

Τμήμα επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής
Πτυχιακή μελέτη

Τίτλος : Εντερικός μικροβιόκοσμος και παχυσαρκία

Προυντζόπουλος Κωνσταντίνος (21236)
Τριμελής επιτροπή Κυριακού Αδαμαντίνη,
Γιαννακούλια Μαρία, Κώτσου Μαρία

Αθήνα 2016

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κα. Κυριακού Μαντώ, που μου εμπιστεύθηκε για να φέρω εις πέραν την παρούσα πτυχιακή καθώς και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Μήτσου Ευδοκία, υποψήφια διδάκτωρ του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, για την άψογη συνεργασία μας και τη βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου, που στηρίζουν πάντα τις επιλογές μου και είναι δίπλα μου σε κάθε βήμα.

Περίληψη

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος αποτελεί το σύνολο των συμβιωτικών μικροοργανισμών του ανθρώπου που καλύπτουν το έντερο και δημιουργούν ένα από τα πιο σύνθετα και πυκνά οικοσυστήματα. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος καταβολίζει και ζυμώνει τα άπεπτα συστατικά της τροφής που καταλήγουν στο παχύ έντερο, ενώ εμπλέκεται σε πολύ σημαντικές λειτουργίες του ξενιστή μέσω των προϊόντων των ζυμώσεων και των συστατικών του, όπως στην ωρίμανση του γαστρεντερικού συστήματος, στο μεταβολισμό του ξενιστή και στην ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Πολλές μελέτες υποδεικνύουν τη συμμετοχή του μικροβιόκοσμου στην ανάπτυξη μεταβολικών διαταραχών του ξενιστή, όπως η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η μη-αλκοολική λιπώδης διήθηση του ήπατος κ.α..

Η παρούσα μελέτη είναι μια συγχρονική μελέτη όπου αναλύθηκαν τα χαρακτηριστικά του εντερικού μικροβιόκοσμου και των γαστρεντερικών συμπτωμάτων ενός τυχαίου δείγματος του ελληνικού πληθυσμού και η διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων με μια σειρά ανθρωπομετρικών, διατροφικών και άλλων παραγόντων.. Στη μελέτη συμμετείχαν 10 εθελοντές άνδρες και γυναίκες 18-65 χρονών, χωρισμένοι σε δύο ομάδες (φυσιολογικοί/υπέρβαροι και παχύσαρκοι).

Για την καταμέτρηση των μικροβιακών εντερικών πληθυσμών ακολουθήθηκε καλλιεργητική μεθοδολογία. Ανιχνεύτηκαν σε όλους τους εθελοντές τα Ολικά Αερόβια και Αναερόβια Βακτήρια, τα Ολικά κολίμορφα και το *E.coli*, *Enterococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp. και *Bifidobacterium* spp. Αντίθετα δεν ανιχνεύτηκαν σε όλα τα δείγματα οι σταφυλόκοκκοι, το *Staphylococcus aureus*, οι ζύμες και οι μύκητες. Παρατηρήθηκε ότι στην ομάδα των φυσιολογικών/υπέρβαρων ο πληθυσμός των *Bacteroides* spp ήταν υψηλότερος σε σχέση με την ομάδα των παχύσαρκων, η διαφορά όμως αυτή έπαψε να είναι σημαντική μετά τον συνυπολογισμό της επίδρασης της ηλικίας και του φύλου. Όσον αφορά στα γαστρεντερολογικά συμπτώματα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Το ποσοστό ημερήσιας κατανάλωσης πρωτεϊνών βρέθηκε υψηλότερο στην ομάδα των φυσιολογικών/υπέρβαρων. Τέλος, η ομάδα των φυσιολογικών/υπέρβαρων τείνει να αξιολογεί καλύτερα τη γενική κατάσταση της υγείας σε αντίθεση με την ομάδα των παχύσαρκων.

Λέξεις κλειδιά : Εντερικός μικροβιόκοσμος, Δείκτης Μάζας Σώματος

Abstract

The gut microbiota a highly dense and complex ecosystem of symbiotic microorganisms inhabits the human intestine and catabolises the non-digestible food ingredients that result in the colon. The intestinal microorganisms modulate important host functions such as the development of the gastrointestinal system, the host metabolism and the maturation of the host immune system. Several studies suggest the involvement of the microbiota in the development of metabolic disorders as obesity, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease.

This study is a cross-sectional study which analyzes certain characteristics of the intestinal microbiota and gastrointestinal symptoms of a random sample of the Greek population and investigates possible interactions with a series of anthropometric, dietary and other factors. Ten volunteers were recruited in this study, men and women 18-65 years old, divided into two groups according to their BMI (normal/overweight and obese).

Selected microbial populations were calculated in faecal samples, using culture based techniques. Total aerobes and anaerobes, total coliforms, *E.coli*, *Enterococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp, were enumerated in all samples. Staphylococci, *Staphylococcus aureus*, yeasts and fungi were not traced in all faecal samples. It was observed that in the group of normal/overweight the population of *Bacteroides* spp was higher than in the group of obese, however this difference was no longer significant after adjusting for the impact of age and gender. Regarding the gastrointestinal symptoms, no significant differences between groups were observed. The proportion of daily protein intake was higher in the group of normal/overweight. Finally, the group of normal/ overweight tends to better assess the general state of health as opposed to the obese group.

Key-words: Intestinal microbiota, Body Mass Index

Περιεχόμενα

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
2.Γαστρεντερικό σύστημα.....	7
3.Μικροβιόκοσμος του εντέρου	8
3.1 Σημαντικοί μικροοργανισμοί του εντερικού μικροβιόκοσμου	9
3.2 Δράσεις του εντερικού μικροβιόκοσμου.....	14
3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο	16
4.Παχυσαρκία.....	19
5.Εντερικός μικροβιόκοσμος και παχυσαρκία – Μηχανισμοί	20
5.1Μεταβολισμός και Ενεργειακό ισοζύγιο	20
5.2 Παχυσαρκία και Δυσβίωση.....	22
6.ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	24
7.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	24
7.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ	28
8.Επεξεργασία Δειγμάτων	29
8.1 Μέτρηση pH ΚΟΠΡΑΝΩΝ	29
8.2 Προσδιορισμός Ξηρού βάρους	29
8.3 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ	30
9.Επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων	37
10.Αποτελέσματα.....	37
11.ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
12. Περιορισμοί	48
13.Βιβλιογραφία.....	49

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια μετά την ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί στη μελέτη του ανθρώπινου μικροβιώματος. Το ανθρώπινο μικροβίωμα αποτελεί το σύνολο των γονιδίων των μικροοργανισμών που συμβιώνουν με τον άνθρωπο.[1] Τα ανθρώπινα γονίδια ανέρχονται στα 23.000 και αυτά των μικροοργανισμών στα 3 εκατομμύρια και επηρεάζουν και τα δύο την υγεία του οργανισμού.[2] Το μεγαλύτερο μέρος του μικροβιόκοσμου του ξενιστή απαντάται στο γαστρεντερικό σύστημα. Το έντερο αποτελεί το πιο πυκνό σε μικροοργανισμούς όργανο στο σώμα. Σε αυτό, βρίσκονται τρισεκατομμύρια μικροοργανισμοί. Εκατοντάδες είδη βακτηρίων σε αριθμό 10^{10} - 10^{11} βακτήρια/g, φτάνοντας σε συνολικό βάρος 1,5 κιλό.[3] Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών αποτελείται από τα αποκλειστικά αναερόβια, ενώ υπάρχουν επίσης προαιρετικά αναερόβιοι και αερόβιοι μικροοργανισμοί. Μεταξύ του μικροβιόκοσμου και του ξενιστή υπάρχει μία συμβιωτική σχέση.

Ενώ ο μικροβιόκοσμος διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο σε πολλές σημαντικές λειτουργίες του οργανισμού (π.χ. μεταβολισμός, προστασία από παθογόνα, ανάπτυξη ανοσοποιητικού), μέλη του σχετίζονται με σημαντικές δυσλειτουργίες και ασθένειες. Για παράδειγμα, οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου όπως η νόσος Crohn και η Ελκώδης Κολίτιδα, έχουν συσχετισθεί με αλλαγές στη σύσταση των μικροοργανισμών του παχέος εντέρου. Επιπλέον, αναφέρονται παθολογικές καταστάσεις που αφορούν όργανα που επικοινωνούν με το Γαστρεντερικό Σύστημα (ΓΕΣ), όπως η χολολιθίαση και η κίρρωση του ήπατος, που συνδέονται με τον μικροβιόκοσμο. Τέλος, προτείνεται πως ο εντερικός μικροβιόκοσμος εμπλέκεται και σε παθολογικές καταστάσεις, οργάνων και συστημάτων εκτός του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως το μεταβολικό σύνδρομο, ο διαβήτης και η παχυσαρκία.[4]

Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων προκαλείται η εμφάνιση αυτών, είναι ιδιαίτερα περίπλοκοι, αλλά σχετίζονται σε μεγάλο βαθμό με τη σύσταση, τον αριθμό και το περιβάλλον των μικροοργανισμών καθώς και με άλλους παράγοντες όπως η φλεγμονή, το στρες και η διατροφή.

2.Γαστρεντερικό σύστημα

Το γαστρεντερικό σύστημα περιλαμβάνει το γαστρεντερικό σωλήνα (στόμα, φάρυγγας, οισοφάγος, λεπτό έντερο, παχύ έντερο και ορθό) και τα επικουρικά όργανα (σιελογόνους αδένες, ήπαρ, χοληδόχος κύστη και πάγκρεας) τα οποία δεν είναι μέρη του σωλήνα αλλά εκκρίνουν ουσίες σε αυτόν. Ο αυλός του σωλήνα είναι σε συνεχή επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον αφού η κεντρική λειτουργία του γαστρεντερικού σωλήνα είναι η επεξεργασία και μετατροπή της προσλαμβανόμενης τροφής σε μόρια ικανά να μεταφερθούν στο εσωτερικό των κυττάρων. Στον αυλό του ΓΕΣ τα μεγάλα μόρια της τροφής υδρολύονται σε μονομερείς ενώσεις με τη λεγόμενη διαδικασία της πέψης. Τα μόρια αυτά είναι πλέον ικανά να διαπεράσουν το τοίχωμα του σωλήνα προς τον βλεννογόνο και στη συνέχεια στην κυκλοφορία του αίματος. Η διαδικασία της πέψης επιτυγχάνεται με τη δράση του υδροχλωρικού οξέος που εκκρίνεται από το στομάχο, της χολής που εκκρίνεται από το ήπαρ και των πεπτικών ενζύμων. Συνοπτικά οι λειτουργίες του ΓΕΣ είναι η πέψη, η απορρόφηση και έκκριση και η κινητικότητα.[5]

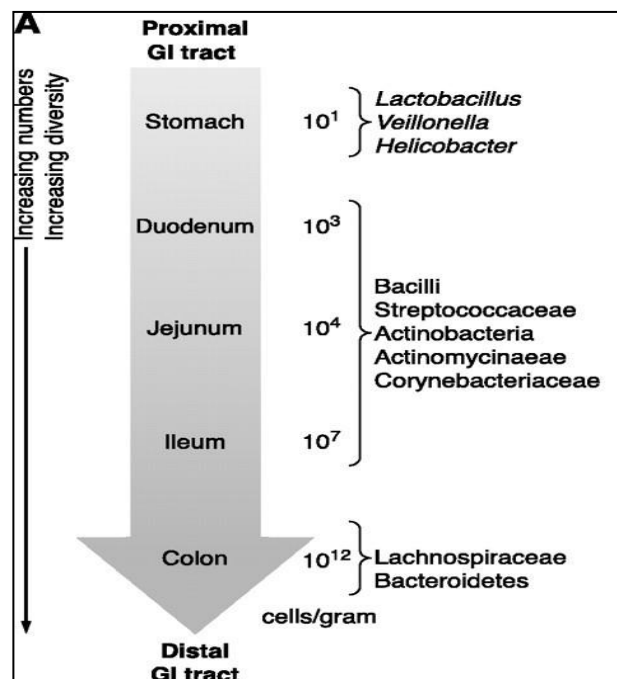
Στον ενήλικα, το γαστρεντερικό σύστημα είναι ένας σωλήνας μήκους περίπου 5 μέτρων. Ο σωλήνας αυτός μπορεί να απορροφήσει όσο το δυνατόν μεγαλύτερες ποσότητες από κάθε ξεχωριστή ουσία που καταναλώνεται χωρίς να διαθέτει την ικανότητα ρύθμισης. Αυτή πραγματοποιείται από τους νεφρούς και από κάποιους ενδοκρινείς αδένες. Το λεπτό έντερο αποτελεί την πρωταρχική θέση για την απορρόφηση των τροφών. Το παχύ έντερο επαναπορροφά υγρά και ηλεκτρολύτες και αποθηκεύει τα κόπρανα πριν την αποβολή τους. Τα κόπρανα αποτελούνται σχεδόν αποκλειστικά από βακτήρια και καταναλωθείσες με τις τροφές ουσίες που δεν υπέστησαν πέψη, ούτε απορροφήθηκαν.

Η ανατομία του τοιχώματος του ΓΕΣ ακολουθεί ορισμένες αρχές οργάνωσης. Η κατά στρώματα δομή του είναι: βλεννογόνος, υποβλεννογόνιος, μυϊκός και ορογόνο χιτώνας. Η λειτουργία του ΓΕΣ ρυθμίζεται από το εντερικό νευρικό σύστημα (ΕΝΣ), το οποίο είναι ένα από τα τρία τμήματα του αυτόνομου νευρικού συστήματος, μαζί με το συμπαθητικό και το παρασυμπαθητικό. Αποτελείται από 100 εκατομμύρια νευρώνες και εντοπίζεται αποκλειστικά εντός του γαστρεντερικού ιστού, αλλά η λειτουργία του μπορεί να τροποποιηθεί από τον εγκέφαλο μέσω νευρικών ώσεων. Η σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητη λειτουργία του ΕΝΣ έχει οδηγήσει στην αντίληψη του 'μικρού εγκεφάλου' του ΓΕΣ. Οι νευροδιαβιβαστές του ΕΝΣ είναι η ακετυλοχολίνη (ACh), πεπτίδια (αγγειοδραστικό εντερικό πεπτίδιο VIP) και αμίνες (π.χ. σεροτονίνη).[6]

3.Μικροβιόκοσμος του εντέρου

Το ανθρώπινο σώμα αποτελεί ζωντανό οικοσύστημα που περιλαμβάνει έναν μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών. Το ΓΕΣ και κυρίως το παχύ έντερο αποικίζονται από μεγάλο εύρος μικροοργανισμών όπως βακτήρια, αρχαία, ιοί και μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί. Υπολογίζεται πως ο εντερικός μικροβιόκοσμος ανέρχεται στα 10^{14} βακτηριακά κύτταρα, δέκα φορές μεγαλύτερος από τα κύτταρα του ανθρώπου, ενώ η πυκνότητα σε μικροβιακά κύτταρα στο παχύ έντερο ανέρχεται σε 10^{11} cells/g περιεχόμενου του εντέρου.[7],[8]. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί (~90%) ανήκουν σε δύο μεγάλες ταξινομικές ομάδες (Φύλα) και είναι τα *Bacteroidetes* και τα *Firmicutes*. Υπολογίζεται ότι περιέχονται περίπου 500-1000 βακτηριακά είδη.[9]

Αποτελέσματα μελετών υποδεικνύουν πως η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου παρουσιάζει έντονη διαφοροποίηση μεταξύ υγιών ενηλίκων. [1]



Εικόνα 1 : Σχηματική αναπαράσταση του εντερικού σωλήνα και των μικροβιακών πληθυσμών που ανιχνεύονται Sekirov et al.2010.

3.1 Σημαντικοί μικροοργανισμοί του εντερικού μικροβιόκοσμου

Bacteroides spp

Τα *Bacteroidetes* spp ανήκουν στο φύλο των *Bacteroidetes*. Το γένος *Bacteroides* περιλαμβάνει υποχρεωτικά αναερόβιους βακίλους, αρνητικούς κατά Gram, που δεν παράγουν ενδοσπόρια αλλά είναι σακχαρολυτικά, δηλαδή διαθέτουν την ικανότητα ζύμωσης σακχάρων κυρίως προς οξικό και ηλεκτρικό οξύ. Είναι ομόσιτα στον πεπτικό σωλήνα του ανθρώπου και είναι τα αριθμητικώς κυρίαρχα βακτήρια στο παχύ έντερο μαζί με τα βακτήρια που ανήκουν στο φύλο *Firmicutes*. [10]

Τα *Bacteroides*, αποικίζουν το έντερο από τα πρώτα στάδια της ζωής καθώς μεταφέρονται από τη μητέρα στο νεογνό μέσω φυσιολογικού τοκετού. Διαδραματίζουν ευεργετικό ρόλο, όσο παραμένουν στο ΓΕΣ, αλλά κάποια στελέχη θεωρούνται ευκαιριακά παθογόνα.

Είδη <i>Bacteroides</i>
<i>B. acidifaciens</i>
<i>B. caccae</i>
<i>B. coprocola</i>
<i>B. coprosuis</i>
<i>B. egerthii</i>
<i>B. finegoldii</i>
<i>B. fragilis</i>
<i>B. helcogenes</i>
<i>B. intestinalis</i>

Είδη των γενών *Bacteroides* και *Parabacteroides* spp.

Το *B.thetaiotaomicron* έχει τη δυνατότητα να διασπά ποικιλία γλυκοζιτικών δεσμών, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο υποστρώματα τα οποία χρησιμοποιούν άλλοι μικροοργανισμοί του εντέρου. Εμπλέκεται στον μεταβολισμό των θρεπτικών συστατικών και μεταβολίζει απλούς και σύνθετους υδατάνθρακες καθώς και πολυσακχαρίτες. [11] Ο μεταβολισμός των πολυσακχαριτών οδηγεί στην απελευθέρωση λιπαρών οξέων, τα οποία επαν-απορροφώνται μέσω του παχέος εντέρου και αποτελούν πηγές ενέργειας για τον ξενιστή. Έχει παρατηρηθεί ότι τα παχύσαρκα άτομα έχουν μεγαλύτερη αναλογία *Firmicutes* προς *Bacteroides*. [12]

Το *B.fragilis* χρησιμοποιεί γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια από τις μεμβράνες των κυττάρων. Το *B.fragilis* αν και αποτελεί το 0,5% του εντερικού μικροβιόκοσμου, θεωρείται ως το πιο κοινό αναερόβιο παθογόνο. Έχει την ικανότητα να κωδικοποιεί μία εντεροτοξίνη (BFT) η οποία είναι μία σιδηρο-μεταλλοπρωτεάση και προκαλεί ρήξη του εντερικού φραγμού και κατά συνέπεια διάρροια.[13]

Τα *Bacteroides* spp εμφανίζουν μεγάλη προσαρμοστικότητα στο περιβάλλον του εντέρου διότι αντιλαμβάνονται τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και μπορούν να αλληλεπιδρούν με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Μελέτες δείχνουν πως δίαιτες χαμηλές σε υδατάνθρακες και υψηλές σε πρωτεΐνες (π.χ. Atkins) δεν επιδρούν στους πληθυσμούς των *Bacteroidetes* και του γένους *Clostridium*. [14]

Bifidobacterium spp

Τα Bifidobacteria είναι Gram θετικά αναερόβια βακτήρια με σχήμα δισχιδούς ή και ασύμμετρου βακίλου, χωρίς αυτόνομη κίνηση, δεν σχηματίζουν ενδοσπόριο, σακχαρολυτικά και ανήκουν στην οικογένεια Bifidobacteriaceae και στο φύλο Actinobacteria.[15] Υπάρχουν περίπου 45 είδη/υποείδη με ιδιαίτερο χαρακτηριστικό την υψηλή αναλογία G+C βάσεων (60%) στο γονιδίωμά τους. Στο ΓΕΣ του ανθρώπου συναντώνται τα εξής είδη: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum*, και *B. pseudolongum*. [16]

Οι πληθυσμοί των Bifidobacteria είναι ιδιαίτερα αυξημένοι στα νεογνά κατά το θηλασμό, αλλά μειώνονται σημαντικά μετά τον απογαλακτισμό.[17] Σε αυτή την αλλαγή φαίνεται ότι συμβάλλει σημαντικά η διατροφή.[18]

Ενώ δεν έχουν συσχετισθεί οι αλλαγές στους πληθυσμούς των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* με ασθένειες, σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως στην παχυσαρκία παρατηρείται μείωση του πληθυσμού τους μεταξύ πολλών άλλων μεταβολών στον εντερικό μικροβιόκοσμο (δυσβίωση).[16]

Πολλά στελέχη τους έχουν χαρακτηριστεί ως προβιοτικά και χρησιμοποιούνται ευρέως ως συμπληρώματα διατροφής που προάγουν την υγεία του ξενιστή, είτε μόνα τους είτε σε συνδυασμό με πρεβιοτικά.

Στο κόλον οι κύριες διαθέσιμες πηγές ενέργειας προέρχονται από τις γλυκάνες και από τους πολυσακχαρίτες της διατροφής. Τα Bifidobacteria καταβολίζουν τους όλιγο- και πόλυ-σακχαρίτες που φτάνουν στο έντερο όπως οι ξύλο-ολιγοσακχαρίτες, trans-γαλακτο-

ολιγοσακχαρίτες, φρούκτο-ολιγοσακχαρίτες και πηκτίνες. Διασπούν τα πολυμερή των υδατανθράκων σε ολιγομερή και στη συνέχεια σε μονοσακχαρίτες με τη βοήθεια ενζύμων. Οι μονοσακχαρίτες μετατρέπονται σε ενδιάμεσα προϊόντα της ζύμωσης της εξόζης και συγκεκριμένα μέσω του κύκλου της 6-φώσφοφρουκτόζης. Στη συνέχεια αυτά τα προϊόντα μετατρέπονται σε λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFA) μέσω του πυροσταφυλικού οξέος. Τα SCFA που παράγονται σε μεγαλύτερο ποσοστό από τα *Bifidobacteria* είναι το γαλακτικό και το οξικό οξύ.

Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση των δεσμών μπορούν να χρησιμοποιηθούν επίσης και για την παρασκευή ενώσεων. Για παράδειγμα οι β-γαλακτοσιδάσες, ένζυμα που διαθέτουν τα *Bifidobacteria* είναι υπεύθυνα για την προσαρμογή των βακτηρίων αυτών στο γαστρεντερικό σωλήνα των θηλαστικών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση πρεβιοτικών συστατικών από τη λακτόζη. Αυτή η ενζυμική διαδικασία είναι καίριας σημασίας για τα *Bifidobacteria* καθώς λόγω αυτής μπορούν και αναπτύσσονται στο γάλα και σε υποκατάστατά του.[19, 20]

Ο πληθυσμός των *Bifidobacteria* φαίνεται ότι επηρεάζεται από την ποσότητα των φυτικών ινών στη διατροφή. Σε έρευνα με μοντέλα ζώων που τους δόθηκαν ισοθερμιδικές δίαιτες υψηλής και χαμηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες, φάνηκε πως σε αυτά που ακολουθούσαν την φτωχή σε ίνες δίαιτα, οι πληθυσμοί των *Bifidobacterium* spp ήταν πιο αυξημένοι.[21]

Clostridium spp

Τα *Clostridia* είναι θετικά κατά Gram βακτήρια χαμηλού ποσοστού G+C βάσεων στο γονιδίωμά τους, που σχηματίζουν ενδοσπόρια. Πρόκειται για υποχρεωτικούς αναερόβιους βακίλους που εκτελούν ζυμώσεις. Η ικανότητα παραγωγής ενδοσπορίου, προσδίδει πλεονέκτημα στους μικροοργανισμούς αυτούς, καθώς πρόκειται για μορφή ανθεκτική στη θερμότητα και στην ξηρασία, ικανή να παραμένει σε λήθαργο για μεγάλες χρονικές περιόδους.[10]

Στον άνθρωπο συναντώνται στο επιθήλιο του εντέρου. Γενικά απαντώνται στο έδαφος, στο νερό και στο γαστρεντερικό σωλήνα εντόμων και ζώων.

Τα είδη του γένους *Clostridium* δεν διαθέτουν σύστημα κυτοχρωμάτων και μηχανισμό οξειδωτικής φωσφορυλίωσης και για το λόγο αυτό προσλαμβάνουν ATP μόνο μέσω

φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος. Τα Clostridia έχουν τη δυνατότητα να ζυμώνουν υδατάνθρακες και αμινοξέα.

Από τη ζύμωση των υδατανθράκων παράγεται βουτυρικό οξύ ως κύριο τελικό προϊόν. Οι αναλογίες των διάφορων προϊόντων επηρεάζονται από τη διάρκεια και τις συνθήκες της ζύμωσης.

Τα προϊόντα της ζύμωσης των αμινοξέων είναι οξικό οξύ, βουτυρικό, CO₂ και H₂ και πολλά από αυτά είναι δύσοσμα, όπως το βουτυρικό, το ισοβαλερικό οξύ, η μεθυλομερκαπτάνη (από θειούχα αμινοξέα) και η πτωμαΐνη (από λυσίνη).

Κάποια είδη του γένους *Clostridium* που απαντώνται στο έντερο είναι παθογόνα ή ευκαιριακά παθογόνα όπως το *C. difficile* υπεύθυνο για διάρροια που σχετίζεται με λήψη αντιβίωσης και το *C. perfringens* υπεύθυνο για την αεριογόνο γάγγραινα.[10] [1]

Lactobacillus spp

Πρόκειται για θετικά κατά Gram βακτήρια, χαμηλού ποσοστού σε G+C στο γονιδίωμά τους με σχήμα βακίλου και δεν σχηματίζουν ενδοσπόριο. Οι λακτοβάκιλλοι είναι τυπικά ραβδόμορφα βακτήρια που ποικίλουν από επιμήκη λεπτά έως βραχεία κεκαμμένα. Τα περισσότερα είδη είναι ομοζυμωτικά και μερικά είναι ετεροζυμωτικά. Ανήκουν στα οξυγαλακτικά βακτήρια (μεταβολίζουν τις εξόζες προς παραγωγή γαλακτικού οξέος) και ανέρχονται σε λιγότερο από 1% του εντερικού μικροβιόκοσμου. [10]

Το γένος περιλαμβάνει πάνω από 25 είδη, τα οποία βρίσκονται σε γαλακτοκομικά προϊόντα και προϊόντα ζύμωσης καθώς και στο ΓΕΣ των θηλαστικών.

Χαρακτηριστικό των λακτοβακίλλων, αποτελεί η ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν στο όξινο pH σε τιμές έως και 4. Επίσης είναι πολύ σπάνια έως και καθόλου παθογόνοι.

Τα είδη που συναντώνται στο έντερο είναι τα *L.gasseri*, *L.paracasei*, *L.ruminis*, *L.reuteri* και *L.plantarum*. Ο πληθυσμός τους ανέρχεται στα 10⁴-10⁸ κύτταρα/g. [22] [23]

Enterobacteriaceae

Τα εντεροβακτήρια είναι αρνητικά κατά Gram, μη σποριογόνα, ραβδόμορφα και προαιρετικώς αερόβια. Στην εντερική οδό αντιπροσωπεύονται κυρίως από τα ολικά κολίμορφα. Ένα από τα πιο γνωστά εντεροβακτήρια, είναι το *Escherichia coli*.

Το *E.coli* εμπλέκεται στη σύνθεση βιταμινών όπως η βιταμίνη K. Ως προαιρετικά αερόβιος μικροοργανισμός, καταναλώνει το οξυγόνο, καθιστώντας το παχύ έντερο ανοξικό. Ορισμένα

στελέχη του γένους αυτού είναι παθογόνα και έχουν συσχετισθεί με διάρροιες και ουρολοιμώξεις.

Μελέτες σε μοντέλα ζώων δείχνουν, πως η δυτικού τύπου διαίτα, η οποία είναι πλούσια σε λίπος και απλούς υδατάνθρακες, σχετίζεται με αύξηση των πληθυσμών των *E.coli* και μείωση των υποδοχέων των SCFAs.[24]

Staphylococcus spp

Πρόκειται για μη σποριογόνα, θετικά κατά Gram βακτήρια, χαμηλού ποσοστού G+C βάσεων στο γονιδίωμά τους. Είναι προαιρετικά αερόβιοι μικροοργανισμοί με τυπικό αναπνευστικό μεταβολισμό.

Δύο κυρίως είδη απαντώνται στον άνθρωπο; *S. epidermitis* και *S. Aureus*, το οποίο συνδέεται συχνά με παθολογικές καταστάσεις όπως εξανθήματα δερματολογικά, γαστρεντερίτιδα (σταφυλοκοκκική δηλητηρίαση), πνευμονία, οστεομυελίτιδα, μηνιγγίτιδα και αρθρίτιδα. Θεωρείται ότι 30% του πληθυσμού είναι φορείς του *S. aureus*.

Candida spp

Οι ζυμομύκητες ή ζύμες είναι μονοκύτταροι μύκητες, οι οποίοι κατατάσσονται στους Ασκομύκητες. Τα κύτταρά τους είναι συνήθως σφαιρικά, ωοειδή και η κυτταρική διαίρεση γίνεται με εκβλαστήσεις. Χαρακτηριστικό του γένους της *Candida* είναι ο σχηματισμός ψευδο-υφών. Οι περισσότεροι μύκητες που αποικίζουν το έντερο του ανθρώπου ανήκουν στο γένος της *Candida* σε πληθυσμό 10^1 - 10^3 κύτταρα ανά γραμμάριο κοπράνων.

3.2 Δράσεις του εντερικού μικροβιόκοσμου

Ανοσοποιητικό σύστημα

Η σημασία του μικροβιώματος, στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος, φαίνεται από τις μελέτες σε αξενικά ποντίκια (πειραματόζωα που δεν διαθέτουν φυσιολογικό μικροβιόκοσμο και ζουν σε στείρες συνθήκες). Τα πειραματόζωα αυτά εμφανίζουν μη φυσιολογικούς αριθμούς διαφόρων τύπων ανοσοκυττάρων καθώς επίσης διαθέτουν ανεπαρκή δομή λεμφικού συστήματος. Ο αριθμός των πλασμο-κυττάρων που εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνες A και G είναι εξίσου μειωμένος.[25]

Ο εντερικός αυλός θεωρείται ότι παρουσιάζει έντονη ανοσοποιητική δράση διότι διαθέτει έναν εκτεταμένο λεμφικό ιστό (gut associated lymphoid tissues GALT) B, T λεμφοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα. Ο εντερικός βλεννογόνος επάγει την ωρίμανση του GALT με την άσκηση αντιγονικών ερεθισμάτων όπως το αντιγόνο PSA που βρίσκεται στην επιφάνεια του *B. fragilis* και προάγει τον πολλαπλασιασμό των CD4+ T- λεμφοκυττάρων. Επίσης στελέχη του *Lactobacillus* spp φαίνεται πως ρυθμίζουν τα δενδριτικά κύτταρα για την παραγωγή των NK (natural killer) κυττάρων. Πολλές μελέτες αναδεικνύουν την συνεργασία των μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου όπως στην περίπτωση της διαφοροποίησης των φλεγμονωδών Th17 κυττάρων από τα *Bacteroides* spp.[26]

Η εμφάνιση του εντερικού μικροβιόκοσμου μετά από την γέννηση, είναι κρίσιμης σημασίας για την ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος του νεογνού.

Η επιτυχής συνύπαρξη του μικροβιόκοσμου και του ξενιστή επιτυγχάνεται από τον φυσικό διαχωρισμό των βακτηρίων και των κυττάρων του ξενιστή και η μειωμένη ανοσολογική απόκριση στις ουσίες που εκκρίνουν ή η απενεργοποίηση αυτών (π.χ. των LPS) μέσω αποφωσφορυλίωσης από την εντερική αλκαλική φωσφατάση.[27]

Ωρίμανση του Γαστρεντερικού Συστήματος

Το ΓΕΣ των νεογνών χρειάζεται να εκτεθεί σε πληθώρα παραγόντων προκειμένου να ωριμάσει. Ένας από αυτούς είναι η έκθεση στον εντερικό μικροβιόκοσμο, ο οποίος συμβάλλει στην αύξηση της επιφάνειας του αυλού και στην αναπαραγωγή και ανακύκλωση των κυττάρων του. Η ωρίμανση του ΓΕΣ είναι κρίσιμης σημασίας για να μπορέσει να επιτελέσει όλες τις

λειτουργίες του και απαιτεί επαρκή περισταλτική κινητικότητα, επαρκή επιφάνεια και αιματική ροή, θέσεις προσκόλλησης για τους μικροοργανισμούς καθώς και αντίσταση σε αντιγόνα της τροφής και των βακτηρίων. [28]

Προστασία από παθογόνα

Ο μικροβιόκοσμος αποτελεί φυσικό φραγμό για την είσοδο και τον πολλαπλασιασμό παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτή η λειτουργία επιτυγχάνεται με την κατάληψη των θέσεων προσκόλλησης στο παχύ έντερο, με την κατανάλωση των θρεπτικών πηγών και την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών ταυτόχρονα και από τον μικροβιόκοσμο αλλά και μέσω της διέγερσης του ξενιστή.[29]

Η παραγωγή πεπτιδίων με αντιμικροβιακή δράση AMPs (Antimicrobial Peptides) από το ΓΕΣ διαταράσσει την επιφάνεια των κυττάρων των βακτηρίων. Η δράση των ενώσεων αυτών είναι διττή. Από τη μία πλευρά ρυθμίζουν τη σύσταση και τον αριθμό του μικροβιώματος και από την άλλη προστατεύουν από τα παθογόνα. Η απελευθέρωση αυτών των μορίων επάγεται από τα ίδια τα μικροβιακά κύτταρα όπως για παράδειγμα *B. thetaiotaomicron* και από προϊόντα του μεταβολισμού τους όπως τα SCFAs. Τα *Lactobacillus spp* με την παραγωγή γαλακτικού οξέος, εμποδίζουν τον αποικισμό ορισμένων στελεχών όπως η *Escherichia coli*. [30] [31]

Μεταβολισμός υποστρωμάτων και σύνθεση βιταμινών

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος λαμβάνει τα θρεπτικά συστατικά κυρίως από τους υδατάνθρακες της διατροφής όπως πολυσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και άμυλο αλλά επίσης και πρωτεΐνες και λίπος. Οι υδατάνθρακες που διέφυγαν της πέψης στο λεπτό έντερο, ζυμώνονται από βακτηριακά στελέχη που ανήκουν στα γένη *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Fecalibacterium*, και *Enterobacteria*. Τα προϊόντα αυτής της καταβολικής διεργασίας, οδηγούν στη σύνθεση SCFAs όπως το οξικό, το βουτυρικό και το προπιονικό οξύ. Τα SCFAs αποτελούν πηγές ενέργειας για τον οργανισμό. Το βουτυρικό είναι η κύρια πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου και καταναλώνεται αμέσως από το έντερο, ενώ φαίνεται πως προστατεύει από την συσσώρευση τοξικών παραπροϊόντων όπως το D-γαλακτικό.[32],[33] Επιπλέον φαίνεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του λιπώδους ιστού και μπορεί να λειτουργήσουν ως μόρια σήματα για την αύξηση των αποθηκών και τη διατήρηση της

ενέργειας μέσω πρόσδεσής τους σε υποδοχείς G πρωτεϊνών GPR41 (G-protein coupled receptor 41) και GPR43 (G-protein coupled receptor 43). Η πρόσδεση και η ενεργοποίηση του GPR41 έχει συνδεθεί με την απελευθέρωση του PYY (Peptide tyrosine tyrosine) που έχει ανορεξιογόνο δράση και αυξάνει το χρόνο διέλευσης της τροφής στο έντερο. Συμπερασματικά, τα SCFAs που προκύπτουν από τις ζυμώσεις των υδατανθράκων μπορεί να δράσουν ως υπόστρωμα ενέργειας ή και ως μεταβολικοί ρυθμιστές.[34] [35]

Άλλη σημαντική λειτουργία του μεταβολισμού του μικροβιόκοσμου, είναι η σύνθεση βιταμινών. Το *Escherichia coli* και το *Bacteroides fragilis* συνθέτουν βιταμίνη K, ενώ υπάρχουν και άλλα βακτήρια στο παχύ έντερο που συνθέτουν βιταμίνη B12 και φυλλικό οξύ. Συμμετέχουν στην παραγωγή βιταμίνης C,B και νιασίνης και βοηθούν στην απορρόφηση ασβεστίου και βιταμίνης D.[36]

Όσον αφορά στο μεταβολισμό των λιπαρών, μέλη του *B.thetaiotaomicron* φαίνεται πως επάγουν την υδρόλυση των λιπαρών οξέων διεγείροντας την έκφραση μίας λιπάσης (του ξενιστή) η οποία είναι απαραίτητη για την πέψη τους από την παγκρεατική λιπάση.[26]

3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Διατροφή

Πολλές μελέτες υπογραμμίζουν τη σημασία της διατροφής και πως αυτή επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Φαίνεται πως στον άνθρωπο, αλλαγές στον μικροβιόκοσμο μέσω αλλαγής της διαίτας μπορούν να επέλθουν μόλις σε 3-4 μέρες.[37] Η επίδραση της διατροφής μπορεί να εξεταστεί είτε μέσω των διατροφικών προτύπων (τύποι διαιτών) είτε μέσω των θρεπτικών συστατικών.

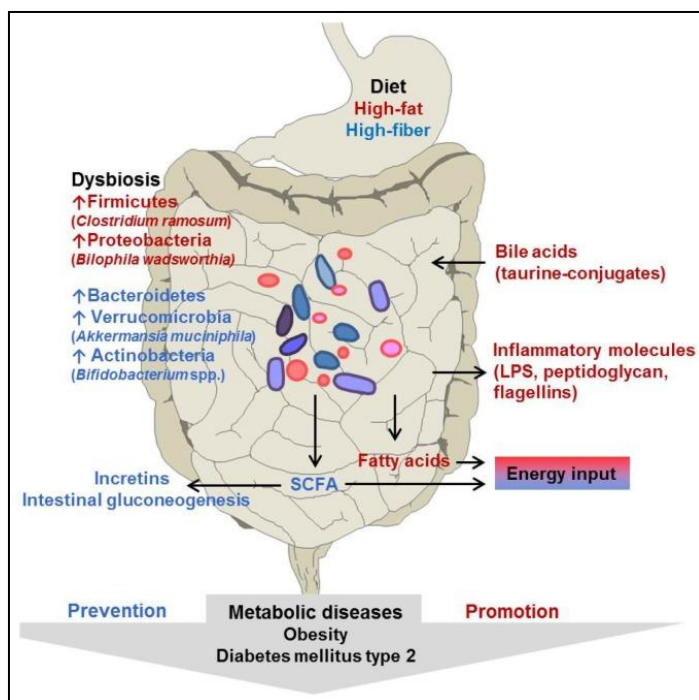
Όσον αφορά στα διατροφικά μοτίβα, ξεκινώντας με τη σύγκριση των φυτοφάγων και των παμφάγων αν και υπάρχουν λίγες μελέτες, υποδεικνύουν πως οι παμφάγοι έχουν αυξημένους πληθυσμούς του γένους *Clostridium* τα οποία παράγουν βουτυρικό οξύ, ενώ οι φυτοφάγοι εμφανίζουν αυξημένα *Bacteroidetes thetaiotaomicron*. [38]

Η δυτικού τύπου διαίτα χαρακτηρίζεται από μικρή ποσότητα φυτικών ινών και υψηλό ποσοστό επεξεργασμένων υδατανθράκων. Αποτελέσματα μελετών δείχνουν πως τα άτομα που ακολουθούν αυτού του τύπου τη διατροφή, εμφάνισαν μειωμένους πληθυσμούς από το γένος *Prevotella* (μέλος των *Bacteroidetes*) και το γένος *Bifidobacterium*. [39]

Δίαιτα υψηλή σε φυτικές ίνες φαίνεται πως έχει επίδραση στα *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* στα οποία παρατηρείται αύξηση και στα *Firmicutes*, στα οποία παρατηρείται μείωση. Επιπλέον παρατηρείται μείωση σε βακτήρια που εμφανίζουν προφλεγμονώδη δραστηριότητα όπως στελέχη του *Escherichia coli* ή γενικότερα από τα *Enterobacteriaceae*. [40]

Αν και η επίδραση των πρωτεϊνών δεν έχει μελετηθεί εκτεταμένα, αποτελέσματα δείχνουν πως δίαιτα πλούσια σε πρωτεΐνες, αυξάνει τα ποσοστά των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου και παράλληλα μειώνει τα ποσοστά του βουτυρικού οξέος και των φαινολικών οξέων. [41]

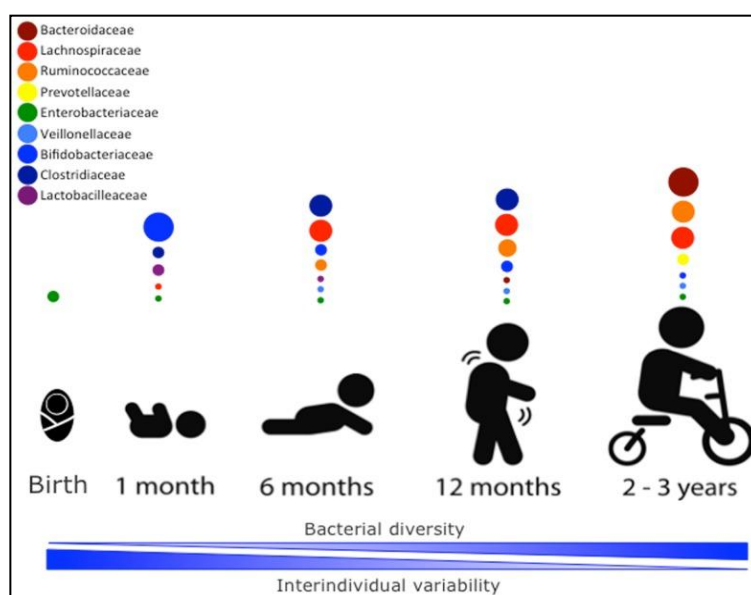
Σε έρευνες μελετήθηκε η αυξημένη ή μη κατανάλωση λίπους. Η αυξημένη κατανάλωση κορεσμένων φαίνεται πως έχει σημαντικές συνέπειες στον εντερικό μικροβιόκοσμο και συγκεκριμένα μείωση της ποικιλομορφίας και αύξηση του λόγου Firmicutes/Bacteroidetes. [42] Σύγκριση διαιτών με ίδιο θερμιδικό περιεχόμενο έδειξαν πως αυτή που περιείχε χαμηλό ποσοστό υδατανθράκων και υψηλό ποσοστό λίπους είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των SCFAs στα κόπρανα των εθελοντών και μείωση του πληθυσμού του γένους *Bifidobacterium*. Η δίαιτα υψηλή σε υδατάνθρακες και χαμηλή σε λίπος οδήγησε σε αύξηση των ολικών αναερόβιων πληθυσμών. [43]



Εικόνα 2: Δίαιτα και εντερικός μικροβιόκοσμος Woting et al.2016.

Ηλικία

Ο αποικισμός του εντέρου ξεκινά από τη στιγμή του τοκετού. Τα νεογνά μέσω του φυσιολογικού τοκετού εμπλουτίζονται με μικροοργανισμούς από τον κόλπο της μητέρας.[44] Ο εντερικός μικροβιόκοσμος των βρεφών είναι παρόμοιος με αυτόν του κόλπου της μητέρας. Μετά το πρώτο έτος της ζωής, ο μικροβιόκοσμος μοιάζει με αυτό του ενήλικα και σταθεροποιείται σε πλήθος μικροβιακών κυττάρων, συνεχίζει όμως να μεταβάλλεται η ποικιλομορφία του. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του μικροβιόκοσμου του βρέφους είναι ο τοκετός, η διατροφή, ο θηλασμός και η λήψη αντιβιοτικών στο πρώτο έτος της ζωής.[45]



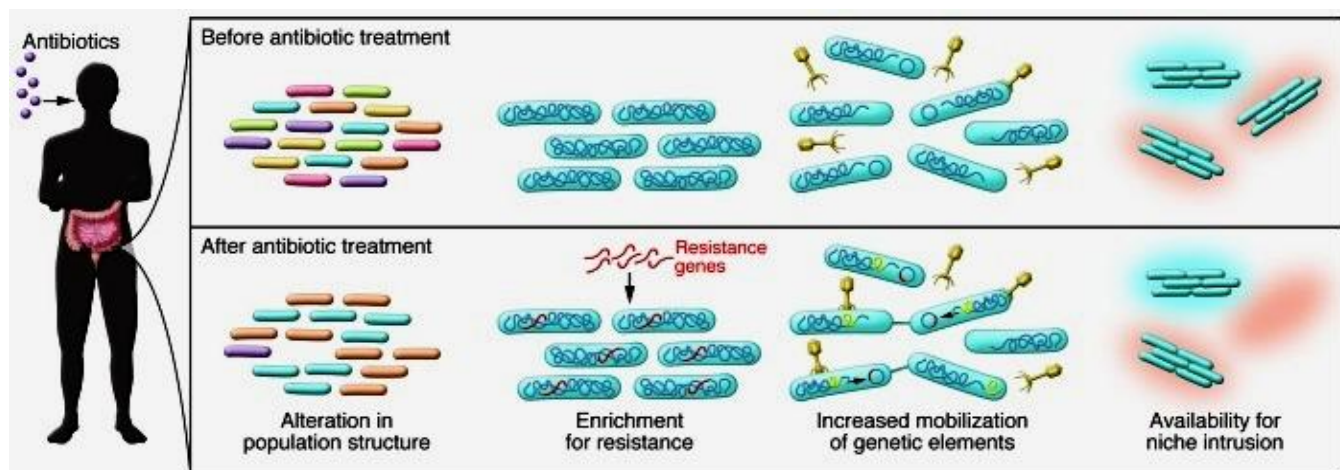
Εικόνα 3: Στάδια αποικισμού του εντέρου σε βρέφη και παιδιά Arrieta et al.2014.

Στους ηλικιωμένους παρατηρείται μείωση στον αριθμό των συνολικών αναερόβιων βακτηρίων και των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium*. Παράλληλα παρατηρείται αύξηση των εντεροβακτηρίων και των *E.coli*, αλλαγές που μπορεί να οφείλονται και στην ηλικία και σε αλλαγές στον τρόπο ζωής (π.χ. διατροφή).[46]

Αντιβιοτικά

Η λήψη αντιβιοτικών αναστέλλει εκτός από τα παθογόνα στα οποία στοχεύει η συγκεκριμένη θεραπεία και την ανάπτυξη των βακτηρίων που αποικίζουν φυσιολογικά το έντερο. Μία σημαντική συνέπεια είναι η ευκολότερη ανάπτυξη εντερικών παθογόνων όπως το *Salmonella spp* και *Clostridium difficile*. Χρήση πολύ ισχυρών αντιβιοτικών για διάστημα επτά ημερών έχει

σημαντικές επιδράσεις στους πληθυσμούς των βακτηρίων και η αποκατάσταση μπορεί να διαρκέσει από ένα μήνα έως έξι και σε μερικές περιπτώσεις φάνηκε πως η επίδραση διήρκησε τέσσερα χρόνια.[47]



Εικόνα 4: Εντερικός μικροβίος και αντιβιοτικά *Modi et al.2014*.

4.Παχυσαρκία

Τα τελευταία 30 χρόνια, η παχυσαρκία έχει αποκτήσει πανδημικές διαστάσεις. Υπολογίζεται πως 1,7 δισεκατομμύρια άνθρωποι στον πλανήτη είναι υπέρβαροι. Η εμφάνισή αυτού του φαινομένου είναι αποτέλεσμα αλλαγής στην ενεργειακή πρόσληψη και κατανάλωση που οδηγεί σε θετικό ισοζύγιο ενέργειας. Τα υπέρβαρα και παχύσαρκα άτομα έχουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2 (ΣΔ2), δυσλιπιδαιμιών, μη αλκοολικής λιπώδους διήθησης του ήπατος καθώς και πολλών τύπων καρκίνου. Ακόμα υπάρχει δρόμος για να διευκρινισθεί πλήρως η αιτιοπαθολογία της νόσου. Οι παράγοντες που έχουν προταθεί, περιλαμβάνουν την αυξημένη πρόσληψη τροφής, τον καθιστικό τρόπο ζωής και την κληρονομικότητα.[48] Τα τελευταία χρόνια, το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί προς τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν το μηχανισμό απόκτησης βάρους και μεταξύ αυτών στη διερεύνηση της επίδρασης του εντερικού μικροβιόκοσμου.

5.Εντερικός μικροβιόκοσμος και παχυσαρκία – Μηχανισμοί

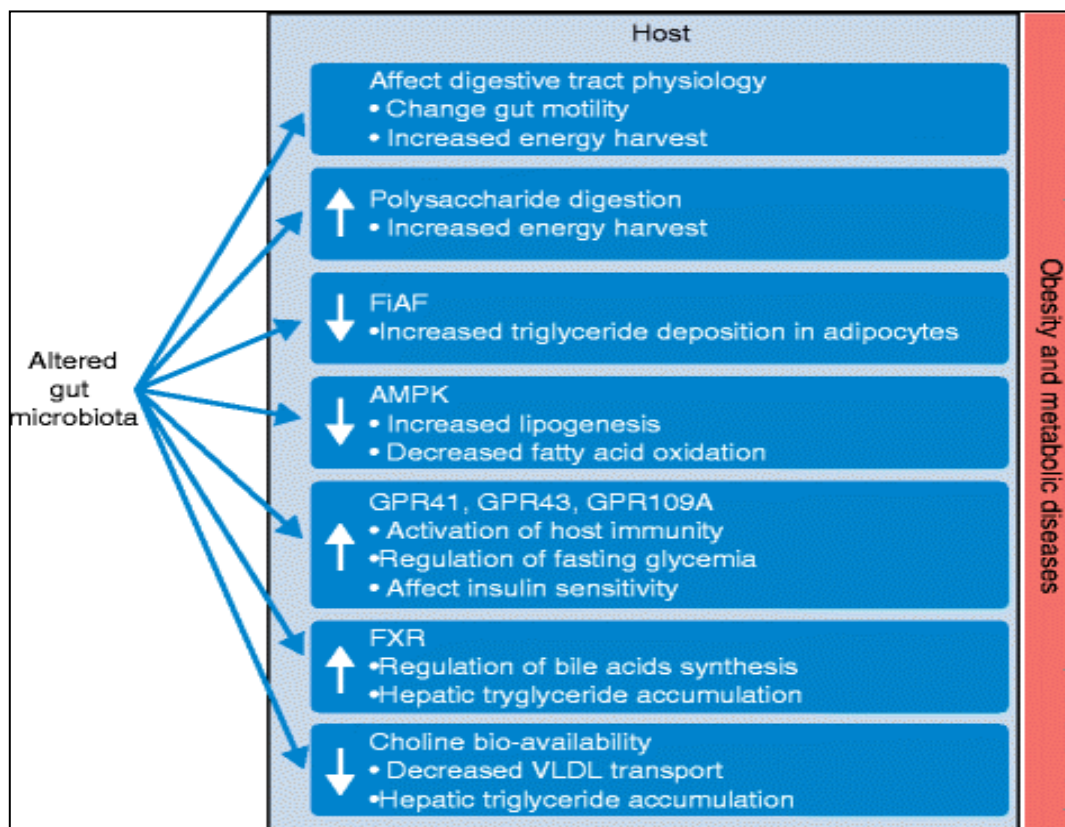
5.1Μεταβολισμός και Ενεργειακό ισοζύγιο

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος εμπλέκεται στον μεταβολισμό διαφόρων υποστρωμάτων προσφέροντας σημαντικά στην ενεργειακή πρόσληψη. Μελέτες σε αξενικά ποντίκια δείχνουν πως έχουν 40% λιγότερο λίπος από τα φυσιολογικά παρόλο που μεταβολίζουν 29% περισσότερες θερμίδες.[49] [50]

Τα βακτήρια μεταβολίζουν τους άπεπτους υδατάνθρακες της τροφής με τελικά προϊόντα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs), των οποίων οι μηχανισμοί δράσης δεν έχουν ακόμα διαλευκανθεί. Από τη μία πλευρά, προάγουν την εντερική γλυκονεογένεση και τη σύνθεση ινκρετινών (GLP-1 - ινσουλινοτρόπος δράση) οδηγώντας σε κορεσμό και από την άλλη, τα SCFAs συνδέονται θετικά με την λιπογένεση και την αύξηση του λιπώδους ιστού καθώς συνεισφέρουν θετικά στο ενεργειακό ισοζύγιο. Προσδένονται με τους υποδοχείς των πρωτεϊνών G, FFAR2 και FFAR3 (free fatty acid receptor 2,3) και επάγουν την έκκριση λεπτίνης από τα λιποκύτταρα και PYY από τα ενδοκρινικά κύτταρα. Το PYY έχει διττή δράση, αποτελεί ανορεξιογόνο (αναστέλλοντας την παχυσαρκία) και παράλληλα αυξάνει το χρόνο διέλευσης της τροφής στο έντερο ευεργετώντας την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών συμπεριλαμβανομένων και των προϊόντων της ζύμωσης από τους μικροοργανισμούς.[51] Τα συμπεράσματα των ερευνών ως προς τη συμβολή ή όχι των SCFAs στην ανάπτυξη παχυσαρκίας και μεταβολικού συνδρόμου, είναι αντικρουόμενα.[52]

Η παχυσαρκία είναι γνωστό ότι είναι κατάσταση χαμηλού βαθμού φλεγμονής. Ένας παράγοντας που πιθανόν εμπλέκεται στην εμφάνιση φλεγμονής είναι τα LPS (gut microbiota-derived lipopolysaccharide). Πρόκειται για ενδοτοξίνες των μεμβρανών των Gram- βακτηρίων που όταν εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος από το έντερο μέσω των χυλομικρών, προσδένονται σε πρωτεΐνες LBP (LPS-binding protein), οι οποίες ενεργοποιούν τον υποδοχέα CD14 που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη των μακροφάγων. Το σύμπλεγμα αυτό, προσδένει τον TLR4 υποδοχέα (Toll-like receptor 4) στην επιφάνεια των μακροφάγων και επάγει την έκφραση γονιδίων φλεγμονωδών παραγόντων. Ο κύριος μηχανισμός της ενδοτοξαιμίας (αυξημένα LPS στο πλάσμα), αφορά στη σύνδεση του μικροβιόκοσμου με την εντερική διαπερατότητα και στην αλλαγή της απορροφητικής ικανότητας του εντερικού

επιθηλίου. Μελέτες σε μοντέλα ζώων δείχνουν πως αυτά που έχουν έλλειψη υποδοχέων των LPS, προστατεύονται από την εμφάνιση παχυσαρκίας. Επίσης φαίνεται ότι η κατάσταση αυτή εντείνεται από τη διαίτα. Για παράδειγμα, διαίτα πλούσια σε λίπος, μπορεί να διαφοροποιήσει τη σύσταση του εντερικού μικροβιώματος οδηγώντας σε αυξημένη διαπερατότητα του εντερικού φραγμού μέσω τροποποίησης στην κατανομή ορισμένων πρωτεϊνών σύνδεσης (ZO-1 και occludin). Αυτή η αλλαγή έχει ως συνέπεια την αύξηση των LPS και την ενεργοποίηση καταρρακτών σηματοδότησης. Αυτοί επάγουν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, ιδιαίτερα TNF-α και IL-6, που εμπλέκονται στις διαδικασίες αθηροσκλήρωσης, παχυσαρκίας και αντίστασης στην ινσουλίνη.[53],[54]



Εικόνα 5: Αποτελέσματα δυσβίωσης Boulange et al.2016.

5.2 Παχυσαρκία και Δυσβίωση

Δυσβίωση είναι μία κατάσταση που χαρακτηρίζεται από αλλαγή στη σύσταση, στις μεταβολικές διεργασίες και στην κατανομή των πληθυσμών του εντερικού μικροβιόκοσμου.[55] Πολλές μελέτες σε ζωικά πειραματικά μοντέλα, αλλά και δεδομένα από ανθρώπους δείχνουν ότι στον παχύσαρκο φαινότυπο παρατηρούνται αλλαγές στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Όταν μεταβάλλεται ο εντερικός μικροβιόκοσμος, διαφορετικοί μικροοργανισμοί επικρατούν, οι οποίοι μπορεί να εξάγουν πιο αποτελεσματικά ενέργεια με τελικά προϊόντα τα SCFAs.

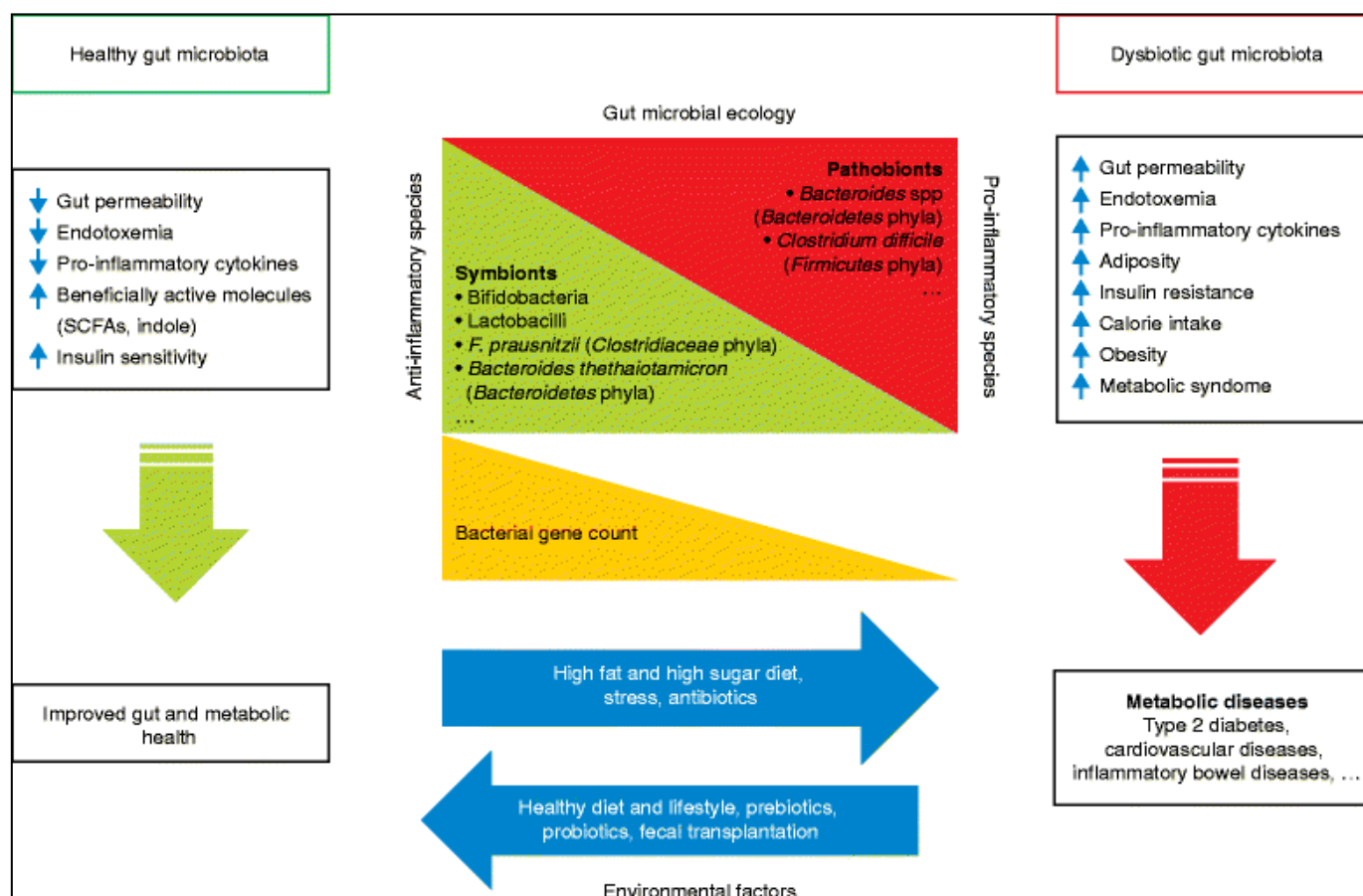
Το μικροβίωμα παίρνει μέρος στη ρύθμιση γονιδίων του ξενιστή που σχετίζονται με τη δαπάνη και την αποθήκευση ενέργειας, επηρεάζοντας έτσι το ισοζύγιο ενέργειας.[56] Πειράματα σε αξενικά ζώα έδειξαν ότι η παρουσία του εντερικού μικροβιόκοσμου προκαλεί αύξηση στην έκφραση των mRNAs δύο ηπατικών πρωτεϊνικών μεταγραφικών παραγόντων (ChREBP και SREBP-1) που παίρνουν μέρος στην ηπατική de novo λιπογένεση. Επίσης η παρουσία των μικροοργανισμών του εντέρου ευνοεί τη συσσώρευση λίπους μέσω ενός μηχανισμού που συνδέει τα ελεύθερα τριγλυκερίδια με τη καταστολή της έκφρασης επιλεκτικά στο έντερο, ενός αναστολέα της LPL (adipocyte lipoprotein lipase), του FIAF (fasting-induced adipose factor).[57]

Ανεξάρτητα από τη FIAF, μελέτες δείχνουν πως σε διαστήματα μεταβολικού στρες παρατηρείται μείωση της AMPK (κινάση που ενεργοποιείται από το AMP) που είναι υπεύθυνη για την οξείδωση λιπαρών οξέων και την έκκριση ινσουλίνης και παράλληλα αναστέλλει την σύνθεση χοληστερόλης και τριακυλογλυκερολών. Τα αποτελέσματα προκύπτουν από τη σύγκριση των επιπέδων της AMPK σε αξενικά και μη ποντίκια, υποδεικνύοντας πως τα ποντίκια με μη φυσιολογικό μικροβιόκοσμο έχουν μειωμένη έκκριση AMPK.[56]

Το ενδοκανναβινοειδές σύστημα (eCB) αποτελείται από βιοενεργά λιπίδια, ένζυμα και πλήθος υποδοχέων και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο ενεργειακό ισοζύγιο και στη ρύθμιση του μεταβολισμού των λιπαρών και της γλυκόζης. Ερευνητές έδειξαν πως ο εντερικός μικροβιόκοσμος ρυθμίζει τον τόνο του eCB και συγκεκριμένα στην παχυσαρκία παρατηρείται αύξηση του eCB στο πλάσμα και στο λιπώδη ιστό και αλλαγή στην έκφραση του eCB1 (cannabinoid receptor 1) μέσω αύξησης της έκφρασης του mRNA. Η απορρύθμιση του συστήματος οδηγεί σε διαταραγμένη πρόσληψη ενέργειας, συμβάλλει στην κοιλιακή εναπόθεση του λίπους και συνδέεται με μεταβολικές αλλαγές. Έχει φανεί σε μελέτες με μοντέλα ζώων πως

το eCB1 ελέγχει την εντερική διαπερατότητα και κατ'επέκταση την συγκέντρωση των LPS στο πλάσμα καταλήγοντας στο συμπέρασμα πως ο μικροβιόκοσμος καθορίζει τη φυσιολογία του λιπώδους ιστού μέσω του eCB-LPS συστήματος.[58], [59]

Τέλος, οι μικροοργανισμοί εμπλέκονται στην έκκριση του FXR (farnesoid X receptor) ο οποίος προσδένεται στα χολικά οξέα. Ρυθμίζουν τον μεταβολισμό των λιποειδών και της γλυκόζης. Μελέτες σε ποντίκια δείχνουν πως είναι απαραίτητη προϋπόθεση η ύπαρξη του FXR στο έντερο για την εμφάνιση παχυσαρκίας και την αντίσταση στην ινσουλίνη, όταν ακολουθείται υψηλή σε λίπος διαίτα. Μελέτες σε ανθρώπους, δείχνουν πως με τη λήψη αντιβιοτικών (vancomycin) μειώνονται οι πληθυσμοί των Gram- βακτηρίων που είχε ως αποτέλεσμα αλλαγές στον μεταβολισμό των χολικών οξέων και μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Τα ευρήματα αυτά δείχνουν πως αλλαγές στον εντερικό μικροβιόκοσμο συνδέονται με τις λειτουργίες του μεταβολισμού και πιθανόν με μεταβολικά νοσήματα.[60]



Εικόνα 6: Υγής και δυσβιωτικός μικροβιόκοσμος Boulange et al.2016.

6.ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η αποτύπωση των χαρακτηριστικών του εντερικού μικροβιόκοσμου και των γαστρεντερικών συμπτωμάτων ενός τυχαίου δείγματος του ελληνικού πληθυσμού και η διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων με μια σειρά ανθρωπομετρικών, διατροφικών και άλλων παραμέτρων.

7.1 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στρατολόγηση εθελοντών : Προσέγγιση οικογενειακού και φιλικού περιβάλλοντος και προβολή σε φαρμακεία, της πρόσκλησης εθελοντών για συμμετοχή στη μελέτη με τα απαραίτητα στοιχεία επικοινωνίας.

Πρώτη επικοινωνία με τον εθελοντή : πέραν του οικογενειακού περιβάλλοντος, η πρώτη επικοινωνία με τους εθελοντές έγινε τηλεφωνικά όπου ρωτήθηκαν βασικά στοιχεία όπως ηλικία, βάρος, τελευταία λήψη αντιβιοτικών και νοσήματα (ιδιαίτερα στο ΓΕΣ). Στο σημείο αυτό καταγράφονται τυχόν κριτήρια αποκλεισμού. Παράλληλα επεξηγήθηκε επιγραμματικά ο σκοπός της μελέτης και η διαδικασία συμμετοχής στη (αιμοληψία, ανθρωπομετρικές μετρήσεις, δείγμα κοπράνων). Στην περίπτωση που πληρούν τις βασικές προϋποθέσεις, κανονίζεται συνάντηση και συνέντευξη.

Συνέντευξη με τον εθελοντή : Πριν την έναρξη της συνέντευξης ο εθελοντής υπογράφει οικειοθελώς συμφωνητικό συμμετοχής στη μελέτη που του εξασφαλίζει την διακοπή της συμμετοχής ανά πάσα στιγμή. Στη συνέχεια ακολουθεί η συνέντευξη και η συμπλήρωση των ερωτηματολογίων. Καταγράφονται γενικά χαρακτηριστικά (π.χ. ηλικία, φύλο, τόπος διαμονής, επίπεδο εκπαίδευσης κλπ), ιατρικό και φαρμακευτικό ιστορικό. Ακολουθούν, λήψη διατροφικού ιστορικού εκτίμηση φυσικής δραστηριότητας και ερωτηματολόγιο αξιολόγησης κατάστασης της ψυχολογικής υγείας. Στο τέλος δίνονται οι απαραίτητες οδηγίες προετοιμασίας και συλλογής δειγμάτων καθώς και τα μέσα (π.χ. ουροσυλλέκτης και περιέκτης κοπράνων) για την επίτευξή τους. Ο εθελοντής καλείται να συμπληρώσει μόνος του ένα ημερολόγιο καταγραφής κατανάλωσης τροφίμων (3 ημέρες) και ένα ημερολόγιο καταγραφής γαστρεντερολογικών νοσημάτων (7 ημέρες). Τέλος κανονίζονται οι ημερομηνίες για την δειγματοληψία.

Δειγματοληψίες βιολογικών δειγμάτων : Ο εθελοντής θα πραγματοποιήσει 2 επισκέψεις στο χώρο του πανεπιστημίου. Την πρώτη φορά θα έρθει για την αιμοληψία και τις ανθρωπομετρικές μετρήσεις. Πρέπει να προσκομίσει ουροσυλλέκτη με πρώτα πρωινά ούρα και να είναι σε τουλάχιστον 8 ώρες νηστεία και όχι υπερβολική κατανάλωση υγρών για την αιμοληψία. Μισή ώρα πριν την αιμοληψία, απαγορεύονται η κατανάλωση υγρών και το κάπνισμα. . Στη δεύτερη

επίσκεψη, ο εθελοντής προσκομίζει τον συλλέκτη με ολόκληρη την κένωση και έναν περιέκτη αποστειρωμένο, όπου τοποθετεί μικρή ποσότητα του δείγματος που μεταφέρεται σε αναερόβιες συνθήκες σε λιγότερο από 2 ώρες από την ώρα της δειγματοληψίας στο Εργαστήριο. Επίσης προσκομίζονται και τα ερωτηματολόγια συμπληρωμένα.

Ανθρωπομετρικές μετρήσεις : Την ημέρα της αιμοληψίας, πραγματοποιούνται και οι ανθρωπομετρικές μετρήσεις, ύψος, βάρος, περιφέρεια μέσης, δερματοπτυχές και λιπομέτρηση.

Επεξεργασία δειγμάτων : Πραγματοποιούνται οι απαραίτητες αναλύσεις των ληφθέντων δειγμάτων

Στατιστική επεξεργασία και ανάλυση : Πραγματοποιείται στατιστική επεξεργασία για την εξαγωγή αποτελεσμάτων.

Αναλυτικότερα

Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά εθελοντών : Οι ανθρωπομετρικές μετρήσεις περιλαμβάνουν, ζύγισμα (ηλεκτρονική ζυγαριά), ύψος (αναστημόμετρο), μέτρηση της πίεσης (πιεσόμετρο omron), δερματοπτυχές δικεφάλου, τρικεφάλου, υποωμοπλατιαίας και υπερλαγόνιας (δερματοπτυχόμετρο), περιφέρεια μέσης (μεζούρα) και λιπομέτρηση (Tanita BC-418 MA). Ο εθελοντής έχει ενημερωθεί από την προηγούμενη μέρα, να φορέσει άνετα ρούχα και να έχει ακολουθήσει το πρωτόκολλο της νηστείας, το οποίο είναι απαραίτητο και για τη λιπομέτρηση.

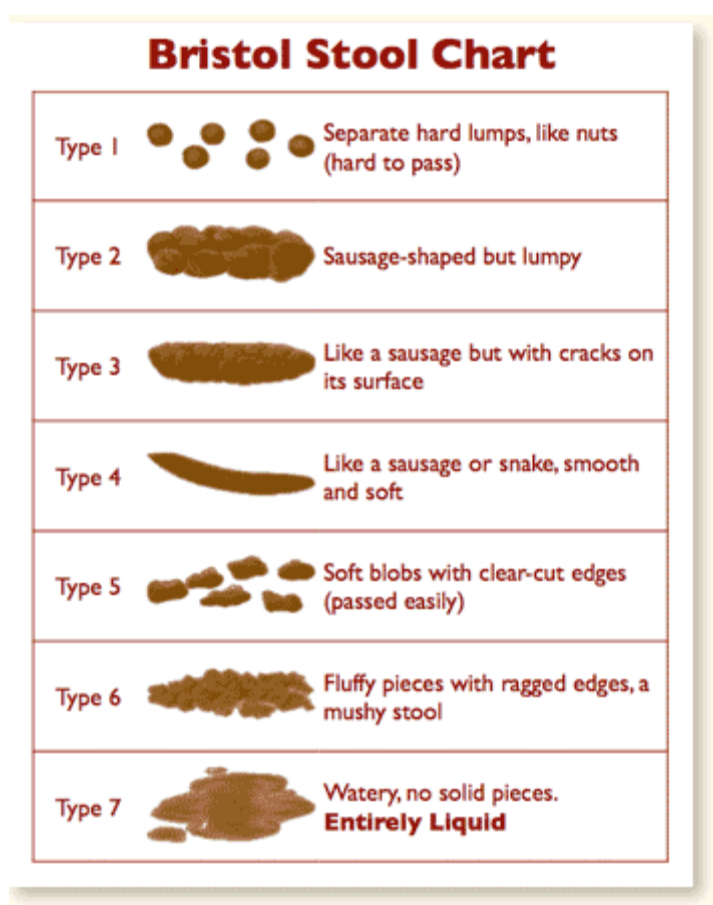
Εκτίμηση σωματικής και ψυχικής κατάστασης των εθελοντών : Χρησιμοποιήθηκαν τα ερωτηματολόγια της μελέτης ΑΤΤΙΚΗ.[61] Η εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας, καταγράφηκε με τη χρήση του IPAQ- SF τις τελευταίες επτά ημέρες. Καταγράφηκε η συχνότητα και η διάρκεια (σε min) τριών κατηγοριών φυσικής δραστηριότητας διαφορετικής έντασης (περπάτημα, μέτρια, έντονη δραστηριότητα). Ξεχωριστά σημειώθηκε και το συνολικό διάστημα που το άτομο ήταν καθιστό την τελευταία εβδομάδα. Στη συνέχεια υπολογίζονται με χρήση εξίσωσης τα λεπτά των μεταβολικών ισοδυνάμων (met).[62]

Για την εκτίμηση της ψυχικής υγείας, χρησιμοποιούνται τα ερωτηματολόγια Zung (Zung Self-Assessment Depression Scale) [63] και Stai (State-Trait Anxiety Inventory).[64] Το Zung είναι ένα σύντομο εργαλείο αξιολόγησης της εμφάνισης και της σοβαρότητας των καταθλιπτικών συμπτωμάτων αλλά δεν αποτελεί διαγνωστικό εργαλείο. Το Stai είναι ένα εργαλείο αξιολόγησης της παρουσίας και της έντασης των συμπτωμάτων άγχους. Και τα δύο ερωτηματολόγια συμπληρώνονται από τον εθελοντή.

Διατροφική αξιολόγηση των εθελοντών : Η διατροφική αξιολόγηση των εθελοντών έγινε μέσω των ερωτηματολογίων συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (FFQ) και των τριήμερων ημερολόγιων καταγραφής τροφίμων. Με το FFQ γίνεται προσπάθεια προσδιορισμού της συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων και ποτών. Το FFQ απαρτίζεται από δύο μέρη, μία λίστα τροφίμων και μία σειρά από απαντήσεις (5 επιλογές από ποτέ ή λιγότερο από μία φορά το μήνα έως πάνω από μία φορά την ημέρα). Το ερωτηματολόγιο που χρησιμοποιήθηκε είναι ημιποσοτικό, δηλαδή προσδιορίζεται η ποσότητα αναφοράς για το εκάστοτε τρόφιμο ή ποτό.[65] Στη συνέχεια υπολογίζεται και το medDietScore.[66] Περαιτέρω ένα τριήμερο ημερολόγιο καταγραφής τροφίμων, συμπληρώνεται από τους εθελοντές με την καθοδήγηση του υπεύθυνου. Οι εθελοντές πρέπει για τρεις ημέρες (1 ΣΚ και 2 καθημερινές) να καταγράψουν όλα τα τρόφιμα και ποτά που κατανάλωσαν καθώς και τις ποσότητες και τις μάρκες των προϊόντων. Είναι επίσης απαραίτητη η καταγραφή της ώρας κατανάλωσης των γευμάτων. Οδηγός για τον υπολογισμό των μερίδων δίνεται στους εθελοντές μαζί με τα ημερολόγια. Στη συνέχεια, τα δεδομένα που προκύπτουν επεξεργάζονται με το πρόγραμμα NutritionistPro ώστε να εκτιμηθεί η πρόσληψη ενέργειας και θρεπτικών συστατικών, συγκεκριμένα πρωτεϊνών, υδατανθράκων, λιπαρών οξέων (κορεσμένων, μονο- και πολυ- ακόρεστων), διαιτητικών ινών και μικροστοιχείων.

Καταγραφή γαστρεντερολογικών συμπτωμάτων : Χρησιμοποιούνται δύο ημερολόγια, ένα ημερολόγιο που αξιολογεί τη σοβαρότητα των γαστρεντερικών συμπτωμάτων κατά τη διάρκεια των τελευταίων τεσσάρων εβδομάδων και συμπληρώνεται από τον ερευνητή και ένα επταήμερο ημερολόγιο που συμπληρώνεται από τον εθελοντή, ξεκινώντας λίγες μέρες πριν τη συλλογή του δείγματος των κοπράνων. Το πρώτο ημερολόγιο (των τελευταίων τεσσάρων εβδομάδων)ι φέρει μια οπτική κλίμακα για την αξιολόγηση της συνολικής σοβαρότητας των συμπτωμάτων από 0 (κανένα παράπονο) έως 10 (αφόρητα συμπτώματα) (Bovenschen et al., 2006). Στο ερωτηματολόγιο αυτό προστέθηκε επιπλέον μια ερώτηση σχετικά με τον μέσο όρο των κενώσεων που έχει καθημερινά το άτομο στην διάρκεια των τελευταίων τεσσάρων εβδομάδων.[67] Στο επταήμερο ημερολόγιο τα γαστρεντερικά συμπτώματα (κοιλιακό άλγος, κοιλιακή διόγκωση, μετεωρισμός, κοιλιακό γουργουρητό), καθώς και τα χαρακτηριστικά των κοπράνων (οσμή, χρώμα), βαθμολογούνται ημερησίως με μια κλίμακα από το 0 (καθόλου συμπτώματα/χωρίς οσμή/κίτρινο χρώμα) έως 4 (σοβαρά συμπτώματα/έντονη οσμή/σκούρο καφέ). Η επταήμερη βαθμολογία για κάθε σύμπτωμα (το άθροισμα της έντασης του συμπτώματος στη διάρκεια των επτά ημερών) κυμαίνεται από 0 έως 28, όπου βαθμολογία ίση με 0 = απουσία συμπτωμάτων, 1–7 = ήπια συμπτώματα, 8–14 = μέτρια συμπτώματα και 15 – 28 =

σοβαρά συμπτώματα. Το συνολικό άθροισμα της εβδομαδιαίας βαθμολογίας των τεσσάρων συμπτωμάτων κυμαίνεται από 0 έως 112.[68] Επιπλέον, στο ημερολόγιο περιλαμβάνονται και ερωτήσεις για την συχνότητα και τη σύσταση των κενώσεων. Για την λεπτομερέστερη καταγραφή της σύστασης των κενώσεων δίνεται και οπτική παρουσίαση της κλίμακας Bristol (Bristol stool chart), όπου καλείται να επιλέξει από το 1 (πολύ σκληρά κόπρανα, μικρού μεγέθους) έως το 7 (υδαρή κόπρανα).[69]



Εικόνα 7: Κλίμακα Bristol

7.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ

Στη συγχρονική μελέτη συμμετέχουν ενήλικες εθελοντές 18-65 ετών και των δύο φύλων. Κριτήρια αποκλεισμού αποτελούν το ιστορικό γαστρεντερικών νοσημάτων και διαταραχών (ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι εντέρου, σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, χρόνια διάρροια ή οξεία διάρροια τις προηγούμενες τέσσερις εβδομάδες, χρόνια δυσκοιλιότητα, ιστορικό καρκίνου πεπτικού συστήματος, πολύποδες παχέος εντέρου, γαστρίτιδα, έλκος πεπτικού συστήματος, γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, χολοκυστεκτομή κ.ά.), τα αυτοάνοσα νοσήματα, το ιστορικό επιληπτικών κρίσεων, το ιστορικό στεφανιαίας νόσου (ισχαιμικό καρδιακό επεισόδιο, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο), το ιστορικό ηπατικών και νεφρικών παθήσεων, ο σακχαρώδης διαβήτης, η παρουσία κρυολογήματος ή γρίπης, η νοσηλεία για πάνω από τέσσερις εβδομάδες και η παρουσία λοίμωξης τον τελευταίο μήνα (π.χ. CRP > 5mg/L), η παρουσία εγκυμοσύνης, οι ακραίες διαιτητικές συμπεριφορές (π.χ. αποκλειστικά χορτοφάγοι), η τρέχουσα απώλεια βάρους λόγω δίαιτας, η κατανάλωση αντιβιοτικών τουλάχιστον δύο μήνες πριν την μελέτη και η κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής (π.χ. ω-3 λιπαρά, αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνες A, E, C, β-καροτένιο, συνένζυμο Q10, σελήνιο, ψευδάργυρος κ.α.) καθώς και προβιοτικών ή/και πρεβιοτικών δύο εβδομάδες πριν τη μελέτη. Επιπλέον, αν και δεν αποτελούν κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη, πραγματοποιείται λεπτομερής καταγραφή της συνύπαρξης άλλων χρόνιων καταστάσεων, της παρουσίας αλλεργίας, της παρουσίας περιοδοντίτιδας ή άλλων προβλημάτων στα ούλα, καθώς και της ορμονικής θεραπείας με οιστρογόνα, της λήψης αντισυλληπτικών δισκίων και της κατανάλωσης μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων τουλάχιστον ένα μήνα πριν τη μελέτη.

8.Επεξεργασία Δειγμάτων

Κατά την δειγματοληψία οι εθελοντές συλλέγουν όλη την κένωση σε ειδικό προζυγισμένο δοχείο από τα οποία μεταφέρουν ποσότητα περίπου 5g σε ειδικό αποστειρωμένο συλλέκτη κοπράνων ο οποίος τοποθετείται σε φορητή συσκευή δημιουργίας αναερόβιας ατμόσφαιρας (GENbag anaer, 45534 BioMérieux S.A., Marcy-l'Etoile/ France) στην οποία εσωκλείεται ένας δείκτης ελέγχου αναερόβιων συνθηκών (Anaer indicator, 96118 BioMérieux S.A., Marcy-l'Etoile/ France).

Μετά τη συλλογή των κοπράνων, το δείγμα (δοχείο και συλλέκτης) μεταφέρεται στο εργαστήριο σε χρονικό διάστημα λιγότερο των 2 ωρών. Αρχικά υπολογίζεται το καθαρό βάρος της κένωσης. Στη συνέχεια ακολουθεί πρώτα η ομογενοποίηση του δείγματος σε Stomacher για 10-15sec και ακολουθεί ο διαχωρισμός του δείγματος σε διαφορετικές ποσότητες για τον προσδιορισμό των διαφορετικών χαρακτηριστικών. Η διαδικασία αυτή γίνεται γρήγορα και προσεκτικά σε απαγωγό θάλαμο για την αποφυγή καταπόνησης των μικροβιακών πληθυσμών του δείγματος.

8.1 Μέτρηση pH ΚΟΠΡΑΝΩΝ

Από το δείγμα της κένωσης, λαμβάνεται 1g κοπράνων, το οποίο ομογενοποιείται σε 10mL αποστειρωμένου νερού με τη χρήση αναδευτήρα. Στη συνέχεια το pH μετράται σε θερμοκρασία δωματίου με τη χρήση πεχάμετρου (WTWInolab) και με ηλεκτρόδιο το οποίο δεν καταστρέφεται από τις πρωτεΐνες των κοπράνων (WTWSenTix).

8.2 Προσδιορισμός Ξηρού βάρους

Ποσότητα περίπου 2g της κένωσης μεταφέρεται σε δύο προζυγισμένα πλαστικά δοχεία και αποθηκεύονται στους -20°C. Πριν τη λυοφιλίωση, τα δείγματα μεταφέρονται στους -80°C για 24 ώρες. Η λυοφιλίωση πραγματοποιείται στο LypLab 3000 (HetoHolten A/S Denmark) για 24 έως 48 ώρες στους -56°C έως ότου ολοκληρωθεί η διαδικασία της αφυδάτωσης. Μετά, τα δείγματα ζυγίζονται ξανά και υπολογίζεται το ξηρό βάρος των κοπράνων με τον τύπο (Βάρος συλλέκτη + λυοφιλιωμένου δείγματος) – Βάρος συλλέκτη. Το τελικό αποτέλεσμα προκύπτει από το μέσο όρο των δύο επαναλήψεων.

8.3 ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ

Για την καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών στα δείγματα ακολουθήθηκε η μέθοδος της καταμέτρησης βιώσιμων αναπαραγωγικών μονάδων (cfu/g δείγματος) σε τρυβλία petri (καλλιεργητική μεθοδολογία). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του δείγματος και επίστρωση σε τρυβλία με εκλεκτικά και μη-εκλεκτικά υποστρώματα

Έγινε καταμέτρηση των ακόλουθων αερόβιων και προαιρετικά αερόβιων μικροοργανισμών: ολικοί αερόβιοι μικροοργανισμοί, ολικά κολίμορφα βακτήρια και *E.coli*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., Ζύμες και Μύκητες. Επίσης έγινε η καταμέτρηση των ακόλουθων αυστηρά αναερόβιων μικροοργανισμών: *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.

Διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του δείγματος

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 (0,1g ανά 100ml δ/τος) και 0,85% NaCl (0,85g ανά 100mL δ/τος) σε απιονισμένο νερό. Με τη βοήθεια διανομέα, το διάλυμα PPS μοιράζεται ανά 9 mL 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°C για 15 λεπτά, για την απομάκρυνση του οξυγόνου.

Ποσότητα 1g κατά προσέγγιση ζυγίζεται και τοποθετείται σε φιαλίδιο universal για τη δημιουργία της πρώτης αραιώσης (10^{-1}). Το δείγμα τοποθετείται στον αναερόβιο επωαστικό-θάλαμο (BACTRON™ 1,5 Anaerobic Environmental Chamber, SHELLAB), όπου και ομογενοποιείται προσεκτικά με ήπια ανάδευση με αυτόματη πιπέτα, αποφεύγοντας την ανάμειξη με τον αέρα. Στην συνέχεια ακολουθούν και οι υπόλοιπες αραιώσεις του δείγματος, που θα χρησιμεύσουν ως εμβόλια για την καταμέτρηση των αναερόβιων και των αερόβιων μικροβιακών πληθυσμών.

Εμβολιασμός του δείγματος σε εκλεκτικά και μη-εκλεκτικά υποστρώματα

Η διαδικασία του εμβολιασμού γίνεται με επίστρωση 100μL από την αραιώση στα τρυβλία με τα διαφορετικά υποστρώματα, με αποστειρωμένη γυάλινη ράβδο. Από κάθε αραιώση εμβολιάζονται 3 τρυβλία. Ο εμβολιασμός για τους αναερόβιους μικροοργανισμούς γίνεται στον αναερόβιο επωαστικό θάλαμο, ενώ για τους αερόβιους στον θάλαμο νηματικής ροής. Στον

Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα Θρεπτικά υποστρώματα, οι συνθήκες καλλιέργειας και ο αντίστοιχος μικροοργανισμός.

Θρεπτικά υλικά	Είδος μικροοργανισμού	Συνθήκες καλλιέργειας	Χρόνος Επώασης(ώρες)	Θερμοκρασία Επώασης (°C)
Chromocult Agar	Ολικά κολίμορφα/ <i>Escherichia coli</i>	Αερόβια	24	37
TSC Agar (Tryptose Sulfite Cycloserine)	<i>Clostridium</i> spp.	Αναερόβια	24	37
Columbia Blood Agar (5% horse blood)	Ολικοί μεσόφιλοι μικροοργανισμοί	Αερόβια/Αναερόβια	48	37
Rogosa Agar	<i>Lactobacillus</i> spp.	Αναερόβια	48	37
Slanetz Bartley Agar	<i>Enterococcus</i> spp.	Αερόβια	48	37
Wilkins Chalgren Agar	<i>Bacteroides</i> spp.	Αναερόβια	48	37
Baird-Parker Medium Base	<i>Staphylococcus</i> spp.	Αερόβια	48	37
Mannitol Salt Agar (MSA)	<i>Staphylococcus</i> spp.	Αερόβια	48	37
Beeren's Agar	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Αναερόβια	72	37
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	Μύκητες και Ζύμες	Αερόβια	96	30

Θρεπτικά Υποστρώματα

Chromocult coliform Agar (Merck)

Το chromocult agar είναι το εκλεκτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την ταυτόχρονη ανίχνευση των ολικών κολίμορφων και του *Escherichia coli*. Για την παρασκευή 1L υλικού προστίθενται 26,5 g *Chromocult Coliform agar* σε 1000ml απιονισμένου ύδατος, διαλύονται υπό ανάδευση με ταυτόχρονη θέρμανση μέχρι βρασμού, χωρίς αποστείρωση. Το υλικό μεταφέρεται στα τρυβλία (20ml/τρυβλίο) πριν πήξει. Τα τρυβλία αποθηκεύονται καλά κλεισμένα στους 4°C μακριά από το φως έως και 6 μήνες. Το υλικό αυτό περιέχει χρωμογόνα οπότε οι αποικίες εμφανίζονται χρωματιστές και διαφορεικό γιατί εμφανίζονται οι αποικίες του *E.coli* με σκούρο μωβ-μπλε χρώμα και τα υπόλοιπα κολίμορφα με ροζ χρώμα. Το άθροισμα των ροζ και μπλε στρογγυλών αποικιών μας δίνουν τον αριθμό των ολικών κολίμορφων βακτηρίων.[70]

TSC Agar (Lab194)

Το TSC χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια του *Clostridium perfringens*. Για την παρασκευή 500ml τελικού όγκου προστίθενται 23g *Perfringens Agar Base* σε 500ml απιονισμένου ύδατος και διαλύονται υπό ανάδευση. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 10 λεπτά. Επιπλέον αποστειρώνονται 5ml απιονισμένου ύδατος για τη διάλυση της D-Cycloserine, η οποία προστίθεται μετά το τέλος της αποστείρωσης και τη ψύξη του υλικού, εντός του θαλάμου νηματικής ροής υπό ασηπτικές συνθήκες. Το υλικό αναδεύεται και μοιράζεται υπό ασηπτικές συνθήκες στο θάλαμο νηματώδους ροής στα τρυβλία. Τα τρυβλία αποθηκεύονται στους 4°C έως και 7 ημέρες.. Οι τυπικές αποικίες των κλωστριδίων είναι στρογγυλές μαύρου ή μπεζ χρώματος. Το *Clostridium perfringens* σχηματίζει μία θολή ζώνη γύρω από την αποικία.[71]

Columbia Blood Agar (CBA) (Lab M Limited)

Το CBA χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση της ολικών μεσόφιλων μικροοργανισμών. Είναι εμπλουτισμένο με 5% αποστειρωμένο αίμα (50 ml αίματος ανά 1000ml τελικού όγκου υλικού). Σε 950 ml απιονισμένου ύδατος προστίθενται 42g *Columbia Agar* και 5g *Agar* και γίνεται αποστείρωση του υλικού στους 121°C για 15 λεπτά. Το υλικό ψύχεται μέχρι τους 45-50°C και έπειτα προστίθεται υπό ασηπτικές συνθήκες το αποστειρωμένο αίμα (Defibrinated Horse blood). Το υλικό μοιράζεται στα τρυβλία στο θάλαμο νηματώδους ροής και αυτά αποθηκεύονται στους

4°C. Στα τρυβλία με θρεπτικό υλικό το Columbia Blood Agar (CBA) καταμετρούνται όλες οι αποικίες.[72]

Rogosa Agar (*Difco™ Rogosa SL Agar Becton, Dickinson and Company*)

Το Rogosa Agar χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση και απομόνωση των στελεχών του γένους *Lactobacillus* spp. Για την παρασκευή 1000ml τελικού όγκου, προστίθενται 74,5g υλικού. Πραγματοποιείται ανάμιξη και θέρμανση μέχρι βρασμού χωρίς αποστείρωση. Μετά από ψύξη ρυθμίζεται το pH με τη βοήθεια οξικού οξέος στην τιμή $5,5 \pm 0,2$. Τα τρυβλία αποθηκεύονται στους 4°C και συντηρούνται για 3-4 ημέρες. Οι τυπικές αποικίες των λακτοβακίλλων είναι λευκές-γυαλιστερές στρογγυλές.[73]

Slanetz Bartley Agar (Lab166)

Για την καλλιέργεια των εντερόκοκκων χρησιμοποιείται το Slanetz Bartley medium. Για την παρασκευή 1000ml τελικού όγκου προστίθενται 43,5g SB Agar. Διαλύονται καλά υπό ανάδευση με ταυτόχρονη θέρμανση μέχρι βρασμού χωρίς αποστείρωση και ψύξη τους 45-50°C. Τα τρυβλία αποθηκεύονται στους 4°C και συντηρούνται έως και 7 ημέρες.[74]

Wilkins-Chalgren Agar (OXOID, CM0619)

Για την καλλιέργεια των *Bacteroides* spp. χρησιμοποιείται το Wilkins-Chalgren anaerobe agar εμπλουτισμένο με το συμπλήρωμα G-N Anaerobe supplement και 5% αποστειρωμένο αίμα. Για την παρασκευή 500mL τελικού όγκου προστίθενται 21,5g Wilkins-Chalgren anaerobe agar σε 475 mL απιονισμένου ύδατος και διαλύονται υπό ανάδευση. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά και παράλληλα αποστειρώνονται 10mL απιονισμένου ύδατος για τη διάλυση του G-N anaerobe supplement. Το υλικό ψύχεται στους 50-55°C και προστίθενται το G-N anaerobe supplement, καθώς και 25mL defibrinated horse blood υπό ασηπτικές συνθήκες στο θάλαμο νηματώδους ροής. Αναδεύεται ελαφρώς και μοιράζεται σε τρυβλία εντός του θαλάμου νηματώδους ροής. Τα τρυβλία αποθηκεύονται στους 4°C και καταναλώνονται το συντομότερο δυνατό. Οι τυπικές αποικίες των *Bacteroides* spp. είναι λευκές-γκρι στρογγυλές.[75]

Baird-Parker Medium Base (Lab M Limited)

Για την παρασκευή 1L διαλύονται 63,5g υλικού σε 1L απιονισμένο νερό. Ακολουθεί ανάμιξη υπό ανάδευση. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Ψύχεται στους 45°C και προστίθενται 50 mL Egg Yolk Tellurite Emulsion (X085). Το υλικό αναμιγνύεται καλά και μοιράζεται σε τρυβλία petri.[70]. Οι τυπικές αποικίες των σταφυλόκοκκων είναι μαύρες και εμφανίζουν μία θολή ζώνη γύρω από την αποικία. Οι αποικίες του *S.aureus* εμφανίζουν μία θολή και μία εξωτερική διαυγή ζώνη γύρω από την αποικία (διπλή).[70]

Mannitol Salt Agar (Lab007)

Για την παρασκευή 1L διαλύονται 108g σε 1L απιονισμένο νερό. Ακολουθεί ανάμιξη υπό ανάδευση. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Το υλικό ψύχεται στους 45°C και μοιράζεται στα τρυβλία Petri.. Οι τυπικές αποικίες των σταφυλόκοκκων είναι λευκές/ροζ και δεν αλλάζουν το χρώμα του υποστρώματος. Οι αποικίες του *S.aureus* αλλάζουν το χρώμα του υποστρώματος σε φωτεινό κίτρινο.[76]

Beeren's Agar (Lab M Limited)

Για την καταμέτρηση και απομόνωση των στελεχών του γένους *Bifidobacterium*, χρησιμοποιείται το Beeren's Agar. Στα 1000mL εκλεκτικού υλικού, διαλύονται 42,5g Columbia Agar Base, 5g Agar με συνολική συγκέντρωση 15g άγαρ/L , 5g γλυκόζης, 0,5g υδροχλωρική κυστεΐνη, ως αναγωγικός παράγοντας και 5mL προπιονικού οξέος ως εκλεκτικός παράγοντας των μπιφιδοβακτηρίων. Αρχικά, βράζεται μέχρι διάλυσης και 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 δ/μα NaOH 1N. Το Beeren's agar δεν απαιτεί αποστείρωση σε αυτόκαυστο και πρέπει να χρησιμοποιείται εντός 48 ωρών από την παρασκευή του. Οι τυπικές αποικίες είναι λευκές και στρογγυλές.[77]

Sabouraud Dextrose Agar (Lab009)

Για την παρασκευή 1L διαλύονται 62g σε 1L απιονισμένο νερό. Ακολουθεί ανάμιξη υπό ανάδευση. Το υλικό αποστειρώνεται στους 121°C για 15 λεπτά. Το υλικό ψύχεται στους 45°C και προστίθενται 2 φιαλίδια του αντιβιοτικού Chloramphenicol (X009). Στη συνέχεια το υλικό μοιράζεται στα τρυβλία Petri.

Στα τρυβλία με θρεπτικό υλικό το SDA μελετώνται οι αποικίες των ζυμών και των μυκήτων. Άμεσα καταμετρούνται οι καφέ προς μαύρες λείες και στρογγυλές αποικίες. Οι υπόλοιπες καταμετρούνται μετά από δημιουργία υγρού παρασκευάσματος και περιγραφής της μορφολογίας, του χρώματος, του μεγέθους, της υφής και του σχήματος των αποικιών. Όσον αφορά στα είδη του γένους *Candida* μας ενδιαφέρουν οι *C.albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* και *C.krusei*.

Στον ακόλουθο πίνακα φαίνονται οι αραιώσεις που χρησιμοποιούνται για κάθε θρεπτικό υλικό:

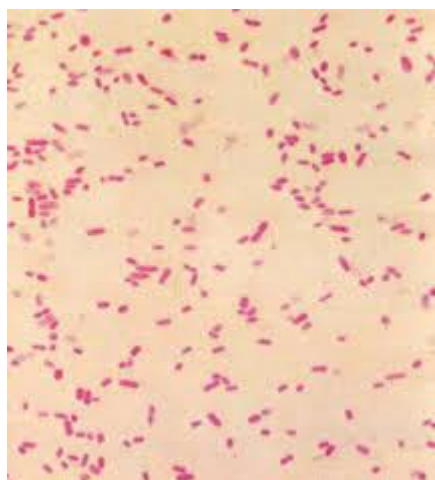
Θρεπτικό Υλικό	Αραιώσεις
CBA αναερόβια	$10^{-6}, 10^{-7}$
CBA αερόβια	$10^{-5}, 10^{-6}$
TSC	$10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-4}$
ROGOSA	$10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}$
Baird-Parker	$10^{-1}, 10^{-2}$
Slanetz Bartley	$10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-4}$
MSA	$10^{-1}, 10^{-2}$
Chromocult	$10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}$
Beerens	$10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}$
SDA	$10^{-1}, 10^{-3}$

Αφού γίνει η επιλογή και περιγραφή των τυπικών αποικιών γίνεται μικροσκοπική παρατήρηση μετά από χρώση Gram και δοκιμή καταλάσης, για την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών.

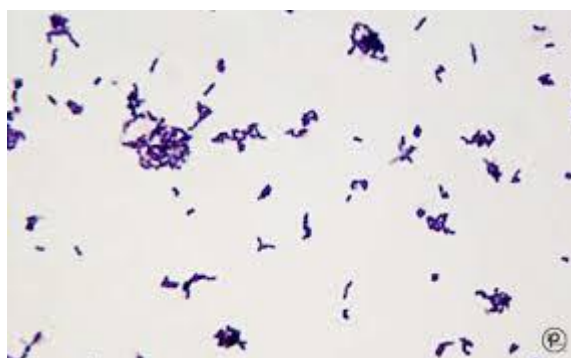
Στον πίνακα παρουσιάζονται τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων , το αποτέλεσμα της καταλάσης και της χρώσης Gram.

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ (γένος)	ΧΡΩΣΗ GRAM	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	ΚΑΤΑΛΑΣΗ
<i>Bifidobacterium</i>	ΘΕΤΙΚΗ	ΣΧΗΜΑ Υ Ή ΡΟΠΑΛΑ	ΑΡΝΗΤΙΚΗ
<i>Bacteroides</i>	ΑΡΝΗΤΙΚΗ	ΒΑΚΙΛΟΙ	ΘΕΤΙΚΗ
<i>Lactobacillus</i>	ΘΕΤΙΚΗ	ΒΑΚΙΛΟΙ	ΑΡΝΗΤΙΚΗ
<i>Clostridium</i>	ΘΕΤΙΚΗ	ΒΑΚΙΛΟΙ ΜΕ ΕΝΔΟΣΠΟΡΙΑ	ΑΡΝΗΤΙΚΗ
<i>Enterococcus</i>	ΘΕΤΙΚΗ	ΚΟΚΚΟΙ	ΑΡΝΗΤΙΚΗ
<i>Staphylococcus</i>	ΘΕΤΙΚΗ	ΚΟΚΚΟΙ	ΘΕΤΙΚΗ

Για τα γένη *Clostridium* και *Staphylococcus* γίνεται έλεγχος για την παρουσία συγκεκριμένων ειδών και συγκεκριμένα το *Clostridium perfringens* και το *Staphylococcus aureus* αντίστοιχα, μέσω της διαφοροποίησης των αποικιών όπως περιγράφονται στα αντίστοιχα υποστρώματα.



Εικόνα 9: Gram- Βακτήρια



Εικόνα 10: Gram+ Βακτήρια

9.Επεξεργασία και ανάλυση δεδομένων

Για την εκτίμηση των μικροβιακών πληθυσμών υπολογίστηκε ο μέσος όρος των δεκαδικών λογαρίθμων των πληθυσμών από τον κάθε μικροοργανισμό ανά g κοπράνων ($\log_{10}\text{cfu/g}$).

Για όλες τις συνεχείς ποσοτικές μεταβλητές υπολογίστηκε ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση και στις κατηγορικές μεταβλητές υπολογίστηκε η συχνότητα εμφάνισης

Έλεγχος κανονικότητας των συνεχών μεταβλητών έγινε με τον έλεγχο Kolmogorov-Smirnov με επίπεδο σημαντικότητας $\alpha:0,05$.

Αν οι μεταβλητές ακολουθούν την κανονική κατανομή, τότε εφαρμόστηκε παραμετρική ανάλυση (student t-test), ενώ αν δεν την ακολουθούν, χρησιμοποιήθηκε μη-παραμετρική (Mann-Whitney).

10.Αποτελέσματα

- Περιγραφικά στοιχεία

Στη συγχρονική μελέτη συμμετείχαν 10 εθελοντές ηλικίας 21-57 ετών με μέσο όρο τα 37 έτη. Ο ΔΜΣ κυμαίνεται μεταξύ 21,9-46,91 με μέσο όρο 31,14 Kg/m^2 . Από τους 10 εθελοντές οι 7 είναι άνδρες και οι 3 γυναίκες. Στη μελέτη, οι εθελοντές χωρίζονται σε 2 ομάδες. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τους φυσιολογικούς-υπέρβαρους (max BMI των υπέρβαρων 26,6 Kg/m^2) η οποία αποτελείται από 5 άνδρες ηλικίας 21-34 με μέσο όρο τα 27,6 έτη και BMI 21,9-26,6 Kg/m^2 με μέσο όρο 25,06 Kg/m^2 . Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει τους παχύσαρκους και αποτελείται από 2 άνδρες και 3 γυναίκες ηλικίας 29-57 με μέσο όρο τα 48,2 έτη και BMI 32,09-46,91 με μέσο όρο 37,2 Kg/m^2 . Το ποσοστό του λίπους στο σύνολο του δείγματος έχει μέσο όρο 28,83%, ενώ στην ομάδα των φυσιολογικών/υπέρβαρων ο μέσος όρος είναι 16,98% και στην ομάδα των παχύσαρκων 40,68%. Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται γενικά και σωματομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντών.

Πίνακας 1. Περιγραφικά χαρακτηριστικά των εθελοντών.

Χαρακτηριστικά εθελοντών	Σύνολο Δείγματος (N=10)	Φυσιολογικοί-Υπέρβαροι (N=5)	Παχύσαρκοι (N=5)
Άνδρες	7	5	2
Γυναίκες	3	0	3
Ηλικία (έτη)	37.90 ± 13.89	27.60 ± 5.59	48.20 ± 11.73
BMI(kg/m ²)	31.14 ± 7.81	25.06 ± 1.83	37.21 ± 6.45
Ποσοστό λίπους(%)	28,83 ± 15,13	16,98 ± 6,34	40,68 ± 11,13 p=0,03
Συστολική πίεση (mmHg)	122,95±6,33	123,80 ± 6,75	122,10 ± 6,54 P=0,697
Διαστολική πίεση (mmHg)	80,35 ± 8,16	76,5 ± 3,89	84,20 ± 9,88 P=0,164
Παλμοί (αριθμός/min)	70,72±13,83	64,6 ± 11,03	78,38 ± 17,40 P=0,147

N: μέγεθος ομάδων μελέτης

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

Το σύνολο του δείγματος ανέφερε ότι γεννήθηκε με φυσιολογικό τοκετό. Όλοι οι παχύσαρκοι και το 80% από την ομάδα των φυσιολογικών/υπέρβαρων δήλωσαν ότι θήλασαν. Εποχική αλλεργία δήλωσαν, ένας εθελοντής από κάθε ομάδα. Τέλος ένας εθελοντής από την ομάδα των φυσιολογικών/υπέρβαρων δήλωσε πως πάσχει από ουλίτιδα.

- Διατροφικά χαρακτηριστικά

Πίνακας 2. Τριήμερο ημερολόγιο καταγραφής τροφίμων

	Σύνολο Δείγματος (N=10)	Φυσιολογικοί-Υπέρβαροι	Παχύσαρκοι	p-value
Σύνολο προσλαμβανόμενων θερμίδων (Kcal)	2320,67 ± 527,81	2200,09 ± 623,19	2441,25 ± 449,56	0,239
Πρωτεΐνες (g)	100,25 ± 25,96	110,35 ± 29,01	90,15 ± 20,49	0,503
Πρωτεΐνες (%)	17,83 ± 4,96	20,79 ± 5,00	14,87 ± 2,93	0,052 ^b
Υδατάνθρακες (g)	241,44 ± 61,28	218,09 ± 65,08	264,79 ± 53,39	0,250
Υδατάνθρακες (%)	41,45 ± 3,54	39,63 ± 4,34	43,27 ± 1,09	0,136
Λίπος (g)	102,11 ± 33,45	96,82 ± 36,00	107,39 ± 33,94	0,646
Λίπος (%)	38,89 ± 5,97	39,00 ± 6,75	38,79 ± 5,88	0,959

Κορεσμένα λιπαρά οξέα (g)	35,69 ± 11,46	32,98 ± 11,00	38,41 ± 12,48	0,486
Μονοακόρεστα λιπαρά (g)	41,03 ± 16,97	37,66 ± 15,70	44,40 ± 19,32	0,561
Πολυακόρεστα λιπαρά (g)	13,81 ± 3,10	13,33 ± 3,37	14,29 ± 3,12	0,651
Φυτικές ίνες (g)	18,75 ± 8,03	17,01 ± 5,77	20,50 ± 10,20	0,525

^a Όλες οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± SD (τυπική απόκλιση)

^b Στατιστικά σημαντική διαφορά p=0,052

Μεταξύ των δύο ομάδων δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά σε ό,τι αφορά τις προσλαμβανόμενες θερμίδες και τα g των μακροθρεπτικών συστατικών και των φυτικών ινών. Παρατηρείται όμως στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό των πρωτεϊνών μεταξύ των δύο ομάδων (p=0,052).

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται η κατανάλωση νερού και καφέ από τους εθελοντές ημερησίως (ποτήρια/ημέρα), όπως προκύπτει από την ανάλυση των FFQ. Επίσης παρουσιάζεται και η εκτίμηση της προσήλωσης στη μεσογειακή διατροφή, όπως αυτή υπολογίζεται από το δείκτη Med diet score

Πίνακας 3. Εκτίμηση του Med Diet score και της συχνότητας κατανάλωσης νερού και καφέ.

	Σύνολο Δείγματος (N=10)	Φυσιολογικοί-Υπέρβαροι (n=5)	Παχύσαρκοι (n=5)	p-value
Med diet score	32,20 ± 3,12	31,00 ± 0,71	33,40 ± 4,22	0,275
Ποτήρια νερό/ημέρα	6,80 ± 1,74	6,80 ± 2,36	6,80 ± 1,10	1
Ποτήρια καφές/ημέρα	1,27 ± 1,34	0,82 ± 1,29	1,71 ± 1,38	0,322

- Επεξεργασία δειγμάτων κοπράνων

Καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών στα δείγματα κοπράνων των εθελοντών

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μικροβιακοί πληθυσμοί των υποχρεωτικά αναερόβιων μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν στα δείγματα των κοπράνων των εθελοντών.

Πίνακας 4. Πληθυσμοί αναερόβιων μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν στα δείγματα κοπράνων των εθελοντών

	Σύνολο δείγματος (N=10)	Φυσιολογικοί- Υπέρβαροι (N=5)	Παχύσαρκοι (N=5)	p-value
Ολικά αναερόβια	9,17 ± 0,58	8.99 ± 0.50 ^a	9.34 ± 0.66	0,384
<i>Bacteroides spp</i>	7,44 ± 1,18	8.19 ± 0.38 ^b	6.70 ± 1.29	0,056
<i>Bifidobacterium spp</i>	8,43 ± 0,89	8.11 ± 0.93	8.75 ± 0.81	0,287
<i>Lactobacillus spp</i>	6,32 ± 1,73	5.96 ± 1.75	6.69 ± 1.82	0,535
<i>Clostridium spp</i>	4,66 ± 1,47	4.81 ± 1.53	4.50 ± 1.63	0,791
<i>Clostridium perfringens</i>	3,78 ± 1,27	3.25 ± 0.58	4.32 ± 1.64	0,269

^a Όλες οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± SD (τυπική απόκλιση)

^b Σημαντική διαφορά στις δύο ομάδες p <0,05

- Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μικροβιακοί πληθυσμοί των αερόβιων και προαιρετικά αερόβιων μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν στα δείγματα των κοπράνων των εθελοντών. Παρατηρείται ότι δεν ανιχνεύτηκαν σε όλα τα δείγματα σταφυλόκοκκοι, αλλά σε 4 από τους 5 στην ομάδα των Φυσιολογικών –Υπέρβαρων (4/5) και όλοι οι παχύσαρκοι (5/5). Επιπλέον *S.aureus* ανιχνεύτηκε σε 2 από την ομάδα των Φυσιολογικών –Υπέρβαρων (2/5) και σε 4 από την ομάδα των Παχύσαρκων (4/5)

Πίνακας 5. Πληθυσμοί αερόβιων μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν στα δείγματα κοπράνων των εθελοντών.

	Σύνολο Δείγματος (N=10)	Φυσιολογικοί- Υπέρβαροι (n=5)	Παχύσαρκοι (n=5)	p-value
Ολικά αερόβια	8,17 ± 1,17	^a 7,79 ± 1,26	8,55 ± 1,06	0,331
Coliforms	6,91 ± 1,22	6,75 ± 1,08	7,08 ± 1,46	0,700
<i>E.coli</i>	6,53 ± 1,59	7,08 ± 1,46	6,32 ± 2,09	0,694
<i>Staphylococcus spp</i>	3,34 ± 0,70	^b 3,35 ± 0,68	3,34 ± 0,80	0,977
<i>S.aureus</i>	2,37 ± 0,57	2,43 ± 0,22	2,35 ± 0,73	0,894
<i>Enterococcus spp</i>	5,60 ± 2,18	5,16 ± 2,31	6,05 ± 2,20	0,549

^a Όλες οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± SD (τυπική απόκλιση)

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της διακύμανσης με συγχυτικούς παράγοντες την ηλικία και το φύλο. Καθώς στις δύο ομάδες, υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε αυτές τις μεταβλητές, εξετάστηκε η επίδρασή τους στους πληθυσμούς εκείνους που παρατηρείται σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων εθελοντών.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε two-way ANOVA και εξετάστηκε η επίδραση της ηλικίας και του φύλου στους πληθυσμούς των *Bacteroides* spp.

Πίνακας 6. Επίδραση ηλικίας και φύλου στα *Bacteroides* spp

Συγχυτικοί παράγοντες	Επίδραση	p-value
Ηλικία	-0,61	0,016
Φύλο	1,875	0,005

Παρατηρούμε πως με την επίδραση των δύο συγχυτικών παραγόντων, του φύλου και της ηλικίας, η διαφορά στους πληθυσμούς των *Bacteroides* spp παύει να είναι σημαντική.

Καθώς βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ποσοστό κατανάλωσης πρωτεϊνών μεταξύ των δύο ομάδων ($p=0,052$), ελέγχθηκε και η επίδραση του ποσοστού των πρωτεϊνών στους πληθυσμούς των *Bacteroides* spp

Πίνακας 7. Ποσοστό κατανάλωσης πρωτεϊνών και πληθυσμοί *Bacteroides* spp.

Συγχυτικοί παράγοντες	Επίδραση	p-value
% πρωτεΐνες	-0,42	0,502

- Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι μικροβιακοί πληθυσμοί των μυκήτων και ζυμών που καταμετρήθηκαν στα δείγματα των κοπράνων των εθελοντών. Στην ομάδα των Φυσιολογικών – Υπέρβαρων ανιχνεύτηκαν ζύμες σε 3/5 δείγματα και μύκητες σε 2/5 δείγματα. Αντίθετα ανιχνεύτηκαν ζύμες σε όλα τα δείγματα και μύκητες σε κανένα δείγμα της ομάδας των παχύσαρκων.

Πίνακας 8. Πληθυσμοί ευκαρυωτικών μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν στα δείγματα κοπράνων των εθελοντών.

	Σύνολο Δείγματος (N=10)	Φυσιολογικοί-Υπέρβαροι	Παχύσαρκοι	p-value
Ζύμες	3,38 ± 1,06	^a 3,05 ± 0,59	3,58 ± 1,29	0,538
Μύκητες	2,49 ± 0,79	2,50 ± 0,80	-	-

^aΌλες οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± SD (τυπική απόκλιση)

- Χαρακτηριστικά κενώσεων και γαστρεντερολογικά συμπτώματα

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται το pH και η υγρασία των κοπράνων των εθελοντών.

Πίνακας 9. pH-και υγρασία κοπράνων των εθελοντών

	Σύνολο Δείγματος (N=10)	Φυσιολογικοί-Υπέρβαροι (N=5)	Παχύσαρκοι (N=5)	p-value
pH	6,82 ± 0,46	7,04 ± 0,32	6,60 ± 0,51	0,142
Υγρασία	70,38 ± 4,93	70,60 ± 6,83	70,15 ± 2,79	0,894

Από τα επτάήμερα ημερολόγια καταγραφής των γαστρεντερολογικών συμπτωμάτων, συγκεντρώθηκαν τα κάτωθι αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 10. Γαστρεντερολογικά συμπτώματα

	Σύνολο Δείγματος (N=10)	Φυσιολογικοί- Υπέρβαροι (N=5)	Παχύσαρκοι (N=5)	p-value
Συχνότητα κενώσεων	10,50 ± 4,35	8,80 ± 3,42 ^a	12,20 ± 4,86	0,237
Επιγαστριο άλγος (τον τελευταίο μήνα)	0,89 ± 0,99	1,09 ± 1,11	0,67 ± 0,92	0,539
Κοιλιακός πόνος	2,70 ± 3,77	4,20 ± 4,96	1,20 ± 1,30	0,254
Κοιλιακή διόγκωση	3,70 ± 3,12	4,40 ± 4,03	3,00 ± 2,12	0,512
Μετεωρισμός	3,80 ± 6,08	5,20 ± 8,40	2,40 ± 2,79	0,500
Βορβορυγμοί	2,70 ± 3,68	3,60 ± 4,97	1,80 ± 1,92	0,472
Σύνολο συμπτωμάτων	12,90 ± 14,96	17,40 ± 20,94	8,40 ± 3,78	0,372
Διαρροϊκές κενώσεις ^b		4,50	6,50	0,421

^a Μέσος όρος των κενώσεων και των συμπτωμάτων 7 ημερών ± SD

^b Οι διαρροϊκές κενώσεις δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή, οπότε πραγματοποιήθηκε το Mann-Whitney U test.

Μεταξύ των δύο ομάδων δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές όσο αφορά τα γαστρεντερολογικά συμπτώματα

- Ερωτηματολόγια υγείας

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η κατάσταση της ψυχικής υγείας των εθελοντών όπως προκύπτει από τη συμπλήρωση των αντίστοιχων ερωτηματολογίων και η αξιολόγηση της γενικής υγείας από τους ίδιους.

Πίνακας 11. Ερωτηματολόγια ψυχικής υγείας (Zung, Stai) και εκτίμηση της συνολικής υγείας των εθελοντών (Eq_50).

	Σύνολο δείγματος (N=10)	Φυσιολογικοί-Υπέρβαροι	Παχύσαρκοι	p-value
Zung	33,40 ± 4,77	32,00 ± 3,53	34,80 ± 5,80	0,384
Stai	39,50 ± 6,38	39,20 ± 3,56	39,80 ± 8,87	0,892
Eq_50	78,50 ± 18,57	88,00 ± 8,36	69,00 ± 21,91	0,108

^aΌλες οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± SD (τυπική απόκλιση)

Παρατηρείται τάση για διαφορά στην κλίμακα αξιολόγησης της υγείας (Eq_50) με βαθμολογία 0-100. Φαίνεται πως η ομάδα των παχύσαρκων, τείνουν να αξιολογήσουν χειρότερα τη γενική κατάσταση της υγείας τους σε σχέση με την ομάδα των φυσιολογικών-υπέρβαρων.

Στον Πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται η εκτίμηση της φυσικής δραστηριότητας των εθελοντών και του χρόνου που έχουν καθιστική δραστηριότητα. Επίσης καταγράφονται οι ώρες ύπνου ημερησίως των εθελοντών

Πίνακας 12. Δραστηριότητα και ώρες ύπνου.

	Φυσιολογικοί-Υπέρβαροι (N=5)	Παχύσαρκοι (N=5)	p-value
Φυσική δραστηριότητα (ώρες/ημέρα)	6,40*	4,60	0,310
Καθιστική δραστηριότητα (ώρες/ημέρα)	28,70 ± 21,79	39,40 ± 16,21	0,404
Ύπνος (ώρες/ημέρα)	7,00 ± 1,83	6,80 ± 1,35	0,849

*Η φυσική δραστηριότητα δεν ακολουθεί την κανονική κατανομή, οπότε έγινε Mann-whitney Test

^aΌλες οι τιμές είναι οι μέσοι όροι ± SD (τυπική απόκλιση)

Δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων των εθελοντών ως προς τη φυσική δραστηριότητα, το χρόνο καθιστικής δραστηριότητας και των ωρών ύπνου ημερησίως.

11.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα πτυχιακή είναι μία συγχρονική μελέτη με σκοπό την αποτύπωση των χαρακτηριστικών του εντερικού μικροβιόκοσμου και των γαστρεντερικών συμπτωμάτων ενός τυχαίου δείγματος του ελληνικού πληθυσμού και τη διερεύνηση πιθανών αλληλεπιδράσεων τους με μια σειρά ανθρωπομετρικών, διατροφικών και άλλων παραμέτρων. Συνολικά συμμετείχαν 10 εθελοντές ηλικίας 21-57 με μέσο όρο τα 37 έτη και με ΔΜΣ 21,9-46,91 με μέσο όρο 31,14 Kg/m². Οι εθελοντές χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Αυτή των φυσιολογικών/υπέρβαρων και αυτή των παχύσαρκων. Από τον έλεγχο κανονικότητας φαίνεται πως η ηλικία και το φύλο δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή και για το λόγο αυτό στο τέλος της στατιστικής ανάλυσης πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση ως προς τους δύο αυτούς συγχυτικούς παράγοντες. Στατιστικά σημαντική διαφορά εμφανίζεται στο ΔΜΣ γεγονός που είναι αναμενόμενο αφού η ομαδοποίηση των εθελοντών έγινε με βάση αυτόν τον παράγοντα. Πολλές μελέτες καταδεικνύουν την πιθανή συσχέτιση στοιχείων του εντερικού μικροβιόκοσμου με την εμφάνιση παχυσαρκίας.[78]

Η μικροβιολογική ανάλυση των κοπράνων των εθελοντών έδειξε ότι ο πληθυσμός των *Bacteroides* spp είναι οριακά υψηλότερος στην ομάδα των φυσιολογικών/υπέρβαρων σε σχέση με τους παχύσαρκους ($p=0,056$). Στις περισσότερες μελέτες έχει καταμετρηθεί ο πληθυσμός των *Bacteroidetes*, που είναι πολύ μεγαλύτερη ομάδα (Φύλο) και περιλαμβάνει το γένος *Bacteroides*. Τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα και σε κάποιες υποστηρίζεται η τάση αυτή (δηλαδή υψηλότεροι πληθυσμοί στους εθελοντές με κανονικό βάρος), ενώ στοιχεία από άλλες έρευνες δείχνουν ότι ο πληθυσμός των *Bacteroidetes*, είναι οριακά αυξημένος στους παχύσαρκους.[79],[80]. Περαιτέρω ανάλυση με κανονικοποίηση των δύο συγχυτικών παραγόντων, του φύλου και της ηλικίας, έδειξε πως οι πληθυσμοί των *Bacteroides* spp δεν διαφέρουν τελικά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($p=0,175$), διότι αυτοί οι δύο παράγοντες πιθανόν επιδρούν σε μεγαλύτερο βαθμό από τον ΔΜΣ. Όσο αφορά στην επίδραση του φύλου στον πληθυσμό που εξετάστηκε, φαίνεται ότι ενισχύεται η παρουσία του *Bacteroides* spp στους άνδρες. Η επίδραση του φύλου έχει μελετηθεί από αρκετούς ερευνητές και φαίνεται ότι ανάμεσα σε παχύσαρκους άνδρες και γυναίκες ($BMI>33$) το φύλο *Bacteroidetes* είναι πιο αυξημένο στις γυναίκες.[81] Όσο αφορά στην επίδραση της ηλικίας στα επίπεδα του *Bacteroides* spp. στον πληθυσμό που εξετάσαμε, φαίνεται ότι με την αύξηση της ηλικίας μειώνονται τα επίπεδα του μικροοργανισμού, αποτέλεσμα που συμφωνεί με άλλες μελέτες.[82]

Τα αποτελέσματα των υπόλοιπων αναερόβιων πληθυσμών δεν έδειξαν κάποια διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων στη συγκεκριμένη εργασία.

Αντίθετα, σε άλλες μελέτες φαίνεται ότι τα *Clostridium* spp συνδέονται θετικά με την ανάπτυξη παχυσαρκίας και εμφάνιση του Σακχαρώδη Διαβήτη, ενώ καταμετρώνται αυξημένοι πληθυσμοί κάποιων ειδών όπως το *Cl.ramosum* σε παχύσαρκους εθελοντές.[83]

Μικροοργανισμοί που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus* σχετίζονται και με τους δύο φαινοτύπους (κανονικού βάρους και παχυσαρκίας). Σε έρευνα των Million και συνεργατών βρέθηκε πως η συχνότητα εμφάνισης πέντε ειδών λακτοβακίλλων είναι μεγαλύτερη στους παχύσαρκους εθελοντές αλλά δεν βρέθηκε κάποιο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα μετά τη γραμμική παλινδρόμηση.[84]

Οι πληθυσμοί των *Bifidobacterium* spp συνδέονται αρνητικά με τον φαινότυπο της παχυσαρκίας και φαίνεται πως σχετίζονται με προστασία από μεταβολικές διαταραχές. Το εύρημα αυτό δεν συμφωνεί με το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης όπου δεν βρέθηκε κάποια διαφορά στους πληθυσμούς των *Bifidobacterium* spp.[85]

Τα αποτελέσματα των ερευνών για τους πληθυσμούς των εντεροβακτηρίων και συγκεκριμένα του *E.coli*, είναι αντικρουόμενα. Στην έρευνα των Million και συνεργατών βρέθηκε πως η παρουσία του *E.coli* συνδέεται με την απουσία της παχυσαρκίας ($BMI < 25 \text{ Kg/m}^2$). Αντίθετα, στην έρευνα των Gao και συνεργατών όπου συγκρίθηκαν οι πληθυσμοί των *E.coli* και των *Bifidobacterium* σε φυσιολογικά και παχύσαρκα παιδιά με τη μέθοδο ποσοτικής PCR (qPCR), φάνηκε πως τα παχύσαρκα παιδιά είχαν μεγαλύτερους πληθυσμούς *E.coli* σε σχέση με τα φυσιολογικού βάρους. Οι ερευνητές υποστηρίζουν πως ο λόγος *Bifidobacterium/E.coli* (B/E) είναι πολύ σημαντικός στην ένδειξη αλλαγών στον εντερικό μικροβιόκοσμο καθώς αυτά τα δύο είδη αποτελούν φυσιολογικά μέλη του.[86] Στον πληθυσμό που εξετάστηκε στο πλαίσιο αυτής της μελέτης, δεν ανιχνεύτηκαν διαφορές σε αυτούς τους πληθυσμούς μεταξύ των ομάδων.

Όσον αφορά στη συχνότητα εμφάνισης του *S.aureus*, διαπιστώθηκε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στους παχύσαρκους εθελοντές. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με μελέτες όπου βρέθηκαν αυξημένοι πληθυσμοί σταφυλόκοκκων σε υπέρβαρες εγκυμονούσες γυναίκες σε σύγκριση με εγκυμονούσες φυσιολογικού βάρους.[87]

Μετά τη στατιστική ανάλυση των γαστρεντερικών συμπτωμάτων των εθελοντών, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται σε αντίθεση με τις περισσότερες έρευνες, που ισχυρίζονται ότι η εμφάνιση γαστρεντερικών συμπτωμάτων όπως η ναυτία, ο έμετος και ο μετεωρισμός είναι 2-4 φορές πιο έντονη στους παχύσαρκους. Πιθανόν, ο μικρός αριθμός του δείγματος, δεν επέτρεψε την ανάδειξη διαφορών μεταξύ των δύο ομάδων.[88]

Αναφορικά με την κατάσταση της υγείας των εθελοντών, η ομάδα των φυσιολογικών/υπέρβαρων τείνουν να αξιολογούν την γενική κατάσταση της υγείας τους

καλύτερα από ότι οι παχύσαρκοι ($p=0,108$) κάτι που επαληθεύεται και σε άλλες έρευνες, λόγω της ύπαρξης περισσότερων νοσημάτων που συνοδεύουν την παχυσαρκία όπως η κατάθλιψη.[89] Μετά τη διατροφική αξιολόγηση των εθελοντών δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά παρά μόνο στο ποσοστό (%) των πρωτεϊνών που προσλαμβάνουν και συγκεκριμένα, η ομάδα των φυσιολογικών καταναλώνει σχεδόν μεγαλύτερο ποσοστό καθημερινά σε σχέση με την ομάδα των παχύσαρκων ($p=0,052$).

Στην πλειοψηφία τους, τα παχύσαρκα άτομα ακολουθούν δίαιτες πλούσιες σε απλά σάκχαρα και κορεσμένα λιπαρά και οι θερμίδες που καταναλώνουν ξεπερνούν αυτές των φυσιολογικών. Στη μελέτη δεν διαπιστώθηκε σημαντική διαφορά στις καταναλισκόμενες θερμίδες γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε υπο-καταγραφή της πρόσληψης τροφής από την ομάδα των παχύσαρκων.

Τέλος, όσον αφορά στην φυσική δραστηριότητα, καθιστική και στις ώρες ύπνου, δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων.

12. Περιορισμοί

Ένας από τους κύριους περιοριστικούς παράγοντες της μελέτης αυτής ήταν ο μικρός αριθμός εθελοντών ($N=10$). Επιπλέον, η χρήση καλλιεργητικών μεθόδων ανάλυσης του εντερικού μικροβιόκοσμου περιορίζει την δυνατότητα ανίχνευσης αρκετών ομάδων μικροοργανισμών. Ο συνδυασμός αυτών των τεχνικών με μοριακές μεθόδους θα οδηγήσουν πιθανά στην εξαγωγή πιο έγκυρων αποτελεσμάτων.

Πρέπει να ληφθεί υπόψη πως το δείγμα της κένωσης είναι μέχρι ενός σημείου αντιπροσωπευτικό της κατάστασης του μικροβιόκοσμου του εντέρου και συγκεκριμένα του παχέος εντέρου. Για την απόκτηση πληροφοριών για μεγαλύτερο τμήμα του εντέρου, θα έπρεπε να γίνει βιοψία του εντέρου, διαδικασία δύσκολα πραγματοποιήσιμη και από τη μεριά των ερευνητών και από τη μεριά των εθελοντών.

13.Βιβλιογραφία

1. Sekirov, I., et al., *Gut microbiota in health and disease*. Physiol Rev, 2010. **90**(3): p. 859-904.
2. Brandl, K., et al., *Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits*. Nature, 2008. **455**(7214): p. 804-7.
3. Calcinaro, F., et al., *Oral probiotic administration induces interleukin-10 production and prevents spontaneous autoimmune diabetes in the non-obese diabetic mouse*. Diabetologia, 2005. **48**(8): p. 1565-75.
4. Nagao-Kitamoto, H., et al., *Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases*. Intest Res, 2016. **14**(2): p. 127-38.
5. Widmaier, E.P., et al., *Vander's human physiology : the mechanisms of body function*. 12th ed. 2011, New York: McGraw-Hill. 1 v. (various pagings).
6. Boron, W.F. and E.L. Boulpaep, *Medical physiology : a cellular and molecular approach*. 2nd ed. 2009, Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier. xii, 1337 p.
7. Ley, R.E., D.A. Peterson, and J.I. Gordon, *Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine*. Cell, 2006. **124**(4): p. 837-48.
8. Peterson, D.A., et al., *Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(6): p. 417-27.
9. Gill, S.R., et al., *Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome*. Science, 2006. **312**(5778): p. 1355-9.
10. Madigan, M.T., *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. 2012, San Francisco: Benjamin Cummings. xxviii, 1043, 77 p.
11. Hooper, L.V., T. Midtvedt, and J.I. Gordon, *How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine*. Annu Rev Nutr, 2002. **22**: p. 283-307.
12. Wexler, H.M., *Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(4): p. 593-621.
13. Sears, C.L., A.L. Geis, and F. Housseau, *Bacteroides fragilis subverts mucosal biology: from symbiont to colon carcinogenesis*. J Clin Invest, 2014. **124**(10): p. 4166-72.
14. Duncan, S.H., et al., *Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(4): p. 1073-8.
15. Bottacini, F., et al., *Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria*. Microb Cell Fact, 2014. **13 Suppl 1**: p. S4.
16. Tojo, R., et al., *Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(41): p. 15163-76.
17. Turroni, F., et al., *Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36957.
18. Liu, S., et al., *Starch and starch hydrolysates are favorable carbon sources for bifidobacteria in the human gut*. BMC Microbiol, 2015. **15**: p. 54.
19. Janer, C., et al., *Hydrolysis of oligofructoses by the recombinant beta-fructofuranosidase from Bifidobacterium lactis*. Syst Appl Microbiol, 2004. **27**(3): p. 279-85.
20. Pokusaeva, K., G.F. Fitzgerald, and D. van Sinderen, *Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria*. Genes Nutr, 2011. **6**(3): p. 285-306.
21. Heinritz, S.N., et al., *Impact of a High-Fat or High-Fiber Diet on Intestinal Microbiota and Metabolic Markers in a Pig Model*. Nutrients, 2016. **8**(5).

22. Kristensen, N.B., et al., *Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials*. *Genome Med*, 2016. **8**(1): p. 52.
23. Heilig, H.G., et al., *Molecular diversity of Lactobacillus spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA*. *Appl Environ Microbiol*, 2002. **68**(1): p. 114-23.
24. Agus, A., et al., *Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive E. coli infection and intestinal inflammation*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 19032.
25. Hooper, L.V., D.R. Littman, and A.J. Macpherson, *Interactions between the microbiota and the immune system*. *Science*, 2012. **336**(6086): p. 1268-73.
26. Jandhyala, S.M., et al., *Role of the normal gut microbiota*. *World J Gastroenterol*, 2015. **21**(29): p. 8787-803.
27. Comalada, M., J. Lloberas, and A. Celada, *MKP-1: a critical phosphatase in the biology of macrophages controlling the switch between proliferation and activation*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(8): p. 1938-48.
28. Gronlund, M.M., et al., *Influence of mother's intestinal microbiota on gut colonization in the infant*. *Gut Microbes*, 2011. **2**(4): p. 227-33.
29. Sanz, Y., I. Nadal, and E. Sanchez, *Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections*. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2007. **2**(2): p. 148-56.
30. Salzman, N.H., M.A. Underwood, and C.L. Bevins, *Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa*. *Semin Immunol*, 2007. **19**(2): p. 70-83.
31. Hooper, L.V., *Do symbiotic bacteria subvert host immunity?* *Nat Rev Microbiol*, 2009. **7**(5): p. 367-74.
32. Duncan, S.H., P. Louis, and H.J. Flint, *Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product*. *Appl Environ Microbiol*, 2004. **70**(10): p. 5810-7.
33. Bourriaud, C., et al., *Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident*. *J Appl Microbiol*, 2005. **99**(1): p. 201-12.
34. Boulange, C.L., et al., *Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease*. *Genome Med*, 2016. **8**(1): p. 42.
35. Sanchez, M., S. Panahi, and A. Tremblay, *Childhood obesity: a role for gut microbiota?* *Int J Environ Res Public Health*, 2015. **12**(1): p. 162-75.
36. Grant, R.W. and V.D. Dixit, *Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 50.
37. Cao, Z.J., et al., *[Research advances in the gut microbiota and inflammation in obesity]*. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2013. **35**(4): p. 462-5.
38. Ferrocino, I., et al., *Fecal Microbiota in Healthy Subjects Following Omnivore, Vegetarian and Vegan Diets: Culturable Populations and rRNA DGGE Profiling*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0128669.
39. Graf, D., et al., *Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota*. *Microb Ecol Health Dis*, 2015. **26**: p. 26164.
40. De Filippo, C., et al., *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(33): p. 14691-6.
41. Russell, W.R., et al., *High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health*. *Am J Clin Nutr*, 2011. **93**(5): p. 1062-72.

42. de Wit, N., et al., *Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **303**(5): p. G589-99.
43. Fava, F., et al., *The type and quantity of dietary fat and carbohydrate alter faecal microbiome and short-chain fatty acid excretion in a metabolic syndrome 'at-risk' population*. Int J Obes (Lond), 2013. **37**(2): p. 216-23.
44. Redondo-Lopez, V., R.L. Cook, and J.D. Sobel, *Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora*. Rev Infect Dis, 1990. **12**(5): p. 856-72.
45. Mandar, R. and M. Mikelsaar, *Transmission of mother's microflora to the newborn at birth*. Biol Neonate, 1996. **69**(1): p. 30-5.
46. Voreades, N., A. Kozil, and T.L. Weir, *Diet and the development of the human intestinal microbiome*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 494.
47. Modi, S.R., J.J. Collins, and D.A. Relman, *Antibiotics and the gut microbiota*. J Clin Invest, 2014. **124**(10): p. 4212-8.
48. Baothman, O.A., et al., *The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes*. Lipids Health Dis, 2016. **15**: p. 108.
49. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
50. Samuel, B.S., et al., *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, 2008. **105**(43): p. 16767-72.
51. Woting, A. and M. Blaut, *The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease*. Nutrients, 2016. **8**(4).
52. Ang, Z. and J.L. Ding, *GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation - Protective or Causative?* Front Immunol, 2016. **7**: p. 28.
53. Fried, S.K., D.A. Bunkin, and A.S. Greenberg, *Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(3): p. 847-50.
54. Cani, P.D., et al., *Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity*. Gut Microbes, 2012. **3**(4): p. 279-88.
55. Lau, E., et al., *Beyond gut microbiota: understanding obesity and type 2 diabetes*. Hormones (Athens), 2015. **14**(3): p. 358-69.
56. Backhed, F., et al., *Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 979-84.
57. Backhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15718-23.
58. Kobylak, N., O. Virchenko, and T. Falalyeyeva, *Pathophysiological role of host microbiota in the development of obesity*. Nutr J, 2016. **15**: p. 43.
59. Muccioli, G.G., et al., *The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis*. Mol Syst Biol, 2010. **6**: p. 392.
60. Parseus, A., et al., *Microbiota-induced obesity requires farnesoid X receptor*. Gut, 2016.
61. Pitsavos, C., et al., *Association of leisure-time physical activity on inflammation markers (C-reactive protein, white cell blood count, serum amyloid A, and fibrinogen) in healthy subjects (from the ATTICA study)*. Am J Cardiol, 2003. **91**(3): p. 368-70.
62. Lee, P.H., et al., *Validity of the International Physical Activity Questionnaire Short Form (IPAQ-SF): a systematic review*. Int J Behav Nutr Phys Act, 2011. **8**: p. 115.
63. Feightner, J.W. and G. Worrall, *Early detection of depression by primary care physicians*. CMAJ, 1990. **142**(11): p. 1215-20.

64. Julian, L.J., *Measures of anxiety: State-Trait Anxiety Inventory (STAI), Beck Anxiety Inventory (BAI), and Hospital Anxiety and Depression Scale-Anxiety (HADS-A)*. Arthritis Care Res (Hoboken), 2011. **63 Suppl 11**: p. S467-72.
65. Willett, W.C., *Invited commentary: comparison of food frequency questionnaires*. Am J Epidemiol, 1998. **148**(12): p. 1157-9; discussion 1162-5.
66. Georgousopoulou, E.N., et al., *Assessment of diet quality improves the classification ability of cardiovascular risk score in predicting future events: The 10-year follow-up of the ATTICA study (2002-2012)*. Eur J Prev Cardiol, 2015. **22**(11): p. 1488-98.
67. Bovenschen, H.J., et al., *Evaluation of a gastrointestinal symptoms questionnaire*. Dig Dis Sci, 2006. **51**(9): p. 1509-15.
68. Kajander, K., et al., *A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **22**(5): p. 387-94.
69. Lewis, S.J. and K.W. Heaton, *Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time*. Scand J Gastroenterol, 1997. **32**(9): p. 920-4.
70. Geissler, K., et al., *Quantitative determination of total coliforms and Escherichia coli in marine waters with chromogenic and fluorogenic media*. J Appl Microbiol, 2000. **88**(2): p. 280-5.
71. Araujo, M., et al., *Enumeration of Clostridium perfringens spores in groundwater samples: comparison of six culture media*. J Microbiol Methods, 2004. **57**(2): p. 175-80.
72. Ellner, P.D., et al., *A new culture medium for medical bacteriology*. Am J Clin Pathol, 1966. **45**(4): p. 502-4.
73. Rogosa, M., J.A. Mitchell, and R.F. Wiseman, *A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli*. J Bacteriol, 1951. **62**(1): p. 132-3.
74. Slanetz, L.W. and C.H. Bartley, *Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium*. J Bacteriol, 1957. **74**(5): p. 591-5.
75. Cadogan-Cowper, G. and R.G. Wilkinson, *Anaerobic bacteriology. Isolation and identification of Bacteroides and Fusobacterium from human sources*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1974. **52**(6): p. 897-908.
76. Blair, E.B., J.S. Emerson, and A.H. Tull, *A new medium, salt mannitol plasma agar, for the isolation of Staphylococcus aureus*. Am J Clin Pathol, 1967. **47**(1): p. 30-9.
77. Beerens, H., *Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent*. Appl Environ Microbiol, 1991. **57**(8): p. 2418-9.
78. Dugas, L.R., et al., *The obese gut microbiome across the epidemiologic transition*. Emerg Themes Epidemiol, 2016. **13**: p. 2.
79. Duncan, S.H., et al., *Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss*. Int J Obes (Lond), 2008. **32**(11): p. 1720-4.
80. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
81. Haro, C., et al., *Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index*. PLoS One, 2016. **11**(5): p. e0154090.
82. Woodmansey, E.J., *Intestinal bacteria and ageing*. J Appl Microbiol, 2007. **102**(5): p. 1178-86.
83. Le Chatelier, E., et al., *Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers*. Nature, 2013. **500**(7464): p. 541-6.
84. Million, M., et al., *Correlation between body mass index and gut concentrations of Lactobacillus reuteri, Bifidobacterium animalis, Methanobrevibacter smithii and Escherichia coli*. Int J Obes (Lond), 2013. **37**(11): p. 1460-6.

85. Wu, X., et al., *Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes*. Curr Microbiol, 2010. **61**(1): p. 69-78.
86. Gao, X., et al., *Obesity in school-aged children and its correlation with gut E.coli and Bifidobacteria: a case-control study*. BMC Pediatr, 2015. **15**: p. 64.
87. Collado, M.C., et al., *Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women*. Am J Clin Nutr, 2008. **88**(4): p. 894-9.
88. Crowell, M.D., L.J. Cheskin, and F. Musial, *Prevalence of gastrointestinal symptoms in obese and normal weight binge eaters*. Am J Gastroenterol, 1994. **89**(3): p. 387-91.
89. Rothberg, A.E., et al., *The impact of weight loss on health-related quality-of-life: implications for cost-effectiveness analyses*. Qual Life Res, 2014. **23**(4): p. 1371-6.