

**ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΑΝΟΙΚΤΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**

**ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ & ΝΕΥΡΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ»**

**ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΤΙΤΛΟΥ ΣΠΟΥΔΩΝ**

«Ανάπτυξη μεθόδων αναλυτικής πρόβλεψης για την αξιολόγηση της διατροφής και των επιπτώσεών της στη φλεγμονή, που συνδυάζουν ομικά δεδομένα, πληροφορίες διατροφής και δείκτες φλεγμονής»

Δήμητρα Παπαθανασίου

Επιβλέπων καθηγητής:

Χαρίδημος Κονδυλάκης

ΠΑΤΡΑ, ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2025

© Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο, 2025 Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της φοιτήτριας Δήμητρα Παπαθανασίου που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οποιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

“ Ανάπτυξη μεθόδων αναλυτικής πρόβλεψης για την αξιολόγηση της διατροφής και των επιπτώσεών της στη φλεγμονή, που συνδυάζουν ομικά δεδομένα, πληροφορίες διατροφής και δείκτες φλεγμονής ”

ΔΗΜΗΤΡΑ ΠΑΠΑΘΑΝΑΣΙΟΥ

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Χαρίδημος Κονδυλάκης

Μάριος Κροκίδης

## **Ευχαριστίες**

Ευχαριστώ τους γονείς μου που με ώθησαν σε κάθε βήμα να ξεπερνώ τον εαυτό μου και τον σύζυγο μου που με στηρίζει συνεχώς, καθώς χωρίς την δική του υποστήριξη δεν θα ήταν εφικτή η υλοποίηση αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Ευχαριστώ τον καθηγητή κύριο Χαρίδημο Κονδυλάκη που με ενθάρρυνε και με βοήθησε σημαντικά στην υλοποίηση αυτής της διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, όλους τους συμφοιτητές και καθηγητές του μεταπτυχιακού προγράμματος που στάθηκαν δίπλα μας σε αυτό το ταξίδι γνώσεων.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ:**

Με την παρούσα εργασία στοχεύσαμε στην διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ διατροφικών δεδομένων και δεικτών φλεγμονής αξιοποιώντας στατιστικά και υπολογιστικά εργαλεία. Ενσωματώσαμε δεδομένα από τρεις μελέτες και εφαρμόσαμε στατιστική ανάλυση και λειτουργικό εμπλουτισμό στα αποτελέσματά μας. Τα δεδομένα αντλήθηκαν από το GEO (Gene Expression Omnibus) αφού αναζητήσαμε μελέτες που σχετίζονται με την διαφορική έκφραση γονιδίων μετά από διατροφικές παρεμβάσεις. Αφού τα δεδομένα κανονικοποιήθηκαν, οργανώθηκαν σε τρεις διαφορετικές καταστάσεις που αντανακλούν χρονικές συνθήκες. Τα γονίδια που εντοπίστηκαν με σημαντική διαφορική έκφραση κατηγοριοποιήθηκαν σε upregulated και downregulated. Στην συνέχεια ακολούθησε ο λειτουργικός τους εμπλουτισμός ώστε να εντοπιστούν μοτίβα που σχετίζονται με γνωστά μονοπάτια μεταβολικών διεργασιών και ανοσολογικών αποκρίσεων κατά την φλεγμονώδη αντίδραση, από γνωστές βάσεις δεδομένων. Καταφέραμε να εντοπίσουμε και να αξιολογήσουμε την δράση συγκεκριμένων διατροφικών επιλογών στην φλεγμονή και στους μοριακούς μηχανισμούς που σχετίζονται με αυτή. Ο συνδυασμός ομικών δεδομένων και πολύπλοκων παραγόντων μπορεί να δείξει συσχετίσεις της διατροφής με την έναρξη, πορεία και έκταση φλεγμονωδών νοσημάτων. Μελλοντικές μελέτες που θα λαμβάνουν υπόψιν περισσότερους παράγοντες στην κατηγοριοποίηση και κανονικοποίηση των δεδομένων μπορεί να υποδείξει άγνωστες συσχετίσεις και μονοπάτια που αφορούν την επίδραση της διατροφής στην φλεγμονή.

**ABSTRACT:**

This present study, aims to investigate possible associations between dietary data and inflammation markers by utilizing statistical and computational tools. We integrated data from three studies and applied statistical analysis and functional enrichment to our results. The data were extracted from GEO (Gene Expression Omnibus) after searching for studies related to differential gene expression after nutritional interventions. After the data were normalized, they were organized into three different states that reflect time conditions. The genes identified with significant differential expression were categorized as upregulated and downregulated. This was followed by their functional enrichment in order to identify patterns related to known pathways of metabolic processes and immune responses during the inflammatory reaction, from known databases. We were able to identify and evaluate the results of specific dietary choices on inflammation and the molecular mechanisms associated with them. The combination of omic data and complex factors can show associations of diet on the trigger, course, and extent of inflammatory diseases. Future studies that take under consideration more factors in the categorization and normalization of data may indicate unknown associations and pathways regarding the effect of diet on inflammation.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	Η σχέση μεταξύ διατροφής και φλεγμονής.....	10
1.1	Υδατάνθρακες, γλυκαιμικός δείκτης και φυτικές ίνες.....	11
1.2	Λιπαρά οξέα και δείκτες φλεγμονής .....	12
1.3	Φλαβονοειδή και φλεγμονώδης αντίδραση .....	15
1.4	Καροτενοειδή και η σχέση τους με την φλεγμονή.....	17
2	Μέθοδοι αναλυτικής πρόβλεψης για την πορεία της φλεγμονής.....	21
2.1	Κατανόηση των Μεθόδων Ανάλυσης Δεδομένων .....	21
2.2	Σύνδεση Μεθόδων Ανάλυσης με τα Δεδομένα .....	24
2.3	Εφαρμογή Στατιστικής Ανάλυσης σε σύνολα δεδομένων .....	27
2.4	Αξιολόγηση του Μοντέλου.....	29
3	Υλικά και μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν .....	31
3.1	Δεδομένα που επιλέχθηκαν και προεπεξεργασία που έγινε.....	31
3.2	Στατιστική Ανάλυση.....	32
3.3	Ανάλυση εμπλουτισμού δεδομένων .....	34
3.4	Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων .....	35
4	Παρουσίαση αποτελεσμάτων, συζήτηση και μελλοντικές προοπτικές.....	37
4.1	Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης.....	37
4.2	Αποτελέσματα μελέτης εμπλουτισμού.....	44
4.3	Σύγκριση αποτελεσμάτων με αρχικές εργασίες.....	48
4.4	Συζήτηση αποτελεσμάτων και μελλοντική έρευνα .....	50

## **EΙΚΟΝΕΣ:**

- Εικόνα 1 Τρόφιμα που σχετίζονται με μείωση των φλεγμονωδών δεικτών σε ανθρώπινες παρεμβατικές μελέτες 20
- Εικόνα 2 Volcano plot σύγκρισης συνθηκών Visit1 vs Visit2 38
- Εικόνα 3 Volcano plot σύγκρισης συνθηκών Visit2 vs Visit3. Η τρίτη εργασία παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στα αποτελέσματα και έτσι παρατηρούμε και μία αύξηση στην διαφορική έκφραση γονιδίων μεταγευματικά. Βλέπουμε έναν σημαντικό αριθμό γονιδίων που εκφράζονται διαφορετικά ανάμεσα στις δύο συνθήκες. 39
- Εικόνα 4 Volcano plot σύγκρισης συνθηκών Visit1 vs Visit3. Τα αποτελέσματα μεταξύ Visit2 – Visit 3 και Visit1-Visit3 είναι παραπλήσια καθώς μελετάνε αποτελέσματα γονιδιακής έκφρασης μέσα σε χρονικό διάστημα ωρών όπου μεταγευματικά έχουμε την ενεργοποίηση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών που συνδέονται με διάφορες λειτουργίες. 40
- Εικόνα 5 Heatmap των 50 σημαντικότερων γονιδίων που βρέθηκαν να εκφράζονται στις διαφορετικές συνθήκες. 41
- Εικόνα 6 Αποτελέσματα KEGG Pathway Enrichment Analysis, στο barplot εμφανίζονται τα μονοπάτια που επιλέχθηκαν και σχετίζονται με την έναρξη, διάδοση και διακοπή της φλεγμονής. Παρατηρούμε πως εντοπίστηκαν γονίδια που σχετίζονται με μονοπάτια των MAPK και του NF-κΒ με σημαντική διαφορική έκφραση. 46
- Εικόνα 7 Dotplot με αποτελέσματα της ανάλυσης GO, το μέγεθος κάθε κουκίδας είναι αναλογικό με τον αριθμό των γονιδίων που εντοπίστηκαν ενώ το χρώμα είναι ενδεικτικό για την ένταση της έκφρασης. 47

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

---

Η σύγχρονη έρευνα στον τομέα της υγείας επικεντρώνεται όλο και περισσότερο στην ανάπτυξη προσωποποιημένων προσεγγίσεων για την αξιολόγηση της διατροφής και της επίδρασής της στην υγεία του ανθρώπου. Σε αυτό το πλαίσιο, η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στην ανάπτυξη μεθόδων στατιστικής ανάλυσης για την αξιολόγηση της διατροφής και των επιπτώσεών της στη φλεγμονή, ενσωματώνοντας ομικά δεδομένα, πληροφορίες διατροφής και πληροφορίες για δείκτες φλεγμονής και τα αντίστοιχα σηματοδοτικά μονοπάτια.

Η φλεγμονή αποτελεί σύνθετη απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος σε διάφορες καταστάσεις, και η διατροφή έχει προταθεί ως ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την πορεία της φλεγμονής, από την έναρξη της έως και την καταστολή της. Η σύνδεση των διατροφικών συνηθειών με τη φλεγμονή απαιτεί μια ολοκληρωμένη προσέγγιση που λαμβάνει υπόψη τόσο τα ομικά όσο και τα διατροφικά δεδομένα. Επίσης έχει γίνει μία προσέγγιση ανάπτυξης πιο φιλικών φαρμάκων και στοχευμένων θεραπειών μέσα από γνωστά διατροφικά μοτίβα παραδοσιακής ιατρικής.

Ο κύριος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας που συνδυάζει ομικά δεδομένα από μελέτες επίπτωσης διατροφής στην συνολική έκφραση και μεθυλίωση του DNA, πληροφορίες διατροφής και δείκτες φλεγμονής καθώς και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται ή καταστέλλονται κατά την ανοσολογική απόκριση, για την αξιολόγηση της επίδρασης της διατροφής στην φλεγμονή.

Η εργασία διαιρείται σε τέσσερα κεφάλαια με σκοπό την ανάλυση των παρακάτω στόχων:

1. Κατανόηση της σχέσης μεταξύ διατροφής και φλεγμονής μέσω βιβλιογραφικής ανασκόπησης.
2. Ανάπτυξη μεθόδων στατιστικής ανάλυσης που συνδυάζουν το σύνολο των δεδομένων
3. Εφαρμογή των μεθόδων σε πραγματικά δεδομένα για την αξιολόγηση της προτεινόμενης προσέγγισης.
4. Συζήτηση των αποτελεσμάτων, ερμηνεία των συσχετίσεων και προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.

Η διπλωματική εργασία καταλήγει με συμπεράσματα και προτάσεις για μελλοντικές κατευθύνσεις της έρευνας στον τομέα της διατροφολογίας και διατροφολογίας.

# Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>:

---

## 1 Η σχέση μεταξύ διατροφής και φλεγμονής

Η σχέση της χρόνιας φλεγμονώδους αντίδρασης με τις σημαντικότερες εκφυλιστικές ασθένειες έχει ωθήσει την έρευνα, τα τελευταία χρόνια, προς την αναζήτηση της συσχέτισης και της επίδρασης της διατροφής στην φλεγμονή. Τα αποτελέσματα των ερευνών είναι ενθαρρυντικά, πως οι στοχευμένες διατροφικές επιλογές μπορούν να περιορίσουν την έκταση εκδήλωσης μίας φλεγμονώδους κατάστασης ή και την καταστολή της, καθώς τα νέα δεδομένα υποδεικνύουν πως κάποια διατροφικά συστατικά μπορούν να επιδράσουν σε μηχανισμούς φλεγμονώδους αντίδρασης και αυτό καταδεικνύεται από την έκδηλη μείωση ορισμένων δεικτών φλεγμονής.

Ο ανοσομεταβολισμός (immunometabolism) όπως περιεγράφηκε πρώτη φορά το 2011, είναι ένας αναδυόμενος κλάδος έρευνας μεταξύ των διακριτών κλάδων της ανοσολογίας και του μεταβολισμού και περιγράφει πως οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μεταβολικού και του ανοσοποιητικού συστήματος μπορεί να αποτελούν τη βάση πολλών επιπλοκών [1]. Μέσω της μεταβολομικής, πρωτεομικής και λιπιδιομικής μπορούμε να λάβουμε πληροφορίες για το πως επηρεάζεται η πορεία της φλεγμονής μέσα από την διατροφή και συγκεκριμένα μέσα από μοντέλα διατροφής και γνωστά διατροφικά πλάνα όπως είναι η μεσογειακή διατροφή. Πληροφορίες που έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια ανοσολογικής απόκρισης και με διαδικασίες όπως ο κυτταρικός θάνατος και η διαφοροποίηση ανοσολογικών κυττάρων.

Με την πάροδο του χρόνου στον ανθρώπινο οργανισμό παρατηρούνται σημαντικές χρόνιες παθήσεις όπως είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η αντίσταση στην Ινσουλίνη, η νόσος Alzheimer, το Parkinson και πολλοί τύποι καρκίνου. Η φλεγμονή έχει αναδειχθεί πρόσφατα ως σημαντική πτυχή της παθοφυσιολογίας αυτών των ασθενειών. Ο γλυκαιμικός δείκτης και το γλυκαιμικό φορτίο, οι φυτικές ίνες, η αναλογία των λιπαρών οξέων, το μαγνήσιο, τα καροτενοειδή και τα φλαβονοειδή έχουν μελετηθεί για την επίδραση τους στην πορεία της φλεγμονής και έχει βρεθεί συσχέτιση τους με τα επίπεδα σημαντικών δεικτών φλεγμονής όπως είναι η HS-CRP, η IL-6, IL-7, IL-8, TNF- $\alpha$ , MMP-3 καθώς και σημαντικών σηματοδοτικών μονοπατιών που παίζουν κρίσιμο ρόλο στην έναρξη, την έκταση, την πορεία και την έκβαση της φλεγμονής. Τέτοια σηματοδοτικά μονοπάτια αφορούν την ενεργοποίηση και καταστολή του NF- $\kappa$ B, τον ρόλο των MAPK, την δράση των

TLR (toll like receptors), αλλά και μονοπάτια που σχετίζονται με την διαφοροποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων, την αναπαραγωγή και μετακίνηση των μακροφάγων αλλά και την κυτταρική σηματοδότηση καθώς και τον κυτταρικό θάνατο (απόπτωση).

### **1.1 Υδατάνθρακες, γλυκαιμικός δείκτης και φυτικές ίνες**

Ο γλυκαιμικός δείκτης (Glycemic Index - GI) είναι ένας αριθμητικός δείκτης που χρησιμοποιείται για να μετρήσει πόσο γρήγορα αυξάνονται τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα από μία συγκεκριμένη τροφή. Ο GI κατατάσσει τις τροφές βάσει του τρόπου με τον οποίο επηρεάζουν τη γλυκαιμία. Με τον όρο γλυκαιμικό φορτίο λαμβάνουμε υπόψιν και την ποσότητα της τροφής που καταναλώνεται, υπολογίζοντας τον GI της τροφής πολλαπλασιασμένο με την ποσότητα διαθέσιμων σακχάρων σε αυτήν. Διατροφές με σχετικά υψηλό δείκτη GI έχουν συσχετιστεί με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, εγκεφαλικού επεισοδίου, διαβήτη τύπου 2, ιδιαίτερα ανάμεσα σε παχύσαρκους ασθενείς [2]. Ωστόσο είναι σημαντικό να λάβουμε υπόψιν μας πως κατά την μελέτη της επίδρασης των υδατανθράκων και κατά συνέπεια της συσχέτισης του γλυκαιμικού δείκτη και γλυκαιμικού φορτίου με την πορεία των δεικτών φλεγμονής, οι διατροφές που ακολουθήθηκαν περιείχαν υψηλά ποσοστά φυτικών ινών. Κατά συνέπεια υπάρχει πιθανότητα η περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες να επηρεάζει σημαντικά την μείωση κάποιων δεικτών φλεγμονής όπως είναι οι HS-CRP, IL-6 και TNF-α [3]. Αυτό γιατί οι φυτικές ίνες έχουν σημαντική επίπτωση στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα καθώς έχει βρεθεί συσχέτιση ανάμεσα στην μεγάλη κατανάλωση φυτικών ινών και τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας [4]

Πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην συσχέτιση του γλυκαιμικού δείκτη των τροφών και των δεικτών φλεγμονής. Δεν υπάρχει όμως σαφής ένδειξη αν ο γλυκαιμικός δείκτης, το γλυκαιμικό φορτίο και η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε υδατάνθρακες έχει άμεση συσχέτιση με τα επίπεδα δεικτών φλεγμονής. Αυτό που φαίνεται να παρατηρήθηκε είναι η σχέση του γλυκαιμικού δείκτη με τον συνολικό δείκτη μάζας σώματος, δηλαδή την απώλεια βάρους. Μία χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη και θερμιδικού περιορισμού δίαιτα, που περιέχει μέση ποσότητα υδατανθράκων, μπορεί να είναι αποτελεσματικότερη σε σχέση με μία υψηλού γλυκαιμικού δείκτη και χαμηλών λιπαρών στην μείωση του βάρους και στον έλεγχο της γλυκόζης και του μεταβολισμού της ινσουλίνης. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκε καμία επίπτωση στην πείνα, τον κορεσμό ή άλλους δείκτες φλεγμονής και δείκτες μεταβολικών παραγόντων. [5]. Επιπλέον έρευνες που αφορούν τα επίπεδα του γλυκαιμικού δείκτη στην διατροφή απέτυχαν να φέρουν αποτελέσματα συσχέτισης με δείκτες φλεγμονής. Προς το παρόν δεν εντοπίζεται κάποια σαφής και άμεση συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης

υδατανθράκων και φλεγμονής. Μία μελέτη του 2022 παρουσίασε μία πιθανότητα συσχέτισης της κατανάλωσης υδατανθράκων με την φλεγμονώδη νόσο του εντέρου επανεξετάζοντας δεδομένα από προηγούμενες μελέτες και υποθέτοντας πως παραμελήθηκε ο ρόλος των υδατανθράκων στην φλεγμονή. Η μελέτη ισχυρίζεται πως η υψηλή πρόσληψη υδατανθράκων προκαλεί φλεγμονή χαμηλού βαθμού και μεσολαβεί περαιτέρω στην παραγωγή λιπιδίων μέσω της οδού mTORC1 [6]. Ωστόσο μένει να επιβεβαιωθούν τα ευρήματα αυτά από περαιτέρω έρευνα καθώς μέχρι στιγμής δεν έχει γίνει κάποια άλλη αναφορά.

## 1.2 Λιπαρά οξέα και δείκτες φλεγμονής

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν πως η διατροφή μπορεί να επηρεάσει την ρύθμιση της συστημικής φλεγμονής. Η διατροφή αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την υγεία, καθώς επηρεάζει διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού. Τα διάφορα συστατικά της διατροφής όπως τα λιπαρά αναδεικνύονται ως σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την απόκριση της φλεγμονής. Τα κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα, παίζουν το ρόλο τους στην πορεία της φλεγμονής. Η σχέση ανάμεσα στην κατανάλωση λιπαρών και την απόκριση στην φλεγμονή έχει απασχολήσει την επιστημονική κοινότητα και αποτελεί ένα σημαντικό κομμάτι της διατροφικής έρευνας δίνοντας μεγάλη βαρύτητα στην ποιότητα των λιπαρών οξέων που καταναλώνονται.

Μία διατροφή δυτικού τύπου (Western Diet) η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση λιπαρών (high-fat diet—HFD), σε συνδυασμό με την καθιστική ζωή του σύγχρονου ανθρώπου, συχνά επιφέρουν το αποτέλεσμα της παχυσαρκίας που τα τελευταία χρόνια έχει χαρακτηριστεί και ως πανδημία. Έχει παρατηρηθεί πως σε άτομα που πάσχουν από παχυσαρκία ο λιπώδης ιστός τους και τα μονοκύτταρα του περιφερικού αίματος τους (PBMCs) παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση φλεγμονωδών γονιδίων και κατά συνέπεια έχουν χρόνια αυξημένα επίπεδα IL-6 και TNFα [7]

Έτσι λοιπόν πολύ σωστά τίθεται το ερώτημα αν όλα τα λιπαρά δρουν αρνητικά στην πορεία της φλεγμονής. Τα λιπαρά της διατροφής μας είναι μία από τις τρεις κύριες κατηγορίες θρεπτικών συστατικών που αποδίδουν ενέργεια στον οργανισμό μας για να επιτελέσει όλες τις σύνθετες λειτουργίες του.

Περιλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό ενώσεων και επιτελούν ξεχωριστές λειτουργίες όπως η αποθήκευση ενέργειας, η λειτουργία τους ως δομικά συστατικά των μεμβρανών, βιταμίνες, ορμόνες κλπ. Ενώ κύριο χαρακτηριστικό τους είναι η αδιαλυτότητα τους στο νερό. Η κύρια πηγή του διαιτητικού λίπους είναι τα λιπαρά οξέα που προσλαμβάνουμε μέσω της τροφής.

Τα λιπαρά οξέα συναντιούνται ως ελεύθερα λιπαρά οξέα ή ενσωματωμένα σε σύνθετες δομές (πχ τριακυλογλυκερόλες, φωσφολιπίδια). Αυτά με την σειρά τους κατηγοριοποιούνται διατροφικά σε 3 βασικές κατηγορίες:

- Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, εδώ μπορούμε να διακρίνουμε τα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα ( $\omega 3$  και  $\omega 6$ ) που είναι κοινώς γνωστά ως «καλά» λιπαρά εξαιτίας των θετικών ενδείξεων από πολυάριθμες έρευνες. Τα συναντάμε σε φυτικές πηγές όπως οι ξηροί καρποί και οι σπόροι ενώ περιέχονται και στα λιπαρά ψάρια.
- Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα χαρακτηρίζονται από το γεγονός πως όλα τα άτομα άνθρακα έχουν πλήρης συνδέσμους υδρογόνου. Έχουν κυρίως ζωική προέλευση και συναντιούνται συνήθως σε στερεή μορφή.
- Τα trans-λιπαρά οξέα συναντιούνται στα μερικώς υδρογονωμένα λίπη και παράγονται κατά την μερική υδρογόνωση των φυτικών ελαίων (πχ βούτυρο και μαργαρίνη)

Μία πρόσφατη έρευνα που δημοσιεύτηκε στο Nutrients το 2023 και αφορά την διατροφικής πρόληψη λιπαρών οξέων μίας ομάδας Αυστραλών ενηλίκων επιβεβαίωσε μια θετική συσχέτιση μεταξύ κορεσμένων λιπαρών οξέων και φλεγμονής, ενώ παρατηρήθηκαν αντίστροφες συσχετίσεις μεταξύ μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, μεσογειακής διατροφής και φλεγμονής. [8]

Κατά την μελέτη ATTICA που διεξήχθη στην Ελλάδα, παρατηρήθηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των ολικών MUFA, PUFA,  $\omega-3$  και  $\omega-6$  λιπαρών οξέων του πλάσματος με τις CRP, IL-6 και TNF- $\alpha$ . Καθώς επίσης ενδιαφέρον παρουσιάζει η ισχυρή θετική συσχέτιση της αναλογίας  $\omega-6/\omega-3$  με όλους τους δείκτες που μελετήθηκαν [9]. Παρατηρούμε πως υπάρχουν ολοένα και περισσότερες συσχετίσεις μεταξύ της ποιότητας των λιπαρών οξέων που καταναλώνονται και της παρουσίας δεικτών φλεγμονής.

Κατά την διάρκεια μίας μελέτης που αφορά στοιχεία από την Εθνική Υπηρεσία Υγείας και Διατροφής Έρευνα Εξετάσεων (NHANES 99-00), διαπιστώθηκε σε ένα εύρος πληθυσμού που αφορούσε άνδρες δημοσίους υπαλλήλους, εργαζόμενους στο Λονδίνο, πως τα επίπεδα των κορεσμένων λιπαρών οξέων στον ορό του αίματος είχαν θετική συσχέτιση με δύο δείκτες φλεγμονής την CRP και το ινωδογόνο. Στον αντίποδα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα φαίνεται να έχουν αντιστρόφως ανάλογη συσχέτιση με τα επίπεδα της CRP [10]. Διαφορετικές διατροφικές προσεγγίσεις μπορούν να επηρεάσουν την πρόσληψη κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων. Οι λαοί της Μεσογείου παραδοσιακά τρέφονται με τροφές πιο πλούσιες σε  $\Omega 3$  λιπαρά οξέα σε σχέση με τις Βόρειες χώρες,

ωστόσο η παρουσία ακόρεστων λιπαρών οξέων φαίνεται να παρουσιάζει το ίδιο ενδιαφέρον σε διαφορετικούς πληθυσμούς.

Σε μία ανασκόπηση των δημοσιεύσεων της Medline οι ερευνητές κατέληξαν στον συμπέρασμα πως η κατανάλωση trans-λιπαρών οξέων τόσο σε ελεγχόμενες δοκιμές όσο και σε μελέτες παρατήρησης είχε ως αποτέλεσμα εκτός από ανεπιθύμητες επιδράσεις στο λιπιδαιμικό προφίλ και προφλεγμονώδη αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας του TNF- $\alpha$ , αύξηση της IL-6 και της CRP καθώς και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία [11]. Τα trans λιπαρά έχουν εισαχθεί στην διατροφή μας σε μεγαλύτερο εύρος τα τελευταία χρόνια λόγω της ευκολίας διακίνησης και του χαμηλότερου κόστους παραγωγής τους. Το ερώτημα είναι αυτή η στροφή προς τα trans λιπαρά τι μακροπρόθεσμες επιπτώσεις μπορεί να έχει στην υγεία καθώς παρατηρείται ήδη να επηρεάζουν το λιπιδαιμικό προφίλ. Έχει βρεθεί συσχέτιση της κατανάλωσης trans λιπαρών οξέων με διάφορες μορφές καρκίνου, καθώς και με θέματα υπογονιμότητας σε γυναίκες. Ωστόσο οφείλουμε να αναφέρουμε πως τα trans λιπαρά διακρίνονται σε φυσικά trans λιπαρά και τεχνητά trans λιπαρά και εδώ υπάρχει και μία διάκριση ως προς τις επιπτώσεις τους στην υγεία. Τα φυσικής προέλευσης λιπαρά μπορεί να έχουν θετικές επιπτώσεις στην υγεία έναντι των τεχνητών trans λιπαρών, αλλά επειδή κατά την διατροφική τους επισήμανση δεν είναι υποχρεωτική η δήλωση της προέλευσης τους στα τρόφιμα, η σύσταση είναι να αποφεύγονται.

Επιπλέον το 2019 πραγματοποιήθηκε μία στοχευμένη αναζήτηση των όρων «λιπαρά οξέα» και «επιγενετικά» στις βάσεις δεδομένων PubMed/Medline και τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι το λιπαρά οξέα μπορούν να επηρεάσει τη μεθυλίωση του DNA (υπερ ή υπομεθυλίωση) καθώς και την ακετυλίωση ή αποακετυλίωση των ιστονών και των miRNA που σχετίζονται με την καταστολή ή την ενεργοποίηση γονιδίων [12]. Οι μεταβολές αυτές εξαρτώνται από την δόση και το μοντέλο ωστόσο απαιτούνται ακόμα περισσότερες μελέτες που να αποσαφηνίζουν τα μονοπάτια που επηρεάζονται από την κατανάλωση λιπαρών οξέων και να ληφθούν υπόψιν και άλλα θρεπτικά συστατικά που έχουν ανάλογη επιγενετική δράση. Ωστόσο δεν μπορούμε να παραλείψουμε την σπουδαιότητα των λιπαρών οξέων στην επιγενετική και να αναγνωρίσουμε πως αρκετές διαδικασίες απόκρισης φλεγμονής σχετίζονται με μεταβολές στην έκφραση του γονιδιώματος.

Μία μελέτη του 2021 παρουσίασε πως τα ακόρεστα λιπαρά οξέα μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο στην καταστολή της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με σηματοδοτικά μονοπάτια που συμμετέχουν στην εξέλιξη της φλεγμονής. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση του διαιτητικού ολεϊκού

οξέος (OA; 18:1 cis-9), της ανθοκυανίνης κερακυανίνης (AC) καθώς και η παρουσία και τον δύο στην διατροφή. Παρατηρήθηκε πως παρουσία των OA, AC και OAAC μειώθηκε η πρωτεϊνική έκφραση για τα pNFκBp65, PPARγ, IκBa, TNF-α, IL-1β, IL-6, και MCP-1 ενώ αυξήθηκε για την IL-10. Και το ολεϊκό οξύ και οι ανθοκυανίνη κερακυανίνη έχουν αντιφλεγμονώδη δράση ξεχωριστά αλλά ο συνδυασμός τους έχει καλύτερο αποτέλεσμα. [13]. Η παρουσία διαφόρων θρεπτικών συστατικών με θετική επίδραση σε σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την εξέλιξη της φλεγμονής μπορεί να επιτελέσει στην διαφοροποίηση της διατροφικής προσέγγισης ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε ατόμου. Επίσης νέοι στόχοι μπορούν να ανακαλυφθούν από συνδυαστικές μελέτες που εντοπίζουν την επίδραση διαφορετικών συστατικών σε γνωστές διεργασίες. Σίγουρα τα λιπαρά οξέα είναι ένας κλάδος που έχει να μας παρουσιάσει πολλές συσχετίσεις καθώς έχει μελετηθεί αρκετά με την πάροδο του χρόνου. Τα διαθέσιμα δεδομένα μπορούν να επανεξεταστούν σε μεγαλύτερη κλίμακα και πιο στοχευμένα ώστε να βρεθούν συσχετίσεις με ανοσολογικές αποκρίσεις ασθενειών που επηρεάζουν τον σύγχρονο άνθρωπο.

### 1.3 Φλαβονοειδή και φλεγμονώδης αντίδραση

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ενώσεις που εμφανίζονται ως παράγωγα του μεταβολισμού των φυτών, έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον των ερευνητών καθώς φαίνεται να διαδραματίζουν ρόλο αντιοξειδωτικό. Προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής όταν αυτή είναι πλούσια σε τροφές φυτικής προέλευσης και είναι γνωστές περίπου 6000 ενώσεις. Μπορούν να ταξινομηθούν σε ομάδες όπως οι ανθοκυανίνες, οι φλαβόνες, οι φλαβονόνες, οι διϋδροφλαβονόλες, οι χαλκόνες, οι φλαβονόλες, οι φλαβάνες, οι προανθοκυανιδίνες και τα ισοφλαβονοειδή, ενώ η πολυφαινολική του δομή είναι υπεύθυνη για την κύρια αντιοξειδωτική τους δράση. Έχει γίνει γνωστό μέσα από πολύχρονες έρευνες, καθώς τα φλαβονοειδή μας είναι γνωστά εδώ και τουλάχιστον 40 χρόνια, πως πολλά φλαβονοειδή εμφανίζουν αντικαρκινική δράση και όχι μόνο. Έχει βρεθεί πως πολλά από αυτά δρουν ως αντιοξειδωτικά μέσα, ως σηματοδοτικά μόρια στην έκφραση γονιδίων καθώς επίσης και ως ρυθμιστές ενζυμικής δραστηριότητας.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες είναι γνωστό πως παίζουν καθοριστικό ρόλο στην μεταγωγή σήματος κατά την κυτταρική ενεργοποίηση στην διάρκεια μίας φλεγμονώδους αντίδρασης. Έχει βρεθεί από μελέτες που έχουν γίνει πως ορισμένα φλαβονοειδή μπορούν να δράσουν ως αναστολείς των πρωτεϊνικών κινάσων για τη χημειοπρόληψη του καρκίνου [14] [15]. Η πρωτεϊνική κινάση 1 (DAPK1) που σχετίζεται με τον θάνατο είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης/θρεονίνης η οποία ανήκει στην υποοικογένεια των πρωτεϊνικών κινάσων που εξαρτώνται από Ca<sup>2+</sup>/καλμοδουλίνη. Θεωρείται ένας πιθανός στόχος για της θεραπεία του οξέος ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου και των

αδενοκαρκινωμάτων του ενδομητρίου. Βρέθηκαν ισχυρές δομικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ ορισμένων φλαβονοειδών και της πρωτεϊνικής κινάσης 1 που σχετίζεται με τον θάνατο [16]. Οι πρωτεϊνικές κινάσες σχετίζονται πολλά σηματοδοτικά μονοπάτια κι έχουν βρεθεί να παίζουν ρόλο και στην πορεία της φλεγμονής. Είναι ένας τομέας που παρουσιάζει ενδιαφέρον και η δράση των φλαβονοειδών σε αυτές ερευνάτε για να διαλευκάνει τον τρόπο με τον οποίο λειτουργούν.

Το cAMP είναι ένα σημαντικό μόριο σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια και μπορεί να λειτουργήσει ως δεύτερος αγγελιοφόρος ρυθμίζοντας κυτταρικές λειτουργίες όπως ο μεταβολισμός των λιπιδίων, η φλεγμονώδη απόκριση και η κυτταρική διαφοροποίηση κατά τον τραυματισμό. Αυτό επιτυγχάνεται διαφοροποιώντας την γονιδιακή και πρωτεϊνική έκφραση και λειτουργία. Έχουν προταθεί ως στόχοι για την θεραπεία της μη αλκοολικής λιπώδης ηπατικής νόσου (NAFLD) και αλκοολικής ηπατικής νόσου (ALD) οι φωσφοδιεστεράσες. Οι φωσφοδιεστεράση του cAMP υδρολύει το cAMP, η αναστολή της μπορεί να κρατήσει ψηλά τα επίπεδα του cAMP και αυτό έχει συσχετιστεί με αντιφλεγμονώδη δράση [17]. Σε μία έρευνα στην Κίνα που περιλάμβανε την απομόνωση φλαβονοειδών από ένα παραδοσιακό κινέζικο φάρμακο το *Morus Alba*, εντοπίστηκε η ανασταλτική τους δράση στην φωσφοδιεστεράση του cAMP η οποία μπορεί να αναστείλει την αποικοδόμηση του cAMP και να παρατείνει την σηματοδοτική του δράση [18]. Η μελέτη της δράσης των φλαβονοειδών στο cAMP και σε άλλα μόρια που σχετίζονται με σηματοδοτικά μονοπάτια του μεταβολισμού, μπορεί να είναι ένα κλειδί στην αναζήτηση φαρμάκων έναντι ασθενειών, φυσικής προέλευσης, με πιο στοχευμένη δράση και μικρότερη κυτταροτοξικότητα.

Οι Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι χημικές ουσίες που σχηματίζονται από το οξυγόνο και δρουν ως σηματοδοτικά μόρια στην πορεία της φλεγμονώδους νόσου. Είναι μερικώς ανηγμένοι μεταβολίτες και διαθέτουν ισχυρές οξειδωτικές ικανότητες. Σε υψηλές συγκεντρώσεις είναι επιβλαβή για την λειτουργία του οργανισμού καθώς οξειδώνουν πρωτεΐνες και λιπίδια και δημιουργούν βλάβες στο DNA [19]. Μία πρόσφατη μελέτη για τα φλαβονοειδή του φυτού *Lotus plumule* έδειξε πως έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση δίνοντας ένα ηλεκτρόνιο και συλλαμβάνοντας ελεύθερες ρίζες DPPH και ABTS+, καθώς και ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλλοντας την παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων και ελεύθερων ριζών [20].

Επιπλέον έχει βρεθεί πως η κατανάλωση φλαβονοειδών μπορούν να ρυθμίσουν την ένταση της φλεγμονής με την δράση του σε συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια. Μία ανασκόπηση του 2022 παραθέτει πως φλαβονοειδή όπως τα

quercetin, genistein, apigenin, kaempferol και epigallocatechin 3-gallate ρυθμίζουν την έκφραση και ενεργοποίηση κυτοκινών όπως IL-1B, TNF-a, IL-6, IL-8 και ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων πολλών προφλεγμονωδών μορίων όπως του NF-κB, AP-1, ICAM, VCAM και της e-σελεκτικής, ενώ επίσης αναστέλλουν την επαγωγίμη συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου, την κυκλοοξυγενάση-2 και την λιποξυγενάση, ένζυμα με προφλεγμονώδη δράση. [21]. Επιπλέον μελέτες που αφορούν συγκεκριμένα τρόφιμα στόχους που χρησιμοποιούνται στην παραδοσιακή διατροφή διαφόρων χωρών έχει δείξει πως τα φλαβονοειδή μπορούν να έχουν στοχευμένη αντιφλεγμονώδη δράση. Όπως για παράδειγμα το εκχύλισμα Chenpi (μία λιαστή φλούδα πορτοκαλιού ή μανταρινιού που χρησιμοποιείται ως μπαχαρικό αλλά και ως συστατικό της παραδοσιακής κινέζικης ιατρικής) έχει αντιφλεγμονώδη δράση αδρανοποιώντας την MAPK και τον NF-κB, υποδηλώνοντας την πιθανή εφαρμογή του ως διατροφικό συμπλήρωμα κατά των φλεγμονωδών ασθενειών. Το εκχύλισμα CRP (Citri Reticulatae Pericarpium / Chenpi) περιέχει δύο φλαβονοειδή, την εσπεριδίνη (Hesperidin – Hsd) και την εσπεριτίνη (Hesperitin – Hst) [22]. Τα φλαβονοειδή μπορεί να είναι γνωστά τα τελευταία 40 χρόνια αλλά σαν συστατικά έχουν χρησιμοποιηθεί ανά τους αιώνες για τις αντιοξειδωτικές και φαρμακολογικές τους δράσης. Παραδοσιακά σκευάσματα, διατροφικές συνήθειες και προσεγγίσεις που έχουν διατηρηθεί μέσα στους αιώνες υποδεικνύουν πως πιθανώς αυτά τα μόρια μπορούν να διερευνηθούν για πιο στοχευμένη δράση και για ανάπτυξη φαρμάκων.

#### **1.4 Καροτενοειδή και η σχέση τους με την φλεγμονή**

Τα καροτενοειδή θεωρούνται παραδοσιακά οι φυτικές χρωστικές που ευθύνονται για τα χρώματα κίτρινο, πορτοκαλί και κόκκινο στα φρούτα και τα λουλούδια. Ωστόσο διαθέτουν και άλλους ρόλους καθώς είναι απαραίτητα συστατικά της φωτοσύνθεσης. Επίσης εμπλέκονται ενεργά στην διατήρηση της υγείας των θηλαστικών. Έχουν απομονωθεί περισσότερα από 600 είδη καροτενοειδή και έχουν ταυτοποιηθεί ως χρωστικές κίτρινου, κόκκινου και πορτοκαλί σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά ολικής άλεσης και λουλούδια, ωστόσο έχουν εντοπιστεί περίπου 30-40 σε ανθρώπινο δείγμα με το λυκοπένιο, τη λουτεΐνη, τη ζεαξανθίνη, τη β-κρυπτοξανθίνη και το β-καροτένιο να είναι σε μεγαλύτερη αφθονία. Το β-καροτένιο, το α-καροτένιο και η β-κρυπτοξανθίνη έχουν την δυνατότητα δράσης προβιταμίνης A και μπορούν να μετατραπούν σε ρετινόλη, αυτή είναι μία επιπλέον δράση των καροτενοειδή εκτός από την δράση τους ως χρωστικές. Επίσης μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιοξειδωτικά καθώς αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες. Αυτή η δυνατότητα τους ευθύνεται στο μήκος της ανθρακικής αλυσίδας, των διπλών δεσμών και των ακραίων ομάδων. Καροτενοειδή όπως η ασταξανθίνη, η ζεαξανθίνη και η

λουτεΐνη λόγω των ομάδων των τελικών λειτουργικών άκρων λειτουργούν εξαιρετικά στην απομάκρυνση των ελεύθερων ριζών. Σε μία μελέτη φάνηκε πως η πρόσληψη λουτεΐνης και ζεαξανθίνης ως συμπλήρωμα μέσω της διατροφής μπορούν και εναποτίθενται ως χρωστικές στην ωχρά κηλίδα του ματιού και παρέχουν προστασία στα βοθρία από την φωτοχημική βλάβη που προκαλείται από το μπλε φως. [23]

Συνεπώς μία διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά περιέχει και μεγάλη ποικιλία σε καροτενοειδή που μπορούν να φανούν χρήσιμα στον οργανισμό ως αντιοξειδωτικά και προβιταμίνες. Μία τέτοια διατροφή είναι η παραδοσιακή Μεσογειακή Διατροφή η οποία είναι πλούσια σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά ολικής άλεσης, όσπρια και ελαιόλαδο. Στην έρευνα του Women's Health and Aging Study I βρέθηκε πως υπάρχει σημαντική πιθανότητα αυξημένης IL-6 σε γυναίκες με χαμηλότερα επίπεδα α- και β-καροτίνης, λουτεΐνης/ζεαξανθίνης και ολικών καροτενοειδών, σε διάστημα 2 ετών. Παράλληλα με την διαπίστωση πως χαμηλότερα επίπεδα σεληνίου είχαν σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο συνολικής θνησιμότητας σε περίοδο 5 ετών, τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι συγκεκριμένα αντιοξειδωτικά θρεπτικά συστατικά μπορεί να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην καταστολή των επιπέδων IL-6 σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας με αναπηρία. [24]

Αποτελέσματα από μία πληθυσμιακή μελέτη έδειξαν πως μια μέτρια αύξηση στην πρόσληψη β-κρυπτοξανθίνης, ισοδύναμο με ένα ποτήρι φρέσκο χυμό πορτοκάλι, σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης φλεγμονωδών διαταραχών όπως για παράδειγμα η ρευματοειδής αρθρίτιδα [25]. Επιπλέον μία μελέτη στην Δανία σε ασθενείς με περιφερική αρτηριακή νόσο, που περιελάμβανε χυμό πορτοκαλιού και χυμό μαύρης σταφίδας για 28 ημέρες, έδειξε πως μειώθηκαν σημαντικά οι δείκτες φλεγμονής C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και το ινοδογόνο σε σχέση με ένα κοινό ζαχαρούχο ρόφημα. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα την IL-6 και των υπόλοιπων παραγόντων ενδοθηλιακής ενεργοποίησης [26]. Παρατηρούμε πως η εισαγωγή περισσότερων καροτενοειδών στην καθημερινή διατροφή μπορεί να επιφέρει σημαντικές βελτιώσεις στα επίπεδα δεικτών φλεγμονής.

Τα καροτενοειδή έχουν μελετηθεί για τον ρόλο τους στα σηματοδοτικά μονοπάτια του NF-κΒ και Nrf2 καθώς και ο νευροπροστατευτικός τους ρόλος σε διάφορες νευροεκφυλιστικές ασθένειες που σχετίζονται με την φλεγμονή. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε πως μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις ενός εκχυλίσματος ακετόνης *Euglena* (μικροάλγη *Euglena gracilis*) καταστέλλουν προφλεγμονώδεις αποκρίσεις μικρογλοίας που προκαλούνται από λιποπολυσακχαρίτες μέσω της μείωσης της ρύθμισης του NF-κΒ και της ενεργοποίησης των οδών σηματοδότησης Nrf2 [27]. Μελέτες που

επικεντρώνονται στην δράση αντιφλεγμονώδη δράση των καρροτενοειδών και στην συσχέτιση τους με γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την εξέλιξη και την ένταση της φλεγμονής μπορούν να ρίξουν φως σε ποιο λεπτομερή στόχευση των μηχανισμών αυτών. Η διάθεση των καρροτενοειδών είναι πλούσια καθώς χρησιμοποιούνται και ως χρωστικές στην βιομηχανία τροφίμων. Μπορεί να βρεθούν σε πολλές ομάδες τροφίμων και η πρόσληψη τους να γίνεται από πολλαπλές πηγές.

---

Από την παραπάνω βιβλιογραφική ανασκόπηση μπορούμε να παρατηρήσουμε την σπουδαιότητα της διατροφής στην πορεία διαφόρων φλεγμονωδών αντιδράσεων. Είναι γνωστό πως όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά παρατηρούνται ταυτόχρονα σε διάφορα μοτίβα διατροφής που έχουν εξεταστεί σε βάθος χρόνου. Ένα μοτίβο διατροφής που έχει εξεταστεί σε βάθος και συνεχίζει και προσελκύει το ενδιαφέρον των ερευνητών είναι αυτό της Μεσογειακής Διατροφής. Ο όρος Μεσογειακή Διατροφή εσωκλείει ένα φάσμα διατροφικών προτύπων που παραδοσιακά συναντάται στις Μεσογειακές και παράλληλα ελαιοκαλλιεργητικές περιοχές της Νότιας Ευρώπης. Κύρια χαρακτηριστικά του είναι η πλούσια κατανάλωση λαχανικών, φρούτων, οσπρίων, δημητριακών ολικής άλεσης και ψαριών ενώ μέτρια είναι η πρόσληψη κόκκινου κρέατος. Ένα μεγάλο μέρος των επιμέρους διατροφικών στοιχείων της μεσογειακής διατροφής έχει εξεταστεί και έχουν παρατηρηθεί σημαντικές επιδράσεις σε ελεγχόμενες in-vivo επιδράσεις σε διάφορους δείκτες φλεγμονής. [28] και παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.

Table 1. Foods associated with a decrease in inflammatory markers in human interventional studies

Food	Study duration	Effect	Ref
Extra virgin olive oil	1 meal	Decreased TXB2 and LTB4 in comparison with corn oil, non-virgin olive oil	55
Tomato juice	10 days	Reduced neutrophil airway influx in asthmatics	56
Tomato drink	26 days	Reduced TNF- $\alpha$ production by whole blood	57
Whole tomatoes	28 days	No change in CRP	58
Walnuts	1 meal	Decreased monocyte mRNA for TNF- $\alpha$ and IL-6 with no change in serum levels	69
Red wine	4 weeks	Reduced CRP and fibrinogen	60
Garlic powder	3 months	No effect on CRP, TNF- $\alpha$	61
Flaxseed flour	2 weeks	Reduced CRP, fibronectin and serum amyloid A in obese subjects	62
Tea, black	12 weeks	40-50% reduction of CRP in subjects with CRP>3 mg/L	63
Tea, black	6 weeks	Decreased CRP and platelet aggregation in healthy men	64
Tea, green	4 weeks	No effect on CRP in men	65
Tea, green	4 weeks	No significant effect on CRP in male smokers	66
Cherries, sweet	4 weeks	Reduced CRP and CCL5, no effect on IL-6 in healthy adults	67

CCL5, chemokine (c-c motif) ligand 5; CRP, c-reactive protein; IL, interleukin; mRNA, messenger ribonucleic acid; TXB, thromboxane; TNF, tumor-necrosis factor.

### Εικόνα 1 Τρόφιμα που σχετίζονται με μείωση των φλεγμονωδών δεικτών σε ανθρώπινες παρεμβατικές μελέτες

Η σύγχρονη επιστήμη έχει στρέψει την προσοχή της σε νέες μεθόδους και τεχνολογίες συλλογής και επεξεργασίας πολύτιμων δεδομένων. Σε αυτό έχει παίξει σημαντικό ρόλο η ανάπτυξη νέων μεθόδων αναλυτικής πρόβλεψης και μοντελοποίησης δεδομένων. Η στατιστική ανάλυση και ο εμπλουτισμός των αποτελεσμάτων σε σχέση με τις ήδη υπάρχουσες βάσεις δεδομένων μπορεί να συσχετίσει την διαφορική έκφραση των γονιδίων με γνωστά μονοπάτια που παίζουν ρόλο στην έναρξη, πορεία και ένταση μιας φλεγμονώδους αντίδρασης. Κοινά μοτίβα παρατηρούνται και μπορούν να εξεταστούν συλλέγοντας περισσότερες πληροφορίες και αποκτώντας πολύτιμη γνώση από μεγαλύτερα σύνολα δεδομένων. Νέες μελέτες επικεντρώνονται στο σύνολο του γονιδιώματος και την διαφορική έκφραση γονιδίων μετά από διατροφικές παρεμβάσεις ώστε να εντοπιστούν κοινοί μηχανισμοί και μοτίβα έκφρασης που μπορούν να υποδηλώνουν πιο στοχευμένες λειτουργίες και πιθανούς στόχους στην αντιμετώπιση φλεγμονωδών νόσων.

# Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>:

---

## 2 Μέθοδοι αναλυτικής πρόβλεψης για την πορεία της φλεγμονής

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι για την αναλυτική πρόβλεψη της πορείας μίας φλεγμονής. Επιπλέον σε αυτές τις μεθόδους έχουν εισαχθεί δεδομένα που φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην συνολική πορεία της φλεγμονής. Για να προσεγγίσουμε ένα μοντέλο που θα μπορούσε να μας δώσει στοιχεία που να αφορούν την διατροφή και την πορεία μίας φλεγμονώδους κατάστασης θα πρέπει πρώτα να κατανοήσουμε κάποιες βασικές μεθόδους ανάλυσης δεδομένων.

### 2.1 Κατανόηση των Μεθόδων Ανάλυσης Δεδομένων

Παρακάτω θα κάνουμε μία σύντομη βιβλιογραφική ανασκόπηση των διαφορετικών μεθόδων ανάλυσης δεδομένων που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη και την ανάλυση συσχετίσεων. Αυτές μπορεί να περιλαμβάνουν τη γραμμική και μη γραμμική παλινδρόμηση, τους ταξινομητές μηχανικής μάθησης, τις μεθόδους ομαδοποίησης, και άλλες τεχνικές.

Η γραμμική παλινδρόμηση είναι μία στατιστική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται για να μελετήσει την σχέση μεταξύ μίας εξαρτημένης μεταβλητής και μίας ή και περισσότερων ανεξάρτητων μεταβλητών, με τη μορφή μιας γραμμικής εξίσωσης. Αποτελεί ένα από τα βασικότερα εργαλεία στατιστικής ανάλυσης ενώ χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλούς τομείς, συμπεριλαμβανομένης της επιστήμης των δεδομένων, της οικονομετρίας και της βιοστατιστικής. Για παράδειγμα κατά την Εθνική Έρευνα Εξέτασης Υγείας και Διατροφής (NHANES) εξετάστηκε εάν ο Διατροφικός Φλεγμονώδης Δείκτης (Dietary Inflammatory Index™ - DII) έχει αντίκτυπο στην βράχυνση των τελομερών. Η επικύρωση του DII έγινε με την CRP. Οι συσχετίσεις των τελομερών με το DII και την CRP έγιναν με την χρήση γραμμικής παλινδρόμησης [29]. Για να χρησιμοποιηθεί σε ένα μοντέλο ως μέθοδος θα πρέπει να οριστεί η εξαρτημένη μεταβλητή όπως για παράδειγμα ένας δείκτης φλεγμονής (CRP, IL-6) και οι ανεξάρτητες μεταβλητές όπως το φύλλο, η ηλικία, η γονιδιακή έκφραση, τα μακροθρεπτικά στοιχεία της διατροφής και άλλα. Στην συνέχεια γίνεται εκπαίδευση του μοντέλου με την χρήση των δεδομένων και μετέπειτα μπορούμε να αξιολογήσουμε το μοντέλο με την χρήση άλλων τεχνικών.

Η μη γραμμική παλινδρόμηση είναι η στατιστική μέθοδος που χρησιμοποιείται όταν η σχέση μεταξύ της εξαρτημένης μεταβλητής και των ανεξάρτητων

μεταβλητών δεν είναι γραμμική. Σε αντίθεση με τη γραμμική παλινδρόμηση όπου η συσχέτιση περιγράφεται από μια ευθεία, στη μη γραμμική παλινδρόμηση η σχέση περιγράφεται από ένα μη γραμμικό μοτίβο. Μια ποικιλία μοντέλων, όπως πολυωνυμικές συναρτήσεις, λογαριθμικές συναρτήσεις, εκθετικές συναρτήσεις, γραμμικά μοντέλα με προσθήκη δεικτών (όπως δείκτες αλληλεπίδρασης), μοντέλα με πυρήνα και άλλα περιγράφουν μία μη γραμμική σχέση.

Οι μη γραμμικές σχέσεις είναι συχνές σε πολλά πραγματικά σενάρια, καθώς οι σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών μπορεί να είναι πιο περίπλοκες από μια απλή γραμμική σχέση. Για παράδειγμα, η σχέση μεταξύ της ηλικίας και της ικανότητας εκμάθησης ενός ατόμου μπορεί να μην είναι γραμμική. Σε αυτήν την περίπτωση, η μη γραμμική παλινδρόμηση επιτρέπει την πιο ακριβή πρόβλεψη ή εξήγηση της σχέσης ανάμεσα στις μεταβλητές. Στην πραγματικότητα οι περισσότερες συσχετίσεις μεταβλητών *in vivo* αποτελούνται από μη γραμμικές σχέσεις και είναι αναγκαίο να δίνουν αρκετές δοκιμές σε διαφορετικά μοντέλα ώστε να βρεθεί αυτό που αποδίδει καλύτερα με βάση τα δεδομένα. Άλλωστε αρκετές μεταβλητές είναι αλληλοεξαρτώμενες όπως για παράδειγμα τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης συγκεκριμένων πρωτεϊνών που μπορεί να μεταβάλλονται από περιβαλλοντικούς και ηλικιακούς παράγοντες. Η χρήση μη γραμμικών μεθόδων σε ένα μοντέλο που μπορεί να περιλαμβάνει ομικά δεδομένα, πληροφορίες διατροφής και δείκτες φλεγμονής απαιτεί την επιλογή του κατάλληλου μη γραμμικού σχεδιασμού ανάλογα με την φύση των δεδομένων και τις σχέσεις που εξετάζονται, μπορεί να περιλαμβάνει πολυωνυμικές, λογαριθμικές και άλλες μεθόδους. Η συλλογή των δεδομένων και η δημιουργία του μοντέλου συνήθως περιλαμβάνει τον υπολογισμό παραμέτρων που προσαρμόζονται στα δεδομένα και την κανονικοποίηση τους για ομαλά αποτελέσματα. Η τελική αξιολόγηση της απόδοσης του μοντέλου μπορεί να περιλαμβάνει την σύγκριση των προβλεπόμενων με τις πραγματικές τιμές, τον υπολογισμό του σφάλματος, την ύπαρξη ακραίων τιμών, την γενικευμένη απόδοση του μοντέλου, έτσι η χρήση μη γραμμικών μεθόδων επιτρέπει την ανίχνευση περίπλοκων σχέσεων μεταξύ των μεταβλητών και προσφέρει μια πιο εκτεταμένη ανάλυση των δεδομένων. Η εκπαίδευση ενός τέτοιου μοντέλου απαιτεί μεγάλο εύρος υπολογιστικών δεδομένων και πόρων που μπορεί να είναι αρκετά απαιτητική ως διαδικασία.

Οι ταξινομητές μηχανικής μάθησης (Machine Learning Classifiers) είναι ουσιαστικά αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται για να κατηγοριοποιήσουν ή να ταξινομήσουν δεδομένα σε διακριτές κλάσεις. Τέτοιοι αλγόριθμοι εκπαιδεύονται με την χρήση δεδομένων τα οποία έχουν ένα γνωστό χαρακτηριστικό, μία ετικέτα. Στην συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για

να προβλέψουν την κατηγορία νέων, αταξινόμητων δεδομένων. Μερικοί από τους πιο κοινούς είναι ο k-Nearest Neighbors - k-NN, τα Δέντρα Απόφασης (Decision Trees), τα Random Forests, οι Support Vector Machines – SVM, τα Νευρωνικά Δίκτυα, οι Naive Bayes Classifiers και η Λογιστική Παλινδρόμηση (Logistic Regression).

Ο αλγόριθμος k-Nearest Neighbor (kNN) είναι ο απλούστερος εκπρόσωπος των τεχνικών Μηχανικής Μάθησης. Πρόκειται για έναν μη παραμετρικό αλγόριθμο, ο οποίος μπορεί και ταξινομεί ένα σύνολο δεδομένων με βάση τις αποστάσεις των k πιο κοντινών του γειτόνων στο χώρο. Χρησιμοποιείται συχνά για προβλήματα ταξινόμησης και παλινδρόμησης. Στα Δέντρα Αποφάσεων ο αλγόριθμος χρησιμοποιεί μία αναδρομική ιεραρχική δομή που αποτελείται από κόμβους και κλάδους για να κατηγοριοποιήσει τα δεδομένα [30]. Οι κόμβοι αντιπροσωπεύουν τα χαρακτηριστικά των δεδομένων και τα κλαδιά τις αποφάσεις που λαμβάνονται βάσει αυτών των χαρακτηριστικών. Τα Random Forests αποτελούν ένα συνδυασμό από δέντρα απόφασης που εκπαιδεύονται με διαφορετικά υποσύνολα δεδομένων και χαρακτηριστικών. Χρησιμοποιούν πολλαπλά δέντρα απόφασης, όπου κάθε δέντρο βασίζεται σε ένα διαφορετικό, τυχαία επιλεγμένο σύνολο δεδομένων, για να βελτιώσουν την ακρίβεια των προβλέψεων [31].

Οι Cortes και Vapnik (1995) έκαναν λόγο για πρώτη φορά για τις Support Vector Machines – SVM για προβλήματα ταξινόμησης δύο ομάδων. Πρόκειται για έναν ισχυρό αλγόριθμο μηχανικής μάθησης που χρησιμοποιείται κυρίως για προβλήματα ταξινόμησης και παλινδρόμησης. Είναι μία μηχανή μάθησης για ταξινόμηση δύο ομάδων, που χρησιμοποιεί μη γραμμικούς μετασχηματισμούς σε υψηλής διάστασης χώρους για να κατασκευάσει γραμμικές επιφάνειες απόφασης, εξασφαλίζοντας υψηλή ικανότητα γενίκευσης, και αποδεικνύεται η αποτελεσματικότητά του σε μη διαχωρίσιμα δεδομένα. [32]

Τα Νευρωνικά Δίκτυα αφορούν μοντέλα που έχουν εμπνευστεί από τη δομή και τη λειτουργία του ανθρώπινου εγκεφάλου. Τα Νευρωνικά Δίκτυα βασίζονται στη δομή, τη μέθοδο επεξεργασίας και την ικανότητα μάθησης του εγκεφάλου [33]. Αποτελούνται από στρώματα τεχνητών νευρώνων που συνδέονται μεταξύ τους και επεξεργάζονται πληροφορίες με τρόπο που μιμείται τη νευρική δραστηριότητα του εγκεφάλου.

Οι Naive Bayes Classifiers βασίζονται στη θεωρία του Bayes και υποθέτουν ότι τα χαρακτηριστικά είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους. Σύμφωνα με το θεώρημα του Bayes μπορούμε να υπολογίσουμε την πιθανότητα ενός γεγονότος δεδομένου των παρατηρήσεων που έχουμε κάνει, χρησιμοποιώντας τη γνώση που ήδη έχουμε γι' αυτό το γεγονός και τις συνθήκες που το περιβάλλουν. Ο αλγόριθμος

μπορεί και δημιουργεί μια συνάρτηση που πρέπει να βελτιστοποιηθεί χρησιμοποιώντας μια αφελή (naive) υπόθεση ότι όλα τα χαρακτηριστικά σε ένα σύνολο δεδομένων είναι ανεξάρτητα. Έτσι λοιπόν υποθέτει ότι η παρουσία/απουσία ενός χαρακτηριστικού που περιγράφει μία συγκεκριμένη τάξη είναι ανεξάρτητη από την παρουσία/απουσία οποιουδήποτε άλλου χαρακτηριστικού, που δεν ισχύει για τις περισσότερες κατηγοριοποιήσεις [34]. Βασιζόμενα στην θεωρία Bayes με διαφορετική προσέγγιση είναι και τα μοντέλα Empirical Bayes, όπου χρησιμοποιούνται συχνά στην στατιστική ανάλυση δεδομένων με πολλαπλές παραμέτρους όπως είναι τα δεδομένα μικροσυστοιχειών DNA. Τα Empirical Bayes βασίζουν την κατανομή των πιθανοτήτων στα δεδομένα για την επιλογή των παραμέτρων.

Τέλος η Λογιστική Παλινδρόμηση είναι ένα στατιστικό μοντέλο που μπορεί και χρησιμοποιεί μία λογιστική καμπύλη η οποία προσαρμόζεται στο σύνολο των δεδομένων δίνοντας την πιθανότητα εμφάνισης μίας κλάσης [35]. Η Λογιστική Παλινδρόμηση μπορεί και προβλέπει την πιθανότητα ότι ένα δείγμα ανήκει σε μια από τις δύο κλάσεις χρησιμοποιώντας μια λογιστική συνάρτηση.

## 2.2 Σύνδεση Μεθόδων Ανάλυσης με τα Δεδομένα

Στην έρευνα έχουν χρησιμοποιηθεί μοντέλα πρόβλεψης που περιλαμβάνουν τη γραμμική και μη γραμμική παλινδρόμηση, τους ταξινομητές μηχανικής μάθησης, τις μεθόδους ομαδοποίησης, και άλλες τεχνικές, καθώς και συνδυασμό των παραπάνω. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι γραμμικές και λογιστικές παλινδρομήσεις μπορούν να είναι χρήσιμες για την πρόβλεψη βιομετρικών δεδομένων, όπως ένα απλό παράδειγμα το βάρος και το ύψος μέσα από δεδομένα χειρός. Αυτές οι τεχνικές χρησιμοποιούνται συχνά για την ανάλυση της σχέσης μεταξύ μεταβλητών εισόδου και εξόδου σε προβλήματα πρόβλεψης και κατηγοριοποίησης (π.χ., πρόβλεψη φύλου βάσει μετρήσεων χεριών). Μοντέλα Πολλαπλής Γραμμικής Παλινδρόμησης (MLR) και Τεχνητού Νευρωνικού Δικτύου (ANN) χρησιμοποιήθηκαν για να προβλέψουν την αντιφλεγμονώδη δραστηριότητα παραγώγων πυριμιδίνης [36]. Τα μοντέλα βασίστηκαν σε μοριακούς δείκτες όπως η διπολική στιγμή, η ενέργεια του υψηλότερου μοριακού τροχιακού, η ισοτροπική πολωσιμότητα και η λιποφιλικότητα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα δύο μοντέλα έχουν υψηλή προγνωστική απόδοση, με το νευρωνικό δίκτυο να αποδίδει καλύτερα από την γραμμική παλινδρόμηση.

Ορισμένοι δείκτες φλεγμονής, όπως η IL-6, η IL-1, η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και το ινωδογόνο, είναι χαρακτηριστικοί της οξείας φάσης, ενώ μπορούν να είναι προγνωστικοί δείκτες της καρδιαγγειακής νόσου. Μία μελέτη εξετάζει τη σχέση μεταξύ δεικτών φλεγμονής και της εξέλιξης σε διαβήτη τύπου 2 (T2DM)

σε υπερτασικούς ασθενείς χρησιμοποιώντας πολυπαραγοντικές αναλύσεις λογιστικής παλινδρόμησης και μοντέλα μηχανικής μάθησης. Τα μοντέλα μηχανικής μάθησης δείχνουν υψηλότερη ακρίβεια για την πρόβλεψη της εξέλιξης σε T2DM, με τους δείκτες φλεγμονής να αναδεικνύονται ως σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες. [37]

Ένας νέος δείκτης φλεγμονής βασισμένος στα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα και τα λεμφοκύτταρα, ο δείκτης συστηματικής ανοσο-φλεγμονώδους απόκρισης (Systemic immune-inflammation index - SII), έχει αποδείξει πως συνδέεται με την προγνωστική αξία σε στερεούς όγκους. Μελετήθηκε η προγνωστική του αξία στη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος (nonalcoholic fatty liver disease - NAFLD) χρησιμοποιώντας πολυπαραγοντική ανάλυση παλινδρόμησης Cox και καμπύλες επιβίωσης Kaplan-Meier μέσω των οποίων μετρήθηκαν οι αναλογίες κινδύνου (hazard ratios - HRs) και του 95% διαστήματος εμπιστοσύνης (confidence interval - CI). Αποτέλεσμα της μελέτης αυτής ήταν η διαπίστωση ότι το αυξημένο SII συνδέεται με υψηλότερη θνησιμότητα από όλες τις αιτίες, υποδεικνύοντας ότι ο SII μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την πρόβλεψη της επιβίωσης σε αυτούς τους ασθενείς [38]. Οι δείκτες φλεγμονής μπορούν να εξυπηρετούν για την πρόβλεψη της πρόγνωσης μιας φλεγμονώδους νόσου.

Μια μελέτη για την πρόβλεψη καρδιαγγειακών νοσημάτων χρησιμοποίησε ταξινομητές μηχανικής μάθησης όπως Random Forests, Decision Trees, Multilayer Perceptrons, και XGBoost, συνδυαστικά με την τεχνική ομαδοποίησης k-modes για τη βελτίωση της ακρίβειας των ταξινομήσεων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πολυεπίπεδοι νευρωνικοί ταξινομητές (multilayer perceptron) παρουσίασαν υψηλότερη ακρίβεια σε σύγκριση με άλλους αλγόριθμους [39]. Οι ταξινομητές μηχανικής μάθησης μπορούν να εξετάσουν πιο περίπλοκες σχέσεις ανάμεσα στα δεδομένα και να δώσουν μεγαλύτερης ακρίβειας αποτελέσματα.

Για την πρόβλεψη της πορείας της φλεγμονής μπορούμε να εξετάσουμε έναν συνδυασμό γραμμικών και μη γραμμικών μεθόδων παλινδρόμησης μαζί με ταξινομητές μηχανικής μάθησης. Για παράδειγμα, μπορούμε να κάνουμε χρήση της πολυωνυμικής παλινδρόμησης για την ανάλυση μη γραμμικών σχέσεων μεταξύ βιοδεικτών και διατροφικών πληροφοριών. Τα Random Forests μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση της ακρίβειας της πρόβλεψης αυτών των σχέσεων [40]. Ο συνδυασμός τεχνικών αν και υπολογιστικά πιο απαιτητικός μπορεί να μιμηθεί καλύτερα τις σχέσεις που υπάρχουν στην φύση.

Η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Inflammatory bowel disease - IBD) είναι μια χρόνια ασθένεια του γαστρεντερικού συστήματος με περίπλοκη παθογένεια.

Μία μελέτη κατάφερε και δημιούργησε ένα μοντέλο πρόβλεψης της IBD μέσω μηχανικής μάθησης, χρησιμοποιώντας βασικές εξετάσεις αίματος, ούρων και κοπράνων. Τα μοντέλα μηχανικής μάθησης που βασίζονται σε τυχαία δάση (Random Forests) έδειξαν υψηλότερη ακρίβεια στη διάγνωση της IBD συγκριτικά με την παραδοσιακή μέθοδο που χρησιμοποιεί τα επίπεδα της CRP. Τα ευρήματα προτείνουν ότι τα μοντέλα αυτά μπορούν να υποστηρίξουν με ακρίβεια τη διάγνωση της IBD, αλλά απαιτείται επιβεβαίωση σε περαιτέρω μελέτες [41]. Σε μία διαφορετική μελέτη έγινε χρήση Clustering Technique εξετάζοντας τη σύνδεση μεταξύ διατροφής, θρεπτικής κατάστασης και φλεγμονής σε ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (IBD). Η διατροφική και θρεπτική κατάσταση μπορούν να επηρεάσουν την πορεία της φλεγμονής του εντέρου σε ασθενείς με IBD. Μέσω αυτής της μελέτης στόχος ήταν η ανάλυση συστάδων (Clustering) για την αξιολόγηση μεταξύ διαφορετικών παραμέτρων όπως τα επίπεδα των λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας ( SCFA) στα κόπρανα καθώς και αιματολογικοί παράγοντες όπως τα επίπεδα της CRP στον ορό και οι προφλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις κιτοκίνες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ διατροφικών και φλεγμονωδών παραμέτρων, κάτι που μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση της θρεπτικής θεραπείας για αυτούς τους ασθενείς[42].

Μέσα από την βιβλιογραφία μπορούμε να παρατηρήσουμε την ανάγκη ανάπτυξης πολύπλοκων μοντέλων που εξετάσουν την συσχέτιση της φλεγμονής με διάφορους παράγοντες διατροφής. Τα θρεπτικά συστατικά πολλές φορές επηρεάζουν διάφορα επίπεδα ομικών δεδομένων, και η ενσωμάτωση αυτών των δεδομένων μπορεί να αποκαλύψει μηχανισμούς του μεταβολισμού και των ασθενειών. Οι παραδοσιακές στατιστικές αναλύσεις δεν αρκούν για την ερμηνεία μεγάλων συνόλων δεδομένων multi-OMICS, γι' αυτό και οι τεχνικές μηχανικής μάθησης είναι κρίσιμες για την ανάλυση αυτών των δεδομένων στη διατροφή [42].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ποσοτική και αιτιώδης ανάλυση με την χρήση στατιστικών εργαλείων και την συσχέτιση της έκφρασης γονιδίων με γνωστές ασθένειες και φλεγμονώδης αντιδράσεις. Σε πρόσφατη μελέτη εντοπίστηκαν πολυμορφισμοί από φλεγμονώδη γονίδια των IL-6, TNF- $\alpha$ , PON1, CYPD6, HLA-DRB, BST1, CCD62 και συσχετίστηκαν στατιστικά με την ευαισθησία της ασθένειας Πάρκινσον και με ενδείξεις αιτιωδών σχέσεων για την ADP-ribosyl cyclase και PON1 στον κίνδυνο εμφάνισης Πάρκινσον, το οποίο μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών και των οδών που υποκρύπτουν την παθογένεση της ασθένειας Πάρκινσον [43].

Το “Data Mining” σε συνδυασμό με διάφορα εργαλεία στατιστικής ανάλυσης μπορεί να ρίξει φως σε στοιχεία που σχετίζονται με την εξέλιξη μιας φλεγμονής και την συσχέτιση της με διατροφικά δεδομένα. Σε μία πρόσφατη ανασκόπηση έγινε μία προσπάθεια για την συγκέντρωση της εξέλιξης της θρεπτικής γονιδιωματικής, της αλληλεπίδρασης του γονιδιώματος και της εξερεύνησης των γονιδιωματικών εργαλείων για την ανάπτυξη της διατροφής ακριβείας και των ασθενειών που σχετίζονται με τα τρόφιμα [44].

### **2.3 Εφαρμογή Στατιστικής Ανάλυσης σε σύνολα δεδομένων**

Η συγκέντρωση δεδομένων από προηγούμενες μελέτες και η συνολική εφαρμογή στατιστικών μοντέλων για τον εντοπισμό σχέσεων ανάμεσα σε γνωστά μονοπάτια που εμπλέκονται με την φλεγμονή και με ασθένειες που διεγείρουν την φλεγμονή και με διάφορα διατροφικά στοιχεία είναι ένα δυνατό πολυδιάστατο εργαλείο. Μπορεί να μας επιτρέψει να εντοπίσουμε και να επιβεβαιώσουμε ή να απορρίψουμε σχέσεις μεταξύ θρεπτικών συστατικών και ανοσολογικής απόκρισης. Για την ανάπτυξη ενός μοντέλου το οποίο θα συνθέτει δεδομένα από πολλαπλές πηγές και θα εξετάζει την σχέση τους με βασικούς δείκτες φλεγμονής απαιτείται ένας συνδυασμό διαφόρων τεχνικών και εργαλείων. Η R είναι μια ισχυρή γλώσσα προγραμματισμού για ανάλυση δεδομένων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συνθέσει δεδομένα διατροφής, ομικά δεδομένα και δείκτες φλεγμονής, και να εξετάσει τις σχέσεις μεταξύ τους.

Τα στάδια υλοποίησης ενός τέτοιου προγράμματος απαιτούν αρχικά την συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων που θα χρησιμοποιηθούν. Τέτοια δεδομένα αφορούν ομικά δεδομένα που να συνδέονται με την έκφραση γονιδίων, την δραστηριότητα ενζύμων, την μεθυλίωση του DNA, το μεταγραφικό προφίλ των υποψηφίων που ακολουθούν ένα συγκεκριμένο τύπο διατροφής και άλλα. Επίσης θα χρειαστούμε δεδομένα που σχετίζονται με τις συνθήκες που θα μελετήσουμε.

Στην συνέχεια είναι απαραίτητο να γίνει μία προεπεξεργασία των δεδομένων που συγκεντρώσαμε. Δηλαδή θα πρέπει να γίνει ένας καθαρισμός και μία κανονικοποίηση των δεδομένων που θέλουμε να εισάγουμε ώστε να αποφύγουμε τις ακραίες τιμές και την πιθανότητα σφαλμάτων. Σε αυτό το στάδιο θα πρέπει να συγχωνεύσουμε τα δεδομένα από διάφορες πηγές ώστε να πάρουμε τα τελικά αρχεία με το σύνολο των υπό εξέταση δεδομένων. Μία προσέγγιση είναι να γίνει αυτό ελέγχοντας οπτικά τα δεδομένα μας, αυτό ίσως να είναι εφικτό σε περιπτώσεις που τα υπό εξέταση σύνολα είναι σχετικά μικρά. Ωστόσο σε αρκετές μελέτες αυτό δεν είναι πάντα πρακτικό γιατί η έκταση των δεδομένων μπορεί να είναι απαγορευτική. Εδώ εισέρχονται εργαλεία που

μπορούν να επιλέξουν και να φιλτράρουν τα δεδομένα με βάση κριτήρια που ορίζουμε εμείς.

Στην συνέχεια ακολουθεί μία ανάλυση συσχέτισης η οποία περιλαμβάνει την εξέταση των σχέσεων μεταξύ των διατροφικών στοιχείων και των δεικτών φλεγμονής. Αυτό θα γίνει με την χρήση γνωστών στατιστικών τεχνικών και εργαλείων.

Σε επόμενο στάδιο ακολουθεί η μοντελοποίηση και η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Αυτό γίνεται με την χρήση γνωστών εργαλείων που μπορούν και δίνουν μία αξιολόγηση ως προς τα αποτελέσματα μας. Κατόπιν χρήσης στατιστικών εργαλείων έχουμε την δυνατότητα περαιτέρω διερεύνησης με τον εντοπισμό και εμπλουτισμό των δεδομένων μας από γνωστές βάσεις δεδομένων που περιέχουν ήδη υπάρχουσες μελέτες με διαθέσιμες πληροφορίες για τα αποτελέσματα τους και την συσχέτιση τους με γνωστές λειτουργίες και μοτίβα που αναζητούμε.

Για την δημιουργία του στατιστικού μοντέλου σε γλώσσα προγραμματισμού R εντοπίσαμε τις βιβλιοθήκες που θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε καθώς κάθε μία από αυτές έχει συγκεκριμένες λειτουργίες και πλεονεκτήματα που βοηθούν στην επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων. Οι βιβλιοθήκες που χρησιμοποιήθηκαν έχουν τα εξής χαρακτηριστικά:

- Βιβλιοθήκη readxl: Η readxl είναι μία βιβλιοθήκη απαραίτητη για την ανάγνωση αρχείων ανάγνωση αρχείων Excel. Με την βοήθεια της μπορούμε να εισάγουμε δεδομένα από αρχείο Excel στο περιβάλλον της R και να τα επεξεργαστούμε καταλλήλως.
- Βιβλιοθήκη dplyr: Πρόκειται για μία βιβλιοθήκη που μας παρέχει εργαλεία κατάλληλα για την διαχείριση δεδομένων (data manipulation). Μας δίνει τα κατάλληλα εργαλεία ώστε να φιλτράρουμε, να ταξινομήσουμε, να ομαδοποιήσουμε, και να τροποποιήσουμε τα δεδομένων σε πίνακες (data frames)
- Βιβλιοθήκη openxlsx: Πρόκειται για άλλο ένα εργαλείο που μας επιτρέπει την ανάγνωση, εγγραφή και τροποποίηση αρχείων Excel χωρίς να απαιτείται το πρόγραμμα Microsoft Excel. Μπορούμε να εξαγάγουμε και να αποθηκεύσουμε τα δεδομένα μας σε αρχεία excel.
- Βιβλιοθήκη ggplot2: Με την χρήση της ggplot2 έχουμε την δυνατότητα να οπτικοποιήσουμε τα δεδομένα μας σε scatter plots, bar charts και heatmaps. Με την βοήθεια της μπορούμε να λάβουμε γραφήματα υψηλής ποιότητας.

- Βιβλιοθήκη limma: Το πακέτο limma έχει αναπτυχθεί για την ανάλυση δεδομένων γονιδιακής έκφρασης. Αρχικά σχεδιάστηκε για πειράματα μικροσυστοιχιών ωστόσο υποστηρίζει και πειράματα RNA-seq καθώς και άλλες μορφές δεδομένων υψηλής διάστασης.
- Βιβλιοθήκη clusterProfiler: Το συγκεκριμένο εργαλείο επιτρέπει τον εμπλουτισμό και την λειτουργική ανάλυση των δεδομένων μέσα από βάσεις δεδομένων όπως η KEGG και GO.
- Βιβλιοθήκη org.Hs.eg.db: Μέσα από το org.Hs.eg.db μπορούμε να εξάγουμε πληροφορίες για το ανθρώπινο γονιδίωμα και να εμπλουτίσουμε τα δεδομένα μας
- Βιβλιοθήκη ReactomePA: Μας επιτρέπει την ανάλυση μονοπατιών χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Reactome. Μπορούμε να κάνουμε αναγνώριση μονοπατιών που σχετίζονται με συγκεκριμένα γονίδια.
- Βιβλιοθήκη msigdb: Είναι μία βιβλιοθήκη που μας παρέχει πρόσβαση σε δεδομένα του Molecular Signatures Database (MSigDB). Μπορούμε έτσι να κάνουμε κατηγοριοποίηση γονιδίων σε σύνολα (gene sets) για τον εμπλουτισμό των δεδομένων μας
- Βιβλιοθήκη DOSE: Η DOSE υποστηρίζει εμπλουτισμό δεδομένων που σχετίζονται με ασθένειες (Disease Ontology Semantic and Enrichment analysis). Χρησιμοποιείται κυρίως για την εύρεση σχέσεων γονιδίων με ασθένειες.
- Βιβλιοθήκη pheatmap: Χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση των δεδομένων σε heatmaps

Συνοψίζοντας μπορούμε να πούμε πως με την χρήση εργαλείων όπως τα παραπάνω είναι δυνατόν να διαχειριστούμε και να κάνουμε την απαραίτητη προεπεξεργασία των δεδομένων μας, να αναλύσουμε και να εξάγουμε πληροφορίες από δεδομένα υψηλής ανάλυσης. Έτσι μπορούμε να λάβουμε ένα ισχυρό και ευέλικτο πλαίσιο για την ανάλυση των δεδομένων μας και την δημιουργία μοντέλων στατιστικής ανάλυσης στην R.

## 2.4 Αξιολόγηση του Μοντέλου

Μετά την δημιουργία και εκπαίδευση του μοντέλου μπορούμε να εξάγουμε συμπεράσματα για την συσχέτιση διατροφικών επιλογών ως προς το αντίκτυπο που έχουν στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Στο αυτό το στάδιο είναι σημαντική η επανεκπαίδευση του μοντέλου με επιπλέον δεδομένα ασθενών και η παρακολούθηση και αξιολόγηση της πορείας του. Μέσα από μελέτες που έχουν προηγηθεί και της γνωστής βιβλιογραφίας μπορούμε να επιβεβαιώσουμε ή να απορρίψουμε συσχετίσεις που προέκυψαν και να εντοπίσουμε σημαντικά στοιχεία. Η χρήση δεδομένων από άλλες παρουσιάσεις μπορεί να μας υποδείξει

και μία πιθανή κατεύθυνση στην οποία μπορούμε να στραφούμε για επιπλέον έρευνα και επιβεβαίωση ή απόρριψη υποθέσεων στο μέλλον.

# Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>:

---

## 3 Υλικά και μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν

### 3.1 Δεδομένα που επιλέχθηκαν και προεπεξεργασία που έγινε

Αρχικά για την προσέγγιση του αντικειμένου επιλέχθηκαν μέσα από την βάση δεδομένων GEO (Gene Expression Omnibus) τρεις μελέτες που σχετίζονται με τις επιπτώσεις συγκεκριμένων διατροφικών μοντέλων στο σύνολο του γονιδιώματος και κατ' επέκταση σε γονίδια που σχετίζονται με γνωστά σηματοδοτικά μονοπάτια που παίζουν ρόλο στην έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης.

Η πρώτη εργασία (GEO accession: GSE87454) αφορούσε την ανάλυση της επίδρασης της χρήσης συμπυκνώματος χυμού φρούτων και λαχανικών για τη μείωση της συστηματικής φλεγμονής στην παχυσαρκία. Η υπόθεση εξέτασε εάν η παρουσία πολυφαινόλων στο συμπύκνωμα χυμού φρούτων και λαχανικών θα μπορούσε να μειώσει την έκφραση συστηματικών φλεγμονωδών γονιδίων στο αίμα παχύσαρκων ασθενών με υψηλά επίπεδα CRP στο πλάσμα ( $\geq 3,0$ ). Τα δεδομένα συλλέχθηκαν από αίμα 16 παχύσαρκων ατόμων, με Υψηλή CRP πλάσματος ( $\geq 3,0$ ), πριν και μετά από παρέμβαση 8 εβδομάδων με συμπυκνωμένο χυμό φρούτων και λαχανικών. [45] Οι πολυφαινόλες, στις οποίες ανήκουν και τα φλαβονοειδή, είναι μία ευρεία ομάδα συστατικών στα φρούτα, τα λαχανικά, το τσάι και τον καφέ ενώ είναι γνωστές για την αντιοξειδωτική τους δράση. Η εργασία κατέληξε πως τα συμπληρώματα φρούτων και λαχανικών είχαν θετικές επιπτώσεις στην μείωση των λιπιδίων του αίματος και την συστηματική φλεγμονή. Ειδικά σε άτομα που παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα CRP οι αλλαγές ήταν εντονότερες, καταλήγοντας πως άτομα με αυξημένα επίπεδα συστηματικής φλεγμονής έχουν περισσότερα οφέλη από την κατανάλωση συμπληρωμάτων φρούτων και λαχανικών, ως προς την βελτίωση του μεταβολικού τους προφίλ και ως εκ τούτου την μείωση ρίσκου ανάπτυξη χρόνιων φλεγμονωδών νόσων.

Η δεύτερη εργασία (GEO accession: GSE54643) που επιλέχθηκε αφορούσε την μελέτη διαιτητικών φλαβονολών που ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με καρδιαγγειακή παθολογία και προκαλούν σύνθετες αλλαγές στην κατάσταση μεθυλίωσης του DNA τους. Τα δείγματα που αναλύθηκαν προέρχονται από 10 άτομα που αξιολογήθηκαν τόσο πριν όσο και μετά από διαιτητική παρέμβαση με φλαβονόλες για 8 εβδομάδες. [46] Στα συμπεράσματα της μελέτης δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορική έκφραση σε σχέση με την

καρδιοαγγειακή λειτουργία των εξετασθέντων και την λήψη φλαβονοειδών. Ωστόσο αυτό δεν σημαίνει πως δεν παρατηρήθηκε συνεισφορά τους στην συνολική αγγειακή υγεία των ατόμων.

Τέλος η τρίτη εργασία (GEO accession: GSE127530) που επιλέχθηκε αφορά την υποβολή μεταγραφωμάτων ανθρώπινου ολικού αίματος ως απόκριση σε γεύμα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Οι χρονικές μεταβολές στα μεταγραφώματα του αίματος μετά το γεύμα αποκαλύπτουν εξατομικευμένα πρότυπα έκφρασης των γονιδίων της έμφυτης ανοσίας μετά από ένα γεύμα πλούσιο σε λιπαρά. Χρησιμοποιήθηκε μία μέθοδος αλληλούχισης για να παρατηρηθεί η έκφραση όλων των γονιδίων σε αιμοσφαίρια από πέντε συμμετέχοντες, οι οποίοι κατανάλωσαν ένα γεύμα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά σε τρεις διαφορετικές ημέρες, παράγοντας συνολικά 45 μεταγραφώματα ολικού αίματος [47]. Εδώ οι συνθήκες που μελετήθηκαν αφορούσαν την ολική απόκριση μετά από ώρες κατανάλωσης γεύματος υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Έγινε ανάλυση σε κατάσταση νηστείας, μετά από 3 ώρες της κατανάλωσης του διαιτολογίου και μετά από 6 ώρες της κατανάλωσης του διαιτολογίου. Η εργασία καταλήγει στο συμπέρασμα πως τα γονίδια που εμπλέκονται με την άμεση φλεγμονώδη αντίδραση εκφράζονται διαφορεικά κατά την μεταγευματική περίοδο ενός γεύματος πλούσιου σε λιπαρά σε σχέση με την περίοδο νηστείας.

Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τις τρεις εργασίες και αφορούσαν έκφραση γονιδίων συγχωνεύθηκαν σε ένα ενιαίο αρχείο Excel στο οποίο κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τα γονίδια που αντιπροσώπευαν. Οι κάθε στήλη του αρχείου αφορά τα διαφορετικά δείγματα από κάθε εργασία ενώ η κάθε γραμμή αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο. Πολλαπλές εκφράσεις ίδιων γονιδίων διατηρήθηκαν ως έχουν ενώ κενά κελιά απομακρύνθηκαν. Στην συνέχεια ακολούθησε κανονικοποίηση των δεδομένων με z-score ώστε να πάρουμε πιο ομοιόμορφα αποτελέσματα. Το z-score επιλέχθηκε καθώς είχαμε και αρνητικές τιμές στα δεδομένα μας που θέλαμε να διατηρήσουμε. Τέλος έγινε μία αξιολόγηση του ενοποιημένου αρχείου ώστε να εντοπίσουμε το ποσοστό των κενών κελιών μας το οποίο ανέρχεται στο 6,5%. Καθώς αυτό το ποσοστό είναι μικρό δεν χρειάστηκε επιπλέον διαμόρφωση των δεδομένων μας.

Έτσι λοιπόν τα δεδομένα μας αντλήθηκαν από τρεις βάσεις δεδομένων (GSE54690, GSE87454, GSE127530) και περιλαμβάνουν συνολικά 97 δείγματα. Τα δείγματα αυτά οργανώθηκαν σε τρεις διαφορετικές συνθήκες (Visit1, Visit2, Visit3) οι οποίες αντανakλούν χρονικές συνθήκες και διατροφικές διαφοροποιήσεις. Οι αρχικές μετρήσεις κανονικοποιήθηκαν και φιλτραρίστηκαν ώστε να συμπεριληφθούν γονίδια μόνο με σημαντική έκφραση.

### **3.2 Στατιστική Ανάλυση**

Αρχικά για να προχωρήσουμε στην στατιστική ανάλυση των δεδομένων μας δημιουργήσαμε έναν πίνακα σχεδιασμού (design matrix) που αντιπροσωπεύει τις πειραματικές συνθήκες των δειγμάτων μας. Έγινε οργάνωση των δειγμάτων σε 3 συνθήκες αυθαιρέτως αγνοώντας τον πραγματικό χρόνο λήψης των

δειγμάτων. Ουσιαστικά επιλέξαμε να κατηγοριοποιήσουμε τα δείγματα με βάση των αριθμό των επισκέψεων και αυτό γιατί θέλαμε να δούμε να υπάρχει γενικευμένη συσχέτιση στην έκφραση γονιδίων. Έτσι χρησιμοποιήσαμε 3 συνθήκες που αφορούσαν τις δειγματοληψίες όπως έγιναν (Visit1, Visit2 και Visit3). Ο σχεδιασμός του design matrix έγινε χωρίς όρο ανακοπής (intercept), ώστε να διασφαλιστεί η ανεξάρτητη σύγκριση μεταξύ των 3 συνθηκών. Αυτό επιλέχθηκε γιατί σε ανάλυση διαφορικής έκφρασης γονιδίων, η αφαίρεση του intercept επιτρέπει την ανεξάρτητη αξιολόγηση κάθε συνθήκης αντί να χρησιμοποιείται μία ως "αναφορά" (reference). Στην συνέχεια κάθε συνθήκη αντιστοιχίστηκε σε μια στήλη στον design matrix, ώστε να αντιπροσωπεύεται η παρουσία ή απουσία της συνθήκης για κάθε δείγμα σε πραγματικό επίπεδο. Αυτό διευκολύνει τις συγκρίσεις μεταξύ των συνθηκών. Έτσι πήραμε έναν πίνακα στον οποίο κάθε γραμμή αντιστοιχεί σε ένα δείγμα και κάθε στήλη σε μια εκ των τριών συνθηκών (Visit1, Visit2, Visit3).

Στην συνέχεια έγινε ένα φιλτράρισμα των δεδομένων ώστε η ανάλυση να επικεντρωθεί σε γονίδια με σημαντική έκφραση. Έγινε αρχικά μία προσπάθεια να αφαιρεθούν γονίδια με πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης, καθώς μπορεί να μην έχουν βιολογική σημασία και να επηρεάζουν αρνητικά την ανάλυση. Ορίσαμε ένα κατώφλι κατά το οποίο διατηρήθηκαν μόνο γονίδια που εκφράζονται σε τουλάχιστον δύο δείγματα με επίπεδο έκφρασης μεγαλύτερο από 1. Φιλτράραμε τα δεδομένα και δημιουργήσαμε έναν νέο πίνακα γονιδιακής έκφρασης που περιλαμβάνει μόνο τα γονίδια που πληρούν αυτό το κριτήριο.

Ακολούθησε η εφαρμογή του πακέτου limma για την ανάλυση της διαφορικής έκφρασης των γονιδίων. Κατασκευάσαμε τους πίνακες αντιθέσεων (contrast matrices) για να συγκρίνουμε τις διαφορετικές συνθήκες:

- Visit1 vs Visit2
- Visit1 vs Visit3
- Visit2 vs Visit3

Ορίσαμε ως παραμέτρους για τον εντοπισμό σημαντικών γονιδίων ένα συνδυασμό του log fold change (logFC) και της απλής τιμής p (P.Value). Επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε την τιμή P.Value όπως χρησιμοποιήθηκε στις αρχικές μελέτες καθώς τα δεδομένα μας παρουσίαζαν υψηλή ομοιογένεια, εξαιτίας της κανονικοποίησης με z-score. Λάβαμε υπόψιν πως μπορεί να προκύψουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα λόγω της απουσίας διόρθωσης για πολλαπλές συγκρίσεις. Έτσι καθορίσαμε το  $\logFC > 0$  ή  $\logFC < 0$  για να διαχωρίσουμε τα upregulated και downregulated γονίδια. Ενώ το  $P.Value < 0.05$  για να επιλέξουμε γονίδια με στατιστικά σημαντική διαφορική έκφραση. Επίσης

εφαρμόσαμε κατώφλι  $\text{abs}(\log\text{FC}) > 0$  για να διασφαλίσουμε ότι τα γονίδια έχουν σημαντική διαφορά στην έκφραση. Τέλος για κάθε σύγκριση δημιουργήθηκαν λίστες με τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια. Επίσης λάβαμε υπόψιν πως μπορεί να προκύψουν ακραίες τιμές οι οποίες θα πρέπει να εξεταστούν ξεχωριστά.

Η τελική διαφοροποίηση έγινε ως εξής, τα *upregulated genes* αποτελούν γονίδια που παρουσίασαν αυξημένη έκφραση σε μία συνθήκη συγκριτικά με μία άλλη, ενώ τα *downregulated genes* παρουσίασαν μειωμένη έκφραση μεταξύ δύο συνθηκών. Για κάθε κατηγορία δημιουργήθηκαν διαφορετικοί πίνακες για περαιτέρω ανάλυση. Επίσης δημιουργήθηκε πίνακας με όλα τα σημαντικά εκφραζόμενα γονίδια.

### 3.3 Ανάλυση εμπλουτισμού δεδομένων

Ο εμπλουτισμός των αποτελεσμάτων με δεδομένα που προέρχονται από γνωστές βάσεις δεδομένων μας επιτρέπει να εντοπίσουμε και να κατανοήσουμε σημαντικές βιολογικές λειτουργίες και μονοπάτια που συνδέονται με διεργασίες όπως είναι η φλεγμονή. Επιλέξαμε αρχικά να εντοπίσουμε μονοπάτια μέσω KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Η KEGG αποτελεί μία βάση δεδομένων η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατανόηση υψηλού επιπέδου λειτουργιών και χρήσεων βιολογικών συστημάτων, με βάση τις πληροφορίες σε μοριακό επίπεδο. Αξιοποιούνται μεγάλης κλίμακας δεδομένα που προέρχονται από αλληλούχιση γονιδιώματος και άλλες τεχνολογίες υψηλής απόδοσης. [48]. Χρησιμοποιήθηκε λοιπόν για την ανάλυση εμπλουτισμένων μονοπατιών. Τα δεδομένα εισόδου αφορούν την λίστα γονιδίων που βρέθηκαν να εκφράζονται διαφορικά. Έτσι καταφέραμε να εντοπίσουμε μονοπάτια που σχετίζονται με βασικές μεταβολικές και φλεγμονώδεις διαδικασίες. Επίσης ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε σε μονοπάτια που εμπλέκονται σε ανοσολογική απόκριση καθώς και σε διεργασίες όπως είναι η σηματοδότηση και οι μεταβολικές αλληλεπιδράσεις κατά την φλεγμονώδη αντίδραση.

Στην συνέχεια ακολούθησε ανάλυση μέσω Reactome η οποία μας παρέχει λεπτομερείς πληροφορίες για μονοπάτια που εμπλέκονται στις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις διεργασίες. Η Reactome είναι μια δωρεάν, ανοιχτού κώδικα, επιμελημένη και με ομότιμη αξιολόγηση βάση δεδομένων μονοπατιών. Στόχος της είναι να παρέχει διαισθητικά εργαλεία βιοπληροφορικής για την οπτικοποίηση, την ερμηνεία και την ανάλυση της γνώσης γύρω από τα μονοπάτια, υποστηρίζοντας τη βασική έρευνα, την ανάλυση γονιδιωμάτων, τη μοντελοποίηση, τη συστημική βιολογία και την εκπαίδευση. [49]. Η ανάλυση αυτή είχε ως αποτέλεσμα να αναδειχθούν μονοπάτια που συμπεριλαμβάνουν

σηματοδοτικές οδούς κυτοκινών, ανοσοκυτταρικές αποκρίσεις καθώς και μηχανισμούς ρύθμισης μονοπατιών φλεγμονής. Έτσι εξασφαλίσαμε βαθύτερη κατανόηση των μηχανισμών που βρίσκονται πίσω από τις βιολογικές διεργασίες σε μοριακό επίπεδο.

Συνεχίσαμε την ανάλυση μας για τον προσδιορισμό βιολογικών διεργασιών μέσω Gene Ontology (GO). Μέσω του GO Consortium είναι εφικτή η ανάπτυξη ενός ολοκληρωμένου, υπολογιστικού μοντέλου βιολογικών συστημάτων, που καλύπτει από το μοριακό έως το επίπεδο του οργανισμού, για την ποικιλομορφία των ειδών στο δέντρο της ζωής. Η βάση δεδομένων Gene Ontology (GO) είναι η μεγαλύτερη πηγή πληροφοριών παγκοσμίως σχετικά με τις λειτουργίες των γονιδίων. Αυτή η γνώση είναι κατανοητή τόσο από ανθρώπους όσο και από μηχανές και αποτελεί τη βάση για την υπολογιστική ανάλυση μεγάλης κλίμακας πειραμάτων μοριακής βιολογίας και γενετικής στη βιοϊατρική έρευνα. [50]. Η βάση δεδομένων GO χρησιμοποιήθηκε για να αποσαφηνίσει βιολογικές λειτουργίες που σχετίζονται με την φλεγμονή και την ανοσολογική απόκριση, επικεντρώνοντας την αναζήτηση σε όρους που σχετίζονται με διεργασίες που εμπλέκονται στην αναγνώριση και απόκριση του οργανισμού σε παθογόνα και βιολογικούς παράγοντες, στην παραγωγή κυτοκινών οι οποίες αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της φλεγμονώδους αντίδρασης. Επίσης εξετάστηκαν κι άλλοι σχετικοί όροι που μας βοήθησαν στο να εντοπίσουμε κρίσιμες διαδικασίες όπως η σηματοδότηση και η επικοινωνία μεταξύ κυτταρικών συστημάτων του ανοσοποιητικού συστήματος.

Στην συνέχεια ακολούθησε η διασταύρωση των ευρημάτων μέσω MSigDB. Η Βάση Δεδομένων Μοριακών Υπογραφών (Molecular Signatures Database - MSigDB) είναι μια πηγή που περιλαμβάνει δεκάδες χιλιάδες επισημασμένα σύνολα γονιδίων για χρήση με το λογισμικό GSEA, χωρισμένα σε συλλογές για τον Άνθρωπο και το Ποντίκι. Ανάμεσα στις λειτουργίες της μπορούμε να αναζητήσουμε σύνολα γονιδίων με βάση λέξεις-κλειδιά και να διερευνήσουμε σύνολα γονιδίων. [51]. Στην περίπτωση μας εστίασαμε σε υπογραφές που σχετίζονται με την ανοσολογική απόκριση και την φλεγμονή. Η διασταύρωση των δεδομένων μας βοήθησε να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα για την ενίσχυση της αξιοπιστίας της ανάλυσης μας, συνδέοντας τα ευρήματα με καθιερωμένα σύνολα γονιδίων από την βάση δεδομένων.

### **3.4 Οπτικοποίηση αποτελεσμάτων**

Τέλος προχωρήσαμε στην οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων μας ώστε να μπορέσουμε να έχουμε μία πιο σαφή εικόνα κατά τον σχολιασμό των αποτελεσμάτων μας. Η χρήση Barplots μας βοηθάει στο να αναδείξουμε τον εμπλουτισμό των μονοπατιών παρέχοντας μια ξεκάθαρη οπτική αναπαράσταση

της σημασίας κάθε μονοπατιού, χρησιμοποιώντας το ύψος των στηλών για να εκφράσουν τη στατιστική σημασία ή τον βαθμό εμπλουτισμού. Σε ανάλογη φιλοσοφία κινηθήκαμε και με τα dotplots στα οποία μπορέσαμε να εντοπίσουμε την ένταση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων, των όγκο αυτών και την σχέση του με γνωστές διεργασίες που σχετίζονται με την φλεγμονή. Επίσης έγινε χρήση των Volcano plots τα οποία μας επιτρέπουν να εντοπίσουμε τον σχετικό βαθμό έκφρασης σε σχέση με την στατιστική σημαντικότητα.

Heatmaps χρησιμοποιήθηκαν για την γραφική απεικόνιση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με ανοσολογική απόκριση σε διάφορες συνθήκες. Παρουσιάζεται έτσι η ένταση της έκφρασης γονιδίων, διευκολύνοντας την αναγνώριση προτύπων έκφρασης διαφορετικών ομάδων. Μας βοηθούν στην ανάδειξη ομάδων γονιδίων με παρόμοια συμπεριφορά και κατηγοριοποίηση βάσει των προφίλ έκφρασης τους.

Με την συνδυαστική χρήση στατιστικών μεθόδων και εργαλείων εμπλουτισμού μονοπατιών μας δίνεται η δυνατότητα να συλλέξουμε πληροφορίες για μοριακούς μηχανισμούς που μπορεί να επηρεάζουν την πορεία μιας φλεγμονής. Έτσι μπορούμε να κατανοήσουμε καλύτερα την συσχέτιση της διατροφής με μηχανισμούς ανοσολογικής απόκρισης και να αναπτύξουμε νέες στρατηγικές για την βελτίωση της υγείας.

# Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>:

---

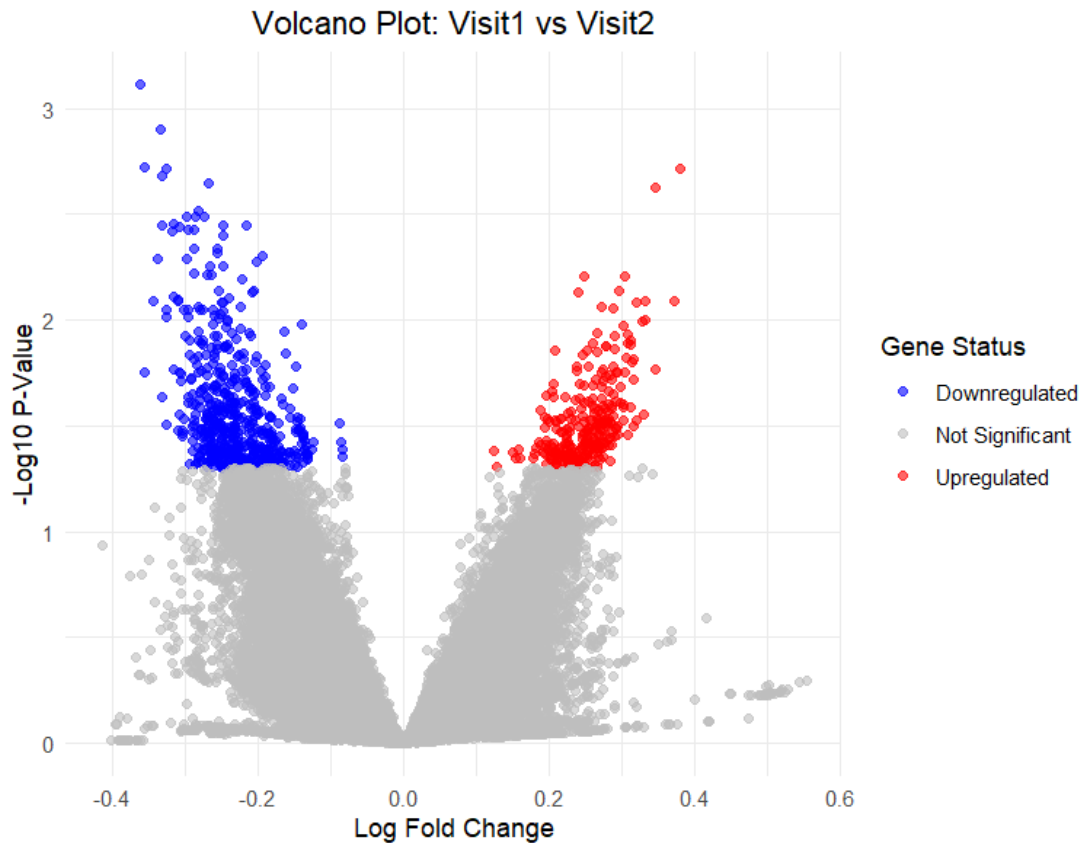
## 4 Παρουσίαση αποτελεσμάτων, συζήτηση και μελλοντικές προοπτικές

Στην τελευταία ενότητα που ακολουθεί γίνεται μία αναλυτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της στατιστικής μελέτης καθώς και μία σύγκριση με τα είδη γνωστά δεδομένα από την βιβλιογραφία. Ακολουθώντας την ανάλυση λαμβάνουμε μία πολυπαραμετρική βάση για την αξιολόγηση της επίδρασης της διατροφής στην φλεγμονή. Κάνοντας συνδυαστική χρήση στατιστικών μεθόδων και μεθόδων εμπλουτισμού μονοπατιών μπορούμε να λάβουμε πληροφορίες για τους μοριακούς μηχανισμούς που συνδέονται με την φλεγμονώδη απόκριση και κατ' επέκταση να αξιολογήσουμε αν συγκεκριμένη διατροφική προσέγγιση θα μπορούσε να έχει αποτελέσματα γιατί όχι και σε συγκεκριμένες ανοσολογικές καταστάσεις.

### 4.1 Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης

Όπως ήδη αναφέραμε κατά την εφαρμογή της στατιστικής ανάλυσης καταφέραμε να εντοπίσουμε τα σημαντικότερα εκφραζόμενα γονίδια ανάμεσα σε τρεις παραμέτρους. Έτσι δημιουργήσαμε έναν πίνακα στον οποίο συγκεντρωτικά παραθέσαμε όλα τα γονίδια με σημαντική διαφορική έκφραση.

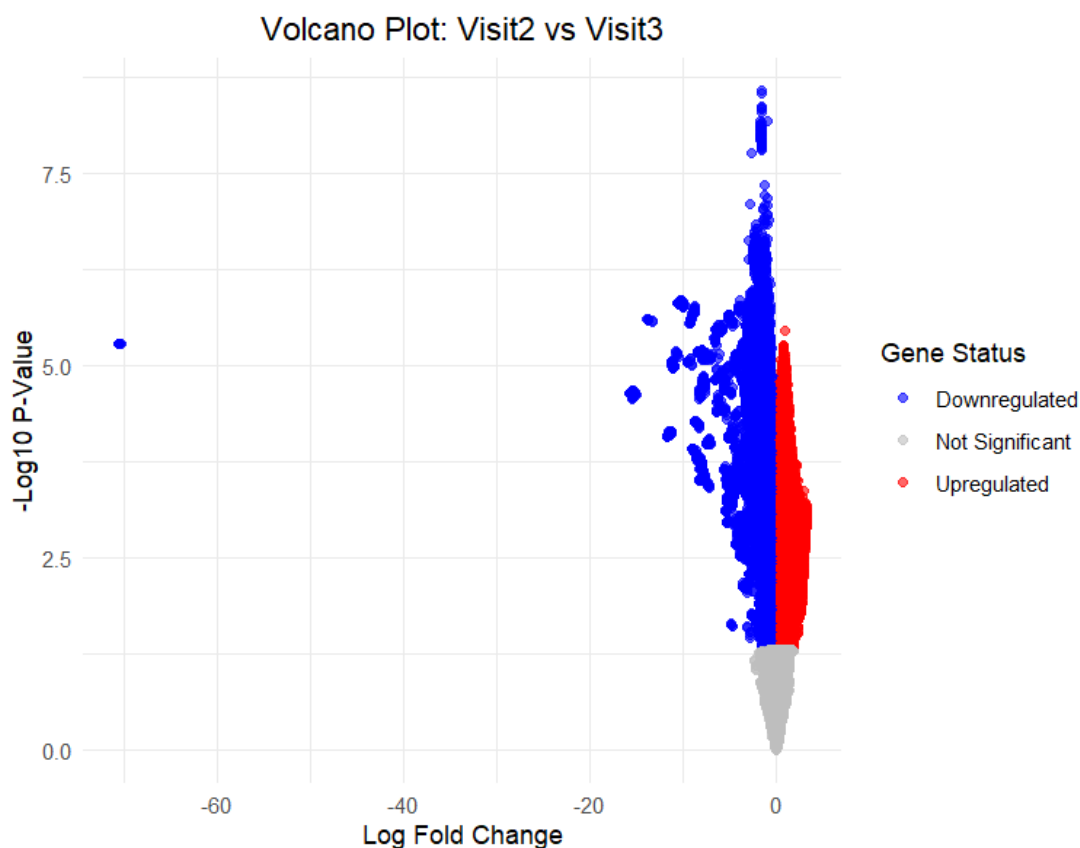
Μεταξύ των συνθηκών Visit 1 και Visit 2 λάβαμε 814 γονίδια με σημαντική διαφορική έκφραση. Επιπλέον καταφέραμε και εντοπίσαμε 270 γονίδια upregulated ενώ 544 είναι downregulated. Αυτές οι δύο συνθήκες είναι που συγκρίνουν κυρίως την απόκριση του οργανισμού μετά από κατανάλωση 8 εβδομάδων φλαβονοειδών, φρούτων και λαχανικών και τι αντίκτυπο έχουν στην έκφραση γονιδίων. Όπως αναμέναμε η κατανάλωση αυτών των κατηγοριών τροφίμων είχε ως αποτέλεσμα την έκφραση σημαντικών γονιδίων που σχετίζονται με την φλεγμονή και την πορεία της. Οπτικοποιήσαμε τα δεδομένα της πρώτης σύγκρισης με την βοήθεια ενός Volcano Plot όπου μπορέσαμε να παρατηρήσουμε την αρνητική και θετικής έκφραση των σημαντικότερων γονιδίων (Εικόνα 2). Παρατηρούμε την ύπαρξη γονιδίων με μεγάλες αλλαγές στην έκφραση και χαμηλά p-values, κάτι που μπορεί να είναι κρίσιμο για τη βιολογική ερμηνεία.



**Εικόνα 2** Volcano plot σύγκρισης συνθηκών Visit1 vs Visit2

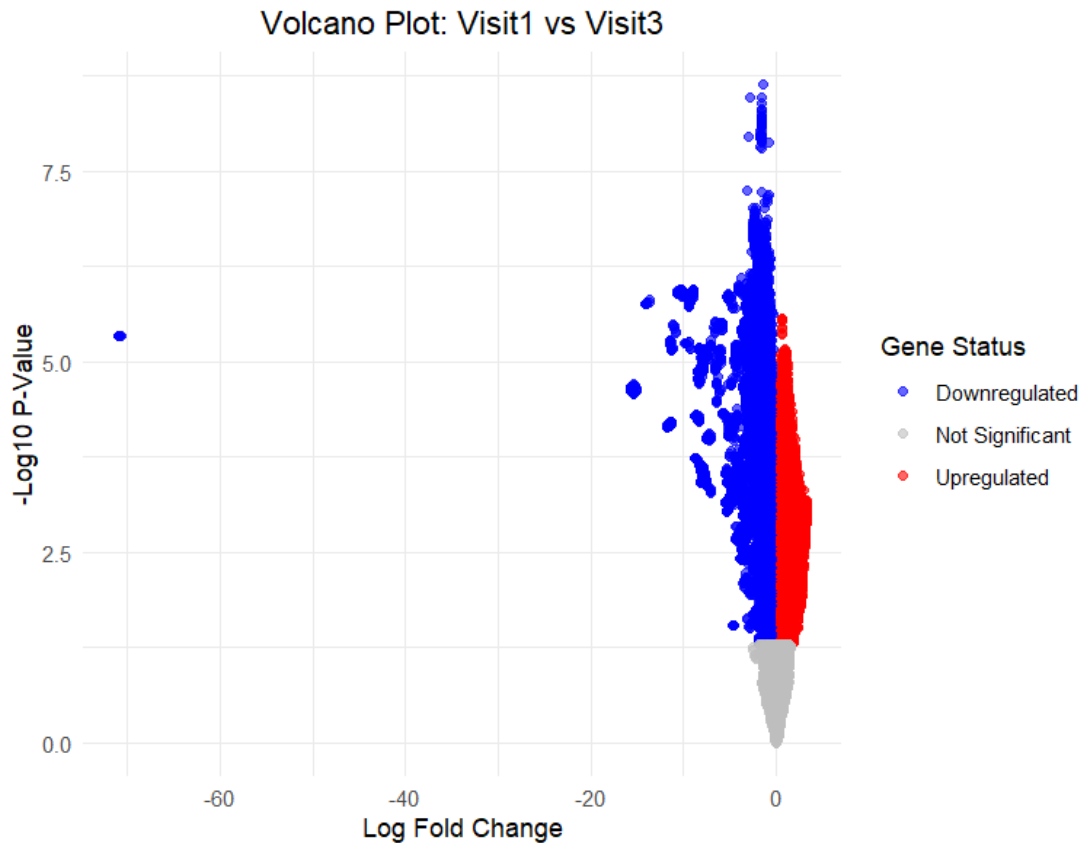
Μεταξύ των συνθηκών Visit 2 και Visit 3 τα αποτελέσματα μας μεταβάλλονται. Οι συνθήκη Visit 3 προέρχεται από την μελέτη κατανάλωσης γεύματος πλούσιου σε λιπαρά ωστόσο επικεντρώνεται στα δεδομένα μετά από νηστεία. Η σύγκριση μεταξύ των δύο συνθηκών επικεντρώνεται κυρίως στην διαφορική έκφραση γονιδίων μετά από περίοδο νηστείας και ως εκ τούτου παρατηρούμε αυξημένη απόκριση του οργανισμού. Όπως είναι αναμενόμενο μετά την κατανάλωση γεύματος στον καταβολισμό ενεργοποιούνται και τα περισσότερα μεταβολικά μονοπάτια και κυρίως μονοπάτια που σχετίζονται με την κυτταρογένεση, την κυτταρική κίνηση και αποκατάσταση. Επίσης τα δεδομένα της τρίτης εργασίας προέρχονται από RNA – sequencing που από όσο γνωρίζουμε είναι μία πιο ευαίσθητη μέθοδος απ’ ότι η χρήση Microarrays, αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον εντοπισμό περισσότερων αλλαγών στην γονιδιακή έκφραση. Η τρίτη εργασία ουσιαστικά είναι η πρώτη που αναφέρεται αυξημένη ρύθμιση των μονοπατιών της έμφυτης ανοσολογικής σηματοδότησης κατά την μεταγευματική περίοδο. Έτσι λοιπόν καταφέραμε να εντοπίσουμε 91870 γονίδια με σημαντική διαφορική έκφραση. Επιπλέον καταφέραμε και εντοπίσαμε 57485 γονίδια upregulated ενώ 34385 είναι downregulated. Κατά την οπτικοποίηση αυτών των δεδομένων παρατηρήσαμε και κάποιες ακραίες τιμές που ήταν αναμενόμενο

καθώς λάβαμε υπόψιν το p.value για το φιλτράρισμα των δεδομένων μας και περιμέναμε να δούμε και κάποιο ποσοστό ακραίων τιμών. (Εικόνα 3)



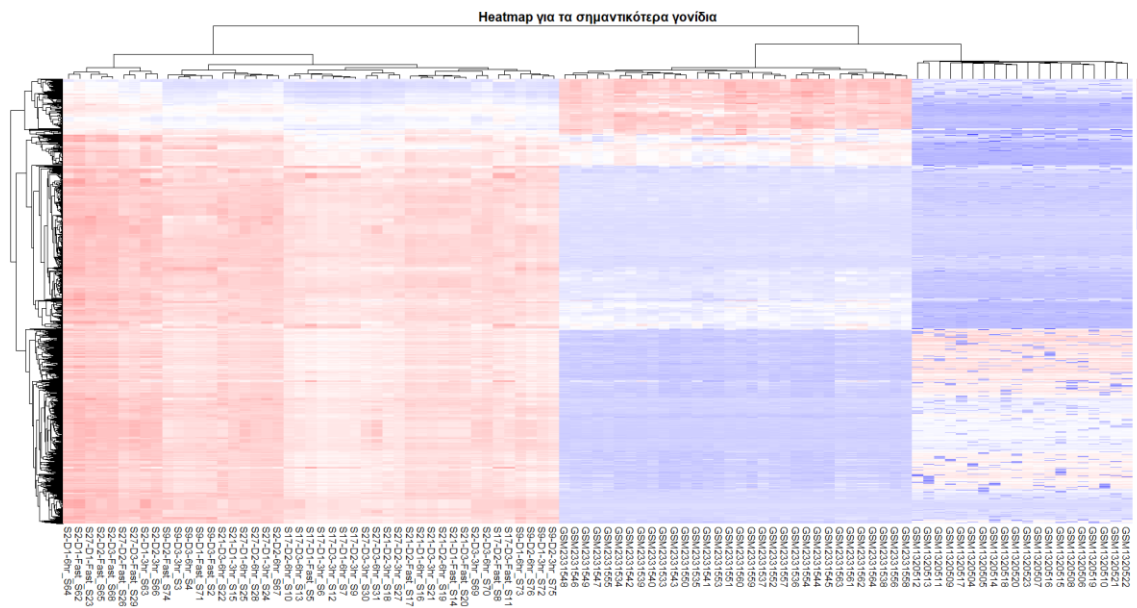
**Εικόνα 3** Volcano plot σύγκρισης συνθηκών Visit2 vs Visit3. Η τρίτη εργασίας παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στα αποτελέσματα και έτσι παρατηρούμε και μία αύξηση στην διαφορική έκφραση γονιδίων μεταγευματικά. Βλέπουμε έναν σημαντικό αριθμό γονιδίων που εκφράζονται διαφορετικά ανάμεσα στις δύο συνθήκες.

Μεταξύ των συνθηκών Visit 1 και Visit 3 έχουμε επίσης αντίστοιχα μεγάλη απόκριση, εξαιτίας της εργασίας 3 και αυτό γιατί εξετάζουμε τις δύο ακραίες υποθέσεις, δηλαδή δείγματα μετά από νηστεία και δείγματα μεταγευματικά. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η συγκεκριμένη εργασία μελετά σε χρονικό εύρος ωρών τις επιπτώσεις της κατανάλωσης τροφών που ξέρουμε πως αυξάνουν την αντίδραση φλεγμονής, σε άμεσο χρόνο, δηλαδή μεταγευματικά. Η συνθήκη 1 (Visit1) σε αντίθεση με την συνθήκη 2 (Visit2) διαφοροποιείται χρονικά καθώς η πρώτη προηγείται της δεύτερης και άρα κατά την σύγκριση τους με την συνθήκη 3 (Visit3) αναμένουμε παραπλήσια δεδομένα ή με μικρές διαφοροποιήσεις καθώς μεταγευματικά και μετά την πάροδο ωρών ενεργοποιούνται και απενεργοποιούνται μηχανισμοί που σχετίζονται με την έκκριση ορμονών, τον μεταβολισμό της τροφής, την κυτταρική αναγέννηση κλπ. Έτσι λοιπόν καταφέραμε να εντοπίσουμε 92061 γονίδια με σημαντική διαφορική έκφραση. Επιπλέον καταφέραμε και εντοπίσαμε 57294 γονίδια upregulated ενώ 34767 είναι downregulated.



**Εικόνα 4** Volcano plot σύγκρισης συνθηκών Visit1 vs Visit3. Τα αποτελέσματα μεταξύ Visit2 – Visit 3 και Visit1-Visit3 είναι παραπλήσια καθώς μελετάνε αποτελέσματα γονιδιακής έκφρασης μέσα σε χρονικό διάστημα ωρών όπου μεταγευματικά έχουμε την ενεργοποίηση πολλών σηματοδοτικών μονοπατιών που συνδέονται με διάφορες λειτουργίες.

Από την στατιστική ανάλυση καταφέραμε να εξάγουμε ένα σύνολο των σημαντικότερων γονιδίων που εκφράζονται καθώς και ποια από αυτά εμφανίζουν θετική έκφραση και ποια αρνητική. Συγκεντρώσαμε τα σημαντικότερα γονίδια σε ένα αρχείο πάνω στο οποίο κάναμε και την μελέτη εμπλουτισμού. Αυτό το αρχείο περιέχει τα σημαντικότερα εκφραζόμενα γονίδια, ωστόσο έχουν αφαιρεθεί τα διπλότυπα ώστε να μπορέσουμε να εξετάσουμε και να εμπλουτίσουμε τους μηχανισμούς που υπάρχουν πίσω από την έκφραση αυτή. Αφού αφαιρέσαμε τις διπλότυπες τιμές είδαμε ουσιαστικά πως έχουμε 9246 σημαντικά γονίδια που εμφανίζονται και στις τρεις μελέτες. Παράλληλα καταφέραμε να διακρίνουμε 8279 upregulated γονίδια και 1291 downregulated γονίδια. Στην Εικόνα 5 μπορούμε να δούμε ένα δείγμα των 50 σημαντικότερων εκφραζόμενων γονιδίων ως γραφική απεικόνιση της έκφρασης των σημαντικότερων γονιδίων στις διαφορετικές συνθήκες.



**Εικόνα 5 Heatmap των 50 σημαντικότερων γονιδίων που βρέθηκαν να εκφράζονται στις διαφορετικές συνθήκες.**

Όπως εξηγήσαμε τα δεδομένα της τρίτης μελέτης παρουσιάζουν μεγαλύτερη πολυπλοκότητα καθώς αποτελούν το σύνολο των εκφραζόμενων γονιδίων μεταγευματικά αφού έχει προηγηθεί μία περίοδος νηστείας. Η πρώτη και δεύτερη μελέτη έχει επικεντρωθεί περισσότερο σε έκφραση γονιδίων μετά από συστηματική πρόσληψη μιας ομάδας τροφίμων. Εξετάζοντας τα δεδομένα που έχουμε λάβει σε βάθος παρατηρούμε πως εντοπίζονται γονίδια που σχετίζονται με σημαντικές ανοσολογικές διεργασίες. Μπορεί λόγω της επιλογής που έχουμε κάνει με κριτήριο το P.Value και το logFC κάποια από αυτά να εμφανίζουν σημαντική έκφραση λόγω οριακών τιμών. Αξίζει να αναφέρουμε πως ανάμεσα στα significant genes εντοπίσαμε γονίδια όπως το S100A8, το NFKB1 και τα γονίδια IL6R και IL6ST.

Το γονίδιο S100A8 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, γνωστή και ως καλγρανουλίνη A, που είναι μέλος των S100 πρωτεϊνών που δεσμεύουν ιόντα ασβεστίου και ψευδαργύρου. Μαζί με την S100A9 δημιουργούν ένα σύμπλοκο που παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση φλεγμονωδών αντιδράσεων και την ανοσολογική απόκριση [ 52]. Πιο συγκεκριμένα το σύμπλοκο συμβάλλει στη ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης με την διέγερση της προσέλκυσης λευκοκυττάρων και την επαγωγική έκκριση κυτοκινών. Επιπλέον λειτουργεί ως σηματοδοτικό μόριο καθώς ενεργοποιεί τους TLR4 και RAGE, οι οποίοι με την σειρά τους ενεργοποιούν μονοπάτια όπως το NF-κB και οδηγούν σε αύξηση της έκφρασης των προφλεγμονωδών γονιδίων [53]. Επιπλέον, το S100A8/A9 σύμπλοκο μπορεί να λειτουργεί ως μόριο σηματοδότησης, ενεργοποιώντας υποδοχείς όπως ο TLR4 (Toll-like receptor 4) και ο RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products), οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν μονοπάτια όπως το NF-κB,

οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση προ-φλεγμονωδών γονιδίων. Τέλος έχει βρεθεί πως η αυξημένη έκφραση του S100A8/A9 συσχετίζεται με διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες και η αναστολή της δραστηριότητας του έχει δείξει βελτίωση παθολογικών καταστάσεων σε πειραματικά μοντέλα. Αυτό το καθιστά έναν πιθανό πειραματικό στόχο [53]. Η καταστολή της έκφρασης του συγκεκριμένου γονιδίου ήταν σημαντική κάτι που μας υποδεικνύει πως μπορεί να έχει θετική δράση στην εξέλιξη μιας φλεγμονής. Το ενδιαφέρον προέρχεται πως η καταστολή της έκφρασης αυτού του γονιδίου προέρχεται κυρίως από την συνθήκη 3 (Visit3) η οποία περιλαμβάνει κυρίως δεδομένα έκφρασης μετά από νηστεία.

Το γονίδιο NFKB1 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p105 η οποία κατόπιν επεξεργασίας παράγει την p50 υπομονάδα του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ο οποίος στον πυρήνα διεγείρει την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται με πολλές βιολογικές λειτουργίες [54]. Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας στο NFKB1 έχουν αναγνωριστεί ως η πιο κοινή αιτία της κοινής μεταβλητής ανοσοανεπάρκειας (CVID) στην Ευρώπη [55]. Ανάλογα με το κυτταρικό πλαίσιο και τα ερεθίσματα ο NFKB1 μπορεί να παίξει είτε κατασταλτικό είτε ρόλο διέγερσης στην πορεία μιας φλεγμονής. Εντοπίσαμε πως το γονίδιο NFKB1 παρουσιάζει αύξηση της διαφορικής έκφρασης του κυρίως μεταγευματικά αλλά και μετά από την κατανάλωση φρούτων και λαχανικών. Επειδή ακόμα και στις εργασίες που μελετούν την κατανάλωση φλαβονοειδών αλλά και φρούτων και λαχανικών η διατροφικές επιλογές των συμμετεχόντων δεν έχουν μεταβληθεί κατά κάποιο συγκεκριμένο τρόπο δεν μπορούμε να εντοπίσουμε ακριβώς που μπορεί να οφείλετε η αύξηση της έκφρασης αυτού του παράγοντα. Και στις 3 εργασίες οι συμμετέχοντες λαμβάνουν φυσιολογικές αναλογίες διαθρεπτικών συστατικών που εναρμονίζονται με τις διατροφικές συστάσεις της χώρας τους.

Τα γονίδια IL6R και IL6ST σχετίζονται με τον υποδοχέα της IL6, μιας κυτοκίνης που παίζει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στην φλεγμονώδη απόκριση. Η σύνδεση της IL6 με την IL6R προκαλεί ομοδιμερισμό της IL6ST και οδηγεί στον σχηματισμό ενός υποδοχέα υψηλής συγγένειας ο οποίος ενεργοποιεί ενδοκυτταρικά μονοπάτια που εμπλέκονται στην προαγωγή της φλεγμονής [56]. Μεταλλάξεις στο γονίδιο IL6ST έχουν συνδεθεί με το σύνδρομο της υπερηωσινοφιλίας τύπου 4B (Hyper-IgE recurrent infection syndrome – 4B), μία σπάνια υπολειπόμενη ανοσολογική διαταραχή [57]. Τα δύο αυτά γονίδια είναι σημαντικά για την μετάδοση σημάτων της IL6 και επηρεάζουν την έναρξη και ρύθμιση της φλεγμονής ενώ εντοπίσαμε μείωση της έκφρασης τους (downregulated)

Επιπλέον εντοπίστηκαν γονίδια με ασθενέστερη διαφορική έκφραση (είτε upregulated είτε downregulated) που όμως συνδέονται άμεσα με την έναρξη και την πορεία της φλεγμονής. Ανάμεσα στα σημαντικότερα εκφραζόμενα γονίδια εντοπίστηκαν και τα TNF, TLR4, PTGS2, IL8, IL1B καθώς και τα γονίδια των υποδοχέων CCL23 και CCL28 που σχετίζονται με πιο εξειδικευμένες ανοσολογικές λειτουργίες. Ο TNF (Tumor Necrosis Factor) είναι μία κυτοκίνη με κύριο ρόλο την ρύθμιση της φλεγμονώδους απόκρισης. Παράγεται από τα μακροφάγα και από τα λεμφοκύτταρα και συμμετέχει στις διαδικασίες απόπτωσης και ανοσολογικής απόκρισης. Έχει συνδεθεί με υπερέκφραση σε ασθένειες όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα και η νόσος του Crohn. Εξετάζοντας ηπατικό ιστό αρουραίων μετά την κατανάλωση αμμώδους μυδιού παρατηρήθηκε ότι η συσσώρευση βαρέων μετάλλων στους ιστούς των μυδιών μπορεί να προκαλέσει την ηπατοτοξικότητα, με αυξημένη ανοσοαντιδραστικότητα του TNF-α στα ηπατικά κύτταρα των αρουραίων. Αυτό μας δείχνει πως ο TNF-α εμπλέκεται στην πρόκληση φλεγμονώδους αντίδρασης στο ήπαρ εξαιτίας τοξικών ουσιών [58]. Αξίζει να αναφέρουμε πως ενώ επιλέγοντας ως κριτήρια τα  $\log_{2}FC > 1$  και  $pValue < 0.05$  το γονίδιο του TNF ενώ εντοπίζεται ως σημαντικό γονίδιο, δεν χαρακτηρίζεται από υψηλή διαφορική έκφραση, αντιθέτως τα γονίδια TNFSF13B, TNFRSF14 που διαδραματίζουν επίσης πολύ σημαντικό ρόλο στην φλεγμονή μέσα από την επίδραση τους στην επιβίωση, την ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των ανοσοκυττάρων, φαίνεται να εμφανίζουν σημαντική διαφορική έκφραση.

Αναφορικά με το γονίδιο της IL8, ομοίως με τον TNF, δεν εμφανίζει σημαντική διαφορική έκφραση στις παραμέτρους που ορίσαμε, ωστόσο παρατηρούμε υψηλή διαφορική έκφραση του γονιδίου IL8RB (Interleukin 8 Receptor Beta γνωστό και ως CXCR2) το οποίο με την σειρά του κωδικοποιεί έναν υποδοχέα της κυτοκίνης IL-8 ο οποίος παίζει κρίσιμο ρόλο στην ρύθμιση των φλεγμονωδών αντιδράσεων. Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι πως το συγκεκριμένο γονίδιο εμφανίζεται και ως upregulated αλλά και ως downregulated και μάλιστα με σημαντική διαφορική έκφραση και αυτό έχει να κάνει με την διατροφική επιλογή σε κάθε αναφορά. Για παράδειγμα στην περίπτωση κατανάλωσης αυξημένων λιπαρών έχουμε σημαντική αύξηση στην έκφραση του, ενώ στην περίπτωση κατανάλωσης γευμάτων πλούσιων σε φλαβονοειδή έχουμε μείωση της έκφρασης του. Αυτό ενισχύει την θεωρία πως γεύματα πλούσια σε λιπαρά μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την φλεγμονώδη αντίδραση και να παρουσιαστεί έξαρση της φλεγμονής.

Η παρουσία γονιδίων όπως το TLR4, PTGS2, IL1B που σχετίζονται με την έναρξη και την πορεία της φλεγμονής δεν εμφανίζει σημαντική διαφορική έκφραση παρά το γεγονός πως σχετίζονται με την φλεγμονώδη αντίδραση και διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους. Ίσως κυρίως γιατί η έκφραση τους ελέγχεται και από άλλους παράγοντες και συμμετέχουν σε πιο εξειδικευμένες διεργασίες. Επίσης στην μία εκ των τριών εργασιών τα αποτελέσματα ήταν αρκετά ήπια ως προς τον αριθμό των γονιδίων που εμφάνιζαν υψηλή διαφορική έκφραση. Η σύγκριση των συνθηκών 1 και 2 (Visit1 και Visit2) επέστρεψε τον μικρότερο αριθμό γονιδίων.

## 4.2 Αποτελέσματα μελέτης εμπλουτισμού

Ο εμπλουτισμός των δεδομένων μας και η συσχέτιση τους με γνωστά βιολογικά μονοπάτια είναι σημαντικός σε αυτό το στάδιο. Καταφέραμε να εντοπίσουμε διαφορική έκφραση σε γονίδια που σχετίζονται με μηχανισμούς ανοσολογικής απόκρισης είτε έμμεσα είτε άμεσα. Προσπαθώντας να αντιστοιχίσουμε τα GENE\_IDS με τις εγγραφές ENTREZID έπρεπε να εντοπίσουμε τα μοναδικά γονίδια με επιτυχώς χαρτογραφημένα ENTREZID's και να φιλτράρουμε πιθανές διπλές αντιστοιχίες. Αυτό συμβαίνει γιατί υπάρχουν πάντα κάποια γονίδια που δεν συμπεριλαμβάνονται στην βάση δεδομένων που επιλέξαμε ή δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως. Επίσης στην περίπτωση μας είχαμε και γονίδια με περισσότερα από ένα χαρακτηριστικά στην βάση δεδομένων δηλαδή γονίδια με περισσότερες αντιστοιχίες εξαιτίας εναλλακτικών ονομασιών και έκφρασης ισομορφικών προϊόντων.

Από την βάση δεδομένων KEGG Pathway Enrichment Analysis μπορέσαμε να εντοπίσουμε μονοπάτια που σχετίζονται γενικά με ανοσολογικές αποκρίσεις στην Εικόνα 6 εμφανίζονται μετά από φιλτράρισμα μονοπάτια που σχετίζονται με φλεγμονώδης καταστάσεις, η ένταση του χρώματος μας επιτρέπει να εντοπίσουμε την ένταση της διαφορικής έκφρασης και ο άξονας χ μας δείχνει τον αριθμό των γονιδίων που εντοπίστηκαν. Τα γονίδια με σημαντική διαφορική έκφραση που σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, λειτουργίες του μεταβολισμού και έναρξη και διάδοση της φλεγμονής. Στο διάγραμμα που ακολουθεί εμφανίζονται τα μονοπάτια που εντοπίστηκαν – επιλέξαμε μία λίστα με βάση λέξεις και φράσεις κλειδιά που σχετίζονται με την φλεγμονή – το μήκος της κάθε μπάρας αντιστοιχεί στον αριθμό των γονιδίων που εντοπίστηκαν στο σύνολο μας.

Αξίζει να αναφερθούμε στα σηματοδοτικά μονοπάτια του TNF όπου γνωρίζουμε πως ενεργοποιείται σε περιπτώσεις χρόνιας φλεγμονής, αυτοάνοσων νοσημάτων και ανοσολογικής απόκρισης. Παρατηρήσαμε αρκετά γονίδια που σχετίζονται με αυτό το μονοπάτι με μία μέτριας έντασης διαφορική έκφραση.

Επίσης παρατηρήσαμε αυξημένη έκφραση του VEGF σηματοδοτικού μονοπατιού, από μελέτες που έχουν προηγηθεί γνωρίζουμε πως το VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) σηματοδοτικό μονοπάτι σχετίζεται με χρόνιες φλεγμονές, καρκίνο και ρευματοειδή αρθρίτιδα. Επίσης αλληλοεπιδρά με άλλα μονοπάτια που σχετίζονται με την φλεγμονή όπως το NF-κB signaling και το TNF signaling. Είναι ενδιαφέρον να αναφέρουμε πως ο VEGF σχετίζεται με την ρευματοειδή αρθρίτιδα καθώς εκτός από τον αγγειογενετικό του ρόλο, μπορεί να δράσει ως άμεσος προφλεγμονώδης μεσολαβητής κατά της διάρκειας της παθογένεσης της ρευματοειδής αρθρίτιδας συμβάλλοντας στην υπερπλασία του αρθρικού συστήματος, προστατεύοντας τα αρθρικά κύτταρα από την απόπτωση [59].

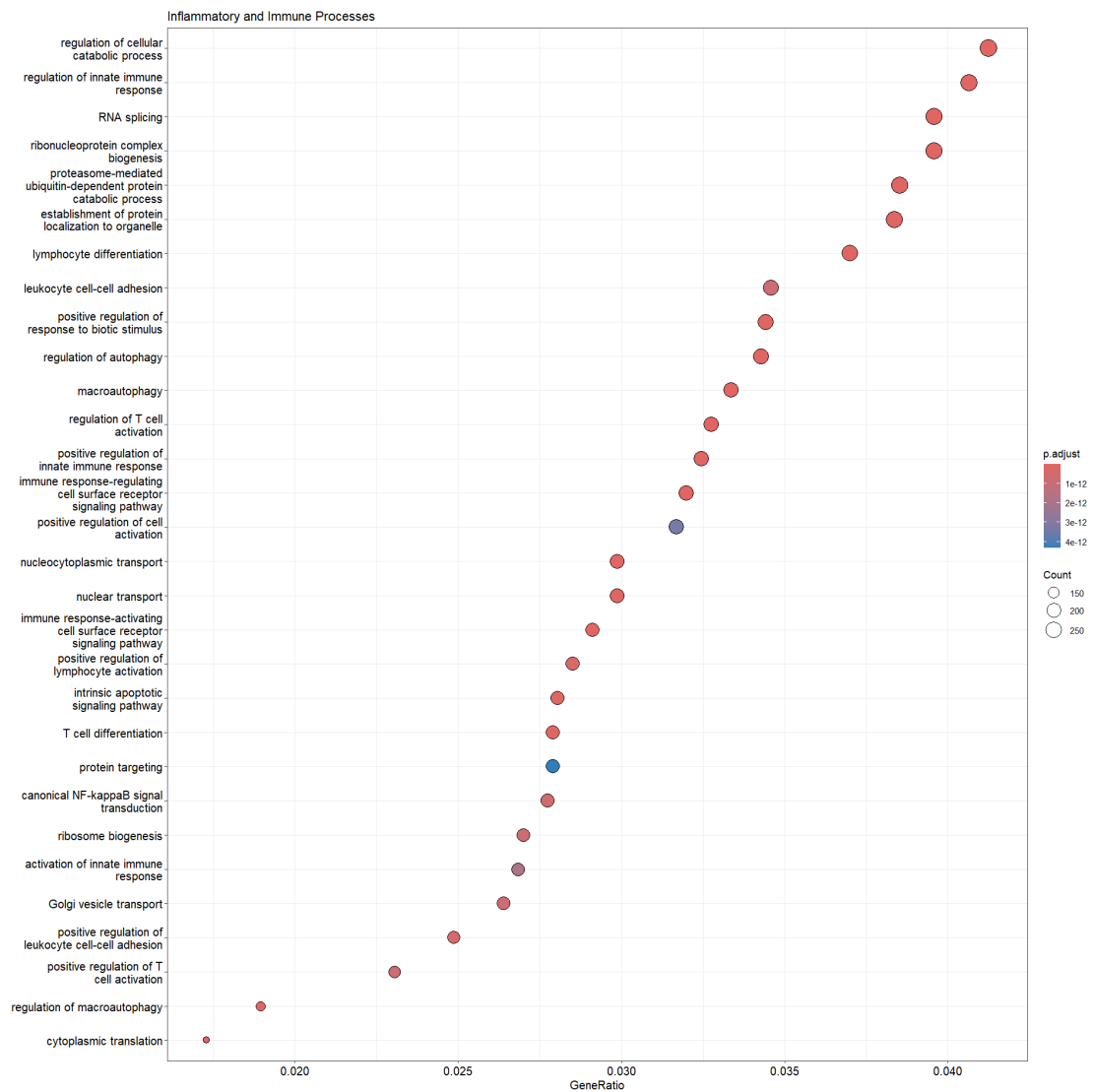
Ένα ακόμα σηματοδοτικό μονοπάτι που φαίνεται να έχει ισχυρή παρουσία είναι αυτό της ενεργοποίησης των MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) το οποίο φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο σε βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η επιβίωση και ο κυτταρικός θάνατος. Η απόκλιση από τον αυστηρό έλεγχο της σηματοδότησης MAPK εμπλέκεται στην ανάπτυξη πληθώρας ασθενειών όπως η νόσος του Alzheimer, η νόσος του Parkinson, η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) και διάφοροι τύποι καρκίνων. [60]

Αξίζει να αναφερθούμε στην ενεργοποίηση του NF-κB καθώς και από την μελέτη εμπλουτισμού αλλά και από την αντιστοίχιση των γονιδίων μέσω της MSigDB για ανοσολογικές διαδικασίες εντοπίστηκαν πολλά γονίδια η διαφορική έκφραση των οποίων σχετίζεται με τον NF-κB. Ο μεταγραφικός παράγοντας NF-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) είναι ένας κεντρικός ρυθμιστής της φλεγμονώδους απόκρισης που ενεργοποιείται από διάφορα ερεθίσματα και έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται στην φλεγμονή. Διεγείρει την έκφραση διάφορων προ-φλεγμονοδών γονιδίων που περιλαμβάνουν την ρύθμιση της έκφρασης των κυτοκινών. Επιπλέον παίζει κρίσιμο ρόλο στην ρύθμιση της επιβίωσης, ενεργοποίησης και διαφοροποίησης των T-λεμφοκυττάρων. Έχει μελετηθεί για την συσχέτιση του και την ενεργοποίηση του σε διάφορες φλεγμονώδεις ασθένειες [61].

Άλλα ενδιαφέροντα ευρήματα αφορούν τα σηματοδοτικά μονοπάτια των υποδοχέων τύπου C λεκτίνης (C-type lectin receptors, CLRs), των υποδοχέων τύπου Toll (Toll-like receptors, TLRs) και την σηματοδοτική οδό Notch (Notch signaling pathway) και τα τρία αυτά σηματοδοτικά μονοπάτια εξετάζονται ως προς την σχέση τους με την έναρξη και διάδοση της φλεγμονής. Οι υποδοχείς CLRs αποτελούν μία οικογένεια διαμεμβρανικών υποδοχέων που εκφράζονται



Συνεχίζοντας την ανάλυση εμπλουτισμού μας επικεντρωθήκαμε σε εκείνες τις διεργασίες που σχετίζονται περισσότερο με την φλεγμονή και πήραμε ένα dotplot από την ανάλυση εμπλουτισμού της GO (Gene Ontology). Στην προσπάθεια μας να οπτικοποιήσουμε τα αποτελέσματα αναπτύξαμε ένα dotplot που περιλαμβάνει την διαφορική έκφραση του συνόλου των γονιδίων σε σχέση με καταστάσεις που σχετίζονται με την φλεγμονή. Τα αποτελέσματα μας εναρμονίζονται με τα αποτελέσματα που λάβαμε μέσω του εμπλουτισμού με την KEGG καθώς επιλέχθηκαν πιο στοχευμένα μονοπάτια που σχετίζονται με την έναρξη, μετάδοση και πορεία της φλεγμονής. Κι εδώ δεσπόζουν σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με τον NF-κΒ, την διαφοροποίηση T-λεμφοκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη ανοσολογικών παραγόντων και τον κυτταρικό θάνατο (Εικόνα 7)



**Εικόνα 7** Dotplot με αποτελέσματα της ανάλυσης GO, το μέγεθος κάθε κουκίδας είναι αναλογικό με τον αριθμό των γονιδίων που εντοπίστηκαν ενώ το χρώμα είναι ενδεικτικό για την ένταση της έκφρασης.

Με την χρήση της MSigDB και συγκεκριμένα της συλλογής C7 που σχετίζεται με ανοσολογικές διεργασίες μπορέσαμε και εντοπίσαμε λειτουργικά μονοπάτια και υπογραφές γονιδίων που σχετίζονται με συγκεκριμένες βιολογικές ανοσολογικές διεργασίες. Πολλαπλές εγγραφές γονιδίων που σχετίζονται με παρόμοιες διεργασίες αντιστοιχήθηκαν με τις μελέτες που έχουν αναφερθεί στην PUBMED και μπορέσαμε να βρούμε τις αντίστοιχες εγγραφές τους. Μπορέσαμε να φιλτράρουμε τις εγγραφές αυτές με βάση συγκεκριμένες λέξεις κλειδιά και να κάνουμε μία ενδοσκόπηση στις εργασίες που έχουν αναφερθεί στο παρελθόν. Εντοπίσαμε συσχετίσεις των γονιδίων μας με σηματοδοτικά μονοπάτια που λαμβάνουν μέρος σε ανοσολογικές αποκρίσεις. Ο όγκος των δεδομένων που λάβαμε ήταν αρκετός για να εντοπίσουμε συσχετίσεις που επιβεβαιώνουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την έναρξη και έκταση μιας φλεγμονώδους αντίδρασης και της διατροφής.

### **4.3 Σύγκριση αποτελεσμάτων με αρχικές εργασίες**

Συγκριτικά με τα αποτελέσματα των αρχικών εργασιών έχει ενδιαφέρον να παρουσιάσουμε κάποια κοινά χαρακτηριστικά που επιβεβαιώνουν πως οι διατροφικές επιλογές σχετίζονται με συγκεκριμένα σηματοδοτικά μονοπάτια που εντοπίζονται και σε καταστάσεις φλεγμονώδους αντίδρασης. Ανάμεσα σε αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια εντοπίζονται οι MAPK να παίζουν σημαντικό ρόλο καθώς και μονοπάτια που σχετίζονται με τον TNF, τις πρωτεϊνικές κινάσες, μονοπάτια που εμπλέκονται στην κυτταρική γένεση, απόπτωση και σηματοδότηση και άλλα.

Ο NF-κB είτε μέσω υποδοχέων είτε μέσω άλλων γονιδίων που καταλήγουν στην έκφραση του, εμφανίζει μέση διαφορική έκφραση και στις 3 εργασίες μας. Η ευαισθησία της μεθόδου επιλογής των σημαντικότερων γονιδίων ίσως ευθύνεται για την εμφάνιση μιας μέσης διαφορικής έκφρασης. Ωστόσο έχουν βρεθεί πολλά γονίδια που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του NF-κB. Από τις δύο εργασίες παρατηρούμε πως ίσως να είναι ένας πιθανός στόχος της δράσης συστατικών όπως τα καροτενοειδή και τα φλαβονοειδή που περιέχονται σε φρούτα και λαχανικά. Μία εργασία στο Nutrients το 2023 εντόπισε πως τα καροτενοειδή της ντομάτας και πιο συγκεκριμένα η λουτεΐνη και το λυκοπένιο είχαν πιο ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση πιθανότατα από λόγω της καταστολής του μονοπατιού σηματοδότησης NF-κB [65]. Επιπλέον έχει γίνει μελέτη πως τα φυσικά φλαβονοειδή μπορούν να καταστείλουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις που προκαλούνται από την σηματοδότηση NF-κB, την ECM αποικοδόμηση και την απόπτωση των χονδροκυττάρων στην οστεοαρθρίτιδα [66]. Βλέπουμε λοιπόν πως αντιοξειδωτικά συστατικά μπορούν

να επηρεάσουν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με την γενικευμένη ανοσολογική απόκριση και την πορεία μιας φλεγμονής.

Επιπλέον είναι πολύ σημαντική η παρουσία γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι σηματοδότησης MAPK. Και στις τρεις εργασίες παρατηρήθηκε διαφορετική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τις MAPK είτε άμεσα είτε έμμεσα. Οι MAPK παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και η απόπτωση των κυττάρων.

Αξίζει να αναφέρουμε από το μονοπάτι MAP κινασών εντοπίστηκαν γονίδια και στις 3 εργασίες και όπως είναι αναμενόμενο έχουμε βρει υψηλή έκφραση σε γονίδια που σχετίζονται με αυτές. Κυρίως γιατί παίζουν τόσο σημαντικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες. Γονίδια που σχετίζονται με το μονοπάτι των MAPK είναι παρών και στις δύο λίστες upregulated και downregulated και ανάμεσα στις συγκρίσεις και των τριών συνθηκών. Αυτό εξηγείται καθώς το μονοπάτι αυτό σχετίζεται με πολλές βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως αναφέραμε. Η έκφραση των οικογένειας των MAPK έχει συσχετιστεί με την παχυσαρκία, ασθένειες όπως το Alzheimer και το Parkinson αλλά και γενικά την ανοσολογική απόκριση. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μία προσπάθεια στόχευσης και αναστολής της δράσης ορισμένων μελών αυτής της οικογένειας για πρόληψη ή θεραπεία φλεγμονωδών αντιδράσεων που οδηγούν σε ασθένειες αλλά φαρμακευτικά δεν προχώρησαν στις κλινικές μελέτες εξαιτίας επιλεκτικής δράσης ή κυτταροτοξικότητας. Ο έλεγχος για ειδικούς και αποτελεσματικούς αναστολείς p38 από φυσικά κινέζικα βότανα και τα μονομερή τους, είναι μία ιδέα για την στόχευση του σηματοδοτικού μονοπατιού p38 MAPK για την βελτίωση του ρόλου του στην θεραπεία ασθενειών [67].

Μία ακόμα ενδιαφέρουσα παρατήρηση ανάμεσα στα αποτελέσματα είναι και η παρουσία έκφρασης των γονιδίων TLR4 και TLR2. Στις δύο εκ των τριών εργασιών και στα δικά μας τελικά αποτελέσματα εμφανίζουν σημαντική έκφραση γονίδια που σχετίζονται με του TLRs. Μία υπόθεση είναι πως μετά την κατανάλωση λιπαρών ο οργανισμός γίνεται πιο επιρρεπείς σε ενδοτοξίνες ή λοιμώξεις από gram αρνητικά βακτήρια. Πράγματι έχει εντοπιστεί πως δίαιτες υψηλές σε λιπαρά μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή αυξάνοντας τα επίπεδα ενδοτοξινών στον αυλό του εντέρου καθώς και στο πλάσμα, αλλάζοντας την μικροχλωρίδα του εντέρου και αυξάνοντας την διαπερατότητα του μέσω της επαγωγής του TLR4 [68]. Επιπλέον τα σηματοδοτικά μονοπάτια TLR4/NF-κB είναι στόχοι πολλών φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την θεραπεία της ιδιοπαθούς φλεγμονώδους εντερικής νόσου (IBD) καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη και ανάπτυξη της [69].

Κατά την δική μας ανάλυση εμπλουτισμού καταλήξαμε σε ένα σύνολο γονιδίων που σχετίζονται με την φλεγμονή και εντοπίστηκαν με σημαντική διαφορική έκφραση και στις 3 εργασίες. Γονίδια όπως SCRB, FERMT3 που σχετίζονται με την μετακίνηση των λευκοκυττάρων και την κυτταρική προσκόλληση καθώς και γονίδια όπως τα TLR4, PTGS2, IL1B, TREM1 που σχετίζονται με τον NF-κΒ. Εντοπίζουμε έτσι παρόμοια μοτίβα που εξηγούν πως συγκεκριμένες διατροφικές προσεγγίσεις επηρεάζουν σημαντικά μονοπάτια που σχετίζονται με την φλεγμονή.

#### **4.4 Συζήτηση αποτελεσμάτων και μελλοντική έρευνα**

Ο εντοπισμός γονιδίων που σχετίζονται με την έναρξη και την εξέλιξη μιας φλεγμονώδους διέγερσης μετά από κατανάλωση συγκεκριμένων ομάδων τροφίμων μπορεί να ρίξει φως στην ίδια την διαδικασία της ανοσολογικής απόκρισης του οργανισμού. Μελετώντας γονίδια που σχετίζονται με γνωστά ανοσολογικά μονοπάτια μπορούμε να εντοπίσουμε πιθανούς φαρμακευτικούς στόχους. Επιπλέον ο εντοπισμός της επίδρασης των διαφόρων διαθρεπτικών στην γενική απόκριση του οργανισμού μπορεί να μας δώσει πληροφορίες και για το πως ο μεταβολισμός συσχετίζεται με γνωστά ανοσολογικά μονοπάτια.

Μία σημαντική πρόκληση είναι να μπορέσουμε να συμπεριλάβουμε επιπλέον πληροφορίες που σχετίζονται με περιβαλλοντικούς παράγοντες και διατροφολογικά μοτίβα. Αυτό γιατί μέχρι πρότινος αυτές οι πληροφορίες δεν ήταν διαθέσιμες στα πλαίσια των μελετών ή δεν γίνεται εκτενής αναφορά σε όλες τις συνθήκες και εργασίες. Δημιουργώντας ένα μοντέλο που να συμπεριλαμβάνει περισσότερες πληροφορίες για τα δείγματα μπορεί αφενός να είναι πιο περίπλοκο ωστόσο με σωστούς χειρισμούς μπορεί να ρίξει φως σε άγνωστα μονοπάτια που σχετίζονται με την φλεγμονώδη αντίδραση. Μέχρι στιγμής γνωρίζουμε τους βασικούς μηχανισμούς στην έναρξη και την εξέλιξη μιας φλεγμονώδους αντίδρασης αλλά τις περισσότερες φορές αποκλείουμε άλλους παράγοντες που αποδεδειγμένα μπορούν να επιτελέσουν ρυθμιστικό ρόλο στην έκφραση πρωτεϊνών και σημάτων που σχετίζονται με ανοσολογική απόκριση. Ένα πιο περίπλοκο μοντέλο θα μπορούσε να λαμβάνει υπόψιν περισσότερους παράγοντες και να διευκρινίζει αν η παρατηρούμενη διαφορική έκφραση έχει σημαντική βιολογική αξία και αν τελικά η διατροφή μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην καταστολή μιας φλεγμονώδους αντίδρασης.

Έχουμε στην διάθεση μας μελέτες που συνδέουν την διατροφογενετική με την πορεία ασθενειών και με την ανοσολογική απόκριση αλλά και παραδείγματα πως ο γονότυπος μπορεί να επηρεάσει την αντίδραση του ατόμου στα διατροφικά στοιχεία. Όπως για παράδειγμα στην μελέτη των Kornmann και

συνεργατών (2007) όπου η επιλεκτική αναστολή του γονότυπου ιντερλευκίνης-1 από ένα βοτανικό σκεύασμα μπορεί να μειώσει τους φλεγμονώδεις δείκτες [69]. Επιπλέον η σχέση μεταξύ διατροφής, γενετικής και φλεγμονωδών νόσων του εντέρου αποτελεί ένα πεδίο αυξημένου ενδιαφέροντος. Η επιστήμη της διατροφογενετικής και της διατροφογενομικής (nutrigenetics και nutrigenomics) μπορούν να παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για την διασύνδεση μεταξύ της αντίδρασης του οργανισμού σε διατροφικές παρεμβάσεις και τις γενετικές παραλλαγές, ιδιαίτερα σε ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (inflammatory bowel disease) [70]

Κάποιες φορές μπορεί να μην λαμβάνεται υπόψιν ο ρόλος συγκεκριμένων παραγόντων στην πορεία εξέλιξης της φλεγμονής. Είναι γνωστό πως άτομα με αυξημένο δείκτη μάζας σώματος (BMI) και παχύσαρκα άτομα μπορεί να εμφανίζουν αυξημένη διαφορική έκφραση σε παράγοντες που σχετίζονται με την φλεγμονή, δεδομένα από τέτοιες μελέτες θα μπορούσαν να παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον ως προς την δράση συγκεκριμένων ομάδων τροφίμων και θα μπορούσαν να δώσουν πληροφορίες για την βελτίωση της συνολικής υγείας αλλά και την πρόληψη και έκβαση φλεγμονωδών νόσων. Επίσης άλλοι παράγοντες όπως το κάπνισμα και κάποιοι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ανταπόκριση του οργανισμού σε συγκεκριμένες ουσίες. Όλα αυτά θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν ειδικά αν θέλουμε να αναπτύξουμε ένα μοντέλο που να προβλέπει εκείνες τις απαραίτητες διατροφικές προτάσεις που μπορεί να έχουν κάποιο αποτέλεσμα στην πορεία μιας φλεγμονής.

Τέλος κάποιες ομάδες τροφίμων έχουν την τάση να χρησιμοποιούν παραπλήσια μεταβολικά μονοπάτια ή να συσχετίζονται σε μεταβολικές διεργασίες. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις έχουν αποτέλεσμα στην τελική έκφραση γονιδίων και ενεργοποίηση και απενεργοποίηση μεταβολικών και ανοσολογικών μονοπατιών. Μπορεί να παρατηρούνται στις μελέτες κοινά μοτίβα ανάμεσα σε συγκεκριμένες διατροφικές κατηγορίες αλλά δεν λαμβάνονται υπόψιν άλλοι παράγοντες και κυρίως δεν λαμβάνεται υπόψιν η πολυπλοκότητα των διατροφικών συνηθειών.

Μελλοντικές έρευνες με την χρήση μεγαλύτερης έκτασης δεδομένων, την χρήση πιο περίπλοκων υπολογιστικών εργαλείων και περισσότερων συγκριτικών παραγόντων θα μπορούσαν να εμπλουτίσουν την συσχέτιση συγκεκριμένων διατροφικών στοιχείων, ομάδων ή διατροφών με την έκφραση γονιδίων σχετικών με την ανοσολογική απόκριση, την έναρξη, την πορεία και την ένταση της φλεγμονής, ενώ παράλληλα θα μπορούσαν να υποδείξουν θεραπευτικούς στόχους ή και συγκεκριμένα διατροφικά μοτίβα που μπορεί να έχουν

ανασταλτική δράση στην έναρξη μιας φλεγμονώδους νόσου ή ακόμα και κατασταλτική δράση.

# Βιβλιογραφία

---

1. Mathis, D., & Shoelson, S. E. (2011). Immunometabolism: an emerging frontier. *Nature Reviews. Immunology*, 11(2), 81.
2. Levitan, E. B., Cook, N. R., Stampfer, M. J., Ridker, P. M., Rexrode, K. M., Buring, J. E., ... & Liu, S. (2008). Dietary glycemic index, dietary glycemic load, blood lipids, and C-reactive protein. *Metabolism*, 57(3), 437-443.
3. Galland, L. (2010). Diet and inflammation. *Nutrition in Clinical Practice*, 25(6), 634-640.
4. Bo, S., Ciccone, G., Guidi, S., Gambino, R., Durazzo, M., Gentile, L., ... & Pagano, G. (2008). Diet or exercise: what is more effective in preventing or reducing metabolic alterations?. *European Journal of Endocrinology*, 159(6), 685-691.
5. Juanola-Falgarona, M., Salas-Salvadó, J., Ibarrola-Jurado, N., Rabassa-Soler, A., Díaz-López, A., Guasch-Ferré, M., ... & Bulló, M. (2014). Effect of the glycemic index of the diet on weight loss, modulation of satiety, inflammation, and other metabolic risk factors: a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*, 100(1), 27-35..
6. Gao, Y., Hua, R., Hu, K., & Wang, Z. (2022). Carbohydrates deteriorate fatty liver by activating the inflammatory response. *Nutrition research reviews*, 35(2), 252-267..
7. Muñoz, A., & Costa, M. (2013). Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013(1), 610950.
8. Clarke, E. D., Stanford, J., Ferguson, J. J., Wood, L. G., & Collins, C. E. (2023). Red blood cell membrane fatty acid composition, dietary fatty acid intake and diet quality as predictors of inflammation in a group of Australian adults. *Nutrients*, 15(10), 2405.
9. Kalogeropoulos, N., Panagiotakos, D. B., Pitsavos, C., Chrysohoou, C., Rousinou, G., Toutouza, M., & Stefanadis, C. (2010). Unsaturated fatty acids are inversely associated and n-6/n-3 ratios are positively related to inflammation and coagulation markers in plasma of apparently healthy adults. *Clinica chimica acta*, 411(7-8), 584-591.
10. Clarke, R., Shipley, M., Armitage, J., Collins, R., & Harris, W. (2008). Plasma phospholipid fatty acids and CHD in older men: Whitehall study of London civil servants. *British journal of nutrition*, 102(2), 279-284.
11. Mozaffarian, D., Aro, A., & Willett, W. C. (2009). Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. *European journal of clinical nutrition*, 63(2), S5-S21.

12. González-Becerra, K., Ramos-López, O., Barrón-Cabrera, E., Riezu-Boj, J. I., Milagro, F. I., Martínez-López, E., & Martínez, J. A. (2019). Fatty acids, epigenetic mechanisms and chronic diseases: a systematic review. *Lipids in health and disease*, *18*, 1-18.
13. Santamarina, A. B., Pisani, L. P., Baker, E. J., Marat, A. D., Valenzuela, C. A., Miles, E. A., & Calder, P. C. (2021). Anti-inflammatory effects of oleic acid and the anthocyanin keracyanin alone and in combination: Effects on monocyte and macrophage responses and the NF-κB pathway. *Food & Function*, *12*(17), 7909-7922.
14. Hou, D. X., & Kumamoto, T. (2010). Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling. *Antioxidants & redox signaling*, *13*(5), 691-719.
15. Lolli, G., Cozza, G., Mazzorana, M., Tibaldi, E., Cesaro, L., Donella-Deana, A., ... & Pinna, L. A. (2012). Inhibition of protein kinase CK2 by flavonoids and tyrphostins. A structural insight. *Biochemistry*, *51*(31), 6097-6107..
16. Yokoyama, T., Kosaka, Y., & Mizuguchi, M. (2015). Structural insight into the interactions between death-associated protein kinase 1 and natural flavonoids. *Journal of medicinal chemistry*, *58*(18), 7400-7408.
17. Wahlang, B., McClain, C., Barve, S., & Gobejishvili, L. (2018). Role of cAMP and phosphodiesterase signaling in liver health and disease. *Cellular signalling*, *49*, 105-115.
18. Guo, Y. Q., Tang, G. H., Lou, L. L., Li, W., Zhang, B., Liu, B., & Yin, S. (2018). Prenylated flavonoids as potent phosphodiesterase-4 inhibitors from *Morus alba*: Isolation, modification, and structure-activity relationship study. *European journal of medicinal chemistry*, *144*, 758-766.
19. Rizwan, S., ReddySekhar, P., & MalikAsrar, B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & redox signaling*.
20. Chen, G. L., Fan, M. X., Wu, J. L., Li, N., & Guo, M. Q. (2019). Antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids from lotus plumule. *Food chemistry*, *277*, 706-712.
21. Al-Khayri, J. M., Sahana, G. R., Nagella, P., Joseph, B. V., Alessa, F. M., & Al-Mssallem, M. Q. (2022). Flavonoids as potential anti-inflammatory molecules: A review. *Molecules*, *27*(9), 2901.
22. Zhang, X., Zhou, Y., Cheong, M. S., Khan, H., Ruan, C. C., Fu, M., ... & Cheang, W. S. (2022). Citri reticulatae pericarpium extract and flavonoids reduce inflammation in RAW 264.7 macrophages by inactivation of MAPK and NF-κB pathways. *Food Frontiers*, *3*(4), 785-795.
23. Barker, F. M., Snodderly, D. M., Johnson, E. J., Schalch, W., Koepcke, W., Gerss, J., & Neuringer, M. (2011). Nutritional manipulation of primate retinas, V: Effects of lutein, zeaxanthin, and n-3 fatty acids on retinal

- sensitivity to blue-light-induced damage. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(7), 3934-3942.
24. Walston, J., Xue, Q., Semba, R. D., Ferrucci, L., Cappola, A. R., Ricks, M., ... & Fried, L. P. (2006). Serum antioxidants, inflammation, and total mortality in older women. *American journal of epidemiology*, 163(1), 18-26.
  25. Pattison, D. J., Symmons, D. P., Lunt, M., Welch, A., Bingham, S. A., Day, N. E., & Silman, A. J. (2005). Dietary  $\beta$ -cryptoxanthin and inflammatory polyarthritis: results from a population-based prospective study. *The American journal of clinical nutrition*, 82(2), 451-455.
  26. Dalgård, C., Nielsen, F., Morrow, J. D., Enghusen-Poulsen, H., Jonung, T., Hørder, M., & de Maat, M. P. (2008). Supplementation with orange and blackcurrant juice, but not vitamin E, improves inflammatory markers in patients with peripheral arterial disease. *British journal of nutrition*, 101(2), 263-269.
  27. Piovan, A., Filippini, R., Corbioli, G., Costa, V. D., Giunco, E. M. V., Burbello, G., ... & Zusso, M. (2021). Carotenoid extract derived from *Euglena gracilis* overcomes lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in microglia: Role of NF- $\kappa$ B and Nrf2 signaling pathways. *Molecular Neurobiology*, 58, 3515-3528.
  28. Galland, L. (2010). Diet and inflammation. *Nutrition in Clinical Practice*, 25(6), 634-640.
  29. Shivappa, N., Wirth, M. D., Hurley, T. G., & Hébert, J. R. (2017). Association between the dietary inflammatory index (DII) and Telomere length and C-Reactive protein from the national health and nutrition examination Survey-1999-2002. *Molecular nutrition & food research*, 61(4), 1600630.
  30. Quinlan, J. R. (1986). Induction of decision trees. *Machine learning*, 1, 81-106. Breiman, L. (2001). Random forests. *Machine learning*, 45, 5-32.
  31. Cortes, C. (1995). Support-Vector Networks. *Machine Learning*.
  32. Haykin, S. (1998). *Neural networks: a comprehensive foundation*. Prentice Hall PTR.
  33. Lorena, A. C., Jacintho, L. F., Siqueira, M. F., De Giovanni, R., Lohmann, L. G., De Carvalho, A. C., & Yamamoto, M. (2011). Comparing machine learning classifiers in potential distribution modelling. *Expert Systems with Applications*, 38(5), 5268-5275.
  34. Kleinbaum, D. G., Dietz, K., Gail, M., Klein, M., & Klein, M. (2002). *Logistic regression* (p. 536). New York: Springer-Verlag.
  35. Traoré, Y., Ehouman, J. M., Koné, M. G. R., Diabaté, D., & Ziao, N. (2022). Prediction of anti-inflammatory activity of a series of pyrimidine derivatives, by multiple linear regression and artificial neural networks. *Computational Chemistry*, 10(4), 186-202.

36. Garcia-Carretero, R., Vigil-Medina, L., & Barquero-Perez, O. (2021). The use of machine learning techniques to determine the predictive value of inflammatory biomarkers in the development of type 2 diabetes mellitus. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 19(4), 240-248.
37. Zhao, E., Cheng, Y., Yu, C., Li, H., & Fan, X. (2023). The systemic immune-inflammation index was non-linear associated with all-cause mortality in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Annals of Medicine*, 55(1), 2197652.
38. Bhatt, C. M., Patel, P., Ghetia, T., & Mazzeo, P. L. (2023). Effective heart disease prediction using machine learning techniques. *Algorithms*, 16(2), 88.
39. Kumar, P., Ambekar, S., Kumar, M., & Roy, S. (2020). Analytical Statistics Techniques of Classification and Regression in Machine Learning. In *Data Mining-Methods, Applications and Systems*. IntechOpen.
40. Kraszewski, S., Szczurek, W., Szymczak, J., Reguła, M., & Neubauer, K. (2021). Machine learning prediction model for inflammatory bowel disease based on laboratory markers. Working model in a discovery cohort study. *Journal of Clinical Medicine*, 10(20), 4745.
41. Dąbek-Drobny, A., Kaczmarczyk, O., Piątek-Guziewicz, A., Woźniakiewicz, M., Paśko, P., Dobrowolska-Iwanek, J., ... & Zwolińska-Wcisło, M. (2022). Application of the clustering technique to multiple nutritional factors related to inflammation and disease progression in patients with inflammatory bowel disease. *Nutrients*, 14(19), 3960.
42. Yi, M., Li, J., Jian, S., Li, B., Huang, Z., Shu, L., & Zhang, Y. (2023). Quantitative and causal analysis for inflammatory genes and the risk of Parkinson's disease. *Frontiers in Immunology*, 14, 1119315.
43. Mishra, U. N., Jena, D., Sahu, C., Devi, R., Kumar, R., Jena, R., ... & Kumar, A. (2022). Nutrigenomics: an inimitable interaction amid genomics, nutrition and health. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 82, 103196.
44. Williams, E. J., Baines, K. J., Berthon, B. S., & Wood, L. G. (2017). Effects of an encapsulated fruit and vegetable juice concentrate on obesity-induced systemic inflammation: a randomised controlled trial. *Nutrients*, 9(2), 116.
45. Milenkovic, D., Vanden Berghe, W., Boby, C., Leroux, C., Declerck, K., Szarc vel Szcic, K., ... & Weseler, A. R. (2014). Dietary flavanols modulate the transcription of genes associated with cardiovascular pathology without changes in their DNA methylation state. *PloS one*, 9(4), e95527.
46. Lemay, D. G., Huang, S., Huang, L., Alkan, Z., Kirschke, C., Burnett, D. J., ... & Hwang, D. H. (2019). Temporal changes in postprandial blood transcriptomes reveal subject-specific pattern of expression of innate immunity genes after a high-fat meal. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 72, 108209.
47. <https://www.genome.jp/kegg/>
48. <https://reactome.org/>

49. <https://geneontology.org/>
50. <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb>
51. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P05109/entry>
52. Wang, S., Song, R., Wang, Z., Jing, Z., Wang, S., & Ma, J. (2018). S100A8/A9 in Inflammation. *Frontiers in immunology*, *9*, 1298.
53. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P19838/entry>
54. Tuijnenburg, P., Allen, H. L., Burns, S. O., Greene, D., Jansen, M. H., Staples, E., ... & Watt, C. (2018). Loss-of-function nuclear factor  $\kappa$ B subunit 1 (NFKB1) variants are the most common monogenic cause of common variable immunodeficiency in Europeans. *Journal of allergy and clinical immunology*, *142*(4), 1285-1296.
55. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P40189/entry>
56. Rodrigues, F. B. B., da Silva, R., Santos, E. F. D., de Brito, M. T. F. M., da Silva, A. L. S., de Meira Leite, M., ... & Santos, E. J. M. D. (2023). Association of polymorphisms of IL-6 pathway genes (IL6, IL6R and IL6ST) with COVID-19 severity in an Amazonian population. *Viruses*, *15*(5), 1197.
57. Öztürk, Ş. A. M. İ. L., & İrkin, L. C. (2023). Reactivity of TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, and TGF- $\beta$  in Liver Tissue of Rats Due to the Sand Mussel Consumption. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *74*(2), 5731-5738.
58. Yoo, S. A., Kwok, S. K., & Kim, W. U. (2008). Proinflammatory role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: prospects for therapeutic intervention. *Mediators of inflammation*, *2008*(1), 129873.
59. Kim, E. K., & Choi, E. J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, *1802*(4), 396-405.
60. Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, *2*(1), 1-9.
61. Drouin, M., Saenz, J., & Chiffolleau, E. (2020). C-type lectin-like receptors: head or tail in cell death immunity. *Frontiers in immunology*, *11*, 251.
62. Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Frontiers in immunology*, *5*, 461.
63. Christopoulos, P. F., Gjørberg, T. T., Krüger, S., Haraldsen, G., Andersen, J. T., & Sundlisæter, E. (2021). Targeting the notch signaling pathway in chronic inflammatory diseases. *Frontiers in immunology*, *12*, 668207.
64. Ba, W., Xu, W., Deng, Z., Zhang, B., Zheng, L., & Li, H. (2023). The antioxidant and anti-inflammatory effects of the main carotenoids from tomatoes via Nrf2 and NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Nutrients*, *15*(21), 4652.

65. Ye, Y., & Zhou, J. (2023). The protective activity of natural flavonoids against osteoarthritis by targeting NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Frontiers in Endocrinology*, *14*, 1117489.
  66. Kim, K. A., Gu, W., Lee, I. A., Joh, E. H., & Kim, D. H. (2012). High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR4 signaling pathway.
  67. Wang, J., Liu, Y., Guo, Y., Liu, C., Yang, Y., Fan, X., ... & Ma, T. (2024). Function and inhibition of P38 MAP kinase signaling: Targeting multiple inflammation diseases. *Biochemical pharmacology*, *220*, 115973.
  68. Dejban, P., Nikravangolsefid, N., Chamanara, M., Dehpour, A., & Rashidian, A. (2021). The role of medicinal products in the treatment of inflammatory bowel diseases (IBD) through inhibition of TLR4/NF-kappaB pathway. *Phytotherapy Research*, *35*(2), 835-845.
  69. Kornman, K., Rogus, J., Roh-Schmidt, H., Krempin, D., Davies, A. J., Grann, K., & Randolph, R. K. (2007). Interleukin-1 genotype-selective inhibition of inflammatory mediators by a botanical: a nutrigenetics proof of concept. *Nutrition*, *23*(11-12), 844-852.
  70. Ferguson, L. R. (2013). Nutrigenetics, nutrigenomics and inflammatory bowel diseases. *Expert Review of Clinical Immunology*, *9*(8), 717-726.
-