



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**«ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΒΑΡΟΥΣ»**



ΚΑΚΑΛΗ ΑΙΜΙΛΙΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΝΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ)

*Επίκουρη Καθηγήτρια Βακτηριολογίας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα*

ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΛΙΑ ΜΑΡΙΑ

*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Διατροφής και Διαιτητικής Συμπεριφοράς, Τμήμα Επιστήμης
Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα*

ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗ ΜΕΡΟΠΗ

*Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Διατροφής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών, του τμήματος Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

Θα ήθελα να ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ.Κυριακού Αδαμαντίνη για τη καθοδήγηση και την ενθάρρυνση που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα. Οι συμβουλές και οι γνώσεις της ήταν αρωγοί στη διεκπεραίωση της εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την κ.Γιαννακούλια Μαρία, επιστημονική υπεύθυνη της μελέτης MedWeight, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε ώστε να διαχειριστώ τα γαστρεντερικά δεδομένα της μελέτης. Το ερέθισμα που πήρα ώστε να ξεκινήσω με τη μελέτη ήταν η αρχή ώστε να συνεχίσω μέχρι σήμερα την εκπαίδευσή μου στη Μικροβιολογία. Οι συμβουλές της και η βοήθεια της ήταν πολύτιμες.

Ευχαριστώ θερμά τη συνάδελφο και υποψήφια διδάκτωρα κα Μήτσου Εύη για τις γνώσεις και την εμπειρία που μου μετέφερε κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού και του στατιστικού μέρους της μελέτης. Η συνεχής εκπαίδευση στο χώρο του εργαστηρίου με βοήθησε ώστε να αποκτήσω τις θεμελιώδεις αρχές της εργαστηριακής μικροβιολογίας και να προχωρώ με τα σωστά βήματα στην ολοκλήρωση της μελέτης. Επίσης, ευχαριστώ πολύ τον κ.Αναστασίου Κώστα, επιστημονικό συνεργάτη της μελέτης MedWeight, για τις πολύτιμες συμβουλές και τη βοήθεια του στη διεκπεραίωση του στατιστικού μέρους της μελέτης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω σε όλους τους εθελοντές της μελέτης -στο καθένα ξεχωριστά- διότι η δυσκολία συλλογής των δειγμάτων ήταν πολύ μεγάλη καθ' όλη τη διάρκεια. Η έμπρακτη, γενναιόδωρη και αναντικατάστατη βοήθειά τους αποτελούσε κάθε φορά τη κινητήρια δύναμη ώστε να βγάλω εις πέρας τη μελέτη.

Ένα ευχαριστώ εκ βάθους καρδίας το οφείλω στην Έφη και το Βαγγέλη, τη Στέλλα, τη Κωνσταντίνα, τη Μαίρη, τη Γιούλα, την Ίριδα και το Νίκο. Στους φίλους μου, οι οποίοι δεν έπαψαν ούτε στιγμή να είναι δίπλα μου. Η ψυχολογική και ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας ήταν απλόχερη και ανεκτίμητη. Η θερμή συμπαράστασή τους κάθε στιγμή με εμπύχωνε και μου έδινε έμπρακτα το ενδιαφέρον και την αγάπη τους.

Ευχαριστώ τη συνάδελφο Χαρά για την υπομονή και κατανόηση που έδωσε στο χώρο εργασίας μου όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω το σεβασμό και την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου. Στους γονείς μου Αποστόλη & Αποστολία Κακάλη και στην αδερφή μου Χριστίνα για την εμπύχωση, τη δύναμη και τη στήριξη που μου δίνουν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	Σελ.7
ABSTRACT	Σελ.9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	Σελ.11
1.2. ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ	Σελ.11
ΓΕΝΙΚΑ	Σελ.11
1.1.1. Η σύνθεση του Εντερικού Μικροβιόκοσμου	Σελ.11
1.1.2. Οι κύριες λειτουργίες του Εντερικού Μικροβιόκοσμου	Σελ.15
1.1.3. Δυσβίωση –Επιπτώσεις	Σελ.16
1.1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τον Εντερικό Μικροβιόκοσμο	Σελ.17
❖ Ενδομήτρια περίοδος και τρόπος τοκετού (φυσιολογικός ή καισαρική)	Σελ.18
❖ Κληρονομικότητα	Σελ.18
❖ Η διαίτα κατά το πρώτο διάστημα της ζωής του	Σελ.19
❖ Η σύσταση της διαίτας στην ενήλικη ζωή	Σελ.19
❖ Η κατανάλωση αντιβιοτικών	Σελ.20
❖ Ο τρόπος ζωής και η φυσική δραστηριότητα	Σελ.21
❖ Η γεωγραφική θέση	Σελ.21
❖ Η κατανάλωση προ- ή πρε- βιοτικών	Σελ.22
❖ Παχυσαρκία	Σελ.23
1.2.1. ΑΠΩΛΕΙΑ ΒΑΡΟΥΣ	Σελ.29
1.2.2. Διατήρηση Απώλειας Βάρους	Σελ.31
1.2.2.1. Διατήρηση Απώλειας Βάρους και Εντερικός Μικροβιόκοσμος	Σελ.32
2. ΣΚΟΠΟΣ	Σελ.35
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	Σελ.36
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	Σελ.36
ΜΕΡΟΣ Α΄ : Μεθοδολογία Μελέτης «MedWeight»	
3.1. ΜΕΛΕΤΗ «MedWeight»	Σελ.36
3.1.1. ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	Σελ.36
3.1.1.1. Τα Χαρακτηριστικά και ο αριθμός του Δείγματος	Σελ.36
3.1.2. Η ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	Σελ.37
ο Ερωτηματολόγιο Μελέτης MedWeight	Σελ.37
ΜΕΡΟΣ Β΄: Μεθοδολογία μελέτης «Εντερικός Μικροβιόκοσμος και Διατήρηση Απώλειας Βάρους»	
3.2 ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΒΑΡΟΥΣ	Σελ.38

3.2.1 ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	Σελ.38
3.2.1.1 Η συλλογή και ο αριθμός του Δείγματος	Σελ.38
3.2.1.2 Τα Χαρακτηριστικά του Δείγματος	Σελ.39
3.2.1.3 Βιοηθική	Σελ.39
3.2.2. Η ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	Σελ.39
1. Ερωτηματολόγιο της μελέτης «Εντερική Μικροχλωρίδα και Παχυσαρκία»	Σελ.39
2. Ερωτηματολόγιο Μελέτης ΑΤΤΙΚΗ	Σελ.41
3. Κλινικά χαρακτηριστικά	Σελ.41
3.2.3 ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	Σελ.41
1. Κοινωνική και Δημογραφική Αξιολόγηση	Σελ.41
2. Ψυχολογική Αξιολόγηση	Σελ.41
3. Διατροφική αξιολόγηση	Σελ.42
4. Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά	Σελ.43
5. Γαστρεντερικά συμπτώματα	Σελ.45
3.2.4. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΚΟΠΡΑΝΩΝ	Σελ.46
3.2.4.1. Δειγματοληψία κοπράνων	Σελ.46
3.2.4.2. Μικροβιολογική επεξεργασία δειγμάτων κοπράνων	Σελ.47
1. Θρεπτικά Υλικά Καλλιέργειας	Σελ.47
I. Μέσο Αραίωσης	Σελ.47
II. Ολικός Εντερικός Μικροβιόκοσμος	Σελ.47
❖ <i>Bacteroides</i> spp.	Σελ.48
❖ <i>Clostridium perfringens</i>	Σελ.48
❖ <i>Lactobacillus</i> spp.	Σελ.48
❖ <i>Bifidobacterium</i> spp.	Σελ.49
❖ Ολικά κολίμορφα/ <i>E.coli</i> (Total coliforms/ <i>E.coli</i>)	Σελ.49
❖ <i>Enterococcus</i> spp.	Σελ.50
❖ Staphylococci / <i>S.aureus</i>	Σελ.50
❖ Ζύμες – Μύκητες	Σελ.51
3.2.4.3. Διαδοχικές αραιώσεις- Επεξεργασία υπό Αναερόβιες και Αερόβιες συνθήκες	Σελ.51
3.2.4.4. Καταμέτρηση αποικιών- Ποσοτικός προσδιορισμός μικροβιακών πληθυσμών	Σελ.52
3.2.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΞΗΡΟΥ ΒΑΡΟΥΣ	Σελ.53
3.2.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ pH ΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΝ	Σελ.54
3.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	Σελ.54
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	Σελ.55

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	Σελ.55
ΜΕΡΟΣ Α΄: «Μελέτη MedWeight»	
4.1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΤΗΣ MEDWEIGH	Σελ.55
4.2. ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ	Σελ.56
ΜΕΡΟΣ Β΄: «Εντερικός Μικροβιόκοσμος και Διατήρηση απώλειας βάρους»	
4.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΕ Ο ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ	Σελ.60
4.3.1. Κοινωνικο- δημογραφικά χαρακτηριστικά	Σελ.61
4.3.2. Ιατρικό ιστορικό	Σελ.61
4.3.3. Σωματομετρικά χαρακτηριστικά	Σελ.62
4.3.4. Διατροφικά χαρακτηριστικά και Φυσική κατάσταση	Σελ.63
4.3.5. Γαστρεντερικά χαρακτηριστικά	Σελ.64
4.3.6. Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά	Σελ.67
4.4. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ή ΜΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΒΑΡΟΥΣ	Σελ.70
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	Σελ.72
5.1 Περιορισμοί	Σελ. 78
5.2 Συμπεράσματα	Σελ.78
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	Σελ.80

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Ο εντερικός μικροβιόκοσμος θεωρείται από τις σημαντικές παραμέτρους που επηρεάζουν την υγεία του ανθρώπου και μεταβάλλεται σε καταστάσεις που διαταράσσεται η ομοιόσταση, όπως η παχυσαρκία. Ενώ υπάρχουν αναφορές για τις μεταβολές που συμβαίνουν στη διαδικασία απώλειας βάρους, δεν έχει μελετηθεί η συμβολή του εντερικού μικροβιόκοσμου στη διατήρηση της απώλειας αυτής σε βάθος χρόνου.

ΣΚΟΠΟΣ: Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αποτυπώσει χαρακτηριστικά του εντερικού μικροβιόκοσμου και των γαστρεντερικών συμπτωμάτων ενός τυχαίου δείγματος του ελληνικού ενήλικου πληθυσμού, οι οποίοι συμμετείχαν στην επιδημιολογική μελέτη MedWeight και τη διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων με ανθρωπομετρικές και διατροφικές παραμέτρους στην περίπτωση της απώλειας βάρους.

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ: 528 εθελοντές (>18 ετών) συμμετείχαν στη μελέτη MedWeight (362 διατηρούντες και 166 επανακτήσαντες). Κριτήρια ένταξης στη μελέτη ήταν η απώλεια $\geq 10\%$ του βάρους τους στο παρελθόν, το οποίο είτε το είχαν διατηρήσει είτε όχι. Σε 15 από αυτά τα άτομα, (8 διατηρούντες και 7 επανακτήσαντες) μελετήθηκαν περαιτέρω τα ανθρωπομετρικά και γαστρεντερικά χαρακτηριστικά. Πραγματοποιήθηκε διατροφική αξιολόγηση και προσπάθεια εκτίμησης του Εντερικού Μικροβιόκοσμου, μετά από μικροβιολογικό έλεγχο των κοπράνων τους.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ: Στο αρχικό δείγμα οι επανακτήσαντες εμφανίζουν μεγαλύτερη ηλικία, βάρος και ΔΜΣ ($p < 0,001$). Στη γαστρεντερική συμπτωματολογία ο αριθμός των κενώσεων είναι μεγαλύτερος και στις δυο ομάδες μετά τη προσπάθεια απώλειας των κιλών ($p < 0,001$). Μικρότερος αριθμός διατηρούντων παρουσίασαν συμπτώματα γαστρο-οισοφαγικής παλινδρόμησης ή καύσου ανά εβδομάδα πριν τη προσπάθεια της απώλειας ($p = 0,037$). Τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, η φυσική κατάσταση, οι ημερήσιες θερμιδικές ανάγκες και οι μέσοι όροι πρόσληψης των θρεπτικών συστατικών και διαιτητικών ινών του δείγματος των δυο υποομάδων δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά.

Στην ομάδα των 15 ατόμων, μετά από τον έλεγχο των κοπράνων παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των δυο υποομάδων τόσο στο χρώμα όσο και στη διαβάθμιση σύμφωνα με την κλίμακα Bristol. Σε όλους τους εθελοντές καταμετρήθηκαν ολικά κολίμορφα και *E.coli*, εντερόκοκκοι, λακτοβάκιλλοι, μπιφοδοβακτήρια και βακτήρια του γένους *Bacteroides*. Αντιθέτως δεν εμφάνισαν όλοι σταφυλόκοκκους, *S.aureus*, κλωστρίδια, ζύμες και μυκηλιακούς μύκητες. Οι διατηρούντες εμφανίζουν οριακά σημαντικά μεγαλύτερους ολικούς αερόβιους και αναερόβιους μικροβιακούς πληθυσμούς. Αντίθετα ο πληθυσμός των μυκήτων εμφανίζεται μικρότερος στην ομάδα των διατηρούντων σε σχέση με τους επανακτήσαντες.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ: Η απώλεια βάρους επηρεάζει τις γαστρεντερολογικές συνήθειες και τα συμπτώματα των εθελοντών. Η διατήρηση της απώλειας βάρους σχετίζεται οριακά θετικά με τους ολικούς αερόβιους και αναερόβιους μικροβιακούς πληθυσμούς, ενώ σχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα των πληθυσμών των μυκήτων. Η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου πιθανόν να μπορεί να επηρεάσει τη δυνατότητα του ξενιστή να διατηρήσει την απώλεια βάρους. Απαιτείται η διενέργεια μελέτης με μεγαλύτερο αριθμό εθελοντών και πληρέστερο μικροβιολογικό έλεγχο.

Λέξεις κλειδιά: εντερικός μικροβιόκοσμος, απώλεια βάρους, διατηρούντες, επανακτήσαντες, γαστρεντερικά συμπτώματα

ABSTRACT

INTRODUCTION: The gut microbiota is considered an important parameter affecting human health. This complicated ecosystem is modified in obesity, a situation where homeostasis is considered to be disturbed. While there are reports of changes occurring in the weight loss process, the contribution of gut microbiota in the weight maintenance over time has not been yet studied.

OBJECTIVE: To study the gut microbiota and the gastrointestinal symptoms of a random sample of Greek adult population who participated in the epidemiological study MedWeight and investigating possible interactions with anthropometric and nutritional parameters in the case of weight loss.

METHODS: 528 volunteers (> 18 years) participated in the study MedWeight (362 maintainers and 166 regainers). Inclusion criteria were the loss of $\geq 10\%$ of their weight in the past and being able or not to maintain this loss of weight. The anthropometric and gastrointestinal characteristics in more details, nutritional assessment and gut microbiota analysis has been studied in 15 subjects (8 maintainers and 7 regainers), out of this sample.

RESULTS: In the original sample (528 subjects), the regainers exhibit higher average of age, weight, and BMI ($p < 0,001$). Regarding the gastrointestinal symptoms, defecation frequency is greater in both groups after the weight loss ($p < 0,001$). Maintainers exhibit less symptoms of gastro-oesophageal reflux or heartburn per week, the period before losing weight ($p = 0,037$). Anthropometric characteristics, physical fitness, the average of nutrients, fiber and calory intake per day in both subgroups did not show any significant difference.

In the smaller group of 15 subjects after stool examination, the two subgroups (maintainers and regainers) show differences in faeces color as well in the score of Bristol scale. Regarding the gut microbiota, total Coliforms and *E. coli*, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. and *Bacteroides* spp. have been detected in all faecal samples, whilst *Staphylococcus* spp., *S.aureus*, *Clostridium* spp., yeast and fungi were not traced in all samples. Maintainers exhibit marginally significant higher populations of total mesophilic aerobic and anaerobic populations. In contrast, the group of maintainers seem to have fewer fungi related to regainers.

CONCLUSIONS: Losing weight is a condition affecting the gastrointestinal habits and symptoms of volunteers. Weight loss maintenance is almost correlated positively with the total aerobic and anaerobic microbial populations and negatively with the fungal population levels. The composition of the gut microbiota probably affects the ability of the host to maintain weight loss. Studies enrolling a greater number of volunteers and a more detailed gut microbiota

analysis are needed in order to elucidate the impact of gut microbiota on the maintenance of weight loss.

Key words: gut microbiota, weight loss, maintainers, regainers, gastrointestinal symptoms

1. ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ

ΓΕΝΙΚΑ

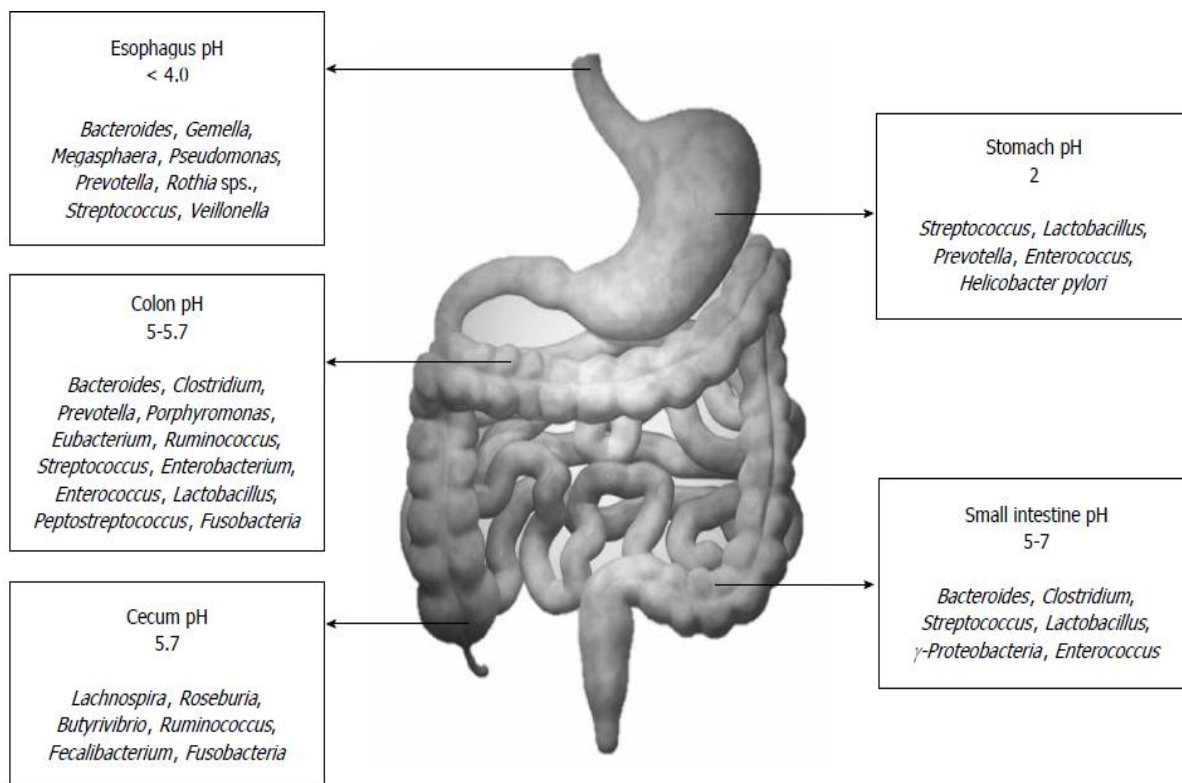
Το έντερο του ανθρώπου αποτελεί το φυσικό περιβάλλον ενός δυναμικού, πολύπλοκου και ποικίλου μικροβιακού οικοσυστήματος (Alonso and Guarner, 2013). Είναι πυκνοκατοικημένο από διάφορα γένη συμβιωτικών μικροοργανισμών, οι οποίοι καθορίζονται από μια διαδικασία επιλογής και ανταγωνισμού (Angelakis et al, 2012; Shen et al, 2012). Οι μικροοργανισμοί εμπλέκονται σε διάφορους μηχανισμούς του μεταβολισμού και αλληλεπιδρούν με το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου (Xu and Knight, 2015). Μεταβάλλουν τα θρεπτικά συστατικά που καταλήγουν άπεπτα στον εντερικό σωλήνα και «συνομιλούν» με τα κύτταρα του ξενιστή (Butel, 2014). Παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του ξενιστή, επηρεάζοντας μεταξύ άλλων και το σωματικό βάρος του και επηρεάζονται τόσο από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όσο και από το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή (Xu and Knight, 2015).

Ως «εντερικός μικροβιόκοσμος» ορίζεται το σύνολο των μικροβιακών πληθυσμών οι οποίοι αποικίζουν το έντερο (Jandhyala et al, 2015) και προτείνεται από αρκετούς ερευνητές ότι λειτουργεί ως ένα μεταβολικό και ανεξάρτητο όργανο, καθώς τα μέλη του δεν είναι απλά «παθητικοί» κάτοικοι, αλλά πραγματοποιούν μια σειρά από βιολογικές λειτουργίες που είναι σημαντικές για την διατροφή και την ευημερία του ανθρώπου (Jeffery and O'Toole, 2013). Ο ξενιστής παρέχει στους μικροοργανισμούς το περιβάλλον και τα θρεπτικά συστατικά ενώ ταυτόχρονα αντλεί πολλά οφέλη καθώς η συνεισφορά τους σε μεταβολικές, ανοσολογικές και σε τροφικές λειτουργίες είναι τεράστια (Alonso and Guarner, 2013).

1.1.1. Η σύνθεση του Εντερικού Μικροβιόκοσμου

Ένα υγιές άτομο κατοικείται από τρισεκατομμύρια μικρόβια (Cresci and Bawden, 2015). Το παχύ έντερο είναι το τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, στο οποίο αναπτύσσεται από την στιγμή της γέννησης του ατόμου ένα σύνθετο σύνολο από μικροοργανισμούς (Εικόνα 1.1). Οι εκτιμήσεις αναφέρουν ότι το παχύ έντερο φιλοξενεί περισσότερα από 10^{14} μικροβιακά κύτταρα (Alonso and Guarner, 2013, τα οποία διαφέρουν από άτομο σε άτομο και σύμφωνα με νεώτερα στοιχεία καταλαμβάνουν συγκεκριμένες θέσεις στο έντερο λόγω της ελάχιστης

παρουσίας του οξυγόνου. Οι προαιρετικά αερόβιοι μικροοργανισμοί κατοικούν κοντά στα τοιχώματα του εντέρου και οι αναερόβιοι προτιμούν τον αυλό του εντέρου (Ravcheev and Thiele, 2014).



Εικόνα 1.1: Κατανομή των βακτηρίων κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα (Jandhyala et al, 2015).

Αν και η πλειονότητα των μικροοργανισμών στον εντερικό μικροβιόκοσμο είναι βακτηριακής προέλευσης, περιλαμβάνονται επίσης και μύκητες, ζύμες, ιοί, αρχαία και πρωτόζωα. Οι διαφορές στην παρουσία των μικροοργανισμών κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα είναι αρκετές. Τα δεδομένα, όμως, σχετικά με τους μύκητες και τις ζύμες είναι ελάχιστα. Στα βακτήρια παρατηρείται σημαντική διαφορά στην ποικιλομορφία και στον αριθμό τους που κυμαίνονται από 10^1 κύτταρα ανά γραμμάριο του περιεχομένου ή του ιστού στον στόμαχο και φτάνουν έως και 10^{12} , στο κόλον (Εικόνα 1.2). Οι πληθυσμοί αυτοί είναι 10X περίπου του αριθμού των ευκαρυωτικών κυττάρων του ανθρώπινου σώματος (Jandhyala et al, 2015).



Εικόνα 1.2: Μεταβολές στη σύνθεση και στον αριθμό του εντερικού μικροβιόκοσμου κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού (Μεντής, 2013).

Εκτιμάται ότι 400–500 περίπου διαφορετικά γένη μικροοργανισμών αποτελούν τον εντερικό μικροβιόκοσμο (Μεντής, 2013), ενώ τα είδη των βακτηρίων ανέρχονται από 1000 έως και 1150 σε κάθε άτομο και το 90% αυτών είναι κυρίως αναερόβια (Alonso and Guarner, 2013). Τα περισσότερα από αυτά ανήκουν σε δύο Φύλα τα Bacteroidetes και τα Firmicutes (Jandhyala et al, 2015). Οι υπόλοιποι πληθυσμοί των βακτηρίων ανήκουν στα Proteobacteria, στα Actinobacteria, στα Fusobacteria και στα Verrucomicrobia (Jeffery and O'Toole, 2013) (Εικόνα 1.3).

Συνομοταξία ή φύλο	Ομοταξία ή κλάση	Τάξη	Οικογένεια	Γένος
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	Rickettsiaceae	Rickettsia
		Rhizobiales	Brucellaceae	Brucella
	Betaproteobacteria	Neisseriales	Neisseriaceae	Neisseria
		Burkholderiales	Alcaligenaceae	Bordetella
	Gammaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	Coxiella
			Legionellaceae	Legionella
		Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas
		Vibrionales	Vibrionaceae	Vibrio
		Aeromonadales	Aeromonaceae	Aeromonas
		Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter, Escherichia Salmonella
				Aggregatibacterium Haemophilus Pasteurella
	Epsilonproteobacteria	Campylobacterales	Campylobacteraceae	Campylobacter
Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	Clostridium
			Lachnospiraceae	Lachnospira
			Ruminococcaceae	Faecalibacterium Ruminococcus
	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae Bacillaceae	Staphylococcus Bacillus
		Lactobacillales	Lactobacillaceae	Lactobacillus Pediococcus
			Enterococcaceae	Enterococcus
			Streptococcaceae	Streptococcus Lactococcus
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Corynebacteriaceae	Campylobacter
			Mycobacteriaceae	Mycobacterium
			Micrococaceae	Microbacterium
		Bifidobacteriales	Bifidobacteraceae	Bifidobacterium
Fusobacteria	Fusobacteriia	Fusobacteriales	Fusobacteriaceae	Fusobacterium
			Leptotrichiaceae	Streptobacillus
Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteroidales	Bacteriodaceae	Bacteroides
			Porphyromonadaceae	Porphyromonas
			Prevotellaceae	Prevotella
	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	Verrucomicrobium

Εικόνα 1.3: Ταξινόμηση των βακτηρίων που αποικίζουν τον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου (Μεντής, 2013).

Αν και η κατανομή των μικροοργανισμών στον εντερικό μικροβιόκοσμο ενός ατόμου παραμένει σταθερή, υπάρχουν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ατόμων (Jandhyala et al, 2015). Η ποικιλομορφία των στελεχών μεταξύ των ατόμων είναι εξαιρετικά μεταβλητή και κάθε άτομο φιλοξενεί τη δική του διακριτή σύνθεση βακτηρίων (Alonso and Guarner, 2013). Κάθε θηλαστικό δηλαδή διαθέτει πρακτικά ένα μοναδικό μικροβιόκοσμο, κάτι δηλαδή ως «μικροβιακό αποτύπωμα» (Μεντής, 2013). Η μικροβιακή σύνθεση του εντέρου, αποτελεί το κυρίως αντικείμενο πολλών και σημαντικών μελετών τα τελευταία χρόνια (MacLean et al, 2011).

Δυστυχώς, τα διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με το πραγματικό επίπεδο των μυκήτων στο έντερο είναι ελάχιστα. Έχουν παρατηρηθεί μυκηλιακοί μύκητες στα κόπρανα ανθρώπων όπως οι *Aspergillus*, *Cryptococcus* και *Trichosporon*. Τα πιο κοινά είδη ζυμών που συμβιώνουν στο έντερο του ανθρώπου ανήκουν στο γένος *Candida* και είναι οι *C.albicans*, *C.glabrata* και *C.krusei*. Επίσης ανιχνεύεται και το γένος *Rhodotorula*. Ορισμένα είδη των παραπάνω μικροοργανισμών μπορεί να θεωρηθούν ευκαιριακά παθογόνα, εάν μεταφερθούν σε άλλα όργανα (για παράδειγμα στον πνεύμονα) αλλά στην γαστρεντερική οδό δρουν ως συμβιώντες. Παρόλο αυτά, το υγιές ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου μπορεί να εξασφαλίσει την άμυνα ενάντια τους (Ianiro et al, 2014).

1.1.2. Οι κύριες Λειτουργίες του Εντερικού Μικροβιόκοσμου

Μια από τις κύριες λειτουργίες του εντερικού μικροβιόκοσμου είναι να προστατεύει το έντερο από τους παθογόνους μικροοργανισμούς, επιπλέον συμβάλλει στην ανάπτυξη ενός υγιούς ανοσοποιητικού συστήματος, ρυθμίζει την κινητικότητα του εντέρου και συμμετέχει στο μεταβολισμό (Ianiro et al, 2014). Τα μικρόβια του εντέρου παίζουν ένα κρίσιμο ρόλο ανάπτυξης ενός ισχυρού και ισορροπημένου ανοσοποιητικού συστήματος. Παρατηρείται μια ανοσοδιέγερση έναντι πιθανών παθογόνων και μια ανοσοκαταστολή έναντι των συμβιωτικών και των διαιτητικών αντιγόνων (Yang et al, 2013). Εκτιμάται ότι το 80% της παραγωγής των αντισωμάτων λαμβάνει χώρα τοπικά στο έντερο, κυρίως παρέχοντας ανοσοσφαιρίνη Α (IgA) (Alonso and Guarner, 2013).

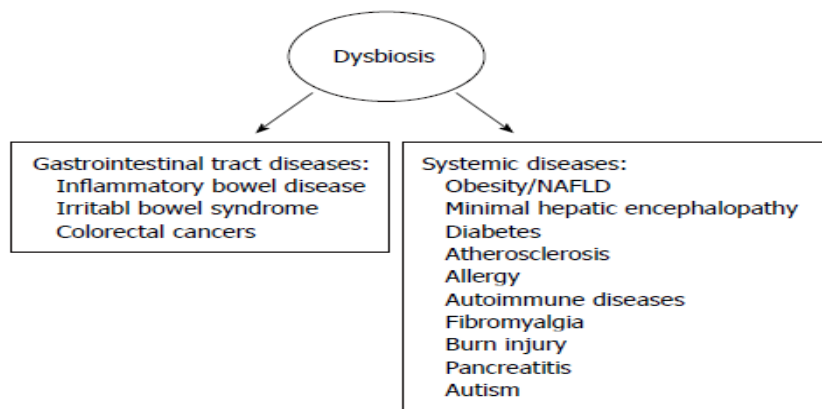
Επιπλέον, συμμετέχουν στο μεταβολισμό του ξενιστή, στο μεταβολισμό των φαρμάκων, στη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του βλεννογόνου, στο μεταβολισμό χολικών αλάτων, στον καταβολισμό φυτικών ινών, βλέννας και λιπαρών οξέων (Jandhyala et al, 2015; Μεντής, 2013). Εκτός από τα βακτήρια που έχουν ήδη μελετηθεί αρκετά, πρόσφατα και οι ζύμες έχουν προταθεί ότι συμμετέχουν στο μεταβολισμό του αμύλου. Η κατανόηση της σχέσης μεταξύ των ζυμών και του ανοσοποιητικού συστήματος χαρακτηρίζεται δύσκολη και ελάχιστα είναι τα δεδομένα σχετικά με την δράση τους. Σε ορισμένες ειδικές περιπτώσεις, μπορεί να δράσουν και θεραπευτικά (Ianiro et al, 2014).

1.1.3. Δυσβίωση- Επιπτώσεις

Σαφής ορισμός των χαρακτηριστικών ενός φυσιολογικού εντερικού μικροβιόκοσμου, δεν υφίσταται. Παρόλο αυτά, λόγω του ότι το ανοσοποιητικό σύστημα δρα από κοινού με τους μικροβιακούς πληθυσμούς ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς (*Jandhyala et al, 2015*), οι διαταραχές στην σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου μπορεί να οδηγήσουν σε ανεπαρκή ανοσολογική απάντηση και σε μειωμένη ανοχή συμβιωτικών μικροοργανισμών (*Ferreira et al, 2014*). Η μεταβολή της ισορροπίας μπορεί να επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ατόμου και καλείται ως «δυσβίωση».

Οι μεταβολές στη σύνθεση των μικροοργανισμών που αποικίζουν στο έντερο μπορεί να προκύψουν από την έκθεση σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Παραδείγματα αυτών είναι: η λήψη αντιβιοτικών, η αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες, η κατάχρηση οινόπνευματος κ.α. Η δυσβίωση συμβάλλει στην παθογένεση διαφόρων μεταβολικών, νευρολογικών και ανοσολογικών ασθενειών, όπως οι φλεγμονώδεις παθήσεις του εντέρου, ο ορθοκολικός καρκίνος, οι αλλεργίες, το μεταβολικό σύνδρομο και η παχυσαρκία (*Μεντής, 2013; Alonso and Guarner, 2013; Althani et al, 2015*) (Εικόνα 1.4).

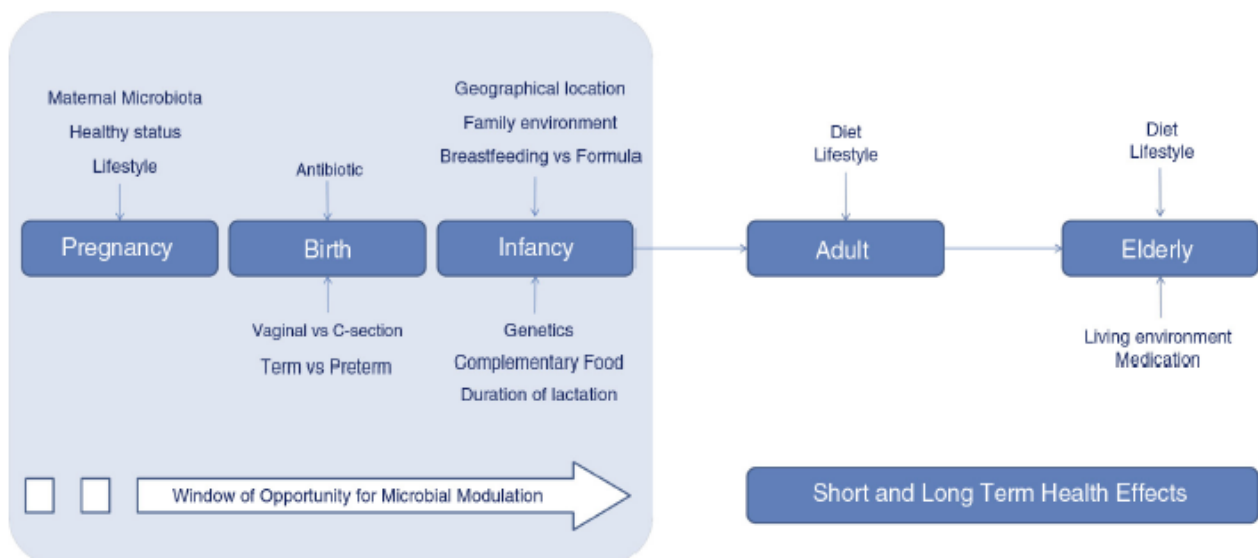
Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων δρουν τα συστατικά του εντερικού μικροβιόκοσμου δεν είναι πλήρως γνωστοί. Η έκκριση βακτηριακών τοξινών και η δράση κάποιων μικροβιακών μεταβολικών προϊόντων μπορεί να οδηγήσουν σε σοβαρές φλεγμονές οι οποίες να εξελιχθούν σε καρκίνο του παχέος εντέρου (*Yang et al, 2013*). Επίσης, η ζύμωση αυξημένων ποσοτήτων πρωτεϊνούχων ενώσεων στο κόλον, πιθανόν να είναι επιβλαβής σε ορισμένες καταστάσεις όπως ο καρκίνος του παχέος εντέρου και οι φλεγμονώδεις νόσοι τους εντέρου (*Alonso and Guarner, 2013*). Τέλος, η αύξηση του πληθυσμού ζυμών του γένους *Candida* οδηγεί συχνά σε αυξημένο κίνδυνο σοβαρών λοιμώξεων (*Ianiro et al, 2014*).



Εικόνα 1.4 : Γαστρεντερικές παθήσεις που σχετίζονται με τον τροποποιημένο εντερικό μικροβιόκοσμο (Arslan, 2014).

1.1.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τον Εντερικό Μικροβιόκοσμο

Πολλοί είναι οι παράγοντες που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση ενός «φυσιολογικού» εντερικού μικροβιόκοσμου (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5: Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του εντερικού μικροβιόκοσμου κατά τη διάρκεια ζωής του ατόμου (Rodríguez et al, 2015).

Ενδομήτρια περίοδος και τρόπος τοκετού (φυσιολογικός ή καισαρική)

Τα αποδεικτικά στοιχεία, τα οποία υποδηλώνουν ότι ο ανθρώπινος εντερικός μικροβιόκοσμος ξεκινά πριν την γέννηση του νεογνού αυξάνονται ολοένα και περισσότερο. Το μηκόνιο (τα πρώτα κόπρανα του μωρού) περιέχει από βακτήρια, όπου επικρατούν τα Firmicutes. Τα βακτήρια μέσω του πλακούντα και του κυκλοφορικού συστήματος εισέρχονται στον εντερικό αυλό του εντέρου του εμβρύου (*Rodriguez et al, 2015*).

Μετά την γέννηση του ανθρώπου, το έντερο αποικίζεται με πολλά μικροβιακά στελέχη και το κάθε άτομο έχει το δικό του εντερικό μικροβιόκοσμο που μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της ζωής του (*Ianiro et al, 2014*). Είναι πολύ σημαντικός ο τρόπος γέννησης του βρέφους καθώς επηρεάζει την ποικιλία των μικροοργανισμών που θα εγκατασταθούν (*Riiser, 2015*). Στο φυσιολογικό τοκετό το βρέφος δέχεται τους μικροοργανισμούς από τον κόλπο ή τον εντερικό σωλήνα της μητέρας, ενώ στην καισαρική τομή το νεογνό εκτίθεται σε εκείνους του περιβάλλοντος του νοσοκομείου. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος σε αυτά τα βρέφη μπορεί να είναι διαταραγμένος για μήνες ή για χρόνια (*Rodriguez et al, 2015*).

Κληρονομικότητα

Οι μηχανισμοί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστών- βακτηρίων, δεν έχουν περιγραφεί πλήρως. Ελάχιστα είναι τα δεδομένα σχετικά με την σχέση γονότυπου του ξενιστή και των κατοίκων του εντέρου του. Υπάρχουν όμως, σαφείς ενδείξεις ότι επηρεάζει τους πληθυσμούς του εντέρου. Απλές μεταλλάξεις γονιδίων μπορούν να οδηγήσουν σε μεταβολές της σύνθεσης των μικροοργανισμών στο έντερο (*Rodriguez et al, 2015*). Περαιτέρω διερεύνηση απαιτείται ώστε να αποτυπωθούν οι μηχανισμοί με τους οποίους διενεργείται.

Ελάχιστες είναι οι μελέτες οι οποίες συγκρίνουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο μεταξύ μελών της οικογένειας. Μελέτη σε μονοζυγωτικά και διζυγωτικά δίδυμα έδειξε μεγαλύτερη ομοιότητα στον εντερικό μικροβιόκοσμο μεταξύ μονοζυγωτικών παρά διζυγωτικών αδερφών (*Merwe et al, 1983*), υποδεικνύοντας τη σημαντικότητα του γενετικού υποβάθρου. Το 2001 ο Vaahotonuo και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι οι ομοιότητες στον εντερικό μικροβιόκοσμο ίδιων στελεχών ποντικών ήταν μεγαλύτερες από ποντίκια διαφορετικού είδους ακόμη και με επίδραση κοινού περιβάλλοντος (*Vaahotonuo et al, 2001*). Ο ρόλος της γενετικής γονικής επίδρασης στον αποικισμό των μικροοργανισμών στο έντερο δεν έχει διευκρινιστεί (*Avershina et al, 2013*).

Η διαίτα κατά το πρώτο διάστημα της ζωής του βρέφους

Τους πρώτους μήνες ζωής του ανθρώπου παρατηρούνται πολλές αλλαγές στους μικροοργανισμούς του εντέρου, ενώ η σταθερότητα και η ποικιλομορφία των γονιδίων των μικροοργανισμών αυξάνονται μετά τα τρία πρώτα χρόνια της ζωής (Riiser, 2015). Ο θηλασμός ή η κατανάλωση υποκατάστατου του μητρικού γάλακτος κατά την βρεφική ηλικία έχει σημαντικές επιπτώσεις στον εντερικό μικροβιόκοσμο του βρέφους καθώς και στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος (Jandhyala et al, 2015).

Σε ζωικά μοντέλα, οι δυο διαφορετικοί τρόποι σίτισης των βρεφών αναπτύσσουν διαφορετικούς πληθυσμούς μικροοργανισμών στο έντερο το οποίο οδηγεί σε διαφορές στο ανοσοποιητικό σύστημα. Επηρεάζεται η ανοσία έως και τα πέντε πρώτα χρόνια της ζωής τους (Narayan et al, 2015). Στον άνθρωπο μελέτες σχετικά με τη διαφορετική χορήγηση γάλακτος στα μωρά είναι λίγες. Αναμφισβήτητα όμως, ο εντερικός μικροβιόκοσμος του μωρού επηρεάζει την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος και του μεταβολισμού του, όπως και στην ενήλικη ζωή (Dogra et al, 2015).

Τα βρέφη που θηλάζουν εκτίθενται στον εντερικό μικροβιόκοσμο που προσφέρει το γάλα το οποίο περιέχει περισσότερο από 700 είδη βακτηρίων. Το μητρικό γάλα περιέχει πολλούς αμυντικούς παράγοντες, που τα υποκατάστατα δεν περιέχουν. Επίσης, φαίνεται ότι οι μεταβολές του εντερικού μικροβιόκοσμου του νεογέννητου προδιαθέτουν ασθένειες και στην μετέπειτα ζωή του (Rodriguez et al, 2015).

Η σύσταση της διαίτας στην ενήλικη ζωή

Οι διατροφικές συνήθειες του ενήλικα είναι ένας από τους σημαντικότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες που διαμορφώνουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο έντερο του ανθρώπου. Η βραχυπρόθεσμη ή η μακροπρόθεσμη κατανάλωση των ζωικών ή φυτικών προϊόντων αλλάζει τη δομή του εντερικού μικροβιόκοσμου και η μικροβιακή έκφραση των γονιδίων των μικροοργανισμών μεταβάλλεται. Πολλές μελέτες απαιτούνται, ώστε να αποσαφηνιστούν οι πληθυσμοί που συνδέονται με διαφορετικές διαιτητικές συνήθειες αλλά και το χρονικό διάστημα που απαιτείται για να επηρεάσουν τους μικροοργανισμούς του εντέρου.

Παρατηρήθηκε ότι η βραχυπρόθεσμη διαίτα που βασίζεται σε ζωικά τρόφιμα αυξάνει τους μικροοργανισμούς γενών όπως τα *Bacteroides*, *Alistipes*, *Bilophila* και μειώνει τα επίπεδα των *Roseburia*, *Eubacterium rectale*, *Ruminococcus bromii* που ανήκουν στα Firmicutes (πληθυσμοί οι οποίοι μεταβολίζουν κυρίως πολυσακχαρίτες φυτικής προέλευσης) (David et al,

2014). Επίσης η μακροχρόνια κατανάλωση δίαιτας πλούσιας σε ζωικά προϊόντα, από ενήλικες Αμερικανούς σχετίζεται με το γένος *Bacteroides*, ενώ η μακροχρόνια κατανάλωση φρούτων και λαχανικών από ηλικιωμένους συνδέεται με αύξηση των πληθυσμών του γένους *Prevotella* (Jeffery and O'Toole, 2013).

Αν και ο εντερικός μικροβιόκοσμος ανταπορίνεται σε βραχυπρόθεσμες αλλαγές στη διατροφή, οι μακροπρόθεσμες αλλαγές των θρεπτικών συστατικών φαίνεται να καθορίζουν το είδος του μικροβιακού πληθυσμού (Jeffery and O'Toole, 2013). Υπάρχουν διαφορές στην παρουσία των βακτηρίων στο έντερο στις δυο μορφές δίαιτας, οι οποίες αντικατοπτρίζουν τις διαφορές στον μεταβολισμό των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών. Η αποίκιση των μυκήτων, των ιών και των ζυμών παρατηρείται και στις δυο περιπτώσεις (David et al, 2014).

Πρόσφατα, η εκτίμηση του πληθυσμού του εντέρου σε 153 Ιταλούς, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση τροφίμων φυτικής προέλευσης σχετίζεται και με ένα ευεργετικό σύνολο γονιδίων των μικροοργανισμών του εντέρου (microbiome) (De Filippis et al, 2015). Οι συνέπειες στο φαινότυπο των ξενιστών είναι διαφορετικές. Παρατηρήθηκε υψηλή συσχέτιση μεταξύ μίας δίαιτας που βασίζεται σε λαχανικά και των αυξημένων επιπέδων βραχείας αλυσού λιπαρών οξέων καθώς και ορισμένων διαιτητικών ινών που αποικοδομούν τα Firmicutes. Τα χαρακτηριστικά του Μεσογειακού τύπου δίαιτας, δηλ. η αυξημένη πρόσληψη δημητριακών, φρούτων, λαχανικών και οσπρίων προσφέρουν πολλά οφέλη στο έντερο των ανθρώπων (De Filippis et al, 2015). Σύμφωνα με μελέτη παρατήρησης που έγινε σε 82 ενήλικα άτομα παρατηρήθηκε ότι οι διαιτητικές ίνες από τα φασόλια, τα φρούτα και τα λαχανικά συσχετίστηκαν με αφθονία ακτινοβακτηρίων και κλωστριδίων (Dominianni et al, 2015).

Αλλά και η κατανάλωση του ξινόγαλου, των πολλών γαλακτοκομικών ή η κατανάλωση ζυμωμένων τροφίμων, όπως το κεφίρ, επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο και αλλάζουν την δομή του. Τέλος, η κατάχρηση του αλκοόλ και οι διαταραχές που προκαλεί στην υγεία του ανθρώπου συνδέεται με ποσοτικές και ποιοτικές αλλαγές στον εντερικό μικροβιόκοσμο (δυσβίωση) (Engen et al, 2015).

Η κατανάλωση αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά έχουν ως στόχο τους παθογόνους μικροοργανισμούς, αλλά επιδρούν αρνητικά και στους συμβιώντες του εντέρου. Δυστυχώς, επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο ειδικά εάν πρόκειται για ευρέως φάσματος αντιβιοτικά τα οποία χρησιμοποιούνται για όλες τις ασθένειες. Η ποικιλομορφία του εντερικού μικροβιόκοσμου μειώνεται, πολλά στελέχη χάνονται και η επανεμφάνισή τους γίνεται σταδιακά και

μακροπρόθεσμα (*Cresci and Bawden, 2015*). Το τελευταίο αποτελεί σημαντική ανησυχία των ειδικών στο τομέα της υγείας του εντέρου (*Jandhyala et al, 2015*).

Ο τρόπος ζωής και η φυσική δραστηριότητα

Πολλά είναι τα στοιχεία του σύγχρονου τρόπου ζωής που μπορούν να επηρεάσουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Αναμφίβολα, η καθιστική ζωή συμβάλλει στην παχυσαρκία. Ενδεχομένως, ο συνδυασμός με το θετικό ενεργειακό ισοζύγιο και την κατανάλωση ζωικών τροφίμων πλούσια σε κορεσμένα λίπη οδηγεί στην ανακατάταξη των πληθυσμών στο έντερο. Αν και οι μελέτες εμφανίζουν αντιφατικά αποτελέσματα, έχει παρατηρηθεί αύξηση των Firmicutes και μείωση των Bacteroidetes σε άτομα που καταναλώνουν ζωικά τρόφιμα (*Conlon and Bird, 2015*).

Η συνήθης μέτρια άσκηση έχει επίδραση στην άμυνα του εντέρου καθώς και στα γονίδια των μικροοργανισμών του εντέρου. Σε μελέτη της επίδρασης της άσκησης στον εντερικό μικροβιόκοσμο 22 αθλητών τονίζεται η ευεργετική επιρροή της άσκησης στην ποικιλομορφία των μικροοργανισμών του εντέρου και υποστηρίζεται πως ο συνδυασμός με τη διατροφή επηρεάζει τη δομή του εντερικού μικροβιόκοσμου (*Clarke et al, 2014*).

Το κάπνισμα, επηρεάζει επίσης τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου, αυξάνοντας τους πληθυσμούς των γενών *Bacteroides-Prevotella*. Το άγχος επιδρά στη κινητικότητα του εντέρου ή οποία μπορεί να αλλάξει την δομή των μικροβιακών πληθυσμών. Το τελευταίο μάλιστα έχει ενοχοποιηθεί και για την ανάπτυξη φλεγμονωδών νόσων του εντέρου (*Conlon and Bird, 2015*).

Η γεωγραφική θέση

Η ποικιλομορφία στους μικροοργανισμούς του εντέρου σε παιδιά που κατοικούν σε αγροτικές περιοχές είναι μεγαλύτερη από εκείνη των παιδιών σε ανεπτυγμένες χώρες (*Conlon and Bird, 2015*). Επιπλέον, μελέτη σε Καυκάσιους και Κινέζους στις Ηνωμένες Πολιτείες και στο Χονγκ Κονγκ κατέληξε ότι υπήρχαν διαφορές στη μικροβιακή σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου μεταξύ των χωρών και μεταξύ των εθνοτήτων (*Cresci and Bawden, 2015*). Εκτός από τις διατητικές συνήθειες, οι διαφορές στον εντερικό μικροβιόκοσμο σε διαφορετικούς γεωγραφικούς πληθυσμούς, μπορεί να οφείλονται και στην επάρκεια της ποσότητας και ποιότητας των τροφίμων, στις τεχνικές καλλιέργειας και στη διαθέσιμη τεχνολογία (*McFarland, 2000*).

Η κατανάλωση προ- ή πρε- βιοτικών

Η κατανάλωση των προ- και πρε – βιοτικών έχει ευεργετικές ιδιότητες στην υγεία του εντέρου. Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που έχουν απομονωθεί από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών ανθρώπων και χορηγούνται σε επαρκή ποσότητα προς όφελος της υγείας του (Μεντής, 2015). Επηρεάζουν τους μικροβιακούς πληθυσμούς του εντέρου και κατά συνέπεια επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα και το μεταβολισμό του ανθρώπου. Οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν δεν είναι ακόμη σαφείς καθώς κάθε στέλεχος λειτουργεί διαφορετικά. Τα πρεβιοτικά «ως άπεπτα υποστρώματα» στο έντερο βοηθούν στην ανάπτυξη των ευεργετικών μικροοργανισμών του εντέρου και επηρεάζουν με ένα διαφορετικό τρόπο την ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Η χρήση των προβιοτικών που ορίζονται ως οι «ζωντανοί μικροοργανισμοί» και των πρεβιοτικών δηλαδή των «μη εύπεπτων υποστρωμάτων» που καταλήγουν στο έντερο έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια. Η κατανάλωση ενός λειτουργικού τροφίμου σε μορφή ζελέ το οποίο περιείχε βραχείας αλύσου φρουτο- ολιγοσακχαρίτες (sc-FOS) (5 g/d) και εκχύλισμα από τσάι του βουνού (*Sideritis Euboea*) (0,3/d), από υγιείς ενήλικες για 30 ημέρες, κατέδειξε την πρεβιοτική δράση του τροφίμου: αύξησε τα επίπεδα των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium*, ενώ το προϊόν ήταν καλά ανεκτό από τους εθελοντές (Mitsou et al, 2009). Επιπρόσθετα, η κατανάλωση 0,75 γραμ. β-γλυκάνης κριθαριού σε εμπλουτισμένο τρόφιμο από 52 Έλληνες εθελοντές καταλήγει στις σημαντικές πρεβιοτικές ιδιότητες της β- γλυκάνης στους εθελοντές (Mitsou et al, 2010).

Τα προβιοτικά και τα πρεβιοτικά χρησιμοποιούνται στη βελτίωση της συμβίωσης των μικροοργανισμών του εντέρου και κατά συνέπεια στην πρόληψη και στη θεραπεία ορισμένων ασθενειών (Alonso and Guarner, 2013; Butel, 2014). Αν και η EFSA (European Food Safety Authority), πρόσφατα αρνήθηκε τους θετικούς ισχυρισμούς συσχέτισης προβιοτικών με την υγεία -λόγω έλλειψης ισχυρών αποδεικτικών στοιχείων, κατανόησης των μηχανισμών δράσης τους- πλήθος μελετών καταδεικνύουν την προσφορά τους στην υγεία των ανθρώπων (Butel, 2014).

Μια ενδιαφέρουσα πτυχή των προβιοτικών είναι η συσχέτισή τους με την παχυσαρκία ή το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, καθώς φαίνεται ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος των παχύσαρκων διαφοροποιείται από τον αντίστοιχο των μη παχύσαρκων ατόμων (Butel, 2014). Ίσως η διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμου με τη κατανάλωση προβιοτικών και πρεβιοτικών να μπορεί να προταθεί μελλοντικά για τη θεραπεία της παχυσαρκίας (Arslan, 2014). Πολλές μελέτες, απαιτούνται υπό το πρίσμα νέων δεδομένων στον διαφορετικό

μικροβιόκοσμο μεταξύ των «παχυσάρκων» και των «φυσιολογικών» ώστε να αντιμετωπιστεί η παχυσαρκία και οι ασθένειες που σχετίζονται με αυτή (Butel, 2014; Arslan, 2014; Μεντής, 2015).

Παχυσαρκία

Το υπερβάλλον βάρος και η παχυσαρκία ορίζεται ως η μη φυσιολογική συσσώρευση λίπους που μπορεί να βλάψει την υγεία ενός ατόμου (WHO; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>). Τα τελευταία χρόνια αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της δημόσιας υγείας σε παγκόσμιο επίπεδο. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, το 2014 περισσότερο από 1,9 δισεκατομμύριο ενήλικοι, ήταν υπέρβαροι εκ των οποίων, τα 600 εκατομμύρια θεωρούνται παχύσαρκοι. Λαμβάνοντας υπόψη τη γρήγορη αύξηση του αριθμού των παχύσαρκων ατόμων σε όλο τον κόσμο, το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και ως πανδημία.

Στην Ελλάδα, ο επιπολασμός των υπέρβαρων και των παχύσαρκων ατόμων το 2014 έφτασε σε 65,8% και σε 21,9% του γενικού πληθυσμού αντίστοιχα. Το ποσοστό των ατόμων με Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) μεγαλύτερο ή ίσο του 25 αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς. Το γεγονός αυτό προκαλεί ανησυχία και κινητοποίηση των ειδικών στον χώρο της υγείας (WHO; http://gamapserv.who.int/gho/interactive_charts/ncd/risk_factors/overweight/atlas.html).

Δυστυχώς, η παχυσαρκία και το υπερβάλλον βάρος θεωρούνται η 5η αιτία θανάτου σε όλο τον κόσμο και τα συνοδά νοσήματα της παχυσαρκίας αυξάνονται σε πρωτοφανείς ρυθμούς (Eslinger et al, 2014).

Στα συνοδά νοσήματα συγκαταλέγονται ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η υπέρταση, η καρδιαγγειακή νόσος, η μη αλκοολική λιπώδης διήθηση ήπατος, η αρθρίτιδα, η κατάθλιψη καθώς και ορισμένες μορφές καρκίνου (Damms –Machado et al, 2015; Ley, 2010). Τα προβλήματα υγείας είναι πολλά, γι αυτό η μείωση του επιπολασμού των υπέρβαρων και παχύσαρκων ατόμων αποτελεί δικαιολογημένα προτεραιότητα της δημόσιας υγείας. Η παχυσαρκία είναι πολυπαραγοντικό νόσημα και εκτός από τη γενετική προδιάθεση, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (αυξημένη ποσότητα τροφής, τροφή πλούσια σε ενέργεια, μειωμένη φυσική δραστηριότητα) θεωρείται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο (Raoult, 2008).

Τα τελευταία χρόνια ολοένα και περισσότερες μελέτες συνδέουν τη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου με την παχυσαρκία και τις συναφείς ασθένειες που προκαλούνται από αυτή (Ley, 2010). Μελέτες σε ζώα (παχύσαρκα και μη) καταδεικνύουν τη ποικιλομορφία των μικροοργανισμών στο έντερο. Το σύνολο των μικροοργανισμών κι ο καθένας με τη δική του

συμβολή, ανταποκρίνονται και συμβάλλουν στο ενεργειακό ισοζύγιο του ξενιστή (*Rosenbaum et al, 2015*). Χρησιμοποιούν την ενέργεια που παράγεται από την κατανάλωση των τροφίμων και επηρεάζουν το μεταβολισμό του (*Ley, 2010*).

Αρκετές είναι οι μελέτες οι οποίες αξιολογούν τις διατροφικές συνήθειες υπέρβαρων, παχύσαρκων και φυσιολογικών ενηλίκων και τις συγκρίνουν με τη βιοπικνιότητα και την αφθονία μικροοργανισμών στο ανθρώπινο έντερο. Ορισμένες έχουν αντιφατικά αποτελέσματα, και αναφέρεται ότι οι αντιθέσεις μεταξύ των αποτελεσμάτων μπορεί να οφείλονται στις διατροφικές συνήθειες του ξενιστή ή στη φυσιολογία του ξενιστή (*Kasai et al, 2015*). Η παχυσαρκία συνδέεται με μειωμένη βακτηριακή ποικιλότητα και αλλαγές σε επίπεδο στελέχους και γένους (*Schwiertz et al, 2009; Duncan et al, 2008*).

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μεταβολές στις μεγάλες βακτηριακές ομάδες (Φύλα) του εντερικού μικροβιόκοσμου κατά την παχυσαρκία, σε σχέση με το φυσιολογικό βάρος.

Πίνακας 1.1: Μεταβολές του εντερικού μικροβιόκοσμου κατά την παχυσαρκία (*Chakraborti, 2015*).

Εντερικός μικροβιόκοσμος σε άτομα με φυσιολογικό βάρος	Εντερικός μικροβιόκοσμος σε παχύσαρκα άτομα
<i>Firmicutes</i>	Αύξηση των <i>Firmicutes</i>
<i>Bacteroidetes</i>	Μείωση της αφθονίας των <i>Bacteroidetes</i>
<i>Actinobacteria</i>	Υψηλότερο επίπεδο των <i>Actinobacteria</i>
<i>Verrucomicrobia</i>	Μικρότερη αναλογία των <i>Verrucomicrobia</i>

Παρατηρείται αύξηση της αναλογίας των *Firmicutes/ Bacteroidetes*, στην παχυσαρκία ενώ η απώλεια του βάρους αυξάνει τα είδη των *Bacteroides* (*Remely, 2014*). Υπάρχουν όμως και μελέτες που καταλήγουν σε αντιφατικά αποτελέσματα (*Rosenbaum et al, 2015*). Εκτιμήθηκαν οι διαφορές στον εντερικό μικροβιόκοσμο μεταξύ 98 ατόμων (παχύσαρκων, υπέρβαρων και φυσιολογικών) και τελικά η αναλογία των *Firmicutes* και των *Bacteroidetes* άλλαξε υπέρ των *Bacteroidetes* στους υπέρβαρους και παχύσαρκους (*Schwiertz et al, 2009*). Επίσης σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Ιαπωνία, εξετάστηκε ο εντερικός μικροβιόκοσμος 23 ατόμων με ΔΜΣ<20kg/m² και σε 33 άτομα με ΔΜΣ>25kg/m². Παρατηρήθηκε ότι η βακτηριακή ποικιλομορφία ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα παχύσαρκα άτομα σε σχέση με τα άτομα φυσιολογικού βάρους όπως επίσης και η αναλογία των *Firmicutes* προς *Bacteroidetes* (*Kasai et al, 2015*).

Σε πρόσφατη μελέτη, όπου αξιολογήθηκε ο εντερικός μικροβιόκοσμος σε 82 ενήλικα άτομα, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των ατόμων με ΔΜΣ $>25 \text{ kg/m}^2$ ή $<25 \text{ kg/m}^2$ σε σχέση με τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Κατέληξαν ότι το φύλο, ο ΔΜΣ και η πρόσληψη διαιτητικών ινών συμβάλλουν στη διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμου στον άνθρωπο. Οι πληθυσμοί των *Bacteroidetes* και η βιοποικιλότητα είναι χαμηλότερα στις υπέρβαρες και παχύσαρκες γυναίκες σε σχέση με τις φυσιολογικού βάρους, λαμβάνοντας υπόψιν το παράγοντα φύλο. Το φύλο πιθανόν να επηρεάζει τον εντερικό μικροβιόκοσμο μέσω των διαφορών του χρόνου διέλευσης του εντέρου ο οποίος φαίνεται να είναι μεγαλύτερος στις γυναίκες από τους άντρες (Dominianni et al, 2015).

Στη μελέτη των Zuo και των συνεργατών του (2011) εξετάστηκε ο εντερικός μικροβιόκοσμος 104 ατόμων, εκ των οποίων τα 52 άτομα είχαν ΔΜΣ $>28 \text{ kg/m}^2$ ενώ στους υπόλοιπους ο ΔΜΣ κυμαινόταν μεταξύ 18,5 έως 24 kg/m^2 . Οι ερευνητές συμπεραίνουν ότι τα παχύσαρκα άτομα είχαν μικρότερες ποσότητες του *Clostridium perfringens* και του γένους *Bacteroides* σε σχέση με τα άτομα με φυσιολογικό βάρος (Zuo et al, 2011).

Η διαδικασία της απώλειας βάρους φαίνεται ότι συνδέεται με αλλαγές στην εκπροσώπηση των βακτηρίων και των γονιδίων τους (Ley, 2010). Παρατηρείται μεταβολή στην αναλογία των *Firmicutes/ Bacteroidetes* σε άτομα που μελετήθηκαν πριν, κατά την διάρκεια και μετά την απώλεια βάρους. Επιπλέον, η ποικιλότητα των γονιδίων του εντερικού μικροβιόκοσμου (εντερικό μικροβίωμα) είναι μικρότερη στα παχύσαρκα άτομα έναντι των αδυνάτων και αυξάνεται πάλι κατά την διάρκεια της απώλειας του βάρους. Διάφοροι μηχανισμοί έχουν προταθεί ως προς την επίδραση του εντερικού μικροβιώματος στο ενεργειακό ισοζύγιο του ξενιστή, οι μελέτες όμως σε ανθρώπους είναι ελάχιστες (Rosenbaum et al, 2015).

Χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές (metagenomics), αξιολογήθηκε ο εντερικός μικροβιόκοσμος 292 ατόμων σε πληθυσμό της Δανίας. Οι 169 ήταν παχύσαρκοι και οι 123 φυσιολογικοί. Τα άτομα με χαμηλή βακτηριακή βιοποικιλότητα (LGC) χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερου βαθμού παχυσαρκία, αντίσταση στην ινσουλίνη και δυσλιπιδαιμία. Επιπλέον παρατηρείται πιο έντονο φλεγμονώδες προφίλ σε σύγκριση με τα άτομα με υψηλή βακτηριακή ποικιλότητα (HGC) και πιο εύκολη η τάση για πρόσληψη βάρους. Οι διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων ήταν σημαντικές σε επίπεδο μικροοργανισμών, μικροβιακών γονιδίων αλλά και στο φαινότυπο των ξενιστών (Le Chatelier et al, 2013).

Επιπρόθετα, το ίδιο περίπου χρονικό διάστημα έγινε σύγκριση στον εντερικό μικροβιόκοσμο 38 παχύσαρκων και 11 υπέρβαρων ατόμων, ακολουθώντας αντίστοιχες τεχνικές (metagenomics) και τον ίδιο δείκτη αξιολόγησης της μικροβιακής ποικιλότητας, με την προηγούμενη ομάδα. Οι εθελοντές ακολούθησαν διατροφική παρέμβαση 12 εβδομάδων. Τα

άτομα με χαμηλή βακτηριακή βιοποικιλότητα (LGC) παρουσίαζαν πιο έντονη τη δυσλειτουργία του μεταβολισμού και τη φλεγμονή χαμηλού βαθμού. Τις πρώτες 6 εβδομάδες η διατροφική παρέμβαση ήταν δίαιτα χαμηλή σε ενέργεια και υψηλή σε πρωτεΐνες. Το διάστημα αυτό παρατηρήθηκε μείωση του μεταβολικού φλεγμονώδους προφίλ καθώς επίσης και αύξηση της βιοποικιλότητας στην ομάδα χαμηλής βακτηριακής βιοποικιλότητας (LGC). Τις υπόλοιπες 6 εβδομάδες οι εθελοντές ακολούθησαν διατροφική παρέμβαση για τη διατήρηση απώλειας βάρους. Παρατηρήθηκε τάση για επαναφορά στο αρχικό μεταβολικό προφίλ και προοδευτική μείωση των δεικτών φλεγμονής (Cotillard et al, 2013).

Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται ώστε να διευκρινιστούν όλα τα παραπάνω συμπεράσματα καθώς επίσης και δεδομένα σχετικά με αλλαγές των υπολοίπων συμβιόντων του εντέρου για τους οποίους δεν υπάρχουν αναφορές. Αξίζει να αποτυπωθεί και να αναφερθεί ο ρόλος των ζυμών και των μυκήτων στις αλλαγές του βάρους.

Ωστόσο οι ακριβείς μηχανισμοί μέσω των οποίων εμπλέκεται ο εντερικός μικροβιόκοσμος δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Δύο είναι οι υποθέσεις που προτείνονται όσον αφορά τον μηχανισμό με τον οποίο δρουν τα συστατικά του εντερικού μικροβιόκοσμου και συμβάλλουν στην κατάσταση της παχυσαρκίας.

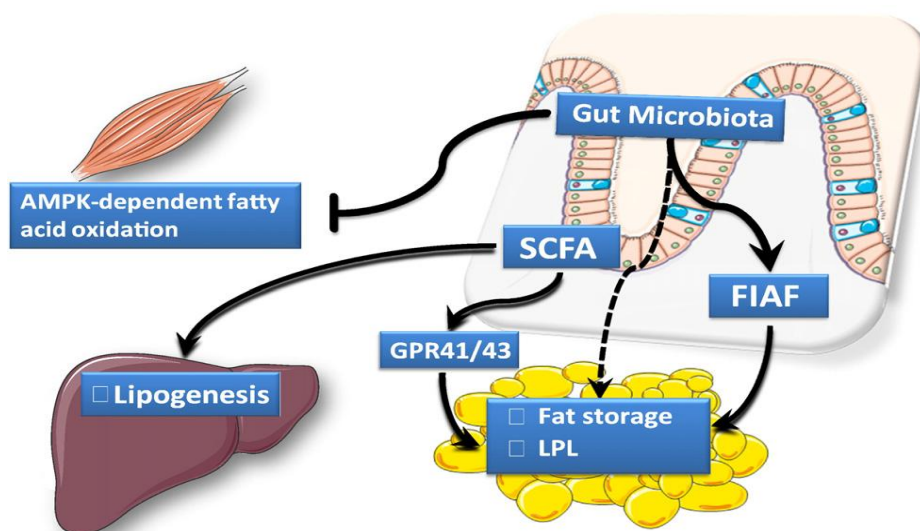
Η πρώτη υπόθεση σχετίζεται με το ισοζύγιο ενέργειας του ξενιστή μέσω των μηχανισμών πρόσληψης, αποθήκευσης και κατανάλωσης ενέργειας Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, οι διαφορετικοί μικροοργανισμοί που εμφανίζονται στα παχύσαρκα άτομα, εκμεταλλεύονται πιο αποδοτικά τα άπεπτα συστατικά της δίαιτας του ξενιστή μέσω των συνεχών ζυμώσεων και της παραγωγής μεγαλύτερων ποσοτήτων λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας (SCFA), τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε λίπος στο ήπαρ (Bäckhed et al, 2007).

Όταν συγκρίθηκαν οι ποσότητες των SCFAs μεταξύ παχύσαρκων, υπέρβαρων και αδύνατων ατόμων, φάνηκε ότι τα παχύσαρκα και υπέρβαρα άτομα παράγουν περισσότερα SCFAs από τους αδύνατους λόγω των διαφορών στον εντερικό μικροβιόκοσμο μεταξύ τους (Rozenbloom et al, 2014). Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται ώστε να διευκρινιστούν τα παραπάνω δεδομένα.

Τα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας φαίνεται ότι επιδρούν και στην έκφραση γονιδίων του ξενιστή που σχετίζονται με την δαπάνη και την αποθήκευση ενέργειας στον ξενιστή. Από πειράματα σε αξενικά (χωρίς μικροοργανισμούς) πειραματόζωα έχει παρατηρηθεί αύξηση της έκφρασης των mRNAs των ηπατικών ενζύμων ChREBP και SREBP-1, τα οποία παίρνουν μέρος στην ηπατική de novo λιπογένεση. Ακόμη, ο εντερικός μικροβιόκοσμος ευνοεί τη δημιουργία λίπους μέσω ενός μηχανισμού που συνδέει τα ελεύθερα τριγλυκερίδια με την καταστολή

επιλεκτικά στο έντερο του FIAF (fasting- induced adipose factor) ενός αναστολέα της LDL (adipocyte lipoprotein lipase), όπως προκύπτει από πειράματα σε αζενικά ποντίκια (Bäckhed *et al*, 2004).

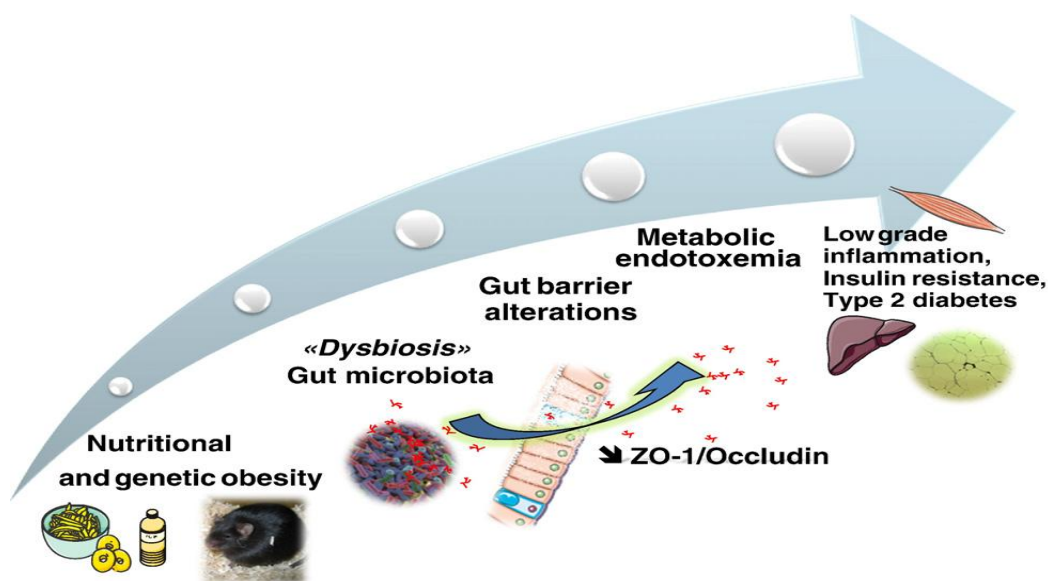
Ο εντερικός μικροβιόκοσμος αναστέλλει επίσης τη δράση της AMPK (AMP-activated protein kinase) που σχετίζεται με την οξείδωση των λιπαρών οξέων στο ήπαρ και τους σκελετικούς μύες (Bäckhed *et al*, 2007). Επίσης από πειράματα σε εμβολιασμένα με εντερικό μικροβιόκοσμο, knock-out ποντίκια για τους υποδοχείς GPR41 και GPR43 (G-protein coupled receptor), στους οποίους συνδέονται τα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας, παρατηρήθηκε ότι τα πειραματόζωα αυτά δεν έπαιρναν βάρος σε σχέση με τα φυσιολογικά επίσης εμβολιασμένα πειραματόζωα (Samuel *et al*, 2008; Bjursell *et al*, 2010).



Εικόνα 1.6: Προτεινόμενοι μηχανισμοί για το ρόλο του εντερικού μικροβιόκοσμου στην παραγωγή και αποθήκευση ενέργειας στον ξενιστή (Cani & Delzenne, 2011).

Η δεύτερη υπόθεση συνδέει την παχυσαρκία με τον εντερικό μικροβιόκοσμο μέσω της φλεγμονής χαμηλού βαθμού. Είναι γνωστό ότι η παχυσαρκία και η αντίσταση στην ινσουλίνη είναι καταστάσεις όπου επικρατεί χαμηλού βαθμού φλεγμονή, με χαρακτηριστική την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (IL-1, IL-6, TNF- α). Φαίνεται ότι η χαμηλού βαθμού φλεγμονή που προκαλείται από δίαιτα υψηλή σε λιπαρά προκαλεί τόσο σε πειραματόζωα, όσο και σε ανθρώπους αύξηση της συγκέντρωσης των LPS στην κυκλοφορία του αίματος (μεταβολική ενδοτοξαιμία). Σε ζωικά μοντέλα, η υποδόρια έγχυση των LPS μπορεί να προκαλέσει αύξηση του σωματικού βάρους και αντίσταση στην ινσουλίνη χωρίς να μεταβάλλεται η πρόσληψη ενέργειας. Οι ενδοτοξίνες ενεργοποιούν τα μακροφάγα στο λιπώδη ιστό και στην περιφερική κυκλοφορία που είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την ανοσία και τη χρόνια φλεγμονή (Bakker *et al*, 2015).

Το LPS είναι συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των Gram – βακτηρίων όπως είναι τα *Bacteroidetes* (Ley, 2010) και πιθανές μεταβολές στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου, μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα αύξηση της συγκέντρωσής τους. Μεταφέρονται από το παχύ έντερο μέσω χυλομικρών στη συστηματική κυκλοφορία. Τα χυλομικρά (λιποπρωτεΐνες) συντίθενται από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου σε απόκριση δίαιτας υψηλής σε λίπος. Η σύνδεση των LPS στα CD14 κύτταρα μέσω του υποδοχέα TLR4 προκαλεί την έκκριση προφλεγμονωδών ενώσεων. Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια που δεν έχουν TLR4 ο οποίος αναγνωρίζει το LPS είναι ανθεκτικά στην παχυσαρκία από τη διατροφή και στην αντίσταση της ινσουλίνης (Ley, 2010).



Εικόνα 1.7: Προτεινόμενοι μηχανισμοί για τη δράση του εντερικού μικροβιόκοσμου στην εμφάνιση μεταβολικής ενδοτοξαιμίας και παχυσαρκίας (Cani and Delzenne, 2011).

Σε μελέτη καταγραφής της ημερήσιας πρόσληψης τροφίμων που πραγματοποιήθηκε σε 37 έφηβους, παρατηρήθηκε ότι στους άντρες εφήβους οι κυτταροκίνες παρουσίαζαν συσχέτιση με την κατανάλωση των ολικών λιπιδίων (Antunes et al, 2015).

Η ενσωμάτωση των LPS στις λιποπρωτεΐνες αυξάνει το κλάσμα των λιπιδίων τα οποία οδηγούν στη φλεγμονή. Αυτό θα μπορούσε να διαμεσολαβείται από τους υποδοχείς CD36 και SR-BI, οι οποίοι έχουν υψηλή συγγένεια προς τα LPS. Οι λιποπρωτεΐνες με ενσωματωμένα τα LPS, έχουν αυξημένη διακυττάρωση μέσω ενδοθηλίου και με αυτό τον τρόπο μετατοπίζουν ένα υψηλότερο ποσό των λιποπρωτεϊνών με LPS σε λιποκύτταρα. Το παραπάνω μπορεί να αυξήσει τη λιπογένεση και έκθεση των λιποκυττάρων και των μακροφάγων σε LPS η οποία είναι υπεύθυνη για τη φαινοτυπική αλλαγή από M2 σε M1 μακροφάγα στο λιπώδη ιστό και το θάνατο λιποκυττάρων. Τα LPS εμπλέκονται στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας ως ο άμεσος στόχος για τη μεταφορά και την αποθήκευση των λιπιδίων στο λιπώδη ιστό (Hersoug et al, 2015).

1.2.1. ΑΠΩΛΕΙΑ ΒΑΡΟΥΣ

Η απώλεια του βάρους σχετίζεται με μείωση του κινδύνου νοσηρότητας και θνησιμότητας. Η ανάπτυξη των παρεμβάσεων για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας στοχεύει στην απώλεια των κιλών και στη μακροχρόνια διατήρηση της απώλειας αυτής (*Dombrowski et al, 2014*). Η ανάκτηση του βάρους έχει αποδειχθεί ως ένα από τα μεγαλύτερα εμπόδια στη θεραπεία της παχυσαρκίας (*MacLean et al, 2011*), ενώ η μακροχρόνια διατήρηση των απολεσθέντων κιλών χαρακτηρίζεται ως επιτυχία. Οι ειδικοί πιστεύουν ότι εάν ένα άτομο διατηρήσει έως και το 5-10% της απώλειας του βάρους του θεωρείται μεγάλο επίτευγμα (*Soeliman & Azadbakht, 2014*)! Οι περισσότεροι «πρώην» παχύσαρκοι, συνήθως δεν αναπτύσσουν τη συμπεριφορά απώλειας κιλών και οι ειδικοί στοχεύουν στα αίτια της επαναπρόσληψης (*Ochner et al, 2013*).

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι διατροφικές συμπεριφορές όπως η μη ύπαρξη αυτοπεριορισμού ή η υπέρμερτη κατανάλωση γευμάτων οδηγούν σε υποτροπή του βάρους. Επιπλέον, η μεγαλύτερη πρόσληψη θερμίδων από αυτές που απαιτούνται και η τροποποίηση κατανομής θερμίδων σε μακροθρεπτικά συστατικά μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση των κιλών (*Soeliman and Azadbakht, 2014*). Σε μελέτη που έγινε σε 14,256 ενήλικους με ΔΜΣ >25m/kg² υποστηρίζεται ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο και ο αρχικός ΔΜΣ, η αρχική απώλεια βάρους και οι συμβουλευτικές επισκέψεις σε ειδικό (*Lenoir et al, 2015*).

Οι μη χειρουργικές παρεμβάσεις, δηλαδή η αλλαγή στη διατροφική συμπεριφορά του ατόμου με την εφαρμογή διαιτολογίου καθώς και η αύξηση της σωματικής του δραστηριότητας αποτελούν δυο από τις πιο σημαντικές παρεμβατικές μεθόδους. Η συμπεριφοριστική θεραπεία και οι συνδυασμοί των παραπάνω μεθόδων (*Soeliman and Azadbakht, 2014*) μπορούν να δώσουν μικρά, αλλά σημαντικά οφέλη στη μακροχρόνια απώλεια βάρους. Οι συμπεριφοριστικές παρεμβάσεις συνήθως κορυφώνονται σε έξι μήνες περίπου μετά την έναρξη απώλειας βάρους (*Dombrowski et al, 2014*).

Ένα μεγάλο ερώτημα που τίθεται μετά από την κατανόηση του ρόλου που διαδραματίζει ο εντερικός μικροβιόκοσμος και τα μεταβολικά του προϊόντα στη δημιουργία της παχυσαρκίας, είναι το εξής: μπορεί οι πιθανές μεταβολές στη σύστασή του να παίζουν ρόλο στην απώλεια βάρους του ξενιστή;

Έχει παρατηρηθεί σε ζωικά μοντέλα ότι τα SCFAs που παράγονται στο παχύ έντερο διεγείρουν την απελευθέρωση των ανορεκτικών ορμονών, του PYY και του GLP-1 από εντερο-ενδοκρινικά L κύτταρα. Το ερώτημα κατά πόσο το προπιονικό οξύ προωθεί την έκκριση των PYY και GLP-1 μέσω της χορήγησης ενός εστέρα προπιονικού ινουλίνης, μελετήθηκε σε

υπέρβαρους ενήλικες (60 άτομα) και οι μακροπρόθεσμες δράσεις του προπιονικού αξιολογήθηκαν για 24 εβδομάδες. Τα δεδομένα της μελέτης καταδεικνύουν ότι η αύξηση του προπιονικού οξέος αποτρέπει την αύξηση του σωματικού βάρους σε υπέρβαρους ενήλικες. Τελικά το προπιονικό οξύ ίσως να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της όρεξης (Chambers et al, 2015).

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός που μπορεί να προκαλέσει απώλεια βάρους είναι η χορήγηση και εγκατάσταση προβιοτικών στελεχών. Τα προβιοτικά και πρεβιοτικά είναι γνωστό ότι μεταβάλλουν τη σύνθεση των πληθυσμών του εντερικού μικροβιόκοσμου (Chakraborti, 2015).

Σε δυο ομάδες ζωικών μοντέλων, η πρώτη με υγιή παχύσαρκα και η άλλη με διαβητικά ποντίκια δόθηκαν δίαιτες υψηλής και χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος και καθημερινή χορήγηση του προβιοτικού *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420 ή νερού (ομάδα ελέγχου). Στην ομάδα με τα παχύσαρκα υγιή μοντέλα δόθηκε δίαιτα με 60% ή 12% περιεκτικότητα σε λίπος και η καθημερινή χορήγηση του *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420 ή νερού (ομάδα ελέγχου) ήταν για 12 εβδομάδες. Στα διαβητικά μοντέλα το ποσοστό λίπους ήταν (72%) για 4 εβδομάδες και ακολούθησε η χορήγηση *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420 ή νερού (ομάδα ελέγχου) για 6 εβδομάδες. Η μελέτη κατέληξε σε σημαντική μείωση του σωματικού λίπους των ποντικών μετά από 6 εβδομάδες. Παράλληλα, παρατηρήθηκαν μειωμένα επίπεδα LPS και φλεγμονή του ήπατος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (Stenman et al, 2014).

Σε ανθρώπους το προβιοτικό *Lactobacillus gasseri* SBT2055 επηρέασε στη μείωση της κοιλιακής παχυσαρκίας και του σωματικού βάρους. Η διπλά τυφλή, τυχαιοποιημένη μελέτη παρέμβασης σε 87 άτομα με ΔΜΣ (24,2–30,7 kg/m²) για 12 εβδομάδες καταλήγει ότι στην ομάδα με την κατανάλωση προβιοτικού το σωματικό βάρος μειώθηκε σημαντικά σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Το αντίστοιχο παρατηρήθηκε και με τη περιφέρεια μέσης και γλουτών (Kadooka et al, 2010).

Σε μια άλλη διπλά τυφλή, τυχαιοποιημένη μελέτη δοκιμάστηκε για 24 εβδομάδες σε παχύσαρκα άτομα η χορήγηση ενός προβιοτικού στελέχους *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 (LPR). Κάθε ομάδα ακολούθησε για τις πρώτες 12 εβδομάδες περιορισμό θερμιδικής πρόσληψης και κατόπιν άλλες 12 εβδομάδες διατήρηση του βάρους. Κάθε άτομο κατανάλωνε 2 κάψουλες/ ημέρα από το προβιοτικό ή κάψουλα με ολιγοφρουκτόζη και ινουλίνη. Η μέση απώλεια βάρους στις γυναίκες στην ομάδα LPR ήταν σημαντικά υψηλότερη από ότι στις γυναίκες με την ολιγοφρουκτόζη και την ινουλίνη. Η απώλεια του βάρους που προκαλείται από το LPR συνδέθηκε όχι μόνο με σημαντικές μειώσεις της λιπώδους μάζας και των κυκλοφορούντων συγκεντρώσεων της λεπτίνης αλλά και με τη σχετική αφθονία των βακτηρίων

της οικογένειας Lachnospiraceae στα κόπρανα. Τα συμπεράσματα της μελέτης υποδηλώνουν ότι τα LPR μπορούν να επιτείνουν την απώλεια και στη διατήρηση του σωματικού βάρους στις γυναίκες (Sanchez et al, 2014).

1.2.2. Διατήρηση Απώλειας Βάρους

Η διατήρηση του βάρους είναι εξίσου σημαντική όσο και η απώλεια των κιλών. Ως διατήρηση ορίζεται η $\geq 10\%$ απώλεια του αρχικού βάρους η οποία έχει διατηρηθεί πάνω από 1 έτος σε ενήλικες με ΔΜΣ $>25\text{m/kg}^2$ (Lenoir et al, 2015). Αν και οι αλλαγές στην διατροφική συμπεριφορά και στην αυτοδιαχείριση της προσπάθειας των ατόμων να μειώσουν το βάρος είναι επιτυχείς, ωστόσο λίγοι καταφέρνουν να διατηρήσουν την απώλεια (Dombrowski et al, 2014). Στο διάστημα της διατήρησης, παρατηρούνται διάφορες βιολογικές προσαρμογές οι οποίες οφείλονται στον περιορισμό των θερμίδων λόγω της δίαιτας που ακολουθείται, καθώς και στην αύξηση της φυσικής δραστηριότητας. Μια «καινούργια» μεταβολική κατάσταση λαμβάνει μέρος και οι προσαρμογές στην ομοιόσταση της ενέργειας διαφέρουν από το προηγούμενο διάστημα. Τα συνηθισμένα σήματα του λιπώδους ιστού δεν πραγματοποιούνται πλέον και σημαντικές αλλαγές παρατηρούνται στη λεπτίνη και στα πεπτίδια του εντέρου (Anastasiou et al, 2015; MacLean et al, 2011).

Τα παραπάνω, μπορεί να οδηγήσουν στην υποτροπή της διατήρησης και πολλοί να ξαναπάρουν βάρος. Η επανάκτηση των κιλών είναι κοινό πρόβλημα στους υπέρβαρους και στους παχύσαρκους. Πιο επιρρεπείς στην επαναπρόσληψη των κιλών είναι τα άτομα που έχασαν βάρος πρόσφατα, ενώ εκείνοι που το είχαν διατηρήσει μειωμένο, έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να συνεχίσουν να είναι συντηρητές (Anastasiou et al, 2015). Έχει παρατηρηθεί, επαναπρόσληψη σχεδόν του μισού των απολεσθέντων κιλών ακόμη και σε διάστημα τριών έως πέντε ετών μετά από απώλεια ενός χρόνου (Soeliman & Azadbakht, 2014). Οι διατηρήσαντες έχουν έναν «ενεργό» τρόπο ζωής, ο οποίος περιλαμβάνει αυξημένη σωματική δραστηριότητα και τήρηση υποθερμидικού διαιτολογίου (Anastasiou et al, 2015). Επιπλέον, επιλέγουν υγιεινά τρόφιμα και αυτοπαρακολουθούν το βάρος τους, (Soeliman and Azadbakht, 2014) συμμετέχουν στη διαδικασία του φαγητού, έχουν υψηλότερη συχνότητα και βραδύτερο ρυθμό κατανάλωσης τροφής (Karforoulou et al, 2016).

Η μελέτη των Reyes και των συνεργατών του διερεύνησε τους παράγοντες οι οποίοι προωθούν ή εμποδίζουν τη διατήρηση της απώλειας βάρους σε μια ομάδα ατόμων, οι οποίοι είχαν χάσει το 10% του βάρους τους τα δυο τελευταία χρόνια. Οι 9 είχαν διατηρήσει το βάρος τους (maintainers) και οι 19 όχι (regainers). Παρατήρησαν διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων. Η

μελέτη καταλήγει στο γεγονός ότι οι προσπάθειες διατήρησης απώλειας βάρους μπορούν να βελτιωθούν με τη μακροπρόθεσμη αυτό-παρακολούθηση και με το τρόπο σκέψης των ανθρώπων κατά τη διάρκεια της διατήρησης των κιλών (*Reyes et al, 2012*).

Πρόσφατα δεδομένα, της 10 ετούς μελέτης παρατήρησης «National Weight Control Registry» (NWCR) (2014), σε 2886 ενήλικες οι οποίοι κατά την εγγραφή τους στη μελέτη είχαν χάσει τουλάχιστον 13,6kg στο παρελθόν και είχαν διατηρήσει την απώλεια για τουλάχιστον 1 χρόνο, καταλήγει ότι η πλειοψηφία των συμμετεχόντων διατηρούν την απώλεια >10 έτη. Η μακροπρόθεσμη διατήρηση απώλειας βάρους είναι εφικτή και απαιτείται συνεχή αλλαγή συμπεριφοράς. Οι διατηρούντες ανέφεραν υψηλά επίπεδα σωματικής δραστηριότητας, μειωμένη καθημερινή πρόσληψη θερμίδων και λίπους και υψηλό επίπεδο διαιτητικής συγκράτησης. Ενώ οι περισσότεροι ζυγίζονται αρκετές φορές την εβδομάδα. Παρατηρείται ότι οι μεγαλύτερες αρχικές απώλειες βάρους και η μεγαλύτερη διάρκεια διατήρησης σχετίζονται με καλύτερα μακροχρόνια αποτελέσματα (*Thomas et al, 2014*).

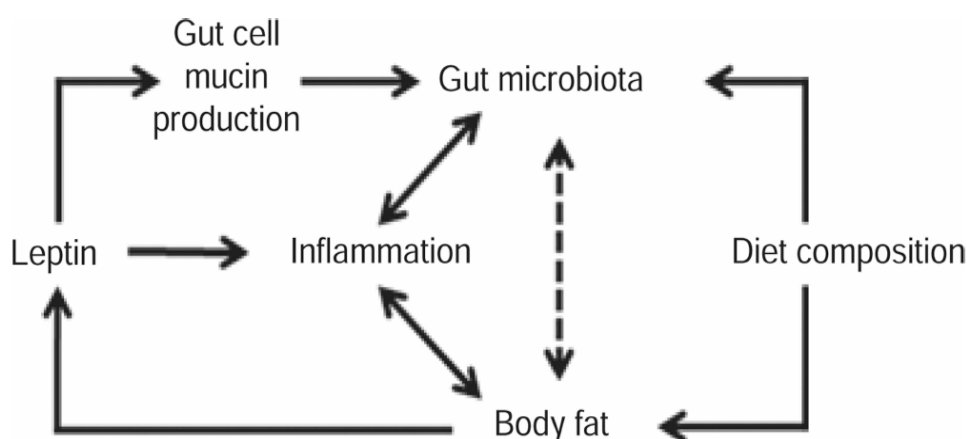
Αλλά και η μελέτη MedWeight σε ελληνικό πληθυσμό 239 ατόμων (με τουλάχιστον 10% απώλεια βάρους) προτείνει ότι η διατήρηση της απώλειας των κιλών σχετίζεται με το ποιός έχει το βασικό έλεγχο της προσπάθειας (*Anastasiou et al, 2015*). Οι διατηρούντες ακολουθούν ένα πιο υγιεινό διατροφικό πρότυπο σε σχέση με τους επανακτήσαντες. Τρώνε στο σπίτι, έχουν μεγαλύτερη συχνότητα γευμάτων και βραδύτερο ρυθμό κατανάλωσης φαγητού (*Karforoulou et al, 2016*). Η εξατομικευμένη θεραπεία, σύμφωνα με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά κάθε ατόμου μπορεί να αυξήσει τα ποσοστά διατήρησης της απώλειας των κιλών σε πρώην υπέρβαρα ή παχύσαρκα άτομα (*Anastasiou et al, 2015*). Η θετική υποστήριξη της οικογένειας και των φίλων σε άτομα τα οποία προσπαθούν να διατηρήσουν το βάρος τους αποδεικνύεται ωφέλιμη (*Karforoulou et al, 2015*).

Η επιτυχής κατανόηση για συμμόρφωση των συνηθειών αυτών στα άτομα που έχουν χάσει βάρος αποτελεί πρωτεύον ζήτημα από τους ειδικούς ώστε να ελεγχθεί η επιδημία της παχυσαρκίας και των συνεπειών της (*Dombrowski et al, 2014*). Ως εκ τούτου υπάρχει ανάγκη να αναπτυχθεί περεταίρω μελέτη, ώστε να βρεθούν λύσεις στον τομέα της διαχείρισης της παχυσαρκίας, εστιάζοντας στην επιτυχή διατήρηση απώλειας βάρους (*Soeliman and Azadbakht, 2014*).

1.2.2.1. Διατήρηση Απώλειας Βάρους και Εντερικός Μικροβιόκοσμος

Εκτός από τις βιολογικές μεταβολές που πραγματοποιούνται το διάστημα της διατήρησης της απώλειας βάρους σε ολόκληρο το σώμα του ξενιστή παρατηρούνται αλλαγές

και στο επίπεδο του εντέρου. Επιστημονικά δεδομένα από ζωικά μοντέλα και από ανθρώπους υποδεικνύουν συσχέτιση μεταξύ της σύνθεσης του εντερικού μικροβιόκοσμου και της διατήρησης απώλειας βάρους που οφείλεται στη «σύνθεση» της νέας δίαιτας και στη μείωση των θερμίδων (Ley, 2010; Ravussin et al, 2012). Η βιβλιογραφία αναφέρει συσχετίσεις μεταξύ της σύστασης της δίαιτας, του εντερικού μικροβιόκοσμου, της λεπτίνης, του σωματικού λίπους, των δεικτών φλεγμονής και του εντερικού βλεννογόνου. Κυρίαρχο ρόλο στην ισορροπία αυτή, κατέχει η σύσταση της δίαιτας (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8: Σχηματική απεικόνιση πιθανών σχέσεων μεταξύ σύστασης διατροφής, εντερικού μικροβιόκοσμου, λεπτίνης, σωματικού βάρους, δεικτών φλεγμονής και παραγωγής βλέννας (Ravussin et al, 2012).

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος μπορεί να ανταποκριθεί σε μια ταχέως τροποποιημένη διαίτα αλλά, και οι μακροπρόθεσμες αλλαγές στη σύνθεση της επηρεάζουν τη δομή και τη δραστηριότητα των συμβιώντων του εντέρου (David et al, 2014). Ο Remely και οι συνεργάτες του ανέλυσαν τα κόπρανα τριάντα τριών παχύσαρκων ατόμων οι οποίοι ακολούθησαν την διαίτα DASH σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με τη «πρόληψη και την θεραπεία της παχυσαρκίας» για περισσότερο από 3 μήνες. Κατέληξαν στο γεγονός ότι οι αναλογίες των *Firmicutes* /*Bacteroidetes* μειώθηκαν σημαντικά το διάστημα αυτό και παρατηρήθηκε γρήγορη αλλαγή της σύνθεσης του εντερικού μικροβιόκοσμου αμέσως μετά από λίγες εβδομάδες. Η μακροπρόθεσμη διατροφική παρέμβαση μπορεί να οδηγήσει σε σημαντική αλλαγή της εικόνας του εντέρου (Remely et al, 2015).

Επιπλέον, η σύσταση της δίαιτας ενός ατόμου μπορεί να επηρεάζει τον εντερικό μικροβιόκοσμο και παράλληλα την ποσότητα παραγωγής των λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας

(SCFA) (Schwiertz *et al*, 2009). Μελετήθηκε η σχέση μεταξύ του ΔΜΣ, της απώλειας βάρους και των δυο μεγάλων ομάδων των βακτηρίων στα κόπρανα πρώην και νυν παχύσαρκων, όπου δόθηκαν υποθερμιδικά διαιτολόγια μειωμένα σε υδατάνθρακες για 4 εβδομάδες σε παχύσαρκους και μη (υπο διατήρηση των κιλών) και σε παχύσαρκους υπό απώλεια βάρους. Η μελέτη κατέληξε στο γεγονός ότι, οι αναλογίες των δυο μεγάλων ομάδων των βακτηρίων δεν είχαν σημαντική μεταβολή, παρόλο αυτά ο εντερικός μικροβιόκοσμος άλλαξε. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι στα παχύσαρκα άτομα με απώλεια βάρους ανιχνεύθηκε ότι το παραγόμενο βουτυρικό οξύ από *Firmicutes* μειώθηκε σημαντικά λόγω του διαιτολογίου που ακολούθησαν (Duncan *et al*, 2008).

Πολλά είναι τα χαρακτηριστικά των «διατηρούντων» της απώλειας βάρους σε σχέση με τους επανακτήσαντες μεταξύ των οποίων και η αύξηση της φυσικής δραστηριότητας η οποία επηρεάζει τους πληθυσμούς του εντέρου. Η έλλειψη αυτής μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ποικιλομορφία των μικροοργανισμών του εντέρου (Conlon and Bird, 2015). Τέλος, πολλοί είναι οι μηχανισμοί οι οποίοι εξελίσσονται το διάστημα αυτό και επιδρούν τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Πρόσθετες έρευνες απαιτούνται ώστε να διευκρινιστούν οι επιρροές αυτές στους συμβιώντες και να μελετηθούν οι δράσεις του κάθε μικροοργανισμού.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός τη παρούσας διπλωματικής μελέτης ήταν να αποτυπώσει χαρακτηριστικά του εντερικού μικροβιόκοσμου και των γαστρεντερικών συμπτωμάτων ενός τυχαίου δείγματος του ελληνικού ενήλικου πληθυσμού, οι οποίοι συμμετείχαν στην επιδημιολογική μελέτη MedWeight και τη διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων με ανθρωπομετρικούς και διατροφικούς παραμέτρους στην περίπτωση της απώλειας βάρους.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η Μεθοδολογία της εργασίας περιλαμβάνει δυο μέρη: Α) τη Μεθοδολογία της μελέτης «MedWeight» και Β) τη Μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη «Εντερικός Μικροβιόκοσμος και Διατήρηση απώλειας Βάρους».

ΜΕΡΟΣ Α΄ : Μεθοδολογία Μελέτης «MedWeight»

3.1. ΜΕΛΕΤΗ «MedWeight»

Η μελέτη «MedWeight», η οποία διεξάγεται από το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, (επιστημονική υπεύθυνη Αναπλ. Καθηγήτρια κ. Γιαννακούλια Μ.) είναι μια επιδημιολογική μελέτη καταγραφής χαρακτηριστικών και συμπεριφορών του πληθυσμού τα οποία συμβάλλουν στην διατήρηση απώλειας βάρους (<http://medweight.hua.gr/>).

3.1.1 ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

3.1.1.1. Τα Χαρακτηριστικά και ο αριθμός του Δείγματος

Τα κριτήρια ένταξης στην μελέτη είναι ενήλικοι άντρες και γυναίκες πρώην παχύσαρκοι ή υπέρβαροι. Η κατηγοριοποίηση των εθελοντών έγινε με βάση την απώλεια των κιλών τους. Όλοι οι εθελοντές έχουν απώλεια βάρους στο παρελθόν $\geq 10\%$ του αρχικού τους βάρους. Ως διατηρούντες χαρακτηρίζονται εκείνοι που έχουν διατηρήσει την απώλεια > 1 έτος και ως επανακτήσαντες εκείνοι που έχουν ξαναπάρει βάρος μετά την πάροδο 1 έτους.

Το δείγμα της μελέτης «MedWeight» στο οποίο μελετήθηκαν τα γαστρεντερικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνει 528 άτομα εκ των οποίων οι 362 είναι διατηρήσαντες και οι 166 επανακτήσαντες. Η εισαγωγή των εθελοντών ξεκίνησε το Δεκέμβρη του 2012 και η καταληκτική ημερομηνία επεξεργασίας των αποτελεσμάτων ήταν έως και τον Οκτώβρη του 2015.

3.1.2. Η ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

- Ερωτηματολόγιο Μελέτης MedWeight

Το ερωτηματολόγιο τη μελέτης MedWeight που χρησιμοποιήθηκε αξιολόγησε τη γαστρεντερική λειτουργία των συμμετεχόντων του πλήθους των εθελοντών της μελέτης MedWeight. Οι ερωτήσεις που χρησιμοποιήθηκαν σχετίζονται με τη γαστρεντερική λειτουργία πριν και μετά την προσπάθεια των συμμετεχόντων για απώλεια βάρους.

ΜΕΡΟΣ Β': Μεθοδολογία μελέτης «Εντερικός Μικροβιόκοσμος και Διατήρηση Απώλειας Βάρους»

3.2. ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΒΑΡΟΥΣ

Ο «Εντερικός Μικροβιόκοσμος και η Διατήρηση Απώλειας Βάρους» είναι μια συγχρονική μελέτη η οποία διεξήχθη στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο κατά το διάστημα μεταξύ του Μαρτίου του 2014 έως τον Οκτώβρη του 2015.

3.2.1. ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

3.2.1.1. Η συλλογή και ο αριθμός του Δείγματος

Η ανέρευση των εθελοντών έγινε από τη βάση δεδομένων της μελέτης MedWeight και με περαιτέρω στρατολόγηση με χρήση ενημερωτικών φυλλαδίων και προσωπικής ενημέρωσης. Συμμετείχαν 15 άτομα, εκ των οποίων οι 8 είναι διατηρήσαντες και οι 7 επανακτήσαντες. Παρακάτω παρουσιάζονται τα ποσοστά των εθελοντών της MedWeight στους οποίους έγινε επιπλέον μικροβιολογικός έλεγχος στον εντερικό μικροβιόκοσμο (Πίνακας 3.1).

Πίνακας: 3.1 Αριθμός και ποσοστό συμμετεχόντων στα δυο μελετούμενα δείγματα.

	Διατηρήσαντες	Επανακτήσαντες	Σύνολο
«MedWeight»	362	166	528
«Εντερικός Μικροβιόκοσμος και Διατήρηση απώλειας βάρους»	8(2,2%της MedWeight)	7 (4,2% της MedWeight)	15(2,8% της MedWeight)

Οι τιμές εκφράζονται ως μέγεθος και στην παρένθεση παρουσιάζεται η αντίστοιχη αναλογία %.

3.2.1.2. Τα Χαρακτηριστικά του Δείγματος

Τα κριτήρια αποκλεισμού της μελέτης είναι το ιστορικό γαστρεντερολογικών νοσημάτων (Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του εντέρου, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, χρόνια διάρροια ή οξεία διάρροια τις προηγούμενες τέσσερις εβδομάδες, χρόνια δυσκοιλιότητα, ιστορικό καρκίνου του πεπτικού συστήματος, πολύποδες παχέος εντέρου, γαστρίτιδα, έλκος πεπτικού συστήματος, γαστρο-οισοφαγική παλινδρόμηση, χολοκυστεκτομή κ.α.), τα αυτοάνοσα νοσήματα, το ιστορικό επιληπτικών κρίσεων, το ιστορικό στεφανιαίας νόσου, το ιστορικό ηπατικών και νεφρικών παθήσεων, ο σακχαρώδης διαβήτης, η παρουσία κρυολογήματος, η νοσηλεία για πάνω από τέσσερις εβδομάδες και η παρουσία λοίμωξης το τελευταίο μήνα (π.χ. CRP >5mg), η παρουσία εγκυμοσύνης, οι ακραίες διαιτητικές συμπεριφορές (π.χ. αποκλειστικά χορτοφάγοι), η τρέχουσα απώλεια βάρους λόγω δίαιτας, η κατανάλωση αντιβιοτικών τουλάχιστον 2 μήνες πριν την μελέτη και η κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής (π.χ. ω-3 λιπαρά οξέα, αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνες Α, Ε, C, β-καροτένιο, συνένζυμο Q10, σελήνιο, ψευδάργυρος) καθώς και προβιοτικών ή/και πρεβιοτικών δυο εβδομάδες πριν την μελέτη. Επιπλέον αν και δεν αποτέλεσαν κριτήρια αποκλεισμού από την μελέτη, πραγματοποιήθηκε λεπτομερής καταγραφή συνύπαρξης άλλων χρόνιων καταστάσεων και της παρουσίας της αλλεργίας.

3.2.1.3. Βιοηθική

Όλα τα άτομα ενημερώθηκαν για τους σκοπούς της μελέτης και έδωσαν την έγκρισή τους για τη συμμετοχή. Η μελέτη έχει λάβει έγκριση από την επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

3.2.2. Η ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

1. Ερωτηματολόγιο της μελέτης «Εντερική Μικροχλωρίδα και Παχυσαρκία»

Το ερωτηματολόγιο της μελέτης «Εντερική Μικροχλωρίδα και Παχυσαρκία» έχει ως στόχο τη συλλογή πληροφοριών για την αξιολόγηση της λειτουργίας του γαστρεντερολογικού συστήματος των συμμετεχόντων. Περιλαμβάνει τα ακόλουθα τμήματα: α) γενικά στοιχεία του εθελοντή, β) κοινωνικό-δημογραφικά στοιχεία, γ) ιατρικό ιστορικό, με ερωτήσεις σχετικές για ιατρικώς διαγνωσμένες παθήσεις, αλλεργίες, παθήσεις των ούλων ή την εφαρμογή ειδικού τύπου

δίαιτας ή δίαιτας απώλειας βάρους, δ) ιστορικό λήψης φαρμάκων και συμπεριλαμβανομένων πληροφοριών σχετικά με τα συμπληρώματα διατροφής, ε) ανθρωπομετρικά δεδομένα, με καταγραφή του ύψους, του σωματικού βάρους, της περιφέρειας μέσης και ισχίου του ατόμου, αλλά και των δερματικών πτυχών του δικεφάλου, τρικεφάλου, υποωμοπλατταίας και υπερλαγόνιας στη δεξιά πλευρά του ατόμου στ) καταγραφή γαστρεντερικών συμπτωμάτων του ατόμου με χρήση κατάλληλα προσαρμοσμένου ερωτηματολογίου (*Bovenschen et al, 2006*) και ζ) τριών ημερών ανακλήσεις 24ώρων, οι οποίες αποσκοπούν στη ποσοτική καταγραφή της διαιτητικής πρόσληψης, εκ των οποίων η μια ημέρα αντιπροσωπεύει το σαββατοκύριακο και οι άλλες δυο τις καθημερινές. Οι ανακλήσεις των 24ώρων λήφθηκαν την τελευταία εβδομάδα πριν την ημέρα συλλογής των κοπράνων η) επταήμερο ημερολόγιο καταγραφής γαστρεντερικών συμπτωμάτων και των χαρακτηριστικών των κενώσεων τους (*Kajander et al, 2005*), το οποίο φέρει και μια οπτική απεικόνιση της κλίμακας Bristol (Bristol Stool Chart) για τη λεπτομερή περιγραφή της σύστασης των κενώσεων καθημερινά (*Lewis & Heaton, 1997*). Εντός των πρώτων ημερών συμπλήρωσης του επταήμερου πραγματοποιείται και η συλλογή του δείγματος των κοπράνων.

2. Ερωτηματολόγιο Μελέτης ΑΤΤΙΚΗ

Το ερωτηματολόγιο της μελέτης ΑΤΤΙΚΗ περιλαμβάνει ερωτήσεις σχετικές με τα κοινωνικά, δημογραφικά, ανθρωπομετρικά, διατροφικά και ψυχολογικά χαρακτηριστικά των εθελοντών καθώς και στοιχεία από το κλινικό τους ιστορικό. Τα μέρη του ερωτηματολογίου τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι α) το ατομικό ιατρικό και οικογενειακό ιατρικό ιστορικό του εθελοντή, β) τα ατομικά χαρακτηριστικά και ο τρόπος ζωής του ατόμου, με ερωτήσεις σχετικές με το κάπνισμα, τη φυσική δραστηριότητα με τη χρήση του IPAQ-SF (International Physical Activity Questionnaire Short Form) (*Lee et al, 2011*), τις συνήθειες του ύπνου του ατόμου, γ) τη διατροφική αξιολόγηση, βασιζόμενη σε διατροφικό ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (*Bountziouka et al, 2011*) δ) ψυχολογική αξιολόγηση του ατόμου, στηριζόμενη στη κλίμακα κατάθλιψης ZDRS (Zung Depression Rating Scale) (*Fountoulakis et al, 2007*) και στη κλίμακα άγχους STAI (State- Trait Anxiety Inventory) (*Fountoulakis et al, 2006*) και ε) την αυτοεκτίμηση του επιπέδου υγείας του ατόμου, μέσω της χρήσης του προτυποποιημένου εργαλείου EQ-5DTM (EuroQol Group Executive Office, (<http://www.euroqol.org/eq-5d>)).

3. Κλινικά χαρακτηριστικά

Η αρτηριακή πίεση και η καρδιακή συχνότητα των εθελοντών μετρήθηκε με ηλεκτρονικό πιεσόμετρο μπράτσου δυο φορές στο δεξί χέρι του εθελοντή, με τον εθελοντή να βρίσκεται στη καθιστή θέση και τουλάχιστον 30 λεπτά σε κατάσταση ηρεμίας.

3.2.3. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

1. Κοινωνική και Δημογραφική Αξιολόγηση

Το επίπεδο εκπαίδευσης των εθελοντών αξιολογήθηκε σε χρόνια εκπαίδευσης του εθελοντή. Το επάγγελμα του εθελοντή χαρακτηρίστηκε ως χειρωνακτικό, ημι-χειρωνακτικό ή πνευματικό και ως προς την οικογενειακή τους κατάσταση οι εθελοντές χαρακτηρίστηκαν ως άγαμοι, έγγαμοι, διαζευγμένοι ή χήροι, δηλώνοντας και τον αριθμό των τεκνών. Όσον αφορά το κάπνισμα, οι «παρόντες καπνιστές» είναι εκείνοι οι οποίοι καπνίζουν τουλάχιστον ένα τσιγάρο την ημέρα, οι «πρώην καπνιστές» χαρακτηρίστηκαν τα άτομα που έχουν σταματήσει το κάπνισμα τουλάχιστον για ένα έτος και οι υπόλοιποι ανήκουν στην κατηγορία «μη καπνιστών».

Η εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας, καταγράφηκε με τη χρήση του IPAQ- SF τις τελευταίες επτά ημέρες. Καταγράφηκε η συχνότητα και η διάρκεια (σε min) τριών κατηγοριών φυσικής δραστηριότητας διαφορετικής έντασης (περπάτημα, μέτρια, έντονη δραστηριότητα). Ξεχωριστά σημειώθηκε και το συνολικό διάστημα που το άτομο ήταν καθιστό την τελευταία εβδομάδα. Το συνολικό σκορ της φυσικής κατάστασης του κάθε συμμετέχοντα υπολογίστηκε με τη προσαρμογή των δεδομένων ώστε να υπολογιστούν τα λεπτά των μεταβολικών ισοδυνάμων (metabolic equivalent of task, MET) ανα εβδομάδα (MET- min-week), βάσει εξίσωσης «Διάρκεια * Συχνότητα ανά εβδομάδα * Επίπεδο MET» για κάθε επίπεδο φυσικής δραστηριότητας και του αθροίσματος των αποτελεσμάτων (Craig et al, 2003; Lee et al, 2011).

2. Ψυχολογική Αξιολόγηση

Η κατάσταση άγχους αξιολογήθηκε με τη κλίμακα άγχους STAI (State- Trait Anxiety Inventory). Περιλαμβάνει 20 ερωτήσεις οι οποίες βαθμολογούνται με κλίμακα 1 έως 4 ανάλογα με τη συχνότητα (σχεδόν ποτέ, μερικές φορές, συχνά, σχεδόν πάντοτε) και το άθροισμα τους ποικίλλει από 20 έως 80. Η συμπτωματολογία της κατάθλιψης εκτιμάται με τη χρήση της κλίμακας κατάθλιψης ZDRS (Zung Depression Rating Scale), η οποία περιλαμβάνει 20

ερωτήσεις που καλύπτουν τη συναισθηματική, τη ψυχολογική και τη σωματική συμπτωματολογία, βαθμολογείται κατά τρόπο ανάλογο με τη STAI (σκορ 20-80).

3. Διατροφική αξιολόγηση

Η διατροφική αξιολόγηση των εθελοντών πραγματοποιήθηκε μέσω ενός επικυρωμένου ημι- ποσοτικού ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (Food Frequency Questionnaire, FFQ) (Bountziouka et al, 2011) και μέσω τριών ανακλήσεων 24ώρου. Στη περίπτωση του FFQ, οι εθελοντές κλήθηκαν να αναφέρουν τη μέση πρόσληψη (ανά εβδομάδα ή μέρα) διάφορων τροφίμων που κατανάλωσαν τον προηγούμενο μήνα. Στη συνέχεια, η συχνότητα κατανάλωσης τροφίμων ποσοτικοποιήθηκε κατά προσέγγιση ως φορές που καταναλώθηκε το συγκεκριμένο τρόφιμο το μήνα. Η ημερήσια και εβδομαδιαία κατανάλωση για κάθε τρόφιμο υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας την μηνιαία κατανάλωση επί 30 και 4 αντίστοιχα, ενώ για τρόφιμα που καταναλώνονται σπάνια ή καθόλου η κατανάλωση τους θεωρήθηκε ως μηδενική. Για την αξιολόγηση των συνολικών διατροφικών συνηθειών υπολογίστηκε μια συνδυαστική βαθμολογία (από 0 έως 55) βασιζόμενη στη λογική της Μεσογειακής Διατροφικής Πυραμίδας (Mediterranean Diet Score, MedDietScore) (Panagiotakos et al, 2007) (Πίνακας 3.2). Το ερωτηματολόγιο περιλαμβάνει επιπλέον ερωτήσεις σχετικά με τη ποσότητα και τη συχνότητα κατανάλωσης νερού και καφέ. Όλοι οι καφέδες (στιγμιαίος, ελληνικός, φίλτρου ή καπουτσίνο) προσαρμόστηκαν σε σχέση με το φλιτζάνι καφέ των 150 ml.

Οι ανακλήσεις του 24ώρου περιλαμβάνουν τη λεπτομερή καταγραφή της διαιτητικής τους πρόσληψης τις προηγούμενες μέρες της συλλογής των κοπράνων, αναφορικά με το είδος, τη ποσότητα, την εμπορική ονομασία, τον τρόπο παρασκευής, το τόπο κατανάλωσης και τις παράλληλες δραστηριότητες που συνόδευσαν τη κατανάλωση τροφής. Επιπλέον καταγράφηκε η κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής και αν η συγκεκριμένη μέρα ήταν τυπική της διαιτητικής συμπεριφοράς του ατόμου. Τα δεδομένα των ανακλήσεων χρησιμοποιήθηκαν ώστε να εκτιμηθεί η ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη και η ημερήσια πρόσληψη μακροθρεπτικών συστατικών. Ο υπολογισμός της ενεργειακής πρόσληψης και των επιμέρους θρεπτικών συστατικών στηρίχθηκε στη χρήση του λογισμικού Nutritionist Pro version 4.1.0. (Axxya Systems, Stafford, Texas, USA).

Πίνακας 3.2: Το σκορ της Μεσογειακής Διατροφής (Προσαρμοσμένο από *Panagiotakos et al, 2007*)

How often do you consume	Frequency of consumption (servings/week or otherwise stated)					
Non-refined cereals (whole grain bread, pasta, rice, etc)	Never	1–6	7–12	13–18	19–31	>32
	0	1	2	3	4	5
Potatoes	Never	1–4	5–8	9–12	13–18	>18
	0	1	2	3	4	5
Fruits	Never	1–4	5–8	9–15	16–21	>22
	0	1	2	3	4	5
Vegetables	Never	1–6	7–12	13–20	21–32	>33
	0	1	2	3	4	5
Legumes	Never	<1	1–2	3–4	5–6	>6
	0	1	2	3	4	5
Fish	Never	<1	1–2	3–4	5–6	>6
	0	1	2	3	4	5
Red meat and products	≤1	2–3	4–5	6–7	8–10	>10
	5	4	3	2	1	0
Poultry	≤3	4–5	5–6	7–8	9–10	>10
	5	4	3	2	1	0
Full fat dairy products (cheese, yoghurt, milk)	≤10	11–15	16–20	21–28	29–30	>30
	5	4	3	2	1	0
Use of olive oil in cooking (times/week)	Never	Rare	<1	1–3	3–5	Daily
	0	1	2	3	4	5
Alcoholic beverages (ml/day, 100 ml=12 g ethanol)	<300	300	400	500	600	>700 or 0
	5	4	3	2	1	0

4. Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά

Η μέτρηση του ύψους καταγράφηκε στο πλησιέστερο 0.5cm. Πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια αναστημόμετρου και τον εθελοντή να βρίσκεται σε όρθια στάση, με την ωμοπλάτη και τους γλουτούς του να εφάπτονται στο αναστημόμετρο (θέση Frankfort horizontal plane) και χωρίς παπούτσια. Το σωματικό βάρος μετρήθηκε με ζυγό με δοκό ισορροπίας στα πλησιέστερα 100g. Ο εθελοντής φορούσε λίγα ρούχα και χωρίς παπούτσια.

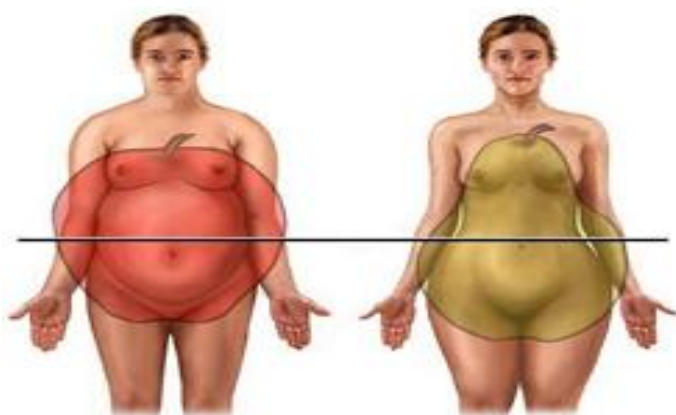
Ο ΔΜΣ υπολογίζεται διαιρώντας το βάρος (kg) του ατόμου με το ύψος του στο τετράγωνο (m²). Με βάση το ΔΜΣ έχουν σχηματιστεί ειδικοί πίνακες με τους οποίους υπολογίζεται ο βαθμός παχυσαρκίας ενός ατόμου. Τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας χαρακτηρίζουν τα άτομα με ΔΜΣ μεταξύ 25 και 29,9 kg/m² ως υπέρβαρα και τα άτομα με ΔΜΣ μεγαλύτερο του 29,9 kg/m² ως παχύσαρκα (*Πίνακας 3.3*).

Πίνακας 3.3: «Όρια ΔΜΣ για ενήλικες»

ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ	Δ.Μ.Σ.
Λιποβαρής	< 18,5
Κανονικός	18,5-24,9
Υπέρβαρος	25-29,9
Παχύσαρκος	30-34,9
	35-39,9
Επικίνδυνα	>= 40

(Ζαμπέλας, 2007)

Η περιφέρεια της μέσης (Waist Circumference, WC) και η περιφέρεια ισχίου (Hip Circumference, HC) εκφράστηκαν σε cm και μετρήθηκαν με μη εκτατή ταινία. Η περιφέρεια της μέσης (Waist Circumference, WC) μετρήθηκε στο μέσο της απόστασης μεταξύ της τελευταίας πλευράς και της λαγόνιας ακρολοφιαίας πάνω από το επίπεδο του ομφαλού και η περιφέρεια ισχίου (Hip Circumference, HC) μετρήθηκε στη περιοχή των γλουτών στη μέγιστη περιφέρεια του ισχίου. Και οι δυο περιφέρειες καταμετρήθηκαν στο πλησιέστερο 0,1cm. Το πηλίκo της περιφέρειας της μέσης προς τη περιφέρεια του ισχίου (Waist-to-Hi Ratio, WHR) υπολογίστηκε ως ο λόγος των δυο περιφερειών. Η μεγαλύτερη τιμή του WHR δείχνει μεγαλύτερη κατανομή του ανθρώπινου λίπους στο κεντρικό μέρος του σώματος, ενώ η μικρή τιμή δείχνει μεγαλύτερη κατανομή λίπους στην περιφέρεια (Χασαπίδου & Φαχαντίδου, 2002) (Εικόνα 3.1). Η περιφέρεια μέσης και το πηλίκo WHR χρησιμοποιούνται για το καθορισμό του βαθμού της κεντρικής παχυσαρκίας. Τιμές του πηλίκου μεγαλύτερες του 1 για τους άνδρες και 0,8 για τις γυναίκες είναι ενδεικτικές της παρουσίας κεντρικής παχυσαρκίας. Τιμές περιφέρειας μέσης ≥ 94 cm για τους άντρες και ≥ 80 για τις γυναίκες αντιστοιχούν σε αυξημένο κίνδυνο για μεταβολικά νοσήματα (WHO, http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/, 2000).



Εικόνα 3.1 : Το σώμα σε σχήμα «Μήλου» και «Αχλάδι».

Πίνακας 3.4: Όρια για μετρήσεις περιφέρειας μέσης και πηλίκου περιφέρειας μέσης-ισχίων που υποδηλώνουν αυξημένο κίνδυνο για την εμφάνιση μεταβολικών διαταραχών που σχετίζονται με την παχυσαρκία.

Κίνδυνος			
Περιφέρεια μέσης		Πηλίκo Μέσης-Ισχίων	
ΦΥΛΟ	Αυξημένος	Ιδιαίτερα αυξημένος	Αυξημένος
Άνδρες	> 94 cm	≥ 102 cm	> 1,0cm
Γυναίκες	≥ 80 cm	≥ 88 cm	> 0,8

(WHO, [http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO TRS 894/en/,2000](http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/,2000))

Ο προσδιορισμός του ποσοστού σωματικού λίπους πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο βιοηλεκτρικής εμπέδησης ή Bioelectrical Impedance Analysis (BIA). Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η συσκευή TANITA BC 418. Η μέθοδος της βιοηλεκτρικής εμπέδησης εκτιμά τη κατάσταση του ατόμου με την αξιολόγηση σύστασης του σώματος. Στηρίζεται στο γεγονός ότι το ηλεκτρικό ρεύμα όταν διατρέχει το ανθρώπινο σώμα συναντά κάποιου είδους αντίσταση η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη του σωματικού νερού και της σωματικής άλιπης μάζας και κατ' επέκταση της σωματικής πυκνότητας (Shirreffs, 2003 & Williams, 2010).

4. Γαστρεντερικά συμπτώματα

Η γαστρεντερική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ενός ημερολογίου καταγραφής γαστρεντερικών συμπτωμάτων και ενός επταήμερου ημερολογίου καταγραφής γαστρεντερικών συμπτωμάτων. Το ημερολόγιο καταγραφής γαστρεντερικών συμπτωμάτων αξιολόγησε τη σοβαρότητα των γαστρεντερικών συμπτωμάτων κατά τη διάρκεια των τελευταίων τεσσάρων εβδομάδων και αποτελεί τμήμα του ερωτηματολογίου της μελέτης. Περιλαμβάνει 16 ερωτήσεις που βαθμολογούν την ένταση των επιγαστρικών και κοιλιακών συμπτωμάτων με μια κλίμακα από 0 έως 6, όπου το 0 αντιστοιχεί στην απουσία παραπόνου και το 6 αντιστοιχεί στη χειρότερη δυνατή μορφή του συμπτώματος. Επιπλέον φέρει και μια οπτική κλίμακα για την αξιολόγηση της συνολικής σοβαρότητας των συμπτωμάτων από 0 (κανένα παράπονο) έως 10 (αφόρητα συμπτώματα). Τέλος, στο ερωτηματολόγιο προστέθηκε μια ερώτηση σχετικά με τον μέσο όρο των κενώσεων που έχει καθημερινά το άτομο στην διάρκεια των τελευταίων τεσσάρων εβδομάδων.

Το επταήμερο ημερολόγιο καταγραφής γαστρεντερικών συμπτωμάτων είναι ένα επταήμερο ημερολόγιο στο οποίο τα γαστρεντερικά συμπτώματα (κοιλιακό άλγος, κοιλιακή διόγκωση, μετεωρισμός, κοιλιακό γουργουρητό), καθώς και τα χαρακτηριστικά των κοπράνων (οσμή, χρώμα) βαθμολογούνται ημερησίως με μια κλίμακα από 0 (καθόλου συμπτώματα/ χωρίς οσμή/ κίτρινο χρώμα) έως 4 σοβαρά συμπτώματα / έντονη οσμή/ σκούρο καφέ). Η επταήμερη βαθμολογία για κάθε σύμπτωμα (το άθροισμα της έντασης του συμπτώματος στη διάρκεια των επτά ημερών κυμαίνεται από 0 έως 28, ενώ το συνολικό άθροισμα της εβδομαδιαίας βαθμολογίας των τεσσάρων συμπτωμάτων κυμαίνεται από 0 έως 112 (Kajander, 2005). Το χρώμα και η οσμή των κοπράνων βαθμολογήθηκε κατά τον αντίστοιχο τρόπο. Οι εθελοντές κατέγραψαν τη συχνότητα και τη σύσταση των κενώσεων κατά τη διάρκεια των επτά ημερών καθώς και τις περιπτώσεις της διάρροιας. Διαρροϊκή κένωση ορίζεται η παρουσία μιας ή παραπάνω υδαρών κενώσεων ημερησίως ή η καταγραφή περισσότερων των τριών κενώσεων καθημερινά. Δόθηκε η οπτική απεικόνιση της κλίμακας Bristol (Bristol Stool Chart), όπου ο εθελοντής καλούνταν να χαρακτηρίσει την υφή των κενώσεων του από 1 (πολύ σκληρά κόπρανα, μικρού μεγέθους) έως το 7 (τελείως υδαρή κόπρανα) (Lewis & Heaton, 1997). Η συμπλήρωση του ερωτηματολογίου έγινε την εβδομάδα συλλογής του δείγματος.

3.2.4. ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΚΟΠΡΑΝΩΝ

3.2.4.1. Δειγματοληψία κοπράνων

Για τη διεξαγωγή της μελέτης πραγματοποιήθηκε η συλλογή δείγματος κοπράνων με τη βοήθεια ενός προζυγισμένου συστήματος πλαστικού συλλέκτη- σακούλας. Το δείγμα κοπράνων, τοποθετείται ταχέως εντός του αποστειρωμένου συλλέκτη, σε φορητή συσκευή δημιουργίας αναερόβιας ατμόσφαιρας (GENbag anaer, 45534 BioMérieux S.A., Marcy-l'Etoile/ France) στην οποία εσωκλείεται ένας δείκτης ελέγχου αναερόβιων συνθηκών (Anaer indicator, 96118 BioMérieux S.A., Marcy-l'Etoile/ France).

Η λήψη του δείγματος των κοπράνων με τη χρήση των αποστειρωμένων συλλεκτών και τη παροδική εναποθήκευσή του υπό αναερόβιες συνθήκες λάμβανε χώρα μέσα σε δυο ώρες από την παραγωγή του, χωρίς να επέλθει η επιβλαβής παρατεταμένη επίδραση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου στους πληθυσμούς των υποχρεωτικά αναερόβιων μικροοργανισμών. Η μεταφορά του πραγματοποιήθηκε υπο ψύξη, μέσα σε ισοθερμικό δοχείο με παγοκύστες στο Εργαστήριο Βιολογίας Βιοχημείας Φυσιολογίας και Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου.

Η πλήρης κένωση ζυγίζεται σε εργαστηριακό ζυγό με ακρίβεια 0,1 g και ομογενοποιείται μηχανικά σε κατάλληλο όργανο (Stomacher, Seward, USA), με κινήσεις που προσομοιάζουν εκείνες του στομάχου υπό φυσιολογική ταχύτητα και μέχρι να καταστεί οπτικά ομοιογενής για περίπου 10- 15sec. Η ομογενοποιημένη κένωση μεταφέρεται σε δοχείο με πάγο εντός απαγωγού και πραγματοποιείται ο καταμερισμός της στις κατάλληλες ποσότητες για τη πραγματοποίηση των αντίστοιχων αναλύσεων των κοπράνων καθώς και για τη μέτρηση του pH.

3.2.4.2. Μικροβιολογική επεξεργασία δειγμάτων κοπράνων

1. Θρεπτικά Υλικά Καλλιέργειας

I. Μέσο αραίωσης:

Ως κατάλληλο μέσο για τη πραγματοποίηση των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων επιλέχθηκε το διάλυμα PPS (Peptone- Saline Solution) (Roy, 2001). Το διάλυμα PPS παρασκευάζεται με 0,1% Bacteriological peptone (L37, OXOID) και 0,85% NaCL (50520, Ducheta) σε απιονισμένο νερό. Με τη βοήθεια διανομέα μοιράζεται ανά 9ml σε γυάλινα φιαλίδια Universal και υποβάλλεται σε αποστείρωση στους 121⁰C για 15 λεπτά. Πριν την επεξεργασία του δείγματος κοπράνων, τα φιαλίδια Universal με το διάλυμα PPS βράζονται στους 100⁰C για 20 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθεί το διαλυμένο οξυγόνο από το μέσο αραίωσης.

I. Ολικός εντερικός μικροβιόκοσμος

Για την καταμέτρηση του συνολικού εντερικού μικροβιόκοσμου χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης Columbia Blood Agar (CBA), το οποίο στηρίζεται στο Columbia Agar, εμπλουτισμένο με 5% αποστειρωμένο ανθρώπινο αίμα παρουσία ηπαρίνης. Σε 950ml απιονισμένου ύδατος προστίθενται 42g Columbia Agar (BBLTM Columbia Agar Base 211124, Becton Dickinson) και 5g άγαρ (BactoTM Agar 212750, Difco) τα οποία διαλύονται μέσω βρασμού για ένα λεπτό. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121⁰C για 15 λεπτά και η ψύξη του σε θερμοκρασία 45-50⁰C. Ακολουθεί η προσθήκη του αίματος (Defibrinated Horse blood) η οποία πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες. Το CBA, όπως όλα τα στερεά θρεπτικά υλικά, μοιράζεται εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία petri 90mm με αναλογία περίπου 20ml υλικού/τρυβλίο. Τα τρυβλία επωάζονται στους 37⁰C για 48 ώρες υπό

αναερόβιες συνθήκες για τη καταμέτρηση του αναερόβιου μεσόφιλου μικροβιόκοσμου και υπό αερόβιες συνθήκες αντίστοιχα για τη καταμέτρηση του αερόβιου μεσόφιλου μικροβιόκοσμου.

❖ *Bacteroides* spp.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των *Bacteroides* spp. είναι το Wilkins- Chalgren anaerobe agar (OXOID, CM0619) εμπλουτισμένο με το συμπλήρωμα G-N Anaerobe supplement (OXOID, SR0108) και 5% αποστειρωμένο αίμα. Συγκεκριμένα, για τη παρασκευή 500ml τελικού υλικού προστίθενται 21,5g Wilkins-Chalgren anaerobe agar σε 475ml απιονισμένου ύδατος και διαλύονται καλά υπο ανάδευση και στη συνέχεια αποστειρώνεται στους 121⁰C για 15 λεπτά. Κατόπιν ψύχεται στους 50-55 ⁰C και προστίθεται υπό ασηπτικές συνθήκες 10 ml αποστειρωμένο ύδωρ στο G-N Anaerobe supplement, 25ml Defibrinated Horse blood και το περιεχόμενο του φιαλιδίου G-N Anaerobe supplement. Αναδεύεται ελαφρώς και μοιράζεται εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες στα τρυβλία. Η αποθήκευση των τρυβλίων είναι σε θερμοκρασία 2-8 ⁰C μακριά από το φως. Τα τρυβλία μετά τον εμβολιασμό επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες στους 37 ⁰C για 48 ώρες.

❖ *Clostridium perfringens*

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του *Clostridium perfringens* είναι το Perfringens Agar Base (Tryptose Sulphite Cycloserine Agar) (TSC) (LAB194) εμπλουτισμένο με D-Cycloserine (X194). Για τη παρασκευή 500ml τελικού υλικού προστίθενται 23g Perfringens Agar Base σε 500ml απιονισμένου ύδατος και διαλύονται καλά υπο ανάδευση. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121⁰C για 10 λεπτά και ψύχεται στους 50-55 ⁰C. Στη συνέχεια προστίθενται στο θρεπτικό υλικό 5 ml απιονισμένο ύδωρ σε 1 φιαλίδιο D-Cycloserine (X194) και 25ml Egg yolk (X073) εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα τρυβλία αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8 ⁰C μακριά από το φως για 7 ημέρες. Τα τρυβλία μετά τον εμβολιασμό επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες στους 37 ⁰C για 18-24 ώρες.

❖ *Lactobacillus* spp.

Για τη καταμέτρηση και απομόνωση των στελεχών του γένους *Lactobacillus* χρησιμοποιείται το εκλεκτικό υλικό Rogosa agar (1.05413.0500, MERCK) (Rogosa, 1951). Η προετοιμασία του Rogosa agar απαιτεί ανάμιξη 74,5g υλικού σε 1000ml απιονισμένου ύδατος,

ρύθμιση του pH με τη βοήθεια οξικού οξέος στη τιμή 5,5 ± 0,2 στους 25 °C, θέρμανση μέχρι βρασμού και ψύξη στους 40-50 °C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται στους 2-8 °C. Η επίστρωση του δείγματος και η επώαση των λακτοβακίλλων στο εκλεκτικό υλικό Rogosa agar πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 48 ώρες.

❖ *Bifidobacterium* spp.

Για τη καταμέτρηση και απομόνωση των στελεχών του γένους *Bifidobacterium* χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό υλικό Beerens' agar (Beerens, 1990 & Beerens, 1991). Η σύσταση του θρεπτικού υλικού ανά 1000 ml είναι: 42,5g Columbia Agar Base (BBLTM Columbia Agar Base 211124, Becton Dickinson), 5g άγαρ (Bacto™ Agar 212750, Difco) με συνολική τελική συγκέντρωση 15g άγαρ/L, 5 g γλυκόζη (141341, Pancreac Quimica SA), 0,5g υδροχλωρική κυστεΐνη (1.023839.0025, MERCK), ως αναγωγικός παράγοντας και 5ml προπιονικού οξέος (99% ACROS) ως εκλεκτικός παράγοντας των βακτηρίων. Αρχικά προστίθενται το Columbia Agar Base, το άγαρ και η υδροχλωρική κυστεΐνη στο απιονισμένο νερό και το νερό υποβάλλεται σε βρασμό μέχρι διάλυσης. Στη συνέχεια, το υλικό ψύχεται στους 40-50 °C, προστίθενται η γλυκόζη και το προπιονικό οξύ, προκαλείται διάλυση με ανάδευση και γίνεται ρύθμιση του pH το 5 ± 0,1 με διάλυμα NaOH 1N (Silvi, 1996). Το Beeren's agar δεν απαιτεί αποστείρωση σε αυτόκαυστο και πρέπει να χρησιμοποιείται εντός 48 ωρών από τη παρασκευή του. Η επίστρωση του δείγματος και η επώαση των βακτηρίων στο εκλεκτικό υλικό Beeren's πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 72 ώρες.

❖ Ολικά κολίμορφα/ *E.coli* (Total coliforms/ *E.coli*)

Το εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιείται για τη ταυτόχρονη ανίχνευση των ολικών κολίμορφων και της *Escherichia coli* είναι το Chromocult Coliform agar. Συγκεκριμένα, για τη παρασκευή 1000ml τελικού υλικού προστίθενται 26,5g Chromocult Coliform agar σε 1000ml απιονισμένου ύδατος, διαλύονται καλά υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεκτική θέρμανση μέχρι βρασμού, χωρίς αποστείρωση και στη συνέχεια ψύξη στους 45-50 °C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται στους 4 °C μακριά από το φως. Η επώαση των ολικών κολίμορφων /*E.coli* στο εκλεκτικό υλικό Chromocult Coliform agar πραγματοποιείται υπο αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 24 ώρες.

❖ Enterococcus spp.

Για τη καταμέτρηση και απομόνωση των στελεχών του γένους *Enterococcus*, χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό υλικό Slanetz & Bartley medium (LAB166). Στη παρασκευή 1000ml τελικού υλικού προστίθενται 43,5 g Slanetz & Bartley medium σε 1000ml απιονισμένου ύδατος τα οποία διαλύονται καλά υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεκτική θέρμανση μέχρι βρασμού χωρίς αποστείρωση και ψύξη στους 45-50 °C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται έως και 7 ημέρες. Η επώαση των εντερόκοκκων στο εκλεκτικό υλικό Slanetz & Bartley medium πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 48 ώρες.

Η ταυτοποίηση των στελεχών του γένους *Enterococcus* πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική της γραμμικής διασποράς (*streaking*) στο υλικό Kanamycin Aesculin Azide Agar KAA (LAB 106). Για τη παρασκευή 1000ml τελικού υλικού προστίθενται 43g σκόνης σε 1000ml απιονισμένου ύδατος. Διαλύονται υπό ανάδευση και με ταυτόχρονη θέρμανση για 10min. Κατόπιν το υλικό αποστειρώνεται στους 121 °C για 15 λεπτά και ψύχεται σε θερμοκρασία 47 °C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται στους 2-8 °C.

❖ Staphylococci / *S.aureus*

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των σταφυλόκοκκων είναι το Mannitol Salt Agar (MSA) (LAB 007). Για τη παρασκευή 1000ml τελικού υλικού προστίθενται 108g MSA σε 1000ml απιονισμένου ύδατος και διαλύονται καλά υπό ανάδευση. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121 °C για 15 λεπτά και ψύχεται σε θερμοκρασία 50-55 °C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται στους 2-8 °C.

Το δεύτερο υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των Staphylococci είναι το Baird Parker agar (LAB 285). Για τη παρασκευή 1000ml τελικού υλικού προστίθενται 63,5 g υλικού σε 1000ml απιονισμένου ύδατος και διαλύονται καλά υπό ανάδευση. Στη συνέχεια αφού αποστειρωθεί στους 121 °C για 15 λεπτά, ψύχεται στους 50-55 °C. Έπειτα, εντός του θαλάμου νηματικής ροής και υπό ασηπτικές συνθήκες προστίθενται 50ml από το συμπλήρωμα Egg Yolk Tellurite (X085) στο θρεπτικό υλικό και πραγματοποιείται η διανομή στα τρυβλία. Τα τρυβλία αποθηκεύονται στους 2-8 °C.

Η επίστρωση του δείγματος και η επώαση των σταφυλόκοκκων και του *S.aureus* στο υλικό πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 30 °C για 48 ώρες. Η διαφοροποίηση των σταφυλόκοκκων και του *S.aureus* πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική της γραμμικής διασποράς (*streaking*) στα θρεπτικά υποστρώματα MSA και Baird Parker agar .

❖ Ζύμες – Μύκητες

Για τη καταμέτρηση των συνολικών ζυμών και μυκήτων χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό υλικό SDA (Sabouraud Dextrose Agar) (LAB 009). Σε 1000ml απιονισμένου ύδατος προστίθενται 62 g υλικού (SDA) και διαλύονται καλά υπό ανάδευση. Κατόπιν, το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Ψύχεται στους 47°C και υπό ασηπτικές συνθήκες εντός του θαλάμου νηματικής ροής προστίθενται 2 φιαλίδια του αντιβιοτικού χλωραμφενικόλη (X009). Η επίστρωση του δείγματος πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες και τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8 °C χωρίς υγρασία. Η επώαση των τρυβλίων πραγματοποιείται στους 30 °C για 4 ημέρες (για τους μύκητες) και 7 ημέρες (για τις ζύμες). Η ταυτοποίηση των στελεχών των ζυμών πραγματοποιείται με τη τεχνική της γραμμικής διασποράς (streaking) σε CHROMagarTM Candida (CHROMagar, Paris, France).

3.2.4.3. Διαδοχικές αραιώσεις- Επεξεργασία υπό Αναερόβιες και Αερόβιες συνθήκες

Κατά προσέγγιση 1 g κοπράνων από κάθε δειγματοληψία μεταφέρεται σε γυάλινο φιαλίδιο Universal με 9 ml προβρασμένου διαλύματος PPS (Peptone – Saline- Solution) ως κατάλληλου μέσου αραιώσης (Roy, 2001). Υπό αναερόβιες συνθήκες (H₂ 5%, CO₂ 5%, N₂ 90%, O₂ 30 ppm) εντός του αναερόβιου επωαστικού θαλάμου (BACTROTM 1,5 Anaerobic Enviromental Chamber, SHELLAB), πραγματοποιείται ομογενοποίηση των κοπράνων με τη βοήθεια της πιπέτας των 1000μl, χωρίς ανάδευση με το υπερκείμενο αέρα. Ακολούθως, πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις με διαδοχική λήψη και μεταφορά 1ml του προκύπτοντος μίγματος σε φιαλίδια Universal με 9 ml προβρασμένου διαλύματος PPS και επιλέγονται οι κατάλληλες αραιώσεις που θα χρησιμοποιηθούν για την επίστρωση στα στερεά θρεπτικά υλικά (2 ή 3 αραιώσεις ανά θρεπτικό υλικό, 3 επαναλήψεις ανά αραιώση.)

Η επιλογή των χρησιμοποιούμενων αραιώσεων εξαρτάται από το είδος του θρεπτικού υλικού. Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες αραιώσεις:

- Columbia Blood Agar CBA: 10⁻⁶, 10⁻⁷ (ολικά αναερόβια)
- Beerens' agar: 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶
- Wilkins- Chalgren agar + anaerobic supplement: 10⁻³, 10⁻⁵, 10⁻⁶
- Rogosa agar: 10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁵
- TSC agar: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻⁴
- Columbia Blood Agar CBA,: 10⁻⁵, 10⁻⁶ (ολικά αερόβια)

- Slanetz & Bartley agar: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4}
- Chromocult Coliform agar: 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}
- MSA, Baird Parker agar: 10^{-1} ,
- SDA: 10^{-1} , 10^{-3}

Μετά τη κατάλληλη επιλογή αραιώσεων, μεταφέρονται 100μl διαλύματος σε κάθε τρυβλίο petri 90mm με τα εκλεκτικά και μη-θρεπτικά υλικά, και πραγματοποιείται η επίστρωση με τη χρήση αποστειρωμένης γυάλινης ράβδου, για τους αναερόβιους μικροοργανισμούς στον αναερόβιο θάλαμο, ενώ για τους αερόβιους στον θάλαμο νηματικής ροής. Σε περιπτώσεις μη ανάπτυξης αποικιών εντός των προβλεπόμενων χρονικών διαστημάτων, η επώαση παρατάθηκε έως τις 7 ημέρες.

3.2.4.4. Καταμέτρηση αποικιών- Ποσοτικός προσδιορισμός μικροβιακών πληθυσμών

Για την αποτίμηση του ολικού εντερικού μικροβιόκοσμου, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση όλων των αποικιών που εμφανίστηκαν μετά την επώαση σε αναερόβιες και σε αερόβιες συνθήκες επώασης στο αντίστοιχο θρεπτικό υλικό (CBA). Η επιλογή της κατάλληλης αραιώσης για καταμέτρηση έγινε βάσει της πυκνότητας των αναπτυσσόμενων αποικιών στο θρεπτικό υλικό. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί εκφράζονται ως ο δεκαδικός λογάριθμος ($\log_{10}$) των βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων (Colony Forming Units, CFU) ανά g αρχικού δείγματος κοπράνων.

Για την εκτίμηση του πληθυσμού κάθε κατηγορίας μικροοργανισμών, έγινε καταμέτρηση των «τυπικών» αποικιών που αναπτύχθηκαν στα διαφορετικά εκλεκτικά υποστρώματα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Στο Beerens' agar καταμετρήθηκαν τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium*. Οι αποικίες που δίνουν είναι λευκές ή μπεζ γαλακτώδεις με άλω ή χωρίς άλω. Δείγματα από αποικίες διαφορετικού τύπου ελήφθησαν και έγινε μικροσκοπική παρατήρηση μετά από χρώση Gram (Gram+), δοκιμή καταλάσης (καταλάση -) και πιθανόν και χρώση ενδοσπορίου (ενδοσπόριο -).

Στο θρεπτικό υπόστρωμα Wilkins- Chalgen anaerobe agar καταμετρήθηκαν τα *Bacteroides* spp., τα οποία δίνουν αποικίες χρώματος γκρι ή άσπρο και είναι είναι Gram(-), καταλάση (+ ή -) βάκιλοι μικρού μήκους.

Οι λακτοβάκιλλοι είναι Gram(+), και καταλάση(-) βάκιλοι ποικίλου μεγέθους. Καταμετρήθηκαν στο υλικό Rogosa agar και δίνουν αποικίες χρώματος λευκές γαλακτώδεις ή γυαλιστερές.

Το *Clostridium perfringens* είναι Gram(+), καταλάση(-) βάκιλοι που σχηματίζουν ενδοσπόρια. Τα κλοστρίδια δίνουν αποικίες χρώματος μαύρο ή μπεζ στο εμπλουτισμένο Perfringens Agar Base. Όλες οι αποικίες χρώματος μαύρο ή μπεζ με άλω στο θρεπτικό υλικό Perfringens Agar Base καταμετρήθηκαν ως ενδεχόμενα *Clostridium perfringens*.

Το *E.coli* δίνει αποικίες χρώματος μπλε σκούρο (dark- blue violet) ενώ τα ολικά κολίμορφα προκύπτουν από το σύνολο των ροζ προς ερυθρών αποικιών (salmon to red) και των μπλε σκούρο προς βιολετί (dark- blue to violet) αποικιών (*E. coli*) στο υπόστρωμα Chromocult Coliform agar. Αποικίες χρώματος ανοικτό μπλε/ τυρκουάζ ή αποικίες χωρίς χρώμα δεν καταμετρήθηκαν. Τα ολικά κολίμορφα και το *E. coli* είναι Gram (-), καταλάση (+) βάκιλοι μικρού μήκους.

Στο υπόστρωμα Slanetz & Bartley agar όλες οι κόκκινες και καστανέρυθρες (maroon) αποικίες καταμετρήθηκαν ως ενδεχόμενοι εντερόκοκκοι. Πρόκειται για κόκκους Gram(+) και καταλάση (-). Μετά την επώαση 48 ωρών πραγματοποιήθηκε επιπρόσθετος φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των εντερόκοκκων στο υλικό KAA. Οι τυπικές μορφές των αποικιών που δίνουν εντερόκοκκους είναι οι μαύρες ή οι γκρι αποικίες με αλλαγή χρώματος.

Οι τυπικές μορφές αποικιών των στελεχών του γένους *Staphylococcus* που παρατηρήθηκαν και καταμετρήθηκαν στο υπόστρωμα MSA είναι άσπρες προς κίτρινες γαλακτώδεις αποικίες και προκαλείται αλλαγή χρώματος του υποστρώματος (γίνεται κίτρινο) μόνο στην περίπτωση του *S.aureus*. Ενώ στο Baird Parker agar οι αποικίες είναι μαύρες γαλακτώδεις με θολή άλω. Αντίστοιχα οι αποικίες του *S.aureus* εμφανίζουν διπλή άλω (θολή και διαυγή γύρω από την αποικία). Οι σταφυλόκοκκοι είναι καλοσχηματισμένοι Gram (+) και καταλάση (+) κόκκοι.

Οι τυπικές αποικίες των ζυμών στο υπόστρωμα SDA είναι άσπρες γαλακτώδεις ή σομόν στην περίπτωση του *Rhodotorula* spp.. Μετά τη γραμμική διασπορά σε CHROMagarTM *Candida* για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Candida* οι αποικίες εμφανίζουν την ακόλουθη εικόνα: οι *C.albicans* είναι πράσινες, οι *C.kruzei* ροζ χνουδωτές ματ, οι *C.glabrata* άσπρες- μωβ γαλακτώδεις και οι *C.parapsilosis*, ροζ γυαλιστερές. Τα κύτταρα των ζυμών στο υγρό παρασκεύασμα είναι κύτταρα στρογγυλά ή οβάλ με εκπλαστήσεις ή χωρίς.

Οι αποικίες των μυκηλιακών μυκήτων εμφανίζουν χαρακτηριστική βαμβακώδη υφή.

3.2.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΞΗΡΟΥ ΒΑΡΟΥΣ

Ποσότητα κοπράνων (περίπου 2g) μεταφέρεται εις διπλούν σε προζυγισμένα πλαστικά δοχεία και αποθηκεύεται στους -20⁰c. Πριν τη λυοφιλίωση, τα δείγματα μεταφέρονται για 24 ώρες στους -80⁰c, ενώ τοποθετείται και αντίστοιχο κενό πλαστικό δοχείο με μικρή ποσότητα

νερού ως δείκτης. Η λυοφιλίωση πραγματοποιείται στο όργανο LypLab 3000 (HetoHolten A/S, Denmark) στους -56°C για 24 ώρες έως 48 ώρες, μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία της αφυδάτωσης (να απομακρυνθεί όλο το νερό του δείκτη). Μετά το πέρας της λυοφιλίωσης, τα δείγματα ζυγίζονται ξανά και υπολογίζεται το ξηρό βάρος των κοπράνων (g) με βάση τον τύπο [(Βάρος συλλέκτη + λυοφιλιωμένου δείγματος) - Βάρος συλλέκτη]. Τα τελικά αποτελέσματα προκύπτουν από το μέσο όρο των δυο επαναλήψεων.

3.2.6. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ pH ΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΝ

Η ποσότητα των κοπράνων (1g) διαλύεται άμεσα με 10ml απιονισμένου νερού και διαλυτοποιείται με καλή ανάμιξη (vortex). Η μέτρηση του pH των κοπράνων πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου σε πεχάμετρο (Inolab Ph720, WTW, Germany) με ηλεκτρόδιο πεχαμέτρησης ανθεκτικό στις πρωτεΐνες (Sentix sp, WTW).

3.3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η χρήση παραμετρικών ελέγχων επιλέχθηκε έναντι της επιλογής μη παραμετρικών ελέγχων καθώς η διαδικασία ελέγχου κανονικότητας Kolmogorov-Smirnov (One Sample Kolmogorov-Smirnov Normality test) έδειξε ότι οι εξεταζόμενες παράμετροι ακολουθούν κανονική κατανομή. Για τον έλεγχο συνάφειας μεταξύ των κατηγορικών μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο chi square (χ^2). Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος (MO)±Τυπική απόκλιση (SD). Πραγματοποιήθηκαν έλεγχοι σύγκρισης των μέσων των ποσοτικών μεταβλητών με βάση το στατιστικό έλεγχο Student's t-test. Τα μοντέλα της γραμμικής παλινδρόμησης παρουσιάζονται ως μοντέλα β, τυπικό σφάλμα και το αντίστοιχο επίπεδο σημαντικότητας για κάθε ανεξάρτητη μεταβλητή. Για τη συσχέτιση των μικροοργανισμών με τη διατήρηση ή μη της απώλειας του βάρους πραγματοποιήθηκε Γραμμική Παλινδρόμηση (Linear Regression). Για την αξιολόγηση των σχέσεων μεταξύ της διατήρησης της απώλειας και της συχνότητας εμφάνισης των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε Multiple Logistic Regression. Η συχνότητα εμφάνισης των μικροοργανισμών θεωρήθηκε ως εξαρτημένη μεταβλητή (1=Ναι, 0=Όχι). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό λογισμικό SPSS for Windows Release 21.0.1 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται στα 5% ($p < 0.05$).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ: Η εργασία αυτή περιλαμβάνει δύο μέρη: Α) τη μελέτη κάποιων χαρακτηριστικών από τους εθελοντές που πήραν μέρος στη MedWeight (περιγραφικά στοιχεία, βάρος και ΔΜΣ, γαστρεντερικά συμπτώματα) Β) τη μελέτη του εντερικού μικροβιόκοσμου ενός υποσυνόλου του πληθυσμού αυτού.

ΜΕΡΟΣ Α': «Μελέτη MedWeight»

4.1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΤΗΣ MEDWEIGHT

Το σύνολο των ατόμων που μελετήθηκαν και συμμετείχαν στη μελέτη MedWeight έως τον Οκτώβρη του 2015 ήταν 528 εκ των οποίων οι 362 είναι διατηρούντες (maintainers) και οι 166 επανακτήσαντες (regainers). Στο πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των βασικών περιγραφικών και ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών του δείγματος (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1: Περιγραφικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών που συμμετείχαν στη MedWeight.

	Διατηρούντες (N=362)	Επανακτήσαντες (N=166)	p-value
Ηλικία (έτη)	31,5±9,8	36,4±10,9	< 0,001
Ύψος (cm)	171±90	171±097	0,857
Βάρος (kg)	75,4± 14,8	92,3±18,8	< 0,001
ΔΜΣ (kg/m ²)	25,6±4,2	31,4±5,1	< 0,001
Μέγιστο Βάρος(kg)	96,6±22,6	95,7±19,5	0,654
Μέγιστο ΔΜΣ(kg/m ²)	32,8±6,6	32,5±5,2	0,675

N: μέγεθος ομάδων μελέτης

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος(MO) ± τυπική απόκλιση(SD). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Η εκτίμηση της διατήρησης απώλειας του βάρους των εθελοντών έγινε και με τη βοήθεια ορισμένων επιπλέον περιγραφικών χαρακτηριστικών. Οι εθελοντές συμπλήρωσαν το μέγιστο βάρος που είχαν στη ζωή τους και υπολογίστηκε ο μέγιστος ΔΜΣ. Παρατηρείται ότι η ομάδα των εθελοντών που έχουν επανακτήσει το βάρος τους εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερη ηλικία, βάρος και ΔΜΣ κατά Μέσο όρο (Πίνακας 4.1). Από τους εθελοντές που πήραν μέρος στη μελέτη 61% είναι γυναίκες και 39% άντρες. Η κατανομή του φύλου στις δύο ομάδες δεν differed σημαντικά ($p=0,194$) (Πίνακας 4.2).

Πίνακας 4.2: Κατάταξη του δείγματος ως προς φύλο.

	Διατηρούντες	Επανακτήσαντες	Σύνολο	p-value
Γυναίκες	214(66,5%)	108(33,5%)	322	0,194
Άντρες	148(71,8%)	58(28,2%)	206	

Οι τιμές εκφράζονται ως μέγεθος και στην παρένθεση παρουσιάζεται η αντίστοιχη αναλογία % μέσα στο φύλο.

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

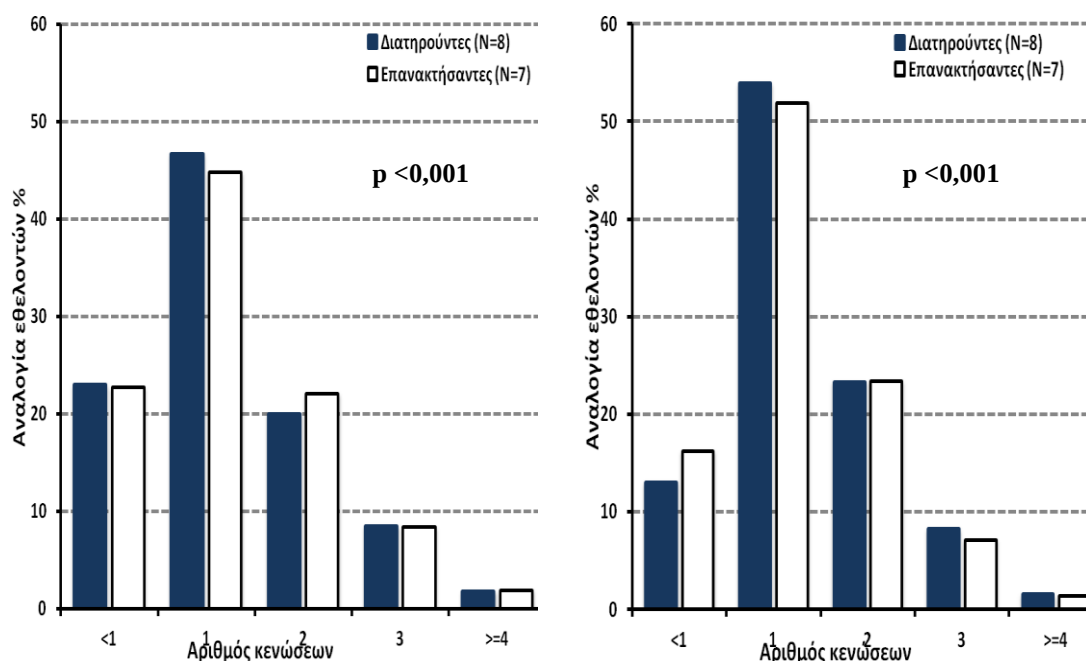
4.2. ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα από την καταγραφή του αριθμού κενώσεων ημερησίως εμφανίζονται στα *Γραφήματα 4.1α* και *β* που ακολουθούν. Οι περισσότεροι εθελοντές και από τις δύο ομάδες δηλώνουν ότι είχαν μία κένωση ημερησίως, γεγονός που δεν φαίνεται να αλλάζει μετά τη προσπάθεια απώλειας βάρους. Παρατηρείται μεταβολή στο ποσοστό της αναλογίας των εθελοντών στις κατηγορίες «λιγότερο από 1 κένωση ημερησίως» πριν τη προσπάθεια απώλειας βάρους και «1 κένωση ημερησίως» η οποία είναι στατιστικά σημαντική ($p\text{-value} < 0,001$).

Πριν την απώλεια η % αναλογία των διατηρούντων που είχαν «λιγότερο από 1 κένωση ημερησίως» είναι 23%, «1 κένωση ημερησίως» 46,7% και «2 κενώσεις ημερησίως» 20% , μετά την απώλεια το ποσοστό αναλογίας αλλάζει σε 13%, 53,9% και 23,3% αντίστοιχα. Οι επανακτήσαντες που είχαν «λιγότερο από 1 κένωση ημερησίως» είναι το 22,7% της ομάδας, «1 κένωση ημερησίως» 44,8% και «2 κενώσεις ημερησίως» 22,1% , μετά την απώλεια τα ποσοστά αλλάζουν σε 16,2%, 51,9% και 23,4% αντίστοιχα. Το σύνολο του ποσοστού των ατόμων με «λιγότερο από <1 κένωση ημερησίως» πριν είναι 22,9% και μετά την απώλεια είναι 53,3% και 23,3% για «1 κένωση ημερησίως» και «2 κενώσεις ημερησίως» αντίστοιχα.

Γράφημα 4.1:

Αριθμός των κενώσεων/ημέρα πριν (α) και μετά (β) την απώλεια βάρους των εθελοντών.



Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Στατιστικά σημαντική μετατόπιση του ποσοστού της αναλογίας των εθελοντών στις κατηγορίες «λιγότερο από 1 κένωση ημερησίως», πριν τη προσπάθεια απώλειας του βάρους σε «1 ή 2 κενώσεις ημερησίως» μετά τη προσπάθεια απώλειας βάρους, $p < 0,001$.

Ο αριθμός των εθελοντών που εμφάνισαν τον διαφορετικό αριθμό των κενώσεων ημερησίως πριν και μετά την απώλεια, παρατίθεται στους δυο παρακάτω πίνακες. Οι δυο ομάδες εμφανίζουν περισσότερες κενώσεις μετά τη προσπάθεια απώλειας. Πιο συγκεκριμένα, οι διατηρούντες οι οποίοι πριν τη προσπάθεια είχαν λιγότερο από μία κένωση ημερησίως (28/76) μετά τη προσπάθεια είχαν 1 ή 2 κενώσεις ημερησίως (37/ 178 και 10/ 77 αντίστοιχα). Επίσης, ενώ πριν τη προσπάθεια δήλωσαν ότι έχουν 1 κένωση ημερησίως 11/154, μετά την προσπάθεια ανέρχονται σε 112/178 και σε 24/77 για 2 κενώσεις. Στον υπόλοιπο αριθμό των κενώσεων δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφοροποίηση (Πίνακας 4.3).

Πίνακας 4.3: Αριθμός ομάδας διατηρούντων πριν και μετά την απώλεια.

Αριθμός κενώσεων μετά							
Αριθμός κενώσεων πριν		0	1	2	3	4	Σύνολο
	0	28	37	10	1	0	76
	1	11	112	24	7	0	154
	2	3	22	33	7	1	66
	3	1	6	7	11	3	28
	4	0	1	3	1	1	6
Σύνολο		43	178	77	27	5	330

Οι τιμές εκφράζονται ως μέγεθος εθελοντών

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Στατιστικά σημαντική μετατόπιση στο μέγεθος των εθελοντών στις κατηγορίες «λιγότερο από 1 κένωση ημερησίως» πριν τη προσπάθεια της απώλεια σε «1 ή 2 κενώσεις ημερησίως» μετά τη προσπάθεια απώλεια βάρους, $p < 0,001$.

Στους επανακτήσαντες, οι 17/35 είχαν λιγότερο από μία κένωση ημερησίως ενώ οι 6/69 κατέγραψαν 1 κένωση πριν τη προσπάθεια της απώλειας. Μετά τη προσπάθεια εμφάνισαν 1 κένωση οι 13/80 και οι 53/80 αντίστοιχα. Στον υπόλοιπο αριθμό των κενώσεων δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφοροποίηση (Πίνακας 4.4).

Πίνακας 4.4 : Αριθμός ομάδας επανακτησάντων πριν και μετά την απώλεια

Αριθμός κενώσεων μετά							
Αριθμός κενώσεων πριν		0	1	2	3	4	Σύνολο
	0	17	13	4	1	0	35
	1	6	53	10	0	0	69
	2	2	11	17	4	0	34
	3	0	3	4	6	0	13
	4	0	0	1	0	2	3
Σύνολο		25	80	36	11	2	154

Οι τιμές εκφράζονται ως μέγεθος εθελοντών.

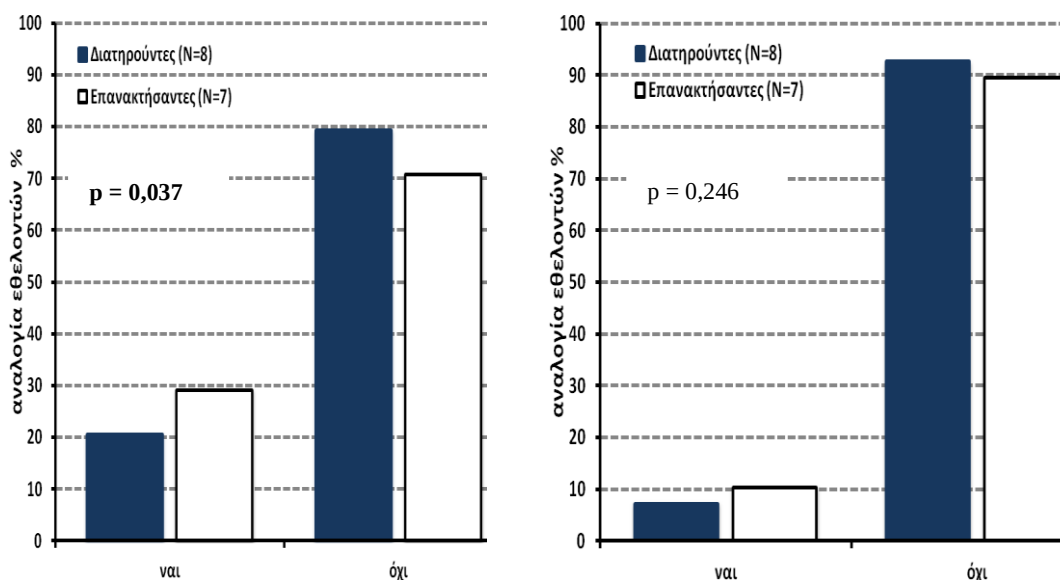
Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Στατιστικά σημαντική μετατόπιση στο μέγεθος των εθελοντών στις κατηγορίες «λιγότερο από 1 κένωση ημερησίως» πριν τη προσπάθεια της απώλειας σε «1 ή 2 κενώσεις ημερησίως» μετά τη προσπάθεια απώλεια βάρους, $p < 0,001$.

Η πλειονότητα των εθελοντών δεν εμφάνισε υδαρείς κενώσεις πριν (92,9%) ή και μετά (90,9%) την προσπάθεια απώλειας βάρους. Η ομάδα των διατηρούντων τείνει να παρουσιάζει περισσότερες υδαρείς κενώσεις μετά τη προσπάθεια της απώλειας βάρους ($p = 0,067$).

Επίσης, η πλειονότητα των εθελοντών δεν εμφάνισε συμπτώματα γαστρο-οισοφαγικής παλινδρόμησης ή αίσθημα καύσου εβδομαδιαίως πριν (79,4%) και μετά (92,7%) την ολοκλήρωση της προσπάθειάς τους. Παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων στα συμπτώματα γαστρο-οισοφαγικής παλινδρόμησης ή αισθήματος καύσου εβδομαδιαίως πριν την προσπάθεια απώλειας. Η ομάδα των διατηρούντων παρουσιάζει λιγότερο τα παραπάνω συμπτώματα ανά εβδομάδα πριν τη προσπάθεια της απώλειας ($p = 0,037$) (Γραφήμα 4.2α και β).

Γράφημα 4.2: Γαστρο-οισοφαγική παλινδρόμηση (α) πριν και μετά (β) την απώλεια βάρους



Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Στατιστικά σημαντική διαφορά στην ομάδα των διατηρούντων, πριν τη προσπάθεια της απώλειας ($p = 0,037$).

Η πλειονότητα των εθελοντών και των δυο ομάδων δεν εμφάνισε κοιλιακό πόνο πριν (91,6%) και μετά (94,8%) την ολοκλήρωση της προσπάθειάς τους. Παρατηρείται επίσης τάση διαφοράς μεταξύ των δυο ομάδων στα επεισόδια κοιλιακού πόνου ανά εβδομάδα πριν τη προσπάθεια. Οι επανακτήσαντες τείνουν να παρουσιάσουν λιγότερα επεισόδια κοιλιακού πόνου ($p = 0,058$). Συμπτώματα ευερέθιστου εντέρου οι δυο ομάδες δεν εμφάνισαν, πριν (84,8%) και μετά (83,9%) την προσπάθεια απώλειας.

4.3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΕ Ο ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται κάποια περιγραφικά χαρακτηριστικά (ηλικία, ύψος, βάρος, ΔΜΣ) των εθελοντών στους οποίους μελετήθηκε περαιτέρω ο εντερικός μικροβιόκοσμος (Πίνακας 4.5).

Πίνακας 4.5: Περιγραφικά δεδομένα του δείγματος που μελετήθηκε ο εντερικός μικροβιόκοσμος

	Διατηρούντες (N=8)	Επανακτήσαντες (N=7)	p-value
Ηλικία (έτη)	31,8±13,6	35,3±11,0	0,815
Ύψος (cm)	169±7	171±6	0,465
Βάρος (kg)	75,9± 14,7	78,4±14,4	0,747
ΔΜΣ (kg/m²)	26,4±4,1	28,2±4,2	0,427

N: μέγεθος ομάδων μελέτης

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος (ΜΟ) ± τυπική απόκλιση (SD). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά στα χαρακτηριστικά που αναφέρονται στον Πίνακα 4.6 μεταξύ των δύο ομάδων (διατηρούντες και επανακτήσαντες).

Οι εθελοντές που πήραν μέρος στη μελέτη και εξετάστηκε περαιτέρω ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι 9 γυναίκες και 6 άντρες. Οι ομάδες των εθελοντών δεν εμφάνισαν κάποια διαφοροποίηση σε σχέση με το φύλο (p=0,833).

Πίνακας 4.6: Κατάταξη του δείγματος ως προς φύλο

	Διατηρούντες (N=8)	Επανακτήσαντες (N=7)	Σύνολο	p-value
Γυναίκες	5 (55,6%)	4 (44,4%)	9	0,833
Άντρες	3 (50%)	3 (50%)	6	

Οι τιμές εκφράζονται ως μέγεθος και στην παρένθεση παρουσιάζεται η αντίστοιχη αναλογία % μέσα στο φύλο.

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

4.3.1. Κοινωνικο- δημογραφικά χαρακτηριστικά

Διερευνήθηκε επίσης ο τρόπος γέννησης, σίτισης κατά τη βρεφική ηλικία (θηλασμός ή υποκατάστατο μητρικού γάλατος), η οικογενειακή και επαγγελματική κατάσταση. Από τα 15 άτομα μόνο ένας διατηρήσας έχει γεννηθεί με καισαρική τομή. Δύο δεν έχουν θηλάσει (ένας διατηρήσας και ένας επανακτήσας) και όσον αφορά την οικογενειακή τους κατάσταση οι τέσσερις είναι παντρεμένοι, (δύο διατηρήσαντες και δυο επανακτήσαντες), ενώ οι υπόλοιποι είναι άγαμοι. Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η επαγγελματική κατάσταση των συμμετεχόντων εθελοντών, στον οποίο παρατηρείται τάση στην ομάδα των επανακτησάντων να ακολουθούν πνευματική εργασία ($p=0,058$). Όσον αφορά την ηλικία και τα χρόνια εκπαίδευσης, δεν παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στις δυο ομάδες.

	Άνεργος	Χειρωνακτική	Ημι-χειρωνακτική	Πνευματική
Διατηρούντες (N= 8)	1	0	4	3
Επανακτήσαντες (N= 7)	0	2	0	5

Οι τιμές εκφράζονται ως μέγεθος σε κάθε ομάδα.

4.3.2. Ιατρικό ιστορικό

Όλοι οι εθελοντές οι οποίοι έλαβαν μέρος στην μελέτη δεν είχαν ιστορικό δυσλιπιδαιμίας, υπέρτασης και σακχαρώδη διαβήτη. Οι τρεις από τους δεκαπέντε (δυο επανακτήσαντες και ένας διατηρήσας) έχουν αλλεργία. Όσον αφορά τις καπνιστικές συνήθειες περιγράφονται στον Πίνακα που ακολουθεί. Στην ομάδα των επανακτησάντων υπάρχει τάση για περισσότερους καπνιστές ($p= 0,060$).

Πίνακας 4.8: Καπνιστικές συνήθειες εθελοντών

	μη καπνίζοντες	καπνίζοντες	Καπνίζοντες στο παρελθόν
Διατηρούντες (N= 8)	6	1	1
Επανακτήσαντες (N= 7)	2	5*	0

Οι τιμές εκφράζονται ως μέγεθος σε κάθε ομάδα.

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Επίσης μελετήθηκαν οι ώρες του ύπνου και τα σκορ της κλίμακων ZUNG και STAI που αξιολογούν την συμπτωματολογία της κατάθλιψης και την κατάσταση άγχους των εθελοντών αντίστοιχα. Η κλίμακα της αυτοαξιολόγησης της υγείας τους πραγματοποιήθηκε με τη συμπλήρωση της κλίμακας από το 0 έως το 100. Δεν παρατηρείται διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες για καμία από τις μεταβλητές αυτές.

4.3.3. Σωματομετρικά χαρακτηριστικά

Οι εθελοντές κατηγοριοποιήθηκαν σε φυσιολογικούς, υπέρβαρους και παχύσαρκους, ανάλογα με το ΔΜΣ που παρουσίασαν. Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η συχνότητα εμφάνισης των κατηγοριών αυτών σε κάθε ομάδα (διατηρούντες και επανακτήσαντες).

Πίνακας 4.9: Κατανομή των δυο υποομάδων ως προς τις κατηγορίες του ΔΜΣ, ποσοστό λίπους, περιφέρεια μέσης, περιφέρεια γλουτών, λόγος περιφέρειας μέσης/ γλουτών.

	Διατηρούντες (N= 8)	Επανακτήσαντες (N= 7)	P-value
Κανονικού βάρους	3	1	0,582
Υπέρβαροι	3	4	
Παχύσαρκοι	2	2	
Ποσοστό λίπους (%)	27,4±8,4	29,5±8	0,628
Περιφέρεια μέσης (cm)	87,9±12,1	89,6± 15,6	0,816
Περιφέρεια γλουτών(cm)	107,6±9,3	107,9±6,1	0,872
Περιφέρεια μέσης /γλουτών	0,82±0,07	0,83±0,11	0,858

Οι τιμές εκφράζονται ως μέγεθος σε κάθε ομάδα και ως μέσος όρος (ΜΟ) ± τυπική απόκλιση (SD). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Αντίστοιχα εξετάστηκε στους εθελοντές η εκτίμηση του ποσοστού του λίπους, η περιφέρεια της μέσης, η περιφέρεια των γλουτών καθώς επίσης και ο λόγος της περιφέρειας μέσης/περιφέρεια γλουτών (Waist Circumference/ Hip Circumference -WH). Δεν παρατηρήθηκε διαφορά ως προς τις μεταβλητές αυτές μεταξύ των δύο ομάδων (διατηρούντες και επανακτήσαντες).

4.3.4. Διατροφικά χαρακτηριστικά και Φυσική κατάσταση

Η αξιολόγηση της διατροφικής κατάστασης των εθελοντών πραγματοποιήθηκε με το ημι-ποσοτικό ερωτηματολόγιο κατανάλωσης τροφίμων (FFQ). Αποτυπώθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η μέση πρόσληψη της ποσότητας των τροφίμων που κατανάλωσε ο κάθε εθελοντής το τελευταίο μήνα και υπολογίστηκε το MedDiet Score. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ως προς τη διατροφική αξιολόγηση των εθελοντών μεταξύ των δυο ομάδων που μελετώνται (διατηρούντες και επανακτήσαντες) (Πίνακας 4.10).

Η ποσότητα του νερού και του καφέ που καταναλώνουν οι εθελοντές δεν διαφέρει μεταξύ των δύο ομάδων (Πίνακας 4.10).

Πίνακας 4.10: Med-diet score, κατανάλωση νερού και καφέ στους εθελοντές.

	Διατηρούντες (N= 8)	Επανακτήσαντες (N= 7)	p-value
Med-Diet Score	33,87± 4,64	33,57± 4,11	0,896
Ποσότητα νερού (αριθμός ποτηριών)	6,25± 2,64	8,14± 3,07	0,222
Ποσότητα καφέ (αριθμός φλιτζ)	1,64± 0,88	2,74± 1,64	0,124

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος(MO) ± τυπική απόκλιση(SD). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Η μέση ημερήσια θερμιδική πρόσληψη και ο μέσος όρος του βάρους των μακροθρεπτικών συστατικών και των φυτικών ινών που καταγράφηκαν στις 24ωρες ανακλήσεις τροφίμων συμπεριλαμβάνονται στον πίνακα που ακολουθεί. Δεν παρατηρείται κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες (Πίνακας 4.11).

Πίνακας 4.11: Ημερήσια πρόσληψη θερμίδων και μακροθρεπτικών συστατικών

	Διατηρούντες (N= 8)	Επανακτήσαντες (N= 7)	p-value
Ημερήσια θερμιδική πρόσληψη (Kcal)	1767 ±480	1884 ±654	0,697
Πρωτεΐνες (g)	69 ±21	78±22	0,448
Υδατάνθρακες (g)	199±69	176±53	0,480
Ολικά λιπίδια (g)	79±25	93±42	0,435
Διαιτητικές ίνες (g)	19,6±11,4	17,9±10,2	0,764

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος(MO) ± τυπική απόκλιση(SD). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Η εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας έγινε με τη χρήση του IPAQ-SF που υπάγεται στο ερωτηματολόγιο ΑΤΤΙΚΗ. Ο μέσος όρος της φυσικής δραστηριότητας και ο καθιστικός χρόνος παρουσιάζονται στον Πίνακα που ακολουθεί. Δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων για καμία από τις δύο αυτές μεταβλητές.

Πίνακας 4.12: Φυσική δραστηριότητα και καθιστικός χρόνος.

	Διατηρούντες (N= 8)	Επανακτήσαντες (N= 7)	p-value
Φυσική Δραστηριότητα (MET-min/week)	2726 ±2193	1858±1548	0,399
Καθιστικός χρόνος(h)	42,3±14,2	40,71±21,1	0,869

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος (MO) ± τυπική απόκλιση(SD). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

4.3.5. Γαστρεντερικά χαρακτηριστικά

Η καταγραφή των γαστρεντερικών συμπτωμάτων έγινε με τη βοήθεια της καταγραφής του 7ήμερου ημερολογίου, της καταγραφής του μέσου όρου του αριθμού των κενώσεων καθημερινά το τελευταίο μήνα και του επιγαστρίου και κοιλιακού πόνου με τη βοήθεια της

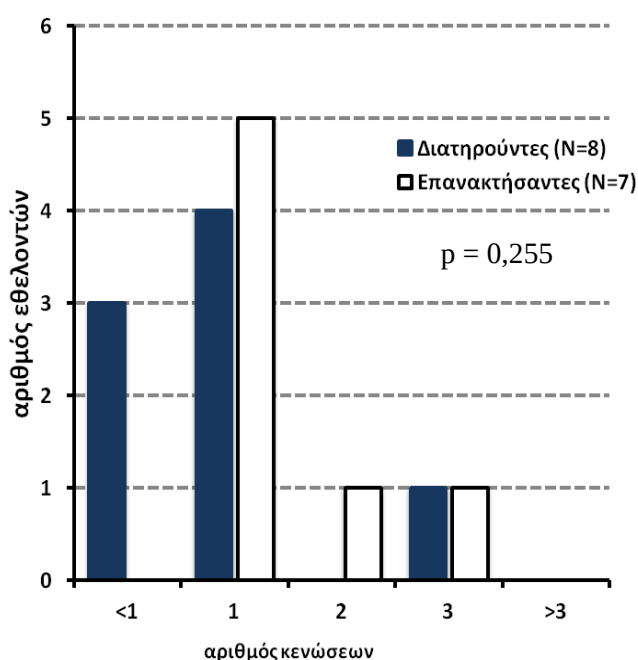
κλίμακας από το 0 -6 για το διάστημα του τελευταίου μήνα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Γράφημα και τους Πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 4.13: Κοιλιακό ή επιγάστριο άλγος το τελευταίο μήνα

	Διατηρούντες (N= 8)	Επανακτήσαντες (N= 7)	p- value
Κοιλιακό ή επιγάστριο άλγος το τελευταίο μήνα	0,75±1,01	0,74±0,72	0,997

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος(MO) ± τυπική απόκλιση(SD). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Γράφημα 4.3: Αριθμός κενώσεων ημερησίως (το προηγούμενο μήνα).



Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Από το 7 ήμερο, παρατηρείται ότι οι δύο ομάδες δεν διέφεραν στο σύνολο των κενώσεων, στο σύνολο των διαρροϊκών κενώσεων, στο κοιλιακό πόνο, τη κοιλιακή διόγκωση, το μετεωρισμό και τους βορβορυγμούς. Καθώς επίσης και στο συνολικό σκορ των γαστρεντερικών συμπτωμάτων (Πίνακας 4.14).

Πίνακας 4.14: Γαστρεντερικά συμπτώματα 7ημέρου

	Διατηρούντες (N=8)	Επανακτήσαντες (N=7)	p-value
Σύνολο κενώσεων	7,25±3,73	10,00±5,71	0,284
Σύνολο διαρροϊκών κενώσεων	0,88±2,10	0,42±0,79	0,606
Κοιλιακός Πόνος	2,50±1,69	5,71±6,79	0,217
Διόγκωση	4,38±3,42	5,57±5,74	0,626
Μετεωρισμός	5,50±4,81	9,29±9,96	0,355
Βορβορυγμοί	2,25±2,87	5,43±4,82	0,139
Συνολικό σκορ συμπτωμάτων	14,62±9,13	26,00±25,29	0,255

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος(MO) ± τυπική απόκλιση(SD). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Από την επεξεργασία του ερωτηματολογίου παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων στο χρώμα των κοπράνων. Η ομάδα των διατηρούντων παρουσιάζει σκουρότερο χρώμα κοπράνων ($p= 0,038$) σε σύγκριση με τους εθελοντές που διατήρησαν την απώλεια βάρους. Ενώ ως προς την οσμή δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p = 0,768$).

Πίνακας 4.15: Χρώμα κοπράνων

	0	1	2	3	4
Διατηρούντες (N= 8)	0	0	4	3	1
Επανακτήσαντες (N= 7)	0	0	7	0	0

Οι τιμές εκφράζονται ως μέγεθος σε κάθε ομάδα

Τα δεδομένα της κλίμακας Bristol παρουσιάζονται στο παρακάτω πίνακα. Παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων καθώς ($p=0,026$). Στο τύπο 3, (σκληρές κενώσεις με ρωγμές στην επιφάνεια) ανήκουν οι 5 από τους 8 διατηρούντες οι 2 από τους 7 επανακτήσαντες. Στο τύπο 4 ανήκουν μόνο οι 4 από τους 7 επανακτήσαντες.

Πίνακας 4.16: Αποτελέσματα κλίμακας Bristol (Τύποι 1 έως 7).

Bristol	1	2	3	4	5	6	7
Διατηρούντες (N= 8)	0	0	5	0	3	0	0
Επανακτήσαντες (N= 7)	0	1	2	4	0	0	0

Οι τιμές εκφράζονται ως μέγεθος σε κάθε ομάδα

4.3.6. Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά

Κατά τη μικροβιολογική ανάλυση των κοπράνων των εθελοντών έγινε η καταμέτρηση των Ολικών Αερόβιων και Αναερόβιων μεσόφιλων Μικροοργανισμών καθώς επίσης και των εξής επιμέρους βακτηριακών ομάδων: Ολικά κολίμορφα και *E.coli*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. και *S. aureus*, *Clostridium* spp. και *C.perfringens*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. Επίσης, καταμετρήθηκαν οι πληθυσμοί των μυκηλιακών μυκήτων και των ζυμών. Πιο ειδικά έγινε η καταμέτρηση των ζυμών του γένους *Candida* και του γένους *Rhodotorula*, όπως επίσης και των ειδών *Candida albicans*, *C. glabrata* και *C.kruzei*, στα δείγματα των εθελοντών που εμφανίστηκαν. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 4.17: Μικροβιακή ανάλυση των κοπράνων των εθελοντών

Μικροοργανισμοί	Διατηρούντες (N=8)	Επανακτήσαντες (N=7)	p- value
Ολικοί αερόβιοι μο	8,65±0,61	7,82±1,08	0,086
Ολικοί αναερόβιοι μο	9,85±0,39	9,26±0,68	0,058
Ολικά κολίμορφα	6,88±1,18	6,78±0,70	0,848
<i>E.coli</i>	6,87±1,19	6,32±1,61	0,474
<i>Enterococcus spp.</i>	5,70±1,24	6,22±1,72	0,510
<i>Staphylococcus spp.</i>	2,63±0,27	3,34±1,49	0,333
% <i>Staphylococcus spp.</i> ^a	5 (62,5%)	6 (85,7%)	0,310
<i>S. aureu</i>	2,44±0,27	3,80 ±2,01	0,224
% <i>S. aureus</i> ^b	4 (50%)	3 (42,9%)	0,782
<i>Clostridium spp.</i>	5,09±0,79	5,52±1,13	0,423
<i>C. perfringens</i>	4,6 ±0,87	4,83±1,63	0,750
<i>Lactobacillus spp.</i>	6,01±1,66	5,83±1,76	0,844
<i>Bifidobacterium spp.</i>	9,06±0,95	8,81±0,53	0,586
<i>Bacteroides spp.</i>	8,41±1,70	7,81±1,60	0,509

*Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών εκφράζονται ως log10 CFU/g κοπράνων.

CFU: colony forming units (βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες).

*Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος (MO)± τυπική απόκλιση(SD). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

a, b, : Συχνότητα εμφάνισης μικροοργανισμών.

Παρατηρούμε ότι στα δείγματα όλων των εθελοντών καταμετρήθηκαν ολικά κολίμορφα και *E.coli*, εντερόκοκκοι, λακτοβάκιλλοι, μπιφοδοβακτήρια και βακτήρια του γένους *Bacteroides*. Αντίθετα δεν παρουσίασαν όλοι οι εθελοντές στα δείγματά τους σταφυλόκοκκους (5/8 στους διατηρούντες και 6/7 στους επανακτήσαντες) και η συχνότητα εμφάνισης του *S.aureus* ήταν διαφορετική στις δύο ομάδες (4/8 στους διατηρούντες και 3/7 στους

επανακτήσαντες), ενώ ο μέσος πληθυσμός της ομάδας των ανακτησάντων ήταν μεγαλύτερος από εκείνον της ομάδας των διατηρούντων την απώλεια βάρους, χωρίς όμως η διαφορά αυτή να γίνεται σημαντική. Ένας εθελοντής (από τους επανακτήσαντες) δεν εμφάνισε κλωστρίδια καθόλου και σε ένα εθελοντή από την ομάδα των διατηρούντων δεν καταγράφηκαν βακτήρια από το γένος *Bacteroides*.

Επιπλέον παρατηρείται τάση στην ομάδα των εθελοντών που διατήρησαν την απώλεια βάρους να εμφανίζουν υψηλότερους πληθυσμούς των ολικών αερόβιων ($p=0,086$) και αναερόβιων μικροοργανισμών ($p=0,058$).

Πίνακας 4.18: Μικροβιολογική ανάλυση των κοπράνων εθελοντών (μύκητες-ζύμες)

Μικροοργανισμοί	Διατηρούντες (N=8)	Επανακτήσαντες (N=7)	p- value
Ζύμες	2,21±1,47	1,67±1,82	0,538
% Ζυμών^b	6 (75%)	4 (57%)	0,464
Μύκητες	1,80±0,15	2,87±0,26	0,002^a
% Μυκήτων^b	4 (50%)	2 (29%)	0,398
<i>Candida</i> spp.^e	2,92 ±0,76	3,07±1,46	0,849
% <i>Candida</i> spp.^b	5 (63%)	3 (43%)	0,447
<i>C. albicans</i>^f	3,06±0,76	1,62± -	0,187
%<i>C. albicans</i>^b	4 (50%)	1 (14%)	0,143
<i>C.glabrata</i>^g	2,41±0,24	3,60± -	0,155
%<i>C.glabrata</i>^b	1 (25%)	1 (14%)	0,605
<i>Rhodotorula</i> spp.	0,63±0,88	0,97±1,68	0,624
% <i>Rhodotorula</i> spp.^b	3 (37,5%)	2 (28,5%)	0,714

*Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών εκφράζονται ως log10 CFU/g κοπράνων

CFU: colony forming units (βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες)

*Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος (MO)± τυπική απόκλιση (SD). Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%

a :Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων.

b: Συχνότητα εμφάνισης ζυμών.

Σύμφωνα με το παραπάνω Πίνακα δεν καταγράφηκαν σε όλους τους εθελοντές μυκηλιακοί μύκητες (4/8 στους διατηρούντες και 2/7 στους επανακτήσαντες). Ο μέσος

πληθυσμός των μυκηλιακών μυκήτων της ομάδας των ανακτησάντων ήταν μεγαλύτερος από εκείνον της ομάδας των διατηρούντων της απώλειας βάρους ($p=0,002$).

Οι ζύμες δεν εμφανίστηκαν σε όλο το μελετούμενο δείγμα. Ο μέσος πληθυσμός της ομάδας των διατηρούντων φαίνεται να είναι μεγαλύτερος, χωρίς όμως να φτάνει σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα η διαφορά αυτή και η συχνότητα εμφάνισης είναι 6/8 διατηρούντες και σε 4/7 επανακτήσαντες. Ο αριθμός των ατόμων που εμφανίζουν αποικίες του γένους *Candida* είναι περιορισμένος 5 από τους 8 διατηρούντες και 3 από τους 7 επανακτήσαντες. *C.albicans* έχουν οι 4 διατηρούντες και 1 επανακτήσας, *C.glabrata* έχουν 2 διατηρούντες και 1 επανακτήσας, ενώ *C.parapsilosis* και *C.kruzei* έχουν μόνο 1 και 1 επανακτήσας αντίστοιχα. Τέλος, οι ζύμες του γένους *Rhodotorula* παρουσιάζονται σε 3/8 διατηρούντες και σε 2/7 επανακτήσαντες.

Επίσης μετρήθηκε το pH και το Ξηρό Βάρος των δειγμάτων των κοπράνων και στις δύο ομάδες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον επόμενο Πίνακα.

Πίνακας 4.19: pH και Ξηρό βάρος κοπράνων

	Διατηρούντες (N= 8)	Επανακτήσαντες (N= 7)	p-value
pH	6,99±0,73	6,62±0,85	0,385
Ξηρό Βάρος κοπράνων (g)	74,1± 8,2	73,5± 5,4	0,863

Οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος(MO) ± τυπική απόκλιση (SD).

Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

4.4. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ή ΜΗ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΒΑΡΟΥΣ

Σύμφωνα με τον επόμενο Πίνακα παρατηρείται ότι υπάρχει τάση για συσχέτιση της διατήρησης απώλειας βάρους με τα επίπεδα του ολικού αερόβιου και αναερόβιου μικροβιόκοσμου. Στους πληθυσμούς των ολικών αερόβιων και αναερόβιων μικροοργανισμών όταν γίνει κανονικοποίηση ως προς το φύλο, την ηλικία και τον ΔΜΣ η κατάσταση διατήρησης της απώλειας βάρους διατηρεί την τάση για θετική συσχέτιση με τα επίπεδα των ολικών αερόβιων και αναερόβιων μικροοργανισμών.

Στους πληθυσμούς των μυκηλιακών μυκήτων, η απώλεια βάρους σχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα των πληθυσμών των μυκήτων. Όταν γίνει κανονικοποίηση ως προς ηλικία και φύλο

η συσχέτιση παραμένει ισχυρά αρνητική, ενώ όταν προστεθεί και ο συγχυτικός παράγοντας ΔΜΣ η απώλεια βάρους δεν σχετίζεται πλέον αρνητικά με τα επίπεδα των μυκήτων.

Πίνακας 4.20: Γραμμική παλινδρόμηση για τη συσχέτιση των πληθυσμών των μυκήτων και του ολικού αερόβιου και αναερόβιου εντερικού μικροβιόκοσμου με τη διατήρηση απώλειας βάρους.

Συγχυτικοί Παράγοντες		B ±SE	p-value
Ολικοί αερόβιοι	Διατηρούντες/ Επανακτήσαντες	0,826±0,444	0,086
	<i>Κανονικοποίηση για Ηλικία, Φύλο</i>	0,887±0,408	0,053
	<i>Κανονικοποίηση για Ηλικία, Φύλο, ΔΜΣ</i>	0,927±0,438	0,060
Ολικοί αναερόβιοι	Διατηρούντες/ Επανακτήσαντες	0,594±0,285	0,058
	<i>Ηλικία, Φύλο</i>	0,606±0,298	0,067
	<i>Ηλικία, Φύλο, ΔΜΣ</i>	0,627±0,321	0,080
Μύκητες	Διατηρούντες/ Επανακτήσαντες	-1,071±0,157	0,002^a
	<i>Ηλικία, Φύλο</i>	-1,060±0,224	0,042^a
	<i>Ηλικία, Φύλο, ΔΜΣ</i>	-0,776±1,399	0,678

*Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών εκφράζονται ως log10 CFU/g κοπράνων

CFU: colony forming units (βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες)

*Οι τιμές εκφράζονται ως b- Coefficient ± τυπικό σφάλμα. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε επίπεδο σημαντικότητας 5%

a : Στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων.

Οι διατηρούντες έχουν αυξημένη πιθανότητα να εμφανίζουν ζύμες, *Candida* spp., *S.aureus* και μύκητες και μικρότερη πιθανότητα να εμφανίζουν σταφυλόκοκκους σε σχέση με τους επανακτήσαντες. Η επίδραση της συχνότητας εμφάνισης των σταφυλόκοκκων, του *S.aureus*, των ζυμών, των *Candida* spp. και των μυκήτων στη διατήρηση απώλειας βάρους λαμβάνοντας υπόψιν τους συγχυτικούς παράγοντες (Ηλικία, Φύλο, ΔΜΣ) δεν ήταν στατιστικά σημαντική.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης αφορούν δεδομένα ενός πληθυσμού του οποίου βασική προϋπόθεση είναι η απώλεια βάρους των συμμετεχόντων στο παρελθόν και η διατήρηση μέρους της απώλειας (10%) για τουλάχιστον 1 χρόνο. Καταγράφηκαν τα βασικά περιγραφικά χαρακτηριστικά και εκτιμήθηκε η γαστρεντερική συμπτωματολογία πριν και μετά την απώλεια σε ένα δείγμα 528 ενηλίκων, το οποίο συμμετείχε στη μελέτη MedWeight που διεξάγεται από το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Για τη περεταίρω μελέτη των γαστρεντερικών δεδομένων αλλά και της διατροφικής αξιολόγησης, του τρόπου ζωής και των μικροβιολογικών χαρακτηριστικών του εντέρου μελετήθηκαν τα 15 άτομα του δείγματος, ένα υποσύνολο του αρχικού δείγματος. Οι 8 έχουν διατηρήσει το απολεσθέν βάρος τους (διατηρούντες) και οι 7 το έχουν ξαναπάρει (επανακτήσαντες). Σε γενικές γραμμές, το συμπέρασμα το οποίο προκύπτει μετά την επεξεργασία των δεδομένων είναι ότι οι διατηρούντες και οι επανακτήσαντες παρουσιάζουν διαφορές ως προς τον τρόπο ζωής, τη γαστρεντερική συμπτωματολογία αλλά και ως προς τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου.

Αναλυτικότερα, το αρχικό δείγμα το οποίο μελετήθηκε είναι 362 διατηρούντες και 166 επανακτήσαντες. Σύμφωνα με τα περιγραφικά δεδομένα του δείγματος ο μέσος όρος του μέγιστου ΔΜΣ που είχαν στο παρελθόν οι δυο ομάδες ήταν περίπου $32\text{kg/m}^2 > 30$ ενώ μετά την προσπάθεια της απώλειας ο μέσος όρος του ΔΜΣ της ομάδας των διατηρούντων είναι περίπου 26kg/m^2 και στους επανακτήσαντες 31kg/m^2 . Τα παραπάνω στοιχεία καταδεικνύουν την αλλαγή του βάρους των εθελοντών μετά τη προσπάθεια της απώλειας και τη πάροδο ενός έτους, η οποία αξίζει να μελετηθεί και να διευκρινιστούν οι παράγοντες που έχουν επηρεάσει τη διατήρηση ή την επαναπρόσληψη του βάρους.

Τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες για τη συμπεριφορά και τη διαχείριση της απώλειας των κιλών θέτοντας ως προτεραιότητα τη θεραπεία της παχυσαρκίας (Thomas et al, 2014; Lenoir et al, 2015; Dale et al, 2009; JaKa et al, 2015). Τα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι ορισμένα από τα γαστρεντερικά συμπτώματα και πιο συγκεκριμένα το κοιλιακό άλγος, τα συμπτώματα γαστρο-οισοφαγικής παλινδρόμησης, η αυξημένη συχνότητα των κενώσεων και οι διαρροϊκές κενώσεις σχετίζονται με τον αυξημένο ΔΜΣ και τη παχυσαρκία (Eslick, 2012; Talley et al, 2004). Στη παρούσα μελέτη οι δυο ομάδες: διατηρούντες και επανακτήσαντες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τον αριθμό των κενώσεων καθημερινά και τα συμπτώματα γαστρο-οισοφαγικής παλινδρόμησης ή καύσου.

Η πλειονότητα των εθελοντών εμφανίζει 1 κένωση ημερησίως. Μετά τη προσπάθεια απώλειας των κιλών, οι διατηρούντες και οι επανακτήσαντες αυξάνουν τον αριθμό των

κενώσεων ημερησίως. Το ποσοστό του συνόλου των εθελοντών που δηλώνει λιγότερη από μία κένωση ημερησίως είναι 22,9% πριν την απώλεια βάρους, ενώ μετά την απώλεια μειώνεται σε 14%. Αντίθετα αυξάνονται τα ποσοστά των εθελοντών που δηλώνουν 1 ή 2 κενώσεις μετά την απώλεια σε 53,3% και 23,3% αντίστοιχα, από 46,1% και 20,7% αντίστοιχα πριν την απώλεια βάρους. Το γεγονός αυτό πιθανά να σχετίζεται με την προσπάθεια των ατόμων για αλλαγή των διατροφικών τους συνηθειών. Είναι αξιοσημείωτο ότι ενώ ο όγκος της τροφής που καταναλώνουν καθημερινά οι εθελοντές μετά την απώλεια βάρους μπορεί να είναι μικρότερος από πριν, δεν μειώνεται ο αριθμός των κενώσεων ημερησίως. Ίσως κάποιοι άλλοι παράγοντες συμβάλλουν στη διαφορά αυτή.

Η συχνότητα και η μορφή των κενώσεων επηρεάζονται από την αύξηση κατανάλωσης φυτικών ινών στο διαιτολόγιο ενός ατόμου (*Ho et al, 2012*). Ίσως οι διατροφικές αλλαγές που προηγήθηκαν με στόχο την απώλεια των κιλών συνέβαλαν στην αλλαγή του αριθμού των κενώσεων. Η φυσική άσκηση, η αυξημένη κατανάλωση νερού και ο χρόνος διέλευσης, ο εντερικός μικροβιόκοσμος καθώς και η λειτουργικότητα του εντέρου μπορεί να επηρεάζουν τη συχνότητα των κενώσεων. Πρόσφατη κλινική μελέτη σε ασθενείς με χρόνια δυσκοιλιότητα καταλήγει ότι χορήγηση 5mg υδατοδιαλυτής, μη -πηκτικής διαιτητικής ίνας (υδρολυμένο κομμι γκουάρ) για 4 εβδομάδες επιτάχυνε το χρόνο διεύλευσης του εντέρου και βελτίωσε τη συχνότητα των κενώσεων των ασθενών (*Polymeros et al, 2014*).

Όσον αφορά την εμφάνιση υδαρών κενώσεων, η πλειονότητα των εθελοντών δεν παρουσίασε υδαρείς κενώσεις. Όμως, παρατηρήθηκε τάση για στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων μετά τη προσπάθεια απώλειας των κιλών ($p=0,067$). Οι διατηρούντες με ΔΜΣ περίπου 26 kg/m^2 τείνουν να εμφανίσουν περισσότερες υδαρείς κενώσεις, γεγονός που υποδηλώνει πιθανή αλλαγή των διατροφικών συνηθειών των εθελοντών μετά τη προσπάθεια. Οι διατροφικές αλλαγές, όπως αναφέρθηκε μπορούν να επηρεάσουν τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου (*Conlon & Bird, 2015*) και κατ' επέκταση την υφή των κοπράνων. Τα βιβλιογραφικά δεδομένα έρχονται σε αντίθεση με το παραπάνω καθώς η συχνότητα των υδαρών κενώσεων είναι μεγαλύτερη σε άτομα με ΔΜΣ $> 25 \text{ kg/m}^2$ (*Eslick, 2012*).

Πριν τη προσπάθεια απώλειας των κιλών, η εμφάνιση συμπτωμάτων γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης ή αισθήματος καύσου και ο κοιλιακός πόνος δεν εμφανίστηκαν στη πλειοψηφία των εθελοντών. Παρατηρείται όμως, στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων πριν τη προσπάθεια απώλειας καθώς στην ομάδα των διατηρούντων παρουσιάζονται λιγότερο τα συμπτώματα γαστρο-οισοφαγικής παλινδρόμησης και καύσου ($p=0,037$). Αντίθετα, ο κοιλιακός πόνος τείνει να εμφανίζεται λιγότερο στους επανακτήσαντες ($p=0,058$). Τα παραπάνω

επιβεβαιώνονται από τα βιβλιογραφικά δεδομένα καθώς γαστρεντερικά συμπτώματα σχετίζονται με αυξημένο ΔΜΣ (Eslick, 2012; Talley et al, 2004).

Η γαστρεντερική συμπτωματολογία εξετάστηκε με περισσότερες λεπτομέρειες στο υποσύνολο του δείγματος στο οποίο μελετήθηκε και ο εντερικός μικροβιόκοσμος. Πιο συγκεκριμένα οι εθελοντές απάντησαν σε ερωτήσεις σχετικά με το κοιλιακό άλγος και τις κενώσεις που είχαν ημερησίως το τελευταίο μήνα. Επιπλέον κατέγραψαν το σύνολο των διαρροϊκών και μη κενώσεων, το κοιλιακό πόνο και τη κοιλιακή διόγκωση καθώς επίσης το μετεωρισμό και το κοιλιακό γουργουρητό που εμφάνισαν τη τελευταία βδομάδα. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις στις απαντήσεις μεταξύ των δυο υποομάδων.

Το υποσύνολο του αρχικού δείγματος που μελετήθηκε είναι 15 άτομα. Οι 8 είναι οι διατηρούντες και οι 7 επανακτήσαντες. Ως προς τη κατάταξη του ΔΜΣ η πλειονότητα των υπέρβαρων ανήκει στους επανακτήσαντες. Οι φυσιολογικοί υπερτερούν στην ομάδα των διατηρούντων, ενώ ο αριθμός των παχύσαρκων παραμένει σχεδόν ο ίδιος και στις δυο υποομάδες. Η περιφέρεια μέσης και γλουτών καθώς και το ποσοστό λίπους δεν φαίνεται να διαφέρει στατιστικά σημαντικά.

Εν συνεχεία, ο μέσος όρος του χρόνου φυσικής δραστηριότητας στους διατηρούντες είναι λίγο πιο υψηλός από τους επανακτήσαντες. Η ημερήσια θερμιδική πρόσληψη είναι σχεδόν η ίδια και στις δυο ομάδες, όμως η σύσταση της διαίτας σε μακροθρεπτικά συστατικά και σε διαιτητικές ίνες φαίνεται να διαφέρει, χωρίς όμως να φτάνει τα επίπεδα της σημαντικότητας μεταξύ των δύο ομάδων. Ο μέσος όρος κατανάλωσης του ολικού λίπους στους επανακτήσαντες είναι αρκετά υψηλός ($93 \pm 41,93$), ενώ η ποσότητα των διαιτητικών ινών είναι πιο χαμηλή σε σχέση με τους διατηρούντες. Πιθανόν να ακολουθούν ένα διατροφικό πρότυπο στο οποίο δεν παρατηρούνται υγιεινές διατροφικές συνήθειες. Τέλος, όσον αφορά την εκτίμηση της διατροφικής κατάστασης από το ημι-ποσοτικό ερωτηματολόγιο κατανάλωσης τροφίμων (FFQ), τη κατανάλωση του καφέ και του νερού δεν φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων.

Οι παρεμβάσεις στη διαίτα και τη φυσική δραστηριότητα οδηγούν σε μικρά αλλά σημαντικά οφέλη της διατήρησης απώλειας βάρους (Dombrowski et al, 2014). Η 10 ετής μελέτη παρατήρησης των Thomas και των συνεργατών του (2014) σε 2886 συμμετέχοντες υποστηρίζει ότι η μείωση της φυσικής δραστηριότητας και η μη διαιτητική συγκράτηση σχετίζονται με τη μεγαλύτερη επαναπρόσληψη των κιλών. Οι επιτυχημένοι διατηρούντες αναφέρουν μειωμένη πρόσληψη λίπους στις διατροφικές συνήθειες (Thomas et al, 2014). Σε προηγούμενα αποτελέσματα της μελέτης MedWeight, η πιο έντονη σωματική δραστηριότητα

(Anastasiou *et al*, 2015) και η κατανάλωση τροφίμων πλούσια σε πρωτεΐνη είναι χαρακτηριστικά των διατηρούντων αντρών. Ενώ οι επανακτήσαντες του ίδιου φύλου ακολουθούν ένα διαφορετικό διατροφικό πρότυπο βασιζόμενο σε τρόφιμα υψηλής θερμιδικής αξίας (Karforoulou *et al*, 2016).

Οι εθελοντές εμφάνισαν τάση για διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ομάδων ως προς το κάπνισμα ($p=0,060$). Οι περισσότεροι καπνιστές είναι επανακτήσαντες. Πιο συγκεκριμένα οι 5 από τους 6 καπνίζοντες, ενώ οι 6 από τους 8 μη καπνίζοντες είναι διατηρούντες. Βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με πιθανή σχέση του καπνίσματος και τη διατήρηση της απώλειας του βάρους δεν αναφέρονται. Το κάπνισμα καταχωρείται στον τρόπο ζωής των συμμετεχόντων στις περισσότερες μελέτες και αναμφίβολα αποτελεί επιβαρυντικό παράγοντα της υγείας (Graciani *et al*, 2016; Flores *et al*, 2016).

Οι περισσότεροι επανακτήσαντες τείνουν να ακολουθούν πνευματική εργασία ενώ οι διατηρούντες κυρίως ημι-χειρωνακτική ($p=0,058$). Ίσως ο διαφορετικός τρόπος ζωής των διατηρούντων, που περιλαμβάνει περισσότερη φυσική δραστηριότητα αν και δεν είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τους επανακτήσαντες, επαγγελματική απασχόληση ημι-χειρωνακτική για τους περισσότερους και μη-καπνιστική συνήθεια για τους περισσότερους, να επηρεάζει την απώλεια και κυρίως τη διατήρηση των απολεσθέντων κιλών. Σίγουρα, ορισμένοι από τους προηγούμενους παράγοντες σχετίζονται με τη παχυσαρκία (Thomas *et al*, 2014), ωστόσο δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα που να καταδεικνύουν σχέση μεταξύ επαγγέλματος και διατήρησης της απώλειας βάρους.

Ως προς την κλίμακα Bristol, που μας δίνει την υφή, το σχήμα και την εικόνα των κοπράνων για τις κενώσεις των εθελοντών παρατηρήθηκε ότι: 5/8 διατηρούντες δήλωσαν ότι ανήκουν στον τύπο 3 και 4/7 επανακτήσαντες ανήκουν στον τύπο 4. Η σύγκριση της κλίμακας μεταξύ των δυο υποομάδων διαφέρει σημαντικά ($p=0,026$). Η κλίμακα Bristol (Bristol stool scale) είναι μια απλή μέθοδος εκτίμησης της εντερικής διέλευσης και χρησιμοποιείται για τη παρακολούθηση της αλλαγής στη λειτουργία του εντέρου. Έχει σχεδιαστεί για να ταξινομεί τη μορφή των ανθρώπινων κοπράνων σε 7 τύπους. Η αλλαγή του τύπου των κοπράνων συσχετίζεται με το χρόνο διέλευσης (Lewis and Heaton, 1997). Οι τύποι 1-2-3 αντιπροσωπεύουν τα άτομα με δυσκοιλιότητα. Στους τύπους 4-5 ανήκουν οι φυσιολογικές κενώσεις και στους τύπους 6-7 οι διαρροϊκές κενώσεις (https://www.gutsense.org/constipation/normal_stools.html).

Στη παρούσα μελέτη οι εθελοντές κατέγραψαν ότι οι κενώσεις τους κυμαίνονται μεταξύ των τύπων 2 έως 5. Στο τύπο 3 ανήκουν οι περισσότεροι διατηρούντες, ενώ στο τύπο 4 οι περισσότεροι επανακτήσαντες. Αν και οι περισσότερες κενώσεις θεωρούνται φυσιολογικές,

σύμφωνα με τη μέθοδο Bristol, ο χρόνος της εντερικής διέλευσης στους διατηρούντες είναι πιο μικρός από τους επανακτήσαντες. Το παραπάνω υποδηλώνει διαφορετική λειτουργία απορρόφησης και διαφορετική σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου (Lewis and Heaton, 1997). Πιο υδαρείς κενώσεις κατέγραψαν οι 3 από τους 8 διατηρούντες, γεγονός που συμβαδίζει με τα αποτελέσματα του αρχικού δείγματος της MedWeight, ότι μετά την απώλεια του βάρους η ομάδα των διατηρούντων τείνει να παρουσιάσει περισσότερες υδαρείς κενώσεις.

Στη καταγραφή των κενώσεων αξίζει να σημειωθεί ότι το χρώμα των κοπράνων των εθελοντών τις τελευταίες 7 ημέρες πριν τη δειγματοληψία διέφερε μεταξύ των δυο υποομάδων. Όλοι οι διατηρούντες παρουσιάζουν σκουρότερο χρώμα κοπράνων από τους επανακτήσαντες. Το χρώμα και οι τύποι της κλίμακας Bristol, επισημαίνουν τις διατροφικές συνήθειες του ατόμου τις τελευταίες 7 ημέρες. Η διαφοροποίηση της καταγραφής, πιθανόν να είναι αποτέλεσμα της προσπάθειας αλλαγής στη διατροφή τους με σκοπό την απώλεια των κιλών. Πιο ανοικτό χρώμα παρουσίασαν οι επανακτήσαντες οι οποίοι στην κλίμακα Bristol κατέγραψαν ότι οι κενώσεις τους ήταν μεταξύ των τύπων 2-4. Οι πιο υδαρείς κενώσεις συνήθως συνοδεύονται με πιο ανοικτό χρώμα κοπράνων. Έχουν μικρότερο χρόνο διέλευσης και μικρότερη συγκέντρωση χολερυθρίνης. Η αυξημένη κατανάλωση φυτικών ινών μπορεί να οδηγήσει σε διαρροϊκές κενώσεις (Ho et al, 2012). Αν ληφθούν υπόψιν οι μέσοι όροι των γραμμαρίων των φυτικών ινών μεταξύ των δυο ομάδων, οι παραπάνω καταγραφές των εθελοντών υποστηρίζονται.

Ακολουθώντας, στις μικροβιολογικές αναλύσεις, ο μέσος όρος των Ολικών Αερόβιων και Αναερόβιων Μεσόφιλων μικροοργανισμών τείνει να είναι μεγαλύτερος και για τις δύο κατηγορίες μικροοργανισμών στους διατηρούντες σε σχέση με τους επανακτήσαντες. Η διατήρηση της απώλειας βάρους τείνει να σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα του εντερικού μικροβιόκοσμου και όταν γίνει κανονικοποίηση ως προς την ηλικία, το φύλο και το ΔΜΣ η σχέση αυτή διατηρείται. Αντίστοιχες μελέτες ως προς τη διαφοροποίηση των πληθυσμών του εντέρου και τη σχέση τους με τη διατήρηση απώλειας βάρους δεν αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Οι διατροφικές συνήθειες θεωρούνται από τους σημαντικότερους παράγοντες που διαμορφώνουν τη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου (Conlon & Bird, 2015). Πολλοί ερευνητές αναφέρουν ότι μετά την αλλαγή των διατροφικών συνηθειών και την απώλεια βάρους η αναλογία των δύο μεγάλων φύλων που επικρατούν στον εντερικό μικροβιόκοσμο, των *Firmicutes* /*Bacteroidetes* μειώνεται (Remely et al, 2015; Duncan et al, 2008). Τα παχύσαρκα ή υπέρβαρα άτομα έχουν χαμηλότερα ποσά *Bacteroidetes* από τα άτομα φυσιολογικού βάρους (Ley et al, 2010) αν και τα αποτελέσματα από άλλες μελέτες είναι αντικρουόμενα (Schwiertz et

al., 2010). Στην παρούσα μελέτη δεν έγινε καταμέτρηση των συγκεκριμένων ομάδων μικροοργανισμών αλλά παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις ως προς τους ολικούς αερόβιους και αναερόβιους πληθυσμούς. Βέβαια οι 3 από τις παραπάνω μελέτες ακολούθησαν άλλη μεθοδολογία κατά την οποία οι εθελοντές εφάρμοζαν υποθερμιδικό διαιτολόγιο.

Όσον αφορά τη καταμέτρηση των αποικιών συγκεκριμένων βακτηρίων και ζυμών στα κόπρανα των εθελοντών, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο υποομάδων. Οι μυκηλιακοί μύκητες στους επανακτήσαντες παρουσιάζουν υψηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τους διατηρούντες. Παρατηρείται σημαντική αρνητική συσχέτιση με την διατήρηση της απώλειας βάρους ($p=0,002$), η οποία μετά τη κανονικοποίηση με την ηλικία και το φύλο παραμένει σημαντική, ενώ χάνεται μετά τη προσθήκη του ΔΜΣ. Είναι ενδιαφέρον ότι αποκτά σημαντικότητα η συσχέτιση αυτή ακόμα και για το μικρό ποσοστό ανίχνευσης των μυκήτων στα δείγματα: σε 2 μόνο εθελοντές από τους επανακτήσαντες και σε 4 από τους διατηρούντες. Δεν υπάρχουν αντίστοιχες αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία. Η πιθανότητα να εμφανίζονται οι μύκητες στους επανακτήσαντες είναι μεγαλύτερη χωρίς να παρατηρείται στατιστική σημαντικότητα.

Η παρουσία των βακτηριακών πληθυσμών στο έντερο είναι υψηλότερη σε σχέση με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς του εντέρου (Jandhyala et al, 2015). Η συχνότητα εμφάνισης των βακτηρίων και πιο συγκεκριμένα: τα ολικά κολίμορφα, το *E.coli*, το *Enterococcus* spp., το *Lactobacillus* spp. και το *Bifidobacterium* spp. ήταν 100% διότι ανιχνεύτηκαν και καταμετρήθηκαν σε όλους τους εθελοντές. Ένας επανακτήσας δεν εμφάνισε *C.perfringens* και *Clostridium* spp. και ένας διατηρήσας δεν εμφάνισε *Bacteroides* spp. Η πιθανότητα πειραματικού σφάλματος είναι πολύ πιθανή.

Τα θετικά άτομα στη παρουσία του *Staphylococcus* spp. είναι 5/8 διατηρούντες και 6/7 επανακτήσαντες ενώ *S.aureus* ανιχνεύτηκε μόνο σε 4/8 διατηρούντες και σε 3/7 επανακτήσαντες. Οι επανακτήσαντες έχουν μεγαλύτερο μέσο όρο καταμέτρησης του *S.aureus* από τους διατηρούντες αν και δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά. Η παρουσία του *S. aureus* στον εντερικό μικροβιόκοσμο διαφέρει στον γενικό πληθυσμό, δεδομένου ότι είναι το παθογόνο είδος του γένους *Staphylococcus* και υπολογίζεται ότι περίπου 25% είναι φορείς (Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών, 2007).

Η παρουσία των ζυμών στον εντερικό μικροβιόκοσμο εθελοντών δεν έχει μελετηθεί όπως επίσης δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες για την παρουσία γενικότερα των μυκήτων. Η πιθανότητα εμφάνισης των ζυμών του γένους *Candida* spp. και των μυκήτων είναι μεγαλύτερη στους διατηρούντες από ότι τους επανακτήσαντες χωρίς την εμφάνιση στατιστικής σημαντικότητας. Αναφορές καταδεικνύουν το γεγονός ότι το γένος *Candida* spp. συσχετίζεται

θετικά με δίαιτες υψηλής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες (Guba and Drancourt, 2014) και αρνητικά με δίαιτες πλούσιες σε πρωτεΐνες και λιπαρά οξέα. Επιπλέον, όσον αφορά τους το πλυθισμό των μυκήτων, η μελέτη των Hoffmann και συν το 2013 αναφέρει ότι οι μύκητες του γένους *Aspergillus* στον εντερικό μικροβίοκοσμο 98 εθελοντών σχετίζονται αρνητικά με τα λιπαρά οξέα της διαίτάς τους (Hoffmann et al, 2013), ενώ η ανίχνευση ορισμένων ειδών των μυκήτων όπως *Aspergillus ruber* ή ο *Saccharomyces cerevisiae* έχουν συσχετιστεί με τη διατροφή και πιο συγκεκριμένα με τα φρούτα και τα λαχανικά (Guba and Drancourt, 2014). Τα παραπάνω συμπίπτουν με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης διότι οι μέσοι όροι της ημερήσιας πρόσληψης των μακροθρεπτικών συστατικών υποστηρίζουν τη συχνότητα εμφάνισης των ζυμών και των μυκήτων στις δυο ομάδες.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν μια διαφορετική προσέγγιση της καταγραφής της σύστασης του εντερικού μικροβίοκοσμου. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί αξίζει να μελετηθούν εκτενέστερα και σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων ώστε να διευκρινιστούν όλες οι παραπάνω υποθέσεις σχετικά με τη διατήρηση της απώλειας βάρους.

5.1 Περιορισμοί

Ο μικρός αριθμός του δείγματος στον οποίο μελετήθηκε περεταίρω ο εντερικός μικροβίοκοσμος (N=15) δεν μπορεί να οδηγήσει σε σαφή και εμπειριστατωμένα αποτελέσματα. Επίσης, ως κλινική μελέτη είχε να αντιμετωπίσει σαφώς πρακτικά προβλήματα όπως η άμεση διατήρηση και ψύξη των κοπράνων αμέσως μετά τη δειγματοληψία.

5.2 Συμπεράσματα

Από τη μελέτη του συνόλου των εθελοντών παρατηρείται ότι:

A) η προσπάθεια απώλειας βάρους επηρέασε τη συχνότητα κενώσεων και στις δύο ομάδες. Μειώνεται το ποσοστό των εθελοντών που δήλωναν λιγότερο από μία κένωση ημερησίως, ενώ αυξάνεται το ποσοστό αυτών που δήλωσαν 1 ή 2 κενώσεις ημερησίως

B) αυξάνονται οι υδαρείς κενώσεις στους διατηρούντες οριακά σημαντικά μετά την απώλεια βάρους

Η προσπάθεια απώλειας βάρους με την αλλαγή των διατροφικών συνηθειών και του τρόπου ζωής επηρεάζει τις γαστρεντερικές συνήθειες

Από τη μελέτη του εντερικού μικροβίοκοσμου στο υποσύνολο των εθελοντών παρατηρείται ότι:

A) οι διατηρούντες εμφανίζουν οριακά υψηλότερους πληθυσμούς ολικών αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων

B) οι διατηρούντες παρουσιάζουν διαφορετική εικόνα κοπράνων ως προς την κλίμακα Bristol σε σχέση με τους επανακτήσαντες

Η διατήρηση της απώλειας βάρους πιθανόν να επηρεάζει τον εντερικό μικροβιόκοσμο και τη σύσταση των κοπράνων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alonso V.R. & Guarner F. (2013) 'Linking the gut microbiota to human health' *British Journal of Nutrition* 109; S21–S26
2. Althani A., Marei H.E., Hamdi W.S., Nasrallah G.K., Zowalaty M.E., Khdor A.S., Asmak M.A., & Abdel-Aziz H. (2015) 'Human microbiome and its association with health and diseases' *Journal of Cellular Physiology*; DOI 10.1002/jcp.25284
3. Anastasiou A.C., Fappa E., Karfopoulou E., Gkza A., Yannakoulia M. (2015) 'Weight loss maintenance in relation to locus of control: The MedWeight study', *Behaviour Research and Therapy* 71; 40e44
4. Anastasiou C.A., Karfopoulou E., Yannakoulia M. (2015) 'Weight regaining: From statistics and behaviors to physiology and metabolism' *Metabolism* 64;1395-1407
5. Angelakis E., Armougom F., Million M., Raoult D. (2012) 'The relationship between gut microbiota and weight gain in humans' *Future Microbiol.* 7(1); 91–109
6. Antunes B.M., Monteiro P.A., Silveira L.S., Brunholi C.C., Lira F.S., Júnior I.F.F. (2015) 'Macronutrient intake is correlated with dyslipidemia and low-grade inflammation in childhood obesity but mostly in male obese' *Nutr Hosp.* 32(3):997-1003
7. Arslan N. (2014) 'Obesity, fatty liver disease and intestinal microbiota' *World J Gastroenterol* 20(44): 16452-16463
8. Avershina E., Storrø O., Øien T., Johnsen R., Pope P., Rudi K. (2013) 'Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children' *Federation of European Microbiological Societies Microbiol Ecol* 87; 280–290
9. Bäckhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A., Semenkovich C.F., Gordon J.I. (2004) 'The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage' *PNAS*; vol. 101, no. 44
10. Bäckhed F., Manchester J.K., Semenkovich C.F., Gordon J.I. (2007) 'Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice' *PNAS*; vol.104; no. 3; 979–984
11. Bakker G.J., Zhao J., Herrema, H., Nieuwdorp M. (2015) 'Gut Microbiota and Energy Expenditure in Health and Obesity' *J Clin Gastroenterol* 49:S13–S19
12. Beerens H. (1991) 'Detection of Bifidobacteria by Using Propionic Acid as a Selective Agent' *Applied and Environmental Microbiology*; p. 2418-2419

13. Beerens, H. (1990) 'An elective and selective culture medium for Bifidobacterium.' *Lett. Appl. Microbiol.* 11:155-157
14. Bjursell M., Admyre T., Göransson M., Marley A.E., Smith D.M., Oscarsson J., Bohlooly-Y M. (2011) 'Improved glucose control and reduced body fat mass in free fatty acid receptor 2-deficient mice fed a high-fat diet' *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300: E211–E220
15. Bountzioukaa V., Constantinidis T.C., Polychronopoulos E., Panagiotakos D.B. (2011) 'Short-term stability of dietary patterns defined a priori or a posterior' *Maturitas* 68 272–278
16. Bovenschen H.J., Janssen M.J.R., van Oijen M.G.H., Laheij R.J.F., van Rossum L. G.M., Jansen J.B.M.J. (2006) 'Evaluation of a Gastrointestinal Symptoms Questionnaire' *Dig Dis Sci* 51:1509–1515
17. Butel M.J. (2014) 'Probiotics, gut microbiota and health', *Médecine et maladies infectieuses* 1–8
18. Cani P.D. & Delzenne N.M. (2011) 'The gut microbiome as therapeutic target' *Pharmacology & Therapeutics* 130;202–212
19. Chakraborti C.K. (2015) 'New-found link between microbiota and obesity' *World J Gastrointest Pathophysiol* 6(4): 110-119
20. Chambers E.S., Viardot A., Psichas A., Morrison D.J., Murphy K.G., Zac-Varghese S.E.K., MacDougall K., Preston T., Tedford C., Finlayson G.S., Blundell J.E., Bell J.D., Thomas E.L., Mt-Isa S., Ashby D., Gibson G.R., Kolida S., Dhillo W.S., Bloom S.R., Morley W., Clegg S., Frost G. (2015) 'Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults' *Gut* 64:1744–1754
21. Chatelier E., Nielsen T., Qin J., Prifti E., Hildebrand F., Falony G., Almeida M., Arumugam M., Batto J-M., Kennedy S., Leonard P., Li J., Burgdorf K., Grarup N., Jørgensen T., Brandslund I., Nielsen H.B., Juncker A.S., Bertalan M. , Levenez F., Pons N., Rasmussen S., Sunagawa S., Tap J., Tims S., Zoetendal E.G., Brunak S., Cle'ment K., Dore' J., Kleerebezem M., Kristiansen K., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Willem M. de Vos, Zucker J-D., Raes J., Hansen T., Metahitconsortium, Bork P., Wang J., Ehrlich S.D., Pedersen O. (2013) 'Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers' *Vol 500; Nature*; 5 4 1
22. Clarke S.F., Murphy E.F., O'Sullivan O., Lucey A.J., Humphreys M. ,Hogan A., Hayes P., O'Reilly M., Jeffery I.B., Wood-Martin R., Kerins D.M., Quigley E., Ross R.P., O'Toole

- P.W., Molloy M.G., Falvey E. , Shanahan F., Cotter P.D. (2014) ‘Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity’ *Gut* 63:1913–1920
23. Conlon M.A. & Bird A.R. (2015) ‘The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health’ *Nutrients* 7;17-44
 24. Cotillard A., Kennedy S.P., Kong L.C., Prifti E., Pons N., Le Chatelier E., Almeida M., Quinquis B., Levenez F., Galleron N., Gougis S., Rizkalla S., Batto J-M., Renault P., MicroObes consortium, Dore J., Zucker J-D., Cle´ment K., Ehrlich S.D. (2013) ‘Dietary intervention impact on gut microbial gene richness’ *Nature* Vol 500;585
 25. Craig C, Marshall A, Sjöström M, Bauman A, Booth M, Ainsworth B. Pratt M., Ekelund U., Yngve A., Sallis J.F., Oja P. (2003) ‘International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity’ *Med Sci Sports Exerc* 35(8):1381–95
 26. Craig C.L., Marshall A.L., Sjöström M., Bauman A.E., Booth M.L., Ainsworth B.E., Pratt M., Ekelund U., Yngve A., Sallis J.F. & Oja P. (2003) ‘International Physical Activity Questionnaire:12-Country Reliability and Validity’ *Medicine & Science in Sports & Exercise* 0195-9131/03/3508-1381
 27. Cresci G.A. and Bawden E. (2015) ‘Gut Microbiome: What We Do and Don’t Know’, *Nutrition in Clinical Practice* Volume 30; Number 6
 28. Dale K.S., McAuley K.A., Taylor R.W., Williams S.M., Farmer V.L., Hansen P., Vorgers S.M., Chisholm A.W., Mann J.I. (2009) ‘Determining optimal approaches for weight maintenance: a randomized controlled trial’ *CMAJ Canadian Medical Association or its licensor* 180(10) :E39-E46
 29. Damms-Machado A., Mitra S., Schollenberger A.E., Kramer K.M., Meile T., Königsrainer A., Huson D.H. & Bischoff S.C. (2015) ‘Effects of Surgical and Dietary Weight Loss Therapy for Obesity on Gut Microbiota Composition and Nutrient Absorption’ Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International* Volume Article ID 806248
 30. David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., Ling A.V., Devlin A.S., Varma Y., Fischbach M.A., Biddinger S.B., Dutton R.J., Turnbaugh P.J. (2014) ‘Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome’ *Nature* 505(7484): 559–563
 31. De Filippis F., Pellegrini N., Vannini L., Jeffery IB, La Stora A., Laghi L., Serrazanetti D.I., Di Cagno R., Ferrocino I., Lazzi C., Turroni S., Cocolin L., Brigidi P., Neviani E., Gobetti M., O’Toole P.W., Ercolini D. (2015) ‘High-level adherence to a Mediterranean diet beneficially impacts the gut microbiota and associated metabolome’ *Gut*. pii: gutjnl-2015-309957

32. Dombrowski S. D., Knittle K., Avenell A., Araújo-Soares V., Sniehotta F.F. (2014) 'Long term maintenance of weight loss with non-surgical interventions in obese adults: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials' *BMJ* 348:g2646
33. Dominianni C., Sinha R., Goedert J.J. , Pei Z., Yang L., Hayes R.B, Ahn J. (2015) 'Sex, Body Mass Index, and Dietary Fiber Intake Influence the Human Gut Microbiome' *Plos One* Journal.pone.0124599; DOI:10.1371
34. Duncan S.H., Lobley G.E., Holtrop G., Ince J., Johnstone A.M., Louis P., Flint H.J. (2008) «Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss» *International Journal of Obesity* 32;1720–1724
35. Engen P.A., Green S.J., Voigt R.M., Forsyth C.B. and Keshavarzian A. (2015) 'Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota' *The Gastrointestinal Microbiome* Vol. 37
36. Eslick G. D. (2012) 'Gastrointestinal symptoms and obesity: a meta-analysis' 69;469 *obesity reviews* 13; 469–479
37. Eslinger A.J., Eller L.K., Reimer R.A. (2014) 'Yellow pea fiber improves glycemia and reduces *Clostridium leptum* in diet-induced obese rats' *Nutrition research* 34;714-722
38. EuroQol Group Executive Office, Available from:
(<http://www.euroqol.org/eq-5d>)
39. Ferreira C.M., Vieira A.T., Ramirez Vinolo M.A., Oliveira F.A., Curi R.,and Santos Martins F. (2014) 'The Central Role of the Gut Microbiota in Chronic Inflammatory Diseases' *Journal of Immunology Research* Volume Article ID 689492
40. Flores T.R., Nunes B.P., Assunção M.C.F., Bertoldi A.D. (2016) 'Healthy habits: what kind of guidance the elderly population is receiving from health professionals?' *Rev Bras Epidemiol* 19(1): 167-180
41. Fountoulakis K.N., Iacovides A., Karamouzis M., Kaprinis G.S. & Ierodiakonou C. (2007) 'Season of birth, clinical manifestations and Dexamethasone Suppression Test in unipolar major depression' *Annals of General Psychiatry* 6:20
42. Fountoulakis K.N., Papadopoulou M., Kleanthous S., Papadopoulou A., Bizeli V., Nimatoudis I., Iacovides A. & Kaprinis G.S. (2006) 'Reliability and psychometric properties of the Greek translation of the State-Trait Anxiety Inventory form Y: Preliminary data' *Annals of General Psychiatry* 5:2
43. Gouba N. & Drancourt M. (2015) 'Digestive tract mycobacteria: A source of infection Le mycobiotome digestif comme source d'infection' *Médecine et maladies infectieuses* 45;9–16

44. Graciani A., Garcia Esquinas E., Lopez- Garcia E., Banegas J.R., Rodriguez-Artalejo F. (2016) 'Ideal Cardiovascular Health and Risk of Frailty in Older Adults' *Circ Cardiovasc Qual Outcomes pii: CIRCOUTCOMES.115.002294*
45. Hersoug L.-G, Møller P., Loft S. (2015) 'Gut microbiota-derived lipopolysaccharide uptake and trafficking to adipose tissue: implications for inflammation and obesity' *World Obesity* doi: 10.1111/obr.12370
46. Ho K-S, You Mei Tan C., Mohd Daud M.A., Seow-Choen F. (2012) 'Stopping or reducing dietary fiber intake reduces constipation and its associated symptoms' *World J Gastroenterol* 7; 18(33): 4593-4596
47. Hoffmann C., Dollive S., Grunberg S., Chen J., Li H., Wu G.D., Lewis J.D., Bushman F.D. (2013) 'Archaea and Fungi of the Human Gut Microbiome: Correlations with Diet and Bacterial Residents' *Plos One* Volume 8; Issue 6; e66019
48. Ianiro G., Bruno G., Lopetuso L., Beghella F. B. , Laterza L., D'Aversa F., Gianti G., Cammarota G. and Gasbarrini A. (2014) 'Role of Yeasts in Healthy and Impaired Gut Microbiota: The Gut Mycome' *Current Pharmaceutical Design* 20; 000-00011381-6128/14
49. JaKa M.M., Sherwood N.E., Flatt S.W., Pacanowski C.R., Pakiz B., Thomson C.A., Rock C.L. (2015) 'Mediation of Weight Loss and Weight Loss Maintenance through Dietary Disinhibition and Restraint' *J Obes Weight Loss Ther* 5(2)
50. Jandhyala S.M., Talukdar R., Subramanyam C., Vuyyuru H., Sasikala M., Reddy D.N. (2015) 'The role of the normal gut microbiota' *World J Gastroenterol* 7; 21(29): 8787-8803
51. Jeffery I.B. and O'Toole P.W. (2013) «Diet-Microbiota Interactions and Their Implications for Healthy Living» *Nutrients* 5;234-252
52. Kadooka Y., Sato M., Imaizumi K., Ogawa A., Ikuyama K., Akai Y., Okano M., Kagoshima M., Tsuchida T. (2010) 'Regulation of abdominal adiposity by probiotics (Lactobacillus gasseri SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial' *European Journal of Clinical Nutrition* 64;636–643
53. Kajander K., Hatakka K., Pousa T., Fa` rkkila M. & Korpela R. (2005) 'A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention' *Aliment Pharmacol Ther* 22: 387–394
54. Karfopoulou E., Brikou D., Mamalaki E., Bersimis F., Anastasiou A.C., Hill O.J., Yannakoulia M. (2016) 'Dietary patterns in weight loss maintenance: results from the MedWeight study' *Eur J Nutr*; DOI 10.1007/s00394-015-1147-z

55. Karfopoulou E., Anastasiou C., Avgeraki E., Kosmidis M., Yannakoulia M. (2016) 'The role of social support in weight loss maintenance: results from the MedWeight study' *J Behav Med* DOI 10.1007/s10865-016-9717-y
56. Kasai C., Sugimoto K., Moritani I., Tanaka J., Oya Y., Inoue H., Tameda M., Shiraki K., Ito M., Takei Y., Takase K. (2015) 'Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing' *BMC Gastroenterology* 15:100
57. Lee P.H., Macfarlane D.J., Lam T.H. & Stewart S.M. (2011) 'Validity of the international physical activity questionnaire short form (IPAQ-SF): A systematic Review' *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity* 8:115
58. Lenoir L., Maillot M., Guilbot A. and Ritz P. (2015) 'Primary Care Weight Loss Maintenance with Behavioral Nutrition: An Observational Study' *Obesity* 23; 1771–1777
59. Lewis S.J. & Heaton K.W.(1997) 'Stool Form Scale as a Useful Guide to Intestinal Transit Time' *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 32:9; 920-924
60. Ley R.E. (2010) 'Obesity and the human microbiome' *Current Opinion in Gastroenterology* 26:5–11
61. MacLean P.S., Bergouignan A., Cornier M.A., and Jackman M.R. (2011) 'Biology's response to dieting: the impetus for weight regain' *American Journal of Physiology* 301(3): R581–R600
62. Madigan M.T., Martinko J.M, Parker J. (2007) «Brock- Βιολογία των Μικροοργανισμών», Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Τόμος 2
63. McFarland L.V. (2000) 'Normal □ flora: diversity and functions' *Microbial Ecology in Health and Disease* 12: 193–207
64. Mitsou K.E, Turunen K., Anapliotis P., Zisi D., Spiliotis V., Kyriacou A. (2009) 'Impact of a jelly containing short-chain fructo-oligosaccharides and Sideritis Euboea extract on human faecal microbiota' *International Journal of Food Microbiology* 135, 112–117
65. Mitsou K.E., Panopoulou N., Turunen K., Spiliotis V., Kyriacou A. (2010) 'Prebiotic potential of barley derived b-glucan at low intake levels: A randomised, double-blinded, placebo-controlled clinical study' *Food Research International* 43; 1086–1092
66. Narayan N.R., Méndez-Lagares G., Ardesir A., Lu D., Rompay K.A.V., Hartigan-O'Connor D.J. (2015) 'Persistent effects of early infant diet and associated microbiota on the juvenile immune system' *Gut Microbes* 6:4;284-289

67. Ochner C.N., Barrios D.M., Lee C.D., Pi-Sunyer F.X. (2013) 'Biological Mechanisms that Promote Weight Regain Following Weight Loss in Obese Humans' *Physiol Behav* 0: 106–113
68. Panagiotakos B.D., Pitsavos C., Arvaniti F., Stefanadis C. (2007) 'Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore' *Preventive Medicine* 44;335–340
69. Panagiotakos D.B., Pitsavos C., Arvaniti F., Stefanadis C. (2006) 'Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore' *Preventive Medicine* 44; 335–340
70. Polymeros D., Beintaris I., Gaglia A., George Karamanolis G., Papanikolaou I.S., Dimitriadis G., Triantafyllou K. (2014) 'Partially Hydrolyzed Guar Gum Accelerates Colonic Transit Time and Improves Symptoms in Adults with Chronic Constipation' *Dig Dis Sci* 59:2207–2214
71. Rahat-Rozenbloom S., Fernandes J, Gloor G.B., Wolever T.M.S. (2014) 'Evidence for Greater Production of Colonic Short Chain Fatty Acids in Overweight than Lean Humans' *Int J Obes (Lond)* 38(12): 1525–1531
72. Raoult D. (2008) 'Obesity pandemics and the modification of digestive bacterial flora' *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 27:631–634
73. Ravcheev D. & Thiele I. (2014) 'Systematic genomic analysis reveal the complementary aerobic and anaerobic respiration capacities of the human gut microbiota' *Frontiers in Microbiology* Vol 5;Article 674
74. Ravussin Y., Koren O., Spor A., LeDuc C., Gutman R. , Stombaugh J., Knight R., Ley R.E, and Leibel R.L. (2012) 'Responses of Gut Microbiota to Diet Composition and Weight Loss in Lean and Obese Mice' *Obesity* 20(4)
75. Remely M., Tesar I., Hippe B., Gnauer S., Rust P., Haslberger A.G. (2015) 'Gut microbiota composition correlates with changes in body fat content due to weight loss' *Beneficial Microbes* 6(4): 431-439
76. Reyes R.N., Oliver L.T., Klotz A.A., LaGrotte A.C., Vander Veur S.S., Virus A., Bailer A.B., Foster D.G. (2012) 'Similarities and Differences between Weight Loss Maintainers and Regainers: A Qualitative Analysis' *Journal of the academy of nutrition and dietetics* Volume 112 Number 4
77. Riiser A. (2015) 'The human microbiome, asthma, and allergy' *Clin Immunol* 11:35

78. Rodri'guez J.M., Murphy K., Stanton C., Ross R.P., Kober O.I., Juge N., Avershina E., Rudi K., Narbad A., Jenmalm M.C., Marchesi J.R. and Collado M.C. (2015) 'The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life', *Microbial Ecology in Health & Disease* 26: 26050
79. Rogosa M., Mitchell J.A., Wiseman R.F. (1951) 'A selective medium for the isolation of oral and fecal lactobacilli' *J. Bacteriol.* 62:132-3
80. Rosenbaum M., Knight R., and Leibel R.L. (2015) 'The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity' *Trends in Endocrinology and Metabolism* Vol. 26; No. 9
81. Roy D. (2001) 'Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products' *Int J Food Microbiol.* 69(3):167-82.
82. Samuel B.S., Shaito A., Motoike T., Rey F.E., Backhed F., Manchester J.K., Hammer R.E., Williams S.C., Crowley J., Yanagisawa M., Gordon G.I. (2008) 'Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41' *PNAS* vol. 105; no. 43;16767–16772
83. Sanchez M., Darimont C., Drapeau V., Emady-Azar S., Lepage M., Rezzonico E., Ngom-Bru C., Berger B., Philippe L., Ammon-Zuffrey C, Leone P., Chevrier G., St-Amand E., Marette A., Dore J., Tremblay A. (2014) 'Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women' *British Journal of Nutrition* 111;1507–1519
84. Schwiertz A., Taras D., Schäfer K., Beijer S., Bos N.A., Donus C. and Hardt P.D. (2009) 'Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects' *Obesity* 18; 190–195
85. Shen J., Obin M.S., Zhao L.(2013) 'The gut microbiota, obesity and insulin resistance' *Molecular Aspects of Medicine* 34;39–58
86. Shirreffs M., (2003) 'Markers of hydration status' *European Journal of Nutrition* 57; Suppl 2;S6–S9
87. Silvi S., Rummey C.J., Rowland I.R. (1996) 'An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces' *J. Appl Bacteriol.* 81(5):561-4.
88. Soeliman F.A. & Azadbakht L.(2014) 'Weight loss maintenance: A review on dietary related strategies' *J Res Med Sci.* 19(3): 268–275
89. Stenman L.K.,Waget A., Garret C., Klopp P., Burcelin R., Lahtinen S.(2014) 'Potential probiotic *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420 prevents weight gain and glucose intolerance in diet-induced obese mice' *Beneficial Microbes* 5(4): 437-445

90. Talley N.J., Quan C. (2004) Jones M.P., Horowitz M. 'Association of upper and lower gastrointestinal tract symptoms with body mass index in an Australian cohort' *Neurogastroenterol Motil* 16; 413–419
91. Thomas J.G., Bond D.S., Phelan S., Hill J.O., Wing R.R. (2014) 'Loss Maintenance for 10 Years in the National Weight Control Registry' *American Journal of Preventive Medicine* 46(1):17-23
92. Vaahntovu, J., Toivanen, P., Eerola, E. (2001) 'Study of murine faecal microflora by cellular fatty acid analysis; effect of age and mouse strain.' *Antonie Van Leeuwenhoek*; 80(1), 35-42
93. Van de Merwe J.P., Stegeman J.H., Hazenberg M.P. (1983) 'The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease?' *Antonie Van Leeuwenhoek*. 49(2):119-24
94. WHO (2000) Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic, Technical report 894 Geneva: World Health Organization, p256 Available from:
([http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO TRS 894/en/](http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/))
95. WHO (World Health Organization) (2015), Available from:
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>)&
http://gamapserv.who.int/gho/interactive_charts/ncd/risk_factors/overweight/atlas.html)
96. Williams M. (2010) 'Διατροφή, Υγεία, Ευρωστία & Αθλητική Απόδοση', *Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης*
97. www.gutsense.org (2016), Available from:
(https://www.gutsense.org/constipation/normal_stools.html)
98. Xu Z. & Knight R. (2015) 'Dietary effects on human gut microbiome diversity' *British Journal of Nutrition* 113; S1–S5
99. Yang T., Owen J.L., Lightfoot Y.L., Kladde M.P., Mohamadzaheh M. (2013) 'Microbiota impact on the epigenetic regulation of colorectal cancer' *Trends Mol Med*. 19(12)
100. Zuo H.-J. , Xie Z.-M., Zhang W.-W., Li Y.-R., Wang W., Ding X.-B., Pei X.-F. (2011) 'Gut bacteria alteration in obese people and its relationship with gene polymorphism' *World J Gastroenterol* 17(8): 076-1081
101. Ζαμπέλας Α. (2007) «Κλινική Διαιτολογία και Διατροφή με στοιχεία Παθολογίας» *Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης*, σελ.940- 941
102. Μεντής Α-Φ.Α., Γύπας Φ., Μεντής Α.Φ. (2013) «Ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου. Ο ρόλος του στην υγεία και στη νόσο», *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*, 30(3):272-288

103.Χασαπίδου Μ., & Τσιλιγκίρογλου- Φαχαντίδου Α., (2002) «Διατροφή για Υγεία, Άσκηση και Αθλητισμό» *University Studio Press, Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών* σελ. 194-195