



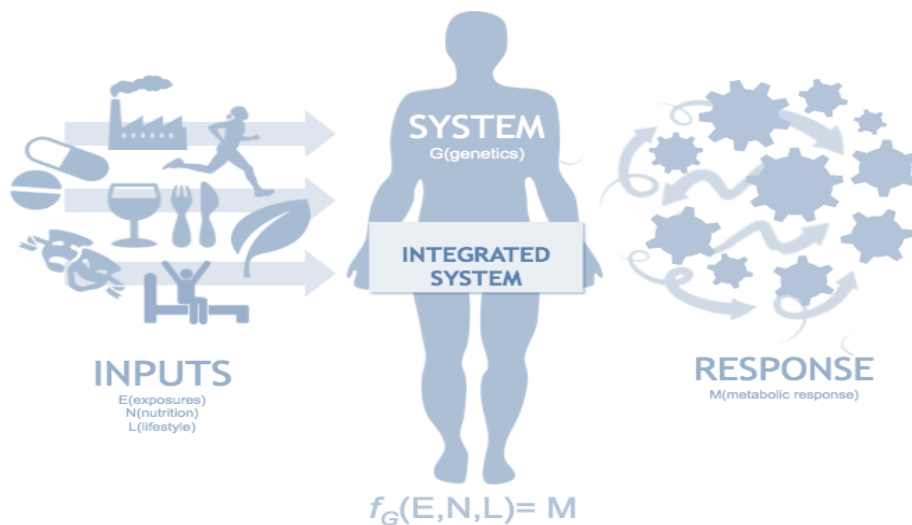
ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΕΑΕΚ
«ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

Η ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΣΤΟΝ ΑΘΛΗΤΙΣΜΟ



ΝΙΑΝΙΑΡΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2012

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Η Μεταβολομική προσέγγιση στη διατροφή και στον αθλητισμό

ΝΙΑΝΙΑΡΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ

A.M.: 1007-11

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ ΜΙΚΡΟΣ

Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ. ΜΙΚΡΟΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ,

Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α. Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

Δρ. ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ Α. ΜΙΧΑΗΛ,

Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α. Τμήμα Χημείας, Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας

Δρ. ΦΩΣΚΟΛΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ,

Καθηγητής Ε.Κ.Π.Α. Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 20/12/2012

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω

τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Μικρό Εμμανουήλ για την ανάθεση αυτού του ιδιαίτερα ενδιαφέροντος θέματος καθώς και για την συνεχή καθοδήγηση του και την βοήθεια που μου παρείχε σε όλη την πορεία της έρευνας αυτής,

τον Καθηγητή Βιοχημείας της Άσκησης κ. Βασίλειο Μούγιο για την παροχή των δειγμάτων και των αντίστοιχων πληροφοριών που σχετίζονταν με αυτά,

τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Κουμπάρη Μιχαήλ και τον Καθηγητή κ. Φώσκολο Γεώργιο για τις αξιοσημείωτες παρατηρήσεις τους,

το Δρ κ. Κωστίδη Σαράντο για την λήψη των φασμάτων NMR, για την εκπαίδευση που μου προσέφερε σε όλα τα επίπεδα της εργασίας αυτής καθώς και για την υπομονή που έδειξε απαντώντας σε όλα τα ερωτήματα μου,

τον Λέκτορα του Imperial College του Λονδίνου κ. Toby Athersuch για τις χρήσιμες συμβουλές του στην στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αυτής της εργασίας,

τον Λέκτορα κ. Ευάγγελο Γκίκα για τις επισημάνσεις του πάνω σε στατιστικά θέματα που αφορούσαν την εργασία αυτή και την παροχή κάποιων στατιστικών προγραμμάτων,

τον κ. Γιάννη Μούμουζα για την παροχή σημαντικής βοήθειας πάνω στο στατιστικό μέρος της εργασίας αυτής καθώς και για την πολύ καλή συνεργασία του και προθυμία του να βοηθήσει και να απαντήσει στις απορίες μου,

όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για όλα τα επίπεδα εκπαίδευσης και για το ευχάριστο περιβάλλον που δημιουργήθηκε,

την οικογένεια μου και τους κοντινούς μου ανθρώπους για την συνεχή συμπαράσταση, την υποστήριξη σε όλα τα επίπεδα και την κατανόηση που μου έδειξαν όλο αυτό τον καιρό.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

[1] ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
[1 ^A] ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ.....	10
[2] ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ.....	13
[2 ^A] Ο ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (NMR) ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ.....	14
[2 ^B] ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ.....	19
[3] ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗΣ.....	21
[3 ^A] ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	22
[3 ^B] ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ.....	27
[3 ^{B.1}] ΜΕΤΑΒΟΝ(Λ)ΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΟΥΡΩΝ ΜΕ NMR.....	31
[3 ^{B.2}] ΜΕΤΑΒΟΝ(Λ)ΟΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ ΜΕ GC-TOF/MS ΚΑΙ NMR.....	37
[3 ^Γ] ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ – NUTRIMETABONOMICS.....	43
[3 ^{Γ.1}] ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΔΙΑΤΡΟΦΟ-ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ.....	47
[3 ^{Γ.2}] ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΕΣ ΜΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ.....	48
[3 ^{Γ.3}] ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΕΣ ΟΛΙΣΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ.....	50
[3 ^{Γ.4}] ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΔΙΑΤΡΟΦΟΛΟΓΙΚΗ ΈΡΕΥΝΑ.....	57
[4] ΣΚΟΠΟΣ.....	60
[5] ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	61
[5 ^A] ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	62
[5 ^B] ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ.....	63
[5 ^Γ] ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	66
[5 ^{Γ.1}] ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΟ MATLAB.....	66
[6] ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	73
[6 ^A] ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PCA).....	75
[6 ^B] ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ - ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (PLS-DA) ...	80
[6 ^Γ] ORTHOGONAL PARTIAL LEAST SQUARES DISCRIMINANT ANALYSIS (OPLS-DA).....	81
[7] ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	81
[7 ^A] ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ.....	82
[7 ^B] ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ.....	90
[7 ^{B.1}] ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΩΝ ΑΘΛΗΤΩΝ/ΤΡΙΩΝ.....	91
ΜΕΛΕΤΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΦΥΛΟ.....	92
[7 ^{B.2}] ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΑΘΛΗΤΡΙΩΝ.....	95

[7 ^{B.3}] ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΑΡΡΕΝΩΝ ΑΘΛΗΤΩΝ	97
ΜΕΛΕΤΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΛΗΨΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ/ΦΑΡΜΑΚΩΝ	97
ΜΕΛΕΤΗ / ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΑΡΡΕΝΩΝ ΑΘΛΗΤΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΜΕ ΕΚΕΙΝΟΥΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ/ΦΑΡΜΑΚΑ.....	98
ΜΕΛΕΤΗ /ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΠΡΟΦΙΛ ΑΘΛΗΤΩΝ ΑΝΑ ΟΜΑΔΕΣ.....	100
ΜΕΛΕΤΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ.....	109
ΜΕΛΕΤΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΠΡΟΠΟΝΗΤΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ	111
ΜΕΛΕΤΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΠΡΟΠΟΝΗΣΗ ΓΙΑ ΠΑΡΑΟΛΥΜΠΙΑΚΟΥΣ ΑΓΩΝΕΣ	113
ΜΕΛΕΤΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΑΦΕΨΗΜΑΤΟΣ ΤΣΑΓΙΟΥ	116
[7 ^{B.4}] ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΚΑΘΕ ΑΡΡΕΝΑ ΑΘΛΗΤΗ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΑΡΡΕΝΩΝ ΑΘΛΗΤΩΝ	123
[7 ^{B.5}] ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ /ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΩΝ (INTERVAL) ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΘΛΗΤΕΣ/ΤΡΙΕΣ.....	132
ΠΟΡΕΙΑ ΚΡΕΑΤΙΝΗΣ ΣΕ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΘΛΗΤΕΣ/ΤΡΙΕΣ.....	132
ΠΟΡΕΙΑ ΒΑΛΙΝΗΣ ΣΕ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΘΛΗΤΕΣ/ΤΡΙΕΣ.....	134
[8]ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	139
[9]ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	153
[10]ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	159

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ταυτόχρονος και κατανοητός καθορισμός των μεταβολικών επιπέδων σε ολόκληρο τον οργανισμό και οι αλλαγές των επιπέδων αυτών στο χρόνο ως αποτέλεσμα απόκρισης σε διάφορα ερεθίσματα όπως η διατροφή, ο τρόπος ζωής, το περιβάλλον, οι γενετικές επιδράσεις και φαρμακευτικές παρεμβάσεις συμπεριλαμβάνονται στον ορισμό της μεταβολομικής. Για τους πολύπλοκους οργανισμούς, όπως ο άνθρωπος, απαιτείται η ανάλυση βιολογικών υγρών και ιστών ενώ τα πολύπλοκα σύνολα δεδομένων συνήθως κατανοούνται με την χρήση χημειομετρικών τεχνικών. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν τεχνικές πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) σε 250 δείγματα ούρων προερχόμενα από επαγγελματίες αθλητές/τριες άρσης βαρών με αναπηρία. Με τη χρήση 2D πειραμάτων NMR και με προσεκτική μελέτη του συνόλου των φασμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια διαδικτυακών και βιβλιογραφικών βάσεων δεδομένων η ταυτοποίηση 57 μεταβολιτών. Τα φάσματα που ελήφθησαν επεξεργάστηκαν με τα κατάλληλα εργαλεία, όπως το MATLAB, ώστε να μπορέσουν στη συνέχεια να υποστούν στατιστική επεξεργασία με πολυπαραμετρική ανάλυση. Ύστερα από εφαρμογή μη επιβλεπόμενων μεθόδων όπως η PCA, αλλά και επιβλεπόμενων, όπως η PLS-DA, δημιουργήθηκαν τα μεταβολικά προφίλ των αθλητών με βάση το φύλο, την λήψη συμπληρωμάτων/φαρμάκων, το κάπνισμα, την προπονητική τους ηλικία, την προπόνηση τους για συμμετοχή σε Παραολυμπιακούς αγώνες και την πρόσληψη αφεψήματος τσαγιού για να εξαχθούν συμπεράσματα σε σχέση με τη διαφοροποίηση τους. Επιπλέον, συγκρίθηκαν τα μεταβολικά προφίλ κάθε αθλητή χωριστά σε σχέση με το σύνολο ώστε να βρεθούν οι παράγοντες που τους διαφοροποιούν και τέλος δημιουργήθηκαν διαγράμματα της πορείας των μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο της δειγματοληψίας για κάθε αθλητή ως συμπληρωματικές πληροφορίες στην εξαγωγή συμπερασμάτων. Παρατηρήθηκαν πολλοί μεταβολίτες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τους ανωτέρω διαχωρισμούς και υπάρχουν φυσιολογικά στα ούρα αλλά λόγω μεγάλης ανομοιογένειας του δείγματος των αθλητών και της επίδρασης πολλών παραμέτρων η συνεισφορά του καθενός στους διαχωρισμούς είναι πολυπαραγοντική. Σε μη

στοχευμένες μελέτες όπου συμμετέχουν άνθρωποι υπάρχει έντονο το φαινόμενο της διακύμανσης και η ελαχιστοποίηση αυτής γίνεται με τη σταθεροποίηση κάποιων παραγόντων εξ'αρχής όπως για παράδειγμα η εφαρμογή συγκεκριμένης διατροφής ή η αποφυγή έντονης δραστηριότητας. Εν τέλει, η χρήση της φασματοσκοπίας NMR, αποδεικνύεται ιδανική αφού δίνει την δυνατότητα καταγραφής πλήθους πληροφοριών για τον μεταβολότυπο ενός οργανισμού, οι οποίες ενδεχομένως να βοηθήσουν στην διάγνωση-θεραπεία παθολογικών καταστάσεων ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί συμπληρωματικά και με άλλες μεθόδους.

SUMMARY

The simultaneous and comprehensive determination of metabolite levels in whole organisms and their changes over time as a consequence of stimuli such as diet, lifestyle, environment, genetic effects and pharmaceutical interventions are all included in the term of metabonomics. For mammalian systems, like humans, this involves the analysis of biofluids and tissues, and the complex datasets are usually interpreted using chemometric techniques. In the present study NMR techniques were applied in 250 urine samples taken from professional weightlifting handicapped athletes. 57 metabolites were successfully assigned with the use of 2D NMR spectroscopy and the appropriate internet and bibliographic data bases. The whole set of spectra was processed with the appropriate tools, such as MATLAB, in order to perform statistical analysis. In the resulting dataset unsupervised methods (PCA) and supervised (PLS-DA) were applied and this led to the creation of the metabolic profiles of each athlete based on gender, supplement / drug uptake, smoking, exercise seniority, training for participation in Paraolympic Games and tea uptake in order to draw conclusions according to their differentiation. Moreover, the metabolic profiles of each athlete were compared individually and in relation to their total number in order to find the factors that differentiate them. Also, charts of the progress of metabolites in relation to the time of sampling were created for each athlete to gain supplementary information. Many metabolites that are normally present in urine were observed to be responsible for the above classifications but due to large heterogeneity of the athletes sample and the influence of many parameters, the contribution of each metabolite in the classifications is multifactorial. In non targeted studies with humans there is variability that causes problems and it can be minimized with the stabilization of certain factors from the beginning of the study such as standardized diet, avoiding any vigorous activity and excluding smokers. Ultimately, the use of NMR spectroscopy, proved ideal for the collection of information related to the metabotype of a biological system/organism, and this may help in the diagnosis/treatment of pathological states and can be used as a supplementary tool to other methods.

[1] ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο «ΚΟΣΜΟΣ» ΤΩΝ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ «-OMICS» ΣΤΗΝ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

Η αποκωδικοποίηση του ανθρώπινου γονιδιώματος οδήγησε την Βιολογία Συστημάτων σε μια νέα εποχή, αυτή των μελετών -omics. Αυτό μεταμόρφωσε την Κυτταρική Βιολογία των Πανεπιστημιακών Ιδρυμάτων και των Βιομηχανιών από μία «οικοτεχνία», όπου ένα γονίδιο ή πρωτεΐνη ήταν υπό διερεύνηση τη φορά, σε ένα κόσμο όπου ολόκληρα οργανίδια και «μονοπάτια» μελετώνται ταυτοχρόνως. Ο όρος -omics σχετίζεται με την μελέτη βιολογικών συστημάτων. Μια ποικιλία προσεγγίσεων -omics έχει ξεκινήσει να αναδύεται, κάθε μία από αυτές με τη δική της αναλυτική οργανολογία, τεχνικές, αντιδραστήρια και λογισμικό.

Η τεχνολογία των -omics, η οποία έχει καθοδηγήσει αυτούς τους νέους ερευνητικούς τομείς, αποτελείται από έναν μεγάλο αριθμό αναλυτικών οργάνων που επιτρέπουν αναλύσεις υψηλής αποτελεσματικότητας όπως η φασματομετρία μάζας και ο μαγνητικός πυρηνικός συντονισμός. Παρομοίως, ο τομέας της βιοπληροφορικής έχει εξελιχθεί παράλληλα ενώ με τη βοήθεια του διαδικτύου, είναι πλέον εφικτή η ταχύτατη ανάλυση δεδομένων και η ανταλλαγή πληροφοριών. Οι μελέτες -omics αναμένεται ότι θα επιδράσουν σημαντικά στην κατανόηση των βιολογικών διαδικασιών καθώς επίσης θα γίνει σύντομα πραγματικότητα η προοπτική της ακριβέστερης διάγνωσης και της θεραπείας ασθενειών. [16]

Όλες αυτές οι προσεγγίσεις -omics, όπως για παράδειγμα, η γενομική (genomics), η πρωτεομική (proteomics) και η μεταβονομική (metabonomics) παρέχουν συμπληρωματικές πληροφορίες σχετικά με φυσιολογικές λειτουργίες και παθολογικές καταστάσεις. **(ΕΙΚΟΝΑ 1)** Επίσης χρησιμοποιούν τα ίδια εργαλεία βιοπληροφορικής και χημειομετρίας που είναι απαραίτητα για την βελτίωση της ανάκτησης των

δεδομένων.[40] Η μεταβονομική γενικότερα αποτελεί τον συνδετικό κρίκο μεταξύ όλων αυτών των μελετών –omics αφού είναι μία συστηματική προσέγγιση για την in vivo μελέτη των μεταβολικών αλλαγών. Οι μεταβολικές αλλαγές είναι πραγματικά «τελικά σημεία» (endpoints) ενώ, για παράδειγμα, οι αλλαγές της γενετικής έκφρασης δεν είναι. Έτσι η μεταβονομική υπόσχεται ευρεία εφαρμογή σε πολλούς τομείς έρευνας όπως π.χ.στην παροχή πληροφοριών σχετικά με την τοξικότητα φαρμάκων, σε διάφορες καταστάσεις ασθένειας και σε πεδία έρευνας και ανάπτυξης.[41]

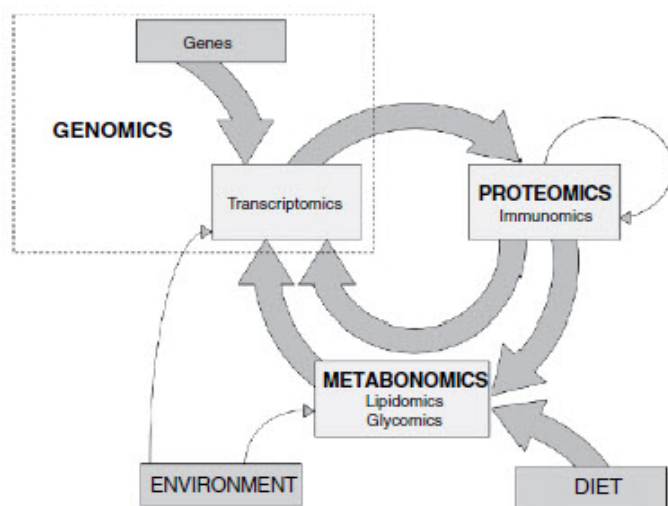
[1^A] ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ

Μια νεοσύστατη ορολογία, που πρωτοεισήχθηκε από μία ομάδα επιστημόνων με τωρινή έδρα τους το Imperial College του Λονδίνου και επικεφαλής τον Jeremy K. Nicholson, είναι αυτή της μεταβονομικής. [2,8] Παρά το ότι οι πρώτες μελέτες στο πεδίο αυτό χρονολογούνται από το 1980, μόλις τα τελευταία χρόνια ο τομέας της μεταβονομικής παρουσίασε τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον και ξεκίνησε να διευρύνεται και να αποκτά την αναγνωρισιμότητα ενός «εργαλείου» υψηλής σημασίας. Αν και αρχαιότερη χρονολογικά, η μεταβονομική έχει συγκαταλεχθεί ανάμεσα στις νεότερες μεθόδους -omics, οι οποίες έχουν παρουσιάσει μια τεχνολογική «επανάσταση» στον τομέα των βιολογικών επιστημών, όπως είναι αυτές της γενομικής (genomics), πρωτεομικής (proteomics) και μεταγραφομικής (transcriptomics) [1,2,8]

Η μεταβονομική χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει «την ποσοτική μέτρηση της δυναμικής πολυπαραμετρικής μεταβολικής απόκρισης ενός κυττάρου ή οργανισμού σε παθοφυσιολογικά ερεθίσματα ή γενετικές τροποποιήσεις».[1,7] Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την εξέταση των αλλαγών σε εκατοντάδες ή χιλιάδες μεταβολίτες σε έναν άθικτο ιστό ή βιολογικό υγρό.[4] Στην προσπάθεια διεξαγωγής τέτοιων μελετών σε πολύπλοκα, πολυκυτταρικά συστήματα υπάρχουν διάφορα προβλήματα που σχετίζονται

με την δειγματοληψία. Στις μεταβολομικές μελέτες, βιολογικά υγρά όπως τα ούρα και το αίμα θεωρούνται «εύκολα» δείγματα προς ανάλυση, αφού παρέχουν μια πλήρη εικόνα της μεταβολικής κατάστασης ενός οργανισμού. Το σημαντικό πλεονέκτημα είναι ότι μπορούν να αποκτηθούν ελάχιστα ή μη-επεμβατικά σε αντίθεση με τις βιοψίες.[5] Επιπλέον, υπάρχει ποικιλία βιολογικών υγρών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείγματα στις μελέτες αυτές, όπως εγκεφαλονωτιαία, χολικά, στομαχικά, πνευμονικά ή και ακόμα εκχυλίσματα από καλλιέργειες κυττάρων και ιστών [2,7] Κάποιες άλλες, ανεκμετάλλευτες μέχρι στιγμής, πηγές για μη επεμβατική μεταβολική παρακολούθηση περιλαμβάνουν την αναπνοή και πιθανόν το σίελο.[5]

Οι μελέτες αυτές είναι ιδιαίτερα επιτυχείς διότι πολλοί εξωγενείς παράγοντες (ασθένειες, φάρμακα, τοξίνες, διατροφή, περιβάλλον) όπως και ενδογενείς (π.χ. φυσιολογία, ανάπτυξη) είναι δυνατόν να προκαλέσουν διαταραχές στις συγκεντρώσεις ενδογενών μεταβολιτών, οι οποίοι συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές μεταβολικές οδούς. Τα κύτταρα, αντίστοιχα, αποκρίνονται σε αυτές τις αλλαγές ρυθμίζοντας το εξωκυτταρικό τους περιβάλλον για να διατηρήσουν την ομοιόσταση. [7]



ΕΙΚΟΝΑ 1. Απεικόνιση της σχέσης μεταξύ γονιδιωματικής, πρωτεομικής και μεταβολομικής, οι οποίες αντανακλούν τους γενετικούς και περιβαλλοντικούς καθοριστικούς παράγοντες της φυσιολογίας [2].

Ακόμα και όταν έχει επιτευχθεί αυτή η κυτταρική ομοιόσταση, μικρές αποκρίσεις σε τοξικότητα ή ασθένεια εκφράζονται με την τροποποίηση της συγκέντρωσης των βιολογικών υγρών και κατά συνέπεια την τροποποίηση των επιπέδων των μεταβολιτών. Οι μεταβολικές αυτές ρυθμίσεις είναι χαρακτηριστικές της φύσης του παράγοντα που προκάλεσε την μεταβολή (π.χ. τοξική προσβολή ή ασθένεια) και μπορούν να χαρακτηριστούν ως το «δακτυλικό αποτύπωμα » των βιοχημικών διαταραχών.[7] Το αποτύπωμα αυτό είναι σαν μία «εικόνα» της μεταβολικής κατάστασης ή αλλιώς ο «μεταβολότυπος» του οργανισμού, καθιστώντας δυνατή τη σύγκριση του μεταβολικού προφίλ του ίδιου του οργανισμού σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ή αλλιώς την σύγκριση αυτού σε διαφορετικούς οργανισμούς.[1]

Ο όρος της μεταβονομικής πολύ συχνά παραλληλίζεται με αυτόν της μεταβολομικής. Η μεταβολομική έχει πολλές ομοιότητες με την μεταβονομική, αλλά θεωρείται ως υποσύνολο των θεμάτων που καλύπτονται από την δεύτερη. Η διάκριση που συνήθως γίνεται μεταξύ των δύο αυτών προσεγγίσεων έχει χαρακτήρα περισσότερο φιλοσοφικής φύσεως παρά τεχνικής. Η μεταβολομική αρχικά βασίστηκε στην μεταβολική αναλογία του γονιδιώματος και πρωτεώματος, το «metabolome», το οποίο ορίστηκε ως το μεταβολικό συμπλήρωμα ενός κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, η μεταβολομική αναζητά μια αναλυτική περιγραφή πολύπλοκων βιολογικών δειγμάτων και στοχεύει στον χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση όλων των μικρών μορίων σε ένα τέτοιο δείγμα.[4] Γενικότερα, η μεταβονομική μπορεί να θεωρηθεί ως μια πιο πλήρης προσέγγιση ενός βιολογικού συστήματος. Έτσι, ως «ολιστική» προσέγγιση, στοχεύει στην ανίχνευση κυτταρικών μεταβολιτών, ποσοτικοποιεί και ταξινομεί τις χρονικές μεταβολικές διεργασίες ενός ολοκληρωμένου βιολογικού συστήματος και τελικά συσχετίζει τέτοιες διαδικασίες με τη φυσιολογική ή παθοφυσιολογική κατάσταση ενός κυττάρου ή οργανισμού.[1] Εστιάζει δηλαδή, στην κατανόηση συστημικών μεταβολών συναρτήσει του χρόνου (δυναμικών) σε πολύπλοκα πολυκυτταρικά συστήματα.[4]

Ένας από τους παράγοντες που συνεισέφεραν στην ανάδειξη του τομέα της μεταβολομικής ήταν και η εξέλιξη των αναλυτικών τεχνικών. Οι κυριότερες αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται στις μελέτες μεταβολομικής βασίζονται στην φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και στην φασματομετρία μάζας (MS). Το NMR ξεκίνησε ως αναλυτική τεχνική το 1940 και μέχρι το 1980, στο ξεκίνημα των μεταβολομικών μελετών, και αποτελούσε μια από τις τεχνικές για τον προσδιορισμό της μεταβολικής σύνθεσης βιολογικών υγρών, κυττάρων και ιστών καθώς και για τον χειρισμό και την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων. [1,7] Χρησιμοποιείται κατεξοχήν στις μελέτες μεταβολομικής καθώς είναι μία μη καταστροφική τεχνική, αφού τα βιολογικά δείγματα διατηρούνται ανέπαφα, και είναι εγγενώς πιο πλούσιο σε πληροφορίες έναντι άλλων τεχνικών. [9]

Η τεχνική της μάζας (MS) απαιτεί διαχωρισμό από πριν των μεταβολικών συστατικών χρησιμοποιώντας είτε αέρια χρωματογραφία (GC – gas chromatography) ύστερα από χημική παραγωγοποίηση, είτε υγρή χρωματογραφία (LC – liquid chromatography) ή την νεότερη μέθοδο υπερυψηλής υγρής χρωματογραφίας (UPLC - ultra-highpressure LC). Μπορεί επίσης να συζευχθεί και με άλλες τεχνικές όπως τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE – capillary electrophoresis), φασματοσκοπία υπεριώδους με μετασχηματισμό Fourier (FTIR – Fourier transform infra-red) κ.α. [2,9] Τόσο η MS όσο και το NMR απαιτούν περαιτέρω εξέλιξη, ειδικότερα στον τομέα της υψηλής αποτελεσματικότητας και των μεθόδων επεξεργασίας δεδομένων, για την βελτιστοποίηση της χρήσης τους σε μεταβολικές μελέτες.[9]

Ωστόσο, αυτό που κυριολεκτικά έδωσε την μεγαλύτερη ώθηση στην μεταβολομική ήταν η συνειδητοποίηση ότι η εφαρμογή χημειομετρικών μεθόδων θα μπορούσε να βοηθήσει στην «μετάφραση» των πολύπλοκων δεδομένων που προέκυπταν από τις μελέτες αυτές.[4] Όλες οι μεταβολομικές μελέτες καταλήγουν σε πολύπλοκα πολυπαραμετρικά

δεδομένα που απαιτούν λογισμικά οπτικοποίησης και χημειομετρικές – βιοϋπολογιστικές μεθόδους για να κατανοηθούν. [2]

Έτσι, με την βοήθεια τόσο των αναλυτικών τεχνικών, κυρίως του NMR, όσο και των στατιστικών μεθόδων, η μεταβολομική έχει αναδειχθεί σε έναν πολύπλευρο και πολλά υποσχόμενο τομέα. Ένα μεγάλο βήμα είναι ότι έχει αρχίσει να εισχωρεί σε πολλούς επιστημονικούς κλάδους όπως αυτών της Βιολογίας, Ιατρικής, Φαρμακευτικής, του Περιβάλλοντος και πολλών άλλων, καθώς επίσης και σε βιομηχανικούς τομείς. [5] Ο γενικότερος σκοπός όλων αυτών των διαδικασιών είναι να παραχθούν βιοχημικά αποτελέσματα που να έχουν διαγνωστική αξία κα θεραπευτική αποτελεσματικότητα προς όφελος τόσο της επιστημονικής έρευνας όσο και του ίδιου του ανθρώπου.

[2] METABONOMΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ

[2^A] Ο ΠΥΡΗΝΙΚΟΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ (NMR) ΣΤΗ METABONOMΙΚΗ

Οι αναλύσεις βιολογικών υγρών μπορούν να δώσουν γενικά μια πολύ καλή εικόνα της βιοχημικής κατάστασης ενός ζωντανού οργανισμού, αφού η σύσταση κάθε βιολογικού υγρού εξαρτάται και, κατά συνέπεια, αλλάζει ανάλογα με τη λειτουργία των κυττάρων. Επομένως, η σύσταση αυτή κάθε βιολογικού υγρού συμπεριλαμβάνει βιοχημικές πληροφορίες για πολλές δυσλειτουργίες οργάνων. Οι δυσλειτουργίες αυτές μπορεί να έχουν προκύψει είτε από ευεργετικές ή ανεπιθύμητες επιδράσεις φαρμάκων είτε από κάποια ασθένεια. Οι διατροφικές και ημερήσιες διακυμάνσεις είναι ένας ακόμα παράγοντας που δύναται να επηρεάσει την σύσταση γενικά των βιολογικών υγρών. [3]

Για τις μεταβολομικές μελέτες, η φασματοσκοπία του NMR παρέχει μία γρήγορη, μη-καταστρεπτική, υψηλής αποτελεσματικότητας μέθοδο με το εξαιρετικό πλεονέκτημα της

ελάχιστης προετοιμασίας δείγματος. Η πλειονότητα των μελετών εφαρμόζουν πειράματα απλού πρωτονίου ^1H NMR καθώς οι περισσότεροι μεταβολίτες διαθέτουν άτομα υδρογόνου. [6]

Η υψηλή αποτελεσματικότητα του NMR διευκολύνει ιδιαίτερως την δημιουργία μεταβολικών «αποτυπωμάτων». Τα δείγματα γενικά δεν απαιτούν ιδιαίτερη προετοιμασία όπως σε άλλες τεχνικές. Συνήθως αναμιγνύονται όπως είναι με διάλυμα πρότυπης ουσίας σε ποσότητες μικρόλιτρων (μl) ενώ η εισαγωγή τους στο όργανο είναι επίσης αρκετά απλή. Σε αυτοματοποιημένα όργανα αυτό μπορεί να γίνει χωρίς ανθρώπινη παρέμβαση, ενώ εκατοντάδες αναλύσεις μπορούν να διεξαχθούν την ημέρα.[6]

Το NMR μειονεκτεί στο θέμα της ευαισθησίας σε σύγκριση με την φασματομετρία μάζας MS, η οποία είναι εγγενώς πιο ευαίσθητη. Στο NMR, η ευαισθησία εξαρτάται από τη φυσική αφθονία του ατόμου που μελετάται (^1H , ^{31}P , ^{19}F 100%, ^{13}C 1.10%; ^{15}N 0.37%), αλλά μεγαλύτερη ευαισθησία μπορεί να επιτευχθεί με μεγαλύτερους χρόνους ανάλυσης, εφαρμογή μεγαλύτερων μαγνητικών πεδίων και την χρήση κρυογενικών ανιχνευτών (cryogenic probes).[6]

Γενικότερα, η φασματοσκοπία ^1H NMR εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα,όσον αφορά τη μέτρηση των επιπέδων των μεταβολιτών (ΠΙΝΑΚΑΣ 1) και τα πιο αξιοσημείωτα συνοψίζονται παρακάτω: [5]

- Γρήγορη και απλή προετοιμασία δειγμάτων
- Αυτοματοποιημένες αναλύσεις
- Δυνατή η παρατήρηση όλων των μεταβολιτών που βρίσκονται σε αφθονία και που δεν περιέχουν ευκίνητα υδρογόνα
- Πιθανές ποσοτικές μεταβολικές μετρήσεις με υψηλή αναπαραγωγιμότητα

- Υψηλή αποτελεσματικότητα
- Επαναληψιμότητα και ανθεκτικότητα
- Διεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα



ΕΙΚΟΝΑ 2. Αυτοματοποιημένο όργανο NMR

Μια πρόκληση στις NMR μελέτες είναι ο σαφής προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών. Αν και το μονοδιάστατο NMR έχει θέσει τα θεμέλια των μεταβολομικών μελέτων μέχρι σήμερα, η προσέγγιση αυτή αντιμετωπίζει το συνεχές πρόβλημα αλληλοεπικάλυψης των φασματικών κορυφών. Αυτό ελαττώνει την ικανότητα αναγνώρισης και ποσοτικοποίησης των μεταβολιτών και περισσότερο εκείνων που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αλλά παρόλα αυτά, τη λύση σε αυτό το πρόβλημα την δίνουν τα δισδιάστατα πειράματα 2D NMR. [5]

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Τα δυνατά σημεία και οι αδυναμίες του μαγνητικού πυρηνικού συντονισμού και της φασματομετρίας μάζας στην δημιουργία μεταβολικών προφίλ. [12]

	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR)	Φασματομετρία Μάζας (MS)
Όρια ανίχνευσης	Χαμηλά - microμοριακά σε τυπικές παρατηρούμενες συχνότητες (600MHz), αλλά και nano-μοριακά με τη χρήση cryoprobes.	Pico-μοριακά με συνηθισμένες τεχνικές,πολύ χαμηλότερα με ειδικές τεχνικές
Καθολικότητα της ανίχνευσης μεταβολιτών	Αν ο μεταβολίτης περιέχει υδρογόνα θα ανιχνευτεί,με την προϋπόθεση ότι η συγκέντρωση είναι επαρκής ή η σύνδεση πρωτεϊνών δεν προκαλεί διεύρυνση κορυφών	Συνήθως απαιτείται μια πιο στοχευμένη προσέγγιση.Παρουσιάζονται προβλήματα με φτωχό χρωματογραφικό διαχωρισμό,με την απώλεια μεταβολιτών σε μικρούς όγκους, με φαινόμενα επίδρασης μήτρας (ion suppression effects),με έλλειψη ιονισμού,ενώ η ικανότητα ανίχνευσης ιόντων +ve και -ve δίνει επιπλέον πληροφορίες.
Χειρισμός δειγμάτων	Όλο το δείγμα αναλύεται με μία μέτρηση	Διαφορετικό πακετάρισμα LC στηλών και συνθηκών για διαφορετικές κατηγορίες μεταβολιτών.Συνήθως τα δείγματα πρέπει να εκχυλιστούν σε κατάλληλο διαλύτη.Τα δείγματα πρέπει να κλασματοποιηθούν (aliquots) ενώ πρόσφατες μελέτες δεν απαιτούν την χρήση χρωματογραφίας
Ποσότητα χρησιμοποιούμενου δείγματος	Τυπικά 200-400 μL ,αλλά και μικρότερα 5-10 μL με microcoil probes	Χαμηλό εύρος μL
Ανάκτηση δείγματος	Μη-καταστροφική τεχνική	Η τεχνική είναι καταστροφική αλλά για μικρή ποσότητα δείγματος
Αναλυτική αναπαραγωγικότητα	Υψηλή	Ικανοποιητική
Βήματα πριν την προκατεργασία του δείγματος	Ελάχιστη,προσθήκη ρυθμιστικού διαλ/τος D_2O και προτύπων χημικής μετατόπισης	Είναι πολύ σημαντική, συνήθως χρειάζεται διαφορετικές στήλες LC και καταβύθιση πρωτεϊνών

Ευκολία μοριακής ταυτοποίησης	Υψηλή, από βάσεις δεδομένων και από ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων από τον ίδιο τον χρήστη	Δύσκολη, συνήθως μόνο το μοριακό ιόν είναι διαθέσιμο. Απαραίτητη η χρήση επιπλέον πειραμάτων συζευγμένης MS.
Χρόνος συλλογής βασικών δεδομένων	5 min για $1D^1H$ NMR	10 min για UPLC-MS
Ποσοτικοποίηση	1-5%	5% εντός ημέρας και μεταξύ ημερών (interday-intraday)
Ανθεκτικότητα οργάνων	Υψηλή	Χαμηλή
Πληροφορίες μοριακής δυναμικής	Ναι, από T1 και T2 χρόνους αποδιέγερσης και μετρήσεις συντελεστών διάχυσης	Όχι
Ανάλυση δειγμάτων ιστών	Ναι, με MAS NMR	Όχι
Διαθεσιμότητα βάσεων δεδομένων	Αυξανόμενες, πολλές είναι ελεύθερες προς χρήση στο διαδίκτυο	Κατανοητές βάσεις δεδομένων για EI (electron ionization) - MS

[2^B] ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗ

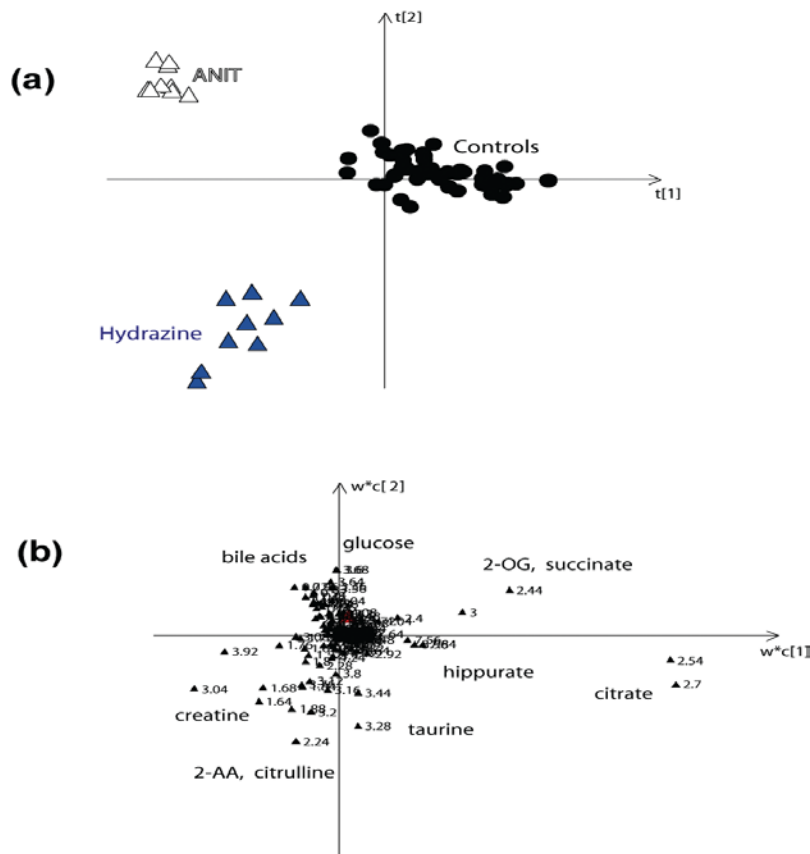
Η χημειομετρία είναι ένας καθιερωμένος κλάδος στην ανάλυση δεδομένων και έχει αποδειχθεί πολύτιμη ειδικά στις μελέτες –omics. Χρησιμοποιείται γενικότερα για να περιγράψει τη χρήση των μεθόδων αναγνώρισης προτύπων (**Pattern Recognition, PR**) και σχετικών πολυμεταβλητών στατιστικών προσεγγίσεων σε χημικά αριθμητικά δεδομένα.[7] Τα δεδομένα των μελετών αυτών είναι πολύπλοκα και πολυπαραμετρικά οπότε είναι αναγκαία η χρησιμοποίηση λογισμικών με στόχο την οπτικοποίηση των δεδομένων αυτών αλλά και χημειομετρικών και βιοπολογιστικών μεθόδων για την καλύτερη κατανόηση τους και την δημιουργία βιοχημικών αποτυπωμάτων διαγνωστικής αξίας. Ένα ακόμα σημαντικό στάδιο είναι να αναγνωριστούν οι ουσίες που προκαλούν την διάγνωση ή την κατηγοριοποίηση, καθώς αυτές είναι ο συνδυασμός των βιοδεικτών που καθορίζουν την βιολογική ή την κλινική κατάσταση.[13]

Ο στόχος της μεταβονομικής είναι αρχικά η κατηγοριοποίηση ενός δείγματος βασισμένη στην διάκριση των φασματικών δεδομένων και στην συνέχεια η αναγνώριση εκείνων των μεταβολικών χαρακτηριστικών που είναι υπεύθυνα για την κατηγοριοποίηση. Η προσέγγιση αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγωγή των διαστάσεων πολύπλοκων συνόλων δεδομένων ώστε να διευκολυνθεί η απεικόνιση οποιασδήποτε ομαδοποίησης των διαφόρων δειγμάτων.[13,12]

Οι PR μέθοδοι μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες, τις επιβλεπόμενες και τις μη επιβλεπόμενες. Οι μη επιβλεπόμενες τεχνικές εφαρμόζονται για να τεκμηριώσουν αν υπάρχει εγγενής ομαδοποίηση σε ένα σύνολο δεδομένων και αποτελούνται από μεθόδους που απεικονίζουν δείγματα. Αυτό γίνεται συνήθως με αναγωγή των διαστάσεων, σύμφωνα με τις ιδιότητες τους, χωρίς να υπάρχει γνώση από πριν της κλάσης των δειγμάτων. Παραδείγματα μη επιβλεπόμενων μεθόδων περιλαμβάνουν την Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA) και τις μεθόδους κατά συστάδες όπως είναι η ιεραρχική ανάλυση συστάδων (Hierarchical Cluster Analysis, HCA). [7]

Οι επιβλεπόμενες μέθοδοι ανάλυσης χρησιμοποιούν την κλάση των πληροφοριών που δίνονται για μια ομάδα εκμάθησης (training set) ενός δείγματος δεδομένων για την βελτιστοποίηση του διαχωρισμού μεταξύ δύο ή περισσότερων κλάσεων δειγμάτων. Αυτές οι τεχνικές περιλαμβάνουν τις μεθόδους Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS), τα νευρωνικά δίκτυα, την SIMCA (soft independent modelling of class analogy), την μέθοδο των k-κοντινότερων γειτόνων (k-nearest neighbour). Τα νευρωνικά δίκτυα είναι μη γραμμικές μέθοδοι απεικόνισης δεδομένων όπου μια ομάδα εκμάθησης (training set) χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη αλγορίθμων που «μαθαίνουν» τη δομή των δεδομένων και μπορούν να χειριστούν πολύπλοκες συναρτήσεις. Πολλοί τύποι νευρωνικών δικτύων έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την πρόβλεψη τοξικότητας ή ασθένειας από φασματικά δεδομένα. Οι επιβλεπόμενες μέθοδοι απαιτούν ένα δεύτερο ανεξάρτητο σύνολο δεδομένων για να εξετάσουν ή να ελέγξουν όποιες προβλέψεις κλάσεως γίνουν στην ομάδα εκμάθησης. **(ΕΙΚΟΝΑ 3)** [7]

Μια απλή μη επιβλεπόμενη τεχνική που χρησιμοποιείται συνήθως στην μεταβολομική είναι η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA). Ο κύριος πίνακας δεδομένων μετατρέπεται σε κύριες συνιστώσες με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο άλλων πινάκων, τον πίνακα τιμών (scores plot) και των πίνακα φορτίων (loadings plot), για την εξαγωγή των συμπερασμάτων. [12,13]



ΕΙΚΟΝΑ 3. Scores και loadings plots από δείγματα ούρων ποντικών μιας μελέτης επίδρασης τοξινών. Είναι διακριτές οι ομαδοποιήσεις των δειγμάτων(α) αλλά και οι μεταβολίτες (β) που επηρεάζουν τα δείγματα.[7]

Ο πίνακας τιμών (scores) είναι ο γραμμικός συνδυασμός των αρχικών μεταβλητών και σε ένα διάγραμμα τιμών κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα ξεχωριστό φάσμα δείγματος, έτσι ώστε οποιαδήποτε ομαδοποίηση να μπορεί να οπτικοποιηθεί. Οι πίνακες φορτίων (loadings) ορίζουν τον τρόπο με τον οποίο οι παλιές μεταβλητές είναι γραμμικά συνδυασμένες για να σχηματίσουν τις νέες μεταβλητές ενώ το διάγραμμα φορτίων χρησιμοποιείται για να αναγνωριστούν οι φασματικές τιμές οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ομαδοποίηση των δειγμάτων. [13]

Καθώς οι αναλυτικές τεχνολογίες και οι χημειομετρικές μέθοδοι συνεχίζουν να εξελίσσονται, είναι σχεδόν σίγουρο ότι θα παρέχουν εξαιρετική συνεισφορά σε πολλούς ερευνητικούς τομείς καθώς και στην διάγνωση ασθενειών στο προσεχές μέλλον. [7]

[3] ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΕΤΑΒΟΝΟΜΙΚΗΣ

[3^A] ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Η μεταβολομική έχει εξελιχθεί πάρα πολύ σαν ερευνητικό πεδίο τα τελευταία χρόνια και αυτό οφείλεται κατά ένα μεγάλο μέρος και στην εξέλιξη των αναλυτικών τεχνικών και συγκεκριμένα της NMR φασματοσκοπίας. Η χρήση κρυογενικών συνδέσμων (NMR probes) και μαγνητικών πεδίων αυξημένης ισχύος έχει βελτιώσει σε μεγάλο βαθμό την ευαισθησία των οργάνων αυτών, ενώ ο συνδυασμός τους με την χημειομετρία αποτελεί μία συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική για την απόκτηση αξιόπιστων αποτελεσμάτων. Για τους λόγους αυτούς η μεταβολομική έχει αρχίσει να εφαρμόζεται σε πολλά και διαφορετικά πεδία όπως για παράδειγμα σε αυτό της διάγνωσης ασθενειών, της τοξικολογίας, της φαρμακευτικής, κλινικής και περιβαλλοντικής έρευνας. [22]

Μεταβολομικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους. Πειραματόζωα έχουν χρησιμοποιηθεί για τον χαρακτηρισμό της διακύμανσης του φυσιολογικού μεταβολικού προφίλ, η οποία προκαλείται από ένα πλήθος κληρονομικών ή εξωτερικών παραγόντων. Οι διακυμάνσεις των μεταβολικών προφίλ μπορούν να βοηθήσουν στο να εξηγηθεί η τοξικότητα μεταξύ διαφορετικών ειδών ζώων αλλά και μεταξύ ζώων του ίδιου είδους εντός μιας μελέτης. Χάρη στην μεταβολομική βασισμένη στον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό NMR αλλά και στην φασματοσκοπία μάζας MS μπορούν να διακριθούν πολλές επιδράσεις παραγόντων στον μεταβολισμό. Ορισμένες από αυτές τις επιδράσεις συμπεριλαμβάνουν διαφορές μεταξύ αρσενικών/θηλυκών,

μοντέλα ζώων άγριου τύπου και γενετικά τροποποιημένων, αλλαγές που σχετίζονται με την ηλικία, την επιδράση του κύκλου οίστρου στα θηλυκά ζώα, διαφορές που σχετίζονται με τη διατροφή, τις ημερήσιες επιδράσεις, και τις διαφορές μεταξύ ειδών ζώων.[2,12] Ακόμα, έχει διερευνηθεί και η σημασία της συμβιωτικής σχέσης μεταξύ θηλαστικών και της εντερικής μικροχλωρίδας τους και έχει μελετηθεί εκτενώς χρησιμοποιώντας αξενικά ζώα, αποικίες ζώων, προβιοτικά καθώς και παρασιτικές επιμολύνσεις σε ζώα.[12]

Στην κλινική έρευνα έχουν χρησιμοποιηθεί σε αντίστοιχες μελέτες πλήθος ανθρώπινων βιολογικών υγρών όπως ούρων και αίματος. Στην περίπτωση μεταβολικών προφίλ από ούρα υγιών ανθρώπων έχει παρατηρηθεί ενδο-ατομική και δια-ατομική διακύμανση που οφείλεται σε διατροφολογικές επιδράσεις, σε επιδράσεις του τρόπου ζωής καθώς και σε ημερήσιες διακυμάνσεις. [19] Ακόμα, έχουν πραγματοποιηθεί επιδημιολογικές μελέτες για την δημιουργία μεταβολικών προφίλ από δείγματα ούρων σε μεγάλα τμήματα ανθρώπινων πληθυσμών διαφορετικής εθνικότητας .Σε αυτές τις μελέτες διερευνήθηκε παράλληλα η αναπαραγωγιμότητα του NMR ως αναλυτικής τεχνικής καθώς επίσης παρατηρήθηκαν διαφορές στα μεταβολικά προφίλ και ανιχνεύθηκαν βιοδείκτες. Οι βιοδείκτες ήταν αυτοί οι οποίοι προκαλούσαν το διαχωρισμό του κάθε πληθυσμού από τους υπόλοιπους και πιθανώς να σχετίζονται με παράγοντες διατροφολογικούς, γενετικούς καθώς και με την εντερική μικροχλωρίδα.[20,21]

Η φασματοσκοπία ^1H NMR έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της σύστασης βιολογικών υγρών πριν και μετά τη χορήγηση ενός μεγάλου εύρους τοξινών. Σε συνδυασμό με τις μεθόδους αναγνώρισης προτύπων (Pattern Recognition, PR) είναι εφικτό να μετρηθεί ικανοποιητικά η προκαλούμενη από την τοξίνη απόκλιση από το φυσιολογικό μεταβολικό προφίλ. Επιπλέον, έχουν δημιουργηθεί στατιστικά μοντέλα πρόβλεψης για το χειρισμό της δημιουργίας τοξικολογικών προφίλ σε τρία επίπεδα. Το πρώτο και πιο βασικό επίπεδο είναι αυτό της διάκρισης ενός δείγματος σε φυσιολογικό ή

μη. Το δεύτερο στάδιο συμπεριλαμβάνει την προσαρμογή των μη φυσιολογικών δειγμάτων σε γνωστές ομάδες/κλάσεις ιστών ή μηχανισμών ειδικής τοξικότητας. Αυτό έχει ως στόχο την πρόβλεψη της τοξικότητας καινοτόμων φαρμακολογικών ενώσεων. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει την αναγνώριση των φασματικών περιοχών που είναι υπεύθυνες για την απόκλιση από το φυσιολογικό προφίλ και τον καθορισμό των βιοδεικτών τοξικότητας σε αυτές τις περιοχές, οι οποίες μπορούν να βοηθήσουν στην απεικόνιση του μηχανισμού αυτής. [3]

Η χορήγηση μιας τοξίνης δεν προκαλεί γενικά μία μόνο μεταβολική απόκριση αλλά μια σειρά μεταβολικών επιδράσεων στον χρόνο, οι οποίες μπορεί ή όχι να επιστρέψουν στην προηγούμενη κατάσταση ομοιόστασης, εξαρτώμενη από την σοβαρότητα της προσβολής. Από τη στιγμή που η απόκριση σε μια τοξική προσβολή είναι δυναμική, το προφίλ των βιολογικών υγρών είναι σε μια διαρκή κατάσταση ρευστότητας- και ο χρόνος της μεταβολικής απόκρισης είναι επίσης χαρακτηριστικός για συγκεκριμένες τοξίνες. [3]

Πολλές τοξίνες μπορούν να αξιολογηθούν από την μεταβολομική αυτή προσέγγιση, κάθε μία από τις οποίες προκαλεί μια διακριτή σειρά από μεταβολικές διαταράξεις που είναι χαρακτηριστικές του τύπου του κατεστραμμένου ιστού και/ή του μηχανισμού της τοξικότητας. Το όργανο-στόχος της τοξικότητας μπορεί να ταυτοποιηθεί με τη χρησιμοποίηση βιολογικών υγρών όπως είναι τα ούρα, το πλάσμα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Μέχρι σήμερα, έχει μελετηθεί εκτενώς η τοξικότητα του ήπατος και των νεφρών με τη χρήση μεταβολομικών τεχνικών ενώ έχει αποδειχθεί επιτυχής και η εκτίμηση της καρδιακής, νευρολογικής και μιτοχονδριακής τοξικότητας.[3]

Όσον αφορά τον τομέα της φαρμακευτικής έρευνας και ανάπτυξης, ένας από τους πιο σημαντικούς στόχους είναι να ελαχιστοποιηθεί η εμφάνιση των ανεπιθύμητων επιδράσεων των φαρμάκων. Οι φαρμακευτικές βιομηχανίες έχουν εναγκαλισθεί την μεταβολομική επειδή αξιολογεί αυτές τις ανεπιθύμητες επιδράσεις υποψήφιων

φαρμάκων. Χάρη στην μεταβολομική μπορεί να κατηγοριοποιηθεί το όργανο στόχος ή η περιοχή τοξικότητας, ο βιοχημικός μηχανισμός της τοξίνης, η αναγνώριση συνδυασμού βιοδεικτών της τοξικής επίδρασης καθώς και η εκτίμηση της πορείας στον χρόνο της επίδρασης αυτής (π.χ το ξεκίνημα, η εξέλιξη και η επάνοδος της τοξικότητας).[12,23]

Εάν η εξατομικευμένη θεραπεία γίνει πραγματικότητα τότε οι θεραπείες με φάρμακα θα πρέπει να προσαρμοστούν επακριβώς στο κάθε άτομο ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη αποτελεσματικότητα και αποφυγή των ανεπιθύμητων επιδράσεων των φαρμάκων αυτών. Μια εναλλακτική προσέγγιση, για να κατανοηθεί η ενδοατομική διακύμανση στην απόκριση θεραπειών με φάρμακα, περιλαμβάνει την χρήση ενός συνδυασμού πολυπαραμετρικών τεχνικών για την δημιουργία μεταβολικών προφίλ καθώς και χημειομετρίας. Αυτή η προσέγγιση βασίζεται εξολοκλήρου στην ανάλυση και στην απεικόνιση του μεταβολικού προφίλ με στόχο την πρόβλεψη του μεταβολισμού και της τοξικότητας κάποιας χορηγούμενης δόσης μιας ουσίας.[12] Η παραπάνω προσέγγιση ορίζεται ως φαρμακομεταβολομική και είναι ευαίσθητη και σε γενετικές αλλά και σε περιβαλλοντικές επιδράσεις οι οποίες καθορίζουν το στοιχειώδες μεταβολικό αποτύπωμα ενός ατόμου, καθώς αυτές είναι που θα επηρεάσουν το αποτέλεσμα μιας χημικής παρέμβασης.

Η προσφορά της μεταβολομικής στην εκτίμηση της επίδρασης ξеноβιοτικής τοξικότητας έχει πρόσφατα διερευνηθεί από την κοινοπραξία COMET (Consortium of Metabonomics Toxicity). Η COMET δημιουργήθηκε από πέντε φαρμακευτικές εταιρίες και του Imperial College του Λονδίνου με στόχο να αναπτυχθούν μεθοδολογίες για να αποκτηθούν και να εκτιμηθούν τα μεταβολομικά δεδομένα που προκύπτουν από την χρήση της φασματοσκοπίας ^1H NMR σε ούρα και ορό αίματος ποντικών για προκλινικές τοξικολογικές μελέτες υποψήφιων φαρμάκων.[12,24]

Παράλληλα, νέες μεθολογίες έχουν αναπτυχθεί για να αναλυθούν και να κατηγοριοποιηθούν πολύπλοκα σύνολα δεδομένων. Μια πρωτοποριακή μέθοδος κατηγοριοποίησης είναι η CLOUDS (Classification Of Unknowns by Density Superimposition) με την οποία μπορεί να αναγνωρισθεί η τάξη της τοξικότητας. [12,25] Η COMET έδειξε ότι είναι δυνατόν να κατασκευαστούν μοντέλα τοξικότητας τόσο για πρόβλεψη όσο και για πληροφόρηση. Αυτό έγινε χρησιμοποιώντας μεταβολομικά δεδομένα βασισμένα στο NMR και απεικονίζοντας τη συνολική χρονική πορεία της τοξικότητας. Οι στόχοι της μελέτης αυτής, οι οποίοι αφορούν την δημιουργία κατανοητών μεταβολομικών βάσεων δεδομένων και επιτυχών, αναπαραγωγικών πολυπαραμετρικών στατιστικών μοντέλων για την πρόβλεψη της τοξικότητας, έχουν επιτευχθεί και τα συστήματα αυτά καθώς και οι βάσεις δεδομένων έχουν παραδοθεί στις εταιρίες-χορηγούς. [12,24]

Η δημιουργία μεταβολικών προφίλ με τη βοήθεια του NMR έχει χρησιμοποιηθεί εκτός από την πρόβλεψη τοξικότητας και για την διάγνωση πολλών ανθρώπινων ασθενειών, και πιο συγκεκριμένα για χρόνιες και εκφυλιστικές ασθένειες καθώς και ασθένειες που προκαλούνται από γενετικά αίτια. Μια πολλά υποσχόμενη χρήση της NMR φασματοσκοπίας σχετίζεται με την διάγνωση εγγενών μεταβολικών νοσημάτων σε ούρα και πλάσμα νεογνών. Η μεταβολομική έχει ακόμα χρησιμοποιηθεί για την διάγνωση ασθενειών όπως του καρκίνου, του διαβήτη, καρδιαγγειακών και νευρολογικών παθήσεων, της δυσανεξίας στη λακτόζη, της ουραιμίας και πολλών άλλων.[22] Επιπλέον, είναι δυνατή και η μελέτη ιστών με την χρήση της τεχνικής MAS (Magic Angle Spinning).[2,12,23]

Η μεταβολομική έχει εφαρμοσθεί και σε διατροφολογικές μελέτες, στην αθλητική ιατρική, στον αθλητισμό (όπως για παράδειγμα στο antidoping [29]) καθώς και σε μελέτες του τρόπου ζωής γενικότερα. Οι τελευταίες περιλαμβάνουν τις επιδράσεις παραγόντων όπως η διαίτα, η άσκηση και το άγχος στον μεταβολισμό καθώς και την

εκτίμηση των αποτελεσμάτων της αλληλεπίδρασης των παραγόντων αυτών μεταξύ φαρμάκων και μεταξύ φαρμάκων και δίαιτας. Πιο πρόσφατα έχει μελετηθεί και η δυνατότητα διάκρισης ατόμων με διαφορετικές διατροφικές προτιμήσεις από τα στοιχειώση μεταβολικά προφίλ ούρων και ορού αίματος.[12,3]

Οι εφαρμογές της μεταβονομικής προσέγγισης επεκτείνονται και σε πεδία εκτός των ανθρώπινων και άλλων θηλαστικών βιολογικών συστημάτων. Για παράδειγμα, μελέτες στον τομέα της περιβαλλοντικής ρύπανσης έχουν αναδείξει τα δυνητικά οφέλη αυτής της προσέγγισης σε μελέτες βιοχημικών αλλαγών σε έντομα ως αποτέλεσμα της ρύπανσης του εδάφους. Καθώς επίσης, έχουν γίνει και μελέτες τοξικότητας βαρέων μετάλλων σε τρωκτικά που ζουν σε μολυσμένες περιοχές οι οποίες έχουν δείξει παρόμοια αποτελέσματα. [3]

[3^B] METABONOMΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ ΤΗΣ ΑΣΚΗΣΗΣ

Σε όλα τα είδη αθλητισμού, ο στόχος της αθλητικής εκπαίδευσης είναι το σώμα να προσαρμοστεί σε ένα εντατικό ερέθισμα, να βελτιώσει την ικανότητα του οργανισμού να φέρει εις πέρας τον αυξημένο αυτό φόρτο «εργασίας» και κατά συνέπεια να αυξήσει έτσι την αθλητική του επίδοση. Θεωρητικά, σε μια επιτυχημένη αθλητική αγωγή πρέπει να υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ του όγκου της αθλητικής δραστηριότητας και επαρκών περιόδων ανάπαυσης. Εάν στην προπόνηση αθλητών υπάρχει υπερβολική άσκηση υψηλής έντασης και περιορισμένες περίοδοι ξεκούρασης τότε δημιουργείται μια ανισορροπία μεταξύ της συνολική έντασης-πόνου που αντιμετωπίζει ο αθλητής κατά τη διάρκεια της άσκησης και της αντοχής του οδηγώντας τον έτσι σε υπερπροσπάθεια ή υπερκόπωση. Οι δύο περιπτώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από μειωμένες επιδόσεις, επιταχυνόμενη κόπωση, στρες και παροδική φλεγμονή. Για τους λόγους αυτούς είναι

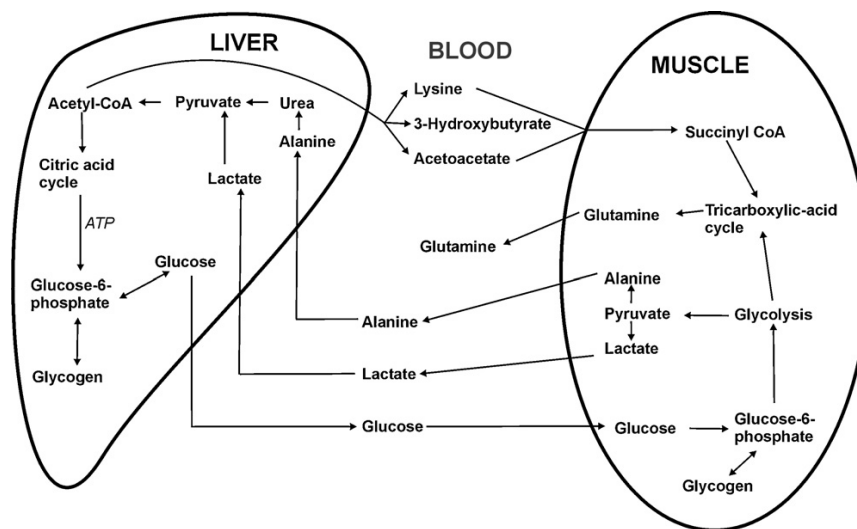
απαραίτητη η πλήρης αξιολόγηση της φυσικής κατάστασης και προσαρμογής ενός αθλητή στην προπόνηση ώστε να προσανατολιστεί κατάλληλα το πρόγραμμα προπόνησης του, προλαμβάνοντας με αυτόν τον τρόπο τις παραπάνω διαταραχές και βελτιώνοντας την απόδοση του. Αν και έχουν μελετηθεί πολλοί παράμετροι όπως βιοχημικοί, βιολογικοί, ορμονικοί και ανοσολογικοί δείκτες, που αφορούν την εκτίμηση της φυσικής κατάστασης αθλητών και την αξιολόγηση της υπερπροσπάθειας και υπερκόπωσης τους κατά τη διάρκεια ενός προγράμματος προπόνησης, δεν ήταν εφικτή η εξεύρεση μιας ευρείας μεθόδου για τη διάγνωση και παρακολούθηση αυτών.[27]

Η μεταβολομική προσφέρει ένα νέο αναλυτικό υπόβαθρο για την παρακολούθηση της φυσιολογικής κατάστασης των αθλητών και τη διάγνωση των διαταραχών που προκαλούνται από την άσκηση. Ωστόσο, μέχρι σήμερα η μεταβολομική αυτή προσέγγιση δεν έχει και τόσο μεγάλη εφαρμογή στην αθλητική ιατρική. Από τη στιγμή που η σωματική άσκηση μεταβάλλει τα ενεργειακά επίπεδα του οργανισμού, διεγείρει τον μεταβολισμό και προκαλεί την παραγωγή περισσότερων μεταβολικών προϊόντων, τα επίπεδα των ενδογενών μεταβολιτών θα αλλάξουν ανάλογα.[27]

Με την ποσοτική μέτρηση των μεταβολιτών, οι μεταβολομικές μελέτες έχουν την δυνατότητα να διακρίνουν την διακύμανση/μεταβολή του μεταβολικού προφίλ κάτω από διαφορετικά προγράμματα προπόνησης, δύναμης και έντασης. Επιπλέον μπορούν να κατηγοριοποιήσουν αθλητές με διαφορετικές επιδόσεις και να αναγνωρίσουν τους βιοδείκτες που σχετίζονται με την επίδοση, την κούραση και με διαταραχές που σχετίζονται με την άθληση γενικότερα.[27]

Το διάγραμμα της **EIKONΑΣ 4** συνοψίζει τις σημαντικότερες μεταβολικές αλλαγές που συνοδεύουν την άσκηση αντοχής. Μπορούν να προσδιοριστούν τρεις βασικές βιολογικές διεργασίες

:



ΕΙΚΟΝΑ 4: Απεικόνιση της παραγωγής και μεταφοράς ορισμένων σημαντικών μεταβολιτών στο ανθρώπινο πλάσμα, που παρατηρούνται με φασματοσκοπία ^1H NMR.[28]

- (1) Η γλυκόζη είναι η κύρια πηγή ενέργειας του μυϊκού ιστού ενώ το γλυκογόνο των μυών μετατρέπεται σε γλυκόζη και καταναλώνεται για την παραγωγή ενέργειας κατά τη διάρκεια της άσκησης. Με εκτεταμένη διάρκεια άσκησης η γλυκόζη μεταφέρεται από το ήπαρ στους μύες μέσω του αίματος για την παροχή πρόσθετης ενέργειας για τη μυϊκή συστολή. Σε αντίθεση, το γαλακτικό οξύ είναι ένα παραπροϊόν του αναερόβιου μεταβολισμού και η συγκέντρωσή του στο πλάσμα αυξάνεται μετά από άσκηση υψηλής έντασης. Το γαλακτικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την ενέργεια των σκελετικών μυών ή να μεταφερθεί στο ήπαρ όπου ανακυκλώνεται (κύκλος Cori-γαλακτικού οξέος).
- (2) Η εξαντλητική άσκηση προκαλεί κυκλοφορία κετονοσωμάτων στο αίμα ως μια προσωρινή και γρήγορη μορφή υποστρώματος των μυών
- (3) Η ανακύκλωση των πρωτεϊνών (σύνθεση σε αντιδιαστολή με αποσύνθεση) είναι μια συνεχής διαδικασία που αυξάνεται κατά τη διάρκεια / μετά από άσκηση και χαρακτηρίζεται από αλλαγές στο ποσοστό της παρουσίας/απουσίας των αμινοξέων στην κυκλοφορία του αίματος. Τα αμινοξέα αντιπροσωπεύουν σχετικά μικρό ποσοστό στη συνεισφορά ενέργειας για συστατική δραστηριότητα αλλά

δυναμικές αλλαγές στο μεταβολισμό των αμινοξέων μπορεί να αποτελέσουν σημαντικό σημείο για την κατανόηση της ρύθμισης της μεταβολικής προσαρμογής κατά τη διάρκεια της ανάρρωσης από σωματική άσκηση.[28]

Τα μεταβολομικά δεδομένα που σχετίζονται με τη σωματική άσκηση είναι πολύ πρόσφατα και προέρχονται είτε από ανθρώπους είτε από πειραματόζωα και έχουν επικεντρωθεί κυρίως σε ορό αίματος ή πλάσμα και λιγότερο σε ούρα. Η γενικότερη διερεύνηση των βιολογικών υγρών στον τομέα αυτό της άσκησης μπορεί να παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την κατανόηση της βιοχημείας της άθλησης. Στις μελέτες αυτές εξετάζονται οι επιπτώσεις της έντονης άσκησης προς απόκτηση αντοχής, της άσκησης για βελτίωση της δύναμης, της έντονης προπόνησης σε συνδυασμό με συγκεκριμένη διατροφή ή της κατανάλωσης διαφορετικών ενεργειακών ποτών ύστερα από άσκηση. Επίσης έχουν μελετηθεί τα αποτελέσματα της έντονης και χρόνιας άσκησης στο μεταβολισμό του ήπατος σε ποντίκια ενώ έχουν γίνει και έρευνες και στον ανθρώπινο μεταβολισμό σε ούρα . Πολύ πρόσφατα, μία μεταβολομική προσέγγιση εφαρμόστηκε στην εκτίμηση του οξειδωτικού στρες με εντατική άσκηση και διατροφική παρέμβαση εστιάζοντας στις πιθανές ευεργετικές επιδράσεις κατανάλωσης N-ακετυλοκυστεΐνης. Σε αυτές τις μελέτες, βιομόρια αναγνωρίζονται ως βασικοί βιοδείκτες συμπεριλαμβανομένων αμινοξέων, οργανικών οξέων και γλυκερόλης. Οι μεταβολομικές προσεγγίσεις έχουν εφαρμοστεί για τη διερεύνηση των επιπτώσεων της άσκησης σε παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένης της νόσου στεφανιαίας αρτηρίας, διαλείπουσας χωλότητας και διαβήτη. Οι αναλυτικές μέθοδοι που εφαρμόζονται σε αυτές τις έρευνες περιλαμβάνουν τις αναλυτικές τεχνικές GC-TOF-MS, CE-MS, LC-MS και NMR.[26]

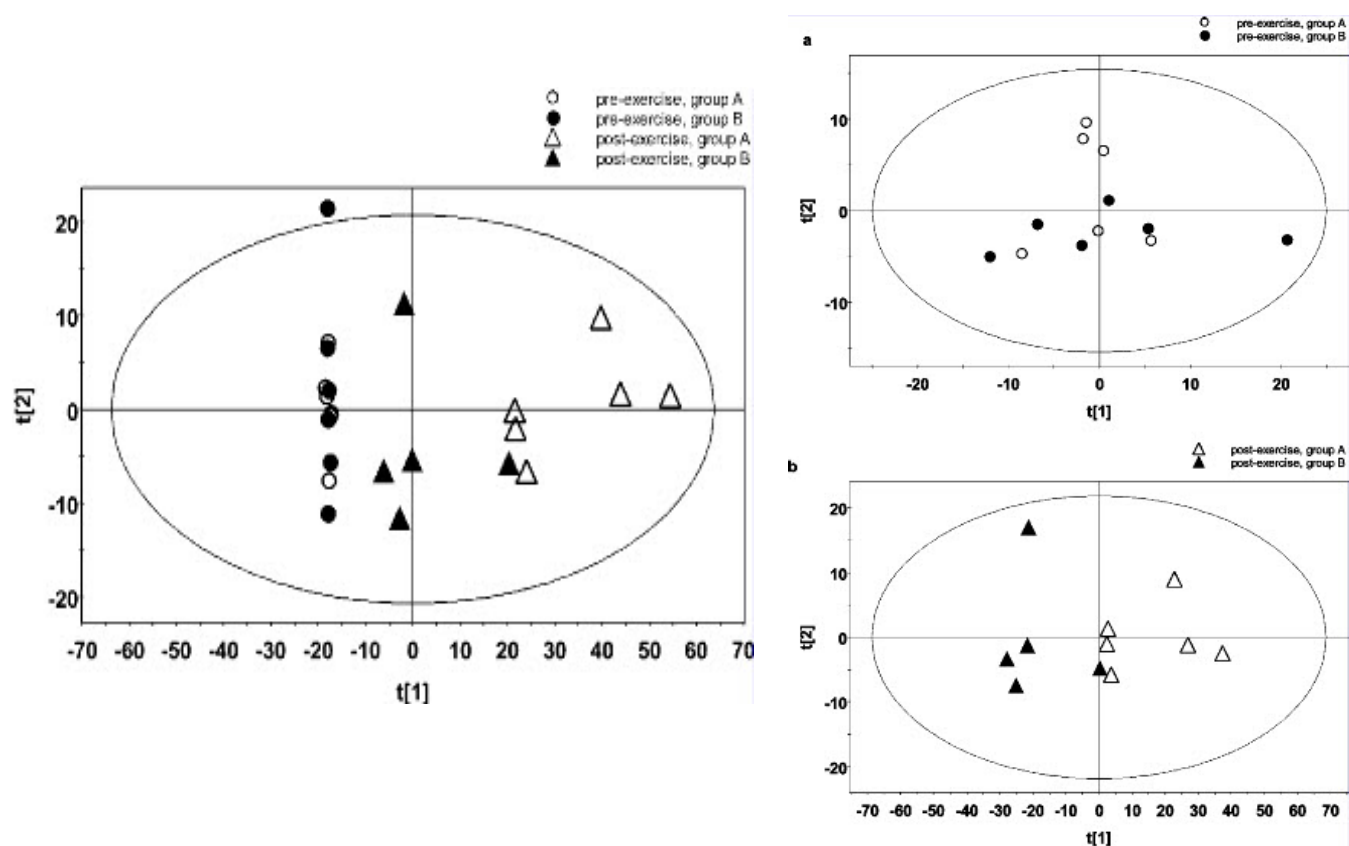
Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός μελετών που αφορούν γενικότερα τον τομέα της βιοχημείας της άσκησης και που το θέμα τους ξεφεύγει από τα όρια της παρούσας

μελέτης. Παρακάτω παρουσιάζονται οι πιο αντιπροσωπευτικές εφαρμογές στα πλαίσια της βιοχημείας της άσκησης και της NMR μεταβολομικής.

[3^{B.1}] Μεταβολ(λ)ομικές μελέτες σε δείγματα ούρων με NMR.

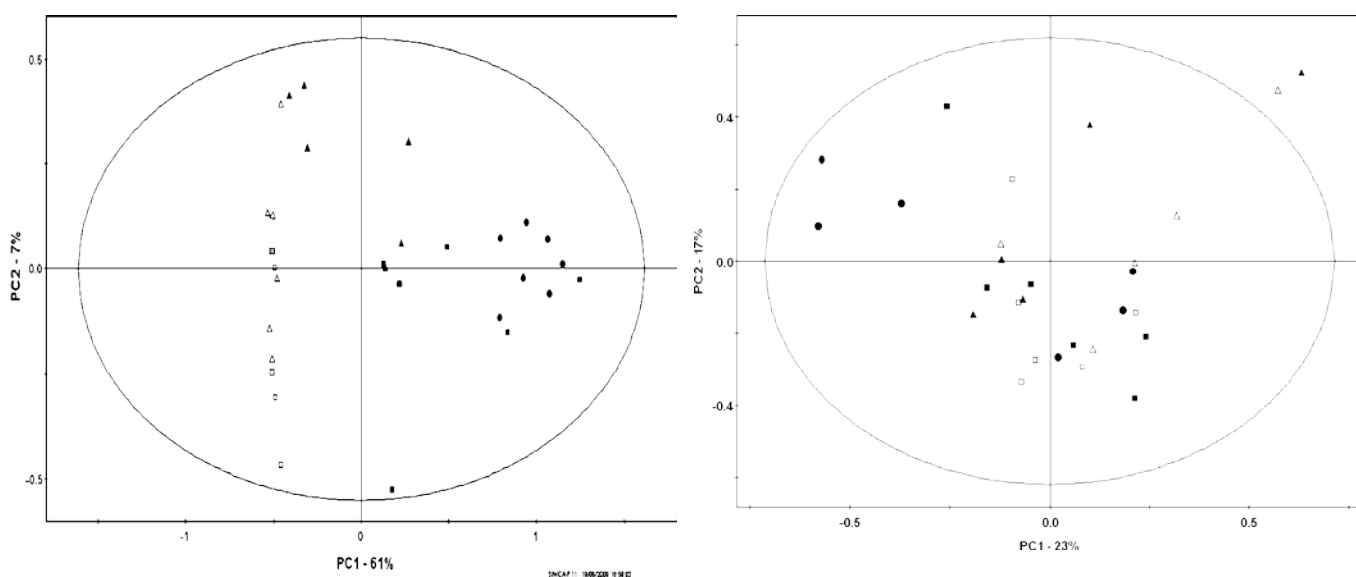
Στην ερευνητική εργασία του Pechlivanis et al.[26] παρουσιάστηκε μια NMR μεταβολομική μελέτη σε δείγματα ούρων αθλητών πριν και μετά από δύο σετ ασκήσεων τα οποία διέφεραν ως προς τη διάρκεια ξεκούρασης μεταξύ επανειλημμένων προσπαθειών. Οι αθλητές ακολούθησαν συγκεκριμένη διατροφή πριν τις ασκήσεις ώστε να υπάρξει έλεγχος στην επίδραση του παράγοντα αυτού για την μετέπειτα μελέτη. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι η άσκηση προκάλεσε δραματικές αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ των ούρων. Με την χρησιμοποίηση χημειομετρικών μεθόδων, **(ΕΙΚΟΝΑ 5)** φάνηκε ότι τα μεταβολικά προφίλ των αθλητών μετά την άσκηση ήταν πολύ διαφορετικά σε σχέση με τα προφίλ πριν την άσκηση και αυτό οφειλόταν κυρίως σε μεταβολίτες όπως το γαλακτικό οξύ, το πυρουβικό, την υποξανθίνη, ενώσεις του κύκλου του Krebs, αμινοξέα, προϊόντα του καταβολισμού των BCAA (Branched Chain Amino Acids), 2-υδροξυβουτυρικού και ιππουρικού. Οι περισσότεροι από αυτούς τους μεταβολίτες αυξήθηκαν στα ούρα με την άσκηση ενώ έχει παρατηρηθεί επίσης ότι αυξάνονται και στους μύες με την άσκηση. Υπήρξε επίσης και διαχωρισμός μεταξύ των χρονικών διαστημάτων ξεκούρασης που αποδόθηκε κυρίως στο γαλακτικό, πυρουβικό, αλανίνη, ενώσεις του κύκλου του Krebs, 2-οξοοξέα των BCAA (Branched Chain Amino Acids) και 2-υδροξυβουτυρικού. Όλοι αυτοί οι μεταβολίτες αυξήθηκαν περισσότερο στο μικρότερο χρονικό διάστημα ξεκούρασης σε σχέση με το μεγαλύτερο διάστημα, επιβεβαιώνοντας έτσι την υπόθεση ότι το μικρότερο χρονικό διάστημα προκάλεσε μεγαλύτερες μεταβολικές διαταραχές σαν αποτέλεσμα του μικρότερου χρόνου διαθέσιμου για ξεκούραση. Το γεγονός ότι μια τέτοια μεθοδολογία μπορεί να εφαρμοσθεί σε ούρα, ένα βιολογικό υλικό απευθείας και μη επεμβατικά διαθέσιμο, και

ότι τα ούρα αντανακλούν πολλές αλλαγές προκαλούμενες από την άσκηση που συμβαίνουν στους μύες, είναι ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα . [26]



ΕΙΚΟΝΑ 5 Scores plot ύστερα από PCA όλων των δειγμάτων ούρων των αθλητών. Φαίνεται ο διαχωρισμός των ομάδων A,B πριν και μετά την άσκηση (αριστερά). Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση της επίδρασης των διαστημάτων ξεκούρασης στο μεταβολικό προφίλ των ούρων (δεξιά). (a) PCA scores plot των δειγμάτων πριν την άσκηση δεν δείχνει διαχωρισμό των ομάδων A(10 s interval) και B (1 min interval), δείχνοντας ισοδυναμία στην ξεκούραση. (b) PCA scores plot των δειγμάτων μετά την άσκηση, παρουσιάζει ομαδοποίηση και δείχνει την διαφορετική επίδραση των δύο ειδών ασκήσεων. [26]

Ο C. Enea et al [30] απέδειξε ότι η έντονη φυσική άσκηση προκαλεί μεταβολή στο μεταβολικό προφίλ των ούρων σε ανθρώπους. Στόχος της μελέτης αυτής ήταν να διερευνήσει τις αλλαγές του μεταβολικού προφίλ ύστερα από έντονη άσκηση και να παρουσιάσει μία καθολική εικόνα της επίδρασης αυτής. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε γυναίκες οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (γυμνασμένων και μη) και εκτέλεσαν δύο ασκήσεις, μία μικρής διάρκειας και μία μεγάλης ενώ τα δείγματα ούρων συλλέχθηκαν 30 λεπτά πριν και μετά τις ασκήσεις, μετρήθηκαν με NMR φασματοσκοπία και αναλύθηκαν με χημειομετρικές μεθόδους. Οι μεταβολίτες που βρέθηκαν να είναι υπεύθυνοι για τις παρατηρούμενες διαφορές ήταν η κρεατινίνη, το γαλακτικό οξύ, το πυρουβικό, η αλανίνη, το β-υδροξυβουτυρικό, το οξικό οξύ και η



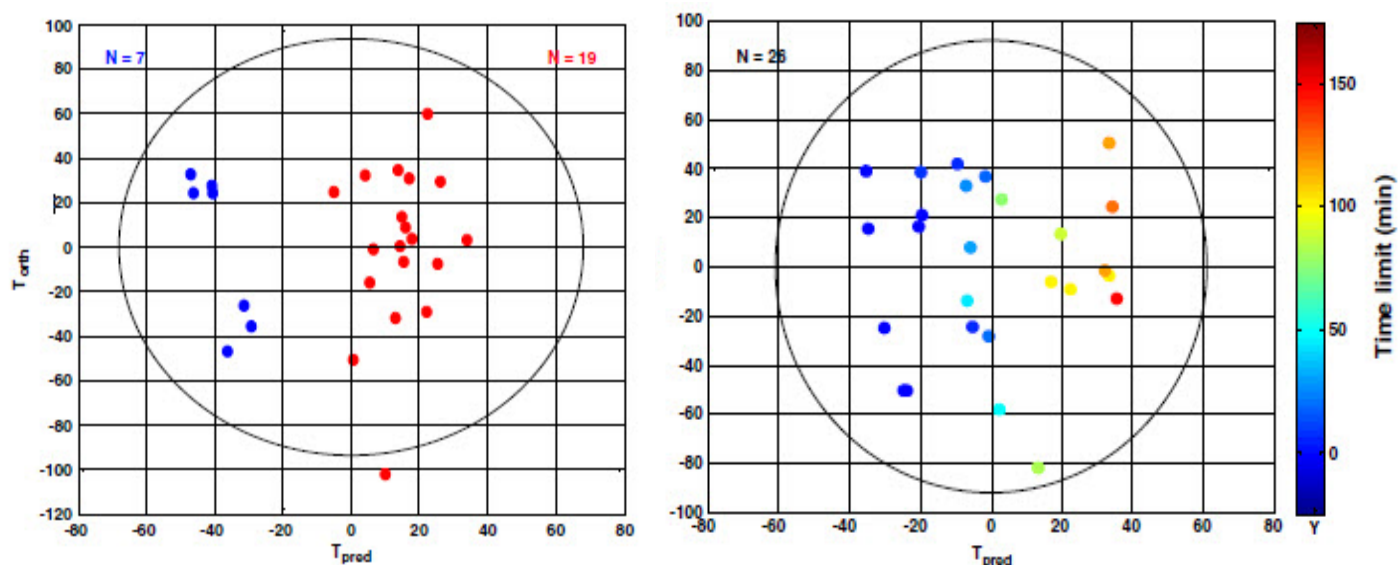
ΕΙΚΟΝΑ 6. PCA Scores plot από τα NMR φάσματα ούρων πριν (λευκά σύμβολα) και μετά (σκούρα σύμβολα) από μικρής διάρκειας, έντονη άσκηση (αριστερά). PCA Scores plot πριν (λευκά σύμβολα) και μετά (σκούρα σύμβολα) από έντονη άσκηση. Δεν παρατηρείται εμφανής διαχωρισμός μεταξύ των ομάδων (δεξιά). [30]

υποξανθίνη. Τα αποτελέσματα για την μικρή διάρκειας άσκηση έδειξαν να υπάρχει διαχωρισμός μεταξύ των γυμνασμένων και μη ομάδων, που οφείλεται κυρίως στην κρεατινίνη και στο γαλακτικό οξύ, δείχνοντας έτσι ότι η άσκηση είναι υπεύθυνη για την πλειονότητα της μεταβολικής διακύμανσης των δεδομένων (**EIKONA 6**). Στην περίπτωση της μεγαλύτερης διάρκειας άσκησης δεν υπήρξε κάποιος σημαντικός διαχωρισμός μεταξύ των ομάδων, δείχνοντας έτσι ότι η διάρκεια της άσκησης αυτής δεν προκάλεσε κάποια μεταβολή στο μεταβολικό προφίλ των ούρων. Οι αλλαγές που παρατηρήθηκαν στις συγκεντρώσεις των μεταβολιτών αντικατοπτρίζουν αλλαγές στην βιοενεργητική των μυών, κυρίως ύστερα από την μικρής διάρκειας έντονη άσκηση. Αυτές οι αλλαγές παρατηρήθηκαν σε ενώσεις που σχετίζονται με το ATP-PCr και τα γλυκολυτικά συστήματα, υπονοώντας με αυτό τον τρόπο την ενεργοποίηση του καταβολισμού των πουρινών και την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Επίσης, η έκκριση κρεατινίνης δεν επηρεάστηκε από την άσκηση αλλά παρατηρήθηκε μια σημαντική διαφορά μεταξύ των γυμνασμένων και μη γυναικών (πριν και μετά την άσκηση). Γενικότερα έχει αποδειχθεί ότι η συγκέντρωση κρεατινίνης σχετίζεται με την διατροφή και την μυική μάζα και από τη στιγμή που οι γυμνασμένοι αθλητές έχουν αυξημένη μυική μάζα σε σχέση με τους μη γυμνασμένους είναι λογική η παρατήρηση αυτής της διαφοράς. [30].

Στην μελέτη του Alfredo Miccheli et al.[31] διερευνήθηκαν οι συστηματικές επιδράσεις ενός ισοτονικού αθλητικού ποτού στην μεταβολική κατάσταση των αθλητών της Ιταλικής Ολυμπιακής κωπηλατικής ομάδας, κατά την διάρκεια ξεκούρασης ύστερα από έντονη και παρατεταμένης διάρκειας φυσικής άσκησης. Και αυτό το ερευνητικό έργο έγινε με την χρήση της μεταβολομικής βασισμένης στο NMR σε δείγματα πλάσματος και ούρων. Οι παράγοντες που θεωρούνται ότι συνεισφέρουν περισσότερο στην έναρξη της κούρασης κατά την διάρκεια της άσκησης είναι η εξάντληση των αποθεμάτων γλυκογόνου ενώ στην έναρξη της αφυδάτωσης είναι η απώλεια νερού και ηλεκτρολυτών με τον ιδρώτα. Όλοι οι αθλητές υποβλήθηκαν σε δύο αξιολογήσεις σε διάστημα μιας

εβδομάδας. Η αξιολόγηση αυτή πραγματοποιήθηκε σε ένα εργόμετρο ύστερα από έντονη άσκηση για την δημιουργία κατάστασης αφυδάτωσης. Στην συνέχεια οι αθλητές ενυδατώθηκαν είτε πίνοντας ένα ηλεκτρολυτικό ποτό βασισμένο σε πράσινο τσάι και υδατάνθρακες είτε πίνοντας νερό με χαμηλή περιεκτικότητα σε μέταλλα. Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από κάθε αθλητή σε τρία χρονικά διαστήματα : στην ξεκούραση, μετά από άσκηση και μετά την ενυδάτωση ενώ συλλέχθηκαν επίσης και δύο δείγματα ούρων, ένα στην ξεκούραση και ένα μετά το διάστημα της ενυδάτωσης. Τα βιολογικά αυτά υγρά αναλύθηκαν με ^1H NMR φασματοσκοπία και για την εξαγωγή συμπερασμάτων χρησιμοποιήθηκαν χημειομετρικές μέθοδοι. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι η διακύμανση μεταξύ των αθλητών αντανakλούσε τις διακυμάνσεις των επιπέδων του γαλακτικού οξέος που προκλήθηκαν από την άσκηση ενώ η διακύμανση για κάθε αθλητή χωριστά έδειξε μια επίδραση του ποτού με πράσινο τσάι στην γλυκόζη, στο κιτρικό οξύ και στα επίπεδα του γαλακτικού στα δείγματα πλάσματος και στην ακετόνη, 3-υδροξυβουτυρικό και γαλακτικό αντίστοιχα για τα δείγματα ούρων. Η αύξηση στα επίπεδα του καφεϊκού και του ιππουρικού οξέος δείχνουν την απορρόφηση των συστατικών του εκχυλίσματος πράσινου τσαγιού.[31]

Μεταβολομικές μελέτες που χρησιμοποιούν το NMR για την ανάλυση δειγμάτων ούρων έχουν γίνει και σε ποντίκια,όπως αυτή του Laurence Le Moyec et al [32]. Σε αυτή την μελέτη συγκρίνονται οι μεταβολικές επιδράσεις της εξαντλητικής άσκησης σε μία μέγιστη ταχύτητα (V_P) και σε μία κρίσιμη ταχύτητα (V_C) σε ποντίκια. Τα πειραματόζωα χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες (ελέγχου, ομάδα V_P , ομάδα V_C) ενώ τα δείγματα ούρων και αίματος συλλέχθηκαν μετά τη θανάτωση των ζώων. Τα φάσματα που προέκυψαν από το αποπρωτεϊνωμένο αίμα δεν μπόρεσαν να διαφοροποιήσουν τις ομάδες ελέγχου από τις υπόλοιπες που υπέστησαν την άσκηση ούτε διαφοροποιήθηκαν με βάση την διάρκεια της άσκησης. Αντιθέτως,με τα δείγματα ούρων μπορεί να εκτιμηθεί ένα σημαντικό στατιστικό μοντέλο όταν συγκρίνεται η ομάδα ελέγχου με τις υπόλοιπες ενώ το



ΕΙΚΟΝΑ 7. Scores plot μοντέλου OPLS από ούρα ποντικών ελέγχου (μπλε) και ποντίκια που ασκήθηκαν (κόκκινα). (αριστερά) Scores plot μοντέλου OPLS σχετικά με το όριο χρόνου (σε minutes, πολύχρωμη κλίμακα δεξιά του διαγράμματος) (δεξιά) [32]

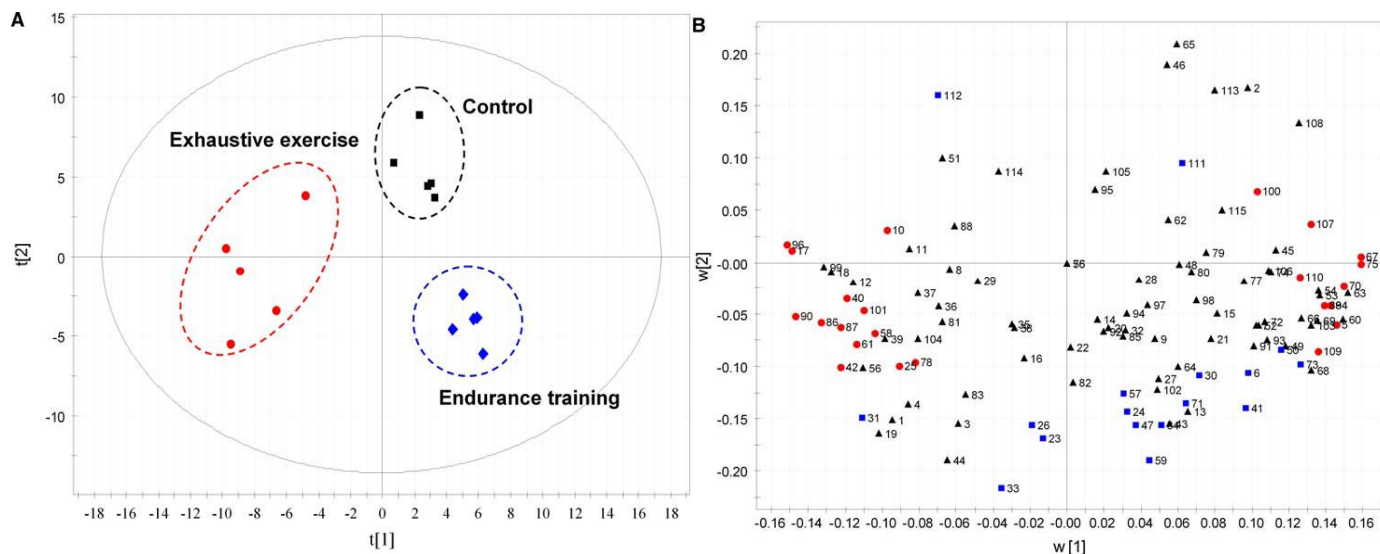
καλύτερο μοντέλο προκύπτει σύμφωνα με την διάρκεια της άσκησης σε όλα τα ποντίκια. Οι μεταβολίτες που προκαλούν τον διαχωρισμό είναι η αλλαντοίνη, η ινοσίνη και τα αμινοξέα διακλαδισμένης αλυσίδας (BCAA). Έτσι, τα μεταβολομικά προφίλ που προέκυψαν από το NMR είναι εξαιρετικά εξαρτώμενα από την άσκηση ενώ, σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα δείγματα ούρων φαίνεται να περιέχουν περισσότερες πληροφορίες σε σχέση με τα δείγματα αίματος, καθώς επίσης, η διάρκεια της άσκησης είναι η πιο σημαντική παράμετρος που επηρεάζει τη μεταβολομική κατάσταση απ'ότι η ταχύτητα της άσκησης.[32] (**ΕΙΚΟΝΑ 7**)

[3^{B.2}] Μεταβον(λ)ομικές μελέτες σε πλάσμα αίματος με GC–TOF/MS και NMR

Μια μεταβολομική προσέγγιση που σχετίζεται με την φυσική άσκηση για την δημιουργία μεταβολικών προφίλ σε δείγματα από πλάσμα αίματος πραγματοποίησε ο Stephen J. Bruce et al.[33]. Στην μελέτη αυτή γίνεται παρακολούθηση των επιδράσεων ενεργειακών ποτών που περιέχουν γλυκόζη, γαλακτόζη και φρουκτόζη σε αθλητές ύστερα από άσκηση και κατά τη διάρκεια μιας περιόδου ξεκούρασης 6 ωρών και 45 λεπτών. Αυτή η μεθοδολογία βασίζεται σε αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας με αναλυτή χρόνου πτήσης (GC–TOF/MS). Μία ομάδα 10 ανδρών ποδηλατών πραγματοποίησε 3 πειραματικές συνεδρίες ασκήσεων σε διαφορετικές ημέρες. Ύστερα από ένα πρωτόκολλο ασκήσεων οι αθλητές κατανάλωσαν ένα από τα τρία διαφορετικά ενεργειακά ποτά όπως μαλτοδεξτρίνη (MD) και γλυκόζη (σε αναλογία 2:1), MD και γαλακτόζη (2:1), και MD και φρουκτόζη (2:1). Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν αμέσως ύστερα από την άσκηση και για κάθε 45 λεπτά εντός της φάσης ξεκούρασης. Η μεταβολομική αυτή προσέγγιση βασισμένη στην GC–TOF/MS σε συνδυασμό με την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση έδειξε ότι είναι μια ισχυρή και ακριβής μέθοδος για την ταυτοποίηση και ημι-ποσοτικοποίηση πολλαπλών μεταβολιτών από μία ποικιλία διαφορετικών χημικών ομάδων στο πλάσμα αίματος. Παρατηρήθηκαν επίσης μερικές διαφορές στα GC–TOF/MS δεδομένα όπου το ποτό με την γαλακτόζη έδειξε αυξημένα επίπεδα γαλακτονικού οξέος καθ'όλη τη διάρκεια της περιόδου ξεκούρασης. Αποδείχθηκε επίσης ότι αυτό δεν προήλθε από επιμόλυνση του αρχικού ποτού αλλά ήταν ένα προϊόν του μεταβολισμού της γαλακτόζης στο αίμα. Το ποτό που περιείχε φρουκτόζη έδειξε αυξημένα επίπεδα φρουκτόζης στο αίμα, αν και ήταν μια προφανής παρατήρηση, αρχικώς είχε υποθεθεί ότι όλη η φρουκτόζη θα απορροφώταν από το ήπαρ και θα μετατρεπόταν σε γλυκόζη για την παραγωγή ηπατικού γλυκογόνου. Τα επίπεδα φρουκτόζης παρατηρήθηκε ότι είχαν μια κορύφωση περίπου στα 180 λεπτά κατά το διάστημα ξεκούρασης και ύστερα από αυτό έγινε μία πτώση των επιπέδων της μέχρι

το τελικό χρονικό σημείο ενώ η μεταβολική «τύχη» της φρουκτόζης παραμένει άγνωστη. Τα επίπεδα ουρικού οξέος κατά την σύγκριση έδειξαν ότι δεν υπάρχει κάποια διαφορά μεταξύ των ενεργειακών ποτών, δείχνοντας έτσι καμία βραχυπρόθεσμη μεταβολή στον μεταβολισμό των πουρινών ενώ πιθανά προβλήματα από την χορήγηση αυτής της ποσότητας φρουκτόζης παραμένουν αναπάντητα.[33]

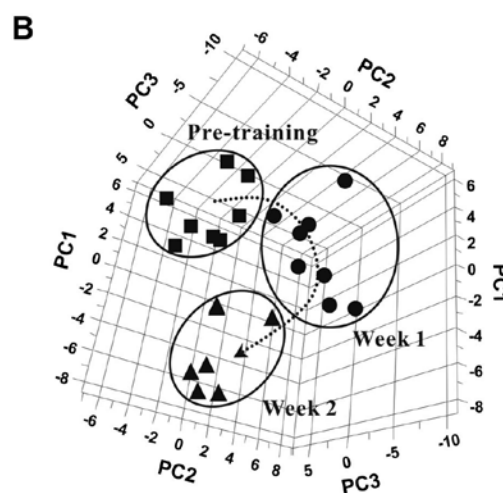
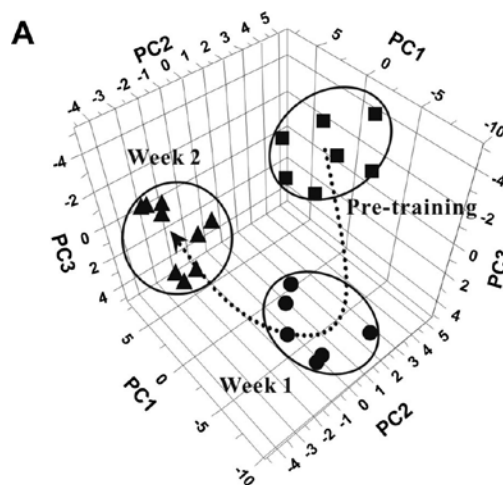
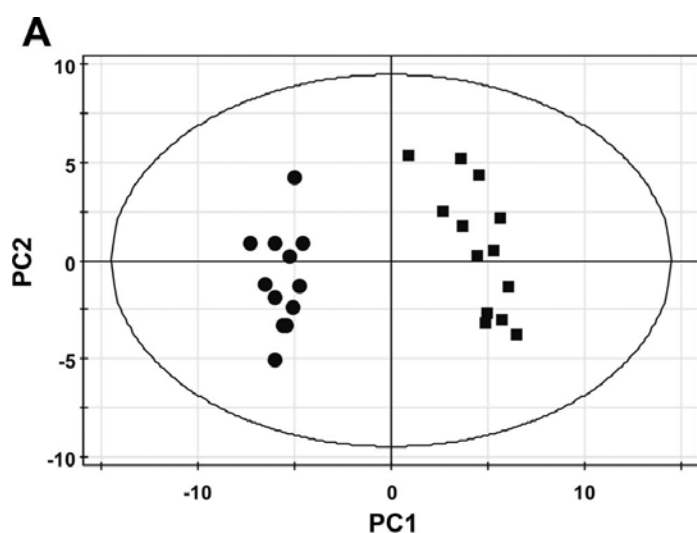
Μία από τις πρώτες μελέτες που εξέτασαν την επίδραση της εξαντλητικής άσκησης και της άσκησης για απόκτηση αντοχής στην λειτουργία του ήπατος και του μεταβολισμού σε ποντίκια σε συνδυασμό με την στρατηγική της μεταβολομικής είναι του Chi-Chang Huang et al [34]. Το ήπαρ παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό και έχει ένα μεγάλο αριθμό λειτουργιών όπως στην αποθήκευση γλυκογόνου, στη γλυκονεογένεση και στην αποσύνθεση των λευκοκυττάρων. Κατά την διάρκεια της άσκησης καταναλώνεται ενέργεια και αυτό προκαλεί αλλαγές στα επίπεδα των ενδογενών μεταβολιτών στο ήπαρ. Το μεταβολικό προφίλ ηπατικού ιστού διερευνήθηκε με GC-MS ενώ η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με στατιστικές μεθόδους (PLS-DA) για να συγκριθούν οι επιδράσεις στους μεταβολίτες σε ποντίκια ελέγχου (μη ασκούμενα), εξαντλητικής άσκησης και άσκησης αντοχής. Οι τρεις ομάδες αυτές έδειξαν σημαντικές διαφορές στα μεταβολικά τους προφίλ (**ΕΙΚΟΝΑ 8**). Οι αλλαγές στο μεταβολισμό του ήπατος περιελάμβαναν μεταβολίτες όπως αμινοξέα, λιπαρά οξέα, οργανικά οξές και υδατάνθρακες. Η άσκηση αντοχής ανύψωσε την γλυκογένεση και την ενδογενή σύνθεση αντιοξειδωτικών ενώ η εξαντλητική άσκηση οδήγησε σε μείωση του ηπατικού γλυκογόνου, σε λιπόλυση, σύνθεση κετονοσωμάτων, σε συσσώρευση ουρίας και σε ηπατική φλεγμονή. Τα αποτελέσματα επίσης έδειξαν ότι η μεταβολομική βασισμένη στην GC-MS είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την παρακολούθηση και την εκτίμηση της φυσιολογικής κατάστασης στην άσκηση.[34]



ΕΙΚΟΝΑ 8. Μοντέλο PLS-DA μη στοχευμένης προσέγγισης όπου συγκρίνονται οι 3 ομάδες ποντικών. (A) το Scores plot δείχνει διακριτή ομαδοποίηση των μεταβολιτών με διαφορετικό χειρισμό. Οι μεταβολικές ομάδες αναγνωρίζονται με τα διαφορετικά χρώματα. (B) Το loadings plot δείχνει τις παραμέτρους που σχετίζονται με τις μεταβλητές στο Scores plot [34]

Ο Bei Yan et al [27] με την βοήθεια της μεταβολομικής διερεύνησε την αλλαγή του μεταβολικού φαινοτύπου ή της βιοχημικής σύστασης σε επαγγελματίες αθλητές που επάγεται ύστερα από μακροχρόνια άσκηση. Δείγματα αίματος σε κατάσταση ξεκούρασης ελήφθησαν από νεότερους και μεγαλύτερους σε προπονητική ηλικία, άνδρες κωπηλάτες πριν και μετά από μία εβδομάδα και δεύτερη εβδομάδα εκπαίδευσης. Επίσης ελήφθησαν και δείγματα αίματος από υγιείς άνδρες εθελοντές κατά την διάρκεια ξεκούρασης ως δείγματα ελέγχου. Η δημιουργία των προφίλ από τους ενδογενείς μεταβολίτες έγινε με την χρήση GC-TOF-MS ενώ η επεξεργασία των δεδομένων με πολυπαραμετρικές στατιστικές τεχνικές όπως PCA, PLS-DA. Γενικότερα παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολομικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων των επαγγελματιών αθλητών και των δειγμάτων ελέγχου καθώς επίσης υπήρξε και διαχωρισμός με βάση την προπονητική ηλικία τους αλλά και πριν και μετά από εντατική

άσκηση (**ΕΙΚΟΝΑ 9**). Η άσκηση για την βελτίωση της δύναμης προκάλεσε μεταβολές στον μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων, του οξειδωτικού στρες καθώς και στον μεταβολισμό των αμινοξέων. Οι ταυτοποιημένοι μεταβολίτες που συνεισφέρουν στον



ΕΙΚΟΝΑ 9. PLS-DA Scores plot κωπηλατών(τετράγωνα) και ομάδας ελέγχου (κύκλοι). Είναι εμφανής η διάκριση μεταξύ τους. (A, πάνω αριστερά) (PLS-DA Scores plot νεώτερων αθλητών A,δεξιά) και παλαιότερων αθλητών σε όλο το πρόγραμμα εκπαίδευσης(B,δεξιά). Διακρίνεται η μετακίνηση των σημείων ανάλογα με το χρόνο προπόνησης κα για τις δύο ομάδες,δείχνοντας έτσι ότι η προπόνηση για δύναμη-αντοχή είχε σημαντική επίδραση στον μεταβολισμό.[27]

διαχωρισμό συμπεριλαμβάνουν την αλανίνη, το γαλακτικό οξύ, το πυρογλουταμικό οξύ, την κυστεΐνη, το γλουταμικό οξύ, το κιτρικό οξύ, την βαλίνη, τη γλουταμίνη, τη φαινυλαλανίνη, την τυροσίνη κλπ, τα οποία συμμετείχαν στον μεταβολισμό της γλυκόζης, του οξειδωτικού στρες, του ενεργειακού μεταβολισμού, του μεταβολισμού των λιπιδίων και των αμινοξέων. [27]

Η άσκηση επηρεάζει την χρησιμοποίηση των υποστρωμάτων και την ευαισθησία της ινσουλίνης, τα οποία με τη σειρά τους βελτιώνουν τη γλυκόζη του αίματος και τα επίπεδα λιπιδίων σε άτομα με διαβήτη τύπου 2 (T2D). Σκοπός της μελέτης των Jeanette Kuhl et al [35] ήταν να εξεταστεί η πιθανότητα εφαρμογής της μεταβολομικής στην αναγνώριση ατόμων με βελτιωμένη ευαισθησία ινσουλίνης σαν αποτέλεσμα αυξημένης της φυσικής δραστηριότητας. Υγιή και διαβητικά άτομα εξετάστηκαν πριν και μετά από τρεις μήνες άσκησης για να καθοριστούν διάφοροι μεταβολικοί παράμετροι. Η ευαισθησία της ινσουλίνης καθορίστηκε από μία αναλυτική διαδικασία (hyperinsulinemic euglycemic clamp) και φάνηκε να είναι βελτιωμένη στους διαβητικούς άνδρες. Πλάσμα αίματος συλλέχθηκε κατά την διάρκεια της ανάλυσης και στην συνέχεια αναλύθηκε με GC-TOF-MS. Τα υγιή άτομα μπορούσαν να διαχωριστούν από τα διαβητικά από κάποιες μικρού μοριακού βάρους ενώσεις (LMC) στο πλάσμα ανεξαρτήτως φύλου ή άσκησης καθώς επίσης φάνηκε ότι η άσκηση προκάλεσε μεταβολές στα επίπεδα των LMC τόσο των υγιών ατόμων όσο και αυτών με διαβήτη τύπου 2 ενώ 44 σημαντικοί μεταβολίτες βρέθηκαν να εξηγούν διαφορές μεταξύ των LMC μοντέλων από αθλούμενους και μη, διαβητικούς. Η ένωση Inositol-1-phosphate αναγνωρίστηκε ως δείκτης για την ευαισθησία της ινσουλίνης στους άνδρες αφού έδειξε τη μεγαλύτερη συσχέτιση με αυτήν. Αντίστοιχα, ένα άγνωστο μέχρι στιγμής λιπαρό οξύ συσχετίστηκε για τις γυναίκες ενώ και οι δύο αυτοί μεταβολίτες συσχετίστηκαν καλύτερα απ'ότι η γλυκόζη. [35]

Στην μελέτη του Ignasi Barba et al [36] σκοπός ήταν η ανάπτυξη μιας NMR μεταβολομικής προσέγγισης ικανής να προβλέψει την εμφάνιση της επαγόμενης από άσκηση ισχαιμίας σε ασθενείς με εικαζόμενη στεφανιαία καρδιακή νόσο και να αναγνωρίσει τα μεταβολικά μοτίβα που συνεισφέρουν κυρίως στην πρόβλεψη της νόσου αυτής. Ο κύριος στόχος ήταν η αξιολόγηση της NMR φασματοσκοπίας στην αναγνώριση ασθενών με μειωμένη στεφανιαία εφεδρεία (Coronary flow reserve (CFR)) και τον καθορισμό των αναλυτικών μεθόδων για τον σκοπό αυτό. Η εμφάνιση της ισχαιμίας του μυοκαρδίου κατά την διάρκεια άσκησης έχει διαγνωστική, προγνωστική και θεραπευτική σημασία για ασθενείς με εικαζόμενη ή ήδη υπάρχουσα στεφανιαία καρδιακή νόσο. Η προκαλούμενη ισχαιμία απεικονίζει την μειωμένη ικανότητα της ροής αίματος του μυοκαρδίου να αυξηθεί επαρκώς ως αντίδραση στην προκαλούμενη από την άσκηση μειωμένη αρτηριακή αγγειοδιαστολή -μειωμένη αρτηριακή εφεδρεία-εξαιτίας της παρουσίας σημαντικής στεφανιαίας αρτηριακής στένωσης. Η αναγνώριση βιοδεικτών που θα μπορούσαν να προβλέψουν την ύπαρξη της στεφανιαίας αρτηριακής νόσου αυτής θα είχε σημαντικές κλινικές εφαρμογές. Η μελέτη αυτή διενεργήθηκε σε 31 ασθενείς με υποπτευόμενη στηθάγχη και χωρίς προηγούμενο έμφραγμα στεφανιαίας ενώ ορός αίματος ελήφθη αμέσως πριν από το τεστ άσκησης. Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε δύο ομάδες (22 με ισχαιμία και 9 χωρίς) και είχαν παρόμοια ηλικία και κλινικό προφίλ εκτός από τους καπνιστές και τους διαβητικούς στην ομάδα της ισχαιμίας. Η περιοχή των φασμάτων NMR που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν μεταξύ 0.50 και 4.25 ppm. Με την αναλυτική τεχνική αυτή καθώς και χημειομετρικές μεθόδους έγινε εμφανές ότι η μέθοδος αυτή μπορεί να παρέχει πληροφορίες που θα χρησιμεύσουν στην αναγνώριση των ασθενών που θα αναπτύξουν ισχαιμία επαγόμενη από άσκηση κατά την διάρκεια μιας δοκιμής καταπόνησης. Η μελέτη αυτή αναγνώρισε τα στατιστικά μοντέλα εκείνα με τις μεγαλύτερες πιθανότητες να παρέχουν μια ικανοποιητική διάκριση των ασθενών με ισχαιμία ενώ βρέθηκαν επίσης και οι μεταβολίτες στους οποίους οφείλεται ο διαχωρισμός όπως το γαλακτικό οξύ, η γλυκόζη και τα αμινοξέα μακριάς αλυσίδας (BCAA). Συμπερασματικά, η μεταβολομική αυτή ανάλυση ορού αίματος μπορεί να

προβλέψει εν τελει την επαγόμενη από άσκηση ισχαιμία σε ασθενείς με υποπτευόμενη στεφανιαία αρτηριακή νόσο καθώς επίσης θα ήταν χρήσιμη και σε δοκιμές (screening) και διαστρωμάτωση του κινδύνου (risk stratification) ασθενών με στεφανιαία προβλήματα.[36]

[3^Γ] METABONOMΙΚΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ – NUTRIMETABONOMICS

Οι διατροφικές προτιμήσεις και συνήθειες, οι οποίες έχουν πολιτιστική προέλευση, ασκούν μεγάλη επίδραση στην υγεία των ανθρώπων και των πληθυσμών. Η επιλογή της τροφής από ένα άτομο είναι αποτέλεσμα μιας διαδικασίας λήψης απόφασης η οποία ενσωματώνει πολλούς βιολογικούς, κοινωνικο-οικονομικούς, ψυχολογικούς και συμπεριφοριστικούς καθοριστικούς παράγοντες. [39] Η διαδραστική αυτή σχέση μεταξύ διατροφής, τρόπου ζωής και γενετικής καθώς και του κινδύνου εκδήλωσης χρόνιων ασθενειών βρίσκεται στο επίκεντρο διεθνών ερευνητικών προσπαθειών για πολλές δεκαετίες. Η διατροφή θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που συνεισφέρουν στην δραματική αύξηση της συχνότητας των μεταβολικών διαταραχών όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης και οι καρδιαγγειακές παθήσεις. [38]

Η «παραδοσιακή» διατροφική έρευνα έχει ασχοληθεί με την κατανόηση της διατροφικής σύστασης των τροφίμων με απώτερο στόχο την θρέψη των πληθυσμών, ενώ αντίθετα στις μέρες μας εστιάζει περισσότερο στην βελτίωση της υγείας των ατόμων μέσα από την διατροφή. Οι σύγχρονες διατροφικές έρευνες στοχεύουν στην προαγωγή της υγείας, στην πρόληψη κατά των ασθενειών και στην βελτίωση των επιδόσεων-αντοχών των ανθρώπων (performance improvement). Η ιδέα της ανάπτυξης διατροφικά ενισχυμένων ή λειτουργικών τροφίμων απαιτεί την κατανόηση των μηχανισμών πρόληψης και προστασίας, την αναγνώριση των βιολογικά ενεργών μορίων και την επιβεβαιωμένη αποτελεσματικότητα αυτών των μορίων. [37]

Η εξέλιξη των γενετικών, τρανσκριπτομικών, πρωτεομικών και μεταβολομικών τεχνολογιών παρέχει τη δυνατότητα να εξαχθούν δεδομένα για την καλύτερη κατανόηση των βιολογικών λειτουργιών μέσα από τα διαφορετικά επίπεδα της βιομοριακής οργάνωσης. Η αντίληψη της βιολογίας συστημάτων έχει αναπτυχθεί και έχει συσχετισθεί με την συνένωση όλων των πληροφοριών στα διαφορετικά επίπεδα της γονιδιωματικής έκφρασης (mRNA, πρωτεΐνες και μεταβολίτες). Με αυτό τον τρόπο, η βιολογία συστημάτων παρέχει πληροφορίες που αφορούν βιολογικά «μονοπάτια» ενώ δίνει και τη δυνατότητα μέτρησης μικρών διαταραχών που οφείλονται σε διατροφικές επιδράσεις, στα «μονοπάτια» αυτά. [37]

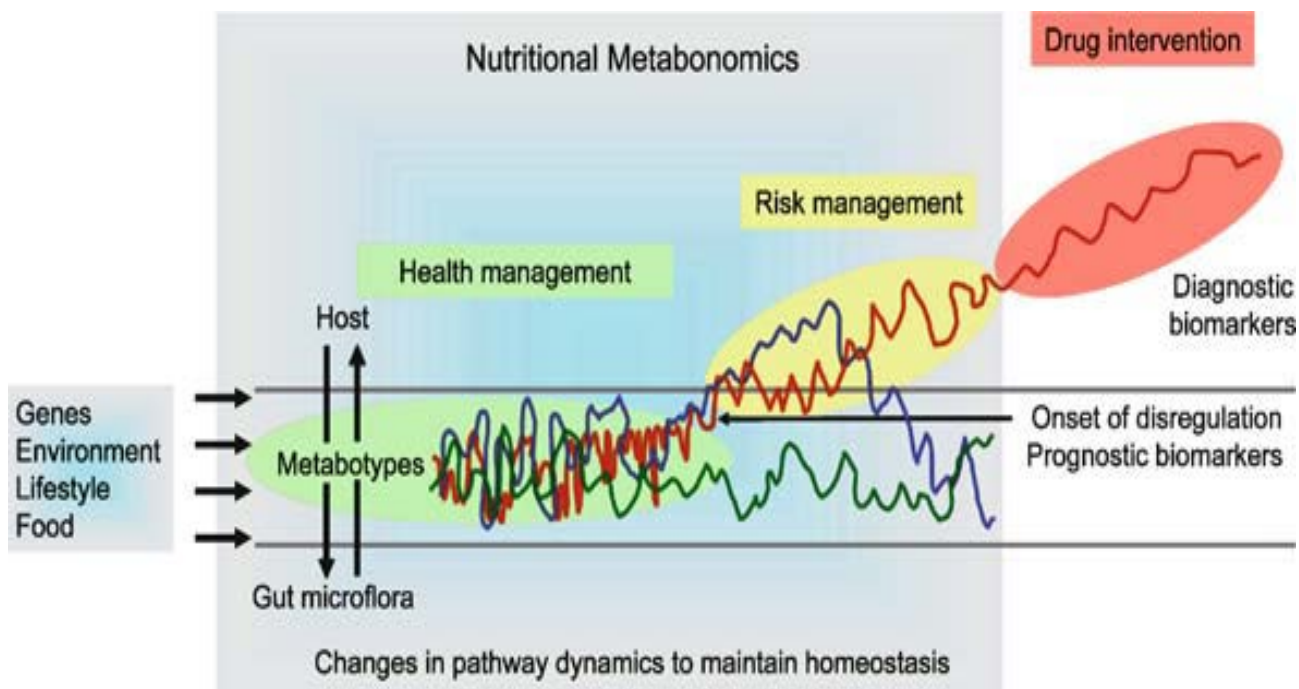
Η ενοποίηση της βιολογίας συστημάτων με την διατροφική έρευνα οδήγησε στην ανάπτυξη της διατροφο-γονιδιωματικής (nutrigenomics). Η διατροφο-γονιδιωματική εξετάζει το πώς η διατροφή επηρεάζει την αντιγραφή των γονιδίων, την έκφραση των πρωτεϊνών καθώς και τον μεταβολισμό. Η διατροφο-γενετική (nutrigenetics) αναλύει το πώς η ατομική γενετική προδιάθεση επηρεάζει την επιδεκτικότητα στην διατροφή. Ο στόχος της διατροφο-γονιδιωματικής είναι να συνδυάσει την γονιδιωματική (ανάλυση γονιδίων), την πρωτεομική (καθολική ανάλυση πρωτεϊνών) και την μεταβολομική (δημιουργία μεταβολικών προφίλ) για τον καθορισμό ενός «υγιούς» φαινότυπου.[37]

Το ανθρώπινο βιολογικό σύστημα είναι πολύ εκτενές και η λειτουργική ακεραιότητα της ανθρώπινης φυσιολογίας που αντικατοπτρίζεται από τον φαινότυπο, εξαρτάται όχι μόνο από τον πολυμορφισμό των νουκλεοτιδίων αλλά και από πολλούς εξωτερικούς παράγοντες . Αυτοί μπορεί να είναι παράγοντες συμπεριφοράς, περιβαλλοντικοί καθώς επίσης και παράγοντες που συμπεριλαμβάνουν άλλα γονιδιώματα από συμβιωτικούς οργανισμούς όπως η μικροχλωρίδα του εντέρου. Η έκφραση των γονιδίων και τα πρωτεομικά δεδομένα μπορούν μόνο να δείχνουν την δυνατότητα για φυσιολογικές αλλαγές επειδή πολλοί μηχανισμοί «μονοπατιών» ανάδρασης δεν απεικονίζονται στην συγκέντρωση των πρωτεϊνών ή την γονιδιακή έκφραση. Από την άλλη πλευρά, οι

συγκεντρώσεις των μεταβολιτών και οι κινητικές αλλαγές τους στα κύτταρα, ιστούς και όργανα αντιπροσωπεύουν πραγματικά «τελικά σημεία» (endpoints) φυσιολογικών ρυθμιστικών διαδικασιών. [37]

Η μεταβονομική, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενη ενότητα, προήλθε από την εφαρμογή του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) στην μελέτη της μεταβολικής σύστασης βιολογικών υγρών, κυττάρων και ιστών με στόχο την κατανόηση της ολικής μεταβολικής ρύθμισης ενός οργανισμού και των συμβιωτικών του «εταίρων». Η μεταβολομική εστιάζει στην μέτρηση των μεταβολικών συγκεντρώσεων, βιολογικών υγρών και εκκρίσεων στα κύτταρα και στους ιστούς στα οποία υπάρχει απ'ευθείας σύνδεση μεταξύ της γονιδιακής έκφρασης, πρωτεϊνικής δραστηριότητας και μεταβολικής δραστηριότητας. Μεταβονομική και μεταβολομική στοχεύουν στην ανίχνευση αλλαγών στην κατανομή και στην συγκέντρωση μεγάλου εύρους μεταβολιτών σε βιολογικές μήτρες και ιστούς κυρίως με την χρήση του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και της φασματομετρίας μάζας (MS). Και στις δύο εφαρμογές αυτές είναι απαραίτητη η χρήση προχωρημένων στατιστικών και βιουπολογιστικών εργαλείων για να μεγιστοποιηθεί η ανάκτηση των δεδομένων και για να κατανοηθούν τα τεράστια σύνολα δεδομένων που παράγονται. [37]

Παρά την σχετικά πρόσφατη εισαγωγή της στο πεδίο της διατροφικής έρευνας, η διατροφο-μεταβονομική προσέγγιση (nutritional metabonomics ή αλλιώς nutri-metabonomics) έχει ήδη αποφέρει σημαντικές γνώσεις για την κατανόηση της μεταβολικής απόκρισης σε ανθρώπους ή ζώα που οφείλεται σε διατροφικές παρεμβάσεις καθώς επίσης και στον ορισμό του μεταβολικού φαινότυπου. [37] **(ΕΙΚΟΝΑ 10)**



ΕΙΚΟΝΑ 10. Η αντίληψη-σκοπός της διατροφο-μεταβονομικής: Οι μεταβολικοί φαινότυποι(χρωματιστές γραμμές) προκύπτουν από τα γονίδια, το περιβάλλον,την τροφή, τον τρόπο ζωής και τις αλληλεπιδράσεις της μικροχλωρίδας – ξενιστή. Διαφορετικοί μεταβολότυποι βρίσκονται κάτω από ομοιοστατικό έλεγχο διατηρώντας μια μεταβολική διακύμανση εντός φυσιολογικού ορίου (πράσινη γραμμή). Οι προγνωστικοί μεταβολικοί βιοδείκτες μπορούν να χρησιμεύσουν στην εκτίμηση της απώλειας ομοιόστασης και πιθανότητα εκδήλωσης ασθένειας. Η διατροφο-μεταβονομική στοχεύει στην βελτίωση της διατροφής για την διατήρηση της υγείας και την αποκατάσταση της ομοιόστασης (μπλε γραμμή) [37]

[3^{Γ.1}] Πειραματικός σχεδιασμός διατροφο-μεταβολομικών μελετών

Σε αντίθεση με τις εφαρμογές της μεταβολομικής σε τοξικολογικές μελέτες όπου οι επιδράσεις είναι γενικά συσχετισμένες με υψηλές δόσεις ενός μόνο ξενοβιοτικού, η διατροφο-μεταβολομική συχνά έρχεται αντιμέτωπη με τις μετρήσεις μικρών μεταβολικών ρυθμίσεων. Αυτές οι μεταβολικές ρυθμίσεις είναι το αποτέλεσμα της βιοχημικής απόκρισης απέναντι σε σχετικά μικρές δόσεις ενός βιοενεργού θρεπτικού συστατικού τροφίμων ή συμπληρωμάτων. Η μεταβολική απόκριση πολύ συχνά είναι το προϊόν πολλών ταυτόχρονων ρυθμίσεων των βιοχημικών «μονοπατιών», τα οποία είναι δύσκολο να καθοριστούν *a priori* όπως γίνεται με τις συμβατικές τοξικολογικές μελέτες. Οι μεταβολικές ρυθμίσεις είναι γενικά πολυπαραγοντικές εξαιτίας της βιολογικής πολυπλοκότητας των οργανισμών. Οι παράγοντες αυτοί είναι υπεύθυνοι για την μεγάλη δια-ατομική βιοχημική διακύμανση στον μεταβολισμό, η οποία είναι γενικά μεγαλύτερη στους ανθρώπους λόγω της μεγαλύτερης ποικιλομορφίας των γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, διατροφικών διαφορών, ημερήσιων διακυμάνσεων, κατάστασης υγείας, φύλου και έμμηνου κύκλου και πολλών χαρακτηριστικών του τρόπου ζωής όπως η κατανάλωση αλκοολών, το κάπνισμα ή ο αθλητισμός. [37]

Σαν αποτέλεσμα, η διατροφο-μεταβολομική απαιτεί έναν πολύ προσεκτικό πειραματικό σχεδιασμό. Για τον χειρισμό της δια-ατομικής μεταβολικής διακύμανσης μια μέθοδος είναι η προσεκτική διεξαγωγή μελετών με ελεγχόμενες διατροφικές παρεμβάσεις κατά τις οποίες κάθε συμμετέχων καταναλώνει καθορισμένα τρόφιμα και συμμετέχει και στην περίοδο ελέγχου (control period) αλλά και στην περίοδο της δοκιμής (test period) της διατροφικής παρέμβασης. Τα κριτήρια επιλογής των συμμετεχόντων είναι εξίσου σημαντικά ενώ ο αριθμός τους πρέπει να είναι καθορισμένος στην μελέτη αυτή για να υπάρχει ανθεκτικότητα και σωστή ερμηνεία των στατιστικών αποτελεσμάτων. Επιπρόσθετες πληροφορίες που μπορούν να είναι υπεύθυνες για απρόσμενες βιοχημικές μεταβολές μπορούν να συλλεχθούν με τη χρήση ερωτηματολογίων για τον τρόπο ζωής

γενικότερα και την διατροφή. Ο σκοπός των πληροφοριών αυτών είναι όχι τόσο η ακριβής γνώση της διατροφικής πρόσληψης ή της ενεργειακής κατανάλωσης αλλά η ερμηνεία τυχόν ασυνήθιστων μεταβολικών προφίλ και η αναγνώριση τροφών που μπορεί να έχουν επηρεάσει τα μεταβολικά προφίλ των βιολογικών υγρών. Για παράδειγμα έχει αποδειχθεί από μελέτες ότι η μεγάλη ένταση κορυφής του trimethylamine-N-oxide (TMAO) στα φάσματα NMR σε δείγματα ούρων σχετίζεται άμεσα με την κατανάλωση ψαριού.[37]

Η μεταβολομική έχει αναγνωριστεί ως μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την εκτίμηση της λειτουργικότητας των τροφίμων και των θρεπτικών συστατικών μέσα από την ταυτόχρονη μέτρηση πολλών μεταβολικών «τελικών σημείων» (μεταβολιτών) σε πολύπλοκους οργανισμούς. Για πολλά χρόνια οι επιστήμονες προσπαθούν να κατανοήσουν την πολύπλοκη αυτή σχέση μεταξύ ανθρώπινου/ζωικού μεταβολισμού και διατροφής. Ο τομέας της διατροφής μπορεί ίσως να επωφεληθεί από τα πλεονεκτήματα της γνώσης του μεταβολισμού για την «αποκωδικοποίηση» των μηχανισμών της δράσης των τροφών και της δίαιτας, για την προαγωγή της υγείας. Από τεχνικής άποψης, υπάρχουν δύο περιπτώσεις προσεγγίσεων, η στοχευμένη προσέγγιση και η ολιστική (μη στοχευμένη). Οι στοχευμένες προσεγγίσεις έχουν ως στόχο την ποσοτική μέτρηση συγκεκριμένων μεταβολιτών ή την δημιουργία μεταβολικών προφίλ μοριακών ομάδων όπως λιπιδίων, αμινοξέων, χολικών οξέων, οργανικών οξέων, ενώ στην ολιστική προσέγγιση δεν γίνεται a priori επιλογή των μεταβολιτών.[37]

[3^{Γ.2}] Μεταβολομικές μη στοχευμένες προσεγγίσεις

Στα πλαίσια της διατροφο-μεταβολομικής έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μη στοχευμένες μελέτες. Η μελέτη του Noguchi et al. αφορά αμινοξέα ενώ περιγράφεται και αξιολογείται μια στατιστική μέθοδος για την επεξεργασία μεταβολικών υποσυνόλων.

Κύριος στόχος ήταν η κατανόηση των σχέσεων μεταξύ της συγκέντρωσης αμινοξέων ως αποτέλεσμα καθαρής πρόσληψης από την διατροφή, καταβολικών και αναβολικών ρυθμών και μεταβολικής προσαρμογής η οποία λαμβάνει μέρος ύστερα από την κατανάλωση διαφορετικών επιπέδων πρωτεϊνών και αμινοξέων. Ο Matsuzaki et al. διερεύνησε με στατιστικές και αναλυτικές τεχνικές την μεταβολική επίδραση της περίσσειας λευκίνης σε αρσενικά ποντίκια ενώ ανέφερε ότι η ουρία ή το ακετοισοκαπροικό οξύ θα μπορούσε να είναι ένας βιοδείκτης του ανώτατου ορίου επαρκούς πρόσληψης λευκίνης.

Ακόμα μια σημαντική διατροφική μελέτη που αφορά κυρίως κυτταρικά λιπίδια έχει πραγματοποιηθεί από τον Watson. Ο Watson εφάρμοσε αναλυτικές τεχνικές που επιτρέπουν την εκχύλιση και την ανάλυση βιολογικών λιπιδίων (λιπιδιομική –lipidomics). Ως επέκταση της μεταβολομικής, η λιπιδιομική είναι μια προσέγγιση που δημιουργήθηκε με σκοπό την κατανόηση της επίδρασης όλων των λιπιδίων σε ένα βιολογικό σύστημα σε σχέση με την κυτταρική επικοινωνία, τη δομή των μεμβρανών, την μεταγραφική και μεταφραστική ρύθμιση, τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-πρωτεϊνών και της απόκρισης σε περιβαλλοντικές αλλαγές με το χρόνο, τα μόρια με τα οποία αλληλεπιδρούν καθώς και τις λειτουργίες τους εντός του κυττάρου. Ο Watkins et al. χρησιμοποίησε ποσοτικά λιπιδικά προφίλ για τον χαρακτηρισμό του λιπιδικού μεταβολισμού σε ανεπάρκεια φωσφατιδυλοαιθανολαμιν-N-μεθυλοτρανσφεράση (PEMT) σε ποντίκια τα οποία κατανάλωσαν τροφές με διαφορετικές συγκεντρώσεις χολίνης.

Ένα άλλο επίπεδο ειδικότητας στις στοχευμένες προσεγγίσεις απεικονίζεται από τις μεταβολομικές μελέτες βασισμένες σε ιχνηθέτες και οι οποίες έχουν καταγραφεί σε πρόσφατες μελέτες όπως αυτή του Lee et al. Η μεταβολομική βασισμένη σε ιχνηθέτηση εστιάζεται στον ταυτόχρονο καθορισμό της κατανομής μεταβολιτών και βιολογικών υγρών με την χρήση ιχνηθετών, όπως ισότοπα. Η κατανομή του ιχνηθέτη σε ένα σύνολο μεταβολιτών καθορίζει επακριβώς ένα μεταβολικό φαινοτυπικό χαρακτηριστικό που εξαρτάται από τη λειτουργική κατάσταση του υπό μελέτη βιολογικού συστήματος και

της απόκρισης του σε γενετικές και διατροφικές περιβαλλοντικές αλλαγές. Οι δυνατότητες της προσέγγισης αυτής σχετίζονται άμεσα με το πολύπλοκο θέμα της σχέσης μεταξύ διατροφικής πρόσληψης και κίνδυνου καρκίνου.[37]

[3^{Γ.3}] Μεταβολομικές ολιστικές προσεγγίσεις

Έχουν διερευνηθεί πολλές εφαρμογές της ολιστικής προσέγγισης για την εκτίμηση των μεταβολικών αλλαγών σε σχέση με την διατροφή, με συγκεκριμένα βιοενεργά συστατικά και συμπληρώματα καθώς επίσης και με παράγοντες που σχετίζονται με την εθνικότητα και τον τρόπο ζωής του γενικού πληθυσμού.

(Α) Μεταβολική εκτίμηση θρεπτικών και διατροφικών παρεμβάσεων

Μια από τις πρώτες μελέτες που δημοσιεύτηκε το 1984 από τον Bales et al. ήταν η προσπάθεια μέτρησης των μεταβολικών επιδράσεων σε σχέση με διατροφικές αλλαγές. Σε αυτή την μελέτη, έγινε ανάλυση ανθρώπινων ούρων με NMR φασματοσκοπία ύστερα από περίοδο νηστείας και άσκησης. Τα φάσματα που συλλέχθηκαν αμέσως ύστερα από άσκηση έδειξαν αυξημένα επίπεδα γαλακτικού οξέος ενώ εκείνα της νηστείας έδειξαν κετονουρία όπως φάνηκε από την έκκριση στα ούρα ακετοξικού οξέος, ακετόνης και 3-D-υδροξυβουτυρικού.

Τα τελευταία 20 χρόνια η μεταβολομική προσέγγιση έχει κυρίως προσανατολιστεί σε τοξικολογικές και φαρμακολογικές έρευνες. Παρόλα αυτά, ο θεμελιώδης ρόλος της διατροφής στον συνολικό μεταβολισμό έχει ήδη απεικονισθεί σε τοξικολογικές μελέτες όπως αναφέρεται και στη μελέτη των Gray et al. το 1990 στη συσχέτιση της χρόνιας βλάβης όρχεων και συγκεντρώσεων κρεατίνης σε ούρα και πλάσμα ποντικών. Επίσης μελετήθηκαν οι μεταβολικές επιδράσεις του χλωριούχου καδμίου ενώ παρατηρήθηκε με

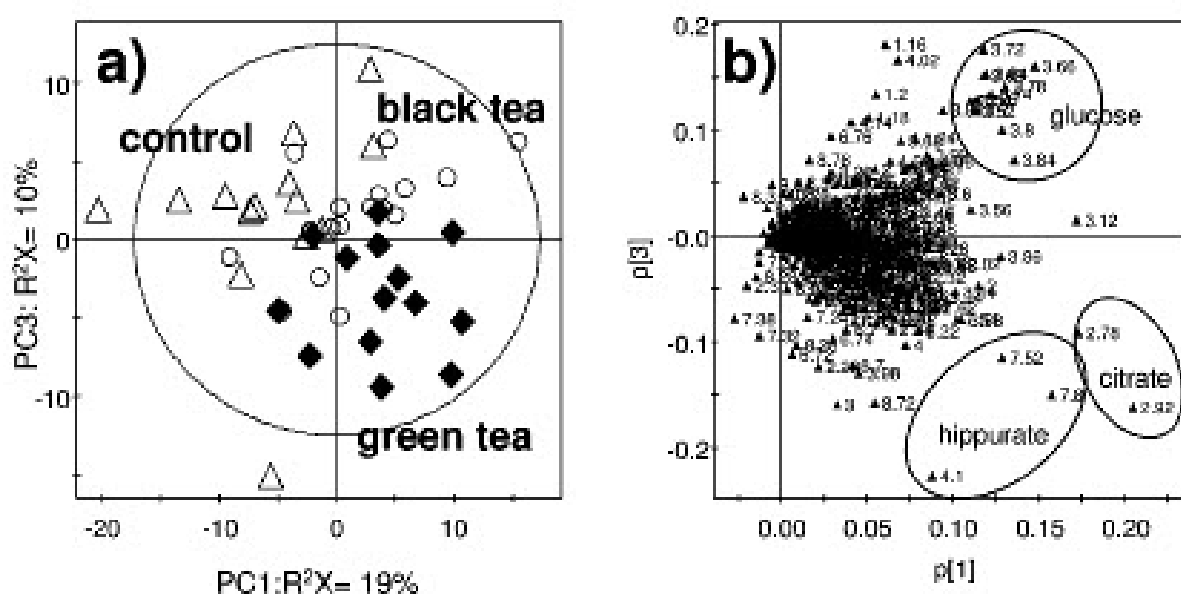
την χρήση του NMR ότι ο διατροφικός περιορισμός οδηγούσε σε αυξημένα επίπεδα κρεατίνης στο πλάσμα.

Πιο πρόσφατα, ο Shelman et al. εξέτασε τις γονιδιωματικές μεταγραφικές αλλαγές μαζί με τις μεταβολικές αλλαγές αίματος που προκαλούνται από χρόνιο θερμιδικό περιορισμό σε ποντίκια. Ο Griffin et al εφάρμοσε την μεταβολομική προσέγγιση για την παρατήρηση της μεταβολικής επίδρασης της βιταμίνης E ως συμπλήρωμα σε ποντίκια με εκφυλισμό του κινητήριου νευρώνα, που αποτελεί μια από τις πιο συνήθεις νευροεκφυλιστικές διαταραχές της παιδικής ηλικίας. Ο Solanky et al διερεύνησε τις μεταβολικές αλλαγές που ακολουθούν την διατροφική παρέμβαση με ισοφλαβόνες σόγιας σε πέντε υγιείς εμμηνοπαυσιακές γυναίκες και πρότεινε ότι οι ισοφλαβόνες έχουν παρεμποδιστική δράση στη γλυκόλυση, αλλάζοντας έτσι τον γενικό ενεργειακό μεταβολισμό από μεταβολισμό υδατανθράκων σε μεταβολισμό λιπιδίων.[37]

Η βιοχημική επίδραση των επικατεχινών, ενός βιοενεργού φλαβονοειδούς το οποίο αφθονεί σε πολλά προϊόντα όπως το τσάι, το κακάο και τα προϊόντα σοκολάτας, μελετήθηκε από τον Solanky et al σε ποντίκια με την χρήση NMR φασματοσκοπίας σε δείγματα ούρων, σε συνδυασμό με PCA (στατιστική ανάλυση). Ο Wang et al εφάρμοσε την μεταβολομική βασισμένη στο NMR για να εκτιμήσει τις συστηματικές μεταβολικές επιδράσεις στο πλάσμα ποντικών ύστερα από έκθεση τους σε στρες που προκλήθηκε από μητρική απομάκρυνση ή από δευτερογενή στρεσογόνο παράγοντα στην μετέπειτα ζωή τους. Ο Van Dorsen et al [42] συνέκρινε τις επιδράσεις της κατανάλωσης μαύρου με πράσινο τσάι στον ανθρώπινο μεταβολισμό. Τα διαφορετικά αφεψήματα είχαν διαφορετικές επιδράσεις στους ενδογενείς μεταβολίτες ενώ και για τα δύο προτάθηκε ότι επιδρούν στον ανθρώπινο οξειδωτικό ενεργειακό μεταβολισμό καθώς και σε βιοσυνθετικά «μονοπάτια» (**EIKONA 11**). Παρόμοια μελέτη έγινε από τον Wang et al σχετικά με την βιολογική απόκριση του ανθρώπινου οργανισμού ύστερα από κατανάλωση αφεψήματος χαμομηλιού, η οποία έδειξε μεταβολή στα επίπεδα ενδογενών

μεταβολιτών λόγω πιθανών αλλαγών που μπορεί να προκαλεί το χαμομήλι στον μεταβολισμό της μικροχλωρίδας του εντέρου.

Η χρήση των δεδομένων που προέρχονται από διατροφο-μεταβολομικές μελέτες αντιμετωπίζει την πρόκληση ότι οι αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ των βιολογικά πολύπλοκων οργανισμών (όπως οι άνθρωποι) ως απόκριση σε συγκεκριμένη διατροφή ή



ΕΙΚΟΝΑ 11. PCA από NMR προφίλ ούρων . Στο Scores plot (αριστερά) φαίνεται η ομαδοποίηση των προφίλ ύστερα από κατανάλωση μαύρου και πράσινου τσαγιού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, ενώ στο loadings plot (δεξιά) κάθε σημείο είναι και μια NMR μεταβλητή και δείχνει που οφείλονται οι διαχωρισμοί στο Scores plot. [42]

τρόφιμα μπορεί να είναι δύσκολο να διαφοροποιηθούν από την κανονική φυσιολογική διακύμανση. Η Walsh et al μελέτησε την επίδραση της διατροφικής τυποποίησης στα μεταβολικά προφίλ πολλών βιολογικών υγρών υγείων ανθρώπων. Η ενδο-ατομική διακύμανση μελετήθηκε επιτρέποντας στα άτομα να ακολουθούν την κανονική τους διατροφή και στην συνέχεια να επαναλάβουν ακριβώς την προηγούμενη τους διατροφή

και την φυσική τους δραστηριότητα. Η δια-ατομική βιοχημική διακύμανση εκτιμήθηκε παρέχοντας στα άτομα μία τυποποιημένη διατροφή και αποφεύγοντας έντονες δραστηριότητες. Πρόσφατα, ο Stella et al εφάρμοσε την μεταβολομική και το NMR για τον χαρακτηρισμό των μεταβολικών επιδράσεων χορτοφαγικής διατροφής, διατροφής με λίγο κρέας και διατροφής με πολύ κρέας σε ανθρώπους. Από την στατιστική ανάλυση βρέθηκε ότι κάθε διατροφή διαφοροποιόταν από τις υπόλοιπες και καθεμία συνδεόταν επίσης με διαφορετικά επίπεδα μεταβολιτών .[37]

(B) Μεταβολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροχλωρίδας εντέρου - ξενιστή

Οι πολύπλοκοι οργανισμοί όπως οι άνθρωποι έχουν συν-εξελιχθεί με την εντερική μικροχλωρίδα και έχουν μια συμβιωτική σχέση με πολλούς μικροοργανισμούς στο έντερο. Οι άνθρωποι μπορούν να θεωρηθούν ως υπερ-οργανισμοί με ένα εσωτερικό οικοσύστημα ποικίλων συμβιωτικών μικροβίων και παρασίτων τα οποία έχουν διαδραστικές μεταβολικές διαδικασίες. Η ομοιοστατική ισορροπία και το μεταβολικό συμπλήρωμα ενός οργανισμού (metabolome) εξαρτώνται όχι μόνο από τον ξενιστή αλλά και από το μεταβολικό συμπλήρωμα της μικροχλωρίδας (microfloral complement-cometabolome). Πλέον υπάρχουν όλο και περισσότερα στοιχεία για την σημασία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ μεταβολισμού μικροχλωρίδας και ξενιστή. Η διατροφή ρυθμίζει την πολύπλοκη εσωτερική «κοινωνία» των εντερικών μικροοργανισμών και μπορεί να αλλάξει δραματικά την βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και του μεταβολισμού. Έτσι είναι μεγάλης σημασίας για την διατροφή η κατανόηση και ο μεταβολικός χαρακτηρισμός των αλληλεπιδρώντων μοριακών διαδικασιών μεταξύ ξενιστή και μικροχλωρίδας. Η μεταβολομική κρίνεται ως μια ιδανική προσέγγιση για την εκτίμηση του μεταβολισμού της εντερικής μικροχλωρίδας και της μεταβολικές επιδράσεις στον ξενιστή μέσα από την δημιουργία προφίλ βιολογικών υγρών όπως τα ούρα. Τα ούρα θεωρούνται προϊόν αυτής της αλληλεπίδρασης μεταβολικού

συμπληρώματος ξενιστή - μεταβολικού συμπληρώματος μικροχλωρίδας (metabolome-metabolome).

Ο Nicholls et al χρησιμοποίησε την NMR μεταβολομική για να εκτιμήσει τα «μονοπάτια» προσαρμογής αξενικών ποντικών σε καθορισμένες εργαστηριακές συνθήκες, συνοδευόμενες από την σχετική ανάπτυξη της εντερικής μικροχλωρίδας. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι χρειάζεται ένα ελάχιστο πέρας ημερών (21) ώστε να εγκληματιστούν τα αξενικά ζώα στο φυσιολογικό περιβάλλον μέσα από την εγκατάσταση σταθερής μικροχλωρίδας. Πιο πρόσφατα, ο Martin et al διερεύνησε τα μεταβολικά αποτυπώματα της μόλυνσης από *Trichinella spiralis* σε ποντίκια με μετα-μολυσματικό σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου για να εκτιμήσει αν η χρήση συμπληρωμάτων με προβιοτικά βακτήρια θα μπορούσε να αναστρέψει της μεταβολικές ανωμαλίες της μετα-μολυσματικής κατάστασης. Ακόμα μια μελέτη διεξήγαγε και ο Dumas et al, ο οποίος εξέτασε την επίδραση της διατροφικής αλλαγής σε ποντίκια με ευπάθεια στην αντίσταση ινσουλίνης (IR, insulin resistance) και στην ασθένεια NAFLD (nonalcoholic fatty liver disease).[37]

(Γ) Ενδο- και δια- ατομική μεταβολική διακύμανση

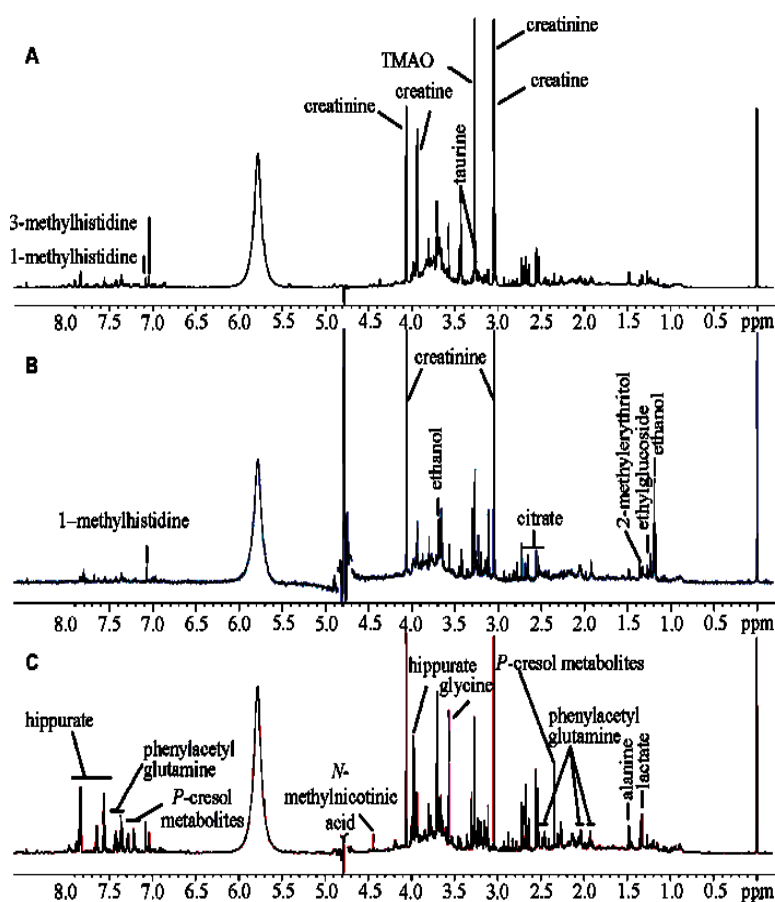
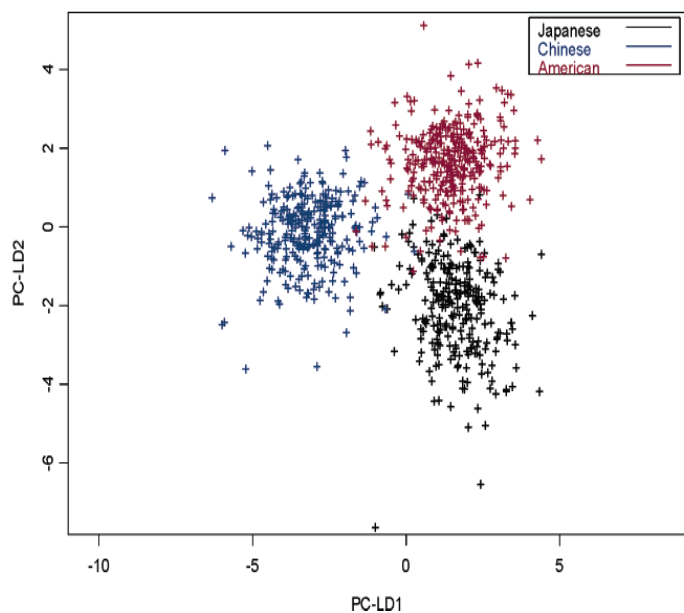
Η πολυπλοκότητα του μεταβολικού συμπληρώματος (metabolome) αντικατοπτρίζει τις πολυάριθμες σχέσεις και μηχανισμούς ρύθμισης που πηγάζουν από τις γενετικές, κανονικές φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες, τον μεταβολισμό της μικροχλωρίδας του εντέρου, περιβαλλοντικούς παράγοντες και την διατροφή. Μια από τις κυριότερες προκλήσεις της διατροφο-μεταβολομικής σχετίζεται με τον διαχωρισμό συγκεκριμένων μεταβολικών αποτυπωμάτων εξαιτίας καλά καθορισμένων τροφίμων ή διατροφών εντός του μεταβολικού συμπληρώματος. Το μεταβολικό συμπλήρωμα αυτό αποτελείται από πολυάριθμα αποτυπώματα που οφείλονται σε πολλούς παράγοντες όπως

είναι το φύλο, η γήρανση, η φυσιολογική κατάσταση και ο τρόπος ζωής. Διαφορετικές μελέτες έχουν προσπαθήσει να περιγράψουν αυτά τα μεταβολικά αποτυπώματα.

Η επιρροή αυτών των πολλών φυσιολογικών παραμέτρων στην σύσταση των βιολογικών υγρών σε ζώα τα οποία χρησιμοποιούνται στην φαρμακολογική και στην τοξικολογική έρευνα έχουν διερευνηθεί από τον Bollard et al. Στην μελέτη αυτή καταγράφηκαν διαφορετικά μεταβολικά αποτυπώματα σε σχέση με εγγενείς (είδος, στέλεχος, γενετικά τροποποιημένα ζώα, ηλικία, φύλο, διακύμανση μεταξύ των ζώων που οφείλεται σε γενετική ποικιλότητα ή στρες, ορμονικές επιδράσεις) και εξωγενείς (ημερήσιες διακυμάνσεις, διατροφή, νηστεία και έλλειψη νερού, θερμοκρασία, έλλειψη ύπνου, άγχος, μικροχλωρίδα εντέρου και εγκλιματισμός) παράγοντες. Ένας πολύ σημαντικός φυσιολογικός παράγοντας που προκαλεί μεταβολικές αλλαγές και κατά συνέπεια συμμετέχει στην συνολική δια-ατομική διακύμανση είναι η ηλικία. Ο Williams et al εφάρμοσε φασματοσκοπία NMR και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (HPLC-MS) για την μελέτη των αλλαγών σε ενδογενείς μεταβολίτες σε ούρα που σχετίζονται με την ηλικία σε ποντίκια για περίοδο πάνω από πέντε μήνες. Κατάφερε να συνδέσει τις ηλικιακά εξαρτώμενες μεταβολικές αλλαγές με την ωρίμανση της εντερικής μικροχλωρίδας, με αλλαγές στη λειτουργία των νεφρών, το μεταβολισμό του ήπατος και άλλα εξελικτικά γεγονότα όπως η ανάπτυξη και η σεξουαλική ωρίμανση.

Πρόσφατα έχουν αξιολογηθεί συγκεκριμένες μεταβολικές διαφορές σε ανθρώπους που βασίζονται στην ηλικία, στο φύλο και στο Δείκτη Μάζας Σώματος (BMI). Ο Kocchar et al με τον συνδυασμό NMR μεταβολομικής σε δείγματα ούρων και αίματος και στατιστικής ανάλυσης, έδειξε ότι με την αύξηση της ηλικίας ο μεταβολισμός ευνοεί την σύνθεση λιπιδίων έναντι πρωτεϊνών στους άνδρες ενώ στις γυναίκες η ολική λιπιδική βιοσύνθεση μειώνεται ως αποτέλεσμα των ορμονικών αλλαγών. Ο Dumas et al [20] πραγματοποίησε επίσης μια πρωτότυπη, μεγάλης κλίμακας, πληθυσμιακή μελέτη χρησιμοποιώντας την NMR μεταβολομική και τη στατιστική. Σε αυτή την

επιδημιολογική μελέτη, η βιοχημική διακύμανση των προφίλ ούρων από δείγματα πληθυσμών Ιαπωνίας, Νότιας Αμερικής και Κίνας έδειξε ότι κάθε πληθυσμός είχε διαφοροποίηση ως προς ορισμένους μεταβολίτες που ήταν συνάρτηση των διατροφικών του συνηθειών (**EIKONA 12**). Τέλος, ο Lenz et al εκτίμησε την συγκρισιμότητα μεταβολομικών προφίλ ούρων από δείγματα πληθυσμών Βρετανίας και Σουηδίας. Τα προφίλ αυτά ήταν διαφορετικά λόγω επιδράσεων διατροφικών και τρόπου ζωής.[37]



ΕΙΚΟΝΑ 12.(αριστερά) PCA Scores plot όπου διακρίνονται οι διαφορετικοί πληθυσμοί Γιαπωνέζων (μαύρο), Κινέζων(μπλε) και Αμερικανών (κόκκινο). (δεξιά) 600-MHz ^1H NMR φάσμα ανθρώπινων ούρων από (Α)Γιαπωνέζους, (Β)Κινέζους,και (C)Αμερικανούς. [20]

[3^{Γ.4}] Μελλοντικός ρόλος της μεταβολομικής στην διατροφολογική έρευνα

Η μεταβολομική ταιριάζει ιδιαίτερα στην εξερεύνηση της πολύπλοκης σχέσης μεταξύ διατροφής και μεταβολισμού . Έτσι μπορεί να διερευνηθεί ο ρόλος που παίζουν τα διατροφικά συστατικά για την διατήρηση της υγείας και για την εκδήλωση ασθενειών. Όντως, αυτή η δυνατή προσέγγιση δίνει τη δυνατότητα να διερευνηθούν οι μηχανισμοί ομοιοστατικού ελέγχου και να εκτιμηθεί το πώς οι μεταβολικές ισορροπίες μπορούν να διαταραχθούν από ελλείψεις ή πλεονασμούς θρεπτικών συστατικών. Τα μεταβολικά προφίλ των βιολογικών υγρών ή ιστών μπορούν να θεωρηθούν σημαντικοί δείκτες του κανονικού φαινότυπου, των φυσιολογικών ή παθολογικών καταστάσεων, δίνοντας μια μοναδική δυνατότητα για την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών ασθένειας σε προγνωστικές και διαγνωστικές εφαρμογές.

Ανάπτυξη Βιοδεικτών

Αν η εξέλιξη στον τομέα της διατροφής είχε περιοριστεί λόγω αναλυτικών προκλήσεων, τώρα με τις πιο εξελιγμένες αναλυτικές τεχνικές στην βιολογία συστημάτων και την μεταβολομική, είναι δυνατή η εκτίμηση των μεταβολικών αποκρίσεων πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων σε πολυσύνθετα μίγματα διατροφικών συστατικών. Η πρόκληση έγκειται στη συσχέτιση των διατροφικών βιολογικών επιδράσεων με σχετικούς βιοδείκτες ενώ είναι απαραίτητη η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών ενδεικτικών των μικρών μεταβολών της ομοιόστασης. Η κατάσταση ασθένειας μπορεί να θεωρηθεί ως απώλεια της ομοιόστασης και η μεθοδολογία της μεταβολομικής δύναται να περιγράψει την κατάσταση αυτή. Πολλές και ενθαρρυντικές είναι οι εφαρμογές για την διάγνωση

πολυπαραμετρικών ασθενειών όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης τύπου II, η υπέρταση και ο επιθηλιακός καρκίνος των ωοθηκών. Η μεταβολομική μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία μοντέλων βιοδεικτών για πρόγνωση, διάγνωση, εκτίμηση της αποτελεσματικότητας φαρμάκων ή διατροφικών παρεμβάσεων που σχεδιάστηκαν για να διορθώσουν ομοιοστατικές δυσλειτουργίες.

Η χρήση τέτοιων βιοδεικτών στην διατροφο-μεταβολομική θα μπορούσε να βοηθήσει στην ταυτόχρονη παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας των τροφίμων. Τα διατροφικά συστατικά δεν καταναλώνονται ποτέ ξεχωριστά αλλά σαν μέρος ενός διατροφικού συνόλου-μείγματος. Η ολική μεταβολική απόκριση σε ένα άτομο θα είναι το συνολικό αποτέλεσμα πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων με τα διατροφικά συστατικά του μείγματος, που πιθανόν δρουν συνεργικά, καθώς επίσης και εξωγενών παραγόντων όπως περιβαλλοντικοί στρεσογόνοι παράγοντες και ο τρόπος ζωής. [37]

Ατομική υγεία και εξατομικευμένη διατροφή

Οι ασθένειες των σύγχρονων κοινωνιών όπως ο διαβήτης, οι καρδιακές παθήσεις και ο καρκίνος είναι γνωστό ότι επηρεάζονται από τις διατροφικές συνήθειες. Ο σκοπός της διατροφής συμπεριλαμβάνει εκτός από την βελτίωση ή την θεραπεία μιας ασθένειας και την πρόληψη ασθενειών αλλά και την βελτίωση της υγείας ολόκληρων πληθυσμών. Η ανάλυση λοιπόν του ανθρώπινου και του ζωικού μεταβολικού συμπληρώματος (metabolome) θα βοηθήσει στην δημιουργία βάσεων δεδομένων για την σύγχρονη διατροφή. Η εξεύρεση βιοδεικτών, όπως προαναφέρθηκε, θα έχει ως μόνο στόχο την πρόβλεψη της πιθανότητας εκδήλωσης ασθενειών ενός ατόμου και την αναγνώριση της αιτιώδους βάσης του κινδύνου. Αυτό θα οδηγήσει στην υπόδειξη των κατάλληλων παρεμβάσεων όπως οι διατροφικές αλλαγές, προς αποφυγή απώλειας της ομοιόστασης και διατήρηση της μεταβολικής υγείας.

Οι γενετικές διακυμάνσεις, οι περιβαλλοντικές συνθήκες και οι διατροφικές συνήθειες συνδέονται με την κουλτούρα και τον τρόπο ζωής και υποδεικνύουν ατομικές προδιαθέσεις σε ασθένεια και σε υγεία. Τα διάφορα άτομα ανταποκρίνονται διαφορετικά σε συγκεκριμένες διατροφές εξαιτίας της βιοχημικής τους διακύμανσης ενώ μια διατροφή που είναι ιδανική για ένα άτομο μπορεί να προδιαθέτει κάποιο άλλο σε ασθένεια. Η βιοχημική διακύμανση ανθρώπων και ζώων είναι κωδικοποιημένη σε πολύπλοκα μεταβολικά «μονοπάτια» τα οποία επεξηγούνται από την μεταβολομική, κάνοντας την έτσι ένα ισχυρό μέσο για τον καθορισμό των φαινοτύπων σε πληθυσμούς.

Ο «μεταβολικός φαινότυπος» ή «μεταβολότυπος» (metabotype) έχει οριστεί ως «η πιθανοτική πολυπαραμετρική περιγραφή ενός οργανισμού σε δεδομένη φυσιολογική κατάσταση βασισμένη σε ανάλυση των κυτταρικών τύπων, βιολογικών υγρών ή ιστών». Ο ανθρώπινος μεταβολότυπος καθορίζεται από ένα συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων και την διατροφή και τον τρόπο ζωής να αντιπροσωπεύουν σημαντικές πηγές ποικιλομορφίας. Ο καθορισμός του μεταβολότυπου στους ανθρώπινους πληθυσμούς θα ήταν μεγάλης σημασίας για τον συσχετισμό ποσοτικών φυσιολογικών και βιοχημικών δεδομένων με φαινοτυπικές, γενετικές και περιβαλλοντικές διακυμάνσεις. Θα παρείχε ένα μοναδικό μέσο χαρακτηρισμού των ορίων της μεταβολικής «κανονικότητας» για την διαχείριση της υγείας. Η μέτρηση της επίδρασης της υγείας στον μεταβολότυπο θα παρείχε πληροφορίες για δημογραφικές και πληθυσμιακές μελέτες της διατροφικής διακύμανσης στον άνθρωπο και του βαθμού της απόκρισης αυτού στην διατροφική ρύθμιση. Αυτό μπορεί να παρέχει τη γνώση για το ρόλο της διαίτας και της διατροφής ως προς την εμφάνιση των ανθρώπινων ασθενειών και να δώσει πληροφορίες για την εξατομίκευση της διατροφής.

Η εξατομίκευση της διατροφής είναι το αποτέλεσμα εκείνων των ατόμων που θα προσαρμόσουν την διατροφή τους και τον τρόπο ζωής τους σύμφωνα με την γνώση της παρούσας και της μελλοντικής κατάστασης της υγείας τους και των μεταγενέστερων διατροφικών απαιτήσεων τους. Αυτή η γνώση θα βασιστεί στον χαρακτηρισμό των

διαφορετικών μεταβολότυπων σε ανθρώπινους πληθυσμούς. Όπως η ιδέα της φαρμακο-μεταβολομικής για την εξατομίκευση της θεραπείας με φάρμακα έτσι και η διατροφο-μεταβολομική θα μπορούσε να εφαρμοστεί στην διατροφική έρευνα για την εκτίμηση της ατομικής απόκρισης σε τρόφιμα και διατροφές. Μελλοντικά, οι διατροφολόγοι θα μπορούν να χρησιμοποιήσουν τα μεταβολικά προφίλ αυτά για να μετρήσουν, να προβλέψουν και να βελτιστοποιήσουν τις μεταβολικές αποκρίσεις των ατόμων σε διατροφικές ρυθμίσεις. Σε περιπτώσεις απόκλισης από την ομοιόσταση, θα μπορούσε ο διατροφολόγος να αναπτύξει μια συγχρονισμένη προσέγγιση για τον επανακαθορισμό μιας μεταβολικής «διόδου» για το άτομο, συνεπεί με τον μεταβολότυπο του και του υπάρχοντος τρόπου ζωής του και των προσδοκιών υγείας του.

Συνοψίζοντας, η προσέγγιση της διατροφο-μεταβολομικής έχει ήδη απεικονίσει τις δυνατότητες της για την ποσοτική μέτρηση των δυναμικών πολυπαραμετρικών μεταβολικών αποκρίσεων των ζωντανών οργανισμών σε διατροφικές παρεμβάσεις. Η δημιουργία μεταβολικών προφίλ βιολογικών υγρών με την χρήση φασματοσκοπίας NMR ή MS εξασφαλίζει μια ταυτόχρονη ανάλυση πλήθους μεταβολιτών οι οποίοι είναι τα «τελικά σημεία» (endpoints) των μοριακών ρυθμιστικών διαδικασιών, της διατροφής, του μεταβολισμού της εντερικής μικροχλωρίδας καθώς και των περιβαλλοντικών παραγόντων. Με αυτό τον τρόπο η μεταβολομική, ως ολιστική προσέγγιση, ταιριάζει απόλυτα για την εξεύρεση νέων βιοδεικτών ικανών να παρέχουν μια καλύτερη εξήγηση των πολύπλοκων μεταβολικών φαινομένων καθώς και των ενδο- και δια- ατομικών διαφορών. Ο καθορισμός του μεταβολικού φαινότυπου ή μεταβολότυπου των ανθρώπινων πληθυσμών θα προσφέρει μια τεράστια δυνατότητα στην εκτίμηση της μεταβολικής απόκρισης και του βαθμού αυτής, σε καθορισμένες διατροφικές μεταβολές σε ατομικό επίπεδο. Αντίστοιχα, η δημιουργία μεταβολικών προφίλ θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την απεικόνιση και την πρόβλεψη των αποκρίσεων ενός ατόμου σε κάποια τρόφιμα. Η διατροφο-μεταβολομική αναμένεται ως μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση απέναντι στην εξατομικευμένη διατροφή.[37]

[4] ΣΚΟΠΟΣ

Η NMR μεταβολομική έχει επιδράσει σημαντικά σε πολλά πεδία εφαρμογών λόγω των πλεονεκτημάτων του NMR. Όπως έχει αναφερθεί και στο εισαγωγικό μέρος, η αναλυτική αυτή τεχνική πλεονεκτεί διότι παρέχει επαναληψιμότητα, ανθεκτικότητα, το κόστος ανά δείγμα και ανά αναλύτη είναι ελάχιστο, δεν χρειάζεται προεπιλογή αναλύτη και με την χρήση βιολογικών υγρών είναι ελάχιστα επεμβατική. Η παρούσα εργασία είναι βασισμένη στην εφαρμογή των πλεονεκτημάτων αυτών των μεταβολομικών προσεγγίσεων για μια μη στοχευμένη ανάλυση βιολογικών δειγμάτων αθλητών και την ολιστική παρακολούθηση των δεδομένων που προκύπτουν.

Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ούρων από αθλητές άρσης βαρών πάγκου με κάποια αναπηρία. Οι αθλητές αυτοί ακολουθούσαν μια συγκεκριμένη διατροφή ενώ ήταν γνωστές και πληροφορίες όπως η λήψη συμπληρωμάτων/φαρμάκων, το κάπνισμα, η συμμετοχή τους σε αγώνες, το φύλο, η αναπηρία τους κ.α. Επιπλέον, στο διάστημα της περιόδου δειγματοληψίας έγινε μια διατροφική παρέμβαση στους αθλητές αυτούς με αφέψημα πράσινου τσαγιού για 3 εβδομάδες. Πρόκειται για μια ενδιαφέρουσα ομάδα «οργανισμών» αφού ως αθλητές είναι σχετικά ελεγχόμενοι ως προς την διατροφή τους και άλλους παράγοντες και γενικότερα δεν υπάρχει μεγάλη ποικιλία επίδρασης περιβαλλοντικών παραγόντων σε αυτούς.

Θεωρήθηκε λοιπόν ιδιαίτερα «ελκυστική» ερευνητικά η μεταβολομική «παρακολούθηση» του πληθυσμού αυτού των αθλητών για τους παραπάνω λόγους και στόχος της μελέτης αυτής είναι αρχικά η ανάλυση των δειγμάτων ούρων με μονοδιάστατη και δισδιάστατη φασματοσκοπία ^1H NMR και η ταυτοποίηση των ευρεθέντων μεταβολιτών. Ως επόμενο βήμα είναι η δημιουργία των μεταβολικών προφίλ των αθλητών αυτών με τη χρήση χημειομετρικών εργαλείων και η παρακολούθηση/διερεύνηση των προφίλ αυτών για να εκτιμηθεί αν οι αθλητές αυτοί διαφοροποιούνται μεταξύ τους ανάλογα με την διατροφή τους ή με άλλες παραμέτρους, αν η διατροφική παρέμβαση με το αφέψημα τσαγιού επιδρά στον μεταβολισμό τους και αν συμμετοχή τους στους Αγώνες μεταβάλλει καθόλου τα μεταβολικά τους προφίλ λόγω της διαφορετικής προπόνησης που ακολουθούν.

[5] ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

[5 ^A] Προετοιμασία δειγμάτων

Στο πειραματικό στάδιο της μεταβολομική μελέτης αυτής αναλύθηκαν 250 δείγματα ούρων από ομάδα 10 αθλητών άρσης βαρών από πάγκο με αναπηρία (8 άνδρες και 2 γυναίκες) οι οποίοι βρίσκονταν σε στάδιο προετοιμασίας και προπονούνταν σύμφωνα με το ατομικό ή ομαδικό πρόγραμμα προπόνησής τους. Στη μελέτη αυτή, η προεπιλογή των δειγμάτων δεν ήταν εφικτή καθώς τα δείγματα απεστάλησαν μέσω συνεργασίας από το εργαστήριο του Καθηγητή Βιοχημείας της Άσκησης κ^{ov} Β.Μούγιου στη Θεσσαλονίκη. Οι αθλητές αυτοί ακολουθούσαν συγκεκριμένη διατροφή και έδιναν δείγματα ούρων στην αρχή κάθε εβδομάδας ενώ έλαβαν και για 2 εβδομάδες αφέψημα πράσινου τσαγιού όπου και εδώ έδωσαν δείγματα ούρων στην αρχή και στο τέλος της περιόδου αυτής. Τα δείγματα αυτά ελήφθησαν σε χρονικό διάστημα 6 μηνών (6/2009 έως και 12/2009) και διατηρήθηκαν παγωμένα στους -80 °C έως τη διαδικασία λήψης των φασμάτων. Επιπλέον πληροφορίες για τους αθλητές παρατίθενται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ στο τέλος της εργασίας.

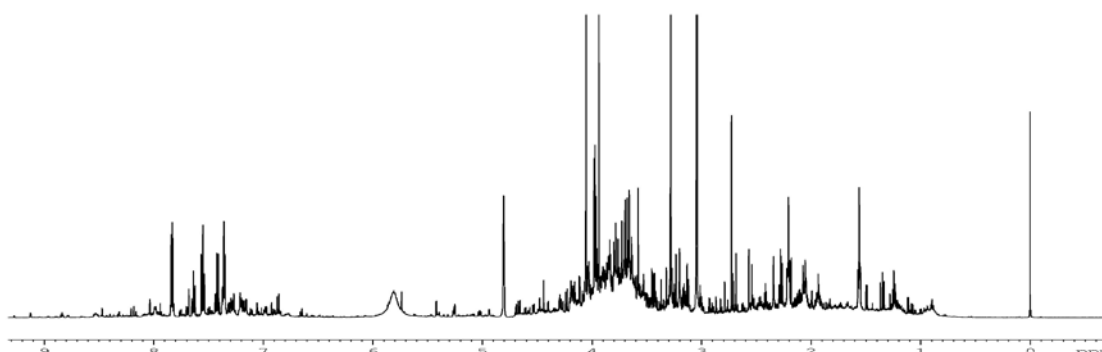
Αρχικά, τα δείγματα ξεπάγωσαν με φυσικό τρόπο σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια 630 μl από κάθε δείγμα αναμίχθηκε με 70 μl φωσφορικού buffer (10% της αρχικής ποσότητας του δείγματος). Ακολούθησε φυγοκέντρωση (4 °C, σε 4000 rpm, για 5 min). Τέλος, 550 μl από το υπερκείμενο μεταφέρθηκαν σε NMR tubes διαμέτρου 5 mm.

Για το buffer χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια : 1,5M KH_2PO_4 / D_2O pH 7.4 (μαζί με KOH), 2mM NaN_3 και 0.1% TSP (sodium 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3- $^2\text{H}_4$)-1-propionate, Aldrich 269913). Ποσότητα 0,050g TSP διαλύθηκε σε 4ml D_2O και αναμίχθηκε με διάλυμα KH_2PO_4 (10.2g) σε 40ml D_2O σε συσκευή υπερήχων. Ακολούθως, το pH ρυθμίστηκε στα 7,4 με την προσθήκη διαλύματος KOD (KOH σε D_2O). Τέλος, προστέθηκαν 0,0065g NaN_3 ως συντηρητικό και ο όγκος του τελικού διαλύματος συμπληρώθηκε με D_2O μέχρι τα 50ml.

[5^B] ΛΗΨΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ

Λήψη φασμάτων ¹H NMR

Οι περισσότερες εφαρμογές της NMR μεταβολομικής βασίζονται στα 1D NMR πειράματα. Τα φάσματα ¹H NMR βιολογικών υγρών, και συγκεκριμένα ούρων, περιέχουν χιλιάδες σήματα τα οποία προέρχονται από εκατοντάδες ενδογενείς μεταβολίτες που αντιπροσωπεύουν πολλά βιοχημικά «μονοπάτια».[11] **(ΕΙΚΟΝΑ 13)** Στα βιολογικά υγρά αυτά υπάρχει σε υψηλές συγκεντρώσεις το νερό, το οποίο



ΕΙΚΟΝΑ 13: ¹H NMR φάσμα δείγματος ούρων αθλητών, στο οποίο διακρίνονται χιλιάδες κορυφές.

δημιουργεί προβλήματα στον ανιχνευτή του NMR και οδηγεί σε NMR κορυφές τόσο υψηλές που υπερκαλύπτουν τις υπόλοιπες μοριακές πληροφορίες. Για το λόγο αυτό στα ¹H NMR φάσματα ούρων εφαρμόζεται η τεχνική του προκορεσμού με εκλεκτική ακτινοβολία που προκαλεί μείωση της διαφοροποίησης των πληθυσμών των πυρήνων υδρογόνου του νερού που βρίσκονται στις δύο ενεργειακές καταστάσεις επιτυγχάνοντας έτσι καλή επαναληψιμότητα και ανθεκτικότητα στη λήψη των φασμάτων.[11,29]

Στην παρούσα μελέτη, όλα τα NMR πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε φασματοσκόπιο Bruker Avance III 600 MHz (Karlsruhe, Germany), εφοδιασμένο με αυτόματο δειγματολήπτη 60 θέσεων (B-ACS 60). Για το σύνολο των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής αντίστροφης ανίχνευσης (5 mm) με z-gradients στους 300 K (27 °C). Όλα τα δείγματα αφέθηκαν για 5 min έπειτα από την εισαγωγή τους στο μαγνήτη ώστε να ισορροπήσουν στην προρυθμισμένη θερμοκρασία των 300 K. Η προετοιμασία για τη λήψη πειράματος βελτιστοποιήθηκε για το πρώτο δείγμα και η ίδια διαδικασία χρησιμοποιήθηκε ταυτοποιημένα για όλες τις υπόλοιπες μετρήσεις, μέσω του προγράμματος ICONNMR, το οποίο εμπεριέχεται στο πρόγραμμα χειρισμού του οργάνου TOPSPIN (1.2 version, Bruker BioSpin GmbH). Τα πειράματα που ελήφθησαν ήταν 1D NOESY (noesygppr1D), με κορεσμό της κορυφής του διαλύτη νερού (water presaturation) και 2D J-resolved κατά τη διάρκεια της αποδιέγερσης και του χρόνου μίξης για τον κορεσμό του νερού. Συγκεκριμένα για το 1D NOESY συλλέχθηκαν 32 σαρώσεις δίνοντας 64K σημεία δεδομένων για φασματικό εύρος 12335,5 Hz, με επιτρεπόμενο χρόνο αποδιέγερσης (relaxation delay) 4 s, χρόνο συλλογής (acquisition time) 2.65 s και χρόνο μίξης (mixing time) 0.01 s. Ένας παραγοντικός συντελεστής διεύρυνσης των φασματικών γραμμών (line broadening) 0.3 Hz εφαρμόστηκε σε όλα τα ληφθέντα Σήματα Εξασθένισης Ελεύθερης Επαγωγής (Free Induction Decay) πριν από το μετασχηματισμό Fourier. Η πλήρως αυτοματοποιημένη επεξεργασία των φασμάτων εμπεριείχε την τοποθέτηση του ^1H μορίου αναφοράς TSP στα 0.0 ppm και τη διόρθωση της γραμμής βάσης και της φάσης.

Λήψη φασμάτων 2D NMR

Η 2D NMR φασματοσκοπία είναι πολύ χρήσιμη γιατί βοηθάει στην καλύτερη ταυτοποίηση των μεταβολιτών. Περιλαμβάνει ομοπυρηνικά και ετεροπυρηνικά πειράματα, ενώ αυτά που ελήφθησαν στην μελέτη αυτή ήταν τα ^1H - ^1H 2D J-resolved, ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY και ^1H - ^{13}C DEPT135-HSQC.

Λήψη φασμάτων ^1H - ^1H 2D J-resolved

Το ^1H - ^1H 2D J-resolved πείραμα παρέχει πληροφορίες για την πολλαπλότητα και τις συζεύξεις των κορυφών με συντονισμό. Για κάθε δείγμα πραγματοποιήθηκε ένα γρήγορο J-resolved πείραμα, με σκοπό να χρησιμοποιηθεί στη διαδικασία της ταυτοποίησης μεταβολιτών, χρησιμοποιώντας την παλμική αλληλουχία jresgpprgf όπως αυτή υπάρχει καταχωρημένη στη βιβλιοθήκη του οργάνου. Για κάθε φάσμα μία μόνο σάρωση εφαρμόστηκε και συλλέχθηκε σε 64K σημεία δεδομένων σε ένα φασματικό εύρος 10000Hz, με επιτρεπόμενο χρόνο αποδιέγερσης 2 s και χρόνο συλλογής 0.4 s στην F2.

Λήψη φασμάτων ^1H - ^1H COSY και ^1H - ^1H TOCSY

Τα ^1H - ^1H COSY και ^1H - ^1H TOCSY πειράματα δίνουν πληροφορίες για το ποια υδρογόνα σε ένα μόριο βρίσκονται κοντά στην περίπτωση χημικού δεσμού. Σε επιλεγμένα δείγματα πραγματοποιήθηκαν πειράματα δύο διαστάσεων (2D) ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY με κορεσμό της κορυφής του διαλύτη νερού, όπως και ^1H - ^{13}C DEPT135-HSQC, για την επιβεβαίωση και απόκτηση επιπλέον πληροφοριών. Τα COSY φάσματα καταγράφηκαν χρησιμοποιώντας κατάλληλη παλμική αλληλουχία εφαρμόζοντας βαθμωτό πεδίο σε σχήμα ημιτόνου (sine-shaped gradient pulse) χωρίς ευαισθησία φάσεως, με 2048 χρονικά σημεία και 256 FID στην δεύτερη διάσταση, ενώ 4 σαρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε FID. Το φασματικό εύρος ήταν 12019 Hz, με περίοδο αποδιέγερσης 4 s και χρόνο συλλογής 0.08 s. Τα TOCSY φάσματα συλλέχθηκαν με ευαισθησία φάσεως με την States-TPPI μέθοδο και παλμική αλληλουχία DIPSI2, με 4096 χρονικά σημεία και 256 FID στην δεύτερη διάσταση, ενώ 16 σαρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε FID. Το φασματικό εύρος ήταν 12019 Hz, με περίοδο αποδιέγερσης 4 s και χρόνο συλλογής 0.17 s.

Λήψη φασμάτων ^1H - ^{13}C DEPT135-HSQC

Στο ^1H - ^{13}C DEPT135-HSQC η χημική μετατόπιση του ^{13}C σχετίζεται με τη χημική μετατόπιση ^1H του άμεσα συνδεδεμένου πρωτονίου μέσω σταθεράς σύζευξης J_{CH} [11,29]. Τα HSQC φάσματα καταγράφηκαν με ευαισθησία φάσεως με την echo-antiecho-TPPI μέθοδο, με βαθμιδωτό πεδίο και επιλογή πολλαπλότητας και GARP αποσύζευξη άνθρακα. Το φασματικό εύρος ήταν 12019 Hz στην μία διάσταση και 99018 Hz στην άλλη, με 1024 χρονικά σημεία και 256 FID στην δεύτερη διάσταση, ενώ 80 σαρώσεις χρησιμοποιήθηκαν για κάθε FID, με αδιαβατικό ανάστροφο παλμό και χρόνο αποδιέγερσης 1.5 s.

[5^Γ] ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΓΙΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

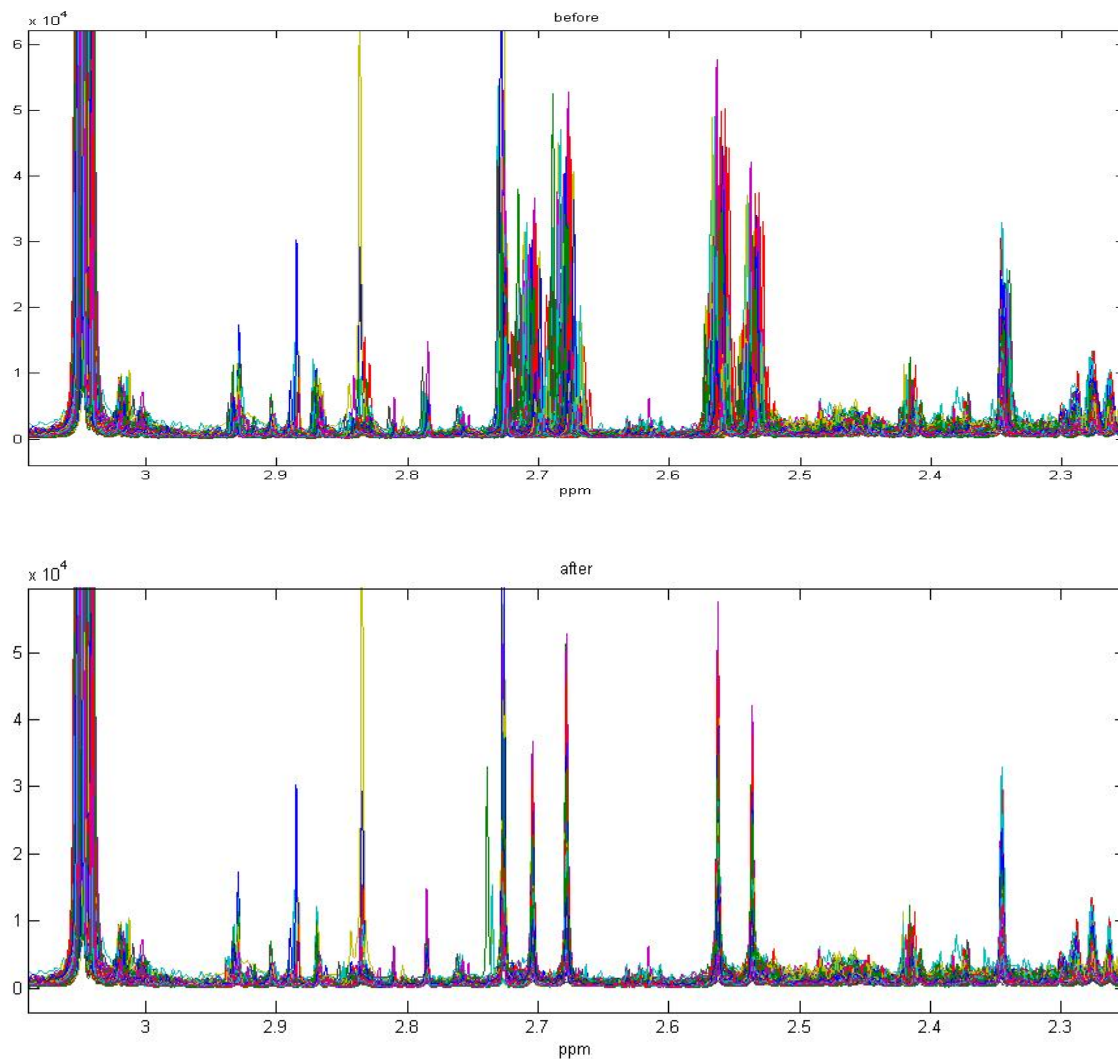
[5^{Γ.1}] ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΣΤΟ MATLAB

Το Matlab® είναι ένα καθιερωμένο διαδραστικό περιβάλλον, το οποίο είναι βασισμένο σε μαθηματικούς πίνακες για υπολογισμούς και οπτικοποίηση δεδομένων. Έχει μεγάλο εύρος εφαρμογών στους επιστημονικούς και μηχανολογικούς κλάδους. Η εκτενής βιβλιοθήκη προγραμμάτων (routines) για μαθηματικούς υπολογισμούς και οπτικοποίηση των δεδομένων το καθιστά ιδανικό ως μια «εργαλειοθήκη» (toolbox) επεξεργασίας που προσφέρει υψηλό βαθμό ελέγχου στο χρήστη. Ο γενικότερος σκοπός της χρήσης του «εργαλείου» αυτού είναι η επεξεργασία των φασμάτων-δεδομένων που προέκυψαν από την ανάλυση όλων των δειγμάτων των αθλητών της μελέτης αυτής, για να μπορέσουν στην συνέχεια τα δεδομένα αυτά να υποστούν στατιστική επεξεργασία και κατά συνέπεια να εξαχθεί ένα στατιστικά ακριβές μοντέλο για την διεξαγωγή των συμπερασμάτων της εργασίας αυτής.

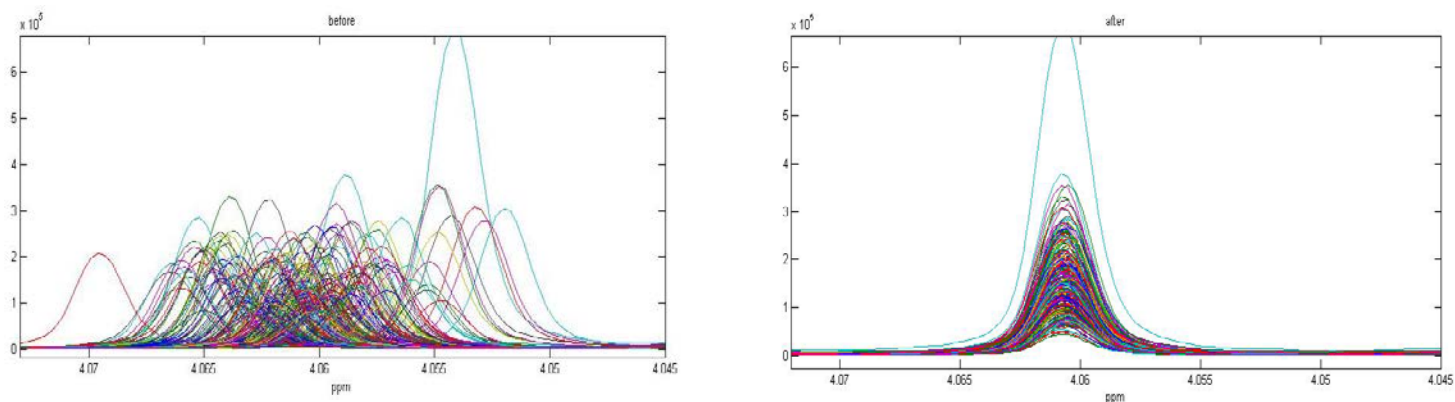
Το πρώτο βήμα της επεξεργασίας των δεδομένων ήταν η εισαγωγή των NMR φασμάτων στο λογισμικό Matlab® ώστε να γίνει η ευθυγράμμιση τους με την χρήση του εργαλείου ευθυγράμμισης icoshift (Savorani F., Tomasi G., Engelsens S.B. J Magnetic Reson. 2010;

202: 190-202) για το λογισμικό Matlab® programming language (2011b, The Mathworks Inc., Natick, MA, USA, web:www.models.life.ku.dk/sources). Υπάρχουν γενικά πολλοί χημικοί και φυσικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την σχετική θέση ενός σήματος NMR, ενώ συχνά δεν είναι δυνατό ή επιθυμητό να απομακρυνθούν αυτές οι επιδράσεις από πριν. Στα βιολογικά δείγματα όπου υπάρχουν οι μικρές μεταβολές στο pH και οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις, είναι επιτακτική η ευθυγράμμιση των φασμάτων πριν την χημειομετρική ανάλυση για να γίνει δυνατή η μετέπειτα εξευρέυνση των δεδομένων καθώς και η δημιουργία μεταβολικών προφίλ στις μεταβολομικές μελέτες.[43]

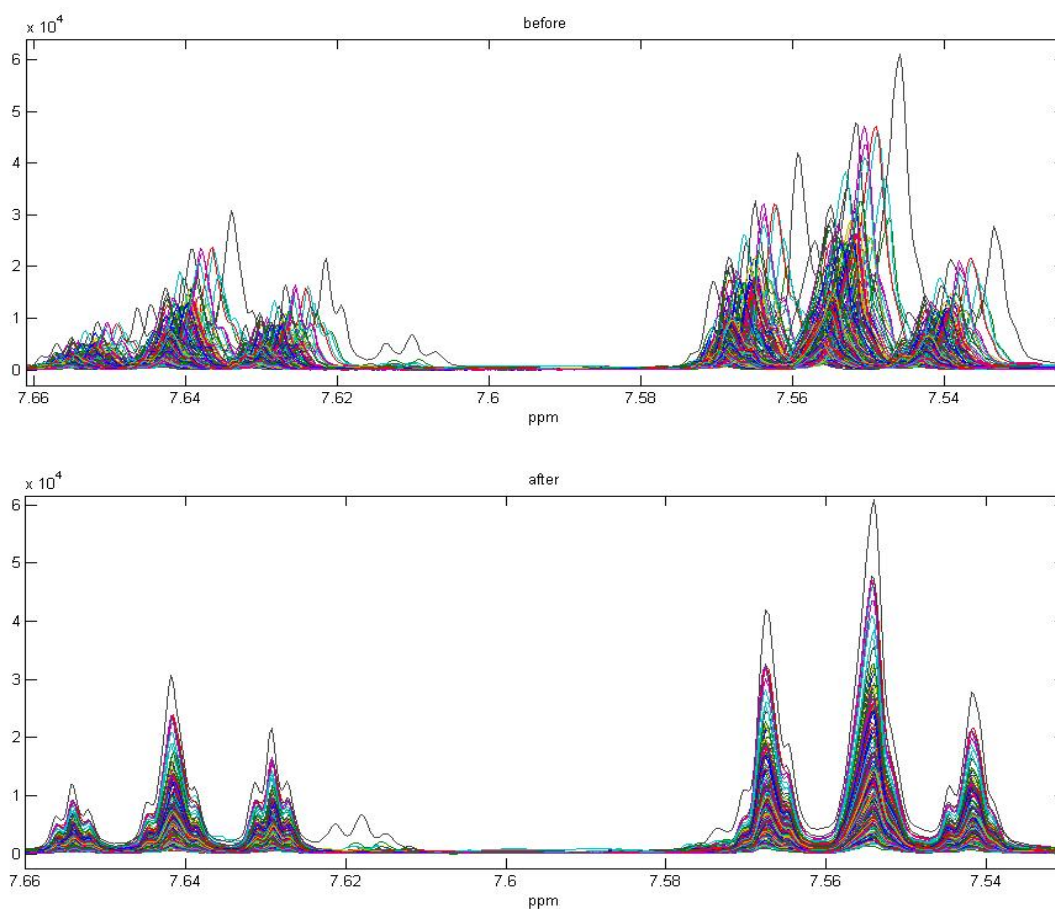
Το icoshift είναι ειδικά σχεδιασμένο λογισμικό ώστε να λύνει τα προβλήματα που παρουσιάζονται λόγω των μεταβολών στις χημικές μετατοπίσεις στα NMR φασματοσκοπικά δεδομένα.. Βασίζεται σε μεταβολές συσχέτισης φασματικών περιοχών (interval based correlation shifting) χρησιμοποιώντας έναν αλγόριθμο γρήγορου μετασχηματισμού κατά Fourier (FFT), ο οποίος επιτρέπει την ταυτόχρονη μεταβολή και ευθυγράμμιση κορυφών που ανήκουν σε πολλά δείγματα (στην συγκεκριμένη περίπτωση 250 φάσματα). Προϋπόθεση για την εφαρμογή του αλγορίθμου αυτού είναι η επιλογή από τον χρήστη της κάθε φασματικής περιοχής (interval) όπου εμπεριέχεται η κορυφή (ή οι κορυφές) η οποία θα ευθυγραμμισθεί. Γενικότερα, απαιτείται προσοχή στην επιλογή των διαστημάτων, καθώς είναι σχετικά εύκολο να αλλοιωθούν τα δεδομένα από την ευθυγράμμιση κορυφών που ανήκουν σε διαφορετικούς μεταβολίτες. Για το λόγο αυτό, κορυφές που εμφανίζονται σε περιοχές με συχνές αλληλεπικαλύψεις (π.χ. πρωτόνια του δακτυλίου σακχάρων) είναι προτιμότερο να εξαιρούνται από την διαδικασία.. Αν και οι διορθώσεις είναι μικρές, βελτιώνεται η ομοιογένεια των δεδομένων και διευκολύνεται η ερμηνεία των αποτελεσμάτων στην μετέπειτα πολυπαραμετρική ανάλυση. [43,29]



ΕΙΚΟΝΑ 14: Φάσματα ούρων αθλητών σε προβολή με υπέρθεση πριν και μετά την επεξεργασία μέσω icoshift. Είναι επίσης διακριτό και το φαινόμενο των μεταβολών στη χημική μετατόπιση κορυφών που ανήκουν στον ίδιο μεταβολίτη και συγκεκριμένα στις δύο διπλές κορυφές του κιτρικού οξέος (2.55 και 2.68 ppm) με την δεύτερη να αλληλεπικαλύπτεται σε κάποιες περιπτώσεις με την απλή κορυφή των μεθυλίων της διμεθυλαμίνης (2.73 ppm).

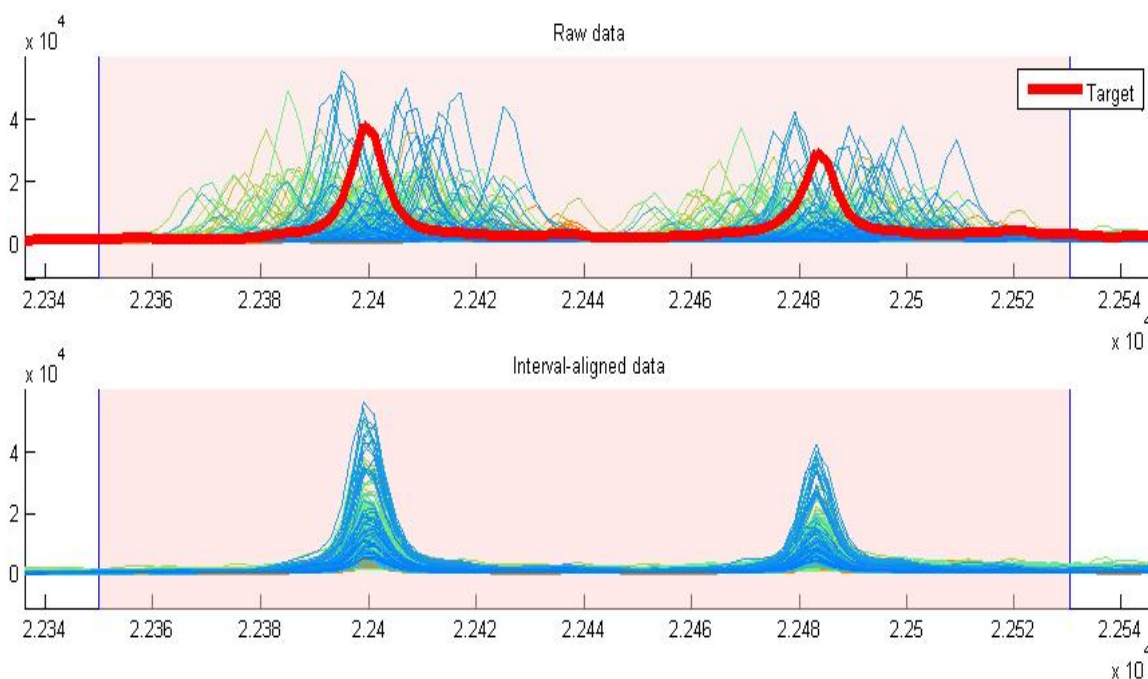


ΕΙΚΟΝΑ 15 . Φάσματα ούρων αθλητών σε προβολή με υπέρθεση πριν και μετά την επεξεργασία μέσω icoshift. Η εστίαση έχει γίνει στην περιοχή της κρεατινίνης στα 4,06 ppm.



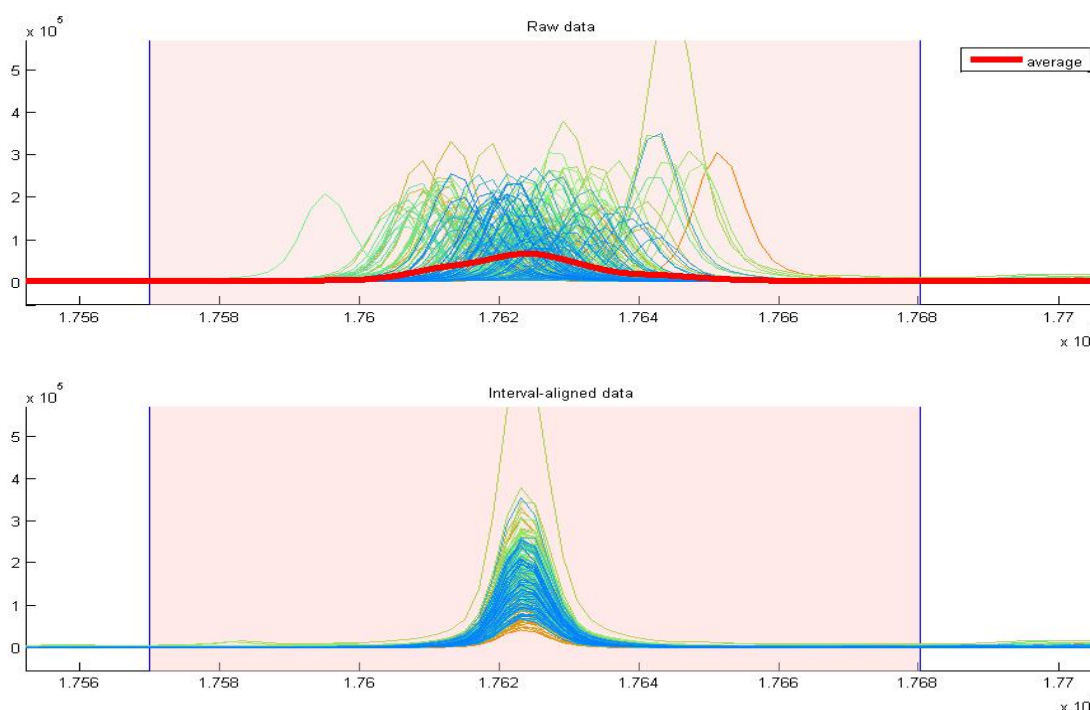
ΕΙΚΟΝΑ 16 Φάσματα ούρων αθλητών σε προβολή με υπέρθεση πριν και μετά την επεξεργασία μέσω icoshift. Η εστίαση έχει γίνει στην περιοχή του ιππουρικού οξέος (7.55 και 7.64 ppm)

Αρχικά, τα NMR δεδομένα μετατρέπονται σε πίνακα αριθμών χωρίς αναγωγή δεδομένων με τη χρήση ενός αλγορίθμου σε κώδικα Matlab®. Ως σύνολο μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε ο μέγιστος δυνατός αριθμός, τα 64.000 σημεία της FID του κάθε 1D ^1H NMR φάσματος. Στη συνέχεια έγινε προεργασία των φασματοσκοπικών δεδομένων με τη μέθοδο της ευθυγράμμισης των NMR σημάτων. Παρά το ότι η προετοιμασία των δειγμάτων NMR σε αυτή την μελέτη έγινε με τον ίδιο τρόπο, στην οποία συμπεριλαμβάνεται η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος (pH 7.4) αλλά και ένωσης αναφοράς (TSP, δ 0.0 ppm), υπάρχουν εμφανείς διαφοροποιήσεις στις χημικές μετατοπίσεις των σημάτων, όπως φαίνεται στην **EIKONA 17** και αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στα φάσματα δειγμάτων ούρων, τα οποία περιέχουν μεταβολίτες με πρωτόνια ευαίσθητα σε μικρομεταβολές, ιδιαίτερα του pH (π.χ. ιστιδίνη, κιτρικό οξύ κ.α.). Η πολυπλοκότητα των φασμάτων, καθιστά αδύνατη την ευθυγράμμιση του συνόλου των σημάτων, ωστόσο, είναι εφικτό να ευθυγραμμιστούν οι κορυφές κάποιων κύριων μεταβολιτών, όπως και αυτών που εμφανίζονται σε πιο διακριτές περιοχές. [29]



EIKONA 17 Απεικόνιση της ευθυγράμμισης της μίας εκ των δύο διπλών κορυφών του κιτρικού οξέος στα 2.55 ppm. Στο επάνω τμήμα του σχήματος παρουσιάζεται η επικάλυψη των 250

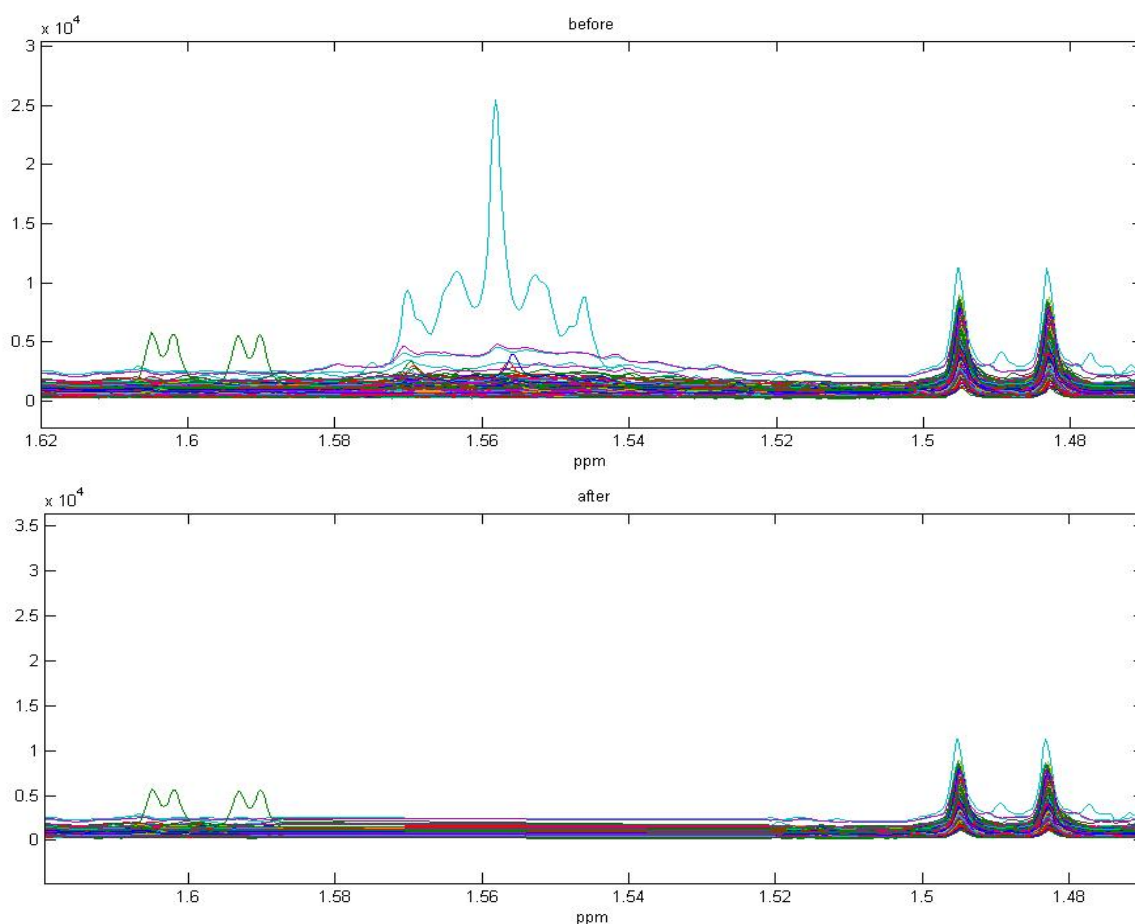
φασμάτων πριν την ευθυγράμμιση. Επιλέχθηκε το διάστημα που περιλαμβάνει τις κορυφές, ενώ με κόκκινο χρώμα τονίζεται το φάσμα που χρησιμοποιήθηκε ως στόχος για την ευθυγράμμιση και το οποίο ανήκει στο σύνολο των 250. Στο κάτω τμήμα παρουσιάζεται το αποτέλεσμα της ευθυγράμμισης για τις δύο κορυφές.



ΕΙΚΟΝΑ 18 Απεικόνιση της ευθυγράμμισης της απλής κορυφής της κρεατινίνης (4.06 ppm) όπως έγινε ταυτόχρονα για όλα τα φάσματα (250 δείγματα). Το χρωματισμένο τμήμα του φάσματος αντιστοιχεί στο διάστημα που επιλέχθηκε για αυτή την κορυφή, ενώ με κόκκινο χρώμα φαίνεται το φάσμα στόχος με βάση το οποίο έγινε η ευθυγράμμιση των υπόλοιπων φασμάτων.

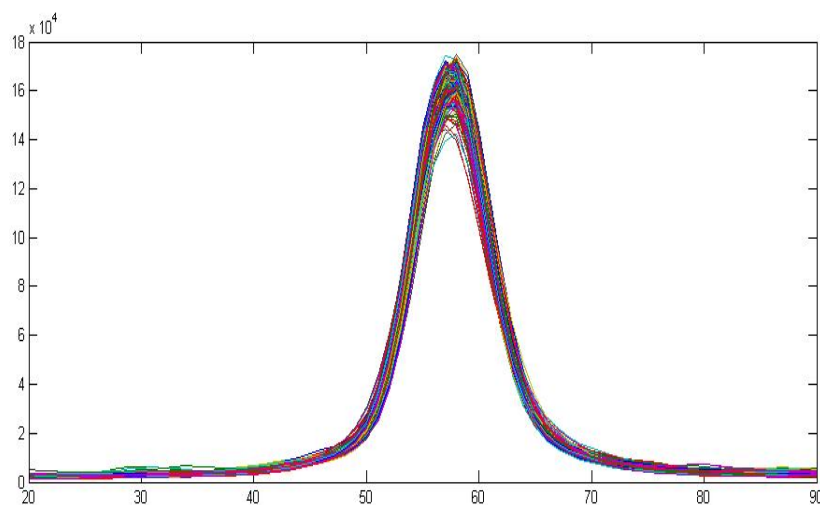
Το επόμενο βήμα που ακολουθεί ύστερα από την ευθυγράμμιση των NMR φασμάτων, είναι η εξαίρεση ορισμένων φασματικών περιοχών (intervals), οι οποίες εμπεριέχουν μεταβλητές ανεξάρτητες από την κατηγοριοποίηση των δειγμάτων. Στην εργασία αυτή εξαιρέθηκαν η κορυφή του νερού (4.7 ppm), της ουρίας (5,8 ppm) λόγω προβλημάτων σε

ορισμένα δείγματα στην γραμμή βάσης του φάσματος. Εκτός βγήκαν επίσης και οι δύο κορυφές (διπλή 1.33 ppm και τετραπλή 4.11 ppm) του γαλακτικού οξέος οι οποίες ήταν παρούσες σε ελάχιστους αθλητές διότι στην πλειοψηφία τους τα δείγματα λαμβάνονταν ύστερα από ξεκούραση. Ακόμα κάποιες περιοχές που αποκόπηκαν λόγω της παρουσίας τους σε ορισμένα δείγματα είναι αυτή της αιθανόλης (1,19 ppm) λόγω κατανάλωσης ποτού και του αδιπικού οξέος (1,55 και 2,2 ppm) λόγω πιθανής κατανάλωσης ζελατινώδους τροφίμου [48]. **(ΕΙΚΟΝΑ 19)**



ΕΙΚΟΝΑ 19 Απεικόνιση όλων φασμάτων ούρων αθλητών σε προβολή με υπέρθεση πριν και μετά την αφαίρεση μέσω icoshift της περιοχής που περιλαμβάνει την κορυφή του αδιπικού οξέος.

Μετά την αφαίρεση των φασματικών περιοχών ακολουθεί η κανονικοποίηση των μεταβλητών με στόχο την εξάλειψη διαφορών συγκέντρωσης των δειγμάτων. Η κανονικοποίηση έγινε σε όλα τα φάσματα με βάση την κορυφή της κρεατινίνης στα 4,06 ppm με τη χρήση ενός αλγορίθμου σε κώδικα Matlab®. **(ΕΙΚΟΝΑ 20)** Με την διαδικασία αυτή τα δεδομένα από όλα τα δείγματα γίνονται απ'ευθείας συγκρίσιμα το ένα με το άλλο και είναι ιδιαίτερα απαραίτητη στα δείγματα ούρων. Σε αυτή την περίπτωση πολλές τοξίνες, φάρμακα και θεραπείες μπορούν να προκαλέσουν μεγάλες αυξομειώσεις στον όγκο των ούρων και κατά συνέπεια στην συγκέντρωση τους οπότε χρησιμοποιείται ως σημείο αναφοράς η κορυφή της κρεατινίνης. Η κρεατινίνη γενικά θεωρείται σταθερή και χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της νεφρικής λειτουργίας αλλά μπορεί να είναι και δείκτης της μυϊκής μάζας κυρίως σε παιδιά και ηλικιωμένους.[44]



ΕΙΚΟΝΑ 20 Η κανονικοποίηση στην κορυφή της κρεατινίνης σε όλα τα φάσματα σε προβολή με υπέρθεση.

Τελευταίο στάδιο της επεξεργασίας των δεδομένων αυτών είναι ο καθορισμός διαστημάτων (intervals) επιθυμητού μεγέθους τα οποία περιλαμβάνουν είτε συγκεκριμένες κορυφές μεταβολιτών, όπου είναι δυνατό να γίνει αυτό λόγω

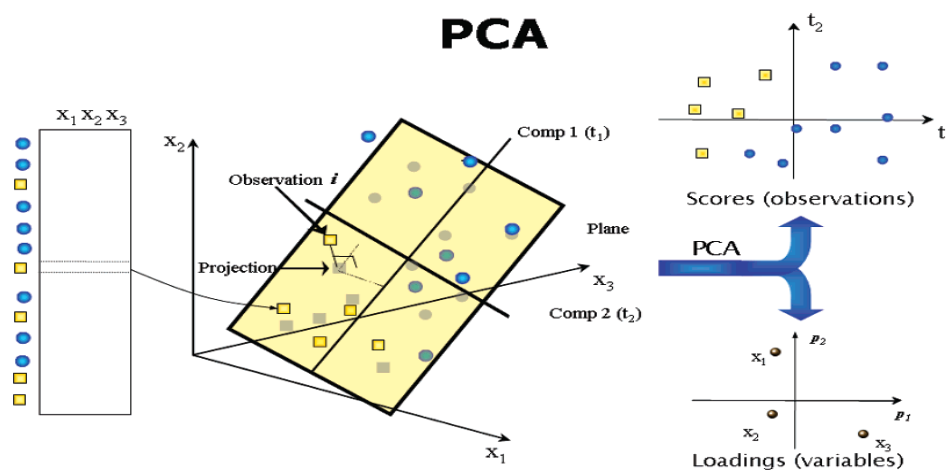
αλληλεπικαλύψεων, είτε ομάδες κορυφών. Συνολικά τα φάσματα τμηματοποιήθηκαν σε περίπου 65 διαστήματα άνισου πλάτους με την εφαρμογή ενός αλγόριθμου στο Matlab®. Έγινε προσπάθεια να συμπεριληφθεί στις περιοχές αυτές όλη η φασματική περιοχή ώστε να μην υπάρχει απώλεια δεδομένων-πληροφοριών για την μετέπειτα στατιστική επεξεργασία. Το αποτέλεσμα αυτού του σταδίου ήταν η δημιουργία ενός πίνακα δεδομένων για καθεμία από τις καθορισμένες περιοχές. Οι πίνακες αυτοί περιλαμβάνουν τις ολοκληρώσεις των κορυφών που περιέχονται στο συγκεκριμένο κάθε φορά διάστημα για όλα τα 250 φάσματα. Στη συνέχεια, οι πίνακες αυτοί μπορούν να εξαχθούν σε φύλλο εργασίας του Microsoft Excel και να υποστούν επιπλέον τροποποιήσεις όπως π.χ ομαδοποίηση των δεδομένων, για να μπορέσουν να εισαχθούν στο στατιστικό λογισμικό για περαιτέρω εξαγωγή συμπερασμάτων.

[6] ΧΗΜΕΙΟΜΕΤΡΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι σχετικά πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα των (βιο-)αναλυτικών διαχωρισμών και των τεχνολογιών ανίχνευσης, σε συνδυασμό με την ταχύτατη άνοδο της ιοπληροφορικής, έχουν κάνει δυνατή την μέτρηση πολύ μεγαλύτερων όγκων NMR μεταβολομικών δεδομένων. Αυτή η συνεχής «έκρηξη» δεδομένων καθιστά αναγκαία την χρήση κατάλληλων εργαλείων για την εξαγωγή σημαντικών πληροφοριών από μεγάλα σύνολα ανεπεξέργαστων δεδομένων. Ένα τέτοιο «εργαλείο» είναι η πολυπαραμετρική ανάλυση δεδομένων (Multivariate Data Analysis, MVDA) με την οποία γίνεται η «εξερεύνηση» και η «μετάφραση» των μεταβολομικών δεδομένων. Δύο τέτοιες μέθοδοι της MVDA είναι η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA) και η μέθοδος Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS). [3]

[6^A] ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PCA)

Με τις μεθόδους προβολής είναι δυνατή η απεικόνιση συνόλων δεδομένων, η κατηγοριοποίηση τους καθώς και η εξεύρεση ποσοτικών σχέσεων μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών. Στις μεθόδους αυτές οι παρατηρήσεις N (δηλαδή τα NMR φάσματα) σχηματίζουν ένα σμήνος σημείων σε K -διάστατο χώρο (όπου K είναι ο αριθμός των μεταβλητών) και στην συνέχεια τα σημεία αυτά προβάλλονται κάθετα σε ένα επίπεδο μικρότερων διαστάσεων. Οι συντεταγμένες των σημείων στο τελευταίο αυτό επίπεδο παρέχουν μια απεικόνιση των παρατηρήσεων (scores plot) ενώ τα διανύσματα κατεύθυνσης δίνουν μια εικόνα των μεταβλητών (loadings plot). [3]



ΕΙΚΟΝΑ 21: Το μοντέλο κύριων συνιστωσών PCA προσεγγίζει την διακύμανση σε ένα πίνακα δεδομένων από ένα μικρών διαστάσεων επίπεδο μοντέλο. Αυτό το επίπεδο μοντέλο παρέχει ένα scores plot, όπου η σχέση μεταξύ των παρατηρήσεων ή δειγμάτων απεικονίζεται, π.χ. αν υπάρχουν ομαδοποιήσεις, τάσεις, ή έκτροπες τιμές. Το loadings plot περιγράφει την επίδραση των μεταβλητών στο μοντέλο και τη σχέση μεταξύ τους. [3]

Σημαντικό στάδιο πριν την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων με τις μεθόδους αυτές είναι η προσαρμογή της κλίμακας των δεδομένων (scaling) ώστε κάθε μεταβλητή να έχει την ίδια συνεισφορά στο μοντέλο. Υπάρχουν πολλοί τρόποι για να γίνει αυτή η προσαρμογή αλλά οι πιο σημαντικοί είναι

- η προσαρμογή Unit Variance (UV) υπολογίζεται ως $1/sd_j$, όπου sd η τυπική απόκλιση της μεταβλητής, υπολογιζόμενη γύρω από τη μέση τιμή. Κατά το μετασχηματισμό Unit Variance, οι «μεγάλες» μεταβλητές συρρικνώνονται και οι «μικρές» ενισχύονται έτσι ώστε όλες να συνεισφέρουν στατιστικά το ίδιο.
- η προσαρμογή στο μέσο όρο (mean centering) όπου υπολογίζεται η μέση τιμή κάθε στήλης και αφαιρείται από τη στήλη αυτή. Αυτό βελτιώνει την «μετάφραση» του μοντέλου καθώς επίσης μπορεί να απομακρύνει τυχόν αριθμητικές αστάθειες.
- η προσαρμογή pareto κατά την οποία κάθε μεταβλητή κεντράρεται και υπολογίζεται με βάση τον όρο $1/\sqrt{sd_j}$, όπου sd η τυπική απόκλιση της μεταβλητής, υπολογιζόμενη γύρω από τη μέση τιμή. Ο μετασχηματισμός Pareto έχει αποτέλεσμα ενδιάμεσο στο μετασχηματισμό Unit Variance και στο μη μετασχηματισμό και χρησιμοποιείται συχνά στις μεταβιομετρικές μελέτες.[3,29]

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) αποτελεί την βάση της πολυπαραμετρικής ανάλυσης δεδομένων. Χρησιμοποιείται για να απεικονίσει ένα πολυπαραμετρικό πίνακα δεδομένων σε ένα επίπεδο μικρότερων διαστάσεων, συνήθως 2-5 διαστάσεων, έτσι ώστε να αποκτηθεί μια αρχική εικόνα των δεδομένων. Αυτή η εικόνα μπορεί να αποκαλύψει ομαδοποιήσεις των παρατηρήσεων, τάσεις και έκτροπες τιμές καθώς και τις σχέσεις μεταξύ παρατηρήσεων και μεταβλητών αλλά και των μεταβλητών μεταξύ τους. Με την PCA δημιουργείται ένας βασικός πίνακας X ($n \times m$) όπου στην πρώτη στήλη βρίσκονται τα δείγματα (πλήθους n) και σε κάθε στήλη που ακολουθεί οι τιμές των παραμέτρων (πλήθους m) για κάθε δείγμα και δίνεται από τον τύπο $X = TP^T + E$ (α). Ο T είναι ένας πίνακας ($n \times k$) που εκφράζει τις προβολές των παρατηρήσεων (scores) και P είναι ένας πίνακας ($m \times k$) που εκφράζει τα φορτία (loadings). Η κάθε διαφοροποίηση που δεν εξηγείται με τους T και P εκφράζεται από τα υπόλοιπα (residuals) δηλαδή τον πίνακα E .

Αναλυτικότερος τύπος του (α) είναι ο $X = TP^T + E = t_1p_1^T + t_2p_2^T + \dots + t_kp_k^T + E$ στον οποίο το t_1 αντιπροσωπεύει την πρώτη στήλη του πίνακα T και το p_1 την πρώτη στήλη του P . Για ένα σύνολο k περιγραφικών μεταβλητών υπάρχουν και k κύριες συνιστώσες

και κάθε κύρια συνιστώσα είναι κάθετη στην προηγούμενη. Η $(t_1p_1^T)$ είναι η πρώτη κύρια συνιστώσα και περιγράφει τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση του σμήνους των σημείων ενώ η δεύτερη κύρια συνιστώσα $(t_2p_2^T)$ την αμέσως επόμενη μεγαλύτερη διαφοροποίηση κ.ο.κ.. Η τελευταία κύρια συνιστώσα περιγράφει μόνο θόρυβο. Τα scores (T) είναι η απεικόνιση των παρατηρήσεων ενώ τα loadings (P) δείχνουν ποιες παρατηρήσεις ασκούν σημαντική επίδραση στο μοντέλο. Η θέση της κάθε παρατήρησης στο επίπεδο δείχνει την σχέση της με τις υπόλοιπες παρατηρήσεις, οπότε δείγματα που βρίσκονται σε κοντινές αποστάσεις θα έχουν παρόμοια πολυπαραμετρικά προφίλ.

Πολύ συχνά είναι απαραίτητος ο έλεγχος των στατιστικών μοντέλων που προκύπτουν με βάση κάποιες διαγνωστικές παραμέτρους.

- Η παράμετρος Hotelling's T^2 δείχνει τις έκτροπες τιμές που εμφανίζονται στα scores και έχουν ισχυρή επίδραση στο μοντέλο «τραβώντας» το σύνολο των σημείων προς το μέρος τους. Το Hotelling's T^2 είναι μια γενίκευση του Student's t-test ενώ όταν συνδυαστεί με τα scores καθορίζει την κανονική περιοχή που ανταποκρίνεται σε όρια εμπιστοσύνης 95% ή 99%.
- Οι παράμετροι που δείχνουν την επεξηγούμενη διακύμανση μιας μεταβλητής και λαμβάνουν τιμές από 0 (καθόλου επεξήγηση) έως και 1 (μέγιστη επεξήγηση) είναι
 - το R^2X είναι το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύονται από τη συγκεκριμένη κύρια συνιστώσα.
 - το R^2X_{adj} είναι το ποσοστό της διακύμανσης όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύονται από τη συγκεκριμένη κύρια συνιστώσα. Η διακύμανση

είναι το άθροισμα των τετραγώνων διορθωμένο για τους βαθμούς ελευθερίας.

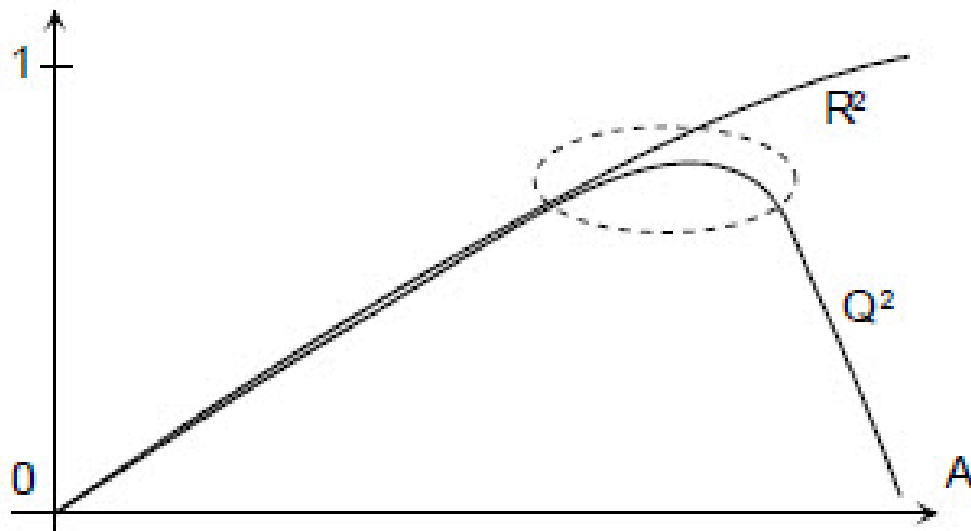
- το $R^2X(\text{cum})$ είναι το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από τις εξαχθείσες κύριες συνιστώσες (ο όρος που περιγράφει το μοντέλο που προκύπτει).
- το $R^2X_{\text{adj}}(\text{cum})$ είναι το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από τις εξαχθείσες κύριες συνιστώσες.

Το R^2X δείχνει επίσης την ικανότητα προσαρμογής του μοντέλου (goodness of fit) δηλαδή του πόσο καλά μπορούν να αναπαραχθούν μαθηματικά τα δεδομένα του συνόλου εκμάθησης (training set).

- Η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου (goodness of prediction) καθορίζεται από τον παράγοντα Q^2X με την τεχνική της διασταυρούμενης αξιολόγησης (cross validation, CV).
 - το Q^2 είναι ο διασταυρούμενος συντελεστής συσχέτισης, που εκφράζει το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης των X , που προβλέπει την κύρια συνιστώσα. Αν το Q^2 για τις μεταβλητές X είναι μεγαλύτερο από κάποιο όριο σημαντικότητας, η συνιστώσα αυτή είναι σημαντική.
 - το $Q^2(\text{cum})$ είναι το συνολικό Q^2 για όλες τις εξαχθείσες συνιστώσες.

Οι παράμετροι R^2X και Q^2X απεικονίζουν εντελώς διαφορετικές συμπεριφορές όσο η πολυπλοκότητα του μοντέλου αυξάνεται. (**EIKONA 22**). Η ικανότητα προσαρμογής, R^2X , κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0 και 1, το 0 δείχνει καθόλου προσαρμογή και το 1 τέλεια προσαρμογή. Το R^2X πλησιάζει την μονάδα όσο το μοντέλο γίνεται πιο

πολύπλοκο. Η ικανότητα πρόβλεψης, Q^2X , είναι εντελώς αντίθετη και δεν πλησιάζει τη μονάδα με την αύξηση της πολυπλοκότητας.



ΕΙΚΟΝΑ 22 Διάγραμμα που δείχνει την σχέση μεταξύ Q^2 και R^2 . Ο κάθετος άξονας απεικονίζει την επεξηγούμενη ή προβλεπόμενη διακύμανση ενώ ο οριζόντιος πολυπλοκότητα του μοντέλου. Σε συγκεκριμένο σημείο πολυπλοκότητας υπάρχει εξισορρόπηση των δύο παραμέτρων.[45]

- Στην εκτίμηση των παραμέτρων R^2X και Q^2X πρέπει να ληφθεί υπόψιν ότι
 - χωρίς υψηλό R^2X είναι αδύνατο να εξαχθεί και υψηλό Q^2X
 - όταν το $Q^2X > 0,5$ θεωρείται καλή τιμή και όταν το $Q^2X > 0,9$ θεωρείται άριστη
 - η διαφορά μεταξύ του R^2X και του Q^2X δεν θα πρέπει να είναι πολύ μεγάλη και να μην υπερβαίνει τις 0,2-0,3 μονάδες. [45]

[6^B]ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΡΙΚΩΝ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ- ΔΙΑΧΩΡΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ (PLS-DA)

Η PLS-DA χρησιμοποιεί την μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων με σκοπό την κατηγοριοποίηση ομάδων δεδομένων. Είναι μια μέθοδος επιβλεπόμενη (supervised) αφού η ομαδοποίηση των δειγμάτων καθίσταται γνωστή ενώ μπορούν να εξαχθούν και πληροφορίες που να συντελούν στην κατηγοριοποίηση αυτή. Πιο συγκεκριμένα, στην PLS-DA δημιουργείται ένας πίνακας X από τις μεταβλητές (π.χ φασματικές περιοχές) και τα αντικείμενα (δείγματα), όπως γίνεται και στην PCA, με την διαφορά όμως ότι εδώ συνυπολογίζεται και μια στήλη όπου καταγράφονται οι ομάδες των αντικειμένων ως ψευδομεταβλητές (dummy vectors). Στην PLS-DA είναι δυνατόν να εξαχθούν νέες μεταβλητές με στόχο την επεξήγηση των διαφορών μεταξύ των ομάδων (y) σε σχέση με τις φασματοσκοπικές μεταβλητές (X1,X2,...) για την εξεύρεση της μέγιστης συσχέτισης.

Η PLS-DA είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σε 2-4 ομάδες δεδομένων, αλλά όταν οι ομάδες ξεπεράσουν τις 4 τα αποτελέσματα της διάκρισης είναι δύσκολο να κατανοηθούν. Επιπλέον, όταν στις ομάδες δεν υπάρχει ομοιογένεια και υπάρχει μεγάλη διασπορά στον X-χώρο, η διαχωριστική ανάλυση δεν μπορεί να εφαρμοστεί. Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή συνυπολογισμού θορύβου και πραγματικής πληροφορίας (overfitting) και κατά συνέπεια την εξαγωγή λανθασμένων αποτελεσμάτων. Η περίπτωση αυτή μπορεί να ελεγχθεί με διάφορες μεθόδους διασταυρούμενης επικύρωσης (cross validation), οι οποίες τις περισσότερες φορές είναι ενσωματωμένες στον αλγόριθμο των υπολογιστικών προγραμμάτων που χρησιμοποιούνται για την PLS-DA (π.χ SIMCA-P+, Umea Sweden).[45]

[6^Γ]ORTHOGONAL PARTIAL LEAST SQUARES DISCRIMINANT ANALYSIS (OPLS-DA)

Η OPLS-DA χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις όπου τα δείγματα παρουσιάζουν έντονη διασπορά εντός της ομάδας στην οποία ανήκουν. Βελτιώνει το διαχωρισμό των ομάδων απομακρύνοντας τις παραμέτρους που προκαλούν ομαδοποίηση με κριτήρια διαφορετικά από αυτά που έχει ορίσει ο χρήστης του λογισμικού.[67]

Το μεγάλο πλεονέκτημα της OPLS-DA σε σχέση με την PLS-DA έγκειται στην ικανότητα της OPLS-DA να διαχωρίζει την προγνωστική διακύμανση από τη μη προγνωστική (ορθογώνια) διακύμανση (predictive and non-predictive variation). Η μέθοδος της OPLS-DA είναι ιδανική για την κατηγοριοποίηση των δεδομένων που έχουν πολύ-συγγραμμικές μεταβλητές και μεταβλητές που εμπεριέχουν θόρυβο, κάτι το οποίο είναι πολύ κοινό σε πολλούς τύπους βιολογικών δεδομένων. Στις περιπτώσεις όπου η Y-ορθογώνια διακύμανση είναι παρούσα στα δεδομένα, ο αλγόριθμος της OPLS-DA θα διαμορφώσει τις διαχωριστικές συνιστώσες και τις Y-ορθογώνιες συνιστώσες ξεχωριστά, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός μοντέλου πιο κατανοητού σε σύγκριση με τα συνηθισμένα PLS-DA μοντέλα.[67]

[7] ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

[7^A] ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) είναι μια πολύ ισχυρή αναλυτική τεχνική για την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών σε βιολογικά υγρά και εκχυλίσματα ιστών και ιδιαίτερα σε ανθρώπινα ούρα. Λόγω της ανάγκης για την διατήρηση της ομοιόστασης, τα ανθρώπινα ούρα έχουν πολύπλοκη σύσταση περιέχοντας εκατοντάδες μέχρι και χιλιάδες διαφορετικές ενώσεις ακόμα και στην περίπτωση υγιών ανθρώπων. Αυτό κατά συνέπεια οδηγεί σε ακόμα μεγαλύτερο αριθμό σημάτων στα ληφθέντα φάσματα με αποτέλεσμα την αλληλεπικάλυψη αυτών, κυρίως στα μονοδιάστατα φάσματα ^1H NMR.[46] Η πιο έντονη αλληλεπικάλυψη κορυφών συμβαίνει στην περιοχή 3-4 ppm λόγω της παρουσίας σακχάρων και αμινοξέων. Τουλάχιστον 30 ενώσεις είναι παρούσες σε επαρκείς ποσότητες στα ούρα ή το πλάσμα ώστε να μπορούν να ανιχνευθούν με το NMR.[47] Το πρόβλημα αυτό της αλληλεπικάλυψης των κορυφών αντιμετωπίζεται με την χρήση των δισδιάστατων φασμάτων NMR. Τα 2D φάσματα παρέχουν τη δυνατότητα ικανοποιητικής ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης μεταβολιτών για τις υψηλής αποτελεσματικότητας μεταβολομικές μελέτες. [46]

Στην παρούσα μελέτη εντοπίστηκαν και μελετήθηκαν 56 μεταβολίτες με την βοήθεια των 1D φασμάτων. Για την επιβεβαίωση των μεταβολιτών αυτών έγιναν και συμπληρωματικά 2D πειράματα J Resolved, ^1H - ^1H COSY, 2D TOCSY και HSQC σε επιλεγμένα δείγματα. Η συνδυαστική ερμηνεία των φασμάτων, αλλά και η μελέτη διαδικτυακών [48,49] και βιβλιογραφικών βάσεων [50,51,52] δεδομένων οδήγησε στην ταυτοποίηση των μεταβολιτών αυτών οι οποίοι παρουσιάζονται στον **ΠΙΝΑΚΑ 2**.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: Μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν στο σύνολο των 250 δειγμάτων ανθρώπινων ούρων.

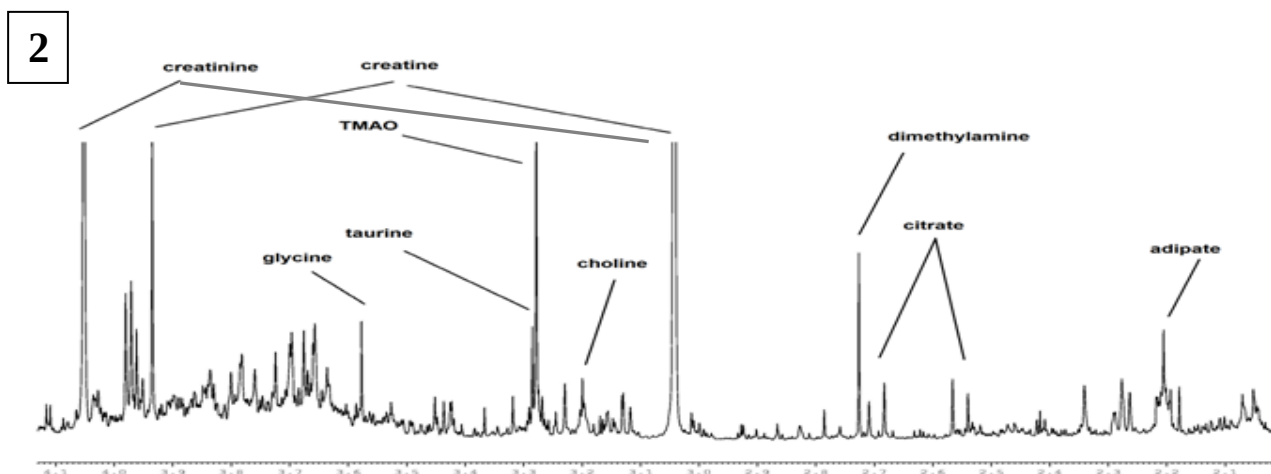
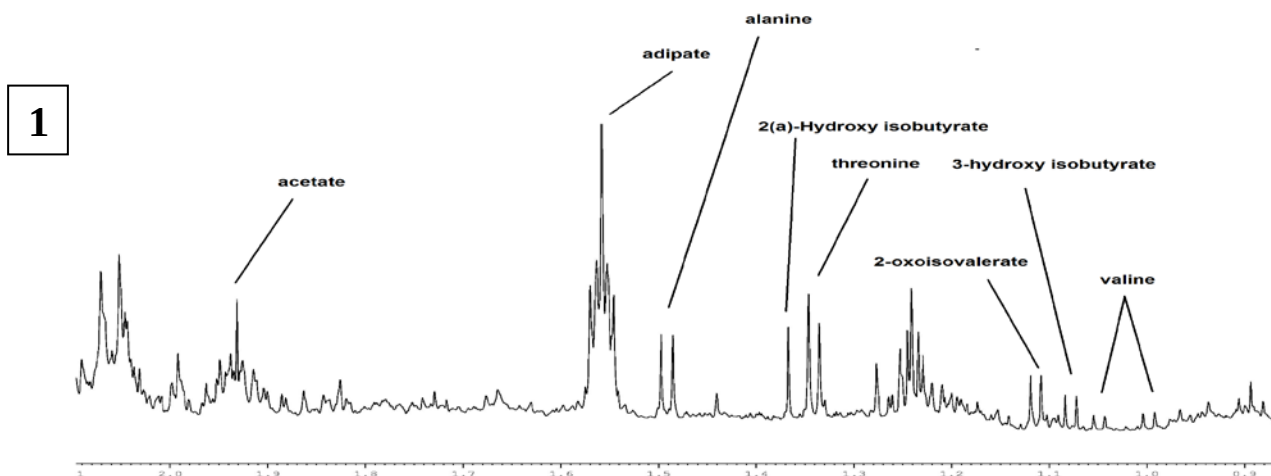
Μεταβολίτης	Ταυτοποίηση κορυφής	Πολλαπλότητα κορυφής	¹ H Χημική Μετατόπιση (ppm)	¹³ C Χημική μετατόπιση
Δωδεκανοϊκό οξύ	CH ₃	(t)	0.88	16.2
	CH ₂		1.29	
2- υδροξυισοβουτυρικό οξύ	CH ₃	(t)	0.88	
	CH ₂	(m)	1.73	
2-οξο-3-μεθυλ-n-βαλερικό οξύ	ε-CH ₃	(t)	0.90	14.0
	δ-CH ₃	(d)	1.11	
λευκίνη	C ^δ H ₃	(d)	0.96	23.6
	CH ₂	(m)	1.71	26.6
	α-CH	(m)	3.78	57.3
2-υδροξυισοβαλερικό οξύ	CH ₃	(d)	0.97	21.1
	α-CH	(d)	3.85	79.2
βαλίνη	CH ₃	(d)	0.99	19.6
	CH ₃	(d)	1.04	20.8
	C ^β H ₂	(m)	2.29	
ισολευκίνη	C ^β H ₃	(d)	1.02	17.4
	C ^γ H ₂	(m)	1.99	35.6
3-υδροξυισοβουτυρικό οξύ	CH ₃	(d)	1.07	16.9
	CH	(m)	2.51	
2-οξοισοβαλερικό οξύ	CH ₃	(d)	1.11	18.3
αιθανόλη	CH ₃	(t)	1.19	
3-αμινοισοβαλερικό οξύ		(d)	1.20	24.9
		(dd)	2.62	
Μεθυλομηλονικό οξύ	CH ₃	(t)	1.24	17.0
	CH	(m)	4.08	
2,3-διυδροξυισοβαλερικό οξύ	CH ₃	(s)	1.27	30.8
	CH ₃	(d)	1.33	20.8
γαλακτικό οξύ	CH	(q)	4.12	71.3
L-θρεονίνη	CH ₃	(d)	1.34	22.4
	CH	(d)	3.62	63.3
	CH	(m)	4.27	69.0

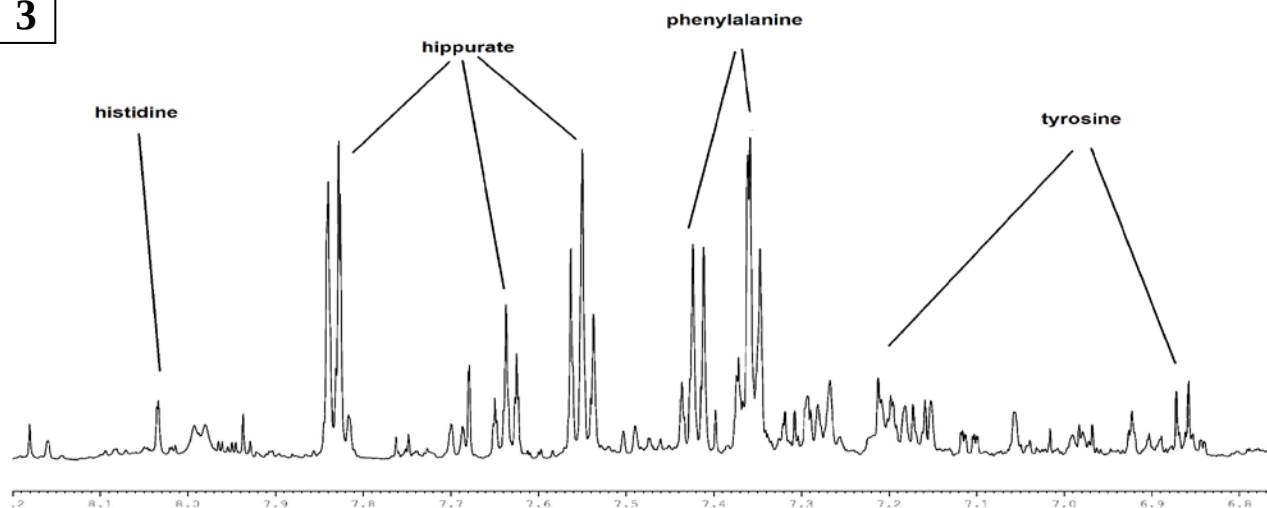
2(a)-υδροξυισοβουτυρικό οξύ	CH ₃	(s)	1.36	29.7
αλανίνη	CH ₃	(d)	1.49	19.2
	CH	(q)	3.79	53.4
Αδιπικό οξύ	CH ₂	(m)	1.55	
	CH ₂ COOH	(m)	2.20	
λυσίνη	γ-CH ₂	(m)	1.45	24.3
	δ-CH ₂	(m)	1.73	39.4
	β-CH ₂	(m)	1.92	32.9
	ε-CH ₂	(t)	3.02	42.1
Οξικό οξύ	CH ₃	(s)	1.93	26.1
Ακετοξικό οξύ	CH ₃	(s)	2.23	30.2
Μηλικό οξύ	CH ₂	(dd)	2.35	44.0
	CH	(dd)	4.29	73.2
Ηλεκτρικό οξύ	CH	(s)	2.41	36.8
Κιτρικό οξύ	½ CH ₂	(d)	2.54	47.9
	½ CH ₂	(d)	2.68	47.9
Διμεθυλαμίνη	CH ₃	(s)	2.72	37.5
Σαρκοσίνη	CH ₃	(s)	2.78	39.9
	CH	(s)	3.63	
Μεθυλγουανιδίνη	CH ₃	(s)	2.81	30.0
		(s)	3.37	
τριμεθυλαμίνη	CH ₃	(s)	2.86	45.5
Οξογλουταρικό οξύ	C ^γ H ₂	(t)	2.46	33.6
	C ^δ H ₂	(t)	3.00	38.5
Διμεθυλγλυκίνη	CH ₃	(s)	2.93	46.3
κρεατίνη	CH ₃	(s)	3.05	33.1
	CH ₂	(s)	3.93	56.6
κρεατινίνη	CH ₃	(s)	3.04	39.8
	CH ₂	(s)	4.06	
Μηλονικό οξύ	CH ₂	(s)	3.11	48.8
χολίνη	CH ₃	(s)	3.20	56.7
ιστιδίνη	C ^β H ₂	(s)	3.13-3.15	
	C ⁴ H	(t)	7.01-7.24	120.0

	CH	(s)	7.89-8.24	138.0
βηταίνη	CH ₃	(s)	3.30	55.1
	CH ₂	(s)	3.90	69.0
Ταυρίνη	CH ₂ SO ₃	(t)	3.27	51.0
	NCH ₂	(t)	3.43	38.4
TMAO	CH ₃	(s)	3.28	62.4
γλυκίνη	CH ₂	(s)	3.57	44.4
Τρυγικό οξύ	CH	(s)	4.35	76.7
τριγονελλίνη	CH ₃	(s)	4.44	51.2
(ή N-μεθυλονικοτινικό οξύ)	C ¹ H	(s)	9.12	148.6
	C ⁴ H	(m)	8.09	130.5
	C ⁵ H, C ³ H	(m)	8.83	148.8
αλλαντοίνη	CH	(s)	5.38	66.1
ουρία	NH ₂	broad	5.80	
ουριδίνη	CH	(d)	5.86	146.6
	CH	(d)	7.54	90.4
cis- ακονιτικό οξύ	CH	(t)	5.70	
	CH ₂	(d)	3.11	
Φουμαρικό οξύ	CH	(s)	6.53	138.2
trans- ακονιτικό οξύ	CH	(s)	6.58	132.9
	CH ₂	(s)	3.44	
p-υδροξυφαινυλοξικό οξύ	CH	(s)	6.86	115.3
	CH	(d)	7.16	
τυροσίνη	C ² H, C ⁶ H	(d)	6.87	118.4
	C ³ H, C ⁵ H	(d)	7.20	133.4
φαινυλαλανίνη	C ⁴ H	(m)	7.36	130.2
	C ⁵ H, C ³ H	(m)	7.41	131.8
	C ⁶ H, C ² H	(m)	7.31	
Ιππουρικό οξύ	C ³ H, C ⁵ H	(t)	7.55	131.7
	C ⁴ H	(tt)	7.64	135.1
	C ⁶ H, C ² H	(dd)	7.83	130.0
	CH ₂	(d)	3.97	
1-μεθυλιστιδίνη	CH	(s)	7.68	
	CH	(s)	7.90	

τρυπτοφάνη	CH	(dd)	7.70	
	CH	(d)	7.51	
	CH	(m)	7.27	
	CH	(m)	7.20	
υποξανθίνη	C ⁷ H	(s)	8.18	139.2
	C ² H	(s)	8.20	145.0
N-μεθυλνικοτιναμίδιο	C ⁴ H	(d)	8.89	146.3
	C ⁶ H	(d)	8.96	
	C ² H	(s)	9.27	
Μυρμηκικό οξύ	CH	(s)	8.46	

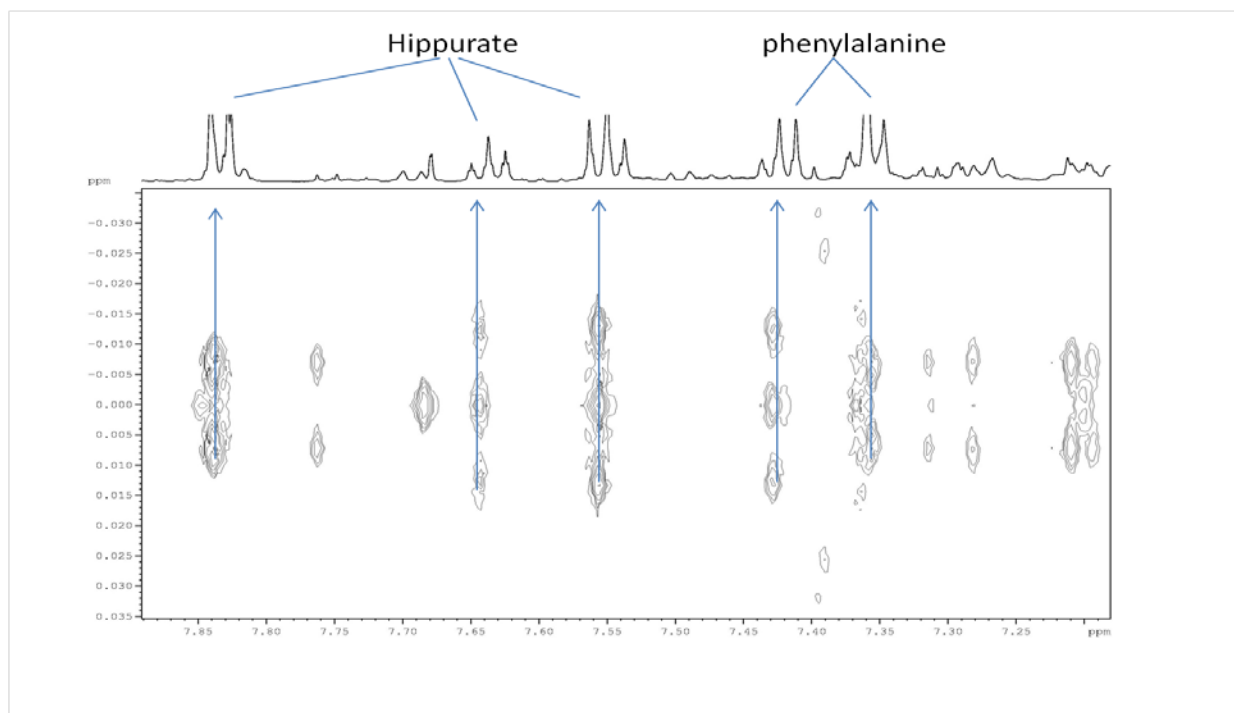
Στις παρακάτω εικόνες παρατίθενται μερικοί από τους συνηθέστερους μεταβολίτες σε τρεις χαρακτηριστικές περιοχές φάσματος **1**. (αλειφατική περιοχή 0,90-2,00 ppm), **2**. (αλειφατική περιοχή 2,00-4,00 ppm) και **3**. (αρωματική περιοχή 6,80-8,10 ppm) από ένα δείγμα ούρων αθλητή σε διαφορετικές μεγενθύσεις.



3

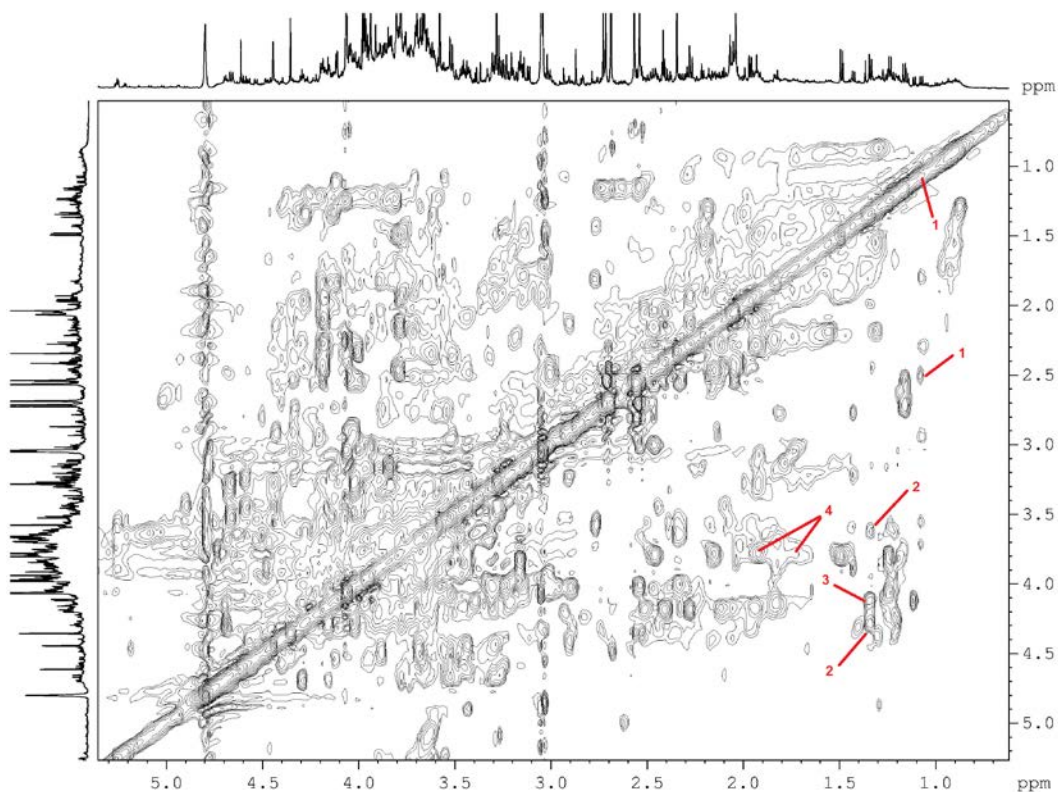
EIKONA 23 1. Αλειφατική περιοχή 0,90-2,00 ppm λόγω συντονισμού πρωτονίων που ανήκουν κυρίως σε CH₃ **2.** Αλειφατική περιοχή 2,00-4,00 ppm λόγω συντονισμού πρωτονίων ομάδων CH₂, CH, αποθωρακισμένων CH₃ **3.** Αρωματική περιοχή 6,80-8,10 ppm λόγω συντονισμού πρωτονίων σε αρωματικούς δακτυλίους από δείγμα ούρων αθλητή.

Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών μελετήθηκαν αρχικά όλες οι φασματικές περιοχές όλων των δειγμάτων, κάθε ένα ξεχωριστά αλλά και σαν σύνολο, σε παράλληλη προβολή στο λογισμικό TOPSPIN (1.2 version, Bruker BioSpin GmbH). Αντίστοιχα μελετήθηκαν και τα 2D J resolved πειράματα με τα οποία διαπιστώθηκε η αλληλεπικάλυση και η πολλαπλότητα των κορυφών στα 1D φάσματα όπως φαίνεται και στην **EIKONA 24**.

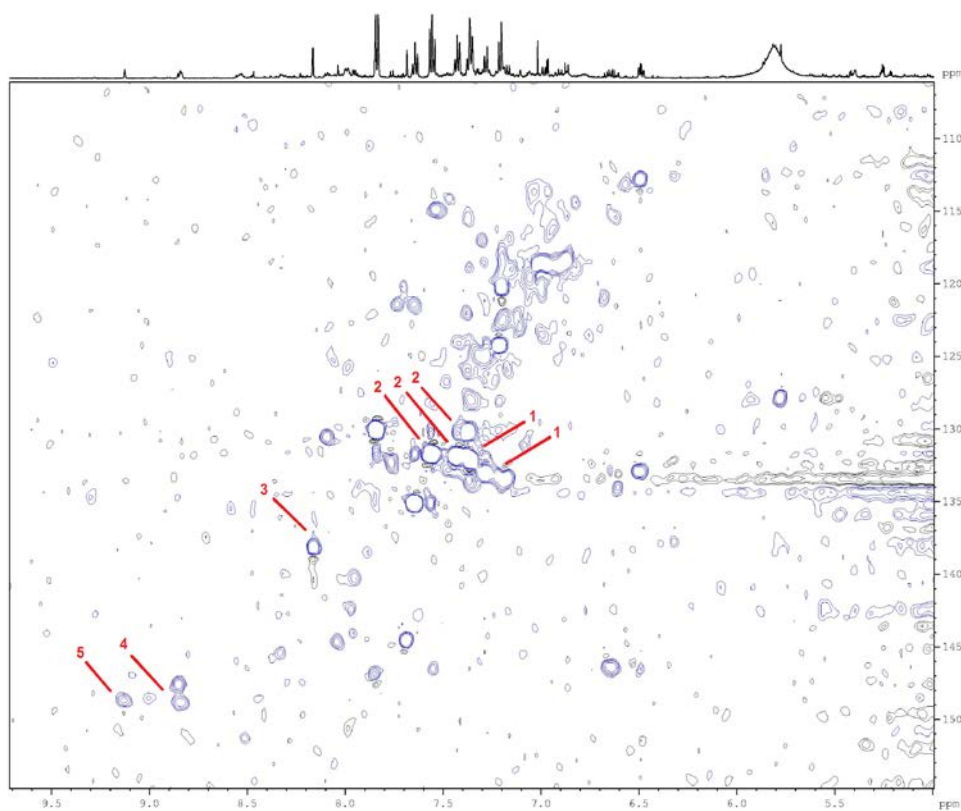


ΕΙΚΟΝΑ 24: J resolved φάσμα δείγματος σύρων αθλητή εστιασμένο στην περιοχή 7,00-7,85 ppm.

Απαραίτητη ήταν και η εξεύρεση των κορυφών διασταύρωσης με τα ^1H - ^1H COSY και 2D TOCSY πειράματα (ΕΙΚΟΝΑ 25) ενώ σε τελικό στάδιο μελετήθηκε το ετεροπυρηνικό ^1H - ^{13}C DEPT135-HSQC με το οποίο συσχετίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των ^{13}C με τα άμεσα συνδεόμενα ^1H πρωτόνια. (ΕΙΚΟΝΑ 26)



ΕΙΚΟΝΑ 25. Χαρακτηριστικό ^1H - ^1H 2D TOCSY φάσμα δείγματος ούρων αθλητή εστιασμένο στην περιοχή 0,5-5,0 ppm στο οποίο έχουν επισημανθεί ενδεικτικά οι συσχετίσεις κάποιων από τους κύριους μεταβολίτες του δείγματος: 1.3-υδροξυισοβουτυρικό οξύ, 2.θρεονίνη, 3.γαλακτικό οξύ, 4. λυσίνη.



ΕΙΚΟΝΑ 26. HSQC φάσμα δείγματος ούρων αθλητή εστιασμένο στην περιοχή 5,0-9,5 ppm, στο οποίο έχουν επισημανθεί οι συσχετίσεις των πρωτονίων με τους αντίστοιχους άνθρακες 1.φαινυλαλανίνη, 2.ιππουρικό οξύ, 3. Υποξανθίνη, 4.N-μεθυλνικοτιναμίδιο, 5.τριγονελλίνη.

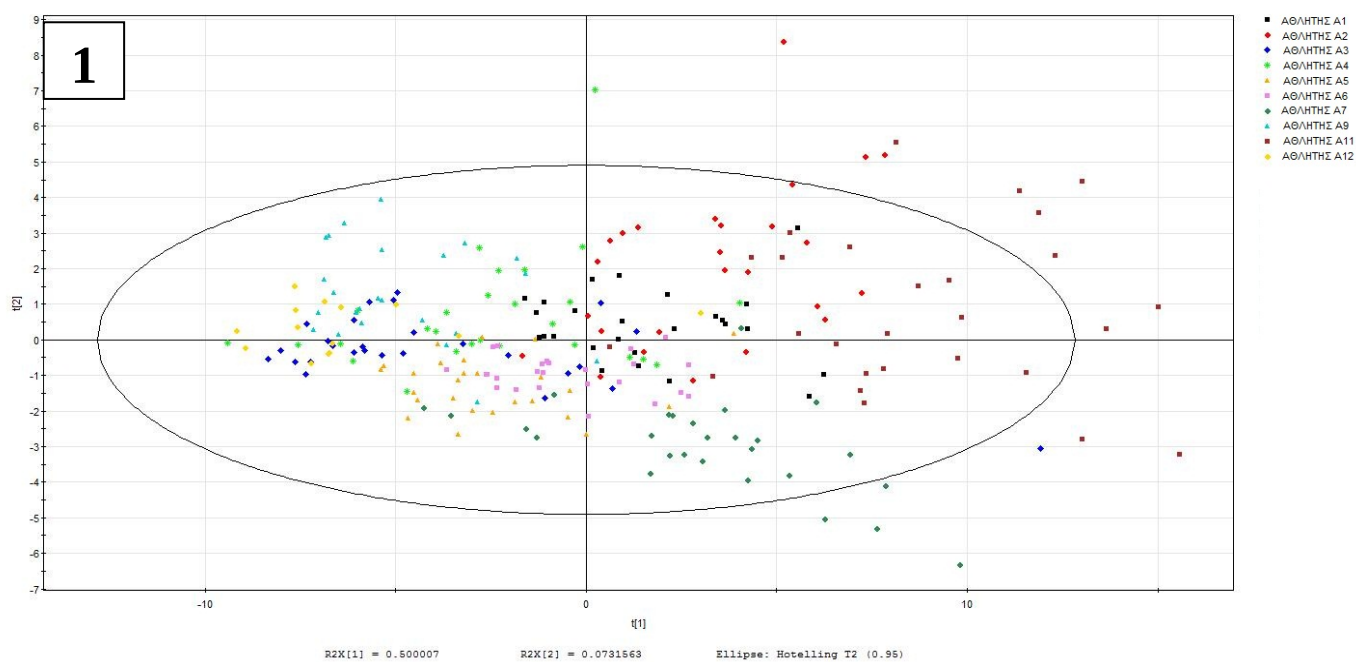
[7^B] ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν κυρίως οι τεχνικές Principal Component Analysis (PCA) και Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) για την εξαγωγή πληροφοριών από το σύνολο των 250 φασμάτων που προέρχονται από δείγματα ούρων αθλητών και αθλητριών. Τα δείγματα ούρων ελήφθησαν από 8 αθλητές και 2 αθλήτριες άρσης βαρών από πάγκο με αναπηρία για διάστημα περίπου 6 μηνών. Τα δεδομένα τα οποία είναι γνωστά είναι το φύλο κάθε αθλητή, η ηλικία τους, η αναπηρία και η προπονητική τους ηλικία. Ως επιπλέον πληροφορία δίνεται το κάπνισμα, τα συμπληρώματα/φάρμακα τα οποία πέρνουν χωρίς όμως να είναι γνωστή η δοσολογία και η συχνότητα λήψης αυτών, οι ημερομηνίες που έδωσαν τα δείγματα και ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με το τι έφαγαν 12 ώρες πριν τη δειγματοληψία. Επιπλέον, οι αθλητές αυτοί στο μέσο περίπου του διαστήματος της δειγματοληψίας συμμετείχαν σε Παραολυμπιακούς αγώνες ενώ προς το τέλος της δειγματοληψίας αυτής ακολούθησαν για 2 συνεχόμενες εβδομάδες μια διατροφική παρέμβαση με αφέψημα πράσινου τσαγιού. Ακόμα δίνονται τυχόν πληροφορίες για τραυματισμούς, για την προπόνηση τους (διακοπή-ξεκίνημα), για προβλήματα υγείας που παρουσιάστηκαν σε ορισμένους από αυτούς και προβλήματα κατά την δειγματοληψία (π.χ απώλεια δείγματος, ακατάλληλη διατήρηση). Περαιτέρω λεπτομέρειες για το σύνολο των αθλητών παρέχονται στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ στο τέλος της εργασίας.

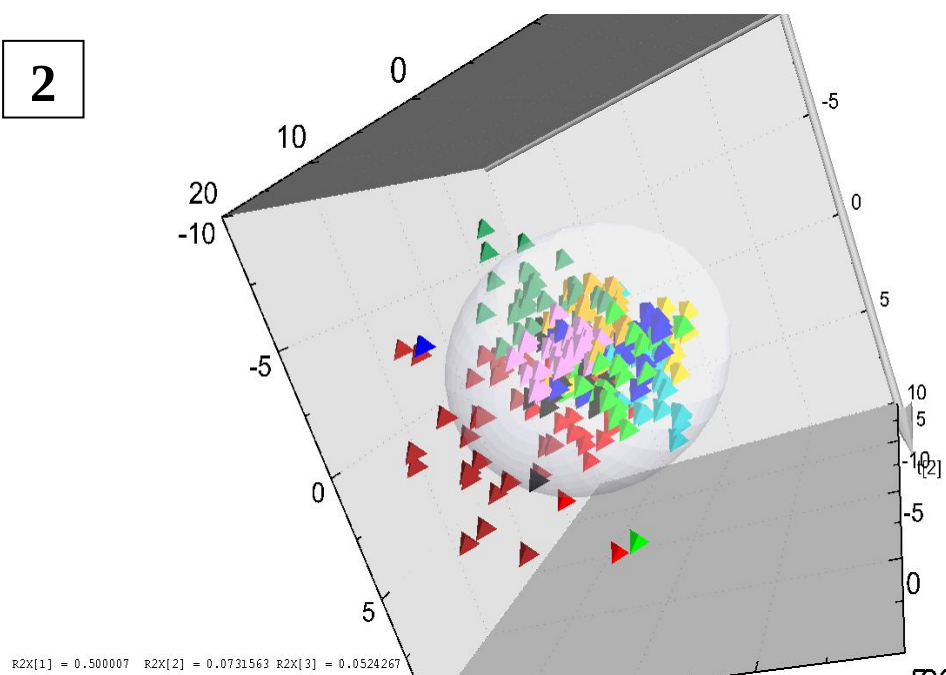
Όπως έχει επεξηγηθεί και στο πειραματικό μέρος, τα φασματικά δεδομένα υπέστησαν επεξεργασία με το λογισμικό Matlab®. Έτσι προέκυψε, ύστερα από κατάλληλη ομαδοποίηση, ένας πίνακας δεδομένων που περιλαμβάνει τις φασματικές περιοχές και τις ολοκληρώσεις των κορυφών για κάθε μία από τις περιοχές αυτές, για το σύνολο των 250 φασμάτων. Στην συνέχεια ο πίνακας αυτός εισήχθηκε στο στατιστικό πρόγραμμα SIMCA-P+ (version 11.5, Umea Sweden).

[7^{B.1}] ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΟΥ ΣΥΝΟΛΟΥ ΤΩΝ ΑΘΛΗΤΩΝ/ΤΡΙΩΝ

Για να μελετηθεί το συνολικό μεταβολικό προφίλ όλων των αθλητών/τριών επιλέχθηκαν και τα 250 δείγματα και εφαρμόστηκε η Principal Component Analysis (PCA) με στόχο την εξεύρεση τυχόν ομαδοποιήσεων ή τάσεων στο σύνολο των δειγμάτων. Για λόγους ευκρίνειας κάθε αθλητής έχει οριστεί ξεχωριστά ως μια κλάση/ομάδα ενώ τα δείγματα καθενός έχουν χρωματιστεί διαφορετικά. Από τα διαγράμματα των ΕΙΚΟΝΩΝ 27.1,27.2, παρατηρείται ότι τα δείγματα που αντιστοιχούν σε κάθε αθλητή συγκεντρώνονται πιο κοντά μεταξύ τους ορίζοντας μια ομάδα, δηλαδή κάθε αθλητής καταλαμβάνει το δικό του χώρο μέσα στο σύνολο των δειγμάτων. Επίσης παρατηρείται έντονη διασπορά στα δείγματα του άνω και κάτω δεξιά τεταρτημορίου σε σχέση με τα υπόλοιπα.



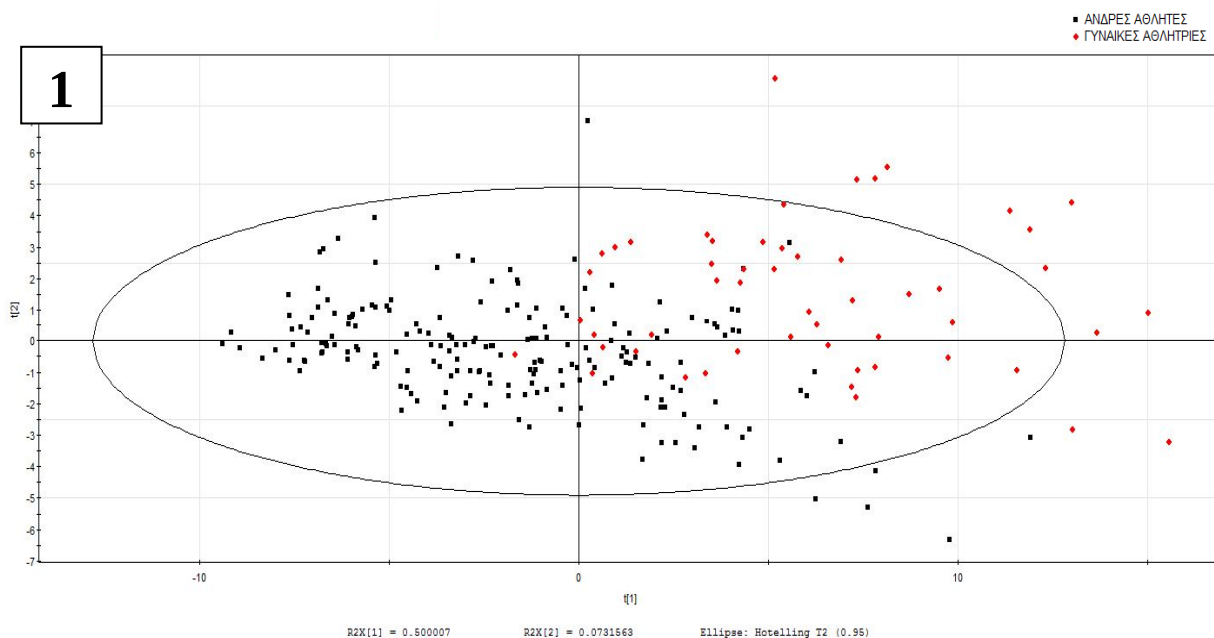
ΕΙΚΟΝΑ 27.1 PCA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων όλων των αθλητών/τριών [R2Xcum(1):50,0%, Q2cum(1):47,9%, R2Xcum(2): 57.3%, Q2cum(2):51.5%,].



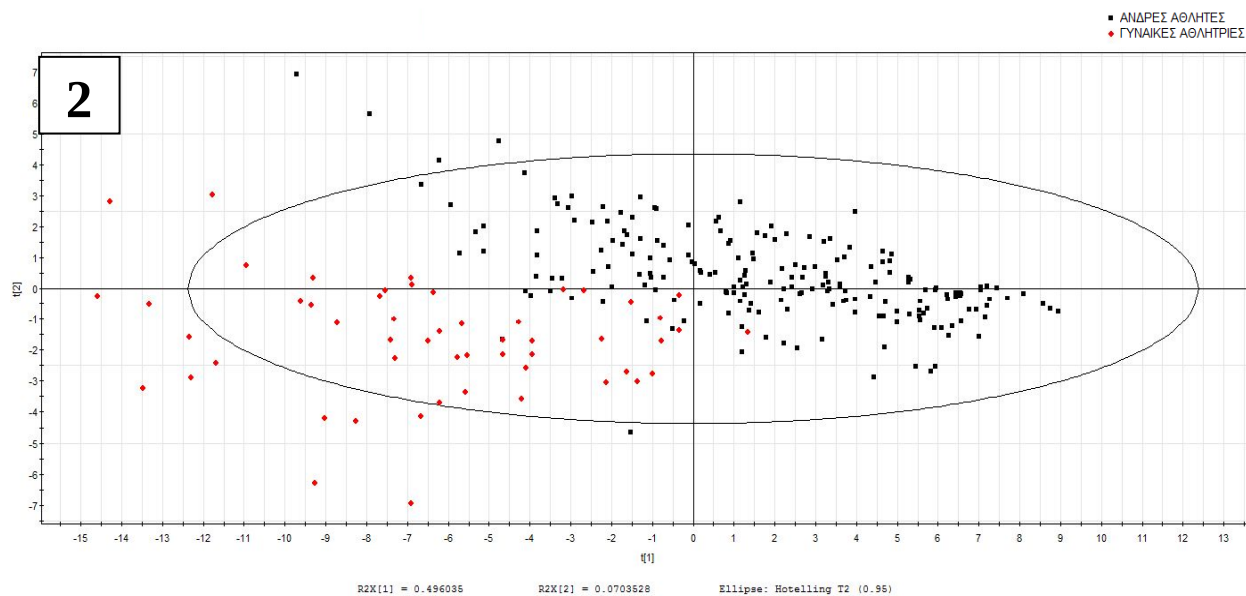
ΕΙΚΟΝΑ 27.2 PCA διάγραμμα τιμών τριών διαστάσεων (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων όλων των αθλητών/τριών [R2Xcum(1):50,0%, Q2cum(1):47,9%, R2Xcum(2): 57,3%, Q2cum(2):51.5%, R2Xcum(3):62.6%, Q2cum(3):53.8%].[(♦)Αθλητής A1,(♦) Αθλήτρια A2,(♦) Αθλητής A3, (♦) Αθλητής A4, (♦) Αθλητής A5, (♦) Αθλητής A6, (♦) Αθλητής A7, (♦) Αθλητής A9, (♦) Αθλήτρια A11, (♦) Αθλητής A12]

ΜΕΛΕΤΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΦΥΛΟ

Αρχικά, επιλέχθηκε το σύνολο των 250 δειγμάτων και εφαρμόστηκε Principal Component Analysis (PCA) για να αποκαλυφθεί τυχόν ύπαρξη διαχωρισμού ανάμεσα σε άνδρες αθλητές και γυναίκες αθλήτριες. Από αυτά τα 53 δείγματα είναι γυναικών και τα υπόλοιπα 197 δείγματα είναι ανδρών. Από το διάγραμμα της PCA (ΕΙΚΟΝΑ 28.1) φάνηκε να υπάρχει κάποια διάκριση μεταξύ των δύο ομάδων οπότε ακολούθησε επιβλεπόμενη στατιστική ανάλυση με την μέθοδο Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) (ΕΙΚΟΝΑ 28.2). Με την PLS-DA γίνεται ακόμα πιο διακριτός ο διαχωρισμός μεταξύ γυναικών-ανδρών αθλητών, με τα δείγματα των γυναικών να διασπείρονται πιο έντονα στο κάτω αριστερό τεταρτημόριο σε σχέση με εκείνα των ανδρών.



ΕΙΚΟΝΑ 28.1 PCA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων ^1H -NMR δειγμάτων ούρων ανδρών (■) και γυναικών [R2Xcum(1):50,0%, Q2cum(1):47,9%, R2Xcum(2):57,3%, Q2cum(2):51.5%]



ΕΙΚΟΝΑ 28 (2) PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων ^1H -NMR δειγμάτων ούρων ανδρών (■) και γυναικών (♦)[R2Xcum(1):49.6%, Q2cum(1):42,9%, R2Xcum(2): 56.6%, Q2cum(2):63.2%]

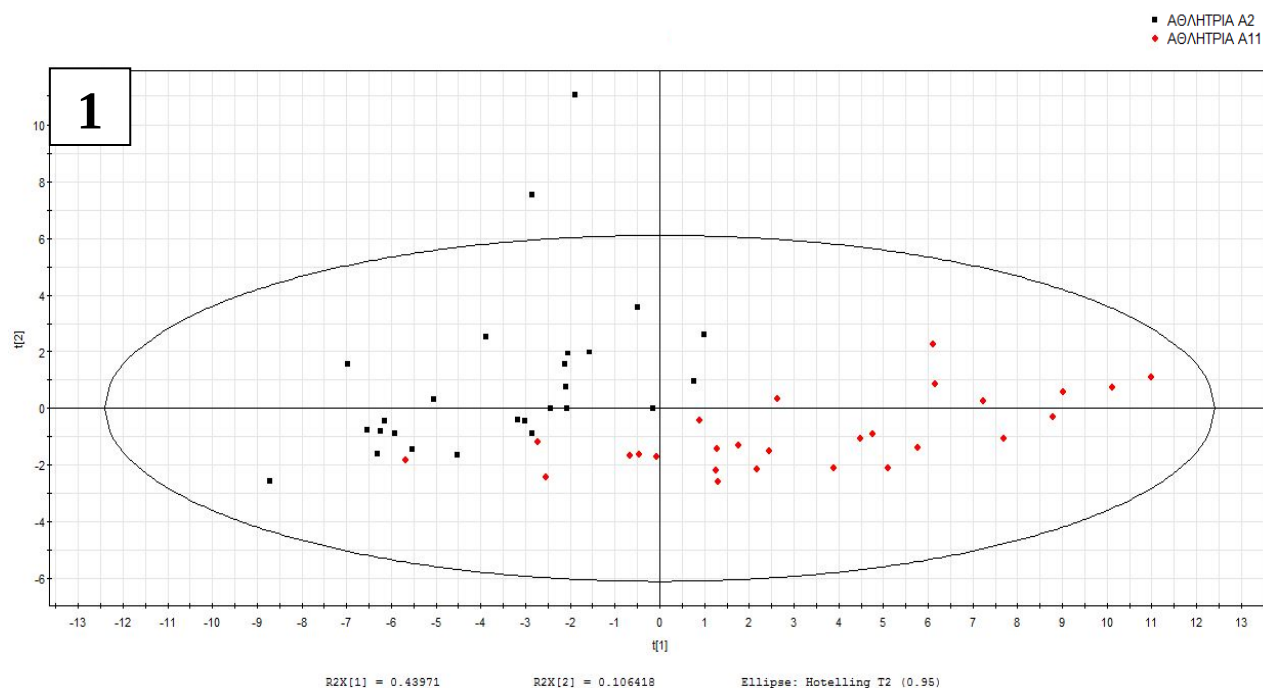
Η έντονη αυτή διασπορά των σημείων μπορεί να οφείλεται στην μεγάλη ανομοιογένεια του συνόλου των δειγμάτων δηλαδή την έλλειψη κάποιου κοινού χαρακτηριστικού μεταξύ αυτών. Τα σημεία τα οποία βρίσκονται εκτός της έλλειψης δεν απορρίπτονται γιατί υπάρχουν πάρα πολλοί παράγοντες οι οποίοι επιδρούν σε κάθε δείγμα και οδηγούν σε κάποιο μεταβολικό αποτέλεσμα το οποίο προκαλεί αυτή την διαφοροποίηση. Μία εικόνα των παραμέτρων που συνεισφέρουν στην διάκριση μεταξύ των δύο ομάδων μπορεί να αποκτηθεί με τη λεγόμενη Variable Importance List. Η λίστα αυτή είναι ένα από τα εργαλεία του στατιστικού λογισμικού SIMCA P-11.5 και περιλαμβάνει τις παραμέτρους της ανάλυσης που επιδρούν στο διαχωρισμό σε φθίνουσα σειρά (από πάνω προς τα κάτω). **(ΠΙΝΑΚΑΣ 3)** Παρατηρείται ότι οι τιμές των παραμέτρων δεν έχουν μεγάλη διαφορά μεταξύ τους .

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της **ΕΙΚΟΝΑΣ 28**.

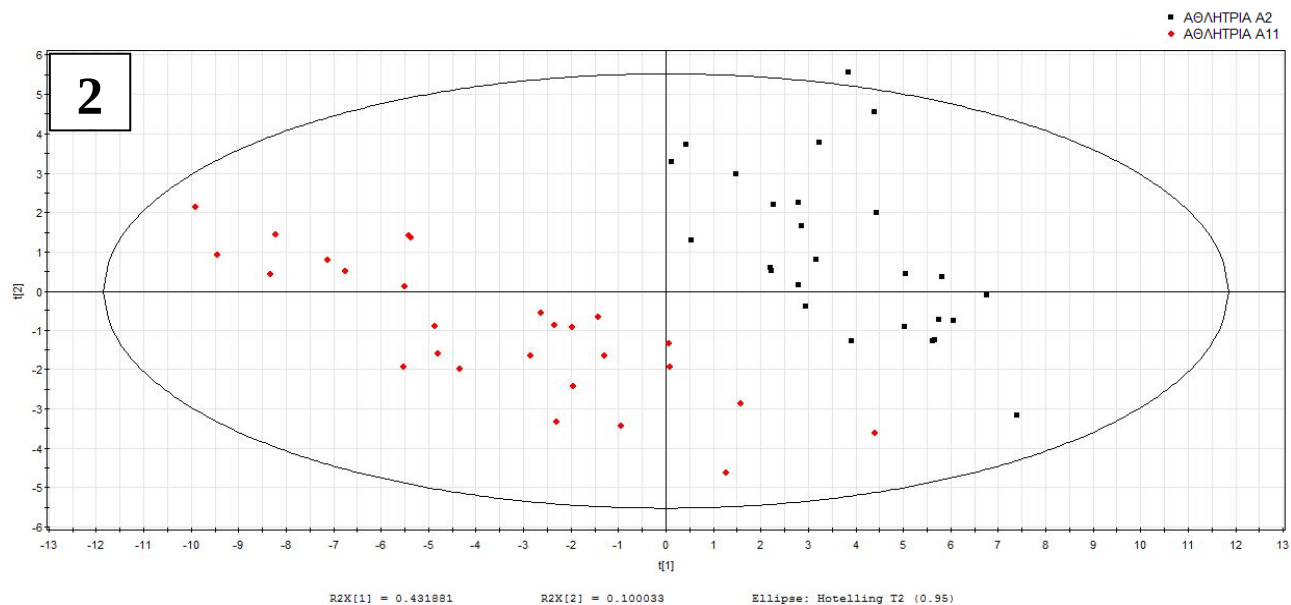
Var ID (Primary)	M31.VIP[4]
trimethylamine	1.65254
trigonelline	1.52485
Interval 6.83-7.00	1.52144
Unknown (m) 8.84	1.51783
Unknown (s) 9.36	1.34045
hippurate	1.24333
creatine 3.93	1.21676
Interval 3.24-3.30	1.13775
Interval 2.74-2.768	1.12516
glycine 3.57	1.12493
Interval 2.6-2.65	1.10478
3-OH-isobutyrate	1.0937

[7^{B.2}] ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΑΘΛΗΤΡΙΩΝ

Επιλέχθηκαν τα δείγματα που αντιστοιχούν μόνο στις γυναίκες αθλήτριες και στα οποία εφαρμόστηκε PCA για εξεύρεση πιθανού διαχωρισμού μεταξύ αυτών. Πρόκειται για 26 δείγματα ούρων της αθλήτριας A2 και 27 δείγματα της αθλήτριας A11 τα οποία έχουν συλλεχθεί σε παραπλήσιες ημερομηνίες. Παρατηρήθηκε κάποια ομαδοποίηση των δειγμάτων και διάκριση μεταξύ των δύο αθλητριών με έντονη όμως διασπορά των σημείων. Στη συνέχεια ακολούθησε και ανάλυση PLS-DA με την οποία έγινε πιο διακριτός ο διαχωρισμός (ΕΙΚΟΝΑ 29.1,29.2) ενώ οι παράγοντες στους οποίους οφείλεται αυτή η διάκριση εμφανίζονται στην αντίστοιχη Variable Importance List. (ΠΙΝΑΚΑΣ 4)



ΕΙΚΟΝΑ 29.1 PCA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων της αθλήτριας A2 (■) και της αθλήτριας A11 (♦)[R2Xcum(1):44,0%, Q2cum(1):40,4%, R2Xcum(2):54,6%, Q2cum(2):42,9%].



EIKONA 29.2 PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων ^1H -NMR δειγμάτων ούρων της αθλήτριας A2 (■) και της αθλήτριας A11 (♦) [R2Xcum(1):43,2%, Q2cum(1):59,4%, R2Xcum(2):53,2%, Q2cum(2):78,0%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 4 Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της EIKONΑΣ 29

Var ID (Primary)	M116.VIP[3]
formate 8.46	1.71961
glycine 3.57	1.54247
citrate	1.53291
Interval 3.17-3.22	1.35559
Interval 2.24-2.31	1.33135
Unknown (s) 2.34	1.27784
isoleucine	1.26419
Interval 1.13-1.268	1.26054
trimethylamine	1.2579
Interval 1.4-1.472	1.2568
Interval 0.73-0.98	1.16841
valine	1.16436

[7^{B.3}] ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΑΡΡΕΝΩΝ ΑΘΛΗΤΩΝ

ΜΕΛΕΤΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗ ΛΗΨΗ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΩΝ/ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Από το σύνολο των δειγμάτων επιλέχθηκαν μόνο εκείνα τα οποία ανήκουν σε άνδρες αθλητές και ταξινομήθηκαν σε 5 ομάδες ανάλογα με την λήψη συμπληρωμάτων /φαρμάκων τα οποία έχουν αναφερθεί πιο πάνω. Οι ομάδες που προέκυψαν είναι οι παρακάτω:

ΟΜΑΔΑ 1 : αθλητής A1 λαμβάνει βιταμίνη C και σπιρουλίνα

ΟΜΑΔΑ 2 : αθλητής A3 λαμβάνει σπιρουλίνα και ιπποφαές

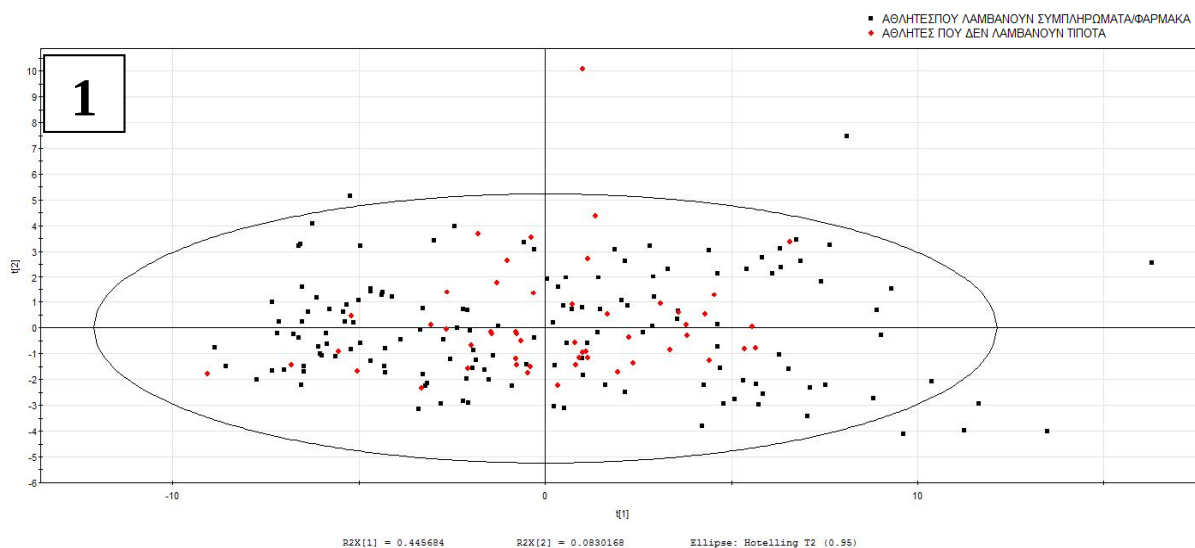
ΟΜΑΔΑ 3 : αθλητές A4,A6 δεν λαμβάνουν τίποτα

ΟΜΑΔΑ 4 :αθλητές A9, A12 λαμβάνουν τα ίδια συμπληρώματα [Creatine-PhosphagenTM (EAS), Glutamine (EAS), BCAA NanoStack (Sci-MX Nutrition), Myoplex Deluxe (EAS[®]), Muscle ArmorTM (EAS), 100% Whey Protein (EAS)]

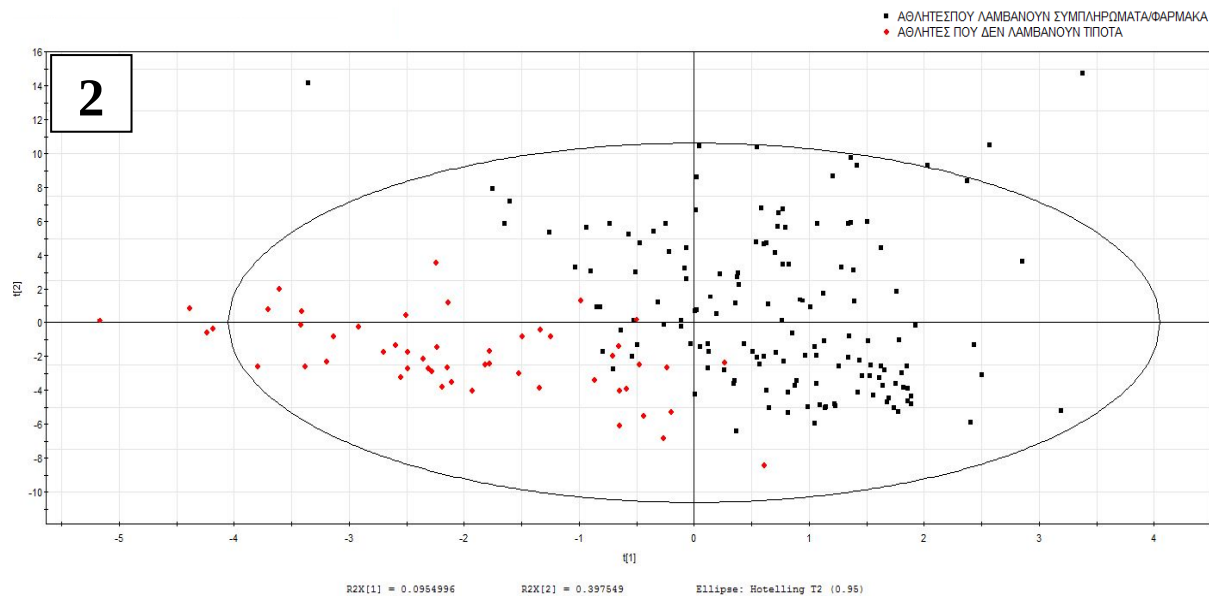
ΟΜΑΔΑ 5:αθλητές A5, A7 λαμβάνουν διαφορετικά φάρμακα / συμπληρώματα ο καθένας. Ο A5 λαμβάνει Xatral και Vesicare (λόγω καθετηριασμού, ανά τακτά χρονικά διαστήματα) και συμπληρώματα Αμινοξέα BCAA NanoStack (Branched Chain Amino Acid Capsules)-(Sci-MX Nutrition), Κρεατίνη Creatine- PhosphagenTM (EAS), Glutamine (EAS), συμπλήρωμα κρεατίνης Creatine Monohydrate (Sci-MX Nutrition) 250g και πολυβιταμίνη Q 10 V-Plus και ο A7 λαμβάνει Ercefuryl (Unipharma) και Ultra-Levure (Biocodex) (λόγω γαστρεντερίτιδας), και συμπληρώματα Power Amino Plex (Power Up), Multi-Vitamin Vital Silver Plus 50+ (SWISS CAPS SWITZERLAND / GERMANY), Ιπποφαές Εύβοιας (SuperfoodsTM), Lecarna - Levocarnitine (Bennett Pharmaceuticals),betamethasone (Celestone), Panadol 500 mg, Zadac.

ΜΕΛΕΤΗ / ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΑΡΡΕΝΩΝ ΑΘΛΗΤΩΝ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΜΕ ΕΚΕΙΝΟΥΣ ΠΟΥ ΔΕΝ ΛΑΜΒΑΝΟΥΝ ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ/ΦΑΡΜΑΚΑ.

Αρχικά έγινε σύγκριση μεταξύ των αθλητών εκείνων που δεν λαμβάνουν κάποιο συμπλήρωμα/φάρμακο σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους που λαμβάνουν κάτι. Επιλέχθηκαν τα δείγματα που ανήκουν στους αθλητές A4,A6 και όλων των υπολοίπων και εφαρμόστηκε PCA για να εξεταστεί η ύπαρξη κάποιου διαχωρισμού. Από το διάγραμμα της ΕΙΚΟΝΑΣ 30.1 η διάκριση μεταξύ των 2 ομάδων ήταν ανεπιτυχής οπότε εφαρμόστηκε PLS-DA όπου είναι εμφανής ο διαχωρισμός. Η ομάδα των αθλητών που δεν λαμβάνουν συμπλήρωμα/φάρμακο συγκεντρώνεται στο κάτω αριστερό τεταρτημόριο (ΕΙΚΟΝΑ 30.2) και υπάρχει γενικά μεγάλη διασπορά στο σύνολο των δειγμάτων ενώ οι τιμές στην VIP list δεν παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους(ΠΙΝΑΚΑΣ 5). Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι οι μεταβολίτες της τριμεθυλαμίνης και ισολευκίνης αυξάνονται στους A4,A6 ενώ της κρεατίνης μειώνεται σε σχέση με την άλλη ομάδα.(βλ.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ)



ΕΙΚΟΝΑ 30.1 PCA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων των αθλητών που λαμβάνουν συμπληρώματα/φάρμακα (■) και των αθλητών που δεν λαμβάνουν τίποτα (♦)[R2Xcum(1):44,6%, Q2cum(1):41,9%, R2Xcum(2): 52,9%, Q2cum(2):46,3%]



ΕΙΚΟΝΑ 30.2 PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων ^1H -NMR δειγμάτων ούρων των αθλητών που λαμβάνουν συμπληρώματα/φάρμακα (■) και των αθλητών που δεν λαμβάνουν τίποτα (♦)[R2Xcum(1):9,5%, Q2cum(1):47,2%, R2Xcum(2): 49,3%, Q2cum(2):54,1%]

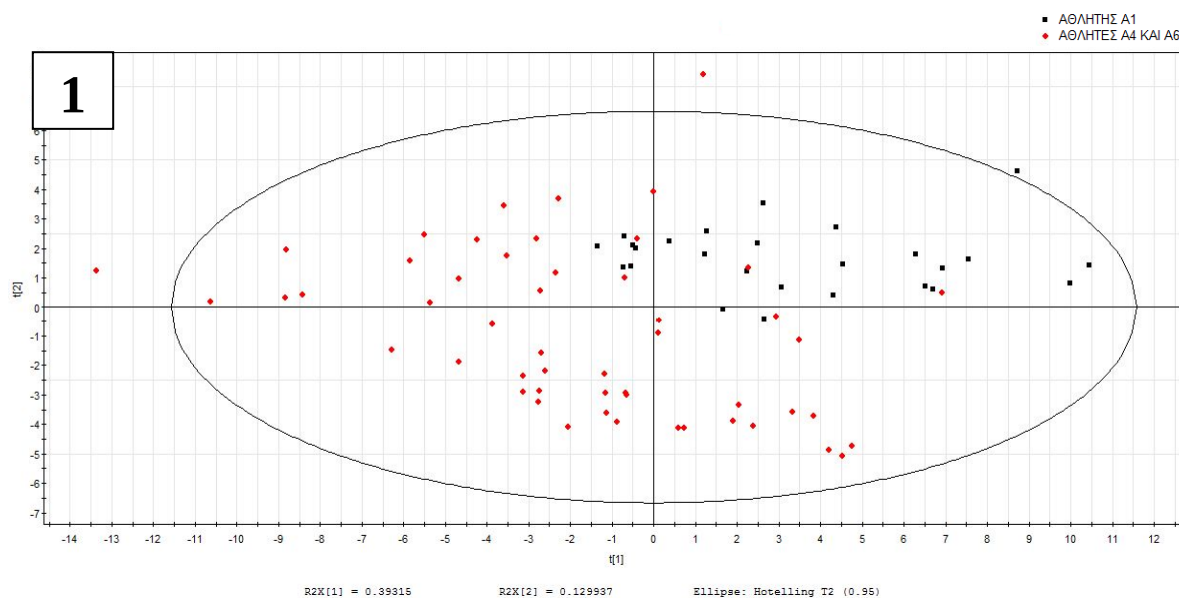
ΠΙΝΑΚΑΣ 5 Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 30.

Var ID (Primary)	M115.VIP[4]
trimethylamine	2.16925
Unknown (s) 3.23	1.70479
creatine 3,93	1.55859
isoleucine	1.55277
Interval 3.17-3.22	1.52712
Unknown (s) 7.68	1.50908
2oxoisovalerate	1.50289
phenylalanine	1.35988
glycine	1.35973
Interval 2.40-2.426	1.34017
Nmethylnicotinamide	1.17983
Unknown (s) 3.368	1.15447

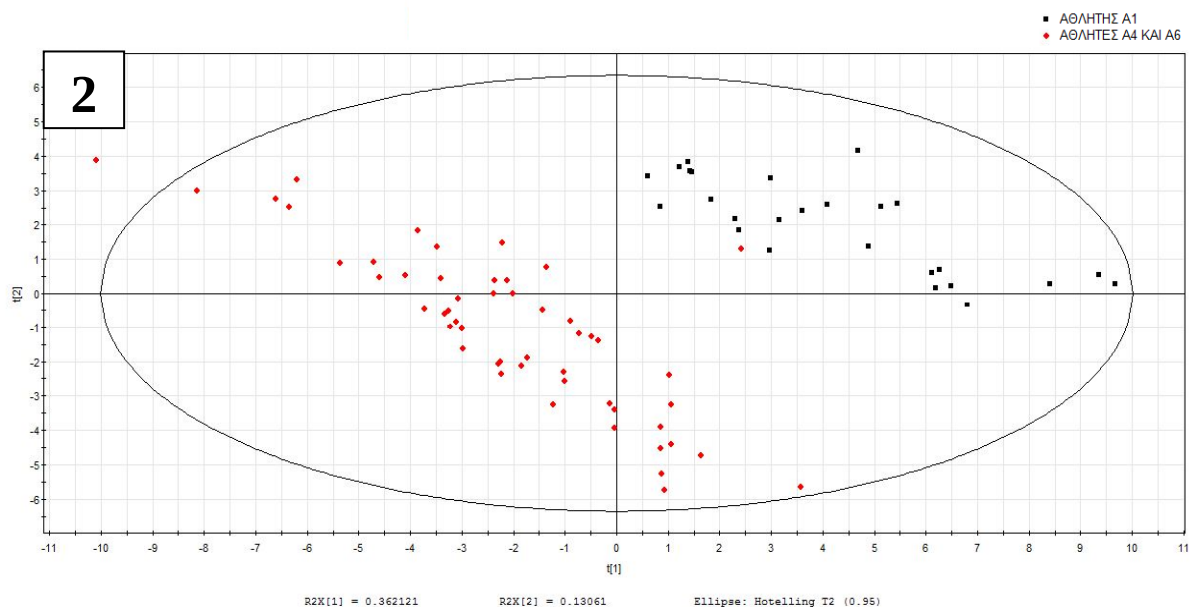
ΜΕΛΕΤΗ /ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΠΡΟΦΙΛ ΑΘΛΗΤΩΝ ΑΝΑ ΟΜΑΔΕΣ

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ 1 ΚΑΙ 3

Επιλέχθηκαν τα δείγματα του αθλητή Α1 (ΟΜΑΔΑ 1) καθώς και των αθλητών Α4,Α6 (ΟΜΑΔΑ 3) και εφαρμόστηκε PCA για να διαπιστωθεί αν αυτές οι δύο ομάδες διαχωρίζονται μεταξύ τους. Από το διαγράμμα (ΕΙΚΟΝΑ 31) που προέκυψε φαίνεται ότι υπάρχει μια διάκριση με τα δείγματα του αθλητή Α1 να συγκεντρώνονται στο άνω δεξιά τεταρτημόριο. Στην συνέχεια ακολούθησε επιβλεπόμενη στατιστική ανάλυση με την μέθοδο PLS-DA όπου παρατηρήθηκε καλύτερος διαχωρισμός και μικρή μείωση της διασποράς των δειγμάτων στις 2 ομάδες. Παρακάτω παρατίθεται και η VIP list με τις παραμέτρους στις οποίες οφείλεται η διαφοροποίηση. Βρέθηκε ότι στην ΟΜΑΔΑ 1 οι μεταβολίτες της τριμεθυλαμίνης και του 3-ΟΗισοβαλερικού μειώνονται ενώ του Ν-μεθυλνικοτιναμιδίου αυξάνονται σε σχέση με την ΟΜΑΔΑ 3.(βλ.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ)



ΕΙΚΟΝΑ 31.1 PCA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων του αθλητή Α1[ΟΜΑΔΑ 1] (■) και των αθλητών Α4 και Α6 [ΟΜΑΔΑ 3](♦) [R2Xcum(1):39,3%, Q2cum(1):35,5%, R2Xcum(2): 52,3%, Q2cum(2):44,3%]



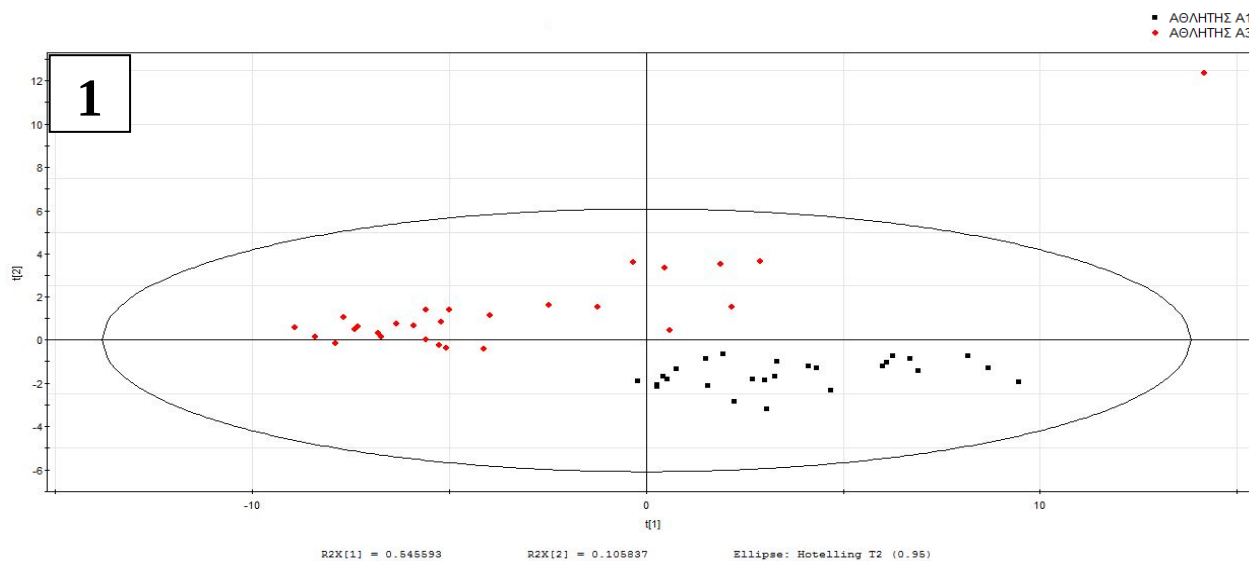
EIKONA 31.2 PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων του αθλητή A1[ΟΜΑΔΑ 1] (■) και των αθλητών A4 και A6 [R2Xcum(1):36,2%, Q2cum(1):53,5%, R2Xcum(2): 49,3%, Q2cum(2):85,8%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 6 Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της EIKONΑΣ 31.

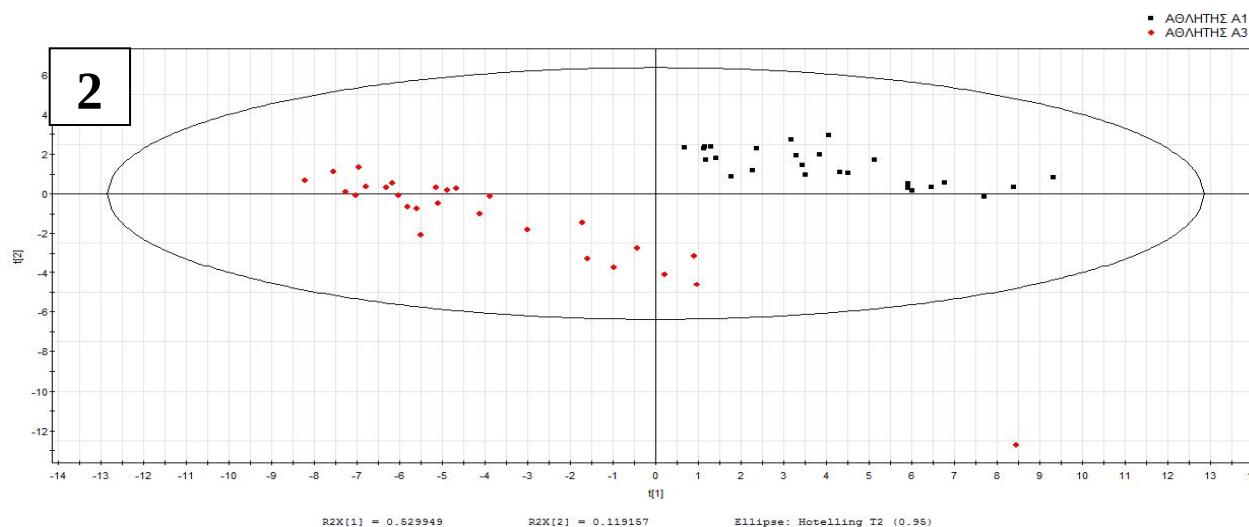
Var ID (Primary)	M119.VIP[3]
trimethylamine	1.95109
3OHisovalerate	1.81476
Nmethylnicotinamide	1.72462
Unknown (s) 2.785	1.49521
Unknown (s) 3.23	1.3252
Interval 2.74-2.768	1.32331
Unknown (d) 1.09	1.32203
Unknown (s) 3.368	1.28211
Interval 3.17-3.22	1.23971
Interval 1.86-1.98	1.20527
Interval 1.98-2.15	1.20527
creatine	1.1842

ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ 1 ΚΑΙ 2

Οι επόμενες 2 ομάδες που μελετήθηκαν περιλαμβάνουν τα δείγματα του αθλητή A1 (ΟΜΑΔΑ 1) και του αθλητή A3 (ΟΜΑΔΑ 2). Η PCA στην περίπτωση αυτή έδειξε έναν πολύ ικανοποιητικό διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων και με την εφαρμογή της PLS-DA οι ομάδες ήταν εξίσου διακριτές.



ΕΙΚΟΝΑ 32.1 PCA διάγραμμα τιμών (uv scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων του αθλητή A1[ΟΜΑΔΑ 1] (■) και του αθλητή A3 [ΟΜΑΔΑ 2](♦) [R2Xcum(1):54,6%, Q2cum(1):49,7%, R2Xcum(2): 65,1%, Q2cum(2):51.3%].



ΕΙΚΟΝΑ 32.2 PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων ¹H-NMR δειγμάτων ούρων του αθλητή A1[ΟΜΑΔΑ 1] (■) και του αθλητή A3 [ΟΜΑΔΑ 2](♦) [R2Xcum(1):53,0%, Q2cum(1):58,4%, R2Xcum(2): 64,9%, Q2cum(2):91,7%].

Οι παράμετροι στους οποίους οφείλεται η διαφοροποίηση των 2 ομάδων διακρίνονται στον παρακάτω πίνακα..Οι μεταβολίτες της άγνωστης κορυφής στα 7,68, του N-μεθυλνικοτιναμίδιου και του μυρμηκικού οξέος παρουσίασαν αύξηση στην ΟΜΑΔΑ 1 ενώ η τριμεθυλαμίνη,το κιτρικό και το 3-OH ισοβαλερικό οξύ μειώθηκαν σε σχέση με την ΟΜΑΔΑ 2. (βλ.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ)

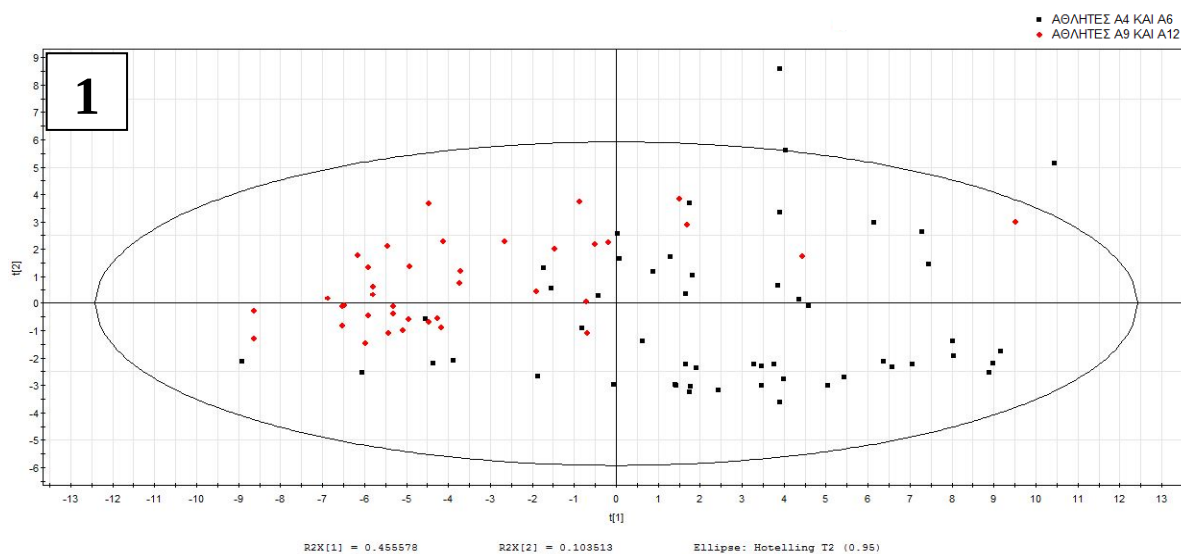
ΠΙΝΑΚΑΣ 7 Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 32.2

Var ID (Primary)	M121.VIP[3]
Unknown (s) 7.68	1.7035
3OHisovalerate	1.69628
Nmethylnicotinamide	1.56523
citrate	1.44865
Interval 2.74-2.768	1.31036
trimethylamine	1.25535
formate	1.22826
3OHisobutyrate	1.22344
Interval 1.13-1.268	1.21064
Interval 2.94-3.03	1.17736
Unknown (s) 2.83	1.14846
Interval 1.86-1.98	1.10906

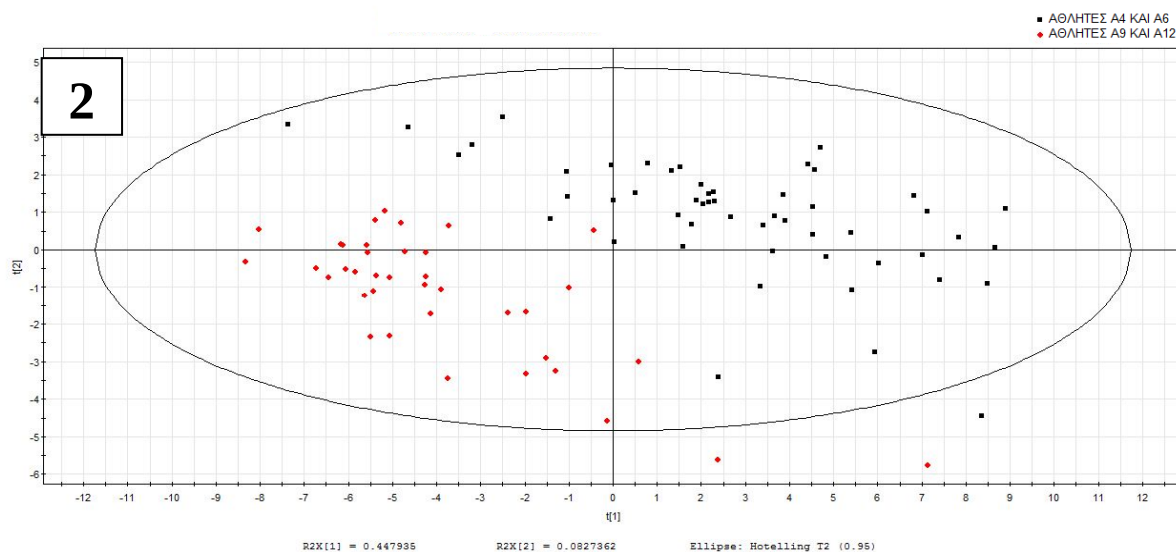
ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ 3 ΚΑΙ 4

Στην συνέχεια επιλέχθηκαν οι αθλητές A4, A6 οι οποίοι δεν λαμβάνουν κάποιο συμπλήρωμα διατροφής ή φάρμακο (ΟΜΑΔΑ 3) καθώς και οι αθλητές A9, A12 οι

οποίοι λαμβάνουν τα ίδια συμπληρώματα (ΟΜΑΔΑ 4). Η PCA αρχικά έδειξε κάποιο διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων ενώ καλύτερη διάκριση φάνηκε με την εφαρμογή της PLS-DA. Αντίστοιχα, παρατίθεται και η VIP list με τις παραμέτρους που προκαλούν την διαφοροποίηση αυτή.



ΕΙΚΟΝΑ 33.1 PCA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων των αθλητών Α4 και Α6 [ΟΜΑΔΑ 3] (■) και των αθλητών Α9 και Α12 [ΟΜΑΔΑ 4](♦) [R2Xcum(1):45,6%, Q2cum(1):43,0%, R2Xcum(2): 55,9%, Q2cum(2):49,4%].



EIKONA 33.2 PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων των αθλητών A4 και A6 [ΟΜΑΔΑ 3] (■) και των αθλητών A9 και A12 [ΟΜΑΔΑ 4](♦) [R2Xcum(1):44,8%, Q2cum(1):47,5%, R2Xcum(2): 53,1%, Q2cum(2):72,7%]

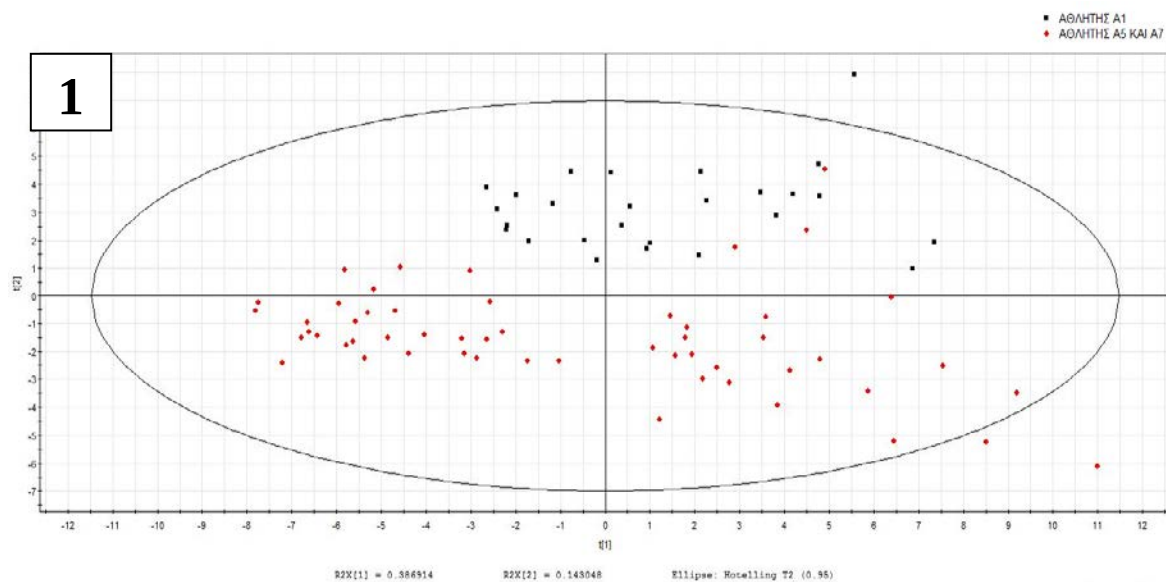
ΠΙΝΑΚΑΣ 8 Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 33

Var ID (Primary)	M122.VIP[3]
Unknown (s) 3.23	1.41256
3OHisovalerate	1.40696
Unknown (s) 3.368	1.34866
Interval 3.17-3.22	1.34341
Unknown (s) 7.68	1.322
Interval 2.24-2.31	1.31806
2oxoisovalerate	1.20462
Unknown (m) 8.84	1.16636
trigonelline	1.16543
valine	1.16187
Interval 6.83-7.00	1.16105
Interval 2.74-2.768	1.14044

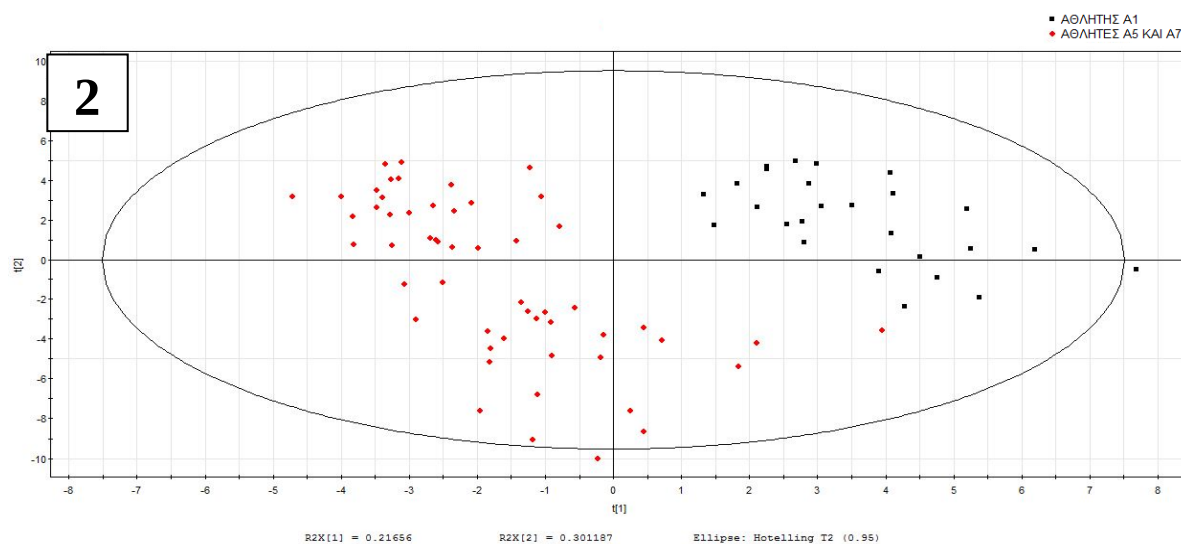
ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ 1 ΚΑΙ 5

Σύγκριση έγινε και μεταξύ του αθλητή A1 (ΟΜΑΔΑ 1) ο οποίος λαμβάνει κάποια συμπληρώματα διαφορετικά από αυτά που λαμβάνουν οι αθλητές A5 και A7 (ΟΜΑΔΑ 5). Κι εδώ εφαρμόστηκε η ίδια πορεία με τις προηγούμενες ομάδες, με την PCA να διακρίνει πολύ καλά τις 2 ομάδες αθλητών. Επίσης παρατηρήθηκε και κάποια εσωτερική ομαδοποίηση στην ΟΜΑΔΑ 5, με την διαφοροποίηση του αθλητή A5 από τον αθλητή A7. Στην PCA ο αθλητής A5 καταλαμβάνει το κάτω αριστερό τεταρτημόριο ενώ ο A7 το κάτω δεξιά. Παρόμοια διάκριση έγινε και με την εφαρμογή της PLS-DA όπου κι εδώ είναι ευδιάκριτη η γενική ομαδοποίηση των 2 ομάδων αλλά και η εσωτερική διάκριση των αθλητών της ΟΜΑΔΑΣ 5. Εδώ ο αθλητής A5 καταλαμβάνει το άνω αριστερό

τεταρτημόριο και ο αθλητής A7 το κάτω αριστερό τεταρτημόριο. Στον ΠΙΝΑΚΑ 9 παρουσιάζονται οι μεταβολίτες που συντελούν στη διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων ενώ βρέθηκε επίσης ότι η τριγονελλίνη και το N-μεθυλνικοτιναμίδιο αυξάνονται στη ΟΜΑΔΑ 1 σε σχέση με την ΟΜΑΔΑ 5.(βλ.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ)



ΕΙΚΟΝΑ 34.1 PCA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων του αθλητή A1 [ΟΜΑΔΑ 1] (■) και των αθλητών A5 και A7[ΟΜΑΔΑ 5]. Διακρίνεται η διαφοροποίηση των αθλητών A5 (κάτω αριστερά) και A7 (κάτω δεξιά) της ίδιας ομάδας(♦)[R2Xcum(1):38,7%, Q2cum(1):33,8%, R2Xcum(2): 53,0%, Q2cum(2):44,9%]



ΕΙΚΟΝΑ 34.2 PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων του αθλητή A1 [ΟΜΑΔΑ 1] (■) και των αθλητών A5 και A7 [ΟΜΑΔΑ 5]. Είναι κι εδώ ευδιάκριτη η διαφοροποίηση των αθλητών A5 (άνω αριστερά) και A7 (κάτω αριστερά) της ίδιας ομάδας(♦)[R2Xcum(1):21,7%, Q2cum(1):66,9%, R2Xcum(2): 51,8%, Q2cum(2):79,7%]

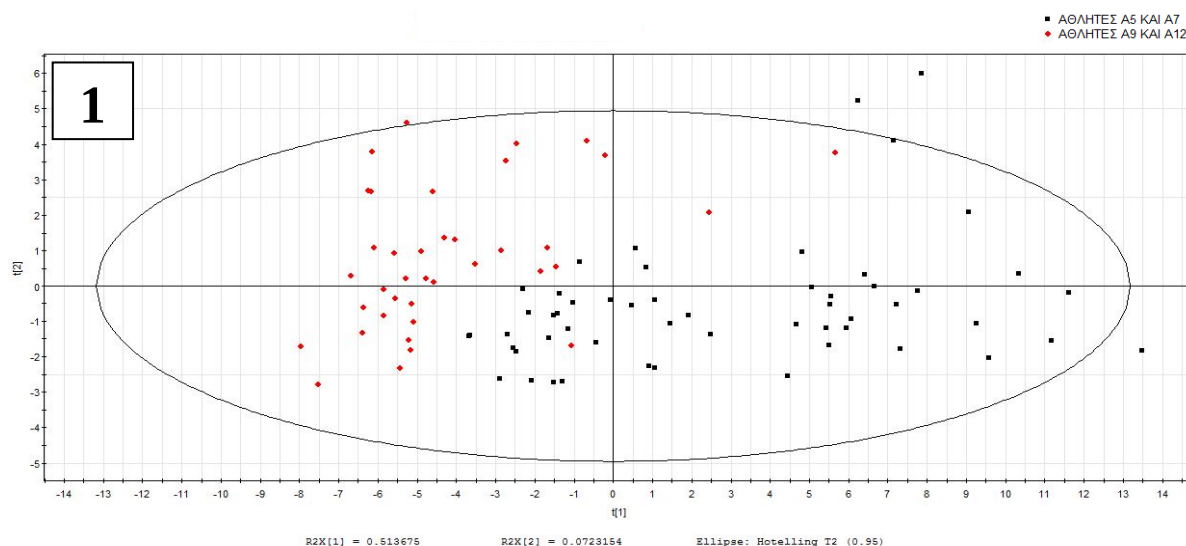
ΠΙΝΑΚΑΣ 9 Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 34

Var ID (Primary)	M124.VIP[3]
trigonelline	1.97438
Interval 6.83-7.00	1.94536
Unknown (m) 8.84	1.90646
Nmethylnicotinamide	1.78091
Interval 2.74-2.768	1.72049
Unknown (s) 3.368	1.52146
Unknown (s) 7.68	1.48418
3OHisovalerate	1.45146
trimethylamine	1.44567
Unknown(s) 2.80	1.29762
citrate	1.27102
Interval 2.6-2.65	1.2244

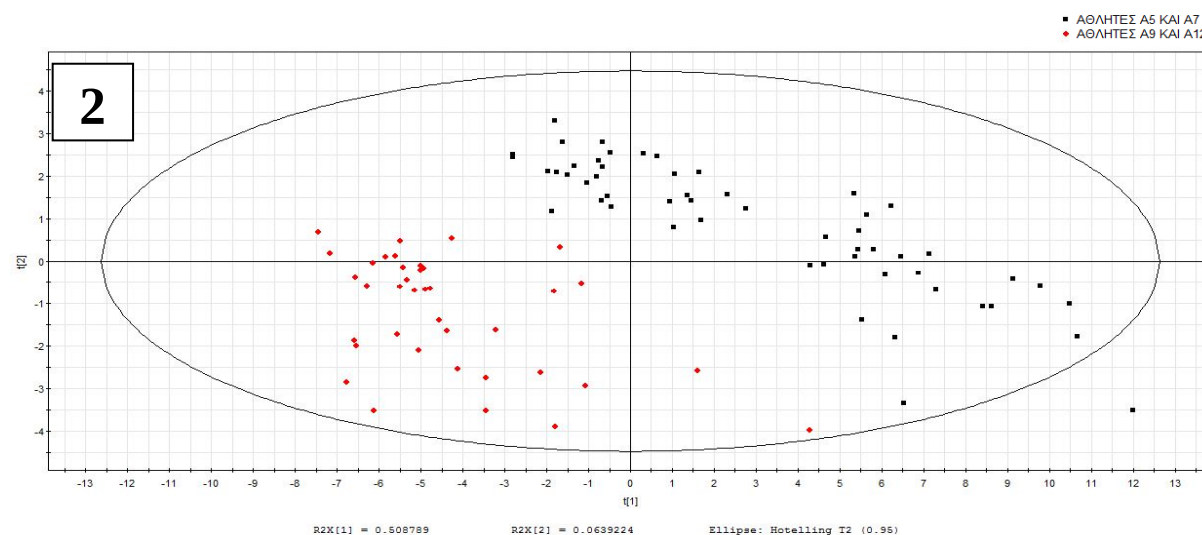
ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΟΜΑΔΩΝ 4 ΚΑΙ 5

Επιλέχθηκαν οι αθλητές A5,A7 της ΟΜΑΔΑΣ 5 οι οποίοι λαμβάνουν κάποια συμπληρώματα και φάρμακα και οι αθλητές A9, A12 της ΟΜΑΔΑΣ 4 που λαμβάνουν μόνο συμπληρώματα. Στην PCA παρατηρήθηκε ικανοποιητική διάκριση μεταξύ των 2 ομάδων καθώς επίσης και εσωτερικές ομαδοποιήσεις. Στην ΟΜΑΔΑ 4 οι αθλητές δεν διακρίθηκαν τόσο καλά μεταξύ τους σε αντίθεση με την καλύτερη ομαδοποίηση της ΟΜΑΔΑΣ 5 όπου τα δείγματα του αθλητή A5 συγκεντρώνονται προς το κέντρο των αξόνων και κάτω αριστερά και του αθλητή A7 κάτω δεξιά. Η PLS-DA δεν παρουσίασε μεγάλη διαφορά για την ΟΜΑΔΑ 4 με τα δείγματα και των δύο αθλητών να διασπείρονται στα αριστερά τεταρτημόρια. Ικανοποιητική είναι η διάκριση των αθλητών της ΟΜΑΔΑΣ 5 με τα δείγματα του αθλητή A5 πιο ομαδοποιημένα στά άνω

τεταρτημόρια σε αντίθεση με αυτά του αθλητή A7 που διασπείρονται στα δεξιά τεταρτημόρια. Πιο κάτω παρατίθεται και η VIP list με τις παραμέτρους που προκαλούν τις διαφοροποιήσεις αυτές με την τριγωνελλίνη να παρουσιάζει αύξηση στην ΟΜΑΔΑ 4 σε σχέση με την ΟΜΑΔΑ 5 (βλ.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ)



ΕΙΚΟΝΑ 35.1 PCA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων των αθλητών Α5 και Α7[ΟΜΑΔΑ 5] (■) και των αθλητών Α9 και Α12 [ΟΜΑΔΑ 4] (◆). Διακρίνεται η διαφοροποίηση των αθλητών Α5 (κάτω αριστερά) και Α7 (κάτω δεξιά) της ίδιας ομάδας [R2Xcum(1):51,4%, Q2cum(1):48,3%, R2Xcum(2): 58,6%, Q2cum(2):49,2%]



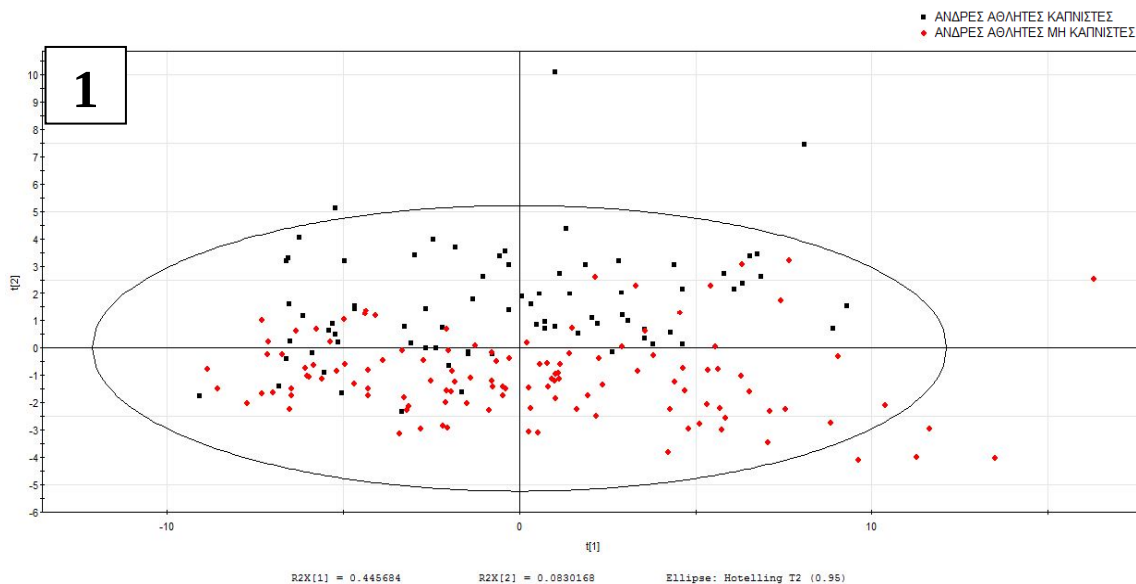
EIKONA 35.2 PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων των αθλητών A5 και A7 [ΟΜΑΔΑ 5] (■) και των αθλητών A9 και A12 [ΟΜΑΔΑ 4] (♦). Και εδώ είναι εμφανής η διαφοροποίηση των αθλητών A5 (επάνω) και A7 (κάτω δεξιά) της ίδιας ομάδας [R2Xcum(1):50,9%, Q2cum(1):51,5%, R2Xcum(2): 57,3%, Q2cum(2):83,4%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 10 Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 35

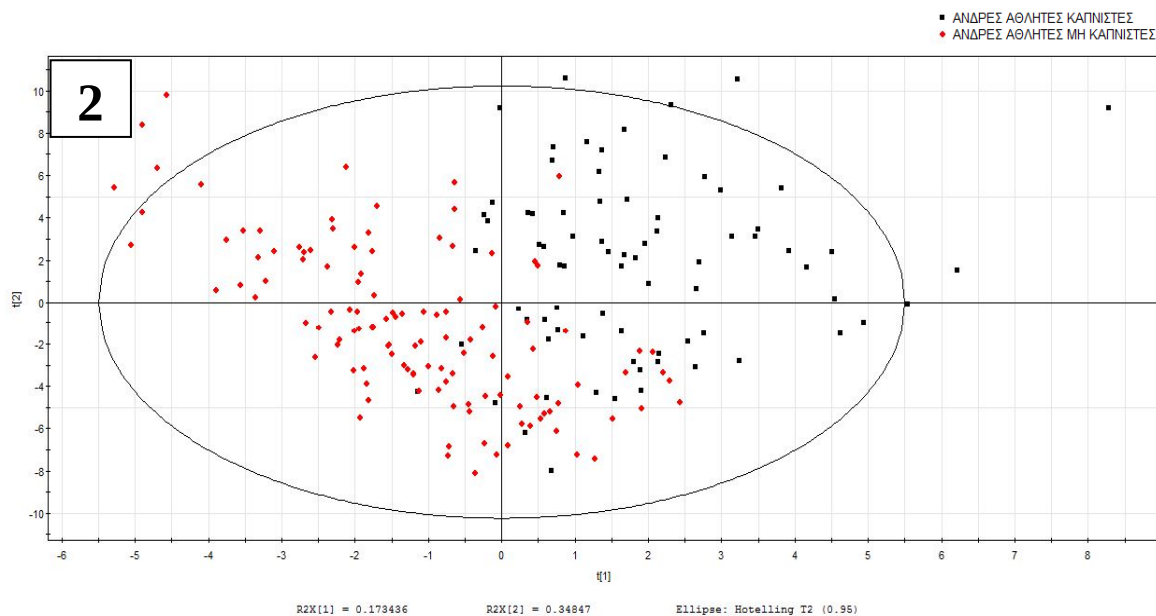
Var ID (Primary)	M34.VIP[5]
trigonelline	1.69114
Interval 6.83-7.00	1.68893
Unknown (m) 8.84	1.63412
3OHisovalerate	1.55476
Unknown (s) 3.23	1.42248
Interval 2.24-2.31	1.39382
Unknown (s) 7.68	1.32028
citrate	1.20268
2oxoisovalerate	1.17502
Unknown (s) 2.34	1.13761
phenylalanine	1.13585
Interval 3.17-3.22	1.11375

ΜΕΛΕΤΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΟ ΚΑΠΝΙΣΜΑ

Επιλέχθηκαν τα δείγματα των ανδρών αθλητών A1,A3,A5,A6,A7,A12 οι οποίοι δεν καπνίζουν και τοποθετήθηκαν σε μία ομάδα ενώ οι υπόλοιποι άνδρες αθλητές καπνιστές A4,A9 συγκρότησαν την δεύτερη ομάδα. Αρχικά εφαρμόστηκε PCA για την εξεύρεση πιθανού διαχωρισμού μεταξύ των ομάδων η οποία έδειξε ικανοποιητική διάκριση με τους μη καπνιστές στα κάτω τεταρτημόρια και τους καπνιστές στα άνω (ΕΙΚΟΝΑ 36.1). Η PLS-DA είχε παρόμοια αποτελέσματα όπως φαίνεται και στην ΕΙΚΟΝΑ 36.2 ενώ ο διαχωρισμός οφείλεται στις παραμέτρους του ΠΙΝΑΚΑ 11.



ΕΙΚΟΝΑ 36.1 PCA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων ανδρών αθλητών καπνιστών (■) και μη καπνιστών (♦). [R2Xcum(1):44,6%, Q2cum(1):41,9%, R2Xcum(2): 52,9%, Q2cum(2):46,3%]



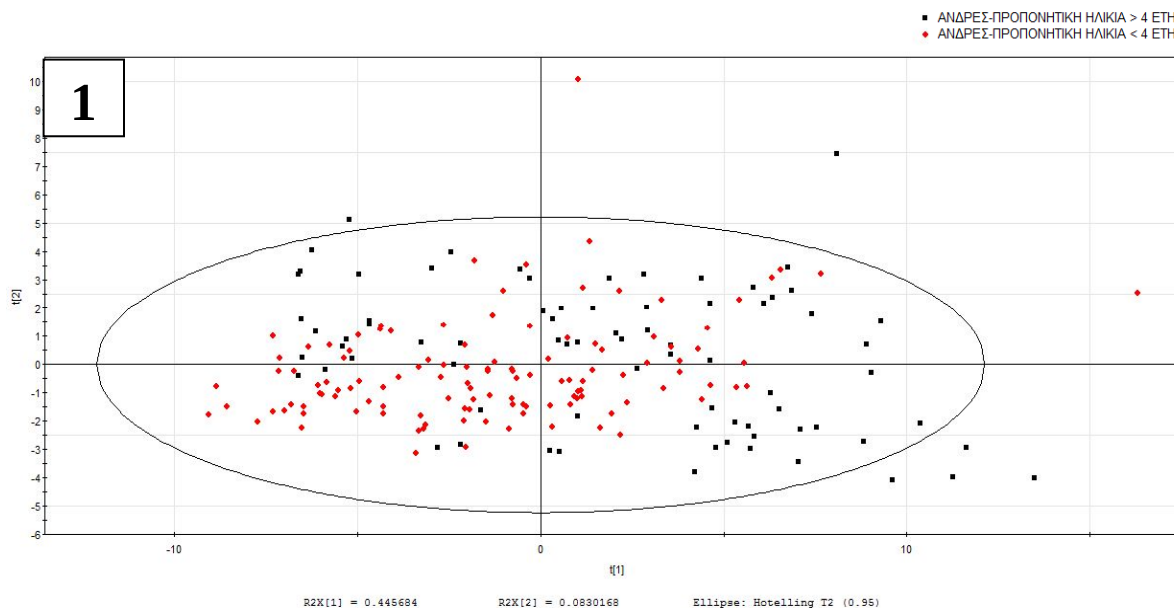
ΕΙΚΟΝΑ 36.2 PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων ανδρών αθλητών καπνιστών (■) και μη καπνιστών (♦). [R2Xcum(1):17,3%, Q2cum(1):41,7%, R2Xcum(2): 52,2%, Q2cum(2):52,7%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 11 Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 36

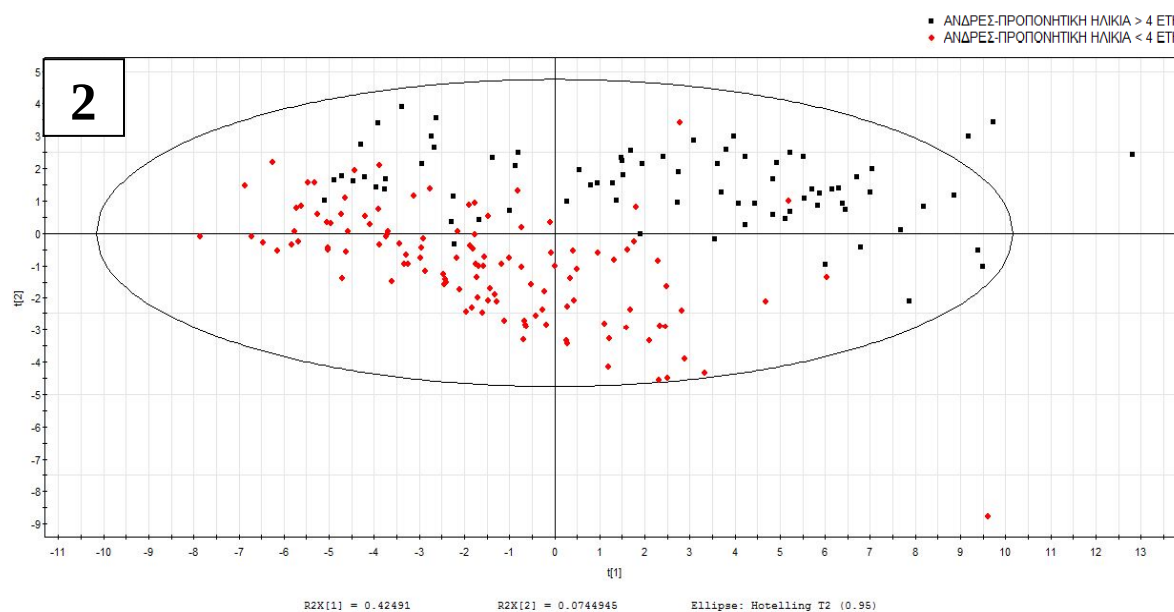
Var ID (Primary)	M41.VIP[4]
trigonelline	2.22988
Unknown (m) 8.84	2.21333
Interval 6.83-7.00	2.19503
citrate	2.07715
hippurate	1.76936
Interval 2.74-2.768	1.5099
Nmethylnicotinamide	1.26472
2oxoisovalerate	1.25104
formate 8.46	1.15852
3OHisovalerate	1.08185
Interval 2.6-2.65	1.06222
Interval 1.13-1.268	1.00385

ΜΕΛΕΤΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΠΡΟΠΟΝΗΤΙΚΗ ΗΛΙΚΙΑ

Για την μελέτη της παραμέτρου αυτής οι άνδρες αθλητές χωρίστηκαν ανάλογα με τα έτη προπόνησης τους στο συγκεκριμένο άθλημα. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει εκείνους που αθλούνται για περισσότερο από 5 έτη (A1,A7,A9) ενώ η δεύτερη ομάδα τους νεότερους (A3,A4,A5,A6,A12) που προπονούνται λιγότερο από 4 έτη. Η PCA φανέρωσε κάποια διάκριση αλλά όχι πολύ ξεκάθαρη με τα δείγματα κάθε ομάδας να ειπαισέρονται στην άλλη. Αντίθετα η PLS-DA διαχώρισε ικανοποιητικά της ομάδες αυτές, οι οποίες διακρίνονται πιο καλά με μειωμένη αισθητά την διασπορά των δειγμάτων όπως φαίνεται και στις ΕΙΚΟΝΕΣ 37.1 και 37.2.



ΕΙΚΟΝΑ 37.1 PCA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων των αθλητών A1,A7,A9 (■) και των αθλητών A3,A4,A5,A6,A12 (♦) [R2Xcum(1):50,0%, Q2cum(1):47,9%, R2Xcum(2): 57,3%, Q2cum(2):51,5%]



ΕΙΚΟΝΑ 37.2 PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων των αθλητών A1,A7,A9 (■) και των αθλητών A3,A4,A5,A6,A12 (♦) [R2Xcum(1):49,6%, Q2cum(1):31,9%, R2Xcum(2): 54,7%, Q2cum(2):60,3%]

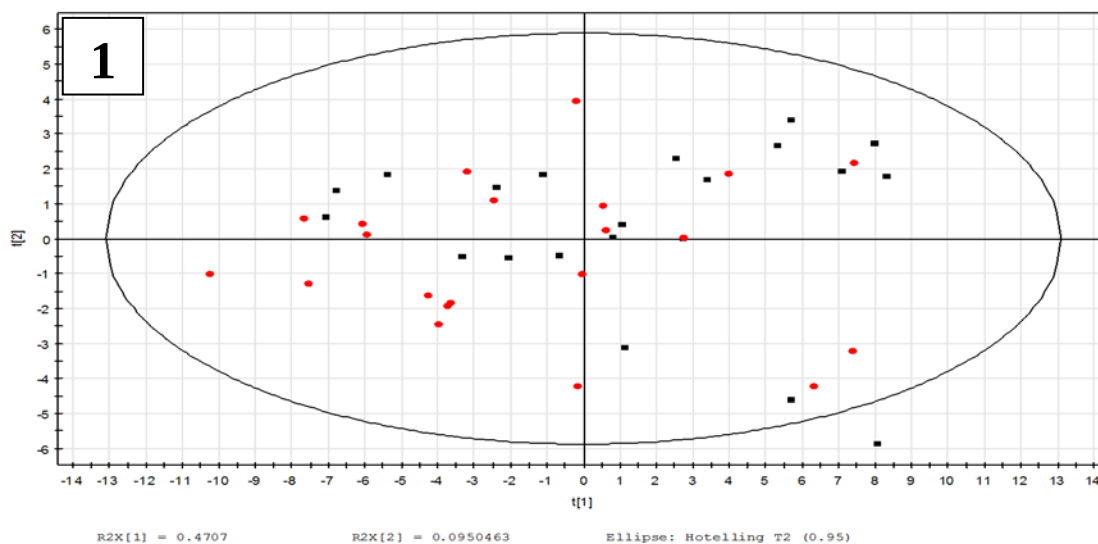
ΠΙΝΑΚΑΣ 12 Variable Importance List των 12 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 37

Var ID (Primary)	M118.VIP[4]
3OHisovalerate	2.26216
Nmethylnicotinamide	1.7192
citrate	1.70465
Trimethylamine	1.60759
Unknown (m) 8.84	1.31124
trigonelline	1.20117
creatine	1.1695
Interval 6.83-7.00	1.13041
glycine	1.11267
isoleucine	1.11257
Interval 1.13-1.268	1.08234
Interval 3.396-3.54	1.05748

ΜΕΛΕΤΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΠΡΟΠΟΝΗΣΗ ΓΙΑ ΠΑΡΑΟΛΥΜΠΙΑΚΟΥΣ ΑΓΩΝΕΣ

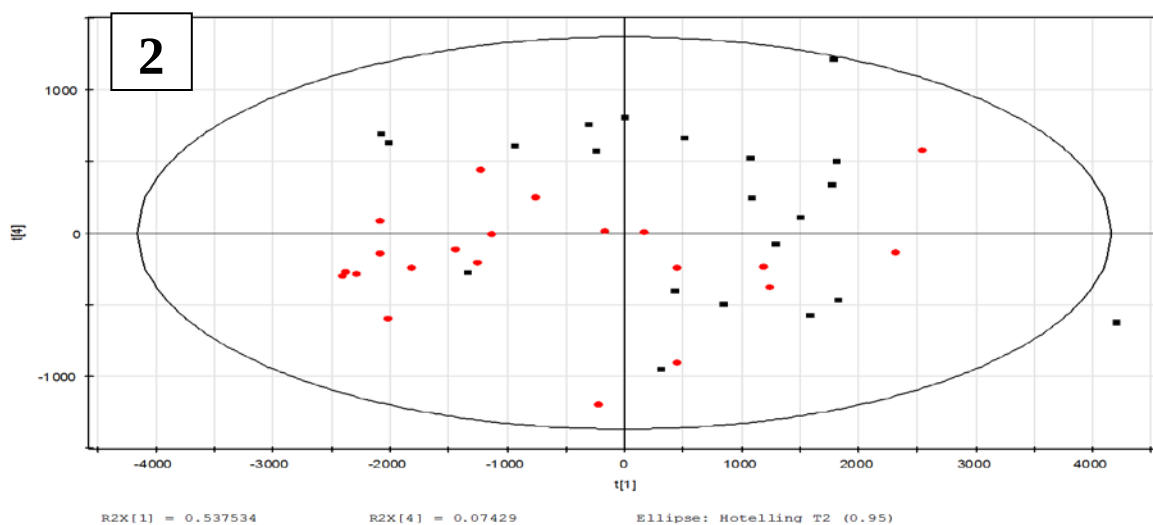
Όλοι οι άνδρες αθλητές συμμετείχαν κάποια στιγμή κατά την διάρκεια της περιόδου της δειγματοληψίας σε Παραολυμπιακούς Αγώνες. Για να μελετηθεί η επίδραση της διαφορετικής προπόνησης των αθλητών στο μεταβολικό τους προφίλ αρχικά εφαρμόστηκε η μέθοδος PCA. Επιλέχθηκαν 3 δείγματα του κάθε άνδρα αθλητή (με εξαίρεση τον αθλητή A12 λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων) από τις 3 πρώτες εβδομάδες στην αρχή της δειγματοληψίας πολύ πιο πριν τους Παραολυμπιακούς Αγώνες όπου ακολουθούσαν ένα απλό πρόγραμμα προπόνησης και ορίστηκαν ως μία ομάδα, ενώ η άλλη ομάδα περιλαμβάνει 3 δείγματα από όλους τους αθλητές τα οποία δόθηκαν το 1 δείγμα μία εβδομάδα πριν τους αγώνες, το 1 κατά τη διάρκεια των Αγώνων και ακόμα 1 την εβδομάδα μετά τους αγώνες όπου ακολουθούσαν διαφορετικό πρόγραμμα

προπόνησης λόγω της προετοιμασίας για τους Αγώνες. Η PCA όπως και η PLS-DA που εφαρμόστηκε (ΕΙΚΟΝΑ 38.1,38.2) επίσης στα δείγματα αυτά δεν έδειξαν κάποιο διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων που να δηλώνει διαφορετική επίδραση του τρόπου προπόνησης στο μεταβολικό προφίλ. Διακριτή είναι η έντονη διασπορά των δειγμάτων προς όλα τα τεταρτημόρια. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) ώστε να ελαχιστοποιηθεί η επίδραση στα δείγματα των ανεπιθύμητων προς εξέταση παραγόντων. Η OPLS-DA συντελεί στην απομάκρυνση του στατιστικού θορύβου, δηλαδή στη μείωση της διασποράς των δειγμάτων εντός της ομάδας που ανήκουν και κατ' επέκταση στον καλύτερο διαχωρισμό των δύο ομάδων. Η OPLS-DA έδειξε κάποιο διαχωρισμό μεταξύ των 2 ομάδων με τα δείγματα που συλλέχθηκαν πολύ πριν τους Αγώνες να συγκεντρώνονται στα δεξιά τεταρτημόρια και τα δείγματα των Αγώνων στα αριστερά. Το διάγραμμα τιμών της συγκεκριμένης OPLS-DA φαίνεται στην ΕΙΚΟΝΑ 38.3 ενώ οι παράμετροι στους οποίους οφείλεται ο διαχωρισμός φαίνονται στον ΠΙΝΑΚΑ 13.

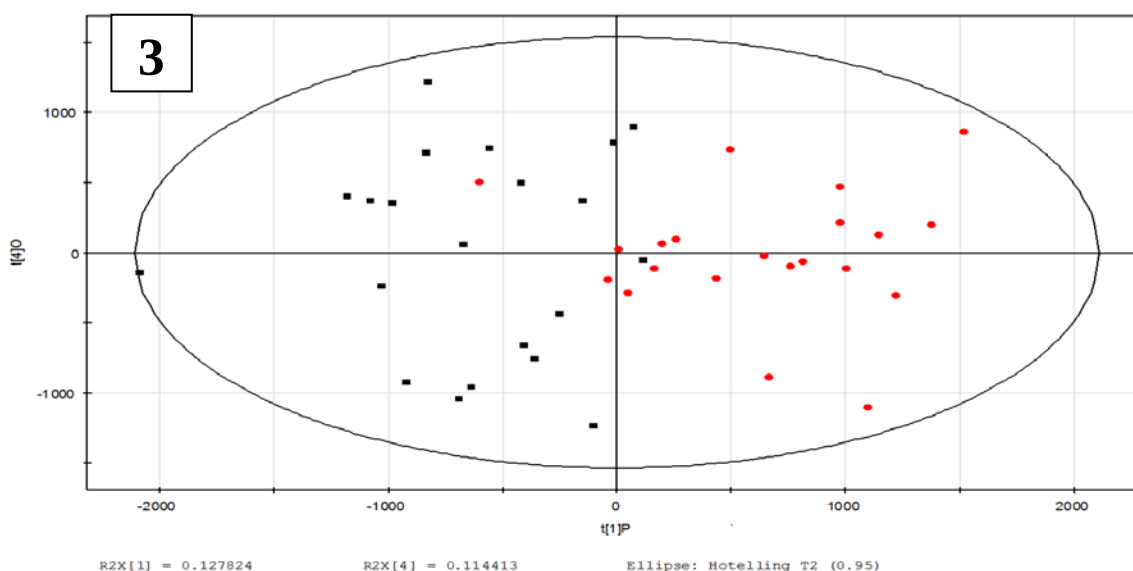


ΕΙΚΟΝΑ 38 (1) PCA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων ^1H -NMR δειγμάτων ούρων των ανδρών αθλητών πολύ πριν τους Αγώνες στην αρχή της δειγματοληψίας (♦) και δειγμάτων των

ίδιων αθλητών που συλλέχθηκαν 1 πριν, 1 κατά τους Αγώνες και 1 μετά (■) [R2Xcum(1):47,1%, Q2cum(1):43,2%, R2Xcum(2): 56,6%, Q2cum(2):44,0%]



ΕΙΚΟΝΑ 38 (2) PLS-DA διάγραμμα τιμών (pareto scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων των ανδρών αθλητών πολύ πριν τους Αγώνες στην αρχή της δειγματοληψίας (◆) και δειγμάτων των ίδιων αθλητών που συλλέχθηκαν 1 πριν, 1 κατά τους Αγώνες και 1 μετά (■) [R2Xcum(1):53,8%, Q2cum(1):7,8%, R2Xcum(4): 7,4%, Q2cum(4):-3,0%]



EIKONA 38 (3)OPLS-DA διάγραμμα τιμών (pareto scaling) φασμάτων ¹H-NMR δειγμάτων ούρων των ανδρών αθλητών πολύ πριν τους Αγώνες στην αρχή της δειγματοληψίας (♦) και δειγμάτων των ίδιων αθλητών που συλλέχθηκαν 1 πριν, 1 κατά τους Αγώνες και 1 μετά (■) [R2Xcum(1):12,8%, Q2cum(1):-19,1%, R2Xcum(4): 11,4%, Q2cum(4):-27,0%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 13 Variable Importance List των 11 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο OPLS-DA διάγραμμα τιμών της EIKONΑΣ 38.3

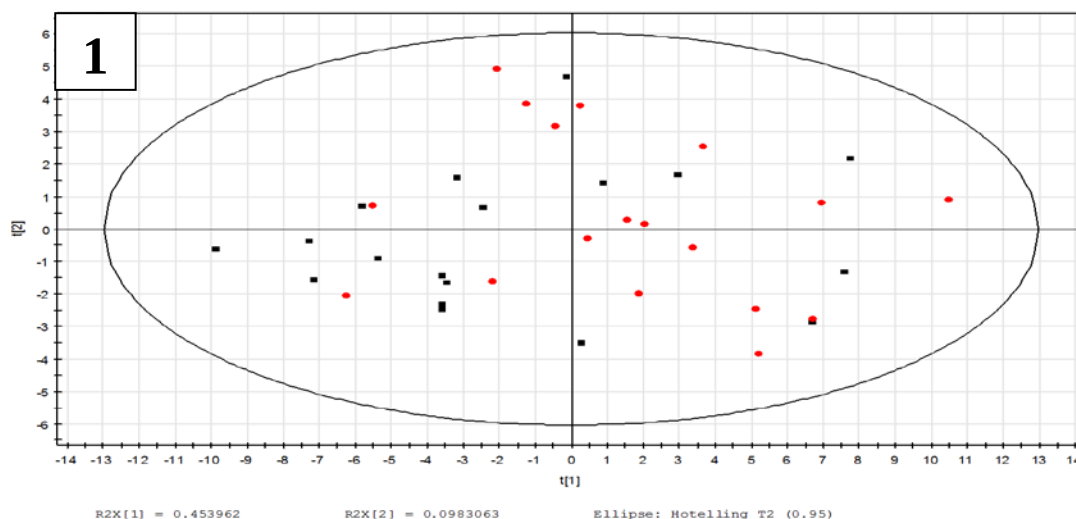
Var ID (Primary)	M1.VIP[4]
Interval 3.60-3.92	5.68419
hippurate	1.96591
Interval 3.396-3.54	1.50372
Interval 3.24-3.30	1.32786
phenylalanine	1.11348
Interval 2.24-2.31	1.01555
glycine	1.00274
Interval 2.42-2.5	0.898251
Interval 7.00-7.304	0.896978
Unknown (s) 4.35	0.891804
Interval 1.13-1.268	0.852826

ΜΕΛΕΤΗ ΩΣ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΠΡΟΣΛΗΨΗ ΑΦΕΨΗΜΑΤΟΣ ΤΣΑΓΙΟΥ

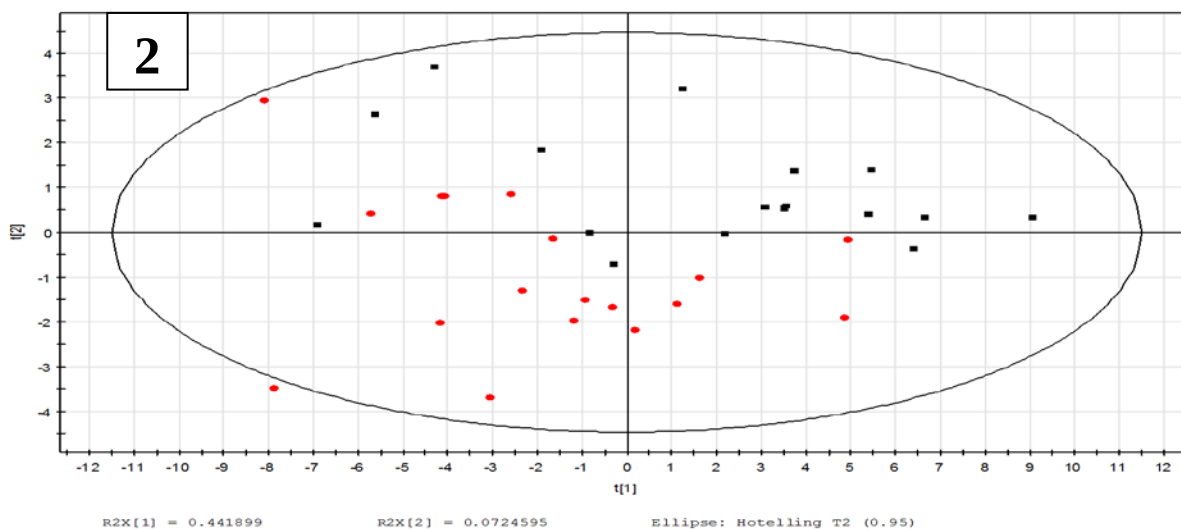
Μια ακόμη παράμετρος που μελετήθηκε ήταν και η επίδραση της πρόσληψης αφεψήματος τσαγιού στο μεταβολικό προφίλ των αθλητών. Όλοι οι άνδρες αθλητές, με εξαίρεση των αθλητή Α6, ακολούθησαν για μερικές εβδομάδες πριν το τέλος της δειγματοληψίας μια διατροφική παρέμβαση με αφέψημα πράσινου τσαγιού.

Αρχικά επιλέχθηκαν και ορίστηκαν ως μια ομάδα τα 3 πρώτα δείγματα στην αρχή της δειγματοληψίας για κάθε αθλητή (με εξαίρεση τους αθλητές Α6 και Α12) όπου δεν έλαβαν το αφέψημα και ως δεύτερη ομάδα ορίστηκαν τα 3 δείγματα κατά την περίοδο λήψης του τσαγιού (1 δείγμα μια εβδομάδα πριν την έναρξη της παρέμβασης με τσάι και

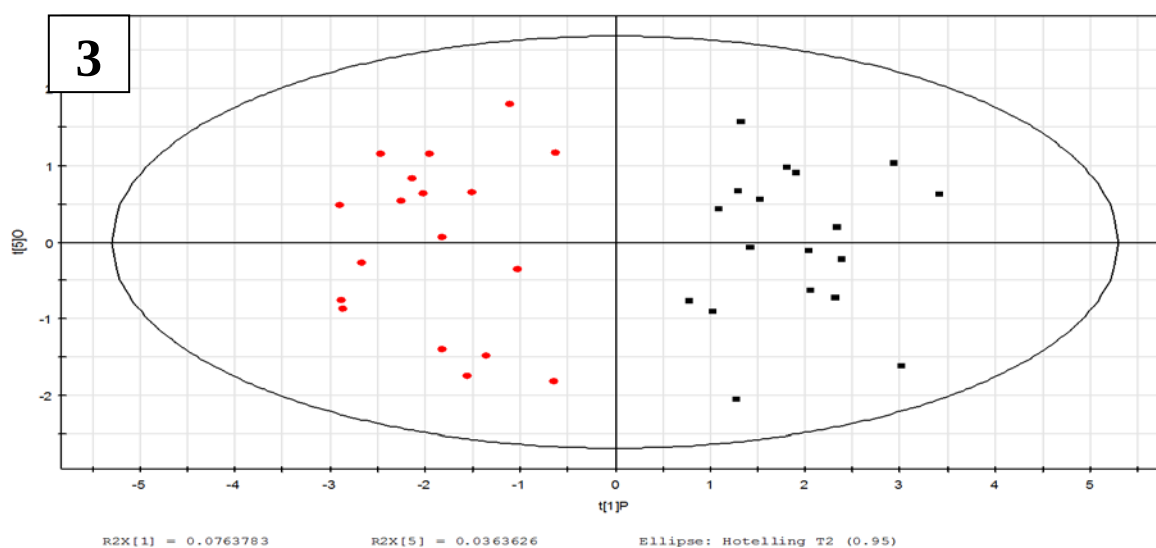
2 δείγματα κατά τη διάρκεια της παρέμβασης αυτής) για κάθε αθλητή αντίστοιχα. Εφαρμόστηκε PCA και PLS-DA στις ομάδες αυτές χωρίς όμως να υπάρχει κάποια διάκριση/ομαδοποίηση μεταξύ των δειγμάτων όπως φαίνεται και στις ΕΙΚΟΝΕΣ 39.1,39. με έντονη τη διασπορά των σημείων στο χώρο των συνιστωσών. Αντίθετα η OPLS-DA για τις ίδιες ομάδες έδειξε κάποιο διαχωρισμό με την ομάδα που έλαβε το τσάι να βρίσκεται στα αριστερά τεταρτημόρια και την ομάδα χωρίς τη λήψη αφεψημάτος στα δεξιά. (ΕΙΚΟΝΑ 39.3)



ΕΙΚΟΝΑ 39.1 PCA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων των ανδρών αθλητών (έχουν εξαιρεθεί οι αθλητές A6,A12) στην αρχή της δειγματοληψίας όπου δεν έλαβαν αφέψημα τσαγιού (■) και δειγμάτων των ίδιων αθλητών που συλλέχθηκαν 1 πριν τη λήψη,2 κατά την λήψη του τσαγιού (♦)[R2Xcum(1):45,4%, Q2cum(1):40,2%, R2Xcum(2): 9,8%, Q2cum(2):44,9%]



ΕΙΚΟΝΑ 39.2 PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων των ανδρών αθλητών (έχουν εξαιρεθεί οι αθλητές A6, A12) στην αρχή της δειγματοληψίας όπου δεν έλαβαν αφέψημα τσαγιού (■) και δειγμάτων των ίδιων αθλητών που συλλέχθηκαν 1 πριν τη λήψη, 2 κατά την λήψη του τσαγιού (♦) [$R^2X_{\text{cum}}(1):44,2\%$, $Q^2_{\text{cum}}(1):5,0\%$, $R^2X_{\text{cum}}(2):51,4\%$, $Q^2_{\text{cum}}(2):-1,4\%$]



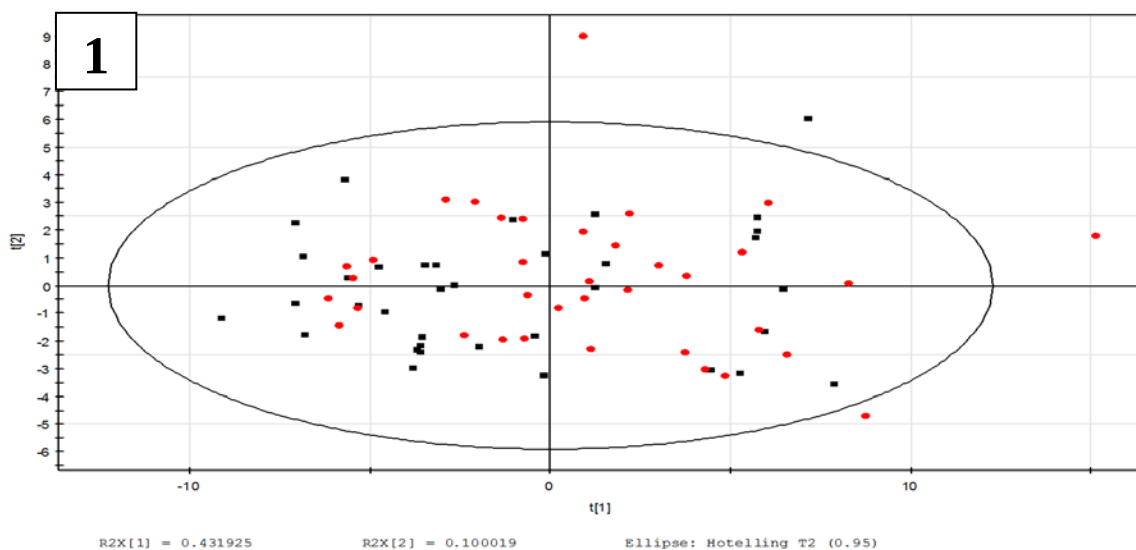
ΕΙΚΟΝΑ 39.3 OPLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων των ανδρών αθλητών (έχουν εξαιρεθεί οι αθλητές A6, A12) στην αρχή της δειγματοληψίας όπου δεν έλαβαν αφέψημα τσαγιού (■) και δειγμάτων των ίδιων αθλητών που συλλέχθηκαν 1 πριν τη

λήψη,2 κατά την λήψη του τσαγιού (♦)[R2Xcum(1):7,6%, Q2cum(1):-6,9%, R2Xcum(5):57,3%, Q2cum(5):-1,2%]

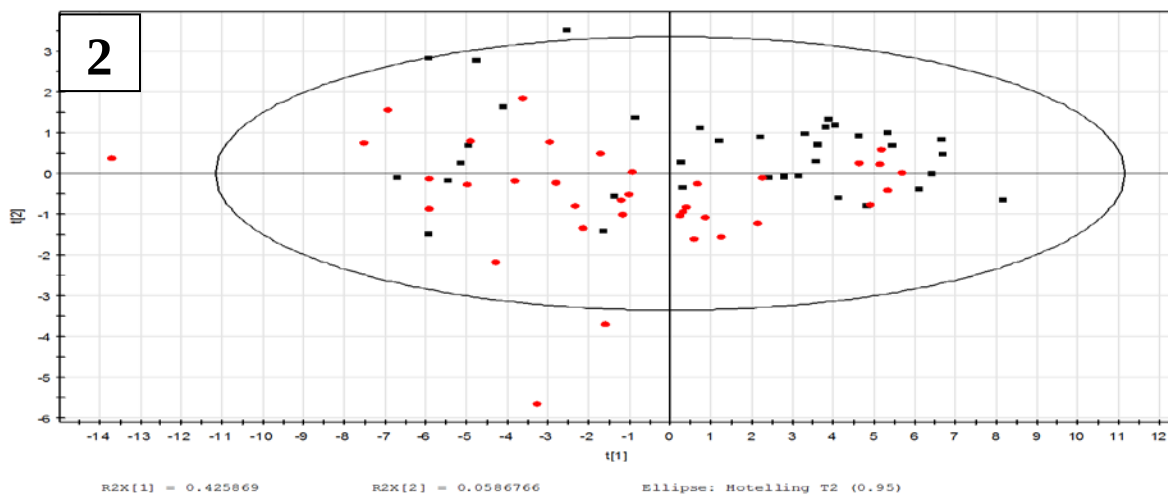
ΠΙΝΑΚΑΣ 14 Variable Importance List των 11 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο OPLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 39

Var ID (Primary)	M10.VIP[5]
Πιθανόν methylguanidine	1.92336
Unknown (s) 2.78	1.7732
Unknown (d) 1.09	1.61465
Unknown (s) 2.83	1.5667
formate	1.56113
Interval 7.00-7.304	1.51798
Interval 2.74-2.768	1.49721
3OHisovalerate	1.36062
Interval 2.40-2.426	1.31241
valine	1.29236

Για περαιτέρω μελέτη της παραμέτρου αυτής, ορίστηκαν ως μια ομάδα τα 3 δείγματα στην αρχή της δειγματοληψίας μαζί με τα 3 δείγματα των 3 εβδομάδων πριν την έναρξη της πρόσληψης τσαγιού για κάθε αθλητή. Ως δεύτερη ομάδα ορίστηκαν τα 3 δείγματα κατά την πρόσληψη του αφεψημάτος μαζί με τα 3 δείγματα μετά την λήψη του τσαγιού τα οποία είναι και τα τελευταία της δειγματοληψίας για κάθε αθλητή (με εξαίρεση πάλι των αθλητών Α6,Α12) . Έτσι εφαρμόστηκε PCA και PLS-DA οι οποίες δεν φανέρωσαν κάποιο διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων αυτών (ΕΙΚΟΝΕΣ 40.1,40.2) ενώ η OPLS-DA εμφανίζει μια ελάχιστη διάκριση με τις δυο ομάδες να αλληλεπικαλύπτονται και έντονη τη διασπορά μεταξύ των σημείων. (ΕΙΚΟΝΑ 40.3)

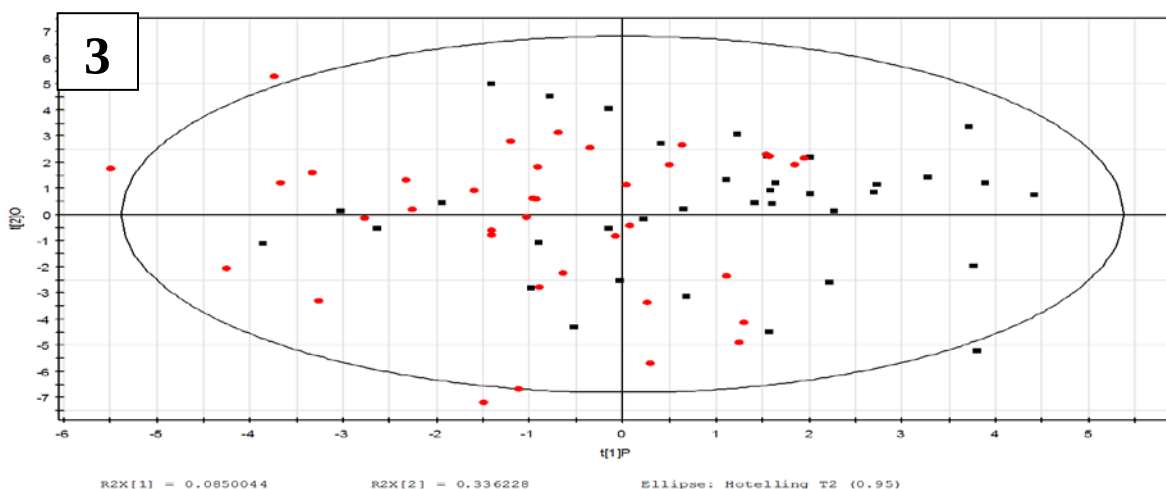


ΕΙΚΟΝΑ 40.1 PCA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων ^1H -NMR δειγμάτων ούρων των ανδρών αθλητών (έχουν εξαιρεθεί οι αθλητές A6,A12) 3 εβδομάδες στην αρχή της δειγματοληψίας όπου δεν έλαβαν αφέννημα τσαγιού και 3 εβδομάδες πριν τη λήψη τσαγιού (■) και δειγμάτων των ίδιων αθλητών που συλλέχθηκαν 3 εβδομάδες κατά την λήψη του τσαγιού και 3 εβδομάδες μετά (♦)[R2Xcum(1):43,2%, Q2cum(1):38,9 %, R2Xcum(2): 10,0%, Q2cum(2):43,4 %]



ΕΙΚΟΝΑ 40.2 PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων ^1H -NMR δειγμάτων ούρων των ανδρών αθλητών (έχουν εξαιρεθεί οι αθλητές A6, A12) 3 εβδομάδες στην αρχή της

δειγματοληψίας όπου δεν έλαβαν αφένχημα τσαγιού και 3 εβδομάδες πριν τη λήψη τσαγιού (■) και δειγμάτων των ίδιων αθλητών που συλλέχθηκαν 3 εβδομάδες κατά την λήψη του τσαγιού και 3 εβδομάδες μετά (♦)[R2Xcum(1):42,6%, Q2cum(1):3,0 %, R2Xcum(2): 5,8%, Q2cum(2): -6,6%]



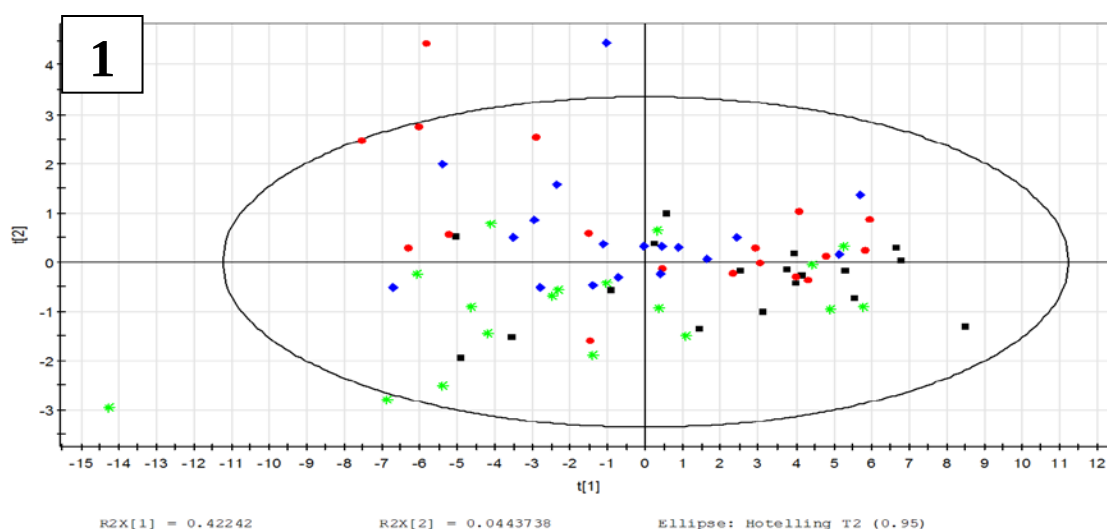
EIKONA 40.3 OPLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων ¹H-NMR δειγμάτων ούρων των ανδρών αθλητών (έχουν εξαιρεθεί οι αθλητές A6,A12) 3 εβδομάδες στην αρχή της δειγματοληψίας όπου δεν έλαβαν αφένχημα τσαγιού και 3 εβδομάδες πριν τη λήψη τσαγιού (■) και δειγμάτων των ίδιων αθλητών που συλλέχθηκαν 3 εβδομάδες κατά την λήψη του τσαγιού και 3 εβδομάδες μετά (♦) [R2Xcum(1):8,5%, Q2cum(1):-3,2%, R2Xcum(2): 33,6%, Q2cum(2):-1,2%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 15 Variable Importance List των 11 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο OPLS-DA διάγραμμα τιμών της EIKONΑΣ 40.3

Var ID (Primary)	M9.VIP[4]
methylguanidine	1.63549
Unknown (s) 2.78	1.51488
3OHisovalerate	1.48021
Unknown (d) 1.09	1.47559
valine	1.38317

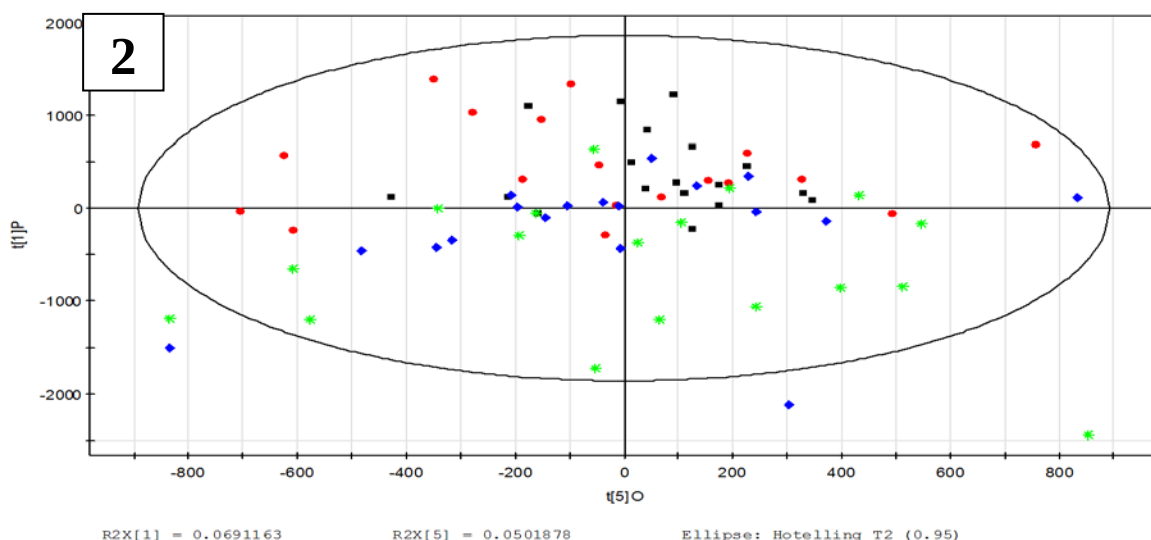
Interval 7.00-7.304	1.36148
Interval 2.40-2.426	1.30824
Interval 2.74-2.768	1.27722
Interval 2.42-2.5	1.25541
Interval 6.83-7.00	1.19907

Στην συνέχεια, ορίστηκαν ως νέες και διαφορετικές ομάδες τα 3 δείγματα στην αρχή της δειγματοληψίας(ΟΜΑΔΑ 1), τα 3 δείγματα πριν τη λήψη του τσαγιού (ΟΜΑΔΑ 2), τα 3 δείγματα κατά τη διάρκεια της πρόσληψης του τσαγιού (ΟΜΑΔΑ 3) και ως τελευταία ομάδα τα 3 δείγματα μετά τη λήψη του αφεψήματος (ΟΜΑΔΑ 4) για κάθε αθλητή. Εφαρμόστηκε PLS-DA και OPLS-DA για τις ομάδες αυτές (ΕΙΚΟΝΕΣ 41.1,41.2) χωρίς να υπάρχει έντονη κάποια διακριτή ομαδοποίηση, με μεγάλη διασπορά στα δείγματα γενικά και μια «υποψία» ομαδοποίησης των δειγμάτων της ΟΜΑΔΑΣ 1 και 2 μαζί και αντίστοιχη «υποψία» ομαδοποίησης των δειγμάτων των ΟΜΑΔΩΝ 3 και 4 μαζί.



ΕΙΚΟΝΑ 41.1 PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων ανδρών αθλητών (έχουν εξαιρεθεί οι αθλητές A6,A12) 3 εβδομάδων στην αρχή της δειγματοληψίας όπου δεν έλαβαν αφέψημα τσαγιού (ΟΜΑΔΑ 1) (■) 3 εβδομάδων πριν τη λήψη τσαγιού (ΟΜΑΔΑ 2) (♦) 3 εβδομάδων κατά την λήψη του τσαγιού (ΟΜΑΔΑ 3) (◆) και 3

εβδομάδων μετά τη λήψη (ΟΜΑΔΑ 4) (◆)[R2Xcum(1):42,2%, Q2cum(1):-2,0%, R2Xcum(2): 46,7%, Q2cum(2):-12,2%]

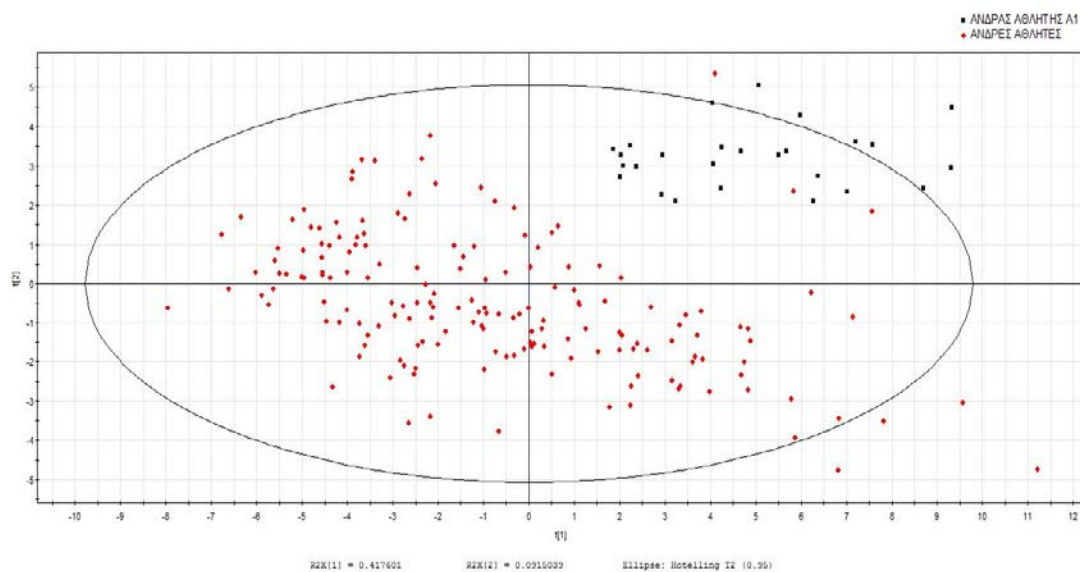


ΕΙΚΟΝΑ 41.2 OPLS-DA διάγραμμα τιμών (pareto scaling) φασμάτων ^1H -NMR δειγμάτων ούρων ανδρών αθλητών (έχουν εξαιρεθεί οι αθλητές A6,A12) 3 εβδομάδων στην αρχή της δειγματοληψίας όπου δεν έλαβαν αφένημα τσαγιού (ΟΜΑΔΑ 1) (■) 3 εβδομάδων πριν τη λήψη τσαγιού (ΟΜΑΔΑ 2) (◆) 3 εβδομάδων κατά την λήψη του τσαγιού (ΟΜΑΔΑ 3) (◆) και 3 εβδομάδων μετά τη λήψη (ΟΜΑΔΑ 4) (◆)[R2Xcum(1):6,9%, Q2cum(1):-55,0%, R2Xcum(5): 76,8%, Q2cum(5):-56,0%]

[7^{B.4}]ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΚΑΘΕ ΑΡΡΕΝΑ ΑΘΛΗΤΗ ΞΕΧΩΡΙΣΤΑ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΑΡΡΕΝΩΝ ΑΘΛΗΤΩΝ

Επιλέχθηκαν τα δείγματα κάθε αθλητή ξεχωριστά, με εξαίρεση αυτά των γυναικών, και ορίστηκαν ως μια ομάδα με την μέθοδο PLS-DA. Στην συνέχεια ορίστηκε και το υπόλοιπο σύνολο δειγμάτων ως μια άλλη ομάδα για να διαπιστωθεί αν τελικά το μεταβολικό προφίλ κάθε αθλητή μπορεί να διαφοροποιηθεί από τους υπόλοιπους. Από τα διαγράμματα είναι εμφανές ότι κάθε αθλητής σχηματίζει ένα δικό του σμήνος σημείων-δειγμάτων, το οποίο διαφοροποιείται κατά πολύ από τα υπόλοιπα δείγματα των αθλητών.

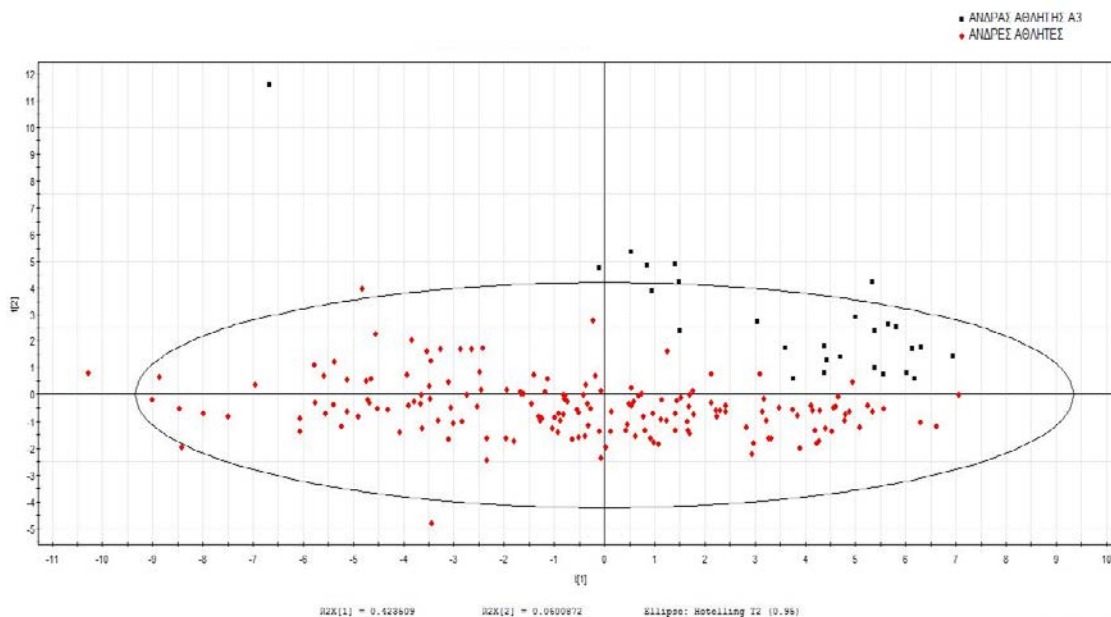
Παρακάτω παρατίθενται τα αντίστοιχα διαγράμματα καθώς και οι πίνακες VIP list για το καθένα με τις παραμέτρους που προκαλούν το διαχωρισμό αυτό.



ΕΙΚΟΝΑ 42. PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων ^1H -NMR δειγμάτων ούρων του αθλητή Α1 (■) και των αθλητών Α3,Α4,Α5,Α6,Α7,Α9,12 (♦) [R2Xcum(1):41,8%, Q2cum(1):22,0%, R2Xcum(2): 48,4%, Q2cum(2):53,5%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 16 Variable Importance List των 10 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 42

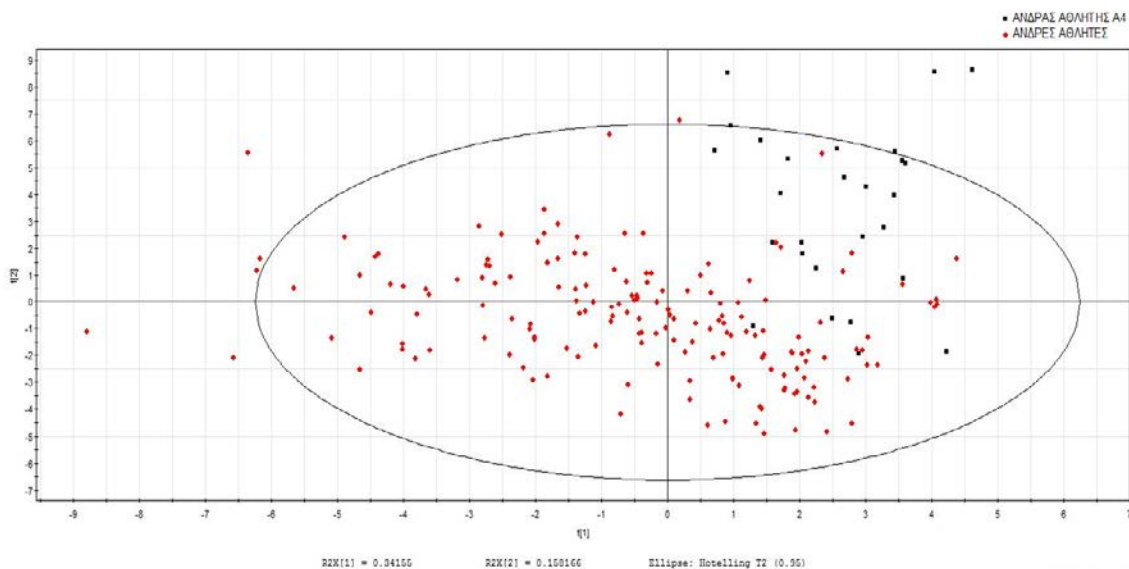
Var ID (Primary)	M125.VIP[4]
Nmethylnicotinamide	2.09904
Trimethylamine	1.83547
3OHisovalerate	1.71191
Unknown (s) 2.34	1.54991
Trigonelline	1.48225
Unknown (m) 8.84	1.47903
Interval 6.83-7.00	1.47493
citrate	1.43305
Interval 2.74-2.768	1.34004
(s) 7.68	1.16216



EIKONA 43. PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων ^1H -NMR δειγμάτων ούρων του αθλητή A3 (■) και των αθλητών A1,A4,A5,A6,A7,A9,12 (♦)[R2Xcum(1):42,4%, Q2cum(1):12,5%, R2Xcum(2): 50,9%, Q2cum(2):57,4%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 17 Variable Importance List των 10 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της EIKONΑΣ 43

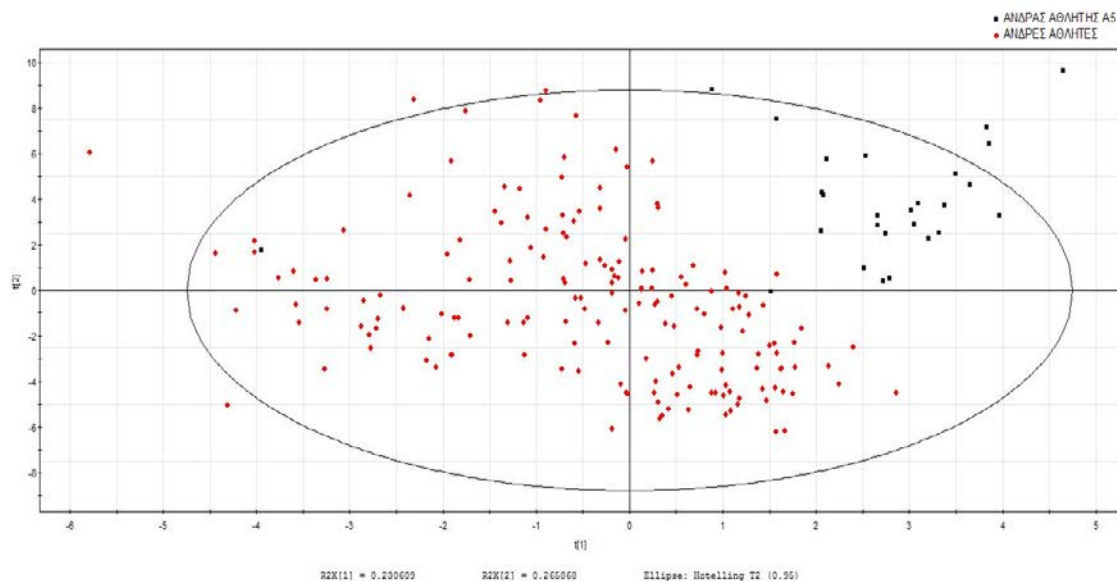
Var ID (Primary)	M126.VIP[8]
Interval 1.13-1.268	2.27223
Unknown (s) 3.368	1.90883
citrate	1.76879
3OHisobutyrate	1.66975
Unknown (d) 1.09	1.27615
Interval 3.396-3.54	1.26644
hippurate	1.24776
Unknown (s) 2.80	1.2385
formate 8.46	1.10058
methylguanidine	1.08041



ΕΙΚΟΝΑ 44. PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων του αθλητή A4 (■) και των αθλητών A1,A3,A5,A6,A7,A9,12 (♦)[R2Xcum(1):34,2%, Q2cum(1):13,6%, R2Xcum(2): 50,0%, Q2cum(2):40,5%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 18 Variable Importance List των 10 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 44

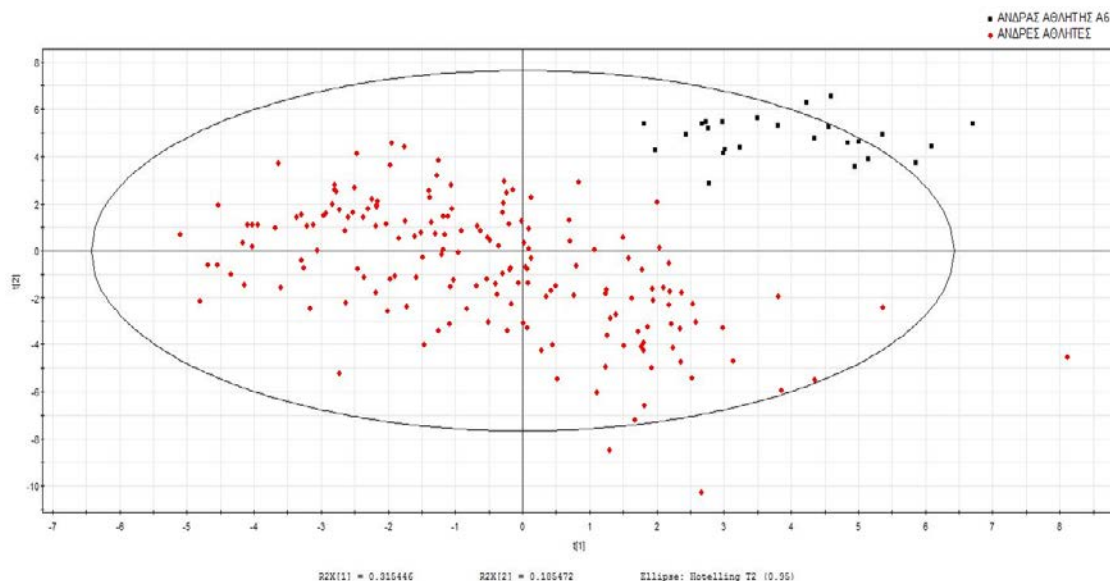
Var ID (Primary)	M127.VIP[4]
Interval 6.83-7.00	1.54533
Trigonelline	1.52332
hippurate	1.46487
Unknown (m) 8.84	1.46133
Interval 1.4-1.472	1.42582
2oxoisovalerate	1.42014
3OHisovalerate	1.41003
dimethylglycine	1.34706
formate 8.46	1.3105
Interval 1.61-1.75	1.29089



ΕΙΚΟΝΑ 45. PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων ^1H -NMR δειγμάτων ούρων του αθλητή Α5 (■) και των αθλητών Α1,Α3,Α4,Α6,Α7,Α9,12 (♦) [R2Xcum(1):23,1%, Q2cum(1):22,2%, R2Xcum(2): 49,6%, Q2cum(2):41,5%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 19 Variable Importance List των 10 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 45

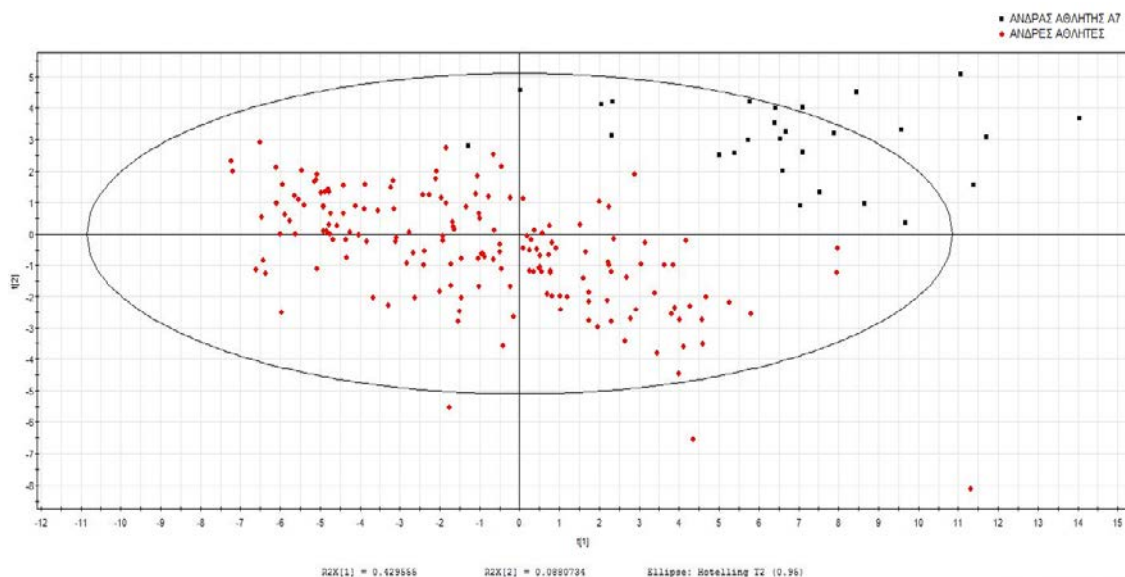
Var ID (Primary)	M128.VIP[4]
3OHisovalerate	1.94914
Unknown (s) 3.368	1.53391
valine	1.53347
Interval 6.83-7.00	1.41731
trigonelline	1.41427
2oxoisovalerate	1.40987
Unknown (s) 2.80	1.35331
Nmethylnicotinamide	1.34988
Unknown (m) 8.84	1.34206
formate 8.46	1.34168



ΕΙΚΟΝΑ 46. PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων του αθλητή Α6 (■) και των αθλητών Α1,Α3,Α4,Α5,Α7,Α9,12 (♦) [R2Xcum(1):31,5%, Q2cum(1):30,4%, R2Xcum(2): 50,1%, Q2cum(2):66,2%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 20 Variable Importance List των 10 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 46

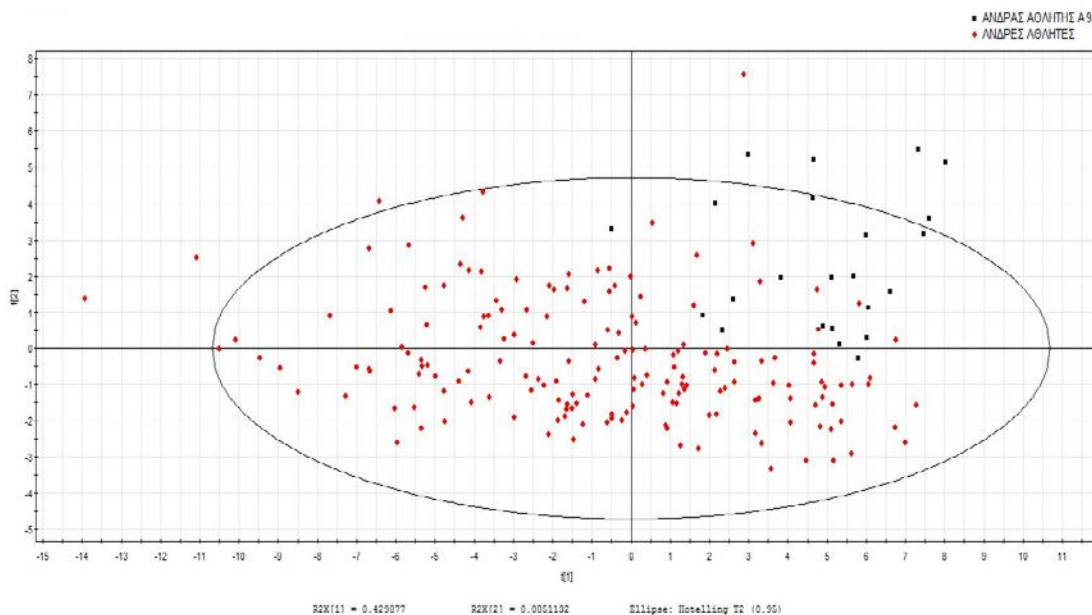
Var ID (Primary)	M129.VIP[4]
trimethylamine	1.57786
isoleucine	1.5341
Interval 3.17-3.22	1.39984
Interval 2.40-2.426	1.39492
Interval 2.42-2.5	1.389
glycine 3.57	1.35828
Unknown (m) 8.84	1.34209
trigonelline	1.18671
Unknown (s) 3.23	1.16247
methylguanidine	1.15783



ΕΙΚΟΝΑ 47. PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων $^1\text{H-NMR}$ δειγμάτων ούρων του αθλητή Α7 (■) και των αθλητών Α1,Α3,Α4,Α5,Α6,Α9,12 (♦)[R2Xcum(1):43,0%, Q2cum(1):35,9%, R2Xcum(2): 51,8%, Q2cum(2):68,7%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 21 Variable Importance List των 10 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 47

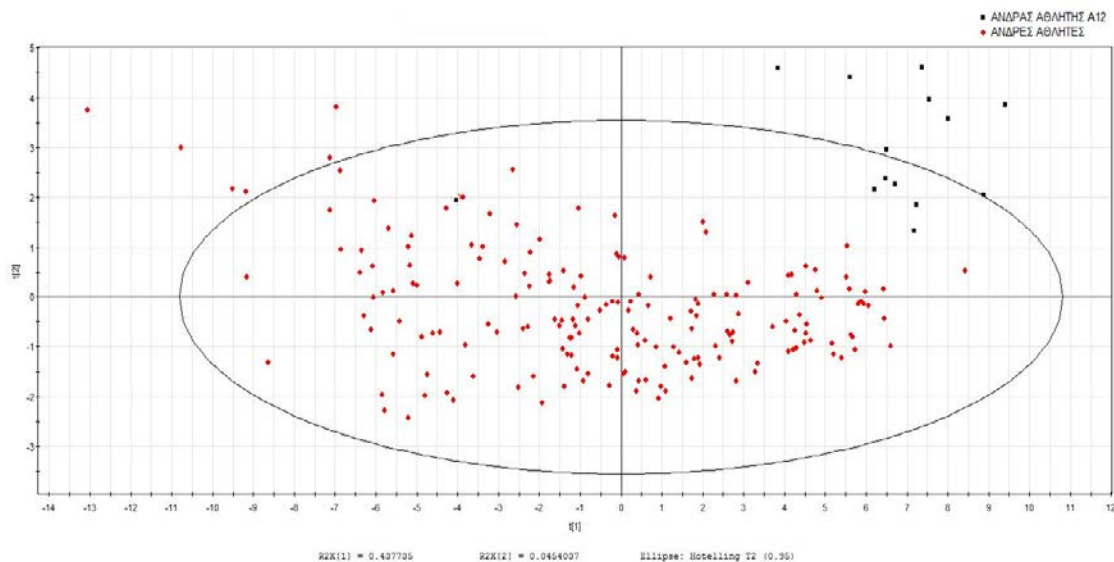
Var ID (Primary)	M130.VIP[4]
Unknown (s) 2.34	2.12659
phenylalanine	1.49017
creatine 3.93	1.38152
Interval 6.83-7.00	1.33743
trigonelline	1.32457
Interval 2.74-2.768	1.28118
isoleucine	1.27892
Unknown (m) 8.84	1.25872
Interval 2.24-2.31	1.19006
Interval 0.73-0.98	1.15342



ΕΙΚΟΝΑ 48. PLS-DA διάγραμμα τιμών (un scaling) φασμάτων ^1H -NMR δειγμάτων ούρων του αθλητή Α9 (■) και των αθλητών Α1,Α3,Α4,Α5,Α6,Α9,12 (♦)[R2Xcum(1):43,0%, Q2cum(1):16,6%, R2Xcum(2): 51,5%, Q2cum(2):35,9%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 22 Variable Importance List των 10 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 48

Var ID (Primary)	M131.VIP[4]
trigonelline	2.04719
Unknown (m) 8.84	2.03444
Interval 6.83-7.00	2.01951
3OHisovalerate	1.58948
Interval 3.17-3.22	1.271
Interval 7.00-7.304	1.2676
hippurate	1.26655
trimethylamine	1.24539
3OHisobutyrate	1.24314
valine	1.22719



ΕΙΚΟΝΑ 49. PLS-DA διάγραμμα τιμών (uv scaling) φασμάτων ^1H -NMR δειγμάτων ούρων του αθλητή A12 (■) και των αθλητών A1,A3,A4,A5,A6,A7,A9 (♦)[R2Xcum(1):43,8%, Q2cum(1):14,4%, R2Xcum(2): 48,3%, Q2cum(2):44,0%]

ΠΙΝΑΚΑΣ 23 Variable Importance List των 10 παραμέτρων που συντελούν περισσότερο στο διαχωρισμό των δύο ομάδων παρατηρήσεων που παρατηρούμε στο PLS-DA διάγραμμα τιμών της ΕΙΚΟΝΑΣ 49

Var ID (Primary)	M132.VIP[4]
Interval 2.24-2.31	2.35895
trimethylamine	1.81906
Interval 3.396-3.54	1.66477
Unknown (s) 3.23	1.53129
dimethylglycine	1.44912
Interval 2.88-2.92	1.33839
Unknown (s) 3.368	1.26575
phenylalanine	1.243
Interval 3.17-3.22	1.23012
Interval 2.94-3.03	1.21808

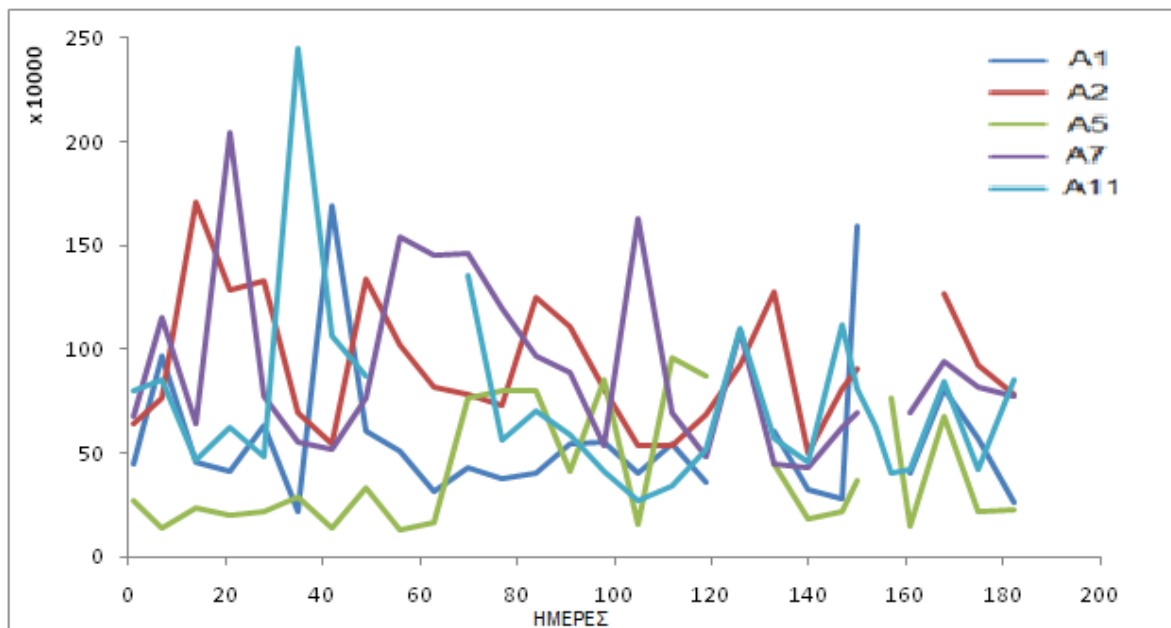
[7^{B.5}] ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ /ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΩΝ (INTERVAL) ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΘΛΗΤΕΣ/ΤΡΙΕΣ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε επίσης και η μεταβολή -των ταυτοποιημένων και μη- μεταβολιτών στην πορεία του χρόνου της δειγματοληψίας. Κάθε αθλητής/τρια έδινε σε συγκεκριμένες ημερομηνίες δείγμα ούρων με εξαίρεση ελάχιστες ημέρες όπου κάποιοι δεν έδωσαν δείγμα. Με βάση λοιπόν τα δεδομένα που προέκυψαν από την επεξεργασία των φασμάτων στο Matlab, και πιο συγκεκριμένα τις ολοκληρώσεις των κορυφών για κάθε μεταβολίτη ή για κάποιο διάστημα κορυφών, σε κάθε δείγμα κάθε αθλητή προέκυψαν τα παρακάτω διαγράμματα από το Microsoft Office Excel 2007.

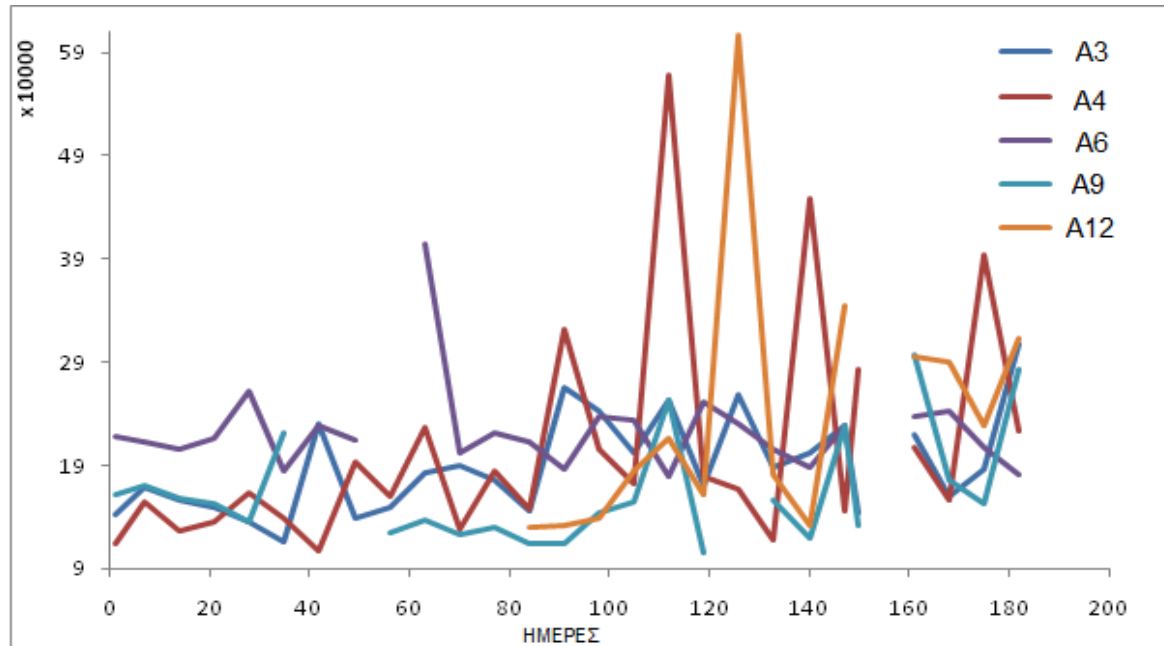
ΠΟΡΕΙΑ ΚΡΕΑΤΙΝΗΣ ΣΕ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΘΛΗΤΕΣ/ΤΡΙΕΣ

Παρατίθεται ενδεικτικά η χρονική μεταβολή της κρεατίνης για το σύνολο των αθλητών. Στον οριζόντιο άξονα δίνεται ο αύξων αριθμός των ημερών που δόθηκαν τα δείγματα και στον κάθετο άξονα δίνονται οι ολοκληρώσεις τις κορυφής του συγκεκριμένου μεταβολίτη της κρεατίνης. Οι πρώτοι 5 αθλητές απεικονίζονται στο πρώτο διάγραμμα και οι υπόλοιποι στο δεύτερο για καλύτερη και πιο διακριτή απεικόνιση, με την κάθε γραμμή να αντιπροσωπεύει και έναν αθλητή.

Είναι εμφανές ότι κάθε αθλητής έχει διαφορετική «γραμμή» από τους υπόλοιπους ενώ παρατηρούνται και διαφορετικές αυξομειώσεις (μεταβολές) του ίδιου μεταβολίτη πάνω στην ίδια γραμμή (στον ίδιο αθλητή) και οι οποίες μεταβολές αυτές επηρεάζονται από πολλούς εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες. Αυτή η μεταβολή παρατηρήθηκε και στους υπόλοιπους μεταβολίτες – διαστήματα μεταβολιτών, για τους οποίους παρατίθενται διαγράμματα στο τέλος της εργασίας.



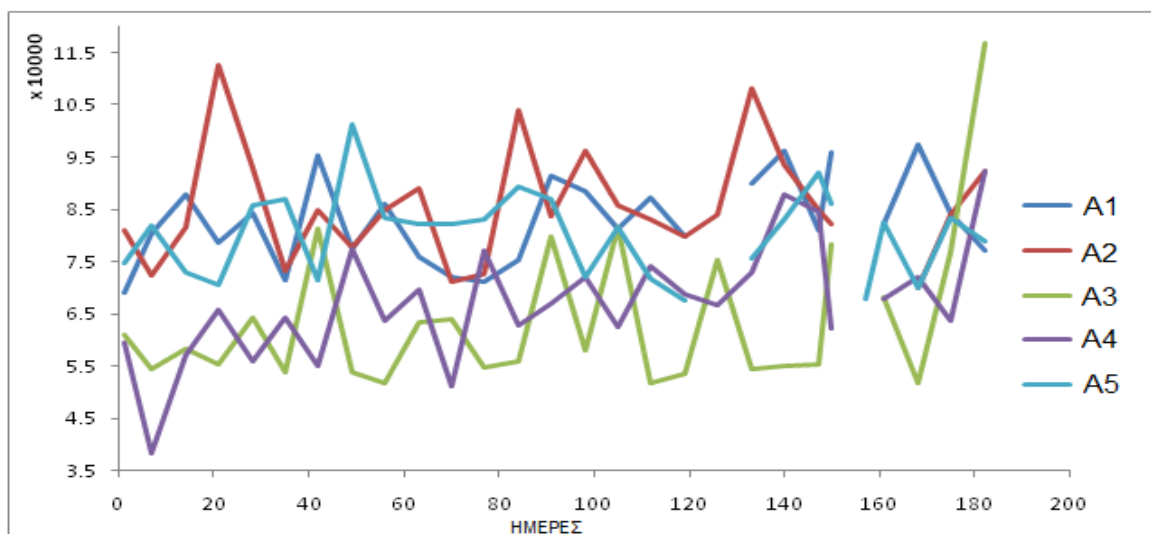
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1. Πορεία κρεατίνης στους αθλητές A1,A2,A5,A7,A11



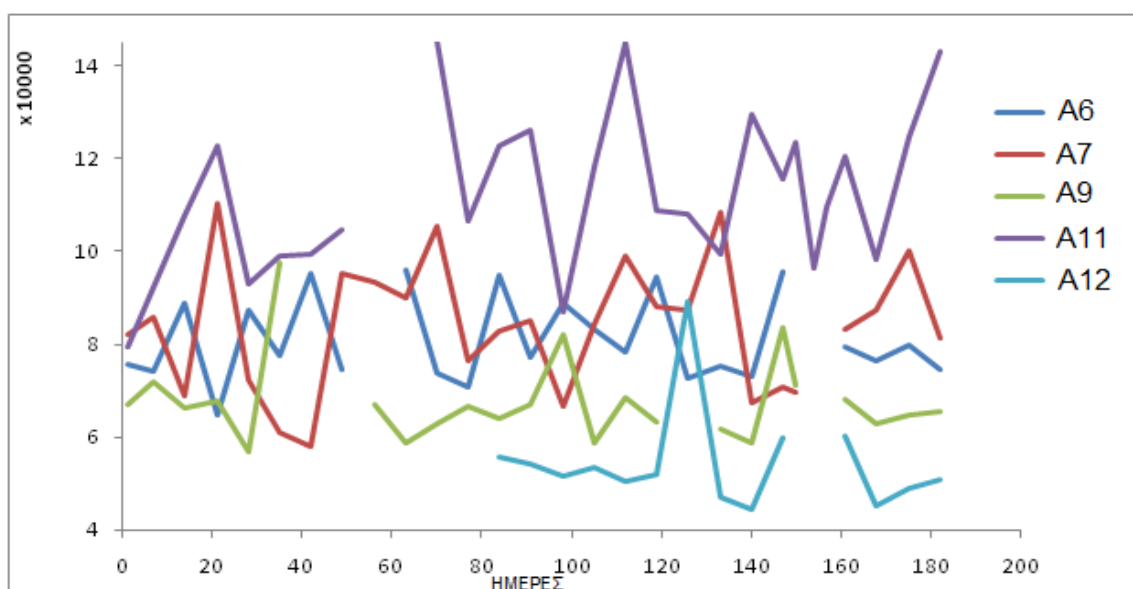
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2. Πορεία κρεατίνης στους αθλητές A3,A4,A6,A9,A12

ΠΟΡΕΙΑ ΒΑΛΙΝΗΣ ΣΕ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΘΛΗΤΕΣ/ΤΡΙΕΣ

Διακρίνεται και εδώ η χρονική πορεία της βαλίνης σε όλους τους αθλητές, με εμφανή την διαφοροποίηση των αθλητών μεταξύ τους αλλά και τις αυξομειώσεις της βαλίνης στον καθένα ξεχωριστά λόγω της επίδρασης διαφόρων παραγόντων.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3. Πορεία βαλίνης στους αθλητές A1,A2,A3,A4,A5



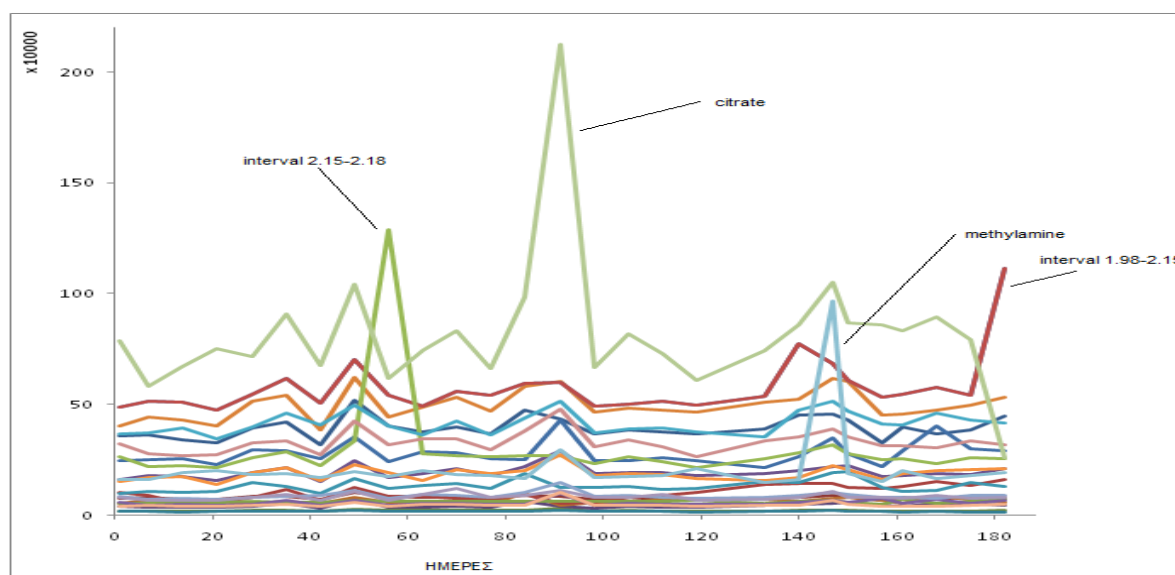
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 4. Πορεία βαλίνης στους αθλητές A6,A7,A9,A11,A12

[7^{B.6}] ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΧΡΟΝΙΚΗΣ ΠΟΡΕΙΑΣ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ/ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΩΝ (INTERVALS) ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΝΑ ΑΘΛΗΤΗ/ΤΡΙΑ

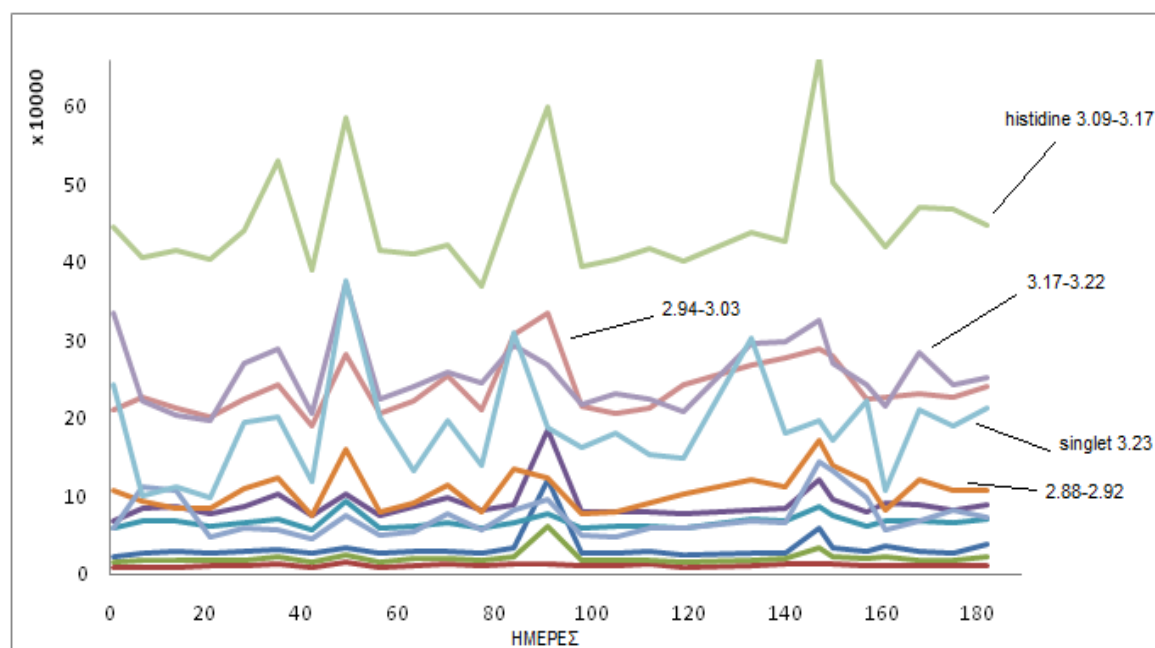
Τα παρακάτω διαγράμματα δείχνουν την πορεία όλων των μεταβολιτών/διαστημάτων μεταβολιτών σε δύο αθλητές. Σε κάθε διάγραμμα απεικονίζεται στον οριζόντιο άξονα ο αύξων αριθμός των ημερών της δειγματοληψίας και στον κάθετο οι ολοκληρώσεις των κορυφών. Κάθε γραμμή αφορά και έναν διαφορετικό μεταβολίτη/διάστημα μεταβολιτών εντός του ίδιου αθλητή, οπότε μπορεί να παρατηρηθεί το πώς μεταβλήθηκε ο κάθε μεταβολίτης του αθλητή αυτού στο χρονικό διάστημα αυτό.

Παρατίθενται τα διαγράμματα των αθλητών Α5 και Α1 χωρισμένα σε φασματικές υποπεριοχές για λόγους καλύτερης ευκρίνειας. Είναι εμφανές από την μορφή της κάθε καμπύλης ότι πολλοί από τους μεταβολίτες αυτούς ακολουθούν ένα παρόμοιο «πρότυπο», δηλαδή μεταβάλλονται κατά τον ίδιο τρόπο εντός του ίδιου αθλητή. Πολλοί και διαφορετικοί είναι εκείνοι οι παράγοντες που επιδρούν στο μεταβολισμό κάθε ατόμου και κατά συνέπεια οι επιδράσεις αυτές αντικατοπτρίζονται στους μεταβολίτες. Παρόμοιες γραφικές απεικονίσεις έχουν γίνει και για τους υπόλοιπους αθλητές, τα γραφήματα των οποίων παρατίθενται στο τέλος της εργασίας.

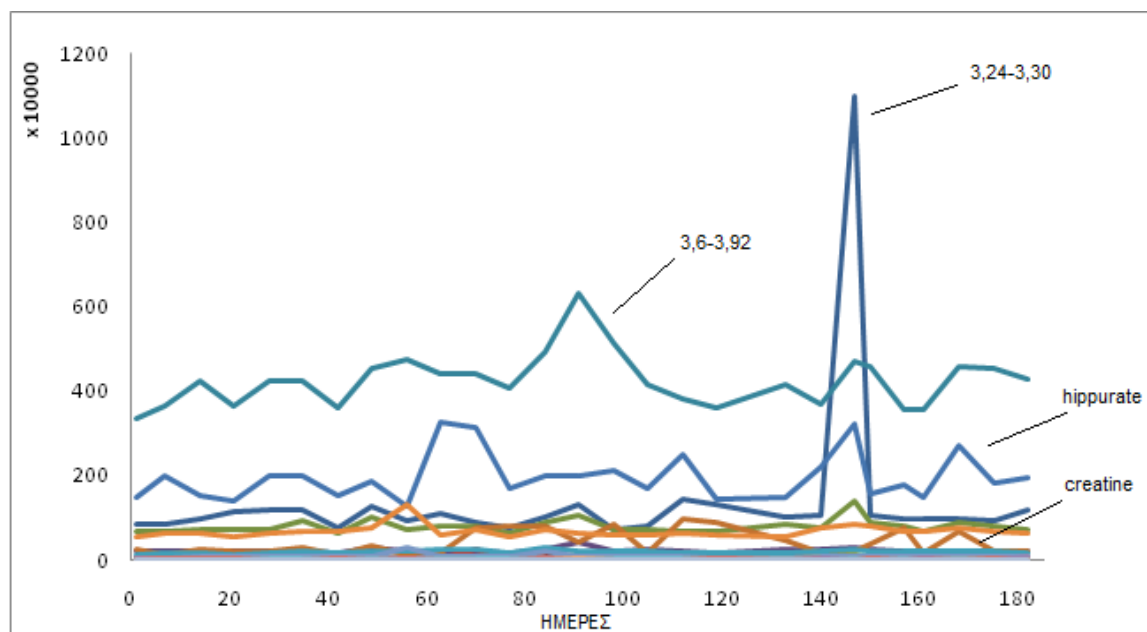
ΑΘΛΗΤΗΣ Α5



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 5. Πορεία μεταβολιτών/διαστημάτων κορυφών της φασματικής περιοχής 0,73-2,77 ppm του αθλητή Α5. Στο φασματικό διάστημα αυτό περιέχονται 24 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών οπότε κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα αντίστοιχα. Στο διάγραμμα σημειώνονται εκείνοι οι μεταβολίτες που μπορούν να διακριθούν καθαρά.

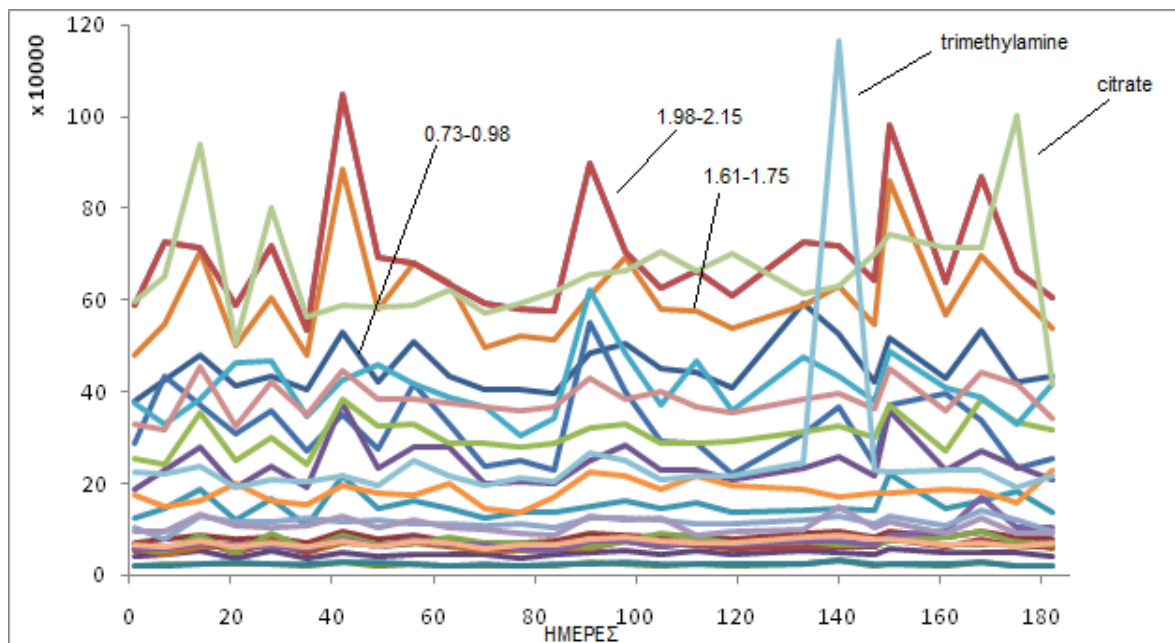


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 6 (επάνω) Πορεία μεταβολιτών/διαστημάτων κορυφών της φασματικής περιοχής 2,78-3,23 ppm του αθλητή Α5. Στο φασματικό διάστημα αυτό περιέχονται 11 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών οπότε κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα αντίστοιχα. Στο διάγραμμα σημειώνονται εκείνοι οι μεταβολίτες που μπορούν να διακριθούν καθαρά

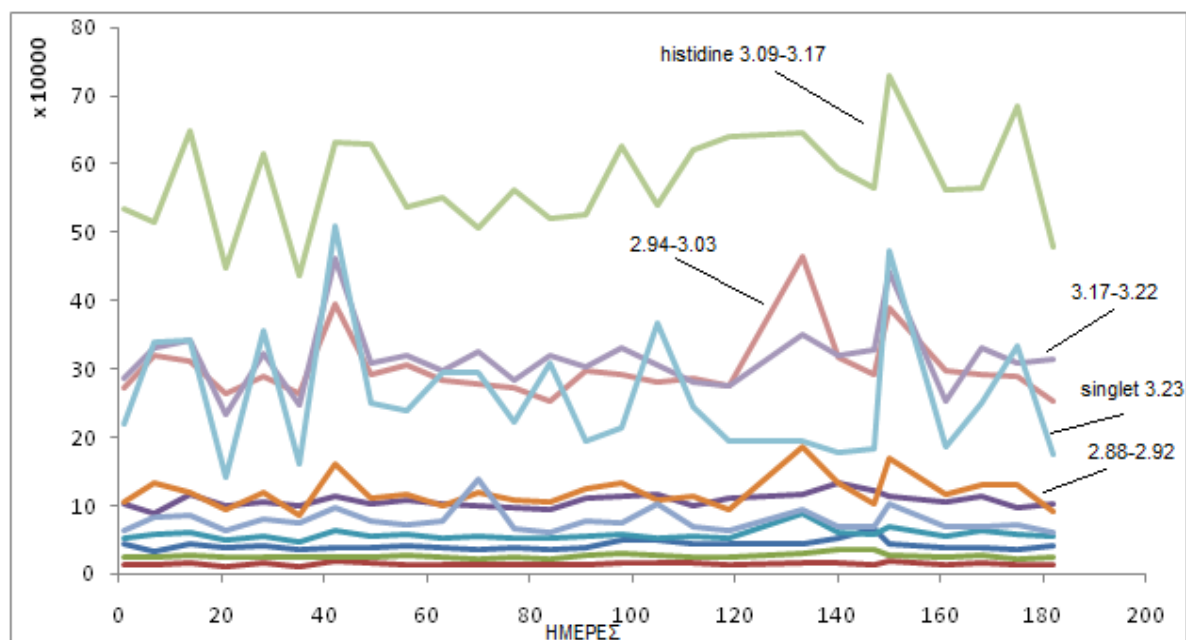


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 7. Πορεία μεταβολιτών/διαστημάτων κορυφών της φασματικής περιοχής 3,24-9,3 ppm του αθλητή Α5. Στο φασματικό διάστημα αυτό περιέχονται 19 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών οπότε κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα αντίστοιχα. Στο διάγραμμα σημειώνονται εκείνοι οι μεταβολίτες που μπορούν να διακριθούν καθαρά

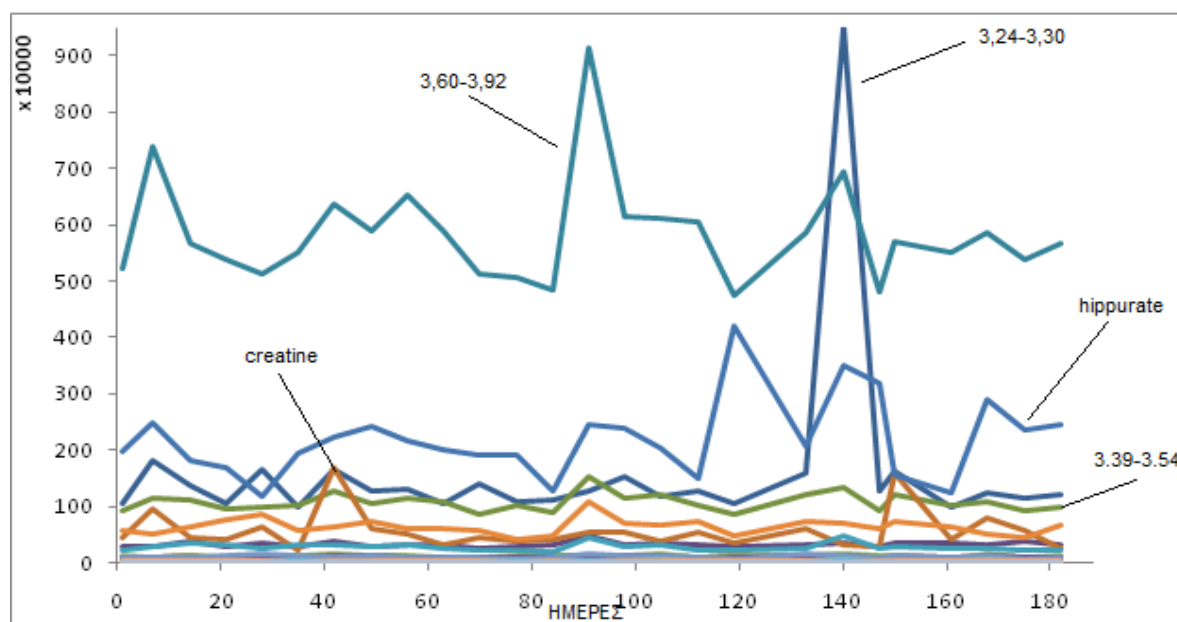
ΑΘΛΗΤΗΣ Α1



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 8. Πορεία μεταβολιτών/διαστημάτων κορυφών της φασματικής περιοχής 0,73-2,77 ppm του αθλητή Α1. Στο φασματικό διάστημα αυτό περιέχονται 24 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών οπότε κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα αντίστοιχα. Στο διάγραμμα σημειώνονται εκείνοι οι μεταβολίτες που μπορούν να διακριθούν καθαρά.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 9 (επάνω) Πορεία μεταβολιτών/διαστημάτων κορυφών της φασματικής περιοχής 2,78-3,23 ppm του αθλητή 1. Στο φασματικό διάστημα αυτό περιέχονται 11 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών οπότε κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα αντίστοιχα. Στο διάγραμμα σημειώνονται εκείνοι οι μεταβολίτες που μπορούν να διακριθούν καθαρά



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 10. Πορεία μεταβολιτών/διαστημάτων κορυφών της φασματικής περιοχής 3,24-9,3 ppm του αθλητή Α1. Στο φασματικό διάστημα αυτό περιέχονται 19 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών οπότε κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα αντίστοιχα. Στο διάγραμμα σημειώνονται εκείνοι οι μεταβολίτες που μπορούν να διακριθούν καθαρά

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συγκεκριμένη εργασία έχει ως αντικείμενο μελέτης την εφαρμογή της NMR μεταβολομικής προσέγγισης σε ένα σύνολο αθλητών άρσης βαρών με αναπηρία με στόχο την δημιουργία των μεταβολικών τους προφίλ, την σύγκριση αυτών των προφίλ μεταξύ τους και τέλος την διεξαγωγή βιοχημικών συμπερασμάτων βασισμένα στα προφίλ αυτά.

Ως βιολογικά δείγματα προς ανάλυση επιλέχθηκαν τα ούρα γιατί έχουν τεράστια διαγνωστική αξία επειδή μπορούν να δώσουν μια διαρκώς μεταβαλλόμενη «εικόνα» ενός μεγάλου αριθμού βιοχημικών διαδικασιών που συμβαίνουν σε ολόκληρο των οργανισμό και όχι μόνο στα νεφρά. Επιπλέον, η ευκολία της συλλογής τους, η «πλούσια» σε μεταβολίτες σύσταση τους και ο μη επεμβατικός χαρακτήρας των ούρων τα καθιστούν κατάλληλα για την μελέτη αυτή.[17,53]

Το NMR αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη, μη επεμβατική τεχνική για τις μεταβολομικές μελέτες λόγω της ταυτόχρονης ανίχνευσης μεγάλου αριθμού ενώσεων με γρήγορο και υψηλής αποτελεσματικότητας τρόπο που απαιτεί ελάχιστο χειρισμό του δείγματος. Ακόμα επιτρέπει στα δείγματα αυτά να αναλυθούν, να αποθηκευθούν και να επαναχρησιμοποιηθούν μελλοντικά. [53]

Τα φασματικά δεδομένα τα οποία συλλέχθηκαν επεξεργάστηκαν στατιστικά αρχικά με την Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (PCA). Η PCA είναι μια μη επιβλεπόμενη μέθοδος που μπορεί να αποκαλύψει τυχόν ομαδοποιήσεις που πιθανόν να υπάρχουν στο σύνολο των δεδομένων ενώ γενικότερα μπορεί να δώσει μια ολική εικόνα της βιοχημικής συμπεριφοράς των δεδομένων.

Στο στατιστικό μέρος της μελέτης αυτής, διερευνήθηκε αρχικά το σύνολο όλων των δειγμάτων των αθλητών ως προς το φύλο και στη συνέχεια μελετήθηκαν ξεχωριστά οι γυναίκες από τους άνδρες. Οι άνδρες αθλητές μελετήθηκαν πιο διεξοδικά ως προς την λήψη συμπληρωμάτων/φαρμάκων, καπνίσματος και προπονητικής ηλικίας ενώ στις γυναίκες αθλήτριες δεν ήταν δυνατή τέτοια μελέτη λόγω του μικρού πλήθους δειγμάτων.

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε ότι υπάρχει μεγάλο πλήθος δειγμάτων τα οποία είναι εκτός της έλλειψης Hotteling. Αυτά τα δείγματα (παρατηρήσεις) σε πολλές μεταβιομικές μελέτες θα χαρακτηρίζονταν ως έκτροπες τιμές. Ο χαρακτηρισμός τους όμως ως έκτροπες τιμές στην εργασία αυτή θα ήταν λανθασμένος γιατί τα δείγματα αυτά, είτε προέρχονται από τον ίδιο αθλητή είτε από διαφορετικούς αθλητές, διαφοροποιούνται μεταξύ τους από πολλούς παράγοντες που τα απομακρύνουν από την ομάδα στην οποία ανήκουν. Οπότε κάθε παρατήρηση εκτός έλλειψης θα πρέπει να διερευνάται ξεχωριστά πριν αποκλειστεί από το στατιστικό μοντέλο.

Ακόμα ένα αποτέλεσμα της επίδρασης των διαφορετικών παραγόντων που χαρακτηρίζει κάθε δείγμα είναι η μεγάλη διασπορά που παρατηρείται σχεδόν στα περισσότερα στατιστικά μοντέλα της παρούσας εργασίας. Τέτοιοι παράγοντες μπορεί να είναι οι διαφορετικές διατροφικές συνήθειες των αθλητών (για τις οποίες υπάρχει έλλειψη πληροφοριών), ο χειρισμός των δειγμάτων ούρων (π.χ. ορισμένα δείγματα δεν ήταν παγωμένα, έγινε μεταφορά δείγματος σε άλλο ουροσυλλέκτη λόγω σπασίματος του πρώτου, κάποιοι αθλητές έδωσαν «δεύτερα» ή και «τρίτα» ούρα μετά το δωδεκάωρο νηστείας), η ακανόνιστη λήψη συμπληρωμάτων/φαρμάκων, η διαφορετική αναπηρία κάθε αθλητή και το πρόγραμμα προπόνησης του καθενός καθώς κάποιοι αθλητές εκτός από άρση βαρών έκαναν και άλλα αθλήματα ενώ κάποιοι δεν ακολουθούσαν κανονικά το πρόγραμμά τους. Αντιθέτως, δείγματα (παρατηρήσεις) τα οποία εμφανίζονται κοντά μεταξύ τους στο επίπεδο που ορίζουν οι επιλεγμένες κύριες συνιστώσες επηρεάζονται από κοινούς παράγοντες.

Από τα στατιστικά μοντέλα που συμπεριλαμβάνουν όλους τους αθλητές (άνδρες-γυναίκες) φάνηκε ότι κάθε αθλητής ανήκε σε μια ξεχωριστή ομάδα και καταλάμβανε το δικό του μεταβολικό χώρο. Στα επόμενα μοντέλα φάνηκε να υπάρχει διάκριση μεταξύ γυναικών-ανδρών η οποία φαίνεται να οφείλεται σύμφωνα με την Variable Importance List στους μεταβολίτες της τριμεθυλαμίνης, τριγονελλίνης, ιππουρικού οξέος και κρεατίνης οι οποίοι παρουσίασαν αύξηση στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες.

(βλ.ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ) Η τριμεθυλαμίνη μπορεί να προέρχεται από την εντερική βακτηριακή αποσύνθεση των συστατικών των τροφών όπως η χολίνη ή μπορεί να είναι το προϊόν καταβολισμού τροφίμων πλούσιων σε μεθυλαμίνη όπως τα ψάρια. Η τριμεθυλαμίνη οξειδώνεται από την δραστηριότητα ενός συστήματος μονοξυγενάσης προς το άοσμο οξείδιο της τριμεθυλαμίνης [trimethylamine-N-oxide (TMAO)] το οποίο εκκρίνεται στα ούρα. Η έλλειψη του ενζύμου αυτού έχει ως συνέπεια το αντίστοιχο μεταβολικό νόσημα (σύνδρομο οσμής ψαριού) και την αύξηση των επιπέδων της τριμεθυλαμίνης στα ούρα. Επίσης η έκκριση της τριμεθυλαμίνης και του TMAO στα ούρα έχει άμεση σχέση με τις διατροφικές συνήθειες των ατόμων (κυρίως ύστερα από κατανάλωση ψαριών) ενώ σε μεγαλύτερες ηλικίες είναι ένδειξη μικρής δυσλειτουργίας του ωσμωτικού τους ρόλου στους νεφρικούς περινευρικούς ιστούς (renal medullary tissues). Προς το παρόν, δεν έχει αποδοθεί κλινική σημαντικότητα σε αυξημένα επίπεδα TMAO σε ούρα, αν και υψηλά επίπεδα έχουν αναφερθεί κατά την παρακολούθηση καταστάσεων νεφρικών μεταμοσχεύσεων. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αναλογία TMAO/τριμεθυλαμίνης σε ούρα γυναικών μπορεί να μεταβληθεί λόγω της εμμηνόρροιας ενώ η τριμεθυλαμίνη στις γυναίκες έχει συσχετισθεί και με κολπικές βακτηριακές λοιμώξεις. [48,51,53,54]

Το ιππουρικό οξύ βρίσκεται φυσιολογικά στα ανθρώπινα ούρα ως αποτέλεσμα νεφρικής και ηπατικής σύνθεσης από γλυκίνη και βενζοϊκό οξύ. Είναι επίσης το προϊόν της αποσύνθεσης του κινικού οξέος (quinic acid) από τους εντερικούς μικροοργανισμούς, επομένως η συγκέντρωση του σχετίζεται με τη μικροβιακή δραστηριότητα και τη σύσταση της μικροχλωρίδας του εντέρου. Μπορεί επίσης να σχετίζεται και με διατροφική πρόσληψη βενζοϊκού οξέος το οποίο υπάρχει ως συντηρητικό σε διάφορα τρόφιμα. Έρευνες έχουν δείξει ότι η σύσταση του ιππουρικού μεταβάλλεται ύστερα από πρόσληψη αφεψημάτων χαμομηλιού και τσαγιού.[53]

Η κρεατίνη εντός των μυικών ιστών μετατρέπεται σταθερά σε κρεατινίνη και για το λόγο αυτό ανιχνεύεται σε μικρές ποσότητες στα φυσιολογικά ούρα,αν και διατροφές πλούσιες

σε κρέας ή η λήψη συμπληρωμάτων μπορούν να την επηρεάσουν. Οι μεταβολές της κρεατίνης στις γυναίκες μπορεί να δηλώνει διαφορετικές διατροφικές συνήθειες ενώ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από την ηλικία και όχι τόσο από το φύλο.[29,53]

Από την εξέταση των στατιστικών μοντέλων που αφορούν τις γυναίκες αθλήτριες διαπιστώθηκε ότι διαχωρίζονται ξεκάθαρα τα μεταβολικά τους προφίλ και μάλιστα κυρίως λόγω των μεταβολιτών του μυρμηκικού οξέος (φορμικού), της γλυκίνης και του κιτρικού οξέος. Σε έρευνες έχει αναφερθεί ότι το κιτρικό οξύ έχει μεγάλες διακυμάνσεις στα ανθρώπινα ούρα λόγω ατομικών μεταβολικών διαδικασιών και όχι τόσο από διατροφικές επιδράσεις, με τις γυναίκες να έχουν αυξημένη έκκριση. Έχει επίσης βρεθεί ότι η αντικατάσταση των οιστρογόνων στις μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες μπορεί να αυξήσει το βαθμό έκκρισης του κιτρικού αλλά δεν έχει αποδειχθεί πλήρως η σύνδεση αυτή μεταξύ κιτρικού οξέος και οιστρογόνων.[53,54] Σε κάποιες ερευνητικές διατροφικές μελέτες οι οποίες συνέκριναν χορτοφάγους και παμφάγους η γλυκίνη αναγνωρίστηκε ως ένας από τους υπεύθυνους μεταβολίτες για την διάκριση αυτή, ενώ αναφέρθηκε ότι οι χορτοφάγοι είχαν υψηλότερα ποσοστά έκκρισης σε γλυκίνη.[38]

Ένας από τους παράγοντες που πιθανόν μπορεί να συμβάλλει στο διαχωρισμό μεταξύ των δύο γυναικών είναι και η λήψη συμπληρωμάτων. Μία από τις δύο αθλήτριες είναι γνωστό ότι λαμβάνει ως συμπληρώματα σπιρουλίνα και βιταμίνη C ενώ η άλλη αθλήτρια δεν λαμβάνει τίποτα. Η σπιρουλίνα θεωρείται ως ένα πολλά υποσχόμενος μικροοργανισμός (θαλάσσιο φύκι) λόγω του υψηλού ποσοστού σε πρωτεΐνη (65-70% του ξηρού του βάρους) και της αφθονίας του σε βιταμίνες και μεταλλικά στοιχεία. Η φυσική άσκηση θεωρείται ως μια κατάσταση κατά την οποία παρατηρούνται γενικές μεταβολικές αλλαγές, όπως η κινητοποίηση των ενεργειακών αποθεμάτων και αλλαγές στις ορμονικές εκκρίσεις. Οι έρευνες σχετικά με τις επιδράσεις της χρήσης σπιρουλίνας ως πηγής πρωτεϊνών στην φυσική άσκηση είναι ελάχιστες. Η μελέτη των G.P.Rogatto et al [56] σε ποντίκια έδειξε ότι τα αποθέματα μυϊκού και ηπατικού γλυκογόνου ήταν σημαντικά αυξημένα σε εκείνα που κατανάλωσαν σπιρουλίνα κατά την διάρκεια

ξεκούρασης σε σχέση με τα υπόλοιπα και ότι πιθανόν να συμβάλλει στην διατήρηση της ομοιόστασης κατά την διάρκεια της άσκησης. Επίσης παρατήρησαν ότι η σπιρουλίνα δεν προκάλεσε προβλήματα στην ανάπτυξη των ποντικών αλλά και σε βιοχημικές παραμέτρους ενώ όσον αφορά την φυσική άσκηση δεν παρατηρήθηκε κάτι ασυνήθιστο. [56]

Η βιταμίνη C χρησιμοποιείται στον αθλητισμό ως εργογόνο διατροφικό συμπλήρωμα και μπορεί να επηρεάσει τον ενεργειακό μεταβολισμό.[57] Η έλλειψη της μπορεί να προκαλέσει κόπωση, μυική αδυναμία και αναιμία καθώς και μείωση της αθλητικής απόδοσης λόγω τραυματισμών σε συνδετικούς ιστούς και μείωση της αθλητικής αντοχής λόγω της αναιμίας. Μελέτες έχουν δείξει την θετική επίδραση της βιταμίνης C στην βελτίωση των φυσιολογικών λειτουργιών σε αθλητές αλλά και στο ανοσοποιητικό σύστημα.[58,59]

Περαιτέρω διερεύνηση έγινε στα στατιστικά μοντέλα των ανδρών, με σύγκριση των μεταβολικών τους προφίλ κατά ομάδες ως προς την παράμετρο λήψης συμπληρωμάτων/φαρμάκων, καπνίσματος, προπονητικής ηλικίας, συμμετοχής σε Αγώνες και πρόσληψης τσαγιού ενώ στην συνέχεια μελετήθηκε το προφίλ κάθε αθλητή ξεχωριστά ως προς το σύνολο των αθλητών. Από τα μοντέλα αυτά παρατηρήθηκαν τάσεις διαχωρισμού μεταξύ των ομάδων αθλητών που λάμβαναν κάποιο συμπλήρωμα σε σχέση με εκείνους που δεν έπαιρναν κάτι. Ικανοποιητικός διαχωρισμός επίσης υπήρξε και μεταξύ των αθλητών εκείνων που λάμβαναν διαφορετικά συμπληρώματα ή φάρμακα. Από τις αντίστοιχες λίστες Variable Importance φαίνεται ποιοι είναι οι μεταβολίτες εκείνοι που προκάλεσαν το διαχωρισμό κάθε φορά. Σε πολλούς από αυτούς δεν έχει επιτευχθεί η ταυτοποίηση τους ενώ οι υπόλοιποι ταυτοποιημένοι δεν έχουν συσχετισθεί άμεσα με την λήψη αυτών των συμπληρωμάτων, οπότε η διάκριση αυτή είναι πιθανόν να οφείλεται σε ένα συνολικό αποτέλεσμα της επίδρασης διαφόρων παραγόντων.

Διάκριση φάνηκε να υπάρχει και στα μοντέλα τα οποία αφορούν το κάπνισμα. Κάποιοι από τους μεταβολίτες που φαίνεται ότι εξηγούν το διαχωρισμό είναι η τριγονελλίνη, το

ιππουρικό οξύ και το N-μεθυλνικοτιναμίδιο, με την τριγονελλίνη και το ιππουρικό οξύ να παρουσιάζουν αύξηση στους καπνιστές και το N-μεθυλνικοτιναμίδιο να αυξάνεται στους μη καπνιστές. Η τριγονελλίνη είναι προϊόν του μεταβολισμού της νιασίνης και εκκρίνεται στα ανθρώπινα ούρα. Μελέτες έχουν συσχετίσει την παρουσία τριγονελλίνης στα ούρα με την κατανάλωση καφέ ενώ βρίσκεται και σε πολλά λαχανικά και τρόφιμα.[48,61] Άλλη έρευνα η οποία πραγματοποιήθηκε μεταξύ ομάδων ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και υγείων ανθρώπων έδειξε ότι η τριγονελλίνη και το ιππουρικό ήταν από τους μεταβολίτες που συνέβαλαν στο διαχωρισμό μεταξύ των δύο ομάδων και μάλιστα οι μεταβολίτες αυτοί ήταν ελαττωμένοι στους ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς. Ελαττωμένα επίπεδα τριγονελλίνης έχουν επίσης βρεθεί και σε ασθενείς με καρκίνο του ήπατος, σε ασθενείς με κακή πνευμονική λειτουργία και σε άλλους με πνευμονία.[60] Το N-μεθυλνικοτιναμίδιο είναι μεταβολίτης της νιασίνης και βρίσκεται φυσιολογικά στα ανθρώπινα ούρα. Σε παλαιότερες μελέτες έχει αναφερθεί ότι το N-μεθυλνικοτιναμίδιο ήταν ανάμεσα στους μεταβολίτες που συσχετίζαν το κάπνισμα με τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης. Γενικότερα δεν έχει επιβεβαιωθεί αν η παρουσία του μεταβολίτη αυτού στα ούρα σχετίζεται απλά με τη διατροφή, το κάπνισμα ή και άλλους παράγοντες.[48,62,63]

Εμφανής ήταν και ο διαχωρισμός ανάμεσα στις ομάδες ανδρών αθλητών ανάλογα με τα έτη προπόνησης τους όπου οι πιο έμπειροι σχετικά αθλητές ξεχώρισαν από τους νεότερους στο άθλημα αυτό. Και σε αυτό το μοντέλο εμφανίζονται ως υπεύθυνοι για το διαχωρισμό μεταβολίτες όπως το N-μεθυλνικοτιναμίδιο, το κιτρικό οξύ, η τριμεθυλαμίνη, η τριγονελλίνη, η κρεατίνη, οι οποίοι υπάρχουν φυσιολογικά στα ούρα ενώ όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω έχουν συσχετιστεί και σε προηγούμενα μοντέλα περισσότερο με διατροφικές συνήθειες, οπότε κι εδώ είναι πολυπαραγοντική η συνεισφορά της επίδρασης τους στο μοντέλο. Επιπλέον οι μεταβολίτες της τριμεθυλαμίνης και του κιτρικού οξέος παρουσίασαν αύξηση ενώ το N-μεθυλνικοτιναμίδιο μειώθηκε στους προπονητικά νεότερους αθλητές σε σχέση με την άλλη ομάδα αθλητών.

Διερευνήθηκε επίσης και η επίδραση της άσκησης στο μεταβολικό προφίλ των ανδρών αθλητών πριν και μετά την συμμετοχή τους στους Παραολυμπιακούς Αγώνες. Οι αθλητές αυτοί ακολούθησαν διαφορετικό τρόπο προπόνησης πολύ πριν τους αγώνες σε σχέση με την προπόνηση τους στο διάστημα των αγώνων οπότε θα ήταν αναμενόμενη η διαφοροποίηση των μεταβολικών τους προφίλ στα διαστήματα αυτά. Τα στατιστικά μοντέλα όμως δεν παρουσίασαν κάποια έντονη διάκριση μεταξύ των προπονήσεων σε αυτές τις περιόδους με εξαίρεση το μοντέλο OPLS-DA. Η OPLS-DA εμφάνισε κάποιο διαχωρισμό ο οποίος οφείλεται κυρίως στους άγνωστους μεταβολίτες που υπάρχουν στο φασματικό διάστημα 3.60-3.92 ppm, το ιππουρικό οξύ (το οποίο παρουσίασε μείωση στα δείγματα πριν τους αγώνες) και στους άγνωστους επίσης μεταβολίτες στα διαστήματα 3.39-3.54 ppm, 3.24-3.30 ppm. Όπως έχει αναφερθεί και στο εισαγωγικό μέρος της εργασίας αυτής, η έντονη φυσική άσκηση προκαλεί αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ των ούρων σε ανθρώπους ενώ έχουν αναγνωριστεί πολλοί μεταβολίτες που μεταβάλλονται στα ούρα όπως η κρεατινίνη, το γαλακτικό οξύ, το πυρουβικό, η υποξανθίνη, ενώσεις του κύκλου του Krebs, αμινοξέα, προϊόντα του καταβολισμού των BCAA (Branched Chain Amino Acids), το 2-υδροξυβουτυρικό και το ιππουρικό. [30,26] Το γαλακτικό οξύ είναι ένας χαρακτηριστικός μεταβολίτης που εμφανίζεται και στα ούρα ύστερα από άσκηση αλλά στην περίπτωση των αθλητών αυτών δεν υπάρχει διότι η δειγματοληψία έγινε ύστερα από ξεκούραση. Γενικότερα, δεν θα ήταν «ασφαλές» να πούμε ότι η διάκριση αυτή οφείλεται μόνο στην επίδραση της άσκησης γιατί υπάρχουν πολλοί παράγοντες που συμβάλλουν στο αποτέλεσμα αυτό. Κάποιοι από τους παράγοντες που πιθανόν να επιδρούν στην διάκριση αυτή είναι η λήψη συμπληρωμάτων από κάποιους αθλητές πριν τους Αγώνες, οι διατροφικές τους παρεμβάσεις για τις οποίες δεν διατίθενται στοιχεία και η τυχόν λήψη φαρμάκων λόγω ατυχημάτων/ασθενειών.

Μελετήθηκε επίσης και η επίδραση της κατανάλωσης αφεψήματος πράσινου τσαγιού στα μεταβολικά προφίλ των ανδρών αθλητών. Έρευνες έχουν δείξει ότι το πράσινο τσάι έχει ευεργετικές δράσεις ενάντια σε πολλές ασθένειες όπως ο καρκίνος, οι μεταλλαξιγεννέσεις ενώ βελτιώνει και την εντερική μικροχλωρίδα. Η πρόσληψη

πράσινου τσαγιού αυξάνει την καθημερινή ενεργειακή κατανάλωση και προωθεί την οξείδωση των λιπών. Επίσης, έχει παρατηρηθεί μεταβολή των επιπέδων των μεταβολιτών που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των υδατανθράκων όπως η γλυκόζη, το γαλακτικό οξύ και το πυροσταφυλικό οξύ. Αλλαγές στα επίπεδα του κιτρικού οξέος, του ηλεκτρικού οξέος (succinate) και του φουμαρικού οξέος(fumarate) υποδηλώνουν μια διαφορετική ρύθμιση του κύκλου του κιτρικού οξέος ύστερα από κατανάλωση τσαγιού. Διακυμάνσεις στα επίπεδα των αμινοξέων όπως της φαινυλαλανίνης, της L-προλίνης και της αλανίνης φανερώνουν μεταβολές στον μεταβολισμό των αμινοξέων που σχετίζεται άμεσα με το τσάι. Το ιππουρικό οξύ είναι προϊόν του μεταβολισμού των χημικών συστατικών, όπως των φλαβονολών, του τσαγιού από τα βακτήρια του εντέρου. Έχει προταθεί ότι η πλειονότητα των διαιτητικών φλαβονοειδών του πράσινου τσαγιού δεν απορροφώνται στο λεπτό έντερο αλλά μεταβολίζονται από την εντερική μικροχλωρίδα. Αυτά τα μικροβιακά φλαβονοειδή απορροφώνται στο κόλον και αποβάλλονται στα ούρα σε υψηλότερα επίπεδα ύστερα από κατανάλωση τσαγιού.[68]

Από τα στατιστικά μοντέλα φάνηκε ένας μικρός διαχωρισμός μόνο με την OPLS-DA στην περίπτωση της ομάδας με τα δείγματα στην αρχή της δειγματοληψίας και της ομάδας κατά την περίοδο κατανάλωσης τσαγιού, με τον μεταβολίτη που πιθανόν να είναι της μεθυλγουανιδίνης και κάποιων άγνωστων απλών κορυφών στα 2,78 και 2,83 ppm και μιας άγνωστης διπλής κορυφής στα 1,09 ppm να προκαλούν αυτή τη διάκριση. Ομαδοποίηση επίσης παρατηρήθηκε και στο OPLS-DA μοντέλο που περιλαμβάνει τις 4 ομάδες στην αρχή της δειγματοληψίας, πριν το τσάι, στην περίοδο του τσαγιού και μετά το τσάι φανερώνοντας μια «υποψία» ομαδοποίησης με τις 2 ομάδες δειγμάτων όπου δεν έχει ληφθεί το συγκεκριμένο αφέψημα να συγκεντρώνονται κοντά μεταξύ τους και τις άλλες 2 ομάδες όπου έχει ληφθεί το τσάι να δημιουργούν μια άλλη ομάδα μεταξύ τους.

Ο μεταβολίτης που υποθέτουμε ότι είναι της μεθυλγουανιδίνης παρουσίασε μείωση στα δείγματα πριν τη λήψη του αφεψήματος σε σχέση με εκείνα κατά τη λήψη. Γενικότερα προέρχεται από τον πρωτεϊνικό καταβολισμό και θεωρείται ως μια δραστική ουραιμική

τοξίνη ενώ η έκκριση της αυξάνεται σημαντικά με την εξέλιξη της νεφρικής ανεπάρκειας. Από τη στιγμή που τα επίπεδα της μεθυλγουανιδίνης αυξάνονται τόσο στο αίμα όσο και στα ούρα, εικάζεται ότι η αύξηση της στα ούρα μπορεί να αποδόσει την γενικότερη εικόνα της στο σώμα. Για το λόγο αυτό θεωρείται ως ένας δείκτης για την ανάλυση μεταβολικών δυσλειτουργιών και παθολογικών καταστάσεων της ουραιμίας. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια έδειξαν ότι η πρόσληψη ταννινών πράσινου τσαγιού αλλά και του κυρίαρχου συστατικού του τσαγιού (-)- epigallocatechin 3-O-gallate μείωσαν την έκκριση της μεθυλγουανιδίνης στα ούρα. Προτάθηκε λοιπόν ότι τα συστατικά που περιέχουν ταννίνες όπως το τσάι μπορούν να προκαλέσουν ανάρρωση από οξειδωτικό στρες και καθιστώντας το τσάι ως ένα νέο υλικό για φυσιολογικά λειτουργικά τρόφιμα.[69]

Από τα μοντέλα στα οποία συγκρίθηκε κάθε αθλητής ως προς τους υπόλοιπους διαπιστώθηκε ότι κάθε ένας διαχωριζόταν ικανοποιητικά από το σύνολο. Τα δείγματα γενικά της κάθε ομάδας παρουσίασαν μεγάλη διασπορά μεταξύ τους η οποία μπορεί να οφείλεται σε έλλειψη κοινών χαρακτηριστικών μεταξύ των δειγμάτων από επίδραση διαφορετικών παραγόντων σε κάθε δείγμα ξεχωριστά. Κι εδώ όπως και στα προηγούμενα μοντέλα εμφανίζονται συγκεκριμένοι μεταβολίτες που προκαλούν τους διαχωρισμούς αλλά δεν μπορεί να αποδοθεί επακριβώς ο παράγοντας στον οποίο οφείλονται οι διακρίσεις αυτές διότι όπως έχει ειπωθεί και παραπάνω υπάρχει επίδραση πολλών παραγόντων. Πρόκειται λοιπόν για ένα ανομοιογενές σύνολο δειγμάτων (π.χ. διαφορετικές ηλικίες αθλητών, διαφορετική αναπηρία) στο οποίο δεν έχει γίνει σταθεροποίηση κάποιων παραγόντων όπως π.χ συγκεκριμένη διατροφή, καθορισμός της συχνότητας λήψης συμπληρωμάτων, ώστε να μπορέσουν να εξαχθούν ασφαλή στατιστικά και βιοχημικά συμπεράσματα.

Επίσης εξετάστηκε και η πορεία των μεταβολιτών / διαστημάτων μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο συλλογής των δειγμάτων εντός του κάθε αθλητή αλλά και η πορεία του κάθε μεταβολίτη στο σύνολο των αθλητών. Από τα διαγράμματα παρατηρήθηκε ότι εντός του

ίδιου αθλητή πολλοί από τους μεταβολίτες αυτούς μεταβάλλονται κατά τον ίδιο τρόπο ενώ σε κάθε αθλητή ξεχωριστά κάθε μεταβολίτης μεταβάλλεται διαφορετικά σε σχέση με τους υπόλοιπους αθλητές. Αυτό μπορεί να είναι μια γενική ένδειξη ότι το μεταβολικό προφίλ κάθε αθλητή σαφώς επηρεάζεται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες που πιθανόν να το καθιστούν μοναδικό σε σχέση με τα προφίλ των υπόλοιπων αθλητών.

Στα διαγράμματα που απεικονίζουν κάθε μεταβολίτη/διάστημα μεταβολιτών σε όλους τους αθλητές παρατηρήθηκαν κάποιες «ακραίες» διακυμάνσεις στο εύρος ορισμένων μεταβολιτών. Τις κυριότερες διακυμάνσεις τις είχαν οι μεταβολίτες της κρεατίνης, του 3-υδροξυισοβουτυρικού οξέος, του κιτρικού οξέος, της διμεθυλαμίνης, της τριγονελλίνης, της γλυκίνης, καθώς και κάποιοι άγνωστοι μεταβολίτες των διαστημάτων 2.15-2.18, 2.34, 2.80, 2.83, 3.24-3.30, 4.35 και 7.44-7.52 ppm. Στην περίπτωση της κρεατίνης παρατηρείται μια μεγάλη διακύμανση στους αθλητές A1,A2,A5,A7,A11 οι οποίοι λαμβάνουν κάποια συμπληρώματα/φάρμακα εκτός από την αθλήτρια A11. Η κρεατίνη γενικότερα μπορεί να ληφθεί εξωγενώς είτε μέσω των τροφών και κυρίως με κατανάλωση κρέατος, είτε μέσω συμπληρωμάτων διατροφής. Η εξωγενής χορήγηση της κρεατίνης γίνεται λόγω της επίδρασης που έχει στην σύντομη και έντονη άσκηση σχετικά με την ενέργεια που έμμεσα προσδίδει στον αθλητή [29].

Επιπλέον έχει παρατηρηθεί και συσχέτιση της κρεατίνης με τη χορήγηση στεροειδών. Στην ερευνητική εργασία των Paris A., Dumas M.E., Vercauteren J., André F., Canlet C., Gottardi G. έγινε εφαρμογή της μεταβονομικής προσέγγισης με στόχο τη δημιουργία και σύγκριση μεταβολικού αποτυπώματος βοοειδών στα οποία έχουν χορηγηθεί συγκεκριμένα αναβολικά. Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις πολυπαραμετρικές μεθόδους αποκάλυψαν ότι μεταβολίτες όπως η διμεθυλαμίνη, το ιππουρικό οξύ, η κρεατίνη, η κρεατινίνη και το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) αποτελούν τις κύριες παραμέτρους που διαφοροποιούν το μεταβολικό προφίλ της ομάδας ελέγχου από τις ομάδες στις οποίες χορηγήθηκαν αναβολικά. Συγκεκριμένα η κρεατίνη, η κρεατινίνη και η διμεθυλαμίνη παρουσίασαν μείωση, ενώ το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης, το ιππουρικό

οξύ και η γλυκόζη παρουσίασαν αύξηση στα δείγματα ούρων βοοειδών που χαρακτηρίζονται από χορήγηση αναβολικών. Οι ερευνητές αυτοί, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι η τεστοστερόνη και η τρενβολόνη παρουσιάζουν αντικαταβολική δράση και επομένως προκαλούν μία ευρύτερη «κατακράτηση αζώτου» και σε συνδυασμό με το ότι η οιστραδιόλη φαίνεται να εμποδίζει τη μετατροπή της γλυκίνης σε κρεατίνη, κάνουν την υπόθεση ότι αυτός είναι ο λόγος των μειωμένων επιπέδων κρεατίνης και κρεατινίνης καθώς και αυξημένων επιπέδων γλυκίνης. [29,70]

Στην παρούσα μελέτη δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με πιθανή λήψη τέτοιων ουσιών ενώ όπως έχει προαναφερθεί υπάρχει έλλειψη γενικότερων πληροφοριών σχετικά με τις διατροφικές συνήθειες των αθλητών αλλά και την συχνότητα λήψης των συμπληρωμάτων που λαμβάνουν. Θα μπορούσαμε λοιπόν να εικάσουμε ότι οι παρατηρούμενες διακυμάνσεις στους μεταβολίτες αυτούς μπορεί να οφείλονται είτε στα συμπληρώματα διατροφής που χρησιμοποιούν οι αθλητές είτε σε συγκεκριμένες διατροφικές παρεμβάσεις πριν τη λήψη των δειγμάτων.

Η ολική ανάλυση του τύπου και της ποσότητας των μεταβολιτών σε βιολογικά υγρά/δείγματα είναι ένας πολλά υποσχόμενος τομέας έρευνας, λόγω της δυνατότητας συσχετισμού της ανθρώπινης υγείας με την μελέτη των μεταβολικών αποκρίσεων σε παθοφυσιολογικά ερεθίσματα ή γενετικές τροποποιήσεις. Από διάφορες έρευνες σε μοντέλα ζώων έχουν παρατηρηθεί διαφορές στα μεταβολικά προφίλ λόγω διαφορών σε γενετικά στελέχη, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι κάθε άτομο ή ομάδα ατόμων μπορεί να χαρακτηρίζεται από διαφορετικό «μεταβολότυπο» (δηλαδή μια πολυπαραμετρική περιγραφή ενός οργανισμού σε δεδομένη φυσιολογική κατάσταση) βασισμένο σε μεταβολομικά δεδομένα. Η διαθεσιμότητα των μεταβολότυπων, οι οποίοι είναι χαρακτηριστικοί του κάθε ατόμου και σταθεροί σε σχέση με το χρόνο, θα ήταν θεμελιώδης για την διατροφο-γονιδιωματική, για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας φαρμάκων, για την φαρμακο-μεταβολομική αλλά και για μελέτες εξατομικευμένης

διατροφής που στοχεύουν στην διατήρηση της μεταβολικής υγείας και στην αποφυγή της απώλειας της ομοιόστασης ή στην διόρθωση ομοιοστατικών ανωμαλιών. [64]

Ένα σημαντικό πρόβλημα είναι ότι το πειραματικό μεταβολικό προφίλ επηρεάζεται όχι μόνο από το γενότυπο αλλά και από την ηλικία, από τον τρόπο ζωής, από περιβαλλοντικούς παράγοντες, από την διατροφική κατάσταση, από πιθανή πρόσληψη φαρμάκων και από άλλους μεταβολίτες συμβιωτικών οργανισμών (π.χ εντερική μικροχλωρίδα). Συνεπώς, οι αλλαγές στο μεταβολικό προφίλ των βιολογικά πολύπλοκων οργανισμών (όπως οι άνθρωποι) που προκαλούνται ως απόκριση σε παθολογικά ερεθίσματα είναι δύσκολο να διαχωριστούν από τις κανονικές φυσιολογικές διακυμάνσεις.[64]

Για να υπερνικηθεί το πρόβλημα αυτό της διακύμανσης στις μελέτες που συμμετέχουν άνθρωποι, έγιναν προσπάθειες ώστε να ελαχιστοποιηθεί η διακύμανση αυτή με διάφορα μέσα, όπως για παράδειγμα η εφαρμογή συγκεκριμένης διατροφής, η αποφυγή έντονης δραστηριότητας καθώς και ο αποκλεισμός των καπνιστών. Άλλες μελέτες έχουν εξετάσει την επίδραση των παραγόντων αυτών που προκαλούν τις διαταραχές στο μεταβολικό προφίλ ανθρώπων και ζώων, όπως είναι η διατροφή, συγκεκριμένα τρόφιμα, η ενηλικίωση-γήρανση αλλά και πολλοί εγγενείς και εξωγενείς φυσιολογικοί παράμετροι. [64]

Με αυτή την προοπτική είναι σημαντικό να εκτιμηθεί αν καθίσταται πιθανό να απομακρυνθεί αυτός ο «θόρυβος» λόγω των διάφορων ημερησίων διακυμάνσεων ώστε να αποκτηθεί ένα φυσικό, σταθερό και αμετάβλητο μεταβολικό προφίλ, δεδομένο για κάποιο άτομο και όχι απαραίτητα μοναδικό. Αυτό συμπεριλαμβάνει την ανάγκη διαχωρισμού των ενδογενών από τις εξωγενείς διακυμάνσεις. Η πιθανότητα ύπαρξης ενός «ατομικού μεταβολικού φαινότυπου» προτείνεται από πολλές μελέτες, οι οποίες αναφέρουν διαφοροποίηση μεταξύ ατόμων στη βάση μιας ατομικής απόκρισης σε συγκεκριμένα ερεθίσματα όπως το είδος της διατροφής ή τρόφιμα, θεραπεία με φάρμακα ή πρόσληψη βιταμινών.[64]

Στην μελέτη των Michael Assfalg et al [64] για την εκτίμηση της ύπαρξης ατομικού μεταβολότυπου χρησιμοποιήθηκαν υγιή άτομα χωρίς χρόνια παθολογικά νοσήματα και συλλέχθηκαν δείγματα ούρων από τον καθένα. Τα μεταβολικά αποτυπώματα δημιουργήθηκαν με τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR ενώ αναπτύχθηκαν και πρωτοπόρα πολυπαραμετρικά μοντέλα βασισμένα σε νέες μεθοδολογίες με στόχο την μεγιστοποίηση των διατομικών διαφορών και την ελαχιστοποίηση των ενδοατομικών διακυμάνσεων για την εξακρίβωση της ύπαρξης ενός «αποτυπώματος» ατομικού μεταβολικού φαινότυπου.[64]

Στην ερευνητική εργασία των Silke S.Heinzmann et al [66] διερευνήθηκε η επίδραση της διατροφικής παρέμβασης στην σταθερότητα του μεταβολικού φαινότυπου σε άτομα που ακολούθησαν ένα συγκεκριμένο διατροφικό πρωτόκολλο. Τα δεδομένα επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ενός ατομικού μεταβολικού φαινότυπου και τονίζουν πολλά μεταβολικά μονοπάτια που επηρεάζονται από δια-ατομικές διαφορές και διαφορετικές αποκρίσεις σε διατροφική πρόσληψη, καθώς επίσης και μεταβολίτες που εκκρίνονται το ίδιο σε όλους τους εθελοντές ύστερα από συγκεκριμένες διατροφικές παρεμβάσεις. Τα ευρήματα αυτά είναι συνεπή και με προηγούμενες μελέτες δείχνοντας την δια-ατομική και ενδο-ατομική διακύμανση και επιβεβαιώνοντας ότι οι δια-ατομικές διαφορές είναι μεγαλύτερες από τις ενδο-ατομικές διαφορές. Η καθημερινή διακύμανση είναι στενά συνδεδεμένη με την διατροφή, όσον αφορά συγκεκριμένους μεταβολίτες (κυρίως αυτούς που σχετίζονται με την εντερική μικροβιακή χλωρίδα), δείχνοντας έτσι την γρήγορη δυναμική απόκριση και τη λειτουργική ελαστικότητα του μικροβιώματος σε μεταβαλλόμενα υποστρώματα. Εικάζεται επίσης ότι τα μικροβιακά συστατικά ενός ενήλικα ανθρώπου θεωρούνται σχετικά σταθερά και ανθίστανται στις ημερήσιες διατροφικές διακυμάνσεις.[66,38,65]

Ο χαρακτηρισμός αυτός του ατομικού μεταβολικού φαινότυπου θα επιφέρει πολλά οφέλη διότι θα επιτρέψει στους ερευνητές να σχεδιάζουν καλύτερα την εξατομικευμένη θεραπεία και διατροφή, να πραγματοποιούν μελέτες φαρμακομεταβολομικής για την καλύτερη πρόβλεψη και εκτίμηση της αποτελεσματικότητας και τοξικότητας των

φαρμάκων, να παρακολουθούν τις φαινοτυπικές αλλαγές ως αποτέλεσμα της εξέλιξης ασθενειών οδηγώντας σε έγκαιρες θεραπείες ή πρόγνωση, να πραγματοποιούν χαμηλού κόστους κλινικές μελέτες σε πληθυσμούς και να εξηγήσουν το αν είναι πιθανόν οι μακροπρόθεσμες αλλαγές να σχετίζονται με την ηλικιακή ωρίμανση/γήρανση.[64]

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. J.S.Knapp,W.L.Cabrera, «Metabolomics, Metabolites, Metabonomics and Analytical Technologies»,Nova Science Publishers,2011
2. J.K.Nicholson, J.C.Lindon, E.Holmes, Handbook of Metabonomics and Metabolomics, 1st ed., Elsevier, 2007.
3. D.G.Robertson, J.Lindon, Metabonomics in toxicity assessment,Taylor and Francis Group,2005
4. J.K.Nicholson, J.C.Lindon, “Systems biology metabonomics”, Nature, 2008, vol 455, p.1054-1056,
5. W.J.Griffiths, “Metabolomics, metabonomics and metabolite profiling”, RSC Publishing, 2008
6. W.B.Dunn, D.I.Ellis, “Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies”, Trends in Analytical Chemistry, 2005, vol.24, No.4
7. J.C.Lindon, “Metabonomics Techniques Applications”, Future Drug Discovery,2004
8. http://www1.imperial.ac.uk/surgeryandcancer/divisionofsurgery/biomol_med/education/metabonomics_history/
9. J.C.Lindon, E.Holmes, J.K.Nicholson, “Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical R&D”, Pharmaceutical Research, Vol. 23, No. 6, June 2006
10. J.K.Nicholson, E.Holmes, J.C.Lindon, “ The metabolic window into systems biology”,Journal of Proteome Research,Vol. ©,American Chemical Society 6, No. 2, 2007
11. J.Ramsden Jeremy, Metabonomics and metabolomics, Computer Science Bioinformatics Computational Biology, 2009, Volume 10, Part 3, 1-6, DOI: 10.1007/978-1-84800-257-9_16
12. J.C.Lindon,J.K.Nicholson, “Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics”, Annu.Rev.Anal.Chem,1:45-69,2008
13. J.C.Lindon,J.K.Nicholson, “Analytical technologies for metabonomics and metabolomics, and multi-omic information recovery”, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 27, No. 3, 2008
14. L.Erikson, H.Antti, J.Gottfries, E.Holmes, E.Johansson, F.Lindgren, I.Long, T.Lundstedt, J.Trygg, S.Wold, “Using chemometrics for navigating in the large data sets of genomics,proteomics, and metabonomics”, Anal. Bioanal. Chem. (2004) 380: 419–429
15. Johan Trygg, Elaine Holmes, Torbjorn Lundstedt, “Chemometrics in Metabonomics”, Journal of Proteome Research, 2007, 6, p.469-479.

16. <http://www.omicsworld.com>
17. J.C.Lindon, J.K.Nicholson,E.Holmes, “Metabonomics: Metabolic Processes Studied by NMR Spectroscopy of Biofluids”, Concepts in Magnetic Resonance, Vol. 12(5),289-320,(2000).
18. J.K.Nicholson, J.Connelly,J.C.Lindon, E.Holmes, “Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function”,Nature Reviews, Vol.1,p.153-161 2002
19. E.M.Lenz, J.Bright, I.D.Wilson, S.R.Morgan, A.F.P.Nash, “A ^1H NMR-based metabonomic study of urine and plasma samples obtained from healthy human subjects”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 33 (2003) 1103-1115.
20. M.E Dumas,E.C. Maibaum,C.Teague,H.Ueshima,B.Zhou,J.C.Lindon,J. K. Nicholson, J. Stamler,P.Elliott,Q. Chan,E.Holmes, “Assessment of Analytical Reproducibility of ^1H NMR Spectroscopy Based Metabonomics for Large-Scale Epidemiological Research”, Anal. Chem. 2006, 78, 2199-2208
21. E.M.Lenz, J.Bright, I.D.Wilson, A.Hughes, J.Morrisson, H.Lindberg, A.Lockton, “Metabonomics, dietary influences and cultural differences:a ^1H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects”, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,36,(2004), 841–849
22. R.Madsen, T.Lundstedt, J.Trygg,“Chemometrics in metabolomics—A review in human disease diagnosis”, Analytica Chimica Acta, 659, (2010) 23–33
23. J.C.Lindon, E.Holmes, M.E.Bollard, E.G.Stanley, J.K.Nicholson,“Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis,Biomarkers,vol.9, No.1 (2004), 1-31
24. J. C. Lindon, J.K. Nicholson, E.Holmes, H.Antti, M. E. Bollard, H.Keun, O.Beckonert, T.M. Ebbels, M.D. Reily, D.Robertson,G. J. Stevens, P. Luke, A. P. Breau, G. H. Cantor, R.H. Bible, U.Niederhauser, H. Senn, G. Schlotterbeck, U. G. Sidelmann,S.M. Laursen, A. Tymiak, B.D. Car, L. Lehman-McKeeman,J.M. Colet, A. Loukaci, C. Thomas, “Contemporary issues in toxicology: The role of metabonomics in toxicology and its evaluation by the COMET project”, Toxicology and Applied Pharmacology,187 (2003), 137–146
25. T.Ebbels, H.Keun, O.Beckonert, H.Antti, M.Bollard,E. Holmes, J. Lindon, J.K. Nicholson,“Toxicity classification from metabonomic data using a density superposition approach:CLOUDS”, Analytica Chimica Acta 490 (2003) 109–122
26. Alexandros Pechlivanis, Sarantos Kostidis, Ploutarchos Saraslanidis, Anatoli Petridou,George Tsalis, Vassilis Mougios, Helen G. Gika, Emmanuel Mikros, Georgios A. Theodoridis, “ ^1H NMR-Based Metabonomic Investigation of the Effect

- of Two Different Exercise Sessions on the Metabolic Fingerprint of Human Urine”, p.6405-6416, 2010.
27. B.Yan, Jiye A, G.Wang H. Lu, X.Huang, Yi Liu, W. Zha, H. Hao, Y. Zhang, L. Liu, Shenghua Gu, Q.Huang, Y.Zheng, J. Sun, “Metabolomic investigation into variation of endogenous metabolites in professional athletes subject to strength-endurance training”, *J.Appl.Physiol.* 106: 531–538, 2009
 28. G. M. Kirwana, V.G. Coffey, J.O. Niere, J.A. Hawley, M. J. Adams Spectroscopic correlation analysis of NMR-based metabonomics in exercise science, *Analytica Chimica Acta*, 652 (2009), 173–179
 29. Γιάννης Μουμουζάς, «Έλεγχος anti doping - Η μεταβολομική προσέγγιση», Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Αθήνα 2011
 30. C. Enea, F. Seguin, J. Petitpas-Mulliez, N. Boildieu, N. Boisseau, N. Delpech, V. Diaz, M. Eugène, B. Dugué 1H NMR-based metabolomics approach for exploring urinary metabolome modifications after acute and chronic physical exercise, *Anal Bioanal Chem* (2010) 396:1167–1176
 31. A. Miccheli, F. Marini, G. Capuani, A.T. Miccheli, M. Delfini, M. Enrica Di Cocco, C. Puccetti, M. Paci, M. Rizzo, A. Spataro, “The Influence of a Sports Drink on the Postexercise Metabolism of Elite Athletes as Investigated by NMR-Based Metabolomics”, *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 28, No. 5, 553–564 (2009)
 32. L. Moyec, L.M. Hamard, M.N. Triba, C. Breuneval, H. Petot Véronique, L. Billat, “NMR metabolomics for assessment of exercise effects with mouse biofluids”, *Anal. Bioanal. Chem.*, Springer, 2012
 33. Stephen J. Bruce, Isabelle Bretona, Jacques Decombaza, Chris Boesch, Eva Scheurer, Ivan Montoliu, Serge Rezzia, Sunil Kochhara, Philippe A. Guya, “A plasma global metabolic profiling approach applied to an exercise study monitoring the effects of glucose, galactose and fructose drinks during post exercise recovery”, *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 3015–3023
 34. Chi-Chang Huang, Wan-Teng Lin, Feng-Lin Hsu, Pi-Wen Tsai, Chia-Chung Hou, “Metabolomics investigation of exercise-modulated changes in metabolism in rat liver after exhaustive and endurance exercise”, *Eur J Appl Physiol* (2010) 108:557–566
 35. Jeanette Kuhl, Thomas Moritz, Henrik Wagner, Hans Stenlund, Krister Lundgren, Peter Bavenholm, Suad Efendic, Gunnar Norstedt, Petra Tollet-Egnell, “Metabolomics as a tool to evaluate exercise-induced improvements in insulin sensitivity”, *Metabolomics* (2008), 4:273–282

36. Ignasi Barba, Gustavo de Leon, Eva Martin, Antonio Cuevas, Santiago Aguade, Jaume Candell-Riera, Jose A. Barrabes, David Garcia-Dorado, "Nuclear Magnetic Resonance-Based Metabolomics Predicts Exercise-Induced Ischemia in Patients with coronary artery disease", *Magnetic Resonance in Medicine*, 2008, 60:27–32
37. Serge Rezzi, Ziad Ramadan, Laurent B. Fay, Sunil Kochhar, "Nutritional Metabonomics Applications and Perspectives", *Journal of Proteome Research* 2007, 6, 513-525
38. Aifric O'Sullivan, Michael J Gibney, Lorraine Brennan, "Dietary intake patterns are reflected in metabolomic profiles", *Am. J. Clin. Nutr.*, 2011, 93:314–21
39. Serge Rezzi, Ziad Ramadan, François-Pierre J. Martin, Laurent B. Fay, Peter van Bladeren, John C. Lindon, Jeremy K. Nicholson, Sunil Kochhar, "Human Metabolic Phenotypes Link Directly to Specific Dietary preferences in healthy individuals", *Journal of Proteome Research* 2007, 6, 4469-4477
40. J.K. Nicholson, J.C. Lindon, E. Holmes, "So what's the deal with metabonomics", *Analytical Chemistry*, 2003, 385
41. Muireann Coen, Elaine Holmes, John C. Lindon, Jeremy K. Nicholson, "NMR-Based Metabolic Profiling and Metabonomic Approaches to Problems in Molecular Toxicology", *Chem. Res. Toxicol.* 2008, 21, 9–27
42. F.A. Van Dorsten, C.A. Daykin, H.P.J. Mulder, J.P.M. Van Duynhoven, "Metabonomics Approach To Determine Metabolic Differences between Green Tea and Black Tea Consumption", *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 6929-6938
43. F. Savorani, G. Tomasi, S.B. Engelsen "icosift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra", *Journal of Magnetic Resonance*, 202, (2010), 190–202
44. Andrew Craig, Olivier Cloarec, Elaine Holmes, Jeremy K. Nicholson, John C. Lindon, "Scaling and Normalization Effects in NMR Spectroscopic Metabonomic Data Sets", *Anal. Chem.* 2006, 78, 2262-2267
45. L. Eriksson, E. Johansson, N. Kettaneh-Wold, J. Trygg, C. Wikström, S. Wold, "Multi- and megavariable data analysis part I, Basic Principles and Applications", *Umetrics AB Sweden*, 2nd ed, 2006
46. Wolfram Gronwald, Matthias S. Klein, Hannelore Kaspar, Stephan R. Fagerer, Nadine Nurnberger, Katja Dettmer, Thomas Bertsch, Peter J. Oefner, "Metabolite Quantification Employing 2D NMR Spectroscopy", *Anal. Chem.* 2008, 80, 9288–9297
47. P.J.D. Foxall, J.A. Parkinson, I.H. Sadler, J.C. Lindon, J.K. Nicholson, "Analysis of biological fluids using 600 MHz proton NMR spectroscopy: application of

- homonuclear two- dimensional J-resolved spectroscopy to urine and blood plasma for spectral simplification and assignment”, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, Vol 11, No. 1, pp.21-31, 1993
48. <http://www.hmdb.ca/> (Human Metabolome Database)
 49. <http://www.bmr.com> (Biological Magnetic Resonance Bank)
 50. Lindon J. C., Nicholson J. K., Everett J. R.; *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 1999; 38, 2-87
 51. C.Zuppi, I.Messana, F.Forni, C.Rossi, L.Pennacchietti, F.Ferrari, B.Giardina, “¹H NMR spectra o normal urines Reference ranges of the major metabolites”, *Clinica Chimica Acta* 265 (1997)85-97
 52. Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC, “750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma”, *Anal Chem.* Vol 67(5), p.793-811, 1995
 53. Erik J. Saude, Darryl Adamko, Brian H. Rowe, Tom Marrie, Brian D. Sykes, “Variation of metabolites in normal human urine”, Springer, *Metabolomics*, 2007
 54. Nikolaos G. Psihogios, Irene F. Gazi, Moses S. Elisaf, Konstantin I. Seferiadis, Eleni T. Bairaktari, “Gender-related and age-related urinalysis of healthy subjects by NMR-based metabonomics”, *NMR Biomed.* 2008, 21: 195–207
 55. H.Wolrath, B.Stahlbom, A.Hallen, U.Forsum, “Trimethylamine and trimethylamine oxide levels in normal women and women with bacterial vaginosis reflect a local metabolism in vaginal secretion as compared to urine”, *APMIS*, Vol 113, Issue 7-8, p.513-516, 2005
 56. Gustavo Puggina Rogatto, Camila Aparecida Machado de Oliveira, Júlio Wilson dos Santos, Fúlvia de Barros Manchado, Fábio Yuzo Nakamura, Camila de Moraes, Alessandro de Moura Zagatto, Marcel Cardoso Faria, Márcia Afonso, Maria Alice Rostom de Mello, “Influence of spirulina intake on metabolism of exercised rat”, *Rev.Bras. Med. Esporte*, Vol. 10, Nº 4, 2004
 57. Michael J. González, Jorge R. Miranda, Hugh D. Riordan, “Vitamin C as an Ergogenic Aid”, *Journal of Orthomolecular Medicine*, 2005, Vol. 20, No. 2
 58. H.C.Lukaski, “Vitamin and Mineral Status: Effects on Physical Performance”, *Nutrition*, Vol 20(7-8), p.632-644, 2004.
 59. Gallice P, Sarrazin F, Polverelli M, Cadet J, Berland Y, Crevat A., “Ascorbic acid-2-O-J3-glucuronide, a new metabolite of vitamin C identified in human urine and uremic plasma”, *Biochim Biophys Acta.*, vol 1199(3), p.305-310, 1994
 60. J. Carrola¹, C. M. Rocha¹, A. S. Barros, A. M. Gil¹, B. J. Goodfellow, M. Santos, S. M. Rocha, I. M.Carreira, A. Gomes, L. Carvalho, I. F. Duarte, “Metabolic Signature

- of Lung Cancer in Urine: an NMR- and MS-based Metabonomics Study”, *J. Proteome Res.*, 2011, 10 (1), pp 221–230
61. Roman Lang, Anika Wahl, Timo Stark, Thomas Hofmann, “Urinary N-methylpyridinium and trigonelline as candidate dietary biomarkers of coffee consumption”, *Mol. Nutr. Food Res.* 2011, 55, 1613–1623
 62. W. K. Kerr, M. Barkin, P. E. Levers, S. K.-C. Woo, Z. Menczyk, “The Effect of Cigarette Smoking on Bladder Carcinogens in Man”, *Can Med Assoc J.*, vol 93(1), p. 1–7, 1965
 63. Hans Holmen, Helge Egsgaard, Jytte Funck, Elfinn Larsen, “N'-Methylnicotinamide in Human Urine”, *Biomedical Mass Spectrometry*, vol. 8. No. 3, 1981
 64. Michael Assfalg, Ivano Bertini, Donato Colangiuli, Claudio Luchinat, Hartmut Schafer, Birk Schutz, Manfred Spraul, “Evidence of different metabolic phenotypes in humans”, *PNAS*, 2008, vol. 105, 1420–1424
 65. Cinzia Stella, Bridgette Beckwith-Hall, Olivier Cloarec, Elaine Holmes, John C. Lindon, Jonathan Powell, Frans van der Ouderaa, Sheila Bingham, Amanda J. Cross, Jeremy K. Nicholson, “Susceptibility of Human Metabolic Phenotypes to Dietary Modulation”, *Journal of Proteome Research*, 2006, 5, 2780–2788
 66. Silke S. Heinzmann, Claire A. Merrifield, Serge Rezzi, Sunil Kochhar, John C. Lindon, Elaine Holmes, Jeremy K. Nicholson, “Stability and Robustness of Human Metabolic Phenotypes in Response to Sequential Food Challenges”, *J. Proteome Res.* 2012, 11, 643–655
 67. Max Bylesjö, Mattias Rantalainen, Olivier Cloarec, Jeremy K. Nicholson, Elaine Holmes and Johan Trygg; *J. Chemometrics*, 2006; 20: 341–351
 68. W.S. Law, P.Y. Huang, E.S. Ong, C.N. Ong, S.F. Yau Li, K.K. Pasikanti, E. C. Yong Chan, “Metabonomics investigation of human urine after ingestion of green tea with gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography/mass spectrometry and ¹H NMR spectroscopy”, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008, 22, pg 2436–2446
 69. T. Yokozama, H. Oura, S. Sakanaka, M. Kim, “Effects of tannins in green tea on the urinary methylguanidine excretion in rats indicating a possible radical scavenging action”, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56(6), pg. 896–899, 1992
 70. Paris A., Dumas M.E., Vercauteren J., André F., Canlet C., Gottardi G.; *Science & Sports*, 2005, 20, 222–225

[10] ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

[7^B] ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΣΥΝΟΛΟ ΤΩΝ ΑΘΛΗΤΩΝ

ΑΘΛΗΤΗΣ Α1: Είναι άνδρας, 44 ετών με πολυομελίτιδα με προπονητική ηλικία 8 ετών. Καπνίζει και λαμβάνει ως συμπληρώματα σπιρουλίνα και βιταμίνη C χωρίς να είναι γνωστή η συχνότητα λήψης αυτών αλλά και οι διατροφικές του συνήθειες γενικά με εξαίρεση ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με την διατροφή του 12 ώρες πριν την δειγματοληψία.

ΑΘΛΗΤΡΙΑ Α2: Είναι γυναίκα, 47 ετών με πολυομελίτιδα με προπονητική ηλικία 10 ετών. Δεν καπνίζει και λαμβάνει ως συμπληρώματα σπιρουλίνα και βιταμίνη C χωρίς να είναι γνωστή η συχνότητα λήψης αυτών ενώ δεν παρέχονται καθόλου πληροφορίες για το τι κατανάλωσε 12 ώρες πριν τη δειγματοληψία.

ΑΘΛΗΤΗΣ Α3: Είναι άνδρας, 33 ετών με εγκεφαλική παράλυση με προπονητική ηλικία 3,5 ετών. Δεν καπνίζει και λαμβάνει ως συμπληρώματα σπιρουλίνα και ιπποφαές Ευβοίας(SuperfoodsTM) χωρίς να είναι γνωστή η συχνότητα λήψης αυτών ενώ δεν παρέχονται καθόλου πληροφορίες για το τι κατανάλωσε 12 ώρες πριν τη δειγματοληψία.

ΑΘΛΗΤΗΣ Α4: Είναι άνδρας, 33 ετών με εγκεφαλική παράλυση με προπονητική ηλικία 1,5 έτους. Καπνίζει και δεν λαμβάνει καθόλου συμπληρώματα ή φάρμακα ενώ παρέχονται ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με την διατροφή του 12 ώρες πριν την δειγματοληψία.

ΑΘΛΗΤΗΣ Α5: Είναι άνδρας, 31 ετών με παραπληγία με προπονητική ηλικία 2,5 έτη. Δεν καπνίζει και λαμβάνει ως φάρμακα Xatral και Vesicare (λόγω καθετηριασμού, ανά τακτά χρονικά διαστήματα) και συμπληρώματα Αμινοξέα BCAA NanoStack (Branched Chain Amino Acid Capsules)-(Sci-MX Nutrition), Κρεατίνη Creatine- Phosphagen TM (EAS), Glutamine (EAS), συμπλήρωμα κρεατίνης Creatine Monohydrate (Sci-MX Nutrition) 250g και πολυβιταμίνη Q 10 V-Plus χωρίς να είναι γνωστή η συχνότητα λήψης αυτών. Δεν διατίθενται καθόλου πληροφορίες σχετικά με την διατροφή του 12 ώρες πριν την δειγματοληψία.

ΑΘΛΗΤΗΣ A6: Είναι άνδρας, 15 ετών με δαρφισμό με προπονητική ηλικία 0,5 έτη. Δεν καπνίζει και δεν λαμβάνει καθόλου συμπληρώματα ή φάρμακα ενώ παρέχονται ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με την διατροφή του 12 ώρες πριν την δειγματοληψία.

ΑΘΛΗΤΗΣ A7: Είναι άνδρας, 35 ετών με παραπληγία με προπονητική ηλικία 2,5 έτη. Δεν καπνίζει και λαμβάνει ως φάρμακα Ercefuryl (Unipharma) και Ultra-Levure (Biocodex) (λόγω γαστρεντερίτιδας), και συμπληρώματα Power Amino Plex (Power Up), Multi-Vitamin Vital Silver Plus 50+ (SWISS CAPS SWITZERLAND /GERMANY), Ιπποφαές Εύβοιας (SuperfoodsTM), Lecarna - Levocarnitine (Bennett Pharmaceuticals), betamethasone (Celestone), Panadol 500 mg, Zadac, χωρίς να είναι γνωστή η συχνότητα λήψης αυτών. Δεν παρέχονται πληροφορίες σχετικά με την διατροφή του 12 ώρες πριν την δειγματοληψία μόνο ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με την προπόνηση του.

ΑΘΛΗΤΗΣ A9: Είναι άνδρας, 32 ετών με δαρφισμό με προπονητική ηλικία 5 έτη. Καπνίζει και λαμβάνει ως συμπληρώματα Creatine- PhosphagenTM (EAS), Glutamine (EAS), BCAA NanoStack (Sci-MX Nutrition), Myoplex Deluxe (EAS[®]), Muscle ArmorTM (EAS), 100% Whey Protein (EAS) χωρίς να είναι γνωστή η συχνότητα λήψης αυτών ενώ δεν παρέχονται καθόλου πληροφορίες για το τι κατανάλωσε 12 ώρες πριν τη δειγματοληψία.

ΑΘΛΗΤΡΙΑ A11: Είναι γυναίκα, 41 ετών με αρθρογρύπωση-παραπληγία με προπονητική ηλικία 10 ετών. Δεν καπνίζει και δεν λαμβάνει συμπληρώματα ενώ δεν παρέχονται καθόλου πληροφορίες για το τι κατανάλωσε 12 ώρες πριν τη δειγματοληψία.

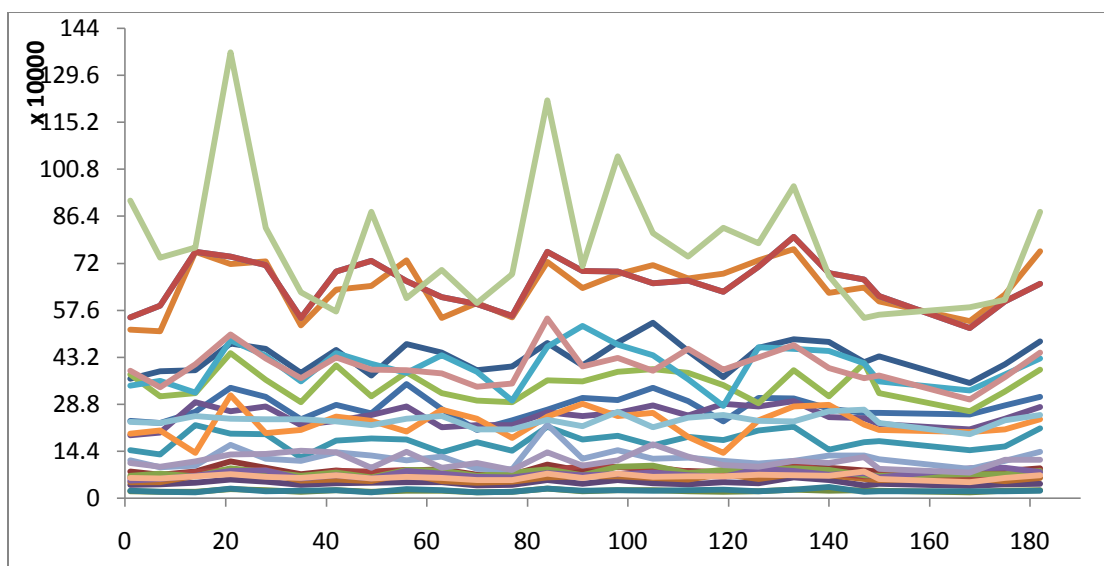
ΑΘΛΗΤΗΣ A12: Είναι άνδρας, 26 ετών με ακρωτηριασμό πάνω από το γόνατο με συντριπτικό κάταγμα λεκάνης και έχει προπονητική ηλικία 2 μήνες. Δεν καπνίζει και λαμβάνει ως συμπληρώματα Creatine- PhosphagenTM (EAS), Glutamine (EAS), Myoplex Deluxe (EAS[®]), Muscle ArmorTM (EAS), 100% Whey Protein (EAS) χωρίς να είναι γνωστή η συχνότητα λήψης αυτών ενώ παρέχονται ελάχιστες πληροφορίες για το τι κατανάλωσε 12 ώρες πριν τη δειγματοληψία.

Επιπλέον, οι αθλητές αυτοί στο μέσο περίπου του διαστήματος της δειγματοληψίας συμμετείχαν σε Παραολυμπιακούς αγώνες ενώ προς το τέλος της δειγματοληψίας αυτής ακολούθησαν για 2 συνεχόμενες εβδομάδες μια διατροφική παρέμβαση με αφένημα πράσινου τσαγιού (όλοι εκτός από τον αθλητή Α6).

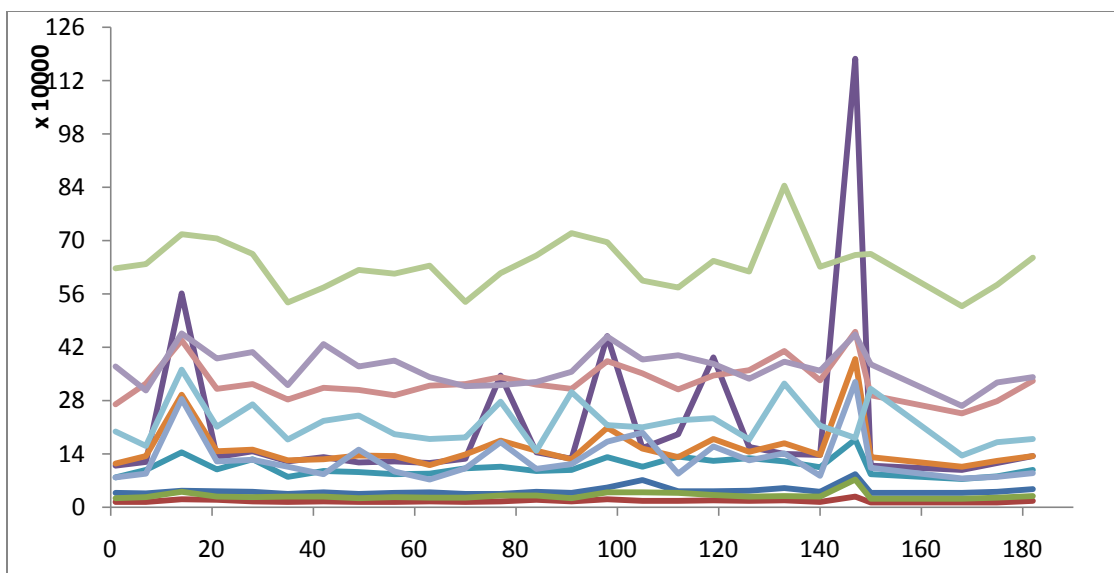
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

[7^{B.6}] ΧΡΟΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ /ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΩΝ (INTERVAL) ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΑΘΛΗΤΕΣ/ΤΡΙΕΣ

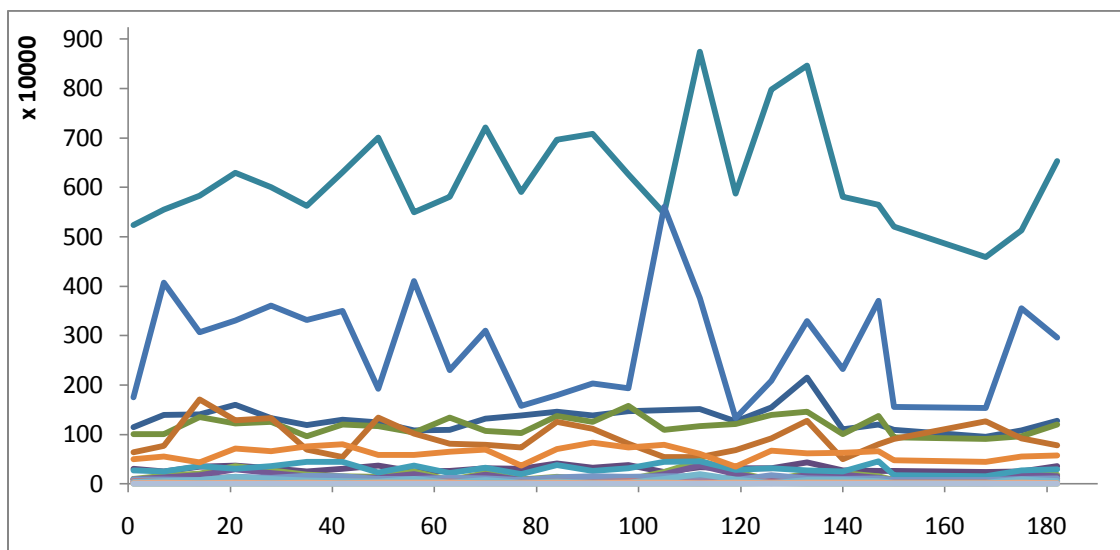
ΑΘΛΗΤΡΙΑ Α2



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 11 .Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 0,73-2,76 ppm της αθλήτριας Α2 που εμπεριέχει 24 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών.Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

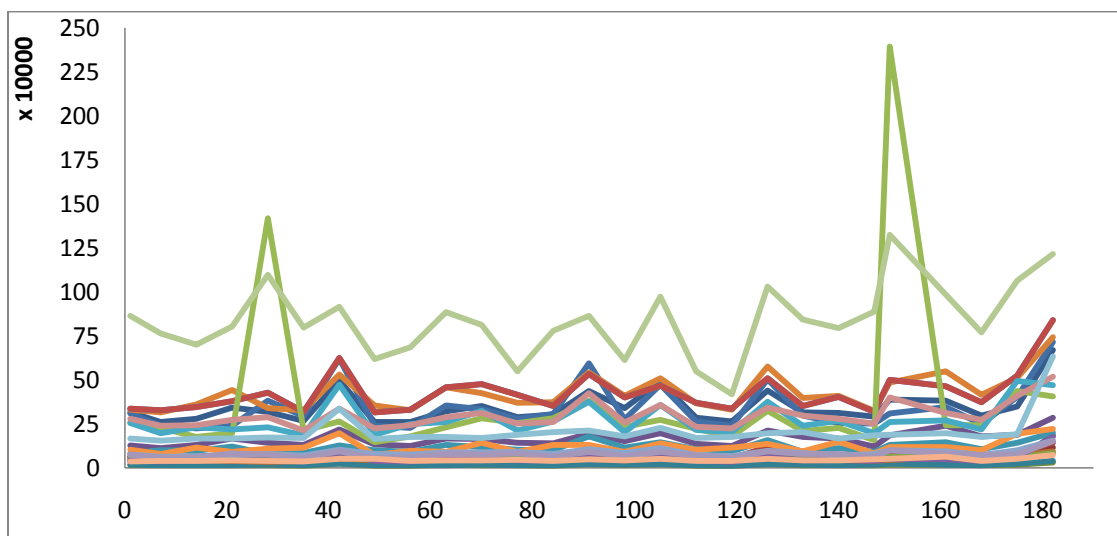


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 12 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 2,78-3,23 ppm της αθλήτριας A2 που εμπεριέχει 11 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

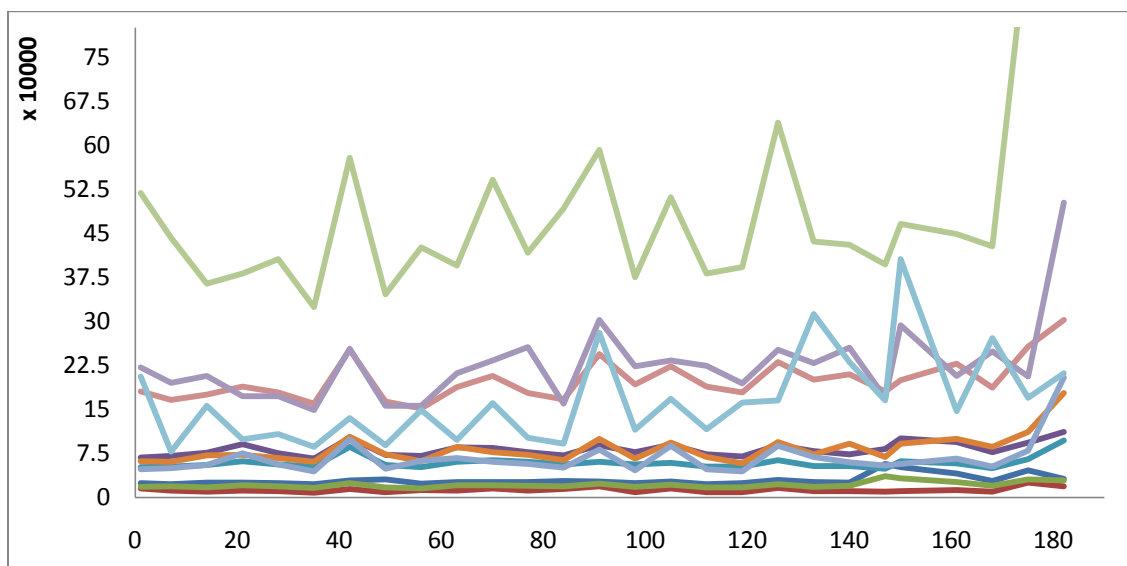


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 13 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 3,24-9,3 ppm της αθλήτριας A2 που εμπεριέχει 19 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

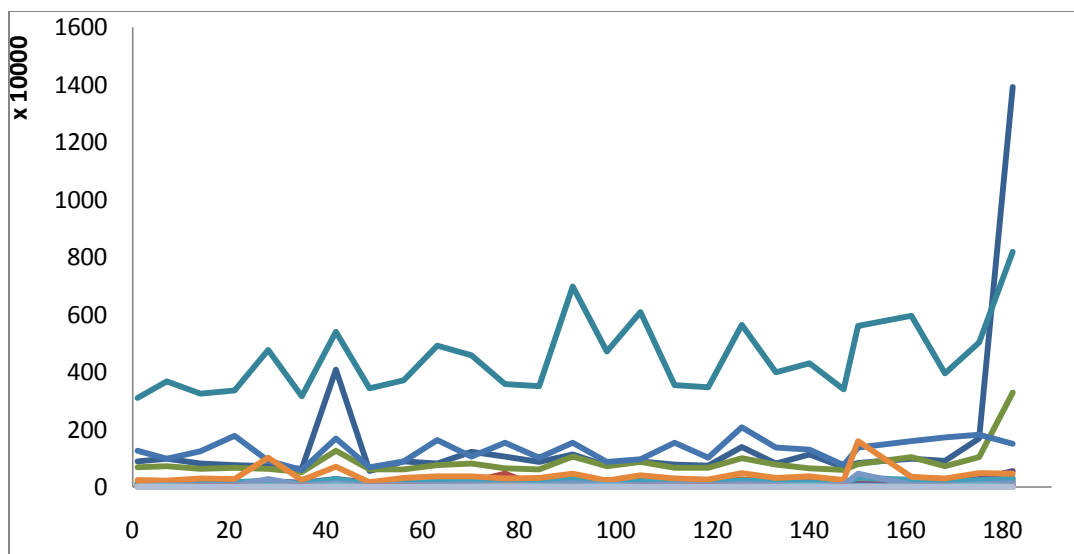
ΑΘΛΗΤΗΣ Α3



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 14 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 0,73-2,76 ppm του αθλητή Α3 που εμπεριέχει 24 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

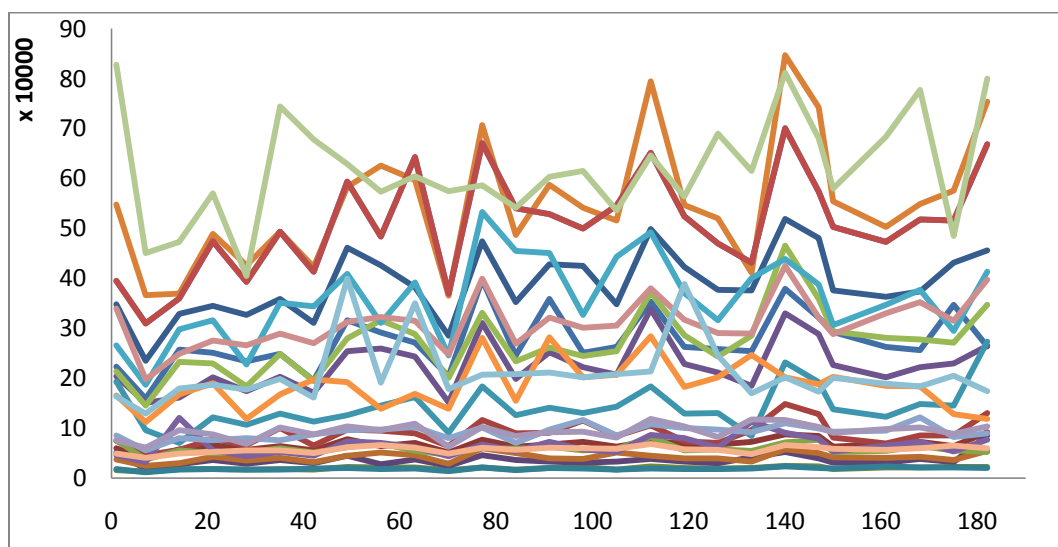


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 15 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 2,78-3,23 ppm του αθλητή Α3 που εμπεριέχει 11 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

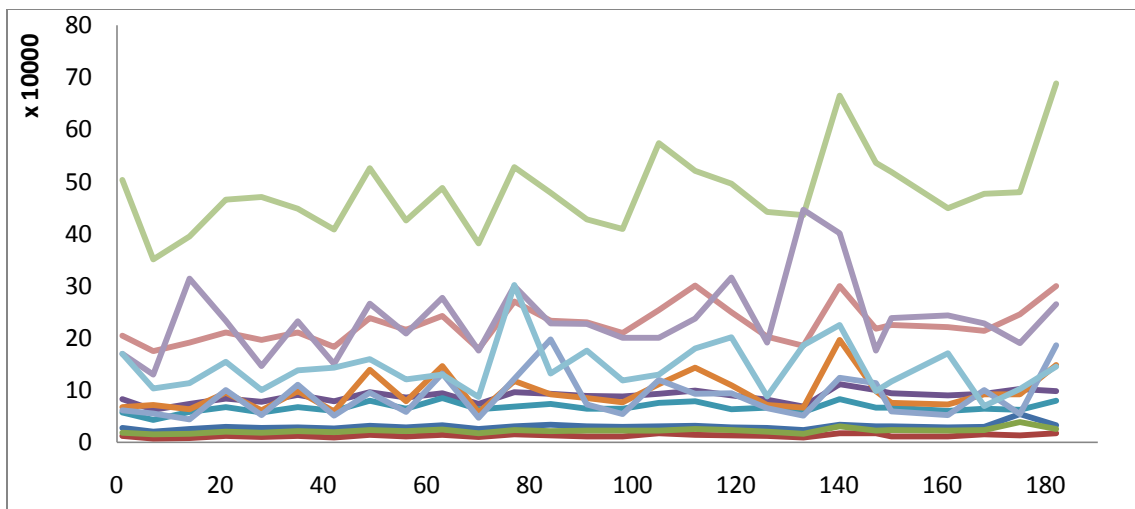


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 16 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 3,24-9,3 ppm του αθλητή A3 που εμπεριέχει 19 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

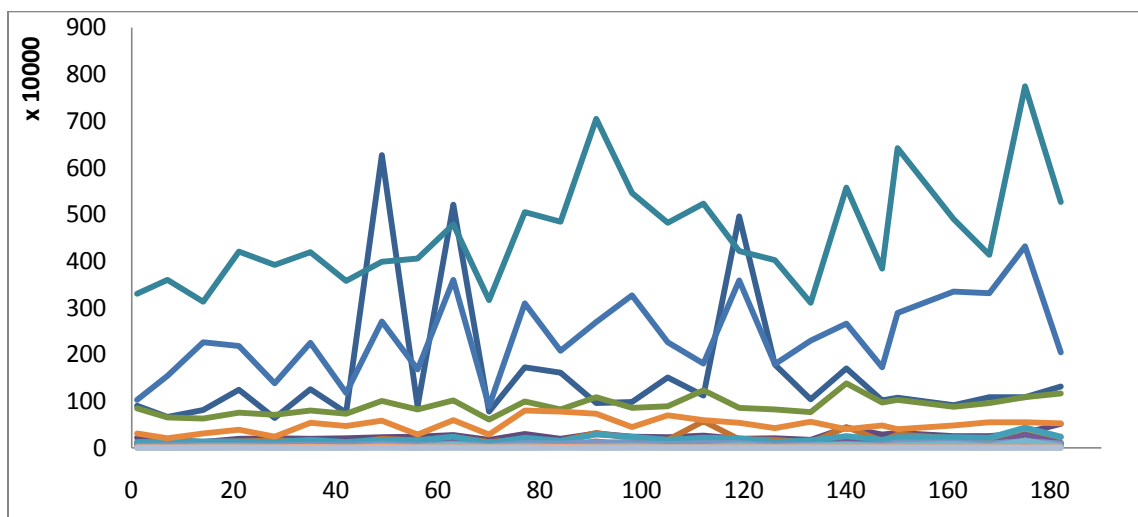
ΑΘΛΗΤΗΣ A4



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 17 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 0,73-2,76 ppm του αθλητή A4 που εμπεριέχει 24 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

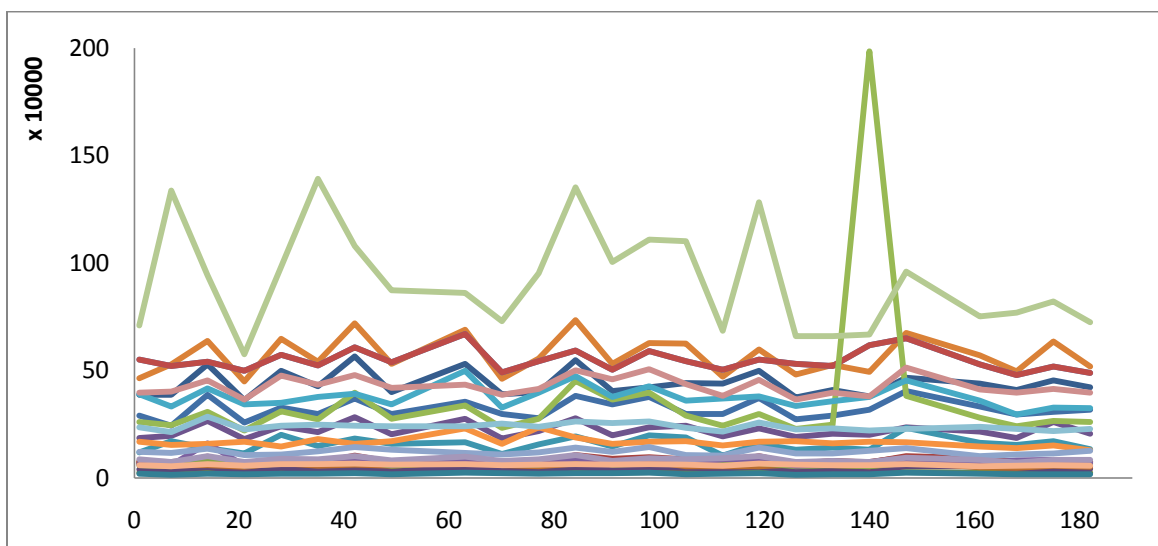


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 18 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 2,78-3,23 ppm του αθλητή Α4 που εμπεριέχει 11 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

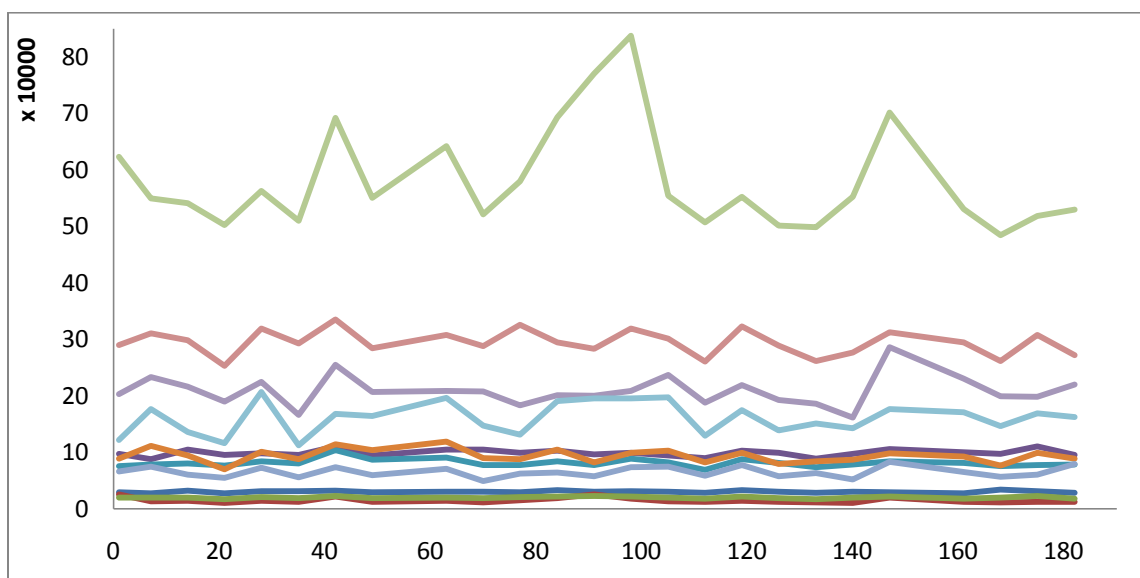


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 19 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 3,24-9,3 ppm του αθλητή Α4 που εμπεριέχει 19 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

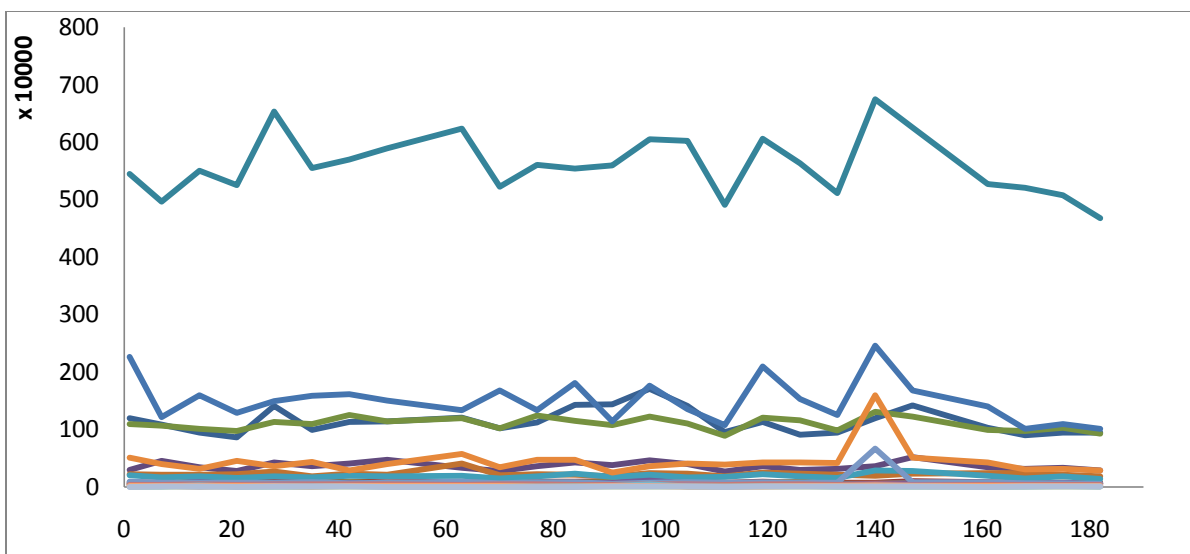
ΑΘΛΗΤΗΣ Α6



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 20 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 0,73-2,76 ppm του αθλητή Α6 που εμπεριέχει 24 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

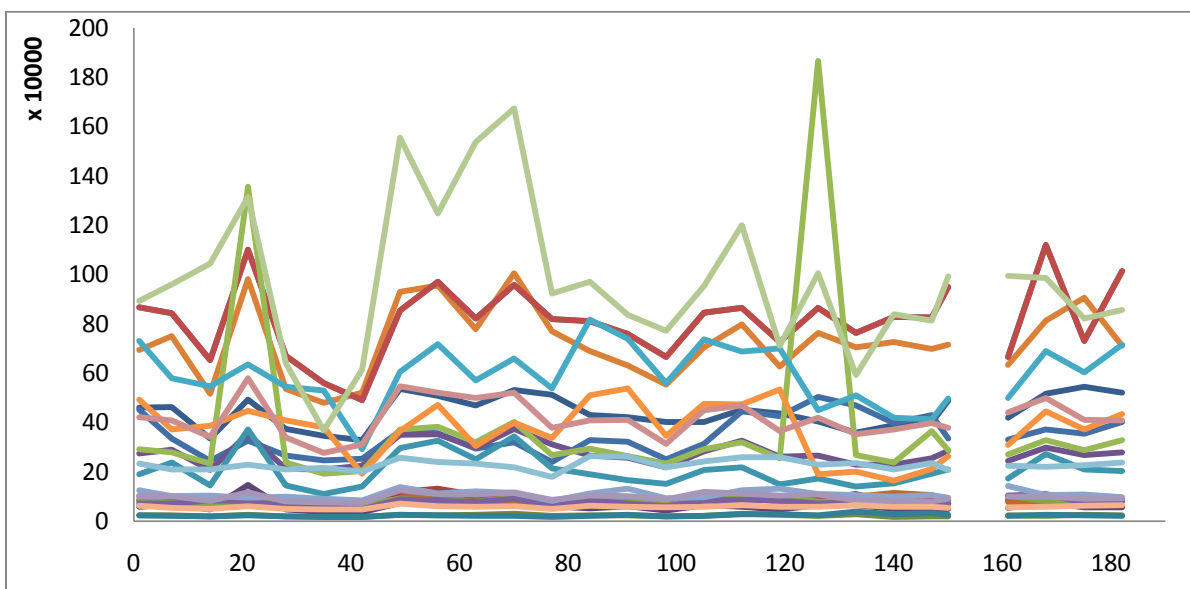


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 21 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 2,78-3,23 ppm του αθλητή Α6 που εμπεριέχει 11 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

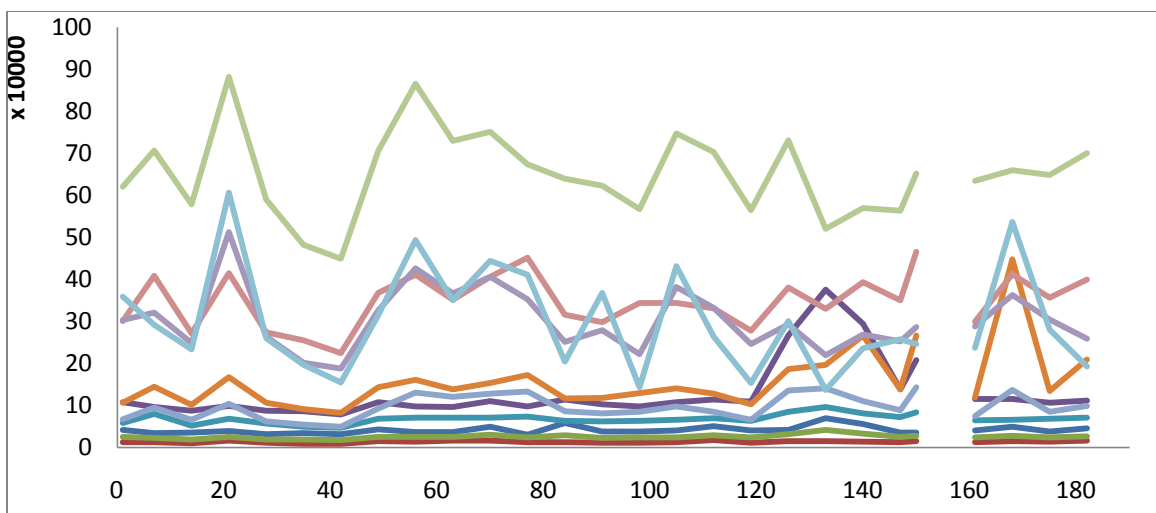


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 22 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 3,24-9,3 ppm του αθλητή Α6 που εμπεριέχει 19 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

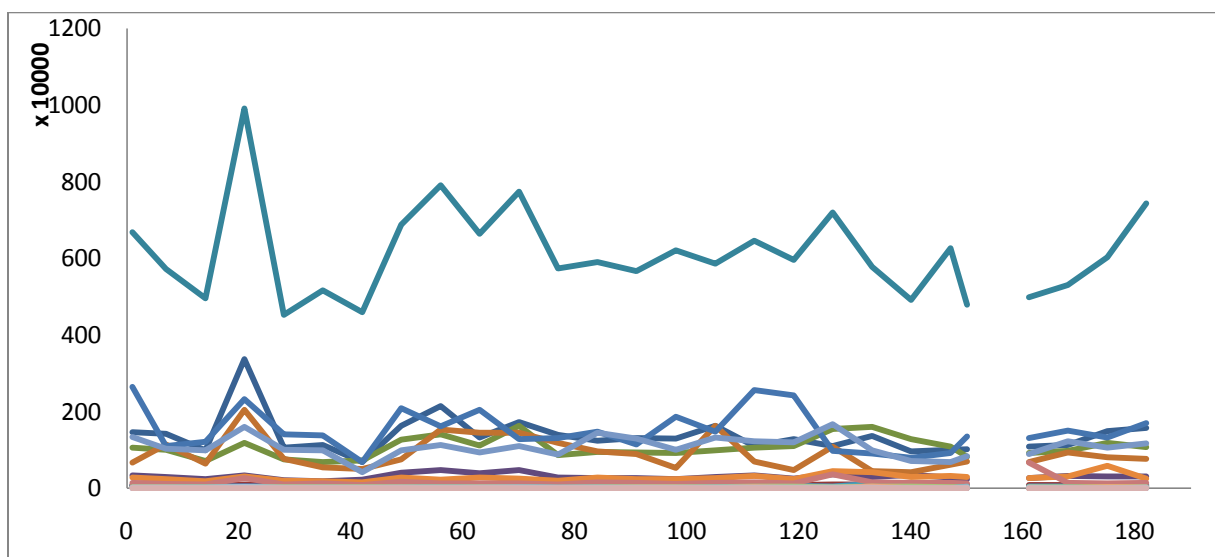
ΑΘΛΗΤΗΣ Α7



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 23 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 0,73-2,76 ppm του αθλητή Α7 που εμπεριέχει 24 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

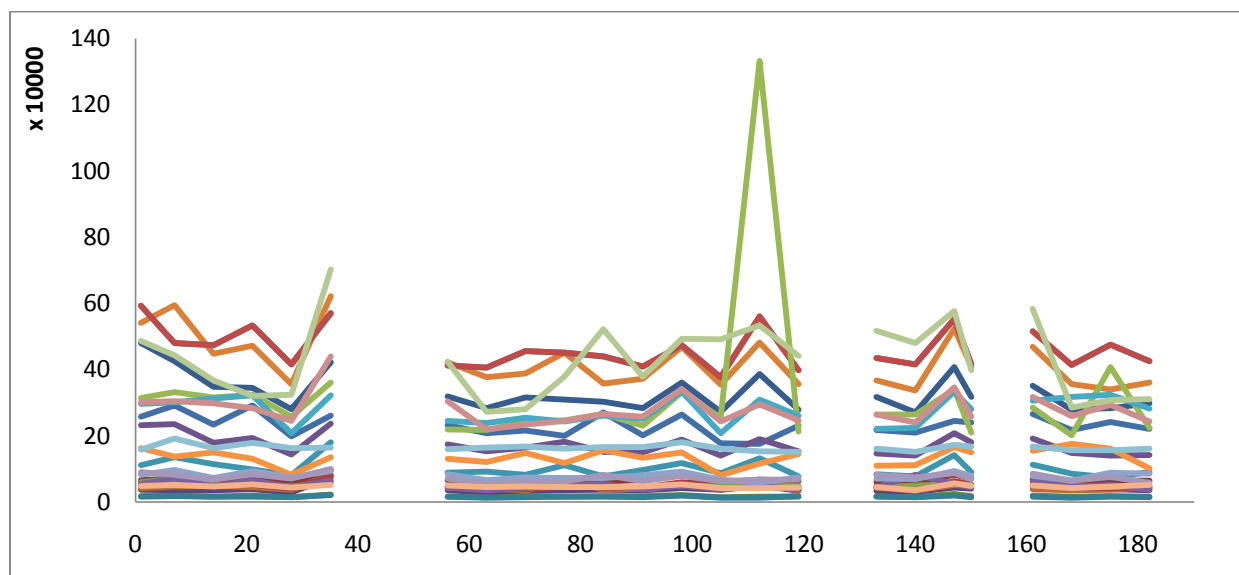


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 24 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 2,78-3,23 ppm του αθλητή Α7 που εμπεριέχει 11 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

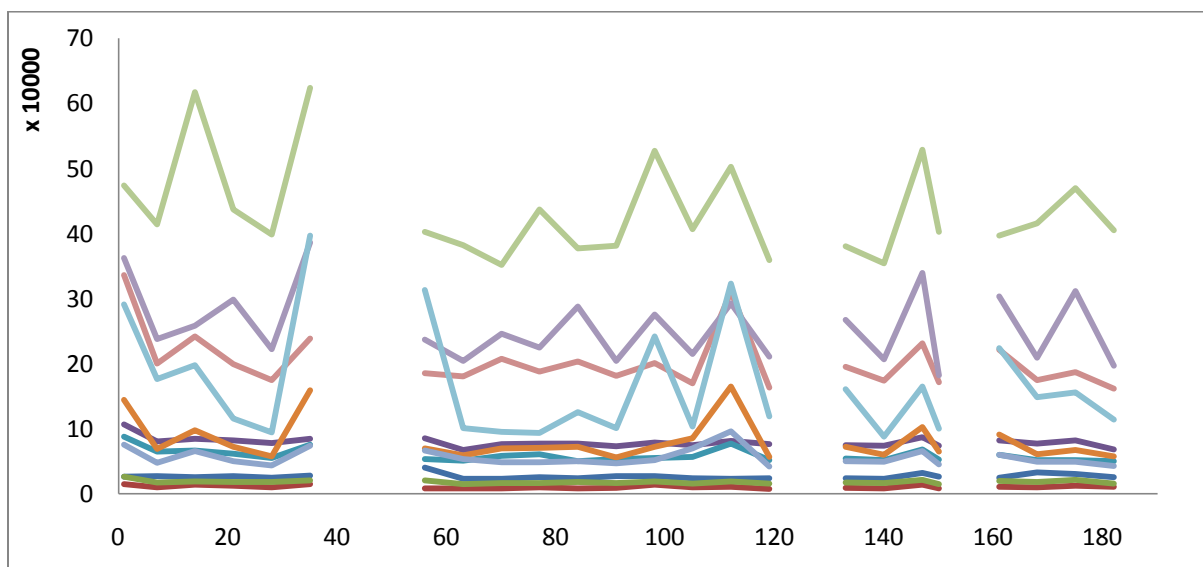


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 25 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 3,24-9,3 ppm του αθλητή Α7 που εμπεριέχει 19 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

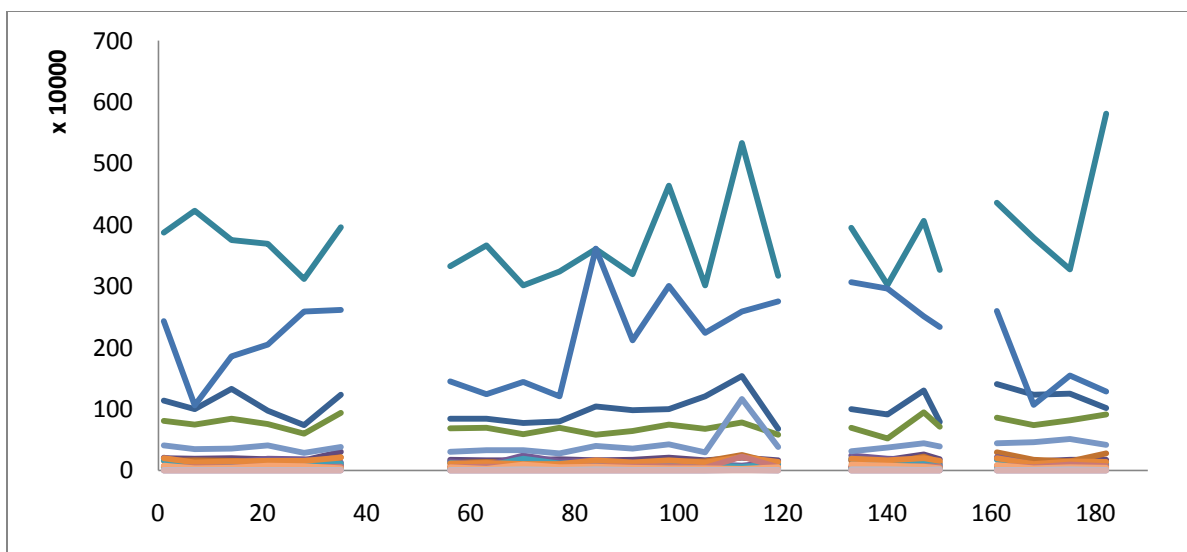
ΑΘΛΗΤΗΣ Α9



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 26 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 0,73-2,76 ppm του αθλητή Α9 που εμπεριέχει 24 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

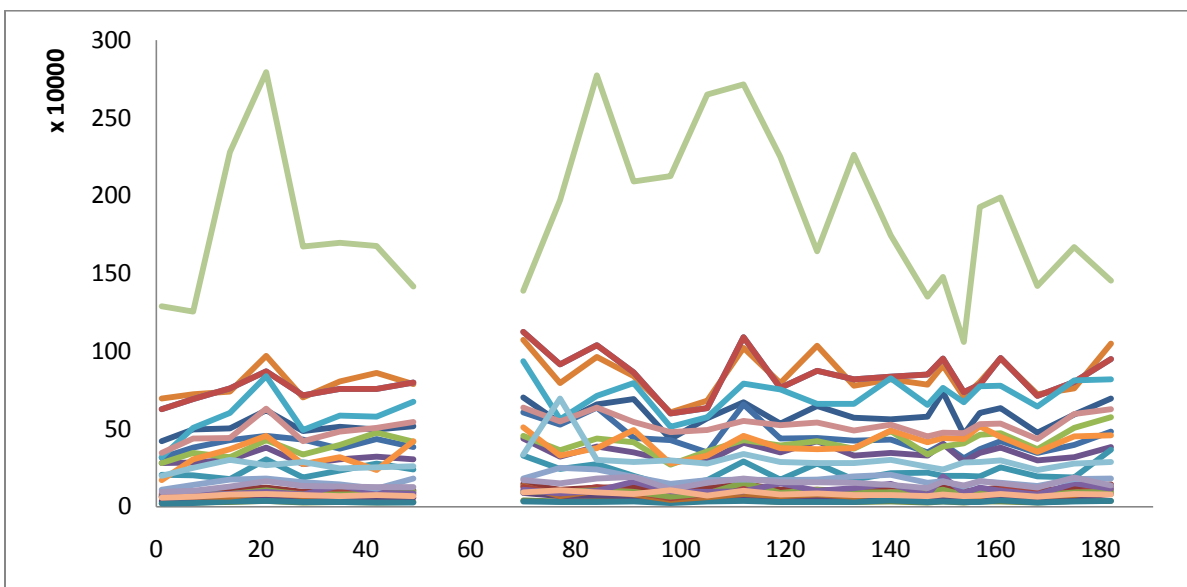


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 27 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 2,78-3,23 ppm του αθλητή Α9 που εμπεριέχει 11 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

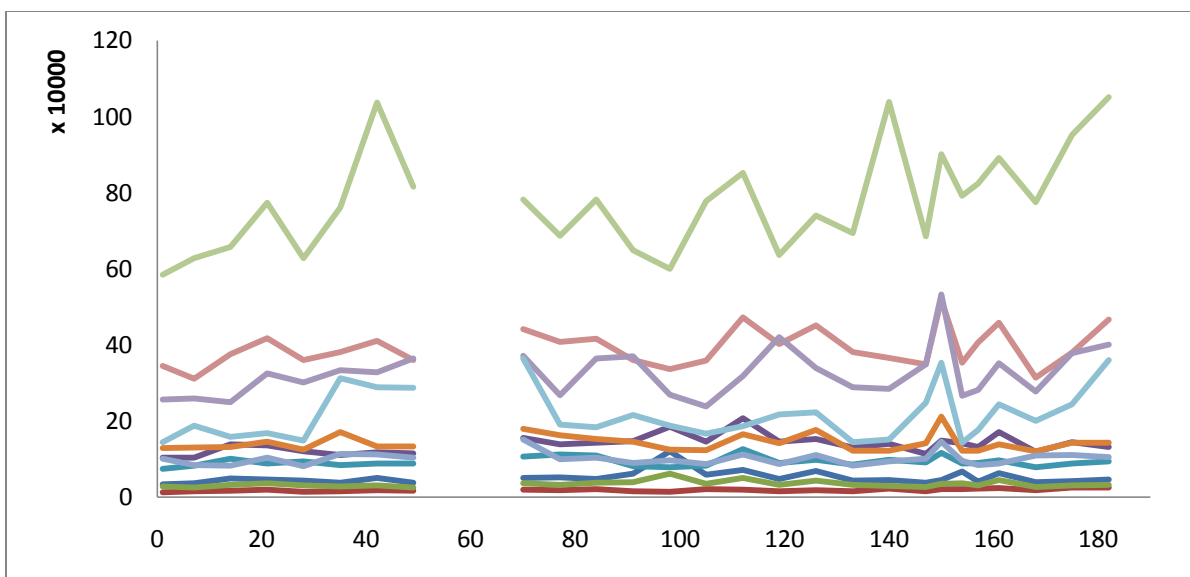


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 28 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 3,24-9,3 ppm του αθλητή Α9 που εμπεριέχει 19 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

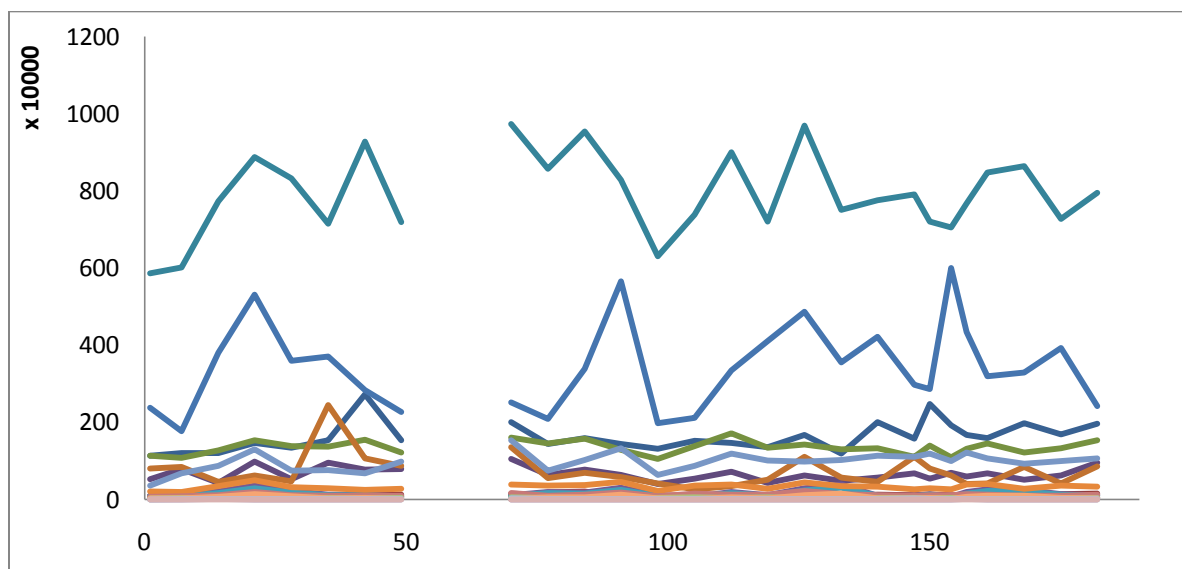
ΑΘΛΗΤΡΙΑ Α11



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 29 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 0,73-2,76 ppm της αθλήτριας Α11 που εμπεριέχει 24 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

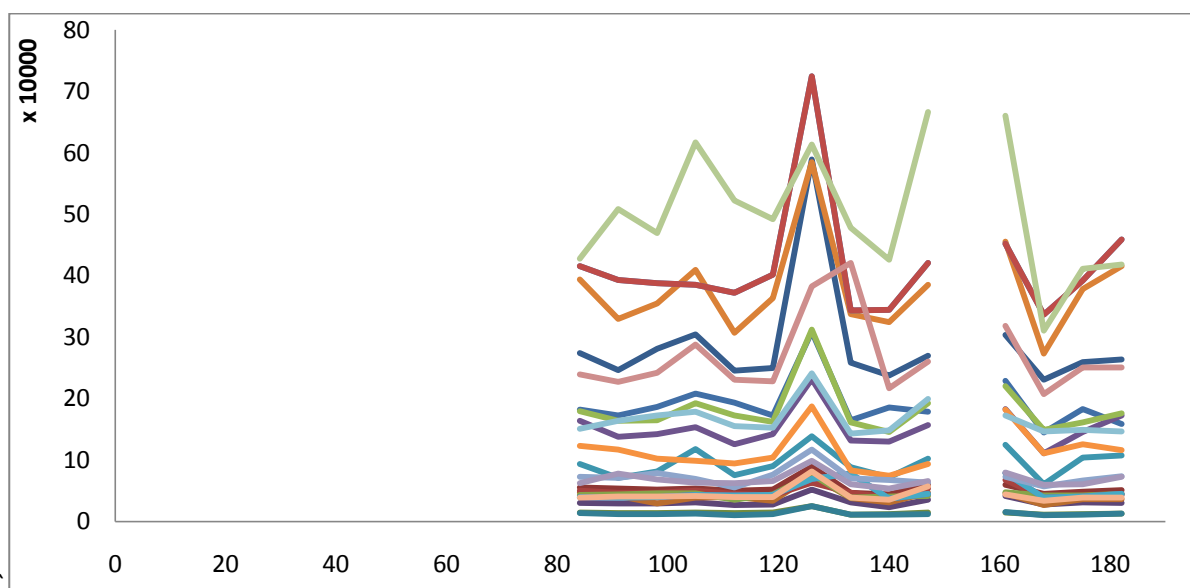


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 30 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 2,78-3,23 ppm της αθλήτριας A11 που εμπεριέχει 11 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

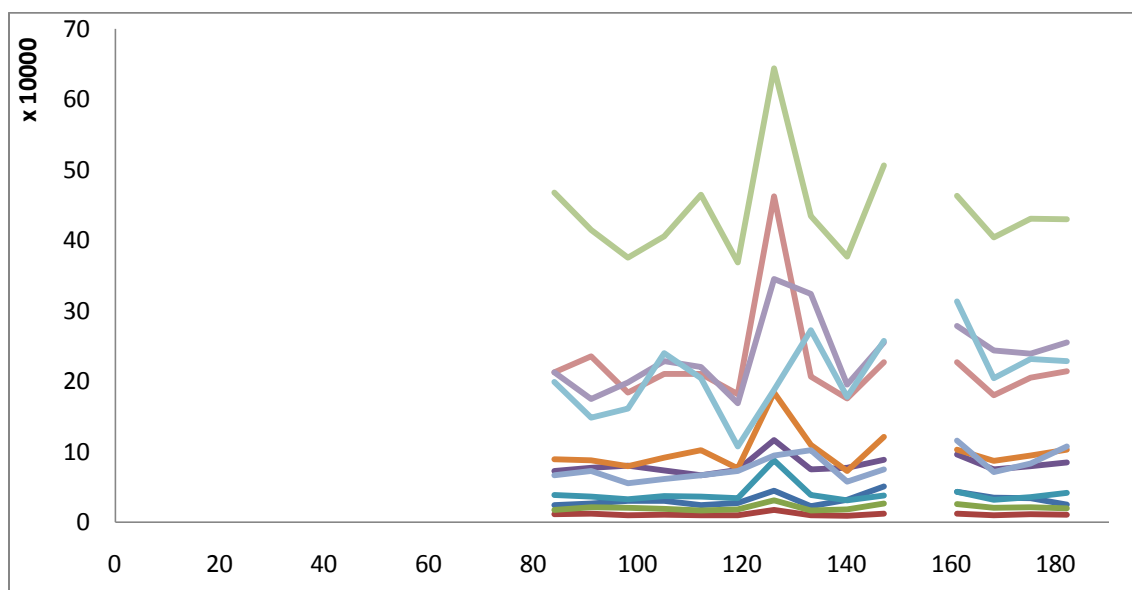


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 31 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 3,24-9,3 ppm της αθλήτριας A11 που εμπεριέχει 19 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

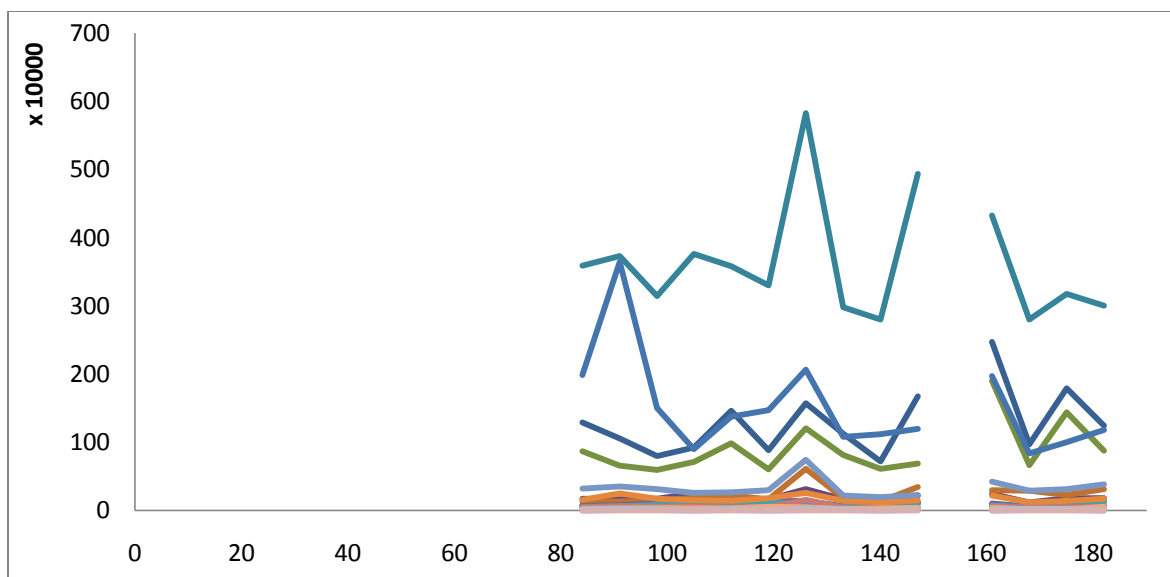
ΑΘΛΗΤΗΣ Α12



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 32 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 0,73-2,76 ppm του αθλητή Α12 που εμπεριέχει 24 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 33 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 2,78-3,23 ppm του αθλητή Α12 που εμπεριέχει 11 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

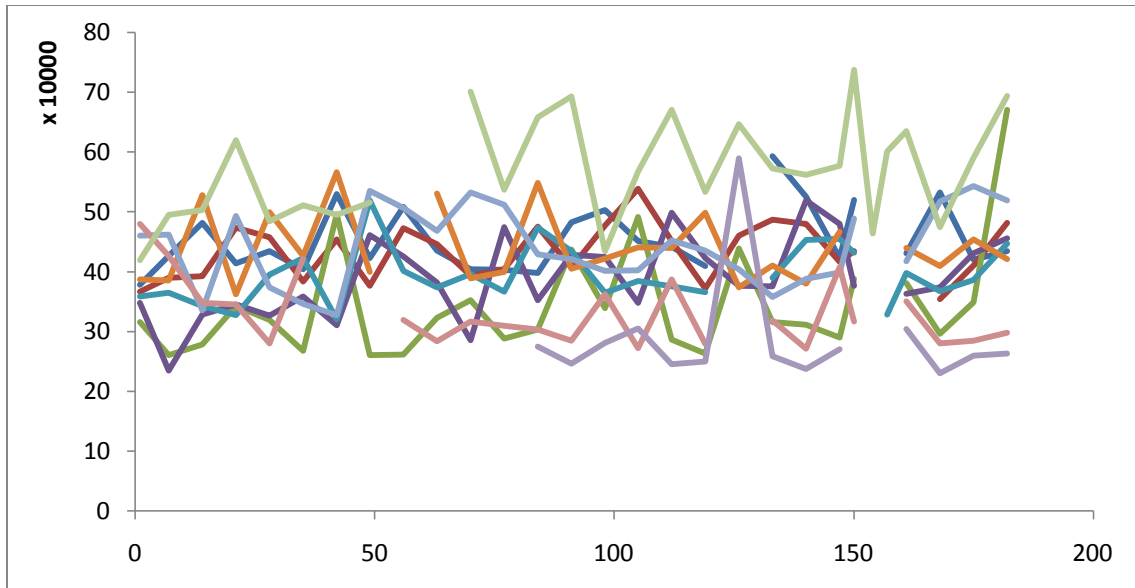


ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 34 Απεικόνιση της φασματικής περιοχής 3,24-9,3 ppm του αθλητή A12 που εμπεριέχει 19 μεταβολίτες/διαστήματα μεταβολιτών. Κάθε γραμμή στο διάγραμμα αντιστοιχεί και σε κάθε ένα μεταβολίτη/διάστημα αντίστοιχα.

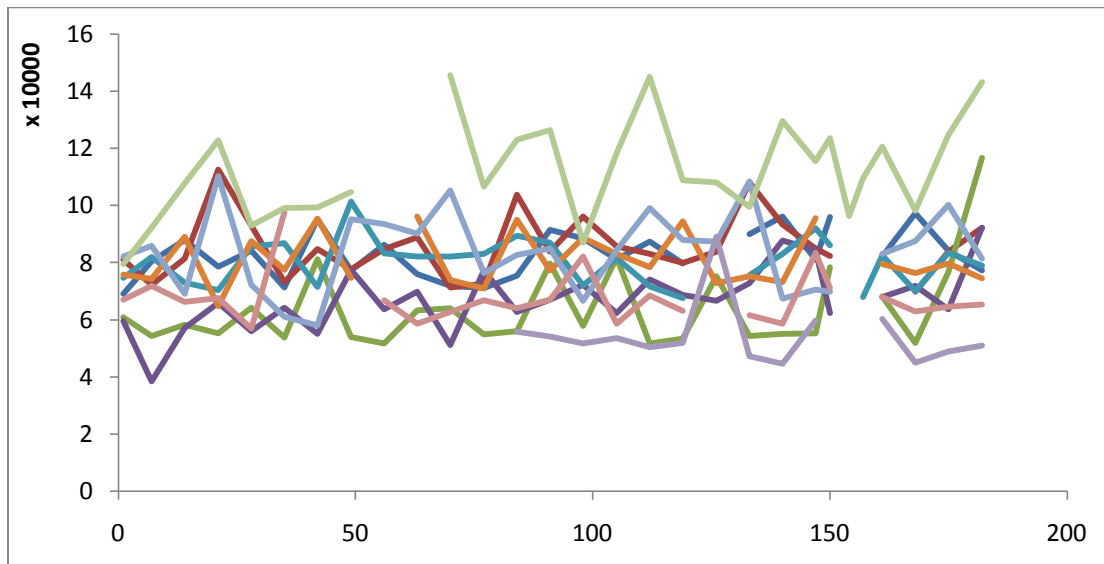
[7^{B.7}] ΧΡΟΝΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ/ΔΙΑΣΤΗΜΑΤΩΝ (INTERVALS) ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΝΑ ΑΘΛΗΤΗ/ΤΡΙΑ

- A1
- A2
- A3
- A4
- A5
- A6
- A7
- A9
- A11
- A12

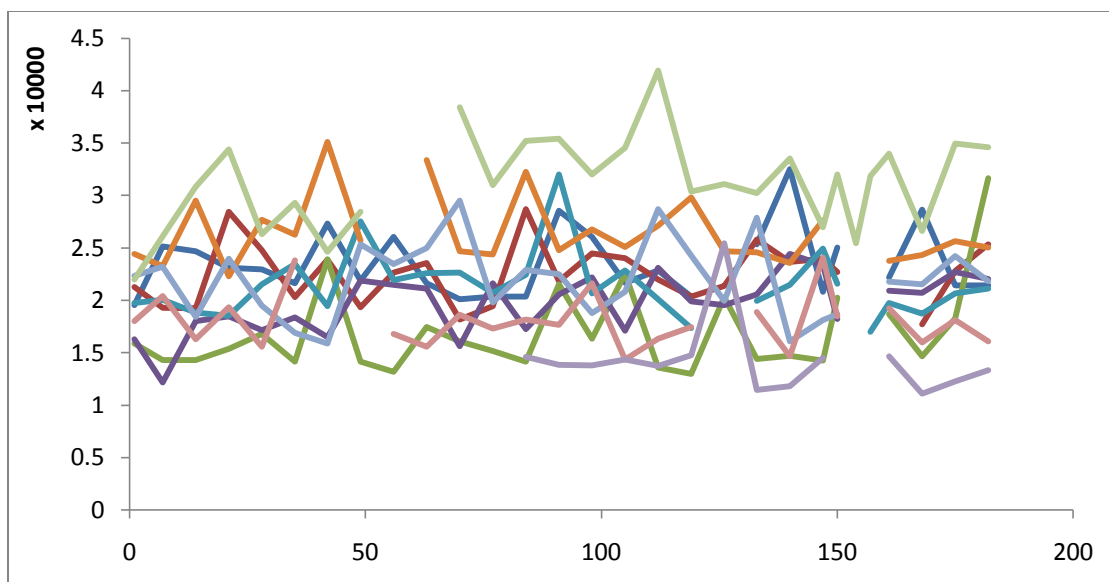
ΕΙΚΟΝΑ 50. Αντιστοίχιση χρώματος γραμμών όλων των διαγραμμάτων με αθλητές



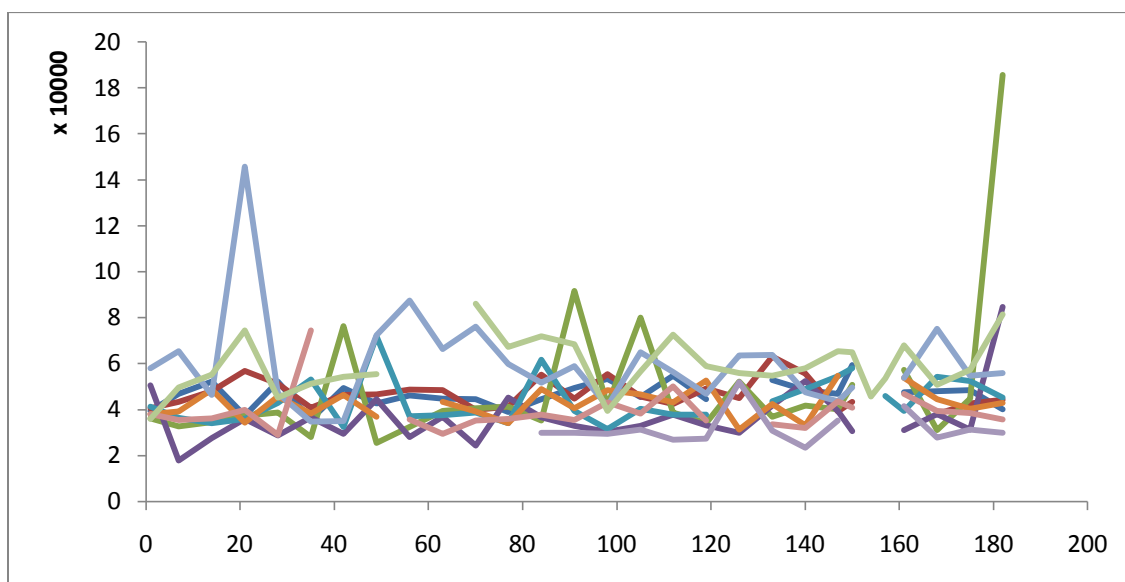
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 35. Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 0,73-0,98 σε όλους τους αθλητές.



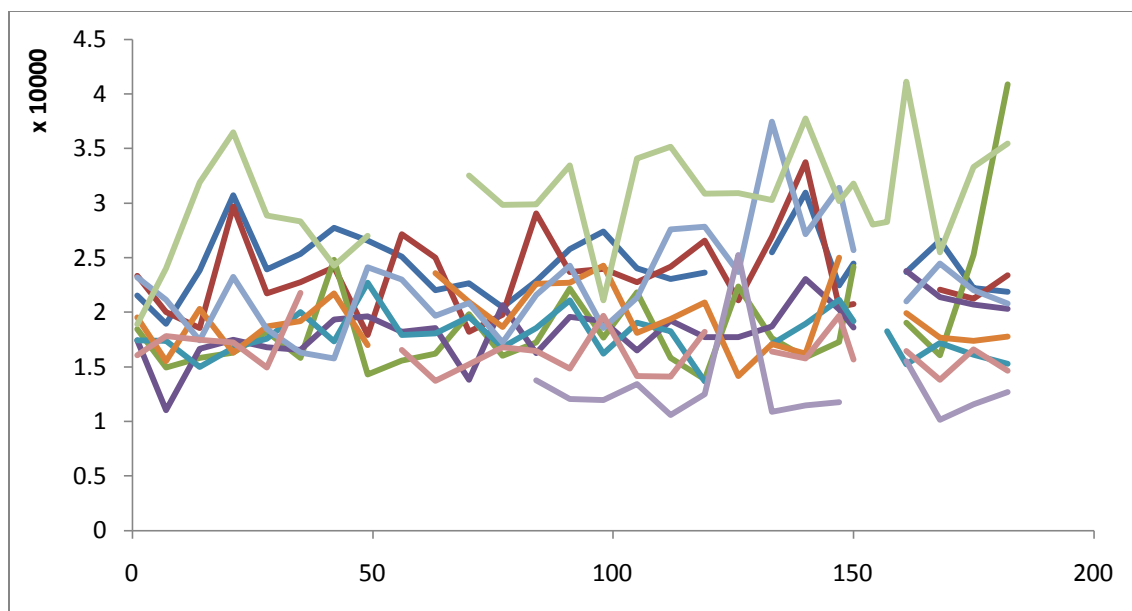
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 36 Χρονική πορεία/διακύμανση βαλίνης σε όλους τους αθλητές



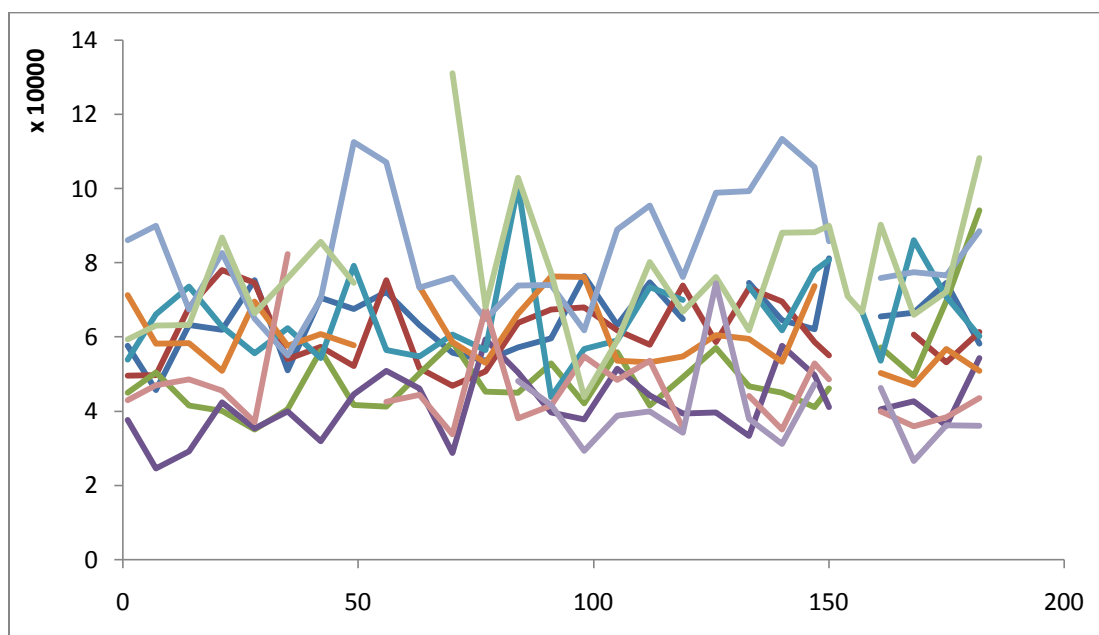
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 37 Χρονική πορεία/διακύμανση ισολευκίνης σε όλους τους αθλητές



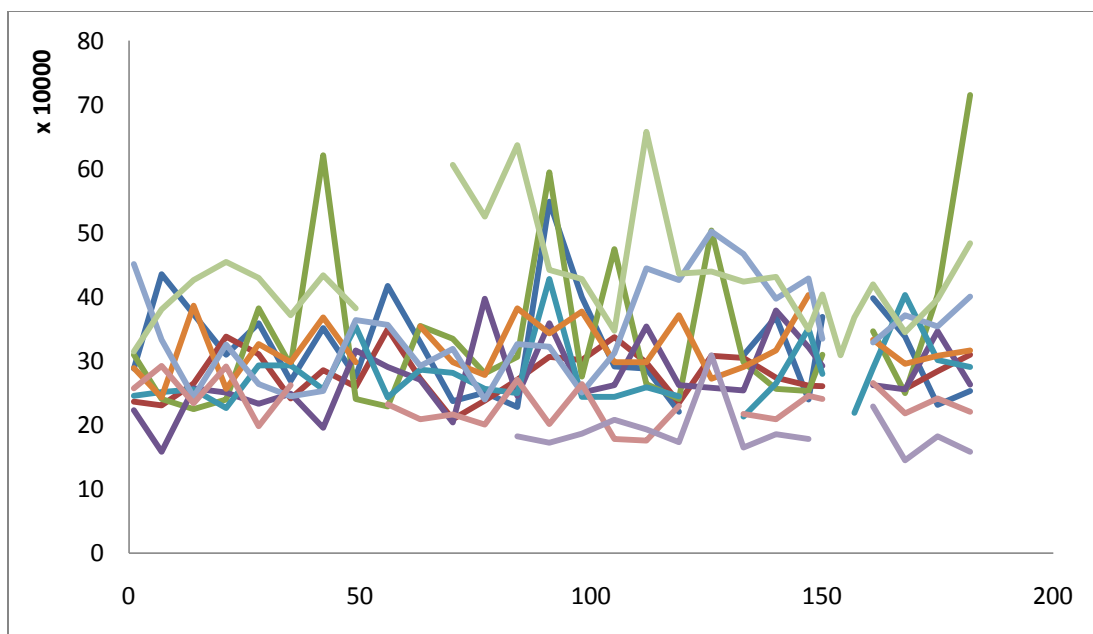
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 38 Χρονική πορεία/διακύμανση του 3-OH-ισοβουτυρικού σε όλους τους αθλητές



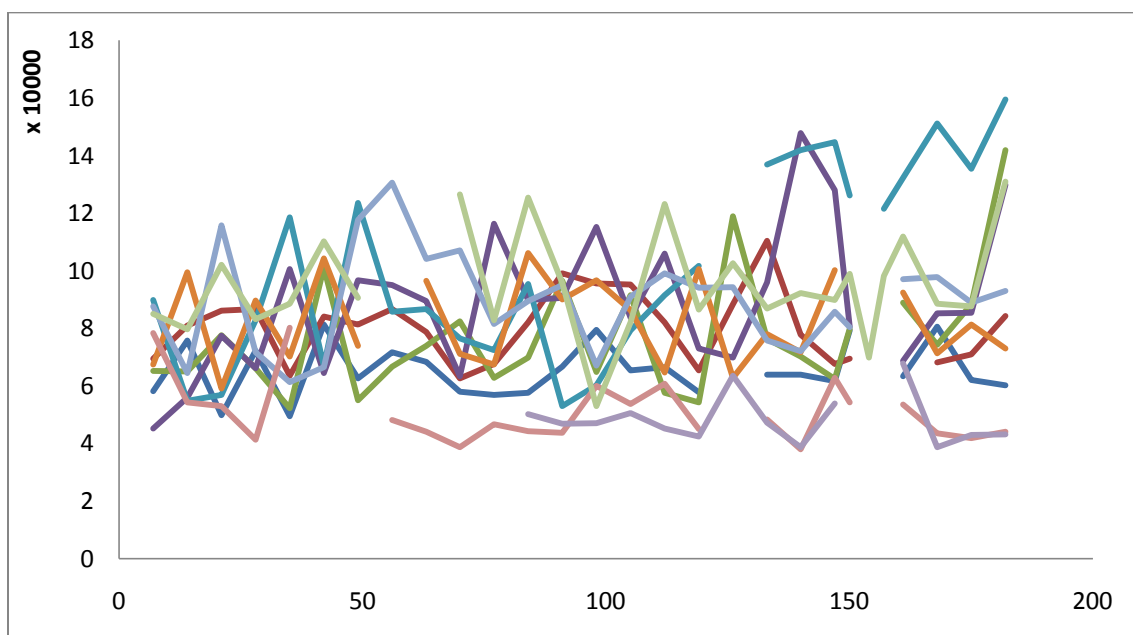
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 39 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος άγνωστης διπλής κορυφής στα 1,09 rpm σε όλους τους αθλητές.



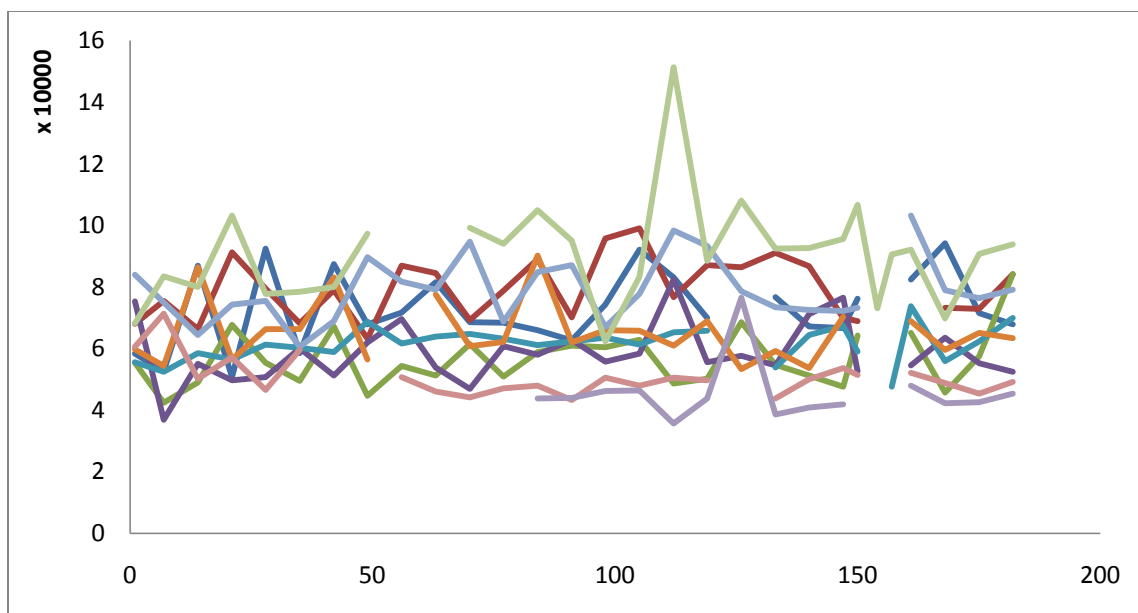
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 40 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 2-οξοισοβαλερικού σε όλους τους αθλητές.



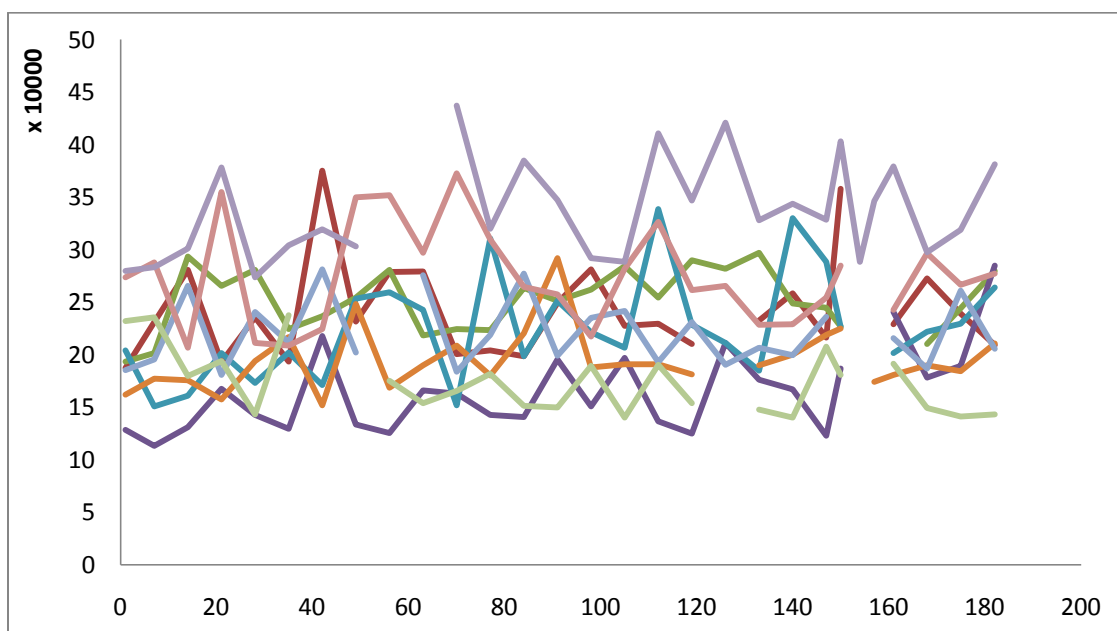
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 41 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 1,13-1,26 σε όλους τους αθλητές.



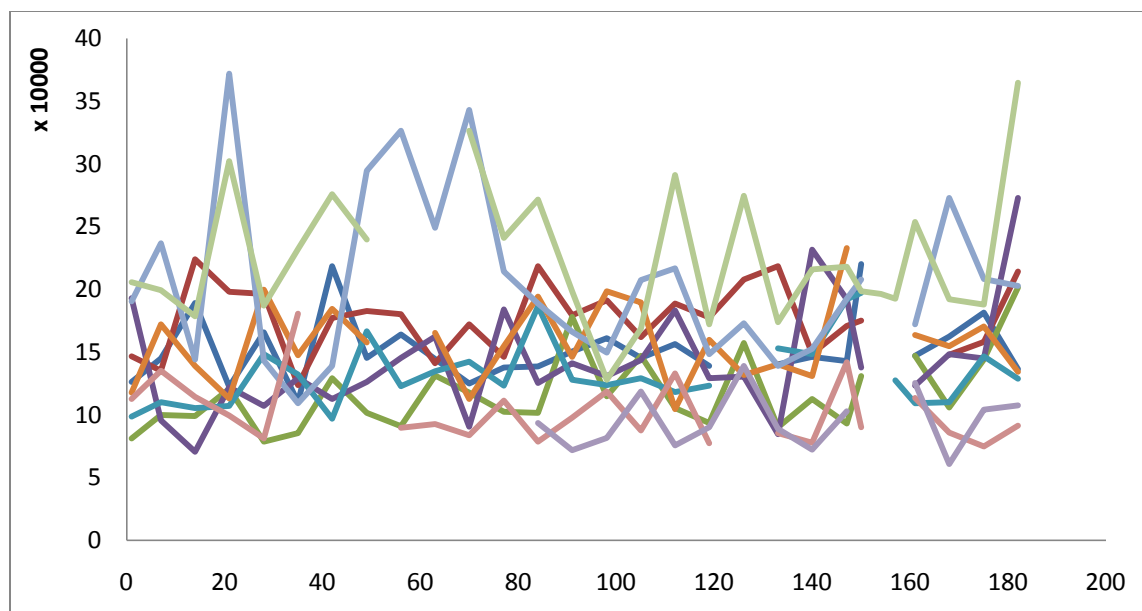
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 42 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 3-OH-ισοβαλερικού 1,27 ppm σε όλους τους αθλητές.



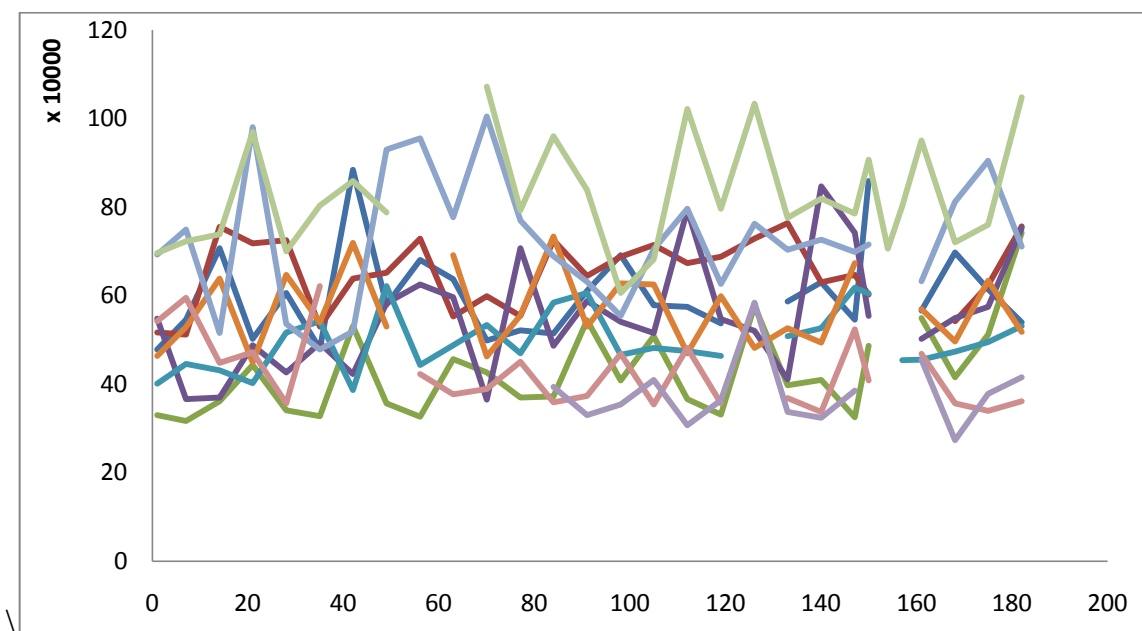
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 43 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος άγνωστης απλής κορυφής στα 1,36 rpm σε όλους τους αθλητές.



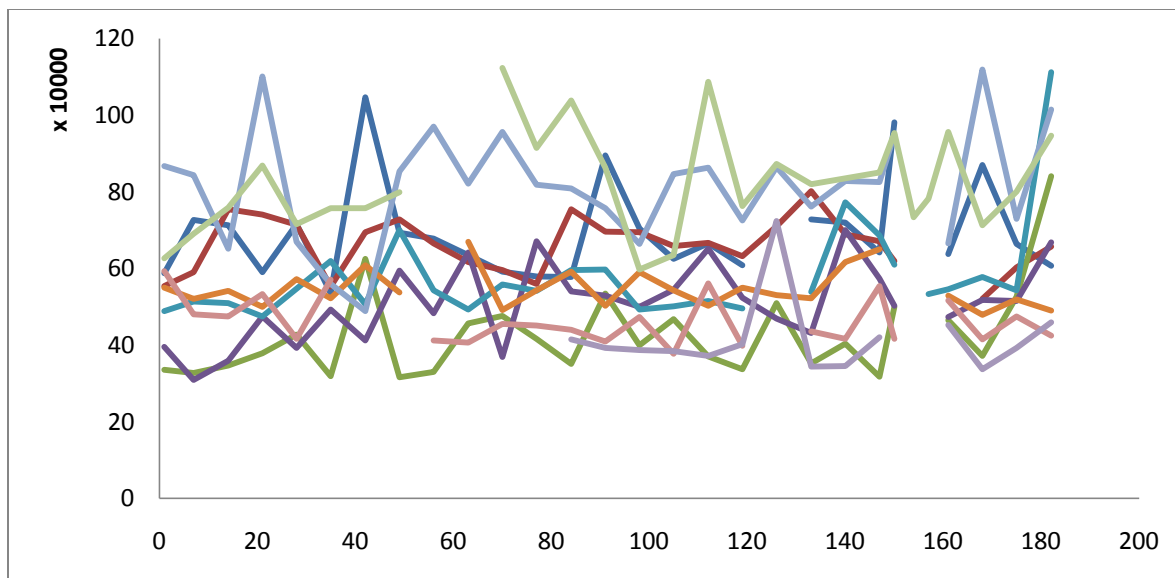
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 44 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 1,40-1,47 rpm σε όλους τους αθλητές.



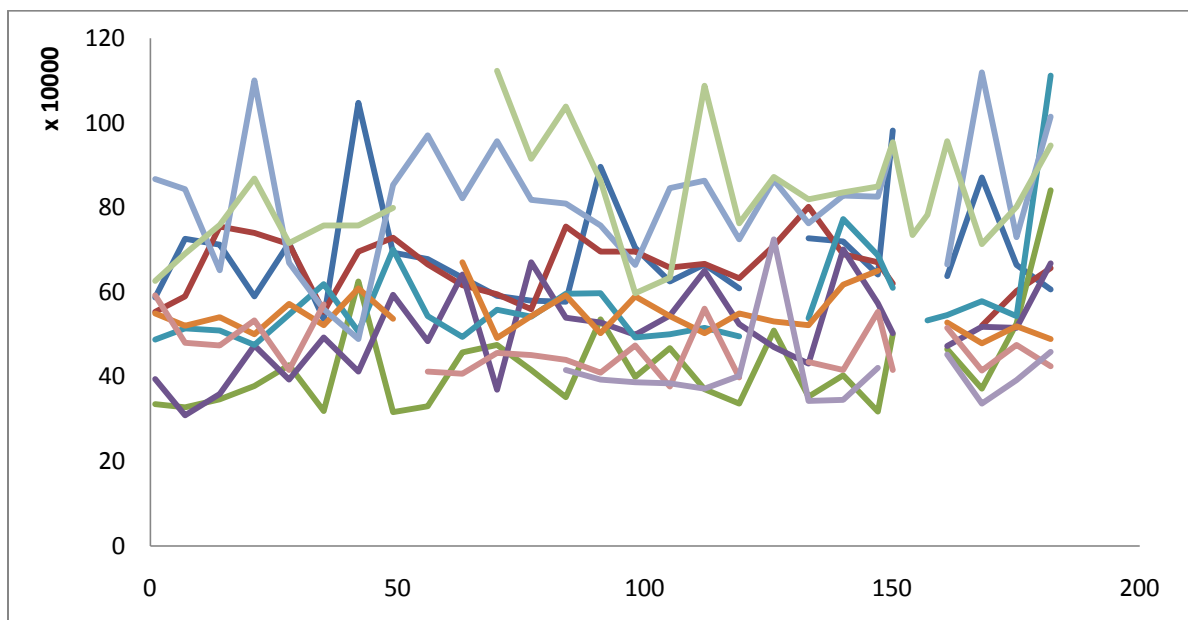
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 45 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος αλανίνης 1,49 ppm σε όλους τους αθλητές.



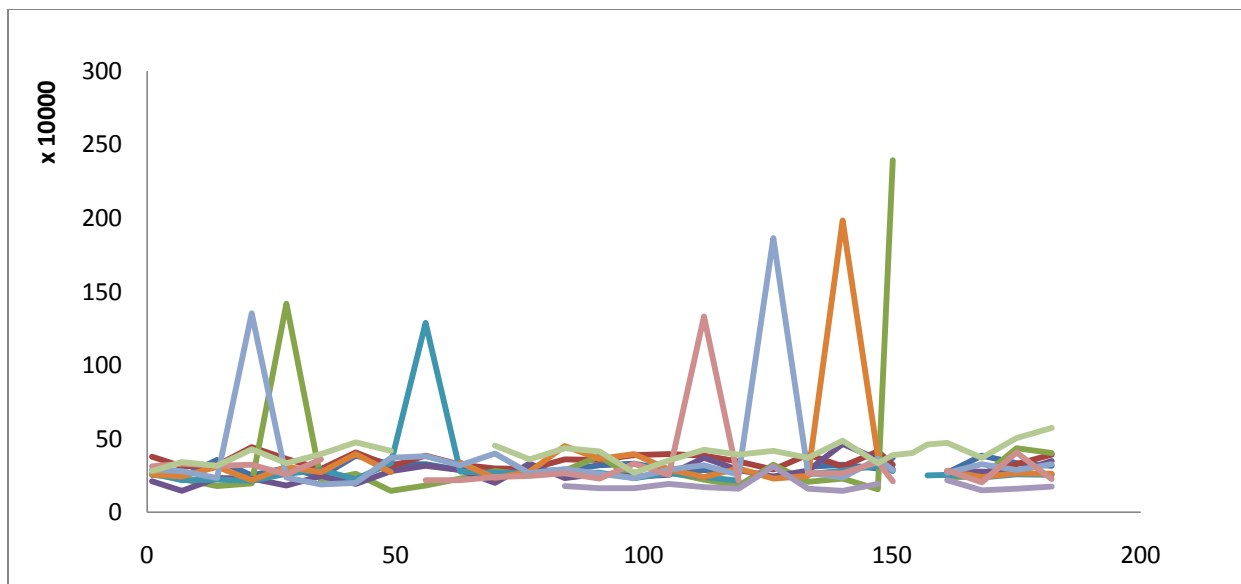
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 46 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 1,61-1,75 ppm σε όλους τους αθλητές.



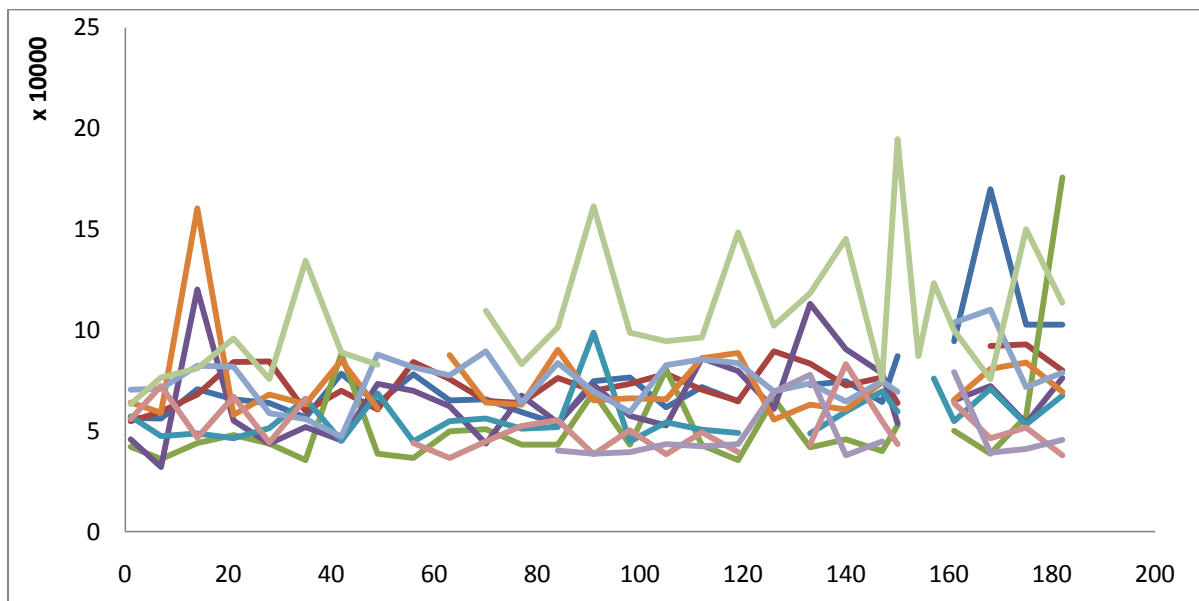
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 47 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 1,86-1,98 rpm σε όλους τους αθλητές.



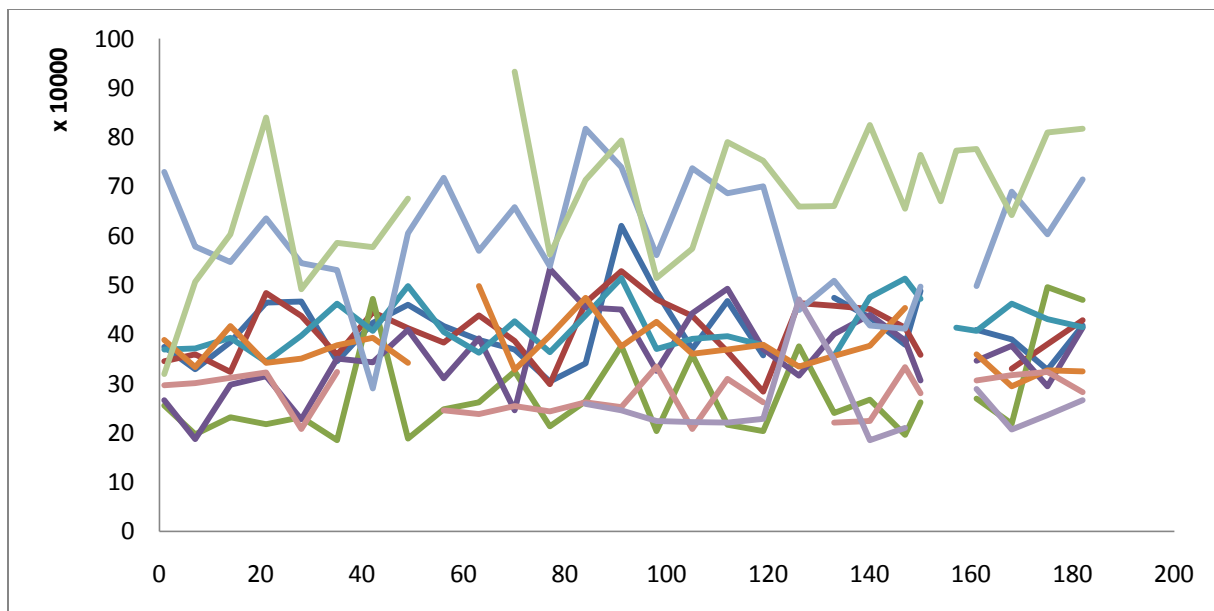
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 48 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 1,98-2,15 rpm σε όλους τους αθλητές.



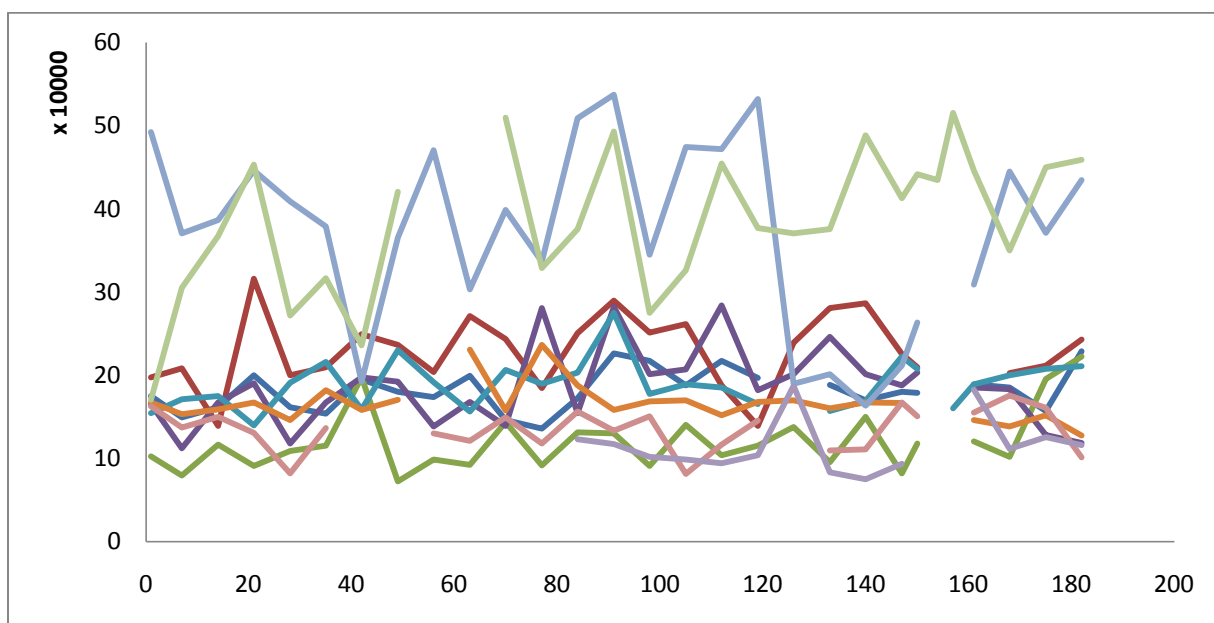
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 49 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 2,15-2,18 ppm σε όλους τους αθλητές.



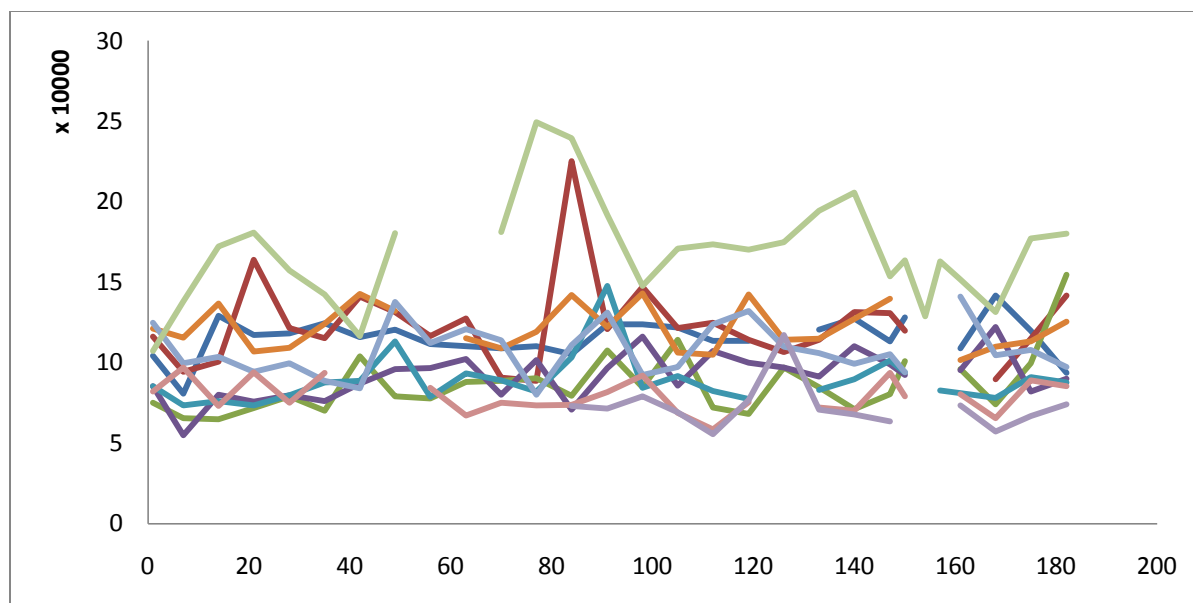
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 50 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος ακετοξικού οξέος 2,24 ppm σε όλους τους αθλητές.



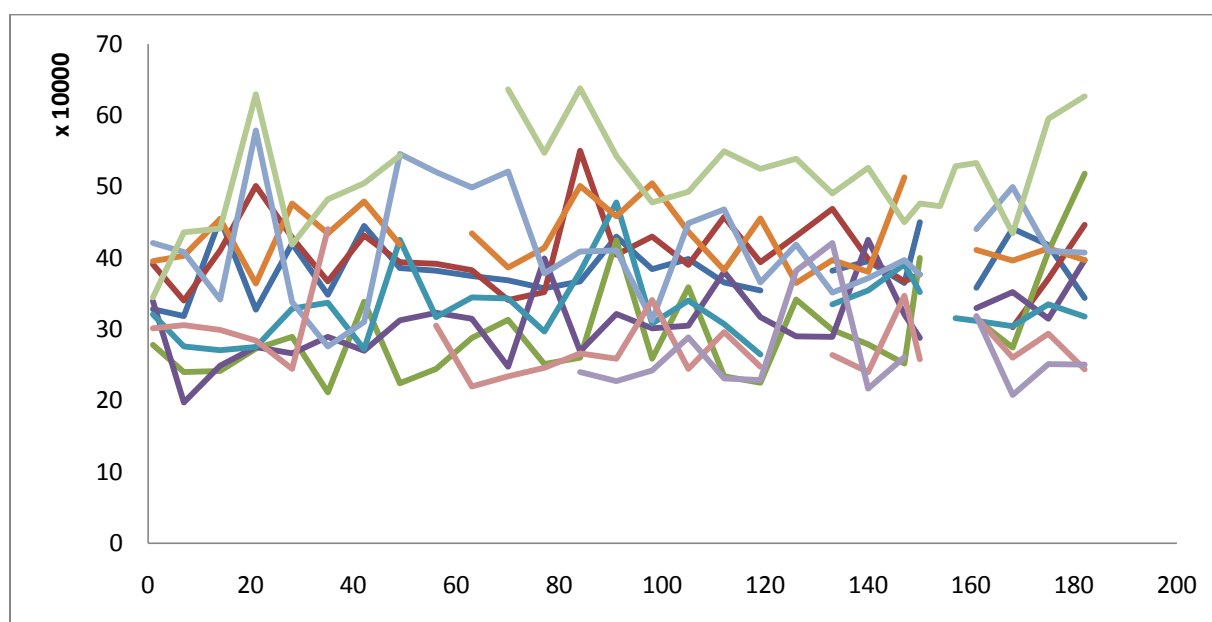
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 51 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 2,24-2,31 ppm σε όλους τους αθλητές.



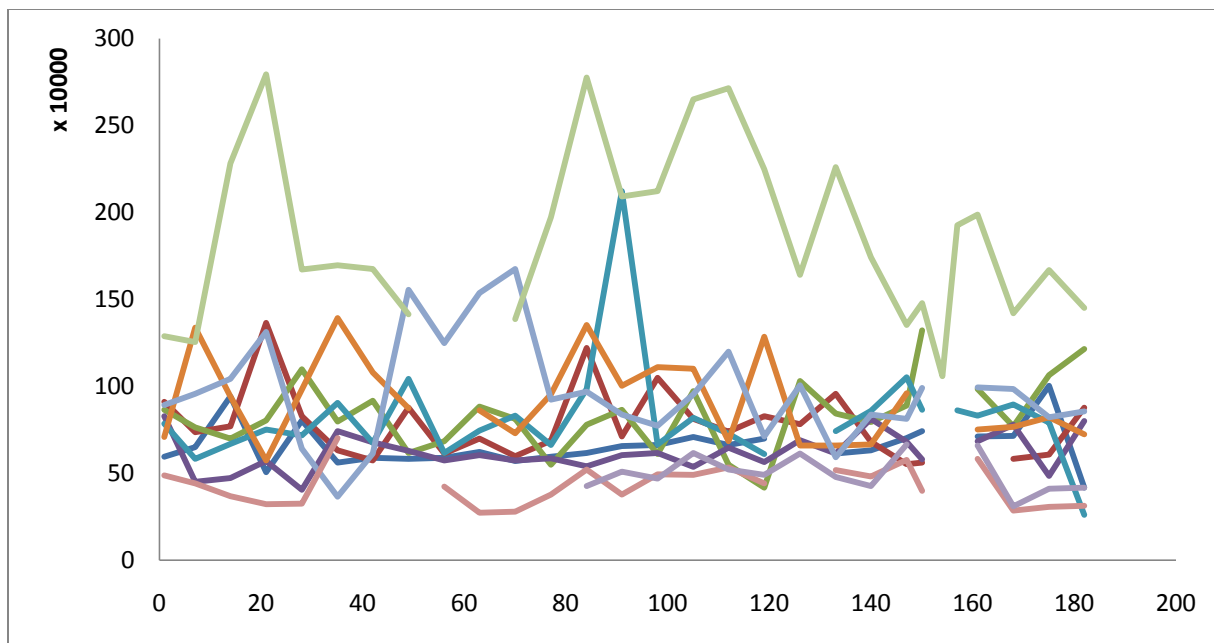
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 52 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 2,34 ppm σε όλους τους αθλητές.



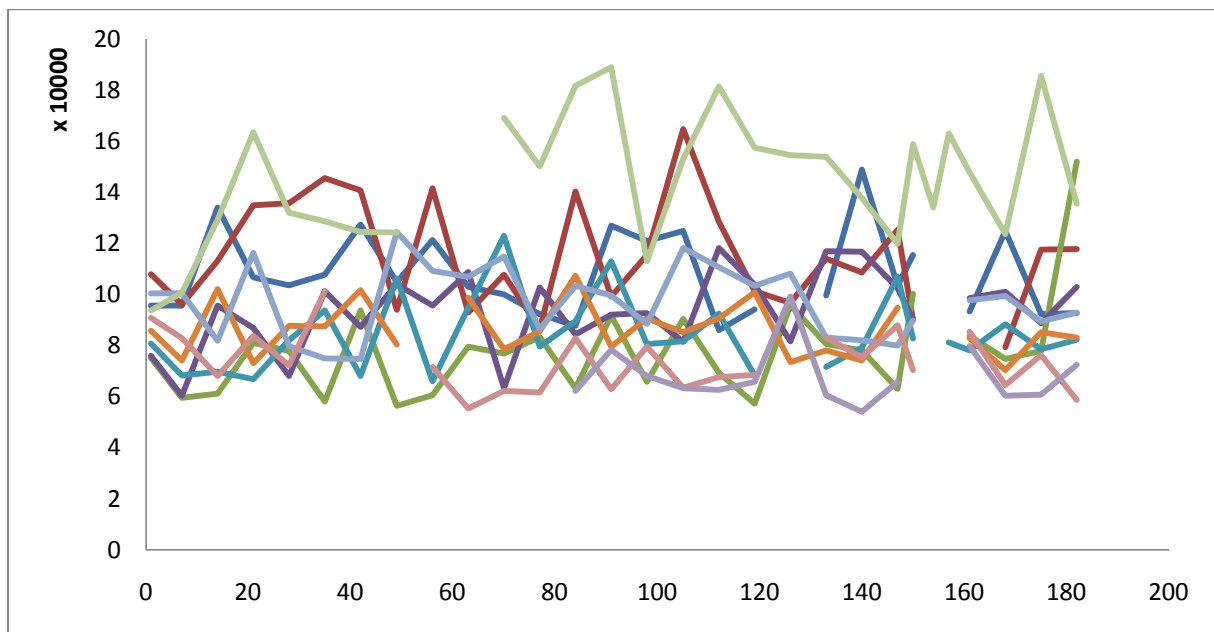
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 53 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 2,40-2,42 rpm σε όλους τους αθλητές.



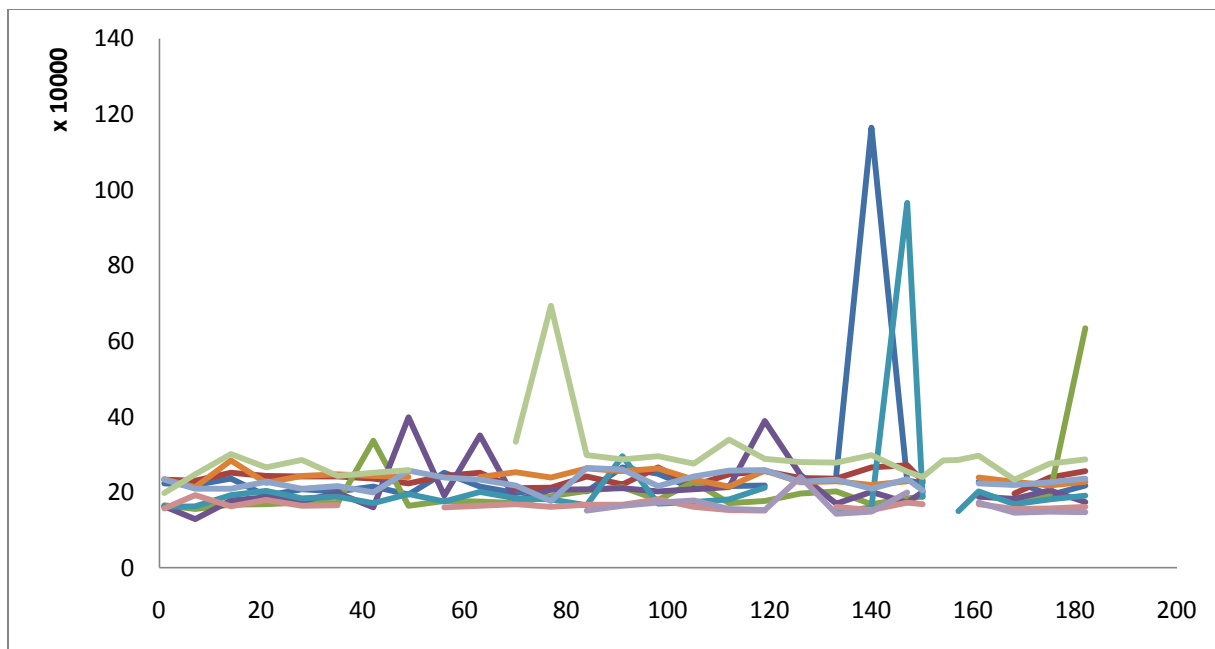
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 54 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 2,42-2,5 rpm σε όλους τους αθλητές.



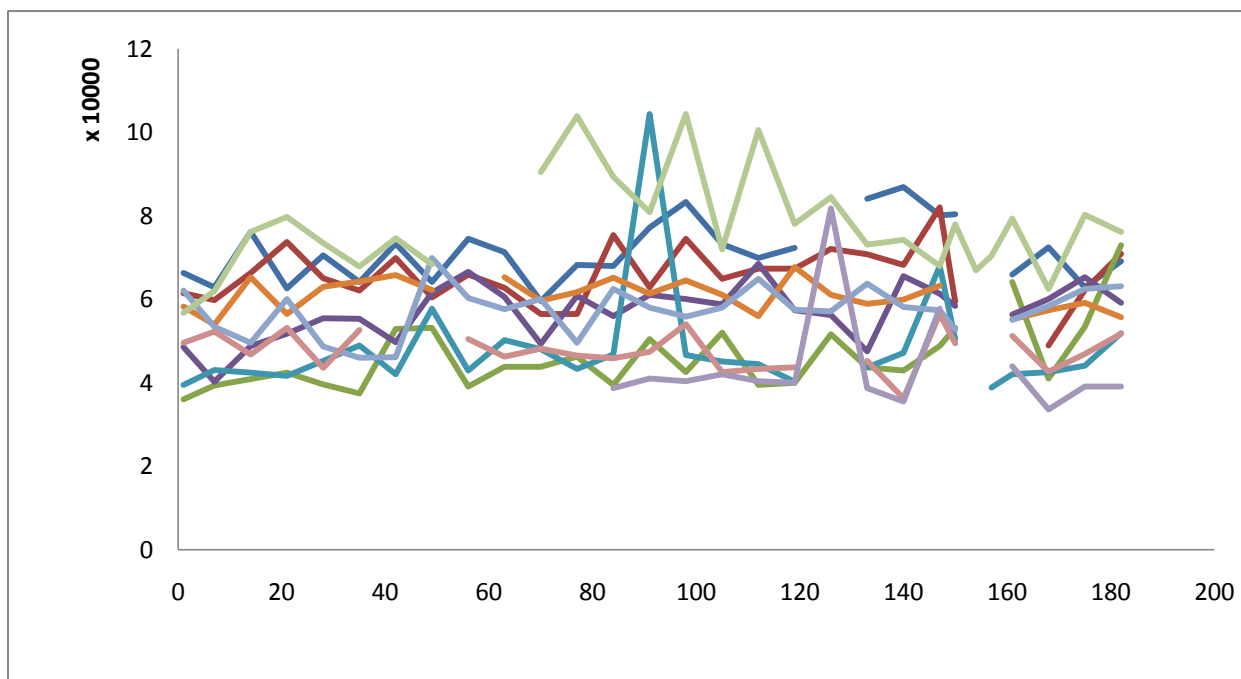
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 55 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος κιτρικού οξέος σε όλους τους αθλητές.



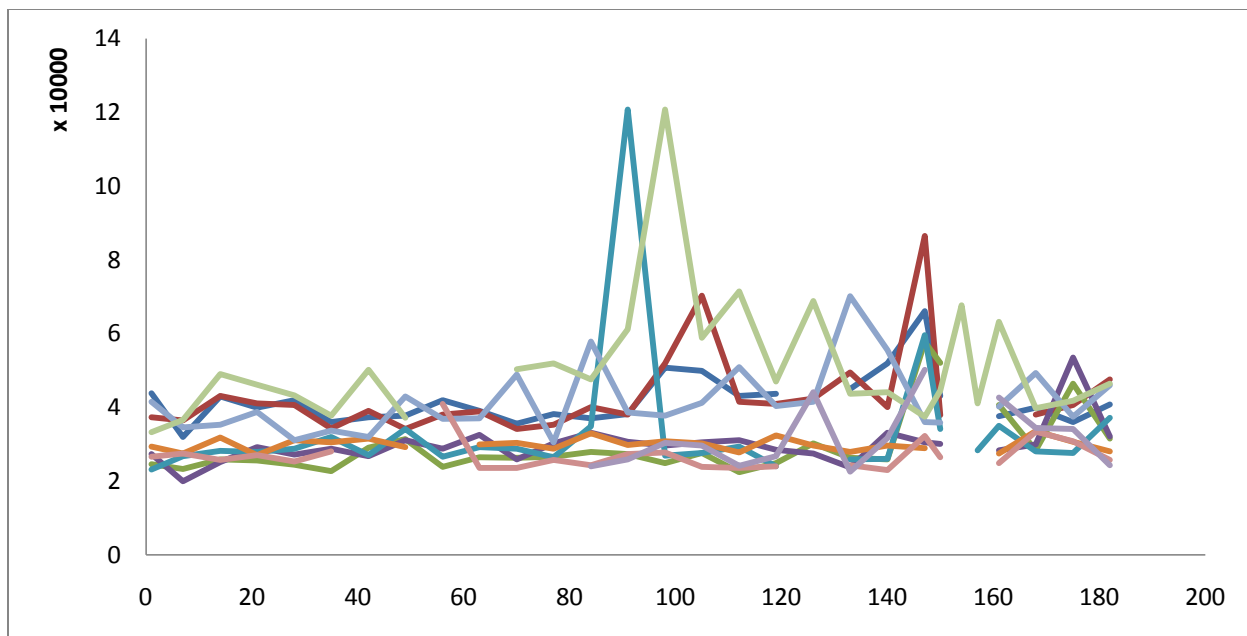
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 56 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 2,6-2,65 ppm σε όλους τους αθλητές.



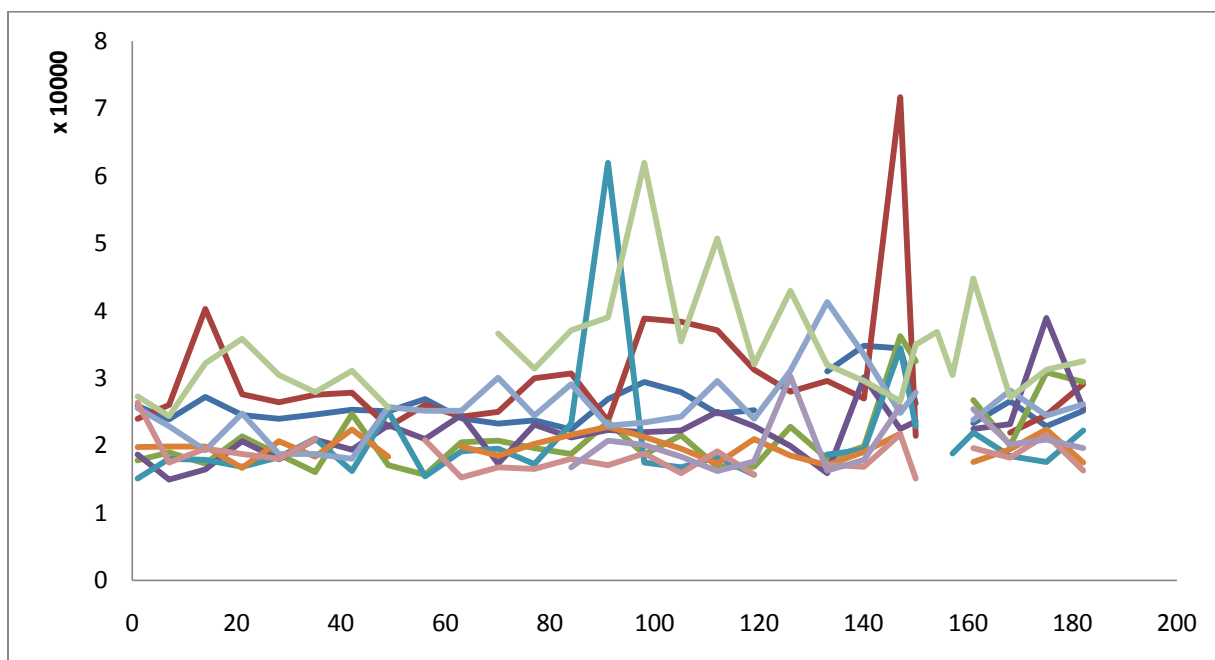
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 57 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος διμεθυλαμίνης 2,72 ppm σε όλους τους αθλητές.



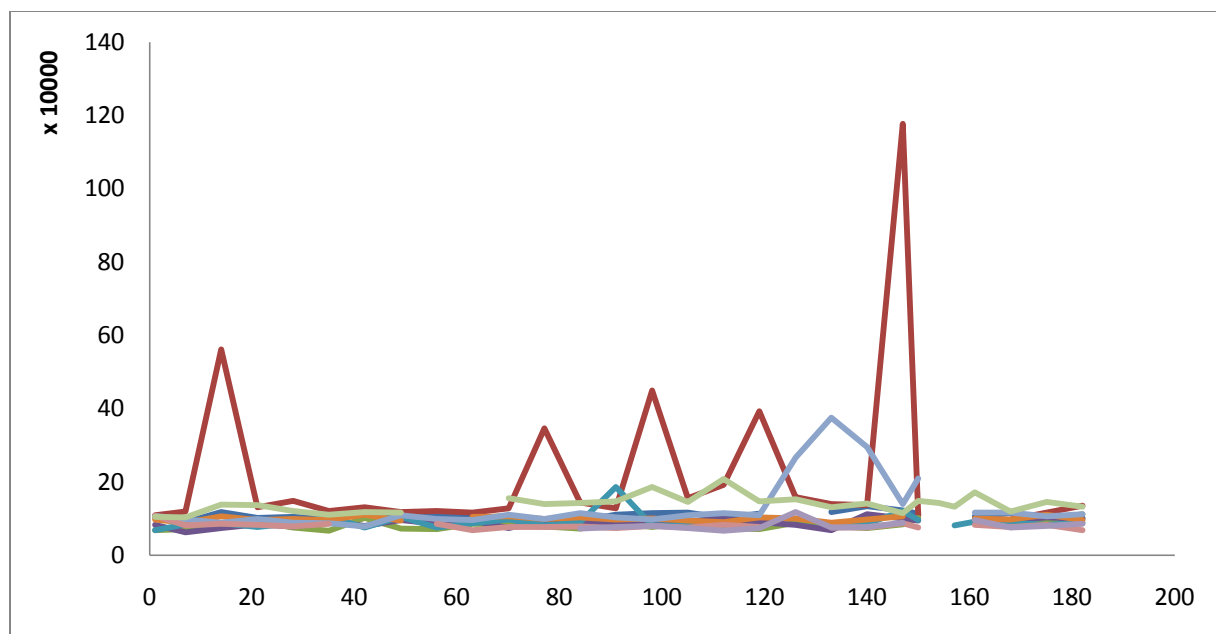
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 58 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 2,74-2,76 ppm σε όλους τους αθλητές.



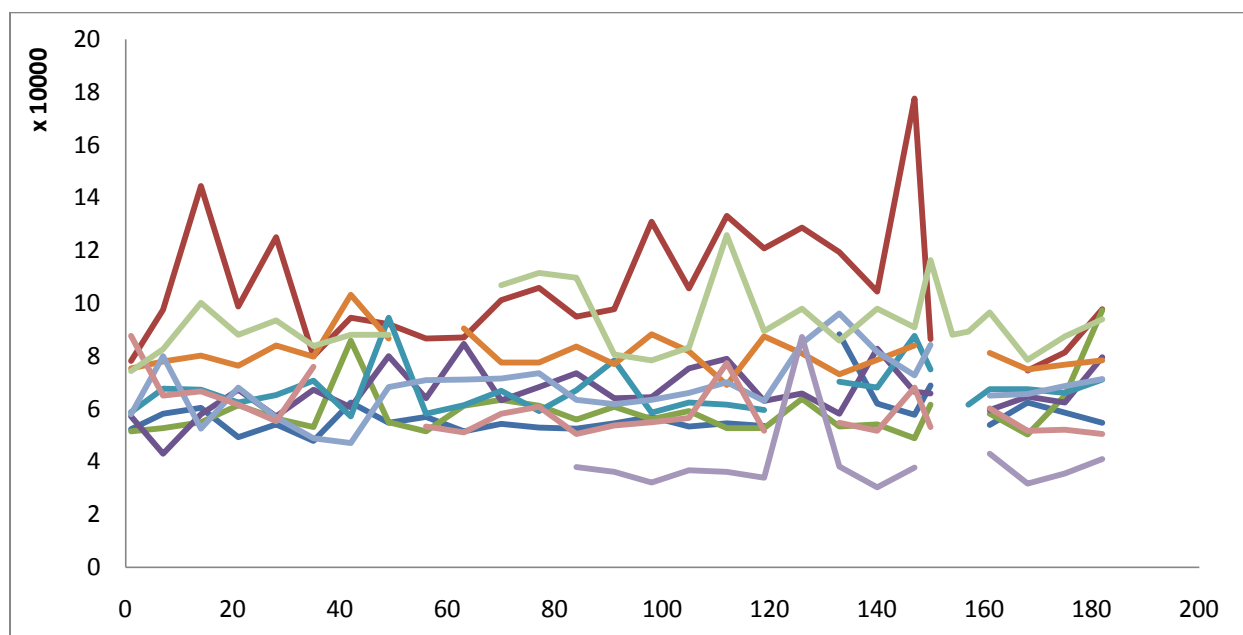
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 59 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος άγνωστης απλής 2,80 ppm σε όλους τους αθλητές.



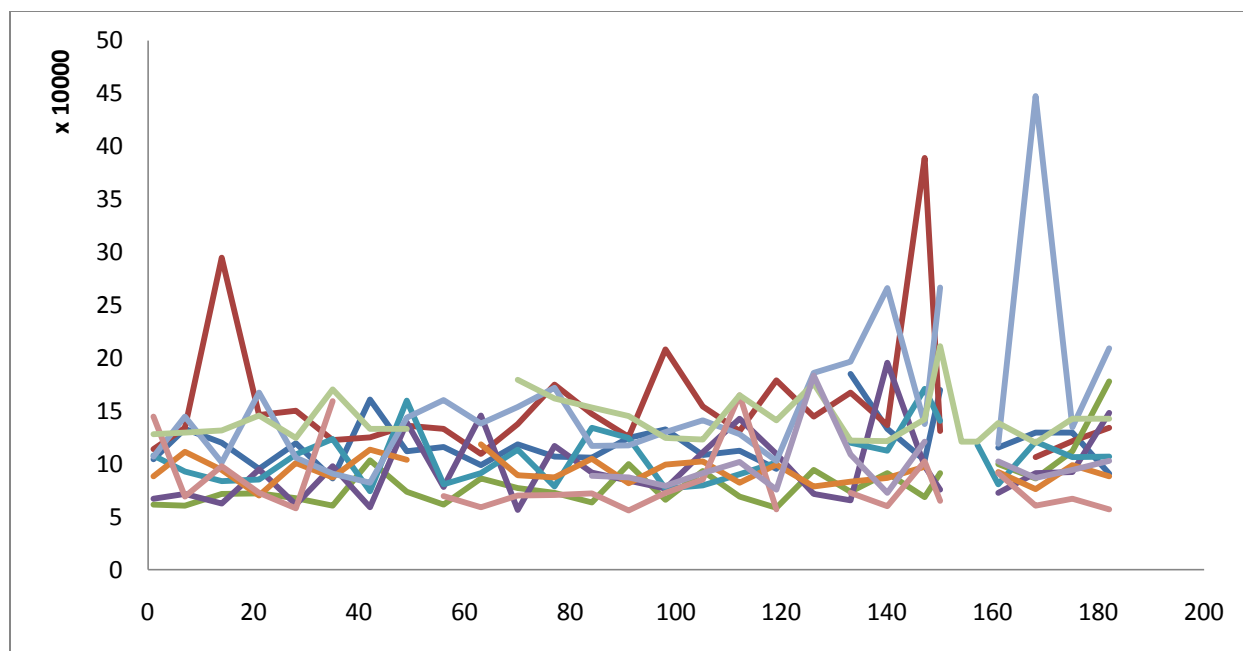
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 60 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος μεθυλγουανιδίνης 2,81 σε όλους τους αθλητές.



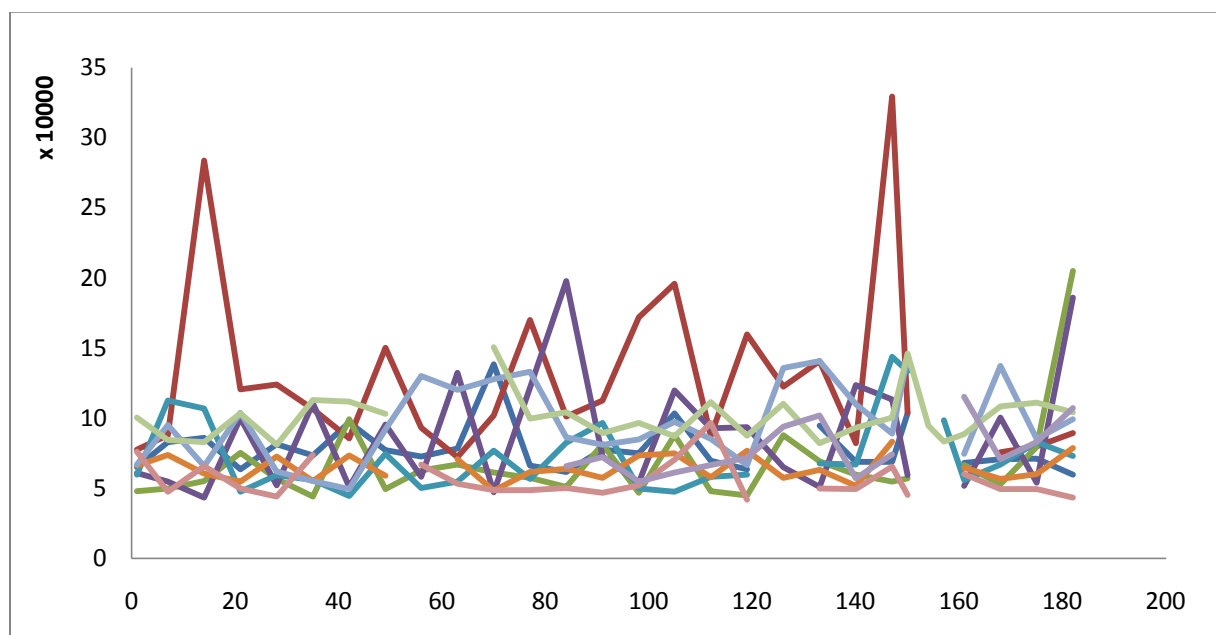
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 61 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος άγνωστης απλής 2,83 ppm σε όλους τους αθλητές.



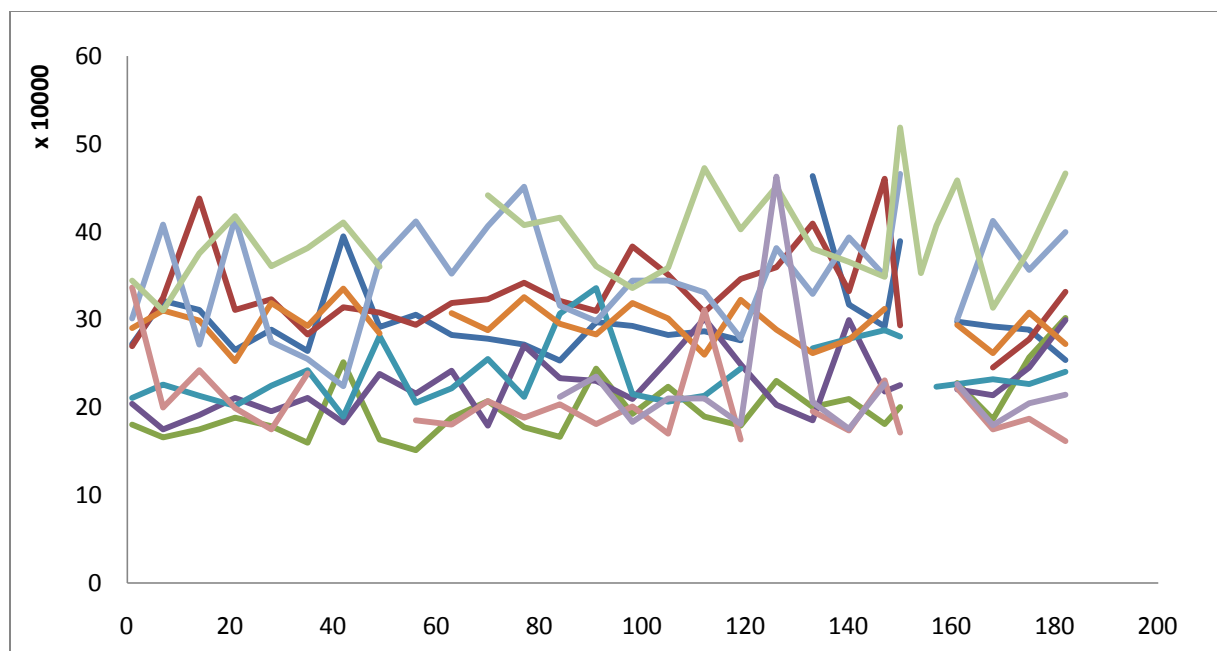
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 62 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος τριμεθυλαμίνης σε όλους τους αθλητές.



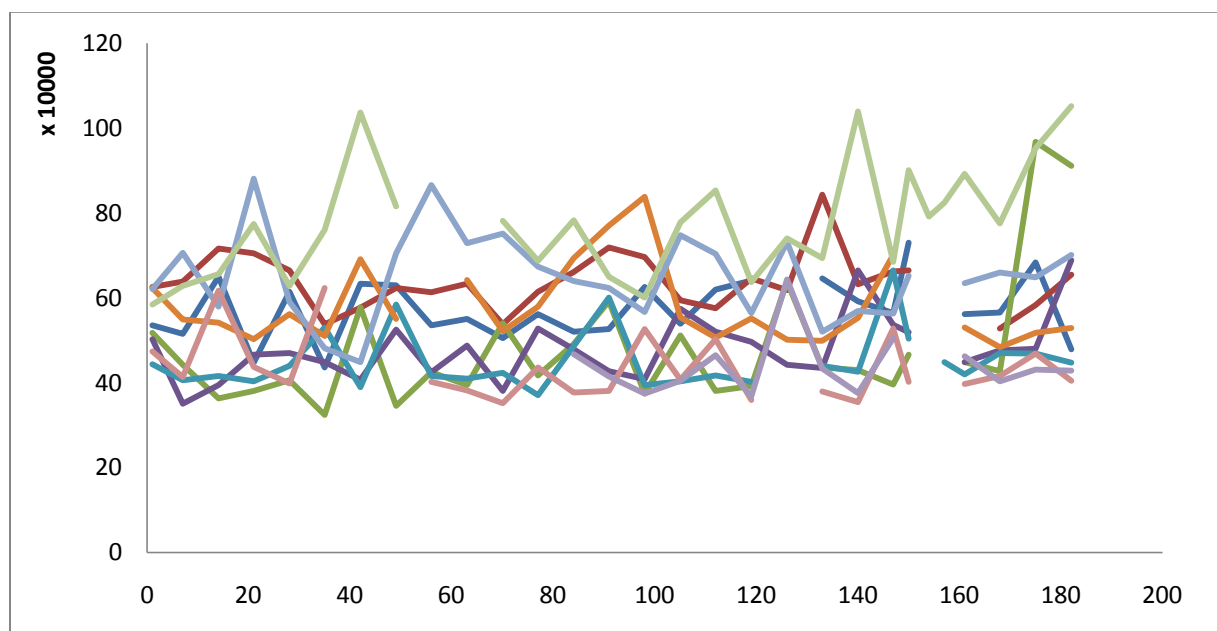
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 63 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 2,88-2,92 rpm σε όλους τους αθλητές.



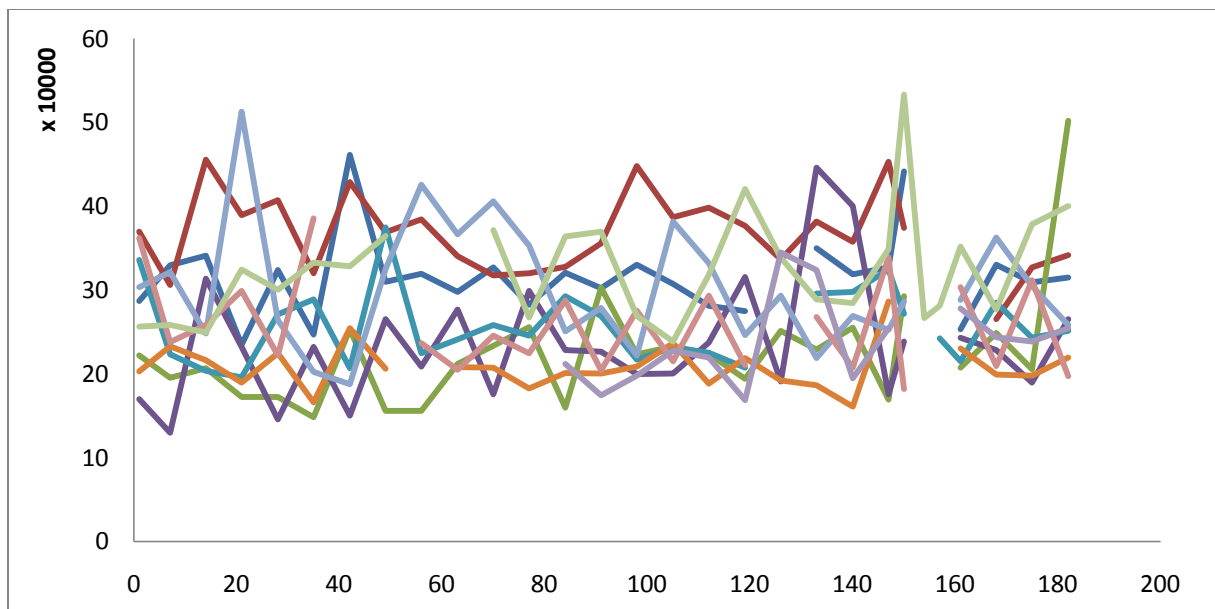
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 64 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος διμεθυλγλυκίνης 2,93 rpm σε όλους τους αθλητές



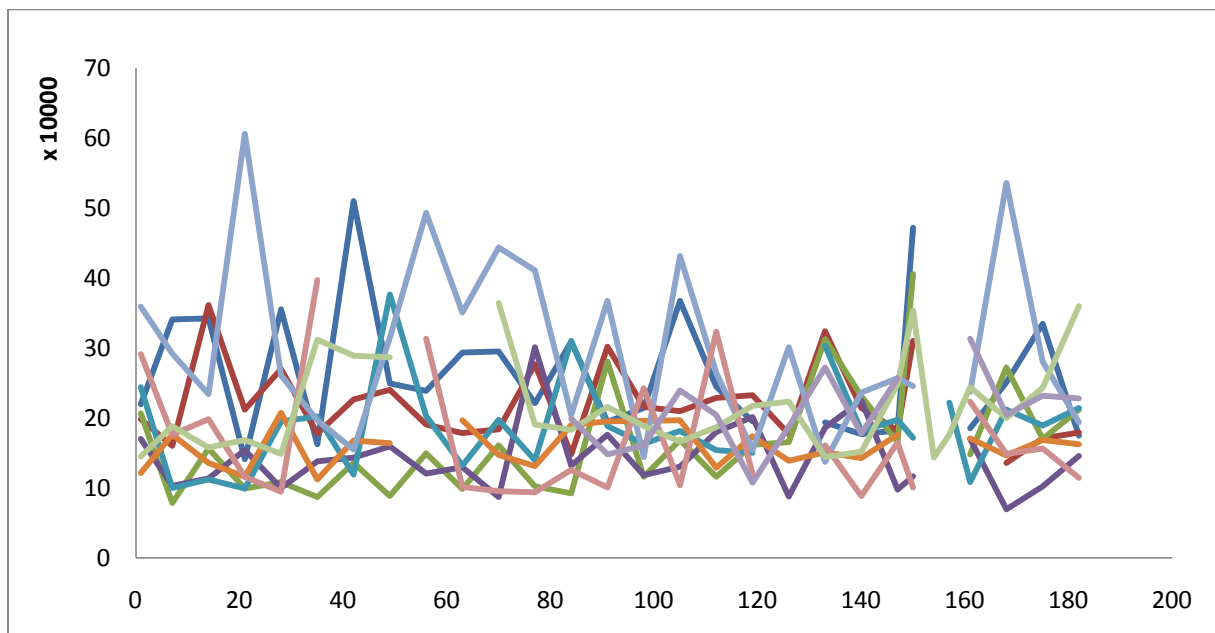
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 65 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 2,94-3,03 ppm σε όλους τους αθλητές.



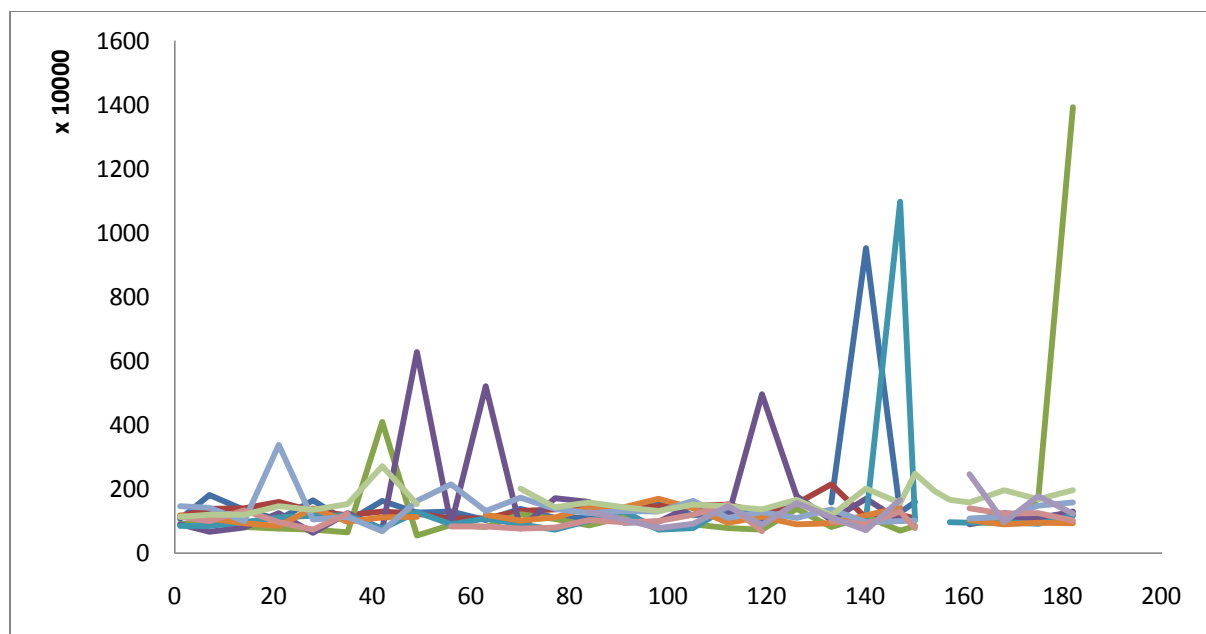
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 66 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος ιστιδινών 3,09-3,17 ppm σε όλους τους αθλητές.



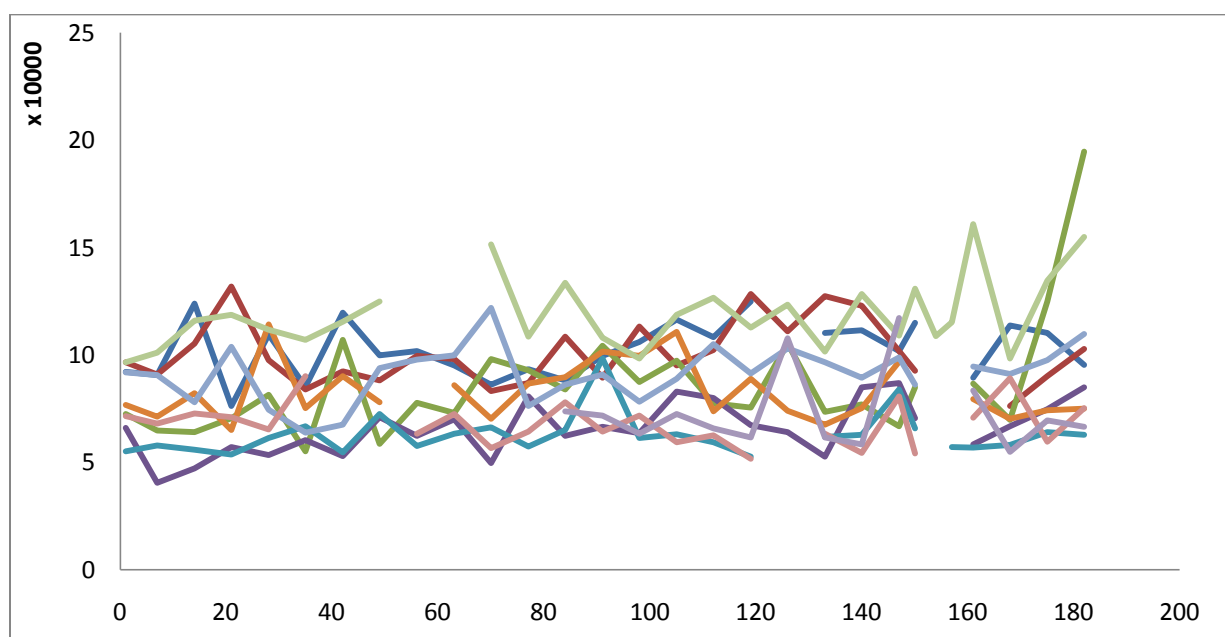
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 67 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος ιστιδινών 3,17-3,22 ppm σε όλους τους αθλητές.



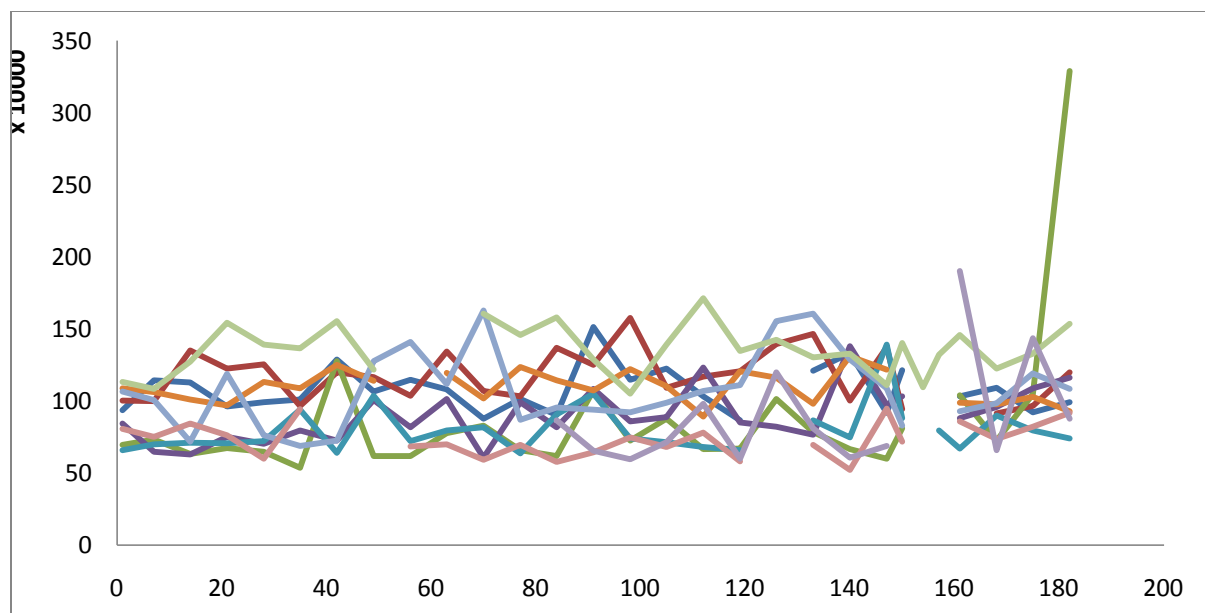
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 68 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος άγνωστης απλής 3,23 ppm σε όλους τους αθλητές.



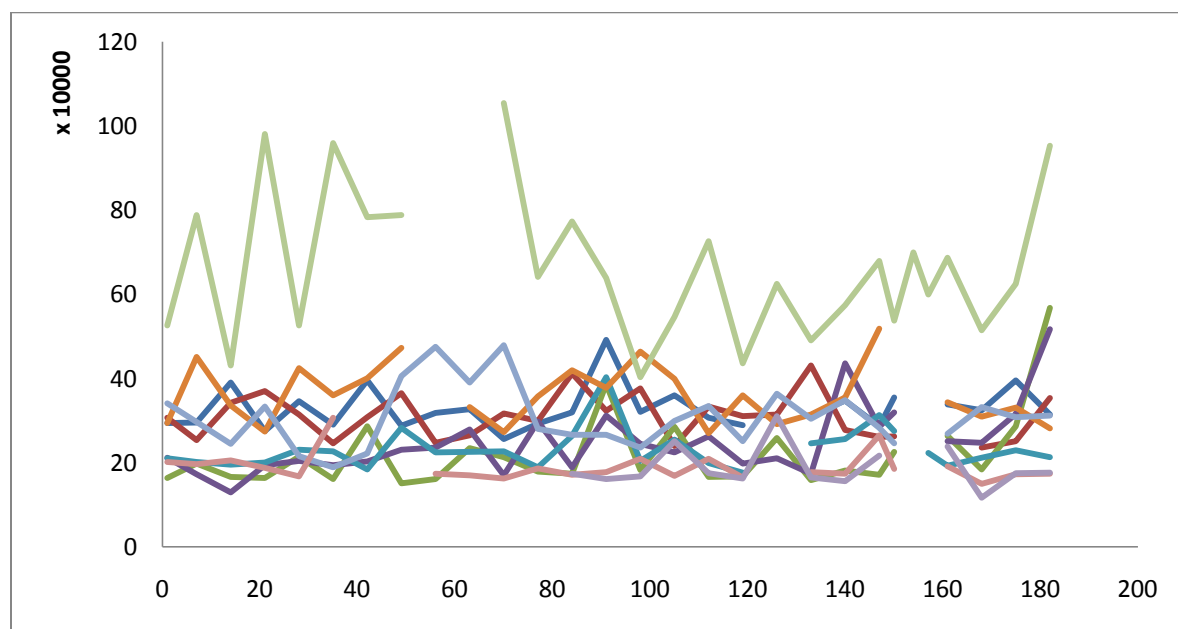
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 69 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 3,24-3,30 rpm σε όλους τους αθλητές.



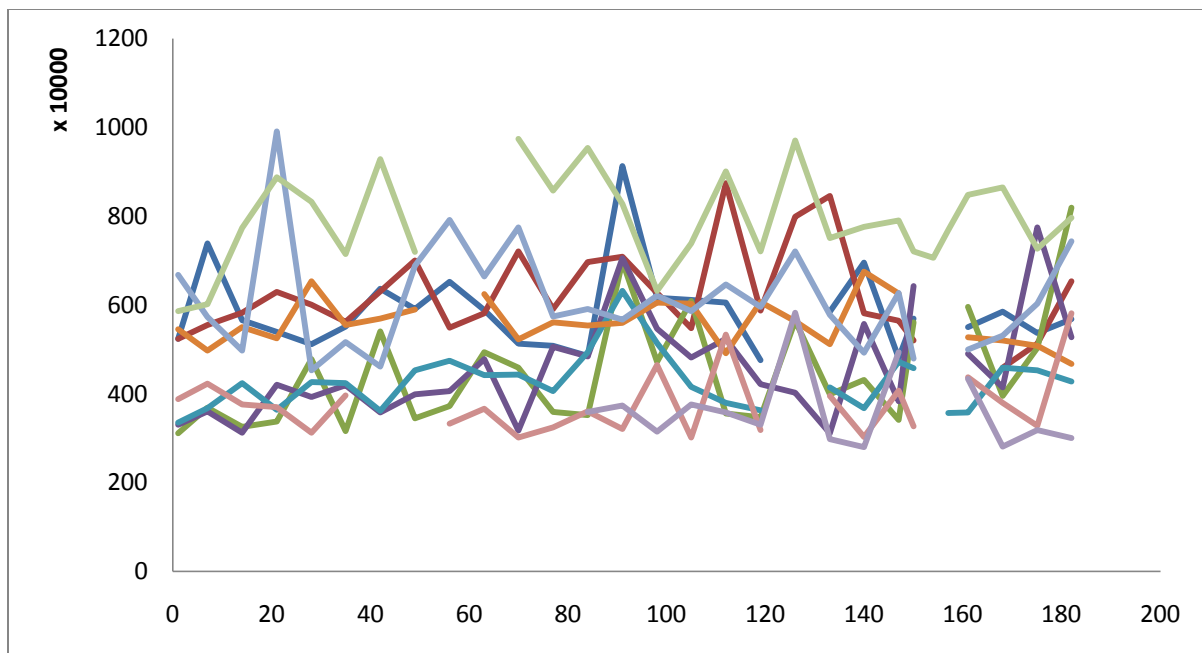
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 70 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος άγνωστης απλής 3,36 rpm σε όλους τους αθλητές.



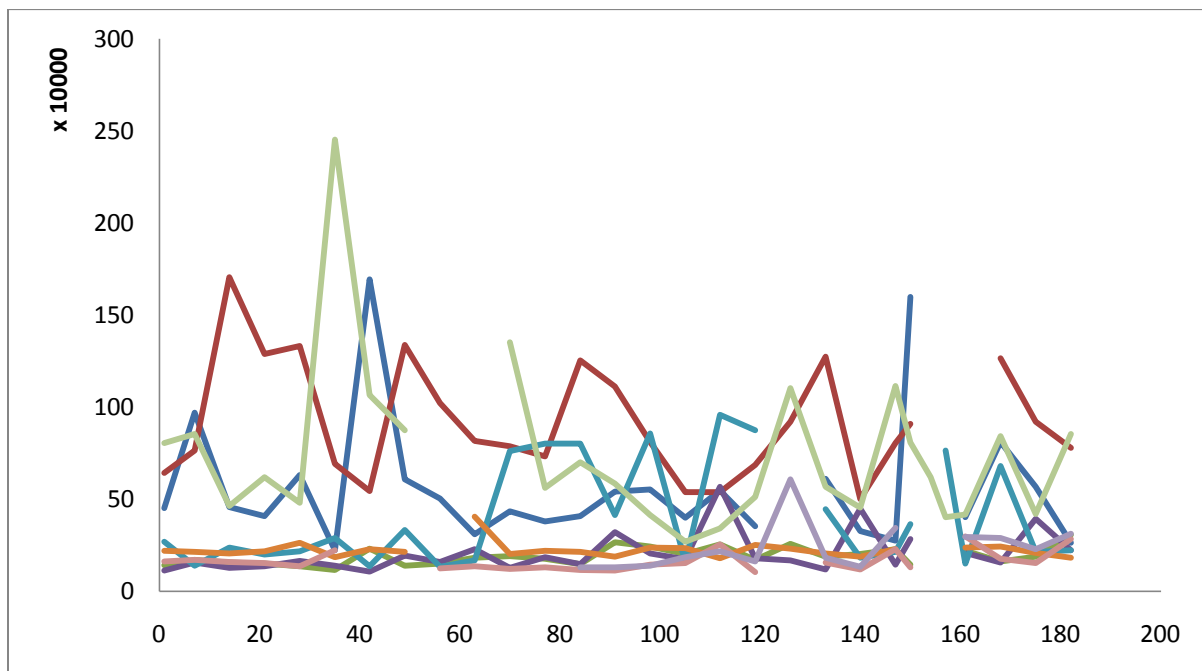
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 71 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 3,39-3,54 ppm σε όλους τους αθλητές.



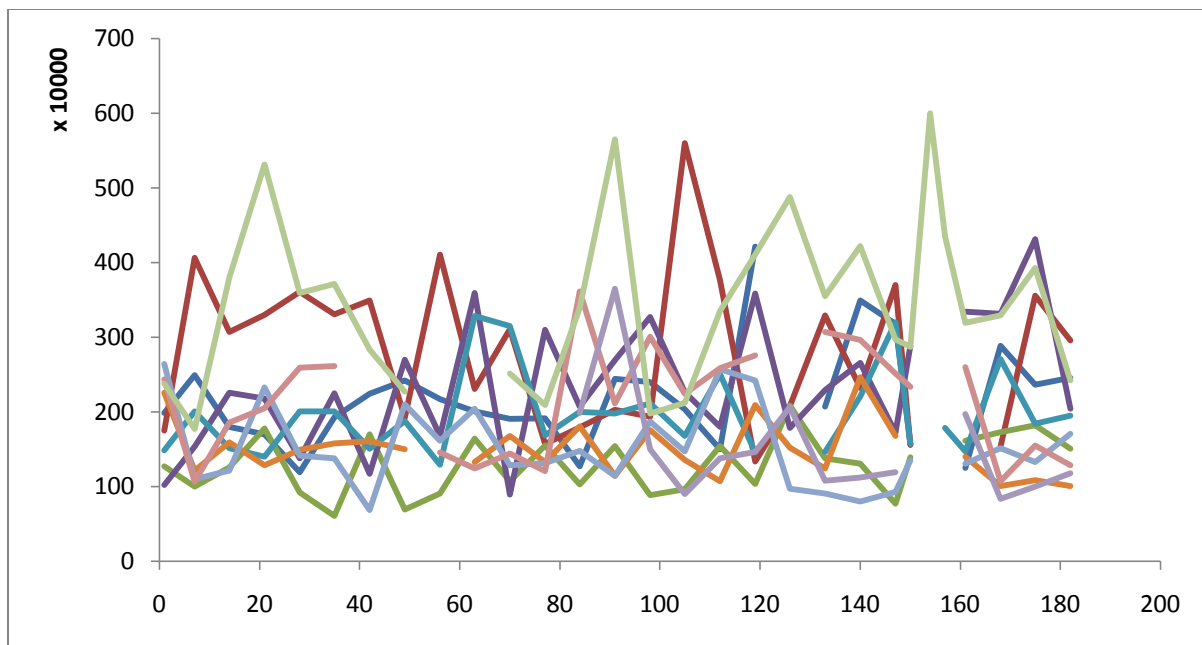
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 72 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος γλυκίνης 3,57 ppm σε όλους τους αθλητές.



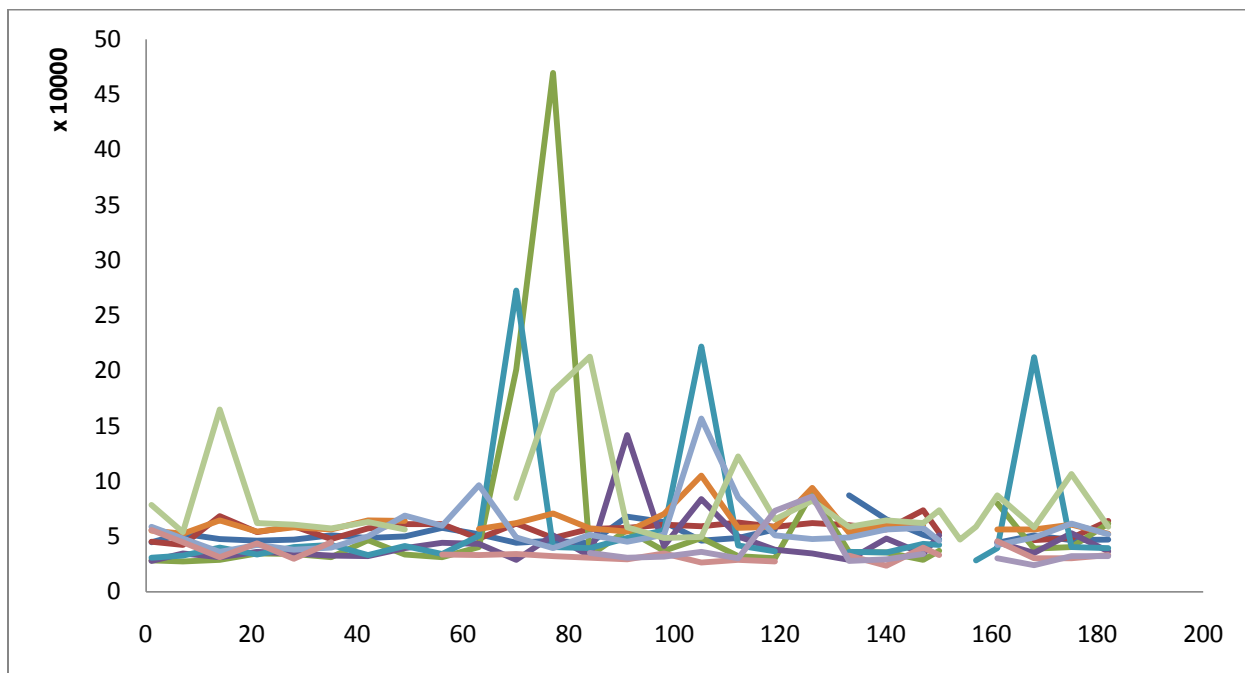
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 73 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 3,6-3,92 ppm σε όλους τους αθλητές.



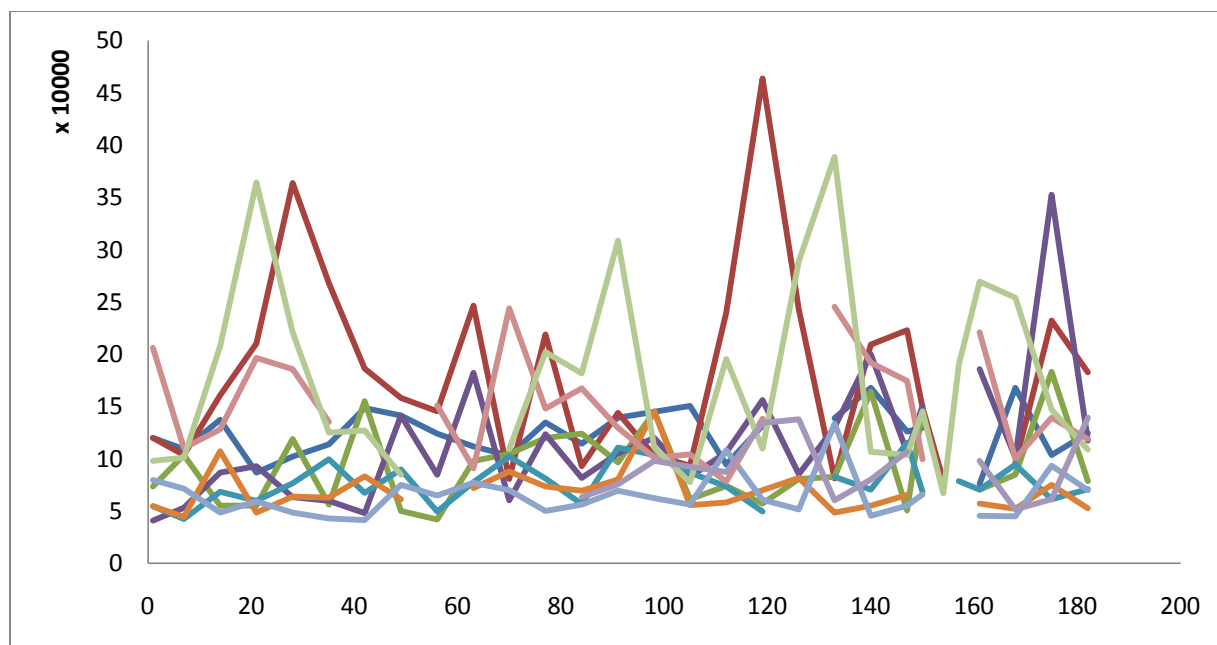
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 74 Χρονική πορεία/διακύμανση κρεατίνης 3,93 ppm σε όλους τους αθλητές.



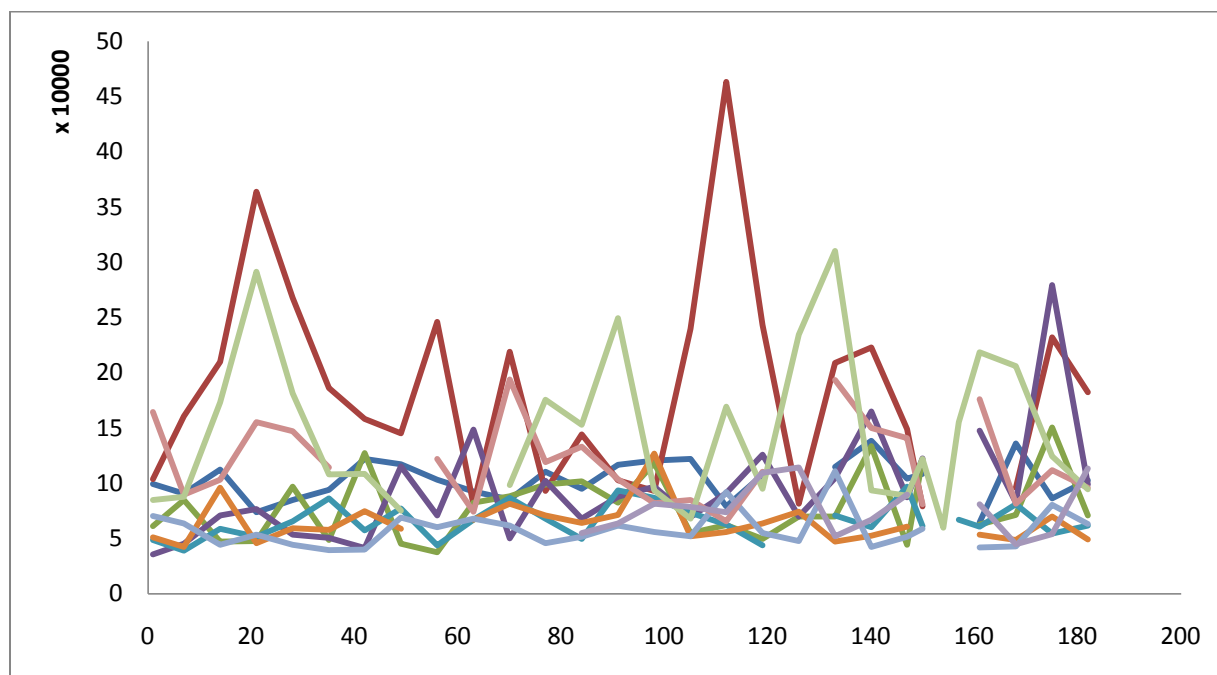
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 75 Χρονική πορεία/διακύμανση ιππουρικού οξέος σε όλους τους αθλητές.



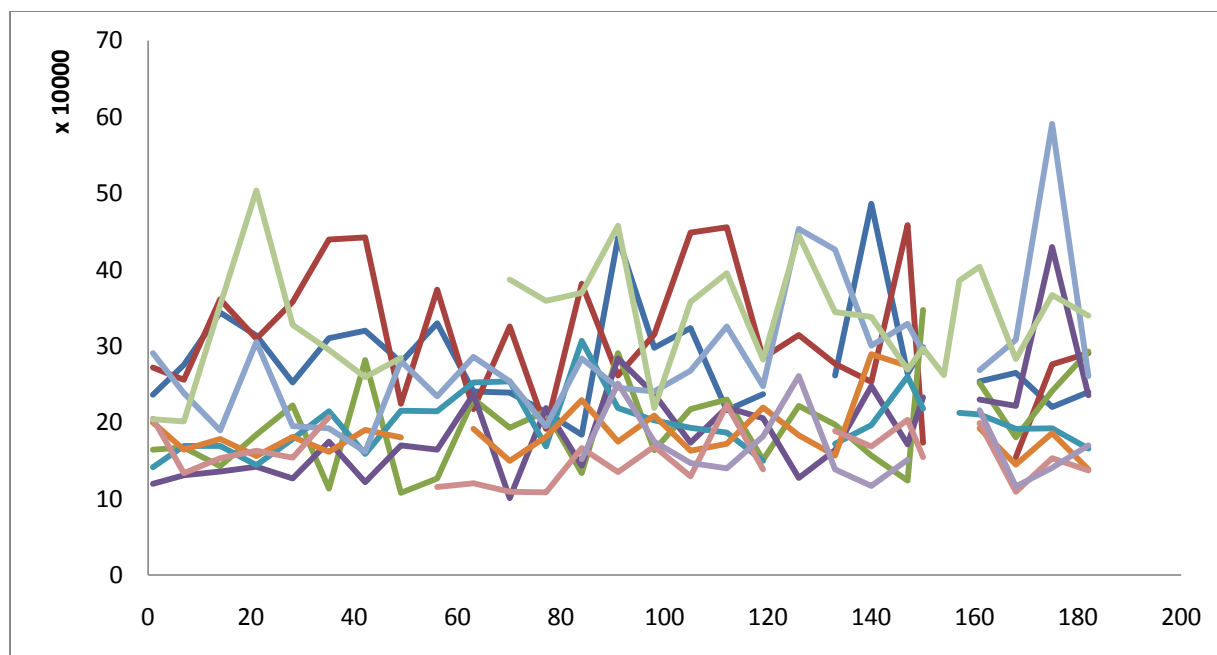
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 76 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος άγνωστης απλής 4,35 rpm σε όλους τους αθλητές.



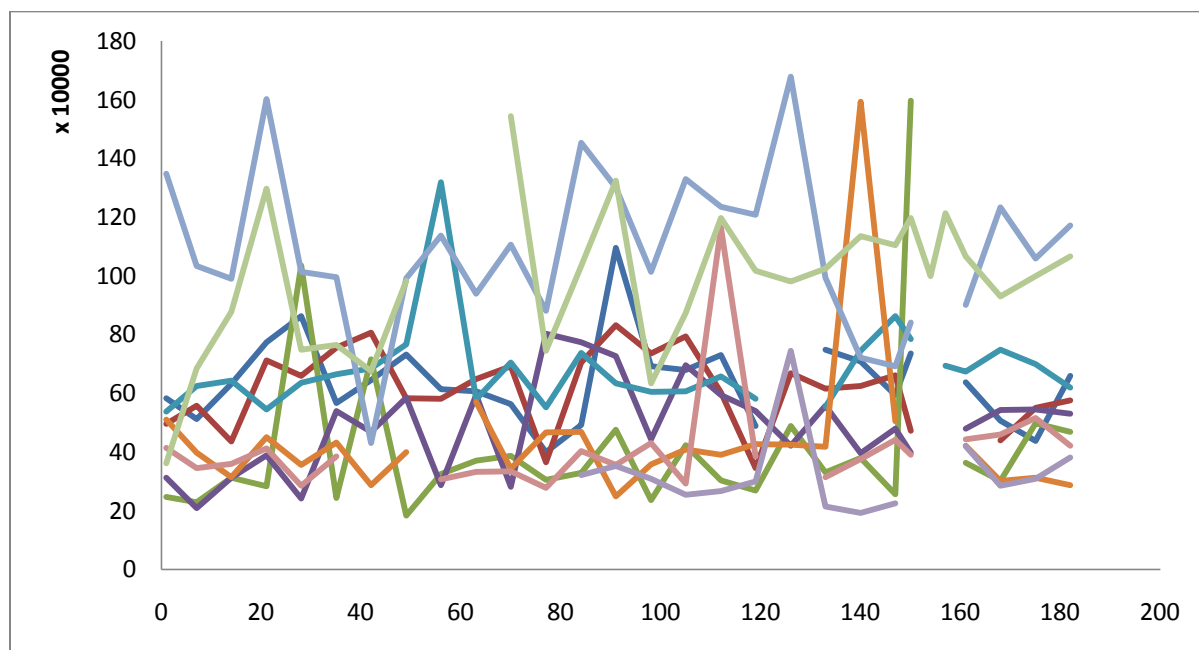
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 77 Χρονική πορεία/διακύμανση τριγωνελλίνης σε όλους τους αθλητές.



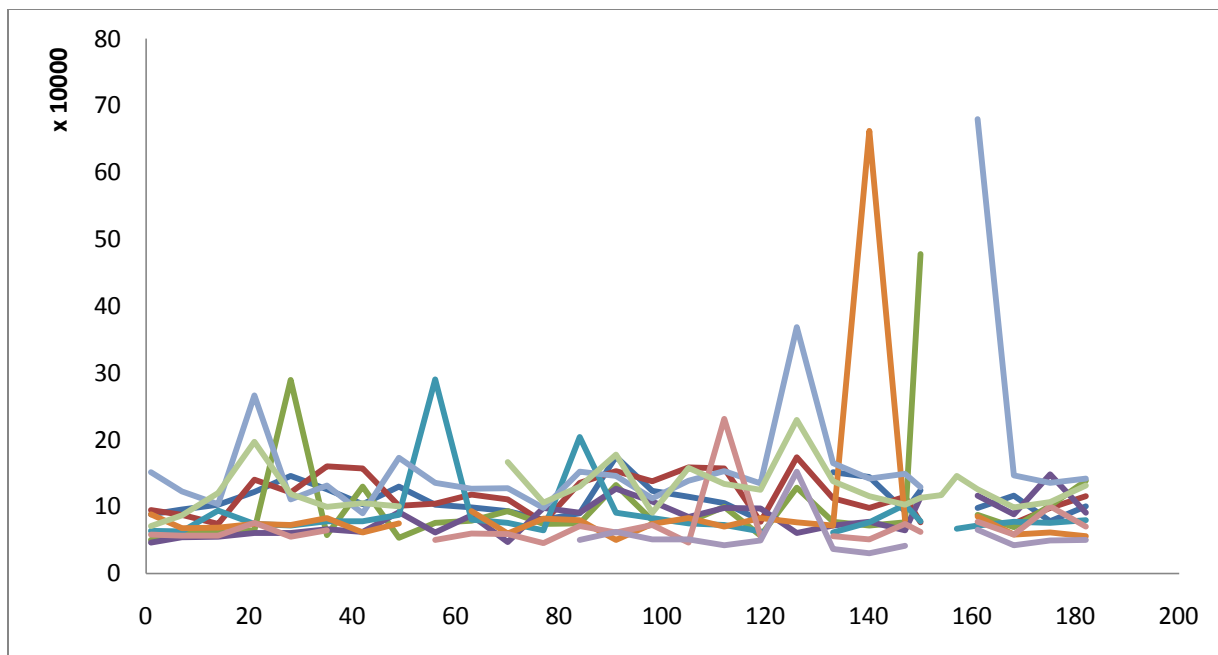
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 78 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 6,83-7,00 rpm σε όλους τους αθλητές.



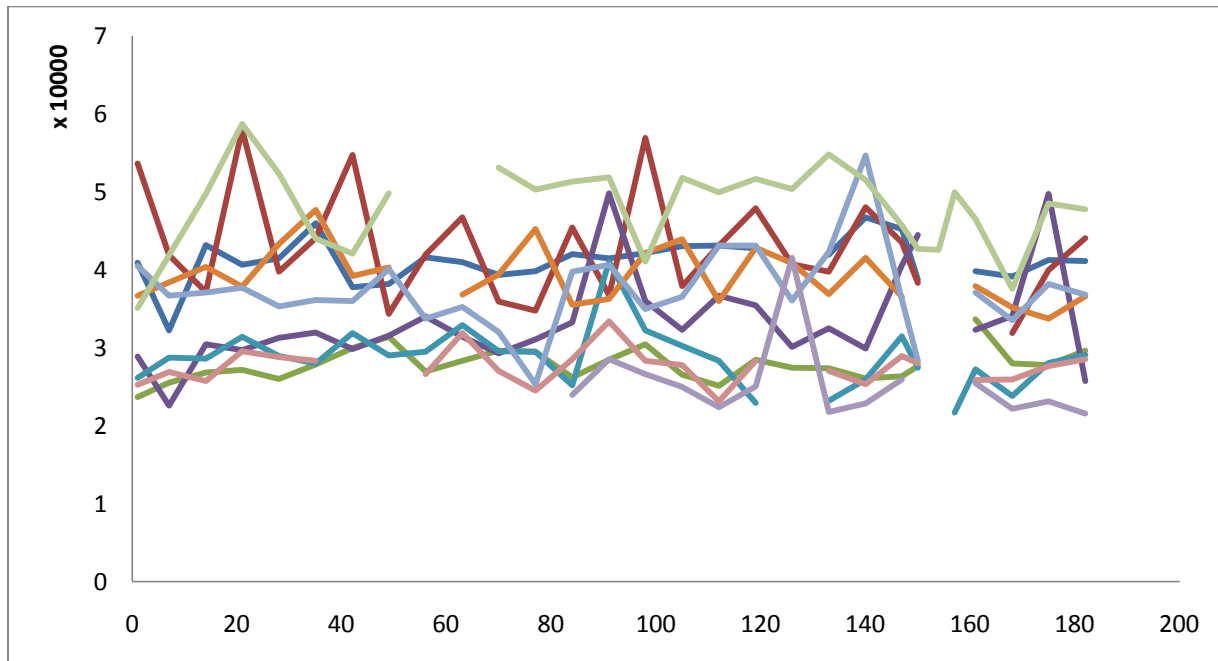
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 79 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 7,00-7,3 ppm σε όλους τους αθλητές.



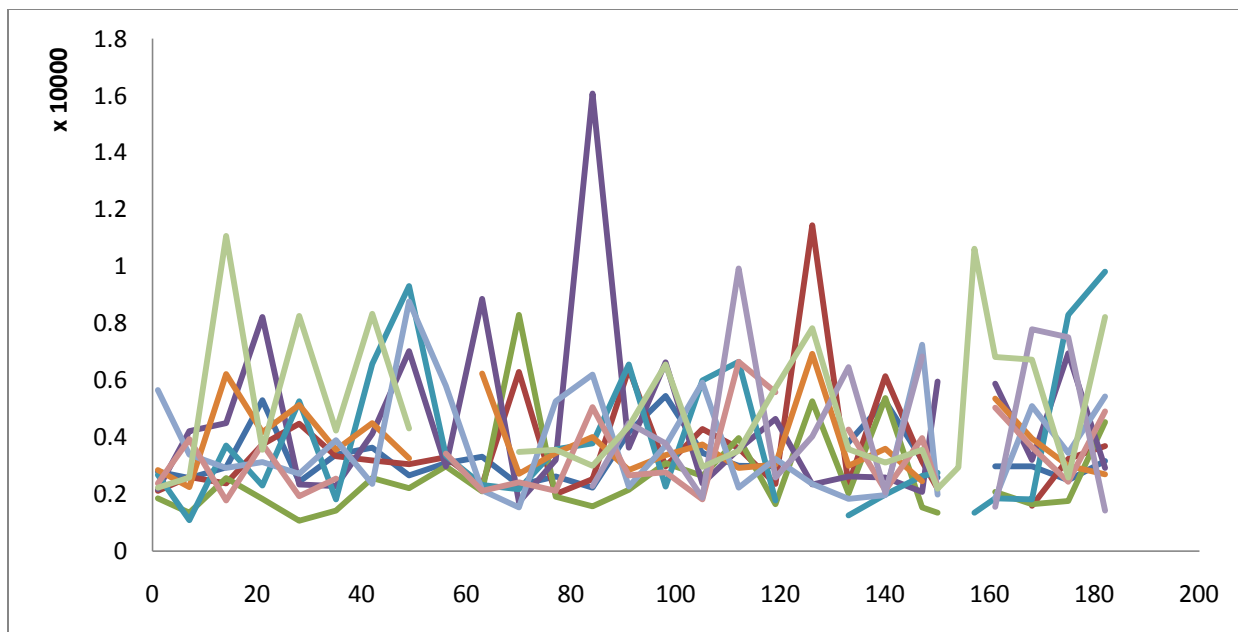
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 80 Χρονική πορεία/διακύμανση φαινυλαλανίνης σε όλους τους αθλητές.



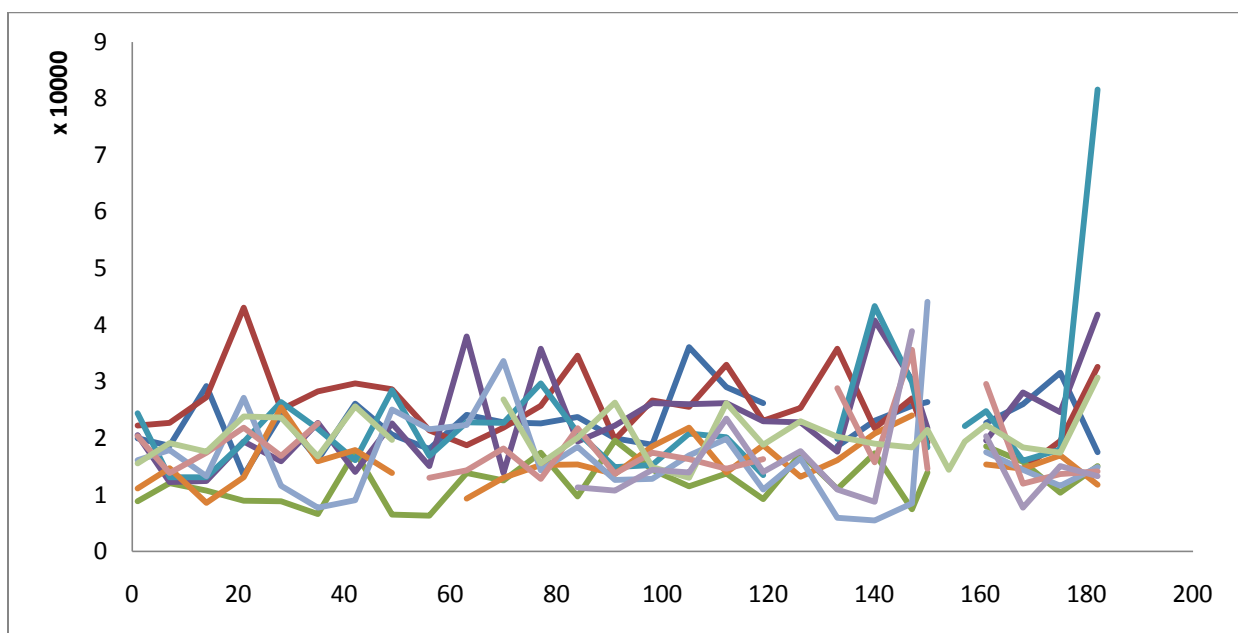
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 81 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 7,44-7,52 rpm σε όλους τους αθλητές.



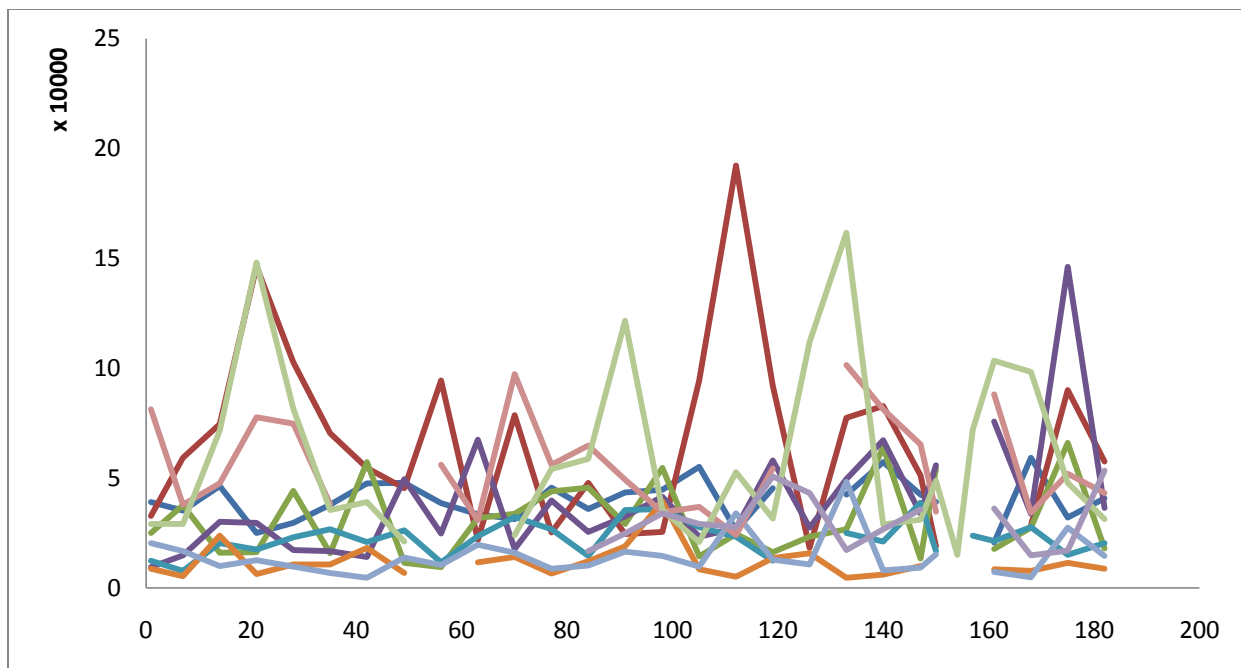
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 82 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος άγνωστης απλής 7,68 rpm σε όλους τους αθλητές.



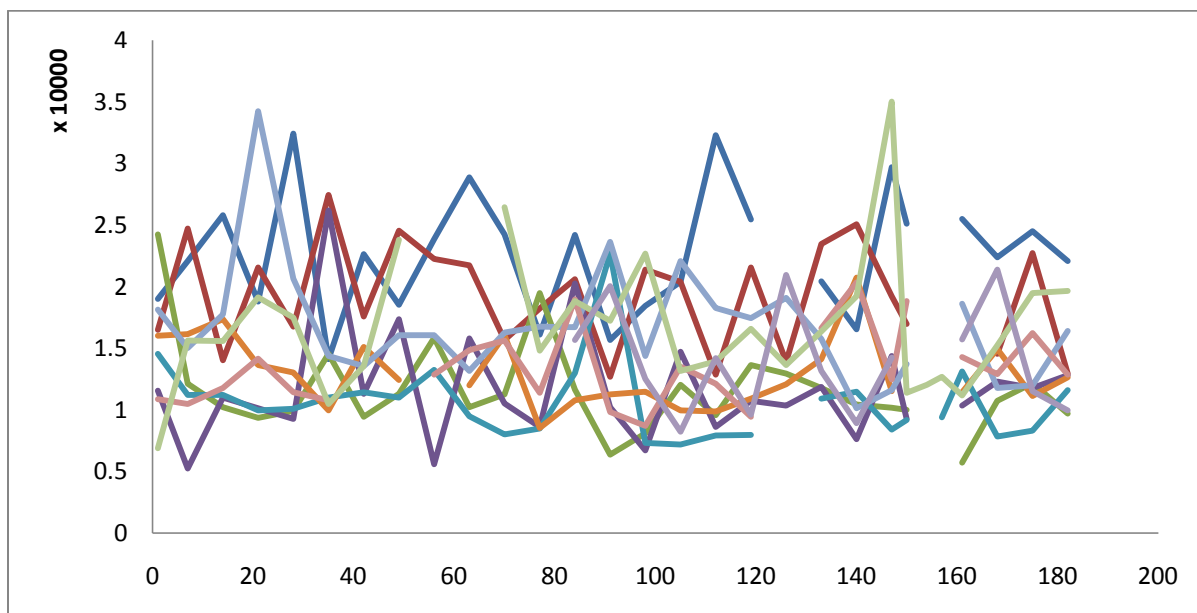
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 83 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος ιστιδινών 7,9-8,4 ppm σε όλους τους αθλητές.



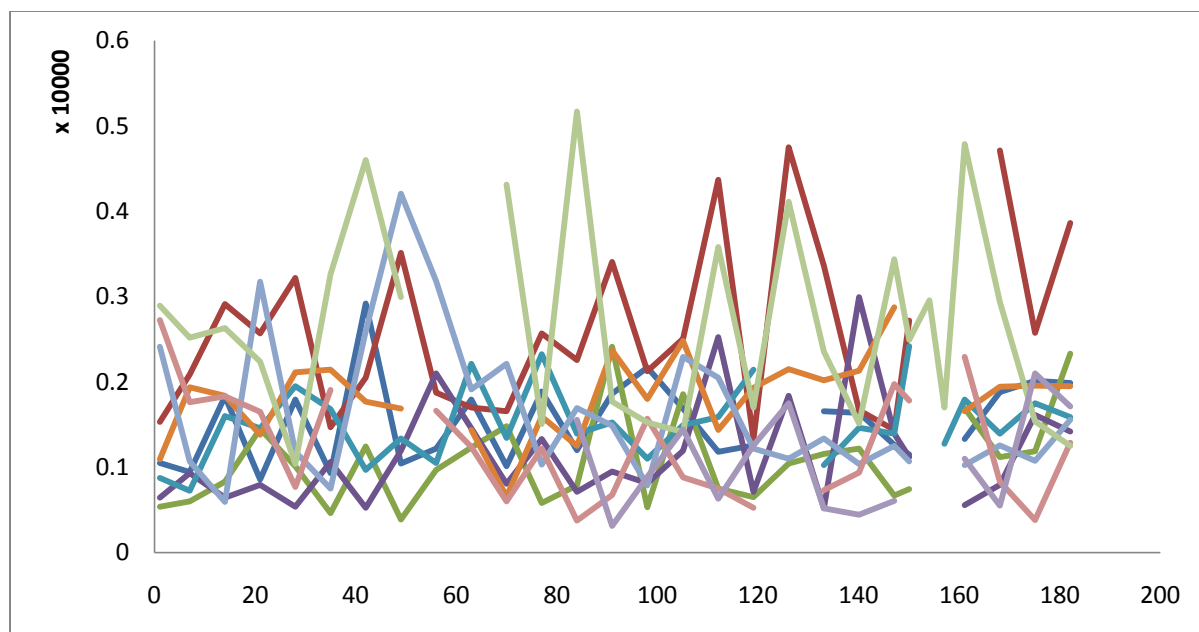
ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 84 Χρονική πορεία/διακύμανση μυρμηκικού/φορμικού οξέος 8,46 ppm σε όλους τους αθλητές.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 85 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος άγνωστης πολλαπλής 8,84 ppm σε όλους τους αθλητές.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 86 Χρονική πορεία/διακύμανση N-μεθυλνικοτιναμιδίου σε όλους τους αθλητές.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 89 Χρονική πορεία/διακύμανση του διαστήματος 9,36 ppm σε όλους τους αθλητές.

ΠΑΡΑΘΕΣΗ ΤΩΝ Z-SCORES ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΑΥΞΟΜΕΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ ΟΡΙΣΜΕΝΩΝ SCORES PLOTS ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.

Τα z-scores είναι μια στατιστική μέτρηση της σχέσης κάποιων τιμών με το μέσο όρο μιας άλλης ομάδας τιμών. Ένα z-score μπορεί να είναι μηδενικό, θετικό ή αρνητικό δείχνοντας έτσι ότι είναι είτε ίδιο με το μέσο όρο, ή είναι πιο πάνω ή πιο κάτω από το μέσο όρο αντίστοιχα, και κατά πόσες μονάδες τυπικής απόκλισης απέχει από αυτόν.

Οι παρακάτω πίνακες δείχνουν την αυξομείωση ορισμένων μεταβολιτών σε κάποιες εικόνες scores plots του στατιστικού μέρους της εργασίας αυτής. Οι αριθμοί που ξεπερνούν σε απόλυτη τιμή τις 1,20 μονάδες υποδηλώνουν ότι ο συγκεκριμένος μεταβολίτης είναι στατιστικά σημαντικός.

ΠΙΝΑΚΑΣ 24. Αναφέρεται στην ΕΙΚΟΝΑ 28.2

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΑΝΔΡΕΣ	ΓΥΝΑΙΚΕΣ
ΤΡΙΜΕΘΥΛΑΜΙΝΗ	-2.6045	1.7970
ΤΡΙΓΟΝΕΛΛΙΝΗ	-1.7547	0.8993
ΠΙΠΟΥΡΙΚΟ	-1.7984	1.1519
ΚΡΕΑΤΙΝΗ	-1.3362	1.1706

ΠΙΝΑΚΑΣ 25. Αναφέρεται στην ΕΙΚΟΝΑ 30.2

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΌΧΙ ΣΥΜΠΛ/ΦΑΡΜ	ΣΥΜΠΛ/ΦΑΡΜ
ΤΡΙΜΕΘΥΛΑΜΙΝΗ	1.2174	-1.0431
ΚΡΕΑΤΙΝΗ	-2.5676	0.5746
ΙΣΟΛΕΥΚΙΝΗ	0.6879	-0.7033
ΑΓΝΩΣΤΗ ΑΠΛΗ 3.23	-1.6058	0.6485

ΠΙΝΑΚΑΣ 26. Αναφέρεται στην ΕΙΚΟΝΑ 31.2

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΟΜΑΔΑ 1 (Α1)	ΟΜΑΔΑ3 (Α4,Α6)
ΤΡΙΜΕΘΥΛΑΜΙΝΗ	-2.0869	1.4903
3ΟΗΙΣΟΒΑΛΕΡΙΚΟ	-2.2495	1.0146
N-ΜΕΘΥΛΝΙΚΟΤΙΝΑΜΙΔΙΟ	2.1338	-2.7589

ΠΙΝΑΚΑΣ 27. Αναφέρεται στην ΕΙΚΟΝΑ 32.2

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΟΜΑΔΑ 1 (Α1)	ΟΜΑΔΑ2 (Α3)
ΑΓΝΩΣΤΗ ΑΠΛΗ 7.68	4.6515	-6.3705
N-ΜΕΘΥΛΝΙΚΟΤΙΝΑΜΙΔΙΟ	2.2719	-2.9723
3ΟΗΙΣΟΒΑΛΕΡΙΚΟ	-1.2871	0.5748
ΚΙΤΡΙΚΟ	-1.4665	0.8655
ΤΡΙΜΕΘΥΛΑΜΙΝΗ	-0.2610	0.1942
ΜΥΡΜΗΚΙΚΟ ΟΞΥ	2.1236	-2.6852

ΠΙΝΑΚΑΣ 28. Αναφέρεται στην ΕΙΚΟΝΑ 33.2

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΟΜΑΔΑ 3(Α4,Α6)	ΟΜΑΔΑ4 (Α9,Α12)
ΑΓΝΩΣΤΗ ΑΠΛΗ 3.23	-0.7878	0.4155
3ΟΗΙΣΟΒΑΛΕΡΙΚΟ	1.7383	-3.4614

ΠΙΝΑΚΑΣ 29. Αναφέρεται στην ΕΙΚΟΝΑ 34.2

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΟΜΑΔΑ 1(A1)	ΟΜΑΔΑ 5 (A5,A7)
ΤΡΙΓΩΝΕΛΛΙΝΗ	2.3625	-2.6089
N-MΕΘΥΛΝΙΚΟΤΙΝΑΜΙΔΙΟ	1.8390	-1.7724
ΔΙΑΣΤΗΜΑ 6.83-7.00	2.2606	-2.5259
ΠΟΛΛΑΠΛΗ 8.84	2.2595	-2.2840

ΠΙΝΑΚΑΣ 30. Αναφέρεται στην ΕΙΚΟΝΑ 35.2

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΟΜΑΔΑ 4(A9,A12)	ΟΜΑΔΑ 5 (A5,A7)
ΤΡΙΓΩΝΕΛΛΙΝΗ	1.1444	-2.8014
ΔΙΑΣΤΗΜΑ 6.83-7.00	1.0940	-2.6074
ΠΟΛΛΑΠΛΗ 8.84	1.2425	-3.0239

ΠΙΝΑΚΑΣ 31. Αναφέρεται στην ΕΙΚΟΝΑ 36.2

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΜΗ ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ	ΚΑΠΝΙΣΤΕΣ
ΤΡΙΓΩΝΕΛΛΙΝΗ	-0.3629	0.2454
ΠΟΛΛΑΠΛΗ 8.84	-1.0293	0.2609
ΚΙΤΡΙΚΟ	0.3722	-0.9727
ΙΠΠΟΥΡΙΚΟ	-0.8380	0.6677
N-MΕΘΥΛΝΙΚΟΤΙΝΑΜΙΔΙΟ	0.5623	-0.7301

ΠΙΝΑΚΑΣ 32. Αναφέρεται στην ΕΙΚΟΝΑ 37.2

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΠΡΟΠΟΝΗΤΙΚΑ ΝΕΟΙ	ΠΡΟΠΟΝΗΤΙΚΑ ΠΑΛΑΙΟΙ
3ΟΗΙΣΟΒΑΛΕΡΙΚΟ	0.4920	-0.6473
N-MΕΘΥΛΝΙΚΟΤΙΝΑΜΙΔΙΟ	-1.5258	1.0077
ΚΙΤΡΙΚΟ	0.2591	-0.2217
ΤΡΙΜΕΘΥΛΑΜΙΝΗ	0.2107	-0.2967

ΠΙΝΑΚΑΣ 33. Αναφέρεται στην ΕΙΚΟΝΑ 38.3

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΠΡΟ ΑΓΩΝΩΝ	ΑΓΩΝΕΣ
ΔΙΑΣΤΗΜΑ 3.6-3.92	-0.7367	0.7310
ΙΠΠΟΥΡΙΚΟ	-0.4019	0.3628
ΦΑΙΝΥΛΑΛΑΝΙΝΗ	-0.2992	0.2863

ΠΙΝΑΚΑΣ 34. Αναφέρεται στην ΕΙΚΟΝΑ 9.3

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΠΡΟ ΑΦΕΨΗΜΑΤΟΣ	ΑΦΕΨΗΜΑ
ΜΕΘΥΛΓΟΥΑΝΙΔΙΝΗ	-0.9769	0.8525
ΑΓΝΩΣΤΗ ΑΠΛΗ 2.78	-1.0000	0.8424
ΜΥΡΜΗΚΙΚΟ	-1.3625	0.7448