



# **ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

**ΣΧΟΛΗ : Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**ΤΜΗΜΑ : Επιστήμη Διατροφής και Διαιτολογίας**

**Τίτλος Εργασίας : “Μελέτη της αντι-αιμοπεταλιακής δράσης μεταβολιτών των  
φαινολικών ενώσεων του κρασιού από τον εντερικό μικροβιόκοσμο”**

**Πτυχιακή εργασία**

**Όνομα φοιτητή**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΗ ΝΙΚΗ**

**Αθήνα, 2019**



**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

**ΣΧΟΛΗ : Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**ΤΜΗΜΑ : Επιστήμη Διατροφής και Διαιτολογίας**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ (Επιβλέπουσα)**

**Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Χαροκόπειο  
Πανεπιστήμιο, Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας**

**ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ**

**Καθηγήτρια Βιοχημείας με έμφαση στα λιποειδή, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο,  
Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας**

**ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΝΗ**

**Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο,  
Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας**

Η Αλεξανδρή Νίκη

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής αυτής μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Φραγκοπούλου θεωρώ για την καθοδήγηση και τη στήριξη που με βοήθησαν να ανταπεξέλθω και να φτάσω μέχρι εδώ, καθώς και την ομάδα του βιοχημικού εργαστηρίου που σε κάθε μου ερώτηση είχαν μια απάντηση, σε κάθε αγχωτική στιγμή με στήριξαν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου που παρ'όλο που δεν κατανοούσαν κάθε εργαστηριακό πρόβλημα προσπαθούσαν να βρουν λύση.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ στα Ελληνικά.....             | 9  |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ στα Αγγλικά.....              | 10 |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....                 | 11 |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....                 | 13 |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ -ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....  | 15 |
| ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....                        | 17 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....                          | 19 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΚΡΑΣΙ .....                | 19 |
| 1.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ .....            | 19 |
| 1.2 ΚΡΑΣΙ ΚΙ ΥΓΕΙΑ .....               | 19 |
| Κρασί και καρδιαγγειακά νοσήματα ..... | 19 |
| Κρασί και καρκίνος .....               | 22 |
| Κρασί και διαβήτης .....               | 22 |
| Κρασί κι άλλες παθήσεις .....          | 23 |
| 1.3 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ .....        | 23 |
| Εισαγωγικά .....                       | 23 |
| 1.3.1 Ρεσβερατρόλη.....                | 26 |
| Δομή .....                             | 26 |
| Απορρόφηση .....                       | 26 |
| Μεταβολισμός.....                      | 26 |
| Βιοδιαθεσιμότητα.....                  | 26 |
| 1.3.2 Κερκετίνη .....                  | 27 |
| Δομή .....                             | 27 |
| Απορρόφηση .....                       | 27 |

|                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| Μεταβολισμός .....                                                  | 27        |
| Βιοδιαθεσιμότητα.....                                               | 27        |
| 1.3.3 Γαλλικό οξύ .....                                             | 28        |
| Δομή .....                                                          | 28        |
| Απορρόφηση .....                                                    | 28        |
| Μεταβολισμός .....                                                  | 28        |
| Βιοδιαθεσιμότητα.....                                               | 28        |
| <b>1.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ .....</b>      | <b>29</b> |
| 1.4.1 Κατηγορίες δράσεων .....                                      | 29        |
| 1.4.2 Δράσεις Ρεσβερατρώλης .....                                   | 31        |
| 1.4.3 Δράσεις Κερκετίνης.....                                       | 33        |
| 1.4.3 Δράσεις Γαλλικού οξέος.....                                   | 36        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ.....</b>                    | <b>37</b> |
| <b>2.1 Τι είναι ο εντερικός μικροβιόκοσμος.....</b>                 | <b>37</b> |
| Λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου .....                       | 37        |
| Μεταβολές με την πάροδο της ηλικίας.....                            | 37        |
| <b>2.2 Αλληλεπίδραση με μακρο-συστατικά της τροφής .....</b>        | <b>39</b> |
| 2.2.1 Υδατάνθρακες.....                                             | 39        |
| 2.2.2 Πρωτεΐνες .....                                               | 40        |
| 2.2.3 Λιπίδια .....                                                 | 41        |
| <b>2.3 Εντερικός μικροβιόκοσμος και καρδιαγγειακά νοσήματα.....</b> | <b>41</b> |
| Αθηροσκλήρωση.....                                                  | 42        |
| Υπέρταση .....                                                      | 43        |
| Καρδιακή ανεπάρκεια.....                                            | 44        |
| <b>2.4.Μικροβιόκοσμος και παχυσαρκία .....</b>                      | <b>44</b> |
| Συσχέτιση εντερικού μικροβιόκοσμου με το σωματικό βάρος .....       | 44        |

|                                                                                                           |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.5.Αντιμετώπιση-Πρόληψη CVD και Παχυσαρκίας .....</b>                                                 | <b>45</b> |
| Διαιτητικές ίνες.....                                                                                     | 45        |
| Πρεβιοτικά.....                                                                                           | 46        |
| Προβιοτικά .....                                                                                          | 46        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΥ.....</b>                  | <b>47</b> |
| <b>3.1 Μεταβολισμός φαινολικών συστατικών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο .....</b>                        | <b>47</b> |
| 3.1.1 Μεταβολισμός ολικών φαινολικών συστατικών του κρασιού από την εντερική μικροχλωρίδα.....            | 49        |
| Μεταβολισμός ρεσβερατρώλης .....                                                                          | 49        |
| Μεταβολισμός κερκετίνης .....                                                                             | 50        |
| Μεταβολισμός γαλλικού οξέος .....                                                                         | 51        |
| <b>3.2 Βιολογική δράση των μεταβολιτών των φαινολικών συστατικών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο .....</b> | <b>51</b> |
| 3.2.1 Επίδραση των φαινολικών στην μικροχλωρίδα .....                                                     | 53        |
| 3.2.2 Επίδραση των φαινολικών στο καρδιαγγειακό σύστημα .....                                             | 53        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ .....</b>                                                                           | <b>55</b> |
| <b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>                                                                             | <b>56</b> |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ .....</b>                                                                      | <b>56</b> |
| <b>5.1 Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων .....</b>                                                       | <b>56</b> |
| 5.1.1 In vitro επώαση κοπράνων.....                                                                       | 56        |
| 5.1.2 In vitro ζύμωση σε στατικές καλλιέργειες (Static batch culture fermentations).....                  | 57        |
| <b>5.2 ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ BLIGH-DYER .....</b>                                            | <b>58</b> |
| Αρχή μεθόδου .....                                                                                        | 58        |

|                                                                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Αναλυτική πορεία.....                                                                                            | 58        |
| <b>5.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....</b>                                             | <b>59</b> |
| 5.3.1 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του δείγματος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu.....                 | 59        |
| 5.3.2 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του δείγματος να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (DPPH).....         | 60        |
| <b>5.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙ-ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ PRP(PLATELET-RICH-PLASMA) .....</b> | <b>56</b> |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....</b>                                                                            | <b>62</b> |
| <b>6.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.</b>                                  | <b>62</b> |
| <b>6.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕ ΤΟ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ FOLIN-CIOCALTEU .....</b>           | <b>65</b> |
| <b>6.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΝΑ ΔΕΣΜΕΥΟΥΝ ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ (DPPH) .....</b>   | <b>75</b> |
| <b>6.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΝΑ ΑΝΑΣΤΕΛΕΙ ΤΗ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ(PRP) .....</b>         | <b>83</b> |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>                                                                                | <b>86</b> |
| <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>                                                                                        | <b>90</b> |



## Περίληψη στα Ελληνικά

Ποικίλες έρευνες υποστηρίζουν ότι η μέτρια κατανάλωση κρασιού συσχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Η δράση αυτή θεωρείται ότι οφείλεται στα μικρο-συστατικά του τα οποία εμφανίζουν αντι-οξειδωτικές, αντι-θρομβωτικές και αντι-φλεγμονώδεις δράσεις. Τα φαινολικά συστατικά του κρασιού έχουν μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό, όπως είναι η ρεσβερατρόλη, η κερκετίνη και το γαλλικό οξύ. Έρευνες έχουν μελετήσει τη συσχέτιση των φαινολικών συστατικών με τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Τα βακτήρια του εντέρου είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τη ζωή, την ανάπτυξη και την ομαλή λειτουργία του οργανισμού, που συμμετέχει ενεργά στον μεταβολισμό πολλών ουσιών συμπεριλαμβανομένων και των φαινολικών συστατικών. Οι φαινολικές ουσίες του κρασιού αλλάζουν τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου και με τη ζύμωσή τους παράγονται μεταβολίτες που συμμετέχουν στην μείωση των παραγόντων κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα και της παχυσαρκίας. Σκοπός της μελέτης είναι η ανίχνευση της αντι-οξειδωτικής και αντι-αιμοπεταλιακής δράσης των μεταβολιτών των μικρο-συστατικών του κρασιού από τα βακτήρια του εντέρου. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα κοπράνων 6 εθελοντών, από τους οποίους οι μισοί ήταν φυσιολογικού βάρους, ενώ οι υπόλοιποι ήταν παχύσαρκοι. Πραγματοποιήθηκε *in vitro* ζύμωση των εκχυλισμάτων του κρασιού και των επιμέρους φαινολικών ενώσεων, ενώ δείγματα παραλήφθηκαν στις 0h, 6h και 24h. Έγινε παραλαβή των υδατικών και λιποειδικών συστατικών με τη μέθοδο Bligh -Dyer και προσδιορίστηκαν τα ολικά φαινολικά, η ικανότητα τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (DPPH). Τέλος μελετήθηκε η ικανότητά τους να αναστέλλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικά ποσοστά αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων που ήταν εμπλουτισμένα με τα συστατικά του κρασιού έναντι του δείγματος ελέγχου.

**Λέξεις κλειδιά:** φαινολικά συστατικά, εντερικός μικροβιόκοσμος, μεταβολισμός φαινολικών συστατικών, αντι-οξειδωτική ικανότητα

## Abstract ή Περίληψη στα Αγγλικά

Various studies suggest that moderate consumption of wine is associated with a reduced risk of cardiovascular disease. This action was thought to be due to its micro-components that exhibit anti-oxidative, anti-thrombotic and anti-inflammatory effects. The phenolic compounds of wine have been studied extensively among them are resveratrol, quercetin and gallic acid. Further research has revealed the correlation of these phenolic substances with the intestinal microbiota. Gut bacteria are an important factor for the host homeostasis and they are, actively involved in the metabolism of many substances including phenolic compounds. Wine phenolics are not digested, end up in the colon where they are transformed and fermented by the gut microbiota. The microbial metabolites of phenolic compounds may be involved in the reduction of cardiovascular risk and obesity. The purpose of the study is to detect the anti-oxidative and anti-platelet activity of the fermentation products of wine extracts with the fecal microbiota. Fecal samples from 6 volunteers were used, three of them had normal BMI and three were obese phenotype. *In vitro* fermentation of the wine extracts and individual phenolic compounds was performed and samples were obtained for 0h, 6h and 24h. The aqueous and lipid compounds were obtained by the Bligh-Dyer method and determination of total phenolics, as well as their ability to bind free radicals (DPPH) was evaluated. Finally, their ability to inhibit platelet aggregation was studied. The results showed significant antioxidant capacity of the samples enriched with the wine components versus the control sample.

**Key words:** phenolic compounds, gut microbiota, anti-oxidant activity, platelet aggregation

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

**Εικόνα 1:** Το μοντέλο που φανερώνει τη σχέση μεταξύ κατανάλωσης κρασιού και της προστατευτικής δράσης έναντι την ανάπτυξη καρδιαγγειακού κινδύνου. **Σελ 21**

**Εικόνα 2:** Αποτελέσματα σχέσης μεταξύ κατανάλωσης κρασιού ή μπύρας με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. **Σελ.22**

**Εικόνα 3:** Πίνακας με τις κύριες ομάδες φαινολικών ουσιών και τα παράγωγά τους. **Σελ.24**

**Εικόνα 4:** Πίνακας με τις τιμές των φαινολικών συστατικών σε κόκκινο και λευκό κρασί. **Σελ.25**

**Εικόνα 5:** Σύνδεση αντι-οξειδωτικών δράσεων φαινολικών συστατικών με αντι-φλεγμονώδεις δράσεις αυτών. **Σελ. 30**

**Εικόνα 6:** Βιολογικές δράσεις της ρεσβερατρόλης. **Σελ.31**

**Εικόνα 7:** Σχέση μεταξύ της ζωής των κυττάρων (viability %) με τη συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (υπεροξείδιο του υδρογόνου). **Σελ.32**

**Εικόνα 8:** Πίνακας επίδρασης της ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση αιμοπεταλίων. **Σελ.33**

**Εικόνα 9:** Επίδραση στην ποσότητα οξειδωμένης LDL, έπειτα από κατανάλωση χυμό σταφυλιού πλούσιο σε κερκετίνη. **Σελ.35**

**Εικόνα 10:** Αλλαγές στη συσσώρευση αιμοπεταλίων με την προσθήκη 150mg κερκετίνης στα δείγματα. **Σελ.35**

**Εικόνα 11:** Αλλαγές στη συσσώρευση αιμοπεταλίων με την προσθήκη 300mg κερκετίνης στα δείγματα. **Σελ.36**

**Εικόνα 12:** Ο κύκλος ζωής του εντερικού μικροβιόκοσμου με την πάροδο της ηλικίας. **Σελ.38**

**Εικόνα 13:** Η επίδραση των διαιτητικών ινών της δίαιτας στον εντερικό μικροβιόκοσμο. **Σελ.40**

**Εικόνα 14:** Πίνακας με τις αλλαγές στον εντερικό μικροβιόκοσμο και των ουσιών που παράγονται κατά τους κύριους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα. **Σελ.41**

**Εικόνα 15:** Οι μηχανισμοί που φανερώνουν τη σχέση μεταξύ εντερικού μικροβιόκοσμου με τα καρδιαγγειακά νοσήματα. **Σελ.42**

**Εικόνα 16:** Επίδραση προ- και πρεβιοτικών και διαιτητικών ινών στον εντερικό μικροβιόκοσμο. **Σελ.45**

**Εικόνα 17:** Οι αλλαγές που υπόκεινται τα φαινολικά συστατικά όταν μεταβολίζονται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο. **Σελ.47**

**Εικόνα 18:** Τα βακτήρια του εντέρου που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των φαινολικών συστατικά. **Σελ.48**

**Εικόνα 19:** Μεταβολισμός ρεσβερατρώλης από τον εντερικό μικροβιόκοσμο. **Σελ.49**

**Εικόνα 20:** Ο μεταβολισμός της κερκετίνης από τον εντερικό μικροβιόκοσμο. **Σελ.50**

**Εικόνα 21:** Μεταβολισμός του γαλλικού οξέος. **Σελ.51**

**Εικόνα 22:** Αλλαγές στον πληθυσμό των βακτηρίων του εντέρου από τη δράση της ρεσβερατρώλης και των μεταβολιτών της. **Σελ.53**

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

**Πίνακας 1a:** Μάζα (mg) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης. **Σελ.62**

**Πίνακας 1b:** Μάζα (mg) των δειγμάτων της υδατικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης. **Σελ.63**

**Πίνακας 2a:** Συγκέντρωση (mg/mL) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης. **Σελ.64**

**Πίνακας 2b:** Συγκέντρωση (mg/mL) των δειγμάτων της υδατικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης. **Σελ.64**

**Πίνακας 3a:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης. **Σελ.66**

**Πίνακας 3b:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) των δειγμάτων της υδατικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης. **Σελ.68**

**Πίνακας 4a:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης στους νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές. **Σελ.70**

**Πίνακας 4b:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) των δειγμάτων της υδατικής φάσης στους νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές. **Σελ.71**

**Πίνακας 5a:** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (mg/mL GA) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης. **Σελ.73**

**Πίνακας 5b:** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (mg/mL GA) των δειγμάτων της υδατικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης. **Σελ.75**

**Πίνακας 6a:** Συνολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης. **Σελ.76**

**Πίνακας 6b:** Συνολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) των δειγμάτων της υδατικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης. **Σελ.78**

**Πίνακας 7a:** Συνολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης σε συνάρτηση με το BMI των εθελοντών. **Σελ.81**

**Πίνακας 7b:** Συνολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) των δειγμάτων της υδατικής φάσης σε συνάρτηση με το BMI των εθελοντών. **Σελ.82**

**Πίνακας 8a:** Συνολικό ποσοστό αναστολής με προσθήκη ADP (4μL) ως συσσωρευτικό παράγοντα στους 3 χρόνους επώασης. **Σελ.84**

**Πίνακας 8b:** Συνολικό ποσοστό αναστολής με προσθήκη PAF (4μL) ως συσσωρευτικό παράγοντα στους 3 χρόνους επώασης. **Σελ.84**

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ-ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

**Διάγραμμα 1a:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) κάθε δείγματος στις 0 ώρες επώασης χλωροφορμική φάση. **Σελ.67**

**Διάγραμμα 1b:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) κάθε δείγματος στις 6 ώρες επώασης χλωροφορμική φάση. **Σελ.67**

**Διάγραμμα 1c:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) κάθε δείγματος στις 24 ώρες επώασης στη χλωροφορμική φάση. **Σελ.68**

**Διάγραμμα 2a:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) κάθε δείγματος στις 0 ώρες επώασης στην υδατική φάση. **Σελ.69**

**Διάγραμμα 2b:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) κάθε δείγματος στις 6 ώρες επώασης στην υδατική φάση. **Σελ.69**

**Διάγραμμα 2c:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) κάθε δείγματος στις 24 ώρες επώασης στην υδατική φάση. **Σελ.70**

**Διαγράμμα 3a:** Ολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) κάθε δείγματος στις 0 ώρες επώασης χλωροφορμική φάση. **Σελ.77**

**Διαγράμμα 3b:** Ολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) κάθε δείγματος στις 6 ώρες επώασης χλωροφορμική φάση. **Σελ.77**

**Διαγράμμα 3c:** Ολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) κάθε δείγματος στις 24 ώρες επώασης χλωροφορμική φάση. **Σελ.78**

**Διαγράμμα 4a:** Ολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) κάθε δείγματος στις 0 ώρες επώασης στην υδατική φάση. **Σελ.79**

**Διαγράμμα 4b:** Ολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) κάθε δείγματος στις 6 ώρες επώασης στην υδατική φάση. **Σελ.80**

**Διαγράμμα 4c:** Ολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) κάθε δείγματος στις 24 ώρες επώασης στην υδατική φάση. **Σελ.80**

**Σχήμα 1:** Σύγκριση συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών μεταξύ δείγματος ελέγχου και δείγματος με λιποδιαλυτά συστατικά του κρασιού στις 0 ώρες επώασης. **Σελ.74**

**Σχήμα 2:** Σύγκριση συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών μεταξύ του δείγματος με την ινουλίνη και του δείγματος με τα υδατοδιαλυτά συστατικά του κρασιού στις 0 ώρες επώασης. **Σελ.74**

**Σχήμα 3:** Σύγκριση δείγματος ελέγχου με το δείγμα με τα λιποδιαλυτά συστατικά του κρασιού στο % δέσμευσης DPPH στις 0 ώρες επώασης. **Σελ.79**



## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

|                 |                                                                 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>ADP</b>      | Adenosine diphosphate                                           |
| <b>ATP</b>      | Adenosine triphosphate                                          |
| <b>BSA</b>      | Bovine serum albumin                                            |
| <b>CRP</b>      | C-reactive protein                                              |
| <b>CVD</b>      | Cardiovascular disease                                          |
| <b>DNA</b>      | Deoxyribonucleic acid                                           |
| <b>DPPH</b>     | 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl                                   |
| <b>FAO</b>      | Food and Agriculture Organization                               |
| <b>GPx</b>      | glutathione peroxidase                                          |
| <b>H.pylori</b> | Helicobacter pylori                                             |
| <b>H2O2</b>     | Hydrogen peroxide                                               |
| <b>HDL</b>      | High-density lipoprotein                                        |
| <b>IL-8</b>     | Interleukin 8                                                   |
| <b>LDL</b>      | Low-density lipoprotein                                         |
| <b>LV</b>       | left ventricular                                                |
| <b>MACE</b>     | major adverse cardiac events                                    |
| <b>NK-κβ</b>    | nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells |
| <b>PAF</b>      | Platelet-activating factor                                      |
| <b>PBS</b>      | Phosphate-buffered saline                                       |
| <b>PCR</b>      | Polymerase chain reaction                                       |
| <b>PRP</b>      | Platelet-rich-plasma                                            |
| <b>rDNA</b>     | Ribosomal DNA                                                   |
| <b>ROS</b>      | Reactive oxygen species                                         |
| <b>SCFA</b>     | Short-chain fatty acids                                         |
| <b>SOD</b>      | Superoxide dismutase                                            |
| <b>TL</b>       | Total lipids                                                    |
| <b>TMA</b>      | Thrombotic microangiopathy                                      |

|              |                           |
|--------------|---------------------------|
| <b>TMAO</b>  | Trimethylamine-N-oxide    |
| <b>TNF-a</b> | Tumor necrosis factor     |
| <b>W</b>     | Water                     |
| <b>WHO</b>   | World Health Organization |

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> : Κρασί

### 1.1 Ιστορική αναδρομή

Το κρασί, από αρχαιολογικά κι αρχαιοβοτανολογικά δεδομένα, φαίνεται να προέρχεται από την περιοχή του κράτους της σημερινής Γεωργίας από το 6000-5800π.Χ.. Τις εποχές της Ελληνικής και Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας η διατροφή του ανθρώπου απαρτιζόταν κυρίως από το σιτάρι, το ελαιόλαδο και το κρασί. Το τελευταίο έφερε υψίστης σημασίας κι ήταν το κύριο μέσω για να νιώσουν ο άνθρωποι 'πιο κοντά στο Θεό' κατά την διάρκεια πολλών τελετών. Ο Ιπποκράτης συνταγογραφούσε σε πολλές παθήσεις κρασί, το οποίο θεωρούταν γιατρεία για πολλές ψυχολογικές και σωματικές παθήσεις. Δεν είναι λίγες οι αναφορές σε θρησκευτικά βιβλία, όπου το κρασί θεωρείτο ως ένα ποτό που 'ανεβάζει τη διάθεση κι αναζωογονεί' (Janice M. Blevinset al., 1997).

Η Ευρώπη κατέχει μια υψηλή θέση στην παραγωγή του κρασιού με τις Ιταλία, Ισπανία και Γαλλία να φθάνουν του 4000τόνους κρασιού το χρόνο (FAO,2014). Όσο αφορά την κατανάλωση, η Γαλλία κατέχει πρώτη θέση με μια μέση κατανάλωση κοντά στα 8 λίτρα (WHO, 2014). Άλλες έρευνες έχουν δείξει πως στη Γαλλία κάθε άτομο καταναλώνει 2-3 ποτήρια κρασί καθημερινά (Brownlee, 2006). Στατιστικά, το κρασί έρχεται δεύτερο στα ροφήματα που καταναλώνονται παγκοσμίως με πρώτο το γάλα (Janice M. Blevinset al., 1997).

### 1.2. Κρασί κι υγεία

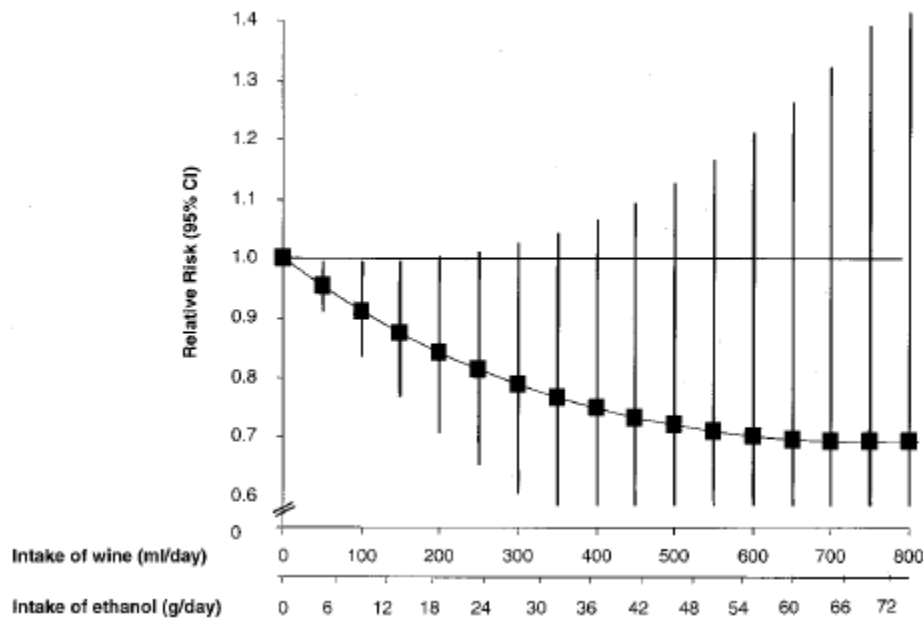
#### Κρασί και Καρδιαγγειακά νοσήματα

Το 1992 οι Renaud και de Lorgeril διεξήγαγαν μια επιδημιολογική μελέτη στον γαλλικό πληθυσμό κι ανακάλυψαν πως η μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού προλάμβανε στην ανάπτυξη καρδιαγγειακών επεισοδίων. Το 'Γαλλικό παράδοξο' προέκυψε από έρευνα το 1993 από τον Holmgren, ο οποίος σύγκρινε το ποσοστό ανάπτυξης καρδιαγγειακού επεισοδίου σε Αμερικανούς και Γάλλους. Φάνηκε πως οι Γάλλοι με με αυξημένο ποσοστό κατανάλωσης τροφών πλούσιες σε κορεσμένο λίπος, με λιγότερη άσκηση και με κάπνισμα στην

καθημερινότητά τους κατείχαν μικρότερο αριθμό εμφραγμάτων, συγκριτικά με Αμερικάνους με ποιοτικότερο τρόπο ζωής. Τελικά, όταν υπολογίστηκε και η κατανάλωση κρασιού, το 'παράδοξο' άρχισε να εξασθενεί καταφέροντας να γίνει πηγή συζητήσεων στην επιστημονική κοινότητα, ωθώντας στη διεξαγωγή πολλών ερευνών σχετικά με τις ιδιότητες του κρασιού και των υποπροϊόντων του.

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα κατατάσσονται στην πρώτη θέση στις αιτίες θανάτου για τους άνδρες και τις γυναίκες των Ηνωμένων Πολιτειών, παρόλο που οι τρόποι πρόληψης κι αντιμετώπισης αυτών είναι ευρέως γνωστοί (Centers for Disease Control and Prevention, 2014). Το 'Γαλλικό παράδοξο' φανέρωσε τις ιδιότητες του κόκκινου κρασιού στην προστασία έναντι του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Από έρευνες σε Βρετανούς ιατρούς από το πανεπιστήμιο της Οξφόρδης, φαίνεται πως η μέτρια κατανάλωση κρασιού είναι πιο ευεργετική από την καθόλου κατανάλωση, με ποσοστό θανάτων από καρδιαγγειακά επεισόδια και καρκίνο στατιστικά σημαντικά μικρότερη (Doll et al., 1994). Συγκεκριμένα, 1-2 ποτήρια κρασί την ημέρα πλεονεκτούσαν έναντι των 3-5 την ημέρα, σύμφωνα με 12-ετή έρευνα του Επιδημιολογικού Κέντρου της Δανίας το 1995. Οι μελέτες δεν σταματούν εκεί. Νεότερα δεδομένα ενισχύουν την μέτρια κατανάλωση κόκκινου κρασιού τονίζοντας πως ο κίνδυνος για θάνατο από καρδιαγγειακά νοσήματα μειώνεται δραστικά κατά 30-50% (Catanesi, 2013). Τα επιστημονικά αυτά ευρήματα αφορούν μόνο την κατανάλωση του κρασιού κι όχι άλλα αλκοολούχα ποτά. Η αιθανόλη παρουσιάζει ευεργετική επίδραση στην υγεία, ωστόσο το κρασί περιέχει μια πληθώρα άλλων ενώσεων που μειώνουν τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Μεγάλη έμφαση έχει δοθεί στις πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή που βρίσκονται στο κρασί και στις ισχυρές αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες. Αρχικά, εμποδίζουν την οξείδωση της LDL χοληστερόλης, η οποία είναι ευαίσθητη από υπεροξειδία κι άλλους αγωνιστές που κυκλοφορούν στο αίμα (Brennan, 1995). Αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στα αγγεία με το να τα κάνουν πιο εύπλαστα και λιγότερο κολλώδη λειτουργώντας σαν την ασπιρίνη (Renaud and de Lorgeril, 1992, Wilcoxon, 1994). Ακόμη, έχουν την ικανότητα να χαλαρώνουν τα λεία κύτταρα των τοιχωμάτων των αγγείων διευκολύνοντας, με αυτόν τον τρόπο, την μεταφορά του αίματος στα αγγεία (Fitzpatrick et al, 1995).

Ένα μεγάλο εύρος μελετών ακολούθησε μελετώντας την επίδραση του κρασιού στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Δύο μεγάλες ερευνητικές, των D Castelnuovo A et al το 2002 και των Costanzo S et al το 2011 απέδειξαν τη διαγραμματική σχέση J-σχήματος που παρουσιάζει η χαμηλή προς μέτρια κατανάλωση κρασιού στην ανάπτυξη καρδιαγγειακού κινδύνου.



**Εικόνα 1:** Το μοντέλο που φανερώνει τη σχέση μεταξύ κατανάλωσης κρασιού και της προστατευτικής δράσης έναντι την ανάπτυξη καρδιαγγειακού κινδύνου.

Οι πρώτοι, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 1**, έπειτα από συλλογή δεδομένων από προοπτικές μελέτες κατέληξαν πως το ποσοστό ανάπτυξης μειώνεται στο μισό με την κατανάλωση μέτριας ποσότητας κρασιού ή ενός άλλου αλκοολούχου ποτού. Ακόμη, παρατήρησαν πως σε μελέτες που περιλαμβάνονταν μόνο άντρες δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική μείωση του κινδύνου, σε αντίθεση με αυτές που στο δείγμα ανήκαν και γυναίκες, όπου το ποσοστό προστασίας τριπλασιαζόταν. Πολλές θεωρίες εξηγούσαν το φαινόμενο αυτό, όπως η πιθανότητα ο γυναικείος οργανισμός να απορροφά μεγαλύτερο ποσοστό των ευεργετικών συστατικών του κρασιού, χωρίς όμως να έχουν αποδειχθεί ερευνητικά.

Οι δεύτεροι σύγκριναν τα δύο επικρατέστερα σε κατανάλωση αλκοολούχα ποτά, το κρασί και την μπύρα ως προς το βαθμό που προλαμβάνουν από την ανάπτυξη καρδιαγγειακού νοσήματος, μέσα από προοπτικές μελέτες.

|                                                                                                    | No of curves | Maximal protection |        |       | Reversion point<br>g/day | Parameters of the best fitted model $\text{Log}(\text{RR}) = \beta_1\sqrt{x} + \beta_2\sqrt{x}\log(x)$ |      |       |           |      |      |                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------|--------|-------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-------|-----------|------|------|---------------------|
|                                                                                                    |              | %                  | 95% CI | g/day |                          | $\beta_1$                                                                                              | SE   | P     | $\beta_2$ | SE   | P    | P for heterogeneity |
| Wine consumption                                                                                   | 12           | 32                 | 18–44  | 25    | 70                       | −0.19                                                                                                  | 0.07 | 0.003 | 0.04      | 0.02 | 0.03 | <0.001              |
| Beer consumption                                                                                   | 12           | 33                 | 13–48  | 25    | 43                       | −0.17                                                                                                  | 0.10 | 0.04  | 0.03      | 0.03 | 0.2  | <0.001              |
| <i>Adjusted studies for different types of alcohol beverages or total amount of alcohol intake</i> |              |                    |        |       |                          |                                                                                                        |      |       |           |      |      |                     |
| Wine consumption                                                                                   | 7            |                    |        |       |                          | −0.22                                                                                                  | 0.15 | 0.06  | 0.05      | 0.05 | 0.2  | <0.001              |
| Beer consumption                                                                                   | 7            |                    |        |       |                          | −0.16                                                                                                  | 0.16 | 0.16  | 0.02      | 0.05 | 0.3  | <0.001              |

CI confidence interval, RR relative risk

**Εικόνα 2:** Αποτελέσματα σχέσης μεταξύ κατανάλωσης κρασιού ή μπύρας με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο.

Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2**, παρατήρησαν πως οι ουσίες που βρίσκονται στα αλκοολούχα ποτά μειώνουν τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, με το κρασί να φέρει τα ίδια ποσοστά με την μπύρα σε μικρότερη ποσότητα, καθιστώντας το πιο πλούσιο σε προστατευτικές ουσίες.

### Κρασί και καρκίνος

Πολλές έρευνες είναι εστιασμένες στην θετική συσχέτιση της κατανάλωσης αλκοόλ και της ανάπτυξης κάποιων τύπων καρκίνου. Σε έρευνα από τους Longnecker et al (1995), η κατανάλωση μπύρας κι άλλων ποτών σχετίστηκαν με τον καρκίνο του μαστού, αλλά το κρασί όχι. Έπειτα από συγκρίσεις με όλους τους παράγοντες θνησιμότητας, φαίνεται πως το κρασί μειώνει τον κίνδυνο. Και σε αυτήν την περίπτωση, τα φλαβονοειδή και οι πολυφαινόλες του κρασιού προσφέρουν αυτές τις ευεργετικές ιδιότητες προλαμβάνοντας την επέκταση παθήσεων όπως ο καρκίνος (Macfarlane et al., 1995).

### Κρασί και διαβήτης

Μία ακόμα ιδιότητα του κρασιού είναι και η ρύθμιση του σακχαρώδους διαβήτη. Μελέτες έδειξαν πως τα μη αλκοολούχα συστατικά του κρασιού χαρακτηρίζονται από υπογλυκαιμικές κι υπολιπιδαιμικές ιδιότητες, οδηγώντας στην μείωση του σωματικού βάρους, της πολυφαγίας και της πολυδιψίας. Επιπλέον η ευαισθησία στην ινσουλίνη από τα ηπατοκύτταρα και τα μυϊκά κύτταρα είχε αυξηθεί με την κατανάλωση κρασιού (Su et al., 2006).

## **Κρασί κι άλλες παθήσεις**

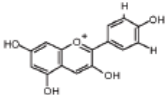
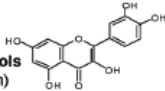
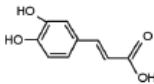
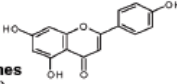
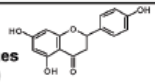
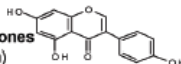
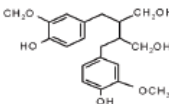
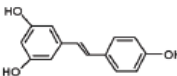
Το κόκκινο κρασί, ειδικά, φαίνεται να είναι αποτελεσματικό στη προστασία έναντι του βακτηρίου *Helicobacter pylori* (Fugelsang and Muller, 1996), ενεργοποιώντας μια αλυσιδωτή αντίδραση από την ανάπτυξη των άλλων βακτηρίων που ζουν στον εντερικό μικροβιόκοσμο, εμποδίζοντας την ανάπτυξη του *H.pylori* (Wiesse et al. 1995).

Εν ολίγοις, το κρασί συνεισφέρει στην πρόληψη ποικίλων παθήσεων. Όμως ποια συστατικά είναι αυτά που ευθύνονται τελικά για τις ιδιότητες αυτές;

## **1.3.Συστατικά του κρασιού**

### **Εισαγωγικά**

Το κρασί προέρχεται από τη ζύμωση των σταφυλιών, τα οποία φέρουν μια σειρά από φαινολικές ενώσεις που επηρεάζουν το χρώμα και τη γεύση του κρασιού. Τα συστατικά αυτά χωρίζονται στα флаβονοειδή, με κυρίαρχες ενώσεις τις ανθοκυανίνες, τις флаβονόλες και τις ταννίνες και στα μη-φλαβονοειδή με κύριους εκπροσώπους τη ρεσβερατρόλη και φαινολικά οξέα (Pierre-Louis Teissedre, Nikolas Laundrult, 2000).

| Flavonoids                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Polyphenols                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Non- Flavonoids |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
|  <p><b>1. Anthocyanins (Pelargonidin)</b></p> <p>e.g. cyanidin, pelargonidin, peonidin, delphinidin, malvidin<br/> <b>Source:</b> red, blue and purple berries, red and purple grapes, red wine, cherry, rhubarb</p>                                                    | <p><b>A) Hydrobenzoic acids:</b> protocatechuic acid, gallic acid, p-hydroxybenzoic acid<br/> <b>Source:</b> blackberry, raspberry, strawberry, black current</p> <p><b>B) Hydroxycinnamic acids:</b> caffeic acid, chlorogenic acid, coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid<br/> <b>Source:</b> blueberry, kiwi, cherry, plum, apple, pear, peach, chicory, artichoke, potato, coffee</p> |                 |
|  <p><b>2. Flavonols (Quercetin)</b></p> <p>e.g. quercetin, kaempferol, myricetin<br/> <b>Source:</b> red cabbage, yellow onion, curly pale, cherry, tomato, broccoli, blueberry, apricot, apple, Black grape, green and black tea</p>                                   |  <p><b>Phenolic acids (caffeic acid)</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                               |                 |
|  <p><b>3. Flavones (apigenin)</b></p> <p>e.g. apigenin, luteolin<br/> <b>Source:</b> parsley, celery, thyme, hot pepper</p>                                                                                                                                             | <p>e.g. hesperitin, naringenin, eriocictyol<br/> <b>Source:</b> Citrus fruits and juices e.g. grapes and oranges</p>                                                                                                                                                                                                                                                                          |                 |
|  <p><b>4. Flavanones (Naringenin)</b></p> <p>e.g. daidzein, genistein, glycitein<br/> <b>Source:</b> Soybeans, soy foods, legumes</p>                                                                                                                                   | <p>e.g. secosolaricresinol, matairesinol<br/> <b>Source:</b> linseed, lentils, garlic, asparagus, carrots, pears, prunes</p>                                                                                                                                                                                                                                                                  |                 |
|  <p><b>5. Isoflavones (Genistein)</b></p>                                                                                                                                                                                                                               | <p><b>Lignans (Secosolaricresinol)</b></p>                                                                                                                                                                                                                                                                 |                 |
| <p><b>6A. Monomeric and polymeric flavonols (epicatechin)</b></p> <p><b>monomeric (catechins)</b> e.g. catechin, epicatechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate<br/> <b>Source:</b> green and black tea, chocolates, grapes, berries, apples<br/> <b>Dimers and polymers:</b> e.g. theaflavins, thearubigins<br/> <b>Source:</b> black teas</p> | <p>e.g. resveratrol<br/> <b>Source:</b> grapes, pomegranate, groundnut</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                 |
|  <p><b>Stilbenes (resveratrol)</b></p>                                                                                                                                                                                                                                | <p><b>6B. Proanthocyanidins</b></p> <p><b>Source:</b> chocolate, apples, berries, red grapes, Red wine</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                 |

**Εικόνα 3:** Πίνακας με τις κύριες ομάδες φαινολικών ενώσεων και τα παράγωγά τους (Singh M. et.al., 2008).

Οι πρώτες είναι αυτές που ευθύνονται για το χρώμα, το pH, την πικρή γεύση, ενώ και οι δύο κατηγορίες παρουσιάζουν αντικαρκινικές, αντιοξειδωτικές ικανότητες.

Η βιοδιαθεσιμότητα και ο μεταβολισμός των φαινολικών ουσιών είναι αρκετά σύνθετος, διότι η κάθε ουσία ακολουθεί διαφορετικό μηχανισμό. Οι περισσότερες φαινολικές ενώσεις απορροφώνται, κατά ένα ποσοστό από το λεπτό έντερο και μεταβολίζονται πλήρως (Singh M., et.al., J Ag Food Chem., 2008). Ο τρόπος απορρόφησή τους κατέχει σημαντικό ρόλο στην ανάλυσή τους στον οργανισμό. Μελέτες έχουν δείξει πως, κατά την απορρόφηση, υπόκεινται σε αντιδράσεις γλυκοζυλίωσης, μεθυλίωσης, γλυκουρονιδίωσης, θείωσης ή ακετυλίωσης, ενώ άλλες συνδέονται σε λιπίδια ή άλλα οργανικά μόρια (Fragoroulou E. et.al., 2009).

Το κόκκινο κρασί, γενικότερα, φέρει υψηλότερα επίπεδα φαινολικών συστατικών από το λευκό. Στην **Εικόνα 4** φαίνεται η διαφορά των τιμών των φαινολικών συστατικών στα δύο αυτά είδη κρασιού. Η αιτία είναι η διαφορετική επεξεργασία και ποικιλία των σταφυλιών κατά την παραγωγή του δύο ειδών κρασιού. Το λευκό κρασί προκύπτει από το χυμό των σταφυλιών έπειτα από ζύμωση, ενώ το κόκκινο κρασί από το χυμό, και τα τοιχώματα των



σκούρων σταφυλιών. Τα περισσότερα είδη φαινολικών συστατικών βρίσκονται στο στέρεο κομμάτι των σταφυλιών, με αποτέλεσμα τα λευκά κρασιά να υστερούν σε αυτόν τον τομέα. Από έρευνες έχει προκύψει πως η πρόσληψη των ολικών φαινολών από το κόκκινο κρασί είναι 10 φορές μεγαλύτερη από εκείνη που θα προκύψει εάν καταναλωθεί λευκό κρασί της ίδιας ποσότητας.

Table 3  
Daily intake of phenolics from white or red wines

| Average intake in mg/day/person <sup>a</sup> |                 |          |
|----------------------------------------------|-----------------|----------|
| Phenolics                                    | White wine      | Red wine |
| Gallic acid                                  | 0.36            | 6.12     |
| Caffeic acid                                 | 1.26            | 4.61     |
| Para-hydroxycoumaric acid                    | 0.18            | 2.02     |
| Caftaric acid                                | 3.96            | 4.97     |
| Protocatechuic acid                          | 0.72            | 0.40     |
| Catechin                                     | 0.72            | 17.50    |
| Epicatechin                                  | 0.18            | 18.97    |
| Dimer B1                                     | 0.09            | 14.54    |
| Dimer B2                                     | 0.054           | 11.84    |
| Dimer B3                                     | 0.036           | 9.54     |
| Dimer B4                                     | 0.09            | 10.84    |
| Malvidine-3-glucoside                        | NF <sup>b</sup> | 29.59    |
| Total phenol                                 | 44.1            | 400.2    |

<sup>a</sup> Based on a daily wine consumption of 180 ml.

<sup>b</sup> NF, not found.

**Εικόνα 4:** Πίνακας με τις τιμές των φαινολικών συστατικών σε κόκκινο και λευκό κρασί (Pierre-Louis Teissedre, Nikolas Laundrult, 2000).

Πολλές ποικιλίες κρασιού έχουν μελετηθεί ως προς το ποσοστό των ολικών φαινολικών συστατικών που φέρουν. Έπειτα από τη σύγκριση λευκού και κόκκινου κρασιού, επιμέρους αναλύσεις μεταξύ των κόκκινων κρασιών που κυκλοφορούν την αγορά έδειξαν πως στο Cabernet Sauvignon, τα ποσοστά των φαινολικών συστατικών είναι αρκετά μεγάλα, προσδίδοντάς του κι όλες τις βιολογικές ιδιότητες (Pierre-Louis Teissedre, Nikolas Laundrult, 2000).

Θα αναφερθούν αναλυτικά τα πιο χαρακτηριστικά φαινολικά συστατικά του κρασιού, τα οποία είναι η ρεσβερατρόλη, η κερκετίνη (φλανονειδές) και το γαλλικό οξύ.

### **1.3.1 Ρεσβερατρόλη**

#### **Δομή**

Η ρεσβερατρόλη ανήκει στην κατηγορία των πολυφαινολών που συναντιώνται στα σταφύλια, στα φρούτα του δάσους, στα φυστίκια, στα φασόλια, στο ρόδι και σε άλλα φυτικά προϊόντα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Στα σταφύλια ανιχνεύεται στο δέρμα, στα φύλλα, στο σπέρμα και στα ξυλλώδη τμήματα. Η υψηλή περιεκτικότητά της σε ποικιλίες κόκκινων κρασιών κατά μέσο όρο ανέρχεται σε ποσότητες μεταξύ 0,2 κι 5,8mg/L (Claudine Manach, et al., 2005). Η ρεσβερατρόλη φέρει δύο δομές στο χώρο, την cis και την trans. Στο κρασί εμφανίζονται και οι δύο μορφές, αλλά η trans- κυριαρχεί, η οποία φανερώνει μεγαλύτερη σταθερότητα κι όταν εκτίθεται σε ακτινοβολία παρουσιάζει απορρόφηση που την κάνει παρατηρήσιμη, οπότε κι αυτή χρησιμοποιείται κατά βάση στις αναλύσεις.

#### **Απορρόφηση**

Η ρεσβερατρόλη, εξαιτίας της δομής της έχει υψηλή διαλυτότητα στο νερό. Λόγω της ικανότητάς της να σχηματίζει ενώσεις με οργανικά μόρια, αυξάνεται η απορρόφησή της από το εντερικό επιθήλιο και η κυτταρική διαπερατότητά της, χωρίς να χάνει της ιδιαίτερες ιδιότητές της (Claudine Manach, et al., 2005).

Στο εντερικό επιθήλιο εισέρχεται ή με παθητική διάχυση είτε σχηματίζοντας ενώσεις με μεμβρανικούς μεταφορείς. Όταν εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος παρατηρείται σε τρεις μορφές: ως γλυκουρονύλο-ρεσβερατρόλη, θείο-ρεσβερατρόλη ή ελεύθερη. Στην ελεύθερή της μορφή, η ρεσβερατρόλη είναι αρκετά δραστική και σχηματίζει δεσμούς με πολλές ενώσεις, όπως η αλβουμίνη και διάφορες λιποπρωτεΐνες, οι οποίες όταν προσδεθούν στους κατάλληλους υποδοχείς στα κύτταρα θα απελευθερώσουν τη ρεσβερατρόλη στο κυτταρόπλασμα (Ann N Y, 2011).

#### **Μεταβολισμός**

Ο μεταβολισμός της ρεσβερατρόλης γίνεται στο ήπαρ. Σημαντικό να αναφερθεί πως έχει την ικανότητα να προάγει την διαδικασία του μεταβολισμού της αυξάνοντας τη δραστηριότητα ηπατικών ενζύμων. Από τον μεταβολισμό της προκύπτουν οι συζευγμένες μορφές της ως γλυκουρονύλο-ρεσβερατρόλη και θείο-ρεσβερατρόλη.

#### **Βιοδιαθεσιμότητα**

Η βιοδιαθεσιμότητα της ρεσβερατρώλης επηρεάζεται από τη δομή και τα συστατικά του τροφίμου. Στο κρασί με την ύπαρξη των διαφόρων φλαβονοειδών, όπως η κερκετίνη, έχει παρατηρηθεί αύξηση της βιοδιαθεσιμότητάς της. Μελέτες *in vitro* δείχνουν χαμηλή επίδραση στους ιστούς, ενώ σε κάποιες *in vivo* η αποτελεσματικότητά της επειδή οι μορφές της στοχεύουν όργανα όπως το ήπαρ. Ακόμη, φαίνεται να γίνεται επανακύκλωση των μεταβολιτών της ρεσβερατρώλης στο λεπτό έντερο, με αποτέλεσμα να ξαναεπαναρροφάται (Marier JF, et al., 2002).

### **1.3.2 Κερκετίνη**

#### **Δομή**

Η κερκετίνη ανήκει στα φλαβονοειδή συστατικά του κρασιού και συναντάται ακόμη στο μπρόκολο, στα κρεμμύδια, σε φρούτα όπως το μήλο και το σταφύλι, στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά και στο τσάι. Στο κόκκινο κρασί η συγκέντρωσή της κυμαίνεται μεταξύ των 4 έως των 16 mg/L (Hertog et al., 1993).

#### **Απορρόφηση**

Σε αντίθεση με τη ρεσβερατρώλη, η κερκετίνη είναι υδρόφιλη κι απορροφάται από τον εντερικό βλεννογόνο με παθητική διάχυση με τη μορφή γλυκουρονιδίων. Η απορρόφησή της ενισχύεται με τη σύνδεση της με ομάδες σακχάρων (Kuhnau, 1976, Griffiths, 1982). Πιθανοί μηχανισμοί που εξηγούν αυτήν την ιδιότητα θεωρούνται η απογλυκοζυλίωση και η διαμεσολαβούμενη μεταφορά. Ο πρώτος μηχανισμός βοηθάει στην απορρόφησή της μέσω διάχυσης, ενώ ο δεύτερος μέσω ειδικών μεταφορών εξαρτώμενων από το νάτριο για τη γλυκόζη διευκολύνει τη μεταφορά της στο κυτταρόπλασμα (Day et al, 1998, Nemeth et al., 2003, Gee et al., 2000).

#### **Μεταβολισμός**

Ο μεταβολισμός της κερκετίνης πραγματοποιείται σε πολλά όργανα, όπως στο λεπτό έντερο, στο κόλον, στο ήπαρ και στους νεφρούς (Hollman and Katan, 1998). Εν αντιστοιχία με τη ρεσβερατρώλη, μεταβολίζεται από το ήπαρ και λεπτό έντερο (Gee et al., 2000).

#### **Βιοδιαθεσιμότητα**

Σε έρευνες δεν προκύπτει υψηλή περιεκτικότητα της κερκετίνης στο πλάσμα των ανθρώπινων κυττάρων (Hollamn et al., 1996). Μόνο σε κλινικές δοκιμές πάνω σε ποντίκια και γουρούνια φαίνονται υψηλά επίπεδα αυτής στους πνεύμονες και στους νεφρούς. Όμως οι μεταβολίτες της κερκετίνης παρατηρούνται σε μεγάλες ποσότητες στο πλάσμα, ενισχύοντας το ενδεχόμενο πως ίσως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις θα υπάρχουν ίχνη και της ίδιας της ουσίας στην κυκλοφορία (Hollman et al., 1997, Manach et al., 2005).

### **1.3.3 Γαλλικό οξύ**

#### **Δομή**

Το γαλλικό είναι ένα τρι-υδροξυβενζοϊκό οξύ, ένα είδος φαινολικού οξέος, που βρίσκεται σε καλάμια, φουντούκια, φύλλα τσαγιού, στο φλοιό δρυός και σε άλλα φυτά. Το κρασί φέρει ένα εύρος από 10 έως 60 mg/L γαλλικού. Συναντάται σε δύο δομές: ως ελεύθερο γαλλικό κι ως υδρολυμένη ταννίνη.

#### **Απορρόφηση**

Συγκριτικά με άλλα φαινολικά συστατικά, το γαλλικό οξύ παρουσιάζει μεγαλύτερα ποσοστά απορρόφησης. Το ποσοστό που έπειτα από κατανάλωση 50mg τελικά αποβλήθηκε από τα ούρα ανερχόταν στο 38%, έναντι κάποιων φλαβονοειδών των οποίων το ποσοστό πλησίαζε το 42%. Το γαλλικό, όπως και η κερκετίνη απορροφάται στο λεπτό έντερο ή στο στομάχι. Κάθε ανθρώπινος οργανισμός φαίνεται να διαφέρει όσον αφορά στην ποικιλία των ενζύμων που βοηθούν στην μεταφορά κι απορρόφησή του.

#### **Μεταβολισμός**

Το γαλλικό οξύ παρουσιάζει διαλυτότητα στους οργανικούς διαλύτες. Πολλές φορές βρίσκεται συνδεδεμένο με πρωτεΐνες και μεταφέρεται στους ιστούς. Επίσης, ούσα ένωση υψηλού μοριακού βάρους, υδρολύεται από ένζυμα του γαστρεντερικού σε ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους και μεταφέρεται στους ιστούς.

#### **Βιοδιαθεσιμότητα**

Ανάλογα με τις πηγές που το περιέχουν, η βιοδιαθεσιμότητα του γαλλικού διαφέρει. Οι μεγαλύτερες ποσότητες των μεταβολιτών του εμφανίζονται στο πλάσμα (Claudine Manach, et al., 2005).

## **1.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ**

### **1.4.1. Κατηγορίες δράσεων**

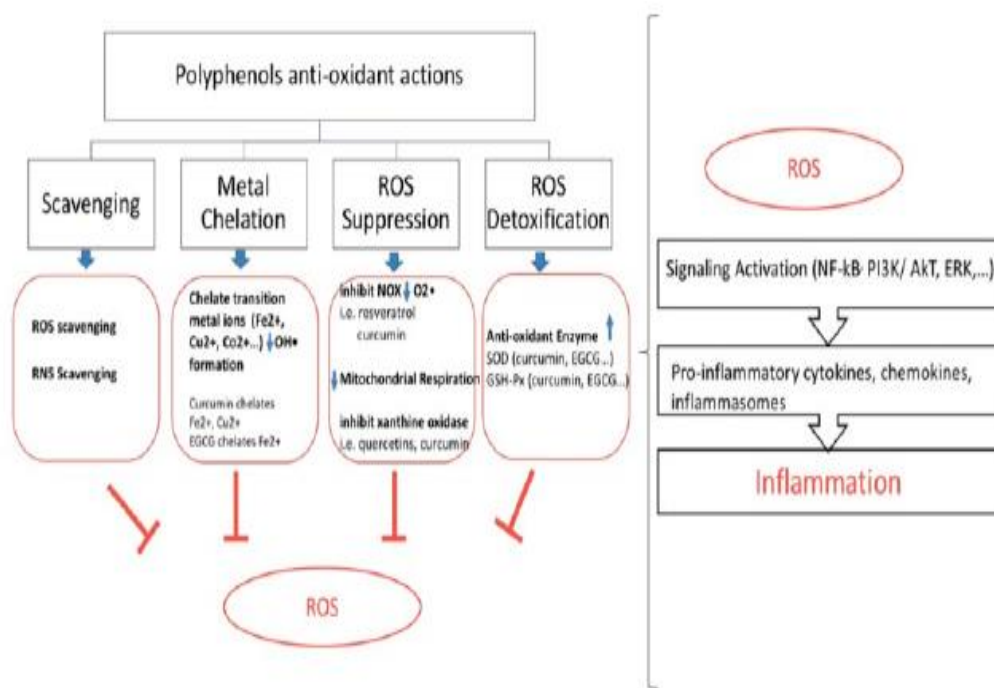
Τα φαινολικά συστατικά του κρασιού, όπως έχει αναφερθεί, προσφέρουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, δρώντας ή προάγοντας προστατευτικούς παράγοντες έναντι της οξείδωσης οργανικών μορίων κι ουσιών, της θρόμβωσης και της φλεγμονής. Πολυάριθμες μελέτες έχουν εστιάσει στις δράσεις αυτές (Fragoroulou E., et al., 2009).

#### **Αντι-οξειδωτικές δράσεις**

Στον ανθρώπινο οργανισμό, οι φαινολικές ουσίες έχουν την ικανότητα να προστατεύουν οργανικά μόρια κι ενώσεις από την επικείμενη οξείδωσή τους από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) ή οξειδωμένες ενώσεις. Οι μηχανισμοί που ακολουθούν μπορεί να είναι: 1) Να δράουν ως δραστικά μόρια, τα οποία εκκαθαρίζουν στις ελεύθερες ρίζες, 2) Μέσω αναγέννησης ενδογενών αντι-οξειδωτικών, όπως η βιταμίνη E και το καροτένιο, 3) Να δεσμεύουν προ-οξειδωτικά μέταλλα, 4) Να τροποποιήσουν τη δράση ενζύμων, ώστε να μην επιτευχθεί οξείδωση των μορίων στόχων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η οξείδωση της LDL χοληστερόλης από οξειδωμένα φωσφολιπίδια (Dell'Agli M, et. al., 2004).

#### **Αντι-φλεγμονώδεις**

Τα φαινολικά συστατικά του κρασιού συνεισφέρουν με πολλούς τρόπους στην μείωση των φλεγμονών του ανθρώπινου οργανισμού. Ένας τρόπος είναι η δέσμευση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS) που με την οξείδωση διάφορων μορίων οδηγούν στην ανάπτυξη φλεγμονών.



**Εικόνα 5:** Σύνδεση αντι-οξειδωτικών δράσεων φαινολικών συστατικών με αντι-φλεγμονώδεις δράσεις αυτών.

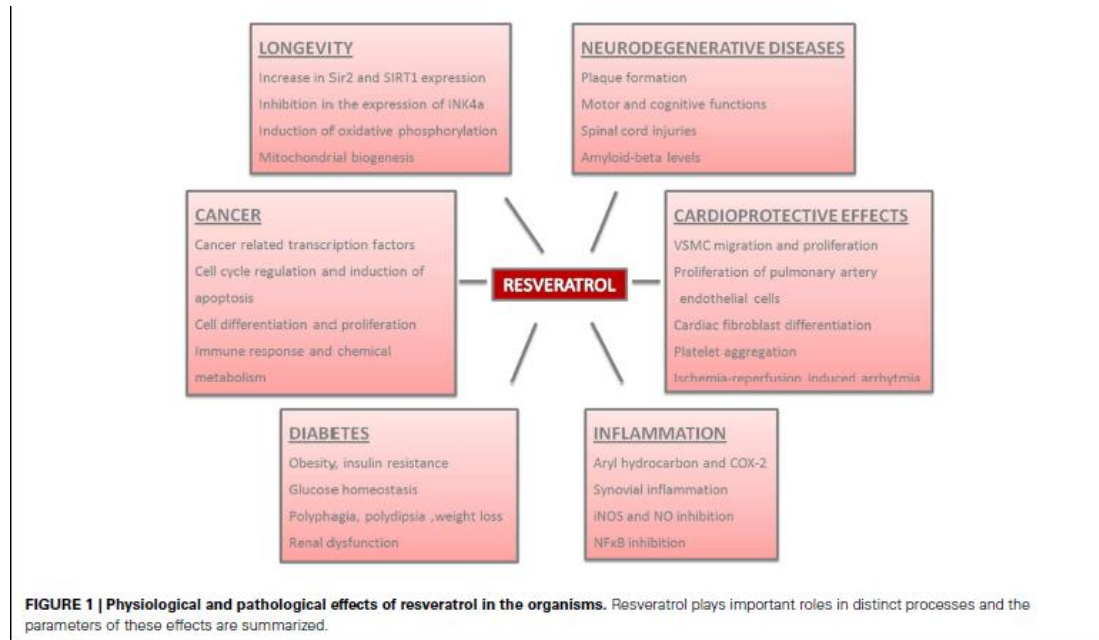
Ακόμη, ελέγχουν την παραγωγή των κυτταροκινών. Οι κυτταροκίνες είναι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταγωγή σημάτων στο ανοσοποιητικό σύστημα και μπορούν να είναι προ-φλεγμονώδεις (IL-2, IL-8, TNF), αλλά κι αντι-φλεγμονώδεις (IL-10, IL-4). Η προαγωγή των αντι-φλεγμονώδων κυτταροκινών από τα φαινολικά συστατικά αποτελεί τα καθιστά ισχυρό παράγοντα στην προστασία του οργανισμού.

Τα μακροφάγα, ο κύριος παράγοντας μιας φλεγμονώδους αντίδρασης, επίσης επηρεάζονται από τα φαινολικά συστατικά. Με τη δράση τους μειώνουν την παραγωγή κυτταροκινών από αυτά, όπως είναι ο TNF-α κι η IL-6 (Nour Yahfoufi et al., 2018).

### Αντι-θρομβωτικές

Η αθηροσκλήρωση, μια ασθένεια πολυπαραγοντική, είναι η αιτία που τα τελευταία χρόνια τα καρδιαγγειακά επεισόδια έχουν αυξηθεί. Η θρόμβωση είναι μία από τους επιμέρους μηχανισμούς που υποβόσκουν κι προάγουν την αθηροσκλήρωση, η οποία προκαλείται από τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων στα αγγεία του καρδιακού συστήματος. Η θρομβίνη, το ADP, το TXA κι ο PAF είναι κάποιοι από τους παράγοντες που μπορεί να ενεργοποιούν αυτόν τον μηχανισμό (Ruf JC, et al., 1999).

#### 1.4.2. Δράσεις Ρεσβερατρόλης



**Εικόνα 6:** Βιολογικές δράσεις της ρεσβερατρόλης (Betul Catalgol, et al., 2012).

#### Αντι-φλεγμονώδεις

Η ρεσβερατρόλη έχει την ικανότητα να αναστέλλει πολλές χυμοκίνες και μόρια που παράγονται από προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως κυκλοοξυγονάσες, λιποοξυγενάσες, τις ιντερλευκίνη-12, ιντερφερόνη- $\gamma$  και τον παράγοντα TNF- $\alpha$ .

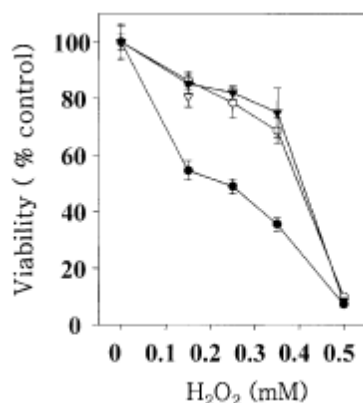
Η θρομβίνη, έχει αποδειχτεί πως προάγει την παραγωγή ADP και ATP σε καταστάσεις αυξημένης ενδοθηλιακής δραστηριότητας, που οδηγούν στην δραστηριοποίηση αιμοπεταλίων και λευκοκυττάρων (Chung, A. W. et al., 2002). Η ρεσβερατρόλη παρεμβαίνει στα σήματα της θρομβίνης, προστατεύοντας το επιθήλιο συγκρατώντας τα επίπεδα των νουκλεοτιδίων της αδενοσίνης χαμηλά (Kaneider, N. C. et al., 2002).

#### Αντι-οξειδωτικές

Στο πλάσμα κυκλοφορούν ενεργές ρίζες οξυγόνου (ROS), οι οποίες θεωρούνται από τους δραστικούς οξειδωτικούς παράγοντες. Η ρεσβερατρόλη φαίνεται να μειώνει την παραγωγή

αυτών και με την αύξηση της παραγωγής αντιοξειδωτικών ενζύμων επηρεάζει και τον μεταβολισμό τους (Floreani M et al., 2003).

Από έρευνα των Vivancos M και Moreno JJ το 2008 πάνω στην επίδραση της ρεσβερατρόλης στη  $[H_2O_2]$ , παρατήρησαν τα εξής:



**Εικόνα 7:** Σχέση μεταξύ της ζωής των κυττάρων (viability %) με τη συγκέντρωση  $H_2O_2$  (υπεροξειδίο του υδρογόνου).

Το  $H_2O_2$  είναι γνωστό να παρουσιάζει τοξικές επιδράσεις και να μειώνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Μετρήθηκαν κύτταρα του φαιοχρωμοκυττώματος ποντικών χωρίς (●) αλλά και με την προσθήκη 25(○) και 50μM(▼) ρεσβερατρόλης, έπειτα από επώαση στους 37°C. Η ρεσβερατρόλη εμφάνιζε προστατευτικές ιδιότητες έναντι των συνεπειών του  $H_2O_2$  στα κύτταρα.

Ακόμη, από κλινικές δοκιμές σε ποντίκια, η ρεσβερατρόλη είχε την ικανότητα να μειώνει την δραστηριότητα της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) και της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) (Floreani M et al., 2003).

### Αντι-θρομβωτικές

Όπως αναφέρεται παραπάνω, η ρεσβερατρόλη αναστέλλει την παραγωγή της θρομβίνης με το να δεσμεύεται με τα κανάλια του ασβεστίου. Υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει πως ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις των 0,1, 1 και 10μM, η ρεσβερατρόλη μειώνει από το 20 έως το 50% την παραγωγή της θρομβίνης (Dobrydneva Y. et al., 1999). Άλλες δράσεις της εστιάζουν στην μείωση των τριγλυκεριδίων και στην αύξηση της λιπόλυσης σε κύτταρα του λιπώδη ιστού (Lasa A. et al., 2012). Σε άλλη ερευνητική μελέτη,



χορηγήθηκε στο πλάσμα από υγιείς ανθρώπους in vitro ρεσβερατρόλη. Στη συνέχεια το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια και τη ρεσβερατρόλη αναμειχθηκε με θρομβίνη, ADP και κολλαγόνο ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής:

Table II. Effect of resveratrol on platelet aggregation in healthy subjects,  $\bar{X} \pm SD$ , n=6.

| Inducer  | Platelet aggregation (%) |                |                              |                             |                             |                             |
|----------|--------------------------|----------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|          | Control                  | DMSO           | Resveratrol (10 $\mu$ M)     | Resveratrol (100 $\mu$ M)   | Resveratrol (1000 $\mu$ M)  | ASA                         |
| Thrombin | 82.9 $\pm$ 12.5          | 74.4 $\pm$ 8.4 | 64.0 $\pm$ 13.9 <sup>a</sup> | 43.6 $\pm$ 6.3 <sup>b</sup> | 30.6 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup> | 52.5 $\pm$ 4.6 <sup>b</sup> |
| ADP      | 64.8 $\pm$ 5.1           | 61.3 $\pm$ 3.7 | 55.2 $\pm$ 6.2 <sup>a</sup>  | 46.2 $\pm$ 9.3 <sup>b</sup> | 15.5 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup> | 48.8 $\pm$ 6.3 <sup>b</sup> |
| Collagen | 74.0 $\pm$ 4.0           | 72.2 $\pm$ 4.5 | 60.6 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>  | 47.2 $\pm$ 7.1 <sup>b</sup> | 26.9 $\pm$ 4.3 <sup>b</sup> | 43.9 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup>p<0.05, <sup>b</sup>p<0.01, compared with control group.

**Εικόνα 8:** Πίνακας επίδρασης της ρεσβερατρόλης στη συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Η πυκνότητα του πλάσματος σε αιμοπετάλια ήταν  $3 \times 10^6$ /mL κι αναμειχθηκαν με σειρά με 10,100 και 1000  $\mu$ M ρεσβερατρόλης. Έπειτα από 5min επώαση στους 37°C, τα δείγματα που τους είχαν χορηγηθεί 0,33 μονάδες θρομβίνης, 4 $\mu$ M ADP και 5 $\mu$ M/mL, μετρήθηκαν ως προς την ικανότητα συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Στα δείγματα ελέγχου είχε χορηγηθεί ακετυλοσαλικυλικό οξύ, σαλίνη και διμέθυλο σουλφονίδιο.

Τα αποτελέσματα είναι θετικά για τη ρεσβερατρόλη, η οποία εμφανίζει μείωση της δράσης των παραγόντων πήξης ακόμα και στη συγκέντρωση των 10 $\mu$ M, με στατιστικά σημαντική διαφορά (Zhirong Wang et al.,2001).

### 1.4.3. Δράσεις Κερκετίνης

#### Αντι-φλεγμονώδεις

Για όσον αφορά τις δράσεις της κερκετίνης έναντι φλεγμονώδων διαδικασιών, πολλές εργαστηριακές μελέτες έχουν δείξει πως αναστέλλει την παραγωγή λιποπολυσακχαριτών, γνωστά για την παραγωγή διάφορων κυτταροκινών. Τα πιο γνωστά παραδείγματα είναι η παραγωγή TNF $\alpha$  από τα μακροφάγα και η παραγωγή IL-8 από κύτταρα των πνευμόνων. Πολλά είδη ενεργού οξυγόνου (ROS) εκτός από ισχυρά αντιοξειδωτικά, προωθούν και την ανάπτυξη φλεγμονής με το να παράγουν παράγοντες όπως NK- $\kappa$ B κύτταρα που προάγουν την παραγωγή κυτταροκινών (TNF $\alpha$ ). Η κερκετίνη αναστέλλοντας την παραγωγή και την

έκφραση τέτοιων παραγόντων μειώνει την πιθανότητα ανάπτυξης και μετανάστευσης της φλεγμονής στους ιστούς (MacNee, 2001 and Rahman, 2002).

Επιπροσθέτως, η κερκετίνη μειώνει την παραγωγή φλεγμονώδων παραγόντων όπως ιντερφερόνη-γ, τις ιντερλευκίνες – και 4 σε μια δίαιτα υψηλή σε λιπαρά, βελτιώνοντας έτσι το προφίλ της γενικότερης φλεγμονής που προκαλείται από την παχυσαρκία και συνοδά νοσήματα (MacNee, 2001 and Rahman, 2002).

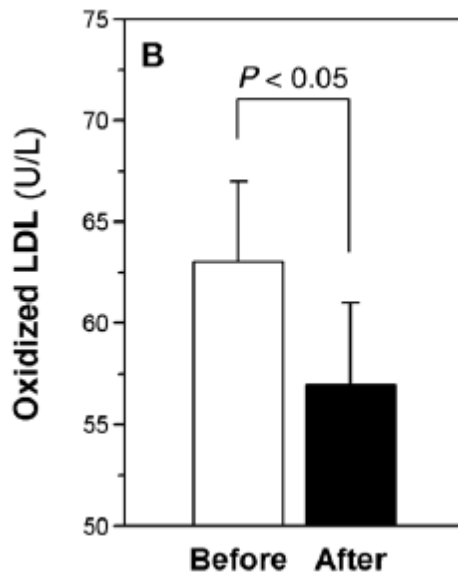
### **Αντι-οξειδωτικές**

Η κερκετίνη έχει χαρακτηριστεί ως ένα φλαβονοειδές με μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι των ελεύθερων ιόντων σιδήρου.

Μετά από διάφορες πειραματικές διαδικασίες, φάνηκε ως η κερκετίνη εμποδίζει την υπεροξείδωση λιπιδίων κι ενζύμων (Morel et al., 1993), καθώς και επιζήμιες επιδράσεις στο DNA από ιόντα σιδήρου (Laughton et al., 1991),

Η ‘ηλεκτροφιλική’ ικανότητά της να δεσμεύει ελεύθερα ιόντα οξυγόνου και ανενεργούς καρκινογόνους παράγοντες, μειώνοντας έτσι τη συγκέντρωση και βιοδιαθεσιμότητα τους, την καθιστά αρκετά ωφέλιμη ανάμεσα στα φλαβονοειδή (Chang et al., 1985, Nakayama, 1994, Nixon et al., 1984).

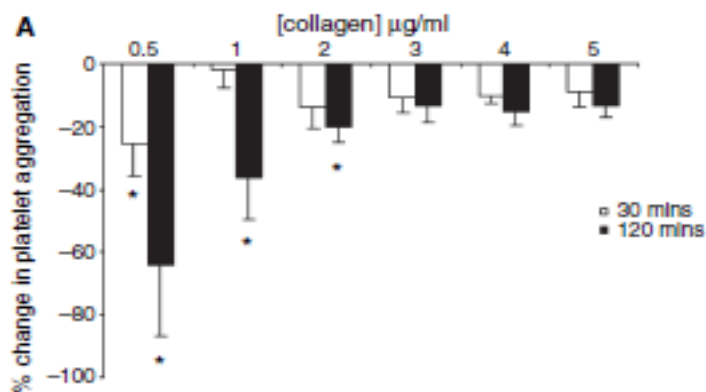
Σε έρευνα των Ruel et al. μετρήθηκαν οι μονάδες οξειδωμένης LDL στο πλάσμα αντρών πριν κι έπειτα από κατανάλωση χυμό σταφυλιού σε διάστημα 14ημερών. Ο χυμός περιείχε μεγάλες ποσότητες κερκετίνης. Έπειτα από συγκρίσεις των συγκεντρώσεων της οξειδωμένης LDL πριν και μετά τη χορήγηση του πλούσιου σε κερκετίνη χυμού αποδείχθηκε η ικανότητα της κερκετίνης να δεσμεύει προ-οξειδωτικούς παράγοντες, προστατεύοντας την LDL χοληστερόλη.



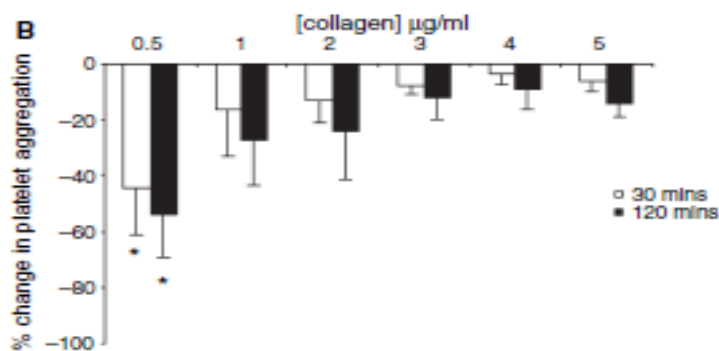
**Εικόνα 9:** Επίδραση στην ποσότητα οξειδωμένης LDL, έπειτα από κατανάλωση χυμό σταφυλιού πλούσιο σε κερκετίνη.

#### Αντι-θρομβωτικές

Από τα πολλά φλαβονοειδή του κρασιού, η κερκετίνη παρουσιάζει έναν προστατευτικό ρόλο έναντι της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με πολλούς τρόπους. Οι Hubbard GP et al. το 2004 μελέτησαν την ικανότητα της κερκετίνης να αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Στα διαγράμματα που απεικονίζονται παρακάτω φαίνονται τα αποτελέσματα της ερευνητικής αυτής μελέτης:



**Εικόνα 10:** Αλλαγές στη συσσώρευση αιμοπεταλίων με την προσθήκη 150mg κερκετίνης στα δείγματα.



**Εικόνα 11:** Αλλαγές στη συσσώρευση αιμοπεταλίων με την προσθήκη 300mg κερκετίνης στα δείγματα.

Συγκεκριμένα, χορήγησαν ποσοστά κερκετίνης (Q-4-G) στο πλάσμα και με παρουσία του κολλαγόνου ως συσσωρευτικό παράγοντα, σύγκριναν το ποσοστό δέσμευσης. Στο διάγραμμα Α έχουν χρησιμοποιηθεί 150mg κερκετίνης, ενώ στο διάγραμμα Β 300mg. Τα αιμοπετάλια με τα κολλαγόνο και την Q-4-G μελετήθηκαν σε χρόνους 30 και 120min. Σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του κολλαγόνου, το ποσοστό συσσώρευσης διαφέρει, ενώ το επίπεδο αναστολής διατηρείται ακόμα και μετά από 2 ώρες. Με την προσθήκη κερκετίνης στο πλάσμα, το ποσοστό αλλαγής στη συσσώρευση αιμοπεταλίων ήταν αισθητό, για να θεωρηθεί ένας ισχυρός αντι-θρομβωτικός παράγοντας.

#### 1.4.4.Δράσεις Γαλλικού οξέος

##### Αντι-οξειδωτικές

Το γαλλικό οξύ και τα παράγωγά του έχουν δείξει πως αντιδρώντας με ελεύθερα ιόντα που κυκλοφορούν στο αίμα, όπως ο σίδηρος, προστατεύουν το DNA, καθώς και τους υδατάνθρακες από την οξείδωσή τους.

Ακόμη, όπως και οι κερκετίνη και ρεσβερατρόλη, αντιδρά με ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) εμποδίζοντας την οξείδωση των λιποειδών (Okezie I. Aruoma et. al.,1993).

## **Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>: ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ**

### **2.1.Τι είναι ο εντερικός μικροβιόκοσμος**

Ο γαστρεντερικός σωλήνας του ανθρώπινου οργανισμού αποτελεί ένα περιβάλλον ευνοϊκό για την ανάπτυξη ποικίλων μικροοργανισμών. Καθημερινά, πληθώρα ποσοτήτων σε τρόφιμα και μικροοργανισμούς, κάποιοι παθογόνοι άλλοι όχι, διέρχονται από το γαστρεντερικό σύστημα (Bengmark S. et al., 1998). Σε άλλες συνθήκες το εντερικό επιθήλιο θα καταστρεφόταν και θα μολυνόταν. Ωστόσο, ένα σύνολο από βακτήρια, αρχαία, και ευκάρια εγκαθίστανται στο γαστρεντερικό σωλήνα σχηματίζοντας τον εντερικό μικροβιόκοσμο.

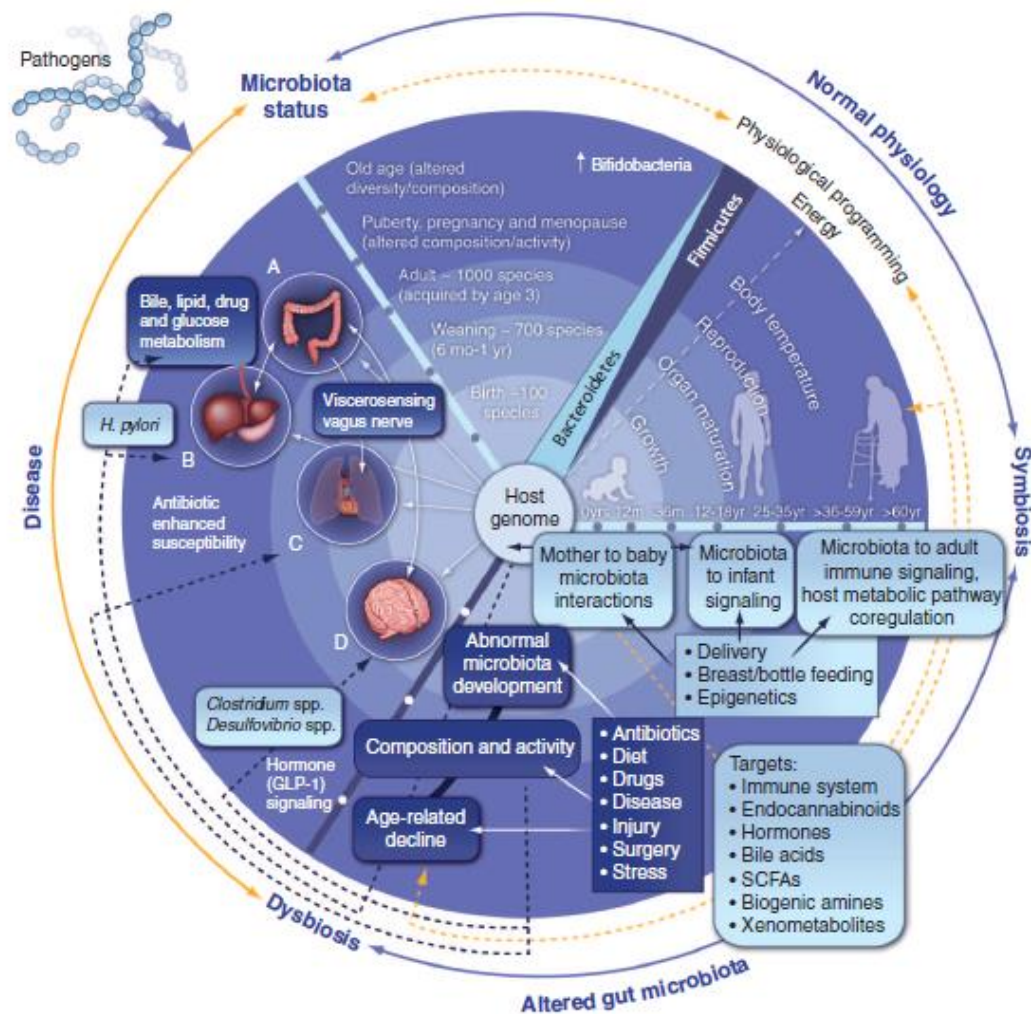
#### **Λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου**

Οι οργανισμοί αυτοί διαμορφώνουν ένα από τα πιο πυκνά οικοσυστήματα αλληλεπιδρώντας συνέχεια με τον ξενιστή. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος συμμετέχει στη διαμόρφωση του εντερικού επιθηλίου (Natividad JM, et al., 2013), ενισχύει την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού και προστατεύει από παθογόνους μικροοργανισμούς (Bäumler AJ, et al., 2016). Επίσης συνεισφέρει ευεργετικά στην πέψη ορισμένων τροφίμων, που ο ξενιστής αδυνατεί λόγω έλλειψης ενζύμων να πέψει και καταλήγουν στο παχύ έντερο προοάγοντας την παραγωγή βιταμινών, όπως αυτές του συμπλέγματος Β και τη βιταμίνη Κ.

#### **Μεταβολές με την πάροδο της ηλικίας**

Η ανάπτυξη του εντερικού μικροβιόκοσμου παρατηρείται από τη στιγμή της γέννησης, όπου ο εντερικός βλεννογόνος του νεογνού αποικείται από τους μικροοργανισμούς της μητέρας και του περιβάλλοντος στο οποίο πραγματοποιείται η γέννηση. Μετά τη γέννηση, ο εντερικός μικροβιόκοσμος εμπλουτίζεται και τροποποιείται από διάφορες παραμέτρους της ζωής, όπως ασθένειες, αντιβιοτικές θεραπείες και διατροφικές συνήθειες (Rodríguez JM et al. Dis. 2015). Επιστήμονες θεωρούν πως στην ηλικία των τριών ετών, ο πληθυσμός των μικροοργανισμών μοιάζει ίδιος με αυτός των ενηλίκων κι αναπτύσσεται με πιο σταθερούς ρυθμούς.

Με το πέρασμα της ηλικίας, αλλάζει η ισορροπία στον εντερικό μικροβιόκοσμο, με αποτέλεσμα στους ηλικιωμένους να ανιχνεύονται διαφορετικοί μικροοργανισμοί.



**Εικόνα 12:** Ο κύκλος ζωής του εντερικού μικροβιόκοσμου με την πάροδο της ηλικίας.

Στην **Εικόνα 12** περιγράφεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών του εντέρου και οι πιο σημαντικοί παράγοντες που τα επηρεάζουν. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στη γέννηση παρατηρούνται περίπου 100 είδη μικροοργανισμών από επιγενετικούς, περιβαλλοντικούς και διατροφικούς παράγοντες. Στην πορεία της ζωής, αλλάζουν οι συγκεντρώσεις ορισμένων μικροοργανισμών για παράδειγμα στα βρέφη παρατηρούνται υψηλοί πληθυσμοί *Bifidobacteria*, ενώ με την αύξηση της ηλικίας μειώνονται δραστικά. Αυτό οφείλεται κυρίως στην αλλαγή των διατροφικών συνηθειών, από την αποκλειστική σίτιση με γαλακτοκομικά προϊόντα στην πολυδιάστατη κατανάλωση τροφίμων (Rodríguez JM et al., 2015).

Πολλές διαδικασίες που απαιτούν ενέργεια, όπως η ρύθμιση της ομοιόστασης, η ανάπτυξη και ανάπλαση των ιστών, επηρεάζονται από την υγεία και την ακεραιότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου (Jeremy K. Nicholson et al., 2012).

Η αλλαγή των ισορροπιών στο πολύπλοκο αυτό σύνολο μικροοργανισμών, με μεταβολή της σύστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου, ονομάζεται δυσβίωση και έχει παρατηρηθεί ότι σχετίζεται με:

- φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου, καρκίνο του κόλον, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου,
  - μη-αλκοολική λιπώδη διήθηση του ήπατος, παχυσαρκία και μεταβολικά νοσήματα,
  - άσθμα, υπέρταση
  - μεταβολές στην συμπεριφορά και στην διάθεση μέσω ορμονικών σημάτων
- ( Jeremy K. Nicholson et al., 2012).

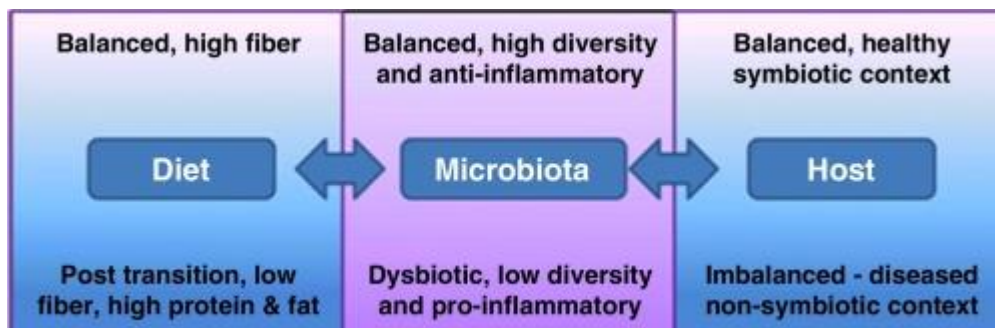
## **2.2. Αλληλεπίδραση με μακρο-συστατικά της τροφής**

### **2.2.1.Υδατάνθρακες**

Οι υδατάνθρακες είναι η κύρια πηγή άνθρακα για τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Οι διαιτητικές ίνες χρήζουν κρίσιμης σημασίας για την ομαλή λειτουργία του μικροβιόκοσμου και φαίνεται να αποτελούν προστατευτικό παράγοντα για πολλές παθήσεις, όπως παχυσαρκία, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και καρδιαγγειακά νοσήματα (Stephen A.M. et al., 1980). Οι διαιτητικές ίνες συνεισφέρουν με ποικίλους τρόπους, όπως με το να αυξάνουν το βλωμό της τροφής όταν αυτός διέρχεται από το γαστρεντερικό σύστημα. Με τον τρόπο αυτόν, απομακρύνονται τοξίνες, μειώνεται ο χρόνος διέλευσης της τροφής κι αυξάνεται η συχνότητα της κένωσης, αλλά και το μέγεθος των κοπράνων (Topping, D.L. et al., 2001). Οι απλοί υδατάνθρακες απορροφώνται πλήρως από το λεπτό έντερο, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό των σύνθετων υδατανθράκων, λόγω έλλειψης ειδικών ενζύμων, δεν πέπτεται από το γαστρεντερικό σύστημα. Κατά συνέπεια, οι διαιτητικοί αυτοί πολυσακχαρίτες καταλήγουν να είναι υποστρώματα των βακτηρίων του εντερικού μικροβιόκοσμου. Η ζύμωση αυτών των ενώσεων μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή διαφόρων μεταβολιτών, όπως είναι τα μικράς αλύσου λιπαρά οξέα (SCFA), CO<sub>2</sub> και H<sub>2</sub>, διαμορφώνοντας το εντερικό περιβάλλον με χαρακτηριστικό



παράδειγμα τη ρύθμιση του pH μέσα στο κόλον. Στην περίπτωση αυτή τα SCFA συμβάλλουν στην μείωση του pH προωθώντας την αύξηση κι επιβίωση των μικροοργανισμών, ενώ αποτρέπουν την εγκατάσταση πολλών παθογόνων (Windey, K., et al., 2012).



**Εικόνα 13:** Η επίδραση των διαιτητικών ινών της δίαιτας στον εντερικό μικροβιόκοσμο (Joël Doré, Hervé Blottière, 2015).

### 2.2.2. Πρωτεΐνες

Οι διαιτητικές πρωτεΐνες ανάλογα την ποσότητα και τον τύπο τους επηρεάζουν διαφορετικά τον εντερικό μικροβιόκοσμο (Silvester, K.R., et al., 1995). Ισορροπία ανάμεσα σε υδατάνθρακες και πρωτεΐνες συνεισφέρουν στην ισορροπία του εντερικού μικροβιόκοσμου, με τις πρωτεΐνες να αποτελούν την κύρια πηγή αζώτου που χρειάζονται για παραγωγή σημαντικών προϊόντων, όπως τα SCFA. Σε δίαιτες αυξημένης περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού τους, όπως η αμμωνία, οι θειόλες κι άλλα, σε αυξημένες ποσότητες φαίνεται να είναι τοξικά και καρκινογόνα (Lin, H.C. et al., 1991). Ανάλογα την προέλευση της πρωτεΐνης, δηλαδή αν είναι ζωϊκή ή φυτική πρωτεΐνη, αλλάζει η σύνθεση των βακτηρίων του εντερικού μικροβιόκοσμου. Συστατικά της ζωϊκής πρωτεΐνης, όπως είναι η L-καριντίνη κι η φωσφατιδοχολίνη μετατρέπονται σε τριμεθυλαμίνη από τα βακτήρια του εντέρου και κατά συνέπεια σε οξειδωμένη τριμεθυλαμίνη (TMAO) στο ήπαρ. Η οξειδωμένη τριμεθυλαμίνη έχει κατηγορηθεί πως συνδέεται με μηχανισμούς που προάγουν την παχυσαρκία και την αθηροσκλήρωση. Σε αντίθεση, η πρωτεΐνη φυτικής προέλευσης φαίνεται να βοηθάει στην ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε μηχανισμούς μείωσης του διαβήτη τύπου 2 και ρύθμισης της παχυσαρκίας (Danneskiold-Samsøe NB, et al., 2018).



### 2.2.3.Λιπίδια

Οι πηγές λιπιδίων φαίνεται να επηρεάζουν τη σύνθεση, αλλά και τη βιοποικιλότητα των βακτηρίων του εντερικού μικροβιόκοσμου. Ακόμη, οι εναλλαγές στην πρόσληψη λιπιδίων από τη διατροφή προκαλεί αλλαγές στον πληθυσμό των βακτηρίων. Τα λιπίδια που προσλαμβάνονται από την τροφή επηρεάζουν με τη σειρά τους τη σύνθεση και την μεταβολική δραστηριότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου:

- i. Ενεργοποιούν την παραγωγή των χολικών οξέων και την υδρόλυση τους στα δευτερογενή χολικά οξέα, όπου τα χολικά οξέα τροποποιούν τον εντερικό μικροβιόκοσμο, δρώντας για παράδειγμα ως υποστρώματα για την ανάπτυξη επιπλέον μικροοργανισμών (Danneskiold-Samsøe NB, et al., 2018),
- ii. Δίαιτες υψηλές σε λίπος, αυξάνουν την παραγωγή των λιποπολυσακχαριτών, ενεργοποιητές φλεγμονώδων αντιδράσεων (Moreira, A.P.B. et al., 2012).

## 2.3.Εντερικός μικροβιόκοσμος και καρδιαγγειακά νοσήματα

|                                           | Atherosclerosis                                                                                                                                                                                                                                                                            | Hypertension                                                                         | Heart Failure                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alterations in gut microbiota composition | ↑Lactobacillus <sup>5</sup><br>↓Roseburia <sup>4</sup>                                                                                                                                                                                                                                     | ↑Firmicutes/Bacteroides ratio <sup>27</sup>                                          | ↑Escherichia coli,<br>Klebsiella pneumoniae,<br>Streptococcus viridans                                                                                                     |
| Alterations in gut microbiota metabolites | ↑TMAO <sup>28,29</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                     | ↑SCFA <sup>18,1</sup>                                                                | ↑TMAO <sup>30,31,32</sup>                                                                                                                                                  |
| Proof of concept                          | Dietary choline/carnitine<br><br>↑TMAO <sup>2</sup> DMB-microbial choline TMA lyase inhibition suppress TMAO <sup>33</sup><br><br>↑TMAO associated with unstable plaque and MACE <sup>32,33,34</sup><br><br>Cecal microbial transplantation transmits disease susceptibility <sup>14</sup> | Infusion of Ang II/TMAO associated with ↑blood pressure <sup>130</sup>               | ↑Gut permeability <sup>35</sup><br><br>↑TMAO was associated with LV remodelling and poor prognosis <sup>30,31,32</sup>                                                     |
| Interventions                             | Diet Intervention: ↑Bacteroides and Proteobacteria, ↓Firmicutes <sup>32</sup><br>Probiotics: ↓LV hypertrophy <sup>32</sup><br>Probiotics: ↑SCFA <sup>132</sup>                                                                                                                             | Diet Intervention: high-fiber diet is associated with ↓blood pressure <sup>132</sup> | Diet: high fiber diet is associated with ↓cardiac hypertrophy and fibrosis <sup>132</sup><br>Probiotics: attenuate heart failure after myocardial infarction <sup>32</sup> |

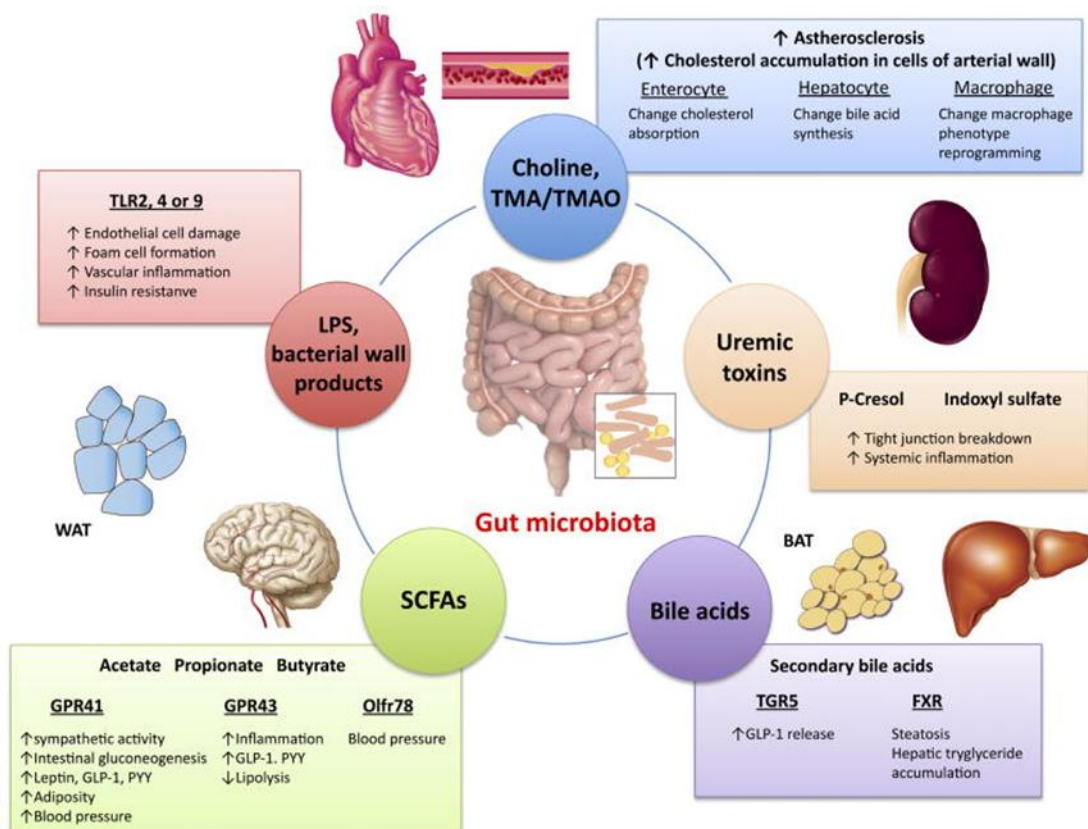
**Εικόνα 14:** Πίνακας με τις αλλαγές στον εντερικό μικροβιόκοσμο και των ουσιών που παράγονται κατά τους κύριους παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα

(TMAO:N-οξείδιο της τριμεθυλαμίνης, SCFA: μικρής αλύσου λιπαρά οξέα, TMA: τριμεθυλαμίνη, MACE: καρδιαγγειακό επεισόδιο, LV: αριστερή κοιλία).

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος συμμετέχει με πολλούς μηχανισμούς στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Θα αναφερθούν οι σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου, η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση κι η καρδιακή ανεπάρκεια.

## Σημαντικότεροι παράγοντες κινδύνου

### Αθηροσκλήρωση



**Εικόνα 15:** Οι μηχανισμοί που φανερώνουν τη σχέση μεταξύ εντερικού μικροβιόκοσμου με τα καρδιαγγειακά νοσήματα (W.H. Wilson Tang, et al., 2017).

Πολλές έρευνες έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στην συσχέτιση που προκύπτει από τις μεταβολικές διαδικασίες που συμμετέχουν οι μικροοργανισμοί του εντέρου και την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων (CVD). Από συντομία, θα αναφερθούν η υπέρταση, η

αθηροσκλήρωση και η καρδιακή ανεπάρκεια και θα συσχετιστούν με τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Στην παραπάνω εικόνα, συνοψίζονται οι σύνδεσμοι μεταξύ των CVD και των μικροοργανισμών του εντέρου, καθώς και πιθανοί τρόποι αντιμετώπισης.

Σε μελέτη που διεξήχθη από τους Omry et al. το 2010, αξιολογήθηκε η παρουσία μικροοργανισμών που προέρχεται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο στις αθηρωματικές πλάκες. Παρατήρησαν πως ένα μεγάλο ποσοστό από τους μικροοργανισμούς που ανιχνεύτηκαν ανήκε στο φύλο Proteobacteria και σε μικρότερο στο φύλο Firmicutes. Ακόμη, ανίχνευσαν και μικροοργανισμούς που δεν υπάρχουν στο έντερο κι ανήκουν στα γένη Staphylococcus, Propionibacterium και Burkholderia. Με αυτά τα αποτελέσματα, κατέληξαν στο αποτέλεσμα πως υπάρχουν μικροοργανισμοί που συνθέτουν γονίδια που σχετίζονται με το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών (Koren O et al., 2011).

Μία άλλη συσχέτιση του εντερικού μικροβιόκοσμου με την προαγωγή της αθηροσκλήρωσης είναι με την οξείδωση της TMA σε TMAO. Η TMA παράγεται από χημικές μετατροπές που γίνονται από τους μικροοργανισμούς του εντέρου σε γνωστές ενώσεις της δίαιτας που καταλήγουν στο έντερο (χολίνη, L-καρνιτίνη, φωσφατιδοχολίνη). Στη συνέχεια μεταφέρεται μέσω της πυλαίας στο ήπαρ όπου οξειδώνεται από ένζυμα και μεταφέρεται στην κυκλοφορία. Σε δίαιτες υψηλής περιεκτικότητας σε χολίνη παρατηρείται αύξηση των επιπέδων των TMAO στο πλάσμα (Brown JM, et al., 2015). Σε μελέτες που ακολούθησαν σε πάνω από 4000 άτομα με στεφανιογραφία κι αυξημένα επίπεδα TMAO, εμφάνισαν αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακών επεισοδίων (Tang WH. Et al., 2013).

## **Υπέρταση**

Η υπέρταση είναι ένας από τους κυρίαρχους παράγοντες που οδηγεί σε καρδιαγγειακά νοσήματα. Περισσότερες έρευνες έχουν γίνει πάνω σε πειραματόζωα και συσχετίζουν την υψηλή αρτηριακή πίεση με τον εντερικό μικροβιόκοσμο (Honour J., et al., 1982). Θετική συσχέτιση αυτών των δύο προκύπτει από δυσλειτουργία και δυσβίωση των μικροοργανισμών. Οι Yang et al., διεξήγαγαν έρευνα σε ποντίκια με υπέρταση κι ανακάλυψαν πως οι μικροοργανισμοί του εντέρου μειώνονται σε πλήθος, ποικιλία και αυξάνονται οι πληθυσμοί των Bacteroidetes και Firmicutes, που έχουν συσχετιστεί και με την ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών (Yang et al., 2015). Ακόμη σε άλλες μελέτες, τα SCFA μέσω ενεργοποίησης μια σειράς από μονοπάτια συμμετέχουν στην αύξηση της πίεσης στα αγγεία.

Από την άλλη πλευρά, σε περιπτώσεις σωστής λειτουργίας του μικροβιόκοσμου παρατηρείται μείωση της αρτηριακής πίεσης.

### **Καρδιακή ανεπάρκεια**

Έρευνες έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στη σχέση του εντερικού μικροβιόκοσμου με την καρδιακή ανεπάρκεια. Οι θεωρίες θέλουν την μειωμένη καρδιακή συχνότητα και την αυξημένη συστηματική συμφόρηση να προκαλούν ισχαιμία κι οίδημα στο γαστρεντερικό. Έπειτα από πειράματα σε ασθενείς με οίδημα και σε υγιείς ασθενείς, φάνηκε πως υπήρχε αυξημένη παραγωγή ενδοτοξινών και κυτταροκινών στο πλάσμα στους πρώτους σε σχέση με τους δεύτερους. Ακόμη, επιπλέον μελέτες έδειξαν πως σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, ο πληθυσμός των βακτηρίων του εντέρου είχε αυξηθεί, οδηγώντας στην παραγωγή λιποπολυσακχαριτών κι αύξησή τους στην κυκλοφορία του αίματος προωθώντας έτσι φλεγμονές υπεύθυνες για την καρδιακή ανεπάρκεια (W.H. Wilson Tang, et al., 2017).

## **2.4.Μικροβιόκοσμος και παχυσαρκία**

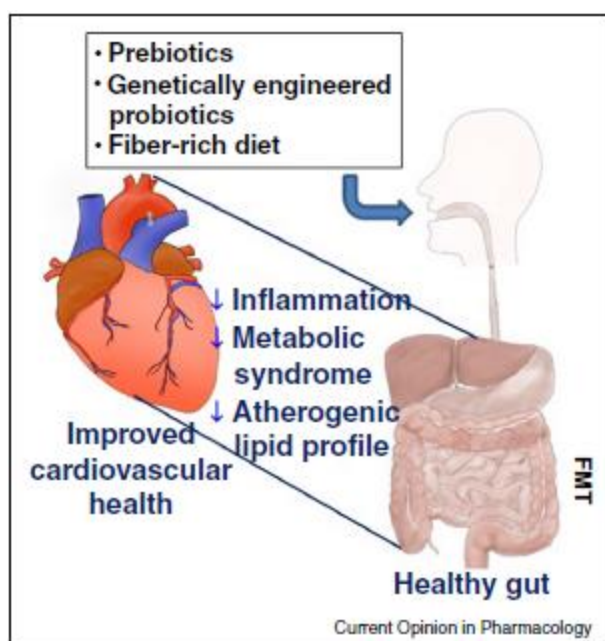
### **Συσχέτιση εντερικού μικροβιόκοσμου με το σωματικό βάρος**

Στη σημερινή εποχή, με τη δυτικού τύπου διατροφή, η παχυσαρκία έχει διεγείρει την ανησυχία πολλών επιστημόνων για την προαγωγή της δημόσιας υγείας. Μια σειρά από πειράματα που έχουν διεξαχθεί σε ποντίκια αποκάλυψαν τη συσχέτιση μεταξύ των μικροοργανισμών του εντέρου και την ανάπτυξη της παχυσαρκίας. Αναφέρεται ότι η αναλογία μεταξύ των δύο σημαντικών φύλων (Bacteroidetes και Firmicutes) του εντερικού μικροβιόκοσμου μεταβάλλεται στον παχύσαρκο φαινότυπο (Ley et al., 2005). Σε πειραματόζωα αλλά και σε δείγμα ανθρώπων παρατηρήθηκε ότι τα Bacteroidetes μειώνονται δραστικά, ενώ τα Firmicutes αυξάνονται στην παχυσαρκία (Ley et al., 2010). Αντίθετα τα Bacteroidetes φαίνεται ότι αυξάνονται όταν μειώνεται το σωματικό βάρος είτε μέσω διατροφικής παρέμβασης είτε μέσω βαριατρικού χειρουργείου, όπως το γαστρικό by-pass. Σε περαιτέρω έρευνες από τους Hildebrandt et al. το 2009 κι άλλους αναλυτές πάνω σε πειραματόζωα, αποδείχθηκε πιθανόν δεν είναι το υψηλό σωματικό βάρος, αλλά η υψηλή σε λίπος δίαιτα που ακολουθούσαν τα αντικείμενα που εξηγούσε την αλλαγή στον εντερικό μικροβιόκοσμο. Στην πορεία άλλες ερευνητικές ομάδες αναφέρουν διαφορετικές συσχετίσεις με τους μικροοργανισμούς του

εντέρου και τον παχύσαρκο φαινότυπο (Yassour et al., 2016). Καταλήγοντας όμως αξίζει να σημειωθεί ότι ο παχύσαρκος φαινότυπος έχει διαφορετικό εντερικό μικροβιόκοσμο σε σχέση με το κανονικό βάρος. Από την άλλη πλευρά σε έρευνες σε ανθρώπους, έπειτα από το γαστρικό by-pass, φαίνεται πως το *Faecalibacterium prausnitzii*, το οποίο απουσιάζει στα παχύσαρκα άτομα ή σε πάσχοντες με διαβήτη, αυξάνει μετά το χειρουργείο. Η ανακάλυψη αυτή φανέρωσε ένα νέο μηχανισμό με τον οποίο ο εντερικός μικροβιόκοσμος βοηθά στη μείωση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα έπειτα από βαριατρικό χειρουργείο, πριν την απώλεια παραπανίσιων κιλών (Furet J.P. et al., 2010).

## 2.5 Αντιμετώπιση-Πρόληψη CVD και παχυσαρκίας

**Διαιτητικές ίνες :** Υψηλές σε διαιτητικές ίνες δίαιτες φαίνεται να παρουσιάζουν ευνοϊκά αποτελέσματα όσον αφορά την αντιμετώπιση και πρόληψη έναντι της υψηλής αρτηριακής πίεσης, της συσσώρευσης αθηρωματικών πλακών και του εμφράγματος του μυοκαρδίου, ευνοώντας την ανάπτυξη μικροοργανισμών στον εντερικό βλεννογόνο ευεργετικών για τη αντιμετώπιση των παθήσεων αυτών (Marques FZ. et al., 2016).



**Εικόνα 16:** Επίδραση προ- και πρεβιοτικών και διαιτητικών ινών στον εντερικό μικροβιόκοσμο.

**Πρεβιοτικά:** Τα πρεβιοτικά είναι πολυσακχαρίτες που δεν πέπτονται από τον ανθρώπινο οργανισμό και προωθούν την παραγωγή λιπαρών οξέων μικρής αλύσου και βακτηρίων με ευεργετικές ιδιότητες στον εντερικό μικροβιόκοσμο. Λίγες μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση των πρεβιοτικών και της παχυσαρκίας. Κλινικές μελέτες σε γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση, έπειτα από τη χορήγηση σιροπιού πλούσιο σε ολιγοφρουκτόζη από το *Polymnia sanchifolia* φανέρωσαν απώλεια 15kg, μείωση στην ινσουλίνη νηστείας και στην LDL-χοληστερόλη, έναντι γυναικών που κατανάλωναν μη εμπλουτισμένο σιρόπι. Ακόμα τα πρεβιοτικά παρουσιάζουν έλεγχο της θερμιδικής πρόληψης και των επιπέδων σακχάρου στο αίμα και μείωση των επιπέδων της γκρελίνης, ορμόνης που είναι αυξημένη σε παχύσαρκους ασθενείς και προωθεί την όρεξη (Jian Shen et al., 2012).

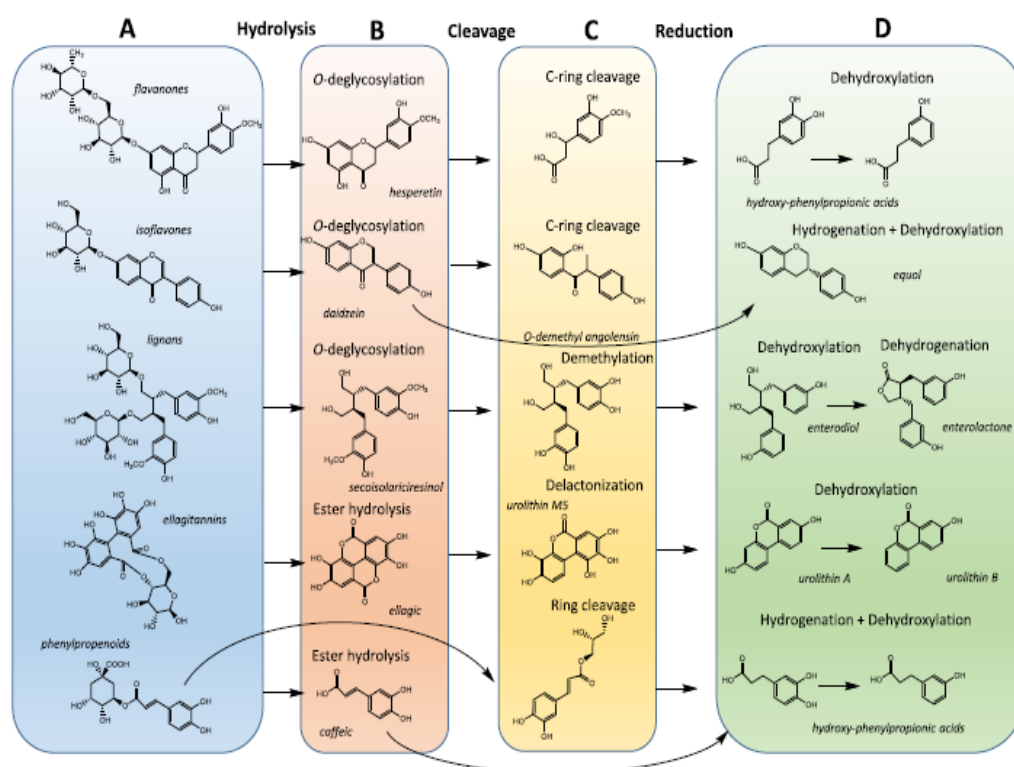
**Προβιοτικά:** Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας τα προβιοτικά είναι ζωντανοί οργανισμοί που, όταν χορηγούνται σε κατάλληλες ποσότητες συνεισφέρουν στην προαγωγή πολλών θετικών επιδράσεων στον οργανισμό. Επιλεγμένα στελέχη προβιοτικών, όπως το γένος *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, φαίνεται να βελτιώνουν τα επίπεδα φλεγμονών, την παχυσαρκία κι άλλες σχετικές μεταβολικές παθήσεις μέσω διαφόρων μηχανισμών, όπως με το να εμποδίζουν παθογόνους μικροοργανισμούς να προσκολληθούν στο επιθήλιο ή με το να προωθούν την ανάπτυξη και συμβίωση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Για τη ρύθμιση της παχυσαρκίας, κλινικές μελέτες με τυχαία επιλογή σε 43 υπέρβαρους ανθρώπους δοκίμασαν τη χορήγηση γάλακτος εμπλουτισμένο με στελέχη του *Lactobacillus gasseri* και γάλακτος χωρίς την προσθήκη προβιοτικών. Παρατήρησαν πως έπειτα από 12 εβδομάδες κατανάλωσης, υπήρξε σημαντική μείωση στο λιπώδη ιστό, στην περιφέρεια μέσης και στο σωματικό βάρος. Παρόμοιες μελέτες σε έγκυες γυναίκες, έδειξαν πως η πρόληψη προβιοτικών τους τελευταίους μήνες της εγκυμοσύνης προλάμβανε την ταχεία ανάπτυξη του σωματικού βάρους των παιδιών (Jian Shen et al., 2012). Όσον αφορά την πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων, σε ασθενείς που τους χορηγούνται προβιοτικά φαίνεται βελτίωση των επιπέδων της πίεσης. Σε μετα-ανάλυση που έγινε το 2014 από τους Khaledi S et al. σημειώθηκε σημαντική μείωση της αρτηριακής πίεσης έπειτα από χορήγηση προβιοτικών (Khaledi S et al., 2014).



## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Αλληλεπίδραση φαινολικών συστατικών και εντερικού μικροβιόκοσμου

### 3.1 Μεταβολισμός φαινολικών συστατικών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Οι φαινολικές ενώσεις αλληλεπιδρούν σε μεγάλο βαθμό με τον εντερικό μικροβιόκοσμο, αφού έπειτα από επεξεργασία τους από αυτόν μπορούν να είναι διαθέσιμες προς απορρόφηση (Laparra J.M., Sanz Y., 2009). Πολλές φαινολικές ενώσεις απορροφώνται από το εντερικό σύστημα, ενώ άλλες υπόκεινται επεξεργασία από την μικροβιόκοσμο, όπου και παράγονται οι μεταβολίτες τους (Marin L. et al., 2015).



**Εικόνα 17:** Οι αλλαγές που υπόκεινται τα φαινολικά συστατικά όταν μεταβολίζονται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο (Espín JC, et.al, 2017).

Ο μεταβολισμός των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο περιλαμβάνει εστεροποιήσεις, υδροξυλιώσεις, γλυκοζυλιώσεις,

αποκαρβοξυλιώσεις κ.ά. (Aura AM., 2008). Τα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών εξαρτώνται από δύο σημαντικούς παράγοντες:

- Τη δομή της φαινολικής ένωσης, η οποία καθορίζει τις ενώσεις που θα προκύψουν, πως θα απορροφηθούν και πως θα μεταφερθούν στην κυκλοφορία και
- Την ποικιλία των μικροοργανισμών στον εντερικό αυλό, διότι μπορεί κάποιες φαινολικές ενώσεις να ζυμώνονται από είδη που παρατηρούνται σχεδόν σε όλους τους ανθρώπους, άλλες όμως απαιτούν εξειδικευμένους οργανισμούς για την επεξεργασία, διάσπαση κι απορρόφηση τους (Marin L. Et al., 2015).

| phenolic compound |                          | metabolite                                                   | responsible intestinal microbiota                                                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| isoflavone        | daidzein                 | equol                                                        | <i>Bacteroides ovatus</i> spp., <i>Streptococcus intermedius</i> spp., <i>Ruminococcus productus</i> , SNU-Julong 732 (AY310748), <i>Enterococcus faecium</i> EPI1, <i>Lactobacillus mucosae</i> EPI2, <i>Fingoldia magna</i> EPI3, and <i>Veillonella</i> spp. EP |
|                   | daidzein                 | O-demethylangolensin                                         | <i>Clostridium</i> spp. HGHA136, <i>Eubacterium ramulus</i>                                                                                                                                                                                                        |
| flavonol          | quercetin                | 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid                           | <i>Clostridium orbiscindens</i> , <i>Eubacterium oxidoreducens</i> , <i>Butyrivibrio</i> spp.                                                                                                                                                                      |
|                   |                          | 2-(3-hydroxyphenyl)acetic acid                               |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   |                          | 3,4-dihydroxybenzoic acid                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   |                          | phloroglucinol                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   |                          | 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid                        |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   |                          | 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid                            |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   | kaempferol               | 2-(4-hydroxyphenyl)acetic acid                               | <i>Clostridium</i> strains                                                                                                                                                                                                                                         |
| flavanone         | naringenin               | 3-(4-hydroxyphenyl)propionic acid                            | <i>Clostridium</i> strains                                                                                                                                                                                                                                         |
|                   |                          | phloroglucinol                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   | isoxanthohumol           | 8-prenylnaringenin                                           | <i>Eubacterium limosum</i>                                                                                                                                                                                                                                         |
| flavan-3-ol       | catechin and epicatechin | 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid                            | <i>Clostridium cocoides</i> — <i>Eubacterium rectale</i> group                                                                                                                                                                                                     |
|                   |                          | 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-γ-valerolactone                    |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   |                          | 5-(3'-hydroxyphenyl)-γ-valerolactone                         |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   |                          | 3-hydroxyhippuric acid pyrogallol                            |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   |                          | 5-(3,4-dihydroxyphenyl)valeric acid                          |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   |                          | 5-(3-hydroxyphenyl)valeric acid                              |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   |                          | 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propionic acid                        |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   |                          | 5-(3-methoxyphenyl)valeric acid                              |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|                   |                          | 2,3-dihydroxyphenoxy 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)propionic acid |                                                                                                                                                                                                                                                                    |

**Εικόνα 18:** Τα βακτήρια του εντέρου που συμμετέχουν στον μεταβολισμό των φαινολικών συστατικά (Selma MV, et al., 2016).



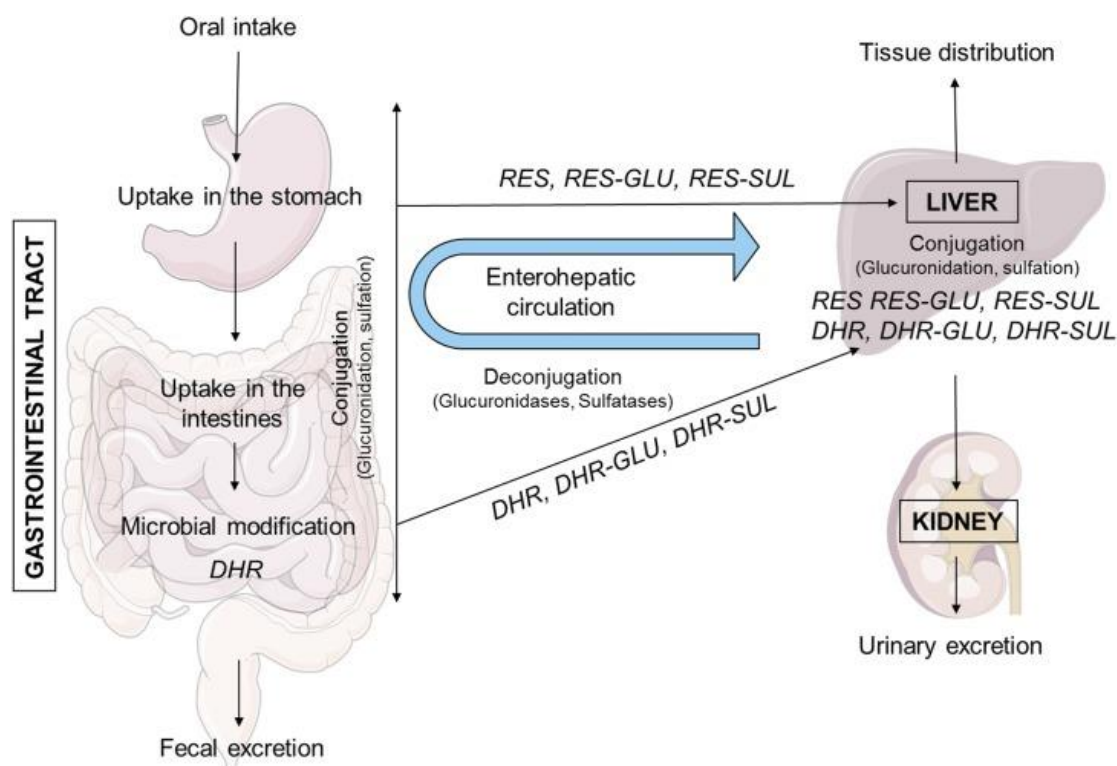
### 3.1.1 Μεταβολισμός ολικών φαινολικών συστατικών του κρασιού από τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Παρακάτω θα αναλυθούν τα προϊόντα από μελέτες *in vitro* χρησιμοποιώντας κόπρανα ανθρώπων ως εμβόλιο για τη μελέτη του μεταβολισμού των επικρατέστερων φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών του κρασιού.

Σε έρευνα που έγινε από τους Fernando Sanchez-Patan et al. το 2012, παρατηρήθηκαν μεγάλες ποσότητες μεταβολιτών των φλαβονολών και των ανθοκυανινών του κρασιού, οι οποίες προέκυψαν μετά την *in vitro* δράση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Από αυτές τις διαδικασίες τροποποιήθηκε η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου, αφού κάποιες κατηγορίες μικροοργανισμών χρησιμοποίησαν τις αρχικές ενώσεις ως πηγή άνθρακα και μεταβλήθηκαν οι βιολογικές δράσεις των αρχικών φαινολικών μορίων.

Παρακάτω θα αναλυθούν τα προϊόντα από *in vitro* μικροβιακές μετατροπές των επικρατέστερων φαινολικών οξέων και φλαβονοειδών του κρασιού, μετά από εμβολιασμό με ανθρώπινα δείγματα κοπράνων.

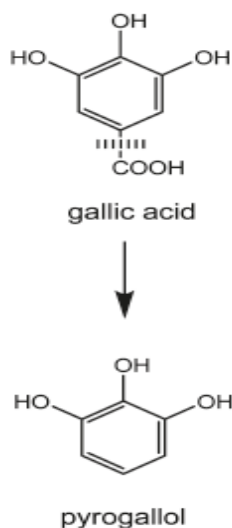
#### Μεταβολισμός ρεσβερατρόλης



**Εικόνα 19:** Μεταβολισμός ρεσβερατρόλης από τον εντερικό μικροβιόκοσμο.



### Μεταβολισμός γαλλικού οξέος



**Εικόνα 21:** Μεταβολισμός του γαλλικού οξέος.

Το γαλλικό οξύ είναι το αποτέλεσμα της υδρόλυσης γαλοταννινών από τα βακτήρια του εντέρου. Στη συνέχεια, το γαλλικό οξύ παράγει πυρογαλλικό ή αλλιώς 1,2,3-τριυδροξυφαινόλη και απορροφάται από το εντεροκύτταρο.

## 3.2 Βιολογική δράση των μικροβιακών μεταβολιτών των φαινολικών συστατικών

### 3.2.1 Επίδραση των φαινολικών στον μικροβιόκοσμο

Τα φαινολικά συστατικά προκαλούν αλλαγές στον εντερικό μικροβιόκοσμο, όπως: α) τροποποιούν τα βακτήρια με τον τρόπο των πρεβιοτικών προϊόντων, β) μεταβάλλουν τον πληθυσμό τους (Tomás-Barberán FA, et al., 2016), γ) δρουν ως αντιμικροβιολογικές ουσίες έναντι παθογόνων βακτηρίων, δ) εμποδίζουν την προσκόλληση παθογόνων μικροοργανισμών στα εντεροκύτταρα.

Οι Queiro-Ortuno et al. πραγματοποίησαν μια έρευνα με δείγματα κοπράνων εθελοντών, έπειτα από κατανάλωση κόκκινου κρασιού, με στόχο να ανιχνεύσουν τις αλλαγές στον εντερικό μικροβιόκοσμο. Παρατήρησαν πως ο πληθυσμός των Proteobacteria, Firmicutes, Fusobacteria και Bacteroidetes αυξήθηκε δραστικά. Το ενδιαφέρον αυτής της έρευνας ήταν η

ανακάλυψη πως ταυτόχρονα με την αλλαγή στον πληθυσμό των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκαν και τα εξής:

- Μείωση των επιπέδων της αρτηριακής πίεσης (συστολικής και διαστολικής), των τριγλυκεριδίων και της HDL χοληστερόλης με αύξηση του πληθυσμού των *Bacteroides* και
- Μείωση των επιπέδων της CRP πρωτεΐνης (πρωτεΐνη οξείας φάσης, αυξάνεται σε φλεγμονές) με αύξηση του πληθυσμού των *Bifidobacterium*.

Η αιτία αυτής της δράσης δεν έχει ακόμα ερευνηθεί, αλλά θεωρείται πως τα φαινορικά συστατικά τροποποιούν των πληθυσμό του εντερικού μικροβιόκοσμου και ταυτόχρονα παράγονται ενώσεις που συνεισφέρουν στις αλλαγές στο λιπιδαιμικό προφίλ και στη CRP.

### Επίδραση της ρεσβερατρόλης

Από τις πρώτες έρευνες που ασχολήθηκαν με τους μεταβολίτες της ρεσβερατρόλης από τα βακτήρια του εντέρου ήταν αυτή των Wang D. et al. (2005), όπου βρέθηκε η διυδροξυρεσβερατρόλη. Το 2015 σε έρευνα με δείγματα κοπράνων από 7 εθελοντές από τους Bode M.L. et al., προστέθηκαν στη λίστα δύο ακόμα ενώσεις που φαίνεται να είναι προϊόντα του μεταβολισμού της, το 3,4-διυδροξυ-trans-σιλβένιο και η λουνουράνη. Η καθεμιά από αυτές διέφερε σε ποσότητα στα δείγματα κι ανιχνεύθηκαν έπειτα από ζύμωση των κοπράνων με τη ρεσβερατρόλη σε χρόνο περίπου 30min. Η διαφορά στις συγκεντρώσεις ανάμεσα στα δείγματα φάνηκε τελικά να οφείλεται στη βιοποικιλότητα των μικροοργανισμών στο δείγμα του κάθε εθελοντή. Στη συνέχεια μετά τη μικροβιολογική ανάλυση του εντερικού μικροβιόκοσμου παρατηρήθηκαν τα ακόλουθα:

|                       | Δείγμα με<br>↑[διυδροξυρεσβερατρόλης] | Δείγμα με<br>↑[λουνουράνης] | Δείγμα με<br>↑[μίξη λουνουράνης-<br>διυδροξυρεσβερατρόλης] |
|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>Firmicutes</b>     | 72%                                   | 53,7%                       | 72,4%                                                      |
| <b>Proteobacteria</b> | 11.6%                                 | 12,2%                       | 11,5%                                                      |
| <b>Actinobacteria</b> | 1,5%                                  | 8,4%                        | 2,4%                                                       |
| <b>Bacteroidetes</b>  | 11,8%                                 | 18,4%                       | 11,3%                                                      |

**Εικόνα 22:** Αλλαγές στον πληθυσμό των βακτηρίων του εντέρου από τη δράση της ρεσβερατρόλης και των μεταβολιτών της.

### **Επίδραση του γαλλικού οξέος**

Αναφέρεται ότι το γαλλικό, αναστέλλει την ανάπτυξη στελεχών του γένους *Streptococcus*, αλλά και την ικανότητά του να προσκολλάται σε άλλα κύτταρα, σε *in vitro* μελέτη (Kang M.S. et al., 2008).

Τα ποσοστά των υπόλοιπων μικροοργανισμών δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους. Από τις αναλύσεις επαληθεύθηκε η θεωρία πως ανάλογα με τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου, οι μεταβολίτες των φαινολικών συστατικών διαφέρουν. Σε ποιες βιολογικές δράσεις συνεισφέρουν παραμένει ακόμα άγνωστο.

### **3.2.2 Επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα**

Όπως έχει αναφερθεί, τα φαινολικά συστατικά παρουσιάζουν πολλές βιολογικές δράσεις ωφέλιμες για τον οργανισμό. Όμως στο πλάσμα, οι ποσότητες των ίδιων των φαινολικών είναι μικρές, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν ενδιαφέρον οι μελέτες για τις επιδράσεις των μεταβολιτών τους στην υγεία και συγκεκριμένα στην προστασία από καρδιαγγειακά νοσήματα. Οι μεταβολίτες των φαινολικών συστατικών φαίνεται να παρουσιάζουν παρόμοιες ιδιότητες ως προς την αντι-οξειδωτική ικανότητα, στη μείωση των φλεγμονών και της πίεσης του αίματος. Πολλά είδη κυττάρων του οργανισμού, όπως του ήπατος, έχουν τα απαραίτητα ένζυμα να μετατρέψουν τους μεταβολίτες των φαινολικών συστατικών σε ασύζευκτα μόρια με αποτέλεσμα να δεσμεύσουν ελεύθερες ρίζες που προκύπτουν από μια φλεγμονώδη αντίδραση. Σε διαφορετικές μελέτες σε ποντίκια φαίνεται πως ο μεταβολίτης της κερκετίνης μειώνει σημαντικά την πίεση του αίματος (Carolina Cueva, et al., 2017).

Σε *in vitro* μελέτη που απομονώθηκαν βακτήρια του εντέρου και τους χορηγήθηκαν γνωστά φλαβονοειδή παρατηρήθηκε πως οι μεταβολίτες της κερκετίνης, εμφάνιζαν μεγαλύτερη αναστολή στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από την ίδια την κερκετίνη (Dong-Hyun Kim et

al., 1998). Τα ίδια αποτελέσματα εμφάνισαν και μεταβολίτες του γαλλικού οξέος σε in vitro μελέτη με δείγμα κοπράνων εθελοντών κι έγχυση τσαγιού (John van Duynhoven et al., 2015). Δεδομένα που να συσχετίζουν τους μεταβολίτες των φαινολικών ουσιών από τα βακτήρια του εντέρου με την ανάπτυξη της παχυσαρκίας δεν υπάρχουν.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>: ΣΚΟΠΟΣ

Τα φαινολικά συστατικά του κρασιού έχουν απασχολήσει πολλές ερευνητικές ομάδες, όσον αφορά τη βιοδιαθεσιμότητα και την απορρόφησή τους και τις βιολογικές τους δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Η αλληλεπίδρασή τους με τον εντερικό μικροβιόκοσμο φαίνεται να οδηγεί στην παραγωγή μεταβολιτών που με τη σειρά τους επιδρούν διαφορετικά στον οργανισμό. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να εξετάσει τη βιολογική δράση των προϊόντων της *in vitro* ζύμωσης γνωστών εκχυλισμάτων κόκκινου κρασιού, αλλά και επιμέρους φαινολικών συστατικών του κρασιού με τον εντερικό μικροβιόκοσμο από εθελοντές με κανονικό βάρος και παχύσαρκους εθελοντές.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 5.1 Συλλογή και Προετοιμασία δειγμάτων

Επιλέχθηκαν έξι υγιείς γυναίκες και άντρες ηλικίας 18-40 ετών και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, νορμοβαρείς και παχύσαρκοι, ανάλογα με το δείκτη μάζας σώματος τους. Ο δείκτης μάζας σώματος της ομάδας των νορμοβαρών κυμαινόταν από 18.50 - 24.99 kg/m<sup>2</sup> και των παχύσαρκων ήταν μεγαλύτερος ή ίσος με 30.00 kg/m<sup>2</sup>. Οι εθελοντές έπρεπε να μην αντιμετωπίζουν προβλήματα του πεπτικού συστήματος όπως για παράδειγμα ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι εντέρου, οξεία διάρροια τις προηγούμενες τέσσερις εβδομάδες και έντονη δυσκοιλιότητα. Επίσης, δεν έπρεπε να έχουν χρόνια ή αυτοάνοσα νοσήματα, όπως για παράδειγμα ιστορικό στεφανιαίας νόσου, ιστορικό ηπατικών και νεφρικών παθήσεων, διαβήτη, καθώς επίσης να μην έχουν ενεργές λοιμώξεις του αναπνευστικού και να μην έχουν λάβει κάποιο αντιβιοτικό ή αντιφλεγμονώδες φάρμακο τους τελευταίους 2 μήνες πριν την μελέτη. Επίσης να μην έχουν καταναλώσει προβιοτικά δύο εβδομάδες πριν τη μελέτη. Για τις γυναίκες εθελόντριες δεν έπρεπε να έχει υπάρξει εγκυμοσύνη το τελευταίο έτος. Τέλος, αποκλείονταν οι εθελοντές που είχαν ακραίες διαιτητικές συμπεριφορές (π.χ. χορτοφάγοι).

##### 5.1.1 *In vitro* επώαση κοπράνων

Η πλήρης κένωση του εθελοντή συλλέγεται εντός προζυγισμένου συστήματος πλαστικού συλλέκτη-σακούλας και μεταφέρεται στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών (Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ.), το συντομότερο δυνατόν ( $\leq 2$  ώρες από την ώρα κένωσης) για μικροβιολογική ανάλυση. Η πλήρης κένωση ζυγίζεται σε εργαστηριακό ζυγό με ακρίβεια 0.1g, διαλυτοποιείται σε διάλυμα PBS pH 7.3 (20%w/v) (faecal slurry) και ομογενοποιείται μηχανικά σε κατάλληλο όργανο (Stomacher, Seward, USA), με κινήσεις που



προσομοιάζουν εκείνες του στομάχου υπό φυσιολογική ταχύτητα και μέχρι να καταστεί οπτικά ομοιογενές το εμβόλιο (περίπου 10-15sec).

### **5.1.2 *In vitro* ζύμωση σε στατικές καλλιέργειες (Static batch culture fermentations)**

Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, το βασικό μέσο καλλιέργειας μεταφέρεται εντός αναερόβιου θαλάμου προκειμένου να προ-αναχθεί για περίπου 12 ώρες.

Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, το βασικό μέσο καλλιέργειας μεταφέρεται εντός αναερόβιου θαλάμου προκειμένου να προ-αναχθεί για περίπου 12 ώρες.

Την ημέρα διεξαγωγής της *in vitro* ζύμωσης μεταφέρονται υπό αναερόβιες συνθήκες στα δοχεία Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας τα εκχυλίσματα κρασιού ή τα επιμέρους φαινολικά συστατικά. Συγκεκριμένα, 10 µg/ml ρεσβερατρόλη, 10 µg/ml κερκετίνη, 10 µg/ml γαλλικό οξύ, τα υδατοδιαλυτά (W) και τα λιποδιαλυτά (TL) συστατικά του κρασιού Cabernet Sauvignon. Η ποσότητα των εκχυλισμάτων που προστέθηκε αντιστοιχεί σε ένα ποτήρι κρασιού (120ml).

Επιπλέον, σε δύο δοχεία Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας προστίθεται ινουλίνη (πρεβιοτικός μάρτυρας), ενώ στο πείραμα περιλαμβάνεται και ένα δοχείο Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς πηγή άνθρακα (αρνητικός μάρτυρας).

Όλα τα δοχεία εμβολιάζονται ασηπτικά με 10% (v/v) από το εμβόλιο κοπράνων (5ml faecal slurry σε 45ml basal medium), το προκύπτον μίγμα (50ml) μοιράζεται υπό καλή ανάδευση σε 3 falcon tubes των 50ml (16.67ml/falcon: χρόνοι 0h, 6h και 24h) και οι στατικές καλλιέργειες επωάζονται υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 24h (με βιδωμένα χαλαρά καπάκια).

Στους χρόνους 0h, 6h και 24h απομακρύνονται από τον αναερόβιο θάλαμο τα αντίστοιχα falcon (φυλάσσονται σε πάγο μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας), προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι βιοχημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις.

## 5.2 Βιοχημική επεξεργασία

### Μέθοδος Bligh – Dyer

**Αρχή της μεθόδου:** Τα λιποειδή διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες. Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύστημα  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:2:0,8, v/v/v), επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών ενός βιολογικού δείγματος, καθώς και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων λιποδιαλυτών ουσιών όπως αλάτων, αμινοξέων ή σακχάρων. Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1:0,9, v/v/v), στη χλωροφορμική φάση κατανέμονται μόνο τα λιποειδή, ενώ στην υδατική κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά του δείγματος.

### Πειραματική διαδικασία:

Σε διαχωριστική χοάνη των 100-250ml βάζουμε 15 ml slurry προσθέτουμε 16,7 ml χλωροφόρμιο και 33,3 ml μεθανόλη ώστε να προκύψει το μονοφασικό σύστημα  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:2:0,8, v/v/v) το μίγμα αναδεύεται και παραμένει για 10min. Μετά από ισχυρή ανάδευση, από την προσθήκη 16,2 ml νερό και 16,2 ml χλωροφόρμιο ώστε να προκύψει μονοφασικό σύστημα  $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$  (1:1:0,9, v/v/v) και καλής ανάδευσης, το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία μέχρι να αποκατασταθεί ισορροπία και να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των δυο φάσεων για 1-2 ώρες. Στη συνέχεια, έγινε παραλαβή της χλωροφορμικής (κάτω) φάσης κάθε δείγματος σε προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες των 0,2L και της υδατικής φάσης (πάνω) κάθε δείγματος σε προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες των 0,2L. Έπειτα από εξάτμιση των δύο φάσεων σε περιστρεφόμενη συσκευή υπό πίεση, ζυγίστηκαν ξανά οι φιάλες. Ακολούθησε μεταφορά της υδατικής φάσης σε προζυγισμένο ουροσυλλέκτη και λυοφιλιωποίηση αυτής μέχρι την εξάτμιση επί ξηρού. Το κάθε δείγμα της χλωροφορμικής φάσης μεταφέρθηκε σε προζυγισμένο γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα με διαλύτη χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1 (2-3 mL), ενώ τα δείγματα στην υδατική φάση συλλέχθηκαν σε Eppendorf με την προσθήκη 1,4mL νερού.

### 5.3 Προσδιορισμός φαινολικών συστατικών του δείγματος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu

**Αρχή μεθόδου:** Παρουσία του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu, οι φαινόλες οξειδώνονται προς τις αντίστοιχες κινόνες και τα σε οξέα, ανάγονται μερικώς από την κατάσταση σθένους +6, σε ένα μείγμα ενώσεων με σθένη +6 και +5, που έχει αποτέλεσμα την παραγωγή συμπλόκου μπλε χρώματος, το οποίο φωτομετρείται στα 725nm.

#### **Αναλυτική πορεία:**

Τοποθετήθηκαν κατάλληλες ποσότητες γαλλικού οξέος σε (2,5,10,30,60μL) σε έξι δοκιμαστικούς σωλήνες κι εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου.

Ακολούθησε προσθήκη συγκεκριμένων ποσοτήτων των δειγμάτων σε διαφορετικές ποσότητες στους σωλήνες κι εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Ένας δοκιμαστικός σωλήνας δεν έφερε δείγμα, τυφλός μάρτυρας. Στη συνέχεια προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα νερού και 0,1mL Folin-Ciocalteu κι ο κάθε σωλήνας αναδεύτηκε σε vortex. Μετά από παραμονή 3 λεπτών προστέθηκε σε κάθε σωλήνα 0,4mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 35% και το δείγμα, έπειτα από έντονη ανάδευση, αφέθηκε για μία ώρα για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Σε plate τοποθετήθηκαν 200μL των δειγμάτων και φωτομετρήθηκαν στα 725nm, με μηδενισμό του τυφλού διαλύματος.

### 5.4. Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών του δείγματος να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (DPPH)

**Αρχή μεθόδου:** Τα μόρια των φαινολικών ουσιών δρώντας ως αντι-οξειδωτικά, αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες της DPPH παράγοντας ανάλογα με το βαθμό δέσμευσης ένα ιώδες χρώμα που φωτομετράται στα 517nm.

**Αναλυτική πορεία:**

Από τον ποσοτικό υπολογισμό της ποσότητας των φαινολικών ενώσεων με την τεχνική του Folin-Ciocaltue, βρέθηκαν οι ποσότητες των δειγμάτων που έφεραν την ίδια ποσότητα φαινολικών συστατικών. Σε plate τοποθετήθηκαν διαφορετικές ποσότητες δείγματος και νερού. Ο μέγιστος όγκος του δείγματος σε κάθε τομή φθάνει τα 200μL, οπότε με αφαίρεση των 35μL DPPH που τοποθετήθηκαν στο τέλος της διαδικασίας, υπολογίζεται ο όγκος της αιθανόλης που θα προστεθεί. Τέλος έγινε προσθήκη 35μL DPPH και τα δείγματα φωτομετρήθηκαν στα 517nm. Έπειτα από επώαση των δειγμάτων για 30min στους 36°C, η διαδικασία της φωτομέτρησης επαναλήφθηκε.

## **5.5. Μέτρηση της αντι-αιμοπεταλιακής ικανότητας του δείγματος με τη μέθοδο prp(platelet-rich-plasma)**

**Αρχή μεθόδου:** Στόχος της μεθόδου είναι να ανιχνεύσει εάν το δείγμα προλαμβάνει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρουσία γνωστών παραγόντων πήξης του αίματος ADP, PAF και κολλαγόνο.

**Αναλυτική πορεία:**

Έγινε παραλαβή 56mL αίματος από εθελοντή για τη συσσώρευση αιμοπεταλίων σε πλαστικά σωληνάκια των 15 mL που περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα AC (anticoagulant citrate) σε αναλογία αίμα/αντιπηκτικό 10/1 (12,6ml αίμα +1,4 ml AC). Έπειτα από ανάδευση αναποδογυρίζοντας το σωλήνα με το αίμα 4-5 φορές προσέχοντας να μην αφρίσει, έγινε φυγοκέντρηση στα 140g ή 1300rpm για 12min στους 20°C χωρίς φρένο. Το υπερκείμενο (Platelet-rich plasma, PRP) μεταφέρθηκε σε πλαστικό σωλήνα, με προσοχή, και το PRP αφέθηκε στον πάγκο έως ότου παραληφθεί και το (Platelet-poor plasma, PPP). Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 1500g ή 3000rpm για 15min στους 20°C ώστε να παραληφθεί το υπερκείμενο (Platelet-poor plasma, PPP) σε πλαστικό σωλήνα.

Ο αριθμός των αιμοπεταλίων υπολογίστηκε ως εξής:

Αρχικά μετρήθηκε η απορρόφηση 1mL PRP στα 530nm στο φωτόμετρο, όπου η απορρόφηση στα 530nm ίση με 0,8 αντιστοιχεί σε 500.000 αιμοπετάλια/μL. Εάν η

απορρόφηση είναι μεγαλύτερη από 0,8, η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων ρυθμίζεται στα 500.000 αιμοπετάλια/μL με προσθήκη PPP από τον ίδιο εθελοντή. Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου (cuvettes) των 0,5mL προστέθηκαν 250μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων που περιέχει  $5 \times 10^5$  κύτταρα/μL και στην ειδική θέση το δ/μα PPP. Ακολούθησε επώαση για 10 min σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο θερμοκρασίας 37°C. Στην συνέχεια στην κυψελίδα με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετήθηκε μικρός μαγνητικός αναδευτήρας που περιστρέφεται με 1200rpm (rounds per min) και 2μL δ/τος αναφοράς. Η κυψελίδα τοποθετήθηκε στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου και μετά από 5 min προστίθεται ο συσσωρευτικός παράγοντας (PAF, ADP, κολλαγόνο) ορισμένης τελικής συγκέντρωσης και καταγράφεται η καμπύλη συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με την συσσώρευση, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα.

### **Στατιστική ανάλυση**

Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στο SPSS, όπου χρησιμοποιήθηκαν τα εργαλεία των Kolmogorov-Smirnov για τον έλεγχο της κανονικότητας και το τεστ ANOVA για τη σύγκριση των διαφορετικών συνθηκών.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 6.1 Εκχύλιση των συστατικών μετά την *in vitro* επώαση με τους μικροοργανισμούς από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών.

Η *in vitro* επώαση από τον εντερικό μικροβιόκοσμο έγινε απουσία (δείγμα ελέγχου) ή παρουσία ινουλίνης, ρεσβερατρόλης, κερκετίνης, γαλλικού οξέος, των υδατοδιαλυτών (W) και των λιποειδικών (TL) συστατικών του κρασιού σε κάθε δείγμα ξεχωριστά. Η επώαση των εκχυλισμάτων του κρασιού και των επιμέρους φαινολικών με τους μικροοργανισμούς από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών πραγματοποιήθηκε σε τελικές συγκεντρώσεις (10μg/mL) 43,9 μM ρεσβερατρόλη, 33,1μM κερκετίνη, 58,8 μM γαλλικό οξύ.

Από την εκχύλιση Bligh Dyer των δειγμάτων μετά από την επώαση προέκυψε σε κάθε περίπτωση μια χλωροφορμική φάση (C), που περιέχει τους λιποδιαλυτούς μεταβολίτες και μια υδατική φάση (W), που περιέχει τους υδατικούς μεταβολίτες. Η μάζα σε mg των δειγμάτων τόσο της χλωροφορμικής (C) όσο και της υδατικής φάσης (W) που συλλέχθηκαν μετά την εκχύλιση για κάθε δείγμα επώασης στις 0, 6 και 24 ώρες φαίνονται στους **πίνακες 1a και b** αντίστοιχα.

**Πίνακας 1a:** Μάζα (mg) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης.

| 0h C           | Ολ.μάζα (mg) | 6h C           | Ολ.μάζα (mg) | 24h C          | Ολ.μάζα (mg) |
|----------------|--------------|----------------|--------------|----------------|--------------|
| Δείγμα ελέγχου | 35,2±12,27   | Δείγμα ελέγχου | 35,45±11,58  | Δείγμα ελέγχου | 32,63±16,08  |
| Ινουλίνη       | 33,32±12,29  | Ινουλίνη       | 38,8±7,65    | Ινουλίνη       | 30,6±17,17   |
| Ρεσβερατρόλη   | 39,08±13,55  | Ρεσβερατρόλη   | 40,08±14,3   | Ρεσβερατρόλη   | 39,63±21,69  |

|                      |             |                      |             |                      |             |
|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|
| Κερκετίνη            | 37,68±8,85  | Κερκετίνη            | 40,23±0,51  | Κερκετίνη            | 35,85±13,67 |
| Γαλλικό οξύ          | 34,88±14,66 | Γαλλικό οξύ          | 37,5±18,17  | Γαλλικό οξύ          | 39,7±14,09  |
| Υδ/τά συστ. κρασιού  | 29,66±16,1  | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 37,85±18,07 | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 35,93±14,1  |
| Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 45,64±10,11 | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 38,08±17,6  | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 50,77±48,98 |
| p*                   | 0,591       | p*                   | 0,998       | p*                   | 0,842       |

**Πίνακας 1b:** Μάζα (mg) των δειγμάτων της υδατικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης.

| 0h W                 | Ολ.μάζα (mg) | 6h W                 | Ολ.μάζα (mg)  | 24h W                | Ολ.μάζα (mg)  |
|----------------------|--------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|
| Δείγμα ελέγχου       | 69,94±7,02   | Δείγμα ελέγχου       | 58,02±8,84    | Δείγμα ελέγχου       | 54,45±12,4    |
| Ινουλίνη             | 125,64±19,8  | Ινουλίνη             | 104,72±18,82  | Ινουλίνη             | 90,52±25,6    |
| Ρεσβερατρόλη         | 76,76±11,54  | Ρεσβερατρόλη         | 66,78±7,97    | Ρεσβερατρόλη         | 56,2±7,68     |
| Κερκετίνη            | 74,1±15,17   | Κερκετίνη            | 63,27±6,07    | Κερκετίνη            | 54,67±8,46    |
| Γαλλικό οξύ          | 72,84±12,42  | Γαλλικό οξύ          | 62,35±7,27    | Γαλλικό οξύ          | 53,57±5,09    |
| Υδ/τά συστ. κρασιού  | 97,82±14,08  | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 171,54±199,78 | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 143,38±178,66 |
| Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 85,6±7,87    | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 74,5±4,37     | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 57,07±7,95    |
| p*                   | 0,001        | p*                   | 0,122         | p*                   | 0,223         |

Από τον **πίνακα 1a** δεν παρατηρείται μεγάλη διαφοροποίηση μεταξύ των τριών στιγμών ζύμωσης στα 7 δείγματα. Στην υδατική φάση στον **πίνακα 1b**, οι μάζες των ιζημάτων πάλι δεν παρουσιάζουν κάποια σημαντική διαφοροποίηση.

Η συγκέντρωση (mg/mL) των δειγμάτων που συλλέχθηκε από τη διαδικασία Bligh-Dyer σε χρόνους 0, 6 και 24ώρες από τη χλωροφορμική C την υδατική W φάση φαίνονται στους πίνακες 2a και b αντίστοιχα.

**Πίνακας 2a:** Συγκέντρωση (mg/mL) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης.

| 0h C                 | Ολ.συγκέντρωση (mg/mL) | 6h C                 | Ολ.συγκέντρωση (mg/mL) | 24h C                | Ολ.συγκέντρωση (mg/mL) |
|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| Δείγμα ελέγχου       | 293,33±180,86          | Δείγμα ελέγχου       | 354,5±115,8            | Δείγμα ελέγχου       | 326,33±160,82          |
| Ινουλίνη             | 277,67±174,87          | Ινουλίνη             | 388±76,51              | Ινουλίνη             | 306±171,68             |
| Ρεσβερατρόλη         | 325,67±200,37          | Ρεσβερατρόλη         | 400,83±143,06          | Ρεσβερατρόλη         | 396,33±216,94          |
| Κερκετίνη            | 314±173                | Κερκετίνη            | 402,33±105,16          | Κερκετίνη            | 378,5±136,74           |
| Γαλλικό οξύ          | 290,67±193,58          | Γαλλικό οξύ          | 375±181,73             | Γαλλικό οξύ          | 397±140,96             |
| Υδ/τά συστ. κρασιού  | 247,17±188,17          | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 378,5±180,7            | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 359,33±141,07          |
| Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 380,33±207,09          | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 380,83±176,01          | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 325,2±224              |
| P*                   | 0,934                  | P*                   | 0,998                  | P*                   | 0,947                  |

**Πίνακας 2b:** Συγκέντρωση (mg/mL) των δειγμάτων της υδατικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης.

| 0h W   | Ολ.συγκέντρωση (mg/mL) | 6h W   | Ολ.συγκέντρωση (mg/mL) | 24h W  | Ολ.συγκέντρωση (mg/mL) |
|--------|------------------------|--------|------------------------|--------|------------------------|
| Δείγμα | 41,63±20,88            | Δείγμα | 41,44±6,32             | Δείγμα | 38,9±8,85              |



| ελέγχου                    |             | ελέγχου                 |              | ελέγχου                 |             |
|----------------------------|-------------|-------------------------|--------------|-------------------------|-------------|
| Ινουλίνη                   | 74,78±38,76 | Ινουλίνη                | 74,8±13,44   | Ινουλίνη                | 64,65±18,28 |
| Ρεσβερατρ<br>όλη           | 45,69±23,57 | Ρεσβερατρώ<br>λη        | 47,7±5,69    | Ρεσβερατρώ<br>λη        | 40,14±5,69  |
| Κερκετίνη                  | 44,11±23,68 | Κερκετίνη               | 45,19±4,33   | Κερκετίνη               | 39,26±6,05  |
| Γαλλικό οξύ                | 43,37±22,67 | Γαλλικό οξύ             | 44,53±5,19   | Γαλλικό οξύ             | 38,26±3,64  |
| Υδ/τά συστ.<br>κρασιού     | 58,23±9,9   | Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 122,53±142,7 | Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 50,33±2,71  |
| Λιπ/τά<br>συστ.<br>Κρασιού | 50,95±25,46 | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 53,21±3,12   | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 40,76±5,68  |
| p*                         | 0,355       | p*                      | 0,122        | p*                      | 0,0001      |

Στη χλωροφορμική φάση (πίνακας 2a), καθώς και στην υδατική φάση (πίνακας 2b) δεν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των συγκεντρώσεων των ιζημάτων στους 3 χρόνους.

## 6.2 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών των δειγμάτων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.

Ο προσδιορισμός των φαινολικών συστατικών γίνεται χρησιμοποιώντας ως πρότυπη ένωση το γαλλικό οξύ (GA) και για αυτό το λόγο εκφράζονται ως ισοδύναμα mg GA.

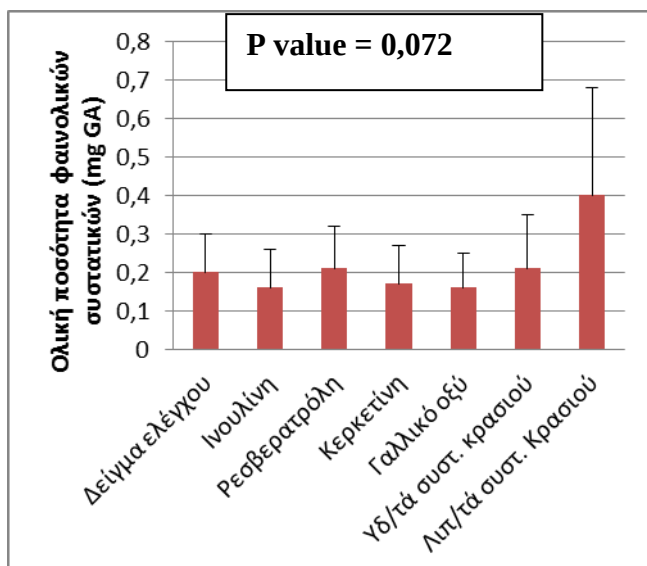
Η in vitro επώαση από τον εντερικό μικροβιόκοσμο έγινε απουσία (δείγμα ελέγχου) ή παρουσία ινουλίνης, ρεσβερατρώλης, κερκετίνης, γαλλικού οξέος, των υδατοδιαλυτών (W) και των λιποειδικών (TL) συστατικών του κρασιού σε κάθε δείγμα ξεχωριστά. Από την εκχύλιση Bligh Dyer των δειγμάτων μετά από την επώαση προέκυψε σε κάθε περίπτωση μια χλωροφορμική φάση (C), που περιέχει τους λιποδιαλυτούς μεταβολίτες και μια υδατική φάση (W), που περιέχει τους υδατικούς μεταβολίτες. Η μάζα σε mg των δειγμάτων τόσο της χλωροφορμικής (C) όσο και της υδατικής φάσης (W). Στους πίνακες 3a και b φαίνονται τα mg

GA που προέκυψαν από τον προσδιορισμό σε χρόνους 0, 6 και 24 ώρες ζύμωσης των δειγμάτων με τα εντεροβακτήρια από τη χλωροφορμική C την υδατική W φάση αντίστοιχα, καθώς και στα **διαγράμματα 1a, 1b, 1c** και **2a, 2b, 2c** αντίστοιχα.

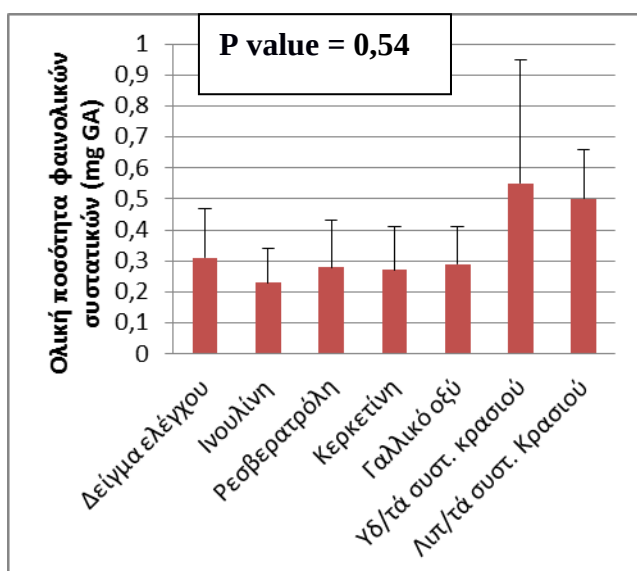
**Πίνακας 3a:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης.

| 0h C                            | Ολ.ποσότητα<br>φαινολικών(mg<br>GA) | 6h C                            | Ολ.ποσότητα<br>φαινολικών(mg<br>GA) | 24h C                           | Ολ.ποσότητα<br>φαινολικών(mg<br>GA) |
|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Δείγμα<br/>ελέγχου</b>       | 0,2±0,1                             | <b>Δείγμα<br/>ελέγχου</b>       | 0,31±0,16                           | <b>Δείγμα<br/>ελέγχου</b>       | 0,28±0,15                           |
| <b>Ινουλίνη</b>                 | 0,16±0,1                            | <b>Ινουλίνη</b>                 | 0,23±0,11                           | <b>Ινουλίνη</b>                 | 0,27±0,13                           |
| <b>Ρεσβερατρόλη</b>             | 0,21±0,11                           | <b>Ρεσβερατρόλη</b>             | 0,28±0,15                           | <b>Ρεσβερατρόλη</b>             | 0,28±0,21                           |
| <b>Κερκετίνη</b>                | 0,17±0,1                            | <b>Κερκετίνη</b>                | 0,27±0,14                           | <b>Κερκετίνη</b>                | 0,27±0,11                           |
| <b>Γαλλικό οξύ</b>              | 0,16±0,09                           | <b>Γαλλικό οξύ</b>              | 0,29±0,12                           | <b>Γαλλικό οξύ</b>              | 0,26±0,15                           |
| <b>Υδ/τά συστ.<br/>κρασιού</b>  | 0,21±0,14                           | <b>Υδ/τά συστ.<br/>κρασιού</b>  | 0,55±0,4                            | <b>Υδ/τά συστ.<br/>κρασιού</b>  | 0,5±0,31                            |
| <b>Λιπ/τά συστ.<br/>Κρασιού</b> | 0,4±0,28                            | <b>Λιπ/τά συστ.<br/>Κρασιού</b> | 0,5±0,16                            | <b>Λιπ/τά συστ.<br/>Κρασιού</b> | 0,52±0,35                           |
| <b>p*</b>                       | 0,072                               | <b>p*</b>                       | 0,54                                | <b>p*</b>                       | 0,162                               |

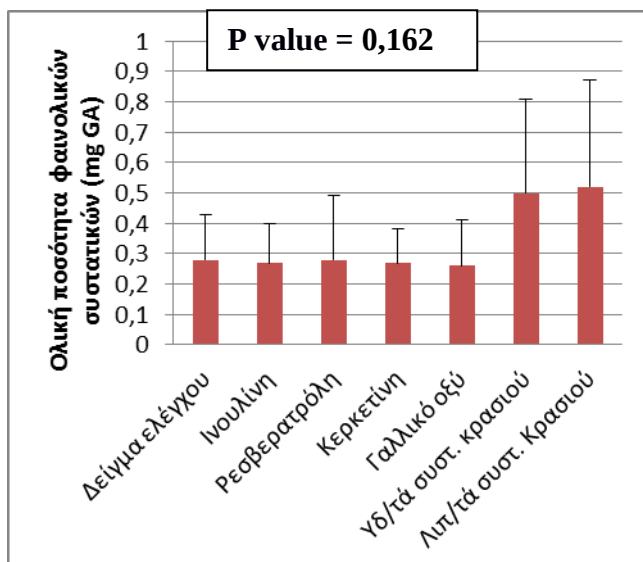
Από τα **διαγράμματα 1a, 1b και 1c** εξηγείται ποιες τιμές καθορίζουν τα p-value.



**Διάγραμμα 1a:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) κάθε δείγματος στις 0 ώρες επώασης χλωροφορμική φάση.



**Διάγραμμα 1b:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) κάθε δείγματος στις 6 ώρες επώασης χλωροφορμική φάση.



**Διάγραμμα 1c:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) κάθε δείγματος στις 24 ώρες επώασης στη χλωροφορμική φάση.

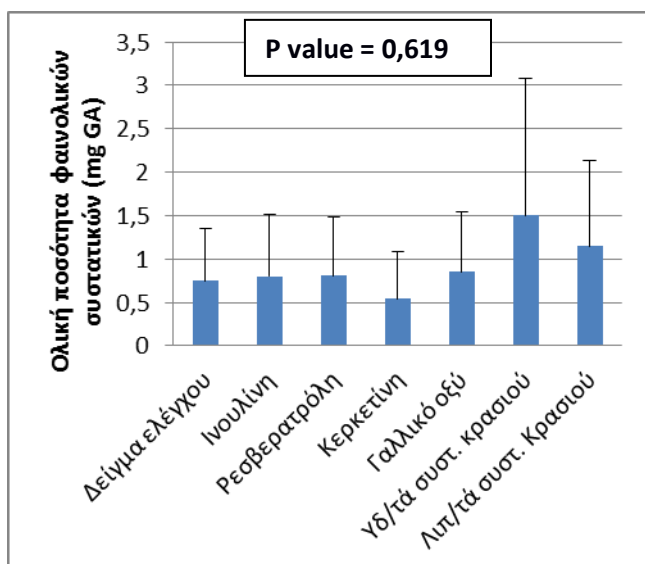
Στη χλωροφορμική φάση από τον **πίνακα 3a** και **διαγράμματα 1a, b και c**, παρατηρείται διαφοροποίηση στις χρονικές στιγμές 0 και 6. Το  $p$  κοντά στο 0,05 υπολογίζεται ως στατιστικά σημαντικό, διότι το δείγμα είναι αρκετά μικρό (6 εθελοντές), οπότε θεωρούμε πως σε μεγαλύτερο δείγμα το  $p$  θα ήταν κάτω του 0,05.

**Πίνακας 3b:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) των δειγμάτων της υδατικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης.

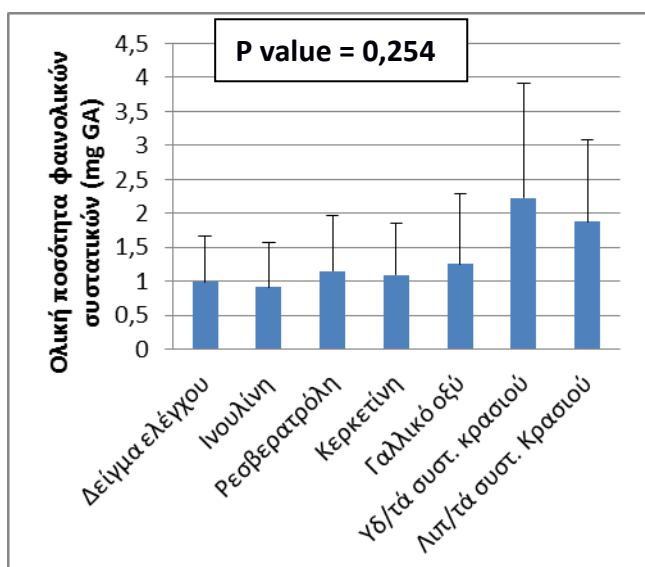
| 0h W                | Ολ.ποσότητα φαινολικών(mg GA) | 6h W                | Ολ.ποσότητα φαινολικών(mg GA) | 24h W               | Ολ.ποσότητα φαινολικών(mg GA) |
|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| Δείγμα ελέγχου      | 0,75±0,6                      | Δείγμα ελέγχου      | 0,99±0,67                     | Δείγμα ελέγχου      | 0,83±0,6                      |
| Ινουλίνη            | 0,8±0,72                      | Ινουλίνη            | 0,91±0,65                     | Ινουλίνη            | 0,95±0,7                      |
| Ρεσβερατρόλη        | 0,81±0,67                     | Ρεσβερατρόλη        | 1,15±0,81                     | Ρεσβερατρόλη        | 1,09±0,91                     |
| Κερκετίνη           | 0,54±0,55                     | Κερκετίνη           | 1,09±0,76                     | Κερκετίνη           | 1,08±0,93                     |
| Γαλλικό οξύ         | 0,85±0,69                     | Γαλλικό οξύ         | 1,25±1,03                     | Γαλλικό οξύ         | 0,92±0,83                     |
| Υδ/τά συστ. κρασιού | 1,5±1,58                      | Υδ/τά συστ. κρασιού | 2,22±1,69                     | Υδ/τά συστ. κρασιού | 1,6±1,15                      |

|                         |           |                         |           |                         |          |
|-------------------------|-----------|-------------------------|-----------|-------------------------|----------|
| Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 1,15±0,98 | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 1,87±1,21 | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 1,2±0,92 |
| p*                      | 0,619     | p*                      | 0,254     | p*                      | 0,807    |

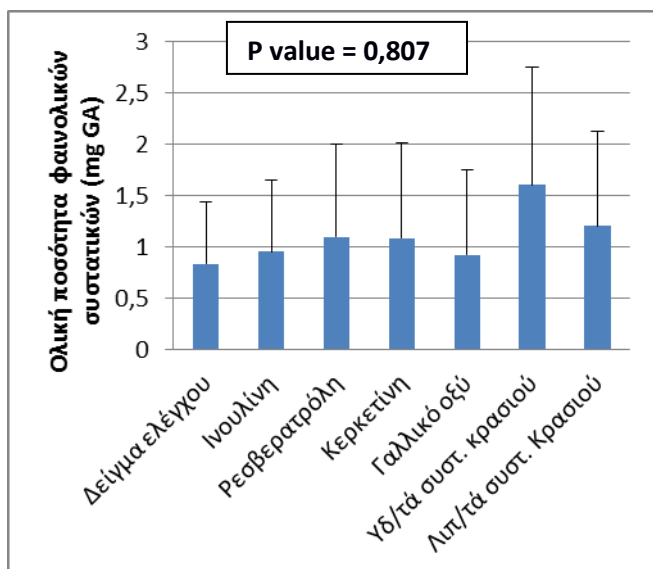
Από τα **διαγράμματα 2a, 2b και 2c** εξηγείται ποιες τιμές καθορίζουν τα p-value.



**Διάγραμμα 2a:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) κάθε δείγματος στις 0 ώρες επώασης στην υδατική φάση.



**Διάγραμμα 2b:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) κάθε δείγματος στις 6 ώρες επώασης στην υδατική φάση.



**Διάγραμμα 2c:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) κάθε δείγματος στις 24 ώρες επώασης στην υδατική φάση.

Στην υδατική φάση, όπως φαίνεται από τον **πίνακα 3b** και τα **διαγράμματα 2a, b και c**, δεν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ των μαζών των ιζημάτων στους 3 χρόνους.

Στους **πίνακες 4a και b** παρατηρείται η διακύμανση της συνολικής μάζας του γαλλικού οξέος συγκριτικά με το διαφορετικό δείκτη μάζας σώματος των εθελοντών.

**Πίνακας 4a:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης στους νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές.

| ΝΟΡΜΟΒΑΡΗΣ     |                               |                |                               |                |                               |
|----------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|
| 0h C           | Ολ.ποσότητα φαινολικών(mg GA) | 6h C           | Ολ.ποσότητα φαινολικών(mg GA) | 24h C          | Ολ.ποσότητα φαινολικών(mg GA) |
| Δείγμα ελέγχου | 0,15±0,12                     | Δείγμα ελέγχου | 0,24±0,07                     | Δείγμα ελέγχου | 0,2±0,06                      |
| Ινουλίνη       | 0,09±0,08                     | Ινουλίνη       | 0,22±0,03                     | Ινουλίνη       | 0,24±0,04                     |
| Ρεσβερατρόλη   | 0,15±0,13                     | Ρεσβερατρόλη   | 0,24±0,07                     | Ρεσβερατρόλη   | 0,19±0,04                     |
| Κερκετίνη      | 0,09±0,08                     | Κερκετίνη      | 0,24±0,04                     | Κερκετίνη      | 0,22±0,03                     |

|                      |                               |                      |                               |                      |                               |
|----------------------|-------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| Γαλλικό οξύ          | 0,1±0,09                      | Γαλλικό οξύ          | 0,26±0,04                     | Γαλλικό οξύ          | 0,22±0,02                     |
| Υδ/τά συστ. κρασιού  | 0,14±0,12                     | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 0,53±0,31                     | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 0,55±0,38                     |
| Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 0,25±0,22                     | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 0,44±0,09                     | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 0,35±0                        |
| <b>ΠΑΧΥΣΑΡΚΟΙ</b>    |                               |                      |                               |                      |                               |
| 0h C                 | Ολ.ποσότητα φαινολικών(mg GA) | 6h C                 | Ολ.ποσότητα φαινολικών(mg GA) | 24h C                | Ολ.ποσότητα φαινολικών(mg GA) |
| Δείγμα ελέγχου       | 0,25±0,04                     | Δείγμα ελέγχου       | 0,38±0,21                     | Δείγμα ελέγχου       | 0,36±0,19                     |
| Ινουλίνη             | 0,23±0,07                     | Ινουλίνη             | 0,24±0,16                     | Ινουλίνη             | 0,3±0,2                       |
| Ρεσβερατρόλη         | 0,26±0,05                     | Ρεσβερατρόλη         | 0,32±0,22                     | Ρεσβερατρόλη         | 0,37±0,3                      |
| Κερκετίνη            | 0,25±0,03                     | Κερκετίνη            | 0,29±0,22                     | Κερκετίνη            | 0,33±0,14                     |
| Γαλλικό οξύ          | 0,23±0,03                     | Γαλλικό οξύ          | 0,31±0,19                     | Γαλλικό οξύ          | 0,31±0,22                     |
| Υδ/τά συστ. κρασιού  | 0,29±0,12                     | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 0,57±0,55                     | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 0,45±0,3                      |
| Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 0,56±0,27                     | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 0,56±0,22                     | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 0,7±0,47                      |

**Πίνακας 4b:** Ολική ποσότητα φαινολικών συστατικών (mg GA) των δειγμάτων της υδατικής φάσης στους νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές.

| <b>NORMΟΒΑΡΗΣ</b> |                               |                |                               |                |                               |
|-------------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|-------------------------------|
| 0h W              | Ολ.ποσότητα φαινολικών(mg GA) | 6h W           | Ολ.ποσότητα φαινολικών(mg GA) | 24h W          | Ολ.ποσότητα φαινολικών(mg GA) |
| Δείγμα ελέγχου    | 0,72±0,63                     | Δείγμα ελέγχου | 1,41±0,6                      | Δείγμα ελέγχου | 1,23±0,54                     |
| Ινουλίνη          | 0,99±0,96                     | Ινουλίνη       | 1,37±0,51                     | Ινουλίνη       | 1,45±0,52                     |
| Ρεσβερατρόλη      | 0,9±0,87                      | Ρεσβερατρόλη   | 1,76±0,62                     | Ρεσβερατρόλη   | 1,73±0,86                     |

|                      |                                     |                      |                                     |                      |                                     |
|----------------------|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| Κερκετίνη            | 0,36±0,55                           | Κερκετίνη            | 1,59±0,68                           | Κερκετίνη            | 1,73±0,87                           |
| Γαλλικό οξύ          | 0,85±0,74                           | Γαλλικό οξύ          | 2,05±0,84                           | Γαλλικό οξύ          | 1,51±0,82                           |
| Υδ/τά συστ. κρασιού  | 2,22±2,13                           | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 3,3±1,38                            | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 2,18±1,07                           |
| Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 1,29±1,26                           | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 2,86±0,14                           | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 1,85±0,82                           |
| <b>ΠΑΧΥΣΑΡΚΟΙ</b>    |                                     |                      |                                     |                      |                                     |
| 0h W                 | Ολ.ποσότητα<br>φαινολικών(mg<br>GA) | 6h W                 | Ολ.ποσότητα<br>φαινολικών(mg<br>GA) | 24h W                | Ολ.ποσότητα<br>φαινολικών(mg<br>GA) |
| Δείγμα ελέγχου       | 0,78±0,7                            | Δείγμα<br>ελέγχου    | 0,57±0,46                           | Δείγμα<br>ελέγχου    | 0,44±0,38                           |
| Ινουλίνη             | 0,63±0,52                           | Ινουλίνη             | 0,45±0,41                           | Ινουλίνη             | 0,45±0,46                           |
| Ρεσβερατρόλη         | 0,73±0,59                           | Ρεσβερατρόλη         | 0,54±0,37                           | Ρεσβερατρόλη         | 0,46±0,39                           |
| Κερκετίνη            | 0,73±0,58                           | Κερκετίνη            | 0,6±0,51                            | Κερκετίνη            | 0,43±0,33                           |
| Γαλλικό οξύ          | 0,85±0,81                           | Γαλλικό οξύ          | 0,45±0,18                           | Γαλλικό οξύ          | 0,34±0,14                           |
| Υδ/τά συστ. κρασιού  | 0,79±0,42                           | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 1,14±1,33                           | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 1,01±1,07                           |
| Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 1±0,85                              | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 0,89±0,88                           | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 0,55±0,42                           |

Η διαφορά στο ΔΜΣ (δείκτης μάζας σώματος) μεταξύ των εθελοντών δεν φαίνεται να επηρέασε την ποσότητα των φαινολικών συστατικών των δειγμάτων, σε κανέναν από τους τρεις χρόνους ζύμωσης με τον εντερικό μικροβιόκοσμο.

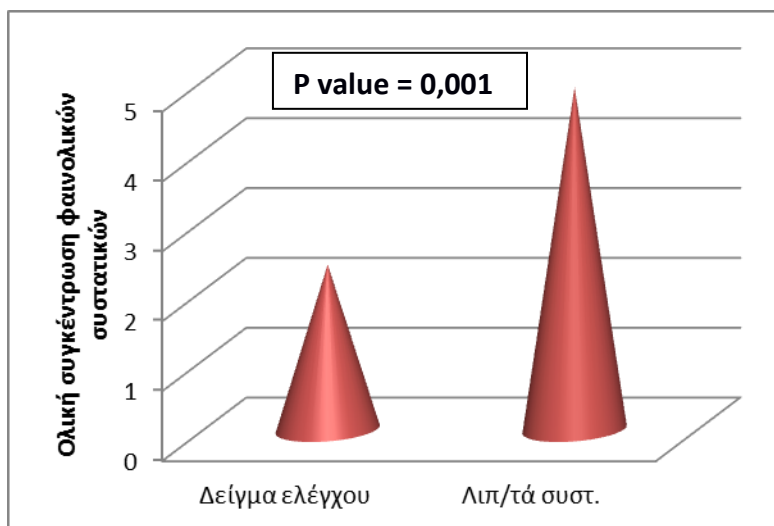
Τα αποτελέσματα εκφρασμένα σε mg mg GA /mL των δειγμάτων σε χρόνους 0, 6 και 24 ώρες από τη χλωροφορμική C την υδατική W φάση φαίνονται στους **πίνακες 5a και b** αντίστοιχα.



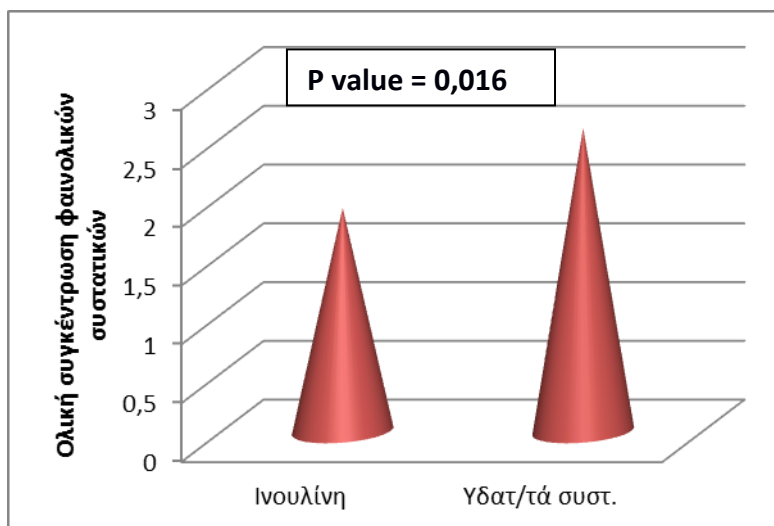
**Πίνακας 5a:** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (mg/mL GA) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης.

| 0h C                       | Ολ.συγκέντρωση<br>φαινολικών(mg/mL) | 6h C                       | Ολ.συγκέντρωση<br>φαινολικών(mg/mL) | 24h C                      | Ολ.συγκέντρωση<br>φαινολικών(mg/mL) |
|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| Δείγμα ελέγχου             | 2,36±0,32                           | Δείγμα ελέγχου             | 3,12±1,59                           | Δείγμα ελέγχου             | 2,8±1,49                            |
| Ινουλίνη                   | 1,9±0,77                            | Ινουλίνη                   | 2,28±1,07                           | Ινουλίνη                   | 2,71±1,33                           |
| Ρεσβερατρ<br>όλη           | 2,48±0,41                           | Ρεσβερατρ<br>όλη           | 2,8±1,51                            | Ρεσβερατρ<br>όλη           | 2,83±2,14                           |
| Κερκετίνη                  | 2,06±0,63                           | Κερκετίνη                  | 2,67±1,42                           | Κερκετίνη                  | 2,75±1,1                            |
| Γαλλικό<br>οξύ             | 1,98±0,51                           | Γαλλικό<br>οξύ             | 0,88±1,26                           | Γαλλικό οξύ                | 2,65±1,5                            |
| Υδ/τά<br>συστ.<br>κρασιού  | 2,58±0,98                           | Υδ/τά<br>συστ.<br>κρασιού  | 5,52±4                              | Υδ/τά συστ.<br>κρασιού     | 4,98±3,09                           |
| Λιπ/τά<br>συστ.<br>Κρασιού | 4,9±2,16                            | Λιπ/τά<br>συστ.<br>Κρασιού | 4,97±1,65                           | Λιπ/τά<br>συστ.<br>Κρασιού | 5,25±3,54                           |

Έπειτα από συγκρίσεις μεταξύ των υδατοδιαλυτών και λιποδιαλυτών συστατικών με το δείγμα ελέγχου και το δείγμα με την ινουλίνη στις 0 ώρες επώασης στα **σχήματα 1 και 2** αντίστοιχα παρατηρούμε σημαντικές διαφορές.



**Σχήμα 1:** Σύγκριση συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών μεταξύ δείγματος ελέγχου και δείγματος με λιποδιαλυτά συστατικά του κρασιού στις 0 ώρες επώασης.



**Σχήμα 2:** Σύγκριση συγκέντρωσης φαινολικών συστατικών μεταξύ του δείγματος με την ινουλίνη και του δείγματος με τα υδατοδιαλυτά συστατικά του κρασιού στις 0 ώρες επώασης.

**Πίνακας 5b:** Συγκέντρωση φαινολικών συστατικών (mg/mL GA) των δειγμάτων της υδατικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης.

| 0h W                            | Ολ.συγκέντρωση<br>φαινολικών(<br>mg/mL) | 6h W                                | Ολ.συγκέντρωση<br>φαινολικών(m<br>g/mL) | 24h W                               | Ολ.συγκέντρωση<br>φαινολικών(<br>mg/mL) |
|---------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|
| <b>Δείγμα<br/>ελέγχου</b>       | 0,64±0,34                               | <b>Δείγμα<br/>ελέγχου</b>           | 0,73±0,46                               | <b>Δείγμα<br/>ελέγχου</b>           | 0,6±0,43                                |
| <b>Ινουλίνη</b>                 | 0,68±0,5                                | <b>Ινουλίνη</b>                     | 0,67±0,48                               | <b>Ινουλίνη</b>                     | 0,68±0,5                                |
| <b>Ρεσβερατρόλη</b>             | 0,7±0,4                                 | <b>Ρεσβερατρ<br/>όλη</b>            | 0,8±0,57                                | <b>Ρεσβερατρ<br/>όλη</b>            | 0,8±0,57                                |
| <b>Κερκετίνη</b>                | 0,46±0,38                               | <b>Κερκετίνη</b>                    | 0,8±0,56                                | <b>Κερκετίνη</b>                    | 0,78±0,65                               |
| <b>Γαλλικό οξύ</b>              | 0,74±0,44                               | <b>Γαλλικό οξύ</b>                  | 0,9±0,74                                | <b>Γαλλικό οξύ</b>                  | 0,67±0,58                               |
| <b>Υδ/τά συστ.<br/>κρασιού</b>  | 1,28±1,1                                | <b>Υδ/τά συστ.<br/>κρασιού</b>      | 1,6±1,2                                 | <b>Υδ/τά συστ.<br/>κρασιού</b>      | 1,13±0,84                               |
| <b>Λιπ/τά συστ.<br/>Κρασιού</b> | 1±0,62                                  | <b>Λιπ/τά<br/>συστ.<br/>Κρασιού</b> | 1,35±0,86                               | <b>Λιπ/τά<br/>συστ.<br/>Κρασιού</b> | 0,85±0,66                               |

Στην υδατική φάση στον **πίνακα 5b**, εν συγκρίσει με τη χλωροφορμική φάση δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των μαζών των ιζημάτων στους 3 χρόνους.

### 6.3 Προσδιορισμός της ικανότητας των συστατικών των δειγμάτων να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες (DPPH).

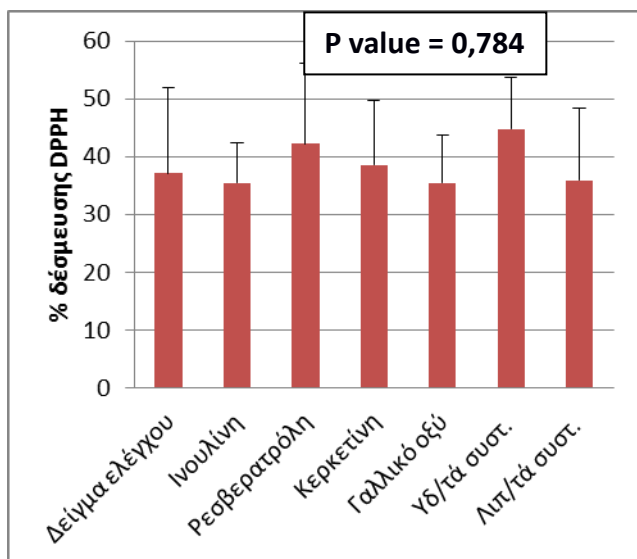
Με σκοπό να διερευνηθεί η ικανότητα των κλασμάτων να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες DPPH χρησιμοποιήθηκε ίδια ποσότητα φαινολικών συστατικών από κάθε κλάσμα ισοδύναμη με 20μg γαλλικού οξέος.

Τα ποσοστά % δέσμευσης της DPPH για χρόνο επώασης 30 λεπτά από τα δείγματα για την χλωροφορμική φάση C και την υδατική W φαίνονται στους **πίνακες 6a και b**, καθώς και στα **διαγράμματα 3a, 3b, 3c και 4a, 4b και 4c** αντίστοιχα.

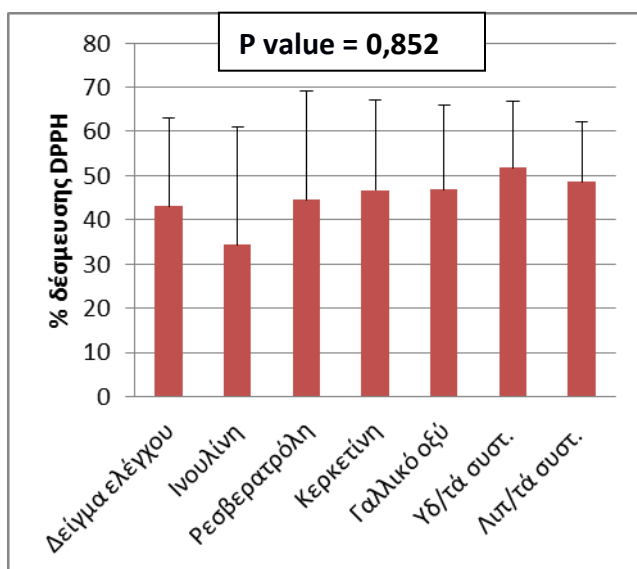
**Πίνακας 6a:** Συνολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης.

| 0h C                            | % δέσμευσης<br>DPPH | 6h C                            | % δέσμευσης<br>DPPH | 24h C                           | % δέσμευσης<br>DPPH |
|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|
| <b>Δείγμα<br/>ελέγχου</b>       | 37,11±14,93         | <b>Δείγμα<br/>ελέγχου</b>       | 43,04±20,05         | <b>Δείγμα<br/>ελέγχου</b>       | 54,33±12,29         |
| <b>Ινουλίνη</b>                 | 35,47±7,04          | <b>Ινουλίνη</b>                 | 34,39±26,55         | <b>Ινουλίνη</b>                 | 52,3±15,15          |
| <b>Ρεσβερατρόλη</b>             | 42,21±13,99         | <b>Ρεσβερατρόλη</b>             | 44,59±24,58         | <b>Ρεσβερατρόλη</b>             | 56,19±10,53         |
| <b>Κερκετίνη</b>                | 38,6±11,08          | <b>Κερκετίνη</b>                | 46,65±20,55         | <b>Κερκετίνη</b>                | 55,99±12,37         |
| <b>Γαλλικό οξύ</b>              | 35,45±8,32          | <b>Γαλλικό οξύ</b>              | 46,85±19,22         | <b>Γαλλικό οξύ</b>              | 53,08±10,41         |
| <b>Υδ/τά συστ.<br/>κρασιού</b>  | 44,82±8,89          | <b>Υδ/τά συστ.<br/>κρασιού</b>  | 51,75±15,15         | <b>Υδ/τά συστ.<br/>κρασιού</b>  | 58,61±8,59          |
| <b>Λιπ/τά συστ.<br/>Κρασιού</b> | 35,97±12,39         | <b>Λιπ/τά συστ.<br/>Κρασιού</b> | 48,52±13,67         | <b>Λιπ/τά συστ.<br/>Κρασιού</b> | 57,69±14,97         |
| <b>p*</b>                       | 0,784               | <b>p*</b>                       | 0,852               | <b>p*</b>                       | 0,969               |

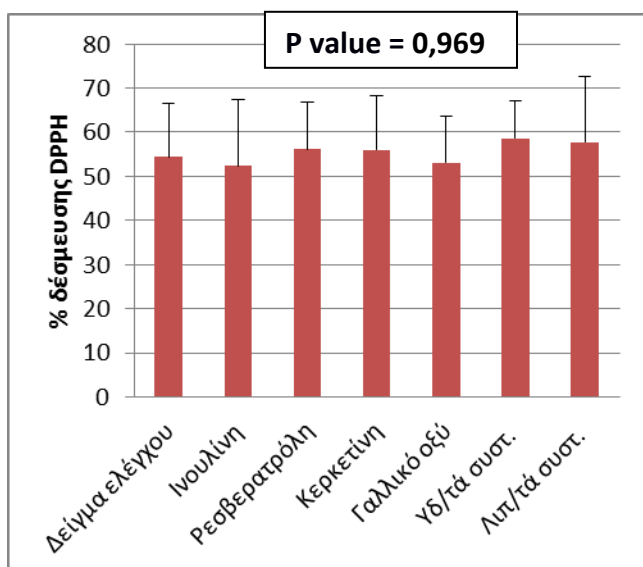
Από τα **διαγράμματα 3a, 3b και 3c** εξηγείται ποιες τιμές καθορίζουν τα p-value σε κάθε χρονική στιγμή της ζύμωσης.



**Διαγράμμα 3a:** Ολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) κάθε δείγματος στις 0 ώρες επώασης χλωροφορμική φάση.



**Διαγράμμα 3b:** Ολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) κάθε δείγματος στις 6 ώρες επώασης χλωροφορμική φάση.



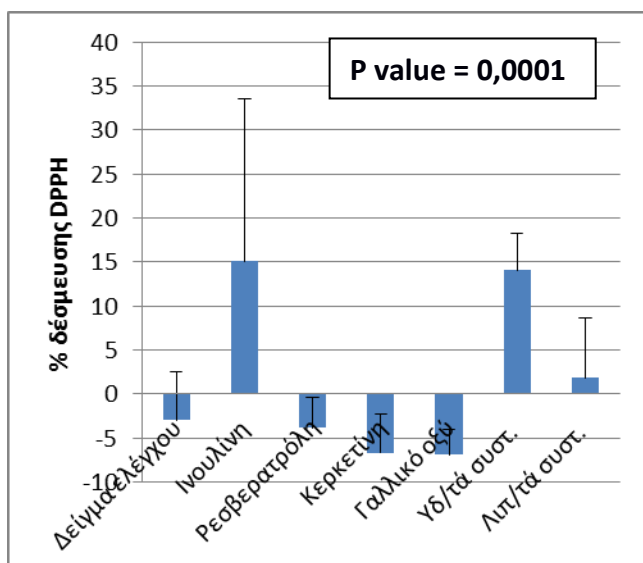
**Διαγράμμα 3c:** Ολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) κάθε δείγματος στις 24 ώρες επώασης χλωροφορμική φάση.

Η στατιστική επεξεργασία έδειξε πως δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των τριών χρόνων ζύμωσης των δειγμάτων με τον εντερικό μικροβιόκοσμο.

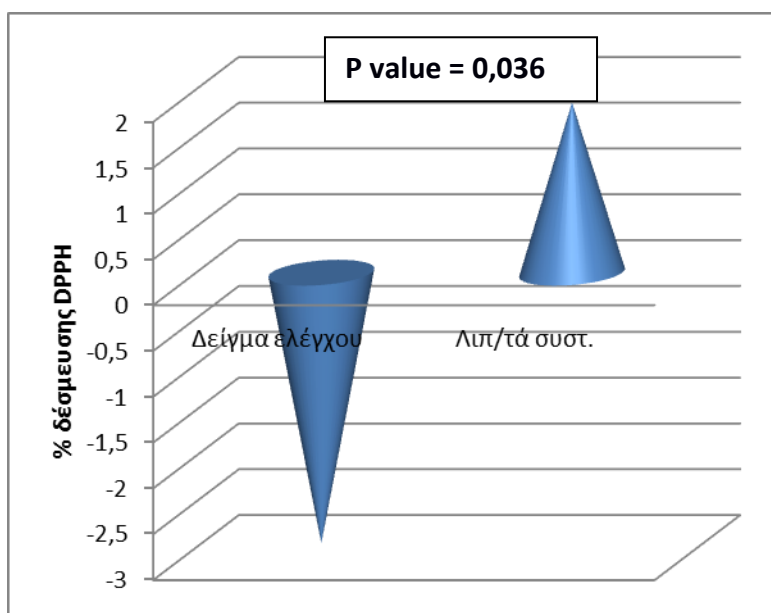
**Πίνακας 6b:** Συνολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) των δειγμάτων της υδατικής φάσης στους 3 χρόνους επώασης.

| 0h W                 | % δέσμευσης DPPH | 6h W                 | % δέσμευσης DPPH | 24h W                | % δέσμευσης DPPH |
|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|
| Δείγμα ελέγχου       | 5,53±2,95        | Δείγμα ελέγχου       | 6,66±6,1         | Δείγμα ελέγχου       | 7,8±11,69        |
| Ινουλίνη             | 15,1±18,48       | Ινουλίνη             | 14,9±15,2        | Ινουλίνη             | 10,51±17,02      |
| Ρεσβερατρόλη         | 3,49±3,84        | Ρεσβερατρόλη         | 4,2±4,15         | Ρεσβερατρόλη         | 11,1±9,6         |
| Κερκετίνη            | 4,44±6,68        | Κερκετίνη            | 2,17±9,02        | Κερκετίνη            | 12,29±10,32      |
| Γαλλικό οξύ          | 2,88±6,86        | Γαλλικό οξύ          | 7,43±8,1         | Γαλλικό οξύ          | 13,62±11,08      |
| Υδ/τά συστ. κρασιού  | 14,07±4,13       | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 28,33±22,79      | Υδ/τά συστ. κρασιού  | 25,57±17,41      |
| Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 1,86±6,78        | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 14,59±14,59      | Λιπ/τά συστ. Κρασιού | 15,25±5,82       |
| p*                   | 0,0001           | p*                   | 0,009            | p*                   | 0,295            |

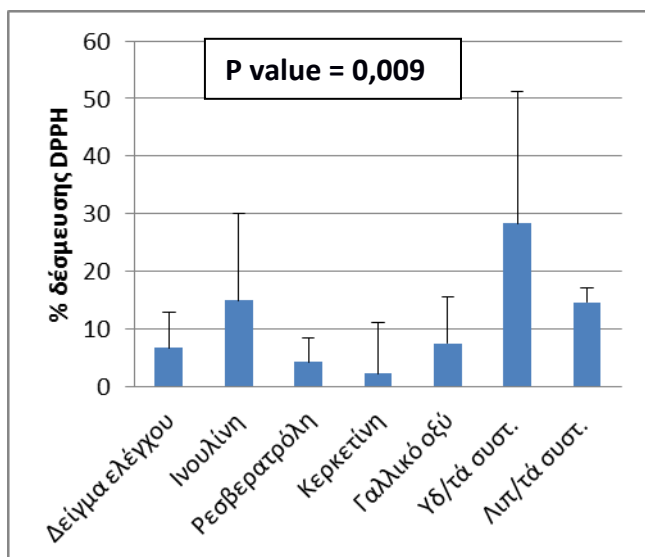
Από τα **διαγράμματα 4a, 4b και 4c** εξηγείται ποιες τιμές καθορίζουν τα p-value.



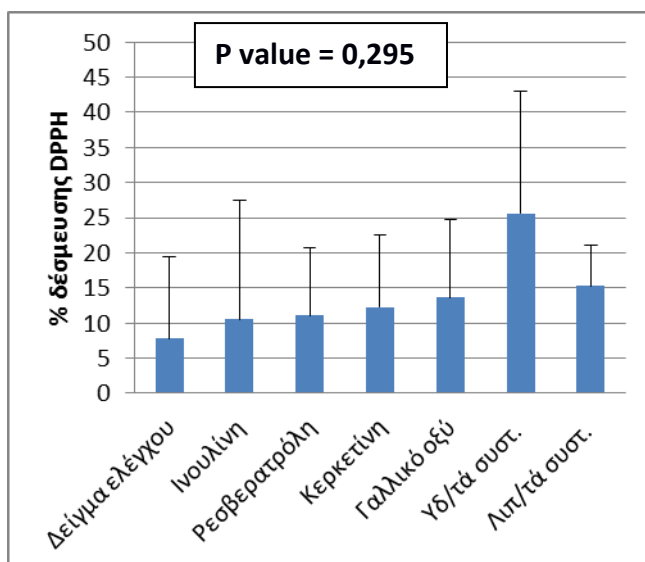
**Διαγράμμα 4a:** Ολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) κάθε δείγματος στις 0 ώρες επώασης στην υδατική φάση.



**Σχήμα 3:** Σύγκριση δείγματος ελέγχου με το δείγμα με τα λιποδιαλυτά συστατικά του κρασιού στο % δέσμευσης DPPH στις 0 ώρες επώασης.



**Διαγράμμα 4b:** Ολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) κάθε δείγματος στις 6 ώρες επώασης στην υδατική φάση.



**Διαγράμμα 4c:** Ολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) κάθε δείγματος στις 24 ώρες επώασης στην υδατική φάση.

Από τα **διαγράμματα 4a, b και c** φαίνεται να παρουσιάζουν διαφοροποίηση τα δείγματα ως προς τη δέσμευση ελεύθερων ριζών στις 0 κι 6 ώρες ζύμωσης, ενώ στις 24 ώρες δεν διαφοροποιούνται. Από το **σχήμα 1**, φαίνεται η διαφορά ανάμεσα στο ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών μεταξύ του δείγματος ελέγχου και του δείγματος με τα λιποδιαλυτά συστατικά του κρασιού, η οποία είναι σημαντική.



Στους πίνακες 7a και b φαίνεται το ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών συγκριτικά στους φυσιολογικού βάρους εθελοντές και στους παχύσαρκους εθελοντές στα χλωροφορμικά C και στα υδατικά W διαλύματα αντίστοιχα.

**Πίνακας 7a:** Συνολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης σε συνάρτηση με το BMI των εθελοντών.

| ΝΟΡΜΟΒΑΡΗΣ              |                        |                         |                     |                         |                        |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|------------------------|
| Oh C                    | %<br>δέσμευσης<br>DPPH | 6h C                    | % δέσμευσης<br>DPPH | 24h C                   | %<br>δέσμευσης<br>DPPH |
| Δείγμα<br>ελέγχου       | 39,19±11,7             | Δείγμα<br>ελέγχου       | 43,67±26,91         | Δείγμα<br>ελέγχου       | 55,78±18,51            |
| Ινουλίνη                | 40,44±10,09            | Ινουλίνη                | 39,21±31,03         | Ινουλίνη                | 54,31±22,46            |
| Ρεσβερατρόλη            | 38,25±9,77             | Ρεσβερατρόλη            | 47,47±33,22         | Ρεσβερατρόλη            | 61,78±13,5             |
| Κερκετίνη               | 31,54±5,05             | Κερκετίνη               | 58,29±18,48         | Κερκετίνη               | 65,26±7,71             |
| Γαλλικό οξύ             | 36,24±0,58             | Γαλλικό οξύ             | 60,02±11,02         | Γαλλικό οξύ             | 60,67±8,79             |
| Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 48,25±4,66             | Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 59,03±10,37         | Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 63,64±6,37             |
| Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 44,9±12,19             | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 57,83±2,14          | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 68,14±9,6              |
| ΠΑΧΥΣΑΡΚΟΙ              |                        |                         |                     |                         |                        |
| Oh C                    | %<br>δέσμευσης<br>DPPH | 6h C                    | % δέσμευσης<br>DPPH | 24h C                   | %<br>δέσμευσης<br>DPPH |
| Δείγμα<br>ελέγχου       | 35,73±19,24            | Δείγμα<br>ελέγχου       | 42,42±16,74         | Δείγμα<br>ελέγχου       | 52,88±5,34             |
| Ινουλίνη                | 32,15±2,76             | Ινουλίνη                | 29,57±27,01         | Ινουλίνη                | 50,28±7,54             |
| Ρεσβερατρόλη            | 44,84±17,83            | Ρεσβερατρόλη            | 41,71±19,54         | Ρεσβερατρόλη            | 50,62±1,24             |
| Κερκετίνη               | 43,31±12,24            | Κερκετίνη               | 35,02±17,56         | Κερκετίνη               | 46,73±8,1              |
| Γαλλικό οξύ             | 34,92±11,71            | Γαλλικό οξύ             | 33,68±16,77         | Γαλλικό οξύ             | 45,5±4,57              |
| Υδ/τά συστ.             | 42,54±11,29            | Υδ/τά συστ.             | 44,46±17,53         | Υδ/τά συστ.             | 53,59±8,24             |

|                         |          |                         |            |                         |             |
|-------------------------|----------|-------------------------|------------|-------------------------|-------------|
| κρασιού                 |          | κρασιού                 |            | κρασιού                 |             |
| Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 30,02±10 | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 39,2±14,22 | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 47,23±11,84 |

**Πίνακας 7b:** Συνολικό ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών (DPPH) των δειγμάτων της υδατικής φάσης σε συνάρτηση με το BMI των εθελοντών.

| ΝΟΡΜΟΒΑΡΗ<br>Σ          |                        |                         |                     |                         |                        |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------|-------------------------|------------------------|
| 0h W                    | %<br>δέσμευσης<br>DPPH | 6h W                    | % δέσμευσης<br>DPPH | 24h W                   | %<br>δέσμευσης<br>DPPH |
| Δείγμα<br>ελέγχου       | 4,46±3,87              | Δείγμα<br>ελέγχου       | 4,79±6,59           | Δείγμα<br>ελέγχου       | 1,45±14,45             |
| Ινουλίνη                | 3,41±2,01              | Ινουλίνη                | 7,35±6,93           | Ινουλίνη                | 20,82±9,08             |
| Ρεσβερατρόλη            | 5,7±2,72               | Ρεσβερατρόλη            | 6,49±4,22           | Ρεσβερατρόλη            | 5,23±2,29              |
| Κερκετίνη               | 2,98±4,82              | Κερκετίνη               | 2,59±0,35           | Κερκετίνη               | 5,27±0,88              |
| Γαλλικό οξύ             | 1,84±4,39              | Γαλλικό οξύ             | 3,2±2,09            | Γαλλικό οξύ             | 6,72±4,95              |
| Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 11,06±5,13             | Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 31,85±30,53         | Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 24,58±16,82            |
| Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 6,84±1,55              | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 13,54±2,32          | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 12,23±2,12             |
| ΠΑΧΥΣΑΡΚΟΙ              |                        |                         |                     |                         |                        |
| 0h W                    | %<br>δέσμευσης<br>DPPH | 6h W                    | % δέσμευσης<br>DPPH | 24h W                   | %<br>δέσμευσης<br>DPPH |
| Δείγμα<br>ελέγχου       | 7,06±2,34              | Δείγμα<br>ελέγχου       | 42,42±16,74         | Δείγμα<br>ελέγχου       | 52,88±5,34             |
| Ινουλίνη                | 26,51±13,76            | Ινουλίνη                | 22,46±18,64         | Ινουλίνη                | 0,19±17,97             |
| Ρεσβερατρόλη            | 2,44±4,59              | Ρεσβερατρόλη            | 1,92±3,1            | Ρεσβερατρόλη            | 16,97±11,06            |
| Κερκετίνη               | 5,41±7,91              | Κερκετίνη               | 1,76±14,24          | Κερκετίνη               | 19,31±10,86            |
| Γαλλικό οξύ             | 2,18±8,5               | Γαλλικό οξύ             | 11,66±10,29         | Γαλλικό οξύ             | 20,53±11,81            |

|                                 |            |                                 |             |                                 |             |
|---------------------------------|------------|---------------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|
| <b>Υδ/τά συστ.<br/>κρασιού</b>  | 16,07±2,44 | <b>Υδ/τά συστ.<br/>κρασιού</b>  | 23,04±10,99 | <b>Υδ/τά συστ.<br/>κρασιού</b>  | 26,57±21,72 |
| <b>Λιπ/τά συστ.<br/>Κρασιού</b> | 7,04±1,46  | <b>Λιπ/τά συστ.<br/>Κρασιού</b> | 15,64±2,72  | <b>Λιπ/τά συστ.<br/>Κρασιού</b> | 18,26±7,27  |

Και στη περίπτωση του ποσοστού δέσμευσης ελεύθερων ριζών των δειγμάτων των δύο διαφορετικών ομάδων, δεν παρατηρείται κάποια διαφορά που να υποδηλώνει αλλαγές λόγω διαφορετικού δείκτη μάζας σώματος.

#### **6.4 Προσδιορισμός της ικανότητας του δείγματος να αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων (PRP).**

**Προσδιορισμός της ικανότητας του δείγματος να αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων σε PRP υγιών εθελοντών.**

Ο προσδιορισμός της ικανότητας των δειγμάτων να αναστέλλει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων μετρήθηκε με την προσθήκη τριών συσσωρευτικών παραγόντων, το ADP, το κολλαγόνο και το PAF. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν αρχικά μόνο στις χλωροφορμικές φάσεις, για να ελέγξουμε το ποσοστό αναστολής. Η ποσότητα των δειγμάτων ήταν σε όλες τις δοκιμασίες 2-4μL. Τα δείγματα του ενός εθελοντή επώαστηκαν σε DMSO, ενώ οι άλλοι δύο σε BSA (0,2mg/4mg εκχυλίσματος).

Στους πίνακες **8a και b** φαίνεται το ποσοστό αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τα δείγματα με συσσωρευτικούς παράγοντες το ADP και τον PAF αντίστοιχα.

**Πίνακας 8a:** Συνολικό ποσοστό αναστολής με προσθήκη ADP (4μL) ως συσσωρευτικό παράγοντα στους 3 χρόνους επώασης.

| 0h C                    | %<br>αναστολής<br>με PAF | 6h C                    | %<br>αναστολής<br>με PAF | 24h C                   | %<br>αναστολής<br>με PAF |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Δείγμα<br>ελέγχου       | 35,15±6,85               | Δείγμα<br>ελέγχου       | 87,88                    | Δείγμα<br>ελέγχου       | 19,61                    |
| Ινουλίνη                | 42,09±20,95              | Ινουλίνη                | 53,03                    | Ινουλίνη                | 15,69                    |
| Ρεσβερατρόλη            | 35,96±16,58              | Ρεσβερατρόλη            | 54,55                    | Ρεσβερατρόλη            | 27,45                    |
| Κερκετίνη               | 45,09±10,2               | Κερκετίνη               | 63,64                    | Κερκετίνη               | 5,88                     |
| Γαλλικό οξύ             | 31,72±11,7               | Γαλλικό οξύ             | 60,61                    | Γαλλικό οξύ             | 33,33                    |
| Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 38,68±14,92              | Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 48,48                    | Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 5,88                     |
| Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 70,36±33,21              | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 30,3                     | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 11,76                    |

**Πίνακας 8b:** Συνολικό ποσοστό αναστολής με προσθήκη PAF (4μL) ως συσσωρευτικό παράγοντα στους 3 χρόνους επώασης.

| 0h C                    | %<br>αναστολής<br>με ADP | 6h C                    | %<br>αναστολής<br>με ADP | 24h C                   | %<br>αναστολής<br>με ADP |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Δείγμα<br>ελέγχου       | 36,51±13,41              | Δείγμα<br>ελέγχου       | 61,22±25,97              | Δείγμα<br>ελέγχου       | 16,17±9,06               |
| Ινουλίνη                | 30,1±19,64               | Ινουλίνη                | 42,04±6,93               | Ινουλίνη                | 58,26±13,41              |
| Ρεσβερατρόλη            | 41,16±23,81              | Ρεσβερατρόλη            | 32,45±2,6                | Ρεσβερατρόλη            | 26,67±17,03              |
| Κερκετίνη               | 33,75±28,63              | Κερκετίνη               | 35,51±1,72               | Κερκετίνη               | 33,16±12,41              |
| Γαλλικό οξύ             | 52,57±21,82              | Γαλλικό οξύ             | 20,8±43,56               | Γαλλικό οξύ             | 23,44±12,47              |
| Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 38,14±33,73              | Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 12,79±27,53              | Υδ/τά συστ.<br>κρασιού  | 39,61±21,53              |
| Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 55,43±46,06              | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 51,93±45,16              | Λιπ/τά συστ.<br>Κρασιού | 36,82±7,23               |

Επίσης πραγματοποιήθηκε ανίχνευση της αναστολής με χρήση του κολλαγόνου. Τα ποσοστά αναστολής ξεπερνούσαν το 92% σε όλα τα δείγματα.

Από τις μετρήσεις παρατηρήθηκε πως το δείγμα ελέγχου παρουσίαζε αρκετά υψηλή αναστολή, υποδηλώνοντας πως το θρεπτικό υλικό, στο οποίο είχαν επωαστεί τα κόπρανα αρχικά, ήταν πλούσιο σε παράγοντες που επηρεάζουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Γι' αυτό το λόγο δεν συνεχίστηκαν οι μετρήσεις στους υπόλοιπους εθελοντές.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup>: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από το 1992 που για πρώτη φορά εισάχθηκε ο όρος 'Γαλλικό παράδοξο', δηλαδή η παρατήρηση ότι παρόλο που οι Γάλλοι καταναλώναν μια δίαιτα πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά εμφάνιζαν μειωμένη πιθανότητα ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου, μια πληθώρα ερευνών προσπαθούσε να εξηγήσει το μηχανισμό που το προκαλεί. Οι ερευνητές το απέδωσαν στην μέτρια κατανάλωση κρασιού από τους Γάλλους. Η αιθανόλη, που στο κρασί κατά μέσο όρο βρίσκεται σε ποσοστά περίπου 11,5 -15% αφενός με μέτρια κατανάλωση ωφελεί τον οργανισμό, αφετέρου δεν μπορεί να εξηγήσει πλήρως τις ευεργετικές ιδιότητες του κρασιού (Fragoroulou E., et al.,2009). Το κρασί, συγκεκριμένα το κόκκινο, φέρει ένα μεγάλο ποσοστό φαινολικών συστατικών, στα οποία φαίνεται να οφείλεται αυτή η προστατευτική δράση. Πολυάριθμες έρευνες πάνω σε αυτά ακολούθησαν τονίζοντας την θεωρία αυτή (Pierre-Louis Teissedre, et al.,2000).

Τα φαινολικά συστατικά του κρασιού χωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες, τα φλαβονοειδή και τα μη-φλαβονοειδή. Οι κύριοι εκπρόσωποι είναι οι φλαβανόλες, ανθοκυανίνες και φλαβονόλες (κερκετίνη) για την πρώτη ομάδα και τα φαινολικά οξέα, τα στυλβένια κι οι φαινόλες για τη δεύτερη. Τα πιο χαρακτηριστικά φαινολικά του κόκκινου κρασιού είναι η ρεσβερατρόλη, η κερκετίνη και το γαλλικό οξύ.

Τα φαινολικά συστατικά του κρασιού αποδείχθηκε πως έχουν πολλές βιολογικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό, με κυριότερες τις αντι-οξειδωτικές, αντι-φλεγμονώδεις κι αντι-θρομβωτικές.

Ως αντι-οξειδωτικοί παράγοντες συμβάλλουν στην εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου, οξειδωμένων φωσφορικών ενώσεων, αλλά κι ελεύθερων ιόντων που αντιδρούν με οργανικά μόρια κι ενώσεις καστρέφοντας τα τροποποιώντας τη δομή και τη λειτουργία τους. Εκτός από αντι-οξειδωτικά, τα φαινολικά συστατικά προλαμβάνουν κι επικείμενες φλεγμονές μειώνοντας την παραγωγή φλεγμονωδών παραγόντων, όπως οι κυτταροκίνες (Iva Fernandes, et al.,2017). Ακόμη, έχουν την ικανότητα να μειώνουν τα επίπεδα του PAF στο πλάσμα, ενός παράγοντα που θεωρείται υπεύθυνος για την πρόκληση αθηρωματικής πλάκας στα αγγεία, ενώ αντιθέτως να αυξάνουν την παραγωγή του NO (μονοξείδιο του αζώτου) υπεύθυνο για τη χαλάρωση των αγγείων (Fragoroulou E., et al.,2009).

Η απορρόφηση κι ο μεταβολισμός των φαινολικών συστατικών στον ανθρώπινο οργανισμό παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των παραπάνω ιδιοτήτων τους. Το πρώτο στάδιο

που υπόκεινται είναι η είσοδός τους στο λεπτό έντερο, όπου με τη δράση ποικίλων ενζύμων αποκτούν την τελική τους μορφή ή παράγουν άλλα προϊόντα. Το εντερικό επιθήλιο είναι πλούσιο σε βακτήρια, γνωστά ως εντερικός μικροβιόκοσμος.

Ο βακτηριακός αυτός πληθυσμός είναι διαφορετικός σε κάθε άνθρωπο και τροποποιείται με την πάροδο της ηλικίας, με τις αλλαγές του περιβάλλοντος στο οποίο ζει ο ξενιστής, από τον τρόπο ζωής, τη διαίτα, τις ασθένειες, αλλά και τα αντιβιοτικά που μπορεί να ληφθούν. Υπάρχει μια συνεχής αλληλεπίδραση μεταξύ του εντερικού μικροβιόκοσμου και του ανθρώπινου οργανισμού από τη γέννηση. Το ανοσοποιητικό σύστημα, για παράδειγμα, επηρεάζεται από τα εντερικά βακτήρια και το αντίθετο. Αξιοσημείωτη είναι και η συμμετοχή τους στην παραγωγή διαφόρων ουσιών και μεταβολιτών, που συμβάλουν στη σωστή λειτουργία και προαγωγή της υγείας του οργανισμού (Laura Marín, et al., 2015).

Παρ'όλο που ο εντερικός μικροβιόκοσμος θεωρείται πως διατηρείται αναλλοίωτος κατά την ενηλικίωση του ανθρώπου, παράγοντες όπως το στρες, τα συστατικά της διαίτας προκαλούν αλλαγές, οι οποίες μπορεί να είναι ωφέλιμες για τον οργανισμό ή μπορεί να προκαλέσουν διαταραχή της ομοιόστασης του ξενιστή (Jeremy K. Nickolson et al., 2012).

Η συμμετοχή του εντερικού μικροβιόκοσμου στην πρόκληση πολλών παθήσεων, όπως η αθηροσκλήρωση, η υπέρταση, η καρδιακή ανεπάρκεια και η παχυσαρκία έχει παρατηρηθεί από πολλές ερευνητικές ομάδες. Ενδιαφέρον δόθηκε στην θεραπευτική αντιμετώπιση αυτών των παθήσεων μέσω του εντερικού μικροβιόκοσμου. Δίαιτες πλούσιες σε διαιτητικές ίνες, σε τα προ- και πρεβιοτικά φαίνεται να προωθούν την υγεία και την ανάπτυξη ωφέλιμων για τον οργανισμό βακτηρίων και να μειώνουν τη δράση των παθογόνων μικροοργανισμών, με αποτέλεσμα την μείωση της πίεσης του αίματος και της καρδιακής υπερτροφίας (W.H. Wilson Tang, et al., 2017).

Ο μεταβολισμός των φαινολικών συστατικών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο έχει παρατηρηθεί πως προστατεύει από πολλές ασθένειες κι ιούς στο γαστρεντερικό σύστημα. Ακόμη, ορισμένα από τα προϊόντα του μεταβολισμού τους φαίνεται να προκαλούν αλυσιδωτές αντιδράσεις που οδηγούν στην παραγωγή αντι-φλεγμονωδών κι αντι-οξειδωτικών παραγόντων (Laura Marín, et al., 2015).

Οι βιολογικές ιδιότητες των μεταβολιτών των φαινολικών συστατικών από τα βακτήρια του εντέρου δεν έχουν ταυτοποιηθεί πλήρως. Η ποικιλομορφία των προϊόντων καθώς και οι πολλές μεταβολές που υπόκεινται τα φαινολικά συστατικά και ο εντερικός μικροβιόκοσμος καθιστά δύσκολη την εξακρίβωσή τους. Ερευνητικά δεδομένα, όμως τόνισαν κάποιες

ομοιότητες σε δομή κι ικανότητες των μεταβολιτών με τις αρχικές ενώσεις. Αρχικά, ταυτοποίησαν κάποιες ως φαινολικές ενώσεις που παρουσίαζαν αντι-οξειδωτικές ικανότητες (Scalbert A, et al., 2002).

Στο πλαίσιο της συγκεκριμένης μελέτης πραγματοποιήθηκε *in vitro* ζύμωση με τον εντερικό μικροβιόκοσμο εκχυλισμάτων κόκκινου κρασιού και συγκεκριμένα τόσο των λιποδιαλυτών όσο και των υδατοδιαλυτών συστατικών του, καθώς και επιμέρους φαινολικών ενώσεων συγκεκριμένα τη ρεσβαρατρόλης, της κερκετίνης και του γαλλικού οξέος. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι η ποσότητα φαινολικών συστατικών μειώνεται στο θρεπτικό υλικό της ζύμωσης όσο περισσότερο διαρκεί η ζύμωση. Σε έρευνα από τους Sanchez-Patan et al. το 2012, ακολουθήθηκε η ίδια πορεία ζύμωσης δείγματος κρασιού με ανθρώπινα βακτήρια του εντερικού μικροβιόκοσμου. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως ένα μεγάλο ποσοστό των φλαβονολών είχε μεταβολιστεί μέσα στις πρώτες 5 ώρες ζύμωσης, ενώ κάποιες ανθοκυανίνες και το γαλλικό οξύ μεταβολίστηκαν πλήρως μετά από 10 έως 30 ώρες. Στα δείγματα κρασιού του πειράματός μας, στο 6ωρο παρατηρήσαμε ύπαρξη φαινολικών συστατικών, ενώ στο 24ωρο δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά με το control δείγμα. Οι πιθανοί λόγοι που μπορεί να εξηγούν τα παραπάνω είναι οι εξής: α) στο control υπήρχαν δραστικές ουσίες που μπορεί να προήλθαν από το θρεπτικό υλικό που είχαν επωαστεί τα δείγματα αρχικά, β) σε συνδυασμό με το α και η ποσότητα των φαινολικών συστατικών στα υπόλοιπα δείγματα ήταν αρκετά μικρή, για να δείξει στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα.

Οι μεταβολίτες των φαινολικών συστατικών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο φαίνεται να παρουσιάζουν αντι-οξειδωτικές ικανότητες. Σε *in vitro* μελέτες όπου επωάστηκαν δείγματα κοπράνων με φαινολικά συστατικά από χυμούς μήλου και κράνμπερι, παρατηρήθηκε δέσμευση ελεύθερων ριζών. Ακόμη, έπειτα από συγκρίσεις με τις αρχικές φαινολικές ουσίες, οι μεταβολίτες εμφάνιζαν αυξημένη αντι-οξειδωτική ικανότητα, η οποία όμως φάνηκε να επηρεαζόταν από τη μήτρα του τροφίμου που τα έφερε, συγκεκριμένα από το ποσοστό των διαιτητικών ινών του τροφίμου (Juana I. Mosele et al., 2015). Επιπρόσθετα, άλλες έρευνες με δείγματα φαινολικών συστατικών από το ελαιόλαδο παρουσίασαν ποικίλες βιολογικές ιδιότητες μεταβολιτών ορισμένων φαινολικών συστατικών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Τα αποτελέσματα κατέληγαν πως μεταβολίτες της κερκετίνης, του καφεϊκού οξέος, αλλά και του ελαϊκού οξέος εμφάνιζαν μείωση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στην κυκλοφορία του αίματος, καθώς και σε διάφορες κυτταροκίνες που προάγουν την ανάπτυξη φλεγμονώδων καταστάσεων (Antonio Maria Borzi, et al., 2018).



Εν συγκρίσει με τα παραπάνω δεδομένα, η δικιά μας *in vitro* μελέτη έχει να προσθέσει πως μεταβολίτες φαινολικών συστατικών του κρασιού παρουσιάζουν αντι-οξειδωτική ικανότητα έπειτα από 6 ώρες επώαση με τα δείγματα κοπράνων των εθελοντών, ενώ μετά από 24 ώρες το ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών ήταν χαμηλό. Το δείγμα ελέγχου, απεναντίας, έφερε ένα υψηλό ποσοστό δέσμευσης της DPPH. Η εξήγηση είναι διττή: είτε α) δεν έχουν προλάβει να μεταβολιστούν όλα τα φαινολικά συστατικά, επομένως το ποσοστό δέσμευσης ελεύθερων ριζών προέρχεται από τα εναπομείναντα, είτε β) προϊόντα του μεταβολισμού τους δρουν ως ενεργά μόρια. Τα δείγματα που είχαν επωαστεί με ρεσβερατρόλη, κερκετίνη και γαλλικό οξύ, στο συγκεκριμένο πείραμα, δεν εμφάνισαν ουσιώδη διαφορά έναντι του δείγματος ελέγχου. Αυτό δεν αλλοιώνει τη δράση των μεταβολιτών τους, αλλά φαίνεται πως τα αποτελέσματα επηρεάστηκαν από πιθανώς την χαμηλή ποσότητα των αρχικών φαινολικών συστατικών, ή ότι είναι σημαντική η συνεργιστική τους δράση για την εμφάνιση βιολογικών δράσεων. Πιθανώς για αυτό το λόγω τα εκχυλίσματα έδειξαν κάποια δράση.

Συμπερασματικά φαίνεται ότι τα συστατικά του κρασιού μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Περαιτέρω όμως αναλύσεις απαιτούνται για την ανίχνευση των μεταβολιτών των φαινολικών συστατικών καθώς και για την πιστοποίηση της βιολογικής τους δράσης.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Antonio Maria Borzì, Antonio Biondi, Francesco Basile, Salvatore Luca, Enzo Saretto Dante Vicari, Marco Vacante, Olive Oil Effects on Colorectal Cancer Nutrients 2018 Dec 23;11 p: 32
- Augustin Scalbert , Christine Morand, Claudine Manach, Christian Rémésy, Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact Biomedicine & Pharmacotherapy Volume 56, Issue 6, August 2002, Pages 276-282
- Aura AM. Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. Phytochem Rev 2008 p:407-429
- Aura AM1, O'Leary KA, Williamson G, Ojala M, Bailey M, Puupponen-Pimiä R, Nuutila AM, Oksman-Caldentey KM, Poutanen K. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro J Agric Food Chem. 2002 Mar 13;50(6):1725-30
- Backhed F., et al., Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007 Jan 16;104(3):979-84.
- Bennett BJ, et al., Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. Cell Metab., 2013 Jan 8;17(1):49-60
- Betul Catalgol, Saime Batirel, Yavuz Taga and Nesrin Kartal Ozer, Resveratrol: French Paradox revisited., Pharmacology, 2012 Jul 17;3:141
- Boscolo P, del Signore A, Sabbioni E. et al. Effects of resveratrol on lymphocyte proliferation and cytokine release. Ann Clin Lab Sci. 2003 Spring;33(2):226-31
- Catanese, N., Could red wine save your life?, Centers for Disease Control and Prevention, 2014.
- Chung, A. W., Jurasz, P., Hollenberg, M. D., Radomski, M.W., Mechanisms of action of proteinase-activated receptor agonists on human platelets. Br. J. Pharmacol. 2002 Mar; 135(5): 1123–1132
- Claudine Manach, Gary Williamson, Christine Morand, Augustin Scalbert, Christian Rémésy. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Am J Clin Nutr 2005 Jan;81(1 Suppl):243S-255S

- Clifford MN, Scalbert A. Ellagitannins: occurrence in food, bioavailability and cancer prevention., *J Food Sci Agric*, 2016 May; 8(5): 151
- Cueva C, Gil-Sánchez I, Ayuda-Durán B, González-Manzano S, González-Paramás AM, Santos-Buelga C, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. An Integrated View of the Effects of Wine Polyphenols and Their Relevant Metabolites on Gut and Host Health. *Molecules*. 2017 Jan; 22(1): 99
- Danneskiold-Samsøe NB, Dias de Freitas Queiroz Barros H, Santos R, Bicas JL, Cazarin CBB, Madsen L, Kristiansen K, Pastore GM, Brix S, Maróstica Júnior MR, Interplay between food and gut microbiota in health and disease. *Food Res Int*. 2019 Jan;115:23-31.
- Dell'Agli M, Busciala A, Bosisio E. Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovasc Res.*, 2004 Sep 1;63(4):593-602
- Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol. Chem*. 1979 Oct 10;254(19):9355-8
- Dobrydneva Y., Williams R. L., Blackmore P. F. Trans-Resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *British Journal of Pharmacology*. 1999 Sep;128(1):149-57
- Doll, R., R. PETO, E. Hall, K. Wheatley, and R. Gray., Mortality in relation to consumption of alcohol. 13 years' observations on male British doctors. *Brit. Med. J.*, 1994 Oct 8; 309(6959): 911–918
- Dong-Hyun Kim , Eun-Ah Jung I, In-Suk Sohng , Jung-Ah Han , Tae-Hyung Kim and Myung Joo Han, Intestinal Bacterial Metabolism of Flavonoids and its Relation to Some Biological Activities, *Arch. Pharm. Res.*, 1998 Feb;21(1):17-23
- Espín JC, González-Sarrías A, Tomás-Barberán F .The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochem Pharmacol*. 2017 Sep 1;139:82-93
- Estruch R, Sacanella E, Badia E, Antúnez E, Nicolás JM, Fernández-Solá J, Rotilio D, de Gaetano G, Rubin E, Urbano-Márquez, A Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis*. 2004 Jul;175(1):117-23.
- F. Natella, M. Nardini, F. Belevi, P. Pignatelli, S. Di Santo, A. Ghiselli, F. Violi, C. Scaccini. Effect of coffee drinking on platelets: inhibition of aggregation and phenols incorporation, 2008 Dec;100(6):1276-82

- Fernando Sanchez-Patan, Carolina Cueva, Maria Monagas, Gemma E. Walton, Glenn R. Gibson M., Jesus E. Quintanilla-Lopez, Rosa Lebron-Aguilar, P. J. Martín-Álvarez, M. Victoria Moreno-Arribas, Begoña Bartolome. In Vitro Fermentation of a Red Wine Extract by Human Gut Microbiota: Changes in Microbial Groups and Formation of Phenolic Metabolites, *J. Agric. Food Chem.* 2012 Mar 7;60(9):2136-47
- Fitzpatrick, D.F., S.L. Hirscheield, T.Ricci, P.Jantzen, and R.G.Coffey, Endothelium-depent vasorelaxation caused by various plant parts. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995 Jul;26(1):90-5
- Floreani M, Napoli E, Quintieri L, Palatini P., Oral administration of trans-resveratrol to guinea pigs increases cardiac DT-diaphorase and catalase activities, and protects isolated atria from menadione toxicity., *Life Sci.* 2003 May 2;72(24):2741-50
- Fragopoulou E., Demopoulos C.A., Antonopoulou S., Lipid minor constituents in wines. A biochemical approach in French paradox. *International Journal of Wine Research*, 27 March 2009 Volume 2009:1 Pages 131—143
- Furet J.P. et al., Differential adaptation of human gut microbiota and low-grade inflammation markers., *Diabetes*, 2010 Dec;59(12):3049-57
- Gao X, Deeb D, Media J. et al. Immunomodulatory activity of resveratrol: discrepant in vitro and in vivo immunological effects. *Biochem Pharmacol.* 2003 Dec 15;66(12):2427-35
- Gao X, Xu Y X, Janakiraman N, Chapman R A, Gautam S C. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol.* 2001 Nov 1;62(9):1299-308
- Gill, S.R. et al., Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome., *Science* 2006 Jun 2; 312(5778): 1355–1359
- Griffiths LA, Smith GE. Metabolism of myricetin and related compounds in the rat. Metabolite formation in vivo and by the intestinal microflora in vitro. *Biochem J.* 1972 Nov;130(1):141-51
- Guillaume Ruela,b, Sonia Pomerleaua,b, Patrick Couturea,b,d, Benoît Lamarchea,b,c, Charles Couillard., Changes in plasma antioxidant capacity and oxidized low-density lipoprotein levels in men after short-term cranberry juice consumption., *Metabolism.*, 2005 Jul;54(7):856-61
- Hildebrandt, Hoffmann et al., High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity., *Gastroenterology.*, 2009 Nov;137(5):1716-24
- Holmgren, E. Health issues. *Wine and Vines* 2004

- Honour J., The possible involvement of intestinal bacteria in steroidal hypertension., *Endocrinology.*, 1982 Jan;110(1):285-7
- Hubbard GP, Wolfram S, Lovegrove JA, Gibbins JM., Ingestion of qercetin inhibits platelet aggregation of the collagen-stimulated platelet activation pathway in humans., *J Thromb Haemost*, 2004 Dec;2(12):2138-45
- Iva Fernandes, Rosa Pérez-Gregorio, Susana Soares, Nuno Mateus, Victor de Freitas. Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention *Molecules*. 2017 Feb 14;22(2) p. 292
- Janice M. Blevins and Justin R. Morris. Healt Benefits of Wine and Grape Juice., *Hortechology.*, July-September 1997 vol. 7 no. 3 228-233
- Jeremy K. Nicholson et al. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions., *Science* 2012 Jun 8;336(6086):1262-7
- John van Duynhoven, Elaine E Vaughan, Ferdi van Dorsten, Victoria Gomez-Roldan, Ric de Vos, Jacques Vervoort, Justin JJ van der Hooft, Laure Roger, Richard Draijer, and Doris M Jacobs., Interactions of black tea polyphenols with human gut microbiota: implications for gut and cardiovascular health, *Amer. J. of Nutr.*, 2013 Dec;98(6 Suppl):1631S-1641S
- John van Duynhoven, Elaine E. Vaughan, Doris M. Jacobs, Robèr A. Kemperman, Ewoud J. J. van Velzen, Gabriele Gross, Laure C. Roger, Sam Possemiers, Age K. Smilde, Joël Doré, Johan A. Westerhuis, and Tom Van de Wiele, Metabolic fate of polyphenols in the human superorganism. *PNAS* March 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4531-8
- Johnson, H. *Vintage: The Story of Wine* 1989
- Juana I. Mosele, Alba Macià, Maria-José Motilva, Metabolic and Microbial Modulation of the Large Intestine Ecosystem by Non-Absorbed Diet Phenolic Compounds: A Review, *Molecules*. 2015 Sep 18;20(9):17429-68
- Julia K Bird, Daniel Raederstorff, Peter Weber, Robert E Steinert. Cardiovascular and Antiobesity Effects of Resveratrol Mediated through the Gut Microbiota *Adv Nutr*. 2017 Nov 15;8(6):839-849
- Jumpertz R et al., Energy-balance studies reveal associationbetween gut micribiomes, caloric load, and nutrient absorption in humans., *Amer. J. Clin. Nut.*, 2011 Jul;94(1):58-65
- Jumpertz R1, Le DS, Turnbaugh PJ, Trinidad C, Bogardus C, Gordon JI, Krakoff J., Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans, *Am J Clin Nutr.*, 2011 Jul;94(1):58-65

- Kaeko Murota, Yoshimasa Nakamura & Mariko Uehara ,Flavonoid metabolism: the interaction of metabolites and gut microbiota, Biosci Biotechnol Biochem. 2018 Apr;82(4):600-610
- Kaneider, N. C., Egger, P., Dunzendorfer, S., Noris, P., et al. Reversal of thrombin-induced deactivation of CD39/ATPDase in endothelial cells by HMG-CoA reductase inhibition:effects on Rho-GTPase and adenosine nucleotide metabolism.Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2002 Jun 1;22(6):894-900
- Kang M.S., Oh J.S., Kang I.C., Hong S.J. and Choi C.H., Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria., Journal of Microbiology, 2008 Dec;46(6):744-50
- Khalesi S et al., Effect of probiotics on blood pressure a systematic review and meta-analysis of randomized, cotrolled trials. Hypertension, 2014 Oct;64(4):897-903
- Kohri T, Nanjo F, Suzuki M, et al. Synthesis of (-)-[4-H<sup>3</sup>]epigallocatechin gallate and its metabolic fate in rats after intravenous administration., J Agric Food Chem, 2001 Feb;49(2):1042-8
- Laparra J.M., Sanz Y., Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals, Pharmacological research, 2010 Mar;61(3):219-25
- Lasa A, Schweiger M, Kotzbeck P, Churruca I, Simón E, Zechner R, Portillo MP Resveratrol regulates lipolysis via adipose triglyceride lipase., J Nutr Biochem. 2012 Apr;23(4):379-84
- Laughton M. J., Evans P. A., Moroney M. A., Hoult J.R.S. and Halliwell B., Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives., Biochemical Pharmacology., 1991 Oct 9;42(9):1673-81
- Laura Marín, Elisa M. Miguélez, Claudio J. Villar, and Felipe Lombó., Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties, BioMed Research International, 2015:905215
- Ley R.E., et al., Obesity alters gut microbial ecology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005 Aug 2;102(31):11070-5
- Ley R.E., Obesity and the human microbiome. Curr. Opin. Gastroenterol. 2010 Jan;26(1):5-11
- Lisa M Bode, Diana Bunzel, Melanie Huch, Gyu-Sung Cho, Denise Ruhland, Mirko Bunzel, Achim Bub, Charles MAP Franz and Sabine E Kulling., In vivo and in vitro metabolism of trans-resveratrol by human gut microbiota1–3, Amer. J. of Clin. Nutr., 2013 Feb;97(2):295-309

- Macfarlane, G.J., T.Zheng, J.R.Marshall,P.Boffetta, S.Niu, J Brasure, F. Merleyyi, and P.Boyle., Alcohol, tobacco, diet and risk of oral cancer: A pooled analysis of 3 case-control studies. *Oral Oncol., Eur. J. Cancer.*, 1995 May;31B(3):181-7
- MacNee W., Oxidate stress and lung inflammationin airway diseases., *Eur. J. Pharmacol.*, 2001 Oct 19;429(1-3):195-207
- Mandard S1, Zandbergen F, Tan NS, Escher P, Patsouris D, Koenig W, Kleemann R, Bakker A, Veenman F, Wahli W, Müller M, Kersten S. The direct peroxisome proliferator-activated receptor target fasting-induced adipose factor (FIAF/PGAR/ANGPTL4) is present in blood plasma as a truncated protein that is increased by fenofibrate treatment., *J Biol Chem.* 2004 Aug 13;279(33):34411-20
- Mari´a Isabel Queipo-Ortun˜o, Mari´a Boto-Ordo˜n˜ez, Mora Murri, Juan Miguel Gomez-Zumaquero, Mercedes Clemente-Postigo, Ramon Estruch, Fernando Cardona Diaz, Cristina Andre´s-Lacueva, and Francisco J Tinahones., Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers., *Amer. J. of Nutr.*, 2012 Jun;95(6):1323-34
- Marques FZ. Et al., High fibre diet and acetate supplementation change the gut microbiota and prevent the development of hypertension and heart failure in doa-salt hypertensive mice. *Circulation*, 2017 Mar 7;135(10):964-977
- Moreira A.P.B. et al., Influence of a high-fat diet on gut microbiota, intestinal permeability and metabolic endotoxaemia. *Br. J. Nutr.*, 2012 Sep;108(5):801-9
- Murphy N. et al., Dietary fibre intake and risks of cancer of the colon and rectum in th European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition , *PLoS One.* 2012;7(6):e39361
- Niebauer J , Volk HD et al., Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet*, 1999 May 29;353(9167):1838-42
- Nossa CW, Oberdorf WE, Yang L, Aas JA, Paster BJ, DeSantis TZ, Brodie EL, Malamud D, Poles MA, Pei Z., Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome.,*World J Gastroenterol*, 2010 Sep 7;16(33):4135-44
- Nour Yahfoufi 1, Nawal Alsadi 1, Majed Jambi 1, Chantal Matar, The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols, *Nutrients* 2018 Nov 2;10(11)

- Okezie I. Aruoma, Antonia. Murcia, John. Butler, and Barry. Halliwell, Evaluation of the Antioxidant and Prooxidant Actions of Gallic Acid and Its Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 1993, 41 (11), pp 1880–1885
- Pierre-Louis Teissedre, Nicolas Landrault. Wine phenolics: contribution to dietary intake and bioavailability. *Food Research International* 2000, Volume 33, Issue 6, July 2000, Pages 461-467
- Pluznick JL., Protzko RJ., Genovese H, et al., Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013 Mar 12;110(11):4410-5
- Rabot S., Membrez M., Bruneau A. et al., Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism., *The FASEB J.*, 2010 Dec;24(12):4948-59
- Renaud, S. and M. de Lorgeril., Wine, alcohol, platelets and the French Paradox for coronary heart disease., *Lancet* 1992 Jun 20;339(8808):1523-6
- Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OL, Juge N, Avershina E, Rudi K, Narbad A, Jenmalm MC, Marchesi JR, Collado MC, The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life *Microb Ecol Health Dis.* 2015 Feb 2;26:26050
- Ruf JC. Wine and polyphenols related to platelet aggregation and atherothrombosis. *Drugs Exp Clin Res.*, 1999;25(2-3):125-31
- Sandek A., Bauditz J., Swidsinski A, Buhner S, Weber-Eibel J, von Haehling S, Schroedl W, Karhausen T, Doehner W, Rauchhaus M, Poole-Wilson P, Volk HD, Lochs H, Anker SD., Altered intestinal function in patient with chronic heart failure., *J Am Coll Cardiol.*, 2007 Oct 16;50(16):1561-9
- Shen J1, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med.* 2013 Feb;34(1):39-58
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., & Witztum, J.L., Beyond cholesterol. Modification of low density lipoproteins that increase its atherogenicity. *New England Journal of Medicine*, 1989 Apr 6;320(14):915-24
- Stephen, A.M., Cummings, J.H. Mechanism of action of dietary fiber in the human colon. *Nature*, 1980 Mar 20;284(5753):283-4



- Tang WH, Wang Z., Levison BS et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatylcholine and cardiovascular risk., *N Engl J Med.*, 2013 Apr 25;368(17):1575-84
- Tomás-Barberán FA, Selma MV, Espín JC. Interactions of gut microbiota with dietary polyphenols and consequences to human health. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2016 Nov;19(6):471-476
- Turnbaugh J.P., Ley R.L., et al., An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest., *Nature.*, 2006 Dec 21;444(7122):1027-31
- Vivancos M, Moreno J J. Effect of resveratrol, tyrosol and  $\beta$ -sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *Br J Nutr.* 2008 Jun;99(6):1199-207
- W.H. Wilson Tang, Takeshi Kitai, Stanley L. Hazen, Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease, American Heart Association, 2017 Mar 31;120(7):1183-1196
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE, Walle UK. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos*, 2004 Dec;32(12):1377-82
- Wang Z., Klipfell E., Bennett BJ., et al. Gut flora metabolism of phosphatylcholine promotes cardiovascular disease., *Nature*, volume 472, pages 57–63 (07 April 2011)
- Wang Zhirong, Huang Yuanzhu, Zou Jiangang, Cao Kejiang, Xu Yinan and Wu M. Joseph, Effects of red wine and wine phenolol resveratrol on platelet aggregation in vitro and in vivo, *Front Pharmacol.* 2012; 3: 141
- Waterhouse, A., Wine and heart disease, 1995
- Weisse, M.E., B. Eberly, and D.A. Person., Wine as a digestive aid: Comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine., *Brit. Med. J.*, 1995 Dec 23-30;311(7021):1657-60
- Wilcoxon, S., Take two glasses of wine and call me in the morning. *Missouri Wine J.*, 1994
- Wycherley T.P. et al., A high-protein diet with resistance exercise training improves weight loss and body composition in overweight and obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2010 May;33(5):969-76
- Yang T., et al., Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertension*, 2015 Jun;65(6):1331-40

