



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ, ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗΣ

«Επίδραση των φαινολικών ενώσεων του κρασιού στη σύσταση του
εντερικού μικροβιόκοσμου σε *in vitro* μοντέλο ζύμωσης»

Διπλωματική Εργασία

Κίσσα Ελπίδα



ΑΘΗΝΑ 2022



HAROKOPIO UNIVERSITY

SCHOOL OF HEALTH SCIENCES AND EDUCATION

DEPARTMENT OF NUTRITION AND DIETETICS

POSTGRADUATE PROGRAMME NUTRITION AND HEALTH

COURSE NUTRITION, FOODS AND CONSUMER

«The effect of wine's phenolic compounds
on gut microbiota, after fermentation in an *in vitro* static model»

Master Thesis

Kissa Elpida



ATHENS 2022



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ, ΤΡΟΦΙΜΑ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΑΛΩΤΗΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΝΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής

ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής

ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής

Εγώ η Ελπίδα Κίσσα

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.

Ευχαριστίες

Με την περάτωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Κυριακού Αδαμαντίνη για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος, τις υποδείξεις και τη στήριξη της σε όλη την πορεία πραγματοποίησής της. Εξίσου θα ήθελα να ευχαριστήσω και την κα. Φραγκοπούλου Ελισάβετ για τις πολύτιμες συμβουλές, τις διορθώσεις και τις γνώσεις που μου παρείχε.

Πολύ σημαντική ήταν επίσης, η συνεισφορά της κα. Μήτσου Ευδοκίας, διδακτορικής φοιτήτριας του πανεπιστημίου, που υπήρξε για μένα σημαντικός αρωγός όλον αυτόν τον χρόνο. Την ευχαριστώ ιδιαίτερος για τη μετάδοση γνώσεων, για την καθοδήγηση, την υπομονή, την επιμονή και την άμεση και ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχε ανελλιπώς. Ήταν πάντα δίπλα μου σε κάθε βήμα και είμαι ευγνώμων για τις ώρες που μου αφιέρωσε και όλα όσα μου έμαθε.

Θα ήταν παράλειψή μου να μην αναφερθώ στις συμφοιτήτριές μου και ιδιαίτερα στην Κερεζούδη Ευαγγελία για την ανταλλαγή απόψεων και γνώσεων, καθώς και την εμψύχωση που μου παρείχε. Επίσης, θέλω να αναφερθώ και στη στήριξη που έλαβα και από την κα. Σαξάμη Γεωργία, μεταδιδακτορικής ερευνήτριας του πανεπιστημίου, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Παράλληλα, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω και τα κορίτσια του χημείου που ήταν δίπλα μου στο χημικό κομμάτι της διπλωματικής και με καθοδήγησαν με την πείρα και τις γνώσεις τους και ήταν πάντα πρόθυμες για να λύσουν όλες μου τις απορίες.

Τέλος, οφείλω να ευχαριστήσω και την οικογένειά μου καθώς χωρίς την στήριξή της δεν θα ήταν εφικτή η συνέχιση των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη.....	v
Abstract.....	vii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	x
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	x
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xi
A.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	xii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.ΕΡΥΘΡΟΣ ΟΙΝΟΣ	1
1.1Παραγωγή ερυθρού οίνου	1
1.1.1 Περίοδος ωρίμανσης.....	1
1.1.2Τρύγος	1
1.1.3 Ερυθρή οινοποίηση	1
1.2Cabernet Sauvignon	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ	4
2.1.Φαινολικά συστατικά κρασιού	7
2.1.1Γαλλικό οξύ.....	8
2.1.2Κερκετίνη.....	9
2.1.3Ρεσβερατρόλη	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΡΙΑΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΚΡΑΣΙΟΥ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ	14
3.1 Η επίδραση των φαινολικών ενώσεων του κρασιού, στην υγεία και την πρόληψη ασθενειών	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ	17
4.1Βασικές λειτουργίες	17
4.2 Οι αλλαγές στη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου κατά τη διάρκεια της ζωής	18
4.3Διατροφή.....	20
4.4Προβιοτικά-Πρεβιοτικά.....	23
4.5Μικροοργανισμοί εντερικού μικροβιόκοσμου	25
4.5.1 Bifidobacterium bifidum.....	25
4.5.2 Bacteroides spp	26
4.5.3 Roseburia spp.-Eubacterium rectale group	26
4.5.4 Akkermansia muciniphila.....	27
4.6Εντερικός μικροβιόκοσμος και υγεία.....	27
4.6.1 Εντερικός μικροβιόκοσμος και παχυσαρκία	28
4.6.1.1 Εντερικός μικροβιόκοσμος κανονικού βάρους και παχύσαρκων ενηλίκων.....	29

4.6.1.2 Εντερικός μικροβιόκοσμος κανονικού βάρους και παχύσαρκων εγκύων.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΚΡΑΣΙ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ	32
Κεφάλαιο 5.1 Μεταβολισμός φαινολικών ενώσεων	32
5.1.1 Αλληλεπιδράσεις φαινολών ενώσεων και μικροοργανισμών του εντέρου	33
5.1.1.1 Γαλλικό οξύ.....	34
5.1.1.2 Κερκετίνη.....	34
5.1.1.3 Ρεσβερατρόλη.....	35
Κεφάλαιο 5.2 Φαινολικές ενώσεις κρασιού—εντερικός μικροβιόκοσμος και παχυσαρκία	36
5.2.1 Φαινολικές ενώσεις και μικροοργανισμοί που σχετίζονται με την παχυσαρκία.....	36
5.2.2 Συσχετισμός κατανάλωσης κόκκινου κρασιού και βάρους	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ	38
6.1 Αθηροσκλήρωση	39
6.2 Ο παράγοντας PAF.....	40
6.3 ADP	41
6.4 Κολлагόνο	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΣΚΟΠΟΣ.....	42
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	44
8.1 Βιοηθική	44
8.2 Επιλογή των προς μελέτη υποστρωμάτων για την <i>in vivo</i> ζύμωση	44
8.3 Δειγματοληψία και επεξεργασία κοπράνων (εμβολίου)	45
8.3.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών	45
8.3.2 Προετοιμασία εμβολίου.....	46
8.4 <i>In vitro</i> ζύμωση σε στατικές καλλιέργειες (Static batch culture fermentations)	46
8.4.1 Παρασκευή Basal medium	46
8.4.2 Προετοιμασία πριν την επώαση	47
8.4.3 Εμβολιασμός και επώαση των καλλιεργιών	47
8.5 Απομόνωση DNA	48
8.5.1 Αρχή μεθόδου	48
8.6 Ποσοτικός προσδιορισμός με Real Time PCR	49
8.6.1 Αρχή μεθόδου	49
8.7 Μέθοδος Bligh and Dyer	51
8.7.1 Αρχή μεθόδου	51
8.7.2 Εξοπλισμός	51
8.7.3 Αναλώσιμα-Υλικά	51
8.7.4 Αναλυτική πορεία.....	52
8.8 Μέτρηση της αντι-αιμοπεταλιακής ικανότητας του δείγματος με τη μέθοδο της οπτικής διαπερατότητας σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια	53
8.8.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών	53
8.8.2 Αρχή μεθόδου	53
8.8.3 Εξοπλισμός	53
8.8.4 Αναλώσιμα-Υλικά	53

8.8.5Αντιδραστήρια.....	53
8.8.6Αναλυτική πορεία.....	54
8.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	56
9.1Χαρακτηριστικά των εθελοντών.....	56
9.2 <i>In vitro</i> ζύμωση των φαινολικών υποστρωμάτων.....	56
9.3Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών του συνόλου των εθελοντών (n=6) κατά την έναρξη της ζύμωσης (t=0)	58
9.3.1Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών του συνόλου των εθελοντών (n=3) με φυσιολογικό BMI στον αρχικό χρόνο δειγματοληψίας (t=0).....	59
9.3.2Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών των παχύσαρκων εθελοντών (n=3) στον αρχικό χρόνο δειγματοληψίας (t=0).....	60
9.4Ποσοτικός προσδιορισμός μικροβιακών πληθυσμών του συνόλου των εθελοντών (n=6) στις (t=24 ώρες).....	61
9.4.1Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών των εθελοντών (n=3) με φυσιολογικό BMI (n=3) στον τελικό χρόνο δειγματοληψίας (t=24).....	63
9.4.2Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών των παχύσαρκων εθελοντών (n=3) στον τελικό χρόνο δειγματοληψίας (t=24).....	65
9.5Σύγκριση του εντερικού μικροβιόκοσμου όλων των εθελοντών (n=6) μετά τη ζύμωση των υποστρωμάτων.....	67
9.5.1 Σύγκριση του εντερικού μικροβιόκοσμου των εθελοντών (n=3) με φυσιολογικό BMI μετά τη ζύμωση των υποστρωμάτων.....	70
9.5.2 Σύγκριση του εντερικού μικροβιόκοσμου των παχύσαρκων εθελοντών (n=3) μετά τη ζύμωση των υποστρωμάτων.....	73
9.6 Μέτρηση της αντι-αιμοπεταλιακής ικανότητας του δείγματος.....	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	78
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	81

Περίληψη

Εισαγωγή

Η σύνδεση του εντερικού μικροβιόκοσμου με την υγεία του ανθρώπου είναι αντικείμενο εκτενούς μελέτης, ενώ έμφαση δίνεται στην πιθανή σχέση που υπάρχει μεταξύ του εντερικού μικροβιόκοσμου και των μεταβολικών νοσημάτων όπως η παχυσαρκία.

Η παχυσαρκία λαμβάνει επιδημικές διαστάσεις στο δυτικό κυρίως κόσμο, προκαλώντας αυξημένα προβλήματα υγείας και/ή μείωση του προσδόκιμου ζωής. Πρόσφατες μελέτες σχετίζουν τη διατροφή και την κατανάλωση πολυφαινόλων με τον έλεγχο του σωματικού βάρους μέσω της τροποποίησης του εντερικού μικροβιόκοσμου. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού και πιο συγκεκριμένα η ρεσβερατρόλη, η κερκετίνη και το γαλλικό οξύ.

Σκοπός

Η μελέτη της πιθανής πρεβιοτικής δράσης του υδατικού και του λιποειδικού εκχυλίσματος του κόκκινου κρασιού, μετά από ζύμωση σε *in vitro* στατικό πειραματικό μοντέλο των εκχυλισμάτων του κόκκινου κρασιού, από τον εντερικό μικροβιόκοσμο εθελοντών με κανονικό βάρος και παχύσαρκων εθελοντών.

Μεθοδολογία

Πραγματοποιήθηκε *in vitro* ζύμωση με εμβόλιο κοπράνων από έξι εθελοντές από τους οποίους οι τρεις ήταν παχύσαρκοι και οι άλλοι τρεις φυσιολογικού βάρους για 24 ώρες. Ακολούθησε ο ποσοτικός προσδιορισμός των μικροοργανισμών: Ολικά βακτήρια, *Bacteroides* spp, *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group, *Akkermansia muciniphila* και *Bifidobacterium* spp. μέσω ποσοτικής PCR (qPCR). Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η αντι-αιμοπεταλιακή ικανότητα του Βασικού διαλύματος (Basal medium) που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις ζυμώσεις, με τη μέθοδο platelet-rich-plasma.

Αποτελέσματα

Η ζύμωση της ινουλίνης επέφερε σημαντική αύξηση του πληθυσμού του *Bifidobacterium* spp., ενώ μειώθηκε το *Akkermansia muciniphila*, μετά από 24 ώρες για το σύνολο των εθελοντών, συγκρινόμενο με την έναρξη της ζύμωσης. Επίσης, μετά τη ζύμωση του πρεβιοτικού (ινουλίνη), το *Bifidobacterium* spp. παρέμεινε σημαντικά υψηλότερο σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την μπιφιδογόνο δράση της ινουλίνης. Το υδατικό εκχύλισμα του κρασιού, μετά τη ζύμωσή του από τον εντερικό μικροβιόκοσμο, προκάλεσε

σημαντική μείωση των *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Roseburia* spp. – *Eubacterium rectale* group, για το σύνολο των εθελοντών, σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης (t=0). Οι πληθυσμοί των *Bifidobacterium* spp., *Roseburia* spp. – *Eubacterium rectale* group, διαμορφώθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα από τους αντίστοιχους του θετικού μάρτυρα (ινουλίνη) στον ίδιο χρόνο και για το σύνολο των εθελοντών. Αντίστοιχα, το λιποειδικό εκχύλισμα επέφερε μείωση σημαντική στα Ολικά βακτήρια και στους πληθυσμούς του *Bacteroides* spp. και *Roseburia* spp. – *Eubacterium rectale* group, μετά από 24 ώρες ζύμωσης σε σχέση με την έναρξη και για το σύνολο των εθελοντών. Οι πληθυσμοί των Ολικών βακτηρίων, *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Roseburia* spp. – *Eubacterium rectale* group, διαμορφώθηκαν σε χαμηλότερα επίπεδα από τους αντίστοιχους του θετικού μάρτυρα (ινουλίνη) στον ίδιο χρόνο και για το σύνολο των εθελοντών.

Στους παχύσαρκους εθελοντές ο πληθυσμός του *Bacteroides* spp παρέμεινε σημαντικά υψηλότερος για όλα τα υποστρώματα συγκρινόμενος με τον αντίστοιχο της ινουλίνης, ενώ ο πληθυσμός του *Bifidobacterium* spp είναι σημαντικά μικρότερος σε όλα τα υποστρώματα εκτός από το γαλλικό οξύ, σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα.

Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα δεν επιβεβαιώνουν τον πρεβιοτικό χαρακτήρα των δύο εκχυλισμάτων του κόκκινου κρασιού.

Abstract

Introduction

The critical role of gut microbiota on human health has been the subject of extended research, while emphasis is given on the possible relationship between gut microbiota and metabolic disorders such as obesity.

Obesity is reaching epidemic proportions particularly in the western world, causing increased health problems and / or reduced life expectancy. Recent studies have linked diet and consumption of polyphenols to body weight control by modulating gut microbiota. Actually, there is increased interest in red wine polyphenols and more specifically in resveratrol, quercetin and gallic acid.

Aim

The aim of this study was to investigate the potential prebiotic effect of water and lipid extracts of red wine, after fermentation in an *in vitro* static model, inoculated with the gut microbiota of normal weight and obese volunteers.

Methodology

The *in vitro* fermentation with fecal inoculum from six volunteers, three obese and three with normal weight for 24 hours, was performed under anaerobic conditions. Total bacteria, *Bacteroides* spp., *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group, *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. populations were measured with quantitative PCR. Finally, the anti-platelet effectiveness of the basal medium used in all fermentations was tested with the platelet-rich-plasma method.

Results

Inulin fermentation resulted in a significant increase of *Bifidobacterium* spp., while *Akkermansia muciniphila* decreased after 24 hours for all volunteers compared to the negative control. Also, after fermentation of the prebiotic substrate (inulin), *Bifidobacterium* spp. remained significantly higher compared to the negative control. These results confirm the bifidogenic effect of inulin. The fermentation of the wine's water extract by the gut microbiota, caused a significant reduction in *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Roseburia* spp. - *Eubacterium rectale* group, for all volunteers, compared to the beginning of fermentation (t = 0). The populations of *Bifidobacterium* spp., *Roseburia* spp. – *Eubacterium rectale* group, were lower compared to the positive control (inulin) at the same time and for all volunteers. Respectively, the lipid extract of red wine, caused a significant reduction in Total bacteria,

Bacteroides spp. and *Roseburia* spp. - *Eubacterium rectale* group, after 24 hour fermentation compared to the beginning and for all volunteers. The populations of Total Bacteria, *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Roseburia* spp. - *Eubacterium rectale* group, were at lower levels than those of the positive control (inulin) at the same time and for all volunteers. In obese volunteers *Bacteroides* spp remained significantly higher in all cases (wine's extracts, phenolic compounds) compared to that of inulin, while *Bifidobacterium* spp was significantly lower in all cases except gallic acid compared to the positive control.

Conclusions

These results do not confirm the potential prebiotic effect of the two red wine extracts.

Keywords: phenolic compounds, gut microbiota, red wine, obesity

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Χημική δομή Γαλλικού οξέος	8
Εικόνα 2. Χημική δομή Κερκετίνης.....	10
Εικόνα 3. Χημική δομή Ρεσβερατρόλης	11
Εικόνα 4. Καρδιοπροστατευτική δράση κόκκινου κρασιού.....	15
Εικόνα 5. Μεταβολισμός φαινολικών ενώσεων	33
Εικόνα 6. Αιμοπετάλια	38
Εικόνα 7. Αιμοπετάλια στο μικροσκόπιο	38
Εικόνα 8. Στάδια αθηροσκλήρωσης	40

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας Ι. Φαινολικά συστατικά στο κρασί.....	8
Πίνακας ΙΙ. Λειτουργικές ιδιότητες προβιοτικών.....	24
Πίνακας ΙΙΙ. Συσχετισμός βάρους μάζας σώματος και εντερικού μικροβιόκοσμου.....	31
Πίνακας ΙV. Ερμηνεία κωδικοποίησης υποστρωμάτων και μαρτύρων.....	44
Πίνακας V. Χαρακτηριστικά Δείγματος	45
Πίνακας VI. Εκκινητές και χαρακτηριστικά της ποσοτικής PCR (qPCR) των υπό εξέταση μικροοργανισμών της μελέτης	50
Πίνακας VII. Περιγραφικά σχοιχεία των εθελοντών.....	56
Πίνακας VIII. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών πριν την έναρξη της ζύμωσης (n=6).....	57
Πίνακας IX. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών κατά την έναρξη της (n=6 και t=0).....	58
Πίνακας X. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για τους εθελοντές με φυσιολογικό BMI (n=3) στην έναρξη της ζύμωσης (t=0).....	59
Πίνακας XI. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για τους παχύσαρκους εθελοντές (n=3) στην έναρξη της ζύμωσης (t=0).....	60
Πίνακας XII. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για το σύνολο των εθελοντών (n=6 και t=24h).....	61

Πίνακας XIII. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για τους εθελοντές με φυσιολογικό BMI (n=3) στις t=24h.....	63
Πίνακας XIV. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για τους παχύσαρκους εθελοντές (n=3) στις t=24h.....	65
Πίνακας XV. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για το σύνολο των εθελοντών (n=6) μεταξύ t=0 και t=24h.....	67
Πίνακας XVI. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για το σύνολο των εθελοντών με φυσιολογικό BMI (n=3) μεταξύ t=0 και t=24h.....	70
Πίνακας XVII. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για το σύνολο των παχύσαρκων εθελοντών (n=3) μεταξύ t=0 και t=24h.....	73
Πίνακας XVIII. Ερμηνεία συμβολισμών.....	75
Πίνακας XIX. % Αναστολή της επαγομένης από τους αγωνιστές συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του Basal medium	76

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Οι 35 χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή Cabernet Sauvignon στον κόσμο.....	4
Διάγραμμα 2. Ο επιταχυνόμενος ρυθμός αύξησης των παχύσαρκων ενηλίκων στον κόσμο.....	28

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Συστατικά κρασιού.....	5
Σχήμα 2. Οι παράγοντες που επιδρούν στη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου στα διάφορα στάδια της ζώης.....	20

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
ALT	Αμινοτρανσφεράση της αλανίνης
AMP	Μονοφωσφορική αδενοσίνη
AST	Αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
CVD	Cardiovascular Disease
DNA	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
FAO	Food and Agriculture Organization
HDL	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
HFS	High Fat–High Sucrose
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
SCFA	Short – Chain Fatty Acids
TAG	Triacylglycerol
WHO	World Health Organization

Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.ΕΡΥΘΡΟΣ ΟΙΝΟΣ

Ως οίνος ορίζεται το προϊόν που παράγεται αποκλειστικά με αλκοολική ζύμωση, ολική ή μερική, νωπών σταφυλιών, που έχουν σπασθεί ή όχι, ή γλεύκους σταφυλιών.¹ Παρόλο που πολλά τρόφιμα με βάση τα σταφύλια μπορούν να βρεθούν στην αγορά, μελέτες έχουν δείξει ότι περίπου το 80% της παγκόσμιας παραγωγής σταφυλιών προορίζεται για τη βιομηχανία οίνου (Zhu, Du , Zheng, Li, 2015).

1.1 Παραγωγή ερυθρού οίνου

Η παραγωγή του κρασιού περιλαμβάνει συνοπτικά τα κάτωθι στάδια:

1.1.1 Περίοδος ωρίμανσης

Αρχικά, στο πρώτο στάδιο η ρόγα λόγω της χλωροφύλλης είναι πράσινη και σκληρή. Ο καρπός επεξεργάζεται και αφομοιώνει τον άνθρακα παράγοντας σάκχαρα, άμυλο, οξέα, φαινολικά συστατικά (Τσακίρης, 2014). Στο δεύτερο στάδιο η ρόγα διογκώνεται και αλλάζει χρώμα απότομα. Ωρίμανση καλείται η περίοδος μετά την αλλαγή του χρώματος μέχρι την πλήρη ωρίμανση κατά την οποία αυξάνεται η συγκέντρωση των σακχάρων.

1.1.2 Τρύγος

Ο τρύγος περιλαμβάνει τη συλλογή των σταφυλιών. Η κατάλληλη χρονική στιγμή εξαρτάται από τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος και καθορίζεται μετά από δειγματοληψία για τον προσδιορισμό ολοκλήρωσης των απαραίτητων χημικών μεταβολών στη σύσταση του σταφυλιού (συνήθως σχέση σακχάρων προς οξέα).

1.1.3 Ερυθρή οινοποίηση

Προφανώς, η ερυθρή οινοποίηση αφορά μόνο τα σταφύλια κόκκινου χρώματος ικανών να προσδώσουν το κατάλληλο χρώμα στο κρασί. Σε αυτό του είδους την οινοποίηση, η διαφορά έγκειται στη σπουδαιότητα της ποιότητας του σταφυλιού και κυρίως στη φλούδα της ρόγας από την οποία γίνεται η εκχύλιση των συστατικών.

¹ Άρθρο 7 του κανονισμού (ΕΟΚ) 823/87 του Συμβουλίου, της 16ης Μαρτίου 1987, για τη θέσπιση ειδικών διατάξεων σχετικά με τους οίνους ποιότητας που παράγονται εντός καθορισμένων περιοχών (ΕΕ L 84, σ. 59).

Οι συνθήκες μεταφοράς είναι υψίστης σημασίας καθότι κρίνεται απαραίτητο να αποφευχθεί η πρόωρη ανάπτυξη μικροοργανισμών και οποιαδήποτε πίεση (πρόωρο σπάσιμο) στα σταφύλια. Για αυτό το λόγο είναι επιθυμητό το οινοποιείο να βρίσκεται κοντά στον αμπελώνα.

Ακολουθεί ο απορραγισμός ο οποίος περιλαμβάνει τον αποχωρισμό των βοστρύχων και την απομάκρυνση των τσάμπουρων, χωρίς όμως να πολτοποιεί βιαίως τις ρόγες.

Στην έκθλιψη πραγματοποιείται το «ομαλό» σπάσιμο της ρόγας του σταφυλιού επιτρέποντας την απελευθέρωση του χυμού της και την ανάμειξή του με τις ζύμες που βρίσκονται στην επιφάνεια του σταφυλιού. Η φυσική περιεκτικότητα της ρόγας σε σάκχαρο παρέχει το απαραίτητο υλικό για ζύμωση. Αρκεί για να παραχθεί ένας οίνος με περιεκτικότητα αλκοόλης 10% ή περισσότερο. Τα κρασιά που περιέχουν μικρότερο ποσοστό είναι ασταθή λόγω της ευαισθησίας τους στην βακτηριακή αλλοίωση (Kordylas, 1992).

Μετά ο σταφυλοπολτός μεταφέρεται στις δεξαμενές ζύμωσης. Πριν το στάδιο αυτό προστίθεται θειώδης ανυδρίτης που ευνοεί την εκχύλιση μεταλλικών ιόντων, οργανικών οξέων και κυρίως φαινολικών ενώσεων (Τσακίρης, 2014). Οι δεξαμενές αυτές είναι συνήθως ανοξείδωτες, κυλινδρικού σχήματος με καπάκι που βυθίζεται μέσα στη δεξαμενή. Επίσης, δεν γεμίζονται ποτέ μέχρι πάνω λόγω του ότι αναμένεται αύξηση του όγκου εξαιτίας της παραγωγής του διοξειδίου του άνθρακα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης.

Πολλές φορές απαιτείται η παρέμβαση και μεταβολή της περιεκτικότητας σε σάκχαρο ή της οξύτητας. Αρκετά σύνηθες επίσης είναι και η προσθήκη εμπορικών ζυμών για να εξασφαλίσουν συνέπεια, να μειωθούν οι κίνδυνοι αλλοιώσεων από ανάπτυξη επιβλαβών βακτηρίων και γενικά ένα σταθερό τελικό προϊόν. Η ζύμωση μπορεί να διαρκέσει από κάποιες μέρες έως κάποιους μήνες.

Οι ιδανικές θερμοκρασίες είναι μεταξύ 25 και 30°C οι οποίες επιτρέπουν την εκχύλιση των συστατικών που είναι χρήσιμα για την απόκτηση του τελικού αρώματος και γεύσης, από τα στέμφυλα (φλούδες, κουκούτσια, βόστρυχοι). Ο χρόνος που παραμένουν τα στέμφυλα με το γλεύκος στην δεξαμενή καθορίζεται από την ποιότητα του κρασιού και τα επιθυμητά χαρακτηριστικά κάθε φορά. Ο χρόνος, για τα κρασιά που θα καταναλωθούν άμεσα είναι πολύ μικρός, ενώ για τα κρασιά που θα οδηγηθούν για παλαίωση είναι μεγαλύτερος.

Ο διαχωρισμός στέμφυλων-κρασιού δεν γίνεται εμπειρικά αλλά συνήθως με τον Δείκτη Φαινολικών ουσιών και με οργανοληπτικούς ελέγχους.

Στη συνέχεια, το γλεύκος θα μεταφερθεί σε άλλη δεξαμενή όπου θα ολοκληρωθεί η αλκοολική ζύμωση αφού πιθανότατα πραγματοποιηθεί η μηλογαλακτική ζύμωση στην οποία το μηλικό οξύ αποικοδομείται σε γαλακτικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα. Η ζύμωση προκαλείται από ένζυμα που παράγονται από ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η μηλογαλακτική ζύμωση είναι επιθυμητή όταν τα νέα κρασιά έχουν πολύ υψηλή συγκέντρωση μηλικού οξέος, σε διαφορετική

περίπτωση πρέπει να εξαφανιστεί το μηλικό οξύ αλλιώς υπάρχει περίπτωση να αρχίσουν τα βακτήρια να αποικοδομούν και άλλα συστατικά (πεντόζες, γλυκερόλη, τρυγικό οξύ και σάκχαρα) και να γίνουν “επιβλαβή”.

Το κρασί που θα πάρουμε αποτελεί το κρασί εκροής. Καθημερινά παρακολουθείται η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης με μετρήσεις του βαθμού μπομέ ή του ειδικού βάρους. Όταν η μέτρηση είναι κάτω από το 1,00 και η περιεκτικότητα σε σάκχαρα μετρημένη με το φελίγγειο υγρό κάτω από 2 g/l διαπιστώνεται το τέλος της αλκοολικής ζύμωσης (Τσακίρης, 2014).

Μετά το τέλος των ζυμώσεων χρειάζονται απογέμισμα και μεταγγίσεις σε νέες δεξαμενές ή σε βαρέλια. Αυτό γίνεται για να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα που φυσιολογικά καθιζάνουν με την πάροδο του χρόνου. Αν πρόκειται για κρασιά που θα εμφιαλωθούν αμέσως δεν απαιτούνται πολλές ή και καθόλου μεταγγίσεις, ενώ σε αυτά που προορίζονται για παλαίωση απαιτούνται συχνές.

Τα βαρέλια που επιλέγονται σε αυτό το στάδιο είναι συνήθως από ξύλο δρυός, καστανιάς ή οξιάς. Το ξύλο γενικά δεν είναι αδρανές υλικό και κατά τις θερμικές κατεργασίες που συντελούνται με την πάροδο του χρόνου, επιδρούν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του κρασιού. Ο χρόνος παραμονής στα βαρέλια εξαρτάται από το είδος κρασιού που περιέχει και πραγματοποιούνται δοκιμές σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Μετά την ωρίμανση τα κρασιά εμφιαλώνονται σε γυάλινες φιάλες είτε με φελλό είτε με βιδωτό πώμα.

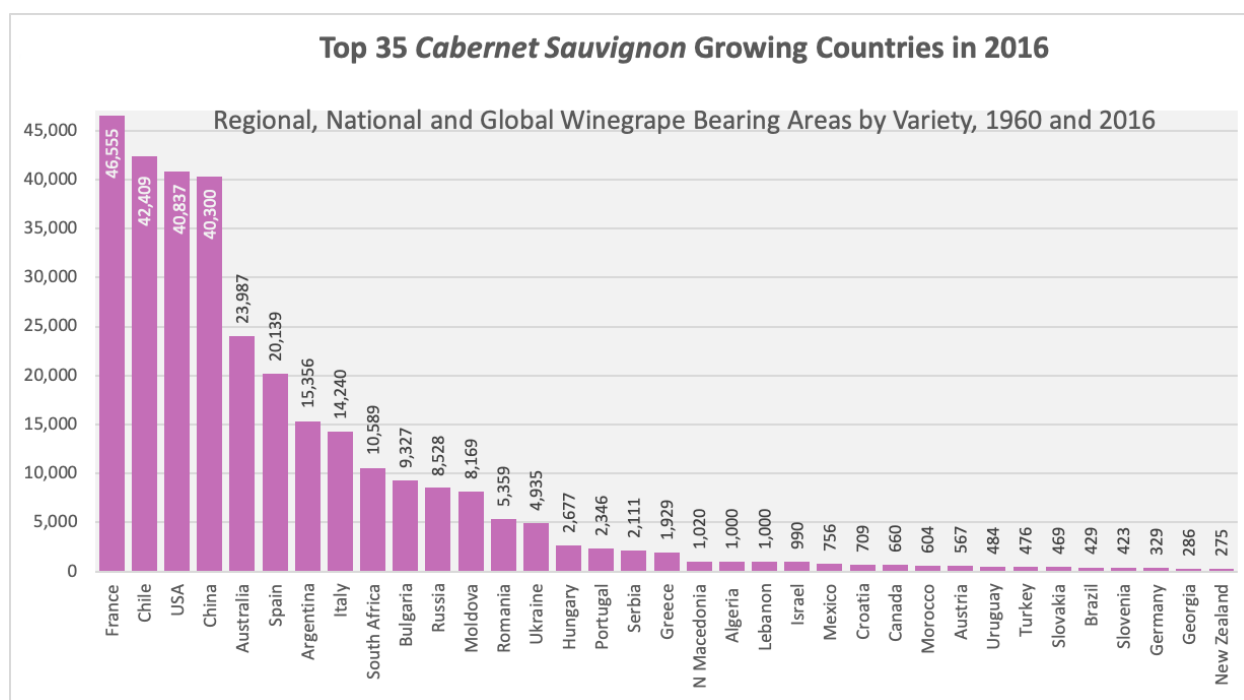
1.2 Cabernet Sauvignon

Προέκυψε από διασταύρωση των ποικιλιών Cabernet Franc και Sauvignon Blanc, διατηρώντας τα αρωματικά χαρακτηριστικά και των 2 ποικιλιών. Πιο συγκεκριμένα, το σταφύλι από το οποίο προκύπτει το Cabernet Sauvignon είναι πολύ μικρό, με ένα παχύ δέρμα, δημιουργώντας μια υψηλή αναλογία 1:12 σπόρων προς φρούτα (πολτός). Οι υψηλές αναλογίες του σε φαινολικά συστατικά και τανίνες μπορούν να επηρεάσουν έντονα τη δομή και τη γεύση του κρασιού - ειδικά εάν το γλεύκος υποβληθεί σε μακρές περιόδους διαβροχής (επαφή με το δέρμα) πριν από τη ζύμωση (Wikipedia, 2019). Επίσης, οι πολυσακχαρίτες του κρασιού Cabernet Sauvignon αποδείχθηκε ότι μειώνουν τη φλεγμονή και τη θνησιμότητα λόγω σήψης, σε πειράματα που έγιναν σε ποντίκια (Iglesias et al., 2019). Συμπληρωματικά, κατάφεραν να μειώνουν τα επίπεδα AST (αμινοτρανσφεράση του ασπαρτικού οξέος), ALT (αμινοτρανσφεράση της αλανίνης), χολερυθρίνης, ουρίας και κρεατινίνης, με επακόλουθη προστασία έναντι βλάβης των ιστών. Έχει επίσης βρεθεί ότι τα μη αλκοολικά εκχυλίσματα του Cabernet Sauvignon προστατεύουν τους

υπερτασικούς αρουραίους κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης (Fantinelli & Mosca, 2007).

Η δημοτικότητά του αποδίδεται συχνά στην ευκολία της καλλιέργειας του σε ποικιλία κλιματολογικών και οινοποιητικών συνθηκών. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι η καλλιέργειά του σε ψυχρότερα κλίματα του προσδίδει μια πιο τραχιά γεύση, με πικρή επίγευση στο τέλος, ενώ το άρωμα του θυμίζει εκείνο πράσινης πιπεριάς. Σε ιδανικές συνθήκες καλλιέργειάς του, προσδίδει ένα άρωμα ώριμου φρούτου (φραγκοστάφυλου). Σε θερμότερα κλίματα έχει άρωμα ευκάλυπτου και μέντας, ενώ η γεύση του παρομοιάζει εκείνη της μαύρης σοκολάτας. Ενώ αν έχει οδηγηθεί σε παλαίωση σε δρύινα βαρέλια αποκτά πλούσιο χρώμα (πορφυρό κόκκινο που με την πάροδο της παλαίωσης γίνεται ρουμπινί), πληθωρική γεύση και άρωμα.

Σήμερα στην Ελλάδα καλλιεργείται σε πολλές περιοχές όπως στην νότια Πελοπόννησο, στην Χαλκιδική, στην Αταλάντη.



Διάγραμμα 1.Οι 35 χώρες με τη μεγαλύτερη παραγωγή Cabernet Sauvignon στον κόσμο
Πηγή: Anderson K., Nelgen S. (2020)

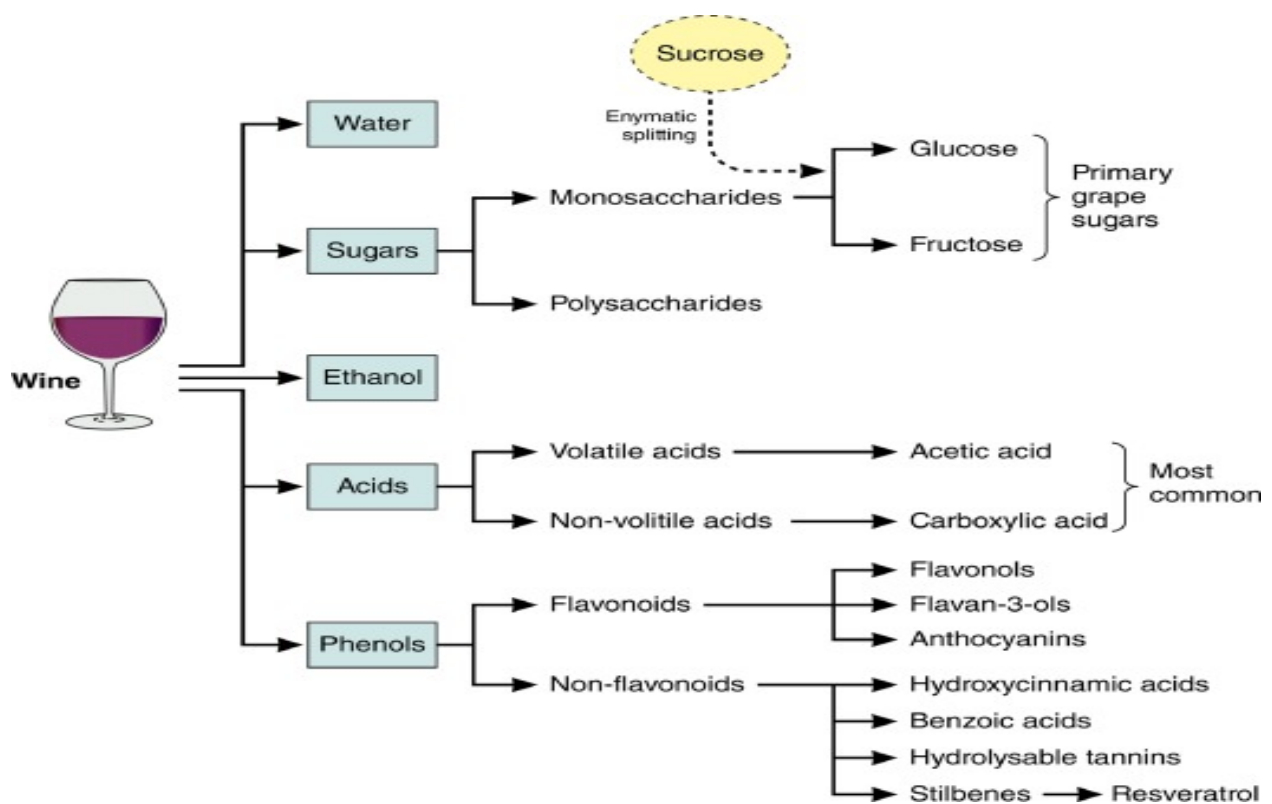
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΡΑΣΙΟΥ

Η σύνθεση του οίνου βασίζεται στα συστατικά του σταφυλιού, στα προϊόντα ζύμωσης και στις ενώσεις που σχηματίζονται κατά την αποθήκευση και την ωρίμανση του κρασιού. Πάνω από 500 ενώσεις έχουν ανιχνευθεί αναλυτικά στον οίνο, οι περισσότερες κυμαίνονται σε συγκεντρώσεις μεταξύ 10^{-1} έως 10^{-6} (mg/L) οι οποίες δεν αρκούν για να διαδραματίσουν

μεμονωμένα κάποιο ρόλο στην γεύση του οίνου, αλλά έχουν συνεργιστική δράση. Η γεύση, το άρωμα και η υφή εκτιμάται ότι οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε λίγα συστατικά που εμφανίζονται σε ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις γραμμαρίων ανά λίτρο (g/L).

Τα κυριότερα συστατικά του οίνου είναι το νερό και η αιθανόλη, που αντιπροσωπεύουν περίπου το 97% κ.β.. Τα υπόλοιπα συστατικά σε αφθονία είναι τα σάκχαρα, τα οξέα, άλλες αλκοόλες και οι φαινόλες, που υπάρχουν σε συγκεντρώσεις g/L. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη γλυκύτητα, την οξύτητα, το χρώμα και τα αισθητικά και γευστικά χαρακτηριστικά του κρασιού. Οι φαινόλες, ιδιαίτερα οι πολυφαινόλες, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι προσδίδουν αντιοξειδωτική δράση στο κρασί και έχουν βρεθεί ότι είναι βιολογικά δραστικές.

Πιο συγκεκριμένα το κρασί περιέχει:



Σχήμα 1. Συστατικά κρασιού (Haseeb et al., 2019)

✓ Νερό

Το νερό αποτελεί θεμελιώδες χημικό συστατικό του οίνου. Λειτουργεί ως μέσο χημικών αντιδράσεων κατά την ωρίμανση των σταφυλιών, τη ζύμωση και την ωρίμανση του κρασιού. Πολλές ενώσεις σημαντικές για τη γεύση και το άρωμα του κρασιού είναι διαλυτές στο νερό μόνο λόγω των μοναδικών δια-μοριακών χημικών ιδιοτήτων του.

✓ Αιθανόλη

Οι τυπικές συγκεντρώσεις αιθανόλης κυμαίνονται από 10-15% v/v. Η αιθανόλη επηρεάζει τα χαρακτηριστικά σταθερότητας, ωρίμανσης, γεύσης και αρώματος του οίνου. Η αύξηση της συγκέντρωσης αιθανόλης γενικά αυξάνει την αντίληψη της πικρής και γλυκιάς γεύσης των οίνων, μειώνει την ένταση άλλων οσμών και καταστέλλει την ανάπτυξη μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Μειώνει επίσης την εξάτμιση άλλων πτητικών ενώσεων όπως οι φαινόλες και βελτιώνει τη συνολική σταθερότητα του κρασιού μέσω της παραγωγής εστέρων. Τα κόκκινα κρασιά έχουν γενικά υψηλότερη συγκέντρωση αιθανόλης από τα λευκά (Haseeb, Bryce, Santi, Liprandi, Baranchuk, 2019).

✓ Σάκχαρα

Τα σάκχαρα αποτελούν το κύριο υπόστρωμα για την παραγωγή αιθανόλης στο κρασί κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Τα υπολείμματα σακχάρων, από ατελή ζύμωση ή μη ζυμώσιμα σάκχαρα, αυξάνουν τη γλυκύτητα των οίνων. Στα σταφύλια, τα κύρια σάκχαρα είναι εξόζες: φρουκτόζη και γλυκόζη, που συνήθως εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις 0,2-4,0 g/L και 0,5-1,0 g/L αντίστοιχα.

✓ Οι φαινόλες

Συμβάλλουν στην εμφάνιση, στο άρωμα, στη γεύση και στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του κρασιού, ιδιαίτερα του κόκκινου κρασιού. Τα κόκκινα κρασιά έχουν σημαντικά υψηλότερη συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες από τους λευκούς οίνους (2 g/L έναντι 200 mg/L).

Βέβαια, η ποιοτική και ποσοτική σύνθεση τους σε φαινόλες επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως ποικιλία σταφυλιών, τοποθεσία αμπελώνων, κλιματολογικές συνθήκες, έκθεση στον ήλιο, διαδικασία οινοποίησης και αποθήκευσης κρασιού (Lachman, Sulc, Faitoná, Pivec, 2009). Ειδικά τα κόκκινα κρασιά φτιαγμένα από ποικιλίες σταφυλιού με πολύ σκούρο χρώμα, περιέχουν γενικά έως και 3500 mg/L φαινολικών ουσιών συμπεριλαμβανομένων μη φλαβονοειδών και φλαβονοειδών. Η τελευταία δε ομάδα αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό ποσοστό φαινολικών ενώσεων, με ποσότητες που κυμαίνονται από 1000 έως 1800 mg/L (Kanner, Frankel, Granit, German, Kinsella, 1994).

✓ Οξέα

Τα κύρια οργανικά οξέα στα σταφύλια και στον οίνο είναι: οξικό (0,1-0,5 g/L), μηλικό (2-7 g/L), τρυγικό (2-6 g/L), ηλεκτρικό (0,5-1,0 g/L) γαλακτικό (0-3g/L) και κιτρικό (0,1-0,7 g/L). Τα οξέα είναι υπεύθυνα για τον προσδιορισμό του pH του κρασιού, το οποίο επηρεάζει το χρώμα, τη γεύση και τη σταθερότητά του. Τα κόκκινα κρασιά έχουν ιδανικές τιμές pH από 3,3 έως 3,5, με λευκούς οίνους που κυμαίνονται μεταξύ 3,0 και 3,3.

✓ Άλλες ενώσεις

Τα σταφύλια και ο οίνος περιέχουν αζωτούχες ενώσεις, με τις σημαντικότερες να θεωρούνται τα αμινοξέα, σε συγκεντρώσεις mg/L. Παίζουν ρόλο ως πρόδρομα μόρια στη βιοσύνθεση ενζύμων και αποτελούν σημαντικές πηγές αζώτου και ενέργειας κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Περίπου 50 ανόργανα συστατικά βρίσκονται επίσης στο κρασί.

Το σημαντικότερο ανόργανο στοιχείο θεωρείται ότι είναι το κάλιο, το οποίο μπορεί να υπάρχει σε συγκεντρώσεις g/L. Παρά το γεγονός ότι τα ανόργανα στοιχεία αποτελούν δευτερεύουσες συνιστώσες της συνολικής σύνθεσης του κρασιού, παίζουν ρόλο κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, ενώ παράλληλα ενισχύουν τη χημική σταθερότητα του κρασιού.

Οι ενώσεις που περιέχουν θείο συμβάλλουν επίσης στην ποιότητα και τις αισθητικές ιδιότητες του οίνου. Προέρχονται από τη ζύμωση του κρασιού ή μέσω της εξωτερικής προσθήκης διοξειδίου του θείου, μιας προστιθέμενης ένωσης στην οινοπαραγωγή. Η έκθεση σε θειώδη έχει συσχετιστεί με ανεπιθύμητες ενέργειες όπως αναφυλαξία, πονοκεφάλους, δερματίτιδα, υπόταση, καρδιακή δυσλειτουργία και γαστρικές και εντερικές διαταραχές (Haseeb et al., 2019).

2.1 Φαινολικά συστατικά κρασιού

Τα φαινολικά συστατικά στο κρασί συνεισφέρουν στο χρώμα, τη γεύση, την τραχύτητα και τη στυπτικότητα. Το συνολικό ποσοστό τους στο κρασί εξαρτάται από:

- την ποικιλία του σταφυλιού
- την επεξεργασία του σταφυλιού για την παραγωγή του κρασιού (συνθήκες, θερμοκρασία)
- τον τρόπο σύνθλιψης του καρπού
- τον χρόνο και τρόπο παλαίωσης

Σε περίπτωση παλαίωσης σε βαρέλια, το ξύλο έχει αποδειχθεί ότι συμβάλει στην αλλαγή της περιεκτικότητας του κρασιού σε φαινολικά.

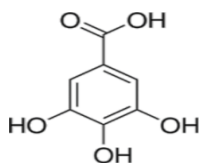
Πίνακας Ι. Φαινολικά συστατικά στο κρασί

Φλαβονοειδείς φαινόλες	Μη φλαβονοειδείς φαινόλες
Βενζοϊκά Οξέα	Φλαβανόνες
Κινναμωνικά οξέα	Φλαβονόλες
Βενζαλδεΐδες	Φλαβονόλες -3 (κατεχίνες)
Κινναμωνικές αλδεΐδες	Φλαβονόλες 3,4 (λευκοανθοκυάνες ή προκυανιδίνες)
	Στιλβένια

Τα βενζοϊκά και κινναμωνικά οξέα, τα παράγωγα της βενζαλεΐδης και της κινναμωνικής αλδεΐδης βρίσκονται στα κρασιά που έχουν υποστεί παλαίωση σε ξύλινα βαρέλια. Οι φλαβανόνες βρίσκονται στα κουκούτσια των σταφυλιών, οι φλαβονόλες-3 (κατεχίνες) στη φλούδα και στα κουκούτσια και οι φλαβονόλες 3,4 στη φλούδα και κυρίως στα κουκούτσια (Τσακίρης, 2014). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι έρευνες που έχουν επικεντρωθεί στο γαλλικό οξύ, στην κερκετίνη και στη ρεσβερατρόλη και τα πιθανά τους οφέλη στη ανθρώπινη υγεία.

2.1.1 Γαλλικό οξύ

Το γαλλικό οξύ (3,4,5 τρι-υδροξυβενζοϊκό οξύ) είναι ένα κρυσταλλικό στερεό, ελαφρώς άχρωμο ή ελαφρώς κίτρινο και ανήκει στα βενζοϊκά οξέα.



Εικόνα 1. Χημική δομή Γαλλικού οξέος

Πολλά τρόφιμα περιέχουν διάφορες ποσότητες γαλλικού οξέος. Τις μεγαλύτερες έχουν τα φρούτα συμπεριλαμβανομένων των φραουλών, σταφυλιών και μπανανών. Μπορεί να βρεθεί στο τσάι, στο κρασί και στο ξύδι.

Σε μια ανασκόπηση 97 μελετών για τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινόλων (Manach, Williamson, Morand, Scalbert, Révész, 2005), βρέθηκε ότι το γαλλικό οξύ και οι ισοφλαβόνες είναι οι καλύτερα απορροφήσιμες πολυφαινόλες. Παράλληλα, αποδείχθηκε ότι η προσθήκη του γαλλικού οξέος πριν από την αλκοολική ζύμωση στο Cabernet Sauvignon, παράγει οίνους με

υψηλότερη συγκέντρωση ανθοκυανίνης και με πιο έντονο, σκούρο, κόκκινο χρώμα (Liu et al., 2016).

Οφέλη υγείας

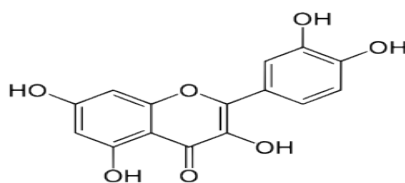
Η αντιϋπερλιπιδαιμική δράση του γαλλικού οξέος σε πειράματα με ποντίκια που ακολουθούσαν δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, είχε ως αποτέλεσμα ελάττωση της LDL και αύξηση της HDL. Επίσης, βρέθηκε ότι είχε και καρδιοπροστατευτική δράση (Zanwar, Badole, Shende, Hegde, Bodhankar, 2014). Επιπλέον, έχει μελετηθεί και η αντικαρκινική του δράση. Το γαλλικό οξύ έχει βρεθεί ότι επάγει *in vitro* απόπτωση καρκινικών κυττάρων και παρουσιάζει εκλεκτική τοξικότητα για καρκινικά κύτταρα χωρίς να βλάπτει τα υγιή κύτταρα. Έχει επίσης αναφερθεί ότι εμφανίζει αντι-μεταστατικές δράσεις σε διάφορες μορφές καρκίνου. Ειδικότερα, μπορεί να είναι ένας πιθανός προληπτικός και θεραπευτικός παράγοντας κατά της μετάστασης του γαστρικού καρκίνου (Nowak, Olech & Nowacka, 2014).

Παχυσαρκία: Το γαλλικό οξύ μελετήθηκε για τη δυνατότητά του να βελτιώνει τις επιπλοκές που σχετίζονται με την παχυσαρκία. Με τις περισσότερες έρευνες να αφορούν ζώα (συνήθως τρωκτικά) παρατηρήθηκε μια μείωση στο βάρος. Αυτό το φαινόμενο μπορεί είτε να οφείλεται στην αναστολή του σχηματισμού λιπιδίων στο ήπαρ ή στον λιπώδη ιστό, καθώς και άμεσα μειώνοντας τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL). Επιπλέον, φαίνεται ότι η αύξηση των επιπέδων της αδιπονεκτίνης (μια ορμόνη που εμπλέκεται στον καταβολισμό των λιπαρών οξέων) και η ρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται στην λιπογένεση μπορεί να είναι ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο το γαλλικό οξύ λειτουργεί κατά της παχυσαρκίας (Dludla et al., 2018).

Ωστόσο, πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι οι ενώσεις που παράγονται από το γαλλικό οξύ έχουν μεγαλύτερες θετικές επιδράσεις στην καταπολέμηση της παχυσαρκίας σε σύγκριση με το γαλλικό οξύ. Για παράδειγμα, το ταννικό οξύ εμφάνισε καλύτερη επίδραση στην εξασθένηση της διεγερόμενης από ινσουλίνη λιπογένεσης μέσω ενεργοποίησης της φωσφορυλίωσης κινάσης τυροσίνης που σχετίζεται με υποδοχέα ινσουλίνης σε αρουραίους Wistar (Ong, Khoo & Das, 1995).

2.1.2 Κερκετίνη

Η κερκετίνη (3,3',4',5,7-πενταϋδροξυφλαβόνη) ανήκει στις φλαβόνες και δεν μπορεί να παραχθεί στο ανθρώπινο σώμα. Έχει κίτρινο χρώμα και είναι ελάχιστα διαλυτή σε ζεστό νερό, αρκετά διαλυτή σε αλκοόλ και λιπίδια και είναι αδιάλυτη σε κρύο νερό.



Εικόνα 2. Χημική δομή Κερκετίνης

Βρίσκεται στα φρούτα (κυρίως εσπεριδοειδή), στα πράσινα φυλλώδη λαχανικά καθώς και στα καρύδια, λουλούδια, φλοιούς, μπρόκολο, ελαιόλαδο, μήλα, κρεμμύδια, πράσινο τσάι, κόκκινα σταφύλια, κόκκινο κρασί, σκούρα κεράσια και μούρα. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις φλαβονολών βρέθηκαν σε λαχανικά όπως κρεμμύδια και μπρόκολα, φρούτα όπως μήλα, κεράσια και μούρα, καθώς και ποτά όπως τσάι και κόκκινο κρασί (Anand, Arulmoli, & Parasuraman, 2016). Μπορεί να βρεθεί επίσης σε φαρμακευτικά βότανα, συμπεριλαμβανομένων των *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* και *Sambucus canadensis*. Τέλος, είναι παρούσα σε διάφορα είδη μελιού από διαφορετικές φυτικές πηγές (Li et al, 2016).

Οφέλη υγείας

Πολλές μελέτες απέδειξαν την αντιφλεγμονώδη δράση της και τη μείωση του κινδύνου θνησιμότητας που προκαλείται από υψηλές τιμές LDL (Li et al., 2016). Επιπλέον, βοηθάει στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων ενώ πολλές τυχαιοποιημένες, διπλά-τυφλές, ελεγχόμενες με εικονικό φάρμακο μελέτες σε ζώα καθώς και σε ανθρώπους σε διαφορετικά στάδια καρδιακών νόσων, έδειξαν ότι η θεραπεία με υψηλή δόση κερκετίνης και των παραγώγων της οδήγησε σε βελτίωση των καρδιακών λειτουργιών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη δυνατότητα της να χρησιμοποιείται και για τη θεραπεία καρδιακών παθήσεων, παρόλο που οι σχετικές λεπτομέρειες του μηχανισμού με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτό δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως (Patel et al., 2018). Είναι επίσης, γνωστό ότι παρουσιάζει σημαντικές αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες σε αρτηρίες, το οποίο συνδέεται με τη μείωση της αρτηριακής πίεσης και εμποδίζει την ανάπτυξη μυοκαρδιακής υπερτροφίας (Anand, Arulmoli, & Parasuraman, 2016). Όσο αφορά τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η νόσος του Alzheimer και το Parkinson, η κερκετίνη μαζί με το ασκορβικό οξύ αποδείχθηκε ότι μειώνει την εμφάνιση οξειδωτικής βλάβης σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα και αναστέλλει τη βλάβη στους νευρώνες. Είναι άλλωστε γνωστό ότι προστατεύει τα εγκεφαλικά κύτταρα από το οξειδωτικό στρες, το οποίο οδηγεί σε νευρολογικές καταστάσεις (Lakhanpal & Rai, 2007).

Παράλληλα, η κερκετίνη έχει ισχυρές αντι-καρκινογόνες ιδιότητες αφού καταφέρει να μειώνει την ανάπτυξη του όγκου του εγκεφάλου, του ήπατος, του παχέως εντέρου και άλλων ιστών και να αναστέλλει την εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων.

Σε άλλες μελέτες, η κερκετίνη παρουσίασε αντιβακτηριακές επιδράσεις έναντι σχεδόν όλων των στελεχών των βακτηρίων, ιδιαίτερα αυτών που προσβάλλουν το γαστρεντερικό, αναπνευστικό, ουροποιητικό σύστημα και το δέρμα. Τέλος, μπορεί και αποτρέπει τις αλλεργικές αντιδράσεις το οποίο έχει τεράστιες επιπτώσεις στη θεραπεία και την πρόληψη του άσθματος και της βρογχίτιδας (Anand, Arulmoli, & Parasuraman, 2016).

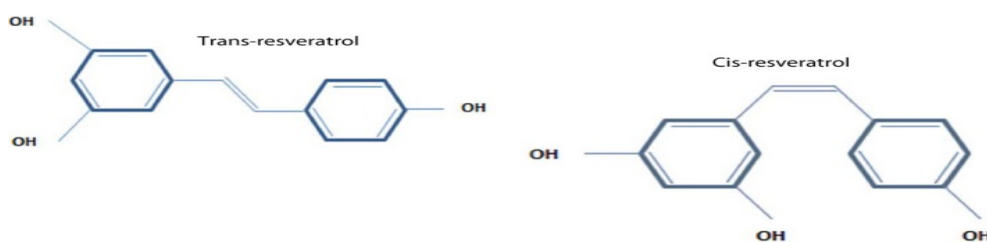
Ωστόσο, πρέπει να διευκρινιστεί ότι οι περισσότερες έρευνες που αναφέρθηκαν έχουν γίνει *in vivo* και σε ποντίκια και δεν υπάρχει ακόμα συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη για την εξασφάλιση των παραπάνω οφελών.

Παχυσαρκία: Η κερκετίνη προστατεύει από τη λιπώδη ηπατική νόσο που προκαλείται από τη διατροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, ρυθμίζοντας την ανισορροπία του εντερικού μικροβιόκοσμου και εξασθενίζοντας την φλεγμονή (Carrera-Quintanar et al., 2018). Μελέτες σε πειραματόζωα έδειξαν ότι η κερκετίνη μπορεί να προστατεύσει ποντίκια ή αρουραίους από την αύξηση του σωματικού βάρους και τη συσσώρευση λιπώδους ιστού που προκαλείται από διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (Zhao, Chen, Shen et al., 2017).

Οι μελέτες σε ανθρώπους είναι ιδιαίτερα περιορισμένες. Ωστόσο, σε μια τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη, 12 εβδομάδων, οι Lee et al. (2016) απέδειξαν ότι η κερκετίνη (100 mg / ημέρα / άτομο) μείωσε σημαντικά το συνολικό σωματικό λίπος, ιδιαίτερα το ποσοστό του λίπους στο βραχίονα, και μείωσε τον δείκτη σωματικής μάζας (BMI) υπέρβαρων ή παχύσαρκων ατόμων. Μια άλλη μελέτη αξιολόγησε τις επιδράσεις της κερκετίνης στην παχυσαρκία σε άτομα που ήταν υπέρβαρα και παχύσαρκα με διάφορους γονότυπους απολιποπρωτεΐνης E (APOE) στην οποία οι συγγραφείς ανέφεραν ότι η κερκετίνη (150 mg / ημέρα / άτομο) μείωσε την περιφέρεια της μέσης και τη συγκέντρωση της τριακυλογλυκερόλης (Pfeuffer et al., 2013).

2.1.3 Ρεσβερατρόλη

Η ρεσβερατρόλη (trans-3,5,4'-τριϋδροξυστιλβένιο) είναι ευρέως γνωστή φαινολική ένωση από την οικογένεια στιλβενίων, με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, η οποία απαντάται σε διάφορα φυτά.



Εικόνα 3. Χημική δομή Ρεσβερατρόλης

Κυρίως βρίσκεται στη φλούδα και τα κουκούτσια από σταφύλια, μήλα, βατόμουρα, δαμάσκηνα, φιστίκια και άλλους ελαιούχους σπόρους. Παράγεται από τα φυτά σαν “άμυνα” τους στο περιβαλλοντικό στρες όπως είναι η μηχανική βλάβη, η μικροβιακή μόλυνση, η ακτινοβολία UV, η θερμότητα και οι παθογόνες παθήσεις (Koushki, Amiri-Dashatan, Ahmadi, Abbaszadeh, Rezaei-Tavirani, 2018). Επίσης, βρίσκεται σε πολλά συμπληρώματα διατροφής και φαρμακευτικά καλλυντικά.

Οφέλη υγείας

Αρχικά, έχει βρεθεί ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου είτε αναστέλλοντας την ανάπτυξη μεμονωμένων μικροβιακών ειδών είτε προκαλώντας αλλαγές στους μικροβιακούς πληθυσμούς. Επίσης, μπορεί να επηρεάσει και το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου μέσω των επιδράσεων της στη λειτουργία και την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού (Bird, Raederstorff, Weber, Steinert, 2017). Όσο αφορά τον διαβήτη τύπου 1 μελέτες σε διαβητικά ζώα ήταν θετικές με την επίτευξη μείωσης της γλυκόζης του αίματος. Επίσης, σε ζωικά μοντέλα βρέθηκε βελτίωση της δράσης της ινσουλίνης, αν και ο μηχανισμός με τον οποίο επιτυγχάνεται είναι ακόμα υπό μελέτη (Koushki et al., 2018). Στους ανθρώπους, υπάρχουν αναφορές που έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη βελτιώνει την ομοιοστάση της γλυκόζης, μειώνει την αντίσταση στην ινσουλίνη και μειώνει τις μεταβολικές διαταραχές, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να συνεισφέρει στη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 (Szkudelski & Szkudelska, 2015).

Παράλληλα, λόγω των αντιοξειδωτικών, αντι-υπερτασικών και αγγειοδιασταλτικών της ιδιοτήτων χρησιμοποιείται και στην προστασία από καρδιαγγειακές παθήσεις. Πολύ υποσχόμενη είναι και η δράση της στην πρόληψη της νόσου του Alzheimer και του Parkinson. Επιπλέον, ως πολυφαινόλη έχει ευρεία προστατευτική δράση έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου. Πρόσφατα, έχουν διεξαχθεί ευρείες έρευνες *in vivo* και *in vitro* σε διάφορους τύπους καρκίνου. Συγκεκριμένα στην περίπτωση του καρκίνου του μαστού ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι η συμπληρωματική χορήγηση ρεσβερατρόλης απέτρεψε την πειραματική καρκινογένεση του μαστού, ενώ σε άλλες μελέτες διαπίστωσαν ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις ρεσβερατρόλης προάγουν τον καρκίνο του μαστού. Ωστόσο, επειδή έγιναν σε μικρό αριθμό εθελοντών τα συμπεράσματα είναι αμφιλεγόμενα (Weiskirchen & Weiskirchen, 2016).

Επιπροσθέτως, θετικά αποτελέσματα είχε η ρεσβερατρόλη στην όραση και πιο ειδικά στο φακό και επιθήλιο κερατοειδούς, από διαβητικές επιπλοκές και άλλα είδη βλάβης (γλαύκωμα, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, καταρράκτης) (Koushki et al., 2018).

Όσον αφορά τις ωοθήκες, η ρεσβερατρόλη αποδείχθηκε ότι συμβάλλει στη θεραπεία για τις καταστάσεις που σχετίζονται με την περίσσεια ανδρογόνων, προστατεύοντας κατά συνέπεια την

εξαρτώμενη από την ηλικία μείωση της γονιμότητας, αυξάνοντας το ωοθυλάκιο των ωοθηκών, τη διάρκεια ζωής των ωοθηκών και εμποδίζοντας την απόπτωση των ωοκυττάρων. Άλλες αναφορές έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη αποκαθιστά τη στυτική λειτουργία σε πειραματικά μοντέλα αρουραίων με διαβήτη (Weiskirchen & Weiskirchen, 2016).

Έπειτα, η ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη συσσώματωση των αιμοπεταλίων και την απόπτωση, πιθανότατα με την αύξηση της υδρόλυσης ATP, ADP και AMP. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι αυτή η δράση της είναι χρήσιμη στην πρόληψη της ανεπιθύμητης ενεργοποίησης των ανθρώπινων αιμοπεταλίων κατά την αποθήκευση αίματος για σκοπούς μετάγγισης.

Στους πνεύμονες, η ρεσβερατρόλη έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική στην πρόληψη της δυσλειτουργίας, της ινογένεσεως, της ανάπτυξης του καρκίνου και της προκαλούμενης από τραυματισμό απόπτωσης κυττάρων. Αρκετές επίσης, ανεξάρτητες αναφορές έχουν βρει ευνοϊκές επιδράσεις της ρεσβερατρόλης στη μυϊκή λειτουργία και τον τραυματισμό σε ζωικά μοντέλα (ποντίκια και χοίροι) (Weiskirchen, Weiskirchen, 2016).

Συμπληρωματικά, οι αντιμικροβιακές και αντι-ιικές επιδράσεις της ρεσβερατρόλης έχουν διερευνηθεί σε αρκετούς ανθρώπινους και ζωικούς ιούς, συμπεριλαμβανομένου του ιού της γρίπης A (Palamara et al., 2005), του ιού Epstein-Bar (Chen et al., 2012), του ιού του έρπητα (Chen et al., 2012), του HIV (Clouser et al., 2012) και του ιού της ηπατίτιδας C (Nakamura et al., 2010). Τα αποτελέσματα από τις περισσότερες από αυτές τις μελέτες δείχνουν ότι μπορεί να αποτρέψει την αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης και έτσι να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό του ιού (Yang et al., 2015). Συνοπτικά, παρά την αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, άλλοι κύριοι μηχανισμοί της έναντι ιικών λοιμώξεων περιλαμβάνουν τα ακόλουθα: (α) αναστολή της οδού σηματοδότησης και (β) αναστολή της γονιδιακής έκφρασης (Koushki et al., 2018).

Τέλος, μελέτες σε αρχικό στάδιο συσχετίζουν τη ρεσβερατρόλη με την αντιγήρανση. Έχει βρεθεί ότι αυξάνει τη δραστικότητα του αντιγηραντικού γονιδίου SIRT1, αναστέλλει τη γήρανση και την απόπτωση, και ενισχύει την αποκατάσταση της οξειδωτικής βλάβης (Li J et al., 2017). Ενώ αρκετές μελέτες σε ζώα έχουν αυξήσει την πιθανότητα ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να είναι χρήσιμη για την προστασία και τον περιορισμό της εγκεφαλικής βλάβης μετά από ισχαιμικό επεισόδιο. Τα ευεργετικά αποτελέσματά στην εστιακή εγκεφαλική ισχαιμία μπορεί να σχετίζονται με τη δράση της κατά της συσσώρευσης αιμοπεταλίων, την αγγειοδιασταλτική δράση, τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες ή με όλους τους μηχανισμούς μαζί (Zhuang, Kim, Koehler, Dore, 2003).

Παχυσαρκία: Έχει βρεθεί η αναστολή της de novo λιπογένεσης με την εμπλοκή της σε ρύθμιση του C / EBPα και του PPARγ. Αυτοί αποτελούν διάφορες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων, με διαφορετικές λειτουργίες και είναι σημαντικοί ρυθμιστές της διαδικασίας της

λιπογένεσης. Επίσης, *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η ρεσβερατρόλη μπορεί να αυξήσει την απόπτωση στα ώριμα λιποκύτταρα. Επιπλέον, διάφορες μεταβολικές οδοί που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της τριακυλογλυκερόλης σε λευκό λιπώδη ιστό έχουν αποδειχθεί ότι είναι στόχοι για τη ρεσβερατρόλη (Aguirre, Fernández-Quintela, Arias, Portillo, 2014). Όσον αφορά τη λιπόλυση, αν και η ρεσβερατρόλη φαίνεται να είναι ανίκανη να προκαλέσει λιπόλυση, ωστόσο αυξάνει την κινητοποίηση των λιπιδίων που διεγείρεται από τους β-αδρενεργικούς παράγοντες. Η αύξηση της θερμογένεσης του φαιού λιπώδους ιστού και συνεπώς η σχετική κατανάλωση ενέργειας μπορεί να συμβάλει στην εξήγηση της επίδρασης της ρεσβερατρόλης στη μείωση του σωματικού λίπους. Εκτός από τις επιδράσεις της στον λιπώδη ιστό, μπορεί επίσης να δρα σε άλλα όργανα και ιστούς. Αυξάνει και την οξείδωση λιπαρών οξέων στους σκελετικούς μύες και στο συκώτι.

Σε μια τυχαιοποιημένη, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο, διπλά τυφλή διασταυρούμενη μελέτη, οι Timmers et al ανέφεραν ευεργετικά αποτελέσματα της λήψης ρεσβερατρόλης για 30 ημέρες στα μεταβολικά προφίλ σε υγιείς παχύσαρκους άνδρες, γεγονός που φαίνεται να προσομοιάζει τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν κατά τη διάρκεια του περιορισμού των θερμίδων (Timmers et al., 2011).

Τέλος, στην αγορά υπάρχουν πολλά συμπληρώματα διατροφής με τη ρεσβερατρόλη να κυριαρχεί ανάμεσα στις υπόλοιπες φαινολικές ενώσεις. Χρησιμοποιείται κυρίως για την αντιοξειδωτική και την προστατευτική της δράση στο καρδιαγγειακό σύστημα. Μεγάλη βαρύτητα όμως, έχει δοθεί το τελευταίο χρονικό διάστημα και στη δυνατότητά της για έλεγχο του βάρους και της όρεξης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

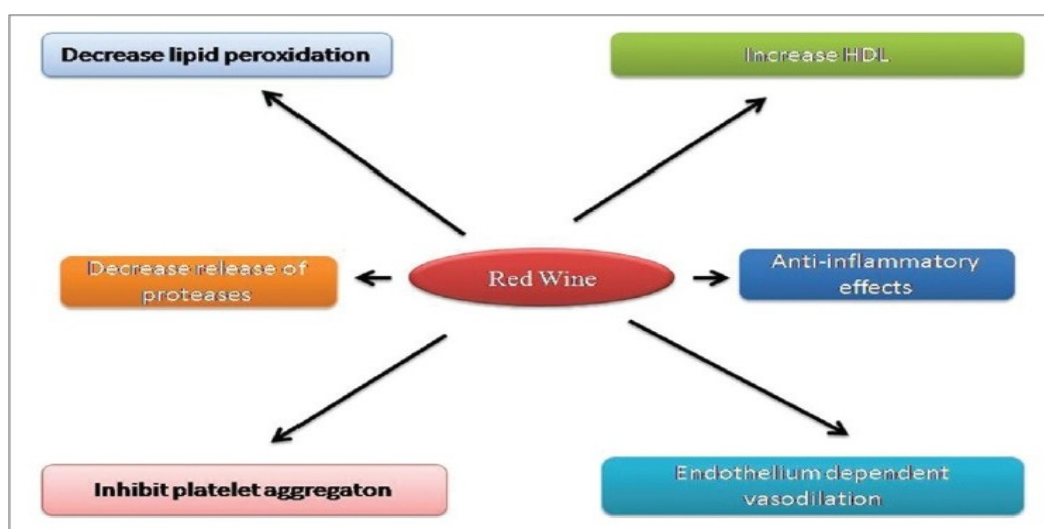
Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΡΙΑΣ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΚΡΑΣΙΟΥ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Παραδόξως, η γαλλική διατροφή, η οποία είναι γνωστή κυρίως για τα τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά τα οποία συνδέονται με χρόνιες παθήσεις, συμπεριλαμβανομένης της NAFLD και της στεφανιαίας νόσου, παρουσιάζει εντυπωσιακά σχετικά χαμηλό επιπολασμό στο γαλλικό πληθυσμό. Αυτό οφείλεται στη σχετικά υψηλή κατανάλωση κόκκινου κρασιού που είναι το βασικό ποτό των Γάλλων (Davies et al., 2017). Η εισαγωγή του όρου "γαλλικό παράδοξο" οδήγησε σε εκτεταμένη και σε βάθος έρευνα για τα οφέλη για την υγεία από τη μέτρια κατανάλωση κρασιού (Fragopoulou & Antonopoulou, 2020). Η ανωτερότητα του οίνου θεωρείται ότι αποδίδεται στα μικρο-συστατικά του και συνεπώς

καταβλήθηκε προσπάθεια για την απομόνωση και αναγνώριση αυτών των βιο-δραστικών ενώσεων καθώς και για την αποσαφήνιση των μηχανισμών της δράσης τους.

Ειδικότερα, ο ερυθρός οίνος είναι διαφορετικός από άλλα αλκοολούχα ποτά λόγω της περιεκτικότητάς του σε διάφορες φαινολικές ενώσεις. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι τα μόρια που είναι υπεύθυνα για αυτές τις επιδράσεις δεν είναι πιθανώς τα ίδια αλλά μάλλον οι μεταβολίτες τους που συμβαίνουν μετά την απορρόφηση ή μετά τη δράση των μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου. Ορισμένες επιδημιολογικές μελέτες μάλιστα έχουν επικεντρωθεί στα μη αλκοολούχα αυτά συστατικά του κρασιού, τα οποία δρουν ως "προστατευτικός παράγοντας" όσον αφορά την ανθρώπινη υγεία, και πολλά από αυτά έχουν συνδεθεί με τη μείωση του ποσοστού θνησιμότητας από στεφανιαία καρδιακή νόσο όσο αφορά τη μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, ιδιαίτερα ερυθρούς οίνους, σε μέτρια επίπεδα από 150 έως 300 ml / ημέρα (López-Vélez, Martínez-Martínez & Del Valle, 2003).

Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους το κόκκινο κρασί ασκεί τις ευεργετικές αυτές επιδράσεις, όπως η ικανότητα αύξησης των της HDL, η αντιοξειδωτική δράση, η βελτίωση της εξαρτώμενης από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολής και η αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων (Ruf, 2004) και της προσκόλλησης των λευκοκυττάρων. Οι καταναλωτές μάλιστα κόκκινου κρασιού έχει βρεθεί ότι έχουν υψηλότερα επίπεδα HDL από αυτούς που απέχουν από την κατανάλωσή του (Da Luz & Coimbra, 2004). Οι Rimm, Williams, Fosher, Criqui, Stampfer, 1999 έχουν βρεί ότι για κάθε γραμμάριο αλκοόλ που καταναλώνεται ανά ημέρα, το επίπεδο HDL αυξάνεται κατά 0,004 mmol/L. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζονται και σε επίπεδο κλινικών μελετών όπου η κατανάλωση κρασιού δείχνει να τροποποιεί πολλούς βιοδείκτες των καρδιαγγειακών νοσημάτων (Fragopoulou, Choleva, Antonopoulou & Demopoulos, 2018).



Εικόνα 4. Καρδιοπροστατευτική δράση κόκκινου κρασιού (Saleem & Basha, 2010)

3.1 Η επίδραση των φαινολικών ενώσεων του κρασιού, στην υγεία και την πρόληψη ασθενειών

Η βιολογική δραστηριότητα των πολυφαινολών εξαρτάται από τη βιοδιαθεσιμότητά τους και το ρυθμό απορρόφησης τους στο κυκλοφορικό σύστημα, που μπορεί να εξαρτάται από τον τύπο του τροφίμου στο οποίο περιέχονται. Μόνο ένα μικρό μέρος των προσλαμβανόμενων πολυφαινολών (5-10%) απορροφάται στο λεπτό. Η πλειονότητα τους (90-95%) φθάνει στο παχύ έντερο άθικτη, όπου αποικοδομούνται από τους μικροοργανισμούς του εντέρου σε απλούστερα φαινολικά οξέα. Επίσης, φαίνεται ότι δεν είναι η δράση μιας φαινόλης του κρασιού που εξασφαλίζει τις ευεργετικές συνέπειες στην υγεία, αλλά ο συνδυασμός πολλών.

Σε πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση βρέθηκε ότι η κατανάλωση πολυφαινολών τροποποιεί τον εντερικό μικροβιόκοσμο, τόσο σε ποσότητα όσο και σε ποιότητα βακτηρίων (Nash et al., 2018). Αυτό έχει πολλαπλά οφέλη για την υγεία του ανθρώπου. Σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι οι πολυφαινόλες βοηθούν στην πρόληψη κατά ασθενειών που οφείλονται σε βακτήρια στη στοματική κοιλότητα και γενικά στην εξασφάλιση της στοματικής υγείας (Fernández, Zorraquín-Peña, González de Llano, Bartolomé, Moreno-Arribas, 2017).

Ορισμένες επιδημιολογικές μελέτες έχουν διαπιστώσει ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ συνδέεται με χαμηλότερο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου (CVD) και μειωμένο κίνδυνο θνησιμότητας όλων των αιτιών μεταξύ των μεσήλικων και των ηλικιωμένων (Fernández, Zorraquín-Peña, González de Llano, Bartolomé, Moreno-Arribas, 2017).

Παράλληλα, τα ευρήματα πολλών μελετών παρείχαν ενδείξεις για έναν προστατευτικό ρόλο των φλαβονοειδών σε διαφορετικούς καρκίνους του γαστρεντερικού σωλήνα. *In vitro* και κλινικές μελέτες, έχουν δείξει ότι το κόκκινο κρασί αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων από διαφορετικούς τύπους καρκίνου του ανθρώπου. Εξίσου θετικές ήταν και οι έρευνες σχετικές με την παχυσαρκία. Ο ρόλος των φλαβονοειδών στην παχυσαρκία βασίζεται σε μηχανισμούς που μειώνουν την πρόσληψη / απορρόφηση τροφίμων, προάγουν την ενεργειακή δαπάνη ή αποτρέπουν την αποθήκευση ενέργειας. Από όλους τους προτεινόμενους μηχανισμούς, μία από τις πιο ελπιδοφόρες προσεγγίσεις στη διαχείριση βάρους, είναι η μείωση της απορρόφησης λίπους (Fernandes I. et al., 2017).

Επιπλέον, η επίδραση της μέτριας πρόσληψης αλκοόλ στις νευρολογικές παθήσεις είναι ασαφής. Ενώ ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν κάποιες συσχετίσεις μεταξύ μέτριας κατανάλωσης κρασιού (3-4 ποτήρια ημερησίως) και μειωμένης συχνότητας εμφάνισης της άνοιας και νόσου Alzheimer σε σύγκριση με αυτούς που απέχουν από το αλκοόλ, μερικοί άλλοι υποστηρίζουν το αντίθετο. Οι αναφορές έδειξαν επίσης ότι αυτοί που κατανάλωναν τακτικά μεγάλες ποσότητες

αλκοόλ, εμφάνισαν φτωχότερα αποτελέσματα στη μνήμη ή στις λειτουργίες πληροφοριών σε σύγκριση με τους μέτριους καταναλωτές ή αυτούς που απείχαν τελείως από το αλκοόλ, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι επιδράσεις της παρατεταμένης και υπερβολικής κατανάλωσης αλκοόλ δεν μπορούν να εξουδετερωθούν από πιθανές θετικές επιδράσεις των φλαβονοειδών του οίνου. Αξίζει λοιπόν, να τονιστεί ότι η κατανάλωση οίνου μπορεί να έχει ευεργετικές ή επιβλαβείς συνέπειες, ανάλογα με την ποσότητα που καταναλώνεται και το προφίλ του καταναλωτή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος φιλοξενεί έναν ποικίλο και σημαντικό πληθυσμό μικροβίων. Περίπου 10^{14} κύτταρα βακτηρίων υπάρχουν σε όλη τη γαστρεντερική οδό, με την πλειοψηφία αυτών, 10^{12} να κατοικούν στο παχύ έντερο. Η σύνθεση του είναι ποικίλη και μοναδική σε κάθε άτομο, και αρχίζει με τη γέννηση του και επηρεάζεται από μια σειρά παραγόντων. Επηρεάζεται κυρίως από τη διατροφή, το φύλο, την ηλικία ενώ η ενδεχόμενη διαταραχή της ομοιόστασης του έχει συνδεθεί με πολλές ασθένειες.

4.1 Βασικές λειτουργίες

Μερικοί από τους σημαντικούς ρόλους των μικροοργανισμών που αποτελούν τον εντερικό μικροβιόκοσμο είναι:

α) η συμμετοχή στο μεταβολισμό. Οι άπεπτοι υδατάνθρακες αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για τους μικροοργανισμούς αυτούς. Μέσω της ζύμωσης παράγονται ευεργετικοί μεταβολίτες για την υγεία, ενώ σε περίπτωση έλλειψής τους στρέφονται σε εναλλακτικές πηγές ενέργειας με αποτέλεσμα την παραγωγή άλλων μεταβολιτών που μπορεί να είναι επιζήμιοι για την ανθρώπινη υγεία (Rowland et al., 2018). Οι ωφέλιμοι μεταβολίτες είναι τα βραχέας αλύσου λιπαρά οξέα (Short – Chain Fatty Acids, SCFAs) και κυρίως το προπιονικό, βουτυρικό και οξικό, που τυπικά βρίσκονται σε αναλογία 1: 1: 3. Αυτά είτε απορροφούνται ταχέως από τα επιθηλιακά κύτταρα (βουτυρικό) και εμπλέκονται στη ρύθμιση κυτταρικών διεργασιών όπως η γονιδιακή έκφραση, η χημειοταξία, η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και η απόπτωση, είτε μεταφέρονται (προπιονικό, οξικό) στο ήπαρ και σε άλλους ιστούς όπου συμμετέχουν σε πλήθος μεταβολικές διεργασίες του ξενιστή (Thursby & Juge, 2017).

β) η *de novo* σύνθεση βασικών βιταμινών που ο ξενιστής είναι ανίκανος να παράγει. Βακτήρια του εντέρου συνθέτουν βιταμίνη Κ, φυλλικό οξύ και παράλληλα με τα βακτήρια της στοματικής κοιλότητας, νικοτινικό οξύ, βιοτίνη, βιταμίνες του συμπλέγματος Β (Β1, Β6, Β12).

γ) συμμετοχή στην άμυνα του οργανισμού. Πιο συγκεκριμένα, ο εντερικός μικροβιόκοσμος εμποδίζει τον αποικισμό παθογόνων μικροοργανισμών με το να ανταγωνίζονται με αυτούς για

τις θέσεις πρόσδεσης ή τις πηγές θρεπτικών ουσιών, αλλά και με την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών (δημιουργία δυσμενούς περιβάλλοντος). Ουσιαστικά δημιουργείται ένας φραγμός ο οποίος μπορεί να είναι:

- i) δραστικός φραγμός όπου παρατηρείται γρήγορη αποβολή του παθογόνου
- ii) ατελής φραγμός που επιτρέπει την παραμονή του παθογόνου αλλά σε μικρά ποσοστά χωρίς να δημιουργεί προβλήματα στον ξενιστή (Μπεζιρτζόγλου, 2004).

4.2 Οι αλλαγές στη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου κατά τη διάρκεια της ζωής

Αρχικά υπήρχε η άποψη ότι το περιβάλλον στο οποίο αναπτυσσόταν το έμβρυο ήταν στείρο. Πρόσφατες μελέτες όμως, ανακάλυψαν την ύπαρξη χαμηλών επιπέδων βακτηριακών στελεχών στον ομφάλιο λώρο, στον πλακούντα, στο αμνιακό υγρό και στο μηκόνιο (Rodríguez et al., 2015). Στο τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης μάλιστα ο εντερικός μικροβιόκοσμος της μητέρας υφίσταται μια τροποποίηση την οποία τα νεογνά δεν τείνουν να ακολουθήσουν. Αντίθετα, το νεογνικό μικροβιακό έντερο μοιάζει περισσότερο με αυτό της μητέρας του στο πρώτο τρίμηνο. Αυτό αποδεικνύει την παρουσία ενός επιλεκτικού περιβάλλοντος στο νεογνικό έντερο, επιτρέποντας τον αποικισμό από ορισμένους μικροοργανισμούς ενώ αναστέλλει άλλους (Barko, McMichael, Swanson, Williams, 2018). Ωστόσο, τα ευρήματα αυτά απαιτούν περαιτέρω έρευνα. Διαφοροποιήσεις παρατηρούνται και στο τρίμηνο στο οποίο πραγματοποιείται ο τοκετός. Σε πρόωρα νεογνά, η μικροβιακή ισορροπία χαρακτηρίζεται από μειωμένη ποικιλομορφία και υψηλότερα επίπεδα δυνητικά παθογόνων βακτηρίων και χαμηλότερους αριθμούς *Bifidobacterium* και *Bacteroides* σε σύγκριση με τελειόμηνα νεογνά.

Στη συνέχεια, σημαντικό ρόλο παίζει ο τρόπος με τον οποίο θα πραγματοποιηθεί ο τοκετός. Στο φυσιολογικό τοκετό, το νεογνό έρχεται σε επαφή με τα μικρόβια της μητέρας -δέρμα, κόλπος, απευθυσμένο κυρίως τα *Lactobacillus* spp. και τα *Bifidobacterium* spp. (Barko et al, 2018). Με αυτόν τον τρόπο προστατεύονται από εξωτερικές μολυσματικές επιθέσεις σε μια περίοδο που το έχουν περισσότερο ανάγκη, καθώς δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως το ανοσοποιητικό τους σύστημα. Στην περίπτωση της καισαρικής ο εντερικός μικροβιόκοσμος του νεογνού καθορίζεται από τη νοσοκομειακή χλωρίδα, δηλαδή το προσωπικό και το περιβάλλον του νοσοκομείου (Μπεζιρτζόγλου, 2004) με το *Staphylococcus* ως το κυρίαρχο γένος.

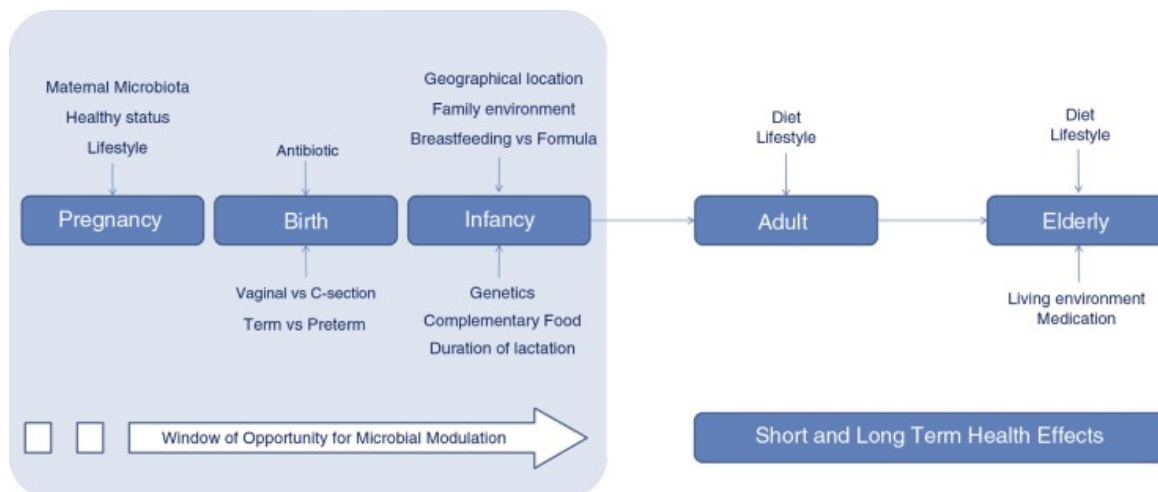
Μετά τον τοκετό σημαντικό ρόλο παίζει η διατροφή του νεογνού. Διαφορές παρατηρούνται στη περίπτωση χορήγησης αποκλειστικά μητρικού γάλακτος και στην περίπτωση που δίνεται αποκλειστικά φόρμουλα. Το μητρικό γάλα της μητέρας περιλαμβάνει κυρίως στρεπτόκοκκους και σταφυλόκοκκους, ακολουθούμενο από άλλα βακτήρια τα οποία συγκαταλέγονται στους

πρώτους αποίκους του εντέρου του νεογνού. Ειδικότερα, έχει βρεθεί ότι περιέχει περισσότερα από 700 είδη βακτηρίων καθώς επίσης μια πληθώρα πολύπλοκων ολιγοσακχαριτών (human galact-oligosacharides) με πρεβιοτική δραστικότητα, διεγείροντας την ανάπτυξη συγκεκριμένων βακτηριακών ομάδων όπως οι σταφυλόκοκκοι και τα *bifidobacteria*. Η ποικιλομορφία μικροβίων στο έντερο αυξάνεται μετά τον απογαλακτισμό και την εισαγωγή στερεών τροφών, με αυξημένο αποικισμό κυρίως των *Bacteroides* και ορισμένων ειδών *Clostridium*. Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι τα στοματικά βακτήρια μπορούν να αποικίσουν το έντερο των βρεφών και, για παράδειγμα, το *Bifidobacterium dentium* από το στόμα έχει βρεθεί ότι είναι τόσο άφθονο και διαδεδομένο και στο εντερικό μικροβιόκοσμο των βρεφών (Rodríguez et al., 2015). Με την πάροδο του χρόνου η ποικιλομορφία των μικροοργανισμών αυξάνεται μέχρι να γίνει σταθεροποίηση με κυρίαρχα τα εξής φύλα: Firmicutes (*Lachnospiraceae* και *Ruminococcaceae*), Bacteroidetes (*Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* και *Rikenellaceae*) και Actinobacteria (*Bifidobacteriaceae* και *Coriobacteriaceae*). Στην ηλικία των τριών ετών ο εντερικός τους μικροβιόκοσμος μοιάζει με αυτόν των ενήλικων ατόμων (Rinninella et al., 2019). Έπειτα, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της γεωγραφικής περιοχής, του οικογενειακού μεγέθους και της έκθεσης σε κατοικίδια ζώα, πιστεύεται ότι διαμορφώνουν το μικροβιακό έντερο της πρώιμης ζωής. Έτσι, όσα παιδιά έχουν αδέρφια έχουν υψηλότερη αναλογία *Bifidobacterium* spp. Η γεωγραφική θέση έχει επίσης αντίκτυπο στον μικροβιόκοσμο, καθώς οι διαφορές σε μικροοργανισμούς σχετίζονται με τα διατροφικά πρότυπα και τον τρόπο ζωής σε μια συγκεκριμένη περιοχή. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι στην Ευρώπη βρέφη από τις βόρειες περιοχές έχουν υψηλότερα επίπεδα στελεχών από το *Bifidobacterium* spp. και μερικά *Clostridium* spp. και *Atopobium* spp., ενώ τα βρέφη από νότιες χώρες, είχαν υψηλότερη αφθονία στελεχών από τα γένη από *Eubacterium*, *Lactobacillus* και *Bacteroides*.

Για τα βρέφη που ζουν με κατοικίδια ζώα με τρίχωμα (όπως σκυλιά), μπορεί να έχουν μεγαλύτερη ποικιλία μικροοργανισμών. Επιπλέον, τα βρέφη με αλλεργίες έχει αποδειχθεί ότι έχουν σχετικά υψηλότερη αφθονία *Enterobacteriaceae* αλλά χαμηλά επίπεδα των ωφέλιμων γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*.

Κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής, η διατροφή και η λήψη αντιβιοτικών είναι καθοριστική για τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Αρχικά, και σε αυτό το στάδιο το είδος της τροφής είναι καθοριστικής σημασίας καθώς αποτελεί το υπόστρωμα για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Παράλληλα, η εκτεταμένη χρήση των αντιβιοτικών, μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη διατάραξη της ομοιόστασης και να επιτρέψει σε παθογόνους μικροοργανισμούς να αναπτυχθούν και να προκαλέσουν προβλήματα υγείας. Μια ακόμη εκδοχή είναι η δημιουργία ανθεκτικών στελεχών, καθιστώντας πιο δύσκολη μια μελλοντική αντιμετώπισή τους (Rinninella et al., 2019).

Η σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου στους ηλικιωμένους ανθρώπους (>65 ετών) είναι εξαιρετικά ποικίλη μεταξύ των ατόμων και διαφέρει από εκείνη των νεότερων. Αυτό οφείλεται σε αλλαγές στις διατροφικές συνήθειες και τελικά στη διατροφή, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης της οδοντοστοιχίας και της λειτουργίας των σιελογόνων, μείωση της πέψης και της απορρόφησης, αλλαγές στην όρεξη ως αποτέλεσμα συνταγογραφούμενων φαρμάκων και ψυχολογικής κατάστασης ή αλλαγές στις συνθήκες διαβίωσης, όπως φροντίδα στο σπίτι ή νοσηλεία σε νοσοκομείο. Ειδικά οι διατροφικές συνήθειες (πιο μονότονες) μπορεί επίσης να περιορίσουν την μικροβιακή ποικιλομορφία (Mills, Stanton, Lane, Smith, Ross, 2019).



Σχήμα 2. Οι παράγοντες που επιδρούν στη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου στα διάφορα στάδια της ζωής (Rodríguez et al., 2015).

4.3 Διατροφή

Οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες και το λίπος είναι μακροθρεπτικά συστατικά που απαιτούνται σε μεγάλες ποσότητες για τη διατήρηση των σωματικών λειτουργιών και για την παροχή ενέργειας για το σώμα. Καθένα από αυτά τα συστατικά περιέχει διαφορετικούς τύπους και μελέτες έχουν δείξει ότι αυτές οι διαφορές μαζί με την ποσότητα που καταναλώνεται μπορεί να επηρεάσει δραματικά τη σύνθεση και τη λειτουργικότητα των μικροβίων του εντέρου.

Πρωτεΐνες

Έχει εκτιμηθεί ότι έως 25 g πρωτεΐνης, πεπτιδίων και ελεύθερων αμινοξέων εισέρχονται στο παχύ έντερο σε καθημερινή βάση και ότι η πηγή ή ο τύπος πρωτεΐνης επηρεάζει τη σύνθεση μικροβίων του εντέρου, δεδομένου ότι η σύνθεση αμινοξέων διαφέρει μεταξύ των τύπων (Mills, Stanton, Lane, Smith, Ross, 2019). Επίσης, βρέθηκε ότι ενώ η διατροφή με υψηλό ποσοστό

πρωτεϊνών και χαμηλό υδατανθράκων μπορεί να προάγει μεγαλύτερη σχετική απώλεια βάρους, αυτός ο τύπος διατροφής μπορεί όμως να βλάψει την υγεία. Μία μελέτη διαπίστωσε ότι τα άτομα που εφάρμοσαν διατροφή πλούσια σε πρωτεΐνες, μείωσαν τα ποσοστά των στελεχών του γένους *Roseburia* και του *Eubacterium rectale* καθώς και άλλα βουτυρο-παράγωγα βακτήρια στον εντερικό μικροβιόκοσμο τους (Singh et al., 2017).

Λίπη

Η τυπική δυτική διατροφή είναι υψηλή σε κορεσμένα και trans-λιπαρά ενώ είναι χαμηλή σε μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λίπη και επομένως συνδέεται με πολλά προβλήματα υγείας για τους καταναλωτές. Αρκετές μελέτες που έγιναν σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι μια δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά αυξάνει τα ολικά αναερόβια βακτήρια και το γένος *Bacteroides* στον εντερικό τους μικροβιόκοσμο. Ειδικότερα, οι Fava et al. (2013) βρήκαν ότι η κατανάλωση δίαιτας χαμηλών λιπαρών οδήγησε σε αυξημένη αφθονία του γένους *Bifidobacterium* με ταυτόχρονη μείωση της γλυκόζης νηστείας και της ολικής χοληστερόλης. Από την άλλη πλευρά, μια δίαιτα υψηλή σε κορεσμένα λιπαρά αύξησε τη σχετική αναλογία του *Faecalibacterium prausnitzii*. Τέλος, τα άτομα με υψηλή πρόσληψη μονοακόρεστου λίπους δεν παρουσίασαν μεταβολές στη σχετική αφθονία οποιονδήποτε βακτηριακών γενών, αλλά είχαν συνολικά μειωμένη ολική και LDL χοληστερόλη στο πλάσμα και μειωμένο βακτηριακό φορτίο (Fava et al., 2013).

Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες που μπορούν να υποστούν πέψη στον ανθρώπινο οργανισμό σε αυξημένα ποσοστά κατανάλωσης, οδηγούν σε αυξημένη αφθονία των *Bifidobacteria*, αλλά με μειωμένη των *Bacteroides*. Αντίθετα, οι μη αφομοιώσιμοι υδατάνθρακες φτάνουν στο παχύ έντερο όπου υφίστανται ζύμωση από τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται εκεί. Συνεπώς, αποτελούν μια καλή πηγή ενέργειας για τους μικροοργανισμούς.

Όσο αφορά τις τεχνητές γλυκαντικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα της λευκής ζάχαρης, αν και έχουν χαρακτηριστεί ως ασφαλή για την υγεία του ανθρώπου, μελέτες σε ποντίκια έδειξαν αρνητικές επιπτώσεις στον εντερικό μικροβιόκοσμο τους. Η σουκραλόζη, η ασπαρτάμη και η σακχαρίνη έχουν αποδειχθεί ότι διαταράσσουν την ισορροπία και την ποικιλία των μικροβίων του εντέρου. Οι αρουραίοι που έλαβαν σουκραλόζη για 12 εβδομάδες είχαν σημαντικά υψηλότερες αναλογίες *Bacteroides*, *Clostridia* και ολικά αερόβια βακτήρια από εκείνους που δεν χορηγήθηκε σουκραλόζη (Valdes, Walter, Segal, Spector, 2018).

Διατροφικά πρότυπα

Η παραδοσιακή Μεσογειακή διατροφή χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση ελαιολάδου, λαχανικών, οσπρίων, φρούτων και ανεπεξέργαστων δημητριακών σε καθημερινή βάση, μέτρια ως υψηλή κατανάλωση ψαριών, χαμηλή κατανάλωση κρέατος και προϊόντων κρέατος, και χαμηλή ως μέτρια κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων (μερικές μέρες μέσα στην εβδομάδα). Χαρακτηριστικό της είναι επίσης, η μέτρια κατανάλωση κρασιού, κυρίως κατά τη διάρκεια των γευμάτων. Επιδημιολογικές μελέτες και τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές έχουν δείξει ότι η κατανάλωση μεσογειακής διαίτας παρέχει προστατευτικά αποτελέσματα έναντι διαφόρων ασθενειών, όπως παχυσαρκία, διαβήτης, υπέρταση, καρδιαγγειακές παθήσεις, ισχαιμικά επεισόδια, πολλοί καρκίνοι, αλλεργικές ασθένειες, καθώς και η νόσος του Πάρκινσον και του Αλτσχάιμερ (Tosti, Bertozzi, Fontana, 2018). Τα οφέλη αυτά της υγείας επιτυγχάνονται ανάμεσα σε άλλα και στην τροποποίηση της σύνθεσης και της λειτουργικότητας των μικροβίων του εντέρου. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος σε αυτήν την περίπτωση παρουσιάζει διαφοροποιήσεις απ' αυτόν που δημιουργείται μέσω της δυτικής διαίτας, ενώ παράλληλα μειώνεται και ο κίνδυνος εμφάνισης ασθενειών. Για παράδειγμα, μια έρευνα έδειξε ότι η κατανάλωση μεσογειακής διατροφής για ένα χρόνο από παχύσαρκους άνδρες ($n = 20$) μείωσε σημαντικά το γένος *Prevotella* και αύξησε τη *Roseburia* και την *Oscillospira* (Haro et al, 2016). Ένας άλλος «μοντέρνος» τύπος διατροφής που διαμορφώνει το μικροβιόκοσμο είναι η διατροφή χωρίς γλουτένη. Ενώ μια δίαιτα χωρίς γλουτένη είναι μια αποτελεσματική θεραπεία για τη θεραπεία ασθενών που έχουν διαγνωστεί με κοιλιοκάκη, συχνά σχετίζεται με διάφορα προβλήματα υγείας και διατροφικές ανεπάρκειες σε υγιείς ανθρώπους. Οι De Palma et al. έδειξε ότι μια δίαιτα 30 ημερών χωρίς γλουτένη μείωσε τους πληθυσμούς *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* ενώ αύξησε τα *E. coli* και το *Enterobacteriaceae* που θα μπορούσαν να αυξήσουν περαιτέρω τον κίνδυνο μόλυνσης από ευκαιριακά βακτήρια (De Palma, Nadal, Collado, Sanz, 2009). Άλλοι, όπως οι Bonder et al. βρήκαν μειώσεις στα *R. bromii* και *Roseburia faecis* σε συνδυασμό με αυξημένα *Victivallaceae* και *Clostridiaceae* σε άτομα που κατανάλωναν δίαιτα χωρίς γλουτένη (Bonder et al, 2016).

Πολυφαινόλες

Τα τρόφιμα με πλούσια περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες περιλαμβάνουν φρούτα, σπόρους, λαχανικά, τσάι, προϊόντα κακάου και κρασί. Η κατανάλωση τους οδηγεί σε αύξηση της αφθονίας στα *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*. Ειδικότερα, η αφθονία του *Bacteroides* αναφέρθηκε ότι αυξάνει σε άτομα που καταναλώνουν πολυφαινόλες κόκκινου κρασιού. Όσον αφορά τα περαιτέρω οφέλη για την υγεία, η κατανάλωση πολυφαινολών προερχόμενων από κακάο έχει συσχετιστεί με σημαντικές αυξήσεις της HDL στο πλάσμα και σημαντικές μειώσεις

στις συγκεντρώσεις τριακυλογλυκερόλης και C-αντιδρώσας πρωτεΐνης στο πλάσμα. Επιπρόσθετα, μια μελέτη που εξέτασε την αντιβακτηριακή δράση πολυφαινολών από φρούτα, βρήκε ότι τα παθογόνα *Staphylococcus aureus* και *Salmonella typhimurium* παρουσίασαν υψηλή ευαισθησία σε αυτές τις ενώσεις. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν μειώσεις των *Clostridium* (*C. perfringens* και *C. histolyticum*) μετά την κατανάλωση φρούτων, σπόρων, οίνων και πολυφαινολών τσαγιού (Singh et al., 2017).

4.4 Προβιοτικά-Πρεβιοτικά

Η κατανάλωση συγκεκριμένων τροφών έχει συνδεθεί με μεγάλα οφέλη για τη ανθρώπινη υγεία. Ένα τέτοιο χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα προβιοτικά και τα πρεβιοτικά, ο συνδυασμός των οποίων ονομάζεται συμβιωτικά. Σύμφωνα με τον ορισμό του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας ως προβιοτικά χαρακτηρίζονται οι «ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν χορηγηθούν σε επαρκείς ποσότητες παρέχουν πλεονεκτήματα υγείας στον ξενιστή» (FAO/WHO, 2016). Οι μικροοργανισμοί αυτοί δηλαδή, δεν πρέπει μόνο να καταφέρουν να επιβιώσουν στις δυσμενείς συνθήκες του πεπτικού συστήματος, αλλά και να εγκατασταθούν και να πολλαπλασιαστούν στο έντερο. Είναι θετικά κατά Gram βακτήρια και περιλαμβάνουν κυρίως δύο γένη, το *Lactobacillus* και το *Bifidobacterium*.

Πίνακας Π.Λειτουργικές ιδιότητες προβιοτικών

Τα οφέλη της διατροφής
• παραγωγή βιταμινών, διαθεσιμότητα μετάλλων και ιχνοστοιχείων • παραγωγή σημαντικών πεπτικών ενζύμων • παραγωγή β-γαλακτοσιδάσης για την ανακούφιση της δυσανεξίας στη λακτόζη
Αποκατάσταση φραγμού, ανταγωνιστικές επιδράσεις κατά:
• λοιμώδη διάρροια (διάρροια ταξιδιωτών, παιδική οξεία διάρροια) • η διάρροια που σχετίζεται με αντιβιοτικά, η διάρροια που σχετίζεται με την ακτινοβολία
Μείωση της χοληστερόλης με:
• αφομοίωση χοληστερόλης • τροποποίηση των δραστηριοτήτων υδρολάσης χολικών αλάτων • αντιοξειδωτικό αποτέλεσμα
Διέγερση και ενίσχυση ανοσοποιητικού συστήματος
• Ενίσχυση της άμυνας κατά της μόλυνσης • Αύξηση της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας των λευκών αιμοσφαιρίων • Αύξηση της παραγωγής IgA • Ρύθμιση της ισορροπίας Th1/Th2, επαγωγή της σύνθεσης κυτταροκίνης
Ενίσχυση της κινητικότητας του εντέρου, ανακούφιση από δυσκοιλιότητα
Μείωση της φλεγμονής ή αλλεργικών αντιδράσεων με:
• αποκατάσταση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού συστήματος • ρύθμιση της σύνθεσης κυτταροκίνης
Αντικαρκινογόνος δράση στο παχύ έντερο με:
• δέσμευση μεταλαξιογόνων • αδρανοποίηση των καρκινογόνων ή προ-καρκινογόνων ουσιών ή πρόληψη σχηματισμού τους • ρύθμιση των μεταβολικών δραστηριοτήτων των μικροοργανισμών του παχέως εντέρου • ανοσολογική απόκριση
Διατήρηση της ακεραιότητας του βλεννογόνου
Αντιοξειδωτικές δραστηριότητες

Πηγή:Goktepe, Juneja & Ahmedna (2006)

Παράλληλα, τα πρεβιοτικά ορίστηκαν πρώτη φορά από τους Gibson and Roberfroid το 1995 ως «μη αφομοιώσιμα συστατικά τροφίμων» τα οποία επηρεάζουν ευεργετικά τον ξενιστή διεγείροντας εκλεκτικά την ανάπτυξη και/ή τη δραστηριότητα ενός ή περισσότερων βακτηριακών ειδών που έχουν ήδη καθιερωθεί στο παχύ έντερο και έτσι εξασφαλίζεται η βελτίωση της υγείας του ξενιστή (Yoo & Kim, 2016). Γενικά υπάρχουν τρία κριτήρια:

(α) αντοχή στη γαστρική οξύτητα, υδρόλυση και γαστρεντερική απορρόφηση

(β) ζύμωση από τον εντερικό μικροβιόκοσμο

(γ) επιλεκτική διέγερση της ανάπτυξης και / ή της δραστηριότητας των εντερικών μικροβιακών στελεχών που σχετίζονται με την υγεία και την ευημερία

Τα πρεβιοτικά που πληρούν αυτά τα τρία κριτήρια είναι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες, λακτουλόζη και άπεπτοι υδατάνθρακες. Οι άπεπτοι υδατάνθρακες περιλαμβάνουν πολυσακχαρίτες (ινουλίνη, ανθεκτικά άμυλα, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτίνες και κόμμεα), μερικούς ολιγο-σακχαρίτες και άπεπτα σάκχαρα και αλκοόλες.

Όσο αφορά την ινουλίνη, νέες μελέτες έδειξαν ότι η κατανάλωσή της έχει επιλεκτική δράση στη διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμου επηρεάζοντας τις συγκεντρώσεις κυρίως των γενών *Bifidobacterium*, *Anaerostipes* και *Bilophila*. Πιο συγκεκριμένα, βοηθάει την αύξηση των *Bifidobacterium*, *Anaerostipes* και στη μείωση των *Bilophila* το οποίο συνδέεται με μεγάλα οφέλη στη υγεία του ανθρώπου (Vandeputte et al., 2017). Με την ιδιότητά της ως πρεβιοτικό, η ινουλίνη και τα παράγωγά της έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμακευτικών προϊόντων. Επίσης, χρησιμοποιείται ως τροποποιητής υφής, υποκατάστατο λίπους και υποκατάστατο της ζάχαρης.

4.5 Μικροοργανισμοί εντερικού μικροβιόκοσμου

Οι μικροοργανισμοί του εντερικού μικροβιόκοσμου που παρουσιάζουν ενδιαφέρον στην μελέτη των φαινολικών ενώσεων του ερυθρού οίνου και της παχυσαρκίας είναι οι κάτωθι.

4.5.1 *Bifidobacterium bifidum*

Το γένος *Bifidobacterium*, είναι μέλος της οικογένειας Bifidobacteriaceae και ανήκει στο φύλο των Actinobacteria. Τα bifidobacteria είναι Gram-θετικοί, αναερόβιοι, μη σπορογόνοι μικροοργανισμοί. Λόγω των προβιοτικών ιδιοτήτων του έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον και μελετάται η σύνδεσή του με ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία.

Τα Bifidobacteria γρήγορα αποικίζουν το έντερο των βρεφών κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων της ζωής τους, σε περίπτωση που θηλάζουν, όπου το *B. breve* είναι το κυρίαρχο είδος, ακολουθούμενο από *B. bifidum* και *B. longum* subsp. *infantis*. Ειδικότερα, τα *B. bifidum* έχει βρεθεί ότι ασκούν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη και ωρίμανση του ανοσοποιητικού

συστήματος του ανθρώπου, μετά τη γέννηση. Κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής όμως μειώνεται η αφθονία τους.

Άλλες *in vivo* μελέτες που περιλαμβάνουν στελέχη *B. bifidum* έδειξαν ότι στην περίπτωση της κολίτιδας η χορήγηση του *B. bifidum* σε ποντίκια που νοσούσαν, κατέστειλε την φλεγμονή του εντέρου. Επίσης διαθέτουν αντιβακτηριακή δράση κατά των παθογόνων όπως το *Helicobacter pylori*, ενώ άλλες *in vitro* μελέτες έδειξαν σαφή αναστολή της προσκόλλησης των παθογόνων βακτηρίων όπως *Escherichia coli* και *Cronobacter sakazakii* (Turroni et al., 2014).

4.5.2 *Bacteroides* spp

Είναι Gram-αρνητικοί, αυστηρώς αναερόβιοι, μη σπορογόνοι μικροοργανισμοί. Στα νεογνά εμφανίζονται περίπου 10 ημέρες μετά τη γέννηση τους. Τα θηλάζοντα βρέφη δεν παρουσιάζουν υψηλούς πληθυσμούς από το γένος *Bacteroides*, τουλάχιστον μέχρι να απογαλακτισθούν.

Η ζύμωση των υδατανθράκων από τα βακτήρια του γένους *Bacteroides* αλλά και άλλα βακτήρια του εντερικού σωλήνα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή μιας ομάδας πτητικών λιπαρών οξέων που απορροφούνται μέσω του παχέος εντέρου και χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο ως πηγή ενέργειας, παρέχοντας ένα σημαντικό ποσοστό της ημερήσιας απαιτούμενης ενέργειας. Γενικά έχουν πολύ καλή ικανότητα να προσαρμόζονται στις αντίξοες συνθήκες του παχέος εντέρου και να αξιοποιούν τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά για την επιβίωσή τους (Wexler, 2007).

Επίσης, αρκετές έρευνες υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα των δύο κύριων εντερικών φύλων, των *Bacteroidetes* και των *Firmicutes*, επηρεάζονται από την παχυσαρκία, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ποντίκια. Αυτό που παρατήρησαν είναι ότι η μικροβιακή περιεκτικότητα των παχύσαρκων ατόμων εμπλουτίζεται περισσότερο με τα βακτήρια από τα *Firmicutes* και λιγότερο με τα *Bacteroidetes*. Παράλληλα, οι δίαιτες που βασίζονται σε υψηλή πρόσληψη πρωτεϊνών αλλά σε χαμηλή πρόσληψη υδατανθράκων μπορεί να μεταβάλλουν το μικροβιόκοσμο του εντέρου. Πιο συγκεκριμένα, δεν μεταβάλλονται οι πληθυσμοί των γενών *Bacteroides* και *Clostridium*, αλλά οι πληθυσμοί των *Roseburia*, *Eubacterium rectale* και *Bifidobacterium* μειώθηκαν σημαντικά καθώς το βουτυρικό οξύ και τα βουτυρο-παράγωγα βακτήρια του εντέρου (Duncan et al., 2007).

4.5.3 *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group

Ανήκει στα βουτυρο-παράγωγα βακτήρια και είναι Gram-θετικά αναερόβιο. Επηρεάζει την κινητικότητα του παχέος εντέρου, τη διατήρηση της ανοσίας και έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Τροποποίηση του εντερικού μικροβιόκοσμου σε *Roseburia* spp. μπορεί να οδηγήσει

στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου, της παχυσαρκίας, του διαβήτη τύπου 2, του νευρικού συστήματος και των αλλεργιών. Γι' αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως προβιοτικό για αποκατάσταση της ομοιόστασης του οργανισμού. Επίσης, αυξημένα επίπεδα του γένους *Roseburia* συνδέονται με την απώλεια βάρους (Tamanai-Shacoori et al., 2017).

4.5.4 *Akkermansia muciniphila*

Είναι ένα Gram-αρνητικός, αυστηρώς αναερόβιος, μη σπορογόνος μικροοργανισμός. Η *A. muciniphila* αντιπροσωπεύει το 1-4% του συνολικού εντερικού μικροβιόκοσμου, ξεκινώντας από τα πρώτα στάδια της ζωής. Διάφορες διατροφικές παρεμβάσεις, κυρίως σε ζωικά μοντέλα, έχουν αναφερθεί ότι επηρεάζουν τα επίπεδα της στο έντερο. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η χορήγηση ειδικών διαιτητικών συστατικών βελτίωσε την υγεία του ξενιστή και αύξησε επίσης τον πληθυσμό της *Akkermansia*. Τέτοιες ενώσεις περιλαμβάνουν τις πολυφαινόλες, φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, μονοσακχαρίτες και άλλα (Derrien, Belzer & de Vos, 2017). Σε πολλές έρευνες συσχετίστηκε αρνητικά με ασθένειες, όπως οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, η σκωληκοειδίτιδα, η παχυσαρκία, ωστόσο η πιο πειστική απόδειξη της ευεργετικής επίδρασής της στην υγεία προέρχεται από μελέτες που τη συνδέουν με μεταβολικές διαταραχές, όπως ο διαβήτης και η παχυσαρκία. Σε πειράματα με ποντίκια διαπιστώθηκε ότι η εντερική αφθονία σε *Akkermansia* μειώθηκε σε εκείνα που είχαν αναπτύξει παχυσαρκία ή άλλα σημάδια φυσιοπαθολογικών διαταραχών που σχετίζονται με το μεταβολικό σύνδρομο. Παράλληλα, σε κλινικές μελέτες με παχύσαρκα παιδιά και ενήλικες, οι πληθυσμοί του *Akkermansia* είναι γενικά μειωμένοι. Σε κλινική μελέτη παρέμβασης βρέθηκε ότι η αφθονία σε *Akkermansia* σε παχύσαρκα και υπέρβαρα άτομα, συνδεόταν με βελτίωση των συμπτωμάτων του μεταβολικού συνδρόμου, ειδικά ότι αφορούσε τη γλυκόζη πλάσματος νηστείας, τα τριγλυκερίδια πλάσματος και την κατανομή σωματικού λίπους (Dao et al, 2016). Τέλος, η *A. muciniphila* έχει βρεθεί ότι επηρεάζει το ανοσοποιητικό σύστημα με την παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων εξασφαλίζοντας την ομοιόσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου (Ottman, Geerlings, Aalvink, de Vos, Belzer, 2017).

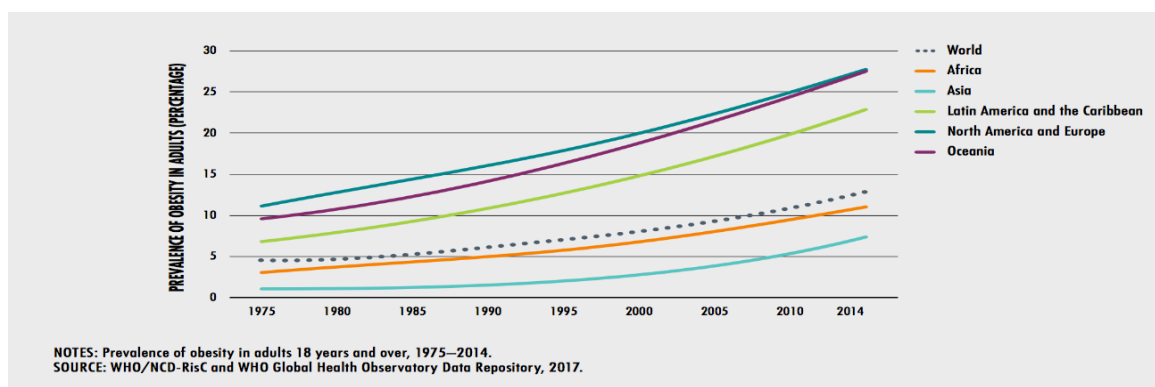
4.6 Εντερικός μικροβιόκοσμος και υγεία

Έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχει μια λεπτή ισορροπία ανάμεσα στον άνθρωπο και στους μικροοργανισμούς του εντερικού μικροβιόκοσμου. Οι διαταραχές της ισορροπίας του εντερικού μικροβιόκοσμου (δυσβίωση) εμφανίζονται σε παθολογικές καταστάσεις όπως η λοίμωξη που προκαλείται από το *Clostridium difficile*, ο καρκίνος, το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, μεταβολικά νοσήματα όπως ο διαβήτης τύπου 2 και η παχυσαρκία, αλλά και νευρολογικές

νόσοι όπως η Άνοια και η νόσος του Alzheimer, το σύνδρομο του φάσματος αυτισμού και άλλα, χωρίς να υπάρχουν μέχρι τώρα αποδείξεις για τη σύνδεση του φαινομένου αυτού με την έναρξη της ασθένειας.

4.6.1 Εντερικός μικροβιόκοσμος και παχυσαρκία

Η παχυσαρκία οφείλεται σε ανισορροπία της πρόσληψης τροφής, του βασικού μεταβολισμού, της μικροβιακής σύνθεσης του πεπτικού συστήματος και της ενεργειακής δαπάνης. Η συχνότητα εμφάνισης της παχυσαρκίας αυξήθηκε σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες. Το 2016, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, περισσότερα από 1900 εκατομμύρια άτομα ηλικίας άνω των 18 ετών είχαν δείκτη μάζας σώματος (BMI) μεγαλύτερο από 25 κιλά/m² και 600 εκατομμύρια ταξινομήθηκαν ως παχύσαρκα (BMI > 30 κιλά/m²). Την ίδια χρονιά το 18% των παιδιών και των εφήβων ηλικίας 5-19 ετών ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι. Το πιο ανησυχητικό όμως είναι η ραγδαία αύξηση της, τόσο στις αναπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες.



Διάγραμμα 2.Ο επιταχυνόμενος ρυθμός αύξησης των παχύσαρκων ενηλίκων στον κόσμο

Πηγή: WHO/NCD-RisC and WHO Global Health Observatory Date Repository, 2017

Η παχυσαρκία και ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος (BMI), αποτελούν προδιαθεσικούς παράγοντες για την εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου. Το μεταβολικό σύνδρομο είναι μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται ως παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακές παθήσεις και διαβήτη τύπου 2. Τα κύρια, διαγνωστικά συστατικά είναι: η μειωμένη HDL, τα αυξημένα τριγλυκερίδια, η αυξημένη αρτηριακή πίεση και γλυκόζη πλάσματος νηστείας, τα οποία σχετίζονται με την αύξηση του σωματικού βάρους. Η μείωση του βάρους κατά 5-10%, με δίαιτα και άσκηση, με ή χωρίς φάρμακα κατά της παχυσαρκίας, βοηθάει στην αντιμετώπιση του μεταβολικού συνδρόμου.

Ο επιπολασμός του μεταβολικού συνδρόμου και των καρδιαγγειακών παθήσεων αναμένεται να αυξηθεί μαζί με την παγκόσμια επιδημία παχυσαρκίας. Μεγαλύτερη έμφαση θα πρέπει να δοθεί

στην αποτελεσματική και έγκαιρη διαχείριση βάρους για τη μείωση του κινδύνου σε προσυμπτωματικά άτομα (Han et Lean, 2016).

Παράλληλα, η παιδική παχυσαρκία θεωρείται ένα από τα σοβαρότερα παγκόσμια προβλήματα υγείας στην κοινωνία μας. Τα παχύσαρκα παιδιά είναι πιο πιθανό να είναι παχύσαρκα και κατά την ενηλικίωση και διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο πρόωρου θανάτου και δυσμενών επιπτώσεων στην υγεία στη μεταγενέστερη ζωή. Η χορήγηση τριών ή περισσότερων κύκλων αντιβιοτικών προτού τα παιδιά φθάσουν σε ηλικία 2 ετών συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο παχυσαρκίας στην παιδική ηλικία. Όταν χορηγούνται στα πρώτα στάδια της ζωής τα αντιβιοτικά διαταράσσουν τη σύνθεση μικροβίων και μπορούν να επηρεάσουν τη σωματική μάζα του ξενιστή είτε προωθώντας την αύξηση του σωματικού βάρους είτε την καχεκτική ανάπτυξη. Η συσχέτιση των αντιβιοτικών με την παχυσαρκία έχει άλλωστε ήδη αποδειχθεί σε ζωικά μοντέλα (Thomas et al., 2017).

Σύμφωνα με τους Turnbaugh et al. ο εντερικός μικροβιόκοσμος θα πρέπει να θεωρείται μαζί με γενετικούς παράγοντες και τον τρόπο ζωής ότι συμβάλλει στην παθοφυσιολογία της παχυσαρκίας (Turnbaugh et al., 2006).

4.6.1.1 Εντερικός μικροβιόκοσμος κανονικού βάρους και παχύσαρκων ενηλίκων

Έχει αποδειχθεί πρόσφατα ότι ορισμένα βακτηριακά είδη είναι ευεργετικά για τον ξενιστή για την πρόληψη της παχυσαρκίας. Σε ζωικά μοντέλα και ανθρώπους ο πληθυσμός της *Akkermansia muciniphila* μειώνεται σε παχύσαρκους και διαβητικούς ποντικούς (διαβήτη τύπου 2) και η χρήση του βακτηρίου ως προβιοτικού είναι ωφέλιμη για τον ξενιστή.

Σε μια συστηματική ανασκόπηση των Castaner et al. στην περίπτωση των παχύσαρκων ατόμων υπήρξε έντονη θετική συσχέτιση με τα ακόλουθα βακτηριακά είδη από το φύλο Firmicutes: *Blautia hydrogenotrophica*, *Coprococcus catus*, *Eubacterium ventriosum*, *Ruminococcus bromii* και *Ruminococcus obeum*. Από την άλλη πλευρά, στα κανονικού βάρους άτομα υπήρχε μεγαλύτερη αναλογία του φύλου Bacteroidetes: *Bacteroides faecichinchillae* και *Bacteroides thetaiotaomicron* και επίσης από τα Firmicutes τα *Blautia wexlerae*, *Clostridium bolteae* και *Flavonifractor plautii* (Castaner et al., 2018).

Επίσης, εκτός από τον Δείκτη Μάζας Σώματος (BMI) φαίνεται ότι επηρεάζει την σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου και το διαφορετικό φύλο. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι ο λόγος Firmicutes/Bacteroidetes μεταβάλλεται μαζί με το BMI, αλλά και κατά φύλο. Ο λόγος F / B τείνει να αυξάνεται με $BMI \leq 33$ και μειώνεται απροσδόκητα όταν $BMI > 33$. Σε άνδρες, το Bacteroidetes μειώθηκε όταν αυξήθηκε το BMI, αλλά δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στις γυναίκες.

Όσο αφορά τον διαβήτη μελέτες έδειξαν ότι οι ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 είχαν σημάδια «δυσβίωσης» στο έντερο, με μείωση στα βακτήρια που παράγουν βουτυρικό και αύξηση των ευκαιριακών παθογόνων. Άλλες σχετικές μελέτες που υπογραμμίζουν το ρόλο αυτών των βακτηρίων στη ρύθμιση σημαντικών οδών του διαβήτη τύπου 2 όπως η σηματοδότηση της ινσουλίνης, η ομοιοστασία της γλυκόζης και η φλεγμονή.

4.6.1.2 Εντερικός μικροβιόκοσμος κανονικού βάρους και παχύσαρκων εγκύων

Έχει παρατηρηθεί ότι παχύσαρκες γυναίκες τείνουν να γεννούν βαρύτερα βρέφη και έτσι πολλές μελέτες επικεντρώθηκαν στη σύγκριση κανονικού βάρους και παχύσαρκων εγκύων. Επίσης διαφοροποιήσεις σημειώνονται και στον εντερικό μικροβιόκοσμο. Ειδικότερα, υψηλότεροι πληθυσμοί των *Bacteroides* και *Staphylococcus aureus* και χαμηλότεροι των *Bifidobacterium* καταγράφηκαν σε υπέρβαρα άτομα. Οι Santacruz et al. απέδειξαν ότι μειωμένοι πληθυσμοί *Bifidobacterium*, *Akkermansia muciniphila* και *Bacteroides* και αυξημένοι *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* και *Escherichia coli* ανιχνεύθηκαν στις υπέρβαρες σε σύγκριση με τις κανονικού βάρους εγκύους (Santacruz et al., 2010). Σε ολόκληρο τον πληθυσμό, τα αυξημένα ολικά βακτήρια και ο πληθυσμός του γένους *Staphylococcus* συσχετίστηκαν με αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα. Ο αυξημένος πληθυσμός του γένους *Bacteroides* σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα HDL-χοληστερόλης και φολικού οξέος και μειωμένα επίπεδα TAG (Clarke et al., 2012). Ο αυξημένος πληθυσμός του γένους *Bifidobacterium* επίσης, σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα φολικού οξέος. Επομένως, η σύνθεση των μικροβίων του εντέρου σχετίζεται με το σωματικό βάρος, την αύξηση του σωματικού βάρους και τους μεταβολικούς βιοδείκτες κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, τα οποία μπορεί να σχετίζονται με τη διαχείριση της υγείας των γυναικών και των βρεφών.

Πιθανές λύσεις

Η διατροφή παραμένει ένας από του βασικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ποικιλομορφία του εντερικού μικροβιόκοσμου. Οι βραχυπρόθεσμες αλλαγές στο προφίλ διατροφής μπορούν να τον τροποποιήσουν. Για παράδειγμα, τα άτομα που τρέφονται με δίαιτες πλούσιες σε ζωικά λίπη παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα *Bacteroidetes* μέσα σε 24 ώρες, μια αλλαγή που καθιερώνεται μετά από 10 ημέρες.

Οι δίαιτες υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και χαμηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες αυξάνουν την αφθονία των *Alistipes*, *Bilophila* και *Bacteroides* και ελαττώνουν την αφθονία των *Roseburia sp.*, *Eubacterium rectale* και *Ruminococcus bromii* ενώ η πρόσληψη διαιτητικών ινών

συσχετίζεται με την αύξηση των βακτηρίων *Prevotella* και *Xylanibacter* και της αύξησης της μικροβιακής ποικιλομορφίας (Al-Assal, Martinez, Torrinhas, Cardinelli, Waitzberg, 2018).

Η διαιτητική παρέμβαση θα μπορούσε να είναι μια καλή στρατηγική για τη θεραπεία της παχυσαρκίας, μειώνοντας την πρόσληψη ενέργειας και ενδεχομένως τροποποιώντας το μικροβιακό έντερο για να βοηθήσει στην απώλεια βάρους. Ωστόσο, η διατροφή, η σωματική δραστηριότητα, τα φάρμακα απώλειας βάρους συχνά αποτυγχάνουν να προωθήσουν την επαρκή απώλεια βάρους σε ασθενείς με νοσηρή παχυσαρκία λόγω της δυσκολίας μακροπρόθεσμης τήρησης της παρέμβασης. Σε αυτό το σενάριο, οι εξαιρετικά επεμβατικές βαριατρικές επεμβάσεις παραμένουν η πιο αποτελεσματική θεραπεία για τους παχύσαρκους ασθενείς.

Πίνακας III.Συσχετισμός βάρους μάζας σώματος και εντερικού μικροβιόκοσμου

Bacteria	Associasion with obesity	Group	Level	Other associations	Πηγή
<i>Lactobacillus reuteri</i>	+ve	Firmicutes	Species	-	Kong et al.,2013 Million et al.,2013
<i>Clostridium cluster XIVa</i>	+ve	Firmicutes	Group	Anti-inflammatory	Kim et al.,2013
<i>E.coli</i>	+ve	Proteobacteria	Species	Nonalcoholic steatohepatitis (NASH)	Kim et al.,2013
<i>Staphylococcus spp.</i>	+ve	Firmicutes	Genus	Energy intake	Bervoets et al,2013
<i>Bacteroides</i>	-ve/+ve	Bacteroides	Genus	Controversial	Ley, Turnbaugh, Klein & Gordon,2006
<i>Akkermansia muciniphila</i>	-ve	Verrucomicrobia	Species	Mucus degradation	Everard et al,2013
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	-ve	Archaea	Species	Increase in anorexia	Armougom, Henry, Vialettes, Raccach & Raoult,2009
<i>Clostridium cluster IV; F.prausnitzii</i>	-ve	Firmicutes	Species	Anti-inflammatory	Calvani et al,2010
<i>Bifidobacteria</i>	-ve	Actinobacteria	Genus	Association with allergy	Kong et al.,2013

+ve θετική συσχέτιση, -ve αρνητική συσχέτιση, -ve/+ve αμφιλεγόμενη συσχέτιση

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΚΡΑΣΙ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ

Η μέτρια κατανάλωση κρασιού (που προέρχεται από τα σταφύλια) φαίνεται να παράγει θετικά αποτελέσματα για την υγεία λόγω των βιοδραστικών συστατικών που περιέχει όπως οι πολυφαινόλες. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος εμπλέκεται στον μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων και αυτές οι ενώσεις και / ή οι μεταβολίτες τους μπορούν με τη σειρά τους να διαμορφώνουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο μέσω της διέγερσης της ανάπτυξης ευεργετικών βακτηρίων και της αναστολής των παθογόνων βακτηρίων. Η αμφίδρομη αυτή αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυφαινολών του κρασιού και των μικροβίων του εντέρου μπορεί να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες που σχετίζονται με τη συγκέντρωση και τη δομή των φαινολικών ενώσεων καθώς και τα χαρακτηριστικά των βακτηριακών στελεχών, το μικροβιακό περιβάλλον, το matrix των τροφίμων και άλλα. Ειδικά, σε ότι αφορά το κομμάτι της παχυσαρκίας ο ρόλος των φλαβονοειδών βασίζεται σε μηχανισμούς που μειώνουν την πρόσληψη / απορρόφηση τροφής, προωθούν την ενεργειακή δαπάνη ή αποτρέπουν την αποθήκευση ενέργειας (Haseeb, Alexander, Baranchuk, 2017), (Das et. al., 1999), (Liberale, Bonaventura, Montecucco, Dallegri, Carbone, 2019).

Κεφάλαιο 5.1 Μεταβολισμός φαινολικών ενώσεων

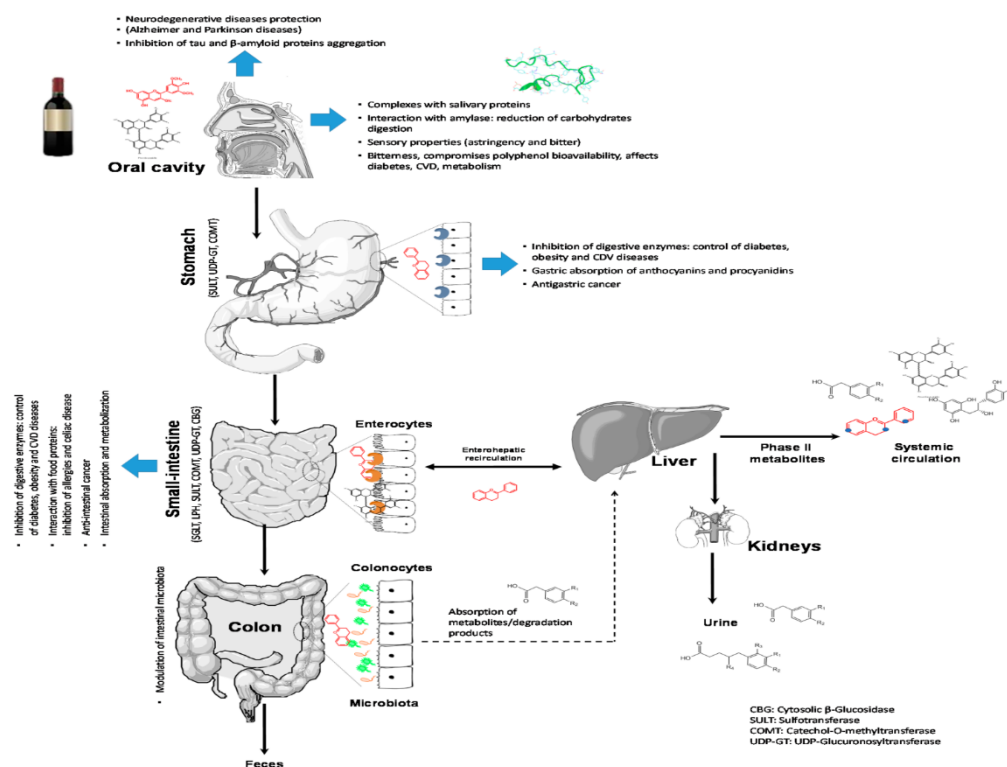
Οι πολυφαινόλες θεωρούνται ξενοβιοτικά και κατά συνέπεια δεν μεταβολίζονται εκτενώς από τον ανθρώπινο οργανισμό και τελικά απομακρύνονται, κυρίως στη χολή αλλά και στα ούρα.

Το πρώτο βήμα της πέψης των πολυφαινολών λαμβάνει χώρα στην στοματική κοιλότητα. Κατά τη διάρκεια της μάσησης, η τροφή διασπάται σε μικρές μερίδες και επίσης αναμιγνύεται με τα ένζυμα του σάλιου και του στόματος, όπως οι γλυκοζιδάσες, που μπορεί να οδηγήσουν στην υδρόλυση μερικών φλαβονοειδών-Ο-γλυκοζιτών. Κατά τη διέλευση μέσω του πεπτικού σωλήνα στο στομάχι, το μέγεθος των τεμαχισμένων τροφίμων μειώνεται, ενισχύοντας την απελευθέρωση φαινολικών ενώσεων από τη μήτρα των τροφίμων (Cueva et al., 2017).

Στη συνέχεια ακολουθεί η απογλυκοζυλίωση πριν από την απορρόφηση στο λεπτό έντερο. Εκτιμάται ότι το 5% -10% των απορροφούμενων πολυφαινολών απορροφάται στο λεπτό έντερο, ενώ το 90% -95% φθάνει στο κόλον όπου αποικοδομείται εντατικά από το μικροβιόκοσμο σε μια ποικιλία βιοενεργών φαινολικών μεταβολιτών, λακτονών και φαινολικών οξέων που απορροφάται περαιτέρω (Dueñas et al., 2015). Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη αμφίδρομης αντίδρασης μεταξύ πολυφαινολικών ενώσεων και μικροβίων του εντέρου. Πρώτον, οι πολυφαινόλες βιομετασχηματίζονται στους μεταβολίτες τους μέσω των μικροοργανισμών του εντέρου που έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών. Δεύτερον, οι πολυφαινόλες ρυθμίζουν τη σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων του εντέρου κυρίως μέσω

της αναστολής των παθογόνων βακτηρίων και της διέγερσης ευεργετικών βακτηρίων. Στο τελευταίο, μπορούν να λειτουργήσουν ως πρεβιοτικά και να εμπλουτίσουν τα ευεργετικά βακτήρια.

Έτσι πολλές μελέτες επικεντρώνονται και στα δύο άκρα της σχέσης: την επίδραση των φαινολικών στη σύνθεση των μικροβίων του εντέρου και την επίδραση των μικροβίων του εντέρου στη βιομετατροπή των φαινολικών ενώσεων, βιοδιαθεσιμότητα ή ανθρώπινη υγεία (Ozdal et al., 2016).



Εικόνα 5.Μεταβολισμός φαινολικών ενώσεων (Fernandes, Pérez-Gregorio, Soares, Mateus & de Freitas, 2017)

5.1.1 Αλληλεπιδράσεις φαινολών ενώσεων και μικροοργανισμών του εντέρου

Συγκεκριμένα όσο αφορά την κατανάλωση κόκκινου κρασιού οι Queiro-Ortuno et al., εξέτασαν τις μεταβολές των εντερικών μικροβιακών πληθυσμών, μετά την κατανάλωση του ή του παραγώγου του μετά την απομάκρυνση της αλκοόλης. Βρέθηκε ότι η κατανάλωση ερυθρού οίνου αύξησε σημαντικά τους πληθυσμούς των *Enterococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Bifobacterium*, *Bacteroides uniformis*, *Eggerthella lenta* και *Blautia coccoides-Eubacterium rectale group* και μείωσε τα *Actinobacteria*, *Clostridium* spp. και *C. histolyticum group*, ωστόσο η μείωση των δύο *Clostridium* spp. δεν θεωρήθηκε σημαντική. Η λήψη του ίδιου οίνου αλλά χωρίς αλκοόλη είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση των *Fusobacteria*, *Firmicutes* (ιδιαίτερα της

ομάδας *Enterococcus* και *Blautia coccoides-Eubacterium rectale*) και μείωση των *Actinobacteria* (ιδιαίτερα *Bifidobacterium* και *Eggerthella lenta*). Οι πληθυσμοί των λακτοβακίλλων δεν άλλαξαν με την παρέμβαση. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι μειώνονται τα γένη *Clostridium*, *Eubacterium* και *Bacteroides* καθώς η αύξηση τους σχετίζεται με διαταραχή ή «δυσβίωση» του εντερικού μικροβιόκοσμου (Queipo-Ortuno et al., 2012).

Παράλληλα, σε μια μελέτη που χρησιμοποιεί προσομοιωτή του γαστρεντερικού συστήματος παρατηρήθηκαν αυξήσεις στα γένη *Klebsiella*, *Alistipes*, *Cloacibacillus*, *Victivallis* και *Akkermansia*, και μειώσεις στην ομάδα *Bifidobacterium*, *Blautia coccoides*, *Anaeroglobus*, *subdoligranulum*, και *Bacteroides* (Duenas et al., 2015). Ενώ μια μελέτη από τους Dolara et al., διαπίστωσαν ότι μετά από τη σίτιση των αρουραίων με πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού υπήρξαν αυξήσεις στα *Lactobacilli* και *Bifidobacteria* και μείωση των *Propionibacteria*, *Bacteroides* και *Clostridia* (Dolara et al., 2005).

5.1.1.1 Γαλλικό οξύ

Στη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Hidalgo et al, η *in vitro* επώαση του γαλλικού οξέος μείωσε μια ομάδα δυνητικά επιβλαβών βακτηρίων όπως το *Clostridium histolyticum* χωρίς αρνητικές επιδράσεις στα ευεργετικά βακτήρια. Επιπλέον, μείωσε σημαντικά την ανάπτυξη του *Bacteroides* spp. και αύξησε τόσο τον συνολικό αριθμό βακτηρίων όσο και την αφθονία του *Atopobium* spp (Hidalgo et al., 2012).

5.1.1.2 Κερκετίνη

Ο Duda Chodak μελέτησε την επίδραση των φλαβονολών (της κερκετίνης και της ρουτίνης) σε συγκεκριμένα εντερικά μικροβιακά είδη. Σε αυτή τη μελέτη εμβολιάστηκαν καθαρές φλαβονόλες σε τελικές συγκεντρώσεις 4, 20 και 50 μg/ml κερκετίνης και σε 20, 100 και 250 μg/ml ρουτίνης, με έξι είδη βακτηρίων (*Bacteroides galacturonicus*, *Lactobacillus* sp., *Enterococcus caccae*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Ruminococcus gauvreauii* και *Escherichia coli*). Είναι ενδιαφέρον ότι η κερκετίνη έδειξε δόσοεξαρτώμενη ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη όλων των βακτηριακών ειδών που αναλύθηκαν (Duda, 2012).

Οι Etcheberria et al. διερεύνησαν κατά πόσο η χορήγηση κερκετίνης θα μπορούσε να αναστρέψει την αύξηση των μικροοργανισμών του εντέρου που σχετίζονται με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και σε υδατάνθρακες και με αυτόν τον τρόπο να επηρεάσει την υγεία. Το αποτέλεσμα ήταν μια τροποποιημένη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου συμπεριλαμβανομένου του σχετικού λόγου *Firmicutes* / *Bacteroidetes* και αναστολής της ανάπτυξης βακτηρίων που σχετίζονται με παχυσαρκία που προκαλείται από τη διατροφή, όπως τα *Erysipelotrichaceae*, *Bacillus* spp. και *Eubacterium cylindroides* (Etcheberria et al., 2015).

Σε μια μελέτη *in vitro* που διεξήχθη από τους Kawabata et al., επωάστηκαν διαφορετικές φλαβονόλες με το *Bifidobacterium adolescentis*. Η κερκετίνη έδειξε καμία ή ελάχιστη επίδραση στον ρυθμό ανάπτυξης (20% αναστολή στις 6 ώρες). Άρα δεν έχει καθόλου ή έχει ασθενή αντιβακτηριακή δράση έναντι του *B. adolescentis* (Kawabata et al., 2013).

5.1.1.3 Ρεσβερατρόλη

Στην *in vivo* μελέτη των Larrosa et al., αρουραίοι τράφηκαν με 1 mg ρεσβερατρόλης / kg / ημέρα (ανθρώπινη ισοδύναμη δόση) για 25 ημέρες και τις τελευταίες πέντε ημέρες χορηγήθηκε 5% θειικό νάτριο δεξτράνης (DSS) για να προκαλέσει κολίτιδα. Εξετάστηκαν κυρίως οι επιδράσεις στις βλάβες των ιστών του παχέος εντέρου, στο μικροβιακό έντερο. Η ρεσβερατρόλη αύξησε τα lactobacilli και τα bifidobacteria καθώς επίσης μείωσε την αύξηση των enterobacteria (Larrosa et al., 2009).

Σε άλλη μελέτη των Qiao et al., τα ποντίκια τράφηκαν με ρεσβερατρόλη (200 mg /kg ανά ημέρα). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η ρεσβερατρόλη βελτιώνει τη «δυσβίωση» στο μικροβιακό έντερο που προκαλείται από τη διαίτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Συγκεκριμένα προκλήθηκε αύξηση του λόγου *Bacteroidetes/Firmicutes*, σημαντική αναστολή της ανάπτυξης του *Enterococcus faecalis* και αυξημένη ανάπτυξη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (Qiao et al., 2014).

Οι Etxeberria et al. μελέτησαν κατά πόσο η χορήγηση της trans-ρεσβερατρόλης θα μπορούσε να επηρεάσει τη διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμου μετά από διαίτα υψηλής περιεκτικότητας σε σακχαρόζη και λιπαρά (HFS), βελτιώνοντας έτσι την υγεία του εντέρου. Η ρεσβερατρόλη μείωσε σημαντικά τη σχετική παρουσία διαφόρων ειδών κλωστριδίων όπως τα *Clostridium aldenense* (-93,1%), *Clostridium hathewayi* (-73,2%), *Clostridium* sp. C9 (-76,3%) και *Clostridium* sp. MLG661 (-53,7%). Επιπρόσθετα, το ποσοστό μεταβολής της μέσης σχετικής παρουσίας των *Gracilibacter thermotolerans* (-57,7%) και *Parabacteroides distasonis* (-77,4%) επηρεάστηκε αρνητικά από την trans-ρεσβερατρόλη σε σύγκριση με εκείνη που ανιχνεύτηκε στην ομάδα ελέγχου με HFS διαίτα. Η προσθήκη της trans-ρεσβερατρόλης παρήγαγε μία στατιστικά σημαντική αναστολή στην οικογένεια *Graciibacteraceae* (-57,7%) σε σύγκριση με τους αρουραίους ελέγχου που έλαβαν διατροφή με HFS. Ως αποτέλεσμα αυτής της μελέτης, αναφέρεται ότι η χορήγηση της trans-ρεσβερατρόλης μόνη της ή σε συνδυασμό με την κερκετίνη σχεδόν τροποποίησε το προφίλ των βακτηρίων του εντέρου (Etxeberria et al., 2015).

Κεφάλαιο 5.2 Φαινολικές ενώσεις κρασιού–εντερικός μικροβιόκοσμος και παχυσαρκία

Πολλά επιδημιολογικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα (CVD) ανεξάρτητα από τον τύπο αλκοολούχου ποτού που καταναλώνεται. Η επίδραση του αλκοόλ στη μείωση της συχνότητας εμφάνισης του διαβήτη (ένας ισχυρός παράγοντας κινδύνου για CVD), μπορεί να είναι ένας μηχανισμός διαμεσολάβησης. Μεταξύ των αλκοολούχων ποτών, το κόκκινο κρασί είναι το πιο αντιπροσωπευτικό γιατί παρέχει τόσο το αλκοόλ όσο και άφθονες πολυφαινολικές ενώσεις, οι οποίες πιστεύεται ότι προσφέρουν πρόσθετα οφέλη για τη μείωση του κινδύνου CVD.

Ωστόσο πολλοί επιστήμονες διαφωνούν μέχρι σήμερα, στο εάν τα προστατευτικά αποτελέσματα των αλκοολούχων ποτών στον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου και του διαβήτη οφείλονται στην αιθανόλη ή στα μη αλκοολικά συστατικά (κυρίως πολυφαινόλες). Σε μια σχετικά πρόσφατη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή των Chiva-Blanch et al., εξήντα επτά άνδρες με υψηλό καρδιαγγειακό κίνδυνο τυχαιοποιήθηκαν. Όλοι έλαβαν ερυθρό οίνο (30 g αλκοόλης / ημέρα), την ισοδύναμη ποσότητα ερυθρού οίνου χωρίς αλκοόλ και ένα άλλο αλκοολούχο ποτό (30 g αλκοόλης / ημέρα) για περιόδους 4 εβδομάδων, με τυχαία σειρά. Αποδείχθηκε μια ευεργετική επίδραση του μη αλκοολούχου κόκκινου κρασιού (κυρίως λόγω της ύπαρξης των πολυφαινολών) στην αντίσταση στην ινσουλίνη, προσδίδοντας μεγαλύτερες προστατευτικές επιδράσεις του ερυθρού οίνου στην καρδιαγγειακή νόσο από άλλα αλκοολούχα ποτά (Chiva-Blanch et al., 2013).

5.2.1 Φαινολικές ενώσεις και μικροοργανισμοί που σχετίζονται με την παχυσαρκία

Γενικά, η κατανάλωση κόκκινου κρασιού έχει βρεθεί ότι αυξάνει τον αριθμό των *Bifidobacteria* των *Lactobacillus* και των βουτυρο-παράγωγων βακτηρίων, καθώς και ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να βελτιώσουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο των παχύσαρκων ατόμων με μεταβολικό σύνδρομο (Chiva-Blanch & Badimon, 2017). Σε μελέτη παρέμβασης σε ανθρώπους βρέθηκε ότι η κατανάλωση πολυφαινολών από κόκκινο κρασί αύξησε σημαντικά τον αριθμό *Enterococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides uniformis*, *Eggerthella lenta* και *Blautia coccoides-E. rectale group* ενώ η ποσότητα του *Lactobacillus* spp. ήταν αμετάβλητη (Queipo-Ortuño et al., 2012). Παράλληλα, οι Moreno-Indias et al. βρήκαν ότι η πρόσληψη πολυφαινολών και πολυφαινολών και αιθανόλης (κρασί) επηρέασε θετικά την ανάπτυξη των *Blautia coccoides-Eubacterium rectal group*, *Faecalibacterium prausnitzii* και *Roseburia* (Moreno-Indias et al., 2016).

Σε μελέτη σε ποντίκια που έλαβαν δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και παράλληλα έλαβαν και ρεσβερατρόλη (200 mg / kg / ημέρα) για 12 εβδομάδες παρουσίασαν επίσης μειωμένο σωματικό λίπος και βάρος μέχρι το τέλος του πειράματος. Η ρεσβερατρόλη συγκεκριμένα, αύξησε σημαντικά τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (αρνητική συσχέτιση με το σωματικό βάρος) και μειώθηκαν τα *Enterococcus faecalis* (θετική συσχέτιση με το σωματικό βάρος). Επίσης, παρατηρήθηκε αφθονία *Bacteroidetes* και μικρότερη ποσότητα βακτηρίων *Firmicutes* (αναλογία που συσχετίζεται αρνητικά με το σωματικό βάρος) (Chaplin , Carpéné & Mercader, 2018).

Σε άλλη μελέτη ερευνήθηκε ο συνδυασμός της ρεσβερατρόλης με την κερκετίνη. Σε μία ομάδα σε αρουραίους Wistar χορήγησαν ένα συνδυασμό από κερκετίνη (30 mg / kg σωματικού βάρους) και ρεσβερατρόλη (15 mg / kg σωματικού βάρους) ημερησίως σε δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά για 10 εβδομάδες. Μέχρι το τέλος του πειράματος, τα ζώα που έλαβαν το συνδυασμό αυτό παρουσίαζαν χαμηλότερο σωματικό βάρος και βάρος λιπώδους ιστού σε σύγκριση με τα ζώα που ήταν σε δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά μόνο. Είναι ενδιαφέρον ότι είχαν επίσης μειωμένες συγκεντρώσεις *Firmicutes* και χαμηλότερη αναλογία *Firmicutes* / *Bacteroidetes*, καθώς και αυξημένα επίπεδα *Christensenellaceae*, *Akkermansia muciniphila*, *Ruminococcaceae*, *Ruminococcaceae* UCG-014 και *Ruminococcaceae* UCG-005 (Zhao, Zhang, Ma et al., 2017).

5.2.2 Συσχετισμός κατανάλωσης κόκκινου κρασιού και βάρους

Η κατανάλωση κόκκινου κρασιού με σύνεση, δεν φαίνεται μέσα από μελέτες να συσχετίζεται με αυξημένο βάρος. Μάλιστα σε έρευνα 280,183 συμμετεχόντων εκείνοι με μέτρια κατανάλωση (κόκκινο κρασί, σαμπάνια, ενισχυμένο κρασί) είχαν χαμηλότερο ΔΜΣ κατά 1,34 kg/m² σε σύγκριση με εκείνους που δεν πίνουν καθόλου (Inan-Eroglu et al., 2020). Ομοίως, σε μελέτη κοόρτης με 14,971 άντρες συμμετέχοντες (40-75 ετών) η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ συσχετίστηκε με μικρή αύξηση βάρους σε επίπεδα που είναι απίθανο να έχουν κλινική σημασία ενώ ο μεγαλύτερος κίνδυνος αύξησης βάρους ήταν μεταξύ των ανδρών που αύξησαν την κατανάλωση σε επίπεδα πολύ πάνω από τη μέτρια (Downer, Bertoia,, Mukamal, Rimm, Stampfer, 2017).

Σε άλλη μελέτη βρέθηκε ότι η μέτρια κατανάλωση κρασιού, ως μέρος μιας μεσογειακής διατροφής, σε 48 άτομα με ελεγχόμενο διαβήτη τύπου 2, δεν προκάλεσε αύξηση βάρους ή συσσώρευση κοιλιακού λίπους (Golan et al., 2017). Παρομοίως σε μελέτη με 224 ασθενείς με ελεγχόμενο διαβήτη τύπου 2, η έναρξη μέτριας κατανάλωσης κρασιού, ιδίως κόκκινου, ως μέρος μιας υγιεινής διατροφής είναι ασφαλής και μειώνει μετρίως τον καρδιομεταβολικό κίνδυνο. Υποδηλώνεται μάλιστα ότι η αιθανόλη παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό της

γλυκόζης και τα αποτελέσματα του κόκκινου κρασιού συμπεριλαμβάνουν επίσης και τα μη αλκοολικά συστατικά του (Gepner et al., 2015).

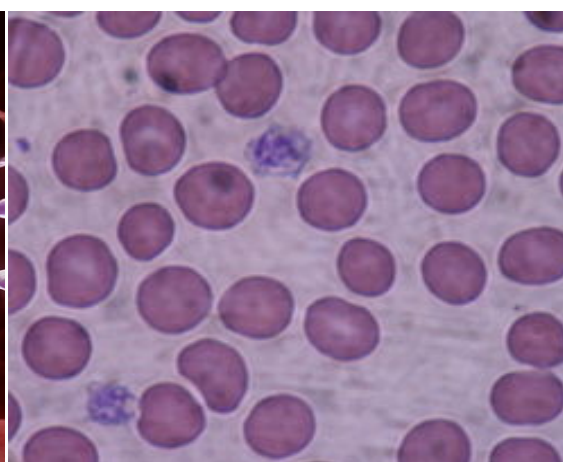
Τέλος, μια μελέτη κοόρτης (Pavlidou et al., 2018) σε άνδρες δεν απέδειξε συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης κρασιού ή αυξημένης κατανάλωσης κρασιού και αλλαγής βάρους. Ωστόσο, οι μεσήλικες συμμετέχοντες του αυξημένου σωματικού βάρους και της περιφέρειας μέσης ήταν λιγότερο πιθανό να έχουν μεγαλύτερη περιφέρεια μέσης και σωματικό βάρος όταν πίνουν χαμηλές έως μέτριες ποσότητες αλκοόλ. Ο μέσος δείκτης μάζας σώματος ήταν χαμηλότερος στους ανθρώπους που κατανάλωναν αλκοόλ και κρασί καθημερινά από εκείνους που κατανάλωναν αλκοόλ λιγότερο συχνά, ενώ για μια δεδομένη ποσότητα κατανάλωσης αλκοόλ, η πρόσληψη κρασιού (και μπύρας) συνδέεται αντιστρόφως με τον BMI και την περιφέρεια μέσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Τα αιμοπετάλια ή αλλιώς θρομβοκύτταρα είναι δισκοειδή, επιμήκη ή ωοειδή, χωρίς πυρήνα κύτταρα με διάμετρο περίπου 2-4μm. Παράγονται από τα μεγακαρυοκύτταρα στον μυελό των οστών και εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος των θηλαστικών. Τα μεγακαρυοκύτταρα είναι μεγάλου μεγέθους κύτταρα των οποίων η κύρια λειτουργία είναι η παραγωγή αιμοπεταλίων. Όταν ένα μεγακαρυοκύτταρο ωριμάσει, δημιουργούνται επιμήκη ψευδοπόδια του κυτταροπλάσματος, δημιουργούνται περισφίξεις, επεκτείνονται και τελικά αποσπώνται από τη μεμβράνη, σχηματίζοντας τα αιμοπετάλια. Τα αιμοπετάλια, μόλις σχηματιστούν, έχουν μέσο χρόνο ζωής 7-10 ημερών, οπότε απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος.



Εικόνα 6.Αιμοπετάλια



Εικόνα 7. Αιμοπετάλια στο μικροσκόπιο

Η κυριότερη λειτουργία των αιμοπεταλίων στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η αιμόσταση αν και τελευταίες μελέτες επισημαίνουν τον κεντρικό τους ρόλο στην φλεγμονή και την

αθηροθρόμβωση. Η αιμόσταση είναι μια κρίσιμη φυσιολογική διαδικασία για να σταματήσει η αιμορραγία από ένα σπασμένο αιμοφόρο αγγείο και να διατηρηθεί η φυσιολογική κυκλοφορία του αίματος. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων στο σημείο της βλάβης αποτελεί την πρωτογενή αιμόσταση και ο καταρράκτης πήξης του αίματος τη δευτερογενή αιμόσταση. Τα αιμοπετάλια παίζουν κεντρικό ρόλο σε μια σειρά διαδοχικών συμβάντων κατά τη διάρκεια της αιμόστασης (δηλαδή προσκόλληση των αιμοπεταλίων, ενεργοποίηση και συσσώρευση) και συμμετέχουν επίσης ενεργά στην παραγωγή της θρομβίνης, η οποία ενισχύει σημαντικά τον καταρράκτη πήξης του αίματος. Ωστόσο, η ίδια διαδικασία της αιμόστασης μπορεί επίσης να προκαλέσει θρόμβωση και απόφραξη αγγείων, που είναι οι συνηθέστεροι μηχανισμοί που οδηγούν σε καρδιακή προσβολή και εγκεφαλικό ή απόφραξη των αιμοφόρων αγγείων σε άλλα μέρη του σώματος (Hou et al., 2015).

Διάφοροι παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν στη θρομβοεμβολή όπως: (1) οι τραχιές αγγειακές επιφάνειες που σχετίζονται με αθηροσκλήρωση, (2) ανισορροπίες των συστημάτων πήξης-αντιπήξης, (3) αργή αιματική ροή, (4) διάχυτη πήξη.

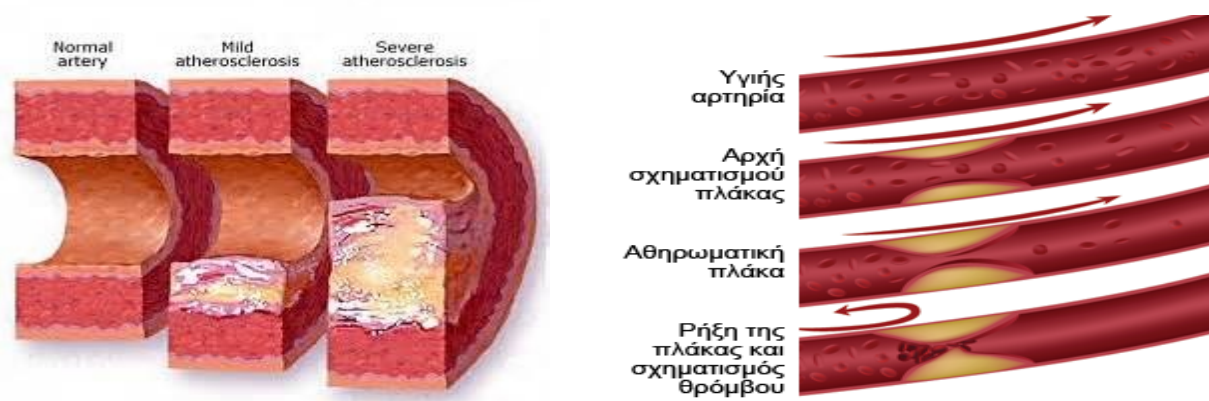
6.1 Αθηροσκλήρωση

Τα αίτια δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως. Πιστεύεται ότι συνδέεται με την παχυσαρκία, την κληρονομικότητα, την προχωρημένη ηλικία, την υπέρταση, την αυξημένη χοληστερόλη στο αίμα, ακόμα και με ιούς και βακτήρια που προσβάλλουν το αγγειακό τοίχωμα.

Η αθηροσκλήρωση ξεκινάει ουσιαστικά με τον τραυματισμό του αγγειακού τοιχώματος που πυροδοτεί μια φλεγμονώδη απόκριση ως φυσιολογική αντίδραση. Αν όμως παραμείνει η χαμηλής έντασης φλεγμονώδης αντίδραση για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να καταλήξει στο σχηματισμό αθηροσκληρωτικής πλάκας και σε καρδιακή νόσο.

Το αρχικό στάδιο χαρακτηρίζεται από τη συσσώρευση μεγάλων ποσοτήτων LDL χοληστερόλης που οξειδώνεται από την παρουσία κυρίως των ελεύθερων ριζών. Τότε προσελκύονται τα μονοκύτταρα (τάξη λευκών αιμοσφαιρίων) τα οποία από την κυκλοφορία του αίματος εισέρχονται στο τοίχωμα του αγγείου όπου έχει παρουσιαστεί η βλάβη, όπου αυξάνονται σε μέγεθος και μετατρέπονται σε μακροφάγα (μεγάλα φαγοκύτταρα) τα οποία με πρόσληψη λίπους μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα.

Με την εξέλιξη της νόσου τα λεία μυϊκά κύτταρα μεταναστεύουν πάνω στην εναπόθεση χοληστερόλης και κάτω από το ενδοθήλιο όπου εκεί συνεχίζουν να διαιρούνται και να μεγεθύνονται. Έτσι δημιουργείται η αθηροσκληρωτική πλάκα η οποία αναπτύσσεται μειώνοντας τη διάμετρο του αγγείου.



Εικόνα 8. Στάδια αθηροσκλήρωσης

Σαν συνέπεια, μειώνεται η ροή του αίματος και περιορίζεται η ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών στα κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος. Σε προχωρημένο στάδιο εναποτίθεται και Ca^{2+} με αποτέλεσμα το αγγείο να χάνει την ελαστικότητά του και να μην διατείνεται εύκολα. Στις επιπλοκές της αθηροσκλήρωσης είναι η στηθάγχη και το έμφραγμα του μυοκαρδίου. (Sherwood, 2016).

Οι πολυφαινόλες του οίνου έδειξαν ότι ρυθμίζουν την αρτηριακή πίεση, ότι προάγουν την αγγειοδιαστολή, αναστέλλουν τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (Dell'Agli, Buscialà & Bosisio, 2004).

6.2Ο παράγοντας PAF

Ο PAF (1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφατιδυλο-χολίνη) παράγεται από μια πληθώρα κυττάρων όπως τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, τα βασεόφιλα, και έχει πολλούς βιολογικούς ρόλους (Tsoupras et al., 2007). Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η παραγωγή PAF ρυθμίζεται μέσω ενζυμικών πορειών και ο παραγόμενος PAF συμμετέχει στις φυσιολογικές διαδικασίες όπως η αναπαραγωγή, ο σχηματισμός μνήμης, ο αγγειακός τόνος, η απόπτωση και η αγγειογένεση. Εν τούτοις, σε παθολογικές καταστάσεις, οι υπερβολικές ποσότητες του PAF μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή και να οδηγήσουν σε φλεγμονώδεις καταστάσεις ή ασθένειες, όπως αλλεργία, άσθμα, αθηροσκλήρωση, διαβήτη, νεφρικές παθήσεις, καρκίνο και περιοδοντίτιδα. Για να εμποδιστούν τα αρνητικά αποτελέσματα σημαντικοί είναι οι αναστολείς του PAF. Υπάρχουν οι φυσικοί, με σημαντικότερους τα γκινγκολίδια από το φυτό *Ginkgo biloba* και οι συνθετικής προέλευσης όπως οι CV-3988, CV-6209, ONO-6240, Ro 19-3704.

Η ρύθμιση των δράσεων του PAF επιτυγχάνεται επίσης με την καθημερινή λήψη αναστολέων PAF που καταναλώνονται μέσω της διατροφής μας. Από όλες τις δίαιτες, η μεσογειακή διατροφή αποτελείται από πολυάριθμα προϊόντα που ασκούν αυτή τη δράση όπως παρθένο ή κανονικό ελαιόλαδο, κρασί από σταφύλια, μέλι, ψάρια, γάλα και γιαούρτι (Nomikos, Fragopoulou, Antonopoulou & Panagiotakos, 2018).

Εκτός από τα μεσογειακά τρόφιμα, οι αναστολείς PAF μπορούν επίσης να βρεθούν σε πολλά άλλα προϊόντα όπως το σκόρδο, η σάλτσα σόγιας και το τσάι. Τελευταίο, αλλά εξίσου σημαντικό, είναι και η κουρκουμίνη η οποία ασκεί ισχυρή αντι-αιμοπεταλιακή δράση (Papakonstantinou, Lagopati, Tsilibary, Demopoulos, Philippopoulos, 2017).

6.3ADP

Η ADP (διφωσφορική αδενοσίνη) διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της θρόμβωσης και της αιμόστασης. Το ADP προκαλεί αλλαγή σχήματος και στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων με ταυτόχρονη ενεργοποίηση δύο υποδοχέων των P2Y₁ και P2Y₁₂. Η συγκέντρωση της ADP που απαιτείται για την αλλαγή του σχήματος είναι μικρότερη από αυτή που απαιτείται για τη συσσώρευση.

Οι θειενοπυριδίνες (τικλοπιδίνη και κλοπιδογρέλη) αναστέλλουν την προκαλούμενη από ADP συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Η αναστολή αυτή είναι δοσο-εξαρτώμενη και μη αντιστρεπτή (Foster et al., 2001).

6.4Κολλαγόνο

Το κολλαγόνο είναι το πιο θρομβογενές συστατικό του ενδοθηλίου. Μετά από αγγειακή βλάβη, το κολλαγόνο παίζει σημαντικό ρόλο στην αιμόσταση μέσω της δημιουργίας ενός φυσικού φραγμού στο σημείο της βλάβης, περιορίζοντας έτσι την απώλεια αίματος και με την ταυτόχρονη διέγερση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Ως αποτέλεσμα, αυξάνεται η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο σημείο της βλάβης και δημιουργείται ο θρόμβος (Roberts, McNicol & Bose, 2004).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να εξετάσει την επίδραση του υδατικού και του λιποειδικού εκχυλίσματος του κόκκινου κρασιού σε συγκεκριμένους μικροβιακούς πληθυσμούς του εντέρου (Ολικά βακτήρια, *Bacteroides* spp, *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group, *Akkermansia muciniphila* και *Bifidobacterium* spp) και την πιθανή πρεβιοτική δράση τους. Προηγήθηκε η ζύμωση σε *in vitro* στατικό πειραματικό μοντέλο των εκχυλισμάτων του κόκκινου κρασιού από τον εντερικό μικροβιόκοσμο εθελοντών με κανονικό βάρος και παχύσαρκων εθελοντών, ενώ παράλληλα εξετάστηκαν ως μάρτυρες οι φαινολικές ενώσεις κερκετίνη, ρεσβερατρόλη και γαλλικό οξύ.

Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

8.1Βιοηθική

Η παρούσα μελέτη έγινε με βάση τους κώδικες Βιοηθικής και δεοντολογίας για ανθρώπους, όπως ορίζει η Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής και η ελληνική νομοθεσία². Τηρήθηκε η Διακήρυξη του Ελσίνκι (1989) και οι συμμετέχοντες είχαν ενημερωθεί για τους σκοπούς της μελέτης και εγγράφως συναινέσει για την συμμετοχή τους σε αυτή. Το πρωτόκολλο της μελέτης αυτής εγκρίθηκε από την Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας Έρευνας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου (57/15-09-2017).

8.2Επιλογή των προς μελέτη υποστρωμάτων για την *in vitro* ζύμωση

Τα υποστρώματα, που χρησιμοποιήθηκαν για την *in vitro* ζύμωση είναι τα πρότυπα φαινολικά συστατικά (κερκετίνη, ρεσβερατρόλη, γαλλικό οξύ), τα εκχυλίσματα του κρασιού (υδατικό και λιποειδικό), καθώς και θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες που αξιοποιήθηκαν για τη διαδικασία. Οι συντομογραφίες τους αναφέρονται στον πίνακα IV προκειμένου να διευκολυνθεί η αναφορά τους.

Πίνακας IV. Ερμηνεία κωδικοποίησης υποστρωμάτων και μαρτύρων

ΕΡΜΗΝΕΙΑ	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ
Negative Control Αρνητικός μάρτυρας Βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς προσθήκη πηγής άνθρακα	N.C.
Inuline Ινουλίνη Θετικός μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση (Orafti® GR, BENEIO-Orafti, Oreya, Belgium) σε αναλογία 1% w/v	I
Resveratrol Ρεσβερατρόλη Τελική συγκέντρωση στο βασικό μέσο καλλιέργειας 10μg/ml	R
Quercetin Κερκετίνη Τελική συγκέντρωση στο βασικό μέσο καλλιέργειας 10μg/ml	Q
Gallic Acid Γαλλικό οξύ Τελική συγκέντρωση στο βασικό μέσο καλλιέργειας 10μg/ml	G.A.
Υδατικό εκχύλισμα κρασιού Τελική συγκέντρωση στο βασικό μέσο καλλιέργειας 5-10mg/15ml	W
Λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού	T.L.

² Κεφάλαιο Ε' (άρθρα 23 και 25) του Ν. 4521/2018 (ΦΕΚ τ. Α' 38/2-3- 2018)

Το κρασί που χρησιμοποιήθηκε ήταν ερυθρός οίνος από το κτήμα Χατζημιχάλη. Συγκεκριμένα: Ερυθρός, ξηρός οίνος του 2006, 750 ml (13,5% vol), κύρια ποικιλία Cabernet Sauvignon.

8.3 Δειγματοληψία και επεξεργασία κοπράνων (εμβολίου)

Η διαδικασία της *in vitro* ζύμωσης πραγματοποιήθηκε σε έξι επαναλήψεις για κάθε ένα υπόστρωμα, με εμβόλιο κοπράνων από έξι διαφορετικούς ενήλικους εθελοντές (ηλικίας 24-48 χρονών). Οι τρεις είχαν φυσιολογικό σωματικό βάρος και οι τρεις ήταν με παχύσαρκο φαινότυπο.

8.3.1 Χαρακτηριστικά εθελοντών

Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν 6 υγιείς άντρες και γυναίκες οι οποίοι χωρίστηκαν ανάλογα με το δείκτη μάζας σώματος τους σε δύο ομάδες, νορμοβαρείς και παχύσαρκοι.

Πίνακας V. Χαρακτηριστικά Δείγματος

ΕΘΕΛΟΝΤΗΣ	ΦΥΛΟ	ΗΛΙΚΙΑ	ΥΨΟΣ	ΒΑΡΟΣ	BMI	ΠΑΧΥΣΑΡΚΟΣ
1	ΘΗΛΥ	24	162	51,6	19,66	
2	ΑΡΡΕΝ	32	179	100,6	31,4	+
3	ΘΗΛΥ	28	158	53,1	21,27	
4	ΑΡΡΕΝ	30	176	68,2	22,02	
5	ΘΗΛΥ	40	160	97,2	37,97	+
6	ΘΗΛΥ	48	174	92	30,39	+

Τα κριτήρια αποκλεισμού είναι τα ίδια με αυτά που εφαρμόζονται σε όλες τις έρευνες που αφορούν τον εντερικό μικροβιόκοσμο ανθρώπων. Δεν συμπεριλήφθησαν άτομα:

- με προβλήματα του πεπτικού συστήματος (παραδείγματος χάριν ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι εντέρου, οξεία διάρροια τις προηγούμενες τέσσερις εβδομάδες, έντονη δυσκοιλιότητα)
- που έχουν χρόνια ή αυτοάνοσα νοσήματα (παραδείγματος χάριν ιστορικό στεφανιαίας νόσου, ιστορικό ηπατικών και νεφρικών παθήσεων, διαβήτη)
- που έχουν ενεργές λοιμώξεις του αναπνευστικού

- που έχουν λάβει κάποιο αντιβιοτικό ή αντιφλεγμονώδες φάρμακο τους τελευταίους 2 μήνες πριν την μελέτη
- που έχουν καταναλώσει προβιοτικά δύο εβδομάδες πριν τη μελέτη
- που ακολουθούν κάποια ακραία διαιτητική συμπεριφορά (παραδείγματος χάριν χορτοφαγία)
- γυναίκες που έχουν γεννήσει το τελευταίο έτος

8.3.2 Προετοιμασία εμβολίου

Σε πλαστικό προζυγισμένο συλλέκτη μεταφέρθηκε το δείγμα της κένωσης για κάθε εθελοντή ξεχωριστά και στη συνέχεια οδηγήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών (Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ.), σε χρονικό διάστημα όχι μεγαλύτερο των 2 ωρών (από την ώρα της κένωσης) για μικροβιολογικές αναλύσεις.

Η πλήρης κένωση: ζυγίζεται σε εργαστηριακό ζυγό με ακρίβεια 0.1g, διαλυτοποιείται σε διάλυμα PBS (20%w/v) (faecal slurry) και ομογενοποιείται μηχανικά στο Stomacher, με κινήσεις που προσομοιάζουν εκείνες του στομάχου υπό φυσιολογική ταχύτητα και μέχρι να καταστεί οπτικά ομοιογενές το εμβόλιο (περίπου 10-15sec).

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

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Olano-Martin, Mountzouris, Gibson, Rastall (2000) και Rycroft, Jones, Gibson, Rastall (2001) με μικρές τροποποιήσεις.

8.4.1 Παρασκευή Basal medium

Την προηγούμενη μέρα της *in vitro* ζύμωσης παρασκευάζεται το Basal medium, σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Rycroft et al. (2001), μετά από κάποιες τροποποιήσεις και το οποίο περιέχει:

- 2,0 g/L peptone water (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- 2,0 g/L yeast extract (Merck KGaA)
- 0.10 g/L NaCl
- 0.04 g/L K_2HPO_4
- 0.04 g/L KH_2PO_4
- 0.01 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 0.01 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- 2,0 g/L $NaHCO_3$
- 0,5 g/L L-cysteine HCl (Merck KGaA)

- 0,5 g/L αφυδατωμένη χολή (Oxgall™, BD and Company, Sparks, MD,USA)
- 0,005 g/L αιμίνη (διαλυμένη σε λίγες σταγόνες NaOH 1.0M) (Fluka, Sigma-Aldrich, Netherlands)
- 0,2g/L Tween® 80 (Pancreac Quimica SA, Barcelona, Spain)
- 10μl/L βιταμίνη K1 (Fluka, Sigma-Aldrich, Switzerland)

Σε δοχεία Durham όγκου 100ml μεταφέρονται 45ml του βασικού μέσου καλλιέργειας και το Basal Medium (βασικό μέσο καλλιέργειας) ρυθμίζεται στο pH 7.0 με HCl 1.0M. Ακολουθεί αποστείρωση του στους 121°C για 15 min. Μεταφορά του εντός αναερόβιου θαλάμου προκειμένου να προαναχθεί για περίπου 12 ώρες.

Θα παρασκευαστούν 2 Basal medium σύμφωνα με το πρωτόκολλο, με το δεύτερο να είναι τροποποιημένο κατάλληλα για τα πειράματα που θα ακολουθήσουν.

8.4.2 Προετοιμασία πριν την επώαση

Την ημέρα της *in vitro* ζύμωσης, ζυγίζονται και μεταφέρονται τα φαινολικά συστατικά στα δοχεία Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας, στον αναερόβιο θάλαμο. Οι τελικές συγκεντρώσεις των φαινολικών στο θρεπτικό μέσο επώασης θα είναι 10 μg/ml, δηλαδή 33,1 μM κερκετίνη, 43,9 μM ρεσβερατρόλη, 58,8 μM γαλλικό οξύ.

Σε ένα δοχείο Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας προστίθεται η προζυγισμένη ινουλίνη (θετικός μάρτυρας), ενώ περιλαμβάνεται και ένα δοχείο που περιέχει μόνο το βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς πηγή άνθρακα (αρνητικός μάρτυρας).

8.4.3 Εμβολιασμός και επώαση των καλλιιεργειών

Ακολουθεί ο ασηπτικός εμβολιασμός όλων των δοχείων με 10% (v/v) με το εμβόλιο κοπράνων (5ml faecal slurry σε 45 ml basal medium). Το μίγμα μοιράζεται μετά από καλή ανάδευση σε 3 falcons (15ml/falcon για τους χρόνους 0h, 6h, 24h). Οι στατικές καλλιέργειες επωάζονται μέσα στον αναερόβιο θάλαμο με βιδωμένα, χαλαρά καπάκια στους 37°C μέχρι 24h. Στους χρόνους 0h, 6h και 24h απομακρύνονται από τον αναερόβιο θάλαμο ένα falcon/δείγμα, προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι βιοχημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις (βιοχημικοί προσδιορισμοί, ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών, προσδιορισμός λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου). Συγκεκριμένα, μεταφέρονται από 1mL σε δύο eppendorfs για τη μέτρηση του πληθυσμού των μικροοργανισμών με απομόνωση DNA και στη συνέχεια φυλάσσονται στους -80°C. Επίσης,

μεταφέρεται 1mL σε eppendorf για τη μέτρηση λιπαρών οξέων μικρής αλύσου και στη συνέχεια φυλάσσονται στους -80°C.

Τέλος, μεταφέρονται 13mL σε 2 falcons των 15ml, για τις βιοχημικές αναλύσεις. Τα δείγματα αυτά φυγοκεντρώνται στις 3200 rpm για 40 min, στους 4°C. Το υπερκείμενο διηθείται από μικροβιολογικό ηθμό (2μ) και το διήθημα φυλάσσεται σε eppendorfs στους -80°C.

8.5 Απομόνωση DNA

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της μεθόδου Repeated Bead Beating Plus Column (Yu and Morrison 2004) κατόπιν τροποποιήσεών της για εφαρμογές στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο (Salonen et al., 2010).

8.5.1 Αρχή μεθόδου

Το πρωτόκολλο στηρίζεται στη συνδυαστική χρήση εμπορικών στηλών απομόνωσης DNA από κόπρανα (QIAmp DNA stool mini kit, Qiagen, Hilden, Germany) και μηχανικής λύσης με τη βοήθεια του οργάνου MiniBead Beater™ (Biospec products, USA). Η καθαρότητα και η τελική συγκέντρωση του DNA ελέγχονται φωτομετρικά στο μηχάνημα IMPLEN P330 με την χρήση του προγράμματος για dsDNA (double-stranded DNA).

Τα δείγματα μεταφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου και αφού ξεπαγώσουν αναδεύονται στον κυκλοαναδευτήρα (Vortex). Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 2000x g, για 5 min, στους 4 °C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και προστίθενται 1ml lysis buffer (500 mM NaCl, 50mM Tris-HCl με pH 8.0, 50mM EDTA και 4% SDS).

Μεταφορά σε screw cup tubes των 2ml με zirconia beads και ομογενοποίηση στο ομογενοποιητή Mini-Beadbeater™ (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) σε 4.800δονήσεις/λεπτό για 3min. Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 95°C για 15 min και φυγοκέντρωση στα 2000x g, για 5 min, στους 4°C. Απομάκρυνση του υπερκειμένου και μεταφορά στα eppendorfs των 2 ml. Προσθήκη 300μl lysis buffer και επανάληψη των προηγούμενων σταδίων (ομογενοποίηση, επώαση σε υδατόλουτρο, φυγοκέντρωση). Μεταφορά του υπερκειμένου στο αντίστοιχο που είχε παραληφθεί στο προηγούμενο στάδιο.

Ακολουθεί η καταβύθιση των νουκλεϊκών οξέων. Προστίθενται 260μl Οξικό Αμμώνιο 10M, ανάδευση στο Vortex για 15 sec, επώαση στον πάγο για 5min και φυγοκέντρωση στα 16000x g, για 10 min, στους 4°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ισομοιράζεται σε 2 eppendorfs των 1,5ml. Προστίθενται 650ml ισο-προπανόλη, αναδεύεται σε Vortex, επώάζεται για 30 min στον

πάγο και φυγοκεντρείται στα 16000x g, για 15 min, στους 4°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο, στο οποίο προστίθενται 1 ml 70% αιθανόλη. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 12000x g, για 2 min, στους 4°C. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και απορρίπτεται και με ανοικτά τα καπάκια αφήνονται τα eppendorfs σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για την εξάτμιση της αιθανόλης.

Προστίθενται 100μl Tris-EDTA buffer και γίνεται καλή αναδιάλυση. Μεταφορά των περιεχομένων σε ένα eppendorf για κάθε δείγμα.

Ακολουθεί η απομάκρυνση από το δείγμα του RNA και των πρωτεϊνών. Προστίθενται 2 μl RNase, ήπια ανάδευση και επώαση σε επωαστικό θάλαμο, στους 37°C, για 15min. Φυγοκέντρηση στα 2000x g. Προσθήκη 15μl πρωτεΐνάσης K (από το DNA kit) και ανάδευση σε Vortex.

Ακολουθεί ο καθαρισμός του δείγματος με τη χρήση του QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

8.6 Ποσοτικός προσδιορισμός με Real Time PCR

8.6.1 Αρχή μεθόδου

Στο πλαίσιο της μελέτης πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός μελών του εντερικού μικροβιόκοσμου με τη χρήση μοριακής προσέγγισης (quantitative PCR) στα δείγματα από τις στατικές καλλιέργειες (1ml), προκειμένου να διερευνηθούν τυχόν διαφοροποιήσεις ανάλογα με το υπόστρωμα και την παρουσία ή όχι του παχύσαρκου φαινότυπου. Συγκεκριμένα, με την εφαρμογή ποσοτικής PCR (qPCR) και τη χρήση κατάλληλων εκκινητών πραγματοποιήθηκε στο ολικό γενωμικό DNA των κοπράνων ο ποσοτικός προσδιορισμός ($\log_{10}$ copies/ml) των ολικών βακτηρίων, του γένους *Bifidobacterium*, του γένους *Bacteroides*, των βουτυροπαραγωγών *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* και του είδους *Akkermansia muciniphila*, προκειμένου να διερευνηθούν τυχόν ποσοτικές διαφοροποιήσεις στους προσδιοριζόμενους μικροοργανισμούς. Η επιλογή των μικροοργανισμών στηρίχτηκε στο ιδιαίτερο βιβλιογραφικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν στην περίπτωση της ζύμωσης των φαινολικών ενώσεων και των επιδράσεών τους στη μεταβολική υγεία (Queipo-Ortuño et al., 2012).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μικροοργανισμών πραγματοποιείται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων εκκινητικών μορίων (primers), που στοχεύουν πολύ συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου 16S rDNA εξειδικευμένες ως προς την κατηγορία των μικροοργανισμών που στοχεύουμε σε κάθε αντίδραση (πίνακας VI), με ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και μέτρηση της έντασης φθορισμού ο οποίος εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Οι αντιδράσεις qPCR πραγματοποιήθηκαν στο όργανο LightCycler®2.0 (Roche

Diagnosics GmbH, Germany) σε γυάλινα τριχοειδή (capillaries) με χρήση του μίγματος αντιδράσεων KAPA SYBR Fast Master Mix (2x) Universal Kit (Kapa Biosystems), το οποίο στηρίζεται στη τεχνολογία φθορισμού της χρωστικής SYBR Green. Σε κάθε αντίδραση (20μl) χρησιμοποιούνται 10μl του kit, 0,4μl ή 0,6μl του κάθε εκκινητή, 0,25μl BSA (Bovine serum Albumin, για αποφυγή της προσκόλλησης του μίγματος της αντίδρασης στα γυάλινα τριχοειδή), 5μl από το DNA-στόχο (αραιώσεις πρότυπου στελέχους ή δείγματα κοπράνων) και ανάλογη ποσότητα PCR-grade ύδατος. Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ενζύμου (πολυμεράση) στους 95°C για 3 min, την ενίσχυση του προϊόντος (45 κύκλοι) [αποδιάταξη DNA: 95°C για 3 s - υβριδισμός εκκινητών στην βέλτιστη θερμοκρασία για 20s – επιμήκυνση στους 72°C για το ελάχιστο δυνατό χρονικό διάστημα, βάσει του αναμενόμενου προϊόντος], την ανάλυση melting curves για την επιβεβαίωση της ειδικότητας των προϊόντων ενίσχυσης και τη ψύξη του οργάνου. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR (ενίσχυση του προϊόντος) προέκυψαν κατόπιν βελτιστοποίησης για την κάθε υπό εξέταση μικροβιακή ομάδα (Mitsou *et al.*, 2017).

ΠΙΝΑΚΑΣ VI. Εκκινητές και χαρακτηριστικά της ποσοτικής PCR (qPCR) των υπό εξέταση μικροοργανισμών της μελέτης

Στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Θερμοκρασία υβριδισμού (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πρότυπο στέλεχος	Παραπομπή
Total Bacteria (Universal)	Forward Reverse	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	60°C	466bp	<i>Bacteroides fragilis</i> MM44 (ATCC 25285)	Nadkarni <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacteroides</i> spp.	Bac303F Bfr-Fmrev	GAAGGTCCCCCACATTG CGCKACTTGGCTGGTTCAG	60°C	103bp	<i>Bacteroides fragilis</i> MM44 (ATCC 25285)	Ramirez-Farias <i>et al.</i> , 2009
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Forward Reverse	TCGCGTCYGGTGTGAAAG CCACATCCAGCRTCAC	58°C	243bp	<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20456	Rintillä <i>et al.</i> , 2004
<i>Roseburia</i> spp.- <i>Eubacterium rectale</i>	RrecF Rrec630mR	GCGGTRCGGCAAGTCTGA CCTCCGACACTCTAGTMCGAC	60°C	81bp	<i>Roseburia intestinalis</i> DSM 14610	Walker <i>et al.</i> , 2011
<i>Akkermansia muciniphila</i>	AM1 AM2	CAGCACGTGAAGGTGGGGAC CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT	60°C	327bp	<i>Akkermansia muciniphila</i> DSM 22959	Collado <i>et al.</i> , 2007; Collado <i>et al.</i> , 2008

Η ποσοτικοποίηση των βακτηρίων σε κάθε δείγμα υπολογίζεται βάσει της τιμής του Ct (threshold circle), η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των κύκλων της qPCR όπου ο φθορισμός του προϊόντος της PCR φτάνει στο κατώφλι ανίχνευσης καθώς είναι η μόνη φάση (log-linear phase) όπου η απόδοση της αντίδρασης PCR είναι σταθερή. Όσο λιγότεροι κύκλοι χρειάζονται για να

φτάσει ένα δείγμα στο δεδομένο επίπεδο φθορισμού (μικρότερο Ct) τόσο μεγαλύτερη η ποσότητα του DNA-στόχου στο αρχικό δείγμα. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των βακτηρίων σε κάθε δείγμα κοπράνων γίνεται μέσω πρότυπων καμπύλων αναφοράς, όπου δίνεται η γραμμική συσχέτιση του δεκαδικού λογάριθμου των αντιγράφων (copies) του γονιδίου του 16S rRNA στο πρότυπο μικροοργανισμό και των αντίστοιχων τιμών Ct. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (101 έως 107 copies) των κατάλληλων βακτηριακών στελεχών αναφοράς σε κάθε περίπτωση. Οι καμπύλες αναφοράς παράγονται κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες που χρησιμοποιούνται και στο ολικό DNA των κοπράνων. Η συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων για την παραγωγή των καμπύλων αναφοράς επιτυγχάνεται με τη χρήση του λογισμικού LCS4 4.1.1.2 (Roche Diagnostics GmbH), με αποδεκτό εύρος απόδοσης το 1.8 με 2.0. Τα τελικά αποτελέσματα εκφράζονται ως «δεκαδικός λογάριθμος των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου/ml δείγματος» (log10 copies / ml δείγματος).

8.7 Μέθοδος Bligh and Dyer

8.7.1 Αρχή μεθόδου

Μέθοδος όπου περιλαμβάνει αρχικά την ανάμειξη ενός δείγματος με ένα σύστημα διαλυτών όπου η αναλογία τους, συνυπολογιζόμενου του νερού στο δείγμα, είναι χλωροφόρμιο, μεθανόλη, νερό 1:2:0,8 v/v/v και σχηματισμό ενός μονοφασικού συστήματος ώστε να πραγματοποιηθεί εκχύλιση όλων των λιποειδών του δείγματος. Ακολουθεί προσθήκη χλωροφορμίου και νερού ώστε να σχηματιστεί διφασικό σύστημα με αναλογία χλωροφόρμιο, μεθανόλη, νερό 1:1:0,9 v/v/v. Με αυτόν τον τρόπο κάθε υδατοδιαλυτή ουσία θα βρίσκεται στην υδατική φάση και τα λιποειδή στην χλωροφορμική φάση.

8.7.2 Εξοπλισμός

- Flash evaporator
- Ζυγός Kern ACT/ACS 220-4M, Kern & Sohn GmbH
- Λυοφιλοποιητής Heto LyoLab 3000, hermo Fisher Scientific
- Speed vac CentricVap Concentrator Labconco

8.7.3 Αναλώσιμα-Υλικά

- 2 διαχωριστικές χοάνες των 250ml
- Σιφόνια μέτρησης των 2ml, 5ml, 10ml
- Πουάρ Τριών Βαλβίδων

- Προ-ζυγισμένοι ουροσυλλέκτες
- Υάλινοι βιδωτοί σωλήνες
- Eppendorfs
- Προ-ζυγισμένες σφαιρικές φιάλες των 250ml
- Αλουμινόχαρτο
- Parafilm tape
- Αυτόματη πιπέτα μεταβλητού όγκου των 2 ml
- Μπλε tips

8.7.4 Αναλυτική πορεία

- Σε δύο διαχωριστικές χοάνες μεταφέρεται 15ml basal medium και η τροποποιημένη μορφή του
- Προστίθενται 18,8ml χλωροφορμίου, 37,5ml μεθανόλη
- Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται σε ηρεμία για περίπου 10min
- Προστίθενται 18,7ml χλωροφορμίου, 18,8ml H₂O
- Ισχυρή ανάδευση
- Αφήνεται σε ηρεμία για 2 ώρες
- Σε προ-ζυγισμένες φιάλες συγκεντρώνεται η κάτω φάση (χλωροφορμική)
- Απορρίπτεται η μεσόφαση
- Σε άλλες δύο προ-ζυγισμένες φιάλες συγκεντρώνεται η πάνω φάση (υδατική)
- Πραγματοποιείται εξάτμιση των δειγμάτων της υδατικής φάσης στο flash evaporator
- Πραγματοποιείται εξάτμιση των δειγμάτων της χλωροφορμικής φάσης στο flash evaporator
- Ξανα-ζυγίζονται οι φιάλες
- Μεταφορά υδατικής φάσης σε προ-ζυγισμένους ουροσυλλέκτες
- Μεταφορά χλωροφορμικής φάσης σε προ-ζυγισμένους βιδωτούς σωλήνες με 2mL διαλύτη χλωροφόρμιο:μεθανόλη 1:1
- Τοποθετούνται οι βιδωτοί σωλήνες σε speed vac στους 30°C για να μειωθεί ο όγκος τους
- Φυλάσσονται με προσθήκη αλουμινόχαρτου και parafilm στους -20°C
- Μεταφορά υδατικής φάσης για λυοφιλοποίηση
- Αναμονή για 2 ημέρες
- Παραλαβή υδατικής φάσης και ζύγιση ουροσυλλεκτών
- Μεταφέρονται 500μl νερό (ή και ακόμα 500μl αν χρειαστεί)
- Μεταφορά της υδατικής φάσης σε eppendorfs

- Ψύξη στους -20° C

8.8 Μέτρηση της αντι-αιμοπεταλιακής ικανότητας του δείγματος με τη μέθοδο της οπτικής διαπερατότητας σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

8.8.1.Χαρακτηριστικά εθελοντών

Οι 3 εθελόντριες ήταν υγιείς και η λήψη του αίματος έγινε μετά από νηστεία τουλάχιστον 8 ωρών και αποφυγή κατανάλωσης παρακεταμόλης τουλάχιστον ενός μηνός πριν την ημέρα αιμοδοσίας.

8.8.2Αρχή μεθόδου

Στόχος είναι ο προσδιορισμός της ικανότητας του δείγματος να προλαμβάνει την συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε ανθρώπινο πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP, platelet-rich-plasma), παρουσία γνωστών παραγόντων πήξης του αίματος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μελετήθηκαν οι αγωνιστές ADP, PAF και κολλαγόνο. Η συσσώρευση εξαρτάται από τη διαπερατότητα δέσμης φωτός από την κυψελίδα που βρίσκεται το προς μελέτη δείγμα.

8.8.3Εξοπλισμός

- Φυγόκεντρος Hermle Z320 Berthold Hermie GmbH & Co
- Συσσωρευματομέτρο CHRONO-LOG® Platelet Aggregometer
- Φασματοφωτόμετρο

8.8.4Αναλώσιμα-Υλικά

- Falcon των 50ml και των 15ml με βιδωτό πώμα
- Κίτρινα tips
- Μικροί μαγνητικοί αναδευτήρες
- Κυψελίδες (cuvettes) των 0,5ml

8.8.5Αντιδραστήρια

- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικού AC (citrate acid)

8.8.6 Αναλυτική πορεία

- Παραλαβή 52ml αίματος εθελοντών
- Αποθήκευση σε Falcon των 15ml με βιδωτό πώμα που περιέχουν αντιπηκτικό διάλυμα AC σε αναλογία αίμα/αντιπηκτικό 10/1
- Ανακίνηση μερικές φορές με αποφυγή βίαιων-έντονων κινήσεων
- Φυγοκέντρωση στις 1300 rpm (στροφές), για 16 λεπτά, χωρίς φρένα
- Παραλαμβάνεται προσεκτικά, χωρίς απότομες κινήσεις το υπερκείμενο (Platelet-rich plasma, PRP)
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε Falcon των 50ml και το PRP αφέθηκε στον πάγκο έως ότου παραληφθεί και το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (Platelet-poor plasma, PPP)
- Φυγοκέντρωση ξανά των αρχικών σωληνάρων στις 3000rpm (στροφές), για 15 λεπτά, με φρένα
- Μεταφορά του PPP σε Falcon των 50ml
- Φωτομέτρηση στα 530nm των PRP. Αν είναι διαφορετική από 0,8 (η οποία αντιστοιχεί σε 500.000 αιμοπετάλια/ μ L) προστίθενται PRP από τον ίδιο εθελοντή μέχρι να επιτευχθεί η ένδειξη 0,8.
- Μεταφέρονται 250 μ l PRP στις κυψελίδες (cuvettes) στις κατάλληλες θέσεις και PPP στις αντίστοιχες θέσεις. Το PPP χρησιμοποιείται ως τυφλό
- Στις κυψελίδες με το PRP προστίθενται και οι μικροί μαγνητικοί αναδευτήρες
- Επώαση στους 37°C για 10min
- Προσθήκη μετά από 5min συγκεκριμένης ποσότητας και συγκέντρωσης αγωνιστή (PAF, ADP, κολλαγόνο)
- Καλιμπράρισμα για μηδενισμό όταν απαιτείται
- Καταγράφονται κάθε φορά: το ύψος (amplitude), κλίση (slope), εμβαδό κάτω από την καμπύλη που έχει σχηματιστεί (area under the curve) και η περίπτωση που παρατηρηθούν δύο πτώσεις στην καμπύλη (1st Wave)

8.9 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών στα εξεταζόμενα δείγματα (μάρτυρες, πρότυπα φαινολικών, εκχυλίσματα κρασιού) βασίστηκε στις διαμέσους ή στις μέσες τιμές των δεκαδικών λογαρίθμων των αντιγράφων του 16S γονιδίου/ml δείγματος ($\log_{10}$ copies/ml δείγματος). Οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν για το σύνολο των εθελοντών ($n=6$), καθώς και μεταξύ φυσιολογικού βάρους ($n=3$) και εθελοντών με παχύσαρκο φαινότυπο ($n=3$). Ο έλεγχος κανονικότητας πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο Kolmogorov-Smirnov. Η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών μεταξύ των εξεταζόμενων δειγμάτων για τις χρονικές στιγμές 0h και 24h πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο Kruskal-Wallis για μη παραμετρικά δεδομένα. Η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών εντός του κάθε δείγματος για τις χρονικές στιγμές 0h και 24h πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο Wilcoxon για εξαρτημένα δείγματα (Wilcoxon paired-samples test). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% ($p<0.05$). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα IBM® SPSS® Statistics version 21.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9.1 Χαρακτηριστικά των εθελοντών

Στη μελέτη αυτή πήραν μέρος 6 ενήλικες, από τους οποίους οι δύο ήταν άνδρες και τέσσερις γυναίκες. Οι εθελοντές επιλέχθηκαν ώστε οι τρεις να έχουν κανονικό βάρος (BMI: 18,5-24,99 kg/m²) και οι υπόλοιποι τρεις να είναι παχύσαρκοι (BMI ≥ 30 kg/m²). Τα περιγραφικά χαρακτηριστικά των εθελοντών παρουσιάζονται στον Πίνακα VII, που ακολουθεί.

Πίνακας VII. Περιγραφικά στοιχεία των εθελοντών

ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	ΣΥΝΟΛΟ (n=6)	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ BMI (n=3)	ΠΑΧΥΣΑΡΚΟΙ (n=3)	p-value
Φύλο(άντρας/γυναίκα)	2/4	1/2	1/2	1.000
Ηλικία (yr)	31,00 (27,00-42,00)	28,00 (26,00-29,00)	40,00 (36,00-44,00)	0,050
Βάρος (kg)	80,10 (52,73-98,05)	53,10 (52,35-60,65)	97,20 (94,60-98,90)	0,050
Ύψος (cm)	168,00 (159,50-176,75)	162,00 (160,00-169,00)	174,00 (167,00-176,50)	0,513
BMI (kg/m ²)	26,21 (20,87-33,04)	21,27 (20,47-21,65)	31,40 (30,90-34,69)	0,050

9.2 *In vitro* ζύμωση των φαινολικών υποστρωμάτων

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η προσθήκη των διαφορετικών υποστρωμάτων και εμβολιάστηκαν με το εμβόλιο κοπράνων από τον κάθε εθελοντή (t=0). Τα υποστρώματα ήταν τα πρότυπα φαινολικά συστατικά, κερκετίνη, ρεσβερατρόλη, γαλλικό οξύ και, το υδατικό και το λιποειδικό εκχύλισμα του κρασιού, καθώς και ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ινουλίνη που είναι γνωστή για την πρεβιοτική της δράση σε αναλογία 1% w/v και ως αρνητικός μάρτυρας το βασικό υπόστρωμα ένα θρεπτικό μέσο χωρίς όμως πηγή άνθρακα. Πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις στο πείραμα με όλα τα υποστρώματα, μία για κάθε εθελοντή, έγινε δειγματοληψία κάθε φορά στους χρόνους t=0h και t=24h για κάθε υπόστρωμα και ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών μέσω της ποσοτικής PCR (qPCR) στους χρόνους t=0h και t=24h. Τα αποτελέσματα των μικροβιακών πληθυσμών παρουσιάζονται σε λογαριθμική μορφή των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου (log₁₀copies16S-rRNA /ml δείγματος).

Πίνακας VIII. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών πριν την έναρξη της ζύμωσης (n=6)

GM	ΣΥΝΟΛΟ (n=6)	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟ BMI (n=3)	ΠΑΧΥΣΑΡΚΟΙ (n=3)	p- value
Ολικά βακτήρια	9,95 (9,77-10,06)	9,77 (9,77-9,82)	9,76 (9,63-9,89)	0,148
<i>Bifidobacterium</i> spp	8,42 (8,09-9,06)	9,13 (9,10-9,15)	9,06 (9,05-9,12)	<0,001
<i>Bacteroides</i> spp	9,27 (9,17-9,40)	8,86 (8,85-8,88)	8,95 (8,87-9,04)	0,068
<i>Roseburia</i> spp.- <i>Eubacterium</i> <i>rectale</i> group	8,18 (7,94-8,43)	7,95 (7,93-7,97)	7,91 (7,81-7,97)	0,473
<i>Akkermansia muciniphila</i>	3,20 (3,05-6,11)	5,60 (3,07-8,15)	3,10 (3,05-5,23)	0,092

Τα αποτελέσματα των μικροβιακών πληθυσμών παρουσιάζονται σε λογαριθμική μορφή των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου (log10copies16S-rRNA /ml δείγματος)

Παρατηρείται ότι η ομάδα των παχύσαρκων εθελοντών έχει στατιστικά χαμηλότερα επίπεδα *Bifidobacterium* spp σε σχέση με αυτούς με φυσιολογικό BMI ($p<0,001$) καθώς και τάση για χαμηλότερα επίπεδα *Akkermansia muciniphila*, ($p=0,092$) και υψηλότερα επίπεδα *Bacteroides* spp ($p=0,068$).

9.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών του συνόλου των εθελοντών (n=6) κατά την έναρξη της ζύμωσης (t=0)

Πίνακας ΙΧ. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών κατά την έναρξη της (n=6 και t=0)

Υποστρώματα	NC	INU	R	Q	GA	W	TL	p-Value
GM								
Ολικά βακτήρια	10,06 (9,75-10,16)	10,02 (9,78-10,09)	9,93 (9,73-10,04)	9,87 (9,83-10,16)	9,89 (9,69-10,07)	9,97(9,55-10,05)	9,83 (9,76-9,98)	0,835
<i>Bifidobacterium</i> spp							8,26(8,05-9,06)	0,990
	8,37 (8,15-9,08)	8,41 (7,86-8,81)	8,45 (7,99-8,98)	8,48 (8,11-9,14)	8,34 (7,97-9,06)	8,34(7,99-9,07)		
<i>Bacteroides</i> spp	9,27(9,14-9,39)	9,26 (9,11-9,42)	9,20 (9,09-9,41)	9,34 (9,11-9,44)	9,27(9,02-9,38)	9,27(9,12-9,47)	9,27 (9,16-9,36)	0,979
<i>Roseburia</i> spp.-								0,988
<i>Eubacterium rectale</i> group	8,30 (7,17-8,47)	8,11(7,15-8,55)	8,04(7,17-8,44)	8,15 (7,25-8,50)	8,08(7,17-8,57)	8,21(6,99-8,50)	8,12(7,17-8,47)	
<i>Akkermansia muciniphila</i>	4,29 (2,92-7,44)	3,21 (2,84-6,78)	4,08 (3,08-7,33)	4,19 (3,07-7,43)	3,94(3,01-7,18)	4,12(3,07-7,56)	3,01(2,73-6,71)	0,969

Τα αποτελέσματα των μικροβιακών πληθυσμών παρουσιάζονται σε λογαριθμική μορφή των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου (log10copies16S-rRNA /ml δείγματος).**NC**(negative control):Αρνητικός Μάρτυρας, **INU**(inuline):Θετικός Μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση σε αναλογία 1% w/v,**R**:Πεσβερατρόλη,**Q**:Κερκετίνη,**G.A.**:Γαλλικό οξύ,**W**:Υδατικό εκχύλισμα κρασιού,**TL**: Λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού

Δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των μικροβιακών πληθυσμών στα διαφορετικά υποστρώματα κατά την έναρξη της ζύμωσης.

9.3.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών του συνόλου των εθελοντών (n=3) με φυσιολογικό BMI στον αρχικό χρόνο δειγματοληψίας (t=0)

Πίνακας X. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για τους εθελοντές με φυσιολογικό BMI (n=3) στην έναρξη της ζύμωσης (t=0)

Υποστρώματα	NC	INU	R	Q	GA	W	TL	p-Value
GM								
Ολικά βακτήρια	10,12 (9,77-10,15)	10,01 (9,79-10,19)	9,98 (9,77-10,18)	10,09 (9,86-10,37)	10,00 (9,76-10,13)	9,94 (9,49-10,03)	9,85 (9,80-9,95)	0,812
<i>Bifidobacterium</i> spp	9,07 (8,20-9,11)	8,69 (8,32-9,18)	8,93 (8,42-9,13)	9,14 (8,49-9,17)	9,05 (8,25-9,09)	9,06 (8,01-9,09)	9,06 (8,08-9,06)	0,902
<i>Bacteroides</i> spp	9,24 (8,86-9,30)	9,11 (9,10-9,41)	9,17 (8,84-9,40)	9,29 (8,89-9,49)	9,33 (8,79-9,53)	9,24 (8,95-9,29)	9,26 (8,92-9,28)	0,989
<i>Roseburia</i> spp.- <i>Eubacterium rectale</i> group	8,25 (7,91-8,42)	8,03 (7,96-8,53)	8,11 (7,95-8,50)	8,18 (7,99-8,63)	8,17 (7,91-8,59)	8,21 (7,70-8,47)	8,07 (7,95-8,43)	0,998
<i>Akkermansia muciniphila</i>	8,48 (2,14-8,18)	5,74 (2,41-8,33)	5,65 (2,38-8,21)	5,63 (2,33-8,27)	5,48 (2,23-8,14)	5,73 (2,32-8,39)	5,58 (2,26-8,23)	0,873

Τα αποτελέσματα των μικροβιακών πληθυσμών παρουσιάζονται σε λογαριθμική μορφή των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου (log10copies16S-rRNA /ml δείγματος).**NC**(negative control):Αρνητικός Μάρτυρας, **INU**(inuline):Θετικός Μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση σε αναλογία 1% w/v,**R**:Ρεσβερατρόλη,**Q**:Κερκετίνη,**G.A.**:Γαλλικό οξύ,**W**:Υδατικό εκχύλισμα κρασιού,**TL**: Λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού

Δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των μικροβιακών πληθυσμών στα διαφορετικά υποστρώματα κατά την έναρξη της ζύμωσης.

9.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών των παχύσαρκων εθελοντών (n=3) στον αρχικό χρόνο δειγματοληψίας (t=0)

Πίνακας XI. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για τους παχύσαρκους εθελοντές (n=3) στην έναρξη της ζύμωσης (t=0)

Υποστρώματα	NC	INU	R	Q	GA	W	TL	p-Value
GM								
Ολικά βακτήρια	9,99 (9,68-10,19)	10,03 (9,75-10,06)	9,87 (9,63-9,99)	9,84 (9,80-9,88)	9,77 (9,45-10,05)	10,01 (9,57-10,08)	9,80 (9,63-10,07)	0,931
<i>Bifidobacterium bifidum</i> spp	8,26 (8,03-8,49)	7,89 (7,78-8,50)	8,11 (7,64-8,49)	8,24 (7,72-8,48)	8,10 (7,58-8,43)	8,16 (7,92-8,52)	8,12 (7,95-8,39)	0,959
<i>Bacteroides</i> spp	9,35 (9,23-9,51)	9,29 (9,22-9,45)	9,21 (9,18-9,43)	9,39 (9,19-9,42)	9,26 (9,10-9,27)	9,47 (9,17-9,47)	9,34 (9,24-9,41)	0,783
<i>Roseburia</i> spp.- <i>Eubacterium rectale</i> group	8,35 (4,94-8,60)	8,20 (4,73-8,63)	7,96 (4,81-8,42)	8,12 (5,05-8,46)	7,97 (4,95-8,56)	8,20 (4,85-8,57)	8,18 (4,79-8,42)	0,987
<i>Akkermansia muciniphila</i>	4,29 (2,32-6,26)	3,04 (2,64-5,29)	4,01 (2,29-5,84)	4,16 (2,29-6,07)	3,94 (2,33-5,71)	4,10 (2,30-6,00)	2,99 (2,46-5,25)	0,829

Τα αποτελέσματα των μικροβιακών πληθυσμών παρουσιάζονται σε λογαριθμική μορφή των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου (log10copies16S-rRNA /ml δείγματος). **NC**(negative control):Αρνητικός Μάρτυρας, **INU**(inuline):Θετικός Μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση σε αναλογία 1% w/v,**R**:Ρεσβερατρόλη,**Q**:Κερκετίνη,**G.A.**:Γαλλικό οξύ,**W**:Υδατικό εκχύλισμα κρασιού,**TL**: Λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού

Δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των μικροβιακών πληθυσμών (εμβόλιο) στα διαφορετικά υποστρώματα κατά την έναρξη της ζύμωσης.

9.4 Ποσοτικός προσδιορισμός μικροβιακών πληθυσμών του συνόλου των εθελοντών (n=6) στις (t=24 ώρες)

Πίνακας XII. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για το σύνολο των εθελοντών (n=6 και t=24h)

Υποστρώματα	NC	INU	R	Q	GA	W	TL	p-Value
GM								
Total bacteria	9,84(7,71-9,86)	10,09(9,75-10,29) [*]	9,76(9,57-9,99)	9,74(9,56-9,90) ⁺	9,84(9,67-10,01)	9,72(9,59-9,79)	9,54(9,35-9,75) ⁺	0,140
<i>Bifidobacterium</i> spp	8,29(8,03-8,97)	9,28(8,60-9,87) [*]	8,30(7,98-8,69) ⁺	8,29(7,93-8,79) ⁺	8,35(8,04-8,95) ⁺	8,17(7,95-8,76) ⁺	8,27(7,91-8,76) ⁺	0,136
<i>Bacteroides</i> spp	8,92(8,65-9,03)	9,57(9,00-9,71) [*]	9,13(8,33-9,31) ⁺	9,05(8,44-9,21) ⁺	9,01(8,61-9,21) ⁺	8,98(8,89-9,07) ⁺	8,62(8,33-9,06) ⁺	0,200
<i>Roseburia</i> spp.- <i>Eubacterium rectale</i> group	6,95(6,15-7,09)	7,55(6,64-7,91) [*]	6,94(5,94-7,35)	6,98(5,92-7,25)	7,07(5,80-8,00)	7,02(5,94-7,15)	6,51(5,62-7,07) ⁺	0,336
<i>Akkermansia muciniphila</i>	4,44(3,56-7,59)	2,62(1,99-6,62)	4,54(3,31-7,33)	4,64(3,20-7,35)	4,62(3,31-7,13)	4,26(3,26-7,37)	3,28(2,95-5,58)	0,675

Τα αποτελέσματα των μικροβιακών πληθυσμών παρουσιάζονται σε λογαριθμική μορφή των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου (log10copies16S-rRNA /ml δείγματος).**NC**(negative control):Αρνητικός Μάρτυρας, **INU**(inuline):Θετικός Μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση σε αναλογία 1% w/v,**R**:Ρεσβερατρόλη,**Q**:Κερκετίνη,**G.A.**:Γαλλικό οξύ,**W**:Υδατικό εκχύλισμα κρασιού,**TL**: Λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού

- * Σημαντική διαφορά σε σχέση με το N.C.
- + Σημαντική διαφορά σε σχέση με την INU

Γενικά δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για το σύνολο των εθελοντών για t=24h.

Σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών στις 24 ώρες, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (N.C.)

Κατά τη ζύμωση της ινουλίνης παρατηρήθηκε ότι τα Ολικά βακτήρια ($p=0.078$) και ο πληθυσμός του *Bacteroides* spp. ($p=0.055$), εμφάνισαν τάση να είναι υψηλότερα σε σχέση με τους αντίστοιχους στον αρνητικό μάρτυρα (NC). Αντίστοιχα, το *Bifidobacterium* spp ($p=0.037$) και το *Roseburia* spp. – *Eubacterium rectale* group ($p=0.037$) ήταν σημαντικά υψηλότεροι οι πληθυσμοί τους σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, την ίδια χρονική στιγμή.

Σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών στις 24 ώρες, σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (INU)

Παρατηρείται ότι μετά την 24ωρη ζύμωση των υποστρωμάτων, τα Ολικά βακτήρια παρουσίασαν τάση να είναι χαμηλότερα στη κερκετίνη ($p=0.078$), στο υδατικό εκχύλισμα του κρασιού ($p=0.055$), ενώ ήταν σημαντικά πιο χαμηλά στο λιποειδικό εκχύλισμα του κρασιού ($p=0.037$), από τους αντίστοιχους πληθυσμούς που καταμετρήθηκαν στη ζύμωση της ινουλίνης.

Αντίστοιχα, ο πληθυσμός του *Bifidobacterium* spp. ήταν σημαντικά μικρότερος στη ρεσβερατρόλη ($p=0.016$), στη κερκετίνη ($p=0.025$), στο γαλλικό οξύ ($p=0.037$), στο υδατικό εκχύλισμα ($p=0.025$) και στο λιποειδικό εκχύλισμα του κρασιού ($p=0.025$), σε σχέση με την ινουλίνη.

Ο πληθυσμός του *Bacteroides* spp. είχε τάση να είναι χαμηλότερος στη ρεσβερατρόλη ($p=0.078$), στη κερκετίνη ($p=0.078$) και στο υδατικό εκχύλισμα του κρασιού ($p=0.078$), ενώ ήταν σημαντικά μικρότερος από την ινουλίνη στο λιποειδικό εκχύλισμα του κρασιού ($p=0.025$).

Τέλος, το *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group παρουσίασε μετά τη ζύμωσή του στις 24 ώρες, τάση για χαμηλότερη τιμή στο υδατικό εκχύλισμα του κρασιού ($p=0.055$) και σημαντικά μικρότερη τιμή στο λιποειδικό εκχύλισμα ($p=0.037$), σε σχέση με την ινουλίνη, την ίδια χρονική στιγμή.

9.4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών των εθελοντών (n=3) με φυσιολογικό BMI (n=3) στον τελικό χρόνο δειγματοληψίας (t=24)

Πίνακας XIII. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για τους εθελοντές με φυσιολογικό BMI (n=3) στις t=24h

Υποστρώματα	NC	INU	R	Q	GA	W	TL	p-Value
GM								
Total bacteria	9,86(9,75-9,87)	10,03(9,40-10,14)	9,61(9,50-9,92)	9,65(9,30-9,85)	9,82(9,72-10,00)	9,73(9,71-9,78)	9,35(9,33-9,65) [*]	0,251
<i>Bifidobacterium</i> spp	8,89(8,23-9,21)	9,43(9,13-9,93)	8,59(8,04-9,00) ⁺	9,75(9,95-8,90) ⁺	8,91(8,15-9,07) ⁺	8,70(7,86-8,93) ⁺	8,75(7,89-8,77) ⁺	0,204
<i>Bacteroides</i> spp	8,69(8,54-8,93)	9,11(8,65-9,66)	8,38(8,16-8,25)	8,44(8,41-9,13)	8,72(8,28-9,18)	8,90(8,87-8,97)	8,40(8,12-8,54) ^{+*}	0,376
<i>Roseburia</i> spp.- <i>Eubacterium rectale</i> group	7,09(6,67-7,09)	7,38(7,18-7,73) [*]	6,82(6,42-7,66)	9,98(6,33-7,47)	7,04(6,20-7,39)	7,12(6,51-7,14) ⁺	6,34(5,82-6,68) ⁺	0,287
<i>Akkermansia muciniphila</i>	5,95(2,66-8,04)	5,29(1,96-7,90)	5,75(2,68-7,87)	5,79(2,74-7,81)	5,66(2,76-7,58)	5,75(2,54-7,87)	3,42(3,14-6,10)	0,903

Τα αποτελέσματα των μικροβιακών πληθυσμών παρουσιάζονται σε λογαριθμική μορφή των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου (log10copies16S-rRNA /ml δείγματος).**NC**(negative control):Αρνητικός Μάρτυρας, **INU**(inuline):Θετικός Μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση σε αναλογία 1% w/v,**R**:Ρεσβερατρόλη,**Q**:Κερκετίνη,**G.A.**:Γαλλικό οξύ,**W**:Υδατικό εκχύλισμα κρασιού,**TL**: Λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού

+ Σημαντική διαφορά σε σχέση με την INU

* Σημαντική διαφορά σε σχέση με το N.C.

Γενικά δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για το σύνολο των εθελοντών με φυσιολογικό BMI για t=24

Σύγκριση με θετικό μάρτυρα την ινουλίνη (INU)

Παρατηρούμε ότι ο πληθυσμός του *Bifidobacterium* spp. είναι σημαντικά χαμηλότερος μετά τη ζύμωση της ρεσβερατρόλης, της κερκετίνης, του γαλλικού οξέος, του υδατικού εκχυλίσματος και του λιποειδικού εκχυλίσματος του κρασιού, σε σχέση με την ινουλίνη ($p=0,50$ και για τα τρία). Ο πληθυσμός του *Bacteroides* spp. είναι σημαντικά χαμηλότερος στο λιποειδικό εκχύλισμα του κρασιού σε σχέση πάντα με την ινουλίνη ($p=0.050$), ενώ ο πληθυσμός του *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group διαμορφώνεται σε χαμηλότερα επίπεδα μετά τη ζύμωση και των δύο εκχυλισμάτων του κρασιού ($p=0.050$ και για τα δύο).

Σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (N.C.)

Η ινουλίνη δεν έχει διαφοροποίηση από τον αρνητικό μάρτυρα σε όλους τους μικροοργανισμούς εκτός από τα *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group όπου είναι σημαντικά υψηλότερα τα επίπεδα για την ινουλίνη ($p=0,050$). Επίσης, μόνο το λιποειδικό εκχύλισμα του κρασιού παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερους τους πληθυσμούς για τα ολικά βακτήρια και το *Bacteroides* spp ($p=0,050$ και στα δύο), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα..

9.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών των παχύσαρκων εθελοντών (n=3) στον τελικό χρόνο δειγματοληψίας (t=24)

Πίνακας XIV. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για τους παχύσαρκους εθελοντές (n=3) στις t=24h

Υποστρώματα	NC	INU	R	Q	GA	W	TL	p-Value
GM								
Total bacteria	9,82(9,60-9,86)	10,22(9,86-10,48) *	9,98(9,59-10,03)	9,83(9,64-10,06)	9,86(9,52-10,02)	9,61(9,51-9,82) +	9,70(9,43-9,88)	0,298
<i>Bifidobacterium</i> spp	8,06(7,93-8,35)	8,61(8,54-9,84) *	8,09(7,80-8,51) +	8,09(7,89-8,49) +	8,10(7,87-8,56)	8,03(7,99-8,31) +	8,04(7,91-8,49) +	0,315
<i>Bacteroides</i> spp	8,97(8,91-9,22)	8,64(9,49-9,84) *	9,29(9,01-9,35) +	9,15(9,97-9,38) +	9,07(8,95-9,27) +	9,03(8,99-9,20) +	9,00(8,71-9,24) +	0,129
<i>Roseburia</i> spp.- <i>Eubacterium rectale</i> group	6,91(4,57-6,99)	7,78(5,02-8,30)	7,06(4,46-7,24)	6,99(4,67-7,18)	7,11(4,58-9,85)	6,92(4,23-7,21)	7,05(5,01-7,14)	0,765
<i>Akkermansia muciniphila</i>	4,44(2,70-5,71)	2,36(1,63-5,27)	4,37(2,42-5,94)	4,33(2,28-6,01)	4,38(2,39-6,64)	4,18(2,42-5,65)	3,10(2,48-5,41)	0,717

Τα αποτελέσματα των μικροβιακών πληθυσμών παρουσιάζονται σε λογαριθμική μορφή των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου (log10copies16S-rRNA /ml δείγματος).**NC**(negative control):Αρνητικός Μάρτυρας, **INU**(inuline):Θετικός Μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση σε αναλογία 1% w/v,**R**:Ρεσβερατρόλη,**Q**:Κερκετίνη,**G.A.**:Γαλλικό οξύ,**W**:Υδατικό εκχύλισμα κρασιού,**TL**: Λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού

+ Σημαντική διαφορά σε σχέση με την INU

* Σημαντική διαφορά σε σχέση με το N.C.

Αρχικά δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για το σύνολο των παχύσαρκων εθελοντών για t=24

Σύγκριση με θετικό μάρτυρα την ινουλίνη (INU)

Ο πληθυσμός των Ολικών βακτηρίων ήταν σημαντικά μικρότερος, σε σχέση με την ινουλίνη, μόνο στο υδατικό εκχύλισμα του κρασιού ($p=0.050$). Παρόμοια, ο πληθυσμός του *Bifidobacterium* spp. ήταν σημαντικά μικρότερος, σε σχέση με την ινουλίνη, για τη ρεσβερατρόλη, την κερκετίνη, το υδατικό και το λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού ($p=0,050$ για όλα). Αντίθετα, ο πληθυσμός του *Bacteroides* spp παρέμεινε σημαντικά υψηλότερος για όλα τα υποστρώματα συγκρινόμενος με τον αντίστοιχο της ινουλίνης ($p=0,050$ για όλα).

Σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα (N.C.)

Συγκρίνοντας τους μικροβιακούς πληθυσμούς στις 24 ώρες, μόνο για την ινουλίνη παρατηρούνται σημαντικές διαφορές σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα: τα Ολικά βακτήρια και ο πληθυσμός του *Bifidobacterium* spp. είναι σημαντικά υψηλότερα ενώ ο πληθυσμός του *Bacteroides* spp. είναι σημαντικά μικρότερος ($p=0.050$).

9.5 Σύγκριση του εντερικού μικροβιόκοσμου όλων των εθελοντών (n=6) μετά τη ζύμωση των υποστρωμάτων

Πίνακας XV. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για το σύνολο των εθελοντών (n=6) μεταξύ t=0 και t=24h

t=0h								t=24h							p-Value
Υποστρώμα τα	NC	INU	R	Q	GA	W	TL	NC	INU	R	Q	GA	W	TL	
GM															
Total bacteria	10,06 (9,75- 10,16)	10,02 (9,78- 10,09)	9,93 (9,73- 10,04)	9,87 (9,83- 10,16)	9,89 (9,69- 10,07)	9,97 (9,55- 10,05)	9,83 (9,76- 9,98)	9,84 (7,71- 9,86) ^a	10,09 (9,75- 10,29)	9,76 (9,57- 9,99)	9,74 (9,56- 9,90)	9,84 (9,67- 10,01)	9,72 (9,59- 9,79)	9,54 (9,35- 9,75) ^a	0,140
<i>Bifidobacter ium</i> spp	8,37 (8,15- 9,08)	8,41 (7,86- 8,81)	8,45 (7,99- 8,98)	8,48 (8,11- 9,14)	8,34 (7,97- 9,06)	8,34 (7,99- 9,07)	8,26 (8,05- 9,06)	8,29 (8,03- 8,97)	9,28 (8,60- 9,87) ^a	8,30 (7,98- 8,69)	8,29 (7,93- 8,79)	8,35 (8,04- 8,95)	8,17 (7,95- 8,76) ^a	8,27 (7,91- 8,76)	0,136

<i>Bacteroides</i> spp	9,27 (9,14- 9,39)	9,26 (9,11- 9,42)	9,20 (9,09- 9,41)	9,34 (9,11- 9,44)	9,27 (9,02- 9,38)	9,27 (9,12- 9,47)	9,27 (9,16- 9,36)	8,92 (8,65- 9,03) ^a	9,57 (9,00- 9,71)	9,13 (8,33- 9,31) ^a	9,05 (8,44- 9,21) ^a	9,01 (8,61- 9,21) ^a	8,98 (8,89- 9,07) ^a	8,62 (8,33- 9,06) ^a	0,200
<i>Roseburia</i> spp.- <i>Eubacteriu</i> <i>m rectale</i> group	8,30 (7,17- 8,47)	8,11 (7,15- 8,55)	8,04 (7,17- 8,44)	8,15 (7,25- 8,50)	8,08 (7,17- 8,57)	8,21 (6,99- 8,50)	8,12 (7,17- 8,47)	6,95 (6,15- 7,09) ^a	7,55 (6,64- 7,91)	6,94 (5,94- 7,35) ^a	6,98 (5,92- 7,25) ^a	7,07 (5,80- 8,00)	7,02 (5,94- 7,15) ^a	6,51 (5,62- 7,07) ^a	0,336
<i>Akkermansi</i> <i>a</i> <i>muciniphila</i>	4,29 (2,92- 7,44)	3,21 (2,84- 6,78)	4,08 (3,08- 7,33)	4,19 (3,07- 7,43)	3,94 (3,01- 7,18)	4,12 (3,07- 7,56)	3,01 (2,73- 6,71)	4,44 (3,56- 7,59)	2,62 (1,99- 6,62) ^a	4,54 (3,31- 7,33)	4,64 (3,20- 7,35)	4,62 (3,31- 7,13)	4,26 (3,26- 7,37)	3,28 (2,95- 5,58)	0,675

Τα αποτελέσματα των μικροβιακών πληθυσμών παρουσιάζονται σε λογαριθμική μορφή των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου (log10copies16S-rRNA /ml δείγματος).NC(negative control):Αρνητικός Μάρτυρας, **INU**(inuline):Θετικός Μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση σε αναλογία 1% w/v,**R**:Ρεσβερατρόλη,**Q**:Κερκετίνη,**G.A.**:Γαλλικό οξύ,**W**:Υδατικό εκχύλισμα κρασιού,**TL**: Λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού

^a Σημαντική διαφορά σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα για t=0

Σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών στις 24 ώρες, σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης (t=0)

Παρατηρείται ότι μετά την 24ωρη ζύμωση του αρνητικού μάρτυρα (NC) μειώθηκαν σημαντικά το *Bacteroides* spp. και το *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group σε σχέση με τα αντίστοιχα κατά την έναρξη της ζύμωσης με $p=0,028$, $p=0,028$ αντίστοιχα και τα Ολικά βακτήρια παρουσίασαν τάση για μείωση ($p=0.075$).

Κατά τη ζύμωση της ινουλίνης (θετικού μάρτυρα), παρατηρείται σημαντική αύξηση σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης στον πληθυσμό του *Bifidobacterium* spp ($p=0.028$) ενώ αντίθετα σημαντική μείωση στον πληθυσμό του *Akkermansia muciniphila* ($p=0.043$). Κατά τη ζύμωση της ρεσβερατρόλης τα *Bacteroides* spp. και *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά με $p=0,046$ και $p=0,028$ αντίστοιχα.

Στην περίπτωση της κερκετίνης μειώθηκε σημαντικά ο πληθυσμός των *Bacteroides* sp ($p=0,028$) και του *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group ($p=0,028$), ενώ κατά τη ζύμωση του γαλλικού οξέος μόνο ο πληθυσμός του *Bacteroides* spp. μειώθηκε σημαντικά ($p=0,046$). Τέλος, η ζύμωση του υδατικού εκχυλίσματος του κρασιού επέφερε σημαντική μείωση στους πληθυσμούς των *Bifidobacterium* spp ($p=0,046$), *Bacteroides* spp ($p=0,028$), *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group ($p=0,028$) και για το λιποειδικό εκχύλισμα του κρασιού σημαντική μείωση στα Ολικά βακτήρια ($p=0,028$), στο *Bacteroides* spp ($p=0,028$) και στο *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group ($p=0,046$).

9.5.1 Σύγκριση του εντερικού μικροβιόκοσμου των εθελοντών (n=3) με φυσιολογικό BMI μετά τη ζύμωση των υποστρωμάτων

Πίνακας XVI. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για το σύνολο των εθελοντών με φυσιολογικό BMI (n=3) μεταξύ t=0 και t=24h

t=0h								t=24h							p-Value
Υποστρώμα τα	NC	INU	R	Q	GA	W	TL	NC	INU	R	Q	GA	W	TL	
GM															
Total bacteria	10,12 (9,77- 10,15)	10,01 (9,79- 10,19)	9,98 (9,77- 10,18)	10,09 (9,86- 10,37)	10,00 (9,76- 10,13)	9,94 (9,49- 10,03)	9,85 (9,80- 9,95)	9,86 (9,75- 9,87)	10,03 (9,40- 10,14)	9,61 (9,50- 9,92)	9,65 (9,30- 9,85)	9,82 (9,72- 10,00)	9,73 (9,71- 9,78)	9,35 (9,33-9,65)	0,251
<i>Bifidobacter ium spp</i>	9,07(8,20 -9,11)	8,69 (8,32-9,18)	8,93 (8,42- 9,13)	9,14 (8,49- 9,17)	9,05 (8,25- 9,09)	9,06 (8,01- 9,09)	9,06 (8,08- 9,06)	8,89 (8,23- 9,21)	9,43 (9,13- 9,93)	8,59 (8,04- 9,00)	9,75 (9,95- 8,90)	8,91 (8,15- 9,07)	8,70 (7,86- 8,93)	8,75 (7,89-8,77)	0,204

<i>Bacteroides</i> spp	9,24 (8,86-9,30)	9,11 (9,10-9,41)	9,17 (8,84-9,40)	9,29 (8,89-9,49)	9,33 (8,79-9,53)	9,24 (8,95-9,29)	9,26 (8,92-9,28)	8,69 (8,54-8,93)	9,11 (8,65-9,66)	8,38 (8,16-8,25)	8,44 (8,41-9,13)	8,72 (8,28-9,18)	8,90 (8,87-8,97)	8,40 (8,12-8,54)	0,376
<i>Roseburia</i> spp.- <i>Eubacterium rectale</i> group	8,25 (7,91-8,42)	8,03 (7,96-8,53)	8,11 (7,95-8,50)	8,18 (7,99-8,63)	8,17 (7,91-8,59)	8,21 (7,70-8,47)	8,07 (7,95-8,43)	7,09 (6,67-7,09)	7,38 (7,18-7,73)	6,82 (6,42-7,66)	9,98(6,33-7,47)	7,04 (6,20-7,39)	7,12 (6,51-7,14)	6,34 (5,82-6,68)	0,287
<i>Akkermansia muciniphila</i>	8,48 (2,14-8,18)	5,74 (2,41-8,33)	5,65 (2,38-8,21)	5,63 (2,33-8,27)	5,48 (2,23-8,14)	5,73 (2,32-8,39)	5,58 (2,26-8,23)	5,95 (2,66-8,04)	5,29 (1,96-7,90)	5,75 (2,68-7,87)	5,79(2,74-7,81)	5,66 (2,76-7,58)	5,75 (2,54-7,87)	3,42 (3,14-6,10)	0,903

Τα αποτελέσματα των μικροβιακών πληθυσμών παρουσιάζονται σε λογαριθμική μορφή των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου ($\log_{10}$ copies 16S-rRNA /ml δείγματος). **NC**(negative control):Αρνητικός Μάρτυρας, **INU**(inuline):Θετικός Μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση σε αναλογία 1% w/v, **R**:Ρεσβερατρόλη, **Q**:Κερκετίνη, **G.A.**:Γαλλικό οξύ, **W**:Υδατικό εκχύλισμα κρασιού, **TL**: Λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού

^a Σημαντική διαφορά σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα για $t=0$

Σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών στις 24 ώρες, σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης ($t=0$)

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για το κάθε ένα υπόστρωμα ξεχωριστά μεταξύ $t=0h$ και $t=24h$.

9.5.2 Σύγκριση του εντερικού μικροβιόκοσμου των παχύσαρκων εθελοντών (n=3) μετά τη ζύμωση των υποστρωμάτων

Πίνακας XVII. Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών για το σύνολο των παχύσαρκων εθελοντών (n=3) μεταξύ t=0 και t=24h

Υποστρώμα τα	t=0h							t=24h							p-Value
	NC	INU	R	Q	GA	W	TL	NC	INU	R	Q	GA	W	TL	
GM															
Total bacteria	9,99 (9,68- 10,19)	10,03 (9,75- 10,06)	9,87 (9,63- 9,99)	9,84 (9,80- 9,88)	9,77 (9,45- 10,05)	10,01 (9,57- 10,08)	9,80 (9,63- 10,07)	9,82 (9,60- 9,86)	10,22 (9,86- 10,48)	9,98 (9,59- 10,03)	9,83 (9,64- 10,06)	9,86 (9,52- 10,02)	9,61 (9,51- 9,82)	9,70 (9,43-9,88)	0,298
<i>Bifidobacter ium</i> spp	8,26 (8,03- 8,49)	7,89 (7,78-8,50)	8,11 (7,64- 8,49)	8,24 (7,72- 8,48)	8,10 (7,58- 8,43)	8,16 (7,92- 8,52)	8,12 (7,95- 8,39)	8,06 (7,93- 8,35)	8,61 (8,54- 9,84)	8,09 (7,80- 8,51)	8,09 (7,89- 8,49)	8,10 (7,87- 8,56)	8,03 (7,99- 8,31)	8,04 (7,91-8,49)	0,315

<i>Bacteroides</i> spp	9,35 (9,23- 9,51)	9,29 (9,22-9,45)	9,21 (9,18- 9,43)	9,39 (9,19- 9,42)	9,26 (9,10- 9,27)	9,47 (9,17- 9,47)	9,34 (9,24- 9,41)	8,97 (8,91- 9,22)	8,64 (9,49- 9,84)	9,29 (9,01- 9,35)	9,15 (9,97- 9,38)	9,07 (8,95- 9,27)	9,03 (8,99- 9,20)	9,00 (8,71-9,24)	0,129
<i>Roseburia</i> spp.- <i>Eubacteriu</i> <i>m rectale</i> group	8,35 (4,94- 8,60)	8,20 (4,73-8,63)	7,96 (4,81- 8,42)	8,12 (5,05- 8,46)	7,97 (4,95- 8,56)	8,20 (4,85- 8,57)	8,18 (4,79- 8,42)	6,91 (4,57- 6,99)	7,78 (5,02- 8,30)	7,06 (4,46- 7,24)	6,99 (4,67- 7,18)	7,11 (4,58- 9,85)	6,92 (4,23- 7,21)	7,05 (5,01-7,14)	0,765
<i>Akkermansi</i> <i>a</i> <i>muciniphila</i>	4,29 (2,32- 6,26)	3,04 (2,64-5,29)	4,01 (2,29- 5,84)	4,16 (2,29- 6,07)	3,94 (2,33- 5,71)	4,10 (2,30- 6,00)	2,99 (2,46- 5,25)	4,44 (2,70- 5,71)	2,36 (1,63- 5,27)	4,37 (2,42- 5,94)	4,33 (2,28- 6,01)	4,38 (2,39- 6,64)	4,18 (2,42- 5,65)	3,10 (2,48-5,41)	0,717

Τα αποτελέσματα των μικροβιακών πληθυσμών παρουσιάζονται σε λογαριθμική μορφή των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου (log10copies16S-rRNA /ml δείγματος).**NC**(negative control):Αρνητικός Μάρτυρας, **INU**(inuline):Θετικός Μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση σε αναλογία 1% w/v,**R**:Ρεσβερατρόλη,**Q**:Κερκετίνη,**G.A.**:Γαλλικό οξύ,**W**:Υδατικό εκχύλισμα κρασιού,**TL**: Λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού

^a Σημαντική διαφορά σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα για t=0

Σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών στις 24 ώρες, σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης (t=0)

Δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για το κάθε ένα υπόστρωμα ξεχωριστά μεταξύ t=0h και t=24h.

9.6 Μέτρηση της αντι-αιμοπεταλιακής ικανότητας του δείγματος

Πίνακας XVIII. Ερμηνεία συμβολισμών

ΕΡΜΗΝΕΙΑ	ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ
Η υδατική φάση που παραλήφθηκε από το Basal medium	W1
Η υδατική φάση που παραλήφθηκε από το τροποποιημένο Basal medium	W2
Η χλωροφορμική φάση από το Basal medium	C1
Η χλωροφορμική φάση από το τροποποιημένο Basal medium	C2

Τα αποτελέσματα από την επίδραση του Basal medium στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τους διάφορους συσσωρευτικούς παράγοντες συγκεντρώνονται στον πίνακα XIX.

Πίνακας XIX. % Αναστολή της επαγομένης από τους αγωνιστές συσσώρευσης των αιμοπεταλίων του Basal medium

	Ποσότητα - Αραίωση	% Αναστολή PAF	% Αναστολή ADP	% Αναστολή κολλαγόνο
W1	10μl			Ενεργοποίηση
W1	4μl	89,8	25,4	3,9
W1	2μl	88,9	86,6	97,4
W1	4μl - 1/10	77,3	4,2	
W1	2μl - 1/10	Ενεργοποίηση		
W2	10μl			1,3
W2	4μl		53,5	7,8
W2	2μl	92,6	56,7	80,5
W2	4μl - 1/10	77,3	0	
W2	2μl - 1/10	Ενεργοποίηση		
C1	4μl	90,9	98,4	
C1	2μl	91,9	82,2	97,4
C1	1μl	88,6		97,5
C2	4μl	95,5	83,9	
C2	2μl	77,3	62,3	78,2
C2	1μl	82,9		60,0

Παρατηρείται ότι και τα δύο basal medium έδωσαν μεγάλα ποσοστά αναστολής, δημιουργώντας αμφιβολία κατά πόσο το basal medium ή το προς εξέταση δείγμα είναι αυτό που προκαλεί τελικά την αναστολή συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Τα πειράματα δεν συνεχίστηκαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι αποδεκτό σήμερα από την επιστημονική κοινότητα, ότι η ισορροπία του εντερικού μικροβιόκοσμου καθώς και η μικροβιακή του ποικιλομορφία συνδέεται με υγιή, φυσιολογικού βάρους άτομα ενώ οι φλεγμονώδεις και μεταβολικές διαταραχές (όπως η παχυσαρκία) συμπίπτουν με αλλαγές στη σύνθεση και/ή τις λειτουργίες του.

Αρχικά, στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι οι παχύσαρκοι εθελοντές σε σχέση με αυτούς με φυσιολογικό BMI, παρουσίασαν χαμηλότερα επίπεδα *Bifidobacterium* spp καθώς και τάση για χαμηλότερα επίπεδα *Akkermansia muciniphila* και υψηλότερα επίπεδα *Bacteroides* spp. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία άτομα με μεταβολικές διαταραχές και ασθένειες όπως διαβήτης τύπου 2 και παχυσαρκία παρουσιάζουν χαμηλά επίπεδα του *Akkermansia muciniphila* ενώ εκείνα με υψηλά επίπεδα έχουν πιο υγιές προφίλ (Dao et al., 2016). Κάποιοι εθελοντές ωστόσο, ανεξάρτητα από το αν είναι παχύσαρκοι ή όχι μπορεί να μην έχουν καθόλου το μικροοργανισμό αυτό ή να έχουν πάρα πολύ χαμηλά επίπεδα, όπως επιβεβαιώνεται και από μελέτη που έγινε σε ελληνικό πληθυσμό (125 άτομα), όπου ανιχνεύτηκε το συγκεκριμένο βακτήριο σε 88.8% του πληθυσμού. Στον ίδιο πληθυσμό αντίστοιχα φάνηκε ότι οι παχύσαρκοι/υπέρβαροι εθελοντές ήταν πιο επιρρεπείς σε χαμηλότερα επίπεδα του πληθυσμού του συγκεκριμένου βακτηρίου σε σχέση με τους εθελοντές με φυσιολογικό βάρος (Mitsou et al., 2019).

Στον αρχικό χρόνο (t=0h) δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση σε κανέναν μικροβιακό πλυθυσμό ούτε για το σύνολο, ούτε για τους εθελοντές με φυσιολογικό βάρος ή τους παχύσαρκους. Αυτό είναι θετικό, καθώς έχει εξασφαλιστεί η ομοιογένεια στην κάθε ομάδα αντίστοιχα και οποιαδήποτε διαφοροποίηση θα οφείλεται στη ζύμωση και όχι σε λάθος χειρισμό.

Μετά το πέρας των 24 ωρών η ζύμωση της ινουλίνης (θετικός μάρτυρας με πρεβιοτική δράση) στο σύνολο των εθελοντών, οδήγησε σε αύξηση τον πληθυσμό του *Bifidobacterium* spp ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον πληθυσμό του *Akkermansia muciniphila*, σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει τη γενικά γνωστή μπιφοδογόνο δράση της ινουλίνης (Mitsou et al., 2020).

Η ζύμωση της ρεσβερατρόλης και της κερκετίνης προκάλεσε μείωση στους πληθυσμούς των *Bacteroides* spp. και *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group ενώ το γαλλικό οξύ μόνο στον πληθυσμό των *Bacteroides* spp., σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης.

Επιπλέον, η ζύμωση του υδατικού εκχυλίσματος του κρασιού επέφερε σημαντική μείωση στους πληθυσμούς των *Bifidobacterium* spp, *Bacteroides* spp, *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale*

group και για το λιποειδικό εκχύλισμα του κρασιού σημαντική μείωση στα Ολικά βακτήρια, στο *Bacteroides* spp και στο *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group, σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης

Δεν υπάρχουν πολλές αναφορές στη διεθνή βιβλιογραφία για την *in vitro* ζύμωση εκχυλισμάτων του κόκκινου κρασιού ή των μεμονωμένων φαινολικών ενώσεων που περιέχονται σε αυτό. Οι Sanchez-Patan et al. (2013) δεν παρατήρησαν μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς μετά από τη ζύμωση ενός εμπορικού εκχυλίσματος κόκκινου κρασιού, παρά μόνο μείωση στην ομάδα του *Clostridium histolyticum*. Αντίθετα, οι Zorraquín-Peña et al., (2021) μετά από τη ζύμωση κόκκινου κρασιού παρατήρησαν μείωση στο *Bacteroides* spp. και αύξηση στους πληθυσμούς των *Veillonella*, *Escherichia/Shigella* και *Akkermansia*.

Σε μελέτη όπου δέκα εθελοντές κατανάλωσαν κόκκινο κρασί, παρατηρήθηκε αύξηση στους πληθυσμούς των βακτηριακών φύλων Proteobacteria, Fusobacteria, Firmicutes και Bacteroidetes, αλλά και στα *Bifidobacterium* spp. και *Prevotella* spp. Αντίθετα, μειώθηκαν τα *Clostridium* spp. and *C. histolyticum* group στα κόπρανα των εθελοντών μετά από την κατανάλωση του κρασιού (Queiro-Ortuño et al., 2012).

Στους παχύσαρκους εθελοντές μόνο ο πληθυσμός του *Bacteroides* spp παρέμεινε σημαντικά υψηλότερος για όλα τα υποστρώματα συγκρινόμενος με τον αντίστοιχο της ινουλίνης, ενώ ο πληθυσμός του *Bifidobacterium* spp είναι σημαντικά μικρότερος σε όλα τα υποστρώματα εκτός από το γαλλικό οξύ.

Υπάρχει διχογνωμία ως προς αν τα *Bacteroides* spp και πιο συγκεκριμένα αν η αναλογία Firmicutes και Bacteroidetes συσχετίζεται με την παχυσαρκία στους ανθρώπους. Το 2009 οι Schwiertz et al. μελέτησαν αδύνατους και παχύσαρκους εθελοντές και των δύο φύλων και αξιολόγησαν τον εντερικό τους μικροβιόκοσμο. Τα Firmicutes και *Bacteroides* spp ήταν οι πιο άφθονες βακτηριακές ομάδες γενικά. Αυτό που βρέθηκε είναι ότι οι αναλογίες του γένους *Bacteroides* ήταν μεγαλύτερες σε υπέρβαρους εθελοντές σε αντίθεση με τους αδύνατους και παχύσαρκους εθελοντές ενώ το *Ruminococcus flavefaciens*, η ομάδα του *C. leptum*, το αρχαίο μεθανοπαραγωγό *Methanobrevibacter* spp. και το γένος *Bifidobacterium* ήταν λιγότερο άφθονα σε υπέρβαρα και παχύσαρκα άτομα. Η σημασία της αναλογίας των Bacteroidetes και Firmicutes που υπάρχουν αμφισβητήθηκε επίσης από τους Duncan et al. (2007) όταν διαπίστωσαν ότι η απώλεια βάρους δεν άλλαξε τις σχετικές αναλογίες των *Bacteroides* spp ή το ποσοστό των Firmicutes που υπάρχουν στο ανθρώπινο έντερο.

Εν κατακλείδι, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες για την καλύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης πολυφαινολών-εντερικού μικροβιόκοσμου και αν η κατάλληλη τροποποίηση συγκεκριμένων μικροβιακών πληθυσμών μπορέσει να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον στην διαχείριση του μεταβολικού συνδρόμου. Από αυτή την άποψη, παρόλο που αυτό πρέπει να

επιβεβαιωθεί από περισσότερες μελέτες, το κρασί (ειδικότερα το κόκκινο) ως ευρέως διαθέσιμη πηγή πολυφαινόλων, θα μπορούσε να αντιπροσωπεύσει μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική.

Περαιτέρω έρευνες για την απομόνωση, τον χαρακτηρισμό και την παραγωγή βακτηρίων που είναι υπεύθυνα/ικανά να μεταβολίζουν τις πολυφαινόλες του κρασιού είναι, πράγματι, ένα ενδιαφέρον πεδίο για εξερεύνηση, όπως επίσης οι διαφοροποιήσεις των πληθυσμών τους μετά από δίαιτα και απώλεια βάρους.

Αναγκαία κρίνεται η πραγματοποίηση περισσότερων μελετών με μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών με μεγαλύτερη διακύμανση χαρακτηριστικών για τη διεξαγωγή ασφαλέστερων και γενικευμένων συμπερασμάτων. Επιπλέον, δεν έχει καθιερωθεί μέχρι σήμερα ημερήσια συνιστώμενη πρόσληψη των πολυφαινόλων (ρεσβερατρόλη, κερκετίνη, γαλλικό οξύ) για την επίτευξη όλων των προαναφερθέντων οφελών στην υγεία του ανθρώπου. Παράλληλα, δεν έχει βρεθεί αν ο συνδυασμός τους και σε ποιες αναλογίες μπορεί να έχει κάποια επιπρόσθετα ευεργετικά αποτελέσματα. Άλλωστε, τα περισσότερα πειράματα αφορούν ζώα (κυρίως τρωκτικά) και οι *in vivo* μελέτες σπανίζουν. Ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζει αν η απομάκρυνση της αιθανόλης από το κρασί αποφέρει τα ίδια αποτελέσματα με την παρουσία της, ή αν συμβάλει με κάποιο τρόπο στο μεταβολισμό/απορρόφηση των πολυφαινόλων.

Τέλος, παρά τις τροποποιήσεις στο basal medium δεν παρουσιάστηκε κάποια σημαντική διαφοροποίηση. Το νέο basal medium ομοίως οδήγησε σε υψηλά ποσοστά αναστολής της συσσώρευσης αιμοπεταλίων δημιουργώντας αμφιβολίες αν το προς εξέταση δείγμα που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αναστέλλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων ή αυτή προκαλείται αποκλειστικά λόγω του basal medium. Απαιτούνται νέες κατάλληλες τροποποιήσεις στην παρασκευή του, ώστε να αποφευχθούν αμφιβολίες για το αποτέλεσμα των πειραμάτων που θα ακολουθηθούν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βιβλία

- ❖ Μπεξιρτζόγλου, Ε. (2004). *Μικροβιολογία Τροφίμων και Πεπτικού Συστήματος*. Αθήνα: Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε.
- ❖ Τσακίρης, Α. (2014) *Οινολογία. Από Το Σταφύλι Στο Κρασί* (4^η έκδοση). Αθήνα: Εκδόσεις Ψυχαλού
- ❖ Goktepe, I., Juneja, V. K., & Ahmedna, M. (Eds.). (2006). *Probiotics in Food Safety and Human Health*. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group
- ❖ Sherwood, L. (2016). *Εισαγωγή Στη Φυσιολογία Του Ανθρώπου* (8^η έκδοση). Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.

Άρθρα

- ❖ Aguirre, L, Fernández-Quintela, A, Arias, N, & Portillo, M. P. (2014). Resveratrol: anti-obesity mechanisms of action. *Molecules*, 19 (11), 18632-18655. doi: 10.3390/molecules191118632
- ❖ Al-Assal, K., Martinez, A.C., Torrinhas, R.S., Cardinelli, C., & Waitzberg, D. (2018). Gut microbiota and obesity. *Clinical Nutrition Experimental*, 20, 60–64. doi: 10.1016/j.yclnex.2018.03.001
- ❖ Anand, David, A. V., Arulmoli, R., & Parasuraman, S. (2016). Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. *Pharmacognosy Reviews*, 10 (20), 84-89. doi: 10.4103/0973-7847.194044
- ❖ Armougom, F., Henry, M., Viallettes, B., Raccach, D., & Raoult, D. (2009). Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients. *PloS one*, 4(9), e7125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007125>
- ❖ Barko, P. C., McMichael, M. A., Swanson, K. S., & Williams, D. A. (2018). The Gastrointestinal Microbiome: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1), 9-25. doi: 10.1111/jvim.14875
- ❖ Bervoets, L., Van Hoorenbeeck, K., Kortleven, I., Van Noten, C., Hens, N., Vael, C., Goossens, H., Desager, K. N., & Vankerckhoven, V. (2013). Differences in gut microbiota

- composition between obese and lean children: a cross-sectional study. *Gut pathogens*, 5(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-10>
- ❖ Bird, J. K., Raederstorff, D., Weber, P., & Steinert, R.E. (2017). Cardiovascular and Antiobesity Effects of Resveratrol Mediated through the Gut Microbiota., *Advances in Nutrition*, 8(6), 839-849. doi: 10.3945/an.117.016568
 - ❖ Bonder, M. J., Tigchelaar, E. F., Cai, X., Trynka, G., Cenit, M. C., Hrdlickova, B.,... Zhernakova, A. (2016). The influence of a short-term gluten-free diet on the human gut microbiome. *Genome Medicine*, 8(45). doi: 10.1186/s13073-016-0295-y
 - ❖ Calvani, R., Miccheli, A., Capuani, G., Tomassini Miccheli, A., Puccetti, C., Delfini, M., Iaconelli, A., Nanni, G., & Mingrone, G. (2010). Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype. *International journal of obesity (2005)*, 34(6), 1095–1098. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.44>
 - ❖ Carrera-Quintanar, L., López Roa, R. I., Quintero-Fabián, S., Sánchez-Sánchez, M. A., Vizmanos, B., & Ortuño-Sahagún, D. (2018). Phytochemicals That Influence Gut Microbiota as Prophyllactics and for the Treatment of Obesity and Inflammatory Diseases. *Mediators of Inflammation*, 2018 (9734845). doi: 10.1155/2018/9734845
 - ❖ Castaner, O., Goday, A., Park, Y.M., Lee, S.H., Magkos, F., Shiow, S.T.E., & Schröder, H. (2018). The Gut Microbiome Profile in Obesity: A Systematic Review. *International Journal of Endocrinology*, 2018 (4095789). doi: 10.1155/2018/4095789
 - ❖ Chaplin, A., Carpené, C., & Mercader, J. (2018). Resveratrol, Metabolic Syndrome, and Gut Microbiota. *Nutrients*, 10 (11). doi: 10.3390/nu10111651
 - ❖ Chen, X., Qiao, H., Liu, T., Yang, Z., Xu, L., Xu, Y., ... & Li, E. (2012). Inhibition of herpes simplex virus infection by oligomeric stilbenoids through ROS generation. *Antiviral Research*, 95(1), 30–36. doi: 10.1016/j.antiviral.2012.05.001
 - ❖ Chiva-Blanch, G., & Badimon, L. (2017). Effects of Polyphenol Intake on Metabolic Syndrome: Current Evidences from Human Trials. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017 (5812401). doi: 10.1155/2017/5812401
 - ❖ Chiva-Blanch, G., Urpi-Sarda, M., Ros, E., Valderas-Martinez, P., Casas, R., Arranz, S., Estruch, R. (2013). Effects of red wine polyphenols and alcohol on glucose metabolism and the lipid profile: a randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*, 32(2), 200-206. doi: 10.1016/j.clnu.2012.08.022
 - ❖ Clarke, S. F., Murphy, E. F., Nilaweera, K., Ross, P. R., Shanahan, F., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2012). The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. *Gut Microbes*, 3(3), 186-202. doi: 10.4161/gmic.20168

- ❖ Clouser, C. L., Chauhan, J., Bess, M. A., van Oploo, J. L., Zhou, D., Dimick Gray, S., ... Patterson, S. E. (2012). Anti HIV1 activity of resveratrol derivatives and synergistic inhibition of HIV1 by the combination of resveratrol and decitabine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(21), 6642–6646. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.08.108
- ❖ Collado, M. C., Derrien, M., Isolauri, E., de Vos, W. M., & Salminen, S. (2007). Intestinal integrity and Akkermansiamuciniphila, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly. *Applied and environmental microbiology*, 73(23), 7767–7770. doi: 10.1128/AEM.01477-07
- ❖ Collado, M. C., Isolauri, E., Laitinen, K., & Salminen, S. (2008). Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *The American journal of clinical nutrition*, 88(4), 894–899. doi: 10.1093/ajcn/88.4.894
- ❖ Cueva, C., Gil-Sánchez, I., Ayuda-Durán, B., González-Manzano, S., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C.,...Moreno-Arribas MV.(2017). An Integrated View of the Effects of Wine Polyphenols and Their Relevant Metabolites on Gut and Host Health. *Molecules*, 22(1). doi: 10.3390/molecules22010099
- ❖ Da Luz, P. L., & Coimbra, S. R. (2004). Wine, alcohol and atherosclerosis: Clinical evidences and mechanisms. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2004(37), 1275–1295. doi: 10.1590/s0100-879x2004000900001
- ❖ Dao, M. C., Everard, A., Aron-Wisnewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E. O., Clément, K. (2016). Akkermansiamuciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*, 65(3), 426-436. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308778
- ❖ Das, D. K., Sato, M., Ray, P. S., Maulik, G., Engelman, R. M., Bertelli, A. A., & Bertelli, A. (1999). Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants. *Drugs under experimental and clinical research*, 25(2-3), 115–120. Ανακτήθηκε από <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10370873/>
- ❖ Davies, J. M. S., Cillard, J., Frigue, B., Cadenas, E., Cadet, J., Cayce, R.,...Davies, K. J. A. (2017). The Oxygen Paradox, the French Paradox, and age-related diseases. *Geroscience*, 39(5-6), 499-550. doi: 10.1007/s11357-017-0002-y
- ❖ De Palma, G., Nadal, I., Collado, M. C., & Sanz, Y. (2009). Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *British Journal of Nutrition*, 102(8), 1154–1160. doi: 10.1017/S0007114509371767
- ❖ Dell'Agli, M., Buscialà, A., & Bosisio, E. (2004). Vascular effects of wine polyphenols. *Cardiovascular Research*, 63(4), 593-602. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.03.019

- ❖ Derrien, M., Belzer, C., & de Vos, W. M. (2017). Akkermansiamuciniphila and its role in regulating host functions. *Microbial Pathogenesis*, 106, 171-181. doi: 10.1016/j.micpath.2016.02.005
- ❖ Dludla, P. V., Nkambule, B. B., Jack, B., Mkandla, Z., Mutize, T., Silvestri, S.,...Mazibuko-Mbeje, S. E. (2018). Inflammation and Oxidative Stress in an Obese State and the Protective Effects of Gallic Acid. *Nutrients*, 11(1). doi: 10.3390/nu11010023
- ❖ Dolara, P., Luceri, C., De Filippo, C., Femia, A. P., Giovannelli, L., Caderni, G.,...Cresci, A. (2005). Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats. *Mutation research*, 591(1-2), 237–246. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.04.022
- ❖ Downer, M. K., Bertoia, M. L., Mukamal, K. J., Rimm, E. B., & Stampfer, M. J. (2017). Change in Alcohol Intake in Relation to Weight Change in a Cohort of US Men with 24 Yearsof Follow-Up. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 25(11), 1988–1996. doi: 10.1002/oby.21979
- ❖ Duda-Chodak, A. (2012). The inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, 63(5), 497–503. Ανακτήθηκε από https://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/10_12/pdf/497_10_12_article.pdf
- ❖ Dueñas, M., Cueva, C., Muñoz-González, I., Jiménez-Girón, A., Sánchez-Patán, F., Santos-Buelga, C.,...Bartolomé, B. (2015). Studies on Modulation of Gut Microbiota by Wine Polyphenols: From Isolated Cultures to Omic Approaches. *Antioxidants (Basel)*, 4(1), 1-21. doi: 10.3390/antiox4010001
- ❖ Duncan, S. H., Belenguer, A., Holtrop, G., Johnstone, A. M., Flint, H. J., & Lobley, G. E. (2007). Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1073-1078. doi: 10.1128/AEM.02340-06
- ❖ Etxeberria, U., Arias, N., Boqué, N., Macarulla, M. T., Portillo, M. P., Martínez, J. A., & Milagro, F. I. (2015). Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(6), 651–660. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.01.002
- ❖ Everard, A., Belzer, C., Geurts, L., Ouwerkerk, J. P., Druart, C., Bindels, L. B., Guiot, Y., Derrien, M., Muccioli, G. G., Delzenne, N. M., de Vos, W. M., & Cani, P. D. (2013). Cross-talk between Akkermansia muciniphila and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(22), 9066–9071. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219451110>

- ❖ Fantinelli, J. C., & Mosca, S. M. (2007). Cardioprotective effects of a non-alcoholic extract of red wine during ischaemia and reperfusion in spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 34 (3), 166–169. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04567.x
- ❖ Fava, F., Gitau, R., Griffin, B. A., Gibson, G. R., Tuohy, K. M., & Lovegrove JA. (2013). The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population. *International Journal of Obesity, (Lond)*, 37(2), 216-223. doi: 10.1038/ijo.2012.33
- ❖ Fernandes, I., Pérez-Gregorio, R., Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2017) Wine Flavonoids in Health and Disease Prevention. *Molecules*, 22(2). doi: 10.3390/molecules22020292.
- ❖ Fernández-Esteban, A., Zorraquín-Peña, I., González de Llano, D., Bartolomé B., & Moreno-Arribas, M. (2017). The role of wine and food polyphenols in oral health, *Trends in Food Science & Technology*, 69, Part A, 118-130. doi: 10.1016/j.tifs.2017.09.008
- ❖ Foster, C. J., Prosser, D. M., Agans, J. M., Zhai, Y., Smith, M.D., Lachowicz, J. E.,... Chintala, M. S. (2001). Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(12), 1591-1598. doi: 10.1172/JCI12242
- ❖ Fragopoulou, E., Choleva, M., Antonopoulou, S., & Demopoulos, C. A. (2018). Wine and its metabolic effects. A comprehensive review of clinical trials. *Metabolism: clinical and experimental*, 83, 102–119. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.01.024>
- ❖ Fragopoulou, E., & Antonopoulou, S. (2020). The French paradox three decades later: Role of inflammation and thrombosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 510, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.07.013>
- ❖ Gepner, Y., Golan, R., Harman-Boehm, I., Henkin, Y., Schwarzfuchs, D., Shelef, I.,... Shai, I. (2015). Effects of Initiating Moderate Alcohol Intake on Cardiometabolic Risk in Adults With Type 2 Diabetes: A 2-Year Randomized, Controlled Trial. *Annals of internal medicine*, 163(8), 569–579. doi: 10.7326/M14-1650
- ❖ Golan, R., Shelef, I., Shemesh, E., Henkin, Y., Schwarzfuchs, D., Gepner, Y.,... Shai, I. (2017). Effects of initiating moderate wine intake on abdominal adipose tissue in adults with type 2 diabetes: A 2-year randomized controlled trial. *Public health nutrition*, 20(3), 549–555. doi:10.1017/S1368980016002597
- ❖ Han, T. S., & Lean, M. E. (2016). A clinical perspective of obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *JRSM Cardiovascular Disease*, 5,(2048004016633371). doi: 10.1177/2048004016633371

- ❖ Haro, C., Montes-Borrego, M., Rangel-Zúñiga, O. A., Alcalá-Díaz, J. F., Gómez-Delgado, F., Pérez-Martínez, P.,...Pérez-Jiménez, F. (2016). Two Healthy Diets Modulate Gut Microbial Community Improving Insulin Sensitivity in a Human Obese Population. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 101(1), 233–242. doi: 10.1210/jc.2015-3351
- ❖ Haseeb, S., Alexander, B., & Baranchuk, A. (2017). Wine and Cardiovascular Health: A Comprehensive Review. *Circulation*, 136(15), 1434–1448. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030387
- ❖ Haseeb, S., Bryce, A., Santi, R., Liprandi, A., & Baranchuk, A. (2019). What's in wine? A clinician's perspective. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 29(2), 97-106. doi: 10.1016/j.tcm.2018.06.010
- ❖ Hidalgo, M., Oruna-Concha, M.J., Kolida, S., Walton, G.E., Kallithraka, S., Spencer, J.P., de Pascual-Teresa, S.(2012) Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(15), 3882–3890. doi: 10.1021/jf3002153
- ❖ Hou, Y., Carrim, N., Wang, Y., Gallant, R. C., Marshall, A., & Ni, H. (2015). Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis. *The Journal of Biomedical Research*, 29(6), 437–444. doi: 10.7555/JBR.29.20150121
- ❖ Iglesias, B., Caillot, A., Oliveira, A., Santana-Filho, A., & Sasaki, G. (2019). Cabernet Sauvignon wine polysaccharides attenuate sepsis inflammation and lethality in mice. *Carbohydrate Polymers*, 210, 254-263. doi: 10.1016/j.carbpol.2019.01.025
- ❖ Inan-Eroglu, E., Powell, L., Hamer, M., O'Donovan, G., Duncan, M. J., & Stamatakis, E. (2020). Is There a Link between Different Types of Alcoholic Drinks and Obesity? An Analysis of 280,183 UK Biobank Participants. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(14), 5178. doi: 10.3390/ijerph17145178
- ❖ Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B., & Kinsella, J. E. (1994). Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(1), 64–69. doi: 10.1021/jf00037a010
- ❖ Kawabata, K., Sugiyama, Y., Sakano, T., & Ohigashi, H. (2013). Flavonols enhanced production of anti-inflammatory substance(s) by *Bifidobacterium adolescentis*: Prebiotic actions of galangin, quercetin, and fisetin. *Biofactors*, 39(4), 422–429. doi: 10.1002/biof.1081
- ❖ Kim, M. S., Hwang, S. S., Park, E. J., & Bae, J. W. (2013). Strict vegetarian diet improves the risk factors associated with metabolic diseases by modulating gut microbiota and reducing intestinal inflammation. *Environmental microbiology reports*, 5(5), 765–775. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12079>

- ❖ Kong, L. C., Tap, J., Aron-Wisnewsky, J., Pelloux, V., Basdevant, A., Bouillot, J. L., Zucker, J. D., Doré, J., & Clément, K. (2013). Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *The American journal of clinical nutrition*, 98(1), 16–24. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.058743>
- ❖ Koushki, M., Amiri-Dashatan, N., Ahmadi, N., Abbaszadeh, H. A., & Rezaei-Tavirani, M. (2018). Resveratrol: A miraculous natural compound for diseases treatment. *Food Science & Nutrition*, 6(8), 2473-2490. doi: 10.1002/fsn3.855
- ❖ Lachman, J., Sulc, M., Faitová, K., & Pivec, V. (2009). Major factors influencing antioxidant contents and antioxidant activity in grapes and wines. *International Journal of Wine Research*, 2009(1), 101–121. doi: 10.2147/IJWR.S4600
- ❖ Lakhanpal, P., & Rai, D. K. (2007). Quercetin: A versatile flavonoid. *Internation Journal of Medical Update*, 2(2), 22–37. doi: 10.4314/ijmu.v2i2.39851
- ❖ Larrosa, M., Yanez-Gascon, M. J., Selma, M. V., Gonzalez-Sarrías, A., Toti, S., Ceron, J. J., Espin, J. C. (2009). Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2211–2220. doi: 10.1021/jf803638d
- ❖ Lee, J.-S., Cha, Y.-J., Lee, K.-H., & Yim, J.-E. (2016). Onion peel extract reduces the percentage of body fat in overweight and obese subjects: a 12-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrition Research Practice*, 10(2), 175–181. doi: 10.4162/nrp.2016.10.2.175
- ❖ Ley, R. E., Turnbaugh, P. J., Klein, S., & Gordon, J. I. (2006). Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444 (7122), 1022–1023. <https://doi.org/10.1038/4441022a>
- ❖ Li, J., Zhang, C. X., Liu, Y. M., Chen, K. L., & Chen, G. (2017). A comparative study of anti-aging properties and mechanism: resveratrol and caloric restriction. *Oncotarget*, 8(39), 65717–65729. doi: 10.18632/oncotarget.20084
- ❖ Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T, Wang, S.,...Yin, Y. (2016). Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients*, 8(3), 167. doi: 10.3390/nu8030167
- ❖ Liberale, L., Bonaventura, A., Montecucco, F., Dallegri, F., & Carbone, F. (2019). Impact of Red Wine Consumption on Cardiovascular Health. *Current medicinal chemistry*, 26(19), 3542–3566. doi: 10.2174/0929867324666170518100606
- ❖ Liu, Y, Zhang, B, He, F., Duan, C. Q., & Shi, Y. (2016). The Influence of Prefermentative Addition of Gallic Acid on the Phenolic Composition and Chromatic Characteristics of Cabernet Sauvignon Wines. *Journal of Food Science*, 81(7), C1669-1678. doi: 10.1111/1750-3841.13340

- ❖ López-Vélez, M., Martínez-Martínez, F., & Del Valle-Ribes, C. (2003). The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3), 233-244. doi: 10.1080/10408690390826509
- ❖ Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005). Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 230S-242S. doi: 10.1093/ajcn/81.1.230S
- ❖ Mangiola, F., Ianiro, G., Franceschi, F., Fagiuoli, S., Gasbarrini, G., & Gasbarrini, A. (2016). Gut microbiota in autism and mood disorders. *World Journal of Gastroenterology*, 22(1), 361-8. doi: 10.3748/wjg.v22.i1.361
- ❖ Million, M., Angelakis, E., Maraninchi, M., et al. (2013). Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *International Journal of Obesity*. 2005;37(11):1460–1466. doi: 10.1038/ijo.2013.20
- ❖ Mills, S., Stanton, C., Lane, J. A., Smith, G. J., & Ross, R. P. (2019). Precision Nutrition and the Microbiome, Part I: Current State of the Science. *Nutrients*, 11(4), 923. doi: 10.3390/nu11040923
- ❖ Mitsou, E. K., Kakali, A., Antonopoulou, S., Mountzouris, K. C., Yannakoulia, M., Panagiotakos, D. B., & Kyriacou, A. (2017). Adherence to the Mediterranean diet is associated with the gut microbiota pattern and gastrointestinal characteristics in an adult population. *British Journal of Nutrition*, 117(12), 1645-1655. doi: 10.1017/S0007114517001593
- ❖ Mitsou, E., Detopoulou, M., Kakali, A., Fragopoulou, E., Nomikos, T., Antonopoulou, S., Panagiotakos, D.B., Kyriacou, A. (2019). Mining possible associations of faecal *Akkermansia muciniphila* colonization patterns with host adiposity and cardiometabolic markers in an adult population. *Beneficial Microbes* 10(7): 741-749 doi: 10.3920/BM2019.0033
- ❖ Moreno-Indias, I., Sánchez-Alcoholado, L., Pérez-Martínez, P., Andrés-Lacueva, C., Cardona, F., Tinahones, F., & Queipo-Ortuño, M. I. (2016). Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food and Function*, 7(4), 1775-1787. doi: 10.1039/c5fo00886g
- ❖ Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology (Reading, England)*, 148(1), 257–266. doi: 10.1099/00221287-148-1-257
- ❖ Nakamura, M., Saito, H., Ikeda, M., Hokari, R., Kato, N., Hibi, T., & Miura, S. (2010). An antioxidant resveratrol significantly enhanced replication of hepatitis C virus. *World Journal of Gastroenterology*, 16(2), 184–192. doi: 10.3748/wjg.v16.i2.184

- ❖ Nash, V, Ranadheera, C. S., Georgousopoulou, E. N., Mellor, D. D., Panagiotakos, D. B., McKune, A. J.,...Naumovski, N. (2018). The effects of grape and red wine polyphenols on gut microbiota - A systematic review. *Food Research International*, 113, 277-287. doi: 10.1016/j.foodres.2018.07.019
- ❖ Nomikos, T., Fragopoulou, E., Antonopoulou, S., & Panagiotakos, D. B. (2018). Mediterranean diet and platelet-activating factor; a systematic review. *Clinical biochemistry*, 60, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.08.004>
- ❖ Nowak, R., Olech, M., & Nowacka, N. (2014). Plant Polyphenols as Chemopreventive Agents. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 2, 1289-1307. doi: 10.1016/B978-0-12-398456-2.00086-4
- ❖ Olano-Martin, E., Mountzouris K. C., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2000). In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*, 83(3), 247-255. doi: 10.1017/s0007114500000325
- ❖ Olano-Martin, E., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2002). Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 505–511. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01719.x
- ❖ Ong, K. C., Khoo, H. E., & Das, N. P. (1995). Tannic acid inhibits insulin-stimulated lipogenesis in rat adipose tissue and insulin receptor function in vitro. *Experientia*, 51(6), 577–584. doi: 10.1007/BF02128747
- ❖ Ottman, N., Geerlings, S. Y., Aalvink, S., de Vos, W. M., & Belzer, C. (2017). Action and function of Akkermansiamuciniphila in microbiome ecology, health and disease. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 31(6), 637-642. doi: 10.1016/j.bpg.2017.10.001
- ❖ Ozdal, T., Sela, D. A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., & Capanoglu E. (2016). The Reciprocal Interactions between Polyphenols and Gut Microbiota and Effects on Bioaccessibility. *Nutrients*, 8(2), 78. doi: 10.3390/nu8020078
- ❖ Palamara, A. T., Nencioni, L., Aquilano, K., De Chiara, G., Hernandez, L., Cozzolino, F.,... Garaci, E. (2005). Inhibition of influenza A virus replication by resveratrol. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(10), 1719–1729. doi: 10.1086/429694
- ❖ Palframan, R. J., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2002). Effect of pH and dose on the growth of gut bacteria on prebiotic carbohydrates in vitro. *Anaerobe*, 8(5), 287-292. doi: 10.1006/anae.2002.0434
- ❖ Papakonstantinou, V. D., Lagopati, N., Tsilibary, E. C., Demopoulos, C. A., & Philippopoulos, A. I. (2017). A Review on Platelet Activating Factor Inhibitors: Could a New

- Class of Potent Metal-Based Anti-Inflammatory Drugs Induce Anticancer Properties?. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2017(6947034). doi: 10.1155/2017/6947034
- ❖ Patel, R.V., Mistry, B. M., Shinde, S. K., Syed, R., Singh, V., & Shin, H. S. (2018). Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 155, 889-904. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.06.053
 - ❖ Pavlidou, E., Mantzorou, M., Fasoulas, A., Tryfonos, C., Petridis, D., & Giaginis, C. (2018). Wine: An Aspiring Agent in Promoting Longevity and Preventing Chronic Diseases. *Diseases*, 6(3), 73. doi: 10.3390/diseases6030073
 - ❖ Pfeuffer, M., Auinger, A., Bley, U., Kraus-Stojanowic, I., Laue, C., Winkler, P., Schrezenmeir, J. (2013). Effect of quercetin on traits of the metabolic syndrome, endothelial function and inflammation in men with different APOE isoforms. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(5), 403-409. doi: 10.1016/j.numecd.2011.08.010
 - ❖ Qiao, Y., Sun, J., Xia, S., Tang, X., Shi, Y., & Le, G. (2014) Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity. *Food and Function*, (6), 1241–1249. doi: 10.1039/c3fo60630a
 - ❖ Queipo-Ortuño, M. I., Boto-Ordóñez, M., Murri, M., Gomez-Zumaquero, J. M., Clemente-Postigo, M, Estruch, R.,...Tinahones, F. J. (2012). Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *The American journal of clinical nutrition*, 95(6), 1323-1334. doi: 10.3945/ajcn.111.027847
 - ❖ Ramirez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G., & Louis, P. (2009). Effect of inulin on the human gut microbiota: Stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *British Journal of Nutrition*, 101(4), 541-550. doi:10.1017/S0007114508019880
 - ❖ Rimm, E. B., Williams, P., Fosher, K., Criqui, M., & Stampfer, M. J. (1999). Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: Meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ*, 319(7224), 1523–1528. doi: 0.1136/bmj.319.7224.1523
 - Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, GAD, Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14. doi: 10.3390/microorganisms7010014
 - ❖ Rinttilä, T., Kassinen, A., Malinen, E., Krogus, L., & Palva, A. (2004). Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 97(6), 1166–1177. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02409.x

- ❖ Roberts, D. E., McNicol, A., & Bose, R. (2004). Mechanism of collagen activation in human platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 19421-19430. doi: 10.1074/jbc.M308864200
- ❖ Rodríguez, J. M., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R. P., Kober, O. I., Juge, N.,...Collado, M. C.(2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 26, 26050, doi: 10.3402/mehd.v26.26050
- ❖ Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*, 57(1), 1-24. doi: 10.1007/s00394-017-1445-8
- ❖ Ruf, J. C. (2004). Alcohol, wine and platelet function. *Biological Research*, 37(2), 209–215. doi: 10.4067/s0716-97602004000200006
- ❖ Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 878-887. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01446.x
- ❖ Saleem, T. S., & Basha, S. D. (2010). Red wine: A drink to your heart. *Journal of cardiovascular disease research*, 1(4), 171–176. <https://doi.org/10.4103/0975-3583.74259>
- ❖ Salonen, A., Nikkilä, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilić-Stojanović, M., Kekkonen, R. A.,...de Vos, W. M. (2010). Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 127–134. doi: 10.1016/j.mimet.2010.02.007
- ❖ Sánchez-Patán, F., Cueva, C., Monagas, M., Walton, G.E., Gibson, G.R., Quintanilla-Lopez, J.E., Lebron-Aguilar, R., Martin-Alvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., Bartolome, B., (2012) In vitro fermentation of a red wine extract by human gut microbiota; changes in microbial groups and formation and phenolic metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 2136–2147. doi: 10.1021/jf2040115
- ❖ Santacruz, A., Collado, M. C., García-Valdés, L., Segura, M. T., Martín-Lagos, J. A., Anjos, T., Sanz, Y. (2010) . Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. *British Journal of Nutrition*, 104(1), 83-92. doi: 10.1017/S0007114510000176
- ❖ Schwartz, A., Taras, D., Schäfer, K., Beijer, S., Bos, N. A., Donus, C., & Hardt, P. D. (2010). Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 18(1), 190–195 <https://doi.org/10.1038/oby.2009.167>

- ❖ Singh, R. K., Chang, H. W., Yan, D., Lee, K. M., Ucmak, D., Wong, K.,...Liao, W. (2017). Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine*, 15, (73). doi: 10.1186/s12967-017-1175-y
- ❖ Szkudelski, T., & Szkudelska, K. (2015). Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1852(6), 1145-1154. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.10.013
- ❖ Tamanai-Shacoori, Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Fong, S. B., Jolivet-Gougeon, A. (2017). Roseburia spp.: a marker of health?. *Future Microbiology*, 12(2), 157-170. doi: 10.2217/fmb-2016-0130
- ❖ Thomas, S., Izard, J., Walsh, E., Batich, K., Chongsathidkiet, P., Clarke, G.,...Prendergast, G. C. (2017). The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Research*, 77(8), 1783-1812. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2929
- ❖ Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823-1836, doi: 10.1042/BCJ20160510
- ❖ Timmers, S., Konings, E., Bilet, L., Houtkooper, R. H., van de Weijer, T., Goossens, G. H., ...Schrauwen, P. (2011). Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metabolism*, 14(5), 612-622. doi: 10.1016/j.cmet.2011.10.002
- ❖ Tosti, V., Bertozzi, B., & Fontana, L. (2018). Health Benefits of the Mediterranean Diet: Metabolic and Molecular Mechanisms. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 73(3), 318–326. doi: 10.1093/gerona/glx227
- ❖ Tsoupras, A. B., Fragopoulou, E., Nomikos, T., Iatrou, C., Antonopoulou, S., & Demopoulos, C. A. (2007). Characterization of the de novo biosynthetic enzyme of platelet activating factor, DDT-insensitive cholinephosphotransferase, of human mesangial cells. *Mediators of Inflammation*, 2007(027683) doi: 10.1155/2007/27683
- ❖ Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444 (7122), 1027–1031. doi: 10.1038/nature05414
- ❖ Turrone, F., Duranti, S., Bottacini, F., Guglielmetti, S., Van Sinderen, D., & Ventura. M. (2014). Bifidobacterium bifidum as an example of a specialized human gut commensal. *Frontiers in Microbiology*, 5, 437. doi: 10.3389/fmicb.2014.00437
- ❖ Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., & Spector, T. D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*, 361, 36-44. doi: 10.1136/bmj.k2179

- ❖ Vandeputte, D., Falony, G., Vieira-Silva, S., Wang, J., Sailer, M., Theis S,...Raes, J. (2017). Prebiotic inulin-type fructans induce specific changes in the human gut microbiota. *Gut*, 66(11), 1968-1974. doi: 10.1136/gutjnl-2016-313271
- ❖ Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X.,...Flint, H. J. (2011). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME Journal*, 5(2), 220–230. doi: 10.1038/ismej.2010.118
- ❖ Weiskirchen, S., & Weiskirchen, R. (2016). Resveratrol : How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy?. *Advances in Nutrition*, 7(4), 706-718. doi: 10.3945/an.115.011627
- ❖ Wexler, H. M. (2007). Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), 593-621. doi: 10.1128/CMR.00008-07
- ❖ Yang, T., Li, S., Zhang, X., Pang, X., Lin, Q., & Cao, J. (2015). Resveratrol, sirtuins, and viruses. *Reviews in Medical Virology*, 25(6), 431–445. doi: 10.1002/rmv.1858
- ❖ Yoo, J. Y., & Kim, S. S. (2016). Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders. *Nutrients*, 8(3), 173. doi: 10.3390/nu8030173
- ❖ Yu, Z., M., & Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*, 36(5), 808-812. doi: 10.2144/04365ST04
- ❖ Zanwar, A. A., Badole, S. L., Shende, P. S., Hegde, M. V., & Bodhankar, S. L. (2014). Role of Gallic Acid in Cardiovascular Disorders. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 2, 1045-1047. doi: 10.1016/B978-0-12-398456-2.00080-3
- ❖ Zhao, L., Zhang, Q., Ma, W., Tian F., Shen, H., & Zhou, M. (2017). A combination of quercetin and resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed rats by modulation of gut microbiota. *Food and Function*, 8(12), 4644–4656. doi: 10.1039/c7fo01383c
- ❖ Zhao, Y., Chen, B., Shen, J., Wan, L., Zhu, Y., Yi, T., & Xiao, Z. (2017). The Beneficial Effects of Quercetin, Curcumin, and Resveratrol in Obesity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, (1459497). doi: 10.1155/2017/1459497
- ❖ Zhu, F., Du, B., Zheng, L., & Li, J. (2015). Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chemistry*, 186, 207-212. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.057
- ❖ Zhuang, H, Kim, Y. S., Koehler, R. C., Dore, S. (2003). Potential mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons. *Annals of the New York Academy Sciences*, 993(1), 276–286. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07534.x

Διαδίκτυο

- ❖ Bajagai, Y. S., Klieve, A.V., Dart, P. J., & Bryden, W. L. (2016). *Probiotics In Animal Nutrition - Production, Impact And Regulation*. [Food and

Agriculture Organisation of The United Nations]. Ανακτήθηκε από <https://www.fao.org/3/i5933e/i5933e.pdf>

- ❖ Cabernet Sauvignon. (2017). Στο *Βικιπαίδεια*. Ανακτήθηκε 30 Μαρτίου, 2019, από: https://en.wikipedia.org/wiki/Cabernet_Sauvignon
- ❖ Kordylas, J. M. (1992). 25, Biotechnology for Production of Fruits, Wines, and Alcohol. Στο *Applications of Biotechnology to Fermented Foods: Report of an Ad Hoc Panel of the Board on Science and Technology for International Development*. (σσ. 170-179). Washington (DC): National Academies Press (US). Ανακτήθηκε από: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK234683/>