



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Χημείας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Αυτόματη Ταυτοποίηση και Ποσοτικοποίηση μεταβολιτών σε
υδατικά εκχυλίσματα κοπράνων μέσω Φασματοσκοπίας
Πρωτονιακού Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^1H
NMR)**

Γερολιόλιου Βασιλική (ΑΜ. 1499)

Επιβλέπων καθηγητής:

Παντελεήμων Τάκης

Ιωάννινα, 2026

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των μεταπτυχιακών σπουδών μου στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και πραγματεύεται την ανάπτυξη και εφαρμογή υπολογιστικών μεθόδων για την επεξεργασία φασματικών δεδομένων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού Πρωτονίου (^1H NMR) σε δείγματα υδατικού εκχυλίσματος κοπράνων. Η επιλογή του συγκεκριμένου θέματος βασίστηκε στο ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον που παρουσιάζει τα τελευταία χρόνια η μεταβολομική ανάλυση και ειδικότερα η μελέτη της εντερικής μικροχλωρίδας μέσω σύγχρονων φασματοσκοπικών τεχνικών. Το ενδιαφέρον αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι, σε σύγκριση με άλλα βιολογικά υγρά, οι μελέτες που αφορούν το εντερικό μικροβίωμα και τα δείγματα κοπράνων παραμένουν περιορισμένες. Παράλληλα, η έλλειψη τυποποιημένων μεθόδων ανάλυσης κοπράνων, καθώς και η ανομοιογένεια της σύνθεσής τους, καθιστούν ιδιαίτερα απαιτητική την ανάπτυξη αξιόπιστων αναπαραγωγίμων πρωτοκόλλων επεξεργασίας και ανάλυσης. Ακόμη, η αξιοποίηση υπολογιστικά αποδοτικών εργαλείων για την ανάλυση πολύπλοκων φασματικών δεδομένων αποτελεί σημαντικό πεδίο έρευνας, καθώς συμβάλλει στην εξαγωγή αξιόπιστων και αναπαραγωγίμων αποτελεσμάτων.

Στόχος της εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας εύχρηστης, αξιόπιστης και υπολογιστικά αποδοτικής μεθοδολογίας σε περιβάλλον MATLAB για την επεξεργασία και ανάλυση φασμάτων ^1H NMR, με σκοπό τον μεταβολικό χαρακτηρισμό δειγμάτων κοπράνων και τη διερεύνηση της μεταβολικής δραστηριότητας της εντερικής μικροχλωρίδας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Παντελεήμων Τάκη, για την πολύτιμη καθοδήγηση, τις συμβουλές και τη συνεχή υποστήριξη του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη αναπτύσσει και εφαρμόζει έναν υπολογιστικά αποδοτικό αλγόριθμο χαμηλού υπολογιστικού φόρτου σε περιβάλλον MATLAB για την επεξεργασία και ανάλυση φασματικών δεδομένων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (Proton Nuclear Magnetic Resonance, ^1H NMR) από δείγματα υδατικού εκχυλίσματος κοπράνων (fecal water samples, FW). Στόχος της μελέτης είναι η ανάπτυξη μιας αξιόπιστης, αναπαραγωγίμης και εύχρηστης μεθοδολογίας για τον μεταβολικό χαρακτηρισμό δειγμάτων κοπράνων και τη διερεύνηση της μεταβολικής δραστηριότητας της εντερικής μικροχλωρίδας.

Για την αναγνώριση, τον χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα σύνολα φασμάτων ^1H NMR, με έμφαση στα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (Short – Chain Fatty Acids, SCFAs) και άλλες βιολογικές σημαντικές ενώσεις (αμινοξέα, σάκχαρα, αλκοόλες κ.α). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των λογισμικών MATLAB (MathWorks R2024b), Chenomx NMR Suite 10.1, GraphPad Prism 10, TopSpin 4.5.0, καθώς και της πλατφόρμας SMoIESY.

Με βάση τη γνωστή τιμή χημικής μετατόπισης του οξικού οξέος και αξιοποιώντας καθιερωμένες σχέσεις συσχέτισης μεταξύ μεταβολιτών, ο προτεινόμενος αλγόριθμος κατέστη ικανός να προβλέπει τις χημικές μετατοπίσεις 30 μεταβολιτών, διευκολύνοντας την αυτοματοποιημένη ταυτοποίηση κορυφών και τη βελτιωμένη ερμηνεία των φασμάτων. Η προτεινόμενη ροή εργασίας επιτρέπει τόσο την απόλυτη όσο και τη σχετική ποσοτικοποίηση μεταβολιτών. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω εξωτερικών καμπυλών βαθμονόμησης σε υδατικά διαλύματα για κάθε μεταβολίτη ενδιαφέροντος, ενώ η σχετική ποσοτικοποίηση βασίστηκε στην ολοκλήρωση ενός χαρακτηριστικού σήματος συντονισμού πρωτονίου (^1H) ανά μεταβολίτη, επιτρέποντας τη συνεπή συγκριτική αξιολόγηση μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων.

Για την αξιολόγηση της μεθοδολογίας ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης υπολογίστηκαν, για κάθε μεταβολίτη, τα όρια ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ), το ποσοστό ανάκτησης (% recovery), το ποσοστό εμφάνισης (% occurrence), οι τιμές z-score, καθώς και το αντίστοιχο πειραματικό σφάλμα ($\pm$ σφάλμα). Επιπλέον, αξιολογήθηκαν η

γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) των τιμών χημικής μετατόπισης (δ , ppm), η Ρίζα Μέσου Τετραγωνικού Σφάλματος - Root Mean Square Error (RMSE) και Relative Root Mean Square Error (RRMSE) και αξιολογήθηκαν η επαναληψιμότητα και η αξιοπιστία της αναλυτικής διαδικασίας, επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητα της προτεινόμενης προσέγγισης για μεταβολομικές εφαρμογές. Η συνδυαστική αυτή μεθοδολογία συμβάλλει στη βελτίωση της ακρίβειας, της συγκρισιμότητας και της ταχύτητας ανάλυσης φασμάτων ^1H NMR δειγμάτων κοπράνων, προσφέροντας ένα αποτελεσματικό εργαλείο για μελέτες μεταβολομικής με απώτερο σκοπό τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ εντερικής μικροχλωρίδας και ανθρώπινης υγείας.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Μεταβολομική (Metabolomics)	7
1.2 Εντερικό μικροβίωμα και μεταβολίτες	9
1.2.1 Λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (Short – Chain Fatty Acids, SCFAs)	10
<i>Χημική δομή και ιδιότητες</i>	10
<i>Παραγωγή και Μικροβιακή σύνθεση</i>	10
<i>Βιολογικές λειτουργίες</i>	11
1.2.2 Αμινοξέα (Amino acids)	11
<i>Χημική δομή και ιδιότητες</i>	11
<i>Μικροβιακός μεταβολισμός και Παραγωγή μεταβολιτών</i>	12
<i>Βιολογικές λειτουργίες</i>	12
1.2.3 Σάκχαρα και μεταβολισμός υδατανθράκων στο εντερικό μικροβίωμα	13
<i>Χημική δομή και ιδιότητες</i>	13
<i>Μικροβιακή ζύμωση και Μεταβολισμός υδατανθράκων</i>	13
<i>Βιολογικές λειτουργίες</i>	14
1.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance – NMR)	14
1.3.1 Βασικές αρχές φασματοσκοπίας NMR	14
1.3.2 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός – Συχνότητα Larmor	14
1.3.3 Spin Relaxation	15
1.3.4 Χημική Μετατόπιση	16
1.3.5 Spin–Spin Coupling και Πολλαπλότητα Σημάτων	18
1.3.6 Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί της Φασματοσκοπίας ^1H NMR στη Μεταβολομική	20
1.3.7. Μεταβολομική ανάλυση με Φασματοσκοπία ^1H NMR	22
<i>Μεταβολικό προφίλ (Profiling)</i>	22
<i>Μεταβολικό αποτύπωμα (Fingerprinting)</i>	22
1.3.8 Εφαρμογές της Φασματοσκοπίας ^1H NMR στη μελέτη του εντερικού μικροβιώματος	23
1.4 Ταυτοποίηση μεταβολιτών ενδιαφέροντος στη Φασματοσκοπία ^1H NMR	23
1.5 Ποσοτικοποίηση μεταβολιτών ενδιαφέροντος στη Φασματοσκοπία ^1H NMR	25

1.6 Σκοπός της μελέτης	27
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	27
2.1 Δείγματα.....	27
2.2 Προετοιμασία δειγμάτων υδατικού εκχυλίσματος κοπράνων	28
2.3 Συνθήκες καταγραφής φασμάτων ¹ H-NMR.....	29
2.4 Επεξεργασία φασματικών δεδομένων και υπολογιστική ανάλυση	30
2.4.1 Ανάπτυξη υπολογιστικής μεθοδολογίας για την εξαγωγή φασματικών χαρακτηριστικών	35
2.5 Μεθοδολογία Ποσοτικοποίησης Μεταβολιτών (Quantification of Metabolites)	37
2.5.1 Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative Quantification)	39
2.5.2 Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute Quantification)	40
2.5.3 Όριο Ανίχνευσης (LOD) - Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ) και Ποσοστό Εμφάνισης (% occurrence)	42
2.5.4 Αξιολόγηση επιδράσεων μήτρας και ποσοστό ανάκτησης (% Retrieval)	43
3. Αποτελέσματα.....	44
3.1 Εφαρμογή του αλγορίθμου στην ταυτοποίηση μεταβολιτών	44
3.2 Εφαρμογή του αλγορίθμου στην ποσοτικοποίηση μεταβολιτών	55
3.2.1 Όριο ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) – Ποσοστό εμφάνισης (% Occurrence)	61
4. Συζήτηση	64
5. Συμπεράσματα.....	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	68

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεταβολομική

Η Μεταβολομική (Metabolomics) αποτελεί έναν από τους πλέον αναπτυσσόμενους κλάδους των omics επιστημών και επικεντρώνεται στη συστηματική μελέτη των μικρών μορίων που βρίσκονται σε ένα βιολογικό σύστημα, γνωστών ως μεταβολιτών.^{1,2} Οι μεταβολίτες αποτελούν συνήθως μικρά μόρια, τα οποία παράγονται ή καταναλώνονται κατά τη διάρκεια μεταβολικών διεργασιών² και αντανακλούν τη βιοχημική δραστηριότητα ενός οργανισμού.³ Πρόκειται για ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού⁴ και περιλαμβάνουν μικρά οργανικά μόρια, χημικές οντότητες καθώς και ανόργανα ιόντα.⁵

Οι omics επιστήμες αποτελούν σύγχρονους κλάδους της συστημικής βιολογίας που μελετούν συνολικά διαφορετικά επίπεδα βιολογικής πληροφορίας ενός οργανισμού, όπως το γονιδίωμα (Genome), το πρωτέωμα (Proteome) και το μεταβόλωμα (Metabolome).^{4,6} Στις σημαντικότερες omics επιστήμες περιλαμβάνονται η γονιδιωματική (genomics), η πρωτεωμική (proteomics), η μεταβολομική (metabolomics) και η μεταγραφωμική (transcriptomics), οι οποίες συμβάλλουν στην κατανόηση πολύπλοκων βιολογικών και μεταβολικών διεργασιών.^{7,8}

Σε αντίθεση με το γονιδίωμα και το πρωτέωμα, τα οποία παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το γενετικό υπόβαθρο και την έκφραση πρωτεϊνών αντίστοιχα, το μεταβόλωμα αντανακλά άμεσα τη βιοχημική και μεταβολική κατάσταση ενός οργανισμού.^{9,10} Ο όρος μεταβόλωμα αναφέρεται στο σύνολο των μεταβολιτών που ανιχνεύονται σε ένα βιολογικό δείγμα, όπως αίμα, ούρα, σάλιο, εγκεφαλονωτιαίο υγρό ή δείγματα κοπράνων.¹¹ Οι μεταβολίτες περιλαμβάνουν ευρύ φάσμα χημικών ενώσεων, όπως αμινοξέα, οργανικά οξέα, λιπίδια, σάκχαρα, νουκλεοτίδια και προϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού. Η συγκέντρωση και η κατανομή των ενώσεων αυτών επηρεάζονται από ποικίλους παράγοντες, όπως η διατροφή, η ηλικία, το περιβάλλον, η φαρμακευτική αγωγή, η φυσιολογική κατάσταση και η παρουσία νοσημάτων.¹²⁻¹⁴

Η μεταβολομική διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύγχρονη βιοϊατρική έρευνα, καθώς επιτρέπει την κατανόηση πολύπλοκων βιοχημικών μηχανισμών και τη διερεύνηση μεταβολικών μεταβολών που σχετίζονται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις.^{15,16}

Μέσω της ανάλυσης μεταβολιτών είναι δυνατή η αναγνώριση βιοδεικτών¹⁷ για τη διάγνωση, πρόγνωση και παρακολούθηση ασθενειών, καθώς και η αξιολόγηση της επίδρασης θεραπευτικών παρεμβάσεων.¹⁸ Για το λόγο αυτό η μεταβολομική εφαρμόζεται ευρέως σε πεδία όπως η κλινική χημεία¹⁹, η φαρμακολογία²⁰, η τοξικολογία, η διατροφική επιστήμη²¹⁻²³ και η μικροβιολογία^{16,24}.

Η ανάλυση μεταβολιτών πραγματοποιείται με τη χρήση σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών υψηλής ευαισθησίας και ακρίβειας, με κυριότερες τη φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry) και τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR).²⁵ Οι τεχνικές αυτές επιτρέπουν την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεγάλου αριθμού μεταβολιτών σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα, όπως βιολογικά υγρά και κοπρανώδη δείγματα, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για το συνολικό μεταβολικό προφίλ ενός οργανισμού.^{19,25}

Μεταξύ των διαθέσιμων αναλυτικών προσεγγίσεων, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού κατέχει ιδιαίτερη θέση στη μεταβολομική ανάλυση, καθώς συνδυάζει υψηλή αναπαραγωγιμότητα, μη καταστρεπτική ανάλυση του δείγματος και δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης πολλών μεταβολιτών χωρίς εκτεταμένη προετοιμασία δείγματος.⁵ Για το λόγο αυτό, η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται ευρέως στη μελέτη πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων και αποτελεί βασικό εργαλείο για την ανάλυση του μεταβολικού προφίλ. Η αρχή λειτουργίας και οι βασικές εφαρμογές της φασματοσκοπίας ¹H-NMR στη μεταβολομική ανάλυση παρουσιάζονται αναλυτικά σε επόμενη ενότητα.

Ανάλογα με τον ερευνητικό στόχο της εκάστοτε μελέτης, η μεταβολομική ανάλυση διακρίνεται σε δύο βασικές προσεγγίσεις, τη στοχευμένη (targeted) και τη μη στοχευμένη (untargeted) μεταβολομική. Η στοχευμένη προσέγγιση επικεντρώνεται στην ανάλυση συγκεκριμένων, προκαθορισμένων ομάδων μεταβολιτών, των οποίων η χημική ταυτότητα και οι συγκεντρώσεις είναι ήδη γνωστές, επιτρέποντας έτσι την υψηλή ακρίβεια και την αξιόπιστη ποσοτικοποίησή τους. Αντίθετα, η μη στοχευμένη μεταβολομική αποσκοπεί στην όσο το δυνατόν πιο ολοκληρωμένη καταγραφή του συνόλου των μεταβολιτών ενός δείγματος, χωρίς εκ των προτέρων επιλογή ή περιορισμό σε συγκεκριμένες ενώσεις, με στόχο τη διερεύνηση του συνολικού μεταβολικού προφίλ και την πιθανή ανακάλυψη νέων βιοδεικτών ή μεταβολικών μονοπατιών.⁵

1.2 Εντερικό μικροβίωμα και μεταβολίτες

Το ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα φιλοξενεί έναν ιδιαίτερα πολύπλοκο και δυναμικό πληθυσμό μικροοργανισμών, γνωστό ως εντερικό μικροβίωμα.²⁶ Το μικροβίωμα περιλαμβάνει βακτήρια, αρχαία (Archaea), μύκητες και ιούς, τα οποία συνυπάρχουν σε συμβιωτική σχέση με τον ανθρώπινο οργανισμό²⁷ και επηρεάζονται από παράγοντες όπως η διατροφή, η ηλικία, η γενετική προδιάθεση, η χρήση αντιβιοτικών και το περιβάλλον.²⁸ Οι μικροοργανισμοί αυτοί συμμετέχουν ενεργά σε ποικίλες μεταβολικές διεργασίες, όπως η αποδόμηση σύνθετων υδατανθράκων, η σύνθεση βιταμινών και η παραγωγή βιοδραστικών μεταβολιτών. Μεταξύ αυτών, σημαντική κατηγορία αποτελούν τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας, όπως το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ²⁹, τα οποία παράγονται μέσω ζύμωσης φυτικών ινών και αποτελούν βασική πηγή ενέργειας για τα κύτταρα του παχέος εντέρου. Τα τελευταία χρόνια, η μελέτη του εντερικού μικροβιώματος έχει προσελκύσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον, λόγω του σημαντικού ρόλου που διαδραματίζει στη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών λειτουργιών του ανθρώπινου οργανισμού. Το γαστρεντερικό σύστημα εμπεριέχει ένα πολύπλοκο οικοσύστημα μικροοργανισμών, οι οποίοι συμμετέχουν σε ποικίλες μεταβολικές διεργασίες και συμβάλλουν στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού.^{30,31} Οι μικροβιακοί μεταβολίτες επηρεάζουν σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως ο μεταβολισμός θρεπτικών συστατικών, η ανοσολογική απόκριση και η ρύθμιση φλεγμονωδών μηχανισμών. Διαταραχές στη σύσταση ή τη λειτουργία του εντερικού μικροβιώματος έχουν συσχετιστεί με πλήθος ασθενειών, συμπεριλαμβανομένων μεταβολικών διαταραχών, φλεγμονωδών νοσημάτων του εντέρου και νευροεκφυλιστικών παθήσεων.^{32,33} Διαταραχές στη σύσταση και λειτουργία του μικροβιώματος, γνωστές ως δυσβίωση, έχουν συσχετιστεί με παθήσεις όπως η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης, οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου και νευρολογικές διαταραχές.^{30,31}

Η μελέτη των μικροβιακών μεταβολιτών μέσω μεταβολομικής ανάλυσης πραγματοποιείται συχνά με τη χρήση δειγμάτων υδατικού εκχυλίσματος κοπράνων (fecal water samples), τα οποία παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τις μεταβολικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο έντερο και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροβιώματος και οργανισμού. Τα fecal water samples (FW) αποτελούν το υδατοδιαλυτό κλάσμα των κοπρανωδών δειγμάτων και περιέχουν πληθώρα υδατοδιαλυτών μεταβολιτών, όπως αμινοξέα, οργανικά οξέα, σάκχαρα, λιπαρά οξέα

βραχείας αλυσίδας και προϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού. Η παρασκευή τους πραγματοποιείται συνήθως μέσω ανάμιξης κοπρανώδους υλικού με απιονισμένο νερό και επακόλουθης φυγοκέντρωσης, με στόχο την απομάκρυνση στερεών σωματιδίων και τη συλλογή του υπερκείμενου υγρού¹. Η σύσταση των μεταβολιτών στα δείγματα αυτά επηρεάζεται από παράγοντες όπως η διατροφή, η μικροβιακή δραστηριότητα, ο τρόπος ζωής και η φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού¹³. Παράλληλα, η πολυπλοκότητα της σύστασής τους και η παρουσία μεγάλου αριθμού μεταβολιτών καθιστούν απαραίτητη τη χρήση σύγχρονων αναλυτικών και υπολογιστικών τεχνικών για την αξιόπιστη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίησή τους²⁵.

1.2.1 Λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (Short – Chain Fatty Acids, SCFAs)

ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs) αποτελούν σημαντική κατηγορία βιοδραστικών μεταβολιτών. Είναι κορεσμένα αλειφατικά καρβοξυλικά οξέα με μικρό αριθμό ατόμων άνθρακα (συνήθως δύο έως έξι).³⁴ Η βασική τους δομή περιλαμβάνει μία καρβοξυλική ομάδα (-COOH) συνδεδεμένη με μία βραχεία υδρογονανθρακική αλυσίδα, γεγονός που επηρεάζει τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως η διαλυτότητα στο νερό, η πτητικότητα και η οξύτητα. Απορροφώνται σε σημαντικό βαθμό από το εντερικό επιθήλιο και μπορούν να μεταφερθούν μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε διάφορους ιστούς και όργανα, εξαιτίας της υδατοδιαλυτότητας και του χαμηλού μοριακού τους βάρους.²⁶

Η παρουσία της καρβοξυλικής ομάδας τα καθιστά ασθενή οργανικά οξέα με δυνατότητα ιονισμού, ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος. Στο φυσιολογικό pH του εντέρου (pH $\approx$ 6–7), σημαντικό ποσοστό των SCFAs βρίσκεται σε ιονισμένη μορφή, γεγονός που επηρεάζει τόσο την απορρόφηση όσο και τη βιολογική τους δραστηριότητα. Οι φυσικοχημικές αυτές ιδιότητες καθιστούν τα SCFAs εξαιρετικά δραστικά μόρια με σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της εντερικής και συστηματικής ομοιόστασης.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ. Η παραγωγή των SCFAs πραγματοποιείται κυρίως στο παχύ έντερο μέσω αναερόβιας βακτηριακής ζύμωσης μη απορροφήσιμων υδατανθράκων, όπως φυτικές ίνες, ανθεκτικό άμυλο, ολιγοσακχαρίτες και άλλοι πολύπλοκοι πολυσακχαρίτες που δεν διασπώνται στα ανώτερα τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα. Κατά τη διαδικασία αυτή σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν η

σύσταση του εντερικού μικροβιώματος και η διαθεσιμότητα υποστρωμάτων ζύμωσης.³⁵ Διαφορετικά μικροβιακά είδη συμβάλλουν επιλεκτικά στην παραγωγή συγκεκριμένων SCFAs. Το οξικό οξύ αποτελεί το βασικότερο τελικό προϊόν της βακτηριακής ζύμωσης και παράγεται από ευρύ φάσμα βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων ειδών των γενών *Bifidobacterium* και *Akkermansia*. Το προπιονικό οξύ παράγεται κυρίως μέσω των μεταβολικών οδών του ηλεκτρικού και του ακρυλικού οξέος (succinate και acrylate metabolic pathways) από βακτήρια όπως τα *Bacteroides* και *Veillonella*. Αντίστοιχα, το βουτυρικό οξύ συντίθεται κυρίως μέσω της οδού butyryl-CoA από βακτήρια των γενών *Faecalibacterium*, *Roseburia* και *Eubacterium*. Σημαντικό χαρακτηριστικό της μικροβιακής οικολογίας του εντέρου αποτελεί το φαινόμενο της διασταυρούμενης θρέψης (cross-feeding), κατά το οποίο μεταβολίτες που παράγονται από ένα μικροβιακό είδος χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα από άλλα βακτήρια για τη σύνθεση διαφορετικών SCFAs.³⁶ Η ποσότητα και η αναλογία τους επηρεάζονται από παράγοντες όπως η σύσταση της διαίτας, η πρόσληψη φυτικών ινών, η χρήση αντιβιοτικών, η ηλικία, η γενετική προδιάθεση και η κατάσταση του εντερικού μικροβιώματος. Για το οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ η αναλογία τους στο παχύ έντερο είναι περίπου 60:20:20.³⁵

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ. Τα SCFAs ασκούν σημαντική επίδραση στη διατήρηση της εντερικής ομοιόστασης και της συνολικής φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού. Για παράδειγμα το βουτυρικό οξύ είναι βασική πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου και ενισχύει την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού.³⁷ Ακόμη, συμμετέχουν στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, της φλεγμονώδους απόκρισης και του ενεργειακού μεταβολισμού μέσω αλληλεπίδρασης με ειδικούς υποδοχείς συζευγμένους με G-πρωτεΐνες.³⁸ Τέλος, αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει ο πιθανός ρόλος τους στον άξονα εντέρου–εγκεφάλου, καθώς φαίνεται ότι επηρεάζουν νευροενδοκρινικές και ανοσολογικές διεργασίες που σχετίζονται με τη νευρολογική και ψυχική υγεία.²⁶

1.2.2 Αμινοξέα (Amino acids)

ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ. Τα αμινοξέα αποτελούν οργανικές ενώσεις που περιέχουν μία αμινομάδα ($-NH_2$) και μία καρβοξυλική ομάδα ($-COOH$), συνδεδεμένες συνήθως στο ίδιο άτομο άνθρακα. Αποτελούν τα δομικά συστατικά των πρωτεϊνών και συμμετέχουν σε πολυάριθμες μεταβολικές και βιολογικές διεργασίες. Ανάλογα με τη

χημική φύση της πλευρικής τους αλυσίδας παρουσιάζουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, όπως πολικότητα, υδροφοβικότητα και ηλεκτρικό φορτίο, οι οποίες επηρεάζουν τη βιολογική τους λειτουργία και τη μεταβολική τους συμπεριφορά.³⁹ Πολλά αμινοξέα είναι υδατοδιαλυτά και απαντώνται σε σημαντικές συγκεντρώσεις στο εντερικό μικροβίωμα και στα κοπρανώδη δείγματα, είτε ως προϊόντα πρωτεϊνικής αποδόμησης, είτε ως μεταβολίτες μικροβιακής δραστηριότητας.⁴⁰

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ. Το εντερικό μικροβίωμα συμμετέχει ενεργά στον μεταβολισμό των διαιτητικών και ενδογενών πρωτεϊνών μέσω πρωτεόλυσης και ζύμωσης αμινοξέων. Κατά τις διεργασίες αυτές παράγονται ποικίλοι βιοδραστικοί μεταβολίτες, όπως αμμωνία, αμίνες, φαινολικές ενώσεις, ινδόλες και οργανικά οξέα.⁴¹ Ορισμένα βακτηριακά γένη, όπως τα *Bacteroides*, *Clostridium* και *Peptostreptococcus*, εμφανίζουν έντονη πρωτεολυτική δραστηριότητα και συμβάλλουν σημαντικά στη ζύμωση αμινοξέων στο παχύ έντερο.⁴² Τα αμινοξέα συμμετέχουν σε πολλαπλές μεταβολικές οδούς του μικροβιώματος. Η τυροσίνη και η φαινυλαλανίνη συμμετέχουν σε οδούς παραγωγής φαινολικών ενώσεων, και p-κρεσόλης, ενώ τα διακλαδισμένης αλυσίδας αμινοξέα, όπως η λευκίνη, η ισολευκίνη και η βαλίνη, μεταβολίζονται μέσω οδών απαμίνωσης και αποκαρβοξυλίωσης οδηγώντας στην παραγωγή διακλαδισμένων λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (Branched-Chain Fatty Acids, BCFAs). Παράλληλα, αρκετά αμινοξέα συμμετέχουν σε αντιδράσεις του κύκλου του Krebs μέσω ενδιάμεσων μεταβολιτών, συνδέοντας τον μικροβιακό μεταβολισμό με τον κυτταρικό ενεργειακό μεταβολισμό.⁴³

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ. Οι μεταβολίτες που προκύπτουν από τον μικροβιακό μεταβολισμό των αμινοξέων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της εντερικής φυσιολογίας και της αλληλεπίδρασης μικροβιώματος-ξενιστή. Ορισμένοι μεταβολίτες παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση και συμβάλλουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού επιθηλίου, ενώ άλλοι έχουν συσχετιστεί με δυσμενείς επιδράσεις όταν παράγονται σε αυξημένες συγκεντρώσεις. Για παράδειγμα, η υπερβολική πρωτεολυτική ζύμωση μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση δυνητικά τοξικών ενώσεων, όπως αμμωνία και p-κρεσόλη, οι οποίες έχουν συνδεθεί με φλεγμονώδεις και μεταβολικές διαταραχές.^{40,41} Επιπλέον, οι μεταβολίτες αμινοξέων φαίνεται να συμμετέχουν στον άξονα εντέρου-εγκεφάλου μέσω νευροενδοκρινικών και ανοσολογικών μηχανισμών, επηρεάζοντας πιθανώς τη νευρολογική και ψυχική υγεία.⁴⁴

1.2.3 Σάκχαρα και μεταβολισμός υδατανθράκων στο εντερικό μικροβίωμα

ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ. Τα σάκχαρα αποτελούν βασική κατηγορία οργανικών ενώσεων και περιλαμβάνουν μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. Χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλαπλών υδροξυλομάδων (-OH) και μίας αλδεϋδικής ή κετονικής ομάδας, γεγονός που τους προσδίδει υψηλή υδατοδιαλυτότητα και αυξημένη χημική δραστηριότητα. Στο γαστρεντερικό σύστημα, οι υδατάνθρακες αποτελούν κύρια πηγή ενέργειας, τόσο για τον ανθρώπινο οργανισμό, όσο και για το εντερικό μικροβίωμα.⁴⁵

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΖΥΜΩΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ. Το μικροβίωμα του εντέρου διαθέτει μεγάλο αριθμό ενζύμων που επιτρέπουν την αποδόμηση σύνθετων πολυσακχαριτών οι οποίοι δε μπορούν να διασπαστούν από τα ανθρώπινα πεπτικά ένζυμα. Βακτήρια των γενών *Bacteroides*, *Ruminococcus* και *Bifidobacterium* συμμετέχουν ενεργά στη διαδικασία αυτή, παράγοντας απλούστερα σάκχαρα και τελικά μεταβολικά προϊόντα, κυρίως λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας. Η μικροβιακή ζύμωση των υδατανθράκων αποτελεί βασικό μηχανισμό παραγωγής ενέργειας στο έντερο και συμβάλλει στη διατήρηση της μικροβιακής οικολογικής ισορροπίας.^{46,47} Επιπλέον, μέσω φαινομένων διασταυρούμενης θρέψης (cross-feeding), ενδιάμεσα προϊόντα αποδόμησης χρησιμοποιούνται από διαφορετικά μικροβιακά είδη για τη παραγωγή επιπλέον μεταβολιτών.⁴⁸

Οι υδατάνθρακες συμμετέχουν κυρίως στις μεταβολικές οδούς της γλυκόλυσης (glycolysis), της πεντοζοφωσφορικής οδού (pentose phosphate pathway) και των αναερόβιων οδών ζύμωσης. Μέσω της γλυκόλυσης παράγεται πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο αποτελεί βασικό ενδιάμεσο μεταβολίτη για την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας.^{46,47} Ανάλογα με το μικροβιακό είδος και τις συνθήκες του εντερικού περιβάλλοντος, το πυροσταφυλικό μπορεί να μεταβολιστεί μέσω διαφορετικών οδών, όπως η οδός παραγωγής οξικού οξέος (acetate pathway), η οδός του ηλεκτρικού οξέος (succinate pathway) για την σύνθεση προπιονικού οξέος και η οδός butyryl-CoA για τη σύνθεση βουτυρικού οξέος. Επιπλέον, η πεντοζοφωσφορική οδός συμβάλλει στη παραγωγή αναγωγικών ισοδυνάμων και πρόδρομων μορίων απαραίτητων για την μικροβιακή ανάπτυξη και βιοσύνθεση.⁴⁹

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ. Ο μεταβολισμός των σακχάρων από το εντερικό μικροβίωμα επηρεάζει σημαντικά τη φυσιολογία του ξενιστή. Τα προϊόντα ζύμωσης των υδατανθράκων, ιδιαίτερα τα SCFAs, συμβάλλουν στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού, στη διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού και στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης.⁴⁷ Παράλληλα, η επαρκής πρόσληψη φυτικών ινών έχει συσχετιστεί με αυξημένη παραγωγή ευεργετικών μεταβολιτών και μεγαλύτερη μικροβιακή ποικιλομορφία. Αντίθετα, δίαιτες πλούσιες σε επεξεργασμένους υδατάνθρακες και χαμηλές σε φυτικές ίνες φαίνεται να σχετίζονται με δυσβίωση και κίνδυνο εμφάνισης μεταβολικών και φλεγμονωδών νοσημάτων.⁴⁹

1.3 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance – NMR)

1.3.1 Βασικές αρχές φασματοσκοπίας NMR

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αναλυτικές τεχνικές στη μεταβολομική, καθώς επιτρέπει την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα.⁵ Η τεχνική βασίζεται στις μαγνητικές ιδιότητες ορισμένων ατομικών πυρήνων, όπως ο πυρήνας του υδρογόνου (^1H), οι οποίοι αλληλεπιδρούν με ισχυρό εξωτερικό μαγνητικό πεδίο και απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία σε συγκεκριμένες συχνότητες.² Στη φασματοσκοπία ^1H -NMR, οι πυρήνες υδρογόνου προσανατολίζονται υπό την επίδραση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και διεγείρονται μέσω παλμών ραδιοσυχνότητας. Η απορρόφηση ενέργειας οδηγεί σε μεταβολή της ενεργειακής κατάστασης των πυρήνων, ενώ κατά την επιστροφή τους στη θεμελιώδη κατάσταση παράγονται σήματα, τα οποία καταγράφονται με τη μορφή φάσματος. Τα φάσματα αυτά περιέχουν πληροφορίες σχετικά με το χημικό περιβάλλον των ατόμων υδρογόνου και επιτρέπουν την αναγνώριση διαφορετικών χημικών ενώσεων.³

1.3.2 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός – Συχνότητα Larmor

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι ατομικοί πυρήνες συμπεριφέρονται ως μικροσκοπικοί μαγνήτες λόγω της μαγνητικής τους ροπής. Σε απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, οι προσανατολισμοί των πυρήνων είναι τυχαίοι. Όταν όμως το δείγμα τοποθετηθεί σε ισχυρό στατικό μαγνητικό πεδίο (B_0), οι πυρήνες προσανατολίζονται είτε παράλληλα, είτε αντιπαράλληλα προς την κατεύθυνση του

πεδίου. Η παράλληλη διάταξη αντιστοιχεί σε χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, ενώ η αντιπαράλληλη σε υψηλότερη. Επειδή η χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση είναι πιο ευνοϊκή θερμοδυναμικά, μεγαλύτερος αριθμός πυρήνων βρίσκεται σε αυτήν, κατάσταση που περιγράφεται από την κατανομή Boltzmann. Για πυρήνες με σπιν $-1/2$ (όπως το ^1H), η πόλωση που οφείλεται στα σπιν που είναι προσανατολισμένα παράλληλα με το πεδίο N_- , σε σχέση με τα σπιν που είναι προσανατολισμένα αντίθετα προς το πεδίο N_+ , δίνεται από τη σχέση:⁵⁰

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (\text{εξ. 1})$$

Οι πυρήνες εκτελούν ταυτόχρονα μία περιστροφική κίνηση γύρω από τον άξονα του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, η οποία ονομάζεται μετάπτωση (precession). Όταν το δείγμα εκτεθεί σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ραδιοσυχνοτήτων κατάλληλης συχνότητας, οι πυρήνες απορροφούν ενέργεια και μεταπίπτουν από τη χαμηλής ενέργειας κατάσταση στην υψηλότερης ενέργειας κατάσταση. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε αναστροφή του spin και επιτυγχάνεται ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός. Η συχνότητα στην οποία παρατηρείται το φαινόμενο αυτό ονομάζεται συχνότητα συντονισμού ή συχνότητα Larmor, η οποία εξαρτάται από το είδος του πυρήνα και την ένταση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου. Μετά την παύση της ακτινοβολίας, οι πυρήνες επανέρχονται στη θεμελιώδη ενεργειακή κατάσταση εκπέμποντας ηλεκτρομαγνητικό σήμα, το οποίο ανιχνεύεται από το φασματομέτρο και καταγράφεται ως φάσμα NMR. Όσο ισχυρότερο είναι το μαγνητικό πεδίο, τόσο μεγαλύτερη είναι η απαιτούμενη συχνότητα ακτινοβολίας για την επίτευξη συντονισμού.⁵⁰

Στη φασματοσκοπία ^1H -NMR, οι πυρήνες υδρογόνου παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της υψηλής φυσικής αφθονίας και ευαισθησίας τους, καθώς και της παρουσίας τους στα περισσότερα βιολογικά μόρια. Για τον λόγο αυτό, η τεχνική χρησιμοποιείται εκτενώς στη μεταβολομική ανάλυση βιολογικών δειγμάτων και στη μελέτη μεταβολιτών που σχετίζονται με το εντερικό μικροβίωμα.

1.3.3 Spin Relaxation

Μετά την απορρόφηση ενέργειας από τους πυρήνες και την επίτευξη πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, το σύστημα τείνει να επανέλθει στη θερμοδυναμική ισορροπία. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται χαλάρωση spin (spin relaxation) και

συνοδεύεται από απελευθέρωση της απορροφούμενης ενέργειας. Οι μηχανισμοί χαλάρωσης είναι ιδιαίτερα σημαντικοί στη φασματοσκοπία NMR, καθώς επηρεάζουν την ένταση, το σχήμα και την ποιότητα των σημάτων του φάσματος.

Διακρίνονται δύο βασικοί μηχανισμοί χαλάρωσης: η διαμήκης χαλάρωση (spin-lattice relaxation ή T_1 relaxation) και η εγκάρσια χαλάρωση (spin-spin relaxation ή T_2 relaxation). Η διαμήκης χαλάρωση περιλαμβάνει ανακατανομή των πληθυσμών των καταστάσεων πυρηνικού σπιν, ώστε να επιτευχθεί η κατανομή θερμικής ισορροπίας. Εξ ορισμού, η διαδικασία αυτή δεν διατηρεί την ενέργεια. Η αυθόρμητη εκπομπή είναι εξαιρετικά αργή στις συχνότητες NMR. Επομένως, πραγματικά απομονωμένα πυρηνικά σπιν θα εμφάνιζαν αμελητέους ρυθμούς χαλάρωσης T_1 . Ωστόσο, διάφοροι μηχανισμοί χαλάρωσης επιτρέπουν τη μεταφορά ενέργειας από τους διεγερμένους πυρήνες προς το περιβάλλον μοριακό πλέγμα (lattice), οδηγώντας στην αποκατάσταση της αρχικής κατανομής πληθυσμών μεταξύ των ενεργειακών καταστάσεων. Ο χρόνος που απαιτείται για την επαναφορά αυτή εκφράζεται μέσω της σταθεράς χαλάρωσης T_1 .

Αντίστοιχα, η εγκάρσια χαλάρωση σχετίζεται με την απώλεια συγχρονισμού μεταξύ των πυρήνων που προελίσσονται στο επίπεδο κάθετα προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο. Η διαδικασία αυτή προκαλεί σταδιακή εξασθένηση του ανιχνεύσιμου σήματος NMR και περιγράφεται από τη σταθερά χαλάρωσης T_2 . Μικρές τιμές T_2 οδηγούν σε διεύρυνση των κορυφών και μείωση της φασματικής διακριτικής ικανότητας.

Οι χρόνοι χαλάρωσης επηρεάζονται από φυσικοχημικές ιδιότητες του δείγματος, όπως το ιξώδες, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση μακρομορίων και οι μοριακές αλληλεπιδράσεις. Μικρές ποσότητες παραμαγνητικών ουσιών σε ένα δείγμα επιταχύνουν σημαντικά τη χαλάρωση. Με την απαέρωση (degassing) και συνεπώς την απομάκρυνση του διαλυμένου οξυγόνου, οι χρόνοι T_1/T_2 υγρών δειγμάτων μπορούν εύκολα να φτάσουν σε τιμές της τάξης των δέκα δευτερολέπτων. Στα πολύπλοκα βιολογικά δείγματα, όπως τα fecal water samples, οι μηχανισμοί χαλάρωσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητα των φασμάτων και στην ανίχνευση μεταβολιτών.⁵¹

1.3.4 Χημική Μετατόπιση

Η χημική μετατόπιση (chemical shift, (δ)) στη φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) αποτελεί μία από τις βασικότερες παραμέτρους στη μεταβολομική ανάλυση του υδατικού εκχυλίσματος κοπράνων, αφού επιτρέπει την

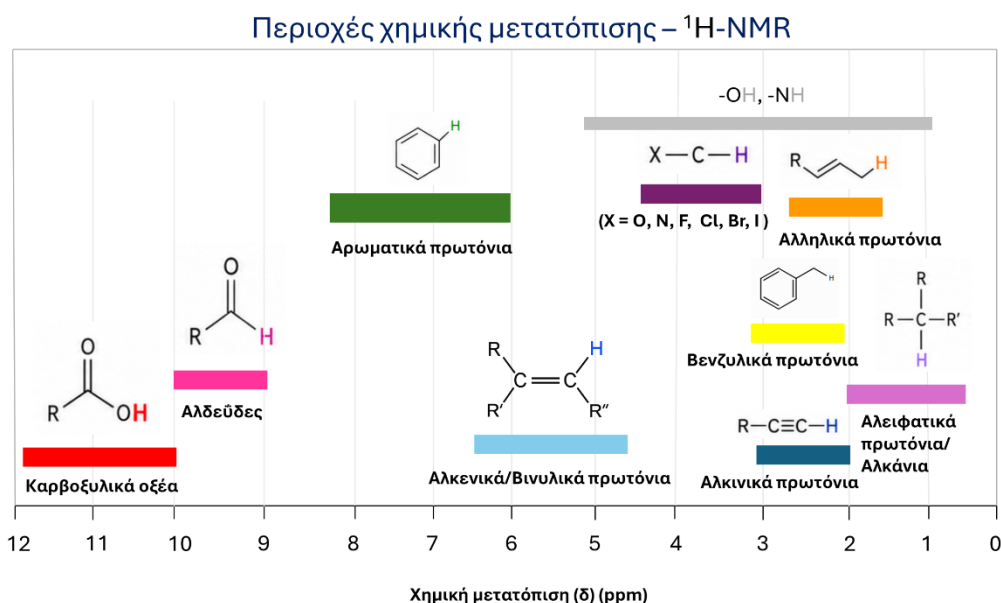
ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών που προέρχονται από τον μεταβολισμό του ξενιστή και της εντερικής μικροχλωρίδας. Το χημικό περιβάλλον, δηλαδή η ηλεκτρονιακή πυκνότητα και το είδος των γειτονικών ατόμων, επηρεάζει τις συχνότητες συντονισμού των πυρήνων ^1H . Η κίνηση των ηλεκτρονίων οδηγεί στη δημιουργία ενός τοπικού διαμαγνητικού πεδίου, μειώνοντας την ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου που νιώθει ο πυρήνας, προκαλώντας το φαινόμενο της θωράκισης – αποθωράκισης.

Εκφράζεται σε ppm (parts per million) και υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχέση:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_0} \times 10^6 ppm \quad (\text{εξ. 2})$$

όπου ν είναι η συχνότητα συντονισμού του πυρήνα, ν_{ref} η συχνότητα του προτύπου αναφοράς και ν_0 η συχνότητα λειτουργίας του φασματομέτρου. Είναι ανεξάρτητη από το μαγνητικό πεδίο του οργάνου, γεγονός που επιτρέπει τη σύγκριση φασμάτων από διαφορετικούς φασματογράφους NMR. Ως πρότυπη ένωση αναφοράς για υδατικούς διαλύτες, όπως το D_2O , χρησιμοποιείται συνήθως το σήμα από το τριμεθυλοσιλυλοπροπιονικό οξύ (TMSP/ TSP), του οποίου η χημική μετατόπιση ορίζεται στα 0 ppm.

Πυρήνες που εντάσσονται στο ίδιο χημικό περιβάλλον θεωρούνται χημικά ισοδύναμοι και εμφανίζουν κοινό σήμα στο φάσμα NMR, ενώ μη ισοδύναμοι πυρήνες δίνουν διαφορετικά σήματα εξαιτίας της χημικής μετατόπισης. Ακόμη, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν η μαγνητική ανισοτροπία, τα επαγωγικά και συζυγιακά φαινόμενα, καθώς και οι δεσμοί υδρογόνου. Ειδικότερα συστήματα π-ηλεκτρονίων, όπως αλκένια, αλκίνια, αρωματικοί δακτύλιοι και καρβονυλικές ομάδες δημιουργούν τοπικά μαγνητικά πεδία που επηρεάζουν σημαντικά τη θωράκιση-αποθωράκιση των πρωτονίων. Παράλληλα, υποκαταστάτες με +R ή +I φαινόμενο αυξάνουν την ηλεκτρονιακή πυκνότητα και οδηγούν σε χαμηλότερες τιμές χημικής μετατόπισης, ενώ ομάδες με -R ή -I φαινόμενο προκαλούν αποθωράκιση και εμφάνιση σημάτων σε υψηλότερες τιμές δ . Στην **Εικόνα 1** παρουσιάζονται οι χημικές μετατοπίσεις των κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα ^1H NMR.⁵²



Εικόνα 1. Περιοχές χημικής μετατόπισης κυριότερων χαρακτηριστικών ομάδων στο φάσμα ^1H NMR.

Στη μεταβολομική ανάλυση κοπρανόδους εκχυλίσματος οι διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις συμβάλλουν στο διαχωρισμό και την αναγνώριση μεταβολιτών, όπως οργανικά οξέα, αμινοξέα, λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs), παράγωγα χολικών οξέων, τα οποία αποτελούν σημαντικούς βιοδείκτες της εντερικής λειτουργίας και της αλληλεπίδρασης μικροβιώματος–ξενιστή⁵³, μέσω σύγκρισης με βάσεις δεδομένων και βιβλιοθήκες φασμάτων.⁵⁴ Ωστόσο, ιδιαίτερα στα ούρα και στα κοπρανώδη δείγματα, οι μεταβολές pH και ιοντικής ισχύος μπορούν να προκαλέσουν μικρές μετατοπίσεις σημάτων, δυσχεραίνοντας την αυτοματοποιημένη ταυτοποίηση μεταβολιτών.²

1.3.5 Spin–Spin Coupling και Πολλαπλότητα Σημάτων

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της φασματοσκοπίας ^1H -NMR είναι η δυνατότητα παροχής πληροφοριών σχετικά με τη δομή και τη συνδεσιμότητα των μορίων μέσω του φαινομένου της σύζευξης spin–spin (spin–spin coupling ή J-coupling). Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στη μαγνητική αλληλεπίδραση μεταξύ γειτονικών, μη ισοδύναμων πυρήνων υδρογόνου, οι οποίοι επηρεάζουν το τοπικό μαγνητικό πεδίο που αντιλαμβάνεται κάθε πυρήνας.

Ως αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης, το αρχικό σήμα ενός πυρήνα δεν εμφανίζεται ως μία απλή κορυφή αλλά διαχωρίζεται σε περισσότερες κορυφές, δημιουργώντας την αποκαλούμενη πολλαπλότητα σημάτων (multiplicity). Η

πολλαπλότητα παρέχει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των γειτονικών πυρήνων υδρογόνου και συνεπώς συμβάλλει σημαντικά στη δομική ανάλυση και την ταυτοποίηση χημικών ενώσεων. Στα απλά συστήματα, η πολλαπλότητα ακολουθεί τον κανόνα $n+1$, όπου n είναι ο αριθμός των γειτονικών ισοδύναμων πυρήνων υδρογόνου:

- ένας γειτονικός πυρήνας οδηγεί σε διπλή κορυφή (doublet),
- δύο γειτονικοί πυρήνες οδηγούν σε τριπλή κορυφή (triplet),
- τρεις γειτονικοί πυρήνες οδηγούν σε τετραπλή κορυφή (quartet).

Η απόσταση μεταξύ των κορυφών ενός πολλαπλού σήματος ονομάζεται σταθερά σύζευξης (coupling constant, J) και εκφράζεται σε Hertz (κύκλος ανά δευτερόλεπτο, Hz). Η σταθερά σύζευξης αποτελεί χαρακτηριστική παράμετρο της χημικής δομής και παραμένει ανεξάρτητη από την ένταση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.^{50,51}

Η ανάλυση της πολλαπλότητας και των σταθερών σύζευξης είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς επιτρέπει την ακριβέστερη αναγνώριση μεταβολιτών, τη διαφοροποίηση παρόμοιων χημικών ενώσεων και τη διερεύνηση της μοριακής δομής σύνθετων βιολογικών μορίων.¹⁰

Ωστόσο, στα πολύπλοκα βιολογικά δείγματα, όπως τα υδατικά εκχυλίσματα κοπρανώδους δείγματος, τα φάσματα $^1\text{H-NMR}$ χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό μεταβολιτών και έντονη επικάλυψη σημάτων. Η επικάλυψη αυτή δυσχεραίνει την ανάθεση κορυφών και την ακριβή ταυτοποίηση των ενώσεων.⁹ Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος χρησιμοποιούνται δισδιάστατες τεχνικές NMR, όπως COSY (Correlation Spectroscopy), TOCSY (Total Correlation Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Οι τεχνικές αυτές επιτρέπουν τη συσχέτιση σημάτων μεταξύ διαφορετικών πυρήνων και παρέχουν πληροφορίες για τη μοριακή δομή και τη συνδεσιμότητα των ατόμων. Ως εκ τούτου, συμβάλλουν σημαντικά στη βελτίωση της αξιοπιστίας και της ακρίβειας της μεταβολομικής ανάλυσης σε πολύπλοκα βιολογικά συστήματα.

1.3.6 Πλεονεκτήματα και Περιορισμοί της Φασματοσκοπίας ^1H NMR στη Μεταβολομική

Η φασματοσκοπία ^1H NMR χρησιμοποιείται ευρέως στη μεταβολομική ανάλυση λόγω σημαντικών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει. Αποτελεί μη καταστροφική τεχνική, επιτρέποντας τη διατήρηση του δείγματος μετά την ανάλυση, ενώ απαιτεί σχετικά απλή και περιορισμένη προετοιμασία δείγματος.^{2,5} Παράλληλα, χαρακτηρίζεται από υψηλή αναπαραγωγιμότητα⁵ και δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσης μεγάλου αριθμού μεταβολιτών σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα, όπως τα κοπρανώδη δείγματα. Επιπλέον, παρέχει τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές πληροφορίες, γεγονός που τη καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη στη μεταβολομική προσέγγιση.

Παρά τα πλεονεκτήματα αυτά, η τεχνική παρουσιάζει και κάποιους περιορισμούς. Η ευαισθησία της φασματοσκοπίας NMR είναι χαμηλότερη σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές, όπως η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry),^{25,55} με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η ανίχνευση μεταβολιτών σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Ακόμη, τα πολύπλοκα βιολογικά δείγματα χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα πολύπλοκη χημική σύσταση, καθώς περιέχουν μεγάλο εύρος μεταβολιτών, διαφορετικών χημικών κατηγοριών, προϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού, οργανικά οξέα, αμινοξέα, σάκχαρα, λιπίδια και άλλα μακρομοριακά συστατικά. Η παρουσία των μακρομορίων οδηγεί στη δημιουργία ευρέων σημάτων στο φάσμα ^1H NMR, τα οποία συχνά επικαλύπτουν τα στενότερα σήματα μικρομοριακών μεταβολιτών. Ως αποτέλεσμα, μειώνεται η φασματική διακριτική ικανότητα και καθίσταται δυσκολότερη η αξιόπιστη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση, ιδιαίτερα σε περιοχές υψηλής φασματικής συμφόρησης.²

Για την αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος έχουν αναπτυχθεί διάφορες πειραματικές και υπολογιστικές μέθοδοι. Παραδοσιακά, χρησιμοποιούνται spin-echo NMR πειράματα, όπως το Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG), τα οποία επιτυγχάνουν μερική καταστολή των σημάτων μακρομορίων μέσω διαφορών στους χρόνους εγκάρσιας χαλάρωσης (T_2 relaxation). Αν και τα πειράματα αυτά βελτιώνουν τη παρατήρηση μικρομοριακών μεταβολιτών, απαιτούν επιπλέον χρόνο απόκτησης δεδομένων και δεν εξαλείφουν πλήρως τα προβλήματα επικάλυψης και γραμμής βάσης. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί υπολογιστικές προσεγγίσεις επεξεργασίας δεδομένων NMR, όπως η μέθοδος Small Molecule Enhancement Spectroscopy

(SMolESY).⁵⁶ Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αξιοποίηση του φανταστικού μέρους (imaginary part) του Fourier transformed ^1H NMR φάσματος, γνωστού ως φάσμα διασποράς (dispersion spectrum). Σε αντίθεση με το φάσμα απορρόφησης (absorption spectrum) που χρησιμοποιείται στη κλασική ανάλυση NMR (real part), το φανταστικό μέρος του φάσματος εμφανίζει διαφορετική συμπεριφορά ως προς το εύρος και το σχήμα των κορυφών, παρέχοντας αυξημένη ευαισθησία στις στενές κορυφές ενώσεων μικρού μοριακού βάρους. Η επεξεργασία των δεδομένων του φάσματος διασποράς μέσω εφαρμογής της πρώτης μαθηματικής παραγώγου οδηγεί σε αποτελεσματική καταστολή των ευρέων μακρομοριακών σημάτων και ταυτόχρονη ενίσχυση της φασματικής διακριτικής ικανότητας. Έτσι, προκύπτουν τα λεγόμενα SMolESY φάσματα, τα οποία χαρακτηρίζονται από καθαρότερη γραμμή βάσης, μειωμένη επικάλυψη σημάτων και βελτιωμένο διαχωρισμό κορυφών μεταβολιτών. Παράλληλα, διατηρείται ο ποσοτικός χαρακτήρας των αρχικών ^1H NMR δεδομένων, επιτρέποντας την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών χωρίς την ανάγκη πολύπλοκων αλγορίθμων αποσυνέλιξης (deconvolution algorithms) ή πρόσθετων NMR πειραμάτων. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της προσέγγισης SMolESY είναι ότι βελτιώνει τη φασματική ποιότητα αποκλειστικά μέσω υπολογιστικής επεξεργασίας των ήδη διαθέσιμων 1D ^1H NMR δεδομένων. Κατά συνέπεια, μειώνεται σημαντικά ο απαιτούμενος χρόνος ανάλυσης και η ανάγκη για πρόσθετους πειραματικούς χειρισμούς, ενώ παράλληλα βελτιώνεται η δυνατότητα αυτοματοποιημένης επεξεργασίας μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε μεταβολομικές μελέτες υψηλής απόδοσης.^{54,56}

Στην παρούσα εργασία, η φασματοσκοπία ^1H -NMR χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση δειγμάτων κοπράνων με σκοπό την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών που σχετίζονται με τη δραστηριότητα του εντερικού μικροβιώματος. Η επεξεργασία των φασματικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε μέσω ανάπτυξης αλγοριθμικής μεθοδολογίας, με στόχο την αυτοματοποιημένη ανάλυση και την αξιόπιστη εξαγωγή μεταβολικών πληροφοριών. Τα φάσματα SMolESY χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα εισόδου για την ανάπτυξη του αλγορίθμου. Η αξιοποίηση τους επέτρεψε τη βελτιωμένη ανίχνευση και ολοκλήρωση των χαρακτηριστικών κορυφών του κάθε μεταβολίτη, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη μίας πιο αξιόπιστης και αυτοματοποιημένης προσέγγισης μεταβολομικής ανάλυσης.

1.3.7. Μεταβολομική ανάλυση με Φασματοσκοπία ^1H NMR

Οι παραπάνω προσεγγίσεις στοχευμένης (targeted) και μη στοχευμένης (untargeted) μεταβολομικής συνδέονται άμεσα με διαφορετικές στρατηγικές επεξεργασίας και ερμηνείας των φασμάτων ^1H -NMR, με κυριότερες το μεταβολικό προφίλ (metabolic profiling) και το μεταβολικό αποτύπωμα (metabolic fingerprinting). Οι προσεγγίσεις αυτές διαφοροποιούνται ως προς τον τρόπο αξιοποίησης των φασμάτων NMR και τον βαθμό ταυτοποίησης των μεταβολιτών, ωστόσο αμφότερες χρησιμοποιούνται ευρέως για τη μελέτη πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων⁵⁷ και την αναγνώριση μεταβολικών διαφοροποιήσεων μεταξύ βιολογικών καταστάσεων.⁵⁸

Profiling: Αποτελεί στοχευμένη ή ημι-στοχευμένη προσέγγιση, κατά την οποία πραγματοποιείται ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων μεταβολιτών μέσω ολοκλήρωσης των αντίστοιχων σημάτων στο φάσμα NMR. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντιστοίχιση των χημικών μετατοπίσεων, της πολλαπλότητας και των σταθερών σύζευξης με βιβλιοθήκες φασμάτων και βάσεις δεδομένων μεταβολιτών. Τα ποσοτικά δεδομένα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για στατιστική ανάλυση, διερεύνηση μεταβολικών μονοπατιών και αναγνώριση πιθανών βιοδεικτών.^{58,59} Στη μελέτη του εντερικού μικροβιώματος, το metabolic profiling εφαρμόζεται συχνά για την ποσοτικοποίηση μεταβολιτών όπως τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs), τα οργανικά οξέα, τα αμινοξέα και προϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού, τα οποία σχετίζονται με τη φυσιολογική κατάσταση και τη μεταβολική δραστηριότητα του μικροβιώματος.^{60,61}

Fingerprinting: αποτελεί περισσότερο μη στοχευμένη προσέγγιση, κατά την οποία αναλύεται το συνολικό φασματικό πρότυπο ενός δείγματος χωρίς να απαιτείται πλήρης ταυτοποίηση όλων των μεταβολιτών. Στην περίπτωση αυτή, το ενδιαφέρον εστιάζεται στη συνολική εικόνα του φάσματος και στις μεταβολές του μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων ή βιολογικών καταστάσεων. Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιείται συχνά για τη σύγκριση μεταβολικών προφίλ και την ανίχνευση διαφοροποιήσεων που σχετίζονται με μεταβολικές ή μικροβιακές μεταβολές. Στη μεταβολομική, τα φασματικά δεδομένα συχνά συνδυάζονται με στατιστικές και υπολογιστικές μεθόδους για τη διερεύνηση διαφοροποιήσεων μεταξύ δειγμάτων και την εξαγωγή βιολογικά σημαντικών πληροφοριών.⁵

1.3.8 Εφαρμογές της Φασματοσκοπίας ^1H NMR στη μελέτη του εντερικού μικροβιώματος

Κατά τη μελέτη του εντερικού μικροβιώματος, η Φασματοσκοπία ^1H -NMR εφαρμόζεται κυρίως στην ανάλυση κοπρανωδών δειγμάτων, τα οποία περιέχουν μεγάλο αριθμό υδατοδιαλυτών μεταβολιτών μικροβιακής και ενδογενούς προέλευσης. Μέσω της τεχνικής μπορούν να ανιχνευθούν και να ποσοτικοποιηθούν σημαντικές κατηγορίες μεταβολιτών, όπως λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (short-chain fatty acids, SCFAs)⁶², αμινοξέα, οργανικά οξέα, σάκχαρα, χολικά οξέα και προϊόντα μικροβιακού μεταβολισμού.^{63,64} Οι ενώσεις αυτές αντικατοπτρίζουν τη μεταβολική δραστηριότητα του μικροβιώματος και παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργική κατάσταση του εντερικού οικοσυστήματος.^{11,65}

Η μεταβολομική ανάλυση μέσω Φασματοσκοπίας ^1H -NMR έχει συμβάλει σημαντικά στη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ εντερικού μικροβιώματος και διαφόρων παθολογικών καταστάσεων. Μεταβολές στο μεταβολικό προφίλ των κοπρανωδών δειγμάτων έχουν συσχετιστεί με φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου,^{66,67} παχυσαρκία, σακχαρώδη διαβήτη,⁶⁸ μεταβολικό σύνδρομο και νευροεκφυλιστικές διαταραχές.⁶⁹⁻⁷¹ Παράλληλα, η τεχνική χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της επίδρασης διατροφικών παρεμβάσεων, προβιοτικών, αντιβιοτικών και άλλων θεραπευτικών προσεγγίσεων στη λειτουργία του μικροβιώματος.^{35,72} Επιπλέον, η συνδυαστική αξιοποίηση της με υπολογιστικές και αλγοριθμικές μεθόδους επεξεργασίας δεδομένων επιτρέπει την αποτελεσματικότερη ανάλυση σύνθετων φασμάτων και τη βελτιωμένη ταυτοποίηση μεταβολιτών. Για τον λόγο αυτό, η τεχνική αποτελεί σημαντικό εργαλείο στη σύγχρονη μεταβολομική έρευνα και συμβάλλει ουσιαστικά στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ εντερικού μικροβιώματος και ανθρώπινου οργανισμού.⁷³

1.4 Ταυτοποίηση μεταβολιτών ενδιαφέροντος στη Φασματοσκοπία ^1H NMR

Ένα από τα σημαντικότερα στάδια της μεταβολομικής ανάλυσης είναι η ακριβής ταυτοποίηση σημάτων μεταβολιτών ενδιαφέροντος, καθώς παρέχει τη δυνατότητα συσχέτισης φασματικών δεδομένων με συγκεκριμένες χημικές ενώσεις, που συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες.^{74,75} Στη φασματοσκοπία ^1H NMR, η διαδικασία αυτή βασίζεται στην ανάλυση των χαρακτηριστικών κορυφών που εμφανίζονται σε

κάθε φάσμα και στην αντιστοίχισή τους με γνωστούς μεταβολίτες, αξιοποιώντας εξειδικευμένα υπολογιστικά και βιβλιογραφικά εργαλεία.⁷⁶

Η όλη διαδικασία της ταυτοποίησης ξεκινάει με επεξεργασία των ^1H NMR φασμάτων προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα και η αξιοπιστία των δεδομένων. Η επεξεργασία αυτή περιλαμβάνει διαδικασίες, όπως διόρθωση γραμμής βάσης (baseline correction), διόρθωση φάσης (κλίσης) κορυφών (phase correction) και ευθυγράμμιση φασμάτων (spectra alignment).^{77,78} Οι μεθοδολογίες αυτές καθίστανται απαραίτητες προκειμένου τα φάσματα να είναι συγκρίσιμα μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων και να μειώνονται τα σφάλματα που προκύπτουν από πειραματικές μεταβολές.⁷⁹ Στη συνέχεια, ακολουθεί η ανίχνευση των χαρακτηριστικών κορυφών, δηλαδή η αναγνώριση των σημάτων που αντιστοιχούν σε ορισμένους πυρήνες υδρογόνου των μεταβολιτών. Σε κάθε μεταβολίτη αντιστοιχεί ένα χαρακτηριστικό σύνολο σημάτων κορυφών, το οποίο εξαρτάται από τη χημική μετατόπιση, τη πολλαπλότητα και τη σταθερά σύζευξης και χρησιμοποιείται για την αναγνώριση της μοριακής δομής των ενώσεων σε ένα δείγμα.⁷⁵ Η αντιστοίχιση των φασματικών σημάτων με μεταβολίτες γίνεται μέσω σύγκρισης με πρότυπα φάσματα και εξειδικευμένες βάσεις δεδομένων όπως οι Human Metabolome Database (HMDB) και Chenomx NMR Suite.^{80,81} Έτσι, καθίσταται δυνατή η ταυτοποίηση ενώσεων με βάση τη θέση και τη μορφή των κορυφών τους στο φάσμα.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα κατά την ανάλυση ^1H -NMR φασμάτων είναι η επικάλυψη σημάτων. Στα πολύπλοκα βιολογικά δείγματα, και ιδιαίτερα στα υδατικά εκχυλίσματα κοπρανωδών δειγμάτων, συνυπάρχουν εκατοντάδες μεταβολίτες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, γεγονός που οδηγεί σε αλληλεπικάλυψη κορυφών σε συγκεκριμένες περιοχές του φάσματος. Η επικάλυψη αυτή δυσχεραίνει τόσο την ακριβή ταυτοποίηση όσο και την ποσοτικοποίηση των ενώσεων. Επιπλέον, ιδιαίτερα στα ούρα και στα κοπρανώδη δείγματα, μεταβολές του pH και της ιοντικής ισχύος του δείγματος μπορούν να προκαλέσουν μικρές μεταβολές στις χημικές μετατοπίσεις των σημάτων, αποτελώντας έναν επιπλέον παράγοντα που δυσχεραίνει την αξιόπιστη και αυτοματοποιημένη ταυτοποίηση των μεταβολιτών. Για την αντιμετώπιση των παραπάνω περιορισμών εφαρμόζονται τεχνικές αποσύνθεσης φασμάτων (spectral deconvolution), πολυδιάστατης ^1H NMR ανάλυσης και προηγμένοι αλγόριθμοι επεξεργασίας σήματος.⁷⁹

Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη υπολογιστικών μεθόδων και αλγορίθμων μηχανικής μάθησης έχει συμβάλλει σημαντικά στην αυτοματοποίηση της διαδικασίας ταυτοποίησης μεταβολιτών.^{82,83} Οι αυτοματοποιημένες προσεγγίσεις επιτρέπουν τη ταχύτερη επεξεργασία μεγάλου όγκου φασματικών δεδομένων και μειώνουν την ανάγκη για εκτεταμένη χειροκίνητη ανάλυση. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα των υπολογιστικών προσεγγίσεων εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τη φύση και την πολυπλοκότητα της εξεταζόμενης βιολογικής μήτρας. Κάθε βιολογική μήτρα παρουσιάζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και διαφορετικές αναλυτικές προκλήσεις. Έτσι, είναι αναγκαία η ανάπτυξη προσαρμοσμένων αλγοριθμικών προσεγγίσεων (adapted algorithms), σχεδιασμένων με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης μήτρας, για την αξιόπιστη αυτοματοποιημένη ανάλυση.

Συνολικά, η ταυτοποίηση σημάτων μεταβολιτών μέσω $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπίας αποτελεί μία σύνθετη αλλά ιδιαίτερα σημαντική διαδικασία στη μεταβολομική ανάλυση. Ο συνδυασμός πειραματικών τεχνικών, υπολογιστικών εργαλείων και βάσεων δεδομένων συμβάλλει στην ακριβή αναγνώριση των μεταβολικών προφίλ και στην εξαγωγή βιολογικά σημαντικών συμπερασμάτων.⁸⁴

1.5 Ποσοτικοποίηση μεταβολιτών ενδιαφέροντος στη Φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$

Η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών αποτελεί κι αυτή ένα από τα βασικά στάδια της μεταβολομικής ανάλυσης, καθώς επιτρέπει τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των ενώσεων που υπάρχουν σε ένα βιολογικό δείγμα.⁸⁵ Στη φασματοσκοπία $^1\text{H NMR}$, η ποσοτική πληροφορία συνδέεται άμεσα με το εμβαδόν των φασματικών κορυφών, το οποίο είναι ανάλογο του αριθμού των πρωτονίων, που συμβάλλουν στο αντίστοιχο σήμα.⁷⁵ Η ιδιότητα αυτή την καθιστά μία ιδιαίτερα αξιόπιστη και αναπαραγωγίμη τεχνική για ποσοτικές εφαρμογές και αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημά της σε σύγκριση με άλλες αναλυτικές τεχνικές, όπως η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS) και η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS).

Η βασική αρχή της ποσοτικής ανάλυσης βασίζεται στην ολοκλήρωση των φασματικών σημάτων. Κατά τη διαδικασία αυτή υπολογίζεται το εμβαδόν κάτω από κάθε κορυφή ή ομάδα κορυφών που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο μεταβολίτη. Το ολοκλήρωμα του σήματος είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της ένωσης στο δείγμα, υπό την προϋπόθεση ότι οι συνθήκες μέτρησης είναι σταθερές και ότι δεν υπάρχουν σημαντικές

αλληλεπικαλύψεις σημάτων.⁸⁶ Για την ακριβή ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών μπορούν να χρησιμοποιηθούν πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης, οι οποίες κατασκευάζονται με τη μέτρηση πρότυπων διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης και τη συσχέτιση της συγκέντρωσης του αναλύτη με το αντίστοιχο ολοκλήρωμα του φασματικού σήματος. Η προκύπτουσα σχέση χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του μεταβολίτη σε άγνωστα δείγματα. Εναλλακτικά, η ποσοτικοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω σημάτων αναφοράς, τα οποία χρησιμοποιούνται για την κανονικοποίηση των φασματικών ολοκληρωμάτων. Εκτός από τη χρήση εσωτερικών προτύπων (internal standards), τα οποία προστίθενται απευθείας στο υπό μελέτη δείγμα σε γνωστή συγκέντρωση και χρησιμοποιούνται ως σημείο αναφοράς για την ποσοτικοποίηση, ή εξωτερικών προτύπων (external standards), τα οποία αναλύονται ξεχωριστά από το δείγμα και παρέχουν τη βάση αναφοράς για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των μεταβολιτών, έχουν αναπτυχθεί και προσεγγίσεις που βασίζονται σε τεχνητά ή υπολογιστικά δημιουργημένα σήματα αναφοράς (artificial reference signal), τα οποία επιτρέπουν την κανονικοποίηση των φασματικών δεδομένων χωρίς την προσθήκη επιπλέον ενώσεων στο υπό μελέτη δείγμα.⁸⁷

Η ακρίβεια της ποσοτικοποίησης εξαρτάται από παράγοντες, όπως η ποιότητα του φάσματος, ο λόγος σήματος προς το θόρυβο, η σταθερότητα του μαγνητικού πεδίου και η επικάλυψη κορυφών.⁷⁵ Επιπλέον, μεταβολές στο pH, τη θερμοκρασία και στην ιοντική ισχύ του δείγματος μπορούν να προκαλέσουν μετατοπίσεις στις κορυφές και να επηρεάσουν την ακρίβεια των μετρήσεων.^{85,87} Για το λόγο αυτό απαιτείται προσεκτική προετοιμασία δειγμάτων και τυποποίηση των πειραματικών συνθηκών. Η αξιολόγηση της αξιοπιστίας και της αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων αποτελεί κρίσιμο στοιχείο της ποσοτικής μεταβολομικής. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων εξετάζεται μέσω πολλαπλών αναλύσεων του ίδιου δείγματος, ενώ η ακρίβεια αξιολογείται με τη χρήση πρότυπων γνωστής συγκέντρωσης. Η εφαρμογή διαδικασιών ποιοτικού ελέγχου διασφαλίζει τη συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων και ενισχύει τη βιολογική αξιοπιστία των συμπερασμάτων.

Έτσι, η ποσοτικοποίηση μεταβολιτών μέσω ¹H-NMR φασματοσκοπίας αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων. Η δυνατότητα άμεσης ποσοτικής εκτίμησης, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη αυτοματοποιημένων

υπολογιστικών μεθόδων τη καθιστά ιδιαίτερα σημαντική για τη μελέτη μεταβολικών διεργασιών και την αναζήτηση βιοδεικτών σε εφαρμογές βιοϊατρικής έρευνας.⁷⁴

1.6 Σκοπός της μελέτης

Η παρούσα μελέτη αποσκοπεί στην ανάπτυξη ενός υπολογιστικά ελαφρού και αποδοτικού αλγορίθμου για την αυτοματοποιημένη επεξεργασία και ανάλυση φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (¹H NMR) από δείγματα υδατικού εκχυλίσματος κοπράνων. Αξιοποιώντας τις γνωστές χημικές μετατοπίσεις του οξικού οξέος ως σημείο αναφοράς και χρησιμοποιώντας σχέσεις συσχέτισης με άλλους μεταβολίτες, ο προτεινόμενος αλγόριθμος επιτρέπει την πρόβλεψη των χημικών μετατοπίσεων και την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση 30 μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων των SCFAs και άλλων βιολογικά σημαντικών ενώσεων. Η απόδοση της προτεινόμενης προσέγγισης αξιολογήθηκε σε συνολικά 754 φάσματα, προερχόμενα από διαφορετικά σύνολα δεδομένων. Η προσέγγιση διαφοροποιείται από συμβατικές μεθόδους χειροκίνητης ανάθεσης και από γενικότερες υπολογιστικές προσεγγίσεις, καθώς έχει προσαρμοστεί στις ιδιαίτερες απαιτήσεις της σύνθετης μήτρας των δειγμάτων κοπράνων και στοχεύει στην αυτοματοποίηση επιμέρους σταδίων της φασματικής ανάλυσης. Συνολικά, η μελέτη αποσκοπεί στην ανάπτυξη μιας αναπαραγωγίσιμης και προσβάσιμης μεθοδολογίας για τον ταχύτερο και αξιόπιστο μεταβολικό χαρακτηρισμό δειγμάτων κοπράνων και τη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ που σχετίζεται με τη λειτουργία του εντερικού μικροβιώματος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δείγματα

Στη παρούσα μελέτη αναλύθηκαν συνολικά 754 δείγματα κοπρανώδους υδατικού εκχυλίσματος (fecal water samples), τα οποία προέρχονται από διαφορετικές πειραματικές και κλινικές ομάδες δειγμάτων που αναλύθηκαν με Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (¹H NMR). Συγκεκριμένα 40 δείγματα, προερχόμενα από 10 εθελοντές του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (University of Ioannina, UoI), χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία επικύρωσης της αυτοματοποιημένης πλατφόρμας ποσοτικοποίησης μεταβολιτών. Επιπλέον, 714 φασματικά δεδομένα ¹H-NMR προέρχονται από 4 διαφορετικές κοόρτες τα οποία πάρθηκαν σε συνεργασία με το Imperial College London και χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη και επικύρωση

του αλγορίθμου αυτόματης ταυτοποίησης χημικών μετατοπίσεων. Όλα τα δείγματα είχαν αποθηκευτεί σε θερμοκρασία $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως τη στιγμή της ανάλυσης, ώστε να διασφαλιστεί η σταθερότητα των μεταβολιτών και να ελαχιστοποιηθεί η αποικοδόμησή τους.²

2.2 Προετοιμασία δειγμάτων υδατικού εκχυλίσματος κοπράνων

Η προετοιμασία των δειγμάτων υδατικού εκχυλίσματος κοπράνων πραγματοποιήθηκε με στόχο την εξαγωγή του υδατοδιαλυτού κλάσματος των κοπρανωδών δειγμάτων, το οποίο περιέχει το σύνολο των μικροβιακών και ενδογενών μεταβολιτών. Συγκεκριμένα, τα δείγματα αναμείχθηκαν με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:3 (δείγμα: καθαρό νερό) και ακολούθησε έντονη ανάδευση σε vortex έως την κατά το δυνατόν πληρέστερη ομογενοποίηση και διάλυση του υλικού. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 10000rpm για 20 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέους σωλήνες Eppendorf και ακολούθησε δεύτερο στάδιο φυγοκέντρωσης υπό τις ίδιες συνθήκες. Τέλος, το τελικό υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρούς σωλήνες Eppendorf και τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ έως την περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνα 2. Πρωτόκολλο προετοιμασίας ¹H NMR δειγμάτων κοπράνων.

Για την παρασκευή του διαλύματος NMR, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) συγκέντρωσης 1.5 M KH_2PO_4 , 1.3 mM NaN_3 και 10 mM sodium 3-(trimethylsilyl)(2,2,3,3- d_4)propionate (TSP- d_4) σε αποδεδεσμευμένο δευτέριο οξείδιο (D_2O), με τελικό pH 7.4. Όλα τα χημικά αντιδραστήρια και οι μεταβολίτες-πρότυπα προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Sigma-Aldrich, TCI και FLUKA με καθαρότητα μεγαλύτερη από 98%.

Για την κατασκευή καμπυλών αναφοράς (standard curves) και τα πειράματα προσθήκης προτύπου (spiking experiments), οι μεταβολίτες-πρότυπα προστέθηκαν στο ρυθμιστικό διάλυμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις, προκειμένου να επιτευχθεί ποσοτική αξιολόγηση της απόκρισης του συστήματος.

Για την τελική προετοιμασία των δειγμάτων, 540 μL fecal water αναμίχθηκαν με 60 μL ρυθμιστικού διαλύματος (τελική αραίωση 10%). Το μίγμα ομογενοποιήθηκε με ήπια ανάδευση και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν 550 μL σε σωληνάρια NMR διαμέτρου 5 mm για ανάλυση.

2.3 Συνθήκες καταγραφής φασμάτων ^1H -NMR

Η καταγραφή των φασμάτων ^1H -NMR πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικά φασματοσκοπικά συστήματα Bruker, ανάλογα με την προέλευση των δειγμάτων. Τα δείγματα του UoI αναλύθηκαν σε φασματόμετρο Bruker AV-500 NEO, εξοπλισμένο με cryoprobe TXI και λειτουργική συχνότητα ^1H 500.13 MHz, καθώς και αυτοματοποιημένο σύστημα αλλαγής δειγμάτων. Τα δείγματα από τις υπόλοιπες μελέτες αναλύθηκαν σε φασματόμετρα Bruker IVDr 600 MHz (Bruker BioSpin), εξοπλισμένα με ανιχνευτές τύπου PATXI H/C/N ή BBI, καθώς και σύστημα αυτόματης εισαγωγής δειγμάτων SampleJet. Επιπλέον, δεδομένα από το Imperial College London είχαν προηγουμένως συλλεχθεί σε φασματόμετρο Bruker IVDr 600 MHz με ένταση μαγνητικού πεδίου 14.1 T και σύστημα αυτόματου tuning/matching.

Σε όλες τις μετρήσεις, η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 300 K. Τα φάσματα 1D ^1H -NMR αποκτήθηκαν με χρήση της παλμικής ακολουθίας NOESY (noesygppr1d), με καταστολή του σήματος του νερού.

Οι βασικές παράμετροι απόκτησης ήταν οι εξής:

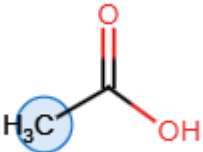
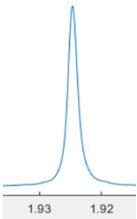
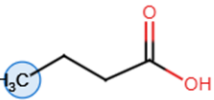
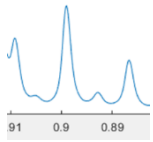
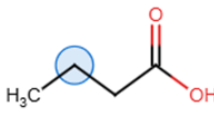
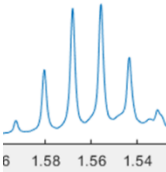
- 32 scans
- 98.304 σημεία δεδομένων
- φασματικό εύρος 18.029 Hz
- χρόνος ανάμειξης 10 ms
- χρόνος χαλάρωσης 4 s

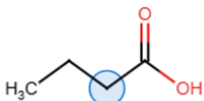
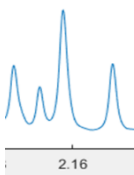
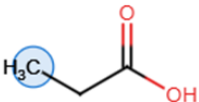
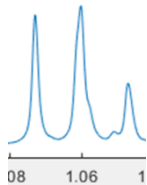
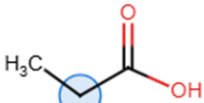
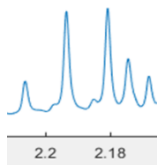
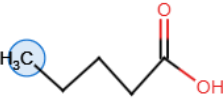
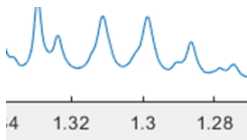
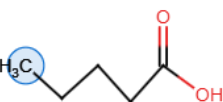
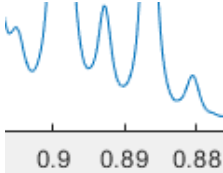
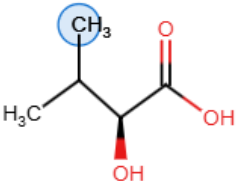
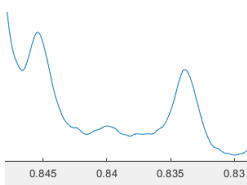
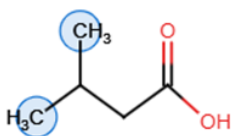
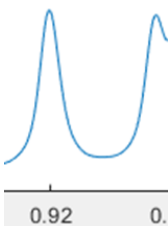
Πριν από τη μετασχηματισμό Fourier εφαρμόστηκε γραμμική διεύρυνση 0.3 Hz στο σήμα FID. Η διόρθωση φάσης και γραμμής βάσης πραγματοποιήθηκε αυτόματα μέσω του λογισμικού IconNMR (Bruker BioSpin).

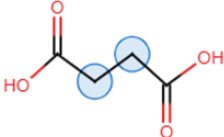
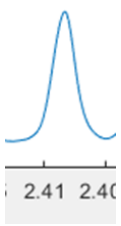
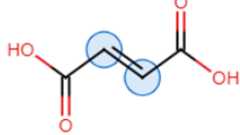
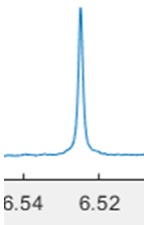
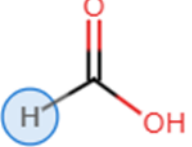
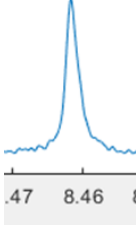
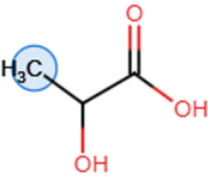
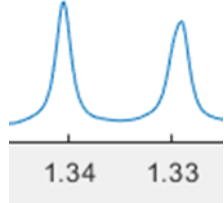
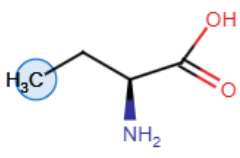
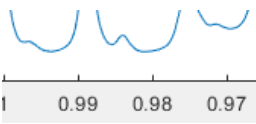
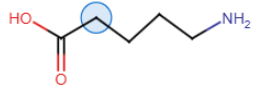
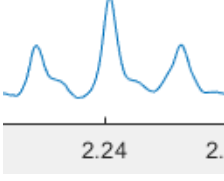
2.4 Επεξεργασία φασματικών δεδομένων και υπολογιστική ανάλυση

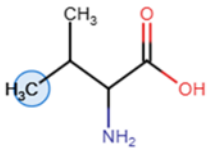
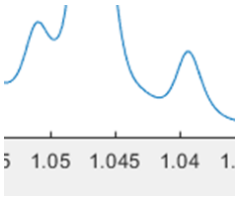
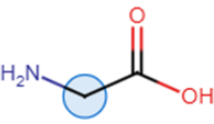
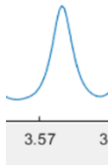
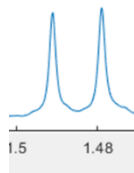
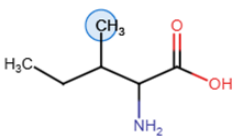
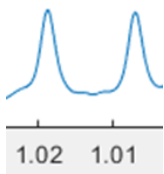
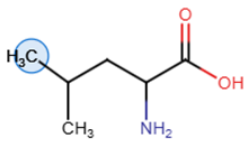
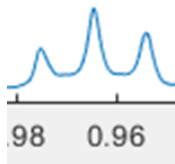
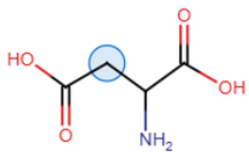
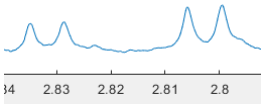
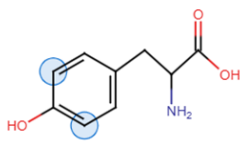
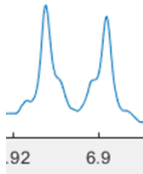
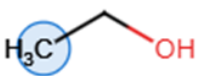
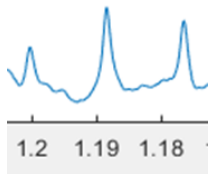
Τα φάσματα ^1H NMR των δειγμάτων κοπρανόδους υδατικού εκχυλίσματος υποβλήθηκαν σε συστηματική επεξεργασία και ανάλυση με στόχο την εξαγωγή αξιόπιστων φασματικών χαρακτηριστικών και τη δημιουργία υπολογιστικών μοντέλων πρόβλεψης των χημικών μετατοπίσεων των χαρακτηριστικών σημάτων των μεταβολιτών. Η φασματική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε περιβάλλον MATLAB (MathWorks R2024b), αξιοποιώντας ενσωματωμένες συναρτήσεις και εξατομικευμένους αλγορίθμους. Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές τιμές χημικής μετατόπισης λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs), αμινοξέων, σακχάρων και άλλων μεταβολιτών σε φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H NMR).

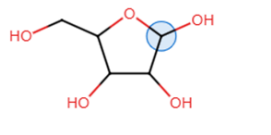
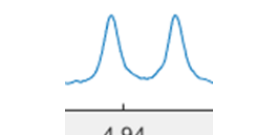
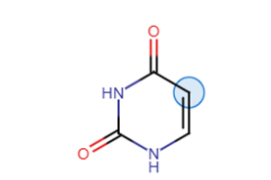
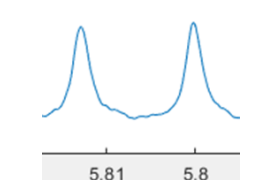
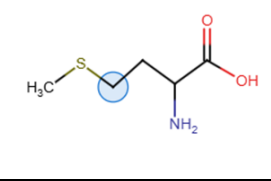
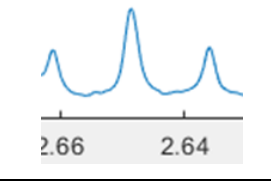
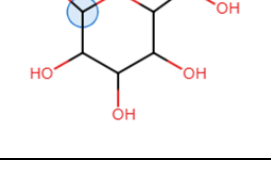
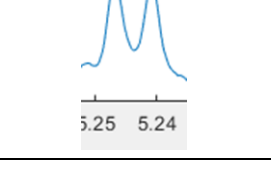
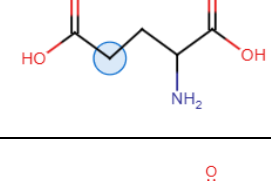
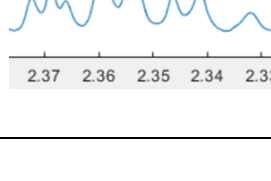
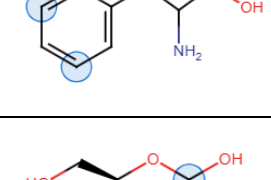
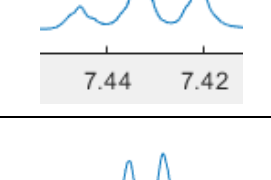
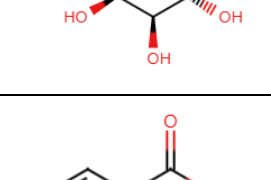
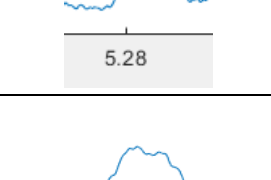
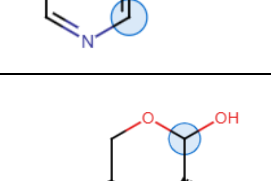
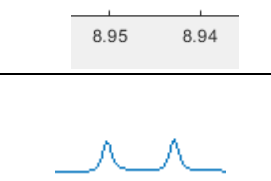
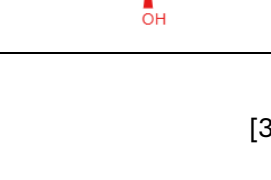
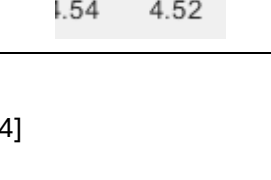
Πίνακας 1. Χαρακτηριστικές τιμές χημικής μετατόπισης μεταβολιτών ενδιαφέροντος σε φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (^1H NMR). Η πρώτη στήλη περιλαμβάνει όλους τους μεταβολίτες που αναλύονται στην παρούσα εργασία, ενώ στη δεύτερη στήλη παρουσιάζεται η μοριακή δομή τους, με επισήμανση των χημικών ομάδων των οποίων τα πρωτόνια εμφανίζουν τα αντίστοιχα σήματα στη φάσμα. Ακολουθούν οι χαρακτηριστικές τιμές χημικής μετατόπισης των αντίστοιχων σημάτων καθώς και η πολλαπλότητα αυτών των σημάτων στην τρίτη και τέταρτη στήλη αντίστοιχα.

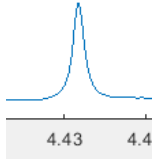
SCFAs	Χημική δομή	Χημική μετατόπιση (ppm)	Μορφή NMR κορυφής
Οξικό οξύ (Acetic Acid)			Απλή (Singlet)
Βουτυρικό οξύ (Butyric Acid)	(1) 		Τριπλή (Triplet)
	(2) 		Εξαπλή (Sextet)

	(3)			Τριπλή (Triplet)
Προπιονικό οξύ (Propionic Acid)	(1)			Τριπλή (Triplet)
	(2)			Τετραπλή (Quartet)
Βαλερικό οξύ (Valeric Acid)	(1)			Εξαπλή (Sextet)
	(2)			Τριπλή (Triplet)
2-Υδροξύ ισοβαλερικό οξύ (2-Hydroxy- Isovaleric Acid)				Διπλή (Doublet)
Ισοβαλερικό οξύ (Isovaleric Acid)				Διπλή (Doublet)

Ηλεκτρικό οξύ (Succinic Acid)			Απλή (Singlet)
Φουμαρικό οξύ (Fumaric Acid)			Απλή (Singlet)
Μυρμηκικό οξύ (Formic Acid)			Απλή (Singlet)
Γαλακτικό οξύ (Lactic Acid)			Διπλή (Doublet)
2-Άμινοβουτυρικό οξύ (2-Aminobutyric acid)			Τριπλή (Triplet)
5-Άμινοβαλερικό οξύ (5-Aminopentanoic acid)			Τριπλή (Triplet)

Μεταβολίτες	Χημική Δομή	Χημική Μετατόπιση (ppm)	Μορφή NMR κορυφής
Βαλίνη (Valine)			Διπλή (Doublet)
Γλυκίνη (Glycine)			Απλή (Singlet)
Αλανίνη (Alanine)			Διπλή (Doublet)
Ισολευκίνη (Isoleucine)			Διπλή (Doublet)
Λευκίνη (Leucine)			Τριπλή (Triplet)
Ασπαρτικό οξύ (Aspartic Acid)			Διπλή (Doublet)
Τυροσίνη (Tyrosine)			Εξαπλή (Sextet)
Αιθανόλη (Ethanol)			Τριπλή (Triplet)

Ριβόζη (Ribose)			Διπλή (Doublet)
Ουρακίλη (Uracil)			Διπλή (Doublet)
Μεθειονίνη (Methionine)			Τριπλή (Triplet)
Γλυκόζη (Glucose)			Διπλή (Doublet)
Γλουταμικό οξύ (Glutamic Acid)			Πολλαπλή (Multiplet)
Φαινυλαλανίνη (Phenylalanine)			Πολλαπλή (Multiplet)
Γαλακτόζη (Galactose)			Διπλή (Doublet)
Νικοτινικό οξύ (Nicotinic Acid)			Διπλή (Doublet)
Αραβινόζη (Arabinose)			Διπλή (Doublet)

1,3- Διϋδροξυακετόνη (1,3- Dihydroxyacetone)			Απλή (Singlet)
---	---	--	-------------------

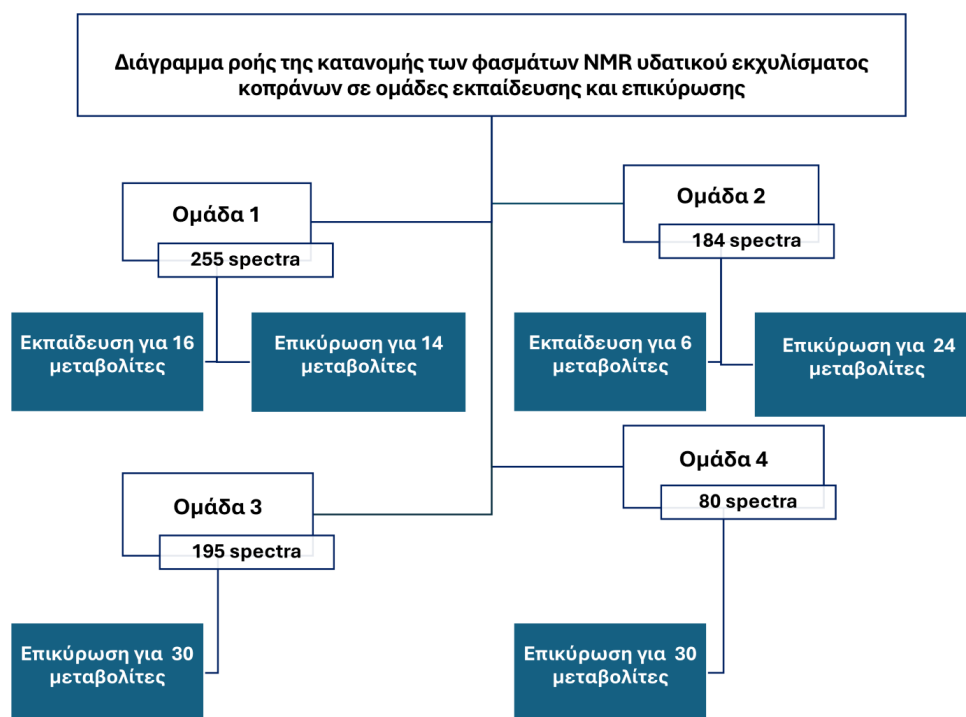
Η προεπεξεργασία των φασμάτων περιλάμβανε διαδοχικά στάδια επεξεργασίας, ώστε να μετατραπούν τα ακατέργαστα δεδομένα σε κατάλληλη μορφή για ανάλυση. Αρχικά, τα σήματα Free Induction Decay (FID) μετατράπηκαν σε φάσματα μέσω του μετασχηματισμού Fourier (Fourier Transform). Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν διορθώσεις φάσης (phase correction) και γραμμής βάσης (baseline correction). Για τη μείωση της επίδρασης του σήματος του νερού εφαρμόστηκε τεχνική καταστολής του σήματός του (water suppression) κατά την επεξεργασία των φασμάτων. Ακολούθησε φασματική ευθυγράμμιση (alignment) για τη διόρθωση μικρών αποκλίσεων στις χημικές μετατοπίσεις μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων.

2.4.2 Ανάπτυξη υπολογιστικής μεθοδολογίας για την εξαγωγή φασματικών χαρακτηριστικών

Για την ανάπτυξη υπολογιστικών μοντέλων χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλά ανεξάρτητα σύνολα δεδομένων ^1H NMR φασμάτων κοπρανώδους εκχυλίσματος, για τη διασφάλιση της αναπαραγωγιμότητας και της συνέπειας των αποτελεσμάτων, τα οποία περιλάμβαναν συνολικά περίπου 714 δείγματα. Συγκεκριμένα, τέσσερα σύνολα δεδομένων (255, 184, 195 και 80 φάσματα) χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη, εκπαίδευση και αξιολόγηση των μοντέλων (**Εικόνα 3**). Οι συναρτήσεις πρόβλεψης χημικής μετατόπισης (δ) και οι στατιστικές παράμετροι τους αναπτύχθηκαν για τη δημιουργία γραμμικών μοντέλων μεταξύ χαρακτηριστικών φασματικών σημάτων. Οι σχέσεις μεταξύ μεταβολιτών προέκυψαν από τη στατιστική ανάλυση των ^1H NMR φασμάτων, μέσω διαγραμμάτων διασποράς (scatter plots) και υπολογισμού συντελεστών συσχέτισης (R^2). Παράλληλα, υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (standard deviation, SD) των τιμών χημικής μετατόπισης (δ , ppm), προκειμένου να εκτιμηθεί η διακύμανση της θέσης των σημάτων μεταξύ των φασμάτων. Για την αξιολόγηση της απόδοσης των μοντέλων υπολογίστηκαν επίσης η Ρίζα Μέσου Τετραγωνικού Σφάλματος - Root Mean Square Error (RMSE), το οποίο εκφράζει τη μέση απόκλιση των προβλεπόμενων τιμών από τις πραγματικές τιμές, παρέχοντας ένα μέτρο του

απόλυτου σφάλματος του μοντέλου στις ίδιες μονάδες με τα δεδομένα και το Relative Root Mean Square Error (RRMSE), το οποίο αποτελεί την κανονικοποιημένη μορφή του RMSE και εκφράζει το σφάλμα σε σχετική κλίμακα ως προς το εύρος ή τη μέση τιμή των παρατηρήσεων, επιτρέποντας τη σύγκριση της απόδοσης μεταξύ διαφορετικών μοντέλων ή σύνολο δεδομένων. Χαμηλότερες τιμές και των δύο δεικτών υποδηλώνουν υψηλότερη ακρίβεια και καλύτερη προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα. Ακόμη, στα διαγράμματα παρουσιάστηκαν και τα όρια πρόβλεψης με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% (95% prediction bounds) των γραμμικών μοντέλων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την αποτύπωση της αβεβαιότητας των προβλέψεων του μοντέλου. Τα όρια αυτά προσδιορίζουν το εύρος εντός του οποίου αναμένεται να εμπίπτει μια νέα παρατηρούμενη τιμή της εξαρτημένης μεταβλητής με πιθανότητα 95%, λαμβάνοντας υπόψη τόσο τη διακύμανση των δεδομένων, όσο και την αβεβαιότητα της εκτίμησης του μοντέλου. Με αυτόν τον τρόπο παρέχεται μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα της αξιοπιστίας των προβλέψεων, πέρα από την απλή εκτίμηση της γραμμικής παλινδρόμησης.

Για την ανάπτυξη του αλγορίθμου ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκαν SMolESY φάσματα, τα οποία προέκυψαν από επεξεργασία των αρχικών 1D ^1H NMR φασμάτων. Η χρήση τους παρείχε φάσματα με μειωμένη επικάλυψη σημάτων και καθαρότερη γραμμή βάσης, διευκολύνοντας την επιλογή των χαρακτηριστικών κορυφών μεταβολιτών και τη διαδικασία ολοκλήρωσης σημάτων. Η αξιοποίηση των SMolESY δεδομένων που προέρχονται από το φανταστικό μέρος του φάσματος συνέβαλε στη βελτίωση της ακρίβειας της ανίχνευσης και του διαχωρισμού επικαλυπτόμενων σημάτων, ιδιαίτερα σε φασματικές περιοχές υψηλής πολυπλοκότητας.



Εικόνα 3. Διάγραμμα ροής της κατανομής των φασμάτων NMR του κοπρανώδους υδατικού εκχυλίσματος στις ομάδες εκπαίδευσης και επικύρωσης. Ο αλγόριθμος εκπαιδεύτηκε και επικυρώθηκε χρησιμοποιώντας πειραματικά δεδομένα ^1H NMR από τέσσερα σύνολα δεδομένων (255, 184, 195 και 80 φάσματα), ώστε να διασφαλιστεί η ακρίβεια και η αξιοπιστία των παραγόμενων μοντέλων. Από τα τέσσερα πειραματικά σύνολα φασμάτων ^1H NMR, τα σύνολα των 255 και 184 φασμάτων (συνολικά 439 φάσματα) χρησιμοποιήθηκαν ως σύνολα εκπαίδευσης (training datasets) για επιλεγμένους μεταβολίτες, ενώ ταυτόχρονα λειτούργησαν ως σύνολα επικύρωσης (validation datasets) για άλλους. Αυτός ο διττός ρόλος επέτρεψε την ανάπτυξη ανθεκτικών μοντέλων και τη διασταυρούμενη επικύρωση μεταξύ των μεταβολιτών ενδιαφέροντος. Τα υπόλοιπα σύνολα δεδομένων, αποτελούμενα από 195 και 80 φάσματα (συνολικά 275 φάσματα), διατηρήθηκαν για ανεξάρτητο έλεγχο και τελική επικύρωση της προβλεπτικής απόδοσης του αλγορίθμου.

2.5 Μεθοδολογία Ποσοτικοποίησης Μεταβολιτών (Quantification of Metabolites)

Μετά τη μοντελοποίηση των χημικών μετατοπίσεων των μεταβολιτών το επόμενο στάδιο της ανάλυσης αφορούσε την ποσοτικοποίηση των επιλεγμένων μεταβολιτών στα κοπρανώδη δείγματα. Στόχος της διαδικασίας ήταν ο προσδιορισμός σχετικών και

απόλυτων συγκεντρώσεων μεταβολιτών, αξιοποιώντας τις προβλεπόμενες τιμές χημικής μετατόπισης (δ) και τις αντίστοιχες ολοκληρωμένες εντάσεις των σημάτων από τα ^1H NMR φάσματα.

Για τον σκοπό αυτό αναπτύχθηκε εξειδικευμένη υπολογιστική διαδικασία ανάλυσης (pipeline), η οποία ενσωματώνει αλγορίθμους φασματικής ολοκλήρωσης και υπολογισμού συγκεντρώσεων, προσδιορισμού φασματικού ορίου ανίχνευσης μέσω εκτίμησης θορύβου και καθορισμού ειδικών φασματικών περιοχών για κάθε μεταβολίτη. Η διαδικασία ποσοτικοποίησης βασίστηκε στην αυτόματη εξαγωγή και ανάλυση των φασματικών κορυφών που αντιστοιχούν σε επιλεγμένους μεταβολίτες ενδιαφέροντος.

Για κάθε φάσμα υπολογίστηκε το φασματικό όριο ανίχνευσης μέσω της βασικής στάθμης θορύβου. Τα φασματικά δεδομένα εισήχθησαν στην αρχική τους (ακατέργαστη) μορφή, όπως εξήχθησαν από τα αρχεία τύπου Bruker, μέσω της συνάρτησης `rbnmr`. Για την ανάλυση των φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα μη επεξεργασμένα δεδομένα έντασης (IData), με βάση τα οποία υπολογίστηκε και η αριθμητική παράγωγος του σήματος ως προς τον άξονα της χημικής μετατόπισης (ppm), προκειμένου να ενισχυθεί ο εντοπισμός των ορίων των κορυφών. Η χρήση της παραγώγου επέτρεψε τον ακριβέστερο εντοπισμό μεταβολών του σήματος και συνεπώς, τον καλύτερο καθορισμό των ορίων των κορυφών. Ο συνδυασμός με τον υπολογισμό παραγώγων συνέβαλε σε πιο αξιόπιστη εκτίμηση του θορύβου και σε στατιστικά τεκμηριωμένο προσδιορισμό των περιοχών σήματος. Οι τιμές του φασματικού ορίου ανίχνευσης και του θορύβου αποθηκεύτηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως βάση για την αναγνώριση σημαντικών κορυφών και τον αποκλεισμό περιοχών που αντιστοιχούν σε θόρυβο.

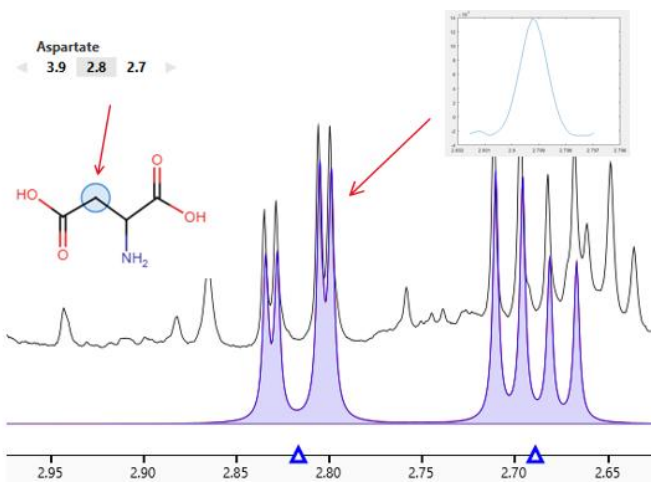
Για τον ορισμό των ορίων (έναρξη και λήξη) κάθε φασματικής κορυφής χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση `findpeaks`. Η διαδικασία αυτή επέτρεψε την απομόνωση μόνο των φασματικών περιοχών που αντιστοιχούν σε πραγματικά και επαναλήψιμα σήματα μεταβολιτών, μειώνοντας την επίδραση θορύβου και επικαλύψεων.

Τέλος, ακολούθησε η ολοκλήρωση των φασματικών αυτών περιοχών, μέσω υπολογισμού του εμβαδού κάθε SMOIESY κορυφής. Τα ολοκληρώματα αξιοποιήθηκαν έπειτα τόσο για σχετική, όσο και για απόλυτη ποσοτικοποίηση.

2.5.1 Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative Quantification)

Η σχετική ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με βάση την αναλογική συμβολή κάθε κορυφής στο αντίστοιχο πολλαπλό σήμα (multiplet). Συγκεκριμένα, αξιοποιώντας τα ακατέργαστα φάσματα (raw spectra) του κάθε μεταβολίτη υπολογίστηκε το ολοκλήρωμα (integral) επιλεγμένων, καλά διαχωρισμένων κορυφών ^1H και στη συνέχεια έγινε κανονικοποίηση ως προς τον θεωρητικό αριθμό πρωτονίων που συμβάλλουν στο εκάστοτε σήμα. Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζεται, ως αντιπροσωπευτικό παράδειγμα, η διαδικασία προσδιορισμού του χαρακτηριστικού σήματος για το αμινοξύ ασπαρτικό οξύ, συμπεριλαμβανομένων των ορίων της χαρακτηριστικής κορυφής (όρια της κορυφής που προκύπτουν αυτόματα από την πλατφόρμα/bounds), του αριθμού πρωτονίων και της σχετικής συνεισφοράς της κορυφής στο πολλαπλό σήμα (multiplet), που χρησιμοποιούνται για τη κανονικοποίηση του σήματος (δηλαδή το ολοκλήρωμα της κορυφής για το σήμα που αντιστοιχεί για ένα πρωτόνιο) στη σχετική ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών ενδιαφέροντος.

Πίνακας 2. Επισκόπηση της χαρακτηριστικής κορυφής του ασπαρτικού οξέος που προκύπτει αυτόματα από τον αλγόριθμο, του αριθμού πρωτονίων και της συνεισφοράς της κορυφής στο πολλαπλό σήμα (A_m : Εμβαδόν κάθε κορυφής, A_{total} : Συνολικό εμβαδόν πολλαπλού σήματος), που χρησιμοποιούνται για τη κανονικοποίηση του σήματος στη σχετική ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών.

Μεταβολίτης	Κορυφή	% A_m/A_{total}
Ασπαρτικό οξύ (-CH ₂) (2.79ppm)		19.81%

Η προσέγγιση αυτή λαμβάνει υπόψη το φαινόμενο της πολλαπλότητας (λόγω spin–spin coupling), διασφαλίζοντας ότι η τελική τιμή αντικατοπτρίζει την πραγματική σχετική συμβολή του μεταβολίτη στο φάσμα. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται συνεπής σύγκριση μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων, ανεξάρτητα από μικρές διακυμάνσεις στην απόλυτη ένταση του σήματος, καθώς και σύγκριση των μεταβολιτών μεταξύ τους.

2.5.2 Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute Quantification)

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω της κατασκευής καμπυλών βαθμονόμησης (calibration curves), σε συνδυασμό με πειράματα προσθήκης πρότυπων ουσιών (spiking experiments), με στόχο την αξιολόγηση πιθανών επιδράσεων μήτρας (matrix effects).

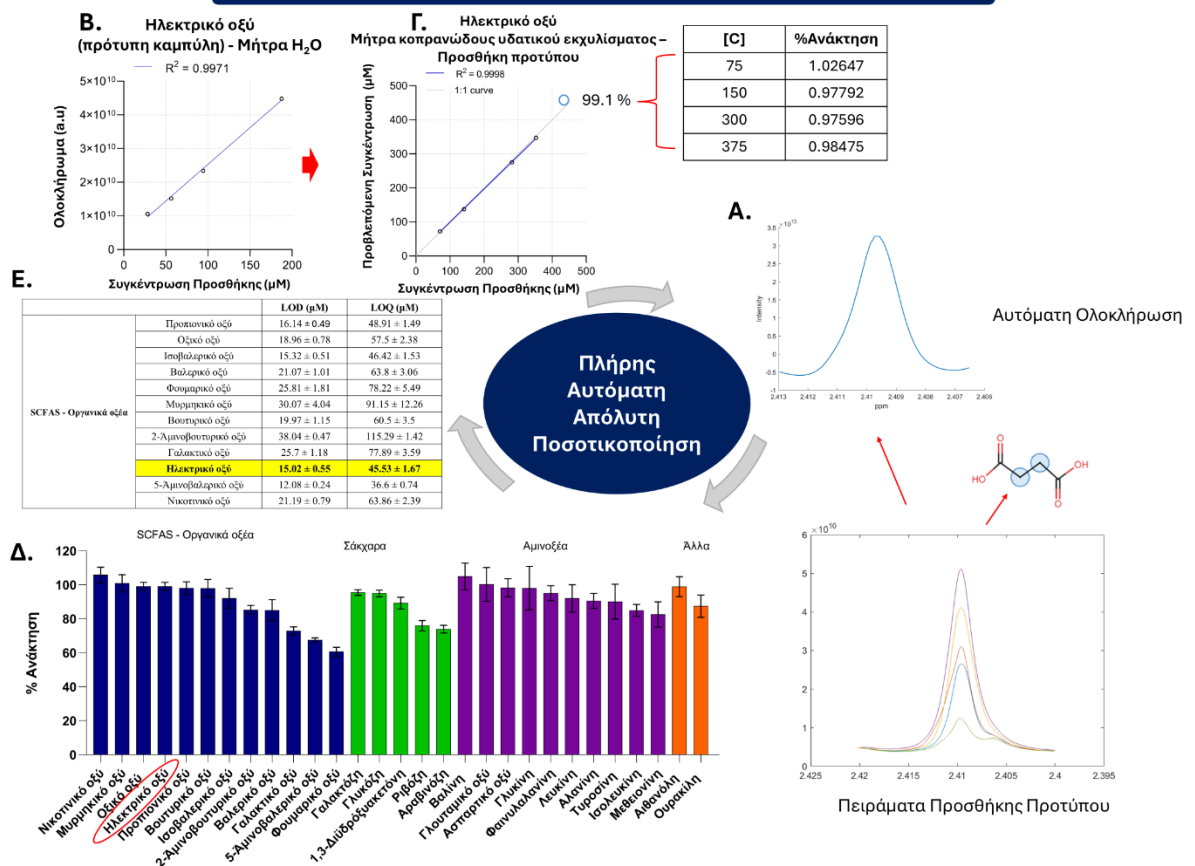
Για κάθε μεταβολίτη κατασκευάστηκαν γραμμικά μοντέλα βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας δεδομένα από δείγματα κοπρανώδους υλικού και αντίστοιχα δείγματα καθαρού νερού (clear water matrix), επιτρέποντας τη σύγκριση και τον έλεγχο επιδράσεων του βιολογικού υποστρώματος στο σήμα του NMR.

Οι μεταβολίτες ομαδοποιήθηκαν σε τέσσερις ομάδες με βάση τα φασματικά τους χαρακτηριστικά και την εγγύτητα των χημικών μετατοπίσεων, ώστε να αποφεύγεται η επικάλυψη σημάτων. Κάθε ομάδα υποβλήθηκε σε προσθήκη πρότυπων ουσιών σε τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης.

Στα πειράματα κοπρανώδους υλικού, 540 μL δείγματος αναμίχθηκαν με 60 μL ρυθμιστικού διαλύματος (urine buffer), ώστε να προκύψει τελικός όγκος 600 μL . Στη συνέχεια προστέθηκαν πρότυπες ποσότητες μεταβολιτών ώστε να επιτευχθούν τελικές συγκεντρώσεις 75, 150, 300 και 375 μM . Για την πρώτη ομάδα μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα 10, 20, 40 και 50 μL διαλύματος πρότυπης ουσίας, ενώ ο τελικός όγκος ρυθμίστηκε με buffer ώστε να παραμένει σταθερός. Η ίδια διαδικασία εφαρμόστηκε για όλες τις μεταβολικές ομάδες.

Παράλληλα, δημιουργήθηκαν αντίστοιχες καμπύλες βαθμονόμησης σε καθαρό υδατικό υπόστρωμα, προκειμένου να εκτιμηθούν οι επιδράσεις του βιολογικού υποστρώματος στην απόκριση του σήματος. Σε αυτή την περίπτωση, 540 μL καθαρού νερού συνδυάστηκαν με 60 μL buffer και πραγματοποιήθηκε spiking σε τελικές συγκεντρώσεις 30, 60, 100 και 200 μM .

Αναλυτική Μεθοδολογία Ποσοτικοποίησης & Πειράματα Προσθήκης Προτύπου



Εικόνα 4. Μεθοδολογία Απόλυτης Ποσοτικοποίησης. Αναλυτική παρουσίαση της όλης διαδικασίας απόλυτης ποσοτικοποίησης για το ηλεκτρικό οξύ. (Α) Αντιπροσωπευτικά φάσματα ¹H NMR, που απεικονίζουν την αυτοματοποιημένη ολοκλήρωση της απλής κορυφής του ηλεκτρικού οξέος, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την απόλυτη ποσοτικοποίηση, παρουσιάζονται για να καταδείξουν την πλήρως αυτοματοποιημένη ροή εργασίας που εφαρμόστηκε στην απόλυτη ποσοτικοποίηση. (Β) Οι καμπύλες βαθμονόμησης που κατασκευάστηκαν σε μήτρα H₂O έδειξαν εξαιρετική γραμμικότητα ($R^2 > 0,99$). (Γ) Πειράματα προσθήκης προτύπου (spiking) πραγματοποιήθηκαν σε μήτρα κοπρανώδους ύδατος (fecal water matrix) σε πολλαπλά επίπεδα συγκέντρωσης, και οι προβλεπόμενες έναντι των προστιθέμενων συγκεντρώσεων παρουσίασαν ισχυρή συμφωνία με τη θεωρητική σχέση 1:1 ($R^2 = 0,9999$ για το ηλεκτρικό οξύ). (Δ) Το ποσοστό ανάκτησης για τον επιλεγμένο μεταβολίτη βρέθηκε 99.1%. (Ε) Παρατίθενται και το όριο ανίχνευσης (LOD) και όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).

Όλα τα δείγματα παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το ίδιο πρωτόκολλο και αναλύθηκαν υπό ταυτόσημες πειραματικές συνθήκες ¹H NMR. Οι εντάσεις των επιλεγμένων κορυφών για τα πειράματα προσθήκης προτύπου σε υδατικά δείγματα κοπράνων εξήχθησαν μέσω του αυτοματοποιημένου αλγορίθμου ανάλυσης, ενώ για τα δείγματα

καθαρού νερού (clear water matrix) τα ολοκληρώματα προσδιορίστηκαν μέσω της πλατφόρμας SMoIESY.

Οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν μέσω γραμμικής παλινδρόμησης (linear regression) μεταξύ της ολοκληρωμένης έντασης του σήματος και της γνωστής συγκέντρωσης του εκάστοτε μεταβολίτη. Τα τελικά μοντέλα βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκαν για την απόλυτη ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών στα δείγματα fecal water, λαμβάνοντας υπόψη πιθανές επιδράσεις μήτρας και εξασφαλίζοντας υψηλή ακρίβεια στις εκτιμήσεις συγκέντρωσης. Στην **Εικόνα 4** γίνεται μία αναλυτική επισκόπηση της όλης διαδικασίας απόλυτης ποσοτικοποίησης μέσω του παραδείγματος του ηλεκτρικού οξέος.

2.5.3 Όριο Ανίχνευσης (LOD) - Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ) και Ποσοστό Εμφάνισης (% occurrence)

Η αναλυτική ευαισθησία της αναπτυχθείσας πλατφόρμας ποσοτικοποίησης μέσω Φασματοσκοπίας ^1H NMR αξιολογήθηκε με τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και του ορίου ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) για κάθε μεταβολίτη (**Πίνακας 2**). Οι παράμετροι αυτοί υπολογίστηκαν με βάση τις καμπύλες βαθμονόμησης που δημιουργήθηκαν στο πλαίσιο της διαδικασίας απόλυτης ποσοτικοποίησης.

Συγκεκριμένα, το LOD ορίστηκε ως η ελάχιστη συγκέντρωση ενός μεταβολίτη που μπορεί να διακριθεί αξιόπιστα από το θόρυβο υποβάθρου του φάσματος, ενώ το LOQ αντιστοιχεί στην ελάχιστη συγκέντρωση η οποία μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

Το όριο ανίχνευσης⁸⁸ και το όριο ποσοτικοποίησης⁸⁸ υπολογίστηκαν μέσω των ακόλουθων εξισώσεων:

$$LOD = \frac{3.3 \cdot \sigma}{s} \quad (\text{εξ. 3})$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{s} \quad (\text{εξ. 4})$$

Όπου s η τυπική απόκλιση της απόκρισης και s η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης για κάθε μεταβολίτη.

Ο υπολογισμός τους βασίστηκε στη στατιστική απόκλιση της απόκρισης του σήματος και στην κλίση της γραμμικής παλινδρόμησης των καμπυλών βαθμονόμησης. Οι τιμές LOD και LOQ προσδιορίστηκαν ξεχωριστά για κάθε μεταβολίτη, χρησιμοποιώντας δεδομένα τόσο από υδατικά δείγματα κοπράνων όσο και από πειράματα σε καθαρό υδατικό υπόστρωμα.

Οι παράμετροι αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της ευαισθησίας και της αξιοπιστίας της αναλυτικής μεθοδολογίας, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις χαμηλών συγκεντρώσεων μεταβολιτών, όπως αυτές που απαντώνται σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα.

Το ποσοστό εμφάνισης (% occurrence) για κάθε μεταβολίτη υπολογίστηκε με βάση το συνολικό αριθμό φασμάτων στα οποία ο κάθε μεταβολίτης επιβεβαιώθηκε. Συγκεκριμένα, το ποσοστό αυτό εκφράζει τη συχνότητα παρουσίας ενός μεταβολίτη στα αναλυθέντα δείγματα και υπολογίστηκε ως το ποσοστό των φασμάτων όπου ανιχνεύθηκε ο μεταβολίτης προς το σύνολο των έγκυρων φασμάτων.

2.5.4 Αξιολόγηση επιδράσεων μήτρας και ποσοστό ανάκτησης (% Retrieval)

Για την εκτίμηση της ακρίβειας και της αξιοπιστίας της προτεινόμενης μεθοδολογίας πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση επιδράσεων μήτρας (matrix effects) μέσω πειραμάτων σταθερής προσθήκης πρότυπων ουσιών (spiking experiments).

Συγκεκριμένες ποσότητες μεταβολιτών προστέθηκαν σε υδατικά δείγματα κοπρανόδους εκχυλίσματος σε προκαθορισμένα επίπεδα συγκέντρωσης και οι μετρούμενες τιμές συγκρίθηκαν με τις θεωρητικά αναμενόμενες συγκεντρώσεις που είχαν προστεθεί. Το ποσοστό ανάκτησης (% retrieval) υπολογίστηκε ως ο λόγος της διαφοράς μεταξύ της πειραματικά προσδιορισμένης συγκέντρωσης του αναλύτη στο εμπλουτισμένο δείγμα και της αντίστοιχης συγκέντρωσης στο μη εμπλουτισμένο δείγμα, προς τη θεωρητικά προστιθέμενη συγκέντρωση του αναλύτη, εκφρασμένος ως ποσοστό (**Εικόνα 4Δ**).

Η διαδικασία εφαρμόστηκε συστηματικά για όλες τις ομάδες μεταβολιτών και για όλα τα επίπεδα συγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκαν στις καμπύλες βαθμονόμησης.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν αντίστοιχα πειράματα σε καθαρό υδατικό υπόστρωμα, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως σύστημα αναφοράς και να αξιολογηθεί η επίδραση της βιολογικής μήτρας στην απόκριση του σήματος.

Οι τιμές ανάκτησης παρείχαν ποσοτικό δείκτη της ακρίβειας της μεθόδου και επέτρεψαν την εκτίμηση πιθανών αποκλίσεων λόγω επιδράσεων μήτρας. Συνολικά, η ανάλυση επιβεβαίωσε την αξιοπιστία της αναπτυγμένης πλατφόρμας για την ποσοτικοποίηση μεταβολιτών σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα όπως τα δείγματα υδατικού εκχυλίσματος κοπράνων.

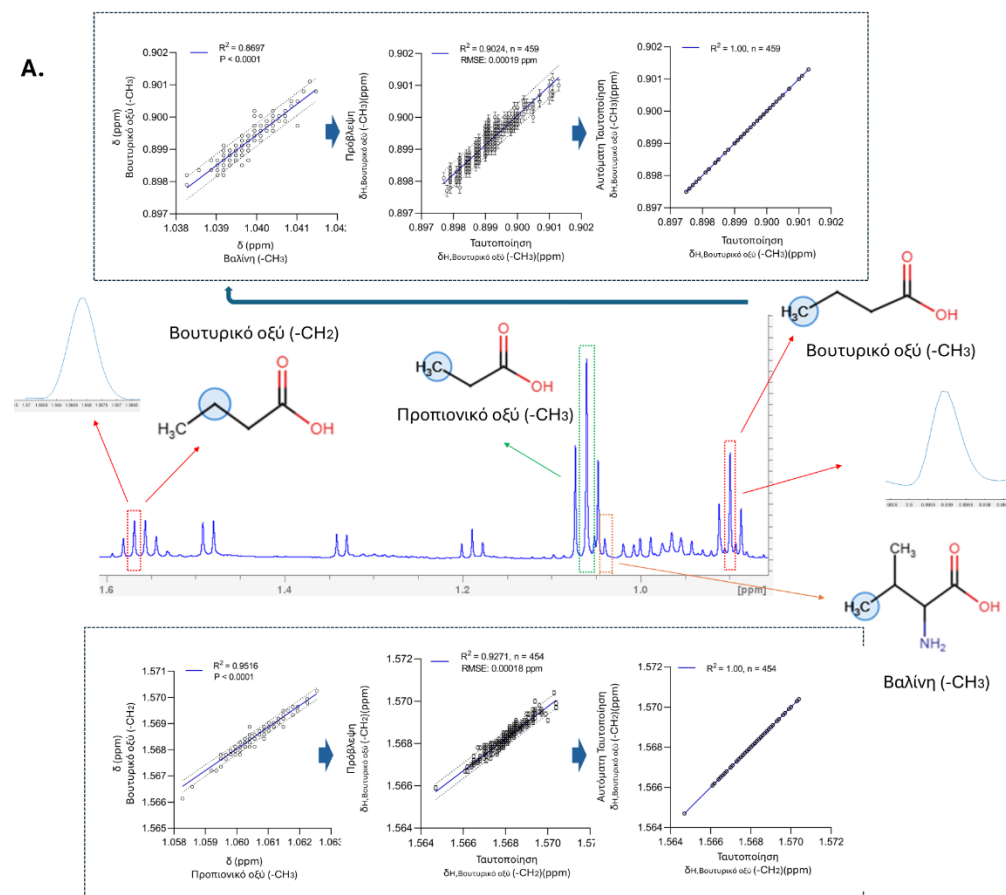
3. Αποτελέσματα

3.1 Εφαρμογή του αλγορίθμου στην ταυτοποίηση μεταβολιτών

Οι συσχετίσεις μεταξύ των χημικών μετατοπίσεων των μεταβολιτών προέκυψαν από τη στατιστική ανάλυση των ^1H NMR φασμάτων υδατικού εκχυλίσματος κοπρανωδών δειγμάτων. Με βάση τις παρατηρούμενες συσχετίσεις, αναπτύχθηκαν υπολογιστικά μοντέλα πρόβλεψης χημικών μετατοπίσεων, τα οποία επιτρέπουν την εκτίμηση τιμών χημικής μετατόπισης (δ) και τη χαρτογράφηση του μεταβολικού προφίλ των δειγμάτων. Τα μοντέλα εκπαιδεύτηκαν και επικυρώθηκαν χρησιμοποιώντας τέσσερα ανεξάρτητα πειραματικά σύνολα δεδομένων (255, 184, 195 και 80 φάσματα), εξασφαλίζοντας υψηλή αξιοπιστία και αναπαραγωγιμότητα (**Εικόνα 5**).

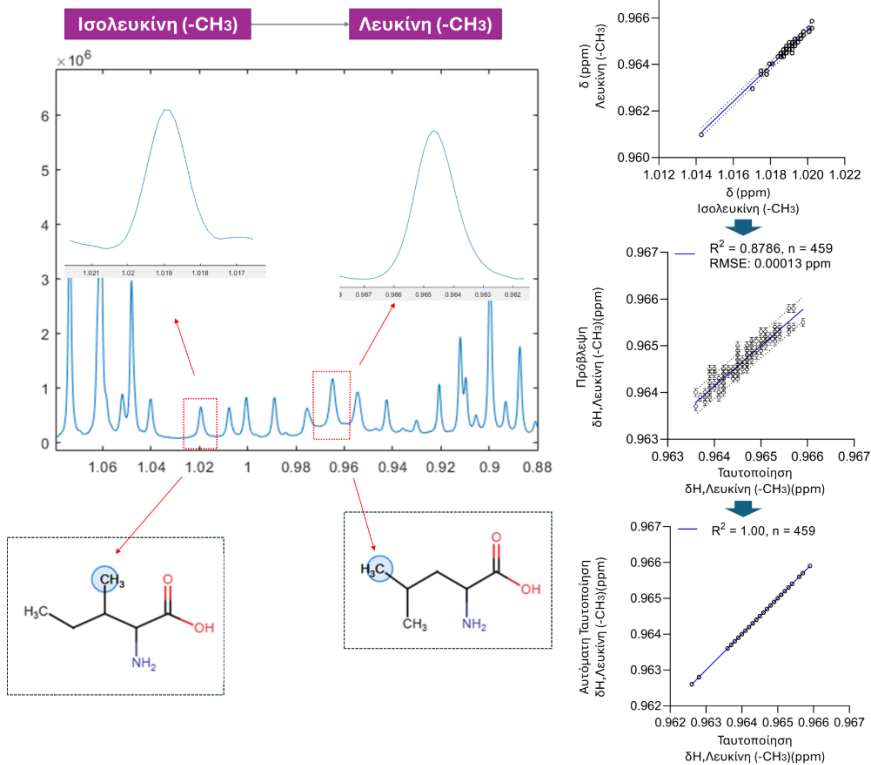
Τα σύνολα των 255 και 184 φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για την ανάπτυξη και εκπαίδευση των μοντέλων, ενώ παράλληλα λειτούργησαν και ως εσωτερική διαδικασία επικύρωσης για επιλεγμένους μεταβολίτες. Τα υπόλοιπα σύνολα (195 και 80 φάσματα) χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά ως ανεξάρτητα δεδομένα επικύρωσης για την τελική αξιολόγηση της προβλεπτικής ικανότητας των μοντέλων.

A.



B.

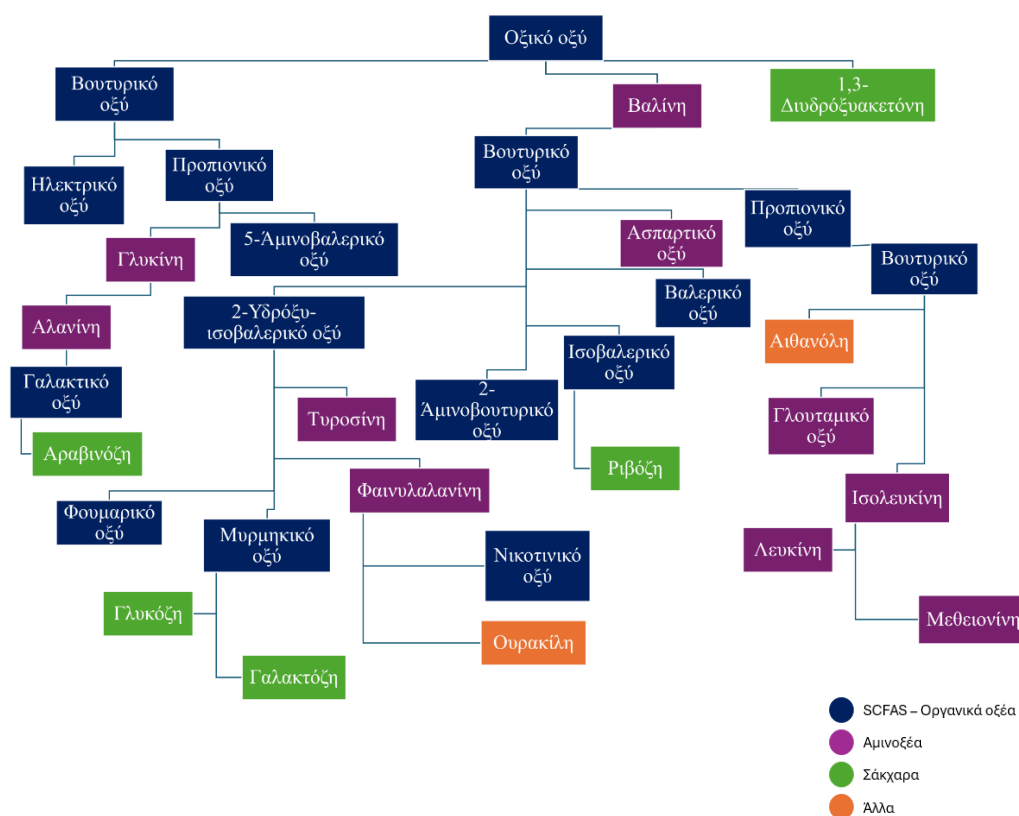
Πλήρης Αυτόματη Ταυτοποίηση



Εικόνα 5. Πλήρης Αυτόματη Ταυτοποίηση μεταβολιτών. Χαρακτηριστικές τιμές χημικής μετατόπισης των (Α) βουτυρικού οξέος ($-\text{CH}_3$), προπιονικού οξέος ($-\text{CH}_3$), βαλίνης ($-\text{CH}_3$) και (Β) λευκίνης ($-\text{CH}_3$), ισολευκίνης ($-\text{CH}_3$) σε φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (^1H NMR). Απόδοση μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ των πρωτονίων μεθυλίου δ της βαλίνης και του βουτυρικού οξέος ($-\text{CH}_3$), των πρωτονίων μεθυλίου δ του προπιονικού οξέος και του βουτυρικού οξέος ($-\text{CH}_2$), καθώς και μεταξύ των πρωτονίων μεθυλίου δ της ισολευκίνης και της λευκίνης ($-\text{CH}_3$), καθώς και των προβλέψεων του αλγορίθμου πριν και μετά τη βελτιστοποίηση (πλήρως αυτοματοποιημένη ταυτοποίηση-επικύρωση). Οι μπάρες σφάλματος (error bars) αντιπροσωπεύουν την τυπική απόκλιση (SD) των τιμών χημικής μετατόπισης, ενώ οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν τα όρια πρόβλεψης (95% prediction bounds) του γραμμικού μοντέλου παλινδρόμησης. Επίσης, παρουσιάζονται ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), το σύνολο των δειγμάτων n και το RMSE.

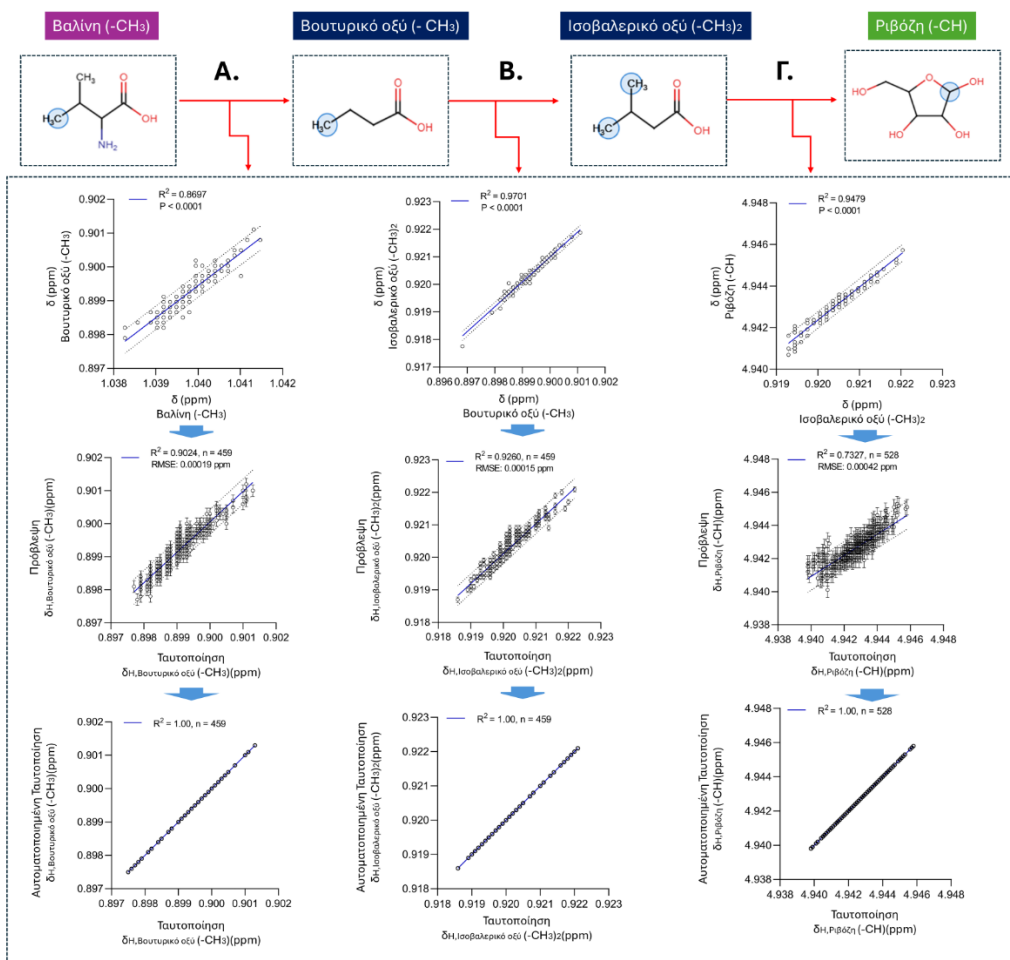
Η αναλυτική διαδικασία βασίστηκε στη συσχέτιση του σήματος του οξικού οξέος με τις αντίστοιχες χημικές μετατοπίσεις άλλων μεταβολιτών, όπως η βαλίνη, επιτρέποντας την εκτίμηση τιμών δ από τα πειραματικά φάσματα. Το οξικό οξύ επιλέχθηκε ως μεταβολίτης αναφοράς, καθώς αποτελεί έναν από τους κύριους και συχνότερα ανιχνεύσιμους μεταβολίτες στα υδατικά εκχυλίσματα δειγμάτων κοπράνων. Επιπλέον, το χαρακτηριστικό σήμα του στο φάσμα ^1H -NMR εμφανίζεται ως διακριτό και σαφώς οριοθετημένο σήμα, παρουσιάζοντας περιορισμένη επικάλυψη με σήματα άλλων μεταβολιτών. Η σχετικά υψηλή συγκέντρωσή του στα υπό μελέτη δείγματα συμβάλλει επίσης στην αξιόπιστη ανίχνευση και στον ακριβή προσδιορισμό της αντίστοιχης χημικής μετατόπισης, καθιστώντας το κατάλληλο ως σημείο αναφοράς για την ανάπτυξη της προτεινόμενης μεθοδολογίας. Με αυτόν τον τρόπο κατέστη δυνατή η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών με υψηλή ακρίβεια.

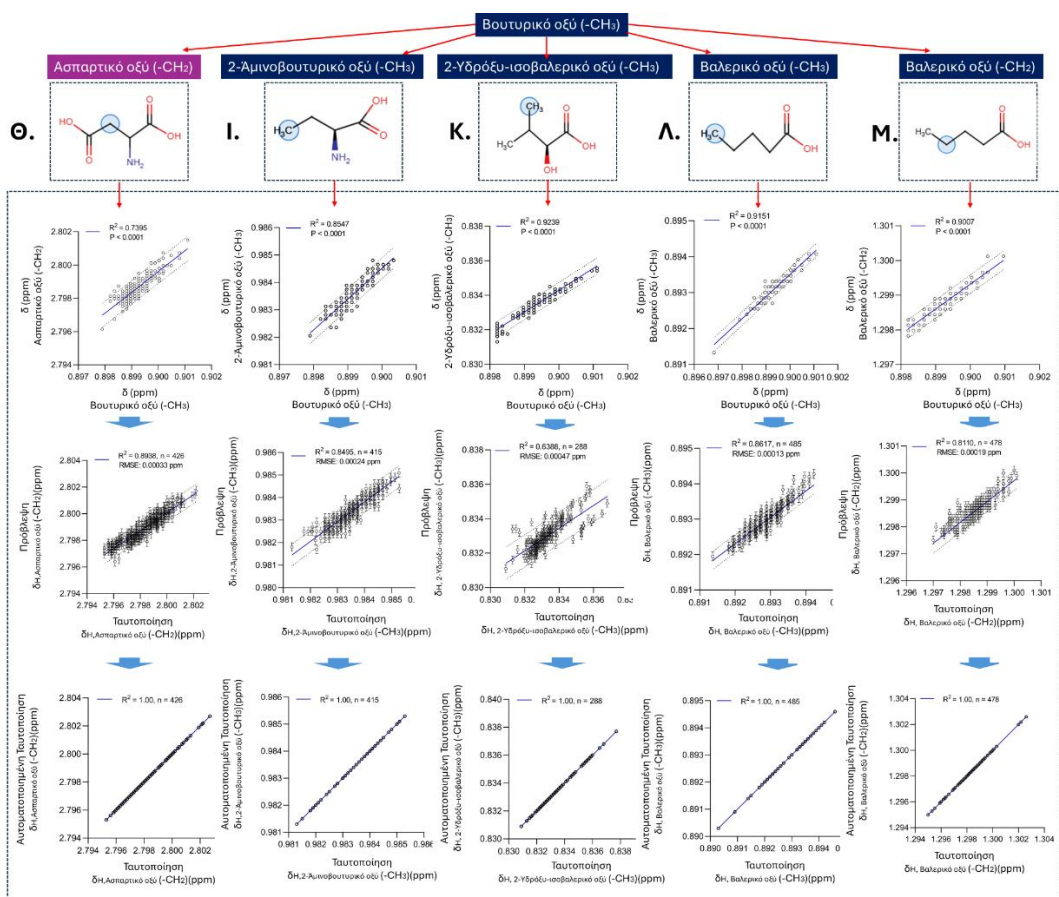
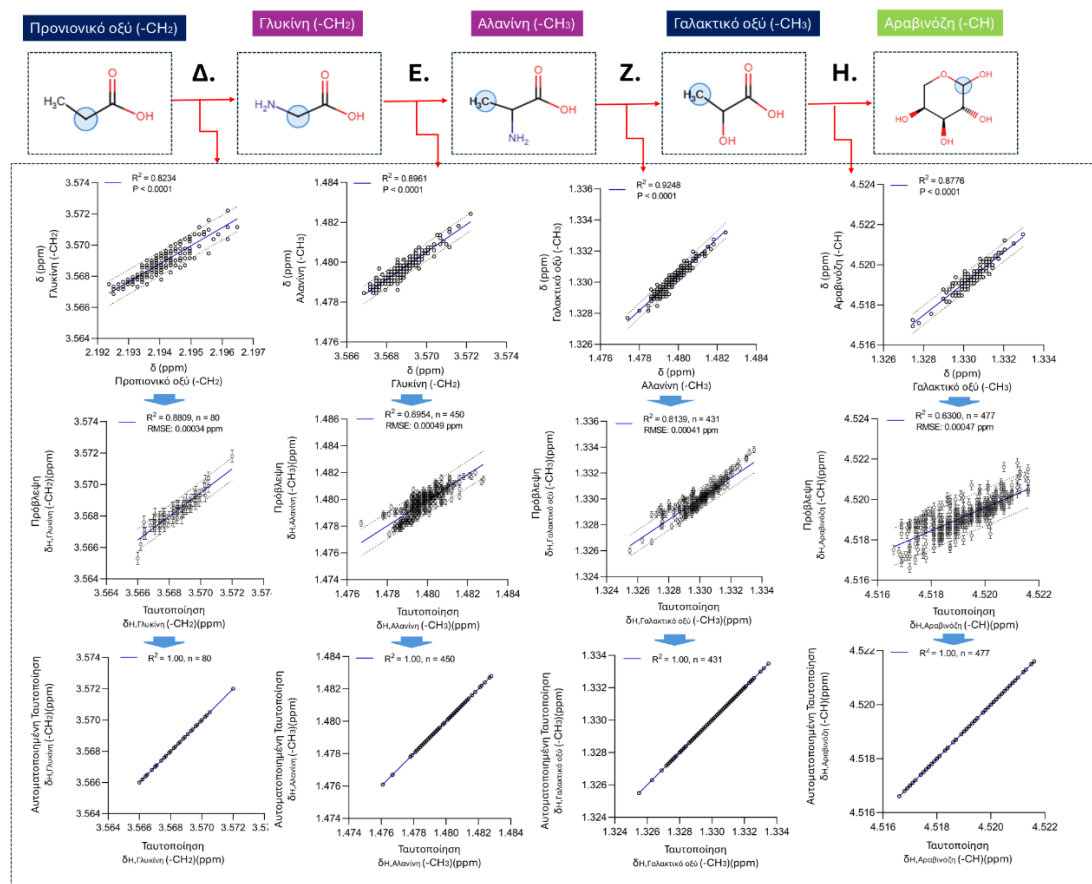
Ειδικότερα, αναπτύχθηκε αλγοριθμική συνάρτηση πρόβλεψης, η οποία αξιοποιεί προεκπαιδευμένα μοντέλα για την εκτίμηση τιμών μεταβολιτών από το σήμα του οξικού οξέος (**Εικόνα 6**). Η συνάρτηση ενσωματώνει παραμέτρους όπως το Root Mean Square Error (RMSE) και χρησιμοποιεί φασματικά δεδομένα (chemical shift και intensity) για την τελική πρόβλεψη. Η διαδικασία επιτρέπει τη μετατροπή των προβλεπόμενων τιμών σε αντίστοιχες χημικές μετατοπίσεις μέσω υπολογιστικής συνάρτησης αναστροφής.

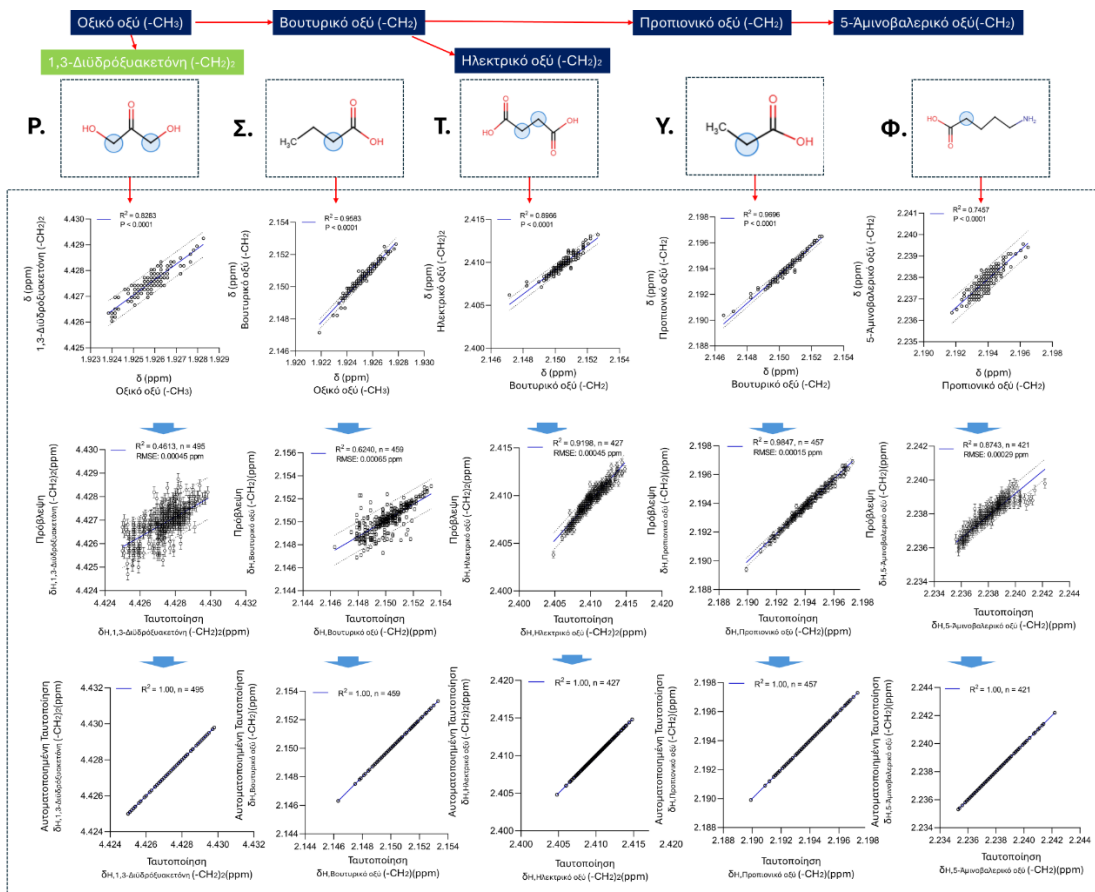
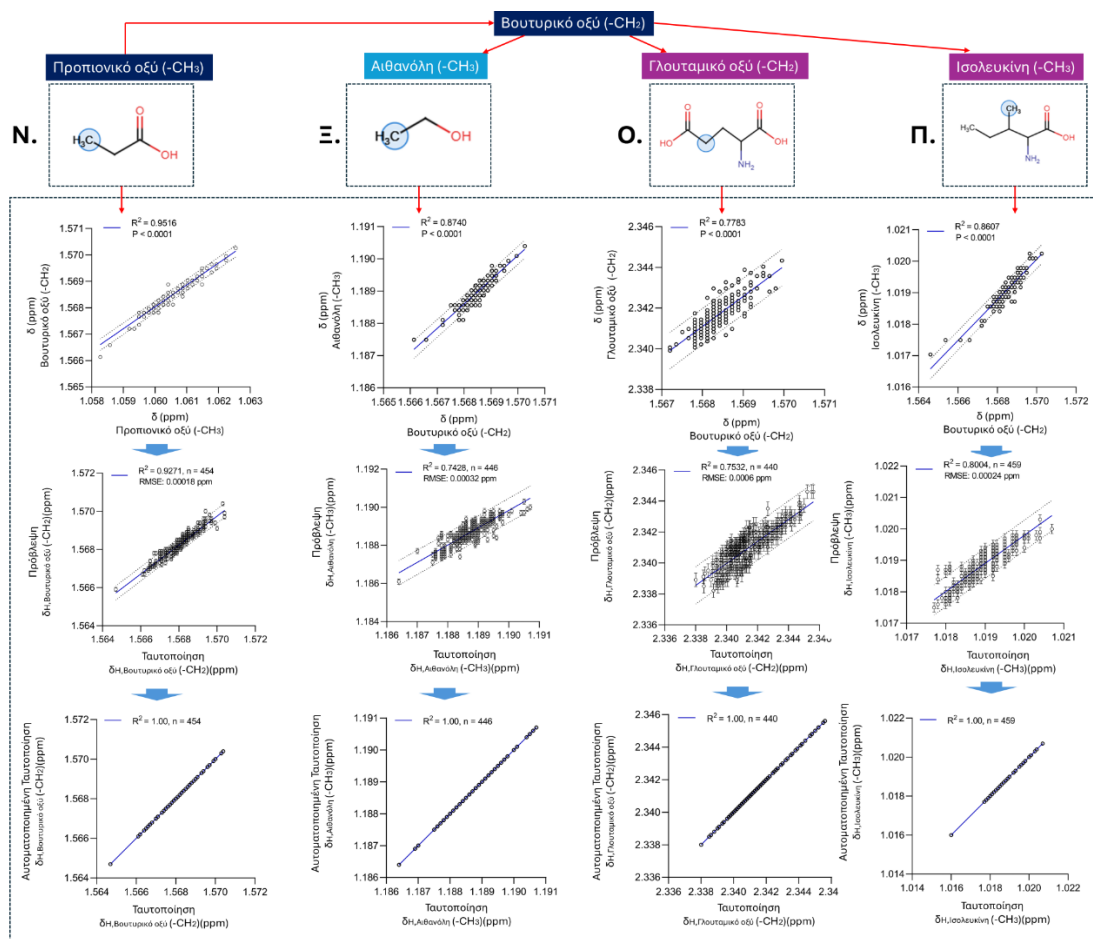


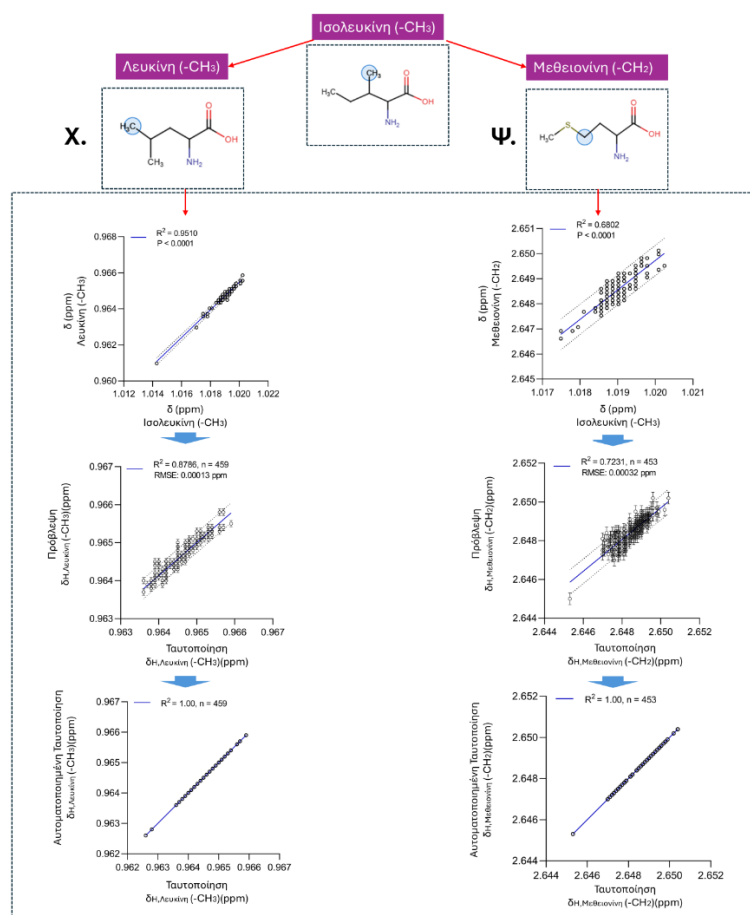
Εικόνα 6. Διάγραμμα ροής συσχετίσεων των μεταβολιτών ενδιαφέροντος. Το παραπάνω διάγραμμα ροής απεικονίζει τον τρόπο με τον οποίο οι μεταβολίτες της παρούσας μελέτης συσχετίζονται μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται οι συσχετίσεις με τον υψηλότερο συντελεστή συσχέτισης μεταξύ των μορίων, οι οποίες υποδεικνύονται με βέλη. Για παράδειγμα, το οξικό οξύ μπορεί να οδηγήσει σε σχετικά υψηλή ακρίβεια στην πρόβλεψη των σημάτων του βουτυρικού οξέος και των κορυφών της βαλίνης. Συνεπώς, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι, γνωρίζοντας τις τιμές χημικής μετατόπισης του οξικού οξέος και βασιζόμενοι στις παραπάνω συσχετίσεις, είναι δυνατόν να προβλεφθεί η χημική μετατόπιση όλων των μεταβολιτών που μελετώνται στην παρούσα εργασία.

Συνολικά, η προσέγγιση αυτή επέτρεψε την ανάπτυξη ενός αξιόπιστου υπολογιστικού πλαισίου που συνδέει βασικά ^1H NMR φασματικά σήματα με το μεταβολικό προφίλ των δειγμάτων κοπράνων, παρέχοντας υψηλή αναπαραγωγιμότητα και ακρίβεια σε πολλαπλά ανεξάρτητα σύνολα δεδομένων. Στην **Εικόνα 7** παρουσιάζονται τα διαγράμματα των καλύτερων συσχετίσεων μεταξύ των μεταβολιτών, καθώς επίσης και οι προβλέψεις του αλγορίθμου πριν και μετά τη βελτιστοποίηση (πλήρως αυτοματοποιημένη ταυτοποίηση).







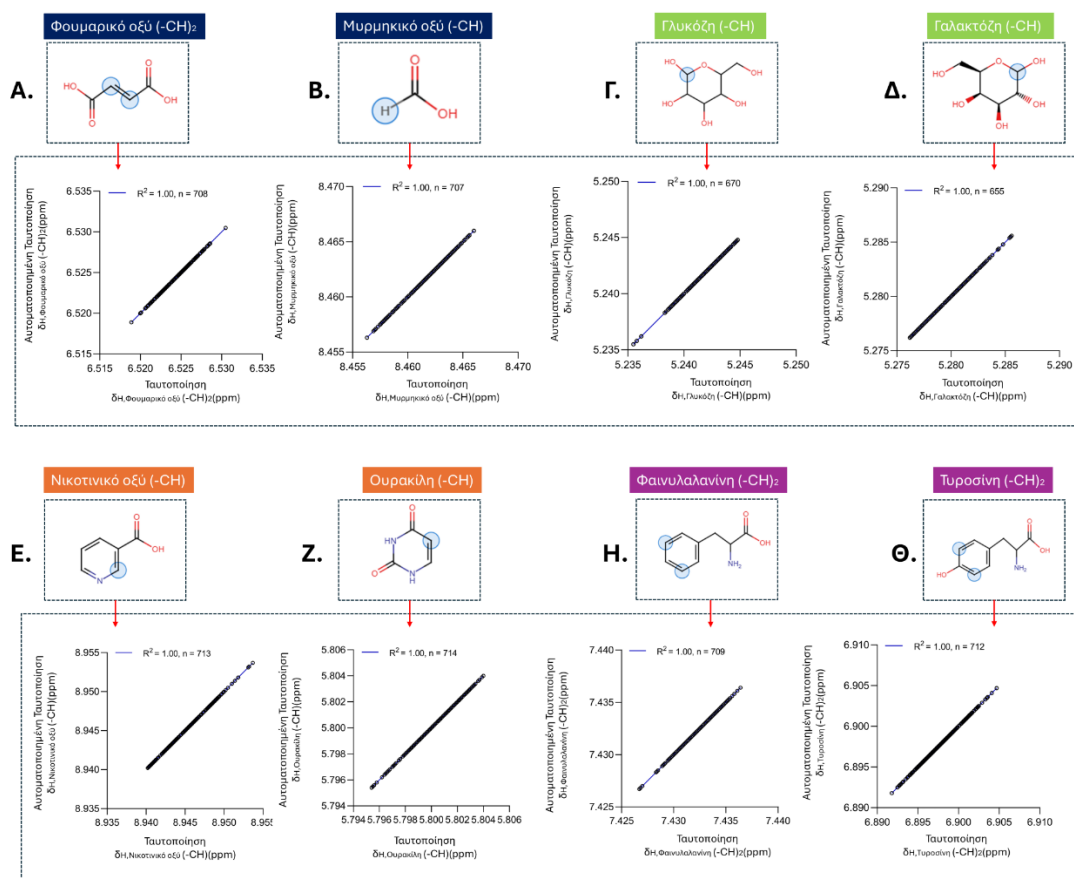


Εικόνα 7. Πλήρης Αυτόματη Ταυτοποίηση μεταβολιτών ενδιαφέροντος. Χαρακτηριστικές τιμές χημικής μετατόπισης των μεταβολιτών ενδιαφέροντος σε φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H NMR). Απόδοση μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης μεταξύ (Α) των πρωτονίων μεθυλίου δ της βαλίνης και του βουτυρικού οξέος (-CH₃), (Β) των πρωτονίων μεθυλίου δ του βουτυρικού οξέος και του ισοβαλερικού οξέος (-CH₃)₂, (Γ) των πρωτονίων μεθυλίου δ του ισοβαλερικού οξέος και της ριβόζης (-CH), (Δ) των πρωτονίων μεθυλενίου δ του προπιονικού οξέος και της γλυκίνης (-CH₂), (Ε) των πρωτονίων μεθυλενίου δ της γλυκίνης και της αλανίνης (-CH₃), (Ζ) των πρωτονίων μεθυλίου δ της αλανίνης και του γαλακτικού οξέος (-CH₃), (Η) των πρωτονίων μεθυλίου δ του γαλακτικού οξέος και της αραβινόζης (-CH), των πρωτονίων μεθυλίου δ του βουτυρικού οξέος και (Θ) του ασπαρτικού οξέος (-CH₂), (Ι) 2-Αμινοβουτυρικού οξέος (-CH₃), (Κ) 2-Υδροξυβαλερικού οξέος (-CH₃), (Λ) βαλερικού οξέος (-CH₃), (Μ) βαλερικού οξέος (-CH₂), των πρωτονίων μεθυλενίου δ του βουτυρικού οξέος και (Ν) προπιονικού οξέος (-CH₃), (Ξ) αιθανόλης (-CH₃), (Ο) γλουταμικού οξέος (-CH₂), (Π) ισολευκίνης (-CH₃), (Ρ) των πρωτονίων μεθυλίου δ του οξικού οξέος και της 1,3-Διϋδρόξυακετόνης (-CH₂)₂, (Σ) των πρωτονίων μεθυλίου δ του οξικού οξέος και του βουτυρικού οξέος (-CH₂), (Τ) των πρωτονίων μεθυλενίου του βουτυρικού οξέος δ και του

ηλεκτρικού οξέος ($-\text{CH}_2$)₂, (Y) των πρωτονίων μεθυλενίου του βουτυρικού οξέος δ και του προπιονικού οξέος ($-\text{CH}_2$), (Φ) των πρωτονίων μεθυλενίου του προπιονικού οξέος δ και το 5-Άμινοβαλερικού οξέος ($-\text{CH}_2$), (X) των πρωτονίων μεθυλίου δ της ισολευκίνης και της λευκίνης ($-\text{CH}_3$) και (Ψ) των πρωτονίων μεθυλίου δ της ισολευκίνης και της μεθειονίνης ($-\text{CH}_3$). Προβλέψεις του αλγορίθμου πριν και μετά τη βελτιστοποίηση (πλήρως αυτοματοποιημένη ταυτοποίηση-επικύρωση).

Για ορισμένους μεταβολίτες, όπως το φουμαρικό οξύ (fumaric acid, 6.52ppm), μυρμηκικό οξύ (formic acid, 8.46ppm), γλυκόζη (glucose, 5.24ppm), γαλακτόζη (galactose, 5.28ppm), νικοτινικό οξύ (nicotinic acid, 8.95ppm), ουρακίλη (uracil, 5.80ppm), φαινυλαλανίνη (phenylalanine, 7.43ppm) και τυροσίνη (tyrosine, 6.90ppm) δεν εφαρμόστηκαν μοντέλα πρόβλεψης χημικής μετατόπισης. Η επιλογή αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι τα χαρακτηριστικά σήματα των συγκεκριμένων μεταβολιτών εντοπίζονται σε σχετικά απομονωμένες φασματικές περιοχές, όπου δε παρατηρείται σημαντική αλληλεπικάλυψη σημάτων από άλλους μεταβολίτες. Ακόμη, οι αντίστοιχες χημικές μετατοπίσεις παρουσίασαν περιορισμένη διακύμανση μεταξύ των εξεταζόμενων φασμάτων. Έτσι, για τον εντοπισμό των κορυφών πραγματοποιήθηκε η αναζήτηση τοπικού μέγιστου εντός προκαθορισμένου στενού εύρους χημικής μετατόπισης (ppm window) γύρω από την αναμενόμενη θέση κάθε σήματος. Ο αλγόριθμος εντόπιζε τη κορυφή μέγιστης έντασης εντός του καθορισμένου εύρους και την αντιστοιχούσε στον αντίστοιχο μεταβολίτη. Η προσέγγιση αυτή επέτρεψε αξιόπιστη και υπολογιστικά αποδοτική ταυτοποίηση των συγκεκριμένων μεταβολιτών, χωρίς την ανάγκη εφαρμογής δυναμικών μοντέλων πρόβλεψης. Στην **Εικόνα 8** παρουσιάζεται η αυτόματη ταυτοποίηση των παραπάνω μεταβολιτών στο σύνολο των φασματικών δεδομένων.

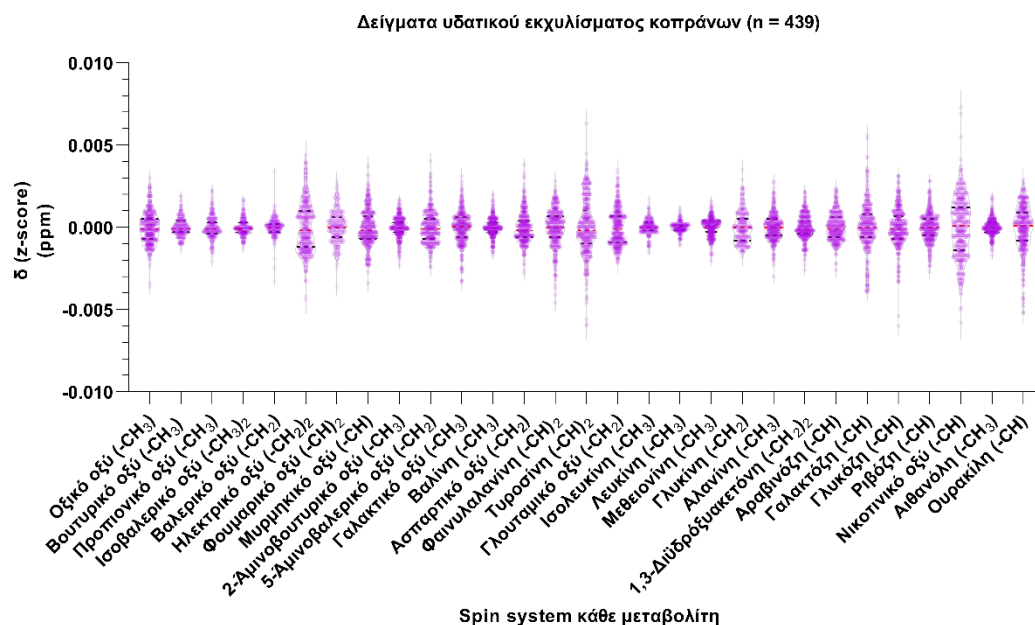
Αυτόματη ταυτοποίηση μεταβολιτών χωρίς μοντέλο πρόβλεψης



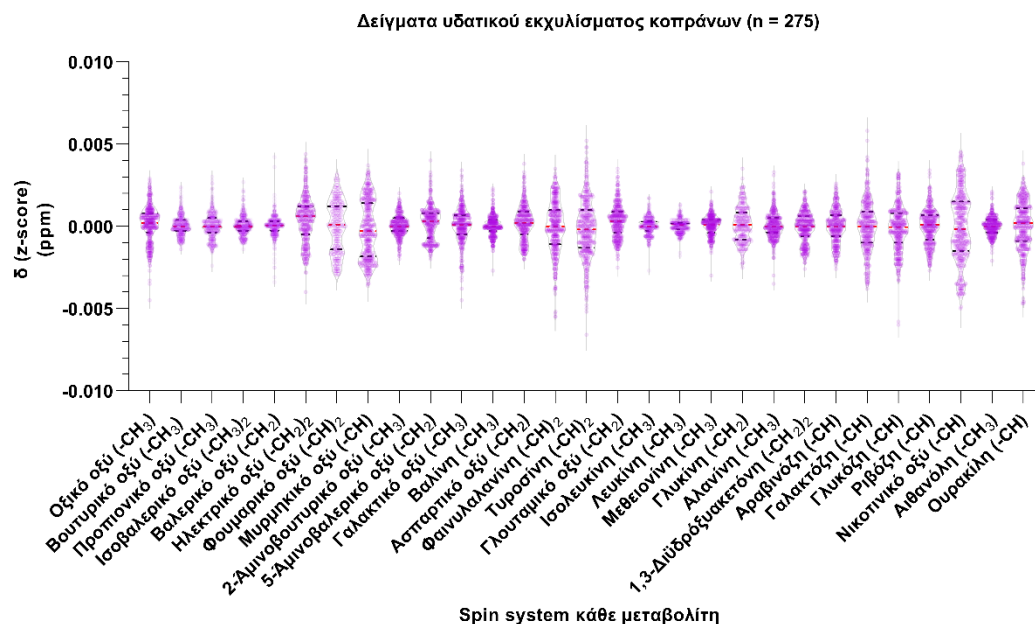
Εικόνα 8. Πλήρης Αυτόματη Ταυτοποίηση μεταβολιτών στο σύνολο των φασματικών δεδομένων. Αυτόματη ταυτοποίηση (Α) φουμαρικού οξέος, (Β) μυρμηκικού οξέος, (Γ) γλυκόζης, (Δ) γαλακτόζης, (Ε) νικοτινικού οξέος (Ζ) ουρακίλης (Η) φαινυλαλανίνης και (Θ) τυροσίνης στο σύνολο των φασματικών δεδομένων ^1H NMR ($n = 714$ φάσματα).

Η στατιστική αξιολόγηση των χημικών μετατοπίσεων μέσω ανάλυσης z-score (**Εικόνα 9**) πραγματοποιήθηκε με στόχο την αποτίμηση της διακύμανσης των φασματικών θέσεων των μεταβολιτών μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων. Η παρουσία αυξημένων z-scores σε ορισμένες χημικές μετατοπίσεις υποδεικνύει σημαντική απόκλιση των φασματικών θέσεων από τη μέση τιμή, γεγονός που αντανάκλα τη μεταβλητότητα των χημικών μετατοπίσεων στα υπό μελέτη φάσματα. Παρά τις σημαντικές αυτές μεταβολές στις απόλυτες τιμές των χημικών μετατοπίσεων, οι συσχετίσεις μεταξύ των χαρακτηριστικών σημάτων των μεταβολιτών διατηρούνται σε ικανοποιητικό βαθμό. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι τα αναπτυγμένα μοντέλα συσχέτισης μπορούν να αξιοποιήσουν τις σχετικές σχέσεις μεταξύ των φασματικών

σημάτων και να επιτύχουν πρόβλεψη των χημικών μετατοπίσεων ακόμη και παρουσία σημαντικής φασματικής μεταβλητότητας.



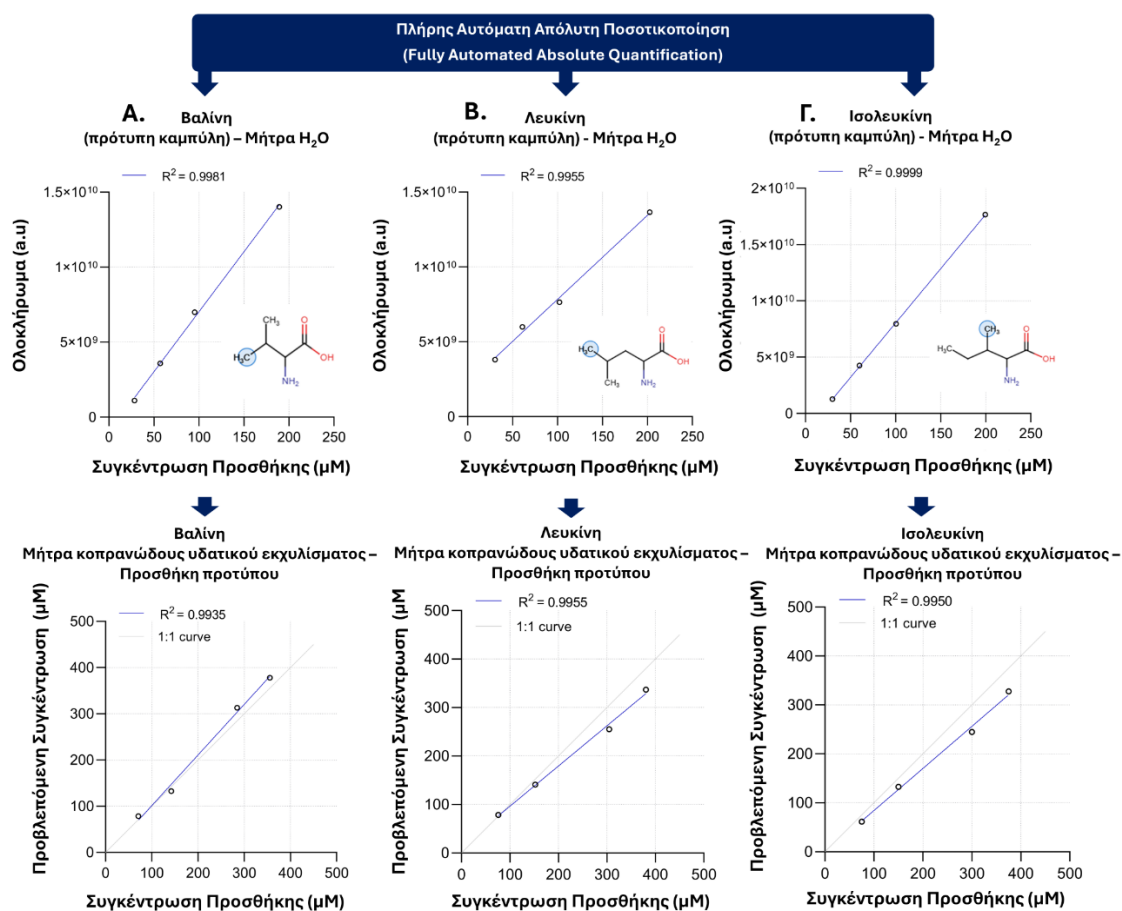
Εικόνα 9Α. Εύρος τιμών χημικών μετατοπίσεων (δ) των μεταβολιτών (σύνολο δεδομένων εκπαίδευσης, n = 439 φάσματα).

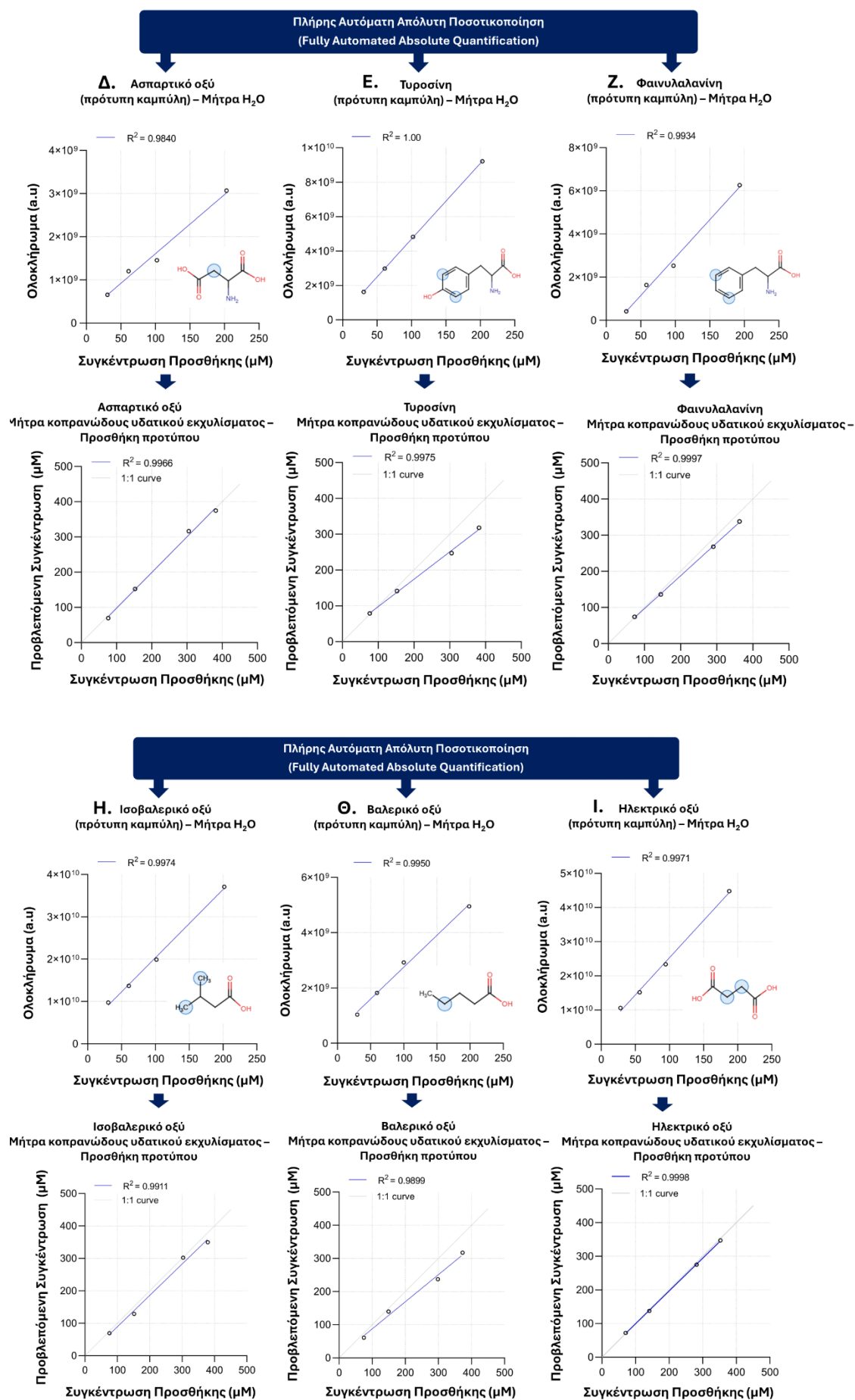


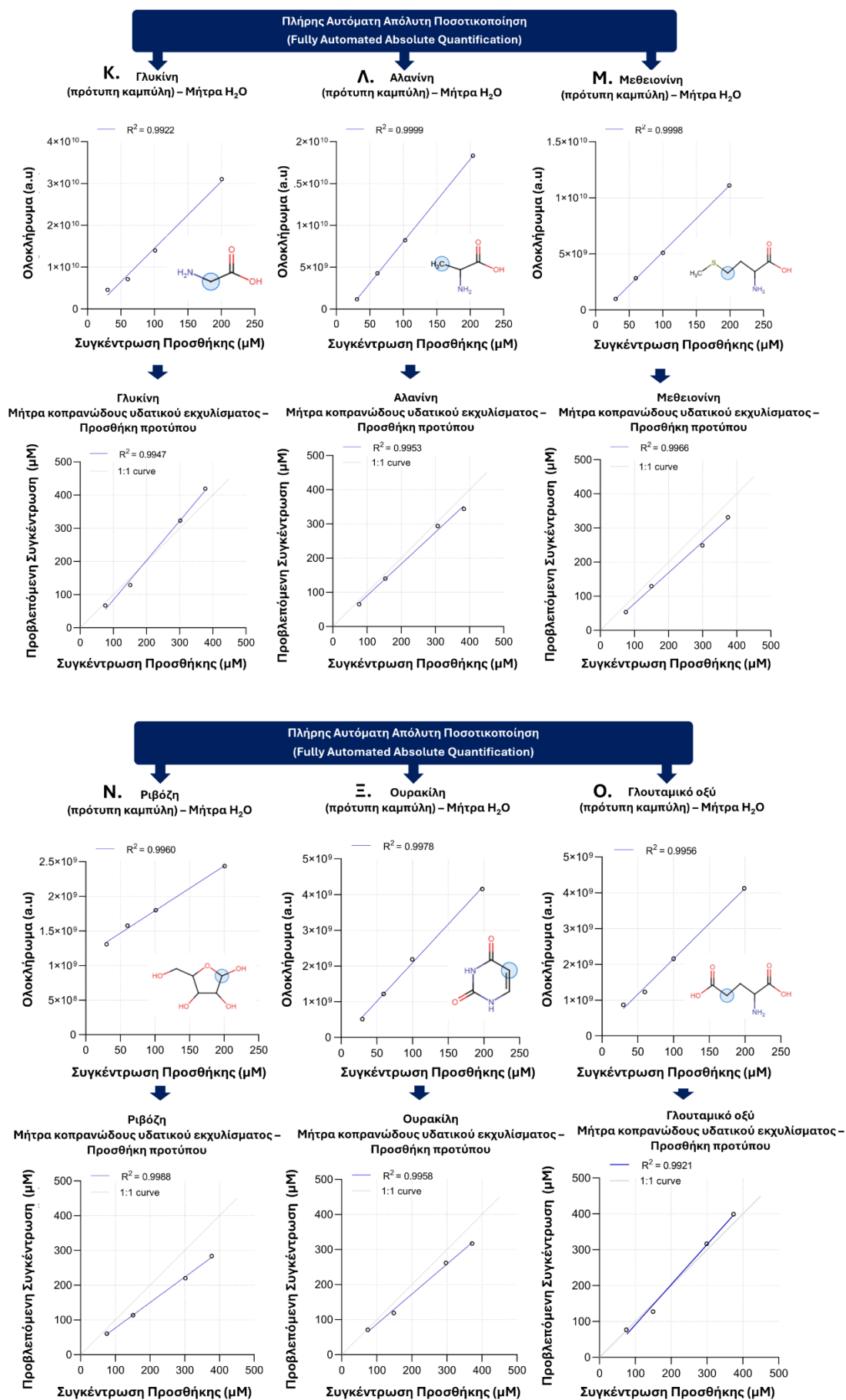
Εικόνα 9Β. Εύρος τιμών χημικών μετατοπίσεων (δ) των μεταβολιτών (σύνολο δεδομένων επικύρωσης, n = 275 φάσματα).

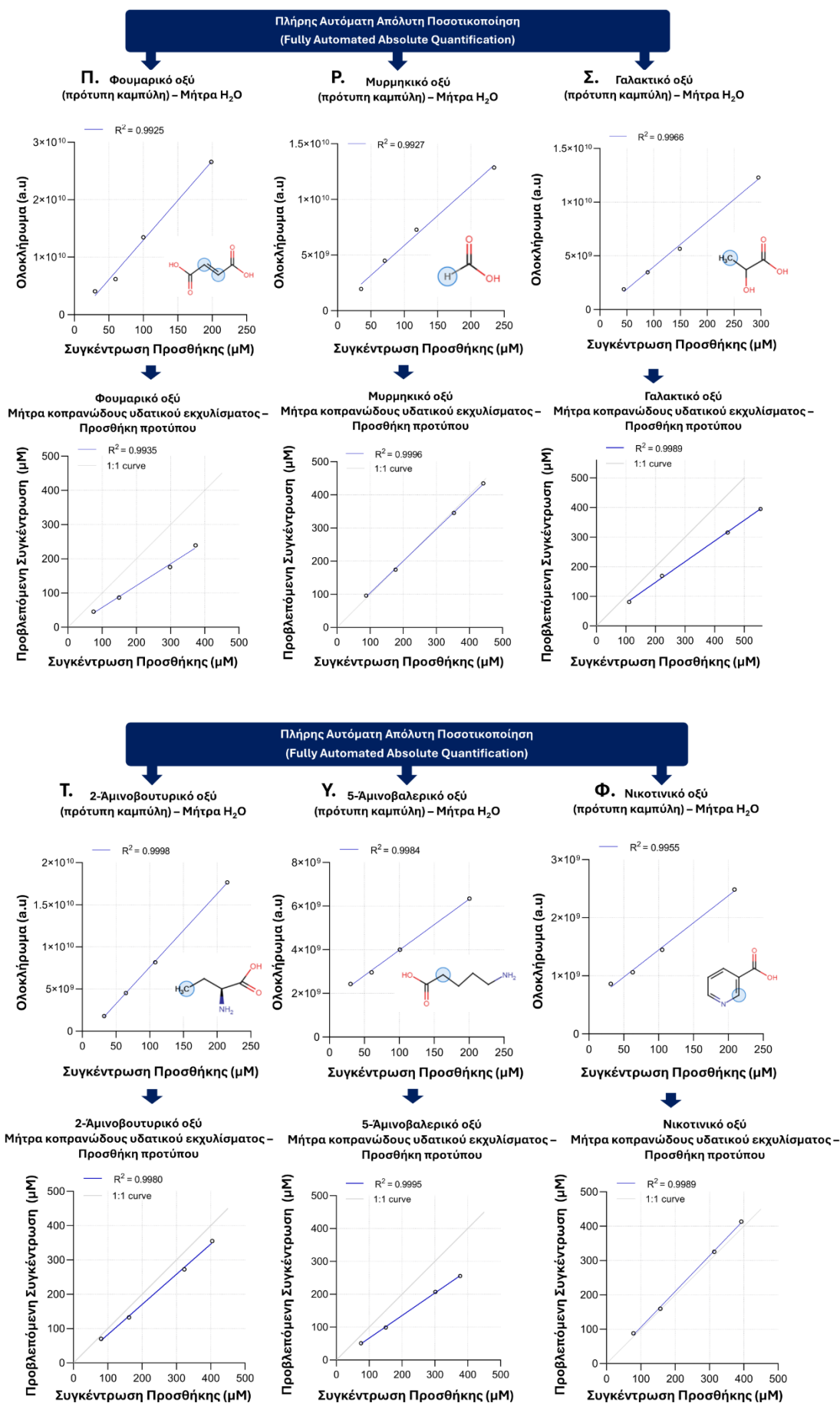
3.2 Εφαρμογή του αλγορίθμου στην ποσοτικοποίηση μεταβολιτών

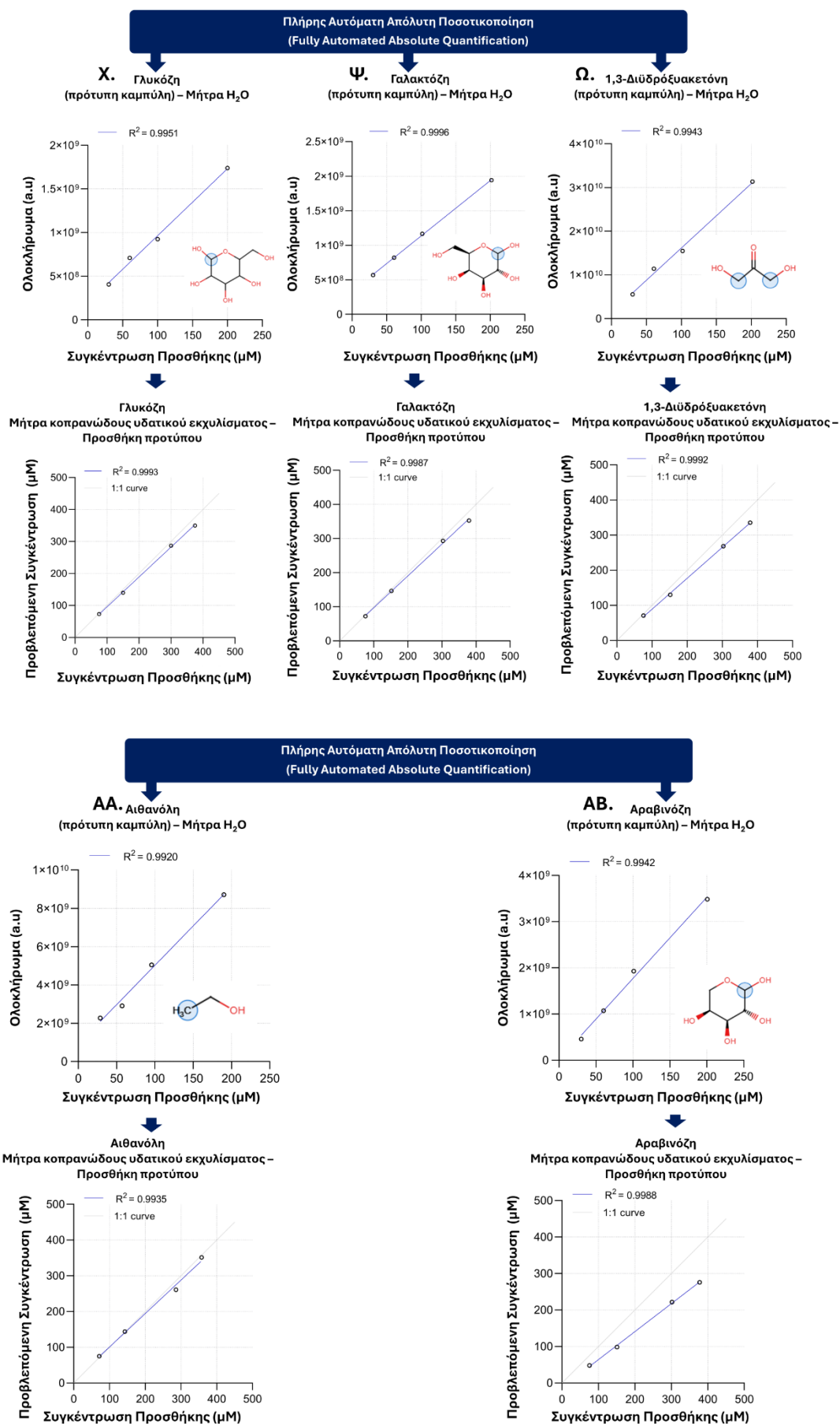
Η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών στα κοπρανώδη δείγματα πραγματοποιήθηκε με βάση τα αναπτυγμένα μοντέλα καμπυλών βαθμονόμησης και την αυτόματη ολοκλήρωση των ^1H NMR σημάτων. Η εφαρμογή της υπολογιστικής μεθόδου επέτρεψε την εξαγωγή τόσο σχετικών όσο και απόλυτων συγκεντρώσεων για τις κύριες κατηγορίες μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στα δείγματα. Στην **Εικόνα 10** γίνεται μία αναλυτική επισκόπηση της διαδικασίας για τη πλήρη αυτόματη απόλυτη ποσοτικοποίηση με κατασκευή και επικύρωση πρότυπων καμπυλών.





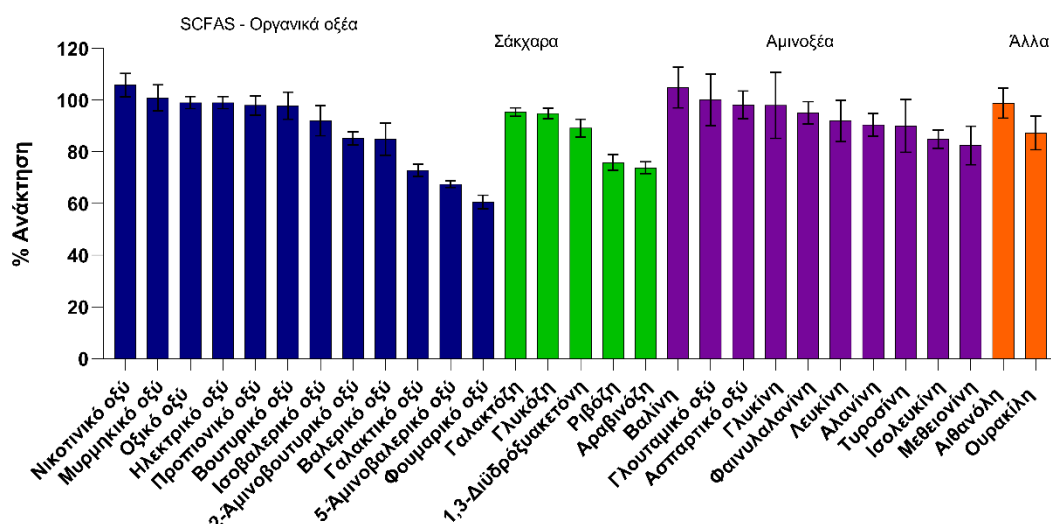






Εικόνα 10. Κατασκευή και επικύρωση πρότυπων καμπυλών (standard curves) για απόλυτη ποσοτικοποίηση με ^1H NMR. Πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης για τη (Α) βαλίνη, (Β) λευκίνη, (Γ) ισολευκίνη, (Δ) ασπαρτικό οξύ, (Ε) τυροσίνη, (Ζ) φαινυλαλανίνη, (Η) ισοβαλερικό οξύ, (Θ) βαλερικό οξύ, (Ι) ηλεκτρικό οξύ, (Κ) γλυκίνη, (Λ) αλανίνη, (Μ) μεθειονίνη, (Ν) ριβόζη, (Ξ) ουρακίλη, (Ο) γλουταμικό οξύ, (Π) φουμαρικό οξύ, (Ρ) μυρμηκικό οξύ, (Σ) γαλακτικό οξύ, (Τ) 2-Αμινο-βουτυρικό οξύ, (Υ) 5-Αμινο-βαλερικό οξύ, (Φ) νικοτινικό οξύ, (Χ) γλυκόζη, (Ψ) γαλακτόζη, (Ω) 1,3-διυδροξυ-ακετόνη, (ΑΑ) αιθανόλη και (ΑΒ) αραβινόζη σε ρυθμιστικά διαλύματα νερού/ούρων που παρασκευάστηκαν κατ' αναλογία με τα δείγματα υδατικού εκχυλίσματος κοπράνων. Οι καμπύλες κατασκευάστηκαν από τα ολοκληρώματα των κορυφών που υπολογίστηκαν με τη βοήθεια της πλατφόρμας SMolESY, σε σχέση με τη συγκέντρωση προσθήκης προτύπου (spiking concentration). Οι εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης που προέκυψαν από τις καμπύλες βαθμονόμησης με βάση το νερό εφαρμόστηκαν στη συνέχεια για την ποσοτικοποίηση των συγκεντρώσεων των αναλυτών στα δείγματα κοπρανώδους εκχυλίσματος, στα οποία είχαν πραγματοποιηθεί πειράματα προσθήκης προτύπου, ενώ υπολογίστηκε επίσης και το ποσοστό ανάκτησης (% recovery).

Γενικότερα, η ανάλυση έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις των βασικών μικροβιακών μεταβολιτών, όπως τα short-chain fatty acids (SCFAs) και τα αμινοξέα, παρουσίασαν σημαντική διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων, αντανakλώντας τη φυσιολογική ετερογένεια του εντερικού μικροβιώματος. Στην **Εικόνα 11** παρουσιάζονται τα ποσοστά ανάκτησης μεταβολιτών από πειράματα προσθήκης προτύπου.



Εικόνα 11. Ποσοστό ανάκτησης μεταβολιτών από πειράματα προσθήκης προτύπου (% recovery). Για τους επιλεγμένους μεταβολίτες κυμάνθηκε μεταξύ 60 - 106%, ανάλογα με τον μεταβολίτη και το επίπεδο συγκέντρωσης, υποδεικνύοντας επιδράσεις που εξαρτώνται από τη μήτρα. Οι τιμές ανάκτησης υπολογίστηκαν ως [(μετρούμενη συγκέντρωση στο εμπλουτισμένο δείγμα – μετρούμενη συγκέντρωση στο μη εμπλουτισμένο δείγμα) / προστιθέμενη συγκέντρωση] × 100, χρησιμοποιώντας την εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης που προέκυψε από την πρότυπη καμπύλη. Οι ράβδοι παρουσιάζουν τη μέση τιμή της % ανάκτησης, ενώ οι γραμμές σφάλματος αντιστοιχούν στην τυπική απόκλιση (SD) των τεσσάρων ανεξάρτητων μετρήσεων.

3.2.1 Όριο ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) – Ποσοστό εμφάνισης (% Occurrence)

Η αναλυτική απόδοση της αναπτυγμένης μεθόδου αξιολογήθηκε μέσω του προσδιορισμού των ορίων ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) και του αντίστοιχου πειραματικού σφάλματος για το σύνολο των μεταβολιτών που ανιχνεύθηκαν στα fecal water δείγματα μέσω ^1H NMR φασματοσκοπίας. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2** και υποδεικνύουν σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των μεταβολικών κατηγοριών.

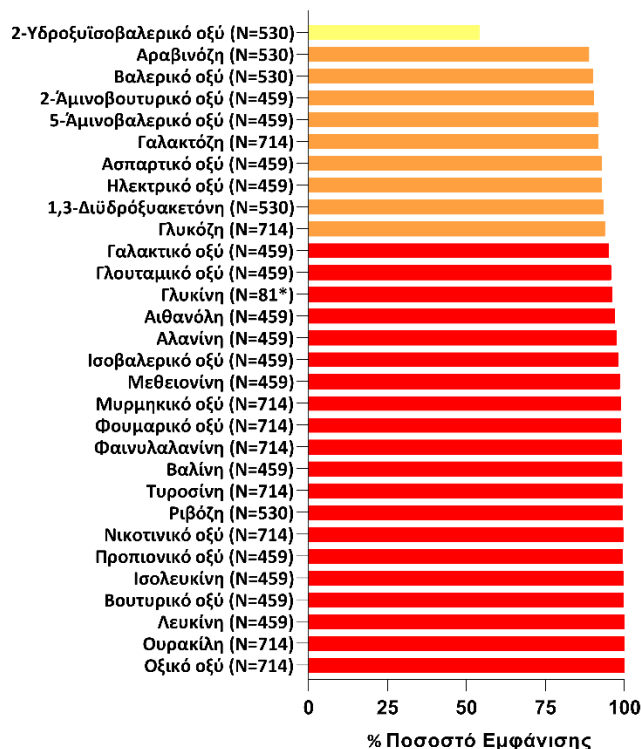
Πίνακας 2. Σύνοψη των χαρακτηριστικών απόδοσης για την απόλυτη ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών μέσω ^1H NMR Φασματοσκοπίας.

		LOD (μM)	LOQ (μM)	Μέση Ανάκτηση (%)
SCFAS - Οργανικά οξέα	Προπιονικό οξύ	16.14 ± 0.49	48.91 ± 1.5	98
	Οξικό οξύ	18.96 ± 0.78	57.5 ± 2.4	99.1
	Ισοβαλερικό οξύ	15.32 ± 0.51	46.42 ± 1.5	92.1
	Βαλερικό οξύ	21.07 ± 1.0	63.8 ± 3.1	85
	Φουμαρικό οξύ	25.81 ± 1.8	78.22 ± 5.5	60.6
	Μυρμηκικό οξύ	30.07 ± 4.0	91.15 ± 12	100.9
	Βουτυρικό οξύ	19.97 ± 1.2	60.5 ± 3.5	97.9
	2-Αμινοβουτυρικό οξύ	38.04 ± 0.47	115.29 ± 1.4	85.3
	Γαλακτικό οξύ	25.7 ± 1.2	77.89 ± 3.6	72.9
	Ηλεκτρικό οξύ	15.02 ± 0.55	45.53 ± 1.7	99.1
	5-Αμινοβαλερικό οξύ	12.08 ± 0.24	36.6 ± 0.74	67.5
	Νικοτινικό οξύ	21.19 ± 0.79	63.86 ± 2.4	105.8
	Ουρακίλη	19.77 ± 0.74	59.9 ± 2.2	87.4
Σάκχαρα	Αραβινόζη	22.87 ± 1.3	69.31 ± 4.0	73.9
	Γαλακτόζη	25.5 ± 0.31	77.29 ± 0.93	95.4
	Γλυκόζη	21.02 ± 0.96	63.66 ± 2.9	94.9
	1,3-Διυδροξυακετόνη	22.91 ± 1.3	69.44 ± 3.8	89.2
	Ριβόζη	19.05 ± 0.39	57.72 ± 1.2	75.9
Αμινοξέα	Λευκίνη	12.35 ± 0.49	37.41 ± 1.5	92
	Βαλίνη	12.26 ± 0.45	37.17 ± 1.4	104.9
	Ισολευκίνη	5.09 ± 0.05	15.41 ± 0.16	84.9
	Αλανίνη	3.43 ± 0.02	10.42 ± 0.07	90.5
	Γλυκίνη	2.08 ± 0.15	6.23 ± 0.45	98.1
	Μεθειονίνη	5.88 ± 0.07	17.82 ± 0.21	82.5
	Γλουταμικό οξύ	19.78 ± 0.95	59.9 ± 2.9	100.2
	Φαινυλαλανίνη	23.67 ± 1.7	71.72 ± 5.2	95.1
	Τυροσίνη	22.25 ± 0.09	67.42 ± 0.27	90.1
	Ασπαρτικό οξύ	21.86 ± 1.9	65.59 ± 5.8	98.2
	Αιθανόλη	25.55 ± 1.5	77.47 ± 4.6	98.9

Οι χαμηλότερες τιμές LOD παρατηρήθηκαν σε αμινοξέα όπως η γλυκίνη ($2.08 \mu\text{M}$) και η αλανίνη ($3.43 \mu\text{M}$), υποδεικνύοντας υψηλή ευαισθησία της μεθόδου για μικρού μοριακού βάρους μεταβολίτες με καλά διαχωρισμένα φασματικά σήματα. Αντίστοιχα, υψηλότερα όρια ανίχνευσης καταγράφηκαν σε λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας, όπως το φουμαρικό οξύ ($25.81 \mu\text{M}$) και το μυρμηκικό οξύ ($30.07 \mu\text{M}$), γεγονός που αποδίδεται σε αυξημένη φασματική επικάλυψη και χαμηλότερη ένταση σήματος. Παρόμοια τάση παρατηρήθηκε και στα όρια LOQ, τα οποία κυμάνθηκαν από $6.23 \mu\text{M}$ (γλυκίνη) έως $91.15 \mu\text{M}$ (βουτυρικό οξύ).

Η ανάλυση της συχνότητας εμφάνισης (% occurrence) (**Εικόνα 12**) των μεταβολιτών ανέδειξε υψηλή αναπαραγωγιμότητα και σταθερότητα του ανιχνεύσιμου κοπρανώδους μεταβολώματος (fecal metabolome) σε ανεξάρτητες ομάδες φασμάτων. Συγκεκριμένα, βασικά SCFAs όπως το οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ ανιχνεύθηκαν σχεδόν καθολικά (>99% των δειγμάτων), επιβεβαιώνοντας τον ρόλο τους ως κεντρικοί μεταβολίτες του κοπρανώδους δείγματος (core fecal metabolites). Αντίστοιχα,

οργανικά οξέα όπως το φουμαρικό, ηλεκτρικό και νικοτινικό οξύ παρουσίασαν επίσης πολύ υψηλή συχνότητα εμφάνισης (>99%), υποδεικνύοντας σταθερή παρουσία σε διαφορετικά βιολογικά υπόβαθρα.



Εικόνα 12. Ποσοστό εμφάνισης μεταβολιτών (% occurrence) σε δείγματα κοπράνων σε ανεξάρτητες ομάδες φασμάτων $^1\text{H-NMR}$. Το ποσοστό εμφάνισης αντιπροσωπεύει το ποσοστό των φασμάτων στα οποία ανιχνεύθηκε κάθε μεταβολίτης (αριθμός θετικών φασμάτων/σύνολο φασμάτων, όπως αναφέρεται στις Μεθόδους· οι ομάδες περιλάμβαναν 459, 530 ή 714 φάσματα, ανάλογα με τον μεταβολίτη).

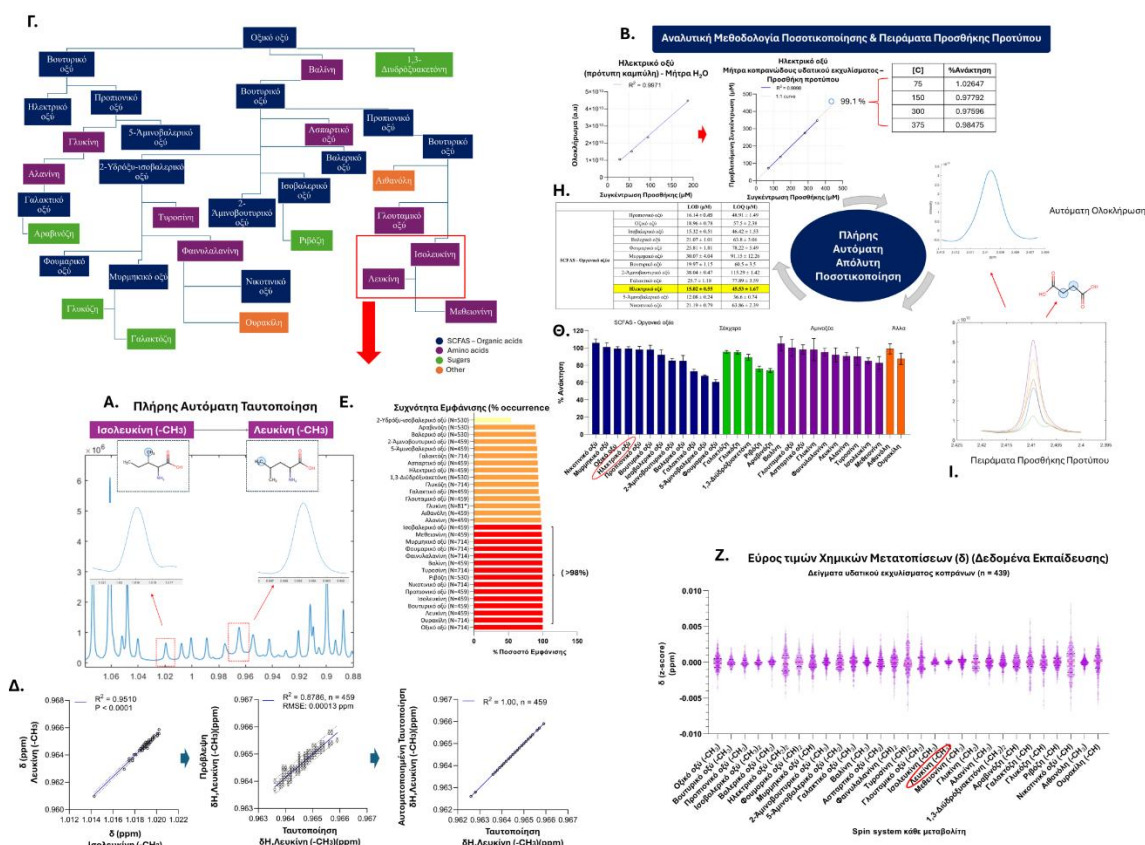
Τα αμινοξέα εμφάνισαν επίσης εξαιρετικά υψηλά ποσοστά ανίχνευσης, με τη λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη να ανιχνεύονται σχεδόν σε όλα τα δείγματα ($\geq 99\%$), ενώ το σύνολο των υπόλοιπων αμινοξέων παρουσίασε εμφάνιση άνω του 90%. Παράλληλα, οι υδατάνθρακες, όπως η γλυκόζη και η γαλακτόζη, καθώς και οι λοιποί μεταβολίτες, παρουσίασαν επίσης υψηλή συχνότητα εμφάνισης, επιβεβαιώνοντας τη σταθερότητα της ανάλυσης μεταξύ διαφορετικών φασματικών συνόλων.

Συνολικά, τα αποτελέσματα LOD/LOQ σε συνδυασμό με τα ποσοστά εμφάνισης υποδεικνύουν ότι η αναλυτική πλατφόρμα παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα, επιτρέποντας την αξιόπιστη ανίχνευση ενός ευρέος φάσματος μεταβολιτών στο μεταβόλωμα κοπράνων.

4. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε ένας αλγόριθμος για την αυτόματη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών σε δείγματα υδατικού εκχυλίσματος κοπράνων (fecal water samples) μέσω Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (^1H NMR). Η προτεινόμενη μεθοδολογία βασίστηκε στη συσχέτιση χημικών μετατοπίσεων μεταξύ μεταβολιτών και στην ανάπτυξη γραμμικών μοντέλων πρόβλεψης, επιτρέποντας την αυτοματοποιημένη εκτίμηση φασματικών θέσεων και τη μείωση της ανάγκης για χειροκίνητη επεξεργασία φασμάτων. Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε πολλαπλά ανεξάρτητα σύνολα δεδομένων αναδεικνύοντας υψηλή αναπαραγωγιμότητα και αξιοπιστία και επιβεβαίωσε τη δυνατότητα για αξιοποίηση της σε εφαρμογές μεταβολομικής μεγάλης κλίμακας.

Η ανάλυση πρωτονιακών φασμάτων NMR από δείγματα κοπράνων αποτελεί ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία εξαιτίας της υψηλής πολυπλοκότητας του μεταβολώματος, της εκτεταμένης αλληλεπικάλυψης κορυφών και της μεταβλητότητας των χημικών μετατοπίσεων. Έτσι, η ανάπτυξη μεθοδολογιών αυτοματοποιημένης ταυτοποίησης μεταβολιτών καθίσταται ιδιαίτερα χρήσιμη, αφού περιορίζει το χειροκίνητο έλεγχο φασμάτων και ενισχύει τη σύγκριση μεταξύ διαφορετικών πειραματικών συνόλων. Η χρήση ανεξάρτητων δεδομένων φασμάτων για την εκπαίδευση και την αξιολόγηση των μοντέλων ενίσχυσε τη στατιστική αξιοπιστία της προσέγγισης και μείωσε τον κίνδυνο υπερεκπαίδευσης (overfitting).



Εικόνα 13. Σύνοψη της συνολικής διαδικασίας αυτόματης (Α) ταυτοποίησης και (Β) ποσοτικοποίησης μεταβολιτών. (Γ) Από την αρχική διερεύνηση των συσχετίσεων μεταξύ των μεταβολιτών, έως την τελική αξιολόγηση της αξιοπιστίας της μεθοδολογίας. Η συνδιαστική εφαρμογή (Δ) μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης, προβλέψεων του αλγορίθμου και πειραμάτων προσθήκης προτύπου επέτρεψε τόσο την αποτελεσματική ταυτοποίηση όσο και την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών ενδιαφέροντος. Επιπλέον, (Ε) τα ποσοστά εμφάνισης, (Ζ) το εύρος χημικών μετατοπίσεων, καθώς και (Η) οι τιμές LOD και LOQ υποστηρίζουν την αναλυτική ευαισθησία και επαναληψιμότητα της προτεινόμενης προσέγγισης. Τέλος, δίνονται και (Θ) τα ποσοστά ανάκτησης των μεταβολιτών από (Ι) τα πειράματα προσθήκης προτύπου.

Ένα από τα σημαντικότερα σημεία της παρούσας μελέτης ήταν η αξιοποίηση των συσχετίσεων μεταξύ των μεταβολιτών για την πρόβλεψη των αντίστοιχων χημικών μετατοπίσεων. Το οξικό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς για την πρόβλεψη των φασματικών θέσεων 30 μεταβολιτών. Οι ισχυρές γραμμικές συσχετίσεις μεταξύ των χημικών μετατοπίσεων πιθανόν να αντικατοπτρίζουν κοινές φυσικοχημικές μεταβολές του δείγματος, όπως μεταβολές pH ή γενικότερες επιδράσεις μήτρας. Αυτό επέτρεψε τη δημιουργία ενός δυναμικού πλαισίου πρόβλεψης χημικών μετατοπίσεων,

το οποίο παρουσίασε υψηλή ακρίβεια και χαμηλές αποκλίσεις RMSE σε διαφορετικά δεδομένα φασμάτων.

Παράλληλα, για ορισμένους μεταβολίτες η μεθοδολογία που αναπτύχθηκε δε βασίστηκε αποκλειστικά σε μοντέλα πρόβλεψης, αλλά συνδύασε διαφορετικές στρατηγικές ταυτοποίησης ανάλογα με τα χαρακτηριστικά κάθε ένωσης. Πιο συγκεκριμένα για το φουμαρικό, μυρμηκικό, νικοτινικό οξύ, γλυκόζη, γαλακτόζη, φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και ουρακίλη εφαρμόστηκε στοχευμένη αναζήτηση τοπικού μεγίστου, εντός προκαθορισμένων στενών περιοχών χημικής μετατόπισης. Η επιλογή αυτής της προσέγγισης βασίστηκε στο γεγονός ότι τα αντίστοιχα σήματα εντοπίζονταν σε σχετικά απομονωμένες φασματικές περιοχές με περιορισμένη αλληλεπικάλυψη.

Η αξιολόγηση της αναλυτικής επίδοσης της μεθόδου μέσω RMSE, z-score ανάλυσης, LOD και LOQ κατέδειξε υψηλή σταθερότητα και επαναληψιμότητα. Τα αναπτυγμένα μοντέλα συσχέτισης, αξιοποιώντας τις σχετικές σχέσεις μεταξύ των φασματικών σημάτων, είχαν επιτυχή πρόβλεψη των χημικών μετατοπίσεων ακόμη και παρουσία σημαντικής φασματικής μεταβλητότητας. Επιπλέον, οι χαμηλές τιμές LOD και LOQ για πολλούς μεταβολίτες υποστηρίζουν ικανοποιητική ευαισθησία της πλατφόρμας, ιδιαίτερα για καλά διαχωρισμένα σήματα ενώσεων. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι η αναπτυγμένη μεθοδολογία μπορεί να υποστηρίξει αξιόπιστη ποσοτικοποίηση μεταβολιτών σε πολύπλοκα βιολογικά δείγματα, όπως είναι τα υδατικά εκχυλίσματα κοπράνων.

Στα πειράματα προσθήκης προτύπου (spiking experiments) για τους περισσότερους μεταβολίτες οι τιμές ανάκτησης (% recovery) κυμάνθηκαν σε αποδεκτά επίπεδα. Επιδράσεις μήτρας, μεταβολές στη γραμμή βάσης (baseline) και η φυσική μεταβλητότητα των βιολογικών δειγμάτων ενδέχεται να συνέβαλαν στις περιπτώσεις μειωμένης ανάκτησης. Παρ' όλα αυτά, η οπτική αξιολόγηση των ορίων ολοκλήρωσης (bounds) επιβεβαίωσε τη λειτουργικότητα του αλγορίθμου και τη σωστή ολοκλήρωση των κορυφών.

Η ανάλυση της συχνότητας εμφάνισης (% occurrence) έδειξε σταθερή παρουσία βασικών μικροβιακών μεταβολιτών στο μεταβόλωμα κοπράνων. SCFAs όπως βουτυρικό, προπιονικό και οξικό οξύ ανιχνεύθηκαν σχεδόν καθολικά στα δείγματα, γεγονός που δικαιολογεί τον χαρακτηρισμό τους ως κύριοι μεταβολίτες της εντερικής μικροχλωρίδας. Αντίστοιχα, αμινοξέα όπως λευκίνη, βαλίνη, ισολευκίνη παρουσίασαν

υψηλή συχνότητα εμφάνισης, επιβεβαιώνοντας τη σταθερότητα και το βιολογικό τους ρόλο στο εντερικό περιβάλλον. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν τη δυνατότητα χρήσης της συγκεκριμένης μεθοδολογίας σε μελλοντικές μελέτες διερεύνησης της σχέσης μεταξύ μεταβολώματος, εντερικού μικροβιώματος και ανθρώπινης υγείας.

Παρότι η προτεινόμενη μεθοδολογία παρουσίασε υψηλή αξιοπιστία η μελέτη περιλαμβάνει ορισμένους περιορισμούς. Η απόδοση των μοντέλων πρόβλεψης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη σταθερότητα του σημείου αναφοράς (οξικού οξέος) που χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη, καθώς επίσης και από τις σωστές προβλέψεις των χημικών μετατοπίσεων των μεταβολιτών που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη άλλων μεταβολιτών. Για το λόγο αυτό, σαν μεταβολίτες που χρησιμοποιούνται ως είσοδοι στα μοντέλα, χρησιμοποιούνται κύριοι μεταβολίτες που υπάρχουν σχεδόν καθολικά σε δείγματα υδατικού εκχυλίσματος κοπράνων. Σε περίπτωση απουσίας κάποιου μεταβολίτη ο αλγόριθμος εφαρμόζει το επόμενο πιο αξιόπιστο μοντέλο, το οποίο βασίζεται στην αντιστοιχισμένη τιμή δ του μοντέλου ενός άλλου μεταβολίτη που εμφανίζει υψηλή συσχέτιση με τον προβλεπόμενο μεταβολίτη. Ωστόσο, η εφαρμογή του αλγορίθμου θα πρέπει να γίνεται με επαρκή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Συνολικά, η παρούσα μελέτη παρουσιάζει ένα ολοκληρωμένο και υπολογιστικά αποδοτικό πλαίσιο για την αυτοματοποιημένη ανάλυση ^1H NMR φασμάτων σε δείγματα κοπρανώδους εκχυλίσματος. Ο συνδυασμός των μοντέλων πρόβλεψης και της αναλυτικής επικύρωσης συνέβαλε στην ανάπτυξη μια αξιόπιστης και αναπαραγωγίμης προσέγγισης, η οποία μπορεί να υποστηρίξει εφαρμογές μεταβολομικής, μελέτες μικροβιώματος και μελλοντικές κλινικές εφαρμογές υψηλής απόδοσης.

5. Συμπεράσματα

Η παρούσα διπλωματική εργασία ανέπτυξε και αξιολόγησε έναν αυτοματοποιημένο υπολογιστικό αλγόριθμο για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών σε δείγματα κοπρανώδους υδατικού εκχυλίσματος μέσω φασματοσκοπίας ^1H NMR. Η προτεινόμενη προσέγγιση στηρίχθηκε στη συσχέτιση χημικών μετατοπίσεων μεταξύ μεταβολιτών και στην ανάπτυξη γραμμικών μοντέλων πρόβλεψης επιτρέποντας την αυτοματοποιημένη εκτίμηση φασματικών θέσεων 30 μεταβολιτών και μειώνοντας την ανάγκη για χειροκίνητη επεξεργασία των φασμάτων. Τα αποτελέσματα της μελέτης

κατέδειξαν υψηλή αναπαραγωγιμότητα, σταθερότητα και αξιοπιστία της μεθόδου σε διαφορετικά σύνολα δεδομένων. Οι δείκτες αξιολόγησης, όπως RMSE, z-score, LOD και LOQ επιβεβαίωσαν την ευαισθησία και την ακρίβεια της μεθόδου, ενώ τα πειράματα προσθήκης προτύπου επικύρωσαν τη λειτουργικότητα του αλγορίθμου για την πλειονότητα των μεταβολιτών της έρευνας. Η μεθοδολογία μπορεί να υποστηρίξει την αξιόπιστη ανάλυση πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων ανιχνεύοντας βασικούς μεταβολίτες του εντερικού μικροβιώματος, γεγονός που αναδεικνύει τη χρησιμότητά της σε εφαρμογές μεταβολομικής έρευνας, που σχετίζονται με τη διερεύνηση της ανθρώπινης υγείας. Παρόλο που η απόδοση του αλγορίθμου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προεπεξεργασία των φασμάτων και τη σταθερότητα του οξικού οξέος, η συνολική εικόνα της μελέτης υποστηρίζει ότι η αναπτυγμένη πλατφόρμα αποτελεί μια αξιόπιστη και υπολογιστικά αποδοτική προσέγγιση για αυτοματοποιημένη ανάλυση ^1H NMR φασμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) Gratton, J.; Phetcharaburanin, J.; Mullish, B. H.; Williams, H. R. T.; Thursz, M.; Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Marchesi, J. R.; Li, J. V. Optimized Sample Handling Strategy for Metabolic Profiling of Human Feces. *Anal. Chem.* **2016**, 88 (9), 4661–4668. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04159>
- (2) Vignoli, A.; Ghini, V.; Meoni, G.; Licari, C.; Takis, P. G.; Tenori, L.; Turano, P.; Luchinat, C. High-Throughput Metabolomics by 1D NMR. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58 (4), 968–994. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.201804736>
- (3) Lee, B. L.; Rout, M.; Mandal, R.; Wishart, D. S. Automated Identification and Quantification of Metabolites in Human Fecal Extracts by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2023**, 61 (12), 705–717. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrc.5372>
- (4) Baima, G.; Dabdoub, S.; Thumbigere-Math, V.; Ribaldone, D. G.; Caviglia, G. P.; Tenori, L.; Fantato, L.; Vignoli, A.; Romandini, M.; Ferrocino, I.; Aimetti, M. Multi-Omics Signatures of Periodontitis and Periodontal Therapy on the Oral and Gut Microbiome. *J. Periodontal Res.* **2025**, 60 (12), 1237–1253. <https://doi.org/10.1111/jre.70055>
- (5) Takis, P. G.; Ghini, V.; Tenori, L.; Turano, P.; Luchinat, C. Uniqueness of the NMR Approach to Metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, 120, 115300. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.036>
- (6) Tan, A. H.; Chong, C. W.; Lim, S.-Y.; Yap, I. K. S.; Teh, C. S. J.; Loke, M. F.; Song, S.-L.; Tan, J. Y.; Ang, B. H.; Tan, Y. Q.; Kho, M. T.; Bowman, J.; Mahadeva, S.; Yong, H. S.; Lang, A. E. Gut Microbial Ecosystem in Parkinson Disease: New

- Clinicobiological Insights from Multi-Omics. *Ann. Neurol.* **2021**, 89 (3), 546–559. <https://doi.org/10.1002/ana.25982>
- (7) Hasin, Y.; Seldin, M.; Lusi, A. Multi-Omics Approaches to Disease. *Genome Biol.* **2017**, 18 (1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1215-1>
 - (8) Karczewski, K. J.; Snyder, M. P. Integrative Omics for Health and Disease. *Nat. Rev. Genet.* **2018**, 19 (5), 299–310. <https://doi.org/10.1038/nrg.2018.4>
 - (9) Kim, H. K.; Kostidis, S.; Choi, Y. H. NMR Analysis of Fecal Samples. In *Clinical Metabolomics: Methods and Protocols*; Giera, M., Ed.; Springer New York: New York, NY, 2018; pp 317–328. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7592-1_24
 - (10) Cui, M.; Trimigno, A.; Aru, V.; Khakimov, B.; Engelsens, S. B. Human Faecal ¹H NMR Metabolomics: Evaluation of Solvent and Sample Processing on Coverage and Reproducibility of Signature Metabolites. *Anal. Chem.* **2020**, 92 (14), 9546–9555. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00606>
 - (11) Matysik, S.; Le Roy, C. I.; Liebisch, G.; Claus, S. P. Metabolomics of Fecal Samples: A Practical Consideration. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, 57, 244–255. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.05.011>
 - (12) Pettersson, J.; Karlsson, P. C.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R.; Rafter, J. J.; Bohlin, L. NMR Metabolomic Analysis of Fecal Water from Subjects on a Vegetarian Diet. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, 31 (6), 1192–1198. <https://doi.org/10.1248/bpb.31.1192>
 - (13) Jacobs, D. M.; Deltimple, N.; van Velzen, E.; van Dorsten, F. A.; Bingham, M.; Vaughan, E. E.; van Duynhoven, J. ¹H NMR Metabolite Profiling of Feces as a Tool to Assess the Impact of Nutrition on the Human Microbiome. *NMR Biomed.* **2008**, 21 (6), 615–626. <https://doi.org/10.1002/nbm.1233>
 - (14) Martin, F.-P. J.; Sprenger, N.; Montoliu, I.; Rezzi, S.; Kochhar, S.; Nicholson, J. K. Dietary Modulation of Gut Functional Ecology Studied by Fecal Metabonomics. *J. Proteome Res.* **2010**, 9 (10), 5284–5295. <https://doi.org/10.1021/pr100554m>
 - (15) Kostidis, S.; Kokova, D.; Dementeva, N.; Saltykova, I. V.; Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Mayboroda, O. A. ¹H-NMR Analysis of Feces: New Possibilities in the Helminthes Infections Research. *BMC Infect. Dis.* **2017**, 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2351-7>
 - (16) Grimaldi, R.; Cela, D.; Swann, J. R.; Vulevic, J.; Gibson, G. R.; Tzortzis, G.; Costabile, A. In Vitro Fermentation of B-GOS: Impact on Faecal Bacterial Populations and Metabolic Activity in Autistic and Non-Autistic Children. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2017**, 93 (2). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw233>
 - (17) Cloarec, O.; Dumas, M.-E.; Craig, A.; Barton, R. H.; Trygg, J.; Hudson, J.; Blancher, C.; Gauguier, D.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. Statistical Total Correlation Spectroscopy: An Exploratory Approach for Latent Biomarker Identification from Metabolic ¹H NMR Data Sets. *Anal. Chem.* **2005**, 77 (5), 1282–1289. <https://doi.org/10.1021/ac048630x>
 - (18) Zidi, O.; Souai, N.; Raies, H.; Ben Ayed, F.; Mezlini, A.; Mezrioui, S.; Tranchida, F.; Sabatier, J.-M.; Mosbah, A.; Cherif, A.; Shintu, L.; Kouidhi, S. Fecal Metabolic

- Profiling of Breast Cancer Patients during Neoadjuvant Chemotherapy Reveals Potential Biomarkers. *Molecules* **2021**, *26* (8). <https://doi.org/10.3390/molecules26082266>
- (19) Gao, X.; Pujos-Guillot, E.; Sébédio, J.-L. Development of a Quantitative Metabolomic Approach to Study Clinical Human Fecal Water Metabolome Based on Trimethylsilylation Derivatization and GC/MS Analysis. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (15), 6447–6456. <https://doi.org/10.1021/ac1006552>
 - (20) Li, J.; Zhao, M.; Li, J.; Wang, M.; Zhao, C. Combining Fecal Microbiome and Metabolomics to Reveal the Disturbance of Gut Microbiota in Liver Injury and the Therapeutic Mechanism of Shaoyao Gancan Decoction. *Front. Pharmacol.* **2022**, *13*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.911356>
 - (21) De Filippis, F.; Pellegrini, N.; Vannini, L.; Jeffery, I. B.; La Stora, A.; Laghi, L.; Serrazanetti, D. I.; Di Cagno, R.; Ferrocino, I.; Lazzi, C.; Turroni, S.; Cocolin, L.; Brigidi, P.; Neviani, E.; Gobetti, M.; O'Toole, P. W.; Ercolini, D. High-Level Adherence to a Mediterranean Diet Beneficially Impacts the Gut Microbiota and Associated Metabolome. *Gut* **2016**, *65* (11), 1812. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309957>
 - (22) Mckirdy, S.; Koutsos, A.; Nichols, B.; Anderson, M.; Dhami, S.; Chowdhury, C. R.; Mascellani Bergo, A.; Havlik, J.; Gerasimidis, K. Micronutrient Supplementation Influences the Composition and Diet-Originating Function of the Gut Microbiome in Healthy Adults. *Clinical Nutrition* **2025**, *51*, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2025.06.020>
 - (23) Carvalho, D. V.; Silva, L. M. A.; Alves Filho, E. G.; Santos, F. A.; Lima, R. P. D.; Viana, A. F. S. C.; Nunes, P. I. G.; Fonseca, S. G. D. C.; Melo, T. S. D.; Viana, D. D. A.; Gallão, M. I.; Brito, E. S. D. Cashew Apple Fiber Prevents High Fat Diet-Induced Obesity in Mice: An NMR Metabolomic Evaluation. *Food Funct.* **2019**, *10* (3), 1671–1683. <https://doi.org/10.1039/c8fo01575a>
 - (24) Li, Y.; Liao, Q.; Lin, M.; Zhong, D.; Wei, L.; Han, B.; Miao, H.; Yao, M.; Xie, Z. An Integrated Metabonomics and Microbiology Analysis of Host-Microbiota Metabolic Interactions in Rats with Coptis Chinensis-Induced Diarrhea. *RSC Adv.* **2015**, *5* (97), 79329–79341. <https://doi.org/10.1039/c5ra16338b>
 - (25) Moosmang, S.; Pitscheider, M.; Sturm, S.; Seger, C.; Tilg, H.; Halabalaki, M.; Stuppner, H. Metabolomic Analysis—Addressing NMR and LC-MS Related Problems in Human Feces Sample Preparation. *Clinica Chimica Acta* **2019**, *489*, 169–176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.10.029>
 - (26) Silva, Y. P.; Bernardi, A.; Frozza, R. L. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2020**, *Volume 11-2020*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
 - (27) Huttenhower, C.; Gevers, D.; Knight, R.; Abubucker, S.; Badger, J. H.; Chinwalla, A. T.; Creasy, H. H.; Earl, A. M.; FitzGerald, M. G.; Fulton, R. S.; Giglio, M. G.; Hallsworth-Pepin, K.; Lobos, E. A.; Madupu, R.; Magrini, V.; Martin, J. C.; Mitreva, M.; Muzny, D. M.; Sodergren, E. J.; Versalovic, J.; Wollam, A. M.; Worley, K. C.; Wortman, J. R.; Young, S. K.; Zeng, Q.; Aagaard, K. M.; Abolude, O. O.; Allen-Vercoe,

E.; Alm, E. J.; Alvarado, L.; Andersen, G. L.; Anderson, S.; Appelbaum, E.; Arachchi, H. M.; Armitage, G.; Arze, C. A.; Ayvaz, T.; Baker, C. C.; Begg, L.; Belachew, T.; Bhonagiri, V.; Bihan, M.; Blaser, M. J.; Bloom, T.; Bonazzi, V.; Paul Brooks, J.; Buck, G. A.; Buhay, C. J.; Busam, D. A.; Campbell, J. L.; Canon, S. R.; Cantarel, B. L.; Chain, P. S. G.; Chen, I.-M. A.; Chen, L.; Chhibba, S.; Chu, K.; Ciulla, D. M.; Clemente, J. C.; Clifton, S. W.; Conlan, S.; Crabtree, J.; Cutting, M. A.; Davidovics, N. J.; Davis, C. C.; DeSantis, T. Z.; Deal, C.; Delehaunty, K. D.; Dewhirst, F. E.; Deych, E.; Ding, Y.; Dooling, D. J.; Dugan, S. P.; Michael Dunne, W.; Scott Durkin, A.; Edgar, R. C.; Erlich, R. L.; Farmer, C. N.; Farrell, R. M.; Faust, K.; Feldgarden, M.; Felix, V. M.; Fisher, S.; Fodor, A. A.; Forney, L. J.; Foster, L.; Di Francesco, V.; Friedman, J.; Friedrich, D. C.; Fronick, C. C.; Fulton, L. L.; Gao, H.; Garcia, N.; Giannoukos, G.; Giblin, C.; Giovanni, M. Y.; Goldberg, J. M.; Goll, J.; Gonzalez, A.; Griggs, A.; Gujja, S.; Kinder Haake, S.; Haas, B. J.; Hamilton, H. A.; Harris, E. L.; Hepburn, T. A.; Herter, B.; Hoffmann, D. E.; Holder, M. E.; Howarth, C.; Huang, K. H.; Huse, S. M.; Izard, J.; Jansson, J. K.; Jiang, H.; Jordan, C.; Joshi, V.; Katancik, J. A.; Keitel, W. A.; Kelley, S. T.; Kells, C.; King, N. B.; Knights, D.; Kong, H. H.; Koren, O.; Koren, S.; Kota, K. C.; Kovar, C. L.; Kyrpides, N. C.; La Rosa, P. S.; Lee, S. L.; Lemon, K. P.; Lennon, N.; Lewis, C. M.; Lewis, L.; Ley, R. E.; Li, K.; Liolios, K.; Liu, B.; Liu, Y.; Lo, C.-C.; Lozupone, C. A.; Dwayne Lunsford, R.; Madden, T.; Mahurkar, A. A.; Mannon, P. J.; Mardis, E. R.; Markowitz, V. M.; Mavromatis, K.; McCorrison, J. M.; McDonald, D.; McEwen, J.; McGuire, A. L.; McInnes, P.; Mehta, T.; Mihindukulasuriya, K. A.; Miller, J. R.; Minx, P. J.; Newsham, I.; Nusbaum, C.; O’Laughlin, M.; Orvis, J.; Pagani, I.; Palaniappan, K.; Patel, S. M.; Pearson, M.; Peterson, J.; Podar, M.; Pohl, C.; Pollard, K. S.; Pop, M.; Priest, M. E.; Proctor, L. M.; Qin, X.; Raes, J.; Ravel, J.; Reid, J. G.; Rho, M.; Rhodes, R.; Riehle, K. P.; Rivera, M. C.; Rodriguez-Mueller, B.; Rogers, Y.-H.; Ross, M. C.; Russ, C.; Sanka, R. K.; Sankar, P.; Fah Sathirapongsasuti, J.; Schloss, J. A.; Schloss, P. D.; Schmidt, T. M.; Scholz, M.; Schriml, L.; Schubert, A. M.; Segata, N.; Segre, J. A.; Shannon, W. D.; Sharp, R. R.; Sharpton, T. J.; Shenoy, N.; Sheth, N. U.; Simone, G. A.; Singh, I.; Smillie, C. S.; Sobel, J. D.; Sommer, D. D.; Spicer, P.; Sutton, G. G.; Sykes, S. M.; Tabbaa, D. G.; Thiagarajan, M.; Tomlinson, C. M.; Torralba, M.; Treangen, T. J.; Truty, R. M.; Vishnivetskaya, T. A.; Walker, J.; Wang, L.; Wang, Z.; Ward, D. V.; Warren, W.; Watson, M. A.; Wellington, C.; Wetterstrand, K. A.; White, J. R.; Wilczek-Boney, K.; Wu, Y.; Wylie, K. M.; Wylie, T.; Yandava, C.; Ye, L.; Ye, Y.; Yooseph, S.; Youmans, B. P.; Zhang, L.; Zhou, Y.; Zhu, Y.; Zoloth, L.; Zucker, J. D.; Birren, B. W.; Gibbs, R. A.; Highlander, S. K.; Methé, B. A.; Nelson, K. E.; Petrosino, J. F.; Weinstock, G. M.; Wilson, R. K.; White, O.; Consortium, T. H. M. P. Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome. *Nature* **2012**, *486* (7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>

- (28) Augustin, A.; Guennec, A. Le; Umamahesan, C.; Kendler-Rhodes, A.; Tucker, R. M.; Chekmeneva, E.; Takis, P.; Lewis, M.; Balasubramanian, K.; DeSouza, N.; Mullish, B. H.; Taylor, D.; Ryan, S.; Whelan, K.; Ma, Y.; Ibrahim, M. A. A.; Bjarnason, I.; Hayee, B. H.; Charlett, A.; Dobbs, S. M.; Dobbs, R. J.; Weller, C. Faecal Metabolite Deficit, Gut Inflammation and Diet in Parkinson’s Disease: Integrative Analysis Indicates Inflammatory Response Syndrome. *Clin. Transl. Med.* **2023**, *13* (1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ctm2.1152>

- (29) Hauser, A.; Eisenmann, P.; Muhle-Goll, C.; Luy, B.; Dötsch, A.; Graf, D.; Tzvetkova, P. Efficient Extraction from Mice Feces for NMR Metabolomics Measurements with Special Emphasis on SCFAs. *Metabolites* **2019**, *9* (3). <https://doi.org/10.3390/metabo9030055>
- (30) Martin, F.-P. J.; Wang, Y.; Sprenger, N.; Yap, I. K. S.; Lundstedt, T.; Lek, P.; Rezzi, S.; Ramadan, Z.; Van Bladeren, P.; Fay, L. B.; Kochhar, S.; Lindon, J. C.; Holmes, E.; Nicholson, J. K. Probiotic Modulation of Symbiotic Gut Microbial-Host Metabolic Interactions in a Humanized Microbiome Mouse Model. *Mol. Syst. Biol.* **2008**, *4*. <https://doi.org/10.1038/msb4100190>
- (31) Yap, I. K. S.; Li, J. V.; Saric, J.; Martin, F.-P.; Davies, H.; Wang, Y.; Wilson, I. D.; Nicholson, J. K.; Utzinger, J.; Marchesi, J. R.; Holmes, E. Metabonomic and Microbiological Analysis of the Dynamic Effect of Vancomycin-Induced Gut Microbiota Modification in the Mouse. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (9), 3718–3728. <https://doi.org/10.1021/pr700864x>
- (32) Gautam, P.; Yadav, R.; Vishwakarma, R. K.; Shekhar, S.; Pathak, A.; Singh, C. An Integrative Analysis of Metagenomic and Metabolomic Profiling Reveals Gut Microbiome Dysbiosis and Metabolic Alterations in ALS: Potential Biomarkers and Therapeutic Insights. *ACS Chem. Neurosci.* **2025**, *16* (14), 2691–2706. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.5c00254>
- (33) Bervoets, L.; Ippel, J. H.; Smolinska, A.; Van Best, N.; Savelkoul, P. H. M.; Mommers, M. A. H.; Penders, J. Practical and Robust NMR-Based Metabolic Phenotyping of Gut Health in Early Life. *J. Proteome Res.* **2021**, *20* (11), 5079–5087. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00617>
- (34) den Besten, G.; van Eunen, K.; Groen, A. K.; Venema, K.; Reijngoud, D.-J.; Bakker, B. M. The Role of Short-Chain Fatty Acids in the Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Host Energy Metabolism. *J. Lipid Res.* **2013**, *54* (9), 2325–2340. <https://doi.org/https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>
- (35) Scott, K. P.; Gratz, S. W.; Sheridan, P. O.; Flint, H. J.; Duncan, S. H. The Influence of Diet on the Gut Microbiota. *Pharmacol. Res.* **2013**, *69* (1), 52–60. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.020>
- (36) Rios-Covián, D.; Ruas-Madiedo, P.; Margolles, A.; Gueimonde, M.; De los Reyes-Gavilán, C.; Salazar, N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and Their Link with Diet and Human Health. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>
- (37) Hamer, H.; Jonkers, D.; Vanhoutvin, S.; Troost, F.; Brummer, R.-J. Review Article: The Role of Butyrate on Colonic Function. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2008**, *27*, 104–119. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03562.x>
- (38) Tan, J.; McKenzie, C.; Potamitis, M.; Thorburn, A. N.; Mackay, C. R.; Macia, L. Chapter Three - The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In *Advances in Immunology*; Alt, F. W., Ed.; Academic Press, 2014; Vol. 121, pp 91–119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9>

- (39) Wu, G. Amino Acids: Metabolism, Functions, and Nutrition. *Amino Acids* **2009**, 37 (1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>
- (40) Neis, E.; Dejong, C.; Rensen, S. The Role of Microbial Amino Acid Metabolism in Host Metabolism. *Nutrients* **2015**, 7, 2930–2946. <https://doi.org/10.3390/nu7042930>
- (41) Davila, A.-M.; Blachier, F.; Gotteland, M.; Andriamihaja, M.; Benetti, P.-H.; Sanz, Y.; Tomé, D. Intestinal Luminal Nitrogen Metabolism: Role of the Gut Microbiota and Consequences for the Host. *Pharmacol. Res.* **2013**, 68 (1), 95–107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.005>
- (42) Macfarlane, G. T.; Macfarlane, S. Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *J. AOAC Int.* **2012**, 95 (1), 50–60. https://doi.org/10.5740/jaoacint.SGE_Macfarlane
- (43) Smith, E. A.; Macfarlane, G. T. Dissimilatory Amino Acid Metabolism in Human Colonic Bacteria. *Anaerobe* **1997**, 3 (5), 327–337. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/anae.1997.0121>
- (44) Agus, A.; Planchais, J.; Sokol, H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe* **2018**, 23 (6), 716–724. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.003>
- (45) Varki, A. Biological Roles of Glycans. *Glycobiology* **2017**, 27 (1), 3–49. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww086>
- (46) Flint, H.; Scott, K.; Duncan, S.; Louis, P.; Forano, E. Microbial Degradation of Complex Carbohydrates in the Gut. *Gut Microbes* **2012**, 3, 289–306. <https://doi.org/10.4161/gmic.19897>
- (47) Louis, P.; Flint, H. J. Formation of Propionate and Butyrate by the Human Colonic Microbiota. *Environ. Microbiol.* **2017**, 19 (1), 29–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>
- (48) Rakoff-Nahoum, S.; Foster, K. R.; Comstock, L. E. The Evolution of Cooperation within the Gut Microbiota. *Nature* **2016**, 533 (7602), 255–259. <https://doi.org/10.1038/nature17626>
- (49) Makki, K.; Deehan, E. C.; Walter, J.; Bäckhed, F. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host Microbe* **2018**, 23 (6), 705–715. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012>
- (50) Bloch, F. Nuclear Induction. *Physical Review* **1946**, 70 (7–8), 460–474. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.70.460>
- (51) Mlynárik, V. Introduction to Nuclear Magnetic Resonance. *Anal. Biochem.* **2017**, 529, 4–9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.05.006>
- (52) Μαυρομούστακος, Θ. *Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός; Συμμετρία*, 2018.
- (53) He, Y.; Cheng, B.; Guo, B.-J.; Huang, Z.; Qin, J.-H.; Wang, Q.-Y.; Feng, L.-L.; Nong, Y.-Y.; Zhu, D.; Guo, H.-W.; Su, Z.-H. Metabonomics and 16S RRNA Gene Sequencing to Study the Therapeutic Mechanism of Danggui Sini Decoction on

- Collagen-Induced Rheumatoid Arthritis Rats with Cold Bi Syndrome. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2023**, 222. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115109>
- (54) Takis, P. G.; Jiménez, B.; Al-Saffar, N. M. S.; Harvey, N.; Chekmeneva, E.; Misra, S.; Lewis, M. R. A Computationally Lightweight Algorithm for Deriving Reliable Metabolite Panel Measurements from 1D ¹H NMR. *Anal. Chem.* **2021**, 93 (12), 4995–5000. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00113>
 - (55) Cai, J.; Zhang, J.; Tian, Y.; Zhang, L.; Hatzakis, E.; Krausz, K. W.; Smith, P. B.; Gonzalez, F. J.; Patterson, A. D. Orthogonal Comparison of GC–MS and ¹H NMR Spectroscopy for Short Chain Fatty Acid Quantitation. *Anal. Chem.* **2017**, 89 (15), 7900–7906. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00848>
 - (56) Takis, P. G.; Jiménez, B.; Sands, C. J.; Chekmeneva, E.; Lewis, M. R. SMolESY: An Efficient and Quantitative Alternative to on-Instrument Macromolecular ¹H-NMR Signal Suppression. *Chem. Sci.* **2020**, 11 (23), 6000–6011. <https://doi.org/10.1039/d0sc01421d>
 - (57) Huart, J.; Cirillo, A.; Taminiau, B.; Descy, J.; Saint-Remy, A.; Daube, G.; Krzesinski, J.-M.; Melin, P.; de Tullio, P.; Jouret, F. Human Stool Metabolome Differs upon 24 h Blood Pressure Levels and Blood Pressure Dipping Status: A Prospective Longitudinal Study. *Metabolites* **2021**, 11 (5). <https://doi.org/10.3390/metabo11050282>
 - (58) Takis, P. G.; Aggelidou, V. A.; Sands, C. J.; Louka, A. Mapping of ¹H NMR Chemical Shifts Relationship with Chemical Similarities for the Acceleration of Metabolic Profiling: Application on Blood Products. *Magnetic Resonance in Chemistry* **2023**, 61 (12), 759–769. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrc.5392>
 - (59) Müller, B.; Rasmusson, A. J.; Just, D.; Jayarathna, S.; Moazzami, A.; Novicic, Z. K.; Cunningham, J. L. Fecal Short-Chain Fatty Acid Ratios as Related to Gastrointestinal and Depressive Symptoms in Young Adults. *Psychosom. Med.* **2021**, 83 (7), 693–699. <https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000965>
 - (60) Monleón, D.; Morales, J. M.; Barrasa, A.; López, J. A.; Vázquez, C.; Celda, B. Metabolite Profiling of Fecal Water Extracts from Human Colorectal Cancer. *NMR Biomed.* **2009**, 22 (3), 342–348. <https://doi.org/10.1002/nbm.1345>
 - (61) Martinez, B.; Schwerdtfeger, L. A.; Richardson, A.; Tobet, S. A.; Henry, C. S. ¹H-NMR Profiling of Short-Chain Fatty Acid Content from a Physiologically Accurate Gut-on-a-Chip Device. *Anal. Chem.* **2022**, 94 (28), 9987–9992. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c05146>
 - (62) Granado-Serrano, A. B.; Martín-Garí, M.; Sánchez, V.; Riart Solans, M.; Berdún, R.; Ludwig, I. A.; Rubió, L.; Vilapinyó, E.; Portero-Otín, M.; Serrano, J. C. E. Faecal Bacterial and Short-Chain Fatty Acids Signature in Hypercholesterolemia. *Sci. Rep.* **2019**, 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38874-3>
 - (63) Davar, D.; Dzutsev, A. K.; McCulloch, J. A.; Rodrigues, R. R.; Chauvin, J.-M.; Morrison, R. M.; Deblasio, R. N.; Menna, C.; Ding, Q.; Pagliano, O.; Zidi, B.; Zhang, S.; Badger, J. H.; Vetizou, M.; Cole, A. M.; Fernandes, M. R.; Prescott, S.; Costa, R. G. F.; Balaji, A. K.; Morgun, A.; Vujkovic-Cvijin, I.; Wang, H.; Borhani, A. A.;

- Schwartz, M. B.; Dubner, H. M.; Ernst, S. J.; Rose, A.; Najjar, Y. G.; Belkaid, Y.; Kirkwood, J. M.; Trinchieri, G.; Zarour, H. M. Fecal Microbiota Transplant Overcomes Resistance to Anti-PD-1 Therapy in Melanoma Patients. *Science* (1979). **2021**, 371 (6529), 595–602. <https://doi.org/10.1126/science.abf3363>
- (64) Turrone, S.; Fiori, J.; Rampelli, S.; Schnorr, S. L.; Consolandi, C.; Barone, M.; Biagi, E.; Fanelli, F.; Mezzullo, M.; Crittenden, A. N.; Henry, A. G.; Brigidi, P.; Candela, M. Fecal Metabolome of the Hadza Hunter-Gatherers: A Host-Microbiome Integrative View. *Sci. Rep.* **2016**, 6 (1), 32826. <https://doi.org/10.1038/srep32826>
- (65) Zierer, J.; Jackson, M. A.; Kastenmüller, G.; Mangino, M.; Long, T.; Telenti, A.; Mohn, R. P.; Small, K. S.; Bell, J. T.; Steves, C. J.; Valdes, A. M.; Spector, T. D.; Menni, C. The Fecal Metabolome as a Functional Readout of the Gut Microbiome. *Nat. Genet.* **2018**, 50 (6), 790–795. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0135-7>
- (66) Gall, G. L.; Guttula, K.; Kellingray, L.; Tett, A. J.; Hoopen, R.; Kemsley, K. E.; Savva, G. M.; Ibrahim, A.; Narbad, A. Metabolite Quantification of Faecal Extracts from Colorectal Cancer Patients and Healthy Controls. *Oncotarget* **2018**, 9 (70), 33278–33289. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26022>
- (67) Iebba, V.; Guerrieri, F.; Di Gregorio, V.; Levrero, M.; Gagliardi, A.; Santangelo, F.; Sobolev, A. P.; Circi, S.; Giannelli, V.; Mannina, L.; Schippa, S.; Merli, M. Combining Amplicon Sequencing and Metabolomics in Cirrhotic Patients Highlights Distinctive Microbiota Features Involved in Bacterial Translocation, Systemic Inflammation and Hepatic Encephalopathy. *Sci. Rep.* **2018**, 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26509-y>
- (68) Forlano, R.; Martinez-Gili, L.; Takis, P.; Miguens-Blanco, J.; Liu, T.; Triantafyllou, E.; Skinner, C.; Loomba, R.; Thursz, M.; Marchesi, J. R.; Mullish, B. H.; Manousou, P. Disruption of Gut Barrier Integrity and Host–Microbiome Interactions Underlie MASLD Severity in Patients with Type-2 Diabetes Mellitus. *Gut Microbes* **2024**, 16 (1), 2304157. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2304157>
- (69) Parmanand, B. A.; Kellingray, L.; Le Gall, G.; Basit, A. W.; Fairweather-Tait, S.; Narbad, A. A Decrease in Iron Availability to Human Gut Microbiome Reduces the Growth of Potentially Pathogenic Gut Bacteria; an in Vitro Colonic Fermentation Study. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2019**, 67, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.01.010>
- (70) Ke, S.; Wang, A.; Strappe, P.; Wang, B.; Blanchard, C.; Zhou, B.; Zhou, Z.; Zhao, G. Design of Functional Glucosaminoglycan via Acetylation for Targeting Regulation of Gut Microbiota. *Carbohydr. Polym.* **2026**, 375. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.124797>
- (71) Ocvirk, S.; Wilson, A. S.; Posma, J. M.; Li, J. V.; Koller, K. R.; Day, G. M.; Flanagan, C. A.; Otto, J. E.; Sacco, P. E.; Sacco, F. D.; Sapp, F. R.; Wilson, A. S.; Newton, K.; Brouard, F.; Delany, J. P.; Behnning, M.; Appolonia, C. N.; Soni, D.; Bhatti, F.; Methé, B.; Fitch, A.; Morris, A.; Gaskins, H. R.; Kinross, J.; Nicholson, J. K.; Thomas, T. K.; O’Keefe, S. J. D. A Prospective Cohort Analysis of Gut Microbial Co-Metabolism in Alaska Native and Rural African People at High and Low Risk of Colorectal Cancer.

- American Journal of Clinical Nutrition* **2020**, *111* (2), 406–419. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz301>
- (72) Liaquat, M.; Le Gall, G.; Scholey, A.; Pontifex, M. G.; Bastiaanssen, T. F. S.; Muller, M.; Miniñane, A. M.; Vauzour, D. APOE4 Genotype Shapes the Role of Dietary Fibers in Cognitive Health through Gut Microbiota Changes. *Gut Microbes* **2025**, *17* (1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2025.2526133>
 - (73) Primec, M.; Mičetić-Turk, D.; Langerholc, T. Analysis of Short-Chain Fatty Acids in Human Feces: A Scoping Review. *Anal. Biochem.* **2017**, *526*, 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.03.007>
 - (74) Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. Metabonomics. *Nature* **2008**, *455* (7216), 1054–1056. <https://doi.org/10.1038/4551054a>
 - (75) Emwas, A.-H. The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; 2015; Vol. 1277, pp 161–193. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_13
 - (76) McDaniel, J. R.; DeKosky, B. J.; Tanno, H.; Ellington, A. D.; Georgiou, G. Ultra-High-Throughput Sequencing of the Immune Receptor Repertoire from Millions of Lymphocytes. *Nat. Protoc.* **2016**, *11* (3), 429–442. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.024>
 - (77) Veselkov, K. A.; Lindon, J. C.; Ebbels, T. M. D.; Crockford, D.; Volynkin, V. V.; Holmes, E.; Davies, D. B.; Nicholson, J. K. Recursive Segment-Wise Peak Alignment of Biological ¹H NMR Spectra for Improved Metabolic Biomarker Recovery. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (1), 56–66. <https://doi.org/10.1021/ac8011544>
 - (78) Dieterle, F.; Ross, A.; Schlotterbeck, G.; Senn, H. Probabilistic Quotient Normalization as Robust Method to Account for Dilution of Complex Biological Mixtures. Application in ¹H NMR Metabonomics. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (13), 4281–4290. <https://doi.org/10.1021/ac051632c>
 - (79) Craig, A.; Cloarec, O.; Holmes, E.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. Scaling and Normalization Effects in NMR Spectroscopic Metabonomic Data Sets. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (7), 2262–2267. <https://doi.org/10.1021/ac0519312>
 - (80) Wishart, D. S.; Feunang, Y. D.; Marcu, A.; Guo, A. C.; Liang, K.; Vázquez-Fresno, R.; Sajed, T.; Johnson, D.; Li, C.; Karu, N.; Sayeeda, Z.; Lo, E.; Assempour, N.; Berjanskii, M.; Singhal, S.; Arndt, D.; Liang, Y.; Badran, H.; Grant, J.; Serra-Cayuela, A.; Liu, Y.; Mandal, R.; Neveu, V.; Pon, A.; Knox, C.; Wilson, M.; Manach, C.; Scalbert, A. HMDB 4.0: The Human Metabolome Database for 2018. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46* (D1), D608–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
 - (81) Weljie, A. M.; Newton, J.; Mercier, P.; Carlson, E.; Slupsky, C. M. Targeted Profiling: Quantitative Analysis of ¹H NMR Metabolomics Data. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (13), 4430–4442. <https://doi.org/10.1021/ac060209g>
 - (82) Trygg, J.; Holmes, E.; Lundstedt, T. Chemometrics in Metabonomics. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (2), 469–479. <https://doi.org/10.1021/pr060594q>

- (83) Ludwig, C.; Günther, U. L. MetaboLab - Advanced NMR Data Processing and Analysis for Metabolomics. *BMC Bioinformatics* **2011**, 12 (1), 366. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-366>
- (84) De Zanche, N.; Massner, J. A.; Leussler, C.; Pruessmann, K. P. Modular Design of Receiver Coil Arrays. *NMR Biomed.* **2008**, 21 (6), 644–654. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/nbm.1237>
- (85) Markley, J. L.; Brüschweiler, R.; Edison, A. S.; Eghbalnia, H. R.; Powers, R.; Raftery, D.; Wishart, D. S. The Future of NMR-Based Metabolomics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, 43, 34–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001>
- (86) Capron, X.; Walczak, B.; de Noord, O. E.; Massart, D. L. A Modification of the ICOMP Criterion for Estimation of Optimum Complexity of PCR Models. *J. Chemom.* **2005**, 19 (5–7), 308–316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cem.934>
- (87) Beckonert, O.; Keun, H. C.; Ebbels, T. M. D.; Bundy, J.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. Metabolic Profiling, Metabolomic and Metabonomic Procedures for NMR Spectroscopy of Urine, Plasma, Serum and Tissue Extracts. *Nat. Protoc.* **2007**, 2 (11), 2692–2703. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.376>
- (88) *INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES Q2(R2).*