

Αξιοποίηση Φυσικών Αντιοξειδωτικών στην Εκτροφή των Αγροτικών Ζώων για Παραγωγή Προϊόντων Ποιότητας

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Εργαστήριο Ζωοτεχνίας

MIS 380231

Δράση 3^η : Ποιότητα σφαγίου και κρέατος ορνίθων

Παραδοτέο: D3_P5

**ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ ΟΡΝΙΘΩΝ ΥΣΤΕΡΑ ΑΠΟ ΤΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ
ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΙΝΗΣ ΚΑΙ ΝΑΡΙΝΓΙΝΗΣ**



1. Εκχύλιση δειγμάτων ιστού από όρνιθες.

Προετοιμασία 120 δειγμάτων ιστού από όρνιθες στις οποίες είχαν χορηγηθεί οι ουσίες Ναργινίνη και Εσπεριδίνη με σκοπό την ποσοτική ανάλυση με τη χρήση συστήματος υγροχρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης (Accela-UHPLC) συζευγμένης με υβριδικό σύστημα γραμμικής και τροχιακής παγίδας σε σειρά (LTQ-ORBITRAP Velos).

Προετοιμασία δείγματος

Σε 1 gr λυοφιλοποιημένου ιστού προστέθηκαν 5 mL εσωτερικού προτύπου 4-ιωδοφαινόλης (2 μg/mL) και 7 mL διαλύματος οξικού οξέος οξικού αμμωνίου ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$, 0,1 M). Ακολούθησε ομογενοποίηση και μεταφορά 1 mL σε falcon, προσθήκη 5 mL χλωροφορμίου (CHCl_3), ανακίνηση και μεταφορά-συλλογή της στοιβάδας του χλωροφορμίου. Η κατακρήμνιση του πρωτεϊνικού περιεχομένου πραγματοποιήθηκε σε δυο στάδια με προσθήκη ακετόνης (5 mL και 1 mL, αντιστοίχως). Τα υπερκείμενα φυλάχθηκαν για την ανάλυση.

2. Μεταβολομική ανάλυση σε πλάσμα ορνίθων ύστερα από τη χορήγηση των ουσιών Εσπεριδίνης και Ναργινίνης.

Γενικά

Ως Μεταβιομική ορίζεται «η ποσοτική μέτρηση της πολυπαραμετρικής απόκρισης οργανισμών σε παθοφυσιολογικά ερεθίσματα ή γενετικές τροποποιήσεις». Παράλληλα με την Μεταβιομική εισήχθη και ο όρος Μεταβολομική. Η Μεταβολομική ορίζεται ως «η μελέτη της ποσοτικής ανάλυσης όλων των μεταβολιτών σε ένα βιολογικό σύστημα και των αλλαγών στα επίπεδα των μεταβολιτών που σχετίζονται με γενετικές ή περιβαλλοντικές διαταραχές». Οι



δύο όροι στη βιβλιογραφία συχνά χρησιμοποιούνται εναλλακτικά, αν και από τους ορισμούς διαφαίνεται ότι η Μεταβολομική αποτελεί υποσύνολο της Μεταβονομικής.

Στόχος των μεταβολομικών μελετών είναι η δημιουργία μοντέλων, η ανάδειξη βιοδεικτών, δηλαδή μεταβολιτών που υπάρχουν φυσιολογικά σε ένα βιολογικό υλικό αλλά όταν η συγκέντρωσή τους είναι μη φυσιολογική μπορούν να χρησιμεύσουν σαν δείκτες διάγνωσης ή ακόμη και πρόβλεψης μιας παθολογικής κατάστασης και τέλος η βιοχημική εξήγηση των αποτελεσμάτων και η σύνδεσή τους με μεταβολικά μονοπάτια.

Τα συνηθέστερα βιολογικά δείγματα που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση είναι τα ούρα, το πλάσμα, ο ορός και το ολικό αίμα και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Μία αναλυτική τεχνική για να είναι κατάλληλη στη Μεταβολομική θα πρέπει να διακρίνεται για την ταχύτητά της, την ικανότητά της να αποτυπώνει το σύνολο των μεταβολιτών που υπάρχουν στο εκάστοτε δείγμα προς μελέτη, την μειωμένη ειδικότητά της και την ακρίβεια της. Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και η Φασματομετρία Μάζας (MS) είναι εκείνες οι αναλυτικές τεχνικές που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται στις Μεταβολομικές μελέτες. Τα αποτελέσματα όμως που παρέχονται από τις δύο αυτές τεχνικές είναι ένα πολύπλοκο πακέτο δεδομένων. Έτσι, η εδραίωση της Μεταβολομικής, επετεύχθη με τη χρήση της Χημειομετρίας μέσω της πολυπαραμετρικής στατιστικής ανάλυσης των πολύπλοκων αυτών δεδομένων.

2.1 Προετοιμασία δειγμάτων πλάσματος για μεταβολομική ανάλυση.

Η προκατεργασία των δειγμάτων πλάσματος από όρνιθες στις οποίες είχαν χορηγηθεί μέσω της τροφής τους Εσπεριδίνη και Ναργινίνη για τη μεταβολομική ανάλυση περιελάμβανε καταβύθιση των πρωτεϊνών με ψυχρή ακετόνη (πλάσμα:ακετόνη 1:2 v/v), vortex,



φυγοκέντρηση στις 13,500 rpm για 10 λεπτά, μεταφορά υπερκειμένου σε περιέκτες erpendorf, εξατμίστηκε με φυγοκεντρική εξάτμιση σε όργανο Lysospeed HT-4X GenVac και ακολούησε επανασύσταση με μεθανόλη : νερό (50:50 v/v) πριν την ανάλυση.

2.2 Ανάλυση Δειγμάτων με τη χρήση UHPLC-HRMS.

Η ανάλυση LC-MS πραγματοποιήθηκε τόσο σε αρνητικό όσο και σε θετικό ιονισμό με τη χρήση συστήματος υδροχρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης (Accela-UHPLC) συζευγμένης με υβριδικό σύστημα γραμμικής και τροχιακής παγίδας σε σειρά (LTQ-ORBITRAP Velos).

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για λήψη των χρωματογραφημάτων ήταν η ACQUITY UPLC BEC C18 1.7μm με διαστάσεις 2.1x150 mm. Ο όγκος έγχυσης καθορίστηκε σε 5 μL, ενώ η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 40°C σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων. Ως κινητή φάση επιλέχθηκε το σύστημα διαλυτών νερό-0.1% οξικό οξύ (v/v) : ακετονιτρίλιο με βαθμιδωτή έκλυση. Το χρωματογραφικό πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:

| Time (min) | A (%) | B (%) | Flow Rate (μl/min) |
|------------|-------|-------|--------------------|
| 0 | 100 | 0 | 360 |
| 1 | 100 | 0 | 360 |
| 17 | 0 | 100 | 360 |
| 22 | 0 | 100 | 360 |
| 22.5 | 100 | 0 | 360 |
| 24 | 100 | 0 | 360 |

όπου, **A:** H₂O, 0.1% (v/v) οξικό οξύ

B: Acetonitrile



Η μελέτη φασματομετρίας μάζας περιλάμβανε την ανάλυση των δειγμάτων με την χρήση της τροχιακής παγίδας ιόντων σε διαχωριστική ικανότητα 30.000. Ως μέθοδος σχηματισμού ιόντων χρησιμοποιήθηκε ο ηλεκτροψεκασμός (electrospray). Η περιοχή μάζας της ανάλυσης ορίστηκε στο εύρος m/z 90-900, ενώ η καταγραφή των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στην κεντροειδή μορφή τους (centroid mode). Δεν χρησιμοποιήθηκε λίστα αποκλεισμού ιόντων. Οι παράμετροι λήψης των φασμάτων μάζας που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 1 που ακολουθεί.

| Parameters | ESI (-) | ESI (+) |
|------------------------------|---------|---------|
| Capillary Temperature (°C) | 356 | 356 |
| Capillary Voltage (V) | 20 | -60 |
| Tube lens (V) | -49 | 110 |
| Spray voltage (kV) | 3.10 | 3.50 |
| Sheath gas flow (arb. units) | 30 | 30 |
| Aux gas flow (arb. Units) | 10 | 10 |

Πίνακας 1. Παράμετροι λήψης φασμάτων μάζας για την ανάλυση των δειγμάτων πλάσματος στον αρνητικό και θετικό ιονισμό.



2.3 Ανάλυση των χρωματογραφημάτων με χρήση του προγράμματος Mzmine

2.11.

Τα δεδομένα που συλλέχτηκαν επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Mzmine 2.11 (<http://mzmine.sourceforge.net/>) για την ανίχνευση και την αποσύζευξη των κορυφών, την κανονικοποίηση των χρωματογραφημάτων, τη διόρθωση της γραμμής βάσης και την αφαίρεση του θορύβου. Σκοπός ήταν η δημιουργία πίνακα δεδομένων για την περαιτέρω στατιστική ανάλυση. Ακολουθήθηκαν δυο μεθοδολογίες. Στην πρώτη, οι παράμετροι και η επεξεργασία έγινε στο συνολικό χρωματογράφημα εύρους m/z 90-900 (scan range 90-900 m/z) και στη δεύτερη τα χρωματογραφήματα επεξεργάστηκαν με το ειδικό φίλτρο (crop-filter) με το οποίο τα φάσματα τεμαχίστηκαν ανά συγκεκριμένες μονάδες μάζας (100 m/z). Οι βασικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν και για τις δυο μεθοδολογίες αναφέρονται στους πίνακα 2 και 3.

Για λόγους συντομίας θα παρουσιαστούν αναλυτικά τα αποτελέσματα από την επεξεργασία των δεδομένων του αρνητικού ιονισμού συγκρίνοντας την ομάδα μάρτυρα (όρνιας στις οποίες δεν είχε γίνει χορήγηση) με την ομάδα χορήγησης Ναργινίνη. Παρόμοια μεθοδολογία ακολουθήθηκε και για τη σύγκριση της ομάδας μάρτυρα με την ομάδα χορήγησης Εσπεριδίνης. Τα αποτελέσματα από τη χορήγηση της Εσπεριδίνης θα παρουσιαστούν στην παράγραφο συμπεράσματα.



| Parameters | Mass range (m/z) |
|-----------------------------|------------------|
| | 90-900 |
| Noise level | 5E5 |
| Minimum height | 7E5 |
| Chromatograph deconvolution | Baseline cut-off |
| Retention time tolerance | 0.08 min |
| Alignment | Join aligner |

Πίνακας 2. Βασικές παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στο πρόγραμμα Mzmine 2.11 για την επεξεργασία των δειγμάτων πλάσματος σε χρωματογραφήματα εύρους 90-900 m/z.

| Parameters | Mass range (m/z) | | | | | | | |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 100-200 | 200-300 | 300-400 | 400-500 | 500-600 | 600-700 | 700-800 | 800-900 |
| Noise level | 1E4 | 2E4 | 1E4 | 1E4 | 1E4 | 2.5E4 | 2E4 | 2.5E4 |
| Minimum height | 2E4 | 4E4 | 2E4 | 2E4 | 2E4 | 5E4 | 4E4 | 5E4 |
| Chromatograph deconvolution | Baseline cut-off | Baseline cut-off | Baseline cut-off | Baseline cut-off | Baseline cut-off | Baseline cut-off | Baseline cut-off | Baseline cut-off |
| Retention time tolerance (min) | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 |



| | | | | | | | | |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Alignment | Join aligner | Join aligner | Join aligner | Join aligner | Join aligner | Join aligner | Join aligner | Join aligner |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|

Πίνακας 3. Παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν στο πρόγραμμα Mzmine 2.11 για την επεξεργασία των δειγμάτων πλάσματος ύστερα από την επεξεργασία τους με ειδικό φίλτρο (crop-filter).

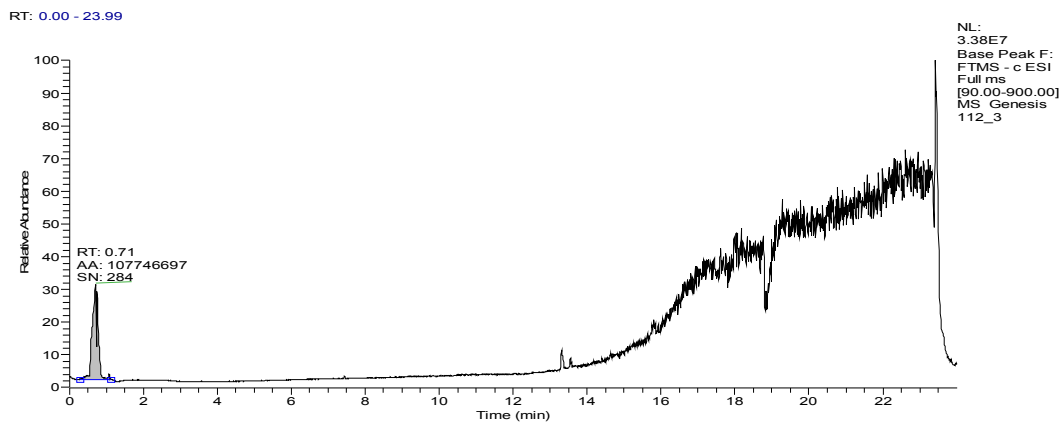
Στα νέα δεδομένα εφαρμόστηκε πολυπαραμετρική στατιστική ανάλυση μέσω του λογισμικού SIMCA-P+ 11.5 και της διαδικτυακής πλατφόρμας MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>).

Σκοπός ήταν η μελέτη διαχωρισμού των δυο ομάδων (δείγματα ομάδας μάρτυρα-δείγματα από όρνιθες στις οποίες είχε χορηγηθεί Ναργινίνη μέσω της τροφής τους) και η εύρεση των στατιστικά σημαντικότερων μεταβολιτών που διαφοροποιούνται μεταξύ των δυο ομάδων.

2.3.1 Επεξεργασία των χρωματογραφήματων εύρους m/z 90-900 amu.

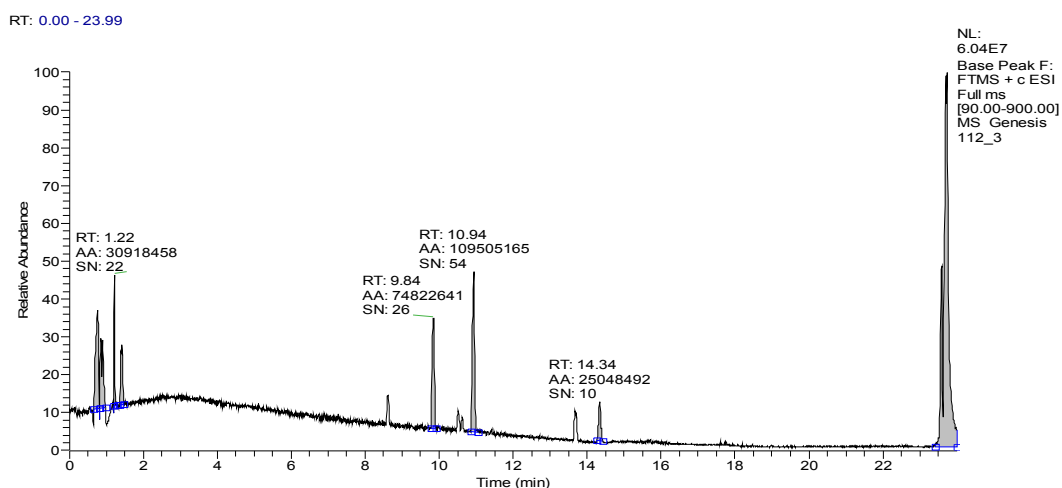
Ένα χρωματογράφημα περιέχει περίπου 5000 σαρώσεις από φάσματα μάζας. Στις εικόνες 1,2 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα χρωματογραφήματα μάζας αρνητικού και θετικού ιονισμού ενός δείγματος πλάσματος από όρνιθα στην οποία είχε χορηγηθεί Ναργινίνη μέσω της τροφής.





Εικόνα 1.

Χρωματογράφημα μάζας αρνητικού ιονισμού δείγματος πλάσματος από όρνιθα στην οποία είχε χορηγηθεί Ναργινίνη μέσω της τροφής.



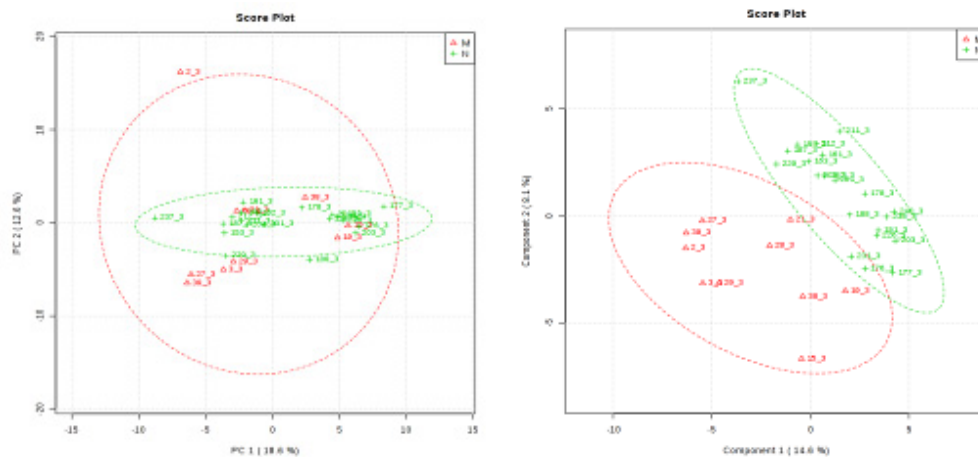
Εικόνα 2.

Χρωματογράφημα μάζας θετικού ιονισμού δείγματος πλάσματος από όρνιθα στην οποία είχε χορηγηθεί Ναργινίνη μέσω της τροφής.

Τα δεδομένα που συλλέχτηκαν μετά την επεξεργασία από το Mzmine2.11 επεξεργάστηκαν εκ νέου μέσω του λογισμικού SIMCA-P+ 11.5 και της διαδικτυακής πλατφόρμας MetaboAnalyst 3.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>). Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η μη



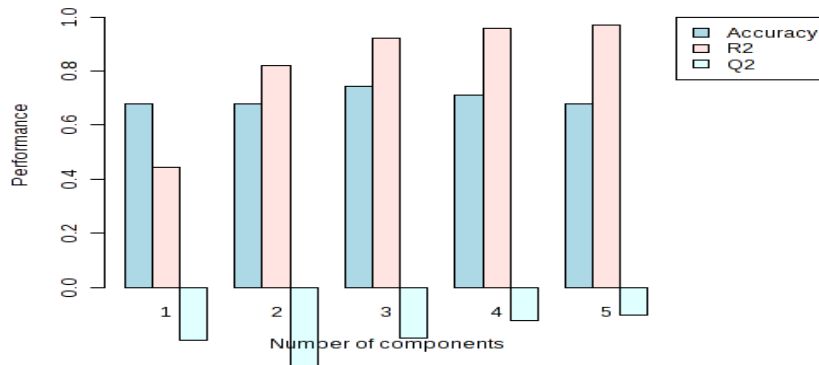
επιβλεπόμενη μέθοδος ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) και η επιβλεπόμενη μέθοδος ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares -Discriminant Analysis, PLS-DA) προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τον διαχωρισμό των δυο ομάδων (Εικόνα 3).



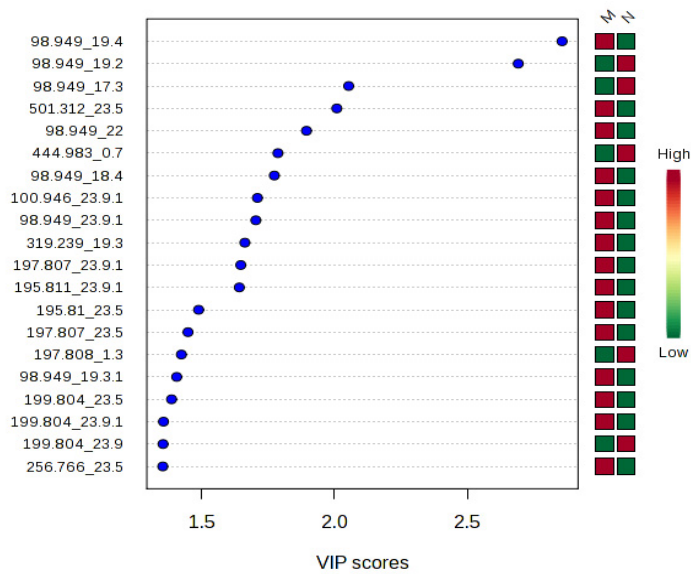
Εικόνα 3. Διαγράμματα αντικειμένων PCA και PLS-DA στα χρωματογραφήματα εύρους 90-900 m/z με UV scaling, ώστε κάθε μεταβλητή να έχει την ίδια στατιστική συνεισφορά στο μοντέλο.

Από τα διαγράμματα αντικειμένων μόνο του PLS-DA παρατηρείται διαφορά μεταξύ των μεταβολικών προφίλ των δυο ομάδων με αρνητική όμως προβλεπτική ικανότητας (Q2) (Εικόνα 4). Παρόλα αυτά εξήχθησαν μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας MetaboAnalyst 3.0 τα διαγράμματα των στατιστικά σημαντικότερων μεταβολιτών (VIP) ώστε να εκτιμηθούν οι μεταβολίτες εκείνοι στους οποίους οφείλεται ο διαχωρισμός των δυο ομάδων (Εικόνα 5).





Εικόνα 4. Προβλεπτική ικανότητα (Q2) και συντελεστής συσχέτισης (R2) του μοντέλου των χρωματογραφημάτων εύρους m/z 90-900.



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Εικόνα 5. Διάγραμμα των στατιστικά σημαντικότερων μεταβολιτών (VIP) σύμφωνα με την PLS-DA με UV scaling όπου φαίνεται σε ποια ομάδα υπερτερεί ο κάθε μεταβολίτης.

Οι μεταβολίτες αξιολογήθηκαν με βάση τα εξής κριτήρια: **1.** Ο λόγος σήμα/θόρυβο (signal/noise ratio) να είναι μεγαλύτερος από 10, **2.** Ο αριθμός των σαρώσεων της κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος (scans) να είναι μεγαλύτερος από 12, **3.** m/z tolerance = ± 0.01 amu και **4.** Η ισοτοπική αναλογία. Παράλληλα, για αυτούς τους μεταβολίτες πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία Student's (t-test) στα μη επεξεργασμένα δεδομένα με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Από την επεξεργασία προέκυψε μόνον ένας πιθανός μεταβολίτης (Πίνακας 4).

| m/z | Χρόνος Ανάσχεσης (Retention Time, min) | p-value |
|---------|---|---------|
| 501.312 | 23.5 | 0.051 |

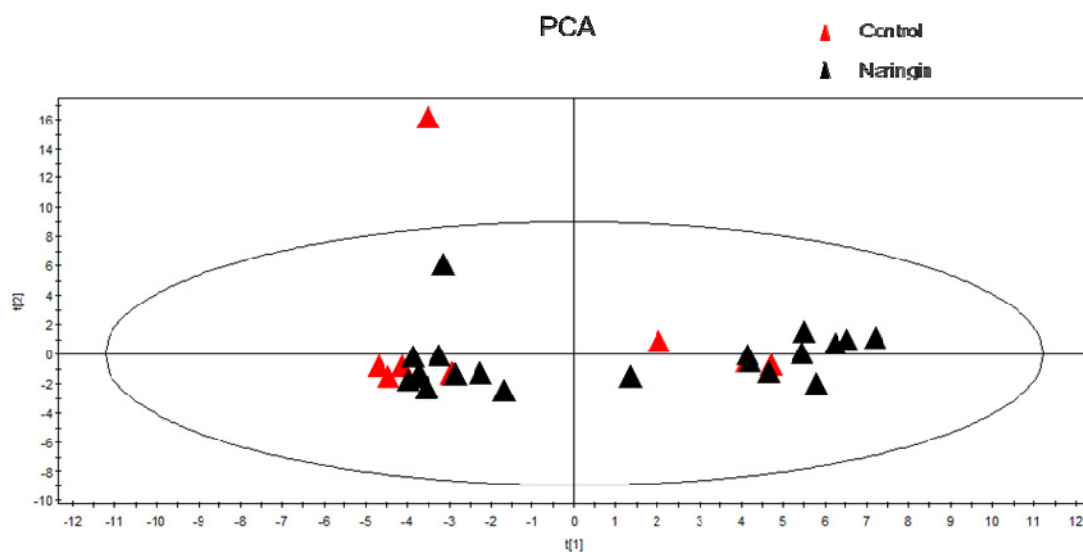
Πίνακας 4. Πιθανός μεταβολίτης στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός των δυο ομάδων, ύστερα από την επεξεργασία των χρωματογραφήματων εύρους m/z 90-900.

Ωστόσο, το μοντέλο που προέκυψε από τις επιβλεπόμενες και μη μεθόδους PLS-DA και PCA δεν μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστο εξαιτίας της μειωμένης προβλεπτικής ικανότητας του (Q2).

Προκειμένου να μελετήσουμε την επίδραση του θορύβου των χρωματογραφήματων στην προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου, συγκεντρώσαμε τους 90 στατιστικά σημαντικότερους



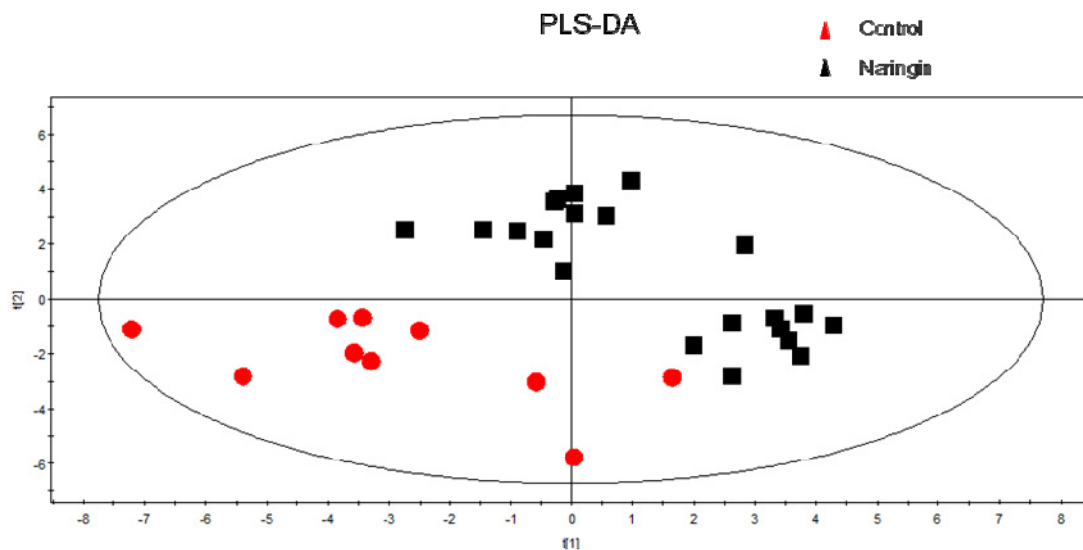
μεταβολίτες (Variable Importance in Projection, VIP) που είχαν εξαχθεί από τα διαγράμματα αντικειμένων του PLS-DA. Στα δεδομένα αυτά πραγματοποιήθηκαν οι επιβλεπόμενες και μη μέθοδοι ανάλυσης PLS-DA και PCA, αντιστοίχως. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες 6 και 7.



Εικόνα

6. Διάγραμμα αντικειμένων PCA των 90 στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών που προέκυψαν από την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων εύρους m/z 90-900 με UV scaling, με τιμή $Q2(cum)=0.0902$.

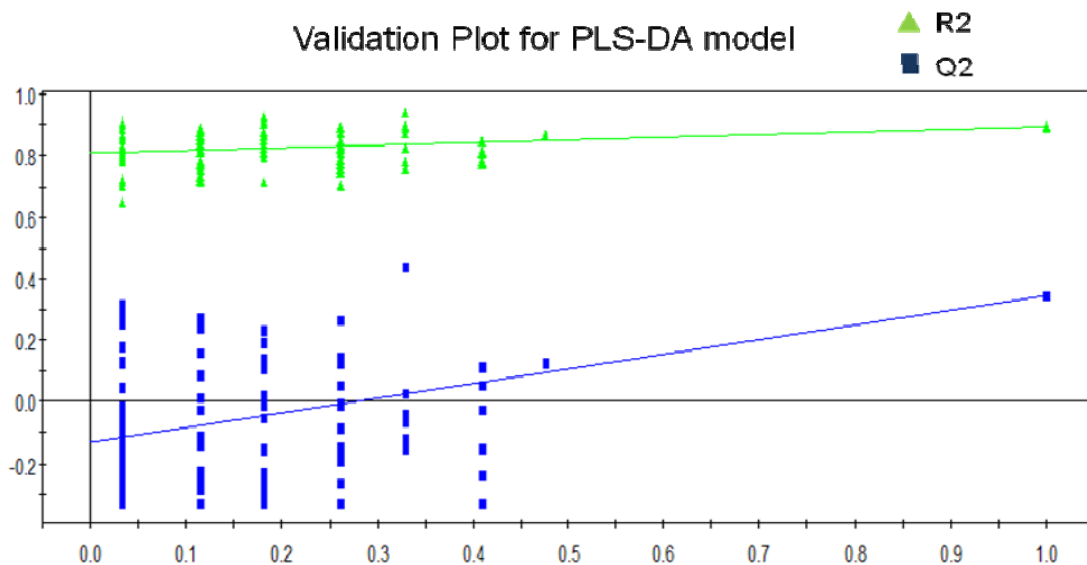




Εικόνα 7. Διάγραμμα αντικειμένων PLS-DA των 90 στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών που προέκυψαν από την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων εύρους m/z 90-900 με UV scaling και με τιμές $R^2Y(cum)=0.893/Q^2(cum)=0.345$.

Στο PLS-DA μοντέλο πραγματοποιήθηκε και η δοκιμασία των τυχαίων αλλαγών (permutation test) με 100 τυχαίες αλλαγές (permutations) με σκοπό να συγκριθεί η περιγραφική και προβλεπτική ικανότητα του πραγματικού μοντέλου με αυτές των τυχαίων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 8.





Εικόνα 8. Δοκιμασία τυχαίων αλλαγών στο PLS-DA μοντέλο των 90 στατιστικά σημαντικών μεταβολιτών που προέκυψαν από την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων εύρους m/z 90-900.

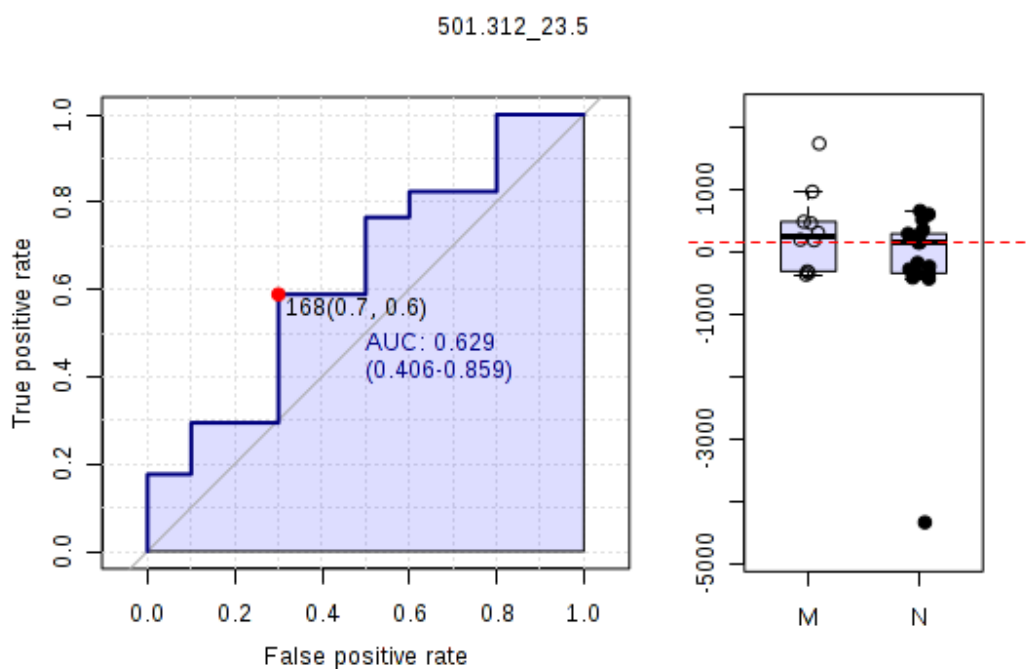
Από τη δοκιμασία, παρατηρείται ότι το μοντέλο με τις τρεις κύριες συνιστώσες θεωρείται οριακά αξιόπιστο καθώς οι τιμές του Q2 είναι ελάχιστα μεγαλύτερες από τις τυχαίες τιμές, ενώ οι τιμές του R2 παρουσιάζουν την ίδια τάση.

2.3.1.1 Επικύρωση υποψήφιων μεταβολιτών.

Η Μεταβολομική στρέφει το ενδιαφέρον της προς την ανάδειξη μεταβολιτών που σχετίζονται με τη διάγνωση ή/και την πρόβλεψη μιας ασθένειας. Παρόλα αυτά, σε ελάχιστες μελέτες αναφέρονται στοιχεία για την ευαισθησία και την ειδικότητα του υποψήφιου μεταβολίτη. Ακόμη λιγότερες είναι οι μεταβολομικές μελέτες οι οποίες παραθέτουν την καμπύλη



Λειτουργικού Χαρακτηριστικού Δέκτη (Receiver Operator Characteristic, ROC) που σχετίζεται με την αξιολόγηση ενός πιθανού μεταβολίτη. Η κατασκευή της καμπύλης ROC θεωρείται μια αντικειμενική και στατιστικά έγκυρη δοκιμασία. Τα στοιχεία που αξιολογούνται σε μια καμπύλη ROC είναι η ειδικότητα, η ευαισθησία και είναι η περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area Under Curve, AUC). Τιμές AUC μικρότερες του 0.6 υποδηλώνουν αποτυχία στην ταξινόμηση. Οι αποδεκτές τιμές ευαισθησίας και ειδικότητας κατά τη μέτρηση ενός άγνωστου δείγματος είναι άνω των 0.95 και 0.6, αντιστοίχως. Στην παρούσα εργασία για την αξιολόγηση των πιθανών μεταβολιτών κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ROC με τη βοήθεια της διαδικτυακής πλατφόρμας ROCcET (<http://www.roccet.ca/ROCCET/>) (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Καμπύλη ROC για το πιθανό μεταβολίτη m/z 501.312 ύστερα από την επεξεργασία των χρωματογραφήματων με εύρος m/z 90-900, στον αρνητικό ιονισμό.

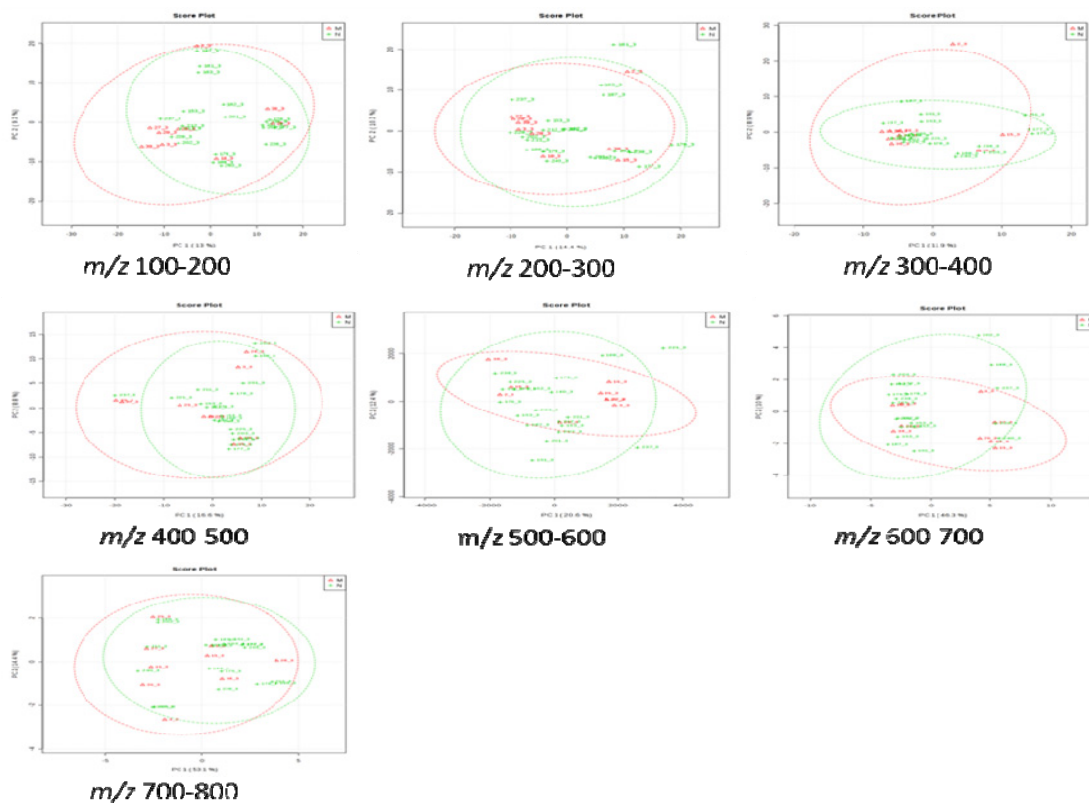
Με βάση το παραπάνω γράφημα διαπιστώνουμε πως η ταξινόμηση είναι μη ικανοποιητική αφού ο συγκεκριμένος πιθανός μεταβολίτης παρουσιάζει διαφορική έκφραση σε ένα μόνο δείγμα και άρα δεν επαρκεί να διαχωρίσει στατιστικά τις δύο ομάδες χωρίς την πιθανότητα σημαντικού αριθμού ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων .

2.3.2 Επεξεργασία των crop-filter χρωματογραφήματων.

Τα δεδομένα που συλλέχτηκαν ύστερα από την επεξεργασία μέσω του προγράμματος Mzmine 2.11, επεξεργάστηκαν τόσο μέσω του λογισμικού SIMCA-P+ 11.5 όσο και της διαδικτυακής πλατφόρμας MetaboAnalyst 3.0, προκειμένου να αναζητηθούν οι κατάλληλες παράμετροι (κανονικοποίηση, προσαρμογή της κλίμακας των δεδομένων).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η μη επιβλεπόμενη μέθοδος ανάλυσης κυρίων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τον διαχωρισμό μεταξύ των δειγμάτων. Όπως φαίνεται στην εικόνα 10 παρατηρείται ο μη διαχωρισμός των ομάδων στα crop-filter χρωματογραφήματα.

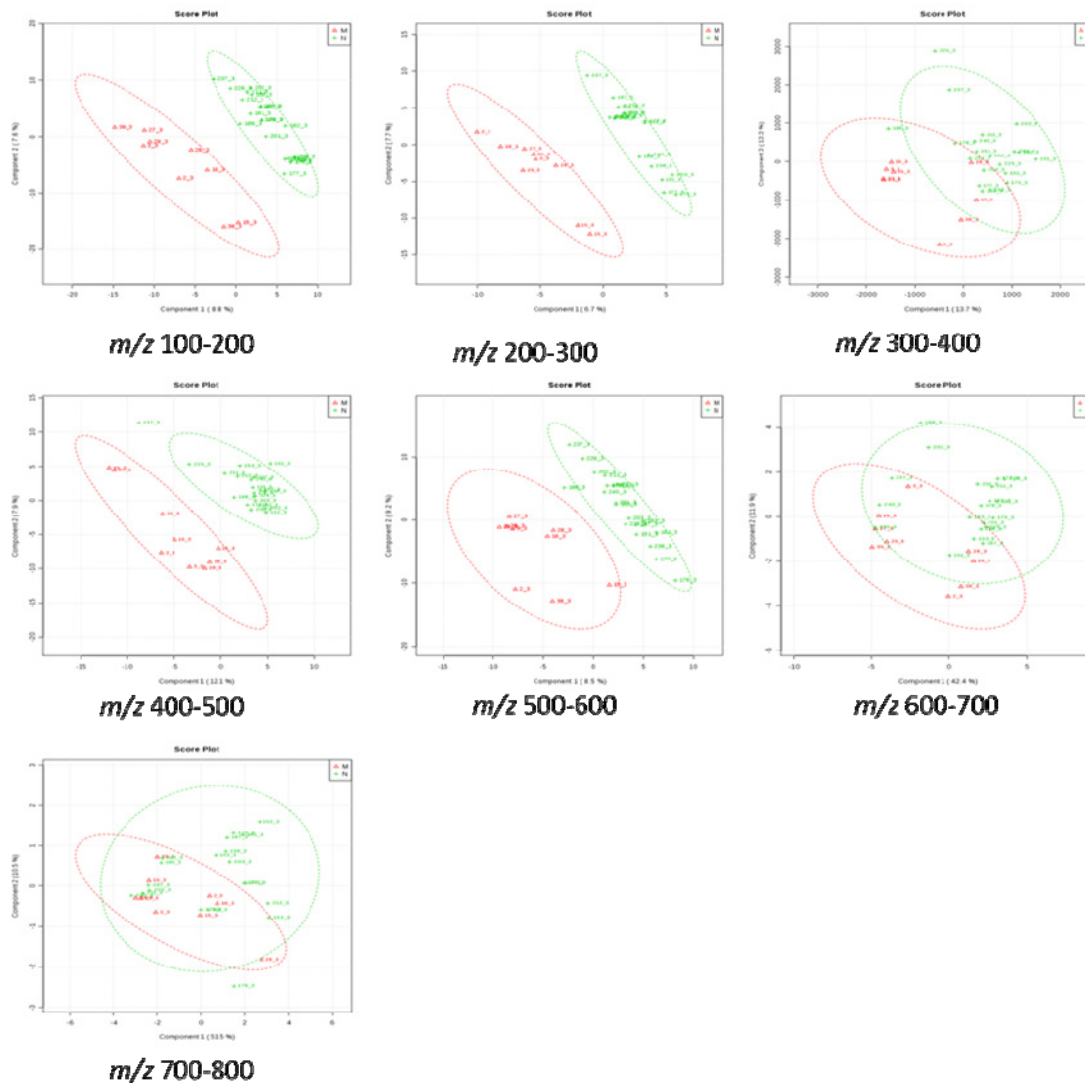




Εικόνα 10. Διάγραμμα αντικειμένων PCA για κάθε crop-filter μεταξύ της ομάδας ορνίθων που δεν τους είχε χορηγηθεί μέσω της τροφής η Ναργινίνη (control) και της ομάδας που τους χορηγήθηκε η Ναργινίνη μέσω της τροφής τους, με UV scaling ώστε κάθε μεταβλητή να έχει την ίδια στατιστική συνεισφορά στο μοντέλο.

Για τα δείγματα ακολούθησε η ανάλυση με την επιβλεπόμενη μέθοδο ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares -Discriminant Analysis, PLS-DA) για κάθε εύρος μάζας (Εικόνα 11).

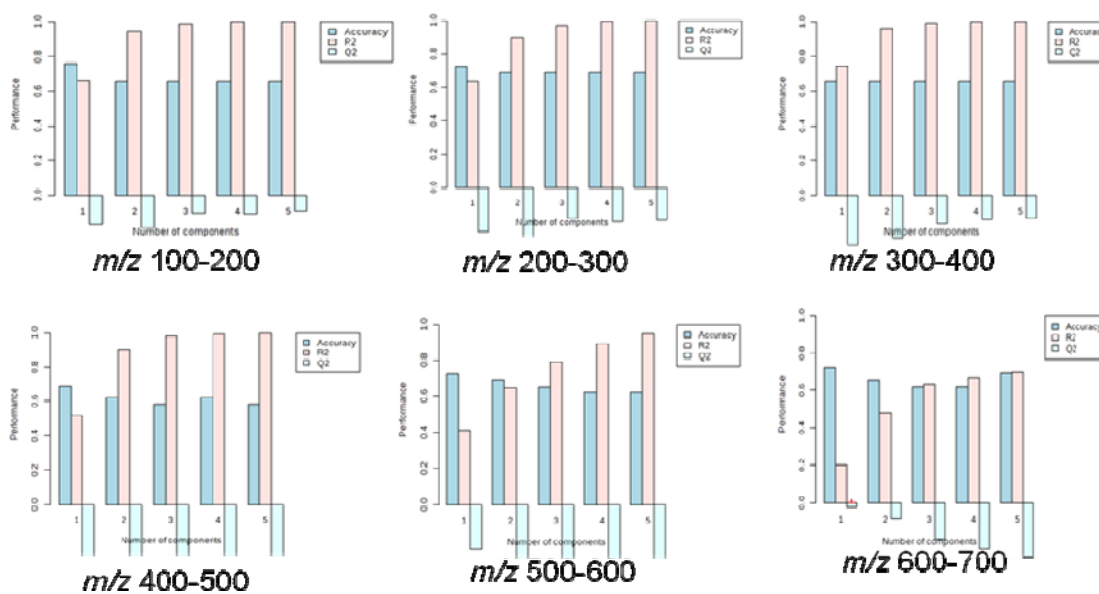




Εικόνα 11. Διαγράμματα αντικειμένων PLS-DA της ομάδας ορνίθων που δεν τους είχε χορηγηθεί μέσω της τροφής η Ναργινίνη (control) και της ομάδας που τους χορηγήθηκε η Ναργινίνη για κάθε crop-filter.

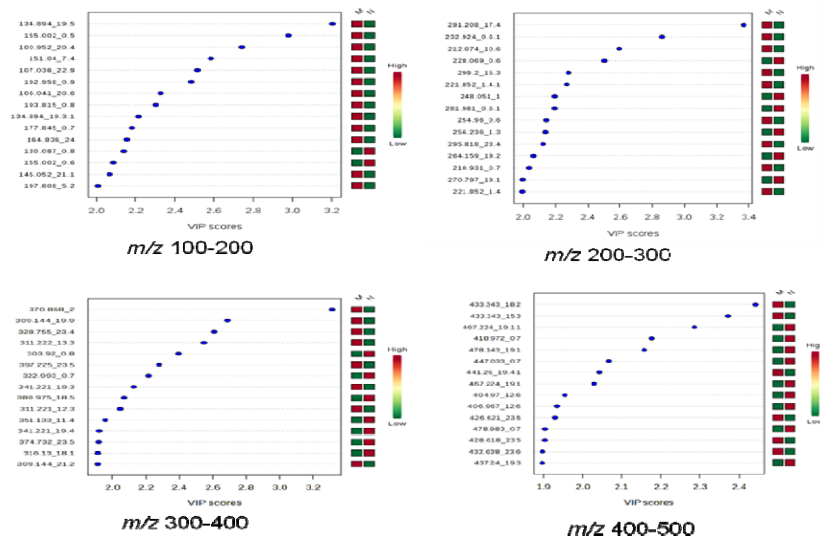


Από τα διαγράμματα αντικειμένων του PLS-DA γίνεται φανερή η ύπαρξη διαφοράς μεταξύ των μεταβολικών προφίλ των δυο ομάδων μέχρι και το εύρος m/z 600-700. Ωστόσο, η προβλεπτική (Q2) ικανότητα του μοντέλου σε κάθε εύρος μάζας ήταν αρνητική (Εικόνα 12) πιθανότατα λόγω υψηλού θορύβου στα χρωματογραφήματα. Παρόλα αυτά εξήχθησαν μέσω της διαδικτυακής πλατφόρμας MetaboAnalyst 3.0 τα διαγράμματα των στατιστικά σημαντικότερων μεταβολιτών (VIP) ώστε να εκτιμηθούν οι μεταβολίτες εκείνοι οι οποίοι οδηγούν στον διαχωρισμό των δυο ομάδων (Εικόνα 13).



Εικόνα 12. Προβλεπτική ικανότητα (Q2) και συντελεστής συσχέτισης (R2) για κάθε εύρος μάζας.





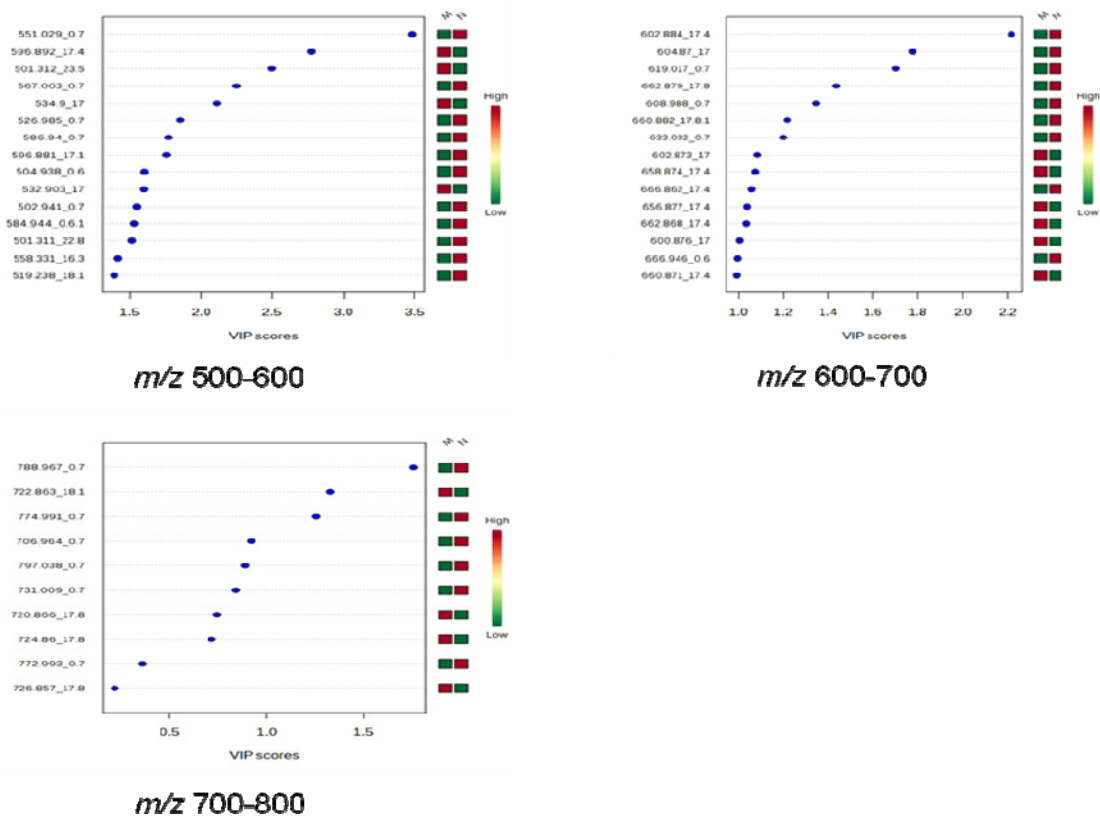
Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ, ΠΟΛΙΤΙΣΜΟΥ & ΑΘΛΗΤΙΣΜΟΥ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Εικόνα 13. Διάγραμμα των στατιστικά σημαντικότερων μεταβολιτών σύμφωνα με την PLS-DA με UV scaling όπου φαίνεται σε ποια ομάδα υπερτερεί ο κάθε μεταβολίτης.

Οι μεταβολίτες αξιολογήθηκαν με βάση τα εξής κριτήρια: **1.** Ο λόγος σήμα/θόρυβο (signal/noise ratio) να είναι μεγαλύτερος από 10, **2.** Ο αριθμός των σαρώσεων της κάθε κορυφής του χρωματογραφήματος (scans) να είναι μεγαλύτερος από 12, **3.** m/z tolerance = ± 0.01 amu και **4.** Η ισοτοπική αναλογία. Παράλληλα, για αυτούς τους μεταβολίτες πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία Student's (t-test) στα μη επεξεργασμένα δεδομένα με



επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Με βάση τα παραπάνω κριτήρια καταλήξαμε στους πιθανούς μεταβολίτες που αναφέρονται στον πίνακα 5.

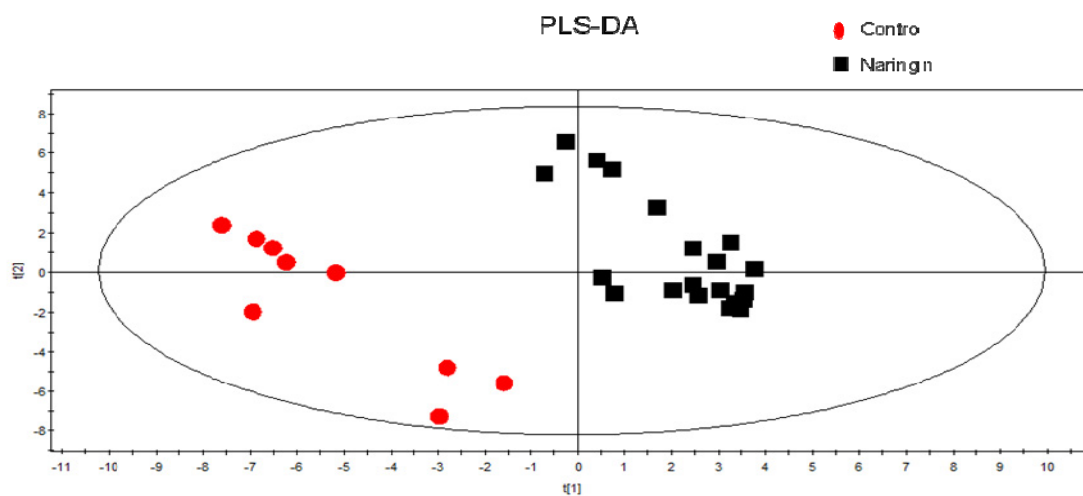
| <i>m/z</i> | Χρόνος Ανάσχεσης (Retention time, min) | p-value |
|------------|---|---------|
| 151.04 | 7.4 | 0.011 |
| 341.221 | 19.3 | 0.024 |
| 316.13 | 18.1 | 0.013 |
| 404.97 | 12.6 | 0.008 |
| 406.967 | 12.6 | 0.009 |
| 551.029 | 0.7 | 0.058 |
| 567.003 | 0.7 | 0.026 |

Πίνακας 5. Πιθανοί μεταβολίτες στους οποίους οφείλεται ο διαχωρισμός των δυο ομάδων, ύστερα από την επεξεργασία των crop-filter χρωματογραφημάτων.

Συμπερασματικά, από τα διαγράμματα αντικειμένων γίνεται φανερή η ύπαρξη διαφοράς μεταξύ των μεταβολικών προφίλ των δυο ομάδων ορνίθων. Ωστόσο, τα μοντέλα που προέκυψαν από τις επιβλεπόμενες και μη μεθόδους PLS-DA και PCA δεν μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα εξαιτίας της μειωμένης προβλεπτικής ικανότητας τους (Q2).

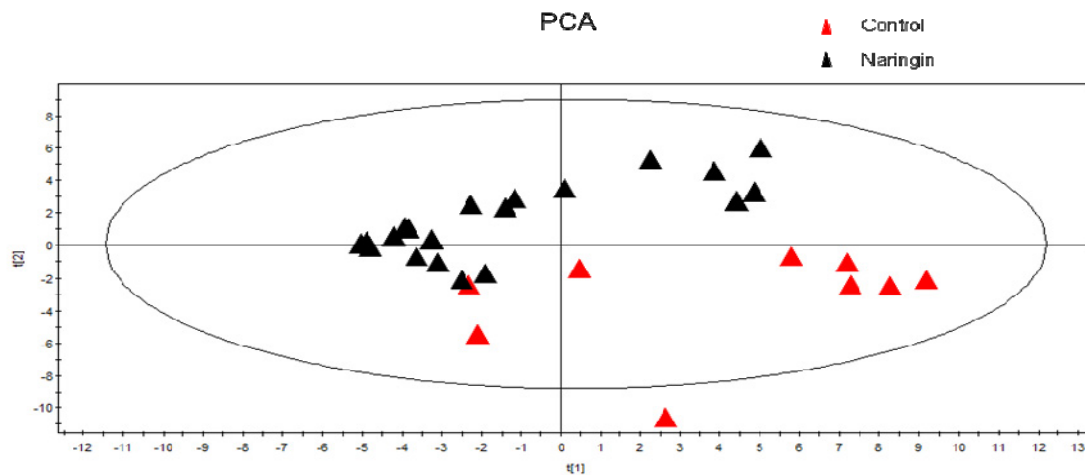


Προκειμένου να μελετήσουμε την επίδραση του θορύβου των χρωματογραφημάτων στην προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου, συγκεντρώσαμε τους 90 στατιστικά σημαντικότερους μεταβολίτες (VIP) από τα crop-filter δεδομένα. Στα δεδομένα αυτά πραγματοποιήθηκαν οι επιβλεπόμενες και μη μέθοδοι ανάλυσης PLS-DA και PCA, αντιστοίχως, παρατηρώντας το διαχωρισμό των ομάδων ακόμη και στην μη επιβλεπόμενη μέθοδο PCA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες 14 και 15.



Εικόνα 14. Διάγραμμα αντικειμένων PLS-DA των 90 στατιστικά σημαντικότερων μεταβολιτών (VIP) από τα crop-filter δεδομένα και με τιμές $R^2Y(cum)=0.978/Q^2(cum)=0.798$.

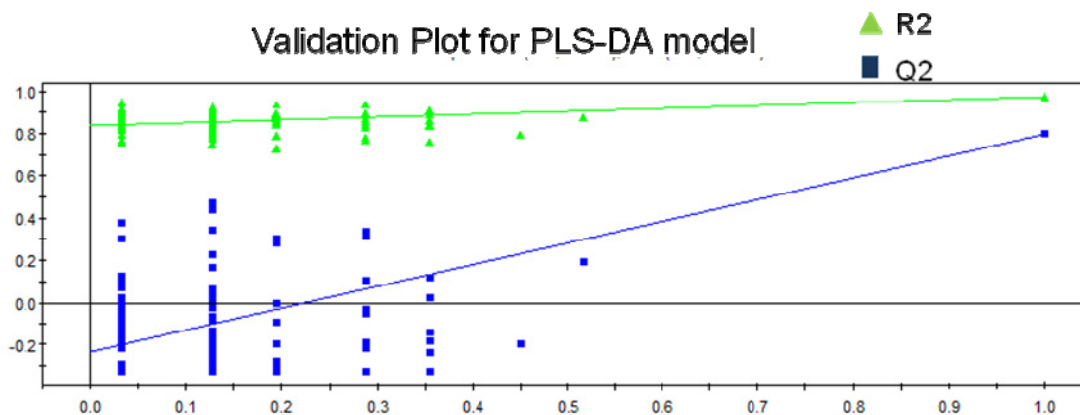




Εικόνα 15. Διάγραμμα αντικειμένων PCA των 90 στατιστικά σημαντικότερων μεταβολιτών (VIP) από τα crop-filter δεδομένα με UV scaling και με τιμές $Q2(\text{cum})=0.0689$.

Στο PLS-DA μοντέλο πραγματοποιήθηκε και η δοκιμασία των τυχαίων αλλαγών (permutation test) με 100 τυχαίες αλλαγές (permutations) με σκοπό να συγκριθεί η περιγραφική και προβλεπτική ικανότητα του πραγματικού μοντέλου με αυτές των τυχαίων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 16.





Εικόνα 16 . Δοκιμασία τυχαίων αλλαγών στο PLS-DA μοντέλο των 90 στατιστικά σημαντικότερων μεταβολιτών που προέκυψαν από την επεξεργασία των crop-filter χρωματογραφημάτων.

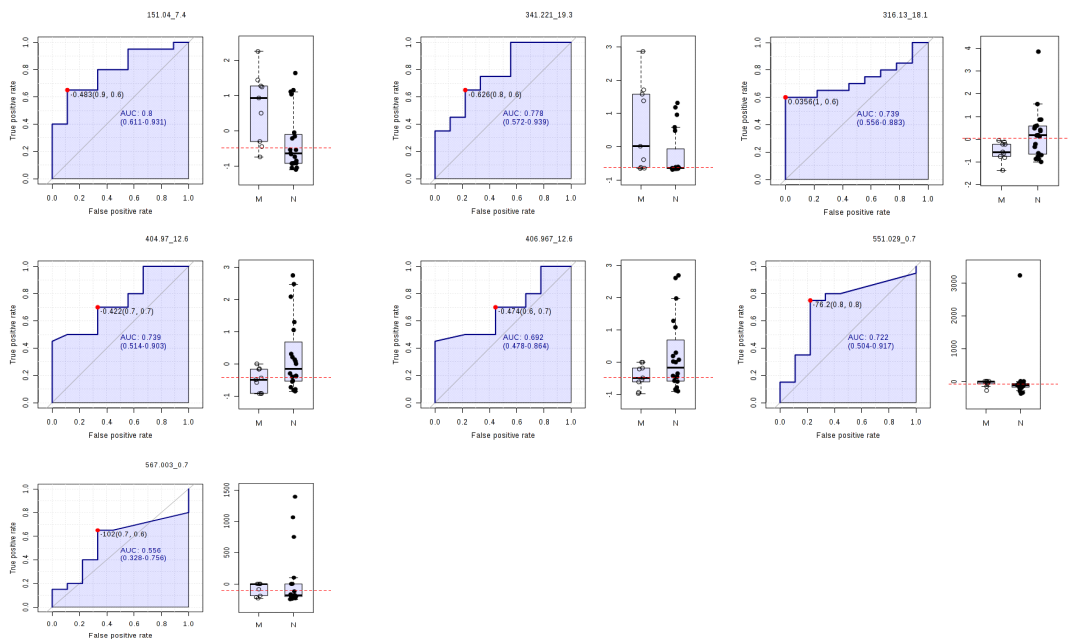
Από τη δοκιμασία, παρατηρείται η μεγάλη ισχύς του μοντέλου με τις τρεις κύριες συνιστώσες. Οι τιμές των R2 και Q2 των τυχαίων μοντέλων είναι χαμηλότερες σε σχέση με το πραγματικό επιτρέποντας μας να το θεωρήσουμε αξιόπιστο και ισχυρό.

2.3.2.1 Επικύρωση υποψήφιων μεταβολιτών.

Οι πιθανοί μεταβολίτες που ανιχνεύτηκαν κατά την επεξεργασία των crop-filter χρωματογραφημάτων αξιολογήθηκαν μέσω της κατασκευής καμπύλης Λειτουργικού Χαρακτηριστικού Δέκτη (Receiver Operator Characteristic, ROC). Τα στοιχεία που αξιολογήθηκαν ήταν η ειδικότητα, η ευαισθησία και είναι η περιοχή κάτω από την καμπύλη (Area Under Curve, AUC). Τιμές AUC μικρότερες του 0.6 υποδηλώνουν αποτυχία στην ταξινόμηση. Οι αποδεκτές τιμές ευαισθησίας και ειδικότητας κατά τη μέτρηση ενός άγνωστου δείγματος είναι άνω των 0.95 και 0.6, αντιστοίχως. Στην παρούσα εργασία, για την αξιολόγηση



των πιθανών μεταβολιτών κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ROC με τη βοήθεια της διαδικτυακής πλατφόρμας ROCcET (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Καμπύλες ROC για τους πιθανούς μεταβολίτες m/z 151.04, 341.221, 316.13, 404.97, 406.967, 551.029 και 567.003 ύστερα από την επεξεργασία των crop-filter χρωματογραφημάτων σε αρνητικό ιονισμό.

Με βάση τα παραπάνω γραφήματα διαπιστώνουμε πως η ταξινόμηση είναι ικανοποιητική και αποδεκτή για τους πιθανούς μεταβολίτες m/z 151.04, 341.221 και 316.13 τόσο με βάση την AUC όσο και με βάση την ειδικότητα και την ευαισθησία. Οι πιθανοί μεταβολίτες m/z 404.97 και 406.967 παρουσιάζουν οριακή αποδοχή, ενώ για τους πιθανούς μεταβολίτες m/z 551.029



και 567.003 η ταξινόμηση είναι μη αποδεκτή επειδή παρουσιάζουν διαφορεική έκφραση σε μικρό αριθμό δειγμάτων (1 και 3 δείγματα , αντιστοίχως).

3. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία, αναλύθηκαν δείγματα πλάσματος από όρνιθες στις οποίες είχε χορηγηθεί μέσω της τροφής τους η Ναργινίνη και η Εσπεριδίνη καθώς και δείγματα από όρνιθες που δεν τους είχαν χορηγηθεί οι παραπάνω ουσίες (δείγματα control). Τα δείγματα αναλύθηκαν, μέσω πλήρους σάρωσης, με τη χρήση συστήματος υγροχρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης (Accela-UHPLC) συζευγμένης με υβριδικό σύστημα γραμμικής και τροχιακής παγίδας σε σειρά (LTQ-ORBITRAP Velos). Σκοπός ήταν η εύρεση πιθανών μεταβολιτών που διαφοροποιούν τις ομάδες χορήγησης από την ομάδα control.

Η επεξεργασία και η ανάλυση των δειγμάτων έγινε αρχικά στο συνολικό χρωματογράφημα εύρους m/z 90-900 (scan range 90-900 m/z) σύμφωνα με τις μέχρι σήμερα μεταβολομικές μεθοδολογίες. Ωστόσο, τα μοντέλα του προέκυπταν παρουσίαζαν αδυναμία προσαρμογής στα δεδομένα. Στην παρούσα εργασία προτείνουμε μια νέα μεθοδολογία, τόσο κατά την ανάλυση όσο και κατά την επεξεργασία των δεδομένων. Με τη χρήση ειδικού φίλτρου (crop-filter) μέσω του προγράμματος Mzmine 2.11 τα φάσματα τεμαχίστηκαν ανά συγκεκριμένες μονάδες μάζας (100 m/z). Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε crop-filter οδήγησαν σε μείωση του θορύβου και σε αύξηση του αριθμού των πιθανών μεταβολιτών. Παράλληλα, χρησιμοποιώντας τους στατιστικά σημαντικούς μεταβολίτες (VIP) και από τις δυο μεθοδολογίες δημιουργήσαμε μοντέλα με αποδεκτή ικανότητα πρόβλεψης και συντελεστή συσχέτισης. Ωστόσο, το μοντέλο που προέκυψε από τα crop-filter δεδομένα παρουσίαζε



υψηλότερη ικανότητα πρόβλεψης, παρατηρώντας το διαχωρισμό των δυο ομάδων ακόμη και στην μη επιβλεπόμενη μέθοδο PCA.

Από τα αποτελέσματα της επεξεργασίας, στα crop-filter χρωματογραφήματα εντοπίζαμε 7 στατιστικά σημαντικούς πιθανούς μεταβολίτες που διαφοροποιούν τις όρνιθες στις οποίες είχε χορηγηθεί η Ναργινίνη μέσω της τροφής τους από τις όρνιθες μάρτυρα στον αρνητικό ιονισμό, ενώ στο θετικό ιονισμό δεν βρέθηκε πιθανός μεταβολίτης που να πληροί τα κριτήρια αξιολόγησης.

Με βάση τις καμπύλες ROC που κατασκευάστηκαν διαπιστώσαμε την ικανοποιητική και αποδεκτή ταξινόμηση των δειγμάτων μέσω των πιθανών μεταβολιτών m/z 151.04, 341.221 και 316.13, θέτοντας ως κριτήρια την περιοχή κάτω της καμπύλης (AUC), την ειδικότητα και ευαισθησία, ενώ οι πιθανοί μεταβολίτες m/z 404.97 και 406.967 παρουσίαζαν οριακή αποδοχή. Οι πιθανοί μεταβολίτες m/z 551.029 και 567.003 παρουσίαζαν μη αποδεκτή ταξινόμηση λόγω διαφορετικής έκφρασης σε μικρό αριθμό δειγμάτων.

Στα χρωματογραφήματα εύρους m/z 90-900 εντοπίζαμε 1 στατιστικά σημαντικό μεταβολίτη που διαφοροποιεί τις δυο ομάδες, στον αρνητικό ιονισμό. Ωστόσο, η ταξινόμηση του με βάση την καμπύλη ROC κρίθηκε μη ικανοποιητική αφού ο συγκεκριμένος πιθανός μεταβολίτης παρουσίαζε διαφορετική έκφραση σε ένα μόνο δείγμα. Δεν εντοπίστηκε κάποιος μεταβολίτης που να πληροί τα κριτήρια στο θετικό ιονισμό.

Κατά την επεξεργασία των crop-filter χρωματογραφήματων από όρνιθες στις οποίες είχε χορηγηθεί η Εσπεριδίνη καταλήξαμε σε 3 στατιστικά σημαντικούς πιθανούς μεταβολίτες (Πίνακας 6) στον αρνητικό ιονισμό και 1 στο θετικό ιονισμό (Πίνακας 7). Κατά την επεξεργασία



των χρωματογραφημάτων εύρους m/z 90-900 από όρνιθες στις οποίες είχε χορηγηθεί η Εσπεριδίνη καταλήξαμε σε 1 στατιστικά σημαντικό πιθανό μεταβολίτη (Πίνακας 8) στον αρνητικό ιονισμό ενώ δεν εντοπίσαμε κάποιον μεταβολίτη που να πληροί τα κριτήρια στο θετικό ιονισμό.

| m/z | Χρόνος Ανάσχεσης (Retention Time, min) | p-value |
|---------|---|---------|
| 341.108 | 0.8 | 0.031 |
| 367.102 | 16.3 | 0.020 |
| 389.158 | 15.8 | 0.001 |

Πίνακας 6. Πιθανοί μεταβολίτες από την επεξεργασία των crop-filter χρωματογραφημάτων στους οποίους οφείλεται ο διαχωρισμός των δυο ομάδων ύστερα από τη χορήγηση της Εσπεριδίνης μέσω της τροφής, στον αρνητικό ιονισμό.

| m/z | Χρόνος Ανάσχεσης (Retention Time, min) | p-value |
|---------|---|---------|
| 391.284 | 19 | 0.044 |



Πίνακας 7. Πιθανός μεταβολίτης από την επεξεργασία των crop-filter χρωματογραφημάτων μετά από τη χορήγηση της Εσπεριδίνης μέσω της τροφής, στο θετικό ιονισμό.

| <i>m/z</i> | Χρόνος Ανάσχεσης (Retention Time, min) | p-value |
|------------|---|---------|
| 534.9 | 17 | 0.035 |

Πίνακας 8. Πιθανός μεταβολίτης από την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων εύρους *m/z* 90-900 στον οποίο οφείλεται ο διαχωρισμός των δυο ομάδων ύστερα από τη χορήγηση της Εσπεριδίνης μέσω της τροφής, στον αρνητικό ιονισμό.

Με βάση τις καμπύλες ROC διαπιστώνουμε πως η ταξινόμηση είναι ικανοποιητική και αποδεκτή για τους πιθανούς μεταβολίτες *m/z* 341.108 και 389.158 τόσο με βάση την AUC όσο και με βάση την ειδικότητα και την ευαισθησία. Ο πιθανός μεταβολίτης *m/z* 391.284 παρουσιάζει οριακή αποδοχή, ενώ για τους πιθανούς μεταβολίτες *m/z* 367.103 και 534.9 η ταξινόμηση είναι μη αποδεκτή επειδή παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση σε μικρό αριθμό δειγμάτων (5 και 1 δείγματα, αντιστοίχως).

Η Επιτροπή Πιστοποίησης Παραδοτέων

Π. Σιμιτζής

Μ. Χαρισμάδου

Π. Ζουμπουλάκης

Λέκτορας

Λέκτορας

Ερευνητής



