



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΤΡΟΦΗ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΑΣΚΗΣΗ

**Βιολογική δράση μεταβολιτών των φαινολικών ενώσεων κρασιού από τον
εντερικό μικροβιόκοσμο**
Διπλωματική Εργασία



ΚΑΡΡΑ ΔΗΜΗΤΡΑ

Αθήνα, 2018



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ- ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΤΡΟΦΗ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΑΣΚΗΣΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ελισάβετ Φραγκοπούλου (Επιβλέπουσα)

Αδαμαντίνη Κυριακού

Σμαραγδή Αντωνοπούλου

Εγώ η Δήμητρα Καρρά

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να απευθύνω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσά μου κα. Ελισάβετ Φραγκοπούλου για την ανάθεση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας. Η καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, η αμέριστη συμπαράσταση που μου έδειξε όλο αυτό το διάστημα της συγγραφής, αλλά και οι πολύτιμες συμβουλές της ήταν καταλυτικές για την εκπόνηση αυτής της μελέτης.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο πρόσωπο της κας Α. Κυριακού, για την πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγηση που προσέφερε σε αυτή μου την προσπάθεια. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να αποδώσω στην Ε. Μήτσου, που με την πείρα και την υπομονή της με βοήθησε να υλοποιήσω αυτή την εργασία. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μητέρα μου Μ. Καρρά και το σύζυγό μου Γ. Μποτώνη για την αμέριστη συμπαράστασή τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη στα Ελληνικά.....	7
Περίληψη στα Αγγλικά.....	8
Κατάλογος Εικόνων.....	9
Κατάλογος Πινάκων.....	10
Συντομογραφίες.....	11

Κεφάλαιο 1: Το κρασί και οι βιολογικές του δράσεις

1.1	Περί οίνου.....	13
1.1.1	Ιστορική αναδρομή.....	13
1.1.2	Οινοποιία.....	14
1.1.3	Οινοποίηση για Λευκά και Ερυθρά κρασιά.....	15
1.2	Επιδημιολογικές μελέτες - Γαλλικό παράδοξο.....	19
1.3	Σύσταση κρασιού.....	21
1.4	Βιολογικές δράσεις κρασιού.....	23

Κεφάλαιο 2: Εντερικός μικροβιόκοσμος

2.1	Γενικά.....	28
2.2	Σημαντικοί μικροοργανισμοί του εντερικού μικροβιόκοσμου.....	31
2.3	Κύριες λειτουργίες.....	34
2.3.1	Ευεργετικές λειτουργίες.....	34
2.3.2	Επιβλαβείς λειτουργίες.....	36
2.4	Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο.....	38
2.5	Προβιοτικά και πρεβιοτικά.....	42
2.6	Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου.....	45
2.7	Παχυσαρκία και εντερικός μικροβιόκοσμος.....	47

Κεφάλαιο 3: Κρασί και εντερικός μικροβιόκοσμος

3.1	In vino μελέτες.....	52
3.2	In vitro μελέτες.....	53
3.3	Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης.....	56

Κεφάλαιο 4: Σκοπός - αντικείμενο μελέτης.....	59
Κεφάλαιο 5: Μεθοδολογία	
5.1	Εθελοντές –Κριτήρια επιλογής..... 60
5.2	Εκχύλιση ολικών λιποειδών κατά Blight-Dyer..... 60
5.3	Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών σε εκχυλίσματα κρασιού..... 62
5.4	Πιλοτικά πειράματα..... 62
5.5	Πρωτόκολλο in vitro ζύμωσης με κόπρανα 68
5.6	Επεξεργασία δειγμάτων..... 71
5.7	Προσδιορισμός SCFAs..... 71
5.8	Στατιστική ανάλυση.....72
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα	
6.1	Αποτελέσματα από εκχύλιση κρασιού.....72
6.2	Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών σε εκχύλισμα κρασιού.....72
6.3	In vitro ζυμώσεις με εντερικό μικροβιόκοσμο..... 73
	6.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά εθελοντών..... 73
	6.3.2 1ο πιλοτικό πείραμα..... 73
	6.3.3 2ο πιλοτικό πείραμα..... 75
6.4	Επίδραση των φαινολικών συστατικών και του κρασιού στα επίπεδα των SCFAs..... 77
Κεφάλαιο 7: Συζήτηση.....	92
Βιβλιογραφία.....	100

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το κόκκινο κρασί έχει μελετηθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια και τα αποτελέσματα από πληθώρα μελετών οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μέτρια κατανάλωση κρασιού έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία. Αυτό θεωρείται ότι οφείλεται στην ύπαρξη μικροσυστατικών, όπως οι φαινολικές ενώσεις με αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική δράση. Οι φαινολικές ενώσεις είναι συστατικά του κρασιού πολύ μεγάλης σημασίας, αφού είναι αυτά που καθορίζουν τη γεύση, το άρωμα και τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες καθώς επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο (gut microbiota).

Ο όρος gut microbiota αναφέρεται στους μικροοργανισμούς που διαβιούν στη γαστρεντερική περιοχή ενός ατόμου. Η «δυσβίωση», δηλαδή η μη αρμονική διαβίωση ανάμεσα στους μικροοργανισμούς, σχετίζεται με διάφορες διαταραχές του οργανισμού. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος ευθύνεται για τη διάσπαση των αρχικών πολυφαινολικών δομών, σε χαμηλού μοριακού βάρους φαινολικούς μεταβολίτες που όταν απορροφηθούν είναι υπεύθυνοι για τις επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία.

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής διατριβής είναι η διερεύνηση της επίδρασης της *in vitro* ζύμωσης των φαινολικών ενώσεων κρασιού στον εντερικό μικροβιόκοσμο και πιο συγκεκριμένα στα κύρια μεταβολικά προϊόντα του, τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs).

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε εκχύλιση Blight Dyer του κρασιού και παραλαβή του υδατικού κλάσματος (W) και των ολικών λιποειδών (TL). Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν δείγματα κοπράνων από 6 υγιείς εθελοντές ως εμβόλιο για την *in vitro* ζύμωση των εκχυλισμάτων του κρασιού, κάποιων πρότυπων φαινολικών ενώσεων και της ινουλίνης (θετικός πρεβιοτικός μάρτυρας) για 0, 6 και 24 ώρες. Στο τέλος μετρήθηκαν τα επίπεδα των SCFAs. Οι εθελοντές ήταν ηλικίας 25-40 ετών, οι 3 ήταν φυσιολογικού βάρους (BMI =19-25) και οι 3 ήταν παχύσαρκοι (BMI >30).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ινουλίνη αυξάνει τα επίπεδα του οξικού και του βουτυρικού οξέος. Το υδατικό εκχύλισμα αύξησε τα επίπεδα του οξικού και του βουτυρικού οξέος και τα ολικά λιποειδή του βουτυρικού οξέος. Οι παχύσαρκοι εθελοντές είχαν μεγαλύτερα επίπεδα SCFAs από τους νορμοβαρείς και οι επιμέρους φαινολικές ενώσεις δε φαίνεται να έχουν κάποια επίδραση στα επίπεδα των SCFAs. Αυτό υποδηλώνει ότι πιθανώς να υπάρχει μια συνεργιστική δράση των μικροσυστατικών του κρασιού σε αυτά τα εκχυλίσματα.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι τα εκχυλίσματα του κρασιού μπορούν να τροποποιήσουν τα επίπεδα των SCFAs επηρεάζοντας την υγεία του οργανισμού.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

Κρασί, εντερικός μικροβιόκοσμος, λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, φαινολικές ενώσεις, μεταβολίτες

ABSTRACT

Red wine has been studied over the last few years, and results from plenty of studies suggest that moderate wine consumption has beneficial health effects. This probably happens due to the presence of micro-constituents, such as phenolic compounds with antioxidant, anti-inflammatory and antithrombotic effects. Phenolic compounds are very important ingredients of wine, since they determine their taste, aroma and antimicrobial properties as they affect gut microbiota.

The term gut microbiota refers to microorganisms living in a person's gastrointestinal area. "Dysbiosis", is the non-harmonious living between microorganisms and is associated with various disorders of the organism. Gut microbiota is responsible for the breakdown of the initial polyphenolic structures in low molecular weight phenolic metabolites which, when absorbed, are responsible for the effects on human health.

The aim of the present research is to investigate the effect of the in vitro fermentation of wine phenolic compounds on gut microbiota and more specifically on its main metabolic products, the short chain fatty acids (SCFAs).

For this purpose, we did Blight Dyer extraction to the wine and we collected the aqueous fraction (W) and total lipids (TL). The wine extracts, as well as standard phenolic compounds and the inulin (positive control prebiotic), were in vitro fermented by the gut microbiota of healthy volunteers, for 0, 6 and 24 hours. In order to prepare the inoculum for the in vitro fermentation we collected faecal samples from 6 healthy volunteers (25-40 years old), 3 of normal weight (BMI = 19-25) and 3 obese (BMI > 30.) The levels of short chain fatty acids (SCFAs) were measured, at the end of fermentation.

The results showed that inulin increases the levels of acetate and butyric acid. The aqueous extract increased levels of acetic and butyric acid and total lipids increased levels of butyric acid. Obese volunteers had higher levels of SCFAs than the normal weight volunteers and the individual phenolic compounds did not appear to have any effect on SCFAs levels. This suggests that there may be a synergistic effect of the micro-constituents of the wine on these extracts.

In conclusion, it appears that wine extracts can modify SCFAs levels by affecting the health of the host.

KEYWORDS

Wine, polyphenols, gut microbiota, metabolites

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση του ανθρώπινου εντερικού μικροβιόκοσμου, με ιδιαίτερη έμφαση στη διατροφή.....σ.39

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίν.1: Βασικά συστατικά κρασιού	σ. 21
Πίν.2: Πολυφαινόλες στο κόκκινο κρασί	σ. 26
Πίν.3: Φύλα βακτηρίων με παραδείγματα βακτηρίων σε επίπεδο γένους που αποικίζουν τον άνθρωπο	σ.33
Πίν.4: Βάρη ουροσυλλεκτών και κρασιού	σ.61
Πίν.5: Αραιώσεις διαλυμάτων για PBS	σ.63
Πίν.6: Καταμέτρηση ολικού μεσόφιλου μικροβιακού φορτίου. Οι πληθυσμοί εκφράζονται ως log ₁₀ CFU/ml κοπράνων (μ.ό±SD).....	σ.74
Πίν.7: Καταγραφή αποικιών μικροοργανισμών. Οι πληθυσμοί εκφράζονται ως log ₁₀ CFU/ml κοπράνων (μ.ό±SD).....	σ.76
Πίν.8: Χαρακτηριστικά των εθελοντών	σ.73
Πίν.9: Απόλυτες τιμές των SCFAs κατά τη διάρκεια της <i>in vitro</i> ζύμωσης με εντερικό μικροβιόκοσμο των δειγμάτων, στο σύνολο των εθελοντών (n=6).....	σ.78
Πίν.10: Αναλογίες (%) των επιμέρους SCFAs στο σύνολο των λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της <i>in vitro</i> ζύμωσης με εντερικό μικροβιόκοσμο των δειγμάτων, στο σύνολο των εθελοντών (n=6)	σ.80
Πίν.11: Απόλυτες τιμές των SCFAs στα δείγματα κοπράνων των δύο ομάδων εθελοντών (κανονικού βάρους και παχύσαρκοι).....	σ.83
Πίν.12: Απόλυτες τιμές των SCFAs κατά τη διάρκεια της <i>in vitro</i> ζύμωσης με εντερικό μικροβιόκοσμο των δειγμάτων, στους εθελοντές κανονικού βάρους (n=3).....	σ.84
Πίν.13: Αναλογίες (%) των επιμέρους SCFAs στο σύνολο των λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της <i>in vitro</i> ζύμωσης με εντερικό μικροβιόκοσμο των δειγμάτων, στους εθελοντές κανονικού βάρους (n=3)	σ.85
Πίν.14: Απόλυτες τιμές των SCFAs κατά τη διάρκεια της <i>in vitro</i> ζύμωσης με εντερικό μικροβιόκοσμο των δειγμάτων, στους παχύσαρκους εθελοντές (n=3).....	σ.89
Πίν.15: Αναλογίες (%) των επιμέρους SCFAs στο σύνολο των λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της <i>in vitro</i> ζύμωσης με εντερικό μικροβιόκοσμο των δειγμάτων, στους παχύσαρκους εθελοντές (n=3)	σ.90

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχ.1: Πορεία οινοποίησης λευκών κρασιών	σ.17
Σχ.2: Πορεία οινοποίησης κόκκινων κρασιών	σ.18
Σχ.3: Χημικές δομές πολυφαινόλων	σ.27
Σχ.4: Ο μικροβιόκοσμος του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα.....	σ.30
Σχ.5: Διάγραμμα απορρόφησης γαλλικού οξέος.....	σ.72
Σχ.6 Σχήμα 6: Καταμέτρηση μικροοργανισμών μετά από ζύμωση 6h στις 48 ώρες επώασης.....	σ.74

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AAD	Διάρροια που σχετίζεται με αντιβιοτικά
ALD	Αλκοολική ηπατοπάθεια
BCFAs	Λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλύσου
BM	Basal medium
BMI	Δείκτης μάζας σώματος
CFU	Βιώσιμες αναπαραγωγικές μονάδες
CVD	Καρδιαγγειακά νοσήματα
DMSO	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
FISH	Φθορίζουσα in situ υβριδοποίηση
FOS	Φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες
GA	Γαλλικό οξύ
GALT	Λεμφικός ιστός του εντέρου
GLP-1	Γλυκαγονόμορφο πεπτίδιο 1
GPR41	Υποδοχέας G-protein-coupled 41
GPR43	Υποδοχέας G-protein-coupled 43
HDL	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
HO-1	Οξυγενάση-1
H ₂ O ₂	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
IBD	Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου
IGN	Εντερική γλυκονεογένεση
INU	Ινουλίνη
INU1	1 ^ο Πιλοτικό πείραμα
INU2	2 ^ο Πιλοτικό πείραμα
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LPL	Λιποπρωτεϊνική λιπάση
LPS	Λιποπολυσακχαρίτες
MB	Μοριακό βάρος
NALP ₃	NACHT, LRR and PYD (κρυοπυρίνη)
NC	Δείγμα αναφοράς
NO	Μονοξείδιο του αζώτου
Nrf ₂	Μεταγραφικός παράγοντας
PAF	Παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
PYY	Πεπτίδιο τυροσίνης
RESV	Ρεσβερατρόλη
SCFAs	Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου
TL	Ολικά λιποειδή
QUERC	Κερσετίνη
VFAs	Volatile Fatty Acids
W	Υδατική φάση κρασιού

1.1 Περί οίνου

Το κρασί είναι οινοπνευματώδες ποτό προϊόν της ζύμωσης των σταφυλιών ή του χυμού τους (μούστος). Ποτά παρεμφερή του κρασιού παράγονται επίσης από άλλα φρούτα ή άνθη ή σπόρους, αλλά η λέξη κρασί από μόνη της σημαίνει πάντα κρασί από σταφύλια.

Το κρασί είναι ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον ποτό για πολλούς λόγους. Αφενός είναι ένα από τα πιο δημοφιλή ποτά που μπορεί να συνοδεύσει ένα ευρύ φάσμα ευρωπαϊκών και μεσογειακών γεύσεων και αφετέρου αποτελεί σημαντικό γεωργικό προϊόν που αποτυπώνει την ποικιλία του εδάφους ενός τόπου.

1.1.1 Ιστορική αναδρομή

Το αμπέλι, από το οποίο προέρχεται το κρασί έχει σύμφωνα με τους παλαιοντολόγους, προϊστορία πολλών εκατομμυρίων ετών. Απολιθωμένα κλήματα ηλικίας 60 εκατομμυρίων ετών αποτελούν την αρχαιότερη επιστημονική απόδειξη της ηλικίας της αμπέλου. Στην πορεία των χρόνων, διάφοροι πληθυσμοί άγριων αμπέλων μετακινήθηκαν προς θερμότερες ζώνες, κυρίως προς την ευρύτερη περιοχή του νοτίου Καυκάσου. Στην περιοχή αυτή, μεταξύ Ευξείνου Πόντου, Κασπίας θάλασσας και Μεσοποταμίας, γεννήθηκε το είδος Άμπελος η οινοφόρος (λατ. *Vitis vinifera*). Οι διαφορετικές ποικιλίες αυτού του είδους καλλιεργούνται και σήμερα. Η διαδικασία της αμπελοργίας χρονολογείται γύρω στο 5.000 π.Χ. Από τους πρώτους γνωστούς αμπελοκαλλιεργητές θεωρούνται οι αρχαίοι Πέρσες, οι Σημιτικοί λαοί και οι Ασσύριοι. Με τα χρόνια οι γνώσεις αμπελοργίας και οινοποιίας μεταφέρθηκαν στην Αίγυπτο, στη Φοινίκη, στη Μ. Ασία και στον Ελλαδικό χώρο.

Οι Αρχαίοι Έλληνες έπιναν το κρασί αναμειγνύοντάς το με νερό, σε αναλογία συνήθως 1:3 (ένα μέρος οίνου προς τρία μέρη νερού). Η λέξη "κρασί" υποδηλώνει ακριβώς τον αναμειγμένο με νερό οίνο, ενώ "άκρατος" λεγόταν ο ανόθευτος οίνος. Διέθεταν ειδικά σκεύη τόσο για την ανάμειξη (κρατήρες) όσο και για τη ψύξη του. Η πόση κρασιού που δεν είχε αναμειχθεί με νερό ("άκρατος οίνος") θεωρείτο βαρβαρότητα και συνηθιζόταν μόνο από αρρώστους ή κατά τη

διάρκεια ταξιδιών ως τονωτικό. Διαδεδομένη ήταν ακόμα η κατανάλωση κρασιού με μέλι καθώς και η χρήση μυρωδικών.

Ο τρόπος παραγωγής του κρασιού σε παλαιότερες εποχές δε διέφερε ουσιαστικά από τις σύγχρονες πρακτικές. Οι Έλληνες γνώριζαν την παλαίωση του κρασιού, την οποία επιτύγχαναν μέσα σε θαμμένα πιθάρια, σφραγισμένα με γύψο και ρετσίνα. Το κρασί εμφιαλωνόταν σε ασκούς ή σε σφραγισμένους πήλινους αμφορείς, αλειμμένους με πίσσα για να μένουν στεγανοί. Στο Βυζάντιο, οι μεγαλύτερες εκτάσεις γης ανήκαν στην εκκλησιαστική περιουσία και οι μοναχοί επωμίστηκαν την καλλιέργεια των αμπελιών καθώς και την παραγωγή του κρασιού. Αυτή την περίοδο μάλιστα πρέπει να εγκαταλείφθηκε και η πρακτική της ανάμειξης του κρασιού με νερό. Στη Δύση, την ίδια περίοδο, η τέχνη του κρασιού γνώρισε μεγάλη ανάπτυξη. Το 16ο αιώνα είχε εξαπλωθεί στην Ισπανία αλλά και στη Γαλλία. Την εποχή αυτή προωθούνται και αρκετές τεχνικές καινοτομίες, όπως η χρήση γυάλινης φιάλης και φελλού. Επιπλέον γίνεται γνωστή η παρασκευή αφρώδους οίνου (όπως για παράδειγμα η σαμπάνια, που αποδίδεται στον Γάλλο βενεδικτίνo μοναχό Περινιόν).

1.1.2 Οινοποιία

Το κρασί ταξινομείται σε κόκκινο, λευκό και ροζέ, βασισμένο στο χρώμα, στην γλυκύτητα, στην περιεκτικότητα του σε αλκοόλ και διοξείδιο του άνθρακα, στο χρώμα, στην ποικιλία αμπελιών, στη ζύμωση, στη διαδικασία ωρίμανσης και στην γεωγραφική καταγωγή. Τα κόκκινα κρασιά παράγονται από την αλκοολική ζύμωση σκούρου κόκκινου ή μαύρου σταφυλιού.

Η κύρια διαφορά μεταξύ κόκκινων και λευκών κρασιών είναι ότι στα κόκκινα η ζύμωση γίνεται παρουσία των σταφυλιών, συμπεριλαμβανομένου του «δέρματός» τους. Η φλοίδα (δέρμα) προσθέτει χρώμα και γεύση στους ερυθρούς οίνους και αυτός είναι και ο λόγος για τον οποίο έχουν πιο πλούσια γεύση. Αυτό οφείλεται στα φυσικά συστατικά που βρίσκονται στο «δέρμα» των σταφυλιών, δηλαδή στις τανίνες. Αντιθέτως, τα λευκά κρασιά παράγονται αποκλειστικώς από την ζύμωση του χυμού του σταφυλιού.

Στην οινοποίηση, στη μετατροπή δηλαδή του μούστου σε κρασί, κυρίαρχο ρόλο παίζει η αλκοολική ζύμωση. Το οινόπνευμα που περιέχει το κρασί παράγεται από σάκχαρα τα του μούστου με την αντίδραση της αλκοολικής ζύμωσης. Η διαδικασία της ζύμωσης διαρκεί συνήθως 8-25 μέρες. Ο χρόνος της ζύμωσης είναι καθοριστικός για το κρασί που θα παραχθεί τελικά. Επιπλέον γίνεται συνήθως λόγος για λευκή και ερυθρή οινοποίηση, ανάλογα με το

χρώμα του παραγόμενου κρασιού. (Guyon F, Effects of must concentration techniques on wine isotopic parameters, 2006)

1.1.3 Οινοποίηση για Λευκά και Ερυθρά Κρασιά

Η διαδικασία ξεκινάει με πολύ προσεκτική μεταφορά των σταφυλιών στο οινοποιείο. Τα σταφύλια πρέπει να μεταφέρονται όσον το δυνατόν ασφαλέστερα και συντομότερα ώστε να αποφευχθούν οι αρνητικές επιπτώσεις της εκχύλισης και οξείδωσης. Ξεχωρίζεται το κοτσάνι (τσάμπουρο) από την ρόγα του σταφυλιού στο εκραγιστήριο. Τα σταφύλια μετά τον απορραγισμό οδηγούνται στο πιεστήριο με τη βοήθεια ειδικής αντλίας. Υπάρχουν 2 ειδών πιεστήρια, τα «ασυνεχή» και τα «πνευματικά». Από εκεί παραλαμβάνεται ο μούστος (γλεύκος) με διαδοχικές συμπίεσεις.

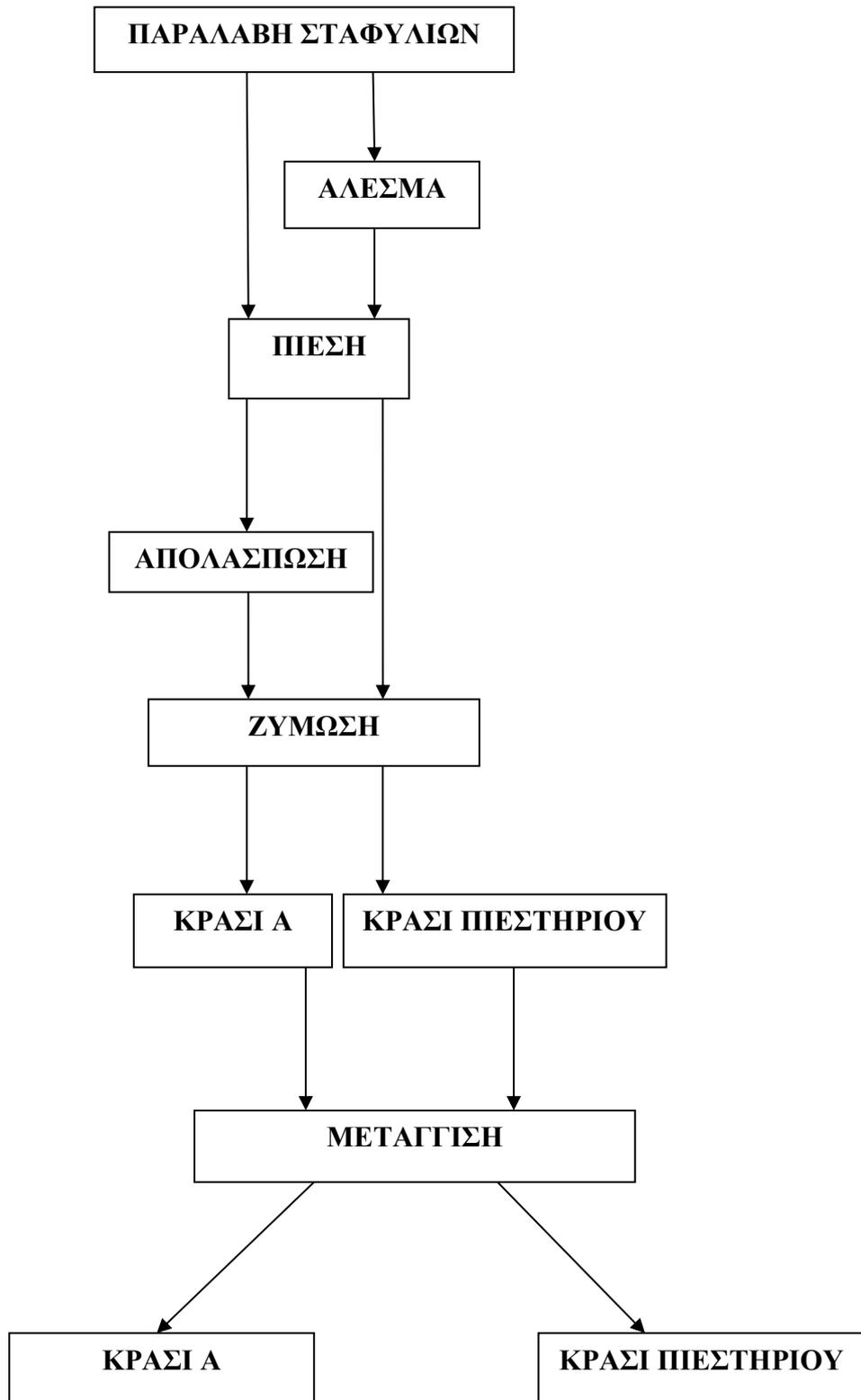
Μετά τις πρώτες πιέσεις παίρνουμε και την καλύτερη ποιότητα γλεύκους (πρόρρογος). Αυτό συμβαίνει διότι το γλεύκος των πρώτων πιέσεων περιέχει λιγότερες τανίνες, που σε μεγάλη συγκέντρωση δίνουν έντονο χρώμα και πολύ στυφή γεύση, κάτι που δεν είναι καθόλου επιθυμητό σε ένα λευκό κρασί. Μετά το πιεστήριο, το γλεύκος οδηγείται μέσω ενός σωλήνα σε δεξαμενές που βρίσκονται σε χαμηλότερο επίπεδο. Εκεί ψύχεται στους 10 °C ώστε να επιβραδυνθεί η έναρξη της αλκοολικής ζύμωσης. Επίσης εκεί δημιουργούνται και οι λάσπες, από τα σωματίδια που κατακάθονται μέσα στον μούστο. Οι λάσπες είναι ιζήματα που δεν είναι επιθυμητά για την παραγωγή ποιοτικών κρασιών, έτσι ακολουθεί η διαδικασία της απολάσπωσης, που είναι η διαύγαση του γλεύκους (μούστου) πριν από τη ζύμωση.

Για τα λευκά κρασιά, όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία της απολάσπωσης, ξεκινάμε τη μετάγγιση του καθαρού μούστου σε καθαρή δεξαμενή όπου και αυξάνεται η θερμοκρασία του από τους 10 στους 18 °C. Ακολουθεί η πορεία της αλκοολικής ζύμωσης, δηλαδή η μετατροπή των σακχάρων σε αλκοόλη. Μετά την ολοκλήρωσή της, το κρασί είναι έτοιμο και μπορεί να εμφιαλωθεί μετά από δύο περίπου μήνες. Το κρασί που παράγεται είναι φρέσκο, λευκό κρασί που πρέπει να καταναλωθεί μέσα σε δύο το πολύ χρόνια από την εσοδεία του.

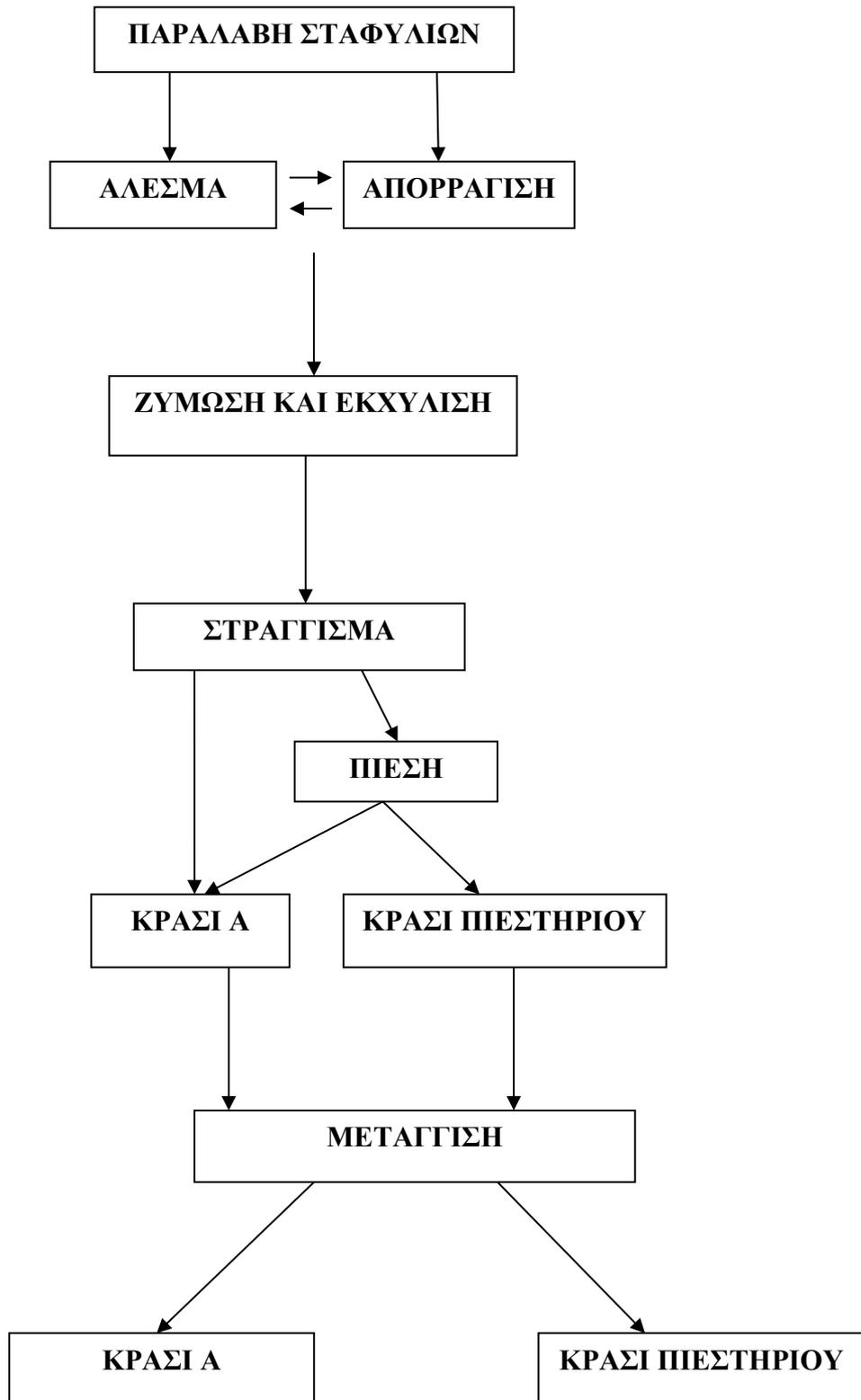
Για τα κόκκινα κρασιά, κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, το παραγόμενο διοξείδιο του άνθρακα σπρώχνει τις φλούδες και τα κουκούτσια (στέμφυλα) προς το επάνω μέρος της δεξαμενής και έτσι σχηματίζεται το «καπέλο». Έπειτα, ο μούστος με τη βοήθεια αντλίας, πηγαίνει στο κάτω μέρος της δεξαμενής και οδηγείται ξανά στην κορυφή, όπου και διαβρέχει τα στέμφυλα (διαβροχή).

Ακολουθεί η διαδικασία της εκχύλισης, όπου οι ανθοκυάνες, οι τανίνες και τα αρώματα, περνούν από τους φλοιούς στο μούστο. Το γλεύκος κατά τη ζύμωση διαχωρίζεται με τη βοήθεια

της βαρύτητας και μεταφέρεται σε μια άλλη δεξαμενή όπου και ολοκληρώνεται η αλκοολική ζύμωση. Το κρασί μετά την επεξεργασία του εμφιαλώνεται. Εφόσον μπορεί να γίνει παλαίωση παραμένει για κάποιο διάστημα σε δρύινα βαρέλια και κατόπιν σε φιάλες. Ανάλογα με την ποικιλία των σταφυλιών και την περιοχή τα κόκκινα κρασιά παλαιώνουν στα βαρέλια από 6 μήνες έως 4 χρόνια.



Σχήμα 1. Πορεία οиноποίησης λευκών κρασιών (Εκδοση 8/2006, Α. Φράγκος)



Σχήμα 2. Πορεία οινοποίησης κόκκινων κρασιών

1.2 Επιδημιολογικές μελέτες - Γαλλικό παράδοξο

Η σχέση μεταξύ της ποσότητας του αλκοόλ που καταναλώνεται ανά ημέρα και της θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα αποδίδεται σχηματικά με τη μορφή J. Αυτό σημαίνει ότι όταν το αλκοόλ καταναλώνεται σε χαμηλή ή μέτρια ποσότητα έχει ευεργετικές ιδιότητες, ενώ αντίθετα όταν η κατανάλωση είναι υπέρμετρη, οδηγεί σε αυξημένη νοσηρότητα και θνησιμότητα. Η μέτρια ποσότητα ορίζεται ως 15g αλκοόλης για τις γυναίκες και ως 30g αλκοόλης για τους άντρες. Τα 15g αντιστοιχούν σε 120ml κρασί ή 300ml μύρα ή 40ml υψηλόβαθμου ποτού.

Επιδημιολογικές μελέτες τα τελευταία χρόνια έχουν αποδείξει ότι η καθημερινή πρόσληψη 15-25 gr αλκοόλης συνδέεται με μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, εμφράγματος και θνησιμότητας που συνοδεύει αυτές τις ασθένειες. Πιθανοί μηχανισμοί που εξηγούν την καρδιοπροστατευτική δράση της μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ είναι η αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, η αύξηση των επιπέδων των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) στον ορό του αίματος και η πρόληψη του σακχαρώδους διαβήτη. Αυτοί οι μηχανισμοί μπορούν επίσης να εξηγήσουν και την καθυστερημένη εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης που οφείλεται στην κατανάλωση αλκοόλ. (Markoski M.,2016)

Αρκετοί είναι οι ερευνητές που αποδίδουν αυτή την ευεργετική δράση συγκεκριμένα στην κατανάλωση κρασιού και όχι στα άλλων αλκοολούχων ποτών (π.χ. μύρα κ.α.). Αυτό πιθανόν να οφείλεται στα βιοδραστικά συστατικά του κρασιού και όχι στη δράση του αλκοόλ αυτή καθαυτή. Μια από τις μελέτες που υποστηρίζουν αυτή την άποψη είναι του Gronbaek και των συνεργατών του μελέτησαν 11.459 γυναίκες και 13.064 άνδρες ηλικίας 20-98 ετών, για 15-17 χρόνια. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στη μέτρια κατανάλωση αλκοόλ (περίπου 1,5-2 ποτήρια κρασί) και στον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα. Δεν βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης άλλων οινοπνευματωδών ποτών και του καρδιαγγειακού κινδύνου.

Ο όρος «Γαλλικό Παράδοξο» εισήχθη το 1992 με σκοπό να περιγράψει την παρατήρηση ότι οι Γάλλοι, ένας πληθυσμός με υψηλή πρόσληψη διαιτητικής χοληστερόλης και κορεσμένων λιπών, εμφανίζει μειωμένη συχνότητα καρδιαγγειακών νοσημάτων. Αυτό το φαινόμενο έχει συσχετισθεί με την αυξημένη κατανάλωση κρασιού στη Γαλλία [Criqui 1994, Renaud 1992]. Οι ακριβείς μηχανισμοί με τους οποίους το κόκκινο κρασί μπορεί εμποδίσει καρδιαγγειακά επεισόδια δεν είναι πλήρως κατανοητοί, πιθανώς όμως να σχετίζονται με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του.

Το ‘Γαλλικό παράδοξο’ ήταν και ένας από τους λόγους που οι επιστήμονες έστρεψαν το ενδιαφέρον τους στο κρασί και τις επιδράσεις του στην υγεία του ανθρώπου. Ακολούθησαν έρευνες σχετικά με την πιθανή συσχέτιση της κατανάλωσης αλκοόλ και του καρδιαγγειακού κινδύνου, οι οποίες προσπάθησαν σε μεγάλο βαθμό να απαντήσουν σε ένα δίλημμα το οποίο ήταν εάν όλα τα αλκοολούχα ποτά ή μόνο το κόκκινο κρασί είχε ευεργετική δράση στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Μεταγενέστερες έρευνες έδειξαν ότι αυτοί που έχουν μια μέτρια κατανάλωση κρασιού είναι υγιέστεροι απ’ αυτούς που πίνουν άλλα αλκοολούχα ποτά ή δεν πίνουν καθόλου. Επίσης φάνηκε ότι η μέτρια κατανάλωση οίνου συσχετίστηκε με λιγότερο κίνδυνο για ορισμένες ασθένειες όπως τα εγκεφαλικά επεισόδια, καρκίνο του πνεύμονα, καρκίνο του άνω πεπτικού συστήματος και μικρότερη συχνότητα θανάτου.

Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε και η μετα-ανάλυση 84 μελετών των Paul E Ronksley και Susan E Brien, όπου οι συγγραφείς ανέλυσαν τα αποτελέσματα της κατανάλωσης του κρασιού και μύρας σχετικά με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο, καταλήγοντας σε αντίστοιχο συμπέρασμα. Έτσι, για ακόμη μία φορά, οι ερευνητές κατέληξαν στο ότι η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, από 10 έως 30 gr αιθανόλης την ημέρα, μπορεί να μειώσει τη θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα, ενώ η υπέρμετρη κατανάλωση (>3 ποτήρια/ημέρα) αλκοολούχων ποτών μπορεί να την αυξήσει.

Η διαπίστωση της ευεργετικής επίδρασης της μέτριας κατανάλωσης αλκοόλ φαίνεται και στη σχετικά πρόσφατη μετα-ανάλυση του Di Castelnuovo και των συνεργατών του, όπου συμπεριελήφθησαν 34 μελέτες που αφορούσαν τη σχέση της κατανάλωσης κρασιού ή μύρας και των καρδιαγγειακών κινδύνων. Βρέθηκε ότι ο σχετικός κίνδυνος για καρδιαγγειακή νόσο ήταν μικρότερος στα άτομα που κατανάλωναν κρασί, σε σύγκριση με εκείνους που δεν έπιναν. Επίσης βρέθηκε μια πιο ασθενής συσχέτιση με την κατανάλωση μύρας και τα αγγειακά επεισόδια.

Υπάρχουν όμως και οι ερευνητές που λένε ότι τα συμπεράσματα αυτά θα μπορούσαν να είναι προκατειλημμένα από την επιρροή του τρόπου ζωής στους ασθενείς που καταναλώνουν κόκκινο κρασί, το οποίο είναι συνήθως πιο ακριβό από τα άλλα ποτά, κάτι που υποδηλώνει οικονομική άνεση. Ως εκ τούτου, τα άτομα που έχουν τη δυνατότητα να διαθέτουν, σχεδόν καθημερινά, χρήματα για να το καταναλώνουν, θα μπορούσαν να έχουν καλύτερη πρόσβαση στην ιατρική περίθαλψη συνεπώς καλύτερη διαχείριση του καρδιαγγειακού κινδύνου. (Lippi, 2010)

Συμπερασματικά, η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ από οποιοδήποτε είδος αλκοολούχου ποτού φαίνεται να είναι ευεργετική για το καρδιαγγειακό σύστημα. Ωστόσο, πολλά στοιχεία δείχνουν ότι το κρασί θα μπορούσε να προσδώσει επιπλέον καρδιαγγειακά οφέλη, λόγω της ύπαρξης των βιοδραστικών συστατικών σε αυτό.

1.3 Σύσταση κρασιού

Το κρασί είναι ένα μίγμα εκατοντάδων ενώσεων, πολλές από τις οποίες βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, ωστόσο διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ποιότητά του. Οι ρώγες του σταφυλιού, που αποτελούν και την πρώτη ύλη του κρασιού, περιέχουν σάκχαρα, οργανικά οξέα και νερό (πάνω από το 70%). (Roulton B. R., 1996)

Η ακριβής σύσταση και οι συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών του κρασιού διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία των σταφυλιών που χρησιμοποιούνται, το χρόνο ωρίμανσης, τις κλιματολογικές συνθήκες κατά την ωρίμανση των σταφυλιών, την περιοχή στην οποία αναπτύσσονται και από πολλούς άλλους παράγοντες. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι κάθε κρασί που εξετάζεται έχει δική του σύσταση και η όποια ανάλυση των επιμέρους συστατικών του αφορά την πλειοψηφία των κρασιών ή το μέσο όρο των συγκεντρώσεων των συστατικών του. (Soleas G. J., 1997)

Αναλυτικότερα τα κυριότερα συστατικά του κρασιού είναι:

Πίνακας 1: Βασικά συστατικά κρασιού

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΠΟΣΟΣΤΟ
Νερό	80-86%
Αιθανόλη, Γλυκερόλη/ Πολυσακχαρίτες	~12% ~1%
Λοιπά Συστατικά	~1%

Αιθανόλη: Η αιθανόλη ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), μετά το νερό, είναι το σημαντικότερο συστατικό του κρασιού αποτελεί, κατά μέσο όρο, το 12% του όγκου του.

Γλυκερόλη: Η γλυκερόλη ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) είναι το 3ο συστατικό του κρασιού σε περιεκτικότητα ~0.5%.

Πολυσακχαρίτες: Πηκτίνες, κόμμεα, δεξτράνη. Η αιθανόλη, η γλυκερόλη και οι πολυσακχαρίτες είναι τα γλυκά συστατικά του κρασιού και εξουδετερώνουν τη ξινή γεύση των οξέων και την πικρή των φαινολικών ενώσεων.

Οργανικά Συστατικά Κρασιού: Οργανικά οξέα, Φαινολικές ενώσεις, Αζωτούχες ενώσεις, Ένζυμα, Αλκοόλες, Αρωματικές ενώσεις, Σάκχαρα, Πολυσακχαρίτες, Βιταμίνες, Λιποειδή

Φαινολικές ενώσεις: Οι φαινόλες είναι συστατικά του κρασιού πολύ μεγάλης σημασίας για την ποιότητά του, καθώς είναι αυτά που καθορίζουν τη γεύση, το άρωμα, την αίσθηση του κρασιού στο στόμα και τις αντιμικροβιακές του ιδιότητες. Προέρχονται από το φλούδι και το κουκούτσι του σταφυλιού και παράγονται από τη μικροβιακή ζύμωση. Η συγκέντρωσή τους στο κόκκινο κρασί είναι περίπου στο 0,1 – 0.2 mg/L, ενώ στο λευκό κρασί βρίσκονται σε πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις, 0,01 mg/L περίπου (Basli A. 2012). Το κόκκινο κρασί περιέχει 10 φορές περισσότερες πολυφαινόλες από το λευκό κρασί. Αυτό συμβαίνει, γιατί κατά τη διάρκεια της οινοποίησης το κόκκινο κρασί, σε αντίθεση με το λευκό, είναι μουλιασμένο για εβδομάδες με το δέρμα του σταφυλιού, που είναι ένα από τα τμήματα με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων. Οι συγκεντρώσεις φαινολικών ενώσεων στο κόκκινο κρασί κυμαίνονται από περίπου 1,2 έως 3,0 mg / L.

Οι πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού είναι ένα πολύπλοκο μείγμα φλαβονοειδών (όπως ανθοκυανίνες και φλαβαν-3-όλες) και μη-φλαβονοειδών (όπως ρεσβερατρόλη, κινναμωμικά και γαλλικό οξύ). Οι φλαβαν-3-όλες είναι αυτές που αποτελούν και το 50% των συνολικών φαινολικών συστατικών. Η ρεσβερατρόλη είναι μια φυσική ουσία της κατηγορίας των φυτοαλεξινών (phytoalexins) με βασική δομή των στυλβενίων, που βρίσκεται σε διάφορα φυτά όπως σταφύλια, τα φιστίκια, πεύκα και τα συναφή προϊόντα τους

Η μελέτη των φαινολικών ενώσεων από τα σταφύλια και από τα κρασιά είναι το πρώτο βήμα, που ακολουθείται από αρκετές αναλυτικές μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας των φαινολικών. Οι χρωματογραφικές και οι φασματοφωτομετρικές αναλύσεις βελτιώνονται συνεχώς, προκειμένου να επιτευχθεί διαχωρισμός των φαινολικών μορίων, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους. (Markoski M., 2016)

1.4 Βιολογικές δράσεις κρασιού

Πληθώρα επιστημονικών δεδομένων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μέτρια κατανάλωση κρασιού έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία. Συγκεκριμένα οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν αποδείξει ότι το κρασί εμφανίζει αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιθρομβωτική και αντιβακτηριδιακή δράση.

Τα φλαβονοειδή όσο και τα μη-φλαβονοειδή έχουν αποδειχθεί ότι έχουν προστατευτική επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα. Συγκεκριμένα, για το στυλβένιο ρεσβερατρόλη έχουν γίνει πολυάριθμες έρευνες λόγω των καρδιοπροστατευτικών ιδιοτήτων του καθώς παρουσιάζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, δηλαδή εξουδετερώνει τις ενεργές μορφές οξυγόνου που παράγονται στους διάφορους ιστούς ή κυκλοφορούν στο πλάσμα του αίματος. Αυτές οι ενώσεις δρουν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά που οδηγούν στη μείωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL), στην οξείδωση της χοληστερόλης και στη μείωση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων. (Arranz, 2012). Αναστέλλει επίσης την ανάπτυξη ορισμένων τύπων όγκων και εμφανίζει αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντι-ική, νευροπροστατευτική, αντιπολλαπλασιαστική και αντι-αγγειογενετική δραστηριότητα (Gambini J,2015).

Ωστόσο, τα ευεργετικά αποτελέσματα της μέτριας κατανάλωσης οίνου μπορεί να αποδοθούν στο συνολικό μίγμα των συστατικών του και όχι στη συγκεκριμένη δράση του ενός, όπως η ρεσβερατρόλη. Πράγματι, οι θετικές επιδράσεις των πολυφαινόλων στον τομέα των καρδιαγγειακών, φαίνονται όταν αντικαθίσταται η μονοδιάστατη άποψη που τις θεωρεί ως απλά αντιοξειδωτικά, από την άποψη της πολύπλευρης βιοδραστικότητας τους, ότι δηλαδή οι πολυφαινόλες είναι βιοδραστικά συστατικά πολλαπλών χρήσεων και όχι απλά αντιοξειδωτικά. (Gambini J,2015)

Οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στο κρασί αποτελούν εκκαθαριστές των ελεύθερων ριζών, δεσμεύουν τα προ-οξειδωτικά μέταλλα και προστατεύουν την LDL από την οξείδωση, γεγονός που συμβάλλει σημαντικά στην πρόληψη της αθηρωματικής διαδικασίας και των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Με την οξείδωση της LDL παράγεται PAF και οξειδωμένα φωσφολιποειδή, τα οποία εμπλέκονται στη διαδικασία της αθηρωμάτωσης. Σε προηγούμενες μελέτες στο εργαστήριο δοκιμάστηκαν διάφορα είδη λευκού και κόκκινου κρασιού όσον αφορά την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη προκαλούμενη από PAF (παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, Platelet Activating Factor) συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τη συνολική αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη ικανότητά τους. Από το σύνολο των πολυφαινόλων, η ρεσβερατρόλη έχει μελετηθεί περισσότερο για την αντιοξειδωτική της ικανότητα, καθώς μειώνει

την οξειδωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. (Fragoroulou, 2015)

Η ρεσβερατρόλη έχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση που οφείλεται στην εξουδετέρωση δραστικών ριζών (απόσπαση υδρογόνου) και τη δημιουργία μη δραστικών ριζών, λόγω δομής, συντονισμού, σχηματισμού κινονών ή συμπλοκοποίησης μετάλλων, με τα δύο υδροξύλια σε ο- ή p-θέση. (Lekli, ,2009). Ο Ουνβάρι και οι συνεργάτες του, το 2007 (Zheng-2010 Resveratrol), διαπίστωσαν ότι η θεραπεία με ρεσβερατρόλη αύξησε (upregulated) την έκφραση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, της καταλάσης, και της οξυγενάσης-1της αίμης (HO-1). Αυτό φαίνεται να αυξάνει την αντίσταση έναντι του οξειδωτικού στρες των αγγείων, λόγω απομάκρυνσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της πρόληψης ενδοθηλιακών κυττάρων έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από τον κυτταρικό θάνατο.

Τα φαινορικά συστατικά του κρασιού εμφανίζουν αντιφλεγμονώδη δράση, καθώς έχει βρεθεί ότι αναστέλλουν την απελευθέρωση και τη σύνθεση της προσταγλανδίνης και της ισταμίνης, που εμπλέκονται στη διαδικασία φλεγμονής. Επίσης φαίνεται ότι συνδέονται με την αναστολή της προσκόλλησης των λεμφοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, μέσω της ρύθμισης της παραγωγής κυτταροκινών.

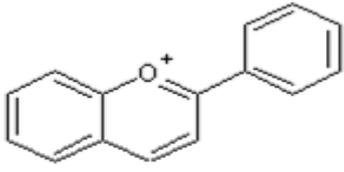
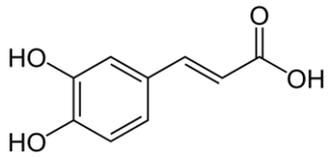
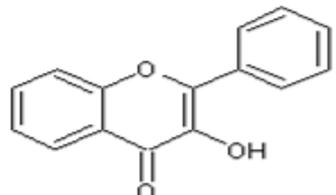
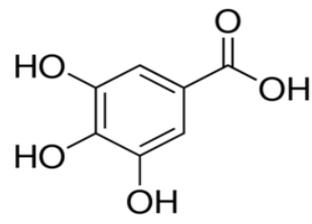
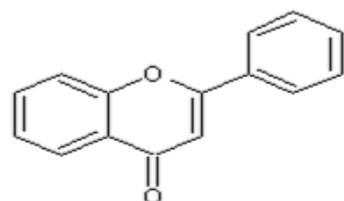
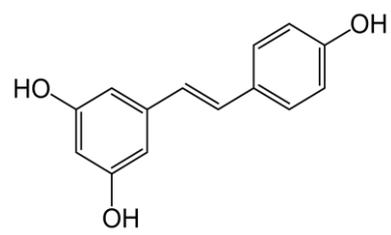
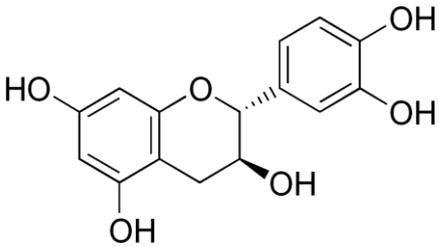
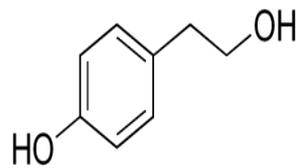
Η επίδραση, για παράδειγμα, της ρεσβερατρόλης στη φλεγμονή θα μπορούσε να περιλαμβάνει την τροποποίηση της έκφρασης των miRNAs που μπορεί να είναι αντιφλεγμονώδη (π.χ., miR-663) ή προ-φλεγμονώδη (π.χ., miR-155). Όσον αφορά την αντιφλεγμονώδη δράση της ρεσβερατρόλης, έχει επίσης δειχθεί ότι ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 (πρωτεΐνη που ρυθμίζει την έκφραση αντιοξειδωτικών πρωτεϊνών που προστατεύουν από οξειδωτικές βλάβες που προκαλούνται από τραυματισμό και φλεγμονή) και καταστέλλει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών σε καρδιομυοκύτταρα, μετριάζοντας έτσι τη βλάβη του μυοκαρδίου σε ποντίκια. Ο τελευταίος μπορεί να είναι ένας πιθανός τρόπος πρόληψης της μυοκαρδιοπάθειας που προκαλείται από τη σήψη. (Bonnefont-Rousselot,2016).

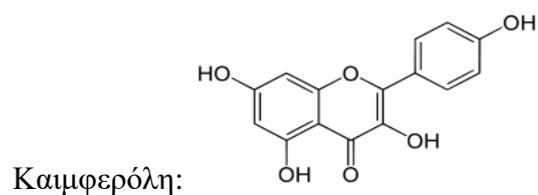
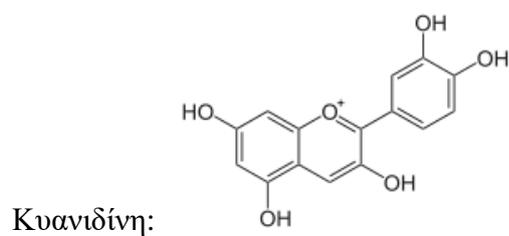
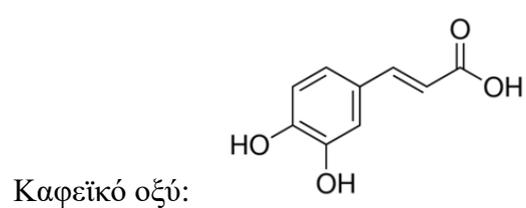
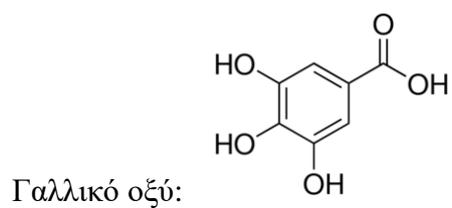
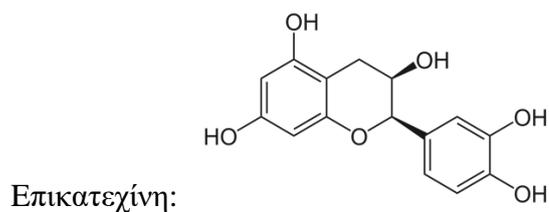
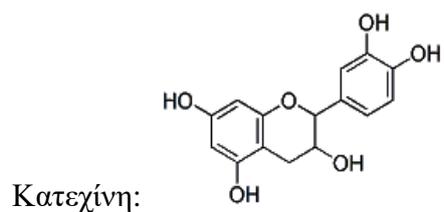
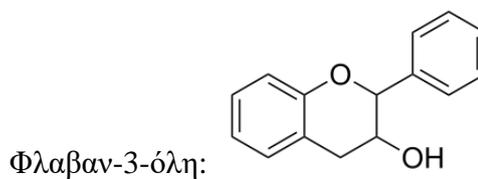
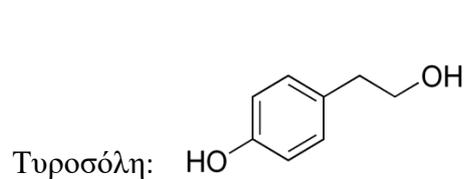
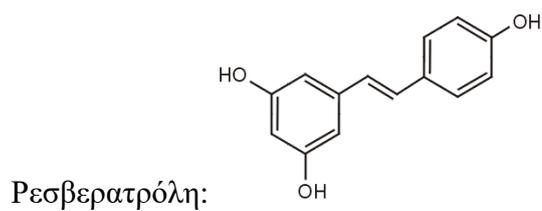
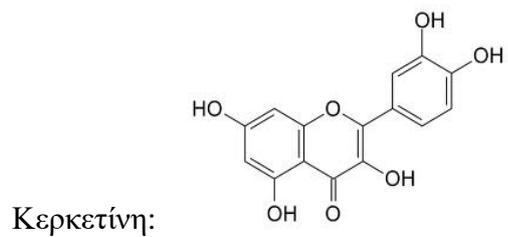
Στην αρχαιότητα μια από τις κύριες χρήσεις του κρασιού ήταν η αποστείρωση νωπών προϊόντων καθώς και το πλύσιμο πληγών. Η αντιμικροβιακή και αντιβακτηριδιακή ιδιότητά του κρασιού αποδίδεται στην αλκοόλη, στα οξέα, αλλά κυρίως στις ταννίνες που περιέχει. Σε έρευνα διαπιστώθηκε ότι εκχυλίσματα λευκού και κόκκινου κρασιού χωρίς αλκοόλ επιδρούν αρνητικά στην ανάπτυξη gram(+) και gram(-) βακτηρίων καθώς επίσης και μυκήτων. Πιο συγκεκριμένα εντοπίστηκε βακτηριοκτόνος δράση απέναντι σε στελέχη των E. Coli και C. Albicans. (Weisse ME, 1995).

Από μελέτες συνοψίζεται ότι η δράση του κρασιού οφείλεται:

1. Στην αύξηση της HDL
2. Στη μείωση της οξείδωσης της LDL
3. Στην αύξηση του NO (προφυλάσσει το αγγείο και προκαλεί αγγειοδιαστολή)
4. Στην αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με διάφορους μηχανισμούς (έτσι εμποδίζεται η δημιουργία θρόμβων στις αρτηρίες).
5. Στην αύξηση της ινωδολύσης (διευκολύνεται η διάλυση των θρόμβων)

Πίνακας 2: Πολυφαινόλες στο κόκκινο κρασί

Φλαβονοειδή	Πολυφαινόλες	Μη φλαβονοειδή	Πολυφαινόλες
<p><u>Ανθοκυανίνες</u></p>  <p>Anthocyanidins</p>	<p>Κυανιδίνη, Δελφινιδίνη, Μαλβιδίνη, Πεονιδίνη</p>	<p><u>Υδροξυκιναμικά οξέα</u></p> 	<p>Καφεϊκό οξύ, p- κουμαρικό οξύ, o- κουμαρικό οξύ, Φερουλικό οξύ,</p>
<p><u>Φλαβονόλες</u></p>  <p>Flavonols</p>	<p>Καιμφερόλη, Κερκετίνη, Μυρισετίνη</p>	<p><u>Υδροξυβενζοϊκά οξέα</u></p> 	<p>Γαλλικό οξύ, Συριγγικό οξύ, Βανιλικό οξύ, 2,3,- διυδροξυβενζοϊκό οξύ</p>
<p><u>Φλαβόνες</u></p>  <p>Flavones</p>	<p>Απιγενίνη, Λουτεολίνη</p>	<p><u>Στιλβένια</u></p> 	<p>Trans- ρεσβερατρόλη, Cis-ρεσβερατρόλη, Παλλιδόλη, d- βινιφερίνη, e- βινιφερίνη</p>
<p><u>Μονομερείς και πολυμερείς φλαβονόλες</u></p> 	<p>Κατεχίνη, Επικατεχίνη, Γαλλοκατεχίνη, Επιγαλλοκατεχίνη</p>	<p><u>Τυροσόλες</u></p> 	<p>Υδροξυτυροσόλη, Τυροσόλη</p>



Σχήμα 3: Χημικές Δομές Πολυφαινολών (Forester, 2009)

2.1 Γενικά

Το ανθρώπινο έντερο είναι το φυσικό περιβάλλον ενός συνόλου αυτόχθονων μικροοργανισμών, κυρίως αναερόβιων βακτηρίων, τα οποία έχουν προσαρμοστεί στις βλεννογονικές επιφάνειες στον αυλό του εντέρου. Αυτοί οι μικροοργανισμοί αποτελούν το ‘φυσιολογικό ή ενδογενή μικροβιόκοσμο’ του εντέρου, ενώ οι ετερόχθονες μικροοργανισμοί που επιτελούν την ίδια λειτουργία αλλά κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες, αποτελούν το ‘μεταβατικό μικροβιόκοσμο’. Σύμφωνα με τους Dubos & Schaedler (1965), ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι από τους πιο σημαντικούς μηχανισμούς άμυνας που προστατεύουν τον ανθρώπινο οργανισμό από την αποίκηση παθογόνων βακτηρίων. (Angelakis E., 2012), (Savage D.C.,1977).

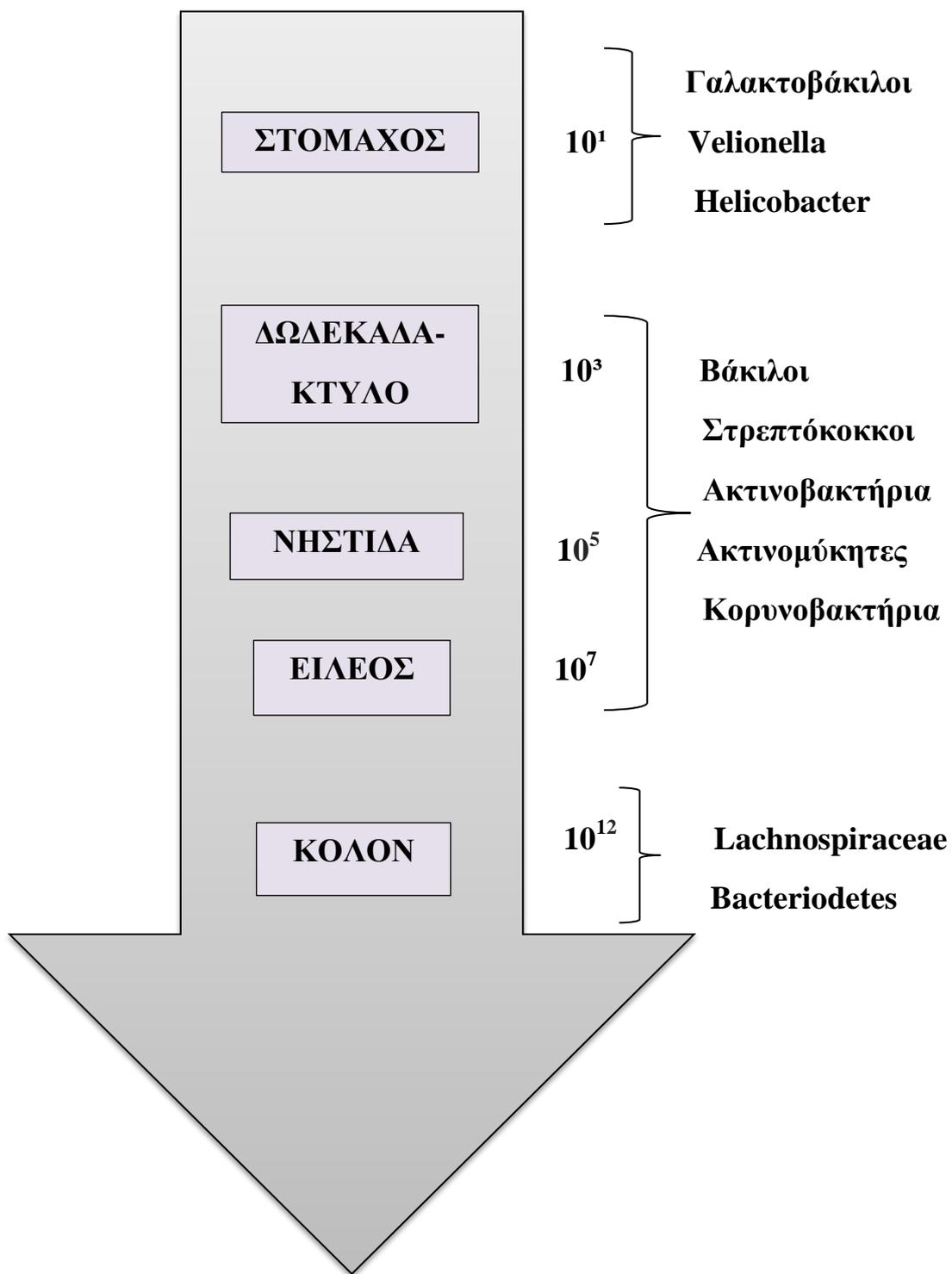
Οι μικροβιακοί πληθυσμοί που αποικίζουν τον άνθρωπο έχουν ονομαστεί «ανθρώπινος μικροβιόκοσμος», ενώ το σύνολο του γενετικού τους υλικού ονομάζεται «ανθρώπινο μικροβίωμα». Ο ανθρώπινος μικροβιόκοσμος αποτελείται από περίπου 10^{14} μικροβιακά κύτταρα, που είναι αριθμός δεκαπλάσιος από το συνολικό αριθμό των ανθρώπινων κυττάρων και εκτιμάται ότι έχει πολλαπλές λειτουργίες, όπως η σύνθεση βιταμινών (π.χ. βιταμίνη B12, φυλλικό οξύ), ο μεταβολισμός χολικών αλάτων, η ρύθμιση φλεγμονωδών αντιδράσεων, ο καταβολισμός φυτικών ινών και λιπαρών οξέων και η ομοιόσταση του ανοσοποιητικού συστήματος. (Gordon JI.,2012)

Η διαδικασία του αποικισμού του εντέρου ξεκινά αμέσως μετά γέννηση. Ο μικροβιόκοσμος του βρέφους δείχνει αρχικά αστάθεια και χαμηλή ποικιλομορφία, όμως εξελίσσεται σε μια πιο σταθερή, ενήλικου-τύπου μικροβιόκοσμο μετά τα πρώτα 2-4 χρόνια της ζωής. Η τελική σύνθεση της εξαρτάται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Σύμφωνα με το Sakata και τους συνεργάτες του, στην πρώτη εβδομάδα της ανθρώπινης ζωής τα εντεροβακτήρια, οι στρεπτόκοκκοι, οι εντερόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι είναι ήδη παρόντα στο έντερο του βρέφους, ενώ αναερόβια βακτήρια, όπως *bifidobacteria* και γαλακτοβάκιλλοι δεν είναι. Η σταδιακή κατανάλωση του οξυγόνου στο έντερο από αερόβιους μικροοργανισμούς παρέχει συνθήκες για την εγκατάσταση των αναερόβιων βακτηρίων. (Dumas Me. 2011)

Ο θηλασμός είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη σύσταση του εντερικού μικροβιόσμου των νεογνών. Στα μωρά που θηλάζουν αποκλειστικά, τα *bifidobacteria* αποτελούν μια κυρίαρχη ομάδα στα κόπρανα. Στα βρέφη που δε θηλάζουν, αν και τα μπιφιδοβακτήρια είναι

επίσης το κύριο είδος, άλλα βακτήρια όπως εντεροβακτήρια, εντερόκοκκοι, γαλακτοβάκιλλοι και κλωστρίδια είναι παρόντα σε σημαντικά μεγαλύτερους αριθμούς σε σύγκριση με τα βρέφη που θηλάζουν.

Έχει βρεθεί ότι τα βρέφη που γεννιούνται με φυσικό τοκετό αποκτούν το εντερικό μικροβιόκοσμο που βρίσκεται στον κόλπο της μητέρας (*Lactobacillus*, *Prevotella*, *Atopobium* ή *Sneathia*), ενώ τα βρέφη που γεννιούνται με καισαρική τομή έχουν αυξημένα επίπεδα από βακτήρια που σχετίζονται με το δέρμα (*Staphylococcus*, *Corynebacterium* και *Propionibacterium*). Ο μικροβιόκοσμος του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα ξεκινά στο στόμα και ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων υπολογίζεται σε 10^8 - 10^{10} CFU (colony forming units) βακτηρίων ανά γραμμάριο σάλιου. Ως αποτέλεσμα του ανακλαστικού της κατάποσης, αυτά τα βακτήρια μεταφέρονται συνεχώς προς τα επόμενα τμήματα της γαστρεντερικής οδού. Ο αριθμός των μικροοργανισμών μειώνεται σημαντικά στο στομάχι ($\sim 10^3$ CFU / g), στο δωδεκαδάκτυλο και στη νήστιδα (10^2 - 10^4 CFU / g), ενώ αυξάνεται πάλι στον ειλεό και το κόλον (περίπου 10^{10} CFU / g και 10^{10} - 10^{12} CFU / g, αντίστοιχα). (G. Dominguez-Bello, 2010)



Σχήμα 4: Ο μικροβιόκοσμος του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα

Ο τεράστιος αριθμός των μικροοργανισμών που ζουν στο ανθρώπινο παχύ έντερο είναι η υψηλότερη συσσώρευση μικροοργανισμών στο περιβάλλον που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα. Η σύνθεση, όπως επίσης και η αναλογία των διαφορετικών ειδών που σχηματίζουν το εντερικό μικροβίωμα, είναι πολύ διαφορετική στον ανθρώπινο πληθυσμό. Η σύνθεση του οικοσυστήματος του ανθρώπινου εντέρου επηρεάζεται από πολλούς και διάφορους παράγοντες, όπως η ηλικία, η καταγωγή, το περιβάλλον, οι διατροφικές συνήθειες και η χρήση αντιβιοτικών. Ως εκ τούτου, κάθε άτομο έχει το δικό του μοναδικό, μικροβιακό προφίλ, το οποίο μπορεί να συγκριθεί με ένα δακτυλικό αποτύπωμα.

2.2 Σημαντικοί μικροοργανισμοί του εντερικού μικροβιόκοσμου

Στη διεθνή βιβλιογραφία, οι όροι gut microbiota και gut microbiome εναλλάσσονται, αλλά υπάρχει μια σημαντική διαφορά μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, ο όρος gut microbiota αναφέρεται στους μικροοργανισμούς που διαβιούν στη γαστρεντερική περιοχή ενός ατόμου και αποτελείται από μέλη των βακτηρίων, των ιών (φάγοι), των αρχαίων (archaea), των μυκήτων, καθώς και των ευκαρυωτικών μικροοργανισμών και επομένως μπορεί να χαρακτηριστεί ως εντερικός μικροβιόκοσμος. Ο όρος gut microbiome αναφέρεται στο σύνολο των γονιδίων των μικροβίων του εντερικού μικροβιόκοσμου ενός ατόμου.

Στο έντερο έχουν κυριαρχήσει 2 φύλα βακτηρίων, τα *Bacteroidetes* και τα *Firmicutes*, τα οποία αποτελούν >99% των φυλοτύπων. Το 95% των *Firmicutes* ανήκει στα *Clostridia*, ενώ τα *Bacteroidetes* αποτελούνται από 4 κύρια είδη: Τα *Bacteroides thetaiotaomicron* (που είναι άριστα προσαρμοσμένα στη διάσπαση πολυσακχαριτών που καταλήγουν άπεπτοι στο παχύ έντερο), τα *B. vulgatis*, *B. distasonis*, *B. fragilis*, τα οποία και αποτελούν το 30 % της ολικής εντερικής χλωρίδας (Gill et al., 2006).

Τα αναερόβια βακτήρια είναι κατά 100 έως 1000 φορές περισσότερα από τα αερόβια, προαιρετικά βακτήρια. Τα κυριότερα αναερόβια γένη είναι τα *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Clostridium*. Στα προαιρετικά αερόβια ανήκουν κυρίως τα εντεροβακτήρια μεταξύ των οποίων και το *Escherichia coli* (ανήκει στα *Proteobacteria*, τα οποία αντιπροσωπεύουν μόνο το 0,1% του πληθυσμού των εντερικών βακτηρίων). Επίσης σημαντική παρουσία είναι και οι εντερόκοκκοι. (Eckburg et al., 2005; Guarner et al., 2003).

Η ταξινόμηση των βακτηρίων περιλαμβάνει τα ακόλουθα επίπεδα: Επικράτεια (domain), βασίλειο (kingdom), συνομοταξία ή φύλο (phylum), ομοταξία ή κλάση (class), τάξη (order), οικογένεια (family), γένος (genus) και είδος (species). Στον πίνακα 3 παρατίθενται παραδείγματα φύλων βακτηρίων, καθώς και επομένων επιπέδων ταξινόμησης μέχρι του

επιπέδου του γένους για σαπροφυτικά και παθογόνα βακτήρια που αποικίζουν τον άνθρωπο, ώστε ο αναγνώστης να μπορέσει να συνδυάσει γνωστά γένη βακτηρίων με τα φύλα στα οποία ανήκουν.

Πίνακας 3. Φύλα βακτηρίων με παραδείγματα βακτηρίων σε επίπεδο γένους που αποικίζουν τον άνθρωπο. (Societe de Bacteriologie Systematique et Veterinaire).

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

2.3 Κύριες λειτουργίες

Μέσω της παράλληλης εξέλιξης οι ξενιστές και τα μικρόβια έχουν σχηματίσει μια αμοιβαία επωφελή σχέση, η οποία εκδηλώνεται σε όλες σχεδόν τις μορφές ζωής. Μόλις αναπτυχθεί πλήρως, ο εντερικός μικροβιόκοσμος γίνεται ένα ζωτικής σημασίας όργανο που παρέχει πολλές σημαντικές λειτουργίες για τον ξενιστή. Ο ξενιστής από την πλευρά του προσφέρει τόπο ανάπτυξης και διατροφής στα συμβιωτικά εντερικά βακτήρια, τα οποία με τη σειρά τους ευνοούν τη λειτουργία του ξενιστή καθώς επάγουν την αντίσταση στις λοιμώξεις και διευκολύνουν την απορρόφηση των τροφών μετά την πέψη.

Ωστόσο, η θεμελιώδης φύση και η σταθερότητα της σχέσης μεταξύ ξενιστή και μικροβίου, απειλείται από τις δραστικές αλλαγές του περιβάλλοντος, της διατροφής και του 'τρόπου ζωής' των τελευταίων 50-100 χρόνων, τα οποία έχουν σχεδόν σίγουρα αναδιαμορφώσει το ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα. Όταν η ισορροπία αυτή διαταράσσεται (δυσβίωση) για διάφορους λόγους, όπως η επαναλαμβανόμενη και ακατάλληλη χρήση αντιβιοτικών ή η κατάχρηση οινοπνεύματος, το αποτέλεσμα είναι αναντιστοιχίες στη σχέση ξενιστή-μικροβίου, που μπορούν να οδηγήσουν σε μη σωστή ομοιόσταση, ενδεχομένως εξηγώντας και τον επιπολασμό πολλών ασθενειών οι οποίες δίνουν συνεχώς το παρόν, με ανησυχητική συχνότητα στη σύγχρονη εποχή.

2.3.1 Ευεργετικές λειτουργίες

Ως ένα αποκτηθέν και ουσιαστικό όργανο του σώματος, ο εντερικός μικροβιόκοσμος παρέχει μια ευρεία ποικιλία ωφέλιμων λειτουργιών, όπως:

- i) Ο διαχωρισμός δύσπεπτων συστατικών από τα τρόφιμα και η σύνθεση θρεπτικών παραγόντων, όπως βιταμίνες (παντοθενικό οξύ, βιοτίνη, πυριδοξίνη και η μενακινόνη (βιταμίνη K). Ο εντερικός μικροβιόκοσμος είτε παράγει, είτε μεταβολίζει προς απορροφήσιμες μορφές τις βιταμίνες αυτές, ενώ βιοσυνθέτει πλήθος άλλων βιταμινών (βιαμίνη B12, θειαμίνη κ.α.) αν και δεν απορροφώνται από το παχύ έντερο.
- ii) Η ζύμωση υπολειμμάτων άπεπτων υδατανθράκων στο κόλον. Οι άπεπτοι υδατάνθρακες είναι πολυσακχαρίτες μεγάλου μήκους, όπως π.χ. κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτίνη, άπεπτο άμυλο και η διάσπαση αυτών έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή βραχέας αλύσου λιπαρών οξέων (Short – Chain Fatty Acids, SCFAs). Τα βραχέας αλύσου λιπαρά οξέα (SCFA), όπως το οξικό, το βουτυρικό και το προπιονικό αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας για τα κύτταρα του παχέος εντέρου. Τα SCFAs επίσης, παρέχουν έναν αριθμό άλλων ευεργετικών επιδράσεων στη

διατήρηση της ομοιόστασης του εντέρου, όπως η εξασφάλιση θρεπτικών συστατικών και ενέργειας για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων (Sanz et al., 2008).

Αν και τα βακτήρια που παράγουν βουτυρικό οξύ, έχουν συσχετισθεί με αυξημένη εντερική μεταβολική δραστηριότητα, η οποία οδηγεί σε παχυσαρκία, το βουτυρικό οξύ χρησιμοποιείται κατά κόρον από τα εντεροκύτταρα. Ο κύριος ρόλος του βουτυρικού οξέος είναι να τροφοδοτεί τα εντεροκύτταρα με ενέργεια, και μπορεί να καλύψει έως και 70% των ενεργειακών τους αναγκών, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίησή τους (Hamer et al., 2008).

Αντίθετα, τα άλλα δύο λιπαρά οξέα, προπιονικό και οξικό οξύ, μπορούν από το έντερο και μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας να μεταβούν στο ήπαρ. Το οξικό οξύ μπορεί να συμβάλει στο μεταβολισμό των λιπιδίων και της χοληστερόλης με την ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής συνθετάσης του ακέτυλοσυνενζύμου Α. Ενώ, το προπιονικό πιθανό να αναστέλλει τη λιπογένεση που προκαλείται από το οξικό οξύ, όπως έχει φανεί από πειράματα σε ηπατικά κύτταρα ποντικών (Wolever et al., 1995). Μια άλλη μεταβολική λειτουργία είναι ο αναερόβιος μεταβολισμός πεπτιδίων και πρωτεϊνών, όπως ελαστίνη, κολλαγόνο και παγκρεατικά ένζυμα. Το μονοπάτι αυτό παράγει επίσης SCFAs, καθώς επίσης και τοξικές ουσίες, όπως αμμωνία, αμίνες, φαινόλες και θειόλες.

- iii) Η ανάπτυξη ενός ισχυρού και ισορροπημένου ανοσοποιητικού συστήματος. Ο εντερικός βλεννογόνος αποτελεί ένα μηχανικό φραγμό ανάμεσα στο περιβάλλον και στον ξενιστή προστατεύοντας τον ανθρώπινο οργανισμό από την εισβολή & την εξάπλωση των παθογόνων μικροοργανισμών. Ακόμη διαθέτει ένα ανοσολογικό σύστημα (gut-associated lymphoid tissue, GALT) που επιτρέπει την απόλυτη ισορροπία με την φυσιολογική ή ενδογενή μικροχλωρίδα, ενώ διεγείρεται έντονα από την εισβολή των παθογόνων μικροοργανισμών. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος επάγει την ωρίμανση του GALT, ασκώντας αντιγονικά ερεθίσματα στα λεμφικά κύτταρα του βλεννογόνου και επηρεάζοντας την χυμική και κυτταρική ανοσία. Η εμφάνιση του εντερικού μικροβιόκοσμου μετά από την γέννηση, φαίνεται ότι συσχετίζεται άμεσα με την ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος του νεογνού. (Sansone P.J., 2004).
- iv) Ο εντερικός μικροβιόκοσμος εμποδίζει την αποίκηση εξωγενών μικροβίων, τα οποία προσπαθούν να εισέλθουν στο εντερικό επιθήλιο καθώς επίσης, παρεμποδίζει το πολλαπλασιασμό ευκαιριακών βακτηρίων, τα οποία βρίσκονται στο έντερο. Είναι ένα φαινόμενο, το οποίο διαφοροποιείται ανάλογα με τα μικροβιακά είδη και την κατάσταση του ξενιστή (περιβάλλον, διαίτα, στρες, ηλικία κ.α). Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους ο εντερικός μικροβιόκοσμος προστατεύει τον ξενιστή από παθογόνους μικροοργανισμούς.

Έχει αποδειχθεί ότι τα βακτήρια ανταγωνίζονται μεταξύ τους για θέσεις πρόσδεσης στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Επομένως, εμποδίζεται η προσκόλληση και κατ' επέκταση η είσοδος παθογόνων βακτηρίων μέσα στα επιθηλιακά κύτταρα. Ένας άλλος τρόπος προστασίας του ξενιστή από παθογόνα είναι ότι τα βακτήρια του εντέρου μπορούν και παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες, όπως βακτηριοσίνες και υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) από τους λακτοβακίλλους και τα μπιφιδοβακτήρια.. Οι βακτηριοσίνες περιορίζουν τους δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς χωρίς να βλάπτουν τον ξενιστή, εφόσον ο ίδιος μπορεί να διασπάσει τις ουσίες αυτές με πρωτεάσες πέψης (O Hara et al., 2006). Μεγάλο ρόλο παίζει και ο ανταγωνισμός μεταξύ των βακτηρίων για τις διαθέσιμες πηγές ενέργειας και άνθρακα καθώς και η παραγωγή εξωκυτταρικών ενζύμων που παρεμποδίζουν την προσκόλληση στους ειδικούς υποδοχείς.

2.3.2 Μικροβιόκοσμος και Παθολογικές Καταστάσεις

Η 'δυσβίωση', δηλαδή η μη-αρμονική διαβίωση ανάμεσα σε οργανισμούς, σχετίζεται με διάφορες διαταραχές του οργανισμού. Σε αυτήν την περίπτωση, οι αλλαγές που προκύπτουν τόσο στη δομή όσο και στις λειτουργίες του εντερικού μικροβιόκοσμου πιστεύεται ότι είναι σημαντικοί παράγοντες που οδηγούν σε μολυσματικές, μεταβολικές, και καρκινικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (IBD), τη νεογνική νεκρωτική εντεροκολίτιδα, το γαστρεντερικό καρκίνο, άσθμα, αλλεργία κ.α. Ακόμη και σε όργανα που θεωρούνταν στείρα, όπως ο οισοφάγος και οι πνεύμονες, έχει βρεθεί ότι ο μικροβιόκοσμος μπορεί να συμβάλλει στην παθογένεση και την εξέλιξη της νόσου.

Οι μεταβολές του μικροβιόκοσμου του εντέρου έχουν συνδεθεί με διαταραχές του μεταβολισμού του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολικού συνδρόμου, του διαβήτη τύπου 2 και της παχυσαρκίας. Μια μελέτη έδειξε ότι η βιοποικιλότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου συσχετίζεται με ορισμένους μεταβολικούς δείκτες. Το *Akkermansia muciniphila*, ένα μικρόβιο που αποικοδομεί βλέννες, έχει αναφερθεί ότι προλαμβάνει τις μεταβολικές διαταραχές που προκαλούνται από μια υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά διατροφή, συμπεριλαμβανομένου της αύξησης λιπώδους μάζας, φλεγμονή του λιπώδους ιστού και την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Σακχαρώδης Διαβήτης Τύπου II:

Έχει δειχθεί πρόσφατα ότι στον εντερικό μικροβιόκοσμο ατόμων με διαβήτη τύπου II η ποσότητα των *Firmicutes* ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένη σε σχέση με τους υγιείς, ενώ

επίσης, η αναλογία *Bacteroidetes* προς *Firmicutes* σχετίστηκε θετικά με τη συγκέντρωση γλυκόζης στο πλάσμα, αλλά όχι με το Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ). Το 2010 ο Furet et al. απέδειξε ότι άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II είχαν επίσης μειωμένα επίπεδα *Firmicutes*. Η μείωση αυτή σχετίστηκε άμεσα με αυξημένους δείκτες φλεγμονής και θεωρείται ότι κάποια βακτήρια που ανήκουν στο φύλο αυτό πιθανόν να έχουν προβιοτική δράση και να μειώνουν την αντίσταση στην ινσουλίνη.

Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου:

Η εμπλοκή μικροβίων στην αιτιολογία των φλεγμονωδών νόσων του εντέρου έχει διερευνηθεί εκτεταμένα στο παρελθόν και κατά καιρούς διάφορα μικρόβια έχουν ενοχοποιηθεί, όπως το *Mycobacterium avium*, το οποίο έχει συσχετιστεί με την αιτιολογία της νόσου Crohn (φλεγμονώδης νόσος του εντέρου άγνωστης αιτιολογίας). Πολλές μελέτες όμως, έχουν δείξει αλλαγή στη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος τόσο στην ελκώδη κολίτιδα όσο και στη νόσο Crohn. Φαίνεται ότι υπάρχει μειωμένη βιοποικιλότητα στο μικροβιόκοσμο του εντερικού αυλού (μειωμένα *bifidobacteria*, γαλακτοβάκλιοι και *Faecalibacterium prausnitzii*) και επίσης αύξηση των μικροβίων που είναι προσκολλημένα στη βλέννη.

Οι ασθενείς με φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου έχουν υψηλότερες ποσότητες βακτηρίων προσκολλημένες στην επιφάνεια του επιθηλίου σε σχέση με τους υγιείς. Αυτά τα βακτήρια προέρχονται από ποικίλα γένη και κάποια από αυτά, ειδικά τα *Bacteroides* spp, έχουν βρεθεί μεταξύ των στρωμάτων του επιθηλίου αλλά και μέσα σε κύτταρα αυτού (Macpherson et al., 1996).

Καρκίνος της γαστρεντερικής οδού:

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος φαίνεται να επιδρά στο μηχανισμό καρκινογένεσης είτε μέσω της διαίτας είτε μέσω της αντιφλεγμονώδους δράσης της στο βλεννογόνο του εντέρου. Η αλληλεπίδραση μεταξύ διατροφικών συστατικών και εντερικού μικροβιόκοσμου έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει μηχανισμούς που εμπλέκονται στην παθογένεση του καρκίνου στο κόλον. Συγκεκριμένα, η αυξημένη κατανάλωση λιπαρών και κόκκινου κρέατος και η μειωμένη πρόσληψη φρούτων, λαχανικών, ψαριού και ασβεστίου επηρεάζει τη μεταβολική δραστηριότητα και τη σύσταση του μικροβιόκοσμου στο παχύ έντερο (1995 Moore).

Το 1995 οι Moore et al έδειξαν ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος σε ασθενείς με ορθοκολικό καρκίνο έχει αυξημένη ποικιλία *Clostridium* spp, καθώς και εμπλουτισμό του εντέρου με *Bacteroides* και *Bifidobacterium* spp. Αντιθέτως, ο εντερικός μικροβιόκοσμος ασθενών με

χαμηλό κίνδυνο για ανάπτυξη καρκινώματος περιέχει πολλά βακτήρια που παράγουν γαλακτικό οξύ, όπως *Lactobacillus spp* και *Eubacterium aerofaciens*. (1995 Moore).

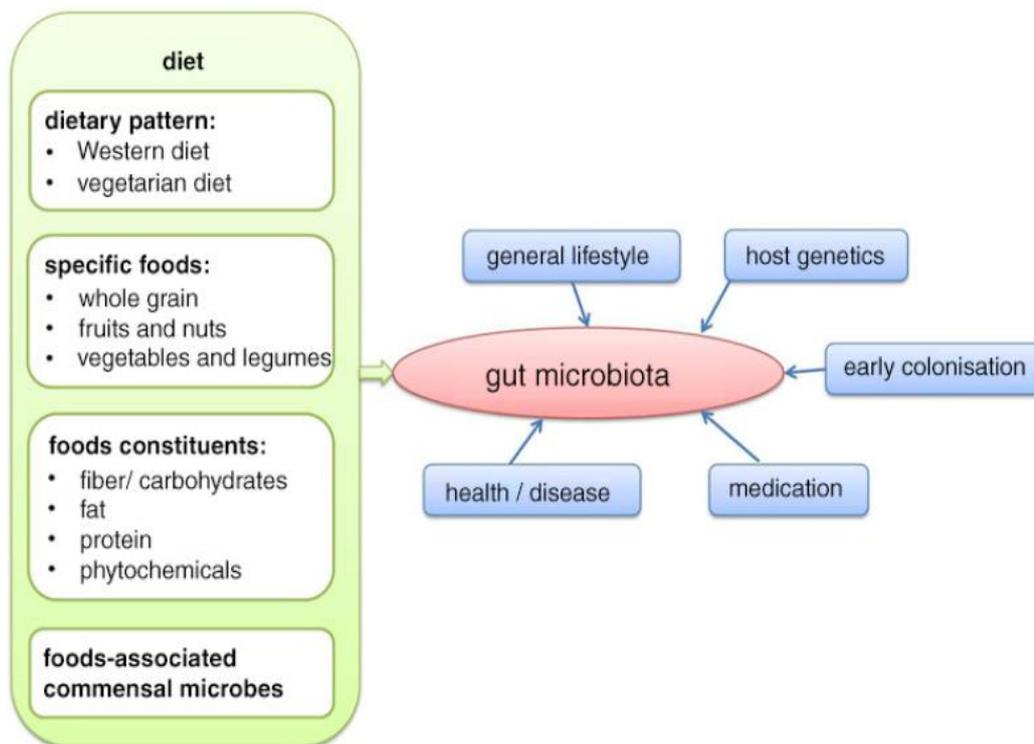
Σε άλλη πιο σύγχρονη μελέτη για τη σχέση της δυσβίωσης των μικροβίων του εντερικού μικροβιόκοσμου με τον ορθοκολικό καρκίνο, ο μικροβιόκοσμος βρέθηκε εμπλουτισμένος σε *Fusobacterium spp* (Moore,1995). Οι μεταβολές, επομένως, στο εντερικό μικροβίωμα φαίνεται ότι προηγούνται της έναρξης των κακοήθων μετασχηματισμών, αν και δεν είναι τόσο σαφές κατά πόσο η «ανωμαλία» του μικροβιώματος οδηγεί στην καρκινογένεση ή αν οι καρκινογόνες αλλοιώσεις από τη διαίτα ή τον ξενιστή δημιουργούν παράλληλες τροποποιήσεις σε αυτό.

2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Είναι πολλοί οι παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Κάποιοι από αυτούς είναι οι εξής: η διαίτα, η ηλικία, το στρες, το περιβάλλον και η έκθεση σε διάφορα μικρόβια, οι κλινικές παρεμβάσεις, όπως τα αντιβιοτικά (Dethlefsen et al., 2006), η λήψη προβιοτικών ή πρεβιοτικών, καθώς και οι χειρουργικές επεμβάσεις (Zhang et al., 2009).

ΔΙΑΙΤΑ:

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες και η διαίτα είναι ένας από τους πολύ σημαντικούς. Συστατικά της τροφής, τα οποία είναι δύσπεπτα για τα ανθρώπινα ένζυμα (π.χ. ίνες), παρέχουν υποστρώματα για τον εντερικό μικροβιακό μεταβολισμό. Καθώς τα βακτήρια ειδικεύονται στη ζύμωση διαφορετικών υποστρωμάτων, μια πολυσύνθετη διαίτα μπορεί να παρέχει ένα φάσμα αυξητικών και ανασταλτικών παραγόντων για συγκεκριμένους φυλότυπους. Επιπλέον, τα τελικά προϊόντα του βακτηριακού μεταβολισμού, ειδικά βιταμίνες και βραχείας αλύσου λιπαρά οξέα (SCFA), είναι ζωτικής σημασίας για την ανθρώπινη υγεία.



Εικόνα 1. Παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση του ανθρώπινου εντερικού μικροβιόκοσμου, με ιδιαίτερη έμφαση στην διατροφή.

Διατροφικά Πρότυπα:

1. Χορτοφαγικό (vegetarian diet)

Μόνο λίγες μελέτες παρατήρησης διερεύνησαν τις διαφορές στη σύνθεση του μικροβιόκοσμου των κοπράνων μεταξύ χορτοφάγων και μη ενηλίκων ανθρώπων. Οι μελέτες αυτές συχνά δεν έχουν καταγραφή των διατροφικών συνηθειών οπότε η μόνη καταγεγραμμένη διαφορά η έλλειψη ή η παρουσία κρέατος και των προϊόντων του. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών δείχνουν ότι ο μικροβιόκοσμος των μη χορτοφάγων είναι εμπλουτισμένος με βακτήρια του συμπλέγματος *Clostridium XIVa*, τα οποία είναι βακτήρια που παράγουν βουτυρικό οξύ, που έχει συσχετιστεί με οφέλη για την υγεία.

2. Δυτικό (western diet)

Η διατροφή των ανθρώπων που ζουν στις δυτικές χώρες είναι συνήθως χαμηλή σε φυτικές ίνες και παρέχει υψηλή ποσότητα λίπους και επεξεργασμένων υδατανθράκων σε σύγκριση με τη διατροφή των ανθρώπων που ζουν σε αγροτικές χώρες. Αρκετές μελέτες συνέκριναν τον εντερικό μικροβιόκοσμο των βόρειων Αμερικανών ή των Ευρωπαίων με των Αφρικανών ή των νότιων Αμερικανών. Διαφορές στη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου υπήρχαν ήδη σε 6-μηνών βρέφη από το Μαλάουι σε σύγκριση με ίδιας ηλικίας βρέφη από τη Φινλανδία.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από τον Yatsunenko et al. (29), ο οποίος καθορίζει τη σύνθεση του μικροβιόκοσμου των εθελοντών (0-70 ετών) από τη Βενεζουέλα, το Μαλάουι και τις Ηνωμένες Πολιτείες. Ανέφερε ότι, ανεξάρτητα από την ηλικία, η σύνθεση του μικροβιόκοσμου άλλαζε ανάλογα με τη χώρα. Τα δείγματα του Μαλάουι και της Βενεζουέλας ήταν αρκετά παρόμοια, σε σύγκριση με τα δείγματα της βόρειας Αμερικής. Η λιγότερη μικροβιακή ποικιλότητα σε αυτή τη μελέτη παρατηρήθηκε σε ενήλικες Αμερικανούς. Αυτό μας δείχνει ότι τα αποτελέσματα έχουν να κάνουν με τη διαφορετικότητα της φυλής.

ΗΛΙΚΙΑ:

Η ηλικία είναι ένας από τους παράγοντες που επιφέρει αλλαγές στη μικροβιακή σύνθεση, αφού ο εντερικός του μικροβιόκοσμος μεταβάλλεται κατά τα διάφορα στάδια της ζωής ενός ατόμου. Η μεταγεννητική περίοδος, η περίοδος δηλαδή που το ελεύθερο μικρόβιον νεογνό μεταφέρεται από το στείρο περιβάλλον της μήτρας σε έναν κόσμο με πολλά μικρόβια, είναι εκείνη κατά την οποία ο οργανισμός του ανθρώπου επηρεάζεται περισσότερο αφού η επιφάνεια του δέρματος και οι βλεννογόνοι του νεογνού σταδιακά αποικίζονται από μικροοργανισμούς. Η άμεση επαφή των νεογέννητων με μικρόβια του γεννητικού σωλήνα κατά το φυσιολογικό τοκετό επηρεάζει την ανάπτυξη του εντερικού μικροβιώματος, καθώς όπως φαίνεται παίρνουν τα μικρόβια από τον κόλπο των μητέρων τους.

Μετά τον πρώτο χρόνο της ζωής, το εντερικό μικροβίωμα των παιδιών αρχίζει να ομοιάζει με εκείνο ενός νεαρού ενήλικα και τότε είναι η περίοδος κατά την οποία το μικροβίωμα ασκεί τη μεγαλύτερη δράση πάνω στο ανοσοποιητικό σύστημα του παιδιού. Η πλήρης σύνθεση των κυριότερων βακτηριακών πληθυσμών, πάντως, δεν σταθεροποιείται μέχρι τουλάχιστον τα δύομισι πρώτα χρόνια της ζωής.

Όσον αφορά το μικροβιόκοσμο των ηλικιωμένων ατόμων, το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό είναι η αλλοίωση στις αναλογίες των βακτηρίων, *Firmicutes* και *Bacteroidetes*. Οι ηλικιωμένοι έχουν υψηλότερο ποσοστό *Bacteroidetes*, ενώ οι νέοι ενήλικες έχουν υψηλότερο ποσοστό *Firmicutes* (Mariat et al., 2009).

Επιπλέον έχουν αναφερθεί σημαντικές μειώσεις στα *Bifidobacteria*, *Bacteriodes*, και *Clostridium cluster IV* (Zwielehner et al., 2009). Η διαφορετικότητα μεταξύ των ατόμων κυμαίνεται από 3% έως 92% για τα *Bacteroidetes* και μεταξύ 7% και 94% για τα *Firmicutes* (Claesson et al., 2011).

Οι αλλαγές που συμβαίνουν στο μικροβιόκοσμο κατά τη γήρανση μπορεί να έχουν αντίκτυπο στην υγεία του ξενιστή. Ο Van Tongeren et al. (2005) μελέτησε τη σχέση μεταξύ της μικροβιακής ποικιλότητας και της ασθενικότητας σε ηλικιωμένα άτομα. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του ποσοστού των γαλακτοβάκιλλων, *Bacteroides* / *Prevotella* και

Faecalibacterium prausnitzii, και σημαντική αύξηση στο ποσοστό των *Ruminococcus*, *Atopobium* και *Enterobacteriaceae* σε άτομα με υψηλό βαθμό αδυναμίας.

Πρόσφατα, ο Claesson et al. (2012) μελέτησε τη σχέση μεταξύ της διατροφής, της υγείας του ξενιστή και του εντερικού μικροβιόκοσμου. Συγκεκριμένα, παρατήρησε ότι η μειωμένη μικροβιακή ποικιλότητα συσχετίζεται με αυξημένη αδυναμία, μειωμένη ποικιλομορφία στη διατροφή και τις παραμέτρους της υγείας και με αυξημένα επίπεδα φλεγμονωδών δεικτών.

ANTIBIOTIKA:

Η αντιβιοτική θεραπεία μπορεί να επηρεάσει όχι μόνο το παθογόνο στόχο αλλά επίσης και τους συμβιωτικούς μικροοργανισμούς του ανθρώπινου ξενιστή. Η έκταση των επιπτώσεων στην υγεία του μικροβιακού πληθυσμού που δεν είναι στόχος των αντιβιοτικών, εξαρτάται από το αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται, τον τρόπο δράσης του και το βαθμό αντίστασης της κοινότητας. Μερικές φορές μια ανισορροπία στο συμβιωτικό εντερικό μικροβιόκοσμο λόγω χορήγησης αντιβιοτικών, μπορεί να οδηγήσει σε εντερικά προβλήματα, όπως διάρροια που σχετίζεται με αντιβιοτικά (AAD) (McFarland, 1998).

Μελέτες σε πειραματόζωα, μετά από χρήση αντιβιοτικών έδειξαν ότι σχεδόν το 88% των μεταβολιτών που βρίσκονται στα κόπρανα εμφάνισαν ποσοτική μεταβολή. Ιδιαίτερα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η περίπτωση του *Clostridium difficile* (*C. difficile*, βρίσκεται στο έντερο στο 5% περίπου του ενήλικου πληθυσμού). Η λοίμωξη από *C. difficile* σχετίζεται με τη χορήγηση ευρέως φάσματος αντιβιοτικών ασθενείς που νοσηλεύονταν και οφείλεται στην απομάκρυνση των προστατευτικών συμβιωτικών βακτηρίων εξ αιτίας των αντιβιοτικών.

Η διαταραχή του εντερικού μικροβιόκοσμου από τα αντιβιοτικά, κάνει πιο ευάλωτο το έντερο στον αποικισμό από εξωγενούς προέλευσης ενδοσπόρια του *C. difficile*. Η χορήγηση αντιβιοτικών, όπως η βανκομυκίνη ή η μετρονιδαζόλη, είναι συνήθως αποτελεσματική στη θεραπεία της λοίμωξης από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό

Ένα πρόσθετο πρόβλημα είναι η αύξηση της αντοχής στα αντιβιοτικά και η πιθανή εξάπλωση των γονιδίων αντοχής σε παθογόνα βακτήρια. Πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι ακόμη και η βραχυπρόθεσμη χορήγηση αντιβιοτικών μπορεί να οδηγήσει στη σταθεροποίηση των ανθεκτικών βακτηριακών πληθυσμών στο ανθρώπινο έντερο που αντέχουν για χρόνια με άγνωστες συνέπειες. (Jakobsson et al., 2010, Jernberg et al., 2007) Υπάρχει κίνδυνος ότι αυτό θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυξημένο επιπολασμό της αντοχής στα αντιβιοτικά, να μειώσει την πιθανότητα επιτυχούς μελλοντικής θεραπείας και στη συνέχεια να οδηγήσει σε υψηλότερο κόστος θεραπείας.

2.5 Προβιοτικά και πρεβιοτικά

Ο όρος «προβιοτικό» προέρχεται από την ελληνική γλώσσα και σημαίνει "για τη ζωή". Το 1989, ο Fuller ορίζει τα προβιοτικά ως «ένα ζωντανό μικροβιακό, διατροφικό συμπλήρωμα που επιδρά ευεργετικά στον ξενιστή με τη βελτίωση της εντερικής ισορροπίας του». Αντίθετα, το 1995 ο Gibson και οι συνεργάτες του ορίζουν τα πρεβιοτικά ως «άπεπτα συστατικά τροφίμων που επηρεάζουν ωφέλιμα τον ξενιστή με επιλεκτική διέγερση της ανάπτυξης και / ή της δραστηριότητας ενός ή περιορισμένου αριθμού βακτηρίων στο κόλον». Υπάρχει μια μακρά ιστορία της ανθρώπινης κατανάλωσης προβιοτικών (κυρίως βακτήρια γαλακτικού οξέως και *bifidobacteria*) και πρεβιοτικών, είτε ως φυσικά συστατικά του τροφίμου ή ως παραδοσιακά ζυμωμένα τρόφιμα.

Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα ο Metchnikoff παρατήρησε τις επιπτώσεις στην υγεία από τη μεταβολή της εντερικής μικροβιακής ισορροπίας, και πρότεινε ότι η κατανάλωση του γιαουρτιού που περιέχει λακτοβάκιλλους θα οδηγούσε σε μείωση των βακτηρίων που παράγουν τοξίνες στο έντερο και την αύξηση της μακροζωίας του ξενιστή. Το 1900, ο Tissier συνέστησε την προσθήκη των *bifidobacteria* στη διατροφή των βρεφών που πάσχουν από διάρροια, υποστηρίζοντας ότι τα *bifidobacteria* αντικαθιστούν τα σηπτικά βακτήρια που είναι υπεύθυνα γι' αυτήν την κατάσταση. Από τότε, πολλοί επιστήμονες έχουν παρατηρήσει ότι τα βακτήρια του παχέος εντέρου παράγουν πολλών διαφορετικών τύπων ενώσεις που διατηρούν τόσο θετικές όσο και αρνητικές επιδράσεις στη φυσιολογία του εντέρου.

Ως παράδειγμα, τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs) παράγονται από τη ζύμωση των βακτηρίων, όταν τα βακτήρια στο κόλον μεταβολίζουν πρωτεΐνες και σύνθετους υδατάνθρακες. Τα προβιοτικά και τα πρεβιοτικά θεωρούνται εναλλακτικά συμπληρώματα κατά των μεταβολικών διαταραχών, αφού ο τρόπος δράσης τους βασίζεται σε μεγάλο βαθμό σε μια διαμόρφωση της σύνθεσης και της λειτουργίας του εντερικού μικροβιόκοσμου.

Ένας αριθμός ερευνητών μελέτησαν την πιθανότητα τα βακτήρια των τροφίμων να θεραπεύουν ή να προλαμβάνουν το διαβήτη. Οι μελέτες έδειξαν ότι ορισμένα προβιοτικά (*L.lactis*, *bifidobacteria*) εκκρίνουν ένα ανάλογο ινσουλίνης και προωθούν την αναμενόμενη βιολογική επίδραση στα λιποκύτταρα-στόχους τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα. Δεδομένα από μελέτες υποστηρίζουν ότι η χρήση των προβιοτικών και πρεβιοτικών θα μπορούσε να έχει προληπτικά και θεραπευτικά αποτελέσματα για τις CVD παθήσεις, λόγω της μείωσης της χοληστερόλης, της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL-χοληστερόλη), και της φλεγμονής. Αυτό τονίζει την αυξανόμενη αναγνώριση του ρόλου των προβιοτικών και πρεβιοτικών στη ρύθμιση των μεταβολικών δραστηριοτήτων του ανθρώπινου εντερικού

μικροβιόκοσμου και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, που με τη σειρά της βελτιώνει την υγεία του ξενιστή (Goodrich JK, 2014).

ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ:

Η αρχική έννοια των προβιοτικών προέρχεται από το έργο του Metchnikoff στις αρχές του 20ου αιώνα. Στη συνέχεια, ο Shaper (1963) και αργότερα ο Mann (1974) παρατήρησαν μείωση στη χοληστερόλη του ορού μετά από κατανάλωση άφθονης ποσότητας γάλακτος που είχε υποστεί ζύμωση με λακτοβάκιλλους και / ή μπιφιδοβακτήρια. Τα προβιοτικά έχουν ερευνηθεί ως δυναμικό συμπλήρωμα διατροφής που μπορεί να συμβάλει θετικά στην υγεία ενός ατόμου. Τα οφέλη της υγείας δεν περιορίζονται στον εντερικό σωλήνα, αλλά περιλαμβάνουν επίσης και τη βελτίωση των μεταβολικών διαταραχών, όπως διαβήτη τύπου 2 και καρδιαγγειακά νοσήματα (Simon MC, 2015).

Η ευεργετική επίδραση των προβιοτικών θεωρείται ότι προέρχεται από την τροποποίηση της ανοσολογικής απόκρισης του ξενιστή. Τα εντερικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων γαλακτοβάκιλλων και μπιφιδοβακτηρίων, μπορούν να διαπεράσουν το στρώμα του εντερικού βλεννογόνου και να δώσουν έναυσμα σε φαγοκυτταρικές δραστηριότητες στη σπλήνα ή σε άλλα όργανα για πολλές ημέρες (Simenhoff ML, 1996). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 έχουν σημαντικά χαμηλότερο αριθμό βακτηρίων που παράγουν βουτυρικό οξύ, σε σύγκριση με υγιή άτομα. Ο Larsen και οι συνεργάτες του έδειξαν μια σύνδεση μεταξύ του διαβήτη τύπου 2 και των μεταβολών της σύνθεσης του εντερικού μικροβιόκοσμου. Ειδικότερα, αποδεικνύεται ένα σημαντικό χαμηλότερο ποσοστό *Firmicutes* και μπιφιδοβακτηρίων σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 σε σχέση με μη διαβητικά άτομα (Karlsson C, 2010).

Είναι ενδιαφέρον ότι, αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα προβιοτικά και τα πρεβιοτικά θα μπορούσαν να έχουν τη δυνατότητα να βελτιώσουν τα προφίλ των λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης της LDL-χοληστερόλης, της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στο πλαίσιο της θεραπείας καρδιαγγειακών νοσημάτων. Προηγούμενες μελέτες έχουν αποδείξει ότι η χορήγηση ορισμένων προβιοτικών μπορεί να προωθήσει βραχείας αλύσου λιπαρά οξέα (SCFAs), που μεταβάλλουν την έκκριση των ινκρετινών και μετριάζουν τη σύνθεση της χοληστερόλης (Goodrich JK, 2014).

Κοινά Προβιοτικά:

-*Lactobacillus acidophilus*: Βοηθάει στον έλεγχο της διάρροιας. Διασπά τη λακτόζη και έτσι μπορεί να βοηθάει άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη (σάκχαρο του γάλακτος).

-*Lactobacillus casei*: Κατάλληλος σε περιπτώσεις εντερικών μολύνσεων.

-*Lactobacillus bulgaricus*: Παράγει λακτικό οξύ που βοηθάει στην ανάπτυξη των φιλικών βακτηρίων. Βοηθάει τόσο σε δυσκοιλιότητα όσο και σε διάρροια, επιδρώντας στην κινητικότητα του εντέρου.

-*Lactobacillus plantarum*: Παράγει λακτικό οξύ που αναστέλλει την ανάπτυξη των παθογόνων και προστατεύει από το μετεωρισμό.

-*Lactobacillus rhamnosus*: Μειώνει την πιθανότητα διάρροιας από τη χρήση αντιβιοτικών.

-*Lactobacillus salivarius*: Προστατεύει από τον μετεωρισμό και αποτρέπει την ανάπτυξη ανεπιθύμητων βακτηρίων στο στόμα και στο έντερο. Είναι αποτελεσματικό και ενάντια στο ελικοβακτηρίδιο.

-*Bacillus subtilis*: Είναι ένα από τα πιο μελετημένα στελέχη και φαίνεται ότι βοηθάει στην εξισορρόπηση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Έχει αντιδιαρροϊκή δράση.

-*Bacillus longum*: Βοηθάει στην απομάκρυνση των νιτρωδών (καρκινικών ουσιών).

ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ:

Το πρεβιοτικό ορίστηκε πρώτη φορά ως ένα «μη εύπεπτο συστατικό των τροφίμων που επηρεάζει ωφέλιμα τον ξενιστή με επιλεκτική διέγερση της ανάπτυξης ή / και της δραστηριότητας ενός ή περιορισμένου αριθμού βακτηρίων στο κόλον, και ως εκ τούτου βελτιώνει την υγεία του ξενιστή». Στη συνέχεια, ο Roberfroid δήλωσε ότι "ένα πρεβιοτικό είναι ένα επιλεκτικά ζυμωμένο συστατικό που επιτρέπει συγκεκριμένες αλλαγές, τόσο στη σύνθεση ή / και δραστηριότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου, που παρέχει στον ξενιστή οφέλη όπως η ευεξία και η υγεία».

Ο Gibson και οι συνεργάτες του εξέτασαν τρία κριτήρια: (α) την αντίσταση στην γαστρική οξύτητα, την υδρόλυση από ένζυμα θηλαστικών, και την απορρόφηση από το γαστρεντερικό (β) τη ζύμωση από τον εντερικό μικροβιόκοσμο και (γ) την επιλεκτική διέγερση της ανάπτυξης ή / και της δραστηριότητας των εντερικών βακτηρίων που σχετίζονται με την ευεξία και την υγεία. Επί του παρόντος, τα πρεβιοτικά που πληρούν τα τρία αυτά κριτήρια είναι οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες, η λακτουλόζη και οι μη εύπεπτοι υδατάνθρακες.

Οι άπεπτοι υδατάνθρακες περιλαμβάνουν μεγάλους πολυσακχαρίτες (ινουλίνη, ανθεκτικά άμυλα, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτίνες κλπ), μερικούς ολιγοσακχαρίτες που διαφεύγουν από την πέψη, και σάκχαρα και αλκοόλες που δεν έχουν απορροφηθεί. Τα περισσότερα πρεβιοτικά, συμπεριλαμβανομένων των φρουκτο-ολιγοσακχαριτών και της ινουλίνης, αφομοιώνονται από τα

bifidobacteria και προκαλούν την ανάπτυξη των πληθυσμών τους. Αυτά τα βακτήρια επηρεάζουν την ομοιόσταση των εντερικών κυττάρων και αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων. Τα SCFAs, όπως το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ, και το βουτυρικό οξύ, είναι τα βασικά τελικά προϊόντα του μεταβολισμού των υδατανθράκων.

Επιπλέον, τα πρεβιοτικά μπορούν να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα, να παράγουν βιταμίνη Β και να αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων. Επίσης, τα SCFAs μειώνουν τα επίπεδα της γλυκαγόνης με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, βελτιώνουν την ανοχής στη ινσουλίνη, και ενεργοποιούν το, παρόμοιο με το γλυκογόνο, γλυκαγονόμορφο πεπτίδιο 1 (GLP-1), που μπορεί να διεγείρει την παραγωγή ινσουλίνης και την αύξηση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Έτσι, η χορήγηση των πρεβιοτικών πιθανώς παίζει ένα ρυθμιστικό ρόλο στον ενδογενή μεταβολισμό.

Οι άπεπτοι υδατάνθρακες για τους οποίους έχει επιβεβαιωθεί ότι έχουν πρεβιοτική δράση, είναι οι ολιγοσακχαρίτες της φρουκτόζης (FOS). Οι φρουκτο-πολυσακχαρίτες απαντώνται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης όπως η πικραλίδα, το σκόρδο, τα κρεμμύδια, οι αγκινάρες και τα σπαράγγια. Επίσης έχουν μελετηθεί και άλλοι άπεπτοι ολιγοσακχαρίτες για τους οποίους υπάρχει η πεποίθηση ότι μπορεί να ασκούν πρεβιοτική δράση. Σε αυτούς ανήκουν οι γλυκό-ολιγοσακχαρίτες, οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες, οι trans-αλακτοζυλιωμένοι ολιγο-σακχαρίτες, οι ισομαλτο-ολιγοσακχαρίτες, οι ξυλο-ολιγοσακχαρίτες και οι ολιγοσακχαρίτες της σόγιας (Karlsson C, 2010).

2.6 Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFA)

Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου παράγονται από τον μεταβολισμό των φυτικών ινών στο παχύ έντερο. Οι φυτικές ίνες περνούν το μεγαλύτερο μέρος του γαστρεντερικού σωλήνα αδιάσπαστες και καταλήγουν στο παχύ έντερο όπου εκεί, διασπώνται από τα βακτήρια του εντερικού μικροβιόκοσμου και έτσι παράγονται τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου. Τα κυριότερα από αυτά είναι το οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ. Απορροφούνται κυρίως μέσω της πυλαίας φλέβας και αργότερα μεταφέρονται στο συκώτι.

Τα SCFAs έχει αποδειχθεί ότι προσφέρουν πολλά οφέλη στον ενεργειακό μεταβολισμό των θηλαστικών, καθώς τα χρησιμοποιούν ως μεταβολικό καύσιμο, εκτός από τη γλυκόζη. Τα SCFAs όταν υπάρχουν σε επαρκείς ποσότητες, κυρίως το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό, είναι ουσιώδη για την υγεία και την ευεξία του ξενιστή. Το βουτυρικό οξύ για παράδειγμα, διεγείρει την κετονογένεση μέσω της οδού του ακετυλοσυνενζύμου Α. Επιπλέον,

όταν τα SCFAs και κυρίως αυτά που προαναφέραμε, οξειδώνονται διεγείρουν την παραγωγή ATP, τη λιπόλυση και την απορρόφηση καλίου και νατρίου. (Fischer JE, Towensend 2001).

Η ελάττωση της οξειδωσής τους, μπορεί να οδηγήσει στη διαταραχή της εύρυθμης λειτουργίας του εντερικού βλεννογονικού φραγμού. Επίσης, η παρουσία των υδατανθράκων (διαιτητικές ίνες, πρεβιοτικά) είναι απαραίτητη για τον προσανατολισμό της μεταβολικής δραστηριότητας προς την κατεύθυνση της ζύμωσης των υδατανθράκων. (Smith JS, Austen WG, 2001)

Στην πραγματικότητα, έχει αποδειχθεί ότι το 70% της ενέργειας που λαμβάνεται από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα προέρχεται από το βουτυρικό, το οποίο παράγεται κυρίως από βακτήρια, ιδιαίτερα από *Clostridia*. Τα SCFAs έχουν επισημανθεί ως ο συνδετικός κρίκος μεταξύ της διατροφής, του εντερικού μικροβιόκοσμου και του ενεργειακού μεταβολισμού του ξενιστή. Επίσης, έχει υπολογιστεί ότι μετά την απορρόφησή τους, ένα μεγάλο μέρος τους χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας και αυτό θα μπορούσε να προσφέρει σχεδόν το 10% των καθημερινών μας θερμιδικών απαιτήσεων. (LeBlanc et al.,2017)

Επιπλέον, παράγονται σε μικρότερο βαθμό λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλύσου (BCFAs, κυρίως ισο-βουτυρικό και ισο-βαλερικό συχνά συνοδεύονται από παραγωγή φαινόλης και αμμωνίας), τα οποία όμως κατά κύριο λόγο προέρχονται από τη ζύμωση πρωτεϊνών. Ένας προτεινόμενος μηχανισμός, σύμφωνα με τον οποίο οι διαιτητικές ίνες μπορούν να μας προστατεύσουν από την παχυσαρκία, βασίζεται στα ευεργετικά αποτελέσματα που έχουν τέτοιοι μεταβολίτες στο ενεργειακό ισοζύγιο του ξενιστή, π.χ. με τη μεσολάβηση της έκκρισης ορμονών του εντέρου που εμπλέκονται στη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού και της πρόσληψης τροφής (συμπεριλαμβανομένης της λεπτίνης, του πεπτίδιο YY κ.α.). Έτσι, μπορεί να είναι δελεαστικό να πούμε ότι η υψηλή πρόσληψη διαιτητικών ινών θα ήταν ένας τρόπος για τη μείωση του κινδύνου παχυσαρκίας. (Anderson JW,2009)

Εκτιμάται, όπως προαναφέραμε, ότι η παραγωγή των SCFAs από το μικροβιόκοσμο αντιπροσωπεύει το 5 έως 10% των συνολικών ενεργειακών αναγκών της διατροφής στους ανθρώπους. Ωστόσο, πρόσφατες έρευνες αμφισβήτησαν αυτόν τον ρόλο τους στην μείωση των κινδύνων. Υπάρχουν ολόένα και αυξανόμενα στοιχεία που δείχνουν ότι η παραγωγή των SCFAs διαφέρει σε παχύσαρκα και μη παχύσαρκα άτομα. Η διαφορά αυτή έγκειται στο γεγονός ότι ο μικροβιόκοσμος των παχύσαρκων ατόμων, μπορεί να παράγει περισσότερα SCFAs που θα μπορούσαν να αποδώσουν περισσότερη ενέργεια από τη διατροφή. Κατά συνέπεια, αυτή η επιπλέον ενέργεια που προέρχεται από τη διατροφή μπορεί να αποθηκευτεί ως λίπος, ωθώντας έτσι την αύξηση του βάρους του ξενιστή. Από αυτόν τον μηχανισμό προκύπτει ότι η ζύμωση διαιτητικών ινών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο είναι ένας παράγοντας της παχυσαρκίας. (Schwiertz et al 2009)

2.7 Παχυσαρκία και εντερικός μικροβιόκοσμος

Η παχυσαρκία είναι μια από τις μεγαλύτερες ανησυχίες για τη δημόσια υγεία, λόγω του υψηλού επιπολασμού της σε όλο τον κόσμο και τη συνεισφορά της σε υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας. Μεταβολικές ασθένειες όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, το λιπώδες ήπαρ και οι καρδιαγγειακές παθήσεις συνδέονται με την παχυσαρκία, με αντίκτυπο στις δαπάνες για τη δημόσια υγεία. Παραδοσιακά, η αλληλεπίδραση μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, κυρίως τη διατροφή (υψηλή ενεργειακή πρόσληψη) και το φυσικό επίπεδο δραστηριότητας (χαμηλή ενεργειακή δαπάνη), θεωρούνται οι κύριοι συντελεστές για την ανάπτυξη της παχυσαρκίας. Ωστόσο, ο εντερικός μικροβιόκοσμος έχει παρουσιαστεί ως ένας πιθανός σημαντικός ενδογενής παράγοντας που επηρεάζει την επιδημία της παχυσαρκίας.

Η διαλεύκανση της συμμετοχής του εντερικού μικροβιόκοσμου στο μεταβολισμό του ξενιστή κατέστη δυνατή λόγω της ανεπτυγμένης τεχνολογίας των μοριακών μεθόδων ανάλυσης. Η περιορισμένη γνώση σχετικά με μικροβιακή σύνθεση εντός της γαστρεντερικής οδού επεκτείνεται όχι μόνο από την άποψη ότι οι μικροοργανισμοί είναι παρόντες, αλλά επίσης, λόγω της λειτουργικότητάς τους. Αυτό θα συμβάλει στην εμβάθυνση της κατανόησης του φυσιολογικού ρόλου του εντερικού μικροβιόκοσμου στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας.

Ο Gordon και οι συνεργάτες του ήταν οι πρωτοπόροι στην έρευνα του ρόλου του εντερικού μικροβιόκοσμου ως περιβαλλοντικού παράγοντα που επηρεάζει τη σύνθεση του σώματος. Επαληθεύτηκε ότι τα ποντίκια που αναπύχθηκαν με μικρόβια είχαν 42% περισσότερο σωματικό λίπος από ό,τι τα αξενικά ποντίκια (πειραματόζωα σε ειδικές συνθήκες που δεν έχουν καθόλου μικροβιόκοσμο), ακόμη και αν η πρόσληψη τροφής τους ήταν χαμηλότερη. Ο εμπλουτισμός του εντερικού τους μικροβιόκοσμου προκαλούσε αύξηση του λιπώδους ιστού κατά 57%. Επίσης, μια υπερλιπιδική διατροφή προκαλούσε μικρότερη αύξηση του λιπώδους ιστού σε αξενικά ποντίκια από ότι στα ποντίκια με μικροβιόκοσμο (Gordon, 2004). Αυτό οδήγησε στην πρώτη σκέψη, ότι δηλαδή ο εντερικός μικροβιόκοσμος γενικά έχει κάποια σχέση με την παχυσαρκία.

Στη συνέχεια έγιναν μελέτες για να εξεταστεί ποιά βακτήρια ήταν υπεύθυνα (Bäckhed F, 2005). Παχύσαρκα ποντίκια, τα οποία δεν είχαν λεπτίνη, είχαν περισσότερα βακτήρια *Firmicutes* από *Bacteroidetes*. Σε άλλη μελέτη, σε τρωκτικά με υπερθερμιδική διατροφή παρατηρήθηκε αύξηση του σωματικού βάρους και παράλληλα καταγράφηκε μείωση *Bacteroidetes* και αύξηση *Firmicutes*. Η αλλαγή αυτή ήταν αναστρέψιμη όταν επανήλθαν στην

προηγούμενη διατροφή, αυξήθηκαν δηλαδή τα *Bacteroidetes* και μειώθηκαν τα *Firmicutes* (Ley RE, 2005).

Ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου ο εντερικός μικροβιόκοσμος συμβάλλει στην παχυσαρκία είναι ακόμα ασαφής. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι οι κύριες οδοί που θα μπορούσαν να συμβάλουν στην βελτίωση της παχυσαρκίας, παρέχουν επιπλέον θερμίδες, αυξάνουν τη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL), αυξάνουν την εντερική διαπερατότητα και την ενδοτοξαιμία.

Ωστόσο, μπορεί οι επιπλέον θερμίδες που προσδίδονται στον ξενιστή από τη ζύμωση των άπεπτων διατροφικών μορίων του μικροβιόκοσμου να μην είναι επαρκείς για να επάγουν σημαντικές αλλαγές στο βάρος. Ένα από τα επιχειρήματα που υποστηρίζει αυτή την υπόθεση είναι ότι η κατανάλωση μιας δίαιτας πλούσιας σε διαιτητικές ίνες θα μπορούσε να αυξήσει την παραγωγή SCFAs, τα οποία συνήθως βοηθούν να μειωθεί το βάρος και ο λιπώδης ιστός. Η δραστηριότητα της LPL επηρεάζει τη συγκέντρωση τριγλυκεριδίων στο λιπώδη ιστό. Ωστόσο, δεν μπορεί να γενικευτεί ότι ο μικροβιόκοσμος των ζώων προστατεύεται από την παχυσαρκία. Ο Fleissner και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι τα αξενικά ζώα δεν προστατεύονται από την αύξηση του σωματικού βάρους που προκαλείται από μια δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, επειδή η έκταση της προστασίας καθορίζεται από τα συστατικά της διατροφής και όχι από τη σύνθεση των μακροθρεπτικών συστατικών.

Η υπερτροφία των λιποκυττάρων λόγω της αυξημένης πρόσληψης τριγλυκεριδίων έχει θεωρηθεί ότι συμβάλλει στη χρόνια φλεγμονώδη κατάσταση μέσω της εναπόθεσης των μακροφάγων εντός του λιπώδους ιστού. Αυτό μειώνει περαιτέρω την εναπόθεση των τριγλυκεριδίων στο λιπώδη ιστό, ξεκινώντας μια έκτοπη συσσώρευση λίπους σε άλλα όργανα που οδηγεί στην ανάπτυξη ινσουλινοαντίστασης (Kalliomaki M, 2008).

Σε ανθρώπους οι πρώτες παρατηρήσεις χρονολογούνται από το 2006. Σε παχύσαρκους ενήλικες παρατηρήθηκαν χαμηλά επίπεδα *Bacteroidetes* και υψηλά *Firmicutes*, φαινόμενο αναστρέψιμο μετά από υποθερμιδική δίαιτα, άσχετα αν ήταν χαμηλή σε υδατάνθρακες ή σε λιπίδια. Παρά, όμως, την ανακάλυψη σύγχρονων και καινοτόμων τεχνικών όπως για παράδειγμα rRNA16S, PCR, FISH κ.α., η μελέτη της εντερικής χλωρίδας παρουσιάζει δυσκολίες λόγω της διαφορετικότητας μεταξύ των ατόμων, της διαφορετικότητας ανάλογα με το τμήμα του εντέρου που εξετάζεται και του γεγονότος ότι πρόκειται συχνά για αναερόβια βακτήρια που δεν μπορούν να μελετηθούν με συμβατική καλλιέργεια.

Πιθανοί Μηχανισμοί:

Οι ακόλουθοι μηχανισμοί προσπαθούν να εξηγήσουν πώς ο εντερικός μικροβιόκοσμος επηρεάζει τον λιπώδη ιστό.

1. Εξοικονόμηση ενέργειας τροφών. “Energy harvest hypothesis”.

Η εντερική χλωρίδα θα μπορούσε να αυξάνει την αποθήκευση ενέργειας με πολλούς τρόπους. Τα βακτήρια είναι πλούσια σε: 1) ένζυμα γλυκοζιδάσες που διασπούν τους γλυκοζιτικούς δεσμούς και μετατρέπουν τους πολυσακχαρίτες σε μόνο- και δι-σακχαρίτες, 2) ένζυμα β-φρουκτοσιδάσες που διασπούν δι-σακχαρίτες της φρουκτόζης, 3) φωσφο-τρανσφεράσες που συμμετέχουν στην απορρόφηση απλών σακχάρων, όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η Ν-γαλακτοσαμίνη, 4) ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη μετατροπή της χολίνης σε μεθυλαμίνες και 5) ένζυμα που διασπούν φυτικές ίνες και παράγουν λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs) όπως το προπιονικό οξύ, που είναι υπόστρωμα της νεογλυκογένεσης στα ηπατοκύτταρα και το οξικό οξύ που είναι υπόστρωμα για de novo λιπογένεση στα ηπατοκύτταρα και λιποκύτταρα.

2. Αύξηση της φλεγμονής

Οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS) είναι εξωτερικά τμήματα της κυτταρικής μεμβράνης των Gram-αρνητικών βακτηρίων και έχουν την ιδιότητα να προκαλούν φλεγμονή. Ο εντερικός αυλός είναι μια δεξαμενή των LPS. Οι LPS ονομάζονται επίσης ενδοτοξίνες, δεδομένου ότι μπορούν να ενεργοποιήσουν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και να επάγουν χρόνια χαμηλού βαθμού φλεγμονή (Membrez M, 2008).

Σε μια μελέτη, η παρεντερική χορήγηση LPSs σε ποντίκια προκάλεσε παχυσαρκία και ινσουλινοαντίσταση, ενώ σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι υπερλιπιδιακή διατροφή προκαλεί μείωση των *Bifidobacterium* και των *Firmicutes* και αύξηση των LPSs στην κυκλοφορία σε επίπεδα 10 φορές μικρότερα της οξείας φλεγμονής (μεταβολική ενδοτοξαιμία) (Turnbaugh PJ, 2009).

3. Μείωση κινητικότητας εντέρου

Τα SFCAs συνδέονται με τους υποδοχείς GPR41 και GPR43 των εντεροενδοκρινικών κυττάρων και προκαλούν την έκκριση του πεπτιδίου τυροσίνης PYY που καταστέλλει την εντερική κινητικότητα και έτσι αυξάνει την απορρόφηση νερού και ηλεκτρολυτών στο παχύ έντερο. (Xuan Li, 2017)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΚΡΑΣΙ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ

Η τροποποίηση του εντερικού μικροβιόκοσμου από τις πολυφαινόλες είναι ένα θέμα που ελκύει την προσοχή του επιστημονικού κόσμου, ολοένα και περισσότερο, τα τελευταία χρόνια. Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες όπου κυμαίνονται από την πιο απλή πειραματική προσέγγιση, δηλαδή με την επίδραση των πολυφαινολών στην ανάπτυξη απομονωμένων εντερικών βακτηρίων, μέχρι και σε περισσότερο πολύπλοκες προσεγγίσεις.

Πολλοί είναι οι συγγραφείς που έχουν στρέψει την προσοχή τους στις επιπτώσεις των συστατικών των τροφίμων (περιλαμβανομένων και των πολυφαινολών) στο μικροβίωμα του εντέρου, ενώ άλλοι έχουν επικεντρωθεί στην επίδραση των διατροφικών πολυφαινολών μέσω της μικροβιακής τροποποίησης στις πιθανές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Η Selma (J. Agric. Food Chem. 2009) και οι συνεργάτες της προσπάθησαν να κατανοήσουν τις έννοιες της μικροβιακής διάσπασης των πολυφαινολών και την τροποποίηση του εντερικού μικροβιόκοσμου από τις πολυφαινόλες και τους μεταβολίτες τους.

Η ανάπτυξη της βιολογίας και των μικροβιακών τεχνικών επέτρεψαν αξιοσημείωτες προόδους στη γνώση του εντερικού μικροβιόκοσμου και τη διαμόρφωσή τους από διατροφικά συστατικά, όπως οι πολυφαινόλες. Σε σχετικό πείραμα, διαπίστωσαν ότι τα μονομερή της φλαβαν-3-όλης [(-) - επικατεχίνη και (+) - κατεχίνη] προώθησαν την ανάπτυξη της ομάδας *Clostridium coccooides-Eubacterium*, που είναι γνωστό ότι παράγει μεγάλες ποσότητες βουτυρικού, ένα λιπαρό οξύ μικρής αλύσου (SCFA) με αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (J. Agric. Food Chem. 2009). Η (+) - κατεχίνη αύξησε επίσης, την ανάπτυξη του *Lactobacillus-Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., και *Escherichia coli*, αλλά μείωσε την ανάπτυξη του *Clostridium histolyticum*. Παρόμοια συμπεράσματα έβγαλε και ο Pozuelo (J Food Sci. 2012), ο οποίος βρήκε μια σημαντική αύξηση της ανάπτυξης του *Lactobacillus reuteri* και του *Lactobacillus acidophilus*, παρουσία μιας αντιοξειδωτικής διαιτητικής ίνας του σταφυλιού που λαμβάνεται με φυσικό τρόπο από τα κόκκινα σταφύλια.

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος διαδραματίζει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της παραγωγής, τη βιοδιαθεσιμότητα και, ως εκ τούτου, και στις βιολογικές δραστηριότητες των φαινολικών μεταβολιτών, ιδιαίτερα μετά την πρόσληψη τροφίμων που περιέχουν πολυφαινόλες υψηλού μοριακού βάρους. Ωστόσο, αν και έχει ερευνηθεί η μεγάλη ποικιλία των δραστηριοτήτων των διατροφικών πολυφαινολών, η επίδρασή τους στη διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμου και η αμφίδρομη σχέση «polyphenols↔microbiota» είναι ακόμα ελάχιστα κατανοητή.

3.1 *In vitro* μελέτες

Αν και οι *in vivo* μελέτες παρέμβασης σε ανθρώπους ή ζώα αφορούν τη μελέτη του μεταβολισμού των πολυφαινολών και τη μικροβιακή τροποποίηση, οι *in vitro* μελέτες έχουν σχεδιαστεί για την κατανόηση και την προσομοίωση των συνθηκών του εντέρου. Σε συνδυασμό με τις *in vivo* δοκιμές, τα *in vitro* πειράματα μπορούν να βοηθήσουν να φωτιστούν οι διεργασίες βιομετατροπής που προκαλούνται από τον ίδιο τον ξενιστή. Η διακύμανση των *in vitro* μοντέλων του εντέρου ποικίλει, ξεκινώντας από απλά στατικά μοντέλα (παρτίδα ζύμωσης πληθυσμού) και καταλήγοντας σε προηγμένα συνεχή μοντέλα (προσομοιωτές γαστρεντερικού).

Οι πολυφαινόλες μπορούν μετατρέπονται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο σε βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες επηρεάζουν την εντερική οικολογία και την υγεία του ξενιστή. Υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία από *in vitro* μελέτες σε ζώα και ανθρώπους που δείχνουν ότι συγκεκριμένες δόσεις επιλεγμένων πολυφαινολών μπορούν να τροποποιήσουν τη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος, και ενώ ορισμένες βακτηριακές ομάδες μπορεί να ανασταλούν, άλλες μπορεί να ευδοκιμήσουν.

Για παράδειγμα η Duenas (Montserrat Dueñas, 2015) και οι συνεργάτες της μελέτησαν δύο κλάσματα φλαβαν-3-όλης με διαφορετικό βαθμό πολυμερισμού, σε καλλιέργειες μικροβίων καθώς επίσης και τη σχέση πολυφαινολών του κρασιού, με τον εντερικό μικροβιόκοσμο από υγιείς εθελοντές. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι και τα 2 κλάσματα φλαβαν-3-όλης προώθησαν την ανάπτυξη του *Lactobacillus / Enterococcus* και ανέστειλαν την ομάδα *Cl. histolyticum* κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, αν και τα αποτελέσματα ήταν σημαντικά μόνο με το λιγότερο πολυμερισμένο κλάσμα. Οι πολυφαινόλες του κρασιού έδειξαν μόνο μια μικρή αναστολή στην ομάδα *Cl. histolyticum*, πιθανώς λόγω της χαμηλότερης περιεκτικότητας τους σε φλαβαν-3-όλες.

Οι φαινολικές ενώσεις αλλάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο και κατά συνέπεια αλλάζουν την ισοροπία Bacteroides / Firmicutes. Για παράδειγμα, σε μια *in vitro* μελέτη, χρησιμοποίησαν ένα μοντέλο εντέρου που προσομοιάζει την περιοχή του κατιόντος και ορθού στο ανθρώπινο παχύ έντερο (X. Tzounis, 2011). Πρότειναν ότι τα μονομερή της φλαβαν-3-όλης, όπως (-) επικατεχίνη και (+) κατεχίνη, μπορεί να επηρεάσουν το βακτηριακό πληθυσμό του παχέος εντέρου, ακόμη και με την παρουσία άλλων θρεπτικών συστατικών, όπως υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Επίσης, διαπίστωσαν ότι η (+) κατεχίνη ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη του *Clostridium histolyticum* και ενίσχυσε την ανάπτυξη των *E. coli* και *Clostridium coccoides-Eubacterium* βακτηρίων, ενώ η ανάπτυξη των *Bifidobacterium* και *Lactobacilli* παρέμεινε ανεπηρέαστη.

Σε παρόμοια μονοπάτια κινήθηκαν η Cueva και οι συνεργάτες της, που ανέλυσαν το πώς επηρεάζουν οι φλαβαν-3-όλες από σπόρους σταφυλιών, την ανάπτυξη των εντερικών βακτηριακών ομάδων χρησιμοποιώντας *in vitro* μοντέλα ζύμωσης. Βρήκαν ότι το προφίλ των φλαβαν-3-ολών θα μπορούσε να επηρεάσει τη σύνθεση του μικροβιόκοσμου (ανάπτυξη των *Lactobacillus* / *Enterococcus* και μείωση των *C. histolyticum*) και την καταβολική δράση της, προκαλώντας αλλαγές που θα μπορούσαν με τη σειρά τους να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα και τη βιοδραστικότητα αυτών των ενώσεων (Cueva 2014).

3.2 *In vivo* μελέτες

Μελέτες σε πειραματόζωα

Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών υπήρξε αντικείμενο πολυάριθμων μελετών σε πειραματόζωα (κυρίως σε ποντίκια), ειδικά για τις επιπτώσεις τους στις μεταβολικές διαταραχές, αλλά μόνο μερικές από αυτές τις μελέτες έχουν ακολουθήσει τη δυναμική και τη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου σε συνδυασμό με τους μεταβολίτες των πολυφαινολών που προέρχονται από τον ξενιστή. Απαιτείται όμως προσοχή στην υιοθέτηση των αποτελεσμάτων στον άνθρωπο, επειδή οι συγκρίσεις που αφορούν τις καλλιέργειες αποκάλυψαν ότι τα περισσότερα βακτηριακά γένη και τα είδη που βρέθηκαν σε ποντίκια δεν παρατηρούνται σε ανθρώπους, αν και ο εντερικός μικροβιόκοσμος των ποντικών και των ανθρώπων φιλοξενεί τα ίδια βακτηριακά φύλα. (Knight, and J. I. Gordon, 2005)

Μελέτη έδειξε ότι η κατανάλωση πολυφαινολών του κρασιού από αρουραίους με καρκίνο, οδήγησε σε διαφοροποίηση του εντερικού μικροβιόκοσμου, σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Παρά το γεγονός ότι το σύνολο των βακτηριακών μετρήσεων και η αναερόβια/αερόβια αναλογία των μικροοργανισμών στα περιττώματα των αρουραίων που κατανάλωσαν πολυφαινόλες ήταν παρόμοια με εκείνη της ομάδας ελέγχου, υπήρξε μείωση στα *propionibacteria*, *Bacteroides* και *Clostridia*, ενώ οι γαλακτοβάκιλλοι και τα μπιφιδοβακτήρια είχαν αυξηθεί. Βασισμένοι και σε προηγούμενες μελέτες, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι μπορεί η μείωση του οξειδωτικού στρες, η τροποποίηση του εντερικού μικροβιόκοσμου και η μεταβολή στην έκφραση των γονιδίων μπορεί να συνδέονται όλα με τη δράση των πολυφαινολών του κρασιού στην εντερική λειτουργία και την καρκινογένεση. (P. Dolara, 2005)

Σε έρευνα σε πειραματόζωα μελετήθηκε η επίδραση στον εντερικό μικροβιόκοσμο εκχυλισμάτων στεμφύλων, που ενσωματώθηκε στην τροφή νεοσσών κρεατοπαραγωγής, διαπιστώθηκε ότι τα πουλιά που τράφηκαν με εκχυλίσματα σταφυλιού είχαν υψηλότερους

πληθυσμούς *E. coli*, *Lactobacillus* και *Enterococcus* σε σχέση με την ομάδα αναφοράς. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα σταφύλια που είναι πλούσια σε πολυφαινόλες τροποποίησαν τη μορφολογία του εντέρου και του εντερικού μικροβιόκοσμου και αύξησαν το βαθμό της βιοποικιλότητας των εντερικών βακτηρίων στα κοτόπουλα (A. Viveros, Poultry Science, 2011).

Το 2009 η Larrosa και οι συνεργάτες της (M. Larrosa, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009) παρατήρησαν μια αύξηση στους γαλακτοβάκιλλους και τα μπιφιδοβακτήρια όταν χορηγήθηκε σε αρουραίους ρεσβερατρόλη (3,5,4'-τριυδροξυ-trans-στιλβενίου). Μετά την επαγωγή της κολίτιδας με δεξτράνη θειικού νατρίου, ο πολλαπλασιασμός τόσο των *E. coli* βακτηρίων όσο και των εντεροβακτηρίων ήταν χαμηλότερος στους αρουραίους που χορηγήθηκε ρεσβερατρόλη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αυτό θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα μιας έμμεσης επίδρασης της εμπλουτισμένης με ρεσβερατρόλη διατροφής, η οποία αύξησε τον αριθμό των μπιφιδοβακτηρίων και των γαλακτοβάκιλλων, προλαμβάνοντας τον αποικισμό και την εισβολή ιστών από εντεροβακτηρίδια συμπεριλαμβανομένων και *E. coli*.

Μελέτες παρέμβασης σε ανθρώπους

Οι μελέτες παρέμβασης είναι απαραίτητες για την κατανόηση της σχέσης μεταξύ των τροφίμων (και των συστατικών τους) και του ανθρώπινης μικροβιόκοσμου, καθώς λαμβάνουν υπόψη τη μεταβλητότητα της και το σύνολο των επιπτώσεων στην υγεία του εντέρου. Η μελέτη των επιδράσεων του αλκοόλ, γενικότερα στη δομή και τη δραστηριότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου εξακολουθεί να είναι σε πολύ πρώιμο στάδιο, ιδιαίτερα σε σύγκριση με τις υπόλοιπες επιπτώσεις που προκαλούνται από αυτό.

Η υπερβολική χρήση αλκοόλ είναι ένα παγκόσμιο πρόβλημα που προκαλεί πολλές παθολογικές επιπτώσεις στην υγεία αφού ασκεί διάφορες επιβλαβείς επιδράσεις στο γαστρεντερικό σωλήνα και τους συναφείς αδένες (Bode C, 1997). Αν και τα δεδομένα είναι περιορισμένα στους ανθρώπους, οι μελέτες τονίζουν τη σημασία των αλλαγών στον εντερικό μικροβιόκοσμο σε σχέση με τις διαταραχές που προκαλούνται από το αλκοόλ. Τέτοιες τροποποιήσεις μπορούν να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες, σε εντερική διαπερατότητα από ινογενή βακτηριακά προϊόντα που έχει ως αποτέλεσμα ενδοτοξαιμία, σε αλκοολική ηπατοπάθεια (ALD), καθώς και άλλες ασθένειες.

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν αλλοιώσεις στα κυρίαρχα βακτηριακά είδη, όπως Bacteroidetes και Firmicutes και αύξηση στα Proteobacteria. Η χρόνια κατανάλωση αλκοόλ στους ανθρώπους προκαλεί επίσης βακτηριακή υπερανάπτυξη και δυσβίωση. Σε μία μελέτη που χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι καλλιέργειας παρατηρήθηκε βακτηριακή υπερανάπτυξη στο λεπτό

έντερο, αερόβιων καθώς και αναερόβιων βακτηρίων (Bode et al., 1984). Επίσης, οι αλλοιώσεις του εντερικού μικροβιόκοσμου και η επακόλουθη βλάβη στα ηπατοκύτταρα εμφανίστηκαν ως ένας σημαντικός παθοφυσιολογικός μηχανισμός με τον οποίο το αλκοόλ μπορεί να συνεισφέρει στην κίρρωση του ήπατος και στην ηπατική ανεπάρκεια (Vassallo G, 2015). Ειδικότερα, μπορεί να υπάρξει διαρροή ανοσοενεργών ενδοτοξινών από το έντερο στο αίμα. Ένας παρόμοιος μηχανισμός προτάθηκε πρόσφατα ως εξήγηση για την υψηλή συχνότητα εμφάνισης άγχους και κατάθλιψης που παρατηρείται σε ασθενείς με αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ και ως συνδυασμός φαγητού και αλκοόλ μετά από περιόδους αποτοξίνωσης (Leclercq S, 2014).

Αναφερόμενοι όμως στο κρασί, οι περισσότερες από τις μελέτες παρέμβασης που έχουν διεξαχθεί, έχουν σκοπό τη μελέτη του εντερικού μεταβολισμού και πως επηρεάζεται από τις πολυφαινόλες του κρασιού. Αρκετοί ερευνητές έχουν χρησιμοποιήσει *in vitro* μοντέλα που προσομοιώνουν τις συνθήκες του γαστρεντερικού σωλήνα, προκειμένου να αξιολογηθεί ο μεταβολισμός των πολυφαινολών από τα βακτήρια του εντέρου και επίσης η επίδραση των πολυφαινολών ή / και των μεταβολιτών τους στην αύξηση και τη μεταβολική δραστηριότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου.

Μια από τις λιγιστές μελέτες που έχουν διεξαχθεί για να αξιολογήσουν το περιεχόμενο των φαινολικών μεταβολιτών στα κόπρανα μετά τη λήψη κρασιού είναι των Jiménez-Girón (Jiménez-Girón, Metabolites 2014). Επιπλέον, επιβεβαιώθηκε ότι ορισμένες ενώσεις του κρασιού διέρχονται ανέπαφες μέσω της γαστρεντερικής οδού (όπως π.χ. το 2-υδροξυγλουταρικό οξύ) καθώς και ότι η κατανάλωση κρασιού επηρεάζει και άλλες οδούς θρεπτικών συστατικών (π.χ. λιπίδια) και ενδογενείς μεταβολίτες (ξανθίνη, χολερυθρίνη). Συνολικά, οι διαφορές που παρατηρούνται στους μεταβολίτες των κοπράνων μετά από την κατανάλωση κρασιού αντανακλούν τις αλλαγές στη σύνθεση της μικροχλωρίδας και τη λειτουργικότητά της.

Ο Yamakoshi και οι συνεργάτες του (J. Yamakoshi, 2001) απέδειξαν ότι όταν ένα εκχύλισμα από σπόρους σταφυλιού πλούσιο σε προανθοκυανιδίνη, καταναλώνεται από υγιείς ενήλικες για 2 εβδομάδες, αυξάνεται σημαντικά ο αριθμός των μπιφιδοβακτηρίων. Αντίστοιχα ο Kemperman (Kemperman, Food Research International, 2013) έδειξε ότι η κατανάλωση των πολυφαινολών του κόκκινου κρασιού αύξησε σημαντικά τον αριθμό των *Enterococcus*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides uniformis*, *Eggerthella lenta*, και *Blautia coccoides-E. rectale* και άφησε αμετάβλητη την ποσότητα των λακτοβάκιλλων, ενώ η Dolara αναφέρει ότι τα μονομερή των φλαβαν-3-ολών και άλλες πηγές φλαβαν-3-όλης, όπως η σοκολάτα, το πράσινο τσάι και εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού μπορεί να ρυθμίζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο, να παράγουν αλλαγές σε ευεργετικά βακτήρια όπως οι λακτοβάκιλλοι, αλλά και να αναστέλλουν άλλες ομάδες όπως τα Clostridia (P. Dolara, 2005).

Έρευνες που αφορούν την χρήση των ανθρώπων δυνητικά παρέχουν τα καλύτερα μοντέλα για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων των συστατικών των τροφίμων (π.χ. πολυφαινόλες) με το μικροβιόκοσμο. Η χρήση των cross-over μελετών, όπου οι εθελοντές ουσιαστικά λειτουργούν και ως δειγματοληψία αναφοράς του εαυτού τους, επιτρέπει την πολυεπίπεδη ανάλυση συστημάτων που αυξάνουν την ισχύ, αλλά απαιτεί ένα σχετικό αριθμό των εθελοντών για να καταστούν δυνατά τα πολυμεταβλητά μοντέλα.

Προηγούμενες μελέτες παρέμβασης έχουν δείξει ότι εκτός από την ατομική διακύμανση στην ημερήσια πρόσληψη πολυφαινόλων, οι ατομικές διαφορές στη σύνθεση του ανθρώπινου μικροβιόκοσμου μπορεί να οδηγήσουν σε διαφορές στη βιοδιαθεσιμότητα και τη βιοδραστικότητα των πολυφαινόλων και των μεταβολιτών τους.

3.3 Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης

Οι πολυφαινόλες αναγνωρίζονται από το ανθρώπινο σώμα ως ξενοβιοτικά, και η βιοδιαθεσιμότητά τους είναι, ως εκ τούτου σχετικά χαμηλή σε σύγκριση με τα μικρο/μακροθρεπτικά συστατικά. Ανάλογα με το βαθμό της δομικής πολυπλοκότητας και του πολυμερισμού, οι ενώσεις αυτές μπορούν να απορροφηθούν εύκολα στο λεπτό έντερο (χαμηλού μοριακού βάρους πολυφαινόλες, όπως π.χ. μονομερείς και διμερείς δομές) ή να φτάσουν μέχρι το παχύ έντερο σχεδόν αμετάβλητες (ολιγομερείς και πολυμερείς πολυφαινόλες). Έχει υπολογιστεί ότι μόνο το 5-10% της συνολικής πρόσληψης πολυφαινόλων απορροφάται στο λεπτό έντερο (Cardona, 2013).

Οι υπόλοιπες πολυφαινόλες (90-95% της συνολικής πρόσληψης πολυφαινόλων) συσσωρεύονται στο μεγάλο εντερικό αυλό όπου, μαζί με προϊόντα σύζευξης εκκρίνονται στον εντερικό αυλό μέσω της χολής και υποβάλλονται σε ενζυμικές δραστηριότητες της εντερικής μικροβιακής κοινότητας. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι ως εκ τούτου, υπεύθυνος για την διάσπαση των αρχικών πολυφαινολικών δομών σε χαμηλού μοριακού βάρους, φαινολικούς μεταβολίτες που, που όταν απορροφηθούν, μπορεί να είναι υπεύθυνοι για τις επιπτώσεις στην υγεία που προέρχονται από κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε πολυφαινόλες, σε σχέση με τις αρχικές ενώσεις πολυφαινόλων που βρίσκονται στα τρόφιμα.

Η επίδραση των πολυφαινόλων στη βακτηριακή ανάπτυξη και το μεταβολισμό εξαρτάται από τη δομή της πολυφαινόλης, τη δοσολογία και το στέλεχος του μικροοργανισμού. Για παράδειγμα, τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά στις πολυφαινόλες οπότε δεν τις μεταβολίζουν σε σχέση με τα Gram-θετικά βακτήρια, πιθανόν λόγω των διαφορών που

βρέθηκαν στη σύνθεση του τοιχώματός τους. Πρόσφατα ευρήματα υποδηλώνουν μια ποικιλία πιθανών μηχανισμών δράσης των πολυφαινόλων στα βακτηριακά κύτταρα. Για παράδειγμα, οι πολυφαινόλες μπορεί να συνδεθούν με τις βακτηριακές κυτταρικές μεμβράνες με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, με συνέπεια να διαταραχτεί η λειτουργία της μεμβράνης και επομένως να επέλθει αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης.

Πολυφαινόλες, όπως οι κατεχίνες, ενεργούν σε διαφορετικά είδη βακτηρίων (*E. coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* και *Bacillus subtilis*) με το να παράγουν υπεροξειδίο του υδρογόνου και με το να μεταβάλουν τη διαπερατότητα της μικροβιακής μεμβράνης. Ο Sirk και οι συνεργάτες του (Sirk TW, 2009) έδειξαν ότι ο μηχανισμός των αντιμικροβιακών, αντικαρκινικών και άλλων ευεργετικών δράσεων των κατεχινών, μπορεί να διέπεται μέσω των δεσμών υδρογόνου των υδροξυλομάδων τους με τις λιπιδικές διπλοστοιβάδες των κυτταρικών μεμβρανών. Η μοριακή δομή των κατεχινών επηρεάζει σημαντικά την απορρόφησή τους, καθώς και την ικανότητά τους να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις ομάδες της κεφαλής των λιπιδίων.

Η μικροβιακή μετατροπή των μη-φλαβονοειδών, πολυμερικών μορίων που ονομάζονται ελλαγιταννίνες (ή υδρολύσιμες ταννίνες) έχει επίσης διερευνηθεί κατά την τελευταία δεκαετία. Μετά την κατανάλωση τροφίμων πλούσιων σε ελλαγιταννίνες, όπως φράουλες, βατόμουρα, καρύδια, κρασιά και ρόδια, οι δομές αυτές υποβάλλονται σε υδρόλυση στον εντερικό αυλό, απελευθερώνοντας ελεύθερο ελλαγικό οξύ. Μόλις βρεθεί το ελλαγικό οξύ στο παχύ έντερο, μεταβολίζεται από την εντερική μικροχλωρίδα ώστε να παραχθεί μια σειρά παραγώγων ενώσεων που ονομάζονται ουρολιθίνες και χαρακτηρίζονται από ένα κοινό 6H-dibenzo[b,d]pyran-6-one-nucleus και μια μείωση του αριθμού των φαινολικών υδροξυλίων (Urolithin D → C → A → B).

Όλοι αυτοί οι φαινολικοί μεταβολίτες απορροφούνται ή εκκρίνονται από τα κόπρανα. Όταν απορροφηθούν, φτάνουν το ήπαρ μέσω της πυλαίας φλέβας, όπου περνάνε στη Φάση II (γλυκουρονίωση, μεθυλίωση, θείωση ή ένας συνδυασμός αυτών) έως ότου εισέλθουν τελικά στη συστηματική κυκλοφορία και διανεμηθούν στα όργανα ή αποβληθούν με τα ούρα (Selma MV, 2009). Τα κύρια γένη που εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φαινολικών ενώσεων, όπως οι ισοφλαβόνες (daidzein), οι φλαβονόλες (quercetin, kaempferol), οι φλαβόνες (naringenin, ixochanthumol) και οι φλαβαν-3-όλες (κατεχίνη και επικατεχίνη), είναι τα *Clostridium* και *Eubacterium*.

Για παράδειγμα, ο Gonthier και οι συνεργάτες του το 2003 έδειξαν ότι μια σημαντική ποσότητα των πολυφαινόλων που υπάρχουν στο πλάσμα και απεκκρίνονται στα ούρα των αρουραίων, που τρέφονται με πολυφαινόλες του κόκκινου κρασιού, περιλαμβάνει μεταβολίτες

αρωματικού οξέος που σχηματίζονται στο έντερο. Είναι πιθανό ότι αυτοί οι μεταβολίτες προσφέρουν ένα προστατευτικό αποτέλεσμα κατά του καρκίνου του παχέος εντέρου, όπως τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της οξειδωτικής βλάβης του DNA.

Επί του παρόντος, εκτιμάται ότι 500-1000 διαφορετικά μικροβιακά είδη κατοικούν στο γαστρεντερικό σωλήνα, φθάνοντας τις υψηλότερες συγκεντρώσεις στο κόλον (έως 10¹² κύτταρα ανά γραμμάριο κοπράνων). Ωστόσο, έχουν βρεθεί μόνο μερικά είδη βακτηρίων (π.χ. *Escherichia coli*, *Bifidobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Bacteroides sp.*, *Eubacterium sp.*) που καταλύουν το μεταβολισμό των φαινολικών, μαζί με τις καταβολικές οδούς που εμπλέκονται. Το σενάριο εμφανίζεται ακόμη πιο περίπλοκο όταν εξετάζεται η αμφίδρομη σχέση "Πολυφαινόλες ↔ μικροβιόκοσμος».

Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι, τόσο τα φαινολικά υποστρώματα που παρέχονται στα βακτήρια του εντέρου μέσα από διαφορετικά μοτίβα της διαιτητικής πρόσληψης, όσο και οι παραγόμενοι αρωματικοί μεταβολίτες, μπορούν να διαμορφώσουν τη σύνθεση του μικροβιόκοσμου μέσω συγκεκριμένων πρεβιοτικών και αντιμικροβιακών δραστηριοτήτων εναντίον των εντερικών παθογόνων βακτηρίων. Ο σχηματισμός των βιοδραστικών μεταβολιτών των πολυφαινολών και η διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμου συμβάλλουν στην υγεία του ξενιστή, αν και οι μηχανισμοί δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως.

Αυτά τα οφέλη της υγείας περιλαμβάνουν την προστασία από τις γαστρεντερικές διαταραχές, την επεξεργασία των θρεπτικών συστατικών, τη μείωση του ορού της χοληστερόλης, την ενίσχυση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων, την αυξημένη έκκριση βλέννας και τη διαμόρφωση της εντερικής ανοσολογικής απόκρισης μέσω τόνωσης των κυτοκινών. Ομοίως, την τελευταία δεκαετία, πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν προσκομίσει νέα στοιχεία σχετικά με το ευρύ φάσμα της υγείας και των διατροφικών πολυφαινολών, που έχουν ήδη τεκμηριωθεί με *in vitro* δεδομένα, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών, αντικαρκινικών, αντιδιαβητικών και νευροπροστατευτικών δυνατοτήτων τους, γεγονός που υποδηλώνει τη σύνδεση μεταξύ της κατανάλωσης τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες και το μειωμένο κίνδυνο πολλών χρόνιων ασθενειών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας ερευνητικής διατριβής είναι η διερεύνηση της επίδρασης των προϊόντων της *in vitro* ζύμωσης των φαινολικών ενώσεων κρασιού στον εντερικό μικροβιόκοσμο και πιο συγκεκριμένα στα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs).

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν ως εμβόλιο για την *in vitro* ζύμωση δείγματα κοπράνων από 6 υγιείς εθελοντές ηλικίας 25-40 ετών, όπου οι 3 ήταν φυσιολογικού βάρους (BMI =19-25) και οι 3 ήταν παχύσαρκοι (BMI >30). Πραγματοποιήθηκε εκχύλιση Blight Dyer του κρασιού και παραλαβή του υδατικού κλάσματος (W) και των ολικών λιποειδών (TL). Ακολούθησε επώαση των κοπράνων με ινουλίνη, με τα εκχυλίσματα του κρασιού και πρότυπες φαινολικές ενώσεις για 0, 6 και 24 ώρες και μετρήθηκαν τα επίπεδα των SCFAs.

5.1 Εθελοντές –Κριτήρια επιλογής

Επιλέχθηκαν έξι υγιείς γυναίκες και άντρες ηλικίας 18-40 ετών και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, νορμοβαρείς και παχύσαρκοι, ανάλογα με το δείκτη μάζας σώματος τους. Ο δείκτης μάζας σώματος της ομάδας των νορμοβαρών κυμαινόταν από 18.50 - 24.99 kg/m² και των παχύσαρκων ήταν μεγαλύτερος ή ίσος με 30.00 kg/m².

Οι εθελοντές έπρεπε να μην αντιμετωπίζουν προβλήματα του πεπτικού συστήματος όπως για παράδειγμα ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι εντέρου, οξεία διάρροια τις προηγούμενες τέσσερις εβδομάδες και έντονη δυσκοιλιότητα. Επίσης, δεν έπρεπε να έχουν χρόνια ή αυτοάνοσα νοσήματα, όπως για παράδειγμα ιστορικό στεφανιαίας νόσου, ιστορικό ηπατικών και νεφρικών παθήσεων, διαβήτη, καθώς επίσης να μην έχουν ενεργές λοιμώξεις του αναπνευστικού και να μην έχουν λάβει κάποιο αντιβιοτικό ή αντιφλεγμονώδες φάρμακο τους τελευταίους 2 μήνες πριν την μελέτη. Επίσης να μην έχουν καταναλώσει προβιοτικά δύο εβδομάδες πριν τη μελέτη. Για τις γυναίκες εθελόντριες δεν έπρεπε να έχει υπάρξει εγκυμοσύνη το τελευταίο έτος. Τέλος, αποκλείονταν οι εθελοντές που είχαν ακραίες διαιτητικές συμπεριφορές (π.χ. χορτοφάγοι).

5.2 Εκχύλιση ολικών λιποειδών κατά *Blight-Dyer*

➤ Αρχή μεθόδου:

Με κατάλληλης ποιότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών, καθώς επίσης και εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ουσιών (π.χ. άλατα, αμινοξέα, σάκχαρα, κλπ.). Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό, στη χλωροφορμική φάση κατανέμονται όλα τα λιποειδή, ενώ στην υδατική φάση κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά.

➤ Αναλυτική πορεία:

Σε διαχωριστική χοάνη των 250 ml βάζουμε 8 ml slurry (1 ml από 8 δείγματα erpendorf) και προσθέτουμε 10 ml χλωροφόρμιο και 20 ml μεθανόλη, ώστε να προκύψει το μονοφασικό

σύστημα (CHCl₃:CH₃OH:H₂O, 1:2:0,8). Το μίγμα αναδεύεται και παραμένει για 10 λεπτά. Προστίθενται 9,5 ml χλωροφόρμιο και 9,5 ml νερό, ώστε να προκύψει το διφασικό σύστημα (C:M:W, 1:1:0,9) και αναδεύεται ισχυρά.

Το μίγμα αφήνεται σε ηρεμία για 2 ώρες. Παραλαμβάνεται η χλωροφορμική (κάτω) φάση κάθε δείγματος (7 δείγματα) σε προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες (7 φιάλες) και πετιέται η μεσόφαση. Έπειτα, παραλαμβάνεται η υδατική (πάνω) φάση κάθε δείγματος σε προζυγισμένες σφαιρικές φιάλες (7 φιάλες). Πραγματοποιείται εξάτμιση των δειγμάτων στο flash evaporator. Ζύγιση κάθε φιάλης μετά από κάθε εξάτμιση (14 εξατμίσεις). Τέλος, γίνεται μεταφορά της υδατικής φάσης σε προζυγισμένους ουροσυλλέκτες και μεταφορά της χλωροφορμικής φάσης σε προζυγισμένους γυάλινους βιδωτούς σωλήνες (7 σωλήνες) με διαλύτη αιθανόλη και πιπέτες παστέρ (2 ml).

Πίνακας 4: Βάρη ουροσυλλεκτών και κρασιού

Ουροσυλλέκτες	Μικτό Βάρος (ουροσυλλέκτης/ κρασί) (gr)	Μέσος όρος Βάρους Ουροσυλλεκτών (gr)	Καθαρό βάρος κρασιού (gr)
1	12,2430	8,09436	4,1486
2	12,1732	8,09436	4,0788
3	13,1723	8,09436	5,0779
4	14,2141	8,09436	6,1197
Συνολικά	-----	-----	19,425

5.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών σε εκχυλίσματα κρασιού

➤ Αρχή μεθόδου:

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

➤ Αναλυτική πορεία:

Πραγματοποιείται αραιώση 1/100 στα εκχυλίσματα από κρασί (W,TL). Δηλαδή σε erpendorf τοποθετώ για το W 90 ml νερό και 10 ml εκχύλισμα και για το TL 180 ml αιθανόλη και 20 ml εκχύλισμα. Τοποθετούνται κατάλληλες ποσότητες διαλύματος γαλλικού οξέος σε (2, 5, 15, 30, 45, 60 ml) δοκιμαστικούς σωλήνες όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Έπειτα, τοποθετούνται διαφορετικές ποσότητες εκχυλίσματος TL στους σωλήνες (15, 30, 60 ml) όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Τοποθετούνται διαφορετικές ποσότητες εκχυλίσματος W στους σωλήνες (5, 15, 30 ml) όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Στη συνέχεια προστίθενται διαδοχικά κατάλληλες ποσότητες νερού και 0,1 ml Folin – Ciocalteu. Αναδεύουμε ισχυρά (vortex). Μετά από παραμονή 3 λεπτών προστίθενται 0,4 ml Na_2CO_3 35% και το όλο μίγμα αφού αναδευτεί εντόνως, αφήνεται προς αντίδραση για 1 ώρα. Φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 725 nm μηδενίζοντας με το τυφλό διάλυμα.

5.4 Πιλοτικά πειράματα

1^ο Πιλοτικό πείραμα

Το 1ο πιλοτικό πείραμα το κάναμε για να γίνει η επιλογή του δοχείου και του όγκου για την *in vitro* ζύμωση με κόπρανα (50 ml ή 15ml). Καταλήξαμε να χρησιμοποιήσουμε διαφορετικά δοχεία για κάθε χρόνο επώασης με όγκο 16 ml (σωλήνες falcon των 50 ml). Σύμφωνα με την *in vitro* δοκιμασία ζύμωσης υδατανθράκων φτιάξαμε το υπόστρωμα (basal medium 16 αντιδραστήριων) για να μπει το υγρό των κοπράνων (εμβόλιο) για να γίνει η ζύμωση των υδατανθράκων. Ο υδατάνθρακας που βάλαμε είναι η ινουλίνη, η οποία προστίθεται ως αποστειρωμένο διάλυμα λίγο πριν τον εμβολιασμό και μέσα στον αναερόβιο θάλαμο, σε

ποσότητα αντίστοιχη έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1%. Στη συνέχεια μετά την ανάδευση και διαλυτοποίηση της πηγής άνθρακα, γινόταν ο εμβολιασμός με το διάλυμα κοπράνων.

Ζυγίσαμε 0,0025 gr σε 10 ml απιονισμένο νερό (0,025 gr στα 100 ml H₂O) και φτιάξαμε 200 ml από το basal medium. Έγινε αναγωγή σε όλα στο λίτρο (200 ml απιονισμένου νερού).

- 1) 0,4 gr peptone water
- 2) 0,4 gr yeast extract
- 3) 0,02 gr NaCl
- 4) 0,008 gr kg HPO₄
- 5) 0,008 gr KH₂PO₄
- 6) 0,002 gr MgSO₄ 7H₂O
- 7) 0,002 gr CaCl₂ 6H₂O
- 8) 0,4 gr NaHCO₃
- 9) 0,1 gr cystein HCl αφαιρούμε το μοριακό βάρος του H₂O επειδή είναι ένυδρη. (0,1 x 175,64 x 157,64 = 0,1114 gr.)
- 10) 0,1 gr bile salts
- 11) 0,01 gr hemin
- 12) 0,4 ml tween 80 παχύρευστο
- 13) 2 ml vitamin k1
- 14) 0,025 gr στα 100 ml H₂O rezazurine

Για την προετοιμασία των κοπράνων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Phosphate-buffered saline (PBS) (για την προετοιμασία του fecal slurry: 20% w/v π.χ. 20 g κοπράνων σε 100 ml PBS) (Palframan R.J. et al 2002).

- 1) 8 g/L NaCl
- 2) 0,2 g/L KCl
- 3) 1,15 g/L Na₂HPO₄
- 4) 0,2 g/L KH₂PO₄

Πίνακας 5: Αραιώσεις διαλυμάτων για PBS

Για 1 lt	για 100 ml
8 g lt NaCl	0,8 gr NaCl
0,2 g lt KCl	0,02 gr KCl
1,15 g lt Na ₂ HPO ₄	0,115 gr Na ₂ HPO ₄
0,2 g lt KH ₂ PO ₄	0,02 gr H ₂ PO ₄

Στη συνέχεια ρυθμίσαμε το pH του διαλύματος PBS στο 7,3 και του Basal Medium στο 7. Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά το διάλυμα με το basal medium τοποθετήθηκε σε αναερόβιο θάλαμο ώστε να προαναχθεί για 24h και το PBS τοποθετήθηκε στο ψυγείο. Την επόμενη μέρα ετοιμάσαμε τριβλία με θρεπτικό υλικό το Columbia blood άγαρ. Κάναμε δύο αραιώσεις (10^{-4} , 10^{-6}) από δύο τριβλία, δηλαδή σύνολο 4 τριβλία. Χρειαστήκαμε όμως 2 μπουκαλάκια με slurry, άρα 8 τριβλία, τα οποία γίνονται 16 τριβλία καθώς μετράμε 2 χρονικές στιγμές, την ώρα μηδέν και τις 6 ώρες.

Βράσαμε για 20 λεπτά 20 μπουκαλάκια universal που έχουν 9 ml από το half strength peptone water (για την αναγωγή του υλικού), το οποίο θα το χρειαστούμε για διαδοχικές αραιώσεις (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}), 5 μπουκαλάκια για αραιώση. Την επόμενη μέρα ζυγίσαμε ινουλίνη (orafted granulated) με αποστειρωμένα αλουμινόχαρτα 0,9 gr. Εθελοντής μας έδωσε δείγμα κοπράνων σε προζυγισμένο συλλέκτη κοπράνων.

Λευκός συλλέκτης: καθαρό βάρος 28,89 gr + σακουλάκι 34,54 gr

Λευκός συλλέκτης: μικτό βάρος 128,59 gr

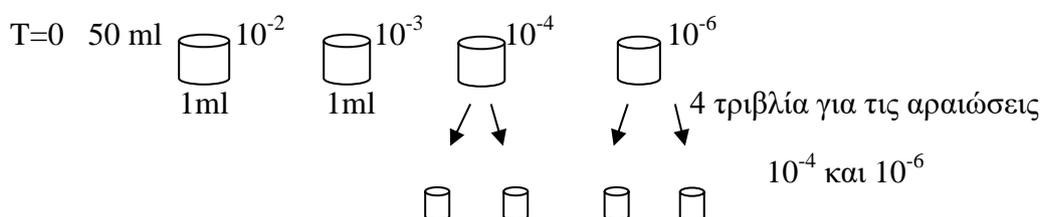
Ζυγίσαμε 10,07 gr κοπράνων στα 50ml slurry. Η κένωση ήταν καλής υφής, BS3. Ακολούθησε ομογενοποίηση μίγματος με το χέρι. Βάλαμε το μόλις δημιουργημένο faecal slurry σε falcon και αμέσως μετά στον αναερόβιο θάλαμο. Μέσα στον αναερόβιο βάλαμε στο basal medium την ινουλίνη. Στα 90 ml basal medium βάλαμε 0,9 gr ινουλίνη. Τέλος, βάλαμε τα 10 ml faecal slurry υπό ανάδευση με κομμένο tip με πιπέτα 1 ml. Τοποθετήσαμε το basal medium (90 ml) + 10 ml faecal slurry + 0,9 inu στον αναερόβιο θάλαμο.

1° Πείραμα (INU1)

Το πρώτο πιλοτικό πείραμα πραγματοποιήθηκε για να γίνει η επιλογή του δοχείου και του όγκου για την *in vitro* επώαση με τα κόπρανα. Η επιλογή ήταν μεταξύ ενός δοχείου 50 ml (INU1), όπου θα υπήρχε ένα κοινό μίγμα επώασης και θα παίρναμε σε κάθε χρονική στιγμή ένα μέρος του και η δεύτερη επιλογή ήταν να υπήρχαν 3 δοχεία των 16 ml (INU2), όπου θα είχαμε διαφορετικά μίγματα για κάθε χρονική στιγμή.

50 ml INU1 t : χρόνος ζύμωσης 0, 6, 24h .

Παίρνουμε υπό ασηπτικές συνθήκες δείγμα 1ml από την καλλιέργεια ζύμωσης και κάνουμε δεκαδικές διαδοχικές αραιώσεις σε peptone water. Στη συνέχεια γίνετονται επιστρώσεις σε τριβλία CBA, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα που ακολουθεί:



Για τους χρόνους T=6 και T=24 ακολουθήθηκαν οι ίδιες διαδικασίες όπως με το χρόνο T=0. Τα τριβλία τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37 °C, σε αναερόβιες συνθήκες και έγινε καταμέτρηση των αποικιών σε 48 ώρες.

2° Πείραμα (INU2)

3 δοχεία των 16 ml (INU2), διαφορετικά μίγματα για κάθε χρονική στιγμή.

INU2 για t=0h



t = 0h 16,67 ml

t = 6h 16,67 ml

t = 24h 16,67 ml

Ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία όπως στη προηγούμενη πειραματική διάταξη (INU1).

Τοποθετήθηκαν τα δύο δοχεία για επώαση μετά τον εμβολιασμό, ενώ το ένα τοποθετήθηκε απευθείας στους -80°C. Το δεύτερο δοχείο απομακρύνθηκε για επεξεργασία μετά από 6 ώρες ζύμωσης, ενώ το τελευταίο μετά από 24 ώρες ζύμωσης. Όταν ολοκληρώθηκαν οι επώσεις των τριβλίων ακολούθησε καταμέτρηση μικροοργανισμών με χρήση στερεοσκοπίου.

2^ο πιλοτικό πείραμα

Το 2^ο πιλοτικό δοσοεξαρτώμενο πείραμα το κάναμε για να δούμε τη βιωσιμότητα των μικροοργανισμών στο πυκνό κρασί. Ξεκινήσαμε παρασκευάζοντας το basal medium με τον ίδιο τρόπο όπως τα προηγούμενα πειράματα. Οι ποσότητες που βάλουμε είναι υπολογισμένες για 300 ml H₂O, τελικό όγκο (273 ml H₂O + όγκος εμβολίου).

- 1) 0,6 gr peptone water
- 2) 0,6 gr yeast extract
- 3) 0,03 gr NaCl
- 4) 0,012 gr K₂HPO₄
- 5) 0,012 gr KH₂PO₄
- 6) 0,003 gr MgSO₄ 7 H₂O
- 7) 0,003 gr CaCl₂ 6 H₂O
- 8) 0,6 gr NaHCO₃
- 9) 0,15 gr cystein HCl → 0,1671gr (ένυδρη)
- 10) 0,15 gr bile salts
- 11) 0,015 gr hemin
- 12) 0,6 ml tween 80 παχύρευστο
- 13) 0,6 μl vitamin k1
- 14) 1,2 ml rezazurine

Ρύθμιση pH στο 7 με HCl 1N. Για την προετοιμασία των κοπράνων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Phosphate-buffered saline (PBS) (Palframan R.J. et al 2002).

- 1) 8 g/L NaCl
- 2) 0,2 g/L KCl
- 3) 1,15 g/L Na₂HPO₄
- 4) 0,2 g/L KH₂PO₄

Ρύθμιση pH στο 7,3 με HCl 1N.

Προετοιμάσαμε 6 γυάλινα Durham για τα δείγματα (Control , INU (ινουλίνη), WA πυκνό 1 : 1, WB 1 : 10, WΓ 1 : 100 και WΔ 1 : 1000), που πρέπει να έχουν από 45ml τελικό όγκο. Το καθένα, σύμφωνα με την ακόλουθη συνταγή:

Βάλαμε σε όλα τα durham 41ml B.M και προσθέσαμε ανάλογα με το δείγμα (Control , INU, WA πυκνό 1 : 1, WB 1 : 10, WG 1 : 100 και WΔ 1 : 1000):

1. (control) 41ml BM + 4ml H₂O
2. (inu) 41ml BM + 4ml διάλυμα ινουλίνης 1%
3. (WA) 41ml BM + 4ml πυκνή υδατική φάση κρασιού
4. (WB 1/10) 41ml BM + 400μl π.κρασί + 3600μl H₂O
5. (WG 1/100) 41ml BM + 40μl π.κρασί + 3960μl H₂O
6. (WΔ 1/500) 41ml BM + 8μl π.κρασί + 3992μl H₂O

Η αποστείρωση του BM γίνεται χωριστά από το διάλυμα ινουλίνης στους 121°C για 15 min. Τα εκχυλίσματα του κρασιού είχαν αποστειρωθεί με διήθηση (διάμετρος φίλτρου 0.2μ) Όλα τα υλικά είχαν προ-αναχθεί. Εθελοντής έδωσε δείγμα κοπράνων την ίδια ημέρα με την έναρξη της ζύμωσης,για την προετοιμασία του Feacal slurry:

Λευκός συλλέκτης, net weight: 29,87gr + σακουλάκι= 35,52 gr

Μεικτό βάρος: 99,89 gr

Ζυγίσαμε 20,06 gr κοπράνων, έπειτα βάλαμε τα 100 ml PBS και ομογενοποιήσαμε με το χέρι. Ακολούθησε προετοιμασία στον αναερόβιο θάλαμο.

Καταμέτρηση του ολικού μεσόφιλου μικροβιακού φορτίου μετά από ζύμωση με εντερικό μικροβιόκοσμο σε t=0, 6, 24 ώρες

Στα δείγματα που απομακρύνθηκαν από τα δοχεία ζύμωσης έγιναν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και επίστρωση σε τρυβλία CBA. Τα τρυβλία επώαστηκαν για 48 ώρες σε αναερόβιες συνθήκες και ακολούθησε καταμέτρηση των αποικιών.

5.5 Πρωτόκολλο *in vitro* ζύμωσης με κόπρανα

Εκχυλίσματα κρασιού προετοιμασία

Οι τελικές συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων στο θρεπτικό μέσο επώασης θα είναι 1 mg φαινολικών στα 15 ml 3.33 mg φαινολικών στα 50 ml.

Φαινολικά συστατικά προετοιμασία

Οι τελικές συγκεντρώσεις των φαινολικών στο θρεπτικό μέσο επώασης θα είναι 10μg/ml, δηλαδή 33,1μM κερκετίνη, 43,9 μM ρεσβερατρόλη, 58,8 μM γαλλικό οξύ (MB: 302 κερκετίνη, 228 ρεσβερατρόλη, 170 γαλλικό οξύ). Διαλύματα φαινολικών συγκέντρωσης 5mg/ml σε DMSO.

Ζυγίζω περίπου < 5 mg από κάθε φαινολικό σε eppendorf και προσθέτω την κατάλληλη ποσότητα DMSO ώστε να έχω συγκέντρωση 5mg/ml. Από αυτό το διάλυμα βάζω 100 μl/50 ml διάλυμα κοπράνων. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιείται η ινουλίνη με γνωστή πρεβιοτική δράση (Orafti GR, BENEIO-Orafti, Oreye, Belgium) σε αναλογία 1% (w/v) (0.5g). Στη συνέχεια γίνεται επισήμανση των δειγμάτων.

Για την προετοιμασία των κοπράνων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Phosphate-buffered saline (PBS) (για την προετοιμασία του faecal slurry: 20% w/v π.χ. 20 g κοπράνων σε 100 ml PBS) (Palframan R.J. et al 2002).

- 1) 8 g/L NaCl
- 2) 0,2 g/L KCl
- 3) 1,15 g/L Na₂HPO₄
- 4) 0,2 g/L KH₂PO₄

Ρύθμιση του pH στο 7,3.

Αναλυτική πορεία

Προετοιμασία εμβολίου κοπράνων για τις *in vitro* ζυμώσεις

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

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

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

Διαλύματα

Basal culture medium (Rycroft et al. 2001)

- 1) 2 g/L peptone water
- 2) 2 g/L yeast extract
- 3) 0,1 g/L NaCl
- 4) 0,04 g/L kg K_2HPO_4
- 5) 0,04 g/L KH_2PO_4
- 6) 0,01 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 7) 0,01 g/L $CaCl_2 \cdot 6H_2O$
- 8) 2 g/L $NaHCO_3$
- 9) 0,5 g/L cystein HCl
- 10) 0,5 g/L bile salts
- 11) 0,05 g/L hemin (διαλυμένη σε 1-2 σταγόνες NaOH 1N)
- 12) 2 ml/L Tween 80
- 13) 10 μl/L vitamin k1
- 14) 0,001 gr/L rezazurin (Steer et al.2003)

Ρύθμιση του pH στο 7,0 με 1M HCL (Rycroft et al. 2001)

Αναλυτική πορεία

Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, το βασικό μέσο καλλιέργειας μεταφέρεται εντός αναερόβιου θαλάμου προκειμένου να προ-αναχθεί για περίπου 12 ώρες (την προηγούμενη ημέρα του πειράματος). Την ημέρα διαξαγωγής της *in vitro* ζύμωσης ζυγίζονται και μεταφέρονται υπό αναερόβιες συνθήκες στα δοχεία Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας τα φαινολικά εκχυλίσματα. Επιπλέον, σε δύο δοχεία Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας προστίθεται ινουλίνη, ενώ στο πείραμα περιλαμβάνεται και ένα δοχείο Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς πηγή άνθρακα (αρνητικός μάρτυρας). Όλα τα δοχεία εμβολιάζονται ασηπτικά με 10% (v/v) από το εμβόλιο κοπράνων (5 ml faecal slurry σε 45ml basal medium), το προκύπτον μίγμα (50ml) μοιράζεται υπό καλή ανάδευση σ 3 falcon tubes των 50ml (15

ml/falcon: χρόνοι 0h, 6h και 24h) και οι στατικές καλλιέργειες επωάζονται υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37° C για 24h (με βιδωμένα χαλαρά καπάκια).

Στους χρόνους 0h, 6h και 24h απομακρύνονται από τον αναερόβιο θάλαμο ένα falcon/δείγμα (φυλάσσονται σε πάγο μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας), προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι βιοχημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις (βιοχημικοί προσδιορισμοί, μοριακός ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών, προσδιορισμός λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου).

Συγκεκριμένα, μέσα στον αναερόβιο κρατάμε σε 1.5 ml-ependorfs (αποστειρωμένα, DNA-ase, RNA-ase free) ποσότητα 2 X 1ml για μοριακά και 1 X 1ml για προσδιορισμό λιπαρών οξέων βραχείας οξέων βραχείας αλύσου (τα δείγματα στα eppendorfs φυλάσσονται σε πάγο μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας στον αναερόβιο) και στη συνέχεια φυλάσσονται στους -80 °C.

5.6 Επεξεργασία δειγμάτων.

Τα δείγματα που παραλαμβάνονται από τη ζύμωση επεξεργάζονται στη συνέχεια ως εξής: Φυγοκέντρηση του δείγματος (50ml falcon) στις 3200g για 40 min στους 4°C. Αναρρόφηση του υπερκείμενου με τη βοήθεια συρίγγων (10ml) με προσοχή γιατί το ίζημα δεν είναι σταθερό. Διήθηση του υπερκείμενου με μικροβιολογικό φίλτρο (διάμετρος 0.4μ), για την κατακράτηση μικροβιακών κυττάρων. Φυλάσσουμε τα δείγματα σε κουτιά στους -80 °C.

5.7 Προσδιορισμός SCFA

Οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFAs) (οξικό οξύ, προπιονικό οξύ, ισο-βουτυρικό οξύ, βουτυρικό οξύ, ισο-βαλερικό οξύ, βαλερικό οξύ, ισο-καπροϊκό οξύ, καπροϊκό οξύ και επταενοϊκό οξύ) προσδιορίζονται με αέρια χρωματογραφία σύμφωνα με τους Mountzouris et al. (2006). Ποσότητα δείγματος (1 ml) φυγοκεντρείται σε θερμοκρασία 4°C στα 10000xg για 15 min και 300 μl του υπερκείμενου υφίστανται περαιτέρω φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4°C στα 13000xg για 15 min. Ποσότητα από τελικό υπερκείμενο (85 μl) αναμιγνύεται με 10 μl 2-αιθυλ-βουτυρικού οξέος (20 mM, εσωτερικό πρότυπο) (2-Ethylbutyric acid, Sigma-Aldrich C., USA) και 5 μl υδροχλωρικού οξέος (HCl) μέσα σε γυάλινα φιαλίδια αέριας χρωματογραφίας, τα οποία σφραγίζονται κατάλληλα.

Δείγμα (1 μ l) από το μίγμα εισάγεται σε αναλυτή αέριας χρωματογραφίας (Agilent 6890 GC System, Agilent Technologies), ο οποίος φέρει ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (flame ionization detector) και τριχοειδή στήλη (Nukol column, εσωτερικής διαμέτρου 30m \times 0.25mm και πάχους 0.25 μ m). Μεταφορικό αέριο είναι το ήλιο, με 20 ml/min ρυθμό ροής στη στήλη και 1:35 λόγο διαχωρισμού, και η θερμοκρασία της στήλης είναι 185 $^{\circ}$ C. Οι συγκεντρώσεις των SCFAs των κοπράνων υπολογίζονται βάσει της ρύθμισης των παραμέτρων του αέριου χρωματογράφου με πρότυπο μίγμα SCFAs (Volatile Acid Standard Mix, Supelco 46975-U, Sigma-Aldrich C., USA).

Οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων εκφράζονται ως μ mol/ml δείγματος, ενώ υπολογίζεται και η μοριακή αναλογία (%) του κάθε οξέος σε σχέση με τη συνολική συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων (Volatile Fatty Acids, VFAs) στο δείγμα κοπράνων. (Mountzouris K.C, 2006)

5.8 Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Microsoft® Excel 2003 (Microsoft Inc) και το πακέτο software SPSS® for Professional Windows 13.0. Ο έλεγχος κανονικότητας των χρησιμοποιούμενων μεταβλητών έγινε με το One-sample Kolmogorov-Smirnov Test, όμως δεν βγήκε κανονική η κατανομή των SCFAs οπότε χρησιμοποιήθηκαν παραμετρικά test. Πραγματοποιήθηκε Friedman test για τη σύγκριση μεταξύ των διαφορετικών χρονικών στιγμών της ομάδας καθώς και Kruskal-Wallis test για τη σύγκριση των ομάδων την ίδια χρονική στιγμή. Επίσης πραγματοποιήθηκε μονοπαραγοντική ανάλυση δύο ομάδων με Mann-Whitney για να συγκριθούν τα επίπεδα των SCFAs μεταξύ νορμοβαρών και παχύσαρκων, ενώ έγινε και t-test.

Κεφάλαιο 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 Αποτελέσματα από εκχύλιση κρασιού

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

Μετά τη μέθοδο εκχύλισης Bligh Dyer προέκυψαν δυο φάσεις:

Η χλωροφορμική φάση που περιέχει τα ολικά λιποειδή (Total Lipids, TL) δηλαδή τις λιποδιαλυτες φαινολικές ενώσεις και τα κλασικά λιποειδή και είχαν συνολικό βάρος 5,81 g.

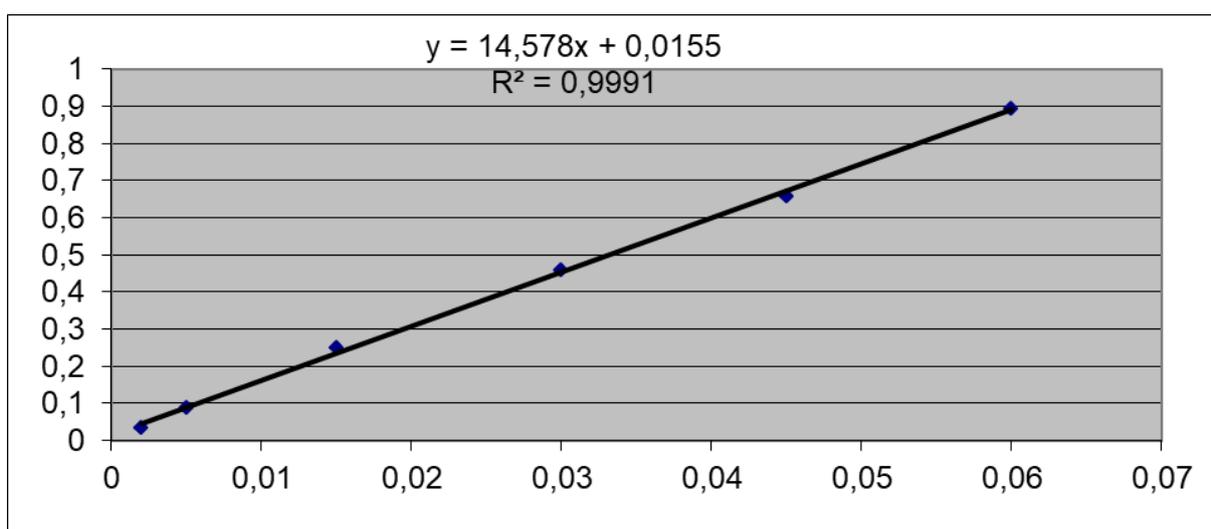
Η υδατική φάση που περιέχει τις υδροδιαλυτές φαινολικές ενώσεις. Μετά τη μέθοδο εκχύλισης Bligh Dyer τοποθετήθηκε για λυοφιλοποίηση για 72 ώρες και η συνολική μάζα που προέκυψε ήταν 19,4 g.

6.2 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών σε εκχύλισμα κρασιού

Πραγματοποιήθηκε χημικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων τόσο στα ολικά λιποειδή (TL) όσο και στην υδατική φάση του κρασιού (W).

TL: 0,051 mg/ml

W: 0,749 mg/ml



Σχήμα 5: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων (Ψ: απορρόφηση, X: mg γαλλικού οξέος)

6.3 *In vitro* ζυμώσεις με εντερικό μικροβιόκοσμο

6.3.1. Γενικά χαρακτηριστικά εθελοντών

Παρακάτω φαίνεται ο πίνακας με τα βασικά χαρακτηριστικά των εθελοντών, έξι υγιείς γυναίκες και άντρες ηλικίας 18-40 ετών που χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, νορμοβαρείς και παχύσαρκοι, ανάλογα με το δείκτη μάζας σώματος τους.

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά των εθελοντών.

	Παχύσαρκοι	Νορμοβαρείς	P
Ηλικία	40,0 ± 6,7	27,3 ± 2,5	0,06
Φύλο (άντρες %)	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1,0
Ύψος	171,0 ± 8,2	165,3 ± 7,9	0,5
Βάρος	96,6 ± 3,6	57,6 ± 7,7	0,003
Δείκτης μάζας σώματος (BMI)	33,3 ± 3,4	21,0 ± 1,0	0,008

6.3.2 1ο πιλοτικό πείραμα

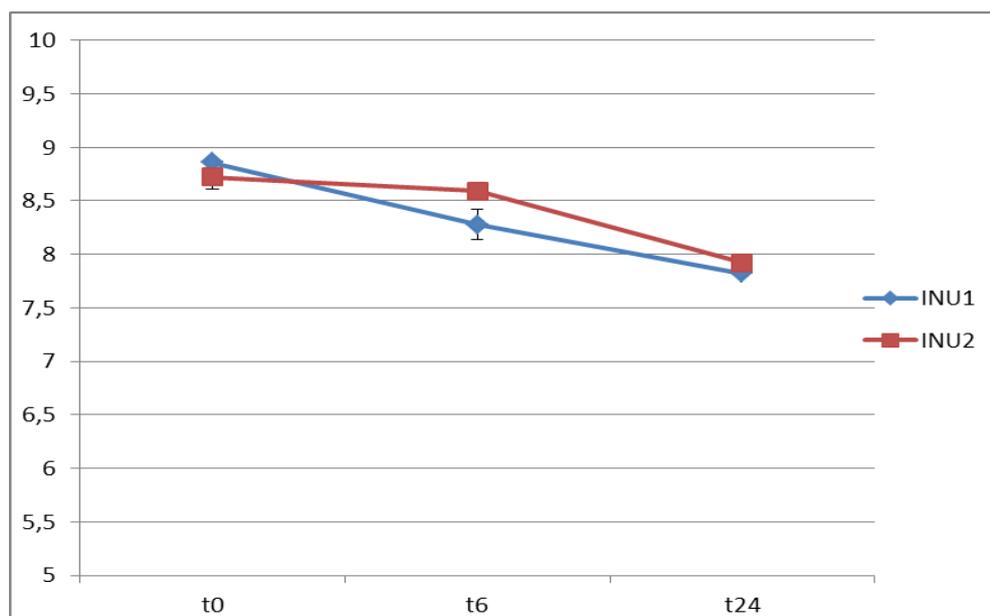
Το 1ο πιλοτικό πείραμα, έγινε για την επιλογή του δοχείου και του όγκου για την *in vitro* ζύμωση με κόπρανα (ένα δοχείο με όγκο υλικού 50 ml ή 3 δοχεία από 15ml, που αντιστοιχούν στις δειγματοληψίες – χρόνους επώασης). Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία και για τις δύο επιλογές όγκου. Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο ήταν η ινουλίνη και η καταμέτρηση του ολικού μεσόφιλου μικροβιακού φορτίου για την αξιολόγηση των διαφορετικών όγκων έγινε σε CBA υπόστρωμα, με διπλές επαναλήψεις.

Πίνακας 6: Καταμέτρηση ολικού μεσόφιλου μικροβιακού φορτίου. Οι πληθυσμοί εκφράζονται ως log₁₀ CFU/ml κοπράνων (μ.ό±SD).

<u>Αποικίες/ Πείραμα ανά ώρες</u>	<u>Αποικίες (μικρές και μεγάλες)</u>	
	<u>Τριβλίο 1</u>	<u>Τριβλίο 2</u>
<u>INU1</u>		
<u>t=0h</u>	<u>74</u>	<u>71</u>
<u>t=6h</u>	<u>119</u>	<u>74</u>
<u>t=24h</u>	<u>4</u>	<u>4</u>
<u>INU2</u>		
<u>t=0h</u>	<u>44</u>	<u>64</u>
<u>t=6h</u>	<u>93</u>	<u>102</u>
<u>t=24h</u>	<u>2</u>	<u>3</u>

*INU1: Όγκος ζύμωσης 50mL

**INU2: Όγκος ζύμωσης 15mL



Σχήμα 6: Καταμέτρηση μικροοργανισμών μετά από ζύμωση 6h στις 48 ώρες επώασης

Τοποθετήθηκαν τα τριβλία για επώαση στους 37°C, σε αναερόβιες συνθήκες και έγινε καταμέτρηση στις 40 και 96 ώρες. Δε φάνηκε να υπάρχει διαφορά στην καταμέτρηση του ολικού μικροβιακού φορτίου μετά από τη ζύμωση της ινουλίνης με τον ίδιο εντερικό μικροβίοκοσμο για 6 ώρες, μεταξύ των 2 όγκων ζύμωσης. Οπότε, επιλέγεται η χρήση μικρότερου όγκου (15ml), έτσι ώστε να αντιστοιχεί ένα δοχείο σε κάθε χρονική στιγμή παραλαβής δειγμάτων (3 falcon 50 ml).

6.3.3 2^ο πιλοτικό πείραμα

Το 2^ο πιλοτικό δοσοεξαρτώμενο πείραμα το κάναμε για να δούμε τη βιωσιμότητα των μικροοργανισμών στο πυκνό κρασί.

1. (control) 41ml BM + 4ml H₂O
2. (inu) 41ml BM + 4ml διάλυμα ινουλίνης 1%
3. (WA) 41ml BM + 4ml πυκνή υδατική φάση κρασιού
4. (WB 1/10) 41ml BM + 400μl π.κρασί + 3600μl H₂O
5. (WG 1/100) 41ml BM + 40μl π.κρασί + 3960μl H₂O
6. (WD 1/500) 41ml BM + 8μl π.κρασί + 3992μl H₂O

Ακολούθησε καταγραφή των μικροοργανισμών. Διαλέξαμε την αραιώση 10⁻⁶ γιατί είχαμε πιο εμφανή αποτελέσματα.

Πίνακας 7: Καταγραφή αποικιών μικροοργανισμών. Οι πληθυσμοί εκφράζονται ως log₁₀ CFU/ml κοπράνων (μ.ό±SD).

Αποικίες/ Αραιώσεις (h)	Αποικίες		
	Μεγάλες	Μικρές	Σύνολο
NC			
t=0h	1	140	141
t=6h	158	56	214
t=24h	8	68	76
INU			
t=0h	0	145	145
t=6h	5	77	82
t=24h	2	35	37
WA			
t=0h	0	75	75
t=6h	7	63	70
t=24h	0	8	8
WB			
t=0h	2	113	115
t=6h	218	53	271
t=24h	231	29	260
WI			
t=0h	2	115	117
t=6h	208	26	234
t=24h	48	57	105
WΔ			
t=0h	0	111	111
t=6h	196	58	254
t=24h	53	63	116

Με βάση τα αποτελέσματα που βλέπουμε στον παραπάνω πίνακα, επιλέξαμε την αραιώση WB (1/10), γιατί είναι η μέγιστη δυνατή ποσότητα που δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων και συνεπώς δε σκοτώνει τους μικροοργανισμούς.

6.4 Επίδραση των φαινολικών συστατικών και του κρασιού στα επίπεδα των SCFAs.

Στους επόμενους πίνακες παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των SCFAs (Πίνακας 9) και οι αναλογίες των συγκεντρώσεων (%) των SCFAs (Πίνακας 10) των δειγμάτων μετά από 0,6 και 24 ώρες *in vitro* ζύμωσης, στο σύνολο των εθελοντών.

NC: αρνητικός μάρτυρας, W: υδατικό εκχύλισμα κρασιού, TL: λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού (ολικά λιποειδή)

Πίνακας 9: Απόλυτες τιμές των SCFAs κατά τη διάρκεια της *in vitro* ζύμωσης με εντερικό μικροβίωμα των δειγμάτων, στο σύνολο των εθελοντών (n=6)

Λιπαρά Οξέα/ Δείγματα	NC	Ινουλίνη	Ρεσβερατρόλη	Κερκετίνη	Γαλλικό οξύ	W	TL	P value
Οξικό								
0 h	1,20 (0,94 - 2,19)	1,14 (0,96 – 2,08)	1,12 (0,92 – 1,94)	1,07 (0,91 – 2,04)	1,13 (0,91 – 2,24)	1,49 (1,14 – 2,97)	2,29 (1,10 – 4,83)	0,668
6 h	10,74 (9,55 -12,65)	28,10 (23,22-48,26)	11,03 (8,42-19,52)	11,05 (9,33-17,84)	10,77 (9,04-19,25)	14,79 (10,38-24,05)	10,86 (6,21-26,05)	0,048 †
24 h	14,64 (13,21-23,75)	35,82 (21,41-55,99)	15,14 (13,47-24,07)	14,68 (13,63-25,06)	14,76 (12,95-24,02)	21,79 (14,36-35,14)	14,42 (12,60-37,98)	0,423
P	0,002 †	0,006 †	0,002 †	0,002 †	0,002 †	0,002 †	0,002 †	
Προπιονικό								
0 h	0,37 (0,24-0,71)	0,27 (0,20-0,38)	0,27 (0,15-0,53)	0,32 (0,17-0,61)	0,33 (0,25-0,70)	0,36 (0,12-2,90)	0,45 (0,25-1,15)	0,851
6 h	2,55 (2,24- 2,86)	4,71 (4,13-6,33)	2,50 (2,31-4,24)	2,28 (2,11-3,79)	2,29 (2,21-4,36)	6,03 (5,03-10,07)	4,66 (2,73-5,15)	0,009 †
24 h	3,79 (2,97-6,40)	5,58 (3,82-7,18)	3,76 (2,76-6,58)	3,46 (2,77-6,08)	3,41 (2,95-5,82)	6,70 (6,27-12,82)	8,61 (6,93-8,96)	0,103
P	0,006 †	0,011 †	0,006 †	0,006 †	0,006 †	0,006 †	0,006 †	
Ισοβουτυρικό								
0 h	0,11 (0,07-0,17)	0,08 (0,05-0,20)	0,05 (0,04-0,14)	0,05 (0,03-0,09)	0,07 (0,06-0,12)	0,28 (0,20-1,05)	0,39 (0,09-1,06)	0,009 †
6 h	0,58 (0,39-0,70)	0,85 (0,78-1,29)	0,46 (0,40-0,86)	0,51 (0,40-0,99)	0,50 (0,36-0,94)	1,38 (0,93-2,49)	0,89 (0,60-3,49)	0,076
24 h	1,39 (1,17-2,44)	1,08 (0,55-1,98)	1,22 (0,97-2,12)	1,20 (1,11-2,13)	1,30 (1,11-2,06)	1,78 (1,16-3,57)	2,81 (0,92-5,24)	0,602
P	0,002 †	0,009 †	0,006 †	0,002 †	0,002 †	0,006 †	0,006 †	
Βουτυρικό								
0 h	0,63 (0,37-1,39)	0,71 (0,39-1,67)	0,53 (0,25-1,33)	0,43 (0,19-0,85)	0,36 (0,19-0,70)	0,18 (0,15-0,69)	0,26 (0,15-0,48)	0,193
6 h	4,53 (2,91-5,28)	13,18 (5,66-19,51)	3,15 (1,08-5,48)	3,03 (1,15-4,74)	3,09 (1,07-5,28)	8,59 (4,18-18,42)	4,97 (2,02-9,22)	0,022 †
24 h	6,83 (4,86-11,36)	13,68 (8,40-27,08)	4,96 (2,88-7,95)	4,63 (2,47-7,50)	4,59 (2,88-7,53)	15,14 (10,07-25,62)	10,60 (8,03-20,35)	0,025 †
P	0,006 †	0,006 †	0,030 †	0,030 †	0,006 †	0,002 †	0,002 †	

Πίνακας 10: Αναλογίες (%) των επιμέρους SCFAs στο σύνολο των λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της *in vitro* ζύμωσης με εντερικό μικροβίοκοσμο των δειγμάτων, στο σύνολο των εθελοντών (n=6)

Λιπαρά Οξέα/ ώρες (h)	NC	Ιουλίνη	Ρεσβερατρόλη	Κερκετίνη	Γαλλικό οξύ	W	TL	P value
Οξικό								
0 h	52,12 (47,60-58,73)	54,72 (49,69-66,05)	58,85 (56,08-65,95)	59,45 (58,29-64,23)	62,38 (45,00-67,69)	70,42 (47,07-74,93)	50,49 (50,09-56,63)	0,319
6 h	61,71 (54,58-76,96)	66,20 (63,96-68,85)	66,76 (65,18-68,33)	65,81 (64,25-68,70)	47,50 (38,96-51,75)	50,25 (45,41-58,74)	60,29 (58,62-62,78)	0,001 †
24 h	56,90 (44,15-77,11)	61,11 (57,49-65,93)	61,74 (60,41-66,02)	60,75 (59,07-65,57)	46,39 (38,02-49,63)	37,29 (35,36-40,23)	55,05 (53,22-58,33)	0,001 †
P								
Προπιονικό								
0 h	14,02 (7,31-15,40)	11,96 (8,11-15,88)	14,66 (10,57-20,02)	16,44 (15,57-19,43)	9,54 (5,31-42,53)	8,21 (4,44-40,57)	14,86 (12,42-18,36)	0,498
6 h	8,64 (8,31-12,83)	14,55 (13,62-18,60)	13,91 (12,83-17,55)	14,63 (13,73-17,81)	17,16 (15,41-31,86)	22,36 (17,71-28,10)	13,22 (12,49-15,59)	0,004 †
24 h	8,87 (6,61-13,31)	14,32 (11,97-19,05)	14,20 (12,36-15,95)	14,06 (12,99-15,78)	14,71 (13,69-29,33)	25,59 (19,48-29,11)	13,39 (12,53-15,77)	0,029 †
P								
Ισοβουτυρικό								
0 h	3,79 (3,08-4,86)	2,10 (1,88-4,74)	2,27 (1,99-2,99)	3,69 (3,25-4,25)	11,44 (7,09-15,75)	12,71 (4,85-15,07)	4,55 (2,64-5,19)	0,000 †
6 h	1,76 (1,40-2,71)	2,94 (2,45-3,44)	3,05 (2,81-3,61)	2,90 (2,49-3,64)	4,25 (3,00-7,53)	5,97 (3,12-10,83)	2,98 (2,53-3,85)	0,010 †
24 h	1,28 (1,05-4,39)	5,33 (4,03-6,02)	5,42 (4,80-5,79)	5,64 (4,79-5,96)	4,43 (3,53-6,19)	8,04 (4,06-9,53)	5,65 (4,92-5,90)	0,107
P								
Βουτυρικό								
0 h	27,78 (23,65-43,38)	25,81 (14,09-38,45)	22,36 (13,30-28,66)	19,18 (10,46-22,56)	10,55 (5,59-13,81)	6,28 (3,58-9,14)	25,62 (21,92-35,01)	0,000 †
6 h	24,02 (12,51-34,44)	17,53 (8,83-19,11)	17,26 (8,77-18,29)	17,53 (8,27-18,79)	28,69 (17,73-34,26)	21,82 (12,48-27,28)	23,83 (19,02-25,36)	0,234
24 h	25,39 (15,87-42,95)	18,71 (13,33-22,29)	18,50 (11,58-20,56)	18,44 (13,09-21,75)	34,47 (22,99-35,19)	31,39 (25,09-36,18)	26,32 (21,05-26,84)	0,058 †
P								

Παρατηρούμε στον πίνακα με τις απόλυτες τιμές ότι για όλα τα SCFAs δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στο χρόνο $t=0$, εκτός από το ισοβουτυρικό οξύ που βλέπουμε μια διαφορά ~100% και 350% στο υδατικό εκχύλισμα κρασιού και στα ολικά λιποειδή αντίστοιχα, σε σχέση με τον μάρτυρα.

Στις 6 ώρες η ινουλίνη φαίνεται να προκαλεί μεγάλη αύξηση, σχεδόν διπλασιάζει τη τιμή, σε όλα τα SCFAs εκτός του ισοβουτυρικού όπου απλά φαίνεται να υπάρχει μια τάση, σε σχέση με τον μάρτυρα. Παρόμοια δράση έχουν το υδατικό εκχύλισμα του κρασιού όπου φαίνεται να αυξάνει τη συγκέντρωση όλων των οξέων αλλά και τα ολικά λιποειδή, που προκαλούν αύξηση στο προπιονικό και το ισοβουτυρικό.

Βλέπουμε ότι παρόλο που υπάρχει αύξηση στα SCFAs που προκαλείται από την ινουλίνη, το υδατικό εκχύλισμα κρασιού και τα ολικά λιποειδή στις 24 ώρες, δεν είναι στατιστικά σημαντική. Εξαιρέση αποτελεί το βουτυρικό οξύ όπου έχουμε σχεδόν διπλάσιες τιμές σε ινουλίνη, υδατικό εκχύλισμα κρασιού και ολικά λιποειδή. Τέλος, βλέπουμε πολύ μεγάλη αύξηση από την αρχή μέχρι τις 24 ώρες σε όλα τα SCFAs όλων των δειγμάτων.

Ωστόσο, παρατηρούμε στον πίνακα με τις % τιμές ότι στην ινουλίνη και στους 3 χρόνους μειώνεται το βουτυρικό οξύ σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Αυτό όμως, έρχεται σε αντίθεση με τις απόλυτες τιμές όπου αντίστοιχα φαίνεται ότι το βουτυρικό οξύ στην ινουλίνη έχει μεγάλη αύξηση. Παρόμοια μείωση βλέπουμε και για το υδατικό εκχύλισμα κρασιού στο οξικό οξύ σε σχέση με το δείγμα αναφοράς, κάτι που πάλι έρχεται σε αντίθεση με τον πίνακα των απόλυτων τιμών. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει γιατί δεν προσμετράται η επιμέρους αύξηση των μορίων όταν γίνεται ο επί % υπολογισμός των τιμών. Για αυτό το λόγο θεωρούμε πιο αξιόπιστη τη μεταβολή που έγινε στις απόλυτες τιμές.

Στον Πίνακα που ακολουθεί καταγράφονται οι τιμές των επιμέρους SCFAs στα δείγματα κοπράνων των εθελοντών στην κάθε ομάδα βάρους (κανονικού βάρους και παχύσαρκοι).

Πίνακας 11: Απόλυτες τιμές των SCFAs στα δείγματα κοπράνων των δύο ομάδων εθελοντών (κανονικού βάρους και παχύσαρκοι)

Ομάδες εθελοντών	Λιπαρά οξέα / Οξικό οξύ	Προπιονικό οξύ	Ισοβουτυρικό οξύ	Βουτυρικό οξύ
Νορμοβαρείς	0,97 (0,85-)	0,24 (0,23-)	0,07 (0,05-)	0,37 (0,35-)
Παχύσαρκοι	1,47 (1,35-)	0,59 (0,50-)	0,15 (0,14-)	0,79 (0,60-)
P value	0,05 †	0,05 †	0,05 †	0,127

Αναλύοντας τον πίνακα με τις απόλυτες τιμές για το χρόνο μηδέν, παρατηρούμε ότι οι παχύσαρκοι έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις SCFAs σε σχέση με τους εθελοντές κανονικού βάρους. Εξαίρεση αποτελεί το βουτυρικό οξύ όπου πάλι βλέπουμε αύξηση στους παχύσαρκους, όμως η διαφορά σε σχέση με τους νορμοβαρείς δεν είναι στατιστικά σημαντική ($P > 0.05$).

Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των SCFAs (Πίνακας 12) και οι αναλογίες των συγκεντρώσεων (%) των SCFAs (Πίνακας 13) των δειγμάτων μετά από 0,6 και 24 ώρες *in vitro* ζύμωσης, στους εθελοντές κανονικού βάρους.

NC: αρνητικός μάρτυρας, W: υδατικό εκχύλισμα κρασιού, TL: λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού (ολικά λιποειδή)

Πίνακας 12: Απόλυτες τιμές των SCFAs κατά τη διάρκεια της *in vitro* ζύμωσης με εντερικό μικροβίοκοσμο των δειγμάτων, στους εθελοντές κανονικού βάρους (n=3).

Λιπαρά Οξέα	NC	Ινουλίνη	Ρεσβερατρόλη	Κερκετίνη	Γαλλικό οξύ	W	TL	P value
Οξικό								
0 h	0,97 (0,85-)	1,01 (0,82-)	0,93 (0,89-)	0,92 (0,87-)	0,92 (0,87-)	1,15 (1,12-)	1,11 (1,05-)	0,198
6 h	11,40 (8,83-)	31,22 (24,98-)	11,17 (8,26-)	11,68 (7,22-)	10,92 (6,80-)	15,15 (2,93-)	10,85 (6,41-)	0,669
24 h	14,51 (13,65-)	39,74 (38,54-)	14,59 (13,66-)	14,07 (13,89-)	14,26 (12,95-)	22,86 (2,95-)	12,88 (11,94-)	0,784
P	0,05†	0,05†	0,05†	0,05†	0,05†	0,05†	0,05†	
Προπιονικό								
0 h	0,24 (0,23-)	0,21 (0,20-)	0,17 (0,10-)	0,19 (0,09-)	0,25 (0,22-)	0,13 (0,09-)	0,35 (0,26-)	0,174
6 h	2,69 (2,31-)	4,69 (2,78-)	2,63 (2,36-)	2,28 (2,13-)	2,33 (2,25-)	8,82 (5,34-)	4,36 (2,78-)	0,222
24 h	3,73 (2,74-)	5,53 (2,70-)	3,45 (2,64-)	3,34 (2,88-)	3,20 (3,00-)	9,45 (6,17-)	8,59 (2,70-)	0,791
P	0,097	0,05†	0,097	0,05†	0,05†	0,05†	0,097	
Ισοβουτυρικό								
0 h	0,07 (0,05-)	0,05 (0,05-)	0,04 (0,03-)	0,03 (0,03-)	0,06 (0,05-)	0,32 (0,25-)	0,10 (0,08-)	0,013 †
6 h	0,58 (0,41-)	0,82 (0,80-)	0,49 (0,37-)	0,59 (0,31-)	0,40 (0,27-)	1,76 (1,10-)	0,66 (0,44-)	0,534
24 h	1,59 (1,38-)	0,95 (0,58-)	1,17 (1,16-)	1,39 (1,19-)	1,33 (1,16-)	2,45 (1,17-)	1,04 (0,58-)	0,550
P	0,097	0,05†	0,097	0,05†	0,05†	0,05†	0,097	
Βουτυρικό								
0 h	0,37 (0,35-)	0,41 (0,34-)	0,32 (0,21-)	0,39 (0,19-)	0,34 (0,17-)	0,17 (0,12-)	0,19 (0,15-)	0,160
6 h	4,84 (1,98-)	15,54 (3,93-)	3,27 (0,76-)	3,18 (0,95-)	3,07 (0,71-)	9,73 (0,27-)	3,93 (2,55-)	0,669
24 h	7,21 (6,45-)	16,49 (8,83-)	5,53 (4,38-)	5,25 (4,26-)	5,19 (3,99-)	13,29 (0,41-)	10,04 (8,83-)	0,557
P	0,05†	0,05†	0,05†	0,05†	0,05†	0,05†	0,05†	

Πίνακας 13: Αναλογίες (%) των επιμέρους SCFAs στο σύνολο των λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της *in vitro* ζύμωσης με εντερικό μικροβιόκοσμο των δειγμάτων, στους εθελοντές κανονικού βάρους (n=3)

Λιπαρά Οξέα	NC	Ινουλίνη	Ρεσβερατρόλη	Κερκετίνη	Γαλλικό οξύ	W	TL	P value
Οξικό								
0 h	58,38 (41,98-)	62,71 (45,00-)	57,98 (56,79-)	59,40 (55,71-)	65,60 (17,71-)	70,20 (34,26-)	55,07 (50,40-)	0,946
6 h	76,83 (56,01-)	64,62 (61,98-)	66,43 (62,98-)	65,34 (62,78-)	46,63 (21,28-)	52,50 (48,01-)	59,58 (57,29-)	0,045 †
24 h	76,63 (49,29-)	61,52 (57,41-)	62,03 (58,18-)	60,95 (57,63-)	46,21 (21,13-)	37,64 (35,85-)	55,42 (53,66-)	0,051 †
P	0,097	0,097	0,368	0,368	0,368	0,717	0,368	
Προπιονικό								
0 h	14,01 (8,50-)	8,43 (7,14-)	11,78 (6,95-)	15,94 (14,48-)	7,70 (5,30-)	8,36 (4,49-)	13,53 (12,48-)	0,439
6 h	8,56 (8,41-)	14,87 (13,68-)	14,27 (12,12-)	14,79 (13,93-)	17,06 (14,71-)	22,48 (8,92-)	12,62 (12,08-)	0,138
24 h	7,07 (5,21-)	14,15 (11,58-)	13,98 (12,84-)	13,96 (13,96-)	14,82 (13,78-)	23,92 (8,40-)	12,99 (11,32-)	0,125
P	0,717	0,05†	0,05†	0,717	0,264	0,717	0,717	
Ισοβουτυρικό								
0 h	3,44 (2,11-)	2,15 (2,01-)	2,01 (1,92-)	4,20 (3,47-)	14,99 (8,53-)	13,47 (4,90-)	4,44 (2,41-)	0,011 †
6 h	1,44 (1,28-)	3,07 (2,81-)	3,37 (2,88-)	2,66 (2,37-)	4,96 (3,50-)	9,94 (2,92-)	3,05 (2,90-)	0,048 †
24 h	1,21 (1,12-)	5,14 (4,88-)	5,51 (5,33-)	5,84 (5,13-)	5,47 (4,49-)	9,16 (6,95-)	5,71 (5,59-)	0,043 †
P	0,097	0,097	0,05†	0,05†	0,097	0,264	0,717	
Βουτυρικό								
0 h	24,17 (22,09-)	21,33 (14,64-)	25,82 (14,50-)	21,92 (10,47-)	10,20 (0,94-)	3,71 (3,19-)	24,08 (20,73-)	0,039 †
6 h	12,65 (12,08-)	18,89 (6,31-)	18,08 (8,80-)	18,37 (7,10-)	31,06 (1,95-)	25,09 (4,44-)	25,29 (14,15-)	0,955
24 h	17,04 (12,36-)	19,24 (18,17-)	19,00 (18,01-)	19,24 (17,64-)	29,68 (2,93-)	31,06 (16,77-)	26,63 (26,00-)	0,932
P	0,264	0,097	0,264	0,264	0,264	0,097	0,05†	

Παρατηρούμε στον πίνακα με τις απόλυτες τιμές με τους νορμοβαρείς, ότι για τον χρόνο $t=0$, δεν υπήρξαν σημαντικές αλλαγές στα SCFAs στην ινουλίνη. Αντιθέτως, υπήρξε αύξηση στην υδατική φάση του κρασιού της τάξεως του 500% στο ισοβουτυρικό οξύ. Όσον αφορά τις πολυφαινόλες, δεν παρατηρείται καμία σημαντική αλλαγή σε σχέση με το δείγμα αναφοράς, με εξαίρεση τον υποδιπλασιασμό του ισοβουτυρικού οξέος στην κερκετίνη. Περαιτέρω, βλέπουμε πολύ μεγάλη αύξηση από την αρχή μέχρι τις 24 ώρες στα SCFAs των δειγμάτων, με εξαίρεση το προπιονικό και το ισοβουτυρικό στο δείγμα αναφοράς, στη ρεσβερατρόλη και στα ολικά λιποειδή ($P=0,097$).

Ωστόσο, παρατηρούμε στον πίνακα με τις % αναλογίες των τιμών των SCFAs ότι η ινουλίνη προκαλεί μείωση στο οξικό οξύ στις 6 και στις 24 ώρες, σε σχέση με τον μάρτυρα. Αυτό όμως, έρχεται σε αντίθεση με τις απόλυτες τιμές όπου αντίστοιχα φαίνεται ότι η ινουλίνη έχει μεγάλη αύξηση. Παρόμοια μείωση βλέπουμε και για το υδατικό εκχύλισμα του κρασιού, κάτι που πάλι έρχεται σε αντίθεση με τον πίνακα των απόλυτων τιμών. Αυτό φαίνεται να συμβαίνει, όπως τονίσαμε και παραπάνω γιατί δεν προσμετράται η επιμέρους αύξηση των μορίων όταν γίνεται ο επί % υπολογισμός των τιμών.

Σε αντίθεση, πάλι, με τον πίνακα των απόλυτων τιμών, στον πίνακα με τις αναλογίες των τιμών των SCFAs (%) τιμές βλέπουμε ότι οι πολυφαινόλες στις 6 και στις 24 ώρες, προκαλούν αύξηση περίπου 50% στο βουτυρικό οξύ και μείωση στο οξικό οξύ.

Στον επόμενο πίνακα παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των SCFAs (Πίνακας 14) και οι αναλογίες των συγκεντρώσεων (%) των SCFAs (Πίνακας 15) των δειγμάτων μετά από 0,6 και 24 ώρες *in vitro* ζύμωσης, στους παχύσαρκους εθελοντές.

NC: αρνητικός μάρτυρας, W: υδατικό εκχύλισμα κρασιού, TL: λιποειδικό εκχύλισμα κρασιού (ολικά λιποειδή)

Πίνακας 14: Απόλυτες τιμές των SCFAs κατά τη διάρκεια της *in vitro* ζύμωσης με εντερικό μικροβιόκοσμο των δειγμάτων, στους παχύσαρκους εθελοντές (n=3)

Λιπαρά Οξέα	NC	Ινουλίνη	Ρεσβερατρόλη	Κερκετίνη	Γαλλικό οξύ	W	TL	P value
Οξικό								
0 h	1,47 (1,35-)	1,51 (1,18-)	1,33 (1,17-)	1,48 (1,12-)	1,56 (1,16-)	1,76 (1,22-)	3,14 (1,47-)	0,930
6 h	10,08 (9,79-)	24,83 (18,36-)	10,88 (8,47-)	10,43 (10,04-)	10,63 (9,79-)	14,43 (12,86-)	10,87 (5,67-)	0,085
24 h	14,77 (11,91-)	25,14 (10,22-)	15,70 (12,90-)	15,29 (12,86-)	15,27 (12,93-)	20,72 (18,17-)	15,96 (12,82-)	0,267
P	0,05†	0,05†	0,097	0,05†	0,05†	0,05†	0,05†	
Προπιονικό								
0 h	0,59 (0,50-)	0,35 (0,29-)	0,45 (0,35-)	0,46 (0,44-)	0,52 (0,41-)	0,38 (0,34-)	0,55 (0,20-)	0,329
6 h	2,41 (2,03-)	4,73 (4,58-)	2,37 (2,14-)	2,28 (2,07-)	2,23 (2,15-)	5,98 (4,11-)	4,97 (2,57-)	0,042 †
24 h	3,85 (3,04-)	5,62 (4,19-)	4,07 (2,80-)	3,59 (2,46-)	3,62 (2,81-)	6,49 (6,31-)	8,77 (8,34-)	0,066
P	0,05†	0,097	0,097	0,097	0,097	0,097	0,05†	
Ισοβουτυρικό								
0 h	0,15 (0,14-)	0,15 (0,08-)	0,11 (0,05-)	0,07 (0,06-)	0,07 (0,06-)	0,22 (0,14-)	0,81 (0,21-)	0,416
6 h	0,57 (0,34-)	0,87 (0,71-)	0,44 (0,41-)	0,45 (0,44-)	0,51 (0,50-)	1,38 (0,43-)	2,14 (0,95-)	0,240
24 h	1,22 (1,00-)	1,22 (0,46-)	1,27 (0,40-)	1,14 (1,01-)	1,28 (0,96-)	1,62 (1,15-)	3,46 (2,32-)	0,716
P	0,05†	0,05†	0,097	0,097	0,05†	0,05†	0,05†	
Βουτυρικό								
0 h	0,79 (0,60-)	0,71 (0,71-)	0,75 (0,26-)	0,47 (0,17-)	0,46 (0,20-)	0,66 (0,16-)	0,33 (0,14-)	0,659
6 h	4,23 (3,22-)	10,82 (6,23-)	3,03 (1,18-)	2,89 (1,21-)	3,12 (1,19-)	7,45 (5,48-)	7,64 (0,42-)	0,022 †
24 h	5,16 (3,95-)	10,87 (7,11-)	3,01 (2,50-)	2,66 (1,90-)	3,10 (2,25-)	15,33 (14,94-)	12,79 (5,61-)	0,030 †
P	0,05†	0,097	0,097	0,368	0,368	0,097	0,05†	

Πίνακας 15: Αναλογίες (%) των επιμέρους SCFAs στο σύνολο των λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της *in vitro* ζύμωσης με εντερικό μικροβίοκοσμο των δειγμάτων, στους παχύσαρκους εθελοντές (n=3)

Λιπαρά Οξέα	NC	Ιουλίνη	Ρεσβερατρόλη	Κερκετίνη	Γαλλικό οξύ	W	TL	P value
Οξικό								
0 h	51,02 (49,48-)	53,60 (51,25-)	59,72 (53,96-)	59,51 (59,16-)	59,15 (54,10-)	70,65 (51,33-)	50,46 (49,15-)	0,099
6 h	55,17 (52,82-)	67,22 (65,19-)	67,18 (65,92-)	66,29 (64,74-)	51,01 (44,86-)	46,61 (41,79-)	61,02 (59,06-)	0,049 †
24 h	44,68 (42,55-)	60,70 (57,52-)	61,45 (61,16-)	60,55 (59,56-)	46,56 (43,65-)	36,94 (33,89-)	54,68 (51,91-)	0,035 †
P	0,097	0,264	0,097	0,264	0,264	0,097	0,05†	
Προπιονικό								
0 h	14,99 (3,72-)	14,05 (10,84-)	18,56 (15,51-)	17,13 (16,52-)	11,38 (5,32-)	8,05 (4,27-)	17,18 (12,21-)	0,680
6 h	12,44 (7,99-)	14,23 (13,44-)	13,55 (13,07-)	14,47 (13,11-)	17,25 (15,64-)	22,25 (20,64-)	13,40 (13,03-)	0,040 †
24 h	11,93 (9,99-)	19,02 (12,10-)	14,42 (10,92-)	14,34 (11,91-)	14,59 (13,45-)	27,26 (23,18-)	14,26 (12,93-)	0,141
P	0,717	0,717	0,717	0,097	0,097	0,368	0,717	
Ισοβουτυρικό								
0 h	4,76 (3,41-)	2,05 (1,48-)	2,82 (2,15-)	3,66 (2,59-)	7,35 (6,31-)	11,96 (4,72-)	5,15 (2,72-)	0,083
6 h	2,04 (1,47-)	2,46 (2,41-)	2,83 (2,76-)	3,14 (2,54-)	3,55 (1,51-)	3,72 (3,18-)	2,71 (2,00-)	0,388
24 h	2,38 (0,82-)	5,52 (1,47-)	5,05 (4,06-)	5,43 (3,81-)	3,89 ((2,44-)	4,32 (3,29-)	5,32 (3,69-)	0,871
P	0,097	0,368	1,000	0,097	0,097	0,097	0,05†	
Βουτυρικό								
0 h	30,58 (24,98-)	30,30 (12,48-)	18,90 (9,70-)	18,31 (10,42-)	10,90 (7,15-)	9,07 (5,28-)	27,15 (22,32-)	0,048 †
6 h	31,13 (16,91-)	16,93 (9,67-)	16,44 (8,66-)	16,70 (8,66-)	26,34 (22,99-)	18,55 (15,16-)	22,87 (20,64-)	0,145
24 h	29,60 (21,18-)	14,18 (10,80-)	12,63 (8,42-)	14,26 (9,56-)	34,96 (34,46-)	31,74 (27,86-)	22,48 (16,79-)	0,028 †
P	0,368	0,717	0,264	0,368	0,717	0,097	0,05†	

Παρατηρούμε στον πίνακα με τις απόλυτες τιμές για τους παχύσαρκους, ότι στο χρόνο $t=0$ δεν υπήρξαν σημαντικές αλλαγές μεταξύ των SCFAs των δειγμάτων.

Στις 6 ώρες, παρατηρούμε διπλασιασμό στο οξικό οξύ, υπερδιπλασιασμό στο προπιονικό οξύ μετά από τη ζύμωση της ινουλίνης, του υδατικού εκχυλίσματος του κρασιού και των ολικών λιποειδών. Τέλος, στο βουτυρικό παρατηρείται υπερδιπλασιασμός στην ινουλίνη και αύξηση της τάξης του 60% σε κρασί και ολικά λιποειδή. Αντιθέτως παρατηρείται μείωση στο βουτυρικό στις πολυφαινόλες. Παρόμοιες μεταβολές στα SCFAs με τις 6 ώρες, παρατηρούμε και στις 24 ώρες σε όλους σχεδόν τους δείκτες τιμών, σε όλα τα οξέα. Περαιτέρω, βλέπουμε πολύ μεγάλη αύξηση από την αρχή μέχρι τις 24 ώρες στα SCFAs των δειγμάτων, με εξαίρεση το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ στην ινουλίνη, το γαλλικό οξύ και την υδατική φάση του κρασιού, όπου υπάρχει αύξηση αλλά όχι στατιστικά σημαντική ($P=0,097$). Εξαίρεση επίσης αποτελούν όλα τα οξέα στη ρεσβερατρόλη και το προπιονικό, βουτυρικό και ισοβουτυρικό οξύ στην κερκετίνη ($P=0,097$).

Ωστόσο, παρατηρούμε στον πίνακα με τις αναλογίες των τιμών των SCFAs % τιμές ότι στην ινουλίνη στις 24 ώρες, το βουτυρικό οξύ μειώνεται σε σχέση με το δείγμα αναφοράς. Αυτό όμως, έρχεται σε αντίθεση με τις απόλυτες τιμές των SCFAs, όπου αντίστοιχα φαίνεται ότι στην ινουλίνη έχει μεγάλη αύξηση. Παρόμοια μείωση βλέπουμε και στο οξικό οξύ στην υδατική φάση του κρασιού στις 6 και στις 24 ώρες κάτι που πάλι έρχεται σε αντίθεση με τον πίνακα των απόλυτων τιμών. Τέλος, παρατηρούμε μείωση και στο βουτυρικό οξύ στα ολικά λιποειδή στις 6 και 24 ώρες σε σχέση με το δείγμα αναφοράς, κάτι που πάλι έρχεται σε αντίθεση με τον προηγούμενο πίνακα. Σε αντίθεση, πάλι, με τον πίνακα των απόλυτων τιμών, στον πίνακα με τις % τιμές βλέπουμε ότι οι πολυφαινόλες στις 6 και στις 24 ώρες, προκαλούν αύξηση στο προπιονικό και στο βουτυρικό οξύ, ενώ παρατηρείται μείωση στις 6 ώρες στο οξικό στο γαλλικό οξύ.

Τέλος, συγκρίναμε τους 2 πίνακες των απόλυτων τιμών για τους νορμοβαρείς και τους παχύσαρκους και παρατηρούμε ότι οι παχύσαρκοι εθελοντές είχαν στο χρόνο $t=0$ περισσότερα SCFAs από τους νορμοβαρείς εθελοντές, με εξαίρεση το βουτυρικό οξύ. Στις 6 και στις 24 ώρες βλέπουμε ότι οι τιμές των SCFAs είναι παρόμοιες ή μειώνονται στους παχύσαρκους σε σχέση με τις τιμές των νορμοβαρών με εξαίρεση τα ολικά λιποειδή, όπου παρατηρείται παντού μικρή αύξηση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον των ερευνητών για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυφαινολών του κρασιού και του εντερικού μικροβιόκοσμου, λόγω των πιθανών ευεργετικών τους επιδράσεων στην υγεία του ανθρώπου. (Cueva, 2012), (Requena et al 2010). Σε πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχει αναφερθεί ότι οι πολυφαινόλες μετατρέπονται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο σε βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο και την υγεία του ξενιστή. Υπάρχουν αποδεικτικά στοιχεία που δείχνουν ότι συγκεκριμένες δόσεις επιλεγμένων πολυφαινολών μπορούν να τροποποιήσουν τη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος, και ενώ ορισμένες βακτηριακές ομάδες μπορεί να ανασταλούν, άλλες μπορεί να ευδοκιμήσουν (Cueva, 2012). Ωστόσο, η γνώση σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις και τον επακόλουθο μεταβολισμό μεταξύ των μικροοργανισμών και των πολυφαινολών εξακολουθεί να είναι περιορισμένη.

Στην παρούσα μελέτη έγινε προσπάθεια να μελετηθεί *in vitro* η βιολογική δράση των προϊόντων της ζύμωσης των φαινολικών ενώσεων κρασιού στον εντερικό μικροβιόκοσμο και πιο συγκεκριμένα στα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs). Επιλέχθηκαν έξι υγιείς γυναίκες και άντρες ηλικίας 18-40 ετών και χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, φυσιολογικού βάρους (BMI=18.50 - 24.99) και παχύσαρκοι (BMI \geq 30,00), ανάλογα με το δείκτη μάζας σώματος τους.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης βλέπουμε στον γενικό πίνακα με τις απόλυτες τιμές των SCFAs κατά τη διάρκεια της *in vitro* ζύμωσης με τον εντερικό μικροβιόκοσμο, ότι αυξάνονται και τα 4 SCFAs στο μάρτυρα κατά τη διάρκεια των 24 ωρών επώασης. Η ινουλίνη φαίνεται ότι προκαλεί μεγαλύτερη αύξηση των SCFAs και συγκεκριμένα περισσότερο στο προπιονικό και το βουτυρικό, όπου σχεδόν διπλασιάζονται. Επίσης, βλέπουμε ότι και τα 4 SCFAs αυξάνονται στο υδατικό εκχύλισμα κρασιού και στα ολικά λιποειδή σχεδόν όσο στην ινουλίνη, με εξαίρεση το τοξικό οξύ που δεν εμφανίζει σημαντική αύξηση στις 24 ώρες, μετά τη ζύμωση των ολικών λιπαρών.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα στις απόλυτες τιμές για τους εθελοντές με κανονικό βάρος και τους παχύσαρκους, σαν γενικό συμπέρασμα βλέπουμε ότι οι παχύσαρκοι εθελοντές είχαν στο χρόνο t=0 περισσότερα SCFAs από τους νορμοβαρείς εθελοντές, με δύο εξαιρέσεις. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τους Schwartz et al. Στη δική τους μελέτη συμμετείχαν 98 εθελοντές, άντρες και γυναίκες ηλικίας 47 ± 13 χρονών, όπου χωρίστηκαν σε 2 ομάδες, νορμοβαρών και παχύσαρκων με δείκτη μάζας σώματος 19-24,9 και 30-40 αντίστοιχα για τις 2

ομάδες και βρήκαν ότι η συνολική περιεκτικότητα SCFAs αυξήθηκε σημαντικά από 84,60 mmol/l στους νορμοβαρείς σε 103,87 mmol/l στους παχύσαρκους εθελοντές.

Για το συμπέρασμα αυτό υπέθεσαν ότι ευθύνεται ο αριθμός των βακτηρίων Firmicutes και Bacteroidetes, όπου έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας. Τα μέλη και των δύο ομάδων παράγουν SCFAs από διατροφικές ενώσεις που ξεφεύγουν από την πέψη και πάνε στο λεπτό έντερο, παρέχοντας έτσι στον ξενιστή μια πρόσθετη ποσότητα ενέργειας. Κατά συνέπεια, αυτή η επιπλέον ενέργεια που προέρχεται από τη διατροφή μπορεί να αποθηκευτεί ως λίπος, ωθώντας έτσι την αύξηση του βάρους του ξενιστή. Από αυτόν τον μηχανισμό προκύπτει ότι η ζύμωση διαιτητικών ινών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο είναι ένας παράγοντας της παχυσαρκίας. (Schwiertz et al 2009) (Ruth E. Ley et al, 2005)

Επίσης, ανέφεραν ότι τα επιθήλια του παχέος εντέρου αποδίδουν το 60-70% της ενέργειάς τους από τα SCFAs, ιδιαίτερα το βουτυρικό. Το προπιονικό λαμβάνεται σε μεγάλο βαθμό από το ήπαρ και είναι πρόδρομος για τη γλυκονεογένεση, τη λιπογένεση και την πρωτεϊνοσύνθεση (Schepbach W. 1994). Το οξικό οξύ εισέρχεται στην περιφερική κυκλοφορία όπου και μεταβολίζεται από τους περιφερειακούς ιστούς και αποτελεί υπόστρωμα για τη σύνθεση της χοληστερόλης. (Schwiertz et al 2009) (Ruth E. Ley et al, 2005).

Επίσης, σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα, βλέπουμε ότι στις 6 και στις 24 ώρες οι τιμές των SCFAs είναι παρόμοιες ή μειώνονται στους παχύσαρκους σε σχέση με τις τιμές των νορμοβαρών με εξαίρεση τα ολικά λιποειδή, όπου παρατηρείται παντού μικρή αύξηση.

Μπορεί, λοιπόν οι επιπλέον θερμίδες που προσδίδονται στον ξενιστή από τη ζύμωση των άπεπτων διατροφικών μορίων του εντερικού μικροβιόκοσμου να μην είναι επαρκείς για να επάγουν σημαντικές αλλαγές στο βάρος. Ένα από τα επιχειρήματα που υποστηρίζει αυτή την υπόθεση είναι ότι η κατανάλωση μιας διατροφής πλούσιας σε διατροφικές ίνες θα μπορούσε να αυξήσει την παραγωγή SCFAs, τα οποία συνήθως βοηθούν να μειωθεί το βάρος και ο λιπώδης ιστός (Kalliomaki M, 2008).

Μελέτες μηχανισμών αποκάλυψαν ότι η ενεργοποίηση του GPR41 σε εντεροενδοκρινικά κύτταρα διεγείρει την έκκριση του πεπτιδίου της ορμόνης του εντέρου YY (PYY), η οποία λειτουργεί για να διεγείρει τον κορεσμό και να μειώνει την πρόσληψη τροφής (Samuel BS et al, 2008), ενώ το εξαρτώμενο από το βουτυρικό και προπιονικό, GPR43 σηματοδοτεί την ινσουλινοευαισθησία του ξενιστή προωθώντας την έκκριση GLP-1 (Tolhurst G et al, 2012). Τέτοιοι μοριακοί μηχανισμοί με τους υποδοχείς των SCFAs επιβεβαιώθηκαν περαιτέρω σε ανθρώπινες μελέτες από το εύρημα ότι η χορήγηση προπιονικού οξέος σε παχύσαρκους

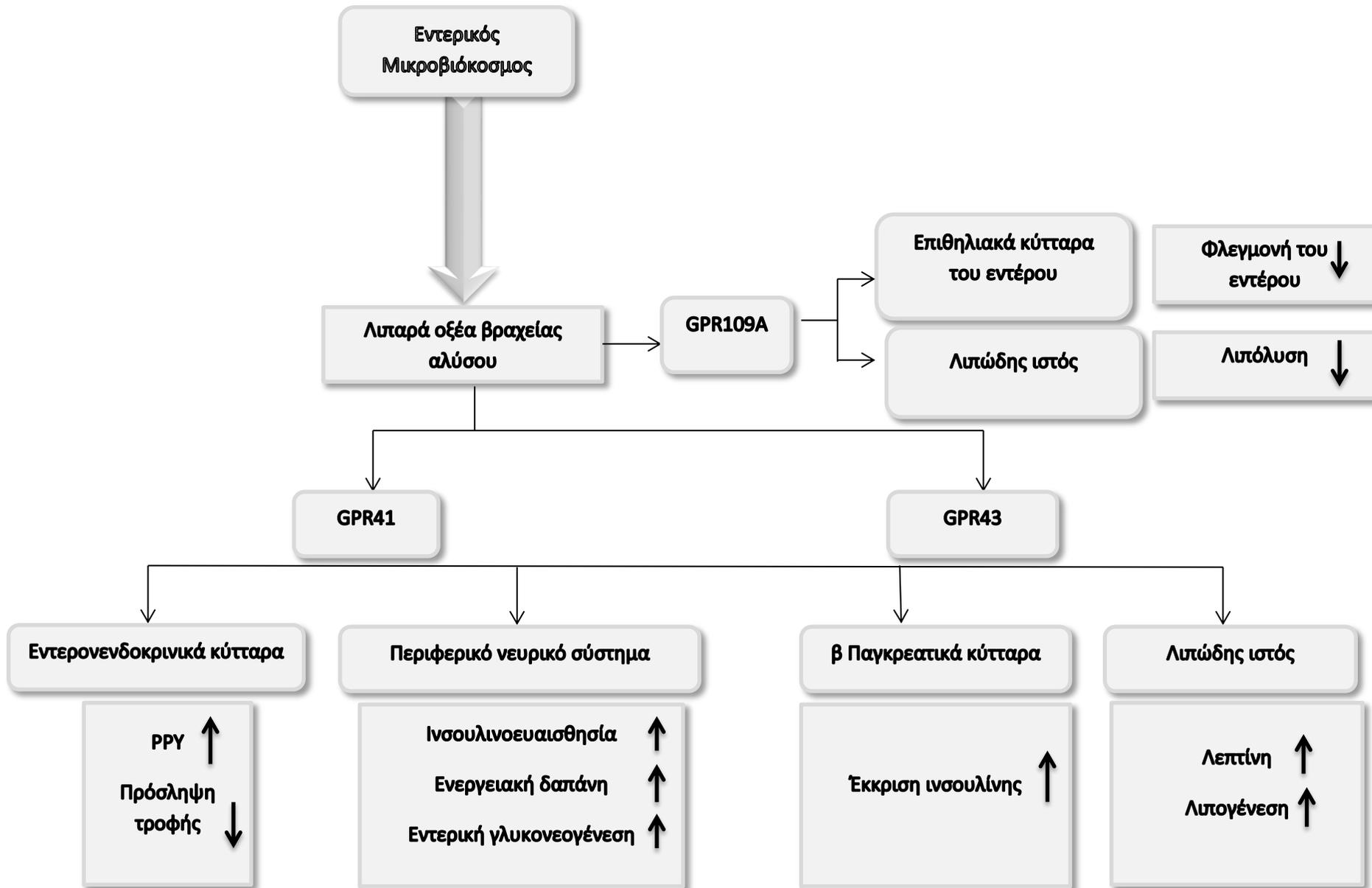
ασθενείς οδήγησε σε αυξημένη έκκριση PYY και GLP-1 με σημαντικά μειωμένο το ποσοστό λίπους, αλλά και το συνολικό βάρος των ασθενών (Chambers ES, Psichas et al, 2015). Πρόσφατα στοιχεία δείχνουν ότι το βουτυρικό και προπιονικό οξύ επίσης συμβάλουν στην υγεία ενεργοποιώντας την εντερική γλυκονογένεση (IGN), η οποία έχει διπλό ρόλο στην διατήρηση της ενεργειακής ομοιόστασης: τη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής και την ενίσχυση της ινσουλινοευαισθησίας (Xuan Li, 2017). Το βουτυρικό επίσης, ως ισχυρός αναστολέας της ακετυλοτρανσφεράσης της ιστόνης προκαλεί επιγενετικά τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, σηματοδοτεί τα GPR41 / GPR43 που δρουν άμεσα στα β παγκρεατικά κύτταρα για τη ρύθμιση της έκκρισης ινσουλίνης (Priyadarshini M, 2015).

Οι αλληλεπιδράσεις των SCFA-GPR41/GPR43 στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου έχουν επίσης προταθεί ως υπεύθυνα για τα προστατευτικά αποτελέσματα της διατροφής και του εντερικού μικροβιόκοσμου. Για παράδειγμα, η σύνδεση βουτυρικού οξέος με GPR43 στα επιθηλιακά κύτταρα του παχέως εντέρου έχει αναφερθεί ότι ανακουφίζει την φλεγμονή του παχέως εντέρου αυξάνοντας την ενεργοποίηση των NALP₃ (NACHT, LRR, PYD) (Macia L et al, 2015). Όταν εκφραστεί στον λιπώδη ιστό, το GPR41 διεγείρει την έκκριση λεπτίνης και το GPR43 χρησιμεύει στην καταστολή της σηματοδότησης της ινσουλίνης και της λιπογένεσης (Xuan Li et al, 2017).

Όσον αφορά τα εκχυλίσματα του κρασιού (W, TL) έχουν παρόμοια δράση με την ινουλίνη στην παραγωγή SCFAs και τέλος οι επιμέρους φαινολικές ενώσεις δε φαίνεται να έχουν κάποια επίδραση στα επίπεδα των SCFAs. Αυτό υποδηλώνει ότι πιθανώς να υπάρχει μια συνεργιστική δράση των μικροσυστατικών του κρασιού σε αυτά τα εκχυλίσματα. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η Parkar με τους συνεργάτες της, όπου και εκείνοι μελέτησαν *in vitro* την επίδραση των φαινολικών ενώσεων κρασιού από τον εντερικό μικροβιόκοσμο και των SCFAs, με εξαίρεση ότι εκείνοι χρησιμοποίησαν δείγμα κοπράνων μόνο από έναν εθελοντή και διαφορετικές φαινολικές ενώσεις. Σύμφωνα και με τα δικά τους αποτελέσματα, η μεγαλύτερη αύξηση στα σημαντικότερα SCFAs (οξικό, προπιονικό και βουτυρικό) παρατηρήθηκε πάλι από την ινουλίνη στα 2 mg / mL στις 48 ώρες. Τέλος, βρήκαν ότι όλες οι πολυφαινόλες αύξησαν την παραγωγή των SCFAs. (Parkar, 2013)

Χρειάζονται περισσότερες ερευνητικές μελέτες για να καθοριστεί αν μπορεί η μικροβιακή ισορροπία να αλλάξει με αυτόν τον τρόπο και αν αυτές οι μεταβολές παρέχουν οφέλη για την υγεία. Θεωρούμε ότι είναι πολύ δύσκολο να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη σημασία των διαφόρων βακτηριακών ομάδων στην παχυσαρκία, καθώς δεν ελήφθησαν υπόψη όλες οι

παράμετροι που αφορούν την υγεία, όπως η διατροφή, το γενετικό υπόβαθρο, οι καθημερινές συνήθειες κ.α.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, βλέπουμε ότι οι παχύσαρκοι εθελοντές είχαν περισσότερα SCFAs από τους νορμοβαρείς. Η ινουλίνη, ως γνωστό προβιοτικό, επιβεβαιώνεται ότι αυξάνει τα SCFAs και αυτό φαίνεται πιο έντονα στους παχύσαρκους εθελοντές. Τα εκχυλίσματα κρασιού (W, TL) έχουν παρόμοια δράση με την ινουλίνη στα SCFAs και τέλος οι επιμέρους φαινολικές ενώσεις δε φαίνεται να έχουν κάποια επίδραση στα επίπεδα SCFAs. Αυτό υποδηλώνει ότι πιθανώς να υπάρχει μια συνεργιστική δράση των μικροσυστατικών του κρασιού σε αυτά τα εκχυλίσματα.

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι τα εκχυλίσματα του κρασιού μπορούν να τροποποιήσουν τα επίπεδα των SCFAs επηρεάζοντας την υγεία του οργανισμού.

Βιβλιογραφία

1. Aguirre M, Jonkers DMAE, Troost FJ, Roeselers G, Venema K, In Vitro Characterization of the Impact of Different Substrates on Metabolite Production, Energy Extraction and Composition of Gut Microbiota from Lean and Obese Subjects. PLoS ONE 9(11) 2007 :e113864. doi:10.1371/journal.pone.0113864
2. Akkerman JW., Verhoef S, Gorter G, Kraaijenhagen RJ, van de Wiel A, Polyphenolic grape extract inhibits platelet activation through PECAM-1: an explanation for the French paradox. Alcohol Clin Exp Res. 2007 ;31(8):1308-14
3. Anderson JW, Baird P, Davis RH, Ferreri S, Knudtson M, Koraym A, et al. Health benefits of dietary fiber. Nutrition Reviews, 2009;67(4):188-205. doi: 10.1111/j.1753-4887
4. Angelakis E., Fabrice Armougom, Matthieu Million & Didier Raoult, The relationship between gut microbiota and weight gain in humans, Future Microbiol, 7(1), 91–109, 2012
5. Arranz Sarah, Gemma Chiva-Blanch, Palmira Valderas-Martínez, Alex Medina-Remón, Rosa M. Lamuela-Raventós and Ramón Estruch, Wine, Beer, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer, Nutrients 2012, 4, 759-781; doi:10.3390/nu4070759
6. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104:979–984
7. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science 2005; 307:1915–1920
8. Basli A, Soulet S, Chaher N, Mérillon JM, Chibane M, Monti JP, Richard T. Wine polyphenols: potential agents in neuroprotection. Oxid Med Cell Longev 2017 :805762. doi: 10.1155/2012/805762
9. Bode C, Bode JC. Alcohol's role in gastrointestinal tract disorders. Alcohol Health Res World.1997 ;21(1):76–6
10. Bonnefont-Rousselot, Resveratrol and Cardiovascular Diseases, Nutrients 2016, 8, 250; doi:10.3390/nu8050250
11. Cardona Fernando, Cristina Andrés-Lacueva, Sara Tulipani, Francisco J. Tinahones, María Isabel Queipo-Ortuño, Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications

- in human health, *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2013, Volume 24, Issue 8, Pages 1415-1422, ISSN 0955-2863, <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
12. Cassidy A., Gail Rogers, Julia J Peterson, Johanna T Dwyer, Honghuang Lin, and Paul F Jacques Higher dietary anthocyanin and flavonol intakes are associated with anti-inflammatory effects in a population of US adults, *Am J Clin Nutr* 2015 ;102:172–81
 13. Chambers ES, Viardot A, Psichas A, Morrison DJ, Murphy KG, Zac-Varghese SE, MacDougall K, Preston T, Tedford C, Finlayson GS, Blundell JE, Bell JD, Thomas EL, Mt-Isa S, Ashby D, Gibson GR, Kolida S, Dhillon WS, Bloom SR, Morley W, Clegg S, Frost G. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut* 64, 2015: 1744–1754
 14. Chen Z, Guo L, Zhang Y, Walzem RL, Pendergast JS, Printz RL, Morris LC, Matafonova E, Stien X, Kang L, Coulon D, McGuinness OP, Niswender KD, Davies SS. Incorporation of therapeutically modified bacteria into gut microbiota inhibits obesity. *J Clin Invest.* 2014 ;124:3391–3406. doi: 10.1172/JCI72517.
 15. Clemente-Postigo M, Queipo-Ortuño MI, Boto-Ordoñez M, Coin-Aragüez L, Roca-Rodríguez MM, Delgado-Lista J, Cardona F, Andres-Lacueva C, Tinahones FJ, Effect of acute and chronic red wine consumption on lipopolysaccharide concentrations, *Am J Clin Nutr.* 2013 ;97(5):1053-61. doi: 10.3945/ajcn.112.051128
 16. Cozzolino D, The Role of Visible and Infrared Spectroscopy Combined with Chemometrics to Measure Phenolic Compounds in Grape and Wine Samples, *Molecules.* 2015;20(1):726-37. doi: 10.3390/molecules20010726
 17. Cueva C, Sánchez-Patán F, Monagas M, Walton GE, Gibson GR, Martín-Álvarez PJ, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. In vitro fermentation of grape seed flavan-3-ol fractions by human faecal microbiota: changes in microbial groups and phenolic metabolites, *FEMS Microbiol Ecol.* 2013 ;83(3):792-805. doi: 10.1111/1574-6941.12037
 18. Dell’Agli M, Buscialà A, Bosisio E Vascular effects of wine polyphenols, *Cardiovasc Res.* 2004 ;63(4):593-602
 19. Di Castelnuovo, Costanzo S, di Giuseppe R, de Gaetano G, Iacoviello L. Alcohol consumption and cardiovascular risk: mechanisms of action and epidemiologic perspectives, *Future Cardiol.* 2009 ;5(5):467-77. doi: 10.2217/fca.09.36
 20. Dominguez-Bello G., Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 ;107(26):11971-5. doi: 10.1073/pnas.1002601107

21. Duda-Chodak, the inhibitory effect of polyphenols on human gut microbiota, *J Physiol Pharmacol.* 2012 ;63(5):497-503
22. Duda-Chodak A, Tarko T, Satora P, Sroka P. Interaction of dietary compounds, especially polyphenols, with the intestinal microbiota: a review. *European Journal of Nutrition.* 2015 ;54(3):325-341. doi:10.1007/s00394-015-0852-y
23. Dueñas, A Survey of Modulation of Gut Microbiota by Dietary Polyphenols, *Cell Metab.* 2011 ;13(5):489-90. doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.005
24. DUMAS ME. The microbial-mammalian metabolic axis: Beyond simple metabolism. *Cell Metab* 2011 ;13(5):489-90. doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.005
25. Eckburg Pb, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. *Science.* 2005;308(5728):1635-8
26. Fåk F, Tremaroli V, Bergström G, Bäckhed F. Oral microbiota in patients with atherosclerosis. *Atherosclerosis.*;243:573–578.doi:10.1016/j.atherosclerosis. 2015.10.097
27. Fåk F, Bäckhed F *Lactobacillus reuteri* prevents diet-induced obesity, but not atherosclerosis, in a strain dependent fashion in Apoe^{-/-} mice. *PLoS One.* 2012 ;7:e46837. doi: 10.1371/journal.pone.0046837.
28. Fischer JE, Sabiston *Textbook of Surgery: the biological basis of modern surgical practice* 17th Edn. C. M. Townsend, R. D. Beauchamp, B. M. Evers and K. L. Mattox (eds). 222 × 283 mm. Pp. 2388. Illustrated. 2004. Elsevier Saunders: New York. *Br J Surg*, 92: 495-496. doi:10.1002/bjs.4959
29. Flamini R, Mattivi F, De Rosso M, Arapitsas P, Bavaresco L. Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols. *International Journal of Molecular Sciences.* 2013;14(10):19651-19669. doi:10.3390/ijms141019651.
30. Forester SC, Waterhouse AL *Metabolites Are Key to Understanding Health Effects of Wine Polyphenolics*, *J Nutr.* 2009;139(9):1824S-31S. doi: 10.3945/jn.109.107664
31. Fragopoulou E, Nomikos T, Detopoulou P, Yannakoulia M, Stamatakis G, Panagiotakos DB, Antonopoulou S. The relation of diet with PAF and its metabolic enzymes in healthy volunteers, *Eur J Nutr.* 2015;54(1):25-34. doi: 10.1007/s00394-014-0682-3
32. Gambini J., Inglés M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, Mas-Bargues C, Abdelaziz KM, Gomez-Cabrera MC, Vina J, Borrás C *Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans*, *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:837042. doi: 10.1155/2015/837042

33. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995;125:1401–12
34. Gill S., Mihai P, Robert T. Deboy, Paul B., Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome, *Science* 2006 : 1355-1359
35. Gordon Ji, Honor thy gut symbionts redux. *Science* 2012;336(6086):1251-3. doi: 10.1126/science.1224686
36. Grønbaek M, Becker U, Johansen D, Gottschau A, Schnohr P, Hein HO, Jensen G, Sørensen TI, Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer, *Ann Intern Med.* 2000 ;133(6):411-9
37. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC, Sutter JL, Koren O, Blekhman R, Beaumont M, Van Treuren W, Knight R, Bell JT, Spector TD, Clark AG, Ley RE. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 2014;159:789–799. doi: 10.1016/j.cell.2014.09.053
38. Guarner F., Bourlioux P., Koletzko B, Braesco V, The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," *Am J Clin Nutr.* 2003 ;78(4):675-83
39. Guyon F, C Douet, S Colas, MH Salagoïty, B Medina, Effects of must concentration techniques on wine isotopic parameters, *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 2006 ;9918-9923
40. Hariram Nile, S. H. Kim, Eun Young Ko, Se Won Park Polyphenolic Contents and Antioxidant Properties of Different Grape (*V. vinifera*, *V. labrusca*, and *V. hybrid*) Cultivars, *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 718065, 5 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/718065>
41. Hussain T., Bie Tan, Yulong Yin, Francois Blachier, Myrlene C. B. Tossou, Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2016, Article ID 7432797, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7432797>
42. Jimenez -Girón A, Ibáñez C, Cifuentes A, Simó C, Muñoz-González I, Martín-Álvarez PJ, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV, Faecal Metabolomic Fingerprint after Moderate Consumption of Red Wine by Healthy Subjects, *J Proteome Res.* 2015;14(2):897-905. doi: 10.1021/pr500960g
43. Kalliomaki M, Collado MC, Salminen S, et al. Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr.* 2008 ;87:534–538
44. Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, Tremaroli V, Fagerberg B, Petranovic D, Bäckhed F, Nielsen J. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun.* 2012 ;3:1245. doi: 10.1038/ncomms2266

45. Karlsson C, Ahrné S, Molin G, Berggren A, Palmquist I, Fredrikson GN, Jeppsson B. Probiotic therapy to men with incipient arteriosclerosis initiates increased bacterial diversity in colon: a randomized controlled trial. *Atherosclerosis*. 2010 ;208:228–233. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.06.019
46. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K, Kashihara D, Hirano K, Tani T, Takahashi T, Miyauchi S, Shioi G, Inoue H, Tsujimoto G . The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun*. 2013;4:1829. doi: 10.1038/ncomms2852
47. Knight RD, J. I. Gordon, Obesity alters gut microbial ecology, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005 ;102(31):11070-5
48. Koren O, Spor A, Felin J, Fåk F, Stombaugh J, Tremaroli V, Behre CJ, Knight R, Fagerberg B, Ley RE, Bäckhed F. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(suppl 1):4592–4598. doi: 10.1073/pnas.1011383107
49. Laparra JM, Sanz Y, Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals, 2010 ;61(3):219-25. doi: 10.1016/j.phrs.2009.11.001
50. LeBlanc JG, Chain F, Martín R, Bermúdez-Humarán LG, Courau S, Langella P, Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria, *Microb Cell Fact*, 2017 ;16(1):79. doi: 10.1186/s12934-017-0691-z
51. Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, et al. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 ;111(42):E4485–E4493
52. Lekli I, Ray D, Das DK. Longevity nutrients resveratrol, wines and grapes. *Genes & Nutrition*. 2010;5(1):55-60. doi:10.1007/s12263-009-0145-2. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006 ;444:1022–1023
53. Lippi G, Franchini M, Favaloro EJ, Targher G, Moderate Red Wine Consumption and Cardiovascular Disease Risk: Beyond the ‘‘French Paradox’’, *Semin Thromb Hemost*. 2010 ;36(1):59-70. doi: 10.1055/s-0030-1248725
54. Liu S, Willett WC, Manson JE, Hu FB, Rosner B, Colditz G. Relation between changes in intakes of dietary fiber and grain products and changes in weight and development of obesity among middle-aged women. *Am J Clin Nutr*. 2003;78(5):920-7
55. Macia L, Tan J, Vieira AT, Leach K, Stanley D, Luong S, Maruya M, Ian McKenzie C, Hijikata A, Wong C, Binge L, Thorburn AN, Chevalier N, Ang C, Marino E, Robert R,

- Offermanns S, Teixeira MM, Moore RJ, Flavell RA, Fagarasan S, Mackay CR. 2015 Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun* 6: 6734
56. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, The gut microbiota and host health: a new clinical frontier *Gut* 2016 ;65:330-339
57. Markoski M., Garavaglia J, Oliveira A, Olivaes J, Marcadenti A, Molecular Properties of Red Wine Compounds and Cardiometabolic Benefits, *Nutr Metab Insights*. 2016 ;9:51-7. doi: 10.4137/NMI.S32909
58. Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesäniemi YA, Syrjälä SL, Jungell PS, Isoluoma M, Hietaniemi K, Jokinen MJ . Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ*. 1989;298:779–781
59. Midtvedt T, Bjorneklett A, Carlstedt-Duke B, et al. The influence of antibiotics upon microflora associated characteristics in man and animals. In: BS Wostman, editor. *Germfree research; Microflora control and its application to the biochemical sciences. Progress in clinical and biological research. Vol. 181, New York (NY): Alan R. Liss Corporation; 1985. p. 241–244*
60. Moreira AP, Fliche Salles Teixeira T, do C Gouveia Peluzio M, de Cássia Gonçalves Alfenas R. Gut microbiota and the development of obesity, *Nutr Hosp*. 2012 ;27(5):1408-14. doi: 10.3305/nh.2012.27.5.5887
61. Mountzouris K.C., Balaskas C., Fava F., Tuohy K.M., Gibson G.R., Fegeros K. Profiling of composition and metabolic activities of the colonic microflora of growing pigs fed diets supplemented with prebiotic oligosaccharides. *Anaerobe*, 12 (2006), pp. 178–185
62. Mullin, G.E. Red wine, grapes, and better health, resveratrol. *Nutr Clin Pract*. 2011 ;26(6):722-3. doi: 10.1177/0884533611423927
63. Ott SJ, El Mokhtari NE, Musfeldt M, et al . Detection of diverse bacterial signatures in atherosclerotic lesions of patients with coronary heart disease. *Circulation*. 2006 ;113:929–937. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.579979
64. Parkar SG, Trower TM, Stevenson DE, Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota, *Anaerobe*. 2013 ;23:12-9. doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.07.00
65. Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 ;110:4410–4415. doi: 10.1073/pnas.1215927110

66. Priyadarshini M, Villa SR, Fuller M, Wicksteed B, Mackay CR, Alquier T, Poitout V, Mancebo H, Mirmira RG, Gilchrist A, Layden BT. 2015. An acetate-specific GPCR, FFAR2, regulates insulin secretion. *Mol Endocrinol* 29: 1055–1066
67. Requena, T., M. Monagas, M.A. Pozo-Bayo 'n, P.J. Martín-Alvarez, B. Bartolome, R. del Campo, M. Avila, M.C. Martinez-Cuesta, C. Pelaez, and M.V. MorenoArribas, 2010. Perspectives of the potential implications of wine polyphenols on human oral and gut microbiota. *Trends Food Sci. Technol.* 21:332–344
68. Roberfroid M, Prebiotics: the concept revisited, *J Nutr.* 2007 ;137(3 Suppl 2):830S-7S. doi: 10.1093/jn/137.3.830S
69. Ronksley Paul E, Brien Susan E, Turner Barbara J, MukamalKenneth J, Ghali William A. Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis *BMJ* 2011; 342 :d671
70. Roulton B. R., Vernon L. Singleton, Linda F. Bisson, Ralph E. Kunkee, *Principles and practices of winemaking.* USA 1996 10.1007/978-1-4757-6255-6
71. Ruth E. Ley, Fredrik Backhed et al, Obesity alters gut microbial ecology, *PNAS* , 2005. 102 (31) 11070-11075
72. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, Hammer RE, Williams SC, Crowley J, Yanagisawa M, Gordon JI. 2008. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16767–16772
73. Sánchez-Patán F, Cueva C, Monagas M, Walton GE, Gibson GR, Quintanilla-López JE, Lebrón-Aguilar R, Martín-Álvarez PJ, Moreno-Arribas MV, Bartolomé B. In Vitro Fermentation of a Red Wine Extract by Human Gut, Microbiota: Changes in Microbial Groups and Formation of Phenolic Metabolites, *J Agric Food Chem.* 2012 ;60(9):2136-47. doi: 10.1021/jf2040115
74. Sanders ME, Probiotics and microbiota composition, *BMC Med.* 2016 Jun 2;14(1):82. doi: 10.1186/s12916-016-0629-z
75. Saraswati S, Sitaraman R. Aging and the human gut microbiota—from correlation to causality. *Frontiers in Microbiology* 2014 ;5:764. doi:10.3389/fmicb.2014.00764
76. Scheppach W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut* 1994 ;35 (1 Suppl):S35–S38
77. Schwartz A, David Taras. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects *Obesity* (2009) 18, 190–195. doi:10.1038/oby.2009.167
78. Seldin MM, Meng Y, Qi H, Zhu W, Wang Z, Hazen SL, Lusis AJ, Shih DM . Trimethylamine n-oxide promotes vascular inflammation through signaling of mitogen-

- activated protein kinase and nuclear factor-kappaB. *J Am Heart Assoc.* 2016; pii: e002767. doi: 10.1161/JAHA.115.002767
79. Selma MV, Espín JC, Tomás-Barberán FA, Interaction between Phenolics and Gut Microbiota: Role in Human Health, *J Agric Food Chem.* 2009 ;57(15):6485-501. doi: 10.1021/jf902107d
80. Serra e Silva Filho W, Casarin RC, Nicoleta EL Jr., Passos HM, Sallum AW, Goncalves RB. Microbial diversity similarities in periodontal pockets and atheromatous plaques of cardiovascular disease patients. *PLoS One.* 2014;9:e109761
81. Shi A, Ziqi Tao Peng Wei Jing Zhao Epidemiological aspects of heart diseases (Review), <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3541>
82. Sirk TW, Brown EF, Friedman M, Sum AK Molecular binding of catechins to biomembranes: relationship to biological activity, *J Agric Food Chem.* 2009 ;57(15):6720-8. doi: 10.1021/jf900951w
83. Simon MC, Strassburger K, Nowotny B, et al. Intake of *Lactobacillus reuteri* improves incretin and insulin secretion in glucose-tolerant humans: a proof of concept. *Diabetes Care.* 2015 ;38:1827–1834. doi: 10.2337/dc14-2690.
84. Simenhoff ML, Dunn SR, Zollner GP, Fitzpatrick ME, Emery SM, andine WE, Ayres JW Biomodulation of the toxic and nutritional effects of small bowel bacterial overgrowth in end-stage kidney disease using freeze-dried *Lactobacillus acidophilus*. *Miner Electrolyte Metab.* 1996;22:92–96
85. Smith JS, Cain B. *Essentials of Surgery: Scientific Principles and Practice.* *Annals of Surgery.* 1999;230(6):824. Soleas G. J., Diamandis EP, Goldberg DM Wine as a Biological Fluid: History, Production and Role in Disease Prevention, *J Clin Lab Anal.* 1997;11(5):287-313
86. Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, Wu Y, Hazen SL . Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2013 ;368:1575–1584. doi: 10.1056/NEJMoa1109400.
87. Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, Cameron J, Grosse J, Reimann F, Gribble FM. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes* 2012;61: 364–371
88. Turnbaugh PJ, Ley RE, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006 ;444:1027–1031. doi: 10.1038/nature05414

89. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457:480–484
90. Tzounis X, Rodriguez-Mateos A, Vulevic J, Gibson GR, Kwik-Urbe C, Spencer JP Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study; *Am J Clin Nutr*. 2011;93(1):62-72. doi: 10.3945/ajcn
91. Urpi-Sarda, Zamora-Ros R, Lamuela-Raventos R, Cherubini A, Jauregui O, de la Torre R, Covas MI, Estruch R, Jaeger W, Andres-Lacueva C HPLC–Tandem Mass Spectrometric Method to Characterize Resveratrol Metabolism in Humans, 2007;53(2):292-9
92. Vassallo G, Mirijello A, Ferrulli A, et al. Review article: alcohol and gut microbiota - the possible role of gut microbiota modulation in the treatment of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015 ;41(10):917–927
93. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011 ;472:57–63. doi: 10.1038/nature09922
94. Weisse ME, Eberly B, Person DA. Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine, *BMJ*. 1995 ;311(7021):1657-60.
95. Xuan Li, Yuuki Shimizu and Ikuo Kimura. Gut microbial metabolite short-chain fatty acids and obesity, *Bioscience of Microbiota, Food and Health* 2017; Vol. 36 (4), 135–140
96. Yamashiro K, Tanaka R, Urabe T, Ueno Y, Yamashiro Y, Nomoto K, Takahashi T, Tsuji H, Asahara T, Hattori N. Gut dysbiosis is associated with metabolism and systemic inflammation in patients with ischemic stroke. *PLoS One*. 2017; 12:e0171521. doi: 10.1371/journal.pone.0171521
97. Yoo, J. Y. and S. S. Kim. Probiotics and Prebiotics: Present Status and Future Perspectives on Metabolic Disorders. *Nutrients* 2017; 8(3): 173.
98. Zheng Yi, Yaohua Liu, Jinying Ge, Xiaoyuan Wang, Lijuan Liu, Zhigao Bu, Ping Liu Resveratrol protects human lens epithelial cells against H₂O₂-induced oxidative stress by increasing catalase, SOD-1, and HO-1 expression, *Mol Vis*. 2010; 16: 1467–1474