



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΝΕΟΓΝΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΠΑ – ΑΡΕΤΑΙΕΙΟ ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΑΙΔΙΑΤΡΙΚΗΣ – ΝΕΟΓΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΝΙΚΟΛΕΤΤΑ Μ. ΙΑΚΩΒΙΔΟΥ

**ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΟΥΡΩΝ ΝΕΟΓΝΩΝ ΠΟΥ ΣΙΤΙΖΟΝΤΑΙ
ΑΠΟΚΛΕΙΣΤΙΚΑ ΜΕ ΜΗΤΡΙΚΟ ΓΑΛΑ ΣΥΓΚΡΙΝΟΜΕΝΟ ΜΕ ΑΥΤΟ
ΝΕΟΓΝΩΝ ΠΟΥ ΣΙΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΒΡΕΦΙΚΟ ΓΑΛΑ
ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟ ΜΕ ΣΥΝΒΙΟΤΙΚΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ Γ. ΦΑΛΑΪΝΑ

Παιδίατρος – Νεογνολόγος

Διευθύντρια ΕΣΥ Νεογνολογικής Κλινικής

Γ.Ν. ΝΙΚΑΙΑΣ – ΠΕΙΡΑΙΑ «ΑΓΙΟΣ ΠΑΝΤΕΛΕΗΜΩΝ»

ΑΘΗΝΑ 2023

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 29/11/2016

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

1. Μπούτσικου Θεοδώρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής – Νεογνολογίας, ΕΚΠΑ, Τμήμα Ιατρικής Σχολής (Επιβλέπουσα)
2. Ιακωβίδου Νικολέττα, Καθηγήτρια Παιδιατρικής – Νεογνολογίας, ΕΚΠΑ, Τμήμα Ιατρικής Σχολής
3. Ξάνθος Θεόδωρος, Καθηγητής Φυσιολογίας – Παθοφυσιολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας

Ημερομηνία ορισμού θέματος Διατριβής: 15/02/2017

Ημερομηνία καταθέσεως της Διδακτορικής Διατριβής: 28/02/2023

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:

1. Πανουλής Κωνσταντίνος, Καθηγητής Μαιευτικής - Γυναικολογίας, ΕΚΠΑ, Τμήμα Ιατρικής Σχολής
2. Ιακωβίδου Νικολέττα, Καθηγήτρια Παιδιατρικής - Νεογνολογίας, ΕΚΠΑ, Τμήμα Ιατρικής Σχολής
3. Ξάνθος Θεόδωρος, Καθηγητής Φυσιολογίας - Παθοφυσιολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας
4. Μπούτσικου Θεοδώρα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής - Νεογνολογίας, ΕΚΠΑ, Τμήμα Ιατρικής Σχολής
5. Ζουμπουλάκης Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων
6. Ηλιοδρομίτη Ζωή, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής - Νεογνολογίας, ΕΚΠΑ, Τμήμα Ιατρικής Σχολής
7. Φεσσάτου Σμαραγδή, Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής, ΕΚΠΑ, Γ' Παιδιατρική Κλινική, Νοσοκομείο «Αττικό»

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής: Γεράσιμος Σιάσος

Ο όρκος του Ιπποκράτη

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρὸν, καὶ Ἀσκληπιὸν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἱστορας ποιεύμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃν κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὄρκον τόνδε καὶ συγγραφὴν τήνδε· ἠγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσασθαι, καὶ χρεῶν χρηρίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ ωυτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξειν τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηρίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ συγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λουπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσί τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοισί τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλῳ δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε· ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσοδὸν φθόριον δώσω. Ἄγνῳς δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμὴν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξιος τῆσδε. Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἐὼν πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίης, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωματῶν καὶ ἀνδρῶν, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἕξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τὸν δε ἐπιτελέα ποιέοντι, καὶ μὴ συγχέοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον· παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκοῦντι, τάναντία τουτέων.

Στον σύζυγό μου Απόστολο

Στα παιδιά μου Γιώργο και Ξανθή

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής αποτελεί μία μοναδική και ανεπανάληπτη εμπειρία στον κόσμο της γνώσης και της επιστήμης, με αφετηρία τη στοιχειοθέτηση του ερευνητικού ερωτήματος και τελικό προορισμό, τα συμπεράσματα της έρευνας και τη συγγραφή της. Για την επίτευξη αυτού του απώτερου επιστημονικού στόχου απαιτούνται ισχυρή θέληση, δύναμη, επιμονή, ενθουσιασμός, προσπάθεια, κόπος, χρόνος και συνεχή υποστήριξη, τόσο από τους συντελεστές της ερευνητικής ομάδας όσο και από το οικογενειακό περιβάλλον.

Η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε στην Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ στη Νεογνολογική Κλινική του Αρεταίειου Νοσοκομείου.

Η συλλογή των δειγμάτων της μελέτης έγινε στη Νεογνολογική Κλινική ΕΚΠΑ του Αρεταίειου Νοσοκομείου και στο Νεογνολογικό Τμήμα του Γ. Ν. Νίκαιας - Πειραιά «Άγιος Παντελεήμων» κατά το χρονικό διάστημα Ιανουάριος 2017 - Απρίλιος 2019.

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική διατριβή μου, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους εκείνους που με την έμπρακτη υποστήριξη, κατανόηση και αμέριστη βοήθειά τους συνέβαλαν στην επίτευξη του στόχου.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ στην Καθηγήτρια Παιδιατρικής – Νεογνολογίας ΕΚΠΑ, Ιακωβίδου Νικολέττα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διατριβή μου, στη Νεογνολογική Κλινική του Αρεταίειου Νοσοκομείου, που επάξια διευθύνει από το έτος 2016, καθώς και για την αμέριστη στήριξη και επιστημονική καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης.

Θερμές ευχαριστίες στον Καθηγητή Παιδιατρικής Yvan Vandenplas, University Hospital Brussels, Head of the Pediatric Hospital, The “Kidz Health Castle”, Chair of Pediatrics, για την καθοριστική συμβολή του στο σχεδιασμό της κλινικής μελέτης καθώς και την υψηλή εποπτεία κατά τη διάρκεια της εκπόνησής της.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς, την επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παιδιατρικής- Νεογνολογίας ΕΚΠΑ Μπούτσικου Θεοδώρα, τον Καθηγητή Φυσιολογίας – Παθοφυσιολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής Ξάνθο Θεόδωρο, την Επίκουρη Καθηγήτρια Παιδιατρικής – Νεογνολογίας ΕΚΠΑ Ηλιοδρομίτη Ζωή για την άριστη συνεργασία, τη συνεχή υποστήριξη, την εποικοδομητική κριτική, την εμπιστοσύνη και ιδιαιτέρως για τη συμβολή στη γνωστοποίηση του ερευνητικού πρωτοκόλλου.

Οφείλω επίσης, θερμότερες ευχαριστίες στον Αναπληρωτή Καθηγητή, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής, Ζουμπουλάκη Παναγιώτη και τους συνεργάτες του από το Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Φωτάκη

Χαράλαμπος, Μώρο Γεώργιο, Ανδρέου Βασιλική, Τσιάκα Θάλεια, Ουζούνη Σωτήρη, που υλοποίησαν τη μεταβολομική ανάλυση των δειγμάτων με την εφαρμογή τεχνικών φασματοσκοπίας NMR καθώς και την πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση στο σύνολο του δειγματοχώρου.

Θα ήταν μεγάλη μου παράλειψη, να μην ευχαριστήσω την εταιρεία Rontis, που προσέφερε όλο το εργαστηριακό υλικό και την πλήρη κάλυψη της τρίμηνης διατροφής των νεογνών – βρεφών που σιτίζονταν αποκλειστικά με την υπό μελέτη βρεφική φόρμουλα Rontamil Complete 1.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στο γονεϊκό περιβάλλον των νεογνών - βρεφών που συμμετείχαν στην εκπόνηση αυτής της ερευνητικής κλινικής μελέτης.

Τελειώνοντας, το μεγαλύτερο και σημαντικότερο ευχαριστώ το οφείλω στην αξιολάτρευτη οικογένειά μου: τους γονείς μου Γιώργο και Ξανθή, την αδελφή μου Έλενα, το σύζυγό μου Απόστολο, τα παιδιά μου Γιώργο και Ξανθή, για τον αξιακό κώδικα, την αγάπη, τη συμπαράσταση, την εμπιστοσύνη και την ανοχή τους σε όλη την επιστημονική μου διαδρομή.

Η διδακτορική μου διατριβή είναι αφιερωμένη στην οικογένειά μου που με στήριξε ποικιλοτρόπως στην επίπονη αυτή προσπάθεια.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Επώνυμο: Φαλαΐνα

Όνομα: Βασιλική

Πατρώνυμο: Γεώργιος

Μητρώνυμο: Ξανθή

Τόπος γέννησης: Αθήνα

Εθνικότητα: Ελληνική

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Από 09/01/2018 – σήμερα

Διευθύντρια ΕΣΥ - ΜΕΝΝ Γενικού Νοσοκομείου Νίκαιας - Πειραιά «Αγ. Παντελεήμων», Πειραιάς, Ελλάδα

- Υπεύθυνη για όλες τις ιατρικές και επιστημονικές λειτουργίες της Μονάδας και του ιατρείου Μακροχρόνιας Παρακολούθησης Προώρων
- Επίβλεψη/διοίκηση και επιστημονική κατάρτιση του προσωπικού 6 Επιμελητών, 4 Εξειδικευομένων Νεογνολογίας, 3 Ειδικευομένων Παιδιατρικής, 1 Υπεύθυνης Νοσηλευτικής και 15 Νοσηλευτών - Μαιευτών
- Ενεργός συμμετοχή στο πρόγραμμα Εφημεριών της ΜΕΝΝ
- Κλινική εξέταση/επανεξέταση των νεογνών της Μαιευτικής Κλινικής του Νοσοκομείου
- Οργάνωση και ενεργή συμμετοχή στο πρόγραμμα επιμόρφωσης των μητέρων που θηλάζουν
- Οργάνωση και παρουσίαση κλινικών μελετών της Κλινικής
- Εισηγήτρια του Παθολογικού Τομέα με αρμοδιότητα την αξιολόγηση για μονιμοποίηση - αναβάθμιση ιατρών
- Συμμετοχή σε επιτροπές μειοδοτικών διαγωνισμών προμήθειας ιατροτεχνολογικού εξοπλισμού του Νεογνολογικού Τμήματος

Από 06/03/2009 – 08/01/2018

Επιμελήτρια Β΄ ΕΣΥ - Επιμελήτρια Α΄ ΕΣΥ ΜΕΝΝ Γενικού Νοσοκομείου Νίκαιας - Πειραιά «Αγ. Παντελεήμων», Πειραιάς, Ελλάδα

- Υπεύθυνη για ιατρικές και επιστημονικές λειτουργίες της Μονάδας και του ιατρείου Μακροχρόνιας Παρακολούθησης Προώρων
- Επιστημονική κατάρτιση του ιατρικού - νοσηλευτικού προσωπικού της ΜΕΝΝ
- Ενεργός συμμετοχή στο πρόγραμμα Εφημεριών της ΜΕΝΝ
- Κλινική εξέταση/επανεξέταση των νεογνών της Μαιευτικής Κλινικής του Νοσοκομείου
- Οργάνωση και ενεργή συμμετοχή στο πρόγραμμα επιμόρφωσης των μητέρων που θηλάζουν
- Οργάνωση και παρουσίαση κλινικών μελετών της Κλινικής

Από 28/07/2004 – 11/11/2008

Επιμελήτρια Β΄ ΕΣΥ - Β΄ Παιδιατρική Κλινική ΕΣΥ Νοσοκομείου Παίδων «Π. & Α. Κυριακού», Αθήνα, Ελλάδα

- Υπεύθυνη για ιατρικές και επιστημονικές λειτουργίες της Κλινικής και των Εξωτερικών Ιατρείων
- Κλινική εξέταση/επανεξέταση των νοσηλευόμενων παιδιών της Κλινικής του Νοσοκομείου
- Ενεργός συμμετοχή στο πρόγραμμα Εφημεριών της Κλινικής
- Οργάνωση και ενεργή συμμετοχή στο πρόγραμμα επιμόρφωσης του προσωπικού της κλινικής και στην ενημέρωση των γονέων
- Οργάνωση και παρουσίαση κλινικών μελετών της Κλινικής

Από 12/11/2008 – 28/02/2009

Επιμελήτρια Παιδίατρος - Νεογνολόγος - ΜΕΝΝ Μαιευτικής Κλινικής «ΜΗΤΕΡΑ», Αθήνα, Ελλάδα

- Υπεύθυνη για ιατρικές και επιστημονικές λειτουργίες της Μονάδας - Αίθουσας Τοκετών - Χειρουργείου για ανάνηψη νεογνών υψηλού κινδύνου
- Ενεργός συμμετοχή στο πρόγραμμα Εφημεριών της ΜΕΝΝ

- Κλινική εξέταση/επανεξέταση των νεογνών της Μαιευτικής Κλινικής

Από 09/2002 - 04/2004

Επιμελήτρια Παιδίατρος/Εντατικολόγος - ΜΕΘ ΠΑΙΔΩΝ ΕΥΡΩΚΛΙΝΙΚΗ, Αθήνα, Ελλάδα

- Ενεργός συμμετοχή στο πρόγραμμα Εφημεριών και των διακομιδών

Από 03/2004 – 06/2004

Επιμελήτρια Παιδίατρος/Νεογνολόγος - ΜΕΝΝ Μαιευτικής Κλινικής «ΛΗΤΩ», Αθήνα, Ελλάδα

- Υπεύθυνη για ιατρικές και επιστημονικές λειτουργίες της Μονάδας - Αίθουσας Τοκετών - Χειρουργείου για ανάνηψη νεογνών υψηλού κινδύνου
- Ενεργός συμμετοχή στο πρόγραμμα Εφημεριών της ΜΕΝΝ
- Κλινική εξέταση/επανεξέταση των νεογνών της Μαιευτικής Κλινικής

Από 02/2003 – 09/2003

Επιμελήτρια Παιδίατρος/Εντατικολόγος - Μονάδα Εντατικής Θεραπείας Παιδών, «ΙΑΤΡΙΚΟ» Κέντρο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα

- Υπεύθυνη για ιατρικές και επιστημονικές λειτουργίες της ΜΕΘ ΠΑΙΔΩΝ και των Καρδιοχειρουργικών Επεμβάσεων με Εξωσωματική κυκλοφορία
- Ενεργός συμμετοχή στο πρόγραμμα Εφημεριών της ΜΕΘ ΠΑΙΔΩΝ
- Κλινική εξέταση/επανεξέταση των νοσηλευόμενων παιδιών της ΜΕΘ ΠΑΙΔΩΝ

Από 05/2002 – 07/2004

Ιδιώτης Παιδίατρος/Νεογνολόγος - Ιδιωτικό Παιδιατρικό Ιατρείο στον Δήμο Αμαρουσίου, Αθήνα, Ελλάδα

- Κλινική εξέταση/ επανεξέταση/ μακροχρόνια παρακολούθηση/ εμβολιασμός/ προληπτικός έλεγχος νεογνών – βρεφών - παιδιών – εφήβων

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

Από 30/11/2016 – σήμερα

Υποψήφια Διδάκτωρ Ιατρικής Σχολής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Γουδί, Αθήνα, Ελλάδα

- Θέμα Διδακτορικής Διατριβής: «Μεταβολομικό προφίλ ούρων νεογνών σιτιζόμενων αποκλειστικά με μητρικό γάλα συγκρινόμενο με αυτό νεογνών σιτιζόμενων με βρεφική φόρμουλα εμπλουτισμένη με συνβιοτικά»

Από 18/10/1999 – 31/10/2001

Εξειδίκευση στη Νεογνολογία - Τμήμα Νεογνών Β' Παιδιατρικής Κλινικής ΕΚΠΑ Νοσοκομείου Παίδων «Π. & Α. Κυριακού»

- **Τίτλος Εξειδίκευσης στη Νεογνολογία**

Από 02/1996 – 02/08/1999 - Α' Παιδιατρική Κλινική ΕΚΠΑ Νοσοκομείου Παίδων «Αγία Σοφία»

- Συνέχιση ειδικότητας Παιδιατρικής, μετά τη συμπλήρωση ενός έτους ειδικότητας στην Παιδιατρική Κλινική του Γ.Ν.Ν.Κορίνθου και εκπλήρωσης ενός έτους υποχρεωτική υπηρεσία υπαίθρου με απόσπαση στο προαναφερόμενο νοσοκομείο, καλύπτοντας τις ανάγκες του Σταθμού Αιμοδοσίας και του Αιματολογικού Εργαστηρίου καθώς και το πρόγραμμα εφημεριών.
- **Τίτλος Ειδικότητας Παιδιατρικής**

Από 09/1984 – 03/1991 - Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Γουδί, Αθήνα, Ελλάδα

- **Πτυχίο Ιατρικής (Βαθμός: ΑΡΙΣΤΑ)**

ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

APLS : Advanced Paediatric Life Support (26/04/2013)

BLS : Basic Life support (01/01/2019)

NLS : Neonatal Life Support (01/02/2019)

IPPN Certificate of Successful Completion: International Program on Preterm Nutrition 2022 (SCORE CARD 90/90/90/100/100/90 MODULES 6)

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Ξένες Γλώσσες: Αγγλικά, Γαλλικά

Επικοινωνιακές δεξιότητες

- Άριστες επικοινωνιακές δεξιότητες με συναδέλφους της νεογνολογικής – παιδιατρικής κοινότητας και άλλων ειδικοτήτων που αποκτήθηκαν μέσα από την εμπειρία μου ως διευθύντρια της MENN
- Ιδιαίτερη επικοινωνιακή ικανότητα όσον αφορά την έγκυρη και λεπτομερή ενημέρωση του γονεϊκού περιβάλλοντος των νοσηλευόμενων νεογνών
- Ψυχολογική υποστήριξη (λοχειακά Blues) και κατάλληλη καθοδήγηση των λεχωίδων όσον αφορά στο μητρικό θηλασμό και την ενθάρρυνσή του

Οργανωτικές / διαχειριστικές δεξιότητες

- Διοικητικές και ηγετικές ικανότητες απαραίτητες για την εύρυθμη λειτουργία της ομάδας της MENN (προγράμματα εκπαίδευσης - μετεκπαιδευτικά μαθήματα - εφαρμογή θεραπευτικών πρωτοκόλλων και κατευθυντήριων οδηγιών - εξεύρεση νέου ιατροτεχνολογικού εξοπλισμού και υλικών νοσηλείας - έλεγχος ποιότητας εκτελούμενων εξετάσεων και ιατρικών πράξεων - συντονισμός διακομιδών ΕΚΑΒ)

Επαγγελματικές δεξιότητες

- Καλή μεταδοτικότητα όσον αφορά στις ιατρικές πράξεις και πρωτόκολλα απαραίτητα για την άριστη νοσηλεία των νεογνών – βρεφών
- Ενεργή συμμετοχή στην άριστη εκπαίδευση των εξειδικευμένων και ειδικευομένων της MENN

Δεξιότητες πληροφορικής

- Καλός χειρισμός των εργαλείων Microsoft Office

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟ ΕΡΓΟ

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ: **27**

ΑΝΑΡΤΗΜΕΝΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ: **7**

ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ: **5**

ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΣΥΝΕΔΡΙΑ: **2**

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ: **32**

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ: **7**

ΔΙΑΛΕΞΕΙΣ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ : **2**

ΠΡΟΕΔΡΕΙΟ ΣΕ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ : **2**

ΣΥΝΕΧΙΖΟΜΕΝΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- Παρακολούθηση **217** Ημερίδων - Διημερίδων – Συνεδρίων Ελληνικών και Διεθνών: CME - EACCME credits (2010 – 2021): **584**
- Παρακολούθηση των ετήσιων Μετεκπαιδευτικών Μαθημάτων της Νεογνολογικής Κλινικής ΕΚΠΑ από 2016 έως σήμερα
- Παρακολούθηση του προγράμματος **UENPS** Learning - Best Practice in Neonatology on Respiratory Care - on Covid - 19 - on Nutrition - on Brain (2020 – 2022 Certificates of Attendance)
- Παρακολούθηση των ετήσιων Workshop – e Learning Courses Nestle Nutrition Institute (2019 - 2022)
- Επιτυχής ολοκλήρωση με πιστοποίηση Europass του εκπαιδευτικού προγράμματος με τίτλο: «Συγγραφή Επιστημονικών Δημοσιεύσεων στις Επιστήμες Υγείας». Διοργανώθηκε από το Κέντρο Επιμόρφωσης και Διά Βίου Μάθησης ΕΚΠΑ. Ακαδημαϊκό Έτος 2020 – 2021. Διάρκεια 3 μήνες/150 ώρες Εξ Αποστάσεως

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

- **Urine Metabolomic Profile of Breast versus Formula - Fed Neonates Using a Synbiotic - Enriched Formula.** Vasiliki Falaina, Charalambos Fotakis, Theodora Boutsikou, Thalia Tsiaka, Georgios Moros, Sotirios Ouzounis, Vasiliki Andreou,

Zoi Iliodromiti, Theodoros Xanthos, Yvan Vandenplas, Nicoletta Iacovidou, Panagiotis Zoumpoulakis. **International Journal of Molecular Sciences** volume 23, n18, p10476. DOI: 10.3390/ijms231810476.

- **Fungemia due to *Moesziomyces aphidis* (*Pseudozyma aphidis*) in a premature neonate. Challenges in species identification and antifungal susceptibility testing of rare yeasts.** Alexandra Mpakosi, Maria Siopi, Maria Demetriou, **Vasiliki Falaina**, Martha Theodoraki, Joseph Meletiadis. **Journal of Medical Mycology**. DOI: 10.1016/j.mycmed.2022.101258}, 2022 Aug, Elsevier BV, vol32, n3, p101258.
- **The Metagenomic and Metabolomic Profile of the Infantile Gut: Can They Be Predicted by the Feed Type?** Eftychia Ioanna Dimitrakopoulou, Abraham Pouliakis, **Vasiliki Falaina**, Theodoros Xanthos, Panagiotis Zoumpoulakis, Thalia Tsiaka, Rozeta Sokou, Zoi Iliodromiti, Theodora Boutsikou, Nicoletta Iacovidou. **Children**. DOI: 10.3390/children9020154, 2022Jan, MDPI, vol9, n2p154.
- **A fatal neonatal case of fungemia due to *Exophiala dermatitis* - case report and literature review.** Alexandra Mpakosi, Maria Siopi, Maria Demetriou, **Vasiliki Falaina**, Martha Theodoraki, Joseph Meletiadis. August 2022. **BMC Pediatrics** 22(1) DOI: 10.1186/s12887-022-03518-5 Licence.CC BY 4.0.
- **Novel PLEC Variant Causes Mild Skin Fragility, Pyloric Atresia, Muscular Dystrophy and Urological Manifestations.** M Valari, M Theodoraki, I Loukas, S Gkantseva - Patsoura, G Karavana, **V Falaina**, L Lykopoulou, R Pons, I Athanasiou, K Wertheim - Tysarowska, C Kanaka - Gantenbein, D Kiritsi. **Acta Dermato Venereologica**. DOI: 10.2340/00015555-3317}, 2019, Medical Journals Sweden, vol99, n13, p1309—1310.
- **Successful therapy of *Candida pulcherrima* fungemia in a premature newborn with liposomal amphotericin B and micafungin.** Alexandra Mpakosi, Maria Siopi, **Vasiliki Falaina**, Nikolaos Siafakas, Emmanuel Roilides, Maria Kimouli, Martha Theodoraki, Paraskevi Karle, Joseph Meletiadis. **Medical Mycology Case Reports**. DOI: 10.1016/j.mmcr.2016.08.002, 2016 Jun, Elsevier, vol12, p24—27.

- **BELL'S PALSY ASSOCIATED WITH MYCOPLASMA PNEUMONIAE INFECTION.**
Vassiliki Papaevangelou, **Vasiliki Falaina**,, Vassiliki Syriopoulou, Maria Theodoridou. **The Pediatric Infectious Disease Journal.** DOI: 10.1097/00006454-199911000-00022, 1999 Nov, Ovid Technologies, v18, n11, p1024—1026.

Συμμετοχή σε Συλλόγους/Εταιρίες

- Μέλος του Ιατρικού Συλλόγου Αθηνών από το 1991.
- Μέλος της Ελληνικής Παιδιατρικής Εταιρείας από το 1999.
- Μέλος της Ελληνικής Ακαδημίας Παιδιατρικής από το 2006.
- Μέλος της Ελληνικής Νεογνολογικής Εταιρείας από το 2008.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	18
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΝΕΟΓΝΙΚΗΣ – ΒΡΕΦΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ	22
1.1 Εισαγωγή	22
1.2 Μητρικό γάλα – Σύσταση	23
1.2.1 Ορισμός μητρικού θηλασμού	24
1.2.2 Πλεονεκτήματα μητρικού γάλακτος για το νεογνό – βρέφος	24
1.3 Ιστορική εξέλιξη της βρεφικής διατροφής	24
1.3.1 Σταθμοί στην εξέλιξη της τυποποιημένης βρεφικής διατροφής	25
1.3.2 Βρεφικό γάλα	27
1.3.3 20 ^{ος} Αιώνας: Βρεφικά γάλατα και Θηλασμός	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ	30
2.1 Ορισμός	30
2.2 Σύγχρονες τάσεις ανάπτυξης του κλάδου των προβιοτικών	31
2.3 Είδη προβιοτικών οργανισμών	33
2.3.1 Γαλακτικά βακτήρια	33
2.3.2 Γένος Lactobacillus	35
2.3.3 Γένος Bifidobacterium	36
2.3.4 Ζύμες ως προβιοτικά	36
2.4 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών	37
2.5 Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών	41
2.6 Ευεργετικές ιδιότητες των προβιοτικών μικροοργανισμών	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ – ΣΥΜΒΙΟΤΙΚΑ – ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ	42
3.1 Ορισμοί	42
3.2 Οφέλη των πρεβιοτικών	43
3.3 Χαρακτηριστικά των πρεβιοτικών	46
3.4 Ιδιότητες πρεβιοτικών	47
3.5 Επιδράσεις στην υγεία νεογνών – βρεφών – νηπίων σιτιζόμενων με βρεφική φόρμουλα εμπλουτισμένη με προβιοτικά ή συνβιοτικά	47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ	49
4.1 Οικολογία της εντερικής μικροχλωρίδας	49
4.2 Ποικιλομορφία του εντερικού μικροβιώματος ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ – ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ – ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΑ	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ – NMR	56
6.1 Τεχνικές φασματοσκοπίας NMR – Φάσματα μίας διάστασης (¹ D – NMR)	57
6.1.1 Καταστολή σήματος διαλύτη	59
6.1.2 Καταστολή σήματος πρωτεϊνών	59
6.2 Αποτίμηση μεταβολιτών με φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (² D – NMR)	60
6.3 Προ - επεξεργασία φασματικών δεδομένων	61
6.4 Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση	62
6.4.1 Ανάλυση κύριων συνιστωσών	63
6.4.2 Ορθογώνια παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση	64
6.4.3 Επικύρωση στατιστικών μοντέλων	64
6.4.4 Εντοπισμός σημαντικών μεταβολιτών	66
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΣΚΟΠΟΣ	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	71
2.1 Συλλογή δειγμάτων	71
2.2 Μεταβολομική ανάλυση	74
2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων	74
2.2.2 NMR μετρήσεις και επεξεργασία δεδομένων	74
2.2.3 Ταυτοποίηση μεταβολιτών	74
2.3 Στατιστική ανάλυση	75
2.3.1 Επεξεργασία δεδομένων μετά τη λήψη του φάσματος	75
2.3.2 Ταυτοποίηση των σημαντικών μεταβολιτών και επικύρωση του μοντέλου για SIMCA – P	76
2.3.3 Επικύρωση των μοντέλων για γλώσσα R	77

2.3.4 Ανάλυση των μεταβολομικών μονοπατιών	77
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	78
3.1 Ανίχνευση μεταβολιτών	78
3.2 Μεταβολική έρευνα	79
3.3 Ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	100
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	105
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	107
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ	108
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	109
ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ	124

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

1D-NMR: Φασματοσκοπία NMR μίας διάστασης

2D-NMR: Φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων

AA: Αραχιδονικό Οξύ- Arachidonic Acid

Acquisition time: Χρόνος καταγραφής σημάτων

AUC: Περιοχή κάτω από την καμπύλη - Area Under Curve

BF: Θηλάζοντα – Breast - fed

Bins: Μεταβλητές

COSY Πείραμα: Πείραμα λήψης φάσματος 2 διαστάσεων - Correlation

SpectroscopyCPMG: Παλμική ακολουθία που εφαρμόζεται για την καταστολή του σήματος πρωτεϊνών/Carr – Purcell - Meiboom - Gill

Cryoprobe: Κρυογενικός αισθητήρας

CV-ANOVA: Έλεγχος διασταυρωμένης επικύρωσης της ανάλυσης - Cross

DHA: Δοκοσαεξανικό Οξύ - Docosahexaenoic Acid

FAO: Διεθνής Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας - Food and Agriculture Organization of the United Nations

FF: Σιτιζόμενα με Φόρμουλα – Formula - fed

FID: Ελεύθερα φθίνουσα ταλάντωση - Free Induction Decay

FOS: Φρουκτοολιγοσακχαρίτες - Fructo Oligosaccharides

GRAS: Αναγνωρισμένα ως ασφαλή στη χρήση - Generally Recognized As Safe

Heteronuclear: Ετεροπυρηνικός

HMBC Πείραμα: Πείραμα μεταβολομικής ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων που συσχετίζει ετεροπυρηνικά σπιν που απέχουν μεταξύ τους μέχρι 3 δεσμούς - Heteronuclear Multiple Bond Coherence

Homonuclear: Ομοιοπυρηνικός

HSQC Πείραμα: Πείραμα μεταβολομικής ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων που συσχετίζει ετεροπυρηνικά σπιν κατά μήκος ενός δεσμού - Heteronuclear Single Quantum Coherence

LC/GC - MS: Υγρή - Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας - Liquid Chromatography/Gas Chromatography - Mass Spectrometry

Loadingplot: Διάγραμμα loading

Mnova – Mester Nova: μαθηματικά λογισμικά για κατάλληλη διαμόρφωση φασμάτων προς αποτίμηση

Multivariate Statistical Analysis: Πολυπαραμετρική Στατιστική Ανάλυση

NDO: Άπεπτοι Ολιγοσακχαρίτες - Non Digestible Oligosaccharides

NMR: Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός - Nuclear Magnetic Resonance

OPLS - DA: Μέθοδος ορθογώνιας παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση/Orthogonal Partial Least Square Regression –Discriminant Analysis

PAHO: Παναμερικανικός Οργανισμός Υγείας - Pan American Health Organization

Pareto: Τεχνική μετατροπής δεδομένων μεταβολομικής ανάλυσης

PCA: Ανάλυση κύριων συνιστωσών - Principal Component Analysis

PFGC: Ηλεκτροφόρηση πηκτής παλλόμενου πεδίου - Pulsed - Field Gel Electrophoresis

Presat: Ακολουθία που εφαρμόζεται για την καταστολή του σήματος νερού

Pulse excitation: Παλμός διέγερσης

Q Παράμετρος: Αναφέρεται στην προβλεπτική ικανότητα του στατιστικού μοντέλου - Goodness of Prediction

R² παράμετρος: Συντελεστής προσαρμογής του εξαγόμενου μοντέλου στην πραγματική διακύμανση των μεταβλητών – Goodness of Fit

RAPP-DNA: Τεχνική τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA - Random Amplification of Polymorphic DNA

Relaxation delay: Χρόνος επαναφοράς ή εφησυχασμού για την προετοιμασία του δείγματος

ROC: Καμπύλη ROC - Receiver Operating characteristic Curve

SBS: Σύνδρομο Βραχέος Εντέρου –Short Bowel Syndrome

Score plot: Διάγραμμα scores

S-line plot: Διάγραμμα S γραμμής

Supervised: Επιβλεπόμενη

Systems Biology: Βιολογία Συστημάτων

Targeted: Στοχευμένη

TOSCY Πείραμα: Πείραμα συμπληρωματικό της ακολουθίας COSY στα πειράματα μεταβολομικής ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων - Total Correlation Spectroscopy

UNICEF: Διεθνές Ταμείο Επείγουσας Βοήθειας των Ηνωμένων Εθνών για τα Παιδιά -

United Nations International Children's Emergency Fund

Unsupervised: Μη επιβλεπόμενη

Untargeted: Μη στοχευμένη

CV – ANOVA: Cross - Validated Analysis of Variance: Έλεγχος Διασταυρωμένης
Επικύρωσης της Ανάλυσης

VIP plot: Διάγραμμα σημαντικότητας

WHO: Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας-World Health Organization

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΝΕΟΓΝΙΚΗΣ – ΒΡΕΦΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ

1.1 Εισαγωγή

Τα δύο πρώτα χρόνια της ζωής είναι μία κρίσιμη περίοδος εξασφάλισης των εφοδίων για μια υγιή παιδική και ενήλικη ζωή μέσω της βέλτιστης διατροφής [1]. Η ταχεία ανάπτυξη κατά τους πρώτους μήνες της ζωής οδηγεί σε ιδιαίτερες απαιτήσεις τόσο σε θρεπτικά μακροσυστατικά (πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες, υγρά), όσο και σε μικροσυστατικά (βιταμίνες, ιχνοστοιχεία, ανόργανα άλατα) [2]. Ακόμη, δεδομένου του ότι η ανάπτυξη πολλών οργάνων του σώματος, όπως του εγκεφάλου, πραγματοποιείται κατά τα πρώτα έτη της ζωής, συμπεραίνουμε την αναγκαιότητα για μια σωστή διατροφή κατά τη χρονική αυτή περίοδο [2]. Το μητρικό γάλα είναι ιδανικό για τα νεογνά [3]. Παρέχει όλα τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται τα βρέφη στα πρώτα στάδια της ζωής τους [4]. Σύμφωνα με τον ΠΟΥ παρέχει όλη την ενέργεια και τις θρεπτικές ουσίες που χρειάζεται το βρέφος για τους πρώτους μήνες της ζωής του, συνεχίζει να καλύπτει πάνω από τις μισές διατροφικές ανάγκες του παιδιού κατά τη διάρκεια του δεύτερου εξαμήνου της ζωής, και έως το ένα τρίτο των αναγκών κατά το δεύτερο έτος της ζωής [5]. Οι συστάσεις του ΠΟΥ και της UNICEF για τη βέλτιστη διατροφή κατά τα πρώτα χρόνια της ζωής, είναι οι εξής [6,7]:

1. αποκλειστικός μητρικός θηλασμός για τους πρώτους 6 μήνες της ζωής
2. ασφαλής προσθήκη συμπληρωματικών τροφών έπειτα από το πρώτο εξάμηνο με συνέχιση του μητρικού θηλασμού έως την ηλικία των 2 ετών ή και περισσότερο εφόσον το επιθυμεί η μητέρα και το παιδί.

Ο όρος «αποκλειστικός θηλασμός» περιλαμβάνει τη χορήγηση μόνο μητρικού γάλακτος ή κάποιας απαιτούμενης φαρμακευτικής αγωγής, χωρίς χορήγηση άλλων υγρών, συμπεριλαμβανομένου του νερού [8]. Εξάλλου το μητρικό γάλα αποτελείται κατά 88% από νερό. Αν η τεχνική του θηλασμού είναι ικανοποιητική, το μητρικό γάλα καλύπτει τις ενεργειακές ανάγκες των βρεφών για τους πρώτους 6 μήνες της ζωής [9]. Η χορήγηση επιπλέον υγρών μειώνει την πρόσληψη γάλακτος από το βρέφος [9].

Από την ηλικία των 6 μηνών και έπειτα, οι ενεργειακές ανάγκες των βρεφών αυξάνονται και η χορήγηση συμπληρωματικών τροφών είναι αναγκαία [10]. Πολλές φορές, είναι στη χρονική περίοδο 6 - 23 μηνών που εμφανίζονται ελλείψεις

θρεπτικών συστατικών και καθυστέρηση της ανάπτυξης [10]. Το μητρικό γάλα συνεχίζει και στην ηλικιακή αυτή ομάδα να παρέχει υψηλής ποιότητας συστατικά, οπότε δε θα πρέπει να διακόπτεται [9].

1.2 Μητρικό γάλα – Σύσταση

Η σύσταση του μητρικού γάλακτος είναι δυναμική και ποικίλλει από το πρωτόγαλα έως το γάλα της όψιμης γαλουχίας [3,4]. Η σύσταση μπορεί να είναι διαφορετική ακόμη και σε διαφορετικά γεύματα της ίδιας ημέρας [3,4]. Το μητρικό γάλα μπορεί να χαρακτηριστεί σαν μια πλήρης τροφή, χωρίς να χρειάζεται επιπλέον πρόσληψη συμπληρωμάτων, τουλάχιστον για τους πρώτους 6 μήνες. Το λίπος του μητρικού γάλακτος αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για το βρέφος, προσφέροντας το 40 - 55% της ολικής ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης του και αναγκαίες ποσότητες λιποδιαλυτών βιταμινών και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (λινελαϊκό οξύ [ω -6] και α -λινολενικό οξύ [ω -3]). Τα μέσης αλύσου λιπαρά οξέα (C<12) αποτελούν μόνο το 10% του συνόλου των λιπαρών οξέων στο «ώριμο» μητρικό γάλα, ενώ στο γάλα μητέρων πρόωρων βρεφών το ποσοστό αυτό είναι διπλάσιο. Το ελαϊκό (18:1), το παλμιτικό (16:0) και το λινελαϊκό οξύ βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στο μητρικό γάλα, σε αντίθεση με το α -λινολενικό οξύ που αποτελεί μόνο το 1% του συνόλου των λιπαρών οξέων [11]. Το μητρικό γάλα περιέχει και συγκεκριμένη ποσότητα συντιθέμενου αραχιδονικού (AA) και δοκοσαεξανοϊκού οξέος (DHA), σε αναλογία 1,5 - 2:1 (AA/DHA) [12]. Το βρέφος απορροφά περίπου το 85% - 90% του λίπους του μητρικού γάλακτος [13], η σύσταση του οποίου σε λιπαρά οξέα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διαίτα της μητέρας, πχ. αν καταναλώνει μεγάλες ποσότητες ψαριών ή είναι χορτοφάγος. Τα τριγλυκερίδια αποτελούν το 98% του συνολικού λίπους του γάλακτος, τα φωσφολιπίδια το 0,7% και η χοληστερόλη το 0,5%. Το μητρικό γάλα περιέχει σημαντική ποσότητα χοληστερόλης (10-20mg/dl ή 250-500mg/100grλίπους) και γι' αυτό τα βρέφη που θηλάζουν έχουν σχετικά υψηλή πρόσληψη χοληστερόλης (25mg/Kg) σε σχέση με αυτή των ενηλίκων (4mg/Kg)[11]. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο μητρικό γάλα κυμαίνεται στα 0,8 - 0,9gr/100ml, ενώ τα αμινοξέα κυστεΐνη και ταυρίνη, βρίσκονται σε σημαντικές ποσότητες σε αυτό. Ο κύριος υδατάνθρακας του μητρικού γάλακτος είναι η λακτόζη (περιεκτικότητα 7gr/dl) [13].

1.2.1 Ορισμός μητρικού θηλασμού

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) προσδιόρισε τρεις έννοιες του μητρικού θηλασμού: Πλήρης μητρικός θηλασμός: μητρικό γάλα και ημιστερεές τροφές. Μερικός μητρικός θηλασμός: μητρικό γάλα μαζί με άλλα είδη γάλακτος (με ή χωρίς την κατανάλωση στερεών τροφών). Αποκλειστικός μητρικός θηλασμός: αποκλειστικά και μόνο μητρικό γάλα.

1.2.2 Πλεονεκτήματα μητρικού γάλακτος για το νεογνό - βρέφος

Το μητρικό γάλα και ο θηλασμός προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα στο βρέφος, που αφορούν τη γενικότερη κατάσταση της υγείας του. Επιδημιολογικές έρευνες στις ΗΠΑ, στην Ευρώπη και σε άλλες αναπτυγμένες χώρες έδειξαν ότι το μητρικό γάλα μειώνει τη συχνότητα ή/και τη βαρύτητα εμφάνισης διάρροιας [14,15], λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος [16], ωτίτιδας, λοιμώξεων του γαστρεντερικού και ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα [17]. Επιπλέον, το μητρικό γάλα μειώνει τον κίνδυνο αιφνίδιου βρεφικού θανάτου, προστατεύει από τον ινσουλινο-εξαρτώμενο διαβήτη, την παχυσαρκία και την τερηδόνα. Σε μια μελέτη με 227 νήπια ηλικίας από 18 έως 48 μηνών, διαπιστώθηκε ότι το 54% των παιδιών που τρέφονταν αποκλειστικά με μητρικό γάλα δεν είχαν τερηδόνα, ενώ μόνο το 20% αυτών που τρέφονταν με υποκατάστατα του μητρικού δεν είχαν τερηδόνα [18]. Ο μητρικός θηλασμός και η διάρκεια αυτού έχει συσχετιστεί και με ενδεχόμενη διανοητική ανάπτυξη του βρέφους στα μετέπειτα χρόνια μέχρι την εφηβεία του [19,20]. Σημαντική είναι και η ανάπτυξη ψυχικού δεσμού μεταξύ μητέρας και βρέφους, αφού έχουν μια συνεχή φυσική επαφή [21]. Τα πλεονεκτήματα του θηλασμού είναι σημαντικά και σε ειδικές περιπτώσεις (φαιτυλοκετονουρία, κυστική ίνωση, σύνδρομο Down), μόνο που χρειάζεται το μητρικό γάλα να εμπλουτιστεί, ώστε να καλύπτονται οι σχετικά υψηλές απαιτήσεις των βρεφών για τα διάφορα θρεπτικά συστατικά [22].

1.3 Ιστορική εξέλιξη της βρεφικής διατροφής

Η διατροφή του βρέφους ανά τους αιώνες και σε διάφορους πολιτισμούς περιλάμβανε πέρα από τον μητρικό θηλασμό, την τροφή και την τεχνητή διατροφή με διάφορα είδη τροφίμων που χορηγούνταν σαν υποκατάστατα του μητρικού γάλακτος. Όλη την περίοδο πριν την βιομηχανική επανάσταση κανένα προϊόν δεν κατόρθωσε να υποκαταστήσει ικανοποιητικά το μητρικό γάλα με αποτέλεσμα

σημαντικά υψηλή βρεφική θνησιμότητα. Από τα τέλη του 19^{ου} αιώνα άρχισε σταδιακά η παραγωγή τροποποιημένων γαλάτων κατάλληλων για την βρεφική διατροφή, που καταναλώθηκαν συστηματικά τα επόμενα χρόνια με αποτέλεσμα την πτώση του θηλασμού σταδιακά. Τις τελευταίες δεκαετίες αναπτύχθηκαν σημαντικές καμπάνιες υπέρ του θηλασμού από Διεθνείς Οργανισμούς αλλά και κοινωνικά κινήματα, που επανέφεραν στο προσκήνιο τη σημασία του θηλασμού στη διατροφή και ανάπτυξη του βρέφους.

1.3.1 Σταθμοί στην εξέλιξη της τυποποιημένης βρεφικής διατροφής

Εκτός από το γάλα και άλλες τροφές χρησιμοποιήθηκαν για την διατροφή, όπως χυλός από δημητριακά και μύρα ή ψωμί και νερό, που ήταν αρκετά συνηθισμένα μέχρι και τον 18ο αιώνα. Εκείνη την εποχή το ξένο γάλα δινόταν αραιωμένο και προκειμένου να αυξηθεί η θρεπτική αξία πρόσθεταν ζάχαρη και δημητριακά για βελτιώσουν την διαλυτότητά του [23]. Στην Ελληνορωμαϊκή περίοδο (από κείμενα του Σορανού) μετά τους 6 μήνες δινόταν χυλός από κομματάκια ψωμί διαλυμένο μέσα σε κρασί, σούπες και αυγά [24]. Τον 19^ο αιώνα άρχισε να εξετάζεται και να συνδέεται η υψηλή θνητότητα, που ήταν περίπου 1 στα 12 βρέφη, και η νοσηρότητα με την διατροφή και ειδικά με τη χορήγηση του χυλού, δηλαδή νερό και αλεύρι, σαν βασική τροφή [23,25]. Οι πρώτες συστηματικές προσπάθειες για παρασκευή τυποποιημένης βρεφικής τροφής αναφέρονται στον **Πίνακα 1** [23,25]. Μέχρι τις αρχές του 20^{ου} αιώνα, η κύρια ξένη τροφή τον 1^ο χρόνο ήταν τα δημητριακά. Είχε ήδη συνδεθεί η εμφάνιση ασθενειών με την έλλειψη βιταμινών, όπως σκορβούτο με την έλλειψη ασκορβικού οξέος και ραχίτιδα με την έλλειψη βιταμίνης D, οπότε άρχισαν να προστίθενται στη διατροφή φρούτα, λαχανικά, μωρουδέλαιο. Από τη δεκαετία του 1920, ξεκινά η συστηματοποίηση της διατροφής [26]. Τις επόμενες δεκαετίες η συνιστώμενη από τους παιδίατρους ηλικία για την έναρξη χορήγησης στερεών τροφών κατεβαίνει στους μήνες και αρχίζει η χορήγηση φρούτων συστηματικά. Περιστασιακά υπάρχουν και κάποιες πιο ακραίες οδηγίες, όπως του 1953 που συνιστούσε χορήγηση δημητριακών την 2^η-3^η μέρα και φρούτα την 10^η μέρα ζωής. Τη δεκαετία του 1960 υπήρξε μεγάλη και συστηματική παραγωγή βιομηχανοποιημένων έτοιμων βρεφικών τροφών. Τότε άρχισαν να προστίθενται στις τυποποιημένες παιδικές τροφές ζάχαρη, αλάτι και όξινο γλουταμινικό μονονάτριο,

προκειμένου να γίνουν πιο νόστιμες και εύληπτες, πρακτική η οποία καταδικάστηκε και τα επόμενα χρόνια τέθηκαν όρια στην περιεκτικότητα ζάχαρης και άλατος, τα οποία γίνονται όλο και πιο αυστηρά και απαγορεύτηκε η χρήση όξινου γλουταμινικού μονονατρίου [26].

Πίνακας 1: Σταθμοί στην εξέλιξη τυποποιημένης βρεφικής διατροφής [23,25]

1867	«Liebig’s Soluble food for Babies» Λονδίνο	Φόρμουλα σε σκόνη που αποτελούνταν από υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λίπη, κατασκευαζόταν από γάλα, σιτάρι και όξινο ανθρακικό κάλιο που μιμούνταν τη σύσταση του μητρικού και διαλυόταν σε νερό ή αραιωμένο γάλα. Κατασκευάστηκε από τον χημικό Liebig, διατέθηκε αρχικά στο Λονδίνο και στη συνέχεια στις ΗΠΑ, όπου και βρήκε πολλούς μιμητές.
1867	«Nestle’s Milk Food» Ελβετία	Η πρώτη τυποποιημένη τροφή για βρέφη, διατίθεται σε τενεκεδάκια, ήταν ένα κοκκώδες μείγμα από ψημένα δημητριακά ανακατεμένο με σακχαρούχο γάλα και διαλυόταν με νερό.
1893	«Mellin’s Food» Λονδίνο	Σκόνη έτοιμη για διάλυση σε ζεστό νερό και στη συνέχεια προστίθεται γάλα, που περιείχε μια μεγάλη αναλογία σακχάρων (από σταφύλι), μεγάλη ποσότητα πρωτεϊνών και διαλυόμενα φωσφορικά άλατα ζωικής προέλευσης (κόκκαλα και κρέας).
1893		Οι πρώτες Ιατρικές Οδηγίες Διατροφής από την Αμερικανική Ιατρική Εταιρεία.
1928	«Gerber’s Food» ΗΠΑ	Οι πρώτες έτοιμες τροφές σε βαζάκια, που περιείχαν μίγματα λαχανικών (καρότο, σπανάκι, φασόλι, δαμάσκηνο), με χαμηλή τιμή πώλησης 1 δολάριο τα 6 βαζάκια.

1.3.2 Βρεφικό γάλα

Η χρήση ζωικού γάλακτος για τη διατροφή των νεογνών σημειώνεται ήδη από το 2000 π.Χ.. Από τότε, οι εναλλακτικές πηγές γάλακτος πέρασαν διάφορα στάδια εξέλιξης μέχρι να φτάσουμε στα σύγχρονα συνθετικά βρεφικά γάλατα. Το είδος του γάλακτος που χρησιμοποιείται κάθε εποχή εξαρτάται από το είδος του ζώου που ήταν διαθέσιμο - αίγες, πρόβατα, γαϊδούρια, καμήλες, χοίροι, ή άλογα αλλά το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο γάλα ήταν το αγελαδινό. Ήδη από τον 17^ο αιώνα η υψηλή βρεφική νοσηρότητα και θνησιμότητα συσχετίστηκε με την λήψη ξένου γάλακτος. Τον 18^ο αιώνα, οι πρώτες χημικές αναλύσεις του ανθρώπινου γάλακτος ανέδειξαν τις μεγάλες διαφορές από τα άλλα ζωικά γάλατα. Η πρώτη διαφορά που εντοπίστηκε αφορούσε την αυξημένη περιεκτικότητα του αγελαδινού γάλακτος σε πρωτεΐνη. Έτσι το γάλα αρχίζει να χορηγείται αραιωμένο, γεγονός που μείωσε τη θνητότητα, επηρέασε όμως την ανάπτυξη. Εμπειρικά, αρχίζουν να προσθέτουν ζάχαρη και βούτυρο στο αραιωμένο γάλα. Όσο η έρευνα εξελίσσεται, αποδεικνύεται ότι το ανθρώπινο γάλα είναι η καλύτερη πηγή διατροφής του βρέφους. Έτσι, ξεκίνησε η προσπάθεια παρασκευής ξένου γάλακτος που να μοιάζει με το μητρικό [27]. Αυτή η συστηματική ενασχόληση με την διατροφή ήταν και η απαρχή της δημιουργίας της παιδιατρικής ως ξεχωριστή ειδικότητα στις αρχές του 19^{ου} αιώνα (1816) [25]. Τον 19^ο αιώνα σημειώθηκε σημαντική πρόοδος στις τεχνικές συντήρησης των τροφίμων. Το 1810, ο N. Appert ανέπτυξε μια τεχνική για την αποστείρωση των τροφίμων σε σφραγισμένα δοχεία. Στην συνέχεια ακολούθησε η εφεύρεση του εβαπορέ (μερικώς αφυδατωμένο) γάλακτος, το οποίο κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας το 1835 από τον W. Newton. Το 1853, άρχισε να πωλείται γάλα εβαπορέ με προσθήκη ζάχαρης σε κονσέρβες, το οποίο αποτέλεσε μια αρκετά δημοφιλή τροφή. Το 1885 παρήχθη από τον J. Myerling μη ζαχαρούχο συμπυκνωμένο γάλα, με την ονομασία «εβαπορέ» και καταναλώθηκε συστηματικά μέχρι και τις δεκαετίες του 1940 - 1950 [26]. Τα επόμενα χρόνια παρήχθησαν και άλλα εμπορικά προϊόντα σε μορφή σκόνης, τα οποία αποτελούνταν από υδατάνθρακες όπως, σάκχαρα, άμυλα, και δεξτρίνες που προστίθενται στο γάλα και είχαν σκοπό τη θερμιδική ενίσχυση. Στα τέλη του 19^{ου} και αρχές του 20^{ου} δόθηκε έμφαση στην καθαριότητα και τη βελτίωση της ποιότητας του παραγόμενου γάλακτος, στην φροντίδα των γαλακτοπαραγωγικών ζώων, στην αποθήκευση και μεταφορά του με ασφάλεια και αναπτύχθηκαν τεχνικές, όπως

ομογενοποίηση, θέρμανση για αποστείρωση, συντήρηση σε ψυγείο κ.α[26]. Τις δεκαετίες του 1920 και 1930 υπήρξε στις ΗΠΑ η τάση να κατασκευάζονται σπιτικές φόρμουλες με γάλα, κρέμα γάλακτος, ζάχαρη ή μέλι σε συγκεκριμένες αναλογίες. Οι συνθήκες υγιεινής κατά την παρασκευή αυτών των προϊόντων ήταν αρκετά χαμηλές, με αποτέλεσμα σημαντική νοσηρότητα, οπότε και η πρακτική εγκαταλείφθηκε. Την ίδια εποχή η τεχνητή διατροφή συνδέθηκε με κάποιες στερητικές ασθένειες που οφείλονται σε έλλειψη βιταμινών, όπως σκορβούτο, ραχίτιδα, μπεριμπέρι, πελλάγρα [25], συσχετίστηκε η αναιμία των βρεφών με τη λήψη αγελαδινού γάλακτος και υπήρξε ο προβληματισμός για την δυνατότητα προσθήκης θρεπτικών συστατικών στο γάλα. Στη δεκαετία του 1920, οι επιστήμονες άρχισαν να αναπτύσσουν φόρμουλες για αλλεργικά στο αγελαδινό γάλα βρέφη. Το πρώτο προϊόν βασίστηκε σε άλευρο σόγιας, ήταν δύσοσμο, δύσληπτο, προκαλούσε γαστρεντερικές διαταραχές, δύσοσμο κόπρανα, εξανθήματα και ήταν φτωχό σε βιταμίνες [29]. Στα τέλη του 1940, προστέθηκε στο γάλα σόγιας βιταμίνη Κ και ιώδιο, ενώ άρχισε σταδιακά και η παραγωγή γάλακτος με υδρολυμένη πρωτεΐνη [30,31]. Τα επόμενα χρόνια καθώς η επιστημονική έρευνα προχωρούσε είχαν ήδη τεκμηριωθεί μια σειρά διαφορών του αγελαδινού γάλακτος σε σχέση με το μητρικό οπότε και εντατικοποιήθηκαν οι προσπάθειες να μοιάσει το ξένο γάλα με το μητρικό, με την τροποποίηση της σχέσης πρωτεϊνών, προσθήκη σακχάρων, βιταμινών, λιπαρών οξέων, ιχνοστοιχείων, όπως σίδηρος. Η παραγωγή τέθηκε υπό αυστηρό έλεγχο, με συγκεκριμένους κανόνες, ενώ απαγορεύτηκε η ιδιωτική παραγωγή, μια πρακτική που συνηθιζόταν τις δεκαετίες 1950 και 1960 σε μαιευτήρια και νοσοκομεία [32]. Τα σημαντικότερα στάδια στην παραγωγή του βρεφικού γάλακτος αναφέρονται στον

Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Σταθμοί στην ιστορία εξέλιξης της βρεφικής φόρμουλα [25-32]

- **1929** – Η πρώτη βρεφική φόρμουλα από σόγια παράχθηκε
 - Χωρίς γάλα, ελεύθερη λακτόζης
 - Αναπτύχθηκε ως εναλλακτική βρεφική τροφή των σπιτικών τροφών εκείνη την εποχή
 - Το σογιάλευρο είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση σημαντικών γαστερεντερικών διαταραχών
- **1942** – Παραγωγή βρεφικής φόρμουλας με υδρολυμένη πρωτεΐνη
- **1959** – Εμφάνιση βρεφικής φόρμουλας εμπλουτισμένης με σίδηρο
- **1960** – Έμφαση στον όρο «νεφρικό φορτίο»
- **1965** – Παραγωγή βρεφικής φόρμουλας από καθαρή πρωτεΐνη σόγιας
- **1966** – Εμφάνιση φόρμουλας για πρόωρα, σχεδιασμένη να καλύψει τις διατροφικές ανάγκες των ταχύτατα αναπτυσσόμενων χαμηλού βάρους γέννησης νεογνών
- **1971** – Παραγωγή της πρώτης πλήρους βρεφικής φόρμουλας με υδρολυμένη πρωτεΐνη και λιπαρά οξέα μέσης αλύσου
- **Δεκαετία 1990**
 - Βρεφική φόρμουλα από γάλα αγελάδας χωρίς λακτόζη
 - Μερικές βρεφικές φόρμουλες εμπλουτίστηκαν με νουκλεοτίδια
- **Αρχές της δεκαετίας 2000**
 - Οι βρεφικές φόρμουλες από γάλα αγελάδας και σόγια εμπλουτίστηκαν με εικοσιδιεξαενοϊκό (DHA) και αραχιδονικό (AA) λιπαρά οξέα

1.3.3 20^{ος} Αιώνας: Βρεφικά γάλατα και Θηλασμός

Όσο βελτιώνεται το παραγόμενο προϊόν τόσο και αυξάνεται η διαφήμιση, η διάδοση και η κατανάλωση του, έτσι ώστε η χρήση του ξένου γάλακτος να φτάσει τις δεκαετίες 1940 και 1950, να θεωρείται τόσο από τους γιατρούς αλλά και από τους καταναλωτές, ως ένα ασφαλές υποκατάστατο του μητρικού και ως εκ τούτου, ο θηλασμός παρουσίασε σταθερή μείωση μέχρι το 1970 [31]. Σ' αυτό συνέβαλε και το επιθετικό μάρκετινγκ της εποχής και στις αναπτυσσόμενες χώρες με αποτέλεσμα την δραματική μείωση του θηλασμού παγκοσμίως. Από τη δεκαετία του 1970, αρχίζουν κινήσεις για την προώθηση του θηλασμού και δημόσιες εκστρατείες ευαισθητοποίησης σχετικά με τη σημασία του, γεγονός που οδήγησε σε σταθερή αύξηση, όχι μόνο στο ποσοστό των θηλαζόντων βρεφών αλλά και στην διάρκεια του

θηλασμού [31,33]. Την ίδια εποχή αναπτύσσονται κοινωνικά και ανθρωπιστικά κινήματα όπως απελευθέρωσης των γυναικών, αυτοδιάθεσης του σώματος, που συμβάλλουν στον επαναπροσδιορισμό της αξίας και αναγκαιότητας θηλασμού και φυσικής διατροφής [34]. Την δεκαετία του 1990 ο ΠΟΥ, η UNICEF και ο Παναμερικανικός Οργανισμός Υγείας (PAHO), απαγόρευσαν την διαφήμιση βρεφικών γαλάτων και πιπίλων θηλάστρων σε μια προσπάθεια προώθησης και προστασίας του θηλασμού [35,36]. Συμπερασματικά, η διατροφή του βρέφους ανά τους αιώνες επηρεάστηκε από τις εκάστοτε κοινωνικές και πολιτιστικές αντιλήψεις αλλά και οικονομικές συνθήκες. Ο θηλασμός αποτέλεσε το πρώτιστο και βασικότερο τρόπο διατροφής, παρουσίασε σημαντική μείωση κυρίως στον δυτικό κόσμο, μετά την βιομηχανική επανάσταση, εξαιτίας της παραγωγής υποκατάστατων τροφών. Σήμερα, η αναντικατάστατη αξία του θηλασμού επανέρχεται στο προσκήνιο και κατακτά σταδιακά μια σημαντική θέση στην διατροφή των βρεφών.

2 ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

2.1 Ορισμός

Η ιδέα της καταστολής και αντικατάστασης των παθογόνων μέσω της στοματικής χορήγησης “ωφέλιμων” βακτηρίων για τη βελτίωση της μικροβιακής ισορροπίας, της υγείας και της μακροζωίας δεν είναι καινοφανής, αλλά παρουσιάστηκε για πρώτη φορά σχεδόν έναν αιώνα νωρίτερα από τον Tissier (1906) και τον Metchnikoff (1907). Ο Tissier έδειξε ότι τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* αποτελούν κυρίαρχα μέλη της εντερικής μικροχλωρίδας των βρεφών και πρότεινε τη χορήγηση τους για την αποκατάσταση της ισορροπίας της εντερικής μικροχλωρίδας και τη θεραπεία της διάρροιας. Την ίδια περίοδο, ο Metchnikoff ανέπτυξε τη θεωρία της αυτό-αποτοξίνωσης του οργανισμού και συνέδεσε την κατανάλωση γιαουρτιού που περιέχει βακτήρια του γένους *Lactobacillus*, με την παρατηρούμενη μακροζωία των Βουλγάρων χωρικών. Έπειτα από τις εξελίξεις αυτές, το 1965, εισήχθη από τους Lilly και Stillwell ο όρος προβιοτικός (προ-βίος, προάγω τη ζωή), για να περιγράψει βακτήρια και ενδοσπόρια που χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα διατροφής των ζώων και τα οποία θα μπορούσαν να περιορίσουν τη χρήση αντιβιοτικών ουσιών. Έκτοτε, ο όρος προβιοτικός επαναδιατυπώθηκε αρκετές φορές για να καταλήξει σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Η.Π.Α και τον Παγκόσμιο

Οργανισμό Υγείας (FAO/WHO, 2001) σε μία γενικώς αποδεκτή αναθεώρηση, στον ορισμό που παρατίθεται παρακάτω [37].

Σύμφωνα λοιπόν, με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO/WHO) τα προβιοτικά ορίζονται ως ζωντανοί μικροοργανισμοί, που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν ορισμένο όφελος για την υγεία του ξενιστή. Ένας παρόμοιος, αλλά περαιτέρω απλουστευμένος ορισμός δόθηκε και από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Γαστρεντερολογίας (WGO) ο οποίος αναφέρει πως τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που προσδίδουν ένα όφελος για την υγεία του ξενιστή [38]. Τα προβιοτικά έχουν κερδίσει έδαφος λόγω της πληθώρας στοιχείων που υποστηρίζουν τα ευεργετικά αποτελέσματά τους σε διάφορες ασθένειες. Καλλιέργειες της μικροχλωρίδας του εντέρου σε ενήλικες ασθενείς με σύνδρομο βραχέος εντέρου (Short Bowel Syndrome - SBS) έδειξαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις πολλών βακτηριακών κλώνων, οι οποίοι αντιθέτως βρέθηκαν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε υγιείς ενήλικες. Όσον αφορά το ρόλο των προβιοτικών στη διατήρηση της μικροχλωρίδας του εντέρου, παρουσιάζουν ενδιαφέρον τα αποτελέσματά τους για την ελάττωση της βακτηριακής υπερανάπτυξης και την πρόληψη της βακτηριακής μετατόπισης σε SBS. Ορισμένα προβιοτικά στελέχη έχουν διερευνηθεί εκτενώς, για να διαπιστωθεί ο αντίκτυπος στη δυσανεξία στη λακτόζη, τη διάρροια, τη δυσκοιλιότητα, καθώς και τη διατήρηση της μικροβιακής ισορροπίας του εντέρου [39].

2.2 Σύγχρονες τάσεις ανάπτυξης του κλάδου των προβιοτικών

Τα πρότυπα υγείας και διατροφής έχουν μεταβληθεί δραματικά κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών. Εκτός από την προσφορά των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για τον ανθρώπινο οργανισμό, τα τρόφιμα αποτελούν πλέον μέσο επίτευξης της ευεξίας, καθιστώντας τους καταναλωτές πιο ευαισθητοποιημένους σε θέματα υγιεινής και ωφέλιμης διατροφής. Δεδομένου ότι το προσδόκιμο όριο ζωής συνεχώς επιμηκύνεται, γίνονται προσπάθειες στον κλάδο της γηριατρικής, για την επίτευξη της υγιούς γήρανσης, χωρίς προβλήματα υγείας. Η ανάπτυξη επιστημονικών κλάδων, όπως η Βιοτεχνολογία, η Νανοτεχνολογία και η Διατροφολογία αποκαλύπτει πως πολυάριθμα παραδοσιακά φαγητά και

συστατικά τροφίμων επιτελούν λειτουργική δράση, ενώ παράλληλα αναπτύσσονται και καινοτόμα λειτουργικά τρόφιμα. Η συσσώρευση ερευνών που συσχετίζουν τη διατροφική δίαιτα με μη γενετικές, χρόνιες ασθένειες έχει προκαλέσει ραγδαίες αλλαγές στην Τεχνολογία Τροφίμων και στην αξιολόγηση των συνεπειών στην υγεία. Τα λειτουργικά τρόφιμα είναι εκείνα που περιέχουν βιολογικά ενεργές ενώσεις, οι οποίες – εκτός από την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών - περιέχουν και θρεπτικά συστατικά (όπως απαραίτητα λιπαρά οξέα ή βιταμίνες) όντας ζωτικής σημασίας για μια ισορροπημένη διατροφή. Τα τρόφιμα αυτά ταξινομούνται ως ολόκληρα, εμπλουτισμένα ή ενισχυμένα τρόφιμα ή ενώσεις τροφίμων που έχουν θετικά οφέλη για την υγεία του οργανισμού. Το μερίδιο αγοράς των συγκεκριμένων τροφίμων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα προβιοτικά αυξάνεται ραγδαία. Τα προβιοτικά τρόφιμα κατέχουν το 60-70% της αγοράς των λειτουργικών τροφίμων. Μεγάλη επιτυχία έχει σημειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες στην ανάπτυξη γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν προβιοτικά βακτήρια όπως ζυμούμενο γάλα, βρεφική τροφή και σκόνη γάλακτος. Τα προβιοτικά τρόφιμα πρέπει να είναι ασφαλή και να περιέχουν την απαραίτητη ποσότητα προβιοτικών οργανισμών όταν καταναλώνονται. Γι' αυτό το λόγο, τα στελέχη των προβιοτικών που επιλέγονται πρέπει να είναι τα κατάλληλα για βιομηχανική παραγωγή μεγάλης κλίμακας και να έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν και να διατηρούν τη λειτουργικότητά τους κατά την παραγωγή και αποθήκευση σε συνθήκες κατάψυξης ή ξηρές. Παρόλο που μία μεγάλη ποικιλία γενών και ειδών θεωρούνται σαν πιθανά προβιοτικά αυτά που χρησιμοποιούνται, κυρίως, εμπορικά σε προβιοτικά τρόφιμα είναι βακτήρια από τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Η κύρια αιτία είναι η μακρά ιστορία ασφαλούς χρήσης τους – θεωρούνται GRAS (generally recognized as safe) – καθώς και το γεγονός ότι είναι κυρίαρχοι μικροβιακοί πληθυσμοί στο ανθρώπινο έντερο. Η επιλογή των κατάλληλων στελεχών των προβιοτικών σε επαρκή δόση είναι η πρώτη προτεραιότητα για την ανάπτυξη ενός προβιοτικού τρόφιμου. Βασικά κριτήρια επιλογής αποτελούν η βιωσιμότητα κατά την παραγωγική διαδικασία και αποθήκευση καθώς και η επιβίωση κατά τη μεταφορά στο γαστρεντερικό σύστημα και τα πιθανά οφέλη για την υγεία μέσα από την κατανάλωσή τους. Με βάση τα παραπάνω κριτήρια, το *Lactobacillus* είναι πιο ανθεκτικό, σε σχέση με το *Bifidobacteria*, σε χαμηλό pH και προσαρμόζεται σε προϊόντα παρουσία γάλακτος και

άλλα υποστρώματα τροφίμων, με αποτέλεσμα να θεωρείται καταλληλότερο για χρήση σε προϊόντα τροφίμων. Η βιομηχανία τροφίμων, όπως και ο FDA των ΗΠΑ, έχει ορίσει ως ελάχιστη προτεινόμενη ποσότητα μικροοργανισμών κατά την κατανάλωση ενός προβιοτικού τρόφιμου τα 10^6 CFU ml⁻¹. Λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση που έχει η αποθήκευση του προβιοτικού τρόφιμου στη βιωσιμότητα του μικροοργανισμού και την ποσότητα που λαμβάνεται, η ημερήσια πρόσληψη 10⁸-10⁹ CFU ml⁻¹ προβιοτικών μικροοργανισμών είναι απαραίτητη για να επωφεληθεί ο ανθρώπινος οργανισμός. Αυτό αντιστοιχεί περίπου σε 100g προβιοτικού προϊόντος/ημέρα, ανάλογα και τη συγκέντρωση των αποικιών. Πολλοί παράγοντες έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των προβιοτικών βακτηρίων κατά την παραγωγή, επεξεργασία και αποθήκευση. Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι ιδιότητες του τρόφιμου όπως το pH, η οξύτητα, το μοριακό οξυγόνο, η ενεργότητα του νερού, η παρουσία αλατιού, ζάχαρης, χημικών όπως το υπεροξειδίου του υδρογόνου, οι βακτηριοσίνες, τεχνητές αρωματικές και χρωστικές ουσίες. Επίσης, παράμετροι που αφορούν την επεξεργασία, όπως η θερμική κατεργασία, η θερμοκρασία επώασης, ο ρυθμός ψύξης του προϊόντος, τα υλικά συσκευασίας, οι μέθοδοι αποθήκευσης και η κλίμακα παραγωγής. Τέλος, μικροβιολογικές παράμετροι όπως τα στελέχη των προβιοτικών, ο ρυθμός και η αναλογία του εμβολιασμού [40,41,42].

2.3 Είδη προβιοτικών οργανισμών

Η πληθώρα των προβιοτικών στελεχών που έχουν αναγνωριστεί ως προς την συνεισφορά τους στην καλύτερη υγεία των ανθρώπων ανήκουν στα γένη των *Lactobacillus* (γαλακτοβακίλλων) και των *Bifidobacteria*. Υπάρχουν, ωστόσο, και άλλα είδη όπως οι λακτόκοκκοι, εντερόκοκκοι, σακχαρομύκητες και προπιονικά βακτήρια που έχουν χαρακτηριστεί ως προβιοτικά είδη.

2.3.1 Γαλακτικά βακτήρια

Τα γαλακτικά βακτήρια είναι οι πιο σημαντικοί προβιοτικοί μικροοργανισμοί που συνδέονται συνήθως με το ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα. Είναι μια ομάδα βακτηρίων με παρόμοιες ιδιότητες και κύριο χαρακτηριστικό τους την παραγωγή γαλακτικού οξέος μέσω της ζύμωσης των υδατανθράκων. Στην κατηγορία των γαλακτικών βακτηρίων ανήκουν τα γένη *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*,

Carnobacterium, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus* (*Streptococcus thermophilus* κ.α.), *Tetragenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* και *Vagococcus*. Τα γαλακτικά βακτήρια χαρακτηρίζονται ως μεσόφιλα, ωστόσο μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες 5°C ως 45°C. Το pH για την ανάπτυξη της πλειοψηφίας των βακτηρίων αυτής της κατηγορίας κυμαίνεται 4,0-6,5 ενώ κάποια είδη μπορούν να αναπτυχθούν και σε χαμηλότερο ή υψηλότερο pH. Τα βακτήρια αυτά, έχουν ασθενή λιπολυτική και πρωτεολυτική ικανότητα. Η ανάπτυξη τους γίνεται παρουσία βιταμινών αμινοξέων και βάσεων πουρίνης και πυριμιδίνης, και για το λόγο αυτό τα μέσα στα οποία καλλιεργούνται περιέχουν πεπτόνη, εκχύλισμα ζύμης, διάφορα ιχνοστοιχεία και υδατάνθρακα ως πηγή ενέργειας. Τα γαλακτικά βακτήρια σχηματίζουν μικρές αποικίες ανεξάρτητα από την αφθονία των απαραίτητων συστατικών του μέσου ανάπτυξης τους, ενώ χαρακτηρίζονται από υψηλή ανεκτικότητα στα οξέα. Η ικανότητα τους να παράγουν μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος και να αντέχουν υπό αυτές τις συνθήκες αποτελεί ένα σημαντικό πλεονέκτημα των γαλακτικών βακτηρίων έναντι των άλλων βακτηρίων. Υπάρχουν δύο είδη γαλακτικών βακτηρίων, τα ομοζυμωτικά και τα ετεροζυμωτικά. Τα ομοζυμωτικά βακτήρια γλυκολύουν τις εξόζες και παράγουν γαλακτικό οξύ. Χαρακτηριστικά ομοζυμωτικά γαλακτικά βακτήρια είναι τα γένη των *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* και *Pediococcus*. Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια οξειδώνουν τις εξόζες προς πεντόζες (τη γλυκόζη σε ριβόζη) και έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα, αιθανόλης και γαλακτικού οξέος σε ίσα μέρη. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα στελέχη του γένους *Leuconostoc* και μερικά στελέχη του *Lactobacillus spp.* Η χρήση των γαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή ζυμωμένων προϊόντων, συμβάλλει στη συντήρηση των τροφίμων για μεγάλα χρονικά διαστήματα (λόγω μείωσης του pH από την παραγωγή γαλακτικού οξέος), στη βελτίωση της γεύσης, του αρώματος και της υφής των προϊόντων. Ορισμένα γαλακτικά βακτήρια παράγουν διάφορα παράγωγα πολυσακχαριτών τα οποία συμβάλλουν στη διαμόρφωση της υφής των ζυμωμένων τροφίμων και κυρίως των γιαουρτιών.

2.3.2 Γένος *Lactobacillus*

Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι γηγενή βακτήρια της βλεννογόνου μεμβράνης των ανθρώπων και ζώων, της στοματικής κοιλότητας, του εντέρου ή του κόλπου. Οι οργανισμοί αυτοί είναι μικροαναερόβιοι ή αναερόβιοι, οξυάντοχοι ή οξύφιλοι. Γενικά, οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν περίπλοκες διατροφικές απαιτήσεις διότι απαιτούν μικρή ποσότητα οξυγόνου, υδατάνθρακες επιδεκτικούς για ζύμωση, πρωτεΐνες και αμινοξέα, βιταμίνες της β-ομάδας, παράγωγα νουκλεϊκών οξέων, ακόρεστα ελεύθερα λιπαρά οξέα, και μέταλλα όπως μαγνήσιο, μαγγάνιο και σίδηρο. Οι γαλακτοβάκιλλοι είναι ανθεκτικοί στις συνθήκες καταπόνησης που επικρατούν στο ανθρώπινο πεπτικό σύστημα και ταυτόχρονα διαθέτουν τεχνολογικό δυναμικό, για αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως ως προβιοτικά. Ορισμένα από τα πιο γνωστά γαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά είναι τα εξής: *L.acidophilus*, *L.amylovorous*, *L.casei*, *L.crispatus*, *L.delbrueckii*, *L.gasseri*, *L.johnsonoo*, *L.paracasei*, *L.plantarum*, *L.reuteri* και *L.rhamnosus* [43]. Η πιθανή ευεργετική επίδραση των προβιοτικών μικροοργανισμών στον άνθρωπο τεκμηριώνεται με την πραγματοποίηση κλινικών δοκιμών. Αν και υπάρχει πληθώρα δεδομένων που αφορούν την ευεργετική δράση των *Lactobacillus*, τα περισσότερα από αυτά προέρχονται από *in vitro* δοκιμές και από δοκιμές σε ζώα, ενώ αντιθέτως λίγες τυχαίοποιημένες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί στον άνθρωπο. Η ανάλυση και αξιολόγηση των κλινικών ερευνών των *Lactobacillus* όπως και των υπόλοιπων προβιοτικών, που έχουν πραγματοποιηθεί έως τώρα, παρουσιάζει ιδιαίτερες δυσκολίες. Ποικιλία παραμέτρων, όπως η διαφορετική δόση και βιωσιμότητα των προβιοτικών στελεχών, οι διαφορές των υπό μελέτη πληθυσμών του ανθρώπου καθώς και οι διαφορές στα προβιοτικά στελέχη που έχουν χρησιμοποιηθεί, δυσκολεύει την ερμηνεία των κλινικών δοκιμών. Ωστόσο, τα αποτελέσματα της μετά-ανάλυσης των κλινικών αυτών δοκιμών τεκμηριώνουν την αποτελεσματικότητα της χορήγησης των *Lactobacillus* ως προφυλακτικό ή θεραπευτικό παράγοντα για την αντιμετώπιση των γαστρεντερικών επιμολύνσεων, των φλεγμονωδών διαταραχών και των αλλεργιών στα τρόφιμα [37].

2.3.3 Γένος *Bifidobacterium*

Μέχρι στιγμής έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί περίπου 30 είδη *Bifidobacteria* από ανθρώπους, ζώα, έντομα και από το περιβάλλον. Σε ένα ενήλικο άτομο το *Bifidobacterium ssp.* είναι ένα από τα πιο χαρακτηριστικά και πολυπληθέστερα βακτήρια που αποικίζουν το παχύ έντερο, ενώ στελέχη των *Bifidobacteria* έχουν εντοπιστεί στη στοματική κοιλότητα και το γαστρεντερικό σύστημα ανθρώπων και ζώων. Τα πιο γνωστά είδη που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί είναι: *B.adolescentis*, *B.animalis*, *B.bifidum*, *B.Breve*, *B.infantis*, *B.Lactis* και *B.longum*. Τα *Bifidobacteria* είναι θετικοί κατά Gram, ραβδόμορφοι, υποχρεωτικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, μη κινητοί, αρνητικοί στην καταλάση. Το βέλτιστο pH ανάπτυξης τους κυμαίνεται μεταξύ 6 και 7, ενώ ουσιαστικά δεν αναπτύσσονται σε pH 4.5-5.0 και χαμηλότερες τιμές, ούτε σε pH μεγαλύτερο από 8.0. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους είναι 37-41°C. Κατά τη ζύμωση των υδατανθράκων παράγουν κυρίως οξικό και γαλακτικό οξύ. Τα *Bifidobacteria* είναι ευαίσθητα στο οξυγόνο, έχουν υψηλές διατροφικές απαιτήσεις, για το λόγο αυτό η χρήση τους είναι περιορισμένη συγκριτικά με τους γαλακτοβάκιλλους. Τα βακτήρια αυτά μπορούν να αναπτυχθούν σε ένα ημισυνθετικό μέσο που περιέχει μόνο λακτόζη, τρία ελεύθερα αμινοξέα (κυστεΐνη, γλυκίνη και τρυπτοφάνη), διάφορες βιταμίνες και νουκλεοτίδια, καθώς και ορισμένα μέταλλα. Ορισμένα στελέχη των *Bifidobacteria* έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει άζωτο ως ιόν αμμωνίου, ενώ τα υπόλοιπα στελέχη του απαιτούν άζωτο από οργανικές πηγές [43].

2.3.4 Ζύμες ως προβιοτικά

Παρόλο που οι ζύμες αποτελούν μέρος της μικροχλωρίδας πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων το ενδιαφέρον για τη χρήση τους σε διατροφικά πρόσθετα ή προβιοτικά σκευάσματα είναι περιορισμένο και μόλις τα τελευταία χρόνια άρχισε να αναπτύσσεται. Ιστορικά οι ζύμες ως προβιοτικά έχουν συνδεθεί με τις τροφές ζώων που αναπτύσσονται σε φάρμες. Ιδιαίτερα, έχουν χρησιμοποιηθεί οι ζύμες του γένους *Saccharomyces* στη βιομηχανία ζωοτροφών για βοοειδή, χοίρους και πουλερικά [44].

2.4 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών

Τα προβιοτικά θα πρέπει να διατηρούν τη βιωσιμότητα και τη μεταβολική τους ικανότητα κατά τη διέλευση τους διαμέσου της γαστρεντερικής οδού. Για να μπορεί να χαρακτηριστεί ένας μικροοργανισμός ως προβιοτικό θα πρέπει να εκπληρώνει συγκεκριμένα κριτήρια όπως:

- Να έχει γίνει ταυτοποίηση του σε επίπεδο είδους (ή ακόμα και στελέχους) με φαινοτυπικές και γενοτυπικές μεθόδους. Η ασφαλής χρήση, οι ιδιότητες και η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών συνιστούν γνωρίσματα συγκεκριμένων μικροβιακών στελεχών, γεγονός που καθιστά αναγκαία τη διάκριση σε επίπεδο στελέχους. Δεδομένου ότι οι συμβατικές φαινοτυπικές μέθοδοι παρουσιάζουν περιορισμούς ως προς την ακρίβεια, την επαναληψιμότητα και τη διακριτική τους ικανότητα, η σύγχρονη ερευνητική δραστηριότητα προτείνει το συνδυασμό διαφορετικών τεχνικών (πολυφασική ταξινόμηση) για το χαρακτηρισμό των προβιοτικών στελεχών. Για το λόγο αυτό, εφαρμόζεται ένας συνδυασμός αξιόπιστων φαινοτυπικών και γενοτυπικών μεθόδων ταυτοποίησης που προσδίδει σταθερή και σαφή ονομασία προσδιορισμό στα στελέχη που επιλέγονται για προβιοτική χρήση. Για την ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους και είδους χρησιμοποιούνται διεθνώς αναγνωρισμένες γενοτυπικές μέθοδοι, όπως ο υβριδισμός μεταξύ ομόλογων μορίων DNA και η ανάλυση γονιδίων ριβοσωμικού RNA. Για τη διάκριση των προβιοτικών σε επίπεδο στελέχους χρησιμοποιείται η τεχνική του τυχαία ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD) - PCR καθώς και η ηλεκτροφόρηση πηκτής παλλόμενου πεδίου (PFGE), που θεωρείται η πλέον αξιόπιστη μέθοδος [45].
- Να αποτελεί γηγενή συστατικό του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος (ανθρώπινης προέλευσης). Οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί από τον πεπτικό σωλήνα υγιούς ανθρώπου θεωρούνται ασφαλέστεροι για κατανάλωση και ταυτόχρονα αποτελεσματικότεροι στην αποίκιση του γαστρεντερικού σωλήνα [43].
- Να είναι ασφαλή για χρήση σε τρόφιμα και φαρμακευτικά σκευάσματα (έλεγχος αιμολυτικής και τοξικής δράσης, επιδημιολογικές μελέτες). Ο

κίνδυνος μόλυνσης κατά την εισαγωγή ζωντανών μικροοργανισμών στη διατροφή θα πρέπει να ληφθεί υπόψιν (Generally Recognized as Safe/GRAS). Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την ορθή καθιέρωση κριτηρίων για την αξιολόγηση της ασφάλειας των προβιοτικών για ανθρώπινη χρήση τόσο από την Ευρώπη (The European Union Novel Food regulation, QPS, and PROSAFE) όσο και από τις Η.Π.Α. (FDA and WHO), και τον Καναδά(Health Canada: NHPR). Οι συνηθέστερες συστάσεις περιλαμβάνουν τα αρχεία ιστορικού απομόνωσης, ταξινομική ταυτοποίηση και απουσία τοξικότητας, μολυσματικότητας και μεταβιβάσιμων γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά.

- Να επιβιώνουν και να διατηρούν τις ιδιότητες τους στο γαστρεντερικό σωλήνα. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη στιγμή της χορήγησης, το προβιοτικό θα πρέπει να είναι ανθεκτικό στα ένζυμα που υπάρχουν στην στοματική κοιλότητα, όπως η αμυλάση και η λυσοζύμη, αν και τα θετικά κατά gram βακτήρια είναι γενικά ευαίσθητα στη λυσοζύμη, μερικά γαλακτικά βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά από άλλα θετικά κατά gram βακτήρια, όντας ικανά να γίνουν τμήμα των μικροβίων της στοματικής κοιλότητας. Μετά την κατάποση τα προβιοτικά αντιμετωπίζουν αντιμικροβιακούς παράγοντες στο στομάχι (όπως είναι το χαμηλό pH και το γαστρικό οξύ) και στο έντερο (παγκρεατίνη και χολικά άλατα), ενώ επίσης υφίστανται θερμικό σοκ λόγω της θερμοκρασίας του ανθρώπινου σώματος. Τα προβιοτικά πρέπει να παρουσιάζουν μηχανισμούς ανοχής σε οξέα και χολικά άλατα ώστε να μπορέσουν να επιβιώσουν στο έντερο. Η γαστρεντερική αντίσταση ποικίλει ανάλογα με τα είδη, για παράδειγμα το γένος των *Lactobacillus* είναι πολύ ανθεκτικό στις μεταβολές του pH, ενώ αντιθέτως το γένος των *Bifidobacteria* είναι εξαιρετικά ευαίσθητο σε χαμηλό pH, παρουσιάζοντας μικρά ποσοστά επιβίωσης σε pH 2-3. Έτσι, η ανοχή στις ανασταλτικές συνθήκες αποκλείει έναν σημαντικό αριθμό μικροοργανισμών. Η αντίσταση ενός μικροοργανισμού σε αυτές τις συνθήκες μπορεί να εξετασθεί πειραματικά καλλιεργώντας το στέλεχος που μας ενδιαφέρει σε διαφορετικό pH με την παρουσία ενζύμων (όπως η πεψίνη, η λυσοζύμη και η αμυλάση), φαινόλης, NaCl, Oxgall, γαστρικού

οξέος χοίρου, παγκρεατικού υγρού και ταυροδεοξυχολικού οξέος. Η αντοχή σε αυτές τις ενώσεις μετριέται με τον αριθμό των αποικιών ή την απορρόφηση σε διαφορετικό χρονικό διάστημα.

- Να μπορούν να προσκολληθούν και να πολλαπλασιαστούν σε επιφάνειες βλεννογόνου και ιδιαίτερα στον εντερικό βλεννογόνο.
- Να παρουσιάζουν ανοσοτροποποιητική δράση.
- Να παρεμποδίζουν ή να μειώνουν την προσκόλληση παθογόνων μικροβίων στον εντερικό βλεννογόνο (ανταγωνιστική ή αντιμικροβιακή δράση).

Μόλις προσκολληθούν στο έντερο, τα προβιοτικά παράγουν εξωκυτταρικά αντιμικροβιακά συστατικά μέσω της μετατροπής των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και άλλων δευτερευουσών ενώσεων σε σημαντικές ουσίες (όπως οργανικά οξέα, ένζυμα, υπεροξειδίο του υδρογόνου, βακτηριοκίνες και χαμηλού μοριακού βάρους πεπτίδια) και εξοντώνουν με αυτόν τον τρόπο παθογόνα βακτήρια. Άλλοι μηχανισμοί προβιοτικού ανταγωνισμού περιλαμβάνουν τον ανταγωνισμό για τα θρεπτικά συστατικά, την συσσωμάτωση με παθογόνα και τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτές οι ανταγωνιστικές δράσεις ποικίλουν ανάλογα με τα μικροβιακά στελέχη. Η παραγωγή αντιμικροβιακού μεταβολίτη μπορεί να εκτιμηθεί σε πλάκες άγαρ μέσω της δοκιμασίας ζώνης αναστολής, ενώ η ανταγωνιστική δραστηριότητα μπορεί να μελετηθεί με αναστολή της προσκόλλησης παθογόνων μικροοργανισμών σε κύτταρα λόγω της προβιοτικής προσκόλλησης. Μια άλλη σημαντική δυνατότητα των προβιοτικών είναι η συσσωμάτωση τους με παθογόνους μικροοργανισμούς και η αποβολή του συσσωματώματος μέσω των κοπράνων, η ιδιότητα αυτή μπορεί να εξετασθεί με δοκιμές της συσσωμάτωσης των προβιοτικών με διάφορα παθογόνα βακτήρια όπως τα *E. Coli*, *S.Aureus*, *Candida spp.*, *Listeria monocytogenes* και *Salomonella choleraesuis* [45]. Από τα παραπάνω, η ικανότητα προσκόλλησης των προβιοτικών στον εντερικό βλεννογόνο θεωρείται από τα σημαντικότερα κριτήρια, καθώς με αυτόν τον τρόπο τα προβιοτικά παραμένουν στο έντερο για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα και παρεμποδίζουν την προσκόλληση παθογόνων μικροοργανισμών λειτουργώντας ανοσορυθμιστικά. Η ικανότητα προσκόλλησης των προβιοτικών ποικίλλει, διότι επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως τα

γαστρικά υγρά του στομάχου, τις συνθήκες ανάπτυξης τους, τον αριθμό των ανακαλλιεργειών και τη χρησιμοποίηση κρουπροστατευτικών στην περίπτωση που αυτά έχουν λυοφιλωθεί. Επίσης, τα προβιοτικά βακτήρια πρέπει να διαθέτουν συγκεκριμένες τεχνολογικές ιδιότητες, εφόσον χρησιμοποιηθούν σε λειτουργικά τρόφιμα, πιο συγκεκριμένα πρέπει να παρουσιάζουν τις εξής ιδιότητες:

- Να πολλαπλασιάζονται σε μεγάλη κλίμακα.
- Να έχουν μεγάλο χρόνο ζωής.
- Να συμβάλλουν στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων των προϊόντων όταν χρησιμοποιούνται για την παρασκευή προϊόντων ζύμωσης, χωρίς να έχουν επίδραση στη γεύση του προϊόντος.
- Να διατηρείται η βιωσιμότητά τους σε όλη τη διάρκεια ζωής του προϊόντος [43].
- Να επιβιώνουν κατά την επεξεργασία των τροφίμων (όπως η ζύμωση, η συγκομιδή, η ξήρανση και η κατάψυξη) στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, του pH και της οξείδωσης κατά την αποθήκευση.

Τέλος, από την άποψη της ασφάλειας, είναι σημαντικό τα προβιοτικά κύτταρα να είναι γενετικά σταθερά για να αποφευχθεί η ανάπτυξη παθογένειας ή η απώλεια παραγωγικότητας. Για την προβιοτική αποτελεσματικότητα, απαιτούνται πληθυσμοί 10⁶ έως 10⁸ CFU/g τη στιγμή της κατανάλωσης. Η αναλογία πληθυσμού μπορεί να επηρεαστεί από βακτηριοφάγους, οι οποίοι μολύνουν προβιοτικά κύτταρα, προκαλώντας έτσι την κυτταρική λύση. Η επιλογή των ανθεκτικών σε βακτηριοφάγους προβιοτικών μπορεί να διεξαχθεί μέσω κλασικών μεθόδων, όπως δοκιμασίες πλάκας ή παρακολούθησης οξίνισης, ή μέσω πιο εξελιγμένων εργαλείων, όπως q PCR και βιοαισθητήρες. Επιπλέον, ορισμένα προϊόντα μπορούν να παρουσιάσουν τροποποιήσεις κατά τη διάρκεια της ζωής τους, όπως μετά την οξίνιση, με αποτέλεσμα την απώλεια της προβιοτικής βιωσιμότητας. Η παρουσία οξυγόνου κατά τη διάρκεια ορισμένων διαδικασιών και αποθήκευσης μπορεί επίσης να επηρεάσει τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Ο έλεγχος των βιώσιμων κυττάρων μπορεί να διεξαχθεί μέσω μικροβιολογικών μεθόδων, όπως επίστρωση σε ένα κλασικό μέσο καλλιέργειας ή q PCR [45].

2.5 Μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών

Υπάρχουν πολυάριθμοι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών που προσφέρουν πιθανές ευεργετικές επιδράσεις στο έντερο. Όπως προαναφέρθηκε, τα κυριότερα βακτήρια που χρησιμοποιούνται σαν προβιοτικά είναι τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, ενώ οι κυριότερες ζύμες είναι οι ζύμες του γένους *Saccharomyces*. Δεδομένου ότι οι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών μικροβίων παρουσιάζουν ποικιλομορφία και πολυπλοκότητα, τα διαφορετικά στελέχη των προβιοτικών επιδεικνύουν διαφορετικό τρόπο δράσης, εξαρτώμενο από το είδος των μορίων που εκφράζονται στην επιφάνεια των κυττάρων τους ή εκκρίνονται από αυτά. Ειδικότερα, σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα, θεωρείται ότι οι προβιοτικοί μικροοργανισμοί επιδρούν ευεργετικά στην υγεία μέσω τριών γενικότερων μηχανισμών: 1) της ενίσχυσης της λειτουργίας του επιθηλιακού εντερικού φραγμού, 2) της ρύθμισης της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας και 3) της ρύθμισης των αποκρίσεων του έμφυτου και επίκτητου ανοσοβιολογικού συστήματος (ανοσοτροποποιητική δράση) [37].

2.6 Ευεργετικές ιδιότητες των προβιοτικών μικροοργανισμών

Η κλινική εφαρμογή των προβιοτικών έχει αποδείξει πως αντιμετωπίζουν ποικίλα προβλήματα υγείας. Συγκεκριμένα, τα προβιοτικά δρουν ενάντια στην παχυσαρκία και το διαβήτη, καθώς αντιμετωπίζουν την εντερική δυσβίωση, που ορίζεται ως μια αφύσικη μεταβολή της σύνθεσης της μικροχλωρίδας του εντέρου και συνδέεται με μια ανισορροπία μεταξύ προστατευτικών (απαραίτητων, μη παθογόνων) και επιβλαβών (παθογόνων) βακτηρίων. Η εντερική δυσβίωση και οι σχετικές αλλοιώσεις στον εντερικό μικροβιακό πληθυσμό μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της παχυσαρκίας και άλλων σχετικών ασθενειών, όπως το μεταβολικό σύνδρομο, ο διαβήτης τύπου 2 και η ηπατική νόσος. Η αντιμικροβιακή/αντιπαθογόνος δράση των προβιοτικών που δρουν ανταγωνιστικά προς τα παθογόνα μικρόβια θεωρείται ως μία από τις πιο ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών, διότι, σε αντίθεση με τα κλασικά αντιβιοτικά, παρεμποδίζεται η διαταραχή ή η μεταβολή στη σύνθεση του πολύπλοκου πληθυσμού των μικροβίων του εντέρου. Επίσης, θεωρείται πως προβιοτικά παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη

δράση (συγκεκριμένα αντιμετωπίζουν τη νόσο του Crohn και την ελκώδη κολίτιδα που σχετίζονται με μη φυσιολογικές αλλοιώσεις του εντερικού μικροβιακού πληθυσμού), αντιαλλεργική και αντικαρκινική δράση (εναντίον του καρκίνου του παχέος εντέρου και του μαστού), αλλά και ευεργετούν τη λειτουργία του ουροποιητικού συστήματος [46,47].

3 ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ – ΣΥΝΒΙΟΤΙΚΑ – ΜΕΤΑΒΙΟΤΙΚΑ

3.1 Ορισμοί

Ακολούθως, θα αναφερθούν τα πρεβιοτικά ως τα συστατικά τροφίμων που υποβοηθούν την υγιή ανάπτυξη της φυσιολογικής μικροχλωρίδας. Όταν αναφερόμαστε στα προβιοτικά, η σύγχυσή τους με τα πρεβιοτικά είναι συνήθης, και αντίστροφα. Για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητος ο ορισμός των πρεβιοτικών, ώστε να αντιπαρατίθεται με εκείνον για τα προβιοτικά. Συγκεκριμένα, ως πρεβιοτικά περιγράφονται συστατικά των τροφίμων που δε χωνεύονται, αλλά ευεργετούν την υγεία του ξενιστή πυροδοτώντας την ανάπτυξη ή και την ενεργοποίηση συγκεκριμένων εντεροβακτηρίων. Τα πρεβιοτικά - τα περισσότερα από τα οποία είναι ενώσεις υδατανθράκων - έχουν διερευνηθεί με περίσσιο ενδιαφέρον λόγω των ευεργετικών δράσεών τους στον ξενιστή. Πράγματι, αυτό το πεδίο βρίσκεται υπό ραγδαία ανάπτυξη και το δυνητικό όφελος από τη χρήση προβιοτικών και πρεβιοτικών δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητό σε ασθενείς με ποικίλες νόσους, όπως το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου [39].

Ακολουθώντας τον ορισμό αυτό, μόνο λίγοι από τους υδατάνθρακες μπορούν να θεωρηθούν ως πρεβιοτικά και συγκεκριμένα (κυρίως) οι μικρές και μεγάλες αλυσίδες β-φρουκτανών (φρουκτοολιγосακχαρίτες και ινουλίνη), οι γαλακτοολιγосακχαρίτες και η λακτουλόζη. Στο 6^ο Συνέδριο της Παγκόσμιας Επιστημονικής Ένωσης Προβιοτικών και Πρεβιοτικών, το 2008, ο ορισμός αυτός εκσυγχρονίστηκε και διατυπώνεται ως εξής: ως πρεβιοτικό χαρακτηρίζεται ένα επιλεκτικά ζυμούμενο συστατικό που προξενεί συγκεκριμένες μεταβολές στη σύνθεση ή και στην ενεργότητα των γαστρεντερικών βακτηρίων, απονέμοντας ποικίλα οφέλη στην υγεία του οργανισμού - ξενιστή. Επίσης, ως συμβιοτικά ταξινομούνται τα συμπληρώματα

διατροφής που συνδυάζουν τα προβιοτικά με τα πρεβιοτικά σε μία μορφή συνεργιστικής δράσης, η οποία επιφέρει τη βελτιωμένη επιβίωση και εμφύτευση των προβιοτικών μικροοργανισμών στο έντερο [48]. Η λέξη συνβιοτικό προέρχεται από την πρόθεση συν και τη λέξη βίος που παραπέμπει σε συνεργιστικές δράσεις που συμβάλλουν στη βελτίωση της ζωής. Ως συνβιοτικό (ή συμβιωτικό) ορίζεται το μίγμα προβιοτικών και πρεβιοτικών, το οποίο ασκεί ευεργετική δράση στην υγεία του ξενιστή, προάγοντας την εγκατάσταση και διευκολύνοντας την επιβίωση των ζώντων βακτηριακών διαιτητικών συμπληρωμάτων κατά τη διέλευση τους από το πεπτικό σύστημα [49]. Η συνεργιστική δράση τους, εμφανίζεται *in vivo* με επαγωγή της αύξησης των *Lactobacilli* και ενίσχυση του ενδογενούς πληθυσμού των *Bifidobacteria* [50]. Θεωρούνται ως μια ολοκληρωμένη προσέγγιση διαχείρισης της εντερικής μικροχλωρίδας συγκρινόμενα με τα προβιοτικά και τα πρεβιοτικά αντίστοιχα [51]. Η ευεργετική δράση των συμβιωτικών είναι το άθροισμα των θετικών επιδράσεων των προβιοτικών και πρεβιοτικών. Τα συνβιοτικά έχουν αντιμικροβιακές, ανοσοτροποποιητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιδιαρροϊκές, αντιαλλεργικές, υπολιπιδαιμικές και υπογλυκαιμικές ιδιότητες. Μια από τις κύριες ιδιότητες των συνβιοτικών είναι η ενίσχυση της αντοχής και της προσκόλλησης των προβιοτικών στον εντερικό βλεννογόνο με ταυτόχρονη μεταβολή των πληθυσμών των παθογόνων βακτηρίων του εντερικού αυλού [52,53,54,55].

Ορισμένα βακτηριακά προϊόντα, απουσία των ζώντων οργανισμών (βακτηρίων από τα οποία παρήχθησαν) ενδέχεται να έχουν παρόμοιες επιδράσεις στην κωδικοποίηση διαφόρων μονοπατιών και στην ενεργοποίηση φραγμών στον οργανισμό. Αυτά τα βακτηριακά προϊόντα χαρακτηρίζονται ευρέως ως μεταβιοτικά και μπορούν να οριστούν ως άβια, βακτηριακά προϊόντα ή μεταβολικά παραπροϊόντα από προβιοτικούς μικροοργανισμούς που έχουν βιολογική δραστηριότητα στον ξενιστή. Γενικά, τα μεταβιοτικά περιλαμβάνουν βακτηριακά μεταβολικά παραπροϊόντα, όπως βακτηριοσίνες, οργανικά οξέα, αιθανόλη, διακετύλιο, ακεταλδεΐδες και υπεροξειδίο του υδρογόνου [46].

3.2 Πρεβιοτικά - οφέλη των πρεβιοτικών

Η ιδέα των πρεβιοτικών προϊόντων προτάθηκε για πρώτη φορά από τους Gibson, G.R. και Roberfroid, M.B., (1995) [49] οι οποίοι αντικατέστησαν το πρόθεμα “προ” της

λέξης προβιοτικά με το ελληνικό πρόθεμα “πρε”, για να περιγράψουν τα μη πεπτόμενα συστατικά των τροφίμων τα οποία επηρεάζουν θετικά την υγεία του ξενιστή, μέσω εκλεκτικής επαγωγής της αύξησης ή/και της δραστηριότητας ενός ή περιορισμένου αριθμού βακτηρίων στο παχύ έντερο, κυρίως των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium*.

Σύμφωνα με τη Διεθνή Επιστημονική Ένωση για τα Προβιοτικά και Πρεβιοτικά (ISAPP), πρεβιοτικά είναι “επιλεκτικά ζυμούμενα συστατικά, τα οποία οδηγούν σε εξειδικευμένες μεταβολές της σύστασης ή και της δραστηριότητας της εντερικής χλωρίδας προς όφελος του ξενιστή [56].

Πρεβιοτικό συστατικό χαρακτηρίζεται κάθε συστατικό των τροφίμων, το οποίο καταλήγει στο παχύ έντερο χωρίς να έχει διασπαστεί. Μέχρι σήμερα, δεν έχουν προκύψει ευεργετικά αποτελέσματα στον ξενιστή από τη βακτηριακή ζύμωση στο παχύ έντερο άπεπτων λιπών, πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Με τα πλέον πρόσφατα στοιχεία, μόνον οι άπεπτοι ολιγοσακχαρίτες (NDO), οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) και γαλακτοολιγοσακχαρίτες πληρούν τα κριτήρια των πρεβιοτικών.

Αντιθέτως το ανθεκτικό άμυλο αλλά και άλλοι πολυσακχαρίτες (από το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα, ημικυτταρίνες, πηκτίνες, κόμμεα) δεν ανταποκρίνονται στη βασική προϋπόθεση της εκλεκτικής επαγωγής αύξησης βακτηρίων, αλλά επάγουν την μη εκλεκτική βακτηριακή αύξηση και το μεταβολισμό των βακτηρίων στο κόλον. Επάγουν δηλαδή την αύξηση, τόσο των πιθανά επιβλαβών όσο και των ευεργετικών για την υγεία του ξενιστή ειδών.

Οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες αναφέρονται είτε ως ολιγοφρουκτόζη εάν έχουν μικρό αριθμό πολυμερισμού ($DP < 9$), είτε ως ινουλίνη με μεγαλύτερο αριθμό πολυμερισμού ($9 < DP < 60$). Επιπλέον άλλοι υδατάνθρακες υποψήφιοι για πρεβιοτικές ιδιότητες είναι η λακτουλόζη και οι ολιγοσακχαρίτες που περιέχουν γαλακτόζη, ξυλόζη και μαννόζη.

Ο ορισμός δεν απέχει πολύ από αυτόν των φυτικών ινών, με εξαίρεση την επιλεκτικότητα και εξειδίκευση των διαφορετικών ειδών πρεβιοτικών ως προς συγκεκριμένα είδη βακτηρίων [50].

Τα κριτήρια για την κατάταξη των υδατανθράκων ως πρεβιοτικά είναι: 1) αντοχή στην γαστρική δραστηριότητα, στην υδρόλυση από τα ένζυμα και στη γαστρεντερική απορρόφηση 2) ζύμωση από την εντερική μικροχλωρίδα και 3) εκλεκτική αύξηση της ανάπτυξης ή και της δραστηριότητας των εντερικών βακτηρίων που συμβάλλουν στην υγεία και την ευεξία [57].

Κύριο χαρακτηριστικό των πρεβιοτικών, είναι ο παρατεταμένος χρόνος παραμονής στο έντερο, με αποτέλεσμα αύξηση της βακτηριακής μάζας και του όγκου των κοπράνων και οφείλεται στη διαλυτότητα και στο ιξώδες των πρεβιοτικών.

Τα θετικά αποτελέσματα που αναμένουμε από τα πρεβιοτικά είναι τα εξής [58,59,60,61]:

- Διατήρηση σύνθεσης πληθυσμού εντερικής χλωρίδας.
- Βελτίωση λειτουργίας του εντερικού φραγμού και εντερικού σωλήνα.
- Αύξηση απορρόφησης ιχνοστοιχείων.
- Ρύθμιση παραγωγής των γαστρεντερικών πεπτιδίων και ενεργειακού μεταβολισμού.
- Ενίσχυση του ανοσολογικού συστήματος του ξενιστή.
- Μείωση εντερικών λοιμώξεων.
- Καταπολέμηση εντερικής φλεγμονής με παράλληλη μείωση κινδύνου του καρκίνου του παχέος εντέρου.

Οι εκλεκτικές ιδιότητες των πρεβιοτικών σχετίζονται με την ανάπτυξη των *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* της εντερικής χλωρίδας με έναν μη ειδικό τρόπο και συνδέονται με μείωση των δυνητικά παθογόνων βακτηρίων όπως *Bacteroides*, *Clostridia*, *Eubacteria*, *Enterobacteria* και *Enterococci*. Σε μελέτες από πειραματόζωα και ασθενείς, ο συνδυασμός της ινουλίνης και της ολιγοφρουκτόζης με προβιοτικά, φάνηκε ότι ενισχύουν τον πληθυσμό των *Bifidobacteria* και *Lactobacilli* και αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηριακών στελεχών όπως *Clostridium spec*, *Cambylobacter jejuni*, *Enterobacterium spec*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* [59,62].

Επίσης, πολλά είναι τα οφέλη που έχουν συσχετιστεί με τα *Bifidobacteria* της εντερικής μικροχλωρίδας, αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους το πετυχαίνουν δεν είναι ακόμα σαφείς. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την αναστολή της παθογένειας του εντέρου, μείωση των επιπέδων λιπιδίων στο αίμα, παρεμπόδιση του καρκίνου στο κόλον, αύξηση της απορρόφησης ασβεστίου, σύνθεση βιταμινών και προαγωγή της απάντησης του ανοσοποιητικού [54]. Τα πιο αποδοτικά πρεβιοτικά επίσης, μειώνουν ή εξαφανίζουν τις ιδιότητες και τον αριθμό μικροοργανισμών που θεωρούνται παθογόνοι [56].

Μία ακόμα ευεργετική δράση τους είναι ότι η ανάπτυξη των πρεβιοτικών, επιτρέπει την αύξηση των βακτηρίων γαλακτικού οξέος, με αποτέλεσμα την ακόλουθη διέγερση της παραγωγής βουτυρικού οξέος [53]. Το βουτυρικό οξύ χρησιμεύει ως πηγή ενέργειας για τα εντεροκύτταρα και φαίνεται ότι συσχετίζεται με τις αντικαρκινικές ιδιότητες των πρεβιοτικών. Το προπιονικό οξύ που παράγεται και αυτό από τον μεταβολισμό των πρεβιοτικών, παρεμποδίζει τη σύνθεση της χοληστερόλης, άρα φαίνεται να βοηθά στη μείωση της στο αίμα. Επίσης, το προπιονικό οξύ βοηθά και στη βελτίωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Ο πληθυσμός των βακτηρίων γαλακτικού οξέος φαίνεται να αυξάνεται από τη χρήση και των πρεβιοτικών και των προβιοτικών [63].

3.3 Χαρακτηριστικά των πρεβιοτικών

- Ενεργά στην διατροφικά εφικτή δόση (όσο το δυνατόν χαμηλότερη).
- Αποφυγή δυσάρεστων παρενεργειών.
- Λεπτός έλεγχος στη ρύθμιση της μικροχλωρίδας.
- Παραμονή σε κάθε σημείο στο κόλον, π.χ. στο κατώτερο τμήμα παχέος εντέρου.
- Κυμαινόμενο ιξώδες.
- Καλή αποθήκευση και σταθερότητα στην επεξεργασία.
- Διαφορετική γλυκύτητα.
- Αναστολή προσκόλλησης των παθογόνων.

3.4 Ιδιότητες πρεβιοτικών

- Εκλεκτική αύξηση και πολλαπλασιασμός των <<ωφέλιμων>> βακτηρίων (*bifidobacter, lactobaccili*).
- Ελάττωση προϊόντων που παράγουν αέρια, σηπτικών μικροοργανισμών, παθογόνων κλπ.
- Ζύμωση σε μικτή καλλιέργεια και εκλεκτική αύξηση συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών.
- Υψηλό μοριακό βάρος, αργή ζύμωση.
- Διαθέσιμοι σε διαφορετικά μοριακά βάρη και τρόπους σύνδεσης.
- Έχουν α 1-6 δεσμούς και υδατανθρακικούς δακτυλίους πυρανοσίλης.
- Κυμαινόμενη σύνθεση μονοσακχαριτών.
- Διαθέτουν ακολουθίες κατάλληλων υποδοχέων.

Προκειμένου να πετύχουν τις ιδιότητες αυτές, τα πρεβιοτικά πρέπει να μεταβολίζονται από συγκεκριμένα είδη - στόχους, όπως *Bifidobacteria* και *Lactobacilli* και όχι από κάποιον άλλο μικροοργανισμό [64].

Η αποτελεσματικότητα των πρεβιοτικών είναι ένα πολύπλοκο αντικείμενο έρευνας, το οποίο απαιτεί την συνεκτίμηση πολλών παραμέτρων, όπως τη μεταβολή των βακτηριακών πληθυσμών της εντερικής χλωρίδας σε κοπρανώδες περιεχόμενο.

3.5 Επιδράσεις στην υγεία νεογνών – βρεφών – νηπίων σιτιζόμενων με βρεφική φόρμουλα εμπλουτισμένη με προβιοτικά ή συνβιοτικά

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλούς τομείς της υγείας του ανθρώπου και του μεταβολισμού. Η σύσταση του μικροβιόκοσμου υφίσταται σημαντικές αλλαγές τα 2-3 πρώτα χρόνια της ζωής και στην ενήλικη ζωή. Η πρώτη επαφή των νεογνών με μικρόβια αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο στην εγκατάσταση του τύπου του μικροβιόκοσμου, ο οποίος παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της υγείας και στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος στην ενήλικη ζωή [65,66]. Για πολλά χρόνια, επικρατούσε η αντίληψη ότι η πρώτη επαφή με βακτήρια επισυμβαίνει κατά τον τοκετό, όπου τα νεογνά που γεννιούνται με φυσιολογικό τοκετό έχουν αφθονία και ποικιλομορφία του μικροβιόκοσμου, σε αντίθεση με τα νεογνά που γεννιούνται με καισαρική τομή.

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν την παρουσία βακτηρίων ή βακτηριακού DNA σε ομφαλο-πλακουντιακό αίμα, αμνιακό υγρό και σε πλακούντα χωρίς ενδείξεις χοριοαμνιονίτιδας, αλλάζοντας την προαναφερόμενη πεποίθηση [67].

Η ενωρίς σίτιση και ο τύπος σίτισης φαίνεται να παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη σύσταση και τη λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου. Το μητρικό γάλα περιέχει περισσότερους από 200 ολιγοσακχαρίτες (πρεβιοτικά), οι οποίοι ζυμώνονται στο κόλο και διεγείρουν την ανάπτυξη ειδικών βακτηρίων στα κόπρανα. Επίσης, το μητρικό γάλα αποτελεί πηγή ζωντανών βακτηρίων (προβιοτικά) όπως *staphylococci*, *streptococci*, *bifidobacteria*, *lactic acid* βακτήρια καθώς και ευεργετικών ιών και μυκήτων [68,69].

Βρέφη σιτιζόμενα με βρεφική φόρμουλα, φαίνεται να έχουν διαφορετικό πρότυπο εντερικού μικροβιόκοσμου όσον αφορά την αφθονία και την ποικιλομορφία, το οποίο προσομοιάζει εκείνο των ενηλίκων [70].

Οι διαφορές στο μικροβιόκοσμο μεταξύ νεογνών σιτιζόμενων με μητρικό γάλα και νεογνών σιτιζόμενων με βρεφική φόρμουλα, οδήγησαν τους ερευνητές στην εξεύρεση στρατηγικών εμπλουτισμού της βρεφικής φόρμουλας, με σκοπό να προσομοιάσουν το χρυσό πρότυπο του μητρικού γάλακτος.

Το 2011 η Επιτροπή Διατροφής της ESPGHAN δημοσίευσε μία συστηματική ανασκόπηση αναφορικά με την αποδεδειγμένη ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της χρήσης εμπλουτισμένης βρεφικής φόρμουλα με προβιοτικά. Παρότι δεν παρατηρήθηκαν αρνητικές επιπτώσεις στη βρεφική ανάπτυξη, η Επιτροπή Διατροφής της ESPGHAN δεν σύστησε την ευρεία χρήση της εμπλουτισμένης με προβιοτικά βρεφικής φόρμουλα ελλείψει επαρκών αποδείξεων [71].

Το 2017, δημοσιεύθηκε μία επικαιροποιημένη συστηματική ανασκόπηση αναφερόμενη στη συσχέτιση των στελεχών των προβιοτικών με τη μείωση του αριθμού των αναπνευστικών – γαστρεντερικών λοιμώξεων, των επεισοδίων κολικών – αναγωγών καθώς και την επιτάχυνση της βρεφικής ανάπτυξης [72].

Το Δεκέμβριο του 2022 οι Flavia Indrio *et al.* δημοσίευσαν μία συστηματική ανασκόπηση με μετα-ανάλυση δικτύου ως προς την επίδραση της εμπλουτισμένης

με προβιοτικά ή συνβιοτικά βρεφικής φόρμουλας στην υγεία των βρεφών και νηπίων έως 36 μηνών.

Οι συγγραφείς συμπεριέλαβαν 26 δημοσιευμένες RCTs (randomized controlled trials) με 35 άμεσες συγκρίσεις δύο διακριτών πληθυσμών: 1957 παιδιών που έλαβαν εμπλουτισμένη με προβιοτικά ή συνβιοτικά φόρμουλα και 1898 παιδιών που έλαβαν μητρικό γάλα ή/και συνήθη βρεφική φόρμουλα.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι ορισμένα στελέχη προβιοτικών ή συνβιοτικών σχετίζονται με μείωση των επεισοδίων κολικών, του αριθμού των ημερών με πυρετό και της χρήσης αντιβιοτικών, όμως παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη ετερογένεια με αποτέλεσμα την μείωση του επιπέδου αξιοπιστίας της επίδρασης στην υγεία. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές επιπτώσεις στην αύξηση του βάρους, του ύψους ή αλλαγές στην αναλογία των *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridia* στα κόπρανα.

Οι συγγραφείς καταλήγουν ότι, παρά το γεγονός του δυνητικού οφέλους εμπλουτισμού με προ- ή συνβιοτικά της βρεφικής φόρμουλας, οι διαφορές στην ποιότητα των δημοσιευμένων μελετών και η ετερογένεια των δεδομένων αποκλείουν την καθιέρωση ισχυρών συστάσεων.

4 ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ

4.1 Οικολογία της εντερικής μικροχλωρίδας

Ο εντερικός μικροβιακός πληθυσμός στον υγιή ανθρώπινο οργανισμό υπολογίζεται σε 10¹⁴ μικροοργανισμούς, οι οποίοι συνολικά κωδικοποιούν 3-4 εκατομμύρια γονίδια, ήτοι περίπου 150 φορές περισσότερα από το ανθρώπινο γονιδίωμα. Αυτό το μικροβιακό γονιδίωμα επιτρέπει στην μικροχλωρίδα να εκτελεί ποικίλες μεταβολικές δραστηριότητες που δεν κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο γονιδίωμα και είναι ωφέλιμα για τον ξενιστή. Αυτά περιλαμβάνουν την αξιοποίηση της ενέργειας και των θρεπτικών συστατικών από τη διατροφή, τη βιοσύνθεση των βιταμινών, τον μετασχηματισμό των χολικών αλάτων, την ανάπτυξη εγγενούς και προσαρμοστικής ανοσίας, διατηρώντας την επιθηλιακή ακεραιότητα του εντέρου, και λειτουργώντας

ως φραγμός στον πολλαπλασιασμό παθογόνων μικροβιακών αποικιών, αλλά και τον μεταβολισμό των φαρμάκων. Για το λόγο αυτό, οι σύγχρονες απόψεις προτείνουν ότι ο οργανισμός του ανθρώπου θα πρέπει να αναγνωρίζεται μαζί με τον ενδογενή μικροβιοκόσμο του ως υπέρ-οργανισμός ή μετα-οργανισμός (metaorganism) με σύνθετο γονιδίωμα το οποίο θα μπορούσε να αναφέρεται ως ανθρώπινο μεταγονιδίωμα.

Τα προϊόντα από το μεταβολισμό των τροφίμων, τα οποία δεν μπορούν να χωνευτούν από τον ανθρώπινο οργανισμό (π.χ. κυτταρίνη ή ολιγοσακχαρίτες) ζυμώνονται από τους εντερικούς μικροοργανισμούς προς λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας τα οποία ο άνθρωπος μπορεί να χρησιμοποιήσει ως πηγές ενέργειας, ή σε άλλες ευεργετικές για τον ίδιο δράσεις. Συνεπώς, η ζύμωση από τα προβιοτικά αποτελεί μια διαδικασία που προσφέρει συμβιωτικά οφέλη στον ξενιστή επιτρέποντας τη χρήση μιας ευρύτερης ποικιλίας τροφίμων. Οι μεταβολές της σύνθεσης των μικροβιακών πληθυσμών του εντέρου που είναι δυσμενείς για τον ξενιστή (δυσβίωση ή δυσβακτηρίωση) έχουν συνδεθεί με μια σειρά ασθενειών, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, οι λοιμώξεις του *Clostridium difficile*, ο διαβήτης και η παχυσαρκία.

Η οικολογία του μικροβιακού πληθυσμού του εντέρου μεταβάλλεται με την ηλικία. Κατά το φυσιολογικό τοκετό, το έντερο αποικίζεται με μικροοργανισμούς παρόμοιους με τη κοιλική χλωρίδα της μητέρας του. Αντίθετα, κατά τον τοκετό με καισαρική τομή αναπτύσσονται βακτηριακοί πληθυσμοί που ομοιάζουν με εκείνες του δέρματος, όπως τα είδη *Staphylococcus*, *Corynebacterium* και *Propionibacterium*. Ο βακτηριακός αποικισμός που παρέχεται από τη διέλευση μέσω του κόλπου της μητέρας βοηθά στην ανάπτυξη της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας. Η έλλειψη της έμφυτης απόκτησης αυτού του φυσικού εμβολίου σε βρέφη που γεννιούνται με καισαρική τομή μπορεί να ενοχοποιηθεί για μεταγενέστερες μεταβολές της ανοσίας τους που τα θέτει σε υψηλότερο κίνδυνο μόλυνσεων ή ατοπικής νόσου. Τα ευεργετικά βακτήρια όπως το *Bifidobacterium* μεταφέρονται επίσης στο βρέφος από τη μητέρα, κατά τη διάρκεια του θηλασμού και χρησιμεύουν για την αποίκηση του εντέρου του βρέφους.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων χρόνων της ζωής, η ποικιλομορφία του εντερικού μικροβιώματος αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς ως αποτέλεσμα της διατροφής και των ασθενειών. Η χορήγηση αντιβιοτικών σε βρέφη φαίνεται πως μειώνει την ποικιλία της χλωρίδας του εντέρου, γεγονός που θα μπορούσε να έχει αρνητικές επιπτώσεις στη μακροπρόθεσμη υγεία, όπως η αύξηση του κινδύνου εμφάνισης άσθματος, αλλεργιών και παχυσαρκίας. Κατά την ενηλικίωση, ο μικροβιακός πληθυσμός συνεχίζει να αλλάζει, αν και με βραδύτερο ρυθμό συγκριτικά με την παιδική ηλικία. Τέλος, ο μικροβιακός πληθυσμός των υγιών ηλικιωμένων ατόμων είναι παρόμοιος με των νεότερων ατόμων. Ωστόσο, ο αντίστοιχος μικροβιόκοσμος σε ευπαθείς ηλικιωμένους μπορεί να είναι ουσιαστικά διαφορετικός.

Η κατανομή των βακτηρίων στην ευρύτερη περιοχή του εντέρου διαφέρει από σημείο σε σημείο. Η βακτηριακή πυκνότητα είναι χαμηλή στο στομάχι και στο δωδεκαδάκτυλο, λόγω της παρουσίας γαστρικού οξέος και παγκρεατικών ενζύμων, ενώ η πυκνότητα αυξάνεται στο απομακρυσμένο λεπτό έντερο (όπου παρατηρείται ένα μείγμα αερόβιων και αναερόβιων) και είναι ακόμη μεγαλύτερη στο παχύ έντερο, όπου η συγκέντρωση των βακτηρίων αυξάνεται στα εκτιμώμενα 10¹¹-10¹³ βακτήρια ανά γραμμάριο, εκ των οποίων το 99,99% είναι αναερόβια.

Έχει μελετηθεί με βάση τα αποτελέσματα καλλιέργειας κοπράνων ότι η ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα περιέχει περίπου 5000 είδη. Ωστόσο, ο προσδιορισμός αυτού του πληθυσμού με χρήση της καλλιέργειας έχει σοβαρούς περιορισμούς. Η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών ανάλυσης όπως η ανάλυση γονιδιακής αλληλουχίας 16S r RNA έδειξε ότι περίπου το 60-80% των αλληλουχιών δεν ταυτοποιούνται με γνωστά καλλιεργημένα είδη βακτηρίων. Έτσι, μια σημαντική αναλογία των άφθονων αριθμητικά βακτηριδίων εντός του εντέρου παραμένουν άγνωστα ή ανώνυμα. Αν και η ανάλυση ακολουθίας γονιδίου 16S r RNA είναι χρήσιμη στην ταυτοποίηση βακτηριακών ειδών, δεν παρέχει καμία πληροφορία σχετικά με τη φυσιολογία ή το μεταβολισμό των βακτηρίων. Νεότερες τεχνικές που περιλαμβάνουν την αλληλούχιση γονιδιώματος των μικροβιακών πληθυσμών μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες, επειδή καθιστούν δυνατή την ταυτοποίηση ορισμένων βακτηριακών γονιδίων που κωδικοποιούν μεταβολικές λειτουργίες. Αυτό έχει οδηγήσει στην αναλυτική τεχνική που ονομάζεται Λειτουργική Μεταγενομική.

Η παρουσία ενός "πυρήνα μικροχλωρίδας" (δηλαδή ενός σταθερού μικροβιακού πληθυσμού) έχει προταθεί από τους Argumagam *et al.* στον οποίο το μικροβιακό φορτίο του ανθρώπινου εντέρου κατηγοριοποιείται σε τρεις διακριτούς τύπους ή "εντεροτύπους". Καθένας από τους τρεις εντεροτύπους μπορεί να ταυτοποιηθεί με μεταβολή στα επίπεδα ενός από τα τρία κύρια γένη: γένος *Bacteroides*, (εντερότυπος 1), γένος *Prevotella* (εντεροτύπος 2) και γένος *Ruminococcus* (εντερότυπος 3). Ακολούθως, διαπιστώθηκε ότι οι «οικότυποι» θα μπορούσαν να είναι η πιο ακριβής ομαδοποίηση από τους εντερότυπους, λόγω της μεταβολής του μικροβιακού πληθυσμού καθ' όλη την γαστρεντερική οδό. Το 2011, οι Wu *et al.* κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι μόνο οι εντερότυποι 1 και 2 υποστηρίζονται επαρκώς από τα δεδομένα και ότι δεν υπάρχουν αρκετά στοιχεία για τον εντεροτύπο *Ruminococcus*. Παρατήρησαν επίσης, ότι αυτοί οι δύο εντεροτύποι συνδέονται με μακροχρόνιες δίαιτες. Οι εντερότυποι 1 (*Bacteroides*) ευνοούνται με δίαιτες πλούσιες σε πρωτεΐνες και ζωικά λίπη, ενώ τα μικρόβια εντερότυπου 2 (*Prevotella*) αναπτύσσονται περισσότερο με δίαιτες απλών υδατανθράκων. Ωστόσο, η ύπαρξη και η βιολογική σημασία των διακριτών εντεροτύπων αποτέλεσε αντικείμενο πολυάριθμων συζητήσεων μεταξύ ερευνητών, καταλήγοντας στην υιοθέτηση της έννοιας της συνεχούς λειτουργικότητας των ειδών παρά εκείνης των διακριτών τύπων. Μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι οι μικροβιακές κοινότητες του εντέρου είναι άκρως μεταβλητές με την πάροδο του χρόνου. Μια μακροχρόνια μελέτη τεσσάρων σημείων στον ανθρώπινο οργανισμό απέδειξε έντονη μεταβλητότητα εντός μηνών, εβδομάδων, ακόμη και ημερών. Αυτό υποδηλώνει ότι δεν υπήρχε κάποιος πυρήνας μικροβίων σε μεγάλη αφθονία. Αντί να κατηγοριοποιήσουμε την εντερική μικροχλωρίδα με βάση κριτήρια μορφολογίας ή καλλιέργειας, μπορεί να είναι πιο χρήσιμο να συνδέσουμε τη μικροβιακή σύνθεση με τη λειτουργία. Επομένως, αν και ο πληθυσμός μεμονωμένων βακτηριδιακών ειδών μπορεί να παρουσιάσει χρονική διακύμανση, ομάδες βακτηριδίων που μοιράζονται μια κοινή μεταβολική λειτουργία διατηρούνται πιο σταθερές. Έτσι, οι λειτουργικές ιδιότητες μιας βακτηριακής κοινότητας μπορούν να διατηρηθούν παρά τις αλλαγές στα επιμέρους μικροβιακά είδη.

Μια υγιεινή διατροφή καταλύει την ανάπτυξη μικροβίων ευεργετικών για τον ξενιστή. Ένα από τα βασικά συστατικά μιας υγιεινής διατροφής είναι η περιεκτικότητα σε ορισμένες ουσίες που τροφοδοτούν και συντηρούν τα επιθυμητά, μη παθογόνα μικρόβια στο παχύ έντερο. Βασικά μέλη αυτής της κατηγορίας περιλαμβάνουν όσα τρόφιμα περιέχουν ίνες και ανθεκτικά άμυλα, όπως αυτά που υπάρχουν στα φρούτα, τα λαχανικά, τα όσπρια ή το σκόρδο. Αυτές οι τροφές ανθίστανται σε πολλαπλά πεπτικά ένζυμα που περιέχονται στις εκκρίσεις του σάλιου, του γαστρικού υγρού και του παγκρέατος. Συνεπώς, δε χωνεύονται στο λεπτό έντερο αλλά υφίστανται ζύμωση και περαιτέρω μεταβολισμό. Οι ζυμώσιμες ουσίες όπως οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες ή η ινουλίνη διατίθενται επίσης ως συμπληρώματα διατροφής, κυρίως σε δίαιτες ενίσχυσης της μικροχλωρίδας του εντέρου.

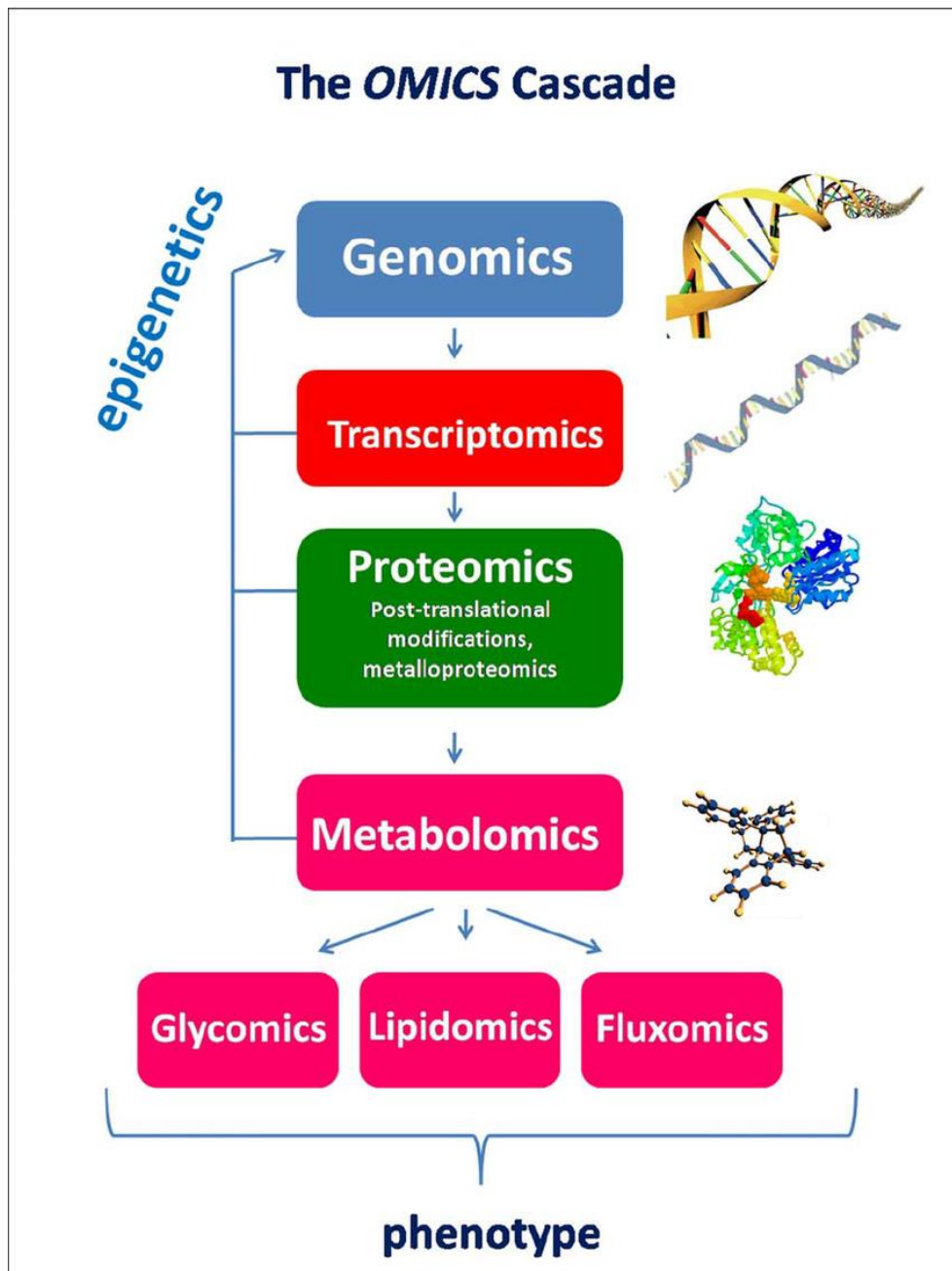
Η μεταβολική διασταυρούμενη σίτιση είναι ένα φαινόμενο στο οποίο ένα είδος ζει και πολλαπλασιάζεται αξιοποιώντας τα προϊόντα ενός άλλου είδους σε μια συμβιωτική σχέση. Διαλυτές (π.χ. ολιγοσακχαρίτες), μη διαλυτές ίνες (π.χ. κυτταρίνη) και ανθεκτικό άμυλο αποφεύγουν την πέψη στο λεπτό έντερο -όπως προαναφέρθηκε- αλλά ζυμώνονται με σακχαρολυτικά βακτήρια όπως οι *Lactobacillus* ή *Bifidobacterium* στο έντερο προς σχηματισμό πυροσταφυλικού και γαλακτικού οξέος. Τα βουτυρικά και άλλα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFA - Short Chain Fatty Acids) συντίθενται από πυροσταφυλικό με αναερόβια βακτήρια, με τους κύριους παραγωγούς βουτυρικού να είναι τα στελέχη του *Clostridium* clusters XIV και IV (π.χ. *Roseburia* και *Faecalibacterium prausnitzii*). Έτσι, η άμεση πυροδότηση της ζύμωσης από ορισμένα τρόφιμα και τα πρεβιοτικά συμπληρώματα μπορεί να οδηγήσουν έμμεσα σε αυξημένο σχηματισμό βουτυρικού. Στους ανθρώπους, το βουτυρικό είναι η προτιμώμενη πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου. Το βουτυρικό επηρεάζει επίσης την γονιδιακή έκφραση και αναστέλλει την ενεργοποίηση του παράγοντα NFκB, οδηγώντας σε μειωμένη έκφραση των προφλεγμονωδών κυτοκινών και έχοντας επακόλουθη αντιφλεγμονώδη δράση. Τα κλύσματα βουτυρικού έχουν χρησιμοποιηθεί θεραπευτικά σε ασθενείς με περιφερική ελκώδη κολίτιδα [47].

4.2 Ποικιλομορφία του εντερικού μικροβιώματος ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση

Η διαφοροποίηση στις διατροφικές συνήθειες συνιστά μια επαρκή εξήγηση για την ισχυρή επιρροή που έχει η γεωγραφική προέλευση στη σύνθεση των μικροβιακών πληθυσμών του γαστρεντερικού συστήματος. Έχει αποδειχθεί ότι ο εντεροτύπος *Bacteroides* αυξάνεται στο έντερο των ανθρώπων που ζουν στις δυτικές χώρες ακολουθώντας μια διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και πρωτεΐνες, ενώ ο εντεροτύπος *Prevotella* είναι περισσότερο συνηθισμένος στις μη δυτικές χώρες, όπου ο πληθυσμός καταναλώνει πολλές ίνες. Αυτή η αντίθεση στη σύνθεση των μικροβιωμάτων του εντέρου έχει επίσης αναφερθεί από ερευνητές, οι οποίοι χρησιμοποίησαν πολλαπλή πυροαλληλούχιση των V5 και V6 υπερ-μεταβλητών περιοχών του γονιδίου του 16S r RNA για τη σύγκριση των μικροβίων του εντέρου παιδιών της Ιταλίας (Ευρώπης) και της Μπουρκίνα Φάσο (Αφρικής).

5 ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ – ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ – ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΑ

Μεταβολίτες χαρακτηρίζονται οι μικρού μοριακού βάρους ενώσεις (<1 kDA) που εντοπίζονται στα βιολογικά συστήματα (π.χ. αίμα, ούρα, ιστοί) [73]. Η μεταβολομική (metabolomics) αποτελεί μέρος της βιολογίας συστημάτων (Εικόνα 1) και αναφέρεται στη συστηματική μελέτη όλων των μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους σ' ένα βιολογικό σύστημα [74,75]. Πρόκειται στην ουσία για ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα ή/και παραπροϊόντα του μεταβολισμού όπως αμινοξέα, αλκοόλες, λιπίδια ή βιταμίνες.



Εικόνα 1. Ολιστική προσέγγιση βιολογικών συστημάτων [74].

Τα βιολογικά συστήματα έχουν μοναδική και χαρακτηριστική βιοχημική σύσταση η οποία μεταβάλλεται με την επίδραση κάποιου εσωτερικού ή/και εξωτερικού ερεθίσματος δημιουργώντας το ονομαζόμενο «μεταβολικό αποτύπωμα» [74]. Η μεταβολομική φωτίζει τη μεταβολική εικόνα των ζωντανών οργανισμών όπως διαμορφώνεται υπό την επίδραση π.χ. μίας παθολογικής κατάστασης – ασθένειας [75], ενός φαρμάκου [76] ή μιας διατροφής [77], με σκοπό τη κατανόηση των βιολογικών ή/και βιοχημικών μηχανισμών των υπό μελέτη συστημάτων [74].

Σκοπός της μεταβολομικής είναι η ανίχνευση και επικύρωση των στατιστικώς σημαντικών μεταβολιτών (βιοδείκτες) εστιάζοντας στη πρόγνωση, διάγνωση ή/και θεραπευτική αξιολόγηση διαφόρων ασθενειών [74,75]. Οι τεχνικές αναλυτικής χημείας που συνήθως χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν τη φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και την υγρή ή αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μαζών (LC/GC-MS) [78]. Κάθε μία από τις παραπάνω τεχνικές προσφέρει μοναδικά πλεονεκτήματα και πολλές φορές κρίνεται απαραίτητος ο συνδυασμός τους.

Η μεταβολομική μελέτη μπορεί να είναι στοχευμένη (targeted) οπότε εξετάζει μία συγκεκριμένη ομάδα ενώσεων ή μη-στοχευμένη - ολιστική (untargeted) οπότε εξετάζει όσο το δυνατόν περισσότερες ενώσεις παρέχοντας τη συνολική εικόνα του μεταβολισμού [79].

Τα δεδομένα που προκύπτουν ωστόσο είναι πολύπλοκα και ογκώδη εξαιτίας του πλήθους των μεταβολιτών που υπάρχουν στα βιολογικά υποστρώματα. Η ανάλυση και ερμηνεία τέτοιων δεδομένων βασίζεται στη πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση (multivariate statistical analysis), η οποία μπορεί να ανιχνεύσει μικρές διακυμάνσεις μέσα σε ένα πλήθος δεδομένων, παράγει μοντέλα διαφοροποίησης και προτείνει στατιστικώς σημαντικές ενώσεις ως βιοδείκτες [78].

6 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΩΜΙΚΗ – NMR

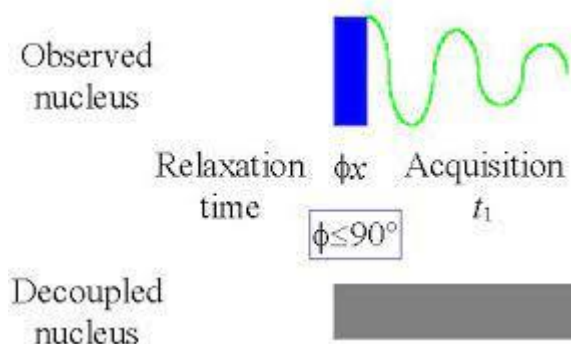
Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance-NMR) είναι μία σύγχρονη αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για το προσδιορισμό της δομής των μορίων [80]. Βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους τομείς μεταξύ των οποίων είναι η χημεία, η βιολογία, η φαρμακευτική και η ιατρική. Τα τελευταία χρόνια, η τεχνική NMR μαζί με την υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας (Liquid Chromatography - Mass Spectrometry, LC-MS) και η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με τη φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography - Mass Spectrometry, GC-MS) βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη βιολογία συστημάτων (systems biology) [81].

Κάθε μία από τις παραπάνω τεχνικές προσφέρει μοναδικά πλεονεκτήματα. Στη φασματοσκοπία NMR η προετοιμασία του δείγματος είναι ελάχιστη, χωρίς να χρειάζεται διαχωρισμός ή κάποιου είδους παραγωγοποίηση του δείγματος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο για τον ποιοτικό όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό ευρέος φάσματος ενώσεων σε σύντομο χρονικό διάστημα και αποτελεί μία μη καταστρεπτική αναλυτική τεχνική. Επιπλέον, είναι δυνατή η ταυτοποίηση των ενώσεων χωρίς πρότυπα είτε με ^2D NMR πειράματα, είτε μέσα από βάσεις δεδομένων (π.χ. πλατφόρμα Chemox), γεγονός που περιορίζει το κόστος της ανάλυσης. Το κυριότερο χαρακτηριστικό της τεχνικής αυτής είναι η υψηλή επαναληψιμότητά της [82–86]. Σε σύγκριση όμως με τις φασματομετρικές μεθόδους ανάλυσης μαζών (LC-MS και GC-MS), έχει το μειονέκτημα της χαμηλής ευαισθησίας [82–86], γεγονός που περιορίζει τον αριθμό των ενώσεων που μπορούν να μετρηθούν στο υπό-μελέτη σύστημα.

Με βάση μία πρόσφατη συγκριτική μεταβολομική μελέτη στον ορό ανθρώπινου αίματος [87], ο αριθμός των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν με τη τεχνική του NMR ήταν περίπου 50 και αφορούσε ενώσεις με συγκέντρωση μεγαλύτερη από $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, ενώ ο αριθμός των μεταβολιτών που ταυτοποιήθηκαν με τη τεχνική του MS ήταν μεγαλύτερος από 90 (ανάλογα με τη χρωματογραφική τεχνική, GC ή LC) και περιλάμβανε και ενώσεις με συγκέντρωση μικρότερη από $10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

6.1 Τεχνικές φασματοσκοπίας NMR – Φάσματα μίας διάστασης (^1D – NMR)

Η φασματοσκοπία NMR μίας διάστασης (^1D -NMR) αποτελεί την πιο συνηθισμένη τεχνική λήψης ενός φάσματος πρωτονίου. Αποτελείται από μία επαναλαμβανόμενη ακολουθία τριών σταδίων που περιλαμβάνει: την προετοιμασία του δείγματος (relaxation delay), την ακτινοβόλησή του μ' ένα παλμό διέγερσης (pulse excitation) και το χρόνο καταγραφής των σημάτων (acquisition time) (**Εικόνα 2**) [80].



Εικόνα 2. Διαγραμματική απεικόνιση ενός $^1\text{D-NMR}$ πειράματος [80].

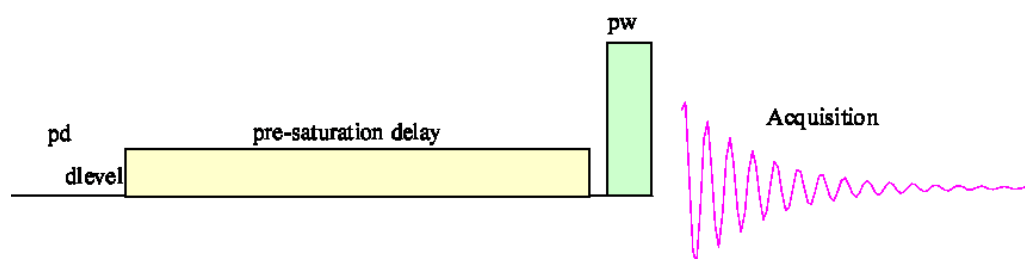
Αρχικά οι πυρήνες είναι σε θερμική ισορροπία. Τα πυρηνικά spin είναι προσανατολισμένα παράλληλα ή αντιπαράλληλα σε σχέση με το εξωτερικό σταθερό μαγνητικό πεδίο και ο πληθυσμός της χαμηλότερης ενεργειακής στάθμης (spin παράλληλα ως προς το μαγνητικό πεδίο) είναι ελαφρώς πλεονάζων.

Στη συνέχεια, εφαρμόζεται ο παλμός διέγερσης των πυρήνων (pulse excitation), συνήθως υπό γωνία $\theta=90^\circ$, οπότε τα spin των πλεοναζόντων πυρήνων μεταπίπτουν στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας και εξισώνεται ο πληθυσμός των δύο ενεργειακών σταθμών. Με την παύση του παλμού, οι πυρήνες αποδιεγείρονται, οπότε τα spin των πυρήνων επανέρχονται στην αρχική ενεργειακή τους κατάσταση. Η ενέργεια που έχει απορροφηθεί, εκπέμπεται και ανιχνεύεται μέσω της τάσης που επάγεται σε συγκεκριμένα πηνία. Το αναλογικό σήμα που καταγράφεται είναι μία φθίνουσα ταλάντωση και ονομάζεται FID (Free Induction Decay), ενώ με τη βοήθεια του μετασχηματισμού Fourier το σήμα που λαμβάνεται μετατρέπεται από το πεδίο του χρόνου στο πεδίο των συχνοτήτων προκειμένου να καταγραφεί το φάσμα $^1\text{H-NMR}$.

Ο χρόνος που μεσολαβεί από την παύση του παλμού μέχρι την αποδιέγερση των πυρήνων και την καταγραφή των σημάτων αντιστοιχεί στο χρόνο καταγραφής (acquisition time). Η συνολική ακολουθία διαρκεί ελάχιστα δευτερόλεπτα, ωστόσο για την αύξηση της ευαισθησίας, ο λόγος σήματος προς θόρυβο (S/N), επαναλαμβάνεται αρκετές φορές (αύξηση των σαρώσεων, scans) [80,88].

6.1.1 Καταστολή σήματος διαλύτη

Η συγκέντρωση του νερού στα βιολογικά δείγματα είναι πολύ υψηλή σε σχέση με τους υπόλοιπους μεταβολίτες. Η μεταβολομική ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων με τη τεχνική του $^1\text{H-NMR}$ απαιτεί τη περιστολή του σήματος του νερού (water suppression). Εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές για την καταστολή του σήματος του νερού. Συνήθως, εφαρμόζεται η ακολουθία presat όπου το σήμα του νερού ακτινοβολείται εκλεκτικά πριν την εφαρμογή του ισχυρού παλμού διέγερσης (**Εικόνα 3**). Η συνεχής ακτινοβολία του σήματος του νερού εμποδίζει την αποδιέγερση των σπιν των πρωτονίων του με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται το σήμα του νερού και να ενισχύεται με αυτό τον τρόπο το σήμα των υπόλοιπων μεταβολιτών που βρίσκονται σε χαμηλότερη συγκέντρωση. Συνήθως, εφαρμόζεται σε συνδυασμό με την κύρια παλμική ακολουθία του πειράματος όπως η $^1\text{D-NOESYpresat}$, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως στην ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων [88,89].



Εικόνα 3. Διαγραμματική απεικόνιση της παλμοσειράς presat για την καταστολή του σήματος του νερού [88].

6.1.2 Καταστολή σήματος πρωτεϊνών

Τα βιολογικά δείγματα είναι πλούσια σε πρωτεΐνες [90]. Οι πρωτεΐνες δίνουν ευρείες και ισχυρές κορυφές στο $^1\text{H-NMR}$ που αλληλεπικαλύπτουν και επισκιάζουν τα σήματα των πρωτονίων πολλών μεταβολιτών [91]. Η ακολουθία Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) εφαρμόζεται για την καταστολή του σήματος των μακρομορίων, όπως είναι οι πρωτεΐνες, επιτρέποντας την ανίχνευση των δευτερογενών μεταβολιτών καθιστώντας τα φάσματα που λαμβάνονται να είναι πιο «καθαρά» [92,93]. Η παλμική ακολουθία CPMG εφαρμόζεται μετά τη καταστολή του σήματος του νερού (presat) και την εφαρμογή του παλμού των 90° (x). Με την τεχνική

crmg presat το φάσμα είναι απαλλαγμένο από τις ευρείες κορυφές των πρωτεϊνών ενώ ο διαχωρισμός των κορυφών είναι πιο αποτελεσματικός.

6.2 Αποτίμηση μεταβολιτών με φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (^2D – NMR)

Η μονοδιάστατη φασματοσκοπία NMR (^1D -NMR) σε συνδυασμό με την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση αποτελεί τη μέθοδο επιλογής για τη μεταβολομική ανάλυση των βιολογικών δειγμάτων. Τα βιολογικά δείγματα είναι πλούσια σε οργανικές ενώσεις όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα, σάκχαρα ή οργανικά οξέα. Στη φασματοσκοπία ^1H -NMR, κάθε ένωση συντονίζεται σε διαφορετικές περιοχές του φάσματος ανάλογα με τα διαφορετικά είδη πυρήνων που διαθέτει και το χημικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα σήματα πολλών ενώσεων να αλληλεπικαλύπτονται και να καθίσταται δύσκολη έως αδύνατη η διάκριση και ταυτοποίησή τους. Με τη χρήση ενός πιο ισχυρού μαγνήτη ή κρυογενικού αισθητήρα (Cryoprobe), επιτυγχάνεται μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα και περιορίζεται ως ένα βαθμό η αλληλοεπικάλυψη των σημάτων.

Με τη φασματοσκοπία NMR δύο διαστάσεων (2D -NMR) καθίσταται δυνατή η αναγνώριση των σημάτων που αλληλεπικαλύπτονται επιτρέποντας κατ' επέκταση την ταυτοποίηση περισσότερων ενώσεων [88,89].

Υπάρχουν δύο είδη δισδιάστατης φασματοσκοπίας NMR: η ομοπυρηνική (homonuclear), όπου η μεταφορά της μαγνήτισης γίνεται μέσω ίδιων πυρήνων (κυρίως πυρήνες υδρογόνου, ^1H - ^1H) και η ετεροπυρηνική (heteronuclear), όπου η μεταφορά της μαγνήτισης γίνεται μέσω διαφορετικών πυρήνων (κυρίως μέσω πυρήνων υδρογόνου και άνθρακα, ^1H - ^{13}C)[93].

Οι πρακτικές τεχνικές λήψης φάσματος ^2D -NMR, σε συνάρτηση με το είδος της πληροφορίας που λαμβάνεται [88] είναι οι ακόλουθες:

➤ Πείραμα COSY

Το πείραμα COSY (COrrelation Spectroscopy) αποτελεί το πρώτο και πιο ευρέως διαδεδομένο πείραμα λήψης φάσματος δύο διαστάσεων. Συσχετίζει ομοπυρηνικά σπιν (κυρίως ^1H) που απέχουν μεταξύ τους 2 ή 3 δεσμούς με σκοπό τη ταυτοποίηση και το προσδιορισμό της δομής των μορίων[93].

➤ Πείραμα TOCSY

Το πείραμα TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) σε αντίθεση με το πείραμα COSY, συσχετίζει όλους τους πυρήνες πρωτονίου που ανήκουν σε ένα δεδομένο σύστημα σπιν. Η μαγνήτιση μεταφέρεται σε όλους τους πυρήνες του συστήματος σπιν μέσω του μηχανισμού της διαδοχικής βαθμιδωτής σύζευξης. Η ακολουθία TOCSY χρησιμοποιείται συμπληρωματικά της ακολουθίας COSY στα πειράματα μεταβολομικής ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων αφού ένα και μόνο σήμα, όταν δεν αλληλεπικαλύπτεται, μπορεί να αποκαλύψει τη δομή ολόκληρης της ένωσης μέσα σε ένα συγκεκριμένο σύστημα σπιν.

➤ Πείραμα HSQC

Το πείραμα HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) συσχετίζει συζευγμένα ετεροπυρηνικά σπιν (συνήθως ^1H και ^{13}C ή ^1H και ^{15}N) κατά μήκος ενός δεσμού. Είναι συμπληρωματικό των ομοπυρηνικών ^2D NMR πειραμάτων και χρησιμοποιείται κυρίως για την ταυτοποίηση των ενώσεων που περιέχουν πρωτόνια που δεν σχάζονται από γειτονικά πρωτόνια (π.χ. γλυκίνη). Επίσης, ενισχύει την ταυτοποίηση των ενώσεων παρέχοντας πληροφορίες για το συντονισμό των ομάδων του άνθρακα.

➤ Πείραμα HMBC

Το πείραμα HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) συσχετίζει ετεροπυρηνικά σπιν (κυρίως ^1H και ^{13}C) που απέχουν μεταξύ τους μέχρι 3 δεσμούς. Το πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC χρησιμοποιείται συμπληρωματικά του πειράματος ^1H - ^{13}C HSQC στα πειράματα μεταβολομικής ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων λόγω του πλήθους των πληροφοριών που παρέχει. Επιπλέον, με το πείραμα ^1H - ^{13}C HMBC καθίσταται εφικτή η ανίχνευση τεταρτοταγών πυρήνων άνθρακα [88,93].

6.3 Προ- επεξεργασία φασματικών δεδομένων

Τα δεδομένα που περιέχονται στα φάσματα είναι ογκώδη, πολύπλοκα και ο χειρισμός τους ιδιαίτερα απαιτητικός. Η υιοθέτηση αυστηρών κανόνων χειρισμού, κατεργασίας και ανάλυσης των δειγμάτων διασφαλίζει εν μέρει την «ποιότητα» των δεδομένων. Ωστόσο, η προ-επεξεργασία των δεδομένων είναι απαραίτητη πριν την εφαρμογή της στατιστικής ανάλυσης ώστε σε κάθε φάσμα να μπορεί να αποδοθεί

παρόμοια ταυτότητα για την ίδια μεταβλητή. Ορισμένα βήματα διασφαλίζουν ότι μικρές αλλαγές στα φάσματα που μπορεί πχ. να οφείλονται στο διαφορετικό pH ή στη διαφορετική ιοντική ισχύ των δειγμάτων δεν οδηγούν σε λάθος συμπεράσματα. Το λογισμικό Mnova ή Mestre Nova (<https://mestrelab.com/>) διαθέτει τους απαραίτητους μαθηματικούς αλγόριθμους ώστε τα φάσματα να διαμορφωθούν κατάλληλα προς αποτίμηση. Οι αλγόριθμοι που εφαρμόζονται περιλαμβάνουν:

- ❖ το φιλτράρισμα για τη βελτίωση της απεικόνισης του φάσματος (apodization).
- ❖ τον καθορισμό σημείου αναφοράς του άξονα των χημικών μετατοπίσεων (referencing).
- ❖ τη διόρθωση της φάσης σήματος (phase correction).
- ❖ τη διόρθωση της γραμμής βάσης (baseline correction).
- ❖ την κανονικοποίηση του φάσματος (normalization).
- ❖ την ευθυγράμμιση των κορυφών συντονισμού των ληφθέντων φασμάτων με βάση ένα φάσμα (alignment).
- ❖ Την τμηματοποίηση του φάσματος (binning).

6.4 Πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα που προκύπτουν από την εφαρμογή ολιστικών τεχνικών ανάλυσης είναι πολλαπλά και ογκώδη με αποτέλεσμα ο χειρισμός τους να είναι δύσκολος και η εξαγωγή/αξιοποίηση των χημικών πληροφοριών ιδιαίτερα απαιτητική. Στόχος των μεταβολομικών μελετών είναι η προβολή των χημικών πληροφοριών σε μία μορφή φιλική προς τον ερευνητή, που να καθιστά δυνατή εξαγωγή χρήσιμων πληροφοριών χωρίς παράπλευρη απώλεια χρήσιμων πληροφοριών.

Χημειομετρία (chemometrics) είναι ο κλάδος που ασχολείται με την εξαγωγή/αξιοποίηση των χημικών πληροφοριών που προκύπτουν από τα πειράματα των χημικών αναλύσεων. Τμήμα της χημειομετρίας αποτελεί η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση (multivariate statistical analysis) που εντοπίζει τις διακυμάνσεις των χημικών πληροφοριών στα δείγματα και βρίσκει τη βέλτιστη συσχέτιση μεταξύ των πιο σημαντικών μεταβολών μεταξύ των δειγμάτων.

Η πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση βασίζεται σε 2 τύπους στατιστικών τεχνικών: στις μη επιβλεπόμενες (unsupervised), όπου ο χρήστης δεν παρέχει καμία πληροφορία που να αφορά την ταυτότητα των δειγμάτων και θα μπορούσε να

χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό τους και στις επιβλεπόμενες (supervised) ,όπου οι πληροφορίες αυτές εισάγονται εκ των προτέρων με σκοπό το διαχωρισμό τους. Ουσιαστικά, οι μη επιβλεπόμενες τεχνικές αποτελούν το πρωταρχικό εργαλείο της στατιστικής ανάλυσης για τον εντοπισμό τάσεων, ομάδων ή ακραίων τιμών ενώ οι επιβλεπόμενες τεχνικές συσχετίζουν τις χημικές πληροφορίες με πρόσθετα δεδομένα με σκοπό το διαχωρισμό των δειγμάτων.

Οι παρατηρήσεις (φάσματα) και οι μεταβλητές (bins) απεικονίζονται σε διαφορετικά διαγράμματα. Το διάγραμμα που προκύπτει από την προβολή των παρατηρήσεων στο νέο σύστημα συντεταγμένων ονομάζεται διάγραμμα scores (score plot) και δείχνει αν υπάρχει κάποια ομαδοποίηση μεταξύ των παρατηρήσεων. Το διάγραμμα loading (loading plot) δείχνει ποιες μεταβλητές είναι σημαντικές ως προς τις τάσεις που ανιχνεύθηκαν με βάση το score plot. Κάθε μεταβλητή αντιστοιχεί σ' ένα τμήμα ενός μεταβολίτη, επομένως με βάση το διάγραμμα loading εντοπίζονται οι σημαντικοί μεταβολίτες.

Πριν την εφαρμογή της πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης τα δεδομένα υπόκειται σε κατάλληλη μετατροπή κλίμακος (scaling) προκειμένου κάθε μεταβλητή ή κάθε μεταβολίτης ανεξάρτητα από τη φυσική αφθονία του στο εξεταζόμενο δείγμα και συνεπώς την ένταση των φασματικών κορυφών του, να έχει το ίδιο «στατιστικό βάρος» στη δημιουργία των μοντέλων. Η μετατροπή pareto αποτελεί την πιο συνηθισμένη τεχνική μετατροπής δεδομένων μεταβολομικής ανάλυσης. Ουσιαστικά, μειώνει την επίδραση των έντονων κορυφών ενώ, δίνει έμφαση στις μικρές κορυφές [94,95].

6.4.1 Ανάλυση κύριων συνιστωσών

Η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) αποτελεί μία μη επιβλεπόμενη μέθοδο ανάλυσης με σκοπό τη συμπίεση της βασικής πληροφορίας που περιέχεται στο σύνολο των μεταβλητών σε μικρότερο αριθμό μεταβλητών, οι οποίες αποκαλούνται βασικές συνιστώσες (Principal Components, PCs). Η κύρια συνιστώσα περιέχει τη μεγαλύτερη δυνατή διακύμανση (variance), ενώ οι υπόλοιπες συνιστώσες ακολουθούν με φθίνουσα σειρά, με αποτέλεσμα οι περισσότερες πληροφορίες να εντοπίζονται στις αρχικές συνιστώσες. Κάθε συνιστώσα σχηματίζει ορθή γωνία με τις προηγούμενες επομένως, οι νέες συνιστώσες είναι μεταξύ τους

κάθετες και άρα, μη συσχετιζόμενες μεταξύ τους. Γραφικά, το αποτέλεσμα της PCA ανάλυσης είναι η προβολή σημείων από ένα πολυδιάστατο χώρο δεδομένων σ' ένα χώρο μικρότερων διαστάσεων[96,97].

6.4.2 Ορθογώνια παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση

Η μέθοδος ορθογώνιας παλινδρόμησης μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωριστική ανάλυση (Orthogonal Partial Least Square Regression – Discriminant Analysis, OPLS-DA) αποτελεί μία επιβλεπόμενη μέθοδο ανάλυσης με σκοπό τον διαχωρισμό των παρατηρήσεων (φασμάτων) με βάση τις πληροφορίες που παρέχονται. Αυτό που κάνει είναι να εντοπίζει τη σύνδεση μεταξύ της ανεξάρτητης μήτρας δεδομένων X (descriptor matrix) με την εξαρτημένη μήτρα αποκρίσεων Y (response matrix) με τη βοήθεια φίλτρου ορθογώνιας διόρθωσης σήματος (orthogonal signal correction, OSC). Για να το επιτύχει αυτό, μειώνει τη μεταβλητότητα που δεν σχετίζεται ή δεν έχει καμία επίδραση στο διαχωρισμό των ομάδων.

6.4.3 Επικύρωση στατιστικών μοντέλων

Τα μοντέλα που εξάγονται από την πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση πρέπει να είναι έγκυρα και αξιόπιστα. Πρώτο βήμα για τη διασφάλιση της αξιοπιστίας των μοντέλων αποτελεί ο έλεγχος των παραμέτρων R^2 (συντελεστής προσαρμογής του εξαγόμενου μοντέλου στην πραγματική διακύμανση των μεταβλητών – goodness of fit) και Q^2 (προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου - goodness of prediction). Στα πειράματα μεταβολομικής αξιόπιστα θεωρούνται τα μοντέλα που παρουσιάζουν τιμές R^2 και Q^2 μεγαλύτερες από 0,5 ενώ η διαφορά $R^2 - Q^2$ είναι μικρότερη από 0,2 [98,99].

Στην περίπτωση ενός OPLS-DA μοντέλου, πέραν από τον έλεγχο των παραπάνω παραμέτρων, είναι απαραίτητη η περαιτέρω επικύρωση των αποτελεσμάτων. Τα «εργαλεία» που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν:

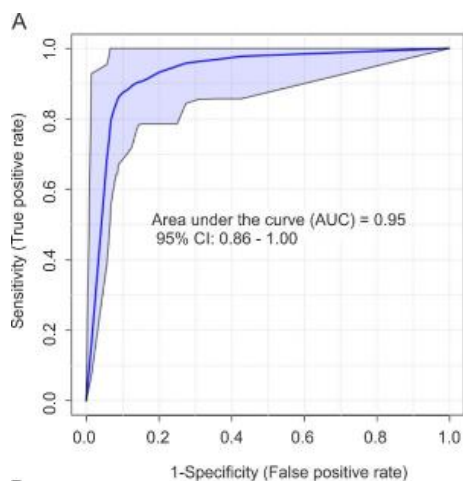
- ❖ τον έλεγχο αναδιάταξης των αποκρίσεων (response permutation testing).
- ❖ τον έλεγχο διασταυρωμένης επικύρωσης της ανάλυσης (cross-validated analysis of variance, CV-ANOVA).

❖ την καμπύλη ROC (receiver operating characteristic curve)[99].

Ο έλεγχος αναδιάταξης των αποκρίσεων διασφαλίζει ότι ο διαχωρισμός των ομάδων σ' ένα OPLS-DA μοντέλο είναι ικανοποιητικός και ότι τα αποτελέσματα που παρατηρούνται δεν οφείλονται στη τύχη. Σε αυτό τον έλεγχο, οι μεταβλητές της μήτρας X παραμένουν σταθερές ενώ οι μεταβλητές της μήτρας Y αναδιατάσσονται τυχαία αρκετές φορές (έως 999 φορές). Κάθε φορά παράγεται ένα νέο OPLS-DA μοντέλο για τη μήτρα X και την αναδιατεταγμένη μήτρα Y ενώ οι συντελεστές R^2 και Q^2 υπολογίζονται πάλι. Για να είναι ένα OPLS-DA μοντέλο αξιόπιστο πρέπει οι τιμές R^2 και Q^2 (στα αριστερά του διαγράμματος), που προέρχονται από την αναδιάταξη των μεταβλητών της μήτρας Y, να είναι χαμηλότερες από τις αρχικές (στα δεξιά του διαγράμματος) καθώς επίσης, η τομή της γραμμής παλινδρόμησης της Q^2 στον άξονα y να είναι κάτω από το μηδέν [100,101].

Ο έλεγχος διασταυρωμένης επικύρωσης της ανάλυσης είναι ένα διαγνωστικό εργαλείο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της αξιοπιστίας ενός OPLS-DA μοντέλου. Βασίζεται στη συνάρτηση ελέγχου F (F-test) για τον έλεγχο της πιθανότητας ο διαχωρισμός να είναι τυχαίος. Συνήθως, ένα μοντέλο θεωρείται στατιστικά σημαντικό, όταν η τιμή p-value είναι μικρότερη από 0,05 για στάθμη εμπιστοσύνης (βεβαιότητα) 95%.

Η καμπύλη ROC χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της συνολικής διακριτικής ικανότητας του μοντέλου. Απεικονίζει το ποσοστό των αληθώς θετικών - true positive rate-TPR (ευαισθησία) σε σχέση με το ποσοστό των ψευδώς θετικών - false positive rate-FPR (1-ειδικότητα) τιμών για όλες τις πιθανές οριακές τιμές διαχωρισμού 95. Όσο πιο μεγάλη είναι η ευαισθησία τόσο καλύτερος είναι ο διαχωρισμός των ομάδων. Αυτό που ουσιαστικά λαμβάνεται υπόψιν σε μία καμπύλη ROC είναι το εμβαδόν της καμπύλης (area under curve-AUC), η τιμή του οποίου μπορεί να κυμαίνεται από 0,50 (κακός διαχωρισμός) μέχρι 1,0 (τέλειος διαχωρισμός). Στην **Εικόνα 4** δίνεται η καμπύλη ROC.



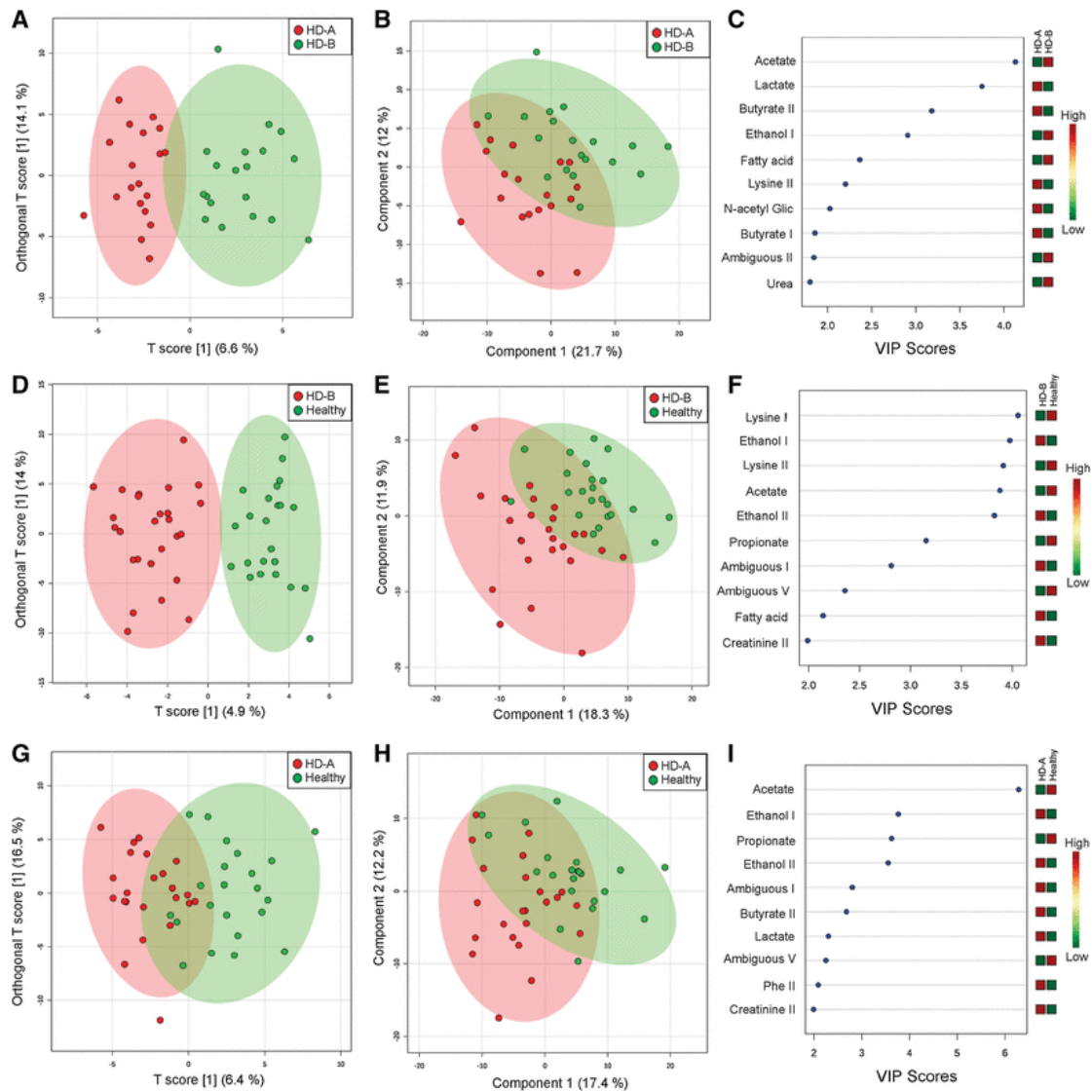
Εικόνα 4. Καμπύλη ROC [99].

6.4.4 Εντοπισμός σημαντικών μεταβολιών

Η διασφάλιση της αξιοπιστίας των μοντέλων επιτρέπει την αναζήτηση των σημαντικών μεταβλητών που συνεισφέρουν κατά κύριο λόγο στο διαχωρισμό των ομάδων στο διάγραμμα score. Κάθε μεταβλητή αντιστοιχεί σε μία ορισμένη περιοχή του φάσματος η οποία είναι χαρακτηριστική για κάθε μεταβολίτη. Επομένως, μπορεί να γίνει ταύτιση των πιο σημαντικών μεταβολιτών οι οποίοι χαρακτηρίζονται δυνητικοί-υποψήφιοι βιοδείκτες (potential biomarkers). Τα «εργαλεία» που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν:

- ❖ Το διάγραμμα σημαντικότητας, VIP plot (Variable Influence on Projection ή Variable Importance in Projection) και
- ❖ το διάγραμμα S-γραμμής, S-line plot [98].

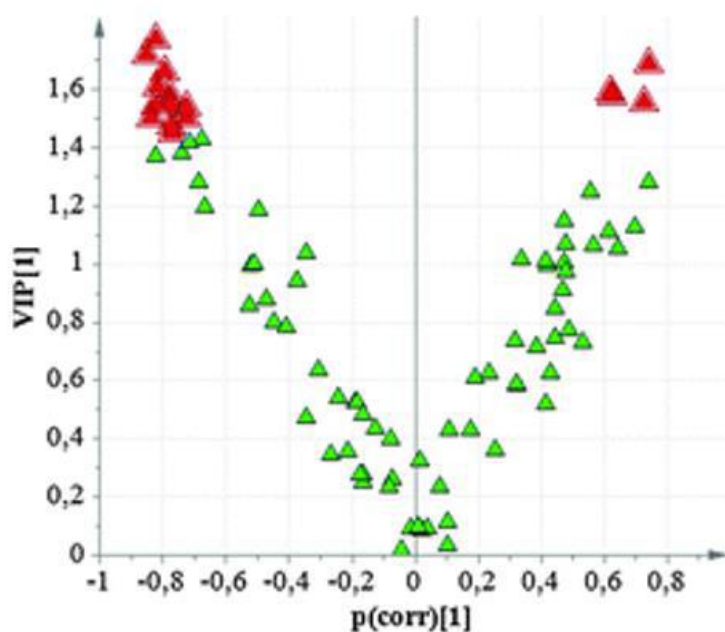
Το διάγραμμα Σημαντικότητας - VIP plot χρησιμοποιείται συνήθως για να περιγράψει ένα OPLS-DA μοντέλο. Δείχνει με φθίνουσα σειρά τις πιο σημαντικές μεταβλητές (bins) για το διαχωρισμό των ομάδων στο διάγραμμα score [98]. Συνήθως, λαμβάνονται υπόψιν μεταβλητές με τιμή VIP > 1,0. Στην ουσία VIP > 1,0 δείχνει ότι η μεταβλητή συνεισφέρει περισσότερο από το μέσο όρο στο διαχωρισμό. Η υιοθέτηση τιμών VIP > 1,0 έχει ως αποτέλεσμα τη συμπερίληψη μέχρι και του 50% των μεταβλητών [94]. Στην **Εικόνα 5** δίνεται ένα τυπικό διάγραμμα VIP, όπου γίνεται χρωματική διάκριση των μεταβλητών ανάλογα με τη τιμή VIP.



Εικόνα 5. Παράδειγμα διαγράμματος VIP [94].

Το διάγραμμα VIP εξαρτάται από τις μεταβλητές που επιλέγονται. Για την εύρεση των πιο σημαντικών μεταβλητών λαμβάνεται υπόψιν και η τιμή της παραμέτρου $\rho(\text{corr})$. $\rho(\text{corr})$ είναι το διάγραμμα των μεταβλητών (loadings) λαμβάνοντας υπόψιν τον συντελεστή συσχέτισης για τη μετατροπή κλίμακος. Οι τιμές της παραμέτρου $\rho(\text{corr})$ παραμένουν σταθερές ανεξάρτητα από τις μεταβλητές που επιλέγονται ενώ το εύρος των τιμών του κυμαίνεται από - 1,0 έως 1,0. Δεν υπάρχει όριο για τη βέλτιστη τιμή του $\rho(\text{corr})$ με βάση το οποίο μία μεταβλητή θεωρείται σημαντική. Συνήθως, πιο σημαντικές θεωρούνται οι μεταβλητές που συνδυάζουν $\text{VIP} > 1,0$ και $|\rho(\text{corr})| >$

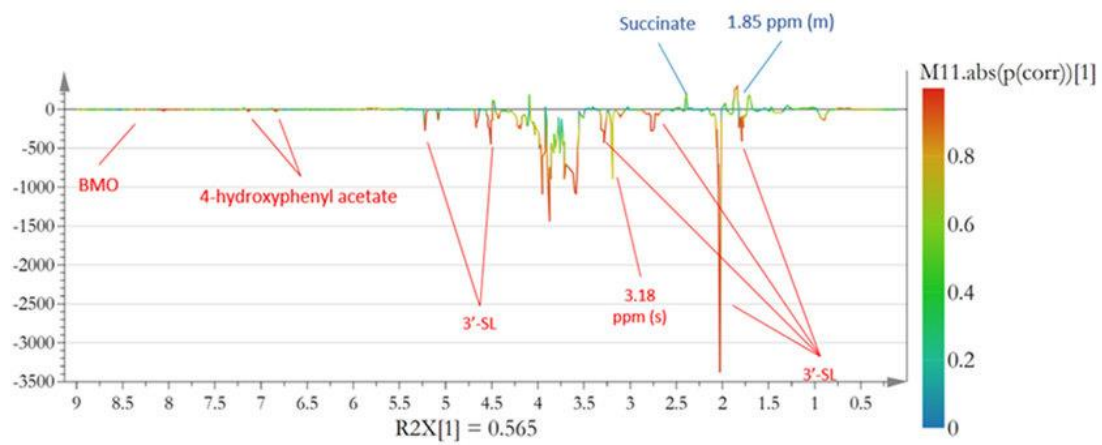
0,596. Στην **Εικόνα 6** δίνεται το διάγραμμα VIP-p(corr) όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές μεταβλητές.



Εικόνα 6. Διάγραμμα σημαντικότητας μεταβλητών VIP-p(corr). Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι πιο σημαντικές μεταβλητές για το διαχωρισμό των ομάδων στο διάγραμμα score [VIP> 1,45 και |p(corr)| > 0,5] [100].

Το διάγραμμα S-γραμμής, S-lineplot πρόκειται για ένα διάγραμμα μεταβλητών (loading plot), όπου το «βάρος» (loading weight) κάθε μεταβλητής στη διαφοροποίηση απεικονίζεται σε χρωματική κλίμακα σύμφωνα με την απόλυτη τιμή του συντελεστή συσχέτισης ($|r|$) (color-coded coefficient loading plot) [100,101]. Το νέο διάγραμμα (ψευδο-φάσμα) απεικονίζει κορυφές σε 2 κατευθύνσεις ανάλογα με τη συνεισφορά τους στο διαχωρισμό των 2 ομάδων. Οι κορυφές που έχουν θετικό προσανατολισμό (>0) αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που εντοπίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην ομάδα στη θετική κατεύθυνση της πρώτης κύριας συνιστώσας πρόβλεψης (1^ο και 4^ο τεταρτημόριο). Αντίθετα, κορυφές με αρνητικό προσανατολισμό (<0) αντιστοιχούν σε μεταβολίτες που βρίσκονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην ομάδα στην αρνητική κατεύθυνση της πρώτης κύριας συνιστώσας πρόβλεψης (2^ο και 3^ο τεταρτημόριο). Όσο πιο κόκκινο είναι το χρώμα των κορυφών στη κλίμακα, τόσο μεγαλύτερη είναι η συμμετοχή των μεταβολιτών στο διαχωρισμό

των ομάδων [101]. Στην **Εικόνα 7** δίνεται ένα τυπικό διάγραμμα S-line με επισήμανση των σημαντικών μεταβολιτών.



Εικόνα 7. Διάγραμμα S-line [101].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΣΚΟΠΟΣ

Σε αυτή τη μελέτη υποθέσαμε ότι οι διακριτοί πληθυσμοί νεογνών που σιτίζονται αποκλειστικά με μητρικό γάλα και με την εμπλουτισμένη βρεφική φόρμουλα θα έχουν διαφορετικό εντερικό μικροβίωμα, που θα μπορούσε να αντανακλάται στους παραγόμενους μεταβολίτες που απεκκρίνονται και ανιχνεύονται με τη βοήθεια της Μεταβολομικής στα ούρα αυτών των νεογνών. Βασιζόμενοι στην προαναφερόμενη υπόθεση, σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να συγκρίνουμε το μεταβολικό αποτύπωμα ούρων υγιών τελειομήνων νεογνών, σιτιζόμενων αποκλειστικά με μητρικό γάλα, με αυτό νεογνών, σιτιζόμενων με βρεφική φόρμουλα εμπλουτισμένη με συνβιοτικά (Rontamil Complete 1), σε τέσσερα χρονικά σημεία (3^η, 15^η ημέρα ζωής, 2^ο και 3^ο μήνα ζωής), χρησιμοποιώντας NMR μεταβολομική ανάλυση.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή δειγμάτων

Τα συμμετέχοντα στην μελέτη νεογνά χωρίστηκαν σε δύο ομάδες: μία ομάδα με τα αποκλειστικά θηλάζοντα (BF) και η άλλη με αυτά που σιτίστηκαν με βρεφική φόρμουλα με συνβιοτικά (Rontamil® Complete 1—*Bifidobacterium animalis* 1.00 x 10⁷ cfu/g, FOS 0.52 g/100 kcal, Rontamil, Zug, Switzerland) (FF). Στην ομάδα FF, τα νεογνά θήλασαν αποκλειστικά πριν την εισαγωγή τους στη μελέτη. Στην περίπτωση παιδιατρικής οδηγίας, ή επιθυμίας των γονιών για σίτιση με βρεφική φόρμουλα σε συνδυασμό με μητρικό θηλασμό, τα νεογνά έλαβαν Rontamil® Complete 1 φόρμουλα. Η μέση διατροφική σύνθεση ανά 100 ml του μητρικού γάλακτος και της φόρμουλας (Rontamil® Complete 1) παρουσιάζεται στον **Πίνακα 3** [103,104].

Πίνακας 3. Μέση θρεπτική σύσταση ανά 100 ml του μητρικού γάλακτος και της υπό μελέτη βρεφικής φόρμουλα Rontamil® Complete 1 [103,104].

	Formula*	Breast^{1, 2}
Energy (kcal)	68	63
Protein (g)	1.4	1.04
Carbohydrates (g)	7.8	7.84
Fibre (g)	0.34	1.2-1.4
Fat (g)	3.4	3.0
Saturated Fatty acids (g)	1.0	1.1
MUFA (g)	1.71	1.4
PUFA (g)	0.66	0.5
Linoleic acid (g)	0.52	0.4
α -linolenic acid (mg)	54	17.8
Arachidonic acid -AA (mg)	15.4	15.2
Docosahexaenoic acid – DHA (mg)	15.4	7.6
Minerals		
calcium (mg)	47	20-25
phosphorus (mg)	29	12-14
magnesium (mg)	5	3.0-3.5
iron (mg)	0.5	0.03-0.07
zinc (μ g)	0.5	0.1-0.3
manganese (μ g)	7.9	0.3-0.4
copper (μ g)	50	0.01-0.03
iodine (μ g)	12.6	14-15
sodium	23	15-25
potassium	74	40-55
chloride	54	40-45
selenium (μ g) 2.71.0-2.5fluoride6.8-Other		
total nucleotides (mg)	2.2	
Non-protein nitrogen (g)		0.18

*100 ml της βρεφικής φόρμουλας παρασκευάζεται αναμιγνύοντας 13.5 g σκόνης σε 90 ml νερό

Τα δείγματα ούρων από 72 νεογνά (36 από την κάθε ομάδα) συλλέχθηκαν σε 4 χρονικά σημεία (3^η και 15^η ΗΖ, 2^ο και 3^ο μήνα). Υγιή, τελειόμηνα, μονόδυμα νεογνά που γεννήθηκαν είτε φυσιολογικά είτε με καισαρική τομή με Apgar score > 7 στο 1^ο και 5^ο λεπτό, χωρίς να χρειαστούν ιατρική παρέμβαση κατά τη γέννηση και με φυσιολογική ενδομήτρια ανάπτυξη (βάρος γέννησης 10-89^η ΕΘ) κρίθηκαν κατάλληλα για εισαγωγή στην μελέτη. Οι WHO καμπύλες ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των εκατοστιαίων θέσεων του βάρους γέννησης. Τα κριτήρια αποκλεισμού ένταξης στην μελέτη ήταν η ενδομήτρια υπολειπόμενη αύξηση (IUGR), το θετικό οικογενειακό ιστορικό αλλεργίας στη πρωτεΐνη του αγελαδινού γάλακτος, η εισαγωγή στη MENN και η ενδομήτρια ή μετά τον τοκετό χορήγηση αντιβιοτικών στο νεογνό. Ο μέσος όρος ηλικίας, μετά τη γέννηση, των εισαχθέντων στην μελέτη νεογνών ήταν 38 εβδομάδες και 5 ημέρες. Το βάρος γέννησης (μέσος όρος, τυπική απόκλιση), το κλάσμα του φύλου και του είδους τοκετού δίνονται και για τις δύο ομάδες στον **Πίνακα 4**.

Πίνακας 4. Σύγκριση δεδομένων μεταξύ ομάδων νεογνών FF και BF.

	Formula-fed	Breast-fed
Birth weight Mean (g)	3,287	3,298
Birth weight Std Dev (g)	410	339
Sex Ratio (F/M)	0.78	0.59
Delivery Mode Ratio (Physical/Cesarean)	0.88	1.69

Έγκριση (Αρ.ΕΕ-2/15/31-01-2017) από την Αναθεωρητική Επιτροπή του Αρεταιείου Νοσοκομείου, μαζί με την επιτροπή Δεοντολογίας, καθώς και έγκριση (Αρ. ΑΔΑ: ΩΔΖΧ46906Ψ-450/09-03-2017) από το Γενικό Νοσοκομείο Νίκαιας «Άγιος Παντελεήμων», δόθηκαν πριν από την έναρξη της μελέτης. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις υπάρχουσες οδηγίες και κανονισμούς. Η ενυπόγραφη ενημερωμένη συγκατάθεση λήφθηκε από τις συμμετέχουσες μητέρες πριν από την εισαγωγή στην μελέτη. Η κλινική μελέτη καταχωρήθηκε στο Clinical Trials.gov με τον τίτλο, «Metabolomic Profile of Urine Samples from Neonates fed with breastmilk and infant formula enriched with synbiotics» με αριθμό μητρώου NCT03320837.

2.2 Μεταβολομική ανάλυση

2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα δείγματα αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου 60 λεπτά πριν από την εκτέλεση των NMR πειραμάτων. Κατόπιν τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (10000 g, 4°C, 10 λεπτά) και 450 μL ούρων αναμεμειγμένα με 150 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 1,5 M (pH 7,4) σε D₂O που περιέχει 0,1% τριμεθυλοσιλυλοπροπιονικό νάτριο (TSP) και αζίδιο του νατρίου (NaN₃, 2 mM) μεταφέρθηκαν σε σωλήνες NMR 5 mm [105].

2.2.2 NMR μετρήσεις και επεξεργασία δεδομένων

Όλα τα φάσματα NMR λήφθηκαν σε φασματόμετρο NMR Varian-600 MHz (Varian, Palo Alto, CA, USA) εξοπλισμένο με ανιχνευτή τριπλού συντονισμού {HCN}. Μονοδιάστατα 1H-NMR φάσματα συλλέχθηκαν στους 25°C με την αλληλουχία παλμών 1D NOESYPRESAT για καταστολή σήματος διαλύτη. Όλα τα φάσματα 1H NMR διορθώθηκαν κατά φάση και βασική γραμμή χρησιμοποιώντας λογισμικό Mnovan.10.1 (Biotechnology, Gaithersburg, MD, Η.Π.Α.). Το φάσμα NMR κάθε δείγματος ευθυγραμμίστηκε με αναφορά στο σήμα TSP στα δ 0,00 ppm. Τα φάσματα 1H NMR μειώθηκαν σε κάδους 0,0001 ppm και η περιοχή D₂O αφαιρέθηκε. Τα φάσματα κανονικοποιήθηκαν στην τυποποιημένη περιοχή της ένωσης αναφοράς και μετατράπηκαν σε μορφή ASCII χρησιμοποιώντας λογισμικό Mnovan.10.1. Τα αρχεία ASCII εισήχθησαν στο MATLAB (R2006a, Mathworks, Inc., Natick, MA, ΗΠΑ, 2006) και όλα τα φάσματα ευθυγραμμίστηκαν χρησιμοποιώντας τη βελτιστοποιημένη μέθοδο συσχέτισης παραμόρφωσης (COW) [106].

2.2.3 Ταυτοποίηση μεταβολιτών

Η φασματοσκοπία 2D NMR χρησιμοποιήθηκε για να βοηθήσει στον προσδιορισμό των μεταβολιτών. Συγκεκριμένα, τα πειράματα gCOSY, zTOCSY, gHMBCad και gHSQCad καταγράφηκαν στους 25°C. Οι παράμετροι λήψης για το gCOSY ήταν: φασματικό εύρος (SW), 7225,4 Hz; t₁ προσαύξηση, 256; χρόνος λήψης, 0,150 s; αριθμός σαρώσεων, 128; 1084 σημεία δεδομένων; ενίσχυση ληφθέντος σήματος, 30; και χρόνος επαναφοράς, 1s. Οι παράμετροι

λήψης για το zTOCSY ορίστηκαν σε: φασματικό εύρος (SW), 7225,4 Hz; t1 προσαύξηση, 256; αριθμός σαρώσεων, 128; χρόνος λήψης, 0,283 s; 2048 σημεία δεδομένων; ενίσχυση ληφθέντος σήματος, 30; και χρόνος επαναφοράς, 1 s. Οι παράμετροι λήψης για το gHSQCad ήταν: f2 φασματικό εύρος (SW), 7225,4 Hz; f1 φασματικό εύρος (SW), 30165,9 Hz; t1 προσαύξηση, 256; αριθμός σαρώσεων, 128; χρόνος λήψης, 0,150 s; 1084 σημεία δεδομένων; ενίσχυση ληφθέντος σήματος, 30; και χρόνος επαναφοράς, 1 s. Οι παράμετροι λήψης για το gHMBCad ήταν: f2 φασματικό εύρος (SW), 7225,4 Hz; f1 φασματικό εύρος (SW), 36199,1 Hz; t1 προσαύξηση, 256; αριθμός σαρώσεων, 128; χρόνος λήψης, 0,150 s; 1084 σημεία δεδομένων; ενίσχυση ληφθέντος σήματος, 40; και χρόνος επαναφοράς, 1 s. Τα φάσματα 2D ερμηνεύτηκαν με το λογισμικό MestReNova v.10.1 (Mestrelab, A Coruña, Ισπανία). Η διαδικασία ταυτοποίησης στηρίχθηκε επίσης σε βιβλιογραφικά δεδομένα [107,108], μια βάση δεδομένων αναφοράς μεταβολίτη ^1H NMR (Chenomx NMR Suite 8.0, Chenomx Inc., Edmonton, AB, Καναδάς) και μια εσωτερική, πλήρως αυτοματοποιημένη πλατφόρμα αναγνώρισης μεταβολιτών [109].

2.3 Στατιστική ανάλυση

2.3.1 Επεξεργασία δεδομένων μετά τη λήψη του φάσματος

Πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση στατιστικών δεδομένων χρησιμοποιώντας ASICS και το `corpls` [110] R πακέτο (έκδοση 4.1), μαζί με την έκδοση SIMCA-P 15.0 (Umetrics, Umeå, Σουηδία). Τα φασματικά δεδομένα ήταν μέσο-κεντρικά και σε κλίμακα Pareto (Par) [111]. Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση περιλάμβανε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) [112], ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων, ανάλυση (PLS-DA) και ανάλυση ορθογώνιων μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA). Το μαθηματικό υπόβαθρο και οι εφαρμογές αυτών των μεθόδων έχουν συζητηθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία [113-117].

2.3.2 Ταυτοποίηση των σημαντικών μεταβολιτών και επικύρωση του μοντέλου για SIMCA – P

Η επιλογή χαρακτηριστικών για τα μοντέλα OPLS-DA βασίστηκε στο διάγραμμα σημαντικότητας (VIP) με βαθμολογίες $> 0,7$ και $P(\text{corr}) > 0,2$ για να αναδείξουν τις μεταβλητές που μπορούν να οδηγήσουν σε διάκριση τάξης. Τα διαγράμματα της γραμμής S χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό μεταβολιτών που συνέβαλαν στη διάκριση των δειγμάτων. Η ποιότητα των μοντέλων (PCA/OPLS-DA) περιγράφηκε από την παράμετρο R^2 ($0 \leq R^2 \leq 1$) και τις τιμές της προβλεπτικής ικανότητας Q^2 ($0 \leq Q^2 \leq 1$). Το R^2 εξηγεί την μεταβλητότητα, αποτελώντας έτσι το ποσοτικό μέτρο της ποιότητας του μαθηματικού μοντέλου αναπαραγωγής των δεδομένων. Η συνολική προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου αξιολογήθηκε από το σωρευτικό Q^2 , που αντιπροσωπεύει το κλάσμα της παραλλαγής του Y που μπορεί να προβλεφθεί από το μοντέλο, το οποίο εξήχθη σύμφωνα με την προεπιλεγμένη μέθοδο εσωτερικής διασταυρούμενης επικύρωσης του Λογισμικού SIMCA-P, έκδοση 14.0 (Umetrics, Malmo, Σουηδία). Το Q^2 θεωρείται de facto προεπιλεγμένη διαγνωστική παράμετρος για την επικύρωση μοντέλων OPLS-DA στη μεταβολομική. Συγκεκριμένα, όλα τα μοντέλα OPLS-DA έδειξαν υψηλές στατιστικές τιμές ($R^2 > 0.7$ και $Q^2 \geq 0.50$), η διαφορά μεταξύ της παραμέτρου R^2 και της προγνωστικής ικανότητας παρέμενε πάντα κάτω από 0.3 ($R^2 - Q^2 < 0.3$) και η παράμετρος R^2 δεν ήταν ποτέ ίση με ένα ($R^2 \neq 1$). Επομένως, επειδή τα εξαγόμενα μοντέλα πληρούσαν αυτούς τους κανόνες, η ευρωστία και η προγνωστική απόκριση ενισχύθηκαν και η υπερβολική προσαρμογή αποφεύχθηκε. Τα μοντέλα ταξινόμησης επικυρώθηκαν χρησιμοποιώντας ανάλυση διασταυρούμενης επικύρωσης (CV-ANOVA), με τιμή $p < 0,05$ όπως σημειώνεται σε κάθε πολυμεταβλητό στατιστικό μοντέλο. Επί πλέον, χρησιμοποιήθηκαν δοκιμές μετάθεσης (999 μεταθέσεις) προκειμένου να αξιολογηθεί εάν η συγκεκριμένη ταξινόμηση δύο κατηγοριών σε ένα μοντέλο ήταν σημαντικά καλύτερη από οποιαδήποτε άλλη με μοντέλα που λαμβάνονται με τυχαία μετάθεση της αρχικής ομάδας απόδοσης. Όλα τα μοντέλα εξήχθησαν σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Ένα επιπλέον μέτρο της εγκυρότητας του μοντέλου PLS-DA περιλάμβανε την

εξαγωγή του δέκτη – χειριστή χαρακτηριστικών (ROC) καμπυλών για την αξιολόγηση της ικανότητας της λανθάνουσας μεταβλητής PLS Tpred ώστε να ταξινομηθεί σωστά το σετ δοκιμής. Υπολογίστηκε η περιοχή κάτω από το ROC (AUROC). Μία τέλεια διάκριση αντιστοιχούσε σε AUROC ίσο με 1.

2.3.3 Επικύρωση των μοντέλων για γλώσσα R

Το πακέτο `ropls` (R) χρησιμοποιήθηκε για την υλοποίηση του PCA, το μοντέλο των μερικών ελάχιστων διακριτών τετραγώνων (PLS-DA) και η ορθογώνια εφαρμογή του (OPLS-DA). Αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούνται για τη μεγιστοποίηση της συσχέτισης μεταξύ δύο συνόλων μεταβλητών με μείωση των δεδομένων σε μερικές λανθάνουσες μεταβλητές. Η ορθογώνια χρήση αυτής της μεθόδου παρέχει αναβαθμισμένη ερμηνεία των παραλλαγών μεταξύ των διακριτών ομάδων. Η αξιολόγηση του PLS – DA και των μοντέλων OPLS-DA βασίστηκαν στο συντελεστή goodness of fit R^2Y και στο συντελεστή Q^2Y . Η πρόβλεψη εκτιμήθηκε με 7-πλάσια διασταυρούμενη επικύρωση και η ευρωστία των μοντέλων μετρήθηκε μέσω δοκιμής μετάθεσης για 999 επαναλήψεις. Για τα μοντέλα PLS, ο βέλτιστος αριθμός λανθάνουσας μεταβλητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν με βάση τη συσσώρευση υψηλών τιμών R^2 χωρίς υπερπροσαρμογή του μοντέλου. Επιπλέον, το πακέτο ASICS χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση μεταβολιτών από τα δεδομένα NMR. Για να εντοπιστούν στατιστικά σημαντικές μεταβλητές που επηρέασαν τις δύο διακρίσεις, πραγματοποιήθηκε μια δοκιμή Kruskal – Wallis [118] και οι τιμές p των πολλαπλών δοκιμών διορθώθηκαν με τη μέθοδο Benjamini – Hochberg [119].

2.3.4 Ανάλυση των μεταβολομικών μονοπατιών

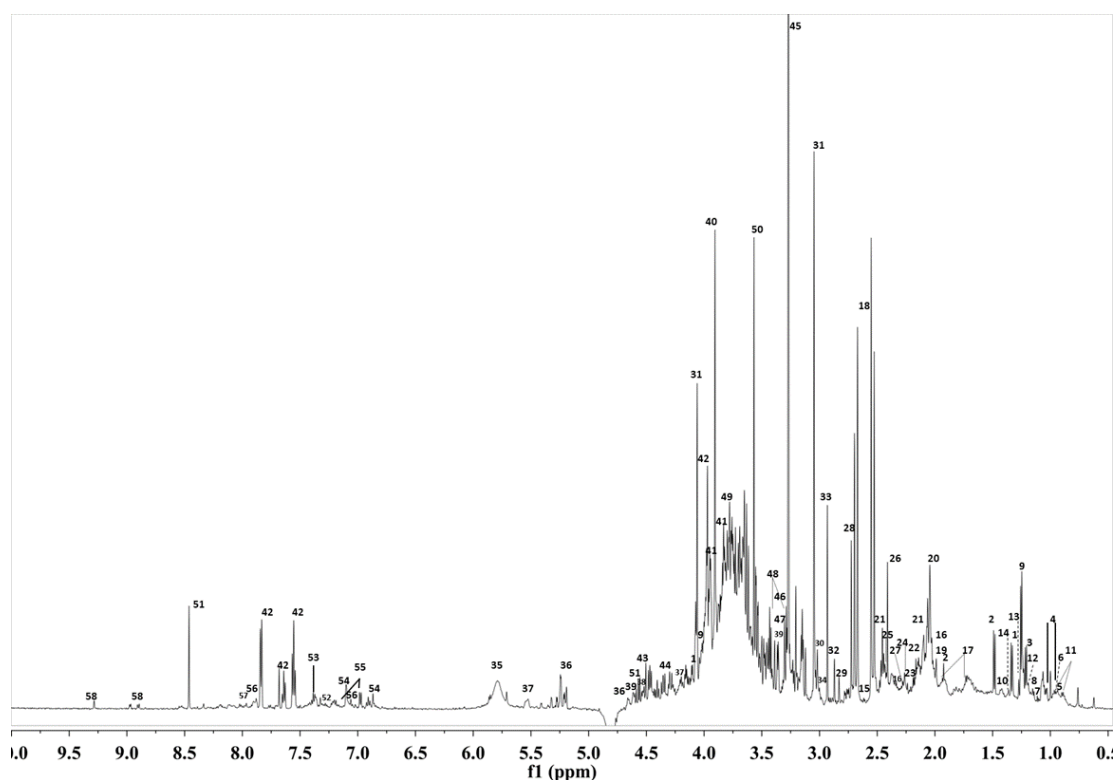
Χρησιμοποιήθηκε το Metaboanalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) για ανάδειξη βιοδεικτών, ταξινόμηση και χαρτογράφηση μονοπατιών. Μια υπεργεωμετρική δοκιμασία που περιλάμβανε ανάλυση υπερ-αναπαράστασης και ανάλυση τοπολογίας μονοπατιών χρησιμοποιήθηκε για να συσχετίσει αυτούς τους μεταβολίτες με τις μεταβολικές οδούς. MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/metaboanalyst/>)

χρησιμοποιήθηκε για βιοπληροφορική ανάλυση και η ανάλυση των μεταβολικών μονοπατιών βασίστηκε στη βάση δεδομένων KEGG η οποία εφαρμόστηκε για να αναδείξει εναλλακτικές μεταβολικές οδούς.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανίχνευση μεταβολιτών

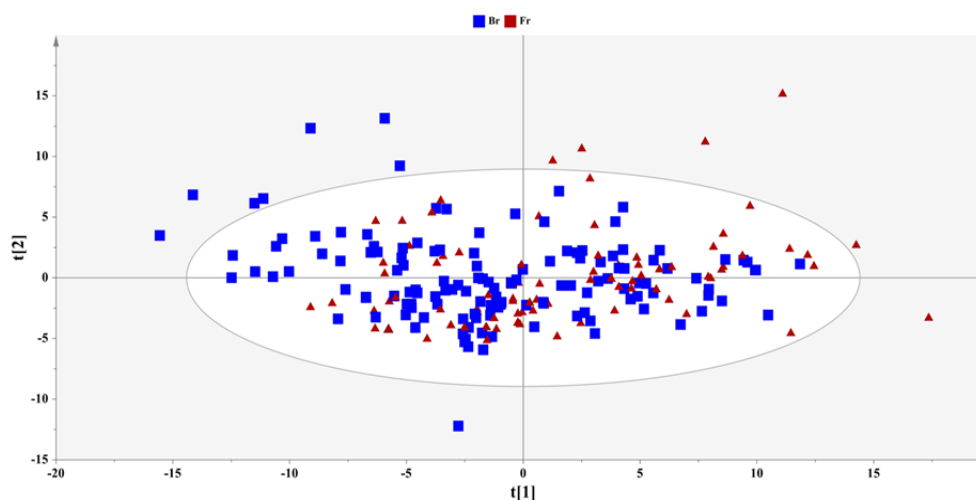
Ένα τυπικό ^1H NMR φάσμα ούρων νεογνού με σχολιασμούς των ταυτοποιημένων μεταβολιτών απεικονίζεται στην **Εικόνα 8**.



Εικόνα 8. Φάσμα ^1H NMR δείγματος ούρων με κορυφές που αντιστοιχούν στους ταυτοποιούμενους μεταβολίτες. 1: lactate; 2: alanine; 3: 3-amino-isobutyrate; 4: valine; 5: isoleucine; 6: leucine; 7: isobutyrate; 8: succinic acid; 9: L-fucose; 10: lysine; 11: bile acids (2-hydroxybutyrate); 12: 3-methyl-2-oxovalerate; 13: 3-hydroxyisovalerate; 14: 2-hydroxyisobutyrate. 15: β -alanine; 16: 2-hydroxyglutarate; 17: lysine; 18: citrate; 19: acetate; 20: N-acetylaspartate; 21: L-glutamine; 22: acetone; 23: amino adipate; 24: acetoacetate; 25: pyroglutarate; 26: pyruvate; 27: isobutyrate; 28: dimethylamine; 29: methylguanidine; 30: creatine; 31: creatinine; 32: trimethylamine; 33: dimethylglycine; 34: isocitrate; 35: urea; 36: D-glucose; 37: sucrose; 38: L-cystine; 39: gluconate; 40: glycolate; 41: serine; 42: hippurate; 43: trigonelline; 44: threonine; 45: choline; 46: trimethylamine-N-oxide; 47: betaine; 48: taurine; 49: guanidoacetate; 50: glycine; 51: formate; 52: τ -methylhistidine; 53: N-phenylacetylglycine; 54: phenol; 55: tyrosine; 56: histidine; 57: π -methylhistidine, 58: trigonelline.

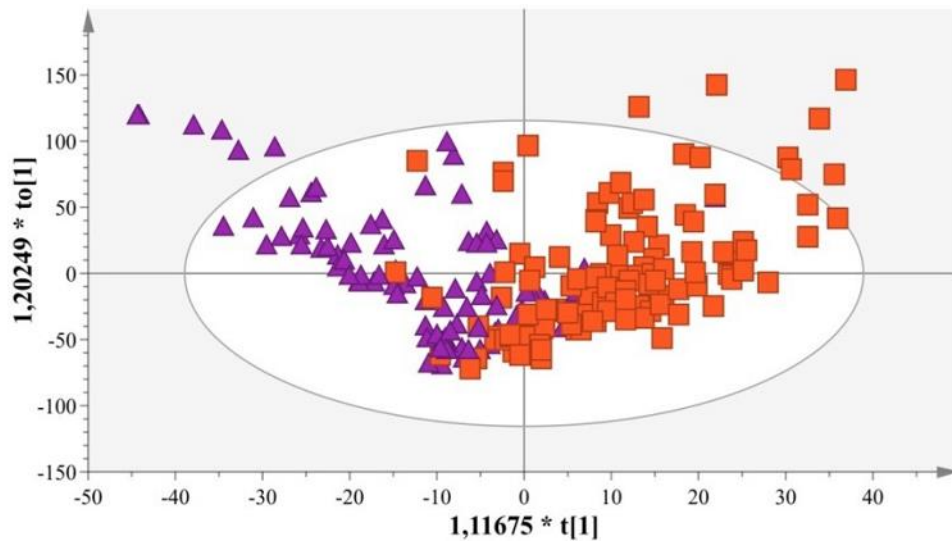
3.2 Μεταβολική έρευνα

Αρκετές διατροφικές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι το μεταβολομικό αποτύπωμα των βρεφών που ακολουθούν διαφορετικές πρακτικές σίτισης συνδέεται στενά με τη διατροφή τους [120,121]. Επομένως, η πρώτη μας έρευνα κατευθύνθηκε προς την παρατήρηση των μεταβολικών τάσεων μεταξύ δειγμάτων νεογνών και βρεφών που θηλάζουν αποκλειστικά (BF) ή σιτίζονται με βρεφική φόρμουλα (FF), ταυτοποιώντας χαρακτηριστικούς μεταβολίτες που μπορούν να σχετίζονται με κάθε ομάδα. Ένα μοντέλο PCA με δύο στοιχεία υπολογίστηκε στο σύνολο των δειγμάτων παρέχοντας μια επισκόπηση και διευκρινίζοντας τις τάσεις της ομαδοποίησης δειγμάτων (**Εικόνα 9**). Στο εξαγόμενο μοντέλο PCA, κανένα από τα δείγματα ούρων, με οποιοδήποτε τρόπο σίτισης (θηλασμός ή βρεφική φόρμουλα) δεν εμφάνισαν σαφείς τάσεις ομαδοποίησης.



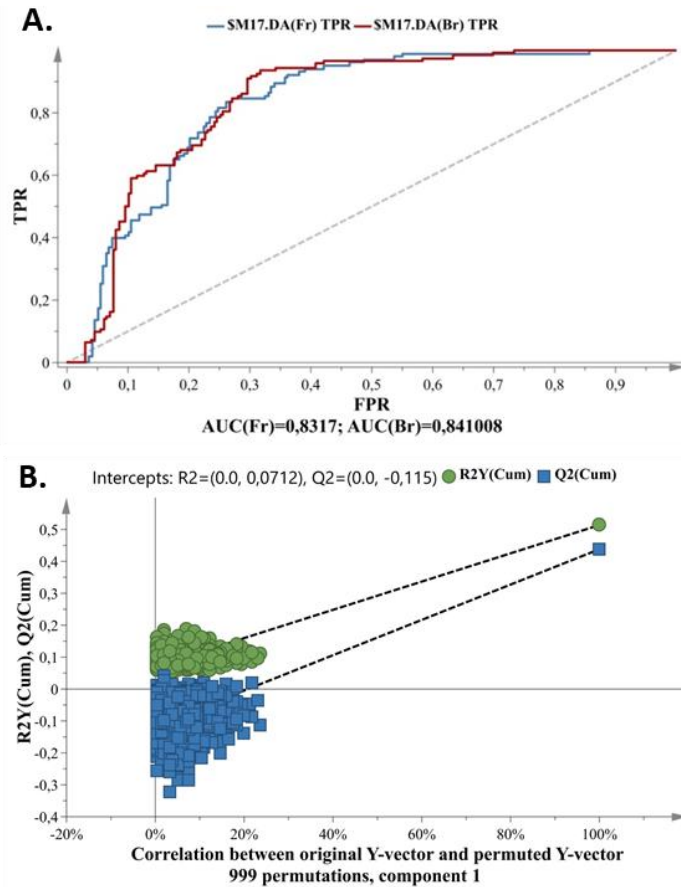
Εικόνα 9. Μετατροπή Pareto, διάστημα εμπιστοσύνης 95%. (δείγματα BF: τετράγωνα, δείγματα FF: τρίγωνα).

Στο επόμενο βήμα, εφαρμόστηκε εποπτευόμενη ανάλυση στις επικαλυπτόμενες ομάδες για την πιθανή επίλυση της μεταβολικής παραλλαγής. Συγκεκριμένα, υπολογίστηκε ένα μοντέλο OPLS-DA, που συμπεριλάμβανε δείγματα από νεογνά που τρέφονται με μητρικό γάλα καθώς και με βρεφική φόρμουλα (**Εικόνα 10**).



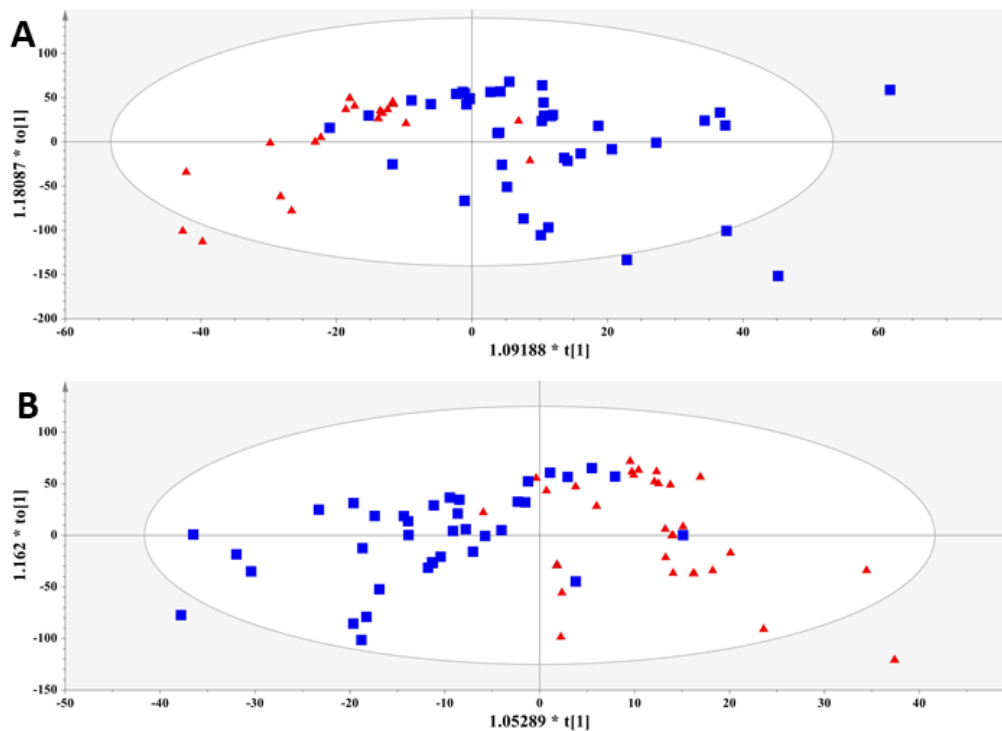
Εικόνα 10. OPLS-DA στατιστικό μοντέλο (BF vs FF δειγμάτων) με $A=1+1+0$, $N=225$, $R^2X(\text{cum})=0.52$, $R^2Y(\text{cum})=0.51$, $Q^2(\text{cum})=0.44$ for pareto scaling and 95% confidence level, $p\text{-value}=6,27E-33$. (δείγματα BF: τετράγωνα, δείγματα FF: τρίγωνα).

Αυτό το μοντέλο επικυρώθηκε με εξαγωγή καμπύλης ROC και δοκιμή μετάθεσης (Εικόνα 11). Σύμφωνα με την AUC για κάθε κατηγορία, οποιαδήποτε τιμή άνω του 0,75 κρίθηκε αποδεκτή, και το μοντέλο θεωρήθηκε ικανό για τη διάκριση μεταξύ των ομάδων ελέγχου.



Εικόνα 11. (α) ROCκαμπύλη AUC (βρεφική φόρμουλα με συνβιοτικά) = 0.8317 και AUC (BF δείγματα)=0.841 (β) Έλεγχος μετάθεσης για το OPLS-DA στατιστικό μοντέλο στην **Εικόνα 10**, φόρμουλα με συνβιοτικά vs μητρικός θηλασμός.

Χρησιμοποιώντας εποπτευόμενη ανάλυση, προσπαθήσαμε να αναδείξουμε πιθανές διαφορές στην ομάδα των θηλαζόντων (BF) έναντι της ομάδας που σιτίζονταν με φόρμουλα (FF) συγκρίνοντας τα δείγματα σε κάθε χρονικό σημείο (3^η και 15^η ημέρα, 2^ο και 3^ο μήνα). Τα συνοπτικά κριτήρια για την εγκυρότητα του μοντέλου και την αναπαραγωγιμότητα σχετικά με τις τιμές των R^2 και Q^2 (R^2 τιμές - Q^2 τιμές > 0.3 και Q^2 τιμές > 0.5) για τα μοντέλα των 2 πρώτων χρονικών σημείων της μελέτης (**Εικόνα 12**) δεν πληρούνταν.



Εικόνα 12. (a) OPLS-DA μοντέλο για τη 3^η ημέρα, δειγμάτων BF και FF, με $A=1+1+0$, $N=64$, $R^2X(\text{cum})=0.61$, $R^2Y(\text{cum})=0.46$, $Q^2(\text{cum})=-0.23$ for pareto scaling and 95% confidence level, $p\text{-value} > 0,05$. (δείγματα BF: μπλε τετράγωνα, δείγματα FF: κόκκινα τρίγωνα); (b) OPLS-DA μοντέλο για τη 15^η ημέρα, δειγμάτων BF και FF με, $A=1+1$, $N=67$, $R^2X(\text{cum})=0.61$, $R^2Y(\text{cum})=0.55$, $Q^2(\text{cum})=0.17$ for pareto scaling and 95% confidence level, $p\text{-value} > 0,05$. (δείγματα BF: μπλε τετράγωνα, δείγματα FF: κόκκινα τρίγωνα).

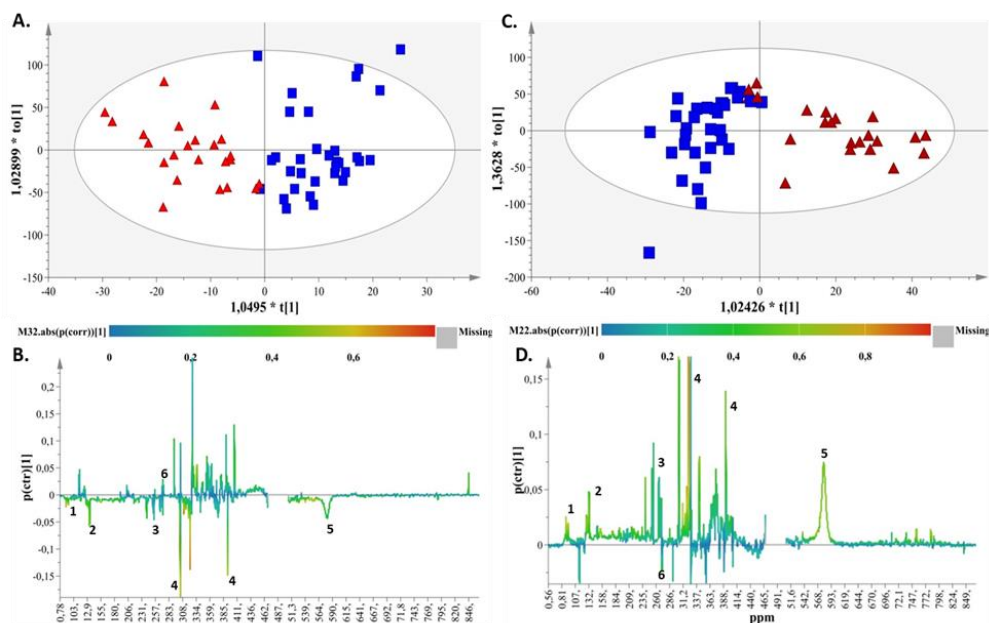
Από την άλλη, τα μοντέλα του 3^{ου} και 4^{ου} σημείου δειγματοληψίας (2^{ος} και 3^{ος} μήνας) εμφανίζονται με υψηλές τιμές προσαρμοστικότητας και προβλεψιμότητας (**Πίνακας 5**).

Πίνακας 5. Μετρήσεις επικύρωσης για τα στατιστικά μοντέλα των δειγμάτων BF vs FF σε κάθε χρονικό σημείο της μελέτης.

	PCA	PLS ¹	OPLS ¹	OPLS-DA (SIMCA ²)
1st Sampling – Day 3 Br= 36 vs Fr= 26 N=62	R2 = 0.798	R ² = 0.633 Q ² = 0.344 (3 predictors)	R2 = 0.433, Q2 = 0.244 N=62	R2Y (cum)=0.69, Q2(cum)=0.33 N=51
2nd Sampling – Day 15 Br= 34 vs Fr= 31 N=65	R2 = 0.858	R2 = 0.573 Q2 = 0.395 (3 predictors)	R2 = 0.406, Q2 =0.276 N=65	R2Y (cum)=0.59, Q2(cum)=0.42 N=57
3rd Sampling – Month 2 Br= 34 vs Fr= 28 N=62	R2 = 0.680	R2 = 0.834 Q2 = 0.669 (4 predictors)	R2 = 0.69, Q2 =0.343 N=62	R2Y(cum)=0.75, Q2(cum)=0.58 N=56
4th Sampling - Month 3 Br= 34 vs Fr= 25 N=59	R2 = 0.676	R2 = 0.922 Q2 = 0.781 (8 predictors)	R2 = 0.574, Q2 =0. 476 N=59	R2Y(cum)=0.72, Q2(cum)=0.58 N=54

¹p -value = 0.001 for all R² and Q² of the PLS and OPLS models. ² Supervised SIMCA models were generated omitting outliers from the PCA models.

Ως εκ τούτου, οι δύο τύποι σίτισης παρουσίασαν σημαντική διαφορά στην τάση μετά τον 2^ο μήνα ζωής. Συγκεκριμένα, οι δύο ομάδες (BF vs FF) διακρίθηκαν σαφώς ως προς το πρώτο συστατικό στους 2 και 3 μήνες σύμφωνα με το εξεταζόμενο μοντέλο OPLS-DA (**Εικόνες 13A και 13C**, αντίστοιχα). Τα μεταβολικά προφίλ των δειγμάτων της ομάδας που θήλαζαν και αυτών της ομάδας που τρέφονταν με συνβιοτική φόρμουλα παρουσίασαν σχεδόν το ίδιο μοτίβο στους 2 και 3 μήνες. Οι βασικοί μεταβολίτες που σχετίζονται με την ομάδα FF σύμφωνα με τα αντίστοιχα διαγράμματα της S-γραμμής (**Εικόνα 13B, 13D**) και για τα δύο χρονικά σημεία (2^{ος} και 3^{ος} μήνας) ήταν ηλεκτρικός μεθυλεστέρας, κιτρικό οξύ, κρεατινίνη, ουρία και χολικά οξέα. Η διμεθυλαμίνη εμφανίστηκε ως ο διαφοροποιός μεταβολίτης της ομάδα BF στα ίδια χρονικά σημεία (**Εικόνες 13B, 13D**).



Εικόνα 13. (a) OPLS-DA μοντέλο για το 2^ο μήνα, δειγμάτων BF και FF, με $A=1+1+0$, $N=56$, $R^2X(\text{cum})=0.57$, $R^2Y(\text{cum})=0.75$, $Q^2(\text{cum})=0.58$ for pareto scaling and 95% confidence level, $p\text{-value}=3,42E^{-10}$. (BF δείγματα: μπλε τετράγωνα, FF δείγματα: κόκκινα τρίγωνα); (b) S-line γράφημα αναδεικνύει τους υπεύθυνους μεταβολίτες για διάκριση. (1. bile acids, 2. methyl succinate, 3. citric acid, 4. creatinine, 5. urea, 6. dimethylamine, (c) OPLS-DA μοντέλο για τον 3^ο μήνα δειγμάτων BF και FF scores plot for month 3 regarding breast- and formula - fed samples, με $A=1+1+0$, $N=54$, $R^2X(\text{cum})=0.54$, $R^2Y(\text{cum})=0.72$, $Q^2(\text{cum})=0.58$ for pareto scaling and 95% confidence level, $p\text{-value}=6,66E^{-10}$. (BF δείγματα: μπλε τετράγωνα, FF δείγματα: κόκκινα τρίγωνα), (d) S-line γράφημα αναδεικνύει τους υπεύθυνους μεταβολίτες για διάκριση. 1. bile acids, 2. methylsuccinate, 3. citric acid, 4. creatinine, 5. urea, 6. dimethylamine.

Τέλος, προσπαθήσαμε να απεικονίσουμε την εξέλιξη των μεταβολιτών σε σχέση με τα τέσσερα χρονικά σημεία για καθεμία από τις δύο ομάδες (BF vs FF). Για το σκοπό αυτό, εποπτευόμενα μοντέλα εξήχθησαν για όλες τις ομάδες δειγμάτων μεταξύ χρονικών σημείων από την 3^η ημέρα έως τον 3^ο μήνα (**Πίνακες 6 και 7**).

Πίνακας 6. Μετρήσεις επικύρωσης για τα στατιστικά μοντέλα των δειγμάτων BF: μεταξύ διαφορετικών χρονικών σημείων.

	PCA	PLS	OPLS	OPLS-DA (SIMCA ¹)
Day 3 (n= 36) vs Day 15 (n= 34)	R2 = 0.843	R2 = 0.245 p-value = 0.05 Q2 = 0.018 p-value = 0.281(2 predictors)	R2 = 0.283 p-value = 0.173 Q2 = 0.04 p-value = 0.067	OPLS: R2 =0.298, Q2 = 0.0338
Day 3 (n= 36) vs Month 2 (n= 34)	R2 = 0.813	R2 = 0.367 p-value = 0.003 Q2 = 0.267 p-value = 0.001 (2 predictors)	R2 = 0.367 p-value = 0.003 Q2 = 0.25 p-value = 0.001	R2X(cum)=0.61, R2Y(cum)=0.48, Q2(cum)=0.33 N=64
Day 3 (n= 36) vs Month 3 (n= 34)	R2 = 0.791	R2 = 0.391 p-value = 0.001 Q2 = 0.264 p-value = 0.001 (2 predictors)	R2 = 0.391 p-value = 0.001 Q2 = 0.201 p-value = 0.001	R2X(cum)=0.57, R2Y(cum)=0.55, Q2(cum)=0.41 N=54
Day 15 days (n=34) vs Month 2 (n= 34)	R2 = 0.858	R2 = 0.227 p-value = 0.05 Q2 = 0.104 p-value = 0.01 (2 predictors)	R2 = 0.227 p-value = 0.05 Q2 = 0.113 p-value = 0.003	OPLS: R2 = 0.362, Q2 = 0.183
Day 15 days (n=34) vs Month 3 (n= 34)	R2 = 0.838	R2 = 0.351 p-value = 0.002 Q2 = 0.187 p-value = 0.001 (2 predictors)	R2 = 0.267 p-value = 0.001 Q2 = 0.147 p-value = 0.001	OPLS: R2 = 0.489, Q2 = 0.34
Month 2 (n=34) vs Month 3 (n= 34)	R2 = 0.721	R2 = 0.335 p-value = 0.504 Q2 = 0.106 p-value = 0.104 (2 predictors)	R2 = 0.313 p-value = 0.07 Q2 = -0.201 p-value = 0.652	-

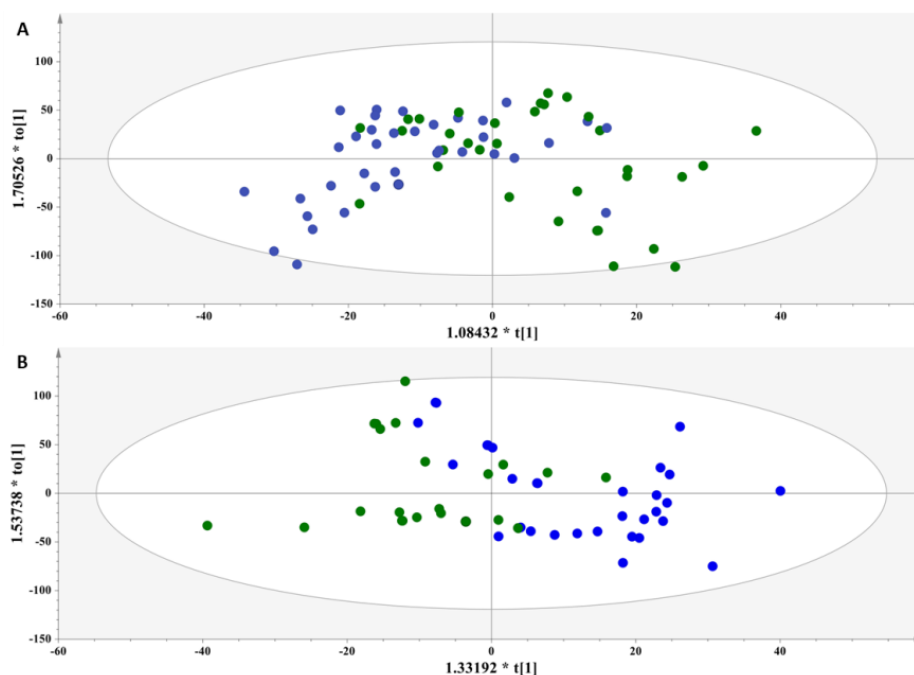
¹ Τα επιβλεπόμενα στατιστικά μοντέλα SIMCA δημιουργήθηκαν απαλείφοντας τις έκτροπες τιμές των μοντέλων PCA.

Πίνακας 7. Μετρήσεις επικύρωσης για τα στατιστικά μοντέλα των δειγμάτων FF: μεταξύ διαφορετικών χρονικών σημείων.

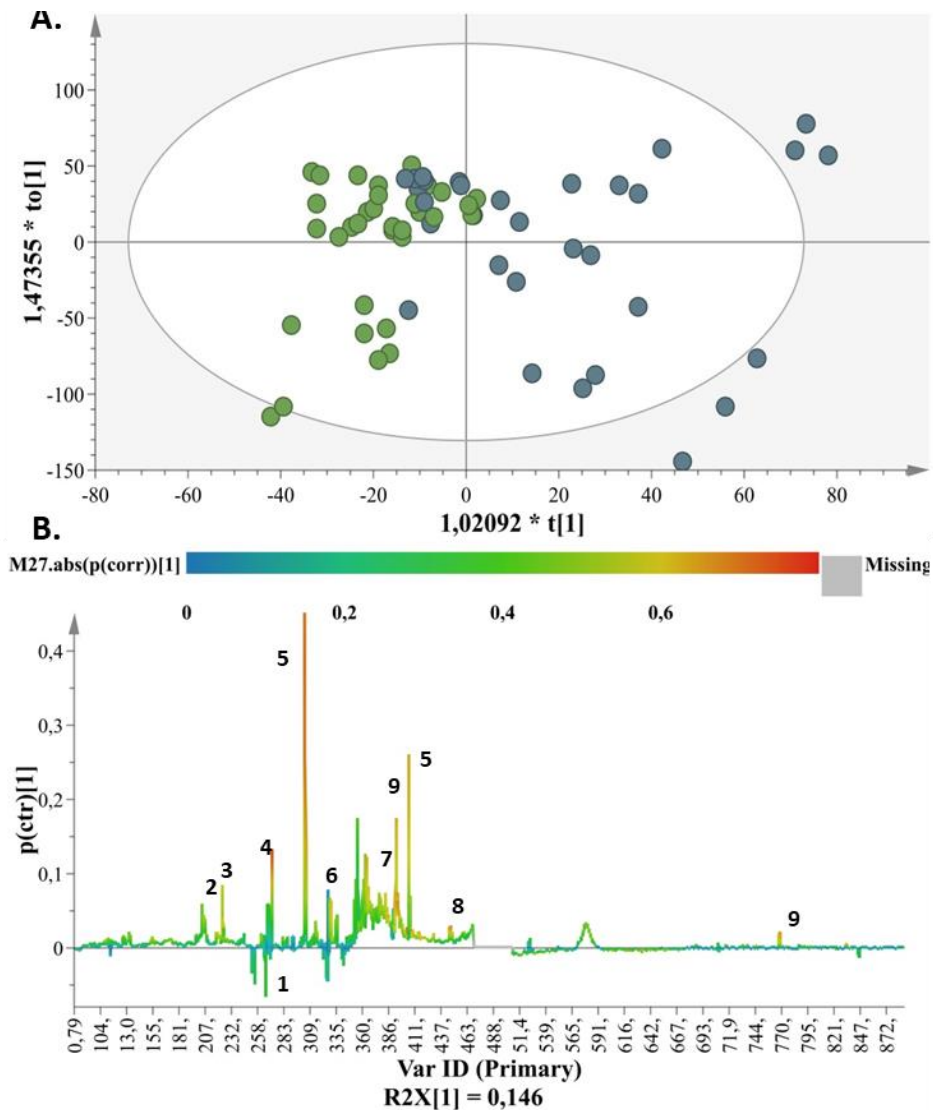
	PCA	PLS	OPLS	OPLS-DA (SIMCA ¹)
Day 3 (n= 26) vs Day 15 (n= 31)	R2 = 0.68	R2 = 0.516 p-value = 0.008 Q2 = 0.118 p-value = 0.046 (3 predictors)	R2 = 0.401 p-value = 0.007 Q2 = 0.246 p-value = 0.002	OPLS: R2 = 0.401, Q2 = 0.228
Day 3 (n= 26) vs Month 2 (n= 28)	R2 = 0.613	R2 = 0.732 p-value = 0.001 Q2 = 0.416 p-value = 0.001 (2 predictors)	R2 = 0.732 p-value = 0.001 Q2 = 0.591 p-value = 0.001	R2X(cum)=0.53, R2Y(cum)=0.75, Q2(cum)=0.55 n=53
Day 3 (n= 26) vs Month 3 (n= 25)	R2 = 0.644	R2 = 0.816 p-value = 0.001 Q2 = 0.681 p-value = 0.001 (4 predictors)	R2 = 0.698 p-value = 0.001 Q2 = 0.639 p-value = 0.001	R2X(cum)=0.51, R2Y(cum)=0.75, Q2(cum)=0.67 n=48
Day 15 (n= 31) vs Month 2 (n= 28)	R2 = 0.691	R2 = 0.36 p-value = 0.004 Q2 = 0.208 p-value = 0.002 (2 predictors)	R2 = 0.36 p-value = 0.003 Q2 = 0.158 p-value = 0.003	OPLS: R2 = 0.377, Q2 = 0.215
Day 15 (n= 31) vs Month 3 (n= 25)	R2 = 0.716	R2 = 0.518 p-value = 0.002 Q2 = 0.382 p-value = 0.001 (3 predictors)	R2 = 0.433 p-value = 0.001 Q2 = 0.405 p-value = 0.001	PCA: R2 = 0.805 OPLS: R2 = 0.492, Q2 = 0.386
Month 2 (n= 28) vs Month 3 (n= 25)	R2 = 0.674	R2 = 0.164 p-value = 0.466 Q2 = 0.033 p-value = 0.091 (2 predictors)	R2 = 0.162 p-value = 0.462 Q2 = 0.024 p-value = 0.122	PCA: R2 = 0.768 OPLS: R2 = 0.263, Q2 = 0.106

¹ Τα επιβλεπόμενα στατιστικά μοντέλα SIMCA δημιουργήθηκαν απαλείφοντας τις έκτροπες τιμές των μοντέλων PCA.

Ο διαχωρισμός μεταξύ των δειγμάτων της ομάδας των θηλαζόντων την 3^η και 15^η ημέρα θα μπορούνα μην απεικονίζεται σε ένα επικυρωμένο μοντέλο OPLS-DA (Εικόνα 14), αλλά η διάκριση ήταν εμφανής μέσα στην ομάδα δειγμάτων BF μεταξύ της 3^{ης} ημέρας και του 2^{ου} μήνα (Εικόνα 15), καθώς και μεταξύ της 3^{ης} ημέρας και του 3^{ου} μήνα (Εικόνα 17A).

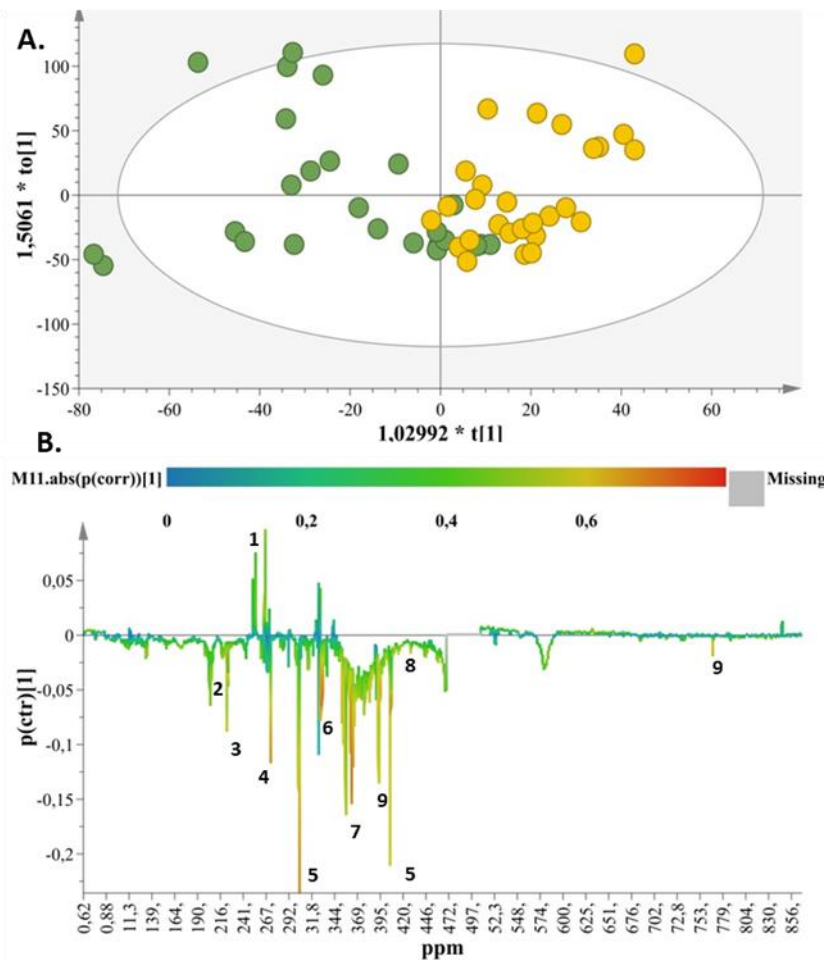


Εικόνα 14. (a) OPLS-DA στατιστικό μοντέλο για την 3^η και 15^η ημέρα BF δειγμάτων, με $A=1+1+0$, $N=64$, $R^2X(cum)=0.61$, $R^2Y(cum)=0.46$, $Q^2(cum)=-0.23$ for pareto scaling and 95% confidence level, $p\text{-value}>0,05$. (3^η ημέρα: μπλε κύκλοι, 15^η ημέρα: πράσινοι κύκλοι) (b) OPLS-DA στατιστικό μοντέλο για την 3^η και 15^η ημέρα FF δειγμάτων, με $A=1+1$, $N=67$, $R^2X(cum)=0.61$, $R^2Y(cum)=0.55$, $Q^2(cum)=0.17$ for pareto scaling and 95% confidence level, $p\text{-value}>0,05$. (3^η ημέρα: μπλε κύκλοι, 15^η ημέρα: πράσινοι κύκλοι)



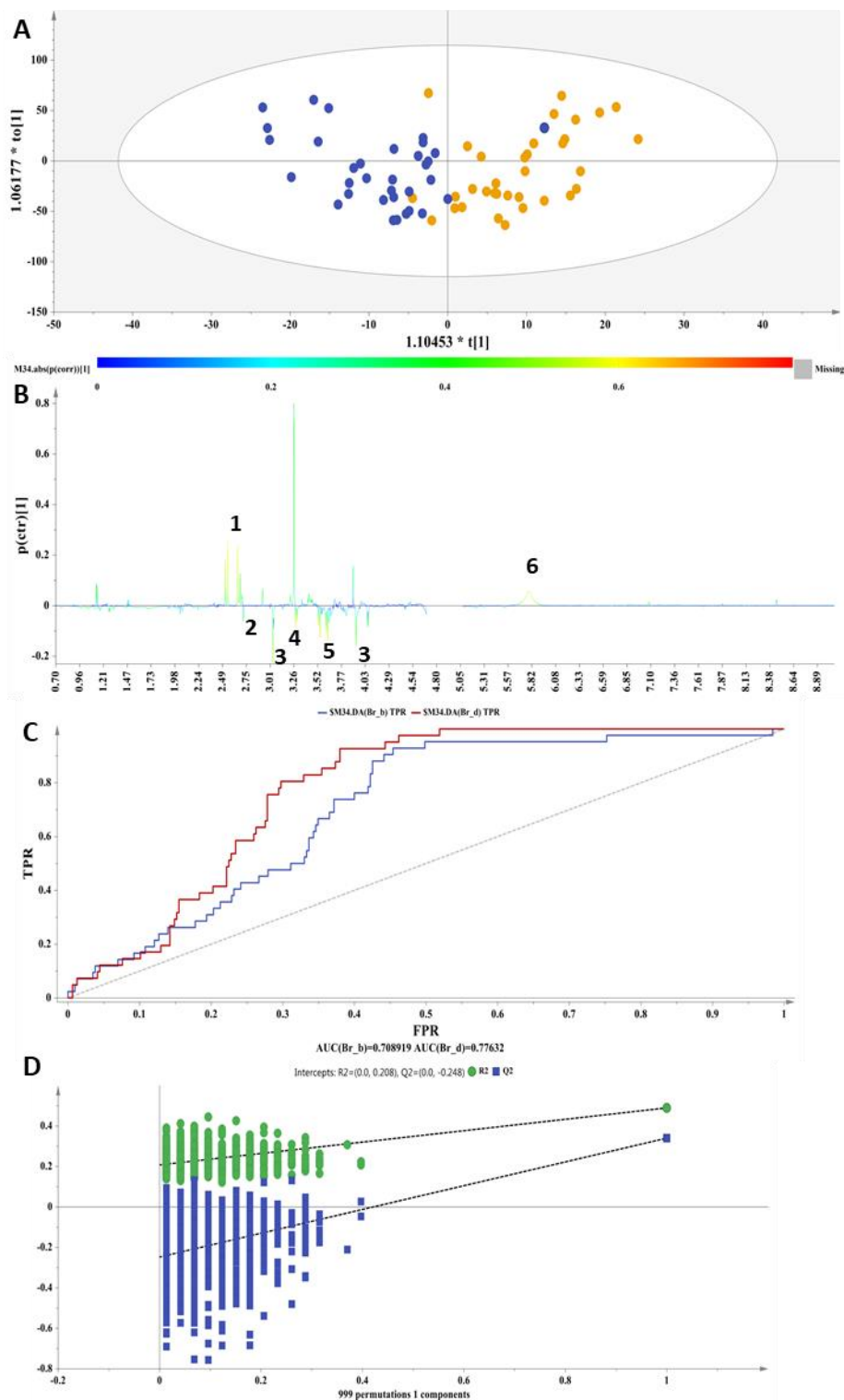
Εικόνα 15. (a) OPLS-DA στατιστικό μοντέλο για BF δείγματα (3^η ημέρα vs 2^ο μήνα), με $A=1+1+0$, $N=64$, $R^2X(\text{cum})=0,61$, $R^2Y(\text{cum})=0,48$, $Q^2(\text{cum})=0,33$, for pareto scaling and 95% confidence level, $p\text{-value}=3,32E^{-5}$. (3^η ημέρα: μπλε κύκλοι, 2^ο μήνας: πράσινοι κύκλοι); (b) S-line γράφημα αναδεικνύει τους υπεύθυνους μεταβολίτες για διάκριση (1. citric acid, 2. glutamine, 3. acetoacetate, 4. dimethylamine, 5. creatinine, 6. betaine, 7. taurine, 8. threonine, 9. hippurate).

Είναι ενδιαφέρον το εύρημα ότι τα μοντέλα OPLS-DA των δύο διαφορετικών χρονικών πλαισίων (3^η ημέρα έναντι 2^{ου} και 3^{ου} μήνα) στην ομάδα BF και τα αντίστοιχα διαγράμματα S-line (**Εικόνες 17B και 15**) ταυτοποίησαν γλουταμίνη, ακετοξικό, διμεθυλαμίνη, κρεατινίνη, βεταΐνη, ταυρίνη, θρεονίνη και το ιππουρικό ως τους βασικούς μεταβολίτες στα δείγματα της 3^{ης} ημέρας, ενώ υψηλή συγκέντρωση κιτρικού οξέος χαρακτήρισε τα δείγματα που συλλέχθηκαν τον 2^ο και τον 3^ο μήνα.



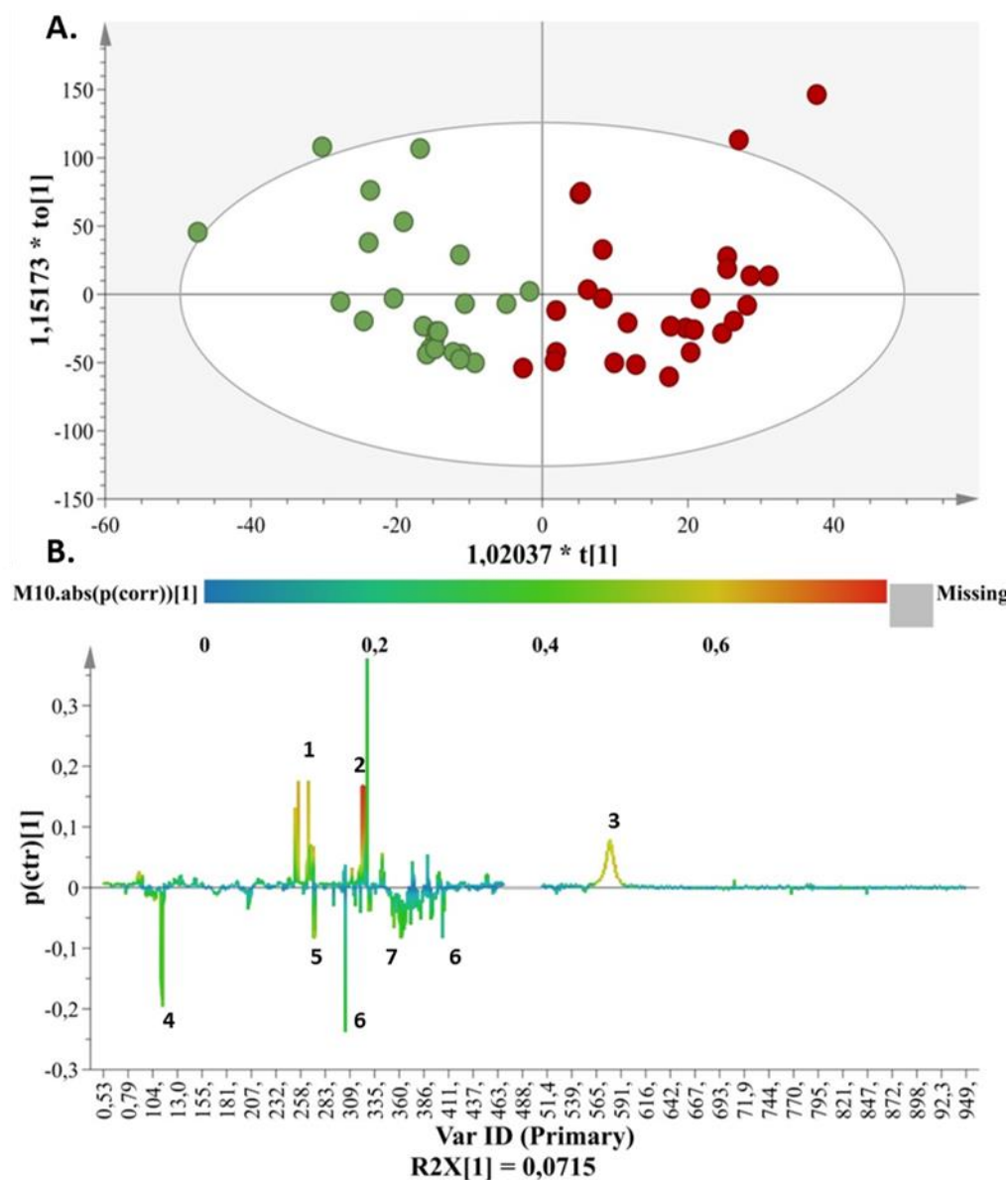
Εικόνα 17. (a) OPLS-DA στατιστικό μοντέλο για BF δείγματα score plots for breast-fed samples (3^η ημέρα: πράσινοι κύκλοι vs 3^{ος} μήνας: κίτρινοι κύκλοι), με A=1+1+0, N=54, R2X(cum)=0.57, R2Y(cum)=0.55, Q2(cum)=0.41, for pareto scaling and 95% confidence level, p -value = 0,000139123. (b) S-line γράφημα αναδεικνύει τους υπεύθυνους μεταβολίτες για διάκριση 1. citric acid, 2. glutamine, 3. acetoacetate, 4. dimethylamine, 5. creatinine, 6. betaine, 7. taurine, 8. threonine, 9. hippurate.

Ομοίως, όταν συγκρίθηκαν η 15^η ημέρα με τον 3^ο μήνα στα δείγματα της ομάδας των βρεφών που θήλασαν (**Εικόνα 16**), το παραγόμενο μοντέλο OPLS-DA παρείχε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που ελήφθησαν από τη σύγκριση μεταξύ της 3^{ης} ημέρας και του 3^{ου} μήνα (**Εικόνα 17A**).



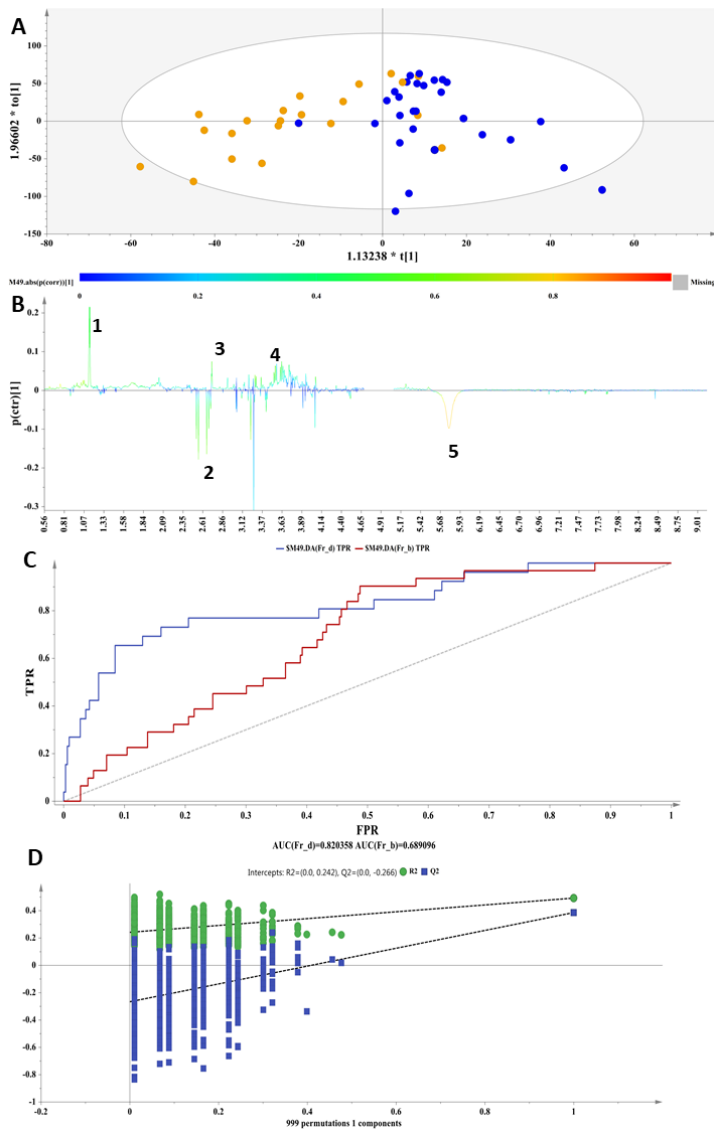
Εικόνα 16.(a) OPLS-DA στατιστικό μοντέλο BF δειγμάτων για την 15^η ημέρα και 3^ο μήνα, με A=1+1+0, N=67, R²X(cum)=0.55, R²Y(cum)=0.49, Q²(cum)=0.34 for pareto scaling and 95% confidence level, p-value=9.21236E⁻⁶. (κίτρινοι κύκλοι: 3^{ος} μήνας, μπλε κύκλοι: 15^ηημέρα); (b) S-line γράφημα αναδεικνύει τους υπεύθυνους μεταβολίτες για διάκριση. 1. citric acid, 2. dimethylamine, 3. Betaine, 4. Creatinine, 5. taurine, 6. urea. (c) ROCκαμπύλη curve AUC (15^η ημέρα)=0.709 and AUC (3οςμήνας)=0.776; (d) έλεγχος μετάθεσης για το OPLS-DA μοντέλο για την 15^η ημέρα vs 3^ο μήνα BF δειγμάτων.

Όσον αφορά στα δείγματα της ομάδας που σιτίστηκαν με βρεφική φόρμουλα, τα μοντέλα OPLS-DA συγκρίναν την 3^η ημέρα έως τον 2^ο (Εικόνα 18) και τον 3^ο μήνα (Εικόνα 11A).



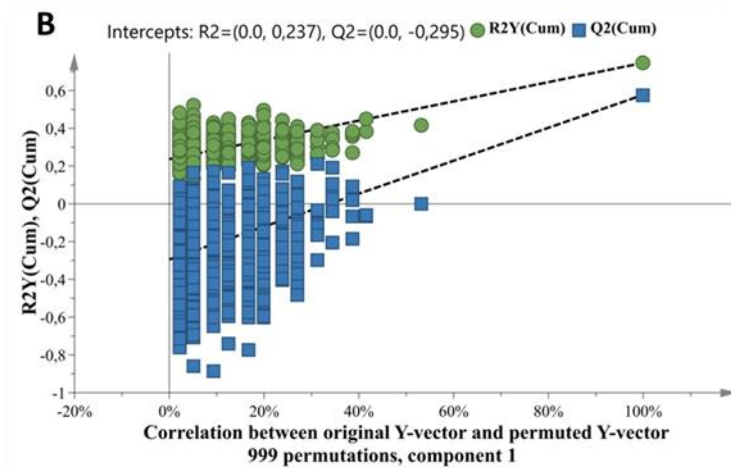
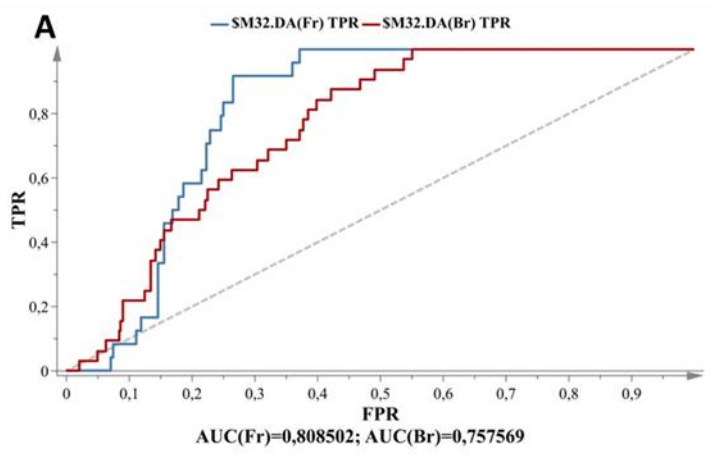
Εικόνα 18. (a) OPLS-DA στατιστικό μοντέλο για τα FF δείγματα score splot for formula - fed samples (3^η ημέρα vs 2^ο μήνα), με A=1+1+0, N=53, $R^2X(cum)=0,53$, $R^2Y(cum)=0,75$, $Q^2(cum)=0,55$ for pareto scaling and 95% confidence level, p-value= $7,33E^{-12}$, (3^η ημέρα: πράσινοι κύκλοι, 2^ο μήνας: κόκκινοι κύκλοι); (b) S-line γράφημα αναδεικνύει τους υπεύθυνους μεταβολίτες για διάκριση.(1. citric acid, 2. betaine, 3. urea, 4. methylsuccinate, 5. dimethylamine, 6. creatinine, 7. Taurine).

Αυτές οι συγκρίσεις διευκόλυναν την ερμηνεία και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μεταξύ αυτών των χρονικών πλαισίων, καθώς η διάκριση δεν ήταν εμφανής κατά τη σύγκριση των δειγμάτων μεταξύ της 3^{ης} και της 15^{ης} ημέρας (**Εικόνα 14**). Συγκεκριμένα, στο μοντέλο OPLS-DA (**Εικόνα 11A**) οι δύο ομάδες (3^η ημέρα vs 3^ο μήνα) διαχωρίζονται σαφώς. Η γραφική παράσταση της γραμμής S (**Εικόνα 11B**) συσχετίζει το κιτρικό οξύ και την ουρία στα δείγματα του 3^{ου} μήνα και ηλεκτρικό μεθυλεστέρα, διμεθυλαμίνη, κρεατινίνη και ταυρίνη στα δείγματα της 3^{ης} ημέρας. Το ίδιο μεταβολικό πρότυπο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση δειγμάτων της ομάδας που σιτίστηκαν με βρεφική φόρμουλα μεταξύ της 3^{ης} ημέρας και του 2^{ου} μήνα (**Εικόνα 18**). Παρόμοια αποτελέσματα αναδείχθηκαν με το μοντέλο OPLS-DA από τη σύγκριση της 15^{ης} ημέρας με τον 3^ο μήνα για τα δείγματα της ομάδας που σιτίστηκαν με βρεφική φόρμουλα (**Εικόνα 19**).

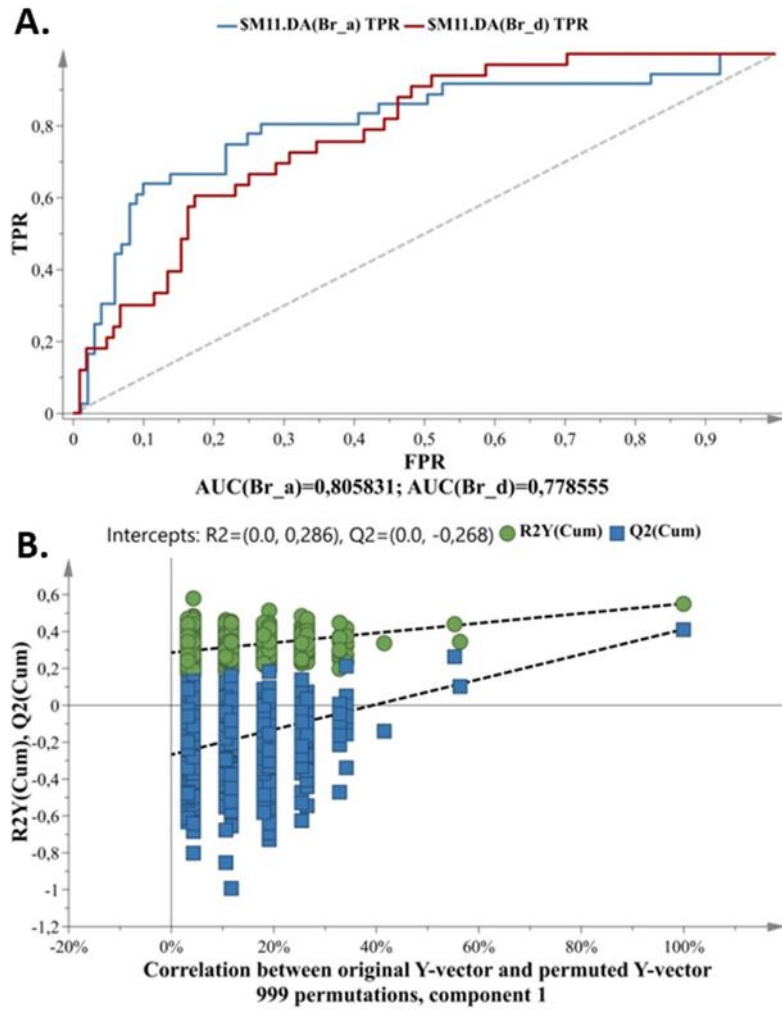


Εικόνα 19. (a) OPLS-DA στατιστικό μοντέλο των FF δειγμάτων για την 15^η ημέρα και τον 3^ο μήνα, με $A=1+1+0$, $N=50$, $R^2X(cum)=0.59$, $R^2Y(cum)=0.49$, $Q^2(cum)=0.39$ for pareto scaling and 95% confidence level, $p\text{-value}=8.3714E^{-5}$. (κίτρινοι κύκλοι: 3^{ος} μήνας, μπλε κύκλοι: 15^η ημέρα); (b) S-line γράφημα αναδεικνύει τους υπεύθυνους μεταβολίτες για διάκριση. 1. methylsuccinate, 2. citric acid, 3. dimethylamine, 4. Taurine, (c) ROC καμπύλη AUC (15^η ημέρα)=0.689 και AUC (3^{ος} μήνας)=0.820; (d) έλεγχος μετάθεσης για το OPLS-DA μοντέλο των FF δειγμάτων για την 15^η ημέρα vs 3^ο μήνα.

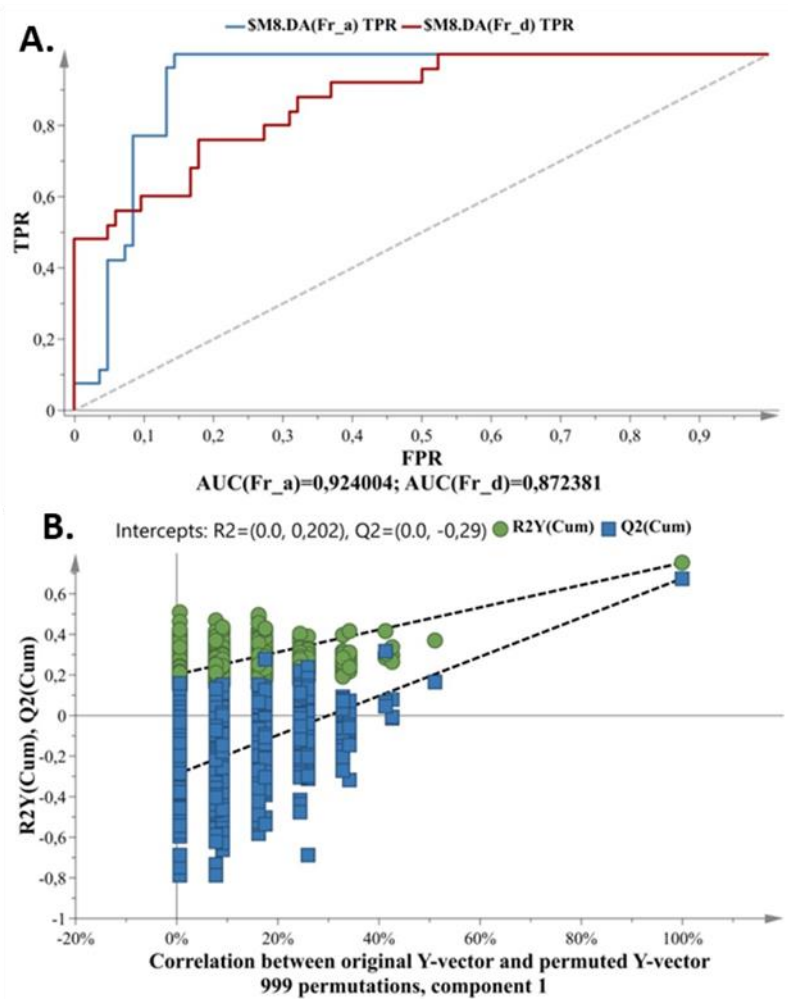
Τέλος, η χρήση μοντέλων επικύρωσης ($p < 0,05$, δοκιμή μετάθεσης και καμπύλες ROC) επιβεβαίωσε ότι τα αποτελέσματα όλων των μοντέλων OPLS-DA ήταν αμερόληπτα και αξιόπιστα, όπως περιγράφεται στις **Εικόνες 20-25**.



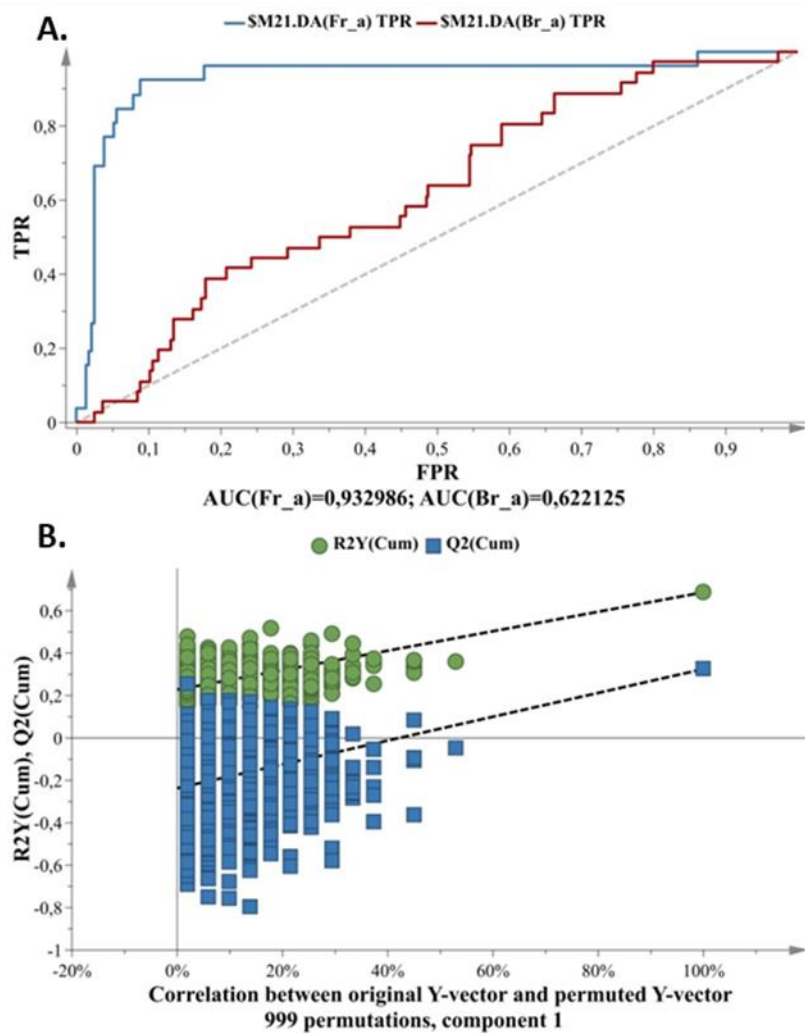
Εικόνα 20. (a) ROC καμπύλη curve AUC 2ος μήνας (FF δείγματα) = 0.808 and AUC (BF δείγματα)=0.757; (b) έλεγχος μετάθεσης για το OPLS-DA μοντέλο των FF δειγμάτων 3^η ημέρα vs 15^η ημέρα.



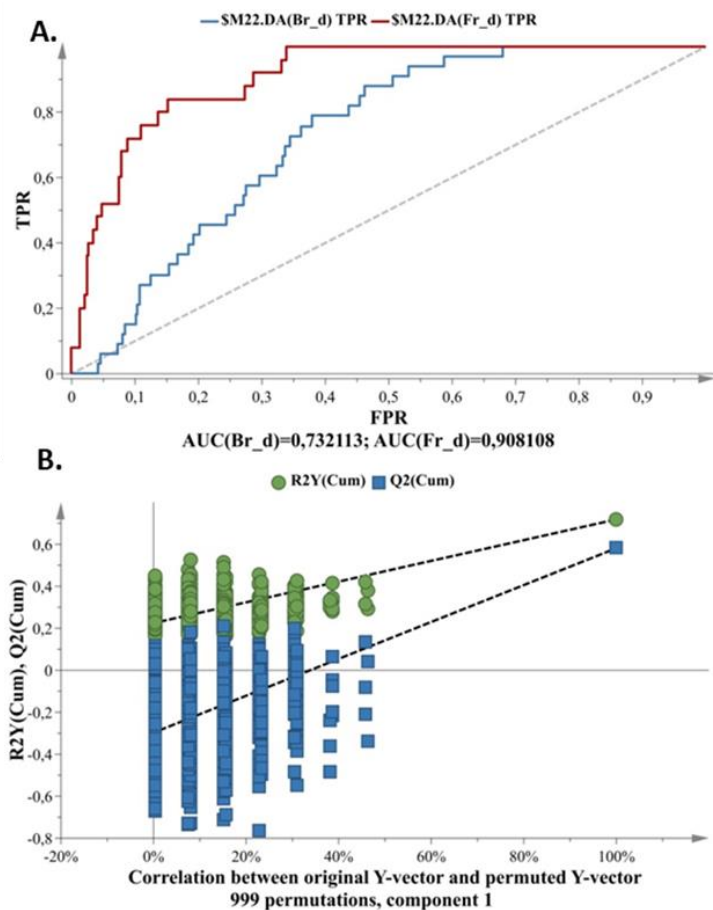
Εικόνα 21. (a) ROC καμπύλη curve AUC 2ος μήνας (BF δείγματα 3^η ημέρα) =0.805 and AUC (BF δείγματα 3^{ος} μήνας)=0.778, (b) έλεγχος μετάθεσης για το OPLS-DA μοντέλο των BF δειγμάτων 3^η ημέρα vs 3^ο μήνα.



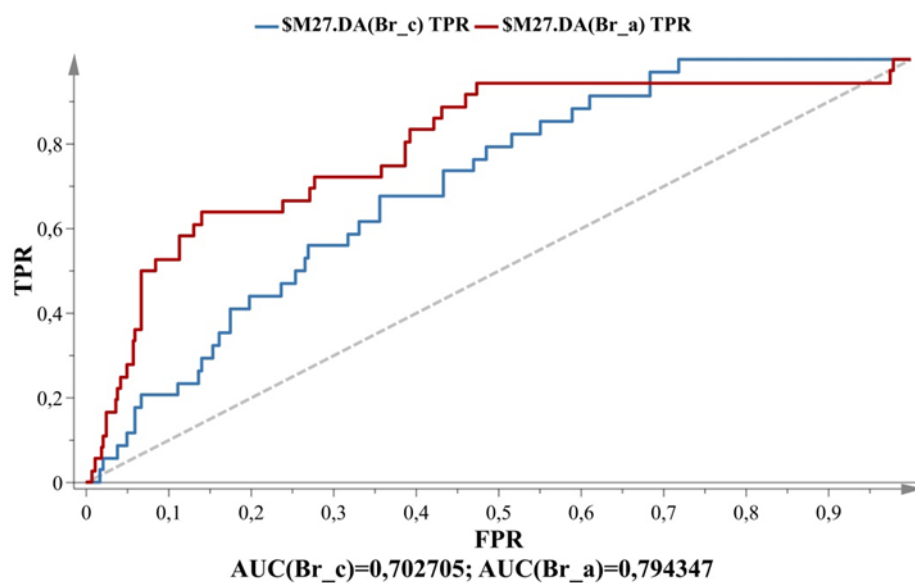
Εικόνα 22. (a) ROC καμπύλη curve AUC (FF δείγματα 3^η ημέρα)= 0.924 and AUC (FF δείγματα 3^{ος} μήνας)=0.872, (b) έλεγχος μετάθεσης για το OPLS-DA FF δειγμάτων (3^η ημέρα vs 3^ο μήνα).



Εικόνα 23. (a) ROC καμπύλη AUC (FF δείγματα 3^η ημέρα)= 0.932 and AUC (BF δείγματα 3^η ημέρα)=0.622, (b) έλεγχος μετάθεσης για το OPLS-DA μοντέλο των δειγμάτων BF vs FF την 3^η ημέρα.



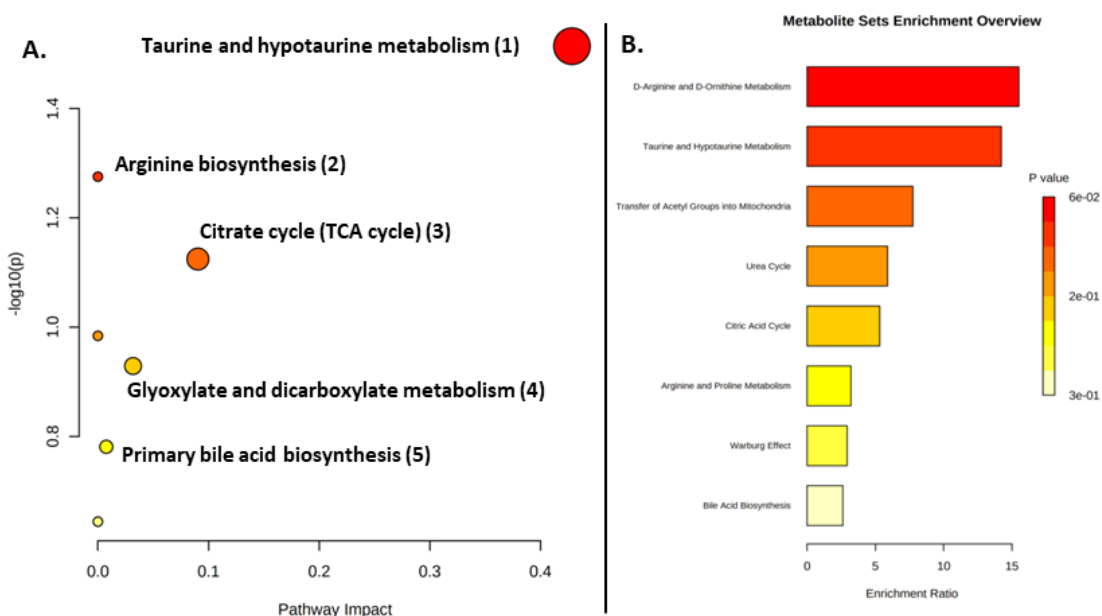
Εικόνα 24. (a) ROC καμπύλη AUC (BF δείγματα 3^{ος} μήνας)= 0.732 and AUC (FF δείγματα 3^{ος} μήνας)=0.908, (b) έλεγχος μετάθεσης για το OPLS-DA μοντέλο των δειγμάτων BF vs FF τον 3^ο μήνα.



Εικόνα 25. ROC καμπύλη AUC (BF δείγματα 2^{ος} μήνας) = 0.702 and AUC (BF δείγματα 3^η ημέρα) =0.794.

3.3 Ανάλυση μεταβολικών μονοπατιών

Η ανάλυση της μεταβολικής οδού (MetPA) πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το Metaboanalyst 5.0 για τους μεταβολίτες που εμφανίζουν AUROC > 0,7 προκειμένου να οριοθετηθούν οι μεταβολικές διαφορές για κάθε μέθοδο σίτισης. Στο πλαίσιο της ανάλυσης της μεταβολικής οδού, ελέγχθηκε εάν οι ενώσεις που εμπλέκονται σε ένα συγκεκριμένο μονοπάτι εμπλουτίστηκαν σε σύγκριση με τις ενώσεις ελέγχου. Τα αποτελέσματα στην ομάδα όπου τα νεογνά σιτίστηκαν με βρεφική φόρμουλα και βασίστηκε στη βάση δεδομένων KEGG έδειξαν αλλοιώσεις στην ταυρίνη και στον μεταβολισμό υποταυρίνης, στη βιοσύνθεση αργινίνης, στον κύκλο κιτρικού οξέος, στην αλανίνη, στο ασπαρτικό και στο μεταβολισμό γλουταμικού, στο μεταβολισμό γλυοξυλικών και δικαρβοξυλικών και στη βιοσύνθεση πρωτογενούς χολικού οξέος (**Εικόνα 26**).



Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση σημαντικότητας μεταβολικών μονοπατιών από το MetaboAnalyst στην ομάδα των FF δειγμάτων. Summary of pathway analysis to the FF group. (A) Όλα τα μεταβολικά μονοπάτια απεικονίζονται ως κύκλοι, το χρώμα και το μέγεθος κάθε κύκλου αντιστοιχούν στο p -value και στην επίπτωση του κάθε μεταβολικού μονοπατιού αντίστοιχα; (B) Διάγραμμα με μπάρες των αποτελεσμάτων εμπλουτισμένης ανάλυσης.

Τα αποτελέσματά μας εντόπισαν τον μεταβολισμό της ταυρίνης και της υποταυρίνης, μεταξύ άλλων οδών, καθώς σχετίζεται με την ομάδα BF. Στην περίπτωση μας, αυτό το μονοπάτι επικράτησε στην ομάδα FF σε σχέση με την ομάδα BF, κυρίως σε σχέση με τις μεταβολικές οδούς λίπους και πρωτεΐνης. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την παρουσία περισσότερων πολυακόρεστων λιπαρών οξέων στη βρεφική φόρμουλα που μοιάζει με το μητρικό γάλα, συμβάλλοντας στην πέψη και στις διαδικασίες απορρόφησης [122]. Η ομάδα FF χαρακτηρίζεται επίσης από τον κύκλο του κιτρικού οξέος (TCA), μια κοινή μεταβολική οδός για σάκχαρα, λιπίδια και αμινοξέα στα μιτοχόνδρια. Από την άλλη, η ανάλυση της μεταβολικής οδού χρησιμοποιώντας σημαντικά διαφοροποιημένους μεταβολίτες στην ομάδα που θηλάζει αν έδειξε αλλαγές στον μεταβολισμό της αλανίνης, του ασπαρτικού και του γλουταμικού, στο μεταβολισμό γλυοξυλικού και δικαρβοξυλικού, στο μεταβολισμό γλυκίνης, σερίνης και θρεονίνης, στη σύνθεση και αποδόμηση των κετονικών ενώσεων, στη βιοσύνθεση αμινοακυλο-tRNA στο μεταβολισμό D-γλουταμίνης και D-γλουταμινικού, στο μεταβολισμό αζώτου, στη βιοσύνθεση βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης και στο μεταβολισμό ταυρίνης και υποταυρίνης, όπως παρουσιάζεται στην **Εικόνα 26**. Οι αλλαγές στις μεταβολικές οδούς που προκύπτουν από τις υπό διερεύνηση μεθόδους σίτισης χαρακτηρίζουν τη δυναμική σχέση μεταξύ του εντερικού μικροβιώματος και του μεταβολώματος στη νεογνική και βρεφική ηλικία. Αν και οι αναλύσεις μας ανέδειξαν σημαντικούς μεταβολίτες, που αντικατοπτρίζουν την επίδραση της μικροχλωρίδας του εντέρου στο μεταβόλωμα, οι περισσότεροι μεταβολίτες δεν κατέστη δυνατόν να προβλεφθούν, όταν αξιολογήθηκαν σε όλη την ανάλυση της μεταβολικής οδού και του εμπλουτισμού.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η τρέχουσα γνώση επιβεβαιώνει αλλαγές στα μεταβολικά αποτυπώματα και στις βιοχημικές οδούς των νεογνών που εξαρτώνται από το χρόνο [123]. Αρκετές διατροφικές μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι το μεταβολικό αποτύπωμα των βρεφών που ακολουθούν διαφορετικές πρακτικές σίτισης συνδέεται στενά με τη διατροφή τους [120,121]. Τέτοια ευρήματα επαληθεύουν την υπόθεση ότι στην πρώιμη ζωή,

επειδή τα βρέφη καταναλώνουν αποκλειστικά μητρικό γάλα ή φόρμουλα, το μικροβίωμα συμμετέχει πιο ενεργά στη μεταβολική δραστηριότητα από ό,τι στη μετέπειτα ζωή, καθώς τα βρέφη βασίζονται περισσότερο στα μικρόβια για τη διάσπαση σύνθετων θρεπτικών ουσιών [124]. Καθώς το γάλα είναι η πρώτη τροφή που εισάγεται στην γαστρεντερική οδό μετά τη γέννηση, είναι σημαντικό να συζητηθούν οι διακριτοί μεταβολίτες που σχετίζονται με τις δύο πρακτικές σίτισης που διερευνήθηκαν σε νεογνά σε διαφορετικά χρονικά σημεία.

Οι μεταβολικές αλλαγές στα ούρα από το σύνολο των δειγμάτων δεν έδειξαν καμία τάση ομαδοποίησης, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 9**. Σχετικά με την εξέλιξη των μεταβολιτών σε σχέση με το χρονικό πλαίσιο της μελέτης, η σύγκριση μεταξύ της 3^{ης} και της 15^{ης} ημέρας δεν παρείχε επικυρωμένα μοντέλα για οποιονδήποτε τύπο σίτισης, γεγονός που υποδηλώνει ότι η περίοδος δύο εβδομάδων είναι μάλλον ένα μικρό χρονικό διάστημα για να αντικατοπτρίζει την επίδραση της σίτισης στο μεταβολικό προφίλ των ούρων. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η ποικιλομορφία στη μικροχλωρίδα μεταβάλλεται σταθερά με την έναρξη του θηλασμού, έτσι ώστε οι διαφοροποιήσεις στο μεταβολισμό μπορούν πιθανώς να απεικονιστούν ως ένα διακριτό μεταβολικό πρότυπο μετά τον πρώτο μήνα σίτισης [125].

Ομαδοποίηση μεταξύ των δειγμάτων που τρέφονταν με μητρικό γάλα και βρεφική φόρμουλα παρατηρήθηκε μετά το τρίτο χρονικό σημείο, δηλαδή τον δεύτερο μήνα της μελέτης. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 13B, 13D**, και για τα δύο χρονικά σημεία (2^{ος} και 3^{ος} μήνας), οι βασικοί μεταβολίτες που σχετίζονται με την ομάδα FF ήταν ο ηλεκτρικός μεθυλεστέρας, το κιτρικό οξύ, η κρεατινίνη, η ουρία και τα χολικά οξέα, ενώ η διμεθυλαμίνη αναδείχθηκε ως ο διακριτός μεταβολίτης στην ομάδα BF.

Ειδικότερα, πρωτογενή και συζευγμένα χολικά οξέα, βασικοί ρυθμιστές στο σχηματισμό της μικροοικολογίας του εντέρου συμμετέχοντας στον βακτηριακό μεταβολισμό, ανιχνεύθηκαν σε υψηλές ποσότητες σε υγιή νεογνά [126]. Η έκκριση χολικών οξέων (κυρίως θειικών) προκαλείται από την παρουσία των λιπιδίων του ανθρώπινου γάλακτος και συνδέεται έμμεσα με αυξημένη παρουσία *Veillonella*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* και *Streptococcustaxa* σε BF νεογνά

[127,128]. Σε μελέτες *in vivo* αρουραίων που απογαλακίζονται, υψηλότερες συγκεντρώσεις δευτερογενών χολικών οξέων (δηλαδή, δεοξυχολικό οξύ) προσδιορίστηκαν στην ομάδα που σιτίστηκε με βρεφική φόρμουλα. Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα, τα δευτερογενή χολικά οξέα μπορεί να είναι αντιπροσωπευτικά μεταβολικά προϊόντα προβιοτικών, όπως *Bifidobacteria* ή βακτηριακών κοινοτήτων, όπως *Clostridia* και *Firmicutes*, σε βρέφη FF από τον 1^ο έως τον 3^ο μήνα της ζωής [128]. Σύμφωνα με τα ευρήματά μας (**Εικόνες 17 και 11**), η ταυρίνη, ένα αμινοξύ που περιέχει θείο που συμμετέχει στη σύνθεση των χολικών οξέων και λαμβάνεται μέσω του ανθρώπινου γάλακτος ή της βρεφικής φόρμουλα, παρουσίασε πτωτική τάση απέκκρισης στα ούρα τρεις μήνες μετά τη γέννηση [129]. Διακυμάνσεις στα επίπεδα του κιτρικού οξέος που παράγεται κατά τη διάρκεια του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (TCA) επηρεάζονται από παράγοντες που σχετίζονται με την ηλικία κύησης, τη γαλουχία, το ύψος, το βάρος, το ρυθμό ανάπτυξης και τις ενεργειακές απαιτήσεις του νεογέννητου [130].

Στην παρούσα μελέτη, το κιτρικό οξύ βρέθηκε να μοιράζεται μια κοινή μεταβολική μοίρα σε σχέση με το χρόνο, καθώς τα επίπεδά του αυξάνονταν με την ηλικία και στις δύο ομάδες (3^{ος} μήνας σε σύγκριση με την 3^η ημέρα), όπως αντικατοπτρίζεται στις **Εικόνες 10 και 11**. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας και μια προηγούμενη κλινική παρέμβαση με νεογνά που έλαβαν μητρικό γάλα βοοειδών ή γαϊδάρου ανέδειξε το κιτρικό οξύ ως έναν βιοδείκτη ωρίμανσης για αυτήν την ομάδα [124,130]. Ωστόσο, το κιτρικό οξύ είναι επίσης, μια βασική ένωση του προφίλ μεταβολικής απέκκρισης κατά τις πρώτες ημέρες (1^η έως 7^η ημέρα) της ζωής στα BF βρέφη [131,124,132]. Σημειωτέον, το μεταβολικό αποτύπωμα ούρων των νεογνών με FF στη μελέτη μας έδειξε το κιτρικό οξύ ως τον διακριτό μεταβολίτη αυτού του τύπου διατροφής μετά το δεύτερο μήνα της μελέτης.

Η ουρία θεωρείται η πιο σημαντική πηγή αζώτου και η παρουσία της στο μεταβόλωμα των ούρων των νεογνών είναι αναμενόμενη. Η ισχυρή συσχέτιση της ουρίας με την BF ομάδα συνδέθηκε στενά με την τροποποίηση του εντερικού μικροβιώματος τους και την αύξηση των κοινών βακτηριακών πληθυσμών, όπως τα *Bifidobacteria* [133]. Παρόλα αυτά, στην περίπτωση της ομάδας FF, η συνεχής πρόσληψη βρεφικού γάλακτος εμπλουτισμένου σε πρωτεΐνες για ένα ορισμένο

χρονικό διάστημα (3 μήνες στη μελέτη μας) συνήθως οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μεταβολιτών του αζώτου, όπως η ουρία και η κρεατίνη, που σχετίζονται με την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (**Εικόνα 26**) [134,135,136]. Αντίθετα, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς του σε λιπίδια, ο θηλασμός φαίνεται να ευνοεί τον καταβολισμό λιπαρών οξέων παρά τον καταβολισμό πρωτεϊνών [136] και ως εκ τούτου, μειωμένες συγκεντρώσεις ουρίας μήνες μετά τη γέννηση μπορούν να αποδοθούν σε μειωμένη μεν αλλά περισσότερο αποτελεσματική χρήση πρωτεϊνών στη διατροφή των βρεφών [137].

Σχετικά με τον ορισμό του ηλεκτρικού μεθυλεστέρα ως πρότυπο δείκτη για την ομάδα νεογνών που σιτίστηκε με βρεφική φόρμουλα με συνβιοτικά (**Εικόνα 13**), τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι σύμφωνα με τα ευρήματα και άλλων ερευνητικών ομάδων [138]. Η αύξηση αυτού του μεταβολίτη στα νεογνά με FF οφείλεται στις καταβολικές οδούς των αμινοξέων, όπως η ισολευκίνη, η οποία βρίσκεται σε υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες βρεφικών γαλάτων. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες με καλλιέργειες κοπράνων υγιών νεογνών ηλικίας 2 μηνών ανέδειξε την αλληλεξάρτηση των ενώσεων του ηλεκτρικού οξέος με την εγκαθίδρυση κοινοτήτων εντεροβακτηριδίων στο έντερο του FF βρέφους [139]. Επίσης, οι μελέτες αυτές έδειξαν πως πέρα από το είδος σίτισης, οι συγκεντρώσεις του ηλεκτρικού μεθυλεστέρα εξαρτώνται σημαντικά από την ηλικία του βρέφους [138].

Τα ευρήματά της μελέτης μας αναδεικνύουν την κρεατινίνη ως την διακριτή ένωση, καθώς βρέθηκε σε υψηλότερα επίπεδα στην ομάδα FF σε σχέση με την ομάδα BF, μετά από 2 μήνες ζωής (**Εικόνα 13**), γεγονός που μπορεί να σχετίζεται στενά με τον γρήγορο ρυθμό αποικοδόμησης των πρωτεϊνών σε τροφές πλούσιες σε πρωτεΐνες [136,140]. Τα μειωμένα επίπεδα κρεατινίνης στα BF και FF νεογνά, στον 3^ο μήνα σε σύγκριση με την 3^η μέρα της μελέτης (**Εικόνες 17 και 11**) είναι σύμφωνα με άλλα δημοσιευμένα επιστημονικά δεδομένα [138,141]. Όπως φαίνεται από το μεταβολικό αποτύπωμα του πλάσματος των βρεφών BF και FF, η κρεατινίνη παρουσίασε φθίνουσα τάση κατά τη διάρκεια της ζωής του βρέφους [141]. Μια *in vivo* μελέτη σε πιθήκους αναφέρει επίσης, ότι τα επίπεδα κρεατινίνης ήταν αυξημένα τις πρώτες ημέρες της ζωής των [142].

Ιδιαίτερη προσοχή, πρέπει να δοθεί στη διμεθυλαμίνη, η οποία παίζει ουσιαστικό ρόλο στην ομαδοποίηση των δειγμάτων ούρων FF έναντι BF (**Εικόνα 13**). Επίσης, πρόσφατα ευρήματα έδειξαν τη διμεθυλαμίνη ως διακριτό μικροβιακό μεταβολίτη νεογνών στα BF σε σύγκριση με FF βρέφη [140]. Συγκεκριμένα, η διμεθυλαμίνη είναι μια δευτεροταγής αμίνη που βρίσκεται σε περίσσεια στα δείγματα ούρων, ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης του ADMA, ενός ενδογενούς αναστολέα της βιοσύνθεσης του νιτρικού οξέος, ή λόγω οξειδωσης του TMAO, μιας ένωσης που βρίσκεται σε τρόφιμα και παράγεται επίσης, στην ανθρώπινη μικροχλωρίδα του εντέρου ως μεταβολίτης χολίνης [143]. Τέλος, η διμεθυλαμίνη θεωρείται ένα σημαντικό βακτηριακό υποπροϊόν των μεταβολικών οδών των αμινοξέων [134].

Σε σχέση με τη μικροχλωρίδα του εντέρου, η διμεθυλαμίνη βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με *Proteobacteria*, ενώ συσχετίστηκε αρνητικά με *Actinobacteria* (δηλαδή *Bifidobacterium*) [144]. Ωστόσο, η συνεχής αναμόρφωση των μικροβιακών πληθυσμών του εντέρου των βρεφών στους πρώτους μήνες της ζωής των έχει συνήθως ως αποτέλεσμα, σημαντικές διακυμάνσεις στα επίπεδα διμεθυλαμίνης και στις δύο διερευνημένες προσεγγίσεις σίτισης, στα διάφορα χρονικά σημεία δειγματοληψίας [145]. Το πιο σημαντικό είναι ότι, η διμεθυλαμίνη είναι ένας πρώιμος μεταβολίτης της μικροχλωρίδας, ως αποτέλεσμα των αμοιβαίων αλληλεπιδράσεων εντός του μικροβιώματος - ξενιστή; έτσι, τα επίπεδά του θα μπορούσαν να αυξηθούν τις πρώτες ημέρες θηλασμού ή σίτισης με βρεφική φόρμουλα [144]. Αυτό το φαινόμενο, ήταν εμφανές τόσο στο BF όσο και στο FF μοντέλο σίτισης στη μελέτη μας, μεταξύ της 3^{ης} ημέρας και του 3^{ου} μήνα (**Εικόνες 17 και 11**).

Ο μικρότερος αριθμός διακριτών μεταβολιτών στην ομάδα BF τον 3^ο μήνα σε σύγκριση με την 3^η ημέρα (**Εικόνα 17 και Εικόνα 15**) μπορεί να αποδοθεί στον σταδιακό αποικισμό/δημιουργία μικροβιακών κοινοτήτων και στην ωρίμανση του συνολικού μεταβολισμού του βρέφους που λαμβάνει χώρα μεταξύ της 3^{ης} ημέρας και του 3^{ου} μήνα [146], ο οποίος, στην μελέτη μας, αντικατοπτρίστηκε από την παρουσία ενός διακριτού μεταβολίτη (κιτρικό οξύ) στα ούρα τον 2^ο και τον 3^ο μήνα σε σύγκριση με αυτόν της 3^{ης} ημέρας.

Από την άλλη, η ατελής ωρίμανση των νεφρών και υψηλή πρόσληψη χολίνης φαίνεται να είναι υπεύθυνη για την αυξημένη παραγωγή βεταΐνης, προϊόντος οξείδωσης της χολίνης. Σε δείγματα ούρων νεογνών που αναφέρθηκαν σε προηγούμενη μελέτη, η βεταΐνη αυξήθηκε προοδευτικά από την 3^η ημέρα έως τον 3^ο μήνα πριν εμφανιστεί απότομη μείωση στα βρέφη στην ηλικία των 6 μηνών [123,141]. Αυξημένη ποσότητα βεταΐνης την 3^η ημέρα της ζωής στην ομάδα BF (**Εικόνα 17**) μπορεί επίσης να σχετίζεται με τα αυξημένα επίπεδα TMAO από την 3^η ημέρα έως τον 3^ο μήνα, επειδή το TMAO είναι ένας μεταβολίτης που δημιουργείται στο έντερο, και η συγκέντρωσή του συνδέεται στενά με τη συνεχιζόμενη ωρίμανση της εντερικής μικροχλωρίδας (πχ. αύξηση της αφθονίας *Akkermansia*) [147-149]. Μια προηγούμενη μελέτη που διερεύνησε υγιή τελειόμηνα βρέφη σε σχέση με τον τρόπο σίτισης τους, η φασματομετρία μάζας με τριχοειδική ηλεκτροφόρηση χρόνου (CE-TOF/MS) ανέδειξε ότι η βεταΐνη μαζί με άλλους μεταβολίτες χολίνης (N,N-διμεθυλογλυκίνη και σαρκosίνη), διαφοροποίησε την ομάδα BF από την ομάδα FF μόνο σε ηλικία 1 μηνός, οπότε και το επίπεδο απέκκρισης των μεταβολιτών της χολίνης ήταν υψηλότερο στα BF βρέφη από ότι στα FF βρέφη [150]. Αν και η βεταΐνη αναγνωρίστηκε ως διακριτός μεταβολίτης σε BF βρέφη στη μελέτη μας, καθώς αυξήθηκε την 3^η ημέρα σε σύγκριση με τον 3^ο μήνα (**Εικόνα 17**), δεν βρέθηκε να γίνεται διάκριση μεταξύ φόρμουλας και βρεφών που θηλάζουν. Τέλος, η θρεονίνη παρατηρήθηκε σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στην αρχή της μελέτης σε σύγκριση με τον 3ο μήνα στην ομάδα BF (**Εικόνα 17**). Ελαττωμένα επίπεδα θρεονίνης κατά τη μεταγεννητική περίοδο αναφέρθηκαν επίσης από τον Lönnerdal *et al.* (2016) στο πλάσμα σε βρέφη 4 και 6 μηνών [151]. Η απέκκριση της θρεονίνης στα ούρα ήταν επίσης μειωμένη μετά τον πρώτο μήνα της ζωής σε BF νεογνά [131].

5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πραγματοποιήσαμε μια μεταβολομική ανάλυση χρησιμοποιώντας δείγματα ούρων από σχετικά μεγάλη μελέτη κοόρτης γεννήσεων σε τέσσερα χρονικά σημεία και εξέταση δύο μεθόδων σίτισης (μητρικός θηλασμός και μια βρεφική φόρμουλα πλούσια σε συνβιοτικά, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και νουκλεοτίδια). Σύμφωνα με τις καθιερωμένες γνώσεις, προσπαθήσαμε να διευκρινίσουμε τις αλλοιώσεις στο

μεταβολικό αποτύπωμα ούρων που συσχετίζεται με πιθανές αλλαγές στη μικροχλωρίδα του εντέρου.

Σε αυτό το πλαίσιο, ήταν προφανές ότι τα μεταβολικά προφίλ των ούρων της BF ομάδας και αυτής των βρεφών με FF εμπλουτισμένης με συνβιοτικά ήταν παρόμοια κατά τα δύο πρώτα χρονικά σημεία της μελέτης. Αξιολόγηση της εξέλιξης των μεταβολιτών σε σχέση με το χρόνο έδειξε ότι μια περίοδος 2 εβδομάδων είναι πολύ μικρή για να αντικατοπτρίσει την επίδραση διαφορετικών τύπων σίτισης στο μεταβολισμό των ούρων. Επίπτωση στο μεταβολικό αποτύπωμα ήταν εμφανής μετά τον δεύτερο μήνα, με κιτρικό οξύ, ηλεκτρικό μεθυλεστέρα, ουρία και χολικά οξέα, καθώς και διμεθυλαμίνη, ως διακριτοί μεταβολίτες. Το κιτρικό οξύ μοιραζόταν μια κοινή μεταβολική μοίρα με την πάροδο του χρόνου, καθώς τα επίπεδά του αυξάνονταν με την ηλικία και στις δύο ομάδες στον 3^ο μήνα σε σύγκριση με την 3^η ημέρα. Όσον αφορά την ομάδα FF, η συνεχής πρόσληψη μιας βρεφικής φόρμουλα εμπλουτισμένης σε πρωτεΐνες για περισσότερο από 2 μήνες μπορεί να οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα μεταβολιτών του αζώτου, όπως η ουρία και η κρεατίνη. Η αύξηση σε ηλεκτρικό μεθυλεστέρα στα νεογέννητα με FF φαίνεται ότι αποδίδεται στις καταβολικές οδούς των αμινοξέων, όπως της ισολευκίνης, που υπάρχουν σε βρεφικές τροφές πλούσιες σε πρωτεΐνες.

Αν και η σχέση μεταξύ της μικροχλωρίδας του εντέρου και της επίδρασης στο μεταβολισμό δεν είναι πλήρως κατανοητή όλο και περισσότερα στοιχεία υποδηλώνουν ότι το εντερικό μικροβίωμα του βρέφους παίζει βασικό ρόλο στον μεταβολισμό και την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού, με επιπτώσεις στη δια βίου υγεία.

Σε πολλές περιπτώσεις, αλλοιώσεις των μεταβολιτών μπορεί να αποδοθούν στη διαμόρφωση της μικροοικολογίας του εντέρου με την πάροδο του χρόνου και με τη συμμετοχή μεταβολιτών στον βακτηριακό μεταβολισμό. Για παράδειγμα, τα συζευγμένα χολικά οξέα αποτελούν βασικό ρυθμιστή της μικροοικολογίας του εντέρου συμμετέχοντας στον βακτηριακό μεταβολισμό και συσχετίστηκαν με την ομάδα FF. Επιπλέον, η διμεθυλαμίνη είναι ένας πρώιμος μεταβολίτης της μικροχλωρίδας των αμοιβαίων αλληλεπιδράσεων του μικροβιώματος - ξενιστή; Έτσι υπάρχει σε υψηλότερα επίπεδα κατά τις πρώτες ημέρες τόσο σε βρέφη με BF όσο και σε βρέφη με FF. Ωστόσο, η διμεθυλαμίνη παραμένει ένας χαρακτηριστικός

μεταβολίτης για τη διάκριση μεταξύ BF και FF βρεφών, ακόμη και σε μεταγενέστερα στάδια (2^{ος} μήνας). Συνολικά, σε αυτή τη μελέτη φαίνεται ότι και οι δύο τύποι σίτισης που ερευνήθηκαν μπορούν να ασκήσουν ευεργετικά αποτελέσματα άμεσα ή έμμεσα μέσω αλλαγών στη μικροχλωρίδα του εντέρου. Ωστόσο, αυτή η μελέτη εμφανίζει περιορισμούς από τη χρήση δειγμάτων ούρων ως αποκλειστικού υποστρώματος και απαιτείται περαιτέρω επικύρωση. Ο ρόλος της μεταβολομικής τονίζεται επίσης, για να παρέχει συγκριτικά δεδομένα σχετικά με την επίδραση διαφορετικών τύπων σίτισης στον μεταβολισμό των βρεφών. Επιπροσθέτως, παρά τα μικρά διαστήματα δειγματοληψίας, το μεταβολικό πλαίσιο σε κάθε σημείο δείγματος παρέχει μόνο ένα στιγμιότυπο του διαρκώς μεταβαλλόμενου οικοσυστήματος μικροβίων. Γενικά, η κατανόηση της αλληλεπίδρασης ανάμεσα στους τύπους σίτισης, της μικροχλωρίδας του εντέρου και του επακόλουθου μεταβολισμού θα διευκολύνει την ανάπτυξη νέων και εξατομικευμένων διατροφικών παρεμβάσεων κατά την πρώιμη ζωή, οι οποίες μπορεί να αποδειχθούν χρήσιμες για την πρόληψη μεταβολικών διαταραχών τα επόμενα χρόνια.

6 ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να συγκρίνουμε το μεταβολικό αποτύπωμα ούρων, υγιών τελειόμηνων νεογνών σιτιζόμενων αποκλειστικά με μητρικό γάλα, με αυτό νεογνών σιτιζόμενων με βρεφική φόρμουλα εμπλουτισμένη με συνβιοτικά (Rontamil® Complete 1) σε τέσσερα χρονικά σημεία (3^η ΗΖ, 15^η ΗΖ, 2^ο και 3^ο μήνα ζωής). Ο προσδιορισμός του μεταβολικού αποτυπώματος ούρων διενεργήθηκε χρησιμοποιώντας NMR μεταβολομική. Η πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού SIMCA-P 15.0 και της γλώσσας R. Δεν παρατηρήθηκε καμία τάση διάκρισης και στις δύο ομάδες (μητρικού γάλακτος και φόρμουλα με συνβιοτικά) για τα δύο πρώτα χρονικά σημεία (3^η ΗΖ και 15^η ΗΖ). Αντιθέτως, μετά τον 2^ο μήνα ζωής παρατηρήθηκε μία τάση διάκρισης μεταξύ των δύο ομάδων, η οποία, επιβεβαιώθηκε εκτενέστερα τον 3^ο μήνα ζωής. Εμφανής τάση διάκρισης παρατηρήθηκε στα δείγματα ούρων της ομάδας φόρμουλα με συνβιοτικά, συγκρίνοντας τους μεταβολίτες που απομονώθηκαν την 3^η ΗΖ με εκείνους που ανιχνεύθηκαν τον 2^ο και 3^ο μήνα ζωής. Και στις δύο περιπτώσεις, τα στατιστικά μοντέλα OPLS-DA ανέδειξαν περισσότερο από το 75% της μεταβολικής

μεταβλητότητας. Δεν παρατηρήθηκαν διακριτά μεταβολομικά προφίλ μεταξύ των δύο υπό μελέτη ομάδων νεογνών μέχρι την 15^η ΗΖ. Τέλος, τάση διάκρισης παρατηρήθηκε μετά τον 2^ο μήνα της μελέτης, η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί στις παραλλαγές της σίτισης με μητρικό γάλα και του συνεπακόλουθου δυναμικού προφίλ των ανιχνευόμενων μεταβολιτών στα ούρα συγκρινόμενο με αυτό της σίτισης με τη σταθερή σύσταση της βρεφικής φόρμουλα εμπλουτισμένης με συνβιοτικά.

Λέξεις κλειδιά: νεογνά, σίτιση με βρεφική φόρμουλα, μητρικός θηλασμός, μεταβολομική ούρων, συνβιοτικά, NMR φασματοσκοπία, εντερικό μικροβίωμα

7 ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΗΝ ΑΓΓΛΙΚΗ ΓΛΩΣΣΑ

The aim of this study was to compare the urine metabolic fingerprint of healthy neonates exclusively breastfed with that of neonates fed with a synbiotic-enriched formula (Rontamil® Complete1) at four time points (the 3rd and 15th days of life and the 2nd and 3rd months). The determination of urine metabolic fingerprint was performed using NMR metabolomics. Multivariate data analyses were performed with SIMCA-P 15.0 software and R language. Non-distinct profiles for both groups (breastfeeding and synbiotic formula) for the two first time points (3rd and 15th days of life) were detected, whereas after the 2nd month of life, a discrimination trend was observed between the two groups, which was further confirmed at the 3rd month of life. A clear discrimination of the synbiotic formula samples was evident when comparing the metabolites taken in the first days of life (3rd day) with those taken in the 2nd and 3rd months of life. In both cases, OPLS-DA models explained more than 75% of the metabolic variance. Non-distinct metabolomic profiles were obtained between breastfed and synbiotic-formula-fed neonates up to the 15th day of life. Discrimination trends were observed only after the 2nd month of the study, which could be attributed to breastfeeding variations and the consequent dynamic profile of urine metabolites compared to the stable ingredients of the synbiotic formula.

Key words: neonates, formula feeding, breast feeding, urine metabolomics, synbiotics, NMR spectroscopy, gut microbiota

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Repositioning nutrition as central to development: a strategy for large scale action Washington DC, The World Bank, 2006.
2. Behrman, R., Kliegman, R., Nelson, W. Nelson essentials of pediatrics. 4th ed. St. Louis: W.B. Saunders; 2002. p.61-62.
3. Ballard, O. and Morrow, A. (2013). Human Milk Composition. Pediatric Clinics of North America, 60(1), pp.49-74.
4. Keikha, M., Bahreynian, M., Saleki, M., Kelishadi, R. Macro - and Micronutrients of Human Milk Composition: Are They Related to Maternal Diet? A Comprehensive Systematic Review. Breastfeeding Medicine. 2017; 12(9):517-527.
5. 14-WHO | Breastfeeding [Internet]. Who.int. 2018 [cited 13 June 2018]. Available from: [http:// www.who.int/ maternal_ child_ adolescent/ topics/ newborn/ nutrition/ breast feeding/ en/](http://www.who.int/maternal_child_adolescent/topics/newborn/nutrition/breastfeeding/en/).
6. Eidelman, Al., Schanler, R.J., Johnston, M., *et al*. Breastfeeding and the use of human milk. Pediatrics. 2012; 129(3): e827–e41.
7. Eriksen, K., Christensen, S., Lind, M., Michaelsen, K. Human milk composition and infant growth. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2018:1.
8. Indicators for assessing infant and young child feeding practices. Washington, D.C.: World Health Organization (WHO); 2008.
9. Infant and Young Child Feeding: Model Chapter for Textbooks for Medical Students and Allied Health Professionals. Geneva: World Health Organization; 2009.
10. Dewey, K.G., Adu-Afarwuah, S. Systematic review of the efficacy and effectiveness of complementary feeding interventions in developing countries. Maternal and Child Nutrition. 2008; 4(s1): 24–85.
11. Koletzko, B. *et al*. Physiological aspects of human milk lipids. Review. Early Hum Develop, 2001; 65S: S3-S18.
12. Uauy, R., Mena, P. Lipids and neurodevelopment. Nutr Reviews, 2001; IIS: S34-S48.

13. Worthington-Roberts, B.S., Rodwell Williams, S. Nutrition throughout the life cycle. 3rd Edition, Mosby 1996.
14. Beaudry, M., Marcoux, S. Relation between infant feeding and infections during the first six months of life. *J Pediatr*, 1995; 126: 191-7.
15. Dewey, K.G., Heinig, J., Nommsen-Rivers, L. Differences in morbidity between breast-fed and formula-fed infants. *J Pediatr*, 1995; 126: 696-702.
16. Lopez-Alarcon, M., Villalpando, S., Fajardo, A. Breast-feeding lowers the frequency and duration of acute respiratory infection and diarrhea in infants under six months of age. *J Nutr*, 1997; 127: 436-443.
17. Sherman, M.P. Human milk, fatty acids, and the immune response: a new glimpse. *Am J Clin Nutr*, 2000; 72: 1071-2.
18. GIFA (Geneva Infant Feeding Association). Breast-feeding briefs. Dec 1995; no. 22.
19. Uauy, R., Peirano, P. Breast is best: human milk is the optimal food for brain development. *Am J Clin Nutr*, 1999; 70: 433-4.
20. Horwood, L.J., Fergusson, D.M. Breastfeeding and later cognitive and academic outcomes. *Pediatr*, 1998;101: 1-7.
21. University of Kentucky, College of Agriculture: Nourishing the newborn: birth to four months. 1997, H.E: 3-145.
22. Dobson, B., Murtaugh, M.A. Position of the American Dietetic Association: breaking the barriers to breastfeeding. *J Am Diet Assoc*, 2001; 101: 1213-1220.
23. Barness, L.A. History of infant feeding practices. *Am J Clin Nutr* 1987; 46:168-70.
24. Wickes, I.G. History of Infant Feeding. *Arch Dis Child* 1953; 28: 151-158.
25. Levenstein, H. *The Transformation of the American Diet*. New York: Oxford University Press; 1988 p.124.
26. Wickes, I.G. A History of Infant Feeding, part V. Nineteenth century concluded and twentieth century. *Arch Dis Child*. 1953; 28(142): 495-502.
27. Radhill, S. Infant feeding through the ages. *Clinical Pediatrics*, 1981; 20(10): 613-621.
28. Stevens, E., Patrick, T., Pickler, R. A History of Infant Feeding. *J Perinat Educ*. 2009; 18(2): 32-39.

29. Fomon, S.J. Infant Feeding in the 20th century: Formula and Beicost. *J.Nutr* 2001; 131no: 2409S-420S.
30. Infant Formula http://en.wikipedia.org/wiki/Infant_formula.
31. Bhatia, J., Green, F. Use of soy protein-based formulas in infant feeding. *Pediatrics*. 2008; 121: 1062-8.
32. Joseph, S.C. The anatomy of the infant formula controversy. *Am J Dis Child*. 1981; 135: 889-92.
33. Fomon, S.J. Reflections on infant feeding in 1970s and 1980s. *Am J Clin Nutr*. 1987; 46: 171-82.
34. The History Of The Medicalization Of Breastfeeding. <http://www.bcbabyfriendly.ca/.pdf>.
35. WHO / Program of Nutrition. Report of a technical consultation (1995. Montpellier, France). Complementary feeding of infants and young children. Geneva: World Health Organization; 1998. p 48.
36. WHO / UNICEF. Global strategy for infant and young child feeding. Geneva: World Health Organization; 2003. p 140.
37. FAO / WHO, Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, Expert Consult. report, Córdoba, Argentina, 2001.
38. Turkmen, N., Akal, C. and Özer, B. Probiotic dairy-based beverages: A review, *J. Funct. Foods*, 2019.
39. Gu, J. and Roberts, K., Chapter 6 - Probiotics and Prebiotics, Corrigan, M.L., Roberts, K., and Steiger, B.S., Eds. Academic Press, 2019, pp. 67–80.
40. Rathore, S., Salmerón, I., and Pandiella, S.S. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures, *Food Microbiol.*, 2012.
41. Tripathi, M.K. and Giri, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, *Journal of Functional Foods*. 2014.
42. Stanton, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Van Sinderen, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites, *Current Opinion in Biotechnology*. 2005.

43. Bigret, M. and Mäyrä-Mäkinen, A. Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria, in Lactic Acid Bacteria, 2010.
44. Κουρελής, Α. Μοριακός και βιοχημικός χαρακτηρισμός ζυμών με πιθανές προβιοτικές ιδιότητες και προσδιορισμός της ανοσοτροποποιητικής τους δράσης *in vivo*, 2009.
45. de Melo Pereira, G.V., de Oliveira Coelho, B., Magalhães Júnior, A.I., Thomaz-Soccol, V., and Soccol, C.R. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria, *Biotechnology Advances*. 2018.
46. George Kerry, R., Patra, J.K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.S. and Das, G. Benefaction of probiotics for human health: A review, *Journal of Food and Drug Analysis*. 2018.
47. Mizock, B.A. Probiotics, *Disease-a-Month*, vol. 61, no. 7, pp. 259–290, 2015.
48. Valcheva, R. and Dieleman, L.A. Prebiotics: Definition and protective mechanisms, *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*. 2016.
49. Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, 1995. 125(6): p. 1401-12.
50. Schrezenmeir, J. and de Vrese, M. *The American Journal of Clinical Nutrition*, March 2009: p. 361S-364S, ajcn.org.
51. Κοτζάμπαση, Κ. Πρεβιοτικά και Συμβιοτικά. Στο : Εντατική Θεραπεία-Λοιμώξεις. Τόμος ΙΙ. Εκδόσεις Πασχαλίδης ΠΧ, (ISBN 960-399-305-0) Αθήνα 2004, σελ.1721-30.
52. Bengmark, S., Garcia de Lorenzo A., Culebras J.M. Use of pro-, pre- and synbiotics in the ICU-future options. *Nutr Hosp* 2001; 16 239-56.
53. Bengmark, S. Gut microbial ecology in critical illness: is there a role for prebiotics, probiotics, and synbiotics? *Curr Opin Crit Care* 2002; 8:145-51.
54. Rastall, R.A., Martin, V. Prebiotics and synbiotics : towards the next generation. *Curr Opin Biotechnol* 2002; 13: 490-6.
55. Bengmark, S. Pre-, Pro, Synbiotics and human health food. *Technol Biotechnol* 2010; 48: 464–475.
56. Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 25: 1401-1412.

57. Roberfroid, M. B. (1999). Concepts in Functional Foods : The Case of Inulin and Oligofructose. *J.Nutr.* 129: 1398S-1401S.
58. Macfarlane, G.T., Gibson, G.R., Cummings J.H. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol* 1992; 72: 57-64.
59. Kotzampassi, K. Dietary fibers and prebiotics: of proven benefit or a new fad? *Annals Gastroenterol* 2006; 19: 225-227.
60. Macfarlane, S., Macfarlane, G.T., Cummings J.H. Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 24: 701-14.
61. Macfarlane, S. Microbial biofilm communities in the gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: S 142-143.
62. Doyglas, L.C., Sanders, M.E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *J Am Diet Assoc* 2008; 108: 510-521.
63. Olano-Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G.R. & Rastall, R. A (2000) *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*, 83: 247-255. UK.
64. Fuller, R., House, R. and Green, R. (1999). Probiotics. In : *Colonic Microbiota, Nutrition and Health*. Gibson G.R. & Roberfroid M. B. eds. P:89-99.
65. Li, M.; Wang, M.; Donovan, S.M. Early development of the gut microbiome and immune-mediated childhood disorders. *Semin.Reprod. Med.* 2014, 32, 74–86.
66. Wang, M.; Monaco, M.H.; Donovan, S.M. Impact of early gut microbiota on immune and metabolic development and function. *Semin. Fetal. Neonatal. Med.* 2016, 21, 380–387.
67. Derrien, M.; Alvarez, A.-S.; de Vos, W.M. The gut microbiota in the first decade of life. *Trends Microbiol.* 2019, 27, 997–1010.
68. Ho, N.T.; Li, F.; Lee-Sarwar, K.A.; Tun, H.M.; Brown, B.P.; Pannaraj, P.S.; Bender, J.M.; Azad, M.B.; Thompson, A.L.; Weiss, S.T.; *et al.* Meta-analysis of effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota across populations. *Nat. Commun.* 2018, 9, 4169.
69. Savage, J.H.; Lee-Sarwar, K.A.; Sordillo, J.E.; Lange, N.E.; Zhou, Y.; O'Connor, G.T.; Sandel, M.; Bacharier, L.B.; Zeiger, R.; Sodergren, E.; *et al.* Diet during

- pregnancy and infancy and the infant intestinal microbiome. *J. Pediatr.* 2018, 203, 47–54.
70. Forbes, J.D.; Azad, M.B.; Vehling, L.; Tun, H.M.; Konya, T.B.; Guttman, D.S.; Field, C.J.; Lefebvre, D.; Sears, M.R.; Becker, A.B.; *et al.* Association of exposure to formula in the hospital and subsequent infant feeding practices with gut microbiota and risk of overweight in the first year of life. *JAMA Pediatr.* 2018, 172, e181161.
71. Braegger, C.; Chmielewska, A.; Decsi, T.; Kolacek, S.; Mihatsch, W.; Moreno, L.; Piescik, M.; Puntis, J.; Shamir, R.; Szajewska, H.; *et al.* Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: A systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2011, 52, 238–250.
72. Skórka, A.; Piescik-Lech, M.; Kołodziej, M.; Szajewska, H. To add or not to add probiotics to infant formulae? An updated systematic review. *Benef. Microbes* 2017, 8, 717–725.
73. Holmes, E.; Wilson, I. D.; Nicholson, J. K. Metabolic Phenotyping in Health and Disease. *Cell* 2008, 134 (5), 714–717. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.026>.
74. Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. Systems Biology: Metabonomics. *Nature* 2008, 455 (7216), 1054–1056. <https://doi.org/10.1038/4551054a>.
75. Spratlin, J. L.; Serkova, N. J.; Eckhardt, S. G. Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: A Review. *Clin. Cancer Res.* 2009, 15 (2), 431–440. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1059>.
76. Nicholson, J. K.; Connelly, J.; Lindon, J. C.; Holmes, E. Metabonomics: A Platform for Studying Drug Toxicity and Gene Function. *Nat Rev Drug Discov* 2002, 1 (2), 153–161. <https://doi.org/10.1038/nrd728>.
77. Zeisel, S. H.; Waterland, R. A.; Ordovás, J. M.; Muoio, D. M.; Jia, W.; Fodor, A. Highlights of the 2012 Research Workshop: Using Nutrigenomics and Metabolomics in Clinical Nutrition Research. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2013, 37 (2), 190–200. <https://doi.org/10.1177/0148607112462401>.

78. Madsen, R.; Lundstedt, T.; Trygg, J. Chemometrics in Metabolomics - a Review in Human Disease Diagnosis. *Anal. Chim. Acta* 2010, 659 (1–2), 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.042>.
79. Bartel, J.; Krumsiek, J.; Theis, F. J. Statistical Methods for the Analysis of High-Throughput Metabolomics Data. *Comput Struct Biotechnol J* 2013, 4, e201301009. <https://doi.org/10.5936/csbj.201301009>.
80. Bharti, S. K.; Roy, R. Quantitative ¹H NMR Spectroscopy. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2012, 35, 5–26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007>.
81. Smolinska, A.; Blanchet, L.; Buydens, L. M. C.; Wijmenga, S. S. NMR and Pattern Recognition Methods in Metabolomics: From Data Acquisition to Biomarker Discovery: A Review. *Anal. Chim. Acta* 2012, 750, 82–97. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.049>.
82. Emwas, A.-H. M. The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. *Methods Mol. Biol.* 2015, 1277, 161–193. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_13.
83. Keun, H. C.; Athersuch, T. J. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Based Metabolomics. *Methods Mol. Biol.* 2011, 708, 321–334. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-985-7_19.
84. Atan, N. A. D.; Koushki, M.; Ahmadi, N. A.; Rezaei-Tavirani, M. Metabolomics-Based Studies in the Field of Leishmania/Leishmaniasis. *Alexandria Journal of Medicine* 2018, 54 (4), 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2018.06.002>.
85. Aboud, O. A.; Weiss, R. H. New Opportunities from the Cancer Metabolome. *Clin. Chem.* 2013, 59 (1), 138–146. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.184598>.
86. Nightingale Health - NMR or MS – which technology to pick when analysing biofluids? <https://nightingalehealth.com/research/blog/nmr-or-ms--which-technology-to-pick-when-analysing> (accessed May 20, 2020).
87. Psychogios, N.; Hau, D. D.; Peng, J.; Guo, A. C.; Mandal, R.; Bouatra, S.; Sinelnikov, I.; Krishnamurthy, R.; Eisner, R.; Gautam, B.; Young, N.; Xia, J.; Knox, C.; Dong, E.; Huang, P.; Hollander, Z.; Pedersen, T. L.; Smith, S. R.; Bamforth, F.;

- Greiner, R.; McManus, B.; Newman, J. W.; Goodfriend, T.; Wishart, D. S. The Human Serum Metabolome. PLOS ONE 2011, 6 (2), e16957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016957>.
88. Claridge, T. D. W. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry; Vol. 2. 2nd Edition – November 5, 2008. Hardcover ISBN: 9780080546285, eBook ISBN: 9780080915036
89. Emwas, A.-H. M.; Merzaban, J. S.; Serrai, H. Chapter 3 - Theory and Applications of NMR-Based Metabolomics in Human Disease Diagnosis. In Applications of NMR Spectroscopy; Rahman, A., Choudhary, M. I., Eds.; Bentham Science Publishers, 2015; pp 93–130. <https://doi.org/10.1016/B978-1-60805-963-8.50003-2>.
90. Adkins, J. N.; Varnum, S. M.; Auberry, K. J.; Moore, R. J.; Angell, N. H.; Smith, R. D.; Springer, D. L.; Pounds, J. G. Toward a Human Blood Serum Proteome: Analysis by Multidimensional Separation Coupled with Mass Spectrometry. Mol. Cell Proteomics 2002, 1 (12), 947–955.
91. Zhang, B.; Xie, M.; Bruschiweiler-Li, L.; Bruschweiler, R. Nanoparticle-Assisted Removal of Protein in Human Serum for Metabolomics Studies. Anal. Chem. 2016, 88 (1), 1003–1007. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03889>.
92. Beckonert, O.; Keun, H. C.; Ebbels, T. M. D.; Bundy, J.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K. Metabolic Profiling, Metabolomic and Metabonomic Procedures for NMR Spectroscopy of Urine, Plasma, Serum and Tissue Extracts. Nat Protoc 2007, 2 (11), 2692–2703. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.376>.
93. Two-Dimensional NMR Spectroscopy [http:// www.cryst.bbk.ac.uk/ PPS2/ projects/ schirra/ html/ 2dnmr.htm](http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/projects/schirra/html/2dnmr.htm) (accessed Jan 17, 2020).
94. Emwas, A.-H.; Saccenti, E.; Gao, X.; McKay, R. T.; Dos Santos, V. A. P. M.; Roy, R.; Wishart, D. S. Recommended Strategies for Spectral Processing and Post-Processing of ¹D ¹H-NMR Data of Biofluids with a Particular Focus on Urine. Metabolomics 2018, 14 (3), 31. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1321-4>.
95. Eriksson, L. Why pre-processing your data creates better data analytics models [https:// blog.umetrics.com/ why-pre-processing-data-creates-better-data-analytics-models](https://blog.umetrics.com/why-pre-processing-data-creates-better-data-analytics-models) (accessed Nov 18, 2019).

96. Marincola, F. C.; Dessì, A.; Pattumelli, M. G.; Corbu, S.; Ossicini, C.; Ciccarelli, S.; Agostino, R.; Mussap, M.; Fanos, V. ¹H NMR-Based Urine Metabolic Profile of IUGR, LGA, and AGA Newborns in the First Week of Life. *Clin. Chim. Acta* 2015, 451 (Pt A), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.08.008>.
97. Eriksson, L.; Johansson, E.; Kettaneh-Wold, N.; Trygg, J.; Wikström, C.; Wold, S. *Multi- and Megavariate Data Analysis: Principles and Applications*, Umetrics AB, Umeå, 2006.
98. Dessì, A.; Marincola, F. C.; Pattumelli, M. G.; Ciccarelli, S.; Corbu, S.; Ossicini, C.; Fanos, V.; Agostino, R. Investigation of the ¹H-NMR Based Urine Metabolomic Profiles of IUGR, LGA and AGA Newborns on the First Day of Life. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med.* 2014, 27 Suppl 2, 13–19. <https://doi.org/10.3109/14767058.2014.955674>.
99. Fotakis, C.; Zoga, M.; Baskakis, C.; Tsiaka, T.; Boutsikou, T.; Briana, D. D.; Dendrinou, K.; Malamitsi-Puchner, A.; Zoumpoulakis, P. Investigating the Metabolic Fingerprint of Term Infants with Normal and Increased Fetal Growth. *RSC Adv.* 2016, 6 (83), 79325–79334. <https://doi.org/10.1039/C6RA12403H>.
100. Cloarec, O.; Dumas, M. E.; Trygg, J.; Craig, A.; Barton, R. H.; Lindon, J. C.; Nicholson, J. K.; Holmes, E. Evaluation of the Orthogonal Projection on Latent Structure Model Limitations Caused by Chemical Shift Variability and Improved Visualization of Biomarker Changes in ¹H NMR Spectroscopic Metabonomic Studies. *Anal. Chem.* 2005, 77 (2), 517–526. <https://doi.org/10.1021/ac048803i>.
101. Guleria, A.; Pratap, A.; Dubey, D.; Rawat, A.; Chaurasia, S.; Sukesh, E.; Phatak, S.; Ajmani, S.; Kumar, U.; Khetrapal, C. L.; Bacon, P.; Misra, R.; Kumar, D. NMR Based Serum Metabolomics Reveals a Distinctive Signature in Patients with Lupus Nephritis. *Sci Rep* 2016, 6, 35309. <https://doi.org/10.1038/srep35309>.
102. Wheelock, Å. M.; Wheelock, C. E. Trials and Tribulations of omics Data Analysis: Assessing Quality of SIMCA-Based Multivariate Models Using Examples from Pulmonary Medicine. *Mol Biosyst* 2013, 9 (11), 2589–2596. <https://doi.org/10.1039/c3mb70194h>.

103. Koletzko, B. Human Milk Lipids. *Ann. Nutr. Metab.* 2016, 69 Suppl 2, 28–40, doi:10.1159/000452819.
104. Kim, S.Y.; Yi, D.Y. Components of Human Breast Milk: From Macronutrient to Microbiome and MicroRNA. *Clin Exp. Pediatr.* 2020, 63, 301–309, doi:10.3345/cep.2020.00059.
105. Emwas, A.-H.; Roy, R.; McKay, R.T.; Ryan, D.; Brennan, L.; Tenori, L.; Luchinat, C.; Gao, X.; Zeri, A.C.; Gowda, G.A.N.; *et al.* Recommendations and Standardization of Biomarker Quantification Using NMR-Based Metabolomics with Particular Focus on Urinary Analysis. *J. Proteome Res.* 2016, 15, 360–373, doi:10.1021/acs.jproteome.5b00885.
106. Tomasi, G.; van den Berg, F.; Andersson, C. Correlation Optimized Warping and Dynamic Time Warping as Pre-processing Methods for Chromatographic Data. *J. Chemom.* 2004, 18, 231–241, doi:10.1002/cem.859.
107. Fotiou, M.; Fotakis, C.; Tsakoumaki, F.; Athanasiadou, E.; Kyrkou, C.; Dimitropoulou, A.; Tsiaka, T.; Chatziioannou, A.C.; Sarafidis, K.; Menexes, G.; *et al.* ¹H NMR-Based Metabolomics Reveals the Effect of Maternal Habitual Dietary Patterns on Human Amniotic Fluid Profile. *Sci. Rep.* 2018, 8, 4076, doi:10.1038/s41598-018-22230-y.
108. Silva, C.L.; Olival, A.; Perestrelo, R.; Silva, P.; Tomás, H.; Câmara, J.S. Untargeted Urinary ¹H NMR-Based Metabolomic Pattern as a Potential Platform in Breast Cancer Detection. *Metabolites* 2019, 9, 269, doi:10.3390/metabo9110269.
109. Filntisi, A.; Fotakis, C.; Asvestas, P.; Matsopoulos, G.K.; Zoumpoulakis, P.; Cavouras, D. Automated metabolite identification from biological fluid ¹H NMR spectra. *Metabolomics*, 2017, 13, 146, doi: 10.1007/s11306-017-1286-8.
110. Thévenot E.A.; Roux A.; Xu Y.; Ezan E.; Junot C. Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. *J. Proteome Res.* 2015, 14(8), 3322-35, doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00354.
111. Eriksson, L.; Antti, H.; Gottfries, J.; Holmes, E.; Johansson, E.; Lindgren, F.; Long, I.; Lundstedt, T.; Trygg, J.; Wold, S. Using Chemometrics for Navigating

- in the Large Data Sets of Genomics, Proteomics, and Metabonomics (Gpm). *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 380, 419–429, doi:10.1007/s00216-004-2783-y.
112. Pearson, F.R.S. . LIII. On Lines and Planes of Closest Fit to Systems of Points in Space. *Lond. Edinb. Dublin philos. mag. j. sci.* 1901, 2, 559–572, doi:10.1080/14786440109462720.
113. Trygg J.; Holmes E.; Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J. Proteome Res.* 2007, 6(2), 469-79, doi: 10.1021/pr060594q.
114. Ståhle, L.; Wold, S. Partial Least Squares Analysis with Cross-Validation for the Two-Class Problem: A Monte Carlo Study. *J. Chemom.* 1987, 1, 185–196, doi:10.1002/cem.1180010306.
115. Barker, M.; Rayens, W. Partial Least Squares for Discrimination. *J. Chemom.* 2003, 17, 166–173, doi:10.1002/cem.785.
116. Jorgensen, W.L.; Tirado-Rives, J. The OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulations) Potential Functions for Proteins, Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *J. Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 1657–1666, doi:10.1021/ja00214a001.
117. Jorgensen, W.L.; Maxwell, D.S.; Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 45, 11225–11236M doi: 10.1021/ja9621760.
118. Kruskal, W.H.; Wallis, W.A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis, *J. Am. Stat. Assoc.* 1952, 47:260, 583-621, doi: 10.1080/01621459.1952.10483441.
119. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J.R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.* 1995, 57, 289–300, doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
120. Li, N.; Yan, F.; Wang, N.; Song, Y.; Yue, Y.; Guan, J.; Li, B.; Huo, G. Distinct Gut Microbiota and Metabolite Profiles Induced by Different Feeding Methods in Healthy Chinese Infants. *Front. Microbiol.* 2020, 11, doi: 10.3389/fmicb.2020.00714.

121. Brink L.R.; Lönnerdal B. Milk fat globule membrane: the role of its various components in infant health and development. *J. Nutr. Biochem.* 2020, 85, 108465, doi: 10.1016/j.jnutbio.2020.108465.
122. Yang, B.; Chen, Y.; Stanton, C.; Ross, R.P.; Lee, Y.-K.; Zhao, J.; Zhang, H.; Chen, W. Bifidobacterium and Lactobacillus Composition at Species Level and Gut Microbiota Diversity in Infants before 6 Weeks. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 3306, doi:10.3390/ijms20133306.
123. Giallourou N.; Fardus-Reid F.; Panic G.; Veselkov K.; McCormick B.J.J.; Olortegui M.P.; Ahmed T.; Mduma E.; Yori P.P.; Mahfuz M.; Svensen E. *et al.* Metabolic maturation in the first 2 years of life in resource-constrained settings and its association with postnatal growths. *Sci. Adv.* 2020, 6(15), eaay5969, doi: 10.1126/sciadv.aay5969.
124. Phan, M.; Momin, S.R.; Senn, M.K.; Wood, A.C. Metabolomic Insights into the Effects of Breast Milk Versus Formula Milk Feeding in Infants. *Curr. Nutr. Rep.* 2019, 8, 295–306, doi:10.1007/s13668-019-00284-2.
125. Valles, Y.; Gosalbes, M.J.; de Vries, L.E.; Abelián, J.J.; Francino, M.P. Metagenomics and Development of the Gut Microbiota in Infants. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012, 18, 21–26, doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03876.x.
126. Zöhrer, E.; Resch, B.; Scharnagl, H.; Schlagenhaut, A.; Fauler, G.; Stojakovic, T.; Hofer, N.; Lang, U.; Jahnel, J. Serum Bile Acids in Term and Preterm Neonates. *Medicine (Baltimore)* 2016, 95, e5219, doi:10.1097/MD.0000000000005219.
127. van den Elsen L.W.J.; Garssen J.; Burcelin R.; Verhasselt V. Shaping the Gut Microbiota by Breastfeeding: The Gate-way to Allergy Prevention? *Front. Pediatr.* 2019, 7, 47, doi: 10.3389/fped.2019.00047.
128. Sillner, N.; Walker, A.; Lucio, M.; Maier, T.V.; Bazanella, M.; Rychlik, M.; Haller, D.; Schmitt-Kopplin, P. Longitudinal Profiles of Dietary and Microbial Metabolites in Formula and Breastfed Infants. *Front. Mol. Biosci.* 2021, 8, 660456. doi: 10.3389/fmolb.2021.660456.
129. Haschke-Becher, E.; Kainz, A.; Bachmann, C. Reference Values of Amino Acids and of Common Clinical Chemistry in Plasma of Healthy Infants Aged 1

- and 4 Months. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2016, 39, 25–37, doi:10.1007/s10545-015-9870-4.
130. Giribaldi, M.; Peila, C.; Coscia, A.; Cavallarin, L.; Antoniazzi, S.; Corbu, S.; Maiocco, G.; Sottemano, S.; Cresi, F.; Moro, G.E.; *et al.* Urinary Metabolomic Profile of Preterm Infants Receiving Human Milk with Either Bovine or Donkey Milk-Based Fortifiers. *Nutrients* 2020, 12, 2247, doi:10.3390/nu12082247.
 131. Shoji, H.; Shimizu, T. Effect of Human Breast Milk on Biological Metabolism in Infants. *Pediatr. Int.* 2019, 61, 6–15, doi:10.1111/ped.13693.
 132. Dessì, A.; Murgia, A.; Agostino, R.; Pattumelli, M.G.; Schirru, A.; Scano, P.; Fanos, V.; Caboni, P. Exploring the Role of Different Neonatal Nutrition Regimens during the First Week of Life by Urinary GC-MS Metabolomics. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 265, doi:10.3390/ijms17020265.
 133. Schimmel, P.; Kleinjans, L.; Bongers, R.S.; Knol, J.; Belzer, C. Breast Milk Urea as a Nitrogen Source for Urease Positive Bifidobacterium Infantis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2021, 97, fiab019, doi:10.1093/femsec/fiab019.
 134. He, X.; Parenti, M.; Grip, T.; Lönnerdal, B.; Timby, N.; Domellöf, M.; Hernell, O.; Slupsky, C.M. Fecal Microbiome and Metabolome of Infants Fed Bovine MFGM Supplemented Formula or Standard Formula with Breast-Fed Infants as Reference: A Randomized Controlled Trial. *Sci. Rep.* 2019, 9, 11589, doi:10.1038/s41598-019-47953-4.
 135. He X.; Sotelo-Orozco J.; Rudolph C.; Lönnerdal B.; Slupsky C.M. The Role of Protein and Free Amino Acids on Intake, Metabolism, and Gut Microbiome: A Comparison Between Breast-Fed and Formula-Fed Rhesus Monkey Infants. *Front. Pediatr.* 2020, 7, 563, doi: 10.3389/fped.2019.00563.
 136. Slupsky C.M.; He X.; Hernell O.; Andersson Y.; Rudolph C.; Lönnerdal B.; West C.E. Postprandial metabolic response of breast-fed infants and infants fed lactose-free vs regular infant formula: A randomized controlled trial. *Sci. Rep.* 2017, 7(1), 3640, doi: 10.1038/s41598-017-03975-4.
 137. Wu, T.-C.; Huang, I.-F.; Chen, Y.-C.; Chen, P.-H.; Yang, L.-Y. Differences in Serum Biochemistry between Breast-Fed and Formula-Fed Infants. *J. Chin. Med. Assoc.* 2011, 74, 511–515, doi:10.1016/j.jcma.2011.09.007.

138. Echeverri-Peña, O.; Guevara-Morales, J.; Barbosa, A.C.; Cortes, S.C.; Pulido, N.; Rodriguez-Lopez, A.; Parra, M. Metabolic Impact of Infant Formulas in Young Infants. An Outlook From the Urine Metabolome; PREPRINT (Version 1) available at Research Square 2020, doi:10.21203/rs.3.rs-120727/v1.
139. Nogacka, A.M.; Arbolea, S.; Nikpoor, N.; Auger, J.; Salazar, N.; Cuesta, I.; Alvarez-Buylla, J.R.; Mantecón, L.; Solís, G.; Gueimonde, M.; *et al.* *In Vitro* Probiotic Modulation of the Intestinal Microbiota and 2'Fucosyllactose Consumption in Fecal Cultures from Infants at Two Months of Age. *Microorganisms* 2022, 10, 318, doi:10.3390/microorganisms10020318.
140. Lee, H.; Slupsky, C.M.; Heckmann, A.B.; Christensen, B.; Peng, Y.; Li, X.; Hernell, O.; Lönnardal, B.; Li, Z. Milk Fat Globule Membrane as a Modulator of Infant Metabolism and Gut Microbiota: A Formula Supplement Narrowing the Metabolic Differences between Breastfed and Formula-Fed Infants. *Mol. Nutr. Food Res.* 2021, 65, 2000603, doi:10.1002/mnfr.202000603.
141. Georgakopoulou, I.; Chasapi, S.A.; Bariamis, S.E.; Varvarigou, A.; Spraul, M.; Spyroulias, G.A. Metabolic Changes in Early Neonatal Life: NMR Analysis of the Neonatal Metabolic Profile to Monitor Postnatal Metabolic Adaptations. *Metabolomics* 2020, 16, 58, doi:10.1007/s11306-020-01680-4.
142. O'Sullivan, A.; He, X.; McNiven, E.M.S.; Haggarty, N.W.; Lönnardal, B.; Slupsky, C.M. Early Diet Impacts Infant Rhesus Gut Microbiome, Immunity, and Metabolism. *J. Proteome Res.* 2013, 12, 2833–2845, doi:10.1021/pr4001702.
143. Mayneris-Perxachs, J.; Swann, J.R. Metabolic Phenotyping of Malnutrition during the First 1000 Days of Life. *Eur. J. Nutr.* 2019, 58, 909–930, doi:10.1007/s00394-018-1679-0.
144. Del Chierico, F.; Vernocchi, P.; Petrucca, A.; Paci, P.; Fuentes, S.; Praticò, G.; Capuani, G.; Masotti, A.; Reddel, S.; Russo, A.; *et al.* Phylogenetic and Metabolic Tracking of Gut Microbiota during Perinatal Development. *PLoS ONE* 2015, 10, e0137347, doi:10.1371/journal.pone.0137347.
145. Bardanzellu, F.; Fanos, V. Omics in Neonatology: The Future? *Innovations and Frontiers in Neonatology* 2020, 22, 169–183, doi:10.1159/000495443.

146. Perrella, S.; Gridneva, Z.; Lai, C.T.; Stinson, L.; George, A.; Bilston-John, S.; Geddes, D. Human Milk Composition Promotes Optimal Infant Growth, Development and Health. *Semin. Perinatol.* 2021, 45, 151380, doi:10.1016/j.semperi.2020.151380.
147. Pintus, M.C.; Lussu, M.; Dessì, A.; Pintus, R.; Noto, A.; Masile, V.; Marcialis, M.A.; Puddu, M.; Fanos, V.; Atzori, L. Urinary ¹H-NMR Metabolomics in the First Week of Life Can Anticipate BPD Diagnosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 2018, e7620671, doi:10.1155/2018/7620671.
148. López-Hernández, Y.; Oropeza-Valdez, J.J.; Blanco-Sandate, J.O.; Herrera-Van Oostdam, A.S.; Zheng, J.; Chi Guo, A.; Lima-Rogel, V.; Rajabzadeh, R.; Salgado-Bustamante, M.; Adrian-Lopez, J.; *et al.* The Urinary Metabolome of Healthy Newborns. *Metabolites* 2020, 10, 165, doi:10.3390/metabo10040165.
149. Ribo, S.; Sánchez-Infantes, D.; Martínez-Guino, L.; García-Mantrana, I.; Ramon-Krauel, M.; Tondo, M.; Arning, E.; Nofrarías, M.; Osorio-Conles, Ó.; Fernández-Pérez, A.; *et al.* Increasing Breast Milk Betaine Modulates Akkermansia Abundance in Mammalian Neonates and Improves Long-Term Metabolic Health. *Sci Transl Med.* 2021, 13, eabb0322, doi:10.1126/scitranslmed.abb0322.
150. Shoji, H.; Taka, H.; Kaga, N.; Ikeda, N.; Kitamura, T.; Miura, Y.; Shimizu, T. A Pilot Study of the Effect of Human Breast Milk on Urinary Metabolome Analysis in Infants. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2017, 30, 939–946, doi:10.1515/jpem-2017-0179.
151. Lönnerdal, B.; Kvistgaard, A.S.; Peerson, J.M.; Donovan, S.M.; Peng, Y. Growth, Nutrition, and Cytokine Response of Breast-Fed Infants and Infants Fed Formula With Added Bovine Osteopontin. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2016, 62, 650–657, doi:10.1097/MPG.0000000000001005.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΑΠΟ ΤΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Urine Metabolomic Profile of Breast - versus Formula-Fed Neonates Using a Synbiotic-Enriched Formula. Vasiliki Falaina, Charalambos Fotakis, Theodora Boutsikou, Thalia Tsiaka, Georgios Moros, Sotirios Ouzounis, Vasiliki Andreou, Zoi Iliodromiti, Theodoros Xanthos, Yvan Vandenplas, Nicoletta Iacovidou and Panagiotis Zoumpoulakis. *Int.J. Mol. Sci.* 2022, 23, 10476.

<https://doi.org/10.3390/ijms231810476>

The Metagenomic and Metabolomic Profile of the Infantile Gut: Can They Be “Predicted” by the Feed Type? Eftychia Ioanna Dimitrakopoulou, Abraham Pouliakis, Vasiliki Falaina, Theodoros Xanthos, Panagiotis Zoumpoulakis, Thalia Tsiaka, Rozeta Sokou, Zoi Iliodromiti, Theodora Boutsikou and Nicoletta Iacovidou. *Children* 2022, 9, 154. <https://doi.org/10.3390/children9020154>