

**Γεφυρώνοντας μεγάλα ομικά, γενετικά και ιατρικά δεδομένα για
την ευρεία εφαρμογή της Ιατρικής Ακριβείας στην Ελλάδα**

ΠΑΡΑΔΟΤΕΟ Π2.2

**«Μεταβολομική ανάλυση ασθενών με σπάνια νοσήματα-
παρουσίαση σε συνέδριο»**

Φορέας	Πανεπιστήμιο Πατρών
Τύπος Παραδοτέου	Παρουσίαση σε συνέδριο
Τίτλος Παραδοτέου	Μεταβολομική ανάλυση ασθενών με σπάνια νοσήματα-παρουσίαση σε συνέδριο
Ενότητα Εργασίας	ΕΕ2: Σπάνια νοσήματα: Ανάλυση δεδομένων αλληλούχισης εξονίων (WES) για την εύρεση του γενετικού υποβάθρου σπανίων νοσημάτων

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή.....	3
2	Στόχος Μελέτης.....	4
3	Μεθοδολογία.....	4
4	Αποτελέσματα.....	6
5	Μελλοντικά βήματα.....	9
6	Παρουσίαση σε συνέδριο.....	10

1 Εισαγωγή

Ο τομέας της μεταβολομικής συνιστά τον νεότερο και συνεχώς αναδυόμενο κλάδο των -omic επιστημών, ο οποίος έχει ήδη αναδειχθεί σε σημαντικό εργαλείο διερεύνησης ογκολογικών καταστάσεων, διαβητικών και καρδιαγγειακών παθήσεων καθώς και αυτοάνοσων νοσημάτων. Επίκεντρο αυτού του επιστημονικού πεδίου τίθεται η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση μεταβολιτών ενδιαφέροντος, οι οποίοι μπορεί να είναι υποστρώματα, ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα ενός βιοχημικού μονοπατιού. Ως μεταβολίτες ορίζονται οι χημικές ενώσεις μικρού μοριακού βάρους (<1000 Da), οι οποίες προκύπτουν ως παράγωγα βιοχημικών αντιδράσεων στο εσωτερικό των οργανισμών και περιλαμβάνουν τόσο οργανικές ουσίες, όσο και ανόργανα μόρια ή χημικά στοιχεία. Το γονιδίωμα, η ηλικία, ο τρόπος ζωής, οι διατροφικές συνήθειες, το περιβάλλον, η ύπαρξη ή όχι παθογενειών και η φαρμακευτική αγωγή διαταράσσουν την ομοιόσταση ενός οργανισμού και επηρεάζουν τα μεταβολικά μονοπάτια, με αποτέλεσμα η μελέτη των μεταβολιτών να επιτρέπει την άμεση συσχέτισή τους με τη φαινοτυπική εικόνα. Σημαντικό πλεονέκτημα του τομέα της μεταβολομικής έναντι τόσο αυτών της γονιδιωματικής όσο και της πρωτεομικής είναι η ταχύτητα με την οποία οι μεταβολικές αποκρίσεις ενός οργανισμού ανταποκρίνονται στις αλλαγές του περιβάλλοντος, εν αντιθέσει με το mRNA και τις πρωτεΐνες, αντανακλώντας πληρέστερα το φαινότυπό του.

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και η Φασματομετρία Μάζας (MS) συνιστούν τις δύο κυριότερα αξιοποιήσιμες ενόργανες τεχνικές ανάλυσης για την διεξαγωγή μεταβολομικών μελετών. Η καθεμία χαρακτηρίζεται από διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, γεγονός που τις καθιστά συμπληρωματικές, ιδιαίτερος κατά την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων. Η φασματοσκοπία NMR εκμεταλλεύομενη την φυσική αφθονία των ισοτόπων των στοιχείων ^1H , ^{15}N , ^{13}C και ^{31}P σε οποιοδήποτε βιολογικό δείγμα προσφέρει τη δυνατότητα δημιουργίας μονοδιάστατων, αλλά και κλασικών ή μη ομο- και ετεροπυρηνικών δισδιάστατων φασμάτων NMR. Μέσω αυτής πραγματοποιούνται αναλύσεις υψηλής ευαισθησίας και επαναληψιμότητας, σε σύντομο χρονικό διάστημα, ανιχνεύεται πληθώρα μεταβολιτών με την ελάχιστη δυνατή και μη καταστρεπτική παρέμβαση στο δείγμα και ήδη από το πρώτο φάσμα πρωτονίου (1D ^1H -NMR φάσμα) είναι εφικτή η ταυτοποίηση του μεγαλύτερου μέρους των μεταβολιτών και η εύρεση του μεταβολικού αποτυπώματος (metabolic fingerprint).

2 Στόχος Μελέτης

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης εστιάζουν στην ολοκληρωμένη αξιοποίηση των μεταβολομικών δεδομένων ως βασικού πυλώνα της Ιατρικής Ακρίβειας. Συγκεκριμένα, επιδιώκεται η συστηματική ανάλυση και ενοποίηση των μεταβολικών προφίλ με γενετικά, πρωτεωμικά, κλινικά και επιδημιολογικά δεδομένα με σκοπό την αποκάλυψη βιολογικών μηχανισμών που σχετίζονται με την αιτιολογία και την εξέλιξη χρόνιων και πολυπαρογοντικών νοσημάτων. Η μεταβολομική προσέγγιση μπορεί να συμβάλει στον εντοπισμό βιοδεικτών πρώιμης διάγνωσης, πρόγνωσης και ανταπόκρισης στη θεραπεία, ιδίως για τα καρδιαγγειακά νοσήματα, τον σποραδικό καρκίνο μαστού/ωοθηκών και τον καρκίνο παχέως εντέρου. Παράλληλα, τα μεταβολομικά δεδομένα θα αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη και εκπαίδευση μοντέλων πρόβλεψης κινδύνου, τα οποία θα ενσωματωθούν στον Έξυπνο Ηλεκτρονικό Φάκελο Υγείας, ενισχύοντας τα υποσυστήματα υποστήριξης κλινικής απόφασης. Μέσω αυτής της ενοποιημένης προσέγγισης, η μεταβολομική θα λειτουργήσει ως γέφυρα μεταξύ γονδιακής πληροφορίας και φαινοτύπου, υποστηρίζοντας την εξατομικευμένη κλινική διαχείριση και τη λήψη τεκμηριωμένων θεραπευτικών αποφάσεων στον ελληνικό πληθυσμό.

3 Μεθοδολογία

Για την διεξαγωγή της NMR ανάλυσης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο των Bernini et al (Bernini et al., 2011). Αρχικά, όλα τα δείγματα αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (διαδικασία απόψυξης) προκειμένου να επανέλθουν στην πρώιμη μορφή τους. Όσον αφορά τα δείγματα πλάσματος και ορού ανακτήθηκαν 300 μL , τα οποία μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια τύπου Eppendorf και αναμίχθηκαν με 240 μL ρυθμιστικού διαλύματος Na_2HPO_4 (0.14 M Na_2HPO_4 , 0.5mM DSS, 4% NaN_3 σε H_2O , pH 7.4) και 60 μL D_2O . Από τα δείγματα ούρων ελήφθησαν 540 μL , τα οποία αναμίχθηκαν με 60 μL ρυθμιστικού διαλύματος KH_2PO_4 , (1.5 M KH_2PO_4 σε 100% v/v D_2O , 0.05 mM DSS & 4% NaN_3 , pH 7.4). Τα Eppendorf υποβλήθηκαν σε ανάδευση με τη χρήση vortex και 590 μL εκ του συνολικού όγκου μεταφέρθηκαν σε σωληνίσκο NMR διαμέτρου 5mm.

Η καταγραφή των φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Προσομοίωσης & Φασματοσκοπίας NMR του Πανεπιστημίου Πατρών. Τα πειράματα υλοποιήθηκαν σε φασματογράφο υψηλής ανάλυσης 700 MHz (Bruker Avance III HD 700 MHz), ο οποίος λειτουργεί σε συχνότητα Larmor των 700.13 MHz και είναι εξοπλισμένος με κρυογονικά ψυχόμενη Z-gradient probe 5 mm ^1H - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/^2\text{H}$ και κασετίνα χωρητικότητας 24 δειγμάτων αυτόματης περιστροφής. Πριν τη λήψη των φασμάτων τα δείγματα παρέμειναν στον ανιχνευτή για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 3 λεπτών προκειμένου να καταστεί εφικτή η ρύθμιση και η σταδιακή σταθεροποίηση της θερμοκρασίας. Ακολούθως, με τη διαδικασία του «κλειδώματος» (locking) πραγματοποιήθηκε η σταθεροποίηση του μαγνητικού πεδίου μέσω συντονισμού στον πυρήνα δευτερίου του διαλύτη. Για τα δείγματα πλάσματος και ορού, η θερμοκρασία σταθεροποιήθηκε στους 310K και καταγράφηκαν τα μονοδιάστατα φάσματα 1D ^1H -NOESY και 1D ^1H -CPMG, καθώς και το δισδιάστατο ομοπυρηνικό 2D ^1H J-resolved φάσμα. Για τα δείγματα ούρων, η θερμοκρασία σταθεροποιήθηκε στους 298 K και

ελήφθησαν τα φάσματα 1D ^1H -NOESY και 2D ^1H *J*-resolved.

Η βασική επεξεργασία των φασμάτων υλοποιήθηκε μέσω του λογισμικού Topspin 4.1.1 (Bruker BioSpin srl). Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκε η εξάλειψη στρεβλώσεων της φάσης και της βασικής φασματικής γραμμής, με στόχο την επίτευξη ομοιομορφίας και τεχνικής αρτιότητας των 1D ^1H φασμάτων. Ακολούθησε η βαθμονόμηση αυτών, προκειμένου να καταστούν μεταξύ τους συγκρίσιμα. Για τα φάσματα των δειγμάτων πλάσματος και ορού, η ευθυγράμμιση πραγματοποιήθηκε βάσει της σταθερής διπλής κορυφής που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο του ανωμερούς άνθρακα της α -γλυκόζης στα 5.24 ppm. Αντιθέτως, στα δείγματα ούρων, η ευθυγράμμιση πραγματοποιήθηκε με γνώμονα την κορυφή του εσωτερικού προτύπου DSS στα 0 ppm. Προκειμένου η συνολική φασματική πληροφορία να μετατραπεί σε μορφή αξιοποιήσιμη από τα βιοστατιστικά εργαλεία, πραγματοποιήθηκε κατακερματισμός των φασματικών δεδομένων και μετασχηματισμός τους σε μήτρα αριθμητικών δεδομένων με τη χρήση του λογισμικού AMIX (Bruker BioSpin).

Την ανάκτηση και επεξεργασία των φασματικών δεδομένων διαδέχθηκε η ταυτοποίηση των μεταβολιτών με εφαρμογή μη στοχευμένης αναλυτικής προσέγγισης. Κατά την διαδικασία αυτή αξιοποιήθηκαν τόσο τα μονοδιάστατα όσο και τα διδιάστατα φάσματα. Αναφορικά με τα δείγματα πλάσματος και ορού αίματος, η ταυτοποίηση υλοποιήθηκε σε φάσματα των 1D ^1H CPMG πειραμάτων, ενώ στα δείγματα ούρων σε φάσματα 1D ^1H NOESY. Η μελέτη τους πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού προγράμματος Chenomx 6.0, καθώς και με τη συμβολή των διεθνών διαδικτυακών βάσεων δεδομένων HMDB (Human Metabolome Data Base)(Wishart et al., 2007), BMRB (Biological Magnetic Resonance Bank) και της διαθέσιμης βιβλιογραφίας.

4 Αποτελέσματα

Στα πλαίσια του έργου έγινε ανάλυση μεταβολομικών δεδομένων Ελλήνων ασθενών με τις εξής παθολογικές οντότητες:

1. Ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης
2. Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου

Τα δεδομένα αυτά παρουσιάστηκαν ως αναρτημένη ανακοίνωση στο συνέδριο “6th Analytical Metabolomics Workshop” που πραγματοποιήθηκε στη Θεσσαλονίκη στις 5-6 Μαΐου 2025. Η ανακοίνωση έφερε τον τίτλο “NMR-based metabolomic data analysis for the implementation of personalized medicine in Greece” και συγγραφείς αυτής ήταν οι Ευτυχία Αγγελάκη, Στυλιανή Χασάπη, Ζωή Λυγερού και Γεώργιος Σπυρούλιας (βλέπε 6 κατωτέρω για την περίληψη και αναρτημένη παρουσίαση)

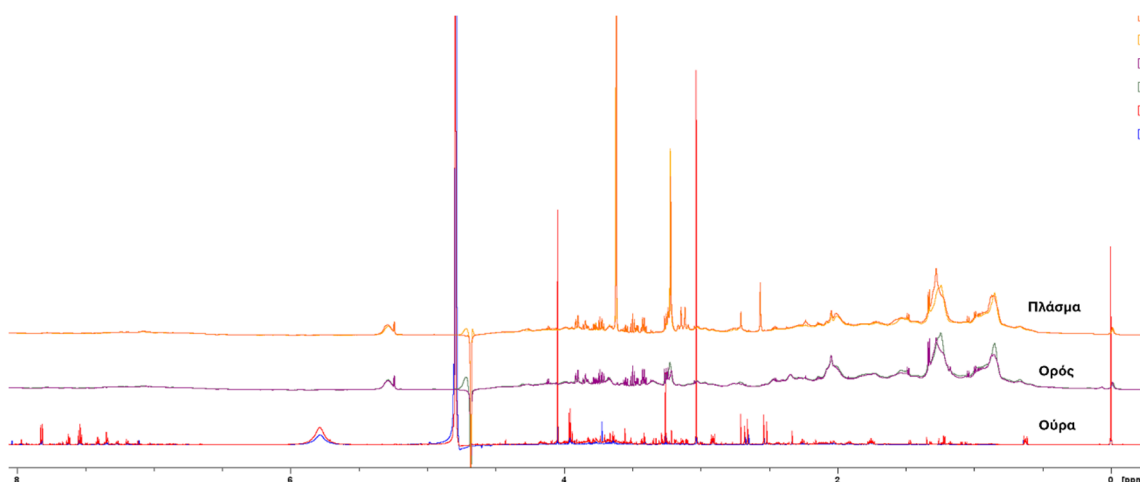
Επιπλέον, στα πλαίσια του έργου πραγματοποιήθηκε μεταβολομική ανάλυση ασθενών με δυσλιπιδαιμία και εικόνα οικογενούς υπερχοληστερολαιμίας χωρίς γενετικά ευρήματα στους συνήθεις γενετικούς τόπους. Στα πλαίσια του δικτύου έγινε συνδυασμός γενετικών δεδομένων μεγάλης κλίμακας (Whole Genome Sequencing) και μεταβολομικών δεδομένων. Τα μεταβολομικά δεδομένα παρουσιάζονται αναλυτικά κατωτέρω.

Αρχικά, παρατίθενται τα βασικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων και οι τύποι των βιολογικών δειγμάτων που συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν στο πλαίσιο του προγράμματος. Η σύνοψη των πληροφοριών παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1: Κλινικά χαρακτηριστικά και βιολογικά δείγματα των συμμετεχόντων.

Κωδικός συμμετέχοντα	Φύλο	Κλινική κατάσταση	Ούρα	Πλάσμα	Ορός
1068	Άνδρας	Δυσλιπιδαιμία, Οικογενή υπερχοληστερολαιμία	✓	✓	✓
1069	Γυναίκα	Δυσλιπιδαιμία, Οικογενή υπερχοληστερολαιμία	✓	✓	✓

Τα φάσματα ¹H NMR που ανακτήθηκαν από τα δείγματα ούρων, πλάσματος και ορού παρουσίασαν συνολικά καλή ποιότητα και κρίθηκαν κατάλληλα για μεταβολομική ανάλυση. Μετά την απόκτηση τους, υποβλήθηκαν σε βασική προεπεξεργασία με στόχο τη βελτίωση της σύγκρισης των δεδομένων. Τα φάσματα των ούρων χαρακτηρίστηκαν από υψηλή παρουσία ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, ενώ στα δείγματα πλάσματος και ορού παρατηρήθηκε κυριαρχία λιπιδικών και πρωτεϊνικών περιοχών, όπως αναμένεται εξαιτίας της φύσης των βιολογικών υγρών.



Εικόνα 1: Υπέρθεση φασμάτων ^1H NMR δειγμάτων πλάσματος, ορού και ούρων.

Στα ^1H NMR φάσματα των δειγμάτων ούρων, πλάσματος και ορού αναγνωρίστηκαν οι τυπικοί μεταβολίτες που συνοψίζονται στον Πίνακα 2. Η ανίχνευση βασίστηκε σε χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις και στη μορφολογία σημάτων, χωρίς ποσοτική ή στατιστική αξιολόγηση λόγω του περιορισμένου αριθμού δειγμάτων.

Στα ούρα, παρατηρήθηκε έντονη παρουσία χαμηλού μοριακού βάρους μεταβολιτών, όπως η κρεατινίνη, η γλυκίνη και το ιππουρικό οξύ, ενώ τα σήματα λιπιδίων είναι περιορισμένα. Στα δείγματα πλάσματος και ορού κυριαρχούν σήματα λιπιδίων, πρωτεϊνών και διαλυτών μικρομοριακών μεταβολιτών. Η γλυκόζη ανιχνεύθηκε στα δείγματα πλάσματος και ορού, αλλά όχι στα ούρα, όπως αναμένεται σε φυσιολογικές συνθήκες. Το ιππουρικό οξύ παρατηρήθηκε μόνο στα ούρα. Οι παρατηρούμενες διαφορές μεταξύ των βιολογικών υγρών ανατανακλούν χαρακτηριστικές μεταβολικές ιδιότητες κάθε τύπου δείγματος και επιβεβαιώνουν την καταλληλότητα της φασματοσκοπίας NMR για ποιοτική μεταβολομική ανάλυση.

Πίνακας 2: Ταυτοποιημένοι μεταβολίτες στα ^1H -NMR φάσματα δειγμάτων ούρων, πλάσματος και ορού.

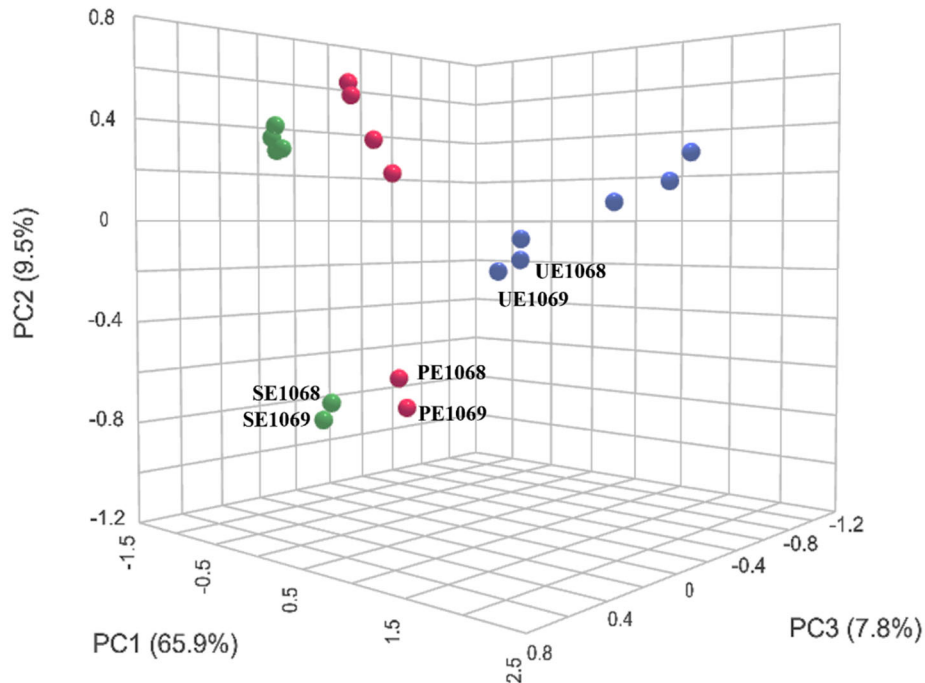
Μεταβολίτης	Ούρα	Πλάσμα	Ορός
Γλυκόζη	Χ	✓	✓
Γαλακτικό οξύ	✓	✓	✓
Κιτρικό οξύ	✓	✓	✓
Κρεατινίνη	✓	✓	✓
Κρεατίνη	✓	✓	✓
Ουρία	✓	✓	✓
Αλανίνη	✓	✓	✓
Βαλίνη	✓	✓	✓
Λευκίνη	✓	✓	✓
Ισολευκίνη	✓	✓	✓

Γλυκίνη	✓	✓	✓
Γλουταμίνη	✓	✓	✓
Γλουταμινικό οξύ	✓	✓	✓
Φαινυλαλανίνη	✓	✓	✓
Τυροσίνη	✓	✓	✓
Ιστιδίνη	✓	✓	✓
Φορμικό οξύ	✓	✓	✓
Οξικό οξύ	✓	✓	✓
Πυροσταφυλικό οξύ	✓	✓	✓
3-Υδροξυβουτυρικό οξύ	✓	✓	✓
Ακετοξικό οξύ	✓	✓	✓
Λιποπρωτείνες	Χ	✓	✓
Λιπίδια	Χ	✓	✓
Ιππουρικό οξύ	✓	Χ	Χ
Σουκκινικό οξύ	✓	✓	✓
Μυο-ινοσιτόλη	✓	✓	✓

Για την υλοποίηση διερευνητικής πολυπαραγοντικής ανάλυσης των φασματικών δεδομένων $^1\text{H NMR}$, εκτός από τα δείγματα των δύο ασθενών, συμπεριελήφθησαν επιπλέον δείγματα ελέγχου (control) πλάσματος, ορού και ούρων, με σκοπό την ενίσχυση της οπτικοποίησης και την επίδειξη της αναλυτικής ροής εργασίας. Τα δείγματα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν αποκλειστικά για διερευνητικούς σκοπούς και δεν αξιολογήθηκαν συγκριτικά ως προς τα κλινικά τους χαρακτηριστικά.

Στην αριθμητική μήτρα των φασματικών δεδομένων εφαρμόστηκε η μη επιβλεπόμενη μέθοδος Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA, Principal Component Analysis), η οποία επέτρεψε την οπτικοποίηση των δεδομένων σε γραφήματα. Το λογισμικό MetaboAnalyst παρέχει τη δυνατότητα προεπεξεργασίας των NMR φασματικών δεδομένων μέσω διαφόρων μορφών κανονικοποίησης (normalization, scaling). Όπως παρατηρείται στο αντίστοιχο score plot (Εικόνα 2), ο διαχωρισμός των δειγμάτων καθορίζεται κυρίως από το είδος του βιολογικού υγρού (ούρα, πλάσμα, ορός), αντανακλώντας τις εγγενείς διαφορές στη μεταβολική τους σύσταση. Τα δείγματα ούρων εμφανίζουν σαφή απόκλιση από τα δείγματα πλάσματος και ορού, τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη μεταξύ τους ομοιότητα.

Παρότι η κύρια πηγή διακύμανσης σχετίζεται με τον τύπο του βιολογικού υγρού, παρατηρείται τάση διαφοροποίησης μεταξύ δειγμάτων ασθενών και ελέγχου εντός του ίδιου βιολογικού υγρού. Η παρατήρηση αυτή είναι καθαρά οπτική και δεν αξιολογείται περαιτέρω, δεδομένου του περιορισμένου αριθμού δειγμάτων και του διερευνητικού χαρακτήρα της ανάλυσης.



Εικόνα 2: 3D διάγραμμα της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA) με χρωματική κωδικοποίηση ανά τύπο βιολογικού υγρού. Τα δείγματα ορού απεικονίζονται με πράσινο χρώμα, τα δείγματα πλάσματος απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα και τα δείγματα ούρων με μπλε χρώμα.

5 Μελλοντικά βήματα

Η παρούσα μελέτη επιδεικνύει την εφαρμογή της φασματοσκοπίας ^1H NMR για την ποιοτική, μεταβολομική, ανάλυση δειγμάτων ούρων, πλάσματος και ορού από ασθενείς και δείγματα ελέγχου. Η διερευνητική PCA ανέδειξε σαφή διαχωρισμό των βιολογικών υγρών, υπογραμμίζοντας τις διαφοροποιήσεις στις μεταβολικές τους συνθέσεις. Τα αποτελέσματα παρέχουν ένα πλαίσιο για μελλοντικές μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, ο οποίος θα καθιστά εφικτή τη ποσοτική αξιολόγηση διαφορών και την εκτενέστερη ανάλυση μεταβολικών προφίλ.

6 Παρουσίαση σε συνέδριο

NMR-based metabolomic data analysis for the implementation of personalized medicine in Greece

Eftychia A. Aggelaki¹, Styliani A. Chasapi¹, Zoi Lygerou², Georgios A. Spyroulias¹

¹Department of Pharmacy, School of Health Sciences, University of Patras, 26504, Rio, Greece

²School of Medicine, University of Patras, 26504, Rio, Greece

E-mail:

Zoi Lygerou (lygerou@upatras.gr) and Georgios A. Spyroulias (G.A.Spyroulias@upatras.gr)

Metabolomics is considered one of the most developing fields in omic-sciences over the last few years. By monitoring the global outcomes of all endogenous, exogenous and gut microbiota-derived metabolites, this approach becomes a powerful tool for investigating and in-depth understanding of the molecular mechanisms underlying human health and disease. Current metabolomics technologies contribute to precision medicine by characterizing the metabolic signature of diseases for diagnostic and prognostic purposes, as well as by enhancing the comprehension of individual susceptibility to drug administration, nutrition and lifestyle intervention [1]. NMR metabolic profiling has already revealed novel biomarkers for various diseases, offering the advantage of being a non-destructive technique, which provides both sensitivity and repeatability, while requiring minimal sample preparation. In the present work, we describe through examples, mostly selected from National-level ongoing projects, using ¹H NMR on biological fluids, pathologies characterized by a well-defined metabolomic signature, and the effects of drug administration on the disease fingerprint.

References

[1] A. Vignoli, V. Ghini, G. Meoni, C. Licari, P. G. Takis, L. Tenori, P. Turano, C. Luchinat, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**,*58*,968.



NMR-based metabolomic data analysis for the implementation of personalized medicine in Greece

Eftychia A. Aggelaki¹, Styliani A. Chasapi¹, Zoi Lygerou², Georgios A. Spyroulias¹

¹Department of Pharmacy, School of Health Sciences, University of Patras, 26504, Rio, Greece

²School of Medicine, University of Patras, 26504, Rio, Greece



Metabolomics is considered one of the most developing fields in omic-sciences over the last few years. By monitoring the global outcomes of all endogenous, exogenous and gut microbiota-derived metabolites, this approach becomes a powerful tool for investigating and in-depth understanding of the molecular mechanisms underlying human health and disease. Current metabolomics technologies contribute to precision medicine by characterizing the metabolic signature of diseases for diagnostic and prognostic purposes, as well as by enhancing the comprehension of individual susceptibility to drug administration, nutrition and lifestyle intervention. NMR metabolic profiling has already revealed novel biomarkers for various diseases, offering the advantage of being a non-destructive technique, which provides both sensitivity and repeatability, while requiring minimal sample preparation. In the present work, we describe through examples, mostly selected from National-level ongoing projects, using ¹H NMR on biological fluids, pathologies characterized by a well-defined metabolomic signature, and the effects of drug administration on the disease fingerprint.

Pediatric Endocrinology

Objective: To characterize the metabolic profile of GHD children, examine the effect of GH administration on the metabolic signature, and investigate the correlations between metabolites and IGF-1, by applying NMR-based untargeted and targeted metabolomic approach. Serum samples were collected from twenty-two children diagnosed with GHD and forty-eight age matched controls from the Pediatric Endocrinology Unit of the University Hospital of Patras (DOI: [10.1007/s11306-024-02217-9](https://doi.org/10.1007/s11306-024-02217-9))

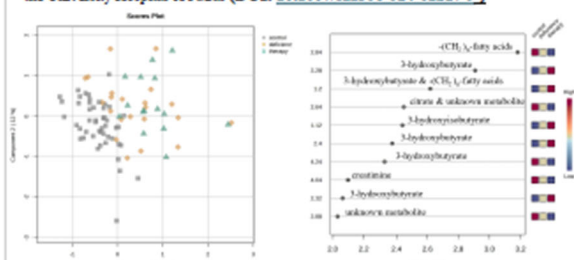


Fig. 1 Multivariate analysis of 1D ¹H CPMG serum spectra obtained from children diagnosed with GHD before (yellow rhombus) and during 3 months of GH replacement (green triangles) as compared with healthy controls (grey squares).

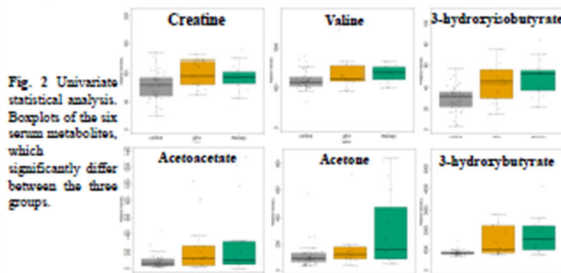


Fig. 2 Univariate statistical analysis. Boxplots of the six serum metabolites, which significantly differ between the three groups.

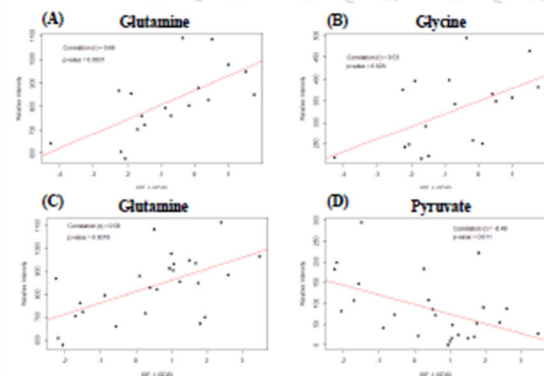


Fig. 3 2D Scatter plots (A-D) with fit lines between different metabolites and IGF-1 (SDS). (A,B) Plots refer to serum glutamine and serum glycine in correlation to IGF-1 (SDS) in GHD group while (C, D) plot shows glutamine and pyruvate changes in GHD group 3 months after initiation of therapy with GH in correlation to IGF-1.

Inflammatory Bowel Disease

Collaboration between the Department of Basic Medical Sciences of the Medical School of the National and Kapodistrian University of Athens (NKUA) and the Department of Pharmacy of the University of Patras

Population

Urine Samples

Control Group, n=15

IBD group, n=39



108 NMR spectra

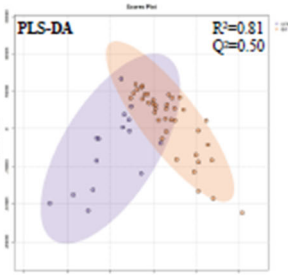
Metabolomic Analysis

- ✓ Characterization of the metabolic profile of patients with IBD
- ✓ Identification of metabolic dysregulations
- ✓ Development of disease stratification models



¹H 1D NOESY

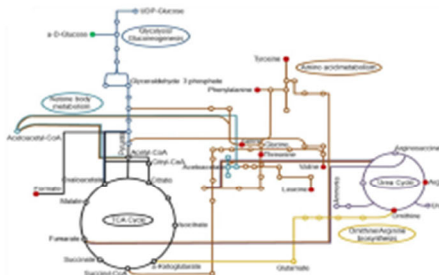
2D J-Resolved



Key Metabolic Alterations in IBD Patients

- Reduced citric acid levels
- Decreased levels of formic acid, hippuric acid and trigonelline
- Low concentrations of short-chain fatty acids (SCFAs)
- Altered amino acid metabolism: alanine, asparagine, glycine, taurine

Metabolic Pathways



♦ Alterations in Krebs cycle intermediates – modifications in energy metabolism

♦ Differences in the gut microbiome

Acknowledgments

This project (TAEDR-0539180) is implemented within the framework of the Action "Actions in interdisciplinary scientific areas with special interests for the connection with the productive fabric", Greece 2.0 - National Recovery and Resilience Plan.

