



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΣΠΟΥΔΩΝ «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

Διατμηματικό Μεταπτυχιακό  
Πρόγραμμα Σπουδών  
«Ιατρική Χημεία»



**ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ  
ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΚΥΗΣΗΣ ΜΕ  
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ <sup>1</sup>H-NMR**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Λυκοβαρδάκης Θεόδωρος, Βιολόγος, Μεταπτυχιακός Φοιτητής

Επιβλέπων Καθηγητής: Μωσής Ελισάφ,  
Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2017





**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**  
**ΣΠΟΥΔΩΝ «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

Διατμηματικό Μεταπτυχιακό  
Πρόγραμμα Σπουδών  
«Ιατρική Χημεία»



**ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ**  
**ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΚΥΗΣΗΣ ΜΕ**  
**ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ <sup>1</sup>H-NMR**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Λυκοβαρδάκης Θεόδωρος, Βιολόγος, Μεταπτυχιακός Φοιτητής

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:** Μωσής Ελισάφ – Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής,  
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**ΜΕΛΟΣ:** Ελένη Μπαϊρακτάρη – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας,  
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**ΜΕΛΟΣ:** Γεώργιος Λιάμης – Αναπληρωτής Καθηγητής Παθολογίας, Τμήμα  
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2017



*«Το πρώτο σου χρέος, εκτελώντας τη θητεία σου στη  
ράτσα, είναι να νιώσεις μέσα σου όλους τους προγόνους.  
Το δεύτερο, να φωτίσεις την ορμή τους και να συνεχίσεις  
το έργο τους. Το τρίτο σου χρέος, να παραδώσεις στο γιο  
τη μεγάλη εντολή να σε ξεπεράσει».*

*Νίκος Καζαντζάκης*



**ΛΥΚΟΒΑΡΔΑΚΗΣ ΘΕΟΔΩΡΟΣ**

Βιολόγος, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

© 2017 – All rights reserved





## *Πρόλογος*

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μωυσή Ελισάφ, Καθηγητή Παθολογίας, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων ως επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας καθώς και την κα Ελένη Μπαϊρακτάρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή της για την εκπόνηση αυτής της εργασίας καθώς και για το χρόνο που μου αφιέρωσε, από το ερευνητικό μέρος μέχρι και τη συγγραφή της.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στην μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Χριστίνα Κωσταρά για την αμέριστη υποστήριξη και συνδρομή της στη εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, για την αρμονική και πετυχημένη συνεργασία που είχαμε, καθώς επίσης και για την άριστη κατάρτισή της που με βοήθησε στην κατανόηση των βασικών αρχών της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον κ. Κώστα Τσιαφούλη επιστημονικό υπεύθυνο του κέντρου NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την πολύτιμη συνδρομή του και τις γνώσεις που προσέφερε κατά τη διάρκεια της λήψης των <sup>1</sup>H-NMR φασμάτων.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ιωάννη Γεωργίου, Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας καθώς και την ερευνητική του ομάδα (Ιωάννα Μπούμπα, Μάκης Σακάλογλου, Χάρης Κωστούλας, Πάρης Λαδιάς) για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκτελέσω τμήμα του πειραματικού μέρους της εργασίας στο ερευνητικό εργαστήριο Γενετικής & Ανθρώπινης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Νίκο και Χαρά, για τη στήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, που πιστεύουν σε εμένα και βιώνουν τις ανησυχίες μου, την κοπέλα μου Σοφία που στάθηκε δίπλα μου τις δύσκολες ώρες και με στήριξε ψυχολογικά και τους φίλους μου Ηλία, Φάνο, Γιάννη, Άνθιμο, Γιώργο και Αλέξανδρο για τα ωραία χρόνια που περάσαμε στο Πανεπιστήμιο και γενικά στα Ιωάννινα.



## Περίληψη

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (*Gestational Diabetes Mellitus-GDM*) είναι μία παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από τη διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης που πρωτοεμφανίζεται ή διαγιγνώσκεται (για πρώτη φορά) κατά την εγκυμοσύνη και πιο συγκεκριμένα μεταξύ της 24<sup>ης</sup> και της 28<sup>ης</sup> εβδομάδας της κύησης και συνήθως υποχωρεί πλήρως μετά τη γέννηση του εμβρύου. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης παρατηρείται σε γυναίκες που εμφανίζουν διαταραχή στην έκκριση ινσουλίνης, καθώς και διαταραχή όσον αφορά τη χρησιμοποίηση της γλυκόζης από τους περιφερικούς ιστούς. Όταν σε αυτές τις διαταραχές προστίθεται η αύξηση των «διαβητογόνων» ορμονών που φυσιολογικά παρατηρείται κατά την εξέλιξη της εγκυμοσύνης το τελικό αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση του Διαβήτη της Κύησης.

Μεταβολομική είναι η συστηματική μελέτη και εκτίμηση συνόλου των ενδογενών μεταβολιτών μέσα σε ένα βιολογικό σύστημα και αποτελεί ένα εργαλείο αποτύπωσης όλου του φάσματος των λειτουργιών ενός βιολογικού συστήματος (από το γονιδίωμα έως το πρωτέωμα). Η παρούσα διπλωματική εργασία ασχολείται με τη μελέτη αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται στη μεταβολομική και συγκεκριμένα με τη φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (*Nuclear Magnetic Resonance-NMR*).

Η φασματοσκοπία NMR των βιολογικών υγρών (π.χ. αίμα, ούρα, αμνιακό υγρό κ.ά.) αποδίδει ένα συνολικό αποτύπωμα στο οποίο όλα τα συστατικά που περιέχονται στο βιολογικό δείγμα εμφανίζονται με χαρακτηριστικό για τη δομή τους σήμα, η ένταση των οποίων είναι ανάλογη της συγκέντρωσής τους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η μεθοδολογία ανάλυσης του μεταβολικού προφίλ στον ορό του αίματος με φασματοσκοπία NMR που εφαρμόστηκε σε εγκυμονούσες με διαβήτη κύησης. Περιλαμβάνει τη λήψη και προετοιμασία των δειγμάτων, την απόκτηση δεδομένων μέσω της παραπάνω αναλυτικής μεθόδου, την επεξεργασία τους, την ανάλυση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση βιοδεικτών, οι οποίοι είναι μετρήσιμοι δείκτες της σοβαρότητας ή της παρουσίας του Σακχαρώδη Διαβήτη της κύησης.

**Λέξεις Κλειδιά:** «Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης, Μεταβολομική, φασματοσκοπία NMR, βιοδείκτες»



## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ**

### **Αγγλικά**

**GDM:** Gestational Diabetes Mellitus

**HAPO:** Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome

**PCOS:** Polycystic Ovary Syndrome

**BMI:** Body Mass Index

**hPL:** human Placental Lactogen

**HCS:** Human Chorionic Somatomammotropin

**TNF- $\alpha$ :** Tumor Necrosis Factor – alpha

**IL-6:** Interleukin 6

**LpL:** Lipoprotein Lipase

**CRP:** C-Reactive Protein

**HbA1c:** Hemoglobin A1c

**GCT:** Glucose Challenge Test

**OGTT:** Oral Glucose Tolerance Test

**ADA:** American Diabetes Association

**WHO:** World Health Organization

**MS:** Mass Spectrometry

**GC-MS:** Gas Chromatography – Mass Spectrometry

**LC-MS:** Liquid Chromatography – Mass Spectrometry

**NMR:** Nuclear Magnetic Resonance

**TMAO:** Trimethylamine N - Oxide

**HDL:** High – Density Lipoprotein

**VLDL:** Very–Low –Density Lipoprotein

**FFA:** Free Fatty Acids

**TRGs:** Triglycerides

**FT-NMR:** Fourier Transform – Nuclear Magnetic Resonance

**UF:** Ultrafiltration

**FID:** Free Induction Decay

**MW:** Molecular Weight

**BCAAs:** Branched Chain Amino Acids

**SSB:** Squared Sine-Bell

**LB:** Line Broadening

**PCA:** Principal Component Analysis

**PLS-DA:** Partial Least Squares – Discriminant Analysis

**OPLS-DA:** Orthogonal Projections to Latent Structures – Discriminant Analysis

**T2DM:** Type 2 Diabetes Mellitus

**mTORC1:** mammalian Target of Rapamycin Complex 1

**S6K1:** S6 Kinase 1

**IRS-1:** Insulin Receptor Substrate – 1

**$\alpha$ -HB:** alpha – hydroxybutyrate

**$\alpha$ -KB:** alpha – Ketobutyrate

**NADH/NAD<sup>+</sup>:** Nicotinamide adenine dinucleotide

**$\beta$ -HB:** beta – hydroxybutyrate

### **Ελληνικά**

**ΣΔΚ:** Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης

**Α.Π.:** Αρτηριακή Πίεση

**ΣΔ:** Σακχαρώδης Διαβήτης



## *Πίνακας περιεχομένων*

<b>1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ</b> .....	18
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	20
Ομοιόσταση της Γλυκόζης.....	20
Ινσουλίνη.....	21
Γλυκαγόνη.....	22
1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης.....	23
1.2 Ορισμός - Επιπολασμός - Σημασία – Πρώιμη Διάγνωση.....	24
1.3 Παράγοντες Κινδύνου.....	25
1.4 Επιπλοκές από τη μητέρα και το έμβryo.....	27
1.5 Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης – Παθοφυσιολογία.....	28
1.6 Διάγνωση Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης, Κλασσική-Νέες Μεθοδολογίες.....	33
<b>2 ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ (METABONOMICS)</b> .....	36
2.1 Μεταβονομική (Metabonomics).....	38
2.2 Μεταβονομική & Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης.....	41
<b>3 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR)</b> .....	48
Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR).....	50
3.1 Θεωρία του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.....	50
3.2 Χημική Μετατόπιση ( $\delta$ Scale in ppm).....	54
3.3. Σύζευξη spin-spin (spin-spin coupling).....	56
3.4. Ολοκλήρωση των κορυφών συντονισμού των πρωτονίων στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ .....	56
Σκοπός της μελέτης.....	57
<b>4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	58
4.1. Πληθυσμός της μελέτης και συλλογή των δειγμάτων αίματος.....	60
4.2. Διήθηση ή Υπερδιήθηση του ορού του αίματος.....	60
Αρχή μεθόδου διήθησης υπό φυγοκέντρωση (υπερδιήθησης) του ορού του αίματος.....	61
4.3. Καταγραφή του Μεταβολικού Προφίλ του Ορού του Αίματος με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ .....	64



Προετοιμασία των δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων <sup>1</sup> H-NMR.....	64
Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων <sup>1</sup> H-NMR.....	65
Ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών.....	66
Στατιστική Ανάλυση.....	68
<b>5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>70</b>
5.1 Διερεύνηση των Πειραματικών Συνθηκών για την Φυγοκέντρωση του Ορού του Αίματος.....	72
1 <sup>ο</sup> Σημείο Διερεύνησης: (α) Αριθμός στροφών – Χρόνου φυγοκέντρωσης και (β) Τρόπος προσθήκης ποσότητας H <sub>2</sub> O .....	72
2 <sup>ο</sup> Σημείο Διερεύνησης: Ποσότητα διηθήματος ορού .....	74
3 <sup>ο</sup> Σημείο Διερεύνησης: Χρόνος φυγοκέντρωσης του δείγματος ορού του αίματος.....	76
5.2. Ποσοτικοποίηση μεταβολιτών.....	77
5.3. Μεταβολομική Ανάλυση Δεδομένων .....	85
<b>6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>88</b>
<b>7 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>96</b>
<b>8 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>98</b>

# 1

*ΕΙΣΑΓΩΓΗ*

–

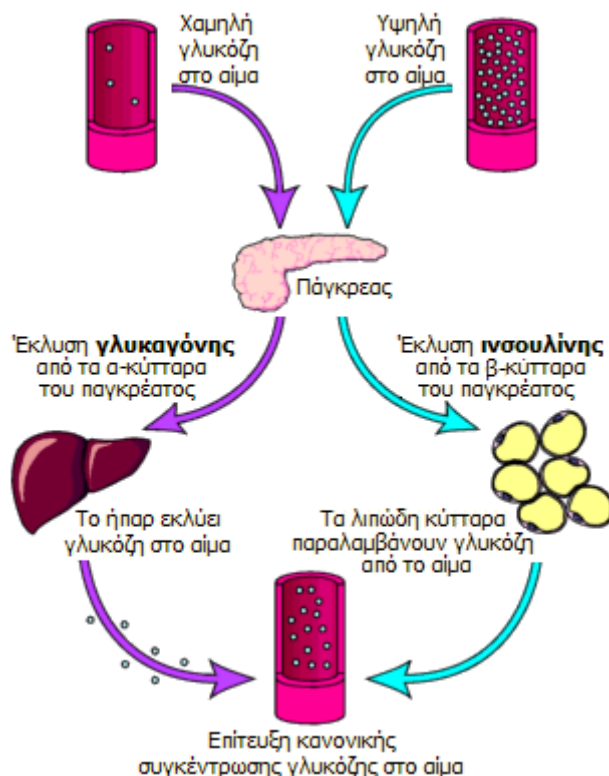
*ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΥΗΣΗΣ*



# ***ΕΙΣΑΓΩΓΗ***

## ***Ομοίσταση της Γλυκόζης***

Οι κύριες πηγές ενέργειας του ανθρώπινου οργανισμού είναι τα σάκχαρα και τα λιπαρά οξέα τα οποία προσλαμβάνονται με την τροφή. Η τροφή μετατρέπεται σε γλυκόζη που είναι απαραίτητη για τις διάφορες βιοχημικές διεργασίες των κυττάρων. Η γλυκόζη είναι ένας από τους τρεις μονοσακχαρίτες, μαζί με τη φρουκτόζη και τη γαλακτόζη, οι οποίοι απορροφώνται άμεσα στην κυκλοφορία του αίματος μέσω του εντέρου κατά τη διάρκεια της πέψης μετά από ένα γεύμα. Κύριο χαρακτηριστικό της γλυκόζης αποτελεί το γεγονός πως είναι το μόνο θρεπτικό συστατικό που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα του εγκεφάλου και για αυτό το λόγο είναι τόσο σημαντική για τον ανθρώπινο οργανισμό με συνέπεια η έλλειψή της να οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις. Η γλυκόζη παράγεται μέσω (α) της γλυκονεογένεσης και (β) της γλυκόλυσης. Ο οργανισμός διαθέτει έναν μηχανισμό ώστε να διατηρεί σε ισορροπία τα επίπεδα της γλυκόζης. Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης είναι υψηλά, τότε αποθηκεύεται στο ήπαρ και στους μύες υπό τη μορφή γλυκογόνου. Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης είναι χαμηλά, ενεργοποιείται η γλυκόζη μέσω του αποθηκευμένου γλυκογόνου και αυξάνεται η πρόσληψη τροφής. Η *ινσουλίνη* και η *γλυκαγόνη* είναι δύο ορμόνες του μεταβολισμού που έχουν κυρίαρχο ρόλο στη διατήρηση σε σταθερά επίπεδα τη συγκέντρωση της γλυκόζης και η δράση τους είναι αντίθετη. **(Εικόνα 1.1)** [1,4]



Εικόνα 1.1 Μεταβολισμός γλυκόζης και ρόλος των δύο ορμονών, ινσουλίνης και γλυκαγόνης.

## Ινσουλίνη

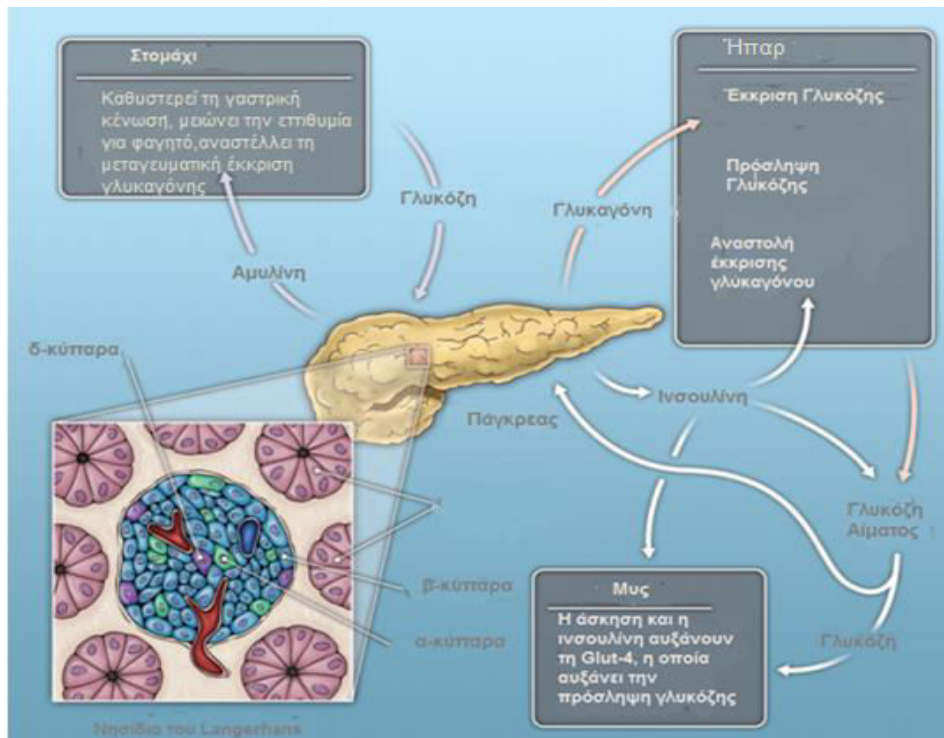
Η ινσουλίνη είναι η μία από τις δύο κύριες ορμόνες που έχουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των υδατανθράκων. Εκκρίνεται από τα β-κύτταρα των νησιδίων Langerhans στην ενδοκρινή μοίρα του παγκρέατος. Είναι μία πεπτιδική ορμόνη που αποτελείται από 2 πολυπεπτιδικές αλυσίδες (α και β) και συνολικά από 51 αμινοξέα. Η ινσουλίνη δρα σε όλους τους ιστούς (κυρίως όμως στο ήπαρ, στους μύες και στο λιπώδη ιστό), συμβάλλοντας στην πρόσληψη της γλυκόζης από τα κύτταρα. Εκτός από αυτή τη ρύθμιση της γλυκόζης η ινσουλίνη εμπλέκεται και στην διατήρηση επαρκών ενεργειακών αποθεμάτων ούτως ώστε να καθίσταται εφικτή η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, εκκρίνεται ινσουλίνη για να αντισταθμίσει τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης του αίματος μετά από τα γεύματα. Κύριος ρόλος της ινσουλίνης είναι η απομάκρυνση της γλυκόζης από την κυκλοφορία. Αν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα παραμένει σε υψηλά επίπεδα τότε η ινσουλίνη συνεχίζει να εκκρίνεται. Αν και η γλυκόζη αποτελεί το κύριο ερέθισμα για την έκκριση της ινσουλίνης υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που συντελούν στην απελευθέρωσή της, όπως οι GLP-1 και GIP που εκκρίνονται από το έντερο κατά τη λήψη ενός γεύματος. [1,4]

## **Γλυκαγόνη**

Η γλυκαγόνη είναι μία πολυπεπτιδική ορμόνη (29 αμινοξέα) που παράγεται από τα α-κύτταρα των νησιδίων Langerhans του παγκρέατος. Η κύρια δράση της γλυκαγόνης συνίσταται στη διάσπαση του γλυκογόνου του ήπατος και την αύξηση της γλυκόζης του αίματος. Έτσι, επέρχεται ισορροπία στη συγκέντρωση της γλυκόζης του αίματος όταν τα επίπεδά της είναι χαμηλά. Η γλυκαγόνη εκκρίνεται σε περιόδους νηστείας (fasting conditions). Στο Σακχαρώδη Διαβήτη η μεταγευματική έκκριση γλυκαγόνης δεν σταματά με αποτέλεσμα να αυξάνεται δραματικά η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα του ασθενή. Στόχος της γλυκαγόνης είναι να διεγείρει το ήπαρ και τους μύες ώστε να διασπάσουν το αποθηκευμένο γλυκογόνο και να απελευθερωθεί γλυκόζη (γλυκόλυση) και να διεγείρει τη διαδικασία της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ και στους νεφρούς.

Σε φυσιολογικές συνθήκες υφίσταται μία ισορροπία μεταξύ των συγκεντρώσεων ινσουλίνης και γλυκαγόνης. Μετά από κάθε γεύμα, ο οργανισμός βρίσκεται σε ετοιμότητα να απορροφήσει γλυκόζη, αμινοξέα και άλλες ουσίες από την κατανάλωση τροφής. Στη συνέχεια, διεγείρονται τα β-κύτταρα του παγκρέατος για να απελευθερώσουν ινσουλίνη και ταυτόχρονα αποτρέπεται η έκκριση γλυκαγόνης από τα α-κύτταρα. Αυτές οι μεταβολές έχουν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ινσουλίνης στο αίμα και την μείωση των επιπέδων της γλυκόζης στην κυκλοφορία με σκοπό να διατηρηθεί εντός φυσιολογικών ορίων. Αντίθετα, σε κατάσταση νηστείας, η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι χαμηλή. Γι' αυτό το λόγο, διεγείρεται η έκκριση γλυκαγόνης από τα α-κύτταρα και εμποδίζεται η έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα. Αφού η συγκέντρωση της γλυκαγόνης αυξάνεται, εμποδίζεται η περαιτέρω μείωση της συγκέντρωσης της γλυκόζης και έτσι διατηρείται μία ισορροπία.

Εκτός από την ινσουλίνη και τη γλυκαγόνη, υπάρχουν πολλές ορμόνες που συμβάλλουν στην ομοιόσταση της γλυκόζης, όπως η αμυλίνη, η GLP-1 και GIP. **(Εικόνα 1.2) [1,4]**



Εικόνα 1.2 Οι βασικές λειτουργίες του παγκρέατος στο μεταβολισμό της γλυκόζης

## 1.1 Σακχαρώδης Διαβήτης Κήσης

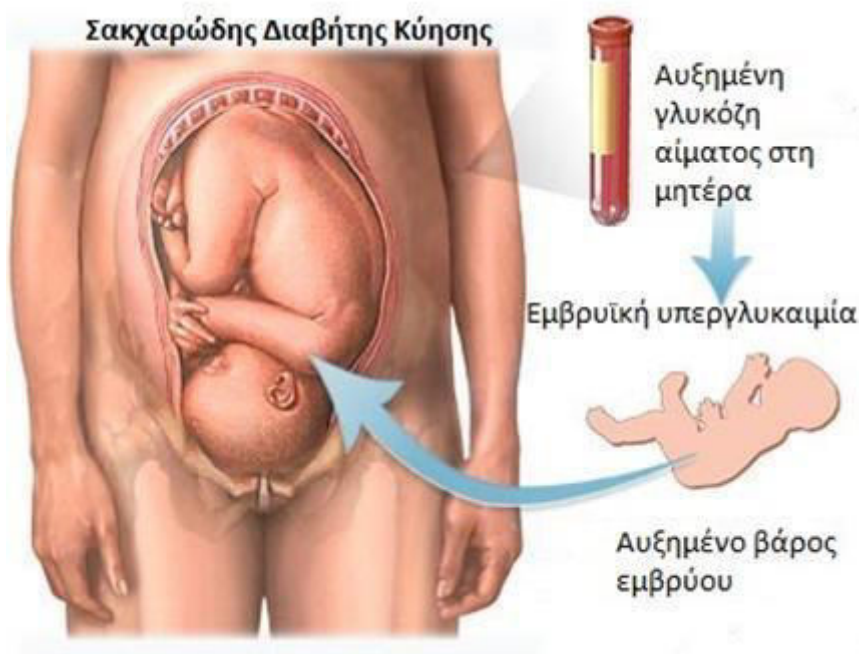
Ο Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ) στην εγκυμοσύνη μπορεί να προϋπάρχει αυτής (*Pre-Gestation Diabetes Mellitus*) ή να παρουσιασθεί κατά τη διάρκεια της κύησης (*Σακχαρώδης Διαβήτης Κήσης, Gestational Diabetes Mellitus-GDM*). Στην τελευταία περίπτωση συνήθως υποχωρεί άμεσα μετά τον τοκετό αν και μπορεί να παραμείνει με τη μορφή του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης επιπλέκει το 2-3% των κύσεων και το 90% αυτών των περιπτώσεων αφορά ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη Κήσης. Αν και η κλινική σημασία αυτής της διαταραχής εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο διαφωνίας, είναι γενικά παραδεκτό ότι ο Διαβήτης της Κήσης αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα περιγεννητικών συμβαμάτων, καθώς τον κίνδυνο εμφάνισης μεταβολικών διαταραχών στο κύημα και καρδιαγγειακής νόσου στη μετέπειτα ζωή. Ωστόσο, η εντατική αντιμετώπιση με παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης, δίαιτα ή/και ινσουλινοθεραπεία έχει μειώσει σημαντικά την περιγεννητική νοσηρότητα και θνητότητα. Παρ' όλα αυτά, ο αυξημένος κίνδυνος συγγενών ανωμαλιών, μακροσωμίας του εμβρύου και οι μαιευτικές κακώσεις που μπορεί να συμβούν κατά τον τοκετό συνεχίζουν να αποτελούν πρόκληση για τη σύγχρονη μαιευτική. [1]

## 1.2 Ορισμός - Επιπολασμός - Σημασία – Πρώιμη Διάγνωση

Ως *Σακχαρώδης Διαβήτης Κήσης (Gestational Diabetes Mellitus-GDM)* ορίζεται η διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης ποικίλης βαρύτητας που πρωτοεμφανίζεται ή διαγιγνώσκεται (για πρώτη φορά) κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. [4,7] Αυτός ο ορισμός περιλαμβάνει:

(α) την υποκατηγορία των γυναικών που παρουσίαζαν ήδη πριν από την εγκυμοσύνη μη διαγνωσθέντα Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 1 ή 2. [3,4]

(β) τις έγκυες που εμφάνισαν τη νόσο για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης ενώ προηγουμένως είχαν φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη.[4]



Εικόνα 1.2.1 Σακχαρώδης Διαβήτης Κήσης (Gestational Diabetes Mellitus,GDM) (Penn Medicine, Endocrinology and Diabetes, Alan Greene, 2006)

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης της Κήσης είναι η κατάσταση εκείνη η οποία χαρακτηρίζεται από διαταραχή στο μεταβολισμό της γλυκόζης που πρωτοεμφανίζεται κατά τη διάρκεια της κύησης και συγκεκριμένα μεταξύ της 24<sup>ης</sup> και της 28<sup>ης</sup> εβδομάδας της κύησης και συνήθως υποχωρεί πλήρως μετά τη γέννηση του εμβρύου. [1,2,5,6,8]

Ο επιπολασμός του Σακχαρώδη Διαβήτη Κήσης κυμαίνεται από 1,1 έως 25,5% των κύσεων στις Η.Π.Α., 2 έως 6% στην Ευρώπη και 17% σε παγκόσμια κλίμακα. Σύμφωνα με τα νέα διαγνωστικά κριτήρια, ο επιπολασμός του Σακχαρώδη Διαβήτη Κήσης με βάση τη μελέτη *HAPO (Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome study)*, κυμαίνεται από 9



έως 26%. Εκτιμάται ότι το 0,5% των περιστατικών με Διαβήτη Κύησης αφορά περιπτώσεις ασθενών με διαβήτη που προϋπήρχε της κύησης. [5,9,19] Οι δύο κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τον επιπολασμό της νόσου είναι τα διαγνωστικά κριτήρια που χρησιμοποιούνται και τα εθνολογικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού που μελετάται. Μελέτες όπως η *HAPO* στις Η.Π.Α. και ευρείας κλίμακας επιδημιολογικές μελέτες στην Ευρώπη, έδειξαν ότι οι μεγάλες διακυμάνσεις που παρατηρούνται στον επιπολασμό του Διαβήτη Κύησης βασίζονται στα εθνολογικά χαρακτηριστικά του υπό εξέταση πληθυσμού, ακόμα και αν εφαρμοστούν τα ίδια διαγνωστικά κριτήρια. Συγκεκριμένα, ο επιπολασμός ήταν υψηλότερος για τις Αфро-Αμερικανές και τις γυναίκες ασιατικής καταγωγής. [8,19]

Η επίπτωση του Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης έχει αυξηθεί τις τελευταίες δεκαετίες παράλληλα με την αύξηση των ποσοστών της μητρικής παχυσαρκίας και του Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 και αναμένεται να αυξηθεί περαιτέρω στα επόμενα χρόνια. [2,5,6,9] Η διαταραχή του μεταβολισμού της γλυκόζης που χαρακτηρίζει τον Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης μπορεί να είναι προσωρινή, να παραμείνει για μεγάλο χρονικό διάστημα ή να είναι υποτροπιάζουσα. Η διαταραχή αυτή μπορεί να οδηγήσει προοδευτικά στην εμφάνιση Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, υπέρτασης και αθηροσκληρωτικής νόσου. [17]

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης παρατηρείται σε γυναίκες που εμφανίζουν διαταραχή στην έκκριση ινσουλίνης, καθώς και διαταραχή όσον αφορά τη χρησιμοποίηση της γλυκόζης από τους περιφερικούς ιστούς. Όταν σε αυτές τις διαταραχές προστίθεται η αύξηση των «διαβητογόνων» ορμονών που φυσιολογικά παρατηρείται κατά την εξέλιξη της εγκυμοσύνης το τελικό αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση του Διαβήτη της Κύησης. Σε ένα μικρό ποσοστό γυναικών με ΣΔΚ (<5%), ο διαβήτης μπορεί να είναι αποτέλεσμα προϊούσας αυτοάνοσης καταστροφής των β-κυττάρων του παγκρέατος, που σε συνδυασμό με την αντίσταση στην ινσουλίνη, έχει ως συνέπεια την εμφάνιση ΣΔ τύπου 1 στη διάρκεια της κύησης. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης (GDM) διαγιγνώσκεται μετά από κύηση 20 εβδομάδων, όταν οι ορμόνες του πλακούντα, που έχουν αντίθετη επίδραση στο μεταβολισμό της γλυκόζης από την ινσουλίνη, αυξάνονται σημαντικά. [3]

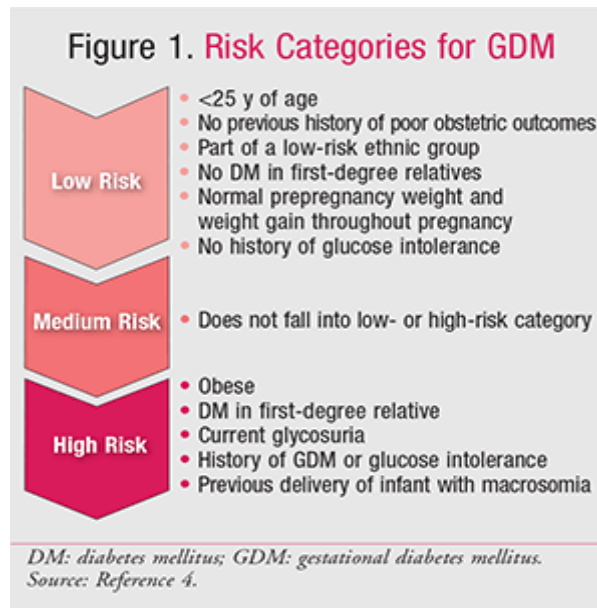
### **1.3 Παράγοντες Κινδύνου**

Στους παράγοντες κινδύνου για τον Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης περιλαμβάνονται:

- η ηλικία της μητέρας (> 35 έτη).

- η φυλή, δεδομένου ότι υπάρχουν πληθυσμοί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2, όπως για παράδειγμα οι Ισπανόφωνοι, οι Αφρικανοί, οι Ιθαγενείς Αμερικανοί, οι Νοτιοανατολικοί Ασιάτες ή η καταγωγή από νησιά του Ειρηνικού.
- το πολυάμνιο ή υδράμνιο.
- το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS, Polycystic Ovary Syndrome), καθώς και το οικογενειακό ιστορικό Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου 2 σε συγγενείς 1<sup>ου</sup> βαθμού.
- η υπέρτασική νόσος της κύησης.
- το ιστορικό μακροσωμίας του εμβρύου σε προηγούμενη κύηση.
- το ιστορικό ανεξήγητου εμβρυϊκού θανάτου σε προηγούμενη κύηση.
- το μεταβολικό σύνδρομο.
- το ιστορικό διαβήτη κύησης σε προηγούμενες κυήσεις (αυξάνει την πιθανότητα κατά 30% με 60%).
- το αυξημένο σωματικό βάρος της γυναίκας πριν την εγκυμοσύνη (με BMI μεγαλύτερο από 25 kg/m<sup>2</sup>). [8,9]

Γυναίκες υψηλού κινδύνου για την εμφάνιση Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης χαρακτηρίζονται όσες εμφανίζουν δύο ή περισσότερους από τους παραπάνω παράγοντες. Μειωμένου κινδύνου για την εμφάνιση Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης χαρακτηρίζονται οι γυναίκες που είναι νεαρής ηλικίας (μικρότερης από 25 ή 30 έτη), ανήκουν στη λευκή φυλή και είναι μη Ισπανόφωνες, έχουν φυσιολογικό Δείκτη Μάζας Σώματος (BMI ≤ 25 kg/m<sup>2</sup>), δεν έχουν ιστορικό προηγούμενης κύησης που να επιπλέχθηκε από Διαβήτη Κύησης ή από μαιευτικά συμβλήματα που σχετίζονται με το διαβήτη και δεν έχουν ιστορικό διαβήτη σε συγγενείς 1<sup>ου</sup> βαθμού. Ως γυναίκες μετρίου κινδύνου για την εμφάνιση ΣΔΚ χαρακτηρίζονται εκείνες που δεν πληρούν όλα τα κριτήρια των γυναικών χαμηλού κινδύνου, αλλά παράλληλα δεν εμφανίζουν δύο ή περισσότερους παράγοντες κινδύνου για ΣΔΚ. [9]



**Εικόνα 1.3.1** Ομάδες χαμηλού, μετρίου και υψηλού κινδύνου για Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης (Managing Gestational Diabetes: The Clinical Pharmacist's Role in a Patient-Centered Medical Home Model, 2014)

## 1.4 Επιπλοκές από τη μητέρα και το έμβρυο

Υπάρχει μία συνεχής συσχέτιση μεταξύ της γλυκόζης του αίματος της μητέρας και του κινδύνου για περιγεννητικά συμβάματα χωρίς να υπάρχει σαφής ουδός τιμών γλυκόζης για την εμφάνιση αυτών των επιπλοκών. Επιπρόσθετα, η διάγνωση του Διαβήτη της Κύησης από μόνη της αυξάνει την πιθανότητα ανεπιθύμητων εξελίξεων, όπως η καισαρική τομή. Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις από μελέτες σε γυναίκες με προϋπάρχοντα διαβήτη ότι η υπερεντατική αντιμετώπιση της νόσου μπορεί να είναι επιζήμια και να εμποδίσει τη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου. [2,4]

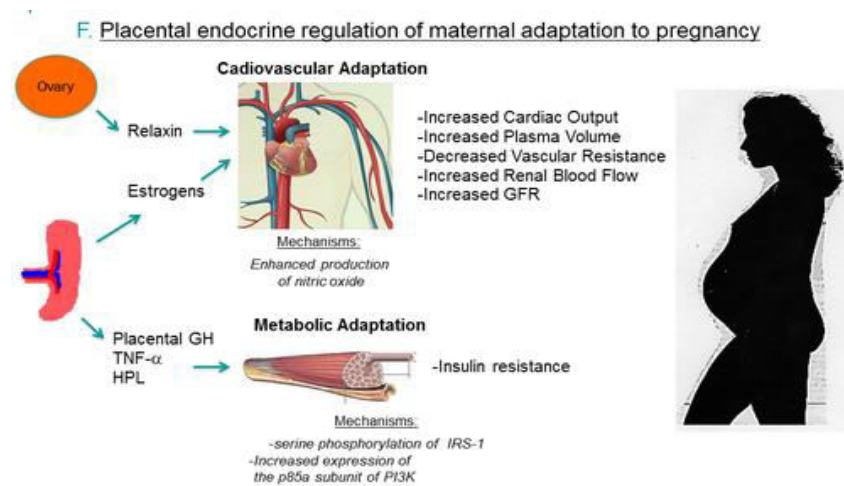
Η βασικότερη επιπλοκή του Διαβήτη Κύησης είναι η μακροσωμία του εμβρύου. Αυτή η διαταραχή οφείλεται στο γεγονός ότι η γλυκόζη της μητέρας διέρχεται ελεύθερα τον πλακούντα κάτι που δεν συμβαίνει με την ινσουλίνη. Έτσι, το έμβρυο αναπτύσσει υπερινσουλιναμία και μακροσωμία ως συνέπεια της μητρικής υπεργλυκαιμίας. Με αυτό τον τρόπο αυξάνεται ο κίνδυνος δυστοκίας των ώμων του μωρού με επακόλουθο τραυματικές βλάβες στον τράχηλο και τον κόλπο. Στις περιπτώσεις εκείνες στις οποίες ο Σακχαρώδης Διαβήτη προϋπάρχει της εγκυμοσύνης, υπάρχει ο κίνδυνος εμφάνισης εμβρυικών ανωμαλιών εξαιτίας των υψηλών επιπέδων της γλυκόζης ή/και της συνύπαρξης της υπεργλυκαιμίας με άλλες μεταβολικές διαταραχές σε μία κρίσιμη περίοδο για την οργανογένεση στο πρώτο τρίμηνο της κύησης. [2,5,7,8,14]

Η προεκλαμψία εμφανίζεται σε διπλάσια ποσοστά σε γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη σε σύγκριση με τον γενικό πληθυσμό, πιθανότατα λόγω της συνυπάρχουσας αγγειοπάθειας, η οποία οφείλεται στην υπεργλυκαιμία.[2] Η προεκλαμψία συνδυάζει την υπέρταση κύησης (επίπεδα Α.Π.  $\geq 140/90$  mmHg που εμφανίζονται για πρώτη φορά μετά το πρώτο μισό της εγκυμοσύνης) με την πρωτεϊνουρία ( $\geq 3.0$ gr/24h). Σε σύγκριση με κύσεις χωρίς μεταβολικές διαταραχές και επιπλοκές, ο Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης συνδέεται με ένα κατά 50% αυξημένο κίνδυνο προεκλαμψίας. [5,14]

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης χαρακτηρίζεται επίσης από μεγάλο ποσοστό αυτόματων εκτρώσεων και συγγενών ανωμαλιών λόγω της ανεπάρκειας του λεκιθικού ασκού και της δράσης ανοσολογικών παραγόντων. Οι πιο συχνά απαντώμενες διαταραχές είναι η μικροκεφαλία και οι διαμαρτίες του ουρογεννητικού αλλά και του καρδιαγγειακού συστήματος.[2]

### 1.5 Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης – Παθοφυσιολογία

Η εγκυμοσύνη, και ιδιαίτερα η προχωρημένη, ασκεί στη φυσιολογική γυναίκα κάποια «διαβητογόνο επίδραση». [1,3] Αυτή οφείλεται βασικά στο γεγονός ότι υπό την επίδραση σημαντικών ορμονικών μεταβολών, όπως είναι η αύξηση του ανθρώπινου πλακουντικού λακτογόνου (hPL), της κορτιζόλης, της προγεστερόνης και της προλακτίνης, μειώνεται η δράση της ινσουλίνης στο κυτταρικό επίπεδο. Σε αυτές τις ορμόνες αποδίδονται οι μεταβολές που παρατηρούνται στο μητρικό μεταβολισμό. (Εικόνα 1.5.1) [3,5]



Εικόνα 1.5.1 Σχηματική απεικόνιση της ορμονικής ρύθμισης κατά την προσαρμογή του οργανισμού στην κύηση.

Τα κύρια παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά του Σακχαρώδη Διαβήτη της Κύησης (ΣΔΚ) περιλαμβάνουν:

- Αυξημένη αρτηριακή πίεση,
- Σημαντική αύξηση της ανθρώπινης χοριακής σωματοτροπίνης (HCS), των οιστρογόνων, της προγεστερόνης και του ανθρώπινου πλακουντικού λακτογόνου (hPL) που έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της λιπόλυσης, τη μειωμένη πρόσληψη γλυκόζης και την αύξηση της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ,
- Δράση της ινσουλινάσης του πλακούντα με αποτέλεσμα τη μείωση της έκκρισης της ινσουλίνης από το πάγκρεας.

Όλες αυτές οι μεταβολές έχουν ως αποτέλεσμα μεγάλες διακυμάνσεις στα επίπεδα της γλυκόζης του ορού, ενώ η κέτωση είναι περισσότερο συχνή. [1]

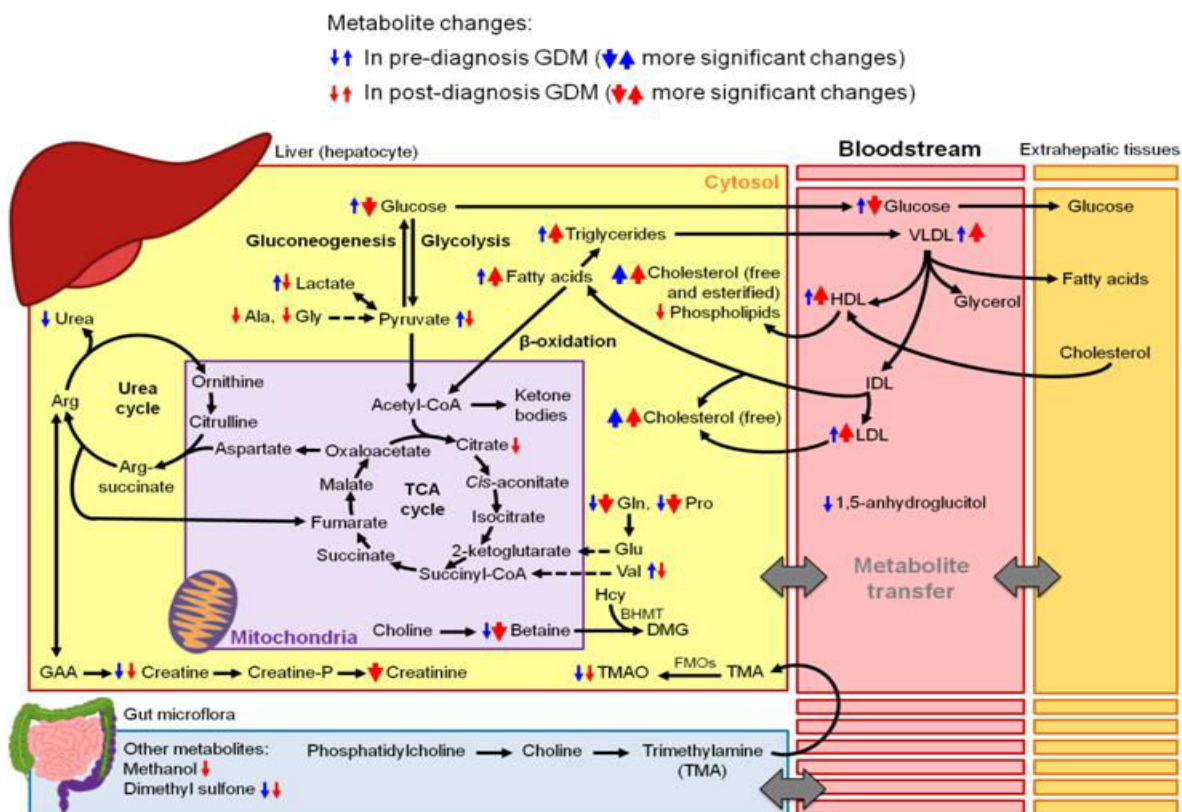
Κατά τα 1<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης, αυξάνεται σημαντικά η έκκριση της προγεστερόνης και των οιστρογόνων από το ωχρό σωματίο. Μετά την πλήρη ανάπτυξη του πλακούντα, το ωχρό σωματίο αντικαθίσταται όσον αφορά τον ορμονικό έλεγχο από τον πλακούντα. Η έκκριση της προγεστερόνης και των οιστρογόνων είναι έως και 10 και 30 φορές αντίστοιχα μεγαλύτερη σε σύγκριση με την προ-κυοφορίας κατάσταση, δηλαδή κατά τη φάση ενός φυσιολογικού καταμηνίου κύκλου. Η έκκριση της προλακτίνης και του ανθρώπινου πλακουντικού λακτογόνου (hPL) επίσης αυξάνονται προοδευτικά από την 12<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης και έπειτα. Το ανθρώπινο πλακουντικό λακτογόνο θεωρείται ότι είναι μία από τις χαρακτηριστικές ορμόνες που εμπλέκονται στις αλλαγές του μητρικού μεταβολισμού κατά την εγκυμοσύνη και συγκεκριμένα με μεταβολές στην ευαισθησία των ιστών στην ινσουλίνη. Οι αλλαγές αυτές στον μεταβολισμό της μητέρας πιθανόν να οφείλονται στην λιπολυτική δράση της hPL η οποία «κατευθύνει» το μητρικό μεταβολισμό προς τα λιπίδια ευνοώντας την εξοικονόμηση και τη διάθεση γλυκόζης για το έμβρυο. Έτσι, η αύξηση στα επίπεδα των λιπαρών οξέων μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην ευαισθησία στην ινσουλίνη. **(Εικόνα 1.5.1)** [5,7]

Τα οιστρογόνα αυξάνουν τη δέσμευση της ινσουλίνης στην επιφάνεια των κυττάρων, ωστόσο η ελάττωση της δέσμευσής της στον υποδοχέα, δευτεροπαθώς λόγω της προγεστερόνης και της κορτιζόλης, αντισταθμίζει αυτή τη δράση. Η προγεστερόνη, η κορτιζόλη και η προλακτίνη έχουν αρνητική επίδραση στη δράση της ινσουλίνης μετά τη σύνδεση με τον υποδοχέα της. Σε μία προσπάθεια αντιστάθμισης αυτών των αλλαγών, παρατηρείται αξιοσημείωτη αύξηση της έκκρισης της ινσουλίνης, με αιχμή το 3<sup>ο</sup> τρίμηνο της

κύησης. [1] Ακόμη, η αυξημένη γλυκονεογένεση στο ήπαρ κατά το 3<sup>ο</sup> τρίμηνο κύησης αντικατοπτρίζει τη μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη και αυτή η μείωση φθάνει έως και το 60%.[7] Η παρατηρούμενη αντίσταση στην ινσουλίνη εντοπίζεται κυρίως στο εσωτερικό των κυττάρων (μετά τους υποδοχείς της ορμόνης). Το αποτέλεσμα είναι η αύξηση της ινσουλινοέκκρισης και ο αυξημένος όγκος των β-κυττάρων ώστε να αντισταθμιστεί η παρατηρούμενη αντίσταση. [3,5,7,12] Στο μηχανισμό αυτό φαίνεται από μελέτες ότι δρα η σεροτονίνη που εμφανίζεται καθοδικά στο σηματοδοτικό μονοπάτι της προλακτίνης, η οποία προάγει την ανάπτυξη των παγκρεατικών β-κυττάρων και συμβάλλει σε σημαντικό βαθμό στην αύξηση του όγκου τους.[7] Στις διαβητικές μητέρες, το έμβρυο καθίσταται υπεργλυκαιμικό (λόγω υπεργλυκαιμίας της μητέρας) με αποτέλεσμα να αυξάνεται η έκκριση ινσουλίνης από το εμβρυϊκό πάγκρεας. Οι μεταβολικές επιδράσεις της εγκυμοσύνης, πλην της σχετικής ινσουλινοαντοχής και της επακόλουθης αύξησης της ινσουλινοέκκρισης, περιλαμβάνουν τα εξής:

- Μείωση των συγκεντρώσεων της γλυκόζης του πλάσματος σε νηστεία και πριν από τα γεύματα και αύξηση μετά τα γεύματα ( σε σύγκριση πάντοτε με τις προ της εγκυμοσύνης τιμές)
- Μείωση των συγκεντρώσεων των αμινοξέων
- Αύξηση των επιπέδων των τριγλυκεριδίων και της χοληστερόλης
- Αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων

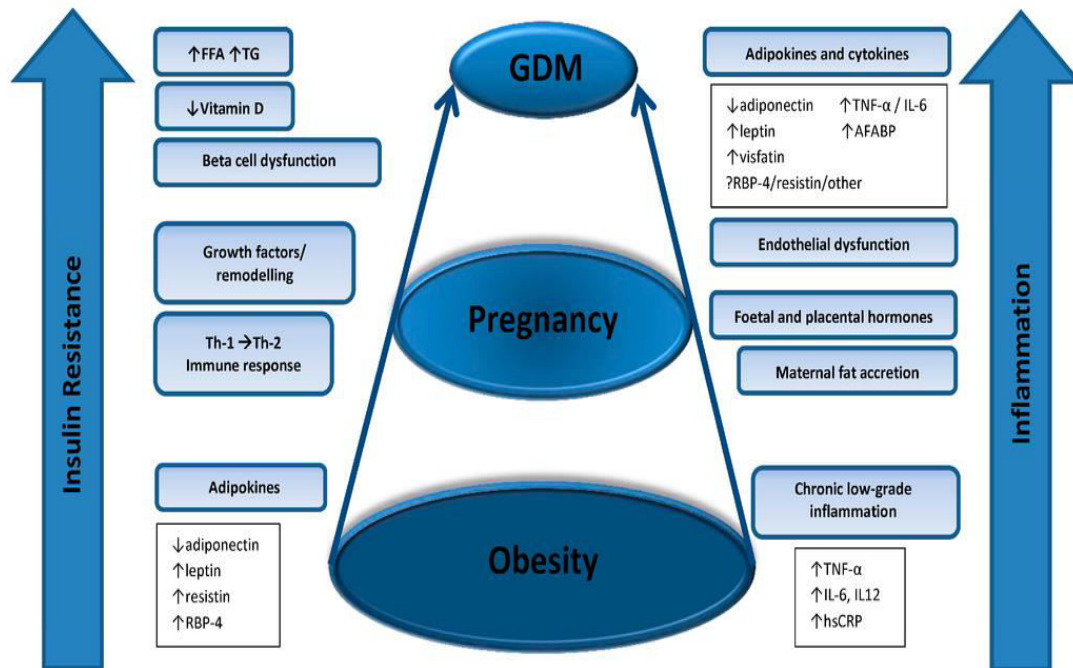
Αυτές οι μεταβολές παρατηρούνται κυρίως στις όψιμες φάσεις της κύησης. **(Εικόνα 1.5.1)**  
[3]



Εικόνα 1.5.1 Πιθανά μεταβολικά βιοχημικά μονοπάτια που επηρεάζονται και σχετίζονται με την εκδήλωση του Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης (GDM) (Prediction of Gestational Diabetes through NMR Metabolomics,2015)

Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην παθοφυσιολογία του Σακχαρώδη Διαβήτη της Κύησης φαίνεται ότι διαδραματίζουν κυκλοφορούντες φλεγμονώδεις παράγοντες, όπως ο Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων (TNF-α) και η Ιντερλευκίνη 6 (IL-6). Συγκεκριμένα, ο TNF-α, που απελευθερώνεται πρωτογενώς από τα μακροφάγα και τα T-λεμφοκύτταρα που διηθούν τον λιπώδη ιστό, συμμετέχει ενεργά στην μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. Στα κύτταρα του λιπώδους ιστού, με τοπική παρακρινή δράση, ο TNF-α καταστέλλει γονίδια που ενέχονται στην πρόσληψη και αποθήκευση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και της γλυκόζης, καταστέλλει τη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LpL) με αποτέλεσμα την επιβράδυνση του καταβολισμού των πλούσιων σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεϊνών, αυξάνει τη δραστηριότητα της ορμονοευαίσθητης λιπάσης με αποτέλεσμα την αύξηση της λιπόλυσης και μειώνει την έκφραση των μεταφορέων της γλυκόζης GLUT-4. Ο TNF-α επηρεάζει αρνητικά τη μετάδοση του σήματος της ινσουλίνης στα κύτταρα-στόχους μέσω ενεργοποίησης των κινασών σερίνης. Η Ιντερλευκίνη-6 (IL-6), όπως και ο TNF-α, παράγεται στα λιποκύτταρα και τα επίπεδά της στο αίμα αυξάνονται με την αύξηση του σωματικού βάρους. Η IL-6 αναστέλλει τη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, διεγείρει την οξείδωση της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων και προάγει την απελευθέρωση γλυκαγόνης

και κορτιζόλης. [5,7,10,11] Πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι τα υψηλά επίπεδα της CRP (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, C-reactive protein - η κυριότερη πρωτεΐνη οξείας φάσης που η συγκέντρωσή της αυξάνεται ως απάντηση σε φλεγμονώδεις καταστάσεις), στο πρώτο τρίμηνο της κύησης συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης. (Εικόνα 1.5.2) [18]



**Εικόνα 1.2.2** Παθοφυσιολογία του Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και επίδραση φλεγμονωδών παραγόντων που προάγουν την εμφάνισή του. (Inflammatory and other Biomarkers: Role in Pathophysiology and Prediction of Gestational Diabetes Mellitus, 2015)

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι ασθενείς με ΣΔΚ εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ομοκυστεΐνης, ενός αμινοξέος που εντοπίζεται σε αυξημένη συγκέντρωση σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 1 και 2 και συνδέεται με ένα σημαντικό αριθμό παθολογικών καταστάσεων, όπως για παράδειγμα με πρώιμη αθηροσκλήρωση. Τα αυξημένα επίπεδα της ομοκυστεΐνης στο πλάσμα ενδεχόμενα αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση περιφερικής αγγειακής και στεφανιαίας νόσου. Η συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης ρυθμίζεται από διάφορους παράγοντες, όπως γενετικά καθορισμένες ενζυμικές μεταβολές, με τη διατροφή, με υποκείμενα νοσήματα, με ορισμένα φάρμακα, με την ηλικία και την εγκυμοσύνη. Φυσιολογικά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, η ομοκυστεΐνη βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα είτε λόγω φυσιολογικής απόκρισης στην κύηση είτε λόγω αυξημένων απαιτήσεων της μητέρας και του εμβρύου σε μεθειονίνη. Αντίθετα, οι ασθενείς με διαταραχές του μεταβολισμού της γλυκόζης κατά την εγκυμοσύνη ή με ιστορικό Διαβήτη



Κύησης, εμφανίζουν μία αύξηση της συγκέντρωσης της ομοκυστεΐνης που συνδέεται με την αυξημένη γλυκόζη στο πλάσμα και την αντίσταση στην ινσουλίνη. [17]

Όταν η μητέρα πάσχει από ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη (τύπου 1), οι ανάγκες για εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης αυξάνουν προοδευτικά κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Σημειώνεται επίσης ότι κατά την εγκυμοσύνη παρατηρείται τάση για κετογένεση λόγω εκτροπής του μητρικού μεταβολισμού προς άλλες πηγές ενέργειας, διαφορετικές από τη γλυκόζη (προς λίπη και κετοξέα) πιθανώς από τη λιπολυτική δράσης της hPL, έτσι ώστε να είναι διαθέσιμη η γλυκόζη περισσότερο για το αναπτυσσόμενο έμβρυο.[3,7] Γι'αυτό στις έγκυες με Διαβήτη Κύησης, η παράλειψη ενός γεύματος μπορεί να συνεπάγεται σχετικά σημαντική κετοναίμια και κετονουρία. Επιπλέον, κατά την εγκυμοσύνη ο ουδός της αποβολής της γλυκόζης μειώνεται. Αυτή η μείωση αφ' ενός μπορεί να οδηγήσει σε γλυκοζουρία σε έγκυες γυναίκες που δεν έχουν διαβήτη και αφ' ετέρου καθιστούν τον έλεγχο του σακχάρου των ούρων των διαβητικών εγκύων γυναικών σχετικά αναξιόπιστο. [3]

## ***1.6 Διάγνωση Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης, Κλασσική-Νέες***

### ***Μεθοδολογίες***

Η έγκαιρη ανίχνευση του Σακχαρώδη Διαβήτη της κύησης έχει ιδιαίτερη σημασία. Όλες οι μέχρι τώρα διαγνωστικές μέθοδοι για τη διάγνωση του διαβήτη κύησης εφαρμόζονται μετά την 24<sup>η</sup>-28<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης και βασίζονται στον προσδιορισμό των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. [33] Η μέτρηση της γλυκιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA<sub>1c</sub>) είναι σημαντική για την ανίχνευση εγκατεστημένου διαβήτη σε γυναίκες στην έναρξη της κύησης. Ωστόσο και αν η χρήση της είναι ευρέως διαδεδομένη η αξιοπιστία της κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι σημαντικά μειωμένα αφού τα επίπεδά της είναι ψευδώς χαμηλά, ιδιαίτερα κατά το 1<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης. [5,33]

Συγκεκριμένα, όλες οι έγκυες γυναίκες πρέπει να υποβάλλονται μεταξύ της 24<sup>ης</sup> και 28<sup>ης</sup> εβδομάδας της κύησης σε έλεγχο σακχάρου αίματος (Glucose Challenge Tolerance-GCT) μία ώρα μετά την από του στόματος χορήγηση 50 g γλυκόζης. (Εικόνα 1.6.1) [3,5] Στις γυναίκες μειωμένου κινδύνου για την εμφάνιση σακχαρώδη διαβήτη κύησης, αυτός ο έλεγχος μπορεί να παραλειφθεί. Αντίθετα, στις γυναίκες υψηλού κινδύνου για σακχαρώδη διαβήτη κύησης επιβάλλεται ο έλεγχος νωρίς κατά την κύηση, μετά τη 12<sup>η</sup> εβδομάδα.[1,14] Όλες οι άλλες γυναίκες (δηλαδή πρακτικά οι γυναίκες με μέτριο κίνδυνο) ελέγχονται συνήθως μεταξύ 24<sup>ης</sup>-28<sup>ης</sup> εβδομάδας της κύησης. [5] Τυπικά χορηγούνται 50 g γλυκόζης

από το στόμα και μετράται η γλυκόζη του πλάσματος 1 ώρα αργότερα. Η ασθενής πρέπει να έχει ακολουθήσει νηστεία 8-10 ωρών πριν την εξέταση. [1] Εάν η τιμή είναι ανώτερη από 140 mg/dl (7,8 mmol/L) τότε ακολουθεί έλεγχος με 3ωρη δοκιμασία ανοχής γλυκόζης μετά από φόρτιση με 100 g γλυκόζης [1,3] Εναλλακτικά, για τη διάγνωση του Σακχαρώδη Διαβήτη στην κύηση διενεργείται η καμπύλη σακχάρου (Oral Glucose Tolerance Test- OGTT) με χορήγηση 100 g. γλυκόζης, μεταξύ 24<sup>ης</sup> -28<sup>ης</sup> εβδομάδας, γιατί τότε παρουσιάζεται η μεγαλύτερη ινσουλινοαντίσταση. [2,15] Κάποια κέντρα χρησιμοποιούν το όριο των 130 mg/dl επειδή θεωρούν πως το υψηλότερο όριο έχει 10% μικρότερη ευαισθησία στη διάγνωση του ΣΔ της κύησης. Η Αμερικανική Διαβητολογική Εταιρεία (ADA-American Diabetes Association) προτείνει την 3ωρη δοκιμασία ανοχής γλυκόζης μετά από φόρτιση με 100 g γλυκόζης και τα όρια μετά την 1<sup>η</sup> ώρα είναι 180 mg/dl, μετά την 2<sup>η</sup> ώρα είναι 155 mg/dl και μετά την 3<sup>η</sup> ώρα η ανώτερη τιμή είναι 140 mg/dl. [1,16]

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) προτείνει ότι όλες οι γυναίκες που πληρούν τα κριτήρια παθολογικής ανοχής στη γλυκόζη ή διαβήτη μετά από τη δοκιμασία ανοχής με φόρτιση 75 gr γλυκόζης από του στόματος πρέπει να θεωρούνται ότι έχουν διαβήτη κύησης. (Εικόνα 1.6) [4] Οι συστάσεις του WHO είναι οι περισσότερο αποδεκτές παγκοσμίως, με εξαίρεση τις ΗΠΑ όπου ακολουθούνται περισσότερο οι συστάσεις της Αμερικανικής Διαβητολογικής Εταιρείας (ADA) για την 3ωρη φόρτιση με 100 g γλυκόζης. [3]

<b>Table 1 Diagnostic criterion for gestational diabetes mellitus (WHO 2013) and diabetes mellitus in pregnancy (WHO 2006)<sup>[5]</sup></b>		
	<b>Gestational diabetes mellitus</b>	<b>Diabetes mellitus in pregnancy</b>
Fasting plasma glucose level	≥ 5.1-6.9 mmol/L	≥ 7.0 mmol/L
	OR	OR
75 g oral glucose tolerance test levels	1 h: ≥ 10.0 mmol/L 2 h: ≥ 8.5-11.0 mmol/L	1: Not required 2 h: ≥ 11.1 mmol/L
Random plasma glucose level	Not required	≥ 11.0 mmol/L

**Εικόνα 1.3.1** Διαγνωστικά κριτήρια που προτείνονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας για τον Διαβήτη Κύησης (Exercise guidelines for gestational diabetes mellitus, 2015)

Τα ευρωπαϊκά κριτήρια για τη διάγνωση του διαβήτη της κύησης είναι γλυκόζη πλάσματος από φλεβικό δείγμα >99 mg/dl (5,5 mmol/L) σε κατάσταση νηστείας και >162 mg/dl (9,0 mmol/L) 2 ώρες μετά από φόρτιση με γλυκόζη. [4]

Στο 70 - 85% των περιπτώσεων ο Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης ελέγχεται ικανοποιητικά με δίαιτα και σωματική άσκηση, ενώ στις υπόλοιπες περιπτώσεις απαιτείται θεραπεία με ινσουλίνη. [16]

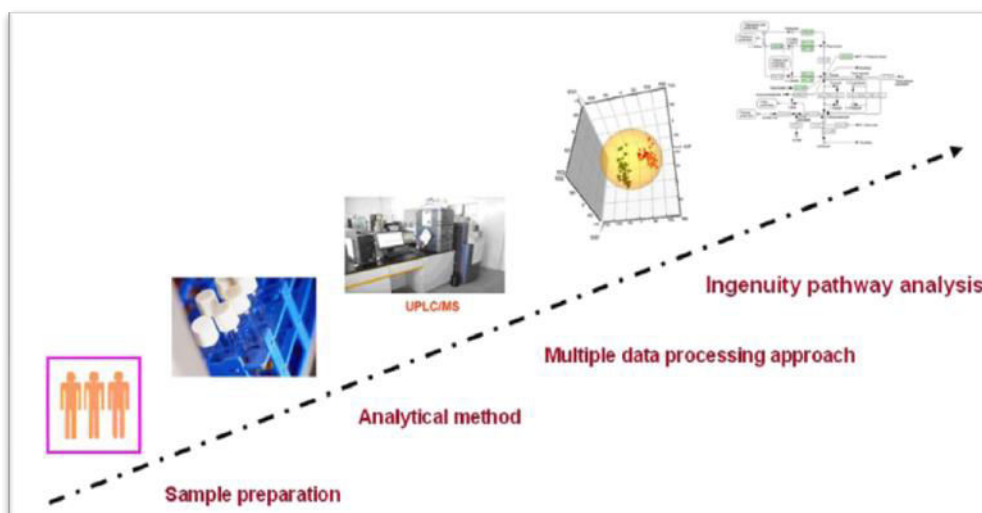
# 2

## *METABONOMIKH (METABONOMICS)*



## **2.1 Μεταβολομική (Metabonomics)**

Το κύτταρο είναι ένα πολύπλοκο βιολογικό σύστημα, που αποτελείται από διάφορα υποσυστήματα τα οποία ονομάζουμε οργανίδια. Η λειτουργία του κυττάρου βασίζεται σε χημικές αντιδράσεις, απαραίτητες για την επιβίωσή του. Αυτές λαμβάνουν χώρα σε όλα τα σημεία του κυττάρου, είτε στο κυτταρόπλασμα είτε στον πυρήνα, και συνθέτουν τη διαδικασία που ονομάζουμε μεταβολισμό. Ενώ έχει πραγματοποιηθεί μεγάλη πρόοδος στους τομείς της Γονιδιωματικής και της Πρωτεομικής, η προσθήκη συνεχώς νέων πληροφοριών, σχετικά με τις διάφορες ανθρώπινες ασθένειες και τους μηχανισμούς με τους οποίους αναπτύσσονται, είναι άκρως επιτακτική καθώς συμβάλλουν καθοριστικά στην πρόγνωση, τη διάγνωση και το σχεδιασμό κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής για την αντιμετώπισή τους. [21-23,26] Ο πολλά υποσχόμενος τομέας της Μεταβολομικής αποτελεί ένα νέο πεδίο έρευνας που βασίζεται στη μελέτη και εκτίμηση του συνόλου των ενδογενών μεταβολιτών μέσα σε ένα βιολογικό σύστημα και αποτελεί ένα εργαλείο αποτύπωσης της γονιδιακής λειτουργίας (γονιδίωμα), της ενεργοποίησης των γονιδίων (mRNA μετάγραφο), της ενζυμικής ενεργότητας (πρωτέωμα) και γενικά της φυσιολογίας του βιολογικού συστήματος. Η προσέγγιση της Μεταβολομικής σε συνδυασμό με τις πληροφορίες που λαμβάνουμε από τη Γονιδιωματική και την Πρωτεομική, μας προσφέρουν μία πληρέστερη εικόνα ώστε να μπορούμε να κατανοήσουμε καλύτερα τα βιολογικά συστήματα σε μοριακό επίπεδο. Ίσως και ακόμα πιο σημαντικό είναι το γεγονός ότι η «εξατομικευμένη ιατρική» αναμένεται να γίνει πραγματικότητα μέσα από την πρόοδο της μεταβολομικής και των υπόλοιπων «ομικών» τεχνολογιών.[24,25] Το αναδυόμενο πεδίο της τεχνολογίας της Μεταβολομικής εφαρμόζεται ευρέως με στόχο την ανακάλυψη υποψήφιων βιοδεικτών που συνδέονται με την εκδήλωση μίας νόσου, την υποτροπή της, καθώς και με την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας. Γενικότερα, το μεταβολικό προφίλ των βιολογικών δειγμάτων επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η διατροφή, η ηλικία, η εθνικότητα, η φαρμακευτική αγωγή, τον τρόπο ζωής και αυτοί οι παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψιν προκειμένου να διαμορφωθεί μία συνολική εικόνα σχετικά με τη νόσο. [22,29,30] Η τεχνική διαδικασία που εφαρμόζεται στα Metabonomics για την ανίχνευση βιοδεικτών και την διάγνωση παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2.1.1.**



Εικόνα 2.1.1 Σχηματική αναπαράσταση της ροής εργασιών της Μεταβολομικής [Metabolomics in diabetes, 2014]

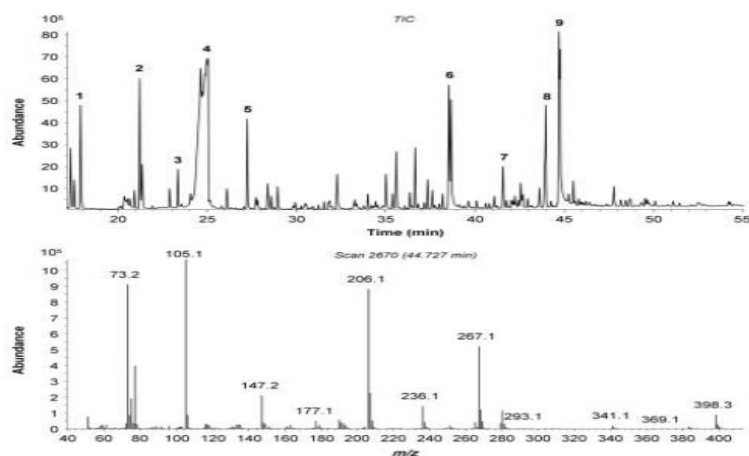
Η συγκέντρωση των μεταβολιτών στα βιολογικά δείγματα δίνει πληροφορίες σχετικά με την εξέλιξη των μεταβολικών οδών και την επίδραση των παθοφυσιολογικών καταστάσεων στη λειτουργία των κυττάρων και των ιστών του οργανισμού.[29] Ο όρος μεταβολίτης περιλαμβάνει τα μόρια μικρού μοριακού βάρους όπως λιπίδια, σάκχαρα, νουκλεοτίδια, αμινοξέα, οργανικές ενώσεις κ.ά. [14] Η εφαρμογή της Μεταβολομικής παρέχει την δυνατότητα ανίχνευσης νέων βιοδεικτών, οι οποίοι πιθανά να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, και ο προσδιορισμός των επιπέδων του στα βιολογικά υγρά μπορεί να συμβάλλει στην πρόγνωση, την παρακολούθηση και αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας μίας θεραπευτικής αγωγής. [25,31]

Οι τεχνικές της Μεταβολομικής αποτελούνται από δύο φάσεις. Η πρώτη φάση περιλαμβάνει την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση ενός μεγάλου αριθμού ενδογενών μεταβολιτών, που απαντώνται σε κύτταρα, ιστούς ή βιολογικά υγρά και είναι ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα του μεταβολισμού. [24,25,27,29,31] Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει την επεξεργασία των δεδομένων με σύγχρονες μεθόδους στατιστικής ανάλυσης όπως τεχνικές αναγνώρισης προτύπων και συσχέτιση των ευρημάτων της μελέτης με τις υπό μελέτη παθολογικές οντότητες. [24]

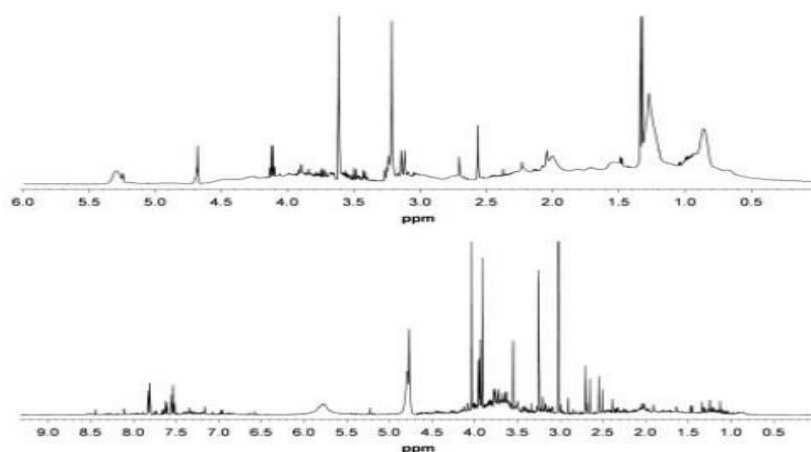
Οι δύο αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται κυρίως στη Μεταβολομική είναι:

- Η Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS), με Αέρια (Gas Chromatography–Mass Spectrometry, GC-MS) (Εικόνα 2.1.2) ή Υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS)

- Η Φασματομετρία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) (Εικόνα 2.1.3)



**Εικόνα 2.1.2** Ανάλυση οργανικών οξέων σε δείγμα ούρων με φασματομετρία μάζας με αέρια χρωματογραφία (GC-MS, Gas Chromatography-Mass Spectrometry) [Metabolomics in diabetes research, 2013]



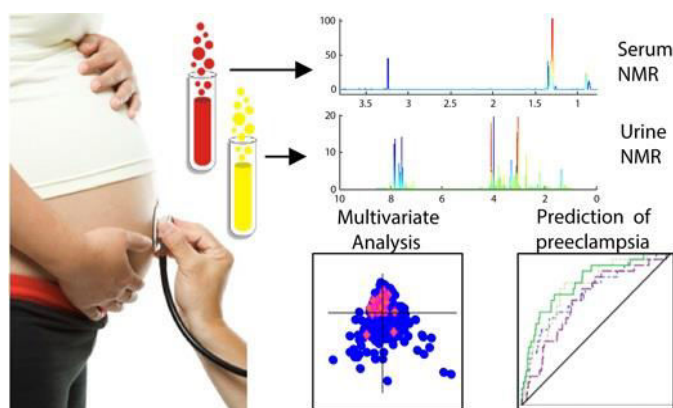
**Εικόνα 2.1.3** Φάσματα σε δείγματα πλάσματος (600 MHz) και ούρων (400 MHz) με  $^1\text{H-NMR}$  φασματοσκοπία [Metabolomics in diabetes research, 2013]

Η φασματοσκοπία NMR είναι γνωστή ως μία από τις κυριότερες μεθόδους για τις αναλύσεις πολυσύνθετων μιγμάτων καθώς απαιτεί ελάχιστη ή καθόλου προετοιμασία του δείγματος, είναι ταχεία, μη επεμβατική και παρέχει επαναλήψιμα αποτελέσματα αφού έχει συντελεστή μεταβλητότητας της τάξεως του 1-2%. Με την φασματοσκοπία NMR μπορεί να ταυτοποιηθεί και να ποσοτικοποιηθεί ταυτόχρονα ένας μεγάλος αριθμός μεταβολιτών σε ένα μόνο πείραμα. [13-15,20,24,27,29,31]



## 2.2 Μεταβολομική & Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης

Οι τεχνικές της Μεταβολομικής εφαρμόζονται για την ανίχνευση πιθανών μεταβολικών βιοδεικτών που συνδέονται με τον Σακχαρώδη Διαβήτη της Κύησης και περιλαμβάνουν ανάλυση των βιολογικών υγρών της μητέρας (ορός και πλάσμα του αίματος, ούρα) και δείγματα της μητέρας και του εμβρύου (υγρό αμνιακού ασκού, υγρό ομφάλιου λώρου, ούρα). Στόχος των αναλύσεων αυτών είναι η απόκτηση αποσαφήνιση των μεταβολικών μηχανισμών που διέπουν την εμφάνιση της νόσου. Η γνώση των μηχανισμών που προωθούν την εμφάνιση του ΣΔΚ αποτελεί ζωτικής σημασίας για την προώθηση στρατηγικών πρόληψης και θεραπείας. [6,20,24,27] Οι τεχνολογίες αυτές αφορούν τη φασματοσκοπία πρωτονίου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού ( $^1\text{H-NMR}$ ) (Εικόνα 2.2.1) και τη Φασματομετρία Μάζας με υγρή χρωματογραφία (LC-MS) που έχουν εφαρμοσθεί στο αμνιακό υγρό, στα ούρα και στο πλάσμα του αίματος της μητέρας [33].



**Εικόνα 2.2.1** Ανάλυση με NMR φασματοσκοπία σε δείγμα ορού και ούρων για την πρόγνωση των προγεννητικών επιπλοκών, όπως της προεκλαμψίας, του Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης κ.ά. [First Trimester Urine and Serum Metabolomics for Prediction of Preeclampsia and Gestational Hypertension: A Prospective Screening Study, 2015]

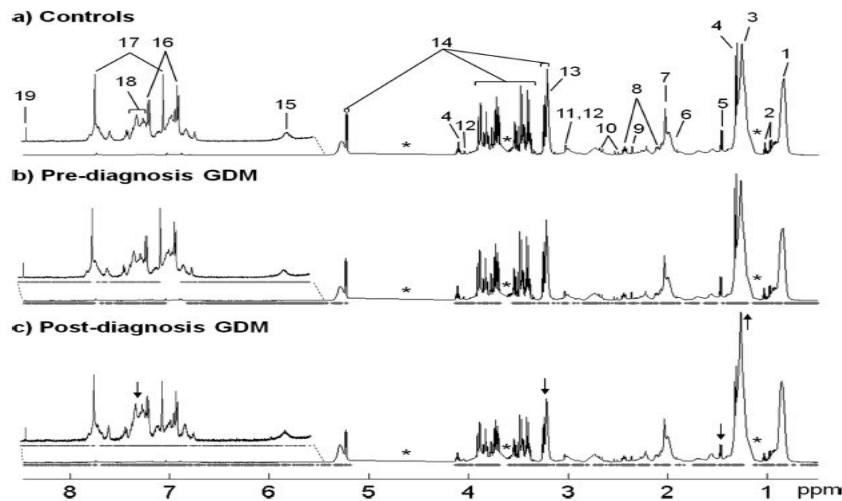
Συγκεκριμένα, ανιχνεύονται διάφοροι μεταβολικοί βιοδείκτες, όπως αμινοξέα (διακλαδισμένης αλυσίδας και αρωματικά), ακυλοκαρνιτίνες, καθώς και φωσφολιπίδια που περιέχουν χολίνη, τα οποία συνδέονται με τη μελλοντική εμφάνιση Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης δεδομένου ότι συμμετέχουν στη ρύθμιση της γλυκαγόνης και την έκκριση ινσουλίνης από τα παγκρεατικά  $\beta$ -κύτταρα και επομένως είναι στενά συνδεδεμένα με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Οι τεχνικές αυτές στοχεύουν στην ανίχνευση βιοδεικτών πριν από την κλινική διάγνωση έτσι ώστε οι γυναίκες με κίνδυνο εμφάνισης Διαβήτη Κύησης να μπορούν να διαγνωσθούν έγκαιρα ώστε να επιτραπεί ο έλεγχος και η θεραπεία της νόσου. [6,13,16,19,20,24,27,34,35]

Σύμφωνα με μελέτες, η φασματοσκοπία NMR εφαρμόστηκε σε διάφορα βιολογικά δείγματα, με στόχο την ανίχνευση και την ταυτοποίηση μεταβολικών βιοδεικτών που σχετίζονται με την εμφάνιση Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης. Αρχικά, η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιήθηκε σε δείγματα αμνιακού υγρού, τα οποία έδειξαν υψηλότερα επίπεδα γλυκόζης και μειωμένα επίπεδα αμινοξέων, οξικού οξέος, μυρμηκικού οξέος και κρεατινίνης. Σε δείγματα πλάσματος της μητέρας, ανιχνεύθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις βεταΐνης και N-οξειδίου της τριμεθυλαμίνης (TMAO) που σχετίζονται με νεφρικές δυσλειτουργίες αλλά και με δυσπλασίες του εμβρύου. Σε δείγματα ούρων εντοπίστηκαν μεταβολές στη συγκέντρωση της γλυκόζης και αύξηση του οξικού οξέος, του N-μεθυλονικοτιναμιδίου και του N-μεθυλο-2-πυριδοно-5-καρβοξαμιδίου (προϊόντα του μη φυσιολογικού μεταβολισμού των αμινοξέων). Επίσης, παρατηρήθηκαν μεταβολές στη συγκέντρωση της κρεατίνης και της κρεατινίνης, καθώς και μείωση του ιππουρικού και του φαινυλο-ακετυλο-γλουταμινικού. [16,19,24,35]

Σε δείγματα πλάσματος της μητέρας που συλλέχθηκαν από τρεις ομάδες ή συγκεκριμένα από:

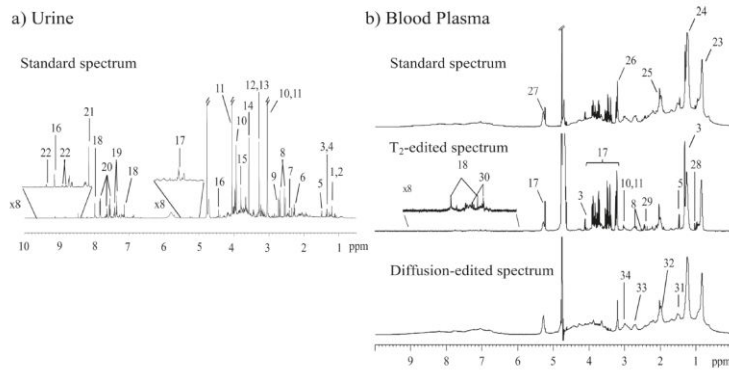
- γυναίκες με φυσιολογική κύηση-ομάδα ελέγχου (control)
- περιπτώσεις γυναικών κατά την κύηση με αρτηριακή υπέρταση, με δίδυμα, με ιστορικό πρόωρου τοκετού, μακροσωμίας και με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη. (pre-diagnosis)
- εγκυμονούσες στις οποίες έχει διαγνωσθεί Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης, 1 με 2 εβδομάδες μετά τη δοκιμασία OGTT κατά την 18<sup>η</sup> έως την 38<sup>η</sup> εβδομάδα κύησης. (post-diagnosis)

ανιχνεύθηκαν μεταβολές στην συγκέντρωση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη), αρωματικών αμινοξέων (τυροσίνη και φαινυλαλανίνη), των αμινοξέων μεθειονίνης, κυστίνης, κυστεΐνης και ομοκυστεΐνης, L-αργινίνης, καθώς και διακυμάνσεις στα επίπεδα της γλυκόζης, της βεταΐνης, της κρεατίνης, της ουρίας και μεταβολιτών που σχετίζονται με την εντερική λειτουργία. Ακόμη, η ομάδα των ασθενών πριν την διάγνωση του Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης παρουσίασε αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης και μικρές αυξήσεις στις HDL, LDL και VLDL λιποπρωτεΐνες, στα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και τα τριγλυκερίδια (TRGs). Οι διαφορές στα επίπεδα μεταξύ των δειγμάτων ελέγχου και των δειγμάτων των ασθενών διαπιστώθηκαν μέσω ανάλυσης <sup>1</sup>H NMR φασμάτων, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2.2.2**. [16,19,35]

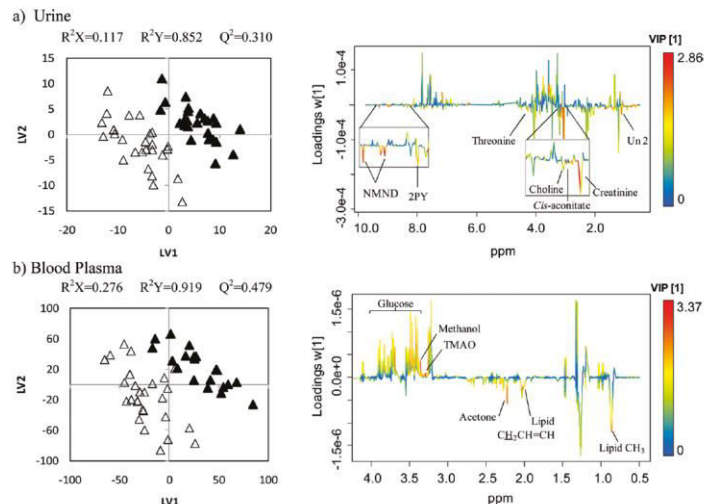


**Εικόνα 2.2.2** Φασματοσκοπία  $^1\text{H}$  NMR σε δείγματα πλάσματος των τριών ομάδων που ελέγχθηκαν και τα φάσματα των μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν. [Prediction of gestational diabetes through NMR Metabolomics of Maternal Blood, 2015]

Ακόμη, σε μία μελέτη, στην οποία διερευνήθηκε με φασματοσκοπία NMR η σύσταση του πλάσματος και των ούρων εγκύων γυναικών στο δεύτερο τρίμηνο της κύησης, διαπιστώθηκε ότι τα ούρα γυναικών που στη συνέχεια εμφάνισαν Σακχαρώδη Διαβήτη της Κύησης εμφάνιζαν υψηλότερα επίπεδα 3-υδροξυϊσοβαλερικού και 2-υδροξυϊσοβουτυρικού, πιθανώς λόγω διαταραχής στο μεταβολισμό της βιοτίνης και των αμινοξέων (βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη) αντίστοιχα. Ακόμη, τα υψηλά επίπεδα 2-υδροξυϊσοβουτυρικού έχουν παρατηρηθεί σε ασθενείς με υψηλές τιμές BMI. Επίσης, στο πλάσμα του αίματος εγκύων γυναικών στις οποίες διαγνώστηκε ΣΔΚ αργότερα κατά την εγκυμοσύνη ανιχνεύθηκαν μειωμένα επίπεδα βεταΐνης και τριμεθυλαμινοξειδίου. Αντίθετα, στα ούρα της ίδιας υπό εξέταση ομάδας ανιχνεύθηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις βεταΐνης και τριμεθυλαμινοξειδίου. Αυτές οι αυξήσεις πιθανώς συνδέονται με διαταραχές στο μεταβολισμό της χολίνης και των νουκλεοτιδίων. (Εικόνες 2.2.3-2.2.4) [32]



**Figure 1.**  $^1\text{H}$  NMR spectra (500 MHz) recorded for 2nd trimester urine and plasma of a healthy pregnant woman: (a) urine, standard 1D spectrum; (b) blood plasma, standard 1D (top),  $T_2$ -edited (middle) and diffusion-edited (bottom) spectra. Legend: (1)  $\beta$ -hydroxybutyrate, (2) 3-aminoisobutyrate, (3) lactate, (4) threonine, (5) alanine, (6)  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA), (7) succinate, (8) citrate, (9) dimethylamine, (10) creatine, (11) creatinine, (12) trimethylamine *N*-oxide (TMAO), (13) betaine, (14) glycine, (15) guanidoacetate, (16) trigonelline, (17) glucose, (18) histidine, (19) phenylacetyl-glycine, (20) hippurate, (21) formate, (22) *N*-methyl-nicotinamide, (23) lipid  $\text{CH}_2$ , (24) lipid  $(\text{CH}_2)_n$ , (25) glycoproteins (26) choline, (27) lipid  $\text{CH}=\text{CH}$ , (28) valine, (29) glutamine, (30) tyrosine, (31) lipid  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ , (32) lipid  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}$ , (33) lipid  $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$ , (34) albumin lysyl  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ .



**Figure 2.** PLS-DA scores plots (left) and corresponding loadings (right) obtained for (a) standard  $^1\text{H}$  NMR spectra of urine (LV = 2) of the FM group ( $\Delta$ ,  $n = 26$ ) vs controls ( $\blacktriangle$ ,  $n = 25$ ) and (b)  $T_2$ -edited  $^1\text{H}$  NMR spectra of blood plasma (LV = 3) of the FM group ( $\Delta$ ,  $n = 27$ ) vs controls ( $\blacktriangle$ ,  $n = 20$ ). Loadings are colored according to Variable Importance to the Projection (VIP) and some assignments are indicated.

**Εικόνα 2.2.3-2.2.4**  $^1\text{H}$ -NMR φάσμα δείγματος ούρων και πλάσματος κατά το 2<sup>ο</sup> τρίμηνο της κύησης. [Metabolic Biomarkers of Prenatal Disorders: An Exploratory NMR Metabonomics Study of Second Trimester Maternal Urine and Blood Plasma, 2011]

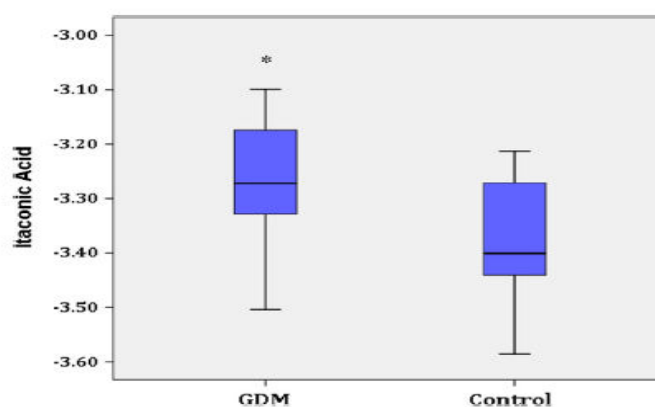
Συμπληρωματικά, σε μελέτη που έγινε στον όρο του αίματος γυναικών με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης (GDM) σε σύγκριση με γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη (τα δείγματα λήφθηκαν κατά την 20<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης), ταυτοποιήθηκαν 48 μεταβολίτες από τους οποίους οι 18 ήταν αμινοξέα, οι 16 λιπαρά οξέα και οι 12 οργανικά οξέα. [6] (Εικόνα 2.2.5)

**Table 1** List of identified metabolites

Metabolites		
2-Hydroxybutyric acid	Creatinine	Nicotinamide
4-Methyl-2-oxopentanoic acid	Cysteine	Oleic acid
9-Heptadecenoic acid	Docosahexaenoic acid	Ornithine
11,14-Eicosadienoic acid	Eicosapentaenoic acid	Palmitic acid
Adrenic acid	Gamma linolenic acid	Palmitoleic acid
Alanine	Glutamic acid	Phenylalanine
Arachidonic acid	Glycine	Proline
Asparagine	Isoleucine	Pyruvic acid
Aspartic acid	Itaconic acid	Quinic acid
Azelaic acid	Lactic acid	Serine
Benzoic acid	Leucine	Stearic acid
Bishomogamma linolenic acid	Linoleic acid	Succinic acid
Cis-aconitic acid	Lysine	Threonine
Cis-vaccenic acid	Margaric acid	Tryptophan
Citraconic acid	Methionine	Tyrosine
Citric acid	Myristic acid	Valine

**Εικόνα 2.2.5** Οι 48 μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στον ορό του αίματος. [Early pregnancy metabolite profiling discovers a potential biomarker for the subsequent development of gestational diabetes mellitus, 2014]

Μεταξύ αυτών των μεταβολιτών, ανιχνεύθηκαν αυξημένα επίπεδα ιτακονικού οξέος και ακοτινικού οξέος στον ορό των γυναικών με ΣΔΚ σε σύγκριση με τις φυσιολογικές γυναίκες. (**Εικόνα 2.2.6**). Η αύξηση των ενώσεων αυτών συνδέεται πιθανώς με την έκφραση του γονιδίου IRG1 (Immune-responsive gene 1), το οποίο υπερεκφράζεται στα μακροφάγα κατά την φλεγμονώδη απόκριση. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την συνεισφορά και τον σημαντικό ρόλο που παίζει η φλεγμονή κατά την εμφάνιση του Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης.[6]



**Fig. 1** Box plot of the distribution of itaconic acid levels among participants. Note Itaconic acid levels are reported as the logarithm of abundance relative to internal standard. \*Statistically significant difference  $P \leq 0.001$

**Εικόνα 2.2.6** Αυξημένα επίπεδα ιτακονικού οξέος στον ορό του αίματος γυναικών με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης.[Early pregnancy metabolite profiling discovers a potential biomarker for the subsequent development of gestational diabetes mellitus, 2014]

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο πλάσμα του αίματος τριών ομάδων γυναικών κατά την 24<sup>η</sup> με 28<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης και συγκεκριμένα:

- Γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη
- Έγκυες με διαταραχή σακχάρου αίματος (GCT) αλλά φυσιολογική καμπύλη γλυκόζης (OGTT)
- Έγκυες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης

Ειδικότερα, στην ομάδα των γυναικών με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης ανιχνεύθηκε αυξημένη συγκέντρωση ομοκυστεΐνης σε σχέση με τις δύο άλλες ομάδες, ένα γεγονός που συνδέεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα και φαίνεται ότι δεν συνδέεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Παρ'όλα αυτά, στη φυσιολογική κύηση η συγκέντρωση της ομοκυστεΐνης είναι χαμηλή εξαιτίας διαφόρων επιδράσεων όπως για παράδειγμα, της δράσης των οιστρογόνων ή τις αυξημένες απαιτήσεις της μητέρας και του εμβρύου σε μεθειονίνη. Τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση μακροαγγειακών και μικροαγγειακών διαταραχών.[17]

Η φασματοσκοπία NMR αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη τεχνική της Μεταβονομικής στην πρόγνωση και τη διάγνωση του Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης αξιοποιώντας τις πολυπαραγοντικές μεταβολές του μεταβολικού προφίλ και όχι ανιχνεύοντας μόνο μεμονωμένες αλλαγές. Επίσης μπορεί να προσφέρει νέες προοπτικές όσον αφορά την μελέτη της παθοφυσιολογίας της νόσου. Ο προσδιορισμός των μεταβολιτών στις μελέτες του Διαβήτη Κύησης απαιτεί ακόμα μεγαλύτερη και εκτεταμένη έρευνα σε μεγάλες ομάδες πληθυσμών πριν εφαρμοστεί στην κλινική πράξη ώστε να σχεδιαστούν ολοκληρωμένα διαγνωστικά μοντέλα τα οποία θα βελτιώνουν το επίπεδο ζωής των μητέρων και των νεογνών. [6,15,19]



# 3

## ***ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR)***





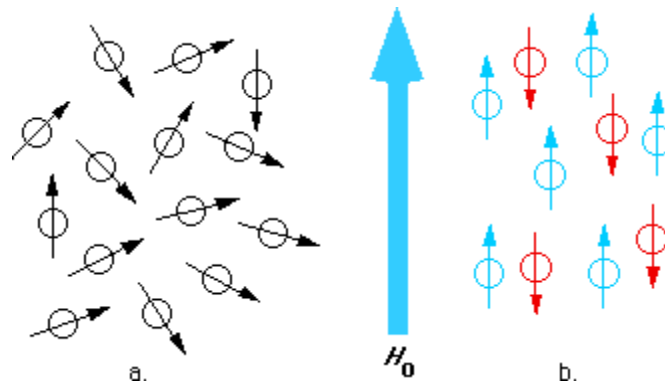
## ***Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)***

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) αποτελεί μία ευρέως χρησιμοποιούμενη φασματοσκοπική τεχνική των Metabonomics που βασίζεται στις μαγνητικές ιδιότητες του πυρήνα του ατόμου (π.χ.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  ή  $^{31}\text{P}$ ). Είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει όταν πυρήνες ορισμένων ατόμων τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Η συμπεριφορά ενός πυρήνα που εμφανίζει το φαινόμενο NMR σε ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δομή και τις χημικές ιδιότητες ενός μορίου. Λόγω της μεγάλης αφθονίας των πυρήνων πρωτονίου ( $^1\text{H}$ ), η φασματοσκοπία πρωτονίου ( $^1\text{H}$ -NMR) χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό για την ανάλυση βιολογικών υγρών, όπως πλάσμα αίματος, ούρα και εκχυλίσματα ιστών. Κάθε ξεχωριστό σήμα σε ένα  $^1\text{H}$ -NMR φάσμα αντιστοιχεί σε μία συγκεκριμένη ένωση.[25,29]

Οι καινούριες εξελίξεις στη φασματοσκοπία NMR, όπως ο συνδυασμός με την τεχνική μετασχηματισμού Fourier (FT-NMR) και η ανάπτυξη δισδιάστατων (2D) και πολυδιάστατων (multidimensional) τεχνικών NMR, έδωσαν άλλες διαστάσεις στη χαρτογράφηση της δομής οργανικών ενώσεων. [25]

### ***3.1 Θεωρία του Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού***

Πυρήνες διαφόρων ειδών συμπεριφέρονται σαν να περιστρέφονται γύρω από έναν άξονα (ιδιοπεριστροφή, spin) και δεδομένου ότι είναι θετικά φορτισμένοι, λειτουργούν ως μικροσκοπικοί μαγνήτες με τυχαίο προσανατολισμό. Όταν όμως οι πυρήνες αυτοί τοποθετηθούν εντός ενός ισχυρού εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, αποκτούν συγκεκριμένους προσανατολισμούς. Οι πυρήνες όλων των στοιχείων περιέχουν φορτία και όταν περιστρέφονται, λόγω των ιδιοπεριστροφών (spin) των πρωτονίων και νετρονίων, συμπεριφέρονται ως μαγνητικά δίπολα και επάγουν μαγνητικά πεδία κάθετα στο επίπεδο περιστροφής. Η ένταση των μαγνητικών αυτών πεδίων εξαρτάται από την μαγνητική διπολική ροπή ή πυρηνική μαγνητική ροπή  $\mu$ , η οποία αποτελεί μια θεμελιώδη ιδιότητα των πυρήνων. Για έναν ορισμένο πυρήνα με κβαντικό αριθμό πυρηνικού spin  $I$  ( $I = 0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, \dots, \frac{9}{2}$ ) υπάρχουν  $2I+1$  πιθανοί προσανατολισμοί μέσα στο μαγνητικό πεδίο. Για πυρήνες με κβαντικό αριθμό spin  $I=\frac{1}{2}$  (όπως πυρήνες H ή C) μόνο δύο προσανατολισμοί με διαφορετική ενέργεια είναι πιθανοί: *παράλληλος* (μικρότερη ενέργεια) και *αντιπαράλληλος* (μεγαλύτερη ενέργεια) προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο  $H_0$ . [36-40] (Εικόνα 3.1.1)

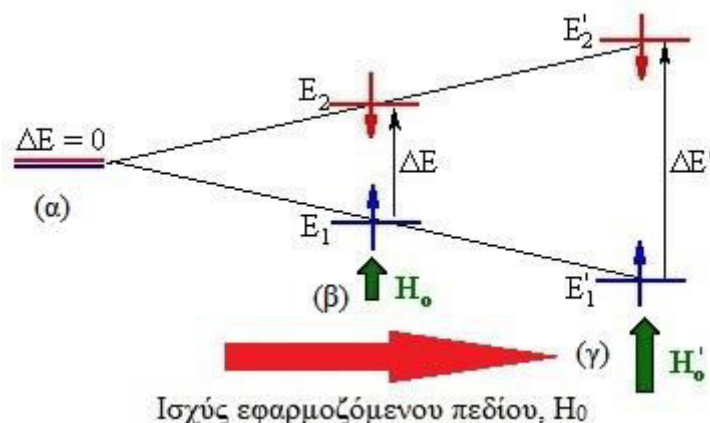


**Εικόνα 3.1.1** Προσανατολισμός διανυσμάτων των μαγνητικών διπολικών ροπών  $\mu$  (α) απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (β) εφαρμογή εξωτερικού ομογενούς μαγνητικού πεδίου. Ορισμένοι πυρήνες (κόκκινο) έχουν παράλληλη διάταξη ως προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο ( $H_0$ ), ενώ άλλοι (μπλε) έχουν αντιπαράλληλη διάταξη.

Αν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας, απορροφάται ενέργεια από τους πυρήνες που βρίσκονται σε κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας (παράλληλο spin προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο), οι οποίοι μεταβαίνουν σε κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με *αναστροφή* του spin. Αφού έχει γίνει η αναστροφή του spin των πυρήνων, τότε οι πυρήνες έχουν «συντονιστεί» με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία (Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός).

Η συχνότητα που απαιτείται για το συντονισμό εξαρτάται:

- α) από την ισχύ του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου  $H_0$
- β) από το είδος του πυρήνα



**Εικόνα 3.1.2** Ενεργειακή διαφορά  $\Delta E$  μεταξύ παράλληλης και αντιπαράλληλης διάταξης των πυρηνικών spin σε συνάρτηση με την ισχύ του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου  $H_0$ . (α) Οι δύο καταστάσεις των πυρηνικών spin έχουν την ίδια ενέργεια απουσία εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου ( $\Delta E=0$ ). (β) Οι δύο πυρήνες έχουν διαφορετική ενέργεια παρουσία μαγνητικού πεδίου. (γ) Η ισχύς του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου  $H_0$  είναι μεγαλύτερη από την  $H_0$  και επομένως η διαφορά ενέργειας  $\Delta E'$  είναι μεγαλύτερη της  $\Delta E$ .

Εάν πυρήνες υδρογόνου ( $I=1/2$ ) τεθούν σε μαγνητικό πεδίο, το άνυσμα της στροφορμής έχει δύο προσανατολισμούς σε σχέση με τη διεύθυνση του εξωτερικού πεδίου. (Εικόνα 3.3) Ο παράλληλος προσανατολισμός αποτελεί τη βασική κατάσταση χαμηλής ενέργειας, ενώ ο αντιπαράλληλος τη διεγερμένη κατάσταση αυξημένης ενέργειας. Τα φάσματα NMR προκύπτουν από διεγέρσεις από τη βασική κατάσταση στη διεγερμένη κατάσταση κατά την επίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ικανής να προκαλέσει συντονισμό. Η διαφορά ενέργειας  $\Delta E$  δίνεται από τη σχέση:

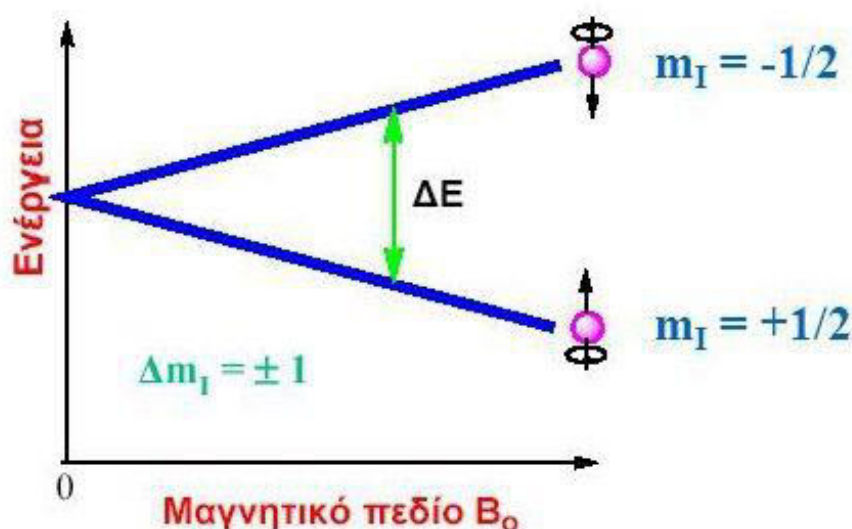
$$\Delta E = h\nu_0 = \mu H_0/I = \gamma h H_0/2\pi$$

απ' όπου ισχύει για τη συχνότητα συντονισμού  $\nu_0$ :

$$\nu_0 = \gamma H_0/2\pi \text{ (εξίσωση Larmor)} = \kappa H_0$$

Όπου  $\nu_0$  είναι η συχνότητα της μεταπτωτικής κινήσεως του πυρήνα (συχνότητα Larmor),  $H_0$  η ισχύς του μαγνητικού πεδίου,  $\mu$  η πυρηνική μαγνητική ροπή,  $\gamma$  ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα, ίσος με  $2\pi/Ih$  και  $\kappa = \gamma/2\pi$ .

Επομένως, όταν το  $H_0$  διατηρείται σταθερό, απαιτείται μία συγκεκριμένη συχνότητα για το συντονισμό ενός πυρήνα. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του  $\gamma$ , τόσο πιο μεγάλη είναι η συχνότητα συντονισμού και επομένως, τόσο πιο εύκολη είναι η παρατήρηση του συγκεκριμένου πυρήνα.[36-40]



Εικόνα 3.1.3 Ενεργειακές στάθμες πυρήνα  $^1H$  ( $I=1/2$ ) σε μαγνητικό πεδίο  $B_0$ .

Υπάρχουν 2 βασικές ομάδες πυρήνων:

α) Πυρήνες που έχουν άρτιο ατομικό (Z) και μαζικό (A) αριθμό (π.χ.  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$  και  $^{32}\text{S}$ ) δεν παρουσιάζουν γωνιακή στροφορμή ( $I=0$ ), δεν εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες και δε δίνουν φάσματα NMR.

β) Πυρήνες που έχουν περιττό μαζικό αριθμό (A) και περιττό ή άρτιο ατομικό αριθμό (Z) (π.χ.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  και  $^{31}\text{P}$ ) παρουσιάζουν αριθμούς spin που είναι περιττά ακέραια πολλαπλάσια του  $\frac{1}{2}$ , δηλαδή  $I=n(1/2)$ , όπου  $n=1,3,5,7,9$ . Οι πυρήνες με  $I=1/2$  παρουσιάζουν συμμετρική σφαιρική κατανομή του φορτίου τους και παρουσιάζουν ενδιαφέρον στην φασματοσκοπία NMR (το 95% της φασματοσκοπίας NMR αφορά το  $^1\text{H}$  και το  $^{13}\text{C}$ ) εκδηλώνοντας μαγνητικές ιδιότητες.

Η ταυτοποίηση των μεταβολιτών και η ποσοτικοποίησή τους είναι δυνατή με βάση τις μετρήσεις από τα ακόλουθα:

α) *Χημική μετατόπιση* ( $\delta$  scale in ppm), που συνίσταται στην εξάρτηση της συχνότητας συντονισμού των μαγνητικών πυρήνων από το χημικό τους περιβάλλον.

β) *Σύζευξη spin-spin*, δηλαδή του διαχωρισμού μίας κορυφής συντονισμού σε ομάδα πολλαπλών συμμετρικών κορυφών, που οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin γειτονικών πυρήνων.

γ) *Αποδιέγερση ή Επαναφορά*, αναφέρεται σε πυρήνες που επιστρέφουν στη θερμοδυναμική κατάσταση στο μαγνήτη. Αυτή η διεργασία λέγεται *επίσης χρόνος επαναφοράς spin-πλέγματος* (*Spin-lattice relaxation time* ή  $T_1$ ), ή *διαμήκης μαγνητική επαναφορά* (*longitudinal magnetic relaxation*), όπου  $T_1$  αναφέρεται στο μέσο χρόνο για έναν μεμονωμένο πυρήνα να επιστρέψει στην κατάσταση θερμικής ισορροπίας του για τα spin. Επίσης, ο χρόνος που απαιτείται για να σταματήσει η παραγωγή σήματος λέγεται *χρόνος επαναφοράς spin-spin* (*Spin-spin relaxation time* ή  $T_2$ ) ή *εγκάρσια επαναφορά* (*transverse relaxation*). [36-40]

### 3.2. Χημική Μετατόπιση ( $\delta$ Scale in ppm)

Τα ηλεκτρόνια των γειτονικών πυρήνων δημιουργούν τοπικό μαγνητικό πεδίο που δρα αντίθετα προς το εφαρμοζόμενο πεδίο ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι μικρότερο από το εξωτερικό.

$$H_{\text{πραγματικό}} = H_{\text{εφαρμοζόμενο}} - H_{\text{τοπικό}}$$

Οι συχνότητες συντονισμού των πυρήνων του ίδιου στοιχείου μέσα σε ένα μόριο επηρεάζονται με χαρακτηριστικό τρόπο από το χημικό τους περιβάλλον, δηλαδή από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα που τα περιβάλλει και το είδος των ατόμων με τα οποία συνδέονται. Τα πρωτόνια, συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες, ανάλογα με το είδος του δεσμού H-X και την ύπαρξη στο μόριο ομάδων, που επηρεάζουν τη συμπεριφορά των πρωτονίων. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στο ότι τα ηλεκτρόνια «προστατεύουν» ή θωρακίζουν τον πυρήνα (διαμαγνητική θωράκιση), δημιουργώντας με την επίδραση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου ( $H_0$ ) ένα μικρό τοπικό μαγνητικό πεδίο αντίθετης κατεύθυνσης από το εφαρμοζόμενο. Εάν  $H_{\pi}$ , είναι η ένταση πεδίου που πραγματικά εφαρμόζεται στον πυρήνα μέσα στο άτομο, ισχύει η σχέση:

$$H_{\pi} = H_0 - \sigma H_0 = H_0(1 - \sigma)$$

όπου  $\sigma$  είναι η σταθερά θωρακίσεως ή προστασίας του ατόμου, που είναι καθαρός αριθμός. Η σταθερά προάσπισης δεν εξαρτάται από το εξωτερικό εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο, αλλά από την ηλεκτρονιακή πυκνότητα γύρω από το πρωτόνιο, η οποία είναι συνάρτηση της δομής της ένωσης. Ως αποτέλεσμα αυτού, η συχνότητα συντονισμού μετατοπίζεται σε διαφορετική τιμή πεδίου και με αντικατάσταση της εξίσωσης  $Larmor$  στην παραπάνω προκύπτει για τη συχνότητα συντονισμού  $\nu_0$ , ότι είναι ανάλογη της ισχύος του εξωτερικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου και του συντελεστή προάσπισης  $(1 - \sigma)$  και δίνεται από τη σχέση:

$$\nu_0 = \gamma H_0(1 - \sigma)/2\pi$$

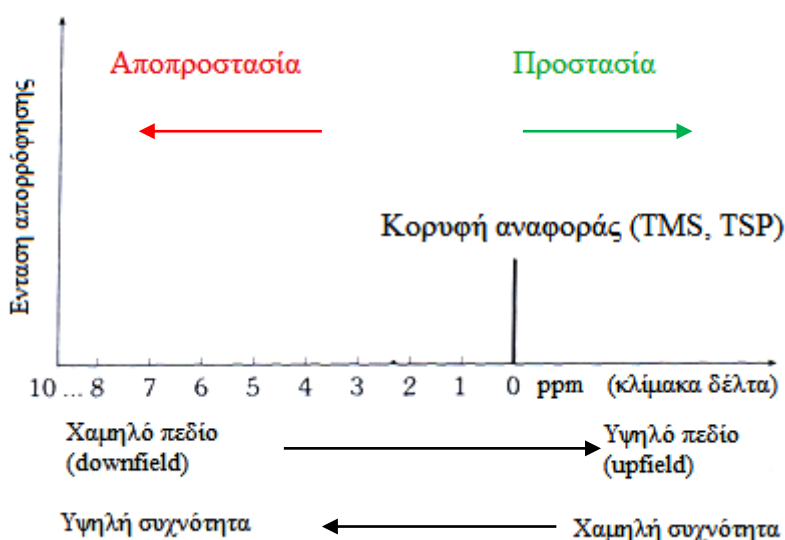
Συμπεραίνουμε ότι χημικά μη ισοδύναμοι πυρήνες προστατεύονται σε διαφορετικό ποσοστό από τα ηλεκτρόνιά τους και επομένως συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες δίνοντας διαφορετικά σήματα (κορυφές) στο φάσμα NMR. Ως χημική μετατόπιση  $\delta$ , ορίζεται ως η διαφορά της συχνότητας συντονισμού του πρωτονίου του υπό εξέταση πυρήνα από τη συχνότητα συντονισμού των πρωτονίων της ουσίας αναφοράς προς τη συχνότητα συντονισμού του οργάνου. Η θέση συντονισμού ενός πρωτονίου εκφράζεται σε σχέση με μία πρότυπη ένωση (TMS, TSP, DSS κ.ά.)

Εάν  $\nu_{\delta}$  και  $\nu_{\alpha}$  είναι οι συχνότητες συντονισμού του εξεταζόμενου πρωτονίου (ή ομάδας πρωτονίων) του δείγματος και της ουσίας αναφοράς, αντίστοιχα, και  $\nu_0$  η βασική συχνότητα λειτουργίας του φασματομέτρου (σε Hz), τότε η χημική μετατόπιση εκφράζεται με την κλίμακα  $\delta$ , όπου:

$$\delta = \frac{\nu_{\delta} - \nu_{\alpha}}{\nu_0} \times 10^6 \text{ ppm}$$

Η παράμετρος  $\delta$  είναι αριθμός χωρίς διαστάσεις και εκφράζεται σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm, particles per million). Το πρόσημο του  $\delta$  είναι κατά κανόνα αρνητικό, στην πράξη όμως η τιμή του  $\delta$  δεν έχει πρόσημο. Παλαιότερα, αντί της κλίμακας  $\delta$  χρησιμοποιούταν η κλίμακα  $\tau$ , όπου  $\tau = 10 - \delta$ , σήμερα όμως χρησιμοποιείται κατεξοχήν η κλίμακα  $\delta$ . Συμβατικά το σημείο συντονισμού της ουσίας αναφοράς λαμβάνεται ως  $\delta = 0$  ppm.

Η ισχύς του εφαρμοζόμενου πεδίου αυξάνεται από αριστερά προς τα δεξιά. Το αριστερό τμήμα του φάσματος είναι η πλευρά χαμηλού πεδίου, όπου θα εμφανίζονται κορυφές οι αποπροστατευμένοι πυρήνες, ενώ στο δεξιό τμήμα αντιπροσωπεύει την πλευρά υψηλού πεδίου, όπου εμφανίζονται κορυφές των προστατευμένων πυρήνων. Γενικά, η θωράκιση ενός πυρήνα μειώνεται όταν αυξάνει η ηλεκτραρνητικότητα των γειτονικών ομάδων.[36,38] (Εικόνα 3.2.1)



**Εικόνα 3.2.1** Γράφημα  $^1\text{H}$  NMR. Το αριστερό τμήμα του γραφήματος είναι η πλευρά χαμηλού πεδίου (downfield) και το δεξιό τμήμα είναι η πλευρά υψηλού πεδίου (upfield). Η απορρόφηση μίας ουσίας αναφοράς (TMS, TSP, κ.ά.) χρησιμοποιείται ως σημείο αναφοράς.

### **3.3. Σύζευξη *spin-spin* (*spin-spin coupling*)**

Σε ένα φάσμα  $^1\text{H-NMR}$  οι κορυφές συντονισμού εμφανίζονται με τη μορφή πολλαπλών κορυφών (διπλές, τριπλές, τετραπλές κ.λ.π.) οι οποίες έχουν ορισμένη κανονικότητα και συμμετρία. Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού ονομάζεται *σύζευξη spin-spin* (*spin-spin coupling*) και οφείλεται σε περιστροφική αλληλεπίδραση γειτονικών πυρήνων, η οποία τους οδηγεί σε περισσότερες ενεργειακές στάθμες μέσα στο μαγνητικό πεδίο. Η σύζευξη *spin-spin* είναι αυτή που προκαλεί το διαχωρισμό του σήματος σε δύο ή περισσότερες κορυφές του φάσματος. Η πολλαπλότητα ενός σήματος συντονισμού πρωτονίου είναι ίση με  $n+1$ , όπου  $n$  ο αριθμός των γειτονικών πρωτονίων. Χαρακτηριστικό των σύνθετων (πολλαπλών) κορυφών είναι ότι έχουν ίση απόσταση μεταξύ τους κατά μία σταθερά, τη σταθερά συζεύξεως  $J$ , που είναι ανεξάρτητη από την ένταση του μαγνητικού πεδίου.[36,38]

### **3.4. Ολοκλήρωση των κορυφών συντονισμού των πρωτονίων στο φάσμα $^1\text{H-NMR}$ .**

Για να μπορέσουμε να συγκρίνουμε ποσοτικά τις κορυφές συντονισμού διαφόρων πρωτονίων, υπολογίζουμε τα εμβαδά των κορυφών. Υπολογίζοντας το ολοκλήρωμα κάθε κορυφής ηλεκτρονικά, μπορούμε να μετρήσουμε τον αριθμό κάθε είδους πρωτονίων σε ένα μόριο. Το ύψος του ολοκληρώματος που καταγράφεται πάνω στο φάσμα είναι ανάλογο ως προς το εμβαδόν που περικλείει κάθε κορυφή συντονισμού και, συνεπώς, ανάλογο ως προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν το σήμα. [36,38]

Ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός είναι μία ποσοτική τεχνική, διότι κάθε κορυφή του φάσματος που αντιστοιχεί σε ένα μεταβολίτη είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωσή του, πράγμα που αποτελεί ένα σαφές πλεονέκτημα έναντι της φασματομετρίας Μάζας (MS). [25] Η φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$ , αν και λιγότερο ευαίσθητη από την φασματοσκοπία Μάζας, παρέχει σε λίγο χρόνο και με μικρή προεργασία του δείγματος το σύνολο των μεταβολιτών που περιέχονται σε ένα βιολογικό υγρό. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου είναι πολύ υψηλή και καθώς το δείγμα δεν καταστρέφεται μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επιπλέον αναλύσεις. [29]



## **Σκοπός της μελέτης**

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ανάλυση του μεταβολικού προφίλ του ορού του αίματος εγκύων με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης (ΣΔΚ) με βάση τη φασματοσκοπία  $^1\text{H-NMR}$  και η διερεύνηση της συσχέτισης κύριων μεταβολιτών του ορού με τον μεταβολισμό και την εξέλιξη της νόσου. Στα πλαίσια αυτής της μελέτης διερευνώνται οι κατάλληλες πειραματικές συνθήκες για το διαχωρισμό μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους του ορού του αίματος από τα μακρομόρια. Στο πρώτο μέρος της εργασίας γίνεται ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση επιλεγμένων μεταβολιτών στον ορό του αίματος εγκύων με και χωρίς ΣΔΚ. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας συγκρίνεται το συνολικό μεταβολικό προφίλ του ορού των δύο ομάδων της μελέτης με τεχνικές αναγνώρισης προτύπων (Μεταβονομική ανάλυση).

# 4

## *ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ*



#### **4.1. Πληθυσμός της μελέτης και συλλογή των δειγμάτων αίματος**

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείται από δυο ομάδες: είκοσι εγκυμονούσες χωρίς Διαβήτη Κύησης (Φυσιολογικές) και είκοσι με Διαβήτη Κύησης (Παθολογικές). Η συλλογή των δειγμάτων έγινε κατά τη δοκιμασία φόρτισης με 75g γλυκόζης, σε χρόνο 0' (κατάσταση νηστείας), κατά την 24<sup>η</sup> έως την 32<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης.

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια αιμοληψίας Vacutainer SST II. Αφού παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου (25°C) για χρονικό διάστημα 30 λεπτών, για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της πήξης, έπειτα φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στις 3000 στροφές ανά λεπτό. Συλλέχθηκε ο ορός, μεταφέρθηκε σε πλαστικά σωληνάκια και καταψύχθηκε σε θερμοκρασία -80°C μέχρι το επόμενο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας. Στο δείγμα ορού μετρήθηκαν τα επίπεδα της γλυκόζης και στο δείγμα ολικού αίματος τα επίπεδα της γλυκιωμένης αιμοσφαιρίνης. Τα δείγματα αίματος ελήφθησαν πριν την έναρξη θεραπευτικής αγωγής.

#### **4.2. Διήθηση ή Υπερδιήθηση του ορού του αίματος**

Η μέθοδος της διήθησης υπό φυγοκέντρωση χρησιμοποιείται ευρύτατα σε εργαστήρια βιοχημείας και κλινικής χημείας κυρίως για την προετοιμασία ενός βιολογικού δείγματος. Η διήθηση ή υπερδιήθηση (Ultrafiltration, UF) είναι μία μέθοδος διαχωρισμού εξαιρετικά μικρών σωματιδίων και διαλυμένων μορίων μεγάλου μοριακού βάρους (MW) τα οποία περιέχονται σε ένα βιολογικό υγρό (π.χ. αίμα, αμνιακό υγρό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό κ.ά.) με τη χρήση πορώδους (ημιπερατής) μεμβράνης. Η κύρια βάση για το διαχωρισμό είναι το μοριακό βάρος, αν και σε όλες τις εφαρμογές διήθησης, η διαπερατότητα ενός στοιχείου διήθησης μπορεί να επηρεάζεται από τις χημικές, μοριακές ή ηλεκτροστατικές ιδιότητες του δείγματος. Η υπερδιήθηση είναι μία διαδικασία διήθησης όπου το μέσο διήθησης (μεμβράνη) έχει μικρότερους πόρους από το μέγεθος των ουσιών που διαχωρίζονται.

Η τεχνική αυτή στηρίζεται στο φαινόμενο της αναπτύξεως φυγοκέντρου δυνάμεως η οποία ασκείται πάνω σε ένα αντικείμενο που περιστρέφεται γύρω από κεντρικό άξονα.

$$\text{Φυγόκεντρος δύναμη} = m \cdot \omega^2 \cdot r$$

$\omega$  = η γωνιακή ταχύτητα σε rad/sec και

$r$  = η ακτίνα περιστροφής δηλαδή η απόσταση του σωματιδίου από τον κεντρικό άξονα περιστροφής

Η μέτρηση της φυγόκεντρης δύναμης πραγματοποιείται με τη μέτρηση δύναμης μεγαλύτερης από αυτή της βαρύτητας (g) που είναι η σχετική φυγόκεντρος δύναμη (relative centrifugal force, RCF) και που ορίζεται από την εξίσωση:

$$RCF = 11,18 \times (n/1000)^2 \times (r)$$

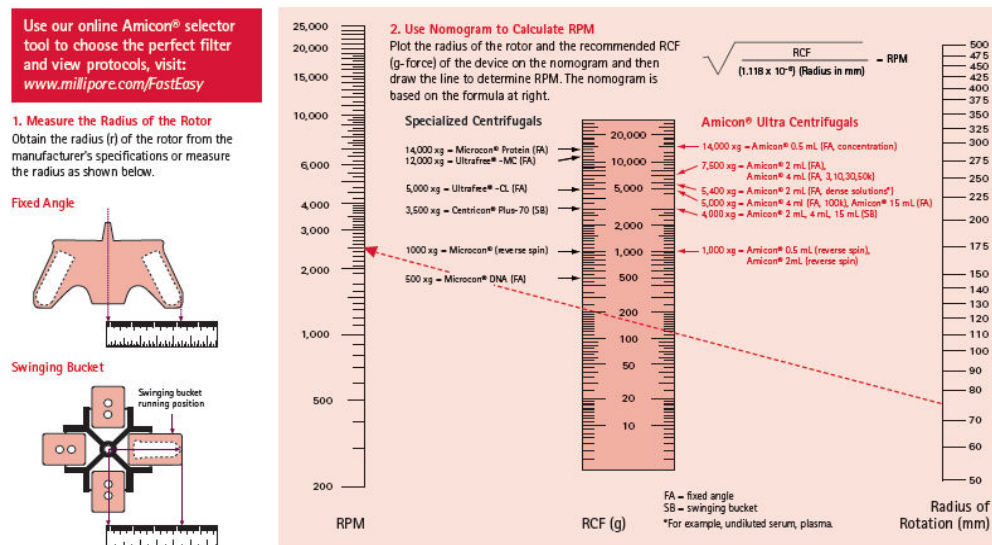
r= ακτίνα φυγόκεντρησης σε cm

n= ταχύτητα περιστροφής σε rpm

(rpm= rounds per minute)

Η εξίσωση αυτή συσχετίζει την RCF με τις στροφές ανά λεπτό του δείγματος. Επίσης δείχνει ότι η RCF εξαρτάται από την ακτίνα περιστροφής (r) του σωματιδίου.

## Centrifugal Filters Guide to Converting g-Force to RPM



Εικόνα 4.2.1 Μετατροπή της σχετικής φυγόκεντρος δυνάμεως (RCF) σε rpm.

## Αρχή μεθόδου διήθησης υπό φυγόκεντρηση (υπερδιήθησης) του ορού του αίματος

Για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) κρίνεται απαραίτητη η απομάκρυνση των

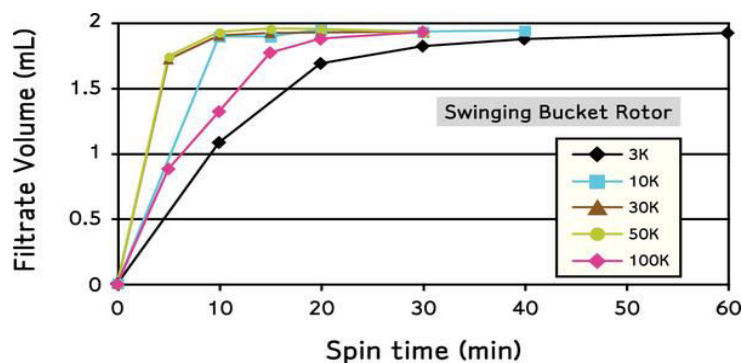
μακρομορίων (λιπιδίων, πρωτεϊνών) με διήθηση του ορού του αίματος. Τα σήματα αυτών των μακρομορίων στο φάσμα NMR αλληλεπικαλύπτουν το σήμα των προσδιοριζόμενων μεταβολιτών παρεμποδίζοντας την ανίχνευσή τους.

Έτσι για την απομάκρυνση των μακρομορίων με φυγοκέντρηση του ορού, χρησιμοποιήθηκαν τα φίλτρα Amicon® Ultra-2 Centrifugal Filter Devices (**Εικόνα 4.2.2**). Με τα συγκεκριμένα φίλτρα επιτυγχάνεται ταχεία υπερδιήθηση διαλυμάτων, καθώς επιτρέπουν τη διήθηση συστατικών μεγέθους έως 3 kDa. Με βάση το μοριακό βάρος των μεταβολιτών ο χρόνος διήθησης του δείγματος καθορίστηκε στα 60 min.



**Εικόνα 4.2.2** Φίλτρα Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Devices (for volumes up to 2 mL)

Ακόμη, η διήθηση πραγματοποιήθηκε σε φυγόκεντρο υψηλής ταχύτητας με ελεγχόμενη θερμοκρασία θαλάμου (Thermo Scientific SL16R) και η κεφαλή που εφαρμόστηκε ήταν κεφαλή ταλαντευόμενων υποδοχέων (swinging bucket rotor). Η μέγιστη ταχύτητα που προτείνεται από τον κατασκευαστή των φίλτρων σε κεφαλή ταλαντευόμενων υποδοχέων είναι 4000 g και αυτή η ταχύτητα εφαρμόζεται στο παρόν πρωτόκολλο. (**Εικόνα 4.2.3**)



**Εικόνα 4.2.3** Χρόνοι φυγοκέντρησης για κεφαλή ταλαντευόμενων υποδοχέων (Swinging Bucket Rotor), στα 4.000 x g, σε θερμοκρασία δωματίου, ανάλογα με τον όγκο που φιλτράρουμε μέχρι 2 mL.

### Υλικά-Αντιδραστήρια

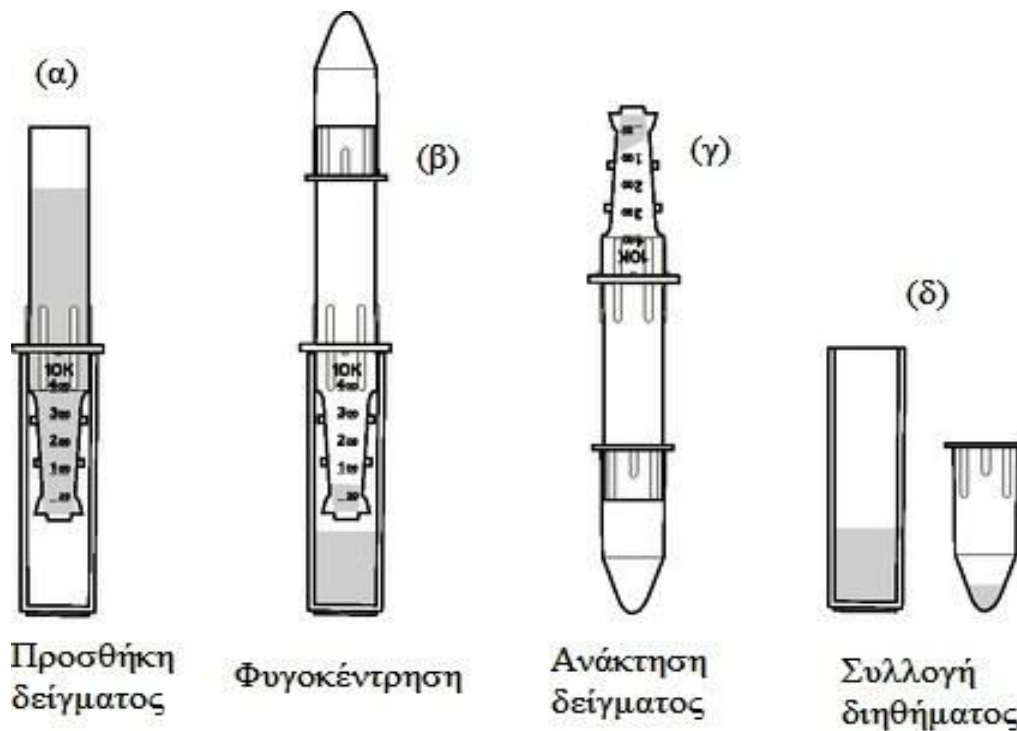
1. Φίλτρα χωρητικότητας 2mL (Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Devices for volumes up to 2 mL, για διήθηση συστατικών έως 3kDa)
2. Πιπέτες: 200-1000  $\mu$ L, 10-100  $\mu$ L (Finnipipette Thermo Labsystems)
3. Απεσταγμένο Ύδωρ
4. Πλαστικά σωληνάκια Cryovials (Cryo Tube<sup>TM</sup> Vials, NUNC)

### Όργανα

1. Φυγόκεντρος (Thermo Scientific SL16R)

Το πειραματικό πρωτόκολλο [41,42] που ακολουθήθηκε περιελάμβανε τα παρακάτω βήματα:

- Πλύσιμο φίλτρων (έκπλυση) με προσθήκη 1,5mL απεσταγμένου ύδατος για να απομακρυνθούν τα ίχνη γλυκερόλης που βρίσκονται στα φίλτρα.
- Φυγοκέντρωση στα 4000g για 1h σε θερμοκρασία δωματίου (25<sup>0</sup>C).
- Προσθήκη 1,2 mL ορού αίματος σε κάθε φίλτρο.
- Φυγοκέντρωση στα 4000g για 1h σε θερμοκρασία δωματίου (25<sup>0</sup>C).
- Συλλογή ποσότητας διηθήματος περίπου 800 $\mu$ L σε πλαστικά σωληνάκια Cryovials (Cryo Tube<sup>TM</sup> Vials, NUNC).
- Αποθήκευση στους -80<sup>0</sup>C. **(Εικόνα 4.2.4)**



**Εικόνα 4.2.4** Βήματα χρήσης συσκευής φιλτραρίσματος δείγματος ορού. (α) Προσθέτουμε το δείγμα στο φίλτρο. (β) Καλύπτουμε το φίλτρο και φυγοκεντρούμε για 60 λεπτά στα 4000 g. (γ) Ανακτούμε με εκ νέου φυγοκέντρηση μέρος του δείγματος που δεν διηθείται. (δ) Συλλέγουμε το διήθημα καθώς και το ίζημα στα αντίστοιχα σωληνάρια.

### 4.3. Καταγραφή του Μεταβολικού Προφίλ του Ορού του Αίματος με φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$

#### Προετοιμασία των δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$

##### Υλικά- Αντιδραστήρια

1. Γυάλινα σωληνάρια NMR διαμέτρου 5 mm (Wilmad 535-PP, Sigma-Aldrich)
2. Κωνικά σωληνάρια Eppendorf 1,5 mL
3. Πιπέτες : 50 $\mu\text{L}$ , 200-1000 $\mu\text{L}$  (Finnipipette Thermo Labsystems)
4. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ / 0.2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , M=141.96 g/mol, Riedel-de Haen,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , M=156.01 g/mol, Merck)
5. Διάλυμα  $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP}$  [Δευτεριωμένο Ύδωρ ( $\text{D}_2\text{O}$ , M=20.03 g/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, M=172.28 g/mol, Sigma-Aldrich)]



## Όργανα

1. Φασματογράφος Bruker Avance DRX 500MHz
2. Φυγόκεντρος Centrifuge 5415 D, Eppendorf

Αρχικά, τα αποθηκευμένα στους  $-80^{\circ}\text{C}$  διηθήματα ορού παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου ( $25^{\circ}\text{C}$ ) για την απόκτηση θερμικής ισορροπίας. Στη συνέχεια σε ποσότητα διηθήματος ορού 400μL προστίθενται 200μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών για την όσο το δυνατόν αποτελεσματικότερη ελαχιστοποίηση των μεταβολών του pH και καλύτερη σταθεροποίηση στην περιοχή  $7.4 \pm 0.5$ . [78] Ακολουθεί ήπια ανάδευση στο μίγμα των 600μL, αναμονή 10min για πλήρη ανάμειξη του ορού με το ρυθμιστικό διάλυμα και εν συνεχεία φυγοκέντρηση (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) σε 8000 στροφές/λεπτό για 5 min για την απομάκρυνση τυχόν ιζημάτων. [79] Μεταφορά κατόπιν 500μL από το διαυγές υπερκείμενο σε γυάλινο σωληνάριο NMR διαμέτρου 5mm και προσθήκη 50μL διαλύματος  $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP}$ . Το  $\text{D}_2\text{O}$  προστέθηκε ως διαλύτης για το lock της συχνότητας πεδίου (field frequency lock solvent) του φασματογράφου NMR ενώ το TSP αποτέλεσε την εσωτερική ουσία αναφοράς ( $\delta^1\text{H}$  0.0) για τη βαθμονόμηση των χημικών μετατοπίσεων.

## ***Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$***

Η λήψη των φασμάτων  $^1\text{H-NMR}$  έγινε στους 300K, στο φασματογράφο 500 MHz Avance Bruker DRX, εντάσεως μαγνητικού πεδίου 11,74 Tesla, στο Κέντρο NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Για την καταστολή του σήματος του νερού χρησιμοποιήθηκε η 1D παλμική ακολουθία NOESYPRESAT (RD- $90^{\circ}$ -t1- $90^{\circ}$ -tm- $90^{\circ}$ -FID λήψη). [80] Σε κάθε φάσμα έγινε συλλογή 256 σαρώσεων (scans), 64K δεδομένων (data points) με φασματικό εύρος 6009.6 Hz (αντιστοιχεί σε 12.02 ppm) και παλμό  $90^{\circ}$  διάρκειας 8-10μs.

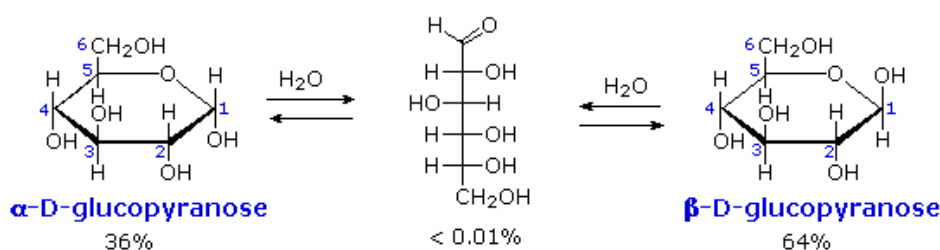
Τα φάσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα Bruker Topspin 3.5r16 (Bruker-Franzen Analytik GmbH). Αρχικά για την αύξηση της ευαισθησίας οι FIDs πολλαπλασιάστηκαν με κατάλληλη εκθετική συνάρτηση (LB=0.3) (exponential weighting function) που αντιστοιχούσε σε διεύρυνση γραμμών (line broadening) πλάτους 0.3 Hz. Στη συνέχεια μετά το μετασχηματισμό Fourier σε φάσμα συνάρτησης συχνότητας, έγινε βαθμονόμηση (Calibration) με βάση το σήμα συντονισμού του δευτεριωμένου άλατος TSP στα 0.000 ppm. Ακολούθησε διόρθωση φάσης (Phase Correction), μηδενικής και πρώτης τάξης για τη βελτίωση της συμμετρίας των κορυφών του φάσματος και τέλος διόρθωση γραμμής βάσης (Baseline Correction). Η διόρθωση της γραμμής βάσης έγινε με τη χρήση μιας απλής πολωνυμικής συνάρτησης  $5^{\text{ου}}$  βαθμού (Automatic Using Polynomial of Degree

ABSG) και ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs).

## Ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών

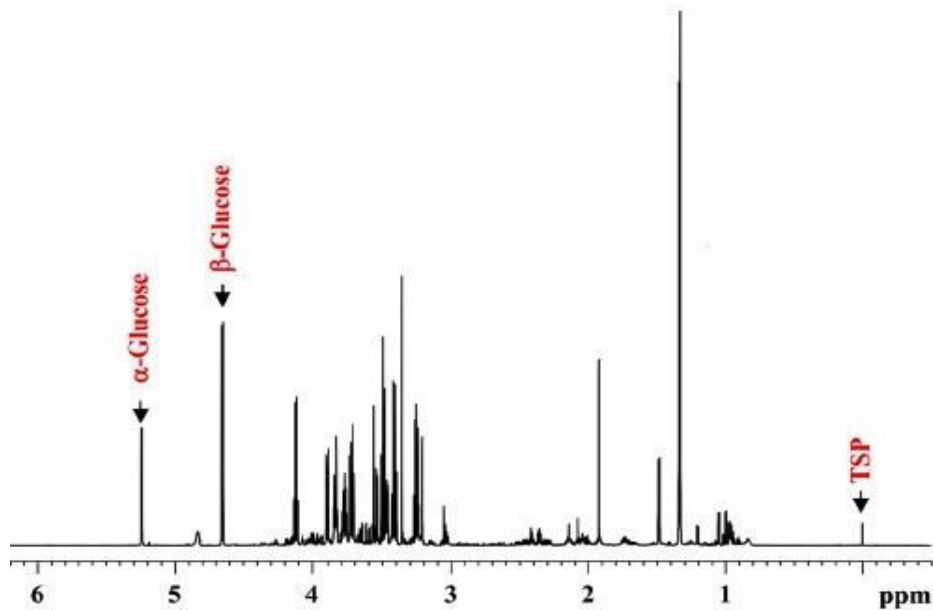
Για να είναι ευδιάκριτες οι κορυφές συντονισμού των υπό εξέταση μεταβολιτών στα φάσματα NMR έγινε πολλαπλασιασμός των FIDs με τη συνάρτηση Squared Sine-Bell (SSB=4) καθώς και με τη συνάρτηση Squared Sine-Bell (SSB=8), όπου κρίθηκε απαραίτητο.

Η ταυτοποίηση των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας έγινε σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία βάσει των χημικών τους μετατοπίσεων και της πολλαπλότητας των κορυφών συντονισμού. [44-46] Για να γίνει η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι. Στα φάσματα των γυναικών χωρίς και με ΣΔΚ η ποσοτικοποίηση έγινε ως προς την τιμή της γλυκόζης η οποία προσδιορίστηκε με την καθιερωμένη βιοχημική μέθοδο. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε ολοκλήρωση (Integration) των κορυφών του φάσματος που προέρχονται από τα σήματα συντονισμού για κάθε μεταβολίτη. Η γλυκόζη σε βιολογικά δείγματα βρίσκεται σε μείγμα ισορροπίας που περιέχει περίπου 1/3 α-ανωμερές, 2/3 β-ανωμερές και λιγότερο από 1% μορφή ανοιχτής αλυσίδας (**Εικόνα 4.3.1**), υπολογίστηκε το άθροισμα των ολοκληρωμάτων των δύο ανωμερών της.



**Εικόνα 4.4.1** Προβολές κατά Haworth των δύο ανωμερών μορφών της γλυκόζης.

Έτσι, αρχικά το ολοκλήρωμα της διπλής (doublet) κορυφής του πρωτονίου του άνθρακα 1 της  $\beta$ -D-Γλυκόζης ( $\delta=4,65$  ppm) τίθεται ίσο με 1 και εν συνεχεία υπολογίζεται το ολοκλήρωμα της διπλής (doublet) κορυφής του πρωτονίου του άνθρακα 1 της  $\alpha$ -D-Γλυκόζης ( $\delta=5,23$ ppm) (**Εικόνα 4.3.2**) καθώς και τα ολοκληρώματα των κορυφών συντονισμού των υπό εξέταση μεταβολιτών. Τέλος, γίνεται αναγωγή των τιμών των ολοκληρωμάτων των μεταβολιτών ως προς το άθροισμα των ολοκληρωμάτων των δύο ανωμερών της γλυκόζης, λαμβάνοντας υπόψη κάθε φορά τον αριθμό των πρωτονίων που αντιστοιχούν σε κάθε κορυφή.



Εικόνα 4.3.2 Χημική μετατόπιση και πολλαπλότητα κορυφών των δύο ανωμερών μορφών της γλυκόζης (Glu).

Συνοπτικά, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών σε mmol/L στα φάσματα των γυναικών με και χωρίς ΣΔΚ ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- (1)  $[\text{Συγκέντρωση γλυκόζης (mg/dl)} / 180] \times 10 = \text{Συγκέντρωση γλυκόζης (mmol/L)}$
- (2)  $\text{Συγκέντρωση γλυκόζης (mmol/L)} / (\text{άθροισμα ολοκληρωμάτων των κορυφών συντονισμού της γλυκόζης}) = \text{conc.index}_1 *$
- (3)  $(\text{Ολοκλήρωμα μεταβολίτη} / \text{αριθμό των πρωτονίων που συμμετέχουν στην κορυφή συντονισμού για το συγκεκριμένο μεταβολίτη}) \times \text{conc.index}_1 = \text{mmol/L μεταβολίτη}$

\*  $\text{conc.index}_1 = \text{συντελεστής μετατροπής σε συγκέντρωση με βάση την τιμή της γλυκόζης}$

Οι μεταβολίτες που ποσοτικοποιήθηκαν, με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία, είναι τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (Branched-Chain Amino Acids, BCAAs) και συγκεκριμένα, η λευκίνη ( $\delta=0.94$  ppm), η ισολευκίνη ( $\delta=0.92-0.99$  ppm) και η βαλίνη ( $\delta=0.97-1.02$  ppm) καθώς επίσης και το  $\alpha$ -υδροξυβουτυρικό οξύ (ή 2-υδροξυβουτυρικό οξύ,  $\alpha$ -HB) ( $\delta=0.89-0.90$  ppm), το γαλακτικό οξύ ( $\delta=1.32$  ppm), η αλανίνη ( $\delta=1.46$  ppm), η γλουταμίνη ( $\delta=2.43-2.48$  ppm), το κιτρικό οξύ ( $\delta=2.53-2.65$  ppm), η κρεατίνη ( $\delta=3.04-3.05$  ppm) και τα αρωματικά αμινοξέα και ειδικότερα, η τυροσίνη ( $\delta=6.89$  ppm) και η φαινυλαλανίνη ( $\delta=7.32$  ppm).

## Στατιστική Ανάλυση

(α) Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα SPSS (IBM SPSS Statistics 19). Οι επιμέρους συγκεντρώσεις των μεταβολιτών που παρατηρούνται στον Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης υπολογίστηκαν ως mmol/L. Οι παράμετροι εκφράστηκαν ως μέσες τιμές  $\pm$  μια τυπική απόκλιση (mean  $\pm$  standard deviation). Η σύγκριση των μέσων τιμών των παραμέτρων έγινε με τη δοκιμασία Independent Samples T-test για σύγκριση μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων (γυναίκες χωρίς Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης). Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν ότι η τιμή του p-value θα πρέπει να είναι  $< 0.05$  ώστε να θεωρείται στατιστικά σημαντική η διαφορά μεταξύ των ομάδων.

(β) Η ανάλυση των δεδομένων NMR πραγματοποιήθηκε με τις τεχνικές αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition-PR). Τα φάσματα NMR διαιρέθηκαν αυτόματα χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα AMIX (Analysis of MIXtures) (version 3.9, Bruker Biospin Corporation) σε συνεχή ακέραια τμήματα (bins) ίσου πλάτους 0.04 ppm. Η περιοχή μεταξύ 4.38 και 6.30 ppm αφαιρέθηκε από την ανάλυση διότι περιείχε αλλοιώσεις στη γραμμή βάσης των φασμάτων αφενός λόγω της μη πλήρους καταστολής της κορυφής του νερού και αφετέρου λόγω της διευρυμένης κορυφής της ουρίας λόγω ανταλλαγής των N-πρωτονίων αυτής με δευτέρια του διαλύτη. Τα bins που αντιστοιχούσαν στο κιτρικό οξύ (2.50 – 2.58 ppm και 2.66 – 2.74 ppm) και στην κρεατινίνη (3.02 – 3.06 ppm και 4.02 – 4.06 ppm) ενοποιήθηκαν στα "superbins" 2.54 και 2.70 ppm για το κιτρικό και 3.04 και 4.04 ppm για την κρεατινίνη αντίστοιχα. Όλα τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν διαιρώντας κάθε τμήμα με τη συνολική επιφάνεια του φάσματος προκειμένου να αντισταθμιστούν οι διαφορές στη συνολική συγκέντρωση μεταξύ των δειγμάτων. Ο τελικός πίνακας των δεδομένων εισήχθη στο λογισμικό SIMCA-P (version 14.0, UMETRICS AB, Umea, Sweden) για την ανάλυση αναγνώρισης προτύπων. Πριν την εφαρμογή της ανάλυσης των κυρίων συνιστωσών (PCA) στα δεδομένα NMR, έγινε κεντράρισμα του μηδενός (mean centering) κάθε στήλης και όλα τα δεδομένα διαιρέθηκαν με την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης της εκάστοτε στήλης στην οποία ανήκαν (Pareto scaling).

Η PCA χρησιμοποιήθηκε αρχικά για μια γενική επισκόπηση του συνόλου των πολυμεταβλητών δεδομένων, την επισήμανση δειγμάτων με ακραία συμπεριφορά (outliers) μεταξύ των παρατηρήσεων (observations, φάσματα), καθώς και την ανίχνευση οποιασδήποτε τάσης ομαδοποίησης ή διαχωρισμού των δεδομένων. Με τις supervised τεχνικές, σε όλα τα δείγματα δίνεται μια κατάλληλη αριθμητική τιμή κατηγοριοποίησης (εξαρτημένη

ψευδομεταβλητή) ανάλογα με την υποομάδα στην οποία ανήκουν για την κατασκευή ενός πίνακα απόκρισης  $Y$  (response  $Y$  matrix). Με την PLS-DA αναζητήθηκε η εκάστοτε σχέση που συνδέει τον πίνακα  $X$  (περιοχές ολοκλήρωσης NMR, bins) με τον πίνακα  $Y$  που περιείχε κωδικοποιημένη την πληροφορία π.χ. της νόσου. Συγκεκριμένα, με την μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε η βέλτιστη διαχωριστική συνάρτηση (discriminant function), δηλαδή το στατιστικό μοντέλο PLS-DA που παρείχε τον σαφέστερο διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων της μελέτης βάσει των μεταβλητών  $X$ . Για την ερμηνεία των γραφημάτων συντεταγμένων χρησιμοποιήθηκαν τα regression coefficients plots (διαγράμματα συντελεστών παλινδρόμησης) αποσκοπώντας στην ανάδειξη των φασματικών περιοχών NMR που συνεισφέρουν σημαντικά στο διαχωρισμό των υπό μελέτη ομάδων. Η τεχνική Orthogonal Projections to PLS-DA (OPLS-DA) εφαρμόστηκε για την αφαίρεση εκείνων των γραμμικών συνδυασμών των μεταβλητών  $X$  που ήταν ορθογώνιοι προς το διάνυσμα  $Y$  (πίνακας στήλη) των εξαρτημένων μεταβλητών κατηγοριοποίησης, με σκοπό την ελαχιστοποίηση της συστημικής διακύμανσης και την επίτευξη του μεγαλύτερου βαθμού διάκρισης των υπό μελέτη ομάδων.

Σε κάθε στατιστικό μοντέλο εφαρμόστηκε η μέθοδος cross validation (διασταυρούμενη αξιολόγηση) εφαρμόζοντας την προεπιλεγμένη διαδικασία των 7 διαδοχικών επαναλήψεων του λογισμικού προγράμματος SIMCA-P. Η παράμετρος  $Q^2$  που υπολογίστηκε με την μέθοδο αυτή παρείχε μια εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης των στατιστικών μοντέλων, η οποία θεωρείται «καλή» για  $Q^2 > 0.5$  και «άριστη» για  $Q^2 > 0.9$ , ενώ αντίστοιχα η παράμετρος  $R^2$ , παρείχε μια εκτίμηση της explained variation και του βαθμού προσαρμογής του εκάστοτε στατιστικού μοντέλου στα δεδομένα.

# 5

## *ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ*



## 5.1 Διερεύνηση των Πειραματικών Συνθηκών για την Φυγοκέντρωση του Ορού του Αίματος

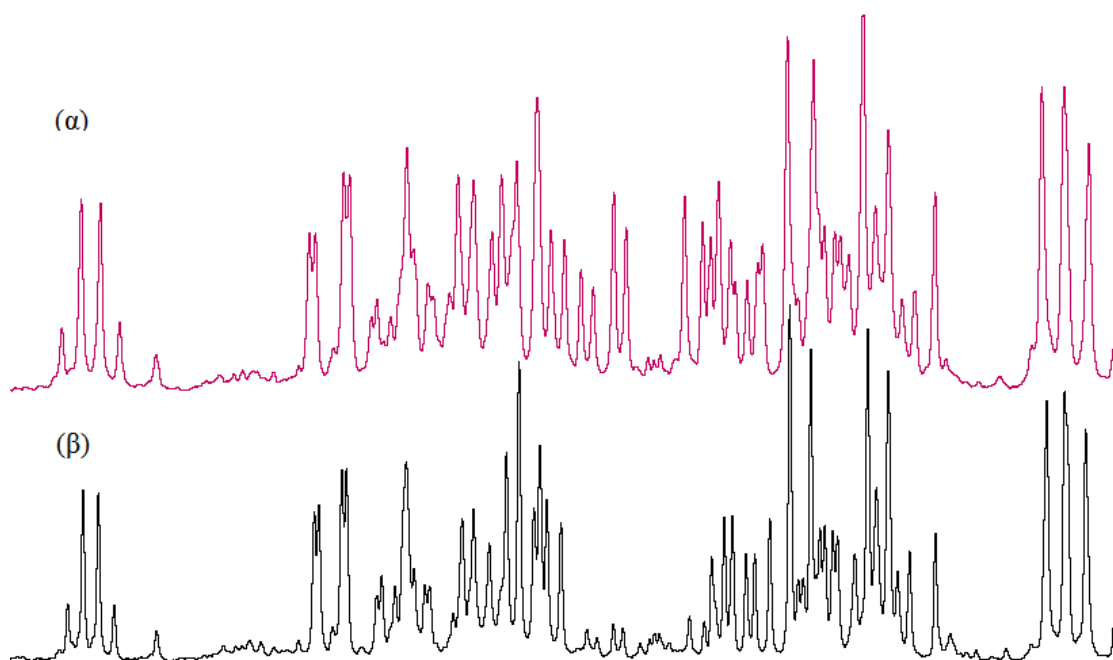
Πραγματοποιήθηκαν δοκιμαστικά πειράματα για να διερευνηθούν οι κατάλληλες πειραματικές συνθήκες διήθησης του ορού του αίματος (ποσότητα δείγματος ορού, ποσότητα H<sub>2</sub>O, απαιτούμενος χρόνος και αριθμός στροφών φυγοκέντρωσης).

### 1<sup>ο</sup> Σημείο Διερεύνησης: (α) Αριθμός στροφών – Χρόνου φυγοκέντρωσης και (β) Τρόπος προσθήκης ποσότητας H<sub>2</sub>O

Δοκιμαστικό Πείραμα	1 <sup>ο</sup>		2 <sup>ο</sup>		3 <sup>ο</sup>	
	(α)	(β)	(α)	(β)	(α)	(β)
<b>Πλύση Φίλτρου</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1.5 mL H<sub>2</sub>O</li> <li>• Φυγοκέντρωση 2000 g</li> <li>• Χρόνος: 120 λεπτά</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0.5 mL H<sub>2</sub>O Φυγοκέντρωση 2000 g Χρόνος: 50 λεπτά</li> <li>• 0.5 mL H<sub>2</sub>O Φυγοκέντρωση 2000 g Χρόνος: 50 λεπτά</li> <li>• 0.5 mL H<sub>2</sub>O Φυγοκέντρωση 2000 g Χρόνος: 50 λεπτά</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1.5 mL H<sub>2</sub>O</li> <li>• Φυγοκέντρωση 3000 g</li> <li>• Χρόνος: 90 λεπτά</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0.5 mL H<sub>2</sub>O Φυγοκέντρωση 3000 g Χρόνος: 90 λεπτά</li> <li>• 0.5 mL H<sub>2</sub>O Φυγοκέντρωση 3000 g Χρόνος: 90 λεπτά</li> <li>• 0.5 mL H<sub>2</sub>O Φυγοκέντρωση 3000 g Χρόνος: 90 λεπτά</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1.5 mL H<sub>2</sub>O</li> <li>• Φυγοκέντρωση 4000 g</li> <li>• Χρόνος: 60 λεπτά</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0.5 mL H<sub>2</sub>O Φυγοκέντρωση 4000 g Χρόνος: 60 λεπτά</li> <li>• 0.5 mL H<sub>2</sub>O Φυγοκέντρωση 4000 g Χρόνος: 60 λεπτά</li> <li>• 0.5 mL H<sub>2</sub>O Φυγοκέντρωση 4000 g Χρόνος: 60 λεπτά</li> </ul>
<b>Ποσότητα ορού</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 mL ορού</li> <li>• Φυγοκέντρωση 2000 g</li> <li>• Χρόνος: 120 λεπτά</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 mL ορού</li> <li>• Φυγοκέντρωση 2000 g</li> <li>• Χρόνος: 120 λεπτά</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 mL ορού</li> <li>• Φυγοκέντρωση 3000 g</li> <li>• Χρόνος: 90 λεπτά</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 mL ορού</li> <li>• Φυγοκέντρωση 3000 g</li> <li>• Χρόνος: 90 λεπτά</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 mL ορού</li> <li>• Φυγοκέντρωση 4000 g</li> <li>• Χρόνος: 60 λεπτά</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 mL ορού</li> <li>• Φυγοκέντρωση 4000 g</li> <li>• Χρόνος: 60 λεπτά</li> </ul>
<b>Ποσότητα Διηθήματος</b>	1.2 – 1.3 mL		1.2 mL		1 mL	



Από άποψη μεθοδολογίας και παρατηρώντας τα φάσματα των δειγμάτων:



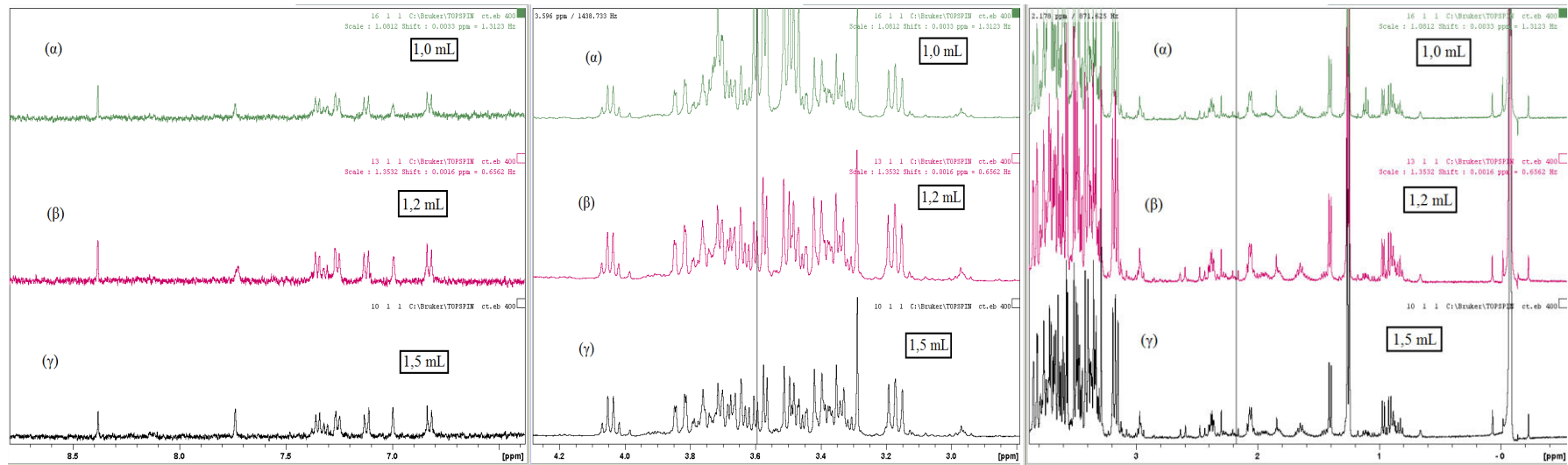
**Εικόνα 3.1.1**  $^1\text{H-NMR}$  φάσμα διηθήματος ορού (περιοχή από 3.2 - 4.5 ppm). Φυγοκέντρωση του δείγματος ορού σε α) 4000 g και (β) σε 2000 g.

Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5.1.1**, το φάσμα που λαμβάνεται με φυγοκέντρωση του ορού στα 4000 g (Εικόνα 5.1α) είναι πιο πλούσιο σε πληροφορία καθώς περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα μεταβολιτών σε σύγκριση με το αντίστοιχο που έχει ληφθεί με φυγοκέντρωση του ορού στα 2000 g (Εικόνα 5.1β). Ακόμη, παρατηρούμε ότι η ποσότητα των μεταβολιτών είναι επίσης μεγαλύτερη στα NMR φάσματα των δειγμάτων όπου το φίλτρο εκπλύθηκε με ποσότητα  $\text{H}_2\text{O}$  ίση με 1.5 mL σε σύγκριση με την σταδιακή έκπλυση των φίλτρων με 0.5 mL  $\text{H}_2\text{O}$  (3 φορές έκπλυση).

## **2<sup>ο</sup> Σημείο Διερεύνησης: Ποσότητα διηθήματος ορού**

Στη συνέχεια, ελέγξαμε την ποσότητα του διηθήματος που λαμβάνεται από την φυγοκέντρηση προσθέτοντας στη συσκευή του φίλτρου ποσότητα ορού μικρότερη από 2 mL.

Δοκιμαστικό Πείραμα	Πλύση Φίλτρου	Ποσότητα ορού	Ποσότητα Διηθήματος
1 <sup>ο</sup>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1.5 mL H<sub>2</sub>O</li><li>• Φυγοκέντρηση 4000 g</li><li>• Χρόνος: 60 λεπτά</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1.5 mL ορού</li><li>• Φυγοκέντρηση 4000 g</li><li>• Χρόνος: 60 λεπτά</li></ul>	900 μL
2 <sup>ο</sup>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1.5 mL H<sub>2</sub>O</li><li>• Φυγοκέντρηση 4000 g</li><li>• Χρόνος: 60 λεπτά</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1.2 mL ορού</li><li>• Φυγοκέντρηση 4000 g</li><li>• Χρόνος: 60 λεπτά</li></ul>	800 μL
3 <sup>ο</sup>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1.5 mL H<sub>2</sub>O</li><li>• Φυγοκέντρηση 4000 g</li><li>• Χρόνος: 60 λεπτά</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 1.0 mL ορού</li><li>• Φυγοκέντρηση 4000 g</li><li>• Χρόνος: 60 λεπτά</li></ul>	700 μL



**Εικόνα 5.1.2 (α-γ)** Αντιπροσωπευτικά NMR φάσματα. Στο φάσμα (α) (πράσινο χρώμα) φυγοκεντρήθηκε ποσότητα ορού ίση με 1 mL, στο φάσμα (β) (κόκκινο χρώμα) ποσότητα ορού ίση με 1.2 mL και στο φάσμα (γ) (μαύρο χρώμα) ποσότητα ορού ίση με 1.5 mL.

Συμπεραίνουμε ότι τα NMR φάσματα των δειγμάτων που ελήφθησαν με φυγοκέντρηση ποσότητας ορού ίση με 1.2 mL ήταν περισσότερο πλούσια σε μεταβολίτες σε σύγκριση με τα άλλα 2 φάσματα που ελήφθησαν με φυγοκέντρηση ποσότητας ορού ίση με 1 και 1.5 mL αντίστοιχα. Αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στην περιοχή των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs) (από  $\delta=1.02$  ppm έως  $\delta=0.92$  ppm) και στην περιοχή των αρωματικών αμινοξέων (από  $\delta=6.89$  ppm έως  $\delta=8.44$  ppm) (Εικόνα 5.1.2)

### **3<sup>ο</sup> Σημείο Διερεύνησης: Χρόνος φυγοκέντρησης του δείγματος ορού του αίματος**

Τέλος, διερευνήθηκε η χρονική διάρκεια φυγοκέντρησης της ανωτέρω ποσότητας του ορού του αίματος.

Δοκιμαστικό Πείραμα	Πλύση Φίλτρου	Ποσότητα Ορού	Ποσότητα Διηθήματος
1 <sup>ο</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1.5 mL H<sub>2</sub>O</li> <li>• Φυγοκέντρηση 4000 g</li> <li>• Χρόνος: 60 λεπτά</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1.2 mL ορού</li> <li>• Φυγοκέντρηση 4000 g</li> <li>• Χρόνος: 20 λεπτά</li> </ul>	400 $\mu$ L
2 <sup>ο</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1.5 mL H<sub>2</sub>O</li> <li>• Φυγοκέντρηση 4000 g</li> <li>• Χρόνος: 60 λεπτά</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1.2 mL ορού</li> <li>• Φυγοκέντρηση 4000 g</li> <li>• Χρόνος: 40 λεπτά</li> </ul>	650 $\mu$ L
3 <sup>ο</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1.5 mL H<sub>2</sub>O</li> <li>• Φυγοκέντρηση 4000 g</li> <li>• Χρόνος: 60 λεπτά</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1.2 mL ορού</li> <li>• Φυγοκέντρηση 4000 g</li> <li>• Χρόνος: 60 λεπτά</li> </ul>	800 $\mu$ L

Θεωρούμε ότι η φυγοκέντρηση πρέπει να διαρκεί 60 λεπτά, καθώς λαμβάνεται ικανοποιητική ποσότητα διηθήματος ορού για την καταγραφή του μεταβολικού προφίλ του ορού του αίματος με τη φασματοσκοπία NMR.

## 5.2. Ποσοτικοποίηση μεταβολιτών

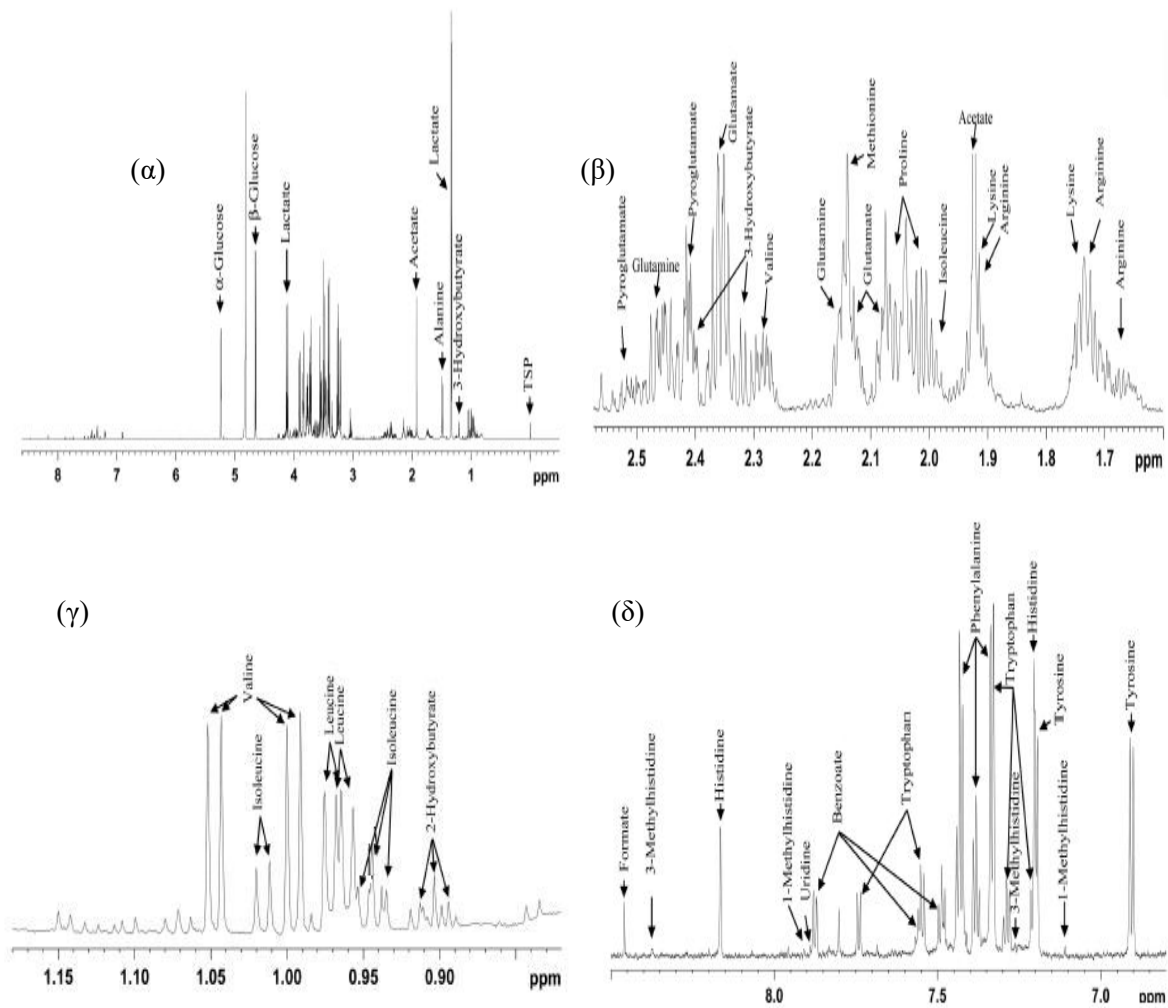
Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκαν τα φάσματα NMR των μεταβολιτών στον ορό του αίματος 20 εγκύων χωρίς Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης (ομάδα ελέγχου) και 20 γυναικών με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης (παθολογικές). Η συλλογή των δειγμάτων έγινε κατά τη δοκιμασία φόρτισης με 75g γλυκόζης, σε χρόνο 0' (κατάσταση νηστείας), κατά την 24<sup>η</sup> έως την 32<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης. Οι βιοχημικές παράμετροι του ορού του αίματος του πληθυσμού της μελέτης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5.2-1**.

Από τα 40 δείγματα που μελετήθηκαν (20 φυσιολογικά και 20 παθολογικά), κρίθηκαν ακατάλληλα για επεξεργασία και ποσοτικοποίηση 3 δείγματα, εκ των οποίων τα δύο ήταν από εγκυμονούσες χωρίς διαβήτη κύησης και το ένα από έγκυο με διαβήτη κύησης, και εξαιρέθηκαν. Τα τρία αυτά δείγματα εξαιρέθηκαν γιατί στα φάσματα η κορυφή συντονισμού του νερού ήταν πολύ μεγάλη λόγω μη καλής καταστολής του νερού και επομένως δεν μπορούσε να γίνει σωστή επεξεργασία του φάσματος και ποσοτικοποίηση των υπό εξέταση μεταβολιτών.

Πίνακας 5.2-1 Δημογραφικά στοιχεία και βιοχημικές παράμετροι του ορού του πληθυσμού της μελέτης.

	Έγκυες χωρίς ΣΔΚ Μέση τιμή ± Τυπική Απόκλιση	Έγκυες με ΣΔΚ Μέση τιμή ± Τυπική Απόκλιση	Εύρος
Αριθμός (N)	18	19	-
Ηλικία (έτη)	26.1 ± 2.70	32.89 ± 3.30	25 - 40
Τιμή γλυκόζης ορού (mmol/L), OGTT 0'	4.67 ± 0.29	5.20 ± 0.58	70 - 106
Γλυκιωμένη Αιμοσφαιρίνη (HbA1c %)	4.89 ± 0.21	5.06 ± 0.35	4.7 – 5.6

Με βάση τις χημικές μετατοπίσεις των πρότυπων φασμάτων που δίνονται από τη διεθνή βιβλιογραφία [44-46,48], έγινε η ταυτοποίηση των κορυφών των μεταβολιτών στα φάσματα <sup>1</sup>H-NMR στον ορό του αίματος. (**Εικόνα 5.2.1**)

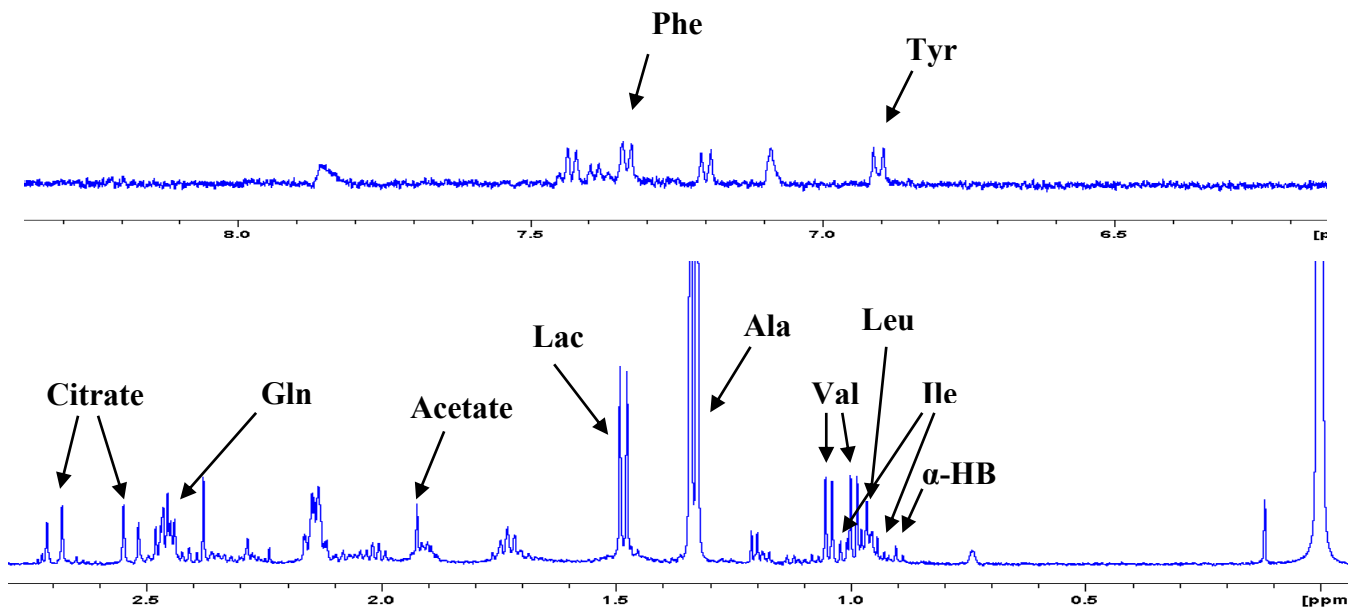


**Εικόνα 5.2.1 (α-δ)** Τυπικό  $^1\text{H-NMR}$  φάσμα από μίγμα ορού υγιών ατόμων με φυσιολογικές βιοχημικές τιμές, όπου έχουν απομακρυνθεί οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους που επηρεάζουν την ποιότητα του φάσματος και εμποδίζουν την ταυτοποίηση των μεταβολιτών.

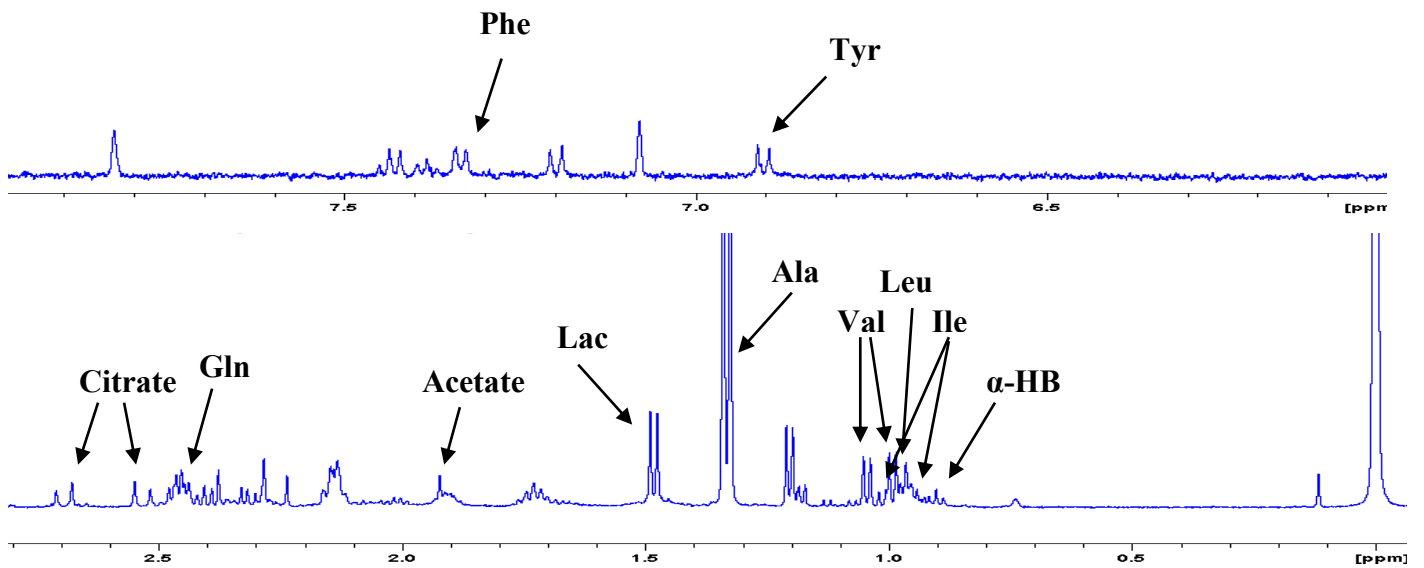
Τα κύρια συστατικά του μεταβολικού προφίλ στον ορό του αίματος είναι τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs) που εντοπίζονται στην περιοχή του φάσματος από 0.94 ppm έως 1.02 ppm και συγκεκριμένα η λευκίνη που εντοπίζεται με μία τριπλή κορυφή στα 0.94 ppm, η ισολευκίνη με μία τριπλή κορυφή στα 0.92 ppm και μία διπλή κορυφή στα 0.99 ppm και η βαλίνη που εμφανίζεται με δύο έντονες διπλές κορυφές, η μία στα 0.97 ppm και η άλλη στα 1.02 ppm, η γλυκόζη που εμφανίζει 2 διπλές κορυφές, η μία διπλή κορυφή στα 4.65 ppm που αντιστοιχεί στο α-ανωμερές της γλυκόζης και η άλλη διπλή κορυφή στα 5.23 ppm που αντιστοιχεί στο β-ανωμερές της γλυκόζης, το 2-υδροξυβουτυρικό οξύ (α-HB) που εντοπίζεται στην περιοχή μεταξύ 0.89 – 0.90 ppm με μία τριπλή κορυφή, το γαλακτικό οξύ και η αλανίνη που εντοπίζονται στα 1.32 ppm και στα 1.46 ppm με μία διπλή κορυφή αντίστοιχα, η γλουταμίνη που εμφανίζεται στην περιοχή του φάσματος από την περιοχή των 2.43 ppm έως τα 2.48 ppm, το κιτρικό οξύ που εμφανίζεται με δύο χαρακτηριστικές διπλές κορυφές στα 2.65 ppm και 2.53 ppm του φάσματος, η κρεατινίνη που αντιστοιχεί στην περιοχή του φάσματος στα 3.04 - 3.05 ppm με μία απλή κορυφή και τα αρωματικά αμινοξέα (περιέχουν έναν αρωματικό δακτύλιο) που εντοπίζονται στην περιοχή του φάσματος από 6.89 ppm έως 8.44 ppm και συγκεκριμένα, η τυροσίνη που εντοπίζεται στα 6.89 ppm με μία διπλή κορυφή, η φαινυλαλανίνη που εντοπίζεται με μία διπλή κορυφή στα 7.32 ppm, το φορμικό οξύ με μία απλή κορυφή στα 8.44 ppm και το οξικό οξύ που εντοπίζεται μία απλή κορυφή στα 1.91 ppm.

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μικρός αριθμός μελετών στις οποίες αναφέρεται ότι το μεταβολικό προφίλ των γυναικών χωρίς διαβήτη κύησης διαφέρει από το αντίστοιχο μίας εγκύου με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης (παθολογική). Στη έγκυο με διαβήτη κύησης παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs), του 2-υδροξυβουτυρικού οξέος, του κιτρικού οξέος, του οξικού οξέος και των αρωματικών αμινοξέων (τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, φορμικό οξύ). Αντίθετα, ανιχνεύεται μειωμένη συγκέντρωση κρεατινίνης, αλανίνης, γαλακτικού οξέος και γλουταμίνης στον ορό του αίματος. [16,51-53]

**(α) Έγκυος χωρίς ΣΔΚ (control)**



**(β) Έγκυος με ΣΔΚ**



Εικόνα 5.2.2 (α-β) Αντιπροσωπευτικά <sup>1</sup>H-NMR φάσματα μεταβολιτών του ορού αίματος εγκύων (α) χωρίς και (β) με ΣΔΚ.



Στην **Εικόνα 5.2.2** (α) και (β), παρουσιάζονται δύο αντιπροσωπευτικά φάσματα των δύο ομάδων που μελετήθηκαν με τις χημικές μετατοπίσεις των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία. [44-46,48] Με επεξεργασία των δύο φασμάτων, παρατηρούμε σχετική αύξηση της συγκέντρωσης των BCAAs και συγκεκριμένα της λευκίνης, της ισολευκίνης και της βαλίνης στο φάσμα της εγκύου με διαβήτη της κύησης, όπως επίσης και του 2-υδροξυβουτυρικού οξέος, των αρωματικών αμινοξέων (τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και φορμικό οξύ), του κιτρικού οξέος και του οξικού οξέος. Αντίθετα, η γλουταμίνη, η αλανίνη και το γαλακτικό οξύ εμφανίζουν μία τάση μείωσης στα δείγματα των εγκύων με διαβήτη κύησης, ενώ η κρεατινίνη δεν εμφανίζει σαφή μεταβολή μεταξύ των δύο καταστάσεων.

Στον **Πίνακα 5.2-2** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, μπορούμε να επισημάνουμε ότι η συγκέντρωση του 2-υδροξυβουτυρικού οξέος ( $p=0.02$ ) και του οξικού οξέος ( $p=0.039$ ) παρουσίασαν μία αύξηση στις έγκυες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης και η διαφορά μεταξύ φυσιολογικής και παθολογικής κατάστασης είναι στατιστικά σημαντική. Επίσης, παρατηρείται μία τάση αύξησης της συγκέντρωσης της λευκίνης ( $p=0.594$ ), της βαλίνης ( $p=0.789$ ) και της ισολευκίνης ( $p=0.506$ ), όπως επίσης και του κιτρικού οξέος ( $p=0.340$ ), της φαινυλαλανίνης ( $p=0.129$ ), του φορμικού οξέος ( $p=0.636$ ) και της κρεατινίνης ( $p=0.862$ ). Όμως, οι διαφορές μεταξύ εγκύων χωρίς διαβήτη κύησης και εγκύων με διαβήτη κύησης δεν είναι στατιστικά σημαντικές.

Αντίθετα, παρατηρείται μία τάση μείωσης (όχι όμως στατιστικά σημαντική) στη συγκέντρωση της τυροσίνης ( $p=0.601$ ), του γαλακτικού οξέος ( $p=0.694$ ), της γλουταμίνης ( $p=0.211$ ) και της αλανίνης ( $p=0.239$ ). Να σημειωθεί ότι, οι συγκεντρώσεις της κρεατινίνης και της τυροσίνης της παρούσας μελέτης δεν συμφωνούν με τα αποτελέσματα των μελετών της βιβλιογραφίας [51-53] πιθανά λόγω του περιορισμένου αριθμού των δειγμάτων που μελετήθηκαν. Ακόμη, όσον αφορά τη κρεατινίνη στο φάσμα υπάρχει αλληλοεπικάλυψη της κορυφής συντονισμού της με αυτή της κρεατινίνης.[44,45]

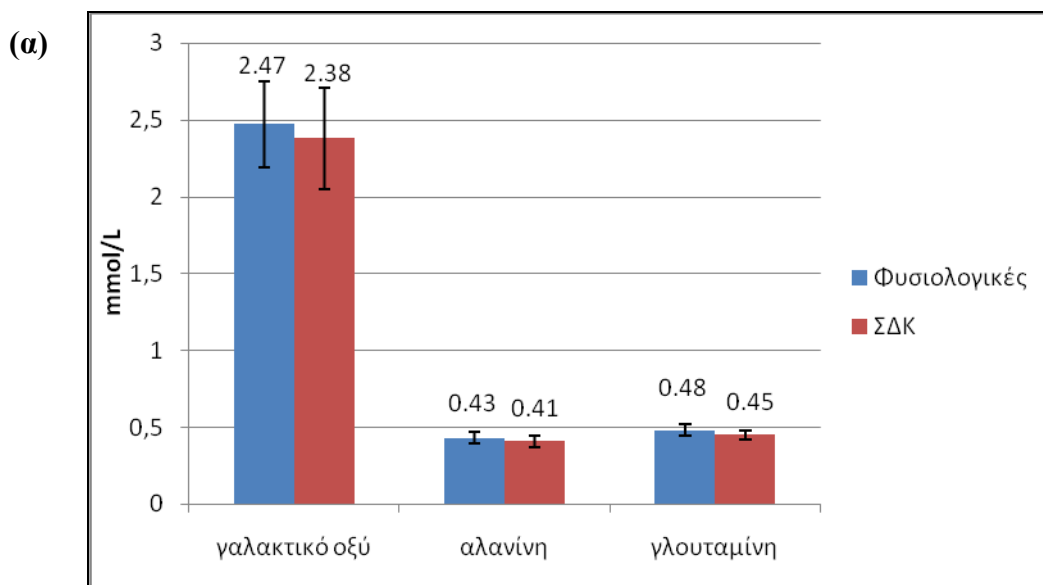
**Πίνακας 5.2-2.** Συγκεντρώσεις των μεταβολιτών στον ορό του αίματος εγκύων με και χωρίς Σακχαρώδη Διαβήτη Κήσης.

Μεταβολίτες (mmol/L)	Χημική Μετατόπιση (δ)	Φυσιολογικές (n=18)	Παθολογικές (n=19)	Τιμές αναφοράς (χωρίς διάκριση φύλου ή κήσης)	p-value
Γλυκόζη	4.65 ppm 5.23 ppm	4.663 ± 0.296	5.187 ± 0.590	4.7 – 6.1	0.02*
Τυροσίνη	6.89 ppm	0.046 ± 0.006	0.044 ± 0.009	0.055 – 0.147	0.601 NS
Φαινυλαλανίνη	7.32 ppm	0.063 ± 0.013	0.070 ± 0.014	0.065 ± 0.009	0.129 NS
Γαλακτικό οξύ	1.32 ppm	2.468 ± 0.615	2.380 ± 0.742	0.740 – 2.40	0.694 NS
Κιτρικό οξύ	2.53 ppm 2.65 ppm	0.105 ± 0.035	0.114 ± 0.022	0.030 – 0.400	0.340 NS
Κρεατινίνη	3.04 - 3.05 ppm	0.076 ± 0.011	0.077 ± 0.014	0.074 ± 0.011	0.862 NS
Αλανίνη	1.46 ppm	0.434 ± 0.081	0.411 ± 0.079	0.259 – 0.407	0.389 NS
Λευκίνη	0.94 ppm	0.096 ± 0.017	0.100 ± 0.023	0.098 – 0.148	0.594 NS
Ισολευκίνη	0.92 ppm 0.99 ppm	0.045 ± 0.008	0.047 ± 0.010	0.048 – 0.076	0.506 NS
Βαλίνη	0.97 ppm 1.02 ppm	0.172 ± 0.029	0.175 ± 0.037	0.190 – 0.276	0.789 NS
Γλουταμίνη	2.43 – 2.48 ppm	0.480 ± 0.084	0.450 ± 0.063	0.502 – 0.670	0.211 NS
2-OH βουτυρικό οξύ	0.89 – 0.90 ppm	0.013 ± 0.003	0.018 ± 0.006	0.008 – 0.080	0.02*
Οξικό οξύ	1.91 ppm	0.056 ± 0.014	0.065 ± 0.015	0.022 – 0.040	0.039*
Φορμικό οξύ	8.44 ppm	0.020 ± 0.008	0.021 ± 0.007	0.024 – 0.22	0.636 NS

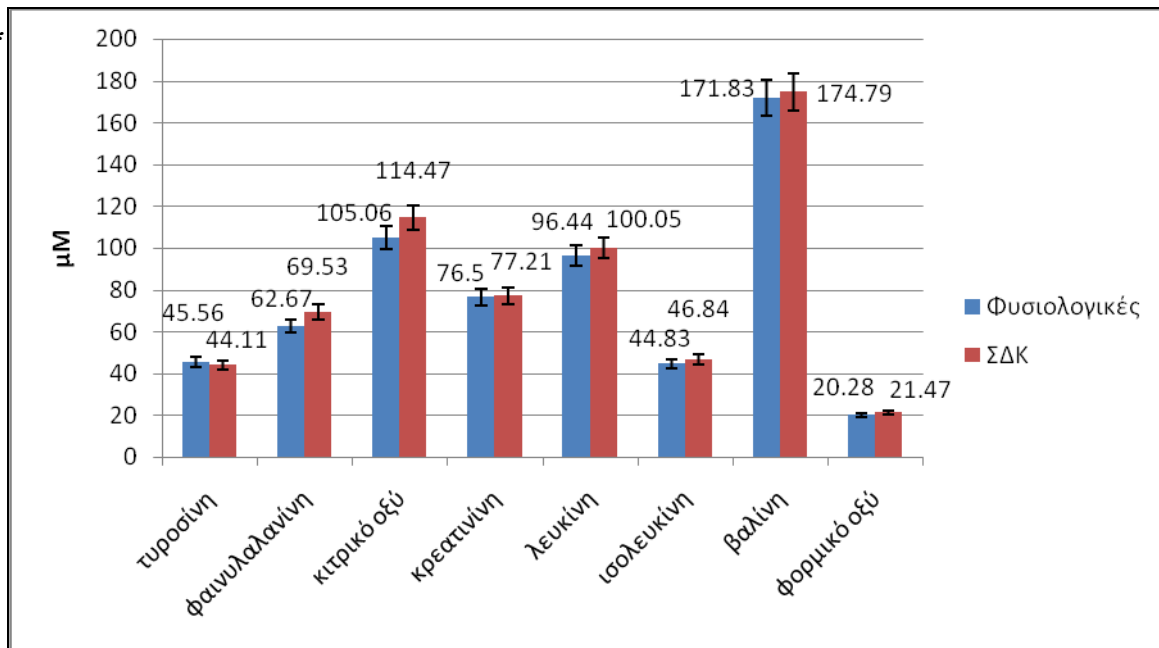
Οι τιμές των μεταβολιτών στον ορό του αίματος έχουν εκφραστεί ως Μέση τιμή ± Τυπική απόκλιση.

Στον **Πίνακα 5.2-3 (α-γ)**, απεικονίζονται οι διαφορές του μέσου όρου της συγκέντρωσης των μεταβολιτών στον ορό του αίματος σε γυναίκες χωρίς ΣΔΚ και σε γυναίκες με ΣΔΚ. Τα επίπεδα της φαινυλαλανίνης, του κιτρικού οξέος, της λευκίνης, της ισολευκίνης, της βαλίνης και του μυρμηκικού οξέος παρουσιάζουν μία μικρή αλλά όχι στατιστικά σημαντική αύξηση στις γυναίκες με ΣΔΚ και τα επίπεδα του 2-υδροξυβουτυρικού και οξικού οξέος παρουσίασαν μία στατιστικά σημαντική αύξηση. Αντίθετα, τα επίπεδα της αλανίνης, της γλουταμίνης, του γαλακτικού οξέος και της τυροσίνης είναι μειωμένα αλλά όχι σημαντικά στις έγκυες με διαβήτη κύησης, ενώ στα επίπεδα της κρεατινίνης δεν παρατηρείται διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων.

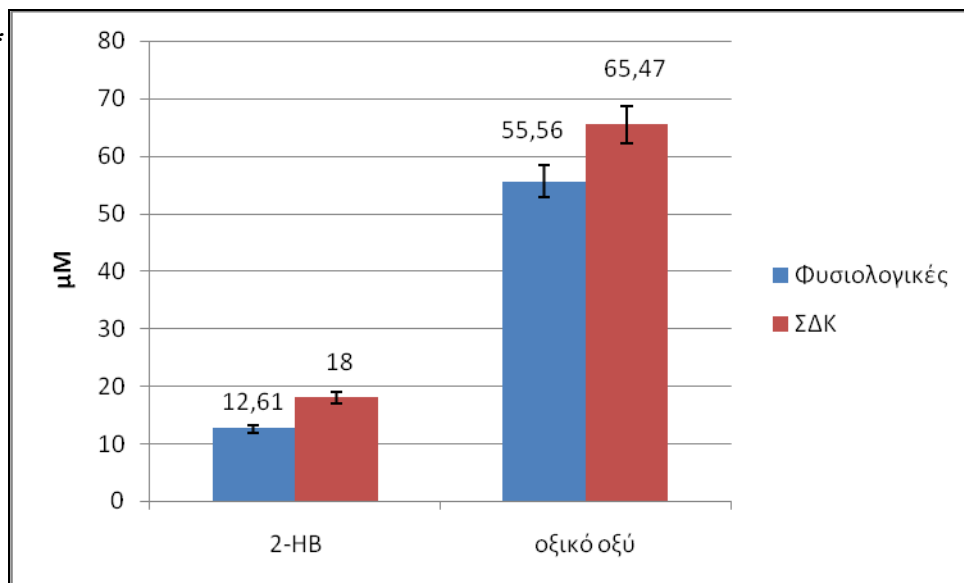
**Πίνακας 5.2-3.** Διάγραμμα του μέσου όρου της συγκέντρωσης των μεταβολιτών στον ορό του αίματος σε γυναίκες χωρίς ΣΔΚ και σε γυναίκες με ΣΔΚ.



(β)\*



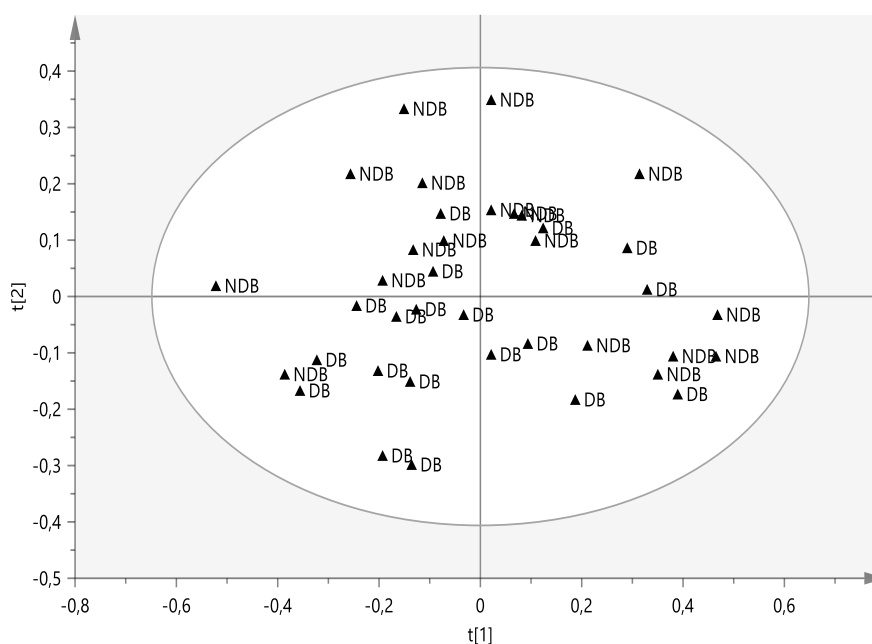
(γ)\*



\*1mmol = 1000 μmol

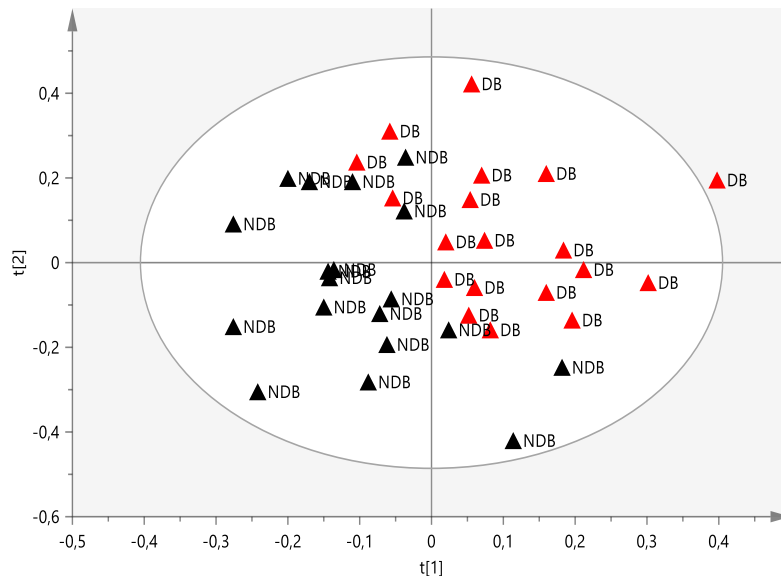
### 5.3. Μεταβολομική Ανάλυση Δεδομένων

Στην μεταβολομική ανάλυση συμμετείχαν 19 γυναίκες χωρίς Διαβήτη Κύησης και 19 με Διαβήτη Κύησης. Αρχικά, εφαρμόστηκε η τεχνική PCA για την γενική επισκόπηση των πολυμεταβλητών δεδομένων. Από το γράφημα συντεταγμένων διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχουν δείγματα με μεταβολικό προφίλ που να διαφοροποιείται σημαντικά από τα υπόλοιπα και ότι υπάρχει ομοιογένεια στις υπό μελέτη ομάδες. Σε αυτό το στάδιο της ανάλυσης δεν παρατηρήθηκε τάση διαχωρισμού των δύο ομάδων. (Εικόνα 5.3.1)



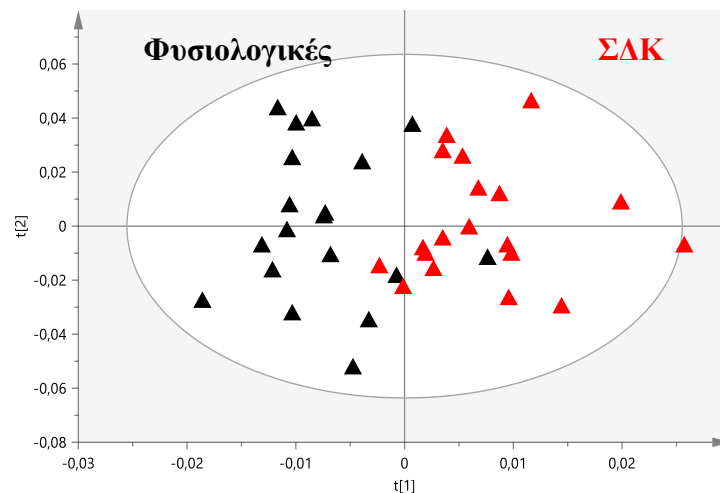
Εικόνα 5.3.1 PCA γράφημα συντεταγμένων  $^1\text{H-NMR}$  πολυμεταβλητών δεδομένων των 19 ασθενών με Σακχαρώδη Διαβήτη κύησης (DB) και των 18 εγκύων χωρίς διαβήτη κύησης (NDB).

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η τεχνική PLS-DA στην οποία τα γραφήματα συντεταγμένων έδειξαν ότι, αν και υπάρχει ένας μικρός βαθμός αλληλοεπικάλυψης, η ομάδα των εγκύων με ΣΔΚ διαχωρίζεται από αυτή των γυναικών χωρίς διαβήτη κύησης. (Εικόνα 5.3.2) Οι τιμές των  $R^2$  και  $Q^2$  παραμέτρων είναι 0.756 και 0.502 αντίστοιχα.



**Εικόνα 5.3.2** Το PLS-DA γράφημα συντεταγμένων των 19 εγκύων γυναικών με διαβήτη κύησης ( ▲DB) και των 18 εγκύων χωρίς διαβήτη κύησης ( ▲NDB)

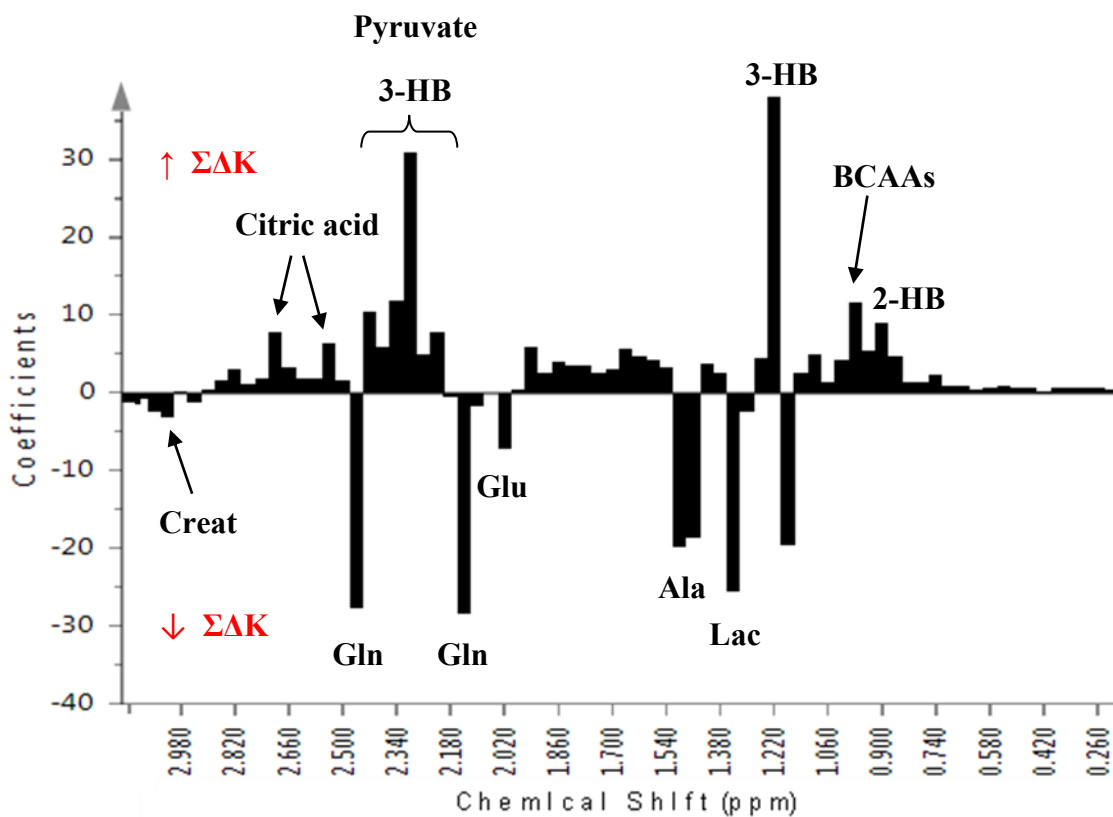
Η μέθοδος Orthogonal Projections to PLS-DA (OPLS-DA) εφαρμόστηκε για να ελαχιστοποιηθεί η συστηματική διακύμανση και να επιτευχθεί μεγαλύτερος βαθμός διάκρισης των δύο υπό μελέτη ομάδων. Από το γράφημα των συντεταγμένων για το OPLS-DA στατιστικό μοντέλο (**Εικόνα 5.3.3**) παρατηρείται μία περαιτέρω βελτίωση του διαχωρισμού των δύο ομάδων το οποίο αντικατοπτρίζεται και στην αύξηση της τιμής των συντελεστών  $R^2$  και  $Q^2$  σε 0.984 και 0.588 αντίστοιχα.



**Εικόνα 5.3.3** Το OPLS-DA γράφημα συντεταγμένων για το στατιστικό μοντέλο του διαβήτη κύησης.

Σύμφωνα με το γράφημα των συντελεστών παλινδρόμησης, για το στατιστικό μοντέλο του διαβήτη κύησης (**Εικόνα 5.3.4**), οι κύριες φασματικές περιοχές που συνέβαλαν στον διαχωρισμό των δυο ομάδων ήταν εκείνες που περιείχαν τους μεταβολίτες 3-υδροξυβουτυρικό, 2-υδροξυβουτυρικό οξύ και τα BCAAs (βαλίνη, λευκίνη, ισολευκίνη) σε

αυξημένα επίπεδα καθώς και οι περιοχές που περιείχαν γαλακτικό οξύ, αλανίνη, γλουταμίνη και γλουταμινικό οξύ σε μειωμένα επίπεδα στις έγκυες με ΣΔΚ σε σύγκριση με εκείνες χωρίς ΣΔΚ. Οι περιοχές αυτές περιέχουν με αλληλοεπικάλυψη περισσότερους από έναν μεταβολίτη και με την διακριτική ικανότητα των συγκεκριμένων φασμάτων ήταν αρκετά δύσκολο να υπολογιστεί η ακριβής περιεκτικότητα των συγκεκριμένων μεταβολιτών. Για το λόγο αυτό, αν και στην μεταβολομική ανάλυση η διάκριση μεταξύ των ομάδων είναι σημαντική, στον ποσοτικό προσδιορισμό εντοπίστηκε μόνο τάση διαφοροποίησης χωρίς στατιστική σημαντικότητα.



Εικόνα 5.3.4 Το γράφημα των συντελεστών παλινδρόμησης για το στατιστικό μοντέλο του διαβήτη κύησης.

# 6

## *ΣΥΖΗΤΗΣΗ*





Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία NMR για τη σύγκριση του μεταβολικού προφίλ στον ορό του αίματος εγκύων με και χωρίς σακχαρώδη διαβήτη κύησης με ποσοτικό προσδιορισμό επιλεγμένων μεταβολιτών καθώς και με μη στοχευμένη ανάλυση του συνολικού μεταβολικού προφίλ. Επίσης, διερευνήθηκαν οι κατάλληλες πειραματικές συνθήκες για το διαχωρισμό των μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους του ορού του αίματος από τα μακρομόρια (πρωτεΐνες, λιπίδια κ.ά.).

Η φασματοσκοπία NMR των βιολογικών υγρών αποδίδει ένα συνολικό αποτύπωμα στο οποίο όλα τα συστατικά που περιέχονται στο βιολογικό δείγμα εμφανίζονται με χαρακτηριστικό για τη δομή τους σήμα, η ένταση των οποίων είναι ανάλογη της συγκέντρωσής τους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, το μεταβολικό προφίλ στον ορό του αίματος γυναικών με διαβήτη κύησης εμφανίζει διαφορές σε σύγκριση με το μεταβολικό προφίλ των γυναικών με φυσιολογική εγκυμοσύνη. Όμως, τα αποτελέσματα των μετρήσεων είναι περιορισμένα σε αριθμό (18 φυσιολογικές γυναίκες και 19 γυναίκες με διαβήτη κύησης) ώστε να προσφέρουν μία σαφή και ολοκληρωμένη εικόνα για τη συσχέτιση του μεταβολικού προφίλ του ορού του αίματος με την παρακολούθηση της πορείας του διαβήτη της κύησης. Σε αρκετά δείγματα της μελέτης παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο καταστάσεων και οι μεταβολές στις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών συμφωνούσαν με τη διεθνή βιβλιογραφία. Κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό επιλεγμένων μεταβολιτών παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση του 2-υδροξυβουτυρικού και οξικού οξέος και μία μικρή, μη σημαντική, αύξηση των επιπέδων της φαινυλαλανίνης, του κιτρικού οξέος, των BCAAs (λευκίνης, ισολευκίνης και βαλίνης) και του μυρμηκικού οξέος. Επίσης, παρατηρήθηκε μία μη στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα της αλανίνης, της γλουταμίνης, του γαλακτικού οξέος και της τυροσίνης. Στη συνέχεια, η μεταβολομική ανάλυση ανέδειξε ένα στατιστικά σημαντικό διαχωρισμό των δύο ομάδων, ο οποίος οφείλεται κυρίως στα αυξημένα επίπεδα των φασματικών περιοχών που περιείχαν τους μεταβολίτες 3-υδροξυβουτυρικό, 2-υδροξυβουτυρικό οξύ και BCAAs και στα μειωμένα επίπεδα των φασματικών περιοχών που περιείχαν τους μεταβολίτες γαλακτικό οξύ, αλανίνη, γλουταμίνη και γλουταμινικό οξύ, μεταβολές οι οποίες χαρακτήριζαν τις έγκυες γυναίκες με ΣΔΚ. Οι διαφορές που παρατηρούνται στα αποτελέσματα της μελέτης μεταξύ των καθιερωμένων ποσοτικών προσδιορισμών και της μεταβολομικής ανάλυσης οφείλονται κυρίως στο ότι οι τεχνικές αναγνώρισης προτύπων λαμβάνουν υπόψη στον προσδιορισμό των μεταβολιτών και όλους τους πιθανούς συγχυτικούς παράγοντες, όπως είναι η ενδοατομική διακύμανση, το συστηματικό πειραματικό σφάλμα (π.χ. θόρυβος του

φάσματος), κ.ά.

Τα **αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας** (BCAAs) βαλίνη, λευκίνη και ισολευκίνη ανήκουν στα απαραίτητα αμινοξέα και αντιπροσωπεύουν το 35% των αμινοξέων των μυϊκών πρωτεϊνών. Λόγω της ιδιαίτερα υδρόφοβης φύσης τους παίζουν καθοριστικό ρόλο στη σταθερότητα των αναδιπλωμένων δομών των πρωτεϊνών. Επίσης, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό καθώς συμμετέχουν στη ρύθμιση της σύνθεσης των μυϊκών πρωτεϊνών, στην έκκριση ινσουλίνης και στην πρόσληψη αμινοξέων από τον εγκέφαλο.[76]

Συμπληρώματα διατροφής ή δίαιτες πλούσιες σε BCAAs έχουν συσχετισθεί με θετικές επιδράσεις στη ρύθμιση του σωματικού βάρους, στη σύνθεση μυϊκών πρωτεϊνών για την αντιμετώπιση της σαρκοπενίας και στην ομοιοστάση της γλυκόζης.[77]

Ωστόσο, τα επίπεδα των BCAAs τείνουν να είναι αυξημένα σε άτομα με παχυσαρκία και να έχουν προγνωστική αξία για την εμφάνιση αντίστασης στην ινσουλίνη ή σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (T2DM). Στο ΣΔ της κύησης, ένας μικρός αριθμός μελετών έχει επισημάνει την παρουσία αυξημένων επιπέδων των αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας στα πρώιμα στάδια της κύησης.[55-57]

Ένας από τους υποθετικούς μηχανισμούς που συνδέει τα αυξημένα επίπεδα BCAAs με τον T2DM περιλαμβάνει τη διαμέσου της λευκίνης ενεργοποίηση του mTORC1 (το σύμπλεγμα στόχου της ραπαμκίνης στα θηλαστικά), ο οποίος είναι ένας κύριος ρυθμιστής της πρωτεϊνοσύνθεσης, της σύνθεσης λιπιδίων, της μεταγραφής γονιδίων και των μονοπατιών αυτοφαγίας. Η αυξημένη ενεργοποίηση του mTORC1 οδηγεί σε αυξημένη ενεργοποίηση της ριβοσωμικής πρωτεϊνικής κινάσης S6 (S6K1), η οποία στη συνέχεια αλληλεπιδρά αρνητικά με το υπόστρωμα του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS-1) και οδηγεί σε μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη.[54,58,59]

Μολονότι τις προηγούμενες δεκαετίες έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί για το πώς τα αυξημένα επίπεδα BCAA θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αντίσταση στην ινσουλίνη ή σε παχυσαρκία, πιο πρόσφατες μελέτες θεωρούν ότι τα αυξημένα επίπεδα BCAA είναι πιθανότερο να είναι ένας δείκτης της μείωσης της δράσης της ινσουλίνης και όχι η αιτία της.

Στην παρούσα μελέτη, τα αυξημένα επίπεδα λευκίνης, ισολευκίνης και βαλίνης που παρατηρήθηκαν είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες.

Το **2-υδροξυβουτυρικό οξύ** (α-υδροξυβουτυρικό οξύ, α-HB) είναι ένα οργανικό οξύ το οποίο κατέχει κομβική θέση στον ενδιάμεσο μεταβολισμό και ιδιαίτερα στον καταβολισμό των αμινοξέων και τη σύνθεση της γλουταθειόνης. Σχηματίζεται ως παραπροϊόν κατά το σχηματισμό του α-κετοβουτυρικού οξέος (α-KB) το οποίο παράγεται από τον καταβολισμό των αμινοξέων θρεονίνη και μεθειονίνη και τον αναβολισμό της γλουταθειόνης.[67-70]

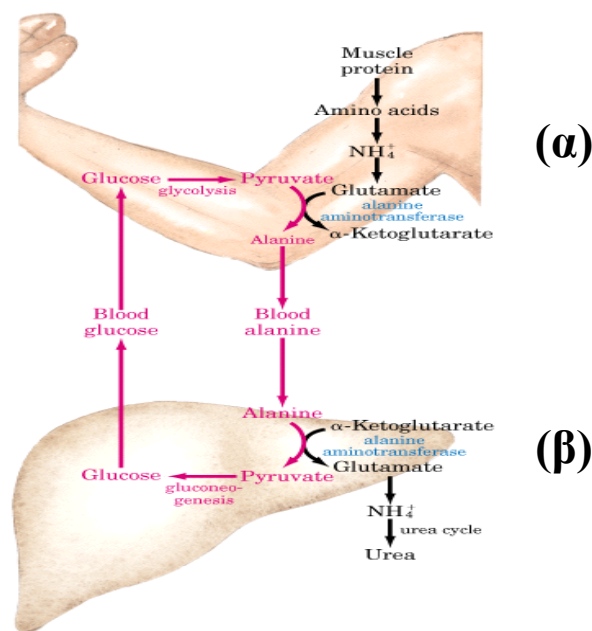
Θεωρείται ότι τα επίπεδα του α-HB αυξάνονται κυρίως: 1) σε κατάσταση αυξημένου ηπατικού στρες, η οποία οδηγεί σε αυξημένες ανάγκες παραγωγής γλουταθειόνης και 2) στην παρουσία υψηλού λόγου NADH/NAD<sup>+</sup> λόγω αυξημένης οξειδωσης των λιπαρών οξέων που συνοδεύει την αντίσταση στην ινσουλίνη.[1,3,5,72]

Πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν το α-HB ως ένα πιθανό πρώιμο δείκτη αντίστασης στην ινσουλίνη και διαταραχών της ομοιόστασης της γλυκόζης. [67] Στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα του α-HB ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα στις έγκυες γυναίκες με ΣΔ κύησης, ένα εύρημα το οποίο αναφέρεται για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία.

Το **3-υδροξυβουτυρικό οξύ** (3-HB ή β-HB) μαζί με το ακετοξικό οξύ και την ακετόνη αποτελούν την ομάδα των κετονικών σωμάτων τα οποία παράγονται από το ακετύλο-CoA, κυρίως στα μιτοχόνδρια των ηπατικών κυττάρων, κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων. Σε φυσιολογικές συνθήκες η παραγωγή κετονικών σωμάτων (κετογένεση) λαμβάνει χώρα σε μικρό και ελεγχόμενο βαθμό, ενώ σε καταστάσεις έλλειψης υδατανθράκων στις οποίες η παραγωγή ενέργειας γίνεται από τα λιπαρά οξέα, η συγκέντρωσή τους στο αίμα είναι αυξημένη. Η παραγωγή κετονοσωμάτων αυξάνεται επίσης όταν δεν υπάρχει επαρκής ποσότητα ινσουλίνης, όπως στον Σακχαρώδη Διαβήτη. Στο διαβήτη κύησης, αυξάνεται ο καταβολισμός των κετογονικών αμινοξέων (λευκίνη, ισολευκίνη) στους σκελετικούς μύες και τον πλακούντα με αποτέλεσμα το σχηματισμό ακετύλο-CoA στα ηπατικά κύτταρα. Στη συνέχεια, το ακετύλο-CoA εκτρέπεται από τον κύκλο του κιτρικού οξέος προς το σχηματισμό κετονοσωμάτων (3-υδροξυβουτυρικό οξύ). Έτσι, εκτός από την β-οξειδωση των λιπαρών οξέων, η παραγωγή κετονοσωμάτων αυξάνεται και μέσω αυτής της οδού. [50,61-66,72-75]

Η **αλανίνη** είναι ένα μη απαραίτητο, γλυκογενετικό αμινοξύ. Σε καταστάσεις παρατεταμένης άσκησης ή αστίας λειτουργεί ως μεταφορέας του αζώτου που παράγεται από τον καταβολισμό των αμινοξέων στους μύες από το ήπαρ (Εικόνα 6.1α-β).[71] Με τη δράση του ενζύμου αμινοτρανσφεράση της αλανίνης, το πυροσταφυλικό προσλαμβάνει το άζωτο με την μορφή αμινομάδας από το γλουταμικό και μετατρέπεται σε αλανίνη (Εικόνα 6.1α). Στη συνέχεια, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, η αλανίνη μεταφέρεται στο ήπαρ, όπου

μετατρέπεται εκ νέου σε πυροσταφυλικό, το οποίο χρησιμοποιείται για την παραγωγή οξαλοξικού και γλυκόζης (Εικόνα 6.1β). Στο διαβήτη της κήσης έχουμε αυξημένη παραγωγή κετονοσωμάτων λόγω της αύξησης της β-οξείδωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων (παρατηρήθηκαν επίσης αυξημένα επίπεδα 3-υδροξυβουτυρικού οξέος στη παρούσα διπλωματική μελέτη). [1,3,5] Τα κετονοσώματα αναστέλλουν τη γλυκόλυση και έτσι η μειωμένη συγκέντρωση πυροσταφυλικού στους σκελετικούς μύες οδηγεί κατά συνέπεια και σε μειωμένη σύνθεση αλανίνης. [72] Τα μειωμένα επίπεδα αλανίνης που παρατηρήθηκαν σε έγκυες γυναίκες με σακχαρώδη διαβήτη της κήσης σε αυτή την εργασία είναι σε συμφωνία με τον προαναφερθέντα βιοχημικό δρόμο.



Εικόνα 6.1 Κύκλος αλανίνης.

Η γλουταμίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό καθώς συμμετέχει σε πολλούς βιοχημικούς δρόμους. Είναι ένας από τους κύριους δότες αζώτου στη βιοσύνθεση των αμινοξέων (θρυπτοφάνη και ιστιδίνη) και σε αναβολικές πορείες που οδηγούν στο σχηματισμό αζωτούχων ενώσεων, όπως οι πουρίνες. Χρησιμοποιείται από τον οργανισμό ως μεταφορέας αμμωνίας στο αίμα και ως μέσο παραγωγής ενέργειας (γλυκογενετικό αμινοξύ). [50] Τα επίπεδα της γλουταμίνης ακολουθούν παρόμοια πορεία με αυτή της αλανίνης. Στο διαβήτη της κήσης, τα αυξημένα κετονοσώματα εμποδίζουν τον καταβολισμό των BCAAs στους σκελετικούς μύες και τη σύνθεση αλανίνης με αποτέλεσμα τη μειωμένη τρανσαμίνωση του γλουταμικού για το σχηματισμό γλουταμίνης. [72,73] Τα χαμηλά επίπεδα

γλουταμίνης που βρέθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη επιβεβαιώνουν την πορεία αυτού του μηχανισμού.

Το **γαλακτικό οξύ** είναι ένας μεταβολίτης που παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιοχημικές διεργασίες και παράγεται στους ενεργούς σκελετικούς μύες όταν η ταχύτητα της γλυκόλυσης υπερβαίνει την ταχύτητα του οξειδωτικού μεταβολισμού. Το γαλακτικό οξύ μετατρέπεται άμεσα σε πυροσταφυλικό με τη δράση της γαλακτικής αφυδρογονάσης. [50] Στο διαβήτη της κύησης τα κετονοσώματα αναστέλλουν τη γλυκόλυση με αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή γαλακτικού οξέος, η οποία στη συνέχεια οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση πυροσταφυλικού οξέος. [1,3,5,72,73] Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος είχε μία τάση μείωσης στις γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης.



# 7

## ***ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ***

Η Μεταβολομική με βάση τη φασματοσκοπία NMR αποτελεί αναδυόμενη αναλυτική προσέγγιση, η οποία θα μπορούσε να συμβάλλει στην πρόγνωση και τη διάγνωση του Σακχαρώδη Διαβήτη Κύησης, αξιοποιώντας τις πολυπαραγοντικές μεταβολές του μεταβολικού προφίλ και όχι ανιχνεύοντας μεμονωμένες αλλαγές. Επίσης μπορεί να προσφέρει νέες προοπτικές όσον αφορά την παθοφυσιολογία της νόσου.

Ο προσδιορισμός των μεταβολιτών στο διαβήτη της κύησης απαιτεί μία πιο εκτεταμένη έρευνα σε μεγάλες ομάδες πληθυσμών πριν εφαρμοστεί στην κλινική πράξη. Οι μελέτες αυτές πιθανά θα οδηγήσουν στο σχεδιασμό ολοκληρωμένων διαγνωστικών μοντέλων με σκοπό την κατανόηση των διαταραχών του μεταβολισμού που συνοδεύουν το διαβήτη κύησης, την έγκαιρη διάγνωση και τη βέλτιστη παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπευτικής αγωγής, παράμετροι οι οποίοι θα συμβάλλουν στη βελτίωση της ποιότητας ζωής των μητέρων και των νεογνών.





# 8

## ***ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ***

1. Frank H. Netter M.D., Marschall S. Runge MD PhD, M. Andrew Greganti MD, Παθολογία – Βασικές Αρχές, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης Ιατρική Βιβλιοθήκη σελ. 702 - 707.
2. Αριστείδης Αντσακλής, Μαιευτική & Γυναικολογία, Β' Έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε., σελ. 342 – 345.
3. Δημητρίου Ε. Λώλη, Γυναικολογία και Μαιευτική, Γ' Έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε., σελ 963 – 965.
4. Nicholas A. Boon MA MD FRCP (Ed) FESC, Nicki R. Colledge BSC FRCP (Ed), Brian R. Walker BSC MD FRCP (Ed), John A. A. Hunter OBE BA MD FRCP (Ed), Davidson's Γενικές Αρχές και Κλινική Πράξη της Ιατρικής, 20<sup>η</sup> Έκδοση, 3<sup>η</sup> Ελληνική Έκδοση, Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιανού Α.Ε., σελ 818 – 819.
5. Baz Baz, Jean-Pierre Riveline and Jean-Francois Gautier, Endocrinology of Pregnancy, Gestational diabetes mellitus: definition, aetiological and clinical aspects, Review, European Journal of Endocrinology, 174:2, R43 – R51.
6. Jamie V. de Seymour, Cathryn A. Conlon, Karolina Sulek, Silas G. Villas Boas, Lesley M. E. McCowan, Louise C. Kenny, Philip N. Baker, Early pregnancy metabolite

profiling discovers a potential biomarker for the subsequent development of gestational diabetes mellitus, *Acta Diabetol* (2014), 51:887–890.

7. Kunihiro Hashimoto, Masafumi Koga, Indicators of glycemic control in patients with gestational diabetes mellitus and pregnant women with diabetes mellitus, *World Journal of Diabetes*, 2015 July 25; 6(8): 1045-1056.
8. Clantha Padayachee, Jeff S Coombes, Exercise guidelines for gestational diabetes mellitus, *World J Diabetes* 2015 July 25; 6(8): 1033-1044.
9. Lisa Hartling, Ph.D., Donna M., Dryden, Ph.D., Alyssa Guthrie, M.S.Sc., Melanie Muise, M.A., Ben Vandermeer, M.Sc., Walie M. Aktary, B.Sc., B.Ed., Dion Pasichnyk, B.Sc., Jennifer C. Seida, M.P.H., Screening and Diagnosing Gestational Diabetes Mellitus, Evidence Report/Technology Assessment Number 210, October 2012.
10. John P. Kirwan, Sylvie Hauguel-De Mouzon, Jacques Lepercq, Jean-Claude Challier, Lorraine Huston-Presley, Jacob E. Friedman, Satish C. Kalhan and Patrick M. Catalano, TNF-a Is a Predictor of Insulin Resistance in Human Pregnancy, *DIABETES*, VOL. 51, JULY 2002, pages 2207 – 2213.
11. Jacob E. Friedman, John P. Kirwan, Ming Jing, Lorraine Presley and Patrick M. Catalano, Increased Skeletal Muscle Tumor Necrosis Factor-a and Impaired Insulin Signaling Persist in Obese Women With Gestational Diabetes Mellitus 1 Year Postpartum, *DIABETES*, VOL. 57, MARCH 2008, pages 606 – 613.
12. Lara J. Monteiro, Jane E. Norman, Gregory E. Rice, Sebastian E. Illanes, Fetal programming and gestational diabetes mellitus, *Placenta xxx* (2015), pages 1-7.
13. Ai-hua Zhang, Shi Qiu, Hong-ying Xu, Hui Sun, Xi-jun Wang, Metabolomics in Diabetes, *Clinica Chimica Acta* 429 (2014), pages 106–110.
14. H. David McIntyre, MD, FRACP, Boyd E. Metzger, MD, Donald R. Coustan, MD, Alan R. Dyer, PhD, David R. Hadden, MD, Moshe Hod, MD, Lynn P. Lowe, PhD, Jeremy J.N. Oats, MD, Bengt Persson, MD, PhD, Counterpoint: Establishing Consensus in the Diagnosis of GDM Following the HAPO Study, *Curr Diab Rep.* 2014 June ; 14(6): 497.
15. Mark B. Landon, M.D., Catherine Y. Spong, M.D., Elizabeth Thom, Ph.D., Marshall W. Carpenter, M.D., Susan M. Ramin, M.D., Brian Casey, M.D., Ronald J. Wapner, M.D., Michael W. Varner, M.D., Dwight J. Rouse, M.D., John M. Thorp, Jr., M.D., Anthony Sciscione, D.O., Patrick Catalano, M.D., Margaret Harper, M.D., George Saade, M.D., Kristine Y. Lain, M.D., Yoram Sorokin, M.D., Alan M. Peaceman, M.D., Jorge E. Tolosa, M.D., M.S.C.E., and Garland B. Anderson, M.D., A Multicenter, Randomized Trial of

Treatment for Mild Gestational Diabetes, *The New England Journal of Medicine* (2009) 361:1339-48.

**16.** Joana Pinto, Lara M. Almeida, Ana S. Martins, Daniela Duarte, Antonio S. Barros, Eulalia Galhano, Cristina Pita, Maria do Ceu Almeida, Isabel M. Carreira, Ana M. Gil, Prediction of Gestational Diabetes through NMR Metabolomics of Maternal Blood, *Journal of Protein Research* (2015) 14, pages 2696–2706.

**17.** Ebru Tarim, Tayfun Bagis, Esra Kilisdag , Serkan Erkanli, Ergodan Aslan, Nurzen Sezgin, Esra Kuscu, Elevated plasma homocysteine levels in gestational diabetes mellitus, *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 2004: 83: pages 543-547.

**18.** Rhonda Bentley-Lewis, Jennifer Huynh, Grace Xiong, Hang Lee, Julia Wenger, Clary Clish, David Nathan, Ravi Thadhani, Robert Gerszten, Metabolomic profiling in the prediction of Gestational Diabetes Mellitus, *Diabetologia* (2015) 58: pages 1329–1332.

**19.** Jennifer Huynh, Grace Xiong, and Rhonda Bentley-Lewis, Systematic review A systematic review of metabolite profiling in gestational diabetes mellitus, *Diabetologia*, 2014 December, 57 (12) pages: 2453–2464.

**20.** Joanna Hajduk, Agnieszka Klupczynska, Paweł Derezinski, Jan Matysiak, Piotr Kokot, Dorota M. Nowak, Marzena Gajecka, Ewa Nowak-Markwitz and Zenon J. Kokot, A Combined Metabolomic and Proteomic Analysis of Gestational Diabetes Mellitus, *International Journal of Molecular Sciences* 2015, 16, pages 30034–30045.

**21.** J. K. Nicholson and I. D. Wilson, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 1989, 21, 449-501.

**22.** J.K.Nicholson, J.C.Lindon and E.Holmes, “Metabonomics”:Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data, *Xenobiotica*, 1999, vol.29, No.11, 1181-1189.

**23.** Fiehn O., *Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes*, *Plant Molecular Biology*, 48, 155-171.

**24.** Vassilios Fanos, Luigi Atzori, Karina Makarenko, Gian Benedetto Melis, Enrico Ferrazzi, *Metabolomics Application in Maternal-Fetal Medicine*, Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 720514, pages 1-10.

**25.** Natalie J. Serkova, Theodore J. Standiford and Kathleen A. Stringer, The Emerging Field of Quantitative Blood Metabolomics for Biomarker Discovery in Critical Illnesses, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* Vol 184, 2011, pages 647-655.

26. Jeremy K. Nicholson, Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology, *Molecular Systems Biology* (2006).
27. Pasi Soininen, Antti J. Kangas, Peter Wurtz, Taru Tukiainen, Tuulia Tynkkynen, Reino Laatikainen, Marjo-Riitta Jarvelin, Mika Kahonen, Terho Lehtimäki, Jorma Viikari, Olli T. Raitakari, Markku J. Savolainen, Mika Ala-Korpela, High-throughput serum NMR metabolomics for cost-effective holistic studies on systemic metabolism, *The Royal Society of Chemistry, Analyst*, 2009, 134 pages 1781-1785.
28. Jeremy K. Nicholson, John Connelly, John C. Lindon and Elaine Holmes, Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1, 153-161.
29. Nele Friedrich, Metabolomics in diabetes research, *Journal of Endocrinology* (2012) 215, pages 29-42.
30. Jeremy K. Nicholson, John Connelly, John C. Lindon and Elaine Holmes, Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1, 153-161.
31. Angelica Dessi, Flaminia Cesare Marincola, Vassilios Fanos, Metabolomics and the great obstetrical syndromes-GDM, PET and IUGR, *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 29 (2015), pages 156-164.
32. Silvia O. Diaz, Joana Pinto, Goncalo Graca, Iola F. Duarte, Antonio S. Barros, Eulalia Galhano, Cristina Pita, Maria do Ceu Almeida, Brian J. Goodfellow, Isabel M. Carreira and Ana M. Gil, Metabolic Biomarkers of Prenatal Disorders: An Exploratory NMR Metabonomics Study of Second Trimester Maternal Urine and Blood Plasma, *Journal of Proteome Research*, 2011, 10, pages 3732-3742.
33. Joana Pinto, Antonio S. Barros, Maria Rosario M. Domingues, Brian J. Goodfellow, Eulalia Galhano, Cristina Pita, Maria do Ceu Almeida, Isabel M. Carreira, Ana M. Gil, Following Healthy Pregnancy by NMR Metabolomics of Plasma and Correlation to Urine, *Journal of Proteome Research*, 2015, 14, pages 1263-1274.
34. Danuta Dudzik, Marcin Zorawski, Mariusz Skotnicki, Wieslaw Zarzycki, Gabryela Kozłowska, Katarzyna Bibik-Malinowska, Maria Vallejo, Antonia Garcia, Coral Barbas, M. Pilar Ramos, Metabolic fingerprint of Gestational Diabetes Mellitus, *Journal of Proteomics*, 2014 December, 57 (12) pages: 2453-2464.
35. Wang, Larson, Vason et al., Maternal and Fetal amino acids concentrations in normal pregnancies and in pregnancies with Gestational Diabetes Mellitus, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005, 192, 610-617.

36. John McMurry, Οργανική Χημεία Τόμος I, Κεφάλαιο 13, σελ. 559-576.
37. Erik J. Saude, Carolyn M. Slupsky and Brian D. Sykes, Optimization of NMR analysis of biological fluids for quantitative accuracy, *Metabolomics*, Vol. 2, No. 3, September 2006.
38. Gerothanassis I., Troganis A., Exarchou V. and Barbarossou K., (2002) Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: Basic principles and phenomena, and their applications to chemistry, biology and medicine, *Chemistry education: Research and practice in Europe*, Vol.3, 229-252.
39. Αθ. Βαλαβανίδης, Βασικές Αρχές Μοριακής Φασματοσκοπίας και Εφαρμογές στην Οργανική Χημεία, 2008.
40. L.G Wade, Οργανική Χημεία, 7<sup>η</sup> έκδοση, Withman College, Κεφάλαιο 13, σελ. 483-503.
41. Ron A. Wevers, Udo Engelke and Arend Heerschap, High-Resolution <sup>1</sup>H-NMR Spectroscopy of Blood Plasma for Metabolic Studies, *Clin. Chem.* 40/7, 1245-1250 (1994).
42. Ray O. Bahado-Singh, Ranjit Akolekar, Rupasri Mandal, Edison Dong, Jianguo Xia, Michael Kruger, David S. Wishart & Kypros Nicolaides, Metabolomics and first-trimester prediction of early-onset preeclampsia, *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 2012, 25(10): 1840–1847.
43. Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M., Farrant RD, Lindon JC., 750 MHz <sup>1</sup>H and <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C NMR spectroscopy of human blood plasma, *Anal Chem* 1995; 67: 793-811.
44. G. A. Nagana Gowda, Yashas N. Gowda and Daniel Raftery, Expanding the Limits of Human Blood Metabolite Quantitation Using NMR Spectroscopy, *Anal. Chem.* 2015, 87, 706–715.
45. G. A. Nagana Gowda and Daniel Raftery, Quantitating Metabolites in Protein Precipitated Serum Using NMR Spectroscopy, *Anal. Chem.* 2014, 86, 5433–5440.
46. [www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca)
47. John C. Lindon, Jeremy K. Nicholson and Jeremy R. Everett, NMR Spectroscopy of Biofluids, *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, Volume 38 (1999).
48. Nikolaos Psychogios, David D. Hau, Jun Peng, An Chi Guo, Rupasri Mandal, Souhaila Bouatra, Igor Sinelnikov, Ramanarayan Krishnamurthy, Roman Eisner, Bijaya Gautam, Nelson Young, Jianguo Xia, Craig Knox, Edison Dong, Paul Huang, Zsuzsanna Hollander, Theresa L. Pedersen, Steven R. Smith, Fiona Bamforth, Russ Greiner, Bruce McManus, John W. Newman, Theodore Goodfriend, David S. Wishart, *The Human Serum Metabolome*, February 2011, Volume 6, Issue 2.

49. Νικόλαος Ψυχογιός, Η Χρήση της Μεταβονομικής στη διερεύνηση των νεφρικών παθήσεων, Ιωάννινα, Διδακτορική διατριβή, 2008.
50. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, Βιοχημεία, Τόμος I, 5<sup>η</sup> Έκδοση, 2007.
51. Peter Weurtz, Pasi Soininen, Antti J. Kangas, Tapani Ronemma, Terho Lehtimäki, Mika Kahonen, Jorma S. Viikari, Olli T. Raitakari, Mika Ala-Korpela, Branched-Chain and Aromatic Amino Acids Are Predictors of Insulin Resistance in Young Adults, *Diabetes Care*, Volume 36, March 2013.
52. Kalliopi I. Pappa, Intermediate metabolism in association with the amino acid profile during the third trimester of normal pregnancy and diet-controlled gestational diabetes, *George American Journal of Obstetrics & Gynecology*, January 2007.
53. Najmeh Rahimi, Farideh Razi, Ensieh Nasli-Esfahani, Mostafa Qorbani, Nooshin Shirzad and Bagher Larijani, Amino acid profiling in the gestational diabetes mellitus, *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders* (2017), 16:13.
54. Christopher J. Lynch and H. Adams, Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance, *Nat Rev Endocrinol*. 2014 December, 10(12): 723–736.
55. Christopher B. Newgard, Jie An, James R. Bain, Michael J. Muehlbauer, Robert D. Stevens, Lillian F. Lien, Andrea M. Haqq, Svati H. Shah, Michelle Arlotto, Cris A. Slentz, James Rochon, Dianne Gallup, Olga Ilkayeva, Brett R. Wenner, William S. Yancy, Jr., Howard Eisenson, Gerald Musante, Richard S. Surwit, David S. Millington, Mark D. Butler, and Laura P. Svetkey, A Branched-Chain Amino Acid-Related Metabolic Signature that Differentiates Obese and Lean Humans and Contributes to Insulin Resistance, *Cell Metabolism* 9, 311–326, April 8, 2009.
56. Boyd E. Metzger, Richard L. Phelps, Norbert Freinkel and Irene A. Navickas, Effects of Gestational Diabetes on Diurnal Profiles of Plasma Glucose, Lipids, and Individual Amino Acids, *Diabetes Care*, Vol. 3 No. 3, May-June 1980.
57. Nancy F. Butte, Helen W. Hsu, Mary Thotathuchery, William W. Wong, Jane Khoury, Mspeter Reeds, Protein Metabolism in Insulin-Treated Gestational Diabetes, *Diabetes Care*, Volume 22, Number 5, May 1999.
58. Norman Balcazar Morales, Cecilia Aguilar de Plata, Role of AKT/mTORC1 pathway in pancreatic  $\beta$ -cell proliferation, *Colombia Medica*, Vol. 43, No. 3 (2012).
59. Bodo C. Melnik, Leucine signaling in the pathogenesis of type 2 diabetes and obesity, *World J. Diabetes*, 2012 March 15; 3(3): 38-53.

60. Harper, A.E; Miller, R.M.; Block, K.P., Branched-chain amino acid metabolism, *Annu Rev. Nutr.* 1984, 4, 409-454.
61. Kalkhoff RK, Kandaraki E, Morrow PG, Mitchell TH, Kelber S, Borkowf HI., Relationship between neonatal birth weight and maternal plasma amino acid profiles in lean and obese non-diabetic women and in type I diabetic pregnant women, *Metabolism* 1988; 37: 234-9.
62. Liechty EA, Barone S, Nutt M., Effect of maternal fasting on ovine fetal and maternal branched-chain amino acid transaminase activities, *Biol Neonate* 1987; 52: 166-73.
63. Liechty EA, Polak MJ, Lemons JA, Branched-chain amino acid carbon and nitrogen arteriovenous concentration differences across the ovine fetal hindlimb, *Pediatr. Res.* 1987; 21: 44-8.
64. Loy GL, Quick AN Jr, Hay WW Jr, Meschia G, Battaglia FC, Fennessey PV, Fetoplacental deamination and decarboxylation of leucine, *Am J Physiol* 1990; 259: E492-7.
65. Ronzoni S, Marconi AM, Cetin I, et al., Umbilical amino acid uptake at increasing maternal amino acid concentrations: Effect of a maternal amino acid infusate, *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181: 477-83.
66. Shimomura Y, Murakami T, Nakai N, Nagasaki M, Harris RA., Exercise promotes BCAA catabolism: Effects of BCAA supplementation on skeletal muscle during exercise, *J. Nutr.* 2004; 134: 1583S-7S.
67. De Fronzo RA, Ferrannini E., Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease, *Diabetes Care* (1991) 14: 173–194.
68. Landaas S., The formation of 2-hydroxybutyric acid in experimental animals, *Clin Chim Acta* (1975) 58: 23–32.
69. Pettersen JE., Landaas S., Eldjarn L., The occurrence of 2-hydroxybutyric acid in urine from patients with lactic acidosis, *Clin. Chim. Acta* (1973) 48: 213–219.
70. Lord RS, Bralley JA, Clinical applications of urinary organic acids, *Altern. Med. Rev.* (2008) 13: 205–215.
71. Felig, P., The glucose-alanine cycle, *Metabolism* 1973, 22, 179–207.
72. Thompson JR, Wu G., The effect of ketone bodies on nitrogen metabolism in skeletal muscle, *Comp. Biochem. Physiol. B* 1991; 100: 209-16.
73. Robinson A.M. and Williamson D.H., Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues, *Physiol. Rev.* 60, (1980), 143-187.



74. Menni C, Fauman E, Erte I, et al., Biomarkers for type 2 diabetes and impaired fasting glucose using a nontargeted metabolomics approach, *Diabetes* 2013; 62: 4270–4276.
75. Scholtens DM, Muehlbauer MJ, Daya NR, et al.; Metabolomics reveals broad-scale metabolic perturbations in hyperglycemic mothers during pregnancy, HAPO Study Cooperative Research Group. *Diabetes Care* 2014; 37: 158–166.
76. Brosnan JT, Brosnan ME., Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation, *J. Nutr.* 2006 Jan; 136 (1 Suppl): 207S-11S. Review.
77. Lynch CJ, Adams SH, Branched-chain amino acids in metabolic signaling and insulin resistance, *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014 Dec; 10 (12): 723-36, Epub 2014 Oct 7. Review.
78. Dumas, M. E., Maibaum, E. C., Teague, C., Ueshima, H., Zhou, B., Lindon, J. C, Nicholson, J.K., Stamler, J., Elliott, P., Chan, Q. and Holmes E. (2006) Assessment of analytical reproducibility of  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy based metabolomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal. Chem.* 78, 2199-2208.
79. Solanky, K. S., Bailey, N. J., Beckwith-Hall, B. M., Bingham, S., Davis, A., Holmes, E., Nicholson, J. K. and Cassidy, A. (2005) Biofluid  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomic techniques in nutrition research - metabolic effects of dietary isoflavones in humans. *J. Nutr. Biochem.* 16, 236-244.
80. Nicholson, J. K., Foxall, P. J., Spraul, M., Farrant, R. D. and Lindon, J. C. (1995) 750 MHz  $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal. Chem.* 67, 793-811.

