



93

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

- **ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΛΟΝΟΜΙΚΗΣ
ΣΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΩΝ ΝΕΦΡΙΚΩΝ ΠΑΘΗΣΕΩΝ**

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΨΥΧΟΓΙΟΣ

Φυσικός Νοσοκομείων - Ακτινοφυσικός Ιατρικής

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000200766





ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ



ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

Τό ερευνητικό έργο συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση - Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) & Εθνικούς Πόρους, στα πλαίσια του προγράμματος με τίτλο «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ» το οποίο εντάσσεται στο ΕΠΕΑΕΚ II του 3^{ου} Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης του ΥΠ.Ε.Π.Θ.

‘Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα’, Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2.



•
Ημερομηνία αίτησης του κ. Ψυχογιού Νικόλαου 23-11-2001

• **Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 467^α/2-4-2002**

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Σεφεριάδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Μέλη

• Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας

Ανασύσταση Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: Αριθμ Συνεδρ. 484^α / 15-10-2002

Επιβλέπουσα

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας

Μέλη

Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας

Σεφεριάδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 9-4-2002

« Η χρήση της μεταβολονομικής στη διερεύνηση των νεφρικών παθήσεων »

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 613^ο/2-10-2007

Ελισάφ Μωϋσής, Καθηγητής Παθολογίας, μέλος

Σεφεριάδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, μέλος

Σιαμόπουλος Κωνσταντίνος Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας, μέλος

Φώτσης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, μέλος

Μπαϊρακτάρη Ελένη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας,
επιβλέπουσα

Κατωπόδης Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας, μέλος

Πολίτου Αναστασία, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας, μέλος

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 17-10-2007

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Ιωάννης Γουδέβενος

Καθηγητής Παθολογίας-Καρδιολογίας



*Στην λατρευτή μου μητέρα, Βασιλική
και αγαπημένη μου νονά, Αγγελική*



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με τη Νεφρολογική Κλινική και το Βιοχημικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Π.Γ.Ν.Ι.) καθώς και την Νεφρολογική Κλινική του Γενικού Νοσοκομείου Χατζηκώστα. Η διατριβή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση - Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) & Εθνικούς Πόρους, στα πλαίσια του προγράμματος με τίτλο «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ» το οποίο εντάσσεται στο ΕΠΕΑΕΚ II του 3^{ου} Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης του ΥΠ.Ε.Π.Θ.

Με τη συγγραφή της εργασίας αυτής θα ήθελα εγκάρδια να ευχαριστήσω πρωτίστως την κα. Ε. Μπαϊρακτάρη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την ανάθεση του θέματος, την ακούραστη καθοδήγηση και ηθική συμπαράστασή της στην διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών και καθόλη την πορεία της διδακτορικής διατριβής, τόσο κατά την πειραματική διαδικασία όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσης εργασίας καθώς και των σχετικών δημοσιεύσεων. Θα ήθελα επίσης να την ευχαριστήσω για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να ασχοληθώ λεπτομερέστατα με το πρωτοποριακό πεδίο της NMR Μεταβονομικής, κάτι που έγινε για πρώτη φορά στην Ελλάδα.

Θερμότατες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Καθηγητή Βιολογικής Χημείας και Διευθυντή του Εργαστηρίου Κλινικής Χημείας κ. Κ. Σεφεριάδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την περίοδο των μεταπτυχιακών μου σπουδών και την αμέριστη στήριξή του έως σήμερα τόσο σε επιστημονικό όσο και σε ανθρώπινο επίπεδο μέσα από πολλές και δημιουργικές συζητήσεις.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον Καθηγητή Νεφρολογίας κ. Κ. Σιαμόπουλο για τις καίριες υποδείξεις του για μια ολοκληρωμένη και συστηματική διερεύνηση της νεφρικής νόσου από τα πρώτα κιόλας χρόνια των μεταπτυχιακών μου σπουδών καθώς και τον νεφρολόγο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων κ. Ρ. Καλαϊτζίδη για την πολύτιμη βοήθεια του στη μελέτη και ομαδοποίηση όλων των ασθενών.

Ευχαριστώ επίσης τον νεφρολόγο κ. Α. Ανδρίκο του Γενικού Νοσοκομείου Χατζηκώστα και τον ειδικευόμενο νεφρολόγο του Π.Γ.Ν.Ι. κ. Π. Νικολόπουλο για την πρόθυμη συνεργασία τους στη συλλογή των δειγμάτων των ασθενών. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τό χρόνο και τη διάθεση που αφιέρωσαν στην εξέταση της παρούσης διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στις ερευνήτριες Α' και υπεύθυνες του Εργαστηρίου NMR του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» Δρ. Κ. Γιαννακοπούλου και Δρ. Μ. Πελεκάνου, και ιδιαίτερος στην επιστημονική συνεργάτιδα του Ινστιτούτου Βιολογίας Δρ. Δ. Μπενάκη και στην τεχνική επιστήμονα Δρ. Α. Παναγιωτοπούλου για την υποδειγματική φιλοξενία και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια λήψης των ¹H-NMR φασμάτων. Στα ίδια πλαίσια ευχαριστώ και την επιστημονική υπεύθυνο του Κέντρου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) του Πανεπιστη-



μίου Ιωαννίνων, Δρ. Β. Εξάρχου, για την εκπαίδευση στη λήψη και επεξεργασία των 2D TOCSY ¹H-NMR φασμάτων. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τις ιστοπαθολόγους κα. Σ. Δήμου του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου και κα. Φ. Σώτσιου του Νοσοκομείου 'Ευαγγελισμός' για τη συμβολή τους στην εμπεριστατωμένη ανάλυση και κατάταξη των βιοψιών νεφρού. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Κλινικής Χημείας Χ. Κωσταρά για τη γενικότερη συμβολή και βοήθειά της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, σε επιστημονικό, συναδελφικό και προσωπικό επίπεδο καθώς και τη Β. Σιαπλαούρα για τη συνεχή στήριξη και συμπαράστασή της σε όλα τα επίπεδα από τα χρόνια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω το σύνολο του επιστημονικού και τεχνικού προσωπικού της Νεφρολογικής Κλινικής, του Εξωτερικού Ιατρείου Λιπιδίων της Παθολογικής Κλινικής και του Βιοχημικού Εργαστηρίου του Π. Γ. Ν. Ι. για την αγαστή συνεργασία τους στη συλλογή των δειγμάτων ούρων και ορού των ασθενών και υγιών και στη βιοχημική τους ανάλυση αντίστοιχα, καθόλη τη διάρκεια της παρούσης εργασίας. Ακόμη, εξαιρετική ήταν η βοήθεια που μου προσέφεραν οι κκ. Lennart Eriksson και κυρίως Mark Earll από την UMETRICS AB στην κατανόηση και εφαρμογή των εννοιών της μεταβονομικής και των τεχνικών αναγνώρισης προτύπων στα πλαίσια των ειδικών σεμιναρίων που παρακολούθησα στο Windsor της Μεγάλης Βρετανίας και στη Βασιλεία της Ελβετίας.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους φίλους μου εντός και εκτός Ελλάδος για τη συνεχή συμπαράστασή τους κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής καθώς και το Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων για την παροχή πάσης φύσεως υλικοτεχνικής και διοικητικής βοήθειας.

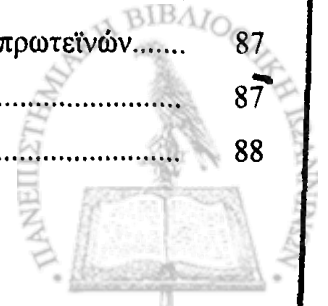


ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Βασικές Αρχές Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	1
1.1.1	Κλασική – κβαντομηχανική – στατιστική περιγραφή	1
1.1.2	Αλληλεπίδραση πυρηνικών στροφορμών με μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο	5
1.1.3	Ελεύθερη επαγωγική απόσβεση (FID) – Μετασχηματισμός Fourier	7
1.1.4	Χημική μετατόπιση δ	8
1.1.5	Λεπτή υφή του φάσματος. Σύζευξη σπιν – σπιν	10
1.1.6	Λήψη φάσματος ¹ H-NMR	11
1.1.7	Φασματοσκοπία NMR δυο διαστάσεων (2D NMR Spectroscopy)	13
1.1.7.1	Γενική περιγραφή πειράματος NMR δυο διαστάσεων	13
1.1.7.2	Φασματοσκοπία NMR 2D COSY και TOCSY	15
1.2	Ο Νεφρός	16
1.2.1	Λειτουργία του νεφρού	16
1.2.2	Ανατομία του νεφρού	16
1.2.3	Σπειραματική λειτουργία	18
1.2.4	Σωληναριακή λειτουργία	19
1.2.5	Στοιχεία παθοφυσιολογίας του νεφρού – Σπειραματονεφρίτιδα	23
1.2.5.1	Εισαγωγή	23
1.2.5.2	Ταξινόμηση σπειραματονεφρίτιδων	24
1.2.5.3	Στοιχεία επιδημιολογίας, διάγνωσης και θεραπείας της ΣΠΝ	26
1.2.5.4	Ρόλος της σωληναριοδιάμεσης βλάβης στην εξέλιξη της ΣΠΝ	27
1.3	Βασικές Αρχές Ανάλυσης Πολυμεταβλητών Δεδομένων	30
1.3.1	Ανάλυση Πολυμεταβλητών Δεδομένων – Αναγνώριση Προτύπων	30
1.3.2	Ιδιότητες της Ανάλυσης Πολυμεταβλητών Δεδομένων	31
1.3.3	Κατηγορίες τεχνικών PR	33
1.3.3.1	Unsupervised techniques	33
1.3.3.2	Principal Components Analysis (PCA)	33
1.3.4	Supervised techniques	37
1.3.4.1	Partial Least Squares - Projection to Latent Structures, PLS	37
1.3.5	Orthogonal Signal Correction, OSC	38
1.3.6	Αξιολόγηση των στατιστικών μοντέλων	40
1.4	Εφαρμογή της ¹H-NMR φασματοσκοπίας στη διερεύνηση της νεφρικής βλάβης	42



1.4.1	Η έννοια της Μεταβονομικής (Metabonomics).....	42
1.4.2	Εφαρμογή της ¹ H-NMR φασματοσκοπίας στη διερεύνηση της νεφρικής βλάβης.....*	45
1.4.2.1	Μελέτες σε πειραματόζωα.....	45
1.4.2.2	Μελέτες σε ανθρώπους.....	51
1.5	Σκοπός της εργασίας.....	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....		57
2.1	Πληθυσμοί της μελέτης.....	57
2.1.1	Ομάδα υγιών ατόμων.....	57
2.1.2	Ομάδα ασθενών.....	57
2.1.3	Ιστοπαθολογική ανάλυση.....	58
2.1.4	Συλλογή και συντήρηση δειγμάτων.....	58
2.1.5	Βιοχημικός έλεγχος.....	59
2.1.6	¹ H-NMR φασματοσκοπία.....	59
2.1.7	Στατιστική ανάλυση.....	61
2.1.8	Ανάλυση Πολυμεταβλητών Δεδομένων.....	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....		65
3.1	Μελέτη του μεταβολικού προφίλ των ούρων της ομάδας των υγιών ατόμων.....	65
3.1.1	Το ¹ H-NMR φάσμα των ούρων.....	65
3.1.2	Γενική επισκόπηση του συνόλου των πολυμεταβλητών δεδομένων.....	66
3.1.3	Βιοχημικές παράμετροι του πληθυσμού της μελέτης.....	67
3.1.4	Δημιουργία στατιστικών μοντέλων με βάση το φύλο.....	68
3.1.5	Δημιουργία στατιστικών μοντέλων με βάση την ηλικία.....	71
3.1.6	Δημιουργία στατιστικών μοντέλων με βάση το κάπνισμα.....	73
3.1.7	Αξιολόγηση των μοντέλων OSC/PLS-DA.....	73
3.1.8	Ποσοτικός προσδιορισμός των κυριότερων μεταβολιτών των ούρων.....	75
3.2	Μελέτη του μεταβολικού προφίλ των ούρων των ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα.....	77
3.2.1	1D και 2D ¹ H-NMR φάσματα των ούρων.....	77
3.2.2	Γενική επισκόπηση του συνόλου των πολυμεταβλητών δεδομένων.....	77
3.2.3	Βιοχημικές παράμετροι του πληθυσμού της μελέτης.....	80
3.2.4	Μεταβονομική προσέγγιση.....	81
3.2.5	Αφαίρεση της περιοχής συντονισμού των αλειφατικών ομάδων των πρωτεϊνών.....	87
3.2.6	Αξιολόγηση των μοντέλων OSC/PLS-DA.....	87
3.2.7	Εσωτερική αξιολόγηση των μοντέλων OSC/PLS-DA.....	88



3.2.8	Εξωτερική αξιολόγηση των μοντέλων OSC/PLS-DA.....	91
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	95
4.1	Γενικό μέρος.....	95
4.2	Προαναλυτικοί παράγοντες και προεπεξεργασία των δεδομένων.....	97
4.3	Μελέτη του υγιούς πληθυσμού.....	99
4.4	Μελέτη των νεφροπαθών.....	102
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	105
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....	107
6.1	Περίληψη στην Ελληνική.....	107
6.2	Περίληψη στην Αγγλική (Summary in English).....	110
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	113



ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

3-HB:	3-hydroxybutyrate (3-υδροξυβουτυρικό οξύ)
γGT:	γ-glutamyltransferase (γ-γλουταμινοτρανσφεράση)
Θ. Ι.:	Θερμοδυναμική Ισορροπία
Π.Γ.Ν.Ι.:	Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων
AMIX:	Analysis of MIXtures
BEA:	bromoethanamine, βρωμοαιθαναμίνη
COMET:	Consortium for Metabonomic Toxicology
COSY:	Correlation Spectroscopy (φασματοσκοπία συσχέτισης)
DMA:	dimethylamine (διμεθυλαμίνη)
DMG:	dimethylglycine (διμεθυλογλυκίνη)
FID:	Free Induction Decay (ελεύθερη επαγωγική απόσβεση)
GFR:	Glomerular Filtration Rate (ρυθμός σπειραματικής διήθησης)
HCBD:	hexachlorobutadiene, εξαχλωροβουταδιένη
LV:	Latent Variable (λανθάνουσα μεταβλητή)
MDA:	Multivariate Data Analysis (ανάλυση πολυμεταβλητών δεδομένων)
MDRD:	Modification of Diet in Renal Disease
NAG:	<i>N</i> -acetyl-β-D-glucosaminidase (<i>N</i> -ακετυλ-β-γλουκοσαμινιδάση)
NCA:	Normal Coronary Arteries (φυσιολογικά στεφανιαία αγγεία)
NMR:	Nuclear Magnetic Resonance (πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός)
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OSC:	Orthogonal Signal Correction (ορθοκανονική διόρθωση σήματος)
OSC/PLS-DA:	Orthogonal Signal Correction/Partial Least Squares-Discriminant Analysis
PAP:	<i>p</i> -aminophenol, πάρα-αμινοφαινόλη
PC:	Principal Component (κύρια συνιστώσα)
PCA:	Principal Components Analysis (ανάλυση κυρίων συνιστωσών)
PI:	propyleneimine (προπυλενική ιμίνη)
PLS:	Partial Least Squares or Projections to Latent Structures (μερικά ελάχιστα τετράγωνα ή προβολή σε κρυφές δομές)
PLS-DA:	Partial Least Squares-Discriminant Analysis (διαχωριστική ανάλυση μερικών ελαχίστων τετράγωνων)
PR:	Pattern Recognition (αναγνώριση προτύπων)
PRESS:	Predicted Residual Error Sum of Squares (άθροισμα τετραγώνων των προβλεπόμενων σφαλμάτων των υπολοίπων)
RSS:	Residual Sum of Squares (άθροισμα τετραγώνων των υπολοίπων)
SMRS:	Standard Metabolic Reporting Structures
SSX:	Sum of Squares of all X variables (άθροισμα τετραγώνων όλων των μεταβλητών X)
TMA:	trimethylamine (τριμεθυλαμίνη)
TMAO:	trimethylamine- <i>N</i> -oxide (τριμέθυλο- <i>N</i> -αμινοξειδίο)
TMS:	tetramethylsilane (τετραμεθυλοσιλάνιο)
TOCSY:	Total Correlation Spectroscopy (φασματοσκοπία ολικής συσχέτισης)
TSP:	sodium 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3- ² H ₄)-1- propionate
TVD:	Triple Vessel Disease (νόσος τριών αγγείων)



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βασικές Αρχές Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

1.1.1 Κλασική – κβαντομηχανική – στατιστική περιγραφή

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) είναι μία ευαίσθητη πυρηνική αναλυτική τεχνική με εφαρμογές στη Φυσική, Χημεία, Βιοχημεία, Βιοφυσική και την τελευταία εικοσιπενταετία στην Ιατρική (Gerothanassis et al., 2002). Το φαινόμενο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού είναι μία μορφή απορρόφησης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, όπου ένα δείγμα απορροφά σε συχνότητες οι οποίες χαρακτηρίζουν τους πυρήνες που περιέχει. Ένα φάσμα NMR είναι ουσιαστικά ένα διάγραμμα των κορυφών απορρόφησης σε συνάρτηση με τη συχνότητα συντονισμού. Τα πρώτα πειράματα NMR έγιναν το 1938 από τους Rabi και συνεργάτες σε μοριακές δέσμες (Rabi et al., 1938) και το 1945 από τον Bloch και τους συνεργάτες του (Bloch et al., 1946) στο Πανεπιστήμιο Stanford της Καλιφόρνιας και τον Purcell και τους συνεργάτες του (Purcell et al., 1946) στο Πανεπιστήμιο Harvard της Μασαχουσέτης (1952, βραβείο Nobel Φυσικής για τους δύο ερευνητές).

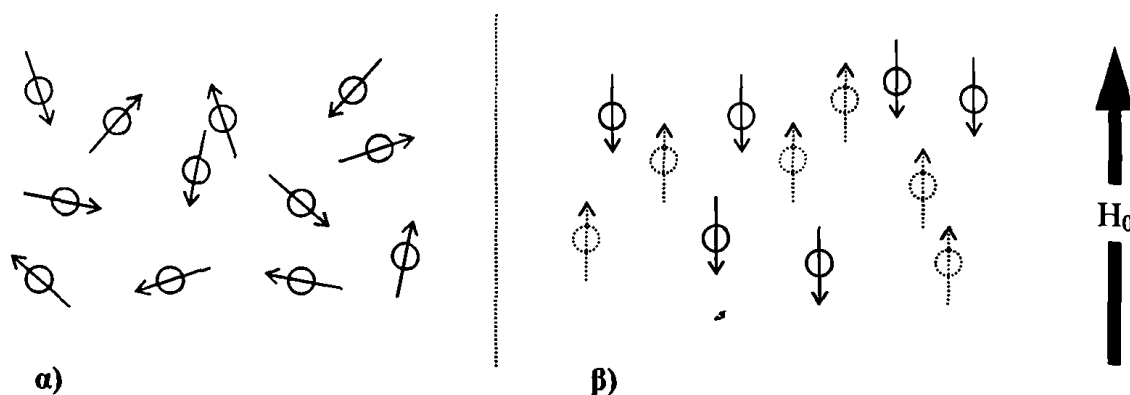
Αναλύοντας τις τρεις λέξεις του ονόματος του φαινομένου προκύπτει ότι ο όρος *Πυρηνικός* αναφέρεται στο χώρο της ύλης από τον οποίο προέρχεται το σήμα, η πληροφορία, διότι βασίζεται στην ανίχνευση πυρήνων με μη μηδενική ολική στροφορμή. Ο όρος *Μαγνητικός* αναφέρεται στην ιδιότητα του χώρου με την οποία συσχετίζεται άμεσα το φαινόμενο, δηλαδή το μαγνητικό πεδίο των ατομικών πυρήνων της ύλης. Ο τρίτος όρος, *Συντονισμός*, αναφέρεται στη μέθοδο που χρησιμοποιείται για να ανιχνευθεί το σήμα. Το NMR είναι ένα φαινόμενο διπλού χρόνου. Στον πρώτο χρόνο οι πυρήνες των ατόμων της ύλης (δέκτες) διεγείρονται κατά την αλληλεπίδραση τους με παλμούς ραδιοσυχνότητας από το πηνίο εκπομπής (πομπός). Στο δεύτερο χρόνο οι ίδιοι πυρήνες, λειτουργώντας ως πομποί, αποδιεγείρονται κατά την αλληλεπίδρασή τους με το γειτονικό μοριακό τους περιβάλλον, εκπέμποντας ενέργεια με τη μορφή ραδιοσυχνότητας που λαμβάνεται από το πηνίο λήψης (δέκτης). Το σήμα καταγράφεται στη διάρκεια του 2^{ου} χρόνου, δηλαδή κατά την αποδιέγερση των πυρήνων από τη διεγερμένη κατάσταση στην κατάσταση θερμοδυναμικής ισορροπίας (Θ. Ι.).

Οι πυρήνες όλων των στοιχείων περιέχουν φορτία και όταν περιστρέφονται, λόγω των ιδιοπεριστροφών (σπιν) των πρωτονίων και νετρονίων, συμπεριφέρονται ως μαγνητικά δίπολα και επάγουν μαγνητικά πεδία κάθετα στο επίπεδο περιστροφής. Η ένταση των μαγνητικών αυτών πεδίων εξαρτάται από την *μαγνητική διπολική ροπή* ή *πυρηνική μαγνητική ροπή* μ , η οποία αποτελεί μια θεμελιώδη ιδιότητα των πυρήνων. Η *ολική πυρηνική στροφορμή* I , είναι ένα επίσης θεμελιώδες διανυσματικό μέγεθος που χαρακτηρίζει τους πυρήνες και το διάνυσμα της είναι παράλληλο ή αντιπαράλληλο με το διάνυσμα της μαγνητικής ροπής και δίνεται από τη σχέση: $\mu = \gamma I$, όπου ο παράγοντας γ καλείται *πυρηνικός γυρομαγνητικός λόγος* και αποτελεί χαρακτηριστικό του κάθε πυρήνα



(πρωτόνιο $\gamma=2.79$ και νετρόνιο $\gamma=-1.909$). Η εμφάνιση μη μηδενικής ολικής στροφορμής I , άρα και μη μηδενικής μαγνητικής διπολικής ροπής μ σε έναν πυρήνα εξαρτάται από το συνολικό αριθμό των πρωτονίων και νετρονίων, ή νουκλεονίων. Αν ο μαζικός αριθμός A (αριθμός των νουκλεονίων) είναι περιττός και ο ατομικός αριθμός Z (αριθμός των πρωτονίων) είναι περιττός ή άρτιος τότε ο κβαντικός αριθμός πυρηνικής στροφορμής I έχει τιμές ημιακέραιες: $1/2$ (π.χ. ^1_1H , $^{13}_6\text{C}$, $^{15}_7\text{N}$, $^{19}_9\text{F}$, $^{31}_{15}\text{P}$), $3/2$ (π.χ. $^{11}_5\text{B}$, $^{23}_{11}\text{Na}$, $^{35}_{17}\text{Cl}$), $5/2$ (π.χ. $^{17}_8\text{O}$). Αν ο A είναι άρτιος και ο Z περιττός, τότε ο I έχει τιμές ακέραιες 1 (π.χ. ^2_1H , $^{14}_7\text{N}$), $2, 3$ (π.χ. $^{10}_5\text{B}$), ενώ αν οι A και Z είναι άρτιοι, τότε ο I είναι 0 (π.χ. $^{12}_6\text{C}$, $^{16}_8\text{O}$).

Κατά την απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου τα διανύσματα των μ προσανατολίζονται τυχαία στο χώρο (Εικόνα 1.1α). Η παρουσία όμως ενός ομογενούς εξωτερικού μαγνητικού πεδίου H_0 αλλάζει την ισοτροπία του χώρου ορίζοντας μια φυσική διεύθυνση προς την οποία τείνουν να προσανατολιστούν οι μαγνητικές ροπές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα διανύσματα των μαγνητικών ροπών να διατάσσονται παράλληλα (χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση) ή αντιπαράλληλα (υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση) προς το εξωτερικό πεδίο H_0 (Εικόνα 1.1β).



Εικόνα 1.1 Προσανατολισμός των διανυσμάτων των πυρηνικών μαγνητικών διπολικών ροπών μ . α) απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, β) παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.

Με βάση τις αρχές της κλασικής φυσικής, το μέτρο της ολικής στροφορμής I πρέπει να διατηρείται σταθερό με τον χρόνο, όπως και η προβολή της I πάνω στον άξονα ορισμού της διεύθυνσης του H_0 (z άξονας). Η μόνη δυνατή κίνηση του διανύσματος της I είναι η περιστροφή πάνω σε έναν κώνο γύρω από αυτόν τον άξονα και λέγεται *μετάπτωση* ή *μεταπτωτική κίνηση Larmor*. Η γωνιακή ταχύτητα ω_0 για την μεταπτωτική κίνηση της I ή της μ γύρω από το H_0 ισούται με: $\omega_0 = \gamma H_0$. Η γωνιακή ταχύτητα ή κυκλική συχνότητα ω_0 της μετάπτωσης (καλείται και συχνότητα Larmor) είναι σταθερή και η τιμή της εξαρτάται από την ένταση του εξωτερικού πεδίου H_0 και την τιμή του γυρομαγνητικού λόγου γ (Ernst et al., 1987).

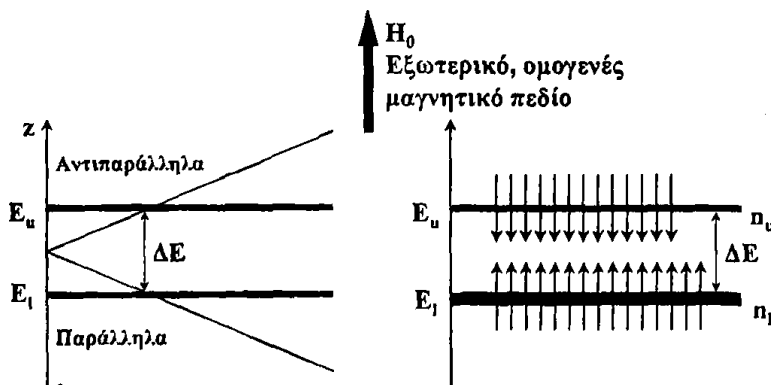
Οι αρχές της κβαντομηχανικής καθορίζουν επιτρεπόμενες τιμές τόσο για το μέτρο της πυρηνικής μαγνητικής ροπής μ , όσο και για τη διεύθυνση των συνιστωσών αυτής. Με την εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, η μ επιτρέπεται να προσανατολισθεί με $2I+1$ τρόπους, χωρίς όμως να μπορεί να προσανατολισθεί ακριβώς παράλληλα ή αντιπαράλληλα με τη διεύθυνση του

εξωτερικού πεδίου. Όπως καθορίζει και η κλασική φυσική, πρέπει η μ , δηλαδή ο άξονας περιστροφής του πυρήνα, να εκτελεί γυροσκοπική (μεταπτωτική) κίνηση γύρω από το διάνυσμα της έντασης του εξωτερικού πεδίου με κυκλική συχνότητα $\omega_0 = \gamma H_0$. Στην περίπτωση του ^1H , όπου $I=1/2$, κατά την παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου \mathbf{H}_0 θα αντιστοιχούν δύο ενεργειακές στάθμες $E(+1/2)$ και $E(-1/2)$. Η E_l είναι η κατάσταση με την μικρότερη ενέργεια και αντιπροσωπεύει τον σχεδόν παράλληλο προσανατολισμό των μ με τη διεύθυνση του \mathbf{H}_0 και η E_u είναι η κατάσταση με την μεγαλύτερη ενέργεια και αντιπροσωπεύει τον σχεδόν αντιπαράλληλο προσανατολισμό των μαγνητικών ροπών μ με τη διεύθυνση του \mathbf{H}_0 (Εικόνα 1.2). Η ενεργειακή διαφορά των δύο σταθμών είναι ανάλογη της έντασης του \mathbf{H}_0 . Αν $\Delta E = h\nu = \hbar\omega_0$ και $\Delta E = \gamma\hbar H_0$, τότε $\hbar\omega_0 = \gamma\hbar H_0 \rightarrow \omega_0 = \gamma H_0$.

Ο προσανατολισμός υπακούει στη στατιστική θερμοδυναμική Boltzmann βάσει της οποίας υπάρχει περίσσειμα πυρήνων στη βασική κατάσταση με προσανατολισμό παράλληλο προς την ένταση του πεδίου \mathbf{H}_0 . Μεταβάσεις μεταξύ των δυο καταστάσεων συμβαίνουν με απορρόφηση ή εκπομπή ενέργειας ίσης με την ενεργειακή διαφορά τους (Εικόνα 1.2), όταν ο πυρήνας και η ακτινοβολία της πηγής συντονίζονται, από όπου και προέρχεται ο όρος Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός. Για το ^1H , $\gamma = 2.675 \times 10^8 \frac{\text{rad}}{\text{sec} \cdot \text{Tesla}}$ και συνεπώς για εξωτερικό πεδίο είναι $H_0 = 1.5\text{T}$ θα ισχύει,

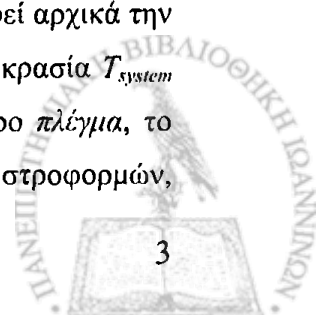
$\omega_0 = 401.25 \times 10^6 \frac{\text{rad}}{\text{sec}}$, $\nu = \omega_0/2\pi = 63.86\text{MHz}$, η οποία και αντιστοιχεί στην περιοχή ραδιοσυχνοτήτων. Οι

σύγχρονοι φασματογράφοι χρησιμοποιούν ισχυρά πεδία υπεραγώγιμων μαγνητών, των οποίων η ένταση αναφέρεται συνήθως ως η τιμή της συχνότητας συντονισμού του πυρήνα του ^1H . Για παράδειγμα, το μαγνητικό πεδίο του φασματογράφου Bruker Avance DRX400 στο Κέντρο Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων έχει ένταση $H_0 = 9.40\text{T}$ και χαρακτηρίζεται ως πεδίο 400MHz.



Εικόνα 1.2 Η κβαντομηχανική θεώρηση μαγνητικά ενεργών πυρήνων πρωτονίου ($I = 1/2$) κατά την παρουσία εξωτερικού ομογενούς μαγνητικού πεδίου H_0 .

Με βάση τη στατιστική Boltzmann, το σύστημα των πυρηνικών στροφορμών διατηρεί αρχικά την αυτονομία του και διαθέτει μια εσωτερική ενέργεια που χαρακτηρίζεται από μια θερμοκρασία T_{system} (T_s). Το υπόλοιπο ηλεκτρομαγνητικό (μοριακό) περιβάλλον χαρακτηρίζεται με τον όρο πλέγμα, το οποίο διαθέτει μια εσωτερική ενέργεια διαφορετική από το σύστημα των πυρηνικών στροφορμών,



που χαρακτηρίζεται από μια θερμοκρασία $T_{lattice}$ (T_l). Το πλέγμα στη στατιστική θερμοδυναμική του Boltzmann αποτελεί δεξαμενή θερμότητας για το σύστημα των πυρηνικών στροφορμών και στην κατάσταση Θ . I. ισχύει $T_l = T_s$. Για ένα τέτοιο σύστημα η στατιστική θερμοδυναμική ορίζει ότι αν n_u και n_l ο αριθμός των πυρήνων που καταλαμβάνουν την υψηλότερη και χαμηλότερη ενεργειακή στάθμη αντίστοιχα, τότε ο λόγος των δύο πληθυσμών είναι: $\frac{n_u}{n_l} = e^{-\frac{\Delta E}{kT_s}} = e^{-\frac{\gamma \hbar H_0}{kT_s}}$ (Hoge, 1995). Η διαφορά στους πληθυσμούς των δυο σταθμών είναι ανάλογη με την ένταση του εξωτερικού πεδίου

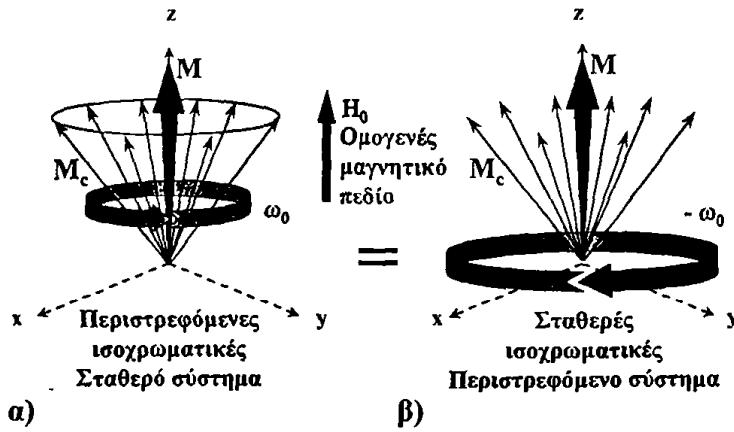
H_0 . Για παράδειγμα στο πρωτόνιο¹ για $H_0 = 2.35T$, τότε $\frac{n_u}{n_l} = e^{-\frac{6.924 \times 10^{-34} J}{4.143 \times 10^{-21} J}} = e^{-1.67 \times 10^{-7}} \approx 1 - 1.67 \times 10^{-7} \approx 1$ και συνεπώς οι δυο πληθυσμοί διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους, αφού σε κάθε 10.000.000 πυρήνες 1H μόνο ένας βρίσκεται επιπλέον στη χαμηλότερη στάθμη. Στην ελάχιστη αυτή πληθυσμιακή διαφορά οφείλονται οι ενεργειακές μεταβάσεις και οι απορροφήσεις ακτινοβολίας στο NMR, το οποίο σημαίνει ότι η ένταση του μετρούμενου σήματος και η ευαισθησία των αντίστοιχων πειραμάτων εξαρτώνται από την ένταση του H_0 .

Η στατιστική Boltzmann ορίζει, ότι ενώ κάθε πυρηνική μαγνητική ροπή μ συμπεριφέρεται κβαντομηχανικά, η μέση τιμή αυτής $\langle \mu \rangle$ συμπεριφέρεται με βάση την κλασική φυσική και αποτελεί μετρήσιμη ποσότητα. Για το λόγο αυτό, ένα εννοιολογικά πιο προσιτό μέγεθος είναι η *ολική μακροσκοπική πυρηνική μαγνήτιση* M , που ορίζεται σαν η μέση τιμή της μ ανά μονάδα όγκου του υλικού. Η τιμή της M εξαρτάται μόνο από την ένταση του H_0 και την απόλυτη θερμοκρασία T_s . Στις συνηθισμένες θερμοκρασίες, οι διαφορές στους πυρηνικούς πληθυσμούς είναι πολύ μικρές και συνεπώς τόσο η μέση μαγνητική διπολική ροπή $\langle \mu \rangle$, όσο και η μαγνήτιση M έχουν χαμηλές τιμές. Παρόλα αυτά η τιμή της M επαρκεί για να αποτελέσει την πηγή του σήματος στο NMR.

Ο Bloch (Bloch et al., 1946) θεώρησε ότι σε ένα σύστημα πυρήνων που αλληλεπιδρά με σταθερό και ομογενές H_0 , η M μπορεί να θεωρηθεί ως το διανυσματικό άθροισμα όλων των επιμέρους ισοχρωματικών συνιστωσών της M . Με τον όρο *ισοχρωματικές συνιστώσες* M_c αναφέρονται οι επιμέρους ομάδες των μ που προέρχονται από μικροσκοπικούς όγκους του υλικού. Η κβαντομηχανικά αναμενόμενη τιμή $\langle \mu \rangle$ συμπεριφέρεται στην χρονική της εξέλιξη όπως και η M , η οποία είναι δυνατόν να θεωρηθεί ότι εκτελεί μια ιδιοπεριστροφική κίνηση γύρω από τον άξονα συμμετρίας του H_0 με ιδιοστροφορμή I και γυρομαγνητικό λόγο γ (Εικόνα 1.3α). Επιλέγοντας ένα κατάλληλο περιστρεφόμενο σύστημα αναφοράς με γωνιακή ταχύτητα περιστροφής αντίθετη της γωνιακής ταχύτητας Larmor, το διάνυσμα της M είναι σταθερό και οι ισοχρωματικές συνιστώσες M_c παρουσιάζονται ακίνητες (Εικόνα 1.3β).

¹ $\gamma = 2.79$, $\hbar = h / 2\pi = 1.056 \times 10^{-34} J$, $kT_s = 1.381 \times 10^{-23} J / K \cdot 300K = 4.143 \times 10^{-21} J$.



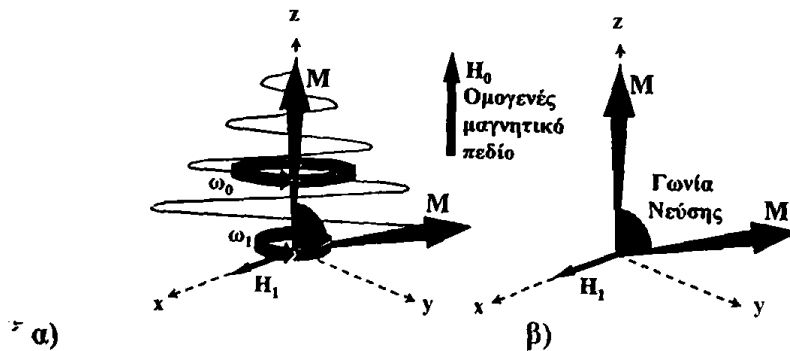


Εικόνα 1.3 Τα διανύσματα της μακροσκοπικής πυρηνικής μαγνήτισης M και των επιμέρους ισochρωματικών συνιστωσών M_c .

α) σταθερό, β) περιστρεφόμενο σύστημα αναφοράς στην κατάσταση Θ . I.

1.1.2 Αλληλεπίδραση πυρηνικών στροφορμών με μεταβαλλόμενο μαγνητικό πεδίο

Πρώτος χρόνος - Διέγερση πυρήνων. Η διέγερση όλων των μαγνητικών πυρήνων επιτυγχάνεται συγχρόνως με τη χρήση ραδιοπαλμών, δηλαδή χρονικά μεταβαλλόμενων μαγνητικών πεδίων H_1 , πολύ μικρότερης έντασης από το εξωτερικό πεδίο H_0 κατά μήκος του άξονα x , όπου θεωρείται συμβατικά ότι βρίσκεται το πηνίο ραδιοσυχνοτήτων (Εικόνα 1.4α). Τότε στο σταθερό σύστημα αναφοράς, το διάνυσμα της μαγνήτισης M εκτελεί μια αργή μεταπτωτική κίνηση γύρω από τον άξονα εφαρμογής του H_1 με γωνιακή ταχύτητα $\omega_1 = \gamma H_1$, ενώ γίνεται παράλληλα και μια επιπλέον εκτροπή του άξονα μετάπτωσης των ισochρωματικών M_c . Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται *νεύση* και αν t_p είναι η χρονική διάρκεια εφαρμογής του H_1 και ν_1 η συχνότητα μετάπτωσης του M γύρω από το H_1 , τότε η αντίστοιχη γωνία νέυσης η του M θα είναι: $\omega_1 = \gamma H_1 = \eta/t_p \rightarrow \eta = \gamma H_1 t_p$. Στο περιστρεφόμενο σύστημα αναφοράς το διάνυσμα της μαγνήτισης παριστάνεται ως στάσιμο (Εικόνα 1.4β).

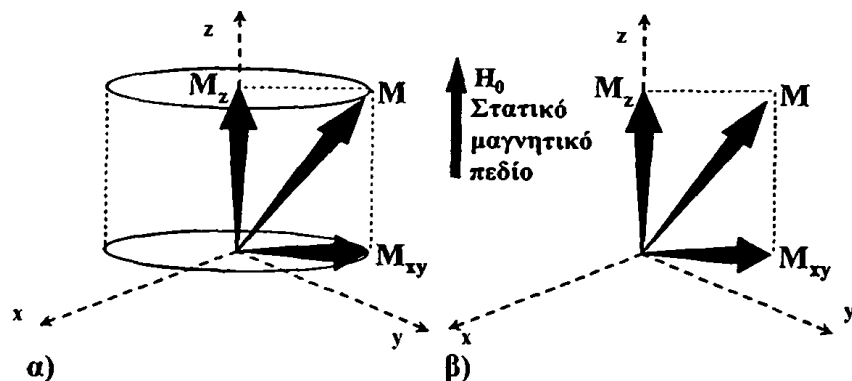


Εικόνα 1.4 Νεύση του διανύσματος της ολικής μαγνήτισης M μετά την εφαρμογή ενός ραδιοπαλμού H_1 .

α) σταθερό, β) περιστρεφόμενο σύστημα αναφοράς.

Ρυθμίζοντας επομένως την ένταση H_1 και τη διάρκεια εφαρμογής του ραδιοπαλμού (συνήθως της τάξεως των μs) επιτυγχάνεται οποιαδήποτε γωνία νέυσης για το διάνυσμα M . Οι ραδιοπαλμοί χαρακτηρίζονται από αυτές τις γωνίες νέυσης, π.χ. παλμός 90° θα οδηγήσει το άνυσμα της μαγνήτισης σε νέυση γωνίας 90° .

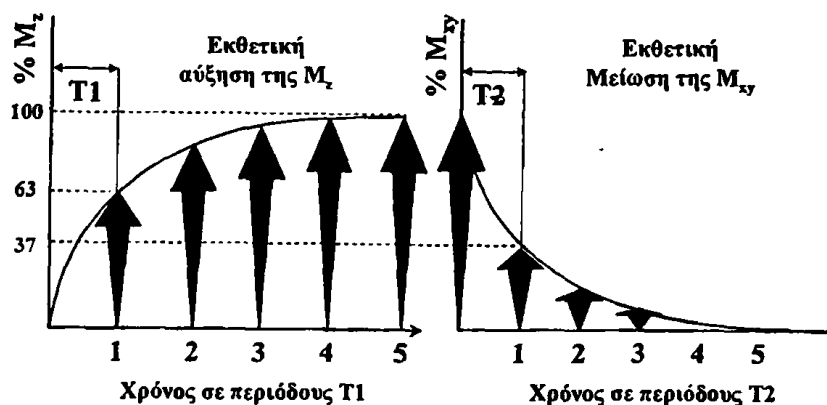
Δεύτερος χρόνος - Αποδιέγερση πυρήνων. Όταν σταματήσει η εφαρμογή του ραδιοπαλμού το σύστημα των πυρηνικών στροφορμών επιστρέφει από τη διεγερμένη κατάσταση στην κατάσταση $\Theta. I.$, φαινόμενο που χαρακτηρίζεται ως *μαγνητική αποκατάσταση*. Σε μια τυχαία χρονική στιγμή της μαγνητικής αποκατάστασης το διάνυσμα \mathbf{M} αναλύεται σε δύο συνιστώσες M_z και M_{xy} σε σχέση με τον άξονα εφαρμογής του \mathbf{H}_0 , οι οποίες καλούνται αντίστοιχα *διαμήκης* και *εγκάρσια* (Εικόνα 1.5). Η καθεμία από τις δυο αυτές συνιστώσες μεταβάλλονται με διαφορετικούς ρυθμούς (Bloch et al., 1946) και έτσι η μαγνητική αποκατάσταση χαρακτηρίζεται από δύο χρονικές παραμέτρους που καλούνται αντίστοιχα *χρόνοι μαγνητικής αποκατάστασης* T_1 και T_2 . Ο χρόνος T_1 περιγράφει τη συμπεριφορά της



Εικόνα 1.5 Η πυρηνική μαγνήτιση \mathbf{M} , η διαμήκης συνιστώσα M_z και η εγκάρσια συνιστώσα M_{xy} μετά την εφαρμογή ραδιοπαλμού 90° και πριν την αποκατάσταση $\Theta. I.$

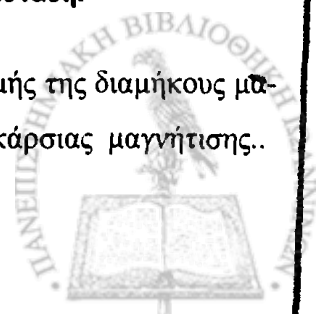
α) σταθερό, β) περιστρεφόμενο σύστημα αναφοράς.

της διαμήκουσ μαγνητικής αποκατάστασης M_z , ενώ ο T_2 τη συμπεριφορά της εγκάρσιας μαγνητικής αποκατάστασης M_{xy} και ονομάζονται αντίστοιχα χρόνοι διαμήκουσ κα εγκάρσιας μαγνητικής αποκατάστασης. Οι δυο συνιστώσες δίνονται από τις σχέσεις: $M_z(t) = M_z(1 - e^{-t/T_1})$ και $M_{xy}(t) = M_{xy}e^{-t/T_2}$ και γραφικά απεικονίζονται στην Εικόνα 1.6. Αμέσως μετά την αλληλεπίδραση ενός συστήματος πυ-



Εικόνα 1.6 Διαμήκης (M_z) και εγκάρσια (M_{xy}) μαγνητική αποκατάσταση.

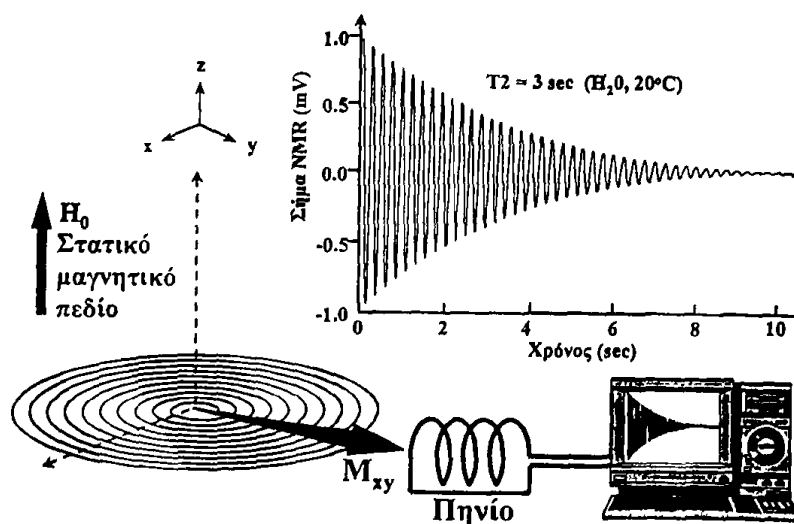
ρήνων με έναν παλμό ραδιοσυχνότητας 90° , το σύστημα ανακτά το 63% της τιμής της διαμήκουσ μαγνήτισης στην $\Theta. I.$ σε χρόνο T_1 , ενώ παράλληλα χάνει το 37% της τιμής της εγκάρσιας μαγνήτισης.



Οι χρονικές παράμετροι T1 και T2 περιγράφουν τελικά σταθερούς ρυθμούς αποκατάστασης του φυσικού μεγέθους της μαγνήτισης που είναι χαρακτηριστικό του πυρηνικού συστήματος. Για να αποκατασταθεί ένα διεγερμένο σύστημα πυρήνων θα πρέπει να αλληλεπιδράσει μαγνητικά με το γειτονικό του περιβάλλον. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητη η παρουσία πεδίων ραδιοσυχνότητας που εξαναγκάζουν αυτή την αποκατάσταση. Τα πεδία αυτά προέρχονται από το γειτονικό πυρηνικό περιβάλλον και κατά κύριο λόγο οφείλονται στη σύζευξη των μαγνητικών διπολικών ροπών μ των γειτονικών πυρήνων. Τα χρονικώς μεταβαλλόμενα αυτά πεδία προέρχονται από τις τυχαίες κινήσεις των μορίων (κινήσεις Brown) και είναι υπεύθυνα τόσο για διαδικασίες T1 όσο και για διαδικασίες T2.

1.1.3 Ελεύθερη επαγωγική απόσβεση (FID) – Μετασχηματισμός Fourier

Η εκθετική μείωση λοιπόν της εγκάρσιας μαγνήτισης M_{xy} κατά την μαγνητική αποκατάσταση ενός πυρήνα καθορίζεται από την αλληλεπίδρασή της με τις πυρηνικές μαγνητικές ροπές μ που προέρχονται από τους γειτονικούς πυρήνες και κατά συνέπεια περιέχει την πληροφορία για τη δομή του μορίου του υπό εξέταση πυρήνα. Αν τοποθετηθεί ένα σωληνοειδές πηνίο με τον κύριο άξονα παράλληλο προς το επίπεδο xy, τότε οι μεταβολές της μαγνητικής ροής που δημιουργούνται από την περιστροφή του διανύσματος M_{xy} , θα επάγουν τάση V στα άκρα του πηνίου, ανάλογη της M_{xy} και ίσης με: $V(t) = AM_{xy}(t)\cos\omega_0 t$, όπου A είναι μια παράμετρος που εξαρτάται από τις γεωμετρικές ιδιότητες του πηνίου για τη λήψη του σήματος (Εικόνα 1.7).

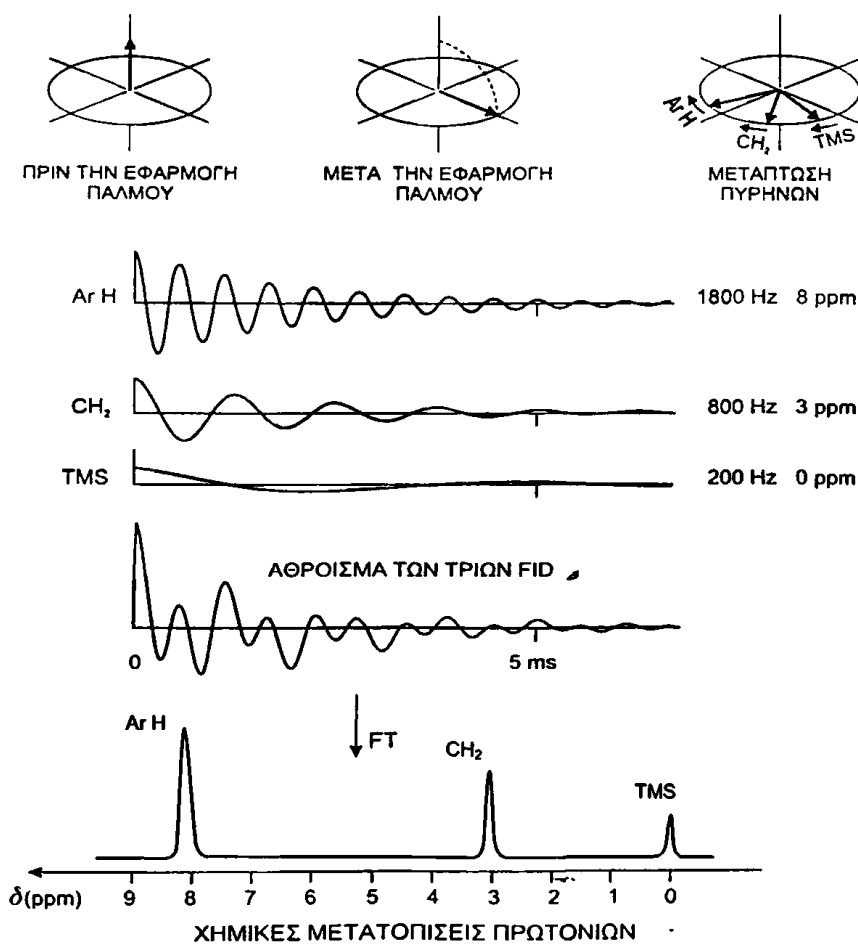


Εικόνα 1.7 Ελεύθερη επαγωγική απόσβεση σε συνάρτηση με τον χρόνο – FID.

Επειδή η M_{xy} δεν παραμένει σταθερή με τον χρόνο, αλλά φθίνει εκθετικά με σταθερά χρόνου T2, η τάση στα άκρα του πηνίου δίνεται από τη σχέση: $V(t) = M_{xy}(0)e^{-\frac{t}{T_2}}\cos\omega_0 t$ και περιγράφει ένα διαμορφωμένο κατά πλάτος ηλεκτρικό σήμα με φέρουσα συχνότητα τη συχνότητα Larmor, δηλαδή μια φθίνουσα ηλεκτρική ταλάντωση της οποίας η περιβάλλουσα κυματομορφή έχει χαρακτηριστική σταθερά χρόνου T2. Το σήμα αυτό ονομάζεται Free Induction Decay, FID (ελεύθερη επαγωγική απόσβεση), αποτελεί την πηγή πληροφορίας και περιέχει το φάσμα NMR.



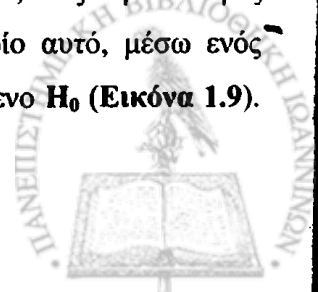
Με μια μαθηματική διαδικασία γνωστή ως *μετασχηματισμός Fourier* (Fourier transform) οι Ernst και Anderson ανέπτυξαν το 1965 το μετασχηματισμό του φάσματος συνάρτησης χρόνου $F(t)$ σε φάσμα συνάρτησης συχνότητας $F(\omega)$,
$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} V(t)e^{i\omega t} dt = \int_{-\infty}^{\infty} AM_{xy} \cos\omega_0 t e^{-\frac{t}{T_2}} e^{i\omega t} dt$$
, που αποτελεί το φάσμα NMR (Ernst and Anderson, 1966). Κάθε πυρήνας συντονίζεται σε ξεχωριστή συχνότητα, επειδή το ηλεκτρονιακό περιβάλλον διαφέρει από κάθε άλλο πυρήνα. Μια ένωση που περιέχει τρεις πυρήνες πρωτονίου με διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον, θα δώσει FID στην οποία θα περιέχεται η πληροφορία και των τριών συνιστωσών. Κατά το μετασχηματισμό Fourier θα ληφθούν τρεις κορυφές που αντιστοιχούν στις συχνότητες συντονισμού των τριών πυρήνων πρωτονίου (**Εικόνα 1.8**).



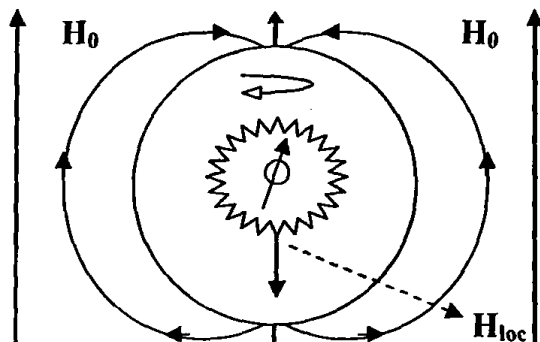
Εικόνα 1.8 FID και μετασχηματισμός κατά Fourier (Μαυρομούστακος και Ματσούκας, 2006, σελ. 29).

1.1.4 Χημική μετατόπιση δ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, κάθε πυρήνας υδρογόνου έχει τη δική του συχνότητα συντονισμού λόγω διαφορετικής *πυρηνικής προάσπισης* των ηλεκτρονίων (nuclear shielding). Όταν ένα μόριο που περιέχει τον υπό εξέταση πυρήνα βρεθεί μέσα σε μαγνητικό πεδίο, στις περισσότερες περιπτώσεις τα ηλεκτρόνια του μορίου *θωρακίζουν* τα πρωτόνια από το πεδίο αυτό, μέσω ενός ελαχίστου τοπικού μαγνητικού πεδίου H_{loc} αντιπαράλληλου προς το εφαρμοζόμενο H_0 (**Εικόνα 1.9**).



Αυτό λοιπόν έχει ως αποτέλεσμα οι πυρήνες ^1H να αντιλαμβάνονται ένα ελαφρώς διαφοροποιημένο (ενεργό) μαγνητικό πεδίο $H_{\text{effective}} (H_{\text{eff}})$. Έτσι μεταβάλλεται το διάστημα των πυρηνικών ενεργειακών σταθμών μέσω μίας παραμέτρου γνωστής ως *σταθερά πυρηνικής προστασίας* σ ως εξής: $\Delta E = \gamma H_0(1 - \sigma)$, όπου $\sigma = H_{\text{loc}}/H_0$ ($\sim 10^{-6}$) [για το ^1H]. $H_{\text{eff}} = H_0 - H_{\text{loc}} \rightarrow H_{\text{eff}} = H_0 - \sigma H_0 \rightarrow H_{\text{eff}} = H_0(1 - \sigma)$. Επομένως το ενεργό $H_{\text{eff}} \approx H_0$ διότι $1 - \sigma \approx 1$ (Günther, 1995).



Εικόνα 1.9 Το τοπικό μαγνητικό πεδίο H_{loc} αντιτίθεται στο εφαρμοζόμενο εξωτερικό πεδίο H_0 .

Για να καθοριστούν οι συχνότητες συντονισμού των πυρήνων ^1H ώστε να είναι συγκρίσιμες μεταξύ τους σε διαφορετικά πειράματα, χρησιμοποιείται μία ουσία αναφοράς. Στη φασματοσκοπία NMR δεν ενδιαφέρει η γνώση της απόλυτης τιμής της συχνότητας συντονισμού μιας ουσίας, αλλά η σχετική της τιμή ως προς την ουσία αναφοράς. Η ουσία αναφοράς συνήθως επιλέγεται έτσι ώστε να υφίσταται μια πολύ ισχυρή θωράκιση από τα περιφερειακά της ηλεκτρόνια (διαμαγνητισμός) και να συντονίζεται σε υψηλότερη ένταση πεδίου, σε σχέση με άλλες οργανικές ενώσεις. Πρέπει επίσης να έχει πολύ σταθερή και συμμετρική δομή, να εμφανίζει ισχυρή πυρηνική προάσπιση και να δίνει μία απλή και χαρακτηριστική κορυφή συντονισμού που να μην επηρεάζεται από τις πειραματικές συνθήκες. Ως ουσία αναφοράς για φάσματα ^1H και ^{13}C σε οργανικούς διαλύτες χρησιμοποιείται κυρίως το τετραμεθυλοσιλάνιο $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ή TMS, ενώ σε υδατικό διαλύτη το άλας $[\text{C}_6\text{H}_9\text{D}_4\text{NaO}_2\text{Si}]$ ή TSP. Η απλή κορυφή συντονισμού των ουσιών αναφοράς στο φάσμα ^1H -NMR προέρχεται από τη συνεισφορά 12 ισοδύναμων ^1H για το TMS και 9 για το TSP.

Η ανίχνευση των πυρήνων γίνεται μέσω μιας χαρακτηριστικής παραμέτρου, η οποία καλείται *χημική μετατόπιση* δ (chemical shift). Η χημική μετατόπιση ορίζεται ως η διαφορά της συχνότητας συντονισμού του υπό εξέταση πυρήνα ν_x από τη συχνότητα συντονισμού των πρωτονίων της ουσίας αναφοράς ν_r (Harris, 1983). Στην πράξη χρησιμοποιείται μία κλίμακα στην οποία η διαφορά αυτή διαιρείται με την συχνότητα λειτουργίας του φασματογράφου (σε Hz), ώστε να μην υπάρχει εξάρτηση από το εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο H_0 : $\delta = \frac{\nu_x - \nu_r}{\omega_0} \times 10^6$ (ppm). Η χημική μετατόπιση είναι αδιάστατο μέγεθος και χαρακτηριστικό για κάθε πυρήνα μίας χημικής ένωσης. Επειδή οι συχνότητες συντονισμού των πρωτονίων είναι της τάξης των MHz ενώ οι διαφορές τους ($\nu_x - \nu_r$) της τάξης των

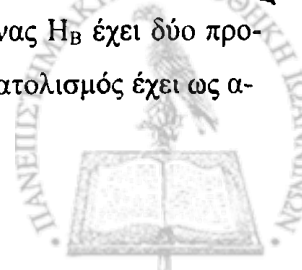
Hz, το πηλίκο πολλαπλασιάζεται επί 10^6 ώστε η δ να εκφράζεται σε μονοψήφιους αριθμούς. Συμβατικά το σημείο συντονισμού της ουσίας αναφοράς λαμβάνεται ως $\delta=0$ ppm.

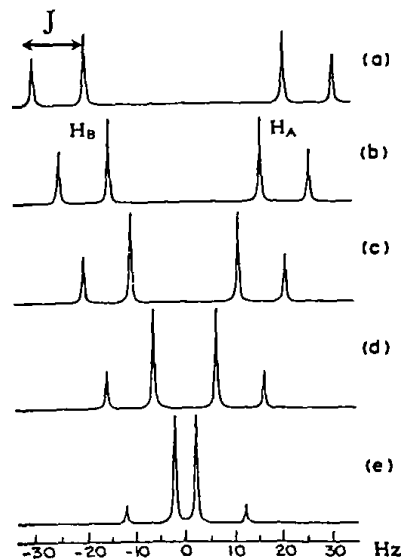
Ας θεωρήσουμε ένα διάλυμα, με ουσία αναφοράς το TMS, όπου βρίσκονται ενώσεις με τρεις ομάδες δεσμού C-H (Si-CH_3 , $-\text{CH}_2$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{-H}$) με διαφορετικό ηλεκτρονιακό περιβάλλον γύρω τους (Εικόνα 1.8). Επειδή η ταχύτητα απόσβεσης της φθίνουσας ταλάντωσης, σχετίζεται με το πλάτος της κορυφής του φάσματος NMR, κατά τον μετασχηματισμό Fourier η αργή μετάπτωση των πρωτονίων του TMS θα δώσει μια οξεία κορυφή, ενώ η γρήγορη μετάπτωση του αρωματικού πρωτονίου (Ar-H ή $\text{C}_6\text{H}_5\text{-H}$) θα δώσει μια πιο ευρεία ταινία απορρόφησης. Όσον αφορά τη σχετική ένταση της κορυφής ενός σήματος NMR, αυτή είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των πρωτονίων που συντονίζονται. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των πρωτονίων που διεγείρονται, τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσό ενέργειας που απορροφάται και συνεπώς το εμβαδόν της κορυφής απορρόφησης. Επομένως η ολοκλήρωση των κορυφών συντονισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της αναλογίας των πρωτονίων που υπάρχουν στο μόριο μίας χημικής ένωσης. Επίσης αν είναι γνωστή η συγκέντρωση της ουσίας αναφοράς ή κάποιας άλλης πρότυπης ουσίας που περιέχεται στο δείγμα, τότε μπορεί να υπολογισθεί και η συγκέντρωση της προς μελέτη ουσίας.

Επιπλέον, όσο πιο θωρακισμένος είναι ο πυρήνας ^1H μιας χημικής ένωσης (μεγάλη τιμή $\sigma_\chi < \sigma_r$), τόσο η συχνότητα συντονισμού του πυρήνα αυτού, ν_χ , θα πλησιάζει προς τη συχνότητα συντονισμού των πρωτονίων της ένωσης αναφοράς ν_r , οπότε και η διαφορά ($\nu_\chi - \nu_r$) θα έχει μικρότερη τιμή. Τότε το σήμα απορρόφησης του ^1H βρίσκεται προς τα δεξιά του φάσματος κοντά στην κορυφή συντονισμού της ουσίας αναφοράς, δηλαδή σε υψηλές εντάσεις (up field) εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου (μικρή τιμή του δ , μεθυλένιο ($-\text{CH}_2$), Εικόνα 1.8). Όμως όσο λιγότερο θωρακισμένος είναι ο πυρήνας ^1H μιας χημικής ένωσης (μικρή τιμή $\sigma_\chi \ll \sigma_r$), τόσο η συχνότητα συντονισμού ν_χ θα απομακρύνεται από τη συχνότητα συντονισμού ν_r , οπότε και η διαφορά ($\nu_\chi - \nu_r$) θα έχει μεγαλύτερη τιμή. Τότε το σήμα απορρόφησης του ^1H βρίσκεται προς τα αριστερά του φάσματος μακριά από την κορυφή συντονισμού της ουσίας αναφοράς σε χαμηλές εντάσεις (downfield) εφαρμοζόμενου πεδίου (μεγάλη τιμή του δ , αρωματική ομάδα Ar, Εικόνα 1.8).

1.1.5 Λεπτή υφή του φάσματος. Σύζευξη σπιν – σπιν

Ένα άλλο σημαντικό φαινόμενο στο οποίο οφείλεται η ονομαζόμενη «λεπτή υφή» του φάσματος NMR είναι η σύζευξη σπιν – σπιν που έχει σαν αποτέλεσμα την πολλαπλότητα της κορυφής συντονισμού ενός πρωτονίου. Για να ερμηνευθεί το φαινόμενο αυτό ας θεωρήσουμε δύο γειτονικούς πυρήνες υδρογόνου (H_A , H_B) μίας χημικής ένωσης, οι οποίοι είναι αρκετά κοντά ο ένας στον άλλο, ώστε να έχουν υπολογίσιμη μαγνητική αλληλεπίδραση της τάξης μερικών nT. Στο φάσμα της ένωσης αντί για τις δύο θεωρητικά αναμενόμενες κορυφές συντονισμού για τα H_A και H_B , θα παρατηρούσαμε ότι εμφανίζονται τέσσερις κορυφές (Εικόνα 1.10). Αυτό εξηγείται διότι ο πυρήνας H_B έχει δύο προσανατολισμούς σε σχέση με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο H_0 . Ο πρώτος προσανατολισμός έχει ως α-





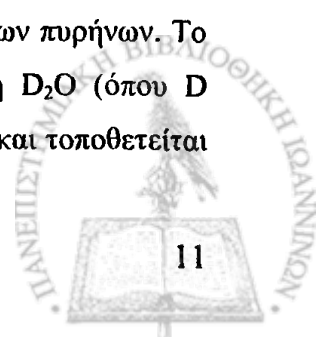
Εικόνα 1.10 Φάσμα της των πρωτονίων H_A και H_B σε 5 διαφορετικής έντασης πεδία H_0 .
 $J=10\text{Hz}$ και $J/\Delta\nu = \alpha$ 0.2, b) 0.25, c) 0.33, d) 0.5 και e) 1 (Bovey et al., 1988, p. 156).

ποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ελαχίστου πεδίου $[\Delta H (\uparrow)]$ παράλληλου στο H_0 κοντά στον πυρήνα H_A . Ο δεύτερος έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία επίσης ενός ελαχίστου πεδίου $[-\Delta H (\downarrow)]$ αντιπαράλληλου προς το H_0 κοντά στον πυρήνα H_A . Οι δύο αυτοί προσανατολισμοί έχουν σχεδόν την ίδια πιθανότητα εμφάνισης, με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται δύο κορυφές συντονισμού για τον H_A . Το ίδιο αποτέλεσμα εξασκεί και ο H_A στον πυρήνα H_B , ο οποίος παρουσιάζει αντίστοιχα δύο γραμμές απορρόφησης. Η απόσταση μεταξύ των δύο κορυφών του H_B είναι ίση με την απόσταση μεταξύ των δύο κορυφών του H_A , καλείται σταθερά σπιν - σπιν σύζευξης (spin - spin coupling constant) και συμβολίζεται ως J_{AB} . Η σταθερά σύζευξης J μεταξύ δύο πυρήνων είναι ανεξάρτητη από το εξωτερικό πεδίο H_0 και είναι της τάξης μερικών Hz.

Η σύζευξη (σε αντίθεση με τη χημική μετατόπιση) δεν είναι αποτέλεσμα των επαγόμενων μαγνητικών πεδίων. Η τιμή της σταθεράς σύζευξης παραμένει η ίδια οποιαδήποτε και αν είναι η ένταση του εφαρμοζόμενου πεδίου. Επομένως η σύζευξη σπιν - σπιν μπορεί να διακριθεί από τη χημική μετατόπιση, αυξάνοντας π.χ. την ένταση του πεδίου H_0 . Στην περίπτωση αυτή οι αποστάσεις των κορυφών λόγω σύζευξης (J) παραμένουν σταθερές (Hz), ενώ οι αποστάσεις των κορυφών λόγω χημικών μετατοπίσεων ($\Delta\nu = \nu_B - \nu_A$) αυξάνουν (ppm), όπου ν_A και ν_B οι συχνότητες συντονισμού των H_A και H_B αν δεν υπήρχε η σπιν - σπιν σύζευξη, στο μέσο δηλαδή των διπλών κορυφών στην Εικόνα 1.10.

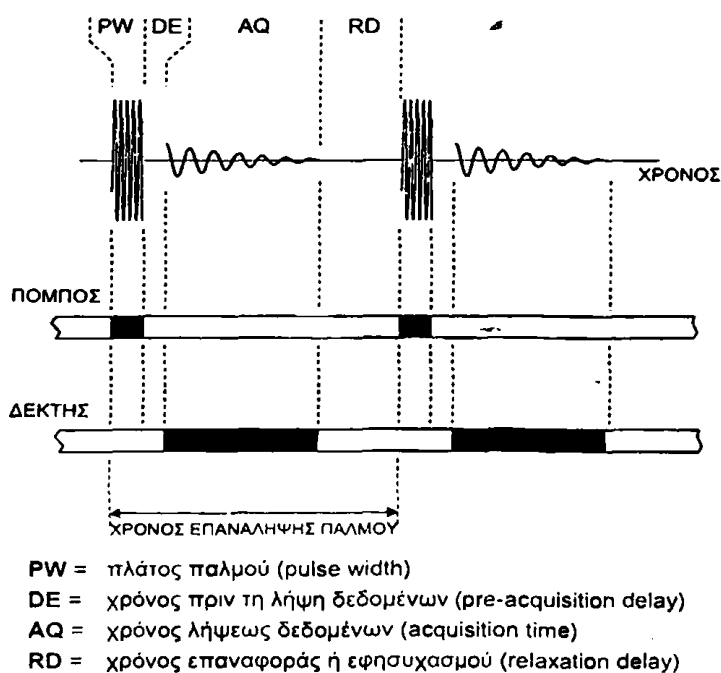
1.1.6 Λήψη φάσματος $^1\text{H-NMR}$

Οι σύγχρονοι φασματογράφοι διαθέτουν υψηλή διαχωριστική ικανότητα και χρησιμοποιούν παλμικές τεχνικές (High Resolution Pulse FT-NMR Spectrometer) για τη διέγερση των πυρήνων. Το δείγμα υπό μορφή διαλύματος σε δευτεριωμένο διαλύτη όπως CDCl_3 , CD_2Cl_2 ή D_2O (όπου D δευτέριο), μεταφέρεται σε ειδικό γυάλινο σωληνάριο NMR με ομοιογενή τοιχώματα και τοποθετείται



σε ένα μεταλλικό κάθετο σωλήνα (probe) που βρίσκεται μεταξύ των πόλων του μαγνήτη. Η ακτινοβολία με παλμούς ραδιοσυχνοτήτων (συνήθως παλμός 90°) εκπέμπεται από ένα πηνίο (πομπός) που είναι περιτυλιγμένο γύρω από το δείγμα για χρονικό διάστημα μερικών msec. Ο ραδιοπαλμός δεν είναι μονοχρωματικός, αλλά περιλαμβάνει ένα εύρος συχνοτήτων (\sim MHz) γύρω από την κεντρική συχνότητα εκπομπής του ν_0 . Το εύρος των συχνοτήτων μπορεί να εκτιμηθεί ως μια κατανομή γύρω από την κεντρική συχνότητα ως $\nu_0 \pm 1/t_p$, όπου t_p είναι η διάρκεια εφαρμογής του παλμού. Με τον τρόπο αυτό διεγείρονται ταυτόχρονα όλοι οι πυρήνες και ο καθένας αποδιεγείρεται ανάλογα με το γειτονικό ηλεκτρονικό περιβάλλον.

Το πείραμα επαναλαμβάνεται αρκετές φορές για να ενισχυθεί το σήμα, αφήνοντας ένα χρονικό διάστημα μερικών δευτερολέπτων (χρόνος αποκατάστασης ή εφησυχασμού, relaxation delay) για την πλήρη αποδιέγερση όλων των πυρήνων του δείγματος (Εικόνα 1.11). Η επανάληψη του ίδιου πειράματος πολλές φορές (π.χ. 32, 64 ή 128) συντελεί στην αύξηση της ευαισθησίας και στη μείωση του λόγου σήμα προς θόρυβο (signal to noise ratio). Η λήψη των φασμάτων γίνεται με τη χρήση διαφόρων παλμικών ακολουθιών (pulse sequences) ανάλογα με το είδος του δείγματος και το σκοπό της κάθε μελέτης. Στην περίπτωση υδατικών διαλυμάτων όπως αυτά των βιολογικών δειγμάτων, η ευρεία κορυφή συντονισμού του νερού καλύπτει μια πολύ μεγάλη περιοχή χημικής μετατόπισης (4.5 – 6.0ppm) με αποτέλεσμα να επικαλύπτονται πολλές κορυφές συντονισμού διαφόρων μεταβολιτών. Για το λόγο αυτό πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες παλμικές ακολουθίες, ειδικότερα στην περίπτωση των ούρων, με τις οποίες επιτυγχάνεται αποτελεσματική καταστολή του σήματος του νερού.



Εικόνα 1.11 Χρόνοι σε ένα πείραμα NMR ενός παλμού.

Η σκιασμένη περιοχή του πομπού ή δέκτη ραδιοσυχνοτήτων δείχνει ότι το χρονικό διάστημα που είναι σε λειτουργία και η λευκή περιοχή δείχνει πότε είναι εκτός λειτουργίας (Μαυρομούστακος και Ματσούκας, 2006).



1.1.7 Φασματοσκοπία NMR δυο διαστάσεων (2D NMR Spectroscopy)

Τα πειράματα με βάση τη φασματοσκοπία NMR 2 διαστάσεων (2D) παρέχουν πολύτιμη πληροφορία που δεν μπορεί εύκολα να εξαχθεί από τα πειράματα μιας διάστασης (1D). Τα 2D φάσματα NMR έχουν πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα και η επιπλέον πληροφορία που περιέχουν προέρχεται κατανέμοντας τις κορυφές συντονισμού σε έναν δεύτερο άξονα συχνότητας. Με τον τρόπο αυτό γίνεται συσχέτιση των περιοχών ενός μορίου που αλληλεπιδρούν με σύζευξη σπιν – σπιν και που απέχουν στο χώρο λιγότερο από 5 \AA (Nuclear Overhauser Effect, NOE) καθώς και των περιοχών με χημική ή δομική αναλογία, με αποτέλεσμα να μπορεί να γίνει λεπτομερής διερεύνηση της δομής και της διαμόρφωσης των βιολογικών μορίων. Ενώ τα συμβατικά 1D φάσματα NMR είναι γραφήματα απεικόνισης της έντασης των κορυφών συντονισμού ως προς τη συχνότητα, στη 2D φασματοσκοπία η ένταση των κορυφών σχεδιάζεται ως συνάρτηση δυο συχνοτήτων, που συνήθως ονομάζονται F_1 και F_2 . Στα γραφήματα αυτά η θέση μιας κορυφής καθορίζεται από δυο συντεταγμένες συχνότητας που αντιστοιχούν στις F_1 και F_2 . Αν και στις δυο διαστάσεις εκφράζονται χημικές μετατοπίσεις, τότε η τεχνική καλείται *shift-correlated 2D NMR spectroscopy* (2D φασματοσκοπία NMR συσχέτισης χημικών μετατοπίσεων), ενώ αν στη μια διάσταση παριστάνονται σταθερές σύζευξης, τότε καλείται *J-resolved*. Αν οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα αφορούν ίδιους πυρήνες τότε η τεχνική αναφέρεται ως *ομοπυρηνική 2D φασματοσκοπία NMR*, ενώ αν αφορούν διαφορετικούς πυρήνες (π.χ. ^1H , ^{13}C) τότε αναφέρεται ως *ετεροπυρηνική*.

Οι κύριες κατηγορίες των 2D φασματοσκοπιών NMR είναι τρεις (Attar-ur-Rahman and Choudhary, 1996):

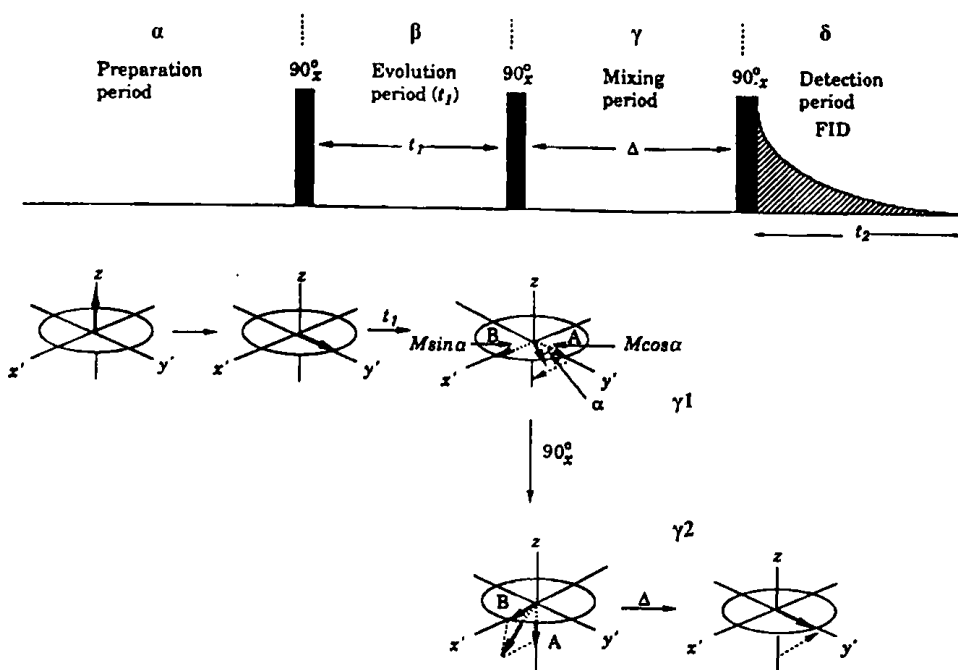
- 1) 2D-J NMR ή 2D φασματοσκοπία NMR ανάλυσης σταθεράς σύζευξης (2D J-resolved NMR).
- 2) COSY-NMR (shift COrrelation SpectroscopY) ή 2D φασματοσκοπία NMR συσχέτισης πυρήνων μέσω δεσμών.
- 3) NOESY-NMR (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) ή 2D φασματοσκοπία NMR αλληλεπίδρασης πυρήνων με NOE μέσω χώρου.

1.1.7.1 Γενική περιγραφή πειράματος NMR δυο διαστάσεων

Τα 2D πειράματα NMR διακρίνονται σε τέσσερις χρονικές περιόδους: 1) Προετοιμασία των σπιν, 2) Εξέλιξη των σπιν και μαγνήτιση, 3) Ανάμιξη των σπιν και 4) Ανίχνευση του σήματος (Εικόνα 1.12).

- 1) Στην περίοδο προετοιμασίας (preparation period), το σύστημα βρίσκεται σε κατάσταση Θ . I. και στο τελικό στάδιο με την εφαρμογή ενός ραδιοπαλμού 90° τα διανύσματα της μαγνήτισης M των πυρήνων προσανατολίζονται σε διεύθυνση παράλληλη με αυτή του μαγνητικού πεδίου H_0 (Εικόνα 1.12a). Αυτό το στάδιο έχει μεγάλη σημασία προκειμένου να διακριθούν οι διάφοροι πυρήνες βάσει του διαφορετικού βαθμού περιστροφής τους.
- 2) Στην περίοδο εξέλιξης (evolution period) t_1 , το διάνυσμα της μαγνήτισης περιστρέφεται σε επίπεδο κάθετο στο εξωτερικό μαγνητικό πεδίο (transverse magnetization) και γίνεται

αλληλεπίδραση μεταξύ των πυρήνων και αναπτύσσονται οι χημικές μετατοπίσεις και οι σπιν-σπιν συζεύξεις (Εικόνα 1.12β).



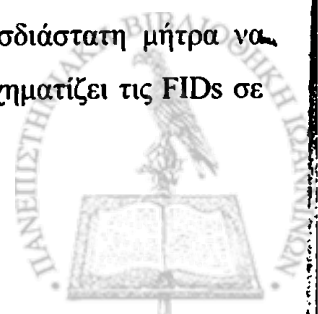
Εικόνα 1.12 Χρονικές περιόδους πειράματος 2D NMR (Attar-ur-Rahman and Choudhary, 1996, p. 151).

α) Περίοδος προετοιμασίας, β) περίοδος εξέλιξης, γ) περίοδος ανάμιξης, δ) περίοδος ανίχνευσης.

3) Στο τέλος της περιόδου εξέλιξης εφαρμόζεται ένας δεύτερος ραδιοπαλμός 90° , ο οποίος επάγει μια εγκάρσια μαγνήτιση και γίνεται ανακατανομή των σπιν (Εικόνα 1.12γ). Αν γίνει άμεση ανίχνευση του σήματος, τότε καταγράφεται η χρονική διακύμανση της συνιστώσας B της εγκάρσιας μαγνήτισης M_{xy} (Εικόνα 1.12γ1), όπως συμβαίνει στην φασματοσκοπία COSY. Αν η καταγραφή του σήματος δεν γίνει άμεσα, τότε λαμβάνει χώρα μια επιμέρους αλληλεπίδραση των σπιν για κάποιο χρονικό διάστημα Δ και αντιστοιχεί στην περίοδο ανάμιξης (mixing period). Στο τέλος του χρόνου Δ εφαρμόζεται ένας τρίτος ραδιοπαλμός 90° , οπότε γίνεται επαναφορά της συνιστώσας A της μαγνήτισης στο επίπεδο xy (Εικόνα 1.12γ2), όπως συμβαίνει στη φασματοσκοπία NOESY.

4) Κατά την περίοδο της ανίχνευσης της μεταβολής της μαγνήτισης (detection period) γίνεται συλλογή της FID για χρόνο t_2 , είτε έχει μεσολαβήσει χρόνος ανάμιξης είτε όχι.

Κατά την περίοδο εξέλιξης t_1 , η ένταση και η φάση της μαγνήτισης των πυρήνων μεταβάλλονται και αυτό καθορίζεται από τη αλληλεπίδραση των πυρηνικών σπιν. Το πείραμα στη περίοδο αυτή επαναλαμβάνεται μεταβάλλοντας σταδιακά τον χρόνο t_1 , οπότε και ανιχνεύονται πολλές FIDs ως συνάρτηση του χρόνου t_1 . Η διαδοχική τοποθέτηση αυτών των FID (data transposition) δίνει τις γραμμές (rows) σε ένα φάσμα 2D. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η αρχική δισδιάστατη μήτρα να περιλαμβάνει μια σειρά από FIDs. Η εφαρμογή FT ως προς το χρόνο t_1 μετασχηματίζει τις FIDs σε

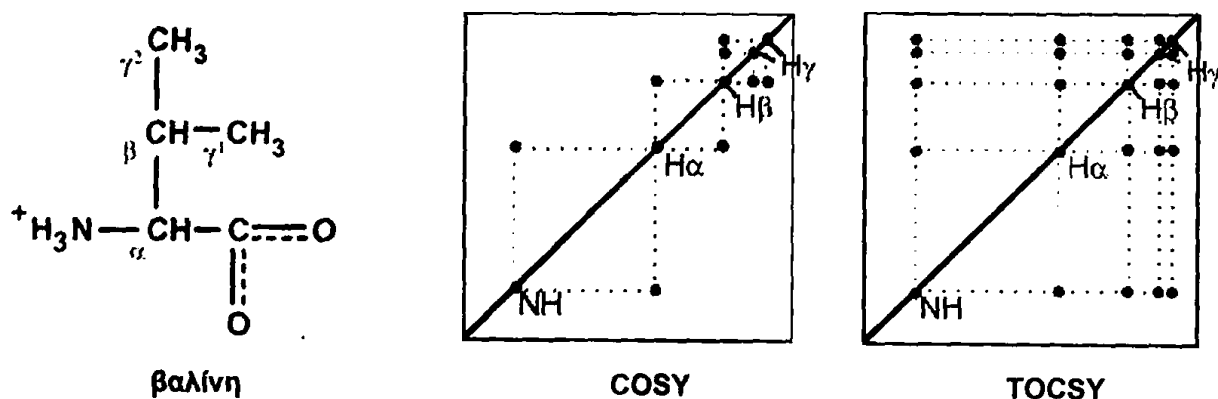


ένα σύνολο μονοδιάστατων φασμάτων NMR, ενώ η εφαρμογή FT ως προς το χρόνο t_2 , οδηγεί στην τελική δισδιάστατη μήτρα συχνότητας (Attar-ur-Rahman and Choudhary, 1996).

1.1.7.2 Φασματοσκοπία NMR 2D COSY και TOCSY

Στα πειράματα NMR της κατηγορίας COSY οι δυο άξονες του φάσματος 2D περιέχουν πληροφορίες χημικής μετατόπισης. Η σύνδεση των χημικών μετατοπίσεων αποκαλύπτει την ύπαρξη σύζευξης σπιν-σπιν ή σύζευξης δίπολου-δίπολου μεταξύ γειτονικών πρωτονίων και το πείραμα COSY βασίζεται στη κατανομή της μαγνήτισης (coherence transfer) μεταξύ αυτών. Στο πείραμα COSY εφαρμόζονται δυο παλμοί 90° κατά τον άξονα x μεταξύ των οποίων μεσολαβεί μια χρονική περίοδος εξέλιξης t_1 . Στην Total Correlation Spectroscopy, TOCSY (φασματοσκοπία ολικής συσχέτισης), που είναι μια παραλλαγή του πειράματος COSY, ο δεύτερος παλμός 90° αντικαθίσταται από ένα σύνολο παλμών 180° (spin lock), το οποίο έχει ως σκοπό την εξέλιξη του συστήματος σπιν υπό την επίδραση μόνο της σύζευξης σπιν-σπιν (Braun et al., 1996).

Στο πείραμα COSY καταγράφονται οι συζεύξεις γειτονικών πρωτονίων που απέχουν μέχρι και 3 δεσμούς (πρωτόνια α-β θέσης, β-γ θέσης και α-NH), όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.13 για το μόριο της βαλίνης, ενώ με το πείραμα TOCSY καταγράφονται συζεύξεις μεταξύ πυρήνων που απέχουν πάνω από 3 δεσμούς.



Εικόνα 1.13 Φάσματα ^1H - ^1H COSY και TOCSY της βαλίνης.

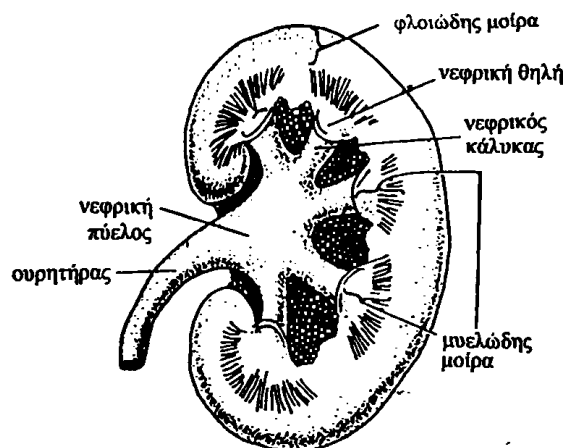
1.2 Ο Νεφρός

1.2.1 Λειτουργία του νεφρού

Οι νεφροί είναι τα κυριότερα υπεύθυνα όργανα για τη διατήρηση σε ένα σταθερό επίπεδο της σύστασης και του όγκου των υγρών του σώματος που απαιτείται για την ομοιόσταση του οργανισμού. Οι κυριότερες λειτουργίες των νεφρών συνοψίζονται σε τέσσερις: 1) ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας καθώς και της περιεκτικότητας του οργανισμού σε νερό και ηλεκτρολύτες, 2) απέκκριση των τελικών προϊόντων του μεταβολισμού (ουρία από τον πρωτεϊνικό μεταβολισμό, κρεατινίνη από τον μυϊκό μεταβολισμό, ουρικό οξύ από τη διάσπαση των πουρινών και των πυριμιδών), 3) αποβολή χημικών ουσιών όπως φάρμακα και συντηρητικά τροφίμων και 4) έκκριση ορμονών (ενδοκυτταρική λειτουργία), ερυθροποιητίνης (παραγωγή ερυθροκυττάρων), ρενίνης (παραγωγή αγγειοτενσίνης II, ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης του αίματος και της ομοιόστασης του νατρίου), 1α-υδροξυλάσης (απαραίτητο ένζυμο για τον μεταβολισμό της βιταμίνης D), προσταγλανδίνης (αγγειοδιασταλτική δράση) (Madsen and Park, 1987).

1.2.2 Ανατομία του νεφρού

Αν εξετασθεί ο νεφρός σε διατομή θα παρατηρήσουμε ότι αποτελείται εξωτερικά από τη φλοιώδη μοίρα (cortex) που περιβάλλει μια κεντρικότερη εσωτερική περιοχή, τη μυελώδη μοίρα (medulla), η οποία καταλήγει στις νεφρικές θηλές (renal papilla) (Εικόνα 1.14). Από τις νεφρικές θηλές εκβάλλουν

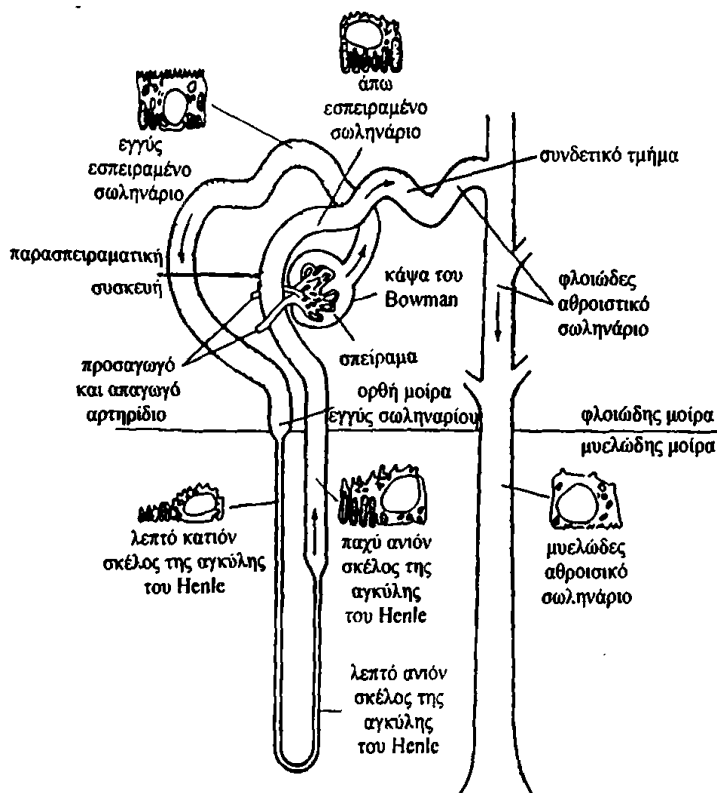


Εικόνα 1.14 Ο νεφρός (Rose and Post, 2001, p. 5).

οι νεφρικοί κάλυκες που καταλήγουν στη νεφρική πύελο συνέχεια της οποίας είναι ο ουρητήρας. Κάθε νεφρός περιέχει περίπου 1 εκατομμύριο νεφρώνες που είναι η λειτουργική μονάδα του νεφρού.

Ο νεφρώνας (Εικόνα 1.15) αποτελείται από το σπείραμα, ένα τριχοειδικό δίκτυο αγγείων που περιβάλλεται από την κάψα του Bowman, το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, την αγκύλη του Henle, το άπω εσπειραμένο σωληνάριο και το αθροιστικό σωληνάριο. Τα 7/8 των σπειραμάτων βρίσκονται στη φλοιώδη μοίρα, ενώ τα υπόλοιπα στην μυελώδη. Τα σωληνάρια αρχικά περιβάλλουν το σπείραμα

και στη συνέχεια εκτείνονται σε ευθεία πορεία μέχρι την εσωτερική μυελώδη μοίρα. Το αίμα εισέρχεται στο σπείραμα από το προσαγωγό και εξέρχεται από το απαγωγό αρτηρίδιο. Στο σπείραμα γίνεται διήθηση του πλάσματος στο χώρο του Bowman και το προκύπτον διήθημα διέρχεται διαδοχικά από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο (proximal convoluted tubule) στην αγκύλη του Henle (λεπτό κατιόν σκέλος και κατόπιν παχύ ανιόν σκέλος). Η συγκεκριμένη δομή της αγκύλης του Henle παίζει σημαντικό ρόλο στην συμπίκνωση και αραίωση των ούρων.

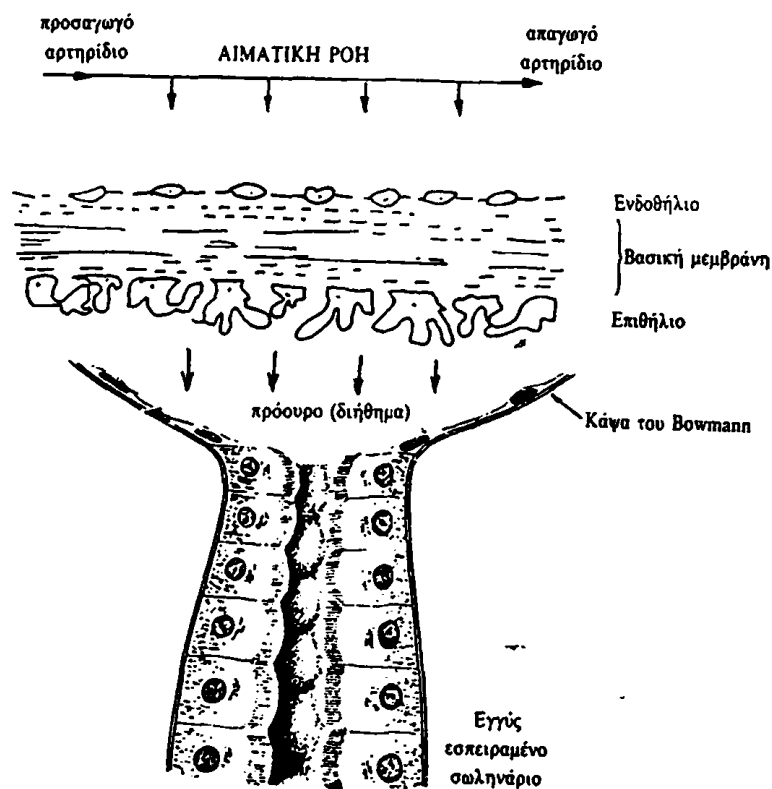


Εικόνα 1.15 Ο νεφρώνας (Rose and Post, 2001, p. 4).

Το πρόουρο στη συνέχεια εισέρχεται στο φλοιώδες τμήμα του παχέος ανιόντος σκέλους της αγκύλης του Henle και διέρχεται της παρασπειραματικής συσκευής (macula densa). Η πορεία συνεχίζεται στο άνω εσπειραμένο σωληνάριο (distal convoluted tubule), στο συνδετικό τμήμα και στο φλοιώδες αρχικά και μυελώδες εν συνεχεία αθροιστικό σωληνάριο. Τελικά το αθροιστικό σωληνάριο οδεύοντας παράλληλα με την αγκύλη του Henle εκβάλλει στους κάλυκες και εν συνεχεία στη νεφρική πύελο. Στο σημείο όπου το σωληνάριο προσεγγίζει το προσαγωγό σπειραματικό αρτηρίδιο, βρίσκεται η παρασπειραματική συσκευή, η οποία συνίσταται από εξειδικευμένα σωληναριακά κύτταρα που είναι υπεύθυνα για την έκκριση της ρενίνης. Εν γένει το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο και η αγκύλη του Henle απορροφούν το μεγαλύτερο σύνολο των διαλυτών ουσιών του διηθήματος (πρόουρο) καθώς και το νερό (η επαναρρόφηση γίνεται στα περισωληναριακά τριχοειδή που περιβάλλουν το σωληνάριο). Τα συλλεκτικά σωληνάρια επιφέρουν τις τελικές αλλαγές στη σύνθεση των ούρων επιτρέποντας την απέκκριση των διαλυτών ενώσεων και του νερού ανάλογα με τις διατροφικές συνθήκες.

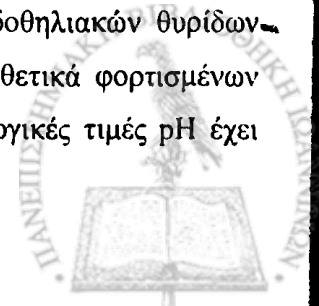
1.2.3 Σπειραματική λειτουργία

Το αίμα διηθείται δια μέσου του σπειραματικού φραγμού διήθησης, ο οποίος αποτελείται από τρεις κύριες στοιβάδες (Εικόνα 1.16): 1) την ενδοθηλιακή στοιβάδα των τριχοειδικών κυττάρων, 2) τη βασική μεμβράνη (basement membrane) και 3) τη στοιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων. Η διαπερατότητα του σπειραματικού φραγμού διήθησης είναι 100-1000 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της μεμβράνης των συνηθισμένων τριχοειδών και οφείλεται στην ειδική υφή που έχει. Τα τριχοειδικά κύτταρα που επενδύουν το σπείραμα συνιστούν ένα διάτρητο ενδοθήλιο. Η τελική στοιβάδα του σπειραματικού φραγμού αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα που επενδύουν την εξωτερική επιφάνεια του σπειράματος, και αποτελούνται κυρίως από δακτυλιοειδείς προσεκβολές, που βλέπουν προς τον αυλό του σωληναρίου. Οι προσεκβολές αυτές στελεχώνονται από μία λεπτή σχισμοειδή μεμβράνη αφήνοντας ανάμεσά τους σχισμές, τους σχισμοειδείς πόρους. Επομένως το διήθημα πριν εισέλθει στον χώρο του Bowman περνάει μέσα από τα τρία διαφορετικά στοιχεία του σπειραματικού φραγμού.



Εικόνα 1.16 Ο σπειραματικός φραγμός διήθησης (Rose and Post, 2001).

Οι θυρίδες του ενδοθηλίου, εμποδίζουν το πέρασμα ουδετέρων μακρομορίων μέσης ακτίνας μεγαλύτερης των 375\AA , ενώ επιτρέπουν την ταχύτατη διήθηση του νερού και των διαλυτών ουσιών μικρού μοριακού βάρους. Επιπλέον το αρνητικά φορτισμένο τμήμα των ενδοθηλιακών θυρίδων, καθώς και της βασικής μεμβράνης διευκολύνει αφενός μεν τη διέλευση των θετικά φορτισμένων μορίων, αφετέρου δε περιορίζει τη διήθηση της αλβουμίνης, αφού σε φυσιολογικές τιμές pH έχει

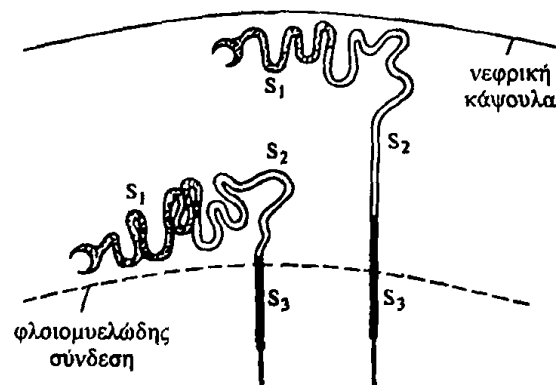


αρνητικό φορτίο. Οι σχισμοειδείς πόροι δεν επιτρέπουν τη διήθηση σωματιδίων με μέση διάμετρο μεγαλύτερη των 70Å, δρουν δηλαδή ως ρυθμιστές μεγέθους. Επειδή οι περισσότερες πρωτεΐνες του πλάσματος έχουν διάμετρο λίγο μεγαλύτερη από αυτήν, εμποδίζεται η διήθηση προς το σωληνάριο ουσιών που έχουν μοριακό βάρος ίσο ή μεγαλύτερο των πρωτεϊνών του πλάσματος (μέση ακτίνα αλβουμίνης 36 Å). Επομένως, ο σπειραματικός φραγμός διήθησης και ειδικότερα η βασική μεμβράνη εμφανίζει επιλεκτικότητα τόσο ως προς το μέγεθος όσο και ως προς το φορτίο των προς διήθηση διαλυτών ουσιών.

Το πρόουρο λοιπόν έχει παρόμοια σύνθεση με το πλάσμα, αλλά η συγκέντρωση των πρωτεϊνών σε αυτό είναι περίπου 0.03% της συγκεντρώσεώς τους στο πλάσμα. Η ποσότητα πλάσματος που διηθείται κάθε λεπτό στους νεφρώνες και των δύο νεφρών ονομάζεται *ρυθμός σπειραματικής διήθησης* (Glomerular Filtration Rate, GFR) και είναι περίπου 125 ml/min. Η συνολική λοιπόν ποσότητα ούρων που διηθούνται ημερησίως κυμαίνεται σε φυσιολογικά άτομα από 135-180 L/day. Εφόσον ο όγκος αυτός αναλογεί σε τουλάχιστον δεκαπλάσιο όγκο από το εξωκυττάριο υγρό και περίπου 50πλάσιο από το πλάσμα, είναι προφανές ότι σχεδόν όλο το διηθημένο υγρό πρέπει να επιστρέψει στην συστηματική κυκλοφορία, σχηματίζοντας τελικά 1.5-2 λίτρα ούρων ημερησίως.

1.2.4 Σωληναριακή λειτουργία

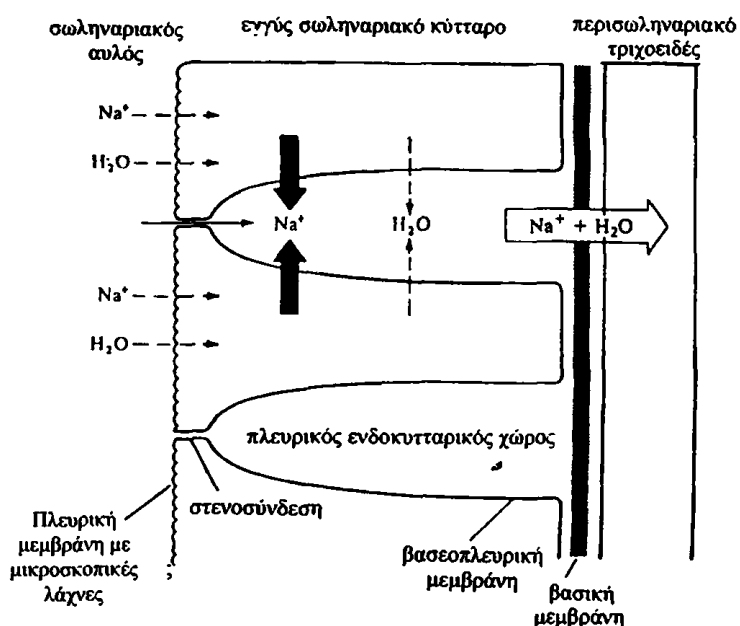
Η επανάκτηση του διηθημένου υγρού πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας που ονομάζεται *σωληναριακή επαναρρόφηση*. Αρχικά το πρόουρο εισέρχεται στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο το οποίο αποτελείται: 1) από την αρχική εσπειραμένη μοίρα S_1 (pars convoluta), 2) το τελικό εσπειραμένο τμήμα και την αρχική ορθή μοίρα S_2 και 3) την τελική ορθή μοίρα S_3 (pars recta) (Εικόνα 1.17).



Εικόνα 1.17 Εγγύς εσπειραμένω σωληνάριο (Rose and Post, 2001, p. 73).

Το 60-65% του διηθήματος φυσιολογικά επαναρροφάται στην περιοχή του εγγύς σωληναρίου. Ο όρος επαναρρόφηση αναφέρεται στην κατεύθυνση της μεταφοράς των ηλεκτρολυτών και του νερού εκτός του σωληναρίου, δηλαδή από τον σωληναριακό αυλό στον ενδιάμεσο περισωληναριακό χώρο και εν συνεχεία επιστροφή στο αίμα. Η διαδικασία της σωληναριακής επαναρρόφησης περιλαμβάνει

μεταφορά των ουσιών διαμέσου του σωληναριακού τοιχώματος, το οποίο αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα (όπως απεικονίζεται η μεταφορά του νατρίου στην **Εικόνα 1.18**). Τα κύτταρα αυτά διακρίνονται σε δύο είδη υπό την έννοια ότι περικλείονται από δύο ξεχωριστές μεμβράνες, που έχουν διαφορετικές λειτουργίες: 1) την μεμβράνη που βλέπει προς τον αυλό του σωληναρίου (luminal membrane) και η οποία είναι εφοδιασμένη με ψηκτροειδή παρυφή που αποτελείται από χιλιάδες μικροσκοπικές μικρολάχνες και 2) τη βασεοπλευρική μεμβράνη (basolateral membrane) που περικλείει τον πλευρικό ενδοκυτταρικό χώρο και βλέπει προς τη βασική μεμβράνη και τα περισωληναριακά τριχοειδή. Οι δύο αυτές μεμβράνες χωρίζονται από την στενοσύνδεση, που έχει δομή δακτυλίου και περιβάλλει κάθε επιθηλιακό κύτταρο. Παρόλο που οι περισσότερες διαλυτές ουσίες επιστρέφουν άθικτες στη συστηματική κυκλοφορία μερικές μεταβολίζονται στο κύτταρο του εγγύς σωληναρίου, κυρίως οι χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες.

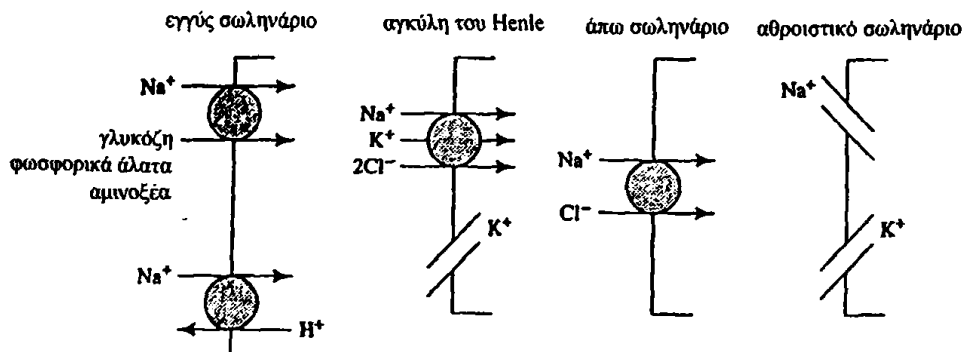


Εικόνα 1.18 Απεικόνιση της σωληναριακής απορρόφησης του νατρίου (Rose and Post, 2001, p. 74).

Οι διαλυτές ουσίες μπορούν να κινηθούν και στην αντίθετη κατεύθυνση, από το περισωληναριακό τριχοειδές μέσω των κυττάρων προς τα σωληνάκια, οπότε και συντελείται η διαδικασία της *απέκκρισης*. Η σωληναριακή επαναρρόφηση και απέκκριση των ιόντων διευκολύνεται από πρωτεΐνες-φορείς ή ειδικευμένα ιοντικά κανάλια. Το ποσό του διηθημένου νατρίου, π.χ., εισέρχεται παθητικά στο κύτταρο υπό την επίδραση κλίσης (διαφοράς) συγκέντρωσης, αφού η ενδοκυτταρική συγκέντρωση του Na^+ διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα στη βασεοπλευρική μεμβράνη. Η είσοδος του Na^+ μπορεί να γίνει με διάφορους πολύπλοκους μηχανισμούς, όπως με ανταλλαγή $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ και συμμεταφορά $\text{Na}^+ - \text{γλυκόζης}$ στο εγγύς σωληνάριο, με μεταφορά των $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ με τη βοήθεια μιας πρωτεΐνης-φορέα στο παχύ ανιόν σκέλος της αγκύλης του Henle, με παθητική μεταφορά $\text{Na}^+ -$



Cl⁻ στο άπω σωληνάριο ή με χρήση ενός καναλιού Na⁺ στο φλοιώδες και μυελώδες αθροιστικό σωληνάριο (Εικόνα 1.19). Η μεταφορά όμως του Na⁺ εκτός του κυττάρου διατηρεί χαμηλή την ενδο-

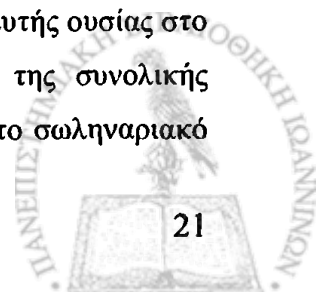


Εικόνα 1.19 Σχηματική απεικόνιση απορρόφησης Na⁺ (Rose and Post, 2001, p.9).

κυτταρική του συγκέντρωση προωθώντας έτσι περαιτέρω διάχυση από το σωληναριακό επιθήλιο στο κύτταρο και συνακόλουθη επαναρρόφηση του. Το παράδειγμα αυτό του νατρίου είναι ενδεικτικό της πολυπλοκότητας των μηχανισμών τους οποίους χρησιμοποιεί ο νεφρός για την ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας και της ομοιόστασης του οργανισμού.

Με τη μεταφορά των διαφόρων διαλυτών ουσιών έξω από το σωληνάριο διαμέσου του σωληναριακού επιθηλίου, η συνολική τους συγκέντρωση ελαττώνεται μέσα στον σωληναριακό αυλό και αυξάνει έξω από το σωληνάριο (Κατρίτσης και Παπαδόπουλος, 1979). Έτσι δημιουργείται διαφορά συγκέντρωσης που προκαλεί *όσμωση*, δηλαδή καθαρή μετακίνηση νερού λόγω αυτής της διαφοράς συγκέντρωσης, προς την κατεύθυνση της μεταφοράς των διαλυτών ουσιών. Η διαδικασία αυτή αποτελεί την *παθητική μεταφορά*, η οποία και δημιουργεί διαφορά συγκέντρωσης για άλλες διαλυτές ουσίες που δεν απορροφώνται ενεργητικά, ανάμεσα στο ενδοσωληναριακό και το περισωληναριακό υγρό, όπως συμβαίνει με την ουρία. Ο ρυθμός επαναρρόφησης μιας μη ενεργητικά μεταφερόμενης διαλυτής ουσίας καθορίζεται από την ποσότητα του νερού που παθητικώς επαναρροφάται και από τη διαπερατότητα της σωληναριακής μεμβράνης για την ουσία αυτή. Επειδή ο βαθμός διαπερατότητας του νερού στα διάφορα τμήματα του σωληναρίου μεταβάλλεται σημαντικά, η ποσότητα του διηθήματος που επαναρροφάται στα διάφορα τμήματα παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις. Εγγύς σωληνάριο: 65%, Αγκύλη του Henle: 15%, Άπω σωληνάριο: 10%, Αθροιστικά σωληνάριο: 9,3%, Σημείο διόδου στα ούρα: 0,7%. Οι παραπάνω τιμές μεταβάλλονται σε διάφορες λειτουργικές καταστάσεις του νεφρού, ιδιαίτερα όταν ο νεφρός παράγει πολύ αραιά ή πυκνά ούρα.

Η επαναρρόφηση και έκκριση διαφόρων ουσιών στα επιμέρους τμήματα των σωληναρίων περιληπτικά έχει ως εξής: Η διακίνηση του νερού γίνεται αποκλειστικά με την οσμωτική διάχυση, που προκαλείται, όπως ανεφέρθη προηγουμένως, από μείωση της συγκέντρωσης μίας διαλυτής ουσίας στο υγρό των σωληναρίων και αύξηση στο περισωληναριακό υγρό. Περίπου 50% της συνολικής ποσότητας της ουρίας, επαναρροφάται καθόλη τη διαδρομή του διηθήματος μέσα στο σωληναριακό



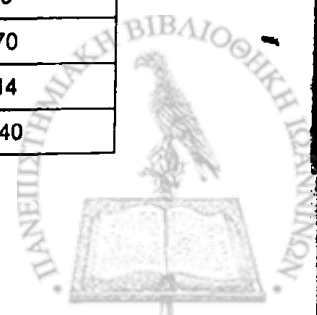
σύστημα. Η κρεατινίνη διηθείται πλήρως, δεν απορροφάται στα σωληνάκια, ενώ μικρές ποσότητες εκκρίνονται από τα εγγύς σωληνάκια, έτσι ώστε η ολική της ποσότητα να αυξάνεται περίπου κατά 20%. Το ουρικό ιόν επαναρροφάται πολύ περισσότερο από την ουρία σε ποσοστό που φθάνει το 90%. Παρόλα αυτά στα τελικά ούρα ανιχνεύονται μεγάλες ποσότητες ουρικού οξέος σε σχέση με την ουρία.

Ορισμένα άλλα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού, όπως τα θειικά, φωσφορικά και νιτρικά ιόντα διακινούνται με τον ίδιο τρόπο όπως και τα ουρικά ιόντα. Όλα φυσιολογικά επαναρροφώνται πολύ λιγότερο σε σχέση με την επαναρρόφηση του νερού, με αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις τους να αυξάνονται στα επιμέρους τμήματα των σωληναρίων. Ωστόσο, τα ιόντα αυτά επαναρροφώνται ενεργητικά κυρίως στο εγγύς και άπω σωληνάριο, γεγονός που εμποδίζει την υπερβολική ελάττωση της συγκέντρωσης τους στο εξωκυττάριο υγρό. Τα ιόντα καλίου εκκρίνονται ενεργητικά στο σωληναριακό υγρό κατά τη διέλευσή του από τα άπω και τα αθροιστικά σωληνάκια, ενώ τα ιόντα Η⁺ εκκρίνονται ενεργητικά στα εγγύς, τα άπω και τα αθροιστικά σωληνάκια. Τέλος το ασβέστιο, το μαγνήσιο και άλλα θετικά φορτισμένα ιόντα απορροφώνται ενεργητικά, ενώ η επαναρρόφηση πολλών από τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα είναι αποτέλεσμα διαφορών ηλεκτρικού δυναμικού που αναπτύσσονται κατά την απορρόφηση θετικών ιόντων.

Η τιμή της συγκέντρωσης μίας ουσίας μέσα στο σωληναριακό υγρό καθορίζεται από τη σχετική επαναρρόφηση ή έκκριση αυτής ως προς την επαναρρόφηση του νερού. Αν απορροφάται μεγαλύτερο ποσοστό νερού, τα ούρα συμπυκνώνονται και η συγκέντρωση της ουσίας αυξάνεται, ενώ αν επαναρροφάται μεγαλύτερο ποσοστό ουσίας τότε η συγκέντρωσή της μειώνεται. Οι ουσίες που είναι σημαντικές για τη θρέψη (γλυκόζη, πρωτεΐνες και αμινοξέα) επαναρροφώνται σχεδόν πλήρως, οι συγκεντρώσεις τους ελαττώνονται εξαιρετικά γρήγορα στα εγγύς σωληνάκια και είναι ουσιαστικά μηδενικές σε όλο το υπόλοιπο σωληναριακό σύστημα και στα ούρα (Πίνακας 1.1). Αντιθέτως, οι συγ-

Πίνακας 1.1 Σχετικές συγκεντρώσεις κυριότερων ουσιών στο διήθημα και στα ούρα.

	Διήθημα (125ml/min)		Ούρα (1ml/min)		[ούρα]/[πλάσμα]
	mEq / min	mEq / L	mEq / min	mEq / L	
Na ⁺	17.7	142	0.128	128	0.9
K ⁺	0.63	5	0.06	60	12
Ca ⁺⁺	0.5	4	0.0048	4.8	1.2
Mg ⁺⁺	0.38	3	0.015	15	5
Cl ⁻	12.9	103	0.134	134	1.3
HCO ₃ ⁻	3.5	28	0.014	14	0.5
H ₂ PO ₄ ⁻ HPO ₄ ⁻²	0.25	2	0.05	50	25
SO ₄ ⁻²	0.09	0.7	0.033	33	47
Γλυκόζη	125 mg	100 mg/dl	0 mg	0 mg/dl	0
Ουρία	33	26	18.2	1820	70
Ουρικό οξύ	3.8	3	0.42	42	14
Κρεατινίνη	1.4	1.1	1.96	196	140



κεντρώσεις όλων των τελικών μεταβολικών προϊόντων προοδευτικά αυξάνονται κατά μήκος του σωληναριακού συστήματος, διότι όλα επαναρροφώνται πολύ λιγότερο σε σχέση με το νερό.

Πολλά από τα ιόντα φυσιολογικά απεκκρίνονται στα ούρα σε συγκεντρώσεις που δεν διαφέρουν από αυτές του διηθήματος και του εξωκυττάριου υγρού (π.χ. Na^+ Ca^{++}). Σε φυσιολογικές συνθήκες το όξινα συστατικά που σχηματίζονται συνολικά στο σώμα κάθε μέρα, είναι κατά 50-80 mmol περισσότερα από τα αλκαλικά και συνεπώς πρέπει συνεχώς να αποβάλλονται. Εξαιτίας της περίσσειας οξέων στα ούρα, το pH τους είναι περίπου 6 αντί για 7.4, που αντιστοιχεί στο αρτηριακό αίμα. Κατά τη διαδικασία της ρύθμισης της συγκέντρωσης των ιόντων υδρογόνου του εξωκυττάριου υγρού πολλές φορές οι νεφροί απεκκρίνουν πολύ όξινα (pH ως 4.5), ή πολύ αλκαλικά ούρα (pH ως 8).

1.2.5 Στοιχεία παθοφυσιολογίας του νεφρού - Σπειραματονεφρίτιδα

1.2.5.1 Εισαγωγή

Συνήθως τα αίτια της νεφρικής νόσου και εν γένει της νεφρικής ανεπάρκειας ταξινομούνται σε προνεφρικά, νεφρικά και μετανεφρικά (Πίνακας 1.2). Εκτός από την οξεία σωληναριακή νέκρωση, οι

Πίνακας 1.2 Αίτια νεφρικής νόσου (Βλαχάκος, 2005).

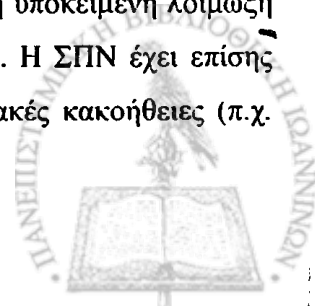
Προνεφρικά αίτια	
Υποογκαιμία	Απώλεια αίματος ή πλάσματος (τραύμα, εγχειρήσεις, έγκαυμα, γαστρορραγία, εντερορραγία, αιμορραγίες στον οπισθοπεριτοναϊκό χώρο)
	Απώλεια υγρών και ηλεκτρολυτών (διουρητικά, παροχετεύσεις, έμετοι και διάρροιες, πυρετός, εφίδρωση, πολυουρία)
	Ανακατανομή των υγρών στον τρίτο χώρο (περιτονίτιδα, παγκρεατίτιδα, σοβαρή υποπρωτεϊναιμία, σηψαιμία, γενικευμένη φλεγμονώδης αντίδραση με πολυοργανική ανεπάρκεια)
Καρδιακή ανεπάρκεια	Ισχαιμική καρδιοπάθεια, μυοκαρδίτιδα, επιπωματισμός, βαλβιδοπάθεια
Έντονος αγγειοσπασμός	Κίρρωση με ηπατονεφρικό σύνδρομο, αγγειοσυσπαστικά φάρμακα
Φάρμακα που μεταβάλλουν την μικροκυκλοφορία του νεφρού	Κυκλοσπορίνη, αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου ή των υποδοχέων της αγγειοτενσίνης, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα
Νεφρικά αίτια	
Σπειραματοπάθειες	Οξεία σπειραματονεφρίτιδα, αγγειίτιδες των μικρών αγγείων, έμβολα, θρόμβοι
Νόσοι του διάμεσου ιστού	Διάμεση νεφρίτιδα από αντίδραση υπερευαισθησίας σε αντιβιοτικά και άλλα φάρμακα, πυελονεφρίτιδα
Οξεία Σωληναριακή Νέκρωση	Ισχαιμία του νεφρικού παρεγχύματος
	Τοξικοί παράγοντες (μόρια φλεγμονής, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, νεφροτοξικά αντιβιοτικά (αμινογλυκοσίδες, αμφοτερικίνη), ακτινοσκιερές διαγνωστικές ουσίες, αιμοσφαιρίνη, μυοσφαιρίνη)
Μετανεφρικά αίτια	
Απόφραξη των ουροφόρων σωληναρίων	Μονοκλωνικές πρωτεΐνες, κρύσταλλοι ουρικού οξέως ή φαρμάκων, όπως ακυκλοβίρη, σουλφοναμίδες και κινολόνες
Απόφραξη ουρητήρων, κύστεως, ουρήθρας από ενδο- ή εξωαυλικούς παράγοντες	Λίθοι, όγκοι, πύγματα, οπισθοπεριτοναϊκή ίνωση, γυναικολογικές επεμβάσεις, διόγκωση προστάτη, νευρογενής κύστη κλπ

παθήσεις του νεφρού γενικά εστιάζονται είτε στα σπειράματα και καλούνται γενικά *σπειραματονεφρίτιδες* (ΣΠΝ), είτε στον σωληναριοδιάμεσο ιστό και χαρακτηρίζονται ως *διάμεσες νεφρίτιδες*. Ο ιστός αυτός εκτείνεται ανάμεσα στα σωληνάρια και τα περισωληναριακά τριχοειδή αγγεία και χαρακτηρίζεται από περιορισμένο διάμεσο συνδετικό υπόστρωμα, το οποίο αποτελείται από λεπτές δικτυωτές ίνες και κύτταρα. Ο διάμεσος ιστός του νεφρού παίζει σημαντικό λειτουργικό ρόλο και εκτός από την στενή ανατομική συνάφεια που έχει με τα νεφρικά σωληνάρια και τα σπειράματα, οι λειτουργίες του αλληλοεπηρεάζουν τόσο τη σπειραματική όσο και τη σωληναριακή λειτουργία του νεφρού. Τα κύτταρα του διάμεσου χώρου, έχουν ικανότητες ανοσοπαρουσιαστικών κυττάρων και ικανότητα παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων κολλαγόνου (Βλαχάκος, 2005).

Η ανάπτυξη των διαφόρων παθήσεων του νεφρού είναι εκτός των πλαισίων της παρούσης διατριβής, γι' αυτό και παρατίθεται μια σύντομη αναφορά στις διάφορες παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζουν μόνο το νεφρικό σπείραμα. Η ΣΠΝ προκαλείται είτε από γενικευμένα νοσήματα του οργανισμού που προσβάλλουν και τον νεφρό (συστηματικός ερυθματώδης λύκος, αγγειίτιδα), είτε από πρωτοπαθείς νόσους των νεφρών (πρωτοπαθής ΣΠΝ) και είναι σχετικά σπάνια (5%), σε σχέση με άλλα νεφρικά νοσήματα (Βλαχάκος, 2005). Οι περισσότερες όμως νόσοι που προσβάλλουν το σπείραμα είναι ανοσολογικής προέλευσης. Άλλοι μηχανισμοί της σπειραματικής νόσου αφορούν μεταβολικά νοσήματα (διαβητική νεφροπάθεια), εναπόθεση συμπλόκων (αμυλοείδωση), καθώς και κληρονομικές διαταραχές της δομής του σπειράματος (π.χ. σύνδρομο Alport) ή τοξικά ενδοθηλιακά τραύματα που οδηγούν σε θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια. Πολλές μορφές ΣΠΝ χαρακτηρίζονται από την εναπόθεση στο σπείραμα ανοσοσυμπλεγμάτων, ιδιαίτερα ανοσοσφαιρινών και συμπληρώματος, και συνοδεύονται από διαφορετικού βαθμού σπειραματικές φλεγμονές και βλάβες. Όταν δεν υπάρχουν τέτοιες εναποθέσεις, τότε η σπειραματική βλάβη μπορεί να προκληθεί μέσω κυτταρικών και χυμικών ανοσολογικών μηχανισμών (Feehally et al., 2005).

1.2.5.2 Ταξινόμηση σπειραματονεφρίτιδων

Μια ταξινόμηση της ΣΠΝ χρήσιμη στην κλινική πράξη θα μπορούσε να γίνει δεδομένου ότι μπορεί να εμφανισθεί είτε ως πρωτοπαθής οντότητα (π.χ. IgA νεφροπάθεια), είτε στα πλαίσια συστηματικής νόσου του οργανισμού (π.χ. στο συστηματικό ερυθματώδη λύκο). Ως δευτεροπαθής νόσος, μπορεί να εμφανισθεί σε περιπτώσεις παρενέργειας φαρμακευτικών σκευασμάτων καθώς και σε περιπτώσεις λοιμώξεων ή κακοήθων όγκων. Παράδειγμα φαρμάκων που μπορούν να προκαλέσουν ΣΠΝ είναι κάποια μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη και αντιρευματικά σκευάσματα, όπως ο χρυσός και η πενικιλαμίνη (penicillamine). Στις περιπτώσεις αυτές, αν διακοπεί η χρήση του προσβάλλοντος φαρμάκου, τότε η ΣΠΝ υποχωρεί. Ανάμεσα στις λοιμώξεις που αποτελούν κύρια αιτία της ΣΠΝ παγκοσμίως, συγκαταλέγονται οι ηπατίτιδες Β και C και η ελονοσία, όπου αν η υποκείμενη λοίμωξη εξαλειφθεί, τότε μπορεί να σημειωθεί βελτίωση των συμπτωμάτων της νόσου. Η ΣΠΝ έχει επίσης αναφερθεί ως απόρροια καρκινικών όγκων και κυρίως σχετίζεται με επιθηλιακές κακοήθειες (π.χ.



βρογχικό καρκίνωμα), όπου αν η υποκείμενη νεοπλασία αντιμετωπισθεί επιτυχώς, τότε η ΣΠΝ αναμένεται να υποχωρήσει. Στις περιπτώσεις όπου δεν υπάρχει κάποια αναγνωρίσιμη υποκείμενη αιτία, τότε η ΣΠΝ θεωρείται πρωτοπαθής. Αυτό μπορεί να είναι μια μεμονωμένη περίπτωση με την ιστική βλάβη να περιορίζεται μόνο στο νεφρό, όπως στην IgA νεφροπάθεια (νόσος του Berger), που είναι ο πιο κοινός τύπος ή να είναι τμήμα μιας συστηματικής φλεγμονώδους νόσου, όπως ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος ή η συστηματική αγγειίτιδα (Mathieson, 2005).

Στον Πίνακα 1.3 παρουσιάζεται μια ταξινόμηση της σπειραματικής νόσου με την περιοχή της πρωταρχικής βλάβης, τον υποθετικό μηχανισμό βλάβης και την τυπική κλινική εικόνα των ασθενών. Στην περίπτωση της μη ανοσολογικής σπειραματοπάθειας, η ταξινόμηση είναι πιο άμεση και αντανακλά ξεκάθαρα τον μηχανισμό της νόσου και την κλινική εικόνα, όπως π.χ. στον σακχαρώδη διαβήτη, στην αμυλοείδωση και στην κληρονομούμενη σπειραματική βλάβη (Feehally et al., 2005). Η

Πίνακας 1.3 Ταξινόμηση της σπειραματικής νόσου (Feehally et al., 2005).

Κατηγορία	Πρωταρχική βλάβη	Υποθετικός μηχανισμός	Τυπική κλινική εικόνα
Νόσος ελαχίστων αλλοιώσεων	Ποδοκύτταρα	Κυκλοφορούν Τ κυτταρικός παράγοντας (Circulating T cell factor)	Νεφρωσικό σύνδρομο
Εστιακή σπειραματική σπειραματοσκλήρυνση	Ποδοκύτταρα	Κυκλοφορούν παράγοντας	Νεφρωσικό σύνδρομο
Μεμβρανώδης νεφροπάθεια	Ποδοκύτταρα + βασική σπειραματική μεμβράνη	Αυτοάνοση In situ ανοσοσυμπλέγματα	Νεφρωσικό σύνδρομο
IgA νεφροπάθεια	Μεσάγγειος χώρος	IgA γλυκοζυλίωση Ανοσοσυμπλέγματα (?)	Αιματοουρία
Μεσαγγειοτριχοειδική (μεμβρανοϋπερπλαστική)	Μεσάγγειος χώρος Τριχοειδικό τοίχωμα	Ανοσοσυμπλέγματα	Νεφρικό / νεφρωσικό σύνδρομο
Νεφρίτιδα λόγω ερυθματώδους λύκου	Όλα τα σημεία	In situ ανοσοσυμπλέγματα	Διάφορα
Εστιακή τμηματική νεκρωτική ΣΠΝ	-	-	Οξεία νεφρική ανεπάρκεια
Σύνδρομο Goodpasture	Τριχοειδικό τοίχωμα	Αυτοάνοση	-
Rauci ανοσία	Τριχοειδικό τοίχωμα	Αυτοάνοση (?)	-
Θρομβωτική μικροαγγειοπάθεια	Ενδοθήλιο	Ενδοθηλιακή κυτταρική βλάβη	Οξεία νεφρική ανεπάρκεια
Νεφρική αμυλοείδωση	Μεσάγγειος χώρος Τριχοειδικό τοίχωμα	Εναπόθεση αμυλοειδούς -	Νεφρωσικό σύνδρομο -

κατηγοριοποίηση των ΣΠΝ με βάση την κλινική εικόνα έχει αλλάξει σε μικρό βαθμό μετά την εισαγωγή της βιοψίας νεφρού κατά τις δεκαετίες 1950 – 1960, όταν οι διάφορες μορφές της σπειραματικής νόσου προσδιορίστηκαν συνδυάζοντας παρατηρήσεις της οπτικής - ηλεκτρονικής μικροσκοπίας καθώς και των μικροσκοπιών ανοσοϋπεροξειδάσης ή ανοσοφθορισμού. Σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να γίνει περαιτέρω ταξινόμηση των ΣΠΝ βάσει ορολογικών παραμέτρων αλλά και μη νεφρι-

κών νόσων. Ωστόσο, η αρχική αισιοδοξία για την αποσαφήνιση της ανοσοπαθογένειας για κάθε τύπο της σπειραματικής νόσου δεν απέδωσε τους αναμενόμενους καρπούς, εκτός από λίγες περιπτώσεις.

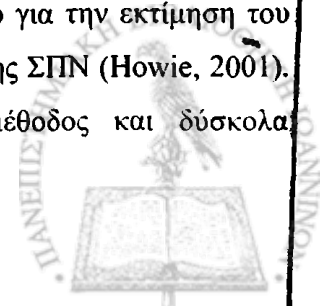
Η ταξινόμηση λοιπόν της ΣΠΝ βασίζεται κυρίως σε μορφολογικές παρατηρήσεις εκτός των περιπτώσεων στις οποίες οι αιτιολογικοί παράγοντες είναι πλήρως προσδιορισμένοι (νεφροπάθεια λόγω HIV), όταν η σχετική πολυσυστηματική νόσος είναι καλά ορισμένη (νεφρίτιδα λόγω ερυθματώδους λύκου) ή όταν η ανοσοπαθογένεια είναι καλά χαρακτηρισμένη (νόσος αντισπειραματικής βασικής μεμβράνης, anti-GBM). Σε αρκετές από τις κύριες κατηγορίες της ΣΠΝ δεν έχει καθοριστεί η ανοσοπαθογένεια και φαίνεται ότι περισσότερες από μια αιτιολογίες και περισσότεροι του ενός ανοσοπαθογόνοι μηχανισμοί μπορούν να προκαλέσουν ακόμα και μια απλή μορφολογική οντότητα, με την μεμβρανώδη νεφροπάθεια και την IgA νεφροπάθεια να είναι χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της παθογόνου ετερογένειας (Feehally et al., 2005).

1.2.5.3 Στοιχεία επιδημιολογίας, διάγνωσης και θεραπείας της ΣΠΝ

Η ΣΠΝ αποτελεί σημαντική αιτία εμφάνισης νεφρικής ανεπάρκειας με αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα, είναι πιθανή αιτία υπέρτασης, υπερλιπιδαιμίας και αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου, ενώ μπορεί να είναι αποτέλεσμα ύπαρξης σοβαρής συστηματικής νόσου. Η έγκαιρη και έγκυρη διάγνωση, ουσιαστικά μέσω βιοψίας νεφρού, είναι παράγοντας κλειδί για την αποφυγή μη αναστρέψιμης βλάβης. Βάσει των περισσότερων στοιχείων νοσηρότητας, τουλάχιστον 10% των περιπτώσεων νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου (end-stage renal failure) οφείλονται στη ΣΠΝ. Στους ενήλικες ενώ συχνά δεν εντοπίζονται τα αίτια εμφάνισης ΣΠΝ, η υπέρταση και η υπερλιπιδαιμία, ως αναγνωρισμένοι παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου, μπορεί να αποτελέσουν γνώρισμα της ΣΠΝ, και ίσως χρειάζεται να δίνεται προσοχή στην υποκείμενη σπειραματοπάθεια πριν την αντιμετώπιση του καρδιαγγειακού κινδύνου (Mathieson, 2005).

Η πρωτοπαθής σπειραματική νόσος είναι σχετικά σπανιότερη στις ανεπτυγμένες χώρες (Briganti et al., 2001, Heaf et al., 1999), ενώ αποτελεί μια από τις πιο συχνές αιτίες εμφάνισης νεφρικής ανεπάρκειας τελικού σταδίου στις αναπτυσσόμενες (Mitwalli et al., 1996, Polenakovic et al., 2003). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι το 2005 στη Μεγάλη Βρετανία 40.000 ασθενείς ήταν σε θεραπεία αντικατάστασης νεφρού (πάνω από 650 ανά εκατομμύριο πληθυσμού), με ετήσιο κόστος άνω των 700 εκ. λιρών, δηλαδή 2% του προϋπολογισμού του Εθνικού Συστήματος Υγείας (NHS) δαπανήθηκε μόνο για το 0.1% του πληθυσμού (Mathieson, 2005).

Η διάγνωση της ΣΠΝ μπορεί να εκτιμηθεί μέσω της κλινικής εικόνας καθώς και κατάλληλων εργαστηριακών ευρημάτων, όπως η πρωτεϊνουρία και η μη φυσιολογική μικροσκοπική ανάλυση των ούρων (Feehally et al., 2005). Η βιοψία νεφρού θεωρείται το κύριο εργαλείο για την εκτίμηση του τύπου και του βαθμού της νεφρικής βλάβης σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις της ΣΠΝ (Howie, 2001). Ωστόσο, εκτός από τη βιοψία νεφρού, η οποία είναι επεμβατική μέθοδος και δύσκολα



επαναλαμβάνεται, καθώς και τη βαριά πρωτεϊνουρία δεν φαίνεται να υπάρχουν ασφαλείς δείκτες για την παρακολούθηση της εξέλιξης της νεφροπάθειας (Bazzi et al., 1997). Η επισταμένη ιστοπαθολογική ανάλυση αποκαλύπτει την έκταση της σωληναριοδιάμεσης βλάβης και το βαθμό της σωληναριακής ίνωσης, τα οποία όμως στις περισσότερες των περιπτώσεων συσχετίζονται καλύτερα με την επιδείνωση της νεφρικής λειτουργίας παρά με το βαθμό της ίδιας της πειραματικής νόσου (Mackensen-Haen et al., 1981, D'Amico, 1999). Συνεπώς οι αλλοιώσεις του σωληναριοδιάμεσου ιστού στην πειραματοπάθεια είναι πρωταρχικής σημασίας για την έκβαση της νόσου και την επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος που κυρίως αποσκοπεί (Mathieson, 2003):

- Στην μείωση των συμπτωμάτων, π.χ. με απαγόρευση χρήσης άλατος στη διατροφή και με χρήση αντιδιουρητικών, αντιυπερτασικών, αντιυπερλιπιδαιμικών και αντιπηκτικών φαρμάκων.
- Στην αποφυγή ή καθυστέρηση της προοδευτικής απώλειας της απεκκριτικής νεφρικής λειτουργίας.
- Στη κατευθείαν αντιμετώπιση της υποκείμενης ΣΠΝ, συχνά με χρήση κορτικοστεροειδών, αντιμεταβολιτών (π.χ. azathioprine) ή κυτταροτοξικών σκευασμάτων (π.χ. cyclophosphamide).

1.2.5.4 Ρόλος της σωληναριοδιάμεσης βλάβης στην εξέλιξη της ΣΠΝ

Είναι πολύ σημαντικό να αναφερθεί και να τονισθεί ότι η ΣΠΝ συχνά συνοδεύεται και από αλλοιώσεις του σωληναριοδιάμεσου ιστού, οι οποίες επιβαρύνουν σημαντικά την πρόγνωση της εξέλιξης της νόσου ακόμη και σε καταστάσεις φυσιολογικής νεφρικής λειτουργίας ή ήπιας νεφρικής ανεπάρκειας (Nath, 1992). Ειδικότερα όταν η σοβαρότητα της πειραματικής βλάβης φθάσει σε ένα συγκεκριμένο βαθμό, τότε η εξέλιξη της νεφρικής νόσου είναι συνεχής, ανεξάρτητη της αρχικής αιτιολογίας και μη αναστρέψιμη (Nangaku, 2002, 2004). Ιστοπαθολογικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η πρόγνωση της νεφρικής νόσου συσχετίζεται καλύτερα με την έκταση των σωληναριοδιάμεσων αλλοιώσεων παρά με το βαθμό της ίδιας της πειραματικής βλάβης (Magil, 1995). Οι αλλοιώσεις αυτές προκαλούν μείωση του GFR μέσω διαφόρων μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης και της μη φυσιολογικής πειραματο-σωληναριακής ανατροφοδότησης (tubuloglomerular feedback) (Nangaku, 2002). Έχει μάλιστα προσφάτως αναφερθεί, ότι σε όλες σχεδόν τις χρόνιες νεφρικές νόσους η ίνωση του σωληναριοδιάμεσου ιστού χαρακτηρίζει τη νεφρική λειτουργία καλύτερα από κάθε άλλο ιστοπαθολογικό εύρημα και προβλέπει την εξέλιξη της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας (Hirschberg and Wang, 2005). Οι αλλοιώσεις του σωληναριοδιάμεσου ιστού συντελούν στην εξάλειψη των μεταπειραματικών (postglomerular) τριχοειδών οδηγώντας σε νεφρική ισχαιμία, ενώ η σωληναριακή βλάβη οδηγεί επιπλέον σε σπειράματα χωρίς σωληνάρια (atubular glomeruli) με αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των λειτουργικών νεφρώνων (Nangaku, 2002).

Πιο συγκεκριμένα, στη σωληναριοδιάμεση βλάβη συντελεί καταρχήν η πειραματική πρωτεϊνουρία που είναι παράγοντας κινδύνου για την εξέλιξη τόσο της χρόνιας νεφρικής ανεπάρκειας, όσο και της διάμεσης ίνωσης, υποδηλώνοντας την ύπαρξη μιας αιτιολογικής σχέσης μεταξύ της πειραματικής υπερδιήθησης των πρωτεϊνών και της ινωδογένεσης (fibrogenesis) (Ong and Fine, 1994, Abbate

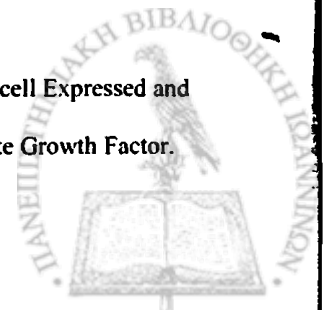
et al., 1998, Ruggenenti et al., 1997, Bazzi et al., 2000). Διάφορες κλινικές μελέτες, και κυρίως η μελέτη MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) έχουν αποδείξει ότι ο βαθμός της πρωτεϊνουρίας επιδρά σημαντικά στο ρυθμό μείωσης του GFR (Klahr et al., 1994, Peterson et al., 1995). Συνοπτικά στη σπειραματοπάθεια, το εγγύς σωληνάριο κατακλύζεται από πρωτεΐνες λόγω αύξησης της διαπερατότητας του σπειραματικού φραγμού διήθησης με αποτέλεσμα να εντείνεται η διαδικασία της επαναρρόφησης τους (Kanwar et al., 1984). Έχει αναφερθεί όμως ότι ο αυξημένος αυτός φόρτος των πρωτεϊνών στο σωληναριακό αυλό έχει τοξικές επιδράσεις στα κύτταρα του εγγύς σωληναρίου και τελικά οδηγεί σε μείωση του ρυθμού επαναρρόφησης των πρωτεϊνών μικρού μοριακού βάρους (Abbate et al., 1998, Ruggenenti and Remuzzi, 2000, Nangaku, 2004). Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι η μειωμένη αυτή επαναρρόφηση σχετίζεται με την έκταση της βλάβης των σωληναριακών κυττάρων και την συνολική σωληναριοδιάμεση βλάβη (Widstam-Attorps et al., 1992, Burton and Walls, 1994, D'Amico et al., 1995).

Δεν είναι τυχαίο λοιπόν που η βαριά πρωτεϊνουρία έχει αξιολογηθεί ως ένας κοινός μηχανισμός που οδηγεί στην νεφρική ανεπάρκεια (Walls, 2001, Zoja et al., 2003). Σύμφωνα με τον επικρατέστερο μηχανισμό βλάβης που έχει προταθεί, η μαζική ή/και παρατεταμένη απώλεια πρωτεϊνών στη σπειραματική νόσο συντελεί στην πιθανή διάρρηξη της ακεραιότητας των επιθηλιακών κυττάρων του εγγύς σωληναρίου και σε λυσοσωματική δυσλειτουργία λόγω αυξημένων μεταβολικών αναγκών, καθώς και σε μορφολογικές αλλοιώσεις, όπως η καταστροφή της δομής της ψηκτροειδούς παρυφής (Bohle et al., 1992, D'Amico and Bazzi, 2003). Υπάρχουν όμως και πολλές ενδείξεις ότι οι πρωτεΐνες μπορούν να συμβάλουν στη σωληναριοδιάμεση βλάβη, διεγείροντας την απελευθέρωση κυτταροκινών, π.χ. MCP-1, RANTES¹ (Donadelli et al., 2000, Zoja et al., 1998) και αυξητικών παραγόντων, π.χ. TGFβ, IGF-I, HGF² (Hirschberg, 1996, Wang et al., 2000, Hirschberg and Wang, 2005) που προκαλούν φλεγμονή και ίνωση στο σωληναριοδιάμεσο ιστό. Επίσης έχει αναφερθεί ο ρόλος τους στην ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών διαδικασιών που περιλαμβάνουν υπερέκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν ρυθμιστές φλεγμονής (inflammatory mediators) (Nangaku, 2002)

Ανάμεσα στις διάφορες πρωτεΐνες που θεωρούνται ότι έχουν επιβλαβή ή τοξική δράση στο εγγύς σωληνάριο, είναι οι λιποπρωτεΐνες (Schreiner, 1995), η τρανσφερίνη (Tang et al., 2001) και τμήματα του συμπληρώματος που ενεργοποιούνται από το αμμώνιο (Matsuo et al., 1998). Όπως αναφέρθηκε το συμπλήρωμα παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια πολλών μορφών ΣΠΝ. Μελέτες σε καλλιέργειες σπειραματικών κυττάρων και σε πειραματικά μοντέλα έχουν αποσαφηνίσει τη σπουδαιότητα που έχει η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ της ενεργοποίησης του συμπληρώματος και των πρωτεϊνών ρύθμισης του συμπληρώματος (complement regulatory proteins) στην παθογένεια της ανοσορυθμιζόμενης σπειραματικής βλάβης (Nangaku et al., 1999). Ο μηχανισμός του συμπληρώματος

¹ (MCP-1: Monocyte Chemoattractant Protein-1, RANTES: Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted.

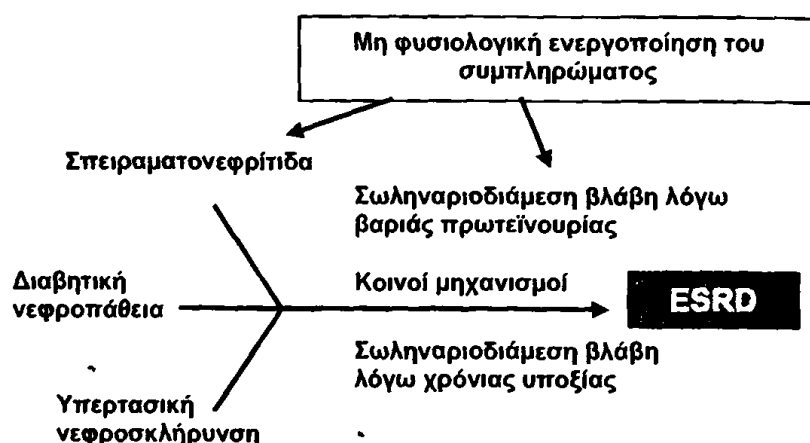
² TGF-β: Transforming Growth Factor-beta, IGF-I: Insulin-like Growth Factor-I, HGF: Hepatocyte Growth Factor.



είναι ένας αποτελεσματικός αμυντικός μηχανισμός ενός ξενιστή, ωστόσο μη φυσιολογική ενεργοποίησή του, οδηγεί σε ιστική βλάβη (Nangaku, 2004). Μελέτες σε πειραματόζωα έχουν δείξει ότι η βλάβη λόγω σχηματισμού ανοσοσυμπλεγμάτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το συμπλήρωμα σε πλήθος νεφρικών νόσων που προσβάλλουν τα πειραματικά κύτταρα του επιθηλίου (Couser et al., 1997), του μεσάγγειου χώρου (Brandt et al., 1996) και του ενδοθηλίου (Nangaku et al., 1997).

Από την άλλη πλευρά, σε μερικές νόσους όπως η υπερτασική νεφροσκλήρυνση, αν και δεν παρατηρείται βαριά πρωτεϊνουρία, οι ασθενείς εμφανίζουν σωληναριοδιάμεση βλάβη και νεφρική ανεπάρκεια (Nangaku, 2002, 2004). Αυτό εξηγείται από έναν άλλο κοινό μηχανισμό, αυτόν της χρόνιας ισχαιμικής βλάβης στο σωληναριοδιάμεσο ιστό, που έχει ιδιαίτερως διερευνηθεί από τους Fine (Fine et al., 2000) και Johnson (Kang et al., 2002). Η χρόνια ισχαιμία στο σωληναριοδιάμεσο ιστό μπορεί να προκληθεί μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως ενδονεφρική αγγειοσυστολή, ως δευτερογενής της τοπικής ενεργοποίησης του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (Remuzzi et al., 2002), λόγω αναστολής της αγγειοδιασταλτικής δράσης του οξειδίου του αζώτου (Shao et al., 2001) ή μέσω δομικών αλλοιώσεων που δυσχεραίνουν τη ροή αίματος (Choi et al., 2000). Η σωληναριοδιάμεση βλάβη οδηγεί σε ίωση και απώλεια των περισωληναριακών τριχοειδών εμποδίζοντας την αιματική ροή και τη διάχυση του οξυγόνου που με τη σειρά τους επάγουν χρόνια υποξία στην περιοχή αυτή δημιουργώντας έτσι ένα φαύλο κύκλο (Norman et al., 1999).

Συνοπτικά λοιπόν, η σωληναριοδιάμεση βλάβη είναι ο τελικός κοινός μηχανισμός που οδηγεί στην νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (Εικόνα 1.20), και ρυθμίζεται από τη βαριά πρωτεϊνουρία, που περιέχει και ένα μεγάλο μέρος πρωτεϊνικών τμημάτων του συμπληρώματος, από τη χρόνια υποξία και το βαθμό απώλειας των περισωληναριακών τριχοειδών του σωληναριοδιαμέσου ιστού, ή από τον συνδυασμό και των δύο.



Εικόνα 1.20 Σωληναριοδιάμεση βλάβη: Τελικός κοινός μηχανισμός που οδηγεί σε νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου (Nangaku, 2002).

Σύντμηση: ESRD: End Stage Renal Disease.

1.3 Βασικές Αρχές Ανάλυσης Πολυμεταβλητών Δεδομένων

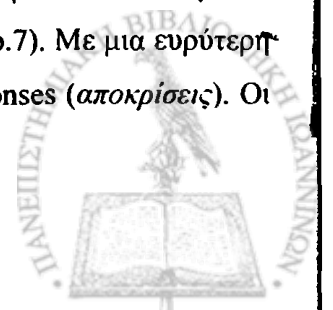
1.3.1 Ανάλυση Πολυμεταβλητών Δεδομένων – Αναγνώριση Προτύπων

Τα δεδομένα που συλλέγονται κατά την εφαρμογή των σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών, όπως της φασματοσκοπίας NMR υψηλής διακριτικής ικανότητας, συχνά χαρακτηρίζονται ως *πολυμεταβλητά* (multivariate), διότι ένας μεγάλος αριθμός μεταβλητών μετράται σε πολλά δείγματα ή σε πολλά χρονικά διαστήματα. Οι αναλυτικές τεχνικές παρέχουν επίσης τη δυνατότητα καταγραφής πολυάριθμων τέτοιων πολυμεταβλητών δεδομένων, γεγονός που οδηγεί εν γένει σε μεγαλύτερες αναλυτικές δυσκολίες σε σχέση με αυτές που εμφανίζονται κατά την επεξεργασία ενός περιορισμένου αριθμού δεδομένων. Η πιο σημαντική όμως παρατήρηση στην επεξεργασία δεδομένων είναι ότι όλα τα δεδομένα χρειάζονται. Δεν πρέπει να απορρίπτονται δεδομένα, να γίνεται ανάλυση των μεταβλητών μια προς μια ή να γίνεται άκριτη επιλογή ενός υποσυνόλου με τις ‘καλύτερες’ μεταβλητές. Αυτό συμβαίνει διότι οι μεταβλητές αφενός μεν είναι συχνά αλληλοεξαρτώμενες και συγγραμμικές, είτε πλήρως είτε μερικώς, αφετέρου δε η προς αναζήτηση πληροφορία αποκαλύπτεται με τη μελέτη συσχέτισης όλων των πρωτογενών μεταβλητών παρά με την μεμονωμένη ανάλυση αυτών. Εάν όμως μέρος των δεδομένων δε ληφθεί υπόψη κατά την επεξεργασία, τότε υπάρχει κίνδυνος να αγνοηθεί σημαντική πληροφορία (Eriksson et al. 2001, p.23).

Την καίρια απάντηση σε αυτό ακριβώς το δίλημμα μπορεί να δώσει η χρήση κατάλληλων αναλυτικών επεξεργασίας πινάκων με πολυμεταβλητά δεδομένα, η οποία και καθίσταται πλέον ενδεδειγμένη. Οι τεχνικές αυτές στοχεύουν μέσα από το συχνά πολυδιάστατο σύνολο των πρωτογενών μεταβλητών, να απομονώσουν ένα μικρό αριθμό “λανθανουσών μεταβλητών” (latent variables) οι οποίες και περιέχουν και την πιο σημαντική πληροφορία του υπό εξέταση συστήματος.

Η πιο γνωστή τεχνική για την ανάκτηση της πληροφορίας από πίνακες δεδομένων μικρών ή μεγάλων διαστάσεων καλείται Multivariate Data Analysis, MDA (*Ανάλυση Πολυμεταβλητών Δεδομένων*), η οποία εφαρμόζει «έξυπνες» μεθόδους υψηλής υπολογιστικής δυνατότητας ώστε η ανάλυση να πραγματοποιείται σε μικρό χρονικό διάστημα (Eriksson et al., 2001, p.7-8). Ο όρος Pattern Recognition, PR (*Αναγνώριση Προτύπων*) συχνά χρησιμοποιείται ως συνώνυμο της MDA και αποσκοπεί στην εύρεση ενός χαρακτηριστικού data pattern («μοντέλου δεδομένων») για μια ή περισσότερες ομάδες από variables (μεταβλητές) ή observations (παρατηρήσεις) (Wold et al., 1984). Το pattern (μοντέλο ή πρότυπο) μιας ομάδας παρέχει πληροφορίες για τις σχέσεις και τις αναλογίες που χαρακτηρίζουν τις μεταβλητές και τις παρατηρήσεις της ομάδας αυτής, δηλαδή ποιες έχουν άμεση συσχέτιση μεταξύ τους και ποιες όχι.

Είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι σε μια κλινική μελέτη οι γενικοί όροι παρατηρήσεις και μεταβλητές που προαναφέρθηκαν, ισοδυναμούν οι μεν με τα δείγματα ή άτομα και οι δε με τα εκάστοτε πειραματικά δεδομένα της μελέτης (Eriksson et al., 2001, Figure 1.1, p.7). Με μια ευρύτερη έννοια, οι μεταβλητές μπορούν να χωρισθούν σε factors (παράγοντες) και responses (αποκρίσεις). Οι



παράγοντες, που καμιά φορά καλούνται και predictors (μεταβλητές πρόβλεψης) ή parameters (παράμετροι), είναι μεταβλητές των οποίων η διαφοροποίηση ενδέχεται να επιδράσει στο υπό μελέτη σύστημα και συνιστούν τον πίνακα που συνήθως καλείται *X*. Οι αποκρίσεις χαρακτηρίζουν μεταβλητές που μετρώνται για την εκτίμηση της απόδοσης του συστήματος, όπως η ποιότητα ενός προϊόντος, η κατάσταση της υγείας ενός πληθυσμού, η επίδραση ενός φαρμάκου ή μιας θεραπείας και συνιστούν τον πίνακα που συνήθως καλείται *Y*. Οι μεταβλητές (παράγοντες και αποκρίσεις) μπορεί να είναι ποσοτικές, οπότε λαμβάνουν οποιαδήποτε αριθμητική τιμή σε μια συνεχή κλίμακα, ή ποιοτικές, οπότε αντιστοιχούν σε μια μεταβλητή κατηγοριοποίησης ή ψευδομεταβλητή (dummy variable), στην οποία μπορεί να δοθούν μόνο συγκεκριμένες τιμές (Eriksson et al., 2001, p. 22-23).

1.3.2 Ιδιότητες της Ανάλυσης Πολυμεταβλητών Δεδομένων

Ποια είναι όμως η κεντρική ιδέα των τεχνικών PR; Παρόλο που χιλιάδες μεταβλητές μπορεί να είναι διαθέσιμες κατά τη μελέτη ενός συστήματος ή μιας διαδικασίας, σίγουρα δεν λαμβάνουν χώρα χιλιάδες ανεξάρτητα γεγονότα. Συνήθως, μόνο ένας μικρός αριθμός από υποκείμενα και αλληλοσυσχετιζόμενα φαινόμενα επηρεάζουν το σύστημα και το ερώτημα έγκειται ακριβώς στην αναζήτησή τους (Eriksson et al., 2001, p. 24). Παρόλο που τα φαινόμενα αυτά επηρεάζουν περισσότερες από μια μεταβλητές, μπορούν να περιγραφούν από ένα μικρό αριθμό “λανθανουσών μεταβλητών” (latent variables), οι οποίες και περιέχουν την πιο σημαντική πληροφορία (Eriksson et al., 2001, p. 2).

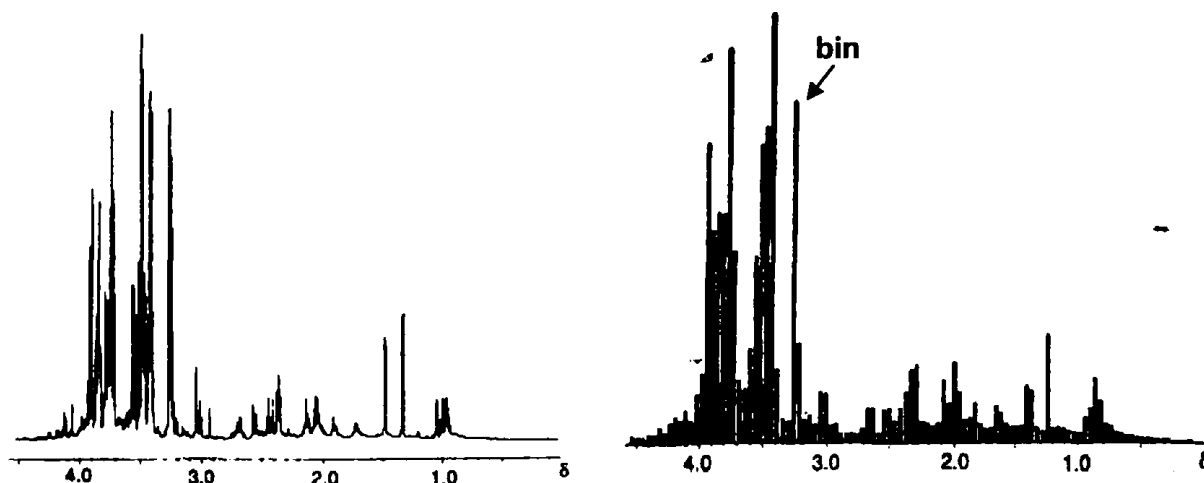
Για το λόγο αυτό, ενδείκνυται η χρήση κατάλληλων projection methods (μεθόδων προβολής), όπως η MDA για την ανάλυση των δεδομένων. Η ερμηνεία με βάση την εφαρμογή της multiple linear regression (πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης) ή παρόμοιων αναλυτικών τεχνικών δεν θα είχε νόημα, διότι αυτές προϋποθέτουν όλες τις μεταβλητές των πινάκων δεδομένων τους οποίους θέλουμε να απλοποιήσουμε (Eriksson et al., 2001, p. 24-25). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα απλά διαγράμματα σημείων με άξονες τις πρωτογενείς μεταβλητές να μην μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να απεικονίσουν οποιαδήποτε ομοιότητα μεταξύ των παρατηρήσεων (δειγμάτων) (Lindon et al., 2001). Με την εφαρμογή όμως κατάλληλων μεθόδων προβολής που χρησιμοποιούν οι τεχνικές PR, τα πολυμεταβλητά δεδομένα που κατανέμονται σε ένα χώρο πολλών διαστάσεων, προβάλλονται σε επίπεδα μικρών διαστάσεων (2-4 συνήθως) με άξονες τις λανθάνουσες μεταβλητές.

Οι τεχνικές PR επιτρέπουν τον προσδιορισμό και την ερμηνεία μιας μη τυχαίας συμπεριφοράς των δεδομένων που αναλύονται, η οποία μπορεί να παρεμποδιστεί από το θόρυβο ή από τυχαίες διακυμάνσεις των μεταβλητών που τα προσδιορίζουν (Lindon et al., 2001). Η διακύμανση (variation) των δεδομένων οφείλεται σε μη επιθυμητούς παράγοντες και αποτελεί το πειραματικό σφάλμα ή απλά τον θόρυβο. Όπως θα αναφερθεί στη συνέχεια, υπάρχουν μέθοδοι προβολής, οι οποίες ελαχιστοποιούν τη διακύμανση των δεδομένων και επιτρέπουν την άντληση της πιο σημαντικής πληροφορίας που περιέχεται σε αυτά. Μια πρόσθετη ιδιότητα των μεθόδων προβολής είναι η ανεκτικότητα τους σε περιπτώσεις μικρής ή μέτριας απώλειας δεδομένων, κάτι που συχνά παρατηρείται σε πίνακες

πολυμεταβλητών δεδομένων (Eriksson et al., 2001, p. 25). Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των δεδομένων, τόσο υψηλότερο είναι το ποσοστό απώλειας που μπορεί να γίνει ανεκτό (10 – 20%), αρκεί η απώλεια να μην γίνεται με κάποιο συστηματικό τρόπο (Wold et al., 1984).

Μια πλήρως αναλυτική παρουσίαση των τεχνικών PR στη γενική μαθηματική τους μορφή εμπίπτει στο επιστημονικό πεδίο της γραμμικής άλγεβρας και της στατιστικής ανάλυσης και θα ήταν εκτός των πλαισίων της παρούσης διατριβής, στην οποία οι τεχνικές αυτές εφαρμόζονται στα πολυμεταβλητά δεδομένα που προκύπτουν από την φασματοσκοπία ^1H NMR ούρων. Για το λόγο αυτό η σύντομη παρουσίαση των διαφόρων τεχνικών PR, εντοπίζεται κυρίως στη γραφική τους αναπαράσταση με γνώμονα την εφαρμογή τους στη φασματοσκοπία NMR. Το σκεπτικό της εφαρμογής των ποικίλων τεχνικών PR στη στατιστική επεξεργασία του συνολικού προφίλ των μεταβολιτών που ανιχνεύονται στα βιολογικά υγρά, όπως αυτό καταγράφεται από την φασματοσκοπία NMR, εντάσσεται στο νεοσύστατο επιστημονικό πεδίο της *Μεταβιονομικής* (Metabonomics), το οποίο και αναπτύσσεται λεπτομερώς στο επόμενο υποκεφάλαιο.

Στο σημείο αυτό είναι σκόπιμο να αναφερθεί η διαδικασία μετατροπής των φασμάτων NMR σε πίνακες πολυμεταβλητών δεδομένων που προηγείται της εφαρμογής των τεχνικών PR. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.21**, κάθε φάσμα NMR, που αντιστοιχεί σε μια παρατήρηση ή δείγμα (observation), διαιρείται με τη χρήση κατάλληλων υπολογιστικών προγραμμάτων σε ίσου εύρους *τμήματα* (bins), που αντιστοιχούν σε μια συγκεκριμένη περιοχή χημικής μετατόπισης (ppm) και αποτελούν τις μεταβλητές (variables). Ο πίνακας δεδομένων που προκύπτει, έχει ως γραμμές τα δείγματα (observations) και ως



Εικόνα 1.21 Διαίρεση ενός φάσματος ^1H -NMR σε τμήματα ίσου εύρους (bins) (Lindon et al., 2001).

στήλης τις τιμές έντασης για κάθε bin (Craig et al., 2006). Πριν την εφαρμογή κάποιας τεχνικής PR, γίνεται κατάλληλη *προ-επεξεργασία* (preprocesssing) των δεδομένων, το λεγόμενο preanalytical (προαναλυτικό) στάδιο, που αντιστοιχεί στην normalization (*κανονικοποίηση*) και στο scaling αυτών.

Η κανονικοποίηση εφαρμόζεται κατά μήκος των γραμμών του πίνακα με τέτοιο τρόπο ώστε αφενός μεν τα φασματοσκοπικά δεδομένα να καθίστανται άμεσα συγκρίσιμα μεταξύ τους, αφετέρου

δε να εξαλείφεται ή να ελαχιστοποιείται η επίδραση του διαφορετικού βαθμού συμπύκνωσης των αντίστοιχων δειγμάτων βιολογικών υγρών (αραιά - πυκνά). Η διαδικασία του scaling εκτελείται σε κάθε στήλη, δηλαδή σε κάθε μεταβλητή (bin). Η πιο συχνή διαδικασία στη μεταβιονομική είναι η αφαίρεση από όλες τις τιμές της στήλης του μέσου όρου αυτών (mean-centering). Με τον τρόπο αυτό μεταφέρεται το κέντρο βάρους των δεδομένων στην αρχή των αξόνων χωρίς να αλλάξει ο τρόπος διάταξής τους στο χώρο. Οι ιδιότητες των προαναλυτικών αυτών παραγόντων αναλύονται λεπτομερέστερα στο υποκεφάλαιο 4.2

1.3.3 Κατηγορίες τεχνικών PR

Οι τεχνικές PR διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τις unsupervised (“μη εποπτευόμενες”) (methods) και τις supervised methods (“εποπτευόμενες” μεθόδους) (Lindon et al., 2001, p.10,11).

1.3.3.1 Unsupervised techniques

Σε πολλές περιπτώσεις, ιδιαίτερα για τα φάσματα NMR υψηλής διακριτικής ικανότητας, το πλήθος των δεδομένων που συλλέγονται είναι τεράστιο και ο στόχος των μη εποπτευόμενων μεθόδων είναι να μειώσουν τόσο την πολυπλοκότητα όσο και τον όγκο τους, έτσι ώστε να εντοπισθούν τυχόν ενυπάρχουσες ομαδοποιήσεις των υπό ανάλυση δειγμάτων. Οι προσεγγίσεις αυτές περιλαμβάνουν δύο στάδια: 1) τον υπολογισμό αλγορίθμων για τη μείωση των δεδομένων και 2) την επακόλουθη γραφική απεικόνισή τους συνήθως σε 2 - 4 διαστάσεις, δηλαδή με διαγράμματα που μπορούν εύκολα να ερμηνευθούν (Kowalski and Bender, 1973).

Πολλές μέθοδοι, όπως η hierarchical cluster analysis ή η non-linear mapping βασίζονται στην απόσταση στο χώρο¹ μεταξύ των δειγμάτων χρησιμοποιώντας τις παραμέτρους των δεδομένων ως συντεταγμένες σε ένα πολυδιάστατο χώρο. Δυο βιολογικά δείγματα που βρίσκονται κοντά σε ένα πολυδιάστατο χώρο θεωρούνται ότι έχουν παρόμοιες βιοχημικές ιδιότητες και συνεπώς ομαδοποιούνται μαζί. Αντιθέτως, δείγματα που είναι απομακρυσμένα θεωρούνται ως βιοχημικά ανόμοια (Lindon et al., 2001, p.12). Η πιο γνωστή πολυμεταβλητή μέθοδος προβολής (multivariate projection methods) στην κατηγορία των μη εποπτευόμενων τεχνικών είναι η Principal Components Analysis, PCA (Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών) (Jolliffe, 1986).

1.3.3.2 Principal Components Analysis, PCA

Η τεχνική PCA αρχικά περιγράφηκε το 1901 από τον Pearson (Pearson, 1901) στα πλαίσια μιας νέας έκφρασης της ανάλυσης παλινδρόμησης και αναπτύχθηκε περαιτέρω αρχικά από τον Hotelling

¹ Η απόσταση r_{ab} δυο σημείων (δηλ. δειγμάτων) σε ένα χώρο p διαστάσεων υπολογίζεται βάσει του γενικού τύπου: $r_{ab} = \sqrt{\sum \{x_a(j) - x_b(j)\}^2}$, όπου $x_a(j)$ είναι η j συνιστώσα του δείγματος a κατά μήκος της οποίας γίνεται η άθροιση. Ο τύπος της γνωστής ευκλείδειας απόστασης στο χώρο 2 διαστάσεων προκύπτει για $p=2$.

(Hotelling, 1933) και αργότερα από τους Karhunen (Karhunen, 1946) και Loeve (Loeve, 1963) προς χάριν των οποίων είναι επίσης γνωστή και ως επέκταση Karhunen-Loeve (Fukunaga, 1990).

Η PCA είναι μια μέθοδος που εκτός από την ανάδειξη των πιο πλούσιων σε πληροφορία μεταβλητών ενός συνόλου δεδομένων ανεξαρτήτως της διακύμανσης τους, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μείωση του αριθμού των διαστάσεων του συνόλου αυτού (Kowalski and Bender, 1973). Έχει ως σκοπό τη δημιουργία γραμμικών συνδυασμών των αρχικών μεταβλητών, ώστε να είναι αφενός μεν ανεξάρτητοι μεταξύ τους, αφετέρου δε να περιέχουν όσο γίνεται μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης των αρχικών μεταβλητών. Οι γραμμικοί αυτοί συνδυασμοί ονομάζονται *Principal Components*, PCs (*Κύριες Συνιστώσες*) και περιέχουν τη σημαντικότερη πληροφορία των αρχικών μεταβλητών, ενώ οι αντίστοιχες γραφικές τους παραστάσεις συμβάλλουν στην ανάδειξη και ερμηνεία των σχέσεων που διέπουν τα δεδομένα με μια απλή και σαφή οπτική παρουσίαση (Lindon et al., 2001, p.12).

Η πρώτη PC είναι ένας γραμμικός συνδυασμός των πρωτογενών μεταβλητών και περιέχει τη μέγιστη διακύμανση των δεδομένων, ενώ η δεύτερη PC είναι ένας άλλος γραμμικός συνδυασμός, ορθογώνιος ως προς τον πρώτο, ο οποίος περιέχει την επόμενη πιο ολοκληρωμένη περιγραφή των δεδομένων. Οι επόμενες PCs εκφράζουν όλο και λιγότερο ποσοστό από την διακύμανση των δεδομένων και από κάποιο σημείο και μετά περιέχουν μόνο θόρυβο. Για ένα σύνολο d μεταβλητών θα υπάρχουν d PC, αλλά η γραφική παράσταση των 2 – 4 πρώτων PC παρέχει συνήθως το μέγιστο βαθμό πληροφορίας. Αξιοποιήσιμη πληροφορία μπορεί να αντληθεί κατά την χάραξη της πρώτης PC με κάποια από τις επόμενες και συνεπώς θα πρέπει διάφοροι συνδυασμοί γραφικών παραστάσεων να ελέγχονται. Στην PCA δεν εφαρμόζεται κάποια ειδική αρχική συνθήκη όσον αφορά τα δείγματα, αλλά υπολογίζονται οι PC και αν κατά τη χάραξη των αντίστοιχων γραφικών παραστάσεων παρατηρηθούν διακριτές ομάδες ή τάσεις ομαδοποίησης ανάμεσα στα δείγματα, τότε αξιολογείται η συμβολή των μεταβλητών στο διαχωρισμό των ομάδων αυτών.

Με βάση τη γραμμική άλγεβρα, για τα στοιχεία x_{ij} , ($i = 1, 2, \dots, n$ και $j = 1, 2, \dots, d$) ενός πίνακα δεδομένων X , ($n \times d$), όπου n ο αριθμός των δειγμάτων και d ο αριθμός των μεταβλητών, η μέση τιμή, μ_j , της μεταβλητής x_j (που αποτελεί μια εκ των j στηλών του πίνακα X) είναι:

$$\mu_j = \bar{x}_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{ij} = \frac{x_{1j} + x_{2j} + \dots + x_{nj}}{n}.$$

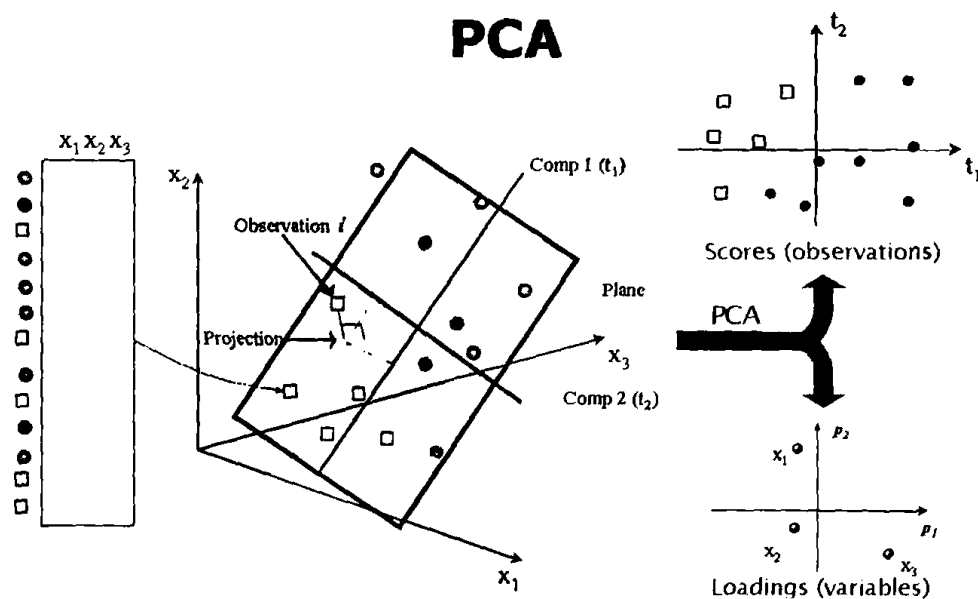
Βασική έννοια στην PCA αποτελεί η covariance, (συνδιακύμανση) c_{jk} , δυο μεταβλητών x_j και x_k , η οποία ορίζεται βάσει της εξίσωσης:

$$c_{jk} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_{ik} - \mu_k)(x_{ij} - \mu_j),$$

όπου μ_k και μ_j είναι η μέση τιμή των μεταβλητών x_k και x_j αντίστοιχα. Ο τετραγωνικός πίνακας ($d \times d$) που έχει ως στοιχεία τις τιμές της συνδιακύμανσης c_{jk} , ονομάζεται covariance matrix (πίνακας συνδιακύμανσης) (Lindon et al., 2001). Με *διαγωνιοποίηση* (diagonalisation) του πίνακα αυτού προκύπτουν αντίστοιχα οι *ιδιοτιμές* (eigenvalues) και τα *ιδιοδιανύσματα* (eigenvectors). Έτσι ο αρχικός πίνακας δεδομένων X αναλύεται σε μια μήτρα

συντεταγμένων (score matrix), T , και μια μήτρα φορτίων (loadings matrix), P , έτσι ώστε $X = TP' \pm E = t_1 p_1' + t_2 p_2' + E$, όπου με $'$ συμβολίζεται ο ανάστροφος (transpose) του πίνακα P . Με E συμβολίζεται ο πίνακας των υπολοίπων (residuals matrix), δηλαδή των δεδομένων που δεν χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση μέσα σε κάποια όρια λάθους πρόβλεψης (Trygg et al., 2007) και περιέχει το μη συστηματικό μέρος της διακύμανσης που δεν εξηγείται από το στατιστικό μοντέλο (Beckwith-Hall et al., 2002). Οι scores (συντεταγμένες), t_1, t_2 , των γραφικών παραστάσεων των ιδιοδιανυσμάτων είναι οι κύριες συνιστώσες και συνιστούν τη μήτρα συντεταγμένων T (scores matrix). Οι συντελεστές των ιδιοδιανυσμάτων, p_1, p_2 , ονομάζονται loadings (φορτία), είναι τα στοιχεία του πίνακα φορτίων P και προσδιορίζουν τη συνεισφορά των μεταβλητών στις PCs. Οι PCs υπολογίζονται συνήθως μέσω του αλγορίθμου NIPALS (Non-linear Iterative PARTial Least Squares) (Wold et al., 1987, Wu et al., 1997).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.22, σε κάθε παρατήρηση (observation) αντιστοιχεί μια μοναδική προβολή (projection) σε ένα επίπεδο 2 διαστάσεων με άξονες τις 2 πρώτες PCs, (t_1) και (t_2). Από το ε-



Εικόνα 1.22 Εφαρμογή της PCA σε έναν πίνακα πολυμεταβλητών δεδομένων.

Κάθε παρατήρηση (observation) προβάλεται (projection) σε ένα επίπεδο 2 διαστάσεων με άξονες τις 2 πρώτες PCs (comp 1 (t_1), comp 2 (t_2)). Από το επίπεδο αυτό προκύπτει το γράφημα συντεταγμένων (scores plot) το οποίο απεικονίζει τις σχέσεις που υπάρχουν ανάμεσα στις παρατηρήσεις και το γράφημα φορτίων (loadings plot) που απεικονίζει τις σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών του στατιστικού μοντέλου. Τα δυο αυτά γραφήματα είναι αλληλοεξαρτώμενα, διότι η διάταξη των μεταβλητών στο γράφημα φορτίων ερμηνεύει τον τρόπο διάταξης των δειγμάτων στο γράφημα συντεταγμένων (Trygg et al., 2007).

πίεδο αυτό προκύπτει το γράφημα συντεταγμένων (scores plot) το οποίο απεικονίζει τις σχέσεις που υπάρχουν ανάμεσα στις παρατηρήσεις (δείγματα), π.χ. εντοπισμός διακριτών ομάδων, τάσεων ομαδοποίησης ή ακραίων συμπεριφορών (outliers). Το γράφημα φορτίων (loadings plot) απεικονίζει την επίδραση των μεταβλητών στο στατιστικό μοντέλο καθώς και τις μεταξύ τους σχέσεις. Τα δυο αυτά γραφήματα είναι αλληλοεξαρτώμενα, διότι η διάταξη των μεταβλητών στο γράφημα φορτίων

ερμηνεύει τη διάταξη των δειγμάτων (και κατ' επέκταση των ατόμων ενός πληθυσμού) στο γράφημα συντεταγμένων (Trygg et al., 2007).

Είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε πόσες PCs πρέπει να χρησιμοποιηθούν για να περιγράψουν ένα σύνολο δεδομένων. Αυτό καθορίζεται με μια διαδικασία γνωστή ως cross validation (διασταυρούμενη αξιολόγηση). Στο πρώτο στάδιο, ένα ποσοστό (z%) των αρχικών δεδομένων αφαιρείται (συνήθως 10%), ακολουθεί μια ανάλυση PCA στα εναπομείναντα δεδομένα για την πρώτη αρχικά PC και προσδιορίζονται οι συντεταγμένες (y_{ik}) και τα φορτία (v_{kj}). Εν συνεχεία με βάση το στατιστικό αυτό μοντέλο γίνεται πρόβλεψη των μεταβλητών που αφαιρέθηκαν $x_{ij}(p)$ καθώς και του σφάλματος πρόβλεψης e_{ij} βάσει των εξισώσεων: $e_{ij} = x_{ij} - x_{ij}(p)$, όπου $x_{ij}(p) = x_j + \sum_{k=1}^p y_{ik} v_{kj}$. Η διαδικασία αυτή

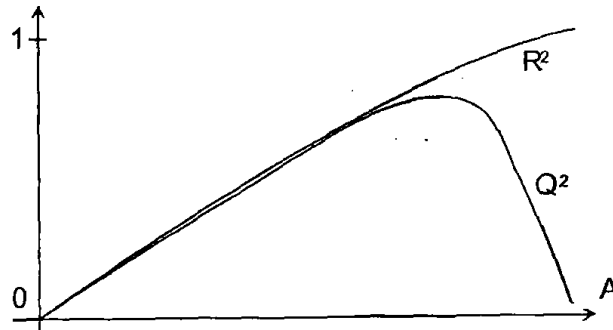
επαναλαμβάνεται $100/z$ φορές και το σφάλμα πρόβλεψης υπολογίζεται με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε ένα δείγμα να αφαιρείται μια φορά. Κατόπιν υπολογίζονται τα: 1) Predicted Residual Error Sum of Squares, PRESS (άθροισμα τετραγώνων των προβλεπόμενων σφαλμάτων των υπολοίπων) ως εξής: $PRESS(c) = \sum_i \sum_j e_{ij}^2$ και 2) Residual Sum of Squares, RSS (άθροισμα τετραγώνων των υπολοίπων).

Στη συνέχεια ο αριθμός των PCs αυξάνεται σε 2, 3 κτλ., υπολογίζεται εκ νέου το PRESS και συγκρίνεται με το RSS για την προηγούμενη PC (Eriksson et al., 2001, p. 67). Όταν το PRESS δεν είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερο από το RSS, τότε η εξεταζόμενη PC θεωρείται στατιστικά μη σημαντική και η διαδικασία σταματά. Γενικά καθώς ο αριθμός των PCs αυξάνει, η ικανότητα πρόβλεψης (predictive ability) των δεδομένων που αφαιρούνται πρέπει να βελτιώνεται και αντίστοιχα το PRESS να μειώνεται. Μετά από κάποιο βέλτιστο αριθμό PCs υπεισέρχεται και ο θόρυβος στην ανάλυση που βέβαια δεν συμβάλει στην ικανότητα πρόβλεψης, με αποτέλεσμα το PRESS να αρχίζει να αυξάνεται. Επομένως ο βέλτιστος αριθμός των PCs αντιστοιχεί στην ελάχιστη τιμή του PRESS (Lindon et al., 2001).

Η αξιολόγηση ενός PCA στατιστικού μοντέλου εκτιμάται από τις παραμέτρους R^2 (explained variation) και Q^2 (predicted variation) (Eriksson et al., 2001, p. 67). Η παράμετρος R^2 δίνει μια ποσοτική εκτίμηση της προσαρμογής του στατιστικού μοντέλου στα δεδομένα (goodness of fit) και υπολογίζεται βάσει της εξίσωσης: $R^2 = 1 - RSS / SSX_{tot,corr}$, όπου ο όρος $SSX_{tot,corr}$ (Sum of Squares of all X variables) (άθροισμα τετραγώνων όλων των μεταβλητών X) εκφράζει την ολική διακύμανση των δεδομένων του πίνακα X μετά το scaling του μέσου όρου. Η παράμετρος Q^2 υπολογίζεται βάσει της εξίσωσης: $Q^2 = 1 - PRESS / SSX_{tot,corr}$ και δίνει μια συνολική εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης του στατιστικού μοντέλου (goodness of prediction). Οι δυο αυτές παράμετροι είναι αδιάστατα μεγέθη με την R^2 ($0 < R^2 \leq 1$) να είναι πάντα μεγαλύτερη της Q^2 , και την Q^2 ($Q^2 < 1$) να μπορεί να λάβει και αρνητικές τιμές. Όταν η R^2 τείνει στο 0, τότε η ικανότητα του στατιστικού μοντέλου να εκφράσει την πληροφορία που υπάρχει στα δεδομένα είναι μηδενική, ενώ όταν τείνει στο 1 είναι άριστη.



Όσο αυξάνει η πολυπλοκότητα του μοντέλου με τη χρήση περισσότερων PCs, τόσο η R^2 πλησιάζει στο 1, αλλά το PRESS αυξάνεται, η Q^2 μειώνεται, υπεισέρχεται θόρυβος στην ανάλυση και οδηγούμαστε σε over fit του μοντέλου, δηλαδή σε αποτυχία έκφρασης της πληροφορίας των δεδομένων (Sustek, 1974). Συνεπώς η επιλογή του βέλτιστου αριθμού των PCs έγκειται στο συμβιβασμό της αυξανόμενης R^2 και της μειούμενης Q^2 , όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.23**. Όταν $Q^2 > 0.5$, τότε η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου θεωρείται καλή, ενώ όταν $Q^2 > 0.9$ θεωρείτο άριστη με την προϋπόθεση η διαφορά $R^2 - Q^2$ να μην υπερβαίνει την τιμή 0.3 (Eriksson et al., 2001, p. 67).



Εικόνα 1.23 Γραφική παράσταση των παραμέτρων R^2 και Q^2 .

Ο κατακόρυφος άξονας αντιστοιχεί την τιμή R^2 ή Q^2 και ο οριζόντιος άξονας χαρακτηρίζει την πολυπλοκότητα του στατιστικού μοντέλου (αριθμός PCs). Η διακεκομμένη έλλειψη δείχνει το σημείο προσδιορισμού του βέλτιστου αριθμού των PCs (Eriksson et al., 2001, p. 105).

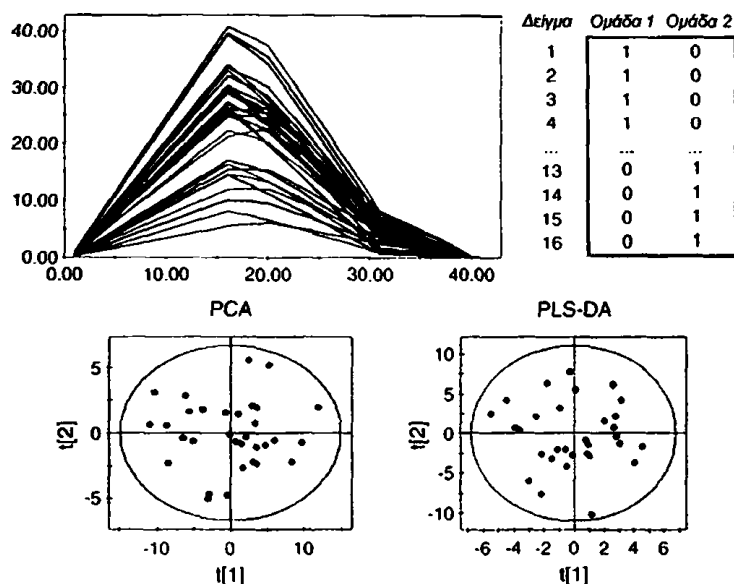
1.3.4 Supervised techniques

Η άλλη κατηγορία αναφέρεται στις supervised ("εποπτευόμενες") τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται κυρίως στην ταξινόμηση αγνώστων δειγμάτων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι κλασικές στατιστικές μέθοδοι least squares (ελάχιστα τετράγωνα) και multiple linear regression (πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση). Οι τεχνικές αυτές όμως έχουν αντικατασταθεί από τη μέθοδο Partial Least Squares, PLS (μερικά ελάχιστα τετράγωνα) ή Projection to Latent Structures, PLS (προβολή σε λανθάνουσες δομές) (Keun, 2006) η οποία χρησιμοποιείται συχνά στη μεταβιομηχανία.

1.3.4.1 Partial Least Squares - Projection to Latent Structures, PLS

Η μέθοδος PLS χρησιμοποιείται συχνά στην ανάλυση φασματοσκοπικών ή χρωματογραφικών δεδομένων, στην οποία εκτός του πίνακα X όπως στην PCA, χρησιμοποιείται και ένας πίνακας Y που περιέχει ποσοτικές τιμές από μια ή περισσότερες ιδιότητες που χαρακτηρίζουν τα δείγματα του πίνακα X , π.χ. πυκνότητα, τιμή pH βιολογικών υγρών κτλ (Trygg et al., 2007). Η τεχνική PLS δημιουργεί ένα γραμμικό μοντέλο των δεδομένων, όπως και η PCA. Αντί όμως να χρησιμοποιεί τα ιδιοδιανύσματα του πίνακα X που περιγράφουν τη μέγιστη διακύμανση των δεδομένων, η τεχνική PLS παράγει ένα στατιστικό μοντέλο που περιγράφει τη συσχέτιση ανάμεσα στα δεδομένα και της ιδιότητας που μας ενδιαφέρει όπως είναι καταχωρημένη στον πίνακα Y , βάσει των εξισώσεων: $X = TP' + E'$ και $Y = TC' + F$. Η εφαρμογή της PLS σε προβλήματα ταξινόμησης γίνεται με χρήση της *Discriminant Analysis* (DA), όποτε και ονομάζεται (PLS-DA), όπου ο πίνακας Y

περιέχει τώρα ποιοτικές τιμές (ψευδομεταβλητές) που χαρακτηρίζουν τα δείγματα, όπως γένος ή νόσος (Keun, 2006, Trygg et al., 2007). Στην περίπτωση αυτή ο Y είναι πίνακας στήλη με μεταβλητές ταξινόμησης, π.χ. 1 αν το δείγμα ανήκει σε μια συγκεκριμένη ομάδα και 0 αν δεν ανήκει. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται μια κατάλληλη περιστροφή των αξόνων προβολής, ώστε να προσδιοριστούν εκείνες οι λανθάνουσες μεταβλητές που παρέχουν το βέλτιστο διαχωρισμό μεταξύ των υπό μελέτη ομάδων, καθώς δίνεται μεγαλύτερη βαρύτητα στις παραμέτρους που τις διαφοροποιούν (Eriksson et al., 2001, p.193), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.24** (Keun, 2006).

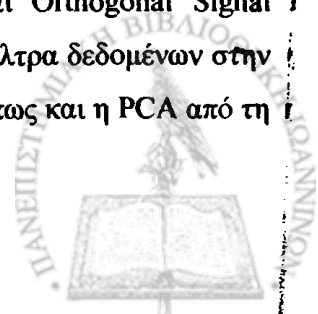


Εικόνα 1.24 Εφαρμογή της PLS-DA για τη δημιουργία στατιστικού μοντέλου ταξινόμησης.

Πάνω αριστερά: φάσματα δύο διαφορετικών ομάδων. Πάνω δεξιά: πίνακας ταξινόμησης Y για ένα στατιστικό μοντέλο 2 ομάδων. Κάτω αριστερά: γράφημα συντεταγμένων του PCA μοντέλου. Κάτω δεξιά: γράφημα συντεταγμένων του PLS-DA μοντέλου που δείχνει το διαχωρισμό των 2 ομάδων (Keun, 2006).

1.3.5 Orthogonal Signal Correction, OSC

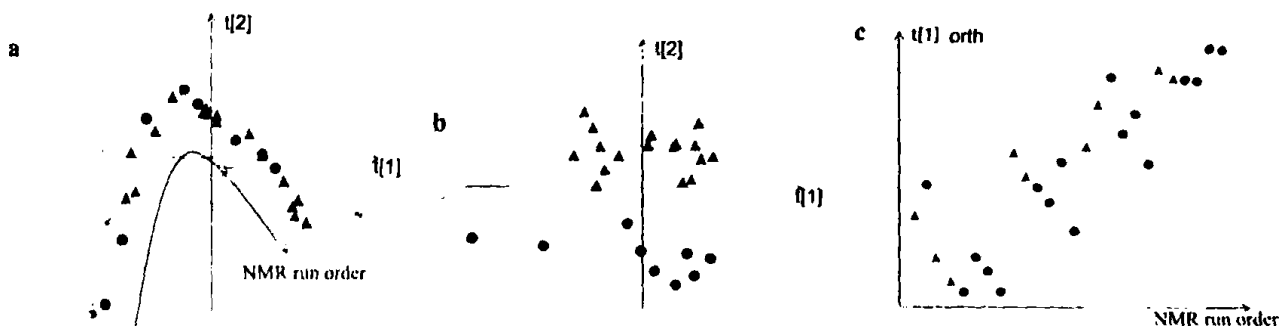
Με τις τεχνικές αυτές είναι δυνατόν να ενισχυθεί η ικανότητα πρόβλεψης των πολυμεταβλητών δεδομένων σε στατιστικά μοντέλα, με την αφαίρεση παρ'αγόντων που μπορούν να την επηρεάσουν, όπως είναι το ποσοστό της διακύμανσης του πίνακα X , που δεν σχετίζεται με τη διακύμανση του πίνακα Y . Σε περιπτώσεις φασματοσκοπικών δεδομένων, όπως στην παρούσα διατριβή, τέτοιου είδους *συστηματική διακύμανση* (systematic variation) μπορεί να είναι η διατομική μεταβλητότητα που παρατηρείται στις ομάδες πληθυσμών σε κλινικές ή πειραματικές μελέτες, καθώς και τυχόν διαφοροποιήσεις της γραμμής βάσης των φασμάτων (baseline drift) (Eriksson et al., 2001, p. 229-230). Για την αφαίρεση της μη συστηματικής πληροφορίας οι Wold και συνεργάτες ανέπτυξαν μια τεχνική φίλτραρισματος φασματοσκοπικών δεδομένων, η οποία ονομάζεται Orthogonal Signal Correction, OSC (*Ορθοκανονική Διόρθωση Σήματος*) (Wold et al., 1998). Τα φίλτρα δεδομένων στην OSC καθώς και γενικά σε άλλες τεχνικές διόρθωσης σήματος, περιγράφονται όπως και η PCA από τη



σχέση $X = TP' + E$, όπου όμως με X συμβολίζεται ο πίνακας των μη φιλτραρισμένων και με E ο πίνακας των φιλτραρισμένων φασματοσκοπικών δεδομένων.

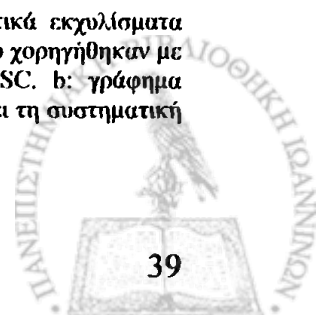
Ο αντικειμενικός σκοπός της προσέγγισης OSC είναι η αφαίρεση του ποσοστού της πληροφορίας των δεδομένων του πίνακα X που είναι μαθηματικά ανεξάρτητη από τα δεδομένα του όποιου πίνακα Y ορίζεται κάθε φορά. Η OSC είναι δηλαδή μια τεχνική που βασίζεται στην PLS και χρησιμοποιεί τον πίνακα Y για να κατασκευάσει ένα συγκεκριμένο φίλτρο δεδομένων για τον πίνακα X . Γραφικές παραστάσεις παρόμοιες με αυτές των τεχνικών PLS και PLS-DA μπορούν επίσης να χαραχθούν, ώστε αφενός μιν να προσδιορισθεί η πληροφορία που έχει αφαιρεθεί από τον πίνακα X , αφετέρου δε να βελτιωθεί ο διαχωρισμός των υπό μελέτη ομάδων (Eriksson et al., 2001, p. 231).

Πιο συγκεκριμένα, η πληροφορία της οποιασδήποτε ομάδας στην οποία μπορεί να ανήκουν τα δείγματα, συμπεριλαμβάνεται στην ανάλυση και ορίζει τον πίνακα Y , όπως στην περίπτωση της PLS-DA τεχνικής (ποιοτικά δεδομένα με μεταβλητές κατηγοριοποίησης 0, 1 κτλ.). Αρχικά υπολογίζεται η πρώτη PC, ή αλλιώς score vector (διάνυσμα συντεταγμένων), t , που είναι ένας κατάλληλος γραμμικός συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων και περιγράφει το μέγιστο διαχωρισμό των δειγμάτων με βάση την ομάδα που ορίστηκε στον πίνακα Y (Gavaghan et al., 2002). Στη συνέχεια υπολογίζεται το διάνυσμα μεγαλύτερου μήκους (longest vector) που είναι ορθογώνιο στον Y , t^* . Το διάνυσμα αυτό περιέχει τη μέγιστη πηγή διακύμανσης που δεν σχετίζεται με την ομάδα στην οποία ανήκουν τα δείγματα παρέχοντας παράλληλα μια καλή περιγραφή των φασματοσκοπικών δεδομένων και δίνεται από τη σχέση: $t^* = (1 - Y(Y'Y)^{-1}Y')t$ (Wold et al., 1998). Στο επόμενο βήμα υπολογίζεται το αντίστοιχο loading vector (διάνυσμα φορτίων), p^* , του διανύσματος μεγαλύτερου μήκους t^* και το γινόμενο του ορθογώνιου score με το loading vector, TP' , αφαιρείται από τα φασματοσκοπικά δεδομένα. Με γραφική απεικόνιση των OSC συντεταγμένων t^* και φορτίων p^* μπορεί να προσδιορισθεί η πηγή της διακύμανσης που αφαιρέθηκε, ενώ ο πίνακας των φιλτραρισμένων δεδομένων E , χρησιμοποιείται για την δημιουργία στατιστικών μοντέλων PCA και PLS. Στην **Εικόνα 1.25a**,



Εικόνα 1.25 Εφαρμογή της PLS-DA για τη δημιουργία στατιστικού μοντέλου ταξινόμησης.

Εφαρμογή της τεχνικής OSC σε τοξικολογική μελέτη με φασματοσκοπικά δεδομένα NMR από ηπατικά εκχυλίσματα επίμων για την απομάκρυνση της συστηματικής διακύμανσης λόγω πειραματικών συνθηκών. Επίμνες που χορηγήθηκαν με παρακεταμόλη, (\blacktriangle), επίμνες ελέγχου (\bullet): a: γράφημα συντεταγμένων PCA πριν την εφαρμογή OSC. b: γράφημα συντεταγμένων PCA μετά την εφαρμογή OSC. c: Η απεικόνιση της ^1H συνιστώσας που αφαιρέθηκε δείχνει τη συστηματική διακύμανση λόγω μεταβολής της θερμοκρασίας κατά τη λήψη των φασμάτων (Holmes and Antti, 2002).



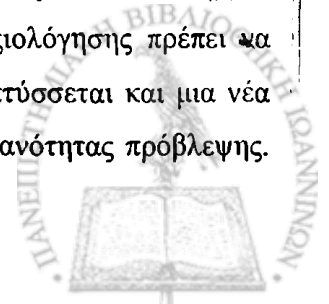
για παράδειγμα, φαίνεται ότι τα δείγματα σε μια ανάλυση PCA έχουν μια σχετικά προσανατολισμένη και όχι τόσο τυχαία κατανομή, που θέτει υποψία για την παρουσία συστηματικής διακύμανσης. Με την εφαρμογή της τεχνικής OSC αφαιρείται η συστηματική διακύμανση που περιείχαν τα δεδομένα και αποκαλύπτεται ένας πλήρης διαχωρισμός των υπό μελέτη ομάδων. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, η συστηματική πληροφορία οφειλόταν σε μια μικρή αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων NMR.

1.3.6 Αξιολόγηση των στατιστικών μοντέλων

Όπως αναφέρθηκε, οι κατηγορίες των εποπτευόμενων τεχνικών χρησιμοποιούνται κυρίως για την ταξινόμηση δειγμάτων. Αυτό πραγματοποιείται με τη δημιουργία σε πρώτο στάδιο μιας ομάδας βαθμονόμησης (training set) με παρατηρήσεις (δείγματα) που ανήκουν σε συγκεκριμένα και προκαθορισμένα σύνολα μιας μελέτης, π.χ. 2 πληθυσμοί ασθενών – υγιών ατόμων. Η ομάδα αυτή χρησιμοποιείται στη συνέχεια για να δημιουργηθούν ένα ή περισσότερα στατιστικά μοντέλα με βάση τις αρχικές μεταβλητές X . Η αξιοπιστία των στατιστικών μοντέλων ελέγχεται μέσω μιας ομάδας αξιολόγησης (test or validation set) που αποτελείται από «γνωστά» δείγματα των προκαθορισμένων συνόλων, δηλαδή δείγματα που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση. Αν το στατιστικό μοντέλο κατατάξει τα δείγματα αυτά ορθά στα αντίστοιχα προκαθορισμένα σύνολα, τότε θεωρείται αξιόπιστο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλέψει μια ομάδα «αγνώστων» δειγμάτων, δηλαδή καινούριων δειγμάτων που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση (Lindon et al., 2001, p.10).

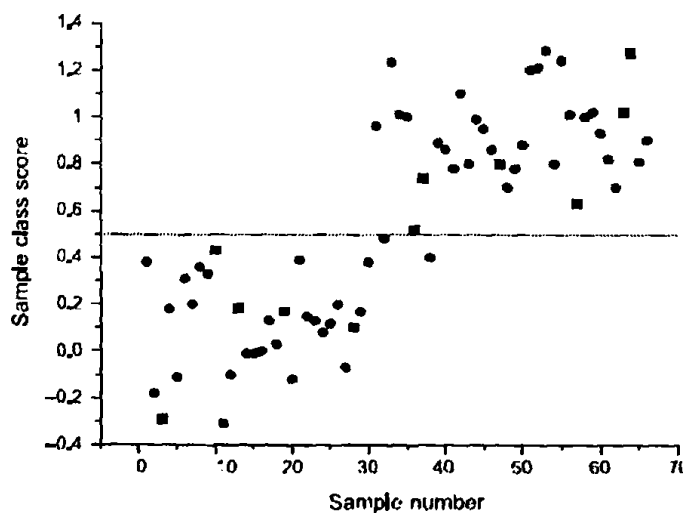
Σύμφωνα με τις οδηγίες της διεθνούς ομάδας εργασίας SMRS (Standard Metabolic Reporting Structures working group, SMRS), το πρώτο βήμα ελέγχου της αξιοπιστίας ενός μοντέλου είναι η προαναφερθείσα διασταυρούμενη αξιολόγηση (cross-validation), η οποία ξεχωρίζει τα αξιοποιήσιμα δεδομένα από το θόρυβο αποτρέποντας το overfit του μοντέλου και παρέχοντας έτσι μια ρεαλιστική εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης (Lindon et al., 2005). Για να μπορεί να γίνει μια σωστή αποτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης ενός στατιστικού μοντέλου, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν δεδομένα τα οποία δεν ήταν διαθέσιμα κατά την δημιουργία του μοντέλου. Τα νέα αυτά δεδομένα ορίζουν την ομάδα εξωτερικής αξιολόγησης, (prediction set) και η διαδικασία ονομάζεται εξωτερική αξιολόγηση (external data validation). Στην περίπτωση αυτή, το στατιστικό μοντέλο καλείται να ταξινομήσει τα δείγματα ως προς τις ομάδες στις οποίες ανήκουν ή να προβλέψει κάποια ιδιότητά τους. Στην παρούσα διατριβή, η ικανότητα πρόβλεψης των στατιστικών μοντέλων αφορά την ταξινόμηση δειγμάτων (φασμάτων NMR από ούρα) που προέρχονται από ομάδες υγιών ή ασθενών ατόμων.

Είναι πιθανό η ικανότητα πρόβλεψης ενός στατιστικού μοντέλου να είναι ανεπαρκής επειδή τα δεδομένα της ομάδας εξωτερικής αξιολόγησης διέπονται από κάποιες νέες 'σχέσεις' που δεν υπήρχαν στην ομάδα βαθμονόμησης. Στις περιπτώσεις αυτές η ομάδα εξωτερικής αξιολόγησης πρέπει να ενσωματώνεται με την ομάδα βαθμονόμησης, ένα καινούριο μοντέλο να αναπτύσσεται και μια νέα ομάδα αξιολόγησης να επιλέγεται, ώστε να γίνεται εκ νέου αποτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης.



Αυτό σημαίνει ότι ακολουθείται μια επαναλαμβανόμενη διαδικασία προκειμένου να δημιουργηθεί ένα αξιόπιστο στατιστικό μοντέλο, κατά την οποία γίνεται πολλές φορές εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψής του (Lindon et al., 2005).

Στις περιπτώσεις όπου ο αριθμός των δειγμάτων είναι μικρός ($n < 10$) ή δεν υπάρχουν διαθέσιμα νέα δεδομένα, ένας εναλλακτικός τρόπος αποτίμησης της ικανότητας πρόβλεψης ενός μοντέλου είναι μέσω της διαδικασίας της εσωτερικής αξιολόγησης (held-back data validation) με τη χρησιμοποίηση μιας κατάλληλης ομάδας εσωτερικής αξιολόγησης (test set). Η ομάδα αυτή δεν περιέχει καινούρια δεδομένα, αλλά προκύπτει από την τυχαία επιλογή μέρους εκείνων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αρχικά κατά τη διαδικασία βαθμονόμησης του στατιστικού μοντέλου. Συνήθως 10 – 30% των αρχικών δεδομένων επιλέγεται για να ορίσει την ομάδα εσωτερικής αξιολόγησης, αρκεί η επιλογή να είναι τυχαία και να περιλαμβάνονται δείγματα από όλες τις διακριτές ομάδες ή τάσεις ομαδοποίησης που παρατηρήθηκαν κατά τη διαδικασία βαθμονόμησης. Τέλος, και στις δυο περιπτώσεις αξιολόγησης πρέπει να υπολογίζεται και ένα ποσοστό επιτυχούς ταξινόμησης των δειγμάτων. Αυτό γίνεται συνήθως με την χάραξη ειδικών διαγραμμάτων, όπου η τεταγμένη y οριοθετεί τις επιμέρους ομάδες στις οποίες ανήκουν τα δείγματα, ενώ η καταμέτρηση των δειγμάτων που ταξινομούνται ορθά ή όχι προσδιορίζει την ευαισθησία και την ειδικότητα του στατιστικού μοντέλου, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1.26**.



Εικόνα 1.26 Διάγραμμα ελέγχου της αξιοπιστίας (Y-Predicted scatter plot) κατά την εσωτερική αξιολόγηση ενός μοντέλου PLS-DA.

Πρόβλεψη της παρουσίας καρδιαγγειακής νόσου βάσει ενός στατιστικού μοντέλου PLS-DA χρησιμοποιώντας ^1H NMR φάσματα ορού με την ευθεία $y=0.5$ στο διάγραμμα ελέγχου της αξιοπιστίας να οριοθετεί τις κατηγορίες στις οποίες ανήκουν τα φάσματα των ασθενών. Οι ομάδες βαθμονόμησης συμβολίζονται με κύκλους: (●) για ασθενείς με φυσιολογικά αγγεία τεκμηριωμένα αγγειογραφικά (Normal Coronary Arteries, NCA) και (●) για ασθενείς με νόσο τριών αγγείων (Triple Vessel Disease, TVD). Αντίστοιχα, οι ομάδες εσωτερικής αξιολόγησης συμβολίζονται με τετράγωνα: (■) για τους NCA ασθενείς και με (■) για τους TVD ασθενείς (Lindon et al., 2004).

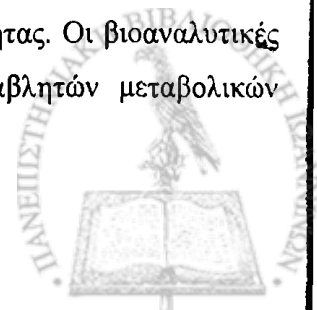
1.4 Εφαρμογή της $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπίας στη διερεύνηση της νεφρικής βλάβης

1.4.1 Η έννοια της Μεταβονομικής (Metabonomics)

Οι σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές συχνά χρησιμοποιούνται για την μέτρηση της απόκρισης των ζώντων οργανισμών, κυττάρων ή ιστών στη χορήγηση φαρμάκων ή άλλων εξωγενών ουσιών (xenobiotics), τόσο στο επίπεδο της γενετικής όσο και της έκφρασης των κυτταρικών πρωτεϊνών, με βάση τις γονιδιακές και πρωτεϊνικές μεθόδους αντίστοιχα. Οι τρέχουσες τεχνικές της βιοπληροφορικής (bio-informatics), της γενωμικής (genomics) και της πρωτεωμικής (proteomics), έχουν αποδείξει ότι αποτελούν πολύ δυναμικά εργαλεία για την μελέτη των διαφορετικών τρόπων βιολογικής απόκρισης στην έκθεση εξωγενών ουσιών. Παρόλα αυτά, οι τεχνικές αυτές ακόμα και αν συνδυαστούν, δεν παρέχουν το πλήθος της πληροφορίας που απαιτείται για την κατανόηση της συνολικής κυτταρικής λειτουργίας των ζώντων συστημάτων, διότι και οι δυο τεχνικές αγνοούν την δυναμική μεταβολική κατάσταση του οργανισμού.

Το 1999 οι Nicholson, Lindon και Holmes του τμήματος Βιολογικής Χημείας του Imperial College του Λονδίνου εισήγαγαν μια νέα έννοια, αυτή της *Μεταβονομικής* (Metabonomics) κατ' αναλογία με τις έννοιες της πρωτεωμικής και γενωμικής. Ο όρος *Μεταβονομική* ορίζεται ως ο ποσοτικός προσδιορισμός της πολυπαραμετρικής μεταβολικής απόκρισης των ζώντων συστημάτων σε παθοφυσιολογικές διεγέρσεις ή γενετικές τροποποιήσεις (Nicholson et al., 1999). Συνιστά δηλαδή ένα σύστημα προσέγγισης για την *in vivo* μελέτη των μεταβολικών προφίλ των βιολογικών υγρών, το οποίο στοχεύει στην συλλογή πληροφοριών που αφορούν τον μηχανισμό δράσης παθολογικών καταστάσεων, της τοξικότητας των φαρμάκων και της επίδρασης των γονιδίων. Τα μέλη της ερευνητικής ομάδας που επινόησαν την καινούρια αυτή έννοια χαρακτηριστικά αναφέρουν ότι συνέθεσαν τον όρο μεταβονομική από τις ελληνικές λέξεις «meta», για να εκφράσουν την *αλλαγή*, και «nomos» για να εκφράσουν ένα *σύστημα κανόνων*. Με το συνδυασμό των δυο αυτών λημμάτων, περιγράφεται η δημιουργία στατιστικών μοντέλων με βάση τις τεχνικές αναγνώρισης προτύπων (σύστημα κανόνων, nomos), τα οποία μπορούν να κατηγοριοποιήσουν αλλαγές του μεταβολισμού (αλλαγή, meta) (Lindon et al., 2004).

Ο σκοπός μίας τέτοιας διαδικασίας είναι να αποκαλύψει βιοχημικές πληροφορίες, οι οποίες αντικατοπτρίζουν πραγματικά βιολογικά συμβάντα (Nicholson et al., 2002). Για την διερεύνηση των περίπλοκων μεταβολικών προφίλ απαιτούνται αναλυτικές προσεγγίσεις, οι οποίες πρέπει να είναι μη εκλεκτικές αλλά παράλληλα «πλούσιες σε πληροφορία», όπως η φασματοσκοπία NMR, η φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS), η αέριος χρωματογραφία/φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography/Mass Spectrometry, GC/MS), η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) και οι τεχνικές οπτικής πυκνότητας. Οι βιοαναλυτικές τεχνικές NMR και MS είναι τα πιο ισχυρά μέσα δημιουργίας πολυμεταβλητών μεταβολικών



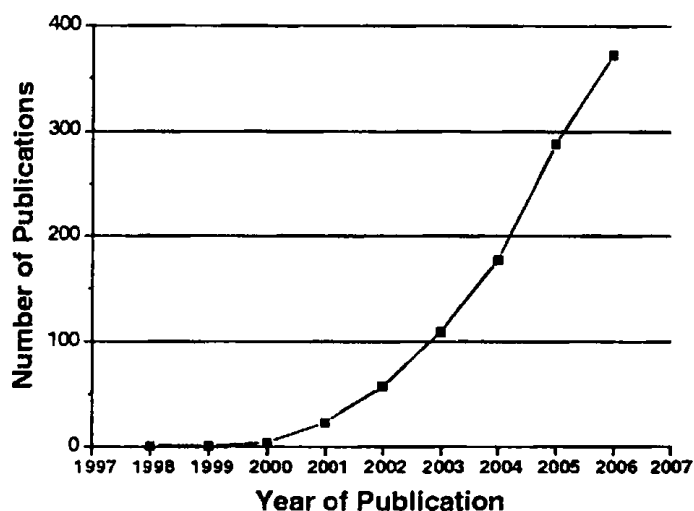
δεδομένων, των οποίων η ανάλυση και ερμηνεία βελτιστοποιείται με τις τεχνικές αναγνώρισης προτύπων (Nicholson et al., 1999, Lindon et al., 2007).

Η επινόηση της έννοιας της μεταβιομικής αποτέλεσε ουσιαστικά το επιστέγασμα πολυάριθμων και πρωτοποριακών μελετών των μελών της προαναφερθείσας ερευνητικής ομάδας κυρίως από τα μέσα της δεκαετίας του 1980 (Nicholson et al., 1984, 1985, Bales et al., 1984a-b, Lindon, 1986, Gartland et al., 1989a-b, Holmes et al., 1990a-b) και έκτοτε (Lindon et al., 2000, 2001, 2004, 2006, 2007). Η ομάδα αυτή επικεντρώθηκε κυρίως στη χρήση της φασματοσκοπίας NMR για την καταγραφή του μεταβολικού προφίλ βιολογικών υγρών, ιστών ή εκχυλισμάτων αυτών σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις ή τοξικές επιδράσεις κυρίως σε τρωκτικά (ποντικοί, επίμυες) και σε μικρότερο βαθμό στον άνθρωπο. Ο κύριος λόγος εστίασης σε μελέτες των βιολογικών υγρών με φασματοσκοπία NMR υψηλής διακριτικής ικανότητας και πρωτίστως πρωτονίου, είναι ότι η αναλυτική αυτή τεχνική παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες για την βιοχημική και τοξικολογική δράση ενός ευρέος φάσματος εξωγενών ουσιών, ενώ αντανακλά και την διαταραχή του μεταβολισμού σε παθολογικές καταστάσεις. Η φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ είναι μια μη επεμβατική τεχνική, όπου ένα απλό φάσμα λαμβάνεται συνήθως σε λίγα λεπτά με ελάχιστη ή καθόλου προεργασία του δείγματος. Τα πλεονέκτημα αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι παρέχεται η δυνατότητα της άμεσης καταγραφής οποιασδήποτε αλλαγής του μεταβολικού προφίλ του οργανισμού και παράλληλα της ανίχνευσης και ταυτοποίησης νέων ή μη αναμενόμενων μεταβολιτών που σχετίζονται με νόσο ή προσβολή ιστού, καθιστούν την τεχνική αυτή ως την πλέον κατάλληλη για την ανάπτυξη της μεταβιομικής.

Θα ήταν σκόπιμο στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι συχνά ο όρος Μεταβιομική συγχέεται ή ταυτίζεται με τον όρο Μεταβολομική (Metabolomics) (Goodacre et al., 2004, Fiehn et al., 2006). Η Μεταβολομική (Delneri et al., 2001) αφορά τη μελέτη του «μεταβολώματος» (metabolome) που αναφέρεται στο πλήρες σύνολο των μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους (εξωγενών ή ενδογενών) που μπορούν να υπάρξουν σε ένα ζωντανό κύτταρο, ιστό ή οργανισμό (Oliver et al., 1998, Oliver, 2000). Ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως ανάλυση του μεταβολώματος (metabolome analysis) το 1998 από τους Tweeddale et al. σε μια μελέτη διερεύνησης του φαινοτύπου του *Escherichia coli* (Tweeddale et al., 1998). Με βάση την επικρατέστερη άποψη στη διεθνή βιβλιογραφία, η μεταβιομική είναι συνδεδεμένη περισσότερο με τη φασματοσκοπία NMR, ενώ η μεταβολομική με τη φασματοσκοπία μάζης (Wishart, 2007). Η διαφοροποίηση όμως των δυο εννοιών δεν έγκειται τόσο στην αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται, αλλά όσο στο γεγονός ότι η μεταβολομική δίνει περισσότερο έμφαση στη μελέτη του συνολικού μεταβολικού προφίλ των κυττάρων, ενώ η μεταβιομική περιγράφει τις μεταβολικές αλλαγές που εντοπίζονται κυρίως στα βιολογικά υγρά.

Στη διεθνή βιβλιογραφία ωστόσο, η μεταβολομική είναι ο πιο διαδεδομένος όρος εκ των δυο, μιας και η μεταβιομική θεωρείται από τους επιστήμονες άλλοτε ως ταυτόσημη έννοια με τη μεταβολομική και άλλοτε ως υποκατηγορία αυτής (Reo, 2002). Στον τίτλο της παρούσας διατριβής οι όροι *μεταβιομική* και *μεταβολομική* έχουν αποδοθεί στα ελληνικά με τον μη διαδεδομένο όρο

«μεταβολονομική» (metabolonomics), ώστε να περιέχονται ταυτόχρονα και οι δυο έννοιες. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι μια αναζήτηση στην παγκόσμια ηλεκτρονική βάση βιβλιογραφικών αναφορών PubMed έδωσε για το μήνα Νοέμβριο 2007, 606 αναφορές για τον όρο metabolomics και μόνο 219 για τον όρο metabonomics. Ο αριθμός μάλιστα των δημοσιεύσεων μέχρι και το 2006 με πεδίο αναζήτησης τον όρο “metabolom” στη ηλεκτρονική βάση ISI Web of Knowledge, φαίνεται ότι ακολουθεί εκθετική πορεία και εκτιμάται ότι θα συνεχίσει με το ρυθμό αυτό και τα επόμενα χρόνια (Εικόνα 1.27).

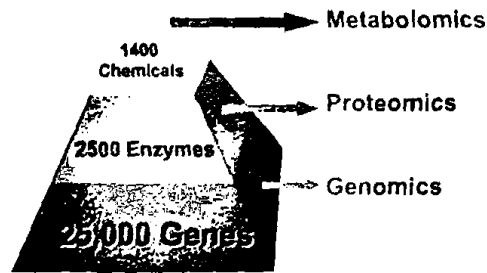


Εικόνα 1.27 Κατανομή των βιβλιογραφικών αναφορών την περίοδο 1998-2006 με πεδίο αναζήτησης τον όρο “metabolom” στη ηλεκτρονική βάση ISI Web of Knowledge (Oldiges et al., 2007).

Συμπερασματικά, για να γίνει καλύτερα κατανοητή η συνάφεια και συμπληρωματικότητα των τεχνικών “omics”, όπως συχνά αναφέρονται στη βιβλιογραφία η γενωμική, η πρωτεωμική και η μεταβολονομική, παρατίθενται σχηματικά τα εξής: Δεδομένου ότι αλλαγές στην έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μπορούν σε μερικές περιπτώσεις να επιφέρουν αλλαγές στο μεταβολισμό, θεωρητικά είναι εφικτό ανιχνεύοντας τις διαταραχές του μεταβολισμού, να εξάγονται συμπεράσματα για τις αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση και το αντίστροφο. Οι λειτουργίες όμως τόσο του κυττάρου όσο και του οργανισμού είναι συνεχείς και αλληλοεξαρτώμενες με αποτέλεσμα να είναι ανιχνεύσιμες σε διάφορα επίπεδα οργάνωσης, όπως της γονιδιακής έκφρασης, της πρωτεϊνοσύνθεσης και του μεταβολισμού. Η μεταβολομική δεν προϋποθέτει την πλήρη ανάλυση του γονιδιώματος προκειμένου να μελετηθούν οι μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους ενός οργανισμού, οι οποίοι συνήθως ανιχνεύονται ευκολότερα καθώς είναι σημαντικά λιγότεροι τόσο σε σχέση με τα γονίδια όσο και τις πρωτεΐνες (Βελεγράκη και Καμπούρης, 2003). Ωστόσο, η τεχνική αυτή δεν είναι πανάκεια για την επίλυση διαγνωστικών προβλημάτων καθώς αποτελεί ένα μικρό μέρος «της πυραμίδας της ζωής» και εκτός των αλληλοεπιδράσεων της με τη γενωμική και την πρωτεωμική, επηρεάζεται σημαντικά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες αλλά και παράγοντες βιολογικής μεταβλητότητας στο άνθρωπο (Εικόνα 1.28). Αυτό που σίγουρα προσφέρει είναι μια προσέγγιση από την «κορυφή της



πυραμίδας» και μπορεί έτσι να βοηθήσει στην κατανόηση των πολύπλοκων μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα σε έναν οργανισμό (Wishart, 2005).



Εικόνα 1.28 Η «πυραμίδα της ζωής» που απεικονίζει τη σχέση της γενωμικής, της πρωτεωμικής και της μεταβολομικής στον άνθρωπο.

Σε κάθε τμήμα της πυραμίδας φαίνεται ο εκτιμώμενος αριθμός των γονιδίων, ενζύμων και μεταβολιτών > 1μM (Wishart, 2005).

1.4.2 Εφαρμογή της $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπίας στη διερεύνηση της νεφρικής βλάβης

Η $^1\text{H-NMR}$ μεταβολομική μελέτη των βιολογικών υγρών έχει επικεντρωθεί κατά κύριο λόγο στη λεπτομερή διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των ούρων σε διάφορες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις και ιδιαίτερα στις τοξικές επιδράσεις εξωγενών ουσιών (Nicholson and Wilson, 1989, Videen and Ross, 1994).

1.4.2.1 Μελέτες σε πειραματόζωα

Για τη διερεύνηση της νεφρικής δυσλειτουργίας ή βλάβης, η εφαρμογή των τεχνικών αναγνώρισης προτύπων στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ των ούρων έχει εστιαστεί αποκλειστικά σχεδόν σε μελέτες με πειραματόζωα. Αυτό ισχύει τόσο στις πρωταρχικές μελέτες εφαρμογής των τεχνικών αυτών (Gartland et al., 1990b, 1990c, 1991), όσο και μετά το 1999 όταν συστηματοποιήθηκαν υπό την έννοια της μεταβολομικής (Robertson et al., 2000, Griffin et al., 2001, Lenz et al., 2004a, 2005, Waters et al., 2005, Wu et al., 2005, Holmes et al., 2006, Zhang et al., 2006, Espandiari et al., 2007). Το σκεπτικό της πλειονότητας των μελετών αυτών, ήταν η χορήγηση σε πειραματόζωα νεφροτοξικών ουσιών (νεφροτοξινών) που προσβάλλουν συγκεκριμένες περιοχές του νεφρού, η συλλογή δειγμάτων ούρων σε καθορισμένες χρονικές στιγμές και η καταγραφή των σχετικών φασμάτων $^1\text{H-NMR}$. Από τις πρώτες κύριες μελέτες φάνηκε ότι, αφενός η σύσταση του φάσματος NMR εξαρτάται ισχυρά από το σημείο δράσης της νεφροτοξίνης στην οποία έχει εκτεθεί το πειραματόζωο (Gartland et al., 1989a-b, 1990a, Holmes et al., 1990a), αφετέρου δε ότι είναι τουλάχιστον το ίδιο ευαίσθητη με τις συμβατικές βιοχημικές μεθόδους (Murgatroyd et al., 1992). Οι πολυάριθμες εργασίες που ακολούθησαν κατέστησαν σαφές ότι κάθε νεφροτοξίνη ή ομάδα νεφροτοξινών προκαλεί χαρακτηριστικές αλλαγές στις συγκεντρώσεις και τη σύσταση των ενδογενών μεταβολιτών που απεκκρίνονται στα ούρα, οι οποίες παρέχουν πληροφορίες για την θέση και τον μηχανισμό της

τοξικής δράσης (Anthony et al., 1992, Feng et al., 2002). Σε όλες σχεδόν τις μελέτες ο ακριβής εντοπισμός της νεφρικής βλάβης γίνονταν με βάση τη βιοψία νεφρού που υποβάλλονταν τα πειραματόζωα και στη συνέχεια με συσχέτιση των ιστοπαθολογικών ευρημάτων με τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ (Harrison et al., 1991, Anthony et al., 1992, 1994a-c, Halligan et al., 1995, Holmes et al., 1995a-b, 1996, 1997).

Η επιμέρους ανάλυση των τοξικολογικών αυτών μελετών είναι εκτός των πλαισίων της παρούσης εργασίας, καθώς μια ενδελεχής παρουσίαση αυτών παρατίθεται σε δυο εκτενείς βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις του 1989 και 1999 (Nicholson and Wilson, 1989, Lindon et al., 1999). Συνοπτικά μόνο αναφέρεται ότι νεφροτοξίνες που προσβάλλουν το εγγύς σωληνάριο προκαλούν μια σειρά από επαναλήψιμες χρονοεξαρτώμενες αλλαγές του μεταβολικού προφίλ των ούρων, που συνιστούν γλυκοζουρία, αμινοξουρία και αύξηση της απέκκρισης του γαλακτικού οξέος (Gartland et al., 1989a). Αντίστοιχα, τοξικές ουσίες που προσβάλλουν τη μυελώδη περιοχή του νεφρού συνθέτουν ένα διαφορετικό μεταβολικό προφίλ στα ούρα, όσον αφορά τη βιοχημική σύσταση και την χρονική εξέλιξη της βλάβης (Holmes et al., 1990a). Συγκεκριμένα, η νέκρωση της νεφρικής θηλής (renal papillary necrosis) λόγω χορήγησης των τοξικών αυτών ουσιών οδηγεί αρχικά σε αύξηση των συγκεντρώσεων στα ούρα της διμεθυλαμίνης (DMA) και του τριμέθυλο-*N*-αμινοξειδίου (TMAO) και μετά το πρώτο 24ώρο σε αυξημένη απέκκριση της διμεθυλογλυκίνης (DMG) και των οξέων ηλεκτρικό και οξικό καθώς και σε μειωμένη απέκκριση του TMAO και του 2-οξογλου-ταρικού οξέος (Gartland et al., 1989b). Οι μεταβολίτες αυτοί έχουν μάλιστα θεωρηθεί και ως πιθανοί δείκτες βλάβης της νεφρικής θηλής (Holmes et al., 1990a, Gartland et al., 1989b).

Για την καλύτερη συστηματοποίηση και αξιοποίηση της βιοχημικής πληροφορίας που περιέχουν τα πολύπλοκα μεταβολικά προφίλ των ούρων, η ερευνητική ομάδα των Nicholson και Lindon εφήρμοσε για πρώτη φορά το 1990 τις τεχνικές PR στη διερεύνηση της νεφρικής βλάβης (Gartland et al., 1990b). Συγκεκριμένα, έγινε χορήγηση σε αρουραίους 2 διαφορετικών ομάδων νεφροτοξινών που προσβάλλουν επιλεκτικά το νεφρό: 4 που προκαλούν νέκρωση στο εγγύς σωληνάριο (HCBD, PAP, CrO_4 , HgCl_2)¹ και 2 που προκαλούν νέκρωση της νεφρικής θηλής (PI, BEA)¹. Εν συνεχεία, σε 4 χρονικές στιγμές μετά από τη χορήγηση (0, 8, 24 και 48 ώρες) προσδιορίστηκαν 5 παράμετροι συμβατικού βιοχημικού ελέγχου (γλυκόζη και ουρία ορού, γGT και NAG ούρων και ρυθμός ροής ούρων)² και έγινε καταγραφή των αντίστοιχων φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ των ούρων. Ο σκοπός της πρωτοποριακής για την εποχή μελέτης ήταν η εφαρμογή της τεχνικής PCA στα δεδομένα αφενός του κλασικού βιοχημικού ελέγχου και αφετέρου της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ και παράλληλα η σύγκριση των αντίστοιχων στατιστικών μοντέλων ως προς την ορθότητα της ταξινόμησης για την εκάστοτε περιοχή νεφρικής βλάβης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ των ούρων προσέφερε όχι μόνο καλύτερο διαχωρισμό της σωληναριακής βλάβης από τη βλάβη στη

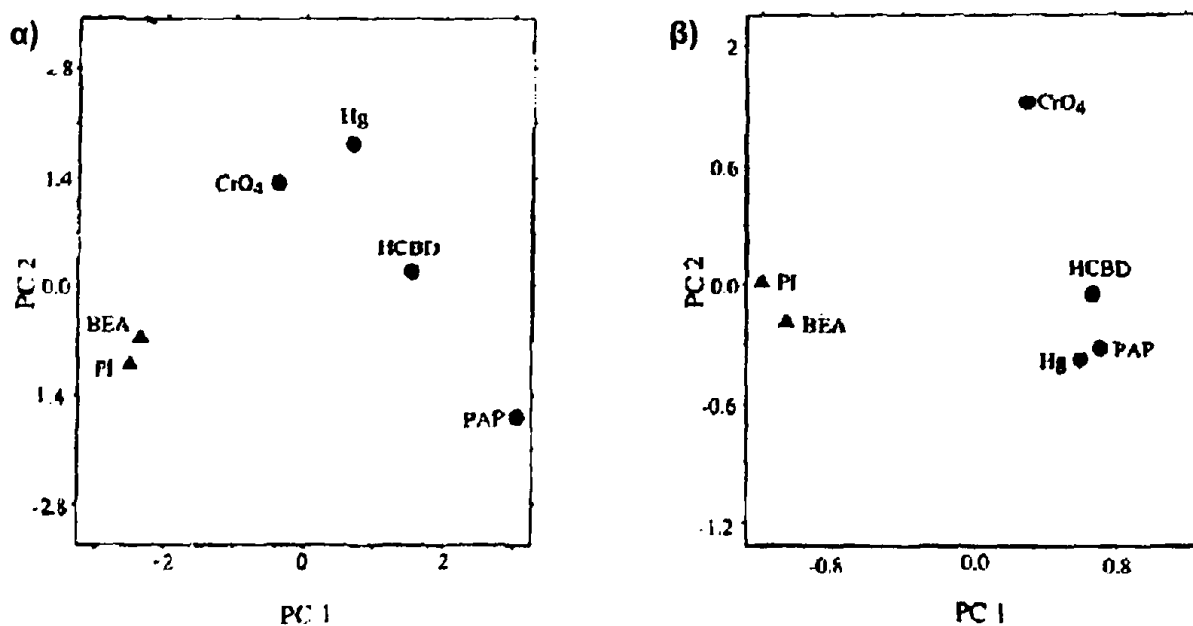
¹ HCBD: hexachlorobutadiene, PAP: *p*-aminophenol, BEA: bromoethanamine, PI: propyleneimine.

² γGT : γ -glutamyltransferase, NAG: *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase.



νεφρική θηλή σε σχέση με το βιοχημικό έλεγχο, αλλά μπόρεσε να διακρίνει και τη νέκρωση στην εσπειραμένη μοίρα (*pars convoluta*) του εγγύς σωληναρίου λόγω του CrO_4 από τη νέκρωση στην ορθή μοίρα (*pars recta*) λόγω των HCBD, PAP και HgCl_2 (Εικόνα 1.29).

Οι δυο επόμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν την επιτυχή εφαρμογή των τεχνικών PR στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ των ούρων σε πειραματόζωα στα οποία είχαν χορηγηθεί τοξικές ουσίες που προσβάλλουν αφενός τη φλοιώδη και μυελώδη περιοχή του νεφρού και αφετέρου το ήπαρ (Gartland et al., 1990c, 1991). Στις μελέτες αυτή έγινε ορθή ταξινόμηση των μεταβολικών δεδομένων $^1\text{H-NMR}$ ανάλογα με την εκάστοτε ιστική βλάβη, σωστή πρόβλεψη των τοξικολογικών επιδράσεων μερικών επιπλέον τοξικών ουσιών και διερευνήθηκε η ανταπόκριση στη διαφορετική δοσολογία. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της διατροφής και του φύλου των πειραματόζωων στο μεταβολικό προφίλ των ούρων.



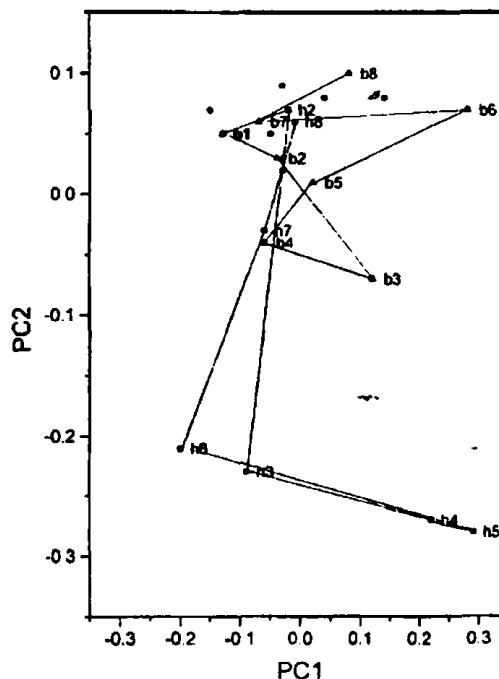
Εικόνα 1.29 Γραφήματα συντεταγμένων των δυο πρώτων PCs.

α) κλασικός βιοχημικός έλεγχος και β) φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ (Gartland et al., 1990b).

Η ιδιαίτερη επιτυχία των τριών αυτών μελετών την περίοδο 1990-1991 αποτέλεσε το έναυσμα για την μετέπειτα ολοένα και συχνότερη εφαρμογή των τεχνικών PR στη $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπία των ούρων με σκοπό την διερεύνηση της νεφρικής βλάβης και των σχετικών μηχανισμών βλάβης (Lindon et al., 2000). Είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι στο φάσμα NMR των 3 αυτών μελετών έγινε υπολογισμός των εντάσεων των κορυφών 16-18 επιλεγμένων μεταβολιτών, οι οποίες κωδικοποιήθηκαν ανάλογα με την αύξηση ή τη μείωση που παρουσίασαν σε σχέση με τις αντίστοιχες εντάσεις κορυφών των ίδιων μεταβολιτών στην ομάδα ελέγχου. Επομένως στα αρχικά στάδια εφαρμογής των τεχνικών PR στη φασματοσκοπία NMR, τα πολυμεταβλητά δεδομένα προέρχονταν από εντάσεις κορυφών προεπιλεγμένων μεταβολιτών και όχι από ολόκληρο το φάσμα NMR. Σε επόμενες μελέτες ως πολυμεταβλητά δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν πάλι οι εντάσεις κορυφών

προεπιλεγμένων μεταβολιτών, εφαρμόζοντας όμως τις unsupervised τεχνικές PCA και NLM (non linear mapping). Με τις μελέτες αυτές επετεύχθη σαφής διαφοροποίηση των μεταβολικών προφίλ των ούρων που καταγράφηκαν σε τοξικογενείς βλάβες της φλοιώδους και της μυελώδους περιοχής του νεφρού (Holmes et al., 1992b). Ειδικότερα στη περίπτωση των τοξικών ουσιών που προσβάλλουν τη φλοιώδη περιοχή, ένας επιμέρους διαχωρισμός των δειγμάτων ούρων κατέστη δυνατός αντανακλώντας τη διαφορετική βλάβη συγκεκριμένων περιοχών του εγγύς σωληναρίου (S_1 , S_2/S_3 τμήμα) (Anthony et al., 1994b).

Οι τεχνικές PR προσέφεραν επίσης τη δυνατότητα σχεδιασμού των λεγόμενων μεταβολικών τροχιών (metabolic trajectories). Η πρώτη φορά που επετεύχθη αυτό ήταν σε μια μελέτη PCA όπου χορηγήθηκαν σε αρουραίους οι τοξικές ουσίες BEA και $HgCl_2$ που προσβάλλουν επιλεκτικά τη μυελώδη και τη φλοιώδη περιοχή αντίστοιχα (Holmes et al., 1992a). Έγινε ποσοτικός προσδιορισμός 24 μεταβολιτών στο φάσμα NMR σε 8 χρονικές στιγμές κατά την εξέλιξη και υποχώρηση της νεφρικής βλάβης. Η γραφική παράσταση των δυο πρώτων PCs ανέδειξε διαφορετικές μεταβολικές τροχιές για κάθε νεφροτοξίνη, χαρακτηριστικές του μηχανισμού εξέλιξης και υποχώρησης της βλάβης, ενώ η ομάδα ελέγχου παρουσίασε μια μικρή διασπορά γύρω από το σημείο αναφοράς (Εικόνα 1.30). Η ανάλυση της κάθε μεταβολικής τροχιάς έδειξε ότι η βαλίνη, η ταυρίνη, το TMAO και η γλυκόζη συσχετίζονται με την τοξικότητα του $HgCl_2$ ενώ το οξικό οξύ, η μεθυλαμίνη, η διμεθυλαμίνη, το γαλακτικό οξύ και η κρεατίνη συσχετίζονται με την τοξικότητα της BEA.



Εικόνα 1.30 Γράφημα συντεταγμένων των δυο πρώτων PCs.

Δίπλα σε κάθε σημείο αναγράφεται η ημέρα της συλλογής των δειγμάτων ούρων και φαίνονται οι διακριτές μεταβολικές τροχιές για τη τοξική δράση του $HgCl_2$ (h, τετράγωνα) και της BEA (b, τρίγωνα) (Lindon et al., 2000). Τα σημεία με αστερίσκο χωρίς ένδειξη αντιστοιχούν στα δείγματα της ομάδας ελέγχου.

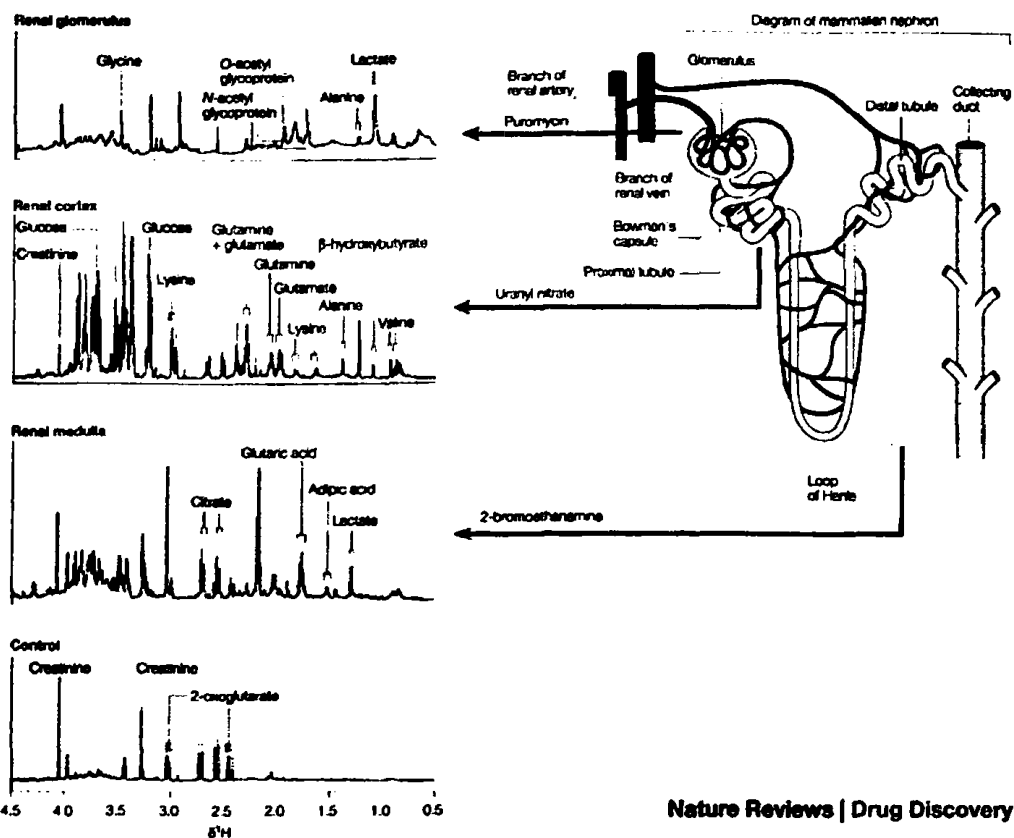


Την ίδια περίοδο έγιναν και οι πρώτες προσπάθειες ανάπτυξης μεθόδων για μια πιο αντικειμενική ανάλυση των φασμάτων NMR, δοκιμάζοντας τεχνικές τεμαχισμού και ψηφιοποίησης αυτών σε διαδοχικές περιοχές χημικής μετατόπισης, ώστε να αποφευχθεί η μέχρι τότε υποκειμενική διαδικασία επιλογής συγκεκριμένων μεταβολιτών (Farrant et al., 1992). Η πρώτη τοξικολογική μελέτη που έγινε εφαρμόζοντας την τεχνική PCA σε ψηφιοποιημένα δεδομένα $^1\text{H-NMR}$ για την διερεύνηση της νεφρικής βλάβης, έδειξε ότι η μέθοδος της ψηφιοποίησης είναι το ίδιο αποτελεσματική με αυτή των προεπιλεγμένων μεταβολιτών (Spraul et al., 1994). Παράλληλα για την ταξινόμηση και πρόβλεψη της τοξικογενούς νεφρικής βλάβης άρχισαν να εφαρμόζονται και οι supervised τεχνικές PR, όπως αυτή των τεχνητών νευρωνικών δικτύων (artificial neural network) (Anthony et al., 1995).

Το 1998 δημοσιεύθηκαν δυο τοξικολογικές μελέτες σε αρουραίους, συνδυάζοντας την τεχνική PCA με τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ των ούρων, που ουσιαστικά αποτέλεσαν το ορόσημο της καινοτόμου αυτής συνδυαστικής μεθοδολογίας για τις μετέπειτα ερευνητικές μελέτες μέχρι και σήμερα. Στην πρώτη μελέτη έγινε για πρώτη φορά εφαρμογή πλήρως αυτοματοποιημένων τεχνικών μείωσης δεδομένων (automatic data reduction techniques) διερευνώντας την πρόκληση ηπατικής βλάβης μετά τη χορήγηση τριών ηπατοτοξικών ουσιών (Beckwith-Hall et al., 1998). Παρατηρήθηκε ότι τα μεταβολικά προφίλ των ούρων και οι αντίστοιχες μεταβολικές τροχιές τοξικότητας διαφοροποιήθηκαν σαφώς για κάθε μια ηπατοτοξίνη ανάλογα με τον υποκείμενο μηχανισμό βλάβης. Την μελέτη αυτή ακολούθησε εν συνεχεία μια πιο εμπειριστατωμένη μελέτη, στην οποία χορηγήθηκαν συνολικά 10 τοξικές ουσίες που προσβάλλουν το ήπαρ και το νεφρό ¹ και διερευνήθηκαν τα αντίστοιχα μεταβολικά προφίλ των ούρων (Holmes et al., 1998). Έγινε σαφής διαφοροποίηση των μεταβολικών προφίλ των ούρων μεταξύ των ομάδων τοξικών ουσιών που προσβάλλουν το ήπαρ και εκείνων που προσβάλλουν επιλεκτικά το νεφρό. Συγκεκριμένα, πρόκληση βλάβης στο σπείραμα οδηγεί σε αυξημένη απέκκριση ταυρίνης και κρεατίνης και μειωμένη απέκκριση TMAO καθώς και των ενδιάμεσων προϊόντων του κύκλου του κιτρικού οξέος. Αλλοιώσεις στη μυελώδη περιοχή προκαλούν αύξηση των επιπέδων του γλουταρικού οξέος και μικρή μείωση των επιπέδων των οξέων κιτρικό και 2-οξογλουταρικό καθώς και του TMAO. Στο εγγύς σωληνάριο, βλάβη στην S_1 εσπειραμένη μοίρα οδηγεί σε παροδική γλυκοζουρία, ενώ στην S_2/S_3 ορθή μοίρα οδηγεί σε γλυκοζουρία με ταυτόχρονη αμινοζουρία και αύξηση των επιπέδων αρκετών οργανικών οξέων (Holmes et al., 1998). Οι παραπάνω διαφοροποιήσεις των μεταβολικών προφίλ των ούρων μεταβολές συνοψίζονται στην **Εικόνα 1.31**.

Η χρήση της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ των ούρων επεκτάθηκε και σε νεφρικές νόσους, όπως στη διερεύνηση της πολυκυστικής νόσου των νεφρών σε αρουραίους (Ogbron et al., 1997) και στην ευεργετική επίδραση της διατροφής με φυτικές πρωτεΐνες σόγιας (Ogborn et al., 1998a) και λιναρόσπορου (Ogborn et al., 1998b) στη διάμεση και σωληναριακή νεφρική λειτουργία για τη νόσο αυτή. Πολλές εργασίες έχουν δημοσιευθεί σχετικά με την αξία της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ των ού-

¹ 3 ηπατοτοξικές και 7 νεφροτοξικές που προσβάλλουν: 2 το σπείραμα, 1 τη μυελώδη περιοχή, 1 την S_1 εσπειραμένη μοίρα και 3 την S_2/S_3 ορθή μοίρα του εγγύς σωληναρίου.



Εικόνα 1.31 Μεταβολομική ανίχνευση της νεφροτοξικότητας.

Φάσματα $^1\text{H-NMR}$ 600MHz ούρων μετά από χορήγηση σε αρουραίους εξωγενών ουσιών που προσβάλουν επιλεκτικά το νεφρό σε σχέση με φάσμα ούρων από πειραματόζωο ελέγχου. Κάθε φάσμα αποτυπώνει το χαρακτηριστικό μεταβολικό προφίλ των ούρων που αντανακλά την εκάστοτε νεφρική βλάβη στο σπείραμα, στο σωληνάριο ή στη μυελώδη περιοχή που προκαλεί η αντίστοιχη νεφροτοξική ουσία (puromycin, uranyl nitrate, 2-bromoethanamine) (Nicholson et al., 2002).

ρων στην εκτίμηση της βλάβης της μυελώδους περιοχής του νεφρού λόγω ισχαιμίας κατά τη διάρκεια της συντήρησης νεφρικών μοσχευμάτων (cold-stored kidney transplants) χοίρων (Hauet et al., 1996, 1997a-b, 1999, 2000a). Έχει γίνει επιπλέον εκτενής διερεύνηση της προστατευτικής επίδρασης των διαφόρων υγρών συντήρησης στη νεφρική λειτουργία των μοσχευμάτων (Eugene et al., 1997, Hauet et al., 1997d, 1998, 2000b-c, Doucet et al., 2004), ενώ έχει προταθεί ότι η καταγραφή της απέκκρισης ορισμένων οσμολυτών (TMAO, DMA) καθώς και των οξέων κιτρικό, γαλακτικό και οξικό θα μπορούσε να συμβάλει στην πρόωπη ανίχνευση νεφρικών αλλοιώσεων κατά τη διάρκεια της συντήρησης και μετά τη μεταμόσχευση (Hauet et al., 1997c, 2000d-e, Baumert et al., 2000). Οι μελέτες νεφρικών παθήσεων με βάση την $^1\text{H-NMR}$ μεταβολομική των ούρων είναι λιγοστές και σε μια από αυτές έχει διερευνηθεί το μεταβολικό προφίλ των ούρων σε αρουραίους με υπέρταση και η πιθανή επίδραση της στη νεφρική λειτουργία (Akira et al., 2005).

Συμπερασματικά, η γνώση και η εμπειρία που αποκτήθηκε κατά τη δεκαετία 1989-1999 με τη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών στη νεφρική βλάβη και ως επί το πλείστον των ούρων, αποδόθηκε με τον όρο Μεταβολομική (Nicholson et al., 1999). Εκτοτε, με γνώμονα κυρίως την $^1\text{H-NMR}$ μεταβολομική, πραγματοποιήθηκαν δεκάδες τοξικολογικές μελέτες σε πειραματόζωα, οι οποίες επέτρεψαν την ορθή ταξινόμηση ή/και πρόβλεψη των δειγμάτων ούρων

ανάλογα με την περιοχή βλάβης ή νέκρωσης ιστού (Holmes et al., 2000, 2001, Solanky et al., 2003a, Williams et al., 2003a-b, Williams and Lock, 2004, 2005, Mally et al., 2005). Σε ορισμένες από τις μελέτες αυτές η φασματοσκοπία NMR συνδυάστηκε με τις τεχνικές HPLC ή MS (Lenz et al., 2004a, 2005). Ο τρόπος μάλιστα ανάλυσης και επεξεργασίας των φασμάτων, κυρίως αυτών της φασματοσκοπίας NMR, με τη χρήση τεχνικών PR στα πλαίσια κυρίως της μεταβιονομικής, καθιερώθηκε το 2002 από την ομάδα του Nicholson ως παγκόσμια πατέντα (Ebbels et al., 2002). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι με κατάλληλη επεξεργασία των μεταβολικών τροχιών τοξικότητας (όπως αυτή της **Εικόνας 1.30**) δίνεται η δυνατότητα σύγκρισης διαφορετικών μεταβιονομικών μελετών, δεδομένου ότι παρόμοιοι μηχανισμοί τοξικής δράσης αναμένεται να εμφανίζουν παρόμοια γεωμετρία στις αντίστοιχες μεταβολικές τροχιές (Keun et al., 2004, Bollard et al., 2005a).

Τέλος, εξαιρετικό ενδιαφέρον έχει η άποψη που δημοσιεύθηκε το 2006 στο *Nature*, ότι το μεταβολικό προφίλ ενός συγκεκριμένου πειραματόζωου (και κατ' επέκταση ενός οργανισμού) πριν τη χορήγηση μιας εξωγενούς ουσίας φαίνεται να περιέχει επαρκή πληροφορία, ώστε να επιτρέψει την πρόβλεψη της απόκρισης του μεταβολισμού μετά τη χορήγηση ή της τοξικής δράσης της χορηγούμενης ουσίας χωρίς πρότερη γνώση του γενωμικού προφίλ του πειραματόζωου (Clayton et al., 2006). Η ορθότητα της ιδέας αυτής ελέγχθηκε με τη χορήγηση παρακεταμόλης σε αρουραίους, ενός κοινού αναλγητικού για το οποίο υπάρχουν λεπτομερέστατα μεταβολικά δεδομένα (Bales et al., 1984b, Coen et al., 2003) και διαπιστώθηκε ότι ισχύει σε μεγάλο βαθμό. Αυτό οδήγησε στην πρόταση ενός νέου όρου, της *Φαρμακο-μεταβιονομικής* (Pharmacometabonomics), που ορίζεται ως: «η πρόβλεψη της επίδρασης (π.χ. αποτελεσματικότητα ή τοξικότητα) ενός φαρμάκου ή μιας εξωγενούς παρέμβασης σε έναν συγκεκριμένο άνθρωπο, βασιζόμενη σε ένα μαθηματικό μοντέλο προ-παρεμβατικών μεταβολικών «αποτυπωμάτων» και η οποία ανοίγει το δρόμο στην εξατομικευμένη φαρμακευτική παρέμβαση (personalized drug treatment) (Clayton et al., 2006).

1.4.2.2 Μελέτες σε ανθρώπους

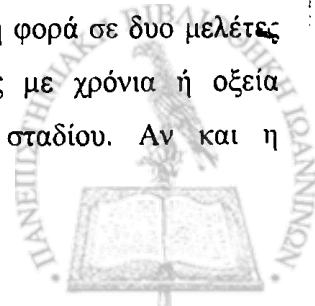
Παρόμοια αποτελέσματα με τις παραπάνω μελέτες νεφροτοξικότητας σε πειραματόζωα έχουν παρατηρηθεί και σε φασματοσκοπικές μελέτες $^1\text{H-NMR}$ των ούρων στον άνθρωπο. Η πλειονότητα των μελετών αυτών αφορά την ανίχνευση νεφρικής βλάβης λόγω έκθεσης σε εξωγενείς ουσίες που μπορεί να έχουν νεφροτοξικές ιδιότητες (Komoroski et al., 2000), όπως φαινόλη (Foxall et al. 1989), ζιζανιοκτόνα (Bairaktari et al. 1998, Imbenotte et al., 1999, 2003), λόγω δηλητηρίασης από υπερκατανάλωση μεθανόλης (Wahl et al., 1998, Janus et al., 2005) ή φαρμάκων, όπως παρακεταμόλης (Bales et al. 1988, Shockcor et al., 1996) και ασπιρίνης (Tsimihodimos et al., 2007), λόγω φαρμακογενούς τοξικότητας, όπως στην περίπτωση ραβδομύδωσης μετά τη χορήγηση στατινών και φιμπράτων (Bairaktari, et al., 2002) ή εξαιτίας άλλων παθολογικών καταστάσεων, όπως στον αποφρακτικό ίκτερο (Bairaktari et al., 2001). Επίσης παρατηρήθηκε ότι η χορήγηση ifosfamide κατά τη διάρκεια χημειοθεραπείας καρκινοπαθών, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση νεφροτοξικών παρενεργειών προκαλώντας

σωληναριακές διαταραχές (Foxall et al., 1996, 1997). Στις μελέτες αυτές η φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ των ούρων συνέβαλε τόσο στη πρόωμη ανίχνευση της νεφρικής δυσλειτουργίας, όσο και στην επιβεβαίωση επαναφοράς της φυσιολογικής νεφρικής λειτουργίας, στις περιπτώσεις εκείνες όπου οι σωληναριακές ή σπειραματικές αλλοιώσεις ήταν πλήρως ή μερικώς αναστρέψιμες.

Οι κλινικές εφαρμογές της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ στη διερεύνηση αμιγώς της νεφρικής δυσλειτουργίας λόγω νεφρικών ή άλλων συστηματικών νοσημάτων είναι μεν λίγες, αλλά ιδιαίτερα αξιόλογες. Στις πιο σημαντικές από αυτές συγκαταλέγεται αυτή των Bell et al., οι οποίοι ανέφεραν την ταυτοποίηση για πρώτη φορά του ΤΜΑΟ και την επιβεβαίωση της διμεθυλαμίνης (DMA) στο πλάσμα αιμοκαθαρώμενων ασθενών με χρόνια νεφρική ανεπάρκεια, καθώς και τη συσχέτιση της συγκέντρωσης του ΤΜΑΟ με τη σοβαρότητα της νόσου (Bell et al., 1991, Holmes et al., 1990b). Επίσης, σε άλλη μελέτη αναφέρεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του ΤΜΑΟ στα ούρα καθώς και ο λόγος (DMA/ΤΜΑΟ) μπόρεσαν να προσδιορίσουν τη δυσλειτουργία των νεφρικών μοσχευμάτων κατά την κλινική παρακολούθηση (follow-up) ασθενών που είχαν υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού (Foxall et al., 1993). Η αυξημένη απέκκριση του ΤΜΑΟ μπόρεσε έγκαιρα να συσχετισθεί με την απόρριψη νεφρικών μοσχευμάτων πριν από την ιστοπαθολογική επιβεβαίωση αυτής, είτε λόγω οξείας σωληναριακής νέκρωσης (Foxall et al. 1993), είτε λόγω νεφροτοξικής δράσης της κυκλοσπορίνης που είχε χορηγηθεί ως ανοσοκατασταλτικό (Le Moyec et al., 1993). Η παρατήρηση αυτή ήταν σε συμφωνία με άλλες μελέτες οι οποίες: α) είχαν αποδείξει την ύπαρξη αυτών καθώς και άλλων οσμωτικά ενεργών μεταβολιτών στη νεφρική θηλή (έσω μυελώδη μοίρα) πειραματόζωων (Balaban and Burg, 1987), (Gullans et al. 1988) και β) είχαν συσχετίσει την αυξημένη απέκκριση του ΤΜΑΟ, της DMA, της DMG και των οξέων ηλεκτρικό και οξικό σε αρουραίους μετά τη χορήγηση νεφροτοξικών ουσιών που προκαλούν νέκρωση της νεφρικής θηλής (Gartland et al. 1989b, Holmes et al. 1990a, 1997).

Σε μια άλλη αξιόλογη κλινική μελέτη μεταμόσχευσης νεφρού, αναφέρεται ότι επιλέγοντας μια κατάλληλη περιοχή του φάσματος και εφαρμόζοντας γραμμική διαχωριστική ανάλυση (linear discriminant analysis) και τεχνικές διασταυρούμενης ταξινόμησης (cross-validated classification), η $^1\text{H-NMR}$ φασματοσκοπία των ούρων μπόρεσε να δώσει ενδείξεις απόρριψης του μοσχεύματος νωρίτερα από τις κλασικές βιοχημικές μεθόδους με ευαισθησία 93% και ειδικότητα 96% (Smith and Baert, 2003). Συγκεκριμένα, ο NMR ταξινομητής (NMR classifier) της μελέτης αυτής προσδιόρισε την υποκλινική απόρριψη (subclinical rejection) του μοσχεύματος 3 εβδομάδες νωρίτερα από τις ενδείξεις απόρριψης που καθόριζε η αύξηση των επιπέδων της κρεατινίνης ορού πάνω από ένα συγκεκριμένο κατώφλι, επιτρέποντας έτσι την έγκαιρη θεραπευτική παρέμβαση και την ελαχιστοποίηση των κινδύνων που ενέχει η φαρμακευτική αγωγή ανοσοκατασταλτικών (Rush et al., 2000).

Η φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ των ούρων στη διερεύνηση της νεφρικής βλάβης σε ασθενείς με διάφορες μορφές σπειραματονεφρίτιδας εφαρμόστηκε για πρώτη και μοναδική φορά σε δυο μελέτες από την ομάδα της Knubovets το 1992, οι οποίες αφορούσαν ασθενείς με χρόνια ή οξεία σπειραματονεφρίτιδα, νεφρωσικό σύνδρομο και νεφρική νόσο τελικού σταδίου. Αν και η



φασματοσκοπική ανάλυση έγινε σε λυοφιλοποιημένα δείγματα ούρων, γεγονός που θα συντελούσε στη μη καταγραφή κορυφών από πτητικούς μεταβολίτες, η πρώτη μελέτη της ομάδας αυτής έδειξε ότι η διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολικό προφίλ των ούρων. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε ότι η διατροφή επηρεάζει το μεταβολικό προφίλ των ούρων υγιών ατόμων αντανακλώνοντας έτσι την προσαρμοστικότητα των μηχανισμών απέκκρισης στη φυσιολογική νεφρική λειτουργία, ενώ το αντίστοιχο προφίλ των νεφροπαθών φάνηκε ότι ήταν ανεξάρτητο τόσο της διατροφής όσο και της ενδοατομικής διακύμανσης (Knubovets et al., 1992). Η σύγκριση των μεταβολικών προφίλ των ούρων της ομάδας των νεφροπαθών με τα αντίστοιχα της ομάδας ελέγχου υγιών ατόμων των οποίων η διατροφή προσομοίαζε αυτή των ασθενών, έδειξε αλλοιώσεις του διάμεσου σωληναριακού ιστού καθώς και μεμονωμένες διαταραχές του εγγύς σωληναρίου ή της νεφρικής θηλής (Lundina et al. 1993). Ειδικότερα, παρατηρήθηκε ότι οι σωληναριακές αλλοιώσεις συνοδεύονται από αμινοξυρία (λευκίνη, γλυκίνη, αλανίνη, κ.α.) και γλυκοζυρία, ενώ δυσλειτουργία της μυελώδους περιοχής οδηγεί σε αυξημένη απέκκριση TMAO και DMA (Knubovets et al., 1992, Lundina et al. 1993).

Άλλες εργασίες που έχουν δημοσιευθεί σχετικά με τη χρήση της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ των ούρων στη διερεύνηση νεφρικών παθήσεων αφορούν την αποτίμηση της νεφρικής λειτουργίας φυσιολογικών και πρόωρων νεογνών (Foxall et al., 1995) καθώς και νεογνών με αμφοτερόπλευρη αποφρακτική ουροπάθεια (bilateral obstructive uropathy), των οποίων τα αντίστοιχα μεταβολικά προφίλ των ούρων είχαν καταγραφεί κατά τη διάρκεια της κύησης (Eugene et al., 1994). Έχει επίσης διερευνηθεί η νεφρική λειτουργία σε παιδιά και εφήβους με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I (Zurri et al., 2002) καθώς και σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (Messana et al., 1998).

Η δυναμική που διαθέτει η μεταβολομική ως μια «ολιστική» προσέγγιση του μεταβολισμού, έστρεψε καταρχήν το ενδιαφέρον των επιστημόνων στη διερεύνηση της επίδρασης ποικίλων παραγόντων στο βιοχημικό προφίλ των ούρων και του ορού στον άνθρωπο, όπως της διατροφής, της ενδοατομικής και διατομικής μεταβλητότητας, του φύλου, της ηλικίας και άλλων. Εκτενέστερη αναφορά για την επίδραση των παραγόντων αυτών γίνεται στα υποκεφάλαια της Συζήτησης της παρούσης διατριβής 4.1 και 4.3, καθώς και σε πρόσφατες βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις (Shockcor and Holmes, 2002, Lindon et al., 2004, 2006, Garrod et al., 2005, Bollard et al., 2005b).

Η πρώτη φορά που εφαρμόστηκαν σε κλινικές μελέτες οι τεχνικές PR σε συνδυασμό με τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ ήταν το 1994, όπου έγινε ταξινόμηση των δειγμάτων ούρων ασθενών με ενδογενείς διαταραχές του μεταβολισμού με βάση το μεταβολικό προφίλ των ούρων (Holmes et al., 1994). Την τελευταία οκταετία έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές κλινικές μελέτες με βάση τη $^1\text{H-NMR}$ μεταβολομική τόσο των ούρων όσο και του ορού. Όσον αφορά τον ορό, αυτές που παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον είναι οι τρεις αντικρουόμενες μελέτες που έχουν δημοσιευθεί στο *Nature Medicine* σχετικά με τη δυνατότητα πρόβλεψης της καρδιαγγειακής νόσου σε ασθενείς με εγκυτεστημένη νόσο τριών αγγείων τεκμηριωμένη αγγειογραφικά (Brindle et al., 2002, Kirschenlohr et al., 2006, Roussel et al., 2007). Σε ανάλογες πρόσφατες μελέτες έχει εφαρμοσθεί η $^1\text{H-NMR}$

μεταβολομική του ορού για τη διάκριση ασθενών με καρκίνο του επιθηλίου των ωοθηκών (epithelial ovarian cancer) (Odunsi et al., 2005) καθώς και φορέων του ιού HIV-1 (Hewer et al., 2006) σε σύγκριση με μια ομάδα ελέγχου υγιών ατόμων.

Σε αντίστοιχες μελέτες με βάση τη μεταβολομική ανάλυση των ούρων, έχει αναφερθεί η διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ σε ασθενείς με σκλήρυνση κατά πλάκας ('t Hart et al., 2003), ενώ σε άλλη μελέτη ήταν δυνατή η διαφοροποίηση ασθενών με βακτηριακή η διάμεση κυστίτιδα (bacterial/interstitial cystitis) τόσο σε σύγκριση με μια ομάδα υγιών ατόμων όσο και μεταξύ τους (Van et al., 2003-2004). Τέλος, σε μια πρόσφατη μελέτη αναφέρεται ότι ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II προκαλεί παρόμοιες αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ των ούρων στον αρουραίο, στο επίμυ και στον άνθρωπο, οι οποίες σχετίζονται με διαταραχές του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων καθώς και του μεταβολισμού των νουκλεοτιδίων και της μεθυλαμίνης (Salek et al., 2007). Μια άλλη κλινική μελέτη σχετικά με τη διερεύνηση της νεφρικής βλάβης με βάση τη ¹H-NMR μεταβολομική που δημοσιεύτηκε πρόσφατα, εξετάζει τη δυνατότητα διάγνωσης της διαβητικής νεφροπάθειας καταγράφοντας και συγκρίνοντας το μεταβολικό προφίλ του ορού των ασθενών σε σχέση με αυτό μιας ομάδας υγιών ατόμων (Makinen et al., 2006).

Είναι γεγονός ότι η εφαρμογή της NMR μεταβολομικής/μεταβολομικής στην κλινική εκτίμηση της νεφρικής λειτουργίας μεταμοσχευμένων ασθενών και στην έγκαιρη διάγνωση της απόρριψης του μοσχεύματος είναι ακόμη στα σπάργα (Gwinner, 2007). Ωστόσο, υπάρχει μια διάχυτη αισιοδοξία ότι η πρόοδος των τεχνικών αυτών θα συμβάλει τελικά στην ανάπτυξη και καθιέρωση μιας γρήγορης και μη επεμβατικής προσέγγισης για την κλινική παρακολούθηση μεταμοσχευμένων νεφροπαθών (Wishart, 2006). Εν τέλει αναφέρεται ότι μέχρι τη συγγραφή της παρούσης διατριβής, δεν είχε δημοσιευθεί κάποια κλινική μελέτη σχετικά με τη διερεύνηση της νεφρικής δυσλειτουργίας βάσει της ¹H-NMR μεταβολομικής ανάλυσης του μεταβολικού προφίλ των ούρων.



1.5 Σκοπός της εργασίας

Στην-παρούσα διατριβή διερευνάται η δυνατότητα ανίχνευσης, με μη επεμβατικά μέσα, της συνύπαρξης σωληναριακής βλάβης σε ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα. Για το σκοπό αυτό έγινε καταγραφή του μεταβολικού προφίλ των ούρων των ασθενών με βάση τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$, το οποίο επεξεργάστηκε με τεχνικές αναγνώρισης προτύπων (μεταβονομική) και συγκρίθηκε με τα ιστοπαθολογικά ευρήματα της βιοψίας νεφρού. Στα πλαίσια αυτά, προτείνεται και αναπτύσσεται μια μεθοδολογία για την ανάλυση των πολυμεταβλητών δεδομένων NMR και αξιολογούνται διάφορες τεχνικές όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων, τη λήψη των φασμάτων και την επεξεργασία των δεδομένων.

Στο πρώτο μέρος της εργασίας καταγράφεται το μεταβολικό προφίλ των ούρων μιας ομάδας υγιών ατόμων και διερευνάται η πιθανή επίδραση παραγόντων φυσιολογικής βιολογικής μεταβλητότητας, όπως το φύλο και η ηλικία. Στα πλαίσια αυτά είναι εξίσου σημαντικός ο προσδιορισμός τιμών αναφοράς και επιπέδων εμπιστοσύνης στον Ελληνικό πληθυσμό για τους κύριους μεταβολίτες που απεκκρίνονται στα ούρα.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης συγκρίνεται το NMR μεταβολικό προφίλ του ούρων των υγιών ατόμων με αυτό των ασθενών, με απώτερο σκοπό την ανεύρεση μη επεμβατικά ενδείξεων του βαθμού σοβαρότητας της βλάβης του σωληναριοδιάμεσου ιστού που συνοδεύουν τη σπειραματονεφρίτιδα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πληθυσμοί της μελέτης

2.1.1 Ομάδα υγιών ατόμων

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της διατριβής, το πρώτο στάδιο της μελέτης αφορούσε τη μεταβολομική ανάλυση ενός πληθυσμού υγιών ατόμων. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν δείγματα ατόμων που επισκέφτηκαν το Εξωτερικό Ιατρείο Λιπιδίων του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (Π.Γ.Ν.Ι.) στα πλαίσια μιας τυπικής ετήσιας ιατρικής εξέτασης, αφού πρώτα ενημερώθηκαν για την πιθανή συμμετοχή τους στο πρωτόκολλο αυτό. Τα κριτήρια επιλογής ήταν: τα άτομα να έχουν ηλικία πάνω από 21 έτη, δείκτη μάζας σώματος (Body Mass Index) μεταξύ 18 και 30, να μην λαμβάνουν κάποια συστηματική φαρμακευτική αγωγή και τα επίπεδα τιμών στα πλαίσια ενός καθιερωμένου βιοχημικού (τριγλυκερίδια, ολική και HDL χοληστερόλη, αλβουμίνη και ηπατικά ενζύμα ορού) και αιματολογικού ελέγχου (αιματοκρίτης, αιμοσφαιρίνη, αριθμός αιμοπεταλίων, λευκών και ερυθρών κυττάρων) να είναι εντός του εύρους των τιμών αναφοράς. Τα κριτήρια αποκλεισμού ήταν η υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η εμφάνιση κάποιας οξείας νόσου σε διάστημα 2 εβδομάδων πριν από τη συλλογή των δειγμάτων και η εφαρμογή θεραπευτικού σχήματος κατά τη διάρκεια των προηγούμενων 2-3 μηνών με οποιοδήποτε φάρμακο με πιθανές ηπατοτοξικές ή νεφροτοξικές παρενέργειες. Από τα άτομα αυτά ζητήθηκε να αποφύγουν ει δυνατόν τη λήψη οιονδήποτε φαρμάκων (συμπεριλαμβανομένων και μη συνταγογραφούμενων ευρείας χρήσεως) και την κατανάλωση οινοπνεύματος και ψαριών 24 ώρες πριν από τη δειγματοληψία, καθώς είναι γνωστό ότι οι παράγοντες αυτοί επηρεάζουν το μεταβολομικό προφίλ των ούρων.

Η ομάδα που μελετήθηκε περιελάμβανε αρχικά 127 υγιή άτομα ηλικίας μεταξύ 23 και 74 ετών. Πέντε άτομα εξαιρέθηκαν από τη μελέτη κατά την ανάλυση των δεδομένων NMR (βλ. Αποτελέσματα, 3.1.2). Στην ομάδα των 122 υγιών ατόμων που τελικά μελετήθηκε, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε δυο στάδια, στα οποία έγινε κατηγοριοποίηση υγιών ατόμων πρώτα με βάση το φύλο και κατόπιν με βάση την ηλικία τους.

2.1.2 Ομάδα ασθενών

Έγινε συλλογή 114 δειγμάτων ούρων και ορού από ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα των 2 συνεργαζόμενων Νεφρολογικών Κλινικών του Π. Γ. Ν. Ι. (89) και του Γενικού Νοσοκομείου Χατζηκώστα (25) που είχαν προγραμματιστεί να υποβληθούν σε διαδερμική βιοψία νεφρού. Τα κριτήρια συμμετοχής στη μελέτη ήταν εμφάνιση ήπιας πρωτεϊνουρίας ($< 2\text{g}/24\text{ώρο}$) και επίπεδα κρεατινίνης ορού $< 3\text{mg}/\text{dL}$. Σε 22 ασθενείς η βιοψία νεφρού δεν αξιολογήθηκε ή δεν πραγματοποιήθηκε είτε διότι δεν κατέστη εφικτό για τεχνικούς λόγους, είτε επειδή οι ίδιοι αρνήθηκαν για προσωπικούς λόγους. Σε 10 ασθενείς η βιοψία δεν εκτιμήθηκε ως επιτυχής, διότι το βιοπτικό

υλικό θεωρήθηκε ανεπαρκές για ιστολογική ταυτοποίηση, ενώ σε 2 περιπτώσεως δεν μπόρεσε να εξαχθεί κατάλληλο τμήμα νεφρικού ιστού (π.χ. σπληνικό παρέγχυμα ή μυϊκός ιστός). Τα δείγματα νεφρικού ιστού από τους ασθενείς της Νεφρολογικής Κλινικής του Π.Γ.Ν.Ι. εξετάστηκαν στο Παθολογοανατομικό Εργαστήριο του Π.Γ.Ν.Ι., ενώ αυτά της Νεφρολογικής Κλινικής του Νοσοκομείου Χατζηκώστα απεστάλησαν για ανάλυση στο Νεφροπαθολογοανατομικό Εργαστήριο του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ».

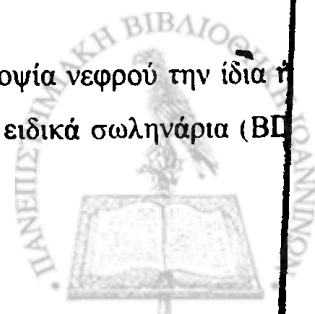
Οι 34 ασθενείς των οποίων οι βιοψίες δεν αξιολογήθηκαν ή δεν πραγματοποιήθηκαν ή ήταν ανεπιτυχείς αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Η ομάδα που αρχικά μελετήθηκε, περιελάμβανε 80 ασθενείς με διάφορους τύπους σπειραματονεφρίτιδας, οι οποίοι εμφάνισαν ήπια ή μέτρια έκπτωση νεφρικής λειτουργίας, αυξημένα επίπεδα κρεατινίνης ορού ή/και πρωτεϊνουρία με χρόνια νεφρική νόσο σταδίου 1-3 (National Kidney Foundation, 2002). Τρεις επιπλέον ασθενείς εξαιρέθηκαν κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των NMR δεδομένων (βλ. Αποτελέσματα, 3.2.2). Η ομάδα των 77 ασθενών που τελικά μελετήθηκε, συγκρίθηκε με 85 υγιή άτομα ίδιου φύλου και παρόμοιας ηλικίας τα οποία επελέγησαν από την ομάδα των 122 υγιών ατόμων που προαναφέρθηκε. Η συμμετοχή όλων των ατόμων έγινε ύστερα από ενημέρωσή τους για το σκοπό και τη μεθοδολογία της μελέτης.

2.1.3 Ιστοπαθολογική ανάλυση

Ο νεφρικός ιστός των ασθενών που υποβλήθηκαν σε βιοψία εξετάστηκε με οπτικό μικροσκόπιο και σε ορισμένες περιπτώσεις με ανοσοφθορισμό ή/και με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα ιστοτεμάχια νεφρού αρχικά μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα φορμόλης και εγκλείστηκαν σε τομές παραφίνης (formalin-fixed, paraffin-embedded) και κατόπιν εφαρμόστηκε η ανοσοϊστοχημική χρωστική μέθοδος της επισημασμένης στρεπταβιδίνης – βιοτίνης (labeled streptavidin biotin (LSAB) method). Όλες οι βιοψίες επεξεργάστηκαν τελικά από έναν ιστοπαθολόγο χωρίς να έχει γνώση των NMR αποτελεσμάτων. Με βάση τη νεφρική βιοψία των ασθενών έγινε διάγνωση εστιακής τμηματικής σπειραματο-σκλήρυνσης σε 23 ασθενείς, μεμβρανώδους νεφροπάθειας σε 13, IgA νεφροπάθειας σε 8, μεσαγγειακής υπερπλαστικής σπειραματοπάθειας σε 5, συστηματικού ερυθματώδους λύκου σε 8, αγγειίτιδας σε 5, διαβητικής νεφροπάθειας σε 9, νόσου ελαχίστων αλλοιώσεων σε 4 καθώς και άλλων νόσων σε 5 ασθενείς. Με γνώμονα τη βιοψία νεφρού και σε συνεργασία με τους ιατρούς της Νεφρολογικής Κλινικής, οι αλλοιώσεις του σωληναριοδιάμεσου ιστού περιελάμβαναν σωληναριακή ατροφία, ίνωση διάμεσου ιστού και διήθηση μονοπύρηνων κυττάρων (mononuclear cell infiltration). Με βάση τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων αυτών, οι ασθενείς κατατάχθηκαν σε 3 υποομάδες με: ήπια (N=25), μέτρια (N=27) και σοβαρή βλάβη (N=25).

2.1.4 Συλλογή και συντήρηση δειγμάτων

Από κάθε υγιές άτομο και από κάθε ασθενή, πριν την υποβολή του σε βιοψία νεφρού την ίδια ή την προηγούμενη ημέρα, έγινε λήψη δείγματος αίματος 12ώρης νηστείας σε ειδικά σωληνάκια (BD



Vacutainer SST II, Plymouth UK) και τουλάχιστον 20 mL πρωινών ούρων σε αποστειρωμένα δοχεία συλλογής ούρων. Ο ορός του αίματος διαχωρίστηκε μετά από φυγοκέντρηση 15 λεπτών σε 1500g. Τα δείγματα ούρων φυγοκεντρήθηκαν (Hettich, UNIVERSAL II) για 10 λεπτά σε 1500g για την αφαίρεση πιθανών ιζημάτων και σε ένα μέρος από το υπερκείμενο προσδιορίστηκαν οι τιμές των εξής βιοχημικών παραμέτρων: γλυκόζη, ουρία, κρεατινίνη, ουρικό οξύ, ολικές πρωτεΐνες, καθώς και των ιόντων ασβεστίου, μαγνησίου, φωσφορικών, χλωριούχων, νατρίου και καλίου. Οι ίδιες παράμετροι προσδιορίστηκαν και στον ορό του αίματος. Στο υπόλοιπο υπερκείμενο των δειγμάτων ούρων προστέθηκαν 100 μ L διαλύματος αζιδίου του νατρίου συγκέντρωσης 1g/L (NaN_3 , $M=65.01$ g/mol, Merck) ανά 2 mL ούρων για την αποφυγή πιθανής βακτηριακής μόλυνσης (Lindon et al., 2003), το οποίο εν συνεχεία διαμοιράστηκε σε επιμέρους δείγματα του 1 mL και αποθηκεύτηκε σε Cryovials (Greiner, Bio-One) στους -80 °C μέχρι την πραγματοποίηση των πειραμάτων NMR εντός 4 μηνών.

2.1.5 Βιοχημικός έλεγχος

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των βιοχημικών παραμέτρων (γλυκόζη, κρεατινίνη, ουρία, ουρικό οξύ, ηλεκτρολύτες) των ούρων και του ορού πραγματοποιήθηκε σε αυτόματο βιοχημικό αναλυτή Olympus AU600 (Olympus Diagnostica, Hamburg, Germany) βάσει καθιερωμένων μεθόδων. Η μέτρηση των επιπέδων των ολικών πρωτεϊνών έγινε φωτομετρικά με την μέθοδο του σουλφοσαλυκυλικού οξέος (Henry et al., 1956). Ο ρυθμός σπειραματικής διήθησης (Glomerular Filtration Rate, GFR) υπολογίστηκε με την εξίσωση MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) (Levey et al., 1999) ως εξής¹:

$$\text{GFR} = 170 \times [\text{P}_{\text{cr}}]^{-0.999} \times [\text{Age}]^{-0.176} \times [0.762 \text{ if patient is female}] \times [\text{SUN}]^{-0.170} \times [\text{Alb}]^{+0.318},$$

όπου Age: η ηλικία, P_{cr} , SUN και Alb, οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις ορού κρεατινίνης και ουρίας σε mg/dL, και αλβουμίνης σε g/dL.

2.1.6 ¹H-NMR φασματοσκοπία

Για τα αποθηκευμένα στους -80 °C δείγματα ούρων που κάθε φορά προορίζονταν για φασματοσκοπική ανάλυση, επαναλαμβάνονταν η ακόλουθη διαδικασία: Αρχικά, απόκτηση θερμικής ισορροπίας με παραμονή των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) και εν συνεχεία ήπια ανάδευση (Vortex, VELP Scientifica) 400 μ L ούρων και ανάμειξη με 200 μ L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (0.2 M Na_2HPO_4 / 0.2 M NaH_2PO_4 , pH 7.4. Na_2HPO_4 , $M=141.96$ g/mol, Riedel-de Haën, NaH_2PO_4 , $M=156.01$ g/mol, Merck). Η χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος συνέβαλε στην όσο το δυνατόν αποτελεσματικότερη ελαχιστοποίηση των μεταβολών του pH και καλύτερη σταθεροποίηση στην περιοχή 7.4 ± 0.5 (Lindon et al., 1999 and Dumas et al., 2006). Ήπια ανάδευση στο μίγμα των 600 μ L, αναμονή 10 λεπτών για πλήρη ανάμειξη των ούρων με το ρυθμιστικό διάλυμα και φυγοκέντρηση (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) σε 8.000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά για απομάκρυνση

¹ έχει παραληφθεί ο πολλαπλασιαστικός όρος [1.180 if patient is black] που δεν χρειάστηκε στη παρούσα μελέτη,

τυχόν ιζημάτων (Solanky et al., 2005). Μεταφορά κατόπιν 500 μL από το διαυγές υπερκείμενο σε γυάλινο σωληνάριο NMR διαμέτρου 5 mm (Wilmaad 535-PP, Sigma-Aldrich) και προσθήκη 50 μL διαλύματος δευτεριωμένου νερού (D_2O , $M=20.03$ g/mol, Sigma-Aldrich, βαθμού δευτερίωσης 99.9%) που περιείχε 0.075% δευτεριωμένο άλας sodium 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3- $^2\text{H}_4$)-1-propionate (TSP, $M=172.28$ g/mol, Sigma-Aldrich). Η τελική συγκέντρωση του TSP στο σωληνάριο NMR ήταν 0.456 mM. Το D_2O χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης για το lock της συχνότητας πεδίου (field frequency lock-solvent) του φασματογράφου NMR. Το δευτεριωμένο άλας TSP αποτέλεσε την εσωτερική ουσία αναφοράς ($\delta^1\text{H}$ 0.0) για τη βαθμονόμηση των χημικών μετατοπίσεων. Το D_2O προστέθηκε ακριβώς πριν την εκτέλεση των πειραμάτων ^1H -NMR για να ελαχιστοποιηθεί η ανταλλαγή των εύκολα αποσπώμενων πρωτονίων με το δευτέριο (Nicholson and Wilson, 1989), όπως συμβαίνει π.χ. με τα πρωτόνια της κορυφής της μεθυλενικής ομάδας της κρεατινίνης ($\delta^1\text{H}$ 4.06ppm) (Lenz et al., 2004b).

Η λήψη των φασμάτων ^1H -NMR μιας διάστασης (1D) έγινε στους 300 K στο φασματογράφο 500 MHz Avance Bruker DRX (Bruker Biospin GmbH) του Εργαστηρίου NMR του Ινστιτούτου Φυσικοχημείας του ΕΚΕΦΕ «Δημόκριτος» σε συχνότητα 500,13 MHz με το λογισμικό XWINNMR V.2.6 της ίδιας εταιρείας.

Για την καταστολή του σήματος του νερού (water suppression) χρησιμοποιήθηκε η 1D παλμική ακολουθία NOESYPRESAT ($\text{RD}-90^\circ-t_1-90^\circ-t_m-90^\circ\text{-FID}$ λήψη) (Nicholson et al., 1995), όπου: RD: χρόνος αποκατάστασης 3s (relaxation delay) ώστε να εξασφαλίζεται πλήρης αποδιέγερση των πυρήνων μεταξύ των διαδοχικών παλμών στη διάρκεια του οποίου έγινε η καταστολή της κορυφής συντονισμού του νερού,

t_1 : χρόνος 3 μs που αντιστοιχούσε στο πρώτο increment του πειράματος NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

t_m : χρόνος ανάμειξης 150ms στη διάρκεια του οποίου γίνονταν επιλεκτική ακτινοβολή της κορυφής συντονισμού του νερού.

Σε κάθε φάσμα έγινε συλλογή 128 σαρώσεων (scans) 64K δεδομένων (data points) με φασματικό εύρος 6009.6 Hz (αντιστοιχεί σε 12.02ppm) και παλμικό 90° διάρκειας 8-10 μs . Πριν το μετασχηματισμό Fourier τα 32K πραγματικά δεδομένα (size spectrum, SI) αύξηθηκαν με την προσθήκη μηδενικών στη μνήμη του υπολογιστή (zero filling) σε 64K, ώστε να ληφθεί τελική μήτρα δεδομένων 64K \times 64K (Bovey et al., 1988). Για την αύξηση της ευαισθησίας οι FIDs πολλαπλασιάστηκαν με κατάλληλη εκθετική συνάρτηση (exponential weighting function) που αντιστοιχούσε σε διεύρυνση γραμμών (line broadening) πλάτους 0.3 Hz. Μετά την εφαρμογή του μετασχηματισμού Fourier, έγινε διόρθωση τριφασίας και της γραμμής βάσης των φασμάτων (baseline) με την εφαρμογή μιας απλής πολυωνμικής συνάρτησης 5^{ου} βαθμού με το λογισμικό πρόγραμμα TopSpin 1.2 (Bruker Biospin GmbH).

Η ταυτοποίηση των απεκκρινόμενων μεταβολιτών έγινε σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία βάσει των χημικών τους μετατοπίσεων και της πολλαπλότητας των κορυφών συντονισμού (Bales et al., 1984 and Lindon et al., 1999). Η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών έγινε με βάση το ύψος τ

κορυφής συντονισμού επιλεγμένων σημάτων για κάθε μεταβολίτη λαμβάνοντας υπόψη κάθε φορά τον αριθμό των πρωτονίων ^1H που αντιστοιχούσαν σε κάθε κορυφή. Ακολούθησε κανονικοποίηση των εκάστοτε κορυφών ως προς το ύψος της κορυφής συντονισμού της μεθυλομάδας της κρεατινίνης στα 3.06ppm και οι μεταβολίτες εκφράστηκαν σε mmol/mol κρεατινίνης.

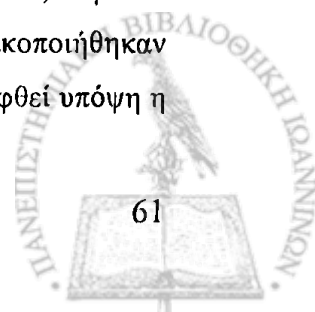
Πραγματοποιήθηκαν επίσης συμπληρωματικά πειράματα φασματοσκοπίας NMR δυο διαστάσεων (2D) για την ταυτοποίηση μερικών μεταβολιτών που παρουσίαζαν μεγάλο βαθμό αλληλοεπικάλυψης στα φάσματα μιας διάστασης. Για το σκοπό αυτό επελέγησαν συνολικά δυο αντιπροσωπευτικά δείγματα ούρων από ασθενείς με μέτρια και σοβαρή νεφρική βλάβη αντίστοιχα. Η λήψη των φασμάτων ^1H - ^1H TOCSY έγινε με εφαρμογή του spin-lock scheme MLEV17 με βάση την παλμική ακολουθία mlevesgpph. Έγινε καταγραφή 56 FIDs ανά increment για 800 increments με 2.048 πραγματικά δεδομένα στη F2 διάσταση. Χρησιμοποιήθηκε φασματικό εύρος 12.02 ppm και στους δυο άξονες συχνότητας και ο χρόνος αποκατάστασης ήταν 1.2s. Για την αύξηση της ευαισθησίας οι FIDs πολλαπλασιάστηκαν με κατάλληλη μαθηματική συνάρτηση (sine-bell squared function) πριν τον μετασχηματισμό Fourier.

2.1.7 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων εφαρμόστηκαν παραμετρικές στατιστικές μέθοδοι (Unpaired t-test) με τη βοήθεια του στατιστικού λογισμικού Statistica 6.0 (StatSoft Inc). Το επίπεδο εμπιστοσύνης ορίστηκε σε $p < 0.05$ και τα αποτελέσματα προσδιορίστηκαν ως μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (Mean \pm SD).

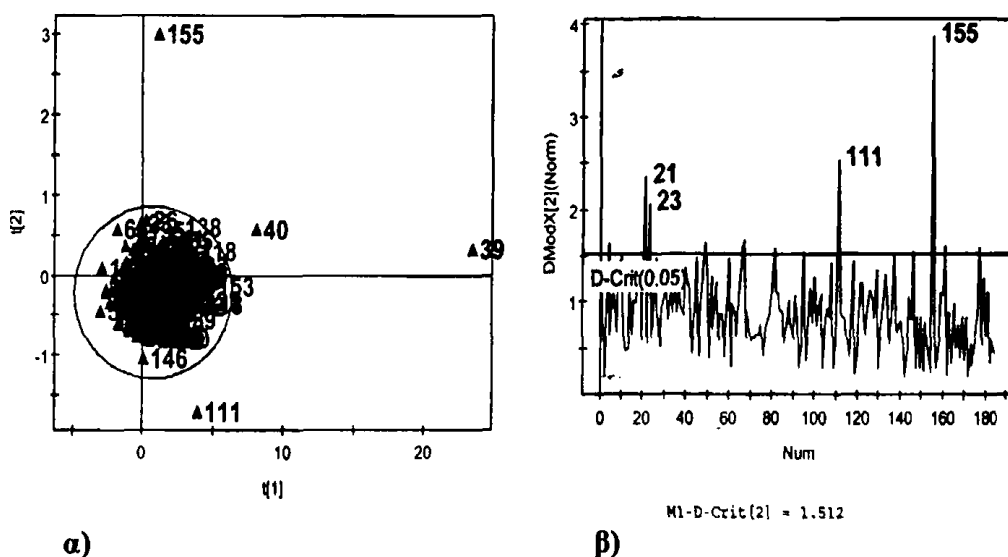
2.1.8 Ανάλυση Πολυμεταβλητών Δεδομένων

Τα ψηφιοποιημένα φάσματα ^1H -NMR εισήχθησαν από το πρόγραμμα TopSpin στο λογισμικό πρόγραμμα AMIX 3.2.4 (Analysis of MIXtures, Bruker Analytik), στο οποίο κάθε φάσμα τεμαχίστηκε με τον ίδιο τρόπο σε 244 συνεχείς περιοχές ολοκλήρωσης (bins) πλάτους 0.04ppm η κάθε μια για εύρος χημικής μετατόπισης (0.20 – 10.00ppm). Η περιοχή μεταξύ 4.38 και 6.30 ppm εξαιρέθηκε από την ανάλυση, διότι περιείχε αλλοιώσεις της μορφής της γραμμής βάσης των φασμάτων αφενός λόγω της μη πλήρους καταστολής της κορυφής του νερού και αφετέρου λόγω της διευρυμένης κορυφής της ουρίας λόγω ανταλλαγής των N-πρωτονίων ^1H αυτής με δευτέρια του διαλύτη. Παρόλο που το pH ρυθμίστηκε με τη χρήση διαλύματος φωσφορικών στην περιοχή 7.4 ± 0.5 , οι κορυφές συντονισμού του κιτρικού οξέος και της κρεατινίνης εμφάνιζαν μια μικρή εξάρτηση από την τιμή του pH με αποτέλεσμα να συντονίζονται συχνά σε ελαφρά διαφορετικές χημικές μετατοπίσεις (Lenz et al., 2003). Για το σκοπό αυτό, τα bins που αντιστοιχούσαν στο κιτρικό οξύ (2,50 – 2,58 και 2,66 – 2,74) και στην κρεατινίνη (3,02 – 3,06 και 4,02 – 4,06) ενοποιήθηκαν στα "superbins" 2,54 και 2,70 για το κιτρικό και 3,04 και 4,04 για την κρεατινίνη αντίστοιχα. Όλα τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν διαγράφοντας κάθε bin με το ολικό εμβαδό του φάσματος στο πρόγραμμα AMIX για να ληφθεί υπόψη η



μεγάλη διαβάθμιση της πυκνότητας των δειγμάτων ούρων. Ο πίνακας δεδομένων που τελικά προέκυψε μετά και τις προαναφερθείσες επεξεργασίες περιείχε 207 γραμμές (φάσματα από 127 υγιείς και 80 ασθενείς) και 194 στήλες (bins) και αποτέλεσε τη βάση δεδομένων (input descriptor) για την ανάλυση πολυμεταβλητών δεδομένων. Αυτή η βάση δεδομένων υπέστη επεξεργασία αρχικά με το Microsoft Excel (Microsoft Office 2000, υπό μορφή ASCII) και εν συνεχεία με το λογισμικό πρόγραμμα SIMCA-P 10.5 (UMETRICS AB, Umeå, Sweden). Πριν την εφαρμογή της ανάλυσης των κυρίων συνιστωσών (PCA) στα δεδομένα NMR, έγινε κεντράρισμα του μηδενός (mean centering) κάθε στήλης και όλα τα δεδομένα διαιρέθηκαν με την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης της εκάστοτε στήλης στην οποία ανήκαν (Pareto scaling) (Eriksson et al., 2001, Craig et al., 2006).

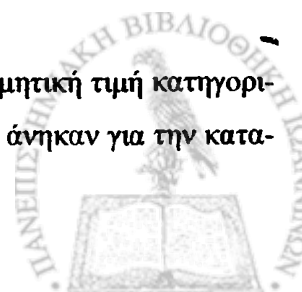
Η PCA χρησιμοποιήθηκε αρχικά για μια γενική επισκόπηση του συνόλου των μεταβιονομικών δεδομένων, την επισήμανση δειγμάτων με ακραία συμπεριφορά (outliers) μεταξύ των παρατηρήσεων (observations, φάσματα) καθώς και την ανίχνευση οποιασδήποτε τάσης ομαδοποίησης ή διαχωρισμού των δεδομένων (Eriksson et al., 2001). Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 2.1α**, ο εντοπισμός τυχόν δειγμάτων με έντονα ακραία συμπεριφορά (strong outliers) που βρίσκονταν έξω από την έλλειψη Hotelling T2 επιπέδου εμπιστοσύνης 95%, έγινε με τη βοήθεια των γραφημάτων συντεταγμένων PCA (scores plots). Αντίστοιχα τα γραφήματα DmodX των υπολοίπων του στατιστικού μοντέλου (model residuals plots DmodX) χρησιμοποιήθηκαν για να ανιχνευθούν τυχόν δείγματα με μετρίως ακραία συμπεριφορά (moderate outliers) που υπερέβησαν το όριο επιπέδου εμπιστοσύνης 0.05 (**Εικόνα 2.1β**).



Εικόνα 2.1 Τα 2 βασικά γραφήματα που χρησιμοποιούνται στην PCA.

Στο γράφημα συντεταγμένων PCA (scores plot) (α) το επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ορίζεται από την έλλειψη Hotelling T2 (Hotelling's T2 ellipse) έτσι ώστε όσες παρατηρήσεις κατανέμονται έξω από την έλλειψη να θεωρούνται ως έχουσες έντονα ακραία συμπεριφορά (strong outliers), ενώ (β) στο γράφημα DmodX των υπολοίπων (residuals plot DmodX) παρατηρήσεις με μετρίως ακραία συμπεριφορά (moderate outliers) χαρακτηρίζονται όσες υπερβαίνουν το όριο επιπέδου εμπιστοσύνης < 0.05 που εκφράζει την απόσταση των υπόλοιπων από το στατιστικό μοντέλο (Trygg et al., 2007).

Με τις supervised τεχνικές, σε όλα τα δείγματα δόθηκε μια κατάλληλη αριθμητική τιμή κατηγοριοποίησης (εξαρτημένη ψευδομεταβλητή) ανάλογα με την υποομάδα στην οποία ανήκαν για την κατα-



σκευή ενός πίνακα απόκρισης Y (response Y matrix). Με την PLS-DA αναζητήθηκε η εκάστοτε σχέση που συνδέει τον πίνακα X (περιοχές ολοκλήρωσης NMR, bins) με τον πίνακα Y που περιείχε κωδικοποιημένη την πληροφορία γένους, ηλικίας, νόσου ή σοβαρότητας νεφρικής βλάβης. Συγκεκριμένα με την μέθοδο αυτή προσδιορίστηκε η βέλτιστη διαχωριστική συνάρτηση (discriminant function), δηλαδή το στατιστικό μοντέλο PLS-DA που παρείχε τον σαφέστερο διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων της μελέτης βάσει των μεταβλητών X (Eriksson et al., 2001, p.193). Για την ερμηνεία των γραφημάτων συντεταγμένων χρησιμοποιήθηκαν τα regression coefficients plots (διαγράμματα συντελεστών πλινδρόμησης) αποσκοπώντας στην ανάδειξη των περιοχών NMR που συνεισφέρουν σημαντικά στο διαχωρισμό των υπό μελέτη ομάδων. Η τεχνική OSC εφαρμόστηκε για την αφαίρεση εκείνων των γραμμικών συνδυασμών των μεταβλητών X που ήταν ορθογώνιοι προς το διάνυσμα Y (πίνακας στήλη) των εξαρτημένων μεταβλητών κατηγοριοποίησης, με σκοπό την ελαχιστοποίηση της διατομικής μεταβλητότητας και την επίτευξη του μεγαλύτερου βαθμού διάκρισης των υπό μελέτη ομάδων.

Σε κάθε στατιστικό μοντέλο εφαρμόστηκε η μέθοδος *cross validation* (διασταυρούμενη αξιολόγηση) εφαρμόζοντας την προεπιλεγμένη διαδικασία των 7 διαδοχικών επαναλήψεων του λογισμικού προγράμματος SIMCA-P. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου αυτής ήταν: αφαίρεση από την ανάλυση του 1/7 των αρχικών δεδομένων, δημιουργία νέων στατιστικών μοντέλων από τα εναπομείναντα 6/7, πρόβλεψη των δεδομένων που αφαιρέθηκαν, σύγκριση των τιμών πρόβλεψης με τις πραγματικές και επανάληψη της διαδικασίας άλλες 6 φορές. Η παράμετρος Q^2 που υπολογίστηκε με την μέθοδο αυτή παρείχε μια εκτίμηση της ικανότητας πρόβλεψης των στατιστικών μοντέλων, η οποία θεωρήθηκε «καλή» για $Q^2 > 0.5$ και «άριστη» για $Q^2 > 0.9$ (Eriksson et al., 2001, p.67), ενώ αντίστοιχα η παράμετρος R^2 , παρείχε μια εκτίμηση της explained variation και του βαθμού προσαρμογής του εκάστοτε στατιστικού μοντέλου στα δεδομένα.

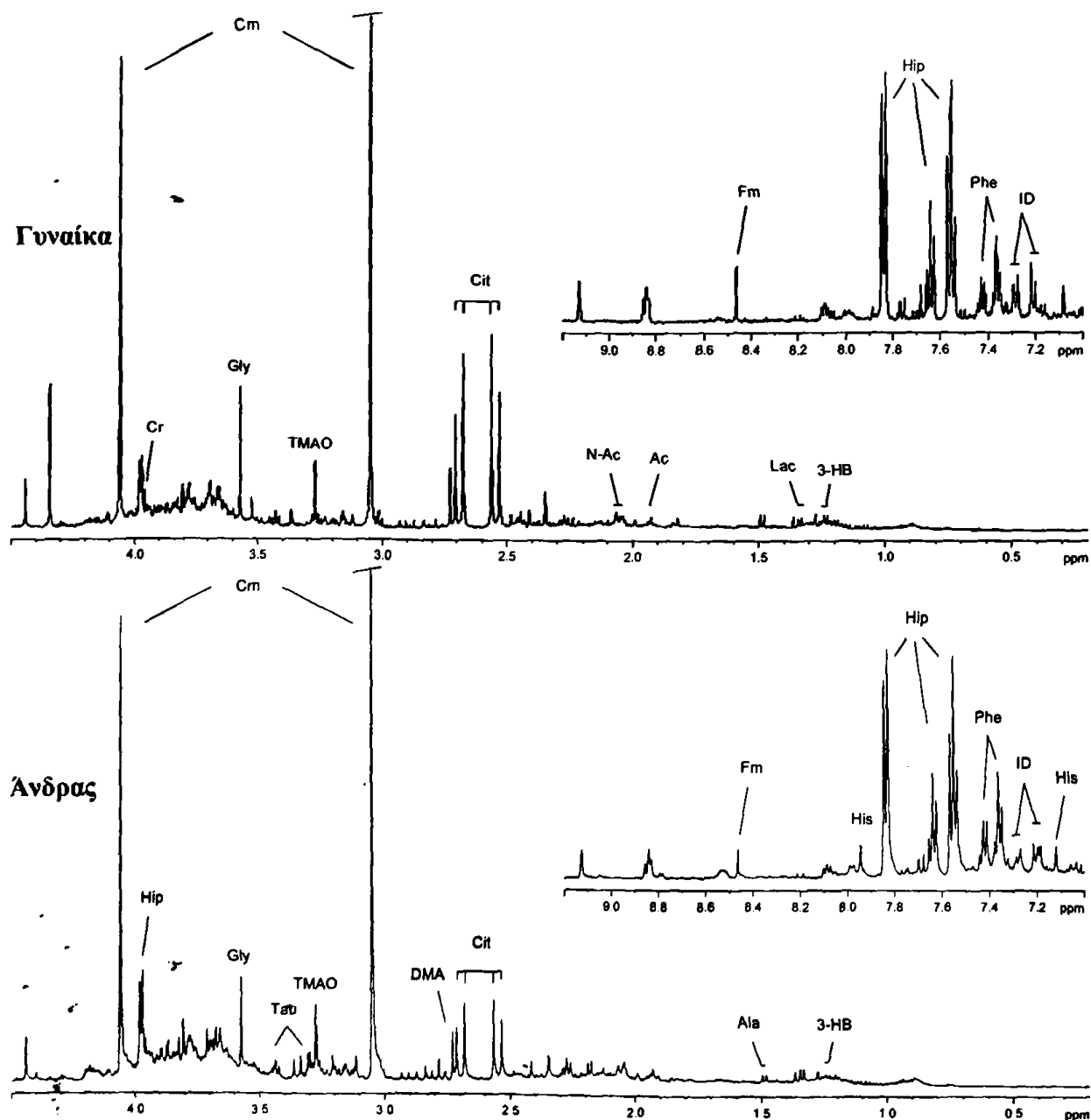
Επιπλέον εφαρμόστηκαν διαδικασίες τόσο εσωτερικής (held-back data) όσο και εξωτερικής αξιολόγησης (external data validation) των στατιστικών μοντέλων. Στην πρώτη περίπτωση η αξιολόγηση έγινε με τυχαία επιλογή μερικών από τα δεδομένα βάσει των οποίων έγινε η βαθμονόμηση του εκάστοτε στατιστικού μοντέλου, ενώ στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα τα οποία δεν ήταν διαθέσιμα κατά την δημιουργία των στατιστικών μοντέλων. Το ποσοστό επιτυχούς ταξινόμησης των δειγμάτων έγινε με την χάραξη ειδικών διαγραμμάτων ελέγχου της αξιοπιστίας (Y -Predicted scatter plots), όπου οι υποομάδες των δειγμάτων οριοθετήθηκαν από την ευθεία $y=0,5$ για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Με βάση τις ορθές ή όχι κατατάξεις των δειγμάτων ορίστηκαν τα Αληθώς Θετικά (ΑΘ), Αληθώς Αρνητικά (ΑΑ), Ψευδώς Θετικά (ΨΘ) και Ψευδώς Αρνητικά (ΨΑ) αποτελέσματα και έγινε εκτίμηση της ευαισθησίας $[ΑΘ/(ΑΘ + ΨΑ) \times 100]$ και της ειδικότητας $[ΑΑ/(ΑΑ + ΨΘ) \times 100]$ (Bylesjö et al., 2006, Burtis et al., 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Μελέτη του μεταβολικού προφίλ των ούρων της ομάδας των υγιών ατόμων

3.1.1 Το $^1\text{H-NMR}$ φάσμα των ούρων

Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζονται 2 αντιπροσωπευτικά φάσματα ούρων $^1\text{H-NMR}$ 500 MHz από έναν υγιή άντρα και μια υγιή γυναίκα που απεικονίζουν το προφίλ των απεκκρινόμενων μεταβολιτών.



Εικόνα 3.1 Αντιπροσωπευτικά φάσματα $^1\text{H-NMR}$ ούρων 500 MHz (δ 0.2 – 4.5 και 7.0 – 9.2ppm) από υγιή άνδρα (κάτω) και υγιή γυναίκα (επάνω).

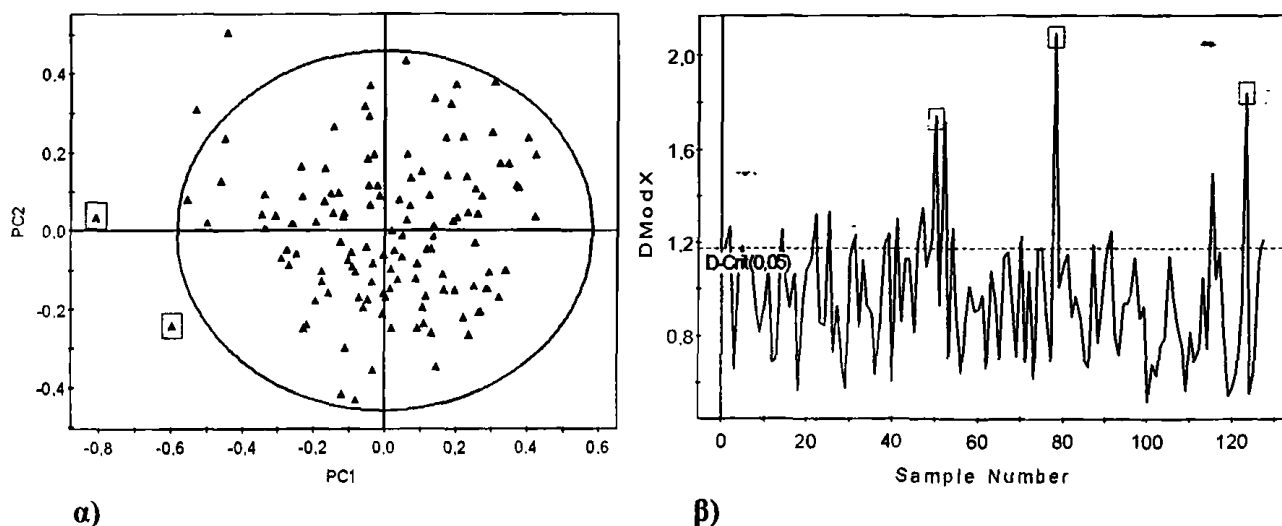
Συντομώσεις: 3-HB: 3-υδροξυβουτυρικό οξύ, Ac: οξικό οξύ, Ala: αλανίνη, Cit: κιτρικό οξύ, Cr: κρεατίνη, Cm: κρεατινίνη, DMA: διμεθυλαμίνη, Fm: μυρμηγκικό οξύ, Gly: γλυκίνη, His: ιστιδίνη, ID: indoxyl sulfate, Lac: γαλακτικό, N-Ac: N-ακετυλομάδες γλυκοπρωτεϊνών, Phe: φαινυλαλανίνη, Tau: ταυρίνη, TMAO: τριμεθυλο-N-αμινοξείδιο, Val: βαλίνη.

Τα κύρια συστατικά ενός φυσιολογικού φάσματος $^1\text{H-NMR}$ ούρων είναι η κρεατινίνη, που εμφανίζεται με δυο έντονες κορυφές συντονισμού στα 3.05 και 4.06ppm, το ιππουρικό οξύ, το κιτρικό οξύ, η γλυκίνη, το τριμεθυλο-*N*-αμινοξείδιο (TMAO), η διμεθυλαμίνη (DMA), ίχνη από τα ανιόντα των οξέων γαλακτικό και 3-υδροξυβουτυρικό (3-HB) καθώς και αμινοξέων όπως αλανίνη, ιστιδίνη, βαλίνη και φαινυλαλανίνη (Bales et al., 1984a). Το φάσμα περιέχει επίσης εκατοντάδες μικρές κορυφές από μεταβολίτες, οι οποίοι φυσιολογικά βρίσκονται σε ίχνη, ενώ σε παθολογικές καταστάσεις η συγκέντρωσή τους μπορεί να αυξηθεί. Μια πρώτη οπτική σύγκριση των δυο φασμάτων δείχνει, ότι στο φάσμα του άνδρα παρατηρείται αυξημένη απέκκριση TMAO και ταυρίνης, ενώ στο φάσμα της γυναίκας αυξημένη απέκκριση κιτρικού, κρεατίνης και γλυκίνης.

3.1.2 Γενική επισκόπηση του συνόλου των πολυμεταβλητών δεδομένων

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μια διεξοδική μελέτη ενός πληθυσμού υγιών ατόμων. Η σκοπιμότητα της μελέτης αυτής ήταν να γίνει μια όσο το δυνατόν πληρέστερη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των ούρων ενός υγιούς πληθυσμού, εφαρμόζοντας τεχνικές αναγνώρισης προτύπων (PR) στα αντίστοιχα φάσματα $^1\text{H-NMR}$.

Η τεχνική της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (PCA) ήταν η πρώτη που εφαρμόστηκε με σκοπό να προσφέρει μια αρχική γενική επισκόπηση του συνόλου των πολυμεταβλητών δεδομένων. Το σύνολο αυτό αποτελούταν από 127 φάσματα NMR ούρων και με την τεχνική PCA έγινε μια αδρή εκτίμηση της ομοιογένειάς του. Όπως φαίνεται από το γράφημα συντεταγμένων (Εικόνα 3.2α), εντοπίστηκαν τέσσερα δείγματα με έντονα ακραία συμπεριφορά που κείτονταν εκτός του διαστήματος εμπιστοσύνης 95% της έλλειψης Hotelling T². Η εξέτασή των αντίστοιχων φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ απόκάλυψε ότι το πρώτο εμφάνιζε δυο κορυφές συντονισμού πολύ υψηλής έντασης στα 2.06 και 2.10ppm



Εικόνα 3.2 Αρχική επισκόπηση των φασματοσκοπικών δεδομένων από 127 υγιή άτομα.

α) Γράφημα συντεταγμένων PCA (PC1 προς PC2) στο οποίο τα 2 δείγματα με έντονα ακραία συμπεριφορά είναι επισημασμένα με γκρι πλαίσιο. β) Γράφημα DModX των υπολοίπων στο οποίο τα 3 δείγματα με μετρίως ακραία συμπεριφορά είναι επισημασμένα με γκρι πλαίσιο.

(προερχόμενες ενδεχομένως από N-ακετυλομάδες γλυκοπρωτεϊνών) καθώς και μια μη ταυτοποιημένη τριπλή κορυφή στα 7.50ppm. Το δεύτερο φάσμα εμφάνιζε δυο κορυφές συντονισμού υψηλής έντασης στα 2.16 και 2.18ppm (προερχόμενες ενδεχομένως από μεταβολίτες λόγω λήψης παρακεταμόλης πριν τη λήψη του δείγματος ούρων (Schoonen et al., 2007). Για τους παραπάνω λόγους τα δυο αντίστοιχα δείγματα (επισημασμένα με πλαίσιο στην **Εικόνα 3.2α**) εξαιρέθηκαν από τη μελέτη. Τα άλλα 2 φάσματα των δειγμάτων με έντονα ακραία συμπεριφορά (μη επισημασμένα στην **Εικόνα 3.2α**) εμφάνιζαν σχετικά υψηλά αλλά μη παθολογικά επίπεδα ιππουρικού οξέος (Zurri et al., 1997) και για αυτό δεν εξαιρέθηκαν από τη μελέτη.

Από το γράφημα DModX των υπολοίπων (DModX residuals plot), όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.2β**, εντοπίστηκαν πέντε επιπλέον δείγματα με μετρίως ακραία συμπεριφορά που υπερέβαιναν το όριο επιπέδου εμπιστοσύνης < 0.05 . Από τα πέντε αντίστοιχα φάσματα, τρία εξαιρέθηκαν από τη μελέτη (επισημασμένα με πλαίσιο στην **Εικόνα 3.2β**), επειδή το πρώτο εμφάνιζε δυο πολλαπλές κορυφές συντονισμού στα 1.73 και 1.91ppm (κορυφές συντονισμού προερχόμενες πιθανά από τη λυσίνη) και το δεύτερο δυο μη ταυτοποιημένες απλές κορυφές στα 1.82 και 6.40ppm. Οι παραπάνω ομάδες κορυφών δεν εμφανίστηκαν σε άλλα φάσματα και δεν θεωρούνται ότι είναι χαρακτηριστικές ενός φάσματος ούρων φυσιολογικών ατόμων. Στο τρίτο φάσμα, η ένταση της κορυφής συντονισμού των μεθυλενικών πρωτονίων της κρεατινίνης στα 4.06ppm ήταν πολύ χαμηλή πιθανά λόγω ανταλλαγής των πρωτονίων αυτών με δευτέρια του διαλυτή D_2O , εξαιτίας παρατεταμένης παραμονής του δείγματος ούρων στο σωληνάριο NMR (Lenz et al., 2004b). Στα άλλα δυο εναπομείναντα φάσματα παρατηρήθηκαν, στο ένα υψηλά επίπεδα ιππουρικού και χαμηλά επίπεδα κρεατινίνης και στο άλλο υψηλά επίπεδα οξικού οξέος. Παρόλα αυτά, τα αντίστοιχα δείγματα δεν εξαιρέθηκαν (μη επισημασμένα στην **Εικόνα 3.2β**), επειδή θεωρήθηκε ότι οι διαφοροποιήσεις των επιπέδων των μεταβολιτών αυτών, ήταν εντός του εύρους της φυσιολογικής διακύμανσης που παρατηρείται σε ένα φάσμα ούρων ενός υγιούς ατόμου. Με την αρχική εφαρμογή της τεχνικής PCA εντοπίστηκαν και εξαιρέθηκαν συνολικά 5 δείγματα με ακραία συμπεριφορά και τα 122 φάσματα που απέμειναν διαμόρφωσαν το τελικό σύνολο των πολυμεταβλητών δεδομένων NMR.

3.1.3 Βιοχημικές παράμετροι του πληθυσμού της μελέτης

Στον **Πίνακα 3.1** αναγράφονται τα δημογραφικά στοιχεία και οι βιοχημικές παράμετροι των 122 ατόμων του υγιούς πληθυσμού μέσης ηλικίας 44.3 ± 11.0 ετών, εκ των οποίων 42 άτομα ήταν καπνιστές (34%). Εξήντα ένα άτομα ήταν άνδρες και 61 γυναίκες χωρίς να εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την ηλικία τους (45.1 ± 10.9 και 43.4 ± 11.1 έτη αντιστοίχως). Επειδή η μέση ηλικία του υγιούς πληθυσμού ήταν 45 ετών, επελέγη αρχικά η τιμή αυτή ως όριο διαχωρισμού δυο επιμέρους υποομάδων (άτομα ηλικίας > 45 και ≤ 45 ετών), οι οποίες και αποτέλεσαν την ηλικιακή ομάδα I. Η διάκριση όμως των δυο υποομάδων αυτών ήταν ασαφής και για το λόγο αυτό μελετήθηκε και μια δεύτερη ομάδα (**Πίνακας 3.1**, ηλικιακή ομάδα II) με πιο διακριτά

ηλικιακά όρια (άτομα ηλικίας >50 και <35 ετών). Η απέκκριση των ολικών πρωτεϊνών και της γλυκόζης (εκφρασμένα ως mg/gr κρεατινίνης) δεν είχε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών, ενώ μια οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ των ατόμων > και ≤ 45 ετών (p=0.04), η οποία δεν υπήρχε όταν συγκρίθηκαν τα άτομα άνω των 50 και κάτω των 30 ετών.

Πίνακας 3.1 Δημογραφικά στοιχεία, βιοχημικές παράμετροι και ομάδες των υγιών ατόμων (mean ± SD).

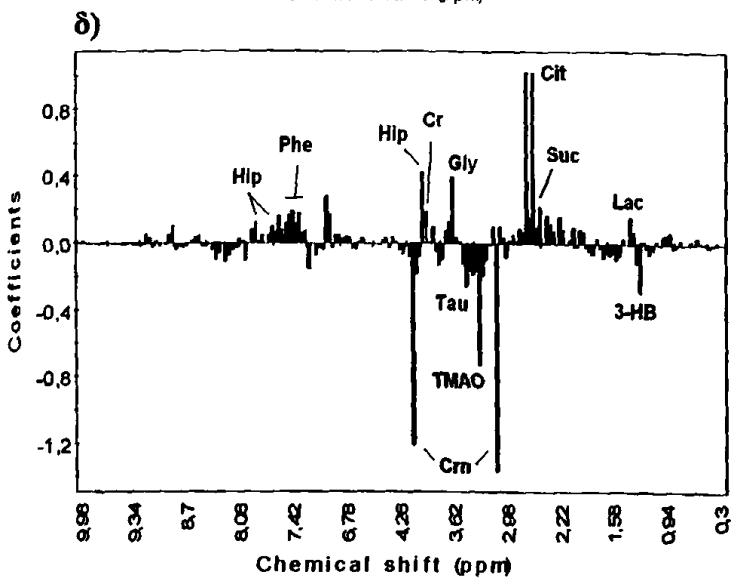
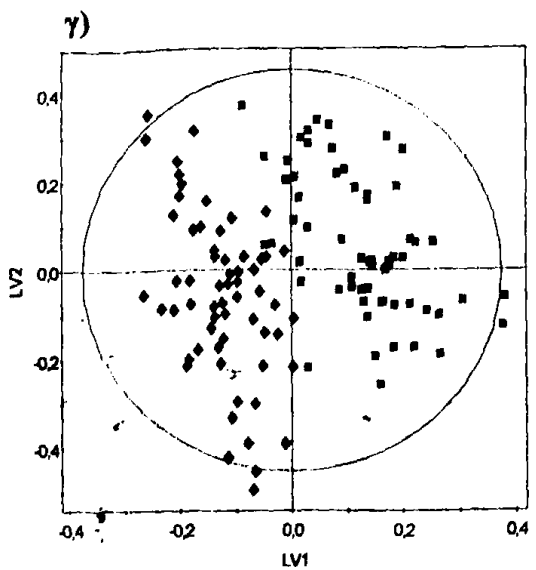
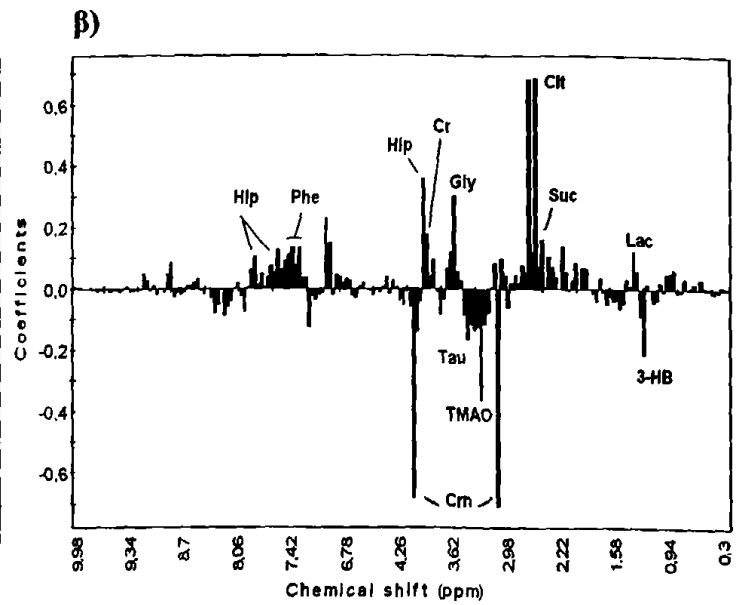
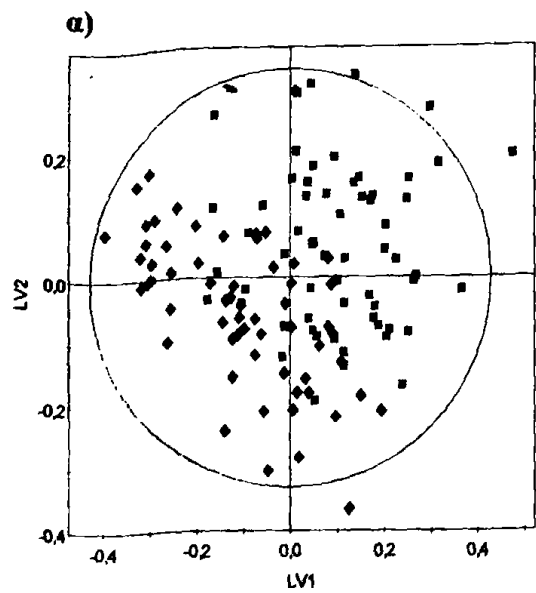
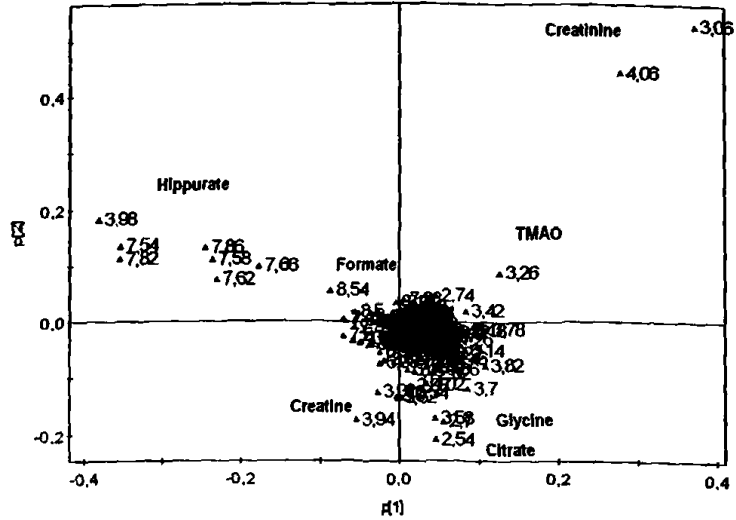
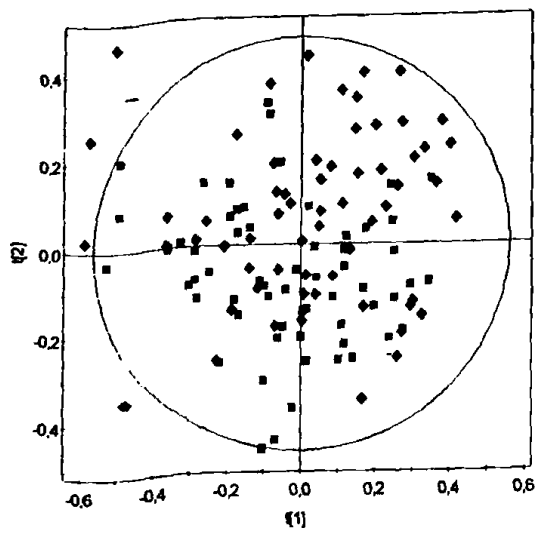
	Συνολικά	Ομάδα φύλου		Ηλικιακή ομάδα I		Ηλικιακή ομάδα II	
		Άνδρες	Γυναίκες	≤ 45 έτη	> 45 έτη	< 35 έτη	> 50 έτ
N	122	61	61	69	53	23	34
Ηλικία (έτη)	44.3 ± 11.0	45.1 ± 10.9	43.4 ± 11.1	36.6 ± 5.5	54.5 ± 7.6	30.0 ± 4.0	58.4 ± 6.0
Πρωτεΐνες ούρων (mg/gr κρεατινίνης)	64.6 ± 30.2	63.7 ± 34.5	66.0 ± 25.1	59.7 ± 27.9	70.8 ± 30.2*	58.7 ± 31.7	69.1 ± 31.7
Γλυκόζη ούρων (mg/gr κρεατινίνης)	42.4 ± 12.8	40.0 ± 12.2	44.8 ± 13.1	40.0 ± 15.0	45.4 ± 10.2*	40.2 ± 11.0	43.6 ± 11.0

*p=0.04

3.1.4 Δημιουργία στατιστικών μοντέλων με βάση το φύλο

Στο τελικό σύνολο των δεδομένων NMR των 122 δειγμάτων, εφαρμόστηκε εκ νέου η τεχνική PCA και οι πρώτες 4 κύριες συνιστώσες (PCs) του στατιστικού μοντέλου που προέκυψε περιείχαν το 50% της διακύμανσης των αντίστοιχων φασμάτων των ούρων. Το νέο γράφημα συντεταγμένων PCA αποκάλυψε τρία επιπλέον δείγματα που κείτονταν εκτός της έλλειψης Hotelling T2, τα αντίστοιχα φάσματα των οποίων χαρακτηρίζονταν κυρίως από υψηλά επίπεδα ιππουρικού οξέος. Ωστόσο, τα δείγματα αυτά δεν εξαιρέθηκαν από τα μελέτη, επειδή η κανονική συνάρτηση πιθανότητας των υπολοίπων (normal probability plot of the residuals) ήταν συμμετρική. Αυτό σημαίνει ότι οι διαφοροποιήσεις των επιπέδων των μεταβολιτών και κυρίως του ιππουρικού οξέος είναι πιθανότερο να αντανakλούν τη τυχαία φυσιολογική διακύμανση των συστατικών των ούρων, παρά μια συγκεκριμένη δομή στη διακύμανση των δεδομένων (Eriksson et al., 2001, p. 206). Προκειμένου να εξεταστεί η πιθανότητα διάκρισης των ατόμων με βάση το φύλο, τα γραφήματα συντεταγμένων PCA επανασχεδιάστηκαν προσδίδοντας ένα χρωματικό συμβολισμό στα δείγματα (Εικόνα 3.3α). Δεν παρατηρήθηκε κάποια σαφή διάκριση μεταξύ των ομάδων φύλου, εκτός από μια μικρή τάση των δειγμάτων από τους άνδρες να κατανέμονται στο άνω δεξιό τμήμα του γραφήματος και των δειγμάτων από τις γυναίκες να εκτείνονται κυρίως στο κάτω τμήμα. Τα αντίστοιχα γραφήματα φορτίων (Εικόνα 3.3β) απεικονίζουν τις αρχικές μεταβλητές καθώς και την επίδραση που έχουν στο έχουν στο στατιστικό μοντέλο PCA. Δηλαδή, μεταβλητές (bins) που περιέχουν πληροφορία παρόμοι-





Εικόνα 3.3 Γραφήματα συντεταγμένων και διαγράμματα των στατιστικών μοντέλων με βάση το φύλο.

Χρωματικός συμβολισμός: 61 γυναίκες (■) και 61 άνδρες (◆). **PCA**: α) γράφημα συντεταγμένων, β) γράφημα φορτίων. **PLS-DA**: γ) γράφημα συντεταγμένων, δ) διάγραμμα συντελεστών παλινδρόμησης. **OSC/PLS-DA**: ε) γράφημα συντεταγμένων, ζ) διάγραμμα συντελεστών παλινδρόμησης.

ας βιοχημικής υφής εμφανίζονται μαζί σε κάποια περιοχή του γραφήματος. Ως εκ τούτου, μεταβολίτες που βρίσκονται στο άνω δεξιό τμήμα του γραφήματος των φορτιών (κρεατινίνη και ΤΜΑΟ) έχουν θετική συσχέτιση με τους άνδρες, ενώ μεταβολίτες που κατανέμονται στο κάτω τμήμα (κιτρικό, κρεατίνη και γλυκίνη) έχουν θετική συσχέτιση με τις γυναίκες (Εικόνα 3.3β). Αντίστοιχα, μεταβολίτες που εκτείνονται στο άνω αριστερό τμήμα, όπως το ιππουρικό και το μυρμηγκικό οξύ, εμφανίζουν παρόμοια διακύμανση και για τα δυο φύλα.

Η τεχνική PCA ανέδειξε λοιπόν μια τάση διαχωρισμού των δειγμάτων, πιθανά εξαρτώμενης από το φύλο, χωρίς να έχει συμπεριληφθεί καθόλου η πληροφορία αυτή στην ανάλυση. Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκε ένα μοντέλο διαχωριστικής ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετράγωνων (PLS-DA) λαμβάνοντας εξαρχής υπόψη στην ανάλυση την ομάδα φύλου των ατόμων. Με το μοντέλο αυτό επιτεύχθηκε ένας καλύτερος διαχωρισμός, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3γ, με έναν όμως σημαντικό βαθμό αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των δυο ομάδων. Για την ερμηνεία του γραφήματος συντεταγμένων χρησιμοποιήθηκε το διάγραμμα συντελεστών παλινδρόμησης, το οποίο έδειξε όλες τις χημικές μετατοπίσεις που συνεισέφεραν στο διαχωρισμό αυτό (Εικόνα 3.3δ). Με βάση το διάγραμμα αυτό και επιπλέον των προαναφερθέντων μεταβολιτών, το 3-υδροξυβουτυρικό οξύ (3-HB) και η ταυρίνη εντοπίστηκαν σε σχετικά υψηλότερα επίπεδα στους άνδρες, ενώ τα οξέα ιππουρικό και γαλακτικό, η φαινυλαλανίνη, το ηλεκτρικό οξύ καθώς και οι μη ταυτοποιημένοι μεταβολίτες (φασματικές περιοχές 2.18, 3.82, 6.94-6.98) ανιχνεύθηκαν σε σχετικά υψηλότερα επίπεδα στις γυναίκες, όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2 Μεταβολές των συστατικών των ούρων ανάλογα με το φύλο και την ηλικία.

Μεταβολίτες	δ (^1H)	Ομάδες φύλου				Ηλικιακή ομάδα I				Ηλικιακή ομάδα II			
		PLS-DA		OSC-PLS-DA		PLS-DA		OSC-PLS-DA		PLS-DA		OSC-PLS-DA	
		A	Γ	A	Γ	N	H	N	H	N	H	N	H
3-HB	1.22	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	-	-
Γαλακτικό	1.34	↓	↑	↓	↑	-	-	-	-	-	-	-	-
Ηλεκτρικό	2.42	↓	↑	↓	↑	-	-	↓	↑	↓	↑	-	-
Κιτρικό	2.54 2.70	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑
DMA	2.74	↓	↑	-	-	↓	↑	↓	↑	-	-	-	-
Κρεατινίνη	3.06 4.06	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓
ΤΜΑΟ	3.26	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑
Ταυρίνη	3.28 3.40	↑	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↑	-	-
Γλυκίνη	3.57	↓	↑	↓	↑	-	-	↓	↑	-	-	-	-
Κρεατίνη	3.94	↓	↑	↓	↑	↓	↑	-	-	-	-	-	-
Ιππουρικό	3.97 7.54 7.82	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↓	↑	↓
Φαινυλαλανίνη	7.36 7.42	↓	↑	↓	↑	-	-	-	-	↓	↑	↓	↑

Συντμήσεις: A: άνδρες, Γ: γυναίκες. Ηλικιακή ομάδα I: N: άτομα ηλικίας ≤ 45 και H: άτομα ηλικίας > 45 ετών. Ηλικιακή ομάδα II: N: άτομα ηλικίας < 35 και H: άτομα ηλικίας > 50 ετών, δ (^1H): χημική μετατόπιση σε ppm.

Για την ελαχιστοποίηση της επίδρασης της διατομικής μεταβλητότητας των υπό μελέτη ατόμων εφαρμόστηκε η τεχνική της ορθοκανονικής διόρθωσης σήματος (OSC), από την οποία αφαιρέθηκαν 2 ορθοκανονικές συνιστώσες και επαναλήφθηκε η τεχνική PLS-DA. Τα γραφήματα φορτίων των δυο αυτών ορθοκανονικών συνιστωσών έδειξαν ότι οι μεταβολίτες με τη μεγαλύτερη διατομική μεταβλητότητα ήταν η κρεατινίνη, τα οξέα κιτρικό και ιππουρικό και το TMAO. Ωστόσο, παρά το φιλτράρισμα για την ελαχιστοποίηση της διατομικής μεταβλητότητας, οι μεταβολίτες αυτοί είναι μεταξύ εκείνων που διαφοροποιούν τις ομάδες φύλου και ηλικίας. Από το γράφημα συντεταγμένων των 2 πρώτων PCs του μοντέλου OSC/PLS-DA προέκυψε ένας σαφής και ευδιάκριτος διαχωρισμός μεταξύ ανδρών και γυναικών (Εικόνα 3.3ε). Το αντίστοιχο διάγραμμα συντελεστών παλινδρόμησης (Εικόνα 3.3ζ) έδειξε ότι οι φασματοσκοπικές περιοχές που συνέβαλαν στο διαχωρισμό των δυο ομάδων φύλου ήταν σχεδόν οι ίδιες με αυτές πριν την εφαρμογή της τεχνικής φιλτραρίσματος (Πίνακας 3.2), αλλά με αυξημένη τη συνεισφορά ορισμένων συντελεστών (π.χ. το ύψος των φασματικών περιοχών του κιτρικού οξέος αυξήθηκε από 0.68 σε 1.01). Η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου OSC/PLS-DA ήταν υψηλή, όπως υποδεικνύεται από τη παράμετρο Q^2 που ήταν ίση με 0.83 (Πίνακας 3.3).

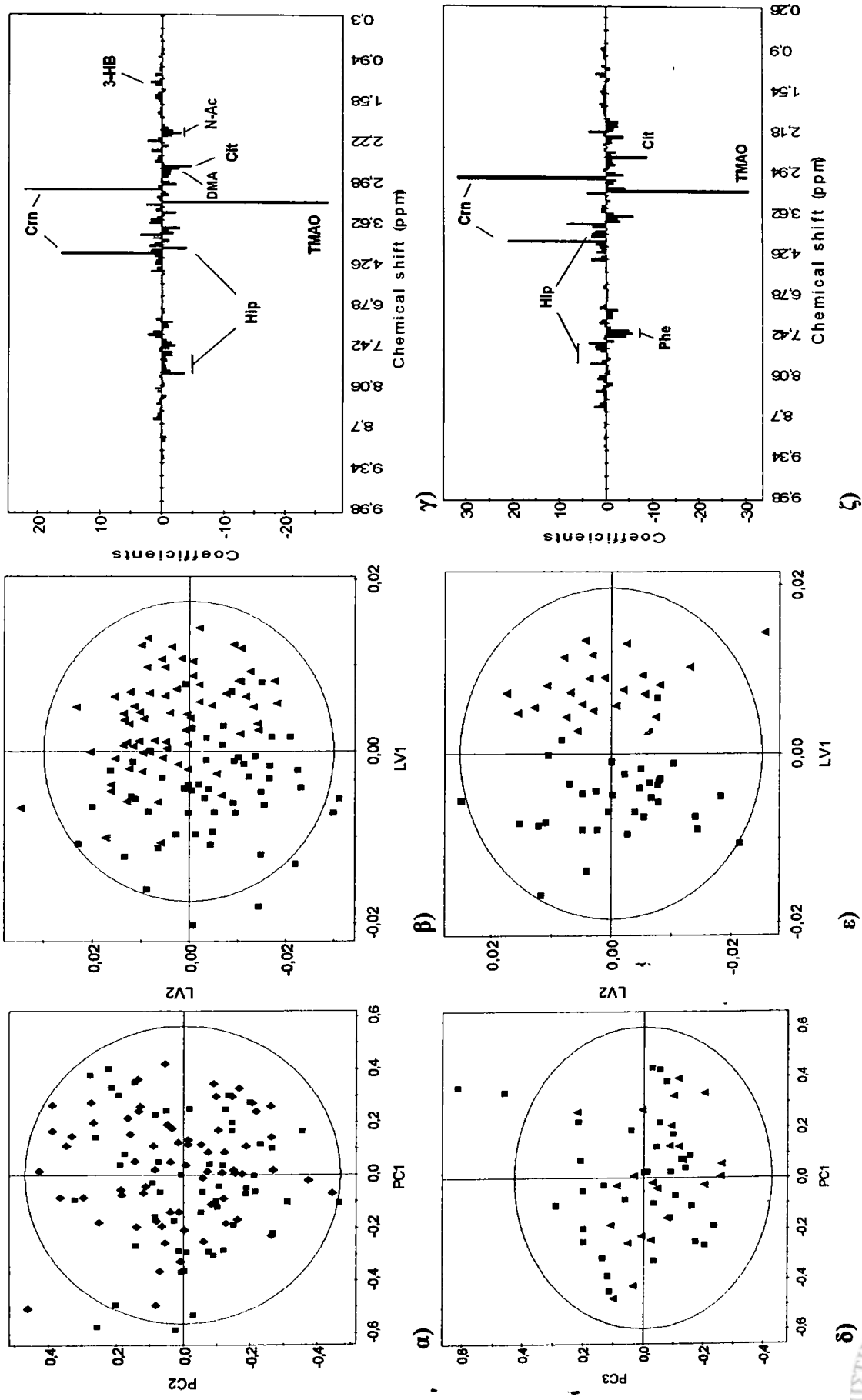
Πίνακας 3.3 Παράμετροι αξιολόγησης των μοντέλων PLS-DA και OSC/PLS-DA.

Μοντέλα	Ομάδα φύλου (N=122)				Ηλικιακή ομάδα I (N=122)				Ηλικιακή ομάδα II (N=57)			
	R ²	Q ²	Q ² _{ext}	LV	R ²	Q ²	Q ² _{ext}	LV	R ²	Q ²	Q ² _{ext}	LV
PLS-DA	0.70	0.28	-	4	0.23	-0.11	-	2	0.51	-0.07	-	2
OSC-PLS-DA	0.83	0.70	-	3	0.47	0.35	-	2	0.76	0.56	-	2
OSC-PLS-DA εσωτερικής αξιολόγησης	N=92				N=92				N=41			
	0.78	0.70	0.78	2	0.48	0.05	0.48	2	0.77	0.43	0.77	2

R²: παράμετρος explained variation, Q² παράμετρος εκτίμησης της ικανότητας πρόβλεψης, Q²_{ext}: παράμετρος εκτίμησης της αθροιστικής ικανότητας πρόβλεψης των ομάδων βαθμονόμησης που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εσωτερική αξιολόγηση, LV: αριθμός των λανθανουσών μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε στατιστικό μοντέλο.

3.1.5 Δημιουργία στατιστικών μοντέλων με βάση την ηλικία

Το όριο διαχωρισμού που χρησιμοποιήθηκε αρχικά για τη μελέτη των ατόμων με βάση την ηλικία ήταν η ηλικία των 45 ετών (Πίνακας 3.1, ηλικιακή ομάδα I). Τα μοντέλα PCA (Εικόνα 3.4α) και PLS-DA που υπολογίσθηκαν δεν έδειξαν κάποιο διαχωρισμό ή τάση ομαδοποίησης, ενώ στο γράφημα συντεταγμένων OSC/PLS-DA (Εικόνα 3.4β) παρατηρήθηκε μια εμφανής, αλλά όχι σαφής διάκριση μεταξύ των ηλικιακών ομάδων \leq και $>$ 45 ετών. Το αντίστοιχο διάγραμμα συντελεστών παλινδρόμησης (Εικόνα 3.4γ) έδειξε ότι τα επίπεδα της κρεατινίνης και σε μικρότερο βαθμό του 3-HB και των μη ταυτοποιημένων μεταβολιτών (στα 3.78ppm και στην περιοχή 7.18 – 7.26ppm) ήταν αυξημένα στα άτομα ηλικίας \leq 45 ετών, ενώ τα επίπεδα του TMAO και του ιππουρικού οξέος και σε μικρότερο βαθμό του κιτρικού οξέος, των N-ακετυλομάδων των γλυκοπρωτεϊνών, της DMA και ενός μη ταυτοποιημένου μεταβολίτη στα 2.98ppm ήταν αυξημένα στα άτομα ηλικίας $>$ 45 ετών (Πίνακας 3.2).



Εικόνα 3.4 Γραφήματα και συντεταγμένα διαγράμματα συντελεστών παλινδρόμησης των στατιστικών μοντέλων με βάση την ηλικία.

Ηλικιακή ομάδα I: ≤ 45 ετών (\blacktriangle) και > 45 ετών (\blacksquare). Γράφημα συντεταγμένων: α) PCA, β) OSC/PLS-DA. γ) διάγραμμα συντελεστών παλινδρόμησης OSC/PLS-DA. Ηλικιακή ομάδα II: < 35 ετών (\blacktriangle) και > 35 ετών (\blacksquare). Γράφημα συντεταγμένων: δ) PCA, ε) OSC/PLS-DA. ζ) διάγραμμα συντελεστών παλινδρόμησης OSC/PLS-DA.



Για μια περαιτέρω διερεύνηση της προαναφερθείσας διάκρισης που παρατηρήθηκε στα μοντέλα OSC/PLS-DA, μελετήθηκαν δυο πιο διακριτές ηλικιακές υποομάδες επιλέγοντας τα άτομα ηλικίας < 35 και > 50 ετών, που αποτέλεσαν και την ηλικιακή υποομάδα II (Πίνακας 3.2). Το γράφημα συντεταγμένων PCA για την 3^η PC έδειξε μια αδρή τάση διαχωρισμού (Εικόνα 3.4δ), η οποία δεν βελτιώθηκε στο μοντέλο PLS-DA. Το αντίστοιχο όμως μοντέλο OSC/PLS-DA συνετέλεσε σε έναν πλήρη διαχωρισμό των 2 ηλικιακών υποομάδων (Εικόνα 3.4ε). Με βάση το διάγραμμα συντελεστών παλινδρόμησης (Εικόνα 3.4ζ) παρατηρήθηκε ότι το ΤΜΑΟ και σε μικρότερο βαθμό το κιτρικό οξύ και η φαινυλαλανίνη είχαν θετική συσχέτιση με τα άτομα ηλικίας > 50 ετών, ενώ η κρεατινίνη, το ιππουρικό οξύ και οι μεταβολίτες στην περιοχή 3.78 – 3.9ppm είχαν θετική συσχέτιση με τα άτομα ηλικίας < 35 ετών (Πίνακας 3.2). Η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου OSC/PLS-DA, όπως εκτιμήθηκε από τη παράμετρο Q^2 , ήταν 0.56 (Πίνακας 3.3)

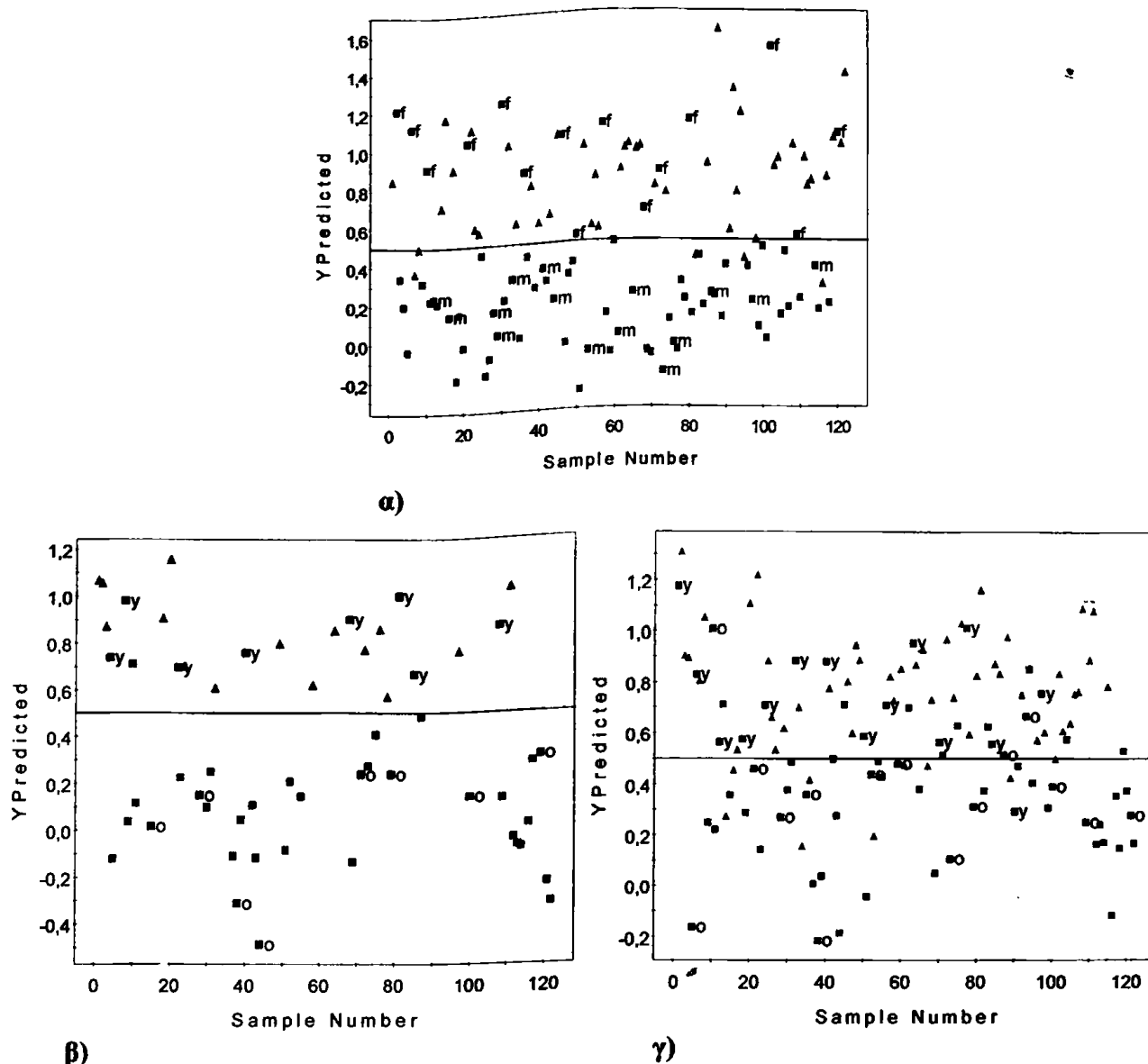
3.1.6 Δημιουργία στατιστικών μοντέλων με βάση το κάπνισμα

Η τεχνική αναγνώρισης προτύπων εφαρμόστηκε επίσης για την αξιολόγηση της πιθανής επίδρασης του καπνίσματος στα στατιστικά μοντέλα. Τα μοντέλα PCA ($R^2=0.33$, $Q^2=0.17$) και PLS-DA ($R^2=0.28$, $Q^2 < 0$) που δημιουργήθηκαν, δεν έδειξαν καμία τάση διαχωρισμού μεταξύ καπνιστών και μη καπνιστών, ενώ ούτε η εφαρμογή της τεχνικής φιλτραρίσματος OSC επέφερε κάποια περαιτέρω βελτίωση ($R^2Y=0.19$ και $Q^2 < 0$). Οι αρνητικές τιμές της στατιστικής παραμέτρου Q^2 είναι ενδεικτικές της μηδαμινής ικανότητας πρόβλεψης των αντίστοιχων στατιστικών μοντέλων.

3.1.7 Αξιολόγηση των μοντέλων OSC/PLS-DA

Ο έλεγχος της αξιοπιστίας των μοντέλων OSC/PLS-DA πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της εσωτερικής αξιολόγησης, όπου το 75% περίπου των δεδομένων συγκρότησε την ομάδα βαθμονόμησης και το υπόλοιπο 25% την ομάδα εσωτερικής αξιολόγησης (test set). Για το στατιστικό μοντέλο με βάση το φύλο, 92 άτομα (46 άνδρες / 46 γυναίκες) επιλέχθηκαν τυχαία και απετέλεσαν την ομάδα βαθμονόμησης, ενώ τα υπόλοιπα 30 άτομα (15 άνδρες / 15 γυναίκες) όρισαν την ομάδα αξιολόγησης. Το μοντέλο προέβλεψε ορθά το φύλο των ατόμων της ομάδας αξιολόγησης στο 100% των περιπτώσεων για επίπεδο σημαντικότητας < 0.05 (Εικόνα 3.5α). Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας του μοντέλου OSC/PLS-DA της ηλικιακής ομάδας II, 41 άτομα (15 ηλικίας < 35 και 26 ηλικίας > 50 ετών) επιλέχθηκαν τυχαία και συγκρότησαν την ομάδα βαθμονόμησης, ενώ τα υπόλοιπα 16 (8 ηλικίας < 35 και 8 ηλικίας > 50 ετών) αποτέλεσαν την ομάδα αξιολόγησης. Το μοντέλο ταξινόμησε ορθά την υποομάδα ηλικίας στο 100% των περιπτώσεων για επίπεδο σημαντικότητας < 0.05 (Εικόνα 3.5β).

Αν και η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου OSC/PLS-DA της ηλικιακής ομάδας I ήταν χαμηλή ($Q^2=0.35$), η αξιοπιστία του εξετάστηκε επιλέγοντας 92 άτομα ως ομάδα βαθμονόμησης (54 ≤ 45 ετών και 38 > 45 ετών) και 30 άτομα ως ομάδα αξιολόγησης (15 ≤ 45 ετών και 15 > 45 ετών). Το στατιστικό μοντέλο μπόρεσε να προβλέψει ορθά την υποομάδα ηλικίας στο 93% των ατόμων ηλικίας



Εικόνα 3.5 Διαγράμματα ελέγχου της αξιοπιστίας των μοντέλων OSC/PLS-DA.

Η ευθεία $y=0,5$ χρησιμοποιήθηκε ως όριο διαχωρισμού των εκάστοτε υποομάδων. α) Ομάδα φύλου: Ομάδα βαθμονόμησης: 46 άνδρες (■), 46 γυναίκες (▲). Ομάδα αξιολόγησης: 15 άντρες (■m), 15 γυναίκες (■f). β) Ηλικιακή ομάδα II: Ομάδα βαθμονόμησης: 15 άτομα < 35 (▲) και 26 άτομα > 50 ετών (■). Ομάδα αξιολόγησης: 8 άτομα < 35 (■y) και 8 άτομα > 50 ετών (■o). γ) Ηλικιακή ομάδα I: Ομάδα βαθμονόμησης: 54 άτομα ≤ 45 (▲) και 38 άτομα > 45 ετών (■). Ομάδα αξιολόγησης: 15 άτομα ≤ 45 (■y) και 15 άτομα > 50 ετών (■o).

≤ 45 ετών (14 άτομα στα 15) και στο 80% των ατόμων ηλικίας > 45 ετών (12 άτομα στα 15) για επίπεδο σημαντικότητας < 0.05 (Εικόνα 3.5γ)

Για μια περαιτέρω διερεύνηση των μεταβολιτών των οποίων η απέκκριση εμφάνισε την πιο σημαντική εξάρτηση με την αύξηση της ηλικίας και στα δυο φύλα, δημιουργήθηκαν επιμέρους μοντέλα OSC/PLS-DA χωριστά για τους άνδρες και χωριστά για τις γυναίκες. Τα άτομα από κάθε φύλο διαιρέθηκαν σε δύο υποομάδες ηλικίας: για τους άνδρες, 36 άτομα ≤ 45 και 25 άτομα > 45 ετών, ενώ για τις γυναίκες, 33 άτομα ≤ 45 και 28 άτομα > 45 ετών. Τα διαγράμματα συντελεστών παλινδρόμησης έδειξαν ότι τα επίπεδα κρεατινίνης, ιππουρικού και μυρμηγκικού οξέος ήταν αυξημένα στις γυναίκες ηλικίας ≤ 45 ετών, ενώ τα επίπεδα του TMAO, των N-ακετυλομάδων των γλυκοπρωτεϊνών, του

κιτρικού οξέος, της κρεατίνης καθώς και των μεταβολιτών που εμφάνισαν κορυφές συντονισμού στα 3.78, 8.82 και 9.14ppm ήταν αυξημένα στις γυναίκες ηλικίας > 45 ετών. Αντίστοιχα στους άνδρες, τα επίπεδα κρεατινίνης, ιππουρικού οξέος και των μεταβολιτών που εμφάνισαν κορυφές συντονισμού στα 4.34 και 8.10ppm ήταν υψηλότερα σε αυτούς ηλικίας ≤ 45 ετών, ενώ τα επίπεδα ΤΜΑΟ, κιτρικού οξέος, ταυρίνης, γλυκίνης, γαλακτικού οξέος, καθώς και των μεταβολιτών που εμφάνισαν κορυφές συντονισμού στην περιοχή 2.22-2.30ppm ήταν υψηλότερα αυτούς ηλικίας > 45 ετών. Όταν εξετάστηκαν τα αντίστοιχα μοντέλα OSC/PLS-DA για τις υποομάδες της ηλικιακής ομάδας II και για τα δύο φύλα, παρατηρήθηκαν αποτελέσματα παρόμοια με αυτά της ηλικιακής ομάδας I.

3.1.8 Ποσοτικός προσδιορισμός των κυριότερων μεταβολιτών των ούρων

Με βάση την ανάλυση πολυμεταβλητών δεδομένων, οι κυριότεροι μεταβολίτες που συνεισέφεραν στο διαχωρισμό των υπό μελέτη ομάδων και ανιχνεύθηκαν σε όλα τα δείγματα ούρων του υγιούς πληθυσμού ήταν: τα οξέα 3-HB και γαλακτικό, η αλανίνη, τα οξέα ηλεκτρικό και κιτρικό, η DMA, το ΤΜΑΟ, η γλυκίνη και το ιππουρικό οξύ. Οι κορυφές που επελέγησαν για την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών αυτών ήταν αυτές των παρακάτω χημικών μετατοπίσεων (ppm): για το 3-HB στα 1.22 (διπλή), του γαλακτικού οξέος στα 1.34 (διπλή), της αλανίνης στα 1.48 (διπλή), του ηλεκτρικού οξέος στα 2.42 (απλή), του κιτρικού οξέος στα 2.54 (διπλή) και στα 2.70 (διπλή), της DMA στα 2.74 (απλή), του ΤΜΑΟ στα 3.27 (απλή), της γλυκίνης στα 3.57 (απλή) και του ιππουρικού οξέος στα 7.82 (διπλή).

Στον Πίνακα 3.4 φαίνεται ότι με βάση την ποσοτικοποίηση στην ομάδα φύλου, η απέκκριση του 3-HB ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη στους άνδρες, ενώ η απέκκριση των οξέων γαλακτικό,

Πίνακας 3.4 Συγκεντρώσεις των κυριότερων μεταβολιτών (mmoles/mol κρεατινίνης) της ομάδας φύλου.

Ατομα		Συνολικά (N = 122)		Άνδρες (N = 61)		Γυναίκες (N = 61)		p*
Μεταβολίτες	δ (H)	Mean ± SD	Διάστημα εμπιστοσύνης	Mean ± SD	Διάστημα εμπιστοσύνης	Mean ± SD	Διάστημα εμπιστοσύνης	
3-HB	1.22	35.6 ± 12.0	33.4 - 37.8	38.9 ± 13.9	35.3 - 42.5	32.3 ± 8.7	30.1 - 34.5	< 0.005
Γαλακτικό	1.34	38.2 ± 14.2	35.7 - 40.8	33.2 ± 11.4	30.3 - 36.1	43.2 ± 15.1	39.4 - 47.1	< 0.001
Αλανίνη	1.48	33.9 ± 12.7	31.6 - 36.2	33.5 ± 14.0	29.9 - 37.1	34.3 ± 11.5	31.3 - 37.2	NS
Ηλεκτρικό	2.42	12.2 ± 5.4	11.2 - 13.2	9.9 ± 5.0	8.6 - 11.2	14.4 ± 4.9	13.2 - 15.7	< 0.001
Κιτρικό	2.54, 2.70	226.7 ± 115.3	206.0 - 247.4	172.8 ± 87.4	150.4 - 195.1	280.6 ± 115.2	251.1 - 310.1	< 0.001
DMA	2.74	36.8 ± 9.1	35.2 - 38.5	34.4 ± 9.3	32.0 - 36.8	39.3 ± 8.3	37.1 - 41.4	< 0.005
ΤΜΑΟ	3.27	70.8 ± 63.0	59.5 - 82.0	74.4 ± 76.6	54.8 - 94.1	67.1 ± 45.8	55.3 - 78.8	NS
Γλυκίνη	3.57	157.8 ± 85.1	142.6 - 173.1	128.1 ± 65.5	111.3 - 144.8	187.6 ± 92.3	163.9 - 211.2	< 0.001
Ιππουρικό	3.98, 7.82	191.6 ± 122.1	169.7 - 213.5	175.9 ± 124.3	144.1 - 207.8	207.3 ± 118.8	176.8 - 237.7	NS

p*: Η σύγκριση των υποομάδων φύλου έγινε με unpaired t-test. Συντμήσεις: Μ. Τ.: μέση τιμή, Τ. Α.: τυπική απόκλιση, NS: στατιστικώς μη σημαντικό (p>0.05).

ηλεκτρικό και κιτρικό, της DMA και της γλυκίνης στις γυναίκες. Τα επίπεδα του TMAO, του ιππουρικού οξέος και της αλανίνης δεν εμφάνισαν στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των δυο φύλων (Πίνακας 3.4). Όσον αφορά την ποσοτικοποίηση στην ηλικιακή ομάδα I, μόνο τα επίπεδα της DMA ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένα στα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας (Πινάκας 3.5), ενώ παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην ηλικιακή ομάδα II. Τόσο στην ομάδα φύλου όσο και στις ομάδες ηλικίας, τα ποσοτικά αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με τα αποτελέσματα της μεταβιομικής πριν την εφαρμογή της τεχνικής OSC για την αφαίρεση της διατομικής μεταβλητότητας.

Πίνακας 3.5 Συγκεντρώσεις των κυριότερων μεταβολιτών (mmoles/mol κρεατινίνης) της ηλικιακής ομάδας I.

Άτομα		<45 ετών (N = 69)		>45 ετών (N = 53)		
Μεταβολίτες	δ (°H)	Mean ± SD	Διάστημα εμπιστοσύνης	Mean ± SD	Διάστημα εμπιστοσύνης	p*
3-HB	1.22	35.2 ± 12.7	32.2 - 38.3	36.1 ± 11.2	33.0 - 39.1	NS
Γαλακτικό	1.34	37.3 ± 15.1	33.6 - 40.9	39.5 ± 12.9	35.9 - 43.0	NS
Αλανίνη	1.48	33.8 ± 12.1	30.8 - 36.7	34.1 ± 13.6	30.3 - 37.8	NS
Ηλεκτρικό	2.42	11.9 ± 5.1	10.7 - 13.1	12.6 ± 5.9	11.0 - 14.2	NS
Κιτρικό	2.54, 2.70	220.3 ± 120.2	191.4 - 249.2	235.0 ± 109.2	204.9 - 265.1	NS
DMA	2.74	34.0 ± 6.5	32.5 - 35.6	40.5 ± 10.6	37.6 - 43.5	< 0.001
TMAO	3.27	62.5 ± 59.0	48.3 - 76.7	81.5 ± 66.8	63.1 - 99.9	NS
Γλυκίνη	3.57	153.2 ± 82.8	133.3 - 173.0	163.9 ± 88.5	139.5 - 188.3	NS
Ιππουρικό	3.98, 7.82	174.7 ± 102.6	150.0 - 199.3	213.6 ± 141.6	174.6 - 252.7	NS



3.2 Μελέτη του μεταβολικού προφίλ των ούρων των ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα

3.2.1 1D και 2D ¹H-NMR φάσματα των ούρων

Στην **Εικόνα 3.6** φαίνονται τέσσερα ενδεικτικά φάσματα ¹H-NMR ούρων 500 MHz από ένα υγιές άτομο και από τρεις ασθενείς με ήπια, μέτρια και σοβαρή νεφρική βλάβη αντίστοιχα, που απεικονίζουν το εκάστοτε προφίλ των απεκκρινόμενων μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους. Τα κύρια συστατικά του φάσματος ούρων του υγιούς ατόμου είναι η κρεατινίνη, το ιππουρικό οξύ, το κιτρικό οξύ, η γλυκίνη, το TMAO, η DMA, ίχνη από τα ανιόντα των οξέων γαλακτικό και 3-HB καθώς και αμινοξέων όπως αλανίνη, ιστιδίνη, βαλίνη και φαινυλαλανίνη (Bales et al., 1984a). Στο φάσμα ούρων από τον ασθενή με ήπια νεφρική βλάβη παρατηρείται μειωμένη απέκκριση ιππουρικού και κιτρικού οξέος καθώς και γλυκίνης, ενώ το φάσμα του ασθενή με μέτρια βλάβη χαρακτηρίζεται από περαιτέρω μείωση της απέκκρισης των οξέων κιτρικό και ιππουρικό και της γλυκίνης, καθώς και από σταδιακή αύξηση της απέκκρισης γαλακτικού οξέος, αλανίνης και φαινυλαλανίνης. Το φάσμα από τον ασθενή με τη σοβαρή νεφρική βλάβη χαρακτηρίζεται από σημαντική έως πλήρη αναστολή της απέκκρισης κιτρικού, ιππουρικού και γλυκίνης, από αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, γαλακτικού οξέος, των αμινοξέων αλανίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη καθώς και από μια ήπια ανύψωση της γραμμής βάσης στην περιοχή συντονισμού (0.5 – 1.8ppm) των αλειφατικών πρωτονίων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων των πρωτεϊνών που απεκκρίνονται στα ούρα.

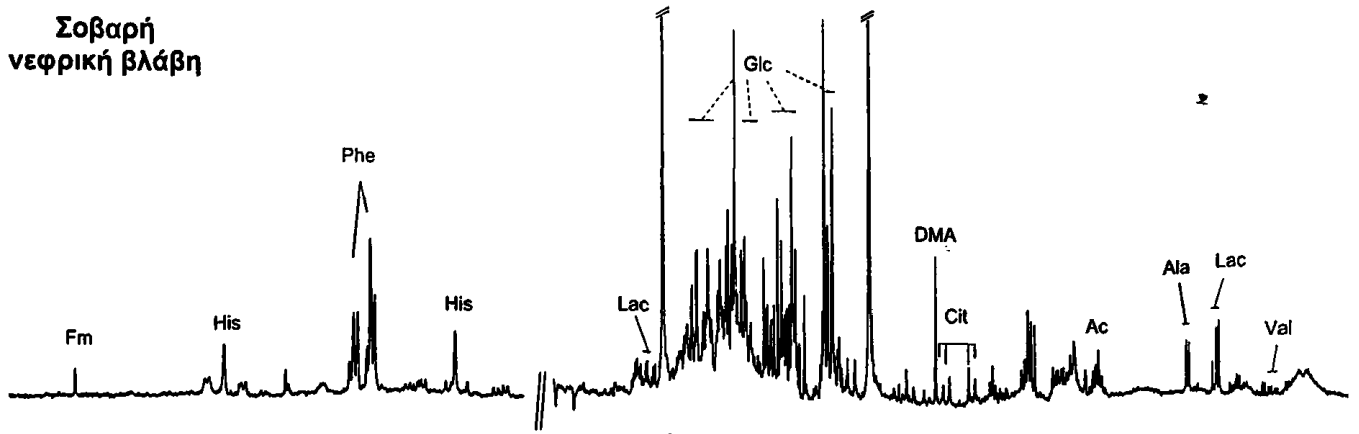
Σε ένα σημαντικό αριθμό ασθενών, εκτός από τα αυξημένα επίπεδα TMAO, παρατηρήθηκε και αυξημένη απέκκριση ενός ή περισσοτέρων μεταβολιτών που περιέχουν την N-τριμεθυλομάδα της χολίνης (περιοχή 3.20 – 3.30ppm), χωρίς όμως να ακολουθεί τη σοβαρότητα της νεφρικής βλάβης. Στην **Εικόνα 3.7** φαίνεται το φάσμα ¹H NMR 2D TOCSY ούρων 500 MHz του ασθενή με σοβαρή νεφρική βλάβη της **Εικόνας 3.6**, το οποίο πραγματοποιήθηκε για την ταυτοποίηση μεταβολιτών που παρουσίαζαν μεγάλο βαθμό αλληλοεπικάλυψης στο φάσμα μιας διάστασης.

3.2.2 Γενική επισκόπηση του συνόλου των πολυμεταβλητών δεδομένων

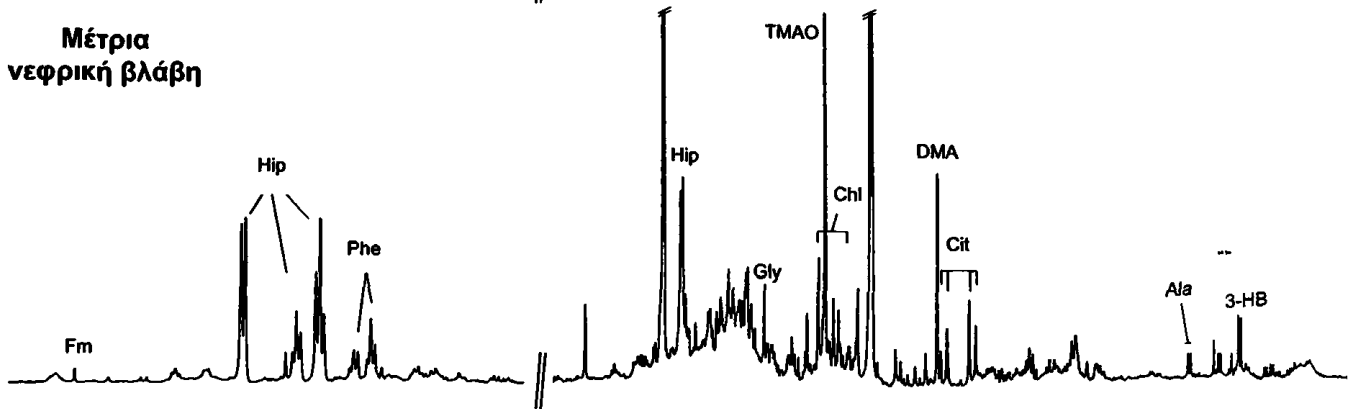
Από την ομάδα του υγιούς πληθυσμού επελέγησαν 85 άτομα ίδιου φύλου και παρόμοιας ηλικίας με την ομάδα των 80 ασθενών που υποβλήθηκαν σε βιοψία νεφρού. Μετά από προσεκτική εξέταση των φασμάτων των ασθενών εξαιρέθηκαν τρία επειδή εντοπίστηκαν κορυφές συντονισμού πολύ υψηλής έντασης από μη ταυτοποιημένους μεταβολίτες. Συγκεκριμένα, και στα τρία αυτά φάσματα εμφανίστηκαν κορυφές συντονισμού στην περιοχή 3.5 – 3.8ppm (**Εικόνα 3.8**), προερχόμενες πιθανά από προϊόντα μεταβολισμού φαρμάκων που είχαν λάβει οι ασθενείς πριν από τη λήψη των δειγμάτων ούρων, ενώ σε ένα (**Εικόνα 3.8α**) εμφανίστηκαν επιπλέον δυο κορυφές στα 2.16 και 2.18ppm, ενδεχομένως από λήψη παρακεταμόλης (Holmes et al., 2007). Το τελικό σύνολο των πολυμεταβλητών δεδομένων περιελάμβανε 85 υγιείς και 77 ασθενείς (25 με ήπια, 27 με μέτρια και 25 με σοβαρή νεφρική βλάβη).



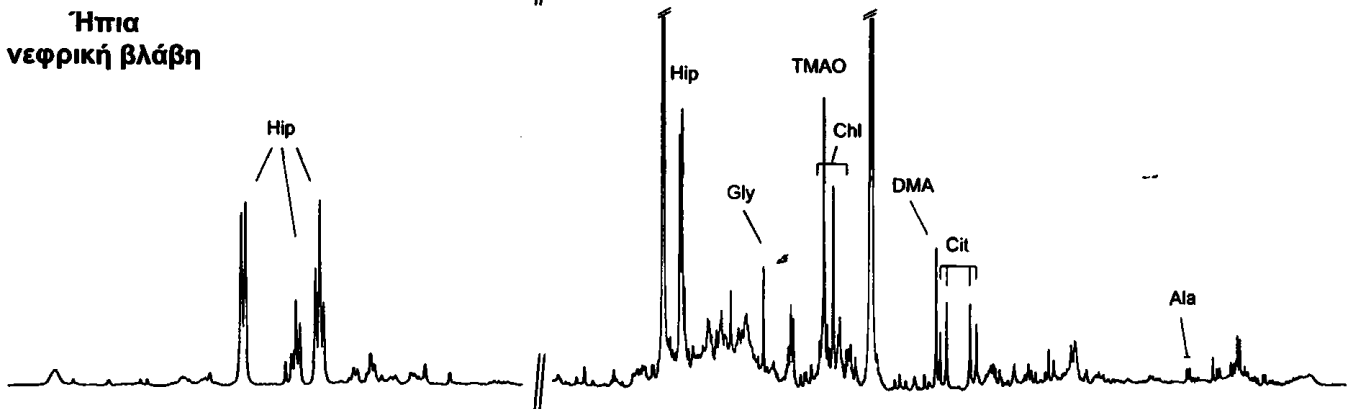
**Σοβαρή
νεφρική βλάβη**



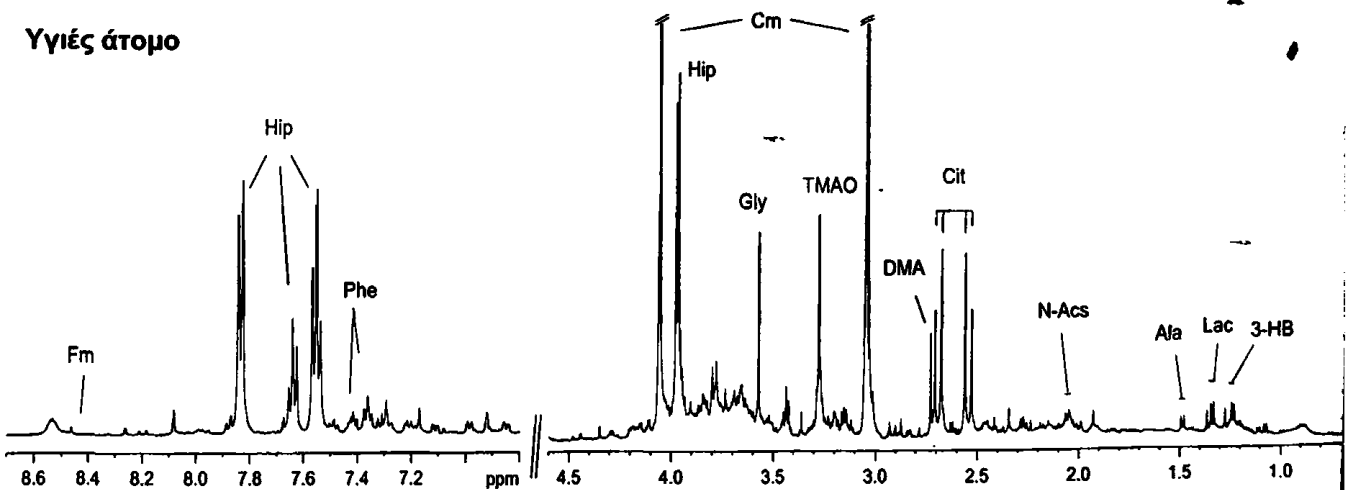
**Μέτρια
νεφρική βλάβη**



**Ήπια
νεφρική βλάβη**

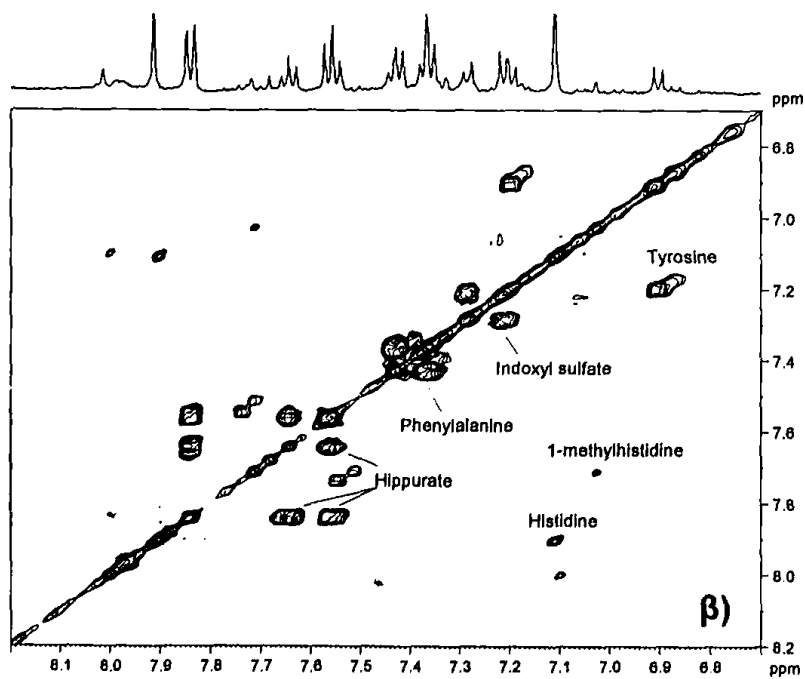
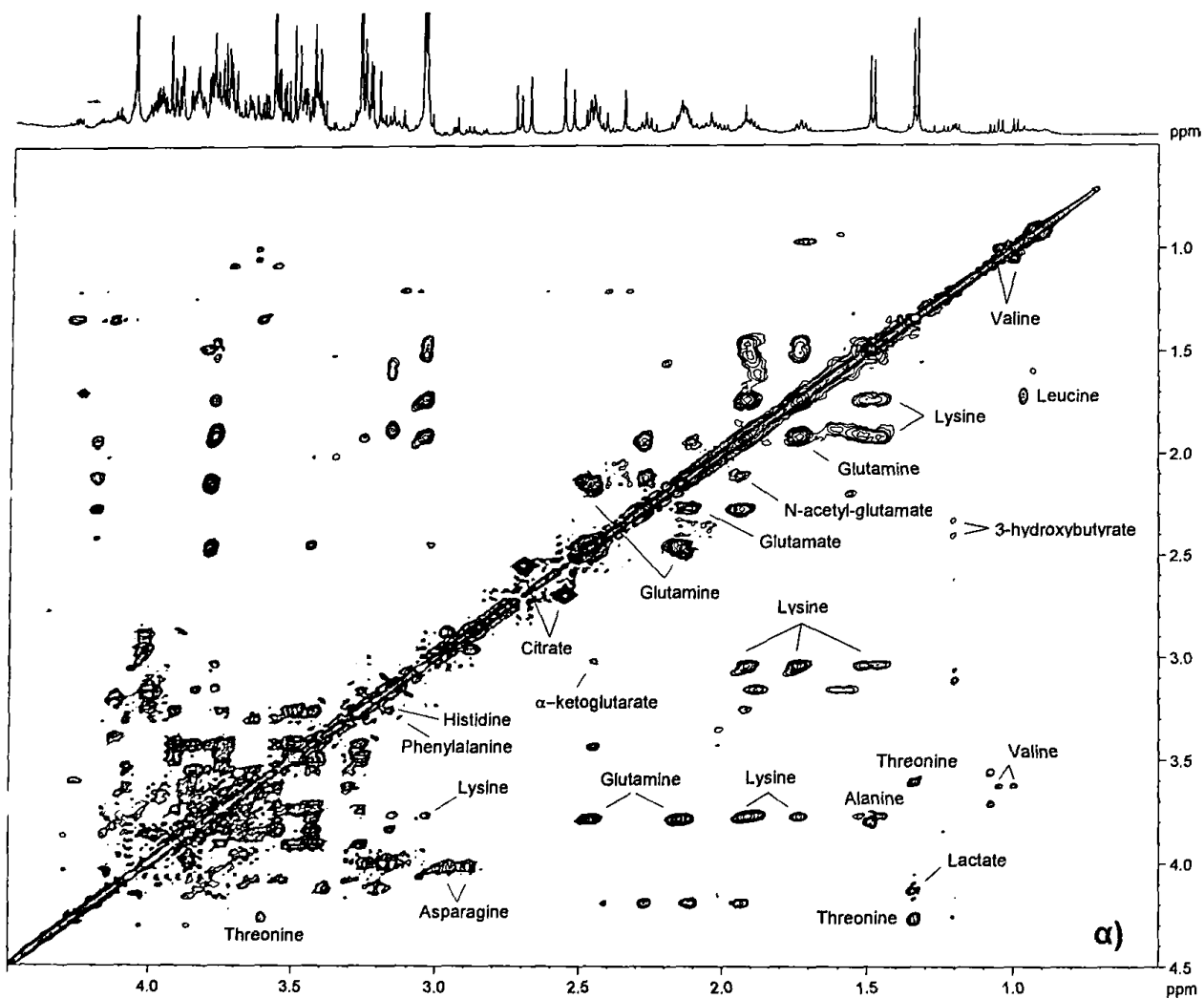


Υγιές άτομο

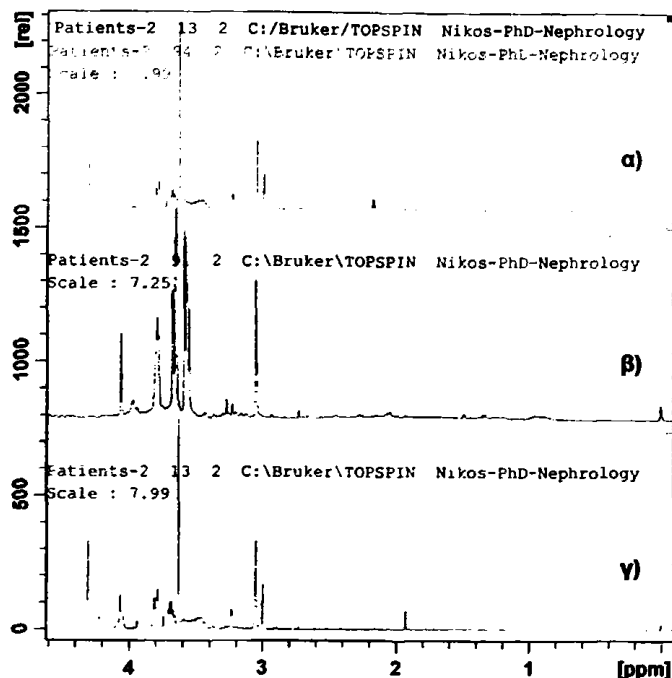


Εικόνα 3.6 Ενδεικτικά φάσματα $^1\text{H-NMR}$ ούρων 500 MHz (δ 0.3 – 8.7ppm) από υγιές άτομο και από ασθενείς με ήπια, μέτρια και σοβαρή νεφρική βλάβη.





Εικόνα 3.7 Φάσμα ^1H NMR 2D TOCSY ούρων 500 MHz από ασθενή με σοβαρή νεφρική βλάβη.
 α) αλειφατική περιοχή (0.5 – 4.5) και β) αρωματική περιοχή (6.7 – 8.2ppm).



Εικόνα 3.8 Φάσματα ^1H NMR ούρων (0.0 – 4.6ppm) των 3 ασθενών που εξαιρέθηκαν από τη μελέτη.

3.2.3 Βιοχημικές παράμετροι του πληθυσμού της μελέτης

Στον Πίνακα 3.6 αναγράφονται τα δημογραφικά στοιχεία και οι κύριες βιοχημικές παράμετροι του πληθυσμού των 85 υγιών και των 77 ασθενών. Στην ομάδα των ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα (ΣΠΝ) παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα επίπεδα κρεατινίνης ορού και ολικών πρωτεϊνών και χαμηλότερα επίπεδα αλβουμίνης ορού και GFR σε σύγκριση με την ομάδα των υ-

Πίνακας 3.6 Δημογραφικά στοιχεία και κύριες βιοχημικές παράμετροι του πληθυσμού της μελέτης.

	Υγιείς	Ασθενείς	p	Υποομάδες των ασθενών με ΣΠΝ ¹		
				Ήπια	Μέτρια	Σοβαρή
Αριθμός	85	77		25	27	25
Φύλο (άνδρες/γυναίκες)	42/43	45/32		12/13	19/8	15/10
	Mean \pm SD	Mean \pm SD		Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Ηλικία	52.0 \pm 8.7	55.5 \pm 15.4	NS	49.2 \pm 17.8	56.9 \pm 9.7	55.4 \pm 16.8
Κρεατινίνη ορού (mg/dL)	0.9 \pm 0.2	2.0 \pm 1.8	< 0.001	1.1 \pm 0.4	1.5 \pm 0.4**	1.6 \pm 0.5***
Αλβουμίνη ορού (g/dL)	4.4 \pm 0.3	3.5 \pm 0.7	< 0.001	3.6 \pm 0.7	3.6 \pm 0.7	3.2 \pm 0.7
Ολικές Πρωτεΐνες ούρων (g/24h)	0.015 \pm 0.012	0.370 \pm 0.540	< 0.001	0.150 \pm 0.209	0.427 \pm 0.595*	0.622 \pm 0.710*
GFR (mL/min/1.73 m ²)	85.2 \pm 11.1	48.6 \pm 25.2	< 0.001	68.8 \pm 23.9	49.4 \pm 15.5**	40.4 \pm 14.4**

*: Σοβαρότητα των αλλοιώσεων του σωληναριοδιάμεσου ιστού βάσει της ιστοπαθολογικής ανάλυσης.

#: p<0.05, ##: p<0.01, ###: p<0.001 επίπεδα εμπιστοσύνης t-test σε σύγκριση με την υποομάδα ήπιας βλάβης.



γιών. Παρατηρήθηκαν επίσης στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών υποομάδων των ασθενών, όπως καθορίστηκαν από τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων του σωληναριοδιάμεσου ιστού βάσει της ιστοπαθολογικής ανάλυσης. Οι υποομάδες των ασθενών με αλλοιώσεις μέτριας και σοβαρής βλάβης είχαν στατιστικά σημαντικά διαφορετικά επίπεδα κρεατινίνης, GFR και πρωτεϊνών των ούρων από την υποομάδα ήπιας βλάβης, ενώ καμία στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε μεταξύ των υποομάδων μέτριας και σοβαρής βλάβης.

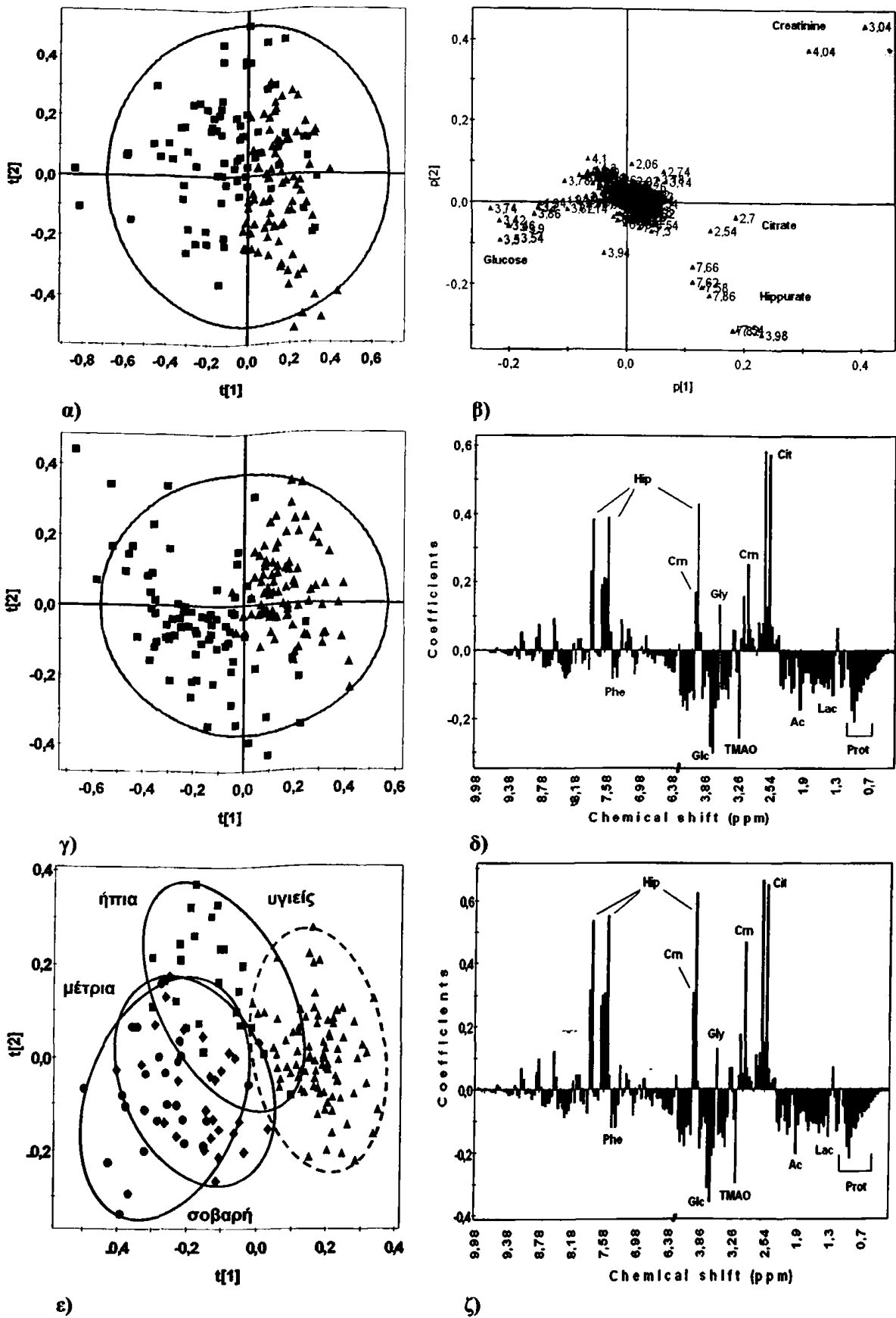
3.2.4 Μεταβονομική προσέγγιση

Αρχικά εφαρμόστηκε η τεχνική PCA και το αντίστοιχο γράφημα συντεταγμένων (Εικόνα 3.9α) έδειξε μια τάση διαχωρισμού μεταξύ των ομάδων ασθενών και υγιών, με τους υγιείς να κατανέμονται στο δεξιό τμήμα και τους ασθενείς κυρίως στην αριστερή περιοχή. Επίσης στο ίδιο γράφημα εντοπίστηκαν στην περιοχή κατανομής των ασθενών δυο δείγματα με έντονα ακραία συμπεριφορά (εκτός της έλλειψης Hotelling T²), τα αντίστοιχα φάσματα των οποίων χαρακτηρίστηκαν κυρίως από κορυφές υψηλής έντασης για τη γλυκόζη και χαμηλής για την κρεατινίνη. Με βάση το αντίστοιχο γράφημα φορτίων (Εικόνα 3.9β), οι περιοχές του φάσματος που συνέβαλαν περισσότερο στη τάση διαχωρισμού των δυο ομάδων προέρχονταν από τις κορυφές της κρεατινίνης και των οξέων ιππουρικό και κιτρικό, με θετική συσχέτιση στους υγιείς, καθώς και από αυτές της γλυκόζης με θετική συσχέτιση στους ασθενείς.

Με την τεχνική PLS-DA επιτεύχθηκε ένας πιο ευδιάκριτος διαχωρισμός με κάποιο όμως βαθμό αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των δυο ομάδων (Εικόνα 3.9γ). Παρόλα αυτά, οι παράμετροι της explained variation R², και της εκτίμησης της ικανότητας πρόβλεψης Q², ήταν σημαντικά υψηλές, 0.67 και 0.61 αντίστοιχα (Πίνακας 3.7). Το αντίστοιχο διάγραμμα συντελεστών παλινδρόμησης (Εικόνα 3.9δ) έδειξε ότι εκτός από τους προαναφερθέντες μεταβολίτες, τα επίπεδα της γλυκίνης ήταν υψηλότερα στους υγιείς (συντελεστές με θετικές τιμές), ενώ τα επίπεδα των οξέων γαλακτικού και οξικού, του TMAO και των αλειφατικών πρωτονίων των πλευρικών ομάδων των αμινοξέων των πρωτεϊνών ήταν υψηλότερα στους ασθενείς (συντελεστές με αρνητικές τιμές).

Για να διερευνηθεί η δυνατότητα της ¹H-NMR μεταβονομικής ανάλυσης να διακρίνει τη σοβαρότητα των αλλοιώσεων του σωληναριοδιάμεσου ιστού, η τεχνική PLS-DA εφαρμόστηκε για τη σύγκριση των υγιών ατόμων με καθεμία από τις τρεις υποομάδες των ασθενών που χαρακτηρίστηκαν από ήπια, μέτρια και σοβαρή νεφρική βλάβη (Πίνακας 3.10). Από τις τιμές των παραμέτρων R² και Q² είναι εμφανές, ότι όσο σοβαρότερη καθίσταται η νεφρική βλάβη τόσο οι τιμές των παραμέτρων αυξάνονται, που σημαίνει ότι αφενός τα στατιστικά μοντέλα περιγράφουν καλύτερα την πληροφορία που υπάρχει στα δεδομένα, αφετέρου ότι η ικανότητα πρόβλεψής τους αυξάνει.

Για την ελαχιστοποίηση της πιθανής επίδρασης της διατομικής μεταβλητότητας εφαρμόστηκε η τεχνική OSC με την οποία αφαιρέθηκαν δυο ορθογώνιες συνιστώσες και επαναλήφθηκε η τεχνική PLS-DA. Η εξέταση των δυο ορθογώνιων συνιστωσών που αφαιρέθηκαν, αποκάλυψε ότι οι μεταβολί-



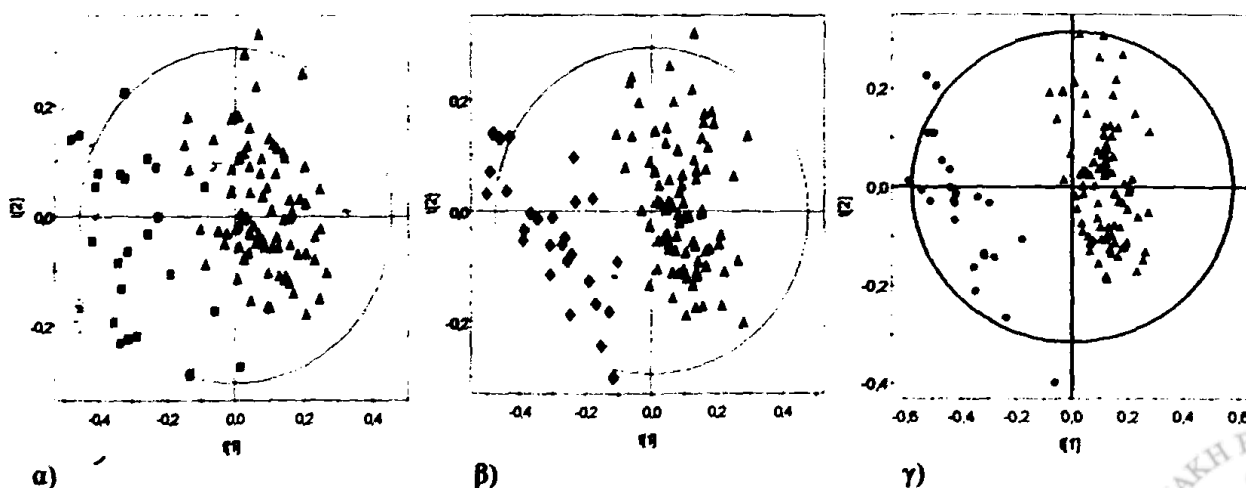
Εικόνα 3.9 Γραφήματα συντεταγμένων και διαγράμματα των μοντέλων PCA, PLS-DA και OSC/PLS-DA*

85 υγιείς (▲), 77 ασθενείς (■). **PCA**: α) γράφημα συντεταγμένων, β) γράφημα φορτίων. **PLS-DA**: γ) γράφημα συντεταγμένων, δ) διάγραμμα συντελεστών παλινδρόμησης. **OSC/PLS-DA**: 25 με ήπια (■), 27 με μέτρια (●), 25 με σοβαρή νεφρική βλάβη (●). ε) γράφημα συντεταγμένων. ζ) διάγραμμα συντελεστών παλινδρόμησης.

Πίνακας 3.7 Παράμετροι των μοντέλων PLS-DA και OSC/PLS-DA μεταξύ υγιών – ασθενών.

Σύνολικά: 85 Υγείς – 77 Ασθενείς (25 με ήπια – 27 με μέτρια – 25 με σοβαρή)								
Υποομάδες	Υγείς – Ασθενείς		Υγείς – Ήπια		Υγείς - Μέτρια		Υγείς - Σοβαρή	
	R ²	Q ²	R ²	Q ²	R ²	Q ²	R ²	Q ²
PLS-DA	0.67	0.61	0.63	0.39	0.73	0.62	0.85	0.79
OSC/PLS-DA	0.80	0.73	0.75	0.58	0.81	0.70	0.89	0.84

τες με τη μεγαλύτερη διατομική μεταβλητότητα ήταν το υπουρικό οξύ, η κρεατινίνη, το κιτρικό οξύ και το ΤΜΑΟ, παρατήρηση που έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Zurri et al., 1998). Το γράφημα συντεταγμένων των δυο πρώτων PCs του μοντέλου OSC/PLS-DA κατέδειξε ένα σαφή διαχωρισμό μεταξύ ασθενών και υγιών, με τα δείγματα των υγιών να συγκροτούν μια συμπαγή ομάδα στο δεξιό τμήμα του γραφήματος για θετικές τιμές της PC1 (Εικόνα 3.9ε). Τα δείγματα των ασθενών καταλαμβάνουν μια αρκετά μεγαλύτερη περιοχή στο αριστερό τμήμα για αρνητικές τιμές της PC1 και φαίνεται ότι κατανέμονται πιο μακριά από την ομάδα των υγιών ακολουθώντας το βαθμό επιδείνωσης της νεφρικής βλάβης από ήπια σε σοβαρή. Το διάγραμμα των συντελεστών παλινδρόμησης για την πρώτη συνιστώσα έδειξε ότι οι περιοχές του φάσματος που συνέβαλαν στο διαχωρισμό παρέμειναν σχεδόν οι ίδιες με αυτές του μοντέλου PLS-DA, με αυξημένη όμως τη συνεισφορά των συντελεστών που αντιστοιχούσαν στην κρεατινίνη, στα οξέα υπουρικό και κιτρικό καθώς και στη γλυκόζη (Εικόνα 3.9ζ). Οι τιμές των παραμέτρων R² και Q² βελτιώθηκαν σε 0.80 και 0.73 αντίστοιχα, καθώς επίσης και αυτές μεταξύ των υγιών και κάθε υποομάδας των ασθενών (Πίνακας 3.7). Στα επιμέρους γραφήματα συντεταγμένων OSC/PLS-DA μεταξύ των υγιών με κάθε υποομάδα ασθενών είναι πολύ εμφανές, ότι όσο σοβαρότερη καθίσταται η νεφρική βλάβη τόσο η κατανομή των ασθενών μετατοπίζεται προς τα αριστερά απομακρυνόμενη από την ομάδα των υγιών (Εικόνα 3.10).



Εικόνα 3.10 Γραφήματα συντεταγμένων OSC/PLS-DA μεταξύ υγιών και των 3 υποομάδων των ασθενών. 85 υγείς (▲). α) 25 ασθενείς με ήπια (■), β) 27 με μέτρια (◆), γ) 25 με σοβαρή νεφρική βλάβη (●).

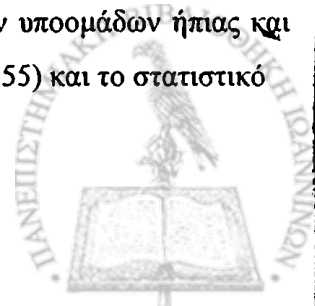
Βάσει των συντελεστών παλινδρόμησης του μοντέλου OSC/PLS-DA μεταξύ υγιών και ασθενών, οι υγιείς εμφάνισαν αυξημένη απέκκριση των οξέων κιτρικού και ιππουρικού καθώς και κρεατινίνης, ενώ οι ασθενείς είχαν κυρίως αυξημένα επίπεδα γλυκόζης, μιας ομάδας μεταβολιτών με κορυφές συντονισμού στην περιοχή 3.70 – 3.74ppm, ενός ή περισσότερων μεταβολιτών της N-τριμεθυλομάδας της χολίνης, πρωτεϊνών και οξικού οξέος (Πίνακας 3.8).

Πίνακας 3.8 Συντελεστές παλινδρόμησης του μοντέλου OSC/PLS-DA μεταξύ υγιών και ασθενών.

Φασματικές περιοχές	Μεταβολίτες	Υγιείς – Ασθενείς		Τιμές Συντελεστών
		Υ	A	
0.94 – 0.98	Πρωτεΐνες	↓	↑	0.22
1.34	Γαλακτικό	↓	↑	0.16
1.94	Οξικό	↓	↑	0.20
2.54, 2.70	Κιτρικό	↑	↓	0.67
3.04, 4.04	Κρεατινίνη	↑	↓	0.44
3.22 – 3.30	Μεταβολίτες χολίνης	↓	↑	0.30
3.58	Γλυκίνη	↑	↓	0.16
3.34 – 3.90 3.70 – 3.74	Γλυκόζη - Μη ταυτοποιημένοι *	↓	↑	0.31
3.94	Κρεατίνη	↑	↓	0.06
3.98, 7.82	Ιππουρικό	↑	↓	0.55
7.38 & 7.46	Φαινυλαλανίνη	↓	↑	0.1

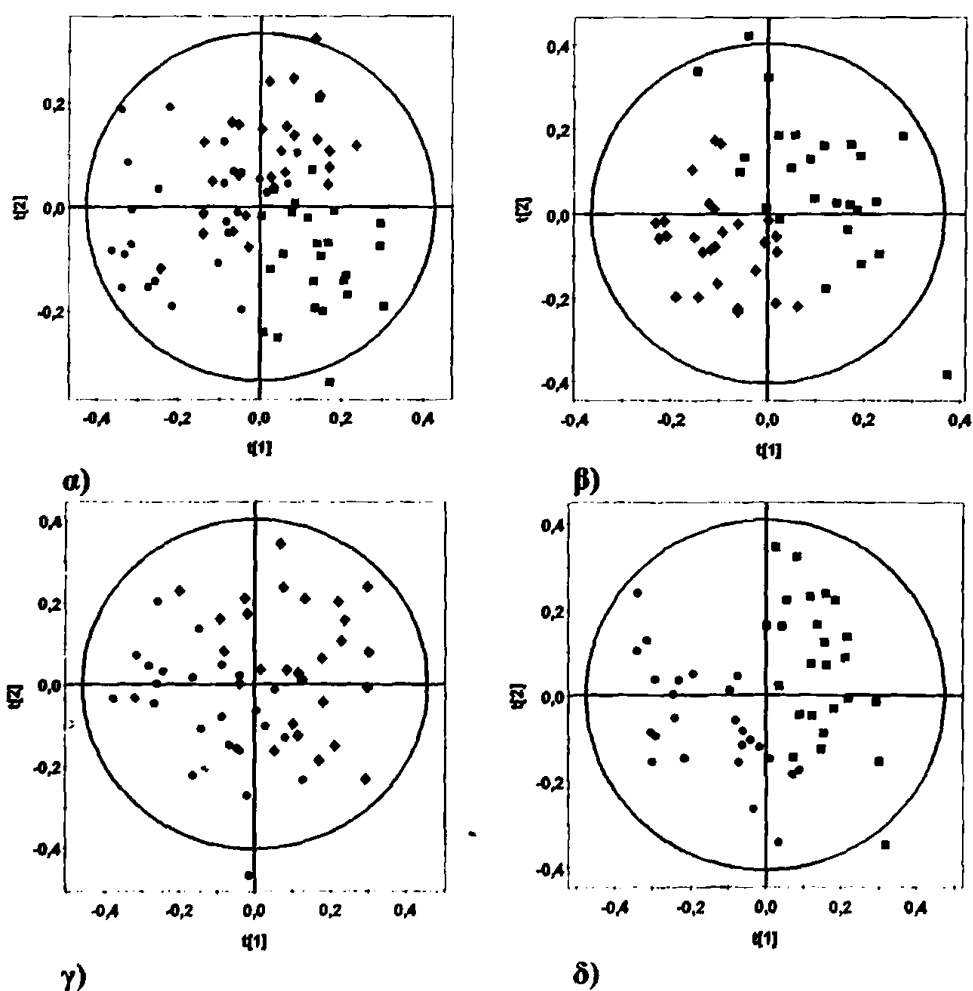
*Ομάδα μη ταυτοποιημένων μεταβολιτών (3.70 – 3.74ppm) πιθανά από αλληλοεπικαλυπτόμενες κορυφές συντονισμού της γλυκόζης ή άλλων υδατανθράκων και των α-πρωτονίων διαφόρων αμινοξέων (Ebbels et al., 2004). Συντιμήσεις: Υ: υγιείς, A: ασθενείς.

Στη συνέχεια δημιουργήθηκαν επιπλέον στατιστικά μοντέλα ώστε να γίνει σύγκριση των τριών ομάδων των ασθενών μεταξύ τους αλλά και κατά ζεύγος (Πίνακας 3.9, Εικόνα 3.11). Όπως υποδεικνύεται από τις παραμέτρους R^2 και Q^2 των μοντέλων PLS-DA (Πίνακας 3.9), ο διαχωρισμός μεταξύ των τριών υποομάδων των ασθενών ήταν χαμηλής σημαντικότητας. Στην κατά ζεύγος σύγκριση, η υποομάδα της μέτριας βλάβης έδειξε έναν μερικό διαχωρισμό από τις υποομάδες ήπιας και μέτριας βλάβης, ενώ ένας πιο ευδιάκριτος διαχωρισμός παρατηρήθηκε μεταξύ των υποομάδων ήπιας και σοβαρής βλάβης ($R^2 = 0.73$ και $Q^2 = 0.46$). Τα αντίστοιχα μοντέλα OSC/PLS-DA έδειξαν παρόμοια ικανότητα διαχωρισμού (Πίνακας 3.9) εκτός από αυτό μεταξύ των υποομάδων ήπιας και σοβαρής βλάβης, στο οποίο η τιμή της παραμέτρου Q^2 αυξήθηκε (0.46 προς 0.55) και το στατιστικό



Πίνακας 3.9 Παράμετροι των μοντέλων PLS-DA και OSC/PLS-DA των τριών υποομάδων των ασθενών σε σύγκριση μεταξύ τους και κατά ζεύγος.

Ομάδα ασθενών: 25 με ήπια - 27 με μέτρια - 25 με σοβαρή νεφρική βλάβη								
Υποομάδες βλάβης	Ήπια-Μέτρια-Σοβαρή		Ήπια-Μέτρια		Μέτρια-Σοβαρή		Ήπια-Σοβαρή	
Παράμετροι	R ²	Q ²	R ²	Q ²	R ²	Q ²	R ²	Q ²
PLS-DA								
Πλήρες φάσμα 0.2 - 10.0ppm	0.39	0.12	0.66	0.24	0.59	0.17	0.73	0.46
OSC/PLS-DA								
Πλήρες φάσμα 0.2 - 10.0ppm	0.43	0.16	0.72	0.31	0.60	0.23	0.79	0.55
Φάσμα χωρίς την περιοχή 0.2 - 1.82ppm	0.36	0.10	0.64	0.28	0.59	0.14	0.80	0.61
Αφαιρεθείσα περιοχή 0.2 - 1.82ppm	0.19	0.04	0.37	< 0	0.39	0.15	0.45	0.16



Εικόνα 3.11 Γραφήματα συντεταγμένων OSC/PLS-DA των 3 υποομάδων των ασθενών (πλήρες φάσμα).

α) Σε σύνολο 77 ασθενών: 25 με ήπια (■), 27 με μέτρια (◆), 25 με σοβαρή νεφρική βλάβη (●).

μοντέλο χαρακτηρίστηκε από στατιστικά σημαντική ικανότητα πρόβλεψης, όπως φαίνεται και στα αντίστοιχα γραφήματα συντεταγμένων (Εικόνα 3.11).

Με βάση τις τιμές των συντελεστών παλινδρόμησης (Πίνακας 3.10), οι μεταβολίτες που κυρίως συνέβαλαν στο διαχωρισμό της υποομάδας μέτριας βλάβης από αυτήν της ήπιας ήταν το κιτρικό οξύ, η κρεατίνη, η φαινυλαλανίνη, η γλυκόζη με την ομάδα των μη ταυτοποιημένων μεταβολιτών (3.70 - 3.74ppm), ενώ από αυτήν της σοβαρής βλάβης ήταν η κρεατινίνη, τα οξέα κιτρικό και ιππουρικό, η γλυκόζη με την ομάδα των μη ταυτοποιημένων μεταβολιτών (3.70 - 3.74ppm) καθώς και οι αλειφατικές ομάδες των πρωτεϊνών. Αντίστοιχα οι μεταβολίτες που κυρίως συνέβαλαν στο διαχωρισμό της υποομάδας ήπιας βλάβης από αυτήν της σοβαρής ήταν το κιτρικό οξύ, η κρεατινίνη, το ιππουρικό οξύ, η κρεατίνη, η γλυκόζη και η ομάδα των μη ταυτοποιημένων μεταβολιτών (3.70 - 3.74ppm), τα αλειφατικά πρωτόνια των πρωτεϊνών και η φαινυλαλανίνη.

Πίνακας 3.10 Συντελεστές παλινδρόμησης των μοντέλων OSC/PLS-DA των ασθενών σε σύγκριση κατά ζεύγος.

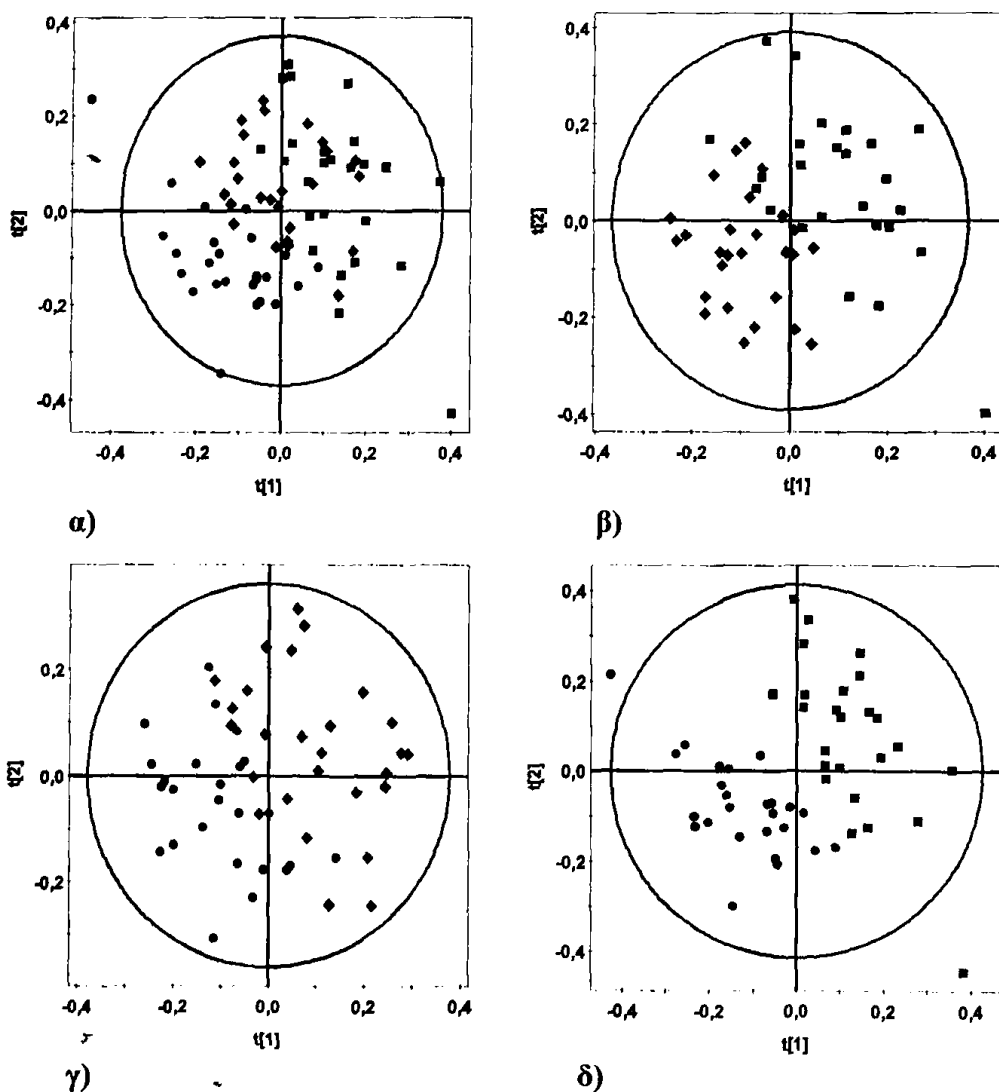
		Στατιστικά μοντέλα των υποομάδων νεφρικής βλάβης								
		Ήπια – Μέτρια		Μέτρια – Σοβαρή		Ήπια – Σοβαρή				
Φασματικές περιοχές	Μεταβολίτες	H	M	Τιμές συντελεστών	M	Σ	Τιμές συντελεστών	H	Σ	Τιμές συντελεστών
0.94 - 0.98	Πρωτεΐνες	↓	↑	0.26	↓	↑	0.32	↓	↑	0.34
1.34	Γαλακτικό	↓	↑	0.29	↑	↓	0.16	↓	↑	0.03
1.94	Οξικό	↓	↑	0.20	↑	↓	0.42	↑	↓	0.24
2.54, 2.70	Κιτρικό	↑	↓	0.46	↑	↓	0.27	↑	↓	0.49
3.04, 4.04	Κρεατινίνη	↓	↑	0.29	↑	↓	0.51	↑	↓	0.36
3.22 - 3.30	Μεταβολίτες χολίνης	↓	↑	0.33	↑	↓	0.23	↑	↓	0.23
3.58	Γλυκίνη	↑	↓	0.33	↑	↓	0.07	↑	↓	0.24
3.34 - 3.90 3.70 - 3.74	Γλυκόζη – Μη ταυτοποιημένοι*	↓	↑	0.34	↓	↑	0.33	↓	↑	0.34
3.94	Κρεατίνη	↑	↓	0.35	↑	↓	0.28	↑	↓	0.34
3.98, 7.82	Ιππουρικό	↑	↓	0.09	↑	↓	0.35	↑	↓	0.35
7.38, 7.46	Φαινυλαλανίνη	↑	↓	0.34	↑	↓	0.06	↑	↓	0.25

*Ομάδα μη ταυτοποιημένων μεταβολιτών (3.70 – 3.74ppm) πιθανά από αλληλοεπικαλυπτόμενες κορυφές συντονισμού της γλυκόζης άλλων υδατανθράκων και των α-πρωτονίων διαφόρων αμινοξέων (Ebbels et al., 2004). Συντμήσεις: Υποομάδες νεφρικής βλάβης: Η: ήπια, Μ: μέτρια, Σ: σοβαρή.



3.2.5 Αφαίρεση της περιοχής συντονισμού των αλειφατικών ομάδων των πρωτεϊνών

Επειδή η πρωτεϊνουρία αποτελεί συχνό εργαστηριακό εύρημα των νεφροπαθών (National Kidney Foundation, 2002), η κύρια φασματική περιοχή συντονισμού των αλειφατικών πρωτονίων των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων των πρωτεϊνών (0.20 - 1.82ppm) αφαιρέθηκε και η τεχνική OSC/PLS-DA εφαρμόστηκε εκ νέου στα υπόλοιπα φασματοσκοπικά δεδομένα (1.82 - 10.0ppm). Τα προκύψαντα στατιστικά μοντέλα ήταν επίσης σε θέση να διακρίνουν τις επιμέρους υποομάδες των ασθενών (Εικόνα 3.12) με παρόμοια ικανότητα πρόβλεψης (Πίνακας 3.9), ενώ η περιοχή συντονισμού των πρωτεϊνών δεν ήταν ικανή από μόνη της να διακρίνει τις υποομάδες (Πίνακας 3.9, Εικόνα 3.13).

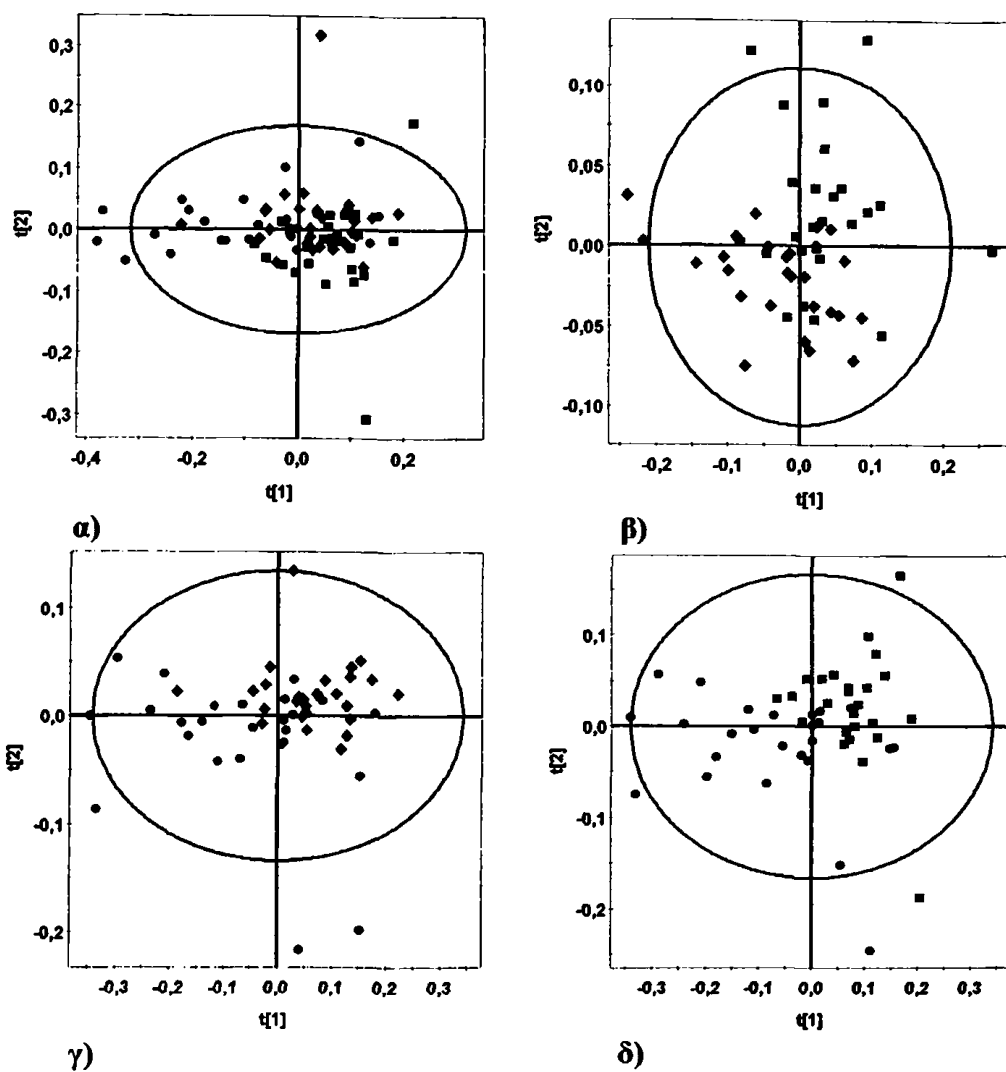


Εικόνα 3.12 Γραφήματα συντεταγμένων OSC/PLS-DA των 3 υποομάδων των ασθενών (1.82 - 10.00ppm).

α) Σε σύνολο 77 ασθενών: 25 με ήπια (■), 27 με μέτρια (◆), 25 με σοβαρή νεφρική βλάβη (●).

3.2.6 Αξιολόγηση των μοντέλων OSC/PLS-DA

Ο έλεγχος της αξιοπιστίας των μοντέλων OSC/PLS-DA υγιών - ασθενών και μεταξύ των υποομάδων νεφρικής βλάβης έγινε με διαδικασίες τόσο εσωτερικής όσο και εξωτερικής αξιολόγησης.



Εικόνα 3.13 Γραφήματα συντεταγμένων OSC/PLS-DA των 3 υποομάδων των ασθενών για την κύρια περιοχή πρωτεϊνουρίας (0.2 – 1.82rpm).

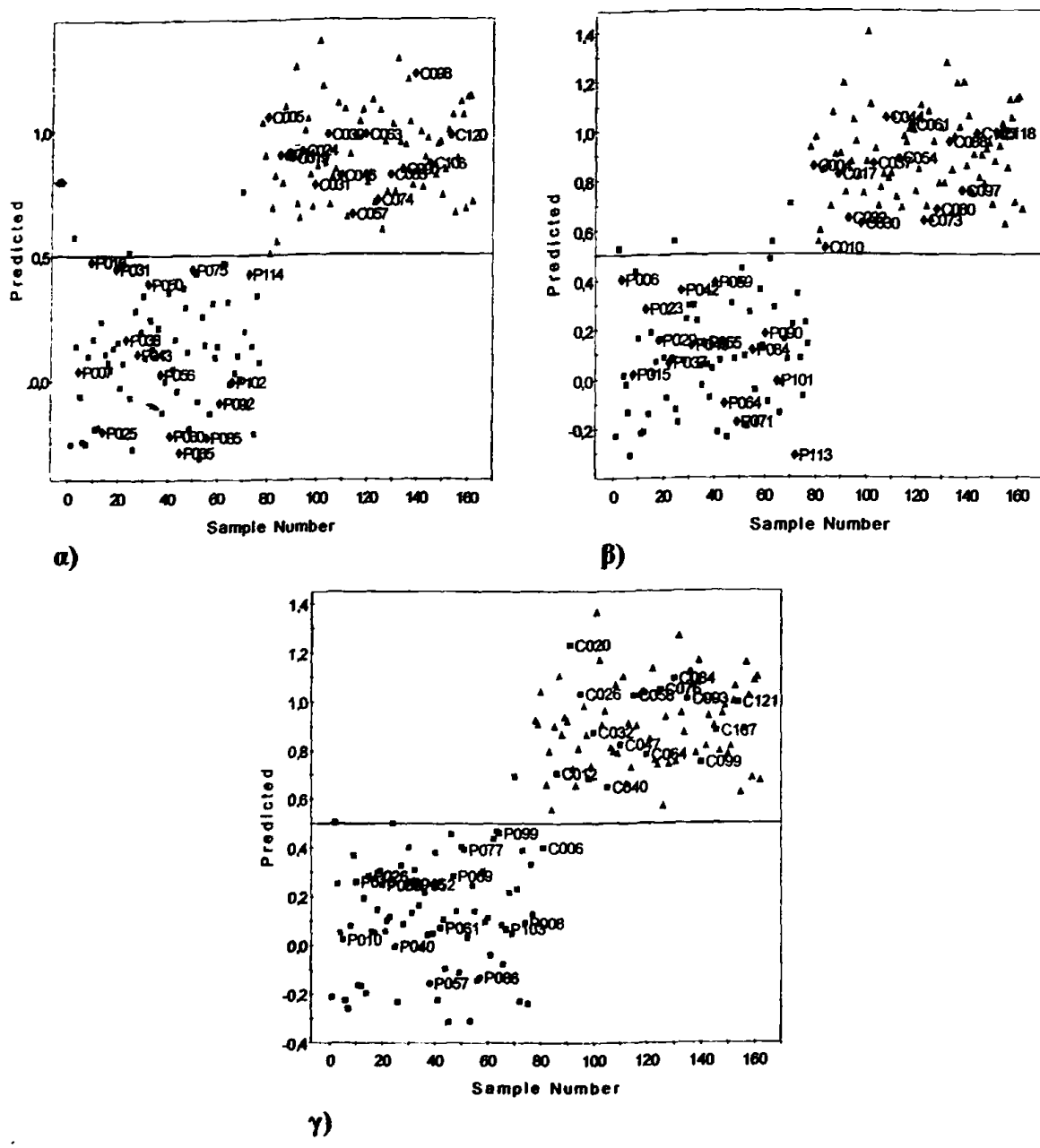
α) Σε σύνολο 77 ασθενών: 25 με ήπια (■), 27 με μέτρια (◆), 25 με σοβαρή νεφρική βλάβη (●).

3.2.7 Εσωτερική αξιολόγηση των μοντέλων OSC/PLS-DA

Για κάθε στατιστικό μοντέλο έγινε τυχαία επιλογή των ατόμων που συγκρότησαν τις εκάστοτε ομάδες βαθμονόμησης και αξιολόγησης. Ειδικότερα, για την αξιολόγηση των μοντέλων OSC/PLSDA μεταξύ υγιών – ασθενών το 81% των ατόμων που επελέγησαν αποτέλεσε την ομάδα βαθμονόμησης και το υπόλοιπο 19% την ομάδα αξιολόγησης, ενώ για το αντίστοιχο μοντέλο μεταξύ των υποομάδων των ασθενών, το 68% αποτέλεσε την ομάδα βαθμονόμησης και το υπόλοιπο 32% την ομάδα αξιολόγησης. Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε συνολικά τρεις φορές επιλέγοντας με τυχαίο τρόπο κάθε φορά έναν σταθερό αριθμό ατόμων για τις επιμέρους ομάδες βαθμονόμησης και αξιολόγησης.

Για το στατιστικό μοντέλο μεταξύ υγιών – ασθενών, επιλέχθηκαν τυχαία 132 άτομα (70 υγιείς / 62 ασθενείς) που συγκρότησαν την ομάδα βαθμονόμησης και 30 άτομα (15 υγιείς / 15 ασθενείς), τα οποία αποτέλεσαν την ομάδα αξιολόγησης. Τα αντίστοιχα διαγράμματα έλεγχου της αξιοπιστίας παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.14** και οι παράμετροι των μοντέλων στον **Πίνακα 3.11**. Η παράμετρος

R^2 των στατιστικών μοντέλων ήταν 0.80 σε κάθε μια εκ των 3 επαναλήψεων, η παράμετρος Q^2 κυμάνθηκε μεταξύ 0.71 και 0.72 και το ποσοστό ορθής ταξινόμησης ήταν 100% (15 άτομα στα 15) σε όλες τις περιπτώσεις. Η ευαισθησία και ειδικότητα ήταν 100% για επίπεδο σημαντικότητας < 0.05 .



Εικόνα 3.14 Διαγράμματα ελέγχου της αξιοπιστίας των μοντέλων OSC/PLS-DA υγιών – ασθενών για τις τρεις επαναλήψεις της διαδικασίας εσωτερικής αξιολόγησης.

Η ευθεία $y=0,5$ χρησιμοποιήθηκε ως όριο διαχωρισμού των εκάστοτε ομάδων. Ομάδα βαθμονόμησης: 70 υγείς (▲), 62 ασθενείς (■). Ομάδα αξιολόγησης: 15 υγείς (♦C), 15 ασθενείς (♦P). α) 1^η, β) 2^η, γ) 3^η επανάληψη.

Για το στατιστικό μοντέλο των υποομάδων ήπιας – σοβαρής νεφρικής βλάβης, 34 ασθενείς (17 με ήπια / 17 με σοβαρή νεφρική βλάβη) συγκρότησαν την ομάδα βαθμονόμησης, ενώ 16 ασθενείς (8 με ήπια / 8 με σοβαρή νεφρική βλάβη) αποτέλεσαν την ομάδα αξιολόγησης. Τα αντίστοιχα διαγράμματα



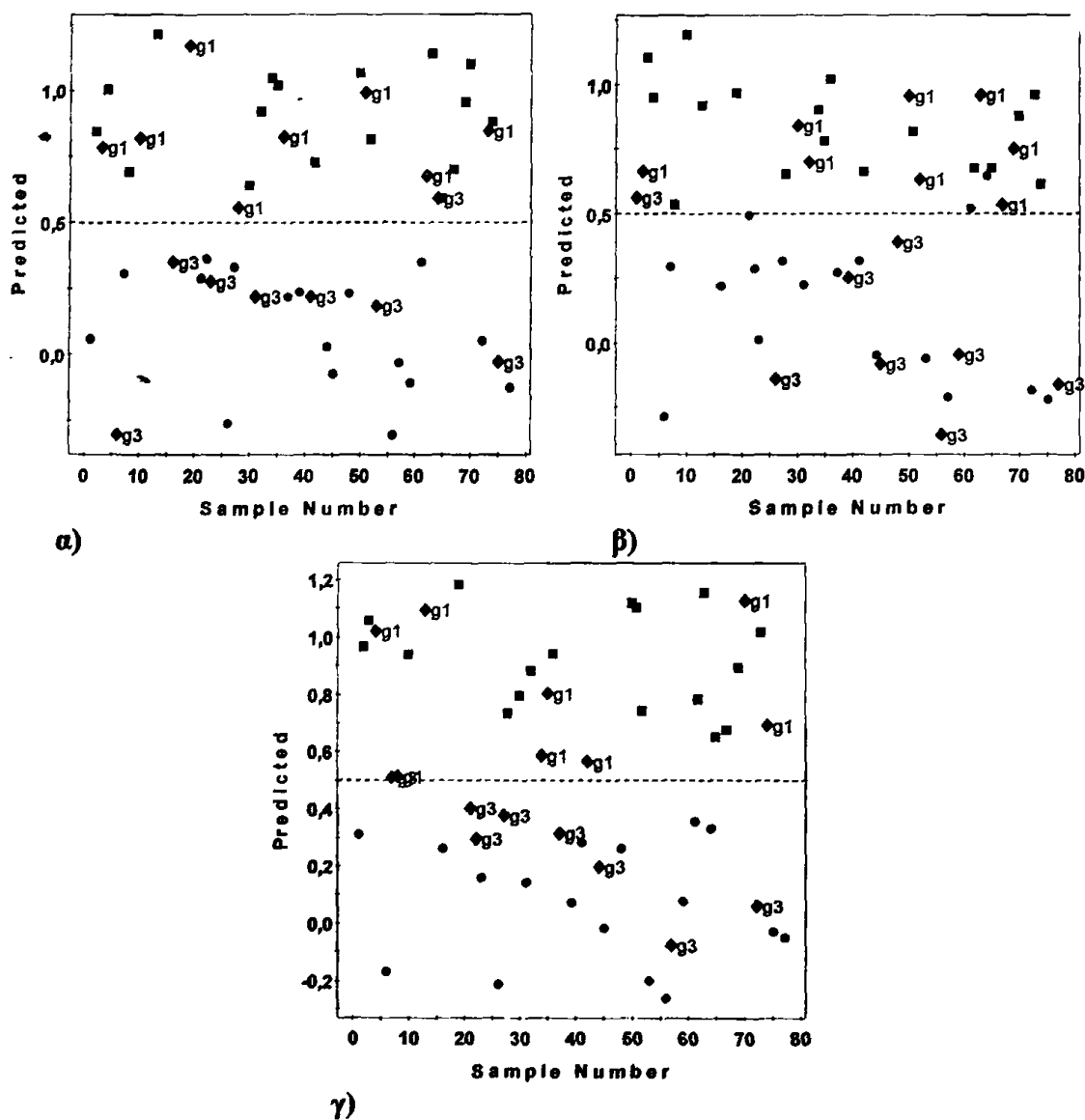
Πίνακας 3.11 Παράμετροι και ποσοστά ταξινόμησης των μοντέλων OSC/PLS-DA μεταξύ υγιών – ασθενών και μεταξύ των υποομάδων ήπιας – σοβαρής νεφρικής βλάβης, όπως προέκυψαν από διαδικασίες εσωτερικής και εξωτερικής αξιολόγησης.

Μοντέλα OSC/PLS-DA	Υγιείς – Ασθενείς						Ήπια – Σοβαρή νεφρική βλάβη					
	Ομάδα βαθμολόγησης	Ομάδα αξιολόγησης	Παράμετροι	Ταξινόμηση	Ομάδα βαθμολόγησης	Ομάδα αξιολόγησης	Παράμετροι	Ταξινόμηση	Ομάδα βαθμολόγησης	Ομάδα αξιολόγησης	Παράμετροι	Ταξινόμηση
Εσωτερική αξιολόγηση	132 (70 Y / 62 A)	30 (15 Y / 15 A)	R ²	Υγιείς	Ασθενείς	34 (17 H / 17 Σ)	16 (8 H / 8 Σ)	R ²	Q ²	Ήπια	Σοβαρή	
1 ^ο μοντέλο			0.80	15/15*	15/15			0.81	0.41	8/8	7/8	
2 ^ο μοντέλο			0.80	15/15	15/15			0.82	0.43	8/8	7/8	
3 ^ο μοντέλο			0.80	15/15	15/15			0.84	0.42	8/8	7/8	
Εξωτερική αξιολόγηση	Ομάδα βαθμολόγησης	Ομάδα αξιολόγησης				Ομάδα βαθμολόγησης	Ομάδα αξιολόγησης					
	114 (53 Y / 61 A)	48 (24 Y / 24 A)				34 (17 H / 17 Σ)	16 (8 H / 8 Σ)					
1 ^ο μοντέλο			0.81	24/24	19/24			0.84	0.29	6/8	6/8	
2 ^ο μοντέλο			0.90	24/24	20/24			0.87	0.44	7/8	7/8	
3 ^ο μοντέλο			0.90	24/24	22/24			0.84	0.42	7/8	6/8	

* Ορθή ταξινόμηση 15 ατόμων στα 15. Συντμήσεις: Υ: υγιείς, Α: ασθενείς, Η: ήπια, Σ: σοβαρή νεφρική βλάβη.



έλεγχου της αξιοπιστίας παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.15 και οι παράμετροι των μοντέλων στον Πίνακα 3.11. Η παράμετρος R^2 κυμάνθηκε μεταξύ 0.81 και 0.84, η παράμετρος Q^2 μεταξύ 0.41 και 0.43 και το ποσοστό ορθής ταξινόμησης ήταν 100% για τις ομάδες ήπιας βλάβης (8 ασθενείς στους 8) και 88% για τις ομάδες σοβαρής βλάβης (7 ασθενείς στους 8) σε όλες τις περιπτώσεις.

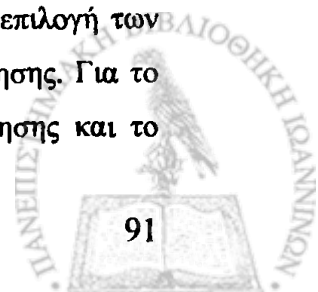


Εικόνα 3.15 Διαγράμματα ελέγχου της αξιοπιστίας των μοντέλων OSC/PLS-DA των υποομάδων ήπιας – σοβαρής νεφρικής βλάβης για τις 3 επαναλήψεις της διαδικασίας εσωτερικής αξιολόγησης.

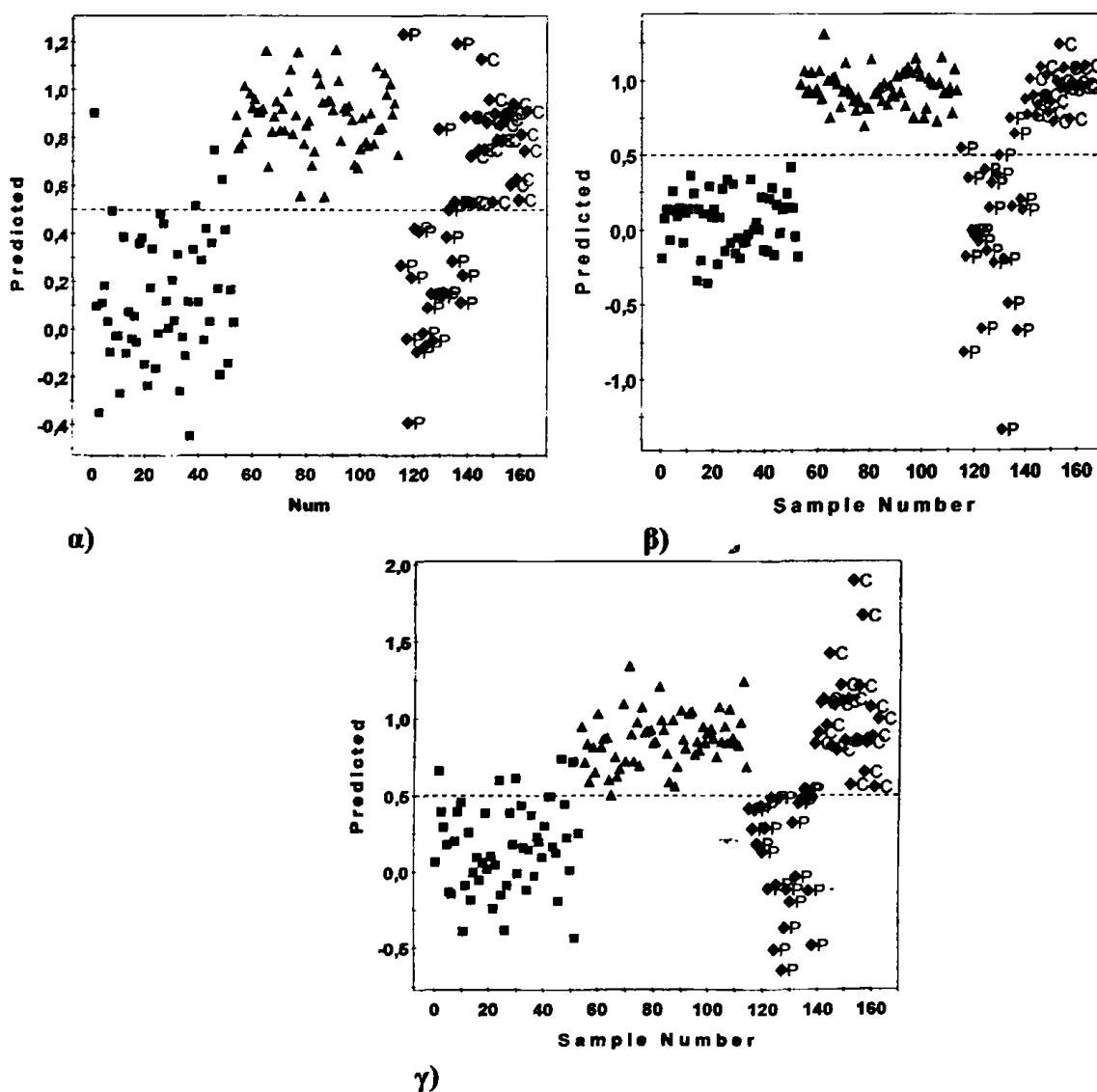
Η ευθεία $y=0,5$ χρησιμοποιήθηκε ως όριο διαχωρισμού των εκάστοτε ομάδων. Ομάδα βαθμονόμησης: 17 ασθενείς με ήπια (■), 17 ασθενείς με σοβαρή (●) νεφρική βλάβη. Ομάδα αξιολόγησης: 8 ασθενείς με ήπια (♦g1), 8 ασθενείς με σοβαρή (♦g3) νεφρική βλάβη. α) 1^η, β) 2^η, γ) 3^η επανάληψη.

3.2.8 Εξωτερική αξιολόγηση των μοντέλων OSC/PLS-DA

Όπως και στην εσωτερική αξιολόγηση, για κάθε στατιστικό μοντέλο έγινε τυχαία επιλογή των ατόμων που συγκρότησαν τις εκάστοτε ομάδες βαθμονόμησης και εξωτερικής αξιολόγησης. Για το μοντέλο υγιών – ασθενών, το 70% των δεδομένων αποτέλεσε την ομάδα βαθμονόμησης και το

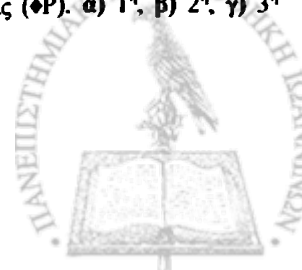


υπόλοιπο 30% την ομάδα αξιολόγησης, ενώ για το αντίστοιχο μοντέλο μεταξύ των υποομάδων των ασθενών, το 68% αποτέλεσε την ομάδα βαθμονόμησης και το υπόλοιπο 32% την ομάδα αξιολόγησης. Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις φορές και για τον καθορισμό των επιμέρους ομάδων επελέγησαν άτομα με τυχαίο τρόπο που δεν είχαν χρησιμοποιηθεί καθόλου κατά την δημιουργία των στατιστικών μοντέλων. Για το στατιστικό μοντέλο υγιών – ασθενών, 114 άτομα (61 υγιείς / 53 ασθενείς) καθόρισαν την ομάδα βαθμονόμησης και 48 άτομα (24 υγιείς / 24 ασθενείς) αποτέλεσαν την ομάδα αξιολόγησης. Τα αντίστοιχα διαγράμματα έλεγχου της αξιοπιστίας παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3.16** και οι παράμετροι των μοντέλων στον **Πίνακα 3.11**. Η παράμετρος R^2 κυμάνθηκε μεταξύ 0.81 και 0.90, η παράμετρος Q^2 μεταξύ 0.73 και 0.88, ενώ η μέση τιμή του ποσοστού ορθής ταξινόμησης

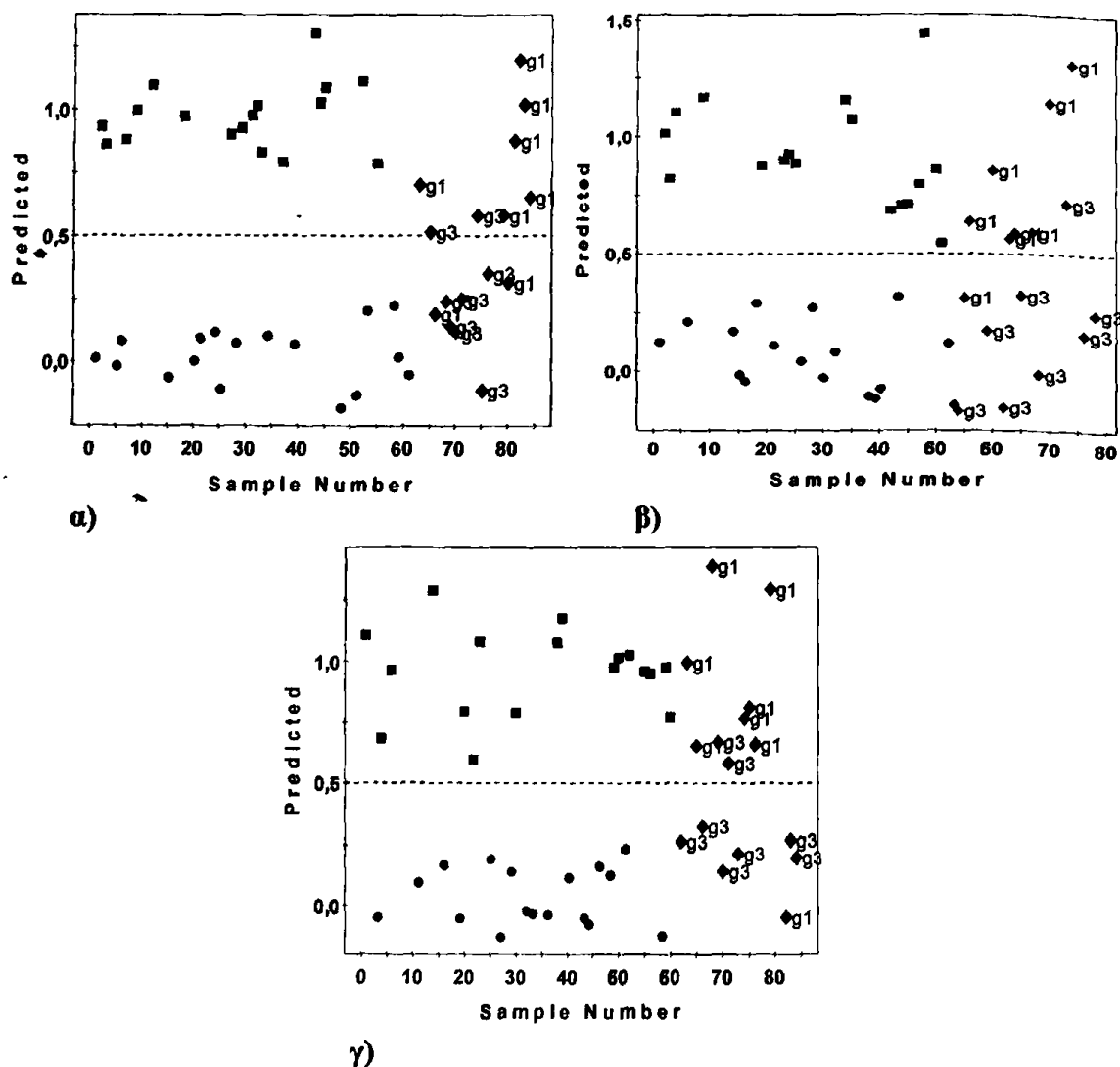


Εικόνα 3.16 Διαγράμματα έλεγχου της αξιοπιστίας των μοντέλων OSC/PLS-DA υγιών – ασθενών για τις τρεις επαναλήψεις της διαδικασίας εξωτερικής αξιολόγησης.

Η ευθεία $y=0,5$ χρησιμοποιήθηκε ως όριο διαχωρισμού των εκάστοτε ομάδων. Ομάδα βαθμονόμησης: 61 υγιείς (▲), 53 ασθενείς (■). Ομάδα αξιολόγησης: 24 υγιείς (◆C), 24 ασθενείς (◆P). α) 1^η, β) 2^η, γ) 3^η επανάληψη.



ήταν 100% στην ομάδα των υγιών (24 στους 24) και 85% στην ομάδα των ασθενών (20.3 στους 24). Η ευαισθησία και ειδικότητα ήταν 96% και 99% αντίστοιχα, για επίπεδο σημαντικότητας < 0.05.



Εικόνα 3.17 Διαγράμματα ελέγχου της αξιοπιστίας των μοντέλων OSC/PLS-DA των υποομάδων ήπιας – σοβαρής νεφρικής βλάβης για τις 3 επαναλήψεις της διαδικασίας εξωτερικής αξιολόγησης.

Η ευθεία $y=0,5$ χρησιμοποιήθηκε ως όριο διαχωρισμού των εκάστοτε ομάδων. Ομάδα βαθμονόμησης: 17 ασθενείς με ήπια (■), 17 ασθενείς με σοβαρή (●) νεφρική βλάβη. Ομάδα αξιολόγησης: 8 ασθενείς με ήπια (♦g1), 8 ασθενείς με σοβαρή (♦g3) νεφρική βλάβη. α) 1^η, β) 2^η, γ) 3^η επανάληψη.

Αντίστοιχα για το στατιστικό μοντέλο των υποομάδων ήπιας – σοβαρής νεφρικής βλάβης, 34 ασθενείς (17 με ήπια / 17 με σοβαρή νεφρική βλάβη) καθόρισαν την ομάδα βαθμονόμησης, ενώ 16 ασθενείς (8 με ήπια / 8 με σοβαρή νεφρική βλάβη) αποτέλεσαν την ομάδα αξιολόγησης. Τα αντίστοιχα διαγράμματα έλεγχου της αξιοπιστίας παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.17 και οι παράμετροι των μοντέλων στον Πίνακα 3.11. Η παράμετρος R^2 κυμάνθηκε μεταξύ 0.84 και 0.87, η παράμετρος Q^2 μεταξύ 0.29 και 0.44, ενώ η μέση τιμή του ποσοστού ορθής ταξινόμησης ήταν 83% στην υποομάδα των ασθενών με ήπια (6.67 στους 8) και 79% στην υποομάδα των ασθενών με σοβαρή νεφρική βλάβη (6.3 στους 8).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Γενικό μέρος

Την τελευταία εικοσιπενταετία, η φασματοσκοπία NMR έχει αναδειχθεί ως μια από τις πλέον σημαντικές μη επεμβατικές αναλυτικές τεχνικές για τη διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών και ιδιαίτερα των ούρων. Το σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής είναι ότι παρέχει ταυτόχρονα μια λεπτομερή απεικόνιση του συνόλου των μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους που ανιχνεύονται στα βιολογικά υγρά σε πειραματικό χρόνο λίγων λεπτών και με ελάχιστη προεργασία του δείγματος (Neild et al., 1997). Αντιθέτως, στις καθιερωμένες βιοχημικές δοκιμασίες επιλέγονται εκ των προτέρων οι μεταβολίτες που θα προσδιορισθούν και χρησιμοποιούνται ειδικά για τον καθένα αντιδραστήρια.

Το φάσμα NMR των βιολογικών υγρών θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένα μοναδικό πολυδιάστατο μεταβολικό «αποτύπωμα», το οποίο φαίνεται ότι διαφοροποιείται τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις του οργανισμού. Η ιδιαίτερη όμως πολυπλοκότητα των φασμάτων δρα ως περιοριστικός παράγοντας στην αξιοποίηση της πολύτιμης βιοχημικής πληροφορίας που περιέχουν (Lindon et al., 2000). Για το λόγο αυτό εκδηλώθηκε ένα έντονο ενδιαφέρον στις αρχές της δεκαετίας του 1990 για τη χρησιμοποίηση τεχνικών αναγνώρισης προτύπων με σκοπό την άντληση της πιο σημαντικής βιοχημικής πληροφορίας που υπάρχει στα φάσματα NMR (Holmes et al., 1994, 1992a, Gartland et al., 1990a, 1990b, 1991, Spraul et al., 1994).

Οι πρώτες αυτές εφαρμογές οδήγησαν στην έννοια της μεταβονομικής το 1999 (Nicholson et al., 1999) και έκτοτε έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μεταβονομικές μελέτες κυρίως με βάση τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$. Οι πιο πρόσφατες από τις μελέτες αυτές έχουν επικεντρωθεί στη διερεύνηση της επίδρασης παραγόντων βιολογικής μεταβλητότητας στο βιοχημικό προφίλ των ούρων και του πλάσματος υγιών ατόμων. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι: η ενδοατομική διακύμανση (Lenz et al., 2003, Teahan et al., 2006, Walsh et al., 2006, Maher et al., 2007), διατροφικές συνήθειες ή διαιτητικές παρεμβάσεις (Solanky et al., 2003b, 2005, Lenz et al., 2004b, Teague et al., 2004, Wang et al., 2005, Stella et al., 2006, Van Dorsten et al., 2006, Dumas et al., 2006, Bertram et al., 2007, Kemsley et al., 2007, Rezzi et al., 2007), το φύλο, η ηλικία, ο δείκτης μάζας σώματος (Kochhar et al., 2006, Ślipusky et al., 2007) ή ακόμη και η χορήγηση αναλγητικών φαρμάκων ευρείας χρήσεως (Holmes et al., 2007). Παρά τις μελέτες αυτές, υπάρχει αναγκαιότητα περαιτέρω καθορισμού των φυσιολογικών προφίλ των ούρων σε διάφορες ομάδες του παγκόσμιου πληθυσμού, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μια αξιόπιστη βάση δεδομένων.

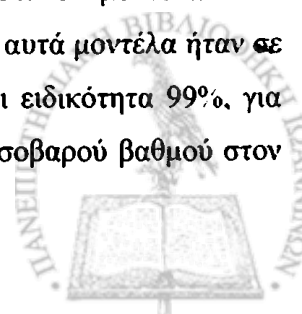
Όσον αφορά τη διεξαγωγή αντίστοιχων $^1\text{H-NMR}$ μεταβονομικών μελετών για την διερεύνηση της νεφρικής νόσου, αυτές έχουν εστιαστεί σχεδόν αποκλειστικά στη χορήγηση ειδικών νεφροτοξικών ουσιών σε πειραματόζωα με στόχο την αποτίμηση της νεφρικής βλάβης βάσει ιστοπαθολογικής

τεκμηρίωσης (Robertson et al., 2000, Waters et al., 2005, Lenz et al., 2005, Coen et al., 2007, Espandiari et al., 2007) ή συνδυάζοντας άλλες αναλυτικές τεχνικές, όπως φασματοσκοπία NMR στερεών (Magic Angle Spinning, MAS) (Lenz et al., 2004b) ή HPLC-MS (Griffin et al., 2001).

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιείται μια μεταβονομική προσέγγιση του μεταβολικού προφίλ των ούρων με βάση τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$, η οποία ήταν και η πρώτη που διεξήχθη στο Εργαστήριο Κλινικής Χημείας. Παράλληλα παρουσιάζεται και αναπτύσσεται μια μεθοδολογία για την ανάλυση των πολυμεταβλητών δεδομένων NMR με βάσει τις τεχνικές αναγνώρισης προτύπων και ως εκ τούτου προτείνονται και αξιολογούνται διάφορες μέθοδοι όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων, τη λήψη των φασμάτων και την επεξεργασία των δεδομένων.

Με τις τεχνικές αυτές, μελετήθηκε αρχικά μια ομάδα υγιών ατόμων του Ελληνικού πληθυσμού που αποτέλεσε τη βάση για τον καθορισμό «μεταβονομικών τιμών αναφοράς» (Psihogios et al., 2007a). Από τη μελέτη αυτή προέκυψαν δυο στατιστικά μοντέλα τα οποία ήταν ικανά να προβλέψουν ορθά το φύλο και την ηλικία των ατόμων που συμμετείχαν. Παράλληλα προσδιορίστηκαν για πρώτη φορά στον Ελληνικό πληθυσμό οι τιμές αναφοράς και τα αντίστοιχα διαστήματα εμπιστοσύνης των κύριων μεταβολιτών που απεκκρίνονται στα ούρα, τόσο για τα δυο φύλα όσο και για άτομα ηλικίας άνω και κάτω των 45 ετών. Ο προσδιορισμός των τιμών αναφοράς των μεταβολιτών αυτών είναι σημαντικός, καθώς τα υπάρχοντα στοιχεία σχετικά με αυτούς, βάσει των καθιερωμένων βιοχημικών μεθόδων, είναι περιορισμένα. Μέσω της τεχνικής της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (PCA) έγινε μια γενική επισκόπηση των πολυμεταβλητών δεδομένων με σκοπό την δημιουργία ενός συγκροτημένου συνόλου δειγμάτων και την αξιολόγηση της ομοιογένειας του πληθυσμού. Με την εφαρμογή των τεχνικών PLS-DA και OSC προέκυψαν στατιστικά μοντέλα που μπόρεσαν να προβλέψουν με απόλυτη επιτυχία το φύλο και την ηλικία (> 50 και < 35 ετών) των υγιών ατόμων για επίπεδο εμπιστοσύνης $> 95\%$. Συνολικά παρατηρήθηκε ότι στους άνδρες, τα επίπεδα απέκκρισης της κρεατινίνης, του τριμέθυλο-*N*-αμινοξειδίου (TMAO) και της ταυρίνης ήταν αυξημένα, ενώ του κιτρικού, της κρεατίνης και της γλυκίνης μειωμένα σε σύγκριση με τις γυναίκες. Αντίστοιχα, στα άτομα ηλικίας > 50 ετών διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα απέκκρισης του TMAO και του κιτρικού ήταν αυξημένα, ενώ τα επίπεδα της κρεατινίνης και του ιππουρικού μειωμένα σε σχέση με τα άτομα ηλικίας < 35 ετών.

Στο κύριο μέρος της μελέτης που αφορούσε ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα (ΣΠΝ), η εφαρμογή των τεχνικών αναγνώρισης προτύπων επέτρεψε μια σαφή διαφοροποίηση όχι μόνο μεταξύ υγιών και ασθενών, αλλά και μεταξύ των επιμέρους υποομάδων των ασθενών. Η τεχνική PCA ανέδειξε μια αδρή τάση διαφοροποίησης, ενώ η τεχνική PLS-DA μια ισχυρή τάση διαχωρισμού μεταξύ των ομάδων υγιών και ασθενών. Η ελαχιστοποίηση όμως της διατομικής μεταβλητότητας μέσω της εφαρμογής της τεχνικής OSC συνετέλεσε στη δημιουργία στατιστικών μοντέλων που παρείχαν πλήρη και σαφή διαχωρισμό μεταξύ υγιών – ασθενών. Τα στατιστικά αυτά μοντέλα ήταν σε θέση να προβλέψουν την παρουσία νεφρικής βλάβης με ευαισθησία 96% και ειδικότητα 99% , για επίπεδο εμπιστοσύνης $> 95\%$. Οι ασθενείς με αλλοιώσεις ήπιου, μέτριου και σοβαρού βαθμού στον



σωληναριοδιάμεσο ιστό διαφοροποιήθηκαν σταδιακά από τα υγιή άτομα, ενώ με την σύγκριση των επιμέρους υποομάδων των ασθενών πρόεκυψαν μοντέλα OSC/PLS-DA που έδειξαν στατιστικά σημαντικό διαχωρισμό μεταξύ αυτών με ήπια και σοβαρή νεφρική βλάβη, καθώς και μια υψηλή ικανότητα πρόβλεψης του βαθμού σοβαρότητας της βλάβης. Κατά τη σύγκριση μεταξύ των υποομάδων μέτριας - ήπιας και μέτριας - σοβαρής βλάβης, ο διαχωρισμός ήταν εμφανής αλλά όχι στατιστικά σημαντικός.

4.2 Προαναλυτικοί παράγοντες και προεπεξεργασία των δεδομένων

Το έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον που εκδηλώθηκε την τελευταία πενταετία με τη διεξαγωγή ολοένα και περισσότερων τοξικολογικών ή κλινικών μελετών με βάση τη μεταβολονομική, δημιούργησε την ανάγκη τυποποίησης του τρόπου σχεδιασμού, διεξαγωγής και παρουσίασης τέτοιων μελετών (Lindon et al., 2003, 2005) ώστε να είναι κατανοητές, αξιόπιστες και συγκρίσιμες μεταξύ τους (Goodacre et al., 2004). Για την αντιμετώπιση της ανάγκης τυποποίησης, έχουν ιδρυθεί αρκετές επιτροπές αξιολόγησης με σκοπό την ανάπτυξη και ευρύτερη διάδοση της έννοιας της μεταβολονομικής στο διεθνή ερευνητικό και βιομηχανικό χώρο και την υιοθέτηση ενός consensus μεταβολονομικής έρευνας (Fiehn et al., 2006). Στην παρούσα ενότητα γίνεται αναφορά στην επίδραση προαναλυτικών παραγόντων και παραμέτρων προεπεξεργασίας των δεδομένων της διατριβής καθώς και σύγκριση τους με τη διεθνή βιβλιογραφία. Οι παράγοντες αυτοί αφορούν κυρίως τη συντήρηση των δειγμάτων, την επιλογή του εύρους των περιοχών ολοκλήρωσης (bins), την επίδραση του pH στη χημική μετατόπιση (ppm) καθώς και των μεθόδων κανονικοποίησης (normalization) και scaling των δεδομένων.

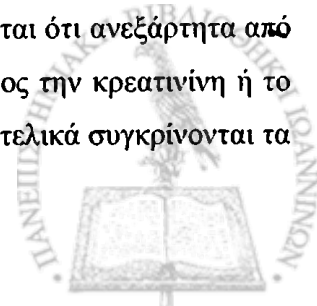
Πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι στις μεταβολομικές μελέτες NMR, η συντήρηση των δειγμάτων ούρων σε θερμοκρασία $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ χωρίς χρήση συντηρητικού είναι ασφαλής μέχρι και 26 εβδομάδες, δίχως να θεωρείται απαραίτητη η κατάψυξη στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lauridsen et al., 2007). Η επιτροπή COMET (Consortium for Metabonomic Toxicology) συνιστά τη χρήση αζιδίου του αζώτου (NaN_3) ως συντηρητικού, κυρίως σε πειραματικές μελέτες με συλλογή δειγμάτων ούρων 24ώρου, για την αποφυγή βακτηριακής μόλυνσης των δειγμάτων (Lindon et al., 2003), καθώς και την άμεση κατάψυξη τους σε θερμοκρασίες $< -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lindon et al., 2000, Ebbels et al., 2007). Αν και θα μπορούσε στην παρούσα μελέτη να θεωρηθεί μη απαραίτητη η βαθιά κατάψυξη των δειγμάτων που περιείχαν συντηρητικό, προτιμήθηκε ο συνδυασμός τους αφενός διότι έχει αναφερθεί ότι δεν επηρεάζει τα αποτελέσματα (Lauridsen et al., 2007) και αφετέρου διότι η συλλογή των δειγμάτων και η καταγραφή των φασμάτων διήρκεσε για διάστημα μεγαλύτερο των τριών ετών.

Στο στάδιο της προεπεξεργασίας συγκαταλέγεται επίσης η επιλογή του εύρους των bins, η οποία αν και εξαρτάται από την εκάστοτε μελέτη, έχει αναφερθεί ότι δεν φαίνεται να επηρεάζει τα αποτελέσματα κατά τη διαδικασία αξιολόγησης των στατιστικών μοντέλων (Webb-Robertson et al., 2005). Η επιλογή της τιμής 0.04ppm για το πλάτος των bins είναι αυτή που επιλέγεται στην πλειονότητα των μεταβολομικών μελετών μιας και καλύπτει πλήρως το σύνθετο εύρος των περισσότερων κορυφών

συντονισμού (0.02 – 0.03ppm). Επιπλέον σε μια πρόσφατη μελέτη, όπου δημιουργήθηκαν και συγκρίθηκαν στατιστικά μοντέλα μεταβάλλοντος την τιμή του πλάτους των bins σε μια περιοχή από 0 μέχρι 0.1ppm με βήμα 0.001, αναφέρεται ότι το ποσοστό επιτυχούς ταξινόμησης των στατιστικών μοντέλων έχει μικρή εξάρτηση από το πλάτος των bins (Webb-Robertson et al., 2005).

Η επιλογή του εύρους των bins κατά την ανάλυση φασμάτων ούρων εξαρτάται σε ένα βαθμό και από τη χημική μετατόπιση των κορυφών συντονισμού. Συχνά αναφέρεται ότι οι χημικές μετατοπίσεις κυρίως των δυο κορυφών συντονισμού της κρεατινίνης (3.04 και 4.06ppm) (Lenz et al., 2003, Lauridsen et al., 2007) καθώς και αυτών του κιτρικού οξέος (2.54 και 2.68ppm) (Ebbels et al., 2004, Miyataka et al., 2007) επηρεάζονται από την ιοντική ισχύ και την τιμή του pH των ούρων, όταν αυτό εκτείνεται πέραν του φυσιολογικών τιμών (Nicholson and Wilson, 1989). Η μετακίνηση των χημικών μετατοπίσεων μερικές φορές υπερβαίνει το όριο των 0.04 ppm των περιοχών ολοκλήρωσης (bins), με αποτέλεσμα μια συγκεκριμένη κορυφή ενός μεταβολίτη να μην καταγράφεται σε όλα τα δείγματα στο ίδιο bin (π.χ. η CH₂ του κιτρικού οξέος μπορεί να καταγραφεί στο 2.52 bin ή/και στο 2.56 bin), οπότε και παρατηρείται ψευδώς μεγάλη διακύμανση της έντασης της κορυφής (Potts et al., 2001). Ένας τρόπος αντιμετώπισης του προβλήματος αυτού είναι η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών για την σταθεροποίηση των διακυμάνσεων του pH, αν και έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι οι κορυφές συντονισμού του κιτρικού και της κρεατινίνης μπορεί και πάλι να εκτείνονται σε περισσότερα από ένα bins (Gavaghan et al., 2001, Keun et al., 2002). Για το λόγο αυτό στις περισσότερες μελέτες NMR, παρά τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος, γίνεται επιπρόσθετα και συγχώνευση δυο ή ακόμη και τριών γειτονικών bins των δυο προαναφερθέντων μεταβολιτών, έτσι ώστε πιθανή μετακίνηση των κορυφών συντονισμού να μην αλλοιώνει τα αποτελέσματα (Cloarec et al., 2005, Dumas et al., 2006). Σε μια πρόσφατη μελέτη προτάθηκε μια εναλλακτική τεχνική ποσοτικοποίησης των μεταβολιτών (targeted profiling), στην οποία το πλάτος των bins για κάθε μεταβολίτη δεν είναι πάντα σταθερό (π.χ. 0.04), αλλά μπορεί να μεταβάλλεται (π.χ. μεταξύ των 0.02 και 0.06) ανάλογα με το κατά πόσο μετακινούνται οι κορυφές συντονισμού που αντιστοιχούν στα εκάστοτε bins (Weljie et al., 2006).

Σημαντικό ρόλο παίζει επίσης η επιλογή των μεθόδων κανονικοποίησης (normalization) και scaling (ή centering) των πολυμεταβλητών δεδομένων, διότι μπορεί να επηρεάσουν την αξιοπιστία ή/και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Στην παρούσα μελέτη, η κανονικοποίηση των δεδομένων επιλέχθηκε να γίνει ως προς την ένταση του ολικού φάσματος και όχι ως προς την ουσία αναφοράς (TSP), την κρεατινίνη ή άλλο ενδογενή μεταβολίτη, διότι η μεν προσθήκη του TSP ενδέχεται να μην είναι πάντα ακριβής (απώλειες από την πιπέτα κατά τη μεταφορά στο σωληνάριο NMR), οι δε συγκεντρώσεις των ενδογενών μεταβολιτών παρουσιάζουν μεγάλη διατομική μεταβλητότητα, ιδίως στους ασθενείς (Craig et al., 2006). Σε μια πρόσφατη μελέτη υγιών ατόμων, αναφέρεται ότι ανεξάρτητα από την κανονικοποίηση των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών των ούρων ως προς την κρεατινίνη ή το ολικό φάσμα, τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια (Slupsky et al., 2007). Εφόσον τελικά συγκρίνονται τα



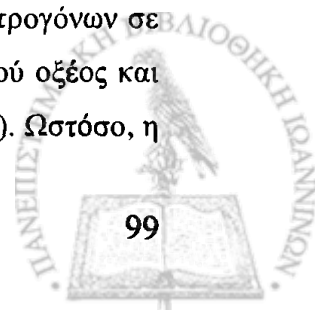
συνολικά μεταβολικά προφίλ, η κανονικοποίηση ως προς το ολικό φάσμα είναι μεθοδολογικά πιο κατάλληλη και παράλληλα πιο αξιόπιστη για δείγματα διαφορετικής πυκνότητας (αραιά – πυκνά). Επίσης επιλέχθηκε η μέθοδος του Pareto scaling, όπου κάθε μεταβλητή του πίνακα των πολυμεταβλητών δεδομένων διαιρείται με την τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης της στήλης στην οποία αντιστοιχεί (Eriksson et al., 2001), ώστε να αναδειχθούν κορυφές μικρής σχετικά έντασης και να μετριάσθούν κορυφές πολύ μεγάλης έντασης που ενδεχομένως να κυριαρχούσαν στις PCs εις βάρος των υπολοίπων (Craig et al., 2006).

4.3 Μελέτη του υγιούς πληθυσμού

Το στατιστικό μοντέλο του υγιούς πληθυσμού όρισε κατά κάποιο τρόπο το αντίστοιχο εύρος τιμών αναφοράς αλλά σε όρους μεταβολομικής και ανέδειξε τη διαφοροποίηση του μεταβολικού προφίλ των ούρων μεταξύ αντρών και γυναικών, καθώς και μεταξύ ατόμων ηλικίας < 35 και > 50 ετών. Η συμβολή του στατιστικού αυτού μοντέλου είναι πολύ σημαντική, διότι σε μελέτες με ασθενείς που θα ακολουθήσουν, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι παράγοντες φύλου και ηλικίας και να επιλέγεται προσεκτικά κάθε φορά η ομάδα ελέγχου, ώστε τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα και συγκρίσιμα. Από τη μελέτη φάνηκε ότι μερικά συστατικά των ούρων παίζουν καθοριστικό ρόλο στο διαχωρισμό των υποομάδων στον υγιή πληθυσμό. Τα συστατικά αυτά είναι κυρίως μεταβολίτες που δεν προσδιορίζονται στην καθημερινή κλινική πράξη με αυτοματοποιημένες μεθόδους ρουτίνας και υπάρχουν πολύ λίγα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με αυτά. Έχει επομένως ιδιαίτερη σημασία να αναλυθεί ο ρόλος των συστατικών αυτών σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις και να καθοριστούν οι τιμές αναφοράς και η βιολογική τους μεταβλητότητα.

Είναι γνωστό ότι η απέκκριση της κρεατινίνης στα ούρα συσχετίζεται θετικά με το σωματικό βάρος, αντανakλώντας τη συνολική μυϊκή μάζα και επομένως τα αντίστοιχα επίπεδα στους άνδρες αναμένεται να είναι πιο υψηλά από ότι στις γυναίκες (Lukaski, 1996). Το γεγονός επίσης πως τα επίπεδα της κρεατινίνης ήταν μειωμένα στα άτομα ηλικίας > 45 ετών συμφωνεί με τη γενικά αποδεκτή άποψη της ελάττωσης της ολικής μυϊκής μάζας με την αύξηση της ηλικίας (Davies et al., 2002). Τέλος η 12ώρη νηστεία όλων των ατόμων μπορεί να θεωρηθεί ότι παρείχε ένα σχετικά ασφαλές όριο για την όσο το δυνατόν αποφυγή αύξησης της απέκκρισης της κρεατινίνης, στις περιπτώσεις εκείνες που είχε ενδεχομένως προηγηθεί πριν τη δειγματοληψία κατανάλωση κρέατος (Bleiler and Schedl, 1962) ή χαμομηλιού (Wang et al., 2005).

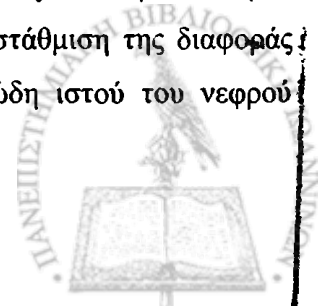
Έχει αναφερθεί ότι η συγκέντρωση του κίτριου οξέος στα ανθρώπινα ούρα μπορεί να έχει μεγάλη διακύμανση ως αποτέλεσμα κυρίως ενδοατομικών μεταβολικών διαδικασιών παρά διατροφικών επιδράσεων (Guneral and Bachmann, 1994), με τις γυναίκες να εμφανίζουν αυξημένη απέκκριση (Kochhar et al., 2006, Zuppi et al., 1997). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η χορήγηση οιστρογόνων σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες μπορεί να συμβάλει στην αύξηση της απέκκρισης κίτριου οξέος και έχει συσχετισθεί με τη δράση των οιστρογόνων και τη σύνθεση λιπιδίων (Dey et al., 2002). Ωστόσο, η



παρουσία μεγάλης ποσότητας επιθηλιακών και ερυθρών κυττάρων στο ίζημα ούρων από γυναίκες έχει αναφερθεί ως επιπρόσθετη αιτία αυξημένης συγκέντρωσης κιτρικού οξέος στα ούρα (Zurri et al., 1997). Σε συμφωνία με τις προαναφερθείσες μελέτες, η απέκκριση του κιτρικού οξέος δεν ήταν μόνο αυξημένη στις γυναίκες, αλλά είχε και θετική συσχέτιση με την αύξηση της ηλικίας.

Στον άνθρωπο η κρεατίνη αφενός προσλαμβάνεται μέσω της τροφικής αλυσίδας, αφετέρου δε βιοσυντίθεται ενδογενώς στο ήπαρ, ως προϊόν του μεταβολισμού της αργινίνης μέσω της μεθυλίωσης του γουανιδινοξικού οξέος από την S-αδενοσυλομεθειονίνη, και αποθηκεύεται στο μυϊκό ιστό (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000). Μέσα στα μυϊκά κύτταρα, η κρεατίνη μετατρέπεται σταθερά σε κρεατινίνη και επομένως φυσιολογικά δεν απεκκρίνεται στα ούρα ή ανιχνεύεται σε ίχνη, αν και διατροφή πλούσια σε κρέας μπορεί να προκαλέσει αύξηση της απέκκρισής της (Greenhaff, 1997). Τα αυξημένα επίπεδα κρεατινίνης που παρατηρήθηκαν στις υγιείς γυναίκες μπορεί να υποδηλώνουν διαφορετικές διατροφικές συνήθειες σε σχέση με τους άνδρες. Επιπλέον, το γεγονός ότι τα επίπεδα της κρεατινίνης στα ούρα ήταν αυξημένα στις γυναίκες ηλικίας > 45 ετών, θα μπορούσε να υποστηριχθεί και από μια πρόσφατη μελέτη βάσει της οποίας φαίνεται ότι η απέκκριση της κρεατινίνης εξαρτάται από την ηλικία και όχι από το φύλο (Valongo et al., 2004).

Το TMAO είναι μια οσμωτικά ενεργός ουσία που προκύπτει από την οξειδωση της τριμεθυλαμίνης (TMA) στο ήπαρ παρουσία του ενζύμου flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) (Al-Waiz et al., 1987). Αναστολή της ενεργότητας του ενζύμου αυτού (Dolphin et al., 1997) οδηγεί σε αδυναμία πλήρους οξειδωσης της TMA σε TMAO και έχει ως αποτέλεσμα την εκδήλωση του μεταβολικού νοσήματος της τριμεθυλαμινουρίας όπου παρατηρείται αυξημένη απέκκριση μη οξειδωμένης TMA στα ούρα, στην αναπνοή και στον ιδρώτα με έντονη χαρακτηριστική οσμή ψαριού (Al-Waiz et al., 1988, Rehman, 1999). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το TMAO εμφανίζει υψηλή διατομική μεταβλητότητα τόσο στον άνθρωπο όσο και σε πειραματόζωα (Zurri et al., 1987, Hirama et al., 1993, Holmes et al., 1994). Αυξημένη απέκκριση του TMAO έχει αναφερθεί μετά από κατανάλωση ψαριών (Zurri et al., 1998, Svensson et al., 1994), σόγιας (D'Amico and Gentile, 1993) καθώς και τροφών πλούσιων σε άλατα ή ισοφλαβόνες (Solanky et al., 2005). Έχει επίσης αναφερθεί ότι η εντερική μικροχλωρίδα μπορεί να επιδράσει στο μεταβολισμό του TMAO (Williams et al., 2002), ενώ έχει διαπιστωθεί ότι η εμμηνόρροια μπορεί να οδηγήσει σε μια σημαντική μείωση της αναλογίας TMAO/TMA στις γυναίκες (Zhang et al., 1996). Οι παραπάνω παρατηρήσεις δεν μπορούν να αιτιολογήσουν πλήρως τα υψηλότερα επίπεδα TMAO που παρατηρήθηκαν στους άνδρες της παρούσας μελέτης και ενδεχομένως να αντανakλούν ένα γενικότερο πλαίσιο διαφορετικών διατροφικών συνθηκών ή να έχουν κάποια ορμονική εξάρτηση. Επιπλέον η αυξημένη απέκκριση TMAO και διμεθυλαμίνης (DMA) στα άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, ίσως υποδηλώνει ήπια δυσλειτουργία του ρόλου που έχουν οι οσμωτικά ενεργές ουσίες στην αντιστάθμιση της διαφοράς όσμωσης μεταξύ ενδο- και εξωκυττάρου χώρου στην περιοχή του μυελώδη ιστού του νεφρού (Yancey et al., 1982).



Το ιππουρικό οξύ παράγεται κατά την αντίδραση του βενζοϊκού οξέος με την γλυκίνη στο ήπαρ και στο νεφρό (Hutt and Caldwell, 1990), η οποία αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό στη διαδικασία απομάκρυνσης των αρωματικών καρβοξυλικών οξέων (Kasuya et al., 1996). Το ιππουρικό οξύ είναι φυσιολογικό συστατικό των ούρων στον άνθρωπο και η συγκέντρωσή του έχει συσχετισθεί με τη μικροβιακή ενεργότητα και τη σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου (Phipps et al., 1998). Η υψηλή διακύμανση των επιπέδων του ιππουρικού οξέος που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι σε συμφωνία με την διεθνή βιβλιογραφία (Bollard et al., 2001) και θα μπορούσε να αποδοθεί στο διαφορετικό βαθμό πρόσληψης του βενζοϊκού οξέος που χρησιμοποιείται συχνά ως συντηρητικό στα τρόφιμα (Zurri et al., 1997). Αυξημένα επίπεδα ιππουρικού οξέος έχουν επίσης αναφερθεί σε υγιή άτομα μετά από κατανάλωση μαύρου ή πράσινου τσαγιού (Mulder et al., 2005) καθώς και χαμομηλιού για περίοδο 2 εβδομάδων (Wang et al., 2005).

Παρά την απουσία αυστηρού ελέγχου της διατροφής των ατόμων της μελέτης, οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών που ποσοτικοποιήθηκαν δεν ήταν αξιοσημείωτα διαφορετικές από εκείνες που έχουν προσδιοριστεί σε ένα πληθυσμό υγιών Ιταλών με βάση τη φασματοσκοπία ¹H-NMR (Zurri et al., 1997). Στον ελληνικό πληθυσμό προσδιορίστηκαν περίπου 31% υψηλότερα επίπεδα DMA, 25% χαμηλότερα επίπεδα κιτρικού οξέος, γλυκίνης και ιππουρικού οξέος, ενώ οι αποκλίσεις των επιπέδων γαλακτικού οξέος, αλανίνης και TMAO κυμάνθηκαν μεταξύ 6 και 9%. Και στους δύο πληθυσμούς, οι γυναίκες παρουσίασαν αυξημένη απέκκριση κιτρικού οξέος σε σχέση με τους άνδρες.

Συγκρίνοντας ποιοτικά τα αποτελέσματα της παρούσης μεταβολομικής μελέτης με μια αντίστοιχη που πραγματοποιήθηκε σε έναν πληθυσμό υγιών Ελβετών (Kochhar et al., 2006), δεδομένου ότι μια άμεσα ποσοτική σύγκριση δεν ήταν δυνατή, διαπιστώθηκε ότι οι Έλληνες και οι Ελβετοί άνδρες απεκκρίνουν υψηλότερα επίπεδα ταυρίνης και χαμηλότερα επίπεδα κιτρικού οξέος από τις γυναίκες. Στα άτομα ηλικίας > 45 ετών και των δυο πληθυσμών, η απέκκριση του κιτρικού οξέος ήταν αυξημένη στους άνδρες σε σύγκριση με τις γυναίκες, ενώ η απέκκριση του γαλακτικού οξέος και της ταυρίνης ήταν παρόμοια και για τα δύο γένη. Ωστόσο, οι Έλληνες είχαν παρόμοια επίπεδα DMA και μικρότερα επίπεδα κρεατίνης σε σχέση με τις Ελληνίδες, ενώ η απέκκριση και των δυο αυτών μεταβολιτών ήταν υψηλότερη στους Ελβετούς σε σχέση με τις Ελβετίδες.

Σε μια πρόσφατα δημοσιευμένη εργασία όπου γίνεται διερεύνηση των μεταβολικών προφίλ των ούρων υγιών Καναδών, αναφέρεται αυξημένη απέκκριση κρεατινίνης στους άνδρες και γλυκίνης, κρεατινίνης και των οξέων κιτρικό και ιππουρικό στις γυναίκες, καθώς και αυξημένη απέκκριση κρεατινίνης σε άτομα ηλικίας < 40 ετών, τα οποία και βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσης εργασίας (Slupsky et al., 2007). Ωστόσο, στους Καναδούς ηλικίας < 40 ετών παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της απέκκρισης γαλακτικού οξέος και αλανίνης σε σχέση με άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, ενώ οι μεταβολίτες αυτοί στον ελληνικό πληθυσμό είχαν παρόμοια επίπεδα στις 2 ηλικιακές ομάδες.

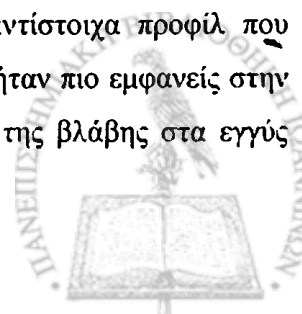
Σε μια συγκριτική μεταβολομική μελέτη με βάση τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ ούρων μεταξύ υγιών Βρετανών και Σουηδών, παρατηρήθηκε ότι η απέκκριση κρεατινίνης ήταν υψηλότερη στους Βρετανούς, ενώ η απέκκριση ιππουρικού οξέος και TMAO ήταν υψηλότερη στους Σουηδούς (Lenz et al., 2004b). Τέλος, στα πλαίσια της διεθνούς επιδημιολογικής μελέτης INTERMAP (International Study of Macro/micronutrients and Blood Pressure) μεταξύ υγιών Αμερικανών, Ιαπώνων και Κινέζων (Stamler et al., 2003), η μεταβολομική σύγκριση των αντίστοιχων φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ των ούρων έδειξε ότι ο ιαπωνικός πληθυσμός εμφάνισε υψηλότερες συγκεντρώσεις TMAO, ο κινέζικος υψηλότερες συγκεντρώσεις β -αμινοϊσοβουτυρικού οξέος και αιθανόλης, ενώ ο αμερικανικός υψηλότερα επίπεδα ιππουρικού οξέος και κρεατινίνης (Dumas et al., 2006).

Από τις παραπάνω ποσοτικές και ποιοτικές συγκρίσεις είναι φανερό ότι η διατομική μεταβλητότητα όπως προσδιορίζεται με τη μεταβολομική είναι παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται στην κλασική κλινική χημεία (Gowans and Fraser, 1987, Ricos et al., 1994). Επίσης υπάρχουν σημαντικές και σαφείς ενδείξεις ότι ακόμα και όταν η συλλογή δειγμάτων δεν υπόκειται σε ιδιαίτερα αυστηρούς περιορισμούς, τα μεταβολομικά σύνολα δεδομένων είναι αξιόπιστα και κατάλληλα για την διεξαγωγή κλινικών μελετών. Η σημαντική όμως συνεισφορά της φασματοσκοπίας $^1\text{H-NMR}$ όμως έγκειται στο γεγονός ότι οι περισσότεροι από τους μεταβολίτες αυτούς δεν προσδιορίζονται στην καθημερινή κλινική πράξη, αν και έχει αναφερθεί ότι αρκετοί φαίνεται να έχουν αξιόλογη διαγνωστική αξία σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις (Lindon et al., 1999) και ιδιαίτερα στη νεφρική δυσλειτουργία (Foxall and Nicholson, 1998).

4.4 Μελέτη των νεφροπαθών

Η εφαρμογή των τεχνικών αναγνώρισης προτύπων στη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ των ούρων για την αποτίμηση της νεφρικής βλάβης έχει εστιαστεί αποκλειστικά σχεδόν σε μελέτες με πειραματόζωα. Αυτό ισχύει τόσο στις πρωταρχικές μελέτες εφαρμογής των τεχνικών αυτών (Gartland et al., 1990a, 1990b, 1991), όσο και μετά το έτος 1999 όταν εισήχθη η έννοια της μεταβολομικής (Robertson et al., 2000, Griffin et al., 2001, Lenz et al., 2004a, 2005, Waters et al., 2005, Espandiari et al., 2007). Στην παρούσα κλινική μελέτη, έγινε για πρώτη φορά μια μεταβολομική προσέγγιση με βάση τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$, για τη διερεύνηση της συσχέτισης ιστοπαθολογικά τεκμηριωμένων αλλοιώσεων του σωληναριοδιάμεσου ιστού με το μεταβολικό προφίλ των ούρων σε νεφροπαθείς με διάφορους τύπους σπειραματονεφρίτιδας (Psihogios et al., 2007b). Από την ομάδα του υγιούς πληθυσμού που αρχικά εξετάστηκε, επιλέχθηκε ένα μικρότερο σύνολο κατάλληλο ώστε να συγκριθεί με την ομάδα των νεφροπαθών.

Τα μεταβολικά προφίλ των ούρων των ασθενών παρουσίασαν σε κάθε ένα από τα τρία στάδια της νόσου (ήπια, μέτρια, σοβαρή νεφρική βλάβη) σαφείς διαφορές από τα αντίστοιχα προφίλ που καταγράφηκαν και αναλύθηκαν στην ομάδα των υγιών. Οι αλλοιώσεις αυτές ήταν πιο εμφανείς στην ομάδα των ασθενών με σοβαρή νεφρική νόσο, αντανακλώντας την έκταση της βλάβης στα εγγύς



σωληνάρια ή/και στο σωληναριοδιάμεσο ιστό βάσει της ιστοπαθολογικής ανάλυσης. Παρόμοιες αλλοιώσεις έχουν αναφερθεί σε αρκετές μέχρι τώρα δημοσιευμένες πειραματικές και κλινικές μελέτες NMR (Gartland et al., 1989b, Knubovets et al., 1992, Lundina et al., 1993, Foxall et al., 1997). Παρατηρείται λοιπόν ότι το αρχικό στάδιο των σωληναριοδιάμεσων αλλοιώσεων χαρακτηρίζεται από μειωμένη απέκκριση κιτρικού και ιππουρικού οξέος, γλυκίνης και κρεατινίνης, ενώ περαιτέρω επιδείνωση της νόσου οδηγεί σε γλυκοζουρία, επιλεκτική αμινοξουρία, πλήρη αναστολή της απέκκρισης κιτρικού και ιππουρικού οξέος καθώς και σε σταδιακή αύξηση της απέκκρισης γαλακτικού και οξικού οξέος και ΤΜΑΟ.

Εκτός από τις παρατηρήσεις για τις συγκεντρώσεις των παραπάνω μεταβολιτών στα ούρα των υγιών, όπως αναπτύχθηκαν στην προηγούμενη ενότητα, έχουν αναφερθεί και τα εξής: Η αναστολή της απέκκρισης του κιτρικού οξέος έχει αποδοθεί τόσο σε διαταραχή του μεταβολισμού του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (Simpson and Angielski, 1973) όσο και σε σωληναριακή οξέωση (Lainig et al, 2005, Nicholson et al., 1989), η οποία συχνά εμφανίζεται σαν μέρος μιας γενικευμένης δυσλειτουργίας του εγγύς σωληναρίου (Gartland et al., 1989b). Η σημαντική ελάττωση των επιπέδων του ιππουρικού οξέος στα ούρα μπορεί να είναι ενδεικτική μιας μεταβολικής δυσλειτουργίας και κυρίως της μείωσης της αποτελεσματικότητας της έκκρισής του από το σωληνάριο (Zurri et al, 1997). Επιπρόσθετα, αυξημένη σύνθεση του ιππουρικού οξέος στο νεφρό για τη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας (Dzurik et al., 2001) θα απαιτούσε αυξημένες ανάγκες για γλυκίνη, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει και τα χαμηλά επίπεδα γλυκίνης που ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς με μέτρια και σοβαρή νεφρική βλάβη (Zurri et al., 1998). Τα επίπεδα του οξικού οξέος στα ούρα μπορούν να επηρεαστούν από την κατάσταση του μεταβολισμού (Roch-Ramel et al., 1992), ενώ αυξημένη απέκκρισή του έχει αναφερθεί στην εγγύς σωληναριακή νέκρωση μετά από χορήγηση $HgCl_2$ σε πειραματόζωα (Lenz et al., 2004a) καθώς και σε νεφροτοξικές αλλοιώσεις της μυελώδους περιοχής (Holmes et al., 1992a, Anthony et al., 1994b).

Η αύξηση της απέκκρισης του γαλακτικού οξέος έχει συσχετισθεί με αυξημένη ενεργότητα των αναερόβιων μεταβολικών οδών (Zhang et al., 2006), με μειωμένη εγγύς σωληναριακή επαναρρόφηση (Holmes et al., 1992a) και οξεία σωληναριακή νέκρωση (Gartland et al., 1989b, Nicholson and Wilson, 1989), με βλάβη της ορθής μοίρας S_2/S_3 του εγγύς σωληναρίου (Holmes et al., 1990a) και φαίνεται να είναι ένας γενικός βιολογικός δείκτης της νέκρωσης της φλοιώδους περιοχής του νεφρού (Gartland et al., 1989b). Αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος έχουν αναφερθεί και σε συνδυασμό με μειωμένη απέκκριση κιτρικού οξέος, θεωρώντας ότι το κιτρικό διασπάται σε οξικό και ακετοξικό, το οποίο μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό και τελικά σε γαλακτικό (Maher et al., 2007). Παράλληλα η λύση των επιθηλιακών κυττάρων του εγγύς σωληναρίου, συντελεί σε μειωμένη επαναρρόφηση αμινοξέων, κυρίως αλανίνης και γλυκίνης (Nicholson and Wilson, 1989), ενώ περαιτέρω βλάβη οδηγεί σε επιλεκτική αμινοξουρία (Anthony et al., 1994b) καθώς και σε γλυκοζουρία (Nicholson et al., 1985). Συνεπώς το προφίλ της επιλεκτικής αμινοξουρίας, τη γλυκοζουρίας και της αυξημένης

απέκκρισης γαλακτικού οξέος, που παρατηρήθηκαν στους ασθενείς κυρίως με σοβαρή βλάβη, παραπέμπει σε διαταραχή των μηχανισμών επαναρόφησης στα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς σωληναρίου (Anthony et al., 1992).

Αυξημένα επίπεδα μεθυλαμινών στα ούρα, κυρίως του TMAO και της DMA, έχουν αναφερθεί σε περιπτώσεις καταστροφής της μυελώδους περιοχής του νεφρού (Holmes et al., 1997) καθώς και σε πρώιμη απόρριψη νεφρικών μοσχευμάτων μετά από μεταμόσχευση νεφρού (Foxall et al., 1993). Στην παρούσα μελέτη, αυξημένη απέκκριση TMAO παρατηρήθηκε κυρίως στους ασθενείς των υποομάδων μέτριας και σοβαρής βλάβης, χωρίς όμως να συνοδεύεται από αυξημένη απέκκριση DMA, υποδηλώνοντας ως επί το πλείστον αλλοιώσεις του σωληναριοδιάμεσου ιστού, παρά νέκρωση της μυελώδους περιοχής ή καταστροφή της νεφρικής θηλής (Lundina et al., 1993).

Είναι ενδιαφέρον ότι παρόμοια ευρήματα παρατηρήθηκαν επίσης και στον κλασσικό έλεγχο με χαρακτηριστική την πρωτεϊνουρία. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι ο βαθμός της πρωτεϊνουρίας δεν συσχετίζεται πάντα με τη σοβαρότητα της σωληναριοδιάμεσης βλάβης. Η πρωτεϊνουρία αντανακλά συνήθως μια αύξηση στη διαπερατότητα του σπειράματος, το οποίο επιτρέπει τη διέλευση φυσιολογικά μη διηθούμενων μακρομορίων, όπως η αλβουμίνη και έτσι η σωληναριακή πρωτεϊνουρία μπορεί να μην ανιχνευθεί λόγω μιας αθρόας σπειραματικής υπερδιήθησης (Rose and Black, 1988). Επιπλέον, η κρεατινίνη ορού και η εκτίμηση του GFR επηρεάζονται από παράγοντες, όπως τα επίπεδα της αρτηριακής πίεσης και η ενυδάτωση των ασθενών (Klag et al., 1996). Ωστόσο, τα ευρήματα με βάση την ¹H-NMR μεταβολομική ανάλυση του μεταβολικού προφίλ των ούρων υποστηρίζουν την ύπαρξη αλλοιώσεων του σωληναριοδιάμεσου ιστού σε ασθενείς με σπειραματονεφρίτιδα, παρά το ευρύ φάσμα των νοσημάτων που διαγνώστηκαν με γνώμονα την ιστοπαθολογική ανάλυση. Ο σαφής διαχωρισμός που παρατηρήθηκε μεταξύ των υποομάδων ήπιας – σοβαρής νεφρικής βλάβης, συνιστά ότι η τεχνική αυτή μπορεί να αποβεί χρήσιμο εργαλείο για την σφαιρική αξιολόγηση της νεφρικής βλάβης. Παράλληλα αποτελεί μια ισχυρή ένδειξη, ότι αν ο αριθμός των ασθενών των επιμέρους μορφών της σπειραματονεφρίτιδας αυξηθεί, τότε η ¹H-NMR μεταβολομική ανάλυση των ούρων ίσως μπορέσει να προσφέρει μια πιο λεπτομερή διερεύνηση των επιμέρους μηχανισμών τόσο της σπειραματικής όσο και της συνυπάρχουσας σωληναριοδιάμεσης βλάβης.



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε μεθοδολογικά μια μεταβονομική προσέγγιση ανάλυσης του μεταβολικού προφίλ των ούρων με βάση τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$. Με την τεχνική αυτή μελετήθηκε για πρώτη φορά μια ομάδα υγιών ατόμων του Ελληνικού πληθυσμού. Το μεταβολικό προφίλ των ούρων του πληθυσμού αυτού παρουσίασε γενικά μια ομοιογενή κατανομή και φάνηκε ότι εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από το φύλο και σε μικρότερο βαθμό από την ηλικία των ατόμων. Ο διαχωρισμός των μεταβολικών προφίλ με βάση το φύλο κατέστη πιο σαφής μετά την ελαχιστοποίηση της επίδρασης της διατομικής μεταβλητότητας. Τα στατιστικά μοντέλα που δημιουργήθηκαν θα μπορούσαν να αποτελέσουν ουσιαστικά και το θεμέλιο βήμα για την δημιουργία της πρώτης ελληνικής βάσης μεταβονομικών δεδομένων φυσιολογικών ατόμων με γνώμονα τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ των ούρων, η οποία θα έχει ιδιαίτερη αξία σε μελλοντικές συγκριτικές μελέτες με άλλες ομάδες πληθυσμού ή ομάδες ασθενών. Επιπλέον, θα αποτελέσει και το έναυσμα για τη διεξαγωγή περαιτέρω μελετών αποσκοπώντας στον εμπλουτισμό και στη βελτίωσή της, μέσω μιας πληρέστερης καταγραφής του μεταβολικού προφίλ των ούρων του ελληνικού πληθυσμού.

Η μεταβονομική προσέγγιση των ασθενών με διάφορους τύπους σπειραματονεφρίτιδας, που αποτελεί στη διεθνή βιβλιογραφία και την πρώτη κλινική μελέτη σε συνδυασμό με ιστοπαθολογικά τεκμηριωμένες νεφρικές βλάβες, ανίχνευσε την ύπαρξη αλλοιώσεων στο σωληναριοδιάμεσο ιστό ακολουθώντας σε ικανοποιητικό βαθμό τα ευρήματα της βιοψίας. Θα ήταν σκόπιμο να υπογραμμισθεί στο σημείο αυτό η αδιαμφισβήτητη συνεισφορά της βιοψίας νεφρού στη διαφοροδιάγνωση των επιμέρους μορφών σπειραματονεφρίτιδας και συνεπώς στη σωστή επιλογή της θεραπευτικής αγωγής. Παρόλα αυτά, αποτελεί μια επεμβατική και δύσκολα επαναλήψιμη τεχνική, με ένα συνολικό ποσοστό μη ολοκλήρωσης ή αποτυχίας της βιοψίας που μπορεί να αγγίζει και το 30%. Δεδομένου λοιπόν ότι η συνύπαρξη σωληναριοδιάμεσων αλλοιώσεων στη σπειραματονεφρίτιδα παίζει καθοριστικό προγνωστικό ρόλο στην εξέλιξη της σπειραματικής νεφρικής νόσου, η μεταβονομική ανάλυση των ούρων με βάση τη φασματοσκοπία NMR, ως μια γρήγορη και μη επεμβατική αναλυτική τεχνική, φαίνεται ότι μπορεί να συμβάλει στην έγκαιρη εκτίμηση της σοβαρότητας της νεφρικής βλάβης καθώς και στην παρακολούθηση της νεφρικής λειτουργίας.

Τα αποτελέσματα της μεταβονομικής μελέτης τόσο των υγιών όσο και των ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα, μπορούν να συμβάλουν στην προσπάθεια που καταβάλλεται για την πλήρη καταγραφή του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών (ορός, ούρα, ENY) του ανθρώπου, στα πλαίσια του Human Metabolome Project (<http://www.metabolomics.ca/index.htm>). Το ερευνητικό αυτό πρωτόκολλο ενεργοποιήθηκε τον Ιανουάριο του 2005 με σκοπό την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση όλων των ανιχνεύσιμων μεταβολιτών ($> 1\mu\text{M}$) του ανθρωπίνου οργανισμού και έχει οδηγήσει στη δημιουργία της πληρέστερης αυτή τη στιγμή τράπεζας μεταβολομικών δεδομένων στον κόσμο

(προερχόμενων και από τη φασματοσκοπία NMR), τα οποία συλλέγονται από τη διεθνή βιβλιογραφία καθώς και από άλλες ηλεκτρονικές βάσεις δεδομένων (Wishart et al., 2007). Η παρούσα εργασία υπογραμμίζει επίσης την «επιτακτική ανάγκη» που εξέφρασε το 2004 η Αμερικανική Εταιρεία Νεφρολογίας, για την ενσωμάτωση της μεταβολομικής στην έρευνα των νεφρικών παθήσεων, ιδιαίτερα στη στρατηγική αναζήτησης βιολογικών δεικτών για την διαβητική νεφροπάθεια (American Society of Nephrology, 2005).



ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

6.1 Περίληψη στην Ελληνική

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου ($^1\text{H-NMR}$) των ούρων είναι μία μη επεμβατική τεχνική με την οποία καταγράφεται το σύνολο των απεκκρινόμενων μεταβολιτών μικρού μοριακού βάρους σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Η τεχνική αυτή προσφέρει δηλαδή μια αποτύπωση του μεταβολικού προφίλ των ούρων, το οποίο αποτελεί ένα σύνολο πολυμεταβλητών δεδομένων (multivariate dataset). Η ανάλυση των δεδομένων αυτών μπορεί να βελτιστοποιηθεί με τη χρήση κατάλληλων τεχνικών στατιστικής επεξεργασίας δεδομένων, όπως είναι οι τεχνικές αναγνώρισης προτύπων (pattern recognition). Η ανάλυση αυτή εντάσσεται στα πλαίσια της Μεταβονομικής (Metabonomics), η οποία είναι ένα σύστημα στατιστικής επεξεργασίας του συνολικού προφίλ των μεταβολιτών που ανιχνεύονται στα βιολογικά υγρά και το οποίο αντανακλά τόσο φυσιολογικές καταστάσεις, όσο και την απόκριση του οργανισμού σε παθολογικές οντότητες ή τοξικές επιδράσεις.

Στην παρούσα διατριβή πραγματοποιείται για πρώτη φορά με βάση τη φασματοσκοπία $^1\text{H-NMR}$ μια μεταβονομική προσέγγιση ανάλυσης του μεταβολικού προφίλ των ούρων, αφενός ενός υγιούς ελληνικού πληθυσμού και αφετέρου ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα, οι οποίοι παρουσίαζαν ιστοπαθολογικά τεκμηριωμένες αλλοιώσεις του σωληναριοδιάμεσου ιστού ήπιου, μέτριου και σοβαρού βαθμού. Αρχικά προτείνεται και αναπτύσσεται μια μεθοδολογία για την ανάλυση των πολυμεταβλητών δεδομένων NMR και αξιολογούνται διάφορες τεχνικές όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων, τη λήψη των φασμάτων και την επεξεργασία των δεδομένων. Στη συνέχεια, διερευνάται η επίδραση του φύλου και της ηλικίας των υγιών ατόμων στο μεταβολικό προφίλ των ούρων και παράλληλα προσδιορίζονται οι τιμές αναφοράς των κυριότερων απεκκρινόμενων μεταβολιτών. Ο κύριος στόχος όμως της εργασίας είναι η συσχέτιση των ιστοπαθολογικά τεκμηριωμένων αλλοιώσεων του σωληναριοδιάμεσου ιστού με το μεταβολικό προφίλ των ούρων ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα, βάσει της $^1\text{H-NMR}$ μεταβονομικής. Συγκεκριμένα, εφαρμόζονται οι τεχνικές Principal Components Analysis (PCA), Partial Least-Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) και Orthogonal Signal Correction (OSC).

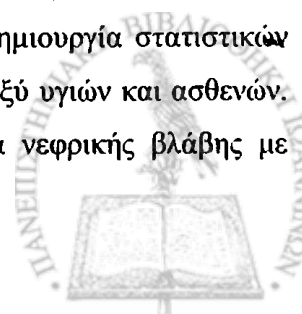
Το πρώτο στάδιο της εφαρμογής των τεχνικών αναγνώρισης προτύπων αφορούσε τη μελέτη του συνολικού μεταβολικού προφίλ των ούρων ενός δείγματος 122 υγιών ατόμων, από την οποία προέκυψαν δυο στατιστικά μοντέλα ικανά να προβλέψουν ορθά το φύλο και την ηλικία αυτών. Αρχικά μέσω της τεχνικής PCA, έγινε μια γενική επισκόπηση των πολυμεταβλητών δεδομένων, με σκοπό την δημιουργία ενός συγκροτημένου συνόλου δειγμάτων και την αξιολόγηση της ομοιογένειας του πληθυσμού. Η ανάλυση με την τεχνική αυτή έδειξε μία αδρή τάση διαχωρισμού μεταξύ ανδρών και γυναικών και μεταξύ ατόμων ηλικίας κάτω των 35 ετών και άνω των 50 ετών. Η ανάλυση PLS-

DA επέφερε έναν πιο ευδιάκριτο διαχωρισμό με σημαντικό βαθμό όμως αλληλοεπικάλυψης, ενώ η αποτελεσματική ελαχιστοποίηση της διατομικής μεταβλητότητας με την εφαρμογή της τεχνικής OSC, κατέδειξε μια σαφή διάκριση μεταξύ των ομάδων φύλου και ηλικίας. Με τον συνδυασμό των τεχνικών OSC και PLS-DA πρόεκυψαν στατιστικά μοντέλα που μπόρεσαν να προβλέψουν με απόλυτη επιτυχία, μέσω διαδικασιών εσωτερικής αξιολόγησης, το φύλο και την ηλικία (> 50 και < 35 ετών) για επίπεδο εμπιστοσύνης > 95%.

Παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα της κρεατινίνης, του τριμεθυλο-*N*-αμινοξειδίου (TMAO), της ταυρίνης και σε μικρότερο βαθμό του 3-υδροξυβουτυρικού οξέος εντοπίστηκαν σε σχετικά υψηλότερα επίπεδα στους άνδρες, ενώ τα επίπεδα του κιτρικού οξέος, της κρεατίνης, της γλυκίνης και σε μικρότερο βαθμό της φαινυλαλανίνης εντοπίστηκαν σε σχετικά υψηλότερα επίπεδα στις γυναίκες. Αντίστοιχα φάνηκε ότι τα επίπεδα απέκκρισης του TMAO και του κιτρικού οξέος ήταν υψηλότερα στα άτομα ηλικίας > 50 ετών, ενώ τα επίπεδα της κρεατινίνης και του ιππουρικού οξέος ήταν χαμηλότερα στα άτομα ηλικίας < 35 ετών. Έγινε επίσης ποσοτικοποίηση των κυριότερων απεκκρινόμενων μεταβολιτών που ανιχνεύονται με την ¹H-NMR φασματοσκοπία και για πρώτη φορά στον ελληνικό πληθυσμό προσδιορίστηκαν τιμές αναφοράς και διαστήματα εμπιστοσύνης για τα δυο φύλα καθώς και για άτομα ηλικίας > και ≤ 45 ετών.

Σε δεύτερο στάδιο, η ¹H-NMR μεταβολομική ανάλυση των ούρων 77 ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα συσχετίστηκε με τη σοβαρότητα της νεφρικής βλάβης, όσον αφορά τις αλλοιώσεις του σωληναριοδιάμεσου ιστού βάσει των ιστοπαθολογικών ευρημάτων. Τα μεταβολικά προφίλ των ούρων των ασθενών παρουσίασαν σε κάθε ένα από τα τρία στάδια της νόσου (ήπια, μέτρια και σοβαρή νεφρική βλάβη) σαφείς διαφορές από τα αντίστοιχα προφίλ των υγιών. Οι αλλοιώσεις αυτές ήταν πιο εμφανείς στην ομάδα των ασθενών με σοβαρή νεφρική νόσο, αντανακλώντας την έκταση της βλάβης στα εγγύς σωληνάρια ή/και στο σωληναριοδιάμεσο ιστό, βάσει της κατάταξης που καθόρισε η ιστοπαθολογική διάγνωση. Παρατηρήθηκε ότι το αρχικό στάδιο των σωληναριοδιαμέσων αλλοιώσεων χαρακτηρίζεται από μειωμένη απέκκριση κιτρικού και ιππουρικού οξέος, γλυκίνης και κρεατινίνης. Περαιτέρω επιδείνωση οδηγεί σε πλήρη αναστολή της απέκκρισης κιτρικού και ιππουρικού οξέος, σε μειωμένη απέκκριση γλυκίνης, σε γλυκοζουρία και επιλεκτική αμινοξουρία (αυξημένη απέκκριση αλανίνης, ιστιδίνης και φαινυλαλανίνης), καθώς και σε σταδιακή αύξηση της απέκκρισης γαλακτικού και οξικού οξέος καθώς και TMAO.

Η εφαρμογή των τεχνικών αναγνώρισης προτύπων επέτρεψε μια σαφή διαφοροποίηση όχι μόνο μεταξύ των ομάδων υγιών και ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα, αλλά και μεταξύ των επιμέρους υποομάδων των ασθενών. Η τεχνική PCA ανέδειξε μια αδρή τάση διαφοροποίησης, ενώ η τεχνική PLS-DA μια ισχυρή τάση διαχωρισμού μεταξύ των δυο ομάδων. Η ελαχιστοποίηση της διατομικής μεταβλητότητας μέσω της εφαρμογής της τεχνικής OSC, συνετέλεσε στη δημιουργία στατιστικών μοντέλων που έδειξαν έναν σαφή και στατιστικά σημαντικό διαχωρισμό μεταξύ υγιών και ασθενών. Τα στατιστικά αυτά μοντέλα ήταν σε θέση να προβλέψουν την παρουσία νεφρικής βλάβης με



ευαισθησία 96% και ειδικότητα 99% για επίπεδο εμπιστοσύνης > 95%. Οι ασθενείς με αλλοιώσεις ήπιου, μέτριου και σοβαρού βαθμού διαφοροποιήθηκαν σταδιακά από τα υγιή άτομα. Με την περαιτέρω σύγκριση μεταξύ των επιμέρους υποομάδων των ασθενών, πρόεκυψαν μοντέλα OSC/PLS-DA που έδειξαν στατιστικά σημαντικό διαχωρισμό μεταξύ αυτών με ήπια και σοβαρή νεφρική βλάβη, καθώς και μια υψηλή ικανότητα πρόβλεψης της σοβαρότητας της νόσου. Κατά τη σύγκριση μεταξύ των υποομάδων μέτριας - ήπιας και μέτριας - σοβαρής βλάβης, ο διαχωρισμός ήταν εμφανής αλλά όχι στατιστικά σημαντικός.

Η συνύπαρξη σωληναριοδιάμεσων αλλοιώσεων στη σπειραματονεφρίτιδα παίζει καθοριστικό προγνωστικό ρόλο στην εξέλιξη της σπειραματικής νεφρικής νόσου. Στα κρίσιμο αυτό σημείο, φαίνεται ότι η μεταβονομική ανάλυση της σύστασης των ούρων βάσει της φασματοσκοπίας NMR, ως μια γρήγορη και μη επεμβατική αναλυτική τεχνική, μπορεί να συμβάλει αφενός μεν στην έγκαιρη εκτίμηση της σοβαρότητας της νεφρικής βλάβης, αφετέρου δε στην παρακολούθηση της νεφρικής λειτουργίας.

Τα αποτελέσματα της μεταβονομικής μελέτης τόσο των υγιών όσο και των ασθενών με σπειραματονεφρίτιδα, μπορούν να συμβάλουν στην προσπάθεια που καταβάλλεται για την πλήρη καταγραφή του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών του ανθρώπου στα πλαίσια του Human Metabolome Project (<http://www.metabolomics.ca/index.htm>). Το ερευνητικό αυτό πρωτόκολλο έχει ως στόχο την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση όλων των ανιχνεύσιμων μεταβολιτών (> 1μM) του ανθρωπίνου οργανισμού και έχει οδηγήσει στην δημιουργία της πληρέστερης αυτή τη στιγμή τράπεζας μεταβολομικών δεδομένων στον κόσμο. Η παρούσα εργασία υπογραμμίζει επίσης την «επιτακτική ανάγκη» που εξέφρασε η Αμερικανική Εταιρεία Νεφρολογίας το 2004 για την ενσωμάτωση της μεταβολομικής στην έρευνα των νεφρικών παθήσεων, ιδιαίτερα στη στρατηγική αναζήτησης βιολογικών δεικτών για την διαβητική νεφροπάθεια (American Society of Nephrology, 2005).

6.2 Περίληψη στην Αγγλική (Summary in English)

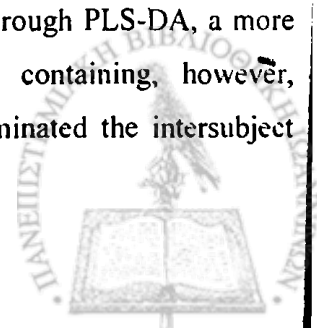
Nick Psihogios

Doctorate thesis: “*The Application of Metabonomics in the Investigation of Kidney Diseases*”

High resolution proton Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$) spectroscopy of urine is a non-invasive analytical technique, which provides an overall profile of the low molecular weight metabolites excreted in urine that alters characteristically in response to changes in physiological status, toxic insult, or disease processes. This $^1\text{H-NMR}$ -based urinary metabolic profile can be characterized as a multivariate dataset. The exploitation of the NMR-generated metabolic datasets can be increased by the application of multivariate statistical data analysis methods, such as pattern recognition techniques, that allow sample classification and effective interpretation. This relatively new approach, known as Metabonomics, has had major applications in clinical and biomedical topics, such as drug toxicity assessment, identification of biomarkers of toxicity and disease, and the understanding of the mechanisms of metabolic responses.

In the current thesis, an $^1\text{H NMR}$ -based metabonomic approach is used for the first time to investigate the urinary metabolite profile of a healthy Greek population and that of renal patients with glomerulonephritis, who were histopathologically diagnosed with tubulointerstitial lesions of mild, moderate and severe extent. Initially, a multivariate data analysis methodology is developed and various techniques concerning sample preparation, spectra acquisition and data processing are evaluated. The metabolite profile of the healthy subjects is examined in relation to gender and age, and reference intervals of the major metabolites detected in urine spectra are determined. The main aim of this prospective study is to investigate the correlation of tubulointerstitial lesions found in renal biopsies, with the metabolite profile of urine analyzed by $^1\text{H-NMR}$ -based metabonomics in patients with glomerulonephritis. In particular, the pattern recognition techniques used, are Principal Components Analysis (PCA), Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) and the data filtering technique of Orthogonal Signal Correction (OSC).

The first step of pattern recognition analysis concerned the investigation of the urinary metabolic profile of 122 healthy Greeks. For the differentiation between gender-based and age-based groups, ‘supervised’ and ‘unsupervised’ pattern recognition techniques were used. The multivariate data analysis led to the construction of two robust models that were able to predict the class membership of the subjects according to their gender and age. The application of PCA to the metabonomic set provided a general overview of the spectral data and resulted in a slight separation trend between men and women and between subjects aged below 35 and above 50 years old. Through PLS-DA, a more evident differentiation between the groups studied was detected, still containing, however, considerable overlap between the two classes. The application of OSC eliminated the intersubject

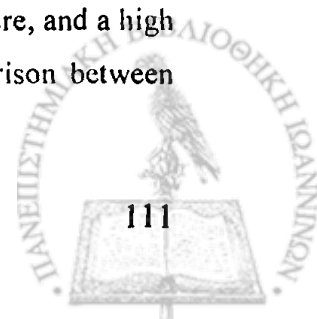


variation and enabled a clear separation in the OSC-filtered models. The final OSC/PLS-DA models were tested by means of internal validation procedures and were proven able to correctly predict the corresponding gender and age (below 35 and above 50yo) in a confidence region >95%.

The overall metabonomic analysis indicated that men tended to excrete higher levels of creatinine, trimethylamine-*N*-oxide (TMAO), taurine and to a lesser extent 3-hydroxybutyrate than women, whereas women excreted higher levels of citrate, creatine and glycine and to a lesser extent phenylalanine than men. Similarly, subjects >50yo presented higher urinary concentrations of TMAO and citrate and lower urinary concentrations of creatinine and hippurate than subjects <35yo. The main low molecular weight metabolites detected in the ¹H-NMR urine spectra were quantified and reference values with the corresponding confidence intervals for men, women and subjects below and above 45yo were determined for the first time in the Greek population.

Secondly, an ¹H NMR-based metabonomic urinalysis of 77 patients with glomerulonephritis was correlated with the severity of the renal damage on the basis of histopathologically assessed tubulointerstitial lesions. The urinary metabolite profiles of these patients at any disease stage (mild, moderate, severe renal damage) showed distinct alterations from those recorded from 85 age- and sex-matched healthy individuals. These alterations were more obvious in patients with severe renal disease and reflected the extent of the damage in the proximal tubules and/or the tubulointerstitial tissue, as it was classified by the histopathological diagnosis. It was shown that the onset of the tubulointerstitial lesions is characterized by decreased excretion of citrate, hippurate, glycine, and creatinine, whereas further deterioration is followed by total depletion of citrate and hippurate, decreased excretion of glycine, glycosuria, selective aminoaciduria (increased excretion of alanine, histidine and phenylalanine), and a gradual increase in the excretion of lactate, acetate, and TMAO.

The application of pattern recognition methods allowed the extraction of the most discriminate information from the multivariate NMR data and an effective sample classification, not only between healthy individuals and patients with glomerulonephritis, but also among the patients' subgroups. The initial PCA was important for the detection of outlying spectra, in order to assess a consistent metabonomic approach and showed a separation trend between patients and healthy individuals. Through PLS-DA, a strong separation trend between these two groups was detected. The application of OSC-filtering led to the elimination of the intersubject variation and enabled a clear and statistically significant separation in the resulting models. These models were able to predict the presence of renal damage with a sensitivity of 96% and a specificity of 99%, based on a 95% confidence limit for class membership. Patients with mild, moderate and severe tubulointerstitial lesions were progressively differentiated from the healthy individuals. A further comparison of the patients' subgroups revealed a statistically significant separation between patients with mild lesions and those with severe, and a high predictive ability of the corresponding OSC/PLS-DA models. Concerning the comparison between



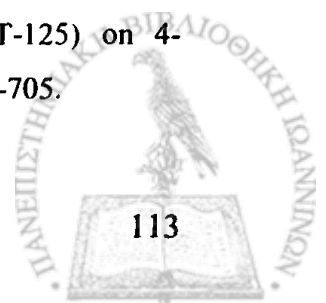
moderate and mild and between moderate and severe renal damage subgroups, the separation was non-significant, but quite evident in the OSC/PLS-DA models.

In conclusion, since the coexistence of tubular and interstitial lesions in glomerulonephritis is of crucial prognostic importance for the progress of renal glomerular function, NMR-based metabonomic urinalysis, as a rapid and non-invasive analytical technique, could contribute to the early evaluation of the severity of renal damage and possibly to the monitoring of kidney function. The published results of the present thesis are hopefully expected to be included in the ongoing effort to accomplish a complete mapping of the metabolite profiles of various biofluids in man. This effort has been developed by the research protocol, called the Human Metabolome Project (<http://www.metabolomics.ca/index.htm>), with the aim to identify and quantify all detectable metabolites ($> 1\mu\text{M}$) in the human body. The present study also reinforces the “urgent need”, addressed in 2004 by the American Society of Nephrology, to develop among other bio research approaches, a metabolomic-based infrastructure for kidney research, especially as a means of a biomarker search strategy in diabetic nephropathy.

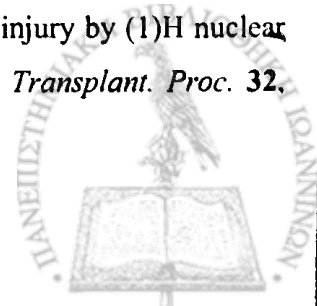


ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Βελεγράκη, Α. και Καμπούρης, Μ. Ε. (2003) Συστοιχίες και πολυπλεκτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Επαναστατικές μέθοδοι Μοριακής Βιολογίας με εφαρμογές στη βιοϊατρική πράξη. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής* **20**, 425-445.
2. Βλαχάκος, Β. Δ. (2005) Παθοφυσιολογία της νεφρικής λειτουργίας. *Νεφρική Λειτουργία, Κείμενα διαλέξεων των πρακτικών του 11ου Εκπαιδευτικού Σεμιναρίου της Ελληνικής Εταιρείας Κλινικής Χημείας - Κλινικής Βιοχημείας*, Αθήνα, σελ. 16-22.
3. Κατρίτσης, Ε. και Παπαδόπουλος Ν. (1979-1982) *Μαθήματα Ανατομικής του Ανθρώπου σε τέσσερα τεύχη*. Λίτσας, Αθήνα.
4. Μαυρομούστακος Θ. και Ματσούκας Ι. (2006) NMR. *Αρχές Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού και Οργανολογία*. Αρχές και εφαρμογές φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στην: Ιατρική, Φαρμακευτική Χημεία, Βιοχημεία, Χημεία τροφίμων και ποτών. Παρισιάνος, Αθήνα.
5. Abbate, M., Zoja, C., Corna, D., Capitanio, M., Bertani, T. and Remuzzi, G. (1998) In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 1213-1224.
6. Akira, K., Imachi, M. and Hashimoto, T. (2005) Investigations into biochemical changes of genetic hypertensive rats using ¹H nuclear magnetic resonance-based metabonomics. *Hypertens. Res.* **28**, 425-430.
7. Al-Waiz, M., Mitchell, S. C., Idle, J.R. and Smith, R. L. (1987) The relative importance of N-oxidation and N-demethylation in the metabolism of trimethylamine in man. *Toxicology* **43**, 117-121.
8. Al-Waiz, M., Ayesb, R., Mitchell, S. C., Idle, J. R. and Smith, R. L. (1988) Trimethylaminuria ('fish-odour syndrome'): a study of an affected family. *Clin. Sci.* **74**, 231-236.
9. American Society of Nephrology (2005) American Society of Nephrology Renal Research Report. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 1886-1903.
10. Anthony, M. L., Gartland, K. P., Beddell, C. R., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (1992) Cephaloridine-induced nephrotoxicity in the Fischer 344 rat: proton NMR spectroscopic studies of urine and plasma in relation to conventional clinical chemical and histopathological assessments of nephronal damage. *Arch. Toxicol.* **66**, 525-537.
11. Anthony, M. L., Beddell, C. R., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (1993) Studies on the effects of L(alpha S,5S)-alpha-amino-3-chloro-4,5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid (AT-125) on 4-aminophenol-induced nephrotoxicity in the Fischer 344 rat. *Arch. Toxicol.* **67**, 696-705.

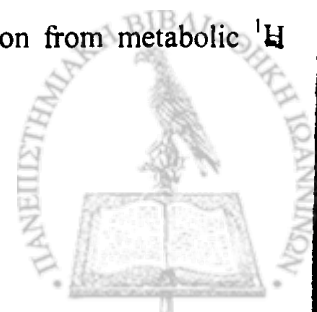


12. Anthony, M. L., Gartland, K. P., Beddell, C. R., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (1994a) Studies of the biochemical toxicology of uranyl nitrate in the rat. *Arch. Toxicol.* **68**, 43-53.
13. Anthony, M. L., Sweatman, B. C., Beddell, C. R., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (1994b) Pattern recognition classification of the site of nephrotoxicity based on metabolic data derived from proton nuclear magnetic resonance spectra of urine. *Mol. Pharmacol.* **46**, 199-211.
14. Anthony, M. L., Beddell, C. R., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (1994c) Studies on the comparative toxicity of S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine, S-(1,2-dichlorovinyl)-L-homocysteine and 1,1,2-trichloro-3,3,3-trifluoro-1-propene in the Fischer 344 rat. *Arch. Toxicol.* **69**, 99-110.
15. Anthony, M. L., Rose, V. S., Nicholson, J. K. and Lindon, J. C. (1995) Classification of toxin-induced changes in ^1H NMR spectra of urine using an artificial neural network. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **13**, 205-211.
16. Atta-ur-Rahman and Choudhary, M.I. (1996). The Second Dimension in *Solving Problems with NMR Spectroscopy*, 1st Edition, Academic Press, San Diego, CA, USA. ..
17. Bairaktari, E., Katopodis, K., Siamopoulos, K. C. and Tsolas, O. (1998) Paraquat-induced renal injury studied by ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. *Clin. Chem.* **44**, 1256-1261.
18. Bairaktari, E., Liamis, G., Tsolas, O. and Elisaf, M. (2001) Partially reversible renal tubular damage in patients with obstructive jaundice. *Hepatology* **33**, 1365-1369.
19. Bairaktari, E., Seferiadis, K., Liamis, G., Psihogios, N., Tsolas, O. and Elisaf M. (2002) Rhabdomyolysis-related renal tubular damage studied by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. *Clin. Chem.* **48**, 1106-1109.
20. Balaban, R. S. and Burg, M. B. (1987) Osmotically active organic solutes in the renal inner medulla. *Kidney Int.* **31**, 562-564.
21. Bales, J. R., Higham, D. P., Howe, I., Nicholson, J. K. and Sadler, P. J. (1984a) Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. *Clin. Chem.* **30**, 426-432. --
22. Bales, J. R., Sadler, P. J., Nicholson, J. K. and Timbrell, J. A. (1984b) Urinary excretion of acetaminophen and its metabolites as studied by proton NMR spectroscopy. *Clin. Chem.* **30**, 1631-1636.
23. Bales, J. R., Bell, J. D., Nicholson, J. K., Sadler, P. J., Timbrell, J. A., Hughes, R. D., Bennett, P. N. and Williams, R. (1988) Metabolic profiling of body fluids by proton NMR: self-poisoning episodes with paracetamol (acetaminophen). *Magn. Res. Med.* **6**, 300-306.
24. Baumert, H., Richer, J. P., Gibelin, H., Ben Amor, I., Caritez, J. C., Germonville, T., Carretier, M., Eugene, M. and Hauet, T. (2000) Early evaluation of renal medulla injury by (^1H) nuclear magnetic resonance spectroscopy after preservation and transplantation. *Transplant. Proc.* **32**, 498-499.

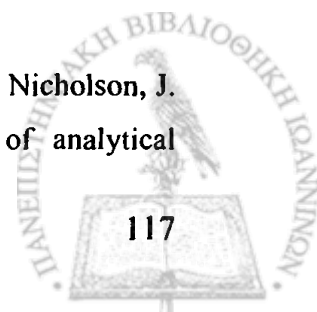


25. Bazzi, C., Petrini, C., Rizza, V., Arrigo, G., Beltrame, A. and D'Amico, G. (1997) Characterization of proteinuria in primary glomerulonephritides. SDS-PAGE patterns: Clinical significance and prognostic value of low-molecular-weight ("tubular") proteins. *Am. J. Kidney Dis.* **29**, 27-35.
26. Bazzi, C., Petrini, C., Rizza, V., Arrigo, G., Beltrame, A. and D'Amico, G. (2000) A modern approach to selectivity of proteinuria: Association with tubulo-interstitial damage and prediction of functional outcome and response to therapy in nephrotic syndrome. *Kidney Int.* **58**, 1732-1741.
27. Beckwith-Hall, B. M., Nicholson, J. K., Nicholls, A. W., Foxall, P. J., Lindon, J. C., Connor, S. C., Abdi, M., Connelly, J. and Holmes E. (1998) Nuclear magnetic resonance spectroscopic and principal components analysis investigations into biochemical effects of three model hepatotoxins. *Chem. Res. Toxicol.* **11**, 260-272.
28. Beckwith-Hall, B. M., Brindle, J. T., Barton, R. H., Coen, M., Holmes, E., Nicholson, J. K. and Antti H. (2002) Application of orthogonal signal correction to minimise the effects of physical and biological variation in high resolution ¹H NMR spectra of biofluids. *Analyst* **127**, 1283-1288.
29. Bell, J. D., Lee, J. A., Lee, H. A., Sadler, P. J., Wilkie, D. R. and Woodham, R. H. (1991) Nuclear magnetic resonance studies of blood plasma and urine from subjects with chronic renal failure: Identification of trimethylamine-N-oxide. *Biochim. Biophys. Acta* **1096**, 101-107.
30. Bertram, H. C., Hoppe, C., Petersen, B. O., Duus, J. O., Molgaard, C. and Michaelsen, K. F. (2007) An NMR-based metabonomic investigation on effects of milk and meat protein diets given to 8-year-old boys. *Br. J. Nutr.* **97**, 758-763.
31. Bleiler, R. E. and Schedl, H. P. (1962) Creatinine excretion: variability and relationships to diet and body size. *J. Lab. Clin. Med.* **59**, 945-955.
32. Bloch, F., Hansen, W. W. and Packard, M. E. (1946) Nuclear Induction. *Phys. Rev.* **69**, 127.
33. Bohle, A., Wehrmann, M., Bogenschutz, O., Batz, C., Vogl, W., Schmitt, H., Muller, C. A. and Muller, G. A. (1992) The long-term prognosis of the primary glomerulonephritides. A morphological and clinical analysis of 1747 cases. *Pathol. Res. Pract.* **188**, 908-924.
34. Bollard, M. E., Holmes, E., Lindon, J. C., Mitchell, S. C., Branstetter, D., Zhang, W. and Nicholson, J. K. (2001) Investigations into biochemical changes due to diurnal variation and estrus cycle in female rats using high-resolution ¹H NMR spectroscopy of urine and pattern recognition. *Anal. Biochem.* **295**, 194-202.
35. Bollard, M. E., Keun, H. C., Beckonert, O., Ebbels, T. M., Antti, H., Nicholls, A. W., Shockcor, J.-P., Cantor, G. H., Stevens, G., Lindon, J. C., Holmes, E. and Nicholson, J. K. (2005a) Comparative metabonomics of differential hydrazine toxicity in the rat and mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **204**, 135-151.

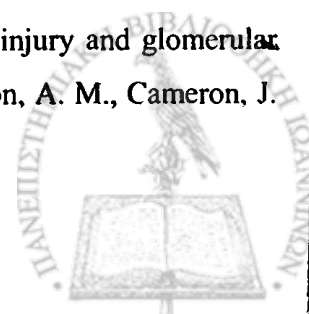
36. Bollard, M. E., Stanley, E. G., Lindon, J. C., Nicholson, J. K. and Holmes, E. (2005b) NMR-based metabonomic approaches for evaluating physiological influences on biofluid composition. *NMR Biomed.* **18**, 143-162.
37. Bovey, A. F., Jelinski, L., Mirau, A. P. (1988) Experimental methods In *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2nd Edition, Academic Press, San Diego, CA, USA.
38. Brandt, J., Pippin, J., Schulze, M., Hänsch, G. M., Alpers, C. E., Johnson, R. J., Gordon, K. and Couser, W. G. (1996) Role of the complement membrane attack complex (C5b-9) in mediating experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *Kidney Int.* **49**, 335-343.
39. Braun, S., Kalinowski, H. O. and Berger, S. (1996) *100 and more Basic NMR experiments. A practical course*, Willey-VCH, Weinheim, Germany.
40. Briganti, E. M., Dowling, J., Finlay, M, Hill, P. A., Jones, C. L., Kincaid-Smith, P. S., Sinclair, R., McNeil, J. J. and Atkins, R. C. (2001) The incidence of biopsy-proven glomerulonephritis in Australia. *Nephrol. Dial. Transplant.* **16**, 1364-1367.
41. Brindle, J. T., Antti, H., Holmes, E., Tranter, G., Nicholson, J. K., Bethell, H. W., Clarke, S., Schofield, P. M., McKilligin, E., Mosedale, D. E. and Grainger, D. J. (2002) Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabonomics. *Nat. Med.* **8**, 1439-1444.
42. Burtis, C.A., Ashwood, E. R. and Bruns, D.E. (2006) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 4th Edition, Elsevier Saunders, St. Louis, MO, USA.
43. Burton, C. J. and Walls, J. (1994) Proximal tubular cell, proteinuria and tubulo-interstitial scarring. *Nephron* **68**, 287-293.
44. Bylesjö, M., Rantalainen, M., Cloarec, O., Nicholson, J. K., Holmes, E. and Trygg, J. (2006) OPLS discriminant analysis: combining the strengths of PLS-DA and SIMCA classification. *J. Chemometrics* **20**, 341-351.
45. Choi, Y. J., Chakraborty, S., Nguyen, V., Nguyen, C., Kim, B. K., Shim, S. I., Suki, W. N. and Truong, L. D. (2000) Peritubular capillary loss is associated with chronic tubulointerstitial injury in human kidney: altered expression of vascular endothelial growth factor. *Human Pathol.* **31**, 1491-1497.
46. Clayton, T. A., Lindon, J. C., Cloarec, O., Antti, H., Charuel, C., Hanton, G., Provost, J. P., Le Net, J. L., Baker, D., Walley, R. J., Everett, J. R. and Nicholson J. K. (2006) Pharmacometabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* **440**, 1073-1077.
47. Cloarec, O., Dumas, M. E., Craig, A., Barton, R. H., Trygg, J., Hudson, J., Blancher, C., Gauguier, D., Lindon, J. C., Holmes, E., and Nicholson, J. (2005) Statistical total correlation spectroscopy: an exploratory approach for latent biomarker identification from metabolic ¹H NMR data sets. *Anal. Chem.* **77**, 1282-1289.



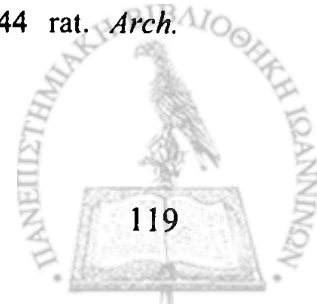
48. Coen, M., Lenz, E. M., Nicholson, J. K., Wilson, I. D., Pognan, F. and Lindon, J. C. (2003) An integrated metabonomic investigation of acetaminophen toxicity in the mouse using NMR spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 295-303.
49. Coen, M., Hong, Y. S., Clayton, T. A., Rohde, C. M., Pearce, J. T., Reily, M. D., Robertson, D. G., Holmes, E., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (2007) The mechanism of galactosamine toxicity revisited; a metabonomic study. *J. Proteome Res.* **6**, 2711-2719.
50. Couser, W. G., Nangaku, M., Shankland, S. J. and Johnson, R. J. (1997) Molecular mechanisms of experimental glomerulonephritis: an overview. *Nephrology* **3**, S633-637.
51. Craig, A., Cloarec, O., Holmes, E., Nicholson, J. K. and Lindon, J. C. (2006) Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. *Anal. Chem.* **78**, 2262-2267.
52. D'Amico, G. and Gentile, M. G. (1993) Influence of diet on lipid abnormalities in human renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* **22**, 151-157.
53. D'Amico, G., Ferrario, F. and Rastaldi, M. P. (1995) Tubulointerstitial damage in glomerular diseases: its role in the progression of renal damage. *Am. J. Kidney Dis.* **26**, 124-132.
54. D'Amico, G. (1999) Tubulointerstitium as predictor of progression of glomerular diseases. *Nephron*, **83**, 289-295.
55. D'Amico, G. and Bazzi, C. (2003) Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int.* **63**, 809-825.
56. Davies, K. M., Heaney, R. P. and Rafferty, K. (2002) Decline in muscle mass with age in women: a longitudinal study using an indirect measure. *Metabolism* **51**, 935-939.
57. Delneri, D., Brancia, F. L. and Oliver, S. G. (2001) Towards a truly integrative biology through the functional genomics of yeast. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 87-91.
58. Dey, J., Creighton, A., Lindberg, J. S., Fuselier, H. A., Kok, D. J., Cole, F. E. and Hamm, L. L. (2002) Estrogen replacement increased the citrate and calcium excretion rates in postmenopausal women with recurrent urolithiasis. *J. Urol.* **167**, 169-171.
59. Dolphin, C. T., Janmohamed, A., Smith, R. L., Shephard, E. A. and Phillips, I. R. (1997) Missense mutation in flavin-containing mono-oxygenase 3 gene, FMO3, underlies fish-odour syndrome. *Nat. Genet.* **17**, 491-494.
60. Donadelli, R., Abbate, M., Zanchi, C., Corna, D., Tomasoni, S., Benigni, A., Remuzzi, G. and Zoja, C. (2000) Protein traffic activates NF- κ B gene signaling and promotes MCP-1-dependent interstitial inflammation. *Am. J. Kidney Dis.* **36**, 1226-1241.
61. Doucet, C., Dutheil, D., Petit, I., Zhang, K., Eugene, M., Touchard, G., Wahl, A., Seguin, F., Milinkevitch, S., Hauet, T. and Mauco, G. (2004) Influence of colloid, preservation medium and trimetazidine on renal medulla injury. *Biochim. Biophys. Acta* **1673**, 105-114.
62. Dumas, M. E., Maibaum, E. C., Teague, C., Ueshima, H., Zhou, B., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Stamler, J., Elliott, P., Chan, Q. and Holmes E. (2006) Assessment of analytical



- reproducibility of ^1H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: the INTERMAP Study. *Anal. Chem.* **78**, 2199-2208.
63. Dzurik, R., Spustová, V., Krivosíková, Z. and Gazdíková, K. (2001) Hippurate participates in the correction of metabolic acidosis. *Kidney Int. Suppl.* **78**, S278-281.
 64. Ebbels, T. M., Lindon, J. C., Nicholson, J. K. and Holmes, E. C. (2002, October). Methods for spectral analysis and their applications: spectral replacement. US Patent US20010029380 20011220 (US2002145425).
 65. Ebbels, T. M., Holmes, E., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (2004) Evaluation of metabolic variation in normal rat strains from a statistical analysis of ^1H NMR spectra of urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36**, 823-833.
 66. Ebbels, T. M., Keun, H. C., Beckonert, O. P., Bollard, M. E., Lindon, J. C., Holmes, E. and Nicholson, J. K. (2007) Prediction and Classification of Drug Toxicity Using Probabilistic Modeling of Temporal Metabolic Data: The Consortium on Metabonomic Toxicology Screening Approach. *J. Proteome Res.* **6**, 4907-4922.
 67. Eriksson, L., Johansson, E., Kettaneh-Wold, N. and Wold, S. (2001) *Multi- and Megavariate Data Analysis, Principles and Applications*. Umetrics AB: Umea, Sweden.
 68. Ernst, R. R., Bodenhausen, A. and Wokaun, A. (1987). *Principles of NMR in one and two dimensions*. Oxford University Press, New York, NY, USA.
 69. Ernst, R. R. and Anderson, W. A. (1966) Application of Fourier Transform spectroscopy to magnetic resonance. *Rev. Sci. Instr.* **37**, 93-102.
 70. Espandiari, P., Zhang, J., Rosenzweig, B., Vaidya, V., Sun, J., Schnackenberg, L., Herman, E., Knapton, A., Bonventre, J., Beger, R., Thompson, K. and Hanig, J. (2007) The utility of a rodent model in detecting pediatric drug-induced nephrotoxicity. *Toxicol. Sci.* **99**, 637-348.
 71. Eugene, M., Muller, F., Dommergues, M., Le Moyec, L. and Dumez, Y. (1994) Evaluation of postnatal renal function in fetuses with bilateral obstructive uropathies by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **170**, 595-602.
 72. Eugene, M., Hauet, T., Mothes, D., Goujon, J. M., Le Moyec, L., Carretier, M. and Caritez, J. C. (1997) Beneficial effects of a low-potassium+ and polyethylene glycol solution on renal function and structure during 48-hour cold storage preservation. *Transplant. Proc.* **29**, 2360-2362.
 73. Farrant, R. D., Lindon, J. C., Rahr, E. and Sweatman, B. C. (1992) An automatic data reduction and transfer method to aid pattern recognition analysis and classification of NMR spectra. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **10**, 141-144.
 74. Feehally, J., Floege, J., Savill, J. and Turner, N. A. (2005) Glomerular injury and glomerular response. In *Oxford Textbook of Clinical Nephrology*, 3rd Edition, Davison, A. M., Cameron, J.



- S., Grünfeld, J., Ponticelli, C., Ritz, E., Winearls, C. G. and van Ypersele, C. Eds; Oxford University Press: New York, p. 367-387.
75. Feng, J., Li, X., Pei, F., Chen, X., Li, S. and Nie, Y. (2002) ^1H NMR analysis for metabolites in serum and urine from rats administrated chronically with $\text{La}(\text{NO}_3)_3$. *Anal. Biochem.* **301**, 1-7.
 76. Fiehn, O., Kristal B., van Ommen, B., Sumner, L. W., Sansone, S. A., Taylor, C., Hardy, N. and Kaddurah-Daouk, R. (2006) Establishing reporting standards for metabolomic and metabonomic studies: a call for participation. *OMICS* **10**, 158-163.
 77. Fite, L. G., Bandyopadhyay, D. and Norman J. T. (2000) Is there a common mechanism for the progression of different types of renal diseases other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia. *Kidney Int.* **75**, S22-26.
 78. Foxall, P. J., Bending, M. R., Gartland, K. P., and Nicholson, J. K. (1989) Acute renal failure following accidental cutaneous absorption of phenol: application of NMR urinalysis to monitor the disease process. *Hum. Toxicol.* **8**, 491-496.
 79. Foxall, P. J., Mellotte, G. J., Bending, M. R., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (1993) NMR spectroscopy as a novel approach to the monitoring of renal transplant function. *Kidney Int.* **43**, 234-245.
 80. Foxall, P. J., Bewley, S., Neild, G. H., Rodeck, C. H. and Nicholson, J. K. (1995) Analysis of fetal and neonatal urine using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Arch. Dis. Child.* **73**, F153-157.
 81. Foxall, P. J., Lenz, E. M., Lindon, J. C., Neild, G. H., Wilson, I. D. and Nicholson, J. K. (1996) Nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance studies on the toxicity and metabolism of ifosfamide. *Ther. Drug Monit.* **18**, 498-505.
 82. Foxall, P. J., Singer, J. M., Hartley, J. M., Neild, G. H., Lapsley, M., Nicholson, J. K. and Souhami, R. L. (1997) Urinary proton magnetic resonance studies of early ifosfamide-induced nephrotoxicity and encephalopathy. *Clin. Cancer Res.* **3**, 1507-1518.
 83. Foxall, P. J. and Nicholson, J. K. (1998) Nuclear magnetic resonance spectroscopy: a non-invasive probe of kidney metabolism and function. *Exp. Nephrol.* **6**, 409-414.
 84. Fukunaga, K. (1990) *Introduction to Statistical Pattern Recognition*, 2nd ed. Academic, Boston, MA, USA.
 85. Garrod, S., Bollard, M. E., Nicholls, A. W., Connor, S. C., Connelly, J., Nicholson, J. K. and Holmes, E. (2005) Integrated metabonomic analysis of the multiorgan effects of hydrazine toxicity in the rat. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 115-122.
 86. Gartland, K. P., Bonner, F. W., Timbrell, J. A. and Nicholson, J. K. (1989a) Biochemical characterisation of para-aminophenol-induced nephrotoxic lesions in the F344 rat. *Arch. Toxicol.* **63**, 97-106.

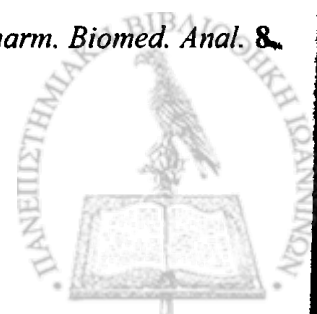


87. Gartland, K. P., Bonner, F. W. and Nicholson, J. K. (1989b) Investigations into the biochemical effects of region-specific nephrotoxins. *Mol. Pharmacol.* **35**, 242-250.
88. Gartland, K. P., Anthony, M. L., Beddell, C. R., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (1990a) Proton NMR studies on the effects of uranyl nitrate on the biochemical composition of rat urine and plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **8**, 951-954.
89. Gartland, K. P., Beddell, C. R., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (1990b) A pattern recognition approach to the comparison of PMR and clinical chemical data for classification of nephrotoxicity. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **8**, 963-968.
90. Gartland, K. P., Sanins, S. M., Nicholson, J. K., Sweatman, B. C., Beddell, C. R. and Lindon, J. C. (1990c) Pattern recognition analysis of high resolution ¹H NMR spectra of urine. A nonlinear mapping approach to the classification of toxicological data. *NMR Biomed.* **3**, 166-172.
91. Gartland, K. P., Beddell, C. R., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (1991) Application of pattern recognition methods to the analysis and classification of toxicological data derived from proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. *Mol. Pharmacol.* **39**, 629-642.
92. Gavaghan, C. L., Nicholson, J. K., Connor, S. C., Wilson, I. D., Wright, B. and Holmes, E. (2001) Directly coupled high-performance liquid chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopic with chemometric studies on metabolic variation in Sprague-Dawley rats. *Anal. Biochem.* **291**, 245-252.
93. Gavaghan C. L., Wilson, I. D. and Nicholson, J. K. (2002) Physiological variation in metabolic phenotyping and functional genomic studies: use of orthogonal signal correction and PLS-DA. *FEBS Letters* **530**, 191-196.
94. Gerothanassis, I. P., Troganis, A., Exarchou, V. and Barbarossou, K (2002). Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy: Basic Principles and Phenomena, and their Applications to Chemistry, Biology and Medicine. *Chem. Educ. Res. Pract. Eur.* **3**, 229-252.
95. Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G. and Kell, D. B. (2004) Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* **22**, 245-252.
96. Gowans, E. M. and Fraser, C. G. (1987) Biological variation in analyte concentrations in urine of apparently healthy men and women. *Clin. Chem.* **33**, 847-850.
97. Greenhaff, P. L. (1997) The nutritional biochemistry of creatine. *J. Nutr. Biochem.* **8**, 610-618.
98. Griffin, J. L., Walker, L. A., Shore, R. F. and Nicholson, J. K. (2001) Metabolic profiling of chronic cadmium exposure in the rat. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 1428-1434.
99. Gullans, S. R., Blumenfeld, J. D., Balschi, J. A., Kaleta, M., Brenner, R. M., Heilig, C. W. and Hebert, S. C. (1988) Accumulation of major organic osmolytes in rat renal inner medulla in dehydration. *Am. J. Physiol.* **255**, F626-F634.



100. Guneral, F. and Bachmann, C. (1994) Age-related reference values for urinary organic acids in a healthy Turkish pediatric population. *Clin. Chem.* **40**, 862-866.
101. Günther, H. (1995) *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts, and Applications in Chemistry*. 2nd Edition, Eds; John Wiley & Sons, Chichester, UK.
102. Gwinner, W. (2007) Renal transplant rejection markers. *World J. Urol.* **25**, 445-455.
103. Halligan, S., Byard, S. J., Spencer, A. J., Gray, T. J., Harpur, E. S. and Bonner, F. W. (1995) A study of the nephrotoxicity of three cephalosporins in rabbits using ¹H NMR spectroscopy. *Toxicol. Lett.* **81**, 15-21.
104. Harris, R. K. (1983) *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: A Physicochemical View*", Ed: Pitman Books Ltd, London, UK.
105. Harrison, M. P., Jones, D. V., Pickford, R. J. and Wilson ID. (1991) beta-Hydroxybutyrate: a urinary marker of imipenem induced nephrotoxicity in the cynomolgus monkey detected by high field ¹H NMR spectroscopy. *Biochem. Pharmacol.* **41**, 2045-2049.
106. Hauet, T., Mothes, D., Goujon, J. M., Badia, P., Carretier, M., Caritez, J. C., Robert, R., Tallineau, C. and Eugene, M. (1996) Assessment of functional activity of cold-stored kidney transplant by proton magnetic resonance spectroscopy. *Transplant. Proc.* **28**, 2896-2898.
107. Hauet, T., Mothes, D., Goujon, J. M., Caritez, J. C., Carretier, M. and Eugene, M. (1997a) Evaluation of injury preservation in pig kidney cold storage by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine. *J. Urol.* **157**, 1155-1160.
108. Hauet, T., Mothes, D., Goujon, J. M., Caritez, J. C., Le Moyec, L., Carretier, M. and Eugene, M. (1997b) Evaluation of normothermic ischemia and simple cold preservation injury in pig kidney by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Surg. Res.* **68**, 116-125.
109. Hauet, T., Mothes, D., Bon, D., Baumert, H., Le Moyec, L., Goujon, J. M., Robert, R., Caritez, J. C., Tallineau, C., Carretier, M. and Eugene, M. (1997c) Proton NMR spectroscopy as a novel approach to the monitoring of citrate and trimethylamine-N-oxide excretion after kidney preservation. *Transplant. Proc.* **29**, 2323-2325.
110. Hauet, T., Bauza, G., Mothes, D., Le Moyec, L., Goujon, J. M., Dore, B., Caritez, J. C., Carretier, M., Eugene, M. and Tillement, J. P. (1997d) Beneficial effect on rat kidney preservation of the antiischemic agent trimetazidine during cold storage and reperfusion: assessment by ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Transplant. Proc.* **29**, 2343-2344.
111. Hauet, T., Mothes, D., Goujon, J., Germonville, T., Caritez, J. C., Carretier, M., Eugene, M. and Tillement, J. (1998) Trimetazidine reverses deleterious effects of ischemia-reperfusion in the isolated perfused pig kidney model. *Nephron* **80**, 296-304.
112. Hauet, T., Goujon, J. M., Tallineau, C., Carretier, M. and Eugene, M. (1999) Early evaluation of renal reperfusion injury after prolonged cold storage using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Br. J. Surg.* **86**, 1401-1409.

113. Hauet T., Baumert, H., Amor, I. B., Gibelin, H., Tallineau, C., Eugene, M., Tillement, J. P. and Carretier, M. (2000a) Pharmacological limitation of damage to renal medulla after cold storage and transplantation by trimetazidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **292**, 254-260.
114. Hauet, T., Gibelin, H., Richer, J. P., Godart, C., Eugene, M. and Carretier, M. (2000b) Influence of retrieval conditions on renal medulla injury: evaluation by proton NMR spectroscopy in an isolated perfused pig kidney model. *J. Surg. Res.* **93**, 1-8.
115. Hauet, T., Gibelin, H., Godart, C., Eugene, M. and Carretier, M. (2000c) Kidney retrieval conditions influence damage to renal medulla: evaluation by proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. *Clin. Chem. Lab. Med.* **38**, 1085-1092.
116. Hauet, T., Baumert, H., Gibelin, H., Godart, C., Carretier, M. and Eugene, M. (2000d) Citrate, acetate and renal medullary osmolyte excretion in urine as predictor of renal changes after cold ischaemia and transplantation. *Clin. Chem. Lab. Med.* **38**, 1093-1098.
117. Hauet, T., Baumert, H., Gibelin, H., Hameury, F., Goujon, J. M., Carretier, M. and Eugene, M. (2000e) Noninvasive monitoring of citrate, acetate, lactate, and renal medullary osmolyte excretion in urine as biomarkers of exposure to ischemic reperfusion injury. *Cryobiology* **41**, 280-291.
118. Heaf, J., Løkkegaard, H. and Larsen, S. (1999) The epidemiology and prognosis of glomerulonephritis in Denmark 1985–1997. *Nephrol. Dial. Transplant.* **14**, 1889-1897.
119. Henry, R.J., Sobel, C. and Seglove, M. (1956) Turbidimetric determination of proteins with sulfosalicylic and trichloroacetic acids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **92**, 748-751.
120. Hewer, R., Vorster, J., Steffens, F. E., and Meyer, D. (2006) Applying biofluid ¹H NMR-based metabonomic techniques to distinguish between HIV-1 positive/AIDS patients on antiretroviral treatment and HIV-1 negative individuals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **41**, 1442-1446.
121. Hirama, Y., Shinriki, N., Fujino, T. and Uedaira, H. (1993) ¹H-NMR spectroscopic analysis of human urine: periodic variation of trimethylamine oxide excretion. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.* **25**, 209-218.
122. Hirschberg, R. (1996) Bioactivity of glomerular ultrafiltrate during heavy proteinuria may contribute to renal tubulo-interstitial lesions: evidence for a role for insulin-like growth factor I. *J. Clin. Invest.* **98**, 116-124.
123. Hirschberg, R. and Wang, S. (2005) Proteinuria and growth factors in the development of tubulointerstitial injury and scarring in kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **14**, 43-52.
124. Holmes, E., Bonner, F. W., Gartland, K. P. and Nicholson, J. K. (1990a) Proton NMR monitoring of the onset and recovery of experimental renal damage. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **8**, 959-62.



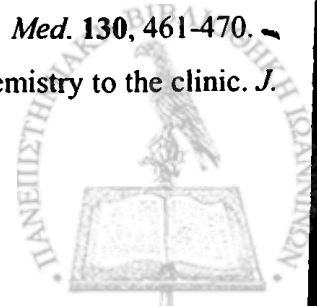
125. Holmes, E., Foxall, P. J. and Nicholson, J. K. (1990b) Proton NMR analysis of plasma from renal failure patients: evaluation of sample preparation and spectral-editing methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **8**, 955-958.
126. Holmes, E., Bonner, F. W., Sweatman, B. C., Lindon, J. C., Beddell, C. R., Rahr, E. and Nicholson, J. K. (1992a) Nuclear magnetic resonance spectroscopy and pattern recognition analysis of the biochemical processes associated with the progression of and recovery from nephrotoxic lesions in the rat induced by mercury(II) chloride and 2-bromoethanamine. *Mol. Pharmacol.* **42**, 922-930.
127. Holmes, E., Nicholson, J. K., Bonner, F. W., Sweatman, B. C., Beddell, C. R., Lindon, J. C. and Rahr, E. (1992b) Mapping the biochemical trajectory of nephrotoxicity by pattern recognition of NMR urinalysis. *NMR Biomed.* **5**, 368-372.
128. Holmes, E., Foxall, P. J., Nicholson, J. K., Neild, G. H., Brown, S. M., Beddell, C. R., Sweatman, B. C., Rahr, E., Lindon, J. C., Spraul, M. and Neidig, P. (1994) Automatic data reduction and pattern recognition methods for analysis of ^1H nuclear magnetic resonance spectra of human urine from normal and pathological states. *Anal. Biochem.* **220**, 284-296.
129. Holmes, E., Bonner, F. W. and Nicholson, J. K. (1995a) Comparative studies on the nephrotoxicity of 2-bromoethanamine hydrobromide in the Fischer 344 rat and the multimammate desert mouse (*Mastomys natalensis*). *Arch. Toxicol.* **70**, 89-95.
130. Holmes, E., Caddick, S., Lindon, J. C., Wilson, I. D., Kryvavych, S. and Nicholson, J. K. (1995b) ^1H and ^2H NMR spectroscopic studies on the metabolism and biochemical effects of 2-bromoethanamine in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **49**, 1349-1359.
131. Holmes, E., Bonner, F. W. and Nicholson, J. K. (1996) Comparative biochemical effects of low doses of mercury II chloride in the F344 rat and the multimammate mouse (*Mastomys natalensis*). *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **114**, 7-15.
132. Holmes, E., Bonner, F. W. and Nicholson, J. K. (1997) ^1H NMR spectroscopic and histopathological studies on propyleneimine-induced renal papillary necrosis in the rat and the multimammate desert mouse (*Mastomys natalensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* **116**, 125-134.
133. Holmes, E., Nicholls, A. W., Lindon, J. C., Ramos, S., Spraul, M., Neidig, P., Connor, S. C., Connelly, J., Damment, S. J., Haselden, J. and Nicholson, J. K. (1998) Development of a model for classification of toxin-induced lesions using ^1H NMR spectroscopy of urine combined with pattern recognition. *NMR Biomed.* **11**, 235-244.
134. Holmes, E., Nicholls, A. W., Lindon, J. C., Connor, S. C., Connelly, J. C., Haselden, J. N., Damment, S. J., Spraul, M., Neidig, P. and Nicholson, J. K. (2000) Chemometric models for toxicity classification based on NMR spectra of biofluids. *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 471-478.

135. Holmes, E., Nicholson, J. K. and Tranter, G. (2001) Metabonomic characterization of genetic variations in toxicological and metabolic responses using probabilistic neural networks. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 182-191.
136. Holmes, E. and Antti, H. (2002) Chemometric contributions to the evolution of metabonomics: mathematical solutions to characterising and interpreting complex biological NMR spectra. *Analyst* **127**, 1549-1557.
137. Holmes, E., Cloarec, O. and Nicholson, J. K. (2006) Probing latent biomarker signatures and in vivo pathway activity in experimental disease states via statistical total correlation spectroscopy (STOCSY) of biofluids: application to HgCl₂ toxicity. *J. Proteome Res.* **5**, 1313-1320.
138. Holmes, E., Loo, R. L., Cloarec, O., Coen, M., Tang, H., Maibaum, E., Bruce, S., Chan, Q., Elliott, P., Stamler, J., Wilson, I. D., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (2007) Detection of urinary drug metabolite (xenometabolome) signatures in molecular epidemiology studies via statistical total correlation (NMR) spectroscopy. *Anal. Chem.* **79**, 2629-2640.
139. Hore, P. J. (1995). *Nuclear magnetic resonance (Oxford Chemistry Primers, 32)*. Oxford University Press, New York, NY, USA.
140. Hotelling, H. (1933) Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J. Educ. Psychol.* **24**, 417-441.
141. Howie, A. J. (2001) *Handbook of Renal Biopsy Pathology*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
142. Hutt, A. J. and Caldwell, J. (1990) Amino acid conjugation. In *Conjugation reactions in drug metabolism: An integrated approach*. Mulder G. J. Eds. Taylor & Francis, London, UK, 273-305.
143. Imbenotte, M., Azaroual, N., Mathieu, D., Cartigny, B., Vermeersch, G. and Lhermitte, M. (1999) Determination by ¹H NMR spectroscopy of paraquat in urine from acutely poisoned patients. Comparison with second-derivative spectroscopy method. *J. Anal. Toxicol.* **23**, 586-590.
144. Imbenotte, M., Azaroual, N., Cartigny, B., Vermeersch, G. and Lhermitte, M. (2003) Detection and quantitation of xenobiotics in biological fluids by ¹H NMR spectroscopy. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **41**, 955-962.
145. Janus, T., Borowiak, K. S., Pabisiak, K., Machoy-Mokrzynska, A., Swiniarski, A. and Rozwadowski, Z. (2005) ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopic investigation of urine for diagnostic and clinical assessment of methanol intoxication. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **97**, 257-260.
146. Jolliffe, I. T. (1986) *Principal Component Analysis*. Springer-Verlag, New York, NY, USA.



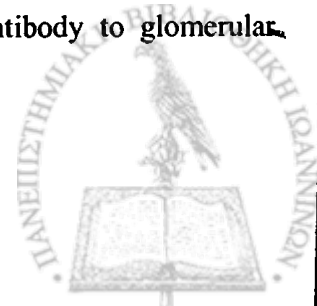
147. Kang, D. H., Kanellis, J., Hugo, C., Truong, L., Anderson, S., Kerjaschki, D., Schreiner, G. F. and Johnson, R. J. (2002) Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 806-816.
148. Kanwar, Y. S. (1984) Biology of disease: Biophysiology of glomerular filtration and proteinuria. *Lab. Invest.* **51**, 7-21.
149. Karhunen, K. (1946) "Über lineare Methoden in der Wahrscheinlichkeitsrechnung". *Ann. Acad. Sci. Fennicae, Series A1: Math. Phys* **37**, 3-79.
150. Kasuya, F., Igarashi, K., Fukui, M. and Nokihara, K. (1996) Purification and characterisation of a medium chain acyl-Coenzyme A synthetase. *Drug Metab. Dispos.* **24**, 879-883.
151. Kemsley, E. K., Le Gall, G., Dainty, J. R., Watson, A. D, Harvey, L. J., Tapp, H. S. and Colquhoun, I. J. (2007) Multivariate techniques and their application in nutrition: a metabolomics case study. *Br. J. Nutr.* **98**, 1-14.
152. Keun, H. C., Ebbels, T. M., Antti, H., Bollard, M. E., Beckonert, O., Schlotterbeck, G., Senn, H., Niederhauser, U., Holmes E., Lindon, J. C. and Nicholson, J. K. (2002) Analytical reproducibility in ¹H NMR-based metabonomic urinalysis. *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 1380-1386.
153. Keun, H. C., Ebbels, T. M., Bollard, M. E., Beckonert, O., Antti, H., Holmes, E., Lindon, J. C. and Nicholson J. K. (2004) Geometric trajectory analysis of metabolic responses to toxicity can define treatment specific profiles. *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 579-587.
154. Keun, H. C. (2006) Metabonomic modeling of drug toxicity. *Pharmacol. Ther.* **109**, 92-106.
155. Kirschenlohr, H. L., Griffin, J. L., Clarke, S. C., Rhydwen, R., Grace, A. A., Schofield, P. M., Brindle, K. M. and Metcalfe, J.C. Proton NMR analysis of plasma is a weak predictor of coronary artery disease. *Nat. Med.* **12**, 705-710.
156. Klag, M. J., Whelton, P. K., Randall, B. L., Neaton, J. D., Brancati, F. L., Ford, C. E., Shulman, N. B. and Stamler, J. (1996) Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N. Engl. J. Med.* **334**, 13-18.
157. Klahr, S., Levey, A. S., Beck, G. J., Caggiula, A. W., Hunsicker, L., Kusek, J. W. and Striker, G. (1994) The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *N. Engl. J. Med.* **330**, 877-884.
158. Knubovets, T. L., Lundina, T. A., Sibeldina, L. A. and Sedov, K. R. (1992) ¹H NMR urinalysis in glomerulonephritis: a new prognostic criterion. *Magn. Reson. Imaging* **10**, 127-134.
159. Kochhar, S., Jacobs, D. M., Ramadan, Z., Berruex, F., Fuerholz, A. and Fay, L. B. (2006) Probing gender-specific metabolism differences in humans by nuclear magnetic resonance-based metabonomics. *Anal. Biochem.* **352**, 274-81.

160. Komoroski, E. M., Komoroski, R. A., Valentine, J. L., Pearce, J. M. and Kearns, G. L. (2000) The use of nuclear magnetic resonance spectroscopy in the detection of drug intoxication. *J. Anal. Toxicol.* **24**, 180-187.
161. Kowalski, B. R., and Bender, C. F. (1972) Pattern Recognition. A powerful approach to interpreting chemical data. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 5632-5639.
162. Kowalski, B. R., and Bender, C. F. (1973) Pattern Recognition. II. Linear and Nonlinear Methods for Displaying Chemical Data *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 686-693.
163. Laing, C. M., Toyne, A. M., Capasso, G. and Unwin, R. J. (2005) Renal tubular acidosis: developments in our understanding of the molecular basis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 1151-1161.
164. Lauridsen, M., Hansen, S. H., Jaroszewski, J. W. and Cornett, C. (2007) Human urine as test material in ¹H NMR-based metabonomics: Recommendations for sample preparation and storage. *Anal. Chem.* **79**, 1181-1186.
165. Le Moyec, L., Pruna, A., Eugene, M., Bedrossian, J., Idatte, J. M., Huneau, J. F. and Tome, D. (1993) Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of urine and plasma in renal transplantation follow-up. *Nephron* **65**, 433-439.
166. Lenz, E. M., Bright, J., Wilson, I. D., Morgan, S. R. and Nash, A. F. P. (2003) A ¹H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **33**, 1103-1115.
167. Lenz, E. M., Bright, J., Knight, R., Wilson, I. D. and Major, H. (2004a) A metabonomic investigation of the biochemical effects of mercuric chloride in the rat using ¹H NMR and HPLC-TOF/MS: time dependent changes in the urinary profile of endogenous metabolites as a result of nephrotoxicity. *Analyst* **129**, 535-541.
168. Lenz, E. M., Bright, J., Wilson, I. D., Hughes, A., Morrisson, J., Lindberg, H. and Lockton A. (2004b) Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a ¹H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **36**, 841-849.
169. Lenz, E. M., Bright, J., Knight, R., Westwood, F. R., Davies, D., Major, H. and Wilson I. D. (2005) Metabonomics with ¹H-NMR spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry applied to the investigation of metabolic changes caused by gentamicin-induced nephrotoxicity in the rat. *Biomarkers* **10**, 173-187.
170. Levey, A. S., Bosch, J. P., Lewis, J. B., Greene, T., Rogers, N. and Roth, D. (1999) A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann. Intern. Med.* **130**, 461-470.
171. Lindon, J. C. (1986) NMR spectroscopy: Analytical applications from chemistry to the clinic. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **4**, 137-145.



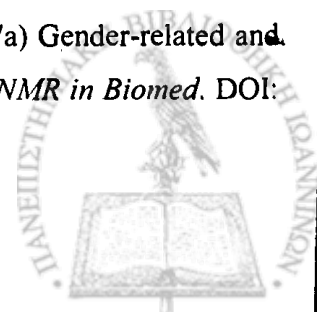
172. Lindon, J. C., Nicholson, J. K. and Everett J. R. (1999) NMR spectroscopy of biofluids. *Ann. Rep. NMR Spectrosc.* **38**, 1-88.
173. Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Holmes, E. and Everett, J. R. (2000) Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. *Concep. Magn. Reson.* **12**, 289-320.
174. Lindon, J. C., Holmes, E. and Nicholson, J. K. (2001) Pattern recognition methods and application in biomedical magnetic resonance. *Prog. Nucl. Magn. Reson.* **39**, 1-40.
175. Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Holmes, E., Antti, H., Bollard, M. E., Keun, H., Beckonert, O., Ebels, T. M., Reily, M. D., Robertson, D., Stevens, G. J., Luke, P., Breau, A. P., Cantor, G. H., Bible, R. H., Niederhauser, U., Senn, H., Schlotterbeck, G., Sidemann, U. G., Laursen, S. M., Tymiak, A., Car, B. D., Lehman-McKeeman, L., Colet, J. M., Loukaci, A. and Thomas, C. (2003) Contemporary issues in toxicology the role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **187**, 137-46.
176. Lindon, J. C., Holmes, E., Bollard M. E., Stanley, E. G. and Nicholson, J. K. (2004) Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis. *Biomarkers* **9**, 1-31.
177. Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Holmes, E., Keun, H. C., Craig, A., Pearce, J. T., Bruce, S. J., Hardy, N., Sansone, S. A., Antti, H., Jonsson, P., Daykin, C., Navarange, M., Beger, R. D., Verheij, E. R., Amberg, A., Baunsgaard, D., Cantor, G. H., Lehman-McKeeman, L., Earll, M., Wold, S., Johansson, E., Haselden, J. N., Kramer, K., Thomas, C., Lindberg, J., Schuppe-Koistinen, I., Wilson, I. D., Reily, M. D., Robertson, D. G., Senn, H., Krotzky, A., Kochhar, S., Powell, J., van der Ouderaa, F., Plumb, R., Schaefer, H. and Spraul, M. Standard Metabolic Reporting Structures working group (2005) Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses. *Nat. Biotechnol.* **23**, 833-838.
178. Lindon, J. C., Holmes, E. and Nicholson, J. K. (2006) Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. *Pharm. Res.* **23**, 1075-1088.
179. Lindon, J. C., Holmes, E. and Nicholson, J. K. (2007) Metabonomics in pharmaceutical R&D. *FEBS J.* **274**, 1140-1151.
180. Loeve, M. (1963) *Probability Theory*, 3rd ed. Van Nostrand, New York, NY, USA.
181. Lukaski, H. C. (1996) Estimation of muscle mass. In Roche AF, Heymsfield SB, Lohman TG (Eds): *Human body composition*. Champaign, IL: Human Kinetics, p. 109-128.
182. Lundina, T. A., Knubovets, T. L., Sedov, K. R., Markova, S. A. and Sibelin, L. A. (1993) Variability of kidney tubular interstitial distortions in glomerulonephritis as measured by ¹H-NMR urinalysis. *Clin. Chim. Acta* **214**, 165-173.
183. Mackensen-Haen, S., Bader, R., Grund, K. E. and Bohle, A. (1981) Correlations between renal cortical interstitial fibrosis, atrophy of the proximal tubules and impairment of the glomerular filtration rate. *Clin. Nephrol.* **15**, 167-171.

184. Madsen K. M. and Park, C. H. (1987) Lysosome distribution and cathepsin B and L activity along the rabbit proximal tubule. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **253**, F1290-1301.
185. Magil, A. B. (1995) Tubulointerstitial lesions in human membranous glomerulonephritis: relationship to proteinuria. *Am. J. Kidney Dis.* **25**, 375-379.
186. Maher, A. D., Zirah, S. F., Holmes, E. and Nicholson, J. K. (2007) Experimental and analytical variation in human urine in ¹H NMR spectroscopy-based metabolic phenotyping studies. *Anal. Chem.* **79**, 5204-5211.
187. Makinen, V. P., Soininen, P., Forsblom, C., Parkkonen, M., Ingman, P., Kaski, K., Groop, P. H. and Ala-Korpela, M. for the FinnDiane Study Group. (2006) Diagnosing diabetic nephropathy by ¹H NMR metabonomics of serum. *MAGMA* **19**, 281-296.
188. Mally, A., Volkel, W., Amberg, A., Kurz, M., Wanek, P., Eder, E., Hard, G. and Dekant, W. (2005) Functional, biochemical, and pathological effects of repeated oral administration of ochratoxin A to rats. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 1242-1252.
189. Mathieson, P. W. (2003) Treatment of glomerulonephritis. In *Horizons in medicine*, Weber, J. ed, Vol 15, London: Royal College of Physicians, p. 13-21.
190. Mathieson, P. W. (2005) Glomerulonephritis: is it worth worrying about? *Clin. Med.* **5**, 264-266.
191. Matsuo, S., Morita, Y., Mizuno, M., Nishikawa, K. and Yuzawa, Y. (1998) Proteinuria and damage to tubular cells – Is complement a culprit? *Nephrol. Dial. Transplant.* **13**, 2723-2726.
192. Messana, I., Forni, F., Ferrari, F., Rossi, C., Giardina, B. and Zuppi, C. (1998) Proton nuclear magnetic resonance spectral profiles of urine in type II diabetic patients. *Clin. Chem.* **44**, 1529-1534.
193. Mitwalli, A. H., Al Wakeel, J. S., Al Mohaya, S. S., Malik, H. G., Abu-Aisha, H., Hassan, O. S., Akhtar, M. (1996) Pattern of glomerular disease in Saudi Arabia. *Am. J. Kidney Dis.* **27**, 797-802.
194. Miyataka, H., Ozaki, T. and Himeno, S. (2007) Effect of pH on ¹H-NMR spectroscopy of mouse urine. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 667-670.
195. Mulder, T. P., Rietveld, A. G. and van Amelsvoort, J. M. (2005) Consumption of both black tea and green tea results in an increase in the excretion of hippuric acid into urine. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 256S-260S.
196. Murgatroyd, L. B., Pickford, R. J., Smith, I. K., Wilson, I. D. and Middleton, B. J. (1992) ¹H-NMR spectroscopy as a means of monitoring nephrotoxicity as exemplified by studies with cephaloridine. *Hum. Exp. Toxicol.* **11**, 35-41.
197. Nangaku, M., Alpers, C. E., Pippin, J., Shankland, S. J., Kurokawa, K., Adler, S., Johnson, R. J. and Couser, W. G. (1997) Renal microvascular injury induced by antibody to glomerular endothelial cells is mediated by C5b-9. *Kidney Int.* **52**, 1570-1578.



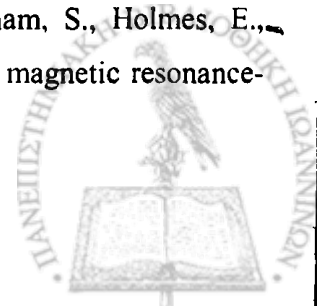
198. Nangaku, M., Pippin, J. and Couser, W. G. (1999) Complement membrane attack complex (C5b-9) mediates interstitial disease in experimental nephritic syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 2323-2331.
199. Nangaku, M. (2002) Final common pathways of progression of renal diseases. *Clin. Exp. Nephrol.* **6**, 182-189.
200. Nangaku, M. (2004) Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure. *Intern. Med.* **43**, 9-17.
201. Nath, K. A. (1992) Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am. J. Kidney Dis.* **20**, 1-17.
202. National Kidney Foundation (2002) K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am. J. Kidney Dis.* **39**, S1-S266.
203. Neild, G. H., Foxall, P. J., Lindon, J. C., Holmes, E. C and Nicholson, J. K. (1997) Uroscopy in the 21st century: high-field NMR spectroscopy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **12**, 404-417.
204. Nicholson, J. K., O'Flynn, M. P., Sadler, P. J., Macleod, A. F., Juul, S. M. and Sonksen, P. H. (1984) Proton-nuclear-magnetic-resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. *Biochem. J.* **15**, 365-375.
205. Nicholson, J. K., Timbrell, J. A. and Sadler, P. J. (1985) Proton NMR spectra of urine as indicators of renal damage. Mercury-induced nephrotoxicity in rats. *Mol. Pharmacol.* **27**, 644-651.
206. Nicholson, J. K. and Wilson, I. D. (1989) High resolution proton magnetic resonance spectroscopy of biological fluids. *Prog. NMR Spectrosc.* **21**, 449-501.
207. Nicholson, J. K., Higham, D. P., Timbrell, J. A. and Sadler, P. J. (1989) Quantitative high resolution ¹H NMR urinalysis studies on the biochemical effects of cadmium in the rat. *Mol. Pharmacol.* **36**, 398-404.
208. Nicholson, J. K., Foxall, P. J., Spraul, M., Farrant, R. D. and Lindon, J. C. (1995) 750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma. *Anal. Chem.* **67**, 793-811.
209. Nicholson, J. K., Lindon, J. C. and Holmes, E. (1999) 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica* **29**, 1181-1189.
210. Nicholson, J. K., Connelly, J., Lindon, J. C. and Holmes, E. (2002) Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **1**, 153-161.
211. Norman, J. T., Orphanides, C., Garcia, P. and Fine, L. G. (1999) Hypoxia-induced changes in extracellular matrix metabolism in renal cells. *Exp. Nephrol.* **7**, 463-469.
212. Odunsi, K., Wollman, R. M., Ambrosone, C. B., Hutson, A., McCann, S. E., Tammela, J., Geisler, J. P., Miller, G., Sellers, T., Cliby, W., Qian, F., Keitz, B., Intengan, M., Lele, S. and

- Alderfer, J. L. (2005) Detection of epithelial ovarian cancer using ¹H-NMR-based metabonomics. *Int. J. Cancer* **113**, 782-788.
213. Ogbron, M. R., Sareen, S., Prychitko, J., Buist, R. and Peeling, J. (1997) Altered organic anion and osmolyte content and excretion in rat polycystic kidney disease: an NMR study. *Am. J. Physiol.* **272**, F63-69.
214. Ogborn, M. R., Bankovic-Calic, N., Shoesmith, C., Buist, R. and Peeling, J. (1998a) Soy protein modification of rat polycystic kidney disease. *Am. J. Physiol.* **274**, F541-549.
215. Ogborn, M. R., Nitschmann, E., Bankovic-Calic, N., Buist, R. and Peeling, J. (1998b) The effect of dietary flaxseed supplementation on organic anion and osmolyte content and excretion in rat polycystic kidney disease. *Biochem. Cell Biol.* **76**, 553-559.
216. Oldiges, M., Lutz, S., Pflug, S., Schroer, K., Stein, N. and Wiendahl, C. (2007) Metabolomics: current state and evolving methodologies and tools. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 495-511.
217. Oliver, S. G., Winson, M. K., Kell, D. B. and Baganz, F. (1998) Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.* **16**, 373-378.
218. Oliver, S. (2000) Guilt-by-association goes global. *Nature* **403**, 601-603.
219. Ong, A. C. and Fine, L. G. (1994) Loss of glomerular function and tubulointerstitial fibrosis: Cause or effect? *Kidney Int.* **45**, 345-351.
220. Pearson, K. (1901) On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Phil. Mag.* **2**, 559-572.
221. Peterson, J. C., Adler, S., Burkart, J. M., Greene, T., Hebert, L. A., Hunsicker, L. G., King, A. J., Klahr, S., Massry, S. G. and Seifter, J. L. (1995) Blood pressure control, proteinuria, and the progression of renal disease. The Modification of Diet in Renal Disease Study. *Ann. Intern. Med.* **123**, 754-762.
222. Phipps, A. N., Stewart, J., Wright, B. and Wilson, I. D. (1998) Effect of diet on the urinary excretion of hippuric acid and other dietary-derived aromatics in rat. A complex interaction between diet, gut microflora and substrate specificity. *Xenobiotica* **28**, 527-537.
223. Polenakovic, M. H., Grcevska, L. and Dzikova, S. (2003) The incidence of biopsy-proven primary glomerulonephritis in the Republic of Macedonia—long-term follow-up. *Nephrol. Dial. Transplant.* **18**, v26-v27.
224. Potts, B. C., Deese, A. J., Stevens, G. J., Reily, M. D., Robertson, D. G. and Theiss, J. (2001) NMR of biofluids and pattern recognition: assessing the impact of NMR parameters on the principal component analysis of urine from rat and mouse. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **26**, 463-476.
225. Psihogios, N., Gazi, I., Elisaf, M., Seferiadis, K. and Bairaktari, E. (2007a) Gender-related and age-related urinalysis of healthy subjects by NMR-based metabonomics. *NMR in Biomed.* DOI: 10.1002/nbm.1176, **in press**.

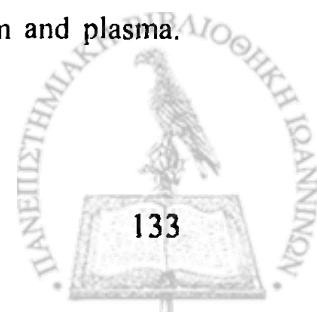


226. Psihogios, N., Kalaitzidis, R., Dimou, S., Seferiadis, K., Siamopoulos, K. C. and Bairaktari, E. (2007b) Evaluation of tubulointerstitial lesions severity in patients with glomerulonephritides. An NMR-based metabonomic study. *J. Proteome Res.* **6**, 3760-3770.
227. Purcell, E. M., Torrey, H. C. and Pound R. V. (1946) Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys. Rev.* **69**, 37-38.
228. Rabi, I. I., Zacharias, J. R., Millman, S. and Kusch, P. (1938) A new method of measuring nuclear magnetic moment. *Phys. Rev.* **53**, 318.
229. Rehman, H. U. (1999) Fish odor syndrome. *Postgrad. Med. J.* **75**, 451-452.
230. Remuzzi, G., Ruggenenti, P. and Perico, N. (2002) Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition. *Ann. Intern. Med.* **136**, 604-615.
231. Reo, N. V. (2002) NMR-based metabolomics. *Drug Chem. Toxicol.* **25**, 375-382.
232. Rezzi, S., Ramadan, Z., Martin, F. P., Fay, L. B., Bladeren, P. V., Lindon, J. C., Nicholson, J. K. and Kochhar, S. (2007) Human Metabolic Phenotypes Link Directly to Specific Dietary Preferences in Healthy Individuals. *J. Proteome Res.* **6**, 4469-4477.
233. Ricos, C., Jimenez, C. V., Hernandez, A., Simon, M., Perich, C., Alvarez, V., Minchinela, J. and Macia, M. (1994) Biological variation in urine samples used for analyte measurements. *Clin. Chem.* **40**, 472-47
234. Robertson, D. G., Reily, M. D., Sigler, R. E., Wells, D. F., Paterson, D. A. and Braden, T. K. (2000) Metabonomics: evaluation of nuclear magnetic resonance (NMR) and pattern recognition technology for rapid in vivo screening of liver and kidney toxicants. *Toxicol. Sci.* **57**, 326-337.
235. Roch-Ramel, F., Besseghir, K. and Murer, H. (1992) Renal excretion and tubular transport of organic anions and cations. In *Handbook of Renal Physiology*; Windhager, E. E., Ed.; Oxford University Press: New York, NY, USA, p. 2189-2262.
236. Rose, B. D. and Black, R. M. (1988) *Manual of Clinical Problems in Nephrology*; Little, Brown: Boston, MA, USA, p. 130.
237. Rose B. D. and Post T., W. (2001) *Clinical Physiology of Acid-Base and Electrolyte Disorders*. 5th Edition. McGraw-Hill Inc, USA.
238. Roussel, R., Mentre, F., Bouchemal, N., Hadjadj, S., Lievre, M., Chatellier, G., Menard, J., Panhard, X., Le Henanff, A., Marre, M. and Le Moyec, L. for the DIABHYCAR Study Group. (2007) NMR-based prediction of cardiovascular risk in diabetes. *Nat. Med.* **13**, 399-400.
239. Ruggenenti, P., Perna, A., Mosconi, L., Matalone, M., Pisoni, R., Gaspari, F. and Remuzzi, G. (1997) Proteinuria predicts end-stage renal failure in non-diabetic chronic nephropathies. The "Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia" (GISEN). *Kidney Int.* **63**, S54-S57.
240. Ruggenenti, P. and Remuzzi, G. (2000) The role of protein traffic in the progression of renal diseases. *Annu. Rev. Med.* **51**, 315-327.

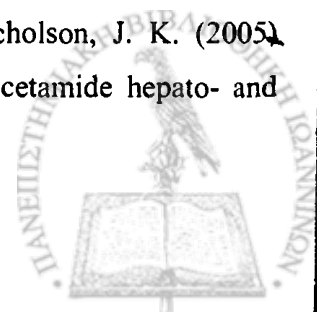
241. Rush, D., Somorjai, R., Deslauriers, R., Shaw, A., Jeffery, J. and Nickerson P. (2000) Subclinical rejection-a potential surrogate marker for chronic rejection-may be diagnosed by protocol biopsy or urine spectroscopy. *Ann. Transplant.* **5**, 44-49.
242. Salek, R. M., Maguire, M. L., Bentley, E., Rubtsov, D. V., Hough, T., Cheeseman, M., Nunez, D., Sweatman, B. C., Haselden, J. N., Cox, R. D., Connor, S. C. and Griffin, J. L. (2007) A metabolomic comparison of urinary changes in type 2 diabetes in mouse, rat, and human. *Physiol. Genomics* **29**, 99-108.
243. Schoonen, W. G., Kloks, C. P., Ploemen, J. P., Horbach, G. J., Smit, M. J., Zandberg, P., Mellema, J. R., Zuylen, C. T., Tas, A. C, van Nesselrooij, J. H. and Vogels, J. T. (2007) Sensitivity of (1)H NMR analysis of rat urine in relation to toxicometabonomics. Part I: dose-dependent toxic effects of bromobenzene and paracetamol. *Toxicol. Sci.* **98**, 271-285.
244. Schreiner, G. F. (1995) Renal toxicity of albumin and other lipoproteins. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **4**, 369-373.
245. Shao, J., Miyata, T., Yamada, K., Hanafusa, N., Wada, T., Gordon, K. L., Inagi, R., Kurokawa, K., Fujita, T., Johnson, R. J. and Nangaku, M. (2001) Protective role of nitric oxide in a model of thrombotic microangiopathy in rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 2088-2097.
246. Shockcor, J. P., Unger, S. E., Wilson, I. D., Foxall, P. J., Nicholson, J. K. and Lindon, J. C. (1996) Combined HPLC, NMR spectroscopy, and ion-trap mass spectrometry with application to the detection and characterization of xenobiotic and endogenous metabolites in human urine. *Anal. Chem.* **68**, 4431-4435.
247. Shockcor, J. P. and Holmes, E. (2002) Metabonomic applications in toxicity screening and disease diagnosis. *Curr. Top. Med. Chem.* **2**, 35-51.
248. Simpson, D. P. and Angielski, S. (1973) Regulation by bicarbonate ion of intramitochondrial citrate concentration in kidney mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 115-123.
249. Slupsky, C. M., Rankin, K. N., Wagner, J., Fu, H., Chang, D., Weljie, A. M., Saude, E. J., Lix, B., Adamko, D. J., Shah, S., Greiner, R., Sykes, B. D. and Marrie, T. J. (2007) Investigations of the effects of gender, diurnal variation, and age in human urinary metabolomic profiles. *Anal. Chem.* **79**, 6995-7004.
250. Smith, I. C. and Baert, R. (2003) Medical diagnosis by high resolution NMR of human specimens. *IUBMB Life.* **55**, 273-277.
251. Solanky, K. S., Bailey, N. J., Holmes, E., Lindon, J. C., Davis, A. L., Mulder, T. P., Van Duynhoven, J. P. and Nicholson, J. K. (2003a) NMR-based metabonomic studies on the biochemical effects of epicatechin in the rat. *J. Agric. Food. Chem.* **51**, 4139-4145.
252. Solanky, K. S., Bailey, N. J., Beckwith-Hall, B. M., Davis, A., Bingham, S., Holmes, E., Nicholson, J. K., Cassidy, A. (2003b) Application of biofluid ¹H nuclear magnetic resonance-



- based metabonomic techniques for the analysis of the biochemical effects of dietary isoflavones on human plasma profile. *Anal. Biochem.* **323**, 197-204.
253. Solanky, K. S., Bailey, N. J., Beckwith-Hall, B. M., Bingham, S., Davis, A., Holmes, E., Nicholson, J. K. and Cassidy, A. (2005) Biofluid ¹H NMR-based metabonomic techniques in nutrition research - metabolic effects of dietary isoflavones in humans. *J. Nutr. Biochem.* **16**, 236-244.
254. Spraul, M., Neidig, P., Klauck, U., Kessler, P., Holmes, E., Nicholson, J. K., Sweatman, B. C., Safman, S. R., Farrant, R. D., Rahr, E., Beddell, C. R. and Lindon, J. C. (1994) Automatic reduction of NMR spectroscopic data for statistical and pattern recognition classification of samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **12**, 1215-1225.
255. Stamler, J., Elliott, P., Dennis, B., Dyer, A. R., Kesteloot, H., Liu, K., Ueshima, H. and Zhou, B. F.; INTERMAP Research Group. (2003) INTERMAP: background, aims, design, methods, and descriptive statistics (nondietary). *J. Hum. Hypertens.* **17**, 591-608.
256. Stella, C., Beckwith-Hall, B., Cloarec, O., Holmes, E., Lindon, J. C., Powell, J., van der Ouderaa, F., Bingham, S., Cross, A. J. and Nicholson, J. K. (2006) Susceptibility of human metabolic phenotypes to dietary modulation. *J. Proteome Res.* **5**, 2780-2788.
257. Sustek, J. (1974) Method for the Choice of Optimal Analytical Positions in Spectrophotometric Analysis of Multicomponent Systems. *Anal. Chem.* **46**, 1676-1679.
258. Svensson, B. G., Akesson, B., Nilsson, A. and Paulsson, K. (1994) Urinary excretion of methylamines in men with varying intake of fish from the Baltic Sea. *J. Toxicol. Environ. Health* **41**, 411-420.
259. 't Hart, B. A., Vogels, J. T., Spijksma, G., Brok, H. P., Polman, C. and van der Greef, J. (2003) ¹H-NMR spectroscopy combined with pattern recognition analysis reveals characteristic chemical patterns in urines of MS patients and non-human primates with MS-like disease. *J. Neurol. Sci.* **212**, 21-30.
260. Tang, S., Lai, K. N., Chan, T. M., Lan, H. Y., Ho, S. K. and Sacks, S. H. (2001) Transferrin but not albumin mediates stimulation of complement C3 biosynthesis in human proximal tubular epithelial cells. *Am. J. Kidney Dis.* **37**, 94-103.
261. Teague, C., Holmes, E., Maibaum, E., Nicholson, J., Tang, H., Chan, Q., Elliott, P., Stamler, J., Ueshima, H., Zhou, B. and Wilson, I. (2004) Ethyl glucoside in human urine following dietary exposure: detection by ¹H NMR spectroscopy as a result of metabonomic screening of humans. *Analyst* **129**, 259-264.
262. Teahan, O., Gamble, S., Holmes, E., Waxman, J., Nicholson, J. K., Bevan, C. and Keun, H. C. (2006) Impact of analytical bias in metabonomic studies of human blood serum and plasma. *Anal. Chem.* **78**, 4307-4318.



263. Trygg, J., Holmes, E. and Lundstedt T. (2007) Chemometrics in Metabonomics. *J. Proteome Res.* **6**, 469-479.
264. Tsimihodimos, V., Psychogios, N., Kakaidi, V., Bairaktari, E. and Elisaf M. (2007) Salicylate-induced proximal tubular dysfunction. *Am. J. Kidney. Dis.* **50**, 463-467.
265. Tweeddale, H., Notley-McRobb, L. and Ferenci, T. (1998) Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("metabolome") analysis. *J. Bacteriol.* **180**, 5109-5116.
266. Valongo, C., Cardoso, M. L., Domingues, P., Almeida, L., Verhoeven, N., Salomons, G., Jakobs, C. and Vilarinho L. (2004) Age related reference values for urine creatine and guanidinoacetic acid concentration in children and adolescents by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* **348**, 155-161.
267. Van, Q. N., Klose, J. R., Lucas, D. A., Prieto, D. A., Luke, B., Collins, J., Burt, S. K., Chmurny, G. N., Issaq, H. J., Conrads, T. P., Veenstra, T. D. and Keay, S. K. (2003 - 2004) The use of urine proteomic and metabonomic patterns for the diagnosis of interstitial cystitis and bacterial cystitis. *Dis. Markers* **19**, 169-183.
268. Van Dorsten, F. A., Daykin, C. A., Mulder, T. P. and Van Duynhoven, J. P. (2006) Metabonomics approach to determine metabolic differences between green tea and black tea consumption. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 6929-6938.
269. Videen, J. S. and Ross, B. D. (1994) Proton nuclear magnetic resonance urinalysis: coming of age. *Kidney Int. Suppl.* **47**, S122-S128.
270. Wahl, A., Azaroual, N., Imbenotte, M., Mathieu, D., Forzy, G., Cartigny, B., Vermeersch, G. and Lhermitte, M. (1998) Poisoning with methanol and ethylene glycol: ¹H NMR spectroscopy as an effective clinical tool for diagnosis and quantification. *Toxicology* **128**, 73-81.
271. Walls, J. (2001) Relationship between proteinuria and progressive renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* **37**, S13-S16.
272. Walsh, M. C., Brennan, L., Malthouse, J. P., Roche, H. M. and Gibney, M. J. (2006) Effect of acute dietary standardization on the urinary, plasma, and salivary metabolomic profiles of healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **84**, 531-539.
273. Wang, S., LaPage, J. and Hirschberg, R. (2000) Role of glomerular ultrafiltration of growth factors in progressive interstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* **57**, 1002-1014.
274. Wang, Y., Tang, H., Nicholson, J. K., Hylands, P. J., Sampson, J. and Holmes, E. (2005) A metabonomic strategy for the detection of the metabolic effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) ingestion. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 191-196.
275. Waters, N. J., Waterfield, C. J., Farrant, R. D., Holmes, E. and Nicholson, J. K. (2005) Metabonomic deconvolution of embedded toxicity: application to thioacetamide hepato- and nephrotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 639-654.



276. Webb-Robertson, B. J., Lowry, D. F., Jarman, K. H., Harbo, S. J., Meng, Q. R., Fuciarelli, A. F., Pounds, J. G. and Lee, K. M. (2005) A study of spectral integration and normalization in NMR-based metabonomic analyses. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**, 830-836.
277. Weljie, A. M., Newton, J., Mercier, P., Carlson, E. and Slupsky, C. M. (2006) Targeted profiling: quantitative analysis of ¹H NMR metabolomics data. *Anal. Chem.* **78**, 4430-4442.
278. Widstam-Attorps, U., Berg, U., Boham, S. O. and Lefvert, A. K. (1992) Proteinuria and renal function in relation to renal morphology. A clinicopathological study of IgA nephropathy at the time of kidney biopsy. *Clin. Nephrol.* **38**, 245-253.
279. Williams, R. E., Eyton-Jones, H. W., Farnworth, M. J., Gallagher, R. and Provan, W. M. (2002) Effect of intestinal microflora on the urinary metabolic profile of rats: a (1)H-nuclear magnetic resonance spectroscopy study. *Xenobiotica* **32**, 783-794.
280. Williams, R. E., Jacobsen, M. and Lock, E. A. (2003a) ¹H NMR pattern recognition and ³¹P NMR studies with d-Serine in rat urine and kidney, time- and dose-related metabolic effects. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 1207-1216.
281. Williams, R. E., Cottrell, L., Jacobsen, M., Bandara, L. R., Kelly, M. D., Kennedy, S. and Lock, E. A. (2003b) ¹H-Nuclear magnetic resonance pattern recognition studies with N-phenylanthranilic acid in the rat: time- and dose-related metabolic effects. *Biomarkers* **8**, 472-490.
282. Williams, R. E. and Lock, E. A. (2004) D-serine-induced nephrotoxicity: possible interaction with tyrosine metabolism. *Toxicology* **201**, 231-238.
283. Williams, R. E. and Lock, E. A. (2005) Sodium benzoate attenuates D-serine induced nephrotoxicity in the rat. *Toxicology* **207**, 35-48.
284. Wishart, D. S. (2005) Metabolomics: the principles and potential applications to transplantation. *Am. J. Transplant.* **5**, 2814-2820.
285. Wishart, D. S. (2006) Metabolomics in monitoring kidney transplants. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **15**, 637-642.
286. Wishart, D. S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A. C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S., Fung, C., Nikolai, L., Lewis, M., Coutouly, M. A., Forsythe, I., Tang, P., Shrivastava, S., Jeroncic, K., Stothard, P., Amegbey, G., Block, D., Hau, D. D., Wagner, J., Miniaci, J., Clements, M., Gebremedhin, M., Guo, N., Zhang, Y., Duggan, G. E., Macinnis, G. D., Weljie, A. M., Dowlatabadi, R., Bamforth, F., Clive, D., Greiner, R., Li, L., Marrie, T., Sykes, B. D., Vogel, H. J. and Querengesser, L. (2007) HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* **35**, (Database issue), D521-D526.
287. Wishart, D (2007) Metabolomics in Humans and Other Mammals in *Metabolome Analysis: An Introduction*. Villas-Bôas, S. G., Roessner, U., Hansen, M. A. E., Smedsgaard, J, and Nielsen, J. Eds; John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA.

288. Wold, S., Albano, C., Dunn, W. J., Edlund, U., Esbensen, K., Geladi, P., Hellberg, S., Johansson, E., Lindberg, W. and Sjöström, M. (1984) *Multivariate Data Analysis in Chemistry*, In: Kowalski, B. R. (ed.) *Chemometrics: Mathematics and Statistics in Chemistry*. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland.
289. Wold, S., Esbensen, K. and Geladi, P. (1987) "Principal component analysis." *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **2**, 37-52.
290. Wold, S., Antti, H., Lindgren, F. and Öhman J. (1998) Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **44**, 175-185.
291. Wu, W., Massart, D. L., de Jong, S. (1997) The kernel PCA algorithms for wide data. Part I: theory and Algorithms. *Chemom. Intell. Lab. Sys.* **36**, 165-172.
292. Wu, H., Zhang, X., Liao, P., Li, Z., Li, W., Li, X., Wu, Y. and Pei, F. (2005) NMR spectroscopic-based metabonomic investigation on the acute biochemical effects induced by Ce(NO₃)₃ in rats. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 2151-2160.
293. Wyss, M. and Kaddurah-Daouk, R. (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. Rev.* **80**, 1107-1213.
294. Yancey, P. H., Clark, M. E, Hand, S. C., Bowlus, R. D. and Somero, G. N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.
295. Zhang, A. Q., Mitchell, S. C. and Smith, R. L. (1996) Exacerbation of symptoms of fish-odour syndrome during menstruation. *Lancet* **348**, 1740-1741.
296. Zhang, X., Wu, H., Liao, P., Li, X., Ni, J. and Pei, F. (2006) NMR-based metabonomic study on the subacute toxicity of aristolochic acid in rats. *Food Chem. Toxicol.* **44**, 1006-1014.
297. Zoja, C., Donadelli, R., Colleoni, S, Figliuzzi, M., Bonazzola, S., Morigi, M. and Remuzzi, G. (1998) Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kappa B activation. *Kidney Int.* **53**, 1608-1615
298. Zoja, C., Morigi, M., and Remuzzi, G. (2003) Proteinuria and phenotypic change of proximal tubular cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, S36-S41.
299. Zuppi, C., Messana, I., Forni, F., Rossi, C., Pennacchiotti, L., Ferrari, F. and Giardina, B. (1997) ¹H-NMR spectra of normal urines: reference ranges of the major metabolites. *Clin. Chim. Acta* **265**, 85-97.
300. Zuppi, C., Messana, I., Forni, F., Ferrari, F., Rossi, C. and Giardina, B. (1998) Influence of feeding on metabolite excretion evidenced by urine ¹H NMR spectral profiles: a comparison between subjects living in Rome and subjects living at arctic latitudes (Svaldbard). *Clin. Chim. Acta* **278**, 75-79.
301. Zuppi, C., Messana, I., Tapanainen, P., Knip, M., Vincenzoni, F., Giardina, B. and Nuutinen, M. (2002) Proton nuclear magnetic resonance spectral profiles of urine from children and adolescents with type 1 diabetes. *Clin. Chem.* **48**, 660-662.

