

# Biologia Systemów - Spektroskopia NMR

Anastazja Tasinkiewicz

## Wprowadzenie

### 1.1. Spektroskopia NMR

Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) to technika wykorzystywana w chemii do określania struktury i właściwości cząsteczek. Metoda opiera się na analizie interakcji jąder atomowych z promieniowaniem elektromagnetycznym w polu magnetycznym (4.7: NMR Spectroscopy - Chemistry LibreTexts, 2025).

### 1.2. Metabolomika

To dziedzina nauki zajmująca się badaniem metabolitów - cząsteczek, które powstają w różnych procesach metabolicznych w organizmie (Metabolomika, 2024)

### 1.3. Spektroskopia NMR w metabolomice

Metabolomika oparta na spektroskopii NMR jest powszechnie wykorzystywana do tworzenia profili metabolicznych w celu identyfikacji potencjalnych biomarkerów związanych z określonymi jednostkami chorobowymi. Dzięki analizie statystycznej zmian stężeń wybranych metabolitów możliwe jest rozróżnienie osób chorych od zdrowych (Emwas i in., 2015). Ponadto, spektroskopia NMR umożliwia śledzenie strumieni metabolicznych w czasie rzeczywistym, co pozwala na analizę szybkości określonych reakcji oraz aktywności szlaków *in situ* (Wishart i in., 2022). Dodatkowo, spektroskopia NMR pozwala na analizę struktur metabolitów oraz ich interakcji (Moco, 2022)

### 1.4. Cel pracy

Celem niniejszej pracy jest analiza składu próbek moczu człowieka, zbadanie zmian metabolicznych zachodzących w czasie oraz ocena wpływu wyboru biblioteki referencyjnej na dokładność identyfikacji metabolitów w próbkach eksperymentalnych. W tym celu zostanie przeprowadzona analiza widm NMR moczu pobranego od jednego wolontariusza w różnych odstępach czasowych. Ponadto, uzyskane widma zostaną porównane z widmem próbki kontrolnej, co umożliwi wykrycie ewentualnych różnic lub zbieżności w składzie metabolitów.

# Metody

## 2.1. Dane eksperymentalne

Próbki moczu były zbierane od 6 wolontariuszy codziennie przez 254 dni oraz w dniach 713-716 od początku eksperymentu. Następnie dokonano pomiarów NMR zebranych próbek. W tej pracy przeprowadzono analizę widm próbek od jednego z sześciu wolontariuszy. Próbkę kontrolną stworzono przez zmieszanie ze sobą wszystkich próbek zebranych podczas eksperymentu od 6 wolontariuszy. Dokonano 32 pomiarów NMR tak przygotowanej próbki kontrolnej.

## 2.2. Dane referencyjne

W celu identyfikacji metabolitów obecnych w próbkach moczu badanego wolontariusza wykorzystano dane referencyjne pochodzące z bazy HMDB (*ang. Human Metabolome Database*). HMDB to ogólnodostępna baza danych, która zawiera informacje o metabolitach występujących w ludzkim organizmie, ich strukturach chemicznych, właściwościach, danych spektralnych oraz powiązaniach z chorobami, szlakami metabolicznymi.

## 2.3. Przygotowanie danych

### 2.3.1. Biblioteka widm referencyjnych

Z HMDB pobrano wszystkie widma NMR w formacie plików xml. W celu wyodrębnienia informacji o przesunięciu chemicznym, pozycji pików w jednostkach ppm oraz intensywności dla każdego z widm 1D opracowano funkcję:

```
extract_1D_spectra(folder path: str, nucleus: str)
```

Funkcja automatycznie przetwarza wszystkie pliki znajdujące się we wskazanym folderze, filtrując widma na podstawie typu jądra atomowego. Dane zapisuje w pliku csv o nazwie w postaci:

```
{HMBD_ID}_1D_{Spectrum_ID}_ {pred/exper}_{nucleus}_{frequency}.csv
```

Dla takich plików csv opracowano funkcję:

```
preprocess_1D_spectra(filename: str, out_folder:"./Preprocessed", sig=None)
```

która opcjonalnie zaokrągla pozycje pików do sig liczb znaczących, grupuje piki po ich pozycjach i przypisuje im nową intensywność, równą sumie intensywności wszystkich pików w grupie.

Przy wyborze widm do biblioteki referencyjnej kierowano się przede wszystkim dostępnością widma eksperymentalnego danego metabolitu. W przypadku jego braku wybierano widma predykcyjne. Dodatkowo zwracano uwagę, aby zawierały one piki o intensywnościach różniących się od zera. Preferowano również widma z większą liczbą sygnałów, zakładając, że dostarczą one więcej informacji przy analizie widm próbek eksperymentalnych.

Aby wykorzystać pobrane z HMDB widma jako widma referencyjne do estymacji proporcji metabolitów w mieszaninie usunięto negatywne intensywności i znormalizowano spektra. To pozwala na ujednolicenie skali intensywności i dzięki temu porównywanie widm między sobą (widma referencyjnego do widma mieszaniny) i prawidłową estymację proporcji.

### 2.3.2. Solvery

Do obliczenia proporcji wybranych metabolitów dla kilku widm eksperymentalnym, wybrano widma próbek z dnia 10, 100, 200. Parametry kary w `estimate_proportions` pozostawiono domyślne ( $\kappa_{\text{mieszanki}} = 0.25$ ,  $\kappa_{\text{składników}} = 0.22$ ). Te same obliczenia przeprowadzono za pomocą solvera PULP, GUROBI oraz MOSEK. Wszystkie trzy metody dały proporcje, w wyniku których otrzymano identyczne wykresy widm. Natomiast otrzymane statystyki (signal proportion in mixture's spectrum, noise proportion in mixture's spectrum, noise proportion in combination of components' spectra) były spójne w przypadku PULP i MOSEK (odpowiednio dla dnia 10: 0.9557, 0.0442742, 0.0050623, dla dnia 100: 0.937086, 0.06291385, 0.0068663765; dla dnia 200: 0.91972, 0.0802799, 0.0032), podczas gdy dla GUROBI dla dnia 10., 100. i 200. wszystkie statystyki były takie same jak dla PULP i MOSEK dnia 10. MOSEK okazał się najszybszy, dlatego ze względu na prędkość i spójne wyniki z PULP, w dalszych analizach korzystano z MOSEK.

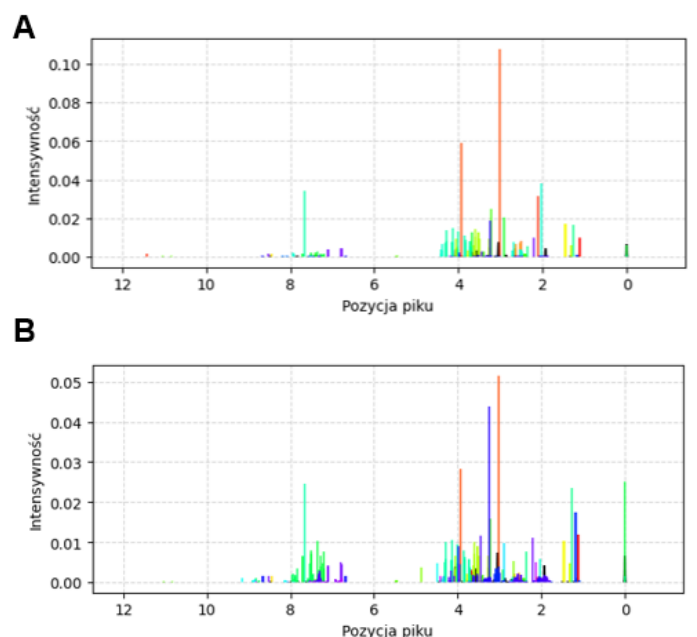
### 2.3.3. Parametry

W metodzie `estimate_proportions` należy podać dwa parametry kary. Pierwszym jest  $\kappa_{\text{mieszanki}}$  – parametr ten pozwala kontrolować sygnał widma eksperymentalnego, określa jaka część wejściowego widma mieszanki ma zostać przeniesione do  $\omega$ , które opisuje nadmiarowy sygnał (szum). Część sygnału ( $p_0$ ) z  $\omega$  zostanie usunięta po obliczeniu minimalnej odległości

Wassersteina. Drugim parametrem jest  $\kappa_{\text{składników}}$ , pozwala kontrolować sygnał widma referencyjnego, określając jaką część widma jest nadmiarowa –  $\xi$ . Podobnie,  $p_0 \xi$  oznacza część widma referencyjnego, która zostanie usunięta (Domżał i in., 2024).

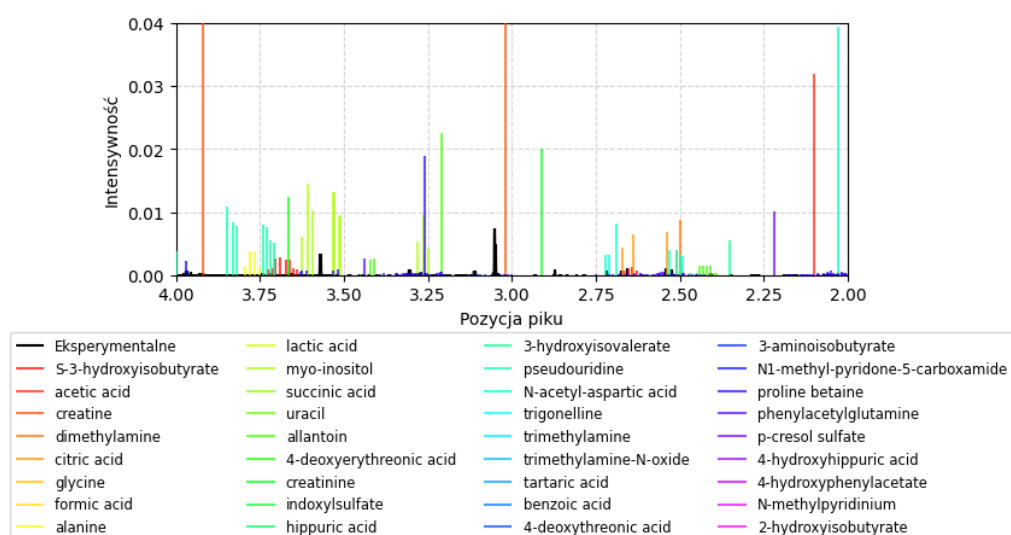
Sprawdzono dla widma eksperymentalnego dnia 100. wyniki estymacji dla innych wartości  $\kappa$  niż standardowe. Na podstawie analizy widma mieszaniny w regionie 7-9 ppm wybrano  $\kappa_{\text{mieszanki}}$  wynoszącą 0.15. Natomiast w celu ustalenia  $\kappa_{\text{składników}}$  do zbadania, przeanalizowano spektra dla dwóch metabolitów w HMDB: HMDB0003911 (3-aminoisobutyrate) oraz HMDB0013678 (p-Hydroxyhippuric acid), które po wstępnym zwizualizowaniu wskazały na obecność kilku wyraźnych grup sygnałów. Na tej podstawie wybrano do analizy  $\kappa_{\text{składników}}$  wartości: 0.05, 0.1.

Dla każdego z tych zestawów wartości, otrzymano bardzo zaszumione widma w porównaniu do domyślnego. Co ciekawe dla widma referencyjnego udało się zmniejszyć maksymalny sygnał (pomarańczowy), jednak pojawiło się dużo dodatkowych w innych miejscach. Statystyki też wskazały na znaczący wzrost *Noise proportion in combination* wynoszącym 0.15. Spróbowano zatem parametrów  $\kappa_{\text{mieszanki}} = 0.25$  i  $\kappa_{\text{składników}} = 0.3$ . W tym przypadku w porównaniu do domyślnego zestawu parametrów, poprawił się znacząco *Noise proportion in combination of components*, który wyniósł 0.0026, ale pogorszył się *Noise proportion in mixture* równy 0.0648. Dlatego przetestowano jeszcze  $\kappa_{\text{mieszanki}} = 0.3$  i  $\kappa_{\text{składników}} = 0.3$ , udało się zredukować dwa szumy porównując do domyślnych parametrów, *Noise proportion in combination of components* wyniósł 0.0028, a *Noise proportion in mixture* 0.0565. W dalszej części badań parametry ustawiono na (0.3, 0.3).



**Ryc. 1. Widmo mieszaniny i referencyjne.** Kolorem czarnym przedstawiono widmo mieszaniny, z kolei widmo referencyjne oznaczono różnymi kolorami odpowiadające różnym metabolitom. (A) Domyślne parametry (0.25, 0.22). (B)  $\kappa_{\text{mieszaniny}} = 0.15$ ,  $\kappa_{\text{składników}} = 0.05$ .

Przeanalizowano przykładowe widmo eksperymentalne i referencyjne dla wybranego zestawu parametrów. Zaobserwowano, że większość sygnałów metabolitów z referencji znacznie przewyższa intensywności z próbki eksperymentalnej. Sugeruje to, że w trakcie estymacji proporcji mogło dojść do błędów.



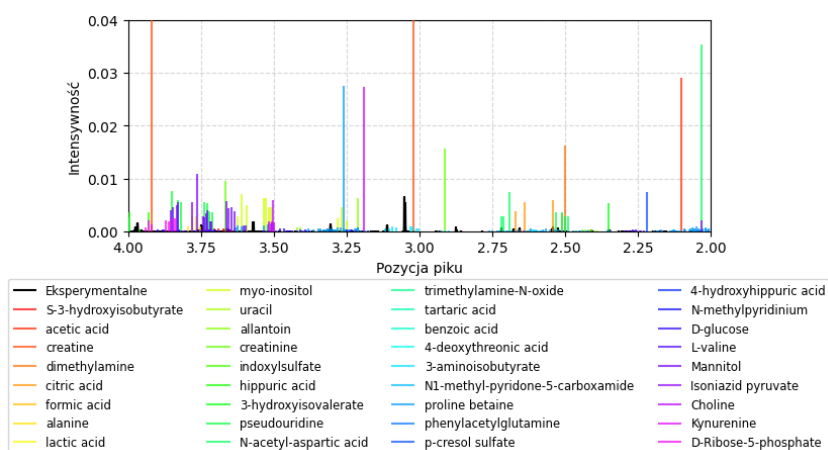
**Ryc. 2. Przykładowe widmo eksperymentalne dla dnia 100. i referencyjne zestawu 1.**

### 2.3.4. Liczenie proporcji

Proporcje metabolitów obliczano metodą *area*, ponieważ nie wymaga dodatkowych informacji o elektronach, co usprawnia pracę przy dużych zestawach danych.

### 2.3.5. Nowa biblioteka referencyjna – zestaw 2.

Na podstawie analizy zmian proporcji w zależności od dnia eksperymentu zidentyfikowano metabolity, które nie ujawniono w próbce eksperymentalnej (proporcje dla każdego dnia wyniosła 0) oraz takie, które zidentyfikowano tylko dla kilku dni. Te wyniki sugerują, że nie ma tych metabolitów w moczu, dlatego 7 takich metabolitów zastąpiono innymi. Wybrano: (a) D-glukozę, która wskazuje na glikozurię i jest powiązana z cukrzycą (Glycosuria, 2024), (b) L-walinę, która może wskazywać na chorobę syropu klonowego (Hassan i Gupta, 2025), (c) mannitol, jest osmotycznym diuretykiem, podawanym przy niewydolności nerek (Patel i in., 2025), (d) pirogronian izoniazydu, pojawia się w moczu po przyjmowaniu leku – izoniazydu, który wykorzystuje się w leczeniu gruźlicy (RYAN, 1980; Isoniazyd - dawkowanie, zastosowanie, opis leku, 2025), (e) cholina, niezbędny składnik odżywczy, ale zbyt duże stężenie może świadczyć o niewydolności nerek (Choline, 2025), (f) kynurenina, jej wysoki poziom jest biomarkerem stanu zapalnego w organizmie (Badawy, 2017) oraz (g) D-rybozo-5-fosforan, znaczące zmiany w jego poziomie mogą wskazywać na zaburzoną biosyntezę nukleotydów lub metabolizm glukozy (Stryer i in., 2019). Na podstawie obliczonych proporcji, przeanalizowano przykładowe widmo eksperymentalne i referencyjne (ryc. 3). Zaobserwowano podobnie jak dla pierwszej biblioteki, że dla większości metabolitów z referencji sygnały są znacznie wyższe niż dla próbki eksperymentalnej, co sugeruje, że mogło dojść do błędów w obliczeniach.

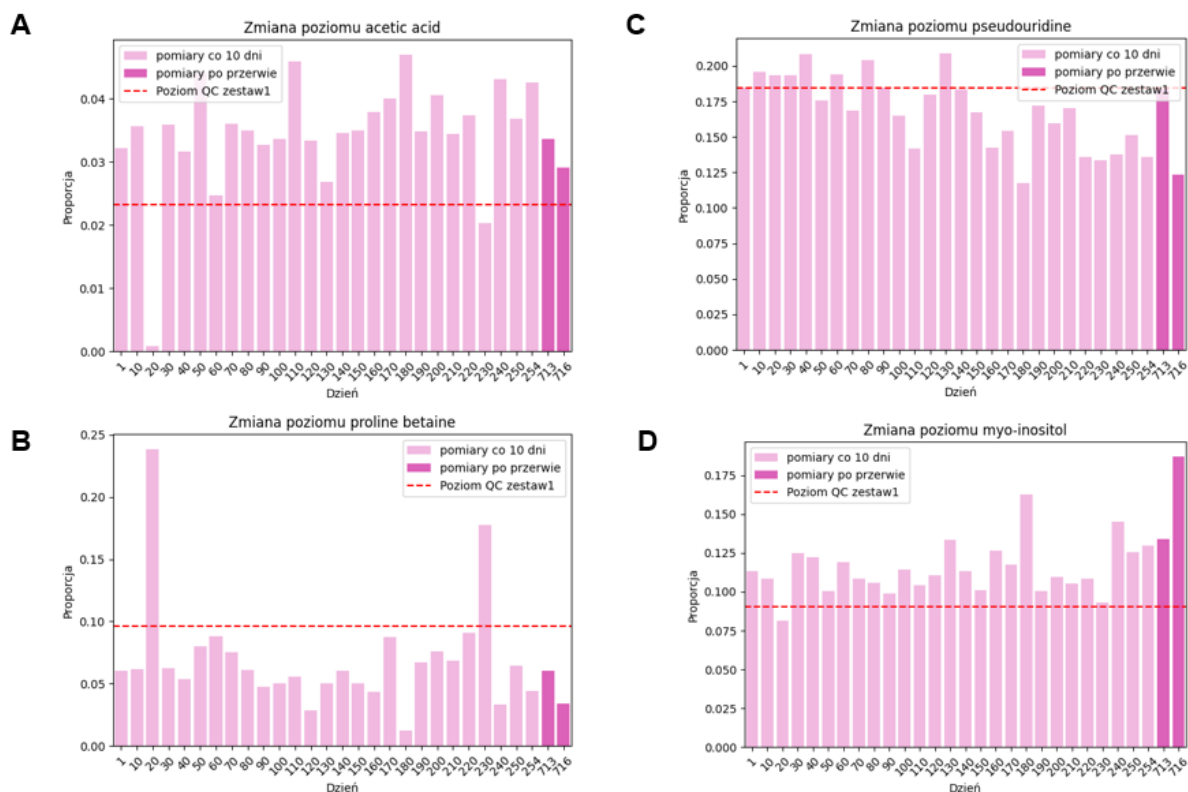


Ryc. 3. Przykładowe widmo eksperymentalne dla dnia 10. i referencyjne zestawu 2.

# Wyniki

## 1.1. Zmiana proporcji metabolitów w zależności od czasu dla zestawu 1.

Metoda `estimate_proportions` umożliwiła identyfikację metabolitów nieobecnych w analizowanych próbkach moczu. Nie wykryto następujących związków: trigoneliny, tlenku trimetyloaminy, kwasu winowego, 4-hydroksyfenylooctanu oraz 2-hydroksyizomasłanu. Dla większości wykrytych metabolitów zaobserwowano, że ich proporcje w trakcie całego eksperymentu oscylowały wokół poziomu obserwowanego w próbce kontrolnej. Niemniej jednak, odnotowano również metabolity, których proporcje przez znaczną część eksperymentu utrzymywały się istotnie powyżej poziomu kontrolnego (QC), m.in. kwas octowy, inozytol oraz siarczan indoksylu. Część metabolitów, takich jak 3-aminoizomasłan, kwas mlekowy oraz betaina prolinowa, utrzymywała się przez dłuższy czas poniżej poziomu QC. Dodatkowo zidentyfikowano metabolity wykazujące wyraźne zmiany trendów w trakcie trwania eksperymentu. Tendencje spadkowe zaobserwowano w przypadku kreatyny oraz pseudourydyny, natomiast wzrostowe — dla S-3-hydroksyizomasłanu oraz myo-inozytol. Zarejestrowano również obecność metabolitów, które pojawiały się w próbkach moczu tylko w określonych dniach eksperymentu, np. glicyny, kwasu bursztynowego, 4-deoksyerytronianu oraz trimetyloaminy. Na ryc. 4 przedstawiono przykładowe zmiany proporcji wybranych metabolitów w czasie.



**Ryc. 4. Zmiana proporcji wybranych metabolitów w czasie.** (A) Poziom kwasu octowego, którego poziom utrzymuje się powyżej QC. (B) Poziom betainy prolinowej, która utrzymuje się przez większość dni poniżej poziomu QC. (C) Proporcje pseudourydyny, dla której obserwuje się tendencję spadkową. (D) Proporcje myo-inozytolu, dla którego obserwuje się tendencję wzrostową.

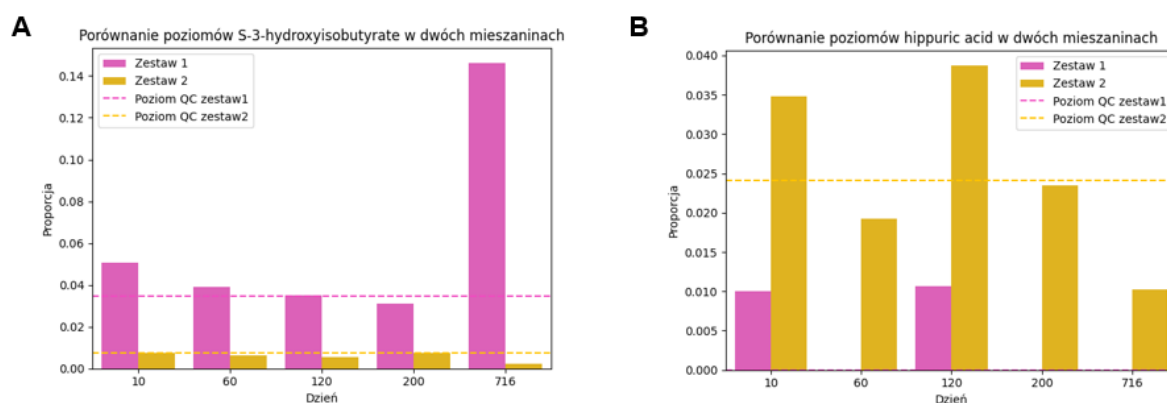
## 1.2. Porównanie zmian proporcji metabolitów w przeciągu dni z zestawu 1. i zestawu 2.

Metabolity, których proporcje mierzono zarówno w zestawie pierwszym jak i drugim, porównano ze sobą, w celu sprawdzenia jak zmiana biblioteki referencyjnej wpływa na szacowanie występowania danego metabolitu w próbce eksperymentalnej. Dla większości związków proporcje były porównywalne między zestawem 1 i 2, jednak w kilku przypadkach zaobserwowano istotne różnice. Na przykład w zestawie 2. dla S-3-hydroksyizomasłanianu wartości proporcji w zestawie 2. były znacznie niższe, różnica wyniosła na przestrzeni badanych dni ponad 0.02 (ryc. 5A). Podobnie proporcje były niższe dla myo-inozytolu, gdzie zaobserwowano różnicę ok. 0.05. W przypadku metabolitów, dla których poziom był wyższy w zestawie 2., różnice były zwykle niewielkie — wyjątkiem był kwas hipurowy, którego proporcja w zestawie 2. była średnio o 0,03 wyższa, a sam związek wykryto we wszystkich analizowanych dniach, podczas gdy w zestawie 1. jedynie w dniach 10 i 120 (ryc. 5B). Ciekawym przypadkiem jest również N1-metylo-pirydon-5-karboksamid, który nie został wykryty w ogóle w zestawie 2. Sugeruje to, że jego sygnał



mógł zostać przypisany do innego metabolitu dodanego do rozszerzonej biblioteki. Mimo tych różnic, ogólny przebieg zmian proporcji w czasie dla większości metabolitów pozostał zbliżony w obu zestawach referencyjnych.

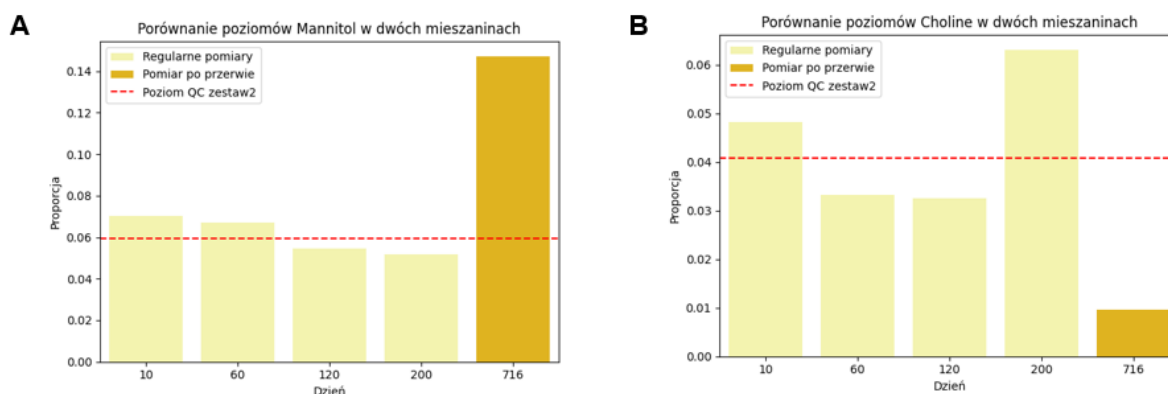
Zaobserwowane zmiany sugerują, że zestaw metabolitów w bibliotece referencyjnej wpływa na oszacowania obecności metabolitów w próbkach eksperymentalnych.



**Ryc. 5. Porównanie estymacji proporcji wybranych metabolitów w zestawie 1. i zestawie 2. (A) Różnice w proporcji dla S-3-hydroksyzomalanianu. (B) Różnice w proporcji kwasu hipurowego.**

### 1.3. Proporcje nowych metabolitów z zestawu 2.

Dla D-glukozy, L-waliny, izoniazydopirogronianu oszacowane proporcje w porównaniu do pozostałych metabolitów były niewielkie; część z tych związków nie została nawet wykryta we wszystkich analizowanych dniach. Stwierdzono natomiast wyraźną obecność mannitolu, którego poziom 716. dnia osiągnął wyjątkowo wysoką wartość – aż 0,14 (ryc. 6A). Z kolei cholina, która we wcześniejszych pomiarach wykazywała wysokie stężenia, 716. dnia odnotowała znaczący spadek w porównaniu do poprzednich dni (ryc. 6B). Dodatkowo, zauważono wzrost poziomu kynureny (zmiana ostatniego dnia z 0.002 na 0.01) oraz stosunkowo stabilne wartości dla D-ribozo-5-fosforanu w całym przebiegu eksperymentu.



**Ryc. 6. Zmiany proporcji wybranych nowych metabolitów w przeciągu eksperymentu.** (A) Zmiany poziomu mannitolu, dla której odnotowano znaczący wzrost 716. dnia. (B) Zmiany poziomu choliny, dla której odnotowano znaczący spadek 716. dnia.

## Dyskusja

Przeprowadzone analizy wskazują, że spektroskopia NMR może stanowić użyteczne narzędzie do badania składu płynów ustrojowych człowieka oraz detekcji potencjalnych zaburzeń metabolicznych. W niniejszej pracy dokonano estymacji proporcji metabolitów w próbkach eksperymentalnych, wykorzystując dwie różne biblioteki referencyjne. Niestety, uzyskane wyniki nie były w pełni spójne — mimo zastosowania procedur obróbki danych, takich jak normalizacja intensywności, sygnały w widmach referencyjnych były zazwyczaj znacznie silniejsze niż w widmach eksperymentalnych. Przypuszcza się, że rozbieżności te mogą wynikać z błędów obliczeniowych, ograniczeń użytych solverów lub niedokładności w dopasowaniu widm referencyjnych do rzeczywistych sygnałów z próbek. Pomimo tych ograniczeń, zastosowana metoda pozwoliła na względne określenie zmian wybranych metabolitów w czasie. Ustalono, że niektóre z badanych związków nie występowały w próbkach, co może być cenną informacją w kontekście poszukiwania biomarkerów chorobowych i wykluczania ich obecności. Z kolei metabolity będące naturalnymi składnikami moczu, takie jak kwas octowy czy alanina, wykazywały stabilne proporcje w czasie, co potwierdza ich fizjologiczną obecność i może stanowić punkt odniesienia w analizie innych związków. Zauważalne różnice w proporcjach metabolitów między zestawem 1. a zestawem 2. sugerują, że wybór biblioteki referencyjnej ma istotny wpływ na dokładność identyfikacji. Wprowadzenie nowych metabolitów, takich jak mannitol czy cholina, pozwoliło uchwycić zmiany, które nie były widoczne przy początkowym zestawie. Ciekawym przypadkiem był S-3-hydroksyzizomasłanian, dla którego obserwowano

przypuszczalne „przejście” sygnału z zestawu 1 do innego, nowo dodanego metabolitu w zestawie 2, co wskazuje na złożoność procesu dopasowania widm. Szczególnie interesujące były skrajne zmiany stężeń niektórych metabolitów w późnym etapie eksperymentu — jak nagły wzrost mannitolu 716. dnia — które mogą odzwierciedlać zmiany stanu fizjologicznego badanego. Co istotne, na podstawie wyników estymacji dla rozszerzonej biblioteki referencyjnej, możliwe było wykluczenie obecności w moczu niektórych metabolitów powiązanych z chorobami, co sugeruje brak przesłanek do rozpoznania np. cukrzycy czy choroby syropu klonowego u badanego. Podsumowując, choć analiza NMR w badaniu moczu wymaga dalszej optymalizacji — zwłaszcza w zakresie dopasowania bibliotek referencyjnych i precyzyjnej estymacji sygnału — przedstawione wyniki pokazują jej potencjał w detekcji zmian metabolicznych oraz w badaniach przesiewowych biomarkerów chorobowych. W przyszłości warto rozszerzyć analizę o większą liczbę próbek, dokładniejsze widma referencyjne oraz walidację wyników z innymi metodami analitycznymi, co zwiększy wiarygodność diagnostyczną tego podejścia.

## Bibliografia

Anon, 2024. Glycosuria. W: *Wikipedia*.

Anon, 2024. Metabolomika. W: *Wikipedia, wolna encyklopedia*.

Anon, 2025. 4.7: *NMR Spectroscopy* - *Chemistry LibreTexts*.

Anon, 2025. Choline. W: *Wikipedia*.

Anon, 2025. *Isoniazyd - dawkowanie, zastosowanie, opis leku*.

Badawy, A.A.-B., 2017. Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. *International Journal of Tryptophan Research : IJTR*.

Domżał, B., Nawrocka, E.K., Gołowicz, D., Ciach, M.A., Miasojedow, B., Kazimierczuk, K. i Gambin, A., 2024. Magnetstein: An Open-Source Tool for Quantitative NMR Mixture Analysis Robust to Low Resolution, Distorted Lineshapes, and Peak Shifts. *Analytical Chemistry*, 96(1), s. 188–196.

Emwas, A.-H.M., Merzaban, J.S. i Serrai, H., 2015. Chapter 3 - Theory and Applications of NMR-Based Metabolomics in Human Disease Diagnosis. W: A. ur-Rahman i M.I. Choudhary, red., *Applications of NMR Spectroscopy*. [online] Bentham Science Publishers, s. 93–130.

Hassan, S.A. i Gupta, V., 2025. Maple Syrup Urine Disease. W: *StatPearls*. [online] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Moco, S., 2022. Studying Metabolism by NMR-Based Metabolomics. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, s. 882487.

Patel, P., Patel, R. i Thorell, W., 2025. Mannitol. W: *StatPearls*. [online] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

RYAN, P.J., 1980. HUMAN URINARY METABOLITES OF ISONIAZID. *ETD Collection for Fordham University*, [online] s. 1–143.

Wishart, D.S., Cheng, L.L., Copié, V., Edison, A.S., Eghbalnia, H.R., Hoch, J.C., Gouveia, G.J., Pathmasiri, W., Powers, R., Schock, T.B., Sumner, L.W. i Uchimiya, M., 2022. NMR and Metabolomics-A Roadmap for the Future. *Metabolites*, 12(8), s. 678.