



Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη μεταβολικού αποτυπώματος μητρικού γάλακτος με
φασματοσκοπία NMR και πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση**

MSc Thesis

**Study of metabolic footprint of breast milk by NMR
spectroscopy and multivariate statistical analysis**

Διευθυντής

Καθ. Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων (ΠΑ.Δ.Α) Ιωάννης Τσάκνης

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ/NAME OF STUDENT

Άλκηστη Αφράτη

Alkisti Afrati

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Ζουμπουλάκης Παναγιώτης

Zoumpoulakis Panagiotis

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2021



Faculty of Food Sciences
Department of Food Science and Technology

Master of Science
FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY

MSc Thesis

**Study of metabolic footprint of breast milk by NMR
spectroscopy and multivariate statistical analysis**

NAME OF STUDENT

Alkisti Afrati

alkistiafrati@gmail.com

NAME OF THE SUPERVISOR

Zoumpoulakis Panagiotis

AIGALEO 2021

Έγινε δεκτή

Ο Διευθυντής του ΠΜΣ:

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο **‘Μελέτη μεταβολικού αποτυπώματος μητρικού γάλακτος με φασματοσκοπία NMR και πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση’** που παρουσιάστηκε από την **Άλκηστη Αφράτη**, υποψήφιας για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών στην **ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ** και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

25/06/2021

Όνομα επιβλέποντος

Ζουμπουλάκης Παναγιώτης

Ημερομηνία

25/06/2021

Όνομα μέλους επιτροπής

Σινάνογλου Βασιλεία

Ημερομηνία

25/06/2021

Όνομα μέλους επιτροπής

Χούχουλα Δήμητρα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας

Η κάτωθι υπογεγραμμένη **Αφράτη Άλκηστη** του **Γεωργίου** με αριθμό μητρώου **19001** φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών **Καινοτομία, Ποιότητα και Ασφάλεια Τροφίμων** του Τμήματος **Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων** της Σχολής **Επιστημών Τροφίμων** του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Δεν επιθυμώ την απαγόρευση πρόσβασης στο πλήρες κείμενο της εργασίας μου.

Η Δηλούσα



Άλκηστη Αφράτη

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής, αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Άλκηστη Αφράτη

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Αν. Καθηγητή Παναγιώτη Ζουμπουλάκη για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου με την ανάθεση αυτού του ιδιαίτερα ενδιαφέροντος θέματος, καθώς και για την υποστήριξη που μου προσέφερε με τις εύστοχες προτάσεις και παρατηρήσεις του. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον μεταδιδακτορικό ερευνητή Γεώργιο Μώρο για τη βοήθεια που μου παρείχε σχετικά με την κατανόηση των φασμάτων NMR και τη χρήση του λογισμικού Mnova 6.0.2 για την επεξεργασία τους. Η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας δε θα ήταν δυνατή, χωρίς τη συνεισφορά του υποψήφιου διδάκτορα Σωτήρη Ουζούνη στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων, τον οποίο και ευχαριστώ ιδιαίτερα. Η συνεργασία μαζί του με βοήθησε να κατανοήσω τα γραφήματα της πολυμεταβλητής ανάλυσης και να ερμηνεύσω τα αποτελέσματά της.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου, ιδιαίτερα για την ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν, τόσο κατά τη διάρκεια εκπόνησης της συγκεκριμένης εργασίας, όσο και κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Το μητρικό γάλα αποτελεί ένα εξαιρετικά περίπλοκο και μεταβλητό βιολογικό υγρό και έχει μεγάλη θρεπτική και ανοσολογική αξία για το νεογνό. Ειδικότερα το πρωτόγαλα έχει κυρίως ανοσολογικό ρόλο προστατεύοντας το βρέφος, καθώς μεταβαίνει από το σχετικά στείρο περιβάλλον της μήτρας, σε ένα περιβάλλον με παθογόνους μικροοργανισμούς και περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις ολιγοσακχαριτών και πολλούς αυξητικούς παράγοντες, που είναι σημαντικοί για τη διατροφή, την ανάπτυξη του νεογνού και του προσφέρουν παθητική ανοσία. Η ανάλυση της σύνθετης και δυναμικής σύστασης του μητρικού γάλακτος και των παραγόντων που την επηρεάζουν, αποτελεί μία ερευνητική πρόκληση και ένα πεδίο μεγάλου ενδιαφέροντος.

Η παρούσα διπλωματική εργασία, έχει ως στόχο τη συγκριτική μελέτη του μεταβολικού αποτυπώματος του πρωτογάλακτος, που προέρχεται από υγιείς μητέρες τελειόμηνων νεογνών, με διαφορετικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και διατροφικές συνήθειες. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν φάσματα πρωτονίου πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) από μεταβολομική μελέτη στα δείγματα πρωτογάλακτος, που είχε διεξαχθεί σε προηγούμενο στάδιο. Συγκεκριμένα, η παρούσα μελέτη περιλαμβάνει την ομαδοποίηση δεδομένων ερωτηματολογίου, που είχε συμπληρωθεί κατά τη λήψη του βιολογικού υλικού από τις μητέρες, την επεξεργασία των φασμάτων NMR που ελήφθησαν από τα δείγματα και την πολυμεταβλητή ανάλυση στη μήτρα δεδομένων που προέκυψε. Η πολυμεταβλητή ανάλυση αποσκοπούσε στην εύρεση τυχόν διαφορών, τάσεων και συσχετίσεων μεταξύ των δειγμάτων, την επισήμανση των φασματικών περιοχών και κατά συνέπεια των μεταβολιτών που συμβάλλουν κυρίως σε αυτές τις διαφορές και την κατασκευή ενός προγνωστικού μοντέλου, για τη σωστή ταξινόμηση νέων δειγμάτων.

Από την πολυμεταβλητή ανάλυση προέκυψε μία φυσική τάση διαχωρισμού των δειγμάτων σε δύο ομάδες και με βάση αυτήν αναγνωρίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν οι μεταβολίτες που υπήρχαν στις δύο ομάδες. Επίσης προέκυψε ένα επικυρωμένο στατιστικό μοντέλο διάκρισης OPLS-DA με $Q^2=0,64$ και $R^2=0,73$, που υποδηλώνουν την καλή ικανότητα πρόβλεψης και προσαρμογής του μοντέλου αντίστοιχα. Η ταυτοποίηση των φασμάτων, οδήγησε στον ποσοτικό προσδιορισμό 26 μεταβολιτών, με στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις σχετικές τους συγκεντρώσεις μεταξύ των δύο ομάδων. Ακολούθησε νέα πολυμεταβλητή ανάλυση από τις σχετικές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών για το κάθε δείγμα, από την οποία προέκυψε ένα επικυρωμένο μοντέλο

διάκρισης OPLS-DA, με πολύ καλή ικανότητα πρόβλεψης και προσαρμογής ($Q^2=0,93$ και $R^2=0,94$). Με τη βοήθεια ενός διαγράμματος σημαντικότητας (VIP Plot), προσδιορίστηκαν οι μεταβολίτες ομοβανιλικό οξύ, 2-οξοϊσοβαλερικό οξύ, θρεονικό οξύ, L-σερίνη, D-φρουκτόζη, D-γλυκόζη, γλυκολικό οξύ, ιππουρικό οξύ, γλυκερικό οξύ και L-λευκίνη, οι οποίοι είχαν τη μεγαλύτερη επίδραση στη διάκριση των ομάδων του μοντέλου αυτού. Από τους μεταβολίτες αυτούς, προσδιορίστηκαν τα μεταβολικά μονοπάτια που επηρεάζονται και τα οποία περιλαμβάνουν τη βιοσύνθεση και αποικοδόμηση βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης, το μεταβολισμό γλυκοξυλικού και δικαρβοξυλικού οξέος, το μεταβολισμό γλυκίνης, σερίνης και θρεονίνης και τη βιοσύνθεση του αμινοάκυλο-tRNA. Τέλος, πραγματοποιήθηκε μονομεταβλητή ανάλυση για τους 26 μεταβολίτες, σε σχέση με τις ομάδες που προέκυψαν από τις απαντήσεις και ομαδοποιήσεις του ερωτηματολογίου και διαπιστώθηκε η ύπαρξη μεταβολιτών, που έχουν μεγαλύτερη επίδραση στο διαχωρισμό μεταξύ δύο ομάδων του ερωτηματολογίου, χωρίς όμως να είναι δυνατή η γενίκευση των αποτελεσμάτων και των σχετικών παρατηρήσεων.

Συμπερασματικά, η φυσική τάση διαχωρισμού των μελών του δειγματοχώρου μας σε δύο ομάδες, δεν μπόρεσε να συσχετιστεί με τις απαντήσεις του ερωτηματολογίου και έτσι πιθανά να οφείλεται σε άλλες παραμέτρους, οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελέσουν βάση, για διατύπωση νέων ερευνητικών ερωτημάτων.

Λέξεις-Κλειδιά: Πρωτόγαλα, Μητρικό γάλα, Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, Μεταβολομική, Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση

Abstract

Breast milk is an extremely complex and variable biological fluid and has great nutritional and immunological value for the newborn. Colostrum in particular has a major immune role in protecting the infant as it transitions from the relatively sterile environment of the womb to an environment with pathogenic microorganisms and contains high concentrations of oligosaccharides and many growth factors, which are important for nutrition, neonatal development and immunity. The analysis of the complex and dynamic composition of breast milk and the factors that affect it, is a research challenge and a field of great interest.

The aim of this master thesis is the comparative study of the metabolic footprint of colostrum, derived from healthy mothers of full-term infants, with different anthropometric characteristics and dietary habits. For this reason, ^1H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra were processed, taken from a previous metabolic study in colostrum samples. Specifically, the present study includes the data processing from questionnaires completed during maternal colostrum collection, NMR spectral processing of the samples, and the multivariate analysis in the resulting data matrix. The multivariate analysis aimed at finding putative differences, trends and correlations between the samples highlighting the spectral regions and consequently the metabolites that contribute mainly to these differences and constructing a predictive model for the correct classification of new samples.

The multivariate analysis revealed a clear clustering of the samples into two groups. Specifically, a validated OPLS-DA model emerged with a relatively good goodness of fit ($R^2=0.73$) and a good predictive ability ($Q^2=0.64$). The spectral interpretation and assignment led to the quantification of 26 metabolites with statistically significant differences in their relative concentrations between the two clusters. Based on the relative concentrations of the metabolites for each sample, a new validated OPLS-DA model was generated with very good goodness of fit ($R^2=0.94$) and predictive ability ($Q^2=0.93$). With the use of a Variable Importance Plot (VIP Plot), the metabolites homovannilic acid, 2-oxoisovaleric acid, threonic acid, L-serine, D-fructose, D-glucose, glycolic acid, hippuric acid, glyceric acid, L-leucine were determined, as those who had the greatest influence on the discrimination of the groups of this model. The metabolic pathways affected include the biosynthesis and degradation of valine, leucine and

isoleucine, the metabolism of glycoxylate and dicarboxylate, the metabolism of glycine, serine and threonine and the biosynthesis of aminoacyl-tRNA.

Finally, a univariate analysis was performed for the 26 metabolites in relation to the groups that emerged from the questionnaire derived groupings. Results indicated that although certain metabolites have a greater effect on the discrimination between the questionnaire groups, these observations cannot be transformed or extrapolated to more general assumptions. In conclusion, the clear discrimination of the samples of our data set into two clusters could not be linked to the answers of the questionnaire and is related to other parameters, which could be the basis for formulating new research questions.

Keywords: Colostrum, Breast milk, Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, Metabolomics, Multivariate statistical analysis

Συντμήσεις

BCAAs:	Αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας
BMI:	Δείκτης μάζας σώματος
CoA:	Συνένζυμο Α
HMO:	Ολιγοσακχαρίτης μητρικού γάλακτος
IQR:	Ενδοτεταρτημοριακό εύρος
NMR:	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
NPN:	Μη πρωτεϊνικό άζωτο
OPLS:	Ορθογώνια παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων
OPLS-DA:	Ορθογώνια παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση
PCA:	Ανάλυση κύριων συνιστωσών
PLS:	Παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων
PLS-DA:	Παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση
p-value:	Στατιστικός όρος σημαντικότητας
VIP:	Διάγραμμα σημαντικότητας

Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα μεταπτυχιακής εργασίας.....	IV
Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright	V
Ευχαριστίες.....	VI
Περίληψη.....	VII
Abstract.....	IX
Συντμήσεις.....	XI
Κατάλογος Πινάκων.....	XIV
Κατάλογος Εικόνων	XV
Εισαγωγή	1
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	4
Κεφάλαιο 1. Μητρικό γάλα.....	5
1.1 Σημασία	5
1.2 Σύσταση	5
1.2.1. Πρωτεΐνες.....	5
1.2.2. Μη πρωτεϊνικό άζωτο	7
1.2.3. Λιπίδια.....	8
1.2.4. Υδατάνθρακες	9
1.2.5. Βιταμίνες.....	11
1.2.6. Μέταλλα και ιχνοστοιχεία.....	13
1.3 Στάδια γαλουχίας και σύσταση.....	14
1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση	17
1.4.1 Ηλικία Μητέρας	18
1.4.2 Σωματικό βάρος και Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI).....	18
1.4.3 Αριθμός Τόκου.....	19
1.4.4 Συνθήκες υγείας	20
1.4.5 Εθνικότητα	20
1.4.6 Περιβαλλοντικοί παράγοντες.....	21
1.4.7 Διατροφή της μητέρας.....	21
Κεφάλαιο 2. Μεταβολομική και NMR.....	24

2.1 Έννοιες μεταβολομικής	24
2.2 Διαφορετικές προσεγγίσεις στη μεταβολομική	25
2.3 Αναλυτικές Τεχνικές.....	27
2.4 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)	27
2.4.1. Πλεονεκτήματα NMR στη μεταβολομική	28
2.4.2 Προ-επεξεργασία φασματικών δεδομένων NMR.....	28
2.5 Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση.....	32
2.5.1. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA).....	33
2.5.2. Παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) και ορθογώνια παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS)	33
2.5.3 Επικύρωση των μοντέλων.....	34
2.6 Μεταβολομική στο μητρικό γάλα με φασματοσκοπία ^1H NMR.....	35
B. ΣΚΟΠΟΣ	41
Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	42
Κεφάλαιο 3. Μεταβολομική μελέτη δειγμάτων πρωτογάλακτος.....	43
3.1 Ομαδοποίηση Δεδομένων Ερωτηματολογίου	44
3.2 Προ-επεξεργασία των φασμάτων NMR	48
3.3 Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση.....	49
3.3.1 Ανάλυση με βάση τις ομάδες του ερωτηματολογίου	50
3.3.2 Μελέτη του συνόλου του Δειγματοχώρου	54
3.3.3 OPLS-DA για τις ομάδες 1 ^{ου} -2 ^{ου} και 3 ^{ου} -4 ^{ου} τεταρτημορίου	56
Κεφάλαιο 4. Αναγνώριση και διερεύνηση μεταβολιτών	58
4.1 Αναγνώριση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών	58
4.1.1 Θηκογράμματα (boxplots) των στατιστικώς σημαντικών μεταβολιτών.....	60
4.1.2 Φάσματα NMR με τους στατιστικώς σημαντικούς μεταβολίτες.....	64
4.2 Πολυμεταβλητή ανάλυση με βάση τις σχετικές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών ..	68
Κεφάλαιο 5. Μονομεταβλητή ανάλυση μεταβολιτών με βάση τις ομαδοποιήσεις του ερωτηματολογίου.....	86
5.1 Πίνακες αληθείας για παραμέτρους του ερωτηματολογίου.....	86
5.2 Ανάλυση μεταβολιτών και μεταβολικών μονοπατιών	89
Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα και προτάσεις για περαιτέρω έρευνα	111
Βιβλιογραφία	117

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Απαντήσεις ερωτηματολογίου	46
Πίνακας 2: Απαντήσεις ερωτηματολογίου με βάση τις ομαδοποιήσεις.....	47
Πίνακας 3: Τιμές προσαρμοστικότητας και ικανότητας πρόβλεψης των μοντέλων για επιλεγμένες ομάδες του ερωτηματολογίου	53
Πίνακας 4: Στοιχεία ερωτηματολογίου για τους 6 outliers	55
Πίνακας 5: Αναγνώριση μεταβολιτών στις ομάδες A και B	58
Πίνακας 6: Μεταβολίτες που αναγνωρίστηκαν και έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις σχετικές τους συγκεντρώσεις μεταξύ των δειγμάτων της Ομάδας A και της Ομάδας B και οι χημικές τους μετατοπίσεις (ppm)	66
Πίνακας 7: Μεταβολίτες που αναγνωρίστηκαν και έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις σχετικές τους συγκεντρώσεις μεταξύ των δειγμάτων της Ομάδας A και της Ομάδας B και οι χημικές τους μετατοπίσεις (ppm)	68
Πίνακας 8: Αποτελέσματα ανάλυσης μεταβολικών μονοπατιών από το MetaboAnalyst .	73
Πίνακας 9: Πίνακας αληθείας για την παράμετρο ψάρι και τις ομάδες «1-3 φ/εβ» και «ποτέ/σπάνια»	87
Πίνακας 10: Πίνακας αληθείας για την παράμετρο κρέας και τις ομάδες «1-2 φ/εβ» και «σπάνια».....	87
Πίνακας 11: Πίνακας αληθείας για την παράμετρο κρέας και τις ομάδες «3-7 φ/εβ» και «σπάνια».....	88
Πίνακας 12: Πίνακας αληθείας για την παράμετρο γάλα και τις ομάδες «1 ποτ/ημ» και «ποτέ».....	88
Πίνακας 13: Πίνακας αληθείας για την παράμετρο όσπρια και τις ομάδες «1-2 φ/μην» και «σπάνια/ποτέ»	89
Πίνακας 14: Πίνακας αληθείας για την παράμετρο αυγά και τις ομάδες «3-7 φ/εβ» και «σπάνια/ποτέ»	89

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Διαφορετικές μεταβολομικές προσεγγίσεις (Vignoli, et al., 2019).....	26
Εικόνα 2: Βασικά βήματα προ-επεξεργασίας NMR φασμάτων: 1.Διόρθωση γραμμής βάσης, διόρθωση φάσης, βαθμονόμηση ως προς σημείο αναφοράς, 2.Κανονικοποίηση, 3. Τμηματοποίηση. (Vignoli, et al., 2019).....	31
Εικόνα 3: Φάσμα NMR δείγματος 5 και κορυφή αναφοράς πριν την προ-επεξεργασία ...	48
Εικόνα 4: Φάσμα NMR δείγματος 5 και κορυφή αναφοράς μετά την προ-επεξεργασία...	48
Εικόνα 5: Κοινό φάσμα αναφοράς στο οποίο έχουν αποκοπεί τα τμήματα χωρίς πληροφορία.....	49
Εικόνα 6: PCA (πάνω) και OPLS-DA (κατω) για τα δείγματα επιλεγμένων ομάδων (Α: Ηλικία, Β: BMI, Γ: Αυγά, Δ: Όσπρια,Ε: Κρέας) του ερωτηματολογίου	52
Εικόνα 7: PCA scores plot για όλο το δειγματοχώρο.....	54
Εικόνα 8: Απεικόνιση των έκτροπων τιμών (outliers)	54
Εικόνα 9: PCA scores plot μετά την αφαίρεση των outliers	55
Εικόνα 10: Χρωματισμένο PCA ως προς τις ομάδες Α και Β.....	56
Εικόνα 11: Μοντέλο OPLS-DA για τις ομάδες Α και Β	56
Εικόνα 12: Επικύρωση του μοντέλου μέσω ανάλυσης μετάθεσης (permutation test).....	57
Εικόνα 13: Θηκογράμματα των σχετικών συγκεντρώσεων των 26 μεταβολιτών με στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ Ομάδας Α και Ομάδας Β.	63
Εικόνα 14: NMR φάσμα του δείγματος 63 που σύμφωνα με το PCA μοντέλο, ανήκει στην ομάδα δειγμάτων της Α ομάδας (1 ^{ου} -2 ^{ου} τεταρτημορίου)	65
Εικόνα 15: NMR φάσμα του δείγματος 89 που σύμφωνα με το PCA μοντέλο, ανήκει στην ομάδα δειγμάτων της Β ομάδας (3 ^{ου} -4 ^{ου} τεταρτημορίου)	67
Εικόνα 16: PCA scores plot με την κατανομή των δειγμάτων όπως προέκυψε από τη νέα μήτρα δεδομένων.....	69
Εικόνα 17: Scores Plot του PLS-DA μοντέλου για τα δείγματα των Ομάδων Α και Β ως προς τη νέα μήτρα δεδομένων.....	69
Εικόνα 18: Επικύρωση του μοντέλου PLS-DA μέσω ανάλυσης μετάθεσης (permutation test)	70
Εικόνα 19: Scores Plot του OPLS-DA μοντέλου για τα δείγματα των Ομάδων Α και Β ως προς τη νέα μήτρα δεδομένων.....	70
Εικόνα 20: Επικύρωση του μοντέλου OPLS-DA μέσω ανάλυσης μετάθεσης (permutation test)	71

Εικόνα 21: Διάγραμμα σημαντικότητας VIP Plot για το μοντέλο OPLS-DA	72
Εικόνα 22: Σύνοψη της ανάλυσης μεταβολικών μονοπατιών για τους 10 μεταβολίτες του διαγράμματος VIP	73
Εικόνα 23: Θηκόγραμμα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του ομοβανιλλικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα του θηκογράμματος	74
Εικόνα 24: Σχηματισμός ομοβανιλλικού οξέος από ντοπαμίνη και ρουτίνη (Combet, et al., 2011).....	75
Εικόνα 25: Θηκόγραμμα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του α-κετοϊσοβαλερικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα του θηκογράμματος.....	75
Εικόνα 26: Καταβολισμός αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας. Το α-κετοϊσοβαλερικό οξύ προκύπτει από τον καταβολισμό της βαλίνης (Gorissen & Phillips, 2019)	77
Εικόνα 27: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της λευκίνης στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	77
Εικόνα 28: Θηκόγραμμα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της σερίνης στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα του θηκογράμματος.....	78
Εικόνα 29: Σύνθεση και καταβολισμός γλυκίνης και σερίνης (Emery, 2013).....	79
Εικόνα 30: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της γλυκόζης στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	80
Εικόνα 31: Θηκόγραμμα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του θρεονικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα του θηκογράμματος.....	81
Εικόνα 32: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλυκολικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	81
Εικόνα 33: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του ιππουρικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	82
Εικόνα 34: Σύνθεση ιππουρικού από βενζοϊκό και γλυκίνη (Nelson & Cox, 2004).....	83

Εικόνα 35: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλυκερικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	83
Εικόνα 36: Μεταβολικό μονοπάτι γλυκερικού οξέος (Dimer, et al., 2015).....	84
Εικόνα 37: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της φρουκτόζης στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	85
Εικόνα 38: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλυκερικού οξέος στις ομάδες 1-2φ/εβ (κόκκινο) και σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση κρέατος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	90
Εικόνα 39: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της φρουκτόζης στις ομάδες 3-7φ/εβ (κόκκινο) και σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση κρέατος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων	91
Εικόνα 40: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της ορνιθίνης στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	92
Εικόνα 41: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της ορνιθίνης στις ομάδες 1-2φ/εβ (κόκκινο) και σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση κρέατος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων	92
Εικόνα 42: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της ορνιθίνης στις ομάδες 3-7φ/εβ (κόκκινο) και σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση κρέατος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων	93
Εικόνα 43: Κύκλος Ουρίας (Berg, et al., 2014).....	94
Εικόνα 44: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλυκουρονικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων	94
Εικόνα 45: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλυκουρονικού οξέος στις ομάδες 1-3φ/εβ (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση ψαριού και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	95
Εικόνα 46: Σύνθεση UDP-γλυκουρονικού οξέος (Bhagavan & Ha, 2015).....	96

Εικόνα 47: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του δεϋδροασκορβικού οξέος στις ομάδες Α και Β και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων	96
Εικόνα 48: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του δεϋδροασκορβικού οξέος στις ομάδες 1-3φ/εβ (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση ψαριού και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	97
Εικόνα 49: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του δεϋδροασκορβικού οξέος στις ομάδες 3-7φ/εβ (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση αυγών και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	98
Εικόνα 50: Το ασκορβικό οξύ και προϊόντα οξειδώσής του (Morrissey & Hill, 2011).....	99
Εικόνα 51: Μεταβολικά μονοπάτια του ασκορβικού οξέος (Kavkova, et al., 2018).....	100
Εικόνα 52: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της μυο-ινοσιτόλης στις ομάδες Α και Β και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	100
Εικόνα 53: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της μυο-ινοσιτόλης στις ομάδες 1ποτ/ημ (κόκκινο) και ποτέ (πράσινο) ως προς την κατανάλωση γάλακτος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων	101
Εικόνα 54: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της μυο-ινοσιτόλης στις ομάδες 3-7φ/εβ (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση αυγών και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	101
Εικόνα 55: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της 3-Μεθυλοξανθίνης στις ομάδες Α και Β και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων	103
Εικόνα 56: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της 3-Μεθυλοξανθίνης στις ομάδες 1-2φ/μην (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση οσπρίων και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	104
Εικόνα 57: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της 3-Μεθυλοξανθίνης στις ομάδες 3-7φ/εβ (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την	

κατανάλωση αυγών και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	104
Εικόνα 58: Οι βιοσυνθετικές οδοί της καφεΐνης από την ξανθοσίνη (Fredholm, 2011)..	106
Εικόνα 59: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλουταμινικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων	106
Εικόνα 60: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλουταμινικού οξέος στις ομάδες 1ποτ/ημ (κόκκινο) και ποτέ (πράσινο) ως προς την κατανάλωση γάλακτος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	107
Εικόνα 61: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλουταμινικού οξέος στις ομάδες 1-2φ/μη (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση οσπρίων και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	108
Εικόνα 62: Μεταβολικά προϊόντα γλουταμίνης (Tapiero, et al., 2002)	109
Εικόνα 63: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του ισοβαλερικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων	109
Εικόνα 64: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του ισοβαλερικού οξέος στις ομάδες 1ποτ/ημ (κόκκινο) και ποτέ (πράσινο) ως προς την κατανάλωση γάλακτος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων.....	110

Εισαγωγή

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, με τίτλο «Καινοτομία, Ποιότητα και Ασφάλεια Τροφίμων», στο τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής και αφορά τη συγκριτική μελέτη του μεταβολικού αποτυπώματος του πρωτογάλακτος, από μητέρες με διαφορετικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και διατροφικές συνήθειες. Η ανάπτυξη του θέματος πραγματοποιείται σε δύο μέρη, στο θεωρητικό και στο πειραματικό μέρος.

Το θεωρητικό μέρος αποτελείται από δύο κεφάλαια. Το πρώτο κεφάλαιο αφορά στο μητρικό γάλα, τη σύστασή του, τα τρία στάδια γαλουχίας και τους παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη σύστασή του, με αναφορές σε μελέτες που έχουν γίνει έως τώρα. Συγκεκριμένα, σχετικά με τη σύσταση του μητρικού γάλακτος, γίνεται ανάπτυξη των μακρομορίων που συμβάλλουν στη θρεπτική και ανοσολογική αξία του μητρικού γάλακτος και τα οποία είναι οι πρωτεΐνες, το μη πρωτεϊνικό άζωτο, τα λιπίδια, οι υδατάνθρακες, οι βιταμίνες και τα μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Παρουσιάζονται τα τρία στάδια γαλουχίας, τα οποία είναι το πρωτόγαλα, το μεταβατικό και το ώριμο γάλα και γίνεται σύγκριση της σύστασης του μητρικού γάλακτος στα τρία αυτά στάδια, ως προς τη φύση των συστατικών του και τις σχετικές τους αναλογίες. Τέλος, αναφέρονται παράγοντες, που έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζουν τη σύσταση του μητρικού γάλακτος και ειδικότερα αναπτύσσεται η επίδραση της ηλικίας της μητέρας, του δείκτη μάζας σώματος, του αριθμού τόκου, των συνθηκών υγείας, της εθνικότητας της μητέρας, των περιβαλλοντικών παραγόντων και της διατροφής της μητέρας, στα διάφορα συστατικά του μητρικού γάλακτος.

Στο δεύτερο κεφάλαιο του θεωρητικού μέρους, εμπεριέχεται ο ορισμός και οι διαφορετικές προσεγγίσεις της μεταβολομικής μελέτης, παρουσιάζονται οι αναλυτικές τεχνικές, που χρησιμοποιούνται σε μεταβολομικές εφαρμογές και γίνεται εκτενέστερη ανάπτυξη του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), αναπτύσσονται μέθοδοι πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης, καθώς και η μέχρι τώρα εφαρμογή της μεταβολομικής με NMR στο μητρικό γάλα. Συγκεκριμένα, παρουσιάζονται οι δύο διαφορετικές προσεγγίσεις για την ανίχνευση μεταβολιτών, η μη στοχευμένη ανάλυση (untargeted analysis), η οποία παρέχει μια συνολική εικόνα ενός δείγματος, με την ανάλυση μετρήσιμων μεταβολιτών, για τους οποίους δεν υπάρχει προηγούμενη γνώση της φύσης ή της ταυτότητάς τους και η στοχευμένη ανάλυση (targeted analysis), η οποία αναφέρεται στην παρακολούθηση μιας ομάδας μεταβολιτών που έχουν επιλεγεί εκ των

προτέρων, με βάση γνωστές μεταβολικές οδούς ή ταυτοποιημένους βιοδείκτες. Αναφέρονται αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζονται στη μεταβολομική, αναπτύσσεται αναλυτικά η τεχνική NMR και διατυπώνονται τα πλεονεκτήματα της χρήσης της, στις μεταβολομικές μελέτες και τα στάδια προ-επεξεργασίας των φασματικών δεδομένων, που είναι απαραίτητα για το μετασχηματισμό των δεδομένων, σε μορφή κατάλληλη για επακόλουθες στατιστικές αναλύσεις. Η ανάπτυξη των μεθόδων πολυμεταβλητής ανάλυσης, περιλαμβάνει την παρουσίαση της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (PCA), στην περιοχή των μη επιβλεπόμενων μεθόδων ανάλυσης και την παρουσίαση της παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) και της ορθογώνιας παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS), στην περιοχή των επιβλεπόμενων μεθόδων ανάλυσης. Έπειτα αναλύονται, η διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation) και ο μεταθετικός έλεγχος αποκρίσεων (permutation test), ως μέθοδοι επικύρωσης της προσαρμοστικότητας και της ικανότητας πρόβλεψης των στατιστικών μοντέλων. Τέλος, παρατίθενται οι εφαρμογές της μεταβολομικής με NMR στο μητρικό γάλα, που σχετίζονται με τη σύνθετη και δυναμική σύστασή του και των παραγόντων που την επηρεάζουν.

Το πειραματικό μέρος περιλαμβάνει το τρίτο, τέταρτο, πέμπτο και έκτο κεφάλαιο της συγκριμένης εργασίας. Στο τρίτο κεφάλαιο αναπτύσσονται, ο τρόπος ομαδοποίησης των απαντήσεων των μητέρων, με βάση το ερωτηματολόγιο που συμπλήρωσαν, τα στάδια προ-επεξεργασίας των φασμάτων NMR, για εξαγωγή της μήτρας δεδομένων και γίνεται αναφορά στη διαδικασία της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης. Η δημιουργία των ομάδων, αποσκοπούσε στην εξασφάλιση ενός ικανοποιητικού αριθμού δειγμάτων σε κάθε ομάδα και στηρίχτηκε σε ποιοτικά χαρακτηριστικά, ο προσδιορισμός των οποίων ήταν σε άμεση συσχέτιση, με τους περιορισμούς και τις διατυπώσεις του ίδιου του ερωτηματολογίου. Μετά από την εφαρμογή των σταδίων προ-επεξεργασίας των φασμάτων NMR και έχοντας ως βάση την προκύπτουσα μήτρα δεδομένων, πραγματοποιήθηκε εφαρμογή μη επιβλεπόμενων και επιβλεπόμενων μεθόδων πολυμεταβλητής ανάλυσης στο δειγματοχώρο μας και παρατηρήθηκε τάση διαχωρισμού των δειγμάτων σε δύο ομάδες.

Το τέταρτο κεφάλαιο περιλαμβάνει, την αναγνώριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών, την πολυμεταβλητή ανάλυση με βάση τους μεταβολίτες και την μονομεταβλητή ανάλυση μεταβολιτών, σε σχέση με τις ομάδες του ερωτηματολογίου. Η αναγνώριση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των μεταβολιτών στις δύο ομάδες δειγμάτων, οδήγησε στον προσδιορισμό 26 μεταβολιτών, με στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις σχετικές τους συγκεντρώσεις μεταξύ των δύο ομάδων, καθώς

και στην απεικόνιση της κατανομής των τιμών τους σε θηκογράμματα. Την απεικόνιση μεταβολιτών κάθε ομάδας σε δύο αντίστοιχα χαρακτηριστικά φάσματα NMR, ακολούθησε η εφαρμογή μη επιβλεπόμενης και επιβλεπόμενης πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης στη μήτρα δεδομένων, που προέκυψε από τις σχετικές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών. Από την επιβλεπόμενη ανάλυση OPLS-DA, προέκυψε το διάγραμμα σημαντικότητας (VIP Plot) και προσδιορίστηκαν 10 μεταβολίτες, που είναι οι πιο σημαντικοί για το διαχωρισμό των δύο ομάδων. Σε συνέχεια της πολυμεταβλητής ανάλυσης, πραγματοποιήθηκε μονομεταβλητή ανάλυση για τους 26 μεταβολίτες και διαπιστώθηκε η ύπαρξη μεταβολιτών, που έχουν μεγαλύτερη επίδραση στο διαχωρισμό μεταξύ δύο ομάδων του ερωτηματολογίου.

Στο πέμπτο κεφάλαιο αναπτύσσονται, οι μεταβολίτες που παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική διαφορά και σημαντική επίδραση στο διαχωρισμό των δύο ομάδων και οι μεταβολίτες που βρέθηκαν να συμβάλλουν στο διαχωρισμό μεταξύ ομάδων του ερωτηματολογίου. Τα πειραματικά ευρήματα συσχετίστηκαν με τη βιβλιογραφία και συμπληρώθηκαν με την παρουσίαση των μεταβολικών μονοπατιών, όπως προέκυψαν από την πλατφόρμα MetaboAnalyst και αφορούσαν στους 10 στατιστικώς σημαντικούς μεταβολίτες.

Τέλος, στο έκτο κεφάλαιο διατυπώνονται, οι παρατηρήσεις και τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τα πειραματικά ευρήματα, σε συσχέτιση και με τις σχετικές βιβλιογραφικές αναφορές. Από τη συγκεκριμένη μελέτη, προέκυψε μία φυσική τάση διαχωρισμού των μελών του δειγματοχώρου μας σε δύο ομάδες, η οποία όμως δεν μπόρεσε να συσχετιστεί με τις απαντήσεις του ερωτηματολογίου και έτσι πιθανά να οφείλεται σε άλλες παραμέτρους, οι οποίες θα μπορούσαν να αποτελέσουν βάση για διατύπωση νέων ερευνητικών ερωτημάτων.

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 1. Μητρικό γάλα

1.1 Σημασία

Το μητρικό γάλα είναι ένα εξαιρετικά περίπλοκο και μεταβλητό βιολογικό υγρό, που περιέχει εκατοντάδες διαφορετικά συστατικά και έχει εξελιχθεί εδώ και χιλιετίες για να τρέφει τα νεογνά, με τον αποτελεσματικότερο δυνατό τρόπο. Περιέχει τις απαιτούμενες ποσότητες όλων των θρεπτικών ουσιών για την ανάπτυξη των βρεφών, κατά τους πρώτους τέσσερις με έξι μήνες της ζωής του, εφόσον η μητέρα είναι υγιής και έχει μία ισορροπημένη διατροφή (Sundekilde, et al., 2016). Παράλληλα, αποτελεί πηγή αυξητικών παραγόντων, ορμονών και άλλων βιοδραστικών συστατικών, ενώ συμβάλλει στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος του νεογνού. Επιπλέον, πολλά συστατικά στο μητρικό γάλα, βοηθούν στη διατήρηση της ακεραιότητας του μαστικού ιστού, βελτιστοποιώντας την παραγωγή και τη σύσταση του γάλακτος (Darragh & Lönnerdal, 2011).

1.2 Σύσταση

Το μητρικό γάλα αποτελείται από νερό, πρωτεΐνες, λίπος και τέφρα. Τα υδατοδιαλυτά συστατικά που βρίσκονται στην υδατική φάση αντιπροσωπεύουν το 87% του όγκου του γάλακτος, και περιλαμβάνουν ορισμένα άλατα, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία, λακτόζη, ολιγοσακχαρίτες, πρωτεΐνες ορού γάλακτος και συστατικά μη πρωτεϊνικού αζώτου (NPN). Η υπόλοιπη υδατική φάση είναι μια κολλοειδής διασπορά (0,3% του όγκου), που περιέχει πρωτεΐνες καζεΐνης σε μορφή μικκυλίων. Ένα επιπλέον 6% του όγκου του γάλακτος, αποτελείται από ένα γαλάκτωμα, που περιέχει λιπώδη σφαιρίδια, μεμβράνες λίπους, τριγλυκερίδια και άλλα συστατικά λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων των λιποδιαλυτών βιταμινών. Το υπόλοιπο αποτελείται από κυτταρικά συστατικά, μη πεπτιδικές ορμόνες και άλλα μικρά κλάσματα (Darragh & Lönnerdal, 2011). Η περιεκτικότητα σε τέφρα στο μητρικό γάλα είναι στο 0,2% (Guo, 2014).

Τα μακρομόρια που συμβάλλουν στη θρεπτική και ανοσολογική αξία του μητρικού γάλακτος, περιγράφονται παρακάτω.

1.2.1. Πρωτεΐνες

Περίπου 1% του μητρικού γάλακτος αποτελείται από πρωτεΐνες και πολλές από τις λειτουργικές του ιδιότητες, παρέχονται μέσω των πρωτεϊνών αυτών. Ένας από τους σημαντικότερους ρόλους των πρωτεϊνών γάλακτος, είναι η παροχή αμινοξέων απαραίτητων για την ανάπτυξη του νεογνού. Επίσης, μερικές από αυτές, παρέχουν στο

βρέφος ανοσοπροστασία, επηρεάζουν θετικά την ανάπτυξη της εντερικής μικροχλωρίδας και διευκολύνουν την πέψη και πρόσληψη άλλων θρεπτικών συστατικών του γάλακτος, όπως ο σίδηρος, το ασβέστιο και η βιταμίνη B₁₂ (Darragh & Lönnerdal, 2011), (Hendricks & Guo, 2014).

Οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στο μητρικό γάλα, μπορούν να χωριστούν σε δύο κλάσματα, με βάση τη διαλυτότητά τους: τις πρωτεΐνες ορού γάλακτος και τις πρωτεΐνες καζεΐνης. Συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος υπάρχουν με τη μορφή διαλύματος, ενώ οι καζεΐνες έχουν χαμηλή διαλυτότητα σε pH 4,0-5,0 και εμφανίζονται ως μικκύλια εναιωρημένα σε διάλυμα (Andreas, 2015).

Οι πρωτεΐνες που υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες στο κλάσμα ορού γάλακτος είναι, η α-λακταλβουμίνη, η αλβουμίνη ορού, που είναι οι κυριότερες πηγές αμινοξέων, η λακτοφερρίνη, η οποία δεσμεύει το σίδηρο και έχει βακτηριοστατικές ιδιότητες, η λυσοζύμη, που είναι ικανή να διασπά πρωτεογλυκάνες στο κυτταρικό τοίχωμα ορισμένων βακτηρίων, παρέχοντας αντιβακτηριακή δράση και οι ανοσοσφαιρίνες, με την ανοσοσφαιρίνη A (IgA) να είναι η κυρίαρχη μορφή, ακολουθούμενη από την ανοσοσφαιρίνη G (IgG).

Το μητρικό γάλα αποτελείται από δύο καζεΐνες, τη β- και την κ-καζεΐνη, ενώ στερείται της α-καζεΐνης, που κυριαρχεί στο βόειο γάλα. Η περιεκτικότητα σε καζεΐνη διαφέρει ανάλογα με το στάδιο της γαλουχίας, με την κ-καζεΐνη να ανιχνεύεται στο μητρικό γάλα, από την 3^η με 4^η ημέρα και έπειτα. Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό του μητρικού γάλακτος είναι, ο υψηλός βαθμός γλυκοζυλίωσης της κ-καζεΐνης, καθώς οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες εμφανίζουν αντιμολυσματικές ιδιότητες και ενισχύουν την απορρόφηση ορισμένων μικροθρεπτικών συστατικών. Ως μέρος της πεπτικής διαδικασίας, οι καζεΐνες στο μητρικό γάλα, απελευθερώνουν μικρότερα πεπτίδια στο έντερο, τα οποία ενισχύουν την απορρόφηση του ασβεστίου, διατηρώντας το σε μορφή διαλύματος. Άλλα πεπτίδια που προέρχονται από καζεΐνες, έχουν συνδεθεί με τη ρύθμιση της εντερικής κινητικότητας και με την ανάπτυξη ευεργετικών βακτηρίων στο έντερο του βρέφους.

Η αναλογία πρωτεϊνών ορού γάλακτος και πρωτεϊνών καζεΐνης, αλλάζει από 90:10 αμέσως μετά τον τοκετό, σε 60:40 στο ώριμο μητρικό γάλα και σε 50:50 προς το τέλος της γαλουχίας. Αυτό συμβαίνει καθώς, όσο αναπτύσσεται το ανοσοποιητικό σύστημα του βρέφους, τόσο μειώνεται η σύσταση σε ανοσολογικές πρωτεΐνες στο μητρικό γάλα (Darragh & Lönnerdal, 2011).

1.2.2. Μη πρωτεϊνικό άζωτο

Το κλάσμα μη πρωτεϊνικού αζώτου στο μητρικό γάλα, αντιπροσωπεύει το 20-25% του ολικού αζώτου, και περιλαμβάνει μόρια όπως, η ουρία, η κρεατίνη, η κρεατινίνη, το ουρικό οξύ, νουκλεοτίδια, μικρά πεπτίδια και ελεύθερα αμινοξέα. Το άζωτο ουρίας, αντιπροσωπεύει σχεδόν το 50% του μη πρωτεϊνικού αζώτου στο μητρικό γάλα και ένα μέρος αυτού χρησιμοποιείται από το βρέφος, για τη σύνθεση πρωτεϊνών (Darragh & Lönnerdal, 2011). Η κρεατίνη είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη του εγκεφάλου και απεκκρίνεται ως κρεατινίνη στα ούρα (Edison, et al., 2013). Τα νουκλεοτίδια, όπως η αδερίνη και κυτοσίνη, θεωρούνται απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την πρόωμη ζωή του βρέφους, και πολλά από αυτά εκτελούν βασικούς ρόλους σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, συμβάλλουν στην ανάπτυξη του γαστρεντερικού σωλήνα, της εντερικής χλωρίδας και της ανοσολογικής λειτουργίας (Andreas, et al., 2015).

Τα ελεύθερα αμινοξέα, αντιπροσωπεύουν το 8%–22% του κλάσματος μη πρωτεϊνικού αζώτου και το 5% –10% του κλάσματος των ολικών αμινοξέων στο μητρικό γάλα. Μετά την πρόσληψή τους, εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος νωρίτερα από τα αμινοξέα, που προέρχονται από πρωτεΐνες και έτσι η ταχεία απορρόφησή τους, συμβάλλει σημαντικά στις αρχικές αλλαγές στα επίπεδα ελεύθερων αμινοξέων, στο πλάσμα του βρέφους. Το γλουταμινικό οξύ, η γλουταμίνη και η ταυρίνη, είναι τα πιο άφθονα ελεύθερα αμινοξέα στο μητρικό γάλα. Το γλουταμινικό οξύ, έχει πολλές ευεργετικές λειτουργίες στο αναπτυσσόμενο βρέφος, καθώς παρέχει α-κετογλουταρικό οξύ για τον κύκλο του κιτρικού οξέος, δρα ως νευροδιαβιβαστής στον εγκέφαλο και χρησιμεύει ως ενεργειακό υπόστρωμα για τα εντερικά κύτταρα (Zhang, et al., 2013). Η ταυρίνη και η γλουταμίνη θεωρούνται απαραίτητα αμινοξέα ανάλογα με την κατάσταση, καθώς το βρέφος έχει ανάγκη για μεγαλύτερη ποσότητα των αμινοξέων αυτών, από αυτή που μπορεί να συνθέσει το σώμα του. Η ταυρίνη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην πέψη του λίπους, καθώς οδηγεί στο σχηματισμό χολικών αλάτων, έπειτα από τη σύζευξή της με χολικά οξέα. Τέλος, η γλουταμίνη εμπλέκεται στο μεταβολισμό των εντερικών κυττάρων και στην ανοσοαπόκριση που σχετίζεται με περιπτώσεις φλεγμονής ή σήψης. Γενικά, το συνολικό κλάσμα μη πρωτεϊνικού αζώτου του μητρικού γάλακτος, παραμένει σταθερό σε όλα τα στάδια γαλουχίας, αν και μπορεί να υπάρξει κάποια διαφοροποίηση, σε μεμονωμένα συστατικά του (Darragh & Lönnerdal, 2011).

1.2.3. Λιπίδια

Τα λιπίδια στο μητρικό γάλα υπάρχουν ως γαλάκτωμα και περιέχουν βιοδραστικά συστατικά, σημαντικά για την ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς και νευρικού ιστού του βρέφους. Έχει αποδειχθεί ότι απενεργοποιούν έναν αριθμό παθογόνων *in vitro*, συμπεριλαμβανομένου του στρεπτόκοκκου της ομάδας Β, δηλαδή παρέχουν επιπρόσθετη προστασία, από διεισδυτικές μολύνσεις στην επιφάνεια του βλεννογόνου. Επίσης, είναι μια από τις κύριες πηγές ενέργειας στο μητρικό γάλα, συμβάλλοντας στο 40-55% της συνολικής του ενέργειας. Η συντριπτική πλειοψηφία των λιπιδίων που εκκρίνονται είναι τριγλυκερίδια, που αντιπροσωπεύουν το 98% του κλάσματος λιπιδίων. Το υπόλοιπο αποτελείται κυρίως από διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια και χοληστερόλη. Αυτά τα συστατικά έχουν τη μορφή λιπωδών σφαιριδίων γάλακτος, με τα φωσφολιπίδια να αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος της μεμβράνης των σφαιριδίων και τα τριγλυκερίδια να βρίσκονται στον πυρήνα. Τις πρώτες εβδομάδες γαλουχίας, η συνολική περιεκτικότητα σε λιπίδια αυξάνεται από περίπου 2 σε 3,5-5%. Καθώς αυξάνεται η περιεκτικότητα, αυξάνεται και το μέσο μέγεθος των σφαιριδίων λίπους γάλακτος. Αυτά τα σφαιρίδια κυμαίνονται συνήθως από 1 έως 10 μm, με μέση διάμετρο στο ώριμο γάλα 4 μm (Darragh & Lönnerdal, 2011) (Andreas, et al., 2015).

Όπως αναφέρθηκε, οι κύριες ενώσεις του λίπους του γάλακτος είναι λιπαρά οξέα, τα οποία είτε εστεροποιούνται στη μορφή των τριγλυκεριδίων, ή ένα μικρότερο μέρος αυτών εστεροποιείται στη μορφή φωσφολιπιδίων. Τα φωσφολιπίδια λειτουργούν ως προμηθευτές πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας, νευρονικού οξέος (C24:1 ω-9) και χολίνης. Αυτά τα θρεπτικά συστατικά, είναι απαραίτητα για τη βέλτιστη ανάπτυξη και λειτουργία του νεογνού. Το νευρονικό οξύ είναι μια σημαντική ένωση της μυελίνης, ένα δομικό λιπίδιο ενσωματωμένο στο αναπτυσσόμενο κεντρικό νευρικό σύστημα, έως την ηλικία των 2 ετών. Η χολίνη εμπλέκεται σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, κυρίως στο μεταβολισμό και το σχηματισμό των μεμβρανών του νεογνού. Τα αποθέματα της μητέρας σε χολίνη, εξαντλούνται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και της γαλουχίας, υποδηλώνοντας ότι το νεογνό απαιτεί μεγάλες ποσότητες αυτής της ένωσης (Sala-Vila, et al., 2005).

Το μητρικό γάλα περιέχει πάνω από 200 λιπαρά οξέα. Ωστόσο, πολλά από αυτά υπάρχουν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (Andreas, 2015). Τα λιπαρά οξέα είναι αναπόσπαστα μέρη των κυτταρικών μεμβρανών, μπορούν να λειτουργήσουν ως σηματοδοτικά μόρια, ρυθμιστές της ανοσοαπόκρισης και συμβάλλουν σε ένα ευνοϊκό

μικροπεριβάλλον για την εντερική χλωρίδα (Floris, et al., 2020). Τα πιο άφθονα κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα μητρικού γάλακτος είναι, το παλμιτικό (C16:0) και το ελαϊκό (C18:1 ω-9) οξύ, ακολουθούμενα από τα απαραίτητα λινελαϊκό (C18:2 ω-6) και α-λινολενικό (C18:3 ω-3) οξύ. Τα λιπαρά οξέα αραχιδονικό (C20:4 ω-6), εικοσατριενικό (C20:3 ω-6), εικοσιδιεξαενοϊκό (C22:6 ω-3) (DHA) και εικοσαπεντανοϊκό (C20:5 ω-3) (EPA), εμφανίζονται επίσης σε μικρές αναλογίες. Το αραχιδονικό και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ, αν και δε θεωρούνται απαραίτητα για τους ενήλικες, είναι τα μόνα λιπαρά οξέα που χρησιμοποιούνται από τον εγκέφαλο και είναι σημαντικά δομικά συστατικά των συστημάτων μεμβρανών όλων των ιστών (Darragh & Lönnerdal, 2011) (Sinanoglou, et al., 2017).

Τα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου στο μητρικό γάλα, προέρχονται είτε από τη μητρική διατροφή, είτε από το λιπώδη ιστό και μεταβολισμό του ήπατος, ενώ τα λιπαρά οξέα βραχείας και μεσαίας αλυσίδας, συντίθενται de novo εντός του μαστικού αδένου (Sinanoglou, et al., 2017). Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας δεν είναι μόνο μια σημαντική πηγή ενέργειας, αλλά η παρουσία τους είναι απαραίτητη για την κανονική ωρίμανση του γαστρεντερικού σωλήνα. Η σύνθεση de novo λιπαρών οξέων, αντιπροσωπεύει περίπου το 17% του συνολικού λίπους στο μητρικό γάλα (Andreas, 2015).

Απ' όλα τα συστατικά στο μητρικό γάλα, το κλάσμα των λιπιδίων είναι το πιο μεταβλητό. Αλλαγές στην περιεκτικότητα σε λιπαρά συμβαίνουν όχι μόνο κατά τις πρώτες εβδομάδες γαλουχίας, αλλά και στις εκκρίσεις γάλακτος καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας, αλλά η μεγαλύτερη διακύμανση εμφανίζεται στους τύπους και τις ποσότητες των λιπαρών οξέων (Darragh & Lönnerdal, 2011).

1.2.4. Υδατάνθρακες

Υπάρχει μια τεράστια ποικιλία διαφορετικών υδατανθράκων στο μητρικό γάλα. Από την περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, η λακτόζη είναι μακράν η πιο άφθονη, με συγκέντρωση περίπου 7%, η οποία μένει σχετικά σταθερή, με αποτέλεσμα τη διατήρηση μιας σταθερής οσμωτικής πίεσης. (Hendricks & Guo, 2014). Η λακτόζη είναι ένας δισακχαρίτης που αποτελείται, από γλυκόζη και γαλακτόζη, ομοιοπολικά συνδεδεμένες μεταξύ τους και συντίθεται από τον μαστικό αδένου. Οι άλλοι σημαντικοί υδατάνθρακες του μητρικού γάλακτος είναι οι ολιγοσακχαρίτες, των οποίων η περιεκτικότητα στο μητρικό γάλα είναι περίπου 1 g/dL, ανάλογα με το στάδιο της γαλουχίας και τους γενετικούς παράγοντες της μητέρας (Ballard & Morrow, 2013). Υπάρχουν αρκετοί άλλοι υδατάνθρακες στο μητρικό γάλα, όπως μονοσακχαρίτες, ουδέτεροι (περίπου 1%) και όξινοι (περίπου 0,1%)

ολιγοσακχαρίτες, και δεσμευμένοι με πεπτίδια και πρωτεΐνες υδατάνθρακες. Μικρές ποσότητες γλυκόζης και γαλακτόζης υπάρχουν επίσης στο μητρικό γάλα. Άλλοι σύνθετοι υδατάνθρακες υπάρχουν σε ελεύθερη μορφή ή συνδέονται με αμινοξέα ή πρωτεΐνες, όπως η N-ακετυλογλυκοζαμίνη (Andreas, 2015) (Lawrence & Lawrence, 2016).

Η λακτόζη είναι η θρεπτική ουσία, η συγκέντρωση της οποίας, είναι λιγότερο πιθανό να επηρεαστεί από τη μητρική διατροφή. Ωστόσο υψηλότερες συγκεντρώσεις λακτόζης, βρίσκονται στο γάλα μητέρων που παράγουν υψηλότερες ποσότητες γάλακτος και η συγκέντρωσή της μειώνεται, καθώς εξελίσσεται η γαλουχία (Darragh & Lönnerdal, 2011) (Ballard & Morrow, 2013). Ένα μωρό που θηλάζει αποκλειστικά, λαμβάνει περίπου 10-14 g λακτόζης την ημέρα/kg σωματικού βάρους. Η λακτόζη στο μητρικό γάλα βοηθά στην απορρόφηση των μετάλλων, κυρίως του ασβεστίου. Αυτό πιθανότατα οφείλεται, στη μετατροπή της σε γαλακτικό οξύ από την εντερική χλωρίδα, το οποίο μειώνει το pH, προκαλώντας αυξημένη διαλυτότητα των αλάτων ασβεστίου (Hendricks & Guo, 2014).

Οι ολιγοσακχαρίτες αντιπροσωπεύουν περισσότερο από το 27% των υδατανθράκων στο πρωτόγαλα. Αυτό σταδιακά μειώνεται στο 15-16% των υδατανθράκων ως ολιγοσακχαριτών στο ώριμο μητρικό γάλα. Οι περισσότεροι περιέχουν λακτόζη στο αναγωγικό άκρο και μπορεί να περιέχουν φουκόζη ή σιαλικό οξύ στο μη αναγωγικό άκρο (Darragh & Lönnerdal, 2011). Οι ολιγοσακχαρίτες μητρικού γάλακτος (HMOs), κυμαίνονται από 3 έως 32 σάκχαρα σε μέγεθος και διαφέρουν ως προς τη σύνθεση απ' αυτούς οποιουδήποτε άλλου θηλαστικού. Συγκαταλέγονται στα μη θρεπτικά βιοδραστικά συστατικά. Τα βιοδραστικά συστατικά, ορίζονται ως στοιχεία που επηρεάζουν βιολογικές διεργασίες ή υποστρώματα και ως εκ τούτου επηρεάζουν τη λειτουργία ή την κατάσταση του σώματος και τελικά την υγεία (Ballard & Morrow, 2013).

Αν και είναι μη θρεπτικοί για το βρέφος, το μητρικό γάλα περιέχει μία σημαντική ποσότητα HMOs, παρόμοια με την ποσότητα της συνολικής πρωτεΐνης. Οι HMOs παίζουν σημαντικό ρόλο, ως πρεβιοτικές διαλυτές ίνες, στη μεταγεννητική ανάπτυξη της εντερικής χλωρίδας. Υπάρχουν ενδείξεις ότι είναι σημαντικοί για το πρεβιοτικό αποτέλεσμα, καθώς και για τις αντιμολυσματικές ιδιότητες και την πρόληψη αλλεργιών στο μητρικό γάλα. (Hendricks & Guo, 2014). Επίσης περιέχουν σημαντικές ποσότητες σιαλικού οξέος, το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του εγκεφάλου και αναστέλλουν την προσκόλληση παθογόνων βακτηρίων στις επιθηλιακές επιφάνειες. (Darragh & Lönnerdal, 2011).

1.2.5. Βιταμίνες

Οι βιταμίνες είναι οργανικές ενώσεις, που απαιτούνται από το ανθρώπινο σώμα σε σχετικά μικρές, αλλά απαραίτητες ποσότητες, για υγιή ανάπτυξη και διατήρηση της ζωής. Κάποιες από αυτές, λειτουργούν ως απαραίτητοι συμπαράγοντες για πολλά ένζυμα, άλλες ως βασικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης και άλλες έχουν αντιοξειδωτική λειτουργία. Είναι σημαντικές για τις μεταβολικές διεργασίες, την ανάπτυξη των οστών, την όραση, τη γνωστική λειτουργία, την καρδιαγγειακή υγεία και την ανοσία (De Vries, et al., 2018).

Το μητρικό γάλα από υγιείς μητέρες, περιέχει επαρκείς ποσότητες των περισσότερων βιταμινών για να υποστηρίξει τη φυσιολογική ανάπτυξη των βρεφών, με εξαίρεση τις βιταμίνες D και K. Συγκεκριμένα, ελλείψεις στη βιταμίνη D συνδέονται άμεσα με τη διατροφή της μητέρας και την έλλειψη έκθεσης του βρέφους στον ήλιο, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ραχίτιδας σε βρέφη που θηλάζουν και η βιταμίνη K χορηγείται συνήθως σε νεογέννητα μωρά, επειδή η μεταφορά της δια μέσου του πλακούντα είναι περιορισμένη και τα επίπεδά της στο γάλα είναι χαμηλά (Darragh & Lönnerdal, 2011). Επίσης, τα βρέφη που θηλάζουν από μητέρες με αυστηρά χορτοφαγική διατροφή, μπορεί να χρειαστούν συμπλήρωμα βιταμίνης B₁₂ για την πρόληψη ανεπάρκειας (Guo, 2014).

Οι βιταμίνες ποικίλλουν ως προς την πολικότητα, η οποία καθορίζει τον τρόπο μεταφοράς τους μέσω του σώματος. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες A, D, E και K χρειάζονται πρωτεΐνες φορείς ή κυστίδια λιποπρωτεΐνης, για τη μεταφορά τους μέσω του αίματος (De Vries, et al., 2018). Η βιταμίνη A είναι ένα βασικό θρεπτικό συστατικό και η έλλειψή της έχει συσχετιστεί με μια σειρά κλινικών διαταραχών για τα βρέφη. Παρόλο που η περιεκτικότητα του γάλακτος σε βιταμίνη A, μειώνεται κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, ο όγκος της πρόσληψης γάλακτος αυξάνεται και έτσι το βρέφος συνεχίζει να λαμβάνει επαρκείς ποσότητες βιταμίνης A. Χαμηλή περιεκτικότητα του μητρικού γάλακτος σε βιταμίνη A, μπορεί να οφείλεται σε κακή διατροφή της μητέρας και μπορεί να θέσει σε κίνδυνο το βρέφος. Η βιταμίνη D παίζει ουσιαστικό ρόλο στο μεταβολισμό των οστών και στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα βρέφη μπορούν να συνθέσουν τη βιταμίνη D ενδογενώς στην επιδερμίδα, κατά την έκθεση στον ήλιο ή μπορούν να την προσλάβουν μέσω της διατροφής. Η βιταμίνη E δρα ως αντιοξειδωτικό στις κυτταρικές μεμβράνες, προστατεύοντας από την υπεροξειδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Η πιο δραστική της ένωση στο μητρικό γάλα είναι η α-τοκοφερόλη. Λόγω της περιορισμένης μεταφοράς της μέσω του πλακούντα, οι ιστοί του νεογνού έχουν χαμηλά επίπεδα βιταμίνης E, γι αυτό το βρέφος απαιτεί μετά τη γέννηση διατροφική βιταμίνη E. Η

ανεπάρκεια βιταμίνης E στα νεογνά, μπορεί να οδηγήσει σε αιμολυτική αναιμία. Η βιταμίνη K είναι απαραίτητη για τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην πήξη του αίματος. Η μεταφορά της βιταμίνης K μέσω του πλακούντα, είναι πολύ περιορισμένη, με αποτέλεσμα τα νεογνήνα βρέφη, να παρουσιάζουν γενικά εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις αυτής της βιταμίνης. Τα επίπεδα βιταμίνης K παραμένουν σταθερά στο μητρικό γάλα, σε διάστημα 6 μηνών γαλουχίας και έχουν αποδειχθεί ανεπαρκή για την κάλυψη των αναγκών των βρεφών, ακόμη και σε περιπτώσεις όπου η μητρική κατανάλωση βιταμίνης K είναι υψηλή. Γι' αυτό συνιστάται, σε όλα τα βρέφη να λαμβάνουν βιταμίνη K κατά τη γέννηση, για να αποφευχθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης αιμορραγικής νόσου (Guo, 2014).

Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες, όπως η θειαμίνη (B₁), η ριβοφλαβίνη (B₂), η νιασίνη (B₃), η πυριδοξίνη (B₆), η κοβαλαμίνη (B₁₂), το φολικό οξύ, η βιοτίνη, το παντοθενικό οξύ και το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), είτε κυκλοφορούν ελεύθερα στο αίμα είτε συνδέονται με μια πρωτεΐνη φορέα (De Vries, et al., 2018). Η βιταμίνη B₁ ή θειαμίνη είναι απαραίτητη για τη χρήση υδατανθράκων στο μεταβολισμό του πυροσταφυλικού και για τη σύνθεση λίπους. Η ανεπάρκεια σε θειαμίνη, οδηγεί σε ανεπαρκή οξείδωση των υδατανθράκων με συσσώρευση ενδιάμεσων μεταβολιτών, όπως το γαλακτικό οξύ. Η βιταμίνη B₂ ή ριβοφλαβίνη, είναι σημαντική για το νεογνήνο βρέφος, καθώς η βακτηριακή σύνθεση του εντερικού του σωλήνα είναι ελάχιστη. Η ριβοφλαβίνη εμπλέκεται σε οξειδωτικά ενδοκυτταρικά συστήματα και είναι απαραίτητη για την πρωτοπλασματική ανάπτυξη (Lawrence & Lawrence, 2016). Η χαμηλή πρόσληψη ριβοφλαβίνης από τη μητέρα, μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλές συγκεντρώσεις της στο μητρικό γάλα (Guo, 2014). Η βιταμίνη B₃ ή νιασίνη είναι απαραίτητο τμήμα των συνενζύμων νουκλεοτιδίων πυριδίνης και αποτελεί μέρος των ενδοκυτταρικών αναπνευστικών μηχανισμών. Η βιταμίνη B₆ ή πυριδοξίνη, σχηματίζει την ενζυμική ομάδα από κάποιες αποκαρβοξυλάσες και τρανσαμινάσες που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του νευρικού ιστού. Η παροχή βιταμίνης B₆ είναι ζωτικής σημασίας για τη σύνθεση του DNA και επομένως για το σχηματισμό των εγκεφαλοσίδων στη μυελίνωση του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η βιταμίνη B₁₂ ή κοβαλαμίνη, συμμετέχει στο μεταβολισμό της πυριμιδίνης και της πουρίνης και σε διαμεθυλώσεις, όπως η σύνθεση χολίνης από μεθειονίνη, σερίνης από γλυκίνη και μεθειονίνης από ομοκυστεΐνη. Επίσης, επηρεάζει το μεταβολισμό του φολικού οξέος. Ανεπάρκεια βιταμίνης B₁₂ μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλοβλαστική αναιμία. Η βιταμίνη B₁₂ εμφανίζεται αποκλειστικά σε ζωικούς ιστούς, συνδέεται με πρωτεΐνες και είναι ελάχιστη ή απουσιάζει από φυτικές πρωτεΐνες. Το φολικό οξύ συμμετέχει στη μετατροπή της γλυκίνης σε σερίνη, αλλά και στη μεθυλίωση του νικοτιναμιδίου και της ομοκυστεΐνης σε

μεθειονίνη. Το φολικό οξύ στο μητρικό γάλα δεσμεύεται ποσοτικά με πρωτεΐνες και παρουσιάζεται σε πολλές ευκίνητες μορφές. Η ανεπάρκεια σε φολικό οξύ κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, έχει αναγνωριστεί ως ένα κρίσιμο σημείο, καθώς σχετίζεται με αποκόλληση πλακούντα, τοξαιμία, αποτυχία ενδομήτριας ανάπτυξης και με μεγαλοβλαστική αναιμία. Το παντοθενικό οξύ είναι μέρος του CoA, καταλύτη των αντιδράσεων ακετυλίωσης. Η αντίδραση του CoA με οξικό οξύ για σχηματισμό ακετυλο-CoA, είναι πρωταρχική στον ενδιάμεσο μεταβολισμό. Η βιταμίνη C είναι μέρος πολλών ενζύμων και ορμονικών συστημάτων, καθώς και ενδοκυτταρικών χημικών αντιδράσεων, ενώ είναι απαραίτητη και για τη σύνθεση κολλαγόνου (Lawrence & Lawrence, 2016).

1.2.6. Μέταλλα και ιχνοστοιχεία

Μέταλλα υπάρχουν στο σώμα σε διάφορες χημικές μορφές, συμπεριλαμβανομένων ανόργανων ιόντων και αλάτων, και ως συστατικά άλλων οργανικών μορίων, όπως πρωτεϊνών, λιπών και νουκλεϊνικών οξέων. Συμβάλλουν σε μια ποικιλία φυσιολογικών λειτουργιών, παρέχοντας δομικά συστατικά των ιστών του σώματος και σχηματίζοντας βασικά μέρη πολλών ενζύμων και βιολογικά σημαντικών μορίων (Guo, 2014). Σε γενικές γραμμές, η περιεκτικότητα του μητρικού γάλακτος σε μέταλλα, παραμένει σταθερή κατά την περίοδο γαλουχίας, μετά από μια αρχική μείωση της συγκέντρωσης χλωρίου, καλίου, νατρίου και θείου. Το νάτριο, το κάλιο, το χλώριο, το ασβέστιο, το μαγνήσιο, ο φωσφόρος και το θειικό άλας, είναι τα μακροπαράγωγα που βρίσκονται στο μητρικό γάλα (Darragh & Lönnerdal, 2011).

Το νάτριο είναι το κύριο κατιόν στο εξωκυτταρικό υγρό. Είναι υπεύθυνο για τη ρύθμιση του εξωκυτταρικού όγκου μέσω του ελέγχου της οσμωτικότητας, της ισορροπίας οξέος-βάσης, της ενεργού μεταφοράς δια των κυττάρων και του δυναμικού μεμβράνης μεταξύ των κυττάρων. Το κάλιο είναι το κύριο ενδοκυτταρικό κατιόν. Η παρουσία του στο εξωκυτταρικό υγρό βοηθά στη μετάδοση νευρικών παλμών, στη διατήρηση της αρτηριακής πίεσης και στον έλεγχο της συστολής των σκελετικών μυών. Το χλώριο είναι το κύριο εξωκυτταρικό ανιόν. Είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ισορροπίας υγρών και ηλεκτρολυτών. Το ασβέστιο βοηθά στη ρύθμιση πολλών λειτουργιών, όπως φυσιολογικός καρδιακός παλμός, έκκριση ορμονών, πήξη αίματος, αγωγιμότητα νεύρων, συστολή μυών, ενεργοποίηση ενζύμων και ακεραιότητα των μεμβρανών. Για τα βρέφη, το μητρικό γάλα περιέχει επαρκείς ποσότητες ασβεστίου. Το μαγνήσιο είναι ζωτικής σημασίας για διάφορες φυσιολογικές διαδικασίες. Αυτές περιλαμβάνουν νευρομυϊκή μετάδοση, συστολή μυών, μεταβολισμό πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων, ανάπτυξη

οστών και ενζυματική δραστηριότητα. Ο φωσφόρος βρίσκεται σε όλους τους ιστούς και τα υγρά με τη μορφή οργανικών και ανόργανων φωσφορικών. Είναι απαραίτητος για πολλά συστατικά του σώματος, συμπεριλαμβανομένων λιπιδίων, πρωτεϊνών, υδατανθράκων και νουκλεϊνικών οξέων. Παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό και σχηματίζει φωσφορικό ασβέστιο, ένα σημαντικό δομικό συστατικό των δοντιών και των οστών (Guo, 2014). Το μητρικό γάλα έχει αναλογία ασβεστίου προς φωσφόρο ίση με 2:1. Επιπλέον, η συμβολή του φωσφορικού στη ρυθμιστική ικανότητα του μητρικού γάλακτος είναι τέτοια, ώστε να προκύπτει χαμηλό pH, προάγοντας την ανάπτυξη ευεργετικών βακτηρίων του εντέρου (Darragh & Lönnerdal, 2011). Το μεγαλύτερο μέρος του θείου στο μητρικό γάλα, βρίσκεται στα αμινοξέα μεθειονίνη και κυστεΐνη, με ένα μικρό κλάσμα να υπάρχει σε μορφή άλατος. Τα αμινοξέα θείου κυριαρχούν στις πρωτεΐνες ορού γάλακτος, οπότε η μείωση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες ορού γάλακτος, κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της γαλουχίας, συνδυάζεται με παρόμοια μείωση της περιεκτικότητας σε θείο (Darragh & Lönnerdal, 2011).

Το κιτρικό δεν ανήκει στα μέταλλα, αλλά είναι διαλυτό στο νερό και δεσμεύει ορισμένα μέταλλα. Παράγεται στα μιτοχόνδρια από πυροσταφυλικό και μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα, όπου διατίθεται για σύνθεση λιπιδίων και για μεταφορά στο σύμπλεγμα Golgi (Lawrence & Lawrence, 2016). Επίσης, επηρεάζει τα χαρακτηριστικά γεύσης και τη ρευστότητα του γάλακτος και μεσολαβεί στο μεταβολισμό της ενέργειας των κυττάρων (Wu, et al., 2016).

Τα ιχνοστοιχεία είναι ουσίες που αποτελούν λιγότερο από το 0,01% της μάζας του σώματος. Τα ιχνοστοιχεία που περιέχονται στο μητρικό γάλα είναι, ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το μαγγάνιο, το σελήνιο, το ιώδιο, το φθόριο, το μολυβδαίνιο, το αλουμίνιο, το κοβάλτιο, το χρώμιο και το νικέλιο (Guo, 2014).

1.3 Στάδια γαλουχίας και σύσταση

Υπάρχουν τρία στάδια στη γαλουχία, που προσδιορίζονται από αλλαγές σε συγκεκριμένα συστατικά στο μητρικό γάλα, οι οποίες αντικατοπτρίζουν τις μεταβαλλόμενες ανάγκες του βρέφους. Έτσι, το μητρικό γάλα διακρίνεται σε πρωτόγαλα, σε μεταβατικό και σε ώριμο γάλα. Το πρωτόγαλα αντιστοιχεί στις πρώτες 1-5 μέρες μετά τον τοκετό, το μεταβατικό γάλα αντιστοιχεί στις 5 μέρες έως 2 εβδομάδες μετά τον τοκετό και έπειτα το γάλα θεωρείται σε μεγάλο βαθμό ώριμο. Μέχρι 4 έως 6 εβδομάδες μετά τον τοκετό, το μητρικό γάλα θεωρείται πλήρως ώριμο (Darragh & Lönnerdal, 2011), (Ballard & Morrow, 2013).

Το πρωτόγαλα είναι ένα κιτρινωπό, παχύρευστο υγρό, είναι το πρώτο γάλα που παράγεται από τις μητέρες μετά τον τοκετό και διαφέρει από το ώριμο γάλα ως προς τον όγκο, την εμφάνιση και τη σύσταση. Ο όγκος ποικίλλει ανάλογα με τον αριθμό τόκου της μητέρας. Οι γυναίκες που είχαν άλλες εγκυμοσύνες, ιδιαίτερα εκείνες που είχαν προηγουμένως θηλάσει βρέφη, έχουν πρωτόγαλα πιο εύκολα διαθέσιμο κατά τον τοκετό και ο όγκος αυξάνεται πιο γρήγορα. Το κίτρινο χρώμα του πρωτογάλακτος οφείλεται στο β-καροτένιο. Η σύστασή του διαφέρει τόσο στη φύση των συστατικών του, όσο και στις σχετικές αναλογίες αυτών των συστατικών (Lawrence & Lawrence, 2016).

Το πρωτόγαλα διαφέρει σημαντικά από το ώριμο μητρικό γάλα από την άποψη των βιοδραστικών ιδιοτήτων του, καθώς περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις εκκριτικής ανοσοσφαιρίνης A (sIgA), η οποία σχηματίζεται από τη σύνδεση δύο μορίων ανοσοσφαιρίνης A ορού με δισουλφιδικούς δεσμούς, και μειώνεται γρήγορα εντός 14 ημερών από τη γαλουχία (Darragh & Lönnerdal, 2011). Αυτές οι ιδιότητες υποδηλώνουν ότι ο πρωταρχικός ρόλος του πρωτογάλακτος δεν είναι θρεπτικός, αλλά ανοσολογικός, προστατεύοντας το βρέφος καθώς μεταβαίνει από το σχετικά στείρο περιβάλλον της μήτρας, σε ένα περιβάλλον με παθογόνους μικροοργανισμούς. Σε αντιστοιχία με αυτό, η συγκέντρωση των HMOs στο πρωτόγαλα είναι ιδιαίτερα υψηλή, και μάλιστα περίπου διπλάσια από αυτή του ώριμου γάλακτος, με τις συγκεντρώσεις να μειώνονται από ~ 21 g/L σε ~ 13 g/L από την 4^η έως την 120^η ημέρα μετά τον τοκετό. Εκτός από τους ανοσολογικούς και θρεπτικούς του ρόλους, το πρωτόγαλα περιέχει και πολλούς αυξητικούς παράγοντες, συχνά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις απ' ό,τι στο ώριμο γάλα, που είναι σημαντικοί για τη διατροφή, την ανάπτυξη των νεογνών και προσφέρουν παθητική ανοσία (Godhia & Patel, 2013) (Andreas, et al., 2015). Οι πρωτεΐνες και οι βιταμίνες A, B₁₂ και K, υπάρχουν σε μεγαλύτερα ποσοστά στο πρωτόγαλα, απ' ό,τι στο μεταβατικό ή ώριμο γάλα. Οι συγκεντρώσεις νατρίου, καλίου, χλωρίου, ασβεστίου και μαγνησίου, είναι μεγαλύτερες στο πρωτόγαλα (Darragh & Lönnerdal, 2011) (Lawrence & Lawrence, 2016). Το πρωτόγαλα περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις πρωτεΐνης ορού γάλακτος, ενώ οι καζεΐνες είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμες. Επίσης, περιέχει χαμηλές συγκεντρώσεις λακτόζης και λίπους και επομένως τα ενεργειακά επίπεδα είναι επίσης μειωμένα, σε σύγκριση με το ώριμο γάλα (Zhang, 2014). Η παραγωγή λακτόζης αυξάνεται τον τέταρτο έως τον έβδομο μήνα, μετά τον οποίο μειώνεται, ενώ η συγκέντρωση των λιπιδίων αυξάνεται σταδιακά, κατά τη γαλουχία (Andreas, et al., 2015).

Καθώς η αναλογία νατρίου προς κάλιο μειώνεται και η συγκέντρωση λακτόζης αυξάνεται, υποδηλώνεται η εκκριτική ενεργοποίηση και η παραγωγή μεταβατικού

γάλακτος. Το μεταβατικό γάλα μοιράζεται μερικά από τα χαρακτηριστικά του πρωτογάλακτος, αλλά αντιπροσωπεύει μια περίοδο αυξημένης παραγωγής γάλακτος, για την υποστήριξη των διατροφικών και αναπτυξιακών αναγκών του ταχέως αναπτυσσόμενου βρέφους. Σε αντίθεση με τη δραματική μεταβολή της σύστασης, που παρατηρείται τον πρώτο μήνα της ζωής, η σύσταση του μητρικού γάλακτος παραμένει σχετικά σταθερή, αν και παρατηρούνται μικρές αλλαγές κατά τη διάρκεια της γαλουχίας (Ballard & Morrow, 2013). Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών και της ολικής πρωτεΐνης μειώνεται, ενώ η περιεκτικότητα σε λακτόζη, λίπος και συνολική θερμιδική αξία αυξάνεται. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες αυξάνονται και οι λιποδιαλυτές βιταμίνες μειώνονται στα επίπεδα του ώριμου γάλακτος (Lawrence & Lawrence, 2016).

Κατά τον απογαλακτισμό, μπορεί να συμβούν αλλαγές στη σύνθεση, ανάλογα με το χρόνο που απαιτείται για τον απογαλακτισμό. Όταν ο απογαλακτισμός είναι γρήγορος, η περιεκτικότητα σε λακτόζη και κάλιο μειώνεται, ενώ το νάτριο, το χλώριο, το λίπος και η ολική πρωτεΐνη αυξάνονται. Στο σταδιακό απογαλακτισμό παρατηρείται αύξηση του νατρίου, του σιδήρου και της πρωτεΐνης, καμία αλλαγή στο ασβέστιο και μείωση του ψευδαργύρου. Τόσο ο γρήγορος όσο και ο σταδιακός απογαλακτισμός, προκαλούν μείωση της περιεκτικότητας σε λακτόζη (Darragh & Lönnerdal, 2011).

Γενικά η σύσταση των μακρομορίων του μητρικού γάλακτος, κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, αλλάζει ως εξής:

Πρωτεΐνες

Η μέση περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες στο μητρικό γάλα, μειώνεται σταδιακά από τον δεύτερο έως τον έβδομο μήνα και έπειτα η ταχύτητα μείωσής της επιβραδύνεται (Andreas, et al., 2015). Στην πρώιμη περίοδο μετά τον τοκετό (ημέρες 1-4), η ανοσοσφαιρίνη A (IgA) και η λακτοφερρίνη (LF), είναι οι δύο κύριες πρωτεΐνες στο πρωτόγαλα. Η συνολική συγκέντρωση καζεΐνης στο μητρικό γάλα, αλλάζει κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Στην πρώιμη γαλουχία το 67-84% της καζεΐνης είναι β-καζεΐνη, ενώ στο τέλος της γαλουχίας απομένει μόνο το 53-67%. Κατά τις ημέρες 9-18, η περιεκτικότητα σε καζεΐνη είναι υψηλή και σταθερή και αρχίζει να μειώνεται τις επόμενες 19-28 ημέρες (Zhang, 2014).

Λίπος

Το λίπος που περιέχεται κυρίως στον πυρήνα των σφαιριδίων λίπους, αυξάνεται από 2% στο πρωτόγαλα, σε 2,9% στο μεταβατικό γάλα και σε 3,6% στο ώριμο γάλα (Lawrence & Lawrence, 2016). Η περιεκτικότητα σε λιπίδια αυξάνεται, ενώ τα φωσφολιπίδια και η χοληστερόλη μειώνονται, καθώς εξελίσσεται η γαλουχία. Τα πρωτόγαλα έχει υψηλότερα επίπεδα εικοσαδιενοϊκού οξέος (C20:2 ω-6) και χαμηλότερα ποσοστά λινελαϊκού (C18:2

ω-6) και α-λινολενικού οξέος (C18:3 ω-3) από το μεταβατικό και ώριμο γάλα. Το ώριμο γάλα παρουσιάζει υψηλότερα ποσοστά εικοσαδιδιενοϊκού οξέος (C22:2 ω-6) και χαμηλότερα ποσοστά εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος (C22:6 ω-3) από το πρωτόγαλα και το μεταβατικό γάλα. Η συγκέντρωση εικοσιπενταενοϊκού οξέος (C20:5 ω-3) αυξάνεται από το πρωτόγαλα στο ώριμο γάλα, ενώ μειώνονται τα επίπεδα αδρενικού οξέος (C22:4 ω-6), καθώς προχωράει η γαλουχία. Χαμηλότερα είναι τα ποσοστά μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, αραχιδονικού οξέος (C20:4 ω-6) και C22:5 ω-3 λιπαρού οξέος στο μεταβατικό και ώριμο γάλα, σε σχέση με το πρωτόγαλα. Τα ποσοστά στεατικού οξέος (C18:0) είναι υψηλότερα στο μεταβατικό και ώριμο γάλα απ' ό τι στα πρωτόγαλα (Zhang, 2014).

Υδατάνθρακες

Η συγκέντρωση λακτόζης στο μητρικό γάλα αυξάνεται ελαφρώς κατά τη διάρκεια της γαλουχίας και φαίνεται να είναι αρκετά σταθερή. Οι συγκεντρώσεις διαφόρων ολιγοσακχαριτών αλλάζουν καθ' όλη τη διάρκεια της γαλουχίας (Zhang, 2014).

Βιταμίνες

Η συγκέντρωση των περισσότερων βιταμινών που βρίσκονται στο μητρικό γάλα, αυξάνεται από το πρωτόγαλα στο ώριμο γάλα, με εξαίρεση τα καροτενοειδή (α-καροτένιο, β-καροτένιο, λουτεΐνη, κρυπτοξανθίνη και λυκοπένιο), ρετινόλη και βιταμίνη E, στις οποίες μειώνεται. Ωστόσο η μείωση της συγκέντρωσης ορισμένων βιταμινών, μπορεί να μην αλλάξει τη συνολική ποσότητα που προσλαμβάνει το βρέφος, καθώς οποιαδήποτε μείωση συγκέντρωσης μπορεί να αντισταθμιστεί, από την αύξηση της ποσότητας του μητρικού γάλακτος που προσλαμβάνεται (Darragh & Lönnerdal, 2011).

1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση

Η σύσταση του μητρικού γάλακτος αλλάζει ανάλογα με πολλούς παράγοντες, και ταιριάζει με τις απαιτήσεις του βρέφους (Andreas, et al., 2015). Κάποιοι απ' τους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τη σύσταση και σχετίζονται με τη μητέρα, είναι η εθνικότητα, η ηλικία της μητέρας, ο δείκτης μάζας σώματος (BMI), ο αριθμός τόκου, η αύξηση βάρους κατά την κύηση, η κατάσταση της υγείας και το γενετικό υπόβαθρο της μητέρας, η διατροφή, η σωματική άσκηση και η κοινωνικοοικονομική της κατάσταση. Άλλοι εξωτερικοί παράγοντες μπορεί να είναι η ώρα της ημέρας, το στάδιο γαλουχίας, η εποχή, το είδος τοκετού, η ηλικία κύησης, η εκατοστιαία θέση νεογνού, το φύλο του βρέφους, αλλά και περιβαλλοντικοί παράγοντες (Bravi, et al., 2016) (Wu, et al., 2018) (Briana, et al., 2020). Ωστόσο, οι πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών

του γάλακτος, οι βιολογικές επιπτώσεις και οι συνέπειες για την υγεία του βρέφους βραχυπρόθεσμα και μακροπρόθεσμα παραμένουν ασαφείς (Gómez-Gallego, et al., 2018). Παρακάτω θα γίνει εκτενέστερη αναφορά σε κάποιους απ' αυτούς τους παράγοντες και στην επίδρασή τους στη σύσταση του μητρικού γάλακτος.

1.4.1 Ηλικία Μητέρας

Η ηλικία της μητέρας σχετίζεται κυρίως με διαφορές στη σύσταση του μητρικού γάλακτος σε λιπαρά οξέα (Casavale, et al., 2019). Σύμφωνα με μελέτη επίδρασης διαφόρων παραγόντων, μεταξύ των οποίων και της ηλικίας της μητέρας, στο προφίλ λιπαρών οξέων πρωτογάλακτος, φάνηκε πως το λίπος στο πρωτόγαλα από μητέρες μεγαλύτερης ηλικίας (≥ 35 ετών), είχε σημαντικά χαμηλότερες αναλογίες κορεσμένων λιπαρών οξέων και υψηλότερες αναλογίες μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, σε σύγκριση με το πρωτόγαλα νεότερων μητέρων. Η παρουσία υψηλότερων ποσοστών κορεσμένων και trans λιπαρών οξέων στο πρωτόγαλα νεότερων (< 35 ετών) μητέρων, πιθανώς σχετίζεται με τις διαφορετικές διατροφικές συνήθειες νεότερων γυναικών και τη συχνότερη κατανάλωση έτοιμων και επεξεργασμένων γευμάτων (Sinanoglou, et al., 2017).

Μια άλλη μελέτη που διερεύνησε τις επιπτώσεις της ηλικίας της μητέρας, στα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες του μητρικού γάλακτος, διαπίστωσε ότι η περιεκτικότητα λιπαρών στο πρωτόγαλα και η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες στο ώριμο γάλα από μητέρες μεγαλύτερης ηλικίας (≥ 35 ετών), είναι αυξημένη σε σύγκριση με εκείνη των νεότερων μητέρων (< 35 ετών). Επιπλέον η περιεκτικότητα σε λακτόζη στο ώριμο γάλα, συσχετίστηκε θετικά με την ηλικία της μητέρας. Αντιθέτως η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, δεν εμφάνισε κάποια στατιστικώς σημαντική διαφοροποίηση (Lubetzky, et al., 2015).

1.4.2 Σωματικό βάρος και Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI)

Η επίδραση του σωματικού βάρους της μητέρας, στην περιεκτικότητα σε μακροθρεπτικά συστατικά του μητρικού γάλακτος, βρέθηκε γενικά χαμηλή σε μελέτες, με τις ισχυρότερες συσχετίσεις να παρατηρούνται για την πρωτεΐνη γάλακτος. Στα βρέφη, η υψηλότερη πρόσληψη πρωτεΐνης έχει συσχετιστεί με υψηλότερες συγκεντρώσεις αμινοξέων στον ορό, υψηλότερη πρόωρη αύξηση βάρους και σημαντικά αυξημένο κίνδυνο παχυσαρκίας στα μετέπειτα παιδικά χρόνια. Σε μία μελέτη των De Luca, et al. του 2016, που συγκρίνει τις συγκεντρώσεις των ελεύθερων αμινοξέων μεταξύ αδύνατων και παχύσαρκων μητέρων, δείγματα γάλακτος συλλέχθηκαν μετά από 1 μήνα γαλουχίας από 2 ομάδες με 45 γυναίκες

η καθεμία, με BMI $21,6 \pm 1,4$ kg/m² (M±SD) και $34,3 \pm 3,9$ kg/m², αντίστοιχα. Οι μετρηθείσες συγκεντρώσεις αμινοξέων ήταν γενικά παρόμοιες με προηγούμενες αναφορές και οι συγκεντρώσεις των περισσότερων αμινοξέων δε διέφεραν μεταξύ των ομάδων, αλλά υπήρχαν σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (20%), τυροσίνης (30%) και αλανίνης (12%) στο γάλα των παχύσαρκων γυναικών. Ωστόσο, η συμβολή των ελεύθερων αμινοξέων στη συνολική πρόσληψη αμινοξέων από το θηλάζον βρέφος είναι μικρή, επομένως αυτές οι διαφορές στις συγκεντρώσεις, δεν επηρεάζουν τόσο τη θρεπτική αξία του γάλακτος. Τα ελεύθερα αμινοξέα μπορούν όμως να επηρεάσουν, τη λειτουργία του εντέρου του βρέφους μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα που είναι συζευγμένος με την πρωτεΐνη G (Demmelmair & Koletzko, 2016).

Μια άλλη μελέτη συνέκρινε πολλά θρεπτικά συστατικά του μητρικού γάλακτος, μεταξύ παχύσαρκων και αδύνατων γυναικών που θηλάζουν. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σύνθεση του μητρικού γάλακτος από παχύσαρκες γυναίκες, διέφερε σε λιπαρά οξέα, ορισμένες βιταμίνες και καροτενοειδή, από εκείνη των αδύνατων γυναικών. Συγκεκριμένα, το μητρικό γάλα από παχύσαρκες μητέρες περιείχε χαμηλότερη περιεκτικότητα σε DHA, βιταμίνη D, λουτεΐνη και ζεαξανθίνη (Wu, et al., 2018).

Οι Sinanoglou et al. παρατήρησαν ότι η περιεκτικότητα πρωτογάλακτος σε λίπος σε υπέρβαρες μητέρες (BMI=26-30), ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σύγκριση με την περιεκτικότητα σε λίπος σε μητέρες κανονικού βάρους (BMI <26) και σε παχύσαρκες μητέρες (BMI >30). Επίσης, οι παχύσαρκες και υπέρβαρες μητέρες είχαν σημαντικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στο πρωτόγαλα, σε σύγκριση με τις μητέρες κανονικού βάρους, τα οποία θα μπορούσαν να αποτελούν καρδιοπροστατευτικό μηχανισμό για το βρέφος, καθώς είναι γνωστό πως μειώνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο (Sinanoglou, et al., 2017).

1.4.3 Αριθμός Τόκου

Ο αριθμός τόκου μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στη σύνθεση του μητρικού γάλακτος, με τις γυναίκες που βρίσκονται στον πρώτο τόκο, να έχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης και λίπους και τις γυναίκες με μεγάλο αριθμό τόκου, να παρουσιάζουν μείωση της περιεκτικότητας των κύριων συστατικών στο γάλα τους, με κάθε διαδοχική γαλουχία (Darragh & Lönnerdal, 2011). Πράγματι, σε μια μελέτη για τη διερεύνηση της επίδρασης της διατροφής και του αριθμού τόκου στη σύνθεση λιπαρών οξέων του ώριμου γάλακτος στις μητέρες της Γκάμπιας, οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι η αναλογία των ενδογενών λιπαρών οξέων, μειώθηκε σημαντικά στο γάλα μητέρων με πολύ

υψηλό αριθμό τόκου. Αυτό θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει μια εξασθένηση της ικανότητας σύνθεσης λιπαρών οξέων γάλακτος de novo σε αυτές τις μητέρες (Wu, et al., 2018).

1.4.4 Συνθήκες υγείας

Η υγεία της μητέρας μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεση του μητρικού γάλακτος, αλλά είναι ένας παράγοντας που δεν έχει μελετηθεί αρκετά. Διαφορές στη λιπιδική σύνθεση του μητρικού γάλακτος έχουν περιγραφεί σε μητρικές ασθένειες, που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν το λιπομεταβολισμό, όπως ο διαβήτης, η κυστική ίνωση, η υποβηταλιποπρωτεϊναιμία και η υπερλιποπρωτεϊναιμία τύπου I. Άλλες ασθένειες, όπως η αλλεργική νόσος, αλλάζουν επίσης τα προφίλ λιπαρών οξέων και τα εικοσανοειδή στο μητρικό γάλα (Wu, et al., 2018).

1.4.5 Εθνικότητα

Η σύνθεση του γάλακτος από γυναίκες από διαφορετικά γεωγραφικά και κοινωνικοοικονομικά υπόβαθρα, είναι εξαιρετικά παρόμοια, ιδιαίτερα σε σχέση με τα μακροθρεπτικά συστατικά. Τυχόν διαφορές που παρατηρούνται, είναι πιθανότερο να είναι αποτέλεσμα διατροφικής παραλλαγής, παρά γενετικής τροποποίησης της σύνθεσης (Darragh & Lönnerdal, 2011).

Σε μια μελέτη που διεξήχθη στην Κίνα, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ 3 διαφορετικών περιοχών, όσον αφορά τα συνολικά μονοακόρεστα (MUFA) και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) στο μητρικό γάλα. Διαφορετικές διατροφικές συνήθειες επισημάνθηκαν, ως οι κύριοι παράγοντες για τα διαφορετικά προφίλ λιπαρών οξέων μεταξύ των 3 περιοχών. Οι συγκεντρώσεις και τα προφίλ των HMOs έχουν επίσης αποδειχθεί, ότι ποικίλλουν γεωγραφικά σε υγιείς γυναίκες (Wu, et al., 2018).

Σε μελέτη που διεξήχθη στην Ελλάδα, τα συνολικά κορεσμένα λιπαρά οξέα στο πρωτόγαλα, ήταν σημαντικά χαμηλότερα στις Ελληνίδες μητέρες, σε σύγκριση με τις μητέρες διαφορετικών εθνικοτήτων. Αυτό σχετίζεται πιθανώς με τη μεσογειακή διατροφή, η οποία περιέχει χαμηλή αναλογία κορεσμένων λιπαρών οξέων λόγω της υψηλής πρόσληψης λαχανικών, δημητριακών και οσπρίων. Επιπλέον, το λίπος του πρωτογάλακτος από Ελληνίδες μητέρες είχε σημαντικά υψηλότερη αναλογία ελαϊκού οξέος, εικοσανοϊκού οξέος και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, σε σύγκριση με το αντίστοιχο λίπος πρωτογάλακτος από Αλβανίδες μητέρες και μητέρες άλλων εθνικοτήτων. Αυτό πιθανώς να οφείλεται, στο γεγονός ότι οι Ελληνίδες μητέρες καταλάωναν υψηλότερη ποσότητα

ελαιολάδου, ενώ η διατροφή μητέρων άλλων εθνικοτήτων περιείχε υψηλότερη περιεκτικότητα σε φυτικά έλαια, όπως το ηλιέλαιο, το σογιέλαιο, το καλαμποκέλαιο ή άλλα σπορέλαια, τα οποία έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ (Sinanoglou, et al., 2017).

1.4.6 Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Οι αλλαγές στη σύσταση του μητρικού γάλακτος, μπορεί να οφείλονται και σε εξωτερικούς παράγοντες, με ορισμένους να έχουν αρνητική επίδραση στην ποιότητα του γάλακτος. Για παράδειγμα, ορισμένοι περιβαλλοντικοί ρύποι, και πολλά φάρμακα, μπορούν να ανιχνευθούν στο μητρικό γάλα (Guo, 2014). Η έκθεση στον αέρα, το χώμα, το νερό, τα τρόφιμα και τα ποτά, τα προϊόντα προσωπικής φροντίδας, τα ρούχα και τα έπιπλα, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση περιβαλλοντικών χημικών ουσιών στο μητρικό γάλα, όπως ανθεκτικές λιπόφιλες ενώσεις (π.χ. πολυχλωριωμένα διφαινύλια), βραχύβια χημικά (π.χ. διφαινόλη Α) και άλλα χημικά και βαρέα μέταλλα (Casavale, et al., 2019).

1.4.7 Διατροφή της μητέρας

Δύο από τους πιο σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση του γάλακτος, είναι η τρέχουσα διατροφική κατάσταση της μητέρας και οι διατροφικές της συνήθειες. Η ανεπαρκής διατροφική κατάσταση, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τον όγκο του γάλακτος και την περιεκτικότητά του σε ανόργανα άλατα (Darragh & Lönnerdal, 2011). Η μητρική διατροφή, έχει αποδειχθεί ότι έχει μικρή επίδραση στις ολικές πρωτεΐνες, τους υδατάνθρακες και ορισμένα μέταλλα, αλλά επηρεάζει τα λιπαρά οξέα, ορισμένες βιταμίνες, τον ψευδάργυρο, το ασβέστιο, το σελήνιο, το ιώδιο και το φθόριο. Τα επίπεδα ορισμένων βασικών μετάλλων, όπως ο φωσφόρος και το μαγνήσιο, μπορούν να ρυθμιστούν στον ορό της μητέρας. Ωστόσο οι συγκεντρώσεις των μικρών μετάλλων, όπως ο σίδηρος και ο χαλκός στο μητρικό γάλα, μπορεί να επηρεαστούν σε μεγάλο βαθμό από τη μητρική διατροφή (Wu, et al., 2018). Επίσης η μητρική αφυδάτωση, έχει βρεθεί ότι μειώνει τον όγκο του παραγόμενου γάλακτος και ο μητρικός υποσιτισμός μπορεί να επηρεάσει την ποιότητά του (Guo, 2014). Η περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα του μητρικού γάλακτος, μπορεί να υποστεί έντονες αλλαγές, που αντικατοπτρίζουν άμεσα την περιεκτικότητα της διατροφής, σε λιπαρά οξέα. Μια διατροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, θα έχει ως αποτέλεσμα μια σημαντική αύξηση των λιπαρών οξέων μεσαίας αλυσίδας, καθώς αυξάνεται η σύνθεση λιπαρών οξέων στους μαστικούς αδένες (Darragh & Lönnerdal, 2011). Γενικά, παρόλο που η διατροφή της μητέρας επηρεάζει την

παροχή θρεπτικών ουσιών στο βρέφος που θηλάζει, οι μητρικές ορμονικές προσαρμογές και τα αποθέματα διατροφής, χρησιμεύουν για να περιορίσουν τις καθημερινές διακυμάνσεις (Wu, et al., 2018). Παρακάτω αναφέρονται τα αποτελέσματα κάποιων μελετών, σχετικά με τη συσχέτιση της περιεκτικότητας του μητρικού γάλακτος σε πρωτεΐνες, λίπος, υδατάνθρακες και βιταμίνες και της μητρικής διατροφής.

Μια μελέτη από τη Σουηδία, ανέφερε υψηλότερη περιεκτικότητα μητρικού γάλακτος σε πρωτεΐνες για μια μητρική διατροφή, υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, απ' ότι για μια διατροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες (8,83 g/d σε σύγκριση με 7,31 g/d, $p < 0,05$). Στην ίδια μελέτη, δεν παρατηρήθηκε διαφορά για την περιεκτικότητα σε λακτοφερρίνη και α-λακταλβουμίνη στο μητρικό γάλα. Άλλες μελέτες από την Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες, δεν ανέφεραν καμία συσχέτιση μεταξύ της συνολικής πρωτεΐνης του μητρικού γάλακτος και μιας διατροφής πλούσιας σε υδατάνθρακες και φτωχής σε λιπαρά οξέα, σε σύγκριση με μια διατροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες και υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα (Bravi, et al., 2016).

Μια μελέτη από τις Ηνωμένες Πολιτείες, διαπίστωσε υψηλότερο ποσοστό συνολικού λίπους μητρικού γάλακτος σε μια μητρική διατροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες και υψηλής σε λιπαρά οξέα, σε σύγκριση με μια διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες και χαμηλή σε λιπαρά οξέα (4,8 g/dL σε σύγκριση με 4,3 g/dL, $p < 0,05$). Μια άλλη μελέτη ανέφερε υψηλότερη συγκέντρωση ολικού λίπους στο μητρικό γάλα, σε διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε γαλακτοκομικά, απ' ότι σε διατροφή χαμηλής περιεκτικότητας σε γαλακτοκομικά (45,6 mg/g σε σύγκριση με 38,3 mg/g, $p < 0,05$) (Bravi, et al., 2016).

Για την περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, δε βρέθηκαν σημαντικές σχέσεις μεταξύ του συνολικού ποσοστού υδατανθράκων του μητρικού γάλακτος και της πρόσληψης ενέργειας από τη μητρική διατροφή ή μεταξύ μίας χορτοφαγικής και μιας μη χορτοφαγικής διατροφής. Επιπλέον δε βρέθηκαν σημαντικές σχέσεις, μεταξύ της λακτόζης μητρικού γάλακτος και μιας διατροφής υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και της λακτόζης μητρικού γάλακτος και μιας μητρικής διατροφής με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και χαμηλή σε υδατάνθρακες, σε σύγκριση με μια διατροφή χαμηλή σε λιπαρά και υψηλή σε υδατάνθρακες (Bravi, et al., 2016).

Μια ρωσική μελέτη, ανέφερε μια θετική συσχέτιση μεταξύ της βιταμίνης C μητρικού γάλακτος και της πρόσληψης βιταμίνης C από τη μητέρα. Μια άλλη μελέτη από τη Φινλανδία, ανέφερε σημαντική συσχέτιση μεταξύ της βιταμίνης C μητρικού γάλακτος και της μητρικής διατροφικής πρόσληψης βιταμίνης C σε 1-2 μήνες μετά τον τοκετό και 4-

5 μήνες μετά τον τοκετό. Μια μελέτη από την Ελλάδα, ανέφερε μια θετική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας του μητρικού γάλακτος σε βιταμίνη E και της πρόσληψης ολικού λίπους και ολικών κορεσμένων λιπαρών οξέων. Στην ίδια μελέτη δε βρέθηκε όμως θετική συσχέτιση, μεταξύ της περιεκτικότητας του μητρικού γάλακτος σε βιταμίνη E και της συνολικής πρόσληψης ενέργειας, μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, υδατανθράκων, ολικής πρωτεΐνης ή βιταμίνης E. Μια άλλη μελέτη από την Ισπανία, ανέφερε υψηλότερη συγκέντρωση βιταμίνης E στο μεταβατικό γάλα μητέρων με διατροφική πρόσληψη βιταμίνης E $\geq 75\%$ της συνιστώμενης πρόσληψης, σε σύγκριση με γυναίκες με διατροφική πρόσληψη βιταμίνης E $< 75\%$ της συνιστώμενης πρόσληψης, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στο ώριμο μητρικό γάλα (Bravi, et al., 2016).

Τέλος, επειδή οι ανάγκες για θρεπτικά συστατικά αυξάνονται κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, πολλοί γιατροί προτείνουν συμπληρώματα διατροφής. Τα στοιχεία δείχνουν ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι περισσότερες (73%) γυναίκες που θηλάζουν λαμβάνουν ένα παρασκεύασμα πολυβιταμίνης, ενώ υπάρχουν λιγότερες αναφορές για χρήση συγκεκριμένων συμπληρωμάτων ασβεστίου (11%), φολικού οξέος (7%) ή σιδήρου (4%). Ορισμένα συμπληρώματα, όπως το DHA, έδειξαν μια ισχυρή και εξαρτώμενη από τη δόση αύξηση στο μητρικό γάλα. Ωστόσο δεν ανταποκρίνονται όλα τα θρεπτικά συστατικά στο μητρικό γάλα, στη συμπλήρωση. Για παράδειγμα, μια διαιτητική πρόσληψη φολικού οξέος ~ 380 $\mu\text{g/g}$, δε φάνηκε να εμποδίζει την κινητοποίηση των μητρικών αποθεμάτων φολικού οξέος κατά τη διάρκεια της γαλουχίας (Wu, et al., 2018).

Κεφάλαιο 2. Μεταβολομική και NMR

2.1 Έννοιες μεταβολομικής

Η μεταβολομική στοχεύει στην αμερόληπτη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση του συνόλου των μεταβολιτών σε ένα συγκεκριμένο βιολογικό σύστημα, όπως ένα κύτταρο, ένας ιστός, ένα όργανο ή ένας ολόκληρος οργανισμός, γνωστό ως μεταβόλωμα (Lubbe, et al., 2013). Η μεταβολομική επηρεάζεται πολύ περισσότερο από περιβαλλοντικούς παράγοντες και αυτό καθιστά δυσκολότερη την ερμηνεία των μεταβολικών δεδομένων, αλλά δίνει και περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την κατάσταση της υγείας ενός ατόμου. Έτσι, ενώ το γονιδίωμα είναι σχεδόν αμετάβλητο καθ' όλη τη διάρκεια ζωής ενός ατόμου, το μεταβόλωμα μπορεί να αλλάξει ως αποτέλεσμα του τρόπου ζωής, του στρες και της έναρξης κάποιας παθολογίας (Vignoli, et al., 2019).

Οι μεταβολίτες είναι συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους (< 1kDa) και έχουν σημαντικό ρόλο στα βιολογικά συστήματα (Kosmides, et al., 2013). Συμπεριλαμβάνουν λιπίδια, αμινοξέα, πεπτιδία, νουκλεϊκά οξέα, μικρά οργανικά οξέα, βιταμίνες, θειόλες, πολυφαινόλες, υδατάνθρακες κ.α. (Zhang, et al., 2012 b). Είναι τα τελικά προϊόντα της γονιδιακής έκφρασης και της πρωτεϊνικής σύνθεσης, καθώς και της απόκρισης των κυττάρων στο περιβαλλοντικό στρες. Οι μεταβολίτες μπορούν να ταξινομηθούν στους ενδογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι συντίθενται και καταναλώνονται μέσα σε ένα βιολογικό σύστημα και στους εξωγενείς μεταβολίτες, οι οποίοι εισάγονται από το εξωτερικό του βιολογικού συστήματος στο κύτταρο, όπως φάρμακα και θρεπτικά συστατικά (Emwas, et al., 2013). Η μεταβολομική επιτρέπει την παράλληλη εκτίμηση των επιπέδων ενός ευρέος φάσματος ενδογενών και εξωγενών μεταβολιτών και έχει αποδειχθεί ότι έχει μεγάλο αντίκτυπο στη διερεύνηση της φυσιολογικής κατάστασης, στη διάγνωση ασθενειών, στην ανακάλυψη βιοδεικτών και στον εντοπισμό διαταραχών των μεταβολικών οδών, λόγω ασθένειας ή θεραπείας. Πρωταρχικός δείκτης μίας νόσου είναι οι μεταβολικές αλλαγές, και ως εκ τούτου η μέτρηση των μεταβολιτών αποτελεί σημαντικό μέρος της κλινικής πρακτικής, με σκοπό τη διάγνωση της νόσου. Παρά τις σημαντικές εξελίξεις στις αναλυτικές τεχνολογίες, η ανακάλυψη βιοδεικτών στα βιολογικά υγρά παραμένει σημαντική πρόκληση (Zhang, et al., 2012 b).

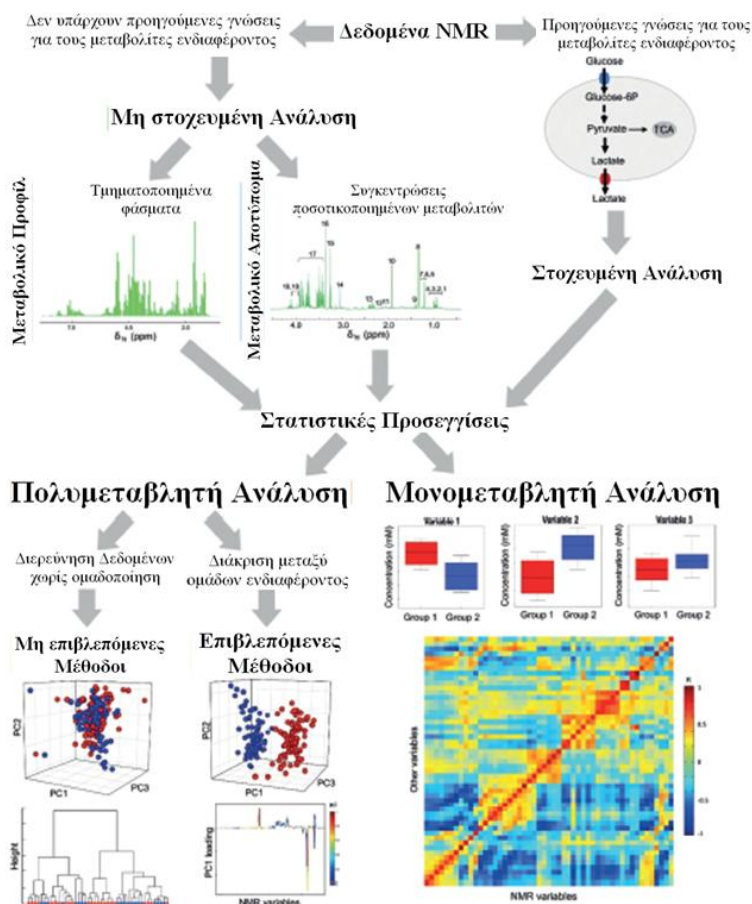
Στην πραγματικότητα είναι τεχνικά αδύνατο να γίνει μεταβολομική μελέτη, δηλαδή ποσοτική ανάλυση όλων των μεταβολιτών, επειδή μέχρι στιγμής καμία αναλυτική τεχνική μόνη της ή σε συνδυασμό με άλλες, δεν είναι αρκετά ευαίσθητη ή εκλεκτική για να μετρήσει όλους τους μεταβολίτες, σε οποιαδήποτε συγκέντρωση σε ένα δείγμα. Αυτό

οφείλεται στη μεγάλη ποικιλία στη δομή, τις χημικές ιδιότητες, τη συγκέντρωση και τη σταθερότητα των μεταβολιτών σε ένα δεδομένο δείγμα. Αντ' αυτού, η μελέτη του «μεταβολικού αποτυπώματος» και του «μεταβολικού προφίλ», είναι πιο ρεαλιστική και όλες οι μελέτες, που αναφέρονται ως μελέτες μεταβολομικής, είναι στην πραγματικότητα μελέτες μεταβολικού αποτυπώματος ή μεταβολικού προφίλ. Το μεταβολικό αποτύπωμα είναι η ποιοτική και ημιποσοτική σάρωση υψηλής απόδοσης της μεταβολικής σύνθεσης, με σκοπό τη διακριτική ανάλυση και τη σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων (Lubbe, et al., 2013). Συγκεκριμένα, είναι μια γενική, ταχεία αξιολόγηση ενός φάσματος στο σύνολό του, που μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτύπωμα όλων των ανιχνεύσιμων μεταβολιτών, που υπάρχουν στο μελετούμενο βιολογικό δείγμα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί, για παράδειγμα, με το μετασχηματισμό των φασμάτων NMR σε μήτρα δεδομένων μέσω τμηματοποίησης (binning), δηλαδή μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για τη μείωση του συνολικού αριθμού των μεταβλητών και για την αντιστάθμιση μικρών λανθασμένων ευθυγραμμίσεων στα φάσματα, που θα αναλυθεί στη συνέχεια (Vignoli, et al., 2019).

2.2 Διαφορετικές προσεγγίσεις στη μεταβολομική

Ανάλογα με το βιολογικό ερώτημα προς μελέτη, οι μεταβολομικές αναλύσεις μπορούν να χωριστούν σε δύο διαφορετικές προσεγγίσεις για την ανίχνευση μεταβολιτών: τη μη στοχευμένη (untargeted) και τη στοχευμένη (targeted). Η μη στοχευμένη ανάλυση παρέχει μια συνολική εικόνα ενός δείγματος με την ανάλυση όλων, ή όσο το δυνατόν περισσότερων μετρήσιμων μεταβολιτών, για τους οποίους δεν υπάρχει προηγούμενη γνώση της φύσης ή της ταυτότητάς τους. Μη στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση επιτυγχάνεται μέσω της μελέτης μεταβολικού αποτυπώματος ή μελέτης μεταβολικού προφίλ. Τα σετ δεδομένων, είναι ιδιαίτερα περίπλοκα και ένας αριθμός μεταβολιτών παραμένει μη χαρακτηρισμένος. Έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές αναλυτικές πλατφόρμες, όπως πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR), υγρή ή αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS)/(GC-MS) ή με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS). Στο δείγμα εφαρμόζεται ελάχιστη προκατεργασία, για να αποφευχθεί η απώλεια μεταβολιτών. Αν και η μη στοχευμένη μεταβολομική περιορίζεται σε ποιοτικές και ημιποσοτικές πληροφορίες, αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την ανακάλυψη νέων περιοχών μεταβολισμού. Η στοχευμένη προσέγγιση απ' την άλλη, αναφέρεται στην παρακολούθηση μιας ομάδας μεταβολιτών, που έχουν επιλεγεί εκ των προτέρων με βάση γνωστές μεταβολικές οδούς ή ταυτοποιημένους βιοδείκτες, που αναμφίβολα σχετίζονται με την κατάσταση ενδιαφέροντος και στον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των

μεταβολιτών αυτών, χρησιμοποιώντας αναλυτικά πρότυπα. Η προετοιμασία του δείγματος και η βέλτιστη προσαρμογή του οργάνου, είναι βασικά στοιχεία για την ακριβή ποσοτικοποίηση των επιλεγμένων μεταβολιτών. Σε αντίθεση με τη μη στοχευμένη μεταβολομική, η στοχευμένη προσέγγιση καθοδηγείται από συγκεκριμένη υπόθεση, που παρακινεί τη διερεύνηση συγκεκριμένων βιοχημικών οδών (Agin, et al., 2016) (Vignoli, et al., 2019). Τα αποτελέσματα της στοχευμένης ή μη στοχευμένης μεταβολομικής μελέτης, υποβάλλονται σε πολυμεταβλητή ή μονομεταβλητή ανάλυση, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1. Η πολυμεταβλητή ανάλυση (multivariate analysis) χρησιμοποιείται συνήθως για την οπτικοποίηση των βιολογικών δεδομένων, τον εντοπισμό πιθανών ομάδων και τη δημιουργία προγνωστικών μοντέλων. Μπορεί να γίνει είτε με επιβλεπόμενη (supervised), είτε με μη επιβλεπόμενη (unsupervised) μέθοδο. Εκτενέστερη αναφορά για την πολυμεταβλητή ανάλυση, θα γίνει στη συνέχεια. Η μονομεταβλητή ανάλυση (univariate analysis), χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό μεταβολιτών και συνεπώς μεταβολικών οδών που μεταβάλλονται ή συσχετίζονται με συγκεκριμένες βιολογικές καταστάσεις (Vignoli, et al., 2019).



Εικόνα 1: Διαφορετικές μεταβολομικές προσεγγίσεις (Vignoli, et al., 2019)

2.3 Αναλυτικές Τεχνικές

Τα τελευταία χρόνια, η εφαρμογή της μεταβολομικής αποκτά όλο και μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Υπάρχουν πολλές αναλυτικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για μεταβολομικές εφαρμογές, όπως NMR, FT-IR και MS που συνδυάζονται με τεχνικές διαχωρισμού, συμπεριλαμβανομένων των NMR, GC-MS, LC-MS, FT-MS και UPLC-MS. Η φασματοσκοπία NMR, αποτελεί μια εξαιρετική τεχνική για τη μελέτη του μεταβολικού προφίλ των βιολογικών υγρών και είναι ιδιαίτερα ικανή στο χαρακτηρισμό σύνθετων διαλυμάτων, το GC-MS χρησιμοποιείται για την ανάλυση των πτητικών οργανικών ενώσεων και των παραγωγοποιημένων πρωτογενών μεταβολιτών, το LC-MS είναι ιδιαίτερα εφαρμόσιμο στην ανάλυση ενός μεγάλου φάσματος ημιπολικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων πολλών δευτερογενών μεταβολιτών. Δεδομένου ότι το LC-MS μπορεί να αποφύγει τη χημική παραγωγή, χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό. Η μεταβολομική, που βασίζεται σε φασματομετρία μάζας, προσφέρει υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών και ο συνδυασμός με προηγμένες και υψηλής απόδοσης τεχνικές διαχωρισμού, μπορεί να μειώσει την πολυπλοκότητα που έχει ο διαχωρισμός μεταβολιτών. Ωστόσο απαιτείται προετοιμασία του δείγματος, που μπορεί να προκαλέσει απώλεια μεταβολιτών. Επομένως, η παράλληλη εφαρμογή πολλών αναλυτικών τεχνικών, για παράδειγμα GC-MS, LC-MS ή NMR, είναι επιθυμητή για τη μελέτη του γενικού μεταβολώματος (Zhang, et al., 2012 a).

2.4 Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)

Η μέθοδος του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR, ανακαλύφθηκε το 1945 ταυτόχρονα από τις ερευνητικές ομάδες του Felix Bloch και του Edward Mills Purcell. Η χρήση του ^1H NMR για τη μεταβολομική, βασίζεται στην αρχή, ότι τα πρωτόνια συντονίζονται μεταξύ των ενεργειακών καταστάσεων σε ένα υψηλό μαγνητικό πεδίο. Ένας ραδιοπαλμός μικρής διάρκειας και υψηλής ισχύος, προκαλεί την απορρόφηση και την επακόλουθη απελευθέρωση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, που ποικίλλει για κάθε ένωση ανάλογα με τη θέση των συσχετιζόμενων πρωτονίων της. Το αναλογικό σήμα που καταγράφεται είναι μία φθίνουσα ταλάντωση, που ονομάζεται FID (Free Induction Decay). Με μια μαθηματική διαδικασία, γνωστή ως μετασχηματισμός Fourier, γίνεται μετατροπή του φάσματος συνάρτησης χρόνου, σε φάσμα συνάρτησης συχνότητας. Έτσι προκύπτει το φάσμα λήψης NMR, που απεικονίζει τη χημική μετατόπιση δ σε ppm, έναντι του ύψους κορυφής, όπου κάθε συχνότητα συντονισμού στο δείγμα, εμφανίζεται ως μία κορυφή. Οι χημικές μετατοπίσεις αυτών των κορυφών, επηρεάζονται από τις

ηλεκτραρνητικές ομάδες, όπως είναι το άζωτο, το οξυγόνο, τα καρβονύλια, οι διπλοί δεσμοί, τα αλογόνα κ.λπ., που θα επηρεάσουν τη θέση κάθε τύπου πρωτονίου στο φάσμα. Κάθε μεταβολίτης έχει το δικό του μοναδικό φάσμα NMR, που αντιπροσωπεύει το περιβάλλον κάθε πρωτονίου στον μεταβολίτη. Ως αποτέλεσμα, το μείγμα διαφορετικών μεταβολιτών σε ένα δείγμα μεταβολομικής, παράγει ένα σύνθετο φάσμα NMR (Barnes, et al., 2016 a).

2.4.1. Πλεονεκτήματα NMR στη μεταβολομική

Υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα της χρήσης του NMR στη μεταβολομική ανάλυση. Αρχικά, αποτελεί μία μη καταστρεπτική τεχνική, με αποτέλεσμα το δείγμα να μπορεί στη συνέχεια να αναλυθεί και με μία καταστρεπτική τεχνική, όπως GC-MS ή LC-MS (Barnes, et al., 2016 a). Επίσης η φασματοσκοπία NMR είναι υψηλής απόδοσης, διαρκεί μόνο λίγα λεπτά ανά δείγμα και δεν απαιτεί εκ των προτέρων γνώση των μεταβολιτών που πρέπει να μελετηθούν, καθώς εξάγει μια υπέρθεση των φασμάτων όλων των ανιχνεύσιμων μεταβολιτών (Kosmidis, et al., 2013). Μπορεί άμεσα να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών. Η ταυτοποίηση υποστηρίζεται από πλήθος λογισμικών και βάσεων δεδομένων, αλλά και από τα 2D πειράματα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι εύκολος για όλες τις ενώσεις, καθώς με ένα ενιαίο εσωτερικό πρότυπο, όλοι οι ανιχνεύσιμοι μεταβολίτες μπορούν να ποσοτικοποιηθούν, χωρίς να χρειάζονται καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε μία ένωση. Απ' τα πιο σημαντικά πλεονεκτήματα του NMR, είναι η απλή προετοιμασία του δείγματος σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα ή ακόμη και η άμεση μέτρηση δειγμάτων, όπως στην περίπτωση των ούρων. Δεδομένου ότι σχεδόν δεν απαιτείται προκατεργασία του δείγματος στη φασματοσκοπία NMR, οι εγγενείς ιδιότητες του δείγματος διατηρούνται καλά. Η μη εκλεκτικότητα του NMR, το καθιστά ιδανικό για τη μελέτη του μεταβολικού προφίλ του δείγματος (Lubbe, et al., 2013). Τα μειονεκτήματα της φασματοσκοπίας NMR, είναι η χαμηλή φασματική ανάλυση και η χαμηλότερη ευαισθησία από τεχνικές φασματοσκοπίας μάζας, αν και τα δύο μπορούν να μετριάστουν, με την εφαρμογή ισχυρότερων μαγνητικών πεδίων (Kosmidis, et al., 2013).

2.4.2 Προ-επεξεργασία φασματικών δεδομένων NMR

Η προετοιμασία των δεδομένων για περαιτέρω ανάλυση, αναφέρεται συχνά ως προ-επεξεργασία δεδομένων. Στη μεταβολομική, το στάδιο επεξεργασίας δεδομένων, ακολουθεί τη λήψη των ακατέργαστων φασμάτων και χρησιμοποιείται για το μετασχηματισμό των δεδομένων, σε μορφή κατάλληλη για επακόλουθες στατιστικές

αναλύσεις (Εικόνα 2) (Vignoli, et al., 2019). Παρακάτω παρατίθενται κάποια από τα στάδια προ-επεξεργασίας των φασματικών δεδομένων, που προσφέρονται από το λογισμικό MestreNova, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη.

- **Καθορισμός σημείου αναφοράς (referencing)**

Τα φάσματα NMR πρέπει πάντα να βαθμονομούνται στον άξονα των χημικών μετατοπίσεων, χρησιμοποιώντας ένα εσωτερικό πρότυπο. Ο καθορισμός του σημείου αναφοράς είναι σημαντικός για την ταυτοποίηση των ενώσεων, για την ευθυγράμμιση κορυφών και για οποιεσδήποτε πολυπαραγοντικές στατιστικές αναλύσεις (Emwas, et al., 2018). Οι πιο σημαντικές προϋποθέσεις για ένα εσωτερικό πρότυπο, είναι η διαλυτότητά του και η χημική του αλληλεπίδραση με τον αναλύτη. Στην περίπτωση βιολογικών δειγμάτων όπου υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες και λιπαρά οξέα, το εσωτερικό πρότυπο πρέπει να επιλέγεται πολύ προσεκτικά (Bharti & Roy, 2012). Στη μεταβολομική τόσο το DSS [4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid], όσο και το TSP [3-(trimethylsilyl)-2,2',3,3'-tetradeuteriopropionic acid], χρησιμοποιούνται ευρέως ως πρότυπα αναφοράς. Ωστόσο είναι σημαντικό να σημειωθεί, ότι το TSP είναι αρκετά ευαίσθητο στο pH (Emwas, et al., 2018).

- **Διόρθωση φάσης σήματος (phase correction)**

Η διόρθωση φάσης είναι μια διαδικασία φασματικής προσαρμογής, που αποσκοπεί στην απαλοιφή παραμορφώσεων, λόγω διαφοράς φάσης και στη μεγιστοποίηση της συμμετρίας όλων των κορυφών NMR, σε όλες τις περιοχές ενός φάσματος NMR. Η διόρθωση φάσης είναι ένα από τα πιο σημαντικά βήματα στη φασματική επεξεργασία, καθώς ακόμη και μικρά σφάλματα φάσης μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικά προβλήματα, που θα επηρεάσουν τα επόμενα βήματα επεξεργασίας φασμάτων. Συγκεκριμένα, τα σφάλματα φάσης μπορούν να επηρεάσουν την ευθυγράμμιση κορυφών, τη φασματική τμηματοποίηση και τα μετρούμενα εμβαδά των κορυφών. Παρόλο που η αυτόματη διόρθωση φάσης, είναι διαθέσιμη στους περισσότερους σύγχρονους φασματογράφους NMR, συχνά απαιτείται χειροκίνητη διόρθωση φάσης σε μελέτες μεταβολομικής, καθώς πολλές φορές η αυτόματη διόρθωση φάσης, μπορεί να παραμορφώσει κορυφές χαμηλής έντασης (Emwas, et al., 2018).

- **Διόρθωση γραμμής βάσης (baseline correction)**

Η παραμόρφωση της γραμμής βάσης, μπορεί να προκύψει από παραμορφώσεις στα ηλεκτρονικά μέρη του φασματογράφου, ανεπαρκές ψηφιακό φιλτράρισμα ή ελλιπή ψηφιακή δειγματοληψία. Όταν γίνει σωστά, η διόρθωση γραμμής βάσης αποδίδει ένα φάσμα, όπου οι περιοχές χωρίς σήμα είναι εντελώς επίπεδες, οριζόντιες γραμμές, με

μηδενική ένταση. Η σωστή γραμμική βάσης είναι απαραίτητη για τη σωστή φασματική ευθυγράμμιση και τη σωστή ολοκλήρωση κορυφών. Μικρά σφάλματα στη γραμμική βάσης, μπορούν εύκολα να οδηγήσουν σε σφάλματα στην ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών (Emwas, et al., 2018). Συνήθως η διόρθωση γραμμικής βάσης γίνεται αυτόματα και όχι χειροκίνητα (Bharti & Roy, 2012).

- **Κανονικοποίηση (normalization)**

Η κανονικοποίηση έχει ως στόχο να κάνει όλα τα δείγματα συγκρίσιμα μεταξύ τους (Emwas, et al., 2018). Για την κανονικοποίηση των σημάτων, ένα σταθερό πρότυπο με γνωστή συγκέντρωση, το οποίο είναι συνήθως το ίδιο το εσωτερικό πρότυπο, προστίθεται στο δείγμα και το υπόλοιπο του φάσματος κανονικοποιείται σε σχέση με αυτό. Το σήμα του διαλύτη NMR μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για κανονικοποίηση. Αυτή η προεπεξεργασία δεδομένων, είναι απαραίτητη για τη σωστή ποσοτικοποίηση των αναγνωρισμένων μεταβολιτών (Lubbe, et al., 2013). Στην πραγματικότητα με την κανονικοποίηση μειώνονται τα συστηματικά σφάλματα, που οφείλονται σε διαφορετικούς πειραματικούς χειρισμούς, όπως είναι για παράδειγμα οι διαφορετικοί όγκοι αραίωσης (Vignoli, et al., 2019).

- **Φιλτράρισμα (apodization)**

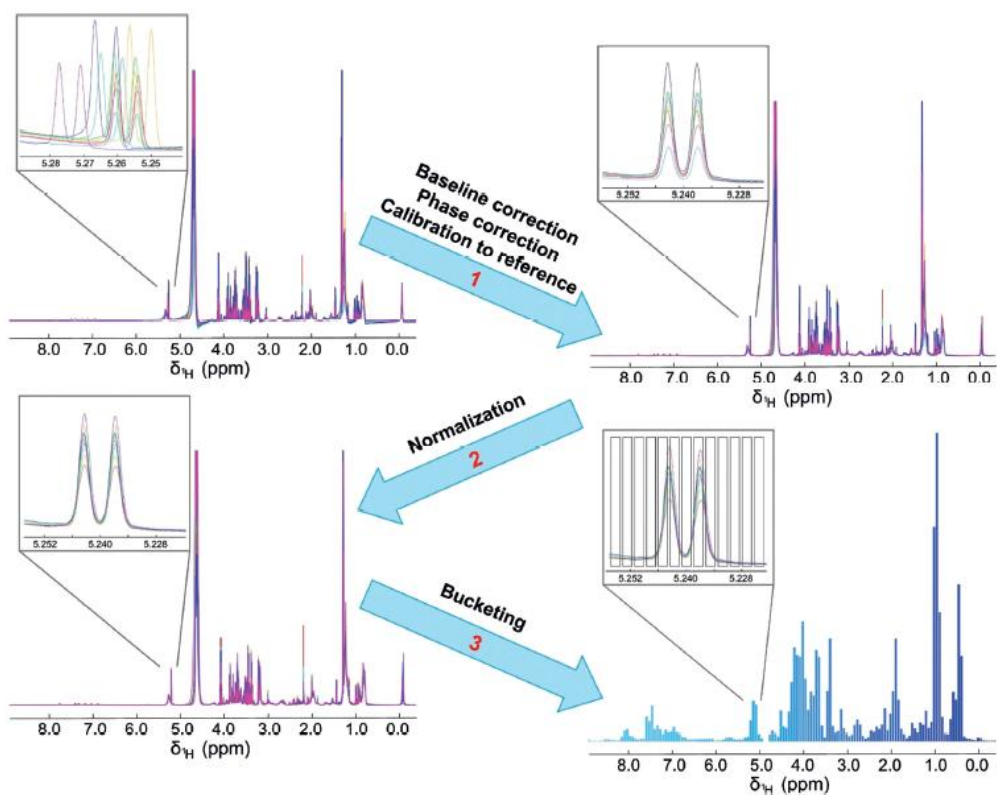
Το φιλτράρισμα εφαρμόζεται για τη βελτίωση του λόγου σήματος προς θόρυβο (S/N) και της διακριτικής ικανότητας (resolution) του φάσματος. Συνήθως, σε ένα 1D φάσμα, ο λόγος S/N βελτιώνεται πολλαπλασιάζοντας το FID με μια εκθετική συνάρτηση, που καθορίζει τον παράγοντα διεύρυνσης γραμμής (line broadening) των σημάτων. Συνήθως χρησιμοποιείται ένας παράγοντας διεύρυνσης γραμμής 0,3-1,0 Hz (Bharti & Roy, 2012).

- **Ευθυγράμμιση (alignment)**

Η φασματική ευθυγράμμιση είναι μια διαδικασία, που αλλάζει τις θέσεις κορυφών σε πολλαπλά φάσματα, ως προς ένα κοινό φάσμα αναφοράς, έτσι ώστε οι κορυφές που αντιστοιχούν στις ίδιες ενώσεις, να μπορούν να ευθυγραμμιστούν άμεσα. Η ευθυγράμμιση απαιτείται για να διασφαλιστεί ότι οι ίδιες κορυφές, από τις ίδιες ενώσεις, μπορούν να συγκριθούν και να ποσοτικοποιηθούν και να εξαχθούν έτσι ορθές πληροφορίες από τα φάσματα. Εάν δεν γίνει ευθυγράμμιση, τα σήματα των οποίων η χημική μετατόπιση έχει μετατοπιστεί ελαφρώς, λόγω μικρών διακυμάνσεων από φάσμα σε φάσμα, δε θα ταιριάζουν σωστά και τα επόμενα βήματα τμηματοποίησης, μετατροπής κλίμακας και πολυμεταβλητής ανάλυσης, θα επηρεαστούν αρνητικά, οδηγώντας την εκάστοτε μελέτη σε λάθος συμπεράσματα (Emwas, et al., 2018).

▪ Τμηματοποίηση (binning/bucketing)

Το Bucketing ή binning είναι ένας τύπος επεξεργασίας δεδομένων, ο οποίος διαιρεί το φάσμα NMR σε έναν αριθμό τμημάτων (bins) επιθυμητού πλάτους, με σκοπό να μειώσει τον αριθμό των μεταβλητών και υπολογίζει το εμβαδό των κορυφών, εντός αυτού του τμήματος του φάσματος. Η τμηματοποίηση αυτή μπορεί να βοηθήσει, στη μείωση των επιπτώσεων των διακυμάνσεων λόγω pH ή επίδρασης ιοντικής ισχύος στις χημικές μετατοπίσεις. Καθώς με την τμηματοποίηση υπολογίζονται τα εμβαδά των κορυφών, μπορεί να γίνει εύκολα και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών, καθώς οι εντάσεις κορυφών στο φάσμα NMR, είναι ανάλογες με τις γραμμομοριακές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών. (Lubbe, et al., 2013) (Emwas, et al., 2013). Μετά το binning πραγματοποιείται πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση, με βάση τις προκύπτουσες τιμές των bins και οι πιο σημαντικές κορυφές ή τμήματα κορυφών, αποδίδονται σε συγκεκριμένους μεταβολίτες (Emwas, et al., 2018).



Εικόνα 2: Βασικά βήματα προ-επεξεργασίας NMR φασμάτων: 1.Διόρθωση γραμμής βάσης, διόρθωση φάσης, βαθμονόμηση ως προς σημείο αναφοράς, 2.Κανονικοποίηση, 3. Τμηματοποίηση. (Vignoli, et al., 2019)

Μετατροπή κλίμακας (Scaling)

Στα φάσματα NMR δεν έχουν όλοι οι μεταβολίτες την ίδια φυσική αφθονία και το ίδιο εύρος εντάσεων και έτσι οι διακυμάνσεις των μεταβολιτών με υψηλότερες συγκεντρώσεις,

είναι ευκολότερο να εντοπιστούν, απ' αυτές με χαμηλές συγκεντρώσεις. Αυτή η επίδραση μπορεί να κάνει ένα μικρό αριθμό μεταβολιτών, να κυριαρχήσουν στα αποτελέσματα των πολυμεταβλητών στατιστικών αναλύσεων. Συνεπώς, πριν την εφαρμογή της πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης, τα δεδομένα υπόκεινται σε κατάλληλη μετατροπή κλίμακας (scaling), έτσι ώστε να είναι ομοιόμορφα κατανομημένα και να μειωθεί η διασπορά των τιμών τους. Η μετατροπή Pareto, αποτελεί την πιο συνηθισμένη τεχνική μετατροπής δεδομένων μεταβολομικής ανάλυσης. Η μετατροπή αυτή, διαιρεί την κάθε μεταβλητή με την τετραγωνική ρίζα της τυπικής της απόκλισης. Αυτό αυξάνει την ευαισθησία και μειώνει το θόρυβο, ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει στα δεδομένα, να παραμένουν πιο κοντά στις αρχικές μετρήσεις (Cloarec, et al., 2005) (Emwas, et al., 2018).

2.5 Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με βάση τα διαθέσιμα δεδομένα, τα οποία μπορεί να είναι φάσματα NMR ή μια λίστα συγκεντρώσεων, διατεταγμένα σε σειρές (δείγματα) και στήλες (μεταβλητές) σε μια μήτρα δεδομένων, οι κύριοι στόχοι της μεταβολομικής είναι η οπτικοποίηση των συνολικών διαφορών, τάσεων και συσχετίσεων μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων, η ανίχνευση σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ομάδων που ερευνηθήκαν, εάν υπάρχει, η επισήμανση των φασματικών περιοχών που συμβάλλουν κυρίως σε αυτές τις διαφορές και η κατασκευή ενός προγνωστικού μοντέλου, για τη σωστή ταξινόμηση των νέων δειγμάτων. Η πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση, είναι το κλειδί για την επίτευξη αυτών των στόχων, είτε με μη επιβλεπόμενες είτε με επιβλεπόμενες μεθόδους ανάλυσης.

Οι μη επιβλεπόμενες μέθοδοι χρησιμοποιούνται για να ανακαλύψουν ομάδες (clusters) ή τάσεις στα δεδομένα, που δε βασίζονται σε κάποια ομαδοποίηση. Επομένως, δεν απαιτούνται προηγούμενες υποθέσεις ή γνώση των δεδομένων. Οι μη επιβλεπόμενες μέθοδοι, αποτελούν συνήθως το πρώτο βήμα στην ανάλυση δεδομένων, βοηθώντας στην οπτικοποίηση της κατανομής των δεδομένων και στην εύρεση πιθανών έκτροπων τιμών (outliers). Η πιο γνωστή μη επιβλεπόμενη μέθοδος, είναι η ανάλυση κύριων συνιστωσών PCA (Principal Component Analysis).

Οι επιβλεπόμενες μέθοδοι, από την άλλη χρησιμοποιούν ήδη υπάρχουσες πληροφορίες και ομαδοποιήσεις για τα δεδομένα, με σκοπό τη δημιουργία μοντέλων για την επέκταση των ήδη διαθέσιμων γνώσεων, από προϋπάρχοντα δείγματα σε νέα δείγματα, έτσι ώστε να μπορούν να γίνουν προβλέψεις. Η επιβλεπόμενη ανάλυση περιλαμβάνει μεθόδους που βασίζονται στην προβολή και τη μείωση δεδομένων, όπως παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS (Partial Least Squares) και την

παραλλαγή της, ορθογώνια παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων OPLS (Orthogonal Partial Least Squares) (Vignoli, et al., 2019).

2.5.1. Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA)

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA), είναι η πιο κοινή μέθοδος μη επιβλεπόμενης πολυμεταβλητής ανάλυσης, η οποία χρησιμοποιείται για τη μείωση των διαστάσεων ενός πολυπαραμετρικού σετ δεδομένων, με την αποσύνθεση δεδομένων. Στην PCA κάθε κύρια συνιστώσα, είναι ένας γραμμικός συνδυασμός των αρχικών μεταβλητών. Οι κύριες συνιστώσες, είναι ορθογώνιες μεταξύ τους, και οι πρώτες κύριες συνιστώσες περιέχουν το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης, με κάθε επόμενη κύρια συνιστώσα, να περιέχει αντίστοιχα μικρότερες ποσότητες. Μόλις προσδιοριστούν οι κύριες συνιστώσες, κάθε δείγμα μπορεί να αποτυπωθεί σε PCA γράφημα (scores plot), για να δώσει μια οπτική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων. Επειδή οι κύριες συνιστώσες, περιλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος της διακύμανσης στα δεδομένα, τα σημεία συνήθως εμφανίζονται ομαδοποιημένα στο γράφημα PCA, με κάθε ομάδα (cluster) να αντιπροσωπεύει ένα διαφορετικό μεταβολικό αποτύπωμα. Αυτά τα μεταβολικά αποτυπώματα, στη συνέχεια χρησιμοποιούνται για να βρεθούν πιθανοί βιοδείκτες-μεταβολίτες, που διαφέρουν περισσότερο μεταξύ των ομάδων. Ωστόσο για τον καλύτερο προσδιορισμό των μεταβολιτών που διαφέρουν περισσότερο μεταξύ των ομάδων, πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια γραφική παράσταση γνωστή ως loadings plot (Kosmides, et al., 2013). Το loadings plot χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των φασματικών σημάτων, που είναι υπεύθυνα για την ομαδοποίηση ή τον διαχωρισμό, μεταξύ των δειγμάτων και που τελικά οδήγησαν στην αναγνώριση των μεταβολιτών, που είναι υπεύθυνοι για το διαχωρισμό στο scores plot (Lubbe, et al., 2013). Ενώ το PCA είναι πολύ καλό στην ανίχνευση clusters και outliers, τα αποτελέσματά του χρησιμοποιούνται συχνά μόνο ως βάση για μελλοντική ανάλυση, καθώς η ακρίβειά του μπορεί να βελτιωθεί χρησιμοποιώντας επιβλεπόμενες μεθόδους (Kosmides, et al., 2013).

2.5.2. Παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) και ορθογώνια παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS)

Μόλις βρεθούν οι πιθανοί βιοδείκτες, χρησιμοποιούνται επιβλεπόμενες μέθοδοι για τη μεγιστοποίηση του διαχωρισμού, μεταξύ των ομάδων και για τον προσδιορισμό των βιοδεικτών με τη μεγαλύτερη επίδραση στο διαχωρισμό αυτό. Επειδή οι επιβλεπόμενες μέθοδοι χρησιμοποιούν τις ήδη γνωστές πληροφορίες, σχετικά με τα δείγματα που

οδήγησαν στο διαχωρισμό τους, μπορούν να προβλέψουν, σε ποια από τις ομάδες που έχουν σχηματιστεί, θα βρεθεί ένα νέο δείγμα, με βάση τις πληροφορίες που υπάρχουν γι' αυτό. Οι δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενες επιβλεπόμενες μέθοδοι, είναι η παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) και η ορθογώνια παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS). Τα μοντέλα PLS/OPLS χρησιμοποιούν μια μήτρα πρόβλεψης X και μια μήτρα απόκρισης Y , για να ορίσουν ένα επίπεδο στο n -διάστατο χώρο, που να διαχωρίζει τα δεδομένα σε ομάδες. Το OPLS μοντέλο χρησιμοποιεί φίλτρο ορθογώνιας διόρθωσης σήματος, με αποτέλεσμα να βελτιώνεται η αξιοπιστία του συνόλου δεδομένων και να αυξάνεται η ακρίβεια του μοντέλου (Kosmidis, et al., 2013). Συγκεκριμένα το OPLS-DA (ορθογώνια παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση), διαχωρίζει τη συστηματική διακύμανση στο X σε δύο μέρη, ένα που σχετίζεται γραμμικά με το Y (προγνωστικές πληροφορίες) και ένα που δεν σχετίζεται με το Y (ορθογώνιες πληροφορίες). Οι προγνωστικές πληροφορίες του Y στο X συγκεντρώνονται στην πρώτη (κύρια) συνιστώσα πρόβλεψης, όπου αποτυπώνεται η διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων, ενώ η διακύμανση στο X που δε σχετίζεται με το Y , τοποθετείται στη δεύτερη (ορθογώνια) συνιστώσα και συνδέεται με τη διαφοροποίηση εντός των ομάδων (Dessi, et al., 2014).

2.5.3 Επικύρωση των μοντέλων

Στη μεταβολομική, η μήτρα πρόβλεψης X έχει συχνά περισσότερες στήλες (μεταβλητές) απ' ότι σειρές (δείγματα) και αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τα μοντέλα PLS/OPLS να υπερπροσαρμοστούν (overfitting) και να υπερεκτιμηθεί η προβλεψιμότητά τους. Ο μόνος τρόπος για την αξιόπιστη εκτίμηση της ικανότητας του μοντέλου, να προβλέψει τις τιμές Y των νέων δειγμάτων, είναι η πρόβλεψη δειγμάτων από ένα ανεξάρτητο σύνολο δεδομένων, το οποίο δε χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του μοντέλου. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με διασταυρούμενη επικύρωση (cross-validation), όπου το σύνολο δεδομένων χωρίζεται σε μια ομάδα εκπαίδευσης (training set), για την κατασκευή του μοντέλου και μια ομάδα δοκιμής (test set), για την εκτίμηση της προβλεψιμότητας του μοντέλου. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές, έτσι ώστε κάθε φορά ένα διαφορετικό μέρος, να αποτελεί την ομάδα δοκιμής. Η διασταυρούμενη επικύρωση μπορεί να αποφέρει αξιόπιστα αποτελέσματα, μόνο εάν υπάρχουν αρκετά δείγματα διαθέσιμα, για να δημιουργήσουν ένα αξιόπιστο μοντέλο. Επομένως, η σημασία των αποτελεσμάτων των μοντέλων πολυμεταβλητής ανάλυσης, εξαρτάται από το μέγεθος του δειγματοχώρου (Triba, et al., 2015).

Τα αποτελέσματα της διαδικασίας διασταυρούμενης επικύρωσης ελέγχονται με δύο παραμέτρους, που είναι οι παράμετροι R^2 και Q^2 . Το R^2 παρουσιάζει την καλή προσαρμοστικότητα του μοντέλου (goodness of fit) και το Q^2 παρουσιάζει την ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου (predictive ability). Το $R^2=1$ (100%) αποτυπώνει την τέλεια περιγραφή των δεδομένων από το μοντέλο και το $Q^2=1$ (100%) αποτυπώνει την τέλεια προβλεπτική ικανότητα. Το R^2 αυξάνεται με τον αριθμό των συνιστωσών, ενώ το Q^2 φτάνει σε ένα σταθερό σημείο, μετά από το οποίο, αρχίζει να μειώνεται με την προσθήκη περισσότερων συνιστωσών. Αυτό σημαίνει ότι μετά από κάποιο βαθμό πολυπλοκότητας, μειώνεται η ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου, καθώς το μοντέλο προσπαθεί να ταιριάξει με τα χαρακτηριστικά του σετ δεδομένων, που δεν είναι πλέον αντιπροσωπευτικά του πληθυσμού που μελετήθηκε. Μια μεγάλη απόκλιση μεταξύ R^2 και Q^2 υποδηλώνει την υπερβολική προσαρμογή (overfitting) του μοντέλου, μέσω της χρήσης πάρα πολλών συνιστωσών. Αξιόπιστα θεωρούνται τα μοντέλα που παρουσιάζουν τιμές R^2 και Q^2 μεγαλύτερες από 0,5, ενώ η διαφορά $R^2 - Q^2$ πρέπει να είναι μικρότερη από περίπου 0,3. Ωστόσο, μπορεί να γίνουν αποδεκτά και μοντέλα με Q^2 μικρότερο του 0,5, αν επικυρωθούν με τον μεταθετικό έλεγχο αποκρίσεων (permutation test) (Triba, et al., 2015).

Στον μεταθετικό έλεγχο αποκρίσεων, η μήτρα Y αναδιατάσσεται τυχαία αρκετές φορές, ενώ η μήτρα X διατηρείται σταθερή. Αυτό σημαίνει ότι τα δεδομένα Y παραμένουν αριθμητικά τα ίδια, αλλά οι θέσεις τους αλλάζουν, με τυχαία ανακατάταξη. Κάθε φορά εξάγεται ένα νέο μοντέλο PLS-DA ή OPLS-DA, χρησιμοποιώντας τη μήτρα δεδομένων X και την αναδιατεταγμένη μήτρα Y , και υπολογίζονται οι τιμές R^2 και Q^2 . Για να είναι το μοντέλο αξιόπιστο, θα πρέπει οι τιμές R^2 και Q^2 που προέρχονται από την αναδιάταξη των δεδομένων της μήτρας Y , να είναι μικρότερες από τις αρχικές τιμές (Dessi, et al., 2014) (Fotakis, et al., 2016).

2.6 Μεταβολομική στο μητρικό γάλα με φασματοσκοπία ^1H NMR

Το μητρικό γάλα θεωρείται πολύ σημαντικό για τη βρεφική διατροφή, καθώς περιέχει μια σειρά από μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά, καθώς και βιοδραστικές ενώσεις, όπως ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και κυτταρικά τμήματα. Η ανάλυση της σύνθετης και δυναμικής σύστασης του μητρικού γάλακτος και των παραγόντων που την επηρεάζουν, αποτελεί μία πρόκληση για τους ερευνητές και είναι αντικείμενο μεγάλου ενδιαφέροντος. Η μεταβολομική μελέτη του μητρικού γάλακτος, έχει βοηθήσει στην επέκταση των γνώσεων, σχετικά με τη μεταβαλλόμενη σύστασή του. Το ^1H NMR είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική, για την ανάλυση πολικών και υδρόφοβων

μεταβολιτών στο μητρικό γάλα, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και ^{13}C -NMR για την ανίχνευση τριακυλογλυκερολών (Ten-Donénech, et al., 2020). Ο χαρακτηρισμός του φάσματος ^1H NMR της πολικής φάσης του μητρικού γάλακτος είναι αρκετά δύσκολος, λόγω της παρουσίας μεγάλου αριθμού επικαλυπτόμενων κορυφών, ειδικά μεταξύ 3,5 και 5,5 ppm όπου εμφανίζονται οι κορυφές των σακχάρων. Το φάσμα ^1H NMR της πολικής φάσης, μπορεί να χωριστεί σε τρεις κύριες φασματικές περιοχές, οι οποίες είναι: 1) Η αλειφατική περιοχή, από 0 έως 3,5 ppm, που περιέχει αμινοξέα, (αλανίνη, ισολευκίνη, λυσίνη, θρεονίνη και βαλίνη), ενδιάμεσα του κύκλου του Krebs (κιτρικό, ηλεκτρικό και ακετογλουταρικό), λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (οξικό και βαλερικό οξύ), το γαλακτικό οξύ, N-ακέτυλο τμήματα, N-τριμέθυλο τμήματα (χολίνη, καρνιτίνη και ακετυλοκαρνιτίνη) και ολιγοσακχαρίτες (σιαλικό οξύ και φουκοσυλιωμένα παράγωγα). 2) Η περιοχή σακχάρων, από 3,5 μέχρι 5,5 ppm, η οποία περιλαμβάνει μια σειρά αλληλεπικαλυπτόμενων σημάτων, λόγω της παρουσίας απλών (γλυκόζη, λακτόζη και μυο-ινοσιτόλη) και σύνθετων σακχάρων (HMOs). 3) Η αρωματική περιοχή που περιλαμβάνει αρωματικά αμινοξέα (ιστιδίνη και τα μεθυλικά της παράγωγα, φαινυλαλανίνη και τυροσίνη) και φαινολικές ενώσεις (4-υδροξυφαινολοξικό οξύ) (Praticò, et al., 2014).

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο, θα γίνει αναφορά σε διάφορες μεταβολομικές μελέτες σε μητρικό γάλα, με φασματοσκοπία ^1H NMR και στα ευρήματά τους.

Η πρώτη μεταβολομική έρευνα σε μητρικό γάλα, πραγματοποιήθηκε από τους Marincola et al. το 2012. Σε αυτή τη μελέτη, οι συγγραφείς εξέτασαν τις δυνατότητες της μεταβολομικής, ως ένα γρήγορο εργαλείο σάρωσης (screening) της σύνθεσης του μητρικού γάλακτος, κατά τον πρώτο μήνα της γαλουχίας, από μητέρες που γέννησαν πρόωρα. Για λόγους σύγκρισης, αναλύθηκαν επίσης μερικά εμπορικά διαθέσιμα δείγματα φόρμουλας γάλακτος. Η εφαρμογή της PCA στα φάσματα NMR, των πολικών εκχυλισμάτων των δειγμάτων μητρικού γάλακτος, έδειξε σαφείς διαφορές στα μεταβολικά προφίλ μητρικού γάλακτος από μητέρες με πρόωρη γέννα και φόρμουλας γάλακτος. Τα πρώτα χαρακτηρίζονταν από υψηλότερες συγκεντρώσεις λακτόζης, ενώ τα δεύτερα από υψηλότερα επίπεδα μαλτόζης (Marincola, et al., 2015). Σε μεταβολομικές μελέτες μητρικού γάλακτος, η ηλικία κύησης είναι μία παράμετρος που ερευνάται συχνά, αν και η επίδρασή της στο μεταβόλωμα του μητρικού γάλακτος, δεν έχει προσδιοριστεί πλήρως. Μελέτες που επικεντρώθηκαν στο μητρικό γάλα από μητέρες πρόωρων νεογνών, έδειξαν ότι, σε σχέση με το μητρικό γάλα από μητέρες τελειόμηνων νεογνών, η σύνθεσή του αλλάζει δυναμικά καθ' όλη τη διάρκεια του πρώτου μήνα γαλουχίας. Ωστόσο, μετά από 5-7 εβδομάδες, η μεταβολική σύσταση του μητρικού γάλακτος από μητέρες πρόωρων

νεογνών, μοιάζει με εκείνη του μητρικού γάλακτος, από μητέρες τελειόμηνων νεογνών (Ten-Doménech, et al., 2020).

Για παράδειγμα, η μελέτη των Sundekilde et al., 2016, είχε ως στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης της ηλικίας κύησης και γαλουχίας, στο μεταβόλωμα του μητρικού γάλακτος, από μητέρες πρόωρων και τελειόμηνων νεογνών στα τρία στάδια γαλουχίας. Τα μεταβολώματα του γάλακτος συγκρίθηκαν, χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου, ^1H NMR. Το αποτέλεσμα ήταν, η διαπίστωση διαφορετικού μεταβολικού προφίλ του μητρικού γάλακτος μητέρων πρόωρων νεογνών, σε σύγκριση με το μητρικό γάλα από μητέρες τελειόμηνων νεογνών, κατά τη διάρκεια τριών σταδίων γαλουχίας, σε 92 συνολικά δείγματα από 45 μητέρες. Ως προς την ηλικία κύησης, η καρνιτίνη, το καπρυλικό, το καπρικό, το παντοθενικό, το β-υδροξυβουτυρικό και η ουρία, βρέθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στο μητρικό γάλα από μητέρες τελειόμηνων νεογνών, σε σύγκριση με το μητρικό γάλα από μητέρες πρόωρων νεογνών, ενώ η λακτόζη, τα φουκοσυλιωμένα τμήματα, το N-ακετυλονευραμινικό οξύ, η N-ακετυλογλυκοζαμίνη, η 3'-σιαλυλακτόζη, η 6'-σιαλυλακτόζη, η λακτο-N-διφουκοεξαόζη I (LNDFH I), το γλουταμινικό οξύ, το κιτρικό οξύ, η φωσφοχολίνη, η χολίνη και το φορμικό οξύ, βρέθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στο μητρικό γάλα από μητέρες πρόωρων νεογνών. Ως προς το στάδιο γαλουχίας, αρκετοί μεταβολίτες γάλακτος, βρέθηκαν να υπάρχουν σε σημαντικά διαφορετική συγκέντρωση στο πρωτόγαλα, το μεταβατικό και το ώριμο γάλα. Φουκοσυλιωμένοι ολιγοσακχαρίτες, και επίσης συστατικά ολιγοσακχαριτών (Φουκόζη, N-ακετυλονευραμινικό οξύ και N-ακετυλογλυκοζαμίνη), βρέθηκαν σε υψηλότερα επίπεδα στο πρωτόγαλα και τα επίπεδά τους μειώθηκαν στα δείγματα ώριμου μητρικού γάλακτος. Επιπλέον, τα επίπεδα της βαλίνης, της λευκίνης, του παντοθενικού, του κιτρικού οξέος, του γαλακτικού οξέος, της βεταΐνης και της κρεατινίνης, ήταν υψηλότερα στο πρωτόγαλα και το μεταβατικό γάλα, σε σύγκριση με το ώριμο μητρικό γάλα, και τα επίπεδα γλουταμινικού, βουτυρικού, καπρυλικού και καπρικού, ήταν υψηλότερα στο ώριμο μητρικό γάλα, σε σύγκριση με το πρωτόγαλα και το μεταβατικό γάλα (Sundekilde, et al., 2016).

Ένας άλλος παράγοντας που έχει μελετηθεί, είναι η γεωγραφική τοποθεσία της μητέρας και κατά συνέπεια του μητρικού γάλακτος. Μία μελέτη διερεύνησε τη μεταβολή του μεταβολικού αποτυπώματος του μητρικού γάλακτος, από μητέρες από πέντε διαφορετικές χώρες. Δείγματα μητρικού γάλακτος (n=109), συλλέχθηκαν ένα μήνα μετά τον τοκετό από μητέρες από την Αυστραλία, την Ιαπωνία, τις ΗΠΑ, τη Νορβηγία και τη Νότια Αφρική και αναλύθηκαν με ^1H NMR. Σε αυτή τη σύγκριση, παρατηρήθηκε

ομαδοποίηση των δειγμάτων ανά χώρα προέλευσης, με αποτέλεσμα οι μεταβολίτες του μητρικού γάλακτος, στις μητέρες της Νότιας Αφρικής να διαφέρουν σημαντικά από εκείνους στις μητέρες από τη Νορβηγία, τις ΗΠΑ και την Αυστραλία. Οι μεταβολίτες του μητρικού γάλακτος σε μητέρες από την Ιαπωνία, σχημάτισαν μια αλληλεπικαλυπτόμενη ομάδα μεταξύ Νορβηγίας και Νότιας Αφρικής. Η κρεατίνη και το α-κετογλουταρικό ήταν οι μεταβολίτες, που ευθύνονταν κυρίως για αυτές τις διαφορές μεταξύ των χωρών και είχαν τα υψηλότερα επίπεδα στο μητρικό γάλα των γυναικών της Νοτίου Αφρικής (Gay, et al., 2018). Μία άλλη μελέτη, αποσκοπούσε στη διερεύνηση της επίδρασης της γεωγραφικής θέσης και του είδους τοκετού, στο μεταβολικό προφίλ του μητρικού γάλακτος, με χρήση πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού NMR, σε 79 υγιείς μητέρες από τη Φινλανδία, την Ισπανία, τη Νότια Αφρική και την Κίνα. Συνολικά 68 μεταβολίτες εντοπίστηκαν στο μητρικό γάλα, ένα μήνα μετά τον τοκετό. Το μεταβολικό προφίλ του μητρικού γάλακτος, βρέθηκε να διαφέρει μεταξύ των χωρών. Η ανάλυση PLS-DA έδειξε ότι τα ισπανικά δείγματα ήταν ιδιαίτερα διασκορπισμένα, και έμοιαζαν περισσότερο με τα φινλανδικά και τα νοτιοαφρικανικά δείγματα, ενώ διέφεραν εντελώς από τα κινεζικά δείγματα. Αυτή η διασπορά δε συσχετίστηκε με διαφορές στα μητρικά χαρακτηριστικά, όπως ο αριθμός τόκου, η ηλικία ή το BMI μεταξύ των δειγμάτων. Στις μητέρες από τη Φινλανδία και την Ισπανία παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αφθονία λακτο-N-φουκοπενταόζης I και 2-φουκοσυλλακτόζης, ενώ τα επίπεδα 3-φουκοσυλλακτόζης και λακτο-N-φουκοπενταόζης III, ήταν πιο άφθονα στη Νότια Αφρική και την Κίνα, αντίστοιχα. Τα φινλανδικά και ισπανικά δείγματα, χαρακτηρίστηκαν από υψηλότερα επίπεδα λιποπρωτεϊνών (LDL και VLDL). Λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFA), ανιχνεύθηκαν επίσης με υψηλότερα επίπεδα οξικού και φορμικού οξέος στα ισπανικά δείγματα (Gómez-Gallego, et al., 2018).

Ως προς το είδος τοκετού, το γάλα από τις μητέρες που είχαν φυσιολογικό τοκετό, είχε υψηλότερα επίπεδα 3-υδροξυβουτυρικού ($p=0,048$) και λακτο-N-φουκοπενταόζης III ($p=0,045$), ενώ το γάλα από τις μητέρες που υποβλήθηκαν σε καισαρική τομή, είχε υψηλότερα επίπεδα βουτυρικού ($p= 0,043$), αιθανολαμίνης ($p=0,004$), προλίνης ($p=0,018$) και ουρίας ($p=0,02$). Ωστόσο, αυτές οι διαφορές φάνηκε να εξαρτώνται και από τη χώρα προέλευσης. Συγκεκριμένα, βρέθηκαν σημαντικές διαφορές σε 16 μεταβολίτες στα δείγματα της Νοτίου Αφρικής, σε 11 μεταβολίτες στα δείγματα της Ισπανίας, σε 4 στα δείγματα της Φινλανδίας και σε έναν μεταβολίτη στα δείγματα της Κίνας, αντανακλώντας τις γεωγραφικές διαφορές, ως προς την επίδραση της καισαρικής τομής στο μεταβόλωμα

του μητρικού γάλακτος. Οι διαφορές αυτές ίσως να οφείλονται, σε διαφορές στις κλινικές διαδικασίες και στη χρήση αντιβιοτικών (Gómez-Gallego, et al., 2018).

Εφαρμόζοντας μεταβολομική με NMR, μια μελέτη των Briana et al., 2020 διερεύνησε το μεταβολικό προφίλ του πρωτογάλακτος, ως προς τις συνθήκες ανάπτυξης του εμβρύου και πώς θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη θρεπτική του αξία. Από 98 μητέρες από τις οποίες 60 γέννησαν φυσιολογικά για την ηλικία κύησης (AGA) νεογνά, 19 γέννησαν μεγάλα για την ηλικία κύησης (LGA) νεογνά και 19 γέννησαν νεογνά ενδομήτριας υπολειπόμενης ανάπτυξης (IUGR), συλλέχθηκαν δείγματα πρωτογάλακτος από την τρίτη έως την τέταρτη ημέρα μετά τον τοκετό και εξετάστηκαν με φασματοσκοπία NMR. Υπό κανονικές συνθήκες, τα νεογνά είναι φυσιολογικά για την ηλικία κύησης (AGA), δηλαδή βρίσκονται μεταξύ 10^{15} και 90^{15} εκατοστιαίας θέσης αναφοράς. Ωστόσο, διάφορες παθολογικές καταστάσεις στη μητέρα, στο έμβρυο και ιδιαίτερα στον πλακούντα, μπορεί να διαταράζουν την ανάπτυξη του εμβρύου, με αποτέλεσμα είτε να βρίσκεται κάτω από τη 10^{11} εκατοστιαία θέση αναφοράς και να εμφανίζει ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (IUGR), είτε να βρίσκεται πάνω από την 90^{11} εκατοστιαία θέση αναφοράς και να είναι μεγάλο για την ηλικία κύησης (LGA), γνωστό και ως μακροσωμικό (ή μακροσωμιακό). Τόσο τα IUGR όσο και τα μακροσωμικά νεογνά, παρουσιάζουν μεταβολές στην ανάπτυξη του εμβρυϊκού λιπώδους ιστού, διαταραχές του μεταβολισμού των θρεπτικών συστατικών και της ενέργειας σε πρώιμο στάδιο μετά τον τοκετό και μόνιμες μεταβολικές αλλαγές, προδιαθέτοντάς τα για επιπλοκές στα μετέπειτα στάδια ζωής τους, όπως παχυσαρκία, μεταβολικό σύνδρομο και νευροψυχιατρικές διαταραχές. Στοιχεία έχουν δείξει πως ο αποκλειστικός θηλασμός, θα μπορούσε να καλύψει τις θρεπτικές ανάγκες των νεογνών IUGR και να προστατέψει τα νεογνά LGA από τον κίνδυνο παχυσαρκίας στην παιδική ηλικία, γι αυτό και η μελέτη των Briana et al., 2020 είναι μεγάλης σημασίας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, τα δείγματα LGA και IUGR πρωτογάλακτος εμφάνισαν αυξημένη περιεκτικότητα σε λακτόζη, κιτρικό οξύ, χολίνη, φωσφοχολίνη και N-ακετυλογλουταμίνη. Τα δείγματα AGA εμφάνισαν αυξημένη περιεκτικότητα σε ισολευκίνη και βαλίνη. Τα μεταβολικά μονοπάτια που ενεπλάκησαν, ήταν η βιοσύνθεση και η αποικοδόμηση της βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης, ο μεταβολισμός των γλυκεροφωσφολιπιδίων, η βιοσύνθεση αμινοάκυλο-tRNA και ο κύκλος του Krebs (Briana, et al., 2020).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μελέτη των Smilowitz et al., 2013, στην οποία μεταξύ άλλων διερευνήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ της μητρικής διατροφής, του τρόπου ζωής και του φαινοτύπου της μητέρας, με τους μεταβολίτες του μητρικού γάλακτος. Μια

αρνητική σχέση προσδιορίστηκε μεταξύ του μητρικού BMI, που μετρήθηκε την 60^η μέρα μετά τον τοκετό και της συγκέντρωσης ακετόνης στο μητρικό γάλα. Μια σύγκριση ασιτίας και σίτισης από τις συμμετέχουσες, κατά τη στιγμή της συλλογής του δείγματος, έδειξε ότι η γαλακτόζη και η αλανίνη ήταν 65% και 36%, αντίστοιχα, υψηλότερες στο γάλα που συλλέχθηκε από γυναίκες, που είχαν καταναλώσει γεύμα εντός 4 ωρών, από τη συλλογή δείγματος, σε σύγκριση με τις μητέρες από τις οποίες συλλέχθηκε δείγμα γάλακτος, τουλάχιστον μετά από 10 ώρες ασιτίας (Smilowitz, et al., 2013).

Αρκετές μελέτες μητρικού γάλακτος με NMR, έχουν επικεντρωθεί στον προσδιορισμό των HMOs, καθώς φαίνεται να έχουν πολλές σημαντικές προστατευτικές, βιολογικές λειτουργίες. Σύμφωνα με τη σύνθεση των HMOs, το μητρικό γάλα μπορεί να ταξινομηθεί, σε γάλα από μητέρες με εκκριτικό (secretory) φαινότυπο και σε γάλα από μητέρες με μη εκκριτικό (non-secretory) φαινότυπο (Dessi, et al., 2018). Άλλες πληροφορίες σχετικά με το φύλο του νεογνού, τον αριθμό τόκου και την ηλικία της μητέρας, έχουν αναφερθεί συχνά σε μεταβολομικές μελέτες, αλλά αποτελούν δευτερεύοντες παράγοντες διερεύνησης. Επομένως, η επίδραση αυτών των παραμέτρων στη σύνθεση του μεταβολώματος του μητρικού γάλακτος, δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί (Ten-Doménech, et al., 2020).

Συμπερασματικά, σε λιγότερο από μια δεκαετία, έχουν δημοσιευτεί 26 ερευνητικές εργασίες, που προσπαθούν να μελετήσουν τη σύνθετη και δυναμική σύσταση του μητρικού γάλακτος και έχει αποδειχθεί, η ύπαρξη διαφορετικών επιλογών για τη συλλογή του δείγματος και για την ανίχνευση των μεταβολιτών (Ten-Doménech, et al., 2020). Λόγω των πολλών παραγόντων, που επηρεάζουν τη σύσταση του μητρικού γάλακτος, υπάρχουν πολλά περιθώρια ακόμα για διερεύνηση της συγκεκριμένης περιοχής. Ειδικά για το πρωτόγαλα, ο αριθμός των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί είναι περιορισμένος, λόγω και της δυσκολίας συλλογής μεγάλης ποσότητας δείγματος, εξαιτίας του μικρού του όγκου. Επίσης, απ' όσο γνωρίζουμε, δεν υπάρχει μία συνολική μελέτη του μεταβολικού αποτυπώματος του πρωτογάλακτος, που να συσχετίζει τη σύστασή του, ως προς τους μεταβολίτες, με διάφορα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά της μητέρας και διατροφικές της συνήθειες. Ως προς αυτή την κατεύθυνση βοηθά και συμπληρώνει με τα αποτελέσματά της η παρούσα μελέτη.

B. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι, η συγκριτική μελέτη του μεταβολικού αποτυπώματος του πρωτογάλακτος, που προέρχεται από υγιείς μητέρες τελειόμηνων νεογνών, με διαφορετικά ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά και διατροφικές συνήθειες. Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει, τη μελέτη του μεταβολικού αποτυπώματος των δειγμάτων, μέσα από τη λήψη φασμάτων ^1H NMR και την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση ορισμένων στατιστικώς σημαντικών μεταβολιτών, όπως προκύπτουν από τα αποτελέσματα πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης. Επίσης, διερευνάται η συσχέτιση αυτών των μεταβολιτών, με τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των μητέρων και με συγκεκριμένες διατροφικές τους συνήθειες, όπως προέκυψαν από τη συμπλήρωση αντίστοιχου ερωτηματολογίου. Τέλος, επιχειρείται να προσδιοριστούν τα μεταβολικά μονοπάτια, που επηρεάζονται και να διατυπωθούν υποθέσεις για τους παράγοντες, που επηρεάζουν τη σύσταση του πρωτογάλακτος, ως προς τους δευτερογενείς μεταβολίτες.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 3. Μεταβολομική μελέτη δειγμάτων πρωτογάλακτος

Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα φάσματα ^1H NMR, από δείγματα πρωτογάλακτος υγείων μητέρων, που είχαν συλλεχθεί από τη νεογνολογική κλινική του Αρεταίειου Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου, για μεγαλύτερου εύρους μελέτες, με στόχο τη συσχέτιση του μεταβολικού προφίλ πρωτογάλακτος, με παθήσεις της μητέρας ή του νεογνού.

Πριν τη δειγματοληψία, είχε συμπληρωθεί από τις συμμετέχουσες μητέρες ερωτηματολόγιο, το οποίο περιλάμβανε πληροφορίες για τα ανθρωπομετρικά τους χαρακτηριστικά, το είδος τοκετού, το φύλο και το βάρος του νεογνού, την ηλικία κύησης, την εκατοστιαία θέση του νεογνού, τις διατροφικές και καπνικές τους συνήθειες.

Παρόλο που η συγκεκριμένη μελέτη, δεν περιλάμβανε τα στάδια της δειγματοληψίας, επεξεργασίας των δειγμάτων και τη λήψη των φασμάτων, παρατίθενται ακολούθως οι σχετικές πληροφορίες.

Για τη δειγματοληψία, ζητήθηκαν από τις συμμετέχουσες θηλάζουσες μητέρες 5-6 mL πρωτογάλακτος, την τρίτη ή τέταρτη ημέρα μετά τον τοκετό, ώστε να έχει αυξηθεί η παραγωγή γάλακτος. Το πρωτόγαλα συλλέχθηκε στο τέλος του θηλασμού τις πρωινές ώρες (9 π.μ.-10 π.μ.), με τη χρήση ηλεκτρικής αντλίας μαστού. Ακολουθήθηκε για όλες η ίδια διαδικασία, ώστε να είναι συγκρίσιμα τα δείγματα.

Σε χρονικό διάστημα 20 λεπτών από τη δειγματοληψία, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο σε ειδικά δοχεία με πάγο, και αμέσως φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά στα 1500 g, σε φυγόκεντρο με ψύξη στους 4 °C. Η υδατική φάση του γάλακτος λήφθηκε και τοποθετήθηκε σε καταψύκτη στους -80 °C. Τα δείγματα στη συνέχεια εξετάστηκαν με φασματοσκοπία NMR, με την εξής διαδικασία: αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, 1 ώρα πριν από την εκτέλεση των πειραμάτων NMR. Έγινε ανάμιξη 300 μL πρωτογάλακτος, με 240 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών σε δευτεριωμένο νερό (D_2O). Μετά από φυγοκέντρηση στους 4 °C για 10 λεπτά στα 10.000 g, προστέθηκαν σε 500 μL του υπερκείμενου, 50 μL TSP ως εσωτερικό πρότυπο και τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε σωλήνες NMR 5 mm. Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε, σε φασματογράφο NMR Varian 600 MHz, του εργαστηρίου Μοριακής Ανάλυσης στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών. Ο φασματογράφος διέθετε ανιχνευτή τριπλού συντονισμού (υδρογόνου-άνθρακα-αζώτου, ^1H , ^{13}C , ^{15}N) και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (25°C).

Για τη λήψη φασμάτων ^1H NMR των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε παλμική αλληλουχία 1D NOEYSYPRESAT (One Dimensional Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy Presaturation) και πραγματοποιήθηκε στις 128 σαρώσεις (scans), σε 64.000 σημεία δεδομένων (data points) (Briana, et al., 2020).

3.1 Ομαδοποίηση Δεδομένων Ερωτηματολογίου

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, από τις συμμετέχουσες μητέρες, είχε συμπληρωθεί ένα ερωτηματολόγιο με τις εξής πληροφορίες: εθνικότητα, αριθμός τόκου, ηλικία, βάρος και ύψος μητέρας, BMI, ημερομηνία γέννησης, ηλικία κύησης, είδος τοκετού, φύλο, βάρος γέννησης, εκατοστιαία θέση νεογνού, σακχαρώδης διαβήτης, αρτηριακή υπέρταση, παθολογία, φαρμακευτική αγωγή, κατανάλωση ψαριού, κρέατος, οσπρίων, γάλακτος, αυγών, κάποια ιδιαιτερότητα στη διατροφή, κάπνισμα και αλκοόλ πριν και κατά τη διάρκεια της κύησης. Ωστόσο, δε χρησιμοποιήθηκαν όλες αυτές οι πληροφορίες στην παρούσα έρευνα. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε να εξεταστεί η επίδραση στο μεταβολικό προφίλ του μητρικού γάλακτος, κάποιων ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών (εθνικότητα, ηλικία, δείκτης μάζας σώματος BMI και αριθμός τόκου), των διατροφικών συνηθειών (κατανάλωση ψαριού, κρέατος, οσπρίων, γάλακτος, αυγών), καθώς και συνηθειών σχετικών με το κάπνισμα και το αλκοόλ, πριν και κατά τη διάρκεια της κύησης. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι απαντήσεις από 55 μητέρες και τα αντίστοιχα φάσματα NMR, στα οποία θα γίνει αναφορά στη συνέχεια. Στον πίνακα 1 παρατίθενται τα στοιχεία του ερωτηματολογίου.

Για να μπορέσουν να αξιοποιηθούν πιο εύκολα τα στοιχεία του ερωτηματολογίου, έγινε μία ομαδοποίηση των απαντήσεων. Σχετικά με τις διατροφικές παραμέτρους, η ομαδοποίηση είχε ως λογική να διακρίνει τις απαντήσεις, ως προς την κατανάλωση του εκάστοτε τροφίμου σε συχνή, λιγότερο συχνή και σπάνια και με βάση τον αριθμό των απαντήσεων, χωρίστηκαν σε τρεις ή τέσσερις ομάδες έτσι ώστε, λαμβάνοντας υπ' όψιν και τον περιορισμό του μεγέθους του δειγματοχώρου μας, να εξασφαλιστεί ένας ικανοποιητικός αριθμός δειγμάτων σε κάθε ομάδα. Γενικά οι ομάδες στηρίχτηκαν σε ποιοτικά χαρακτηριστικά και ο προσδιορισμός τους ήταν σε άμεση συσχέτιση, με τους περιορισμούς και τις διατυπώσεις του ίδιου του ερωτηματολογίου. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι ομαδοποιήσεις που έγιναν, για την κάθε παράμετρο:

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ	ΟΜΑΔΑ 1	ΟΜΑΔΑ 2	ΟΜΑΔΑ 3	ΟΜΑΔΑ 4
Εθνικότητα	Ελληνική (N=30)	Αλβανική (N=10)	Άλλη (N=15)	
BMI (kg/m ²)	≤25 (κανονικό βάρος) (N=20)	26-30 (υπέρβαρη) (N=18)	≥30 (παχύσαρκη) (N=17)	
Ηλικία	<30 (N=13)	30-35 (N=24)	≥35 (N=18)	
Αριθμός τόκου	1 (N=26)	2 (N=18)	>2 (N=11)	
Ψάρι	1-3φ/εβ (N=26)	1-2φ/μην (N=19)	ποτέ/σπάνια (N=8)	
Κρέας	3-7φ/εβ (N=27)	1-2φ/εβ (N=20)	Σπάνια (N=4)	
Γάλα	2-4π/ημ (N=13)	1π/ημ (N=31)	Ποτέ (N=9)	Σόγια/αμυγδάλου (N=1)
Όσπρια	2-4φ/εβ (N=22)	1φ/εβ (N=13)	1-2φ/μην (N=9)	Ποτέ/σπάνια (N=8)
Αυγά	3-7φ/εβ (N=17)	1-2φ/εβ (N=19)	ποτέ/σπάνια (N=10)	
Κάπνισμα προ κύησης	Ναι (N=14)	Όχι (N=27)		
Κάπνισμα κατά κύηση	Ναι (N=6)	Όχι (N=31)		
Αλκοόλ προ κύησης	Ναι (N=6)	Όχι (N=33)		
Αλκοόλ κατά κύηση	Ναι (N=3)	Όχι (N=34)		

φ/εβ: φορές την εβδομάδα, φ/μην: φορές το μήνα, π/ημ: ποτήρι την ημέρα

Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι ομαδοποιημένες απαντήσεις του ερωτηματολογίου. Σε κάποια δείγματα υπάρχουν ερωτήσεις που δεν απαντήθηκαν, γεγονός που εξηγεί τα κενά στους πίνακες.

Πίνακας 1: Απαντήσεις ερωτηματολογίου

a/a	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΒΜΙ (kg/m ²)	ΗΛΙΚΙΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΟΚΟΥ	ΨΑΡΙ	ΚΡΕΑΣ	ΓΑΛΛΑ	ΟΣΠΡΙΑ	ΑΥΓΑ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΠΡΟ ΚΥΗΣΗΣ	ΚΑΠΝΙΣΜΑ ΚΑΤΑ ΚΥΗΣΗ	ΑΛΚΟΟΛ ΠΡΟ ΚΥΗΣΗΣ	ΑΛΚΟΟΛ ΚΑΤΑ ΚΥΗΣΗ
1	1	Ελληνική	24	31	1	1/15 ημ.	2-3/εβ.	1-2π/ημ.	Σπάνια		Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
2	2	Ελληνική	29	38	1	1/15 ημ.	1/εβ.	Σόγια/ Αμυγδάλου	2/εβ.		Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
3	5	Ελληνική	25	31	2	3/εβ.	4/εβ.	Όχι	1/15ημ	Σπάνια	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
4	6	Ελληνική	28	32	1	1/15 ημ.	3-4/εβ.	Όχι	Όχι	Αρκετά	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
5	12	Αιγυπτιακή	55	36	4	1/εβ.	1/εβ.	1ποτ/ημ	Αρκετά	2-3/εβ	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
6	15	Βουλγαρική	28	35	2	1/εβ.	4-5/εβ.	1π/ημ	1/εβ.	3-4/εβ	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
7	16	Φιλιππίνες	22	32	4	2/εβ.	1/εβ.	1λίτρο/ημ	2/εβ.	1/εβ.	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
8	17	Ελληνική	18	31	1	1/μην	2/εβ.	Όχι	2/εβ.	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
9	18	Ελληνική	30	33	2	1/εβ.	3/εβ.	2π/ημ	1/εβ.	1/εβ.	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
10	24	Μολδαβία	33	30	1						Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
11	26	Ρουμάνικη	27	24	3	1/μην	4-5/εβ.	Όχι	1/μην	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
12	27	Ελληνική	25	36	2	2/εβ.	1/εβ.	1π/ημ	Όχι		Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
13	29	Ρωσική	25	35	3	1/μην	5-6/εβ	Όχι	1/εβ.	2-3/εβ	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
14	33	Ελληνική	31	32	3	Όχι	4/εβ.	1π/ημ	1-2/εβ.	2/εβ.	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
15	34	Ελληνική	21	28	1	Όχι	2/εβ.	1π/ημ	2/εβ.	1/εβ.	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
16	35	Ελληνική	37	34	1	1/εβ.	2/εβ.	1π/ημ	2/εβ.	1-2/εβ	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
17	36	Ελληνική	39	37	2	2/εβ.	2/εβ.	1π/ημ	Όχι	2/εβ.	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
18	37	Αλβανική	19	32	2	2/εβ.	3/εβ.	2π/ημ	2-3/εβ.	1/εβ.	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
19	38	Αλβανική	25	35	1	2/εβ.	1-2/εβ.	2π/ημ	1/εβ.		Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
20	40	Ουκρανική	24	33	1	Όχι	3-4/εβ.	1π/ημ	Σπάνια	2-3/εβ	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι
21	41	Φιλιππίνες	24	31	1	1/εβ.	2/εβ.	1π/ημ	1/εβ.	1/ημ	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
22	42	Αλβανική	29	20	1	1-2/εβ.	2/εβ.	1π/ημ	1-2/εβ.	1-2/εβ	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
23	43	Αλβανική	31	33	2	1/εβ.	Λίγο	1π/ημ	3/εβ.	1/ημ	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
24	44	Καζακστάν	29	27	1	1/εβ.	3/εβ.	1π/ημ	2/εβ.	2-3/εβ	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
25	45	Ελληνική	34	34	3	1/εβ.	4/εβ.	1π/ημ	1/10ημ	1/εβ.	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
26	47	Αλβανική	23	32	1	1/εβ.	2-3/εβ.	2-3π/ημ	3/εβ.	1-2/εβ	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι
27	48	Ελληνική	23	32	3	1/μην	2-3/εβ.	1π/ημ	1/εβ.	1/εβ.	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
28	50	Ελληνική	40	33	1	Όχι	3/εβ.	1λίτρο/ημ	Όχι	Όχι	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
29	51	Ελληνική	26	24	2	1/εβ.	2/εβ.	1π/ημ	Όχι	1-2/εβ	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
30	52	Ελληνική	27	26	1	1/εβ.	2-3/εβ.	1π/ημ	3-4/εβ.	Όχι	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
31	53	Ουκρανική	26	40	1	1/15 ημ.	1/ημ	1π/ημ	2/εβ.	1/ημ	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
32	54	Μολδαβία	23	27	2	2/μην	2/μην	Όχι	1/εβ.	3-4/εβ	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
33	55	Ελληνική	29	34	1	1/10ημ	3-4/εβ.	1π/ημ	3-4/εβ.	1/ημ	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι
34	56	Ελληνική	24	35	1	Όχι	1/εβ.	1π/ημ	3/εβ.	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι
35	58	Ρουμάνικη	32	34	5	1/μην	1/εβ.	1π/ημ	1/εβ.	2/εβ.	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
36	63	Ελληνική	23	24	2	1φ/εβ.	4/εβ.	2-3π/ημ	1/15ημ	Όχι				
37	65	Αλβανική	22	27	2	1φ/μην	2/εβ.	1π/ημ	1/εβ.	2/εβ.				
38	71	Αλβανική	27	39	2		5/εβ.	Όχι	2/εβ.	4/εβ.				
39	74	Ελληνική	29	28	1	1/εβ.	3/εβ.	Όχι	2/εβ.					
40	77	Ελληνική	29	34	1	1-2/μην	5/εβ.	1π/ημ	1-2/εβ.	3-4/εβ.	10τσ/ημ		2-3 π/εβ.	
41	78	Ρουμάνικη	27	35	1	1-2/εβ.	3-4/εβ.	1π/ημ	1/μην	2-3/εβ.			3φ/εβ.	3φ/εβ.
42	79	Ελληνική	28	31	1	1/μην	5-7/εβ.	1π/ημ	1/μην	2-3/εβ.				
43	81	Ελληνική	25	38	2	Όχι	1/3μην	1π/ημ	1/εβ.	Όχι	10τσ/ημ			
44	83	Ελληνική	30	36	3	1/εβ.	4-5/εβ.	2π/ημ	1-2/εβ.	1-2/εβ.				
45	84	Αλβανική	31	27	1	1/μην	3/εβ.	1π/ημ	1-2/εβ.	3/εβ.				
46	85	Ελληνική	28	32	3	Όχι	1/15ημ	Όχι	Ναι	Όχι	Ναι			
47	88	Καζακστάν	28	32	1	1/εβ.	2/εβ.	1π/ημ	1/15ημ	2/εβ.	10τσ/ημ	10τσ/ημ	1φ/ημ	
48	89	Μολδαβία	25	27	2	1/15ημ	2-3/εβ.	1π/ημ	2/εβ.	1-2/εβ.				
49	91	Ελληνική	29	38	2	1/εβ.	2/εβ.	1-2π/ημ	1/μην	2/εβ.				
50	93	Αλβανική	25	38	1	Όχι	1/εβ.	1π/ημ	Σπάνια	Σπάνια	1τσ/ημ	1τσ/ημ		
51	94	Ελληνική	30	41	2	1/μην	3-4/εβ.	1π/ημ	1/εβ.					
52	97	Ελληνική	30	24	2	2/μην	4-5/εβ.	1-2π/ημ	1/εβ.		10τσ/ημ			
53	98	Ελληνική	32	34	3	1/10ημ	3/εβ.	2π/ημ	3/εβ.	2-3/εβ.				
54	100	Αλβανική	29	35	2	1/εβ.	2-3/εβ.	1π/ημ		2-3/εβ.				
55	101	Ελληνική	33	42	1	2/εβ.	1-2/εβ.	2π/ημ	1/15ημ				Ναι	1π /εβ

Πίνακας 2: Απαντήσεις ερωτηματολογίου με βάση τις ομαδοποιήσεις

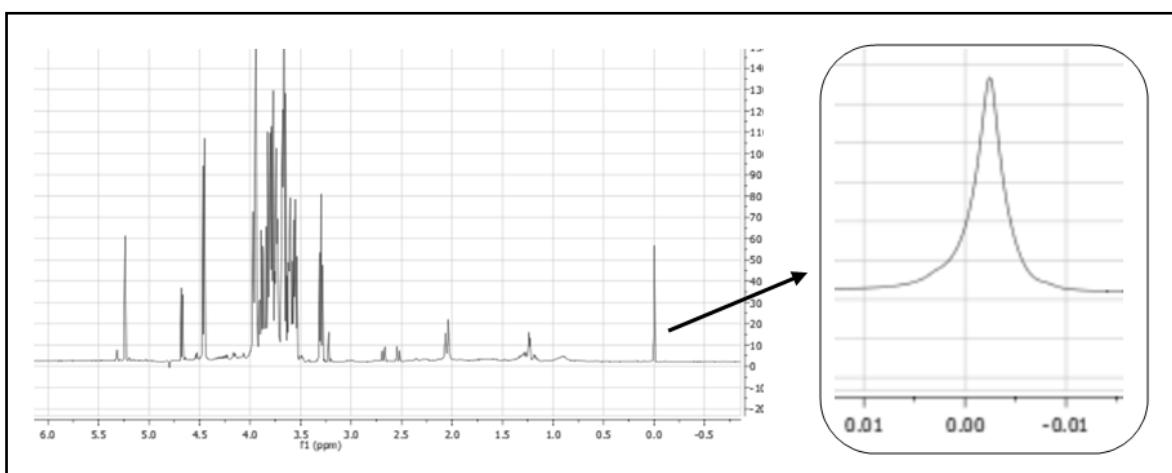
α/α	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΘΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΒΜΗ (kg/m ²)	ΗΛΙΚΙΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΟΚΟΥ	ΨΑΡΙ	ΚΡΕΑΣ	ΓΛΑΛΗ	ΟΣΠΡΙΑ	ΑΥΓΑ	ΚΑΙΝΙΣΜΑ ΠΡΟ ΚΥΗΣΗΣ	ΚΑΙΝΙΣΜΑ ΚΑΤΑ ΚΥΗΣΗ	ΑΛΚΟΟΛ ΠΡΟ ΚΥΗΣΗΣ	ΑΛΚΟΟΛ ΚΑΤΑ ΚΥΗΣΗ
1	1	Ελληνική	<=25	30-34	1	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	ποτέ/σπάνια		Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
2	2	Ελληνική	26-30	>=35	1	1-2(φ/μην)	1-2(φ/εβ)	Σόγια/ αμυγδάλου	2-4(φ/εβ)		Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
3	5	Ελληνική	<=25	30-34	2	1-3(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	ποτέ	1-2(φ/μην)	ποτέ/σπάνια	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
4	6	Ελληνική	26-30	30-34	1	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	ποτέ	ποτέ/σπάνια	1-2(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
5	12	Άλλη	>=30	>=35	>2	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	1(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
6	15	Άλλη	26-30	>=35	2	1-3(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	1(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
7	16	Άλλη	<=25	30-34	>2	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
8	17	Ελληνική	<=25	30-34	1	1-2(φ/μην)	1-2(φ/εβ)	ποτέ	2-4(φ/εβ)	ποτέ/σπάνια	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
9	18	Ελληνική	>=30	30-34	2	1-3(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	1(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
10	24	Άλλη	>=30	30-34	1						Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
11	26	Άλλη	26-30	<30	>2	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	ποτέ	1-2(φ/μην)	ποτέ/σπάνια	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
12	27	Ελληνική	<=25	>=35	2	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	ποτέ/σπάνια		Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
13	29	Άλλη	<=25	>=35	>2	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	ποτέ	1(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
14	33	Ελληνική	>=30	30-34	>2	ποτέ/σπάνια	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
15	34	Ελληνική	<=25	<30	1	ποτέ/σπάνια	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
16	35	Ελληνική	>=30	30-34	1	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
17	36	Ελληνική	>=30	>=35	2	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	ποτέ/σπάνια	1-2(φ/εβ)	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
18	37	Αλβανική	<=25	30-34	2	1-3(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
19	38	Αλβανική	<=25	>=35	1	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	1(φ/εβ)		Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
20	40	Άλλη	<=25	30-34	1	ποτέ/σπάνια	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	ποτέ/σπάνια	3-7(φ/εβ)	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
21	41	Άλλη	<=25	30-34	1	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	1(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
22	42	Αλβανική	26-30	<30	1	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
23	43	Αλβανική	>=30	30-34	2	1-3(φ/εβ)	σπάνια	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
24	44	Άλλη	26-30	<30	1	1-3(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
25	45	Ελληνική	>=30	30-34	>2	1-3(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	1-2(φ/μην)	1-2(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
26	47	Αλβανική	<=25	30-34	1	1-3(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι
27	48	Ελληνική	<=25	30-34	>2	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	1(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
28	50	Ελληνική	>=30	30-34	1	ποτέ/σπάνια	3-7(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	ποτέ/σπάνια	ποτέ/σπάνια	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
29	51	Ελληνική	26-30	<30	2	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	ποτέ/σπάνια	1-2(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
30	52	Ελληνική	26-30	<30	1	1-3(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	ποτέ/σπάνια	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
31	53	Άλλη	26-30	>=35	1	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
32	54	Άλλη	<=25	<30	2	1-2(φ/μην)	σπάνια	ποτέ	1(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
33	55	Ελληνική	26-30	30-34	1	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	Ναι	Ναι	Όχι	Όχι
34	56	Ελληνική	<=25	>=35	1	ποτέ/σπάνια	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	ποτέ/σπάνια	Ναι	Όχι	Ναι	Όχι
35	58	Άλλη	>=30	30-34	>2	1-2(φ/μην)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	1(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
36	63	Ελληνική	<=25	<30	2	1-3(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	1-2(φ/μην)	ποτέ/σπάνια				
37	65	Αλβανική	<=25	<30	2	1-2(φ/μην)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	1(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)				
38	71	Αλβανική	26-30	>=35	2		3-7(φ/εβ)	ποτέ	2-4(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)				
39	74	Ελληνική	26-30	<30	1	1-3(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	ποτέ	2-4(φ/εβ)					
40	77	Ελληνική	26-30	30-34	1	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	Ναι		Ναι	
41	78	Άλλη	26-30	>=35	1	1-3(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)			Ναι	Ναι
42	79	Ελληνική	26-30	30-34	1	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)				
43	81	Ελληνική	<=25	>=35	2	ποτέ/σπάνια	σπάνια	1(π/ημ)	1(φ/εβ)	ποτέ/σπάνια	Ναι			
44	83	Ελληνική	>=30	>=35	>2	1-3(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)				
45	84	Αλβανική	>=30	<30	1	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)				
46	85	Ελληνική	26-30	30-34	>2	ποτέ/σπάνια	σπάνια	ποτέ		ποτέ/σπάνια	Ναι			
47	88	Άλλη	26-30	30-34	1	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	1-2(φ/μην)	1-2(φ/εβ)	Ναι	Ναι	Ναι	
48	89	Άλλη	<=25	<30	2	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)				
49	91	Ελληνική	26-30	>=35	2	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	1-2(φ/μην)	1-2(φ/εβ)				
50	93	Αλβανική	<=25	>=35	1	ποτέ/σπάνια	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	ποτέ/σπάνια	ποτέ/σπάνια	Ναι	Ναι		
51	94	Ελληνική	>=30	>=35	2	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)	1(φ/εβ)					
52	97	Ελληνική	>=30	<30	2	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	1(φ/εβ)		Ναι			
53	98	Ελληνική	>=30	30-34	>2	1-2(φ/μην)	3-7(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)				
54	100	Αλβανική	26-30	>=35	2	1-3(φ/εβ)	3-7(φ/εβ)	1(π/ημ)		3-7(φ/εβ)				
55	101	Ελληνική	>=30	>=35	1	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	1-2(φ/μην)				Ναι	Ναι

3.2 Προ-επεξεργασία των φασμάτων NMR

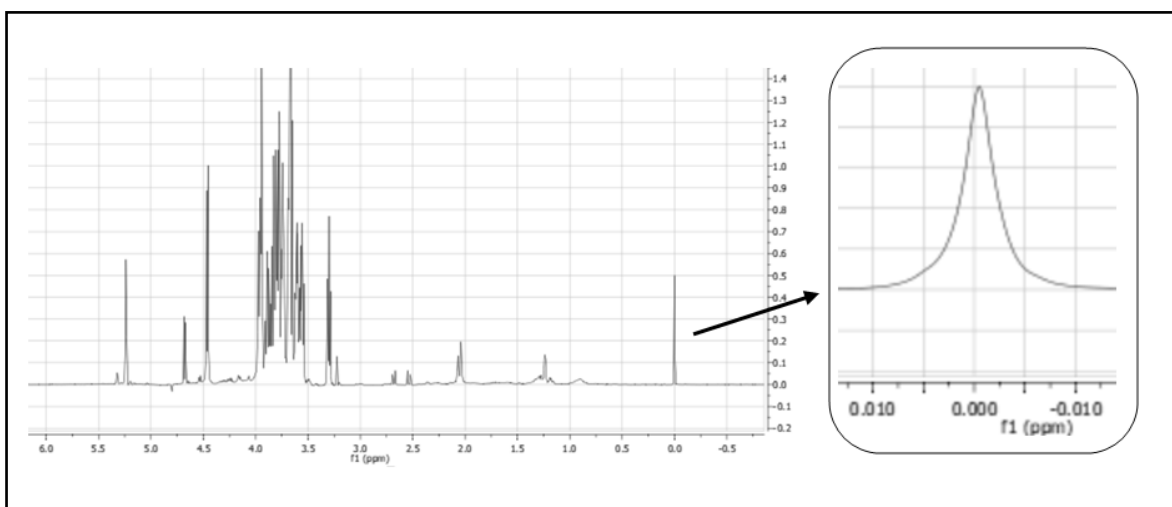
Μετά τη λήψη των φασμάτων $^1\text{H-NMR}$, με τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω, ακολούθησε η προ-επεξεργασία τους, για το μετασχηματισμό των δεδομένων, σε μορφή κατάλληλη για τις επακόλουθες στατιστικές αναλύσεις. Για την προ-επεξεργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Mnova 6.0.2 της εταιρείας Mestrelab Research, Chemistry Software Solutions, Ισπανία. Για όλα τα φάσματα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία:

1. Βαθμονόμηση (*Reference*): TSP στα 0 ppm
2. Διόρθωση Φάσης σήματος (*Phase correction*): Χειροκίνητη (Manual correction)
3. Διόρθωση της γραμμής βάσης (*Baseline correction*): Αυτόματη
4. Κανονικοποίηση κορυφής αναφοράς (*Normalization*): Normalize by peak, value=0,5, peak position: 0 ppm
5. Φιλτράρισμα (*Apodization*): Εκθετικό (exponential)=0,5Hz

Παρακάτω φαίνεται το φάσμα του δείγματος 5 πριν και μετά την προ-επεξεργασία.

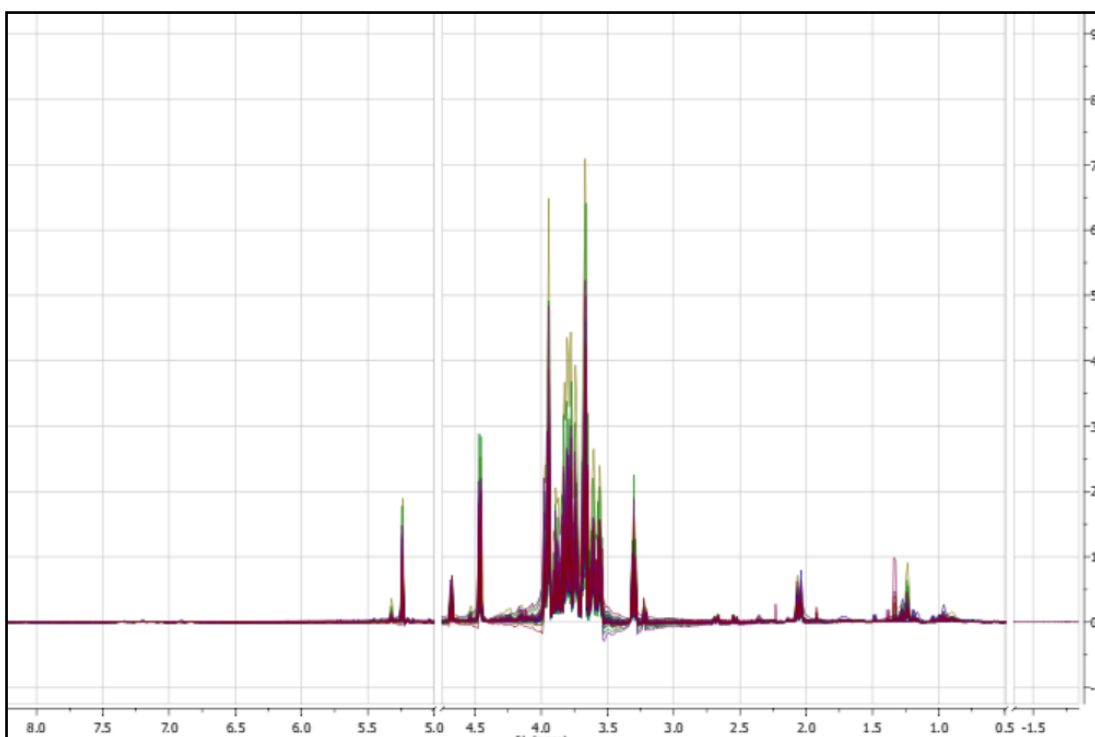


Εικόνα 3: Φάσμα NMR δείγματος 5 και κορυφή αναφοράς πριν την προ-επεξεργασία



Εικόνα 4: Φάσμα NMR δείγματος 5 και κορυφή αναφοράς μετά την προ-επεξεργασία

Στη συνέχεια όλα τα φάσματα ενώθηκαν σε ένα κοινό φάσμα (Superimpose selected spectra) και έγινε ευθυγράμμιση όλων των κορυφών συντονισμού (Alignment). Τα τμήματα χωρίς πληροφορία, αποκόπηκαν από το κοινό φάσμα αναφοράς. Συγκεκριμένα, αποκόπηκαν οι περιοχές από 0,00 ppm–0,60 ppm, 4,68 ppm–5,00 ppm (περιοχή του D₂O), 9,00 ppm–11,00 ppm. Κατόπιν έγινε τμηματοποίηση (binning) του κοινού φάσματος, με εύρος 0,001 και μετατράπηκε σε ASCII txt μορφή, η οποία αποτέλεσε τη μήτρα δεδομένων, που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση. Στην εικόνα 5 απεικονίζεται το κοινό φάσμα αναφοράς.



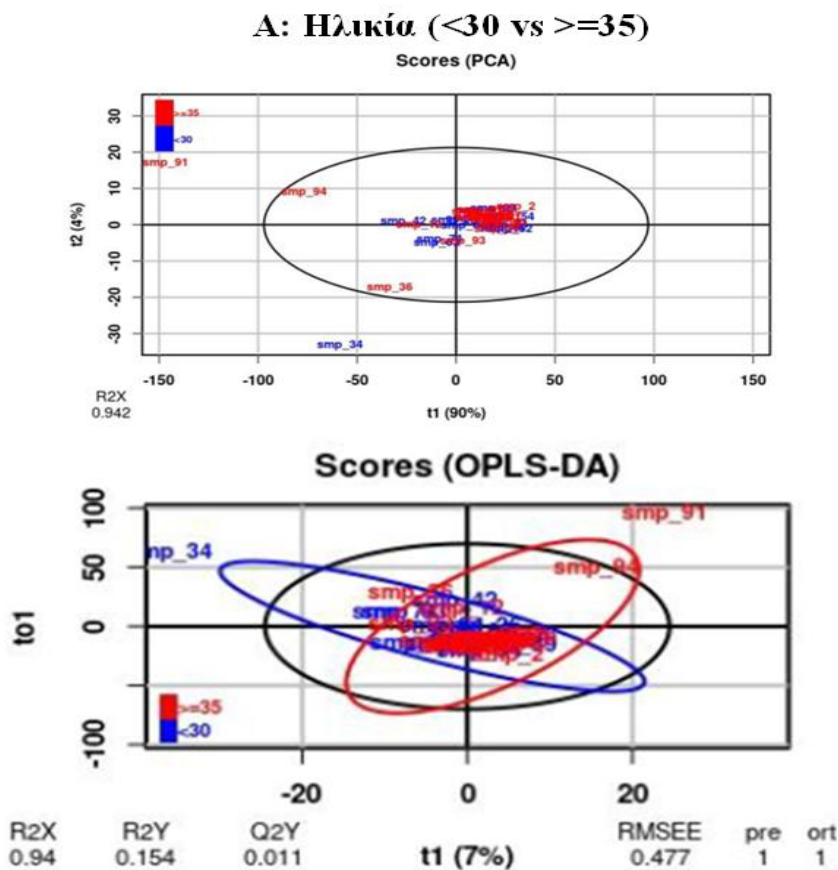
Εικόνα 5: Κοινό φάσμα αναφοράς στο οποίο έχουν αποκοπεί τα τμήματα χωρίς πληροφορία

3.3 Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση

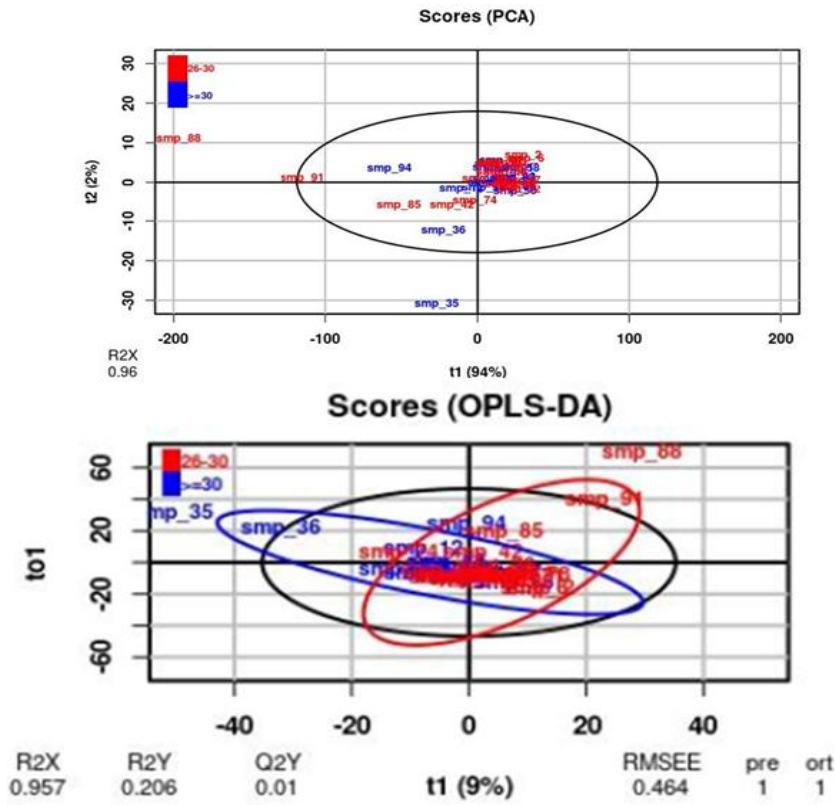
Μετά από την προ-επεξεργασία των φασμάτων και έχοντας πλέον ως βάση για τη μελέτη μας τη μήτρα δεδομένων και την ομαδοποίηση των απαντήσεων του ερωτηματολογίου, χρησιμοποιήθηκε το `ropis` πακέτο και το περιβάλλον RStudio, για επιβλεπόμενη και μη επιβλεπόμενη πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Για τα φασματικά δεδομένα, επιλέχθηκε να ακολουθηθεί η τεχνική μετατροπής κλίμακας `pareto` και όλα τα μοντέλα εξήχθησαν σε διάστημα εμπιστοσύνης 95%.

3.3.1 Ανάλυση με βάση τις ομάδες του ερωτηματολογίου

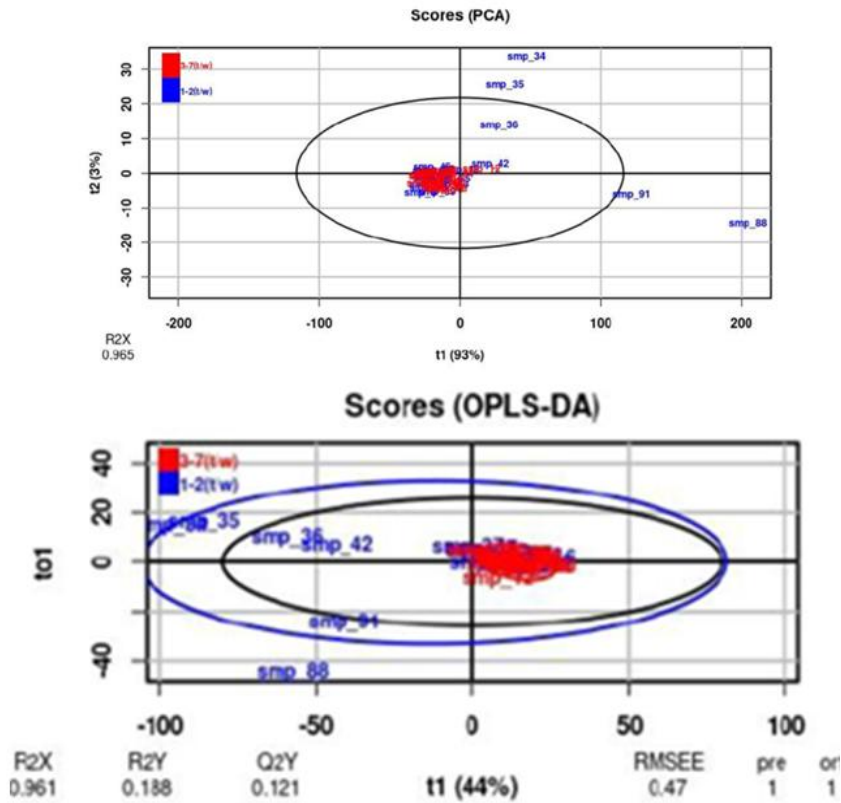
Για την κάθε παράμετρο, εφαρμόστηκε αρχικά η μη επιβλεπόμενη μέθοδος PCA (Principal Component Analysis), για να υπάρξει μία αποτύπωση της εικόνας που παρουσιάζει η διακύμανση των δεδομένων και να φανεί αν υπάρχει κάποια φυσική ομαδοποίησή τους. Έπειτα, εφαρμόστηκε η επιβλεπόμενη μέθοδος διάκρισης OPLS-DA (Orthogonal Partial Least-Squares-Discriminant Analysis), για να αυξηθεί ο τυχόν διαχωρισμός των εξεταζόμενων ομάδων. Οι προσδιορισμένες με βάση το ερωτηματολόγιο ομάδες, εξετάστηκαν ανά δύο για κάθε παράμετρο και έτσι μελετήθηκαν όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί. Στην εικόνα 6 φαίνονται ενδεικτικά οι γραφικές παραστάσεις (scores plot) των μοντέλων PCA και OPLS-DA, για επιλεγμένες ομάδες του ερωτηματολογίου.



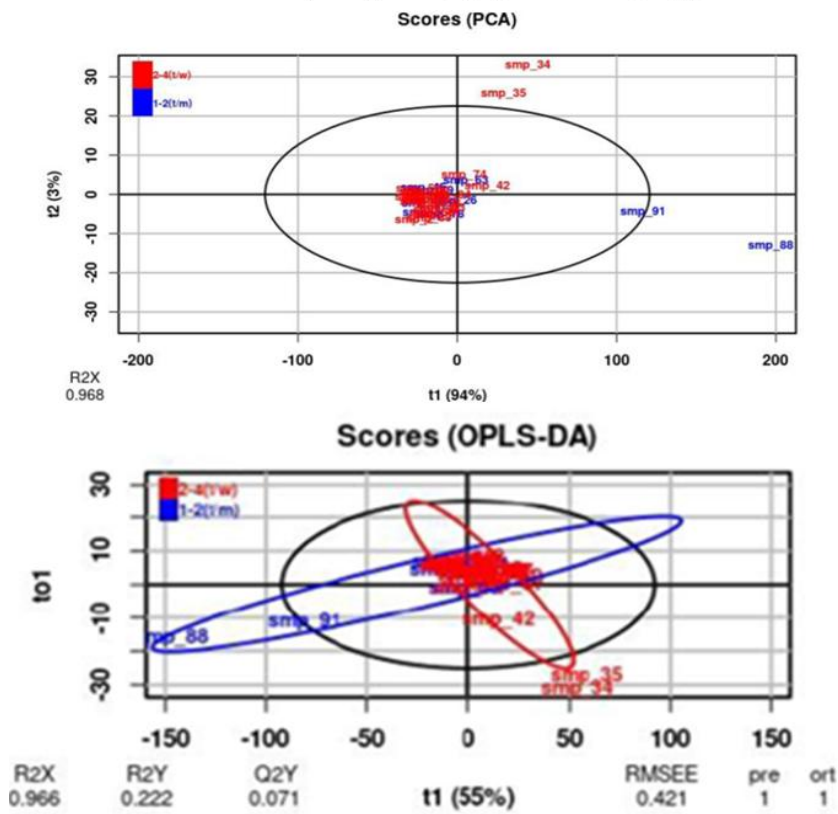
B: BMI (≥ 30 vs 26-30)



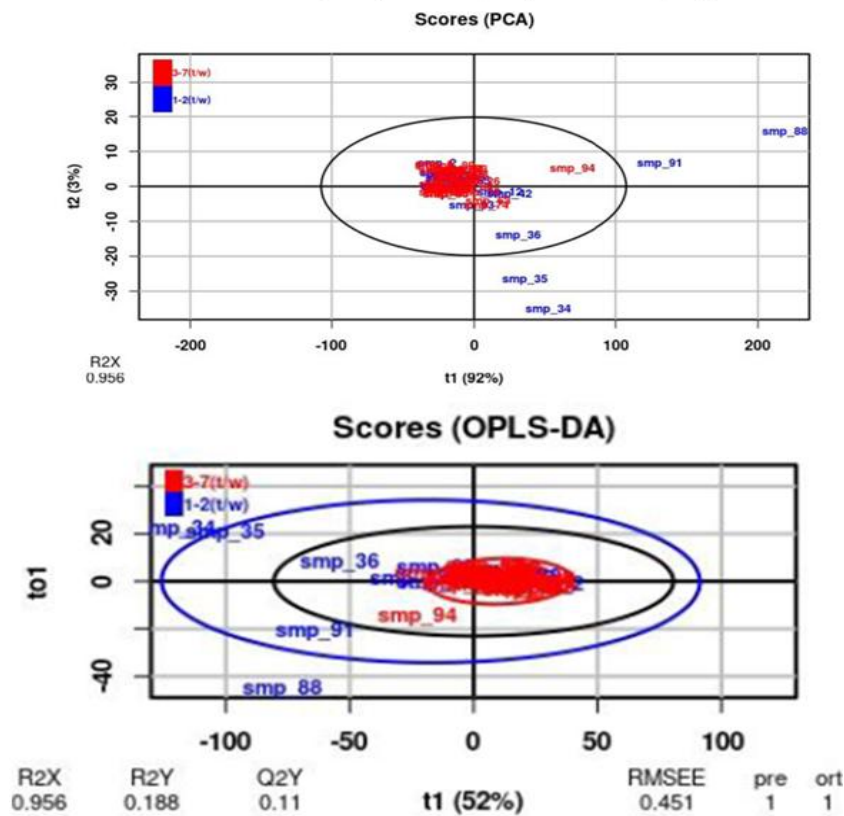
Γ: Αυγά (1-2φ/εβ vs 3-7φ/εβ)



Δ: Όσπρια (1-2 φ/μην vs 2-4 φ/εβ)



Ε: Κρέας (1-2 φ/εβ vs 3-7 φ/εβ)



Εικόνα 6: PCA (πάνω) και OPLS-DA (κάτω) για τα δείγματα επιλεγμένων ομάδων (Α: Ηλικία, Β: BMI, Γ: Αυγά, Δ: Όσπρια, Ε: Κρέας) του ερωτηματολογίου

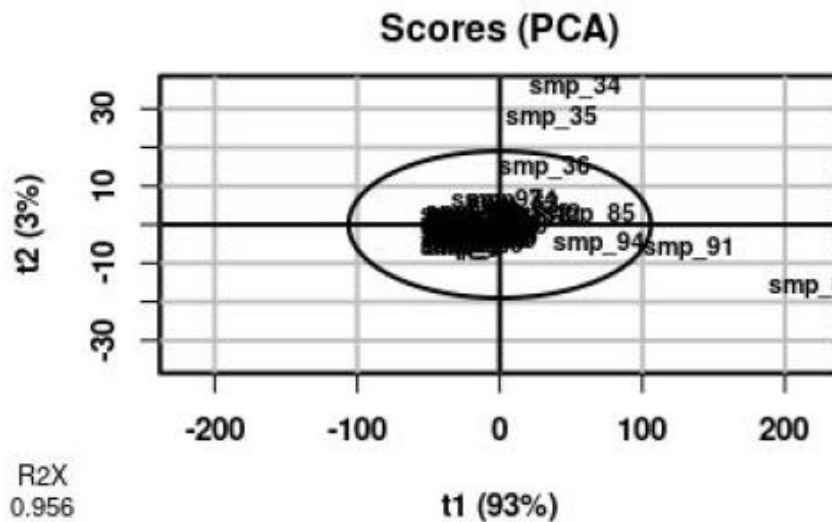
Όπως φαίνεται από την εικόνα 6, δεν υπήρξε κάποιος εμφανής διαχωρισμός ή τάση διαχωρισμού των εκάστοτε δύο ομάδων. Στον πίνακα 3 αναγράφονται για την κάθε παράμετρο ο αριθμός των δειγμάτων, που αντιστοιχεί σε καθεμία από τις δύο ομάδες, η τιμή προσαρμοστικότητας $R^2X(\text{cum})$ για το αντίστοιχο PCA μοντέλο, καθώς και η τιμή προσαρμοστικότητας $R^2Y(\text{cum})$ και η τιμή $Q^2Y(\text{cum})$ που εκφράζει την ικανότητα πρόβλεψης, για το αντίστοιχο επιβλεπόμενο μοντέλο OPLS-DA.

Πίνακας 3: Τιμές προσαρμοστικότητας και ικανότητας πρόβλεψης των μοντέλων για επιλεγμένες ομάδες του ερωτηματολογίου

Παράμετροι	Εξεταζόμενες Ομάδες	Αριθμός Δειγμάτων	R^2X (PCA)	R^2Y (OPLS-DA)	Q^2Y (OPLS-DA)
Ηλικία	<30 vs \geq 35	31	0,94	0,154	0,011
BMI	\geq 30 vs 26-30	35	0,96	0,206	0,010
Αυγά	1-2 φ/εβ vs 3-7 φ/εβ	36	0,96	0,188	0,121
Όσπρια	1 φ/εβ vs 2-4 φ/εβ	35	0,92	0,131	0,046
Όσπρια	1-2 φ/μην vs 2-4 φ/εβ	31	0,95	0,222	0,071
Κρέας	1-2 φ/εβ vs 3-7 φ/εβ	50	0,95	0,18	0,11

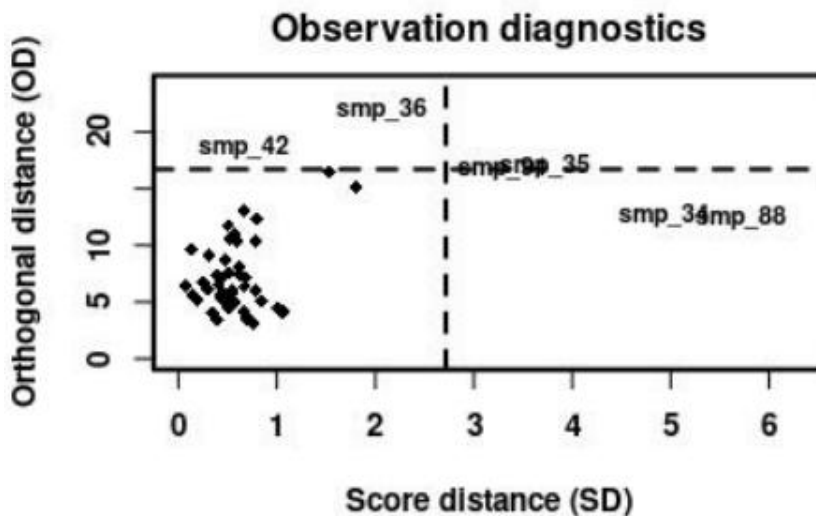
Το υψηλό R^2X του PCA, προέρχεται από την πρώτη κύρια συνιστώσα, PC1 η οποία αποτυπώνει σε πολύ μεγάλο βαθμό, από 92% έως 96% την πραγματική διακύμανση των τιμών, που παρουσιάζουν οι παράμετροι αντίστοιχα σε κάθε περίπτωση. Ωστόσο, για το μοντέλο OPLS-DA, η προσαρμοστικότητα $R^2Y(\text{cum})$ και η ικανότητα πρόβλεψης $Q^2Y(\text{cum})$, έχουν τιμές πολύ χαμηλότερες από 0,5, επομένως δεν μπορεί να θεωρηθεί επικυρωμένο μοντέλο, που σημαίνει ότι δεν προκύπτει κάποια διάκριση με βάση τις ομάδες του ερωτηματολογίου, κάτι που ήταν εμφανές και από τις γραφικές παραστάσεις των μοντέλων (PCA Plots και OPLS-DA Plots). Για το συγκεκριμένο αριθμό δειγμάτων και τις συγκεκριμένες απαντήσεις, οι ομαδοποιήσεις του ερωτηματολογίου, ως προς τη διατροφή και τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά της μητέρας, δε φάνηκε να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στο μεταβολικό αποτύπωμα του μητρικού πρωτογάλακτος, όσον αφορά τους δευτερογενείς μεταβολίτες. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε στη συνέχεια να εφαρμοστεί μη επιβλεπόμενο μοντέλο σε όλο το δειγματοχώρο, ώστε να δούμε αν υπάρχουν φυσικές ομαδοποιήσεις στα δεδομένα και να ερευνήσουμε στη συνέχεια, πού μπορεί να οφείλονται.

3.3.2 Μελέτη του συνόλου του Δειγματοχώρου



Εικόνα 7: PCA scores plot για όλο το δειγματοχώρο

Στην Εικόνα 7 παρουσιάζεται το σύνολο του δειγματοχώρου σε μια ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA). Όπως φαίνεται, για το πλήθος των μεταβλητών, που αντικατοπτρίζονται στη μεταβολομική μελέτη δε σχηματίζεται κάποια εμφανής διάκριση.



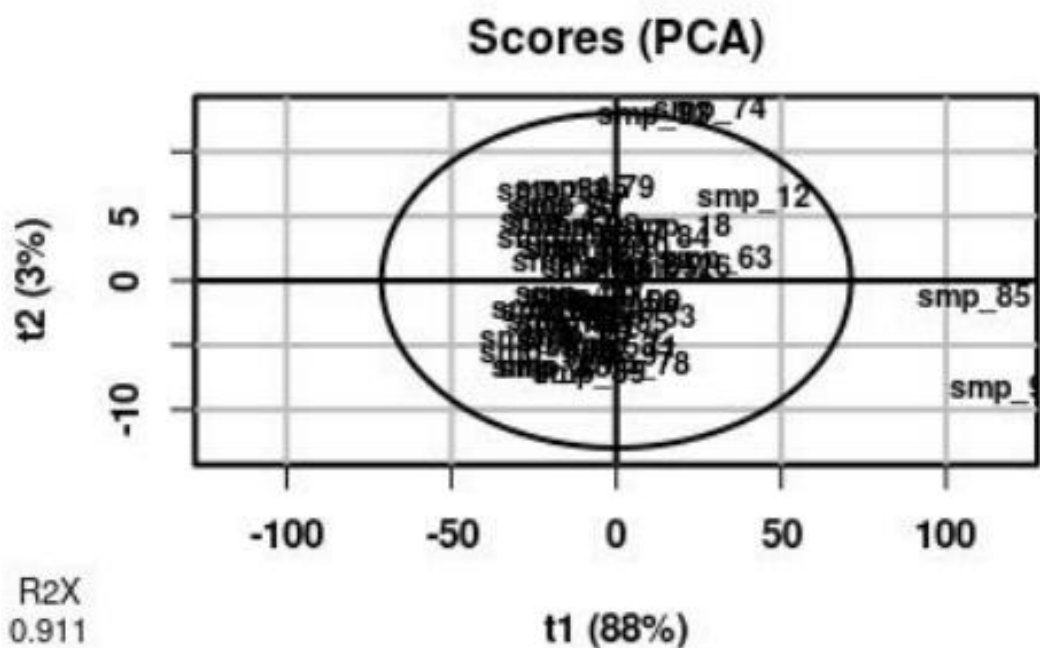
Εικόνα 8: Απεικόνιση των έκτροπων τιμών (outliers)

Στην εικόνα 8 ξεχωρίζουν 6 δείγματα (34, 35, 36, 42, 88 και 91) που αποτελούν έκτροπες τιμές (outliers). Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι πληροφορίες, που έχουμε από το ερωτηματολόγιο γι' αυτά τα 6 δείγματα. Τα δείγματα δεν παρουσιάζουν κοινά χαρακτηριστικά, ως προς μια συγκεκριμένη παράμετρο, που να δικαιολογεί τον διαχωρισμό τους από τα υπόλοιπα. Επομένως, η αιτία της διαφοροποίησής τους, μπορεί να οφείλεται είτε σε κάποια άλλη παράμετρο που δεν έχει απαντηθεί στο συγκεκριμένο ερωτηματολόγιο, είτε σε πειραματικό σφάλμα κατά την ανάλυσή τους.

Πίνακας 4: Στοιχεία ερωτηματολογίου για τους 6 outliers

a/a	Αριθμός Δείγματος	Εθνικότητα	BMI (kg/m ²)	Ηλικία	Αριθμός Τόκου	Ψάρι	Κρέας	Γάλα	Όσπρια	Αυγά	Κάπνισμα προ κύησης	Κάπνισμα κατά κύηση	Αλκοόλ προ κύησης	Αλκοόλ κατά κύηση
15	34	Ελληνική	<=25	<30	1	ποτέ/σπάνια	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
16	35	Ελληνική	>=30	30-34	1	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
17	36	Ελληνική	>=30	>=35	2	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	ποτέ/σπάνια	1-2(φ/εβ)	Ναι	Όχι	Όχι	Όχι
22	42	Αλβανική	26-30	<30	1	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	2-4(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	Όχι	Όχι	Όχι	Όχι
47	88	Άλλη	26-30	30-34	1	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	1(π/ημ)	1-2(φ/μην)	1-2(φ/εβ)	Ναι	Ναι	Ναι	
49	91	Ελληνική	26-30	>=35	2	1-3(φ/εβ)	1-2(φ/εβ)	2-3(π/ημ)	1-2(φ/μην)	1-2(φ/εβ)				

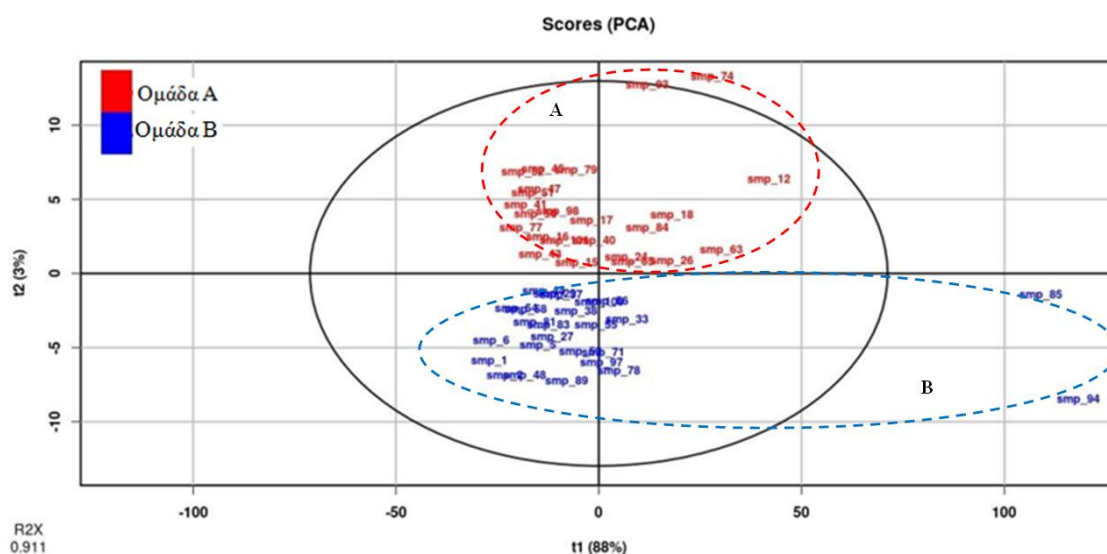
Στη συνέχεια τα παραπάνω 6 δείγματα εξαιρέθηκαν από το δειγματοχώρο και υπολογίστηκε εκ νέου η ανάλυση PCA (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: PCA scores plot μετά την αφαίρεση των outliers

Στην εικόνα 9 φαίνεται να υπάρχει μία τάση διάκρισης των δειγμάτων μεταξύ 1^{ου}-2^{ου} και 3^{ου}-4^{ου} τεταρτημορίου, δηλαδή κατά μήκος της δεύτερης κύριας συνιστώσας PC2. Η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1), εκφράζει το 88% και η δεύτερη (PC2) το 3% της συνολικής διακύμανσης των δεδομένων.

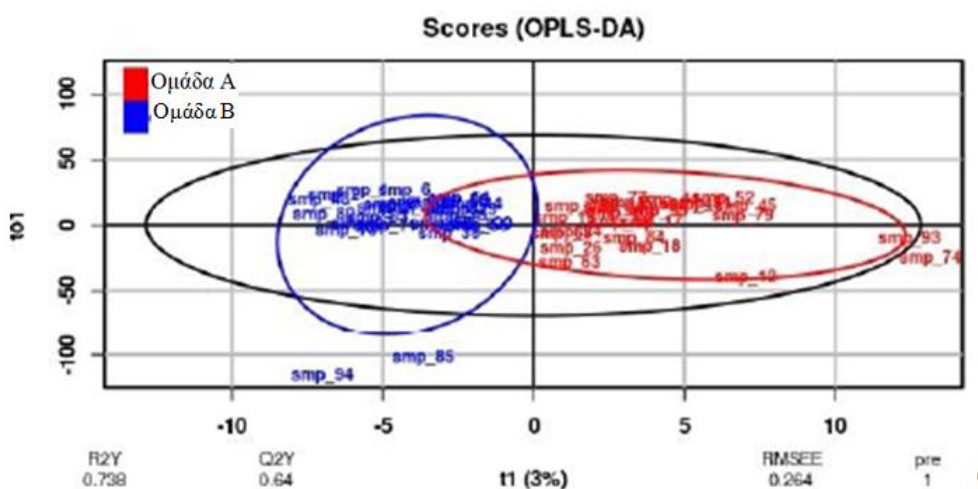
3.3.3 OPLS-DA για τις ομάδες 1^{ου}-2^{ου} και 3^{ου}-4^{ου} τεταρτημορίου



Εικόνα 10: Χρωματισμένο PCA ως προς τις ομάδες A και B

Στην εικόνα 10 φαίνεται το γράφημα του μη επιβλεπόμενου μοντέλου PCA και οι ομάδες 1^{ου}-2^{ου} (**Ομάδα A**) και 3^{ου}-4^{ου} (**Ομάδα B**) τεταρτημορίου χρωματισμένες με κόκκινο και μπλε αντίστοιχα.

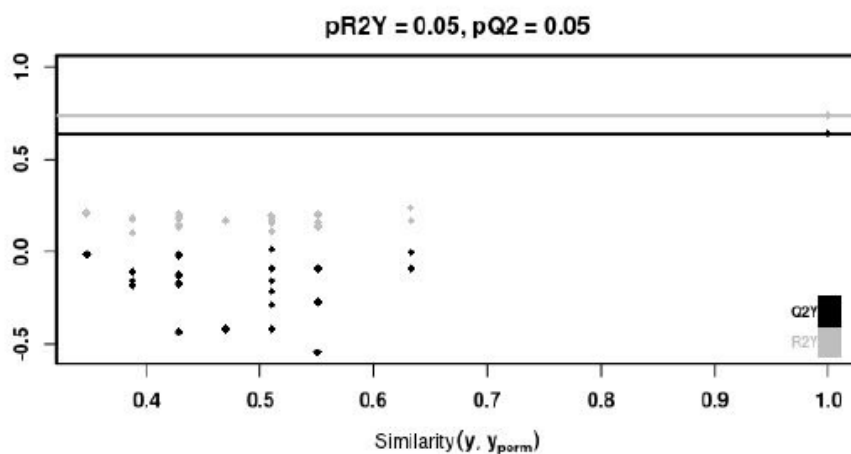
Στη συνέχεια εφαρμόστηκε επιβλεπόμενη μέθοδος κατηγοριοποίησης PLS-DA, προκειμένου να διαπιστωθεί, αν μπορεί να μεγιστοποιηθεί ο διαχωρισμός των δύο εξεταζόμενων ομάδων (Ομάδα A και Ομάδα B), αλλά παρουσιάστηκε overfitting. Προκειμένου να αναδειχθούν μόνο οι μεταβλητές, που ευθύνονται για τη διαφοροποίηση των μεταβολικών προφίλ μεταξύ της ομάδας A και B, εφαρμόστηκε η επιβλεπόμενη μέθοδος κατηγοριοποίησης OPLS-DA. Η μέθοδος χρησιμοποιεί ορθογώνια διόρθωση σήματος, για να απομακρύνει έναν αριθμό μεταβλητών, που διαφοροποιούν τα δείγματα, χωρίς να σχετίζονται με την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων.



Εικόνα 11: Μοντέλο OPLS-DA για τις ομάδες A και B

Από το OPLS-DA μοντέλο εξήχθησαν οι παράμετροι $Q^2Y=0,64$ και $R^2Y=0,73$, που υποδηλώνουν την καλή ικανότητα πρόβλεψης και προσαρμογής του μοντέλου αντίστοιχα. Το παραπάνω OPLS-DA μοντέλο είναι αξιόπιστο, καθώς οι τιμές R^2Y και Q^2 είναι μεγαλύτερες του 0,50, ενώ η διαφορά $R^2Y - Q^2 = 0,73 - 0,64 = 0,09$ είναι μικρότερη του 0,20.

Για την επικύρωση του μοντέλου, εφαρμόστηκε ανάλυση μετάθεσης (permutation test) με 20 μεταθέσεις, για να πιστοποιηθεί η καλή ικανότητα πρόβλεψης και προσαρμογής του OPLS-DA μοντέλου, απ' όπου όλα τα μοντέλα που προέκυψαν, έπειτα από ανακατάταξη των τιμών της κατηγορικής μεταβλητής, είχαν πολύ μικρότερες τιμές Q^2 και R^2 από το αρχικό μοντέλο, γεγονός που εξασφαλίζει, ότι το αρχικό OPLS-DA μοντέλο, είναι ικανό να προβλέψει σωστά το μεταβολικό προφίλ, που χαρακτηρίζει τα δείγματα της Ομάδας A και της Ομάδας B.



Εικόνα 12: Επικύρωση του μοντέλου μέσω ανάλυσης μετάθεσης (permutation test)

Κεφάλαιο 4. Αναγνώριση και διερεύνηση μεταβολιτών

Από την πειραματική διαδικασία του προηγούμενου κεφαλαίου, καταλήξαμε σε ένα επικυρωμένο μοντέλο διάκρισης των δειγμάτων της Ομάδας Α και της Ομάδας Β. Με βάση τα συγκεκριμένα αποτελέσματα του ερευνητικού μας έργου, έγινε έλεγχος των απαντήσεων του ερωτηματολογίου, για τα δείγματα που ανήκουν στην κάθε ομάδα και δε βρέθηκε κάποια άμεσα παρατηρήσιμη διαφορά, μεταξύ των απαντήσεων των δειγμάτων των δύο ομάδων. Στη συνέχεια, επιλέχθηκε να γίνει αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών για όλα τα δείγματα, ώστε να μελετηθεί η συμβολή των διαφορετικών συγκεντρώσεων κάποιων μεταβολιτών, στο διαχωρισμό των δύο ομάδων.

4.1 Αναγνώριση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών

Με τη χρήση του πακέτου ASICS έγινε αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών, με βάση τα 1D ¹H NMR των δειγμάτων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε μια βιβλιοθήκη αναφοράς με φάσματα NMR, για έναν μεγάλο αριθμό μεταβολιτών και με συσχέτιση των δικών μας φασμάτων με τα φάσματα αναφοράς, έγινε η αναγνώριση. Επίσης, με βάση τις κορυφές που αντιστοιχούν στον κάθε μεταβολίτη και τις τιμές της αντίστοιχης ολοκλήρωσης από το φάσμα NMR, έγινε μία ποσοτικοποίηση που εκφράζει τη σχετική συγκέντρωση του κάθε μεταβολίτη. Γνωρίζοντας ποια δείγματα ανήκουν στην Ομάδα Α και ποια στην Ομάδα Β, προέκυψε ο Πίνακας 5, στον οποίο εμφανίζονται οι μεταβολίτες που αναγνωρίστηκαν στις δύο ομάδες, με σειρά φθίνουσας σχετικής συγκέντρωσης. Με έντονη γραφή (bold) εμφανίζονται οι μεταβολίτες που δεν είναι κοινοί στις δύο ομάδες.

Πίνακας 5: Αναγνώριση μεταβολιτών στις ομάδες Α και Β

a/a	Μεταβολίτες ομάδας Α	Μεταβολίτες ομάδας Β
1	Lactose	Lactose
2	D-Sorbitol	DehydroAscorbicAcid
3	GuanidinoaceticAcid	Glycerol
4	Glycerol	D-Sorbitol
5	DehydroAscorbicAcid	L-Arabitol
6	Xylitol	GlycolicAcid
7	L-Arabitol	GuanidinoaceticAcid
8	L-Serine	Xylitol
9	Myo-Inositol	D-Glucose-6-Phosphate
10	Threitol	Threitol
11	D-Glucose	Myo-Inositol
12	GlycolicAcid	D-Galactose
13	D-Fructose	D-Fucose
14	GlycericAcid	D-GlucuronicAcid
15	D-Glucose-6-Phosphate	GlycericAcid
16	D-Galactose	N-(2-Furoyl)Glycine
17	D-GluconicAcid	HippuricAcid
18	HippuricAcid	D-Glucose
19	L-Proline	L-Proline
20	D-GlucuronicAcid	D-GlucuronicAcid

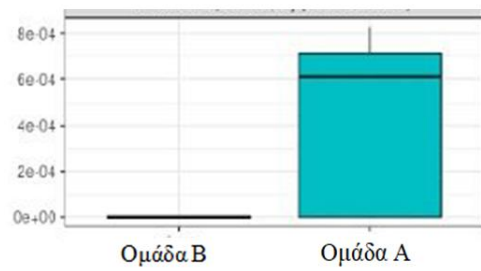
a/a	Μεταβολίτες ομάδας Α	Μεταβολίτες ομάδας Β
21	4-AminoHippuricAcid	NicotinuricAcid
22	D-Fucose	Trigonelline
23	N-Acetylglycine	2-HydroxyphenylAceticAcid
24	NicotinuricAcid	<i>trans</i> -FerulicAcid
25	Trigonelline	D-Fructose
26	N-(2-Furoyl)Glycine	L-Arginine
27	MethylmalonicAcid	N-Acetylglycine
28	2-HydroxyphenylAceticAcid	3-Methylxanthine
29	L-Arginine	Galactitol
30	7-Methylxanthine	L-Threonine
31	<i>trans</i> -FerulicAcid	SyringicAcid
32	VanillicAcid	HomovanillicAcid
33	3-Methylxanthine	3-Methyl-L-Histidine
34	Phenethylamine	Citrate
35	L-Ornithine	Phenethylamine
36	3-Methyl-L-Histidine	TMAO
37	2-AminoAdipicAcid	IsovalericAcid
38	SyringicAcid	Betaine
39	Citrate	beta-HydroxyisovalericAcid
40	L-Threonine	3-HydroxyphenylAceticAcid
41	beta-HydroxyisovalericAcid	ThreonicAcid
42	PropyleneGlycol	Taurine
43	L-Leucine	L-Alanine
44	Betaine	L-GlutamicAcid
45	IsovalericAcid	4-AminoHippuricAcid
46	2-Oxoisovalerate	L-Leucine
47	Sarcosine	D-Mannose
48	TMAO	VanillicAcid
49	CholineChloride	PropyleneGlycol
50	2-Propanol	MethylmalonicAcid
51	Glycerophosphocholine	2-Propanol
52	D-Mannose	Sarcosine
53	L-GlutamicAcid	D-Maltose
54	Ethanolamine	2-HydroxybutyricAcid
55	L-Anserine	3-Hydroxybutyrate
56	PimelicAcid	3-MethyladipicAcid
57	Phosphocholine	L-Isoleucine
58	L-Alanine	L-Serine
59	L-Isoleucine	Glycogen
60	MalicAcid	2-AminoAdipicAcid
61	2-HydroxybutyricAcid	Levogluconan
62	3-MethyladipicAcid	CholineChloride
63	Lactate	Phosphocholine
64	1-Methyl-L-Histidine	L-Ornithine
65	L-Tryptophane	Ethanolamine
66	EthylmalonicAcid	L-Anserine
67	3-HydroxyphenylAceticAcid	EthylmalonicAcid
68	SebacicAcid	L-Tryptophane
69	2-AminobutyricAcid	L-Glycine
70	Azelaic Acid	
71	AceticAcid	
72	L-Aspartate	
73	ArgininosuccinicAcid	
74	L-Methionine	
75	ThreonicAcid	
76	D-Maltose	
77	Glycogen	
78	S-Acetamidomethylcysteine	

4.1.1 Θηκογράμματα (boxplots) των στατιστικώς σημαντικών μεταβολιτών

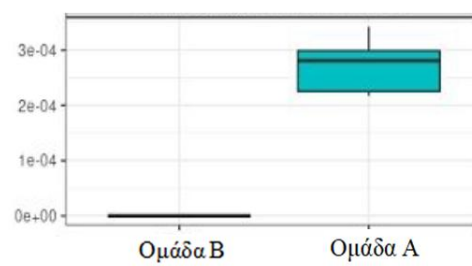
Τα θηκογράμματα είναι μια γραφική απεικόνιση, που βοηθάει στην οπτικοποίηση διαφορών μεταξύ ομάδων. Από τα θηκογράμματα παίρνουμε πληροφορίες για 5 στατιστικά δεδομένα: την ελάχιστη τιμή (min), το 1^ο τεταρτημόριο (Q1), το 2^ο τεταρτημόριο (Q2), που είναι η διάμεσος, το 3^ο τεταρτημόριο (Q3) και τη μέγιστη τιμή (max). Αν έχουμε θηκόγραμμα με κατακόρυφο προσανατολισμό, κάτω από το Q1 έχουμε το 25% των παρατηρήσεων και πάνω από το Q1 το 75% των παρατηρήσεων και αντίστοιχα κάτω από το Q3 έχουμε το 75% των παρατηρήσεων και πάνω από το Q3 το 25% των παρατηρήσεων. Κατά συνέπεια το Q2 χωρίζει το σύνολο των παρατηρήσεων, σε δύο υποσύνολα που το καθένα περιέχει το 50% αυτών. Το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (IQR) ισούται με $Q3-Q1$ και απεικονίζει τη μεταβλητότητα των δεδομένων. Συγκεκριμένα, θηκογράμματα με μικρό IQR, αποτελούν ένδειξη μικρής μεταβλητότητας δεδομένων, ενώ θηκογράμματα με μεγάλο IQR, αποτελούν ένδειξη μεγάλης μεταβλητότητας δεδομένων. Μια άλλη πληροφορία που προκύπτει από το θηκόγραμμα, είναι τα ακραία σημεία, δηλαδή τα σημεία που βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη κατά $1.5 \cdot IQR$ από το Q1 ή μεγαλύτερη κατά $1.5 \cdot IQR$ από το Q3, τα οποία απεικονίζονται με μία κουκίδα. Άρα για το θηκόγραμμα ισχύει, ότι η ελάχιστη τιμή (min) είναι μεγαλύτερη ή ίση της τιμής $Q1 - 1.5 \cdot IQR$ και η μέγιστη τιμή (max) είναι μικρότερη ή ίση της τιμής $Q3 + 1.5 \cdot IQR$. Τέλος, μπορούμε από την απεικόνιση του θηκογράμματος, να διαπιστώσουμε εάν η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο είναι συμμετρική, όταν η διάμεσος βρίσκεται στο μέσο του ενδοτεταρτημοριακού εύρους, ή ασύμμετρη όταν η διάμεσος είναι μετατοπισμένη προς τα πάνω ή προς τα κάτω από το σημείο που παρουσιάζεται η συμμετρική κατανομή.

Για τους μεταβολίτες που αναγνωρίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν, εφαρμόστηκε στατιστικό τεστ Kruskal-Wallis και έγινε μία κανονικοποίηση των τιμών, οπότε προέκυψε ένα προσαρμοσμένο p-value (adj. p-value) για κάθε μεταβολίτη. Από το σύνολο των μεταβολιτών που αναγνωρίστηκαν, σχηματίστηκαν τα θηκογράμματα των μεταβολιτών, που παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, σχετικές με τη διάκριση των δειγμάτων μεταξύ της Ομάδας A και της Ομάδας B, όπου ως στατιστικώς σημαντικοί, θεωρήθηκαν όσοι είχαν $\text{adj. p-value} < 0,05$. Στην εικόνα 13 απεικονίζονται τα θηκογράμματα των 26 μεταβολιτών με στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις σχετικές τους συγκεντρώσεις, μεταξύ των δειγμάτων της Ομάδας A και της Ομάδας B.

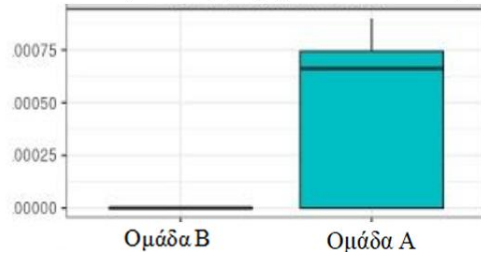
2-Αμινοαδιπτικό οξύ (adj. p-value: 0.0023)



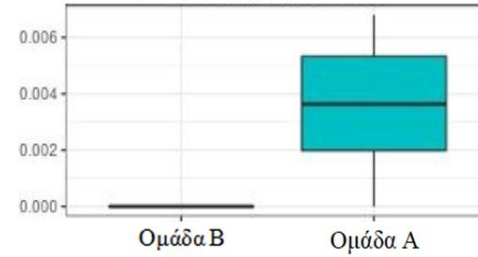
2-Οξοϊσοβαλερικό (adj. p-value :< 0.0001)



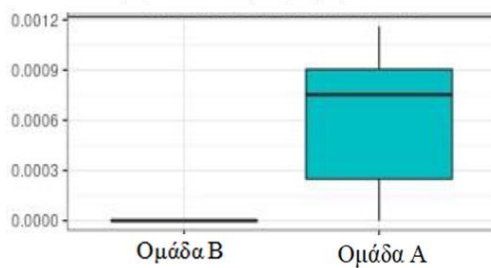
L-Ορνιθίνη (adj. p-value: 0.0171)



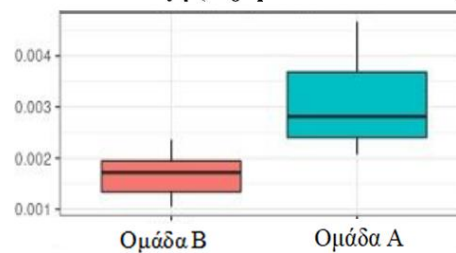
L-Σερίνη (adj. p-value :< 0.0001)



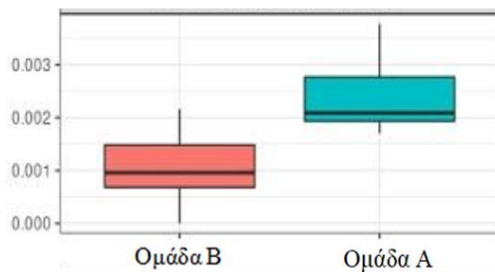
Μεθυλγλυκονικό οξύ (adj. p-value: 0.0079)



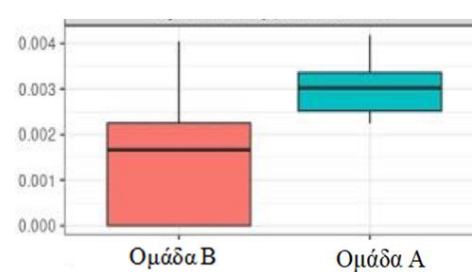
D-Γλυκόζη (adj. p-value :< 0.0001)



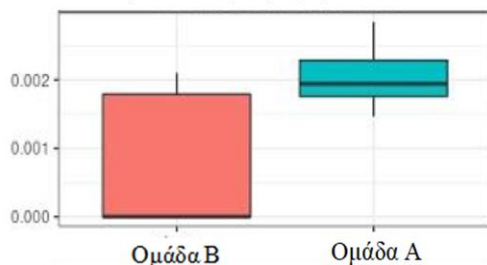
D-Φρουκτόζη (adj. p-value :< 0.0001)



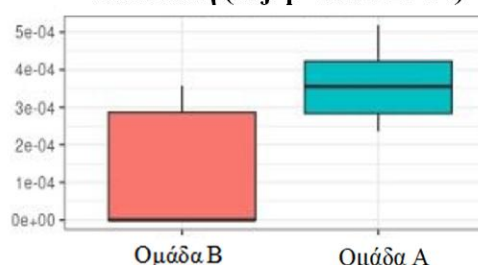
Γλυκερικό οξύ (adj. p-value :< 0.0001)



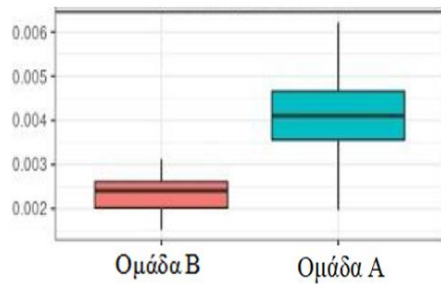
L-Γλουταμινικό οξύ (adj. p-value: 0.0031)



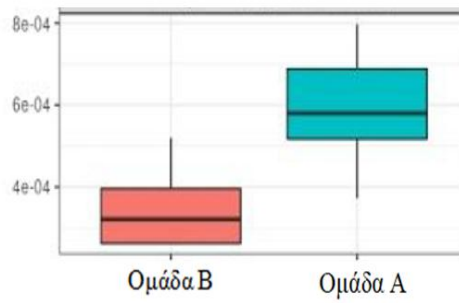
L-Λευκίνη (adj. p-value: 2e-04)



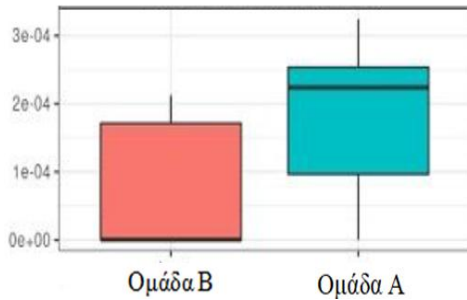
μυο-Ινοσιτόλη (adj. p-value: 2e-04)



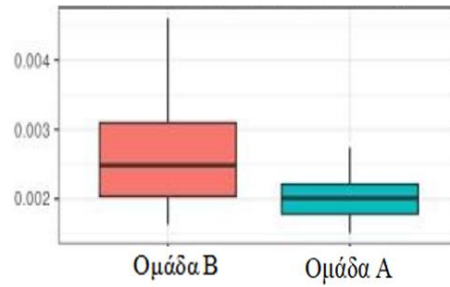
Φαιλαιθυλαμίνη (adj. p-value: <0.0001)



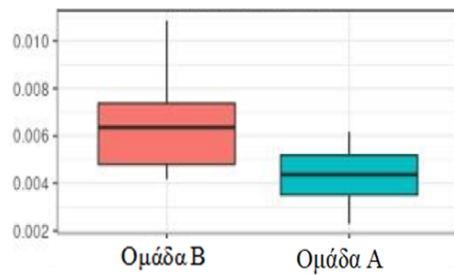
Ισοβαλερικό οξύ (adj. p-value: 0.0042)



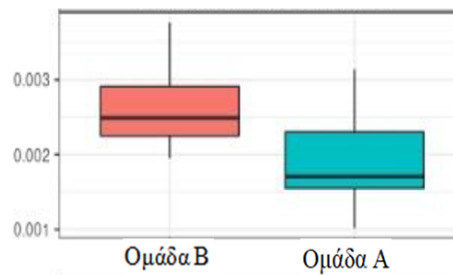
6-Φωσφορική D-Γλυκόζη (adj. p-value: 0.0257)



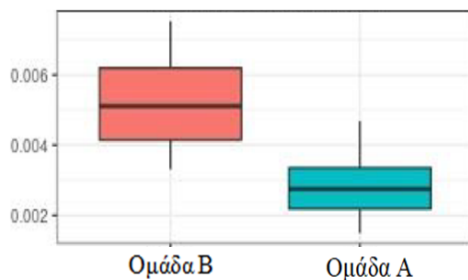
Γλυκερόλη (adj. p-value: 7e-04)



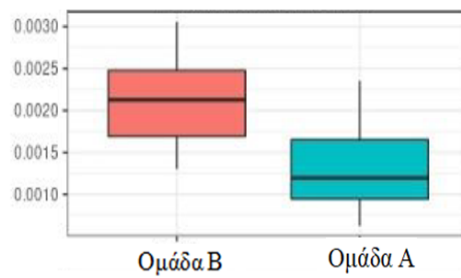
D-Γλοκουρονικό οξύ (adj. p-value: 0.0027)



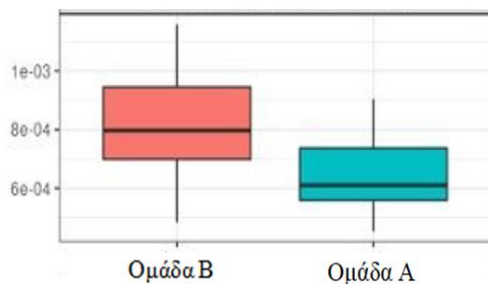
Γλυκολικό οξύ (adj. p-value: < 0.0001)



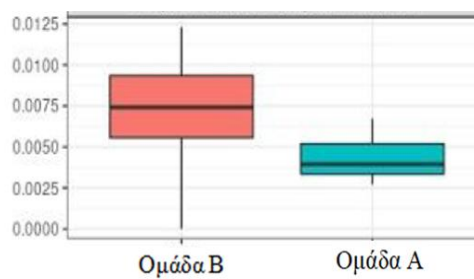
Ιππουρικό οξύ (adj. p-value: 4e-04)

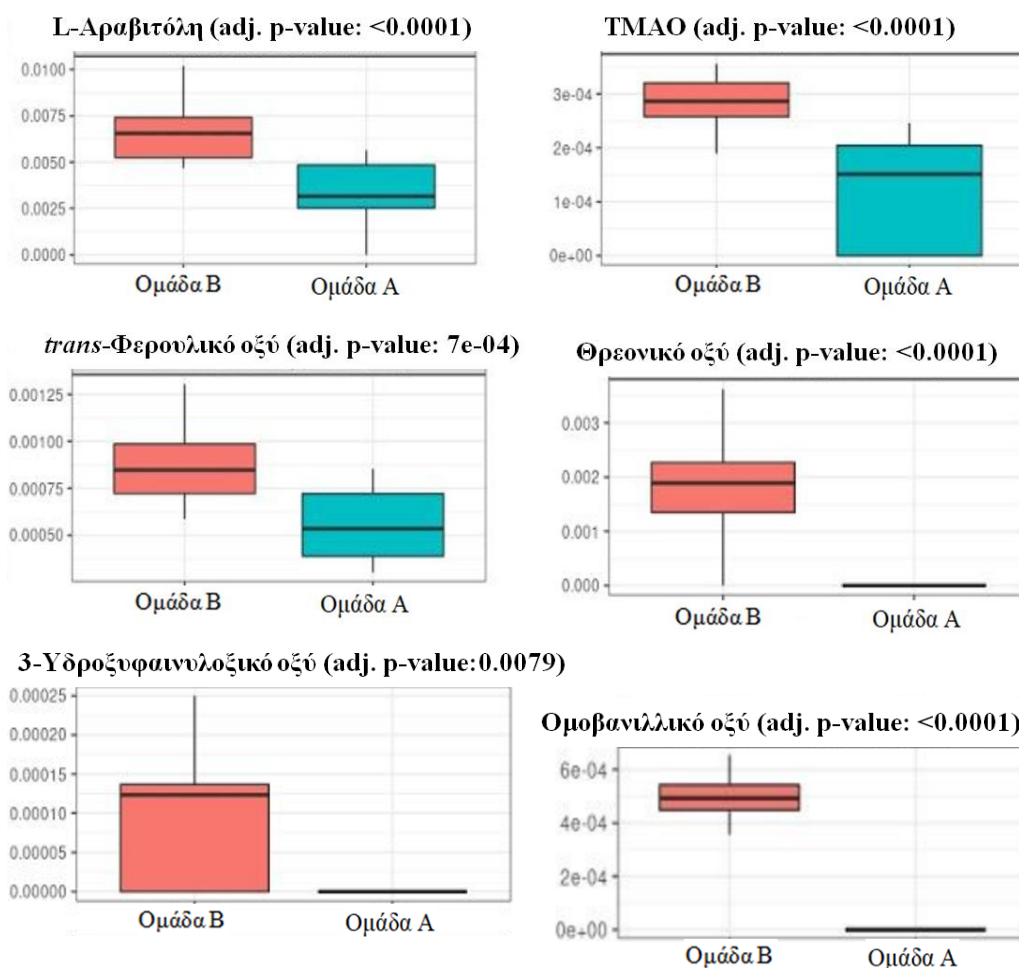


3-Μεθυλοξανθίνη (adj. p-value: 0.0044)



Δεϋδροασκορβικό οξύ (adj. p-value: 7e-04)





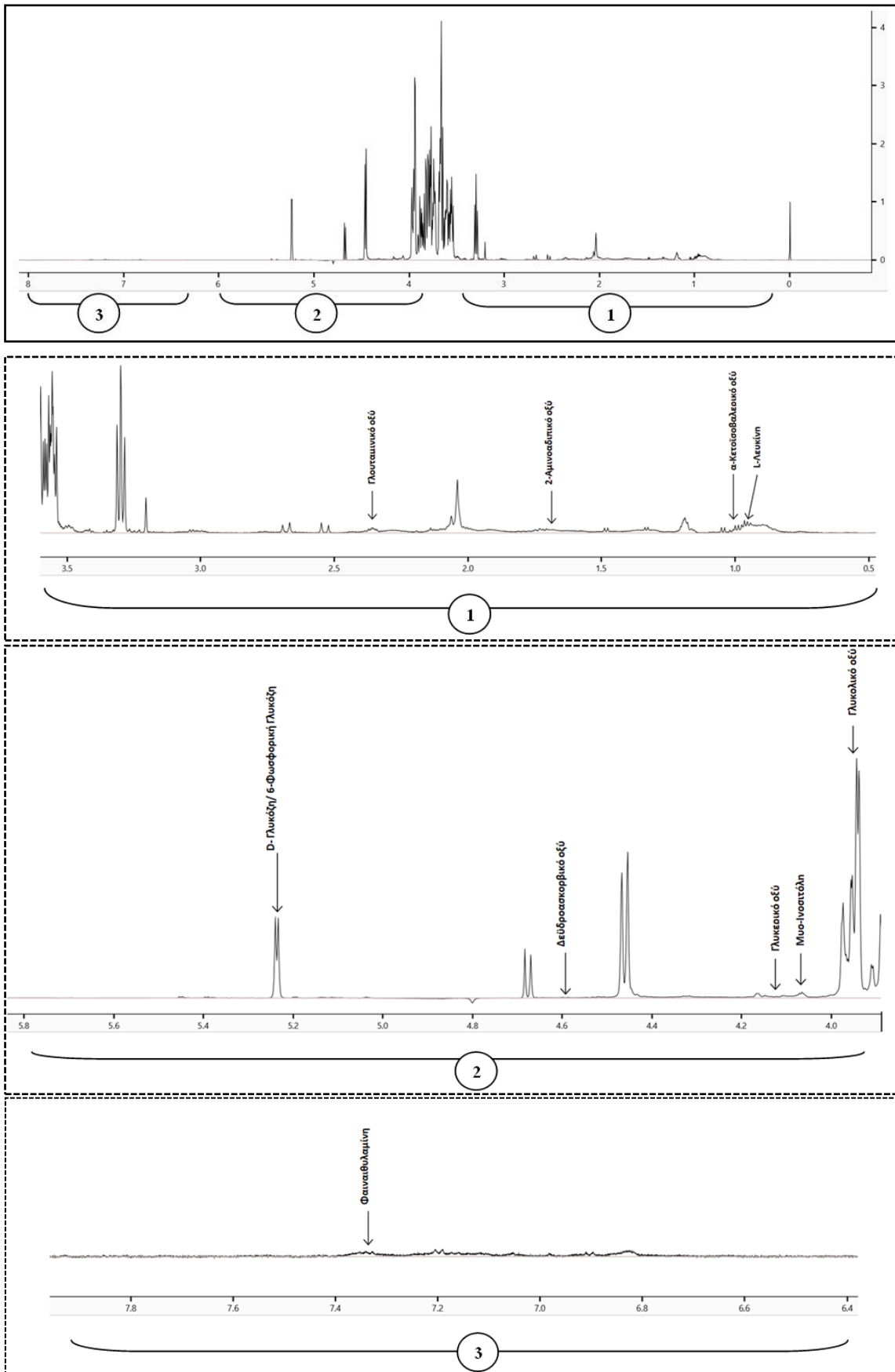
Εικόνα 13: Θηκογράμματα των σχετικών συγκεντρώσεων των 26 μεταβολιτών με στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ Ομάδας Α και Ομάδας Β.

Όπως φαίνεται από την εικόνα 13, το 2-αμινοαδιπικό οξύ, η L-ορνιθίνη η L-σερίνη και το μεθυλομηλονικό οξύ, είναι οι μεταβολίτες που εμφανίζονται σχεδόν αποκλειστικά στην ομάδα Α, δηλαδή εμφανίζονται και σ'έναν μικρό αριθμό δειγμάτων της ομάδας Β. Το 2-οξοϊσοβαλερικό οξύ, ωστόσο, εμφανίζεται αποκλειστικά στην ομάδα Α. Οι μεταβολίτες D-γλυκόζη, D-φρουκτόζη, γλυκερικό οξύ, L-γλουταμινικό οξύ, L-λευκίνη, μυο-ινοσιτόλη, φαιαιθυλαμίνη και ισοβαλερικό οξύ, εμφανίζονται και στις δύο ομάδες, αλλά με μεγαλύτερη σχετική συγκέντρωση στην ομάδα Α. Οι μεταβολίτες 6-φωσφορική D-γλυκόζη, D-γλυκουρονικό οξύ, γλυκερόλη, γλυκολικό οξύ, ιππουρικό οξύ, 3-μεθυλοξανθίνη, δεϋδροασκορβικό οξύ, L-αραβιτόλη, TMAO και *trans*-φερουλικό οξύ εμφανίζονται και στις δύο ομάδες, αλλά με μεγαλύτερη σχετική συγκέντρωση στην ομάδα Β. Το θρεονικό οξύ και το 3-υδροξυφαινυλοξικό οξύ εμφανίζονται σχεδόν αποκλειστικά στην ομάδα Β, δηλαδή εμφανίζονται και σ'έναν μικρό αριθμό δειγμάτων της ομάδας Α, ενώ το ομοβανιλικό οξύ εμφανίζεται αποκλειστικά στην ομάδα Β.

Τα θηκογράμματα των μεταβολιτών που εμφανίζονται και στις δύο ομάδες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: Αυτά στα οποία η τιμή Q1 της μίας ομάδας βρίσκεται πολύ ψηλότερα από την τιμή Q3 της άλλης ομάδας (D-γλυκόζη, D-φρουκτόζη, γλυκερικό οξύ, μυο-ινοσιτόλη, φαιναυλαμίνη, γλυκολικό οξύ, ιππουρικό οξύ, δεϋδροασκορβικό οξύ, L-αραβιτόλη και ΤΜΑΟ) και άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, και αυτά στα οποία υπάρχει αλληλοεπικάλυψη, αλλά η διάμεσος (Q2) της μίας ομάδας βρίσκεται πιο πάνω από το Q3 της άλλης ομάδας (γλουταμινικό οξύ, L-λευκίνη, ισοβαλερικό οξύ, 6-φωσφορική D-γλυκόζη, D-γλυκουρονικό οξύ, γλυκερόλη, 3-μεθυλοξανθίνη και *trans*-φερουλικό οξύ) και άρα πιθανώς να υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων.

4.1.2 Φάσματα NMR με τους στατιστικώς σημαντικούς μεταβολίτες

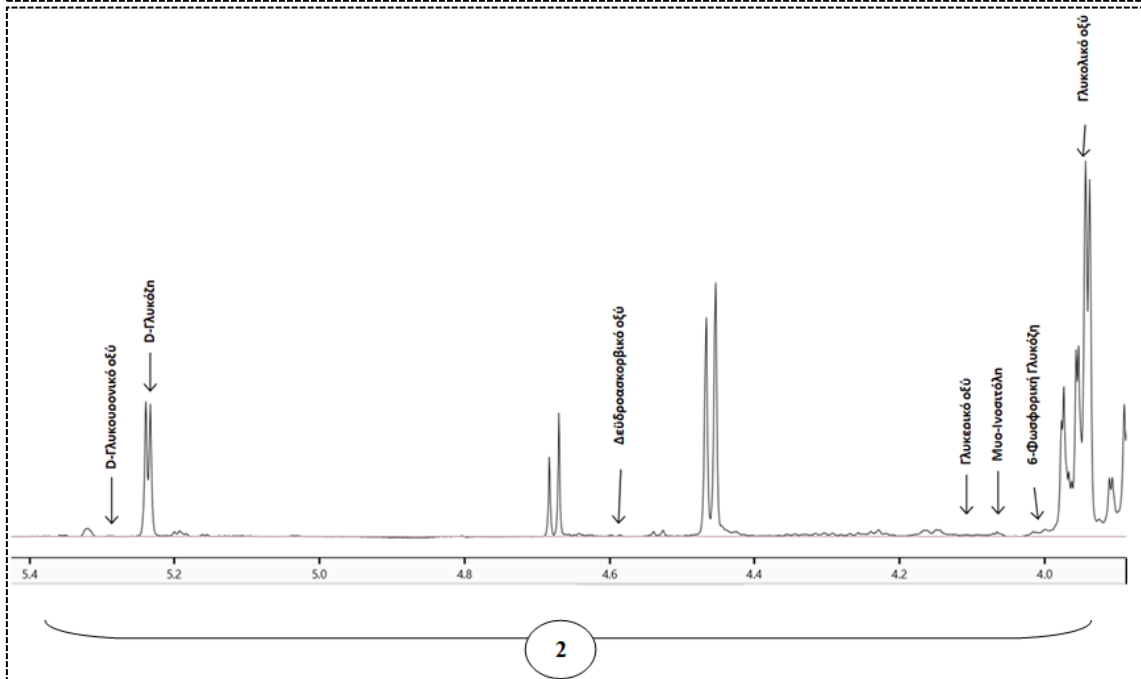
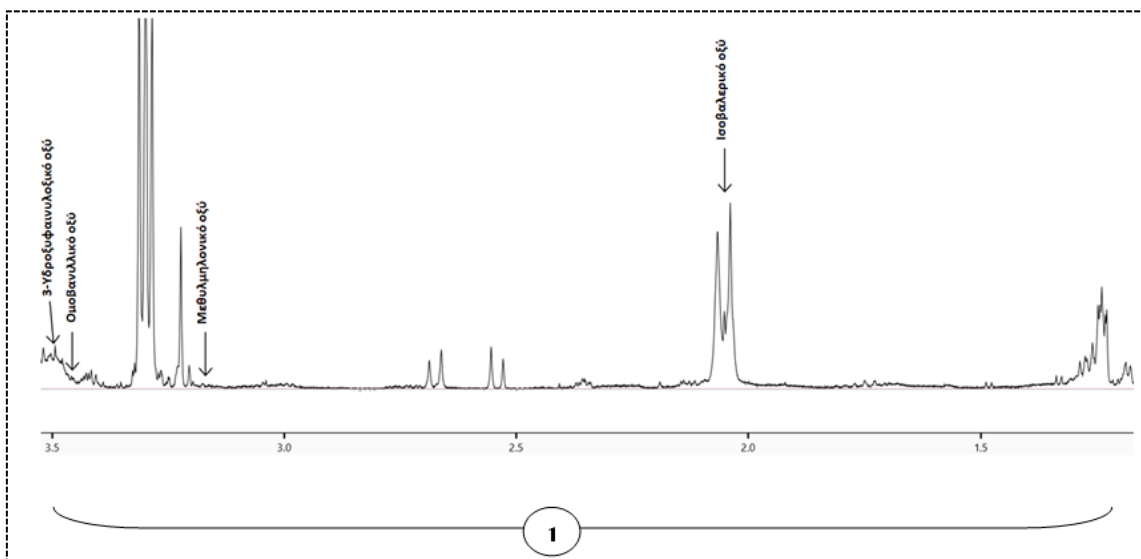
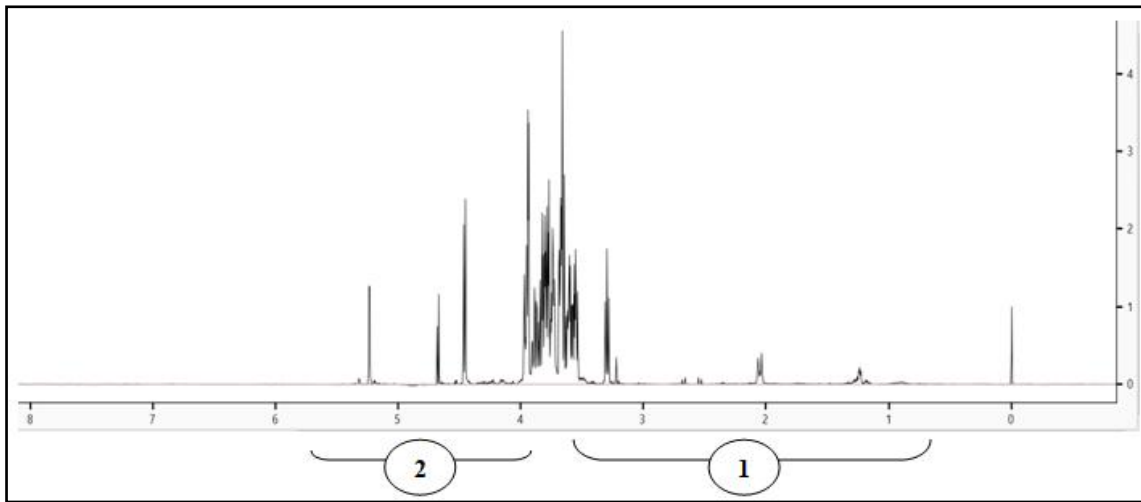
Όπως αναφέρθηκε, από τον αλγόριθμο ASICS προέκυψαν οι μεταβολίτες που αναγνωρίστηκαν και τα ppm, με βάση τα οποία έγινε η αντιστοίχιση με τον εκάστοτε μεταβολίτη για τα δείγματα της Ομάδας Α και της Ομάδας Β. Με βάση τα συγκεκριμένα ευρήματα, τη βοήθεια της βάσης δεδομένων HMDB (Human Metabolome Database) και του λογισμικού Chenomx NMR Suite 8, προέκυψαν οι εικόνες 14 και 15, όπου απεικονίζονται όσοι από τους 26 μεταβολίτες μπόρεσαν να ανιχνευθούν για τα δείγματα της Ομάδας Α και της Ομάδας Β. Παρόλο που ο αλγόριθμος μπόρεσε να αναγνωρίσει τους μεταβολίτες, πολλοί από αυτούς βρίσκονταν σε πάρα πολύ χαμηλή σχετική συγκέντρωση, με αποτέλεσμα να μην είναι ορατές οι κορυφές τους στο φάσμα NMR. Ένας άλλος λόγος που δεν έχουν αποτυπωθεί και οι 26 μεταβολίτες στο φάσμα είναι ότι για αρκετούς οι κορυφές με βάση τις οποίες είχε γίνει η αναγνώριση από τον αλγόριθμο, βρίσκονταν στην περιοχή των σακχάρων (3,5-5,5 ppm), όπου εξαιτίας της παρόμοιας δομής τους συντονίζονται στην ίδια φασματική περιοχή και έτσι δεν είναι εύκολη η διάκρισή τους, απουσία φασμάτων 2D NMR. Στους πίνακες 6 και 7 αναγράφονται οι μεταβολίτες που αναγνωρίστηκαν και βρέθηκαν να έχουν σχετικές συγκεντρώσεις με στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων της Ομάδας Α και της Ομάδας Β και οι χημικές τους μετατοπίσεις (ppm). Γι' αυτούς που έχουν αποτυπωθεί πάνω στο NMR φάσμα, αναγράφεται μόνο η χημική μετατόπιση που αντιστοιχεί στη συγκεκριμένη κορυφή που ανιχνεύτηκε, ενώ γι' αυτούς που δεν αποτυπώνονται στο φάσμα, για τους λόγους που αναφέρθηκαν, αναγράφονται όλες οι χημικές μετατοπίσεις, όπως προέκυψαν από τον ASICS σε συνδυασμό με την HMDB.



Εικόνα 14: NMR φάσμα του δείγματος 63 που σύμφωνα με το PCA μοντέλο, ανήκει στην ομάδα δειγμάτων της Α ομάδας (1^{ου}-2^{ου} τεταρτημορίου). Το φάσμα έχει χωριστεί σε τρία τμήματα στα οποία έχει γίνει μεγέθυνση ώστε να αποτυπωθούν κάποιοι από τους μεταβολίτες που έχουν αναγνωριστεί και έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις σχετικές τους συγκεντρώσεις μεταξύ των δειγμάτων των Ομάδων Α και Β.

Πίνακας 6: Μεταβολίτες που αναγνωρίστηκαν και έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις σχετικές τους συγκεντρώσεις μεταξύ των δειγμάτων της Ομάδας Α και της Ομάδας Β και οι χημικές τους μετατοπίσεις (ppm)

α/α	Μεταβολίτης	Χημική Μετατόπιση πρωτονίου ppm (πολλαπλότητα)
1	L-Αραβιτόλη	3.58 (dd), 3.68 (m), 3.76 (m), 3.84 (dd), 3.94 (m)
2	L-Σερίνη	3.84 (dd), 3.97 (m)
3	μυο-ινοσιτόλη	4.08 (t)
4	Γλυκολικό οξύ	3.94 (s)
5	Γλυκερόλη	3.59 (dd), 3.68 (dd), 3.81 (m)
6	Γλυκερικό οξύ	3.78 (m), 4.10 (m)
7	Δεϋδροασκορβικό οξύ	3.77 (m), 3.97 (m), 4.09 (m), 4.19 (m), 4.27 (dd), 4.45 (s)
8	D-Γλυκόζη	5.27 (d)
9	D-Φρουκτόζη	3.57 (m), 3.69 (m), 3.81 (m), 3.90 (dd), 4.01 (m), 4.03 (dd), 4.11 (m)
10	D-Γλυκουρονικό οξύ	3.31 (t), 3.53 (m), 3.60 (dd), 3.75 (m), 4.10 (d), 5.27 (d)
11	Ιππουρικό οξύ	3.96 (d)
12	6-Φωσφορική Γλυκόζη	5.25 (d)
13	Γλουταμινικό οξύ	2.34 (m)
14	3-Μεθυλοξανθίνη	3.55 (s)
15	<i>trans</i> -Φερουλικό οξύ	3.89 (s)
16	Φαιναιθυλαμίνη	7.34 (t)
17	2-Αμινοαδιπικό οξύ	1.64 (m)
18	α-Κετοϊσοβαλερικό οξύ	0.99 (d)
19	L-Λευκίνη	0.96 (t)
20	TMAO	3.28 (s)



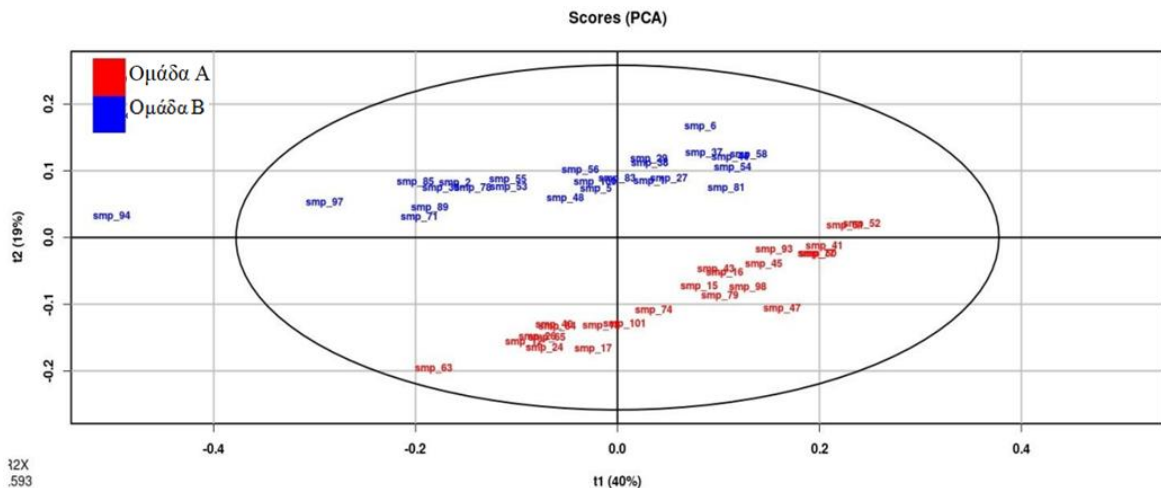
Εικόνα 15: NMR φάσμα του δείγματος 89 που σύμφωνα με το PCA μοντέλο, ανήκει στην ομάδα δειγμάτων της Β ομάδας ($3^{ου}$ - $4^{ου}$ τεταρτημορίου). Το φάσμα έχει χωριστεί σε δύο τμήματα στα οποία έχει γίνει μεγέθυνση ώστε να αποτυπωθούν κάποιοι από τους μεταβολίτες που έχουν αναγνωριστεί και έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις σχετικές τους συγκεντρώσεις μεταξύ των δειγμάτων των Ομάδων Α και Β

Πίνακας 7: Μεταβολίτες που αναγνωρίστηκαν και έχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις σχετικές τους συγκεντρώσεις μεταξύ των δειγμάτων της Ομάδας Α και της Ομάδας Β και οι χημικές τους μετατοπίσεις (ppm)

α/α	Μεταβολίτης	Χημική Μετατόπιση πρωτονίου ppm (πολλαπλότητα)
1	Γλυκερόλη	3.59 (dd), 3.68 (dd), 3.81 (m)
2	Δεϋδροασκορβικό οξύ	3.76 (m), 3.94 (m), 4.12 (m), 4.21 (m), 4.30 (dd), 4.47 (s)
3	Γλυκολικό οξύ	3.94 (s)
4	L-Αραβιτόλη	3.58 (dd), 3.68 (m), 3.76 (m), 3.84 (dd), 3.93 (m)
5	6-Φωσφορική Γλυκόζη	4.03 (m)
6	D-Γλυκουρονικό οξύ	5.27 (d)
7	Ιππουρικό οξύ	3.96 (d)
8	μυο-ινοσιτόλη	4.08 (t)
9	Γλυκερικό οξύ	3.78 (m), 4.10 (m)
10	Θρεονικό οξύ	3.61 (dd), 3.68 (dd), 3.97 (m)
11	D-Γλυκόζη	5.24 (d)
12	D-Φρουκτόζη	3.56 (m), 3.68 (m), 3.80 (m), 3.88 (dd), 3.99 (m), 4.02 (dd), 4.10 (m)
13	3-Μεθυλοξανθίνη	3.55 (s)
14	<i>trans</i> -Φερουλικό οξύ	3.89 (s)
15	Ομοβανιλικό οξύ	3.43 (s), 3.88 (s)
16	TMAO	3.28 (s)
17	Φαιαιθυλαμίνη	3.02 (t), 3.29 (t)
18	Μεθυλομηλονικό οξύ	3.17 (q)
19	Ισοβαλερικό οξύ	0.90 (d), 2.05 (d)
20	3-Υδροξυφαινυλοξικό οξύ	3.49 (s)

4.2 Πολυμεταβλητή ανάλυση με βάση τις σχετικές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών

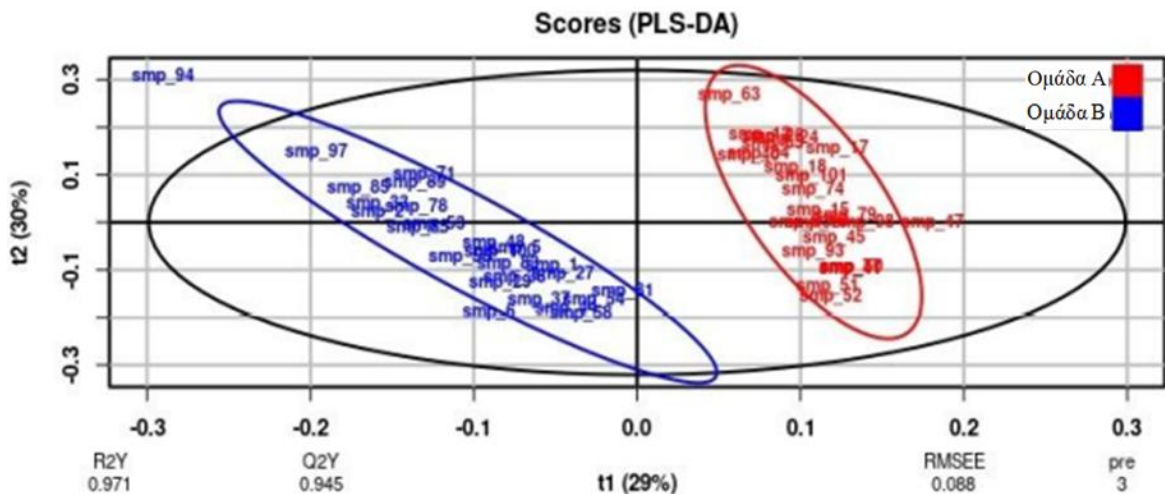
Όπως προαναφέρθηκε, από τη μήτρα δεδομένων που είχαμε, έγινε ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών που αναγνωρίστηκαν και υπολογίστηκε η σχετική τους συγκέντρωση. Έτσι, προέκυψε μία νέα μήτρα δεδομένων που περιλάμβανε τις σχετικές συγκεντρώσεις του κάθε μεταβολίτη που αναγνωρίστηκε για κάθε δείγμα. Με βάση τη νέα μήτρα δεδομένων, η οποία περιλαμβάνει σαφώς λιγότερες μεταβλητές (στήλες), μία για κάθε προσδιορισμένο και ποσοτικοποιημένο μεταβολίτη, έγινε μία νέα πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση μη επιβλεπόμενη και μία επιβλεπόμενη. Ο σκοπός της νέας πολυμεταβλητής ανάλυσης είναι να προσδιοριστούν οι μεταβολίτες που ευθύνονται για το φυσικό διαχωρισμό που προέκυψε μεταξύ δειγμάτων της Ομάδας Α και της Ομάδας Β από το PCA μοντέλο σε όλο το δειγματοχώρο (Εικόνα 10).



Εικόνα 16: PCA scores plot με την κατανομή των δειγμάτων όπως προέκυψε από τη νέα μήτρα δεδομένων

Στην εικόνα 16 απεικονίζεται το μη επιβλεπόμενο στατιστικό μοντέλο PCA καθώς και η κατανομή των δειγμάτων όπως αυτή προέκυψε από τη νέα μήτρα δεδομένων. Η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) εκφράζει το 40% και η δεύτερη (PC2) το 19% της συνολικής διακύμανσης των δεδομένων.

Έπειτα, εφαρμόστηκε επιβλεπόμενη μέθοδος κατηγοριοποίησης PLS-DA προκειμένου να διαπιστωθεί, αν μπορεί να μεγιστοποιηθεί ο διαχωρισμός των δύο εξεταζόμενων ομάδων.

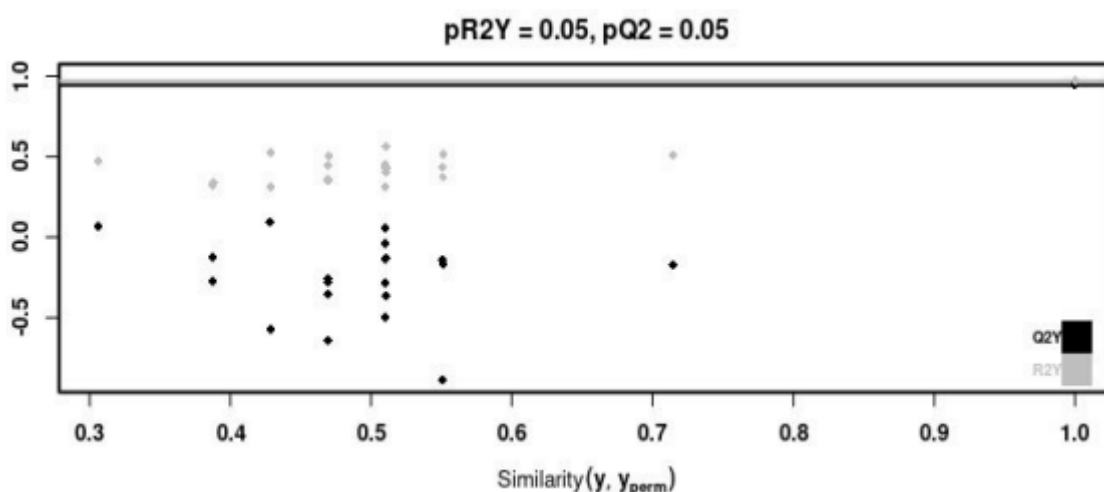


Εικόνα 17: Scores Plot του PLS-DA μοντέλου για τα δείγματα των Ομάδων Α και Β ως προς τη νέα μήτρα δεδομένων

Όπως φαίνεται στην εικόνα 17, από το PLS-DA μοντέλο εξήχθησαν οι παράμετροι $Q^2Y=0,94$ και $R^2Y=0,97$, που υποδηλώνουν την καλή ικανότητα πρόβλεψης και προσαρμογής του μοντέλου αντίστοιχα. Το PLS-DA μοντέλο είναι αξιόπιστο καθώς οι τιμές R^2Y και Q^2 είναι μεγαλύτερες του 0,50, ενώ η διαφορά $R^2Y - Q^2$ είναι μικρότερη του 0,20. Το PLS-DA μοντέλο έδειξε μία τάση διαφοροποίησης των μεταβολικών προφίλ των ομάδων Α και Β.

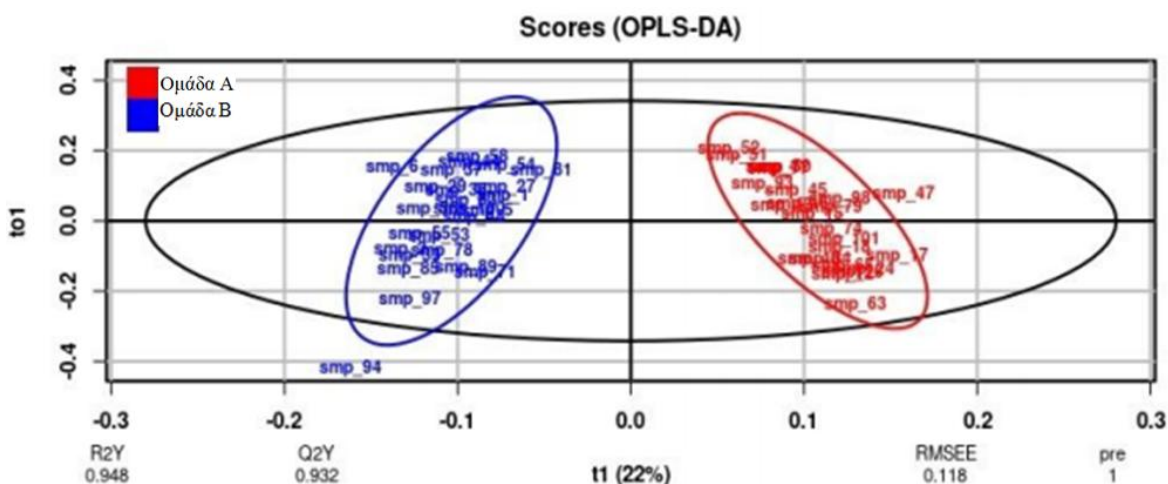
Η πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) εκφράζει το 29% και η δεύτερη (PC2) το 30% της συνολικής διακύμανσης των δεδομένων.

Για την επικύρωση του μοντέλου εφαρμόστηκε ανάλυση μετάθεσης (permutation test) με 20 μεταθέσεις για να πιστοποιηθεί η καλή ικανότητα πρόβλεψης και προσαρμογής του PLS-DA μοντέλου, απ' όπου όλα τα μοντέλα που προέκυψαν, έπειτα από ανακατάταξη των τιμών της κατηγορικής μεταβλητής, είχαν πολύ μικρότερες τιμές Q^2 και R^2 από το αρχικό μοντέλο, γεγονός που εξασφαλίζει ότι το αρχικό PLS-DA μοντέλο είναι ικανό να προβλέψει σωστά τα μεταβολικά προφίλ των δειγμάτων των δύο ομάδων (Εικόνα 18).



Εικόνα 18: Επικύρωση του μοντέλου PLS-DA μέσω ανάλυσης μετάθεσης (permutation test)

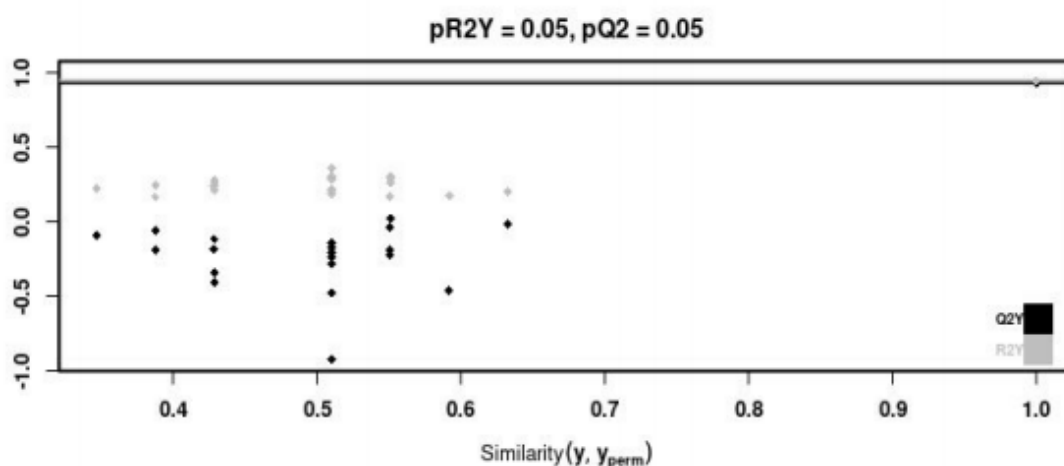
Προκειμένου να αναδειχθούν μόνο οι μεταβολίτες που ευθύνονται για τη διαφοροποίηση των μεταβολικών προφίλ μεταξύ των δειγμάτων των Ομάδων Α και Β, εφαρμόστηκε η επιβλεπόμενη μέθοδος κατηγοριοποίησης OPLS-DA (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: Scores Plot του OPLS-DA μοντέλου για τα δείγματα των Ομάδων Α και Β ως προς τη νέα μήτρα δεδομένων

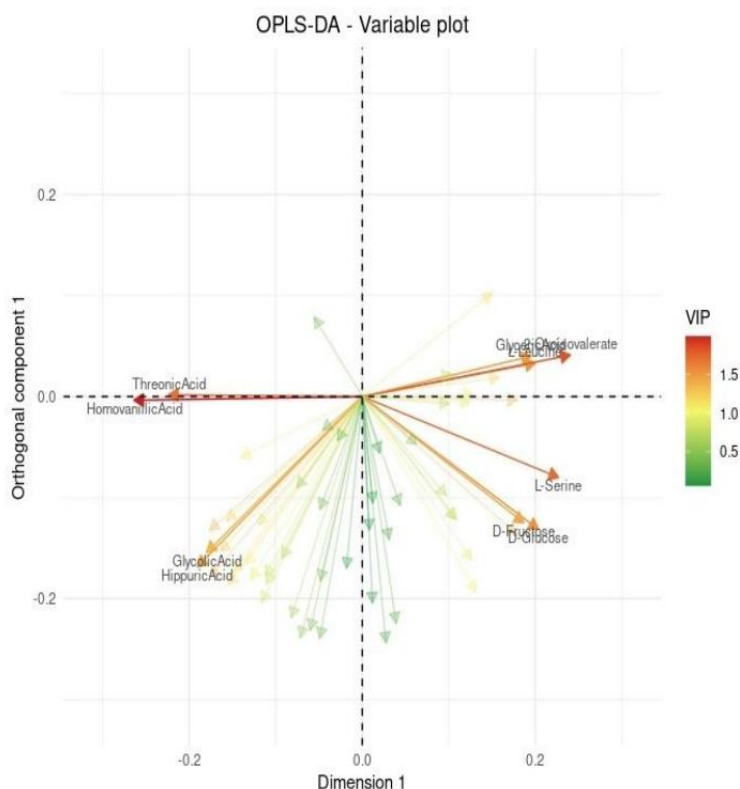
Από το OPLS-DA μοντέλο εξήχθησαν οι παράμετροι $Q^2Y=0.93$ και $R^2Y=0.94$, που υποδηλώνουν την καλή ικανότητα πρόβλεψης και προσαρμογής του μοντέλου αντίστοιχα. Το παραπάνω OPLS-DA μοντέλο είναι αξιόπιστο, καθώς οι τιμές R^2Y και Q^2 είναι μεγαλύτερες του 0,50, ενώ η διαφορά $R^2Y - Q^2$ είναι μικρότερη του 0,20.

Για την επικύρωση του μοντέλου εφαρμόστηκε ανάλυση μετάθεσης (permutation test) με 20 μεταθέσεις για να πιστοποιηθεί η καλή ικανότητα πρόβλεψης και προσαρμογής του OPLS-DA μοντέλου, απ' όπου όλα τα μοντέλα που προέκυψαν, έπειτα από ανακατάταξη των τιμών της κατηγορικής μεταβλητής, είχαν πολύ μικρότερες τιμές Q^2 και R^2 από το αρχικό μοντέλο, γεγονός που εξασφαλίζει ότι το αρχικό OPLS-DA μοντέλο είναι ικανό να προβλέψει σωστά τα μεταβολικά προφίλ των δύο ομάδων (Εικόνα 20).



Εικόνα 20: Επικύρωση του μοντέλου OPLS-DA μέσω ανάλυσης μετάθεσης (permutation test)

Το διάγραμμα σημαντικότητας VIP χρησιμοποιείται συνήθως για να περιγράψει ένα OPLS-DA μοντέλο. Δείχνει με φθίνουσα σειρά τις πιο σημαντικές μεταβλητές για το διαχωρισμό δύο ομάδων. Συνήθως, λαμβάνονται υπόψη μεταβλητές με τιμή $VIP > 1,0$. Στην ουσία $VIP > 1,0$ δείχνει ότι η μεταβλητή συνεισφέρει περισσότερο από το μέσο όρο στο διαχωρισμό. Η υιοθέτηση τιμών $VIP > 1,0$ έχει ως αποτέλεσμα τη συμπερίληψη μέχρι και του 50% των μεταβλητών. Στην εικόνα 21 δίνεται το διάγραμμα VIP για το παραπάνω OPLS-DA μοντέλο, όπου γίνεται χρωματική διάκριση των μεταβολιτών ανάλογα με την τιμή VIP και απεικονίζονται με κόκκινες και πορτοκαλί γραμμές οι μεταβολίτες που είναι οι πιο σημαντικοί για το διαχωρισμό των δύο ομάδων (Ομάδα A και Ομάδα B).

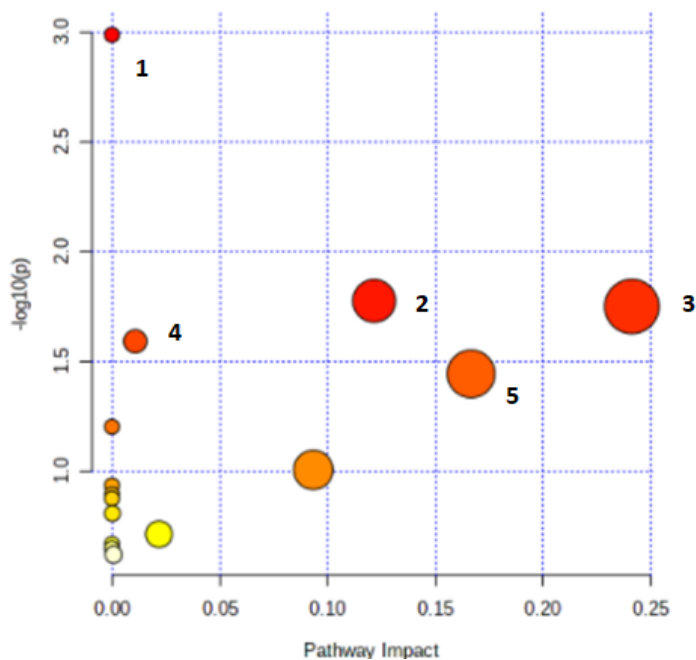


Εικόνα 21: Διάγραμμα σημαντικότητας VIP Plot για το μοντέλο OPLS-DA

Όπως φαίνεται από την Εικόνα 21, οι σημαντικότεροι μεταβολίτες για το διαχωρισμό παρουσιάζονται με κόκκινες γραμμές (ομοβανιλικό οξύ και 2-οξοϊσοβαλερικό οξύ). Ακολουθούν το θρεονικό οξύ και η L-σερίνη, και έπειτα η D-φρουκτόζη, η D-γλυκόζη, το γλυκολικό οξύ, το ιππουρικό οξύ, το γλυκερικό οξύ και η L-λευκίνη. Παρατηρούμε επίσης ότι και οι 10 μεταβολίτες ανήκουν στην ομάδα των 26, που είχαν ανιχνευτεί με στατιστικώς σημαντική διαφορά στη σχετική συγκέντρωσή τους μεταξύ των ομάδων Α και Β.

Ανάλυση Μεταβολικών Μονοπατιών με το MetaboAnalyst

Για τη ανάλυση των μεταβολικών μονοπατιών (Pathway Analysis) που σχετίζονται με τους 10 μεταβολίτες που προσδιορίστηκαν ως σημαντικοί για το διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων Α και Β, χρησιμοποιήθηκε η διαδικτυακή πλατφόρμα MetaboAnalyst. Το λογισμικό αυτό χρησιμοποιεί ανάλυση εμπλουτισμού με ταυτόχρονη ανάλυση τοπολογίας μονοπατιών και χρησιμοποιεί επίσης υψηλής ποιότητας μεταβολικά μονοπάτια από τη βάση δεδομένων KEGG. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζονται τα μεταβολικά μονοπάτια, που επηρεάζονται στατιστικώς σημαντικά από τους υπό διερεύνηση μεταβολίτες. Στην εικόνα 22 παρουσιάζεται μία γραφική αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης μεταβολικών μονοπατιών για τους 10 μεταβολίτες του διαγράμματος VIP.



Εικόνα 22: Σύνοψη της ανάλυσης μεταβολικών μονοπατιών για τους 10 μεταβολίτες του διαγράμματος VIP

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα 5 στατιστικώς σημαντικά μονοπάτια ($p < 0,05$), που προέκυψαν από τα αποτελέσματα ανάλυσης μεταβολικών μονοπατιών. Αυτά είναι η βιοσύνθεση βαλίνης, λευκίνης, ισολευκίνης, ο μεταβολισμός γλυκοξυλικού και δικαρβοξυλικού, ο μεταβολισμός γλυκίνης, σερίνης, θρεονίνης, η αποικοδόμηση βαλίνης, λευκίνης, ισολευκίνης και η βιοσύνθεση αμινοάκυλο-tRNA. Όπως φαίνεται, από τους 10 μεταβολίτες, αυτοί που συμμετέχουν στα στατιστικώς σημαντικά μονοπάτια είναι τέσσερις (Λευκίνη, α -Κετοϊσοβαλερικό οξύ, Σερίνη, Γλυκερικό οξύ).

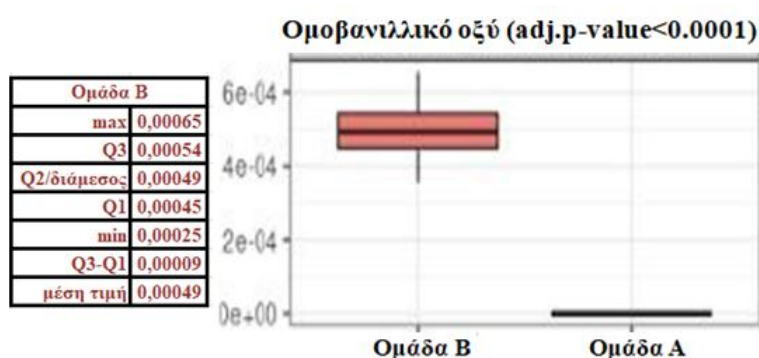
Πίνακας 8: Αποτελέσματα ανάλυσης μεταβολικών μονοπατιών από το MetaboAnalyst

a/a	Όνομα Μονοπατιού	Αριθμός Μεταβολιτών που συμμετέχουν /Συνολικός αριθμός μεταβολιτών	Μεταβολίτες που συμμετέχουν	p-value	Επίδραση
1	Βιοσύνθεση Βαλίνης, Λευκίνης και Ισολευκίνης	2/8	Λευκίνη, α -Κετοϊσοβαλερικό οξύ	0,001028	0,0
2	Μεταβολισμός Γλυκοξυλικού και Δικαρβοξυλικού	2/32	Σερίνη, Γλυκερικό οξύ	0,016763	0,1217
3	Μεταβολισμός Γλυκίνης, Σερίνης και Θρεονίνης	2/33	Σερίνη, Γλυκερικό οξύ	0,017783	0,24127
4	Αποικοδόμηση Βαλίνης, Λευκίνης και Ισολευκίνης	2/40	α -Κετοϊσοβαλερικό οξύ, Λευκίνη	0,025642	0,01084
5	Βιοσύνθεση Αμινοάκυλ-tRNA	2/48	Σερίνη, Λευκίνη	0,036071	0,16667

Ακολούθως θα συζητηθούν οι 10 αυτοί μεταβολίτες, που βρέθηκαν να έχουν στατιστικώς σημαντική διαφορά στις συγκεντρώσεις και σημαντική επίδραση στο διαχωρισμό των ομάδων A και B και θα γίνει συσχέτιση των πειραματικών ευρημάτων με τη βιβλιογραφία.

➤ Ομοβανιλλικό οξύ (Homovanillic Acid)

Το ομοβανιλλικό οξύ, όπως φαίνεται από το διάγραμμα VIP (Εικόνα 21), έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στο διαχωρισμό των ομάδων A και B. Στην εικόνα 23 παρατίθεται το θηκόγραμμα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του ομοβανιλλικού οξέος και ένας πίνακας με τη μέγιστη τιμή (max), το 3^ο τεταρτημόριο (Q3), το 2^ο τεταρτημόριο (Q2) δηλαδή τη διάμεσο, το 1^ο τεταρτημόριο (Q1), την ελάχιστη τιμή (min) και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος (IQR=Q3-Q1) του θηκογράμματος και τη μέση τιμή των σχετικών συγκεντρώσεων. Αυτός ο πίνακας με το αντίστοιχο θηκόγραμμα θα παρατεθεί και για τους 10 μεταβολίτες του διαγράμματος VIP.



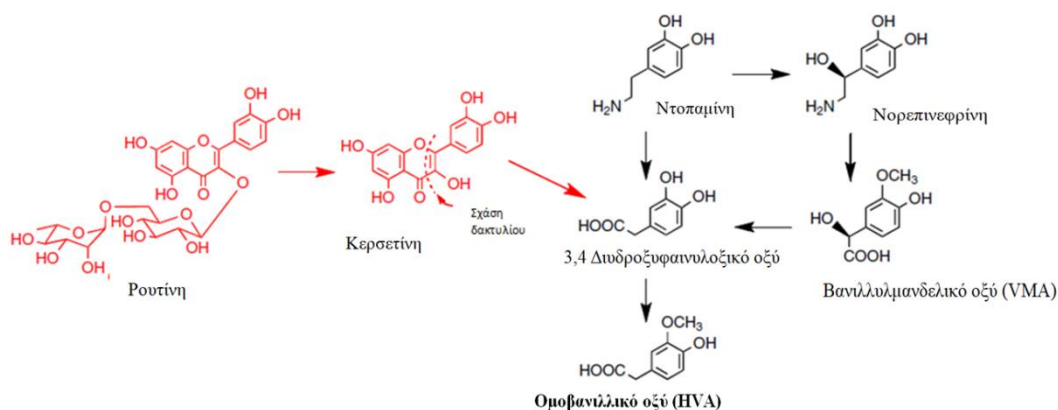
Εικόνα 23: Θηκόγραμμα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του ομοβανιλλικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα του θηκογράμματος

Από το θηκόγραμμα της Εικόνας 23 αλλά και από την αναγνώριση που έχει γίνει (Πίνακας 5), προκύπτει ότι το ομοβανιλλικό οξύ έχει ανιχνευτεί μόνο στα δείγματα της ομάδας B. Επίσης, το IQR είναι πολύ μικρό, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο είναι συμμετρική.

Το ομοβανιλλικό οξύ, ανήκει στην κατηγορία οργανικών ενώσεων γνωστών ως μεθοξυφαινόλες. Είναι ένας μεταβολίτης κατεχολαμίνης και συγκεκριμένα της ντοπαμίνης, που εμφανίζεται στα ανθρώπινα βιολογικά υγρά (HMDB, 2021).

Ορισμένα φάρμακα, όπως το L-DOPA, επηρεάζουν την εκτίμηση του ομοβανιλλικού οξέος στα ούρα, καθώς και διάφοροι διατροφικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της βιταμίνης B₆ σε συνδυασμό με μαγνήσιο, συμπλήρωμα τυροσίνης σε παχύσαρκες γυναίκες, καθώς και πιο ιδιαίτερες περιπτώσεις όπως το NADH που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ασθενών με νόσο του Πάρκινσον και γεύματα με υψηλή μονοαμίνη σε ασθενείς με σχιζοφρένεια. Το ομοβανιλλικό οξύ σχηματίζεται επίσης ως μεταβολίτης διαιτητικών φλαβονοειδών με βάση την κερσετίνη όταν φτάνουν στο παχύ έντερο. Η ρουτίνη, που βρίσκεται στο τσάι, τις ντομάτες, τα μήλα, τα σπαράγγια, τα ροδάκινα, τα νεκταρίνια, τα ακτινίδια, τις μπανάνες και πολλά μούρα, δεν απορροφάται

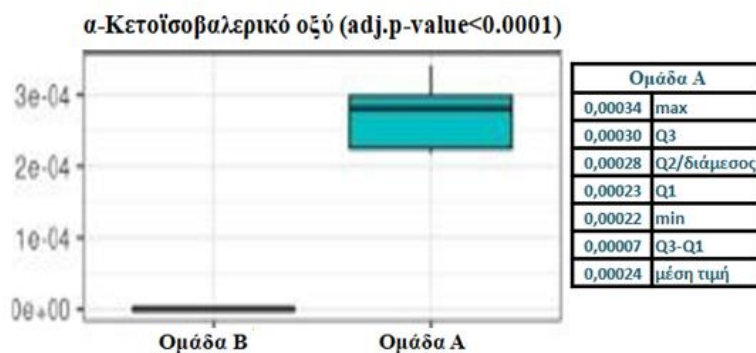
καλά στο λεπτό έντερο και φτάνει στο παχύ έντερο σε σημαντικές ποσότητες, όπου τα βακτήρια του παχέος εντέρου διασπούν το τμήμα της ρουτόζης, για να ελευθερωθεί η κερσετίνη. Ακολουθεί σχάση δακτυλίου, απελευθερώνοντας 3,4-διυδροξυφαινυλοξικό οξύ, το οποίο απορροφάται στην κυκλοφορία του αίματος και μεθυλιώνεται στο ήπαρ σε ομοβανιλικό οξύ, πριν από την απέκκριση στα ούρα, μαζί με 3- υδροξυφαινυλοξικό οξύ (Εικόνα 24). Το ομοβανιλικό οξύ στα ούρα μπορεί να αυξηθεί έως και 2-3 ημέρες, μετά την πρόσληψη των συγκεκριμένων τροφών. Άλλες πιθανές διατροφικές πηγές αύξησης του HVA περιλαμβάνουν την τυραμίνη, μια μονοαμίνη που βρίσκεται σε μια σειρά τροφών, όπως επεξεργασμένα κρέατα και τυρί, αβοκάντο και μπανάνες, τα οποία μπορούν να μεταβολιστούν σε ντοπαμίνη από το ηπατικό μικρόσωμα και την υδροξυτυροσόλη, που βρίσκεται στο ελαιόλαδο και το κόκκινο κρασί και είναι πρόδρομος ντοπαμίνης (Combet, et al., 2011).



Εικόνα 24: Σχηματισμός ομοβανιλικού οξέος από ντοπαμίνη και ρουτίνη (Combet, et al., 2011)

➤ **α -Κετοϊσοβαλερικό οξύ (2-Oxoisovaleric acid/ α -Ketoisovaleric acid)**

Το α -κετοϊσοβαλερικό οξύ όπως φαίνεται από το VIP Plot (Εικόνα 21) έχει τη δεύτερη μεγαλύτερη επίδραση στο διαχωρισμό των ομάδων A και B.

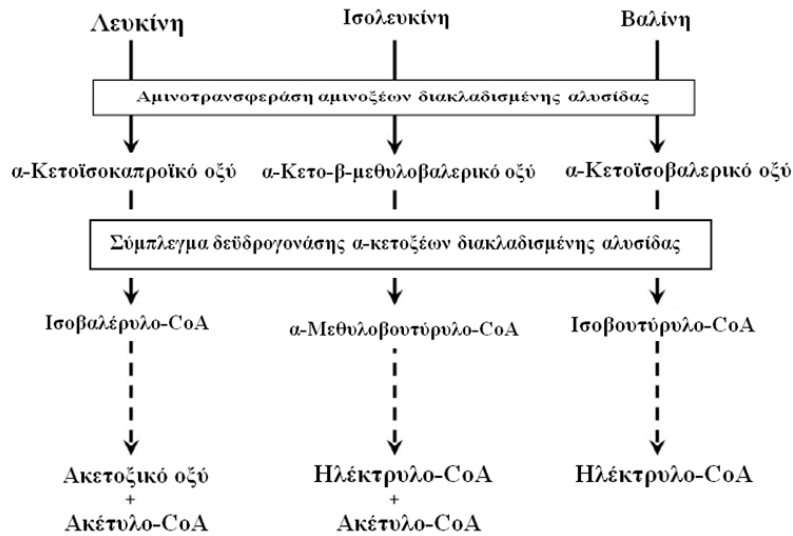


Εικόνα 25: Θηκογράμμα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του α -κετοϊσοβαλερικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα του θηκογράμματος

Από το θηκόγραμμα της Εικόνας 25, αλλά και από την αναγνώριση που έχει γίνει (Πίνακας 5), προκύπτει ότι το α-κετοϊσοβαλερικό οξύ έχει ανιχνευτεί μόνο στα δείγματα της ομάδας Α. Επίσης, το IQR είναι πολύ μικρό, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική.

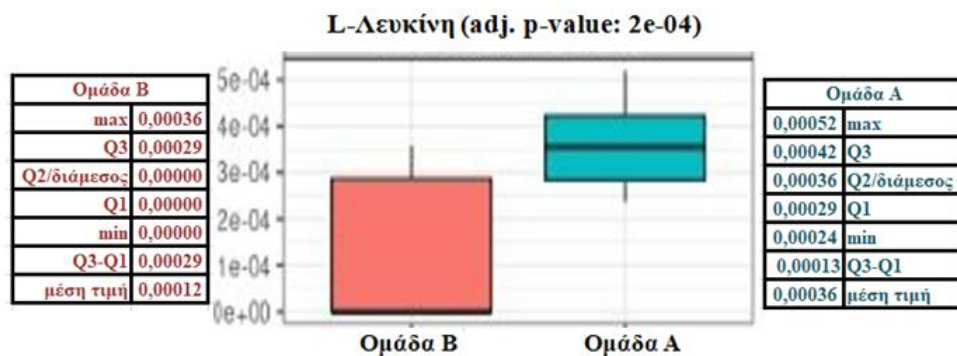
Το α-κετοϊσοβαλερικό οξύ (α-KIV) είναι α-κετοξύ διακλαδισμένης αλυσίδας, το οποίο περιέχει μία καρβονυλομάδα και μία καρβοξυλομάδα. Το α-KIV έχει εφαρμοστεί ευρέως στα φαρμακευτικά προϊόντα, στα τρόφιμα και στα καλλυντικά και στις πρόσθετες ύλες ζωοτροφών. Στο φαρμακευτικό τομέα, το α-KIV έχει καλή επίδραση στη μείωση της πίεσης των νεφρών και μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ορισμένων ασθενειών, που σχετίζονται με το μεταβολισμό του αζώτου, όπως η χρόνια ουραιμία. Επιπλέον, είναι μια βασική πρώτη ύλη για τη σύνθεση της βιταμίνης B₅ (Luo, et al., 2021). Το α-KIV προκύπτει από τον καταβολισμό της βαλίνης, η οποία ανήκει στα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAA).

Το πρώτο βήμα στον καταβολισμό των BCAAs είναι η τρανσαμίνωση για την απομάκρυνση της αμινομάδας, η οποία καταλύεται από την αμινοτρανσφεράση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας. Η τρανσαμίνωση της λευκίνης, ισολευκίνης και βαλίνης, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή των α-κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας, δηλαδή του α-κετοϊσοκαπροϊκού οξέος (KIC), του α-κετο-β-μεθυλοβαλερικού οξέος (KMV) και του α-κετοϊσοβαλερικού οξέος (α-KIV), αντίστοιχα. Το δεύτερο βήμα στον καταβολισμό των BCAAs είναι η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση, η οποία καταλύεται από το σύμπλεγμα δεϋδρογονάσης α-κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας. Η οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση των KIC, KMV και KIV, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ισοβαλερυλο συνενζύμου Α (CoA), α-μεθυλοβουτυρυλο-CoA και ισοβουτύρυλο-CoA, αντίστοιχα. Ο καταβολισμός της λευκίνης αποδίδει τελικά ακετοξικό οξύ και ακέτυλο-CoA, η ισολευκίνη μεταβολίζεται σε ηλεκτρυλο-CoA και ακέτυλο-CoA, και η βαλίνη σε ηλεκτρυλο-CoA. Τα τρία ενδιάμεσα προϊόντα που προέρχονται από τον καταβολισμό των BCAAs, δηλαδή το ηλεκτρυλο-CoA, το ακέτυλο-CoA και το ακετοξικό οξύ, εισέρχονται απευθείας στα μονοπάτια του ενδιάμεσου μεταβολισμού, με αποτέλεσμα είτε τη σύνθεση της γλυκόζης (γλυκονεογένεση), είτε την παραγωγή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP), μέσω της οξειδώσής τους από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (Εικόνα 26) (Gorissen & Phillips, 2019).



Εικόνα 26: Καταβολισμός αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας. Το α-κετοϊσοβαλερικό οξύ προκύπτει από τον καταβολισμό της βαλίνης (Gorissen & Phillips, 2019)

➤ L-Λευκίνη (L-Leucine)



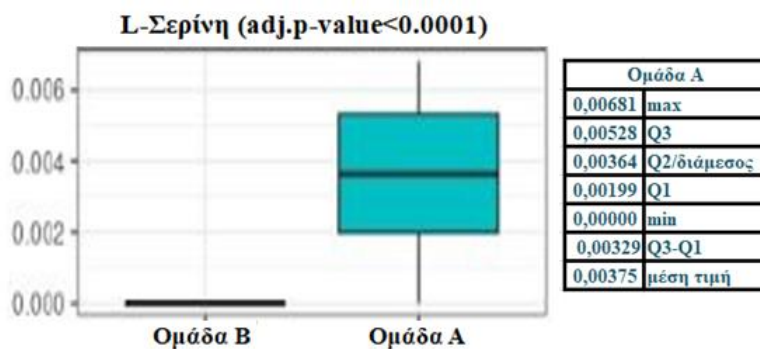
Εικόνα 27: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της λευκίνης στις ομάδες Α και Β και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 27, προκύπτει ότι το Q1 της ομάδας Α είναι ίσο με το Q3 της Β και η διάμεσος (Q2) της ομάδας Α, βρίσκεται πιο πάνω από το Q3 της ομάδας Β, άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης της σχετικής συγκέντρωσης της λευκίνης στην ομάδα Α. Επίσης, το IQR της ομάδας Α είναι πολύ μικρό, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, είναι συμμετρική. Αντίθετα, στην ομάδα Β το IQR είναι μεγάλο, άρα παρατηρείται μεγάλη μεταβλητότητα των δεδομένων και μάλιστα το 50% των δεδομένων, είναι κατανεμημένα πάνω από τη διάμεσο, η οποία είναι 0. Είναι προφανές ότι στην ομάδα Β τουλάχιστον στο 50% των δεδομένων, παρουσιάζεται μηδενική σχετική συγκέντρωση της λευκίνης.

Η λευκίνη είναι ένα μη πολικό αλειφατικό α-αμινοξύ, που χρησιμοποιείται στη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών. Είναι απαραίτητο για τους ανθρώπους, που σημαίνει ότι το σώμα δεν μπορεί να το συνθέσει, και πρέπει να ληφθεί από τη διατροφή. Οι ανθρώπινες διατροφικές πηγές, είναι τρόφιμα που περιέχουν πρωτεΐνες, όπως γάλα, αυγά, καλαμπόκι, σόγια, ψάρι, ρύζι, βόειο κρέας, φασόλια, σιτάρι και πατάτες (HMDB, 2021). Μάλιστα, από μία έρευνα που συνέκρινε τη χορτοφαγική διατροφή, με τη διατροφή αυτών που έτρωγαν κρέας και τις διαφορές στους μεταβολίτες, προέκυψε ότι τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAAs) λευκίνη, ισολευκίνη και βαλίνη, ήταν υψηλότερα σε όσους τρώνε κρέας, απ' ότι σε αυτούς που δεν τρώνε (Lindqvist, et al., 2019). Τα BCAAs είναι απαραίτητα αμινοξέα, των οποίων η δομή του άνθρακα χαρακτηρίζεται από ένα σημείο διακλάδωσης. Αυτά τα αμινοξέα είναι κρίσιμα για την ανθρώπινη ζωή και εμπλέκονται ιδιαίτερα στο στρες, την ενέργεια και τον μεταβολισμό των μυών (Gorissen & Phillips, 2019). Επίσης, η συγκέντρωση των BCAAs, έχει βρεθεί αυξημένη στο μητρικό γάλα παχύσαρκων μητέρων ($BMI=34,3\pm 3,9 \text{ kg/m}^2$), σε σχέση με αυτό μητέρων κανονικού βάρους ($BMI=21,6\pm 1,4 \text{ kg/m}^2$). Συγκεκριμένα, σύμφωνα με έρευνα, το ώριμο μητρικό γάλα των παχύσαρκων μητέρων, περιείχε 20% περισσότερο BCAAs, από το μητρικό γάλα των μητέρων κανονικού βάρους (De Luca, et al., 2016).

Παρά την παρόμοια δομή τους, τα BCAAs συμμετέχουν σε διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια. Η βαλίνη μετατρέπεται σε υδατάνθρακες, η λευκίνη σε λιπίδια και η ισολευκίνη και στα δύο. Η λευκίνη διεγείρει επίσης την απελευθέρωση ινσουλίνης, η οποία με τη σειρά της, διεγείρει τη σύνθεση πρωτεϊνών και αναστέλλει τη διάσπασή τους. Μπορεί να βρεθεί στα περισσότερα βιολογικά υγρά, συμπεριλαμβανομένου του αίματος, του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (CSF), των περιττωμάτων και του ιδρώτα, καθώς και στους περισσότερους ανθρώπινους ιστούς (HMDB, 2021).

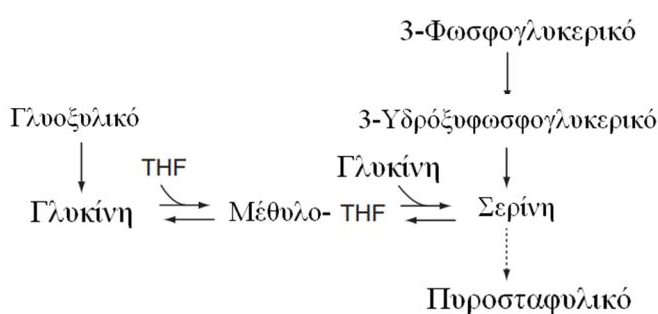
➤ **L-Σερίνη (L-Serine)**



Εικόνα 28: Θηκογράμμο της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της σερίνης στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα του θηκογράμματος

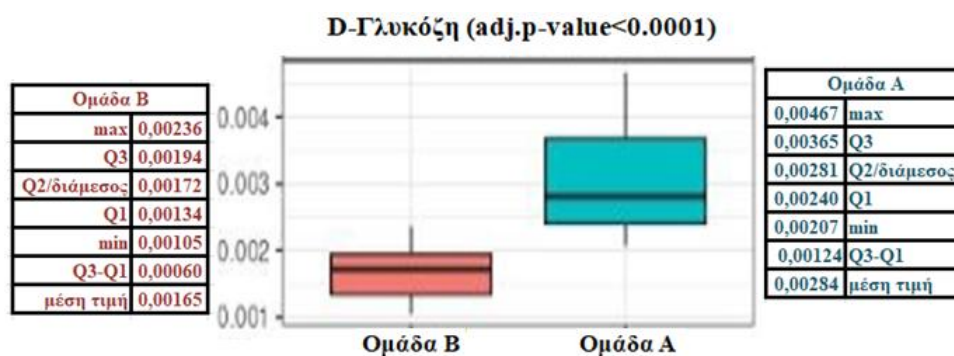
Από το θηκόγραμμα της Εικόνας 28, αλλά και από την αναγνώριση που έχει γίνει (Πίνακας 5), προκύπτει ότι η σερίνη έχει ανιχνευτεί κατά κύριο λόγο, στα δείγματα της ομάδας Α. Το IQR είναι σχετικά μεγάλο, επομένως υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα δεδομένων, τα οποία επίσης είναι σχεδόν συμμετρικά κατανομημένα, γύρω από τη διάμεσο.

Η σερίνη είναι ένα μη απαραίτητο αμινοξύ, που προέρχεται από τη γλυκίνη. Όπως όλα τα δομικά στοιχεία των αμινοξέων των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων, η σερίνη μπορεί να καταστεί απαραίτητη, υπό ορισμένες συνθήκες και επομένως είναι σημαντική για τη διατήρηση της υγείας και την πρόληψη ασθενειών. Έχει χαμηλή μέση συγκέντρωση στους μύες, σε σύγκριση με άλλα αμινοξέα, αλλά έχει υψηλή συγκέντρωση, σε όλες τις κυτταρικές μεμβράνες. Μπορεί να προέρχεται από διατροφική πρόσληψη, τη βιοσύνθεση από το 3-φωσφογλυκερικό, από τη γλυκίνη ή από τη διάσπαση πρωτεϊνών και φωσφολιπιδίων (HMDB, 2021). Συγκεκριμένα, η σερίνη και η γλυκίνη μπορούν εύκολα να αλληλομετατραπούν, μέσω του μεθυλοτετραϋδροφυλλικού οξέος, το οποίο είτε συμπυκνώνεται με ένα μόριο γλυκίνης για να δώσει σερίνη, είτε διασπάται για να δώσει γλυκίνη και τετραϋδροφυλλικό (THF). Ωστόσο, υπάρχουν επίσης ξεχωριστές βιοσυνθετικές οδοί και για τα δύο μόρια. Η γλυκίνη μπορεί να συντεθεί με τρανσαμίνωση του γλυοξυλικού, που προκύπτει από την οδό φωσφορικής πεντόζης και η σερίνη με αποφωσφορυλίωση της 3-φωσφοσερίνης, η οποία προκύπτει με διαδοχική αφυδρογόνωση και τρανσαμίνωση του 3-φωσφογλυκερικού, ενός ενδιάμεσου της γλυκόλυσης (Εικόνα 29) (Emery, 2013).



Εικόνα 29: Σύνθεση και καταβολισμός γλυκίνης και σερίνης (Emery, 2013)

➤ **D-Γλυκόζη (D-Glucose)**

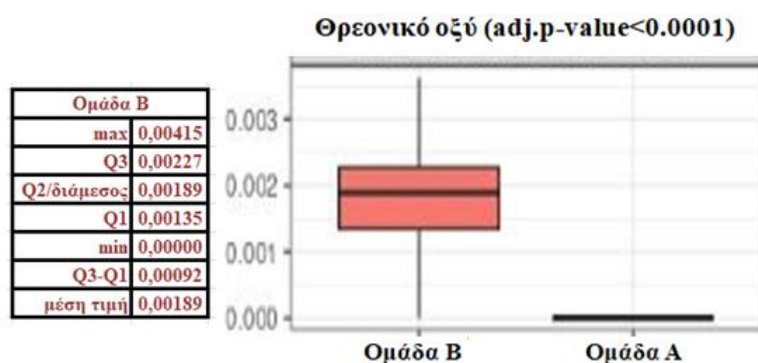


Εικόνα 30: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της γλυκόζης στις ομάδες Α και Β και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 30, προκύπτει ότι η τιμή Q1 της ομάδας Α, βρίσκεται πολύ ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας Β, άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης της σχετικής συγκέντρωσης της γλυκόζης στην ομάδα Α. Επίσης, το IQR της ομάδας Α είναι σχετικά μεγάλο, επομένως υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, είναι ασύμμετρη. Αντίθετα, στην ομάδα Β το IQR είναι μικρό, άρα παρατηρείται μικρή μεταβλητότητα των δεδομένων και δεν είναι κατανομημένα συμμετρικά γύρω από τη διάμεσο.

Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης που περιέχει έξι άτομα άνθρακα και μια ομάδα αλδεϋδης και ως εκ τούτου αναφέρεται ως αλδόζη ή αλδοεξόζη. Είναι μια κύρια πηγή ενέργειας για τους ζωντανούς οργανισμούς. Απαντάται σε φρούτα και άλλα μέρη φυτών, σε ελεύθερη κατάσταση. Στα ζώα, η γλυκόζη προκύπτει από τη διάσπαση του γλυκογόνου, σε μια διαδικασία γνωστή ως γλυκογονόλυση. Η γλυκόζη συντίθεται κατά τη γλυκονογένεση στο ήπαρ και στα νεφρά, από μη υδατανθρακικά ενδιάμεσα, όπως πυροσταφυλικό και γλυκερόλη (HMDB, 2021). Επίσης, έρευνα έδειξε ότι τα επίπεδα γλυκόζης στα ούρα από νεογνά θηλυκού γένους, είναι αυξημένα σε σύγκριση με τα νεογνά αρσενικού γένους (Pinto, et al., 2016).

➤ **Θρεονικό οξύ (Threonic acid)**

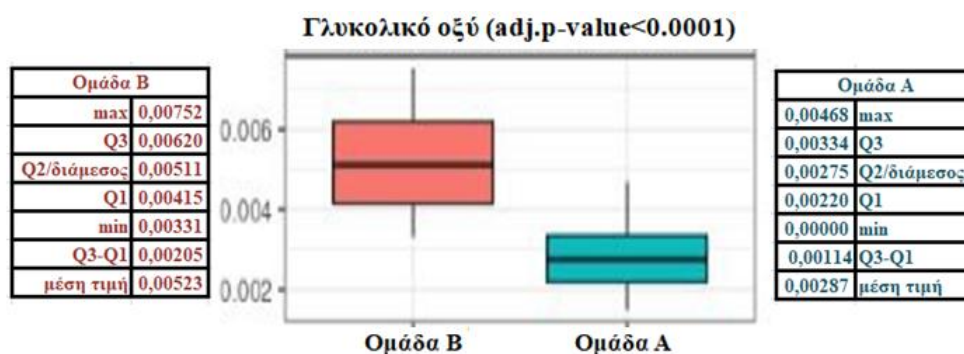


Εικόνα 31: Θηκόγραμμα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του θρεονικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα του θηκογράμματος

Από το θηκόγραμμα της Εικόνας 31, αλλά και από την αναγνώριση που έχει γίνει (Πίνακας 5), προκύπτει ότι το θρεονικό οξύ έχει ανιχνευτεί, κατά κύριο λόγο στα δείγματα της ομάδας B. Το IQR είναι μικρό, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων, τα οποία είναι σχεδόν συμμετρικά κατανομημένα γύρω από τη διάμεσο.

Το θρεονικό οξύ, ανήκει στην κατηγορία οργανικών ενώσεων, που είναι γνωστά ως υδροξυοξέα βραχείας αλυσσους και παράγωγα. Το θρεονικό οξύ προέρχεται από τη θρεόζη. Το L-ισομερές είναι μεταβολίτης ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C). Το θρεονικό οξύ προέρχεται πιθανώς από γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες ή από την αποικοδόμηση του ασκορβικού οξέος. Το θρεονικό οξύ είναι ένα υπόστρωμα της L-θρεονικής 3-αφυδρογονάσης στην οδό του ασκορβικού και του αλδερικού μεταβολισμού. Είναι ενδογενής και μικροβιακός μεταβολίτης και φυσικό συστατικό του αίματος και του υδατοειδούς υγρού του οφθαλμού (aqueous humour) (HMDB, 2021).

➤ **Γλυκολικό οξύ (Glycolic acid)**



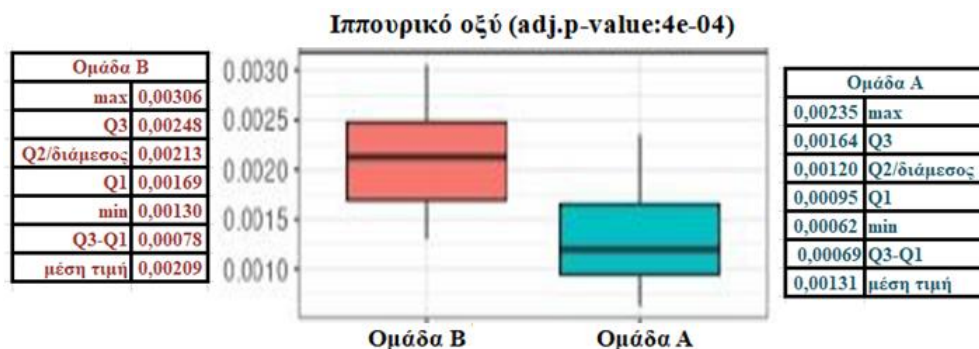
Εικόνα 32: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλυκολικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 32, προκύπτει ότι η τιμή Q1 της ομάδας B, βρίσκεται πολύ ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας A, άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο

ομάδων και τάση αύξησης της σχετικής συγκέντρωσης του γλυκολικού οξέος στην ομάδα B. Επίσης, το IQR της ομάδας A είναι πολύ μικρό, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, είναι σχεδόν συμμετρική. Αντίθετα, στην ομάδα B το IQR είναι πιο μεγάλο, άρα παρατηρείται μεγαλύτερη μεταβλητότητα των δεδομένων και δεν είναι κατανεμημένα ακριβώς συμμετρικά γύρω από τη διάμεσο.

Το γλυκολικό οξύ (ή υδροξυοξικό οξύ) είναι το μικρότερο αλφα-υδροξύ οξύ (ΑΗΑ). Αυτό το άχρωμο, άοσμο και υγροσκοπικό κρυσταλλικό στερεό, είναι εξαιρετικά διαλυτό στο νερό. Λόγω της εξαιρετικής ικανότητάς του να διεισδύει στο δέρμα, το γλυκολικό οξύ χρησιμοποιείται συχνά σε προϊόντα περιποίησης του δέρματος (HMDB, 2021).

➤ **Ιππουρικό οξύ (Hippuric Acid)**

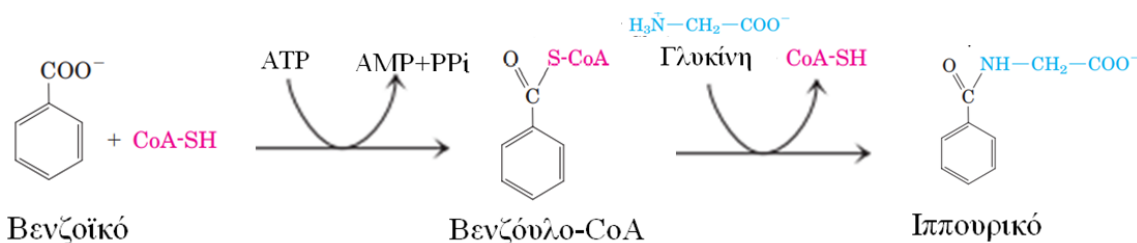


Εικόνα 33: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του ιππουρικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 33, προκύπτει ότι η τιμή Q1 της ομάδας B, βρίσκεται πολύ ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας A, άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης της σχετικής συγκέντρωσης του ιππουρικού οξέος στην ομάδα B. Επίσης, το IQR της ομάδας A είναι σχετικά μεγάλο, επομένως υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, είναι σχετικά συμμετρική. Στην ομάδα B το IQR είναι λίγο μεγαλύτερο, άρα παρατηρείται μεγαλύτερη μεταβλητότητα των δεδομένων και δεν είναι κατανεμημένα ακριβώς συμμετρικά γύρω από τη διάμεσο.

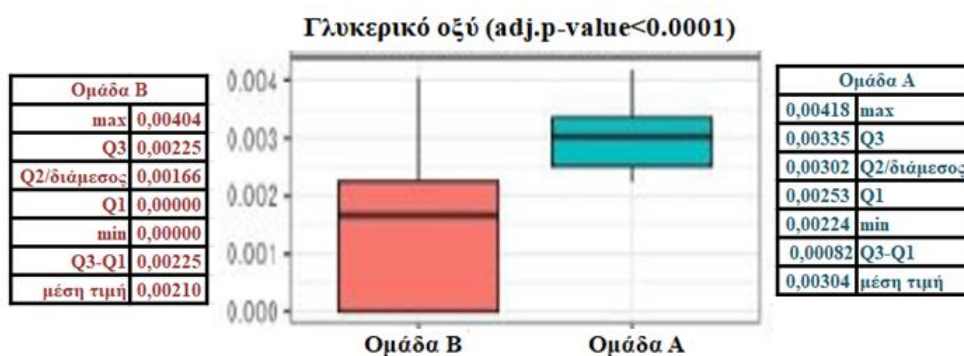
Το ιππουρικό οξύ είναι μια ακυλογλυκίνη που σχηματίζεται, από τη σύζευξη βενζοϊκού οξέος με γλυκίνη (Εικόνα 34). Οι ακυλογλυκίνες παράγονται μέσω της δράσης της N-ακυλοτρανσφεράσης της γλυκίνης, που είναι ένα ένζυμο που καταλύει τη χημική αντίδραση: $\text{ακυλο-CoA} + \text{γλυκίνη} \leftrightarrow \text{CoA} + \text{N-ακυλογλυκίνη}$. Το ιππουρικό οξύ βρέθηκε να σχετίζεται με τη φαινυλκετονουρία, την προπιονική οξυαιμία και την τυροσιναιμία τύπου

I, τα οποία είναι εγγενείς βλάβες του μεταβολισμού (HMDB, 2021). Είναι ένα φυσιολογικό συστατικό των ούρων και υπάρχουν 2 κύριες διατροφικές οδοί, που μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή του. Η μια είναι η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν βενζοϊκό οξύ, το οποίο μπορεί να υπάρχει φυσικά ή να προστίθεται ως συντηρητικό και η άλλη είναι μέσω του μεταβολισμού των φυτικών φαινολών, από τη μικροχλωρίδα του εντέρου. Τα φαινυλοπροπιονικά οξέα, παράγονται από τη μικροβιακή αποικοδόμηση των πολυφαινολών στο έντερο, οι οποίες μεταβολίζονται περαιτέρω σε βενζοϊκά οξέα και τελικά σε ιππουρικό στο ήπαρ. Η κατανάλωση τροφών και ποτών πλούσιων σε πολυφαινόλες, όπως το μαύρο τσάι, το πράσινο τσάι, το κρασί και το χαμομήλι, έχουν συσχετιστεί με αυξημένη απέκκριση του ιππουρικού στα ούρα (Walsh, et al., 2007). Επίσης, αυξημένη απέκκριση ιππουρικού στα ούρα, έχει βρεθεί σε άρρενες νεογνά, σε σύγκριση με τις θήλειες (Pinto, et al., 2016).



Εικόνα 34: Σύνθεση ιππουρικού από βενζοϊκό και γλυκίνη (Nelson & Cox, 2004)

➤ Γλυκερικό οξύ (Glyceric acid)



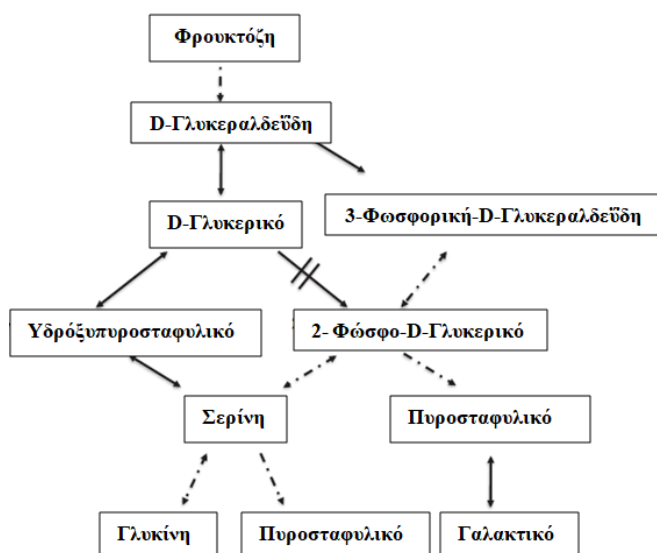
Εικόνα 35: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλυκερικού οξέος στις ομάδες Α και Β και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 35, προκύπτει ότι η τιμή Q1 της ομάδας Α βρίσκεται πολύ ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας Β, άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης της σχετικής συγκέντρωσης του γλυκερικού οξέος στην ομάδα Α. Επίσης, το IQR της ομάδας Α είναι σχετικά μικρό, επομένως υπάρχει σχετικά μικρή μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, είναι σχεδόν συμμετρική. Στην ομάδα Β το IQR είναι μεγαλύτερο, άρα παρατηρείται

μεγαλύτερη μεταβλητότητα των δεδομένων, τα οποία δεν είναι κατανομημένα συμμετρικά γύρω από τη διάμεσο.

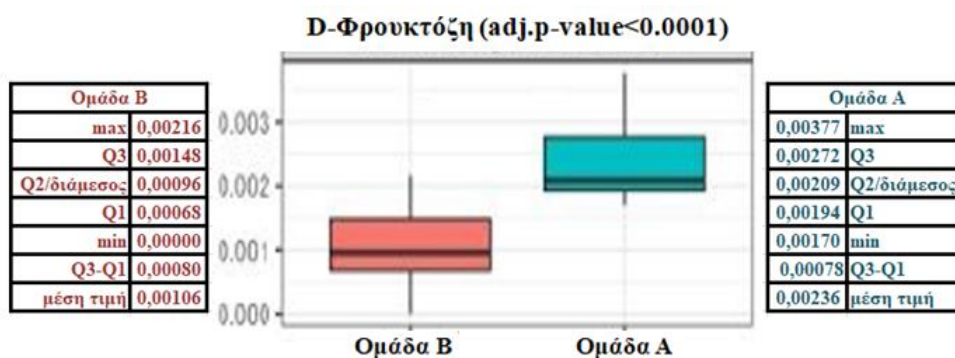
Το γλυκερικό οξύ είναι ένα άχρωμο οργανικό οξύ, που λαμβάνεται από την οξείδωση της γλυκερόλης. Ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα οργανικών οξέων στο αίμα, τα ούρα, τον εγκέφαλο και σε άλλους ιστούς, οδηγούν σε γενική μεταβολική οξέωση. Η οξέωση εμφανίζεται συνήθως, όταν το αρτηριακό pH πέφτει κάτω από το 7,35. Οι αυξημένες τιμές γλυκερικού, μπορούν επίσης να οφείλονται σε μικροβιακές πηγές, όπως ζύμες ή λόγω διατροφικών πηγών, που περιέχουν γλυκερόλη (HMDB, 2021).

Το D-γλυκερικό σχηματίζεται ως προϊόν διάσπασης της φρουκτόζης, και τα φωσφορικά του παράγωγα, είναι σημαντικά ενδιάμεσα στην γλυκολυτική οδό (Habe, et al., 2009). Συγκεκριμένα, η φρουκτόζη φωσφορυλιώνεται από τη φρουκτοκινάση σε 1-φωσφορική φρουκτόζη, η οποία μετατρέπεται σε D-γλυκεραλδεΐδη, από την αλδολάση B. Η μετατροπή της D-γλυκεραλδεΐδης σε D-γλυκερικό οξύ, καταλύεται από την αλδεΐδική αφυδρογονάση και στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται από την 2-κινάση του D-γλυκερικού σε 2-φωσφογλυκερικό οξύ, ένα ενδιάμεσο της γλυκολυτικής οδού. Αυτή η οδός μπορεί να είναι η κύρια πηγή D-γλυκερικού οξέος. Το D-γλυκερικό οξύ είναι επίσης ένα ενδιάμεσο και στη γλυκονεογενετική οδό της σερίνης, η οποία μπορεί να μετατραπεί με τρανσαμίνωση σε υδροξυπυροσταφυλικό, ενώ το τελευταίο ανάγεται σε D-γλυκερικό, από την αφυδρογονάση του D-γλυκερικού (Εικόνα 36) (Dimer, et al., 2015).



Εικόνα 36: Μεταβολικό μονοπάτι γλυκερικού οξέος. Το βέλος με τις δύο γραμμές δείχνει πώς η αντίδραση καταλύεται από την 2-κινάση του D-γλυκερικού. Τα διακεκομμένα βέλη δείχνουν πως υπάρχουν και άλλα ενδιάμεσα στάδια και τα βέλη δύο κατευθύνσεων αντιπροσωπεύουν αντιστρεπτά βήματα (Dimer, et al., 2015).

➤ **D-Φρουκτόζη (D-Fructose)**



Εικόνα 37: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της φρουκτόζης στις ομάδες Α και Β και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 37, προκύπτει ότι η τιμή Q1 της ομάδας Α, βρίσκεται πολύ ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας Β, άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης της σχετικής συγκέντρωσης της φρουκτόζης στην ομάδα Α. Επίσης, τα IQR και των δύο ομάδων είναι σχετικά μικρά, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική σε καμία από τις δύο ομάδες.

Η φρουκτόζη, είναι ένας μονοσακχαρίτης και ένα ισομερές γλυκόζης. Η καθαρή φρουκτόζη έχει γλυκιά γεύση, παρόμοια με τη ζάχαρη από ζαχαροκάλαμο, αλλά με άρωμα "φρουτώδες". Αν και η φρουκτόζη είναι εξόζη, απαντάται γενικά ως πενταμελής δακτύλιος ημικετάλης (φουρανόζη) (HMDB, 2021).

Κεφάλαιο 5. Μονομεταβλητή ανάλυση μεταβολιτών με βάση τις ομαδοποιήσεις του ερωτηματολογίου

Σε συνέχεια της πολυμεταβλητής ανάλυσης, έγινε μονομεταβλητή ανάλυση για τους μεταβολίτες, με στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις σχετικές τους συγκεντρώσεις, μεταξύ δειγμάτων της Ομάδας Α και της Ομάδας Β, ώστε να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν κάποιοι μεταβολίτες, που έχουν μεγαλύτερη επίδραση στο διαχωρισμό μεταξύ δύο ομάδων του ερωτηματολογίου.

5.1 Πίνακες αληθείας για παραμέτρους του ερωτηματολογίου

Η ανάλυση ξεκίνησε χρησιμοποιώντας τους 26 μεταβολίτες, που είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δειγμάτων των δύο ομάδων. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πακέτο caret, που έκανε επιλογή χαρακτηριστικών (feature selection), ώστε να δείξει για κάθε ομαδοποίηση με βάση το ερωτηματολόγιο, ποιους μεταβολίτες συμβάλουν ιδιαίτερα στο διαχωρισμό (predictors). Η ανάλυση γινόταν κάθε φορά, ανά δύο ομάδες μίας παραμέτρου του ερωτηματολογίου. Τέλος, έτρεξαν 5 μοντέλα ταξινομητών, γραμμικών και μη, οι οποίοι εκπαιδεύτηκαν στο πώς να διαχωρίζουν τις 2 ομάδες κάθε φορά. Οι ταξινομητές αυτοί ήταν ο Regularize Discriminant Analysis (RDA), ο Naïve Bayesian (BAY), ο K Nearest Neighbor (KNN), ο Support vector machines (SVM) και ο Random Forest (RF), απ' τους οποίους ο RDA και ο BAY είναι γραμμικοί. Μελετήθηκαν όλες οι παράμετροι (ανθρωπομετρικές και διατροφικές), ωστόσο αυτές που θα παρουσιαστούν παρακάτω, αφορούν τις διατροφικές πληροφορίες του ερωτηματολογίου και αυτό γιατί από τους πίνακες αληθείας, προέκυψε ότι οι υπόλοιποι παράμετροι είχαν πολύ χαμηλή ακρίβεια (accuracy), δηλαδή <75%. Για την επικύρωση των ταξινομητών, χρησιμοποιήθηκε η leave one out επικύρωση. Παρόλο που χρησιμοποιήθηκαν 5 μοντέλα ταξινομητών, θα παρουσιαστούν οι πίνακες αληθείας για τα μοντέλα, που έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα σε κάθε περίπτωση. Στους πίνακες που ακολουθούν, παρατίθενται για την κάθε παράμετρο, οι πίνακες αληθείας που περιλαμβάνουν τους μέσους όρους των αποτελεσμάτων, που προέκυψαν από 5 επαναλήψεις, της ακρίβειας, ευαισθησίας και εξειδίκευσης σε ποσοστά, τον αριθμό των δειγμάτων που ταυτοποίησε σωστά ο ταξινομητής (True positive/negative) και τον αριθμό των δειγμάτων που ταυτοποίησε λάθος (False positive/negative). Από την ακρίβεια βλέπουμε, πόσο καλά τα μοντέλα μπορούν να ξεχωρίσουν τα δείγματα που έχουμε στο δικό μας σετ δεδομένων αλλά, λόγω κυρίως του μικρού αριθμού δειγμάτων, χωρίς αυτό να

μπορεί να γενικευτεί και να έχουμε εκτίμηση του πόσο καλά, θα μπορούσαν να ταξινομήσουν ένα νέο δείγμα από άλλο δειγματοχώρο.

Πίνακας 9: Πίνακας αληθείας για την παράμετρο ψάρι και τις ομάδες «1-3 φ/εβ» και «ποτέ/σπάνια»

	RDA	BAY	RF
Ακρίβεια / Accuracy	85,71	85,71	85,71
Ευαισθησία / Sensitivity	86,96	86,96	86,96
Εξειδίκευση / Specificity	95,24	95,24	95,24
Ορθώς θετικά / True Positive	20	20	20
Εσφαλμένως αρνητικά / False Negative	3	3	3
Εσφαλμένως θετικά / False Positive	1	1	1
Ορθώς Αρνητικά / True Negative	4	4	4

Ως predictors για τη διάκριση των δύο ομάδων, προσδιορίστηκαν το D-γλυκουρονικό οξύ και το δεϋδροασκορβικό οξύ. Οι τιμές της ακρίβειας, ευαισθησίας και εξειδίκευσης σε ποσοστά, είναι αρκετά υψηλές. Ως «θετικά» προσδιορίστηκαν τα δείγματα που ανήκουν στην ομάδα «1-3 φ/εβ» και ως «αρνητικά» τα δείγματα που ανήκουν στην ομάδα «σπάνια/ποτέ». Επομένως από τα 21 δείγματα της ομάδας «1-3 φ/εβ», οι ταξινομητές ταυτοποίησαν σωστά τα 20 και από τα 7 δείγματα της ομάδας «σπάνια/ποτέ», οι ταξινομητές ταυτοποίησαν σωστά τα 4.

Πίνακας 10: Πίνακας αληθείας για την παράμετρο κρέας και τις ομάδες «1-2 φ/εβ» και «σπάνια»

	RDA	BAY	RF
Ακρίβεια / Accuracy	82,35	82,35	82,35
Ευαισθησία / Sensitivity	85,71	85,71	85,71
Εξειδίκευση / Specificity	92,31	92,31	92,31
Ορθώς θετικά / True Positive	12	12	12
Εσφαλμένως αρνητικά / False Negative	2	2	2
Εσφαλμένως θετικά / False Positive	1	1	1
Ορθώς Αρνητικά / True Negative	2	2	2

Ως predictors για τη διάκριση των δύο ομάδων, προσδιορίστηκαν το γλυκερικό οξύ και η L-ορνιθίνη. Οι τιμές της ακρίβειας, ευαισθησίας και εξειδίκευσης σε ποσοστά, είναι αρκετά υψηλές. Ως «θετικά» προσδιορίστηκαν τα δείγματα που ανήκουν στην ομάδα «1-2 φ/εβ» και ως «αρνητικά» τα δείγματα που ανήκουν στην ομάδα «σπάνια». Επομένως από τα 13 δείγματα της ομάδας «1-2 φ/εβ», οι ταξινομητές ταυτοποίησαν σωστά τα 12 και από τα 4 δείγματα της ομάδας «σπάνια», οι ταξινομητές ταυτοποίησαν σωστά τα 2.

Πίνακας 11: Πίνακας αληθείας για την παράμετρο κρέας και τις ομάδες «3-7 φ/εβ» και «σπάνια»

	RDA
Ακρίβεια / Accuracy	91,43
Ευαισθησία / Sensitivity	91,18
Εξειδίκευση / Specificity	100
Ορθώς θετικά / True Positive	31
Εσφαλμένως αρνητικά / False Negative	3
Εσφαλμένως θετικά / False Positive	0
Ορθώς Αρνητικά / True Negative	1

Ως predictors για τη διάκριση των δύο ομάδων προσδιορίστηκαν η D-φρουκτόζη και η L-ορνιθίνη. Οι τιμές της ακρίβειας, ευαισθησίας και εξειδίκευσης σε ποσοστά είναι πολύ υψηλές και συγκριτικά με τον πίνακα 9, που αφορούσε πάλι το κρέας αλλά τη χαμηλότερη κατανάλωσή του, παρατηρείται αύξηση στις τιμές αυτές. Ως «θετικά» προσδιορίστηκαν τα δείγματα που ανήκουν στην ομάδα «3-7 φ/εβ» και ως «αρνητικά» τα δείγματα που ανήκουν στην ομάδα «σπάνια». Επομένως από τα 31 δείγματα της ομάδας «3-7 φ/εβ», ο ταξινομητής τα ταυτοποίησε όλα σωστά και από τα 4 δείγματα της ομάδας «σπάνια», ταυτοποίησε σωστά μόνο το 1. Επομένως, το ποσοστό της ακρίβειας βγήκε ψηλό λόγω της καλής ταυτοποίησης στην ομάδα «3-7 φ/εβ».

Πίνακας 12: Πίνακας αληθείας για την παράμετρο γάλα και τις ομάδες «1 ποτ/ημ» και «ποτέ»

	K.NN	SVM
Ακρίβεια / Accuracy	80	80
Ευαισθησία / Sensitivity	78,79	78,79
Εξειδίκευση / Specificity	100	100
Ορθώς θετικά / True Positive	26	26
Εσφαλμένως αρνητικά / False Negative	7	7
Εσφαλμένως θετικά / False Positive	0	0
Ορθώς Αρνητικά / True Negative	2	2

Ως predictors για τη διάκριση των δύο ομάδων προσδιορίστηκαν το ισοβαλερικό οξύ, η μυο-ινοσιτόλη και το L-γλουταμινικό οξύ. Οι τιμές της ακρίβειας και εξειδίκευσης σε ποσοστά είναι πολύ υψηλές και της ευαισθησίας σχετικά υψηλή. Ως «θετικά» προσδιορίστηκαν τα δείγματα που ανήκουν στην ομάδα «1 ποτ/ημ» και ως «αρνητικά» τα δείγματα που ανήκουν στην ομάδα «ποτέ». Επομένως από τα 26 δείγματα της ομάδας «1 ποτ/ημ», ο ταξινομητής τα ταυτοποίησε όλα σωστά και από τα 9 δείγματα της ομάδας «ποτέ», ταυτοποίησε σωστά μόνο τα 2. Επομένως, το ποσοστό της ακρίβειας βγήκε ψηλό λόγω της καλής ταυτοποίησης στην ομάδα «1 ποτ/ημ».

Πίνακας 13: Πίνακας αληθείας για την παράμετρο όσπρια και τις ομάδες «1-2 φ/μην» και «σπάνια/ποτέ»

	RDA
Ακρίβεια / Accuracy	92,86
Ευαισθησία / Sensitivity	100
Εξειδίκευση / Specificity	85,71
Ορθώς θετικά / True Positive	6
Εσφαλμένως αρνητικά / False Negative	0
Εσφαλμένως θετικά / False Positive	1
Ορθώς Αρνητικά / True Negative	7

Ως predictors για τη διάκριση των δύο ομάδων προσδιορίστηκαν το L-γλουταμινικό οξύ και η 3-μεθυλοξανθίνη. Οι τιμές της ακρίβειας, ευαισθησίας και εξειδίκευσης σε ποσοστά είναι πολύ υψηλές. Ως «θετικά» προσδιορίστηκαν τα δείγματα που ανήκουν στην ομάδα «1-2 φ/μην» και ως «αρνητικά» τα δείγματα που ανήκουν στην ομάδα «σπάνια/ποτέ». Επομένως, από τα 7 δείγματα της ομάδας «1-2 φ/μην», ο ταξινομητής ταυτοποίησε σωστά τα 6 και από τα 7 δείγματα της ομάδας «σπάνια/ποτέ», τα ταυτοποίησε όλα σωστά.

Πίνακας 14: Πίνακας αληθείας για την παράμετρο αυγά και τις ομάδες «3-7 φ/εβ» και «σπάνια/ποτέ»

	RDA
Ακρίβεια / Accuracy	81,48
Ευαισθησία / Sensitivity	77,27
Εξειδίκευση / Specificity	100
Ορθώς θετικά / True Positive	14
Εσφαλμένως αρνητικά / False Negative	5
Εσφαλμένως θετικά / False Positive	0
Ορθώς Αρνητικά / True Negative	5

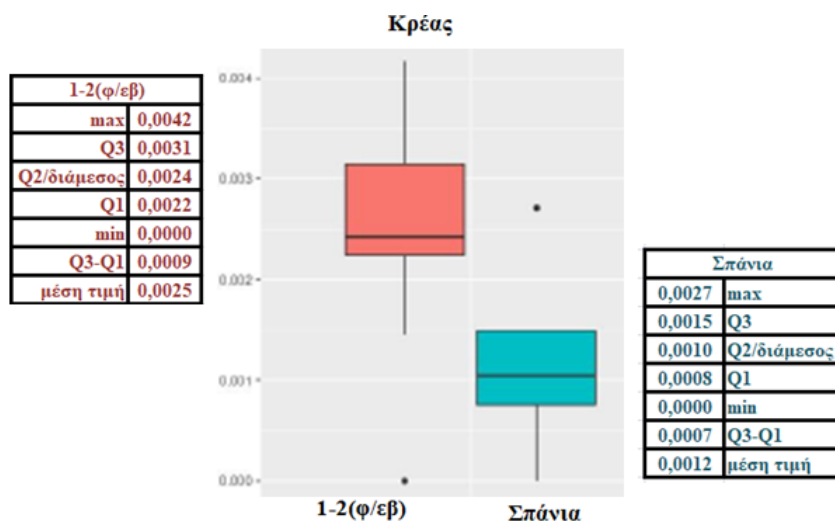
Ως predictors για τη διάκριση των δύο ομάδων προσδιορίστηκαν το δεϋδροασκορβικό οξύ, η 3-μεθυλοξανθίνη και η μυο-ινοσιτόλη. Οι τιμές της ακρίβειας, ευαισθησίας και εξειδίκευσης σε ποσοστά είναι σχετικά υψηλές. Ως «θετικά» προσδιορίστηκαν τα δείγματα που ανήκουν στην ομάδα «3-7 φ/εβ» και ως «αρνητικά» αυτά που ανήκουν στην ομάδα «σπάνια/ποτέ». Επομένως, από τα 14 δείγματα της ομάδας «3-7 φ/εβ», ο ταξινομητής τα ταυτοποίησε όλα σωστά και από τα 10 δείγματα της ομάδας «σπάνια/ποτέ», ταυτοποίησε τα 5 σωστά.

5.2 Ανάλυση μεταβολιτών και μεταβολικών μονοπατιών

Στο κεφάλαιο αυτό θα αναπτυχθούν οι μεταβολίτες, που βρέθηκαν να συμβάλλουν στο διαχωρισμό μεταξύ ομάδων του ερωτηματολογίου και θα γίνει συσχέτιση των πειραματικών ευρημάτων με τη βιβλιογραφία.

➤ Γλυκερικό οξύ (Glyceric acid)

Από τη μονομεταβλητή ανάλυση, το γλυκερικό οξύ βρέθηκε να συμβάλλει στο διαχωρισμό των ομάδων «1-2φ/εβ» και «σπάνια», όσον αφορά την κατανάλωση κρέατος.



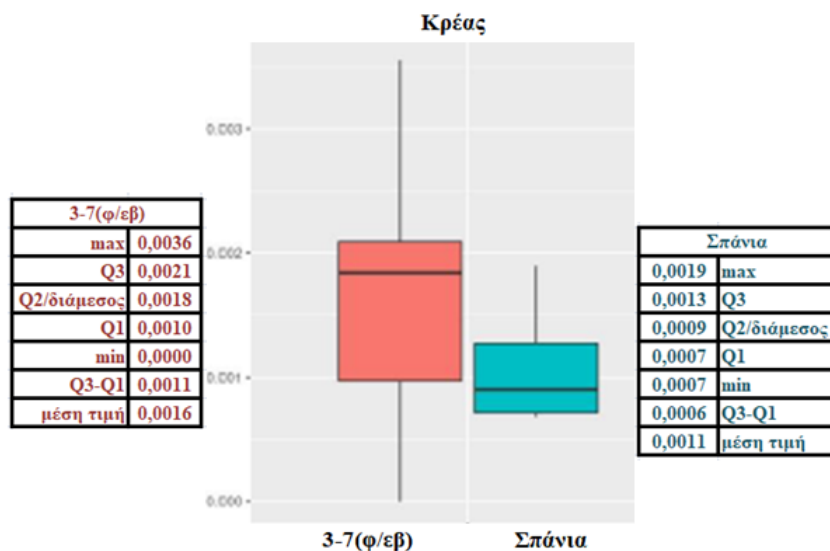
Εικόνα 38: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλυκερικού οξέος στις ομάδες 1-2φ/εβ (κόκκινο) και σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση κρέατος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 38, προκύπτει ότι η τιμή Q1 της ομάδας «1-2φ/εβ» βρίσκεται πολύ ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας «σπάνια», άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και αύξηση της σχετικής συγκέντρωσης του γλυκερικού οξέος στην ομάδα αυτών που έχουν δηλώσει ότι καταναλώνουν κρέας 1-2φ/εβ. Επίσης, τα IQR και των δύο ομάδων είναι σχετικά μεγάλα επομένως υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο δεν είναι συμμετρική σε καμία από τις δύο ομάδες.

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 4.2, το D-γλυκερικό οξύ σχηματίζεται ως προϊόν διάσπασης της φρουκτόζης και τα φωσφορικά του παράγωγα είναι σημαντικά ενδιάμεσα στη γλυκολυτική οδό (Habe, et al., 2009).

➤ D-Φρουκτόζη (D-Fructose)

Από τη μονομεταβλητή ανάλυση, η φρουκτόζη βρέθηκε να συμβάλλει στο διαχωρισμό των ομάδων «3-7φ/εβ» και «σπάνια», όσον αφορά την κατανάλωση κρέατος.



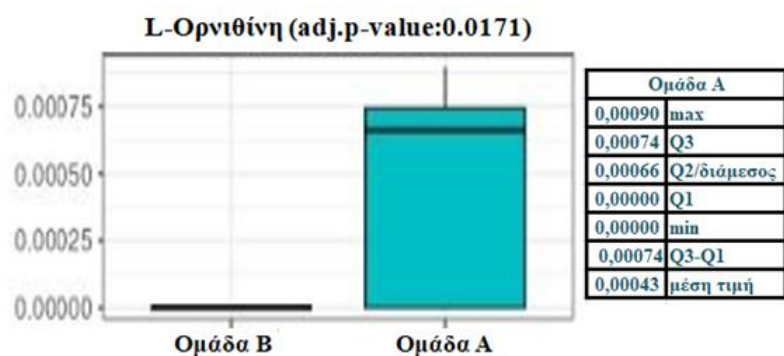
Εικόνα 39: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της φρουκτόζης στις ομάδες 3-7φ/εβ (κόκκινο) και σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση κρέατος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 39, προκύπτει ότι η διάμεσος (Q2) της ομάδας «3-7φ/εβ» βρίσκεται πιο πάνω από το Q3 της ομάδας «σπάνια», άρα πιθανώς να υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης της σχετικής συγκέντρωσης της φρουκτόζης στην ομάδα αυτών που έχουν δηλώσει ότι καταναλώνουν κρέας 3-7φ/εβ. Επίσης, τα IQR και των δύο ομάδων είναι σχετικά μεγάλα, και ειδικά της ομάδας «3-7φ/εβ», παρουσιάζει μεγαλύτερη μεταβλητότητα δεδομένων, η δε κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο δεν είναι συμμετρική σε καμία από τις δύο ομάδες.

Η ποσότητα της φρουκτόζης που εμφανίζεται στα ούρα και πιθανώς και σε άλλα βιολογικά υγρά, είναι πιθανώς ένα κλάσμα της διατροφικής φρουκτόζης ή της φρουκτόζης που προέρχεται από σακχαρόζη, που διαφεύγει από την πρόσληψη από το ήπαρ και από άλλους ιστούς, όπως τα νεφρά, ο λιπώδης ιστός και ο σκελετικός μυς. Σημαντικές ποσότητες φρουκτόζης, έχουν ανιχνευθεί στα ούρα μετά την κατάποση σακχαρόζης (Tasevska, 2015). Επίσης, έχει βρεθεί μικρή ποσότητα φρουκτόζης στο μητρικό γάλα, παρόλο που δεν περιέχεται φυσικά, η οποία πιθανά να οφείλεται, στην πρόσληψη από τη μητέρα προϊόντων που περιέχουν φρουκτόζη, όπως ποτά που περιέχουν ζάχαρη (Goran, et al., 2017).

Η φρουκτόζη βρίσκεται επίσης σε πολλά τρόφιμα και είναι ένα από τα τρία πιο σημαντικά σάκχαρα στο αίμα μαζί με τη γλυκόζη και τη γαλακτόζη. Το μέλι, τα φρούτα δέντρων, τα μούρα, τα πεπόνια και ορισμένα λαχανικά, όπως τεύτλα, γλυκοπατάτες, παστινάκι και κρεμμύδια, περιέχουν φρουκτόζη, συνήθως σε συνδυασμό με σακχαρόζη και γλυκόζη. Η φρουκτόζη απαντάται επίσης στο κεράσι, τον γλυκάνισο και το λευκό κρασί (HMDB, 2021).

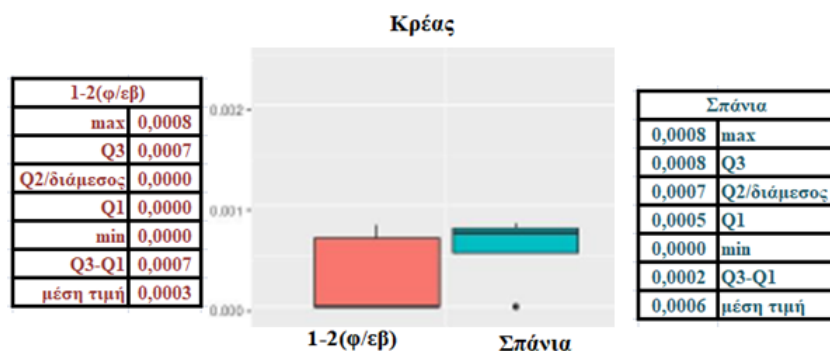
➤ **L-Ορνιθίνη (L-Ornithine)**



Εικόνα 40: Θηκόγραμμα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της ορνιθίνης στις ομάδες Α και Β και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

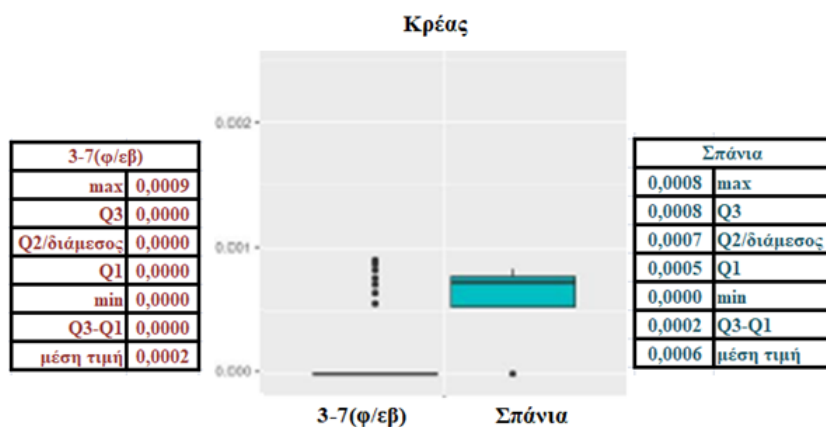
Από το θηκόγραμμα της Εικόνας 40, αλλά και από την αναγνώριση που έχει γίνει (Πίνακας 5), προκύπτει ότι η ορνιθίνη έχει ανιχνευτεί κατά κύριο λόγο στα δείγματα της ομάδας Α. Το IQR είναι πολύ μεγάλο, επομένως υπάρχει πολύ μεγάλη μεταβλητότητα δεδομένων, τα οποία δεν είναι συμμετρικά κατανεμημένα γύρω από τη διάμεσο.

Από τη μονομεταβλητή ανάλυση, η ορνιθίνη βρέθηκε να συμβάλλει στο διαχωρισμό των ομάδων «1-2φ/εβ» και «σπάνια» και «3-7φ/εβ» και «σπάνια», όσον αφορά την κατανάλωση κρέατος.



Εικόνα 41: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της ορνιθίνης στις ομάδες 1-2φ/εβ (κόκκινο) και σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση κρέατος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 41, προκύπτει ότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη, αλλά η διάμεσος (Q2) της ομάδας «σπάνια», βρίσκεται πιο πάνω από το Q3 της ομάδας «1-2φ/εβ», άρα πιθανώς να υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση μείωσης της σχετικής συγκέντρωσης της ορνιθίνης, στην ομάδα αυτών που έχουν δηλώσει ότι καταναλώνουν κρέας 1-2φ/εβ. Επίσης, το IQR της ομάδας «1-2φ/εβ» είναι σχετικά μεγάλο, επομένως υπάρχει μεγαλύτερη μεταβλητότητα δεδομένων, ενώ της ομάδας «σπάνια» είναι πολύ μικρό, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων, η δε κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική σε καμία από τις δύο ομάδες. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το ότι η διάμεσος των δεδομένων της ομάδας 1-2φ/εβ, είναι μηδέν και επομένως τουλάχιστον το 50% των δεδομένων, παρουσιάζει μηδενική σχετική συγκέντρωση ορνιθίνης.



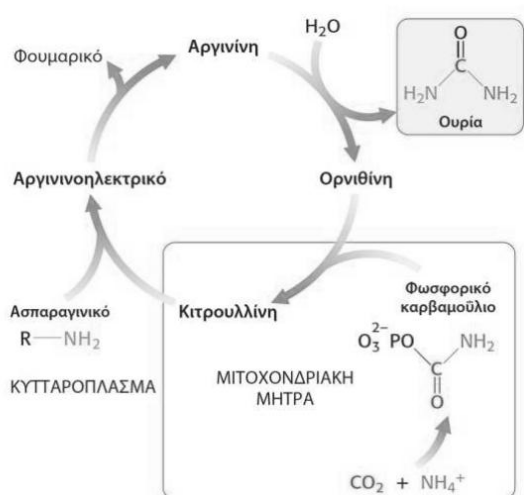
Εικόνα 42: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της ορνιθίνης στις ομάδες 3-7φ/εβ (κόκκινο) και σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση κρέατος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 42, προκύπτει ότι η σχετική συγκέντρωση ορνιθίνης αυτών που έχουν δηλώσει ότι καταναλώνουν κρέας 3-7φ/εβ είναι μηδενική, εκτός από κάποιες έκτροπες τιμές, ενώ στις μητέρες που έχουν δηλώσει «σπάνια», είναι αυξημένη. Επομένως φαίνεται να υπάρχει περαιτέρω μείωση στις μητέρες, που καταναλώνουν συχνότερα κρέας. Επίσης, το IQR της ομάδας «σπάνια» είναι πολύ μικρό, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική.

Η L-ορνιθίνη είναι μέλος της τάξης των ενώσεων που είναι γνωστές ως L-άλφα-αμινοξέα. Μπορεί να βρεθεί σε όλους τους ανθρώπινους ιστούς και στα περισσότερα βιολογικά υγρά, όπως αίμα, ούρα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF), ιδρώτα, σάλιο και κόπρανα. Μέσα στο κύτταρο, η L-ορνιθίνη βρίσκεται στα μιτοχόνδρια και στο κυτταρόπλασμα (HMDB, 2021). Είναι ένα ελεύθερο αμινοξύ που δεν κωδικοποιείται από

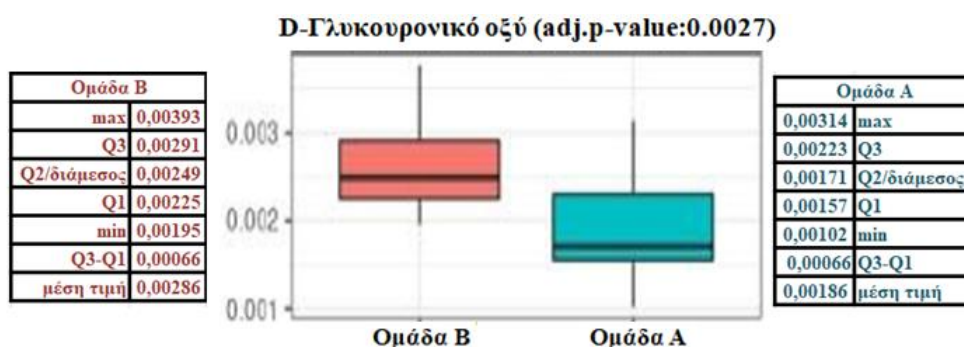
το DNA, αλλά συντίθεται μέσω του κύκλου ουρίας από την αργινίνη και έχει σημαντικό ρόλο, καθώς επιτρέπει την απομάκρυνση της περίσσειας αζώτου και βοηθά στην αποτοξίνωση από επιβλαβείς ουσίες (Εικόνα 43). Η αργινίνη έχει βρεθεί ότι αυξάνεται στις φυτικές πρωτεΐνες, όπως είναι τα όσπρια και μπορεί να βελτιώσει την ευαισθησία σε ινσουλίνη, αυξάνοντας τη μικροαγγειακή λειτουργία μέσω της παραγωγής μονοξειδίου του αζώτου.

Η κιτρουλλίνη είναι ένα από τα μη απαραίτητα αμινοξέα και υπάρχει στα περισσότερα τρόφιμα, ειδικά στο καρπούζι. Η από του στόματος χορηγούμενη κιτρουλλίνη απορροφάται μέσω του εντερικού σωλήνα και μεταφέρεται στο νεφρό, όπου μεταβολίζεται σε αργινίνη και μεταφέρεται σε ολόκληρο το σώμα (Sucher, et al., 2017), (Takeda & Takemasa, 2018).



Εικόνα 43: Κύκλος Ουρίας (Berg, et al., 2014)

➤ D-Γλυκουρονικό οξύ (D-Glucuronic Acid)

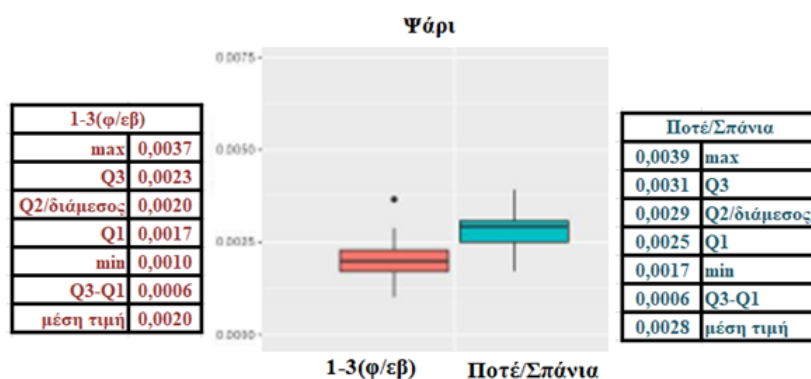


Εικόνα 44: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλυκουρονικού οξέος στις ομάδες Α και Β και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 44, προκύπτει ότι υπάρχει μικρή αλληλοεπικάλυψη, αλλά η διάμεσος (Q2) της ομάδας Β βρίσκεται ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας Α, άρα πιθανώς να υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης της σχετικής

συγκέντρωσης του γλυκουρονικού οξέος στην ομάδα Β. Επίσης, τα IQR και των δύο ομάδων είναι σχετικά μικρά, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική σε καμία από τις δύο ομάδες.

Από τη μονομεταβλητή ανάλυση, το γλυκουρονικό οξύ βρέθηκε να συμβάλλει στο διαχωρισμό των ομάδων «1-3φ/εβ» και «ποτέ/σπάνια», όσον αφορά την κατανάλωση ψαριού.



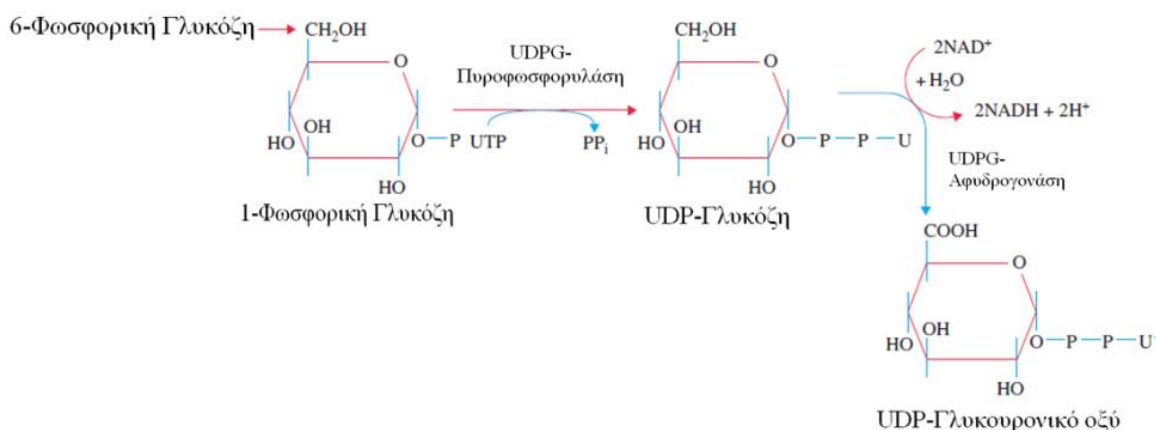
Εικόνα 45: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλυκουρονικού οξέος στις ομάδες 1-3φ/εβ (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση ψαριού και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 45, προκύπτει ότι το Q1 της ομάδας «ποτέ/σπάνια», βρίσκεται πιο πάνω από το Q3 της ομάδας «1-3φ/εβ», άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και μείωση της σχετικής συγκέντρωσης του γλυκουρονικού στην ομάδα αυτών, που έχουν δηλώσει ότι καταναλώνουν ψάρι 1-3φ/εβ. Επίσης, τα IQR και των δύο ομάδων είναι ίσα, επομένως υπάρχει η ίδια μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, είναι συμμετρική στην ομάδα «1-3φ/εβ», ενώ δεν εμφανίζεται το ίδιο συμμετρική στην ομάδα «ποτέ/σπάνια».

Το γλυκουρονικό οξύ είναι ένα καρβοξυλικό οξύ, που έχει τη δομή ενός μορίου γλυκόζης, της οποίας έχει οξειδωθεί το έκτο άτομο άνθρακα. Στους ανθρώπους το γλυκουρονικό οξύ συνδέεται συχνά με τοξικές ή δηλητηριώδεις ουσίες, που επιτρέπουν την επακόλουθη αποβολή, και με ορμόνες που επιτρέπουν την ευκολότερη μεταφορά. Αυτές οι συνδέσεις περιλαμβάνουν Ο-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Η διαδικασία είναι γνωστή ως γλυκουρονιδίωση. Η γλυκουρονιδίωση χρησιμοποιεί ως ενδιάμεσο το UDP-γλυκουρονικό οξύ, το οποίο σχηματίζεται στο ήπαρ όλων των ζώων (HMDB, 2021).

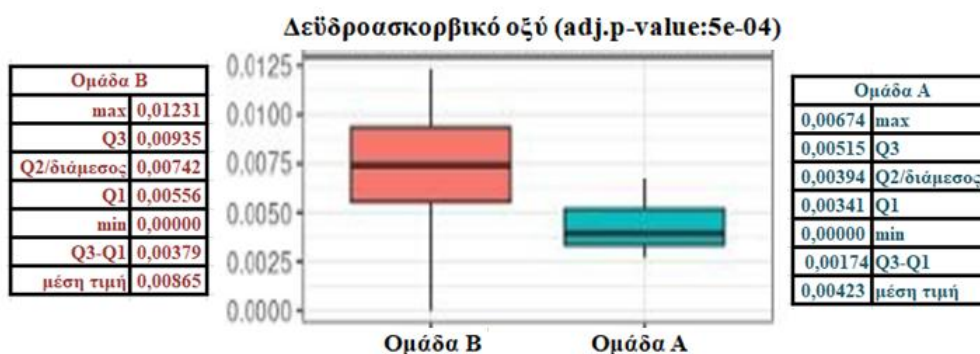
Η μεταβολική οδός του γλυκουρονικού οξέος, είναι μια μικρότερη οδός του μεταβολισμού της γλυκόζης. Παρέχει βιοσυνθετικά πρόδρομες ενώσεις και μετατρέπει ορισμένα λιγότερο κοινά σάκχαρα, σε αυτά που μπορούν να μεταβολιστούν. Τα πρώτα

στάδια είναι παρόμοια με εκείνα της σύνθεσης γλυκογόνου, δηλαδή σχηματισμός 6-φωσφορικής γλυκόζης, ισομερείωση αυτής σε 1-φωσφορική γλυκόζη και ενεργοποίηση της 1-φωσφορικής γλυκόζης από την πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης (UDPG), για να σχηματίσει UDP-γλυκόζη. Στη συνέχεια, η UDP-γλυκόζη οξειδώνεται σε UDP-γλυκουρονικό οξύ με NAD^+ και αφυδρογονάση της UDP-γλυκόζης (Εικόνα 46). Το UDP-γλυκουρονικό οξύ χρησιμοποιείται σε βιοσυνθετικές αντιδράσεις, που περιλαμβάνουν συμπύκνωση γλυκουρονικού οξέος με ποικιλία μορίων, για να σχηματίσουν έναν αιθέρα, έναν εστέρα ή ένα αμίδιο, ανάλογα με τη φύση του μορίου δέκτη. Επειδή το γλυκουρονικό οξύ είναι πολύ πολικό, η σύζευξή του με λιγότερο πολικές ενώσεις, όπως στεροειδή, χολερυθρίνη και ορισμένα φάρμακα, μπορεί να μειώσει τη δραστηριότητά τους και να τα καταστήσει πιο υδατοδιαλυτά, διευκολύνοντας έτσι τη νεφρική απέκκριση (Bhagavan & Ha, 2015).



Εικόνα 46: Σύνθεση UDP-γλυκουρονικού οξέος (Bhagavan & Ha, 2015)

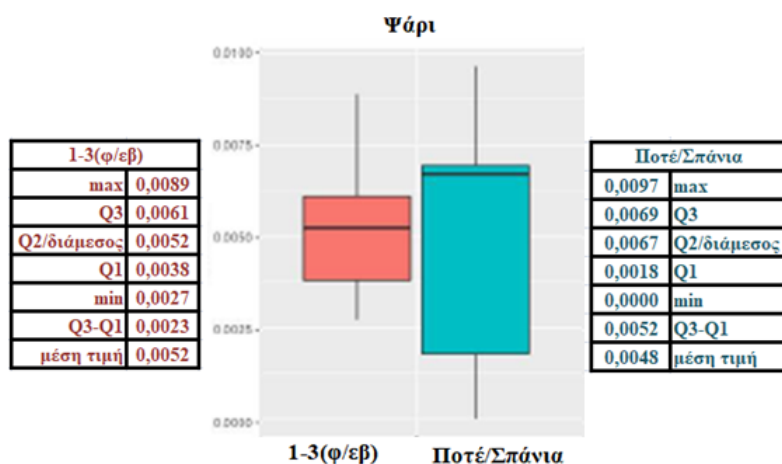
➤ Δεϋδροασκορβικό οξύ (Dehydroascorbic Acid)



Εικόνα 47: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του δεϋδροασκορβικού οξέος στις ομάδες Α και Β και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

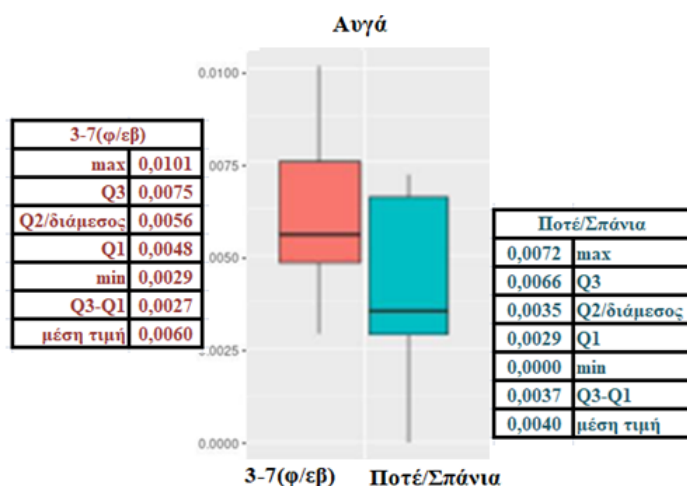
Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 47, προκύπτει ότι η τιμή Q1 της B ομάδας βρίσκεται ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας A, άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης της σχετικής συγκέντρωσης του δεϋδροασκορβικού οξέος στην ομάδα B. Επίσης, το IQR της ομάδας A είναι σχετικά μικρό, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων, αλλά της ομάδας B είναι διπλάσιο, επομένως στην ομάδα αυτή η μεταβλητότητα δεδομένων, είναι μεγαλύτερη. Η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο είναι συμμετρική στην ομάδα B, αλλά όχι στην ομάδα A.

Από τη μονομεταβλητή ανάλυση, το δεϋδροασκορβικό οξύ βρέθηκε να συμβάλλει στο διαχωρισμό των ομάδων «1-3φ/εβ» και «ποτέ/σπάνια», όσον αφορά την κατανάλωση ψαριού και των ομάδων «3-7φ/εβ» και «ποτέ/σπάνια», όσον αφορά την κατανάλωση αυγών.



Εικόνα 48: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του δεϋδροασκορβικού οξέος στις ομάδες 1-3φ/εβ (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση ψαριού και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 48, για την κατανάλωση ψαριού, προκύπτει ότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη, αλλά η διάμεσος (Q2) της ομάδας «ποτέ/σπάνια» βρίσκεται πιο πάνω από το Q3 της ομάδας «1-3φ/εβ», άρα πιθανώς να υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση μείωσης της σχετικής συγκέντρωσης του δεϋδροασκορβικού οξέος στην ομάδα αυτών, που έχουν δηλώσει ότι καταναλώνουν ψάρι 1-3φ/εβ. Επίσης, το IQR της ομάδας «1-3φ/εβ» είναι σχετικά μεγάλο, επομένως υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα δεδομένων και της ομάδας «ποτέ/σπάνια», είναι υπερδιπλάσιο, επομένως υπάρχει πολύ μεγαλύτερη μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική σε καμία από τις δύο ομάδες, παρουσιάζοντας μια ιδιαίτερα μεγάλη ασυμμετρία στην ομάδα «ποτέ/σπάνια».



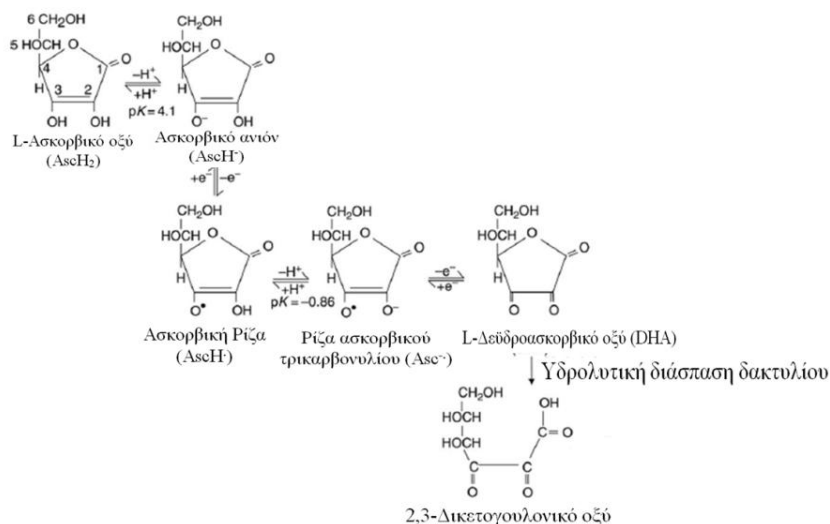
Εικόνα 49: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του δεϋδροασκορβικού οξέος στις ομάδες 3-7φ/εβ (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση αυγών και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 49, για την κατανάλωση αυγών, προκύπτει ότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη, αλλά η διάμεσος (Q2) της ομάδας «ποτέ/σπάνια», βρίσκεται χαμηλότερα από το Q1 της ομάδας «3-7φ/εβ», επομένως πιθανώς να υπάρχει τάση αύξησης της σχετικής συγκέντρωσης του δεϋδροασκορβικού οξέος στην ομάδα αυτών, που έχουν δηλώσει ότι καταναλώνουν αυγά 3-7φ/εβ. Επίσης, το IQR και των δύο ομάδων είναι μεγάλο, άρα υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική σε καμία από τις δύο ομάδες.

Το δεϋδροασκορβικό οξύ, ανήκει στην κατηγορία οργανικών ενώσεων γνωστών ως γ-βουτυρολακτόνες. Οι γ-βουτυρολακτόνες περιέχουν ένα τμήμα, που αποτελείται από έναν αλειφατικό πενταμελή δακτύλιο με τέσσερα άτομα άνθρακα, ένα άτομο οξυγόνου και φέρει μια ομάδα κετόνης στον άνθρακα δίπλα στο άτομο οξυγόνου. Στον άνθρωπο, το δεϋδροασκορβικό οξύ εμπλέκεται στη μεταβολική διαταραχή, που ονομάζεται τυροσιναιμία τύπου I. Παράγεται από την οξείδωση του ασκορβικού οξέος και έχουν και τα δύο παρόμοια βιολογική δραστηριότητα ως αντικά, αλλά το δεϋδροασκορβικό οξύ έχει και νευροπροστατευτική δράση (HMDB, 2021).

Η οξείδωση του ασκορβικού οξέος, λαμβάνει χώρα ως δύο διαδικασίες μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει απώλεια ενός ηλεκτρονίου του AscH προς σχηματισμό της ουδέτερης ασκορβικής ρίζας (AscH[•]), η οποία δεν είναι πρωτονιωμένη στα βιολογικά συστήματα και είναι παρούσα ως σταθεροποιημένη με συντονισμό ελεύθερη ρίζα ασκορβικού τρικαρβονυλίου (Asc^{•-}). Η απώλεια ενός ακόμα ηλεκτρονίου, δίνει το L-δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA). Η οξείδωση του ασκορβικού σε δεϋδροασκορβικό οξύ, είναι αντιστρεπτή μέσω της ίδιας διαδικασίας ενδιάμεσης ρίζας και

για το λόγο αυτό το DHA, εμφανίζει επίσης βιολογική δραστηριότητα, καθώς μπορεί εύκολα να μετατραπεί σε ασκορβικό οξύ στο ανθρώπινο σώμα. Η υδρόλυση του DHA σχηματίζει μη αντιστρεπτά 2,3-δικετογουλονικό οξύ και οδηγεί στην απώλεια της δράσης της βιταμίνης C (Εικόνα 50) (Morrissey & Hill, 2011).



Εικόνα 50: Το ασκορβικό οξύ και τα προϊόντα οξειδωσής του (Morrissey & Hill, 2011)

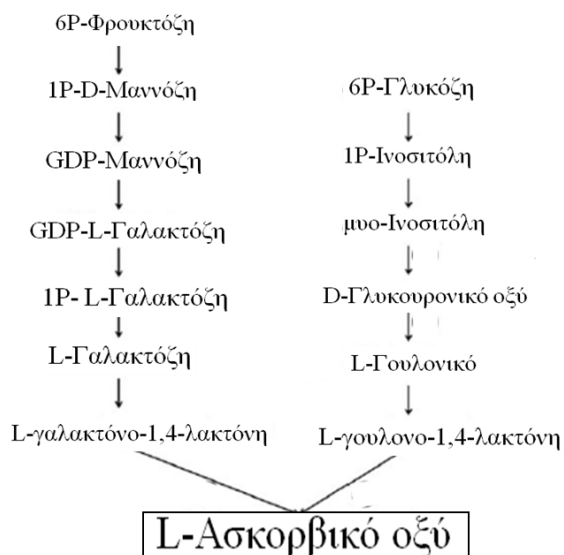
Καθώς υπάρχει άμεση συσχέτιση του δεϋδροασκορβικού οξέος με το ασκορβικό οξύ, θα αναφερθούν παρακάτω κάποιες πληροφορίες για το ασκορβικό οξύ και με τι μπορεί να σχετίζεται η συγκέντρωσή του στον άνθρωπο.

Το ασκορβικό οξύ είναι ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό στα φυτά. Οι άνθρωποι πρέπει να προσλαμβάνουν το ασκορβικό οξύ με την τροφή τους (βιταμίνη C) (Kavkova, et al., 2018). Περισσότερο από το 80% της βιταμίνης C προέρχεται από φρούτα και λαχανικά, με τα εσπεριδοειδή, τις ντομάτες, το χυμό ντομάτας και τις πατάτες, να είναι τα πιο σημαντικά. Ένα μικρό μέρος προέρχεται από εμπλουτισμένα κρέατα, ψάρια, πουλερικά, αυγά και γαλακτοκομικά προϊόντα (Morrissey & Hill, 2011).

Εκτός από τη διατροφή, η συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος στο αίμα, έχει συσχετιστεί άμεσα με τη συνήθεια του καπνίσματος. Μια μείωση από 30% έως 40% στα επίπεδα ασκορβικού οξέος στο πλάσμα, έχει επιβεβαιωθεί σε μεμονωμένους καπνιστές, σε σύγκριση με τους μη καπνιστές. Αυτή η μείωση οφείλεται κυρίως σε μια ανεπαρκή διατροφή, με χαμηλή πρόσληψη αντιοξειδωτικών, ειδικά βιταμίνης C, και στον αυξημένο ρυθμό μεταβολισμού αυτής της βιταμίνης στους καπνιστές (Madruga de Oliveira & Rondó de Carvalho, 2004).

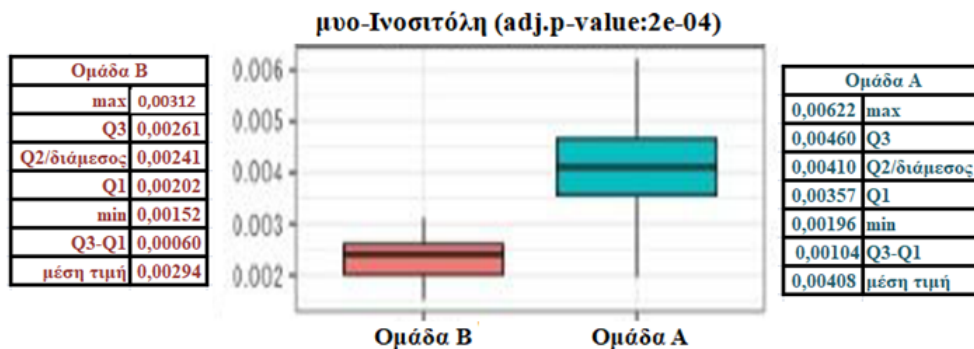
Η βιοσύνθεση του ασκορβικού οξέος, ακολουθεί διαφορετικές οδούς σε φυτά και ζώα. Η οδός των θηλαστικών περιλαμβάνει D-γλυκουρονικό οξύ, το οποίο ανάγεται σε L-

γουλονικό, αφυδατώνεται σε L-γουλono-1,4-λακτόνη και τελικά οξειδώνεται σε L-ασκορβικό οξύ (Εικόνα 51). Στην οδό βιοσύνθεσης ασκορβικού οξέος σε φυτά, η D-μαννόζη ενεργοποιείται σε GDP-μαννόζη, επιμερίζεται σε GDP-L-γαλακτόζη και υδρολύεται σε L-γαλακτόζη (Κανκονα, et al., 2018).



Εικόνα 51: Μεταβολικά μονοπάτια του ασκορβικού οξέος (Κανκονα, et al., 2018)

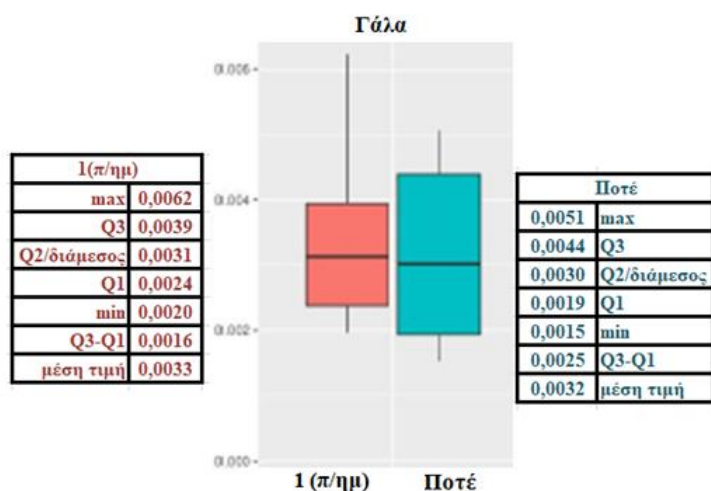
➤ **μνο-Ινοσιτόλη (Myo-Inositol)**



Εικόνα 52: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της μνο-ινοσιτόλης στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

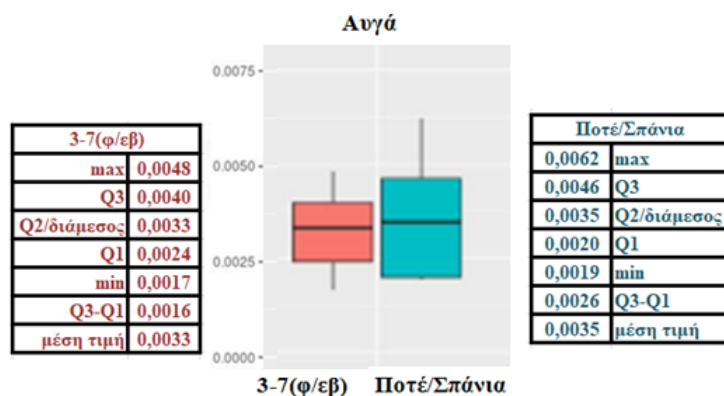
Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 52, προκύπτει ότι η τιμή Q1 της ομάδας A βρίσκεται ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας B, άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης της σχετικής συγκέντρωσης της μνο-ινοσιτόλης στην ομάδα A. Επίσης, το IQR της ομάδας A είναι σχετικά μικρό, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων, αλλά της ομάδας B είναι σχεδόν το μισό, επομένως στην ομάδα αυτή η μεταβλητότητα δεδομένων είναι μικρότερη. Η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο είναι συμμετρική στην ομάδα A, αλλά όχι στην ομάδα B.

Από τη μονομεταβλητή ανάλυση, η μυο-Ινοσιτόλη βρέθηκε να συμβάλλει στο διαχωρισμό των ομάδων «1ποτ/ημ» και «ποτέ» όσον αφορά την κατανάλωση γάλακτος και των ομάδων «3-7φ/εβ» και «ποτέ/σπάνια» όσον αφορά την κατανάλωση αυγών.



Εικόνα 53: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της μυο-ινοσιτόλης στις ομάδες 1ποτ/ημ (κόκκινο) και ποτέ (πράσινο) ως προς την κατανάλωση γάλακτος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 53, για την κατανάλωση γάλακτος, προκύπτει ότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη και οι διάμεσοι των δύο ομάδων βρίσκονται σχεδόν στο ίδιο ύψος, επομένως δεν μπορεί να βγει συμπέρασμα, για το αν υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης ή μείωσης της σχετικής συγκέντρωσης της μυο-ινοσιτόλης. Επίσης, τα IQR και των δύο ομάδων είναι μεγάλα, με αυτό της ομάδας «ποτέ» να είναι λίγο μεγαλύτερο, επομένως υπάρχει μεγαλύτερη μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, είναι σχεδόν συμμετρική και στις δύο ομάδες.



Εικόνα 54: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της μυο-ινοσιτόλης στις ομάδες 3-7φ/εβ (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση αυγών και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 54, για την κατανάλωση αυγών, προκύπτει ότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη και οι διάμεσοι των δύο ομάδων βρίσκονται σχεδόν στο ίδιο ύψος, επομένως δεν μπορεί να βγει συμπέρασμα, για το αν υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης ή μείωσης της σχετικής συγκέντρωσης της μυο-ινοσιτόλης, σε κάποια από τις δύο ομάδες. Επίσης, τα IQR και των δύο ομάδων είναι μεγάλα, με αυτό της ομάδας «ποτέ/σπάνια» να είναι λίγο μεγαλύτερο, επομένως υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, είναι σχεδόν συμμετρική και στις δύο ομάδες.

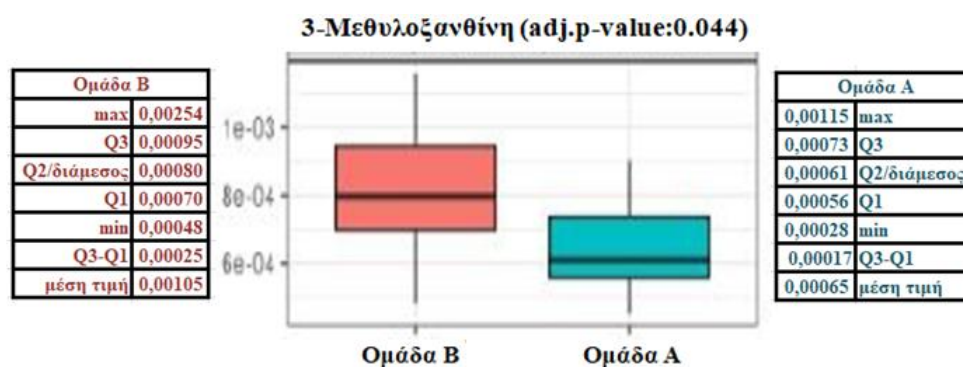
Η μυο-ινοσιτόλη είναι ένα ισόμορφο ινοσιτόλης. Η ινοσιτόλη είναι παράγωγο του κυκλοεξανίου με έξι υδροξυλομάδες, καθιστώντας την πολυόλη. Θεωρούνταν αρχικά μέλος του συμπλέγματος βιταμινών Β και είχε το όνομα βιταμίνη Β₈. Ωστόσο, επειδή παράγεται από το ανθρώπινο σώμα από γλυκόζη, δεν είναι απαραίτητο θρεπτικό συστατικό και επομένως δεν μπορεί να ονομαστεί βιταμίνη. Συντίθεται από γλυκόζη, μέσω της 6-φωσφορικής γλυκόζης σε δύο στάδια. Πρώτον, η 6-φωσφορική γλυκόζη ισομερίζεται από το ένζυμο της συνθάσης της 3-φωσφορικής ινοσιτόλης σε 1-φωσφορική ινοσιτόλη, η οποία στη συνέχεια αποφωσφορλιώνεται από το ένζυμο της μονοφωσφατάσης ινοσιτόλης, για να δώσει ελεύθερη μυο-ινοσιτόλη (Εικόνα 51). Στους ανθρώπους, η μυο-ινοσιτόλη συντίθεται κυρίως στα νεφρά με ρυθμό λίγων γραμμαρίων την ημέρα. Μειωμένα επίπεδα μυο-ινοσιτόλης, έχουν βρεθεί στο νοτιαίο υγρό των ασθενών με κατάθλιψη (HMDB, 2021). Επίσης, έρευνα έδειξε ότι τα ούρα από νεογνά θηλυκού γένους, περιλαμβάνουν χαμηλότερα επίπεδα μυο-ινοσιτόλης, σε σύγκριση με τα αρσενικού γένους (Pinto, et al., 2016).

Όσον αφορά τη διατροφή, η μυο-ινοσιτόλη βρίσκεται φυσικά σε πολλά τρόφιμα, ιδιαίτερα σε δημητριακά με υψηλή περιεκτικότητα πίτουρου και όσπρια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γλυκαντικό, καθώς έχει τη μισή γλυκύτητα της σακχαρόζης. Σε μεταβολομική μελέτη που έγινε στο πλάσμα αίματος, για την εύρεση βιοδεικτών της μεσογειακής διατροφής, η μυο-ινοσιτόλη συσχετίστηκε αρνητικά με τις ελιές και θετικά με την κατανάλωση επεξεργασμένου κρέατος, ενώ ούτε η κατανάλωση φρούτων ή λαχανικών, ούτε η κατανάλωση κόκκινου κρέατος συσχετίστηκαν με τα επίπεδα μυο-ινοσιτόλης στο πλάσμα. Εκ πρώτης όψεως, αυτές οι παρατηρήσεις φαίνονται μη αναμενόμενες, δεδομένου ότι η μυο-ινοσιτόλη εμφανίζεται σε άφθονη ποσότητα σε πολλές φυτικές τροφές, όπως φρούτα, φασόλια, δημητριακά και ξηρούς καρπούς. Ωστόσο, οι ζωικές πηγές ινοσιτόλης είναι πιο βιοδιαθέσιμες από τη φυτική μορφή, η οποία υπάρχει στις φυτικές πηγές. Επιπλέον, μερικές από τις πλουσιότερες, πιο βιοδιαθέσιμες πηγές

ινοσιτόλης είναι τα εσωτερικά όργανα των ζώων, που επεξεργάζονται για ανθρώπινη κατανάλωση (organ meats), το οποίο πιθανώς εξηγεί τη θετική συσχέτιση που παρατηρείται για το επεξεργασμένο κρέας, αλλά όχι για το κόκκινο κρέας (Macías, et al., 2019).

Επίσης, έχει βρεθεί ότι η υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη, αναστέλλει την πρόσληψη μυο-ινοσιτόλης από τα κύτταρα, το έντερο και τους νεφρούς. Συγκεκριμένα, τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης, εμποδίζουν τη διαθεσιμότητα της ινοσιτόλης, αυξάνοντας την αποδόμησή της και αναστέλλοντας τη βιοσύνθεση και την απορρόφηση της μυο-ινοσιτόλης (Dinicola, et al., 2017).

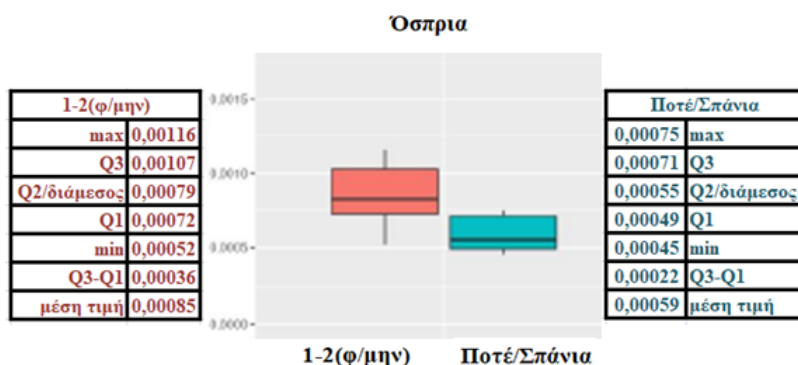
➤ **3-Μεθυλοξανθίνη (3-Methylxanthine)**



Εικόνα 55: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της 3-Μεθυλοξανθίνης στις ομάδες Α και Β και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

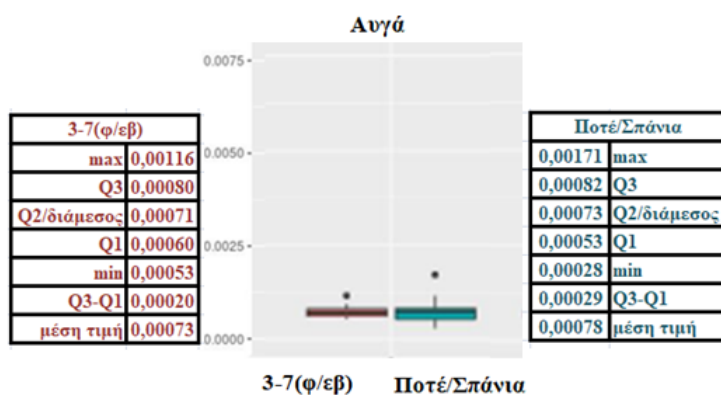
Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 55, προκύπτει ότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη, αλλά η διάμεσος (Q2) της ομάδας Β, βρίσκεται ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας Α, άρα πιθανώς να υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης της σχετικής συγκέντρωσης της 3-Μεθυλοξανθίνης στην ομάδα Β. Επίσης, τα IQR και των δύο ομάδων είναι σχετικά μικρά, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων. Η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική σε καμία από τις δύο ομάδες.

Από τη μονομεταβλητή ανάλυση, η 3-Μεθυλοξανθίνη βρέθηκε να συμβάλλει στο διαχωρισμό των ομάδων «1-2φ/μην» και «ποτέ/σπάνια», όσον αφορά την κατανάλωση οσπρίων και των ομάδων «3-7φ/εβ» και «ποτέ/σπάνια», όσον αφορά την κατανάλωση αυγών.



Εικόνα 56: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της 3-Μεθυλοξανθίνης στις ομάδες 1-2φ/μην (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση οσπρίων και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 56, για την κατανάλωση οσπρίων, προκύπτει ότι η τιμή Q1 της ομάδας «1-2φ/μην» βρίσκεται λίγο ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας «ποτέ/σπάνια», άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και αύξηση της σχετικής συγκέντρωσης της 3-Μεθυλοξανθίνης στην ομάδα «1-2φ/μην». Επίσης, τα IQR και των δύο ομάδων είναι σχετικά μικρά, με αυτό της ομάδας «ποτέ/σπάνια» να είναι λίγο μικρότερο, επομένως υπάρχει μικρότερη μεταβλητότητα δεδομένων. Η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική σε καμία από τις δύο ομάδες.



Εικόνα 57: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων της 3-Μεθυλοξανθίνης στις ομάδες 3-7φ/εβ (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση αυγών και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

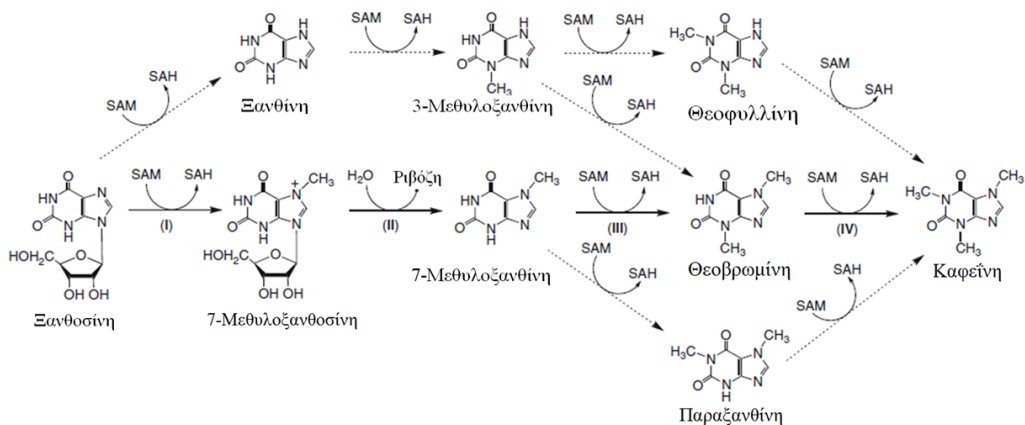
Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 57, για την κατανάλωση αυγών, προκύπτει ότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη και οι διάμεσοι των δύο ομάδων βρίσκονται σχεδόν στο ίδιο ύψος, επομένως δεν μπορεί να βγει συμπέρασμα για το αν υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης ή μείωσης της σχετικής συγκέντρωσης της 3-Μεθυλοξανθίνης σε κάποια από τις δύο ομάδες. Επίσης, τα IQR και των δύο ομάδων είναι πολύ μικρά, επομένως υπάρχει πολύ μικρή μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των

δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, είναι συμμετρική στην ομάδα «3-7φ/εβ», ενώ στην ομάδα «ποτέ/σπάνια», δεν είναι συμμετρική.

Η 3-μεθυλοξανθίνη, ανήκει στην κατηγορία των οργανικών ενώσεων που είναι γνωστές ως ξανθίνες και είναι μεταβολίτης της θεοφυλλίνης, η οποία συμμετέχει στη βιοσύνθεση καφεΐνης (HMDB, 2021). Η καφεΐνη (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη), η θεοβρωμίνη (3,7-διμεθυλοξανθίνη) και η θεοφυλλίνη (1,3-διμεθυλοξανθίνη), είναι οι πιο γνωστές ενώσεις της οικογένειας μεθυλοξανθινών και απαντώνται φυσικά σε φύλλα τσαγιού, yerba mate, κόκκους καφέ, κόκκους κακάο, ξηρούς καρπούς και μούρα γκουαράνα (Sanchez, 2017).

Εκτός από την κύρια οδό βιοσύνθεσης καφεΐνης, μπορούν επίσης να λειτουργήσουν διάφορες δευτερεύουσες οδοί, που εξαρτώνται κυρίως από τη συνθάση της καφεΐνης (Εικόνα 58). Για παράδειγμα, η συνθάση καφεΐνης καταλύει τη σύνθεση της 3-μεθυλοξανθίνης από την ξανθίνη. Η παραξανθίνη συντίθεται από την 7-μεθυλοξανθίνη. Ωστόσο, μικρή συσσώρευση αυτών των ενώσεων συμβαίνει σε φυτικούς ιστούς (Fredholm, 2011).

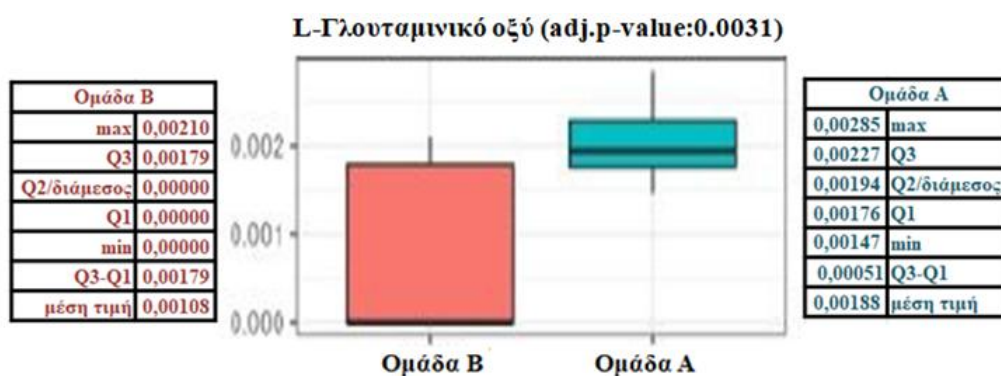
Σε μία μεταβολομική μελέτη για βιοδείκτες της διατροφής, που αποσκοπεί στη μείωση της υπέρτασης, γνωστής ως DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension), οι συγκεντρώσεις θεοβρωμίνης, 7-μεθυλουρικού, 3-μεθυλοξανθίνης και 7-μεθυλοξανθίνης στον ορό, ήταν χαμηλότερες σε εκείνους που τυχαία υποβλήθηκαν στη δίαιτα DASH, απ' ό,τι σε αυτούς που υποβλήθηκαν τυχαία στη δίαιτα control. Η δίαιτα DASH συνίστατο από υψηλή πρόσληψη φρούτων, λαχανικών και γαλακτοκομικών προϊόντων, με χαμηλά λιπαρά. Περιλάμβανε ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνικών πηγών, όπως κρέας, ψάρι, πουλερικά, ξηρούς καρπούς και φασόλια. Τα ζαχαρούχα ποτά, τα επιδόρπια και το κόκκινο κρέας, ήταν περιορισμένα. Για τη δίαιτα control, η πρόσληψη μακροθρεπτικών συστατικών ήταν παρόμοια με τη μέση κατανάλωση στις ΗΠΑ. Η πρόσληψη λίπους (κορεσμένο λίπος, ειδικότερα, καθώς και μονοακόρεστο λίπος) ήταν χαμηλότερη στη δίαιτα DASH, σε σχέση με τη δίαιτα control (Rebholz, et al., 2018).



Εικόνα 58: Οι βιοσυνθετικές οδοί της καφεΐνης από την ξανθοσίνη. Η κύρια διαδρομή αποτελείται από τέσσερα βήματα από το I έως το IV. Δευτερεύουσες οδοί, που φαίνονται με διακεκομμένα βέλη, μπορεί να εμφανιστούν λόγω των μεγάλων ιδιοτήτων του υποστρώματος των N-μεθυλοτρανσφερασών. SAM: S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη, SAH: S-αδενοσυλ-L-ομοκυστεΐνη (Fredholm, 2011)

Αν και η καφεΐνη απεκκρίνεται σε περιορισμένο βαθμό στο μητρικό γάλα, ο μεταβολισμός των μεθυλοξανθινών στα νεογνά και ιδίως, στα πρόωρα βρέφη, τους κάνει να κινδυνεύουν από συσσώρευση μεθυλοξανθινών. Η θεοφυλλίνη που χορηγείται στη μητέρα για το άσθμα και η θεοβρωμίνη από τη σοκολάτα, είναι επίσης παρόντα στο μητρικό γάλα και συσσωρεύονται στο νεογνό. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ελάχιστη μείωση στην ανάπτυξη του εμβρύου, μετά από υπερβολική κατανάλωση καφεΐνης από τη μητέρα, δηλαδή πάνω από 600 mg/ημέρα, που ισοδυναμεί με περίπου έξι φλιτζάνια καφέ (Fredholm, 2011).

➤ L-Γλουταμινικό οξύ (L-Glutamic Acid)

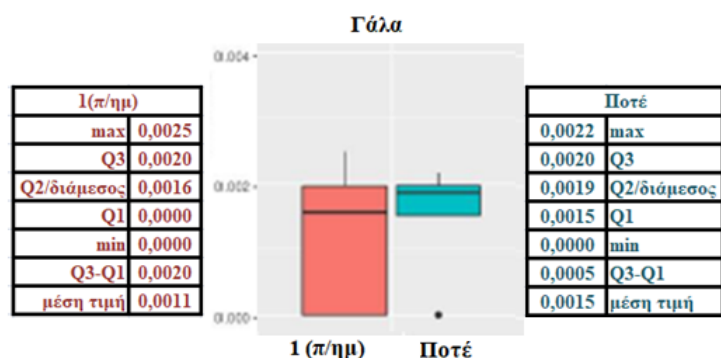


Εικόνα 59: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλουταμινικού οξέος στις ομάδες A και B και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 59, προκύπτει ότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη, αλλά η διάμεσος (Q2) της ομάδας A βρίσκεται ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας B, άρα πιθανώς να υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης της σχετικής

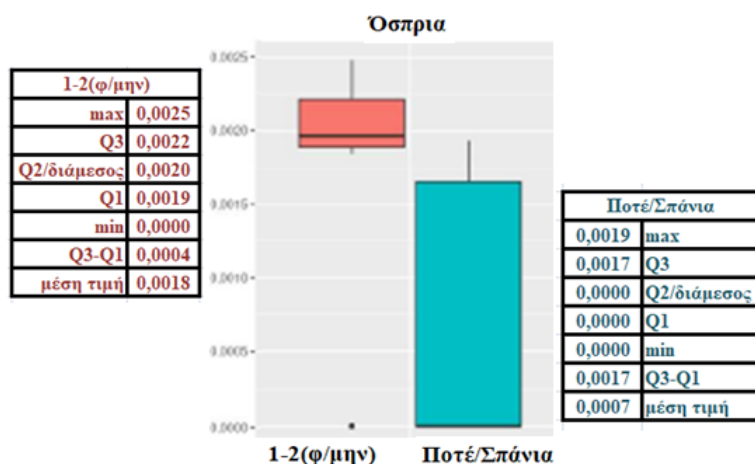
συγκέντρωσης του γλουταμινικού οξέος στην ομάδα A. Επίσης, το IQR της ομάδας A είναι μικρό, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων, ενώ της ομάδας B είναι πολύ μεγάλο, επομένως υπάρχει πολύ μεγάλη μεταβλητότητα δεδομένων. Η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική σε καμία από τις δύο ομάδες και μάλιστα στην ομάδα B το 50% των δεδομένων, είναι κατανομημένα πάνω από το μηδέν, διότι η διάμεσος είναι ίση με μηδέν.

Από τη μονομεταβλητή ανάλυση, το γλουταμινικό οξύ βρέθηκε να συμβάλλει στο διαχωρισμό των ομάδων «1ποτ/ημ» και «ποτέ», όσον αφορά την κατανάλωση γάλακτος και «1-2φ/μην» και «ποτέ/σπάνια», όσον αφορά την κατανάλωση οσπρίων.



Εικόνα 60: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλουταμινικού οξέος στις ομάδες 1ποτ/ημ (κόκκινο) και ποτέ (πράσινο) ως προς την κατανάλωση γάλακτος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 60, για την κατανάλωση γάλακτος, προκύπτει ότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη, αλλά η διάμεσος (Q2) της ομάδας «1ποτ/ημ» βρίσκεται στο ίδιο ύψος με το Q1 της ομάδας «ποτέ», άρα πιθανώς να υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση μείωσης της σχετικής συγκέντρωσης του γλουταμινικού οξέος στις μητέρες, που δήλωσαν ότι καταναλώνουν 1 ποτήρι γάλα την ημέρα. Βέβαια οι τιμές των θηκογραμμάτων είναι πολύ κοντά, οπότε δεν μπορεί, μόνο από τα θηκογράμματα, να βγει κάποιο σίγουρο συμπέρασμα. Επίσης, το IQR της ομάδας «ποτέ» είναι μικρό, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων, ενώ της ομάδας «1ποτ/ημ» είναι πολύ μεγάλο, επομένως υπάρχει πολύ μεγάλη μεταβλητότητα δεδομένων. Η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική σε καμία από τις δύο ομάδες.

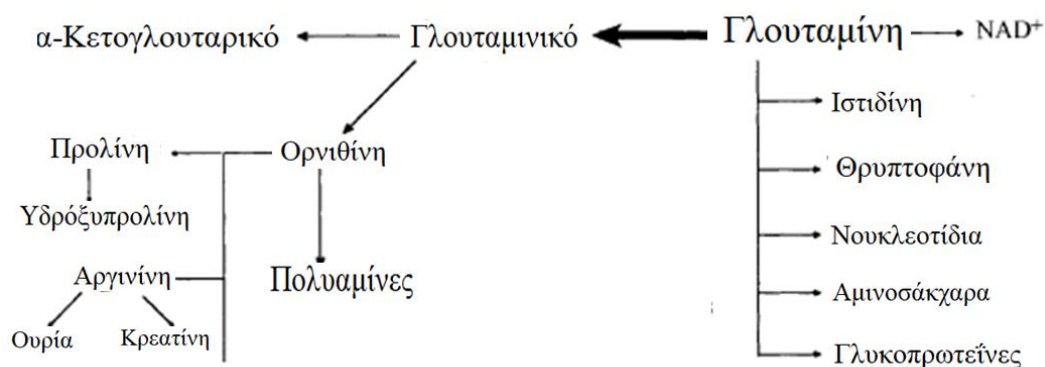


Εικόνα 61: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του γλουταμινικού οξέος στις ομάδες 1-2φ/μην (κόκκινο) και ποτέ/σπάνια (πράσινο) ως προς την κατανάλωση οσπρίων και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 61, για την κατανάλωση οσπρίων, προκύπτει ότι η τιμή Q1 της ομάδας «1-2φ/μην» βρίσκεται ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας «ποτέ/σπάνια», άρα υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και αύξηση της σχετικής συγκέντρωσης του γλουταμινικού οξέος στην ομάδα «1-2φ/μην». Επίσης, το IQR της ομάδας «1-2φ/μην» είναι μικρό, επομένως υπάρχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων, ενώ της ομάδας «ποτέ/σπάνια» είναι πολύ μεγάλο, επομένως υπάρχει πολύ μεγάλη μεταβλητότητα δεδομένων. Η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική σε καμία από τις δύο ομάδες, μάλιστα στην ομάδα «ποτέ/σπάνια», το 50% των δεδομένων είναι κατανεμημένα πάνω από το μηδέν, διότι η διάμεσος είναι ίση με μηδέν ή με άλλα λόγια τουλάχιστον το 50% δειγμάτων παρουσιάζουν μηδενική σχετική συγκέντρωση του γλουταμινικού οξέος.

Το L-γλουταμινικό οξύ (Glu), είναι ένα από τα 20 πρωτεϊνογενή αμινοξέα και ένα βασικό μόριο, για τον κυτταρικό μεταβολισμό. Δε συγκαταλέγεται στα απαραίτητα αμινοξέα, ωστόσο τα τελευταία χρόνια, έχει βρεθεί ότι, όπως και με τα απαραίτητα αμινοξέα, τα διατροφικά μη απαραίτητα αμινοξέα απαιτούνται για την ανάπτυξη και την υγεία του ανθρώπου. Το γλουταμινικό οξύ είναι το πιο κοινό διαιτητικό αμινοξύ, καθώς υπάρχει σε πολλά τρόφιμα είτε σε ελεύθερη μορφή είτε σε πεπτίδια και πρωτεΐνες. Η ζωική πρωτεΐνη μπορεί να περιέχει από 11 έως 22% κατά βάρος γλουταμινικό οξύ και η φυτική πρωτεΐνη έως και 40% γλουταμινικό κατά βάρος. Οι κύριες ομάδες τροφίμων που εφοδιάζουν την πρόσληψη γλουταμινικού οξέος είναι τα δημητριακά, οι πατάτες, τα ψάρια και τα οστρακοειδή και τα τρόφιμα σόγιας. Ένας μεγάλος αριθμός οδών εμπλέκονται στον μεταβολισμό του γλουταμινικού οξέος. Μετασχηματίζεται σε αλανίνη στα κύτταρα του

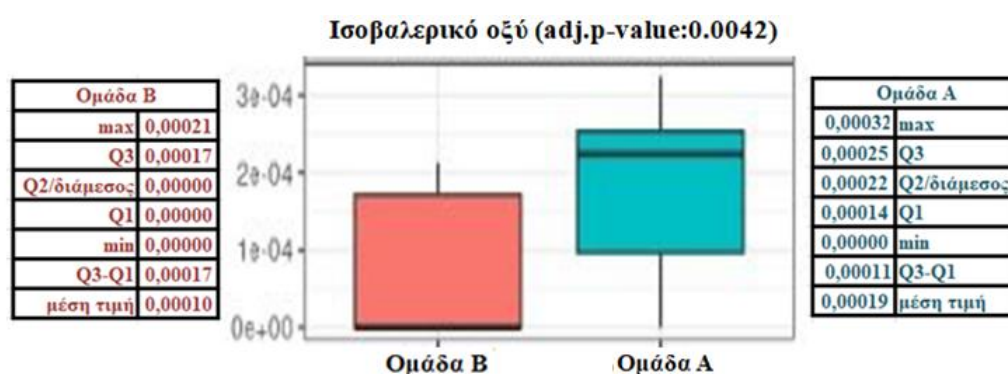
εντερικού βλεννογόνου και σε γλυκόζη και γαλακτικό στο ήπαρ (Tapiero, et al., 2002), (Nagata, et al., 2015).



Εικόνα 62: Μεταβολικά προϊόντα που προκύπτουν από τη γλουταμίνη (Tapiero, et al., 2002)

Σε μία μελέτη, το γλουταμινικό οξύ ήταν σχετικά υψηλό στη διατροφή πρωτεΐνης από σιτηρά, το οποίο αντανακλάται σε υψηλότερη έκκριση προλίνης, αργινίνης και ορνιθίνης, για τις οποίες το γλουταμινικό οξύ είναι πρόδρομος. Η διατροφή πρωτεΐνης σιτηρών περιλάμβανε εκτός από σιτηρά και όσπρια (Altorf-van der Kuil, et al., 2013). Το γλουταμινικό οξύ προκύπτει από τη γλουταμίνη (Εικόνα 62) και μια μελέτη που αποσκοπούσε στο χαρακτηρισμό του μεταβολικού αποτυπώματος των ούρων, έδειξε τη γλουταμίνη, τη διμεθυλαμίνη και 3-μεθυλιστιδίνη, ως υποψήφιους βιοδείκτες της κατανάλωσης οσπρίων (Sri Harsha, et al., 2018). Επομένως, φαίνεται να υπάρχει θετική συσχέτιση της συγκέντρωσης του γλουταμινικού οξέος με τα όσπρια.

➤ Ισοβαλερικό οξύ (Isovaleric Acid)

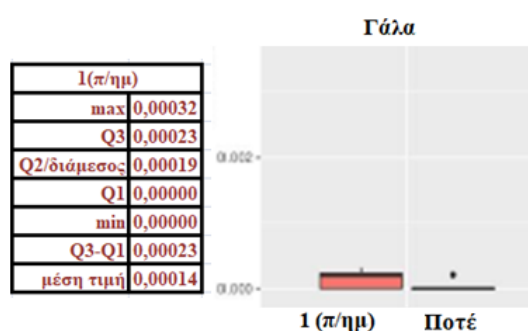


Εικόνα 63: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του ισοβαλερικού οξέος στις ομάδες Α και Β και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 63, προκύπτει ότι υπάρχει αλληλοεπικάλυψη, αλλά η διάμεσος (Q2) της ομάδας Α βρίσκεται ψηλότερα από την τιμή Q3 της ομάδας Β, άρα πιθανώς να υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων και τάση αύξησης της σχετικής

συγκέντρωσης του ισοβαλερικού οξέος στην ομάδα Α. Επίσης, τα IQR και των δύο ομάδων είναι μεγάλα, επομένως υπάρχει μεγάλη μεταβλητότητα δεδομένων. Η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική σε καμία από τις δύο ομάδες και μάλιστα στην ομάδα Β το 50% των δεδομένων είναι κατανεμημένα πάνω από το μηδέν, διότι η διάμεσος είναι ίση με μηδέν ή με άλλα λόγια τουλάχιστον το 50% δειγμάτων, παρουσιάζει μηδενική σχετική συγκέντρωση του ισοβαλερικού οξέος.

Από τη μονομεταβλητή ανάλυση, το ισοβαλερικό οξύ βρέθηκε να συμβάλλει στο διαχωρισμό των ομάδων «1ποτ/ημ» και «ποτέ», όσον αφορά την κατανάλωση γάλακτος.



Εικόνα 64: Θηκογράμματα της κατανομής των σχετικών συγκεντρώσεων του ισοβαλερικού οξέος στις ομάδες 1ποτ/ημ (κόκκινο) και ποτέ (πράσινο) ως προς την κατανάλωση γάλακτος και πίνακας με τις τιμές που αντιστοιχούν στα στατιστικά δεδομένα των θηκογραμμάτων

Από τα θηκογράμματα της Εικόνας 64, για την κατανάλωση γάλακτος, προκύπτει ότι το ισοβαλερικό οξύ έχει ανιχνευθεί μόνο στην ομάδα «1ποτ/ημ», ενώ στην ομάδα «ποτέ» η σχετική του συγκέντρωση είναι μηδέν πέρα από μία έκτροπη τιμή. Επίσης, το IQR της ομάδας «1ποτ/ημ» είναι πολύ μικρό, επομένως υπάρχει πολύ μικρή μεταβλητότητα δεδομένων και η κατανομή των δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, δεν είναι συμμετρική.

Το ισοβαλερικό οξύ είναι ένα λιπαρό οξύ διακλαδισμένης αλυσίδας με 5 άτομα άνθρακα, που υπάρχει σε ζυμωμένα τρόφιμα και παράγεται στο έντερο με βακτηριακή ζύμωση λευκίνης. Τα λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, παράγονται όταν οι πρωτεΐνες διέρχονται από το λεπτό έντερο, χωρίς να απορροφώνται και τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, βαλίνη, ισολευκίνη και λευκίνη ζυμώνονται αντίστοιχα σε ισοβουτυρικό οξύ, 2-μεθυλβουτυρικό οξύ και ισοβαλερικό οξύ. Επιπλέον, τα λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλυσίδας προέρχονται ιδίως από γαλακτοκομικά προϊόντα και προϊόντα βοείου κρέατος (Blakeney, et al., 2020).

Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα και προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

Από την πολυμεταβλητή ανάλυση που έγινε με βάση τις ομάδες που σχηματίστηκαν από τις απαντήσεις των μητέρων στο ερωτηματολόγιο, δεν προέκυψε κάποιος διαχωρισμός ή ένα επικυρωμένο στατιστικό μοντέλο διάκρισης. Επομένως, για το συγκεκριμένο αριθμό δειγμάτων και τις συγκεκριμένες απαντήσεις, οι ομαδοποιήσεις του ερωτηματολογίου ως προς τη διατροφή και τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά της μητέρας, δε βρέθηκε να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στο μεταβολικό αποτύπωμα του μητρικού πρωτογάλακτος. Η παρατήρηση αυτή, οδήγησε στο να συνεχιστεί η διερεύνηση με μη επιβλεπόμενη ανάλυση του δειγματοχώρου, ώστε να φανεί αν υπάρχουν φυσικές ομαδοποιήσεις στα δεδομένα και να ερευνηθεί στη συνέχεια, πού μπορεί να οφείλονται. Έτσι εφαρμόστηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), η οποία στην αρχή δεν έδειξε κάποια εμφανή διάκριση, αλλά ανέδειξε 6 δείγματα, που αποτελούσαν έκτροπες τιμές (outliers). Παρόλο που από το ερωτηματολόγιο, δε βρέθηκε αυτά τα δείγματα να έχουν κάποιο κοινό χαρακτηριστικό, που να δικαιολογεί το διαχωρισμό τους από τα υπόλοιπα, η κατανομή τους διέφερε κατά πολύ από τα υπόλοιπα και έτσι αποφασίστηκε να εξαιρεθούν από το δειγματοχώρο. Η διαφοροποίησή τους μπορεί να οφείλεται, είτε σε κάποια άλλη παράμετρο που δεν εμπεριέχεται στο συγκεκριμένο ερωτηματολόγιο, είτε σε πειραματικό σφάλμα κατά την ανάλυσή τους.

Μετά την αφαίρεση των outliers, στο νέο μοντέλο PCA, φάνηκε να υπάρχει μία τάση διαχωρισμού των δειγμάτων μεταξύ 1^{ου}-2^{ου} και 3^{ου}-4^{ου} τεταρτημορίου, δηλαδή κατά μήκος της δεύτερης κύριας συνιστώσας PC2, με την πρώτη κύρια συνιστώσα (PC1) να εκφράζει το 88% και τη δεύτερη (PC2) το 3% της συνολικής διακύμανσης των δεδομένων. Επίσης, με βάση αυτές τις δύο ομάδες (A:1^ο-2^ο και B:3^ο-4^ο τεταρτημόριο) προέκυψε ένα επικυρωμένο επιβλεπόμενο μοντέλο διάκρισης OPLS-DA, με καλή ικανότητα πρόβλεψης και προσαρμογής. Αυτή η φυσική τάση διαχωρισμού των δειγμάτων, ήταν και το κύριο εύρημα της συγκεκριμένης μελέτης και εκεί βασίστηκε, όλη η διερεύνηση που έγινε στη συνέχεια.

Αρχικά, επιχειρήθηκε να συσχετιστούν οι ομαδοποιήσεις των δειγμάτων αυτών, με τις απαντήσεις τους στο ερωτηματολόγιο, όμως δε βρέθηκε κάποια άμεσα παρατηρήσιμη σχέση. Στη συνέχεια έγινε αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών και προσδιορίστηκαν οι μεταβολίτες, που βρέθηκαν να έχουν σχετικές συγκεντρώσεις με στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων των ομάδων A και B. Αυτοί οι μεταβολίτες, 26 στο σύνολο, ήταν το 2-αμινοαδιπικό οξύ, η L-ορνιθίνη, η

L-σερίνη, το μεθυλομηλονικό οξύ, το 2-οξοϊσοβαλερικό οξύ, η D-γλυκόζη, η D-φρουκτόζη, το γλυκερικό οξύ, το L-γλουταμινικό οξύ, η L-λευκίνη, η μυο-ινοσιτόλη, η φαιναιθυλαμίνη, το ισοβαλερικό οξύ, η 6-φωσφορική D-γλυκόζη, το D-γλυκουρονικό οξύ, η γλυκερόλη, το γλυκολικό οξύ, το ιππουρικό οξύ, η 3-μεθυλοξανθίνη, το δεϋδροασκορβικό οξύ, η L-αραβιτόλη, το TMAO, το *trans*-φερουλικό οξύ, το θρεονικό οξύ, το 3-υδροξυφαινυλοξικό οξύ και το ομοβανιλλικό οξύ.

Επίσης, έγινε νέα πολυμεταβλητή ανάλυση με βάση τη νέα μήτρα δεδομένων, που προέκυψε από τις σχετικές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών για το κάθε δείγμα, από την οποία προέκυψε ένα επικυρωμένο μοντέλο διάκρισης OPLS-DA, με καλή ικανότητα πρόβλεψης και προσαρμογής. Με τη βοήθεια του διαγράμματος σημαντικότητας (VIP Plot), προσδιορίστηκαν οι 10 μεταβολίτες, που είχαν τη μεγαλύτερη επίδραση στη διάκριση των ομάδων του μοντέλου αυτού. Αυτοί οι 10 μεταβολίτες ήταν το ομοβανιλλικό οξύ, το 2-οξοϊσοβαλερικό οξύ, το θρεονικό οξύ, η L-σερίνη, η D-φρουκτόζη, η D-γλυκόζη, το γλυκολικό οξύ, το ιππουρικό οξύ, το γλυκερικό οξύ και η L-λευκίνη. Όπως αναμενόταν, οι 10 αυτοί μεταβολίτες ανήκουν και στους 26 που βρέθηκαν να έχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις σχετικές τους συγκεντρώσεις, μεταξύ των ομάδων A και B.

Τελευταίο βήμα της μελέτης αυτής, ήταν η προσπάθεια συσχέτισης των 26 μεταβολιτών με τις ομάδες του ερωτηματολογίου, με τη βοήθεια μονομεταβλητής ανάλυσης και χρήση πέντε ταξινομητών. Από αυτή την ανάλυση προέκυψαν κάποια ζευγάρια ομάδων του ερωτηματολογίου και οι μεταβολίτες που είχαν επίδραση στο διαχωρισμό τους, με σχετικά υψηλή ακρίβεια. Οι ομάδες αυτές αφορούσαν διατροφικές συνήθειες και συγκεκριμένα την κατανάλωση ψαριού, κρέατος, γάλακτος, οσπρίων και αυγών. Για τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά της μητέρας και τις πληροφορίες για το κάπνισμα και το αλκοόλ, η ακρίβεια των μοντέλων ήταν πολύ μικρή (<75%), ή ήταν πολύ μικρός ο αριθμός των δειγμάτων στη μία ομάδα, σε σχέση με την άλλη, οπότε επηρεαζόταν το μοντέλο. Ωστόσο, ακόμα και η υψηλή ακρίβεια, αφορούσε την καλή ικανότητα των μοντέλων ταξινομητών να ξεχωρίσουν τα δείγματα του συγκεκριμένου σετ δεδομένων, αλλά χωρίς αυτό να μπορεί να γενικευτεί και να υπάρξει εκτίμηση, του πόσο καλά θα μπορούσαν να ταξινομήσουν ένα νέο δείγμα, από άλλο δειγματοχώρο. Επίσης, από τους πίνακες αληθείας, προέκυψε ότι σε κάποιες περιπτώσεις ο ταξινομητής, είχε ταυτοποιήσει σωστά, μεγάλο αριθμό δειγμάτων από τη μία ομάδα, αλλά από την άλλη ομάδα είχε ταυτοποιήσει σωστά, μόνο ένα δείγμα και παρόλα αυτά η ακρίβεια ήταν υψηλή.

Από τα αποτελέσματα της μονομεταβλητής ανάλυσης, μόνο η συσχέτιση του γλουταμινικού οξέος με την κατανάλωση οσπρίων, μπόρεσε να επιβεβαιωθεί από τη βιβλιογραφία, όπου το γλουταμινικό έχει βρεθεί σχετικά υψηλό, σε διατροφή πρωτεΐνης από σιτηρά και όσπρια, και η γλουταμίνη, που είναι πρόδρομος του γλουταμινικού οξέος, έχει χαρακτηριστεί ως βιοδείκτης της κατανάλωσης οσπρίων (Altorf-van der Kuil, et al., 2013), (Sri Harsha, et al., 2018). Το γεγονός ότι για τους άλλους μεταβολίτες, δε βρέθηκε αυτή η συσχέτιση με τη βιβλιογραφία, μπορεί να οφείλεται στο μικρό αριθμό δειγμάτων που υπήρχαν σε κάθε ομάδα και με βάση τα οποία έγινε η μονομεταβλητή ανάλυση. Μπορεί το αποτέλεσμα να ήταν στατιστικώς ορθό και με υψηλή ακρίβεια, αλλά αφορούσε ένα μικρό σύνολο ατόμων, επομένως ήταν δύσκολο να προκύψει κάποιο γενικό συμπέρασμα, για το λόγο που οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες, βρέθηκαν να έχουν σημαντική επίδραση στο διαχωρισμό των συγκεκριμένων ομάδων του ερωτηματολογίου.

Για παράδειγμα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μονομεταβλητής ανάλυσης, σημαντική επίδραση στο διαχωρισμό αυτών που δήλωσαν ότι καταναλώνουν 1-3 φορές την εβδομάδα ψάρι και αυτών που δήλωσαν ότι καταναλώνουν σπάνια ή ποτέ ψάρι, είχαν το Γλυκουρονικό οξύ και το Δεϋδροασκορβικό οξύ. Αυτοί που δήλωσαν ότι τρώνε ψάρι 1-3 φορές την εβδομάδα ήταν 21 και αυτοί που δήλωσαν σπάνια ή ποτέ ήταν 7 και από τον πίνακα αληθείας, προέκυψε ότι ο ταξινομητής, είχε ταυτοποιήσει σωστά μόνο τα 4 από τα 7 δείγματα που απάντησαν «σπάνια ή ποτέ». Το γλυκουρονικό οξύ αποτελεί πρόδρομο του ασκορβικού οξέος και το δεϋδροασκορβικό οξύ προκύπτει από την οξείδωση του ασκορβικού οξέος, γεγονός που υποδεικνύει κάποια συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβολιτών, αλλά δεν μπόρεσε να επιβεβαιωθεί από τη βιβλιογραφία για κανέναν από τους δύο, η συσχέτισή τους με την κατανάλωση ψαριού και η επακόλουθη μείωσή τους. Ωστόσο, φάνηκε να υπάρχει θετική συσχέτιση αυτών των δύο μεταβολιτών, με την κατανάλωση φυτικών τροφών. Συγκεκριμένα, το γλυκουρονικό οξύ προκύπτει από τη μυο-ινοσιτόλη, η οποία έχει βρεθεί να συσχετίζεται με την κατανάλωση φυτικών τροφών, όπως δημητριακών και λαχανικών (Dinicola, et al., 2017). Αντίστοιχα, το δεϋδροασκορβικό οξύ, προκύπτει από το ασκορβικό οξύ, που έχει χαρακτηριστεί ως βιοδείκτης για φρούτα και λαχανικά (Morrissett & Hill, 2011). Επίσης, το ασκορβικό οξύ έχει συσχετιστεί με το κάπνισμα, καθώς έχει βρεθεί μείωση της συγκέντρωσής του στο αίμα από καπνιστές (Madruga de Oliveira & Rondó de Carvalho, 2004). Και οι δύο αυτοί μεταβολίτες, βρέθηκε να έχουν τάση αύξησης της σχετικής τους συγκέντρωσης στην ομάδα B, επομένως θα μπορούσε να είναι κάποια άλλη παράμετρος, που δεν έχει απαντηθεί στο ερωτηματολόγιο, όπως η κατανάλωση φυτικών τροφών ή που έχει απαντηθεί από μικρό

δείγμα, όπως το κάπνισμα, αυτή που οδήγησε τις σχετικές συγκεντρώσεις των δύο μεταβολιτών να διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων A και B.

Το ομοβανιλλικό οξύ, βρέθηκε από το VIP Plot να έχει τη μεγαλύτερη επίδραση στο διαχωρισμό των δειγμάτων των ομάδων A και B και έχει ανιχνευτεί μόνο στα δείγματα της ομάδας B. Επίσης έχει μικρή μεταβλητότητα δεδομένων, συμμετρική κατανομή δεδομένων γύρω από τη διάμεσο, όμως δεν προέκυψε ως σημαντικός μεταβολίτης για το διαχωρισμό των ομάδων του ερωτηματολογίου. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε κάποια διατροφική παράμετρο, που δεν έχει μελετηθεί στην παρούσα εργασία. Συγκεκριμένα, το ομοβανιλλικό οξύ σχηματίζεται, μεταξύ άλλων, ως μεταβολίτης διαιτητικών φλαβονοειδών με βάση την κερσετίνη, όταν φτάνουν στο παχύ έντερο. Άλλες πιθανές διατροφικές πηγές αύξησης του ομοβανιλλικού οξέος, περιλαμβάνουν την τυραμίνη, που βρίσκεται σε μια σειρά τροφών, όπως επεξεργασμένα κρέατα και τυρί, αβοκάντο και μπανάνες και την υδροξυτυροσόλη, που βρίσκεται στο ελαιόλαδο και το κόκκινο κρασί και είναι πρόδρομος ντοπαμίνης, της οποίας μεταβολίτης είναι το ομοβανιλλικό οξύ (Combet, et al., 2011).

Το α-οξοϊσοβαλερικό οξύ, βρέθηκε από το VIP Plot να έχει τη δεύτερη μεγαλύτερη επίδραση στο διαχωρισμό των δειγμάτων των ομάδων A και B και έχει ανιχνευτεί μόνο στα δείγματα της ομάδας A, ωστόσο δεν προέκυψε ως σημαντικός μεταβολίτης, για το διαχωρισμό των ομάδων του ερωτηματολογίου. Το ίδιο ισχύει και για τη λευκίνη, η οποία βρέθηκε να έχει σημαντική επίδραση στο διαχωρισμό των δειγμάτων των ομάδων A και B, να έχει αυξημένη σχετική συγκέντρωση στα δείγματα της ομάδας A, αλλά δε βρέθηκε να έχει επίδραση στο διαχωρισμό ομάδων του ερωτηματολογίου. Η λευκίνη ανήκει στα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, και το α-οξοϊσοβαλερικό οξύ, στα α-κετοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας, καθώς προκύπτει από τον καταβολισμό της βαλίνης, η οποία επίσης ανήκει στα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας. Για το λόγο αυτό, οι δύο αυτοί μεταβολίτες συμμετέχουν στο ίδιο μεταβολικό μονοπάτι, που είναι η βιοσύνθεση αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας. Τα αμινοξέα αυτά είναι κρίσιμα για την ανθρώπινη ζωή και εμπλέκονται ιδιαίτερα στο στρες, την ενέργεια και τον μεταβολισμό των μυών, ενώ η συγκέντρωσή τους, έχει βρεθεί αυξημένη στο μητρικό γάλα παχύσαρκων μητέρων ($BMI=34,3\pm 3,9 \text{ kg/m}^2$) (De Luca, et al., 2016). Σ' αυτή την περίπτωση, η διαφορά στις σχετικές συγκεντρώσεις αυτών των δύο μεταβολιτών, μεταξύ δειγμάτων των ομάδων A και B, θα μπορούσε να οφείλεται σε στρες, στο BMI των μητέρων ή σε κάποιο διατροφικό παράγοντα, που δεν ερωτήθηκε στις μητέρες αυτής της μελέτης.

Ένας άλλος μεταβολίτης, είναι η 3-μεθυλοξανθίνη, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει συσχετιστεί με την κατανάλωση τροφίμων και ποτών, που περιέχουν καφεΐνη, όπως το τσάι, ο καφές, το κακάο, κάποια αναψυκτικά κ.α. (Sanchez, 2017), γεγονός που μας οδηγεί στην υπόθεση, ότι η διαφορά στη σχετική της συγκέντρωση μεταξύ των ομάδων Α και Β, θα μπορούσε να οφείλεται στην κατανάλωση καφεϊνούχων ποτών από τη μητέρα, κάτι που δε ρωτήθηκε στο ερωτηματολόγιο.

Τέλος, υπήρξαν δύο μεταβολίτες που βρέθηκαν, να έχουν σημαντική επίδραση στο διαχωρισμό των δειγμάτων των ομάδων Α και Β, να έχουν τάση αύξησης σχετικής συγκέντρωσης στα δείγματα της ομάδας Α και να έχουν επίδραση στο διαχωρισμό ομάδων, σχετικά με την κατανάλωση κρέατος. Αυτοί είναι το γλυκερικό οξύ και η φρουκτόζη. Πράγματι, υπάρχει σύνδεση μεταξύ τους, καθώς το γλυκερικό οξύ προκύπτει από τη διάσπαση της φρουκτόζης, αλλά από τη βιβλιογραφία δεν μπόρεσε να βρεθεί κάποια συσχέτιση, με τη διατροφική πρόσληψη κρέατος. Βρέθηκε όμως ότι η υψηλή ποσότητα φρουκτόζης στα βιολογικά υγρά, συσχετίζεται με διατροφική πρόσληψη σακχαρόζης και με διάφορα φρούτα και λαχανικά με υψηλή περιεκτικότητα σε φρουκτόζη, σακχαρόζη και γλυκόζη. Για το μητρικό γάλα συγκεκριμένα, παρόλο που δεν περιέχει φυσικά φρουκτόζη, βρέθηκε μικρή ποσότητα αυτής, που πιθανά να οφείλεται στην πρόσληψη από τη μητέρα προϊόντων που περιέχουν φρουκτόζη, όπως ποτά και αναψυκτικά που περιέχουν ζάχαρη (Goran, et al., 2017). Επομένως, θα μπορούσε η διαφορά στις σχετικές συγκεντρώσεις των δύο αυτών μεταβολιτών, μεταξύ των δειγμάτων των ομάδων Α και Β, να οφείλεται στην κατανάλωση από τη μητέρα ποτών και τροφίμων με υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη, κάτι που δεν ερωτήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη.

Συνοψίζοντας, από τη συγκεκριμένη μελέτη προέκυψε, πως για το συγκεκριμένο δειγματοχώρο υπήρξε μία φυσική τάση διαχωρισμού των δειγμάτων, η οποία όμως δεν μπόρεσε να συσχετιστεί με τις απαντήσεις του ερωτηματολογίου και έτσι πιθανά να οφείλεται σε άλλες παραμέτρους, που δε μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία ή άλλες διατροφικές συνήθειες, που δεν ερωτήθηκαν. Για το διαχωρισμό αυτό, προσδιορίστηκαν οι μεταβολίτες που είχαν τη μεγαλύτερη επίδραση και εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις σχετικές τους συγκεντρώσεις. Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά της μητέρας και οι πληροφορίες για το κάπνισμα και το αλκόολ, από τη στατιστική ανάλυση που έγινε, δε βρέθηκε να έχουν σημαντικό αντίκτυπο στο μεταβολικό αποτύπωμα του μητρικού πρωτογάλακτος. Όλα τα ευρήματα που προέκυψαν, αφορούν βέβαια το συγκεκριμένο αριθμό δειγμάτων και βασίζονται στις συγκεκριμένες ερωτήσεις που τέθηκαν στις μητέρες.

Η περαιτέρω διερεύνηση των μεταβολιτών που βρέθηκαν να έχουν μεγάλη επίδραση στο διαχωρισμό των δύο ομάδων και των μεταβολικών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν και η αύξηση του αριθμού των δειγμάτων, θα μπορούσε να οδηγήσει στη διεύρυνση της συγκεκριμένης έρευνας. Επίσης η συγκρότηση ενός ερωτηματολογίου με μεγαλύτερο εύρος ερωτήσεων, σχετικά με τις διατροφικές συνήθειες, θα μπορούσε να αποκαλύψει κάποια μεγαλύτερη συσχέτιση διατροφικών παραμέτρων, με το μεταβολικό προφίλ του μητρικού γάλακτος.

Βιβλιογραφία

Agin, A. et al., 2016. Metabolomics – an overview. From basic principles to potential biomarkers (part 1). *Médecine Nucléaire*, Volume 40, pp. 4-10.

Altorf-van der Kuil, W. et al., 2013. Identification of biomarkers for intake of protein from meat, dairy products and grains. *British Journal of Nutrition*, Volume 110, pp. 812-822.

Andreas, N. J., 2015. *The influence of maternal metabolic phenotype on breast milk composition and on the maternal and infant urinary metabolome*, s.l.: Imperial College London Department of Medicine.

Andreas, N. J., Kampmann, B. & Mehring Le-Doare, K., 2015. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Human Development*, pp. 1-7.

Ballard, O. & Morrow, A. L., 2013. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*, pp. 49-74.

Barnes, S. et al., 2016 a. Training in metabolomics research. I. Designing the experiment, collecting and extracting samples and generating metabolomics data. *Journal of Mass Spectrometry*, 51(7), pp. 461-475.

Barnes, S. et al., 2016 b. Training in metabolomics research. II. Processing and statistical analysis of metabolomics data, metabolite identification, pathway analysis, applications of metabolomics and its future. *Journal of Mass Spectrometry*, 51(8), pp. 535-548.

Bhagavan, N. V. & Ha, C.-E., 2015. Carbohydrate Metabolism II: Gluconeogenesis, Glycogen Synthesis and Breakdown, and Alternative Pathways, 2nd Edition. In: *Essentials of Medical Biochemistry*. s.l.:Academic Press, pp. 205-226.

Bharti, S. K. & Roy, R., 2012. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. *Trends in Analytical Chemistry*, Volume 35, pp. 5-26.

Blakeney, B. A. et al., 2020. Branched Short-Chain Fatty Acid Isovaleric Acid Causes Colonic Smooth Muscle Relaxation via cAMP/PKA Pathway. *Digestive Diseases and Sciences*, 64(5), pp. 1171-1181.

Bravi, F. et al., 2016. Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition* , pp. 646-662.

- Briana, D. D. et al., 2020. Early Human-Milk Metabolome in Cases of Intrauterine Growth-Restricted and Macrosomic Infants. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, pp. 1-9.
- Casavale, K. O. et al., 2019. NIH workshop on human milk composition: summary and visions. *American Journal of Clinical Nutrition*, pp. 769-779.
- Cloarec, O. et al., 2005. Evaluation of the Orthogonal Projection on Latent Structure Model Limitations Caused by Chemical Shift Variability and Improved Visualization of Biomarker Changes in ¹H NMR Spectroscopic Metabonomic Studies. *Analytical Chemistry*, Volume 77, pp. 517-526.
- Combet, E. et al., 2011. Dietary flavonols contribute to false-positive elevation of homovanillic acid, a marker of catecholamine-secreting tumors. *Clinica Chimica Acta*, pp. 165-169.
- Darragh, A. & Lönnerdal, B., 2011. Human Milk. *Elsevier Ltd.*, pp. 582-590.
- De Luca, A. et al., 2016. Higher concentrations of branched-chain amino acids in breast milk of obese mothers. *Nutrition*, Volume 32, pp. 1295-1298.
- De Vries, J. Y. et al., 2018. Maternal Circulating Vitamin Status and Colostrum Vitamin Composition in Healthy Lactating Women—A Systematic Approach. *Nutrients*, pp. 1-29.
- Demmelair, H. & Koletzko, B., 2016. Variation of Metabolite and Hormone Contents in Human Milk. *Clinics in Perinatology*, 44(1), pp. 151-164.
- Demmelair, H. & Koletzko, B., 2016. Variation of Metabolite and Hormone Contents in Human Milk. *Clinics in Perinatology*, pp. 1-14.
- Dessi, A. et al., 2018. Metabolomics of Breast Milk: The Importance of Phenotypes. *Metabolites*, 8(79), pp. 1-10.
- Dessi, A. et al., 2014. Investigation of the ¹H-NMR based urine metabolomic profiles of IUGR, LGA and AGA newborns on the first day of life. *Matern Fetal & Neonatal Medicine*, Volume 27, pp. 13-19.
- Dimer, N. W., Schuck, P. F., Streck, E. L. & Ferreira, G. C., 2015. D-glyceric aciduria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Volume 87, pp. 1409-1414.

- Dinicola, S. et al., 2017. Nutritional and Acquired Deficiencies in Inositol Bioavailability. Correlations with Metabolic Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, Volume 18, pp. 1-18.
- Dragsted, L. O., 2010. Biomarkers of meat intake and the application of nutrigenomics. *Meat Science*, Volume 84, pp. 301-307.
- Edison, E. E., Brosnan, M. E., Aziz, K. & Brosnan, J. T., 2013. Creatine and guanidinoacetate content of human milk and infant formulas: implications for creatine deficiency syndromes and amino acid metabolism. *British Journal of Nutrition*, p. 1075–1078.
- Emery, P., 2013. Amino acids: Metabolism. In: *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition)*. s.l.:Academic Press, pp. 72-78.
- Emwas, A.-H. M., Salek, R. M., Griffin, J. L. & Merzaban, J., 2013. NMR-based metabolomics in human disease diagnosis: applications, limitations, and recommendations. *Metabolomics*, pp. 1048-1072.
- Emwas, A. et al., 2018. Recommended strategies for spectral processing and post-processing of 1D ¹H-NMR data of biofluids with a particular focus on urine. *Metabolomics*, pp. 1-23.
- Floris, L., Stahl, B., Abrahamse-Berkeveld, M. & Teller, I., 2020. Human milk fatty acid profile across lactational stages after term and preterm delivery: A pooled data analysis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, pp. 1-10.
- Fotakis, C. et al., 2016. Investigating the Metabolic Fingerprint of Term Infants with Normal and Increased Fetal Growth. *RSC Advances*, Issue 83, pp. 1-11.
- Fredholm, B. B., 2011. *Methylxanthines*. s.l.:Springer.
- Gay, M. C. L. et al., 2018. Worldwide Variation in Human Milk Metabolome: Indicators of Breast Physiology and Maternal Lifestyle?. *Nutrients*, Issue 10, pp. 1-12.
- Gibbons, H. et al., 2017. Metabolomic based identification of clusters that reflect dietary patterns. *Molecular Nutrition & Food Research*, pp. 1-30.

- Godhia, M. L. & Patel, N., 2013. Colostrum - Its Composition, Benefits As A Nutraceutical : A Review. *Current Research in Nutrition and Food Science*, pp. 37-47.
- Gómez-Gallego, C. et al., 2018. Human Breast Milk NMR Metabolomic Profile across Specific Geographical Locations and Its Association with the Milk Microbiota. *Nutrients*, pp. 1-20.
- Goran, M. I. et al., 2017. Fructose in Breast Milk Is Positively Associated with Infant Body Composition at 6 Months of Age. *Nutrients*, Volume 9, pp. 1-11.
- Gorissen, S. H. & Phillips, S. M., 2019. Branched-Chain Amino Acids (Leucine, Isoleucine, and Valine) and Skeletal Muscle. In: *Nutrition and Skeletal Muscle*. s.l.:Academic Press, pp. 263-278.
- Guo, M., 2014. Chemical composition of human milk 1st Edition. In: *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. s.l.:Woodhead Publishing, pp. 19-32.
- Habe, H., Fukuoka, T., Kitamoto, D. & Sakaki, K., 2009. Biotechnological production of D-glyceric acid and its application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 84, pp. 445-452.
- Hendricks, G. M. & Guo, M., 2014. Bioactive components in human milk. In: *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. s.l.:Woodhead Publishing, pp. 33-54.
- HMDB, 2021. [Online]
Available at: <https://hmdb.ca/>
[Accessed 21 05 2021].
- Kavkova, E. I., Blöchl, C. & Tenhaken, R., 2018. The Myo-inositol pathway does not contribute to ascorbic acid synthesis. *Plant Biology*, pp. 95-102.
- Kosmidis, A. K. et al., 2013. Metabolomic fingerprinting: challenges and opportunities. *Critical reviews in biomedical engineering*, 41(3), pp. 205-221.
- Lawrence, R. A. & Lawrence, R. M., 2016. Biochemistry of Human Milk. In: *Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession, 8th edition*. s.l.:Elsevier.

- Lindqvist, H. M. et al., 2019. Serum metabolite profiles of habitual diet: evaluation by ¹H-nuclear magnetic resonance analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 110, pp. 53-62.
- Lubbe, A., Ali, K., Verpoorte, R. & Hae Choi, Y., 2013. NMR-Based Metabolomics Analysis. In: *Metabolomics in Practice: Successful Strategies to Generate and Analyze Metabolic Data*. 1st edition ed. s.l.:Wiley-VCH, pp. 209-238.
- Lubetzky, R., Sever, O., Mimouni, F. B. & Mandel, D., 2015. Human Milk Macronutrients Content: Effect of Advanced Maternal Age. *Breastfeeding Medicine*, 10(9), pp. 433-436.
- Luo, Z., Yu, S., Zeng, W. & Zhou, J., 2021. Comparative analysis of the chemical and biochemical synthesis of keto acids. *Biotechnology Advances*, Volume 47, pp. 1-29.
- Macias, S. et al., 2019. Application of ¹H-NMR Metabolomics for the Discovery of Blood Plasma Biomarkers of a Mediterranean Diet. *Metabolites*, 9(10), pp. 1-14.
- Madruga de Oliveira, A. & Rondó de Carvalho, P. H., 2004. Concentrations of Ascorbic Acid in the Plasma of Pregnant Smokers and Nonsmokers and their Newborns. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 74(3), pp. 193-198.
- Marincola, F. C. et al., 2015. Clinical impact of human breast milk metabolomics. *Clinica Chimica Acta*, Issue 451, pp. 103-106.
- Morrissey, P. A. & Hill, T. R., 2011. Vitamin C. *Vitamins*, pp. 667-674.
- Nagata, C. et al., 2015. Dietary Intakes of Glutamic Acid and Glycine Are Associated with Stroke Mortality in Japanese Adults. *American Society for Nutrition*, pp. 720-728.
- Nelson, L. D. & Cox, M. M., 2004. Amino Acid Oxidation and the Production of Urea. In: *Lehninger Principles of Biochemistry fourth Edition*. s.l.:W. H. Freeman, pp. 656-689.
- Pinto, et al., 2016. Newborn Urinary Metabolic Signatures of Prematurity and Other Disorders: A Case Control Study. *Journal of Proteome Research*, 15(1), pp. 311-325.
- Praticò, G. et al., 2014. Exploring human breast milk composition by NMR- based metabolomics. *Natural Product Research*, 28(2), pp. 95-101.
- Rasmussen, L. G. et al., 2012. Assessment of the Effect of High or Low Protein Diet on the Human Urine Metabolome as Measured by NMR. *Nutrients*, Volume 4, pp. 112-131.

- Rebholz, C. M. et al., 2018. Serum untargeted metabolomic profile of the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) dietary pattern. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 108, pp. 243-255.
- Sala-Vila, A. et al., 2005. Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): Changes during lactation. *Nutrition*, p. 467–473.
- Sanchez, J. M., 2017. Methylxanthine Content in Commonly Consumed Foods in Spain and Determination of Its Intake during Consumption. *Foods*, 6(109), pp. 1-13.
- Sinanoglou, V. J. et al., 2017. Factors affecting human colostrum fatty acid profile: A case study. *PLOS ONE*, 12(4), pp. 1-14.
- Sinanoglou, V. J. et al., 2017. Factors affecting human colostrum fatty acid profile: A case study. *PLOS ONE*, pp. 1-14.
- Smilowitz, J. T. et al., 2013. The Human Milk Metabolome Reveals Diverse Oligosaccharide Profiles. *American Society for Nutrition*, pp. 1709-1718.
- Sri Harsha, P. S. C. et al., 2018. Biomarkers of legume intake in human intervention and observational studies: a systematic review. *Genes & Nutrition*, pp. 1-16.
- Sucher, S. et al., 2017. Comparison of the effects of diets high in animal or plant protein on metabolic and cardiovascular markers in type 2 diabetes: A randomized clinical trial. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, Volume 19, pp. 944-952.
- Sundekilde, U. K. et al., 2016. The Effect of Gestational and Lactational Age on the Human Milk Metabolome. *Nutrients*, pp. 1-15.
- Takeda, K. & Takemasa, T., 2018. An Overview of Ornithine, Arginine, and Citrulline in Exercise and Sports Nutrition. In: *Nutrition and Enhanced Sports Performance*. s.l.:Academic Press, pp. 627-636.
- Tapiero, H., Mathé, G., Couvreur, P. & Tew, K., 2002. Glutamine and glutamate. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 56, pp. 446-457.
- Tasevska, N., 2015. Urinary Sugars—A Biomarker of Total Sugars Intake. *Nutrients*, Volume 7, pp. 5815-5833.

- Ten-Doménech, I. et al., 2020. Current Practice in Untargeted Human Milk Metabolomics. *Metabolites*, 10(2), pp. 1-17.
- Triba, M. N. et al., 2015. PLS/OPLS models in metabolomics: the impact of permutation of dataset rows on the K-fold cross-validation quality parameters. *The Royal Society of Chemistry*, Volume 11, pp. 13-19.
- Vignoli, A. et al., 2019. High-Throughput Metabolomics by 1D NMR. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(4), pp. 968-994.
- Walsh, M. C. et al., 2007. Influence of acute phytochemical intake on human urinary metabolomic profiles. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 86, pp. 1687-1693.
- Wu, J. et al., 2016. NMR-based metabolite profiling of human milk: A pilot study of methods for investigating compositional changes during lactation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, pp. 626-632.
- Wu, X. et al., 2018. Human Milk Nutrient Composition in the United States: Current Knowledge, Challenges, and Research Needs. *Current Developments in Nutrition*, pp. 1-18.
- Zhang, A. et al., 2012 a. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*, 137(2), pp. 293-300.
- Zhang, A. et al., 2012 b. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *Journal of Proteomics*, 75(4), pp. 1079-1088.
- Zhang, L., 2014. Variations in the chemical composition of human milk. In: *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology 1st Edition*. s.l.:Woodhead Publishing, pp. 55-111.
- Zhang, Z. et al., 2013. Amino Acid Profiles in Term and Preterm Human Milk through Lactation: A Systematic Review. *Nutrients*, pp. 4800-4821.