



Σχολή Επιστημών Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ταυτοποίηση ενώσεων σε δείγματα ανθρωπίνων κοπράνων που
σχετίζονται με τη λήψη φλαβονοειδών.**

**Identification of compounds in human stool samples related to flavo-
noid intake.**

ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ / NAME OF THE STUDENT

ΕΡΜΕΙΔΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ERMEIDIS DIMITRIOS

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Δρ. ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ
Dr. ZOUMPOULAKIS PANAGIOTIS

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2024

Έγινε δεκτή

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο **‘Ταυτοποίηση ενώσεων σε δείγματα ανθρωπίνων κοπράνων που σχετίζονται με τη λήψη φλαβονοειδών.’** που παρουσιάστηκε από τον Ερμείδη Δημήτριο και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

16/10/2024

Ζουμπουλάκης Παναγιώτης

16/10/2024

Κρίση Ευτυχία

16/10/2024

Τσιάκα Θάλεια

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

<Ερμείδης Δημήτριος>

Περίληψη

Εισαγωγή: Τα τελευταία χρόνια έχει ενταθεί η έρευνα επάνω στην εντερική μικροχλωρίδα και τα οφέλη για την υγεία από ένα υγιές μικροβίωμα. Τα φλαβονοειδή αποτελούν μια ομάδα πολυφαινόλων ωφέλιμων για την υγεία κυρίως λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης τους. Η αλληλεπίδραση αυτών των δύο και τα πιθανά οφέλη για τον οργανισμό από αυτό αποτελούν σημείο έντονου επιστημονικού ενδιαφέροντος.

Σκοπός: Η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης εντερικού μικροβιώματος – φλαβονοειδών τόσο σε επίπεδο μεταβολισμού των φλαβονοειδών όσο και του αντίκτυπου της κατανάλωσης των φλαβονοειδών στο μεταβόλωμα του εντερικού μικροβιόκοσμου.

Μέθοδος: Από διατροφική παρέμβαση με βιταμίνη D, Ca, βιοφλαβονοειδή (ναρινγκίνη & εσπεριδίνη) σε γυναίκες στην εμμηνόπαυση με σκοπό τη βελτίωση της οστεοπενίας, εξετάστηκαν δείγματα κοπράνων στους 0 και 9 μήνες μετά την παρέμβαση, με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR και LCMS, για μεταβολές στη συγκέντρωση μεταβολιτών των φλαβονοειδών και χαρακτηριστικών μεταβολιτών του εντερικού μικροβιώματος. Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν πολυμεταβλητές στατιστικές προσεγγίσεις (PLS-DA/PCA)

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε δύο μεταβολίτες των πολυφαινόλων – το διϋδροκαφεϊκό και το υδροκινναμικό οξύ – αν και κατά γενική ομολογία οι ομάδες 0 και 9 μηνών δεν διαφοροποιούνται σε επίπεδο μεταβολιτών των πολυφαινόλων. Σε επίπεδο εντερικού μεταβολώματος παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες σε 8 μεταβολίτες - ισοβαλερικό οξύ, βαλίνη, ασπαραγγινικό οξύ, μεθανόλη, γλυκερόλη, τυροσίνη, φαινυλοξικό οξύ, φαινυλαλανίνη.

Συμπεράσματα: Οι πολυφαινόλες έδειξαν να χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα από το εντερικό μικροβίωμα επηρεάζοντας κατ' επέκταση και το εντερικό μεταβόλωμα.

Λέξεις – Κλειδιά: εντερικό μικροβίωμα, φλαβονοειδή, μεταβολωμική, αλληλεπίδραση, NMR, LCMS, στατιστική ανάλυση

Abstract

Introduction: Over the last few years, research on gut microbiota and the health benefits stemming from a healthy gut microbiome has seen significant growth. Flavonoids are a polyphenol group beneficial for human health mainly due to their antioxidant effects. The two-way interaction between gut microbiome and flavonoids constitutes a field of growing academic interest.

Aim: The aim of the current study is the investigation of the interaction between the gut microbiome and flavonoids on two levels. Firstly, the way that these flavonoids are metabolized by the gut microbiota and secondly the impact of the consumption of flavonoids on the composition of the gut microbiota and the gut microbiome in general.

Methodology: Stool samples were collected from a dietary intervention in women in menopause aiming to examine the effects of a supplement, including vitamin D, Ca and two bioflavonoids (naringin, hesperidin), in osteopenia. Samples were examined at two time points, specifically at 0 months 0 and 9 after the intervention for differences in concentration of flavonoid metabolites and characteristic gut microbiome metabolites, using NMR spectroscopy and LCMS . Multifactorial statistical approaches, such as PLS-DA and PCA, were utilized for the statistical analysis of the results.

Results: A statistically significant differentiation was observed for two flavonoid metabolites – dihydrocaffeic and hydrocinnamic acids – even though a differentiation was not found between the two groups (0 and 9 months) on a flavonoid-metabolite level. On the other hand, significant differences were observed between the two groups for 8 characteristic gut microbiome metabolites – isovaleric acid, valine, aspartic acid, methanol, glycerol, tyrosine, phenylacetic acid, phenylalanine.

Conclusions: Flavonoids have been observed to be used as substrates by the gut microorganisms influencing the gut microbiome at least at a certain level.

Keywords: gut microbiome, flavonoids, metabolomics, interaction, NMR, LCMS, statistical analysis

Πίνακας περιεχομένων

Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright	iii
Περίληψη	iv
Abstract.....	v
Κατάλογος Πινάκων	vii
Κατάλογος Σχημάτων/Εικόνων	vii
Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή και σκοπός της εργασίας.....	1
Κεφάλαιο 2: Θεωρητικό υπόβαθρο-ανασκόπηση βιβλιογραφίας	2
2.1 : Η εντερική μικροχλωρίδα	2
2.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά	2
2.1.2 Σύσταση και ομοίωση EM.....	2
2.1.3 Λειτουργίες στον ανθρώπινο οργανισμό.....	4
2.1.4 Συσχέτιση εντερικού μικροβιόκοσμου με οστεοπόρωση.....	6
2.2. Φυτοχημικά – Πολυφαινόλες – Φλαβονοειδή: Ο ρόλος στην ανθρώπινη υγεία.....	8
2.2.1 Εισαγωγή στα φυτοχημικά.....	8
2.2.2 Πολυφαινόλες.....	8
2.3 Αλληλεπίδραση πολυφαινολών – εντερικού μικροβιώματος	12
2.3.1 Απορρόφηση των πολυφαινολών από τον οργανισμό	12
2.3.2 Μεταβολισμός των πολυφαινολών από την εντερική μικροχλωρίδα	13
2.3.3 Επίδραση των πολυφαινολών και του μεταβολισμού τους στη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος	16
2.3.4 Περιορισμοί και προοπτικές στην ανάλυση της αλληλεπίδραση πολυφαινολών – εντερικού μικροβιώματος.....	17
2.4. Αναλυτικές και Στατιστικές Μέθοδοι στη Μεταβολομική	18
2.4.1 Αναλυτικές Μέθοδοι.....	18
2.4.2 Στατιστικές μέθοδοι	20
Κεφάλαιο 3: Υλικά & Μέθοδοι.....	22
3.1 Παραλαβή και προετοιμασία δειγμάτων	22
3.2 Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός.....	22
3.3 Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας.....	22
Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα & Συζήτηση	24
4.1 Πώς επηρεάστηκαν οι ενώσεις από τον εντερικό μικροβιόκοσμο.....	24
4.2 Πώς επηρέασε η λήψη των πολυφαινολών την εντερική μικροχλωρίδα σε μεταβολομικό επίπεδο	33

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα και υποδείξεις για περαιτέρω έρευνα	37
Βιβλιογραφία-Αναφορές.....	38
Πηγές Εικόνων	50

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Κυριότερες κατηγορίες των πολυφαινολών με παραδείγματα ενώσεων και πηγές τους στη διατροφή.....	9
Πίνακας 2: Παραδείγματα μεταβολικών δράσεων μικροοργανισμών με υποστρώματα πολυφαινόλες	14
Πίνακας 3: Μεταβολίτες που βρέθηκαν στις μήτρες δεδομένων του LCMS/MS	25
Πίνακας 4 : Συγκεντρώσεις των μεταβολιτών (σε mM) στα δείγματα NMR (O/L = overlapping)	27
Πίνακας 5: Μέσοι όροι συγκεντρώσεων (mM) και μεταβολές τους πριν και μετά την παρέμβαση	29
Πίνακας 6 : Μεταβολές συγκεντρώσεων ανά δείγμα μετά την παρέμβαση	30
Πίνακας 7: Μεταβολίτες της εντερικής μικροχλωρίδας στους οποίους βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (p<0.05)	34

Κατάλογος Σχημάτων/Εικόνων

Εικόνα 1 : Χαρακτηριστικοί μικροοργανισμοί από κάθε φύλο βακτηρίων που απαρτίζει την εντερική μικροχλωρίδα (δεδομένα από Rinnipela κ.α.,2019).....	3
Εικόνα 2 : Το εντερικό μικροβίωμα χρησιμοποιεί θρεπτικά συστατικά από τη διατροφή για την παραγωγή μεταβολιτών των οποίων η βιοχημική δράση επιφέρει οφέλη σε αρκετά όργανα του σώματος.....	6
Εικόνα 3: 2D απεικόνιση των μορίων της εσπεριδίνης και της εσπεριτίνης	10
Εικόνα 4: 2D αναπαράσταση των μορίων της ναρινγκίνης και της ναρινγκενίνης	11
Εικόνα 5 : Απορρόφηση των πολυφαινολών από τον οργανισμό.....	13
Εικόνα 6: Τυπικό Διάγραμμα Ροής Μεταβολομικής Ανάλυσης.....	19
Εικόνα 7: Διάγραμμα ροής για την διαδικασία εύρεσης από το αρχικό σει ενώσεων τις ενώσεις που τελικά ποσοτικοποιήθηκαν (*φίλτρα: αποκλεισμός χαλκονών, ενώσεων ισομερών αυτών που βρέθηκαν στα πρώτα τέσσερα στάδια, ενώσεων με M.B. > 200 g/mol).....	26
Εικόνα 8 : Box plots για τις τρεις ενώσεις που ποσοτικοποιήθηκαν με NMR (κόκκινο: μετά την παρέμβαση, πράσινο: πριν την παρέμβαση, κίτρινη κουκίδα: M.O.)	31
Εικόνα 9: Scores Plot για τα δείγματα του χρόνου 0 (πράσινες κουκίδες) και του χρόνου 9 (κόκκινες κουκίδες).....	32
Εικόνα 10: VIP Scores για τις τρεις ενώσεις που ποσοτικοποιήθηκαν με NMR.....	33
Εικόνα 11: Απεικόνιση της στατικά σημαντικής διαφοράς με βάση το ραβδόγραμμα για το (Αριστερά) και επιβεβαίωση αυτής εστιάζοντας στην φασματική περιοχή που αντιστοιχεί στον αντιστοιχο μεταβολίτη σε τυχαίο δείγμα στους χρόνους 0 και 9. Από πάνω προς τα κάτω: Ισοβαλερικό B0_950, Βαλίνη B0_9657, Ασπαρτικό οξύ B2_7570, Μεθανόλη B3_3584.....	35
Εικόνα 12: Απεικόνιση της στατικά σημαντικής διαφοράς με βάση το ραβδόγραμμα για το (Αριστερά) και επιβεβαίωση αυτής εστιάζοντας στην φασματική περιοχή που αντιστοιχεί στον αντιστοιχο μεταβολίτη σε τυχαίο δείγμα στους χρόνους 0 και 9. Από πάνω προς τα κάτω: Γλυκερόλη B3_5624, Τυροσίνη B7_2085, Φαινυλοξικό οξύ B7_4150, Φαινυλαλανίνη B7_4307	36

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή και σκοπός της εργασίας

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα επάνω στην εντερική μικροχλωρίδα και στην επίδραση που μπορεί να έχει η διατήρηση ενός «υγιούς μικροβιώματος» στην ανθρώπινη υγεία αναπτύσσεται με γρήγορους ρυθμούς. Πέρα από τις ήδη αναγνωρισμένες φυτικές ενώσεις, όπως για παράδειγμα οι φυτικές ίνες, εξετάζεται η επίδραση που μπορεί να έχουν και άλλες ενώσεις στην διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμου και κατ' επεκτάση ο αντίκτυπος στην ανθρώπινη υγεία. Μια τέτοια ομάδα ενώσεων αποτελούν οι πολυφαινόλες.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να εξετάσει αρχικά σε βιβλιογραφικό επίπεδο την ήδη υπάρχουσα γνώση γύρω από το εντερικό μικροβίωμα, τις πολυφαινόλες και την αλληλεπίδρασή τους. Κατόπιν σε πειραματικό επίπεδο θα εξεταστεί αρχικά το κατά πόσο βιοφλαβονοειδή που λήφθηκαν στα πλαίσια διατροφικής παρέμβασης απορροφήθηκαν από την εντερική μικροχλωρίδα ποσοτικοποιώντας μεταβολίτες τους πριν και μετά τη λήψη του συμπληρώματος. Σε δεύτερο επίπεδο θα εξεταστεί η επίδραση που είχε η λήψη των ενώσεων αυτών στο εντερικό μικροβίωμα ποσοτικοποιώντας μεταβολίτες χαρακτηριστικούς των εντερικών βακτηρίων πριν και μετά την παρέμβαση. Οι πειραματικές μελέτες θα πραγματοποιηθούν με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR.

Κεφάλαιο 2: Θεωρητικό υπόβαθρο-ανασκόπηση βιβλιογραφίας

2.1 : Η εντερική μικροχλωρίδα

2.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

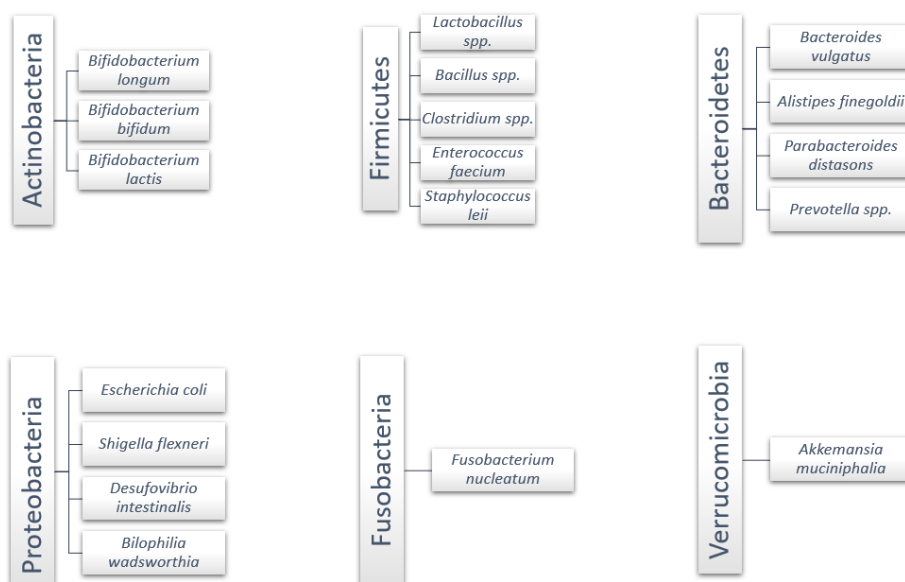
Πολλά συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού, από τη δερματική και τη στοματική κοιλότητα μέχρι το ουρογεννητικό σύστημα επικοινωνούν από έναν μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών όπως βακτήρια, ευκάρυα (ζύμες, μύκητες) και αρχαία. Το σύνολο του γονιδιώματος αυτών των οργανισμών ονομάζεται ανθρώπινο μικροβίωμα ή ανθρώπινη μικροχλωρίδα (Valdes κ.ά., 2018; Vyas & Ranganathan, 2012). Ο αριθμός των μικροβίων αυτών υπολογιζόταν περίπου στα 10^{14} βακτηριακά κύτταρα, περίπου δηλαδή 10 φορές μεγαλύτερος από αυτόν των ανθρωπίνων κυττάρων (Bäckhed κ.ά., 2005; Vyas & Ranganathan, 2012), αν και νεότερες έρευνες τοποθετούν την αναλογία ανθρωπίνων : βακτηριακά κύτταρα πιο κοντά στο 1:1 (Thursby & Juge, 2017).

Πλέον ενδιαφέροντες όσον αφορά τη συμβολή τους στην λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού είναι οι μικροοργανισμοί οι οποίοι επικοινωνούν τον γαστρεντερικό σωλήνα (Gastro-Intestinal Tract - εν συντομία GIT), τα όργανα δηλαδή της γαστρεντερικής οδού από το στομάχι μέχρι το κόλον (Vyas & Ranganathan, 2012). Το σύνολο των μικροοργανισμών που επικοινωνούν τον εντερικό σωλήνα ονομάζεται εντερική μικροχλωρίδα (ή gut microbiota), με τους οργανισμούς αυτούς να έχουν αναπτύξει μια ιδιαίτερη αμοιβαία ωφέλιμη σχέση συμβίωσης με τον ανθρώπινο οργανισμό (Bäckhed κ.ά., 2005; Thursby & Juge, 2017). Ένας άλλος όρος που χρησιμοποιείται συχνά είναι το εντερικό μικροβίωμα (ή gut microbiome). Ο όρος αυτός αναφέρεται στο σύνολο του γονιδιώματος των μικροοργανισμών αυτών που περιλαμβάνει όχι μόνο τους μικροοργανισμούς αλλά και το σύνολο των δομικών τους στοιχείων (π.χ. κυτταρικά τοιχώματα, λιποπολυσακχαρίτες, πεπτιδογλυκάνη), των μεταβολιτών τους (π.χ. λιπαρά οξέα βραχέας αλύσου - SCFA, ολιγοπεπτίδια) και των συνθηκών όπου αυτοί ευδοκιμούν (MetaHIT Consortium κ.ά., 2010). Αποτελεί λοιπόν μια έννοια ευρύτερη από εκείνη της μικροχλωρίδας, εντούτοις όμως πολλές φορές οι δύο όροι χρησιμοποιούνται εναλλάξιμα.

2.1.2 Σύσταση και ομοιότητα EM

Σύμφωνα με έρευνες οι βακτηριακοί πληθυσμοί του γαστρεντερικού σωλήνα αποτελούνται από 160 είδη / άτομο (Bäckhed κ.ά., 2005; MetaHIT Consortium κ.ά., 2010), με τα είδη αυτά να κατατάσσονται σε έξι κύρια φύλα που είναι οι Βακτηριοϊδήτες, τα Ακτινοβακτήρια,

οι Firmicutes, τα Πρωτεοβακτήρια, τα Verrucomicrobia και τα Fusobacteria (Rinninella κ.ά., 2019; Schroeder & Bäckhed, 2016). Το GIT χωρίζεται σε επιμέρους τμήματα λόγω της δομής του, δηλαδή το στομάχι, το λεπτό και το παχύ έντερο, με κάθε ένα από αυτά να έχει διαφορετικό pH, πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά ή/και παρουσία O₂. Επομένως, σε κάθε όργανο ευνοείται η ανάπτυξη διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών (Tsiantas κ.ά., 2022). Παρά τη μεγάλη ποικιλομορφία σε επίπεδο ειδών, το εντερικό μικροβίωμα αποτελείται κατά 85- 90% περίπου από Βακτηριοϊδήτες και Firmicutes (Rinninella κ.ά., 2019; Tsiantas κ.ά., 2022). Στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται ενδεικτικά παραδείγματα διαφορετικών μικροοργανισμών (σε επίπεδο φύλου και γένους), τα οποία εντοπίζονται κατά μήκος του GIT. Ωστόσο τα ποσοστά αυτά είναι γενικευμένα και οι σχέσεις μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών στον εντερικό σωλήνα διαφέρουν μεταξύ άλλων ανάλογα με τη διατροφή του ατόμου, τη φυσική του κατάσταση, τη γεωγραφική περιοχή που βρίσκεται και το γενετικό του υπόβαθρο (Tsiantas κ.ά., 2022).



Εικόνα 1 : Χαρακτηριστικοί μικροοργανισμοί από κάθε φύλο βακτηρίων που απαρτίζει την εντερική μικροχλωρίδα (δεδομένα από Rinninella κ.α.,2019)

Η ανάπτυξή τους στην περιοχή του εντερικού σωλήνα επωφελείται από την ύπαρξη αρκετών μορίων - προϊόντων του ανθρώπινου μεταβολισμού ή/και μορίων τα οποία δεν διασπώνται σε προηγούμενα μεταβολικά στάδια, όπως οι φυτικές ίνες (Holscher, 2017), τα γλυκαντικά (Singla & Chakkaravarthi, 2017), κ.α., τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θρεπτικά συστατικά. Παράγοντες που προτείνεται πως μπορούν να επηρεάσουν την σύνθεση του μικροβιώματος είναι η διατροφή, η λήψη αντιβιοτικών, η παχυσαρκία, η έλλειψη άσκησης, το άγχος και η ηλικία (Belizário & Faintuch, 2018). Συνεχιζόμενη διαταραχή της

ισορροπίας του μικροβιώματος (δυσβίωση - gut dysbiosis) μπορεί να διαταράξει την σωστή λειτουργία του οργανισμού οδηγώντας στις παθήσεις και τις επιπλοκές που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Ως αποτέλεσμα αποτελεί τάση στη βιομηχανία τροφίμων και συμπληρωμάτων διατροφής η σχεδίαση, ανάπτυξη και διάθεση λειτουργικών τροφίμων ή/και συμπληρωμάτων διατροφής εμπλουτισμένων με προβιοτικά – δηλαδή μικροοργανισμούς που αποτελούν μέρος ενός υγιούς μικροβιώματος, πρεβιοτικά – δηλαδή πολυσακχαρίτες που αποτελούν θρεπτικά υποστρώματα για τους μικροοργανισμούς αυτούς και προωθούν την ανάπτυξή τους και συμβιωτικά – δηλαδή συνδυασμό προβιοτικών και πρεβιοτικών. Παραδείγματα τέτοιων τροφίμων αποτελούν είτε ζυμώμενα τρόφιμα που έχουν οργανισμούς με προβιοτική δράση από την αρχική τους καλλιέργεια, π.χ. γιαούρτι, κεφίρ, ζυμωμένα αλλαντικά, αρτοσκευάσματα ή εμπλουτισμένα τρόφιμα, π.χ. πουτίγκες με προβιοτικά.

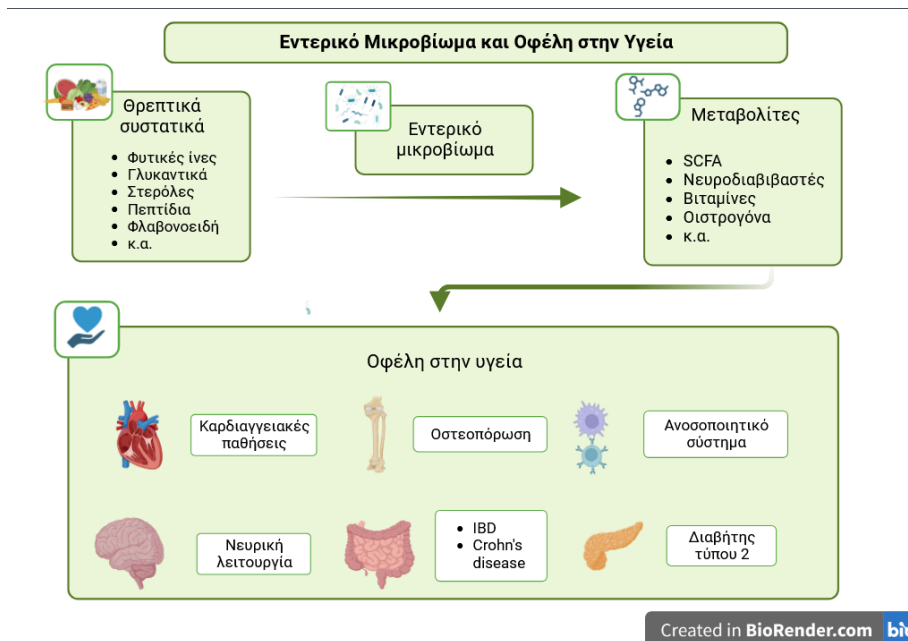
2.1.3 Λειτουργίες στον ανθρώπινο οργανισμό

Η μεταβολική δράση των μικροοργανισμών αυτών προσφέρει μια πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων σε πολλές από τις λειτουργίες του ανθρώπινου οργανισμού. Η δράση περιλαμβάνει αναβολικά και καταβολικά μονοπάτια με υποστρώματα διάφορα θρεπτικά συστατικά. Το πλέον σημαντικό μονοπάτι καταβολισμού αποτελεί η έκφραση ενζύμων μεταβολισμού των υδατανθράκων (carbohydrate-active enzymes) μέσω του οποίου ενισχύεται η μετατροπή πολύπλοκων πολυσακχαριτών - των λεγόμενων δηλαδή φυτικών ινών που δεν μεταβολίζονται από τον ανθρώπινο οργανισμό - σε λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας (SCFA), όπως του βουτυρικού, οξικού και προπιονικού οξέος (Thursby & Juge, 2017), καθώς και η πρωτεόλυση σύνθετων δομών πρωτεϊνών (Yoo κ.ά., 2020). Όσον αφορά τα αναβολικά μονοπάτια αυτά περιλαμβάνουν τη σύνθεση βιταμινών, κυρίως των συμπλεγμάτων Β και Κ και την παραγωγή ενός τεράστιου αριθμού μεταβολιτών με σκοπό την μεταφορά πληροφοριών ανάμεσα στα κύτταρα του GM και τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, του νευρικού συστήματος, κ.α. (Schroeder & Bäckhed, 2016; Yoo κ.ά., 2020), μια επικοινωνία απαραίτητη για τη διατήρηση της σωστής λειτουργίας του οργανισμού – ξενιστή (Schroeder & Bäckhed, 2016), ενώ αναφορά έχει γίνει και για τη συμμετοχή τους ως ορμόνες στην γλυκονεογέννεση (Schroeder & Bäckhed, 2016).

Από τις παραπάνω το πλέον ερευνητικό ενδιαφέρον έχει η αλληλεπίδραση του μικροβιώματος με το νευρικό σύστημα, μέσω του λεγόμενου gut-brain axis, δηλαδή αμφίδρομων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο κεντρικό νευρικό σύστημα, τα νεύρα του εντέρου και τον εντερικό σωλήνα (Mayer κ.ά., 2015). Από την αλληλεπίδραση μεταξύ νευρικού συστήματος – εντερικής μικροχλωρίδας έχει παρατηρηθεί επιρροή στην ανάπτυξη του εγκεφάλου

(Fung κ.ά., 2017) και την ομαλή νευρική λειτουργία μέσω αποστολής σημάτων μέσω διάφορων νευρικών, ανοσοποιητικών και ενδοκρινολογικών μονοπατιών, π.χ. σύνθεση νευροδιαβιβαστών όπως το GABA ή σύνθεση βιταμινών συμπλέγματος Κ και Β (Mayer κ.ά., 2015; Rudzki κ.ά., 2021) και μετέπειτα είσοδος στην αιματική κυκλοφορία από όπου τελικά καταλήγουν στο νευρικό σύστημα. Λόγω του ότι ευρήματα υποδεικνύουν την σύνδεση μεταξύ της διαταραχής του εντερικού μικροβιώματος και της πρόκλησης διάφορων νευρολογικών ασθενειών, η περαιτέρω εξέταση των μηχανισμών αλληλεπίδρασης εικάζεται ότι μπορεί να αποτελέσει σύμμαχο στην καταπολέμηση ασθενειών όπως το Parkinson's, το Αλτσχάιμερ, η κατάθλιψη καθώς και άλλες ασθένειες νευρολογικής / ψυχολογικής φύσης (Mayer κ.ά., 2015; Rudzki κ.ά., 2021). Ένα άλλο κομμάτι του gut-brain axis φαίνεται να είναι και το αντίθετο μονοπάτι, δηλαδή ο εγκέφαλος να επηρεάζει τη σύνθεση και μεταβολική συμπεριφορά του μικροβιώματος (Mayer κ.ά., 2015).

Άξια αναφοράς είναι επίσης η δυναμική σχέση με το βλεννογόνο ανοσοποιητικό σύστημα, τις ανοσοποιητικές αντιδράσεις απέναντι σε αντιγόνα από μικρόβια και τρόφιμα (Yoo κ.ά., 2020) και το ανοσοποιητικό σύστημα γενικότερα (Vyas & Ranganathan, 2012). Ειδικότερα, τα SCFA που παράγονται συμβάλλουν στη διατήρηση της ακεραιότητας του επιθηλιακού ιστού (Morrison & Preston, 2016), της διαφοροποίησης και της απόπτωσης των κυττάρων (Thursby & Juge, 2017), ενώ αξιοσημείωτη φαίνεται να είναι και η αντιφλεγμονώδης και ανοσοποιητική τους δράση (Morrison & Preston, 2016). Επίσης, τα βακτήρια αυτά λειτουργούν σαν ένας μηχανισμός άμυνας απέναντι σε παθογόνα βακτήρια (Yoo κ.ά., 2020). Σημειώνεται δε ότι η διαταραχή της ομοιόστασης, δύναται να προκαλέσει αύξηση των παθογόνων Gram- βακτηρίων, ευνοώντας την πιθανότητα εμφάνισης μικροβιακής ανισορροπίας (δυσβίωση), η οποία έχει συσχετιστεί αρνητικά με διάφορες όπως τα φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου (Inflammatory Bowel Disease-IBD), μεταβολικές ανισορροπίες όπως η παχυσαρκία (Gérard, 2016), ο διαβήτης τύπου 2 (Yoo κ.ά., 2020), η ελκώδης κολίτιδα (Ni κ.ά., 2017), οι καρδιαγγειακές παθήσεις (Belizário & Faintuch, 2018), η νόσος του Chron (Tsiantas κ.ά., 2022), κ.α. Συνολικά, τα περισσότερα από τα οφέλη ενός υγιούς εντερικού μικροβιώματος παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.



Εικόνα 2 : Το εντερικό μικροβίωμα χρησιμοποιεί θρεπτικά συστατικά από τη διατροφή για την παραγωγή μεταβολιτών των οποίων η βιοχημική δράση επιφέρει οφέλη σε αρκετά όργανα του σώματος.

2.1.4 Συσχέτιση εντερικού μικροβιόκοσμου με οστεοπόρωση

Μια από τις ασθένειες των οποίων εξετάζεται η σχέση με την μικροχλωρίδα του εντέρου είναι η οστεοπόρωση. Η οστεοπόρωση αποτελεί μια ασθένεια με κύρια συμπτώματα όπως χαμηλή οστική πυκνότητα ($t \text{ score} < -2.5$), επιδείνωση του ιστού και της δομής του οστού, οδηγώντας σε μειωμένη δύναμη και αντοχή του οστού και αυξημένο κίνδυνο κατάγματος (Sozen κ.ά., 2017). Αν και παρατηρείται ανεξαρτήτως ηλικίας και φύλου, φαίνεται να εμφανίζεται συχνότερα σε άτομα ηλικίας 50 ετών και άνω, ιδιαίτερα γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση (Lyu κ.ά., 2023).

Η ομοιόσταση του οστικού ιστού διατηρείται από μια συνεχή ανανέωσή του μέσω αποσύνθεσης ιστού από τους οστεοκλάστες και σύνθεση νέου από οστεοβλάστες (Tanaka κ.ά., 2005). Η ισορροπία ανάμεσα σε αυτούς τους δύο, όσον αφορά τόσο τον πληθυσμό όσο και τη δράση τους, είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με μια σειρά μονοπατιών σηματοδότησης (Tanaka κ.ά., 2005). Το εντερικό μικροβίωμα έχει παρατηρηθεί να επεμβαίνει στην ομοιόσταση αυτή, μέσω του λεγόμενου gut-bone axis, με διάφορους τρόπους. Αρχικά μέσω παραγωγής μεταβολιτών (μεταβιοτικά), όπως SCFA, πολυαμίνες και υδρόθειο. Όσον αφορά τα SCFA – μεταβολίτες των φυτικών ινών - τόσο το οξικό όσο και το προπιονικό και το βουτυρικό οξύ έχουν δείξει να περιορίζουν την παραγωγή οστεοκλαστών, ενώ για το βουτυρικό έχει αναφερθεί και θετική επίδρασή του στην αναγέννηση του οστού (Lyu κ.ά., 2023; Zaiss κ.ά., 2019). Επίσης τόσο οι πολυαμίνες – που αποτελούν προϊόντα του μεταβολισμού των αμινοξέων – όσο και το υδρόθειο – μεταβολίτης της κυστεΐνης - έχουν παρατηρηθεί σε

in-vivo μελέτες σε ζώα να προωθούν την διαφοροποίηση βλαστοκυττάρων υπεύθυνα για την δημιουργία νέου οστού (Lyu κ.ά., 2023). Δεύτερο κομμάτι του gut-bone axis αποτελεί η αλληλεπίδραση του μικροβιόκοσμου με το ανοσοποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα η δράση βακτηρίων όπως ο *Bacillus clausii*, ο *Lactobacillus rhamnosus LGG*, το *Bifidobacterium longum*, κ.α. διατηρεί την ισορροπία ανάμεσα στα T- βοηθητικά (Th17) και T-ρυθμιστικά κύτταρα (Treg) που προωθούν την διαφοροποίηση και τη δράση οστεοκλαστών και οστεοβλαστών αντίστοιχα (Lyu κ.ά., 2023).

Ένα άλλο κομμάτι του gut-bone axis είναι ο έλεγχος της έκκρισης ορμονών, συγκεκριμένα των οιστρογόνων. Το εντερικό μικροβίωμα ελέγχει άμεσα την έκκριση οιστρογόνων (και γενικότερα στερολών που προέρχονται από τον μεταβολισμό της χοληστερόλης – sterolbiome), μέσω της έκκρισης ενζύμων όπως σουλφατάσες, υδρολάσες και γλυκοζιδάσες (Pace & Watnick, 2021). Τα οιστρογόνα αποτελούν ορμόνες με άμεσο ρόλο στην ομοιοστάση των οστών μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τα T-reg κύτταρα, που όπως προαναφέρθηκε ελέγχουν την ισορροπία οστεοκλαστών – οστεοβλαστών (Lyu κ.ά., 2023). Τέλος κυστίδια τα οποία παράγονται από τα βακτήρια ως μέσα επικοινωνίας (EV – Extracellular Vesicles) εξετάζονται για την πιθανή τους δράση στο gut-bone axis. Τα κυστίδια αυτά αποτελούνται από αρκετά βιοδραστικά μόρια όπως πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, κ.α. κι έχουν δείξει να επηρεάζουν την οστεογένεση (Liu κ.ά., 2021).

Με βάση τα παραπάνω εξετάζονται νέοι τρόποι επέμβασης σε ασθενείς με οστεοπόρωση, οι οποίοι θα εκμεταλλεύονται τις δράσεις αυτές του εντερικού μικροβιώματος. Βιβλιογραφικά προτεινόμενες παρεμβάσεις φαίνεται να είναι συμπληρώματα διατροφής με προβιοτικά (Zhao κ.ά., 2022), ενώσεις με πιθανή πρεβιοτική δράση (Lecomte κ.ά., 2023), συνβιοτικά (Desfita κ.ά., 2021), μεταβιοτικά (Ii κ.ά., 2019) ή/και μεταμοσχεύσεις κοπράνων (Y.-W. Zhang κ.ά., 2022).

2.2. Φυτοχημικά – Πολυφαινόλες – Φλαβονοειδή: Ο ρόλος στην ανθρώπινη υγεία

2.2.1 Εισαγωγή στα φυτοχημικά

Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει έντονο επιστημονικό ενδιαφέρον η έρευνα πάνω σε συστατικά των τροφίμων τα οποία μπορούν πέραν της διατροφικής τους αξίας να έχουν και κάποια ευεργετική για τον οργανισμό δράση. Μια κατηγορία των συστατικών αυτών συνιστούν τα φυτοχημικά. Τα φυτοχημικά αποτελούν ενώσεις φυτικής προέλευσης και μπορούν να εντοπιστούν σε μια πληθώρα πηγών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τροφίμων που περιέχουν φυτοχημικές ενώσεις αποτελούν διάφορες ποικιλίες τσαγιού, φρούτα (π.χ. μούρα, εσπεριδοειδή), λαχανικά (π.χ. τομάτες, καρότα) και οι ξηροί καρποί, σε καθένα από τα οποία εντοπίζονται διαφορετικές κατηγορίες και σε διαφορετικές ποσότητες (Campos-Vega & Oomah, 2013). Ο όρος αυτός περιλαμβάνει ένα μεγάλο φάσμα ενώσεων, που είτε αποτελούν δομικά συστατικά των φυτών, π.χ. χλωροφύλλες, είτε αποτελούν μεταβολίτες τους, π.χ. πολυφαινόλες. Συγκεκριμένα τα φυτοχημικά μπορούν με βάση τη δομή τους να ταξινομηθούν σε πολυφαινόλες, καροτενοειδή, χλωροφύλλες, αλκαλοειδή, κ.α.

Όπως προαναφέρθηκε η δράση τους στον ανθρώπινο οργανισμό και ο αντίκτυπος αυτής σε διάφορες ασθένειες αποτελεί σημείο ερευνητικού ενδιαφέροντος. Ενδεικτικά η δράση τους στη διεθνή βιβλιογραφία σχετίζεται κυρίως με πιθανές αντιοξειδωτικές (Chang κ.ά., 2019; Ghildiyal κ.ά., 2020; Prakash κ.ά., 2020), αντιφλεγμονώδεις (Zhu κ.ά., 2018), αντικαρκινικές (George κ.ά., 2021), νευροπροστατευτικές (Velmurugan κ.ά., 2018), αντικές (Ghildiyal κ.ά., 2020) αλλά και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Prakash κ.ά., 2020)

2.2.2 Πολυφαινόλες

2.2.2.1 Κατηγοριοποίηση των πολυφαινολών

Μια από τις υποκατηγορίες των φυτοχημικών είναι οι πολυφαινόλες. Αποτελούν ένα ευρύ φάσμα φυτικών ενώσεων, με τις πλήρως ταυτοποιημένες να υπολογίζονται περίπου στις 8.000 (Durazzo κ.ά., 2019) . Συντίθενται αποκλειστικά σε φυτικούς ιστούς, ως δευτερογενείς μεταβολίτες σαν αντίδραση σε καταστάσεις όπως η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών ή τα ακραία κλιματικά φαινόμενα (Di Lorenzo κ.ά., 2021; Rasouli κ.ά., 2017) . Τα βιοχημικά μονοπάτια για την σύνθεσή τους είναι κατά κύριο λόγο γνωστά, με κύρια υποστρώματα τα αρωματικά αμινοξέα, δηλαδή την φαινυλαλανίνη, την τρυπτοφάνη και την τυροσίνη(Rasouli κ.ά., 2017). Χημικά αποτελούν φαινολικά συστήματα αποτελούμενα από

έναν ή παραπάνω αρωματικούς δακτυλίους υποκατεστημένους με μία ή παραπάνω ομάδες υδροξυλίων (Di Lorenzo κ.ά., 2021; Durazzo κ.ά., 2019; Rasouli κ.ά., 2017). Ανάλογα με τη δομή τους μπορούν να χωριστούν σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή. Στα φλαβονοειδή γίνεται υποκατηγοριοποίηση σε: φλαβονόλες, φλαβανόνες, ισοφλαβόνες, φλαβόνες, φλαβαν-3-όλες, ανθοκυανίνες. Τα περισσότερα φλαβονοειδή από τις τροφές προσλαμβάνονται συζευγμένα με σάκχαρα, οξέα ή αλκοόλες (Di Lorenzo κ.ά., 2021). Στα μη-φλαβονοειδή συμπεριλαμβάνονται τα φαινολικά οξέα (π.χ. υδροξυβενζοϊκά και υδροξυκιναμικά), τα στυλβένια, οι ξανθόνες, οι λιγνάνες και οι ταννίνες (Di Lorenzo κ.ά., 2021; Durazzo κ.ά., 2019). Παραδείγματα των κυριότερων κατηγοριών πολυφαινολών καθώς και ενώσεων και πηγών τους στη διατροφή διαφαίνονται στον

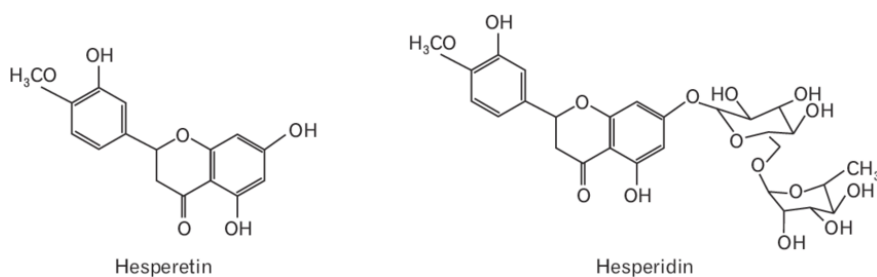
Πίνακας 1:

Πίνακας 1: Κυριότερες κατηγορίες των πολυφαινολών με παραδείγματα ενώσεων και πηγές τους στη διατροφή

	ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΝΩΣΕΩΝ	ΠΗΓΕΣ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ	ΠΗΓΗ
ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	Φλαβονόλες	Καεμπφερόλη, Κερσιτίνη, Μυρικετίνη	Κράνμπερι, τσάι, κόκκινο κρασί, κρεμμύδι	1.Foobd.ca 2. phenolexplorer.eu
	Φλαβανόνες	Ναρινγκενίνη, Εσπερετίνη, Εριοδικτυόλη	Εσπεριδοειδή, κόκκινο κρασί, μέντα	
	Φλαβανόλες	Κατεχίνη, Επικατεχίνη, Επιγαλλοκατεχίνη	Τσάι, κακάο, μαύρη σοκολάτα, αμύγδαλα, μούρα	
	Ισοφλαβόνες	Γενιστεΐνη, Νταϊντζίνη	Σόγια και παράγωγά της	
	Ανθοκυανιδίνες	Κυανιδίνη, Δελφινιδίνη, Πελαργονιδίνη	Κόκκινο κρασί, κόκκινα φρούτα, φασόλια, κόκκινα λαχανικά	
	Φλαβόνες	Απιγενίνη, Λουτεολίνη, Χρυσίνη	Ελαιόλαδο, φρέσκια ρίγανη, θυμάρι, αγκινάρα	
ΜΗ ΦΛΑΒΟΝΟΕΙΔΗ	Υδροξυκιναμικά οξέα	Καφεϊκό οξύ, p-Κουμαρικό οξύ, Κιναμμικό οξύ	Καφές, τσάι, όσπρια	
	Υδροξυβενζοϊκά οξέα	Γαλλικό οξύ, Βανιλικό οξύ, 4 – υδροξυβενζοϊκό οξύ	Κάστανο, γαρίφαλο, όσπρια	
	Στυλβένια	Ρεσβερατρόλη	Κόκκινο κρασί, σταφύλια	
	Λιγνάνες	Σησαμίνη, Ματαιρεσινόλη	Σησαμέλαιο, σταφίδες	

2.2.2.2 Εσπεριδίνη και Ναρινγκίνη

Η εσπεριδίνη είναι ένα флаβονοειδές που ανήκει στις флаβανόνες και συγκεκριμένα αποτελεί τη γλυκοζιτική μορφή της εσπεριτίνης (4 μεθύξυ-3,5,7-τριυδροξυφλαβανόνη)(Li & Schluesener, 2017) . Το γλυκοζιτικό ήμισυ της αποτελείται από έναν δισακχαρίτη γλυκόζης και ραμνόζης ο οποίος εμφανίζεται σε δύο ισομερείς μορφές – τη νεοεσπεριδόση και τη ρουτινόζη(Aggarwal κ.ά., 2020) – το οποίο και δίνει την χαρακτηριστική πικράδα στους κίτρους(Aggarwal κ.ά., 2020). Η άγλυκη μορφή της ονομάζεται εσπεριτίνη. Κατά γενική ομολογία εντοπίζεται σε κίτρους όπως είναι τα λεμόνια (*Citrus limon*), τα πορτοκάλια (*Citrus sinensis*), τα μανταρίνια (*Citrus reticulata*), κ.α., καθώς και σε παραπροϊόντα τους στη βιομηχανία τροφίμων, όπως φλούδες, σπόροι, υπολείμματα τα οποία μάλιστα είναι και πλούσια στο флаβονοειδές αυτό (Pyrzynska, 2022). Οι κίτροι αυτοί αποτελούν και την κύρια πηγή της στην ανθρώπινη διατροφή συν την λήψη της μέσα σε συμπληρώματα διατροφής.

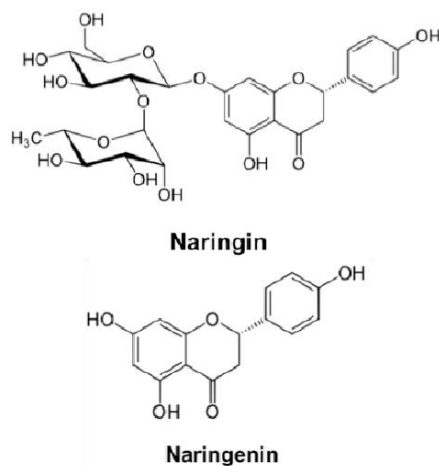


Εικόνα 3: 2D απεικόνιση των μορίων της εσπεριδίνης και της εσπεριτίνης

Η βιοδιαθεσιμότητά της είναι περιορισμένη λόγω της χαμηλής της διαλυτότητας στο νερό(Li & Schluesener, 2017; Pyrzynska, 2022) και της χαμηλής διάθεσης από ένζυμα φάσης II του μεταβολισμού ξενοβιοτικών (Li & Schluesener, 2017). Σε αντίθεση με την εσπεριτίνη που μπορεί να απορροφηθεί απευθείας από το λεπτό έντερο, η εσπεριδίνη πρέπει να απορροφηθεί στο κόλον ώστε να διασπαστεί από τη β-γλυκοζιδάση, ένα ένζυμο που παράγεται από την εντερική μικροχλωρίδα, σε εσπεριτίνη και μετά να απορροφηθεί από το GIT(Jin κ.ά., 2010; Mas-Capdevila κ.ά., 2020).

Η ναρινγκίνη αποτελεί τη γλυκοζιτική μορφή της флаβανόνης ναρινγκενίνης (εικόνα). Κύριες φυσικές πηγές του флаβονοειδούς αυτού αποτελούν τα εσπεριδοειδή και τα λαχανικά, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα γκρέιφρουτ (*Citrus paradisi*), τα λεμόνια (*Citrus limon*), τα πορτοκάλια (*Citrus sinensis*) και τις τομάτες (*Solanum lycopersicum*)(Motallebi κ.ά., 2022; Stabrauskiene κ.ά., 2022). Παρόμοια με την εσπεριδίνη λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα της δεν αφομοιώνεται εύκολα από το ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα και κατά κύριο λόγο μετατρέπεται στην άγλυκη μορφή της από βακτήρια

του εντερικού μικροβιώματος – μέσω ενζύμων όπως η α -ραμνοζιδάση και η β -γλυκοζιδάση - (Cavia-Saiz κ.ά., 2010; Motallebi κ.ά., 2022) και σε άλλες μικρότερου μοριακού βάρους ενώσεις (Ravetti κ.ά., 2023).



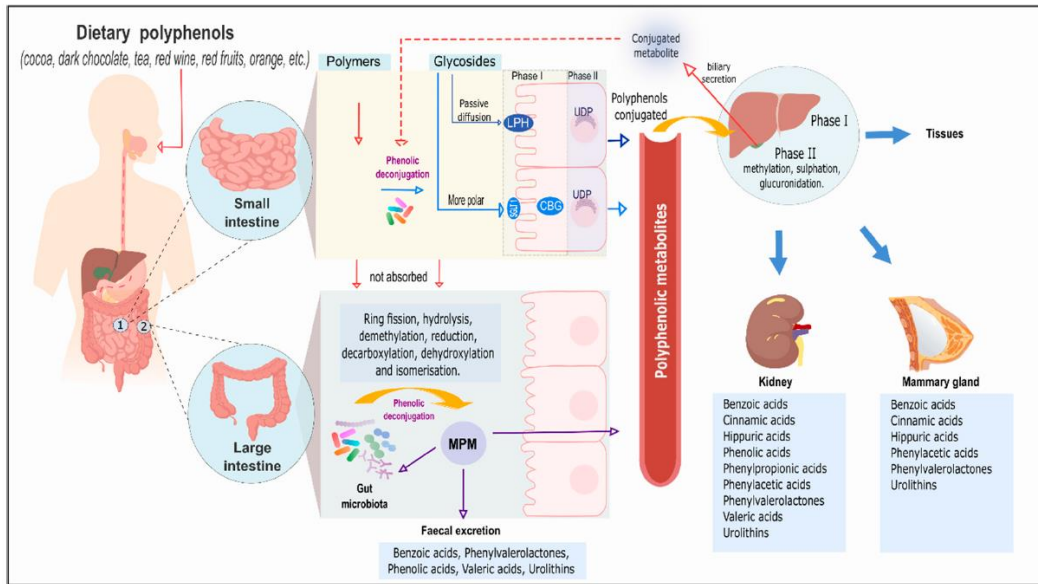
Εικόνα 4: 2D αναπαράσταση των μορίων της ναρινγκίνης και της ναρινγκενίνης

Οι δύο αυτές φλαβανόνες δείχνουν να έχουν σημαντική και πολύπλευρη βιολογική δράση στον ανθρώπινο οργανισμό. Αρχικά για την εσπεριδίνη, η αντιοξειδωτική της δράση εκφράζεται άμεσα μέσω σάρωσης ελευθέρων ριζών ή έμμεσα με αναστολή προοξειδωτικών ενζύμων που συμμετέχουν στη δημιουργία των ριζών αυτών, καθώς και με χηλίωση μετάλλων που προκαλούν οξειδωτικές αντιδράσεις (Pyrzynska, 2022). Η αντιφλεγμονώδης δράση της εσπεριδίνης έχει επίσης εξεταστεί κι έχει συσχετισθεί η δράση με ευεργετικές ιδιότητες απέναντι σε μια πληθώρα ασθενειών με τη συνολική της δράση να παρατηρείται πως δρα ευεργετικά – μετά και από *in vivo* πειράματα – μεταξύ άλλων στην καταπολέμηση του καρκίνου (Aggarwal κ.ά., 2020; Pyrzynska, 2022), διαφόρων καρδιαγγειακών παθήσεων (Li & Schluesener, 2017; Pyrzynska, 2022), διαβήτη τύπου 2 και του στρες (Li & Schluesener, 2017). Μια πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων φαίνεται να παρουσιάζει και η ναρινγκίνη. Άξια αναφοράς είναι η πιθανή αντικαρκινική δράση της καθώς έχει παρατηρηθεί η επίδραση, τόσο της γλυκοζιτικής όσο και της μη-γλυκοζιτικής μορφής, σε μονοπάτια που προωθούν την ανάπτυξη καρκινωμάτων, την μετάσταση, την απόπτωση κυττάρων, κ.α. (Stabrauskiene κ.ά., 2022). Όσον αφορά τη βιολογική της δράση βιβλιογραφικά φαίνεται να επιδρά στην αναδόμηση των οστών, σε μεταβολικά σύνδρομα, στο οξειδωτικό στρες καθώς και στο κεντρικό νευρικό σύστημα, καρδιαγγειακά σύνδρομα, κ.α. (Chen κ.ά., 2022).

2.3 Αλληλεπίδραση πολυφαινολών – εντερικού μικροβιώματος

2.3.1 Απορρόφηση των πολυφαινολών από τον οργανισμό

Η απορρόφηση των πολυφαινολών από τον ανθρώπινο οργανισμό ποικίλει ανάλογα με διάφορους παράγοντες συσχετιζόμενους με τη φύση της ένωσης (π.χ. άγλυκη ή συζευγμένη με σάκχαρο μορφή), την επεξεργασία του τροφίμου ή του συμπληρώματος από το οποίο λήφθηκε (π.χ. ομογενοποίηση, μικροενθυλάκωση), το γενετικό υπόβαθρο του ατόμου, κ.α.(Mithul Aravind κ.ά., 2021). Οι πολυφαινόλες που προσλαμβάνονται από τη διατροφή έχουν σχετικά χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα(Di Lorenzo κ.ά., 2021; Mithul Aravind κ.ά., 2021), επομένως δεν ευνοείται η απορρόφησή τους στο λεπτό έντερο κατά τη διάρκεια της πέψης. Όσες από αυτές δεν απορροφούνται στο λεπτό έντερο μεταφέρονται στο παχύ έντερο όπου και αλληλοεπιδρούν με την μικροχλωρίδα του εντέρου(Catalkaya κ.ά., 2020; Mosele κ.ά., 2015; Parkar κ.ά., 2013). Εκεί μεταβολίζονται από το εντερικό μικροβίωμα, περνώντας από πολυενζυμικές διαδικασίες όπως πολυμερισμό, οξείδωση, de-conjugation,υδρολύσεις, θειώσεις, αποκαρβοξυλίωση, κ.α. , - διαδικασίες που ευνοούνται και από τις συνθήκες που επικρατούν στον εντερικό σωλήνα, π.χ. αναερόβιες (Espín κ.ά., 2017)- δίνοντας ενώσεις μικρότερου M.W., π.χ. υδροξυκιναμμικά οξέα, φαινολικά οξέα, που είναι ευκολότερα απομωιάσιμες από τον ανθρώπινο οργανισμό(Catalkaya κ.ά., 2020; Etxeberria κ.ά., 2013; Marhuenda-Muñoz κ.ά., 2019) και οι οποίες με τη σειρά τους φαίνεται επιτελούν ποικίλες βιολογικές λειτουργίες στον οργανισμό(Cardona κ.ά., 2013; Marhuenda-Muñoz κ.ά., 2019). Βιβλιογραφικά αναφέρεται πως μέσα από αυτό το μεταβολικό μονοπάτι, η απορρόφηση αυτή αποτελεί το 90-95% της συνολικής απορρόφησης πολυφαινολών από τον οργανισμό(Cardona κ.ά., 2013) Τελικά οι μεταβολίτες αυτοί είτε θα περάσουν μέσω του εντερικού βλεννογόνου στον εσωτερικό μεταβολισμό είτε θα εκκριθούν στα κόπρανα(Cardona κ.ά., 2013; Marhuenda-Muñoz κ.ά., 2019). Η παραπάνω μεταβολική πορεία είναι εμφανής και στην Εικόνα 5:



Εικόνα 5 : Απορρόφηση των πολυφαινολών από τον οργανισμό

2.3.2 Μεταβολισμός των πολυφαινολών από την εντερική μικροχλωρίδα

Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών από το εντερικό μικροβίωμα εξαρτάται από δύο παράγοντες. Ο πρώτος είναι το προφίλ των μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιώματος του ατόμου (Cardona κ.ά., 2013; Marín κ.ά., 2015). Τα ένζυμα που απαιτούνται για μερικούς από τους βιοσχηματισμούς αυτούς μπορούν να εκφραστούν από διαφορετικά φύλα και γένη βακτηρίων, όπως γίνεται μεταξύ άλλων με τις διασπάσεις των σακχαρώδων ομάδων σε πολυφαινόλες συζευγμένες με σάκχαρα. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι εμφανές και στον Πίνακα 2, όπου για την διάσπαση της σακχαρώδους ομάδας της διοσμίνης μπορούν να εκφραστούν ένζυμα από τέσσερα διαφορετικά είδη βακτηρίων (*Bacteroides spp*, *Eubacterium spp*, *Enterococcus spp*, *Blautia spp*.) ή για τη διάσπαση του δακτυλίου C της εσπεριδίνης και της δαϊδζεΐνης μπορούν να εκφραστούν αντίστοιχα ένζυμα από *Flavonifactor (Clostridium)*, *Eubacterium spp* και *Eggerthella, spp*. Παρόλα αυτά υπάρχουν και διαδικασίες που απαιτούνται εξειδικευμένα ένζυμα που απαντώνται μόνο σε συγκεκριμένα είδη ή στελέχη βακτηρίων (Marín κ.ά., 2015; Mithul Aravind κ.ά., 2021). Παράδειγμα του τελευταίου αποτελεί η παραγωγή της εκουόλης από συγκεκριμένα στελέχη μικροοργανισμών, π.χ. *Bifidobacterium breve ATCC15700* ή *Lactobacillus intestinalis JCM7548* από την κατανάλωση δαϊδζεΐνης, μιας ισοφλαβόνης που εντοπίζεται στη σόγια (Πίνακας 2). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται παραπάνω παραδείγματα δράσεων μικροοργανισμών που χρησιμοποιούν πολυφαινολικές ενώσεις σαν υποστρώματα.

Πίνακας 2: Παραδείγματα μεταβολικών δράσεων μικροοργανισμών με υποστρώματα πολυφαινόλες

<u>Μικροοργανισμοί</u>	<u>Ενώσεις – Κατηγορίες ενώσεων</u>	<u>Δράσεις</u>	<u>Πηγή</u>
<i>Bacteoides spp, Eubacterium spp, Enterococcus spp, Blautia spp.</i>	Κερσιτίνη, Διο- σμίνη	Αποσύνδεση σακχαρο- ειδούς ομάδας	(Espín κ.ά., 2017)
<i>Flavonifactor (Clostridium), Eu- bacterium spp, Eggerthella, spp.</i>	Εσπεριτίνη, Δαϊδζεΐνη	Διάσπαση δακτυλίου C	(Davinelli & Scapagnini, 2022; Espín κ.ά., 2017)
<i>Clostridium spp, Coriobacteria- ceae spp</i>	Φλαβονοειδή, Ελλαγικό οξύ, Χλωρογενικό οξύ	Άνοιγμα δακτυλίων, διάσπαση δεσμών C-C, απομεθυλίωση	(Espín κ.ά., 2017)
<i>Bifidobacterium breve ATCC15700, Lactobacillus intes- tinalis JCM7548</i>	Δαϊδζεΐνη	Μετατροπή δαϊδζεΐνης σε εκουόλη	(Mayo κ.ά., 2019)
<i>Bacteroides distasonis, Bacteroides uniformis, Bac- teroides ovatus, Enterococcus casseliflavus, Eubacterium ramulus</i>	Φλαβονόλες με δι- και τρι-σακ- χαρώδεις ομάδες χωρίς υποκατά- σταση στους C5, C7, and C4'.	Υδρόλυση σακχα- ρώδων ομάδων	(Marín κ.ά., 2015)
<i>Eubacterium oxidoreducens, E. ramulus, E. casseliflavus, Clostridium or- biscidens,</i>		Διάσπαση δακτυλίου C	
<i>Clostridium spp, Eubacterium ra- mulus</i>	Φλαβανόνες	Αποσύνδεση σακχαρο- ειδών ομάδων, περαι- τέρω αποδόμηση	(Marín κ.ά., 2015)
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Χλωρογενικό οξύ	Υδρόλυση	(Davinelli & Scapagnini, 2022)

<i>Fusobacterium K-60, Eubacterium YK- 4, Bacteroides JY-6.</i>	Εσπεριδίνη, Ναρινγκίνη	Αποσύνδεση σακχάρου για παραγωγή εσπεριτίνης και ναρινγκίνης αντίστοιχα	(Najmanová κ.ά., 2020)
<i>Streptococcus S-2, Lactobacillus L-2, Bifidobacterium B-9, Bacteroides Jy-6</i>	Εσπεριτίνη	Μετατροπή εσπεριτίνης σε φαινολικά παράγωγα	(Najmanová κ.ά., 2020)
<i>Streptococcus S-2, Lactobacillus L-2, Bacteroides Jy-6</i>	Ναρινγκενίνη	Μετατροπή ναρινγκενίνης σε φαινολικά παράγωγα	(Najmanová κ.ά., 2020)
<i>B. thetaiotaomicron, Bifidobacterium spp., Blautia producta, Erysipelatoclostridium ramosum, E.coli, Lactobacillus Plantarum</i>	Πολυφαινόλες συζευγμένες με σάκχαρα	Παραγωγή β-γλυκοζιδάσης και διάσπαση του δεσμού σακχάρου-πολυφαινόλης	(Rodríguez-Daza κ.ά., 2021)
<i>Lactobacillus plantarum IJFPL935</i>	Εκχύλισμα φλαβαν-3-ολών από σταφύλι	Παραγωγή των φαινολικών ενώσεων γαλλικό οξύ, πυρογαλλόλη, κατεχόλη	(Tabasco κ.ά., 2011)

Έναν δεύτερο παράγοντα αποτελεί η δομή της ένωσης. Όπως προαναφέρθηκε οι άγλυκες μορφές των ενώσεων κατά κύριο λόγο απορροφούνται στο λεπτό έντερο, ενώ οι γλυκοζιτικές μορφές αντίστοιχα περνούν στο παχύ έντερο (Fabbrini κ.ά., 2022; Najmanová κ.ά., 2020). Εκεί, λαμβάνοντας υπόψη ότι τα ένζυμα του εντέρου δεν είναι ικανά να διασπάσουν τους δεσμούς με τα σάκχαρα, η διάσπαση αυτή διενεργείται από ένζυμα βακτηριακής προέλευσης, τις α-ραμνοζιδάσες και β-γλυκοζιδάσες (Najmanová κ.ά., 2020). Όπως προαναφέρθηκε οι μη γλυκοζιτικές μορφές ύστερα είτε θα απορριφθούν μέσω των κοπράνων είτε είναι πιθανό να μεταβολισθούν περαιτέρω από τα ένζυμα της εντερικής μικροχλωρίδας. Παραδείγματα τέτοιων διαδικασιών, όπως η διάσπαση των φαινολικών δακτυλίων, οι μεθυλίσεις, κ.λπ., είναι εμφανή στον Πίνακα 2.

2.3.3 Επίδραση των πολυφαινολών και του μεταβολισμού τους στη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος

Η πρόσληψη των πολυφαινολών καθώς και η εκμετάλλευσή τους σαν υποστρώματα από τους μικροοργανισμούς της εντερικής μικροχλωρίδας έχει παρατηρηθεί να έχει ρυθμιστική δράση όσον αφορά τους βακτηριακούς πληθυσμούς αυτούς (Cardona κ.ά., 2013; Catalkaya κ.ά., 2020). Οι πολυφαινόλες που δεν έχουν απορροφηθεί από τον οργανισμό – καθώς και οι μεταβολίτες τους – μπορούν να δράσουν είτε σαν ενεργοποιητές ή καταστολείς βακτηρίων ανάλογα με τη δομή τους, δηλαδή τον αριθμό των φαινολικών δακτυλίων και την υποκατάσταση αυτών, καθώς και ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους (Tabasco κ.ά., 2011). Η ρυθμιστική αυτή δράση των πολυφαινολών οφείλεται σε διάφορους μηχανισμούς. Από αυτούς οι πλέον σημαντικοί είναι αντιδράσεις με πρωτεΐνες, η αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη και αλλαγή της δομής της, η αναστολή της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων, η επέμβαση στην παραγωγή ATP, κ.α. (Biharee κ.ά., 2020; Makarewicz κ.ά., 2021).

Η δράση αυτή είναι πολύπλοκη και αρκετές φορές εξαρτάται από εξειδικευμένη αλληλεπίδραση μεταξύ πολυφαινόλης – στελέχους, η οποία είτε θα προωθήσει την ανάπτυξη του βακτηρίου είτε θα την καταστείλει (Makarewicz κ.ά., 2021). Επομένως είναι πιθανό μια πολυφαινόλη να προωθήσει την ανάπτυξη ενός βακτηρίου και να δρα κατασταλτικά έναντι ενός άλλου. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η ναρινγκενίνη. Στο ίδιο *in vitro* πείραμα η ναρινγκενίνη έδειξε κατασταλτική δράση απέναντι στα παθογόνα βακτήρια *Staphylococcus aureus* και *Salmonella typhimurium*, ευνοώντας παράλληλα την ανάπτυξη του προβιοτικού *Lactobacillus rhamnosus*, καθώς και του παθογόνου *Escherichia Coli* (Baky κ.ά., 2022). Η αντιβακτηριακή δράση των πολυφαινολών ωστόσο δεν φαίνεται να περιορίζεται στα παθογόνα βακτήρια, καθώς και προβιοτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να επηρεαστούν, όπως λ.χ. οξυγαλακτικά βακτήρια (Baky κ.ά., 2022; Makarewicz κ.ά., 2021). Στην *in vitro* μελέτη των (Gwiazdowska κ.ά., 2015) για την επίδραση φλαβονοειδών (ναρινγκενίνη, εσπεριδίνη, ρουτίνη, κερσιτίνη) και μη φλαβονοειδών (p-κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ, χλωρογενικό οξύ, βανιλικό οξύ, σιναπικό οξύ) πολυφαινολών στην ανάπτυξη βακτηρίων *Bifidobacterium spp.* – γνωστά για την προβιοτική τους δράση συν το ότι αποτελούν και μέρος της εντερικής μικροχλωρίδας - χρησιμοποιώντας πλάκα μικροτιτλοδότησης, όλα τα μόρια φάνηκαν να επηρεάζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων με την κερσιτίνη και την εσπεριδίνη να είναι τα μόνα τα οποία δρούσαν κατασταλτικά, και μάλιστα περισσότερο κατασταλτικά όσο αυξανόταν η συγκέντρωσή τους. Επίσης κατασταλτική ως προς προβιοτικούς μικροοργανισμούς δράση έδειξε και η μελέτη των (Tabasco κ.ά., 2011), όπου εξετάστηκε η επίδραση φλαβαν-3-ολών από σταφύλι στην ανάπτυξη LAB και *Bifidobacteria*.

Επιπρόσθετα η βακτηριοστατική δράση φλαβονοειδών είναι εμφανής και στη μελέτη των (Huang κ.ά., 2016) όπου εκχυλίσματα από τρία φλαβονοειδή (κερσιτίνη, κατεχίνη, πουρεαρίνη) τοποθετήθηκαν σε καλλιέργεια από κόπρανα υγιούς ασθενούς για 24h, οι τρεις ενώσεις αυτές έδειξαν να διαμορφώνουν διαφορετικά την εντερική μικροχλωρίδα. Όλες οι ενώσεις έδειξαν να περιορίζουν συνολικά την ποικιλομορφία των μικροοργανισμών, με την κατεχίνη να είναι η αυτή με την πλέον βακτηριοστατική δράση. Συγκεκριμένα η κατεχίνη περιορίσε την ανάπτυξη Βακτηριοϊδιτών, Firmicutes, Fuseobacteria, ενώ στις υπόλοιπες δύο περιορίστηκε η ανάπτυξη των Βακτηριοϊδιτών, ενώ η ανάπτυξη των υπολοίπων ευνοήθηκε - αν και συνολικά η δράση χαρακτηρίστηκε ως κατασταλτική.

2.3.4 Περιορισμοί και προοπτικές στην ανάλυση της αλληλεπίδραση πολυφαινολών – εντερικού μικροβιώματος

Τόσο ο μεταβολισμός των πολυφαινολών από τους μικροοργανισμούς της ανθρώπινης εντερικής μικροχλωρίδας, όσο και η βακτηριοστατική δράση των πολυφαινολών και των μεταβολιτών τους, έχουν εξετασθεί κυρίως in-vitro (Marhuenda-Muñoz κ.ά., 2019). Οι μελέτες αυτές παρόλο που μπορούν να δώσουν κάποιες πρώτες ενδείξεις για να προχωρήσουν οι in vivo μελέτες, δεν μπορούν να αναπαραστήσουν πλήρως το γαστροεντερικό περιβάλλον, ενώ πιθανές μεταβολές των ενώσεων λόγω πρότερων διαδικασιών, π.χ. της μάσησης, δεν λαμβάνονται υπόψιν (Marhuenda-Muñoz κ.ά., 2019). Επίσης το ποσοστό των πολυφαινολών που θα φτάσουν εν τέλει στον εντερικό σωλήνα – κι επομένως θα αποτελέσουν υπόστρωμα για τους μικροοργανισμούς - δεν είναι επίσης ξεκάθαρο λόγω της διαφορετικής πεπτικής λειτουργίας του κάθε ατόμου (Marhuenda-Muñoz κ.ά., 2019).

Οι in vivo μελέτες που να έχουν εξετάσει και να έχουν δώσει επαρκή δεδομένα για επιβεβαίωση των φαινομένων αυτών είναι προς το παρόν λίγες, ενώ αντίστοιχη πρόοδος υπάρχει και στη συσχέτιση των αλληλεπιδράσεων αυτών με τα προτεινόμενα οφέλη για την υγεία (Espín κ.ά., 2017). Οι κύριοι λόγοι για αυτό αφορούν τη μοναδικότητα του κάθε ατόμου, είτε αυτή περιλαμβάνει το γενετικό του προφίλ και γενικότερα τον τρόπο με τον οποίο λειτουργεί ο κάθε οργανισμός είτε το προφίλ του εντερικού του μικροβιώματος (Marhuenda-Muñoz κ.ά., 2019). Οι μελλοντικές κλινικές δοκιμές πρέπει να εστιάσουν σε μια πιο ξεκάθαρη συσχέτιση μεταξύ: των πολυφαινολών που λαμβάνονται, του προφίλ της εντερικής μικροχλωρίδας του κάθε ατόμου (φύλα, γένη, ποσοστά Bacteroidetes/Firmicutes, κ.α.), των ενώσεων – δεικτών (biomarkers) που παράγονται από την αλληλεπίδραση πολυφαινολών – μικροβιώματος και τη συνεργιστική δράση όλων αυτών που θα δείξει εν τέλει το ρόλο που παίζει το καθένα στην παρουσίαση των οφελών στην υγεία (Espín κ.ά., 2017).

2.4. Αναλυτικές και Στατιστικές Μέθοδοι στη Μεταβολομική

2.4.1 Αναλυτικές Μέθοδοι

Η μεταβολομική αφορά στοχευμένη (targeted) και μη στοχευμένη ανάλυση (untargeted) ενδογενών και εξωγενών μικρών μορίων (<1500Da) μεταβολιτών (Markley κ.ά., 2017; A. Zhang κ.ά., 2012). Αποτελεί ένα μια προσέγγιση με μεγάλη δυναμική που χρησιμοποιείται κυρίως για την ανακάλυψη βιοδεικτών που σχετίζονται είτε με μια πληθώρα ασθενειών (έγκαιρη πρόληψη) είτε για την αξιολόγηση της επίδρασης φαρμάκων, συμπληρωμάτων και τροφίμων (Markley κ.ά., 2017; A. Zhang κ.ά., 2012). Στη διεθνή βιβλιογραφία γίνεται αναφορά μεταξύ άλλων για τέτοιες έρευνες επάνω στις ασθένειες των κινητικών νευρώνων (Blasco κ.ά., 2014), της παχυσαρκίας (Telle-Hansen κ.ά., 2020), διαφόρων μορφών καρκίνου (Lin κ.ά., 2016, 2019; Monteiro κ.ά., 2016), κ.α.

Για την διεκπεραίωση των αναλύσεων αυτών αναπτύσσεται μια μεθοδολογία, η οποία προσαρμόζεται στις ανάγκες της εκάστοτε μελέτης. Ένα ενδεικτικό διάγραμμα ροής μιας μεταβολομικής μελέτης παρουσιάζεται στην Εικόνα 6. Μετά τη δειγματοληψία, το δείγμα – συνήθως βιολογικά υγρά ή κόπρανα – ανάλογα με τη μέθοδο που θα χρησιμοποιηθεί περνάει μια προεργασία – για παράδειγμα για ανάλυση με NMR απαιτείται λίγη έως καθόλου προεργασία ενώ για ανάλυση με MS λόγω χρωματογραφίας θα χρειαστεί πιο περίπλοκη προετοιμασία (εκχυλίσεις, παραγωγοποιήσεις, κλπ) (Cevallos-Cevallos κ.ά., 2009; A. Zhang κ.ά., 2012). Την εκτέλεση του πειράματος ακολουθεί η προπεξεργασία των δεδομένων, στην οποία επεξεργάζονται τα ακατέργαστα σήματα από τα όργανα με τη χρήση ειδικών προγραμμάτων (π.χ Analyst, SCIEX OS, proteowizard κλπ.) και η οποία αποτελείται κυρίως από μείωση θορύβων, διόρθωση των χρόνων έκλουσης, κ.α. Στη συνέχεια γίνεται στατιστική ανάλυση των δεδομένων που παραλήφθηκαν με διάφορες μεθόδους ανάλογα με τη φύση των δεδομένων και τα επιθυμητά αποτελέσματα. Τέλος εξετάζονται τα μεταβολικά μονοπάτια από τα οποία προήλθαν οι ενώσεις και πως αυτές καθώς και η βιοχημική και βιολογική σημασία τους. (Chen κ.ά., 2022) Όπως φαίνεται, η χρήση ενόργανων αναλυτικών μεθόδων είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό, την αναγνώριση της δομής και την ποσοτικοποίηση των ενώσεων αυτών. Δύο από τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους είναι η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και η Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματοσκοπία Μάζας (LCMS).



Εικόνα 6: Τυπικό Διάγραμμα Ροής Μεταβολομικής Ανάλυσης

Η φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance – εν συντομία NMR) εκμεταλλεύεται την ιδιότητα της ιδιοπεριστροφής (spin) που παρουσιάζουν ορισμένοι πυρήνες για να δώσει πληροφορίες για τη δομή και τη σύνθεση ενός μορίου. Πυρήνες που παρουσιάζουν την ιδιότητα του spin, όπως το ^1H , ^{13}C , ^{31}P , όταν τοποθετηθούν σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο απορροφούν ενέργεια από ραδιοκύματα, διεγείρονται και κατά την αποδιέγερσή τους εκπέμπουν ενέργεια σε μορφή ραδιοκυμάτων σε συγκεκριμένες συχνότητες. Από τον εντοπισμό των κυμάτων αυτών παράγονται τα φάσματα NMR. Από τα φάσματα αυτά μπορούν να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τη δομή της ένωσης (τύπος ατόμων και ταξινόμησή τους στο χώρο) και το χημικό της περιβάλλον. Επίσης είναι δυνατή η χρήση του NMR για ποσοτικοποίηση ενώσεων. Λόγω των ιδιοτήτων του αυτών ο NMR βρίσκει μια πληθώρα εφαρμογών στις επιστήμες υγείας, τις θετικές επιστήμες και την επιστήμη τροφίμων. Παράδειγμα τέτοιας μελέτης-εφαρμογής αποτελεί η παρακολούθηση του ημερήσιου του αίματος σε γυναίκες στην εμμηνόπαυση μετά την πρόσληψη συμπληρώματος βιταμίνης D₃ (Espersen κ.ά., 2022).

Η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματοσκοπία μάζας (Liquid chromatography mass spectrometry – εν συντομία LCMS) είναι μια τεχνική με την οποία μπορούν να εντοπιστούν και να ποσοτικοποιηθούν ενώσεις μέσα σε ένα μείγμα. Ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των ενώσεων γίνεται μέσω της υγρής χρωματογραφίας ανάλογα με τις φυσικές και χημικές ιδιότητες των ενώσεων – π.χ. τη διαλυτότητα, το φορτίο, κ.α. - ενώ με τη χρήση της φασματοσκοπίας μάζας αναλύονται οι διαχωρισμένες ενώσεις και γίνεται ταυτοποίησή τους μέσω του μοριακού τους βάρους και του μοτίβου θραυσμάτωσής τους. Αντίστοιχα με τον NMR βρίσκει εφαρμογή σε πολλά επιστημονικά πεδία μεταξύ άλλων επιστήμες υγείας, η επιστήμη τροφίμων, η ιατρική κλπ.

Αμφότερες μέθοδοι χρησιμοποιούνται ευρέως στην μεταβολομική. Η εξέλιξη στην τεχνολογία της φασματοσκοπίας NMR έχει επιτρέψει τον ακριβή προσδιορισμό δομής, τον εντοπισμό και κατόπιν την ποσοτικοποίηση ενώσεων με τρόπο μη καταστρεπτικό ενώ

ταυτόχρονα επιτρέπει και την non-targeted ανάλυση, χωρίς να είναι δηλαδή γνωστές εξ' αρχής οι προς εύρεση ενώσεις (Smolinska κ.ά., 2012; Wishart, 2019). Παράλληλα σε σχέση με μεθόδους που έχουν ως βάση την φασματοσκοπία μάζας MS, όπως π.χ. η LCMS, η προετοιμασία των δειγμάτων είναι απλούστερη (Wishart, 2019; A. Zhang κ.ά., 2012) ενώ εξοικονομείται και χρόνος από το γεγονός ότι δεν είναι απαραίτητη η εκτέλεση χρωματογραφίας για διαχωρισμό των δειγμάτων (Wishart, 2019). Παρόλα αυτά η μέθοδος υστερεί σε ευαισθησία καθώς η ανίχνευση συγκέντρωσης γίνεται σε επίπεδα μM σε αντίθεση με μεθόδους με βάση το MS όπου η ευαισθησία είναι σε επίπεδα nM (Chen κ.ά., 2022; Wishart, 2019; A. Zhang κ.ά., 2012). Ένα άλλο πρόβλημα στη χρήση του NMR είναι το κόστος, τόσο εγκατάστασης όσο και συντήρησης, του οργάνου όσο και ο χώρος που απαιτείται για την εγκατάσταση αυτή. Ο (Wishart, 2019) αναφέρει πως χρειάζεται περίπου δεκαπλάσιος χώρος για την εγκατάσταση ενώ το κόστος είναι πολλές φορές είναι διπλάσιο έως και τετραπλάσιο από αυτό μιας φασματοσκοπίας μάζας συν την συντήρηση των κρυογόνων που αυξάνουν ακόμα περισσότερο το κόστος. Τέλος οι βάσεις δεδομένων για τα φάσματα του NMR όσο και τα διαθέσιμα προγράμματα λογισμικού για ανάλυση είναι αρκετά περιορισμένα σε σχέση με τα αντίστοιχα για την LCMS ή την GCMS (Wishart, 2019).

Μια σχετικά πρόσφατη προσέγγιση στην μη στοχευμένη ανάλυση αποτελεί και ο συνδυασμός των δύο αυτών μεθόδων και η χρήση τους συμπληρωματικά (multiplatform metabolomics). Δεδομένου ότι οι δύο μέθοδοι χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό διαφορετικών τύπων ενώσεων, η συμπληρωματική χρήση τους αυξάνει την κάλυψη των ενώσεων που μπορούν να εντοπιστούν, προσπερνώντας εμπόδια που τίθενται από τη χρήση μίας μόνο μεθόδου – τουλάχιστον σε επίπεδο μεταβολιτών που μπορούν να εντοπιστούν (Jeppesen & Powers, 2023).

2.4.2 Στατιστικές μέθοδοι

Το τελευταίο από τα στάδια της μεταβολομικής ανάλυσης περιλαμβάνει την εφαρμογή στατιστικών προσεγγίσεων οι οποίες στοχεύουν να εντοπίσουν διαφορές εντός των δεδομένων βρίσκοντας όχι μόνο ένα μοτίβο τάσης (αύξηση/μείωση κάποιου μεταβολίτη) αλλά αναδεικνύοντας ενδεχομένως και βιολογικά νοήματα πίσω από αυτό. Επί του παρόντος, οι δυο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες πολυπαραμετρικές στατιστικές προσεγγίσεις πάνω στις οποίες μπορεί να βασιστεί η μεταβολομική είναι οι μη επιβλεπόμενες (unsupervised) και οι επιβλεπόμενες (supervised). Από τη μια, οι μη επιβλεπόμενες δεν χρησιμοποιούν πληροφορίες που ενδεχομένως να ευνοούσαν την ανάδειξη τάσεων, ενώ από την άλλη οι επιβλεπόμενες τεχνικές χρησιμοποιούν υπάρχουσες πληροφορίες των δειγμάτων, οι οποίες ενσωματώνονται

εκ των προτέρων στοχεύοντας στο διαχωρισμό τους.

Έτσι, σε πρώτη φάση θα μπορούσε κανείς να χρησιμοποιήσει τις μη επιβλεπόμενες τεχνικές έτσι ώστε να εντοπίσει τάσεις ή ακόμη και ακραίες τιμές ενώ στη συνέχεια με τη χρήση επιβλεπόμενων τεχνικών θα μπορούσε να συσχετίσει τις διαθέσιμες πληροφορίες των δειγμάτων για την ενίσχυση και περαιτέρω ανάδειξη των μοτίβων διαχωρισμού. Η πιο γνωστή μη επιβλεπόμενη τεχνική είναι αυτή της ανάλυσης κύριων συνιστωσών (PCA). Η συγκεκριμένη τεχνική εστιάζει στα δεδομένα που χρησιμοποιούνται δηλαδή των μεταβλητών ενδιαφέροντος (στη προκειμένη περίπτωση των μεταβολιτών είτε του NMR είτε του LC-MS), αποτυπώνοντας τα υπό τη μορφή άξονα συνιστωσών. Ουσιαστικά, οι συνιστώσες αντικατοπτρίζουν το ποσοστό διακύμανσης μέσα στο οποίο μπορούν ερμηνευθούν τα δεδομένα. Έτσι η πρώτη κύρια συνιστώσα αναμένεται να έχει τη μεγαλύτερη τιμή, η δεύτερη την αμέσως μεγαλύτερη κοκ. Από την άλλη η ανάλυση διάκρισης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) είναι μια επιβλεπόμενη τεχνική στην οποία παρέχονται όλες οι δυνατές πληροφορίες για τη ταξινόμηση των δειγμάτων (π.χ χρόνος παρέμβασης-0 μήνες και χρόνος παρέμβασης-9 μήνες), έτσι ώστε να ευνοηθεί ο διαχωρισμός τους.

Για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, τα στατιστικά μοντέλα πρέπει να επικυρώνονται αποδεικνύοντας τη σημαντικότητα των ευρημάτων. Η πρώτη και πιο βασική παράμετρος που αξιολογείται είναι η ακρίβεια, η οποία πρέπει να λαμβάνει τιμές μεγαλύτερες του 0.85 (ή >85%). Συνεχίζοντας, υπάρχει η προβλεψιμότητα του μοντέλου (Q^2), η ικανότητα δηλαδή του μοντέλου να ταξινομήσει σωστά ένα άγνωστο δείγμα βάσει του μεταβολικού του προφίλ. Ακόμη, υπάρχει ο δείκτης καλής προσαρμογής (R^2). Και οι δυο αυτές παράμετροι πρέπει να λαμβάνουν τιμές πάνω 0.5 ενώ για να μην παρατηρείται το φαινόμενο του overfitting, πρέπει η μεταξύ τους διαφορά να μην υπερβαίνει το 0.25.

Κεφάλαιο 3: Υλικά & Μέθοδοι

3.1 Παραλαβή και προετοιμασία δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Τα δείγματα παραλήφθηκαν εντός 2 ωρών παρουσία πάγου και ομογενοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ειδικό αναδευτή. Στη συνέχεια χωρίστηκαν σε 5 ισόποσα falcon και αποθηκεύτηκαν στους -80°C , με το κάθε ένα να προορίζεται για μια συγκεκριμένη αναλυτική τεχνική. Δεδομένου ότι τα πρωτόκολλα ανάλυσης που επιλέχθηκαν περιλαμβάνουν τη λυοφιλίωση των δειγμάτων, ικανή ποσότητα ζυγίστηκε σε Eppendorfs των 2mL και τα δείγματα παρέμειναν σε φυγοκεντρικό συμπυκνωτή (speed vacuum concentrator) για μια ολόκληρη μέρα (overnight).

3.2 Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός

Για την ανάλυση των δειγμάτων με τη διάταξη του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού τα λυοφιλοποιημένα δείγματα κοπράνων (10mg) αποψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και ανασυστάθηκαν χρησιμοποιώντας 540μl ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Phosphate Saline Buffer) καθώς και 60μl εσωτερικού προτύπου TSP έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση στο σωληνάκι ανάλυσης να είναι 5mM. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα φασματομέτρο 600MHz (Varian) με ενσωματωμένη μια HCN cryoprobe. Ο χρόνος της ανάλυσης ορίστηκε στα 10 λεπτά εκτελώντας 144 σαρώσεις (scans).

Τα φάσματα επεξεργάστηκαν συνολικά (overlay), χρησιμοποιώντας το λογισμικό του MestreNOVA. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε διόρθωση της χημικής μετατόπισης του εσωτερικού προτύπου (ppm calibration), ευθυγράμμισης (alignment), γραμμής βάσης (base line) και κανονικοποίησης (normalization). Οι λίστες κορυφών (μια λίστα για φάσματα $1\text{H}-13\text{C}$ HSQC και μια για τα φάσματα $1\text{H}-1\text{H}$ TOSCY) όπως αυτές προέκυψαν από το MestreNOVA χρησιμοποιήθηκαν από το λογισμικό Metabminer το οποίο υπογράμμισε την ύπαρξη συγκεκριμένων μεταβολιτών. Έτσι, σε συνδυασμό με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, ολοκληρώθηκε η ταυτοποίηση μεταβολιτών.

3.3 Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας

Η διάταξη που χρησιμοποιήθηκε αφορούσε ένα υγρής χρωματογραφίας μικρών ροών συζευγμένο με τετραπολικό ανιχνευτή μαζών χρόνου πτήσης (microLC-tTOF-MS). Το πρωτόκολλο εκχύλισης περιελάμβανε την προσθήκη συστήματος διαλυτών μεθανόλης-νερού έτσι ώστε να καθιζάνουν οι πρωτεΐνες. Αρχικά τα φάσματα μετατράπηκαν σε διαχειρίσιμη μορφή χρησιμοποιώντας το λογισμικό proteowizard και στη συνέχεια επεξεργάστηκαν στη

δωρεάν πλατφόρμα του MetaboAnalyst 5.0. Από την επεξεργασία, προέκυψαν 2 μήτρες δεδομένων (μια για τα θετικά και μια για τα αρνητικά ιόντα) οι οποίες περιελάμβαναν, το μοτίβο θραυσματοποίησης, το λόγο μάζας προς φορτίου (m/z), το χρόνο έκλουσης και άλλα στοιχεία όπως ο σχετικός κωδικός αναγνώρισης στη διεθνή βάση δεδομένων HMDB (όπου ήταν διαθέσιμος).

Κεφάλαιο 4: Αποτελέσματα & Συζήτηση

4.1 Πώς επηρεάστηκαν οι ενώσεις από τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Η αναζήτηση για πιθανούς μεταβολίτες των πολυφαινολών έγινε μέσω της χρήσης του προγράμματος BioTransformer(Djombou-Feunang κ.ά., 2019). Από αυτό ανακτήθηκαν 10 αρχεία τύπου sdf, πέντε για κάθε ένωση εκ των οποίων το καθένα αναφερόταν σε διαφορετικό στάδιο μεταβολισμού της ένωσης μετά τη λήψη της, δηλαδή μεταβολισμός πρώτου, δευτέρου, τρίτου, τετάρτου και πέμπτου σταδίου. Συνολικά παρελήφθησαν 1363 πιθανοί μεταβολίτες για την εσπεριδίνη και 1501 για την ναρινγκίνη αντίστοιχα.

Αρχικά έγινε ένα πρώτο φιλτράρισμα των δεδομένων που λήφθηκαν και απορρίφθηκαν μεταβολίτες που δεν είχαν να κάνουν με το εντερικό μικροβίωμα, δηλαδή απορρίφθηκαν ενώσεις οι οποίες αποτελούν παράγωγα του ανθρώπινου μεταβολισμού, π.χ. φάσης 1 ή 2 μεταβολισμού ξενοβιοτικών. Το δεδομένο αυτό λαμβάνεται κατευθείαν από το BioTransformer, καθώς αναγράφεται στα αρχεία που ελήφθησαν. Μετά το φιλτράρισμα αυτό ο αριθμός των πιθανών μεταβολιτών μειώθηκε στους 569 για την εσπεριδίνη και 658 για την ναρινγκίνη.

Κατόπιν έγινε αναζήτηση σε χημειοθήκες (PubChem, ChemSpider) χρησιμοποιώντας τα SMILES που δόθηκαν από το πρόγραμμα για να γίνει ταυτοποίηση των μεταβολιτών αυτών. Η αναζήτηση έγινε για τα πρώτα τέσσερα στάδια μεταβολισμού, δεδομένης της πληθώρας πιθανών μεταβολιτών στα τέσσερα στάδια αυτά – 124 για την εσπεριδίνη και 120 για την ναρινγκίνη. Από την αναζήτηση αυτή επιβεβαιώθηκε η δομή 27 ενώσεων για την εσπεριδίνη και 56 για τη ναρινγκίνη. Και στις δύο περιπτώσεις οι προτεινόμενες ενώσεις αποτελούν άγλυκες μορφές των φλαβονών (εσπεριτίνη και ναρινγκενίνη) φαινολικά παράγωγα (π.χ. υποκατεστημένες φλαβονόνες, βενζοϊκά οξέα) καθώς και κινναμικά οξέα και χαλκόνες. Οι τρεις πρώτες κατηγορίες συνάδουν με τις θεωρητικά αναμενόμενες ενώσεις, όπως αυτές σχολιάστηκαν στο κεφάλαιο 2.3. Από την άλλη οι χαλκόνες – ενώσεις στις οποίες δύο αρωματικοί δακτύλιοι συνδέονται μέσω ενός αλειφατικού τριανθρακικού α,β,-ακόρεστου καρβονυλικού συστήματος – αναφέρονται κατά κύριο λόγο στη βιβλιογραφία σαν ενώσεις πρόδρομες των φλαβονοειδών και όχι σαν μεταβολίτες τους (Rudrapal et al, Tong et al). Δεδομένου ότι κάποιες ενώσεις εμφανίστηκαν σαν πιθανοί μεταβολίτες και των δύο φλαβονοειδών - συγκεκριμένα η ναρινγκενίνη, η 6-δεοξυεξοπυρανόζη, η 5,4-διυδροξυφλαβανόνη, η 5,7,3'-τριυδροξυφλαβανόνη και η φλωρογλυκινόλη - συνολικά από τα τέσσερα

πρώτα μεταβολικά στάδια συγκεντρώθηκε ένα σετ 76 ενώσεων.

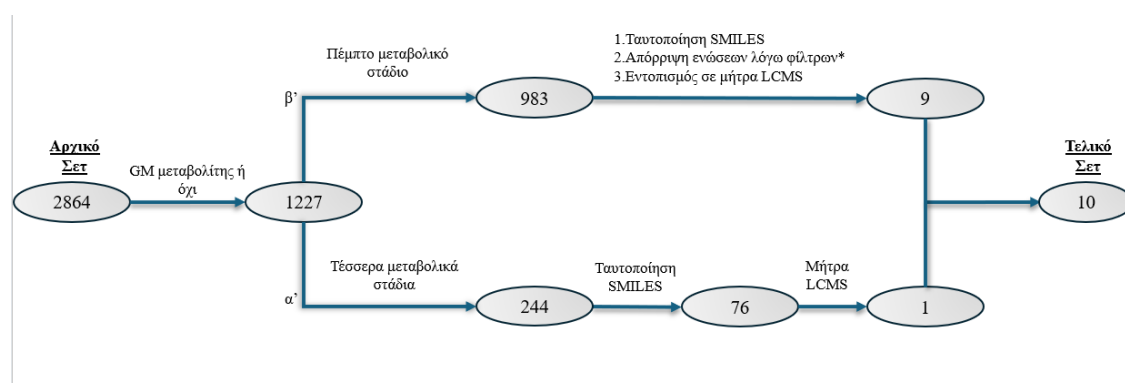
Μέσα από τη μέθοδο LCMS/MS ανακτήθηκαν δύο μεγάλες μήτρες δεδομένων μεταβολιτών συνδυαστικά από τους χρόνους 0 και 9 μηνών όπου η μία αφορούσε τα θετικά και η άλλη τα αρνητικά θραύσματα. Από το προαναφερθέν σετ των 76 ενώσεων μόνο το ισοφερουλικό οξύ βρέθηκε στα μήτρες δεδομένων του LCMS/MS. Για αυτό το λόγο επαναλήφθηκε η διαδικασία αναζήτησης στις χημειοθήκες αυτή τη φορά με τις ενώσεις του πέμπτου σταδίου μεταβολισμού. Λόγω του υψηλού αριθμού ενώσεων – 983 σύνολο – αυτή τη φορά αποκλείστηκαν: οι χαλκόνες – δεδομένου ότι βιβλιογραφικά δεν υποστηρίζεται κάπως η παραγωγή τους από μεταβολισμό φλαβονοειδών, ενώσεις που ήδη έχουν βρεθεί - καθώς και ισομερή τους - και τέλος τέθηκε ένα κατώφλι μοριακού βάρους των 200 - δεδομένου ότι η πληθώρα των ενώσεων που θεωρητικά αναμένονται με βάση τη βιβλιογραφία (βλ. κεφάλαιο 2.3) πληρούν αυτή τη συνθήκη. Εν τέλει από τις ενώσεις αυτές βρέθηκαν στις μήτρες δεδομένων του LCMS/MS οι παρακάτω:

Πίνακας 3: Μεταβολίτες που βρέθηκαν στις μήτρες δεδομένων του LCMS/MS

Όνομα	Major Isotope Mass	Positive	Negative	Αρχική ένωση		
Dihydrocaffeic acid	182,06	263,0214	Sulfate	Και οι δύο		
Pyrogallol	126,03	206,9945	Sulfate	Και οι δύο		
Phenol	94,04	175,0010	Sulfate	Και οι δύο		
4-Hydroxystyrene (Desaminotyrosine)	120,06			165,0553	[M-H+HCOOH]- 120.057	Να-ρινγκίνη
4-Methoxyphenylacetic acid	166,06			165,0553		Να-ρινγκίνη
Benzoic acid	122,04			121,0282		Να-ρινγκίνη
Hydrocinnamic acid	150,07	151,0805				Εσπεριδίνη

Isohomovanillic acid	182,06			181,0504		Εσπερι- δίνη
Homovanillic acid	182,06	263,0214	Sulfate			Εσπερι- δίνη
Isoferulic acid	194,06	275,0299	4-o- sulfate, 3-o- sulfate			Εσπερι- δίνη

Όλες οι ενώσεις αυτές αποτελούν φαινολικά παράγωγα και βιβλιογραφικά σε επίπεδο in vitro πειραμάτων έχουν βρεθεί να αποτελούν μεταβολίτες φλαβονοειδών από την εντερική μικροχλωρίδα (Stevens κ.ά., 2019) Η παραπάνω διαδικασία απεικονίζεται περιληπτικά στην εικόνα



Εικόνα 7: Διάγραμμα ροής για την διαδικασία εύρεσης από το αρχικό σετ ενώσεων τις ενώσεις που τελικά ποσοτικοποιήθηκαν (*φίλτρα: αποκλεισμός χαλκονών, ενώσεων ισομερών αυτών που βρέθηκαν στα πρώτα τέσσερα στάδια, ενώσεων με M.B. > 200 g/mol)

Στη συνέχεια έγινε ποσοτικοποίηση των ενώσεων αυτών μέσω των φασμάτων NMR στους 0 και 9 μήνες μετά τη λήψη του συμπληρώματος, με τη χρήση του προγράμματος ChenomX. Στη βάση του προγράμματος δεν ήταν περασμένες οι ενώσεις της πυρογαλόλης και του 4-μεθοξυφαιτυλοξικού οξέος επομένως η ποσοτικοποίηση των ενώσεων αυτών δεν καταστάθηκε δυνατή. Οι υπόλοιπες ενώσεις του σετ ποσοτικοποιήθηκαν και τα αποτελέσματα διαφαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4 : Συγκεντρώσεις των μεταβολιτών (σε mM) στα δείγματα NMR (O/L = overlapping)

Sample Code	Group	B6_9005_Phenol	B6_8762_DHC	B7_1700_DAT
01_T0	Control	0,0385	0,1796	0,0266
01_T9	Intervention	0,028	0,096	0
15_T0	Control	0,049	0,1358	0,0556
15_T9	Intervention	0,05	0,09	0,0461
18_T0	Control	0,015	0,042	O/L
18_T9	Intervention	0,012	0,0268	0,0034
20_T0	Control	0,0266	0,1221	O/L
20_T9	Intervention	0,0499	0,3059	O/L
25_T0	Control	0,0236	0,0821	O/L
25_T9	Intervention	0,14	0,4722	O/L
28_T0	Control	0,0313	0,1435	O/L
28_T9	Intervention	0,0611	0,3041	O/L
29_T0	Control	0,027	0,065	O/L
29_T9	Intervention	0,0411	0,12	O/L
30_T0	Control	0,021	0,1022	O/L
30_T9	Intervention	0,0184	0,122	O/L
33_T0	Control	0,0355	0,1046	O/L
33_T9	Intervention	0,0591	0,0621	O/L
38_T0	Control	0,0314	0,1295	O/L
38_T9	Intervention	0,0203	0,1421	O/L
52_T0	Control	0,0116	0,0838	0,0291
52_T9	Intervention	0,0023	0,014	O/L
53_T0	Control	0,024	0,0929	O/L
53_T9	Intervention	0,1055	0,4775	O/L
57_T0	Control	0,0319	0,0696	O/L
57_T9	Intervention	0,0718	0,184	O/L
59_T0	Control	0,0204	0,0342	O/L
59_T9	Intervention	0,069	0,3027	O/L

60_T0	Control	0,075	0,199	O/L
60_T9	Intervention	0,0592	0,107	O/L
68_T0	Control	0,0343	0,0815	O/L
68_T9	Intervention	0,0075	0,0369	O/L
74_T0	Control	0,0205	0,0881	O/L
74_T9	Intervention	0,068	0,2484	O/L
83_T0	Control	0,0333	0,2043	O/L
83_T9	Intervention	0,0744	0,3585	O/L

Sample Code	Group	B7_8602_ Benzoic	B7_2587_HCA	B6_7862_HVA	B7_0347_IFA
01_T0	Control	0,0085	0,2102	0,0231	0,0103
01_T9	Intervention	0,004	0,1075	0	0
15_T0	Control	0,0092	0,281	0,0605	0
15_T9	Intervention	0,0174	0,165	0,0328	0,0132
18_T0	Control	0	0	0	0
18_T9	Intervention	0,0027	0,0361	0,0075	0
20_T0	Control	0,0147	0,0636	O/L	0
20_T9	Intervention	0	0,2462	O/L	0
25_T0	Control	0,007	0,0854	O/L	0
25_T9	Intervention	0,0495	0,363	O/L	0
28_T0	Control	0	0,0641	O/L	0
28_T9	Intervention	0	0,2493	O/L	0
29_T0	Control	0	0,0719	O/L	0
29_T9	Intervention	0,0046	0,11	0,0387	0
30_T0	Control	0	0,0875	O/L	0
30_T9	Intervention	0	0,1204	O/L	0
33_T0	Control	0,0075	0,0629	O/L	0
33_T9	Intervention	0	0,194	O/L	0,013
38_T0	Control	0	0,0951	O/L	0
38_T9	Intervention	0	0,1693	O/L	0
52_T0	Control	0	0,0505	O/L	0

52_T9	Intervention	0	0,518	O/L	0
53_T0	Control	O/L	0,1041	O/L	0
53_T9	Intervention	O/L	0,5171	O/L	0
57_T0	Control	0	0,1123	O/L	0
57_T9	Intervention	0,0112	0,267	O/L	0
59_T0	Control	0	0,0503	O/L	0
59_T9	Intervention	0	0,3416	O/L	0
60_T0	Control	0	0,2757	O/L	0
60_T9	Intervention	0	0,1694	O/L	0
68_T0	Control	0	0,1266	O/L	0
68_T9	Intervention	0	0,2421	O/L	0
74_T0	Control	0	0,0271	O/L	0
74_T9	Intervention	0,0124	0,1312	O/L	0
83_T0	Control	0	0,0805	O/L	0
83_T9	Intervention	0	0,1339	O/L	0

Παρατηρείται ότι από τις επτά ενώσεις μόνο τρεις έχουν επαρκή δεδομένα – δηλαδή οι μηδενικές τιμές είναι λιγότερες από το 20% των συνολικών και δεν υπάρχει overlapping στην επιλεγμένη κορυφή από άλλη ένωση – για να μπορέσουν να αναλυθούν περαιτέρω στατιστικά. Το ισοφερουλικό και το βενζοϊκό οξύ απορρίπτονται λόγω πληθώρας μηδενικών τιμών ενώ οι κορυφές που επιλέχθηκαν για τη δεσαμινοτυροσίνη και το ομοβανλικό οξύ επικαλύπτονται από κορυφές άλλων αγνώστων ενώσεων, επομένως δεν καθίσταται δυνατή η ποσοτικοποίησή τους. Οι ενώσεις στις οποίες έγινε περαιτέρω στατιστική ανάλυση είναι η φαινόλη, το υδροκιναμικό οξύ και το διυδροκαφεϊκό οξύ.

Πίνακας 5: Μέσοι όροι συγκεντρώσεων (mM) και μεταβολές τους πριν και μετά την παρέμβαση

	B6_9005_Phenol	B6_8762_DHC	B7_2587_HCA
Control	0,0306 ± 0,0138	0,1089 ± 0,0478	0,1027 ± 0,0754
Intervention	0,0521 ± 0,0343	0,1928 ± 0,1430	0,2267 ± 0,1309
Shift	71%	77%	121%

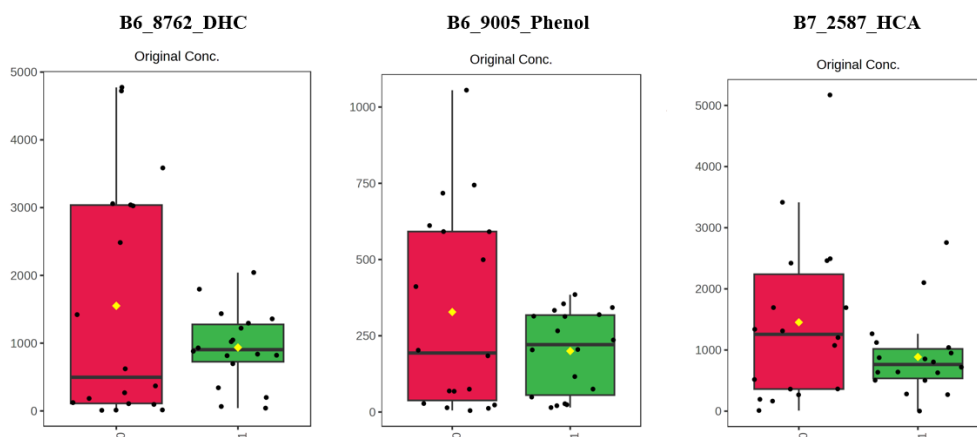
Από τον υπολογισμό των μέσων όρων πριν και μετά την παρέμβαση (Πίνακας 3) φαίνεται να υπάρχει μια τάση αύξησης της συγκέντρωσης των ενώσεων, με τον Μ.Ο. συγκέντρωσης του υδροκιναμικού οξέος μάλιστα να διπλασιάζεται. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι τάσεις αύξησης και μείωσης των συγκεντρώσεων σε κάθε δείγμα ξεχωριστά. Παρατηρείται πως τα δείγματα 1 και 60 είναι τα μόνα στα οποία διαφαίνεται μείωση της συγκέντρωσης όλων των ενώσεων. Σε όλα τα υπόλοιπα δείγματα παρατηρείται κατά κύριο λόγο αυξητική τάση σε τουλάχιστον μία από τις ενώσεις. Για τις αυξήσεις αυτές δεν διακρίνεται κάποιο σταθερό μοτίβο είτε ανάλογα με την ένωση είτε ανάλογα με το δείγμα. Για παράδειγμα όσον αφορά την μεταβολή της συγκέντρωσης του HCA η αύξηση μπορεί να κινηθεί από τιμές μικρότερες του 100%, π.χ. 38% στο δείγμα 30, μέχρι και το 926% στο δείγμα 52. Αντίστοιχα και μέσα στο ίδιο δείγμα μπορεί να αυξάνονται οι συγκεντρώσεις και των τριών ενώσεων παρόμοια, π.χ. δείγμα 53, ή να αυξάνεται η μία – και μάλιστα ραγδαία – και οι άλλες να μειώνονται, π.χ. δείγμα 52, κλπ.

Πίνακας 6 : Μεταβολές συγκεντρώσεων ανά δείγμα μετά την παρέμβαση

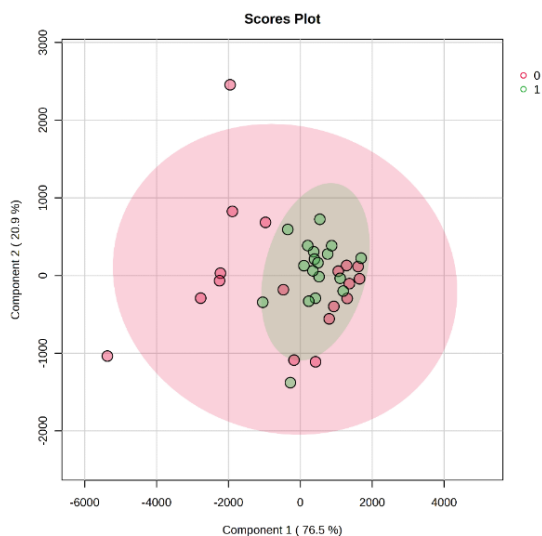
Sample	B6_9005_Phenol	B6_8762_DHC	B7_2587_HCA
1	-27%	-47%	-49%
15	2%	-34%	-41%
18	-20%	-36%	N/A
20	88%	151%	287%
25	493%	475%	325%
28	95%	112%	289%
29	52%	85%	53%
30	-12%	19%	38%
33	66%	-41%	208%
38	-35%	10%	78%
52	-80%	-83%	926%
53	340%	414%	397%
57	125%	164%	138%
59	238%	785%	579%
60	-21%	-46%	-39%
68	-78%	-55%	91%

74	232%	182%	384%
83	123%	75%	66%

Όσον αφορά τη διασπορά των τιμών γύρω από το μέσο όρο, με τη δημιουργία των box plots αυτή γίνεται πιο εμφανής. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8 και στις τρεις ενώσεις οι τιμές των συγκεντρώσεων στο χρόνο 9 (κόκκινο χρώμα) παρουσιάζουν μεγαλύτερες διακυμάνσεις σε αντίθεση με τον χρόνο 0 (πράσινο χρώμα). Αυτή η παρατήρηση επιβεβαιώνεται και από την εικόνα 2, όπου μέσω της PLS-DA παρατηρείται πολύ μεγάλη διασπορά των δειγμάτων στο χρόνο 9 (κόκκινος κύκλος εμπιστοσύνης) σε σχέση με τον χρόνο 0 (πράσινο κύκλος εμπιστοσύνης). Παράλληλα, από τα box plots μπορούν επίσης να επιβεβαιωθούν και οι αυξήσεις των Μ.Ο. (κίτρινες βούλες) των συγκεντρώσεων μετά την παρέμβαση σε σχέση με πριν.

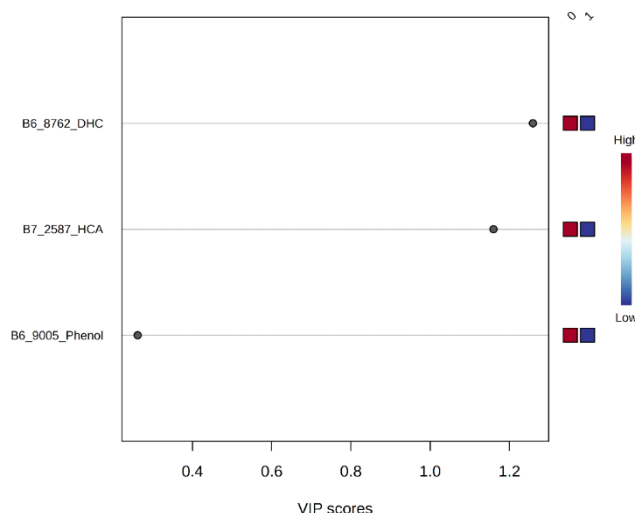


Εικόνα 8 : Box plots για τις τρεις ενώσεις που ποσοτικοποιήθηκαν με NMR (κόκκινο: μετά την παρέμβαση, πράσινο: πριν την παρέμβαση, κίτρινη κουκίδα: Μ.Ο.)



Εικόνα 9: Scores Plot για τα δείγματα του χρόνου 0 (πράσινες κουκίδες) και του χρόνου 9 (κόκκινες κουκίδες)

Όσον αφορά το διαχωρισμό μεταξύ χρόνου 0 και χρόνου 9, στην εικόνα 2 παρατηρείται η τάση ομαδοποίησης των δειγμάτων του χρόνου 0 (πράσινες κουκίδες) δεξιά του μηδενός στον κάθετο άξονα της πρώτης κύριας συνιστώσας βάσει της οποίας εξηγείται το 76.5 % της διακύμανσης. Ωστόσο, δεν φαίνεται ξεκάθαρος διαχωρισμός μεταξύ των δυο ομάδων. Για την απεικόνιση των δειγμάτων κατά αυτό το τρόπο εξήχθησαν οι τιμές συνεισφοράς ή αλλιώς variance importance projection scores (VIP scores), με τιμές μεγαλύτερες της μονάδας αναδεικνύουν σημαντικότερη συνεισφορά σε επίπεδο διαχωρισμού συγκριτικά με αυτές κάτω της μονάδας. Στη προκειμένη περίπτωση, όπως διαφαίνεται και στην εικόνα 3, δύο από τις τρεις ενώσεις που ποσοτικοποιήθηκαν φαίνεται να συνεισφέρουν σημαντικά στο διαχωρισμό, το διυδροκαφεϊκό οξύ και το υδροκινναμικό οξύ. Συνολικά από την PLS-DA συμπεραίνεται πως αν και δεν υπάρχει ξεκάθαρος διαχωρισμός ανάμεσα στις δύο ομάδες, το DHC και το HCA σε ένα μεγαλύτερο δειγματοχώρο με περισσότερες μεταβλητές (μεταβολίτες) θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς διαχωριστές του μοντέλου. Αυτό θα μπορούσε να γίνει με δύο τρόπους.



Εικόνα 10: VIP Scores για τις τρεις ενώσεις που ποσοτικοποιήθηκαν με NMR

Η μεγάλη διασπορά των τιμών αυτών και η έλλειψη ενός μοτίβου στην μεταβολή των συγκεντρώσεων θα μπορούσαν να εξηγηθούν από την λειτουργία του εντερικού μικροβιώματος του κάθε ατόμου. Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 2 τόσο η σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος όσο και οι λειτουργίες που επιτελεί είναι μοναδικές για κάθε άτομο. Οι διαφορετικοί πληθυσμοί που εποίκουν το εντερικό μικροβίωμα της καθημίας από τις συμμετέχουσες της έρευνας σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες, όπως η διατροφή (δεδομένου του ότι στα πλαίσια της παρέμβασης δεν ήταν προαπαιτούμενο η αλλαγή στη διατροφή), η άθληση, το κάπνισμα, κ.α. θα μπορούσε να είναι ένας λόγος για τον οποίο το κάθε μικροβίωμα φαίνεται να αντέδρασε τόσο διαφορετικά στο συμπλήρωμα – όσον αφορά τουλάχιστον το μεταβολισμό των ενώσεων.

4.2 Πώς επηρέασε η λήψη των πολυφαινολών την εντερική μικροχλωρίδα σε μεταβολομικό επίπεδο

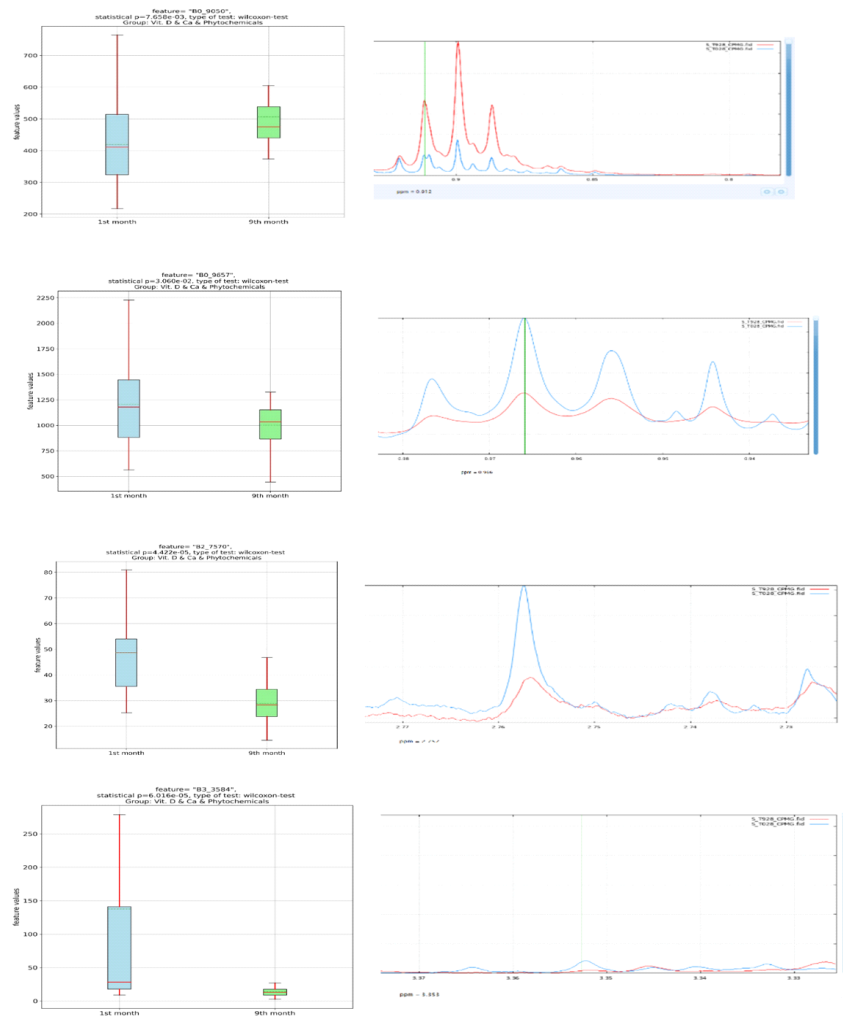
Όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2.3.3 η σχέση μεταξύ πολυφαινολών και εντερικού μικροβιώματος είναι αμφίδρομη δηλαδή τόσο οι πολυφαινόλες χρησιμοποιούνται σαν υποστρώματα από το εντερικό μικροβίωμα όσο και η σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος ρυθμίζεται από την παρουσία πολυφαινολών ή/και των μεταβολιτών τους. Σύμφωνα με αυτό αλλά και ενδείξεις κατά τη διάρκεια της ποσοτικοποίησης στα πλαίσια του κεφαλαίου 5.1, στις οποίες παρατηρήθηκαν μεταβολές στις συγκεντρώσεις κάποιων μεταβολιτών χαρακτηριστικών της εντερικής μικροχλωρίδας, έγινε μια σκιαγράφηση του γενικότερου μεταβολικού προφίλ των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Για το συγκεκριμένο σκοπό ανακτήθηκαν από το λογισμικό NMR procflow τα επιφανειακά ολοκληρώματα για τους 39 ταυτοποιημένους μεταβολίτες με τη χρήση φασματοσκοπία NMR στους χρόνους 0 και 9 μηνών της διατροφικής παρέμβασης. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση μηχανικής μάθησης (machine learning). Από τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας προέκυψε ότι οκτώ μεταβολίτες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) ανάμεσα στους μήνες 0 και 9. Οι μεταβολίτες αυτοί παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

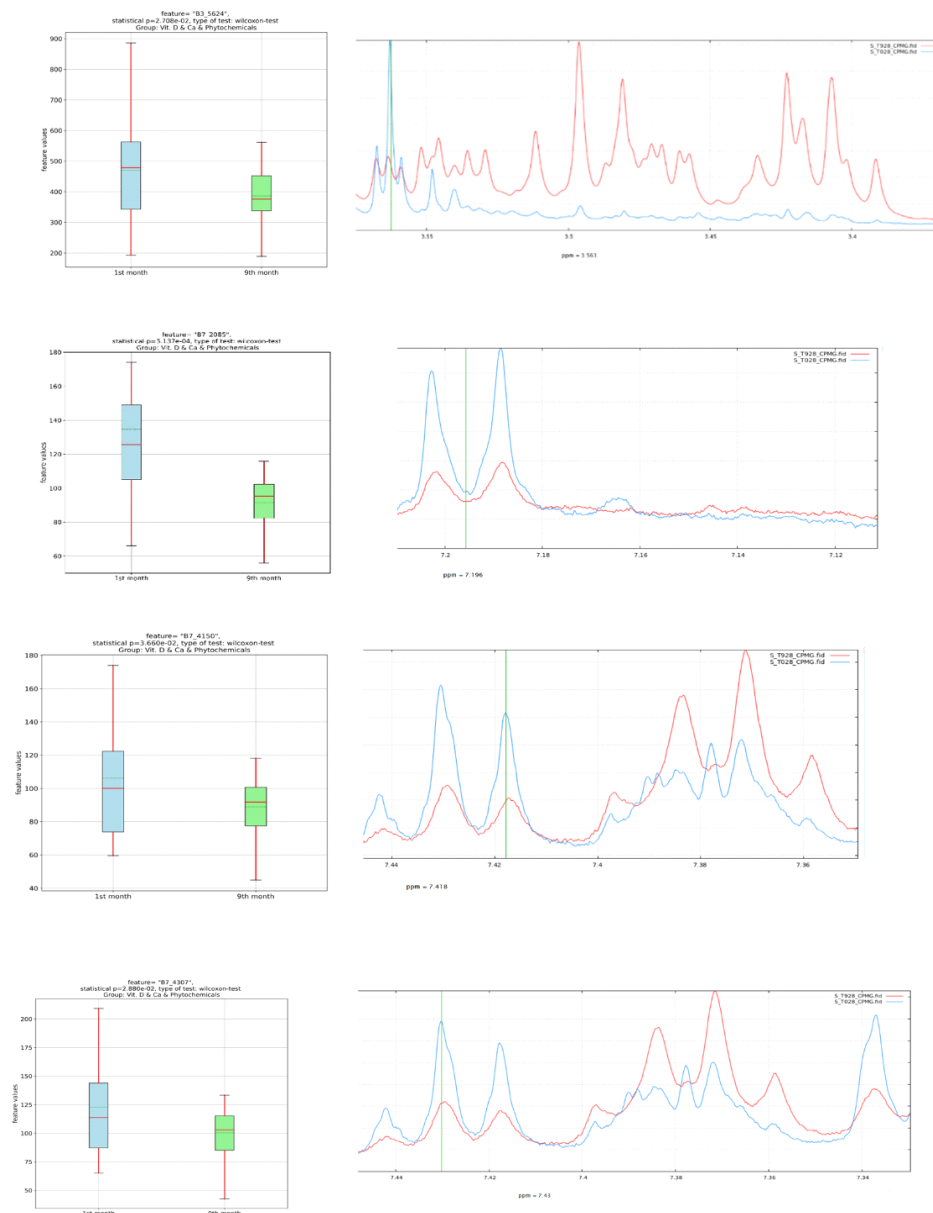
Πίνακας 7: Μεταβολίτες της εντερικής μικροχλωρίδας στους οποίους βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$)

Μεταβολίτης	Bucket (ppm)	P
Ισοβαλερικό οξύ	0.9050	7,658 e-3
Βαλίνη	0.9675	3,060 e-2
Ασπαρτικό οξύ	2.7570	4.422 e-5
Μεθανόλη	3.3584	6.016 e-5
Γλυκερόλη	3.5624	2.708 e-2
Τυροσίνη	7.2085	3.137 e-4
Φαινυλοξικό οξύ	7.4150	3.3660 e-2
Φαινυλαλανίνη	7.4307	2.880 e-2

Η ποσοτική διαφοροποίηση των μεταβολιτών αυτών παρουσιάζεται και οπτικά στις παρακάτω εικόνες τόσο απεικονίζοντας τα αντίστοιχα ραβδογράμματα (αριστερά) όσο και αποτυπώνοντας τη τάση τους σε φάσματα NMR.



Εικόνα 11: Απεικόνιση της στατικά σημαντικής διαφοράς με βάση το ραβδόγραμμα για το (Αριστερά) και επιβεβαίωση αυτής εστιάζοντας στην φασματική περιοχή που αντιστοιχεί στον αντιστοιχο μεταβολίτη σε τυχαίο δείγμα στους χρόνους 0 και 9. Από πάνω προς τα κάτω: Ισοβαλερικό B0_950, Βαλίνη B0_9657, Ασπαρτικό οξύ B2_7570, Μεθανόλη B3_3584



Εικόνα 12: Απεικόνιση της στατικά σημαντικής διαφοράς με βάση το ραβδόγραμμα για το (Αριστερά) και επιβεβαίωση αυτής εστιάζοντας στην φασματική περιοχή που αντιστοιχεί στον αντιστοιχο μεταβολίτη σε τυχαίο δείγμα στους χρόνους 0 και 9. Από πάνω προς τα κάτω: Γλυκερόλη B3_5624, Τυροσίνη B7_2085, Φαινυλοξικό οξύ B7_4150, Φαινυλαλανίνη B7_4307

Συνολικά, φαίνεται πως μετά το τέλος της παρέμβασης το μεταβολικό προφίλ των εθελοντών που τους χορηγήθηκε το σκεύασμα με Βιταμίνη D, Ca και βιοφλαβονοειδή είναι διαφοροποιημένο στους 0 μήνες σε σχέση με τους 9. Σε επόμενο στάδιο, πρέπει να μελετηθεί κατά πόσον αυτές οι μεταβολές σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με τις ενώσεις που περιέχονται στο σκεύασμα και στη συνέχεια να ερμηνευθεί η βιολογική σημασία τους.

Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα και υποδείξεις για περαιτέρω έρευνα

Η ανάλυση με τη χρήση NMR και LCMS των κοπράνων στους μήνες 0 και 9 έδειξε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε δύο μεταβολίτες – τα φαινολικά παράγωγα διϋδροκαφεϊκό οξύ και υδροκινναμικό οξύ. Η μεγάλη διασπορά των τιμών των συγκεντρώσεων μετά την παρέμβαση και η έλλειψη ενός μοτίβου στην μεταβολή των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών θα μπορούσαν να εξηγηθούν από την μοναδική λειτουργία του εντερικού μικροβιώματος του κάθε ατόμου. Αν και στατιστικά δε διαφαίνεται διαχωρισμός στην ομάδα του χρόνου 0 από αυτή του χρόνου 9, μια ανάλυση που θα λάμβανε υπόψιν περισσότερες μεταβλητές – μεταβολίτες θα έδινε μια πιο ξεκάθαρη απάντηση. Αυτό θα μπορούσε να γίνει με δύο τρόπους. Πρώτον μέσω της φασματοσκοπίας NMR, η χρήση διαφορετικών προγραμμάτων για την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών, ώστε να εντοπιστούν και οι δύο ενώσεις που δεν βρίσκονταν εντός της βάσης δεδομένων του ChenomX σε συνδυασμό με την περαιτέρω βιβλιογραφική έρευνα για να βρεθούν οι ενώσεις που συντονίζονται στις ίδιες χημικές μετατοπίσεις με το ομοβανιλικό οξύ και τη δεσαμινοτυροσίνη. Δεύτερον η χρήση εξ ολοκλήρου του LCMS για την ανάλυση αυτή θα έδινε παραπάνω αποτελέσματα τόσο για τις ενώσεις που δεν περιλαμβάνονται στο ChenomX και όσες απορρίφθηκαν λόγω δυσκολίας ταυτοποίησης αλλά ίσως εξάλειφε και τις μηδενικές τιμές λόγω μεγαλύτερης ευαισθησίας του LCMS σε σχέση με το NMR.

Η ανάλυση για την επίδραση των πολυφαινολών στη σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας έδειξε να υπάρχουν διαφορές ανάμεσα στους μήνες 0 και 9 όσον αναφορά το μεταβολομικό προφίλ. Συγκεκριμένα στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν στους μεταβολίτες ισοβαλερικό οξύ, βαλίνη, ασπαρτικό οξύ, μεθανόλη, γλυκερόλη, τυροσίνη, φαινολικό οξύ, φαινυλαλανίνη. Σε επόμενο στάδιο, πρέπει να μελετηθεί κατά πόσον αυτές οι μεταβολές σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με τις ενώσεις που περιέχονται στο σκεύασμα και στη συνέχεια να ερμηνευθεί η βιολογική σημασία τους, καθώς και σε μη-μεταβολομικό επίπεδο ο αντίκτυπος στο προφίλ των μικροοργανισμών (γένη, είδη, ποσότητα) πριν και μετά την παρέμβαση.

Βιβλιογραφία-Αναφορές

- Aggarwal, V., Tuli, H. S., Thakral, F., Singhal, P., Aggarwal, D., Srivastava, S., Pandey, A., Sak, K., Varol, M., Khan, Md. A., & Sethi, G. (2020). Molecular mechanisms of action of hesperidin in cancer: Recent trends and advancements. *Experimental Biology and Medicine*, 245(5), 486–497.
<https://doi.org/10.1177/1535370220903671>
- Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science*, 307(5717), 1915–1920.
<https://doi.org/10.1126/science.1104816>
- Baky, M. H., Elshahed, M., Wessjohann, L., & Farag, M. A. (2022). Interactions between dietary flavonoids and the gut microbiome: A comprehensive review. *British Journal of Nutrition*, 128(4), 577–591. <https://doi.org/10.1017/S0007114521003627>
- Belizário, J. E., & Faintuch, J. (2018). Microbiome and Gut Dysbiosis. Στο R. Silvestre & E. Torrado (Επιμ.), *Metabolic Interaction in Infection* (τ. 109, σσ. 459–476). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74932-7_13
- Biharee, A., Sharma, A., Kumar, A., & Jaitak, V. (2020). Antimicrobial flavonoids as a potential substitute for overcoming antimicrobial resistance. *Fitoterapia*, 146, 104720. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104720>
- Blasco, H., Nadal-Desbarats, L., Pradat, P.-F., Gordon, P. H., Antar, C., Veyrat-Durebex, C., Moreau, C., Devos, D., Mavel, S., Emond, P., Andres, C. R., & Corcia, P. (2014). Untargeted ¹H-NMR metabolomics in CSF: Toward a diagnostic biomarker for motor neuron disease. *Neurology*, 82(13), 1167–1174.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000274>
- Campos-Vega, R., & Oomah, B. D. (2013). Chemistry and classification of phytochemicals. Στο B. K. Tiwari, N. P. Brunton, & C. S. Brennan (Επιμ.), *Handbook of Plant Food Phytochemicals* (1η έκδ., σσ. 5–48). Wiley.

<https://doi.org/10.1002/9781118464717.ch2>

Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I.

(2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *24*(8), 1415–1422.

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>

Catalkaya, G., Venema, K., Lucini, L., Rocchetti, G., Delmas, D., Daglia, M., De Filippis,

A., Xiao, H., Quiles, J. L., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2020). Interaction of dietary polyphenols and gut microbiota: Microbial metabolism of polyphenols, influence on the gut microbiota, and implications on host health. *Food Frontiers*, *1*(2), 109–

133. <https://doi.org/10.1002/fft2.25>

Cavia-Saiz, M., Busto, M. D., Pilar-Izquierdo, M. C., Ortega, N., Perez-Mateos, M., &

Muñiz, P. (2010). Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: A comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(7), 1238–1244.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.3959>

Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., & Ro-

drick, G. E. (2009). Metabolomic analysis in food science: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *20*(11–12), 557–566.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.002>

Chang, S. K., Alasalvar, C., & Shahidi, F. (2019). Superfruits: Phytochemicals, antioxidant

efficacies, and health effects – A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *59*(10), 1580–1604.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1422111>

Chen, Y., Li, E.-M., & Xu, L.-Y. (2022). Guide to Metabolomics Analysis: A Bioinformat-

ics Workflow. *Metabolites*, *12*(4), 357. <https://doi.org/10.3390/metabo12040357>

- Davinelli, S., & Scapagnini, G. (2022). Interactions between dietary polyphenols and aging gut microbiota: A review. *BioFactors*, *48*(2), 274–284.
<https://doi.org/10.1002/biof.1785>
- Desfita, S., Sari, W., Yusmarini, Y., Pato, U., Zakłós-Szyda, M., & Budryn, G. (2021). Effect of Fermented Soymilk-Honey from Different Probiotics on Osteocalcin Level in Menopausal Women. *Nutrients*, *13*(10), 3581.
<https://doi.org/10.3390/nu13103581>
- Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C., & Restani, P. (2021). Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*, *13*(1), 273.
<https://doi.org/10.3390/nu13010273>
- Djombou-Feunang, Y., Fiamoncini, J., Gil-de-la-Fuente, A., Greiner, R., Manach, C., & Wishart, D. S. (2019). BioTransformer: A comprehensive computational tool for small molecule metabolism prediction and metabolite identification. *Journal of Cheminformatics*, *11*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13321-018-0324-5>
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., Novellino, E., & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, *33*(9), 2221–2243.
<https://doi.org/10.1002/ptr.6419>
- Espersen, R., Correia, B. S. B., Rejnmark, L., & Bertram, H. C. (2022). The Diurnal Blood Metabolome and Effects of Vitamin D Supplementation: A Randomised Crossover Trial in Postmenopausal Women. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(17), 9748. <https://doi.org/10.3390/ijms23179748>
- Espín, J. C., González-Sarrías, A., & Tomás-Barberán, F. A. (2017). The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochemical Pharmacology*, *139*, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.04.033>

- Etxeberria, U., Fernández-Quintela, A., Milagro, F. I., Aguirre, L., Martínez, J. A., & Portillo, M. P. (2013). Impact of Polyphenols and Polyphenol-Rich Dietary Sources on Gut Microbiota Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(40), 9517–9533. <https://doi.org/10.1021/jf402506c>
- Fabbrini, M., D'Amico, F., Barone, M., Conti, G., Mengoli, M., Brigidi, P., & Turrone, S. (2022). Polyphenol and Tannin Nutraceuticals and Their Metabolites: How the Human Gut Microbiota Influences Their Properties. *Biomolecules*, *12*(7), 875. <https://doi.org/10.3390/biom12070875>
- Fung, T. C., Olson, C. A., & Hsiao, E. Y. (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nature Neuroscience*, *20*(2), 145–155. <https://doi.org/10.1038/nn.4476>
- George, B. P., Chandran, R., & Abrahamse, H. (2021). Role of Phytochemicals in Cancer Chemoprevention: Insights. *Antioxidants*, *10*(9), 1455. <https://doi.org/10.3390/antiox10091455>
- Gérard, P. (2016). Gut microbiota and obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(1), 147–162. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2061-5>
- Ghildiyal, R., Prakash, V., Chaudhary, V. K., Gupta, V., & Gabrani, R. (2020). Phytochemicals as Antiviral Agents: Recent Updates. Στο Μ. Κ. Swamy (Επιμ.), *Plant-derived Bioactives* (σσ. 279–295). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1761-7_12
- Gwiazdowska, D., Juś, K., Jasnowska-Małecka, J., & Kluczyńska, K. (2015). The impact of polyphenols on Bifidobacterium growth. *Acta Biochimica Polonica*, *62*(4), 895–901. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1154
- Holscher, H. D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes*, *8*(2), 172–184. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756>

- Huang, J., Chen, L., Xue, B., Liu, Q., Ou, S., Wang, Y., & Peng, X. (2016). Different Flavonoids Can Shape Unique Gut Microbiota Profile *In Vitro*. *Journal of Food Science*, *81*(9). <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13411>
- Li, D. Y., Pan, K., Shendge, V. B., Liu, J., & Ebraheim, N. A. (2019). Linkage of microbiota and osteoporosis: A mini literature review. *World Journal of Orthopedics*, *10*(3), 123–127. <https://doi.org/10.5312/wjo.v10.i3.123>
- Jeppesen, M. J., & Powers, R. (2023). Multiplatform untargeted metabolomics. *Magnetic Resonance in Chemistry*, *61*(12), 628–653. <https://doi.org/10.1002/mrc.5350>
- Jin, M. J., Kim, U., Kim, I. S., Kim, Y., Kim, D.-H., Han, S. B., Kim, D.-H., Kwon, O.-S., & Yoo, H. H. (2010). Effects of Gut Microflora on Pharmacokinetics of Hesperidin: A Study on Non-Antibiotic and Pseudo-Germ-Free Rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *73*(21–22), 1441–1450. <https://doi.org/10.1080/15287394.2010.511549>
- Lecomte, M., Tomassi, D., Rizzoli, R., Tenon, M., Berton, T., Harney, S., & Fañca-Berthon, P. (2023). Effect of a Hop Extract Standardized in 8-Prenylnaringenin on Bone Health and Gut Microbiome in Postmenopausal Women with Osteopenia: A One-Year Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Nutrients*, *15*(12), 2688. <https://doi.org/10.3390/nu15122688>
- Li, C., & Schluesener, H. (2017). Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(3), 613–631. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.906382>
- Lin, Y., Ma, C., Bezabeh, T., Wang, Z., Liang, J., Huang, Y., Zhao, J., Liu, X., Ye, W., Tang, W., Ouyang, T., & Wu, R. (2019). ¹H NMR-based metabolomics reveal overlapping discriminatory metabolites and metabolic pathway disturbances between colorectal tumor tissues and fecal samples. *International Journal of Cancer*,

145(6), 1679–1689. <https://doi.org/10.1002/ijc.32190>

Lin, Y., Ma, C., Liu, C., Wang, Z., Yang, J., Liu, X., Shen, Z., & Wu, R. (2016). NMR-based fecal metabolomics fingerprinting as predictors of earlier diagnosis in patients with colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(20), 29454–29464.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.8762>

Liu, Y.-Q., Wang, X.-L., He, D.-H., & Cheng, Y.-X. (2021). Protection against chemotherapy- and radiotherapy-induced side effects: A review based on the mechanisms and therapeutic opportunities of phytochemicals. *Phytomedicine*, 80, 153402.

<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153402>

Lyu, Z., Hu, Y., Guo, Y., & Liu, D. (2023). Modulation of bone remodeling by the gut microbiota: A new therapy for osteoporosis. *Bone Research*, 11(1), 31.

<https://doi.org/10.1038/s41413-023-00264-x>

Makarewicz, M., Drożdż, I., Tarko, T., & Duda-Chodak, A. (2021). The Interactions between Polyphenols and Microorganisms, Especially Gut Microbiota. *Antioxidants*, 10(2), 188. <https://doi.org/10.3390/antiox10020188>

Marhuenda-Muñoz, M., Laveriano-Santos, E. P., Tresserra-Rimbau, A., Lamuela-Raventós, R. M., Martínez-Huélamo, M., & Vallverdú-Queralt, A. (2019). Microbial Phenolic Metabolites: Which Molecules Actually Have an Effect on Human Health?

Nutrients, 11(11), 2725. <https://doi.org/10.3390/nu11112725>

Marín, L., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2015). Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. *BioMed Research International*, 2015, 1–18. <https://doi.org/10.1155/2015/905215>

Markley, J. L., Brüschweiler, R., Edison, A. S., Eghbalnia, H. R., Powers, R., Raftery, D., & Wishart, D. S. (2017). The future of NMR-based metabolomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 43, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.08.001>

- Mas-Capdevila, A., Teichenne, J., Domenech-Coca, C., Caimari, A., Del Bas, J. M., Escoté, X., & Crescenti, A. (2020). Effect of Hesperidin on Cardiovascular Disease Risk Factors: The Role of Intestinal Microbiota on Hesperidin Bioavailability. *Nutrients*, *12*(5), 1488. <https://doi.org/10.3390/nu12051488>
- Mayer, E. A., Tillisch, K., & Gupta, A. (2015). Gut/brain axis and the microbiota. *Journal of Clinical Investigation*, *125*(3), 926–938. <https://doi.org/10.1172/JCI76304>
- Mayo, B., Vázquez, L., & Flórez, A. B. (2019). Equol: A Bacterial Metabolite from The Daidzein Isoflavone and Its Presumed Beneficial Health Effects. *Nutrients*, *11*(9), 2231. <https://doi.org/10.3390/nu11092231>
- MetaHIT Consortium, Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), 59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>
- Mithul Aravind, S., Wichienchot, S., Tsao, R., Ramakrishnan, S., & Chakkaravarthi, S. (2021). Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. *Food Research International*, *142*, 110189. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110189>
- Monteiro, M. S., Barros, A. S., Pinto, J., Carvalho, M., Pires-Luís, A. S., Henrique, R., Jerónimo, C., Bastos, M. D. L., Gil, A. M., & Guedes De Pinho, P. (2016). Nuclear Magnetic Resonance metabolomics reveals an excretory metabolic signature of renal cell carcinoma. *Scientific Reports*, *6*(1), 37275. <https://doi.org/10.1038/srep37275>
- Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, *7*(3), 189–200.

<https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>

Mosele, J., Macià, A., & Motilva, M.-J. (2015). Metabolic and Microbial Modulation of the Large Intestine Ecosystem by Non-Absorbed Diet Phenolic Compounds: A Review. *Molecules*, *20*(9), 17429–17468. <https://doi.org/10.3390/molecules200917429>

Motallebi, M., Bhia, M., Rajani, H. F., Bhia, I., Tabarraei, H., Mohammadkhani, N., Pereira-Silva, M., Kasaii, M. S., Nouri-Majd, S., Mueller, A.-L., Veiga, F. J. B., Paiva-Santos, A. C., & Shakibaei, M. (2022). Naringenin: A potential flavonoid phytochemical for cancer therapy. *Life Sciences*, *305*, 120752. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120752>

Najmanová, I., Vopršalová, M., Saso, L., & Mladěnka, P. (2020). The pharmacokinetics of flavanones. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(18), 3155–3171. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1679085>

Ni, J., Wu, G. D., Albenberg, L., & Tomov, V. T. (2017). Gut microbiota and IBD: Causation or correlation? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *14*(10), 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.88>

Pace, F., & Watnick, P. I. (2021). The Interplay of Sex Steroids, the Immune Response, and the Intestinal Microbiota. *Trends in Microbiology*, *29*(9), 849–859. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.11.001>

Parkar, S. G., Trower, T. M., & Stevenson, D. E. (2013). Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe*, *23*, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.07.009>

Prakash, B., Kumar, A., Singh, P. P., & Songachan, L. S. (2020). Antimicrobial and antioxidant properties of phytochemicals. Στο *Functional and Preservative Properties of Phytochemicals* (σσ. 1–45). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818593->

3.00001-4

- Pyrzynska, K. (2022). Hesperidin: A Review on Extraction Methods, Stability and Biological Activities. *Nutrients*, *14*(12), 2387. <https://doi.org/10.3390/nu14122387>
- Rasouli, H., Farzaei, M. H., & Khodarahmi, R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 1–42. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1354017>
- Ravetti, S., Garro, A. G., Gaitán, A., Murature, M., Galiano, M., Brignone, S. G., & Palma, S. D. (2023). Naringin: Nanotechnological Strategies for Potential Pharmaceutical Applications. *Pharmaceutics*, *15*(3), 863. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030863>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiaro, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, *7*(1), 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Rodríguez-Daza, M. C., Pulido-Mateos, E. C., Lupien-Meilleur, J., Guyonnet, D., Desjardins, Y., & Roy, D. (2021). Polyphenol-Mediated Gut Microbiota Modulation: Toward Prebiotics and Further. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 689456. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.689456>
- Rudzki, L., Stone, T. W., Maes, M., Misiak, B., Samochowiec, J., & Szulc, A. (2021). Gut microbiota-derived vitamins – underrated powers of a multipotent ally in psychiatric health and disease. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *107*, 110240. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110240>
- Schroeder, B. O., & Bäckhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature Medicine*, *22*(10), 1079–1089. <https://doi.org/10.1038/nm.4185>

- Singla, V., & Chakkaravarthi, S. (2017). Applications of prebiotics in food industry: A review. *Food Science and Technology International*, 23(8), 649–667.
<https://doi.org/10.1177/1082013217721769>
- Smolinska, A., Blanchet, L., Buydens, L. M. C., & Wijmenga, S. S. (2012). NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *Analytica Chimica Acta*, 750, 82–97.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.049>
- Sozen, T., Ozisik, L., & Calik Basaran, N. (2017). An overview and management of osteoporosis. *European Journal of Rheumatology*, 4(1), 46–56.
<https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2016.048>
- Stabrauskiene, J., Kopustinskiene, D. M., Lazauskas, R., & Bernatoniene, J. (2022). Naringin and Naringenin: Their Mechanisms of Action and the Potential Anticancer Activities. *Biomedicines*, 10(7), 1686. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10071686>
- Stevens, Y., Rymenant, E. V., Grootaert, C., Camp, J. V., Possemiers, S., Masclee, A., & Jonkers, D. (2019). The Intestinal Fate of Citrus Flavanones and Their Effects on Gastrointestinal Health. *Nutrients*, 11(7), 1464. <https://doi.org/10.3390/nu11071464>
- Tabasco, R., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Bartolomé, B., Victoria Moreno-Arribas, M., Peláez, C., & Requena, T. (2011). Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism. *Food Microbiology*, 28(7), 1345–1352. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.06.005>
- Tanaka, Y., Nakayamada, S., & Okada, Y. (2005). Osteoblasts and Osteoclasts in Bone Remodeling and Inflammation. *Current Drug Target -Inflammation & Allergy*, 4(3), 325–328. <https://doi.org/10.2174/1568010054022015>
- Telle-Hansen, V. H., Christensen, J. J., Formo, G. A., Holven, K. B., & Ulven, S. M.

- (2020). A comprehensive metabolic profiling of the metabolically healthy obesity phenotype. *Lipids in Health and Disease*, 19(1), 90.
<https://doi.org/10.1186/s12944-020-01273-z>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Tsiantas, K., Konteles, S. J., Kritsi, E., Sinanoglou, V. J., Tsiaka, T., & Zoumpoulakis, P. (2022). Effects of Non-Polar Dietary and Endogenous Lipids on Gut Microbiota Alterations: The Role of Lipidomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4070. <https://doi.org/10.3390/ijms23084070>
- Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., & Spector, T. D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*, k2179. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2179>
- Velmurugan, B. K., Rathinasamy, B., Lohanathan, B. P., Thiagarajan, V., & Weng, C.-F. (2018). Neuroprotective Role of Phytochemicals. *Molecules*, 23(10), 2485.
<https://doi.org/10.3390/molecules23102485>
- Vyas, U., & Ranganathan, N. (2012). Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Gut and Beyond. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012, 1–16.
<https://doi.org/10.1155/2012/872716>
- Wishart, D. S. (2019). NMR metabolomics: A look ahead. *Journal of Magnetic Resonance*, 306, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.07.013>
- Yoo, J., Groer, M., Dutra, S., Sarkar, A., & McSkimming, D. (2020). Gut Microbiota and Immune System Interactions. *Microorganisms*, 8(10), 1587.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8101587>
- Zaiss, M. M., Jones, R. M., Schett, G., & Pacifici, R. (2019). The gut-bone axis: How bacterial metabolites bridge the distance. *Journal of Clinical Investigation*, 129(8), 3018–3028. <https://doi.org/10.1172/JCI128521>

Zhang, A., Sun, H., Wang, P., Han, Y., & Wang, X. (2012). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *The Analyst*, *137*(2), 293–300.

<https://doi.org/10.1039/C1AN15605E>

Zhang, Y.-W., Cao, M.-M., Li, Y.-J., Zhang, R.-L., Wu, M.-T., Yu, Q., & Rui, Y.-F.

(2022). Fecal microbiota transplantation as a promising treatment option for osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, *40*(6), 874–889.

<https://doi.org/10.1007/s00774-022-01375-x>

Zhao, F., Guo, Z., Kwok, L.-Y., Zhao, Z., Wang, K., Li, Y., Sun, Z., Zhao, J., & Zhang, H.

(2022). *Bifidobacterium lactis* Probio-M8 improves bone metabolism in patients with postmenopausal osteoporosis, possibly by modulating the gut microbiota. *European Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s00394-022-03042-3>

Zhu, F., Du, B., & Xu, B. (2018). Anti-inflammatory effects of phytochemicals from fruits, vegetables, and food legumes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *58*(8), 1260–1270. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1251390>

Πηγές Εικόνων

Εικόνα 1-2: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 3: (Campos-Vega & Oomah, 2013)

Εικόνα 4: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structures-of-hesperetin-and-hesperidin_fig1_338421095

Εικόνα 5: https://www.researchgate.net/figure/Fig-12-Chemical-structure-of-Naringin-and-Naringenin_fig10_273459646

Εικόνα 6: (Marhuenda-Muñoz κ.ά., 2019)

Εικόνες 7: Προσωπικό αρχείο

Εικόνες 8-12: Γραφήματα που προέκυψαν από τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων