



Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας & Διατροφής

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Μελέτη μικροοργανισμών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο
εθελοντών, μετά από παρέμβαση με γιαούρτι εμπλουτισμένο με
βιοδραστικά λιποειδή από παραπροϊόντα ελαιουργίας.

ΖΑΦΕΙΡΟΠΟΥΛΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

A.M. 21109

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κυριακού Αδαμαντινή, Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Κώτσου Μαρία

Νομικός Τζώρτζης

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	4
Abstract	5
Θεωρητικό μέρος	6
Γαστρεντερικός μικροβιόκοσμος	6
Ορισμός	6
Ποιοι είναι? Που βρίσκονται και από πού προέρχονται?	6
Συμμετοχή του εντερικού μικροβιόκοσμου σε φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού – μεταβολίτες που παράγει και οι δράσεις αυτών.....	7
Συσχέτιση με παθοφυσιολογικές καταστάσεις.	10
Αλληλεπίδραση τροφής – εντερικού μικροβιόκοσμου	11
Γιαούρτι.....	13
Πολυφαινόλες και εντερικός μικροβιόκοσμος	15
Εντερικός μικροβιόκοσμος και Καρδιαγγειακά νοσήματα	16
Υλικά και Μέθοδοι	24
Δειγματοληψία και επεξεργασία κοπράνων	25
Καλλιεργητική μεθοδολογία	25
Διαδοχικές αραιώσεις– Επεξεργασία υπό αναερόβιες και αερόβιες συνθήκες.....	25
Μέσο αραιώσης	26
Θρεπτικά υλικά.....	26
Ολικοί αερόβιοι και αναερόβιοι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί.....	26
Αναερόβια επώαση	27
Αερόβια επώαση	29
Περιγραφή αποικιών – Χρώση Gram – Δοκιμασία καταλάσης – Καταμετρήσεις πληθυσμών.....	30
Μέτρηση pH κοπράνων.....	31
Μέτρηση υγρασίας κοπράνων	32
Απομόνωση ολικού DNA.....	32
Ποσοτικός προσδιορισμός εντερικού μικροβιόκοσμου με τη μέθοδο real-time PCR (quantitative PCR) ..	33
Προσδιορισμός Λιπαρών Οξέων Βραχείας Αλύσου (Short Chain Fatty Acids, SCFAs)	33
Διατροφική αξιολόγηση	34
Καταγραφή γαστρεντερολογικών συμπτωμάτων.....	35
Στατιστική επεξεργασία	35
Αποτελέσματα	36
Χαρακτηριστικά δείγματος εθελοντών	36
Χαρακτηριστικά των κενώσεων (pH, ποσοστό υγρασίας)	41
Ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών	42

Καλλιεργητική μεθοδολογία	42
Μη – καλλιεργητική μεθοδολογία	43
Γαστρεντερολογικά συμπτώματα	45
Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs)	48
Συζήτηση	50
Συμπεράσματα	57
Παράρτημα.....	58
Εικόνες.....	58
Εικόνα 1 : Μεταβολισμός διαιτητικών ινών προς λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου και περαιτέρω χρησιμοποίηση αυτών (Tremaroli & Bäckhed, 2012).	58
Εικόνα 3	59
Εικόνα 4	59
Εικόνα 5	60
Εικόνα 6	60
Εικόνα 7	61
Διαγράμματα.....	62
Διάγραμμα 1.....	62
Διάγραμμα 2.....	63
Διάγραμμα 3.....	64
Διάγραμμα 4.....	64
Διάγραμμα 5.....	65
Βιβλιογραφία.....	66

Περίληψη

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος αποτελεί ένα σύνθετο, πυκνό ($\sim 10^{12}$ κύτταρα), δυναμικό μικροβιακό οικοσύστημα, με καθοριστικό ρόλο για την υγεία του ξενιστή. Η διατροφή επηρεάζει άμεσα τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου, και η τροποποίηση αυτής προς πιο ισορροπημένα πρότυπα μέσω διατροφικών παρεμβάσεων αποτελεί πεδίο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος.

Στην παρούσα πτυχιική εργασία μελετήθηκε η επίδραση εμπλουτισμένου γιαουρτιού με βιοδραστικά λιποειδή από παραπροϊόντα ελαιουργίας σε υγιείς εθελοντές, για 2 μήνες. Συμμετείχαν 72 εθελοντές, οι οποίοι χωρίστηκαν σε 3 ομάδες: ομάδα ελέγχου (δεν άλλαξαν τη διατροφή τους), ομάδα παρέμβασης (1 εμπλουτισμένο γιαούρτι καθημερινά) και ομάδα απλής παρέμβασης (1 απλό γιαούρτι). Έδωσαν δείγματα κοπράνων 54 εθελοντές ($t=0$ και 2 μήνες).

Πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών μέσω της καλλιεργητικής και μη – καλλιεργητικής μεθοδολογίας. Για την εφαρμογή της μη καλλιεργητικής μεθοδολογίας προηγήθηκε απομόνωση του μικροβιακού DNA στα δείγματα κοπράνων και στη συνέχεια ποσοτικός προσδιορισμός συγκεκριμένων μικροβιακών ομάδων (real-time PCR). Τέλος πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των Λιπαρών Οξέων Βραχείας Αλύσου (οξικό, προπιονικό, βουτυρικό και διακλαδισμένα SCFAs) με τη μεθοδολογία της αέριας χρωματογραφίας.

Δεδομένα συλλέχθηκαν επίσης για τα γαστρεντερικά συμπτώματα και τις διαιτητικές συνήθειες των εθελοντών ($t=0, 1, 2$ μήνες) μέσω ερωτηματολογίων.

Η χορήγηση βιοδραστικών λιποειδών μέσα από εμπλουτισμένο γιαούρτι σε υγιείς ενήλικες αύξησε σημαντικά τους μικροοργανισμούς του φύλου Firmicutes, του γένους *Bifidobacterium* και της ομάδας του *Clostridium perfringens*, σε σχέση με την έναρξη της παρέμβασης. Στο τέλος της παρέμβασης οι μικροοργανισμοί του φύλου Firmicutes στην ομάδα κατανάλωσης του εμπλουτισμένου γιαουρτιού παρουσίασαν τάση για σημαντικά μεγαλύτερη μέση τιμή σε σχέση με την ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού. Στην ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού αυξήθηκε σημαντικά η ομάδα των λακτοβακίλλων και η ομάδα του *Clostridium perfringens*, σε σχέση με την έναρξη της παρέμβασης. Η ομάδα των λακτοβακίλλων ήταν αυξημένη στους ίδιους εθελοντές, όχι μόνο σε σχέση με την αρχή της παρέμβασης αλλά και σε σχέση με την ομάδα μη κατανάλωσης γιαουρτιού με τάση για στατιστική σημαντικότητα.

Η παρέμβαση δε διαφοροποίησε σημαντικά τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου για καμία ομάδα της μελέτης.

Λέξεις κλειδιά: εντερικός μικροβιόκοσμος, *Bifidobacterium spp.*, πολυφαινόλες, παραπροϊόντα ελαιουργίας.

Abstract

Gut microbiota, comprised of trillions of typically non-pathogenic commensal microorganisms, is widely recognized as an active organ that can modulate multiple functions of the host, from development of the intestinal immune system to hepatic and energy metabolism and to modulation of the brain (gut – brain axis). One of the most interesting research topics is the modulation of gut microorganisms and the impact of host's diet on the composition of gut microbiota.

72 apparently healthy volunteers were recruited in order to examine the consumption of bioactive lipids extracted from olive oil byproducts. They have been asked to consume daily a yogurt enriched with bioactive lipids, or a non – enriched yogurt (placebo) for 8 weeks. A control group with healthy volunteers was asked not to consume any yogurt for the same period.

Selected microbial populations were measured in fecal samples before (t=0) and at the end of the intervention (t=8wks), using quantitative- PCR. Short Chain Fatty Acids (SCFAs) were also measured using Gas Chromatography. Gastrointestinal symptoms and dietary intake were evaluated during the trial, as well.

Firmicutes, *Bifidobacterium* and *Clostridium perfringens* group increased significantly after the 8 weeks daily consumption of the enriched yogurt. At the end of the intervention, the fecal samples of the volunteers that consumed the enriched yoghurt had significantly higher Firmicutes compared to the fecal samples of the volunteers that consumed the simple yoghurt (placebo). Moreover, the simple yoghurt consumers at the end of the intervention had significantly higher populations of *Lactobacillus* group and *Clostridium perfringens* group compared to the start of the intervention. *Lactobacillus* group was also almost higher in the fecal samples of yoghurt eaters compared to those that did not eat yoghurt at al.

No changes on the concentrations of SCFAs were observed.

Key words: intestinal microbiota, *Bifidobacterium* spp., polyphenols, olive oil mill waste.

Θεωρητικό μέρος

Γαστρεντερικός μικροβιόκοσμος

Ορισμός

Ως γαστρεντερικός μικροβιόκοσμος ορίζεται το σύνολο των μικροοργανισμών που αποικίζουν το γαστρεντερικό αυλό ζώντων οργανισμών.

Είναι γεγονός ότι “συμβιώνουμε” με ένα πλήθος μικροοργανισμών σε όλο το μήκος του ανθρώπινου σώματος. Κοιλότητες του σώματος μας αποικίζονται από μικροοργανισμούς με τα κύτταρα αυτών να είναι δέκα φορές περισσότερα των δικών μας σωματικών και γεννητικών κυττάρων (Turnbaugh, Ley et al. 2007). Πρόκειται για ένα μικροβιακό οικοσύστημα εξαιρετικά πυκνό, σημαντικής ποικιλομορφίας, ανερχόμενο στα 100 τρισεκατομμύρια (10^{14}) μεταβολικά ενεργά κύτταρα, συλλογικά γνωστός ως γαστρεντερικός μικροβιόκοσμος (Candela, Biagi et al. 2015). Έως τώρα έχει καλλιεργηθεί μόνο το 30% του εντερικού μικροβιόκοσμου που αποικίζει τον ανθρώπινο οργανισμό (Duenas, Munoz-Gonzalez et al. 2015). Ορίζοντας ως μικροβίωμα το συνολικό γονιδίωμα των μικροοργανισμών με τους οποίους συνυπάρχουμε εντός αλλά και στην επιφάνεια του ανθρώπινου οργανισμού (το γονιδίωμα του μικροβιόκοσμου στο σύνολό του) (Tremaroli and Backhed 2012) και συνυπολογίζοντας αυτό στο ανθρώπινο γονιδίωμα, περίπου 20.000 γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, καταλήγουμε στο συνολικό γονιδίωμα του ανθρώπινου οργανισμού να κωδικοποιεί πρωτεΐνες για χαρακτηριστικά, γνωρίσματα και μεταβολικές ανάγκες εξελικτικά πολύ σημαντικές, τις οποίες δύσκολα θα ολοκληρώναμε απουσία του μικροβιόκοσμου (Verbeke, Boobis et al. 2015). Το DNA του Homo sapiens εκτιμάται ότι αποτελεί μόνο το 10% του DNA του ανθρώπινου οργανισμού συνολικά. Το υπόλοιπο 90% ανήκει στους μικροοργανισμούς που φιλοξενεί τόσο στην επιφάνεια του σώματός του όσο και στο εσωτερικό του και η πλειοψηφία των μικροοργανισμών εντοπίζονται στο γαστρεντερικό αυλό (2012) (Human Microbiome Project Consortium, <http://hmpdacc.org/>).

Ποιοι είναι? Που βρίσκονται και από πού προέρχονται?

Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου είναι αναερόβιοι. Μέχρι το 2010 είχαν περιγραφεί πάνω 50 διαφορετικά βακτηριακά φύλα, με 2 από αυτά να κυριαρχούν στο γαστρεντερικό μας αυλό, τα Bacteroidetes και Firmicutes. Μικροοργανισμοί των φύλων Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria, και Cyanobacteria αποικίζουν σε μικρότερες ποσότητες (Sekirov, Russell et al. 2010). Μικροοργανισμοί από τα 4 κυρίαρχα φύλα Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria και Actinobacteria καλύπτουν το 98% του εντερικού μικροβιόκοσμου (Yamashita, Kasahara et al. 2015).

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος του ανθρώπινου οργανισμού αυξάνεται προοδευτικά κατά μήκος του γαστρεντερικού συστήματος. Αρχικά στο ύψος του στομάχου έως και το δωδεκαδάκτυλο παρατηρούνται 10 έως 10^3 βακτηριακά κύτταρα ανά γραμμάριο υλικού, προχωρώντας στη

νήστιδα και τον ειλεό αυξάνονται στα 10^4 έως και 10^7 κύτταρα ανά γραμμάριο και καταλήγουν στο πυκνό περιεχόμενο του παχέος εντέρου με 10^{11} έως 10^{12} κύτταρα ανά γραμμάριο εντερικού περιεχομένου. Προοδευτικά του γαστρεντερικού αυλού δεν αλλάζει μόνο η ποσότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου συνολικά αλλά και η αναλογία των μικροοργανισμών (Frank, St Amand et al. 2007). Σύμφωνα με την ομάδα του Frank δείγματα από το ύψος του λεπτού εντέρου ήταν πλούσια σε Actinobacteria και την τάξη Bacilli από το φύλο Firmicutes. Αντίστοιχα, δείγματα από το ύψος του παχέος εντέρου ήταν πλούσια σε Bacteroidetes και την οικογένεια Lachnospiraceae από το φύλο Firmicutes (Frank, St Amand et al. 2007). Τέλος, η αναλογία των μικροοργανισμών διαφοροποιείται και κατά πλάτος του γαστρεντερικού αυλού. Το περιεχόμενο εντός του γαστρεντερικού αυλού, που θα είναι τελικώς και το υλικό της κένωσης είναι πλούσιο σε Bacteroides, Bifidobacterium, Streptococcus, μέλη Enterobacteriaceae, Enterococcus, Clostridium, Lactobacillus, και Ruminococcus, από την άλλη σύμφωνα με βιοψίες από την επιφάνεια του επιθηλίου αλλά και τα ενδιάμεσα στρώματα στο υλικό βρέθηκαν μόνο Clostridium, Lactobacillus και Enterococcus (διάγραμμα 1, A & B) (Sekirov, Russell et al. 2010).

Ο ανθρώπινος γαστρεντερικός αυλός εποίκίζεται από τη γέννηση κιόλας του εμβρύου. Γι' αυτό και διαφοροποιείται ανάλογα με τον τρόπο γέννησης, φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική τομή. Στην πρώτη περίπτωση ανιχνεύονται στο εντερικό περιεχόμενο του εμβρύου μικροοργανισμοί που εντοπίζονται και στον κόλπο της μητέρας. Αντίθετα, στη δεύτερη περίπτωση ο γαστρεντερικός αυλός του εμβρύου εποίκίζεται από τους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντα χώρου της κύησης, το νοσοκομειακό δωμάτιο. Κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους ζωής ο εντερικός μικροβιόκοσμος καλλιεργείται και ποικίλει σε κάθε άτομο. Με το πέρας του πρώτου έτος σταθεροποιείται και δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες αλλαγές από αυτόν του ενήλικου μετά από 20 χρόνια ατόμου (διάγραμμα 1, C) (Sekirov, Russell et al. 2010).

Συμμετοχή του εντερικού μικροβιόκοσμου σε φυσιολογικές λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού – μεταβολίτες που παράγει και οι δράσεις αυτών.

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος αποικίζει το γαστρεντερικό αυλό και αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι των ζώντων οργανισμών. Λειτουργεί και θεωρείται πλέον, αυτοτελές όργανο του ανθρώπινου οργανισμού και συμμετέχει σε μεγάλο βαθμό στο μεταβολισμό αυτού, ποικιλοτρόπως. Η σχέση που δημιουργείται μεταξύ του εντερικού μικροβιόκοσμου και του ξενιστή είναι πλέον ξεκάθαρο ότι είναι συμβιωτική (Org, Mehrabian et al. 2015). Ο ξενιστής παρέχει στους μικροοργανισμούς τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την θρέψη, επιβίωση και πολλαπλασιασμό αυτών, ενώ ο εντερικός μικροβιόκοσμος συμμετέχει στο μεταβολισμό διαιτητικών ινών – σύνθετων υδατανθράκων, τη βιοσύνθεση της βιταμίνης K, τις μεταβολικές λειτουργίες και προστατεύει από παθογόνους, ευκαιριακούς μικροοργανισμούς, ενώ φαίνεται ότι επιδρά στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή.

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος παρέχει στον οργανισμό του ξενιστή την ικανότητα να απορροφήσει ενέργεια από σύνθετους άπεπτους υδατάνθρακες, διαιτητικές ίνες, όπως η κυτταρίνη, οι ξυλάνες,

το ανθεκτικό άμυλο και η ινουλίνη, τους οποίους τα ανθρώπινα ένζυμα δε δύνανται να αποικοδομήσουν (Tremaroli and Backhed 2012).

Οι μικροοργανισμοί του εντέρου αποικοδομούν τις διαιτητικές ίνες σε oligo- και μονο-σακχαρίτες και τις «ζυμώνουν» στη συνέχεια με κύρια προϊόντα των ζυμώσεων τα Λιπαρά Οξέα Βραχείας Αλύσου (Short Chain Fatty Acids – SCFAs), όπως είναι το βουτυρικό, το οξικό, το προπιονικό κ.α. Τα λιπαρά οξέα που προκύπτουν απορροφώνται έπειτα από τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου, όπου το βουτυρικό οξύ αποτελεί πηγή ενέργειας αυτών, ενώ το προπιονικό και το οξικό οξύ κατευθύνονται προς το ήπαρ και τους περιφερικούς ιστούς και αποτελούν εκεί υποστρώματα γλυκονογένεσης και λιπογένεσης (εικόνα 1). Η ποσότητα των παραγόμενων SCFAs, άρα και το κατά πόσο αποικοδομήθηκαν οι σύνθετοι υδατάνθρακες και απορρόφησε ενέργεια ο οργανισμός από αυτούς, εξαρτάται από την καταναλισκόμενη ποσότητα υδατανθράκων κάθε ατόμου και την εκάστοτε σύνθεση του εντερικού του μικροβιόκοσμου (Tremaroli and Backhed 2012).

Τα SCFAs που παράγονται μετά τη μικροβιακή ζύμωση των άπεπτων υδατανθράκων λειτουργούν όχι μόνο ως υποστρώματα των εντεροκυττάρων και των ηπατοκυττάρων αλλά και ως μόρια – σηματοδότες στους G protein – coupled υποδοχείς, Gpr41 και Gpr43 (Samuel, Shaito et al. 2008). Πρόκειται για 2 τύπους υποδοχέων G πρωτεϊνών, οι οποίοι λαμβάνουν σήμα μετά την πρόσδεση των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (ligands) και ενεργοποιούνται αφού προσδεθεί και η φωσφορυλιωμένη G – πρωτεΐνη. Επιστρέφουν, λοιπόν τα SCFAs στο γαστρεντερικό αυλό και η ενεργοποιημένη πλέον G – πρωτεΐνη ενεργοποιεί το ένζυμο που διεγείρει την έκφραση της λεπτίνης, μια πολυπεπτιδική ορμόνη με πλειοτροπική δράση στην όρεξη και το μεταβολισμό (Kimura, Inoue et al. 2011). Οι δύο αυτοί υποδοχείς εκφράζονται τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα του λεπτού εντέρου, του παχέος εντέρου όσο και στα λιποκύτταρα (Samuel, Shaito et al. 2008). Συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση των SCFAs με τον Gpr41 υποδοχέα φαίνεται να οδηγεί σε αυξημένη έκκριση ορμονών που μειώνουν την κινητικότητα του γαστρεντερικού σωλήνα, αυξάνοντας έτσι το χρόνο διέλευσης και το ποσοστό των SCFAs που απορροφώνται από τα εντεροκύτταρα. Κατ'επέκταση, παρέχεται στο ήπαρ μεγαλύτερη συγκέντρωση SCFAs που αποτελούν ένα από τα πλέον κατάλληλα υποστρώματα λιπογένεσης, αυξάνοντας έτσι την παραγωγή ενέργειας από τους άπεπτους υδατάνθρακες (Samuel, Shaito et al. 2008).

Τέλος, μία από τις πλέον σημαντικές δράσεις των SCFAs είναι η συμμετοχή τους στη ρύθμιση του pH του περιεχομένου εντός του γαστρεντερικού αυλού (Nicholson, Holmes et al. 2012).

Το μικροβιακό γονιδίωμα όπως έχει ήδη αναφερθεί παρέχει στον οργανισμό που το φιλοξενεί την ικανότητα να μεταβολίζει σύνθετους υδατάνθρακες, οι οποίοι φυσιολογικά περνούν από το λεπτό έντερο και εισέρχονται στο παχύ άπεπτο, και να «συλλέγει», έτσι, επιπλέον ενέργεια από αυτούς. Η ικανότητα αυτή παρουσιάζεται αυξημένη σε παχύσαρκα άτομα συγκριτικά των αντίστοιχων φυσιολογικού βάρους. Συγκεκριμένα, μέσω βιοχημικών αναλύσεων και αναλύσεων μεταγενομικής σε παχύσαρκα ποντίκια αλλά και σε ποντίκια φυσιολογικού βάρους (ομάδα ελέγχου), φαίνεται ότι αλλαγές στην αναλογία των δύο κυρίαρχων φύλων Firmicutes και Bacteroidetes επηρεάζουν τη μεταβολική δυναμική του εντερικού μικροβιόκοσμου των ποντικών και των δύο ομάδων, με τα αποτελέσματα να αναδεικνύουν την ικανότητα παραγωγής ενέργειας αυξημένη κατά πολύ στα παχύσαρκα ποντίκια (Turnbaugh, Ley et al. 2006). Αντίστοιχα δεδομένα

από παχύσαρκους και μη ανθρώπους έρχονται από μελέτες ανίχνευσης ποσοτήτων αιθανόλης κατά την αναπνοή με τους παχύσαρκους να εκπνέουν μεγαλύτερες ποσότητες αυτής (Satheesh Nair 2001). Έμμεσα αποτελέσματα, τα οποία δυνητικά μπορούν να μας οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι στα παχύσαρκα άτομα, με την αυξημένη ποσότητα αιθανόλης στην αναπνοή τους, ζυμώνονται οι σύνθετοι υδατάνθρακες σε μεγαλύτερο βαθμό, παράγοντας μεγαλύτερη ποσότητα SCFAs και απορροφώντας έτσι περισσότερη ενέργεια από την ίδια ποσότητα τροφής (Schwartz, Taras et al. 2010).

Επιπλέον, ο εντερικός μικροβιόκοσμος συμμετέχει στο μεταβολισμό των χολικών οξέων (Tremaroli and Backhed 2012). Τα χολικά οξέα βιοσυντίθενται εντός του ήπατος, κυρίως στα περιφερικά κύτταρα, δηλαδή τα κύτταρα γύρω από την κύρια ηπατική φλέβα, με πρόδρομο μόριο τη χοληστερόλη (Staels and Fonseca 2009). Στη συνέχεια, τα πρωτογενή χολικά οξέα συζεύγγονται με ταυρίνη ή γλυκίνη. Τα πρωτογενή χολικά οξέα που παράγονται στον ανθρώπινο οργανισμό είναι το χολικό και το χινοδεοξυχολικό οξύ. Αφού παραχθούν στα ηπατοκύτταρα, αποθηκεύονται στη χοληδόχο κύστη και μετά την κατανάλωση γεύματος εκκρίνονται με τη σειρά τους στο δωδεκαδάκτυλο του λεπτού εντέρου. Εκεί είναι υπεύθυνα για την απορρόφηση του λίπους και των λιποδιαλυτών βιταμινών σε όλο το μήκος του λεπτού εντέρου. Μόλις φτάσουν, λοιπόν, στον ειλεό του λεπτού εντέρου, το 95% αυτών επαν-απορροφάται. Δημιουργείται έτσι μια «δυναμική» δεξαμενή χολικών οξέων, τα οποία ανακυκλώνονται συνεχώς στον ανθρώπινο οργανισμό, μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας, με την μικρή απώλεια του 5% να ελέγχεται μέσω της βιογενούς παραγωγής πρωτογενών χολικών οξέων εντός του ήπατος όπως έχει ήδη αναφερθεί (Lefebvre, Cariou et al. 2009).

Αυτό που ωστόσο συμβαίνει είναι οι μικροοργανισμοί οι οποίοι εδρεύουν στο τελικό μέρος του ειλεού να αποδεσμεύουν ορισμένα από τα χολικά οξέα από τη γλυκίνη και την ταυρίνη κι έτσι αυτά να μην επαν-απορροφώνται αλλά να μεταβολίζονται σε δευτερογενή χολικά οξέα (Tremaroli and Backhed 2012). Ο παραπάνω μεταβολισμός χαρακτηρίζεται όχι μόνο από αποδέσμευση από τη γλυκίνη ή την ταυρίνη αλλά και αφυδρογόνωση, αφαίρεση υδροξυλίου, αντίδραση του μορίου που προκύπτει με θεική ομάδα (Swann, Want et al. 2011) και πραγματοποιείται επίσης από τη μικροχλωρίδα της περιοχής του ειλεού. Τα δευτερογενή χολικά οξέα, στη συνέχεια, επαν-απορροφώνται μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας, εισάγονται στο ήπαρ και αποτελούν πλέον μέρος της ήδη υπάρχουσας δεξαμενής των χολικών οξέων (εικόνα 2). Αυξάνεται έτσι συνολικά η ποικιλία των χολικών οξέων, γεγονός που γίνεται πλέον ξεκάθαρο από αναλύσεις σε αξενικά (germ-free) πειραματόζωα. Πρόκειται για ποντίκια που αναπτύσσονται σε αποστειρωμένο περιβάλλον και δεν αποικίζονται από μικροοργανισμούς σε καμία κοιλότητα του σώματός τους. Αναλύοντας λοιπόν την ποσότητα των χολικών οξέων συνολικά, του χολικού οξέος συγκεκριμένα αλλά και την ποικιλία αυτών, φάνηκε ότι τα αξενικά ζώα χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ποσότητα χολικού οξέος (πρωτογενές οξύ) και μικρότερη ποικιλία στα είδη των χολικών, συγκριτικά με τα ποντίκια που αναπτύχθηκαν σε φυσιολογικό περιβάλλον και αποικίζονται από μικροοργανισμούς. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη ότι οι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν περαιτέρω τα πρωτογενή χολικά οξέα (χολικό και χινοδεοξυχολικό) μειώνοντας έτσι την ποσότητα του πρωτογενούς χολικού οξέος και αυξάνοντας έτσι την ποικιλία αυτών.

Τα χολικά οξέα, στο σύνολό τους, δεν συνεισφέρουν μόνο στο μεταβολισμό του λίπους και των λιποδιαλυτών βιταμινών, αλλά αποτελούν και μόρια σηματοδότες για δύο υποδοχείς, τον

υποδοχέα ρυθμιστή της σύνθεσης χολικών οξέων FXR (bile-acid-synthesis controlling nuclear receptor farnesoid X receptor) και τον GPCR TGR5 υποδοχέα (Staels and Fonseca 2009). Και οι δύο αυτοί υποδοχείς έχουν συσχετιστεί με τη ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης στα ποντίκια (Tremaroli and Backhed 2012). Η ενεργοποίηση, επομένως, των δύο αυτών υποδοχέων, μετά την πρόσδεση των χολικών οξέων (πρωτογενών ή δευτερογενών) αποτελεί ένα ακόμα μέσο ελέγχου του λιπιδαιμικού προφίλ, του μεταβολισμού της γλυκόζης και της ενεργειακής ομοιόστασης του ξενιστή πέραν της αυτορρύθμισης της σύνθεσης, σύζευξης, μεταφοράς και αυτοκαταστροφής των χολικών οξέων (Swann, Want et al. 2011).

Τέλος, αξίζει να τονίσουμε, τη συμμετοχή του εντερικού μικροβιόκοσμου στο μεταβολισμό της χολίνης (εικόνα 3). Πρόκειται για μεταβολικό προϊόν της φωσφατιδυλοχολίνης, απαραίτητο για την ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών, τη σύνθεση της ακετυλοχολίνης, τη σηματοδότηση – ενεργοποίηση των μεμβρανών των κυττάρων καθώς και το μεταβολισμό της μεθυλομάδας. Για να πραγματοποιηθεί η τελευταία λειτουργία κρίνεται απαραίτητη η συμμετοχή της βηταίνης, μεταβολίτης της χολίνης (Ierardi, Sorrentino et al. 2015). Δεδομένων των παραπάνω διαδικασιών στις οποίες συμμετέχει ενεργά η χολίνη και η συμμετοχή αυτής κρίνεται αναγκαία καταλήγουμε στο ότι η χολίνη είναι ένα ημιαπαραίτητο θρεπτικό συστατικό το οποίο σίγουρα δε μπορούμε να αποκλείσουμε οριστικά από τη διατροφή μας (Ierardi, Sorrentino et al. 2015).

Το πώς συμμετέχει ο εντερικός μικροβιόκοσμος στο μεταβολισμό της χολίνης παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Βακτήρια της τάξης Erysipelotrichia (φύλο Firmicutes) μεταβολίζουν το μόριο της χολίνης προς τριμεθυλαμίνη TMA, η οποία στη συνέχεια απορροφάται από τα ηπατοκύτταρα και οξειδώνεται προς TMAO εντός του ήπατος (Serino, Blasco-Baque et al. 2014). Αντίστοιχη διαδικασία ακολουθείται και για την L – καρνιτίνη, πιθανότατα από διαφορετικούς μικροοργανισμούς (εικόνα 4) (Koeth, Levison et al. 2014). Το οξύδιο της TMA (TMAO), συσχετίζεται άμεσα με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο.

Συσχέτιση με παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος συγκαταλέγεται πλέον στους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν το μεταβολισμό του ξενιστή και πρόσφατα δεδομένα αναδεικνύουν τη συμμετοχή αυτού στην ανάπτυξη παχυσαρκίας (Parseus, Sommer et al. 2016). Ποικίλες οι μελέτες στις οποίες παρουσιάζεται ο εντερικός μικροβιόκοσμος παχύσαρκων ποντικών και ανθρώπων τροποποιημένος, συγκριτικά με εκείνον που έχουν φυσιολογικό βάρος (Ley, Backhed et al. 2005; Turnbaugh, Hamady et al. 2009).

Αξίζει να τονιστεί ότι παρά τις πολλές μελέτες παρατήρησης που έχουν δημοσιευτεί με αναφορές στον «τροποποιημένο» εντερικό μικροβιόκοσμο σε υπέρβαρα – παχύσαρκα άτομα, ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός που υποβόσκει και οδηγεί σε μία τέτοια κατάσταση δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός. Αναγνωρίζεται πλέον, ότι η ανισορροπία στην ποσότητα και την αναλογία μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου, γνωστή ως «δυσβίωση», οδηγεί σε χαμηλού βαθμού, χρόνια φλεγμονή, που δύναται να καταλήξει σε ορισμένη ινσουλινοαντίσταση, δυσλιπιδαιμία και πιθανόν Μεταβολικό Σύνδρομο (Haro, Garcia-Carpintero et al. 2016).

Επιπλέον της παχυσαρκίας και του μεταβολικού συνδρόμου, υπάρχουν αναφορές συσχέτισης της δυσβίωσης του εντερικού μικροβιόκοσμου με τη Μη Αλκοολική Λιπώδη Διήθηση του Ήπατος (Non Alcoholic Fatty Liver Disease – NAFLD), με ισχυρές προσπάθειες για αποσαφήνιση του μηχανισμού δράσης (He, Ji et al. 2016).

Διαταραχή στην ισορροπία των μικροβιακών πληθυσμών του εντερικού μικροβιόκοσμου δε μπορεί να μην επηρεάσει το γαστρεντερικό σύστημα στο οποίο και εδρεύει. Συσχετίσεις μεταξύ αυτής και του καρκίνου του παχέως εντέρου (Gagniere, Raisch et al. 2016), της νόσου του Crohn και την Ελκώδη Κολίτιδα (τους δύο βασικούς τύπους Ιδιοπαθούς Φλεγμονώδους Νόσου του Εντέρου – ΙΦΝΕ) (Wang, Kaplan et al. 2016) έχουν ήδη αναφερθεί.

Όμως πρόσφατα αρκετές δημοσιεύσεις εμφανίζουν και άλλα συστήματα πέραν του γαστρεντερικού να επηρεάζονται από τους μικροοργανισμούς του εντέρου. Για παράδειγμα ασθενείς με νόσο Parkinson παρουσιάζουν δυσλειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος (80% των ασθενών) και δεν είναι γνωστό εάν αυτή η δυσλειτουργία είναι που επιδεινώνει τη συμπτωματολογία της νόσου. Φαίνεται ότι υπάρχει δυναμική συσχέτιση της νόσου με τον εντερικό μικροβιόκοσμο που εμφανίζεται τροποποιημένος στους ασθενείς αυτούς (Mulak and Bonaz 2015). Η σημασία του εντερικού μικροβιόκοσμου και οι επιπτώσεις που μπορεί να επιφέρουν τυχόν μεταβολές του (δυσβίωση) επεκτείνεται πλέον και σε νευροψυχιατρικές διαταραχές, τον αυτισμό και διαταραχές της διάθεσης όπως το διπολικό σύνδρομο (Mangiola, Ianiro et al. 2016). Οι παρατηρήσεις αυτές οδηγούν πολύ συχνά στη σύνδεση του εντέρου με το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), που συνοπτικά αποκαλείται «άξονας σύνδεσης εγκεφάλου – εντέρου» (gut brain axis).

Αλληλεπίδραση τροφής – εντερικού μικροβιόκοσμου

Σε αυτή τη συμβιωτική σχέση μεταξύ των μικροοργανισμών και του ξενιστή οργανισμού ποικίλοι είναι οι παράγοντες που δύνανται να παρέμβουν και να τροποποιήσουν την υπάρχουσα κατάσταση. Παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο και η διατροφή του ξενιστή επηρεάζουν κατά πολύ τη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος, με τη διατροφή να αποτελεί εύκολα τροποποιήσιμο στόχο θεραπευτικής παρέμβασης (Wu, Chen et al. 2011). Η υιοθέτηση μίας ισορροπημένης δίαιτας έχει φανεί ότι συμβάλει στη διατήρηση ενός «υγιούς» εντερικού μικροβιόκοσμου και μειώνει τον κίνδυνο ποικίλων ασθενειών (Houghton, Stewart et al. 2016).

Ομάδες ερευνητών στην προσπάθεια τους να μελετήσουν την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, καθώς και το γονότυπο του ξενιστή – οργανισμού «χρησιμοποιούν» αξενικά πειραματόζωα, στα οποία μεταμοσχεύουν μέρος του εντερικού μικροβιόκοσμου από τον εν λόγω ξενιστή και πραγματοποιούν την αντίστοιχη παρέμβαση που επιθυμούν. Ωστόσο, υπάρχουν περιοριστικοί παράγοντες για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων αυτών σε ανθρώπινο επίπεδο, καθώς μπορεί ο εντερικός μικροβιόκοσμος των ποντικών και του ανθρώπου να φιλοξενεί τα ίδια φύλα μικροοργανισμών (Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, TM7, Fusobacteria, και Spirochaetes), ωστόσο τα περισσότερα

γέννη και είδη που εντοπίζονται στα ποντίκια δεν εντοπίζονται στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο (Turnbaugh, Hamady et al. 2009).

Ενδεικτικά των μελετών σε πειραματόζωα που αναδεικνύουν την αξία της διατροφής στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου αναφέρεται η μελέτη του Turnbaugh και των συνεργατών του (Turnbaugh, Hamady et al. 2009) κατά την οποία πραγματοποιήθηκε παρέμβαση με δίαιτα πλούσια σε διαιτητικές ίνες / φτωχή σε λίπος και αλλαγή αυτής στη συνέχεια με δίαιτα πλούσια σε σάκχαρα / πλούσια σε λίπος. Στη συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε αύξηση του πληθυσμού του φύλου Firmicutes στις τάξεις Bacilli και Erysipelotrichi και παράλληλη μείωση του φύλου Bacteroidetes, μετά την αλλαγή της διαίτας. Αντίστοιχα αποτελέσματα σε ανθρώπινο επίπεδο λαμβάνουμε από μελέτη παρατήρησης σε κατοίκους της αγροτικής περιοχής της Αφρικής και της αστικής περιοχής της Ευρώπης, όπου παρατηρείται ότι στα άτομα της Αφρικής, που ακολουθούν δίαιτα πλούσια σε διαιτητικές ίνες και λαχανικά, ο πληθυσμός του φύλου Bacteroidetes είναι ενισχυμένος και του φύλου Firmicutes σχετικά μειωμένος συγκριτικά με τους αντίστοιχους πληθυσμούς μικροοργανισμών στους κατοίκους της Ευρώπης (που φαίνεται να καταναλώνουν δίαιτα πλούσια σε λίπος και σάκχαρα και φτωχή σε ίνες και λαχανικά) (Houghton, Stewart et al. 2016). Τέλος, μελέτη παρέμβασης σε ανθρώπους με δίαιτα εμπλουτισμένη σε άπεπτους υδατάνθρακες έδειξε αλλαγή στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου μέσα σε λίγες μόλις ημέρες, συγκριτικά της ομάδας ελέγχου (Walker, Ince et al. 2011).

Σε συγχρονική μελέτη που συμμετείχαν 98 εθελοντές μελετήθηκε σε δείγματα κοπράνων ο εντερικός τους μικροβιόκοσμος και έγινε διατροφική αξιολόγηση των εθελοντών. Σε δέκα από αυτούς έγινε διατροφική παρέμβαση σε ελεγχόμενες συνθήκες ώστε να συγκριθούν δύο δίαιτες, η μία πλούσια σε λίπος/ φτωχή σε διαιτητικές ίνες και η άλλη φτωχή σε λίπος / πλούσια σε διαιτητικές ίνες. Τέλος, λήφθηκαν δείγματα βιοψίας από τους δέκα εθελοντές πριν και μετά τη δεκαήμερη παρέμβαση (Wu, Chen et al. 2011). Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης αναδεικνύουν την αξία και την επίδραση των μακροθρεπτικών συστατικών στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 2 τα μακροθρεπτικά συστατικά πρωτεΐνη και λίπος συσχετίζονται θετικά με τα επίπεδα των μικροοργανισμών του γένους *Bacteroides* ενώ οι υδατάνθρακες παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση. Επίσης το γένος *Prevotella* συσχετίζεται θετικά με την κατανάλωση υδατανθράκων, ενώ αρνητικά με την κατανάλωση αμινοξέων και την πλειοψηφία των λιπαρών οξέων (Wu, Chen et al. 2011).

Επίσης μετά από συσχέτιση των αποτελεσμάτων με την υπόθεση των 3 εντερότυπων (*Bacteroides*, *Prevotella*, και *Ruminococcus*, διάγραμμα 3) (Arumugam, Raes et al. 2011), προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα: Πρώτον, ο εντερότυπος, *Bacteroides* συσχετίζεται με αυξημένη κατανάλωση κορεσμένου λίπους και αμινοξέων, γεγονός που αναδεικνύει ότι η αυξημένη κατανάλωση κρέατος, έντονη στη Δυτικού τύπου δίαιτα, χαρακτηρίζει αυτό τον εντερότυπο. Δεύτερον, ο εντερότυπος *Prevotella* συσχετίζεται αρνητικά με τις τιμές λίπους και αμινοξέων ενώ παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την κατανάλωση των υδατανθράκων, συμπεριλαμβανομένων των απλών σακχάρων, γεγονός που συσχετίζει τον εντερότυπο αυτό με τη δίαιτα αγροτικών περιοχών. Τρίτον, ο εντερότυπος *Ruminococcus* δύσκολα διαχωρίζεται από τον εντερότυπο *Bacteroides* (διάγραμμα 4) (Wu, Chen et al. 2011).

Σε μελέτη του εντερικού μικροβιόκοσμου νεαρών ατόμων κατηγοριοποιημένων με κριτήριο το Δείκτη Μάζας Σώματος σε φυσιολογικού Σωματικού Βάρους (Δ.Μ.Σ. <25Kg/m²), υπέρβαρους (Δ.Μ.Σ.: 25 – 30Kg/m²) και παχύσαρκους (Δ.Μ.Σ. > 30Kg/m²), όπου έγινε προσπάθεια συσχέτισης με τις διατροφικές τους συνήθειες προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα: (Mayorga Reyes, Gonzalez Vazquez et al. 2016). Δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ της ενεργειακής πρόσληψης και των φύλων Bacteroidetes και Firmicutes. Αντίστοιχα δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της ενεργειακής πρόσληψης και των *B. thetaiotaomicron*, *F. prausnitzii*, *C. leptum* ή *Prevotella*. Η πρόσληψη κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων δε διαφοροποιήθηκε σημαντικά ανάμεσα στις 3 ομάδες, ωστόσο η πρόσληψη ακόρεστων λιπαρών οξέων συσχετίστηκε θετικά με το *B. longum*. Τέλος, παρατηρήθηκε συσχέτιση της πρόσληψης διαιτητικών ινών και του φύλου Bacteroidetes.

Γιαούρτι

Το γιαούρτι αποτελεί ένα από τα πλέον σημαντικά προϊόντα επεξεργασίας του γάλακτος, μαζί με το τυρί. Σύμφωνα με το Codex Alimentarius (1992), γιαούρτι είναι το προϊόν της ζύμωσης του γάλακτος από τους μικροοργανισμούς *Lactobacillus delbrueckii* υποείδος *bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus* (Bourlioux and Pochart 1988), και η αξία του στην υγεία του ανθρώπου έχει μελετηθεί αρκετά (Elli, Callegari et al. 2006). Πλέον χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης μικροοργανισμών για την παραγωγή του γιαουρτιού και άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια (lactic acid bacteria – LAB), τα οποία προσδίδουν επιπλέον οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τελειοποιούν το παραγόμενο προϊόν. Για να πληροί τα κριτήρια του Codex Alimentarius (second edition, 2011) για «ζωντανό και ενεργής καλλιέργειας γιαούρτι» το τελικώς παραγόμενο προϊόν θα πρέπει να περιέχει όσο είναι στο εργοστάσιο ακόμα, τουλάχιστον 10⁷ CFU μικροοργανισμών ανά γραμμάριο προϊόντος και να διατηρήσει τις καλλιέργειες ενεργές έως και το τέλος του καθορισμένου χρόνου «ζωής» του γιαουρτιού, δηλαδή έως και την ορισμένη ημερομηνία λήξης (WHO 2011). Τα βακτήρια που συμμετέχουν στη διαδικασία παραγωγής του γιαουρτιού και έχουν απομονωθεί από αυτό φαίνεται να συνεισφέρουν σημαντικά στη λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος (Adolfsson, Meydani et al. 2004), να βελτιώνουν την απορρόφηση της λακτόζης σε άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη, να επιδρούν στο χρόνο μεταφοράς του υλικού κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα και να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα (Meydani and Ha 2000).

Τα κριτήρια που έχουν τεθεί κατά καιρούς για την επιλογή των κατάλληλων μικροοργανισμών για τη ζύμωση του γάλακτος ποικίλουν. Πλέον κρίνεται απαραίτητο χαρακτηριστικό να περνούν μέσα από το γαστρεντερικό σωλήνα και να φτάνουν ζωντανοί στο παχύ έντερο, ώστε να διατηρούν με τον τρόπο αυτό τα οποιαδήποτε οφέλη προαγωγής υγείας του ξενιστή που θα καταναλώσει το γιαούρτι (Elli, Callegari et al. 2006). Μελέτες έχουν ελέγξει την «επιβίωση» των μικροοργανισμών κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα και φάνηκε ότι στα δείγματα κενώσεων εθελοντών, που καταλάωναν 1 γιαούρτι του εμπορίου (125gr), 2 φορές την ημέρα για 1 εβδομάδα, εντοπίζονται τα βακτήρια του γιαουρτιού, κυρίως το *Lactobacillus bulgaricus* (Elli, Callegari et al. 2006).

Οι διαφορές του γιαουρτιού ως προς τη θρεπτική αξία, σε σχέση με το γάλα είναι λίγες. Οι βιταμίνες B-12 και C κατά τη διάρκεια της ζύμωσης καταναλώνονται και παράγεται Φυλικό Οξύ.

Όσον αφορά στα μακροθρεπτικά συστατικά, το γιαούρτι περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα πεπτιδίων και ελεύθερων αμινοξέων, άρα πρωτεϊνών συνολικά, λιγότερη λακτόζη, περισσότερη γαλακτόζη και γαλακτικό οξύ, και τέλος περισσότερα ελεύθερα λιπαρά οξέα (Meydani and Ha 2000). Ο βασικός παράγοντας που επηρεάζει τη διατροφική αξία του γιαουρτιού είναι η ποιότητα του γάλακτος, η οποία επηρεάζεται και ποικίλει ανάλογα με το γενετικό και ατομικό υπόβαθρο του ζώου, την ηλικία του, τη διατροφή του, το στάδιο ανάπτυξής του καθώς και οι καιρικές συνθήκες διαβίωσης αυτού. Επιπλέον, το τελικό προϊόν και η αξία αυτού επηρεάζεται από τις συνθήκες παραγωγής του, δηλαδή τη θερμοκρασία ζύμωσης και παραγωγής του γιαουρτιού, το χρόνο βρασμού, την έκθεση στον ήλιο και τις συνθήκες αποθήκευσης (Adolfsson, Meydani et al. 2004).

Τα οφέλη της κατανάλωσης γιαουρτιού ποικίλουν. Τα γιαούρτια ή ακόμα και οι καλλιέργειες μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση του γάλακτος και την παραγωγή του γιαουρτιού έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζουν ευεργετική δράση σε παιδιά και ενήλικες με έντονες διαρροϊκές κενώσεις κατά τη διάρκεια της θεραπείας, ακόμα και σε παιδιά που η διάρροια αποδίδεται σε ροταϊό, ή παρουσιάζουν αυξημένη συγκέντρωση αναγωγικών σακχάρων στα κόπρανα (Boudraa, Benbouabdellah et al. 2001). Το πώς αυτό αιτιολογείται δεν έχει ακόμα πλήρως διευκρινισθεί, ωστόσο έχει ήδη αναφερθεί η ικανότητα του γιαουρτιού να διεγείρει την απορρόφηση της λακτόζης που δυνητικά επηρεάζει τόσο την παθολογική αιτία όσο και τη συχνότητα των διαρροϊκών κενώσεων. Η ευεργετική αυτή δράση του γιαουρτιού αποδίδεται, κυρίως, στους μικροοργανισμούς που όπως έχει ήδη αναφερθεί ζυμώνουν το γάλα και παράγουν το γιαούρτι.

Η σημασία της κατανάλωσης γιαουρτιού αξιολογείται πλέον όχι μόνο για νοσήματα του γαστρεντερικού συστήματος αλλά και για μεταβολικά νοσήματα, όπως είναι η παχυσαρκία και συνολικά το Μεταβολικό Σύνδρομο (ΜΣ). Οι 5 άξονες αξιολόγησης του Μ.Σ., τα Τριγλυκερίδια (TG), η HDL, η Αρτηριακή Πίεση (Α.Π.), η Γλυκόζη Νηστείας (Gluc) και το μήκος της Περιφέρειας μέσης επηρεάζονται πολύ από τις διατροφικές συνήθειες του ατόμου. Το 2010, το Μεταβολικό Σύνδρομο στην Ισπανία εμφανιζόταν σε ποσοστό 22,7% ανά τον ενήλικο πληθυσμό (Sayon-Orea, Bes-Rastrollo et al. 2015). Αποτελεί πλέον απειλή για τη Δημόσια Υγεία καθώς αυξάνει πολύ την πιθανότητα εμφάνισης Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2 και Καρδιαγγειακών Νοσημάτων.

Δεν είναι λίγες οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με στόχο να συσχετίσουν συγκεκριμένα στοιχεία της διατροφής με το Μεταβολικό Σύνδρομο. Κατά καιρούς ποικίλες ερευνητικές ομάδες έχουν ασχοληθεί και με τα γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα αποτελέσματα αυτών είναι διφορούμενα, ωστόσο τα αποτελέσματα των μελετών που ήταν προσανατολισμένες στην κατανάλωση γιαουρτιού δείχνουν μια συγκεκριμένη τάση προστατευτικής δράσης αυτού έναντι της εμφάνισης Μεταβολικού Συνδρόμου (Lutsey, Steffen et al. 2008). Σε μελέτη παρατήρησης φάνηκε ότι τα άτομα που κατανάλωναν τη μεγαλύτερη ποσότητα γιαουρτιού ήταν και τα άτομα με το χαμηλότερο Δείκτη Μάζας Σώματος, τα πιο δραστήρια άτομα, με τη μικρότερη πιθανότητα να είναι καπνιστές και τη μεγαλύτερη συνολική πρόσληψη ενέργειας, πρόσληψη πρωτεΐνης και υδατανθράκων αλλά τη μικρότερη πρόσληψη λίπους. Καμία συσχέτιση δεν παρουσιάστηκε μεταξύ της κατανάλωσης γιαουρτιού, είτε πλήρους είτε χαμηλών λιπαρών, και της εμφάνισης Μεταβολικού Συνδρόμου, ωστόσο αφού έγινε προσαρμογή για πιθανούς συγχρητικούς παράγοντες παρατηρήθηκε μη στατιστικά σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της

κατανάλωσης γιαουρτιού και της εμφάνισης Μεταβολικού Συνδρόμου, δηλαδή αυξημένη κατανάλωση γιαουρτιού να συσχετίζεται με μειωμένη πιθανότητα εμφάνισης (Sayon-Orea, Bes-Rastrollo et al. 2015).

Πολυφαινόλες και εντερικός μικροβιόκοσμος

Οι πολυφαινόλες είναι στοιχεία ευρέως διαδεδομένα στο βασίλειο των φυτών. Φαίνεται να παρουσιάζουν ευεργετικές δράσεις στους ζώντες οργανισμούς που τις καταναλώνουν και κατηγοριοποιούνται σε 2 βασικές ομάδες: τα φλαβονοειδή και τα μη – φλαβονοειδή. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι φλαβονόλες, οι φλαβαν-3-όλες, οι φλαβόνες, οι ανθοκυανιδίνες, οι ισοφλαβόνες και άλλες. Στη δεύτερη κατηγορία βασικά παραδείγματα είναι τα φαινολικά οξέα, οι τανίνες και τα στυλβένια. Η απορρόφηση των πολυφαινολών στο λεπτό έντερο εξαρτάται από τη χημική δομή της κάθε φαινόλης, ωστόσο συνολικά μόνο το 5 – 10% όσων καταναλώνονται φαίνεται να απορροφώνται από τα εντεροκύτταρα, το υπόλοιπο 90 – 95% προχωράει άπεπτο στο παχύ έντερο. Οι ισοφλαβόνες είναι αυτές που έχουν τη μεγαλύτερη ικανότητα απορρόφησης, ακολουθούν οι κατεχίνες, οι φλαβονόνες και τα γλυκοζίδια των φαινολών με ενδιάμεση ικανότητα απορρόφησης και τέλος οι προανθοκυανιδίνες και οι ανθοκυανίνες που απορροφώνται ελάχιστα στο λεπτό έντερο (Duenas, Munoz-Gonzalez et al. 2015).

Πρωταρχικό βήμα στη διαδικασία μεταβολισμού των πολυφαινολών είναι η υδρόλυση του δεσμού μεταξύ των φαινολικών στοιχείων και της ομάδας σακχάρου. Το βήμα αυτό λαμβάνει συχνά χώρα στη στοματική κοιλότητα του ανθρώπου, ωστόσο, η συγκεκριμένη υδρόλυση πραγματοποιείται κυρίως από το ένζυμο lactase phlorizin hydrolase (LPH), στην επιφάνεια του εντερικού επιθηλίου του λεπτού εντέρου και έτσι οι υδρολυμένες πλέον φαινολικές ενώσεις, χωρίς το σάκχαρο (aglycones), εισέρχονται στα εντεροκύτταρα με παθητική διάχυση. Εντός του εντεροκυττάρου, υπό τη δράση ενζύμων φάσης II, βιομετατρέπονται σε ενώσεις ικανές να συζευχθούν περαιτέρω και οι τελικοί μεταβολίτες είναι αυτοί που θα εντοπίζονται στην αιματική κυκλοφορία του ανθρώπινου οργανισμού. Ωστόσο, πριν προχωρήσουν στην αιματική κυκλοφορία, επιδέχονται ένα επιπλέον μεταβολικό βήμα «αποτοξίνωσης» (detoxification) από τα ένζυμα φάσης II, στο ήπαρ αυτή τη φορά, όπου συζευγνύονται με χημικές ομάδες όπως το γλυκουρονικό οξύ, τα σουλφίδια ή οι μεθυλομάδες (Zanotti, Dall'Asta et al. 2015). Σημειώνεται ότι μεγάλο ποσοστό των πολυφαινολών συζευγνύονται με πρωτεΐνες και σχηματίζουν σύμπλοκα τα οποία δεν υδρολύονται και δεν απορροφώνται καθόλου στο λεπτό έντερο. Οι συζευγμένοι μεταβολίτες, μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας επιστρέφουν στο λεπτό έντερο, όπου δε απορροφώνται και συνεχίζουν την πορεία τους στο παχύ έντερο, μαζί με τα φαινολικά τα οποία περνούν ανέπαφα (εικόνα 5). Εκεί, ο εντερικός μικροβιόκοσμος παρουσιάζει μεγάλη ποικιλία υδρόλυσης ανάλογα με τους μικροοργανισμούς που αποικίζουν το παχύ έντερο κάθε οργανισμού. Οι ενώσεις που προκύπτουν είτε απορροφώνται είτε καταβολίζονται περαιτέρω σε μικρότερου μεγέθους φαινολικά παράγωγα (Aura 2008). Το τελευταίο πραγματοποιείται με ποικίλους μηχανισμούς (π.χ. αφαίρεση μεθυλομάδας, υδροξυλομάδας, σπάσιμο αρωματικού δακτυλίου κ.α.). Πολλοί ερευνητές υποθέτουν ότι η ευεργετική δράση των φαινολικών ουσιών αποδίδεται

στα μεταβολικά παράγωγα αυτών μετά τη δράση του εντερικού μικροβιόκοσμου και όχι στην αυθεντική ουσία που καταναλώθηκε (Williamson and Clifford 2010).

Οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί ώστε να αποσαφηνιστεί η σχέση μεταξύ των διαιτητικών πολυφαινολών και του εντερικού μικροβιόκοσμου ποικίλουν τόσο σε σχεδιασμό όσο και στη φαινολική ουσία και δοσολογία που χορηγείται. Οι μελέτες *in vitro* είναι 2 κατηγοριών, η μία πραγματοποιείται σε σταθερές συνθήκες με επώαση των εναιωρημάτων των δειγμάτων κοπράνων παρουσία των πολυφαινολών για μικρά μόνο χρονικά διαστήματα και η άλλη είναι σε «προσομοιωτές» του γαστρεντερικού συστήματος του ανθρώπου, με ικανότητα παραμονής για ημέρες έως και εβδομάδες (Duenas, Munoz-Gonzalez et al. 2015).

Η επίδραση των πολυφαινολών στον εντερικό μικροβιόκοσμο έχει μελετηθεί αρκετά, όπου έχουν εξεταστεί φαινολικές ουσίες από διάφορα προϊόντα φυτικής προέλευσης και κυρίως blueberries (Vendrame, Guglielmetti et al. 2011), κακάο (Tzounis, Rodriguez-Mateos et al. 2011), σόγια (De Boever, Deplancke et al. 2000), τσάι (Mai, Katki et al. 2004) και κρασί (Queiro-Ortuno, Boto-Ordonez et al. 2012). Συνολικά, καταλήγουν στο ότι οι πολυφαινόλες επηρεάζουν θετικά τον εντερικό μικροβιόκοσμο μειώνοντας τον πληθυσμό παθογόνων μικροοργανισμών όπως είναι το *Clostridium perfringens*, το *Clostridium histolyticum* και ορισμένα Gram αρνητικά βακτήρια, στελέχη του γένους *Bacteroides* και ενισχύοντας τον πληθυσμό ευεργετικών μικροοργανισμών όπως τα Clostridia, bifidobacteria και lactobacilli (Duenas, Munoz-Gonzalez et al. 2015).

Είναι γεγονός ότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα κερδίζουν όλο και περισσότερο έδαφος στην αγορά λειτουργικών τροφίμων. Οι εταιρείες τα εμπλουτίζουν με κάθε λογής συστατικό που έχει φανεί ότι έχει ευεργετικές ιδιότητες για τον ανθρώπινο οργανισμό και προσελκύουν έτσι όλο και περισσότερους καταναλωτές. Σε αυτό το πλαίσιο, ο εμπλουτισμός των γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως είναι το γιαούρτι, με πολυφαινόλες, φαίνεται να αποτελεί μια αποτελεσματική τεχνολογική εναλλακτική, με στόχο την αποκατάσταση της ισορροπίας του εντερικού μικροβιόκοσμου του καταναλωτή, χάρη όχι μόνο στα προβιοτικά με τα οποία μπορεί να είναι εμπλουτισμένο αλλά και στις πολυφαινόλες (Duenas, Munoz-Gonzalez et al. 2015).

Εντερικός μικροβιόκοσμος και Καρδιαγγειακά νοσήματα

Η Στεφανιαία Νόσος σε συνδυασμό με το Αγγειακό Εγκεφαλικό Επεισόδιο (Α.Ε.Ε.) αποτελούν τις 2 πρώτες αιτίες θανάτου σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Το 2012 η Στεφανιαία Νόσος ήταν υπεύθυνη για το θάνατο 7,4 εκατομμυρίων ανθρώπων και το Α.Ε.Ε. για 6,7 εκατομμύρια αντίστοιχα (WHO, updated 2014). Οι παράγοντες κινδύνου της Καρδιαγγειακής Νόσου κατηγοριοποιούνται σε αυτούς που δεν τροποποιούνται [Αύξηση ηλικίας (άνδρες >45 ετών, γυναίκες >55 ετών), Κληρονομικότητα, Φύλο (άνδρες), Καρδιακό επεισόδιο ή ΑΕΕ στο παρελθόν], σε αυτούς που τροποποιούνται (Υπέρταση, Υπερχοληστερολαιμία, Κάπνισμα, Υπέρβαρο - παχυσαρκία, Σωματική αδράνεια, Σακχαρώδης διαβήτης, Δίαιτα πλούσια σε κορεσμένο λίπος, χοληστερόλη και ενέργεια) και σε άλλους παράγοντες όπως η εξατομικευμένη απόκριση στο stress, η κατάχρηση αλκοόλ και η χρήση απαγορευμένων ουσιών. Επιπλέον αυτών, κατηγορούνται νεότεροι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση «πρώιμης» καρδιαγγειακής

νόσου όπως η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας, τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης, η υπερτριγλυκεριδαμία, τα αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεΐνης (α) [Lp(a)], το οξειδωτικό stress, η υπερπηκτικότητα, η μειωμένη δραστηριότητα του ινωδολυτικού μηχανισμού, οι δείκτες φλεγμονής (π.χ. C- αντιδρώσα πρωτεΐνη) και τέλος ορισμένοι λοιμώδεις παράγοντες (Franklin and Cushman 2011).

Συνολικά, η αθηροσκλήρωση θεωρείται μια χρόνια φλεγμονώδης νόσος στην οποία συμμετέχουν πολλοί τύποι κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Τα δύο πρώτα στάδια στη διαδικασία σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας είναι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και η συσσώρευση LDL – χοληστερόλης στο ενδοθηλιακό τοίχωμα. Σε αυτά συμμετέχουν οι παράγοντες κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου όπως η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση, ο Σακχαρώδης Διαβήτης και το κάπνισμα. Ακολουθεί η οξείδωση της συσσωρευμένης LDL προς OxLDL. Ο σχηματισμός της OxLDL κρίνεται κομβικό σημείο της φλεγμονής του αρτηριακού τοιχώματος και του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας. Παράλληλα, μονοκύτταρα και ποικίλα άλλα λευκοκύτταρα προσκολλώνται στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, μεταναστεύουν εντός του τοιχώματος και παράγουν προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Στη συνέχεια, τα μονοκύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα, τα οποία λαμβάνουν μέσω υποδοχέων εκκαθαριστών την OxLDL και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Μέσω των παραπάνω μηχανισμών σχηματίζονται οι λιπώδεις ραβδώσεις (fatty streaks) οι οποίες περιέχουν τόσο λιπίδια όσο και κύτταρα του ανοσοποιητικού (μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, T – λεμφοκύτταρα κ.α.). Η διαδικασία της αθηρωμάτωσης έχει συνεπώς ξεκινήσει, με τη συμμετοχή προφλεγμονωδών αλλά και αντι – φλεγμονωδών κυττάρων (όπως τα ρυθμιστικά T – κύτταρα). Είναι γεγονός πως προοδευτικά ο μηχανισμός σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας γίνεται όλο και πιο περίπλοκος (εικόνα 2) (Yamashita, Kasahara et al. 2015).

Στους παράγοντες κινδύνου συγκαταλέγονται τόσο γενετικοί όσο και περιβαλλοντικοί. Η συμμετοχή των γενετικών παραγόντων στον καρδιαγγειακό κίνδυνο υπολογίζεται λιγότερο από 20% (Brown and Hazen 2015). Με την πάροδο του χρόνου θα έρχονται στο φως όλο και περισσότεροι γενετικοί παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, ωστόσο αξίζει να επαναξιολογήσουμε και τους περιβαλλοντικούς. Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες είναι που κυριαρχούν του καρδιαγγειακού κινδύνου, αυτοί στους οποίους μπορούμε να παρέμβουμε και να τροποποιήσουμε, μειώνοντας έτσι την πιθανότητα εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου (Tang and Hazen 2014).

Η μεγαλύτερη έκθεση του ανθρώπου σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα είναι μέσω της τροφής που εισέρχεται στον οργανισμό μας σε μεγάλες ποσότητες (κιλά) καθημερινά (Tang and Hazen 2014). Όπως έχει ήδη αναφερθεί μετά το πρώτο έτος ζωής του ανθρώπου ο εντερικός μικροβιόκοσμος σταθεροποιείται, ωστόσο πρόκειται για ένα δυναμικό μικροβιακό οικοσύστημα το οποίο επηρεάζεται τόσο από τις χρόνιες διατροφικές συνήθειες του ατόμου όσο και από την περιστασιακή - μεμονωμένη κατανάλωση συγκεκριμένων τροφίμων (Lozupone, Stombaugh et al. 2012). Η διατροφή επηρεάζει τόσο τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου, που σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες έχουν προταθεί και διαφορετικοί εντερότυποι συσχετισμένοι με τις διατροφικές συνήθειες των ατόμων.

Ο μεταβολισμός και η απορρόφηση της καταναλισκόμενης τροφής λαμβάνουν χώρα μέσα από το σταθερό αλλά ταυτόχρονα δυναμικό αυτό φίλτρο τρισεκατομμυρίων μικροοργανισμών που αποικίζουν το γαστρεντερικό μας σύστημα, καθιστώντας έτσι τον εντερικό μικροβιόκοσμο φίλτρο για τη μεγαλύτερη περιβαλλοντική έκθεση του ανθρώπινου οργανισμού στο εξωτερικό περιβάλλον (Tang and Hazen 2014).

Σύμφωνα με μελέτη αλληλούχισης του μικροβιώματος ασθενών με στενωτική, συμπτωματική αθηρωματική πλάκα στην καρωτιδική αρτηρία παρατηρείται ότι το μικροβίωμα αυτών είναι πλούσιο σε μικροοργανισμούς του γένους *Collinsella*, ενώ το εντερικό μικροβίωμα της ομάδας ελέγχου (υγιείς, αντίστοιχης ηλικίας και φύλου) πλούσιο σε *Roseburia* και *Eubacterium* (Karlsson, Fak et al. 2012). Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν προσπαθήσει έως τώρα να εξηγήσουν τη συσχέτιση της δυσβίωσης με την αθηροσκλήρωση και έχουν τελικά καταλήξει σε ποικίλα παθοφυσιολογικά μονοπάτια.

Αρχικά, αναφέρονται οι μεταβολίτες (protein-bound uraemic retention solutes) para – cresyl sulfate και indoxyl sulfate, οι οποίοι έχουν συσχετιστεί με ένα εύρος εκφάνσεων της καρδιαγγειακής νόσου, από την αθηροσκλήρωση έως και την ομπρέλα του «καρδιονεφρικού» συνδρόμου (cardiorenal syndrome) (Lekawanvijit, Kompa et al. 2016). Παράγονται κατά το μεταβολισμό – ζύμωση των διαιτητικών πρωτεϊνών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο, εκκρίνονται και περνάνε εν συνεχεία στην αιματική κυκλοφορία (Meijers and Evenepoel 2011), (εικόνα 6). Καταλήγουν στους νεφρούς από όπου και διαχέονται και τελικά απεκκρίνονται μέσω των ούρων. Σε περίπτωση υπερβολικής κατανάλωσης διαιτητικής πρωτεΐνης, καθώς και προβληματικής λειτουργίας του νεφρικού συστήματος, πιθανότατα δεν απεκκρίνονται φυσιολογικά από τους νεφρούς, αυξάνεται κατά πολύ η συγκέντρωσή τους στο αίμα και προσδένονται στις πρωτεΐνες της αιματικής κυκλοφορίας. Παρατηρείται ότι σε ασθενείς με Χρόνια Νεφρική Νόσο η αυξημένη συγκέντρωση των προσδεμένων σε πρωτεΐνες μεταβολιτών στην αιματική κυκλοφορία συμβάλλει στην εμφάνιση ισσουλινοαντίστασης. Μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως σε ποντίκια με ΧΝΝ αλλά αντίστοιχα είναι τα αποτελέσματα και από καλλιέργειες μυϊκών κυττάρων ασθενών, όπου φαίνεται ότι το p-cresyl sulfate (PCS) παρεμβαίνει στα ενδοκυτταρικά μονοπάτια μεταφοράς σημάτων του μορίου της ινσουλίνης (Soulage, Korpe et al. 2013). Η ισσουλινοαντίσταση οδηγεί αναπόφευκτα σε Σακχαρώδη Διαβήτη. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης και συγκεκριμένα οι μακροαγγειακές επιπλοκές της νόσου, αποτελούν τον κυρίαρχο παράγοντα εμφάνισης Καρδιαγγειακής Νόσου. Καταλήγουμε λοιπόν σε έναν πιθανό μηχανισμό συσχέτισης των ενδοτοξινών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο και την εμφάνιση Καρδιαγγειακής Νόσου.

Ένας επιπλέον μεταβολίτης που έχει απασχολήσει ιδιαίτερα, και έχει πλέον συσχετισθεί με τον κίνδυνο εμφάνισης Καρδιαγγειακής Νόσου είναι το οξείδιο της Τριμεθυλαμίνης (TMAO). Αυτό που αρχικά παρατηρήθηκε είναι ότι σε δείγματα πλάσματος ασθενών με αθηρωματική πλάκα, οι οποίοι παρακολουθήθηκαν για ένα διάστημα 3 ετών και «πέρασαν» κάποια στιγμή κατά τη διάρκεια αυτού του διαστήματος Έμφραγμα του Μυοκαρδίου, εγκεφαλικό ή απεβίωσαν, η τιμή του TMAO ήταν πολύ πιο υψηλή συγκριτικά με τα υγιή άτομα αντίστοιχου φύλου και ηλικίας που αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (Wang, Klipfell et al. 2011). Στο πλάσμα αυτών των ασθενών οι συγκεντρώσεις των επίσης μικρών μορίων βηταΐνης και χολίνης ήταν αντίστοιχα αυξημένες. Οι

αυξημένες αυτές τιμές του TMAO, της βηταΐνης και της χολίνης, στο πλάσμα του αίματος συσχετίστηκαν με αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης Καρδιαγγειακής Νόσου (Wang, Klipfell et al. 2011).

Όταν μελέτησαν το οξείδιο της τριμεθυλαμίνης και το πώς αυτό παράγεται, κατέληξαν στο ότι προέρχεται από το μεταβολισμό της χολίνης και της καρνιτίνης (Wang, Klipfell et al. 2011). Η χολίνη είναι συστατικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης (συμμετέχει στο σχηματισμό των φωσφολιποειδών) και του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη. Λαμβάνοντας υπόψη τη συμμετοχή της χολίνης τόσο σε δομικό επίπεδο (μιτοχονδριακή μεμβράνη) όσο και σε επίπεδο μεταφοράς σήματος (ακετυλοχολίνη) γίνεται πλέον αντιληπτό γιατί η χολίνη θεωρείται απαραίτητο στοιχείο της διατροφής του ανθρώπου. Χολίνη παράγεται ενδογενώς από τον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά όχι σε επαρκή ποσότητα, γι αυτό και είναι απαραίτητη η λήψη της μέσω της διατροφής μας. Επηρεάζει διαδικασίες όπως ο μεταβολισμός των λιποειδών, η εξαρτώμενη από τη μεθυλίωση βιοσύνθεση μορίων, η εντεροηπατική κυκλοφορία της χολής και της χοληστερόλης και άλλες (Corbin and Zeisel 2012). Η κυρίαρχη μορφή με την οποία εντοπίζεται η χολίνη στα τρόφιμα είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (PC), ή αλλιώς λεκιθίνη. Τρόφιμα πλούσια σε φωσφατιδυλοχολίνη είναι τα αυγά, το γάλα, το συκώτι, το κόκκινο κρέας, τα πουλερικά, τα οστρακόδερμα και τα ψάρια (Zeisel, Mar et al. 2003). Η τιμή επαρκούς πρόσληψη χολίνης την ημέρα ανέρχεται στα 550 mg (Adequate Intake) (Zeisel, Mar et al. 2003). Σε περιπτώσεις μη επαρκούς πρόσληψης ενέχουν κίνδυνοι στεάτωσης του ήπατος και νευρολογικών διαταραχών (Tang and Hazen 2014).

Στη συνέχεια ελέγχθηκαν οι οδοί σίτισης (εντερική ή παρεντερική) της χολίνης. Φάνηκε ότι μετά από κατανάλωση διαιτητικής χολίνης από του στόματος, η συγκέντρωση του TMAO στο πλάσμα αυξήθηκε ενώ μετά από παρεντερική χορήγηση χολίνης, η συγκέντρωση TMAO πλάσματος δεν άλλαξε. Η παραπάνω παρατήρηση οδήγησε στο συμπέρασμα ότι κάποιο από τα βιοχημικά στάδια του μεταβολισμού της χολίνης λαμβάνει χώρα εντός του γαστρεντερικού αυλού (Yamashita, Kasahara et al. 2015).

Η διαιτητική χολίνη μεταβολίζεται σε τριμεθυλαμίνη στο παχύ έντερο από μικροοργανισμούς της τάξης *Erysipelotrichia* από το φύλο *Firmicutes* και όχι μόνο (Serino, Blasco-Baque et al. 2014). Η βακτηριακή αυτή ζύμωση και μετατροπή της χολίνης και καρνιτίνης σε TMA πραγματοποιείται με τη δράση ποικίλων βακτηριακών ενζύμων (Org, Mehrabian et al. 2015). Η τριμεθυλαμίνη που προκύπτει απορροφάται στη συνέχεια από τα εντεροκύτταρα και μεταφέρεται, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μέσω της αιματικής κυκλοφορίας στο ήπαρ. Οξειδώνεται μέσω των Φλαβινομονοοξυγενασών (FMOs) και σχηματίζει το N- οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) (Tang and Hazen 2014). Το TMAO εμποδίζει και μειώνει την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης, προάγοντας έτσι τη συσσώρευση και εναπόθεση αυτής πάνω στα μονοκύτταρα, που θα μετατραπούν σε μακροφάγα και εν συνεχεία σε αφρώδη κύτταρα. Η διαδικασία της αθηρωμάτωσης έχει πλέον ξεκινήσει. Αυτό που παραμένει αδιευκρίνιστο είναι το πώς το TMAO μειώνει την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης (Serino, Blasco-Baque et al. 2014).

Η συγκέντρωση του TMAO στο πλάσμα αυξάνεται και μετά την κατανάλωση διαιτητικής L – καρνιτίνης. Η καρνιτίνη είναι ένα αμινοξύ το οποίο βρίσκεται σε αφθονία στο κόκκινο κρέας και

περιέχει μια δομή τριμεθυλαμίνης αντίστοιχη αυτής που περιέχεται στη χολίνη. Αντίθετα της χολίνης, η καρνιτίνη συντίθεται ενδογενώς από το αμινοξύ λυσίνη σε επαρκή ποσότητα. Η λυσίνη βρίσκεται σε αφθονία τόσο σε φυτικής όσο και σε ζωικής προελεύσεως πρωτεΐνες, συνεπώς παρά τα πολλά στάδια που απαιτούνται, παράγεται επαρκής ποσότητα καρνιτίνης, με αποτέλεσμα να μην είναι απαραίτητη η διαιτητική πρόσληψη αυτής. Η καρνιτίνη ακολουθεί το ίδιο μονοπάτι παραγωγής TMAO με τη χολίνη και πιθανολογείται ότι στο μεταβολισμό της καρνιτίνης σε TMA συμμετέχουν μικροοργανισμοί των οικογενειών *Clostridiaceae* και *Peptostreptococcaceae* (Yamashita, Kasahara et al. 2015). Πρόσφατα έγινε αναφορά σε ένα δεύτερο, εναλλακτικό μονοπάτι παραγωγής TMAO από την καρνιτίνη με βασικό ενδιάμεσο αυτού τη γ-βουτυροβηταΐνη, η οποία χαρακτηρίζεται και ως προ-αθηρωματική ένωση (Koeth, Levison et al. 2014). Το TMAO ανεξαρτήτως προελεύσεως (χολίνη ή καρνιτίνη) και βιοχημικού μονοπατιού που ακολουθήθηκε για να παραχθεί μειώνει την αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης και ενισχύει έτσι τη μετατροπή των μακροφάγων κυττάρων σε αφρώδη. Ωστόσο, το ποιο μονοπάτι μετατροπής της καρνιτίνης σε TMAO θα ακολουθηθεί επηρεάζει κατά πολύ την παρέμβαση που μπορούμε να κάνουμε ώστε να το προλάβουμε ή να το αντιμετωπίσουμε, καθώς συμμετέχουν διαφορετικοί μικροοργανισμοί.

Επιπρόσθετα των σουλφιδίων και του οξειδίου της τριμεθυλαμίνης, μια ακόμα κατηγορία μεταβολιτών του εντερικού μικροβιόκοσμου που σχετίζονται με τον κίνδυνο εμφάνισης Καρδιαγγειακής Νόσου είναι τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs). Τα δείγματα κοπράνων από παχύσαρκα ποντίκια είναι πιο πλούσια σε βουτυρικό και οξικό οξύ, συγκριτικά των ποντικών φυσιολογικού βάρους, αντίθετα καμία διαφορά δεν παρατηρείται στα δείγματα των δύο ομάδων όσον αφορά στη συγκέντρωση του προπιονικού οξέος (Turnbaugh, Ley et al. 2006). Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα SCFAs δρουν και επιβαρύνουν τον κίνδυνο εμφάνισης Καρδιαγγειακών Νοσημάτων ποικίλουν.

Αρχικά αναφέρεται η επαγωγική τους δράση στην έκκριση της angiopoietin – like 4 (ANGPTL4) ή αλλιώς fasting – induced adipose factor (FIAF). Η ANGPTL4 εκκρίνεται ως μια προ-ορμόνη από διάφορους ιστούς, όπως το ήπαρ, οι σκελετικοί μύες, ο λιπώδης ιστός και το έντερο και στη συνέχεια σπάει σε N – τελικό και C – τελικό κομμάτι. Το N – τελικό κομμάτι μπλοκάρει τη δράση του ενζύμου λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), που είναι υπεύθυνο για την επαναφορά των λιπιδίων από την αιματική κυκλοφορία στους ιστούς. Έτσι, σε περίπτωση υπερέκκρισης ANGPTL4, η LPL απενεργοποιείται κατά πολύ, με αποτέλεσμα τα λιπίδια να συσσωρεύονται στην κυκλοφορία του αίματος και να μη μεταφέρονται πίσω στους ιστούς (Alex, Lange et al. 2013). Αναπόφευκτα τα τριγλυκερίδια εναποτίθενται στη συνέχεια επάνω στα μακροφάγα, επιδεινώνουν το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και τη διαδικασία της αθηρωμάτωσης συνολικά. Το βουτυρικό είναι που διεγείρει κυρίως την έκκριση της ANGPTL4 και ακολουθεί το προπιονικό. Αντίθετα, το οξικό επιδρά ελάχιστα στην έκκριση αυτής.

Τα 3 κύρια Λιπαρά Οξέα Βραχείας Αλύσου είναι το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό, με τα 2 πρώτα να περνάνε στην πυλαία κυκλοφορία και να αποτελούν υποστρώματα της ηπατικής γλυκονογένεσης και λιπογένεσης ενώ το βουτυρικό χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας από τα εντεροκύτταρα. Τόσο το οξικό όσο και το προπιονικό συμμετέχουν στο μεταβολισμό των

λιποειδών και κυρίως της χοληστερόλης και αυτό αποτελεί το δεύτερο μηχανισμό με τον οποίο μπορεί να επιδρούν στον κίνδυνο εμφάνισης Καρδιαγγειακής Νόσου. Το οξικό οξύ (acetate acid) μέσω της δράσης του ενζύμου acetyl – CoA συνθετάση μετατρέπεται σε acetyl – CoA, το υπόστρωμα της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης. Συνεπώς, όσο περισσότερο οξικό οξύ παράγεται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο τόσο αυξημένη είναι η παραγωγή χοληστερόλης άρα και η τιμή της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στην αιματική κυκλοφορία άρα και ο κίνδυνος εμφάνισης Καρδιαγγειακής Νόσου. Από την άλλη το προπιονικό οξύ είναι αναστολέας του ενζύμου acetyl – CoA συνθετάση. Συνεπώς, το προπιονικό δρα ανασταλτικά στη βιοσύνθεση χοληστερόλης και μειώνει αντίστοιχα τον κίνδυνο CVD. Η συγκεκριμένη υπόθεση είναι ακόμα υπό αμφισβήτηση. Καταλήγει όμως στο λόγο οξικό οξύ: προπιονικό οξύ, που έχει θετική συσχέτιση με τη συγκέντρωση ολικής χοληστερόλης και LDL – cholesterol στο πλάσμα αντρών με φυσιολογικές τιμές χοληστερόλης ορρού αλλά όχι στις γυναίκες. Η θετική συσχέτιση στην ομάδα των αντρών παρέμεινε στατιστικά σημαντική αφού έγινε και διόρθωση για τους συγχρητικούς παράγοντες ηλικία και Δείκτης Μάζας Σώματος (Wolever TM 1996).

Η συμμετοχή των SCFAs στο μεταβολισμό των λιποειδών δε στέκεται μόνο στη βιογενή σύνθεση χοληστερόλης, αλλά επεκτείνεται και στο μεταβολισμό των χολικών αλάτων, την απορρόφηση διαιτητικού λίπους και το σχηματισμό δευτερογενών χολικών αλάτων. Μέσω και αυτών των μηχανισμών, οι οποίοι έχουν αναφερθεί παραπάνω τα SCFAs δύνανται να συμμετέχουν στον κίνδυνο εμφάνισης Καρδιαγγειακής Νόσου.

Τέλος, τα SCFAs δρουν και σαν μόρια σηματοδότες, επηρεάζοντας την έκφραση της λεπτίνης, μια ορμόνη με δράση στην όρεξη και το μεταβολισμό. Σε περίπτωση δυσβίωσης του εντερικού μικροβιόκοσμου άρα και μη φυσιολογικής παραγωγής SCFAs, είναι πιθανό να επηρεαστεί η όρεξη και ο μεταβολισμός του ανθρώπου, να επιδεινώσει την κατάσταση του υπέρβαρου και της παχυσαρκίας και να αυξήσει τέλος τον κίνδυνο εμφάνισης Καρδιαγγειακής Νόσου (Kimura, Inoue et al. 2011).

Ένας τελευταίος μεταβολίτης του εντερικού μικροβιόκοσμου που παράγεται από το μεταβολισμό μικρού μοριακού βάρους αρωματικών στοιχείων και διαιτητικών πολυφαινόλων είναι το ιππουρικό. Πρόκειται για ένα μεταβολίτη η παραγωγή του οποίου απαιτεί το μεταβολισμό τόσο του ξενιστή όσο και του εντερικού μικροβιόκοσμου που τον αποικίζει. Όταν φτάσουν τα αρωματικά στοιχεία ή οι πολυφαινόλες στο παχύ έντερο του καταναλωτή, οι μικροοργανισμοί που βρίσκονται εκεί τα μεταβολίζουν προς βενζοϊκό οξύ. Στη συνέχεια το βενζοϊκό οξύ εισέρχεται μέσω της αιματικής κυκλοφορίας στα ηπατικά κύτταρα όπου εντός των μιτοχονδρίων συζευγνύεται με τη γλυκίνη και παράγεται το ιππουρικό οξύ. Αμέσως αφού παραχθεί το ιππουρικό απεκκρίνεται μέσω των ούρων. Αποτελεί, συνεπώς, δείκτη λειτουργίας του εντερικού μικροβιόκοσμου, εύκολα μετρήσιμο σε δείγμα ούρων (Harris, Kassis et al. 2012). Το ιππουρικό διαφέρει μεταξύ των υγιών και μη ατόμων, ειδικά σε άτομα με ινσουλινοαντίσταση ή καρδιαγγειακά νοσήματα. Συγκεκριμένα, σε δείγμα ούρων ασθενών το ιππουρικό είναι σε πολύ χαμηλότερη τιμή. Πρόσφατα, το ιππουρικό χαρακτηρίστηκε ως δείκτης ανίχνευσης ατόμων με αρτηριακή υπέρταση έναντι των νορμοτασικών. Στη μελέτη INTERMAP σε 4630 συμμετέχοντες από Κίνα, ΗΠΑ, Ιαπωνία και Ηνωμένο Βασίλειο το ιππουρικό συσχετίστηκε αρνητικά με την

αρτηριακή πίεση (Holmes, Loo et al. 2008). Η αρτηριακή υπέρταση αποτελεί παράγοντα κινδύνου των Καρδιαγγειακών Νοσημάτων, έτσι το υπουρικό φαίνεται να είναι ένας ακόμα μεταβολίτης του εντερικού μικροβιόκοσμου που επηρεάζεται τόσο από την τροφή (πολυφαινόλες) όσο και από τον εντερικό μικροβιόκοσμο και αποτελεί δείκτη Καρδιαγγειακού Κινδύνου.

Δεν είναι μόνο οι μεταβολίτες του εντερικού μικροβιόκοσμου που σχετίζονται με την εμφάνιση CVD αλλά και τα συστατικά των ίδιων των μικροοργανισμών όπως είναι τα λιποπολυσακχαρίδια (LPS). Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει συγκεκριμένα στοιχεία των βακτηριακών μεμβρανών μέσω υποδοχέων (pattern recognition receptors – PRRs). Υπάρχουν 2 κατηγορίες υποδοχέων, οι Toll-like receptors και οι Nod-like receptors. Ορισμένοι από τους πρώτους εντοπίζονται στην επιφάνεια των κυττάρων και άλλοι στη μεμβράνη αυτών. Αντίθετα, οι Nod-like υποδοχείς εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα (Harris, Kassis et al. 2012). Τα λιποπολυσακχαρίδια που προέρχονται από τη μεμβράνη των Gram – αρνητικών βακτηρίων αναγνωρίζονται από τους υποδοχείς Toll-like Receptors 4 (TLR4) και φαίνεται να σχετίζονται με την χαμηλού βαθμού χρόνια φλεγμονή. Τα LPS που προέρχονται από το βακτηριακό τοίχωμα «νεκρών» Gram – αρνητικών βακτηρίων αφού αναγνωριστούν από τους TLR4, μεταφέρονται υπό φυσιολογικές συνθήκες στα τριχοειδή κύτταρα του γαστρεντερικού συστήματος. Στη συνέχεια, μεταφέρονται στον ιστό στόχο μέσω ενός μηχανισμού όπου συμμετέχουν λιποπρωτεΐνες και κυρίως χυλομικρά. Τέλος, αφού προσδεθούν στο σύμπλοκο mCD14 και TLR4 στην επιφάνεια των κυττάρων του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, ενεργοποιούν την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Cani, Amar et al. 2007). Δεδομένα μελετών αναφέρουν πως η μεταβολική ενδοτοξαιμία, όπως αυτή ορίζεται με LPS πλάσματος 50 – 100 pg/ml, δύναται να οδηγήσει σε χαμηλού βαθμού φλεγμονή η οποία όπως έχει αναφερθεί ενυπάρχει στα Καρδιαγγειακά Νοσήματα, την ινσουλινοαντίσταση και το Σακχαρώδη Διαβήτη (Harris, Kassis et al. 2012). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης Bruneck τα άτομα με LPS > 50pg/mL αντιμετώπισαν 3 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης αθηροσκλήρωσης και μάλιστα στα άτομα με χρόνια φλεγμονή και πρώην ή νυν καπνιστές ο κίνδυνος είναι ακόμα πιο μεγάλος. Όσον αφορά στους καπνιστές και μη, οι οποίοι έχουν χαμηλές τιμές LPS πλάσματος δε φαίνεται να παρουσιάζουν ιδιαίτερη διαφορά στην πιθανότητα εμφάνισης αθηροσκλήρωσης. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω τα LPS φαίνεται να αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου των Καρδιαγγειακών Νοσημάτων (Wiedermann, Kiechl et al. 1999).

Μια κατηγορία μικροοργανισμών που αξίζει να αναφερθεί για την ωφέλιμη δράσης της στην παρούσα ενότητα είναι ορισμένα βακτηριακά στελέχη με προβιοτικές ιδιότητες. Σε ομάδα ατόμων με υπερχοληστερολαιμία η οποία κατανάλωνε καθημερινά για έξι εβδομάδες 2 γιαούρτια εμπλουτισμένα με μικροοργανισμούς *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242, τα αποτελέσματα ήταν εντυπωσιακά. Η συγκέντρωση της LDL – cholesterol μειώθηκε κατά 8,92%, η ολική χοληστερόλη (TC) κατά 4,81% και τέλος η non – HDL cholesterol κατά 6,01%, παρουσιάζοντας και στα τρία σημαντική μείωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Jones, Martoni et al. 2012). Φαίνεται πως υπεύθυνη για αυτή τη μείωση της χοληστερόλης του πλάσματος είναι η ικανότητα του συγκεκριμένου μικροοργανισμού να εκκρίνει την υδρολάση των χολικών αλάτων (bile salt hydrolase enzyme – BSH). Η BSH υδρολύει τον C – 24 N – άκυλο αμιδικό δεσμό που ενώνει το ελεύθερο χολικό οξύ με το συζευγμένο αμινοξύ (γλυκίνη ή ταυρίνη), δηλαδή υδρολύει τα χολικά

άλατα. Στην προσπάθεια του οργανισμού να αναπληρώσει τα χολικά άλατα και να σχηματίσει νέα ενεργοποιείται ο καταβολισμός της χοληστερόλης με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγκέντρωση της στο πλάσμα. Επιπλέον, αφού μειώνονται τα διαθέσιμα χολικά άλατα μειώνεται και η ικανότητα του οργανισμού να απορροφήσει τη διαιτητική χοληστερόλη, και αυτό αποτελεί το δεύτερο μηχανισμό δράσης της BSH που οδηγεί σε μείωση της χοληστερόλης του πλάσματος (Begley, Hill et al. 2006). Ο ίδιος μικροοργανισμός εμφανίζει την ικανότητα αύξησης της συγκέντρωσης της 25 – υδροξύ - βιταμίνης D στο πλάσμα των κατά τα άλλα υγιών ατόμων που κατανάλωσαν το γιαούρτι και είχαν μόνο παθοφυσιολογικά αυξημένη τιμή LDL – cholesterol (Jones, Martoni et al. 2013). Τόσο η μείωση της LDL – cholesterol όσο και η αύξηση της 25 – υδροξύ – βιταμίνης D παρουσιάζουν μια καρδιοπροστατευτική δράση, οπότε αξίζει να ληφθεί σοβαρά υπόψη η χορήγηση του συγκεκριμένου προβιοτικού για μείωση της πιθανότητας εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, ειδικά σε άτομα με ήδη αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο (άτομα με αυξημένη LDL).

Υλικά και Μέθοδοι

Η συγκεκριμένη μελέτη έχει ως στόχο να μελετήσει την επίδραση της κατανάλωσης γιαουρτιού, εμπλουτισμένο με βιοδραστικά λιποειδή που έχουν απομονωθεί από τα παραπροϊόντα της επεξεργασίας του ελαιολάδου, στον εντερικό μικροβίοκοσμο. Για αυτό το σκοπό πραγματοποιήθηκε παρέμβαση με το συγκεκριμένο γιαούρτι για 2 μήνες (8 εβδομάδες) σε υγιείς εθελοντές μέσης ηλικίας. Ορίστηκε επιπλέον μια ομάδα χορήγησης απλού γιαουρτιού και μια ομάδα μη κατανάλωσης γιαουρτιού ώστε να συγκριθούν τα τελικά αποτελέσματα. Στρατολογήθηκαν άτομα ηλικίας 40 έως 60 ετών, που δεν ήταν υπό αγωγή στατινών, δεν είχαν λάβει αντιβιοτικά τους τελευταίους δύο μήνες πριν την έναρξη της μελέτης και αντιφλεγμονώδη αγωγή τις δυο εβδομάδες που προηγήθηκαν της πρώτης δειγματοληψίας. Άτομα που λάμβαναν συμπληρώματα διατροφής αποκλείστηκαν από τη μελέτη, όπως και άτομα με ενεργή λοίμωξη. Αποκλείστηκαν, επίσης, ασθενείς αυτοάνοσων νοσημάτων (π.χ. Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης Νόσος του Εντέρου), άτομα που έπασχαν από Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου και όσοι αντιμετώπιζαν κάθε είδους δυσκοιλιότητα ή διάρροια με εναλλακτικές θεραπείες και βότανα (π.χ. φύλλα Αλεξανδρείας κ.α.). Όσον αφορά στις γυναίκες, η δειγματοληψία γινόταν το πρώτο δεκαήμερο του έμμηνου κύκλου, και δεν είχαν δικαίωμα συμμετοχής όσες δήλωσαν κύηση, τοκετό ή γαλουχία το τελευταίο έτος.

Στο πλαίσιο της προετοιμασίας των εθελοντών, 2 εβδομάδες πριν την έναρξη της παρέμβασης, έλαβαν όλοι οδηγίες ώστε να περιορίσουν την κατανάλωση γιαουρτιού σε 1 γιαούρτι τις 2 εβδομάδες. Τα άτομα κατηγοριοποιήθηκαν με τυχαία κατανομή σε 3 ομάδες. Η πρώτη ομάδα (ελέγχου) ακολούθησε την ίδια λογική μέγιστης κατανάλωσης 1 γιαουρτιού ανά δύο εβδομάδες, η δεύτερη ομάδα κατανάλωνε 1 απλό γιαούρτι καθημερινά, το οποίο χορηγούσαν στους εθελοντές οι υπεύθυνοι της μελέτης, ώστε να καταναλώνουν όλα τα άτομα της ομάδας το ίδιο προϊόν. Τέλος, η τρίτη ομάδα της μελέτης, κατανάλωνε καθημερινά 1 επιδόρπιο γιαουρτιού 1,6% λιπαρά, με φρουτοπαρασκεύασμα φράουλας και εμπλουτισμένο με βιοδραστικά λιποειδή προερχόμενα από τη διαδικασία παραγωγής του ελαιολάδου. Στην αρχή της μελέτης όλα τα άτομα έλαβαν οδηγίες να μην αλλάξουν τις διατροφικές τους συνήθειες κατά τη διάρκεια της παρέμβασης, να μην ακολουθήσουν κάποια δίαιτα περιορισμένου θερμιδικού περιεχομένου και να διατηρήσουν το υπάρχον Σωματικό τους Βάρος. Πραγματοποιήθηκε διατροφική αξιολόγηση των συμμετεχόντων, ανθρωπομετρικές μετρήσεις (σωματικού βάρους, ύψους, περιφέρειας μέσης, περιφέρειας ισχύων και λιπομέτρηση), μέτρηση της Συστολικής και Διαστολικής Αρτηριακής Πίεσης και των παλμών ανά λεπτό. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της φυσικής δραστηριότητας των εθελοντών μέσα από ένα σύντομο ερωτηματολόγιο 7 ερωτήσεων (PAQ).

Στην πρώτη συνεδρία, αφού πραγματοποιούνταν οι παραπάνω μετρήσεις, δινόταν στους εθελοντές ένας πλαστικός προζυγισμένος συλλέκτης, ώστε να φέρουν μέσα σε αυτόν, το δείγμα της κένωσης. Δινόταν επίσης ένα εβδομήμερο ημερολόγιο καταγραφής γαστρεντερολογικών συμπτωμάτων, το οποίο έπρεπε να συμπληρώσουν οι εθελοντές από την πρώτη κιόλας ημέρα που θα έφερναν το δείγμα κοπράνων στο εργαστήριο και θα ξεκινούσε η αντίστοιχη σε κάθε ομάδα παρέμβαση. Το δείγμα έπρεπε να μεταφερθεί στο εργαστήριο εντός 2 ωρών. Στην κένωση της χρονικής στιγμής $t=0$, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της υγρασίας και του pH, καταμέτρηση

των μικροβιακών πληθυσμών με καλλιεργητικές και μη – καλλιεργητικές τεχνικές καθώς και προσδιορισμός των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFAs).

Οι εθελοντές την 4^η εβδομάδα της παρέμβασης συμπλήρωσαν ακόμα ένα 7ήμερο ημερολόγιο καταγραφής των γαστρεντερολογικών τους συμπτωμάτων, όπως και την 8^η. Αφού ολοκληρώθηκαν οι 8 εβδομάδες της παρέμβασης, οι εθελοντές έδωσαν το δεύτερο και τελευταίο δείγμα κοπράνων. Στα δείγματα της χρονικής στιγμής t=8 εβδομάδες, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της υγρασίας και του pH, καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών μόνο με μη – καλλιεργητικές τεχνικές καθώς και προσδιορισμός των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFAs).

Δειγματοληψία και επεξεργασία κοπράνων

Η πλήρης κένωση του εθελοντή συλλέγεται εντός προζυγισμένου συστήματος πλαστικού συλλέκτη-σακούλας και μεταφέρεται στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών (Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ.), το συντομότερο δυνατόν (≤ 2 ώρες από την ώρα κένωσης) για μικροβιολογική ανάλυση. Μέρος της κένωσης (~3,0 g) συλλέγεται σε προζυγισμένο αποστειρωμένο συλλέκτη κοπράνων και μεταφέρεται υπό αναερόβιες συνθήκες για την πραγματοποίηση του ποσοτικού προσδιορισμού του εντερικού μικροβιόκοσμου με καλλιεργητική μεθοδολογία. Η πλήρης κένωση ζυγίζεται σε εργαστηριακό ζυγό με ακρίβεια 0.1g και ομογενοποιείται μηχανικά σε κατάλληλο όργανο (Stomacher), με κινήσεις που προσομοιάζουν εκείνες του στομάχου υπό φυσιολογική ταχύτητα και μέχρι να καταστεί οπτικά ομοιογενής (περίπου 10-15sec). Η ομογενοποιημένη κένωση μεταφέρεται σε δοχείο με πάγο εντός απαγωγού και πραγματοποιείται ο καταμερισμός της στις κατάλληλες ποσότητες για την πραγματοποίηση των αντίστοιχων αναλύσεων κοπράνων [pH, ξηρό βάρος, καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών με μη-καλλιεργητικές τεχνικές, προσδιορισμός λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFAs)].

Καλλιεργητική μεθοδολογία

Διαδοχικές αραιώσεις- Επεξεργασία υπό αναερόβιες και αερόβιες συνθήκες

Κατά προσέγγιση 1g κοπράνων από κάθε δειγματοληψία μεταφέρεται σε γυάλινο φιαλίδιο Universal με 9 ml προβρασμένου διαλύματος PPS. Υπό αναερόβιες συνθήκες (H_2 5%, CO_2 5%, N_2 balance) εντός αναερόβιου επωαστικού θαλάμου (BACTRON™ 1,5 Anaerobic Environmental Chamber, SHELLAB), πραγματοποιείται ομογενοποίηση των κοπράνων και του διαλύματος PPS με τη βοήθεια πιπέττας των 1000μl, χωρίς ανάδευση με τον υπερκείμενο αέρα. Ακολούθως, πραγματοποιούνται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις με διαδοχική λήψη και μεταφορά 1 ml του προκύπτοντος μίγματος σε φιαλίδια Universal με 9 ml προβρασμένου διαλύματος PPS και επιλέγονται οι κατάλληλες αραιώσεις που θα χρησιμοποιηθούν για την επιστροφή στα στερεά θρεπτικά υλικά (2 ή 3 αραιώσεις ανά θρεπτικό υλικό, 2 επαναλήψεις ανά αραιώση).

Μέσο αραιώσης

Ως κατάλληλο μέσο για την πραγματοποίηση των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων επιλέγεται το διάλυμα PPS (Peptone-Physiological Saline). Το διάλυμα PPS παρασκευάζεται με 0,1% Bacteriological peptone (0,1gr ανά 100ml διαλύματος) και 0,85% NaCl (0,85gr ανά 100ml διαλύματος) σε απιονισμένο νερό. Με τη βοήθεια διανομέα, το διάλυμα PPS μοιράζεται ανά 9ml σε γυάλινα φιαλίδια Universal και υποβάλλεται σε αποστείρωση στους 121° C για 15 λεπτά. Πριν την επεξεργασία του δείγματος κοπράνων, τα φιαλίδια Universal, με το διάλυμα PPS βράζονται στους 100° για 20 λεπτά προκειμένου να απομακρυνθεί το διαλυμένο οξυγόνο από το μέσο αραιώσης.

Θρεπτικά υλικά

Τα θρεπτικά υλικά και οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τους αναερόβιους μικροοργανισμούς είναι οι εξής:

- Ολική αναερόβια μεσόφιλη μικροχλωρίδα: Columbia Blood Agar (CBA) → 10^{-6} , 10^{-7}
- *Bifidobacterium* spp.: Beerens' agar → 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6}
- *Bacteroides* spp.: Wilkins-Chalgren agar (WC) → 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6}
- *Lactobacillus* spp.: Rogosa agar → 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}
- *Clostridium* spp. και *Clostridium perfringens*: TSC agar + D-cycloserine → 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4}

Τα θρεπτικά υλικά και οι αραιώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τους αερόβιους μικροοργανισμούς:

- Ολική αερόβια μεσόφιλη μικροχλωρίδα: CBA (αερόβια επώαση) → 10^{-5} , 10^{-6}
- *Enterococcus* spp.: Slanetz & Bartley medium (SB) → 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4}
- Ολικά κολίμορφα και *E. coli*: Chromocult Coliform agar → 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}
- *Staphylococcus* spp. και *S. aureus*: Mannitol Salt Agar (MSA) & Baird Parker (BP) → 10^{-1}
- Ζύμες και μύκητες: Sabouraud Dextrose Agar (SDA) → 10^{-1}

Ύστερα από κατάλληλη επιλογή των αραιώσεων, μεταφέρονται 100μl εναιωρήματος σε κάθε τρυβλίο petri 90 mm (2 τρυβλία ανά αραιώση) με τα εκλεκτικά και μη-θρεπτικά υλικά, τα οποία πρόκειται να επωαστούν υπό αναερόβιες συνθήκες στον επωαστικό θάλαμο του αναερόβιου θαλάμου (CBA, Rogosa agar, Wilkins-Chalgren agar, Beerens' agar, TSC agar) και πραγματοποιείται επίστρωση (plating). Με παρόμοιες διαδικασίες, πραγματοποιείται επίστρωση (plating) σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar) υπό ασηπτικές συνθήκες και στα εκλεκτικά και μη-θρεπτικά υλικά, τα οποία πρόκειται να επωαστούν υπό αερόβιες συνθήκες σε επωαστικό θάλαμο (CBA, Slanetz & Bartley medium, Chromocult Coliform agar, MSA & Baird Parker, SDA).

Ολικοί αερόβιοι και αναερόβιοι μεσόφιλοι μικροοργανισμοί

Για τη καταμέτρηση των ολικών αερόβιων και αναερόβιων μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό γενικής χρήσης Columbia Blood Agar (CBA) (Ellner, Stoessel et al. 1966), εμπλουτισμένο με 5-7% απινωδογονωμένο αίμα (50ml αίματος ανά 1000ml τελικού όγκου θρεπτικού υλικού). Σε 950 ml απιονισμένου ύδατος προστίθενται 41g Columbia Agar Base και διαλύονται μέσω βρασμού για ένα λεπτό. Η προσθήκη του αίματος (Defibrinated Horse blood

100mL) πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες ύστερα από αποστείρωση του υλικού τους 121°C για 15 λεπτά και ψύξη του σε θερμοκρασία 45-50°C. Το CBA, όπως όλα τα στερεά θρεπτικά υλικά, μοιράζεται εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία petri 90 mm με αναλογία περίπου 20ml υλικού/τρυβλίο.

Τα τρυβλία επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες (BACTRON™ 1,5 Anaerobic Environmental Chamber, SHELLAB) στους 37°C για 48 ώρες για την καταμέτρηση των αναερόβιων και σε αερόβιες συνθήκες αντίστοιχα για τη καταμέτρηση των αερόβιων μικροοργανισμών.

Αναερόβια επώαση

Bacteroides spp.

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του γένους *Bacteroides* είναι το Wilkins-Chalgren anaerobe agar (Wilkins and Chalgren 1976) εμπλουτισμένο με το συμπλήρωμα G-N Anaerobe supplement και 5% αποστειρωμένο αίμα. Πρόκειται για ένα θρεπτικό υλικό πλούσιο σε βιταμίνες αλλά φωτοευαίσθητο, για αυτό το λόγο το διαφυλάσσουμε από το φως και φροντίζουμε να μην στεγνώσουμε τελείως τα τρυβλία. Συγκεκριμένα, για τη παρασκευή 500ml τελικού υλικού προστίθενται 21,5g Wilkins-Chalgren Anaerobe agar σε 475ml αποσταγμένου νερού και θερμαίνεται μέχρι βρασμού προκειμένου να διαλυθεί πλήρως υπό ανάδευση. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά, ενώ παράλληλα αποστειρώνονται και τουλάχιστον 10 ml απιονισμένου ύδατος που απαιτούνται για το G-N Anaerobe supplement. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, προστίθενται μετά από καλή ψύξη στους 50°C, τα 10ml απιονισμένου ύδατος σε 1 φιαλίδιο G-N Anaerobe supplement εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Το θρεπτικό υλικό ψύχεται στους 50-55°C και προστίθεται υπό ασηπτικές συνθήκες το περιεχόμενο του φιαλιδίου G-N Anaerobe supplement καθώς και 25ml αποστειρωμένο αίμα αλόγου. Το υλικό αναδεύεται ελαφρώς και μοιράζεται εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται στους 2-8°C μακριά από το φως και καταναλώνονται το ταχύτερο δυνατό.

Τα τρυβλία μετά τον εμβολιασμό επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 48 ώρες. Τα *Bacteroides spp.* είναι αρνητικοί κατά Gram, βάκιλλοι μικρού μήκους, με ποικίλη αντίδραση στη δοκιμή της καταλάσης, οι οποίοι δίνουν στρογγυλές αποικίες χρώματος γκρι/άσπρο στο εμπλουτισμένο Wilkins-Chalgren Anaerobe agar.

Bifidobacterium spp.

Για τη καταμέτρηση του γένους *Bifidobacterium spp.* χρησιμοποιείται το εκλεκτικό υλικό Beerens' agar (Beerens 1991). Η σύσταση του θρεπτικού υλικού ανά λίτρο είναι 42,5g Columbia Agar Base), 5g άγαρ (Agar Bacteriological) με συνολική τελική συγκέντρωση 15 g άγαρ/L, 5g γλυκόζης (Dextrose), 0,5g υδροχλωρική κυστεΐνη ως αναγωγικό παράγοντα και 5 ml προπιονικού οξέος ως εκλεκτικό παράγοντα των μπιφιδοβακτηρίων (αναστέλλει την ανάπτυξη μελών της οικογένειας των Enterobacteriaceae και άλλων Gram (-) βακτηρίων, καθώς επίσης και στελεχών από τα γένη *Enterococcus*, *Staphylococcus*, και *Micrococcus*). Αρχικά, προστίθενται το Columbia Agar Base, το

άγαρ και η υδροχλωρική κυστεΐνη στο απιονισμένο νερό και το υλικό υποβάλλεται σε βρασμό μέχρι διάλυσης. Στη συνέχεια, το υλικό ψύχεται στους 40-50°C, προστίθενται η γλυκόζη και το προπιονικό οξύ, προκαλείται διάλυση με ανάδευση και γίνεται ρύθμιση του pH στο $5 \pm 0,1$ με διάλυμα NaOH 1N. Το Beerens' agar δεν απαιτεί αποστείρωση σε αυτόκαυστο και πρέπει να χρησιμοποιείται εντός 48 ωρών από τη παρασκευή του.

Η επίστρωση του δείγματος και η επώαση των μπιφιδοβακτηρίων στο εκλεκτικό υλικό Beerens' πραγματοποιείται υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 72 ώρες. Τα μπιφιδοβακτήρια είναι Gram (+), καταλάση (-), βάκιλλοι σχήματος Y ή με ροπαλοειδείς υφές και οι αποικίες που σχηματίζουν είναι λευκές και στρογγυλές.

Lactobacillus spp.

Για την καταμέτρηση και απομόνωση των στελεχών του γένους *Lactobacillus* spp. χρησιμοποιείται το εκλεκτικό υλικό Rogosa agar (Rogosa SL agar) (Rogosa, Mitchell et al. 1951). Η προετοιμασία του Rogosa agar απαιτεί ανάμιξη 75 g υλικού σε 1L απιονισμένου ύδατος και θέρμανση μέχρι βρασμού για 1 λεπτό προκειμένου να διαλυθεί πλήρως. Ακολουθεί προσθήκη 1,32ml οξικού οξέος, καλή ανάδευση και βρασμός για 2-3 λεπτά, ώστε να γίνει ρύθμιση του pH στην τιμή $5,5 \pm 0,2$. Το υλικό ψύχεται στους 40-50°C και μοιράζεται εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία petri 90 mm με αναλογία περίπου 20ml υλικού/τρυβλίο. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται στους 2-8°C και καταναλώνονται το ταχύτερο δυνατό (3-4 μέρες).

Η επίστρωση του δείγματος και η επώαση των λακτοβακίλλων στο εκλεκτικό υλικό Rogosa agar πραγματοποιήθηκε υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 48 ώρες. Οι λακτοβάκιλλοι είναι Gram (+), καταλάση (-), βάκιλλοι ποικίλου μεγέθους και σχηματίζουν λευκές, γυαλιστερές και στρογγυλές αποικίες.

Clostridium spp. και Clostridium perfringens

Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του γένους *Clostridium* είναι το Perfringens Agar Base εμπλουτισμένο με το αντιβιοτικό D-cycloserine και Egg Yolk Emulsion [Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) Agar]. Το TSC για το *C. perfringens*, το οποίο είναι το πλέον σύνηθες είδος κλωστριδίων στα κόπρανα, θεωρείται εκλεκτικό (Araujo, Sueiro et al. 2004). Συγκεκριμένα, για τη παρασκευή 500ml τελικού υλικού προστίθενται 23g Perfringens Agar Base σε 500ml απιονισμένου ύδατος και διαλύονται καλά υπό ανάδευση. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 10 λεπτά, ενώ παράλληλα αποστειρώνονται και τουλάχιστον 5 ml απιονισμένου ύδατος που απαιτούνται για το D-Cycloserine. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, προστίθενται, αφού ψυχθούν, τα 5ml απιονισμένου ύδατος σε 1 φιαλίδιο D-Cycloserine εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Η κυκλοσερίνη αναστέλλει την ανάπτυξη διαφόρων άλλων βακτηριακών γενών από τον εντερικό μικροβίοκοσμο ή σε περίπτωση ανάπτυξης αποικιών διατηρεί το μέγεθός τους μικρό. Το θρεπτικό υλικό ψύχεται στους 47°C και προστίθεται υπό ασηπτικές συνθήκες το περιεχόμενο του φιαλιδίου D-Cycloserine και 25ml Egg Yolk Emulsion. Το υλικό αναδεύεται ελαφρώς και μοιράζεται εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται στους 2-8°C στο σκοτάδι έως και 7 ημέρες.

Τα τρυβλία μετά τον εμβολιασμό επωάζονται σε αναερόβιες συνθήκες στους 37°C για 18-24 ώρες. Το γένος *Clostridium* είναι Gram (+), καταλάση (-) βάκιλλοι που σχηματίζουν ενδοσπόρια και δίνουν στρογγυλές αποικίες μαύρου ή μπεζ χρώματος στο εμπλουτισμένο Perfringens Agar Base. Το *Clostridium perfringens* πέραν των μαύρων αποικιών που δίνει, λόγω της αντίδρασης της λεκιθινάσης με τον κρόκο αυγού του θρεπτικού υλικού σχηματίζει μία θολή περιοχή (άλω) γύρω από την αποικία και έτσι συνήθως ξεχωρίζει από τα υπόλοιπα κλωστρίδια.

Αερόβια επώαση

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

Το εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την ταυτόχρονη ανίχνευση των ολικών κολίμορφων και του *Escherichia coli* είναι το Chromocult Coliform agar. Συγκεκριμένα, για τη παρασκευή 1L τελικού υλικού προστίθενται 26,5g Chromocult Coliform agar σε 1L απιονισμένου ύδατος, διαλύονται καλά υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεχτική θέρμανση μέχρι βρασμού χωρίς αποστείρωση και ψύξη στους 45-50°C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται καλά κλεισμένα στους 4°C μακριά από φως έως και 6 μήνες.

Η επώαση των ολικών κολίμορφων/*E.coli* στο εκλεκτικό υλικό Chromocult Coliform agar πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 24 ώρες. Η *E.coli* δίνει αποικίες χρώματος μπλε σκούρο προς βιολετί (dark blue to violet), ενώ τα ολικά κολίμορφα προκύπτουν από το σύνολο των ροζ προς ερυθρών αποικιών (salmon to red) και των μπλε σκούρο προς βιολετί (dark blue to violet) αποικιών (*E.coli*). Αποικίες χρώματος ανοιχτό μπλε/τουρκουάζ ή αποικίες χωρίς χρώμα δεν καταμετρώνται. Τα ολικά κολίμορφα και η *E.coli* είναι Gram (-), καταλάση (+) βάκιλλοι μικρού μήκους.

Enterococcus spp.

Το εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια των εντερόκοκκων είναι το Slanetz & Bartley medium. Για την παρασκευή 1L τελικού υλικού προστίθενται 43,5g Slanetz & Bartley medium σε 1L απιονισμένου ύδατος, διαλύονται καλά υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεχτική θέρμανση μέχρι βρασμού χωρίς αποστείρωση και ψύξη στους 45-50°C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται καλά κλεισμένα στους 2-8°C έως και 7 ημέρες.

Η επώαση των εντερόκοκκων στο εκλεκτικό υλικό Slanetz & Bartley medium πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 48 ώρες. Όλες οι κόκκινες και καστανέρυθρες (maroon) αποικίες καταμετρώνται ως ενδεχόμενοι εντερόκοκκοι. Οι εντερόκοκκοι είναι Gram (+), καταλάση (-) κόκκοι.

Staphylococcus spp. και *Staphylococcus aureus*

Τα εκλεκτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση των σταφυλόκοκκων και του *S. aureus* είναι το Baird Parker Medium Base (BP) και το Mannitol Salt Agar (MSA) (Parker 1962); (MacFaddin 1985). Για την παρασκευή 1L τελικού υλικού BP προστίθενται 63g Baird Parker

Medium Base σε 950ml απιονισμένου ύδατος, διαλύονται καλά υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεκτική θέρμανση μέχρι βρασμού. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, προστίθενται μετά από καλή ψύξη στους 45-50°C, 50ml Egg Yolk Tellurite Emulsion εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται καλά κλεισμένα στους 2-8°C. Για την παρασκευή 1L τελικού υλικού MSA προστίθενται 108g Mannitol Salt Agar σε 1L απιονισμένου ύδατος, διαλύονται καλά υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεκτική θέρμανση μέχρι βρασμού. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, το υλικό ψύχεται στους 45-50°C. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται καλά κλεισμένα στους 2-8°C.

Η επώαση των σταφυλόκοκκων στο εκλεκτικό υλικό Baird Parker Medium Base πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 48 ώρες. Όλες οι αποικίες με μαύρο χρώμα, με ή χωρίς θολή ή/και διαυγή άλω, εξετάζονται ως υποψήφιοι σταφυλόκοκκοι, ενώ αποικίες με μαύρο χρώμα και παρουσία θολής και διαυγούς άλω εξετάζονται ως υποψήφιοι εκπρόσωποι του είδους *S. aureus*.

Η επώαση των σταφυλόκοκκων στο εκλεκτικό υλικό Mannitol Salt Agar πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 37°C για 48 ώρες. Όλες οι λευκές/ροζ αποικίες, που δεν αλλάζουν το χρώμα του θρεπτικού υλικού, εξετάζονται ως υποψήφιοι σταφυλόκοκκοι, ενώ όλες οι κίτρινες αποικίες με αλλαγή του χρώματος του θρεπτικού υλικού από κόκκινο σε φωτεινό κίτρινο εξετάζονται ως υποψήφιοι εκπρόσωποι του είδους *S. aureus*.

Ζύμες και μύκητες

Το εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των ζυμών και των μυκήτων είναι το Sabouraud Dextrose Agar (SDA), με προσθήκη του αντιβιοτικού Chloramphenicol για την αναστολή ανάπτυξης των βακτηρίων. Για την παρασκευή 1L τελικού υλικού SDA προστίθενται 62g Sabouraud Dextrose Agar σε 1L απιονισμένου ύδατος, διαλύονται καλά υπό ανάδευση με ταυτόχρονη προσεκτική θέρμανση μέχρι βρασμού. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της αποστείρωσης, προσθέτονται 2 φιαλίδια Chloramphenicol, γίνεται καλή ανάμιξη και ψύξη στους 45-50°C. Ακολουθεί η διανομή σε τρυβλία υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα έτοιμα τρυβλία αποθηκεύονται καλά κλεισμένα στους 2-8°C, μακριά από φως.

Η επώαση των ζυμών στο εκλεκτικό υλικό Sabouraud Dextrose Agar πραγματοποιείται υπό αερόβιες συνθήκες στους 30°C για 96 ώρες, ενώ η επώαση των μυκήτων παρατείνεται έως τις 7 ημέρες. Οι ζύμες δίνουν κρεμώδεις αποικίες, με ευμεγέθη κύτταρα κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση (40X μεγέθυνση), ενώ οι μύκητες δίνουν ευμεγέθεις αποικίες βαμβακώδους υφής με ενδεχόμενη παρουσία σπορίων ποικίλου χρώματος.

Περιγραφή αποικιών – Χρώση Gram – Δοκιμασία καταλάσης – Καταμετρήσεις πληθυσμών

Μετά την επεξεργασία του δείγματος κοπράνων και την επώαση των τρυβλίων υπό τις κατάλληλες συνθήκες, πραγματοποιείται περιγραφή της μορφολογίας των παρατηρούμενων

αποικιών στα εκλεκτικά υλικά. Μετά την περιγραφή των διαφορετικών τύπων αποικιών ακολουθεί η χρώση Gram, η δοκιμασία καταλάσης και η παρατήρηση των χρώσεων στο μικροσκόπιο.

Για τους ολικούς αερόβιους και αναερόβιους μικροβιακούς πληθυσμούς πραγματοποιήθηκε απλή αριθμητική καταμέτρηση των αποικιών στο θρεπτικό υλικό (CBA), οι οποίοι αναπτύχθηκαν υπό αναερόβιες και υπό αερόβιες συνθήκες επώασης. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί εκφράζονται ως βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες (Colony Forming Units, CFU) ανά g αρχικού δείγματος κοπράνων.

Στο Chromocult Coliform Agar (θρεπτικό υλικό των ολικών κολίμορφων/ *E.coli*), πραγματοποιήθηκε απλή αριθμητική καταμέτρηση των σχηματιζόμενων αποικιών και κατάταξη τους σε αποικίες ολικών κολίμορφων ή *E.coli* ως εξής: το *E.coli* δίνει αποικίες χρώματος μπλε σκούρο προς βιολετί (dark blue to violet), ενώ τα ολικά κολίμορφα προκύπτουν από το σύνολο των ροζ προς ερυθρών αποικιών (salmon to red) και των μπλε σκούρο προς βιολετί (dark blue to violet) αποικιών (*E.coli*).

Στα υπόλοιπα βακτήρια (εντερόκοκκοι, σταφυλόκοκκοι, μπιφιδοβακτήρια, λακτοβάκιλλοι, *Bacteroides* spp. , *Clostridium* spp. και *Clostridium perfringens*) πραγματοποιήθηκε περιγραφή των μορφολογικών χαρακτηριστικών των διαφόρων τύπων αποικιών στα αντίστοιχα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά, χρώση Gram, δοκιμασία καταλάσης με 3% H₂O₂ και μικροσκοπική παρατήρηση των παρασκευασμάτων. Για τη περαιτέρω ταυτοποίηση των σταφυλόκοκκων πραγματοποιήθηκε και γραμμική διασπορά των υποψήφιων τύπων αποικιών σε εκλεκτικό υλικό MSA με επακόλουθη χρώση Gram, δοκιμασία καταλάσης με 3% H₂O₂ και μικροσκοπική παρατήρηση των παρασκευασμάτων. Οι σταφυλόκοκκοι δίνουν λευκές/ ροζ αποικίες χωρίς αλλαγή χρώματος και ο *S. aureus* δίνει κίτρινες/ μπεζ αποικίες με αλλαγή χρώματος υλικού.

Στις ζύμες και τους μύκητες παρατηρήθηκε η ανάπτυξη τυπικών αποικιών στα θρεπτικά τους υλικά μετά τον προβλεπόμενο χρόνο επώασης τους και η μικροσκοπική παρατήρηση τους σε υγρά παρασκευάσματα (40x μεγέθυνση). Αποικίες που πληρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις αξιοποιήθηκαν για καταμέτρηση.

Μέτρηση pH κοπράνων

Μία μικρή ποσότητα του δείγματος (1g κοπράνων) ομογενοποιείται σε 10ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια το pH μετράται σε θερμοκρασία δωματίου με τη χρήση πεχάμετρου και με ηλεκτρόδιο το οποίο είναι ανθεκτικό σε υψηλή συγκέντρωση πρωτεϊνών (WTW SenTix SP).

Μέτρηση υγρασίας κοπράνων

Μια μικρή ποσότητα του δείγματος (2g κοπράνων) ζυγίζεται σε ζυγό ακριβείας 0,1g και τοποθετείται σε προζυγισμένο πλαστικό «καφασάκι» το οποίο αποθηκεύεται στους -20°C . Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία και λαμβάνουμε τελικώς 2 δείγματα από κάθε κένωση. Ελέγχουμε έτσι την ακρίβεια των μετρήσεων και χρησιμοποιούμε το μέσο όρων αυτών, ο οποίος είναι ο πλέον αντιπροσωπευτικός της υγρασίας της κένωσης. Τοποθετούνται στη συνέχεια τα «καφασάκια» με ανοιχτό το καπάκι μέσα στο λυοφυλιοποιητή (Heto Lyolab 3000) όπου παραμένουν 24 περίπου ώρες, έως ότου εξαχρωθεί ο πάγος και απομακρυνθεί το 100% της υγρασίας των κενώσεων. Στο μηχάνημα τοποθετούνται και 2 «καφασάκια» με 2gr νερό το κάθε ένα τα οποία χρησιμοποιούνται ως σημείο αναφοράς/ ελέγχου. Όταν εξατμιστούν και τα 2gr νερού από αυτά (100% υγρασία), τα δείγματα αφαιρούνται από το μηχάνημα. Ζυγίζονται ξανά στο ζυγό ακριβείας 0,1g και το ξηρό πλέον βάρος του δείγματος αφαιρείται από την αρχική ζύγιση. Το ποσοστό της μείωσης του βάρους του δείγματος αποτελεί το ποσοστό της υγρασίας της κένωσης.

Απομόνωση ολικού DNA

Η απομόνωση του ολικού DNA από τα κόπρανα πραγματοποιήθηκε βάσει της μεθόδου RBB+C (Repeated Bead Beating plus Column) (Yu and Morrison 2004), κατόπιν τροποποιήσεων της για εφαρμογές στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο (Salonen, Nikkila et al. 2010)

Το πρωτόκολλο στηρίζεται στη συνδυαστική χρήση εμπορικών στηλών απομόνωσης DNA από κόπρανα και μηχανικής λύσης με τη βοήθεια του οργάνου MiniBead Beater. Η καθαρότητα και η τελική συγκέντρωση του DNA ελέγχονται φωτομετρικά.

Αρχικά, πραγματοποιείται λύση της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων μέσω μηχανικής (MiniBead Beater) και θερμικής επεξεργασίας (επώαση στους 95°C για 15 λεπτά). Ακολουθεί η κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με τη βοήθεια οξικού αμμωνίου, ισοπροπανόλης υπό ψύξη και αιθανόλης 70%. Στη συνέχεια, προστίθεται RNA – άση και πρωτεΐνάση K, ώστε να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες και το RNA και να μείνει καθαρό το DNA, το οποίο και θέλουμε να απομονώσουμε. Τέλος, προσθέτοντας ρυθμιστικά διαλύματα buffer δεσμεύεται το DNA πάνω στη στήλη (QIAamp DNA mini Kit, Qiagen) και το λαμβάνουμε τελικά χρησιμοποιώντας διάλυμα έκλουσης.

Μετά την απομόνωση του DNA πραγματοποιείται φασματοφωτομέτρηση στα 230nm, 260nm, 280nm και 320nm (IMPLEN), ελέγχεται έτσι η καθαρότητα του δείγματος χρησιμοποιώντας τους λόγους A_{260}/A_{280} και A_{260} / A_{230} και υπολογίζεται η συγκέντρωση (concentration ng/ μL) του DNA. Ακολουθεί ο διαχωρισμός του διαλύματος DNA σε 2 erpendorfs* 40 μL και η αποθήκευση στους -80°C .

Ποσοτικός προσδιορισμός εντερικού μικροβιόκοσμου με τη μέθοδο real-time PCR (quantitative PCR)

Αφού ολοκληρώθηκε η απομόνωση του ολικού DNA από τα δείγματα κοπράνων των εθελοντών σε χρόνο 0 και 2 μήνες μετά την παρέμβαση, έλαβε χώρα ο ποσοτικός προσδιορισμός συγκεκριμένων μικροοργανισμών με τη μέθοδο real – time quantitative PCR. Συγκεκριμένα, με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός στο ολικό DNA των φύλων Firmicutes και Bacteroidetes και υπολογίστηκε η μεταξύ τους αναλογία, ενώ επιπρόσθετα προσδιορίστηκαν ποσοτικά το γένος *Bifidobacterium* spp. και οι ομάδες των λακτοβακίλλων (*Lactobacillus* group) και των θειοαναγωγικών κλωστριδίων (*Clostridium perfringens* group).

Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων εκκινητικών μορίων (primers), που στοχεύουν πολύ συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου 16S rRNA, εξειδικευμένες ως προς την κατηγορία των μικροοργανισμών που στοχεύουμε σε κάθε αντίδραση. Ακολουθεί ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια, χρωστικής SYBR Green, και μέτρηση της έντασης φθορισμού ο οποίος εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Οι αντιδράσεις qPCR θα πραγματοποιηθούν στο όργανο LightCycler2.0 σε γυάλινα τριχοειδή (capillaries). Σε κάθε αντίδραση (20μl) χρησιμοποιούνται 10μl του kit, 0,4μl 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 και 3,95μl PCR-grade ύδατος. Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ενζύμου (πολυμεράση), την ενίσχυση του προϊόντος (45 κύκλοι), την ανάλυση melting curves και τη ψύξη του οργάνου.

Η ποσοτικοποίηση των βακτηρίων σε κάθε δείγμα κοπράνων 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 (10^1 έως 10^7 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. Τα τελικά αποτελέσματα εκφράζονται ως «δεκαδικός λογάριθμος των αντιγράφων του 16S γονιδίου/g κοπράνων» ($\log_{10}$ copies /g κοπράνων).

Προσδιορισμός Λιπαρών Οξέων Βραχείας Αλύσου (Short Chain Fatty Acids, SCFAs)

Οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFAs) (οξικό οξύ, προπιονικό οξύ, ισο-βουτυρικό οξύ, βουτυρικό οξύ, ισο-βαλερικό οξύ, βαλερικό οξύ, ισο-καπροϊκό οξύ, καπροϊκό οξύ

και επτανοϊκό οξύ) προσδιορίζονται με αέρια χρωματογραφία σύμφωνα με τους Mountzouris et al. (Mountzouris et al., 2006) στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Αρχικά πραγματοποιείται η προετοιμασία των προς ανάλυση δειγμάτων στο εργαστήριο του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου Αθηνών. Στο vial με το 1,5gr δείγματος που αποθηκεύτηκε κατά τη διάρκεια του καταμερισμού της κένωσης στους -80°C προστίθενται 4,5gr φυσιολογικού ορού 0,9% NaCl, πραγματοποιώντας έτσι αραιώση 1:3. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με vortex σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να ομογενοποιηθεί το δείγμα με τον ορό και λαμβάνεται 1ml από το προκύπτον διάλυμα το οποίο και τοποθετείται σε erpendorf (1,5ml). Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4°C στα 10000xg για 15min και παραλαβή 300μl από το υπερκείμενο. Αυτή η ποσότητα αποθηκεύεται σε καινούριο erpendorf στους -80°C για μετέπειτα χρήση.

Σε δεύτερη φάση λαμβάνει χώρα η προετοιμασία των τελικών φιαλιδίων που θα τοποθετηθούν στο μηχάνημα της αέριας χρωματογραφίας για να «καούν» και να προκύψουν οι αντίστοιχες τιμές SCFAs. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των 300μl διαλύματος που είχαν προκύψει στην πρώτη φάση προετοιμασίας, σε θερμοκρασία 4°C στα 13000xg για 15min. Στη συνέχεια προστίθενται στο εσωτερικό κάθε γυάλινου φιαλιδίου αέριας χρωματογραφίας 5μl HCl, 10μl εσωτερικού προτύπου (Internal Standard) και 85μl από τα 300μl διαλύματος, με τη σειρά που καταγράφονται αντίστοιχα. Πραγματοποιείται ελαφριά ανάδευση με vortex και τα γυάλινα φιαλίδια σφραγίζονται κατάλληλα.

Τέλος, τοποθετούνται τα φιαλίδια στις ειδικές θύρες του μηχανήματος (max: 90 φιαλίδια/ round), τοποθετώντας επίσης στην αρχή κάθε γύρου – round πρότυπα διαλύματα πτητικών λιπαρών οξέων (Volatile Fatty Acids – VFAs) και νερό ώστε να ξεπλυθεί η στήλη και να λάβουμε όσο το δυνατόν πιο αντιπροσωπευτικές τιμές SCFAs.

Μετά την ολοκλήρωση των μετρήσεων ελέγχονται οι κορυφές για κάθε λιπαρό οξύ ($\text{C1} - \text{C7}$), γίνεται η επεξεργασία και υπολογίζεται η συγκέντρωση των SCFAs, όπως περιγράφεται από τους Mountzouris et al. (Mountzouris, Balaskas et al. 2006).

Διατροφική αξιολόγηση

Στην πρώτη συνεδρία κάθε εθελοντή λάμβανε χώρα μια μικρή συνέντευξη στην οποία ο υπεύθυνος συμπλήρωνε ένα ερωτηματολόγιο καταγραφής συχνότητας τροφίμων για το μήνα που προηγήθηκε της παρέμβασης. Υπολογίστηκε έτσι η ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη κάθε συμμετέχοντα, το ποσοστό υιοθέτησης της Μεσογειακής Διατροφής (MedDietScore), οι καταναλισκόμενες ποσότητες των βασικών μακροθρεπτικών συστατικών και τέλος η συμμετοχή αυτών στο σύνολο της προσλαμβανόμενης ενέργειας.

Καταγραφή γαστρεντερολογικών συμπτωμάτων

Κατά τη διάρκεια της πρώτης συνεδρίας ο εθελοντής απαντούσε και σε ορισμένες ερωτήσεις αναφορικά των γαστρεντερικών του συμπτωμάτων του μήνα που προηγήθηκε της παρέμβασης. Ζητήθηκε, επίσης, από τους εθελοντές να συμπληρώσουν ένα επταήμερο ημερολόγιο καταγραφής γαστρεντερικών συμπτωμάτων την πρώτη εβδομάδα της παρέμβασης, την 4^η εβδομάδα και την τελευταία εβδομάδα της παρέμβασης (8^η) ώστε να αξιολογηθεί η ανοχή του γιουρτιού από το γαστρεντερικό τους σύστημα. Κάθε μέρα για μια εβδομάδα έπρεπε να συμπληρώσουν εννέα χαρακτηριστικά: τον αριθμό των κενώσεων τους, τον αριθμό των διαρροϊκών τους κενώσεων, την κλίμακα Bristol που περιγράφει τη σύσταση της κένωσης, μια κλίμακα από το 0 έως το 4 όσον αφορά στο χρώμα, μια όσον αφορά στην οσμή της κένωσης, την ένταση του κοιλιακού πόνου, της διόγκωσης στην κοιλιακή χώρα, του μετεωρισμού και των βορβορυγμών.

Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων θα χρησιμοποιηθεί το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 21. Ο έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής των συνεχών μεταβλητών θα πραγματοποιηθεί με τη δοκιμασία κανονικότητας Kolmogorov-Smirnov (One Sample Kolmogorov-Smirnov Normality test) σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$.

Οι συνεχείς μεταβλητές, που κατανέμονται κανονικά, θα εκφραστούν ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση. Θα εξεταστεί πιθανή σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των 3 ομάδων την ίδια χρονική στιγμή για κάποιο χαρακτηριστικό με την ανάλυση διακύμανσης (One – Way ANOVA) και οι επιμέρους ανά δύο συγκρίσεις με POST HOC comparison, μετά την κανονικοποίηση με το τεστ του Bonferroni (POST HOC comparisons after Bonferroni's adjustment). Για την επίδραση της παρέμβασης συνολικά θα χρησιμοποιηθεί η ανάλυση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (General linear model/ Repeated measures), όπου σε περίπτωση σημαντικής διαφοροποίησης θα ακολουθήσουν επί μέρους ανά δυο συγκρίσεις με POST HOC comparison και κανονικοποίηση με Bonferroni's test. Για τον έλεγχο της παρέμβασης σε κάθε ομάδα χωριστά, θα πραγματοποιηθεί έλεγχος διαφοράς μέσων δυο εξαρτημένων δειγμάτων (Paired – Samples T test).

Οι συνεχείς μεταβλητές, που δεν ακολουθούν τη κανονική κατανομή, θα εκφραστούν ως διάμεσος (1^ο τεταρτημόριο – 3^ο τεταρτημόριο) και η σύγκριση των μέσω τιμών μεταξύ των 3 ομάδων θα πραγματοποιηθεί με τον έλεγχο Kruskal- Wallis test. Οι έλεγχοι θα πραγματοποιηθούν σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$. Η συνολική επίδραση της παρέμβασης σε κάθε μεταβλητή θα αναλυθεί με το Friedman's test, ενώ σε κάθε ομάδα χωριστά με το Wilcoxon's test.

Οι κατηγορικές μεταβλητές θα εκφραστούν ως απόλυτες και σχετικές συχνότητες (%) και οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων ως προς τις κατηγορικές μεταβλητές θα πραγματοποιηθούν με τη χρήση πινάκων συνάφειας και εφαρμογή της δοκιμασίας χ^2 (Chi-Square test)

Αποτελέσματα

Χαρακτηριστικά δείγματος εθελοντών

Στη μελέτη έλαβαν μέρος συνολικά 72 άτομα, από τα οποία 54 συμμετείχαν στην ανάλυση του εντερικού μικροβιόκοσμου (75%). Στο σύνολο των 54 ατόμων η κατανομή του φύλου είναι 26 γυναίκες (48,1%) και 28 άντρες (51,9%), ηλικίας $47,5 \pm 8,7$ έτη (μ.ο. $\pm$ T.A.) με Δ.Μ.Σ. = $27,7 \pm 4,2$ Kg/m² (μ.ο. $\pm$ T.A.). Μετά την τυχαία κατανομή των εθελοντών σε 3 ομάδες (ομάδα χορήγησης εμπλουτισμένου γιαουρτιού, ομάδα χορήγησης απλού γιαουρτιού, ομάδα ελέγχου – μη χορήγησης γιαουρτιού) προκύπτει η ακόλουθη κατανομή αυτών, με τα αντίστοιχα περιγραφικά στοιχεία, στο χρόνο t=0 της μελέτης (πίνακας 1).

Πίνακας 1: Περιγραφικά χαρακτηριστικά όλων των εθελοντών που συμμετείχαν στον ποσοτικό προσδιορισμό του εντερικού μικροβιόκοσμου στην αρχή της παρέμβασης (N=54, t=0)

	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (n=7)	Απλό γιαούρτι (n=23)	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (n=24)	<i>p-value</i>
Φύλο (άντρες/ γυναίκες)	3/4	13/10	12/12	0,794
Ηλικία (έτη)	43,4 $\pm$ 5,0	48,9 $\pm$ 9,2	47,5 $\pm$ 9,0	0,358
Δείκτης Μάζας Σώματος (Kg/m ²)	24,2 $\pm$ 3,7	29,6 $\pm$ 4,1*	26,95 $\pm$ 3,64	0,004
Σωματικό Βάρος (Kg)	68,5 $\pm$ 12,9	84,5 $\pm$ 16,4 ^x	76,5 $\pm$ 12,1	0,023
Περιφέρεια μέσης (cm)	84,6 $\pm$ 12,6	97,5 $\pm$ 14,8	89,9 $\pm$ 11,0 (n=22) [#]	0,039
Περιφέρεια ισχύων (cm)	102,9 $\pm$ 7,4	110,1 $\pm$ 6,6	108,3 $\pm$ 7,5 (n=22) [#]	0,073
Περιφέρεια μέσης / περιφέρεια ισχύων	0,82 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,1	0,85 $\pm$ 0,09 (n=22) [#]	0,087
Ποσοστό σωματικού λίπους (%)	25,25 $\pm$ 9,5	30,7 $\pm$ 7,7	27,8 $\pm$ 9,3 (n=23) [#]	0,277
Συστολική Αρτηριακή Πίεση (mmHg)	119,6 $\pm$ 13,5	132,3 $\pm$ 18,1	119,3 $\pm$ 13,3 [^]	0,015
Διαστολική Αρτηριακή Πίεση (mmHg)	75,5 $\pm$ 10	77,9 $\pm$ 8,9	73,6 $\pm$ 9,9	0,315
Παλμοί (#/min)	80,1 $\pm$ 6,5	72,7 $\pm$ 8,7	72,6 $\pm$ 9,5	0,120
Καθιστική ζωή (ώρες / εβδομάδα)	48,3 $\pm$ 20,4	43,6 $\pm$ 22,1 (n=22) [#]	42,9 $\pm$ 18,8	0,826
Συνολική φυσική δραστηριότητα (MET min/εβδομάδα)	412,0 (99,0 - 1440,0)	1116,0 (360,0 - 2424,0)	1390,50 (760,13 - 2398,5)	0,119
Εκπαίδευση (έτη)	18,1 $\pm$ 6,7	14,8 $\pm$ 6,3	18,0 $\pm$ 5,3	0,157

Οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± T.A.; One – way ANOVA: Post Hoc multiple comparisons after Bonferroni's adjustment for multiplicity; Για τα μη παραμετρικά χαρακτηριστικά οι τιμές εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1 – Q3); Kruskal – Wallis test; *: $p=0,006$ συγκριτικά με τη μη κατανάλωση γιαουρτιού; *: $p=0,034$ συγκριτικά με τη μη κατανάλωση γιαουρτιού; ^: $p=0,018$ συγκριτικά με την κατανάλωση απλού γιαουρτιού; #: δίνεται ιδιαίτερη έμφαση καθώς διαφέρει το δείγμα από αυτό που αναγράφεται στην πρώτη γραμμή.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης ANOVA ο Δείκτης Μάζας Σώματος ($p_{value}=0,004$), το Σωματικό Βάρος ($p_{value}=0,023$), η περιφέρεια μέσης ($p_{value}=0,039$) και η Συστολική Αρτηριακή Πίεση ($p_{value}=0,015$) διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις 3 ομάδες της μελέτης. Η ομάδα χορήγησης απλού γιαουρτιού παρουσίασε εμφανώς μεγαλύτερες τιμές συγκριτικά των άλλων 2 ομάδων. Επιπλέον, η περιφέρεια ισχύων ($p_{value}=0,073 < 0,10$) και η αναλογία της περιφέρειας μέσης προς την περιφέρεια ισχύων ($p_{value}=0,087 < 0,10$) παρουσίασαν αυξημένη τάση για στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στις 3 ομάδες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των επιμέρους ανά δύο συγκρίσεων (post hoc comparisons after Bonferroni's adjustment for multiplicity), η ομάδα χορήγησης απλού γιαουρτιού παρουσίασε σημαντικά πιο υψηλές τιμές από την ομάδα μη κατανάλωσης γιαουρτιού στο Δείκτη Μάζας Σώματος ($p_{value}=0,006$) και στο Σωματικό Βάρος ($p_{value}=0,034$). Αντίστοιχα, η ομάδα χορήγησης απλού γιαουρτιού υπερέιχε σημαντικά της ομάδας χορήγησης εμπλουτισμένου γιαουρτιού στη Συστολική Αρτηριακή Πίεση ($p_{value}=0,018$).

Από τα 54 άτομα, ολοκλήρωσαν τις 8 εβδομάδες της παρέμβασης βάσει του πρωτοκόλλου και έδωσαν δείγμα κοπράνων προς ανάλυση τα 46 (85,2%). Τα περιγραφικά χαρακτηριστικά αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Περιγραφικά χαρακτηριστικά των εθελοντών που συμμετείχαν στον ποσοτικό προσδιορισμό του εντερικού μικροβιόκοσμου και ολοκλήρωσαν την παρέμβαση (N=46, t=0)

	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (n=6)	Απλό γιαούρτι (n=18)	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (n=22)	<i>p-value</i>
Φύλο (άντρες/ γυναίκες)	3/3	9/9	10/12	0,954
Ηλικία (έτη)	44,0 ± 5,25	49,2 ± 10,29	47,82 ± 9,13	0,502
Δείκτη Μάζας Σώματος (Kg/m ²)	24,75 ± 3,74	29,21 ± 4,10	27,05 ± 3,65	0,041
Σωματικό Βάρος (Kg)	70,5 ± 12,8	82,8 ± 16,8	76,2 ± 12,4	0,151
Περιφέρεια μέσης (cm)	87,2 ± 11,5	95,8 ± 15,4	89,9 ± 11,2 (n=20) #	0,255
Περιφέρεια ισχύων (cm)	104 ± 7,4	109,8 ± 6,7	108,5 ± 7,7 (n=20) #	0,255
Περιφέρεια μέσης / περιφέρεια ισχύων	0,84 ± 0,06	0,87 ± 0,11	0,83 ± 0,08 (n=20) #	0,372
Ποσοστό σωματικού λίπους	25 ± 10,3	31,2 ± 8,2	28,8 ± 8,6 (n=21) #	0,310

(%)				
Συστολική Αρτηριακή Πίεση (mmHg)	115,7 ± 9,5	130,2 ± 18,4	120,2 ± 13,5	0,060
Διαστολική Αρτηριακή Πίεση (mmHg)	74,0 ± 9,9	77,5 ± 10,0	74,7 ± 9,7	0,594
Παλμοί (#/min)	82,2 ± 4,0	71,8 ± 8,4 [^]	72,9 ± 9,9	0,047
Καθιστική ζωή (ώρες / εβδομάδα)	47,0 ± 22,0	42,3 ± 23,7	45,2 ± 18,0	0,863
Συνολική φυσική δραστηριότητα (MET min/εβδομάδα)	354,5 (86,63 - 1671,0)	1102,5 (609,75 - 3139,5)	1390,5 (804,34 - 2203,5)	0,209
Εκπαίδευση (έτη)	17,2 ± 6,8	15,3 ± 5,6	18,2 ± 5,4	0,295

Οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± T.A.; One – way ANOVA: Post Hoc multiple comparisons after Bonferroni's adjustment for multiplicity; Για τα μη παραμετρικά χαρακτηριστικά οι τιμές εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1 – Q3); Kruskal – Wallis test: [^]: $p=0,049$ συγκριτικά με τη μη κατανάλωση γιαουρτιού; #: δίνεται ιδιαίτερη έμφαση καθώς διαφέρει το δείγμα από αυτό που αναγράφεται στην πρώτη γραμμή.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης ANOVA, ο Δείκτης Μάζας Σώματος ($p_{value}=0,041$) και οι παλμοί ανά λεπτό ($p_{value}=0,047$) διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις 3 ομάδες της μελέτης. Η ομάδα χορήγησης απλού γιαουρτιού παρουσίασε εμφανώς μεγαλύτερη μέση τιμή Δ.Μ.Σ. σε σύγκριση με τις άλλες 2 ομάδες και η ομάδα μη χορήγησης γιαουρτιού υπερείχε των άλλων δύο ομάδων κατά περίπου 10 παλμών το λεπτό. Επιπλέον, η Συστολική Αρτηριακή Πίεση παρουσίασε αυξημένη τάση για στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στις τρεις ομάδες ($p_{value}=0,060 < 0,10$).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των επιμέρους ανά δύο συγκρίσεων (post hoc comparisons after Bonferroni's adjustment for multiplicity), η ομάδα χορήγησης απλού γιαουρτιού παρουσίασε κατά μέσο όρο σημαντικά λιγότερους παλμούς ανά λεπτό ($p_{value}=0,049$) από την ομάδα μη κατανάλωσης γιαουρτιού ενώ παρουσίασε τάση για μεγαλύτερο Δείκτη Μάζας Σώματος ($p_{value}=0,054 < 0,10$) από την ομάδα μη κατανάλωσης γιαουρτιού. Τέλος, η ομάδα κατανάλωσης εμπλουτισμένου με βιοδραστικά λιποειδή γιαουρτιού έτεινε να έχει σημαντικά λιγότερους παλμούς ανά λεπτό από την ομάδα μη κατανάλωσης γιαουρτιού ($p_{value} = 0,082 < 0,10$).

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται οι διατροφικές συνήθειες όλων των εθελοντών που συμμετείχαν στον ποσοτικό προσδιορισμό του εντερικού μικροβιόκοσμου (N=54) στην αρχή της παρέμβασης (t=0). Αντίστοιχα, στον πίνακα 4 παρατίθενται οι διατροφικές συνήθειες των εθελοντών που ολοκλήρωσαν τις 8 εβδομάδες της παρέμβασης σύμφωνα με το πρωτόκολλο και έδωσαν δείγμα κοπράνων με το πέρας αυτής (N=46).

Πίνακας 3: Διατροφικές συνήθειες των εθελοντών που συμμετείχαν στον ποσοτικό προσδιορισμό του εντερικού μικροβιοκόσμου στην αρχή της παρέμβασης (N=54, t=0)

	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (n=7)	Απλό γιαούρτι (n=23) (n=22) [#]	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (n=24)	<i>p-value</i>
MedDietScore	30,43 ± 3,3	30,30 ± 4,14 (n=22) [#]	32,20 ± 3,20	0,177
Νερό (ποτήρι:240mL/ημέρα)	7,50 ± 4,82	6,65 ± 3,47	5,48 ± 2,27	0,254
Συνολική Ημερήσια Ενεργειακή Πρόσληψη (Kcal/d)	2282,83 ± 328,77	2344,26 ± 608,53 (n=22) [#]	2356,89 ± 623,45	0,958
Πρωτεΐνη (gr/d)	72,35 ± 21,73	81,37 ± 30,34 (n=22) [#]	84,40 ± 24,20	0,578
Πρωτεΐνη (%)	12,68 ± 2,86	13,97 ± 3,60 (n=22) [#]	14,67 ± 2,40	0,301
Υδατάνθρακες (gr/d)	175,84 ± 53,49	181,04 ± 67,55 (n=22) [#]	197,18 ± 73,67	0,651
Υδατάνθρακες (%)	30,74 ± 5,39	30,59 ± 5,68 (n=22) [#]	33,89 ± 5,52	0,115
Λίπος (gr/d)	140,14 ± 15,60	141,09 ± 33,31 (n=22) [#]	132,35 ± 37,28	0,658
Λίπος (%)	56,58 ± 7,0	55,45 ± 6,82 (n=22) [#]	51,43 ± 6,27	0,067
Κορεσμένα λιπαρά οξέα (gr/d)	34,86 ± 5,59	35,20 ± 10,94 (n=22) [#]	34,46 ± 12,19	0,974
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (gr/d)	78,30 ± 10,66	77,58 ± 19,29 (n=22) [#]	71,94 ± 21,54	0,563
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (gr/d)	19,22 ± 4,38	20,14 ± 6,84 (n=22) [#]	18,00 ± 5,42	0,480
Διαιτητικές ίνες (gr/d)	16,49 ± 6,26	19,32 ± 8,52 (n=22) [#]	21,69 ± 6,70	0,239

Οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± Τ.Α.; One – way ANOVA

[#]: δίνεται ιδιαίτερη έμφαση καθώς διαφέρει το δείγμα από αυτό που αναγράφεται στην πρώτη γραμμή.

Πίνακας 4: Διατροφικές συνήθειες των εθελοντών που συμμετείχαν στον ποσοτικό προσδιορισμό του εντερικού μικροβιοκόσμου και ολοκλήρωσαν την παρέμβαση (N=46, t=0)

	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (n=6)	Απλό γιαούρτι (n=18)	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (n=22)	<i>p-value</i>
MedDietScore	29,83 ± 3,19	30,28 ± 3,68	32,59 ± 2,92	0,051
Νερό (ποτήρι:240mL/ημέρα)	8,08 ± 5,00	6,64 ± 3,67	5,57 ± 2,35	0,233
Συνολική Ημερήσια Ενεργειακή Πρόσληψη (Kcal/d)	2216,78 ± 305,06	2364,38 ± 573,98	2365,57 ± 630,84	0,843
Πρωτεΐνη (gr/d)	70,33 ± 23,07	80,19 ± 29,93	85,35 ± 24,85	0,470
Πρωτεΐνη (%)	12,70 ± 3,13	13,52 ± 3,13	14,78 ± 2,46	0,190
Υδατάνθρακες (gr/d)	159,80 ± 35,67	184,18 ± 68,07	199,27 ± 76,59	0,453
Υδατάνθρακες (%)	29,13 ± 3,62	30,99 ± 5,49	34,03 ± 5,52	0,074
Λίπος (gr/d)	140,04 ± 17,09	141,80 ± 30,40	131,79 ± 35,81	0,598
Λίπος (%)	58,17 ± 6,15	55,49 ± 7,54	51,20 ± 6,18	0,040
Κορεσμένα λιπαρά οξέα (gr/d)	33,70 ± 5,11	35,37 ± 10,31	34,31 ± 12,31	0,930
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (gr/d)	79,54 ± 11,10	77,46 ± 17,68	71,71 ± 20,77	0,514
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (gr/d)	19,19 ± 4,79	20,75 ± 7,17	17,84 ± 5,02	0,316
Διαιτητικές ίνες (gr/d)	15,21 ± 5,76	19,73 ± 8,57	22,17 ± 6,78	0,129

Οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± T.A.; One – way ANOVA

Στην αρχή της παρέμβασης, στο σύνολο των 54 εθελοντών, δεν παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των 3 ομάδων για κανένα διατροφικό χαρακτηριστικό. Όσον αφορά στα 46 άτομα που ολοκλήρωσαν την παρέμβαση επιτυχώς, παρατηρείται ότι στην αρχή της παρέμβασης οι 3 ομάδες διέφεραν σημαντικά στην υιοθέτηση της μεσογειακής διατροφής, δείκτης MedDietScore ($p_{value}=0,051$), καθώς και στο ποσοστό λίπους που καταναλώνουν καθημερινά ($p_{value}=0,040$).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των επιμέρους ανά δύο συγκρίσεων (post hoc comparisons after Bonferroni's adjustment for multiplicity) η μέση τιμή του MedDietScore παρουσιάζει τάση διαφοροποίησης μεταξύ των ομάδων κατανάλωσης εμπλουτισμένου με βιοδραστικά λιποειδή γιαουρτιού και της ομάδας κατανάλωσης απλού γιαουρτιού ($p_{value}=0,094 < 0,10$). Αντίστοιχα, η μέση τιμή του ποσοστού καθημερινής κατανάλωσης λίπους παρουσιάζει τάση διαφοροποίησης μεταξύ των ομάδων κατανάλωσης εμπλουτισμένου με βιοδραστικά λιποειδή γιαουρτιού και της ομάδας μη κατανάλωσης γιαουρτιού ($p_{value}=0,090 < 0,10$).

Χαρακτηριστικά των κενώσεων (pH, ποσοστό υγρασίας)

Στον πίνακα 5 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά των κενώσεων (pH και ποσοστό υγρασίας) όλων των εθελοντών που έλαβαν μέρος στον ποσοτικό προσδιορισμό του εντερικού μικροβιόκοσμου (N=54), στην αρχή της παρέμβασης (t=0). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης ANOVA οι μέσοι όροι των χαρακτηριστικών αυτών από τα δείγματα των τριών ομάδων δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά [p_{value} (pH)= 0,911>0,05, p_{value} (%moist)=0,125 > 0,05].

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά των κενώσεων (pH, ποσοστό υγρασίας) των εθελοντών που συμμετείχαν στον ποσοτικό προσδιορισμό του εντερικού μικροβιόκοσμου στην αρχή της παρέμβασης (N=54, t=0)

	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (n=7)	Απλό γιαούρτι (n=23)	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (n=24)	<i>p-value</i>
pH	6,86 ± 0,55	6,82 ± 0,75	6,76 ± 0,60	0,911
Ποσοστό υγρασίας (%)	67,59 ± 6,52	71,33 ± 6,50	73,83 ± 8,04	0,125

Οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± T.A.; One – way ANOVA

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά των κενώσεων των εθελοντών που ολοκλήρωσαν τους 2 μήνες της παρέμβασης (N=46), για χρόνο t=0 και t=2μήνες (πίνακας 6).

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά των κενώσεων (pH, ποσοστό υγρασίας) των εθελοντών που ολοκλήρωσαν την παρέμβαση (N=46, t=0 και t=8wks)

	Πριν την παρέμβαση (t=0)			Μετά την παρέμβαση (t=8 εβδομάδες)			<i>p-overall</i>
	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (n=6)	Απλό γιαούρτι (n=18)	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (n=22)	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (n=6)	Απλό γιαούρτι (n=18)	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (n=22)	
pH	6,70 ± 0,38	6,86 ± 0,78	6,80 ± 0,56	7,02 ± 0,64	6,99 ± 0,62	6,94 ± 0,59	0,939 [^]
Ποσοστό υγρασίας (%)	67,55 ± 7,15	71,38 ± 5,21	73,85 ± 7,72 [*]	69,30 ± 5,73	72,42 ± 5,83	72,33 ± 5,25	0,169 [#]

Οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± T.A.; Repeated Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity.

*: $p=0,049$ συγκριτικά με την ομάδα μη κατανάλωσης γιαουρτιού

[^]: $p-overall=0,647$ μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων για Δείκτη Μάζας Σώματος, φύλο και ηλικία

[#]: $p-overall=0,242$ μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων για Δείκτη Μάζας Σώματος, φύλο και ηλικία

Η επίδραση της παρέμβασης συνολικά στο pH και την υγρασία των κοπράνων δεν είναι στατιστικά σημαντική. Ακόμα και μετά την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων για το Δείκτη Μάζας Σώματος, την ηλικία και το φύλο η επίδραση της παρέμβασης παρέμεινε μη στατιστικά σημαντική. Φαίνεται, ωστόσο, ότι πριν την έναρξη της παρέμβασης τα δείγματα των κοπράνων που έδωσαν τα άτομα που στρατολογήθηκαν στην ομάδα της κατανάλωσης ενός εμπλουτισμένου γιαουρτιού είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη υγρασία σε σχέση με τα δείγματα των

κοπράνων που συλλέχθηκαν από τα άτομα της ομάδας μη κατανάλωσης γιαουρτιού ($p_{value}=0,049$). Η συγκεκριμένη στατιστικά σημαντική διαφορά μετατρέπεται σε τάση για στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μετά από κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων για το Δείκτη Μάζας Σώματος, την ηλικία και το φύλο ($p_{value}=0,076$). Σημειώνεται, επιπλέον, ότι στην περίπτωση του pH των κοπράνων παρατηρήθηκε συνολικά σημαντική επίδραση του φύλου ($p_{value}=0,013$).

Ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών

Καλλιεργητική μεθοδολογία

Στο σύνολο των 54 ατόμων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια της καλλιεργητικής μεθοδολογίας ποσοτικός προσδιορισμός τόσο των προκαρυωτικών (αερόβιων και αναερόβιων βακτηρίων) όσο και των ευκαρυωτικών μελών του εντερικού μικροβιόκοσμου. Υπολογίστηκαν σε δεκαδικούς λογάριθμους των μονάδων CFU ανά γραμμάριο κοπράνων, δηλαδή $\log_{10}\text{CFUs/g}$ κοπράνων, όπου CFU: Colony Forming Units και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7: Ποσοτικός προσδιορισμός ($\log_{10}\text{CFUs/g}$ κοπράνων) και συχνότητα απομόνωσης μικροοργανισμών με τη βοήθεια καλλιεργητικής μεθοδολογίας από δείγματα κοπράνων εθελοντών στην αρχή της παρέμβασης (N=54, t=0)

	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (n=7)	Απλό γιαούρτι (n=23)	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (n=24)	<i>p-value</i>
Ολικά αερόβια βακτήρια	8,04 ± 0,73	8,01 ± 1,04	8,11 ± 0,93	0,937
Ολικά κοκίμορφα	7,16 ± 0,72	7,06 ± 0,99	6,92 ± 1,31	0,851
<i>Escherichia coli</i>	7,16 ± 0,71	7,13 ± 0,94	6,62 ± 1,49	0,370 (Robust)
<i>Enterococcus spp.</i>	5,65 ± 1,63	5,91 ± 1,13	5,95 ± 1,16	0,846
<i>Staphylococcus spp.</i>	2,56 ± 0,61	3,09 ± 0,99	2,61 ± 0,90	0,234
% απομόνωσης (no θετικών ατόμων)	71,43 ± 48,8 (5)	78,26 ± 42,17 (18)	83,33 ± 38,07 (20)	0,775
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,30 ± 0,78	2,62 ± 1,13	2,49 ± 0,76	0,791
% απομόνωσης (no θετικών ατόμων)	71,43 ± 48,8 (5)	65,22 ± 48,7 (15)	58,33 ± 50,36 (14)	0,788
Ολικά αναερόβια βακτήρια	9,72 ± 0,30	9,50 ± 0,56	9,44 ± 0,47	0,412
<i>Clostridium spp.</i>	5,50 ± 0,88	4,87 ± 1,40	4,39 ± 1,10	0,091
<i>Clostridium perfringens</i>	3,38 ± 1,48	4,40 ± 1,33	3,52 ± 1,36	0,088
% απομόνωσης (no θετικών ατόμων)	85,71 ± 37,80 (6)	82,61 ± 38,76 (19)	91,67 ± 28,23 (23)	0,654
<i>Lactobacillus spp.</i>	5,61 ± 1,32	5,60 ± 1,56	5,24 ± 1,06	0,623
<i>Bifidobacterium spp.</i>	7,29 ± 2,26	8,02 ± 1,66	8,19 ± 1,18	0,417
<i>Bacteroides spp.</i>	8,60 ± 0,64	8,46 ± 0,64	8,17 ± 1,24	0,465
Ζύμες	3,34 ± 1,13	2,86 ± 1,14	3,00 ± 0,94	0,619
% απομόνωσης	85,71	82,61	95,83	0,346

(no θετικών ατόμων)	(6)	(19)	(23)	
Μύκητες	3,08 ± 2,39	3,03 ± 1,66	2,64 ± 1,09	0,768
% απομόνωση	42,86	43,48	62,50	0,382
(no θετικών ατόμων)	(3)	(10)	(15)	
<i>Candida spp.</i>	3,01 ± 1,14	3,08 ± 1,19	2,97 ± 0,90	0,959
% απομόνωσης	85,71	65,22	75,00	0,531
(no θετικών ατόμων)	(6)	(15)	(18)	
<i>Candida albicans</i>	3,77 ± 1,50	2,75 ± 0,82	2,95 ± 0,42	0,231
% απομόνωσης	28,57	39,16	37,50	0,880
(no θετικών ατόμων)	(2)	(9)	(9)	
<i>Candida parapsilosis</i>	4,24 ± 0,83	2,73	2,03 ± 0,08	0,120
% απομόνωση	28,57	4,35	8,33	0,156
(no θετικών ατόμων)	(2)	(1)	(2)	
<i>Candida glabrata</i>	2,03 ± 0,18	3,10 ± 0,92	2,63 ± 0,85	0,309
% απομόνωσης	28,57	26,09	33,33	0,863
(no θετικών ατόμων)	(2)	(6)	(8)	
<i>Candida kruzei</i>	2,93	2,29 ± 0,38	2,92 ± 1,04	0,523
% απομόνωσης	14,29	17,39	16,67	0,982
(no θετικών ατόμων)	(1)	(4)	(4)	
Άλλα είδη <i>Candida</i> spp.	-	-	2,87	-
% απομόνωσης	0	0	8,33	-
(no θετικών ατόμων)	(0)	(0)	(2)	
<i>Rhodotorula spp.</i>	3,78 ± 1,90	1,94 ± 0,27	2,36 ± 0,58	0,282
				(Robust)
% απομόνωσης	28,57	26,09	41,67	0,512
(no θετικών ατόμων)	(2)	(6)	(10)	

Οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± Τ.Α.; One – way ANOVA

Τα ποσοστά απομόνωσης δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, για αυτό και τα p-value έχουν υπολογιστεί εφαρμόζοντας Kruskal – Wallis test.

Τόσο οι προκαρυωτικοί όσο και οι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από τα δείγματα των κοπράνων των εθελοντών πριν την έναρξη της παρέμβασης φαίνεται ότι δε διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στις 3 ομάδες της μελέτης. Εξαίρεση αποτελεί το γένος *Clostridium* spp. και το είδος *Clostridium perfringens* που παρουσίασαν μια τάση διαφοροποίησης (p -value=0,091 < 0,10 και p -value=0,088 < 0,10 αντίστοιχα), χωρίς ωστόσο να παρατηρείται συγκεκριμένη διαφοροποίηση σε κάποιο ζεύγος ομάδων (p -value από post hoc comparisons after Bonferroni's adjustment for multiplicity > 0,05).

Μη – καλλιεργητική μεθοδολογία

Στην περίπτωση των 46 εθελοντών που ολοκλήρωσαν την παρέμβαση επιτυχώς (λήψη δειγμάτων κοπράνων στην αρχή και το τέλος της παρέμβασης) πραγματοποιήθηκε περαιτέρω ποσοτικός προσδιορισμός των μελών του εντερικού τους μικροβιόκοσμου με τη χρήση μη – καλλιεργητικής μεθοδολογίας. Συγκεκριμένα, με την εφαρμογή ποσοτικής PCR (qPCR) και τη χρήση εξειδικευμένων μορίων εκκινητών υπολογίστηκαν ποσοτικά τα φύλα Firmicutes και Bacteroidetes όπως και η μεταξύ τους αναλογία, ενώ επιπρόσθετα προσδιορίστηκαν ποσοτικά το γένος

Bifidobacterium και οι ομάδες των λακτοβακίλλων (*Lactobacillus* group, που περιλαμβάνει είδη των γενών *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* και *Leuconostoc*) και των θειοαναγωγικών κλοστριδίων (*Clostridium perfringens* group). Στον πίνακα 8 παρατίθενται τα αποτελέσματα της επίδρασης της παρέμβασης συνολικά. Επίσης, παρουσιάζονται οι διαφοροποιήσεις ανάμεσα σε ομάδες αλλά και σε χρονικές στιγμές όταν αυτές είναι ή τείνουν να είναι στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 8: Μοριακός ποσοτικός προσδιορισμός (qPCR; log₁₀copies/g κοπράνων) μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου των εθελοντών που ολοκλήρωσαν τη παρέμβαση (n=46), με κανονικοποίηση ως προς το φύλο, την ηλικία και τον ΔΜΣ.

	Πριν την παρέμβαση (t=0)			Μετά την παρέμβαση (t=8 εβδομάδες)			p-overall
	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (n=6)	Απλό γιαούρτι (n=18)	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (n=22)	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (n=6)	Απλό γιαούρτι (n=18)	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (n=22)	
Firmicutes	11,75 ± 0,11	11,65 ± 0,20	11,70 ± 0,17	11,77 ± 0,15	11,69 ± 0,18	11,80 ± 0,19 ^a	0,118
Bacteroidetes	11,14 ± 0,26	11,05 ± 0,27	11,06 ± 0,26	11,04 ± 0,23	11,05 ± 0,24	11,07 ± 0,28	0,893
Firmicutes/ Bacteroidetes	1,05 ± 0,02	1,05 ± 0,02	1,06 ± 0,02	1,07 ± 0,02	1,06 ± 0,02	1,07 ± 0,02	0,619
<i>Bifidobacterium</i> spp.	10,55 (8,69-11,03)	10,64 (10,26-10,77)	10,45 (9,94-10,81)	10,59 (9,77-11,07)	10,48 (9,99-10,84)	10,56 (10,23-10,99) ^b	0,972
<i>Lactobacillus</i> group	7,79 ± 0,58	7,79 ± 0,83	7,65 ± 0,65	7,87 ± 0,43	8,11 ± 0,77 ^c	7,73 ± 0,68	0,450
<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> group	8,45 ± 0,09	8,16 ± 0,77	8,17 ± 0,72	8,33 ± 0,21	8,55 ± 0,56 ^d	8,55 ± 0,70 ^e	0,954

Για τα παραμετρικά χαρακτηριστικά οι τιμές εκφράζονται ως: μ.ο. ± T.A.; Repeated Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity; Για τα μη παραμετρικά χαρακτηριστικά οι τιμές εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1-Q3); Friedman test; Wilcoxon test; ^a: p=0,049 συγκριτικά με την αρχή της παρέμβασης; ^b: p=0,014 συγκριτικά με την αρχή της παρέμβασης; ^c: p=0,017 συγκριτικά με την αρχή της παρέμβασης; ^d: p=0,039 συγκριτικά με την αρχή της παρέμβασης; ^e: p=0,007 συγκριτικά με την αρχή της παρέμβασης

Σύμφωνα με τον πίνακα 8, η παρέμβαση συνολικά δεν είχε σημαντική επίδραση στους μικροοργανισμούς που υπολογίστηκαν με ποσοτική PCR (qPCR). Ωστόσο, η ανάλυση των δεδομένων κάθε ομάδας χωριστά παρουσίασε ορισμένες σημαντικές διαφοροποιήσεις, με εξαίρεση την ομάδα μη κατανάλωσης γιαουρτιού, στην οποία δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση σε κανέναν μικροοργανισμό. Όσον αφορά στην ομάδα χορήγησης απλού γιαουρτιού παρατηρείται ότι οι μικροοργανισμοί της ομάδας των λακτοβακίλλων και της ομάδας των θειοαναγωγικών κλοστριδίων (*Clostridium perfringens* group) αυξήθηκαν σημαντικά με την πάροδο των 8 εβδομάδων της παρέμβασης ($p_{value}=0,017$ και $p_{value}=0,039$ αντίστοιχα). Επιπλέον, στην ομάδα χορήγησης εμπλουτισμένου γιαουρτιού οι μικροοργανισμοί του φύλου Firmicutes ($p_{value}=0,049$), του γένους *Bifidobacterium* spp. ($p_{value}=0,014$) και της ομάδας των θειοαναγωγικών κλοστριδίων (*Clostridium perfringens* group) ($p_{value}=0,007$) αυξήθηκαν σημαντικά σε σχέση με τις τιμές τους πριν την παρέμβαση. Τέλος, στην ομάδα χορήγησης εμπλουτισμένου γιαουρτιού η αναλογία Firmicutes/ Bacteroidetes σημείωσε τάση για αύξηση ($p_{value}=0,055$).

Σημειώνεται ότι οι μικροοργανισμοί του φύλου Firmicutes μετά την παρέμβαση στην ομάδα χορήγησης εμπλουτισμένου γιαουρτιού παρουσίασαν τάση για στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές σε σχέση με την ομάδα χορήγησης απλού γιαουρτιού ($p_{value}=0,064 < 0,10$). Επιπρόσθετα, οι μικροοργανισμοί της ομάδας των λακτοβακίλλων στην ομάδα μη κατανάλωσης γιαουρτιού παρουσίασαν τάση για στατιστικά σημαντικά χαμηλότερες τιμές σε σχέση με την ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού ($p_{value}=0,098 < 0,10$).

Γαστρεντερολογικά συμπτώματα

Στον πίνακα 15 παρατίθενται τα γαστρεντερολογικά συμπτώματα (κοιλιακός πόνος και αριθμός κενώσεων καθημερινά) των 71 από τους 72 εθελοντές που έλαβαν μέρος στο σύνολο της μελέτης (98,6%) για το μήνα που προηγήθηκε της παρέμβασης.

Πίνακας 9: Γαστρεντερολογικά συμπτώματα του συνόλου των εθελοντών, όπως τα κατέγραψαν για το μήνα που προηγήθηκε της παρέμβασης (N=71).

		Μη κατανάλωση γιαουρτιού (n=14)	Απλό γιαούρτι (n=29)	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (n=28)	<i>p-value</i>
Κοιλιακός πόνος		0,00 (0,00 - 0,57)	0,00 (0,00 - 0,95)	0,00 (0,00 - 0,19)	0,731
Ημερήσιες κενώσεις (#/d)	<1	3	7	8	0,988
	1	9	17	16	
	2	2	4	3	
	3	0	1	1	

Για το μη παραμετρικό χαρακτηριστικό (κοιλιακός πόνος) οι τιμές εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1-Q3); Kruskal – Wallis test; Οι συχνότητες των ημερήσιων κενώσεων υπολογίστηκαν με Crosstabs; statistics; Chi - Square

Δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων των 3 ομάδων ως προς τον εκτιμώμενο κοιλιακό/ επιγάστριο πόνο ($p_{value}=0,988$). Αντίστοιχα, δε διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ως προς τη συχνότητα των ημερήσιων κενώσεων, με την πλειοψηφία των εθελοντών να δηλώνουν μια (n=42) ή λιγότερη από μία κένωση την ημέρα (n=18) την ημέρα.

Έχουμε συλλέξει ημερολόγια με δεδομένα για τα γαστρεντερικά συμπτώματα από 69 εθελοντές για την πρώτη εβδομάδα της παρέμβασης, από 51 άτομα για την 4^η εβδομάδα της παρέμβασης και από 64 άτομα για την 8^η εβδομάδα κατανάλωσης ή μη γιαουρτιού. Αξίζει, λοιπόν, να σχολιάσουμε τη συνολική επίδραση της παρέμβασης στην αρχή και το τέλος αυτής, 1^η και 8^η εβδομάδα (δεδομένα από 62 άτομα) καθώς και την επίδρασή της σε όλη τη διάρκεια της μελέτης, 1^η, 4^η και 8^η εβδομάδα (48 άτομα).

Τα χαρακτηριστικά της κλίμακας Bristol, χρώμα και οσμή της κένωσης ακολουθούν κανονική κατανομή και στις 3 εβδομάδες (1^η, 4^η, 8^η). Θα εφαρμόσουμε λοιπόν ανάλυση επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Repeated Measures), τα υπόλοιπα έξι καθώς και το σύνολο των

συμπτωμάτων που αισθάνθηκε ο κάθε εθελοντής δεν είναι παραμετρικά, για αυτό και θα χρησιμοποιήσουμε μη παραμετρικά εργαλεία.

Πίνακας 10: Γαστρεντερολογικά συμπτώμάτων εθελοντών που συμπλήρωσαν τα επταήμερα ημερολόγια καταγραφής την 1^η και 8^η εβδομάδα της μελέτης (n=62)

	1 ^η εβδομάδα παρέμβασης			8 ^η εβδομάδα παρέμβασης			p-overall
	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (N=12)	Απλό γιαούρτι (N=26)	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (N=24)	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (N=12)	Απλό γιαούρτι (N=26)	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (N=24)	
Κενώσεις (#/εβδομάδα)	7,0 (5,0 – 8,0)	7,0 (6,0 - 10,25)	7,0 (5,25 - 10,75)	6,5 (6,0 - 7,75)	7,0 (6,0 - 10,0)	7,0 (5,25 – 9,0)	0,631
Διαρροϊκές κενώσεις (#/εβδομάδα)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,320
Bristol (1-7)	3,17 ± 0,74*	3,56 ± 0,72	3,74 ± 0,59	3,74 ± 1,04	3,62 ± 0,84	3,89 ± 0,67	0,230
Χρώμα (0-4)	2,70 ± 0,66	2,88 ± 0,65	2,70 ± 0,74	2,71 ± 0,66	2,75 ± 0,71	2,41 ± 0,64 ^a	0,355
Οσμή (0-4)	1,45 ± 0,76	1,89 ± 0,79	1,55 ± 0,65	1,63 ± 0,69	2,18 ± 1,43	1,74 ± 0,80	0,130
Πόνος (0-4)	0,00 (0,00 – 3,5)	0,00 (0,00 – 4,25)	0,00 (0,00 – 2,00)	0,00 (0,00 – 3,25)	0,00 (0,00 – 5,50)	0,00 (0,00 – 5,25)	0,814
Διόγκωση (0-4)	0,50 (0,00 – 2,75)	0,00 (0,00 – 4,25)	1,00 (0,00 – 2,00)	0,00 (0,00 – 3,25)	0,00 (0,00 – 3,25)	1,50 (0,00 – 6,75) ^b	0,479
Μετεωρισμός (0-4)	3,00 (0,00 – 6,75)	0,00 (0,00 – 9,00)	4,00 (0,00 – 7,75)	0,50 (0,00 – 2,75) ^c	1,00 (0,00 – 7,25)	6,00 (0,00 – 11,75)	0,267
Βορβορυγμοί (0-4)	0,00 (0,00 – 0,75)	0,00 (0,00 – 2,25)	0,00 (0,00 – 3,00)	0,00 (0,00 – 0,00)	0,00 (0,00 – 2,25)	0,00 (0,00 – 3,75)	0,295
Σύνολο συμπτωμάτων	8,5 (0,25 – 17,00)	5,00 (0,00 – 17,50)	9,00 (0,50 – 14,75)	2,00 (0,25 – 8,25)	4,5 (0,00 – 13,00)	15,00 (0,00 – 19,50) ^d	0,493

Οι τιμές για τα παραμετρικά χαρακτηριστικά (Bristol, χρώμα, οσμή) εκφράζονται ως: μ.ο. ± T.A.; Repeated Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity; Οι τιμές για τα μη παραμετρικά χαρακτηριστικά εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1 – Q3); Friedman test; Wilcoxon test; *: $p=0,020$ συγκριτικά με το εμπλουτισμένο γιαούρτι; ^a: $p=0,007$ συγκριτικά με την 1^η εβδομάδα της παρέμβασης; ^b: $p=0,034$ συγκριτικά με την 1^η εβδομάδα της παρέμβασης; ^c: $p=0,024$ συγκριτικά με την 1^η εβδομάδα της παρέμβασης; ^d: $p=0,031$ συγκριτικά με την 1^η εβδομάδα της παρέμβασης

Συνολικά, η παρέμβαση δεν προκάλεσε σημαντική διαφοροποίηση σε κανένα γαστρεντερολογικό σύμπτωμα. Όσον αφορά στην ομάδα μη χορήγησης γιαουρτιού, την πρώτη εβδομάδα της παρέμβασης, κατέγραψαν σημαντικά πιο χαμηλές τιμές στην κλίμακα Bristol σε σχέση την ομάδα κατανάλωσης εμπλουτισμένου με βιοδραστικά λιποειδή γιαουρτιού ($p_{value}=0,020$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε τάση για σημαντικά πιο ήπια οσμή των κενώσεων των ατόμων που δεν κατανάλωσαν γιαούρτι σε σχέση με τις κενώσεις των ατόμων της ομάδας κατανάλωσης απλού γιαουρτιού ($p_{value}=0,083$). Από την άλλη, την 8^η εβδομάδα της παρέμβασης παρουσιάστηκε τάση για σημαντικά πιο σκούρο χρώμα των κενώσεων των ατόμων που κατανάλωναν καθημερινά ένα απλό γιαούρτι σε σχέση με τα άτομα της ομάδας κατανάλωσης εμπλουτισμένου με βιοδραστικά λιποειδή γιαουρτιού ($p_{value}=0,076$).

Εξετάζοντας την επίδραση της παρέμβασης στα γαστρεντερολογικά συμπτώματα των εθελοντών κάθε ομάδας χωριστά προκύπτουν τα παρακάτω. Αρχικά, όσον αφορά στην ομάδα μη κατανάλωσης γιαουρτιού, οι εθελοντές δήλωσαν σημαντικά πιο ήπιο μετεωρισμό την 8^η

εβδομάδα της παρέμβασης σε σχέση με την 1^η εβδομάδα ($p_{value}=0,024$). Επιπλέον, παρουσιάστηκε μια τάση για σημαντικά πιο χαμηλό συνολικό σκορ των συμπτωμάτων που δήλωσαν οι εθελοντές την τελευταία εβδομάδα της μελέτης ($p_{value}=0,080$).

Στην ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού η παρέμβαση δεν προκάλεσε σημαντική διαφοροποίηση σε κανένα γαστρεντερολογικό σύμπτωμα.

Περνώντας στην ομάδα κατανάλωσης εμπλουτισμένου με βιοδραστικά λιποειδή γιαουρτιού φαίνεται ότι την 8^η εβδομάδα της παρέμβασης το συνολικό σκορ των συμπτωμάτων αυξήθηκε με στατιστική σημαντικότητα ($p_{value}=0,031$). Η δηλωθείσα διόγκωση της κοιλιακής χώρας αυξήθηκε επίσης σημαντικά, ωστόσο η διαφορά ήταν μικρή ($p_{value}=0,034$). Παρατηρήθηκε, τέλος, τάση για αύξηση της οσμής των κενώσεων ($p_{value}=0,99<0,10$) και σημαντική μείωση της κλίμακας Bristol την 8^η σε σχέση με την 1^η εβδομάδα ($p_{value}=0,07$).

Πίνακας 11: Γαστρεντερολογικά συμπτώματα των εθελοντών που συμπλήρωσαν τα επτάμερα ημερολόγια καταγραφής την 1^η, 4^η και 8^η εβδομάδα της μελέτης (n=48)

	1 ^η εβδομάδα παρέμβασης			4 ^η εβδομάδα παρέμβασης			8 ^η εβδομάδα παρέμβασης			<i>p-overall</i>
	Ελέγχου (n=7)	Απλό (n=19)	Εμπλουτισμένο (n=22)	Ελέγχου (n=7)	Απλό (n=19)	Εμπλουτισμένο (n=22)	Ελέγχου (n=7)	Απλό (n=19)	Εμπλουτισμένο (n=22)	
Κενώσεις (#/εβδομάδα)	7 (7-10)	6 (5-10)	7 (5,75-10,25)	7 (6-8)	7 (6-9)	7 (6-9,25)	7 (6-9)	7 (6-8)	7 (5-9,5)	0,933
Διαρροϊκές κενώσεις (#/εβδομάδα)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0,486
Bristol (1-7)	3,58 ± 0,54	3,63 ± 0,73	3,77 ± 0,59	3,57 ± 0,74	3,45 ± 0,88	3,82 ± 0,63	3,56 ± 0,83	3,42 ± 0,83*	3,90 ± 0,69	0,228
Χρώμα (0-4)	2,59 ± 0,74	2,71 ± 0,57	2,64 ± 0,73	2,46 ± 0,63	2,51 ± 0,64 ^a	2,47 ± 0,53	2,55 ± 0,64	2,64 ± 0,71	2,36 ± 0,63	0,838
Οσμή (0-4)	1,68 ± 0,68	1,82 ± 0,90	1,59 ± 0,66	1,61 ± 0,53	1,87 ± 0,90	1,83 ± 0,86	1,70 ± 0,59	1,89 ± 1,01	1,70 ± 0,83	0,771
Πόνος (0-4)	0 (0-0)	0 (0-5)	0 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-5)	0 (0-1,5)	0 (0-1)	0 (0-5)	0 (0-3,75)	0,460
Διόγκωση (0-4)	0 (0-2)	0 (0-5)	1 (0-2)	0 (0-0)	0 (0-7)	1,5 (0-5,25) ^b	0 (0-0)	0 (0-2)	1,5 (0-7)	0,143
Μετεωρισμός (0-4)	5 (0-12)	0 (0-9)	3 (0-7)	1 (0-5)	0 (0-9)	3,5 (0-11,25)	1 (0-3)	1 (0-7)	4,5 (0-11,25)	0,429
Βορβορυγμοί (0-4)	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-3)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-3)	0 (0-0)	0 (0-2)	0 (0-4,25)	0,070
Σύνολο συμπτωμάτων	8 (1-13)	2 (0-19)	8,5 (0-14,25)	1 (0-5) ^c	5 (0-18)	11,5 (0-20,25) ^d	3 (0-6)	5 (0-12)	13,5 (0-18,5)	0,407

Οι τιμές για τα παραμετρικά χαρακτηριστικά (Bristol, χρώμα, οσμή) εκφράζονται ως: μ.ο. ± T.A.; Repeated Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity; Οι τιμές για τα μη παραμετρικά χαρακτηριστικά εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1 – Q3); Friedman test; Wilcoxon test για 1^η -4^η και 4^η – 8^η εβδομάδα; *: $p=0,051$ συγκριτικά με το εμπλουτισμένο; ^a: $p=0,017$ συγκριτικά με την 1^η εβδομάδα; ^b: $p=0,033$ συγκριτικά με την 1^η εβδομάδα; ^c: $p=0,043$ συγκριτικά με την 1^η εβδομάδα; ^d: $p=0,041$ συγκριτικά με την 1^η εβδομάδα

Παρατηρείται ότι η παρέμβαση συνολικά δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε κανένα γαστρεντερολογικό σύμπτωμα μεταξύ των ατόμων των 3 ομάδων. Εξαίρεση αποτελεί η τάση για σημαντική διαφοροποίηση της έντασης των βορβορυγμών ανάμεσα στις 3 ομάδες ($p-overall = 0,070<0,10$). Σημειώνεται ότι την όγδοη εβδομάδα της παρέμβασης η σύσταση των κοπράνων των εθελοντών της ομάδας κατανάλωσης εμπλουτισμένου γιαουρτιού ήταν σημαντικά

πιο υδαρής σε σχέση με τη σύσταση που δήλωσαν μέσω της κλίμακας Bristol οι εθελοντές της ομάδας κατανάλωσης απλού γιαουρτιού ($p_{value}=0,051$).

Εξετάζοντας την επίδραση της παρέμβασης σε κάθε ομάδα ξεχωριστά παρατηρήθηκαν τα εξής. Την 4^η εβδομάδα της παρέμβασης η ομάδα μη χορήγησης γιαουρτιού είχε σημαντικά ($p_{value}=0,043$) χαμηλότερο σύνολο – σκορ γαστρεντερολογικών συμπτωμάτων σε σχέση με την 1^η εβδομάδα της μελέτης. Παρουσίασε, επιπλέον, τάση για σημαντική πτώση της έντασης του μετεωρισμού σε σχέση με την 1^η εβδομάδα ($p_{value}=0,068 < 0,10$).

Όσον αφορά στην ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού η μοναδική διαφοροποίηση εντοπίστηκε την 4^η εβδομάδα της παρέμβασης, οπότε και κατέγραψε κενώσεις με σημαντικά πιο κίτρινο χρώμα σε σχέση με την 1^η εβδομάδα της μελέτης ($p_{value}=0,017$).

Η ομάδα κατανάλωσης εμπλουτισμένου γιαουρτιού παρουσίασε διαφοροποιήσεις τόσο στην ένταση του πόνου, όσο και στην κοιλιακή διόγκωση, το μετεωρισμό και το συνολικό σκορ των συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα, την 4^η εβδομάδα της μελέτης, οι εθελοντές δήλωσαν σημαντική αύξηση της έντασης της κοιλιακής διόγκωσης σε σχέση με την 1^η εβδομάδα ($p_{value}=0,033$). Τάση για σημαντική διαφοροποίηση στην κοιλιακή διόγκωση εντοπίστηκε και την 8^η εβδομάδα της παρέμβασης σε σχέση με την 4^η ($p_{value}=0,065$), με μικρή ωστόσο αριθμητική διαφορά των τιμών. Στην ομάδα κατανάλωσης εμπλουτισμένου γιαουρτιού παρατηρήθηκε επίσης σημαντική αύξηση του συνολικού σκορ των γαστρεντερικών συμπτωμάτων την 4^η εβδομάδα της παρέμβασης σε σχέση με τα δηλωθέντα συμπτώματα την 1^η εβδομάδα της μελέτης ($p_{value}=0,041$). Σημειώνεται η τάση για διαφοροποίηση του πόνου την 8^η εβδομάδα σε σχέση με την 4^η εβδομάδα ($p_{value}=0,074$) και η τάση για διαφοροποίηση της έντασης του μετεωρισμού την 4^η συγκριτικά με την 1^η εβδομάδα ($p_{value}=0,088$).

Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs)

Στον πίνακα 12 παρατίθεται το σύνολο των παραγόμενων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου ανά γραμμάριο κοπράνων και οι μοριακές αναλογίες (molar ratio) αυτών τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της μελέτης. Παρουσιάζονται δεδομένα για τους εθελοντές που ολοκλήρωσαν τις 8 εβδομάδες της παρέμβασης σύμφωνα με το πρωτόκολλο και έδωσαν δείγμα κοπράνων και στο τέλος της 8^{ης} εβδομάδας (N=46). Έχει πραγματοποιηθεί κανονικοποίηση για τους βασικούς συγχυτικούς παράγοντες φύλο και ηλικία.

Πίνακας 12: Μοριακή αναλογία των SCFAs στην αρχή και το τέλος της μελέτης, στα δείγματα κοπράνων των εθελοντών που ολοκλήρωσαν την παρέμβαση (N=46), με κανονικοποίηση ως προς το φύλο, την ηλικία και τον ΔΜΣ.

	Πριν την παρέμβαση (t=0)			Μετά την παρέμβαση (t=8 εβδομάδες)			p-overall
	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (n=6)	Απλό γιαούρτι (n=18)	Εμπλουτισμέν ο γιαούρτι (n=22)	Μη κατανάλωση γιαουρτιού (n=6)	Απλό γιαούρτι (n=18)	Εμπλουτισμένο γιαούρτι (n=22)	
Ποσότητα SCFAs στο δείγμα (μmol/gr κοπράνων)	68,34 ± 34,35	74,58 ± 30,92	84,29 ± 30,95	72,84 ± 33,13	79,52 ± 42,44	71,71 ± 37,79	0,870
Οξικό οξύ (%)	48,56 ± 5,68	47,84 ± 5,74	46,55 ± 5,87	50,46 ± 2,04	48,48 ± 7,23	48,93 ± 4,96	0,569
Προπιονικό οξύ (%)	17,29 ± 3,69	19,00 ± 4,74	18,82 ± 3,47	16,47 ± 2,20	18,12 ± 3,49	18,43 ± 3,98	0,425
Βουτυρικό οξύ (%)	27,06 ± 7,39	26,51 ± 6,78	27,30 ± 5,55	26,41 ± 4,01	25,93 ± 8,14	24,76 ± 4,9 ^a	0,980
Διακλαδισμένα SCFAs(%)	4,25 ± 2,01	3,33 ± 2,00	3,57 ± 3,21	4,05 ± 2,65	4,06 ± 2,33	4,07 ± 2,26	0,978
Άλλα SCFAs (%)	2,83 ± 1,10	3,77 ± 1,95	3,32 ± 1,31	2,61 ± 1,22 ^b	3,81 ± 1,84	3,41 ± 1,46	0,300

Οι τιμές εκφράζονται ως: μ.ο. ± T.A.; Repeated Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity; ^a: p= 0,050 συγκριτικά με την αρχή της παρέμβασης; ^b: p= 0,027 συγκριτικά με την αρχή της παρέμβασης; SCFAs: λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου; Διακλαδισμένα SCFAs: ισο-βουτυρικό, ισο-βαλερικό και ισο-καπροϊκό οξύ; Άλλα SCFAs: βαλερικό, καπροϊκό και επτανοϊκό οξύ

Σύμφωνα με τον πίνακα 12 η παρέμβαση συνολικά δεν προκάλεσε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε κανένα λιπαρό οξύ βραχείας αλύσου.

Ελέγχοντας κάθε ομάδα ξεχωριστά παρατηρείται ότι στην ομάδα μη κατανάλωσης γιαουρτιού, η παρέμβαση διαφοροποίησε σημαντικά τη μοριακή αναλογία του αθροίσματος των άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (βαλερικό, καπροϊκό και επτανοϊκό οξύ) ($p_{value}=0,027$).

Στην ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού δε διαφοροποιήθηκε καμία μοριακή αναλογία ούτε και το σύνολο των παραγόμενων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου ανά γραμμάριο κοπράνων.

Τέλος, στην ομάδα κατανάλωσης εμπλουτισμένου γιαουρτιού αναδείχθηκε τάση για στατιστικά σημαντική αύξηση της μοριακής αναλογίας του οξικού οξέος ($p_{value}=0,091$) και μειώθηκε σημαντικά η μοριακή αναλογία (molar ratio) του βουτυρικού οξέος ($p_{value}=0,050$).

Σημειώνεται ότι στην περίπτωση της συνολικής ποσότητας παραγόμενων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου ανά γραμμάριο κοπράνων και της μοριακής αναλογίας του οξικού οξέος, παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση του φύλου ($p_{value}=0,028$ και $0,084$ αντίστοιχα).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της χορήγησης βιοδραστικών λιποειδών μέσα από εμπλουτισμένο γιαούρτι σε υγιείς ενήλικες, φαίνεται ότι στην ομάδα χορήγησης του εμπλουτισμένου γιαουρτιού οι μικροοργανισμοί του φύλου Firmicutes, του γένους *Bifidobacterium* και της ομάδας του *Clostridium perfringens* αυξήθηκαν σημαντικά, σε σχέση με την έναρξη της παρέμβασης. Στο τέλος της παρέμβασης οι μικροοργανισμοί του φύλου Firmicutes στην ομάδα κατανάλωσης του εμπλουτισμένου γιαουρτιού παρουσίασαν τάση για σημαντικά μεγαλύτερη μέση τιμή σε σχέση με την ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού. Στην ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού αυξήθηκε σημαντικά η ομάδα των λακτοβακίλλων και η ομάδα του *Clostridium perfringens*, σε σχέση με την έναρξη της παρέμβασης. Η ομάδα των λακτοβακίλλων ήταν αυξημένη όχι μόνο σε σχέση με την αρχή της παρέμβασης αλλά και σε σχέση με την ομάδα μη κατανάλωσης γιαουρτιού με τάση για στατιστική σημαντικότητα.

Κατά την παρέμβαση με βιοδραστικά λιποειδή επιλέχθηκε ως φορέας – τρόφιμο το γιαούρτι. Το γιαούρτι προέρχεται από την οξυγαλακτική ζύμωση του γάλακτος από τα βακτήρια *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*, ενώ σύμφωνα με τον Codex Alimentarius πρέπει να διατηρούνται οι πληθυσμοί αυτοί ζωντανοί ($>10^7$ CFU/g) σε όλη τη διάρκεια ζωής του τροφίμου (WHO 2011). Η επιβίωση των αρχικών καλλιεργειών του γιαουρτιού (*Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*) μετά από τη διέλευση τους από τον γαστρεντερικό σωλήνα έχει ήδη μελετηθεί τα τελευταία χρόνια, με τις περισσότερες μελέτες να καταγράφουν αυξημένους πληθυσμούς στα δείγματα των κοπράνων των εθελοντών που κατανάλωσαν γιαούρτι. Σε μελέτη που εξετάστηκε η κατανάλωση φρέσκου και παστεριωμένου γιαουρτιού σε δείγματα κοπράνων, δεν εντοπίστηκαν οξυγαλακτικά βακτήρια στο γαστρεντερικό μικροβιόκοσμο των εθελοντών, όταν τα δείγματα των κενώσεων αναλύθηκαν με την καλλιεργητική μεθοδολογία. Όταν πραγματοποιήθηκε υβριδισμός *in situ* στο DNA που απομονώθηκε από τις κενώσεις των ίδιων εθελοντών, τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria – LAB) εντοπίστηκαν στο 10,52% αυτών που είχαν καταναλώσει το φρέσκο γιαούρτι και μόνο στο 2,10% αυτών που είχαν καταναλώσει το παστεριωμένο (del Campo, Bravo et al. 2005). Σε άλλη μελέτη περίπου την ίδια χρονική περίοδο, εντοπίστηκαν οι μικροοργανισμοί *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus* σε άτομα που κατανάλωσαν τόσο φρέσκο όσο και παστεριωμένο γιαούρτι, σε δείγματα κενώσεων που επεξεργάστηκαν αποκλειστικά εφαρμόζοντας την καλλιεργητική μεθοδολογία (Mater, Bretigny et al. 2005). Μετά από καταμέτρηση με ποσοτική PCR (quantitative real time) δειγμάτων κοπράνων εθελοντών που κατανάλωσαν επίσης φρέσκο και παστεριωμένο γιαούρτι, παρατηρήθηκε και στις δύο ομάδες σημαντική αύξηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων και του *Clostridium perfringens* (Garcia-Albiach, Pozuelo de Felipe et al. 2008).

Λαμβάνοντας υπόψη την επίδραση της κατανάλωσης γιαουρτιού στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο, προστέθηκε στις ομάδες της μελέτης μια ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού, ώστε να εξεταστεί η πιθανή επίδραση της κατανάλωσης γιαουρτιού στον εντερικό μικροβιόκοσμο. Από τα αποτελέσματα της καθημερινής χορήγησης του απλού γιαουρτιού, για 2 μήνες, παρατηρήθηκε αύξηση τόσο της ομάδας των λακτοβακίλλων όσο και του *Clostridium perfringens*, στα κόπρανα των εθελοντών, συμφωνώντας έτσι με τους προηγούμενους ερευνητές.

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα της παρέμβασης με το εμπλουτισμένο με εκχύλισμα βιοδραστικών λιποειδών γιαούρτι παρατηρούμε ότι αυξήθηκαν διαφορετικοί μικροοργανισμοί σε σχέση με αυτούς που αυξήθηκαν στην ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού. Η συγκεκριμένη παρατήρηση μας επιτρέπει να αποδώσουμε τις διαφοροποιήσεις που προέκυψαν στους μικροοργανισμούς του φύλου Firmicutes και του γένους *Bifidobacterium*, στα φαινολικά συστατικά που απομονώθηκαν από τα παραπροϊόντα της επεξεργασίας του ελαιολάδου και με τα οποία εμπλουτίστηκε το γιαούρτι της παρέμβασης. Οι μικροοργανισμοί της ομάδας *Clostridium perfringens* αυξήθηκαν σημαντικά κατά 0,38 log₁₀ CFU/gr κοπράνων, αντίστοιχη αύξηση με αυτή που παρατηρήσαμε στην ομάδα κατανάλωσης του απλού γιαουρτιού.

Η αύξηση του γένους *Bifidobacterium* που παρατηρήσαμε στην ομάδα κατανάλωσης του εμπλουτισμένου γιαουρτιού συμφωνεί με τα αποτελέσματα μελέτης στην οποία χορηγήθηκε ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με πολυφαινόλες από παρθένο ελαιόλαδο και θυμάρι. Στη συγκεκριμένη μελέτη φάνηκε ότι η καθημερινή χορήγηση 25ml ελαιολάδου το οποίο έχει εμπλουτιστεί ανά λίτρο με 250mg πολυφαινόλων από παρθένο ελαιόλαδο σε συνδυασμό με 250mg φαινολικών από θυμάρι αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της ομάδας των *Bifidobacteria* στον εντερικό μικροβίοκοσμο των εθελοντών. Αντίθετα, η χορήγηση 25ml ελαιολάδου, το οποίο είναι εμπλουτισμένο ανά λίτρο με 500mg φαινολικών αποκλειστικά από παρθένο ελαιόλαδο, δεν οδηγεί σε αντίστοιχη αύξηση (Martin-Pelaez, Mosele et al. 2015). Αύξηση στα επίπεδα των *Bifidobacteria* έχει παρατηρηθεί μετά τη χορήγηση φαινολικών και από άλλα φυτικής προέλευσης προϊόντα, όπως είναι το κρασί, το οποίο περιέχει διαφορετικά φαινολικά συστατικά. Η αύξηση ήταν σημαντική μετά τη χορήγηση κόκκινου κρασιού ελεύθερου αλκοόλ (272ml) και παρέμεινε σημαντική όταν ακολούθησε η εικοσαήμερη κατανάλωση κόκκινου κρασιού (272ml). Ωστόσο μετά την αντίστοιχη καθημερινή κατανάλωση gin (100ml), τα επίπεδα του γένους *Bifidobacterium* μειώθηκαν σε τιμές μικρότερες των αρχικών (Queiro-Ortuno, Boto-Ordonez et al. 2012). Μετά την κατανάλωση χυμού βατόμουρου (blueberry drink), πλούσιο σε πολυφαινόλες, για 6 εβδομάδες τα *Bifidobacteria* αυξήθηκαν επίσης σημαντικά (Vendrame, Guglielmetti et al. 2011). Σημειώνεται ότι ο χυμός βατόμουρου περιέχει διαιτητικές ίνες που επηρεάζουν εξίσου τον εντερικό μικροβίοκοσμο, συνεπώς η προκληθείσα αύξηση στα *Bifidobacteria* ενδέχεται να απορρέει από την «πρεβιοτική» δράση των ινών.

Μετά την καθημερινή κατανάλωση εμπλουτισμένου με βιοδραστικά λιποειδή γιαουρτιού αυξήθηκαν σημαντικά οι μικροοργανισμοί του φύλου Firmicutes. Ωστόσο δεν είναι πολλές οι κλινικές δοκιμές χορήγησης φαινολικών συστατικών στις οποίες έχει αξιολογηθεί το φύλο Firmicutes. Στη μελέτη χορήγησης κόκκινου κρασιού και gin παρατηρήθηκε μια σημαντική ανοδική τάση μετά την κατανάλωση του κόκκινου αλκοολούχου κρασιού, η οποία άρθηκε μετά την κατανάλωση του gin (Queiro-Ortuno, Boto-Ordonez et al. 2012). Αντίστοιχα ανοδική τάση, μη σημαντική, παρατηρήθηκε σε δείγματα κοπράνων ποντικών που κατανάλωσαν τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε ελαιόλαδο, πλούσιο σε αντίστοιχες πολυφαινόλες με αυτές που έχει εμπλουτιστεί το γιαούρτι της δικής μας παρέμβασης (M. Hidalgo 2014). Στην προαναφερθείσα in vivo μελέτη χορηγήθηκε σε 3 ομάδες ποντικών ab libitum τροφή υψηλής περιεκτικότητας παρθένου ελαιολάδου, ραφινρισμένου ελαιολάδου και βουτύρου, αντίστοιχα. Παρότι η σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των Bacteroidetes και των Firmicutes, που παρατηρήθηκε στην ομάδα (ελέγχου) κατανάλωσης κλασικής τροφής, δε φάνηκε ούτε σε 6 ούτε σε 12 εβδομάδες μετά

την χορήγηση της τροφής υψηλής περιεκτικότητας σε ελαιόλαδο, το φύλο Firmicutes διατήρησε την ανοδική του τάση και στην έκτη εβδομάδα της παρέμβασης να ξεπερνά, μη σημαντικά, τα Bacteroidetes.

Μετά την καθημερινή κατανάλωση του εμπλουτισμένου γιαουρτιού αυξήθηκαν σημαντικά και οι μικροοργανισμοί της ομάδας *Clostridium perfringens*. Δεδομένα από μελέτες χορήγησης τροφίμων φυτικής προέλευσης πλούσια σε πολυφαινόλες που να αξιολογούν στον εντερικό μικροβιόκοσμο των εθελοντών το *Clostridium perfringens* δεν υπάρχουν πολλά. Πιθανότατα γιατί στη βιβλιογραφία οι πολυφαινόλες δεν έχουν συσχετιστεί με αυτό, ώστε να προσπαθήσουν να το επιβεβαιώσουν ή όχι. Στην μελέτη του Queiro-Ortuno και των συνεργατών του αναλύθηκε η ποσότητα του *Clostridium spp.* και το *Clostridium histolyticum group* με αποτελέσματα αντίθετα της δικής μας παρέμβασης. Ενδεχομένως η παρατηρηθείσα άνοδος στα αποτελέσματά μας να οφείλεται στο μέσο «μεταφοράς» των πολυφαινολών, το γιαούρτι, η κατανάλωση του οποίου όπως φάνηκε αυξάνει τα επίπεδα του *Clostridium perfringens*.

Στο τέλος της παρέμβασης οι μικροοργανισμοί του φύλου Bacteroidetes δεν αυξήθηκαν ούτε στην ομάδα κατανάλωσης εμπλουτισμένου γιαουρτιού ούτε στην ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού. Αντίθετα, σε μελέτη χορήγησης τροφής πλούσιας σε ελαιόλαδο σε ποντίκια οι μικροοργανισμοί του φύλου Bacteroidetes στα δείγματα των κοπράνων αυξήθηκαν σημαντικά (Patterson, RM et al. 2014). Στην *in vivo* μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια, αξιολογήθηκε η επίδραση δίαιτας πλούσιας σε λίπος στον εντερικό μικροβιόκοσμο, λαμβάνοντας υπόψη την πηγή του λίπους. Τα ποντίκια κατηγοριοποιήθηκαν σε 4 ομάδες υψηλής (45%) και 2 ομάδες χαμηλής (12%) κατανάλωσης λίπους και είχαν ελεύθερη πρόσβαση στην τροφή και στο νερό. Η παρέμβαση διήρκεσε 16 εβδομάδες. Οι πηγές λίπους στις 4 ομάδες ήταν το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, το φοινικέλαιο, το ιχθυέλαιο εμπλουτισμένο με λιναρόσπορο και το λάδι από safflower (safflower oil). Στα δείγματα των κοπράνων της ομάδας κατανάλωσης τροφής πλούσια σε ελαιόλαδο εντοπίστηκε σημαντικά μικρότερη ποικιλία μικροοργανισμών σε σχέση με αυτή που εντοπίστηκε στα δείγματα των κενώσεων των υπόλοιπων ομάδων. Οι μικροοργανισμοί του φύλου Bacteroidetes ήταν ωστόσο σημαντικά περισσότεροι σε σχέση με την ομάδα κατανάλωσης φοινικέλαιου. Αντίστοιχα, σημαντικά περισσότεροι ήταν οι μικροοργανισμοί της οικογένειας *Bacteroidaceae* και του γένους *Bacteroides* στην ομάδα του ελαιολάδου σε σχέση με την ομάδα του φοινικέλαιου, του ιχθυελαίου με το λιναρόσπορο αλλά και την ομάδα δίαιτας χαμηλού λίπους/ αυξημένης σουκρόζης.

Μετά τη χορήγηση συγκεκριμένης ποικιλίας πράσινων ελιών για 30 ημέρες φάνηκε μια μη σημαντική τάση για αύξηση των λακτοβακίλλων στον εντερικό μικροβιόκοσμο των εθελοντών (Accardi, Aiello et al. 2016). Ενδεχομένως, μια παρέμβαση μεγαλύτερης διάρκειας να επέφερε σημαντικά αποτελέσματα. Στη δική μας παρέμβαση τα αποτελέσματα συμφώνησαν με τα παραπάνω και οι λακτοβάκιλλοι έδειξαν μια τάση για αύξηση, χωρίς αυτή να είναι σημαντική. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στον περιορισμένο αριθμό του δείγματος.

Ελέγχοντας τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου στα δείγματα των κοπράνων και από τις 3 ομάδες της μελέτης στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης δεν παρατηρούμε σημαντικές διαφοροποιήσεις. Βλέπουμε όμως ότι το φύλο επιδρά σημαντικά στη συνολική ποσότητα των SCFAs. Κάτι που αντιμετωπίσαμε και κατά την ανάλυση του pH των κοπράνων. Το ότι ο ίδιος

παράγοντας επιδρά σημαντικά στο pH και στη συνολική ποσότητα SCFAs των κοπράνων δικαιολογείται αν λάβουμε υπόψη μας ότι η αυξημένη ποσότητα οξέων σε ένα υλικό αυξάνει την οξύτητα του, μειώνοντας έτσι το pH του. Δηλαδή ότι η αυξημένη ποσότητα SCFAs θα μειώσει το pH του γαστρεντερικού υλικού και κάτι που επιδρά στην παραγωγή των λιπαρών οξέων δε μπορεί παρά να επιδρά και στο pH του γαστρεντερικού περιεχομένου, και αντίστροφα. Η κινητικότητα του γαστρεντερικού αυλού, οι εκκρίσεις του γαστρικού οξέος και των διττανθρακικών ιόντων καθώς και το pH του στομάχου έχουν συσχετιστεί με το φύλο (Freire, Basit et al. 2011). Έχει φανεί ότι το pH του στομάχου των γυναικών είναι σημαντικά πιο υψηλό, καθώς το γαστρικό οξύ εκκρίνεται σε μεγαλύτερες ποσότητες στους άντρες και τα διττανθρακικά ιόντα στις γυναίκες. Όσον αφορά στην επίδραση του φύλου στο pH του παχέος εντέρου έχει δοθεί λιγότερη έμφαση σε σχέση με αυτή που έχει δοθεί για το pH του στομάχου. Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι δε διαφοροποιείται ανά φύλο (McDougall 1993) ενώ άλλες ότι διαφοροποιείται (Stephen, Wiggins et al. 1986). Στη μελέτη του Stephen και των συνεργατών του το pH των κοπράνων των γυναικών ήταν σημαντικά μεγαλύτερο σε σχέση με των αντρών και συσχετίστηκε με την παραγωγή μεθανίου. Σε μελέτη φάνηκε ότι οι μικροοργανισμοί που παράγουν μεθάνιο είναι σημαντικά περισσότεροι στον εντερικό μικροβιόκοσμο των γυναικών έναντι των αντρών (Pitt, de Bruijn et al. 1980). Επίσης ότι τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου απορροφώνται πιθανότατα περισσότερο από τα εντεροκύτταρα ατόμων που φιλοξενούν στον εντερικό τους μικροβιόκοσμο μεγάλες ποσότητες μικροοργανισμών που παράγουν μεθάνιο (Flick and Perman 1989). Υποστηρίζει συνεπώς η Freire και οι συνεργάτες της ότι τα SCFAs απορροφώνται περισσότερο από τα εντεροκύτταρα του γαστρεντερικού αυλού των γυναικών απ' ότι των αντρών (Freire, Basit et al. 2011). Αυτό συνεπάγεται μικρότερη συγκέντρωση SCFAs στο γαστρεντερικό περιεχόμενο των γυναικών, άρα μεγαλύτερες τιμές pH. Αυτή η υπόθεση συμφωνεί και με τα δικά μας αποτελέσματα, όπου οι γυναίκες συνολικά στην αρχή της παρέμβασης είχαν σημαντικά μεγαλύτερη μέση τιμή pH κοπράνων σε σχέση με τους άντρες ($p=0,004$) (διάγραμμα 5). Οι τιμές του pH των κοπράνων των γυναικών δε διαφοροποιήθηκαν μετά την παρέμβαση, ούτε στην ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού ούτε στην ομάδα κατανάλωσης εμπλουτισμένου με βιοδραστικά λιποειδή από τα παραπροϊόντα ελαιουργίας γιαουρτιού. Από την άλλη, στο pH των κοπράνων των αντρών, παρατηρήθηκε τάση για σημαντική αύξηση στην ομάδα κατανάλωσης εμπλουτισμένου γιαουρτιού ($p=0,091$) και μη σημαντική αύξηση στην ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού. Στην περίπτωση μεγαλύτερου δείγματος οι προαναφερθέντες παρατηρήσεις πιθανότατα να ήταν σημαντικές. Βλέπουμε ότι η παρέμβαση επηρέασε κυρίως το pH των κοπράνων των αντρών ενώ των γυναικών δε διαφοροποιήθηκε.

Για να εξακριβώσουμε περαιτέρω την παραπάνω υπόθεση θα έπρεπε να αξιολογήσουμε την παρουσία μικροοργανισμών που παράγουν μεθάνιο στον εντερικό μικροβιόκοσμο των γυναικών και των αντρών που συμμετείχαν στη μελέτη μας. Ωστόσο στην παρούσα παρέμβαση δεν αξιολογήθηκε η παρουσία αρχαίων ή άλλων μεθανο – παραγώγων.

Στην ομάδα χορήγησης εμπλουτισμένου γιαουρτιού τα SCFAs μειώθηκαν κατά $\sim 12 \mu\text{mol/gr}$ κοπράνων. Αντίθετα, στην ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού και στην ομάδα μη κατανάλωσης γιαουρτιού αυξήθηκαν. Η διαφοροποίηση των SCFAs ήταν μη σημαντική και στις 3 ομάδες. Η παρατηρηθείσα μείωση στην ομάδα χορήγησης του εμπλουτισμένου γιαουρτιού προκαλεί, ωστόσο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον και έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα μελέτης

όπου χορηγήθηκε ελαιόλαδο εμπλουτισμένο με φαινολικά από παρθένο ελαιόλαδο και το σύνολο των SCFAs αυξήθηκε κατά πολύ, επίσης μη σημαντικά (Martin-Pelaez, Mosele et al. 2015). Όσον αφορά στη μοριακή αναλογία των κυρίαρχων SCFAs στα δείγματα των κοπράνων, τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με την προαναφερθείσα μελέτη. Και στις δυο μελέτες χορηγήθηκαν πολυφαινόλες, προερχόμενες από το ελαιόλαδο ή τα παραπροϊόντα της επεξεργασίας του και οι μοριακές αναλογίες των SCFAs παρέμειναν σταθερές. Κάτι που παρατηρήθηκε και μετά την κατανάλωση φρουτοχυμού εμπλουτισμένου με πολυφαινόλες (Wallace, Eady et al. 2015). Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης *in vitro* μελέτης όπου ζυμώθηκαν σε ανθρώπινα δείγματα κοπράνων φαινολικά συστατικά από σταφύλια και τα SCFAs στις 12, 24 και 36 ώρες ζύμωσης ήταν σημαντικά αυξημένα (Zhou, Wang et al. 2016). Συγκεκριμένα το βουτυρικό οξύ στις πρώτες 24 ώρες ακολούθησε μια προοδευτική ανοδική πορεία, ενώ αυξήθηκε κατακόρυφα μετά τις 36 ώρες ζύμωσης. Στις *in vitro* όμως μελέτες δε λαμβάνεται υπόψη ο ζωντανός οργανισμός, ο οποίος με τις λειτουργίες του συμμετέχει στην απορρόφηση των λιπαρών οξέων και στην αποβολή της περίσσειας με τα κόπρανα.

Έχει φανεί ότι κάποιες ομάδες από το φύλο Firmicutes είναι που κυρίως συμμετέχουν στο μεταβολισμό των άπεπτων υδατανθράκων προς βουτυρικό οξύ. Συγκεκριμένες τάξεις κλοστριδίων (Clostridial clusters XIVa+b, IV, XVI) κυριαρχούν σε αυτά τα μεταβολικά μονοπάτια και οι μικροοργανισμοί της ομάδας *Eubacterium rectale/ Roseburia*, που βρίσκονται σε αφθονία κατά 2,3 – 8,8 % στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο, είναι κατά βάση υπεύθυνοι για την παραγωγή του βουτυρικού οξέος (Louis, Scott et al. 2007). Αντίστοιχα, υπεύθυνα για το μεταβολισμό των άπεπτων υδατανθράκων προς προπιονικό οξύ είναι ορισμένα Gram αρνητικά βακτήρια του φύλου Bacteroidetes, ενώ για την παραγωγή του οξικού τα *Bifidobacteria* (Louis, Scott et al. 2007). Στην ομάδα κατανάλωσης του εμπλουτισμένου γιαουρτιού, μετά τις 8 εβδομάδες της παρέμβασης παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των μικροοργανισμών του φύλου Firmicutes. Σημειώνεται, ότι υπήρχε προτροπή προς τους εθελοντές να διατηρήσουν τις διατροφικές τους συνήθειες, έτσι ώστε η ποσότητα των καταναλισκόμενων άπεπτων υδατανθράκων πριν και κατά τη διάρκεια της παρέμβασης να παραμείνει σταθερή. Παρόλη την αύξηση των Firmicutes δεν αυξήθηκε η ποσότητα του τελικώς παραγόμενου βουτυρικού οξέος. Βέβαια δεν έχουν μετρηθεί οι επιμέρους ομάδες που θεωρείται ότι παράγουν βουτυρικό και έτσι δεν είναι εύκολη η συσχέτιση, δεδομένου ότι πρόκειται για τεράστια κατηγορία (Firmicutes) που περιλαμβάνει πολλές ομάδες βακτηρίων. Τέλος, είναι γνωστό ότι το βουτυρικό οξύ αποτελεί πηγή ενέργειας για τα εντεροκύτταρα (Tremaroli and Backhed 2012). Είναι επομένως πιθανόν να παράχθηκε όντως μεγαλύτερη ποσότητα βουτυρικού οξέος, αλλά να «καταναλώθηκε» από τα εντεροκύτταρα και η αξιολόγηση που γίνεται της ποσότητας στο γαστρεντερικό περιεχόμενο που αποβάλλεται από τον οργανισμό να μην είναι αντικειμενική.

Συνολικά, φάνηκε ότι ανέχτηκαν αρκετά καλά οι εθελοντές το εμπλουτισμένο με βιοδραστικά λιποειδή γιαούρτι όπως και το απλό. Συγκεκριμένα, την πρώτη εβδομάδα της παρέμβασης τα άτομα που κατανάλωσαν το εμπλουτισμένο γιαούρτι κατέγραψαν σημαντικά χαμηλότερη τιμή στην κλίμακα Bristol σε σχέση με τα άτομα που δεν κατανάλωσαν γιαούρτι. Η διαφορά ωστόσο ποσοτικά ήταν μικρή και αν είχαμε αξιολογήσει την κλίμακα ως διατακτική και όχι συνεχή μεταβλητή, θα παρατηρούσαμε διαφοροποίηση ενός τύπου-σταδίου, και συγκεκριμένα οι

διαφοροποιήσεις περιορίστηκαν μεταξύ των τύπων 3 και 4, δηλαδή τους δύο πιο «φυσιολογικούς» τύπους κενώσεων. Την 8^η εβδομάδα της παρέμβασης τα άτομα που κατανάλωναν το εμπλουτισμένο με βιοδραστικά λιποειδή γιαούρτι κατέγραψαν επίσης σημαντικά πιο υψηλή τιμή στην κλίμακα Bristol, σε σχέση με την ομάδα κατανάλωσης απλού γιαουρτιού αυτή τη φορά, με ποσοτική διαφοροποίηση εξίσου μικρή. Σε μελέτη χορήγησης χυμού φρούτων, ο οποίος είχε εμπλουτιστεί με πολυφαινόλες, διαιτητικές ίνες ή και τα 2 μαζί, φάνηκε ότι η κατανάλωση εμπλουτισμένου μόνο με πολυφαινόλες χυμού μείωσε την κοιλιακή διόγκωση και το μετεωρισμό, ενώ η κατανάλωση των άλλων δύο χυμών επιδείνωσε τα συμπτώματα (Wallace, Eady et al. 2015). Δε μπορούμε να αποδώσουμε τα ευεργετικά αυτά αποτελέσματα στις πολυφαινόλες αποκλειστικά καθώς όταν καταναλώθηκε ο χυμός που είχε εμπλουτιστεί με πολυφαινόλες σε συνδυασμό με τις διαιτητικές ίνες τα γαστρεντερολογικά συμπτώματα επέστρεψαν. Πιθανότατα ο μετεωρισμός να οφείλεται στη ζύμωση των ινών και την παραγωγή SCFAs και αερίων, υπάρχει ωστόσο και η πιθανότητα να αλληλεπιδρούν οι πολυφαινόλες με τις ίνες εντός του προϊόντος και να τροποποιούνται οι ιδιότητες τους (Nozaki, Kimura et al. 2009).

Τέλος, αξίζει να σχολιάσουμε ότι στην παρούσα μελέτη, το προϊόν της παρέμβασης ήταν εμπλουτισμένο με εκχύλισμα πολυφαινολών και δεν ήταν ένα προϊόν φυσικά πλούσιο σε πολυφαινόλες. Η μορφή με την οποία χορηγούνται οι πολυφαινόλες, άρα η μορφή με την οποία εισέρχονται στο γαστρεντερικό σύστημα, φτάνουν στο παχύ έντερο και ζυμώνονται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο, διαφοροποιεί πολύ την εκεί μεταβολική τους πορεία. Ενδέχεται ένα προϊόν που αποτελεί φυσική πηγή πολυφαινολών να περιέχει συστατικά τα οποία δρουν συνεργιστικά με τις πολυφαινόλες και προσαυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητα τους στον εντερικό μικροβιόκοσμο του καταναλωτή. Από την άλλη πλευρά, ο εμπλουτισμός τροφίμου, το οποίο υπό φυσιολογικές συνθήκες δεν περιέχει πολυφαινόλες, με εκχύλισμα πολυφαινολών, πιθανότατα να μην οδηγήσει σε αντίστοιχη ευεργετική για τον εντερικό μικροβιόκοσμο του καταναλωτή αλληλεπίδραση. Η αλληλεπίδραση των πολυφαινολών με τα μακροθρεπτικά συστατικά, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λιποειδή είναι αναπόφευκτη και λαμβάνει χώρα τόσο στο εσωτερικό του τροφίμου όσο και του οργανισμού που θα το καταναλώσει. Ποικίλες μελέτες έχουν καταλήξει στο ότι οι συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη μεταβολική μοίρα και τον ρόλο των πολυφαινολών μέσα στον οργανισμό του καταναλωτή (Jakobek 2015). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυφαινολών και των λιποειδών δύναται να μειώσει την απορρόφηση του λίπους (Shishikura, Khokhar et al. 2006) και την οξείδωσή του από τις ελεύθερες ρίζες. Όταν οι πολυφαινόλες φτάνουν στο γαστρεντερικό αυλό αντιδρούν με τα παράγωγα της οξείδωσης του λίπους (lipid peroxidation products) και προλαμβάνουν την περαιτέρω οξείδωση τους (Shlomit Gorelik 2013). Ιδιαίτερη έμφαση έχει δοθεί στις πολυφαινόλες του παρθένου ελαιολάδου και την προστατευτική αυτή δράση τους (Incani, Serra et al. 2016). Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι όταν οι πολυφαινόλες προσδεθούν σε μόρια λίπους, «σταθεροποιούνται» και φτάνουν σε μεγαλύτερο βαθμό ανέπαφες στο παχύ έντερο. Έτσι ένα τρόφιμο που είναι πλούσιο σε λίπος αποτελεί το πλέον κατάλληλο περιβάλλον ύπαρξης/ εμπλουτισμού των πολυφαινολών, σε σχέση με ένα τρόφιμο χαμηλής περιεκτικότητας λίπους (Ortega, Reguant et al. 2009). Περνώντας στην αλληλεπίδραση μεταξύ των πολυφαινολών και των πρωτεϊνών, αναφέρεται ότι πιθανόν να οδηγεί σε μείωση της βιοδιαθεσιμότητας ορισμένων αμινοξέων, της απορρόφησης των πρωτεϊνών και της δράσης κάποιων ενζύμων (Jakobek 2015). Τέλος, η αλληλεπίδραση των πολυφαινολών με τους υδατάνθρακες φαίνεται να επιδρά ευεργετικά στον ανθρώπινο

οργανισμό. Οι πολυφαινόλες αλληλεπιδρούν κυρίως με τα μόρια των υδατανθράκων που βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτικών κυττάρων και δημιουργούν ασθενείς υδροφοβικούς δεσμούς (Padayachee, Netzel et al. 2012). Μόλις φτάσουν στο παχύ έντερο τα ένζυμα των μικροοργανισμών υδρολύουν τους δεσμούς και τόσο τα φαινολικά συστατικά όσο και τα μόρια σακχάρων μεταβολίζονται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο δημιουργώντας ένα αντιοξειδωτικό περιβάλλον (Macdonald and Wagner 2012). Τα φαινολικά όταν είναι προσδεμένα σε μόρια υδατανθράκων όπως και όταν είναι προσδεμένα σε μόρια λιποειδών προστατεύονται κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα και φτάνουν ανέπαφα το παχύ έντερο. Εκεί δρουν προστατευτικά έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών και ευεργετικά στην ανάπτυξη του φυσιολογικού εντερικού μικροβιόκοσμου (Palafox-Carlos, Ayala-Zavala et al. 2011). Φάνηκε ότι ο ανθρώπινος οργανισμός απορροφά περισσότερο τους γλυκοζίτες της κερκετίνης συγκριτικά με την «καθαρή» ουσία της κερκετίνης, μη γλυκοζυλιωμένη (Hollman and Katan 1999).

Στη παρέμβαση οι πολυφαινόλες (τυροσόλη, υδροξυ – τυροσόλη και ολευροπεΐνη) δε βρίσκονται στο φυσικό τους περιβάλλον (ελαιόλαδο, παραπροϊόντα ελαιουργίας) αλλά το εκχύλισμα αυτών έχει εμπλουτιστεί σε γιαούρτι. Αξίζει να το λάβουμε αυτό υπόψη μας όταν συγκρίνουμε τα αποτελέσματα μας με την μελέτη της Martin-Pelaez και των συνεργατών της που χορήγησαν πολυφαινόλες ελαιολάδου και θυμαριού εμπλουτισμένες σε ελαιόλαδο (Martin-Pelaez, Mosele et al. 2015). Αξίζει επιπλέον να αναφερθεί ότι το γιαούρτι, όπως και το ραφινάρισμένο ελαιόλαδο, δεν αποτελούν τα πλέον κατάλληλα μέσα «μεταφοράς» των πολυφαινολών του ελαιολάδου, ιδίως αν συγκριθούν με το ίδιο το ελαιόλαδο (Visioli F 2003).

Συμπεράσματα

Η χορήγηση βιοδραστικών λιποειδών, που έχουν απομονωθεί από τα παραπροϊόντα της επεξεργασίας του ελαιολάδου, με φορέα – τρόφιμο το γιαούρτι, οδήγησε σε σημαντική αύξηση των Firmicutes, *Bifidobacteria* και της ομάδας των *Clostridium perfringens*, στα κόπρανα των εθελοντών, σε σχέση με την έναρξη της παρέμβασης. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με την υπάρχουσα βιβλιογραφία και ενισχύει την υπόθεση ότι η χορήγηση πολυφαινολών αυξάνει τα επίπεδα των ευεργετικών για τον ανθρώπινο οργανισμό *Bifidobacteria*. Επίσης, παρατηρήθηκε σχεδόν σημαντική αύξηση των Firmicutes στην ομάδα που κατανάλωσε βιοδραστικά λιποειδή σε σχέση με την ομάδα του απλού γιαουρτιού.

Όπως έχει φανεί και από τη βιβλιογραφία, η χορήγηση απλού γιαουρτιού αύξησε σημαντικά τους μικροοργανισμούς της ομάδας των *Lactobacillus* και των *Clostridium perfringens*, σε σχέση με την έναρξη της παρέμβασης.

Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, από την άλλη, δε διαφοροποιήθηκαν στο τέλος της παρέμβασης σε σχέση με την αρχή αυτής.

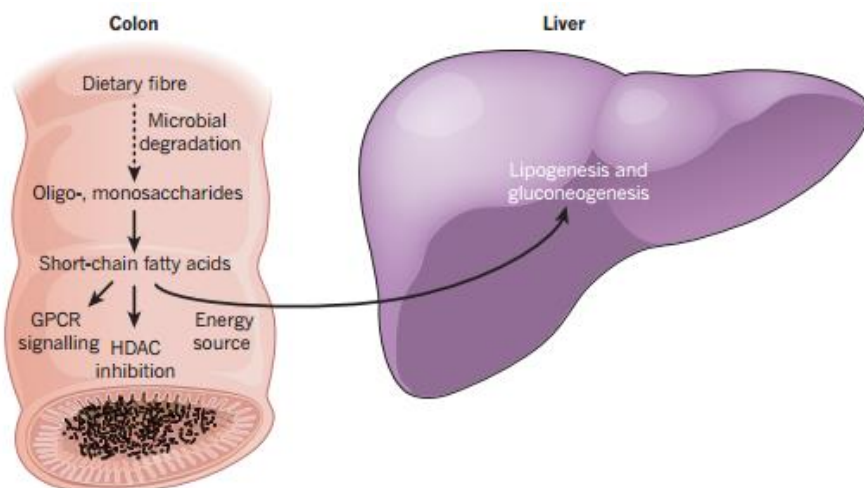
Σκοπός της παρούσα μελέτης ήταν να ελεγχθεί η επίδραση της κατανάλωσης πολυφαινολών, που έχουν απομονωθεί από τα παραπροϊόντα της ελαιουργίας, στον εντερικό μικροβιόκοσμο του ανθρώπινου οργανισμού.

Χρειάζεται περαιτέρω έρευνα ώστε να διευκρινισθεί πλήρως η επίδραση των πολυφαινολών στον εντερικό μικροβιόκοσμο του ανθρώπινου οργανισμού και το πώς αυτό μπορεί συσχετιστεί με τον κίνδυνο εμφάνισης Καρδιαγγειακών Νοσημάτων.

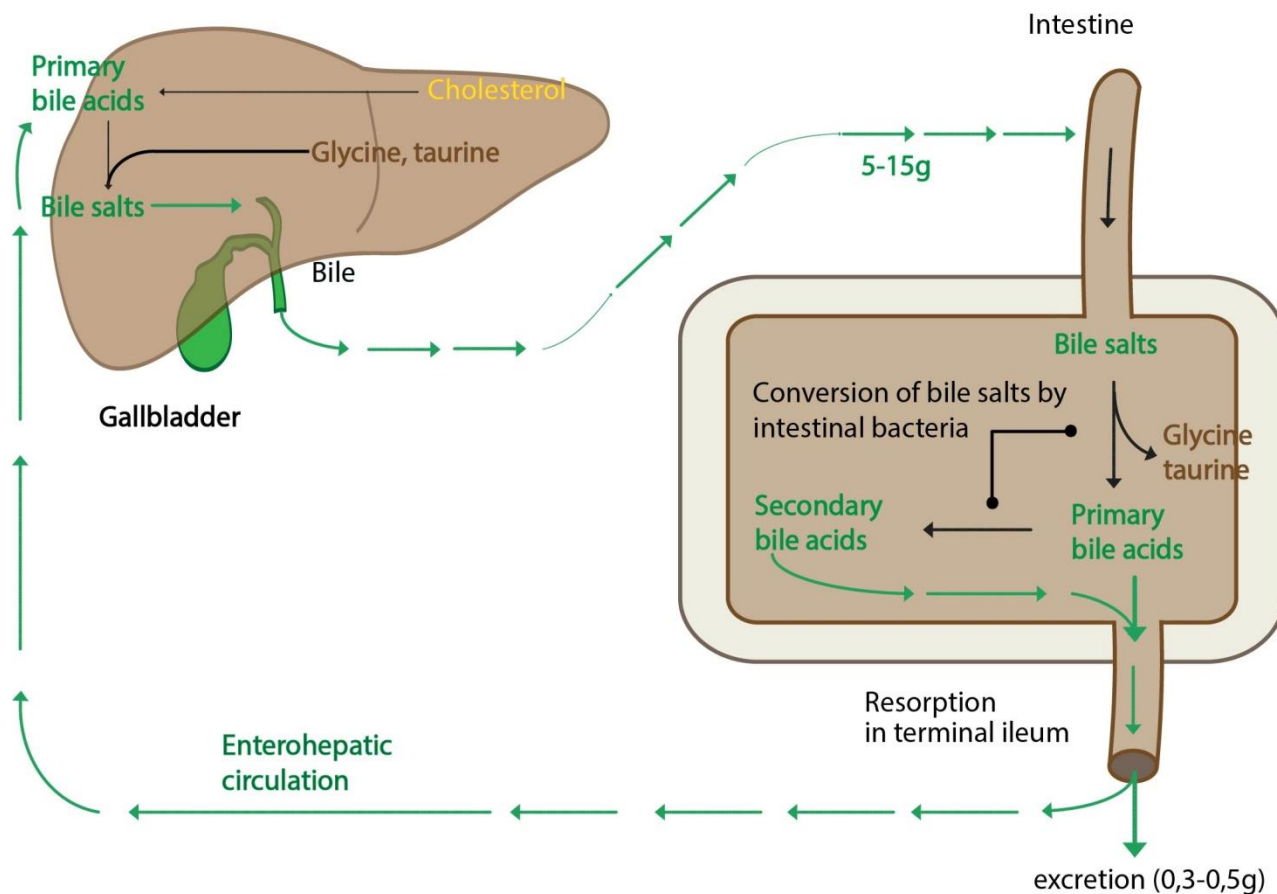
Παράρτημα

Εικόνες

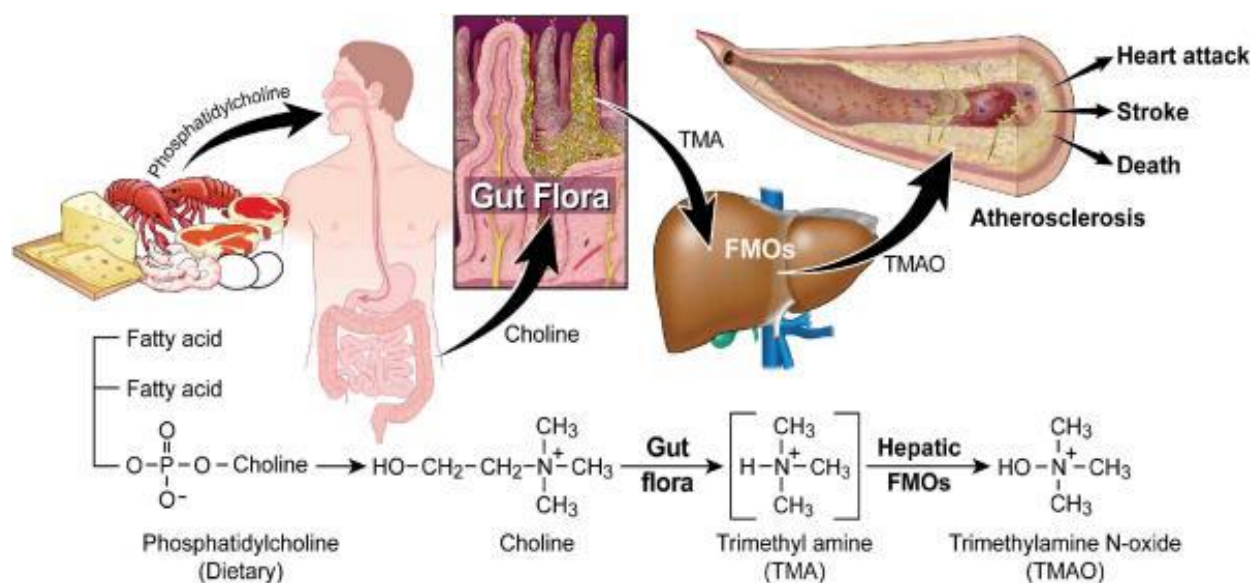
Εικόνα 1 : Μεταβολισμός διαιτητικών ινών προς λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου και περαιτέρω χρησιμοποίησή αυτών (Tremaroli & Bäckhed, 2012).



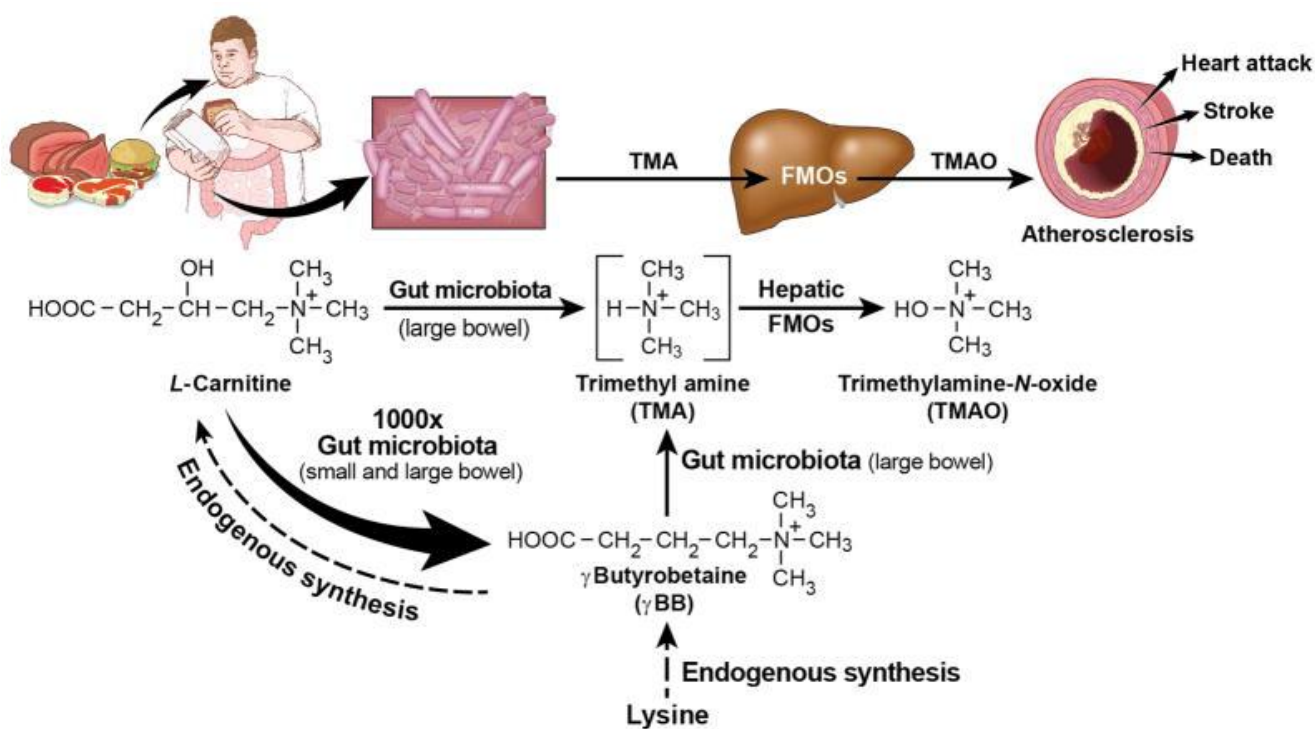
Εικόνα 2 : Συμμετοχή του εντερικού μικροβιόκοσμου στον μεταβολισμό των πρωτογενών χολικών οξέων προς δευτερογενή (Sigillum Facultatis Medicae Tertiae Universitatis Carolinae, Multimedia textbook).



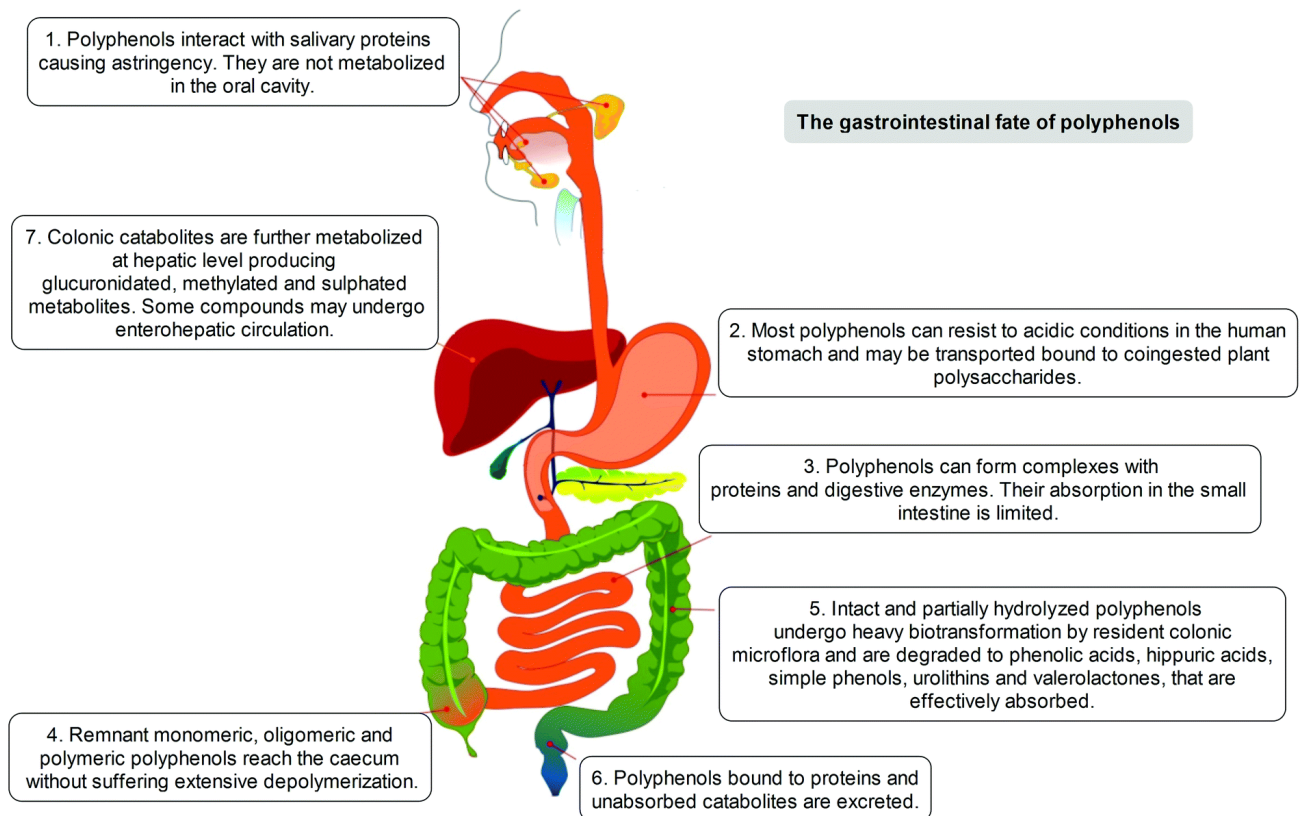
Εικόνα 3: Συμμετοχή του εντερικού μικροβιόκοσμου στο μεταβολισμό της χολίνης (Wange et al., 2011)



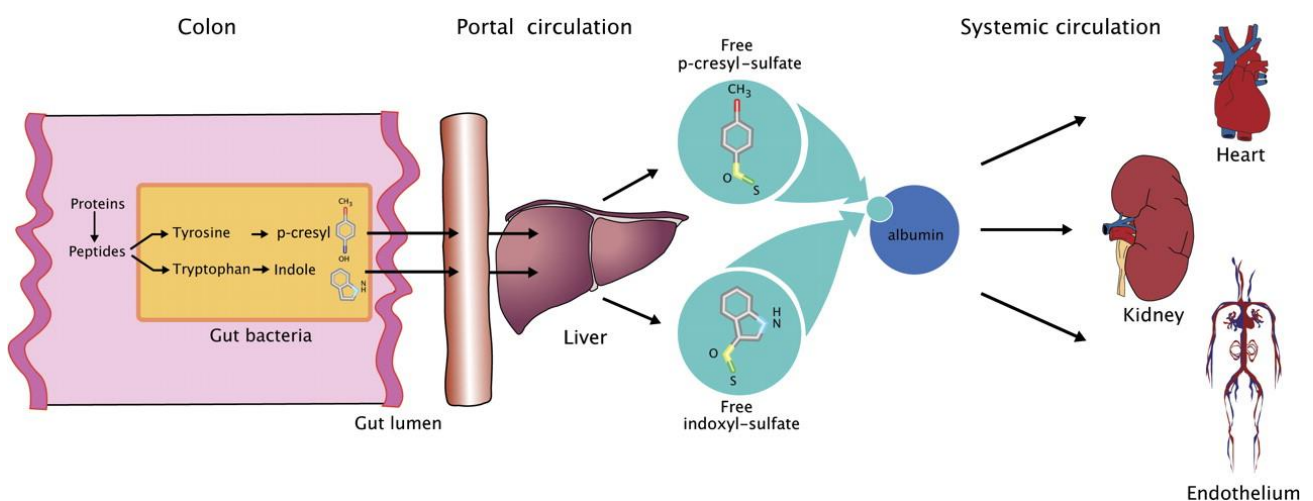
Εικόνα 4: Συμμετοχή του εντερικού μικροβιόκοσμου στο μεταβολισμό της L – καρνιτίνης (Koeth et al., 2014)



Εικόνα 5: Συμμετοχή του εντερικού μικροβιόκοσμου στο μεταβολισμό των πολυφαινολών (Zanotti et al., 2015).



Εικόνα 6: Συμμετοχή του εντερικού μικροβιόκοσμου στο μεταβολισμό των άπεπτων διαιτητικών πρωτεϊνών (Meijers et al., 2011).



Εικόνα 7: Διαδικασία δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας (Yamashita, 2015).

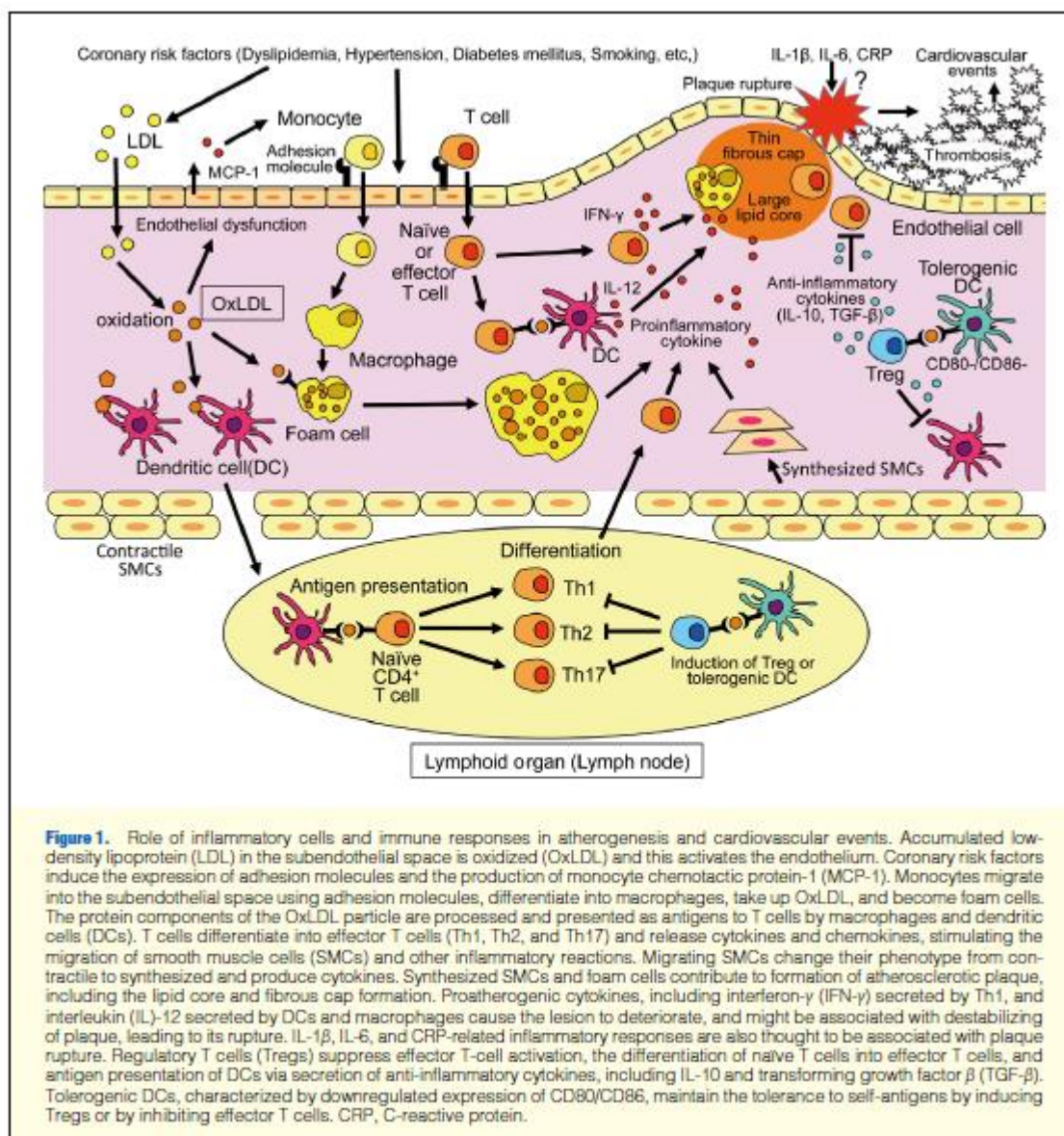


Figure 1. Role of inflammatory cells and immune responses in atherogenesis and cardiovascular events. Accumulated low-density lipoprotein (LDL) in the subendothelial space is oxidized (OxLDL) and this activates the endothelium. Coronary risk factors induce the expression of adhesion molecules and the production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Monocytes migrate into the subendothelial space using adhesion molecules, differentiate into macrophages, take up OxLDL, and become foam cells. The protein components of the OxLDL particle are processed and presented as antigens to T cells by macrophages and dendritic cells (DCs). T cells differentiate into effector T cells (Th1, Th2, and Th17) and release cytokines and chemokines, stimulating the migration of smooth muscle cells (SMCs) and other inflammatory reactions. Migrating SMCs change their phenotype from contractile to synthesized and produce cytokines. Synthesized SMCs and foam cells contribute to formation of atherosclerotic plaque, including the lipid core and fibrous cap formation. Proatherogenic cytokines, including interferon- γ (IFN- γ) secreted by Th1, and interleukin (IL)-12 secreted by DCs and macrophages cause the lesion to deteriorate, and might be associated with destabilizing of plaque, leading to its rupture. IL-1 β , IL-6, and CRP-related inflammatory responses are also thought to be associated with plaque rupture. Regulatory T cells (Tregs) suppress effector T-cell activation, the differentiation of naïve T cells into effector T cells, and antigen presentation of DCs via secretion of anti-inflammatory cytokines, including IL-10 and transforming growth factor β (TGF- β). Tolerogenic DCs, characterized by downregulated expression of CD80/CD86, maintain the tolerance to self-antigens by inducing Tregs or by inhibiting effector T cells. CRP, C-reactive protein.

Διαγράμματα

Διάγραμμα 1

Serikov et al., 2010

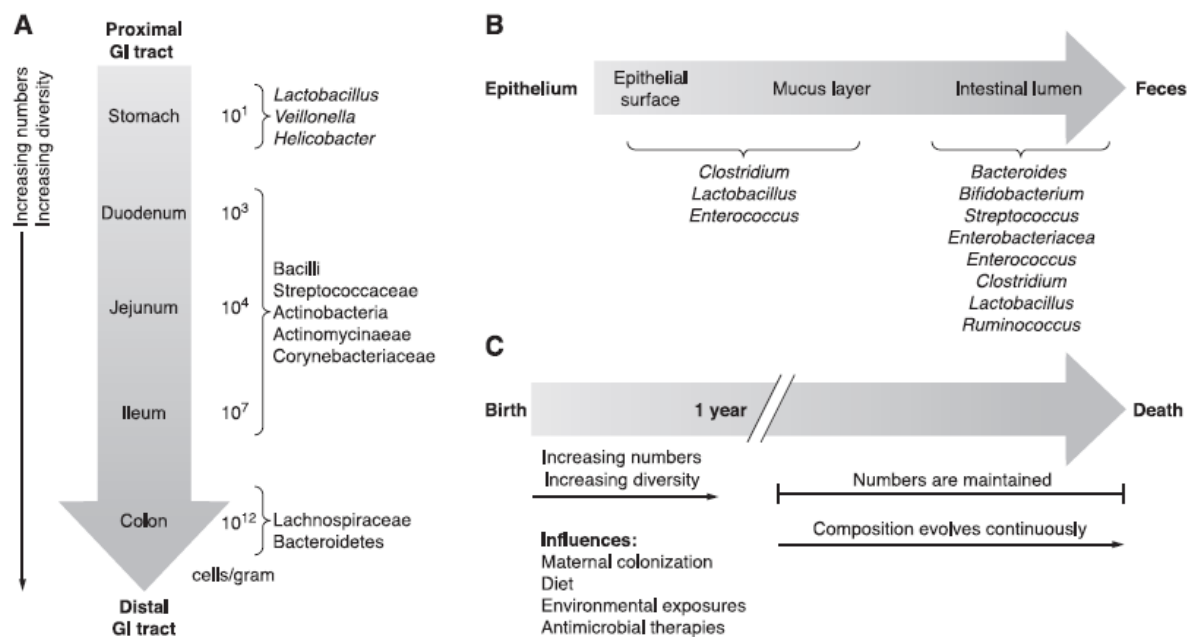
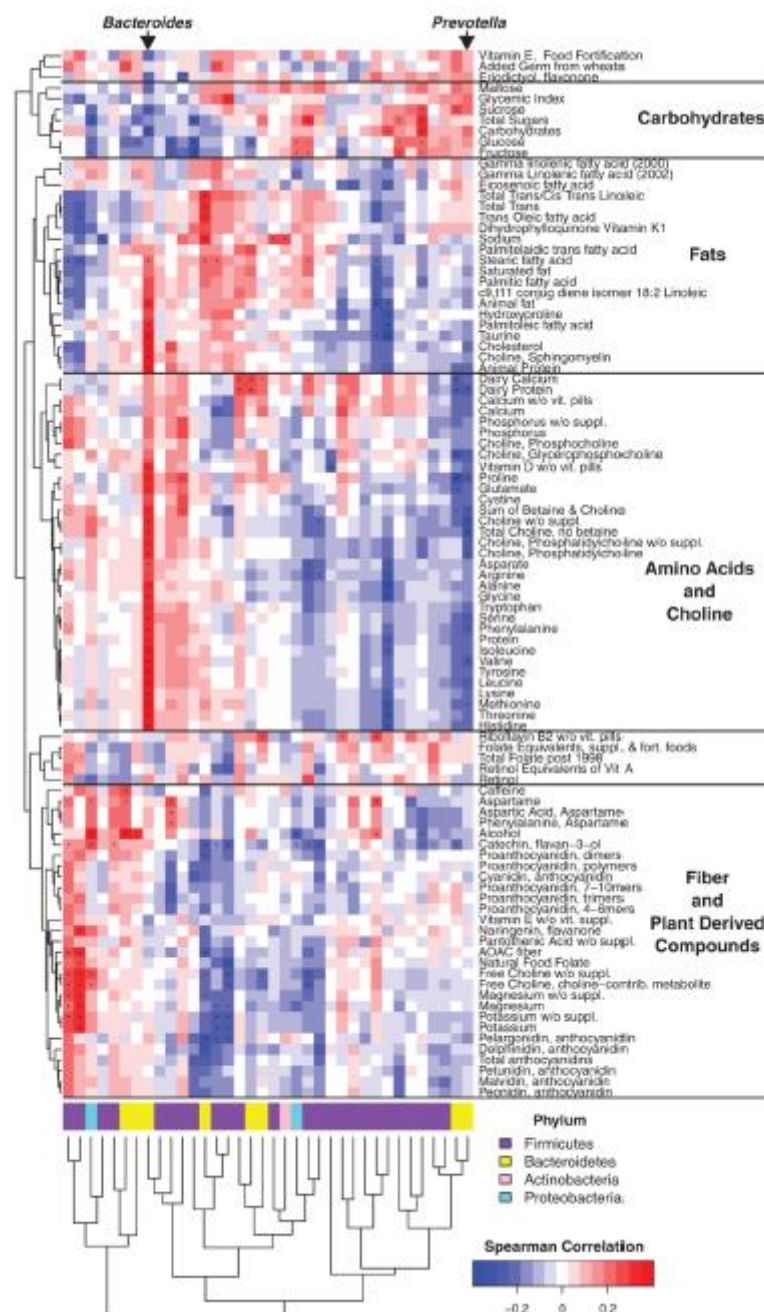


FIG. 2. Spatial and temporal aspects of intestinal microbiota composition. A: variations in microbial numbers and composition across the length of the gastrointestinal tract. B: longitudinal variations in microbial composition in the intestine. C: temporal aspects of microbiota establishment and maintenance and factors influencing microbial composition.

Διάγραμμα 2



Gary D. Wu, 2011

Correlation of diet and gut microbial taxa identified in the cross-sectional COMBO analysis. Columns correspond to bacterial taxa quantified using 16S rDNA tags; rows correspond to nutrients measured by dietary questionnaire. Red and blue denote positive and negative association, respectively. The intensity of the colors represents the degree of association between the taxa abundances and nutrients as measured by the Spearman's correlations. Bacterial phyla are summarized by the color code on the bottom; lower-level taxonomic assignments specified are in fig. S1. The dots indicate the associations that are significant at an FDR of 25%. The FFQ data were used for this comparison (both FFQ and Recall dietary data are shown together in fig. S1). Columns and rows are clustered by Euclidean distance, with rows separated by the predominant nutrient category.

Διάγραμμα 3

Yamashita et al., 2015

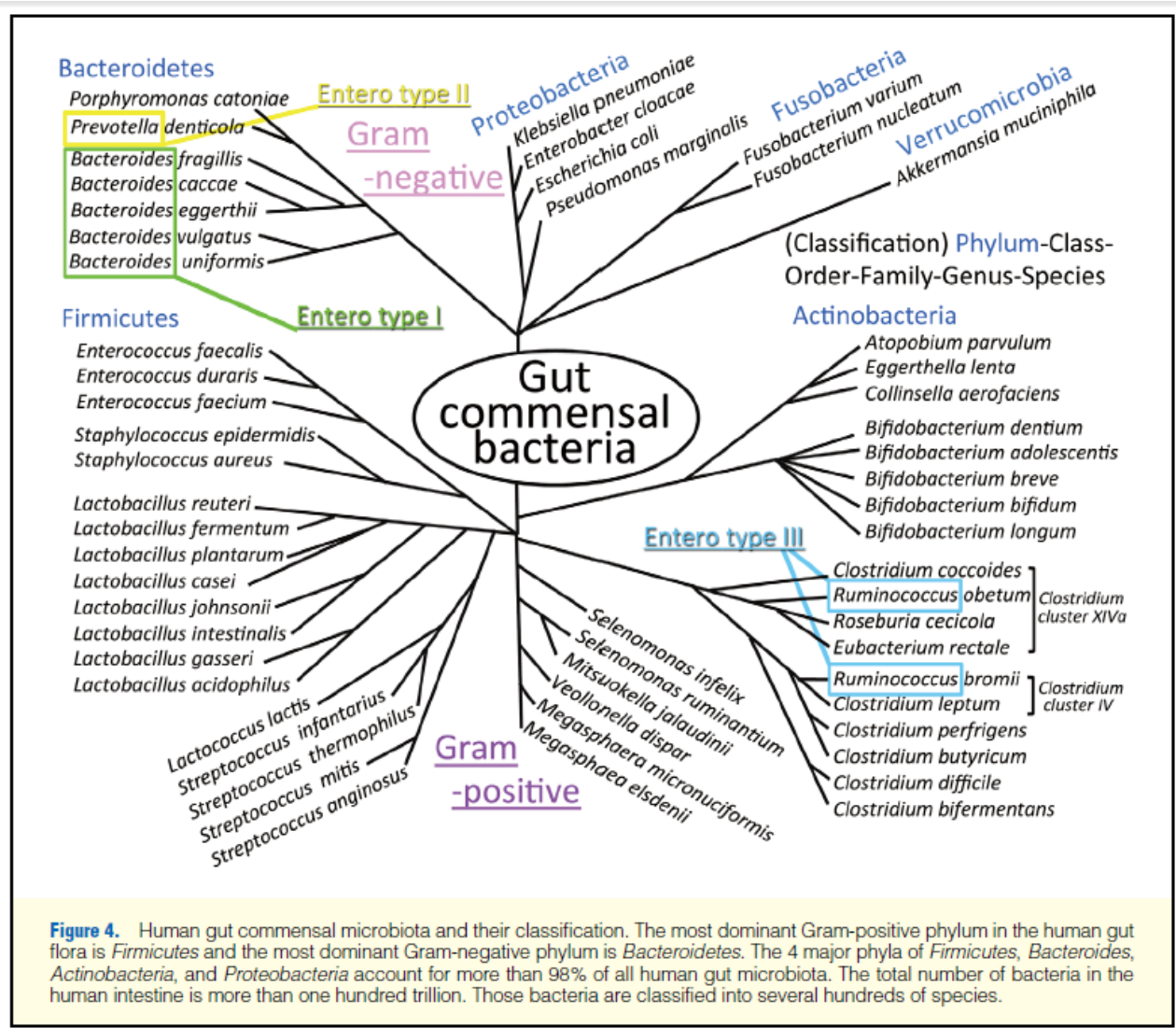
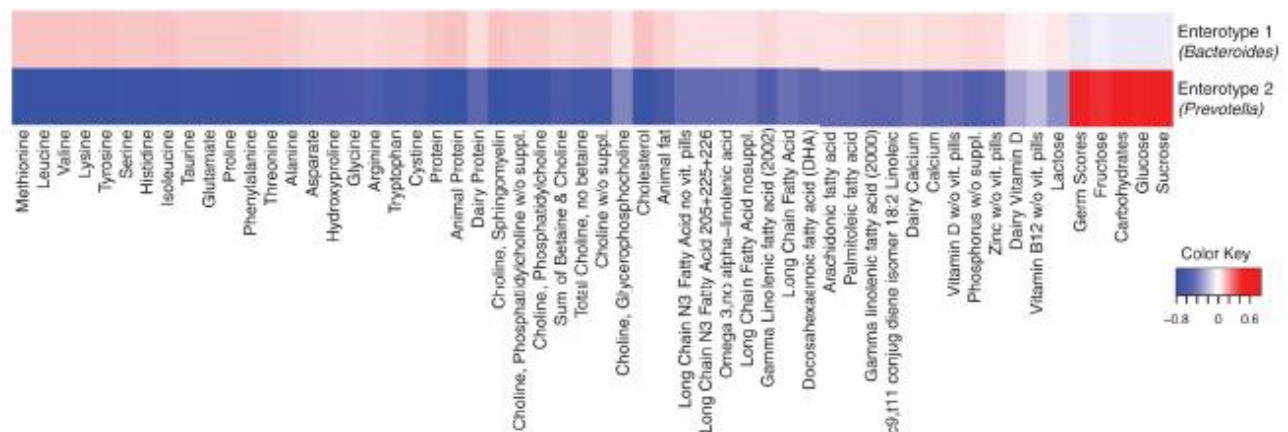


Figure 4. Human gut commensal microbiota and their classification. The most dominant Gram-positive phylum in the human gut flora is *Firmicutes* and the most dominant Gram-negative phylum is *Bacteroidetes*. The 4 major phyla of *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, and *Proteobacteria* account for more than 98% of all human gut microbiota. The total number of bacteria in the human intestine is more than one hundred trillion. Those bacteria are classified into several hundreds of species.

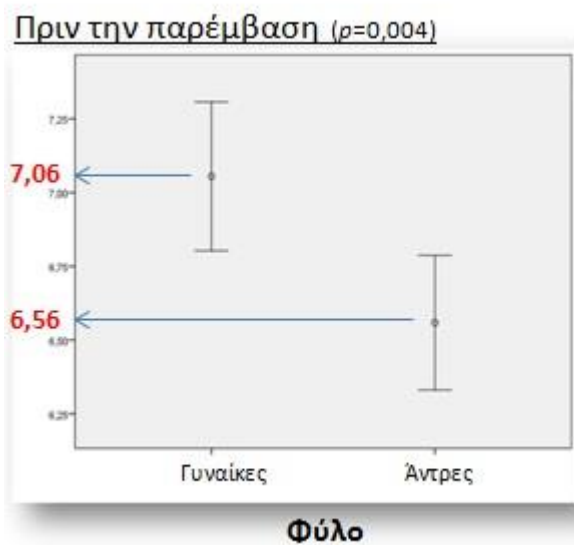
Διάγραμμα 4

Gary D. Wu, 2011



Διάγραμμα 5

pH κοπράνων αντρών και γυναικών στην αρχή της παρέμβασης (N=54, t=0).



Βιβλιογραφία

- (2012). "Structure, function and diversity of the healthy human microbiome." *Nature* **486**(7402): 207-214.
- Accardi, G., A. Aiello, et al. (2016). "Nutraceutical effects of table green olives: a pilot study with Nocellara del Belice olives." *Immun Ageing* **13**: 11.
- Adolfsson, O., S. N. Meydani, et al. (2004). "Yogurt and gut function." *Am J Clin Nutr* **80**(2): 245-256.
- Alex, S., K. Lange, et al. (2013). "Short-chain fatty acids stimulate angiopoietin-like 4 synthesis in human colon adenocarcinoma cells by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma." *Mol Cell Biol* **33**(7): 1303-1316.
- Araujo, M., R. A. Sueiro, et al. (2004). "Enumeration of Clostridium perfringens spores in groundwater samples: comparison of six culture media." *J Microbiol Methods* **57**(2): 175-180.
- Arumugam, M., J. Raes, et al. (2011). "Enterotypes of the human gut microbiome." *Nature* **473**(7346): 174-180.
- Aura, A.-M. (2008). "Microbial metabolism of dietary phenolic compounds." *Phytochemistry Reviews*.
- Beerens, H. (1991). "Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent." *Appl Environ Microbiol* **57**(8): 2418-2419.
- Begley, M., C. Hill, et al. (2006). "Bile salt hydrolase activity in probiotics." *Appl Environ Microbiol* **72**(3): 1729-1738.
- Boudraa, G., M. Benbouabdellah, et al. (2001). "Effect of feeding yogurt versus milk in children with acute diarrhea and carbohydrate malabsorption." *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **33**(3): 307-313.
- Bourlioux, P. and P. Pochart (1988). "Nutritional and health properties of yogurt." *World Rev Nutr Diet* **56**: 217-258.
- Brown, J. M. and S. L. Hazen (2015). "The gut microbial endocrine organ: bacterially derived signals driving cardiometabolic diseases." *Annu Rev Med* **66**: 343-359.
- Candela, M., E. Biagi, et al. (2015). "Dynamic efficiency of the human intestinal microbiota." *Crit Rev Microbiol* **41**(2): 165-171.
- Cani, P. D., J. Amar, et al. (2007). "Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance." *Diabetes* **56**(7): 1761-1772.
- Corbin, K. D. and S. H. Zeisel (2012). "Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression." *Curr Opin Gastroenterol* **28**(2): 159-165.
- De Boever, P., B. Deplancke, et al. (2000). "Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder." *J Nutr* **130**(10): 2599-2606.
- del Campo, R., D. Bravo, et al. (2005). "Scarce evidence of yogurt lactic acid bacteria in human feces after daily yogurt consumption by healthy volunteers." *Appl Environ Microbiol* **71**(1): 547-549.
- Duenas, M., I. Munoz-Gonzalez, et al. (2015). "A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols." *Biomed Res Int* **2015**: 850902.
- Elli, M., M. L. Callegari, et al. (2006). "Survival of yogurt bacteria in the human gut." *Appl Environ Microbiol* **72**(7): 5113-5117.
- Ellner, P. D., C. J. Stoessel, et al. (1966). "A new culture medium for medical bacteriology." *Am J Clin Pathol* **45**(4): 502-504.
- Flick, J. A. and J. A. Perman (1989). "Nonabsorbed carbohydrate: effect on fecal pH in methane-excreting and nonexcreting individuals." *Am J Clin Nutr* **49**(6): 1252-1257.
- Frank, D. N., A. L. St Amand, et al. (2007). "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(34): 13780-13785.
- Franklin, B. A. and M. Cushman (2011). "Recent advances in preventive cardiology and lifestyle medicine: a themed series." *Circulation* **123**(20): 2274-2283.
- Freire, A. C., A. W. Basit, et al. (2011). "Does sex matter? The influence of gender on gastrointestinal physiology and drug delivery." *Int J Pharm* **415**(1-2): 15-28.
- Gagniere, J., J. Raisch, et al. (2016). "Gut microbiota imbalance and colorectal cancer." *World J Gastroenterol* **22**(2): 501-518.

- Garcia-Albiach, R., M. J. Pozuelo de Felipe, et al. (2008). "Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota." *Am J Clin Nutr* **87**(1): 91-96.
- Haro, C., S. Garcia-Carpintero, et al. (2016). "The gut microbial community in metabolic syndrome patients is modified by diet." *J Nutr Biochem* **27**: 27-31.
- Harris, K., A. Kassis, et al. (2012). "Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders?" *J Obes* **2012**: 879151.
- He, X., G. Ji, et al. (2016). "Gut Microbiota and Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Insights on Mechanism and Application of Metabolomics." *Int J Mol Sci* **17**(3).
- Hollman, P. C. and M. B. Katan (1999). "Health effects and bioavailability of dietary flavonols." *Free Radic Res* **31 Suppl**: S75-80.
- Holmes, E., R. L. Loo, et al. (2008). "Human metabolic phenotype diversity and its association with diet and blood pressure." *Nature* **453**(7193): 396-400.
- Houghton, D., C. J. Stewart, et al. (2016). "Gut Microbiota and Lifestyle Interventions in NAFLD." *Int J Mol Sci* **17**(4).
- Ierardi, E., C. Sorrentino, et al. (2015). "Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine: a novel insight in the cardiovascular risk scenario." *Hepatobiliary Surg Nutr* **4**(4): 289-292.
- Incani, A., G. Serra, et al. (2016). "Extra virgin olive oil phenolic extracts counteract the pro-oxidant effect of dietary oxidized lipids in human intestinal cells." *Food Chem Toxicol* **90**: 171-180.
- Jakobek, L. (2015). "Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins." *Food Chem* **175**: 556-567.
- Jones, M. L., C. J. Martoni, et al. (2012). "Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults." *Br J Nutr* **107**(10): 1505-1513.
- Jones, M. L., C. J. Martoni, et al. (2013). "Oral supplementation with probiotic *L. reuteri* NCIMB 30242 increases mean circulating 25-hydroxyvitamin D: a post hoc analysis of a randomized controlled trial." *J Clin Endocrinol Metab* **98**(7): 2944-2951.
- Karlsson, F. H., F. Fak, et al. (2012). "Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome." *Nat Commun* **3**: 1245.
- Kimura, I., D. Inoue, et al. (2011). "Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(19): 8030-8035.
- Koeth, R. A., B. S. Levison, et al. (2014). "gamma-Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO." *Cell Metab* **20**(5): 799-812.
- Lefebvre, P., B. Cariou, et al. (2009). "Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation." *Physiol Rev* **89**(1): 147-191.
- Lekawanvijit, S., A. R. Kompa, et al. (2016). "Protein-bound uremic toxins: a long overlooked culprit in cardiorenal syndrome." *Am J Physiol Renal Physiol*: ajprenal.00348.02015.
- Ley, R. E., F. Backhed, et al. (2005). "Obesity alters gut microbial ecology." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(31): 11070-11075.
- Louis, P., K. P. Scott, et al. (2007). "Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine." *J Appl Microbiol* **102**(5): 1197-1208.
- Lozupone, C. A., J. I. Stombaugh, et al. (2012). "Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota." *Nature* **489**(7415): 220-230.
- Lutsey, P. L., L. M. Steffen, et al. (2008). "Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study." *Circulation* **117**(6): 754-761.
- M. Hidalgo, I. P., Hikmate Abriouel, Magdalena Martinez-Canamero (2014). "Effect of virgin and refined olive oil consumption on gut microbiota. Comparison to butter." *Food Research International*.
- Macdonald, R. S. and K. Wagner (2012). "Influence of dietary phytochemicals and microbiota on colon cancer risk." *J Agric Food Chem* **60**(27): 6728-6735.
- MacFaddin (1985). "Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria." *Williams and Wilkins, Baltimore*.
- Mai, V., H. A. Katki, et al. (2004). "Effects of a controlled diet and black tea drinking on the fecal microflora composition and the fecal bile acid profile of human volunteers in a double-blinded randomized feeding study." *J Nutr* **134**(2): 473-478.

- Mangiola, F., G. Ianaro, et al. (2016). "Gut microbiota in autism and mood disorders." World J Gastroenterol **22**(1): 361-368.
- Martin-Pelaez, S., J. I. Mosele, et al. (2015). "Effect of virgin olive oil and thyme phenolic compounds on blood lipid profile: implications of human gut microbiota." Eur J Nutr.
- Mater, D. D., L. Bretigny, et al. (2005). "Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt." FEMS Microbiol Lett **250**(2): 185-187.
- Mayorga Reyes, L., R. Gonzalez Vazquez, et al. (2016). "Correlation between diet and gut bacteria in a population of young adults." Int J Food Sci Nutr **67**(4): 470-478.
- McDougall, C. J., Wong, R., Scudera, P., Lesser, M., Decosse, J.J., (1993). "Colonic mucosal pH in humans." Digestive Diseases and Sciences.
- Meijers, B. K. and P. Evenepoel (2011). "The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression." Nephrol Dial Transplant **26**(3): 759-761.
- Meydani, S. N. and W. K. Ha (2000). "Immunologic effects of yogurt." Am J Clin Nutr **71**(4): 861-872.
- Mountzouris, K. C., C. Balaskas, et al. (2006). "Profiling of composition and metabolic activities of the colonic microflora of growing pigs fed diets supplemented with prebiotic oligosaccharides." Anaerobe **12**(4): 178-185.
- Mulak, A. and B. Bonaz (2015). "Brain-gut-microbiota axis in Parkinson's disease." World J Gastroenterol **21**(37): 10609-10620.
- Nicholson, J. K., E. Holmes, et al. (2012). "Host-gut microbiota metabolic interactions." Science **336**(6086): 1262-1267.
- Nozaki, A., T. Kimura, et al. (2009). "Interaction of polyphenolic metabolites with human serum albumin: a circular dichroism study." Chem Pharm Bull (Tokyo) **57**(9): 1019-1023.
- Org, E., M. Mehrabian, et al. (2015). "Unraveling the environmental and genetic interactions in atherosclerosis: Central role of the gut microbiota." Atherosclerosis **241**(2): 387-399.
- Ortega, N., J. Reguant, et al. (2009). "Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an in vitro digestion model." J Agric Food Chem **57**(13): 5743-5749.
- Padayachee, A., G. Netzel, et al. (2012). "Binding of polyphenols to plant cell wall analogues - Part 2: Phenolic acids." Food Chem **135**(4): 2287-2292.
- Palafox-Carlos, H., J. F. Ayala-Zavala, et al. (2011). "The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants." J Food Sci **76**(1): R6-R15.
- Parker, A. C. B.-. (1962). "An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive Staphylococci." Journal of Applied Microbiology.
- Parseus, A., N. Sommer, et al. (2016). "Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor." Gut.
- Patterson, E., O. D. RM, et al. (2014). "Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice." Br J Nutr **111**(11): 1905-1917.
- Pitt, P., K. M. de Bruijn, et al. (1980). "Studies on breath methane: the effect of ethnic origins and lactulose." Gut **21**(11): 951-954.
- Queipo-Ortuno, M. I., M. Boto-Ordóñez, et al. (2012). "Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers." Am J Clin Nutr **95**(6): 1323-1334.
- Rogosa, M., J. A. Mitchell, et al. (1951). "A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli." J Bacteriol **62**(1): 132-133.
- Salonen, A., J. Nikkila, et al. (2010). "Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis." J Microbiol Methods **81**(2): 127-134.
- Samuel, B. S., A. Shaito, et al. (2008). "Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(43): 16767-16772.
- Satheesh Nair, K. C., Risby H Terence and Anna Mae Diehl (2001). "Obesity and female gender increase breath ethanol concentration: potential implications for the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. ." The American Journal of Gastroenterology.
- Sayon-Orea, C., M. Bes-Rastrollo, et al. (2015). "Association between yogurt consumption and the risk of metabolic syndrome over 6 years in the SUN study." BMC Public Health **15**: 170.

- Schwartz, A., D. Taras, et al. (2010). "Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects." Obesity (Silver Spring) **18**(1): 190-195.
- Sekirov, I., S. L. Russell, et al. (2010). "Gut microbiota in health and disease." Physiol Rev **90**(3): 859-904.
- Serino, M., V. Blasco-Baque, et al. (2014). "Far from the eyes, close to the heart: dysbiosis of gut microbiota and cardiovascular consequences." Curr Cardiol Rep **16**(11): 540.
- Shishikura, Y., S. Khokhar, et al. (2006). "Effects of tea polyphenols on emulsification of olive oil in a small intestine model system." J Agric Food Chem **54**(5): 1906-1913.
- Shlomit Gorelik, J. K., Daniel Schurr, Ron Kohen (2013). "A rational approach to prevent postprandial modification of LDL by dietary polyphenols." Journal of Functional Foods.
- Soulage, C. O., L. Koppe, et al. (2013). "Protein-bound uremic toxins...new targets to prevent insulin resistance and dysmetabolism in patients with chronic kidney disease." J Ren Nutr **23**(6): 464-466.
- Staels, B. and V. A. Fonseca (2009). "Bile acids and metabolic regulation: mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration." Diabetes Care **32** Suppl 2: S237-245.
- Stephen, A. M., H. S. Wiggins, et al. (1986). "The effect of age, sex and level of intake of dietary fibre from wheat on large-bowel function in thirty healthy subjects." Br J Nutr **56**(2): 349-361.
- Swann, J. R., E. J. Want, et al. (2011). "Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments." Proc Natl Acad Sci U S A **108** Suppl 1: 4523-4530.
- Tang, W. H. and S. L. Hazen (2014). "The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease." J Clin Invest **124**(10): 4204-4211.
- Tremaroli, V. and F. Backhed (2012). "Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism." Nature **489**(7415): 242-249.
- Turnbaugh, P. J., M. Hamady, et al. (2009). "A core gut microbiome in obese and lean twins." Nature **457**(7228): 480-484.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, et al. (2007). "The human microbiome project." Nature **449**(7164): 804-810.
- Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, et al. (2006). "An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest." Nature **444**(7122): 1027-1031.
- Tzounis, X., A. Rodriguez-Mateos, et al. (2011). "Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study." Am J Clin Nutr **93**(1): 62-72.
- Vendrame, S., S. Guglielmetti, et al. (2011). "Six-week consumption of a wild blueberry powder drink increases bifidobacteria in the human gut." J Agric Food Chem **59**(24): 12815-12820.
- Verbeke, K. A., A. R. Boobis, et al. (2015). "Towards microbial fermentation metabolites as markers for health benefits of prebiotics." Nutr Res Rev **28**(1): 42-66.
- Visioli F, G. C., Grande S, Colonnelli K, Patelli C, Galli G, Caruso D. (2003). "Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration." Journal of Nutrition.
- Walker, A. W., J. Ince, et al. (2011). "Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota." ISME J **5**(2): 220-230.
- Wallace, A. J., S. L. Eady, et al. (2015). "No difference in fecal levels of bacteria or short chain fatty acids in humans, when consuming fruit juice beverages containing fruit fiber, fruit polyphenols, and their combination." Nutr Res **35**(1): 23-34.
- Wang, F., J. L. Kaplan, et al. (2016). "Detecting Microbial Dysbiosis Associated with Pediatric Crohn Disease Despite the High Variability of the Gut Microbiota." Cell Rep **14**(4): 945-955.
- Wang, Z., E. Klipfell, et al. (2011). "Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease." Nature **472**(7341): 57-63.
- WHO, F. (2011). "Codex Alimentarius (second edition)."
- Wiedermann, C. J., S. Kiechl, et al. (1999). "Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study." J Am Coll Cardiol **34**(7): 1975-1981.
- Wilkins, T. D. and S. Chalgren (1976). "Medium for use in antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria." Antimicrob Agents Chemother **10**(6): 926-928.
- Williamson, G. and M. N. Clifford (2010). "Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?" Br J Nutr **104** Suppl 3: S48-66.
- Wolever TM, F. J., Rao AV. (1996). "Serum acetate:propionate ratio is related to serum cholesterol in men but not women." J Nutr: 2790-2797.

- Wu, G. D., J. Chen, et al. (2011). "Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes." Science **334**(6052): 105-108.
- Yamashita, T., K. Kasahara, et al. (2015). "Intestinal Immunity and Gut Microbiota as Therapeutic Targets for Preventing Atherosclerotic Cardiovascular Diseases." Circ J **79**(9): 1882-1890.
- Yu, Z. and M. Morrison (2004). "Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples." Biotechniques **36**(5): 808-812.
- Zanotti, I., M. Dall'Asta, et al. (2015). "Atheroprotective effects of (poly)phenols: a focus on cell cholesterol metabolism." Food Funct **6**(1): 13-31.
- Zeisel, S. H., M. H. Mar, et al. (2003). "Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods." J Nutr **133**(5): 1302-1307.
- Zhou, L., W. Wang, et al. (2016). "In vitro extraction and fermentation of polyphenols from grape seeds (*Vitis vinifera*) by human intestinal microbiota." Food Funct **7**(4): 1959-1967.