



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης ενώσεων μετά από
γαστρεντερική προσομοίωση.**

Εισηγήτριες:

Γεωργακοπούλου Παναγιώτα Α.Μ. 18684055

Στέρπη Ευσταθία Α.Μ. 18684012

Επιβλέποντες:

Ανθιμία Μπατρίνου

Αθήνα 2023

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

1. Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Ανθιμία Μπατρίνου

Βιολόγος MSc, PhD, Επίκουρος Καθηγήτρια Εργαστηρίου Μικροβιολογίας Τροφίμων, Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων.

2. Μέλος Επιτροπής:

Ειρήνη Στρατή

Χημικός MSc, PhD, Επίκουρος Καθηγήτρια του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

3. Μέλος Επιτροπής:

Σπυρίδων Κοντελές

Γεωπόνος MSc, PhD, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ

Το δοκίμιο αυτό αποτελεί πτυχιακή εργασία που συντάχθηκε για το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής . Δηλώνουμε υπεύθυνα και γνωρίζοντας τις κυρώσεις του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας ότι είμαστε οι μοναδικές συγγραφείς της παρούσας πτυχιακής εργασίας η οποία είναι αποτέλεσμα προσωπικής έρευνας και δεν αποτελεί προϊόν αντιγραφής ούτε προέρχεται από ανάθεση σε τρίτους. Όλες οι πηγές που χρησιμοποιήθηκαν για την συγγραφή της, περιλαμβάνονται στην βιβλιογραφία και έχει γίνει η κατάλληλη αναφορά στην εργασία τρίτων, όπου αυτό ήταν απαραίτητο σύμφωνα με τους κανόνες της ακαδημαϊκής δεοντολογίας. Δηλώνουμε επιπλέον, ότι αναλαμβάνουμε τις συνέπειες όπως αυτές νομίμως ορίζονται, σε περίπτωση που αποδειχθεί μελλοντικά ότι η εργασία αυτή αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Γεωργακοπούλου Παναγιώτα και Στέρπη Ευσταθία.

Ευχαριστίες

Θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά την Καθηγήτρια κ. Μπατρίνου Ανθιμία υπεύθυνη της πτυχιακής μας εργασίας για την ανάθεση του θέματος και την καθοδήγησή της καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής της παρούσας πειραματικής εργασίας.

Ακόμα θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε την υποψήφια διδάκτωρ κ. Πυροβόλου Αικατερίνη για την στήριξη και εμπάθυνση των γνώσεων μας επί του θέματος της πτυχιακής εργασίας.

Τέλος ευχαριστούμε ιδιαίτερα τις οικογένειες μας για την συνεχή στήριξη τους καθ' όλη την διάρκεια της φοίτησης μας έως και το πέρας αυτής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Δεδομένου ότι το χαρούπι αποτελεί την νέα τάση στην αγορά και επανέρχεται εδραιώνοντας την θέση του στο καθημερινό διατροφολόγιο του κόσμου λόγω της ωφέλιμης δράσης του στην υγεία και του πλούσιου περιεχομένου από αντιοξειδωτικά, θρεπτικά συστατικά και ιχνοστοιχεία αποτελεί ένα αξιόλογο και ενδιαφέρον θέμα μελέτης. Μέσω της εκπόνησης της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας που είχε πειραματικό και ερευνητικό χαρακτήρα επρόκειτο να μελετηθεί ο τρόπος απορρόφησης ευεργετικών συστατικών του χαρουπόμελου και της δράσης και συνεισφοράς του ανθρώπινου μικροβιώματος σε όλη αυτή την διεργασία σε έναν άνθρωπο υγιή και έναν άνθρωπο που πάσχει από νόσο του Crohn's. Σε πειραματικό επίπεδο ακολουθήθηκε μια διαδικασία μέσω της οποίας δημιουργήθηκε ένα *in vitro* γαστρεντερικό σύστημα σε εργαστηριακό επίπεδο. Ουσιαστικά ακολουθήθηκε μία όσο το δυνατόν πιο κοντινή αναπαράσταση των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα από την στιγμή της πρόσληψης μίας τροφής και της εισόδου της στον οργανισμό έως την στιγμή της τελικής απομάκρυνσης της από αυτόν αφού πρώτα έχουν απορροφηθεί όλα τα απαραίτητα συστατικά που μπορεί να προσδώσει στον οργανισμό. Ακολουθήθηκαν αυστηρά πέντε στάδια που προσομοίαζαν την αρχική και την γαστρική φάση, την εντερική, την πρώιμη εντερική ζύμωση και την όψιμη γαστρική ζύμωση όπου στο τέλος κάθε σταδίου συλλέγονταν δείγματα τα οποία υποβάλλονταν στην διαδικασία της ανάλυσης της Folin και καταγραφόταν το σύνολο των φαινολικών ουσιών. Εντός του πειραματικού αυτού πλάνου απαραίτητες κρίθηκαν και κάποιες μικροβιολογικές αναλύσεις που αφορούσαν τα δείγματα των περιττωμάτων ως προς την μικροβιολογική τους ενεργότητα. Από την διεξαγωγή αυτής της μελέτης προέκυψε για αρχή ξεκάθαρη αλληλεπίδραση μεταξύ του ανθρώπινου μικροβιώματος με τις φαινόλες του χαρουπόμελου οι οποίες και μετρήθηκαν τελικώς.

Λέξεις κλειδιά: χαρούπι, αντιοξειδωτικά, απορρόφηση, νόσος του Crohn's, *in vitro* γαστρεντερικό σύστημα, Folin, μικροβιολογική ενεργότητα, αλληλεπίδραση.

ABSTRACT

Since carob is the new trend in the market and is re-establishing its place in the daily diet of the world due to its beneficial effects on health and its rich content of antioxidants, nutrients and trace elements, it is a worthy and interesting topic of study. Through the preparation of this thesis, which was of an experimental and research nature, it was intended to study the mode of absorption of beneficial components of carob and the action and contribution of the human microbiome in this entire process in a healthy person and a person suffering from Crohn's disease. At the experimental level, a procedure was followed to create an *in vitro* gastrointestinal system at the laboratory level. In essence, a representation was followed which is as close as possible to the processes that take place from the moment a food is ingested and enters the body to the moment of its final elimination from the body after all the necessary components that it can provide to the body have been absorbed. Five stages were strictly followed, simulating the initial and gastric phases, intestinal, early intestinal fermentation and late gastric fermentation, at the end of each stage samples were collected and subjected to the Folin analysis procedure and the total phenolic substances were recorded. Within this experimental plan, some microbiological analyses of the fecal samples in terms of their microbiological activity were considered necessary. This study revealed a clear interaction between the human microbiome and the phenols of carob, which were finally measured.

Key words: carob, antioxidants, absorption, Crohn's disease, *in vitro* gastrointestinal system, Folin, microbiological activity, interaction.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πίνακας περιεχομένων

ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ	2
ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ ΜΗ ΛΟΓΟΚΛΟΠΗΣ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT	6
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	13
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	14
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	17
1.1. Χαρούπι – Ονομασία και Βοτανική προέλευση.....	17
1.2 Γενετική Παραλλαγή.....	19
1.3 Βιολογία Αναπαραγωγής.....	22
1.4 Προϊόντα και Χρήσεις.....	23
1.5 Οφέλη στην υγεία και Αντενδείξεις.....	25
1.6 Διατροφική Αξία και ιδιότητες.....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	28
2.1 Περί Αντιοξειδωτικών.....	28
2.2 Κατηγοριοποίηση Αντιοξειδωτικών.....	28

2.3 Συστήματα Αντιοξειδωτικής Άμυνας.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	34
3.1 Περί Folin Ciocalteu.....	34
3.2 Αρχή της μεθόδου Folin Ciocalteu.....	34
3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την δοκιμή Folin Ciocalteu	35
3.4 Εφαρμογές της μεθόδου	37
3.5 Περιορισμοί και προκλήσεις.....	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	42
4.1 Ανθρώπινη Μικροχλωρίδα	42
4.2 Εντερικό Μικροβίωμα.....	44
4.3 Μικροβίωμα παχέος εντέρου	45
4.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας.....	47
4.5 Συμβολή του εντερικού μικροβιώματος στον μεταβολισμό.....	51
4.5.1. Εντερικό μικροβίωμα και μεταβολισμός.....	51
4.5.2 Εντερική μικροχλωρίδα και SCFA's	53
4.5.3 Εντερικό Μικροβίωμα και πρωτεΐνες.....	54
4.5.4 Εντερικό μικροβίωμα και Βιταμίνες.....	54
4.5.5. Εντερικό μικροβίωμα και άμυνα του οργανισμού	55
4.6 Φαινόμενο της Δυσβίωσης	56
4.6.1. Γενικά.....	56
4.6.2 Αιτίες πρόκλησης δυσβίωσης.....	58

4.6.3 Συνέπειες της Δυσβίωσης	59
4.6.4. Αντιμετώπιση Φαινομένου Δυσβίωσης	61
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	63
5.1 Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι (ΙΦΝΕ).....	63
5.1.1.Γενικά	63
5.1.2 Συμπτώματα Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Εντερικών Νόσων (ΙΦΝΕ).....	64
5.1.3 Πεδίο Προσβολής των Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Εντερικών Νόσων (ΙΦΝΕ).....	64
5.1.4. Αίτια εμφάνισης ΙΦΝΕ	64
5.1.5. Αντιμετώπιση των ΙΦΝΕ	65
5.2 Νόσος του Crohn.....	65
5.2.1.Γενικά.....	65
5.2.2. Αίτια της Νόσου	66
5.2.3 Κλινική εικόνα της νόσου.....	67
5.2.4 Επιπλοκές της Νόσου	69
5.2.5 Θεραπεία νόσου του Crohn's	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	71
6.1 Βασικά όργανα και λειτουργίες του γαστρεντερικού συστήματος.....	71
6.1.1 Στόμα	71
6.1.2 Φάρυγγας & Οισοφάγος	71
6.1.3 Στομάχι.....	71
6.1.4 Λεπτό Έντερο	72

	10
6.1.5 Πάγκρεας.....	73
6.1.6 Ήπαρ	73
6.1.7 Λεπτό Έντερο	74
6.1.8 Ορθό.....	74
6.2 Ρύθμιση Λειτουργίας Γαστρεντερικού Συστήματος	75
6.3 Φάσεις Γαστρικού Ελέγχου	75
6.4 Έκκριση Γαστρικού υγρού	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	78
7.1 Σχεδιασμός Πειράματος	78
7.2 Παρασκευή Χαρουπόμελου.....	78
7.2.1 Υλικά και Εξοπλισμός	78
7.2.2 Διαδικασία Παρασκευής Χαρουπόμελου	79
7.3 Μικροβιολογικές Αναλύσεις.....	80
7.3.1 Υλικά και Εξοπλισμός	80
7.3.2 Προετοιμασία Μικροβιολογικών Αναλύσεων	81
7.4 Προσομοίωση Γαστρεντερικού Συστήματος in vitro.....	87
7.4.1 Υλικά και Εξοπλισμός	87
7.4.2 Διαδικασία προσομοίωσης γαστρεντερικού συστήματος in vitro.....	88
7.4.3 Διακρίβωση Μεθόδου Παρασκευής Γαστρικού Υγρού	92
7.5 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu.....	94
7.5.1 Υλικά και εξοπλισμός	94

7.5.2 Παρασκευή Κορεσμένου Διαλύματος Ανθρακικού Νατρίου (Na_2CO_3)	95
7.5.3 Πρωτόκολλο μεθόδου Folin Ciocalteu	95
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	97
8.1 Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	97
8.1.1.Μικροβιολογικές Αναλύσεις.....	97
8.1.2 Αποτελέσματα Ολικών Φαινολικών Ουσιών.....	99
8.1.3 Αποτελέσματα Διακρίβωσης Μεθόδου Παρασκευής Γαστρικού Υγρού.....	107
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	111
9.1 Συμπεράσματα	111
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	112

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1α και 1β : Αγρονομικά Χαρακτηριστικά Ποικιλιών

Πίνακας 2: Είδη και γένη βακτηρίων εντερικής μικροχλωρίδας.

Πίνακας 3: Τελικά αποτελέσματα pH και βαθμών Brix στο παραχθέν χαρουπόμελο.

Πίνακας 4: Τα δείγματα που συλλέχθηκαν ανά φάση σε erpendorfs.

Πίνακας 5α: Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων (Οκτώβριος 2022).

Πίνακας 5β: Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων (Φεβρουάριος 2023).

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών των δειγμάτων C2,C3,C4 κατά την αρχική και τελική φάση της πέψης και το ποσοστό μείωσης αυτών.

Πίνακας 7: Συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών των δειγμάτων Δ1,Δ2,Δ3,Δ4 κατά την αρχική και τελική φάση της πέψης και το ποσοστό μείωσης αυτών.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Batlle I., Tous J (1997) Carob Tree *Ceratonia Siliqua* L Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Εκδότης: IPK

Εικόνα 2: Batlle I., Tous J (1997) Carob Tree *Ceratonia Siliqua* L Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Εκδότης: IPK

Εικόνα 3: Προσωπική Δημιουργία

Εικόνα 4: [Meet you microbiome, American Museum of Natural History](#)

Εικόνα 5: [The human microbiome, Future Learn](#)

Εικόνα 6: [Δυσβίωση -Υγεία του εντέρου](#)

Εικόνα 7: [EnteroScan Έλεγχος Εντερικού Μικροβιώματος](#)

Εικόνα 8: [Ανασκόπηση Review – Ανθρώπινο Μικροβίωμα Εντέρου Φ. Γύπας,2 Α.Φ. Μεντής.](#)

[ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE](#)

Εικόνα 9: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 10: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 11: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 12: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 13: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 14: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 15: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 16: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 17: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 18: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 19: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 20: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 21: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 22: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 23: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 24: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 25: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 26: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 27: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 28: Προσωπικό αρχείο

Εικόνα 29: Προσωπικό αρχείο

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Εξίσωση Πρότυπης Καμπύλης Αναφοράς

Διάγραμμα 2α: Ολική Συγκέντρωση Πολυφαινολών (Προσομοίωση 1^η)

Διάγραμμα 2β: Ολική Συγκέντρωση Πολυφαινολών (Προσομοίωση 2^η)

Διάγραμμα 2γ: Ολική Συγκέντρωση Πολυφαινολών (Προσομοίωση 3^η)

Διάγραμμα 3: Ολική Συγκέντρωση Πολυφαινολών Γαστρικού Υγρού

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το χαρούπι φαίνεται να είναι ένα φυτό με βαθιές ρίζες στην ιστορία της χώρας μας. Μέσω μαρτυριών που είναι διαθέσιμες και αξιόπιστες αποδεικνύεται ότι η διάδοση του χρονολογείται από την αρχαιότητα και χαρακτηρίζεται από τους διάφορους τρόπους χρήσης του. Το χαρούπι φαίνεται να πωσ συναντήθηκε έντονα και κατά τις περίοδο διεξαγωγής πολέμων λόγω τις πλούσιας σύνθεσης του αλλά και τις αφθονίας του τα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Από το 1936-1939 όπου και διεξήχθη ο Ισπανικός εμφύλιος το χαρούπι αποτέλεσε την βασική τροφή που βοήθησε τους ανθρώπους να επιβιώσουν από την αστία ενώ για τους πιο μεγάλους ανθρώπους της Ελλάδας είναι γνωστό και ως «σοκολάτα της κατοχής» κατά την διάρκεια του Δεύτερου Παγκοσμίου πολέμου ενώ συνέβαλε ακόμα και στην αντικατάσταση βασικών αγαθών που βρίσκονταν σε έλλειψη την περίοδο εκείνη (αλεύρι, καφέ). Δεδομένου ότι το χαρούπι έλαβε ενεργό ρόλο σε περιόδους ανέχειας, φτώχειας και δυσκολιών για αρκετό καιρό απαξιώθηκε όμως πλέον μέσω της νέας τάσης της αγοράς αλλά και μελετών έχει επανέλθει στην αγορά με τον χαρακτηρισμό «Μαύρος Χρυσός» λόγω της πλούσιας διατροφικής αξίας που έχει και της πλούσιας συγκέντρωσης του σε φυτικές ίνες, ασβέστιο, πρωτεΐνες, μέταλλα, αντιοξειδωτικά και άλλες ενώσεις που χαρακτηρίζονται για την αντιφλεγμονώδη, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική συμβολή τους στον οργανισμό.

Τα πιο διαδεδομένα προϊόντα εντός της εγχώριας αγοράς που προκύπτουν από το χαρούπι θεωρούνται το χαρουπόμελο και ο καφές από χαρούπι τα οποία καταναλώνονται αρκετά λόγω του ότι αποτελούν φυσική πηγή όλων των προαναφερόμενων θρεπτικών συστατικών.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρον θέμα μελέτης στην επιστημονική κοινότητα αποτελεί και η ανθρώπινη μικροχλωρίδα και η συμβολή της συνολικά στις διεργασίες που πραγματοποιούνται στον οργανισμό. Διεξάγονται καθημερινά μελέτες προς εμβάθυνση και ανακάλυψη τόσο της

ποικιλίας των μικροοργανισμών που συνθέτουν το ανθρώπινο μικροβίωμα όσο και την κατανόηση του βαθμού εμπλοκής αυτών στις επιμέρους διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό του ανθρώπου και εξασφαλίζουν μια ορθή και ομαλή λειτουργία αυτού.

Μέσω της εκπόνησης αυτής της πειραματικής μελέτης σκοπό αποτελεί η κατανόηση του τρόπου απορρόφησης μέρους των ευεργετικών συστατικών που περιλαμβάνονται στο χαρούπι επιτυγχάνοντας μια προσομοίωση τόσο του γαστρικού όσο και του εντερικού περιβάλλοντος μελετώντας επιμέρους τις διεργασίες και την πορεία απορρόφησης σε ένα όσο πιο αληθοφανές περιβάλλον επιτρέπεται να πραγματοποιηθεί σε επίπεδο εργαστηρίου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1. Χαρούπι – Ονομασία και Βοτανική προέλευση

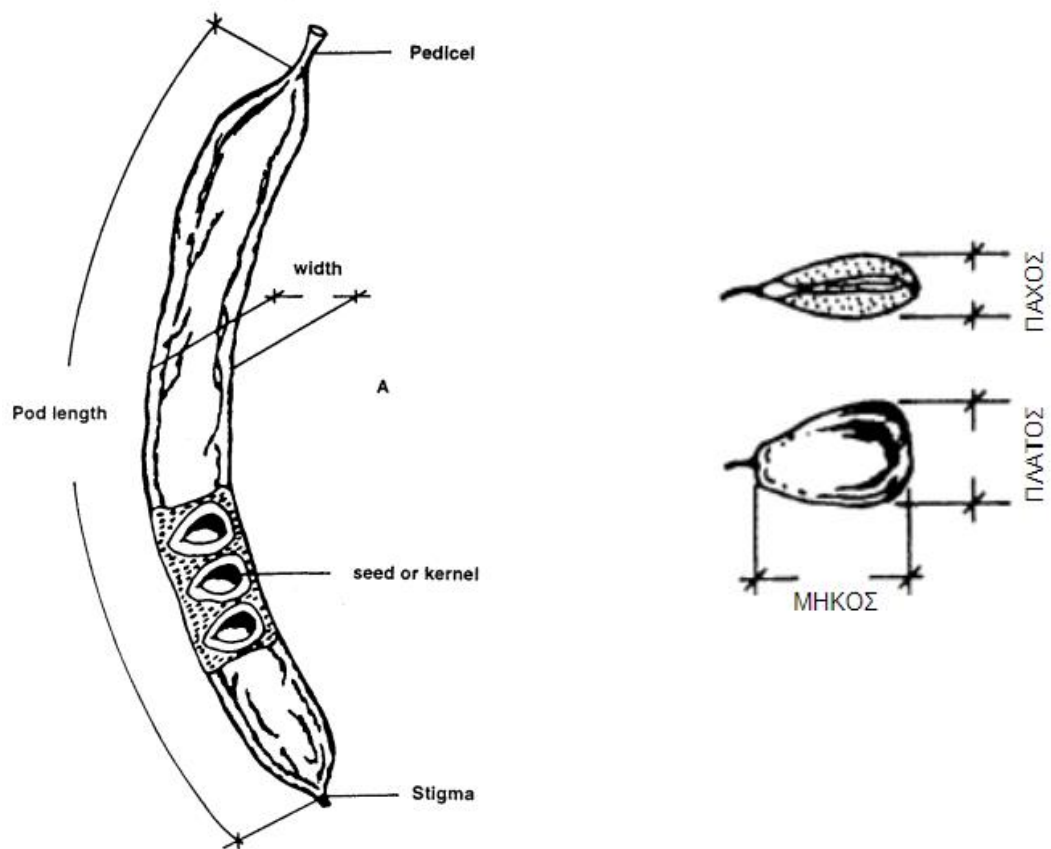
Η χαρουπιά ή ξυλοκερατιά είναι ένας σκληρόφυλλος αειθαλής θάμνος ή δέντρο που φτάνει σε ύψος έως και τα 10 μέτρα. Η επιστημονική του ονομασία είναι *Ceratonia Siliqua* L, από όπου προέρχεται από την ελληνική λέξη Κέρας (κέρατο) και την λατινική λέξη *Siliqua* που παραπέμπει στην σκληρότητα και το σχήμα του λοβού.

Η οικογένεια στην οποία ανήκει, Leguminosae της τάξης των Rosales, είναι μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες ανθοφόρων φυτών με 650 γένη και περισσότερα από 18.000 είδη (Polhill et al 1981). Το κύριο χαρακτηριστικό της οικογένειας αυτής είναι η εξαιρετικά μεταβλητή της μορφολογία.

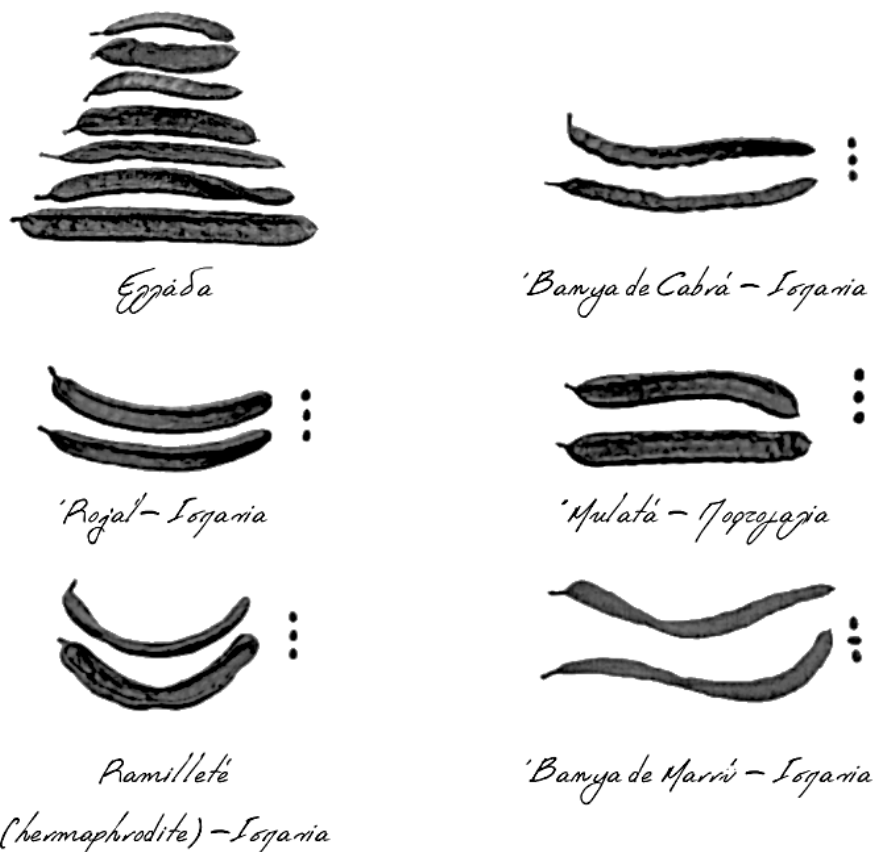
Το χαρουπόδεντρο καλλιεργείται από την αρχαιότητα στις περισσότερες χώρες της λεκάνης της Μεσογείου, συνήθως σε ήπια και ξηρά μέρη. Η αξία του αναγνωρίστηκε τόσο από τους Αρχαίους Έλληνες όσο και από τους Άραβες, καθώς οι πρώτοι το έφεραν από την Μέση Ανατολή στην Ελλάδα και την Ιταλία και οι δεύτεροι το διέδωσαν κατά μήκος της Βόρειας Αφρικής.

Το χαρούπι είναι ένα δίγONO είδος με ορισμένες ερμαφρόδιτες μορφές, επομένως αρσενικά θηλυκά και ερμαφρόδιτα άνθη προέρχονται από διαφορετικά δέντρα. Τα άνθη είναι αρχικά αμφίφυλα, αλλά συνήθως το ένα φύλο καταστέλλεται κατά την όψιμη ανάπτυξη των λειτουργικά αρσενικών ή θηλυκών ανθέων. Οι σπόροι εμφανίζονται εγκάρσια στον λοβό είναι σκληροί, πολυάριθμοι, συμπιεσμένοι, ωοειδής και μακριοί. Το μήκος τους φτάνει τα 8-10 mm ενώ το πλάτος και το πάχος τους υπολογίζεται κατά μέσο όρο στα 7 και στα 4 mm αντίστοιχα. Οι κοσμηματοπώληδες λόγω των σταθερών του διαστάσεων χρησιμοποιούσαν τον σπόρο του χαρουπιού ως μονάδα βάρους (200mg), το καράτι, που προκύπτει από την αρχαιοελληνική λέξη κεράτιον, δηλαδή χαρούπι.

Το μέγεθος των χαρουπιών- λοβού είναι εξαιρετικά μεταβλητός χαρακτήρας που επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες , το επίπεδο επικονίασης και την καρπόδεση. Η συλλογή γίνεται πιο εύκολα και οικονομικά όταν οι λοβοί είναι ευθύγραμμοι και μεγάλου μήκους και όχι όταν είναι καμπυλωτοί ή στριμμένοι. Το μεγάλο μέγεθος των χαρουπιών είναι εξίσου σημαντικό και για την αντοχή τους στους ισχυρούς ανέμους την άνοιξη, προς αποφυγήν της πρόωρης πτώσης των καρπών.



Εικόνα 1 Ανατομία του λοβού και του σπόρου.



Εικόνα 2 Διαφοροποίηση της μορφολογίας των λοβών σε διαφορετικούς τύπους χαρουπιών

1.2 Γενετική Παραλλαγή

Το καλλιεργούμενο χαρούπι δεν έχει αποκλίνει από τον άγριο πρόγονο του (Zohary 1973). Όμως το χαρούπι είναι λίγο πολύ υποχρεωτικός διασταυρωτής καθώς οι σπόροι του δραπετεύουν από τις φυτείες στη γύρω ύπαιθρο. Οι μεγαλύτερες μορφολογικές διαφορές παρατηρήθηκαν στα δέντρα που προκύπτουν από διασταυρώσεις και στους καρπούς αυτών. Ως αποτέλεσμα, οι τοπικές ποικιλίες διαφέρουν ως προς την ευρωστία, το μέγεθος, την ποιότητα των λοβών, την ανθεκτικότητα σε ασθένειες, την απόδοση των σπόρων και την παραγωγικότητα. Η πλειοψηφία των τοπικών ποικιλιών είναι άγνωστες και αντιπροσωπεύουν το βλαστικό πλάσμα (germplasm) κάθε περιοχής.

Ύστερα από έρευνα που διενεργήθηκε στις ποικιλίες αυτές, προέκυψαν 2 σημαντικά ευρήματα. Πρώτον η υψηλή γενετική ποικιλομορφία σε μορφολογικούς,

αγρονομικούς και τεχνολογικούς χαρακτήρες και δεύτερον ο χαμηλός πολυμορφισμός μεταξύ των ποικιλιών διαφορετικής και ίδιας προέλευσης. Στις αναλύσεις DNA και ισοενζύμων που διενεργήθηκαν στις ποικιλίες αυτές δεν παρατηρήθηκαν ισοενζυμικές διαφορές στο φύλο ή στα πρότυπα γεωγραφικής παραλλαγής.

Από όλες τις διαφορετικές ποικιλίες που επικρατούν, ως επικονιαστές επιλέγονται ορισμένοι Ιταλικοί ερμαφρόδιτοι τύποι όπως οι Bonifacio και Tantillo (Russo 1954). Τα κύρια κριτήρια για την επιλογή της ποικιλίας που θα συμμετέχει στην διαδικασία της γονιμοποίησης είναι το μεγάλο μέγεθος των λοβών του δέντρου και η υψηλή περιεκτικότητα αυτών σε πολτό και ζάχαρη. Οι σπόροι είναι πολύτιμοι αφού χρησιμοποιούνται για παραγωγή κόμμεος χαρουπιού, όσο για τον πολτό η αξία του εξαρτάται από την χρήση του, την γεύση του και την περιεκτικότητά του σε σάκχαρα, ίνες και τανίνες. Το μεγάλο μέγεθος λοβών είναι επιθυμητό λόγω της υψηλής περιεκτικότητας του σε σπόρους. Ωστόσο υπάρχει αρνητική συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας σε πολτό και σε σπόρους. Ένας λοβός μεγάλου μεγέθους με πολυάριθμους σπόρους έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε πολτό και το αντίθετο.

Η τελική επιλογή του επιθυμητού χαρακτηριστικού εξαρτάται από το προϊόν που είναι πιο πολύτιμο εμπορικά. Αυτός είναι και ο λόγος που επικρατεί μεταξύ των δύο χαρακτηριστικών η απόδοση σε σπόρους. Στην Ελλάδα κυριαρχούν δύο ποικιλίες, οι Hemere και Tylliria. Το μεγαλύτερο μέρος παραγωγής λοβών, προέρχεται από την Hemere που αποδίδει σε σπόρο περίπου 9%.

Καλλιεργούμενη ποικιλία	Σχήμα Λοβού	Περιεκτικότητα σε πολτό (σε ξ.β. πολτού)	Περιεκτικότητα ζάχαρης στον πολτό (%)	Απόδοση σε σπόρους
Negra	S	υψηλή	-	7-9
Matalafera	S	μεσαία	-	12-14
Duraió	S	χαμηλή προς μεσαία	-	16-17
Rojal	C	μεσαία	-	10-11
Sayalonga	C	μεσαία	-	13-14
Ramillete	C	υψηλή	-	8-10
Banya Cabra	T	χαμηλή	-	13-14
Gibiliana	C	υψηλή	38-40	8-10
Amele di Bari	S	υψηλή	53-54	8
Mulata	C	μεσαία	40-50	12-14
Galhosa	S	χαμηλή	-	14-16
Tylliria	C	υψηλή	51-52	8-11
Koundourka	S	χαμηλή	49-50	14-1
Hemere	C	υψηλή	56-57	-
Sfax	C	μεσαία προς υψηλή	51-52	9
Santa Fe	C	μεσαία	47-48	12-12

Πίνακας 1(α) Αγρονομικά χαρακτηριστικά ποικιλιών

Καλλιεργούμενη ποικιλία	Προέλευση	Φύλο	Ευαισθησία στο ωίδιο	Μέγεθος Λοβού
Negra	Spain	Θηλυκό	υψηλή	χαμηλό
Matalafera	Spain	Θηλυκό	χαμηλή	μεσαίο προς μακρύ
Duraió	Spain	Θηλυκό	μεσαία	μεσαίο
Rojal	Spain	Θηλυκό	χαμηλή	μακρύ
Sayalonga	Spain	Θηλυκό	χαμηλή	μακρύ
Ramillete	Spain	Ερμαφρόδιτο	μεσαία	μεσαίο προς μακρύ
Banya Cabra	Spain	Θηλυκό	μεσαία	μακρύ
Gibiliana	Italy	Θηλυκό	μεσαία	μεσαίο
Amele di Bari	Italy	Θηλυκό	χαμηλή	μεσαίο
Mulata	Portugal	Θηλυκό	χαμηλή	μεσαίο
Galhosa	Portugal	Θηλυκό	χαμηλή	χαμηλό προς μεσαίο
Tylliria	Cyprus	Θηλυκό	μεσαία	μεσαίο προς μακρύ
Koundourka	Cyprus	Θηλυκό	χαμηλή	χαμηλό
Hemere	Greece	Θηλυκό	-	χαμηλό προς μεσαίο
Sfax	Tunisia	Θηλυκό	χαμηλή	μακρύ
Santa Fe	California	Ερμαφρόδιτο	υψηλή	μακρύ

Πίνακας 1(β) Αγρονομικά χαρακτηριστικά ποικιλιών

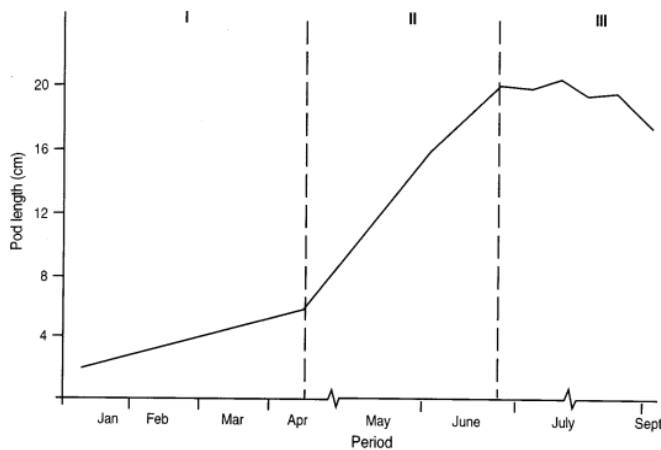
Σημειώσεις: Μεσαίο μέγεθος λοβού = 15 cm / S = ευθύ / C = καμπυλωτό / T = γυρισμένο / Μεσαία απόδοση σε σπόρους = 10%

1.3 Βιολογία Αναπαραγωγής

Οι χαρουπιές είναι δέντρα που αναπτύσσονται βέλτιστα σε ασβεστούχα εδάφη κατά προτίμηση κοντά σε θάλασσα, σε ημίξηρες μεσογειακές ή υποτροπικές περιοχές. Ωστόσο αν και είναι ξηροθερμικά δέντρα έχουν μια ορισμένη αντοχή στις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως ο ελαφρύς παγετός. Η ευαισθησία τους στον άνεμο αποκαλύπτεται από τα σπασμένα κλαδιά και σχετίζεται με την υγεία του ξύλου, το σχήμα και το μέγεθος του δέντρου. Συνεπώς οι περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν σημαντικά την απόδοση του δέντρου σε καρπούς. Άλλοι παράγοντες που διαδραματίζουν εξίσου σπουδαίο ρόλο, είναι η ποσότητα της επικονίασης και οι καλλιεργητικές πρακτικές που ακολουθούνται. Αν ακολουθηθούν όλες οι βέλτιστες πρακτικές η βλάστηση του δέντρου κατά μέσο όρο διαρκεί 4-5 έτη. Κάθε έτος επαναλαμβάνονται με την σειρά τα εξής 3 γεγονότα. Η γονιμοποίηση, η ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών και η αποβολή αυτών.

Οι λοβοί του χαρουπιού ακολουθούν μια σιγμοειδή καμπύλη ανάπτυξης που χωρίζεται σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο χαρακτηρίζει την αργή ανάπτυξη των λοβών, και τοποθετείται χρονικά τον Οκτώβριο, μετά την γονιμοποίηση και κατά την περίοδο φθινοπώρου-χειμώνα όπου παρατηρείται μηδενική αύξηση βάρους νωπού και ξηρού λοβού. Το δεύτερο στάδιο είναι εκείνο της ταχείας ανάπτυξης όπου λαμβάνει χώρα την ενεργή περίοδο ανάπτυξης στις αρχές της άνοιξης από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο. Το τρίτο και τελευταίο στάδιο αντιστοιχεί στην αργή ανάπτυξη και ωρίμανση των λοβών. Η ξήρανση τους αρχίζει τον Ιούνιο και συνοδεύεται από την αλλαγή χρώματος από πράσινο σε καφέ. (Pahi and Vardar 1976). Οι πράσινοι ανώριμοι λοβοί είναι πολύ βαρύτεροι των ώριμων καθώς περιέχουν νερό σε ποσοστό 70% συγκριτικά με τους καφέ που φτάνουν μόλις το 12-18% σε νερό. Η αποβολή των ανθέων και των νεαρών καρπών γίνεται από τον Οκτώβριο έως τον Δεκέμβριο (Bosch et al 1996-

Rovira and Tous 1996) ενώ η αποβολή των λοβών σε ποσοστό 59-90% κυρίως την άνοιξη (Bosch et al, 1996).



Εικόνα 3 Στάδια ανάπτυξης του λοβού χαρουπιάς (Ilahi and Vardar, 1976)

Οι μέθοδοι αναπαραγωγής ποικίλουν μεταξύ της εμπειρικής επιλογής από καλλιεργητές που αναζητούν παραγωγικά δέντρα με γλυκό και σαρκώδες λοβό και στον πολλαπλασιασμό τυχαίων δενδρυλλίων βάσει απόδοσης σπόρων. Καθώς το χαρούπι είναι δίγONO είδος σε μεγάλο βαθμό, η γενετική βελτίωση για τους χαρακτήρες των καρπών παρεμποδίζεται από την έλλειψη πληροφοριών για τον αρσενικό γονέα.

1.4 Προϊόντα και Χρήσεις

Το χαρούπι ταξινομείται στα όσπρια και μπορεί να χρησιμοποιηθεί τόσο αυτούσιο ως τροφή για ζώα μηρυκαστικά και μη όσο και για ανθρώπινη διατροφή αφού αλεσθεί σε σκόνη. Το χαρούπι σε σκόνη αποτελείται από 46% ζάχαρη, 7% πρωτεΐνη, μικρές ποσότητες πολυάριθμων ανόργανων συστατικών και βιταμινών. Επομένως είναι μια θρεπτική σκόνη, η οποία αφού ξηρανθεί σε φούρνο, μπορεί να προστεθεί σε cake, ψωμί και προϊόντα αρτοποιίας, γλυκά, παγωτά, ζυμαρικά, αλοιφές ή ποτά ως αρωματική ουσία (NAS 1979, Vidal 1985). Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του χαρουπιού για το

οποίο είναι πολύ γνωστό είναι πως αποτελεί υγιεινό υποκατάστατο της σοκολάτας. Η σκόνη χαρουπιού «ΚΑΚΑΟ» έχει πλεονεκτήματα σε σχέση με την σοκολάτα διότι έχει λιγότερες θερμίδες και δεν περιέχει ούτε καφεΐνη ούτε θεοβρωμίνη. Η γεύση της δεν είναι τόσο πλούσια όσο της μαύρης σοκολάτας αλλά μοιάζει με αυτήν της σοκολάτας γάλακτος. Ένα άλλο προϊόν που δημιουργείται κατά βάση στην Αίγυπτο είναι το σιρόπι χαρουπιού. Ένα δημοφιλές ποτό από εκχύλιση κομματιών σάρκας χαρουπιού (carob kibbles) με νερό.

Το προϊόν που χρησιμοποιείται ευρύτερα στην βιομηχανία είναι το κόμμι χαρουπιού, το οποίο παράγεται από τον πυρήνα του χαρουπιού και χρησιμοποιείται ως μέσο διογκώσεως, σαν σταθεροποιητής και γαλακτωματοποιητής. Περίπου το ένα τρίτο (1/3) του σπόρου αποτελείται από κόμμι και λαμβάνεται από τον πυρήνα ύστερα από αφαίρεση περιβλήματος και άλεση. Οι σπόροι που περιέχουν περισσότερο κόμμι είναι εκείνοι με το μεγαλύτερο βάρος και πάχος και το χαμηλότερο ύψος. Για χρήση ως φυσικό πρόσθετο (E410) επιτρέπεται μόνο κόμμι υψηλής καθαρότητας, ενώ για πρόσθετο σε τροφή για ζώα συντροφιάς επιτρέπονται περισσότερα υπολείμματα. Μερικά παραδείγματα τροφίμων στα οποία γίνεται χρήση κόμμιος είναι οι σούπες, τα παγωτά, οι σάλτσες, τα τυριά, τα κονσερβοποιημένα κρέατα, τα προϊόντα αρτοποιίας κ.α.

Μια άλλη χρήση του χαρουπιού είναι ως υπόστρωμα για καλλιέργεια μυκήτων όπως *Aspergillus niger* και *Fusarium moniliforme* λόγω των διαλυμάτων ζάχαρης που εξάγονται. Τα αποξηραμένα μικκύλια είναι μια εύγευστη και θρεπτική ζωοτροφή με έως και 38% πρωτεΐνη κατά βάρος.

Ακόμα, το χαρουπόδεντρο εξυπηρετεί και καλλωπιστικούς σκοπούς, αφού είναι ανθεκτικό στην ξηρασία και στην περιβαλλοντική ρύπανση. Γι' αυτό προτιμάται ως δέντρο σκιάς και απομόνωσης θορύβου από εργοστάσια, δρόμους και σιδηροδρομικές

γραμμές. Συνήθως για αυτήν την χρήση προτιμώνται τα αρσενικά δέντρα που δεν αποβάλλουν τα φύλλα και τους καρπούς τους. Επιπλέον προτάθηκε και ως ανεμοφράκτης σε οπωρώνες. Τέλος ο κορμός του δέντρου χρησιμοποιείται ως ξυλεία για κατασκευή εργαλείων και για καύσιμα.

1.5 Οφέλη στην υγεία και Αντενδείξεις

Οι φυτικές ίνες που περιέχει το χαρούπι, προσδίδουν πολλαπλά οφέλη στην υγεία. Οι φυτικές ίνες χαρουπιού βοηθούν στην πρόληψη της δυσκοιλιότητας και στην ομαλή λειτουργία του εντέρου αποκαθιστώντας την εντερική διέλευση. Δρα όμως και αντίθετα σαν αντιδιαρροϊκό φάρμακο μειώνοντας κατά πολύ τα συμπτώματα της οξείας διάρροιας, ακόμη και σε βρέφη. Μεγάλη επίδραση έχει στις διάρροιες που προκαλούνται από ιούς ή βακτήρια, καθώς όταν καταναλώνεται, τα βακτηριοκτόνα και ιοκτόνα αποτελέσματά του είναι αισθητά στο εντερικό μας σύστημα. Επιπλέον, η κρέμα χαρουπιού είναι αποδεδειγμένα φάρμακο ενάντια στον εμετό και την παλινδρόμηση στα μωρά. Η κατανάλωσή του βοηθά τα βρέφη να μειώσουν τον αριθμό των παλινδρομήσεων, χωρίς να επηρεάζει τις πεπτικές διεργασίες.

Εκτός αυτών, από μελέτες, έχει φανεί ότι η κατανάλωση προϊόντων διατροφής εμπλουτισμένων σε αδιάλυτες φυτικές ίνες χαρουπιού έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην πρόληψη και θεραπεία της υπερχοληστερολαιμίας. Πρακτικά βοηθά στη μείωση της «κακής» (LDL) χοληστερόλης και συμβάλει στην καλύτερη λειτουργία της καρδιάς. Επίσης, στο γυναικείο φύλο έχει φανεί ότι βοηθά στη μείωση των τριγλυκεριδίων. Το χαρούπι λόγω της γλυκιάς του γεύσης και των θρεπτικών χαρακτηριστικών του μπορεί να αντικαταστήσει την σοκολάτα. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη, το αλεύρι χαρουπιού μπορεί να χαρακτηριστεί ως προϊόν με χαμηλό

γλυκαιμικό δείκτη, καθώς η τιμή του κυμαίνεται κάτω από 55 και πιο συγκεκριμένα 40.6. Ταυτόχρονα, παρουσιάζει χαμηλό γλυκαιμικό φορτίο με τιμή 31, χαρακτηριστικά που το καθιστούν εξαιρετική επιλογή για άτομα με σακχαρώδη διαβήτη που έχουν ως στόχο την καλύτερη διαχείριση των επιπέδων σακχάρου στο αίμα. Το γεγονός αυτό αποδίδεται στα συστατικά του χαρουπιού. Αφενός, τα σάκχαρα τα οποία περιέχει το χαρούπι είναι φυσικά σάκχαρα τα οποία δίνουν τη γλυκιά γεύση αλλά πιο ήπια επίδραση στα επίπεδα σακχάρου σε σχέση με την πρόσθετη ζάχαρη. Αφετέρου, οι φυτικές ίνες που περιέχει συμβάλλουν στα καλύτερα επίπεδα σακχάρου. Ωστόσο, καθώς περιέχει και υδατάνθρακες, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η όσο το δυνατόν καλύτερη προσαρμογή των δόσεων ινσουλίνης. Το χαρούπι επίσης είναι κατάλληλο και για άτομα με κοιλιοκάκη καθώς δεν περιέχει καθόλου γλουτένη. Τέλος ο καρπός της χαρουπιάς περιέχει πολυφαινόλες και αντιοξειδωτικά συστατικά που βοηθούν στην πρόληψη του καρκίνου και της υπερλιπιδαιμίας

Όπως κάθε τρόφιμο, έτσι και το χαρούπι έχει τις δικές του αντενδείξεις. Έχει παρατηρηθεί πως οι άνθρωποι που παρουσιάζουν αλλεργία στους ξηρούς καρπούς αντιμετωπίζουν συχνά προβλήματα στην κατανάλωσή του. Ως πιθανή παρενέργεια αυτού του οσπρίου, πρέπει να σημειωθεί ότι λόγω της αυξημένης ποσότητας ινών που περιέχει μπορεί να προκαλέσει μετεωρισμό όταν καταναλώνεται σε μεγάλες ποσότητες προκαλώντας μια περιστασιακή ενόχληση.

1.6 Διατροφική Αξία και ιδιότητες

Η χημική σύνθεση των λοβών σε 40 ποικιλίες έδειξε πως αποτελούνται από 37-62% ολικά σάκχαρα, 2,2-6,6% ακατέργαστη πρωτεΐνη, 4,2-9,6% ακατέργαστες ίνες, 1,5-2,4 τέφρα, 0,46-1,46% ακατέργαστο λίπος και 2,6-6,7% τανίνες επί ξηρού βάρους.

Όλα τα ποσοστά είναι κατά βάρος σε υγρασία 10%. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την χημική σύνθεση του πολτού είναι η ποικιλία, η προέλευση και η εποχή συγκομιδής.

Τα δύο κύρια συστατικά του λοβού του χαρουπιού κατά βάρος είναι ο πολτός 90% και ο σπόρος 10%. Ο πολτός έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ολικά σάκχαρα όπως σακχαρόζη, γλυκόζη, φρουκτόζη και μαλτόζη σε ποσοστό 48-56%. Κυτταρίνη και ημικυτταρίνη σε ποσοστό 18%. Τα ανόργανα συστατικά που περιέχονται σε mg/100g πολτού είναι K=1100 , Ca=307, Mg=42, Na=13, Cu=0,23, Fe=104, Mn=0,4 και Zn=0,59. Όσον αφορά τα λιπίδια που περιέχει, αποτελούν ίσες αναλογίες κορεσμένων και ακόρεστων οξέων. Ύστερα από έρευνες βρέθηκαν 5 αμινοξέα σε εκχυλίσματα λοβών. Αυτά είναι η αλανίνη, γλυκίνη, λευκίνη, προλίνη και βαλίνη. Οι Χαραλάμπους και Παπακωνσταντίνου το 1966 ανέφεραν την παρουσία 2 ακόμη αμινοξέων της τυροσίνης και της φαινυλαλανίνης.

Οι δοκιμές διατροφής στον πολτό χαρουπιού έδειξαν πως μόνο 1-2% της πρωτεΐνης που περιέχεται σε αυτόν είναι αφομοιώσιμη και έχει σχετικά χαμηλή μεταβολιζόμενη ενέργεια. Η πρωτεΐνη έχει χαμηλή πεπτικότητα επειδή είναι συνδεδεμένη με τανίνες και φυτικές ίνες. Οι ώριμοι λοβοί έχουν υψηλή ποσότητα συμπυκνωμένων τανινών, περίπου 16-20% ξ.β.

Το φυτρωμένο αλεύρι, το οποίο λαμβάνεται από κοτυληδόνες και έχει περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες 50% είναι κατάλληλο για τη διατροφή ανθρώπων και ζώων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Περί Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά είναι φυσικές ουσίες ικανές να αποτρέψουν ή να καθυστερήσουν την οξειδωτική βλάβη στα κύτταρα του σώματος. Τα αντιοξειδωτικά είναι μόρια που μπορούν να εξουδετερώσουν τις ελεύθερες ρίζες προσφέροντας ένα ηλεκτρόνιο ή άτομο υδρογόνου στην ελεύθερη ρίζα, σταθεροποιώντας την. Οι ελεύθερες ρίζες είναι εξαιρετικά αντιδραστικά μόρια που παράγονται κατά τη διάρκεια φυσιολογικών κυτταρικών διεργασιών, όπως ο μεταβολισμός. Ωστόσο μπορούν να παραχθούν και ως απόκριση σε περιβαλλοντικούς στρεσογόνους παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία, η ατμοσφαιρική ρύπανση και ο καπνός του τσιγάρου. Όταν οι ελεύθερες ρίζες δεν εξουδετερώνονται, μπορούν να βλάψουν το DNA, τις πρωτεΐνες και άλλες κυτταρικές δομές, οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο ή μεταλλάξεις που μπορούν να συμβάλουν στην ανάπτυξη χρόνιων ασθενειών όπως ο καρκίνος, οι καρδιακές παθήσεις και οι νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Υπάρχουν διάφοροι τύποι αντιοξειδωτικών, όπως βιταμίνες (όπως οι βιταμίνες C και E), μέταλλα (όπως το σελήνιο) και φυτοχημικά (όπως τα φλαβονοειδή και τα καροτενοειδή). Κάθε τύπος αντιοξειδωτικού έχει μοναδικό μηχανισμό δράσης και βρίσκεται σε διαφορετικά τρόφιμα.

2.2 Κατηγοριοποίηση Αντιοξειδωτικών

Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με πολλούς τρόπους.

- Με βάση τη **δραστηριότητά** τους, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε ενζυμικά και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά.

Τα *ενζυμικά* αντιοξειδωτικά λειτουργούν διασπώντας και απομακρύνοντας τις ελεύθερες ρίζες. Τα αντιοξειδωτικά ένζυμα μετατρέπουν τα επικίνδυνα οξειδωτικά προϊόντα σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) και στη συνέχεια σε νερό, σε μια διαδικασία πολλών βημάτων παρουσία συμπαραγόντων όπως ο χαλκός, ο ψευδάργυρος, το μαγγάνιο και ο σίδηρος.

Τα *μη ενζυμικά* αντιοξειδωτικά λειτουργούν διακόπτοντας τις αλυσιδωτές αντιδράσεις των ελεύθερων ριζών. Μερικά παραδείγματα μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, η φυτική πολυφαινόλη, τα καροτενοειδή και η γλουταθειόνη.

- Ο άλλος τρόπος κατηγοριοποίησης των αντιοξειδωτικών βασίζεται στη **διαλυτότητα** τους στο νερό ή στα λιπίδια. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε υδατοδιαλυτά και λιποδιαλυτά αντιοξειδωτικά.

Τα *υδατοδιαλυτά* αντιοξειδωτικά (π.χ. βιταμίνη C) υπάρχουν στα κυτταρικά υγρά, όπως το κυτταρόλυμα ή η κυτταροπλασματική μήτρα.

Τα *λιποδιαλυτά* αντιοξειδωτικά (π.χ. βιταμίνη E, καροτενοειδή και λιποϊκό οξύ) βρίσκονται κυρίως στις κυτταρικές μεμβράνες.

- Τα αντιοξειδωτικά μπορούν επίσης να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με το μέγεθός τους, τα μικρομοριακά αντιοξειδωτικά και τα μεγαλομοριακά αντιοξειδωτικά.

Τα *μικρομοριακά* αντιοξειδωτικά εξουδετερώνουν τις ROS (reactive oxygen species) σε μια διαδικασία που ονομάζεται απορρύπανση ριζών και τις απομακρύνουν.

Τα κυριότερα αντιοξειδωτικά αυτής της κατηγορίας είναι η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή και η γλουταθειόνη (GSH).

Τα αντιοξειδωτικά *μεγάλων μορίων* είναι ένζυμα (SOD, CAT και GSHPx) και θυσιαστικές πρωτεΐνες (αλβουμίνη) που απορροφούν τις ROS και τις εμποδίζουν να επιτεθούν σε άλλες βασικές πρωτεΐνες. Για να κατανοήσουμε τον μηχανισμό δράσης

των αντιοξειδωτικών, είναι απαραίτητο να κατανοήσουμε τη δημιουργία των ελεύθερων ριζών και τις βλαπτικές αντιδράσεις τους.

2.3 Συστήματα Αντιοξειδωτικής Άμυνας.

Οι ρίζες έχουν την ικανότητα να αντιδρούν με αδιάκριτο τρόπο οδηγώντας σε βλάβες σχεδόν σε κάθε κυτταρικό συστατικό. Για αυτό υπάρχει ένα εκτεταμένο φάσμα αντιοξειδωτικών αμυντικών συστημάτων, τόσο ενδογενών όσο και εξωγενών, για την προστασία των κυτταρικών συστατικών από βλάβες που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Αυτές μπορούν να χωριστούν σε τρεις κύριες ομάδες:

➤ Αντιοξειδωτικά ένζυμα

Η καταλάση ήταν το πρώτο αντιοξειδωτικό ένζυμο που χαρακτηρίστηκε και καταλύει τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε υδατικό οξυγόνο σε δύο στάδια. Η σταθερά ταχύτητας για τις αντιδράσεις αυτές είναι εξαιρετικά υψηλή ($\approx 10^7$ M/sec), γεγονός που σημαίνει ότι είναι πρακτικά αδύνατο να κορεστεί το ένζυμο *in vivo*. Η καταλάση βρίσκεται σε μεγάλο βαθμό εντός των κυττάρων στα υπεροξισώματα, τα οποία περιέχουν τα περισσότερα από τα ένζυμα που είναι ικανά να παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η ποσότητα της καταλάσης στο κυτταρόπλασμα και σε άλλα υποκυτταρικά διαμερίσματα παραμένει ασαφής, για τον λόγο ότι τα υπεροξισώματα διαρρηγνύονται εύκολα κατά τη διάρκεια του χειρισμού των κυττάρων. Η μεγαλύτερη δραστηριότητα υπάρχει στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα, ωστόσο μικρή ποσότητα καταλάσης υπάρχει σε όλους τους ιστούς.

Οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης καταλύουν την οξείδωση της γλουταθειόνης σε βάρος ενός υδροϋπεροξειδίου, το οποίο μπορεί να είναι υπεροξείδιο του υδρογόνου ή άλλο είδος, όπως ένα υδροϋπεροξείδιο των λιπιδίων. Άλλα υπεροξειδία, συμπεριλαμβανομένων των υδροϋπεροξειδίων των λιπιδίων, μπορούν

επίσης να λειτουργήσουν ως υποστρώματα για αυτά τα ένζυμα, τα οποία θα μπορούσαν επομένως να διαδραματίσουν ρόλο στην αποκατάσταση των βλαβών που προκύπτουν από την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Αρκετά ένζυμα υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης κωδικοποιούνται από διακριτά γονίδια. Η μορφή της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στο πλάσμα πιστεύεται ότι συντίθεται κυρίως στους νεφρούς. Εντός των κυττάρων, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίζονται στο ήπαρ, αν και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ευρέως κατανεμημένη σε όλους σχεδόν τους ιστούς. Η κυρίαρχη υποκυτταρική κατανομή είναι στο κυτταρόλυμα και τα μιτοχόνδρια, γεγονός που υποδηλώνει ότι η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι ο κύριος αποδέκτης του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αυτά τα υποκυτταρικά διαμερίσματα. Η δραστηριότητα του ενζύμου εξαρτάται από τη συνεχή διαθεσιμότητα ανηγμένης γλουταθειόνης. Ο λόγος της ανηγμένης προς την οξειδωμένη γλουταθειόνη διατηρείται συνήθως πολύ υψηλός ως αποτέλεσμα της δραστηριότητας του ενζύμου αναγωγή της γλουταθειόνης

➤ Αντιοξειδωτικά που σπάνε αλυσίδες

Κάθε φορά που μια ελεύθερη ρίζα αλληλεπιδρά με ένα άλλο μόριο, μπορεί να δημιουργηθούν δευτερογενείς ρίζες. Ένα παράδειγμα μιας τέτοιας αντίδρασης είναι η υπεροξειδωση των λιπιδίων, όπου η αντίδραση αυτή θα συνεχίσει να διαδίδεται μέχρις ότου οι ρίζες να συνδυαστούν για να δημιουργήσουν ένα σταθερό προϊόν ή μια άλλη ρίζα να εξουδετερωθεί από ένα αντιοξειδωτικό που σπάει τις αλυσίδες. Τα αντιοξειδωτικά αυτά είναι μικρά μόρια που μπορούν να λάβουν ένα ηλεκτρόνιο από μια ρίζα ή να δώσουν ένα ηλεκτρόνιο σε μια ρίζα με το σχηματισμό σταθερών παραπροϊόντων. Γενικά, το φορτίο που σχετίζεται με την παρουσία ενός μη εξασθενημένου ηλεκτρονίου διαχωρίζεται πάνω από το αντιοξειδωτικό και το

προκύπτουν προϊόν δεν θα δέχεται εύκολα ένα ηλεκτρόνιο από ένα άλλο μόριο, αποτρέποντας την περαιτέρω εξάπλωση της αλυσιδωτής αντίδρασης. Τέτοια αντιοξειδωτικά μπορούν να χωριστούν σε αντιοξειδωτικά υδατικής φάσης και αντιοξειδωτικά λιπιδικής φάσης.

Είναι ζωτικής σημασίας να θυμόμαστε ότι *in vivo* είναι πιθανό να υπάρχουν πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντιοξειδωτικών. Για παράδειγμα, είναι πιθανό το ασκορβικό οξύ να ανακυκλώνει τη ρίζα τοκοφερόλης στη διεπιφάνεια υδατικού-λιπιδίων, αναγεννώντας έτσι την τοκοφερόλη. Αυτό μπορεί να έχει καθοριστική σημασία για τη διατήρηση των συγκεντρώσεων της τοκοφερόλης στις λιποπρωτεΐνες και τις μεμβράνες. Με παρόμοιο τρόπο, η γλουταθειόνη μπορεί να αναγεννήσει το ασκορβικό από το δεϋδροασκορβικό. Επομένως, είναι πιθανό να υπάρχει μια σύνθετη αλληλεπίδραση μεταξύ των αντιοξειδωτικών, γεγονός που καθιστά δύσκολη την πρόβλεψη του τρόπου λειτουργίας των αντιοξειδωτικών *in vivo*. Μια δεύτερη σημαντική ιδιότητα των αντιοξειδωτικών που σπάνε την αλυσίδα είναι η ικανότητά τους να δρουν ως προ-οξειδωτικά. Υπό ορισμένες συνθήκες, η παρουσία ενός αντιοξειδωτικού μπορεί παραδόξως να οδηγήσει σε αυξημένη οξειδωτική βλάβη. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι η χορήγηση βιταμίνης C μπορεί μερικές φορές να οδηγήσει σε αύξηση της οξειδωτικής βλάβης, ιδίως εάν χορηγείται επίσης σίδηρος. Ομοίως, έχει αποδειχθεί σαφώς *in vitro* ότι η τοκοφερόλη μπορεί να προάγει την οξείδωση της LDL απουσία ενός αντιοξειδωτικού υδατικής φάσης, όπως το ασκορβικό. Το κατά πόσον οι αντιδράσεις αυτές είναι σημαντικές *in vivo* δεν είναι ακόμη σαφές. Ωστόσο, η πιθανότητα τα αντιοξειδωτικά να έχουν προοξειδωτικές επιδράσεις *in vivo* πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά το σχεδιασμό και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των κλινικών δοκιμών χορήγησης αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων.

➤ Πρωτεΐνες που δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης.

Οι πρωτεΐνες που δεσμεύουν μέταλλα μετάπτωσης (φερριτίνη, τρανσφερρίνη, λακτοφερρίνη και καϋρουλοπλασμίνη) δρουν ως ένα σημαντικό συστατικό του συστήματος αντιοξειδωτικής άμυνας, δεσμεύοντας το σίδηρο και το χαλκό, έτσι ώστε να μην είναι διαθέσιμα για το σχηματισμό της ρίζας υδροξυλίου. Η κύρια πρωτεΐνη δέσμησης χαλκού, η καερουλοπλασμίνη, μπορεί επίσης να λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό ένζυμο που μπορεί να καταλύσει την οξείδωση του δισθενούς σιδήρου. Είναι η μορφή του σιδήρου που κινεί την αντίδραση Fenton και η ταχεία οξείδωση του Fe^{2+} προς τη λιγότερο δραστική μορφή Fe^{3+} έχει επομένως αντιοξειδωτική δράση.

Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τις ROS έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης πολλών ασθενειών, όπως φλεγμονώδη νοσήματα, καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνος, διαβήτης, νόσος Αλτσχάιμερ, καταρράκτης, αυτισμός και γήρανση. Τα αντιοξειδωτικά μπορούν να αντιδράσουν άμεσα με τις αντιδραστικές ρίζες για να τις καταστρέψουν με την αποδοχή ή τη δωρεά ηλεκτρονίου(ων) για να εξαλείψουν τη μη ζευγαρωμένη κατάσταση της ρίζας, ή μπορούν να μειώσουν έμμεσα το σχηματισμό των ελεύθερων ριζών αναστέλλοντας τις δραστηριότητες ή τις εκφράσεις των ενζύμων που παράγουν ελεύθερες ρίζες ή ενισχύοντας τις δραστηριότητες και τις εκφράσεις άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Πολλά ερευνητικά μοντέλα έχουν δημιουργηθεί σε χημικά ή/και βιολογικά συστήματα για τη μελέτη των μηχανισμών δράσης των αντιοξειδωτικών και για τον εντοπισμό νέων αντιοξειδωτικών, ιδίως από φυσικές ουσίες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Περί Folin Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των ολικών φαινολών σε διάφορα δείγματα. Η μέθοδος αυτή, που αναπτύχθηκε από τους Otto Folin και Vintilă Ciocalteu στις αρχές του 20ού αιώνα, εξελίχθηκε σε ένα ισχυρό εργαλείο για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας και του βιοδραστικού δυναμικού φυσικών προϊόντων, όπως φρούτα, λαχανικά, ποτά και φαρμακευτικά φυτά.

3.2 Αρχή της μεθόδου Folin Ciocalteu

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu βασίζεται στην αρχή των αντιδράσεων οξείδωσης-αναγωγής. Στο πλαίσιο αυτό, η οξείδωση αναφέρεται στην απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ η αναγωγή περιλαμβάνει την απόκτηση ηλεκτρονίων. Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αποτελεί βασικό συστατικό της μεθόδου και η σύνθεσή του παίζει καθοριστικό ρόλο στην αντίδραση. Αποτελείται από ένα μείγμα φωσφομολυβδικού και φωσφοτουγγικού οξέος διαλυμένων σε υδατικό διάλυμα. Το αντιδραστήριο δρα ως οξειδωτικός παράγοντας, ξεκινώντας την οξειδοαναγωγική αντίδραση με τις φαινολικές ενώσεις. Οι φαινολικές ενώσεις είναι φυσικές οργανικές ενώσεις που περιέχουν μία ή περισσότερες ομάδες υδροξυλίου συνδεδεμένες με έναν αρωματικό δακτύλιο. Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και είναι ευρέως διαδεδομένες σε διάφορα φυτικά υλικά. Η μέθοδος Folin-Ciocalteu επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις μέσω της μέτρησης του δυναμικού αναγωγής των φαινολικών ενώσεων.

Τα φωσφομολυβδαινικά και φωσφοτουγγιστικά οξέα υφίστανται αναγωγή κατά την αντίδραση με τις φαινολικές ενώσεις, με αποτέλεσμα το σχηματισμό συμπλόκων

μπλε χρώματος. Αυτά τα σύμπλοκα απορροφούν φως σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, επιτρέποντας την ποσοτικοποίηση της περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά. Η συγκέντρωση του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu που χρησιμοποιείται στην ανάλυση είναι μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να βελτιστοποιηθεί για να εξασφαλιστούν ακριβή αποτελέσματα.

3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την δοκιμή Folin Ciocalteu

Ο ακριβής προσδιορισμός του ολικού φαινολικού περιεχομένου με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Η κατανόηση και ο έλεγχος αυτών των παραγόντων είναι ζωτικής σημασίας για την εξασφάλιση αξιόπιστων και αναπαραγώγιμων αποτελεσμάτων.

Η φύση και η σύνθεση των αναλυτών που εξετάζονται μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ανάλυση Folin-Ciocalteu. Οι διάφορες φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν διακυμάνσεις στην αντιδραστικότητά τους και στις αναγωγικές τους ικανότητες. Για παράδειγμα, ορισμένες φαινολικές ενώσεις μπορεί να αντιδρούν ευκολότερα με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, οδηγώντας σε υψηλότερες τιμές απορρόφησης, ενώ άλλες μπορεί να παρουσιάζουν χαμηλότερη αντιδραστικότητα. Επομένως, η παρουσία διαφορετικών φαινολικών ενώσεων στη μήτρα του δείγματος μπορεί να επηρεάσει την ακρίβεια της ανάλυσης. Είναι σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη αυτή η μεταβλητότητα και να προσαρμόζεται ανάλογα η ανάλυση ή να εφαρμόζονται πρόσθετες τεχνικές διαχωρισμού, όπως εκχύλιση υγρού-υγρού ή εκχύλιση στερεάς φάσης, για την απομόνωση συγκεκριμένων φαινολικών ενώσεων ενδιαφέροντος.

Το pH του μείγματος αντίδρασης είναι μια κρίσιμη παράμετρος που επηρεάζει τη δοκιμασία Folin-Ciocalteu. Το βέλτιστο εύρος pH για την αντίδραση βρίσκεται μεταξύ 5 και 8.

Σε ακραίες τιμές pH ενδέχεται να επηρεαστεί η ανάπτυξη χρώματος και ο σχηματισμός συμπλόκων, οδηγώντας σε ανακριβή αποτελέσματα. Η διατήρηση του pH εντός του κατάλληλου εύρους είναι απαραίτητη και συχνά χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά, όπως το ανθρακικό νάτριο, για τον έλεγχο του pH.

Η *θερμοκρασία* είναι ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει την κινητική της αντίδρασης και τη σταθερότητα της ανάλυσης Folin-Ciocalteu. Γενικά, η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου, περίπου 25-30°C. Σημαντικές αποκλίσεις από τη βέλτιστη θερμοκρασία μπορεί να οδηγήσουν σε διακυμάνσεις του ρυθμού αντίδρασης και της ανάπτυξης χρώματος. Συνιστάται η διεξαγωγή της ανάλυσης υπό ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας για να διασφαλιστεί η αναπαραγωγιμότητα.

Η *συγκέντρωση* του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu που χρησιμοποιείται στην ανάλυση παίζει καθοριστικό ρόλο στη λήψη ακριβών αποτελεσμάτων. Η βέλτιστη συγκέντρωση μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με την περιεκτικότητα του εξεταζόμενου δείγματος σε φαινόλες. Υψηλότερες συγκεντρώσεις του αντιδραστήριου μπορεί να οδηγήσουν σε υπερβολική ανάπτυξη χρώματος, καθιστώντας δύσκολη την ακριβή μέτρηση της απορρόφησης. Αντίθετα, η χρήση χαμηλότερης συγκέντρωσης μπορεί να οδηγήσει σε ασθενή ανάπτυξη χρώματος, οδηγώντας σε υποεκτίμηση της περιεκτικότητας σε φαινόλες. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να προσδιοριστεί η κατάλληλη συγκέντρωση του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu μέσω πειραμάτων βελτιστοποίησης.

Η *διάρκεια του χρόνου* αντίδρασης είναι μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά την εκτέλεση της ανάλυσης Folin-Ciocalteu. Η αντίδραση μεταξύ των φαινολικών ενώσεων και του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu χρειάζεται

χρόνο για να ολοκληρωθεί. Ανεπαρκής χρόνος αντίδρασης μπορεί να οδηγήσει σε ατελή ανάπτυξη χρώματος και σε υποεκτίμηση της περιεκτικότητας σε φαινόλες. Αντίθετα, η υπερβολική παράταση του χρόνου αντίδρασης μπορεί να οδηγήσει σε σκούρο χρώμα και πιθανή αποικοδόμηση των σχηματιζόμενων συμπλόκων. Είναι σημαντικό να προσδιοριστεί ο βέλτιστος χρόνος αντίδρασης με την παρακολούθηση της κινητικής ανάπτυξης του χρώματος και τη διασφάλιση της γραμμικότητας της ανάλυσης.

Διάφορες ουσίες που υπάρχουν στη μήτρα του δείγματος μπορούν να παρεμποδίσουν την ανάλυση Folin-Ciocalteu, οδηγώντας σε ανακριβή αποτελέσματα. Οι συνήθεις ουσίες παρεμβολής περιλαμβάνουν αναγωγικούς παράγοντες, ασκορβικό οξύ, σάκχαρα και άλλες μη φαινολικές ενώσεις. Αυτές οι ουσίες μπορούν να αντιδράσουν με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη χρώματος που δεν σχετίζεται με την περιεκτικότητα σε φαινόλες. Για τον μετριάσμό αυτών των παρεμβολών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατάλληλες τεχνικές προετοιμασίας του δείγματος, όπως η απομάκρυνση ή η μείωση των ουσιών που παρεμβάλλονται μέσω διήθησης, αιμοκάθαρσης ή ενζυμικών επεξεργασιών. Επιπλέον, η χρήση τυφλών δειγμάτων και πειραμάτων ελέγχου μπορεί να βοηθήσει στον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των παρεμβολών, επιτρέποντας τη διόρθωση και τον ακριβή προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά.

3.4 Εφαρμογές της μεθόδου

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu βρίσκει εκτεταμένη εφαρμογή σε διάφορους τομείς λόγω της ικανότητάς της να αξιολογεί την ολική περιεκτικότητα των δειγμάτων σε φαινόλες. Ακολουθούν ορισμένες βασικές εφαρμογές της μεθόδου Folin-Ciocalteu:

➤ Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας:

Οι φαινολικές ενώσεις διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Η μέθοδος Folin-Ciocalteu επιτρέπει τον προσδιορισμό της ολικής περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις, παρέχοντας ένα έμμεσο μέτρο της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός δείγματος. Με τον ποσοτικό προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε φαινόλες, οι ερευνητές μπορούν να αξιολογήσουν το δυναμικό φυσικών προϊόντων, όπως φρούτα, λαχανικά και φυτικά εκχυλίσματα, ως πηγές αντιοξειδωτικών. Η εφαρμογή αυτή είναι πολύτιμη σε διατροφικές μελέτες, στη διαμόρφωση διατροφικών συμπληρωμάτων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά και στην ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων.

➤ Αξιολόγηση βιοδραστικών ενώσεων:

Πέρα από την αντιοξειδωτική τους ικανότητα, οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένων αντιφλεγμονωδών, αντιμικροβιακών, αντικαρκινικών και νευροπροστατευτικών επιδράσεων. Η μέθοδος Folin-Ciocalteu βοηθά στην αξιολόγηση του βιοδραστικού δυναμικού των δειγμάτων με τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής περιεκτικότητας σε φαινολικά συστατικά. Οι ερευνητές μπορούν να συσχετίσουν την περιεκτικότητα σε φαινόλες με τις παρατηρούμενες βιολογικές δραστηριότητες, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τα οφέλη για την υγεία και το θεραπευτικό δυναμικό των φυσικών προϊόντων. Η εφαρμογή αυτή είναι σχετική με τη φαρμακευτική έρευνα, τον φυτοχημικό έλεγχο και την ανακάλυψη νέων κύριων ενώσεων.

➤ Ποιοτικός έλεγχος και τυποποίηση:

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu χρησιμεύει ως πολύτιμο εργαλείο για τον έλεγχο ποιότητας και την τυποποίηση σε βιομηχανίες όπως τα τρόφιμα, τα ποτά και η φυτική ιατρική. Επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών ενώσεων, οι οποίες συμβάλλουν στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, τη διατροφική αξία και τη διάρκεια ζωής των προϊόντων. Με τον καθορισμό τυποποιημένων διαδικασιών και τιμών αναφοράς, οι κατασκευαστές μπορούν να διασφαλίσουν τη συνοχή και την αποτελεσματικότητα των προϊόντων τους. Η εφαρμογή αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αξιολόγηση εκχυλισμάτων βοτάνων, τσαγιών, κρασιών και άλλων σκευασμάτων πλούσιων σε πολυφαινόλες.

➤ Σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων:

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu διευκολύνει τη σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων με βάση την ολική περιεκτικότητά τους σε φαινόλες. Οι ερευνητές μπορούν να χρησιμοποιήσουν αυτή τη μέθοδο για να αξιολογήσουν τις διαφορές στη φαινολική σύνθεση μεταξύ διαφορετικών φυτικών ειδών, ποικιλιών ή γεωγραφικής προέλευσης. Επιτρέπει επίσης τη σύγκριση διαφορετικών τεχνικών επεξεργασίας, συνθηκών αποθήκευσης και μεθόδων εκχύλισης όσον αφορά την επίδρασή τους στη φαινολική περιεκτικότητα. Με την ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων, οι ερευνητές μπορούν να εντοπίσουν πηγές με υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινόλες, να βελτιστοποιήσουν τις διαδικασίες εκχύλισης και να λάβουν τεκμηριωμένες αποφάσεις σχετικά με την επιλογή και τη χρήση των πρώτων υλών.

3.5 Περιορισμοί και προκλήσεις

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu, όπως κάθε αναλυτική τεχνική, έχει τους περιορισμούς και τις προκλήσεις της. Η κατανόηση αυτών των περιορισμών είναι ζωτικής σημασίας για την ακριβή ερμηνεία των αποτελεσμάτων και τη λήψη

τεκμηριωμένων αποφάσεων. Ακολουθούν ορισμένοι βασικοί περιορισμοί και προκλήσεις που σχετίζονται με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu:

➤ Επιλεκτικότητα και εξειδίκευση:

Ένας από τους περιορισμούς της μεθόδου Folin-Ciocalteu είναι η έλλειψη εκλεκτικότητας και ειδικότητας έναντι των φαινολικών ενώσεων. Ενώ η μέθοδος μετρά τη συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες, δεν κάνει διάκριση μεταξύ διαφορετικών κατηγοριών φαινολικών ή δεν προσδιορίζει συγκεκριμένες ενώσεις. Αυτή η έλλειψη επιλεκτικότητας μπορεί να αποτελέσει πρόκληση κατά την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων που περιέχουν διάφορες φαινολικές ενώσεις. Συχνά χρησιμοποιούνται πρόσθετες τεχνικές διαχωρισμού και ταυτοποίησης, όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ή η φασματομετρία μάζας (MS), για να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός και να παρασχεθούν λεπτομερέστερες πληροφορίες σχετικά με μεμονωμένες φαινολικές ενώσεις.

➤ Μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων:

Η μέθοδος Folin-Ciocalteu μπορεί να εμφανίσει μεταβλητότητα στα αποτελέσματα λόγω διαφόρων παραγόντων. Παράγοντες όπως η φύση του δείγματος, οι μέθοδοι προετοιμασίας του δείγματος, οι διακυμάνσεις του pH και η κινητική της αντίδρασης μπορούν να επηρεάσουν την ακρίβεια και την αναπαραγωγικότητα της ανάλυσης. Η παρουσία παρεμβαλλόμενων ουσιών, οι διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και οι ασυνέπειες στην προετοιμασία των αντιδραστηρίων μπορούν επίσης να συμβάλουν στη μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων. Είναι ζωτικής σημασίας ο

έλεγχος και η βελτιστοποίηση αυτών των μεταβλητών για τη διασφάλιση συνεπών και αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

➤ Παρεμβολές από μη φαινολικές ενώσεις:

Οι μη φαινολικές ενώσεις που υπάρχουν στη μήτρα του δείγματος μπορούν να παρεμποδίσουν τη δοκιμασία Folin-Ciocalteu, οδηγώντας σε ανακριβή αποτελέσματα. Ουσίες όπως αναγωγικοί παράγοντες, σάκχαρα, πρωτεΐνες και χρωστικές ουσίες μπορούν να αντιδράσουν με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη χρώματος που δεν σχετίζεται με την περιεκτικότητα σε φαινόλες. Αυτές οι παρεμβολές μπορούν να υπερεκτιμήσουν την περιεκτικότητα σε φαινόλες ή να εισάγουν θόρυβο στη μέτρηση. Προσεκτικές τεχνικές προετοιμασίας του δείγματος, όπως διήθηση, αιμοκάθαρση ή ενζυμικές επεξεργασίες, μπορούν να συμβάλουν στον μετριασμό των παρεμβολών και στη βελτίωση της ακρίβειας της ανάλυσης.

➤ Θέματα τυποποίησης:

Η τυποποίηση είναι ζωτικής σημασίας για τη διασφάλιση ακριβών και συγκρίσιμων αποτελεσμάτων κατά τη χρήση της μεθόδου Folin-Ciocalteu. Ωστόσο, η τυποποίηση μπορεί να αποτελέσει πρόκληση λόγω της έλλειψης ενός καθολικά αποδεκτού προτύπου αναφοράς για την ολική περιεκτικότητα σε φαινόλες. Το γαλλικό οξύ χρησιμοποιείται συνήθως ως πρότυπο βαθμονόμησης, αλλά οι διαφοροποιήσεις στην επιλογή των προτύπων, η καθαρότητα των προτύπων και οι διαφορές στις διαδικασίες βαθμονόμησης μπορούν να επηρεάσουν τη συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών μελετών. Για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος καταβάλλονται προσπάθειες για τη δημιουργία κοινών υλικών αναφοράς και τυποποιημένων πρωτοκόλλων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Ανθρώπινη Μικροχλωρίδα

Είναι γνωστό ότι το «ανθρώπινο μικροβίωμα» αποτελεί ένα αρκετά ενδιαφέρον θέμα μελέτης και έρευνας για πολλούς επιστήμονες λόγω της σπουδαιότητας και της πολυπλοκότητας που το διακατέχει. Υπάρχουν και άλλοι όροι που χρησιμοποιούνται για την αναφορά σε αυτό όπως «φυσιολογική μικροχλωρίδα», «αυτόχθονη μικροχλωρίδα», «συμβιωτική μικροχλωρίδα» ωστόσο έχει επικρατήσει το «ανθρώπινο μικροβίωμα». Μέσω του όρου αυτού υποδηλώνεται το σύνολο των βακτηρίων, ιών, μυκήτων και παρασίτων που απαντώνται σε διάφορες περιοχές του ανθρώπινου σώματος (μέσα και πάνω). Ανάλογα με το σημείο που βρίσκεται το μικροβίωμα λαμβάνει και την χαρακτηριστική ονομασία του οργάνου και κατηγοριοποιείται στα παρακάτω:

- a. Μικροβίωμα στόματος
- b. Μικροβίωμα ανώτερου αναπνευστικού συστήματος
- c. Μικροβίωμα οισοφάγου
- d. Μικροβίωμα δέρματος
- e. Μικροβίωμα ουροποιογεννητικού συστήματος
- f. Εντερικό μικροβίωμα κλπ.

Είναι αρκετά σημαντικό και ενδιαφέρον να τονίσουμε κάποια αποτελέσματα που έχουν προκύψει ύστερα από εκτενείς μελέτες και έρευνες σχετικά με το ανθρώπινο μικροβίωμα. Αναλυτικότερα έχει υπολογιστεί ότι ο αριθμός των μικροοργανισμών που

σημειώνονται στο μικροβίωμα είναι κοντά στους 100 τρισεκατομμύρια εκ των οποίων το 90% αυτών απαντώνται στο έντερο. Θεωρείται ότι είναι δέκα φορές περισσότερα από τα κύτταρα που αποτελούν το ανθρώπινο σώμα ενώ ζυγίζουν περίπου 2 κιλά , όσο ζυγίζουν περίπου και τα υπόλοιπα όργανα του ανθρώπινου οργανισμού. Δίνοντας έναν πιο παραστατικό τόνο θα μπορούσε κανείς να δηλώσει ότι ένας άνθρωπος ποσοστιαία συγκροτείται από 90% μικρόβια ενώ το υπόλοιπο 10% αποτελεί «ανθρώπινο υλικό» γεγονός που μπορεί να προσδώσει στον άνθρωπο το χαρακτηρισμό του υπέρ-οργανισμού και όχι απλά του οργανισμού. Ο εντερικός αυλός έχει υπολογιστεί ότι περιέχει περίπου από 800 βακτήρια και 7000 γένη αυτών. Δεδομένου της αριθμητικής υπεροχής των βακτηρίων από τα ανθρώπινα κύτταρα είναι εύκολα αντιληπτό ότι και τα γονίδια αυτών θα υπερισχύουν και μάλιστα θεωρείται ότι είναι εκατό φορές περισσότερα από τα αντίστοιχα γονίδια των κυττάρων. Τέλος υπολογίζεται ότι τα μικρόβια αριθμούν γύρω στα 10.000 είδη σε όλο το σώμα εκ των οποίων 1000 είδη εντοπίζονται στο έντερο. Διαπιστώνουμε ότι η ύπαρξη τους στο ανθρώπινο σώμα καθώς και η σημαντική συμβολή τους στην ομαλή λειτουργία του οργανισμού είναι αξιοσημείωτη πράγμα που έχει οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα στο να θεωρεί ότι αποτελεί ξεχωριστό, ιδιαίτερα δραστήριο όργανο το οποίο το χαρακτηρίζουν και ως «ξεχασμένο».



Εικόνα 4 Εικονική σύνθεση ανθρώπινου οργανισμού

4.2 Εντερικό Μικροβίωμα

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως το γαστρεντερολογικό σύστημα αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό μικροβίων αποτελώντας έτσι ένα οικοσύστημα με ιδιαίτερη συμβολή αλλά και εξαιρετική συνθετότητα. Το σύστημα αυτό αποτελείται από 19 οικογένειες βακτηρίων εκ των οποίων πάνω από 50 γένη ανήκουν εκεί. Στα γένη αυτά περιέχονται 450-550 είδη βακτηρίων από τα οποία έχει αποδειχθεί ότι στελέχη των *Bifidobacteria* αλλά και των *Lactobacilli* προσδίδουν μια ξεχωριστή ταυτότητα εξαιτίας της μοναδικότητας τους σε κάθε άνθρωπο. Το εντερικό μικροβίωμα περιλαμβάνει περίπου 10¹⁴ κύτταρα μικροβίων σε ένα ενήλικο σώμα ενώ μεγαλύτερη εμφάνιση βακτηρίων συναντάται στο παχύ έντερο, της τάξης των 10¹¹ κύτταρα/g. Τονίζεται ότι η μικροχλωρίδα του εντέρου διαφέρει από τμήμα σε τμήμα στον γαστρεντερικό αυλό και συγκεκριμένα όσον αφορά την διαδρομή από την στοματική κοιλότητα μέχρι και το κόλον εμφανίζεται ιδιαίτερα σύνθετη ως προς την ποσότητα αλλά και ως προς την ποιότητα αυτής. Από τα πιο σημαντικά είδη και γένη βακτηρίων που απαρτίζουν την εντερική μικροχλωρίδα φαίνονται παρακάτω:

Μικροχλωρίδα λεπτού εντέρου	Μικροχλωρίδα παχέος εντέρου
<ol style="list-style-type: none"> 1. Bacteroides spp. 2. Clostridium spp. 3. Enterobacteriaceae 4. Enterococci spp. 5. Lactobacillus spp. 6. Mycobacterium spp. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bacteroides spp. 2. Clostridium spp. 3. Coagulase- negative Staphylococci 4. Enterococci 5. Escherichia coli 6. Fusobacterium spp. 7. Lactobacillus spp. 8. Mycobacterium spp. 9. Peptostreptococcus spp. 10. Proteus spp. 11. Pseudomonas spp. 12. Staphylococcus aureus 13. Streptococci 14. Acinetobacter spp. 15. Actinomyces spp.

Πίνακας 2 Είδη και γένη βακτηρίων εντερικής μικροχλωρίδας

Σε γενικές γραμμές η σύνθεση της εντερική μικροχλωρίδας χαρακτηρίζεται από τα αναερόβια *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium* και *Lactobacillus*. Αναφορικά με τους αερόβιους είναι κυρίως Gram-θετικά κόκκοι, με κυριότερους τους *Enterococci*, *Streptococci* και *Staphylococcus*, και Gram-αρνητικά βακτήρια με κυριότερα την *Escherichia coli* και την *Salmonella*. Σε ένα υγιές εντερικό περιβάλλον είναι σημαντική και η ύπαρξη συμβιωτικών βακτηρίων τα οποία εξασφαλίζουν ισορροπία ισοσταθμίζοντας την τοξική δράση ορισμένων παθογόνων στελεχών. Εκτός από την βακτηριακή ύπαρξη είναι αξιοσημείωτο να υπογραμμίσουμε και την ύπαρξη αερόβιων μυκήτων όπως η *Candida albicans*. Συνοψίζοντας είναι βολικό να καταλήξουν στο ότι τα κύρια φύλλα που απαντώνται στο ανθρώπινο μικροβίωμα τα:

- *Fermicutes* (*Clostridia*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*)
- *Bacteroidetes* (*Bacteroides*, *Prevotella*)
- *Actinobacteria* (*Bifidobacterium*)
- *Verrucomicrobia*
- *Proteobacterium* (*E.coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*)

4.3 Μικροβίωμα παχέος εντέρου

Είναι εύκολα αντιληπτό, παρατηρώντας τον παραπάνω πίνακα, ότι το μεγαλύτερο ποσοστό μικροοργανισμών συναντάται στο τμήμα του παχέος εντέρου και έχει αποτελέσει πεδίο για αρκετές ερευνητικές ενέργειες. Οι μελέτες αυτές βασίζονται κυρίως στο μικροβίωμα των περιττωμάτων. Αναλύσεις πάνω στα κόπρανα των

ανθρώπων έχουν αποδείξει ότι οι μικροοργανισμοί που συναντώνται σε αυτά είναι κυρίως αναερόβιοι και μάλιστα θεωρείται ότι είναι κατά 100-1000 φορές περισσότεροι συγκριτικά με τους αερόβιους. Έχει υπολογιστεί ότι ο συνολικός αριθμός των βακτηρίων ανέρχεται σε 10¹⁰ έως 10¹² cfu ανά γραμμάριο κοπράνων. Οι περιοχές όπως οι βλεννογόνοι, ο αυλός, η βλέννα είναι μικροπεριβάλλοντα και «φωλιές» που επιτρέπουν την ανάπτυξη μικροοργανισμών και βακτηρίων τα οποία έχουν συχνά την τάση να αναπτύσσονται υπό τη μορφή λεπτών στρωμάτων με αποικίες που ονομάζονται Biofilms. Η ανάπτυξη των βακτηρίων σε Biofilms συχνά προσδίδει σε αυτά μια διαφορετική συμπεριφορά ανάπτυξης και ανήκουν στα ίδια γένη έναντι των βακτηρίων που είναι σταθερά προσδεμένα σε μια περιοχή. Τέτοια βακτήρια που συναντώνται στο τμήμα του παχέος εντέρου σχετίζονται με την αποσύνθεση των σύνθετων αδιάλυτων πολυμερών της βλέννας. Βιοψίες και μελέτες δείχνουν ότι στην περιοχή της βλεννογόνου τα κυριότερα γένη που έχουν απομονωθεί είναι τα *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium* και Gram θετικοί κόκκοι. Δεδομένου ότι η διατροφή αποτελεί παράγοντα επηρεασμού της σύνθεσης της μικροχλωρίδας αναλύσεις που αφορούσαν κόπρανα έδειξαν ότι ανθρώπινη διατροφή στηριζόμενη στην λήψη υδατανθράκων έδινε αποτελέσματα υψηλής συγκέντρωσης *Bifidobacterium* σε αυτά. Αντίστοιχα διατροφή πλούσια στην κατανάλωση λίπους έδινε υψηλά αποτελέσματα σε *Bacteroides* ενώ μια στοιχειώδης διατροφή, δηλαδή διατροφή κατά την οποία τα θρεπτικά συστατικά χορηγούνται όσο το δυνατόν πιο κοντά στην στοιχειώδη του μορφή και άρα σε πιο εύπεπτη, είχε σαν αποτέλεσμα την μείωση των ποσοστών *Streptococcus* και *Lactobacillus* στα περιττώματα

Συμπέρασμα των διάφορων μελετών που πραγματοποιούνται στα περιττώματα και αφορούν το τμήμα του παχέος εντέρου είναι ότι παρά τον τρόπο ζωής, την εθνικότητα, και την διατροφή που είναι βασικοί παράγοντες τροποποίησης την

χλωρίδας του εντέρου κάποιοι μικροοργανισμοί απαντώνται κοινοί. Αναλυτικότερα έχει βρεθεί ότι το *Clostridium* συναντάται σε όλα τα ανθρώπινα περιττώματα σε ποσότητα με μέσο όρο $\text{Log}(109.8) / 1\text{g}$ με μάλιστα κυρίαρχο είδος να αποτελεί το *C.perfringens* το οποίο φαίνεται να επηρεάζεται σε ποσοστά από την εθνικότητα και την διατροφή ενώ οι αριθμοί του φαίνεται πως ποικίλουν από βδομάδα σε βδομάδα στα κόπρανα των νεογνών. Μάλιστα συναντάται σε ποσοστό 73% σε δείγματα Γιαπωνέζων ενώ απουσιάζει παντελώς από δείγματα ατόμων που τηρούσαν αυστηρά χορτοφαγική διαίτα ενώ υπάρχει και στις υπόλοιπες πληθυσμιακές ομάδες ανθρώπων. Οι μικροοργανισμοί *Streptococcus* ή *Enterococcus* απαντώνται σε όλες τις ομάδες ανθρώπων σε ένα ποσό της τάξης των $\text{log} (108.9) / 1\text{g}$ κοπράνων. Τα κυριότερα είδη που απομονώθηκαν έδειξαν να είναι πρωτίστως ο *Enterococcus faecalis* και έπειτα τα *E.faecium*, *S.bovis*, *S.lactis*, *S.mitis*, *S.sanguis*. Σε ποσοστό 93% απομονώθηκε από όλες τις πληθυσμιακές ομάδες η *Escherichia coli*. Με κατά μέσο όρο $\text{log} (108.6) / 1\text{g}$ δείγματος. Σε μικρότερα ποσοστά απομονώθηκε το γένος *Citrobacter* ενώ το *Bacillus* φαίνεται πως εντοπίστηκε στο 82% των δειγμάτων με μέσο όρο $\text{log} (105.2) / 1\text{g}$. Τέλος ο *S.aureus* έδωσε το παρών στο 11% των δειγμάτων με μέσο όρο $\text{log} (105.4) / 1\text{g}$.

4.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας

Το ανθρώπινο μικροβίωμα είναι ένα χαρακτηριστικό το οποίο δεν υπάρχει εξ αρχής αλλά το αποκτά ο άνθρωπος μετά από την γέννηση του. Το μικροβίωμα αρχίζει να εμφανίζεται μετά την διαδικασία της γέννας και αποτελείται από μικροοργανισμούς που έχουν εξωτερική προέλευση. Αυτή η συνθήκη έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι με την ενηλικίωση και με το πέρασμα των χρόνων στον εντερικό αυλό εγκαθίσταται μία σύνθετη ομάδα μικροβίων. Η εντερική μικροχλωρίδα παρουσιάζει διακύμανσης καθ' όλη την διάρκεια ζωής του ανθρώπου. Θεωρείται ότι η

εντερική μικροχλωρίδα κατά την διάρκεια της εμβρυακής ζωής ξεκινάει να παίρνει την μορφή της εντός του μηκωνίου ενώ η βασική του πιά μορφή δίδεται μετά το πέρας του νεογνού από τον κόλπο. Το εντερικό μικροβίωμα φαίνεται να επηρεάζεται από ένα πλήθος παραγόντων οι οποίοι επιδρούν τόσο στην σύστασή του ενώ συμβάλουν στην ποικιλομορφία αυτού από άνθρωπο σε άνθρωπο.

➤ Είδος τοκετού:

Ο γαστρεντερικός αυλός των εμβρύων παρουσιάζεται στείρος μικροοργανισμών και η εγκαθίδρυσή τους λαμβάνει χώρα με την διαδικασία του τοκετού, ο οποία ανάλογα με τον τρόπο που θα πραγματοποιηθεί επηρεάζει διαφορετικά την σύνθεσή του. Η γέννηση ενός πλήρους ανάπτυξης νεογέννητου μωρού που πραγματοποιείται με φυσιολογικό τρόπο έχει ως αποτέλεσμα τον εμβολισμό του νεογνού με το κολπικό μικροβίωμα, το μικροβίωμα των μητρικών χλωριδίων και του δέρματος. Έτσι το νεογέννητο φαίνεται να είναι προφυλαγμένο κατά τις πρώτες μέρες της ζωής του, μιας κομβικής περιόδου της ζωής του δεδομένου ότι το ανοσοποιητικό του σύστημα δεν έχει ολοκληρωθεί πλήρως και λόγω των εξωτερικών επιθέσεων-μολύνσεων που δέχεται από το περιβάλλον του. Αντίθετα νεογνά που έχουν γεννηθεί με την μέθοδο της καισαρικής εμβολιάζονται με διαφορετικού είδους μικροβίωμα δεδομένου ότι έρχονται σε επαφή με το δέρμα. Ως επί το πλείστον στην περίπτωση της καισαρικής τα νεογνά εμβολιάζονται με μικροβίωμα του δέρματος, του ιατρικού προσωπικού, των αντικειμένων και γενικά του εξωτερικού περιβάλλοντος τα οποία διαφέρουν στο κάθε ένα νοσοκομειακό περιβάλλον. πιο συγκεκριμένα οι δύο πιο συχνά απαντούμενοι μικροοργανισμοί είναι το *Corynebacterium spp.* και ο *Lactobacillus spp.*

➤ Θηλασμός

Νεογέννητα που έχουν λάβει αποκλειστικό θηλασμό ως μέσο διατροφής φαίνεται να έχουν μια πιο ωφέλιμη μικροχλωρίδα ενισχυμένη με *Bifidobacterium* και ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα από *Fusobacterium* και *E.coli* δεδομένου ότι η υψηλή συγκέντρωση των *Bifidobacterium* συμβάλλει στην μείωση εμφάνισης της *E.coli*. Το μητρικό γάλα φαίνεται να περιέχει 600 διαφορετικά βακτήρια τα οποία διανθίζουν το έντερο του νεογέννητου. Λόγω του ότι το μητρικό γάλα δεν εμφανίζεται στείρο είναι εύκολα αντιληπτό ότι η διαδικασία του θηλασμού εμπλουτίζει το νεογνό με βακτήρια σε αντίθεση με το συνθετικό γάλα φόρμουλας. Αντίθετα βρέφη τα οποία έχουν λάβει τεχνητή μορφή τροφής (γάλα φόρμουλας) φαίνεται να είναι περισσότερο επιρρεπή σε εντερίτιδες προκαλούμενες κυρίως από την *Escherichia coli*, λόγω απουσίας των ωφέλιμων μικροοργανισμών που παρέχονται μέσω του μητρικού γάλακτος.

➤ Διατροφή

Μετά τη βρεφική περίοδο, ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλει και επηρεάζει την ανάπτυξη της ωφέλιμης μικροχλωρίδας είναι η λήψη στερεών τροφών. Παρατηρείται ότι διατροφή πλούσια σε λαχανικά επηρεάζει θετικά την εντερική μικροχλωρίδα σε αντίθεση με την κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων κρέατος. Με την είσοδο της στερεάς τροφής τροποποιείται η μικροχλωρίδα και παρατηρείται εγκατάσταση κυρίως βακτηρίων σήψης όπως είναι το *Clostridium* και το *Bacteroides*. Το εντερικό μικροβίωμα φαίνεται να σταθεροποιείται κατά την ηλικία των 2-4 χρονών όπου ισορροπεί η σχέση μεταξύ ωφέλιμων και παθογόνων βακτηρίων φτάνοντας να σταθεροποιηθεί στην ενήλικη ζωή. Αυτό δικαιολογείται με την εγκατάσταση των *Bacteroidetes* και των *Firmicutes*. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται πως πρώτα αποικίζουν τον εντερικό αυλό αναερόβια προαιρετικά βακτήρια τα οποία

δημιουργούν ευνοϊκές συνθήκες αλλά ρυθμίζουν ανάλογα και το οξειδοαναγωγικό δυναμικό προκειμένου να υπάρξει το κατάλληλο περιβάλλον για ανάπτυξη των αναερόβιων μικροοργανισμών. Τα κυριότερα αναερόβια που συναντώνται είναι τα γένη του *Clostridium* και τα *Bifidobacterium*. Αφού υπάρξει σταθεροποίηση μεταξύ των μικροοργανισμών αυτών επιτυγχάνεται και ομοιόσταση η οποία συμβάλλει στην μη εγκατάσταση άλλων βακτηρίων.

➤ Ηλικία

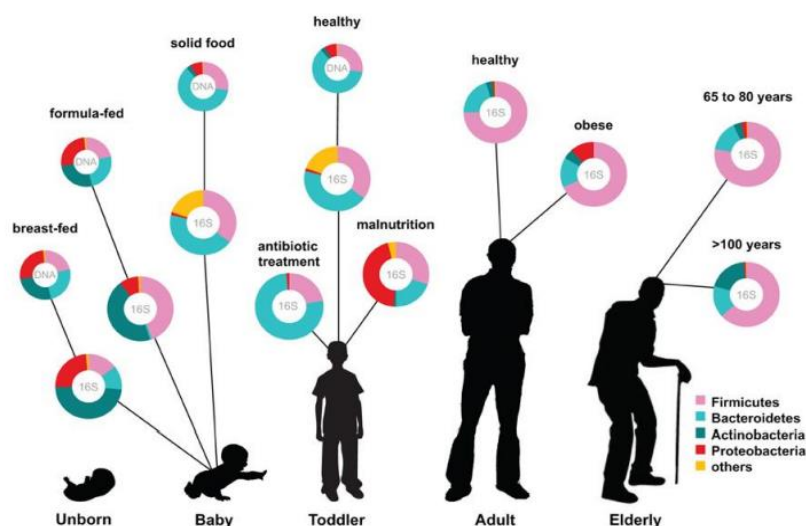
Η εντερική μικροχλωρίδα δείχνει πως μεταβάλλεται με την ηλικία του ανθρώπου. Πιο συγκεκριμένα τα βακτήρια *Bacteroides*, αναερόβιοι κόκκοι και *Eubacterium* φαίνεται να απαντώνται κατά την εισαγωγή στην στερεά τροφή του παιδιού (απογαλακτισμός) και παραμένουν σε μεγάλες συγκεντρώσεις και στις μεγάλες ηλικίες. Όσον αφορά τα *Enterobacteriaceae* μειώνονται στον ενήλικη ζωή συγκριτικά με την παιδική ηλικία και επρόκειτο να αυξηθεί στις πιο μεγάλες ηλικίες. Στους ηλικιωμένους έχει παρατηρηθεί ότι τα *Bifidobacterium* μειώνονται ή και εξαφανίζονται και βρίσκονται σε αφθονία οι *Lactobacillus*, τόσο στους ενήλικες όσο και στους πρώτους, σε αντίθεση με τα αρχικά στάδια της ζωής του ανθρώπου. Στους ηλικιωμένους φαίνεται πως σε υψηλή συγκέντρωση βρίσκονται τα *Enterobacteriaceae*, οι *Enterococcus* και τα *Clostridium* συγκριτικά με τους ενήλικες. Τέλος οι *Staphylococcus* συναντώνται κυρίως σε παιδιά.

➤ Άλλοι παράγοντες

Σημαντική συμβολή στο μικροβίωμα έχουν ασθένειες που μπορεί να περάσει ένας άνθρωπος καθώς και φαρμακευτικές αγωγές τις οποίες μπορεί κατά καιρούς να ακολουθεί, έχοντας σαν αποτέλεσμα την διατάραξη της μικροχλωρίδας. Τα κυριότερα χορηγούμενα φάρμακα που προκαλούν σημαντική αλλαγή στο μικροβίωμα αποτελούν

τα αντιβιοτικά, τα αντιόξινα και τα ανοσοκατασταλτικά. Επιπλέον το στρες δείχνει να επηρεάζει την σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας συμβάλλοντας στο σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου. Τέλος το κάπνισμα αποτελεί παράγοντα διατάραξης της εντερικής μικροχλωρίδας καθώς και επιδείνωσης ή ακόμα και εμφάνισης τόσο της νόσου Crohns όσο και του καρκίνου στο παχύ έντερο. Δεν θα πρέπει να παραλειφθεί να υπογραμμιστεί ο παράγοντας που καλείται καθιστική ζωή και απαντάται σε μεγάλο αριθμό ατόμων της σημερινής εποχής.

4.5 Συμβολή του εντερικού μικροβιώματος στον μεταβολισμό



Εικόνα 5 Είδη μικροβιακής χλωρίδας συναρτήσει της ηλικιακής βαθμίδας

4.5.1. Εντερικό μικροβίωμα και μεταβολισμός

Είναι γνωστό ότι η χολή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της πέψης και της απορρόφησης του λίπους. Τα κυριότερα παραγόμενα συστατικά της χολής προκύπτει ότι είναι τα χολικά άλατα και η χοληστερίνη. Τα χολικά άλατα που εκκρίνονται και εμφανίζονται συνδεδεμένα και κυρίως ρόλος τους είναι να γαλακτωματοποιούν το λίπος σε συνεργασία με την εντερική μικροχλωρίδα. Από την χοληστερίνη προκύπτει το χολικό οξύ και γενοδεοξυχολικό οξύ. Για να αποσυνδεθούν τα χολικά οξέα είναι απαραίτητη η εντερική μικροχλωρίδα. Τα στελέχη των

Bifidobacterium, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Staphylococcus* προκαλούν την υδρόλυση των παραγόμενων χολικών αλάτων. Σημαντική θεωρείται και η συμμετοχή της μικροχλωρίδας του εντέρου στην παραγωγή ουρεάσης (ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση της ουρίας). Η ουρία είναι η κύρια πηγή από την οποία στο έντερο εντοπίζεται αμμωνία. Στελέχη των βακτηρίων *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, αλλά και τα *Bifidobacterium*, τα *Eubacterium* και οι *Lactobacillus*, που είναι αναερόβιοι, είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της ουρεάσης που όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως συντελεί στην διάσπαση της ουρίας δίνοντας τελικά αμμωνία και διοξείδιο του άνθρακα. Έχει υπολογιστεί ότι μέσω της δράσης αυτής των παραπάνω μικροοργανισμών διασπάται ένα ποσοστό ουρίας της τάξης των 40%. Αξίζει να σημειώσουμε ότι η μικροχλωρίδα του εντέρου συμβάλει και στο φαινόμενο της ουραιμίας κατά την οποία ουσιαστικά παρατηρείται αύξηση της ουρίας στο αίμα. Έχει παρατηρηθεί ότι το ποσοστό ουρίας που υδρολύεται στο έντερο μέσω την μικροχλωρίδας του είναι σταθερό λόγω αύξησης των βακτηρίων εκείνων που πραγματοποιούν την διαδικασία αυτή. Δεδομένου της περίσσειας αμμωνίας που παράγεται κατά την ουραιμία ο οργανισμός χρησιμοποιεί αυτή την ποσότητα για βιοσυνθετικές διαδικασίες. Έτσι σαν αποτέλεσμα όλου αυτού του μηχανισμού η αποφυγή διατάραξης του ισοζυγίου του αζώτου και καλύτερευση της εικόνας της νόσου.

Είναι επίσης γνωστό ότι στο παχύ έντερο πραγματοποιείται μια δεύτερη πέψη από την εντερική μικροχλωρίδα σε ουσίες μη εύπεπτες που δεν κατάφεραν να απορροφηθούν στο τμήμα του λεπτού εντέρου λόγω αδυναμίας των πεπτικών ενζύμων του ανθρώπου να διασπάσουν τους χημικούς δεσμούς υδατανθράκων. Τέτοια παραδείγματα ουσιών μπορούν να θεωρηθούν οι ανθεκτικοί τύποι αμύλου, η κυτταρίνη, η ινουλίνη, πεπτίδια, ολιγοσακχαρίτες, πρωτεΐνες και άλλες ουσίες που χαρακτηρίζονται από μικρό μοριακό

βάρος καθώς και γλυκοπρωτεΐνες που συναντώνται στην βλέννα του ανθρώπου. Όλες αυτές οι προαναφερόμενες ουσίες σε συνδυασμό με άλλα σύνθετα προϊόντα του ανθρώπινου οργανισμού όπως είναι εκκρίσεις από το πάγκρεας, μουκοπολυσακχαρίτες (συμβάλλουν στον σωστό προσανατολισμό των ινών του κολλαγόνου) καταλήγουν και διασπώνται από υδρολυτικά ένζυμα που παράγονται από την μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου σε σάκχαρα και αμινοξέα τα οποία με την σειρά τους υπόκεινται την διαδικασία της ζύμωσης από τα ίδια τα βακτήρια της περιοχής.

4.5.2 Εντερική μικροχλωρίδα και SCFA's

Ως SCFA's καλούνται τα εξής λιπαρά με χαρακτηριστικό την κοντή αλυσίδα και τα κυριότερα τις κατηγορίες είναι το βουτυρικό οξύ (C4), το οξικό οξύ (C2), το προπιονικό οξύ (C3), το βαλερικό οξύ (C5), το εξανικό οξύ (C6) και το ισοβουτυρικό και ισοβαλερικό οξύ (με τα τέσσερα τελευταία να απαντώνται κυρίως στο κόλον). Υπολογίζεται ότι τα συγκεκριμένα λιπαρά οξέα προσφέρουν ενέργεια στον ανθρώπινο οργανισμό κατά ένα ποσοστό των 20-25% ενώ η κυριότερη τους λειτουργία είναι να αποτελούν ενέργεια για τα κύτταρα που αφορούν την βλεννογόνο του παχέος εντέρου με σημαντικότερο το βουτυρικό οξύ- το οποίο καταναλώνεται από τα συγκεκριμένα κύτταρα σε ένα ποσοστό του 80-90%. Εκτός αυτού η ύπαρξη του συγκεκριμένου οξέος κρίνεται σημαντική για την ώστε να διεξαχθεί φυσιολογικά η διαδικασία απορρόφησης του Na από το έντερο του ανθρώπου και απουσία αυτού μαρτυρά έλλειψη αυτού. Τα συγκεκριμένα αμινοξέα φαίνεται να είναι συνδεδεμένα με την μικροχλωρίδα του εντέρου επηρεάζοντας την κίνηση του γαστρεντερολογικού μέσω των ορμονών και του νευρικού συστήματος είτε σε ένα μικρό κομμάτι (τοπικά) είτε σε μεγαλύτερη έκταση. Σε άτομα τα οποία φαίνεται να πάσχουν από φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου έρευνες έδειξαν ότι τα SCFA'S βρισκόντουσαν σε χαμηλή συγκέντρωση και για αυτό πια προτείνονται σαν θεραπεία για ίαση ασθενειών που

αφορούν το εντερικό σύστημα. Μελέτες έδειξαν ότι πρόσληψη ενός αξιόλογου ποσοστού ινών δρα προστατευτικά και αποτρεπτικά στην εμφάνιση καρκίνου στο παχύ έντερο και μάλιστα το βουτυρικό οξύ που παράγεται από τις άπεπτες ίνες συμβάλλει στην απόπτωση καρκινικών κυττάρων.

4.5.3 Εντερικό Μικροβίωμα και πρωτεΐνες

Το εντερικό μικροβίωμα πέρα από όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως φαίνεται να έχει ενεργό δράση και στον μεταβολισμό των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες υπόκεινται σε πέψη σε μεγάλο βαθμό λόγω των πεπτικών ενζύμων του ανθρώπινου οργανισμού. Εκτός από τις πρωτεΐνες που λαμβάνει ο άνθρωπος από της διατροφή του μια καθόλου αδιάφορη ποσότητα πρωτεϊνών υπάρχει στα επιθηλιακά νεκρά κύτταρα του γαστρεντερικού, στο παγκρεατικό υγρό και την βλέννα. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι διαθέσιμες και μπορούν να υποστούν ζύμωση από τα βακτήρια παράγοντας SCFA's και σε μεταβολίτες που θα μπορούσαν να γίνουν τοξικοί για τον άνθρωπο όπως είναι τα σουλφίδια, οι αμίνες, ενώσεις αζώτου και φαινολικές ενώσεις.

4.5.4 Εντερικό μικροβίωμα και Βιταμίνες

Αξιοσημείωτη είναι και η δράση συγκεκριμένων μικροοργανισμών σε περιόδους που το σώμα έχει έλλειμα βιταμινών. Συγκεκριμένα η *E.coli* και το στέλεχος *Bacteroides fragilis* συμβάλλουν στην σύνθεση της βιταμίνης K, μιας αρκετά σημαντικής και χρήσιμης βιταμίνης καθώς σχετίζεται με πηκτικότητα του αίματος. Ωστόσο δεν είναι μόνο αυτά τα βακτήρια που συνδράμουν στην παραγωγή βιταμινών αφού και άλλα που απαντώνται στο έντερο είναι υπεύθυνα για την παραγωγή φυλικού οξέος που θεωρείται ότι δρα ενάντια της καρκινογένεσης. Τέλος βακτήρια του τμήματος του λεπτού εντέρου είναι ικανά να συνθέσουν βιοτίνη, βιταμίνες του συμπλέγματος B (B₁, B₆, B₁₂) και νικοτινικού οξέος.

4.5.5. Εντερικό μικροβίωμα και άμυνα του οργανισμού

Το εντερικό μικροβίωμα αποτρέπει την εγκατάσταση και την ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών. Γενικότερα οι μικροοργανισμοί που συνθέτουν την ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα έχουν αναπτύξει έναν οργανισμό με τον οποίον έχουν την δυνατότητα να αναγνωρίζουν και να αποτρέπουν την εγκατάσταση και την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών που προσβάλλουν τον άνθρωπο και προέρχονται από το εξωτερικό περιβάλλον. Αφού αναγνωριστούν ως «ξένα» αποβάλλονται από τον οργανισμό. Μέσω της διαδικασίας αυτής προσφέρεται μία προστασία στο άτομο. Όταν ένας άνθρωπος είναι υγιής υπάρχει μια ισορροπία στην εντερική μικροχλωρίδα ή οποία εξασφαλίζεται μέσω ενός φαινομένου που καλείται Barrier effect ή αλλιώς φαινόμενο φραγμού. Το φαινόμενο του φραγμού εντοπίζεται σε δύο μορφές. Η πρώτη μορφή καλείται ως δραστικός φραγμός και στοχεύει στην γρήγορη αποβολή του μικροοργανισμού που εισβάλλει στο σώμα. Η δεύτερη μορφή καλείται ατελής φραγμός ουσιαστικά για ένα μικροοργανισμό ο οποίος δεν θεωρείται παθογόνος δίνεται η δυνατότητα να εγκατασταθεί σε χαμηλή συγκέντρωση. Δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο τρόπος με τον οποίο ο μηχανισμός Barrier effect αποτρέπει την ανάπτυξη ξένων παθογόνων μικροοργανισμών ωστόσο θεωρείται ότι ο μηχανισμός βασίζεται στην παρακάτω αρχές λειτουργίας:

1^η θεωρία: Τα αναερόβια βακτήρια συνθέτουν κατώτερα λιπαρά οξέα τα οποία συμβάλλουν στην φυσική άμυνα του οργανισμού

2^η θεωρία: Δεδομένου ότι ο εντερικός βλεννογόνος κατακλύζεται από την εντερική χλωρίδα δεν υπάρχει επαρκής χώρος ώστε να μπορέσει να εγκατασταθεί οποιοσδήποτε άλλος ξένος παθογόνος μικροοργανισμός στην επιφάνεια αυτού φαινόμενο που καλείται κατά την διεθνή βιβλιογραφία spatial arrangement.

3^η θεωρία: Τα βακτήρια φαίνεται να συναγωνίζονται για ουσίες σε μικρή ποσότητα ή οποίες είναι απαραίτητες ώστε να αναπτυχθούν τα ξένα παθογόνα

4^η θεωρία: Η αποφυγή ανάπτυξης παθογόνων βασίζεται στην αλλαγή τόσο του pH όσο και του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του συστήματος

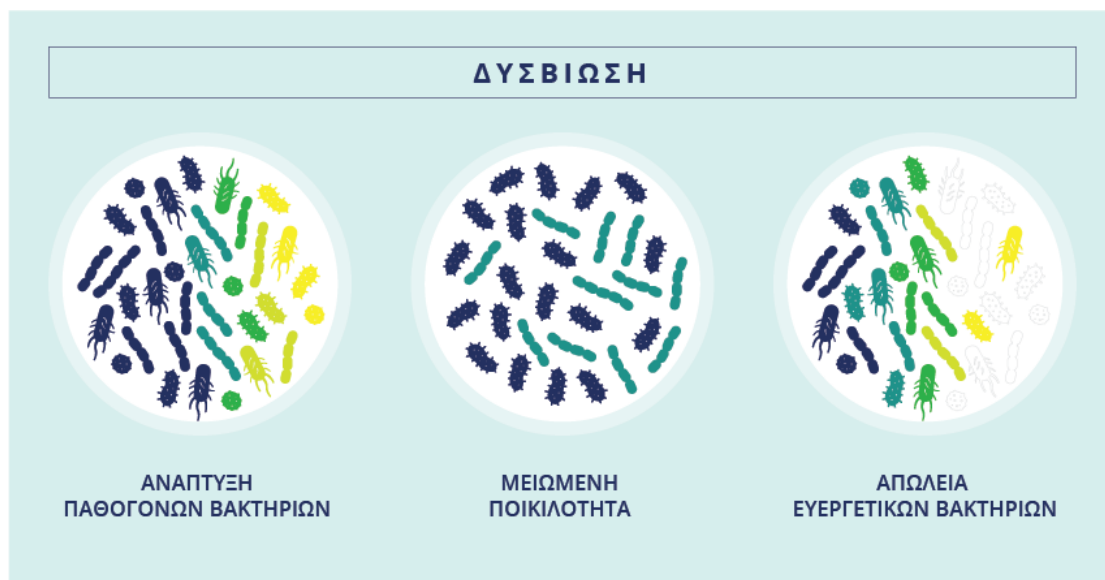
5^η θεωρία: Τα βακτήρια είναι ικανά να παράξουν ουσίες όπως οργανικά οξέα ή αντιβιοτικά που χαρακτηρίζονται από ανασταλτική δράση

4.6 Φαινόμενο της Δυσβίωσης

4.6.1. Γενικά

Με τον όρο εντερική δυσβίωση γίνεται αναφορά σε οποιαδήποτε ποιοτική και/ή ποσοτική μεταβολή στο εντερικό μικροβίωμα, μεταβολή στην κατανομή αυτού εντός του εντερικού αυλού ακόμα και σε αλλαγή στην μεταβολική λειτουργία. Ουσιαστικά οποιαδήποτε απώλεια ωφέλιμων μικροοργανισμών, αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών, τα οποία έχουν την δυνατότητα να προκαλέσουν ασθένειες, φλεγμονές, παθολογίες και διατάραξη της μικροβιακής ποικιλίας, που χαρακτηρίζει την περιοχή του εντέρου, καλείται δυσβίωση. Σε γενικές γραμμές σε υγιή άτομα στα οποία το σύστημα μεταξύ μικροοργανισμών και ξενιστή βρίσκεται σε ομοιόσταση παρατηρείται μια πλούσια ποικιλία μικροοργανισμών, που έχει αναλυθεί και σε παραπάνω ενότητες, η οποία αποτελεί ένα ιδιαίτερα ευνοϊκό σύστημα για την υγεία του ανθρώπου. Όταν γίνονται εξωτερικές παρεμβάσεις όπως η χορήγηση αντιβιοτικών, η υιοθέτηση φτωχής ή ανεπαρκούς διατροφής παρατηρείται διατάραξη της εντερικής μικροχλωρίδας και κατ' επέκταση διατάραξη της ομοιοστασίας της. Αποτελέσματα διάφορων ερευνών έχουν δείξει ότι σχεδόν πάντα οι εκδηλωμένες διαταραχές του οργανισμού είτε αυτές αναφέρονται σε μεταβολικές είτε νεοπλαστικές ακόμα και σε

ψυχιατρικές φαίνεται να έχουν άμεση συσχέτιση με το φαινόμενο της δυσβίωσης. Με την κυριαρχηση των παθογόνων μικροοργανισμών είναι πιθανό από αυτά να παραχθούν τοξίνες που έχουν καταστροφική δράση στα επιθηλιακά κύτταρα προκαλώντας εντερική διαπερατότητα. Αυτό καλείται ως «διαρρέον έντερο». Με το αδυνάτισμα της επένδυσης του εντέρου οι παραγόμενες τοξίνες μπορούν να μεταφερθούν και στο αίμα με αποτέλεσμα να προκαλούνται προβλήματα όπως τροφικές δυσανεξίες, αυτοάνοσα, αλλεργίες, ομίχλη στον εγκέφαλο και εντερικές ασθένειες. Θεωρείται ότι το 80% του ανοσοποιητικού συστήματος απαντάται στην περιοχή του εντέρου, επομένως η οποιαδήποτε διατάραξη της αναλογίας μεταξύ ωφέλιμης μικροχλωρίδας και παθογόνων επιδρά αρνητικά και στην ανοσία του οργανισμού. Επιπλέον, δεδομένου ότι ένα αρκετά σημαντικό ποσοστό νευροδιαβιβαστών όπως η σεροτονίνη και η ντοπαμίνη σχηματίζεται από βακτήρια που υπάρχουν στο έντερο διατάραξη της μικροχλωρίδας αυτού μπορεί να προκαλέσει μεταβολές και στην ψυχολογία.



Εικόνα 6: Φαινόμενο της Δυσβίωσης

4.6.2 Αιτίες πρόκλησης δυσβίωσης

Οι κύριες αιτίες διατάραξης της ομοιόστασης του εντερικού περιβάλλοντος δηλώνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

➤ 1^η κατηγορία: Τροφική αιτία

Κυρίως αναφέρεται σε μια διατροφή που στηρίζεται σε διατροφή στηριζόμενη σε ελλιπή κατανάλωση σε διαιτητικές ίνες, μειωμένη κατανάλωση λαχανικών και τυροκομικών προϊόντων.

➤ 2^η κατηγορία: Ιατρογενής αιτία

Που αφορά την λήψη φαρμακευτικών σκευασμάτων όπως αντιβιοτικά, σουλφαμιδικά, κορτικοστεροειδή, αντισυλληπτικά, καθαρτικά και οποιαδήποτε άλλη εξωτερική ουσία μπορεί να χορηγηθεί για αντιμετώπιση θεμάτων υγείας. Οι λοιμώξεις οι οποίες προκαλούνται από ιούς συνηθίζεται να αντιμετωπίζεται μέσω της λήψης αντιβιοτικών ευρέου φάσματος τα οποία προκαλούν θανάτωση ενός μεγάλου μέρος βακτηριακών πληθυσμών επηρεάζοντας όμως και βακτήρια που συνθέτουν μία υγιή και φυσιολογική εντερικής μικροχλωρίδας. Αυτή είναι και βασική αιτία της εμφάνισης συμπτωμάτων διάρροιας κατά την χορήγηση αντιβιοτικά σκευασμάτων. Έχει παρατηρηθεί ότι η κατάχρηση αντιβιοτικών προκαλεί ανάγκη για παρατεταμένη χρήση τους δεδομένου ότι η λήψη τους προκαλεί διατάραξη του ανοσοποιητικού συστήματος. Εκτέλεση θεραπευτικών αγωγών μέσω την λήψης ορμονών για θέματα όπως η εμμηνόπαυση προκαλούν και αυτά το φαινόμενο της δυσβίωσης και δυσκολεύουν την αντιμετώπιση της αν αυτή προϋπάρχει. Αξίζει να υπογραμμίσουμε ότι το φαινόμενο αυτό παρατηρείται μόνο κατά της λήψη ορμονών από το στόμα και όχι στις περιπτώσεις που χορηγούνται μέσω διαδερματικών αυτοκόλλητων

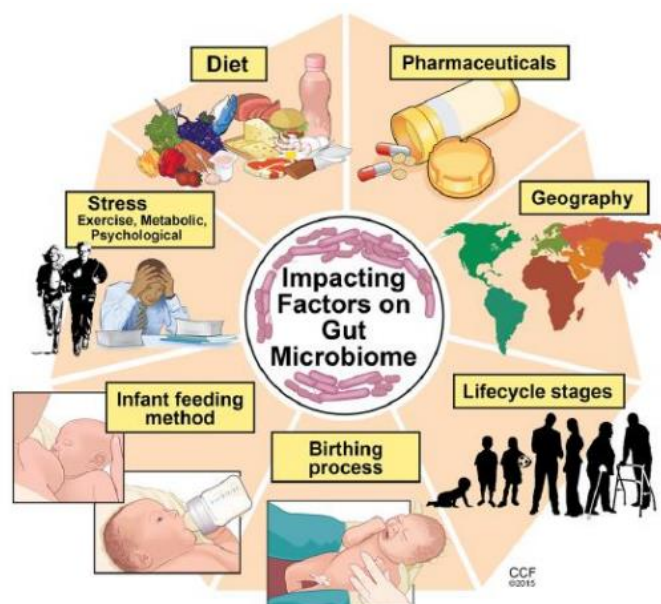
➤ 3^η κατηγορία: Τοξίνωση

Η συγκεκριμένη κατηγορία συνήθως προκαλείται από την κατανάλωση τροφών που περιέχουν χρωστικές ουσίες, συντηρητικά μπορεί να φέρουν υπολείμματα παρασιτοκτόνων, φυτοφαρμάκων ή στεροειδών ορμονών.

➤ 4^η κατηγορία: Παθολογική αιτία

Κυρίως λόγω βαριών μολύνσεων που προσβάλουν το έντερο και παρασιτώσεων

Φυσικά βαθμό επηρεασμού της σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας έχουν και όλα οι προηγουμένως αναφερόμενοι παράγοντες.



Εικόνα 7: Παράγοντες που επηρεάζουν την σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας

4.6.3 Συνέπειες της Δυσβίωσης

Ως επί το πλείστον οι συνέπειες του φαινομένου της εντερικής δυσβίωσης οδηγεί σε παθολογικές καταστάσεις. Κλινικά αποδεικνύεται ότι το σύστημα αφού διαταραχθεί δεν μπορεί να επανέλθει και να λειτουργήσει σωστά χωρίς την επαναφορά των *Lactobacillus* και την βελτίωση του εντερικού περιβάλλοντος που έχει αλλοιωθεί. Για

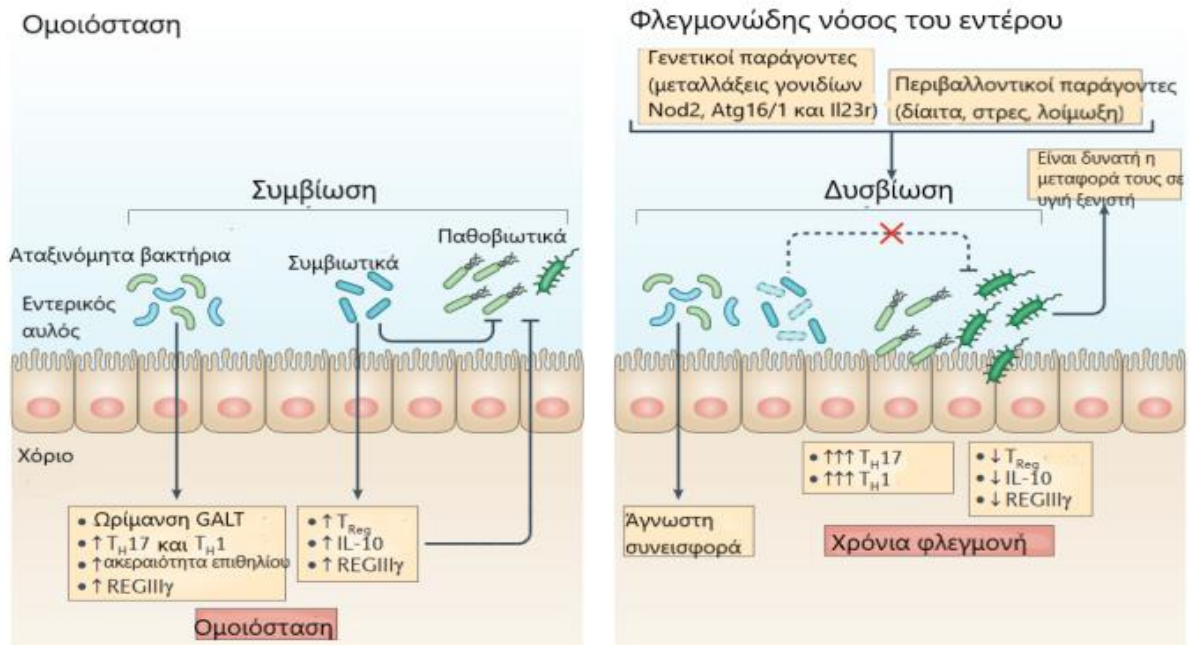
να μπορέσει να αποκατασταθεί η λειτουργία και να χαρακτηρίζεται από σταθερότητα μέσω κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής δεν είναι απαραίτητη μόνο η αποβολή των παθογόνων μικροοργανισμών που προκαλούν το φαινόμενο αλλά είναι απαραίτητη η ριζική αλλαγή στο εντερικό περιβάλλον. Για τον κλάδο της Ιατρικής αποτελεί δεδομένο ότι η ζωή ανθρώπων που έχουν προσβληθεί από παθογόνα ένζυμα όπως η *Candida* ενέχει μεγάλο κίνδυνο.

Σε περιπτώσεις ανθρώπων που πάσχουν από ανοσοποιητική ανεπάρκεια διάφοροι σακχαρομύκητες έχουν την ικανότητα να εισχωρήσουν στις οδούς τις λέμφου και του αίματος μέσω των λαχών που υπάρχουν στην βλεννογόνου του εντέρου ή ακόμα και από περιοχές που έχουν προβληθεί και φέρουν βλάβες στον επιθήλιο του εντέρου. Αυτό δίνει την δυνατότητα στους μύκητες να μολύνουν ή και να καταστρέψουν όργανα. Κλασικό παράδειγμα αποτελούν οι περιπτώσεις επιπλοκές σε βρογχοπνευμονικές περιοχές σε ασθενείς οφείλονται σε μολύνσεις λόγω μυκήτων κυρίως *Candida* και *Aspergillus*.

Μηχανισμοί που προκαλούν βλάβες και είναι ικανοί να οδηγήσουν σε ανατάραξη της ανοσοποιητικής άμυνας του οργανισμού είναι ικανοί να οδηγήσουν και σε παθολογικές καταστάσεις. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλοί άνθρωποι νοσούν από παθολογίες που αρχικά φέρουν μια ασυνήθιστη εικόνα αλλά υπό μελέτη προκύπτουν συμπεράσματα εμπλοκής βακτηριδίων τα οποία προκαλούν χρόνια λοίμωξη στον οργανισμό.

Στο τμήμα του εντέρου το φαινόμενο της δυσβίωσης προκαλεί ζύμωση των υδατανθράκων δίνοντας ως προϊόντα σάκχαρα, αέρια και αλκοόλες για το λεπτό έντερο ενώ στο τμήμα του παχέος εντέρου προκαλεί σήψη των πρωτεϊνών και των λιπαρών δίνοντας τα ίδια προϊόντα που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Αποτέλεσμα αυτού είναι οι μεταβολικές διαταραχές και η εμφάνιση φλεγμονωδών νοσημάτων του εντέρου με

κυριότερα το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, της ελκώδους κολίτιδας και της νόσου Crohn.



Εικόνα 8: Απεικόνιση της εντερικής χλωρίδας σε κατάσταση ομοιόστασης (αριστερά) και σε εμφάνιση φλεγμονής (δεξιά)

4.6.4. Αντιμετώπιση Φαινομένου Δυσβίωσης

Το φαινόμενο της εντερικής δυσβίωσης βασίζεται στην θεραπεία του μέσω μιας θεραπείας που καλείται ως «συμβιωτική αγωγή» και στοχεύει κυρίως στην εκκαθάριση του εντέρου και στην επανεγκατάσταση των ωφέλιμων βακτηρίων μέσω χορήγησης φυτικών φαρμακευτικών προϊόντων τα οποία δεν προκαλούν παρενέργειες και γέρουν θετικά αποτελέσματα.

Η θεραπεία της εντερικής δυσβίωσης είναι αντιληπτό ότι αποσκοπεί ουσιαστικά στην αποκατάσταση των ωφέλιμων βακτηρίων εντός του εντερικού αυλού, διαδικασία που φέρει μεγάλο βαθμό δυσκολίας. Η λήψη βακτηρίων, προς αναπλήρωση, αρκετές φορές δεν καταφέρνουν να φτάσουν στο τμήμα του εντέρου, λόγω του όξινου περιβάλλοντος

που επικρατεί στο στομάχι. Επιπλέον λόγω της ύπαρξης ενός αρκετά μεγάλου αριθμού βακτηρίων στο έντερο κρίνεται απαραίτητη η χορήγηση μεγάλης δόσης αγωγής για μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να υπάρξει αποτέλεσμα. Σημαντικό ρόλο στο αποτέλεσμα έχει ο τύπος των βακτηρίων που χορηγούνται ο οποίος είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με τις διατροφικές συνήθειες. Κατά την χορήγηση των περισσότερων συμπληρωμάτων που αφορούν ζωντανά βακτήρια (προβιοτικά) οι μικροοργανισμοί είναι αδρανείς και ενεργοποιούνται όταν εκτεθούν σε περιβάλλον με υγρασία. Τα σκευάσματα αυτά ουσιαστικά στοχεύουν στην ανάπτυξη ευνοϊκού εντερικού περιβάλλοντος και την αποφυγή διατάραξης αυτού. Για να πληροί τις προϋποθέσεις ένα συμπλήρωμα βακτηρίων οφείλει να περιέχει μία τέτοια ποσότητα βακτηρίων η οποία θα εξασφαλίζει ότι θα οδηγηθεί επαρκής ποσότητα στον εντερικό αυλό περνώντας μέσα από το στομάχι χωρίς να υποστούν μεγάλη απώλεια στον πληθυσμό τους, να περιέχει βακτήρια τα οποία είναι κατάλληλα για την εντερική μικροχλωρίδα και είναι εύκολο να απομονωθούν και να ληφθούν μεμονωμένα, να χαρακτηρίζονται ως εύληπτα και εύγεστα, να περιέχεται η αγωγή εντός καψυλλίων ώστε να προστατεύονται τα ωφέλιμα χορηγούμενα βακτήρια από το όξινο pH του στομάχου και να επιτυγχάνεται η εγκατάσταση των ωφέλιμων βακτηρίων στο έντερο. Κλείνοντας είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι είναι κατανοητό ότι κάθε σκεύασμα δεν παρουσιάζει την ίδια αποτελεσματικότητα σε όλους τους ασθενείς δεδομένου ότι οι ανάγκες του κάθε ασθενεί ποικίλουν επηρεαζόμενες από τις διατροφικές του συνήθειες αλλά και από τον τρόπο ζωής του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1 Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι (ΙΦΝΕ)

5.1.1.Γενικά

Χαρακτηρίζονται ως χρόνια φλεγμονή που προκαλείται στο τμήμα του εντέρου ύστερα από την επίδραση μικροβίων, παρασίτων ακόμα και συναισθηματικά έντονων καταστάσεων όπως το στρες. Τα κυριότερα είδη ιδιοπαθών φλεγμονωδών νοσημάτων αποτελούν η νόσος της ελκώδης κολίτιδας και η νόσος του Crohn's οι οποίες κυρίως χαρακτηρίζονται από βλάβες, αιμορραγία και πρήξιμο του πεπτικού συστήματος. Η βασική διαφορά μεταξύ της ελκώδης κολίτιδας και της νόσου του Crohn's είναι ότι η πρώτη στοχεύει στην εσωτερική επιφάνεια του τμήματος του παχέος εντέρου ενώ η δεύτερη προκαλεί προβλήματα σε οποιοδήποτε σημείο του του πεπτικό σωλήνα. Τα ΙΦΝΕ δρουν με διαφορετικό τρόπο από άτομο σε άτομο και μάλιστα έχουν σημειωθεί διαφοροποιήσεις ακόμα και ανάμεσα σε άτομα που πάσχουν από την ίδια νόσο. Αρκετά ενθαρρυντικό αποτελεί το γεγονός ότι και οι δύο ασθένειες είναι ιάσιμες και μέσω παρακολούθησης και λήψης κατάλληλης θεραπείας οι περισσότεροι άνθρωποι που πάσχουν από φλεγμονώδης νόσους έχουν την δυνατότητα να ζουν υπό φυσιολογικούς ρυθμούς ζωής. Και οι δύο τύποι των νόσων δεν θεωρούνται μεταδοτικοί όμως η εμφάνιση της νόσου μπορεί να εμφανίζει κληρονομικότητα αφού άτομα που φέρουν συγγένεια με άτομα που πάσχουν από τις αναφερόμενες παθήσεις τείνουν να εμφανίζουν υψηλότερο κίνδυνο εμφάνισης.

5.1.2 Συμπτώματα Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Εντερικών Νόσων (ΙΦΝΕ)

Τα χαρακτηριστικότερα συμπτώματα που συναντώνται σε αυτές τις νόσους είναι ο κοιλιακός πόνος, ο εντερικός σπασμός, η κόπωση, οι διάρροιες, και η απώλεια σωματικού βάρους. Δευτερεύοντα συμπτώματα αποτελούν ο πυρετός, η αναιμία που συχνά προκαλεί δύσπνοιες, συμπτώματα λιποθυμίας και κόπωση, εξάντληση που συναντάται και στα παιδιά καθυστερήσεις που αφορούν στην ανάπτυξη. Οι παθήσεις αυτές είναι χρόνιες και χαρακτηρίζονται από περιόδους έξαρσης και περιόδους ύφεσης.

5.1.3 Πεδίο Προσβολής των Ιδιοπαθών Φλεγμονωδών Εντερικών Νόσων (ΙΦΝΕ)

Η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί σε οποιαδήποτε ηλικία. Έχει παρατηρηθεί ότι συνήθως όμως εμφανίζονται συμπτώματα από την ηλικία των 15 χρόνων έως και τα 30. Γενικά σαν ασθένειες έχουν παρατηρηθεί σε όλων τον κόσμο ωστόσο η εμφάνισή τους είναι συχνότερη στους δυτικούς πληθυσμούς με μάλιστα 2,2 εκατομμύρια ανθρώπους σε όλη την Ευρώπη να πάσχουν από αυτές και με μεγαλύτερη συχνότητα κυρίως στην βόρεια Ευρώπη. Αξίζει να τονίσουμε ότι οι Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Εντερικές Νόσοι απαντώνται εξίσου και στα δύο φύλλα ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι η ελκώδης κολίτιδα φαίνεται ελαφρώς πιο συχνά εμφανιζόμενη σε άντρες ενώ η νόσος του Crohn's σε γυναίκες.

5.1.4. Αίτια εμφάνισης ΙΦΝΕ

Σε γενικές γραμμές τα αίτια που προκαλούν προσβολή του οργανισμού από τις παραπάνω ασθένειες είναι σχετικά άγνωστα ωστόσο θεωρείται ότι υπεύθυνες είναι αλλαγές στο ανοσοποιητικό σύστημα οι οποίες κατά κύριο ρόλο προκαλούνται από ερεθίσματα του περιβάλλοντος και κυρίως σε άτομο τα οποία φέρουν προδιάθεση για προσβολή από την νόσο. Κύριοι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν αποτελούν οι

μικροοργανισμοί, τα γονίδια, το κάπνισμα και διάφορα αναλγητικά που λαμβάνονται χωρίς επίβλεψη και χωρίς ιατρική καθοδήγηση αποτελούν βασικούς λόγους. Το στρες και η διατροφή ωστόσο σίγουρα δεν αποτελούν βασικά αίτια αλλά συμβάλλουν στην επιδείνωση της νόσου.

5.1.5. Αντιμετώπιση των ΙΦΝΕ

Η αντιμετώπιση των φλεγμονωδών νοσημάτων του εντέρου συνήθως ακολουθεί την χορήγηση φαρμακευτικής αγωγής. Η θεραπευτική αγωγή που ακολουθείται εξαρτάται από τον βαθμό σοβαρότητας της εκάστοτε νόσου και την επίδραση αυτής στην καθημερινή ζωή του πάσχοντος. Στην περίπτωση που η φαρμακευτική αγωγή δεν αποδώσει μια άλλη προσέγγιση για την αντιμετώπιση της νόσου αποτελεί και η χειρουργική επέμβαση. Η περίπτωση αυτή ακολουθείται και στην περίπτωση που εμφανιστούν σοβαρές επιπλοκές όπως αυτή της απόφραξης ή της διάτρησης του εντέρου. Μέσω της χειρουργικής επέμβασης για την περίπτωση της ελικώδους κολίτιδας η μεταχείριση αυτή οδηγεί σε πλήρη ίαση δεδομένου ότι η νόσος προσβάλλει μόνο το τμήμα του παχέος εντέρου. Αντιθέτως για την νόσο Crohn's δεν μπορεί να θεωρηθεί ιάσιμη μεταχείριση λόγω του ότι η νόσος έχει την δυνατότητα επανεμφάνισης σε άλλο σημείο του πεπτικού σωλήνα.

5.2 Νόσος του Crohn

5.2.1. Γενικά

Η νόσος του Crohn's πρόκειται για πάθηση χρόνια και εμφανίζεται ως διατοίχωματική φλεγμονώδη νόσο του γαστρεντερικού σωλήνα χωρίς να έχει προσδιοριστεί ακόμα η αιτία εμφάνισης της. Η νόσο του Crohn's μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα σε οποιοδήποτε σημείο του γαστρεντερικού συστήματος ακόμα και στην στοματική κοιλότητα και τον οισοφάγο. Από διαγνώσεις και μελέτες έχει παρατηρηθεί ότι το 1/3

των κλινικών περιπτώσεων έφερε φλεγμονές μόνο στο τμήμα του παχέος εντέρου, το 1/3 μόνο στο λεπτό και το υπόλοιπο 1/3 έφερε φλεγμονές τόσο στο λεπτό όσο και στο παχύ έντερο. Η νόσος κυρίως προκαλεί φλεγμονές στις πιο βαθιές στιβάδες του τοιχώματος του εντέρου. Θεωρείται η συχνότερη πάθηση του λεπτού εντέρου και συναντάται με ετήσια συχνότητα από 3 έως 8 νέα περιστατικά ανά 100.000 άτομα στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής. Σαν νόσος ωστόσο εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα στην βόρεια Αμερική και την βόρεια Ευρώπη ενώ για την Ιαπωνία η εμφάνιση της νόσου παρουσιάζεται με 10 φορές μικρότερη συχνότητα ενώ για τις αναπτυσσόμενες χώρες η νόσο φαίνεται πως εμφανίζεται σπάνια.

5.2.2. Αίτια της Νόσου

Η αιτία που προκαλεί την πάθηση την νόσου του Crohn's είναι σχετικά άγνωστη με τους κυριότερους παράγοντες να θεωρούνται ότι οι λοιμώξεις καθώς και θέματα στο ανοσοποιητικό αλλά και η γενετική προδιάθεση. Αναλυτικότερα:

➤ Λοιμώδεις παράγοντες:

Οι κυριότεροι υπεύθυνοι μικροοργανισμοί στην δράση των οποίων οφείλεται η εμφάνιση της νόσου είναι κυρίως η *Listeria Monocytogenes*, *Pseudomonas*, *Chlamydia*, το *Mycobacterium paratuberculosis* κ.α. Ωστόσο δεν υπάρχει καμία σοβαρή απόδειξη για να μπορέσει να τεκμηριώσει απόλυτα την θέση αυτή.

➤ Ανοσολογικοί παράγοντες:

Η επαφή του ανοσολογικού συστήματος του εντερικού αυλού με τοξίνες και άλλες μικροβιακά στοιχεία είναι ικανά να προκαλέσουν παθολογία στο σύστημα η οποία διαχειρίζεται και με δυσκολία. Η παραπάνω θέση έχει βασιστεί σε μελέτες που έχουν

πραγματοποιηθεί μέσω πειραμάτων σε πειραματόζωα από τις οποίες έχουν προκύψει οι εξής θέσεις:

Η ανοσορύθμιση σε παθολογικό βαθμό είναι υπεύθυνη για εντερίτιδες που εμμένουν
Μεταβολές σε γενετικό βαθμό στο ανοσορυθμιστικό σύστημα (κυτταροκίνες) οδηγούν στην πρόκληση χρόνιας εντερικής φλεγμονής

Η γενετική προδιάθεση καθορίζει τον βαθμό επιθετικότητας της νόσου.

Είναι σημαντικό να επισημανθεί ότι δεδομένου ότι η ανοσοκατασταλτική αγωγή όπως για παράδειγμα η κορτιζόνη δείχνει να βελτιώνει θεαματικά την εικόνα της νόσου γεγονός που μπορεί να επιβεβαιώσει τον ανοσολογικό χαρακτήρα που φέρει η νόσος.

➤ Γενετικοί Παράγοντες:

Παρόλο που η γενετική προδιάθεση είναι σχεδόν δεδομένη δεν έχει επιβεβαιωθεί ούτε στηρίζεται ότι ακολουθεί τα μεντελικά μοντέλα κληρονομικότητας. Ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι συγγενείς πρώτου βαθμού δείχνουν πως κινδυνεύουν να εμφανίσουν την νόσο σε βαθμό συχνότητας 14-15 φορές μεγαλύτερο από ότι εκείνον που εμφανίζει ο γενικός πληθυσμός. Βέβαια βαθμό βαρύτητας στην νόσο φέρουν και οι διατροφικές συνήθειες, το στρες, και κάπνισμα και ψυχολογικοί παράγοντες ενώ έχει παρατηρηθεί ότι τα υψηλότερα κοινωνικοοικονομικά στρώματα τείνουν να προσβάλλονται συχνότερα από την νόσο.

5.2.3 Κλινική εικόνα της νόσου

Ως κλασσικοί ασθενείς της νόσου παρουσιάζονται νεαρές ενήλικες γυναίκες με μέση ηλικία από 20 έως 40 ετών. Τα κυριότερα συμπτώματα της νόσου φαίνεται πως είναι η διάρροια με βαθμό εμφάνισης κατά 90%, πόνος στην κοιλιακή χώρα (55%) και συχνά απώλεια σωματικού βάρους (22%). Όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως η

νόσος εμφανίζει περιόδους εξάρσεις αλλά και ύφεσης. Η αρχική εμφάνιση της νόσου μπορεί να ταλαιπωρήσει τους ασθενείς σε έντονο έως και δραματικό βαθμό, με κύρια συμπτώματα να αποτελούν ο πόνος στην περιοχή τις κοιλιάς και οι συνεχείς διάρροιες οι οποίες μπορούν να διαρκέσουν για αρκετούς μήνες έως και χρόνια. Γενικώς το φαινόμενο της διάρροιας παρατηρείται στο σύνολο των περιπτώσεων ασθενών που πάσχουν από την νόσο αλλά φέρει διαφοροποιήσεις ανάλογα με το που εντοπίζεται η φλεγμονή. Όταν η φλεγμονή έχει προσβάλλει το τμήμα του λεπτού εντέρου οι κενώσεις έχουν μεγαλύτερο όγκο. Όμως ασθενείς που φέρουν φλεγμονή σε εκτεταμένο μέρος του πεπτικού συστήματος ή έχουν υποστεί χειρουργική επέμβαση προς αφαίρεση του τελικού ειλεού αντιμετωπίζουν διάρροιες με χολώδη μορφή ή και στεατόρροια

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο βαθμός πόνου που αντιλαμβάνεται ο ασθενής επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το τμήμα στο οποία εντοπίζεται η νόσος. Η απώλεια βάρους οφείλεται κυρίως στις δυσαπορρόφηση ή στην ελλιπή πρόσληψη τροφής είτε λόγω πόνου, ανορεξίας ή διάρροιας. Η έξαρση της νόσου επιφέρει τις περισσότερες φορές αδυναμία, κόπωση, πυρετό και ανατριχίλα.

Σε ένα ποσοστό γύρω στο 30% των περιπτώσεων με νόσο του Crohn's εμφανίζονται και συμπτώματα εκτός του εντερικού τμήματος (εξωεντερικές εκδηλώσεις) με κυριότερες τις δερματικές εκδηλώσεις, αρθρίτιδες, φλεγμονή των οφθαλμών και της ίριδας, αναιμία αλλά και περιπτώσεις εμφάνισης παγκρεατίτιδας.

5.2.4 Επιπλοκές της Νόσου

Οι κυριότερες επιπλοκές που μπορεί να εκδηλώσει η νόσος είναι η διάτρηση, η εμφάνιση συριγγίων και η εντερική απόφραξη. Αναλυτικότερα:

➤ Στένωση:

Προκαλείται λόγω περιορισμού του εντερικού αυλού από ουλές. Αυτό μπορεί να προκαλέσει δυσκολία ή και αδυναμία διέλευση της τροφής ενώ σε περίπτωση που προκληθεί ολική απόφραξη του εντερικού τμήματος προκαλείται πόνος και εμετός.

➤ Διάτρηση:

Δημιουργείται μικρό άνοιγμα (οπή) σε κάποιο σημείο του εντερικού τοιχώματος με αποτέλεσμα το περιεχόμενο που υπάρχει εντός του εντέρου να έχει την δυνατότητα διαφυγής προκαλώντας λοιμώξεις ή και αποστήματα στην κοιλιακή χώρα κατάσταση ιδιαίτερης σοβαρότητας και επικινδυνότητας ως προς την ζωή του πάσχοντος .

➤ Συρίγγιο:

Εμφανίζεται μέσω της πρόκλησης διαύλου επικοινωνίας μεταξύ του εντέρου σε δύο μέρη και κάποιου άλλου οργάνου ή του δέρματος το οποίο προκαλεί την διαφυγή του εντερικού περιεχομένου σε άλλες περιοχές.

5.2.5 Θεραπεία νόσου του Crohn's

➤ Φαρμακευτική αγωγή

Η φαρμακευτική αγωγή βασίζεται στην λήψη αντιβιοτικών αμινοσαλικυλικών και ανοσορρυθμιστικών φαρμάκων. Η χορήγηση των αντιβιοτικών στοχεύει στην καταπολέμηση των φλεγμονών και αφορούν τις περιπτώσεις εμφάνισης συριγγίων και ενεργούς νόσου του κόλου. Η χορήγηση των αμινοσαλικυλικών έχουν ενδοαυλική

δράση και θεωρούνται αρκετά πετυχημένα σαν χορήγηση θεραπείας. Έχει παρατηρηθεί ότι η ανταπόκριση στην θεραπεία από της ασθένειας γίνεται εντός διαστήματος 2 έως 4 εβδομάδων. Επίσης είναι συχνή η λήψη πρεδνιζολόνης ή οποία σταδιακά μειώνεται. Κατά τις περιόδους των εξάρσεων της νόσου είναι πιθανό να χορηγηθεί αζαθειοπρίνη ή και μονοκλωνικά αντισώματα που δρουν ώστε να καταστεί η νόσος σε ύφεση αλλά και για να μπορέσουν να επουλωθούν τα συρίγγια.

➤ Χειρουργική αντιμετώπιση

Η αντιμετώπιση αυτή δεν επιφέρει ίαση της νόσου και άρα είναι η τελική επιλογή σε περίπτωση που παρατηρηθεί ότι ο ασθενής δεν ανταποκρίνεται στην συντηρητική αγωγή που του χορηγείται ή εμφανίσει επιπλοκές ή ακόμα και παρενέργειες λόγω της χορηγούμενης αγωγής. Η προσέγγιση της χειρουργικής αντιμετώπισης προσεγγίζει περιστατικά ασθενών που χρειάζονται εντερική απόφραξη περιστατικό που εμφανίζεται σε έναν στους τρεις που πάσχουν από την νόσο. Στην πράξη πραγματοποιείται τομή στο σημείο εκείνο του εντέρου που πάσχει και προτιμάται να γίνεται ανοιχτή επέμβαση ωστόσο πολλές περιπτώσεις αντιμετωπίζονται λαπαροσκοπικά κυρίως σε καταστάσεις που ο πάσχων χειρουργείται για πρώτη φορά και η τομή είναι περιορισμένη.

Τέλος είναι πιθανόν ένα μικρό ποσοστό να εμφανίσει επιπλοκές ύστερα από την προσέγγιση της νόσου χειρουργικά σε ποσοστό 15-30% ενώ αρκετοί ασθενείς είναι πιθανό να παρουσιάσουν υποτροπή σε διαφορετικό σημείο στον εντερικό αυλό με πιθανότερη χρονική περίοδο εμφάνισης τον πρώτο χρόνο (με πιθανότητα 70%) και σε τρία χρόνια (με πιθανότητα 85%)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

6.1 Βασικά όργανα και λειτουργίες του γαστρεντερικού συστήματος

6.1.1 Στόμα

Η αρχή του γαστρεντερικού σωλήνα ξεκινά από την περιοχή του στόματος όπου θεωρείται και το πρώτο στάδιο έναρξης της διαδικασίας της πέψης μέσω της μάσησης της τροφής. Η διαδικασία αυτή συνοδεύεται από την ταυτόχρονη έκκριση σιέλου από τους σιελογόνους αδένες μέσω των εκκριτικών πόρων. Ουσιαστικά η βλέννα από την οποία αποτελείται το σιέλο δίνει την δυνατότητα ύγρανσης και λίπανσης της τροφής ώστε να είναι έτοιμη να καταποθεί χωρίς να προκληθεί κάποια περιστατικό πνιγμού. Στο σιέλο που εκκρίνεται πρωταγωνιστικό ρόλο έχει το ένζυμο αμυλάση μέσω της δράσης της οποίας οι πολυσακχαρίτες διασπώνται έως ένα σημείο. Τέλος ο σιέλος διευκολύνει την διάλυση μορίων στις τροφές τα οποία είναι υπεύθυνα και για την αντίληψη της γεύσης της τροφής δεδομένου μόνο στην διασπασμένη τους μορφή μπορούν να ευαισθητοποιήσουν τους αισθητήρες που βρίσκονται στο στόμα.

6.1.2 Φάρυγγας & Οισοφάγος

Το επόμενο συναντούμενο τμήμα είναι ο φάρυγγας και ο οισοφάγος οι οποίοι αποτελούν την οδό μέσω της οποίας οι τροφές και τα ροφήματα που καταναλώνονται οδηγούνται στο στομάχι. Η κατάποση των τροφών που καταναλώνονται ελέγχεται μέσω μυών που απαντώνται στα τοιχώματα των προαναφερόμενων οργάνων.

6.1.3 Στομάχι

Θα μπορούσε το όργανο αυτό να παρομοιαστεί με «σάκο» ο οποίος εντοπίζεται μεταξύ οισοφάγου και λεπτού εντέρου. Το στομάχι αποθηκεύει, διαλύει και εκτελεί μερική απορρόφηση και ελέγχει το ρυθμό με τον οποίο οι τροφές που καταναλώθηκαν θα οδηγηθούν στο τμήμα του λεπτού εντέρου. Μέσω αδένων που εντοπίζονται στα

τοιχώματα του στομάχου εκκρίνεται ένα σημαντικό και ισχυρό οξύ το υδροχλωρικό ή αλλιώς γαστρικό οξύ (HCl) καθώς και το πρόδρομο μόριο της πεψίνης, το πεψινογόνο το οποίο μετέπειτα μετατρέπεται σε πεψίνη. Με την έκκριση του υδροχλωρικού οξέος επιτυγχάνεται η διαίρεση των τροφών σε μικρότερα κομμάτια. Το όξινο περιβάλλον του γαστρικού οξέος συντελεί στο να μεταβληθούν διάφοροι ιονικοί δεσμοί που απαντώνται σε πολικά μόρια όπως οι πρωτεΐνες διαταράσσοντας το εξωκυττάριο πρωτεϊνικό σύστημα του συνδετικού ιστού. Οι πρωτεΐνες αλλά και οι πολυσακχαρίτες που προκύπτουν από την δράση του γαστρικού οξέος μπορούν να υποστούν μερική πέψη στο τμήμα του στομάχου από την αμυλάση και την ομάδα των πεψινών. Το γαστρικό υγρό αποτελεί και εχθρό των βακτηρίων που προσβάλλουν τον άνθρωπο μέσω από τις τροφές που καταναλώνει αφού έχει την δυνατότητα να καταστρέψει χωρίς όμως να σημαίνει ότι θεωρείται πλήρως αποτελεσματική διεργασία, με αποτέλεσμα την επιβίωση βακτηρίων τα οποία στην συνέχεια πολλαπλασιάζονται στο τμήμα του λεπτού και του παχέος εντέρου. Οι τροφές στο στομάχι παίρνουν μια μορφή χυμού που αποτελείται από μόρια πρωτεϊνών, πολυσακχαριτών, σταγονίδια λιπών, άλλα μικρομόρια, αλάτι και νερό. Αξίζει να τονίσουμε ότι δεν πραγματοποιείται σχεδόν καθόλου απορρόφηση των παραπάνω ουσιών στο στομάχι λόγω αδυναμίας τους να διαπεράσουν το επιθήλιο του γαστρικού τοιχώματος.

6.1.4 Λεπτό Έντερο

Στο τμήμα αυτό λαμβάνει χώρα η πέψη των περισσότερων τροφών. Το λεπτό έντερο έχει σωληνοειδή μορφή με διάμετρο 4 cm και μήκος 2,8 m. Στο κομμάτι αυτό διαμεμένα μόρια υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπών υφίστανται επιπλέον διάσπαση μέσω των υδρολυτικών ενζύμων. Τα ένζυμα αυτά είτε βρίσκονται στον εντερικό αυλό ή εκκρίνονται μέσω του πάγκρεας και στην συνέχεια οδηγούνται εντός του εντέρου. Στην συγκεκριμένη φάση τα προϊόντα που προκύπτουν από την πέψη έχουν την

δυνατότητα να διαπεράσουν τα κύτταρα του επιθηλίου και άρα επιτρέπεται η μεταφορά αυτών στο αίμα και στην λέμφο. Πέρα των προϊόντων που αναφέρθηκαν στο τμήμα του λεπτού εντέρου είναι δυνατή και η απορρόφηση του νερού, των μετάλλων και των βιταμινών για τα οποία δεν απαιτείται η δράση ενζύμων για να μπορέσουν να απορροφηθούν. Το λεπτό τμήμα απαρτίζεται από τον δωδεκαδάχτυλο, την νηστίδα και τον ειλεό. Ο σημαντικότερος βαθμός απορρόφησης επιτυγχάνεται στα δύο πρώτα τμήματα επομένως είναι ευκολά αντιληπτό ότι το λεπτό έντερο έχει σημαντική συνεισφορά.

6.1.5 Πάγκρεας

Χαρακτηρίζεται ως ένας μακρόστενος αδένες που η θέση του εντοπίζεται πίσω από το στομάχι. Έχει και ενδοκρινή και εξωκρινή λειτουργία με την τελευταία να σχετίζεται άμεσα με την λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος. Το πάγκρεας παράγει πεπτικά ένζυμα και ένα υγρό πλούσιο σε διττανθρακικά (όξινα ανθρακικά ιόντα).

6.1.6 Ήπαρ

Η εξωκρινής δράση του ήπατος συνδέεται άμεσα με την διαδικασία έκκρισης της χολής. Τα κυριότερα συστατικά που περιέχει η χολή είναι τα όξινα ανθρακικά ιόντα, τα φωσφολιπίδια, χρωστικές ουσίες, χοληστερόλη, ορισμένα οργανικά απόβλητα και τα πλέον πιο σημαντικά αποτελούν τα χολικά άλατα τα οποία είναι υπεύθυνα για την διάλυση των λιπών που λαμβάνονται από τις τροφές. Σε περίπτωση που δεν υπήρχε η συγκεκριμένη ομάδα των χολικών αλάτων τότε η διαδικασία διάλυσης των λιπών θα ήταν αδύνατη λόγω της αδιαλυτότητας τους στο νερό και σαν αποτέλεσμα αυτού θα ήταν η αύξηση της όλης διαδικασίας πέψης και μετέπειτα της απορρόφησης τους από τον οργανισμό. Προς διευκρίνηση η χολή εκκρίνεται στο ήπαρ σε μικρές περιοχές-πόρους με το σύνολο αυτών να σχηματίζει τον κοινό ηπατικό πόρο. Κατά την διάρκεια και ενδιάμεσα των γευμάτων που καταναλώνει ο άνθρωπος η χολή που εκκρίνεται

αποθηκεύεται σε έναν σάκο κάτω από τον ηπατικό πόρο που ονομάζεται χοληδόχος κύστη.

6.1.7 Λεπτό Έντερο

Στο σημείο εκείνο γίνεται απορρόφηση των μονοσακχαριτών και των αμινοξέων μέσω της μεμβράνης του πλάσματος των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου με την συμβολή διάφορων διαμεσολαβούντων συστημάτων μεταφοράς. Τα λιπαρά οξέα εισέρχονται σε αυτά τα συστήματα μέσω της διαδικασίας της διάχυσης. Όσον αφορά τα ιόντα μετάλλων η απορρόφηση αυτών πραγματοποιείται μέσω διαδικασιών ενεργούς μεταφοράς ενώ για το νερό πραγματοποιείται παθητική διάχυση εξαιτίας της οσμωτικής πίεσης στα διάφορα τμήματα. Στο λεπτό έντερο η ύπαρξη λείων μυών δίνει στο τμήμα την δυνατότητα κίνησης μέσω της οποίας πραγματοποιείται η ανάμειξη των διάφορων εκκριμάτων και του περιεχομένου του εντέρου και παράλληλα η επαφή του περιεχομένου του εντερικού τμήματος με τα επιθήλια όπου και πραγματοποιείται η απορρόφηση και τέλος η μεταφορά του εντερικού περιεχομένου στον τμήμα του παχέος εντέρου. Συνήθως στο παχύ έντερο προωθείται νερό και σύνολο άπεπτων ουσιών οι οποίες αποθηκεύονται στο τμήμα αυτό προσωρινά, τροποποιούνται συχνά από βακτήρια και συμπυκνώνονται μέσω της διαδικασίας απορρόφησης νερού και άλατος.

6.1.8 Ορθό

Αποτελεί το τελευταίο σημείο του γαστρεντερικού σωλήνα και έχει την δυνατότητα να συστέλλεται. Οι μύες που εντοπίζονται στον σφιγκτήρα είναι και αυτοί που οφείλονται για την αποβολή των κοπράνων από τον οργανισμό διαδικασία γνωστή ως αφόδευση.

6.2 Ρύθμιση Λειτουργίας Γαστρεντερικού Συστήματος

Τα αντανακλαστικά που εντοπίζονται στο γαστρεντερικό σύστημα ευαισθητοποιούνται και ενεργοποιούνται από λίγα ερεθίσματα με χαρακτηριστικά την διάταση του τοιχώματος του εντερικού αυλού από το περιεχόμενο αυτού, από την συνολική συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών στον χυμό (ωσμωμοριακότητα), την οξύτητα του χυμού και την συγκέντρωση μονοσακχαριτών, λιπαρών οξέων, αμινοξέων και πεπτιδίων σε αυτών. Μέσω αυτών των ερεθισμάτων προκαλείται ενεργοποίηση σε διάφορους αισθητήρες που εντοπίζονται πάνω στο τοίχωμα του εντέρου και τελικώς επηρεάζουν την λειτουργία δραστικών οργάνων και πιο συγκεκριμένα την λειτουργία των μυϊκών στιβάδων του εντέρου και των εξωκρινών αδένων που εκκρίνουν ουσίες στο εντερικό τμήμα.

6.3 Φάσεις Γαστρικού Ελέγχου

Ο έλεγχος που αφορά τόσο τον ορμονικό όσο και τον νευρικό έλεγχο του γαστρεντερικού συστήματος μπορεί να διακριθεί σε τρεις βασικές φάσεις.

- 1^η Φάση: Κεφαλική

Ουσιαστικά αναφερόμαστε σε ερεθίσματα που απαντώνται στο κεφάλι και επηρεάζουν ερεθίσματα και της όρασης, της όσφρησης, της γεύσης και της μάσησης. Η έναρξη της φάσης αυτής είναι δυνατό να ενεργοποιηθεί και μέσω συναισθηματικών καταστάσεων.

- 2^η Φάση: Γαστρική

Η φάση αυτή επηρεάζεται από τα βασικότερα ερεθίσματα του στομάχου που είναι η διάταση, η οξύτητα και το σύνολο των πεπτιδίων που σχηματίζονται κατά την διαδικασία της πέψης των πρωτεϊνών. Οι αποκρίσεις που εκδηλώνονται από αυτούς

τους τύπους ερεθισμάτων διευκολύνονται από την δράση μακρών και βραχέων αντανακλαστικών και από την έκκριση της ορμόνης γαστρίνης

3^η Φάση: Εντερική

Η συγκεκριμένη φάση ενεργοποιείται μέσω της δράσης των ερεθισμάτων της διάτασης, της οξύτητας, της ωσμωμοριακότητας και μιας ποικιλίας προϊόντων που προκύπτουν από την διαδικασία της πέψης

Είναι αναγκαίο να τονιστεί ότι η κάθε φάση λαμβάνει το όνομά της από την περιοχή εκείνη στην οποία εμφανίζεται το ερέθισμα και όχι από εκείνη που εκκινεί η λειτουργία των εκτελεστικών οργάνων. Οι φάσεις που αναφέρονται παραπάνω δεν έχουν κάποια χρονική ακολουθία πλην της έναρξης του γεύματος. Ωστόσο κατά την διαδικασία της πέψης και κατά την περίοδο που ο οργανισμός πραγματοποιεί απορρόφηση είναι πιθανό τα χαρακτηριστικά αντανακλαστικά των τριών φάσεων που αναφέρθηκαν να λειτουργούν παράλληλα.

6.4 Έκκριση Γαστρικού υγρού

Στην περιοχή του στομάχου εκκρίνεται κυρίως βλέννα, υδροχλωρικό οξύ και το ένζυμο του πεψινογόνου που έχει πρόδρομη μορφή. Το κυριότερο εκκρινόμενο παράγωγο του στομάχου είναι το υδροχλωρικό οξύ που εκκρίνεται σε ποσότητα περίπου 2 λίτρων την ημέρα. Είναι απαραίτητα η συγκέντρωση των ιόντων H^+ εντός του αυλού του στομάχου να φτάνει τα 150mM δηλαδή επεξηγηματικά να είναι 3.000.000 φορές μεγαλύτερη από την συγκέντρωση που απαντάται στο αίμα. Η K-ATPάση που βρίσκεται στα τοιχώματα του στομάχου μεταφέρει ιόντα H^+ εντός του στομάχου. Με την παρουσία ιόντων H^+ εντός του περιβάλλοντος του στομάχου από το αίμα γίνεται έκκριση όξινων ανθρακικών αλάτων το οποίο έχουν σαν δράση την μείωση της οξύτητας του αίματος που υπάρχει στην περιοχή του στομάχου. Όταν πραγματοποιείται κατανάλωση μιας

τροφής παρατηρείται αύξηση του ρυθμού με τον οποίο εκκρίνεται το γαστρικό οξύ. Αφού έχει εκκριθεί η απαραίτητη ποσότητα υδροχλωρικού οξέος στο στομάχι η έκκριση του σταματά μέσω επαγωγής από τα ίδια τα ιόντα με την απελευθέρωση σωματοστασίνης από κύτταρα του γαστρικού τοιχώματος. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά του γαστρικού οξέος είναι το pH του κυμαίνεται από 1,5 έως 3,5 και παίζει καθοριστικό ρόλο κατά την διαδικασία πέψης των πρωτεϊνών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7.1 Σχεδιασμός Πειράματος

Σκοπός πειράματος:

Ο σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της αλληλεπίδρασης του ανθρώπινου μικροβιώματος που υπάρχει σε ανθρώπινα κόπρανα με τις πολυφαινόλες του χαρουπόμελου, ενός τροφίμου που έχει υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, κατά την διάρκεια της πέψης του σε προσομοίωση γαστρεντερικού συστήματος.

Ο σχεδιασμός και η πραγματοποίηση του πειράματος έλαβε χώρα στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας, της σχολής Επιστήμης Τροφίμων, του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν χαρούπια τα όποια συλλέχθηκαν πολύ προσεκτικά από τα δέντρα στον προαύλιο χώρο του πανεπιστημίου (Αγ. Σπυρίδωνος, Αιγάλεω). Τα χαρούπια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για παρασκευή χαρουπόμελου. Έπειτα ακολούθησε η πειραματική πορεία της προσομοίωσης του γαστρεντερικού συστήματος και αφού συλλέχθηκαν δείγματα και από τις τέσσερις (4) φάσεις προσδιορίστηκαν οι ολικές φαινολικές ενώσεις με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν και μικροβιολογικές αναλύσεις για να βρεθεί το ολικό μικροβιακό φορτίο των δειγμάτων των κοπράνων και να επιβεβαιωθεί η διατήρηση της O.M.X καθ' όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

7.2 Παρασκευή Χαρουπόμελου

7.2.1 Υλικά και Εξοπλισμός

Για την παρασκευή του χαρουπόμελου χρησιμοποιήθηκαν

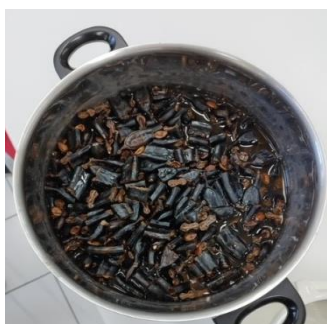
- Αναλυτικός ζυγός (Kern EW)

- Μεταλλικό εργαλείο κοπής (πένσα)
- Ποτήρια ζέσεως
- Μεταλλικό σκεύος (κατσαρόλα)
- Θερμαντική πλάκα
- Σουρωτήρι
- Μπουκάλια με φαρδύ λαιμό και βιδωτό καπάκι
- pHμετρο (HANNA HI 8010)
- Αναλογικό διαθλασίμετρο (Kern optics, ORA 80BB)

7.2.2 Διαδικασία Παρασκευής Χαρουπόμελου

Για την παρασκευή 620,078 g χαρουπόμελου χρησιμοποιήθηκαν 6 L νερό και 2 Kg χαρουπιών.

Αφού συλλέχθηκαν τα χαρουπια, ακολούθησε το πλύσιμο και η θραύση τους σε μικρότερα τμήματα με την βοήθεια πένσας. Έπειτα ακολούθησε ο βρασμός τους για 10 min στους 100°C. Αφού ολοκληρώθηκε ο βρασμός, αποσύρθηκε το σκεύος από την θερμαντική πλάκα και αφέθηκαν τα χαρουπια μέσα στο νερό για 3 μέρες. Μετά το πέρας των 3 ημερών το μίγμα σουρώθηκε και το υγρό που προέκυψε αφέθηκε να βράσει σε χαμηλή θερμοκρασία έως ότου αποκτήσει μορφή τελικού σιροπιού. Για την διαδικασία αυτή απαιτήθηκαν 1 ώρα και 35 λεπτά. Το χαρουπόμελο που προέκυψε συσκευάστηκε σε μπουκάλι 500 mL με βιδωτό καπάκι και αποθηκεύτηκε στο ψυγείο.



Εικόνα 9 Βράσιμο Χαρουπιών



Εικόνα 10 Σουρωμένο Μίγμα



Εικόνα 11 Χαρουπόμελο

Ακολούθησε μέτρηση του pH και των βαθμών Brix στο χαρουπόμελο με τα εξής αποτελέσματα:

	Μέτρηση 1	Μέτρηση 2	Μέτρηση 3	Μ.Ο
pH	4,94	4,89	4,89	4,91
Brix	64,50%	64,50%	64,50%	64,50%

Πίνακας 3 Τελικά αποτελέσματα pH και Βαθμών Brix στο παραχθέν χαρουπόμελο

7.3 Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας κρίθηκε απαραίτητη η πραγματοποίηση μικροβιολογικών αναλύσεων στα δείγματα κοπράνων F1 και F2 που μας παραχώρησε το τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου. Οι μικροβιολογικές αναλύσεις σκοπό είχαν την επιβεβαίωση της διατήρησης της Ο.Μ.Χ. των κοπράνων κατά την εξάμηνη υλοποίηση της πειραματικής διαδικασίας. Τα δείγματα κοπράνων το χρονικό αυτό διάστημα διατηρήθηκαν στην κατάψυξη και οι κωδικοί F1 και F2 αναφέρονται σε δείγμα από κόπρανα ασθενούς ατόμου με σύνδρομο Crohn's και σε δείγμα υγιούς ατόμου αντίστοιχα. Οι αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν αφορούν την ανίχνευση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, οξυγαλακτικών βακτηρίων σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, καθώς και την ανίχνευση ζυμών και μυκήτων μόνο σε αερόβιες συνθήκες.

7.3.1 Υλικά και Εξοπλισμός

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις μικροβιολογικές αναλύσεις είναι:

- Αραιωτικό υγρό APHA
- Απιονισμένο νερό
- Θρεπτικό υπόστρωμα BHI
- Θρεπτικό υπόστρωμα MRS
- Θρεπτικό υπόστρωμα ROSE
- Άγαρ

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε κατά τις μικροβιολογικές αναλύσεις είναι:

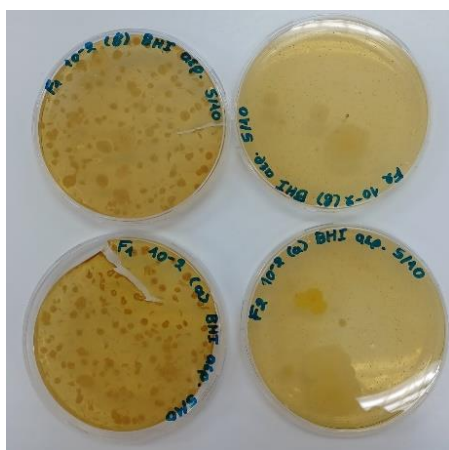
- Σωληνάκια αραίωσης
- Κωνική φιάλη
- Γυάλινο δοχείο
- Dispenser (fortuna, polyfix 10)
- Στατώ
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης
- Αναλυτικός ζυγός
- Λύχνος Bunsen
- Τρίποδο
- Ογκομετρικός κύλινδρος
- Μπουκάλια με φαρδύ λαιμό και βιδωτό καπάκι
- Τρυβλία
- Κλίβανος επώασης
- Anaerobic jar
- Πιπέττα μεταβλητού όγκου 100- 1000 μL (ratiopetta)
- Colony Counter
- Γυάλινη τρίγωνη ράβδος επίστρωσης (κρεπιέρα)

7.3.2 Προετοιμασία Μικροβιολογικών Αναλύσεων

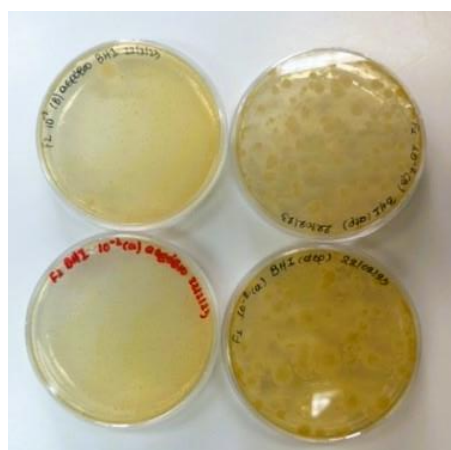
7.3.2.1 Παρασκευή Θρεπτικού Υπόστρώματος

Για την ανίχνευση της *Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX)* σε αερόβιο και αναερόβιο περιβάλλον χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό εκλεκτικό υπόστρωμα BHI Agar. Εργαστηριακά για την παρασκευή του BHI Agar αναμίχθηκαν BHI broth

και Agar. Σύμφωνα με τις οδηγίες παρασκευής τους, για δημιουργία ενός λίτρου διαλύματος από το κάθε ένα απαιτούνται 37 g σκόνης BHI broth και 15 g σκόνης Agar. Ωστόσο παρασκευάστηκαν 500 mL διαλύματος από το κάθε ένα γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν 18,5g και 7,5 g αντίστοιχα. Όλα τα υλικά ζυγίστηκαν στον αναλυτικό ζυγό και το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν απιονισμένο. Αφού αναδεύτηκαν όλα τα υλικά υπό θέρμανση και το διάλυμα έγινε απόλυτα διαυγές, το θρεπτικό υπόστρωμα αποθηκεύτηκε σε φιαλίδια και αποστειρώθηκε σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης για 15 min στους 121°C.



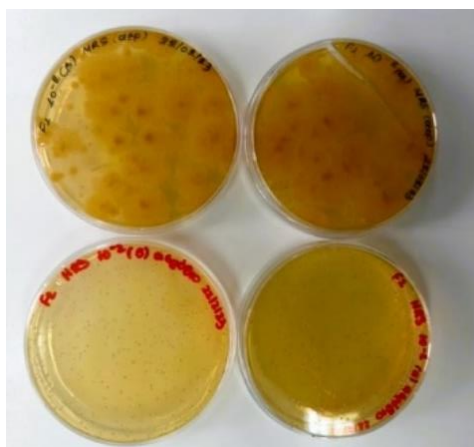
Εικόνα 12 Τρυβλία μετά από επώαση για ανίχνευση OMX (5/10/2022)



Εικόνα 13 Τρυβλία μετά από επώαση για ανίχνευση OMX (22/2/2023)

Για την ανίχνευση των *Οξυγαλακτικών βακτηρίων* σε αερόβιο και αναερόβιο περιβάλλον χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό εκλεκτικό υπόστρωμα MRS. Σύμφωνα με τις οδηγίες παρασκευής του για την παρασκευή 1000mL υποστρώματος MRS απαιτούνται 62 g σκόνης MRS. Ωστόσο παρασκευάστηκαν 500 mL διαλύματος γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν 31g σκόνης υποστρώματος. Όλα τα υλικά ζυγίστηκαν στον αναλυτικό ζυγό και το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν απιονισμένο. Αφού αναδεύτηκαν όλα τα υλικά υπό

θέρμανση το θρεπτικό υπόστρωμα αποθηκεύτηκε σε φιαλίδια και αποστειρώθηκε σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης για 15 min στους 121°C.

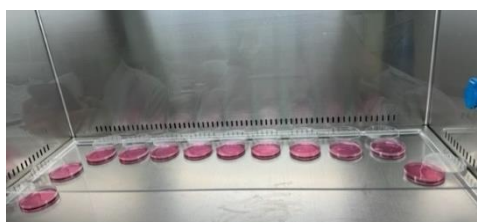


Εικόνα 14 Τρυβλία μετά από επόαση για ανίχνευση οξυγαλακτικών (22/02/2023)

Για την ανίχνευση των Ζυμών και Μυκήτων σε αερόβιο περιβάλλον χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό εκλεκτικό υπόστρωμα ROSE και Petrifilms.

Για το Rose Bengal Chloramphenicol Agar:

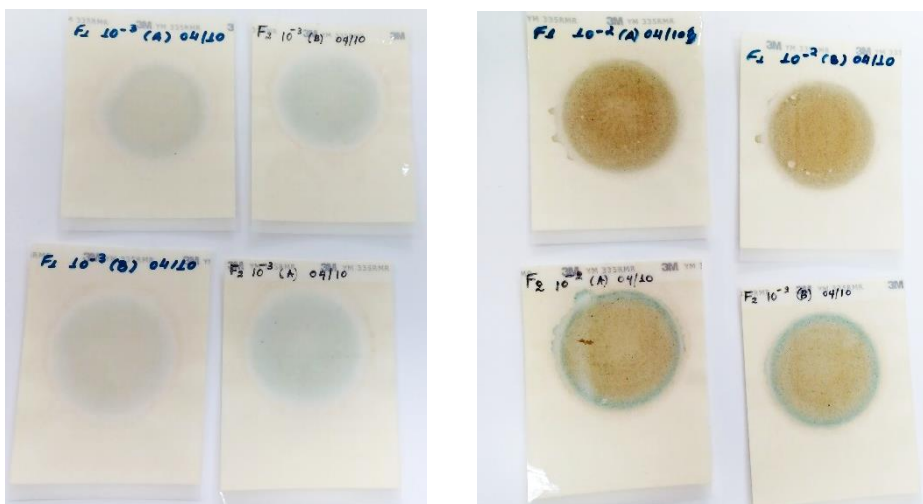
Σύμφωνα με τις οδηγίες παρασκευής του για την παρασκευή 500mL υποστρώματος RBC απαιτούνται 15,8 g σκόνης RBC. Ωστόσο παρασκευάστηκαν 300mL διαλύματος γι' αυτό χρησιμοποιήθηκαν 9,48g σκόνης υποστρώματος. Όλα τα υλικά ζυγίστηκαν στον αναλυτικό ζυγό και το νερό που χρησιμοποιήθηκε ήταν απιονισμένο. Αφού αναδεύτηκαν όλα τα υλικά υπό θέρμανση το θρεπτικό υπόστρωμα αποθηκεύτηκε σε φιαλίδια και αποστειρώθηκε σε υγρό κλίβανο αποστείρωσης για 15 min στους 121°C.



Εικόνα 15 Στρώσιμο υποστρώματος RBC σε τρυβλία petri

Για τα petrifilms:

Αρχικά τοποθετείται το petrifilm σε μια επίπεδη επιφάνεια. Έπειτα ανασηκώνοντας την επάνω ταινία και με την χρήση ενός σιφωνιού τοποθετείται 1 mL δείγματος στο κέντρο της κυκλικής επιφάνειας της κάτω ταινίας. Αφού αφηθεί η επάνω ταινία να κυλήσει στην επιφάνεια της κάτω ταινίας με τέτοιο τρόπο ώστε να απλωθεί μερικώς το δείγμα στον κύκλο, χρησιμοποιείται ένας διαστολέας με σκοπό να κυλήσει το δείγμα σε όλη την επιφάνεια του κύκλου εσωτερικά και να οριοθετηθεί. Τέλος τα δείγματα επωάζονται για 3 ημέρες στους 25°C.



Εικόνα 16 και 17 Petrifilms ύστερα από επώαση 3 ημερών

7.3.2.2. Παρασκευή δεκαδικών αραιώσεων

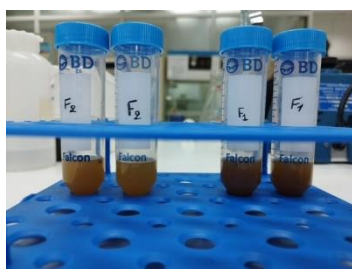
Για την δημιουργία των δεκαδικών αραιώσεων των κοπράνων για τα δείγματα F1 & F2 χρησιμοποιήθηκε ισότονο αραιωτικό υγρό. Η παρασκευή του έγινε με ανάμειξη 1,25mL μητρικού υγρού APHA και απιονισμένου νερού μέχρι την χαραγή της ογκομετρικής φιάλης των 1000mL Έπειτα με την βοήθεια του dispenser τοποθετούνται 9mL παρασκευάσματος σε γυάλινα σωληνάκια, τα οποία στην συνέχεια αποστειρώθηκαν σε υγρό κλίβανο για 15 min στους 121°C.

Ακολουθεί η παρασκευή 4 falcons με δείγματα κοπράνων, δύο για χρήση στις μικροβιολογικές αναλύσεις και δύο για εμβολιασμό των κωνικών C₃ & C₄ όπως

θα δούμε στην συνέχεια. Σε ασηπτικό περιβάλλον πήραμε 0,1 g κοπράνων από το δείγμα F1 και το τοποθετήσαμε μέσα στο Falcon όπου και προσθέσαμε 10 mL ισότονου αραιωτικού διαλύματος. Το διάλυμα που προέκυψε θεωρείται η πρώτη αραιώση δείγματος F1 (10^{-1}). Για την δημιουργία της επόμενης αραιώσης (10^{-2}), ανακινούμε το Falcon με την πρώτη αραιώση σε vortex και αφού αλλάξουμε το tip της πιπέτας λαμβάνουμε 1 mL διαλύματος και το τοποθετούμε στο ήδη αποστειρωμένο σωληνάκι που περιείχε 9 mL ισότονου αραιωτικού υγρού. Κατά αυτόν τον τρόπο προκύπτει η δεύτερη αραιώση. Ακολουθώντας την ίδια ακριβώς διαδικασία φτάνουμε μέχρι την αραιώση 10^{-5} . Η ίδια ακριβώς διαδικασία ακολουθείται και για το δείγμα F2.



Εικόνα 18 Ζύγιση Κοπράνων



Εικόνα 19 Δημιουργία αραιώσεων 10^{-1} σε falcons για τα κόπρανα

7.3.2.3 Μέθοδος Εμβολιασμού

Για την ανίχνευση της O.M.X και των οξυγαλακτικών βακτηρίων ακολουθήθηκε η τεχνική της ενσωμάτωσης. Τοποθετήσαμε σε ασηπτικές συνθήκες 1 mL αραιωμένου δείγματος σε τρυβλία και μετέπειτα ενσωματώσαμε το υπόστρωμα σε υγρή μορφή, αφού πρώτα το είχαμε αναθερμάνει σε υδατόλουτρο ($T^{\circ}\text{C} \approx 45^{\circ}\text{C}$). Τα τρυβλία επωάστηκαν σε κατάλληλες συνθήκες. Όσον αφορά την ανάπτυξη της O.M.X τα τρυβλία επωάστηκαν στους 37°C για 1 ημέρα σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, ενώ τα τρυβλία για τον έλεγχο των

οξυγαλακτικών επώαστηκαν στους 37°C για 2 εικοσιτετράωρα σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες.

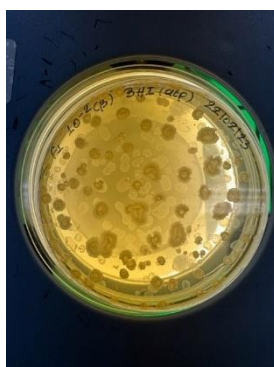
Για την ανίχνευση των ζυμών και μυκήτων ακολουθήθηκε η τεχνική της επίστρωσης. Αρχικά τοποθετήθηκε υγρό υπόστρωμα RBC υπό ασυπτικές συνθήκες σε τρυβλία και αφέθηκε να κρυώσει. Έπειτα με αποστειρωμένο tip πιπέτας λήφθηκαν 0,1mL από τα αραιωμένα δείγματα κοπράνων και τοποθετήθηκαν πάνω στο υπόστρωμα Rose. Με την βοήθεια της σπάτουλας γίνεται επίστρωση του δείγματος πάνω στο υπόστρωμα. Τα τρυβλία αφέθηκαν για επώαση για 3 ημέρες στους 37°C σε συνθήκες αναεροβίωσης.

7.3.2.4 Καταμέτρηση Αποικιών

Αφού ολοκληρωθεί η επώαση των τρυβλίων, ακολουθεί η καταμέτρηση των αποικιών με το ειδικό μηχάνημα καταμέτρησης Colony counter, το οποίο φέρει ειδικό φωτισμό και μεγεθυντικό φακό. Καταμετρήθηκαν όλες οι ορατές αποικίες ακόμα και οι πιο μικρές και για τα 62 τρυβλία. Τα ευρήματα παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 20 Συσκευή Καταμέτρησης Αποικιών Colony Counter



Εικόνα 21 Καταμέτρηση Αποικιών στο Colony Counter (22/02/2023)

7.4 Προσομοίωση Γαστρεντερικού Συστήματος in vitro

7.4.1 Υλικά και Εξοπλισμός

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την προσομοίωση του γαστρεντερικού συστήματος in vitro είναι:

- NaOH 1N
- Χολικά άλατα (bile extract porcine)
- Παγκρεατίνη (Pancreatin)
- Γλυκόζη
- Εκχύλισμα Μαγιάς
- Πεπτόνη Κρέατος
- Βλεννίνη από στομάχι χοίρων
- NaCl
- NaHCO₃
- K₂HPO₄
- KH₂PO₄
- MgSO₄·7H₂O
- Xylan
- Διαλυτό Άμυλο
- Πηκτίνη
- Tween.
- Πυκνό HCl
- Κυστεΐνη
- Πεψίνη

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για την προσομοίωση του γαστρεντερικού συστήματος *in vitro* είναι:

- Λύχνος Bunsen
- Κωνικές φιάλες
- Κλίβανος επώασης (memmert)
- Multi Vortex Genie digital (Scientific Industries)
- pHμετρο (HANNA HI 8010)
- Αναλυτικό ζυγό (Kern EW)
- Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης, 50ml (BD Falcon)
- Eppendorfs
- Όργανο φυγοκέντρωσης (Biofuge pico, Heraeus)
- Πιπέττα μεταβλητού όγκου 100-1000μL (ratiopetta)
- Βαμβάκι
- Αλουμινόχαρτο

7.4.2 Διαδικασία προσομοίωσης γαστρεντερικού συστήματος *in vitro*.

Η προσομοίωση του γαστρεντερικού συστήματος *in vitro* είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για την προσομοίωση της ανθρώπινης πέψης. Στο παρόν μοντέλο η πειραματική πορεία αποτελείται από πέντε φάσεις.

- Αρχική Φάση Α (t = 0 h)
- Γαστρική Φάση Β (t = 1,5 h)
- Εντερική Φάση Γ (t = 2 h)
- Πρώιμη εντερική ζύμωση Φάση Δ (t = 4h)
- Όψιμη εντερική ζύμωση Φάση Ε (t = 18h)

ΑΡΧΙΚΗ ΦΑΣΗ Α:

Κατά την αρχική φάση παρασκευάστηκαν τα εξής 4 δείγματα σε κωνικές φιάλες σε αποστειρωμένο περιβάλλον:

- C1: 40 ml γαστρικό υγρό (gastric fluid / GF)
- C2: 40 ml γαστρικό υγρό (GF) + 5 ml χαρουπόμελο (carob syrup / CB)
- C3: 40ml γαστρικό υγρό (GF) + 5 ml χαρουπόμελο (CB)
- C4: 40 ml γαστρικό υγρό (GF) +5 ml χαρουπόμελο (CB)



Εικόνα 22 Διαδικασία ζύγισης Γαστρικού υγρού και Χαρουπόμελου για τις κωνικές φιάλες

Από κάθε κωνική φιάλη συλλέγουμε δύο δείγματα των 2mL σε eppendorfs, στα οποία κάνουμε φυγοκέντριση στα 6000 rounds per minute (rpm) για 1 λεπτό και κρατάμε το υπερκείμενο υγρό. Η συλλογή των δειγμάτων γίνεται σε αποστειρωμένο περιβάλλον με χρήση πιπέτας και αποστειρωμένου tip. Ακολούθησε επώαση των κωνικών φιαλών σε σταθερή θερμοκρασία 37 °C για 1,5 ώρα υπό συνθήκες ανάδευσης.

ΓΑΣΤΡΙΚΗ ΦΑΣΗ Β:

Μετά την επώαση από κάθε κωνική φιάλη συλλέγουμε δύο δείγματα των 2mL σε erpendorfs, στα οποία κάνουμε φυγοκέντριση στα 6000 rpm για 1 λεπτό και κρατάμε το υπερκείμενο υγρό. Η συλλογή των δειγμάτων γίνεται σε αποστειρωμένο περιβάλλον με χρήση μικροπιπέτας και αποστειρωμένου tip.

Σε κάθε κωνική φιάλη έγινε ρύθμιση του pH = 8 με προσθήκη NaOH 1 N. Εν συνεχεία προστέθηκαν 0,12g χολικά άλατα και 0,2g παγκρεατίνη. Με την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας παρασκευάστηκε το εντερικό υγρό. Ακολούθησε επώαση των κωνικών φιαλών σε σταθερή θερμοκρασία 37 °C για 2 ώρες υπό συνθήκες ανάδευσης.



Εικόνα 23 Τα τέσσερα δείγματα C1,C2,C3,C4 στο τέλος της γαστρικής φάσης.

ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΦΑΣΗ Γ:

Μετά την επώαση από κάθε κωνική φιάλη συλλέγουμε δύο δείγματα των 2mL σε erpendorfs, στα οποία κάνουμε φυγοκέντριση στα 6000 rpm για 1 λεπτό και κρατάμε το υπερκείμενο υγρό. Η συλλογή των δειγμάτων γίνεται σε αποστειρωμένο περιβάλλον με χρήση μικροπιπέτας και αποστειρωμένου tip.



Εικόνα 24 Συλλογή δειγμάτων σε eppendorfs

Στις κωνικές φιάλες 3 και 4 έγινε προσθήκη των δειγμάτων κοπράνων F1 και F2 αντίστοιχα. Η προσθήκη πραγματοποιήθηκε με την χρήση των 2 επιπλέον falcons που είχαμε παρασκευάσει κατά τις μικροβιολογικές αναλύσεις. Ακολούθησε επώαση των κωνικών φιαλών σε σταθερή θερμοκρασία 37 °C για 4 ώρες υπό συνθήκες ανάδευσης.

ΠΡΩΙΜΗ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΦΑΣΗ Δ:

Μετά την επώαση από κάθε κωνική φιάλη συλλέγουμε δύο δείγματα των 2mL σε eppendorfs, στα οποία κάνουμε φυγοκέντριση στα 6000 rpm για 1 λεπτό και κρατάμε το υπερκείμενο υγρό. Η συλλογή των δειγμάτων γίνεται σε αποστειρωμένο περιβάλλον με χρήση μικροπιπέτας και αποστειρωμένου tip. Ακολούθησε επώαση των κωνικών φιαλών σε σταθερή θερμοκρασία 37°C για όλο το βράδυ υπό συνθήκες ανάδευσης.



Εικόνα 25 και 26 Επώαση και Ανάδευση κωνικών σε κλίβανο επώασης

Όψιμη Εντερική Φάση Ε:

Μετά την επώαση από κάθε κωνική φιάλη συλλέγουμε δύο δείγματα των 2mL σε erpendorfs, στα οποία κάνουμε φυγοκέντριση στα 6000 rpm για 1 λεπτό και κρατάμε το υπερκείμενο υγρό. Η συλλογή των δειγμάτων γίνεται σε αποστειρωμένο περιβάλλον με χρήση μικροπιπέτας και αποστειρωμένου tip.

ΦΑΣΗ	ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΣΕ ERPENDORFS			
Αρχική	$C_1A_1 \times 2$	$C_2A_1 \times 2$	$C_3A_1 \times 2$	$C_4A_1 \times 2$
Γαστρική	$C_1B_1 \times 2$	$C_2B_1 \times 2$	$C_3B_1 \times 2$	$C_4B_1 \times 2$
Εντερική	$C_1\Gamma_1 \times 2$	$C_2\Gamma_1 \times 2$	$C_3\Gamma_1 \times 2$	$C_4\Gamma_1 \times 2$
Πρώιμη Εντερική	$C_1\Delta_1 \times 2$	$C_2\Delta_1 \times 2$	$C_3\Delta_1 \times 2$	$C_4\Delta_1 \times 2$
Όψιμη Εντερική	$C_1E_1 \times 2$	$C_2E_1 \times 2$	$C_3E_1 \times 2$	$C_4E_1 \times 2$

Πίνακας 4 Τα δείγματα που συλλέχθηκαν ανά φάση σε erpendorfs (όπου x2: συλλέχθηκαν δύο ίδια δείγματα)

Τα δείγματα που προέκυψαν μετά την φυγοκέντριση, χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών με την μέθοδο Folin Ciocalteu.

7.4.3 Διακρίβωση Μεθόδου Παρασκευής Γαστρικού Υγρού

Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχή έκβαση του πειράματος αποτελεί η παρασκευή γαστρικού υγρού και η διακρίβωση της μεθόδου παρασκευής του. Για την παρασκευή 400mL γαστρικού υγρού έγινε ανάμιξη 0,16g γλυκόζης, 1,2g

εκχυλίσματος μαγιάς, 0,4g πεπτόνης από κρέας, 1,6g βλεννίνης από στομάχι χοίρων, 0,032g NaCl, 0,16g NaHCO₃, 0,016g K₂HPO₄, 0,016g KH₂PO₄, 0,0032g MgSO₄·7H₂O, 0,4g Xylan, 1,2g διαλυτό άμυλο, 0,8g πηκτίνη και 0,4 mL tween 80 σε 400 mL νερό. Έπειτα αναδεύτηκαν για περίπου 1,5 ώρα με μαγνήτη όλα τα συστατικά μέσα σε ποτήρι ζέσεως και αφού διαλύθηκαν ακολούθησε ρύθμιση του pH με πυκνό HCl 1N έως ότου pH = 2. Το διάλυμα αποστειρώνεται για 15 min στους 121°C. Τέλος γίνεται προσθήκη 0,2g κυστεΐνης και 1,2g πεψίνης. Το γαστρικό υγρό είναι έτοιμο προς χρήση. Όλα τα υλικά ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας και το τελευταίο βήμα έγινε παρουσία φλόγας για αποφυγή επιμολύνσεων του ήδη αποστειρωμένου γαστρικού υγρού.



Εικόνα 27 Συστατικά παρασκευής Γαστρικού υγρού

Για την διακρίβωση της μεθόδου παρασκευής του γαστρικού υγρού παρασκευάστηκαν 4 διαφορετικά δείγματα γαστρικού υγρού. Οι ποσότητες των συστατικών παραμένουν σταθερές ωστόσο διαφοροποιείται η σειρά των βημάτων.

- **Δείγμα 1:** προσθήκη κυστεΐνης και πεψίνης ΠΡΩΤΗ την αποστείρωση
- **Δείγμα 2:** προσθήκη κυστεΐνης και πεψίνης ΑΜΕΣΩΣ ΜΕΤΑ την αποστείρωση
- **Δείγμα 3:** προσθήκη κυστεΐνης και πεψίνης το ΕΠΟΜΕΝΟ ΠΡΩΤΗ μετά την αποστείρωση

- **Δείγμα 4:** προσθήκη κυστεΐνης και πεψίνης ΠΡIN & ΜΕΤΑ την αποστείρωση.

Και για τα 4 δείγματα ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία των πέντε (5) φάσεων που περιγράφηκε παραπάνω, όπως και η συλλογή των δειγμάτων σε eppendorfs στο τέλος της κάθε φάσης. Τα δείγματα αυτά φυγοκεντρήθηκαν στα 6000 rpm για 1 λεπτό και τα νέα δείγματα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών με την μέθοδο Folin Ciocalteu.

7.5 Προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu

7.5.1 Υλικά και εξοπλισμός.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin Ciocalteu είναι:

- Αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu
- Κορεσμένο διάλυμα ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3)
- Γαλλικό οξύ (Gallic Acid, GA)
- Απεσταγμένο νερό
- Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητα

Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών συστατικών με τη μέθοδο Folin Ciocalteu είναι:

- eppendorfs
- Φυγόκεντρος (Biofuge pico, Heraeus)
- Στατώ
- Κυψελίδες

- Πιπέττα μεταβλητού όγκου 100- 1000 μL (ratiopetta)
- Πιπέττα μεταβλητού όγκου 20- 200 μL (Transferpette S)
- Πιπέττα Gilson
- Ρύγχη
- Υδατόλουτρο
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

7.5.2 Παρασκευή Κορεσμένου Διαλύματος Ανθρακικού Νατρίου (Na_2CO_3)

Για την παρασκευή του ανθρακικού νατρίου σε 800,0 mL απεσταγμένου νερού προστίθενται 200,0 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου. Το διάλυμα αφήνεται να βράσει έως ότου διαλυθούν όλα τα στερεά συστατικά. Αφού κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται περίπου 80 g κρυστάλλων ανθρακικού νατρίου και το διάλυμα αφήνεται για 24 ώρες. Τέλος, το προκύπτον διάλυμα διηθείται και αραιώνεται έως τα 1000mL με απεσταγμένο νερό.

7.5.3 Πρωτόκολλο μεθόδου Folin Ciocalteu

- Σε κυψελίδες των 4,0 mL, τοποθετείται 0,2 mL = 20 μL δείγματος (από τα erpendorfs της κάθε φάσης).
- Στην ίδια κυψελίδα προστίθενται 2500,0 μL απεσταγμένο νερό και 200 μL αντιδραστήριο Folin Ciocalteu.
- Γίνεται ανάδευση με την βοήθεια του καπακιού της κυψελίδας και έπειτα αυτές τοποθετούνται σε σκοτεινό μέρος για 8 λεπτά.
- Στην συνέχεια προστίθεται στις κυψελίδες 500 μL Na_2CO_3 και ακολουθεί ξανά ανάδευση.

- Οι κυψελίδες τοποθετούνται για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 40°C, σε συνθήκες σκότους.
- Ακολουθείται η ίδια διαδικασία για την δημιουργία ενός «τυφλού» διαλύματος με εξαίρεση την προσθήκη του δείγματος. Το διάλυμα αυτό συμβάλει στην διόρθωση του σφάλματος των τιμών απορρόφησης.
- Επιπλέον δημιουργείται και μια κυψελίδα μόνο με απιονισμένο νερό για τον μηδενισμό του φασματοφωτομέτρου.
- Τέλος φασματοφωτομετρούμε στα 750 nm και καταγράφουμε τις τιμές απορρόφησης. Η πειραματική διαδικασία και οι προσδιορισμοί πραγματοποιήθηκαν τρεις φορές για κάθε δείγμα.



Εικόνα 28 Κυψελίδες ύστερα από προσθήκη όλων των διαλυμάτων



Εικόνα 29 Κυψελίδες μετά από 30 min σε υδατόλουτρο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

8.1 Αποτελέσματα και Συζήτηση

8.1.1.Μικροβιολογικές Αναλύσεις

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν δύο φορές. Η πρώτη έγινε τον Οκτώβριο του 2022 πριν την πρώτη πειραματική προσέγγιση του γαστρεντερικού συστήματος *in vitro* και η δεύτερη έγινε τον Φεβρουάριο του 2023 πριν την τρίτη και τελευταία πειραματική προσέγγιση που πραγματοποιήθηκε. Ο λόγος που πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν είναι για να εξασφαλιστεί η παρουσία των μικροοργανισμών στα κόπρανα και η διατήρηση αυτών μετά από 4 μήνες στην κατάψυξη. Για την ανίχνευση των ζυμών και των μυκήτων την πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε petrifilm ενώ την δεύτερη Rose agar.

ΔΕΙΓΜΑ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	cfu/mL
F1 (ασθενής)	MRS (αναερ)	$5 \cdot 10^2$
	BHI (αερ)	$9,5 \cdot 10^4$
	BHI (αναερ)	$> 10^6$
	ΖΥΜΕΣ/ΜΥΚΗΤΕΣ	0
F2 (υγιής)	MRS (αναερ)	$8,5 \cdot 10^5$
	BHI (αερ)	$6,8 \cdot 10^5$
	BHI (αναερ)	$1,7 \cdot 10^6$
	ΖΥΜΕΣ/ΜΥΚΗΤΕΣ	$> 10^4$

Πίνακας 5α Αποτελέσματα
Μικροβιολογικών Αναλύσεων (Οκτώβριος
2022)

ΔΕΙΓΜΑ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	cfu/mL
F1 (ασθενής)	ΕΠΙΣΤΙΒΑΔΕΥΣΗ	$1,1 \cdot 10^4$
	MRS (αναερ)	0
	BHI (αερ)	$2,3 \cdot 10^4$
	BHI (αναερ)	$6,1 \cdot 10^1$
	ΖΥΜΕΣ/ΜΥΚΗΤΕΣ	0
F2 (υγιής)	ΕΠΙΣΤΙΒΑΔΕΥΣΗ	$3,6 \cdot 10^2$
	MRS (αναερ)	$2,6 \cdot 10^4$
	BHI (αερ)	$5 \cdot 10^2$
	BHI (αναερ)	$> 10^4$
	ΖΥΜΕΣ/ΜΥΚΗΤΕΣ	0

Πίνακας 5β Αποτελέσματα
Μικροβιολογικών Αναλύσεων (Φεβρουάριος
2023)

➤ Πρώτη Μικροβιολογική Ανάλυση:

Όσον αφορά τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν ανιχνεύτηκε σημαντικός αριθμός στο δείγμα κοπράνων του ασθενούς συγκριτικά με το δείγμα του υγιούς που ανιχνεύθηκαν $8,5 \cdot 10^5$ cfu/ml κοπράνων.

Όσον αφορά την Ο.Μ.Χ σε αερόβιες συνθήκες, το δείγμα κοπράνων του υγιούς παρουσιάζει μεγαλύτερο βαθμό βακτηρίων συγκριτικά με το δείγμα κοπράνων του ασθενούς. Ωστόσο ισχύει το αντίθετο σε συνθήκες αναερόβιωσης.

Όσον αφορά τις ζύμες και τους μύκητες και τα δύο δείγματα φαίνεται να είναι απαλλαγμένα.

Και στα δύο δείγματα κοπράνων υπάρχουν ενεργοί μικροοργανισμοί. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως οι ασθενείς με νόσο Crohn's παρουσιάζουν αυξημένες συγκεντρώσεις αναερόβιων βακτηρίων.

➤ Δεύτερη Μικροβιολογική Ανάλυση:

Όσον αφορά τα οξυγαλακτικά βακτήρια με την τεχνική της επιστιβάδευσης, σχηματίστηκαν περισσότερες αποικίες στον ασθενή από ότι στον υγιή. Σε συνθήκες αναερόβιωσης ωστόσο συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο, γεγονός που δείχνει ότι τα κόπρανα F2 (του υγιούς) έχουν περισσότερα ενεργά αυστηρά αναερόβια οξυγαλακτικά βακτήρια..

Όσον αφορά την Ο.Μ.Χ σε αερόβιες συνθήκες, το δείγμα κοπράνων του ασθενούς παρουσιάζει μεγαλύτερο βαθμό βακτηρίων συγκριτικά με το δείγμα κοπράνων του υγιούς. Σε συνθήκες αναερόβιωσης κανένα από τα δύο δείγματα δεν παρουσιάζει υψηλό φορτίο.

Όσον αφορά τις ζύμες και τους μύκητες και τα δύο δείγματα είναι πλήρως απαλλαγμένα.

➤ Συγκριτικά οι 2 αναλύσεις:

Όσον αφορά τα οξυγαλακτικά βακτήρια φαίνεται να έχουν ελαφρώς εξασθενήσει μετά από 4 μήνες κατάψυξης και στο δείγμα του ασθενούς και στο δείγμα του υγιούς.

Το ίδιο συμβαίνει και με την Ο.Μ.Χ. Όσον αφορά τις ζύμες και τους μύκητες και τα δύο δείγματα συνεχίζουν να είναι πλήρως απαλλαγμένα. Συμπερασματικά μπορούμε να αναφέρουμε πως τα κόπρανα έχουν ακόμα ορισμένους ενεργούς μικροοργανισμούς ωστόσο το μικροβιακό φορτίο έχει υποβαθμιστεί λόγω κατάψυξης.

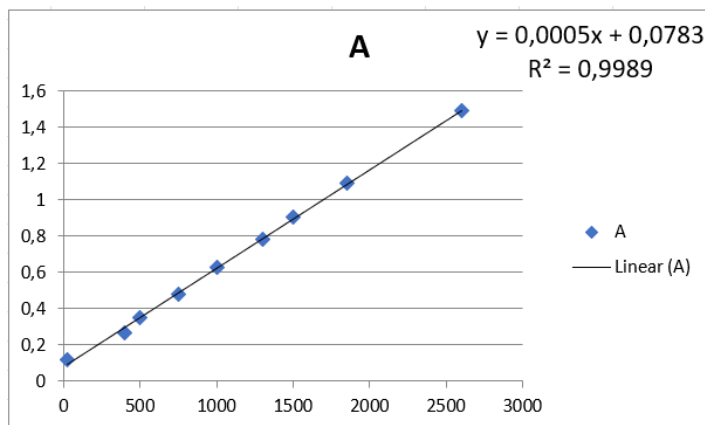
8.1.2 Αποτελέσματα Ολικών Φαινολικών Ουσιών

Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ουσιών των δειγμάτων και για τις 5 φάσεις της *in vitro* πέψης, μετά την εφαρμογή της μεθόδου Folin Ciocalteu.

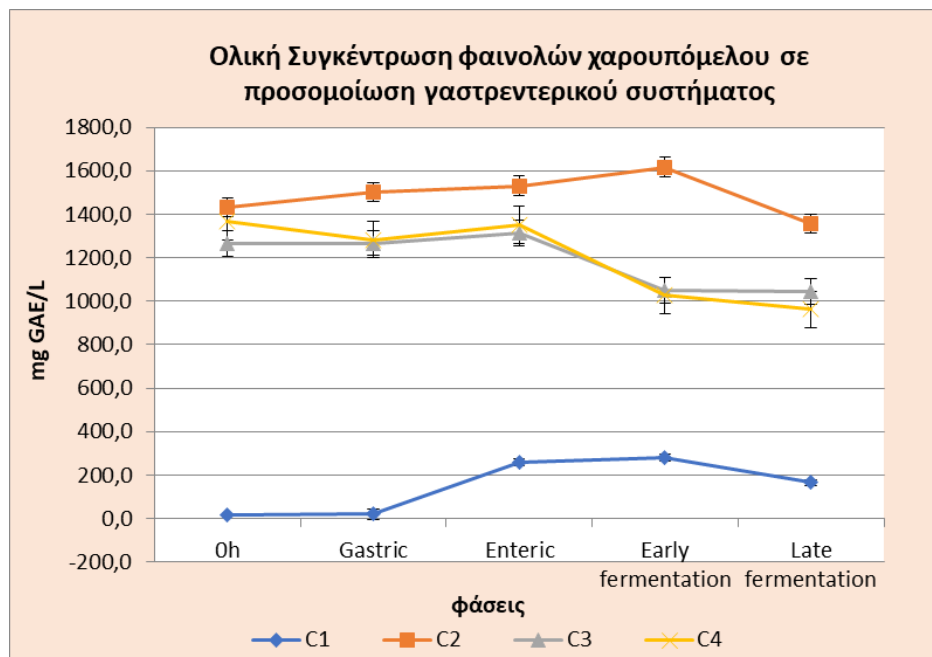
Πραγματοποιήθηκαν 3 προσομοιώσεις γαστρεντερικού συστήματος *in vitro*. Τα αποτελέσματα της κάθε προσομοίωσης υπολογίστηκαν βάσει μιας πρότυπης καμπύλης αναφοράς με πρότυπη ουσία το γαλλικό οξύ και είναι εκφρασμένα σε mg γαλλικού οξέος/ L πεπτικού υγρού.

ΕΞΙΣΩΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ:					$y = 0,0005x + 0,0783$	
FOLIN					Y=ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ στα 750nm	
					X=mg/L GA	
					A = f c	
Καμπύλη Αναφοράς Γαλλικού Οξέος (GA)						
C (mg / L)	A 750 nm	A 750 nm – Blank		Average	C (mg / L)	A
25	0,183	0,182	0,1165	0,1155	25	0,116
400	0,332	0,322	0,2655	0,2655	400	0,2655
500	0,374	0,42	0,3535	0,3535	500	0,3535
750	0,532	0,557	0,4655	0,4905	750	0,478
1000	0,691	0,697	0,6245	0,6305	1000	0,6275
1300	0,863	0,837	0,7965	0,7705	1300	0,7835
1500	0,987	0,955	0,9205	0,8885	1500	0,9045
1850	1,196	1,158	1,0915	1,0915	1850	1,0915
2600	1,559	1,4925	1,4925	1,4925	2600	1,4925
Blank	0,053	0,08				

Εικόνα 30 Εξίσωση Πρότυπης Καμπύλης Αναφοράς



Διάγραμμα 1 Εξίσωση Πρότυπης Καμπύλης Αναφοράς



Διάγραμμα 2α Ολική Συγκέντρωση Πολυφαινολών (Προσομοίωση 1η)

Όπου:

C1: γαστρικό υγρό (GF) , **C2:** GF + χαρουπόμελο (carob syrup / CB) ,

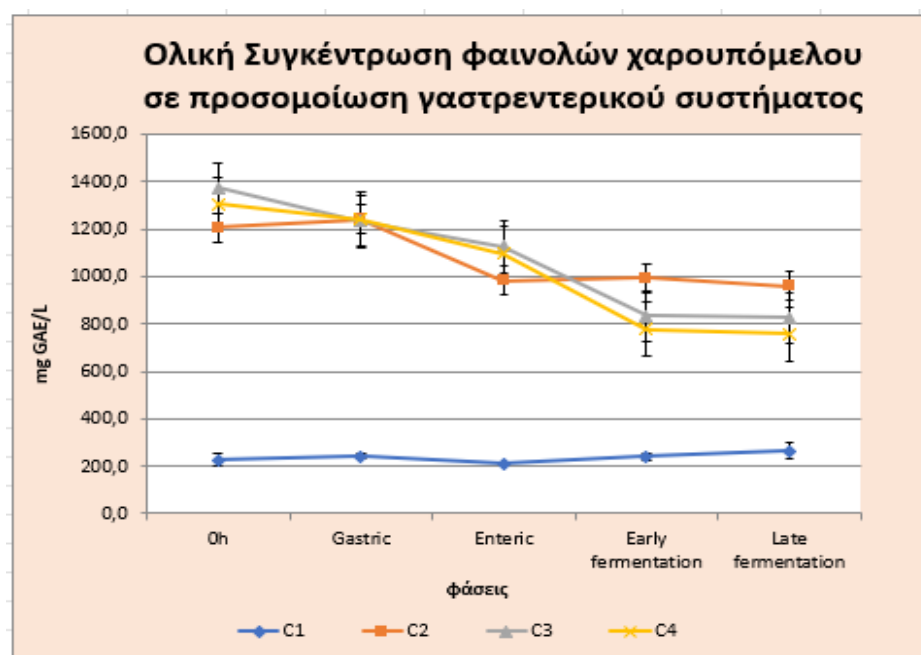
C3: GF + CB + κόπρανα ασθενούς (F1), **C4:** GF + CB + κόπρανα υγιούς (F2)

Από το διάγραμμα της πρώτης προσομοίωσης φαίνεται ότι το γαστρικό υγρό (C1) συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα παρουσιάζει πολύ χαμηλή συγκέντρωση φαινολικών ουσιών σε όλες τις φάσεις του πειράματος με μια μικρή αύξηση των τιμών από την γαστρική φάση και έπειτα λόγω προσθήκης των χολικών αλάτων και της παγκρεατίνης που συνθέτουν το εντερικό υγρό. Η διαφορά με τα άλλα δείγματα είναι στατιστικώς σημαντική και είναι απολύτως φυσιολογική καθώς το δείγμα C1 περιέχει μόνο γαστρικό υγρό.

Το δείγμα C2 παρουσιάζει την υψηλότερη συγκέντρωση φαινολών σε όλες τις φάσεις και είναι το δείγμα που περιέχει γαστρικό υγρό και χαρουπόμελο και αποτελεί το δείγμα ελέγχου (control) με το οποίο θα συγκρίνουμε τα άλλα δύο δείγματα C3 και

C4. Αυτό μας επιβεβαιώνει πως το χαρούπι έχει αυξημένα επίπεδα φαινολών και υψηλή αντιοξειδωτική δράση.

Τα δείγματα C3 και C4 έχουν παρόμοια συμπεριφορά. Συγκριτικά με το C2, τα δύο δείγματα παρουσιάζουν μια μικρή μείωση στην γαστρική και εντερική φάση η οποία αυξάνεται στην πρόιμη εντερική ζύμωση όπου προστίθενται τα κόπρανα του ασθενούς με νόσο Crohn's στο δείγμα C3 και του υγιούς στο δείγμα C4. Οι τιμές των αποτελεσμάτων δείχνουν πως το κάθε δείγμα στην πρόιμη εντερική ζύμωση μειώθηκε κατά 20,1% και 24,2% αντίστοιχα σε σχέση με την εντερική φάση, δηλαδή πριν την ένταξη των κοπράνων. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως το δείγμα του υγιούς ατόμου απορροφά περισσότερο τις φαινολικές ενώσεις του χαρουπιού συγκριτικά με το δείγμα του ασθενούς. Τέλος συγκρίνοντας την τελευταία φάση (όψιμη εντερική ζύμωση) της *in vitro* πέψης με την αρχική και για τα δύο δείγματα βλέπουμε σημαντική στατιστική διαφορά καθώς η συγκέντρωση των φαινολών μειώθηκε κατά 17,4% για το δείγμα C3 (ασθενής) και 29,6% για το δείγμα C4 (υγιής).



Διάγραμμα 2β Ολική Συγκέντρωση Πολυφαινολών (Προσομοίωση 2η)

Όπου:

C1: γαστρικό υγρό (GF) , **C2:** GF + χαρουπόμελο (carob syrup / CB) ,

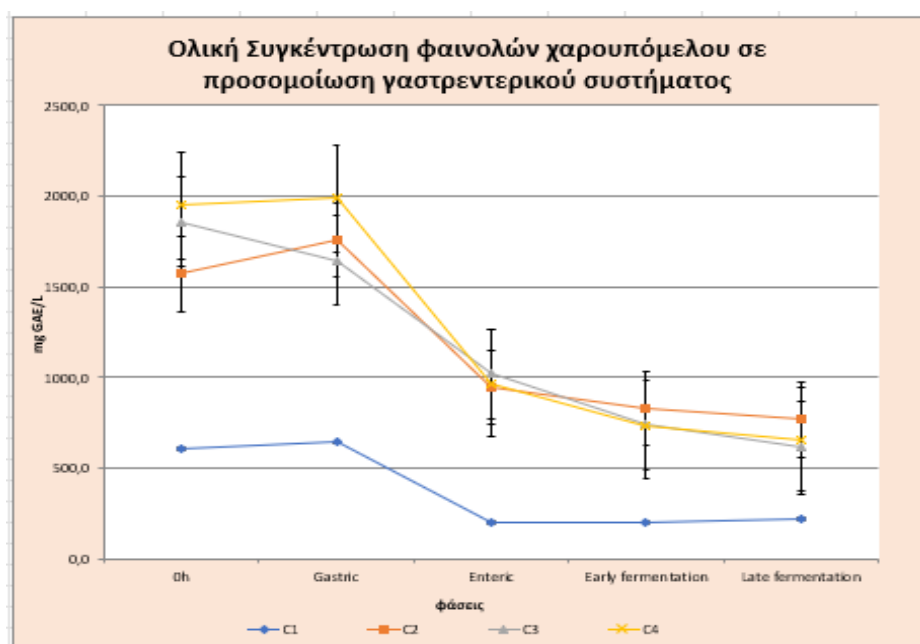
C3: GF + CB + κόπρανα ασθενούς (F1), **C4:** GF + CB + κόπρανα υγιούς (F2)

Από το διάγραμμα της δεύτερης προσομοίωσης φαίνεται ότι το γαστρικό υγρό (C1) συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα παρουσιάζει πολύ χαμηλή συγκέντρωση φαινολικών ουσιών σε όλες τις φάσεις του πειράματος. Η διαφορά με τα υπόλοιπα δείγματα παραμένει στατιστικώς σημαντική και είναι φυσιολογική καθώς το δείγμα C1 περιέχει μόνο γαστρικό υγρό.

Το δείγμα C2 παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση φαινολών συγκριτικά με το C1 καθώς είναι το δείγμα που περιέχει μόνο γαστρικό υγρό και χαρουπόμελο. Αυτό μας επιβεβαιώνει πως το χαρούπι έχει αυξημένα επίπεδα φαινολών και υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο παρουσιάζει χαμηλότερα επίπεδα συγκριτικά με την πρώτη προσομοίωση. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί πως στο τέλος της πέψης η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών έχει μειωθεί κατά 20,6% συγκριτικά με την αρχική της φάση. Αυτό μας επιβεβαιώνει πως η συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών δεν παραμένει σταθερή και μειώνεται ήδη από το γαστρικό περιβάλλον και έπειτα χωρίς να χρειαστεί να προστεθούν τα κόπρανα. Επομένως υπάρχει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα πολυφαινολών.

Τα δείγματα C3 και C4 έχουν παρόμοια συμπεριφορά. Η συγκέντρωση των φαινολών μειώνεται σταθερά έως την εντερική φάση. Από την εντερική φάση όπου προστίθενται τα κόπρανα του ασθενούς με νόσο Crohn's στο δείγμα C3 και του υγιούς στο δείγμα C4, η συγκέντρωση των φαινολών μειώνεται σε ποσοστό 26,0%

και 29,2% αντίστοιχα έως την φάση της πρώιμης εντερικής ζύμωσης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως το δείγμα του υγιούς ατόμου απορροφά περισσότερο τις φαινολικές ενώσεις του χαρουπιού συγκριτικά με το δείγμα του ασθενούς. Τέλος συγκρίνοντας την τελευταία φάση της *in vitro* πέψης με την αρχική και για τα δύο δείγματα βλέπουμε διαφορά καθώς η συγκέντρωση των φαινολών μειώθηκε κατά 39,9% για το δείγμα C3 (ασθενής) και 42,1% για το δείγμα C4 (υγιής) όμως η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική.



Διάγραμμα 2γ Ολική Συγκέντρωση Πολυφαινολών (Προσομοίωση 3η)

Όπου:

C1: γαστρικό υγρό (GF) , **C2:** GF + χαρουπόμελο (carob syrup / CB) ,

C3: GF + CB + κόπρανα ασθενούς (F1), **C4:** GF + CB + κόπρανα υγιούς (F2)

Από το διάγραμμα της τρίτης και τελευταίας προσομοίωσης φαίνεται ότι το γαστρικό υγρό (C1) συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα παρουσιάζει πολύ χαμηλή

συγκέντρωση φαινολικών ουσιών, ιδίως στις τελευταίες 3 φάσεις του πειράματος. Στις 2 πρώτες φάσεις παρατηρούμε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών συγκριτικά με τις τιμές των προηγούμενων 2 προσομοιώσεων για τις ίδιες φάσεις. Αυτό συμβαίνει καθώς το γαστρικό υγρό που χρησιμοποιήθηκε στην τελευταία προσομοίωση ήταν διαφορετικό από τα προηγούμενα. Στο συγκεκριμένο γαστρικό υγρό η πεψίνη και η κυστεΐνη προστέθηκαν εις διπλούν, μία φορά κατά την παρασκευή του γαστρικού υγρού πριν αυτό αποστειρωθεί και άλλη μια φορά στα μέσα της επώασης κατά την διάρκεια της Α' φάσης. Θεωρήθηκε πως μετά την αποστείρωση τα ένζυμα καταστράφηκαν για αυτό προστέθηκαν ξανά. Ωστόσο οι τιμές των αποτελεσμάτων δείχνουν πως όχι μόνο δεν είχαν καταστραφεί κατά την αποστείρωση αλλά λειτούργησαν προσθετικά καθώς συγκριτικά με το δείγμα C1 της προηγούμενης προσομοίωσης (Διάγραμμα 2β), η συγκέντρωση των φαινολών στην Α φάση έχει μια αύξηση της τάξης του 66% και η συγκέντρωση των φαινολών στην Β' φάση αυξήθηκε κατά 84,6%.

Η αύξηση αυτή δικαιολογείται καθώς η κυστεΐνη είναι πρόδρομη ένωση της αντιοξειδωτικής ουσίας «Γλουταθειόνη». Η γλουταθειόνη βοηθά στην αποτοξίνωση από βλαβερές τοξίνες, είναι από τους καλύτερους καταστροφείς ελεύθερων ριζών και συντίθεται από κυστεΐνη, γλυκίνη και γλουταμινικό οξύ. Τα δύο τελευταία είναι εύκολα διαθέσιμα στον οργανισμό, η κυστεΐνη όμως όχι, για αυτό είναι και η ουσία που περιορίζει το ρυθμό σύνθεσης της αντιοξειδωτικής ουσίας «Γλουταθειόνη» εντός του κυττάρου. Επιπλέον είναι σημαντικό να αναφερθεί πως η κυστεΐνη έχει από μόνη της αντιοξειδωτικές ιδιότητες λόγω της ικανότητας της να υφίσταται οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις. Τέλος η κυστεΐνη καταβολίζεται αυθόρμητα στο γαστρεντερικό σύστημα και κατά την πέψη. Η διαφορά του δείγματος C1 με τα υπόλοιπα δείγματα παραμένει

στατιστικώς σημαντική παρά την απότομη αύξηση στις 2 πρώτες φάσεις της πέψης και είναι φυσιολογική καθώς το δείγμα C1 περιέχει μόνο γαστρικό υγρό.

Το δείγμα C2 παρουσιάζει υψηλότερη συγκέντρωση φαινολών συγκριτικά με το C1 καθώς είναι το δείγμα που περιέχει μόνο γαστρικό υγρό και χαρουπόμελο. Αυτό μας επιβεβαιώνει πως το χαρούπι έχει αυξημένα επίπεδα φαινολών και υψηλή αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο παρουσιάζει χαμηλότερα επίπεδα συγκριτικά με την πρώτη προσομοίωση. Η απότομη αύξηση της συγκέντρωσης στην γαστρική φάση δικαιολογείται από την διπλή ποσότητα των αμινοξέων και δικαιολογεί την τόσο μεγάλη διαφορά συγκεντρώσεων μεταξύ γαστρικής και εντερικής φάσης. Χωρίς την διπλή ποσότητα αμινοξέων που εκτόξευσε την συγκέντρωση των φαινολών, η μείωση που θα βλέπαμε μεταξύ των δύο προαναφερθέντων φάσεων θα ήταν πιο ομαλή όπως στις προηγούμενες δύο προσομοιώσεις. Είναι σημαντικό να τονίσουμε πως από την εντερική φάση και μετά τα επίπεδα των συγκεντρώσεων για το δείγμα C2 σταθεροποιούνται και είναι υψηλότερα από εκείνα των δειγμάτων C3 και C4. Γεγονός φυσιολογικό καθώς τα δείγματα 3 και 4 περιέχουν ενεργούς μικροοργανισμούς από τα κόπρανα που μειώνουν την συγκέντρωση των φαινολών. Τα δείγματα C3 και C4 έχουν παρόμοια συμπεριφορά. Εμφανώς ξεκινάμε με υψηλή συγκέντρωση φαινολών λόγω της διπλής ποσότητας των αμινοξέων ωστόσο η συγκέντρωση τους μειώνεται θεαματικά έως την εντερική φάση καθώς εξελίσσεται η επώαση. Έπειτα οι τιμές των πολυφαινολών συνεχίζουν να μειώνονται από την εντερική φάση όπου προστίθενται τα κόπρανα του ασθενούς με νόσο Crohn's στο δείγμα C3 και του υγιούς στο δείγμα C4 έως ότου φτάσουν στο επιθυμητό επίπεδο κατά την όψιμη φάση με μία μείωση της τάξης του 35% και για τα δύο δείγματα. Κατά την όψιμη εντερική ζύμωση το δείγμα C3 έχει 618,7 mg γαλλικού οξέος/L ενώ το C4 έχει 650,7 mg γαλλικού οξέος/L. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα έως τώρα συμπεράσματα πως ο υγιής

εμφανίζει υψηλότερα επίπεδα απορρόφησης φαινολικών ενώσεων συγκριτικά με τον ασθενή. Ωστόσο το αποτέλεσμα της 3^{ης} προσομοίωσης δικαιολογείται αν λάβουμε υπ' όψη μας τα αποτελέσματα των δεύτερων μικροβιολογικών αναλύσεων που δείχνουν ξεκάθαρα πως οι μικροοργανισμοί από το δείγμα κοπράνων του υγιούς έχουν μειωθεί και όσον αφορά την O.M.X σε αερόβιο περιβάλλον είναι εμφανώς λιγότεροι από εκείνους του ασθενούς. Τέλος συγκρίνοντας την τελευταία φάση της *in vitro* πέψης με την αρχική και για τα δύο δείγματα βλέπουμε σημαντικά στατιστική διαφορά καθώς η συγκέντρωση των φαινολών μειώθηκε κατά 66,7% για το δείγμα C3 (ασθενής) και 66,6% για το δείγμα C4 (υγιής).

Συνυπολογίζοντας και τις 3 προσομοιώσεις γαστρεντερικού συστήματος παρατηρούμε πως η μεγαλύτερη μείωση στην συγκέντρωση των πολυφαινολών και για τα δύο δείγματα (ασθενούς και υγιούς) πραγματοποιήθηκε από το τέλος της εντερικής φάσης έως και το τέλος της πρώιμης εντερικής ζύμωσης. Επιπλέον παρατηρούμε πως από το τέλος της πρώιμης έως και την ολοκλήρωση της όψιμης εντερικής ζύμωσης δεν υπήρξε σημαντική μεταβολή και η συγκέντρωση διατηρήθηκε σε σταθερά επίπεδα. Τέλος συγκρίνοντας τα ποσοστά τελικής μείωσης συγκεντρώσεων φαινολών του χαρουπόμελου και στις 3 προσομοιώσεις (Πίνακας 4) η υψηλότερη απορρόφηση πολυφαινολών συνολικά παρατηρήθηκε στα δείγματα C4 του υγιούς. Αυτό οφείλεται στο πλήθος των μικροοργανισμών που υπήρχαν στο δείγμα κοπράνων του υγιούς που ήταν περισσότεροι από εκείνους του ασθενούς με αποτέλεσμα να καταναλώσουν μεγαλύτερη ποσότητα πολυφαινολών.

Επομένως εξάγεται το συμπέρασμα πως το μικροβίωμα του εντέρου αλληλεπιδρά με τις φαινολικές ενώσεις του χαρουπόμελου, μειώνοντας με στατιστικά σημαντική διαφορά την αρχική συγκέντρωση των ολικών πολυφαινολών.

	Προσομοίωση 1η			Προσομοίωση 2η			Προσομοίωση 3η		
	C2	C3	C4	C2	C3	C4	C2	C3	C4
Α' Φάση	1431,4	1265,4	1364,7	1206,7	1371,4	1304,7	1570,7	1859,4	1948,1
Ε' Φάση	1358,1	1044,7	961,4	958,7	824,1	756,1	766,7	618,7	650,7
Μείωση (%)	5,1%	17,4%	29,6%	20,6%	39,9%	42,0%	51,2%	66,7%	66,6%

Πίνακας 6 Συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών των δειγμάτων C2,C3,C4 κατά την αρχική και τελική φάση της πέψης και το ποσοστό μείωσης αυτών.

Όπου:

C2: γαστρικό υγρό (GF) + χαρουπόμελο (carob syrup / CB),

C3: GF + CB + κόπρανα ασθενούς (F1), **C4:** GF + CB + κόπρανα υγιούς (F2)

8.1.3 Αποτελέσματα Διακρίβωσης Μεθόδου Παρασκευής Γαστρικού Υγρού

Παραπάνω παρατίθενται τα αποτελέσματα των ολικών φαινολικών ουσιών των 4 διαφορετικών δειγμάτων γαστρικού υγρού και για τις 5 φάσεις της in vitro πέψης της γαστρεντερικής προσομοίωσης.

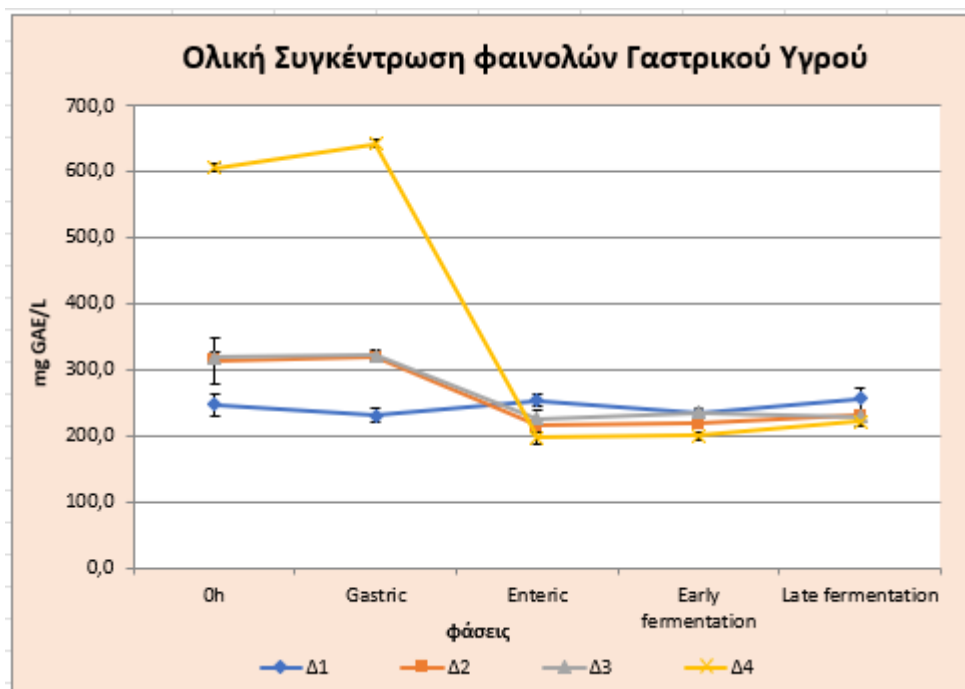
Επισημαίνεται πως:

Δ1: GF με προσθήκη ενζύμων (κυστεΐνη και πεψίνη) ΠΡΙΝ την αποστείρωση.

Δ2: GF με προσθήκη ενζύμων (κυστεΐνη και πεψίνη) ΤΟ ΙΔΙΟ ΒΡΑΔΥ ΜΕΤΑ την αποστείρωση.

Δ3: GF με προσθήκη ενζύμων (κυστεΐνη και πεψίνη) ΤΟ ΕΠΟΜΕΝΟ ΠΡΩΙ ΜΕΤΑ την αποστείρωση.

Δ4: GF με προσθήκη ενζύμων (κυστεΐνη και πεψίνη) ΠΡΙΝ & ΜΕΤΑ την αποστείρωση (διπλή ποσότητα)



Διάγραμμα 3: Ολική Συγκέντρωση Πολυφαινολών Γαστρικού Υγρού

Βάσει αυτών των στοιχείων και λαμβάνοντας υπόψιν πως η κυστεΐνη είναι πρόδρομη ένωση της αντιοξειδωτικής ουσίας Γλουταθειόνη όπως και του γεγονότος ότι από μόνη της η κυστεΐνη δρα ως αντιοξειδωτική ουσία δικαιολογούμε την απότομη αύξηση της συγκέντρωσης των πολυφαινολών για το δείγμα Δ4. Η διαφορά του από τα υπόλοιπα δείγματα είναι στατιστικώς σημαντική ωστόσο ακολουθεί την ίδια πορεία με εκείνη που ακολουθούν τα δείγματα στις παραπάνω προσομοιώσεις. Η συγκέντρωση μειώνεται απότομα από την γαστρική έως την εντερική φάση και έπειτα παραμένει σταθερή έως το τέλος της όψιμης εντερικής φάσης. Υπολογίζοντας το τελικό ποσοστό μείωσης των πολυφαινολών από την αρχική φάση έως το τέλος της όψιμης παρατηρώ μια σημαντική μείωση 63,4%.

Όσον αφορά τα δείγματα Δ2 και Δ3 που τα ένζυμα προστίθενται μετά την αποστείρωση, ακολουθούν παρόμοια πορεία και οι τιμές των συγκεντρώσεων τους

είναι πολύ κοντά, επομένως δεν υπάρχει στατιστική διαφορά μεταξύ τους. Τα δείγματα Δ2 & Δ3 ακολουθούν την ίδια πορεία με απότομη μείωση της συγκέντρωσης από την γαστρική έως την εντερική φάση και έπειτα σταθερή συγκέντρωση πολυφαινολών έως το τέλος της όψιμης εντερικής φάσης. Υπολογίζοντας το τελικό ποσοστό μείωσης των πολυφαινολών από την αρχική φάση έως το τέλος της όψιμης παρατηρώ μια μείωση της τάξης του 27% και στα δύο δείγματα.

Όσον αφορά το δείγμα Δ1 όπου τα ένζυμα προστέθηκαν πριν την αποστείρωση φαίνεται να ακολουθεί μια διαφοροποιημένη πορεία από τα υπόλοιπα δείγματα. Οι τιμές των συγκεντρώσεων παραμένουν σταθερές και παραπλήσιες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως για το συγκεκριμένο δείγμα υπολογίζοντας το τελικό ποσοστό διαφοράς των πολυφαινολών από την αρχική φάση έως το τέλος της όψιμης παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης τους κατά 3,6% και όχι μείωση όπως αναμέναμε. Αυτό πιθανότατα συμβαίνει καθώς τα ένζυμα που προστέθηκαν καταστράφηκαν μερικώς μετά την αποστείρωση και η συγκέντρωση των πολυφαινολών κατά την εντερική φάση είναι εξαρχής πολύ μικρή συγκριτικά με τα υπόλοιπα δείγματα.

	Δ1	Δ2	Δ3	Δ4
Α' Φάση	247,0	313,7	319,0	605,7
Ε' Φάση	256,0	231,0	230,0	221,7
Μείωση (%)	-3,6%	26,4%	27,9%	63,4%

Πίνακας 7 Συγκεντρώσεις των ολικών φαινολών των δειγμάτων Δ1,Δ2,Δ3,Δ4 κατά την αρχική και τελική φάση της πέψης και το ποσοστό μείωσης αυτών.

Συμπερασματικά ακολουθώντας 4 διαφορετικές μεθόδους παρασκευής μπορούμε να πούμε με ασφάλεια πως ο πιο σωστός τρόπος είναι αυτός που υποδεικνύει η βιβλιογραφία, δηλαδή η προσθήκη των ενζύμων να γίνεται μετά την αποστείρωση. Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια κατανόησης του σφάλματος που

παρουσίασε η τρίτη προσομοίωση γαστρεντερικού συστήματος *in vitro* και κατανόησης της συμπεριφοράς των δειγμάτων και του γαστρικού υγρού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

9.1 Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας υποδεικνύουν ότι η βιοδιαθεσιμότητα του εντέρου σε πολυφαινόλες από τροφές πλούσιες σε αντιοξειδωτικές ουσίες όπως το χαρουπόμελο μπορεί να μειωθεί λόγω της βιομετατροπής που λαμβάνει χώρα στο παχύ έντερο.

Ακόμα μέσω της διακρίβωσης της μεθόδου παρασκευής του γαστρικού υγρού, φάνηκε πως η πλέον κατάλληλη μέθοδος παρασκευής είναι με την προσθήκη των 2 αμινοξέων μετά την αποστείρωση, ειδάλως είτε καταστρέφονται είτε δρουν συνεργιστικά.

Τέλος παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ του μικροβιώματος του ασθενούς με νόσο Crohn's και του μικροβιώματος του υγιούς, με τον τελευταίο να παρουσιάζει μεγαλύτερη μείωση στο σύνολο των φαινολικών ουσιών, επομένως μεγαλύτερη απορρόφηση άρα και πιο ενεργό μεταβολισμό.

Ωστόσο, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του μικροβιώματος του εντέρου και των συστατικών των τροφίμων και ανάλυση του τρόπου με τον οποίο μπορούν να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα των βιοδραστικών ουσιών- πολυφαινολών στα τρόφιμα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Barracosa, P.M.T. Almeida and J.Cenis (1996) Characterization of cultivars of carob tree in Algarve (Portugal) . In proceedings of the III international Carob Symposium. Cabanas – Tavira, Portugal (in press)
2. Battle I (1997) Current situation and possibilities of development of the carob tree (Ceratonia Siliqua L.) in the Mediterranean region. Unpublished FAO report. Rome, Italy.
3. Coit J.E (1951) Carob varieties Fruit varieties and Hort digest. Rittenhouse San Diego, California.
4. Diamantoglou S. and K. Mitrakos (1981) Leaf Longevity in Mediterranean evergreen sclerophylls in components of productivity – Basic and Applied Aspects. Junk Publishers, The Hague.
5. Batlle I., Tous J (1997) Carob Tree Ceratonia Siliqua L Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Εκδότης: IPK
6. Kourmouli S. , Chalepaki A. (2021) Carob and carob products: ways of processing, nutrition and pharmaceutical applications. Published 29/03/2021.
7. Konstantakis A. (2021) Beneficial and therapeutic properties of carob in humans. Published 10/11/2021.
8. Janciauskiene S. (2020) The Beneficial Effects of Antioxidants in Health and Diseases Published 22/05/2020.
9. Loukides S, , Bakakos P, Kostikas K. (2011) Oxidative stress in patients with COPD. Curr Drug Targets.
10. Neeraj Pramod, J,Singh, S,Singh J. (2013) Antioxidants to the rescue of cell under invasion of free radicals-a review. Int J Basic Appl Med Sci.

11. Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*.
12. De la Fuente M, Miquel J. (2009) An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm*
13. Shahidi F. (2000) Antioxidants in food and food antioxidants. Published 04/07/2000
14. Eunok Choe, David B. Min (2009) Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods Published 16/09/2009.
15. Jian-Ming Lü, Peter H. Lin, Qizhi Yao, Changyi Chen (2010) Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems Published 10/05/2010.
16. Shalaby E. (2019) Antioxidants, London, United Kingdom by IntechOpen
17. Satish Balasaheb N., Dilipkumar P. (2015) Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms.
18. Y. Park, S. Nam, H. J. Yi, H. J. Hong and M. Lee, *Nutr. Res.*, (2009)
19. B. Halliwell and J. M. C. (2007). Gutteridge, in *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, Oxford, 4th edn,
20. C. von Sonntag, in *Free-radical-induced DNA damage and its repair*, Springer, Heidelberg, 2006.
21. M. Dizdaroglu and P. Jaruga, *Free Radical Res.* (2012)
22. M. N. Alam, N. J. Bristi and *Saudi Pharm. J.* (2013)
23. Canabate-Diaz B, Segura Carretero A, Fernandez-Gutierrez A, Belmonte Vega A, Garrido Frenich A, Martinez Vidal JL, Duran Martos J. (2007) Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chem*
24. Cao W, Chen W, Sun S, Guo P, Song J, Tian C. (2007). Investigating the antioxidant mechanism of violacein by density functional theory method. *J Mol Struct: Theochem*

25. Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*
26. Folin, O., and Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*
27. Waterhouse, A.L. (2001). Determination of Total Phenolics. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry (F1.1.1-F1.1.8)*. John Wiley & Sons, Inc.
28. Slinkard, K., and Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*
29. Pérez-Magariño, S., and González-Sanjosé, M.L. (2012). Wine Analysis: Total Phenolic Index. In *Wine Chemistry and Biochemistry*
30. Makris, D.P., and Rossiter, J.T. (2002). Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and asparagus spears (*Asparagus officinalis*): Effect on flavonol content and antioxidant status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
31. Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
32. Mensor, L.L., Menezes, F.S., Leitão, G.G., Reis, A.S., dos Santos, T.C., Coube, C.S., and Leitão, S.G. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*
33. Hsu, C.L., Chen, W., and Weng, Y.M. (2003). Glycemic index and glycemic load of selected Chinese traditional foods. *World Journal of Gastroenterology*
34. Ortega, N., Reguant, J., Romero, M.P., Macià, A., and Motilva, M.J. (2010). Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant capacity, and color of

fortified wines during accelerated aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

35. Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
36. Sun, B., Ricardo-da-Silva, J.M., and Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
37. Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Katrich, E., Lojek, A., Číž, M., Haruenkit, R., and Trakhtenberg, S. (2001). Comparison of the contents of the main biochemical compounds and the antioxidant activity of some Spanish olive oils as determined by four different radical scavenging tests. *Journal of Nutritional Biochemistry*
38. Rahman, M.M., and Kim, H.K. (2012). Colorimetric estimation of total phenolic content with phosphomolybdic acid reagents. *Natural Product Communications*
39. Prior, R.L., Wu, X., and Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
40. Jane A. Foster, Karen-Anne McVey Neufeld (2013) Gut–brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. Published: 04/02/23
41. S.R. Gill. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome *Science* (2006)
42. R.D. Heijtz. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2011)
43. K.A. Neufeld. Effects of intestinal microbiota on anxiety-like behavior, *Commun. Integr. Biol.* (2011)
44. K.M. Neufeld. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice, *Neurogastroenterol. Motil.* (2011)

45. J. Qin. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing, *Nature* (2010)
46. P.B. Eckburg. Diversity of the human intestinal microbial flora, *Science* (2005)
47. C. Lay. Design and validation of 16S rRNA probes to enumerate members of the *Clostridium leptum* subgroup in human faecal microbiota, *Environ. Microbiol.* (2005)
48. M. Diamant. Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes, *Obes. Rev.* (2011)
49. M. Arumugam. Enterotypes of the human gut microbiome, *Nature* (2011)
50. R. Bennet. The fecal microflora of 1-3-month-old infants during treatment with eight oral antibiotics, *Infection* (2002)
51. Cho. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity, *Nature* (2012)
52. L. Drago. Cultivable and pyrosequenced fecal microflora in centenarians and young subjects, *J. Clin. Gastroenterol.* (2012)
53. P.J. Turnbaugh. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice, *Sci. Transl. Med.* (2009)
54. T. Yatsunencko. Human gut microbiome viewed across age and geography, *Nature* (2012)
55. R. Blumberg, F. Powrie. Microbiota, disease, and back to health: a metastable journey, *Sci. Transl. Med.*, 4 (2012)
56. S.K. Mazmanian, J.L. Round, D.L. Kasper. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease, *Nature*, (2008)
57. Ezra-Nevo 1, Sílvia F Henriques 1, Carlos Ribeiro 2.

58. The diet-microbiome tango: how nutrients lead the gut brain axis (2020) Published 19/03/20
59. Ευρωπαϊκή Ομοσπονδία των Συλλόγων Ασθενών με Νόσο Crohn & Ελκώδη Κολίτιδα. Κατανοώντας τα Ιδιοπαθή Φλεγμονώδη Νοσήματα του Εντέρου (2019)
60. Α.-Φ.Α. Μεντής,¹ Φ. Γύπας,² Ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου: Ο ρόλος του στην υγεία και στη νόσο ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE (2013)
61. Hill, J.O., Peters, J.C., Yang, D. et al. (2012). Energy balance and obesity. *Circulation*
62. Bray, G.A. (2019). Energy and fructose from beverages sweetened with sugar or high-fructose corn syrup pose a health risk for some people. *Advances in Nutrition*
63. Kolanowski, J., Bodson, A., Elies, J., Muccioli, G.G., & Mansouri, A. (2018). Metabolic and signaling roles of branched-chain amino acids in physiology and pathology. *Cellular and Molecular Life Sciences*
64. Vandenberghe, C., St-Pierre, V., Courchesne-Loyer, A., Hennebelle, M., Castellano, C.A., Cunnane, S.C. (2017). Caffeine intake increases plasma ketones: an acute metabolic study in humans. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*
65. Weyer, C., Pratley, R.E., & Salbe, A.D. (2000). Energy expenditure, fat oxidation, and body weight regulation: a study of metabolic adaptation to long-term weight change. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*
66. A.Vander, J Sherman, D Luciano M Τσακόπουλος, *Human Physiology*, Broken Hill Publisher LTD(2011)
67. Δρ. Τσιγκρής Χρήστος,Π Χειρουργική Δ.Ε.Π.Α Χειρουργικής Κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας (2014)
68. Δρ.Α.Φικιώρης Επίδραση της διατροφής και της οξονίωσης στην εντερική χλωρίδα του ανθρώπου, Ορεστιάδα (2007)

69. Δρ. Χαρίκλεια.Α Στεφανάκη Επίδραση των προβιοτικών στην ανάλυση της σύστασης του σώματος στους μεταβολικούς παράγοντες και στην εντερική χλωρίδα έφηβων με προδιαβήτη, Αθήνα (2020)
70. Δρ.Βασιλική Πουλίδου Φραγμοί και Μικροβίωμα, Θεσσαλονίκη (2020)