



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Survival of the littlest: improving preterm outcomes through metabolomics and microsampling

Thangavelu, M.U.

Citation

Thangavelu, M. U. (2026, February 26). *Survival of the littlest: improving preterm outcomes through metabolomics and microsampling*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4293294>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4293294>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse Samenvatting

Vroeggeboorte verstoort de normale ontwikkeling van de foetus en vormt een grote uitdaging voor de perinatale gezondheidszorg. Naast de directe bedreiging voor de overlevingskansen van pasgeborenen, gaat vroeggeboorte gepaard met een verhoogd risico op chronische morbiditeit. Dit heeft grote gevolgen voor gezinnen, gezondheidszorgstelsels en de samenleving. Ondanks aanzienlijke vooruitgang in de perinatale zorg, waardoor overleving bij steeds kortere zwangerschapsduur mogelijk is geworden, moeten de klinische prioriteiten verder reiken dan acute stabilisatie door zich richten op het voorkomen van langdurige gevolgen en het waarborgen van levenslange gezondheid en kwaliteit van leven. De behandeling van vroeggeboorte en bijbehorende complicaties is bijzonder uitdagend vanwege de aanzienlijke heterogeniteit in etiologie en klinische presentaties. Premature pasgeborenen hebben specifieke fysiologische kenmerken en verhoogde kwetsbaarheid voor snelle klinische verslechtering. Bij gebrek aan gevoelige en specifieke diagnostische hulpmiddelen wordt de klinische besluitvorming vaak gedreven door vermoedens in plaats van zekerheid, waardoor het risico op overbehandeling en iatrogene schade toeneemt.

Klinische fouten die gevolgen hebben voor de pasgeborene kunnen zowel voor als na de geboorte optreden en komen vaak voort uit diagnostische onzekerheid, zoals geïllustreerd door de behandeling van spontane vroeggeboorte en laat optredende sepsis. Empirische behandeling met prenatale corticosteroïden of postnatale breedspectrumantibiotica, hoewel essentieel in bevestigde gevallen, is niet gerechtvaardigd in vals-positieve scenario's en kan een negatieve invloed hebben op de stofwisseling, groei en neurologische ontwikkeling van de pasgeborene. Deze risico's zijn versterkt bij premature pasgeborenen, bij wie de fysiologie wezenlijk verschilt van die van voldragen pasgeborenen en volwassenen, met gevolgen voor de ziektepresentatie en behandelrespons. Om deze uitdagingen het hoofd te bieden is een dieper mechanistisch inzicht in de onderliggende pathofysiologie noodzakelijk, zodat nauwkeurige en gepersonaliseerde diagnostische en therapeutische strategieën kunnen worden ontwikkeld.

Daarom is specifiek onderzoek naar deze populatie van cruciaal belang. De vooruitgang wordt echter inherent beperkt door hun lage circulerend bloedvolume en ethische beperkingen rondom invasieve en pijnlijke procedures. Dit vormt een aanzienlijke belemmering voor het verzamelen van monsters voor onderzoeksdoeleinden. Conventionele, op plasma gebaseerde werkwijzen vereisen relatief grote monstervolumes en complexe handelingen, terwijl bemonstering met dried blood spotting (DBS, ingedroogde bloedvlekken op speciaal filterpapier), hoewel beter haalbaar, gepaard gaat met analytische beperkingen, waaronder variabiliteit als gevolg van het hematocriet en een verminderde kwantitatieve betrouwbaarheid. Deze beperkingen benadrukken de noodzaak van

bemonsteringsstrategieën die fysiologisch compatibel, volume-efficiënt en analytisch robuust zijn, zodat uit elk kostbaar monster maximale informatie wordt verkregen.

Het overkoepelende doel van dit proefschrift was daarom het verdiepen van het inzicht in de pathofysiologische processen die betrokken zijn bij spontane vroeggeboorte en laat optredende sepsis. Dit inzicht moet bijdragen aan eerdere en nauwkeurigere diagnostiek, het ontwikkelen van gerichte behandelstrategieën, het beperken van onnodige interventies en het verbeteren van de klinische uitkomsten bij vroeggeboorte. Daartoe werd gebruikgemaakt van gerichte metabolomics technieken om signaallipiden en -aminen te onderzoeken, moleculen die betrokken zijn bij ontstekingsroutes die de bevalling versnellen en gastheerrespons op een infectie stimuleren. Hiermee werden biologisch betekenisvolle moleculaire kenmerken geïdentificeerd die deze ziekte-toestanden weerspiegelen. Daarnaast werd een centrale methodologische barrière die inherent is aan onderzoek bij premature populaties aangepakt, door de evaluatie van geavanceerde microbemonsteringstechnieken, met als doel een volume-efficiënte, analytisch robuuste bemonsteringsstrategie vast te stellen die compatibel is met premature pasgeborenen en translationele implementatie.

Het prenatale onderdeel van dit proefschrift onderzocht de metabolomics profielen van maternale urine op het klinisch beslissende moment van een vermoedelijke dreigende vroeggeboorte, wanneer verloskundige beslissingen moeten worden genomen ondanks aanzienlijke diagnostische onzekerheid. In hoofdstuk II werden gevallen van dreigende vroeggeboorte retrospectief geclassificeerd als niet-infectieuze vroeggeboorte, infectieuze vroeggeboorte met histologische chorioamnionitis of voldragen geboorte. Deze onderzoeksopzet weerspiegelde de ambiguïteit van de klinische praktijk en maakte een mechanistische vergelijking tussen etiologische subtypen mogelijk. Vergelijkende metabolomics profilering bracht duidelijke biologische patronen aan het licht die verband houden met spontane vroeggeboorte. Niet-infectieuze vroeggeboorte werd gekenmerkt door metabole kenmerken die consistent zijn met oxidatieve stress en verminderde regulatie van de ontsteking. Reeds op het moment van klinische verdenking vertoonde deze groep een duidelijke afwijking ten opzichte van profielen bij voldragen zwangerschappen, wat wijst op een onderscheidbare pathofysiologische toestand. Daarentegen vertoonde infectieuze vroeggeboorte metabole profielen die grotendeels overlapt met die van voldragen zwangerschappen op het moment van verdenking, hetgeen duidt op activering van gemeenschappelijke ontstekingsroutes die vaak voorkomen bij het begin van de bevalling. Bovendien werden etiologie-onafhankelijke metabolieten geïdentificeerd in alle gevallen van vroeggeboorte, wat inzicht gaf in downstream metabole processen die samenhangen met het voortijdig begin van de bevalling en potentiële biomarkers opleveren voor nauwkeurigere risicostratificatie.

Het postnatale deel van dit proefschrift richtte zich op laat optredende sepsis bij premature pasgeborenen, een belangrijke oorzaak van morbiditeit en mortaliteit en een belangrijke determinant van blootstelling aan antibiotica op de neonatale intensive care. In hoofdstuk III werd gerichte metabolomics technieken toegepast om metabole veranderingen geassocieerd met infectie-gedreven systemische ontsteking te karakteriseren en om sepsis te onderscheiden van niet-infectieuze systemische ontsteking (SINS). De analyse werd uitgevoerd op bloedplasmamonsters uit de biobank die verkregen waren tijdens routinematige klinische zorg. Hierdoor konden de ziektemechanismen worden onderzocht zonder extra bemonsteringslast voor de premature neonaten. De dataset omvatte een aanzienlijke klinische heterogeniteit, waaronder gezonde controles, SINS-gevallen en zowel kweekpositieve als kweeknegatieve sepsisgevallen, met representatie van beide geslachten en infecties veroorzaakt door verschillende bacteriële pathogenen. Metabolomics profilering identificeerde zowel gedeelde als onderscheidende metabole veranderingen in het spectrum van controle tot SINS tot sepsis. Verschillende metabolieten waren op vergelijkbare wijze ontregeld bij SINS en sepsis, wat wijst op overlappende metabole reacties op systemische ontsteking, ongeacht de onderliggende oorzaak. Bovendien vertoonden subsets van metabolieten progressieve veranderingen van controlegroep naar SINS naar sepsis, wat overeenkomt met een toenemende ernst van metabole ontregeling. Daarnaast werden sepsis specifieke metabole veranderingen waargenomen, wat inzicht biedt in de pathofysiologie van sepsis en veelbelovende kandidaat-biomarkers oplevert. Verder werden geslacht specifieke metabole profielen geïdentificeerd, waarbij mannelijke neonaten een pro-inflammatoir fenotype vertoonden en vrouwelijke neonaten een anti-inflammatoir fenotype, wat wijst op een biologische basis voor een op geslacht afgestemde klinische behandeling. Eveneens benadrukten uiteenlopende metabole responsen op grampositieve en gramnegatieve bacteriële sepsis het potentieel van metabolomics profielen van de gastheer voor vroege identificatie van pathogenen en gerichte therapieën. Ten slotte toonde de integratie van metabole en inflammatoire markers in één diagnostisch panel het potentieel van metabolomics om de tijdigheid en nauwkeurigheid van de sepsisdiagnostiek te verbeteren.

Dit proefschrift ging verder in op methodologische uitdagingen bij het genereren van hoogwaardige moleculaire gegevens uit bloedmonsters met een laag volume, met de nadruk op microbemonsteringsmethoden. Hoofdstuk IV bevatte een uitgebreid overzicht van recente ontwikkelingen in microbemonsteringstechnologieën voor bloed en hun toepassingen. Het overzicht beschreef een verschuiving van conventionele flebotomie naar minimaal invasieve bemonsteringsmethoden die aanzienlijk minder bloedvolume vereisen. Er werd een breed scala aan gedroogde en vloeibare microbemonsteringstechnologieën besproken, evenals technologische ontwikkelingen die gericht zijn op het verbeteren van de volumetrische nauwkeurigheid, analytische betrouwbaarheid, gebruiksvriendelijkheid en

monsterintegriteit. De besproken technologieën varieerden van traditionele DBS tot nieuwere vormen die zijn ontwikkeld om beperkingen zoals hematocriet-gerelateerde variabiliteit te ondervangen. Hieronder vielen onder meer volumetrische DBS-apparaten, gedroogde plasma-gebaseerde formaten, dried blood spheroids, Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) en microtube-gebaseerde liquid microsampling. Verder beschreef het overzicht dat de klinische implementatie van microbemonsteringstechnologieën beperkt blijft, ondanks het toenemende gebruik in meerdere onderzoeksvelden, waaronder farmacokinetiek, therapeutische medicijnmonitoring en biomarkeronderzoeken. Vanuit neonataal perspectief benadrukte het onderzoek dat veel commercieel verkrijgbare microbemonsteringssystemen nog steeds afhankelijk zijn van lancet gebaseerde afname, waardoor de vermindering van pijn door de procedure en weefseltrauma beperkt is. Technologieën gebaseerd op micronaalden werden geïdentificeerd als een veelbelovend alternatief, hoewel de huidige commerciële oplossingen grotendeels geoptimaliseerd voor volwassenen en nog steeds beperkingen vertonen.

Voortbouwend op deze methodologische context, werd in hoofdstuk V VAMS experimenteel geëvalueerd als alternatief voor DBS om signaallipide gericht te kunnen analyseren. VAMS maakt het mogelijk om monsters af te nemen met een vast volume onafhankelijk van hematocriet, terwijl de praktische voordelen van DBS behouden blijven. Met behulp van een aangepast extractieprotocol, afgeleid van een gevalideerde plasmamethode, werd VAMS systematisch vergeleken met DBS en volbloedmonsters. Er werd gekeken naar belangrijke analytische parameters, waaronder precisie, opbrengst, matrixeffecten, overeenstemming met endogene metaboliëtniveaus en korte termijn stabiliteit. VAMS bleek de beste analytische precisie te hebben ten opzichte van zowel DBS als volbloed en vertoonde een betere overeenstemming met de metaboliëtniveaus in volbloed in vergelijking met DBS, wat de geschiktheid ervan voor reproduceerbare signaal lipide metingen met een laag volume ondersteunt. De extractie opbrengst percentages voor VAMS waren matig en grotendeels vergelijkbaar met DBS voor de meeste lipidenklassen, terwijl ze consequent hoger waren dan die voor volbloed. De matrixeffecten waren vergelijkbaar voor VAMS, DBS en volbloed. Op korte termijn bleven de metaboliëtniveaus relatief stabiel, daarentegen leidde langdurige opslag tot uitgesproken veranderingen van verschillende lipiden. Samenvattend, bevestigden de bevindingen dat VAMS een veelbelovend alternatief is voor DBS voor analytisch robuust metabolomics onderzoek bij premature pasgeborenen.

Het laatste hoofdstuk VI vat de belangrijkste bevindingen van de voorgaande hoofdstukken over het onderzoek samen, reflecteert op hun bijdrage aan het aanpakken van kritieke uitdagingen in de zorg voor premature baby's, erkent methodologische en interpretatieve beperkingen en schetst een toekomstperspectief. Het sluit af met een bredere kijk op de implicaties van dit werk en plaatst het in de bredere context van onderzoek naar premature

neonaten, diagnostische innovatie en de klinische vertaling. Het werk dat in dit proefschrift wordt gepresenteerd, herdefinieert de grenzen van de mogelijkheden in zowel de klinische zorg als het wetenschappelijk onderzoek naar premature neonaten herdefinieert. Door zowel complexe pathofysiologische mechanismen te ontrafelen om precisiediagnostiek en -behandeling te verbeteren, als kritisch te kijken naar de ethische en praktische wijze waarop deze kennis wordt verkregen, verschuift de focus van het accepteren van klinische beperkingen naar het actief herdefiniëren ervan. Deze gelijktijdige vooruitgang in wetenschappelijke diepgang en praktische haalbaarheid positioneert het proefschrift niet alleen als een kennisbijdrage, maar ook als een transformatief kader dat laat zien hoe toekomstig onderzoek bij kwetsbare populaties zowel wetenschappelijk rigoureus als ethisch verantwoord kan worden uitgevoerd. Uiteindelijk bevordert dit proefschrift de visie op een toekomst waarin het overleven van de allerkleinsten niet alleen gaat om in leven blijven, maar ook om het waarborgen van een gezonde ontwikkeling en een langdurige kwaliteit van leven.