



Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

Σχολή Επιστημών Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πτυχιακή Εργασία

Μελέτη αλληλεπίδρασης μικροοργανισμών με αντιοξειδωτικές ενώσεις.

Diploma Thesis

The interaction of microorganisms with antioxidants



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

Αθανασία Μητσοπούλου/Athanasia Mitsopoulou

AM/RN

71617164

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

Ανθμία Μπατρίνου / Anthimia Batrinou

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2023

**Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του
Εισηγητή**

**Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι
Εξεταστική Επιτροπή:**

Επιβλέπων Καθηγητής : Ανθμία Μπατρίνου, Επίκουρη Καθηγήτρια

Μέλος Επιτροπής : Ειρήνη Στρατή, Επίκουρη Καθηγήτρια

Μέλος Επιτροπής : Σπύρος Κοντελής, Επίκουρος Καθηγητής

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ/ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μητσοπούλου Αθανασία του Σωτηρίου, με αριθμό μητρώου 71617164 και φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου.»

Η Δηλούσα



Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα. Μπατρίνου Ανθιμία για την καθοδήγησή της και την βοήθειά της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας. Την κα. Στρατή Ειρήνη που χωρίς αυτήν δεν θα είχε πραγματοποιηθεί μεγάλο μέρος της εργασίας και την υποψήφια διδάκτωρ Πυροβόλου Αικατερίνη που ήταν δίπλα σε ότι χρειαζόμασταν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	7
1.1 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ Η ΕΝΕΡΓΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΜΟΡΙΩΝ	7
1.2 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	9
1.3 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	10
1.4 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΛΑΜΒΑΝΟΝΤΑΙ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΣΤΟΜΑΧΟΥ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΟΥ	16
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	16
2.2 ΔΟΜΗ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ	16
2.3 ΣΤΟΜΑΧΙ.....	19
2.4 ΈΝΤΕΡΟ	22
2.4.1 Λεπτό έντερο.....	22
2.4.2 Παχύ έντερο	23
2.5 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ	24
2.6 ΔΡΑΣΗ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ.....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΛΛΗΛΕΠΑΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ ΣΤΟΜΑΧΟΥ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΟΥ	27
3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	27
3.2 ΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ	28
3.3 ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΤΟΥ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	34
ΣΚΟΠΟΣ	34
4.1 ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
4.1.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN–CIOCALTEU	35

4.1.2 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ.....	36
4.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ	38
4.2.1 ΓΑΣΤΡΙΚΟ-ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΥΓΡΟ	38
4.2.2 Α ΔΟΚΙΜΗ ΜΕ ΚΑΨΟΥΛΕΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	40
4.2.3 Β ΔΟΚΙΜΗ ΜΕ ΡΟΔΙ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ (I).....	47
4.2.4. Γ ΔΟΚΙΜΗ ΜΕ ΡΟΔΙ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ (II).....	53
Κεφάλαιο 5. Συμπεράσματα.....	59

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.	60
---------------------------	-----------

Πίνακες

Πίνακας 1: Παραδείγματα αντιοξειδωτικών με δράση στον ανθρώπινο οργανισμό	11
Πίνακας 2: Παραδείγματα αντιοξειδωτικών συστατικών των τροφίμων και ορισμένες από τις πηγές τους	14
Πίνακας 3: Σημαντικές παράμετροι των οργάνων του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα.	17
Πίνακας 4: Κυριότερες κατηγορίες μικροοργανισμών ανά όργανο του γαστρεντερικού σωλήνα.....	25
Πίνακας 5: Παραδείγματα βακτηρίων εντέρου και αποικοδόμηση πολυφαινολών	28
Πίνακας 6: Παραδείγματα δράσης αντιοξειδωτικών στη μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα.....	31
Πίνακας 7: Φάσεις επώασης Α δοκιμής.....	40
Πίνακας 8: Δείγματα Α δοκιμής	40
Πίνακας 9: Δείγματα από κάθε χρονική φάση επώασης Α δοκιμής.....	41
Πίνακας 10: Αποτελέσματα Follin της Α δοκιμής.....	43
Πίνακας 11: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα Α δοκιμής. Αλληλεπίδραση ροδιού με προβιοτικά στελέχη.....	45
Πίνακας 12: Φάσεις επώασης Β Δοκιμής	47
Πίνακας 13: Δείγματα Β Δοκιμής.....	47
Πίνακας 14: Δείγματα από κάθε χρονική φάση επώασης Β δοκιμής.....	48
Πίνακας 15: Αποτελέσματα Folin της Β Δοκιμής	49
Πίνακας 16: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα Δοκιμής Β: αλληλεπίδραση ροδιού με ανθρώπινο μικροβίωμα Ι.....	51

Πίνακας 17: Φάσεις Γ Δοκιμής.....	53
Πίνακας 18: Δείγματα Γ Δοκιμής	53
Πίνακας 19: Δείγματα από κάθε χρονική φάση επώασης Γ δοκιμή	54
Πίνακας 20: Αποτελέσματα Folin της Γ Δοκιμής.....	55
Πίνακας 21: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα Δοκιμής Γ: αλληλεπίδραση ροδιού με ανθρώπινο μικροβίωμα II.....	56
Πίνακας 22: Καταμέτρηση μικροοργανισμών των δειγμάτων κοπράνων που χρησιμοποιήθηκαν στην Γ δοκιμή	58

Εικόνες

Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του πεπτικού συστήματος, όπου απεικονίζεται και ο γαστρεντερικός σωλήνας	17
Εικόνα 2: α. Η ανατομία του στομάχου. b. Στοιβάδες κυττάρων και δομή στομάχου	21
Εικόνα 3: Σχηματισμός υδροχλωρικού οξέος (HCl) στους γαστρικούς αδένες	22
Εικόνα 4: Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου.....	35
Εικόνα 5 :Petri-film https://wahanahilabindonesia.co.id/wp-content/uploads/2021/01/3M-Petri-film.jpg	38
Εικόνα 6 :Διαστολέας	38
Εικόνα 7: Οι κυψελίδες του πειράματος πριν την τοποθέτηση σε υδατόλουτρο.....	42
Εικόνα 8: Οι κυψελίδες του πειράματος μετά το πέρας 30 λεπτών σε υδατόλουτρο	42

Σχήματα

Σχήμα 1: Κυριότερες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (NOS)	8
Σχήμα 2: Φαινολικές ενώσεις σε φρούτα berry	13
Σχήμα 3: Αντιοξειδωτικά και επίδραση στο μικροβίωμα του ανθρώπου	30

Γραφήματα

Γράφημα 1: Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέως	43
Γράφημα 2: Τιμές ολικού φαινολικού φορτίου (mgGAE/L) στις διάφορες φάσεις της γαστρεντερικής προσομείωσης: GF only=Γαστρικό υγρό, GF+juice= Γαστρικό υγρό και χυμός ροδιού, GF+Juice+probiotics=Γαστρικό υγρό και Χυμός ροδιού και Προβιοτικά, GF+Seeds+probiotics= Γαστρικό υγρό και Σπόροι ροδιού και Προβιοτικά	46

Γράφημα 3: Τιμές ολικού φαινολικού φορτίου (mgGAE/L) στις διάφορες φάσεις της γαστρεντερικής προσομείωσης : GF only=Γαστρικό υγρό, GF+juice= Γαστρικό υγρό και χυμός ροδιού, GF+seeds=Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού, sample 1+juice= Γαστρικό υγρό και χυμός ροδιού και δείγμα κοπράνων 1, sample 1+seeds=Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού και δείγμα κοπράνων 1, sample 2+seeds= Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού και δείγμα κοπράνων 2, sample 3+seeds= Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού και δείγμα κοπράνων 3.....52

Γράφημα 4: Τιμές ολικού φαινολικού φορτίου (mgGAE/L) στις διάφορες φάσεις της γαστρεντερικής προσομείωσης : GF =Γαστρικό υγρό, GF+seeds=Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού ,GF+SEEDS+F1=Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού και δείγμα κοπράνων 1, GF+SEEDS+F2=Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού και δείγμα κοπράνων 2..... 57

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στους οργανισμούς υπάρχουν ορισμένες δραστικές ή ενεργές μορφές μορίων οι οποίες σχετίζονται με τα οξειδωτικά φαινόμενα που συντελούνται στον οργανισμό.

Οι ενεργές μορφές μορίων, αν βρεθούν σε υπερβολικές ποσότητες στον οργανισμό ξεκινούν να επιτίθενται σε μόρια του οργανισμού, τα οποία έχουν ζωτική σημασία. Έτσι μπορούν να επηρεάσουν το γενετικό υλικό του οργανισμού, αλλά και τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες του οργανισμού προκαλώντας τροποποιήσεις ή κατακερματισμό των μορίων.

Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι ουσίες που έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν ή να αναστέλλουν τις αντιδράσεις των ενεργών μορφών των μορίων με αποτέλεσμα να προστατεύουν τον οργανισμό από τις βλαβερές συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Τα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται από τον άνθρωπο μέσω της διατροφής έχουν κυρίως φυτική προέλευση. Πρόκειται για φρούτα, λαχανικά, αρωματικά ή φαρμακευτικά φυτά και τα μπαχαρικά, τα οποία είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις, βιταμίνες και καροτενοειδή. Τα αντιοξειδωτικά επιδρούν και στη σύνθεση και τη λειτουργία της γαστρεντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου και έχει τόσο βραχυπρόθεσμες όσο και μακροχρόνιες συνέπειες στην υγεία του. Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των μικροοργανισμών του εντέρου και του στομάχου με τις αντιοξειδωτικές ουσίες που ο άνθρωπος μπορεί να λάβει μέσω της διατροφής του. Το θέμα προσεγγίζεται τόσο θεωρητικά όσο και πειραματικά. Θεωρητικά συλλέγονται επιστημονικά στοιχεία που θεμελιώνουν και εξηγούν τη σχέση μεταξύ μικροοργανισμών και αντιοξειδωτικών στο γαστρεντερικό ανθρώπινο σύστημα και πειραματικά γίνεται μία προσπάθεια δημιουργίας μιας προσομοίωσης ενός γαστρεντερικού συστήματος με δείγματα κοπράνων από εθελοντές και την αλληλεπίδραση του με τα αντιοξειδωτικά μετά από την προσθήκη σπόρων ροδιού.

ΛΕΞΕΙΣΚΛΕΙΔΙΑ: Αντιοξειδωτικές ουσίες, γαστρεντερικό σύστημα, μικροχλωρίδα, ρόδι

ABSTRACT

In organisms there are certain active or active forms of molecules that are related to the oxidative processes that take place in the organism.

The active forms of molecules, if found in excessive amounts in the body, start attacking molecules in the body that are of vital importance. Thus they can affect the genetic material of the body, but also the body's lipids, proteins and carbohydrates, causing modifications or fragmentation of the molecules. Antioxidant compounds are substances that have the ability to neutralise or inhibit the reactions of the active forms of molecules, thus protecting the body from the harmful effects of oxidative stress. The antioxidants obtained by humans through the diet are mainly of plant origin. These are fruits, vegetables, aromatic or medicinal plants and spices, which are rich in phenolic compounds, vitamins and carotenoids. Antioxidants also affect the composition and function of the human gastrointestinal microflora and have both short-term and long-term effects on human health. The aim of this thesis is to investigate the interaction of the microorganisms of the gut and stomach with the antioxidants that humans can obtain through their diet. Theoretically, scientific data are collected to establish and explain the relationship between microorganisms and antioxidants in the human gastrointestinal system and experimentally, an attempt is made to create a simulation of a gastrointestinal system, with fecal samples from volunteers, and its interaction with antioxidants after the addition of pomegranate seeds.

KEY WORDS: Antioxidants, gastrointestinal system, microflora, pomegranat

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

1.1 Δραστικές ή ενεργές μορφές μορίων

Στους οργανισμούς υπάρχουν ορισμένες δραστικές ή ενεργές μορφές μορίων οι οποίες σχετίζονται με τα οξειδωτικά φαινόμενα που συντελούνται στον οργανισμό. Οι κυριότερες κατηγορίες αυτών των μορίων είναι (Avila-Escalante et al., 2020):

- Ενεργές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species - ROS)
- Ενεργές μορφές αζώτου (reactive nitrogen species - RNS)
- Ενεργές μορφές θείου (reactive sulfur species - RSS)
- Ενεργές μορφές καρβονυλίου (reactive carbonyl species - RCS)
- Ενεργές μορφές σεληνίου (reactive selenium species - RSeS)

Ο ανθρώπινος οργανισμός παράγει ενεργές μορφές μορίων με δύο τρόπους:

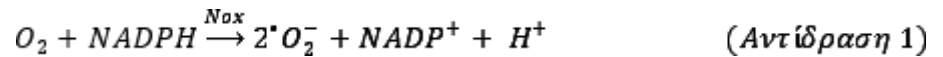
- Μέσω φυσιολογικών βιοχημικών οδών. Έτσι, για παράδειγμα, παραγωγή ενεργών μορφών μορίων φυσιολογικά μπορεί να συντελεστεί στα μιτοχόνδρια κατά την αναπνευστική διαδικασία, όπου ηλεκτρόνια (e^-) μεταφέρονται περιστασιακά σε μόρια οξυγόνου και δημιουργούνται ανιόντα σουπεροξειδίου ($\cdot O_2^-$). Επίσης, ενεργές μορφές μορίων παράγονται από τη δράση ορισμένων ενζύμων όπως των λιποξυγενασών¹ ή ως αποτέλεσμα της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς ορισμένα κύτταρα παράγουν ενεργές μορφές μορίων ώστε να εξουδετερώσουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς (Avila-Escalante et al., 2020, Jiang et al., 2021).
- Μέσω έκθεσης σε εξωτερικούς παράγοντες, όπως είναι ο καπνός του τσιγάρου, τοξικά αέρια, ιονίζουσα ακτινοβολία, υπεριώδες φως, φαρμακευτική αγωγή, όζον, κατανάλωση αλκοόλ, κατανάλωση λιπαρών τροφών σε υπερβολική ποσότητα ή συχνότητα, φυτοφάρμακα ή μέταλλα (Oroian & Esrliche, 2015).

Οι κατηγορίες των δραστικών ενώσεων που έχει κινήσει ιδιαίτερα το επιστημονικό ενδιαφέρον είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (NOS). Στο Σχήμα 1, διακρίνονται ορισμένες από τις κυριότερες δραστικές ενώσεις αυτών των κατηγοριών, καθώς

¹ Λιποξυγενάση (lipoxygenase): Ένζυμο που συμμετέχει στην οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων. Οδηγεί στην παραγωγή υδροϋπεροξειδίων

και η αλληλομετατροπή από τη μία μορφή στην άλλη. Παρατηρείται ότι η μετακίνηση ηλεκτρονίων δημιουργεί αλυσιδωτές αντιδράσεις και νέες μορφές ενεργών μορίων, συχνά παρουσία ενζύμων όπως (Avila-Escalante et al., 2020, Jiang et al., 2021):

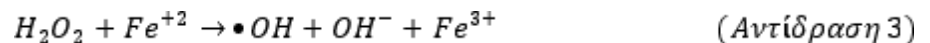
- Οξειδάση του NADPH (Nox), η οποία μετατρέπει το μοριακό οξυγόνο σε ανιόντα σουπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet -}$), σύμφωνα με την αντίδραση 1:



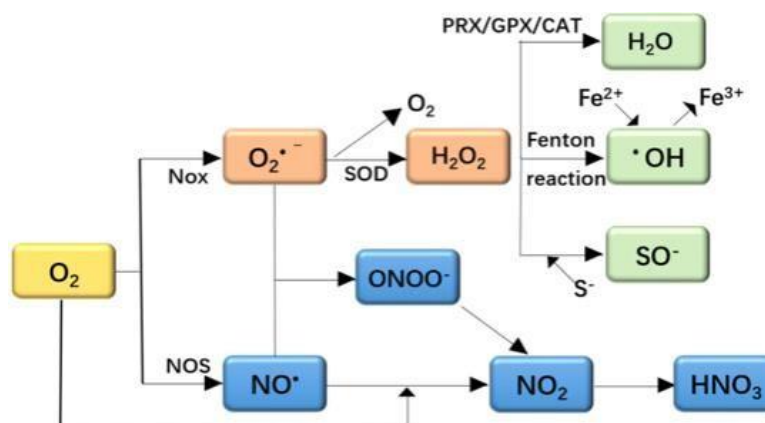
- Μεδισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), η οποία μετατρέπει τα ανιόντα σουπεροξειδίου σε ήπιο τοξικό υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και μη τοξικό O_2 , σύμφωνα με την αντίδραση 2:



- Η υπεροξειρεδοδεξίνη (PRX), η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλυταθειόνης (GPX) είναι σημαντικά ένζυμα που μειώνουν τη συγκέντρωση του υπεροξειδίου στο περιβάλλον του κυττάρου, παράγοντα μόρια νερού.
- Οι αντιδράσεις Fenton παράγουν νέες ενεργές μορφές οξυγόνου, ρίζες υδροξυλίου (OH^\bullet), σύμφωνα με την αντίδραση 3:



- Η συνθάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) καταλύει την αντίδραση διάσπασης της L-αργινίνης για την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO^\bullet).



Σχήμα 1: Κυριότερες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) και αζώτου (NOS)

Πηγή: Jiang et al., 2021

Το μονοξειδίο του αζώτου και το σουπεροξειδίο του οξυγόνου μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ενεργών μορφών αζώτου όπως υπεροξυνιτρώδες ανιόν (ONOO^-), διοξειδίο του αζώτου ($\text{NO}_2\bullet$) και νιτρικού οξέος (HNO_3) (Jiang et al., 2021).

Οι ενεργές μορφές των μορίων προστατεύουν τον ανθρώπινο οργανισμό έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Όταν όμως βρίσκονται στον οργανισμό σε υπερβολικές ποσότητες τότε λειτουργούν επιθετικά έναντι ζωτικών μορίων των κυττάρων των οργανισμών.

1.2 Οξειδωτικό στρες

Ο όρος οξειδωτικό στρες (oxidative stress) επινοήθηκε από τον Sies μόλις πριν μερικές δεκαετίες (1985) για να δηλώσει την ύπαρξη ανισορροπίας ανάμεσα στα οξειδωτικά μόρια και στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς που ο οργανισμός διαθέτει, προς όφελος των οξειδωτικών μορίων. Η ανισορροπία αυτή έχει συσχετιστεί με την επιβάρυνση της ανθρώπινης υγείας και την αύξηση κινδύνου για την ανάπτυξη χρόνιων φλεγμονών και μεταβολικών νοσημάτων (Jiang et al., 2021).

Οι ενεργές μορφές μορίων, αν βρεθούν σε υπερβολικές ποσότητες στον οργανισμό ξεκινούν να επιτίθενται σε μόρια του οργανισμού, τα οποία έχουν ζωτική σημασία για τη λειτουργικότητα των κυττάρων και τη βιωσιμότητα του οργανισμού. Έτσι μπορούν να επηρεάσουν το γενετικό υλικό του οργανισμού (κυρίως του DNA), αλλά και τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες και τους υδατάνθρακες του οργανισμού προκαλώντας τροποποιήσεις ή κατακερματισμό των μορίων.

- Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβη, δηλαδή τροποποίηση στη δομή του DNA. Η τροποποίηση του DNA συνεπάγεται μεταβολές που μπορεί να σχετίζονται με αλλαγές που σχετίζονται με τις κυτταρικές μεταβολικές διαδικασίες, όπως η αντιγραφή ή η μεταγραφή. Ειδικά οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) μπορούν να οδηγήσουν σε μετακίνηση ή αποβολή ή διακοπή αλληλουχίας βάσεων στην γενετική αλυσίδα, αλλά και σε αλλοίωση ενός ή περισσότερων σακχάρων των νουκλεοτιδίων, που συνεπάγεται σε γονιδιακές μεταλλάξεις, εξασθένηση ή διάρρηξη των κλώνων του DNA, δυσκολία ή αδυναμία πρωτεϊνοσύνθεσης (Gonzalez-Hunt et al., 2018).
- Επίσης, το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή των δομών των πρωτεϊνών. Η καταστροφή της πρωτεϊνικής διαμόρφωσης μπορεί να οδηγήσει σε εξασθένηση της δραστηριότητας ορισμένων ενζύμων, αλλά και την αλληλεπίδραση

μεταξύ των μορίων πρωτεΐνης, όπως τη δημιουργία συμπλεγμάτων πρωτεϊνών (Pizzino et al., 2017).

- Οι ρίζες υπεροξειδίου ($\bullet\text{OH}$) ή υπεροξυνιτρώδους (ONOO^-) μπορούν να οδηγήσουν αντιδράσεις οξειδωσης λιπαρών οξέων, τριγλυκεριδίων, φωσφολιπιδίων ή στερολών. Η επίδραση των ενεργών μορφών οξυγόνου πάνω στις λιπαρές ενώσεις μπορεί να οδηγήσει σε αλυσιδωτές αντιδράσεις παραγωγής νέων ενεργών μορφών μορίων, τα οποία προκαλούν περισσότερες οξειδώσεις (Pizzino et al., 2017).

1.3 Αντιοξειδωτικές ενώσεις

Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι ουσίες που έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν ή να αναστέλλουν τις αντιδράσεις των ενεργών μορφών των μορίων με αποτέλεσμα να προστατεύουν τον οργανισμό από τις βλαβερές συνέπειες του οξειδωτικού στρες. Οι αντιοξειδωτικές ουσίες δεν στοχεύουν απλά στην εξουδετέρωση των ενεργών μορφών των μορίων αλλά και στην διαδικασία ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων που βρίσκονται στα κύτταρα του οργανισμού και οδηγούν στην έκφραση και στην παραγωγή αντιοξειδωτικών ενζύμων (Oroian & Escriche, 2015).

Το ανθρώπινο αντιοξειδωτικό σύστημα είναι πολύπλοκο και ιδιαίτερα εξελιγμένο. Περιλαμβάνει ενδογενή και εξωγενή συστατικά που λειτουργούν με κοινό στόχο την εξουδετέρωση των παραγόντων που προκαλούν οξειδωτικό στρες. Έτσι, μπορεί κανείς να διακρίνει τρεις κατηγορίες αντιοξειδωτικών: τις ενδογενείς αντιοξειδωτικές ενώσεις και ένζυμα, τα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται μέσω της διατροφής και οι πρωτεΐνες που μεταφέρουν μέταλλα, κυρίως χαλκό ή σίδηρο. Ορισμένα παραδείγματα αυτών των αντιοξειδωτικών συστατικών παρουσιάζονται στον πίνακα 1 (Krishnamurthy & Wadhvani, 2011).

Πίνακας 1: Παραδείγματα αντιοξειδωτικών με δράση στον ανθρώπινο οργανισμό

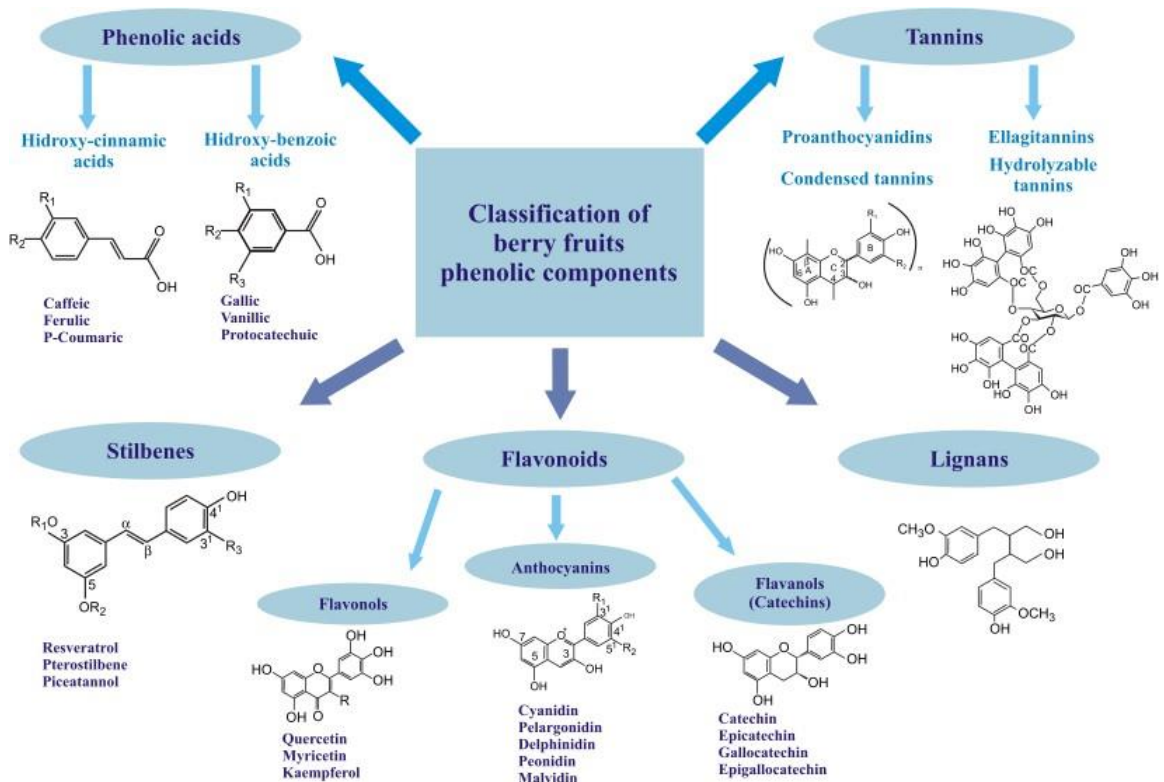
Ενδογενείς αντιοξειδωτικές ενώσεις	Ενδογενή αντιοξειδωτικά ένζυμα	Αντιοξειδωτικές ουσίες που λαμβάνονται μέσω τροφή	Πρωτεΐνες που μεταφέρουν μέταλλα με αντιοξειδωτική δράση
Χολερυθρίνη	Υπεροξειδικές δισμουτάσες του χαλκού/ ψευδαργύρου και μαγγανίου	Βιταμίνη C	Αλβουμίνη (χαλκός)
Θειόλες, π.χ., γλουταθειόνη, λιποϊκό οξύ, N-ακετυλοκυστεΐνη	Καταλάση εξαρτώμενη από την παρουσία σιδήρου	Βιταμίνη E	Σερουλοπλασμίνη (χαλκός)
NADPH και NADH	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, εξαρτώμενη από την παρουσία σελήνιου	β-καροτένιο και άλλα καροτενοειδή και οξυκαροτενοειδή όπως λυκοπένιο και λουτεΐνη	Μεταλλοθειονίνη (χαλκός)
Συνένζυμο Q10		Πολυφαινόλες, όπως φλαβανοειδή, φλαβόνες, φλαβονόλες και προανθοκυανιδίνες	Φερριτίνη (σίδηρος)
Ουρικό οξύ		Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	Μυοσφαιρίνη (σίδηρος)
			Τρανσφερίνη (σίδηρος)

Πηγή: Krishnamurthy & Wadhvani, 2011

1.4 Αντιοξειδωτικές ενώσεις που λαμβάνονται μέσω της διατροφής

Τα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται από τον άνθρωπο μέσω της διατροφής έχουν κυρίως φυτική προέλευση. Πρόκειται για φρούτα, λαχανικά, αρωματικά ή φαρμακευτικά φυτά και τα μπαχαρικά, τα οποία είναι πλούσια σε φαινολικές ενώσεις, βιταμίνες και καροτενοειδή (Lourenco et al., 2019). Οι οικογένειες των φυτών, σύμφωνα με τους Halvorsen et al., (2002), που έχουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ουσίες με αντιοξειδωτική δράση είναι οι *Rosaceae*, *Empetraceae*, *Ericaceae*, *Grossulariaceae*, *Juglandaceae*, *Asteraceae*, *Punicaceae* και *Zingiberaceae*. Στις οικογένειες αυτές ανήκουν τα τριαντάφυλλα, τα blackberries, οι φράουλες, τα blueberries, οι ξηροί καρποί και ιδιαίτερα τα καρύδια, το ρόδι κ.α. Επίσης, εξαιρετική πηγή αντιοξειδωτικών αποτελούν τα εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια μπαχαρικών και αρωματικών φυτών, όπως για παράδειγμα τα υδατικά εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια του τσαγιού, της ρίγανης, του θυμαριού, του δίκταμου, της μαντζουράνας, της λεβάντας, της κανέλας, του δεντρολίβανου. Το μειονέκτημα, κυρίως των αιθέριων ελαίων, είναι ότι εκτός από αντιοξειδωτική δράση έχουν και ένα έντονο οργανοληπτικό χαρακτήρα και χαρακτηριστικά αρώματα, γεγονός που περιορίζει το εύρος της χρήσης του (Halvorsen et al., 2002).

Στο σχήμα παρουσιάζονται οι κυριότερες κατηγορίες φαινολικών ενώσεων που περιέχονται στα φρούτα berry (μούρα).



Σχήμα 2: Φαινολικές ενώσεις σε φρούτα berry

Πηγή: Paredes- Lopez et al., 2010

Κατά την επεξεργασία των φρούτων και των οσπρίων παράγεται σημαντική μάζα υποπροϊόντων, όπως φλοιοί, πυρήνες, σπόροι, φύλλα τα οποία αποτελούν πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών ουσιών. Με τη βοήθεια της εκχύλισης και της απόσταξης γίνεται προσπάθεια να απομονωθούν αυτές οι ουσίες και να χρησιμοποιηθούν για τον εμπλουτισμό νέων διατροφικών προϊόντων (Lourenco et al, 2019). Στον πίνακα 2, παρουσιάζονται ορισμένα παραδείγματα φυσικών αντιοξειδωτικών συστατικών που βρίσκονται στα τρόφιμα, οι φυσικές διατροφικές πηγές τους καθώς και ορισμένες τροφές εμπλουτισμένες με τα συστατικά αυτά.

Πίνακας 2: Παραδείγματα αντιοξειδωτικών συστατικών των τροφίμων και ορισμένες από τις πηγές τους

Φυσική διατροφική πηγή	Αντιοξειδωτικές ουσίες	Εμπλουτισμένο διατροφικό προϊόν	Αναφορά
Λάδι κανόλας, πίτουρο ρυζιού, καρύδια	Πολυφαινόλες, βιταμίνη E και βιταμίνη B	Χοιρινό κρέας	Alvarez, D. et al., 2012
Υδατικό εκχύλισμα μάραθου (<i>Foeniculum vulgare Mill.</i>)	Φαινολικές ενώσεις	Τυρί cottage	Caleja et al., 2015
Υδατικά εκχυλίσματα μάραθου (<i>Foeniculum vulgare Mill.</i>) και χαμομηλιού (<i>Matricaria recutita L.</i>)	Φαινολικές ενώσεις	Γιαούρτι	Caleja et al., 2016
Λύματα ελαιοτριβείου	Πολυφαινόλες, ασκορβικό οξύ και τοκοφερόλες	Προϊόντα αρτοποιίας (ψωμί και παξιμάδια)	Galanakis et al., 2018
Εκχύλισμα φλούδας, χυμού και σπόρων ροδιού (<i>Punica granatum L.</i>)	Φαινολικές ενώσεις (φλαβονοειδή, φλαβονόλες)	Πιο έντονη αντιοξειδωτική δράση το εκχύλισμα φλούδας – Πιθανή εφαρμογή ως συντηρητικό τροφίμων	Derakhshan et al., 2018
Εκχύλισμα ροδιού (<i>Punica granatum L.</i>)	Φαινολικές ενώσεις, βιταμίνη C	Μοσχαρίσια κεφτεδάκια	Jahan et al, 2018
Πυρήνας μήλου (apple pomace)	Πολυφαινόλες (φλαβαν-3-όλες κυρίως)	-	Fernandes et al., 2019

Εκχύλισμα πυρήνων ντομάτας	Λυκοπένιο και β- καροτένιο	-	Correa-Filho et al., 2019
---------------------------------------	-------------------------------	---	------------------------------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑ ΣΤΟΜΑΧΟΥ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΟΥ

2.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η εντερική μικροχλωρίδα συμβάλει σημαντικά στην κατάσταση της υγείας του ξενιστή, είτε πρόκειται για άνθρωπο είτε για ζώο. Παρουσιάζει έντονη μεταβολική δραστηριότητα και θεωρείται, σύμφωνα με τα υπάρχοντα επιστημονικά δεδομένα ότι έχει προστατευτική, ανοσολογική και μεταβολική λειτουργικότητα. Η λειτουργικότητα αυτή συσχετίζεται με τη σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων που συνυπάρχουν στο έντερο, αλλά και τις σχέσεις συνεργασίας και ανταγωνισμού που αναπτύσσουν μεταξύ τους (Rajoka et al., 2021).

Οι μικροοργανισμοί κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα μπορούν να διεγείρουν ένα σημαντικό αριθμό φυσιολογικών και βιοχημικών αντιδράσεων που σχετίζονται με τις μεταβολικές διαδικασίες που συντελούνται στον οργανισμό, αλλά και τη διαδικασία της πέψης και της απορρόφησης της τροφής από τον ξενιστή. Επίσης, συμμετέχουν στη ρύθμιση της ανοσοποιητικής διαδικασίας. Η αλλοίωση της σύνθεσης της μικροχλωρίδας του εντέρου έχει συσχετιστεί με την αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης φλεγμονωδών νόσων και την επιβάρυνση της υγείας του ξενιστή (Thursby & Juge, 2017).

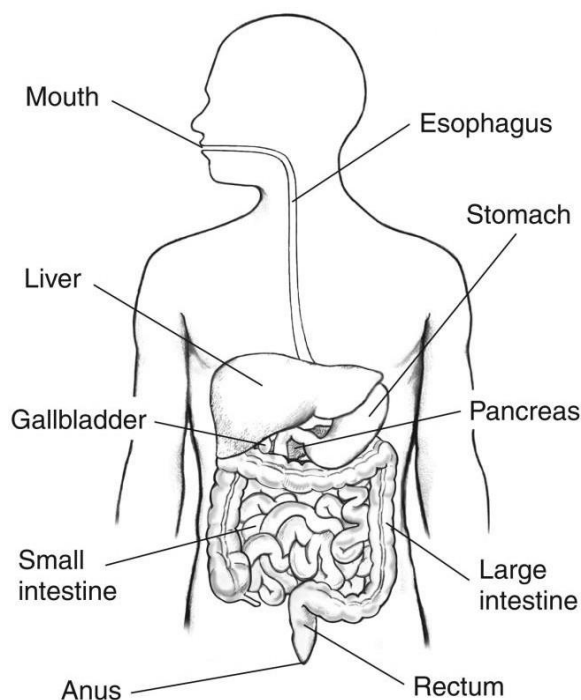
Ένας από τους παράγοντες που συμβάλλουν σημαντικά στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών του εντέρου, στη σύνθεση και τον πληθυσμό τους είναι η διατροφή που ο ξενιστής ακολουθεί (Thursby & Juge, 2017).

2.2 Δομή γαστρεντερικού σωλήνα

Ο γαστρεντερικός σωλήνας (gastrointestinal tract) αποτελείται από το σύνολο των οργάνων τα οποία βοηθούν στη κατάποση, αφομοίωση, απορρόφηση και αποβολή της τροφής από τον ανθρώπινο οργανισμό. Τα κυριότερα όργανα είναι (εικόνα 1)(NIH, 2017):

- Η στοματική κοιλότητα
- Ο φάρυγγας
- Ο οισοφάγος
- Το στομάχι
- Το λεπτό έντερο
- Το παχύ έντερο

- Ο όρθρος
- Ο πρωκτός



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση του πεπτικού συστήματος, όπου απεικονίζεται και ο γαστρεντερικός σωλήνας

Πηγή: <https://www.niddk.nih.gov/news/media-library/18162> [20/01/2013]

Στο πίνακα 3 περιγράφονται συνοπτικά ορισμένες από τις κυριότερες ανατομικές και φυσιολογικές παραμέτρους του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα. Σημειώνεται ότι ο χρόνος διέλευσης ενός στερεού γεύματος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως από το φύλο, την ηλικία, τη ψυχική κατάσταση, την ώρα της ημέρας και τις ιδιότητες που το ίδιο το τρόφιμο διαθέτει όπως είναι η συνεκτικότητα, η υγρασία, η σύσταση αλλά και η ποσότητα (Benshitrit et al., 2012).

Πίνακας 3: Σημαντικές παράμετροι των οργάνων του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα

Μέρος του γαστρεντερικού σωλήνα	Ανατομικά δεδομένα	Ημερήσιος όγκος	Χρόνος διέλευσης (h)	pH	Μικροχλωρίδα [CFU/ml ή CFU/g]
---------------------------------	--------------------	-----------------	----------------------	----	-------------------------------

		έκκρισης (L)	στερεού γεύματος		
Στοματική κοιλότητα		1-1,5		6,35- 6,85	
Στομάχι	Χωρητικότητα: 1 – 1,6 L	2	3,0 – 3,6	2-3	0-10 ³
Λεπτό έντερο	Μήκος: 3m Διάμετρος: 2,5cm Επιφάνεια ~ 600 m ²	Χολή: 0,8-1 Πάγκρεας: 1,2 – 1,5 Έντερο: 1-3	3,8 – 4,6	6-7,7	10 ⁵ -10 ⁷
Παχύ έντερο	Μήκος: 1,5 m Διάμετρος: 6,5 cm		18-22	5,5- 7,6	10 ⁹ -10 ¹²
Σύνολο	Μήκος 6-8 m				

Πηγή: Benshitrit et al., 2012

Ο γαστρεντερικός σωλήνας είναι ένας σωλήνας – αγωγός κυλινδρικού σχήματος με συνολικό μήκος που μπορεί να φθάσει ως τα 8 m. Το τοίχωμα του γαστρεντερικού σωλήνα σχηματίζεται από 4 κύριες στοιβάδες κυττάρων, οι οποίες παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις ως προς την διάμετρο και τη δομή τους ανάλογα με το επιμέρους τμήμα που καλύπτουν. Οι διαφορετικές λειτουργίες που επιτελεί κάθε τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, όπως κινητική, εκκριτική ή απορροφητική, φαίνεται ότι απαιτούν την ύπαρξη αυτών των ανατομικών διαφοροποιήσεων (Lewis, 2014)

Οι στοιβάδες των κυττάρων του γαστρεντερικού τοιχώματος, από το εσωτερικό προς το εξωτερικό είναι (Lewis, 2014, Farre, 2020):

- **Ο βλεννογόνος χιτώνας (mucos layer).** Αποτελεί ένα φράγμα μεταξύ της εσωτερικής επιφάνειας του γαστρεντερικού σωλήνα και του υπόλοιπου οργανισμού. Επιστρώνεται από επιθηλιακό ιστό, δηλαδή κύτταρα τα οποία έχουν στενή σύνδεση το ένα με το άλλο και σχηματίζουν μία επιφάνεια που καλύπτει εσωτερικά το συγκεκριμένο όργανο. Ο ρόλος του επιθηλιακού ιστού είναι προστατευτικός, έναντι των επιβλαβών ουσιών και των παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει την επιλεκτική προσρόφηση ουσιών.

Στο έντερο, εκκρίνεται βλέννα (εκκριτική λειτουργία) η σύσταση της οποίας είναι κυρίως νερό και βλεννίνες (mucins), οι οποίες είναι κατά κύριο λόγο μόρια γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών. Ο ρόλος της βλέννας είναι να εμποδίζει τους μικροοργανισμούς και τα μακρομόρια των τροφίμων να έρχονται σε επαφή με τα κύτταρα του επιθηλιακού ιστού, χωρίς όμως να δημιουργεί προβλήματα στη διέλευση μικρότερων μορίων. Προστατεύει τον επιθηλιακό ιστό από οξέα, πεπτικά ένζυμα, παθογόνους μικροοργανισμούς. Το πάχος της βλέννας διαφέρει. Στο λεπτό έντερο είναι διάχυτη ενώ στο παχύ έντερο ουσιαστικά σχηματίζει δύο στοιβάδες, όπου οι μικροοργανισμοί περιορίζονται στο πιο εξωτερικό στρώμα.

- **Ο υποβλεννογόنيος χιτώνας (submucosal layer).** Έχει ενεργό ρόλο στην μεταφορά των απορροφημένων ουσιών και στην έκκριση νερού. Αποτελείται από κύτταρα συνδετικού ιστού ακανόνιστου σχήματος και μεγέθους, αδένες, λεμφικά και αιμοφόρα αγγεία και νευρικές απολήξεις.

- **Ο μυϊκός χιτώνας (muscular layer).** Αποτελείται από λείους μύες που με τη βοήθεια συσπάσεων προωθούν την κίνηση του βλωμού κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα και από διαμήκεις ίνες οι οποίες με διατάσεις ελέγχουν την βράχυνση ή επιμήκυνση του σωλήνα .

- **Ο ορογόνος χιτώνας (serosa layer).** Αποτελεί το εξωτερικό στρώμα του γαστρεντερικού σωλήνα με εξαίρεση τον οισοφάγο και μέρη του παχέος εντέρου. Εκκρίνει μία ορώδης υγρή ουσία που επιτρέπει στα όργανα της κοιλιακής χώρας να γλιστρούν το ένα πάνω στο άλλο ομαλά.

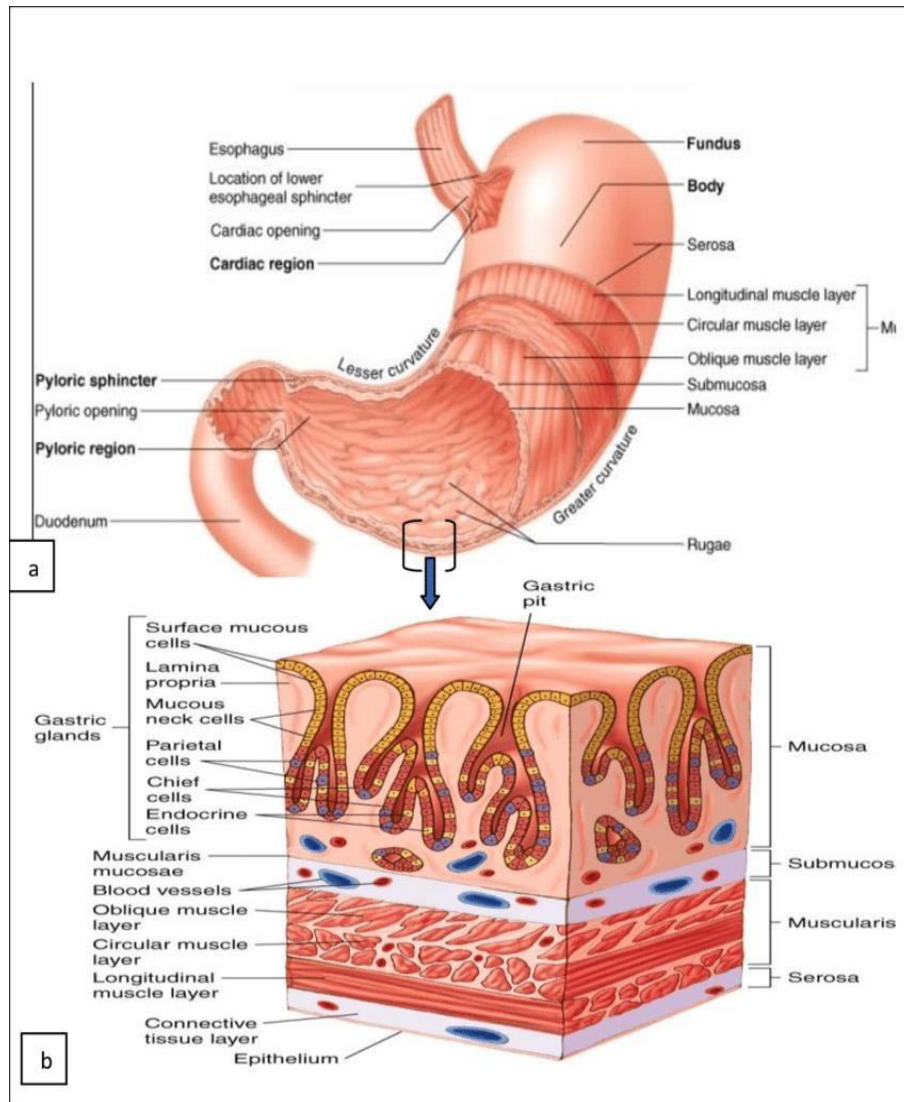
2.3 Στομάχι

Το στομάχι είναι το τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα το οποίο λαμβάνει την τροφή από τον οισοφάγο. Πρόκειται για ένα τμήμα του πεπτικού συστήματος που μπορεί να διευρύνεται, ανάλογα με την ποσότητα της τροφής που δέχεται. Έτσι, όταν δεν έχει περιεχόμενο μοιάζει με σωλήνα ο οποίος έχει λεπτό στόμιο, ενώ μπορεί να φιλοξενήσει 1,5 – 2,5 L τροφής. Η διάσταση αυτή που παρουσιάζει μπορεί να αιτιολογηθεί από την ύπαρξη πτυχώσεων στα δύο εσωτερικά στρώματα κυττάρων του στομάχου, του βλεννογόνιου και υποβλεννογόνιου χιτώνα, οι οποίες όσο το στομάχι δέχεται τροφή γίνονται πιο επίπεδες επιτρέποντας την αύξηση του όγκου και της χωρητικότητας του (Jabbar, 2016).

Στην εικόνα 2α απεικονίζεται η ανατομία του στομάχου. Το στομάχι του ανθρώπου βρίσκεται στο αριστερό άνω μέρος της κοιλιακής χώρας. Ο βλωμός(μπουκιά τροφής) μεταφέρεται από τον οισοφάγο στο στομάχι μέσα από ένα άνοιγμα που περιβάλλεται από σφιγκτήρα. Το πιο μεγάλο μέρος του στομάχου καλείται σώμα (body) το σχήμα του οποίου, όσο το περιεχόμενο αυξάνει, γίνεται καμπυλωτό. Για την ακρίβεια, αποκτά μία δεξιά κλίση ώστε να αυξηθεί η δεξιά καμπυλότητα περισσότερο από την αριστερή. Το πιο μικρό μέρος του στομάχου, κοντά στην έξοδο της τροφής από το στομάχι, είναι το πυλωρικό μέρος (pyloric part), το οποίο φέρει ένα ευρύ τμήμα (πυλωρικό άντρο – pyloric antrum) και ένα στενό τμήμα (πυλωρικός σωλήνας – pyloric canal) το οποίο στο στόμιο της εξόδου της τροφής φέρει σφιγκτήρα (Jabbar, 2016).

Στην εικόνα 2b, απεικονίζεται το τοίχωμα του στομάχου. Διακρίνονται οι τέσσερις στοιβάδες κυττάρων του γαστρεντερικού τοιχώματος, καθώς και επιμέρους κυτταρικές δομές που υπάρχουν και σχηματίζουν τις στοιβάδες αυτές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο επιθηλιακός ιστός ο οποίος προστατεύει τα τοιχώματα του στομάχου από τις όξινες εκκρίσεις και τα πεπτικά ένζυμα, αλλά παράλληλα περιέχει ένα μεγάλο αριθμό γαστρικών κοιλοτήτων (gastric pits), οι οποίες οδηγούν σε γαστρικούς αδένες (gastric glands). Κάθε γαστρικός αδένας περιέχει (Jabbar, 2016):

- Κύτταρα που παράγουν βλέννα (mucous cells) κοντά στην επιφάνεια του γαστρικού αδένου
- Βρεγματικά κύτταρα (parietal cells), τα οποία αποτελούν μέρος από το εκκριτικό δίκτυο του γαστρεντερικού σωλήνα και παράγουν υδροχλωρικό οξύ και εγγενή παράγοντα (intrinsic factor). Το υδροχλωρικό οξύ (pH 1-3) βοηθάει στην προστασία του οργανισμού από τους παθογόνους μικροοργανισμούς και προωθεί την παραγωγή πεψίνης. Ο εγγενής παράγοντας είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που έχει την ικανότητα να συνδέεται με την βιταμίνη B12. Το μόριο γλυκοπρωτεΐνης – βιταμίνης B12 απορροφάται από τον ειλέο και θεωρείται απαραίτητο για την σύνθεση των ερυθρών αιμοσφαιρίων του οργανισμού.
- Κύρια κύτταρα (chief cells) που παράγουν πεψινογόνο. Πρόκειται ουσιαστικά για ένα προένζυμο το οποίο παρουσία υδροχλωρικού οξέος μπορεί να μετατραπεί στο ένζυμο πεψίνη, βοηθάει στη διάσπαση των πρωτεϊνών
- Ενδοκρινικά κύτταρα (endocrine cells) υπεύθυνα για την παραγωγή ρυθμιστικών ορμονών



Εικόνα 2: α. Η ανατομία του στομάχου. β. Στοιβάδες κυττάρων και δομή στομάχου

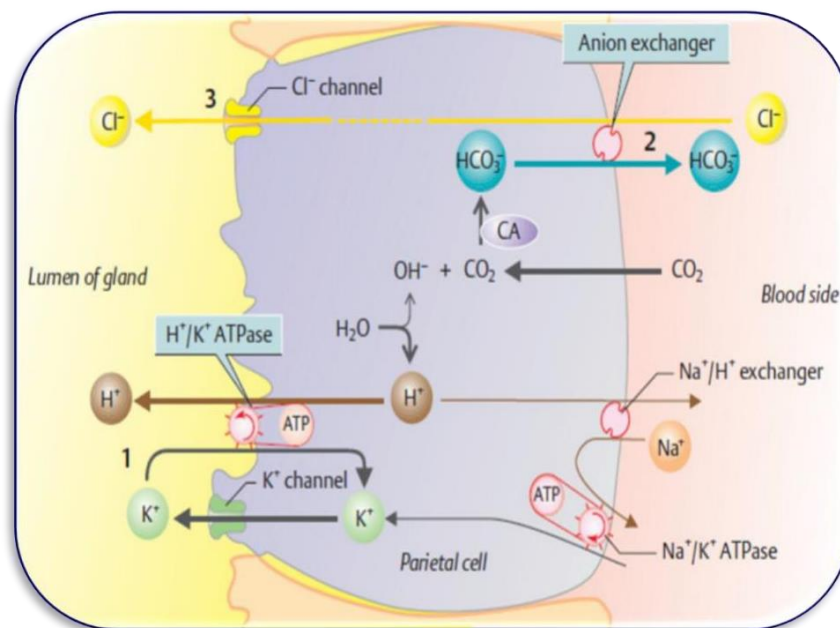
Πηγή: Jabbar, 2016

Ο λειτουργικός ρόλος του στομάχου είναι σημαντικός και πολλαπλός :

- Αποθήκευση της τροφής για μικρό χρονικό διάστημα και σταδιακή απελευθέρωση στο δωδεκαδάκτυλο.
- Ανάμειξη της τροφής με ένζυμα, με HCl, με εγγενή παράγοντα. Σχηματισμός ενός ημίρευστου υλικού, του χυλού (chyme).
- Έκκριση ουσιών όπως βλέννα, HCl, γαστρίνη, ισταμίνη, πεψινών, ορμονών.

Στην εικόνα 3, διακρίνεται η διαδικασία παραγωγής του υδροχλωρικού οξέος στα βρεγματικά κύτταρα των γαστρικών αδένων. Το υδρογόνο (H₂) που σχηματίζεται από οξυγόνο (O₂) και νερό (H₂O) εισέρχεται στα βρεγματικά κύτταρα. Το ένζυμο καρβονική ανυδράση

(carbonic anhydrase), στο εσωτερικό των κυττάρων λειτουργεί ως καταλύτης για την αντίδραση διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) με το νερό (H_2O) ώστε να σχηματιστεί ανθρακικό οξύ (H_2CO_3), το οποίο στη συνέχεια θα απελευθερώσει κατά τη διάσπασή του κατιόντα υδρογόνου (H^+) και όξινο ανθρακικό ανιόν (HCO_3^-). Το H^+ μεταφέρεται ενεργά με αντλία πρωτονίων (αντλία $\text{H}^+ - \text{K}^+$) στον αυλό του στομάχου. Τα ιόντα χλωρίου διαχέονται με H^+ από τα κύτταρα (για να μειωθεί η ενέργεια που απαιτείται για τη μεταφορά του H^+ έναντι της βαθμίδας συγκέντρωσης). Το HCO_3^- ανταλλάσσεται με Cl^- κάτω από τη βαθμίδα συγκέντρωσης και το Cl^- εισέρχεται στα κύτταρα (Jabbar, 2016).



Εικόνα 3: Σχηματισμός υδροχλωρικού οξέος (HCl) στους γαστρικούς αδένες

Πηγή: Jabbar, 2016

2.4 Έντερο

2.4.1 Λεπτό έντερο

Πρόκειται για ένα τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα που αναδιπλώνεται ώστε να «χωρέσει» στο ανθρώπινο σώμα και ξεκινάει από τον σφιγκτήρα του πυλωρού ως την ειλεοτυφλική βαλβίδα. Στο λεπτό έντερο συντελείται το μεγαλύτερο μέρος από τις πεπτικές διαδικασίες και την επιλεκτική απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών. Το λεπτό έντερο έχει μικρότερη διάμετρο (2,5cm) συγκριτικά με τη διάμετρο του παχέος εντέρου (6,5 cm). Σε

αντίθεση με τη διάμετρο, το μήκος του (6-7 m) είναι σχεδόν τετραπλάσιο από το μήκος του παχέος εντέρου (1,5 m) (Πίνακας 3) (Benshitrit et al., 2012).

Το λεπτό έντερο διακρίνεται σε τρία μέρη (Jabbar, 2016):

- Τον δωδεκαδάκτυλο (duodenum). Έχει μήκος 25 cm και αποτελεί το αρχικό μέρος του λεπτού εντέρου. Στο δωδεκαδάκτυλο εκχύεται από κοινό πόρο (ηπατοπαγκρεατική αμπούλα – hepatopancreatic ampulla), χολή που παράγεται στην χοληδόχο κύστη και παγκρεατικές εκκρίσεις που παράγονται από το πάγκρεας. Ένας σφιγκτήρας (ηπατοπαγκρεατικός σφιγκτήρας – hepatopancreatic sphincter) ελέγχει την ποσότητα και τη διάρκεια των εκκρίσεων. Ο βλεννογόνος χιτώνας στο λεπτό έντερο προστατεύεται από βλέννα, όπου ειδικά στον δωδεκαδάκτυλο προστατεύει και από τα οξέα του στομάχου.
- Την νήστιδα (jejunum).
- Τον ειλεό (ileum).

Από τα κύτταρα που σχηματίζουν τον επιθηλιακό ιστό στο έντερο παράγεται το εντερικό υγρό, σε ποσότητα ίση περίπου με 2L την ημέρα. Το εντερικό υγρό δεν περιέχει ένζυμα και το pH είναι ουδέτερο.

Ο βλεννογόνος χιτώνας του λεπτού εντέρου φέρει ένα σημαντικό αριθμό πτυχώσεων, οι οποίες σχηματίζουν τις λάχνες. Κάθε λάχνη καλύπτεται από επιθηλιακά κύτταρα που φέρουν μικρολάχνες, δηλαδή προεκβολές πολύ μικρού μεγέθους. Εκεί βρίσκονται τα ένζυμα που βοηθούν στη διαδικασία της διάσπασης της τροφής και συγκεκριμένα καταβολίζονται οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες και τα λίπη. Επίσης, πραγματοποιείται η απορρόφηση των απαραίτητων για τον οργανισμό συστατικών (Jabbar, 2016).

2.4.2 Παχύ έντερο

Το παχύ έντερο αποτελεί το τμήμα του γαστρεντερικού συστήματος που ξεκινά από την ειλεοτυφλική βαλβίδα μέχρι τον πρωκτό. Τα κυριότερα μέρη του εντέρου είναι (Jabbar, 2016):

- Τυφλό
- Κόλον

- Ορθός
- Πρωκτικό κανάλι

Αποτελεί ένα μέσο αποθήκευσης της τροφής που ο οργανισμός ακόμη δεν έχει μεταβολίσει, μέχρι την τελική αποβολή της από τον οργανισμό. Ο χυλός απορροφά νερό, άλατα και ορισμένες βιταμίνες. Δημιουργούνται τα κόπρανα, που ουσιαστικά περιέχουν τα άπεπτα υπολειμματικά συστατικά της τροφής, χρωστικές ουσίες που παράγονται από τη χολή και μικροοργανισμούς, κυρίως βακτήρια. Τα βακτήρια μεταβολίζουν τα άπεπτα συστατικά παράγοντας κυρίως οξέα και δυσάρεστες οσμηρές ενώσεις (Jabbar, 2016).

Η βλέννα που εκκρίνεται στο παχύ έντερο προστατεύει τα τοιχώματα από τη δράση των οξέων και παγιδεύει ορισμένους παθογόνους μικροοργανισμούς. Τα βακτήρια που βρίσκονται εκεί συχνά λειτουργούν συμβιωτικά με τον άνθρωπο, παράγοντας χρήσιμες βιταμίνες για τον οργανισμό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η βιταμίνη K, η οποία συμβάλλει στην πήξη του αίματος (Jabbar, 2016).

2.5 Μικροοργανισμοί του εντέρου

Ο πληθυσμός των μικροοργανισμών στο έντερο ανέρχεται περίπου στα 10^{14} μικροοργανισμούς, οι οποίοι ανήκουν σε περισσότερα από 1000 διαφορετικά είδη. Αναλογικά τα κύτταρα των βακτηρίων είναι σχεδόν δεκαπλάσια από τα ανθρώπινα κύτταρα και το συνολικό μικροβιακό γονιδιωματικό περιεχόμενο υπερβαίνει το ανθρώπινο γονιδίωμα περίπου κατά 100 φορές (Thursby & Juge, 2017).

Σημειώνεται ότι σε μελέτη των Sender et al. (2016), η αναλογία 10:1 μεταξύ των βακτηριακών και των ανθρώπινων κυττάρων, αμφισβητήθηκε. Τα ανθρώπινα κύτταρα για έναν άνθρωπο 70 kg υπολογίστηκαν κατά μέσο όρο στα $3,0 \cdot 10^{13}$, ενώ τα κύτταρα των βακτηρίων υπολογίστηκαν, αντιστοίχως, περίπου στα $3,8 \cdot 10^{13}$, άρα η αναλογία επανεκτιμήθηκε στο 1:1 (Sender et al., 2016).

Οι μικροοργανισμοί μεταφέρονται από το εξωτερικό περιβάλλον στο έντερο κυρίως μέσω της τροφής που καταναλώνει ο ξενιστής (Thursby & Juge, 2017).

Ο γαστρεντερικός σωλήνας του ανθρώπου λειτουργεί ως διεπαφή του ξενιστή με το περιβάλλον και με τα αντιγόνα του σώματος. Η συνολική επιφάνεια έχει υπολογιστεί στα 250 – 400 m². Η διαδικασία του αποικισμού του εντέρου ξεκινάει αμέσως μετά τη γέννηση του βρέφους. Το έντερο του εμβρύου θεωρείται ότι είναι χωρίς μικροοργανισμούς, στείρο. Τα δύο

πρώτα χρόνια της ζωής του ανθρώπου δημιουργείται η μικροβιακή σύνθεση του εντέρου (Rajoka et al., 2021).

Η μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα ενός ξενιστή δεν είναι σταθερή σε όλο το μήκος του. Παρουσιάζονται διακυμάνσεις τόσο στη σύνθεση των μικροοργανισμών όσο και στον πληθυσμό τους. Στον πίνακα 4, παρουσιάζονται οι κυριότερες κατηγορίες (phylum) στις οποίες ανήκουν οι μικροοργανισμοί ανάλογα το όργανο του γαστρεντερικού σωλήνα που εξετάζεται.

Πίνακας 4: Κυριότερες κατηγορίες μικροοργανισμών ανά όργανο του γαστρεντερικού σωλήνα

Οισοφάγος	Στομάχι	Λεπτό έντερο	Κόλον
<i>Lactobacillus</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>
<i>Corynebacteria</i>	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteria</i>
	<i>Proeobacteria</i>	<i>Proeobacteria</i>	<i>Proeobacteria</i>

Πηγή: Rajoka et al., 2021

Οι δύο κυριότερες κατηγορίες μικροοργανισμών θεωρείται ότι είναι τα *Firmicutes* και οι *Bacteroides* τα οποία αποτελούν σχεδόν το 90% της εντερικής μικροχλωρίδας. Η αναλογία τους επηρεάζεται από εγγενείς ή/και εξωτερικούς παράγοντες, αλλά για τους υγιείς οργανισμούς είναι σχετικά παρόμοια. Τα κυριότερα γένη μικροοργανισμών που έχουν αναγνωριστεί και ανήκουν στη μικροχλωρίδα του εντέρου είναι (Backhed et al., 2005):

- *Escherichia*
- *Bifidobacterium*
- *Bacteroides*
- *Clostridium*
- *Streptococcus*
- *Ruminococcus*
- *Lactobacillus*

Γενικά, παρατηρείται αύξηση μικροβιακού πληθυσμού όσο η τροφή απομακρύνεται από τη στοματική κοιλότητα. Μεγαλύτερη αφθονία μικροοργανισμών παρουσιάζεται στο κόλον, όπου υπολογίζεται ότι βρίσκονται περίπου 10^{13} βακτηριακά κύτταρα / γραμμάριο

περιεκτικότητας παχέος εντέρου, μαζί με ένα σημαντικό αριθμό ενζύμων. Τα ένζυμα συμμετέχουν στον βιομετασχηματισμό των διατροφικών συστατικών, δηλαδή στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών, υδατανθράκων, λιπιδίων. Στο περιβάλλον του εντέρου περιέχονται και πολλά ένζυμα, κυρίως όπως α-ραμνοσιδάση, β-γλυκουρονιδάση, β-γλυκοσιδάση, σουλφατάση και διάφορες εστεράσες, τα οποία στοχεύουν στην υδρόλυση των γλυκοσιδών, των γλυκουρονιδίων, των θειικών, των αμιδίων των εστέρων και των λακτονών. Επίσης, με τη βοήθεια ενζύμων και μικροοργανισμών διασπώνται πολύπλοκα μόρια που λαμβάνονται μέσω της τροφής, όπως είναι οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, οι πολυφαινόλες, σε πιο απλά μόρια όπως αμινοξέα και σάκχαρα που τα χρησιμοποιεί ο ξενιστής για ενέργεια ή ανοσία (Rajoka et al., 2021).

Μετά την πέψη, ο μικροβιακός βιομετασχηματισμός των διατροφικών συστατικών συνέβη στον αυλό όπου η μικροβιακή ζύμωση ενισχύει την παραγωγή συγκεκριμένων μεταβολιτών με ευεργετική επίδραση στην υγεία. (Rajoka et al., 2021).

2.6 Δράση και ρόλος μικροχλωρίδας γαστρεντερικού σωλήνα

Οι μικροοργανισμοί που συνθέτουν την κοινή μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα ενός ενήλικου και υγιούς ατόμου έχουν πολλαπλό ρόλο (Farre et al., 2020)Q

- Μπορούν να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των επιθηλιακών κυττάρων.
- Μπορούν να προκαλέσουν την διέγερση των επιθηλιακών κυττάρων, ώστε να εκκρίνουν κυτοκίνες.
- Μπορούν να συμμετέχουν στη σύνθεση βασικών θρεπτικών συστατικών, όπως βιταμινών ή λιπαρών οξέων βραχείας, τα οποία χρησιμοποιούνται από τα επιθηλιακά κύτταρα ως πηγή ενέργειας.
- Συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση του ξενιστή.
- Μπορούν να βοηθήσουν στην αναστολή του αποικισμού από παθογόνα βακτήρια καθώς αναπτύσσονται ανταγωνιστικές σχέσεις για τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ ΣΤΟΜΑΧΟΥ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΟΥ

3.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Τα σύγχρονα επιστημονικά δεδομένα στηρίζουν την άποψη ότι η διατροφή μπορεί να προάγει την ανθρώπινη υγεία και να μειώσει τη νοσηρότητα. Έχουν γίνει σημαντικές και αξιόλογες προσπάθειες για να αναπτυχθούν λειτουργικά τρόφιμα, δηλαδή τρόφιμα που δεν είναι μόνο θρεπτικά, αλλά παρουσιάζουν και πρόσθετο λειτουργικό όφελος και αξία για την υγεία του ανθρώπου. Πρόκειται για τρόφιμα που είναι πλούσια σε βιοδραστικά συστατικά είτε λόγω της φύσης των συστατικών του τροφίμου είτε λόγω εμπλουτισμού τους με αυτά τα συστατικά. Είναι συστατικά που έχουν θεραπευτική ή προληπτική δυναμική ικανότητα έναντι ανθρώπινων νοσημάτων όπως η χοληστερίνη, η οστεοπόρωση, ο καρκίνος, ο διαβήτης ή οι γαστρεντερικές διαταραχές (Benshitrit et al., 2012).

Στα βιοδραστικά ή βιοενεργά συστατικά ανήκουν χημικές ενώσεις που ανήκουν στις κατηγορίες των πολυφαινολών, των καροτενοειδών, των λιπαρών οξέων και των παραγώγων τους, των αμινοξέων, των πεπτιδίων, των πρωτεϊνών, των βιταμινών, των μετάλλων. Ωστόσο, αρκετά από τα συστατικά αυτά, αποικοδομούνται ή χάνουν τη λειτουργικότητά τους κατά την επεξεργασία του τροφίμου ή κατά τη διαδικασία της πέψης, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της βιοπροσβασιμότητας και της βιοδιαθεσιμότητάς τους. Εξετάζονται, λοιπόν, οι συνθήκες κάτω από τις οποίες η απελευθέρωση των βιοδραστικών ενώσεων μπορεί να πραγματοποιηθεί στον γαστρεντερικό σωλήνα και, κατά προτίμηση, στο έντερο (Benshitrit et al., 2012).

Ένας σημαντικός αριθμός ερευνών, ιδιαίτερα τις τελευταίες δεκαετίες, έχει συσχετίσει την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικές ουσίες με την μείωση του κινδύνου εκδήλωσης ορισμένων χρόνιων νοσημάτων, αλλά και στην αποτελεσματικότερη ρύθμιση και αντιμετώπισή τους. Η εντερική δυσβίωση μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολικές διαταραχές ή σε φλεγμονές του εντέρου. Σε ένα σημαντικό βαθμό, η επίδραση αυτή αποδίδεται στη δράση των αντιοξειδωτικών στη μικροχλωρίδα που κατοικεί στον γαστρεντερικό σωλήνα του οργανισμού (Chen et al., 2022).

3.2 Δράση αντιοξειδωτικών έναντι της εντερικής μικροχλωρίδας

Τα αντιοξειδωτικά επιδρούν στη σύνθεση και τη λειτουργία της εντερικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου και έχει τόσο βραχυπρόθεσμες όσο και μακροχρόνιες συνέπειες στην υγεία του (Chen et al., 2022). Η διατροφική πρόσληψη τροφών πλούσιων σε αντιοξειδωτικά προάγει την ανάπτυξη των ευεργετικών για τον οργανισμό βακτηρίων, όπως είναι τα *Bifidobacterium* και τα *Lactobacillus*, ενώ παράλληλα αναστέλλει ή περιορίζει την ανάπτυξη των επιβλαβών βακτηρίων όπως τα *Escherichia coli* και τα *Enterococcus spp* (Han & Hang, 2020).

Οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν μικρή απορροφητική ικανότητα στην άνω γαστρεντερική οδό με αποτέλεσμα να φθάνουν στο κόλον είτε χωρίς να έχουν υποστεί κάποια μετατροπή είτε με τη μορφή μεταβολικών ουσιών. Υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με την εντερική μικροχλωρίδα. Τα βακτήρια του εντέρου προσπαθούν να χρησιμοποιήσουν τις ενώσεις που δεν έχουν απορροφηθεί κατά τη διαδικασία της πέψης ώστε να εκπληρώσουν τις βιολογικές τους δραστηριότητες, ενώ οι μεταβολίτες που παράγονται επηρεάζουν τη σύνθεση και τη λειτουργία της μικροχλωρίδας. Έτσι, οι πολυφαινόλες των φρούτων και των λαχανικών αποικοδομούνται από τα βακτήρια και οι παραγόμενοι μεταβολίτες μαζί με τις πολυφαινόλες συμμετέχουν στη ρύθμιση του μικροβιακού πληθυσμού του εντέρου (Han & Hang, 2020; Chen et al., 2022).

Κατά τη διάσπαση των πολυφαινολών δημιουργούνται πιο απλές δομές όπως παράγωγα φαινολικών οξέων, φαινυλοπροπιονικού, φαινυλοβουτυρικού, βαλερικού οξέος και ουρολιθινών (Han & Hang, 2020). Στον πίνακα 5, αναφέρονται παραδείγματα βακτηρίων του εντέρου που αποικοδομούν ή μετασχηματίζουν τις πολυφαινόλες του εντέρου ή παράγουν ένζυμα που έχουν παρόμοιο ρόλο.

Πίνακας 5: Παραδείγματα βακτηρίων εντέρου και αποικοδόμηση πολυφαινολών

Μικροοργανισμοί	Παράδειγμα μετατροπής πολυφαινολών	Αναφορά
Βακτήρια παχέος εντέρου → ένζυμα: πολλαπλά β-γλυκουρονιδάση, β-γλυκοσιδάση,	Διάσπαση πολυφαινολών σε απλούστερες ενώσεων	Aura, 2008

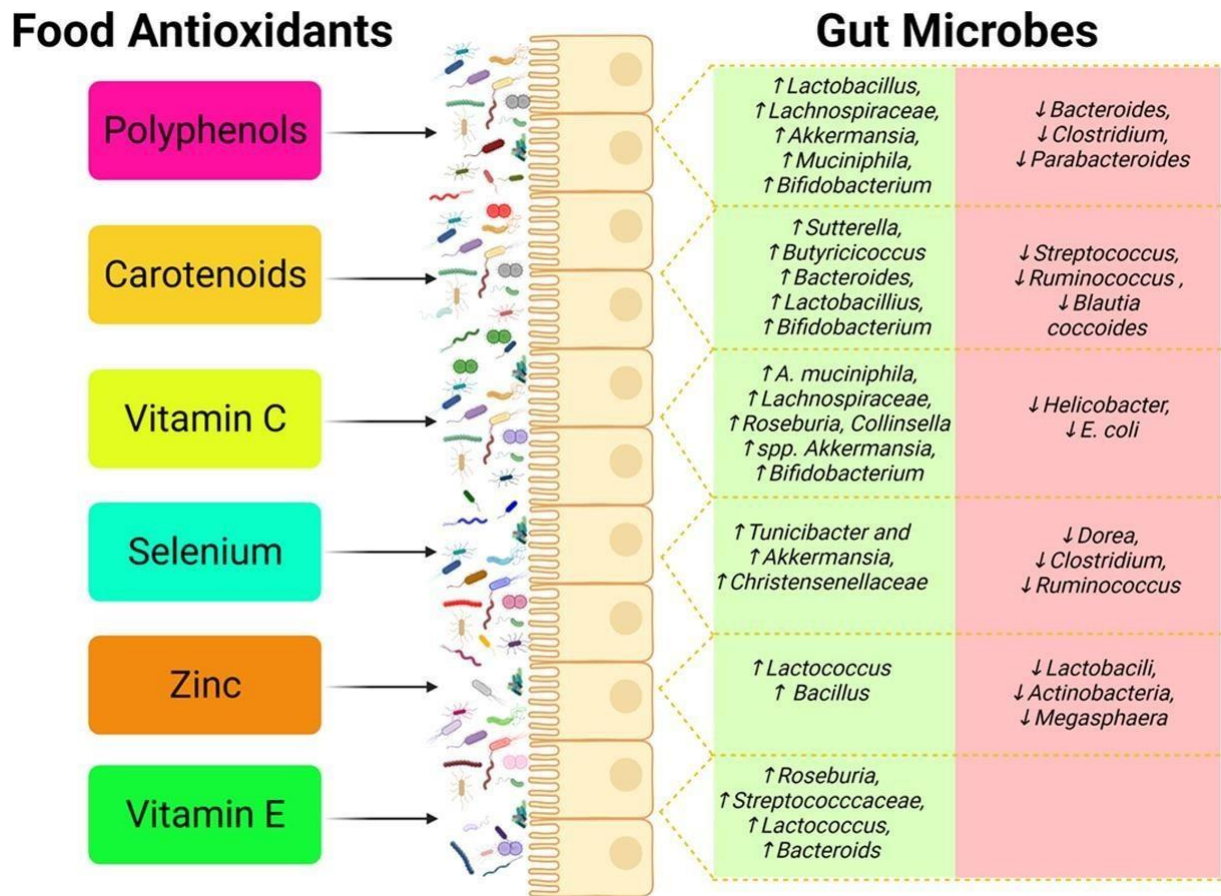
εστεράσες, υδρογονάσες, δευδροξυλάση, απομεθυλάση		
<i>Eubacterium ramulus</i> και <i>Clostridium</i> <i>saccharogumia</i>	Από τον γλυκοζίτη -3- κυανιδίνης σχηματισμός 3,4-διδροξυβενζοϊκού οξέος, της 2,4,6-τριδροξυβενζαλδεΐδης και του 2,4,6-τριδροξυβενζοϊκού οξέος	Hanske et al. 2013
<i>Streptococcus</i> <i>thermophilus</i> και <i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i>	Ανθοκύανες μούρων (mulberry) με τη βοήθεια β-γλυκοσιδάσης μετατροπή σε χλωρογενικό οξύ, κρυπτοχλωρογενικό οξύ, καφεϊκό οξύ και φερουλικό οξύ	Cheng et al., 2016
<i>Bifidobacterium lactis</i> και <i>Lactobacillus</i> <i>gasseri</i>	Παραγωγή κινναμούλ-εστεράσης που μετέτρεψε το χλωρογενικό οξύ σε υδροξυκινναμικό και φερουλικό οξύ	Couteau et al., 2001

Όπως αναφέρθηκε, η πλειοψηφία των μικροοργανισμών του εντέρου είναι *Firmicutes* και *Bacteroidetes*. Ένας δείκτης της υγείας του εντέρου θεωρείται η αναλογία *Firmicutes* προς *Bacteroidetes* (F/B). Όσο πιο μικρές τιμές λαμβάνει τόσο πιο υγιές θεωρείται το έντερο (Han & Hang, 2020)

3.3 Παραδείγματα δράσης αντιοξειδωτικών στη μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα

Η αλληλεπίδραση της μικροχλωρίδας του εντέρου και των αντιοξειδωτικών ενώσεων είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ομοίωση του μικροβιώματος του εντέρου. Ασκεί σημαντική επιρροή στην ποικιλία των βακτηρίων αλλά και στη βιοδιαθεσιμότητα των αντιοξειδωτικών ουσιών και έχει ενεργό ρόλο στην αντιμετώπιση της δυσβίωσης του εντέρου

(Naliyadhara et al., 2023). Στο σχήμα 3 απεικονίζεται η σχέση αντιοξειδωτικών και εντερικού μικροβιώματος.



Σχήμα 3: Αντιοξειδωτικά και επίδραση στο μικροβίωμα του ανθρώπου

Πηγή: Naliyadhara et al., 2023

Ένας σημαντικός αριθμός κλινικών ερευνών έχει πραγματοποιηθεί με σκοπό να εξετάσει την αλληλεπίδραση αντιοξειδωτικών και μικροχλωρίδας του εντέρου. Στον πίνακα 6 διακρίνονται ορισμένα παραδείγματα δράσης αντιοξειδωτικών στη μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα.

Πίνακας 6: Παραδείγματα δράσης αντιοξειδωτικών στη μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα

Τρόφιμο/ αντιοξειδωτική ουσία	Πειραματική διαδικασία	Αποτελέσματα	Αναφορά
Μούρα (berries) (μαύρο goji berry, blueberry, μούρα, κόκκινο κινέζικο bayberry, βατόμουρο, κόκκινο goji berry, φράουλα και λευκό κινέζικο bayberry) / Φαινολικές ενώσεις – κυρίως ανθοκυανιδίνες	In vino αξιολόγηση αντιοξειδωτικής δράσης σε υγιή ποντίκια. Κατανάλωση εκχυλισμάτων μούρων για 15 ημέρες.	Αλλαγή στη σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου. Αύξηση των ευεργετικών βακτηρίων και μείωση των δυνητικά επιβλαβών	Chen et al., 2022
Εκχύλισμα ροδιού και χυμός ρόδι / Ελλαγιταννίνες	In vitro μελέτη της ανάπτυξης Enterobacteriaceae, Bacteroides fragilis group, Clostridia, Bifidobacteria, και Lactobacilli. Επώαση μικροοργανισμών σε δείγματα κοπράνων παρουσία 400, 100 και 25 μg/ml εκχυλίσματος και χυμού	Αύξηση στους μέσους αριθμούς Bifidobacterium και Lactobacillus και αναστολή της ανάπτυξη B. fragilis, Clostridia και Enterobacteriaceae	Li et al., 2015
Εκχύλισμα ροδιού / πολυφαινόλες φλούδας - ελλαγιταννίνες	Αρουραίοι ακολούθησαν πλούσια σε λιπαρά διατροφή, η οποία προκάλεσε παχυσαρκία.	Ομαλοποίησαν την δυσβίωση στη μικροχλωρίδα του εντέρου.	Zhao et al., 2019

	Προσθήκη στη διατροφή εκχυλίσματος ροδιού	Παρατηρήθηκε ουρολιθίνη Α- κύριος μεταβολίτης των ελλαγιταννινών ροδιού από τα μικρόβια	
Πολτός ροδιού	Ποντίκια χωρίστηκαν σε τρεις διατροφικές ομάδες: χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά και υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά με συμπλήρωμα πολτού ροδιού για 14 βδομάδες	Αλλαγή στη μικροχλωρίδα του εντέρου. <i>Αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων Akkermansia muciniphila, Parabacteroides distasonis, Bacteroides acidifaciens, Mucispirillum schaedleri και Lachnospiraceae</i>	Song et al., 2021
Ελαιόλαδο / πολυφαινόλες, τοκοφερόλες, καροτενοειδή	Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	Θετική επίδραση στο μικροβίωμα του εντέρου	Gavahian et al., 2019

Οι Chen et al. (2022) αξιολόγησαν την δράση των αντιοξειδωτικών ενώσεων των μούρων (berries) στη μικροχλωρίδα του εντέρου. Σε in vivo μελέτη πρόσθεσαν τα εκχυλίσματα από εννέα τύπους κοινών μούρων, βατόμουρο, μαύρο goji berry, blueberry, μούρα, κόκκινο κινέζικο bayberry, βατόμουρο, κόκκινο goji berry, φράουλα και λευκό κινέζικο bayberry, στη διατροφή υγιών ποντικών για 15 ημέρες. Προηγήθηκε έλεγχος του αντιοξειδωτικού δυναμικού των μούρων και ταυτοποιήθηκε η παρουσία φαινολικών ενώσεων. Σε μεγαλύτερη

περιεκτικότητα βρίσκονταν οι ανθοκυανιδίνες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αντίδραση της μικροχλωρίδας του εντέρου ήταν παρόμοια ανεξάρτητα από το είδος του μούρου που εκχυλίστηκε. Ο μικροβιακός πληθυσμός του εντέρου επηρεάστηκε σημαντικά και παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των δυνητικά επιβλαβών βακτηρίων, συγκριτικά με τα ευεργετικά βακτήρια (Chen et al., 2022)

Το ελαιόλαδο, ειδικά το έξτρα παρθένο ελαιόλαδο, θεωρείται ότι παρουσιάζει πολλά οφέλη για την ανθρώπινη υγεία. Σε βιβλιογραφική ανασκόπηση που πραγματοποίησαν οι Ganahian et al. (2019) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι έχει αντιοξειδωτική δράση λόγω της παρουσίας ενώσεων όπως πολυφαινόλων, τοκοφερολών και καροτενοειδών (προβιταμίνη Α, β-καροτένιο, λουτεΐνη). Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις που περιέχει στη σύνθεσή του επηρεάζουν ευεργετικά το εντερικό μικροβίωμα.

Ένας καρπός με σημαντικό αντιοξειδωτικό περιεχόμενο είναι το ρόδι. Έρευνες *in vitro* (Li et al., 2015) αλλά και *in vivo* (Zhao et al., 2019, Song et al., 2021) έδειξαν ότι οι αντιοξειδωτικές ενώσεις του ροδιού και ιδιαίτερα οι ελλαγιτανίνες έχουν θετική επίδραση στην ανάπτυξη ιδιαίτερα των *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* και λειτούργησαν σαν πρεβιοτικά

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σκοπός

Το ρόδι είναι ένα ευρείας κατανάλωσης φρούτο σε διάφορους πολιτισμούς εδώ και χιλιάδες χρόνια. Ανήκει στην οικογένεια πουνικίδων. Έχει χαρακτηριστεί ως θεραπευτική τροφή, καθώς εμπεριέχει διάφορες βιοδραστικές ενώσεις όπως φαινόλες, φλαβονοειδή, ταννίνες, μέταλλα, σύνθετους πολυσακχαρίτες κ.α. Έτσι τα τελευταία χρόνια έχει δημιουργήσει μεγάλο ενδιαφέρον σε διάφορες *in vitro* μελέτες, για την απόδειξη των ευεργετικών του δράσεων (αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη, αντιαρτηρική και αντικαρκινική δράση). Στην παρούσα εργασία γίνεται μία προσπάθεια προσομείωσης ενός γαστρεντερικού συστήματος και την αλληλεπίδραση του με τα αντιοξειδωτικά μετά από την προσθήκη σπόρων ροδιού. Πραγματοποιήθηκαν 3 δοκιμές μελέτης προσομείωσης γαστρεντερικού συστήματος:

1. Η 1^η μελέτη έγινε με έτοιμες κάψουλες προβιοτικών μικροοργανισμών
2. Η 2^η και η 3^η μελέτη με δείγματα ανθρώπινων κοπράνων

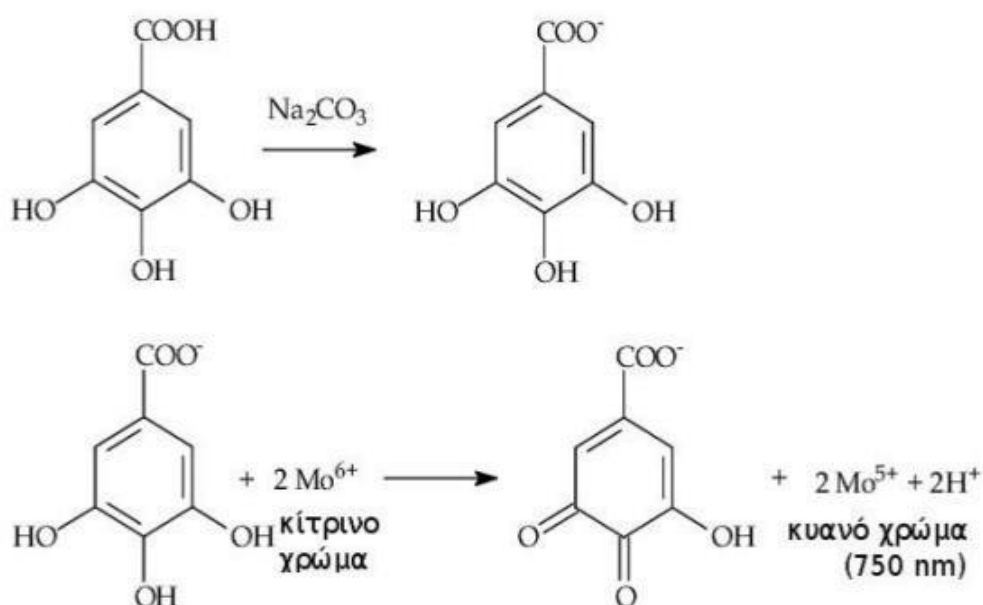
Στις δοκιμές πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις:

- A) προσδιορισμού ολικού φαινολικού περιεχομένου
- B) καταμέτρησης ομάδων μικροοργανισμών

4.1 ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΛΙΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ FOLIN-CIOCALTEU

Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu αποτελείται από άλατα μολυβδαινίου (Mo) και βολφραμίου (W). Υπό αλκαλικές συνθήκες, οι φαινολικές ενώσεις οξειδώνονται και το αντιδραστήριο ανάγεται σε χαρακτηριστικά οξειδία κυανού χρώματος του πεντασθενούς μολυβδαινίου. Ανάλογα με την φαινολική περιεκτικότητα επηρεάζεται και η ένταση του χρώματος. Η συγκέντρωση της φαινολικής ένωσης εκφράζεται σε ισοδύναμα επιλεγμένου προτύπου.



Εικόνα 4: Αντίδραση του γαλλικού οξέος με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu μέσω μηχανισμού μεταφοράς ενός ηλεκτρονίου.

Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν:

1. Αντιδραστήριο (F-C phenol reagent), Merck KGaA, Germany
2. Διάλυμα κορεσμένου ανθρακικού νατρίου Na_2CO_3 : Σε 800,0 mL απεσταγμένου νερού διαλύονται 200,00 g άνυδρου ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) με βρασμό. Αφού επανέλθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, προστίθενται περίπου 80 g κρυστάλλων Na_2CO_3 , και το διάλυμα αφήνεται για 24 ώρες. Τέλος, ακολουθεί διήθηση και αραίωση μέχρι το 1,00 L με απεσταγμένο νερό. Το διάλυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.
3. Γαλλικό οξύ. Παρασκευάστηκε stock διαλύματος γαλλικού οξέος, σε συγκέντρωση 5 g GA/L ως εξής: σε 10,0 mL αιθανόλης διαλύθηκαν 0,500 g GA και αραιώθηκαν με απιονισμένο H_2O μέχρι τα 100,00 mL. Το διάλυμα διατηρείται στο ψυγείο για 2 εβδομάδες. Από το stock διάλυμα δημιουργούνται υδατικά διαλύματα συγκέντρωσης 25-2600 mg GA/L ώστε να παρασκευασθεί η πρότυπη καμπύλη αναφοράς.
4. Μεθανόλη αναλυτικής καθαρότητας.
5. Απεσταγμένο H_2O .

4.1.2 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΕΛΕΓΧΟΙ

- **ΟΜΧ(Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα)**

Για την ανίχνευση της αερόβιας και αναερόβιας ολικής μεσόφιλης χλωρίδας δειγμάτων κοπράνων χρησιμοποιήθηκε ως επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα BHI Agar(στερεό υποστρώμα, κατάλληλο για την ανάπτυξη πολλών διαφορετικών τύπων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, ζυμομυκήτων και νηματοειδών μυκήτων και πολλών τύπων παθογόνων)

- **Ανίχνευση οξυγαλακτικών βακτηρίων**

Σε αναερόβιες συνθήκες για την ανίχνευση οξυγαλακτικών βακτηρίων στα δείγματα κοπράνων χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MRS

- **Ανίχνευση Μπιφιδοβακτηρίων**

Για την ανίχνευσή του χρησιμοποιήθηκε ως εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα TOS

- **□ Μέθοδος δεκαδικών αραιώσεων**

Χρησιμοποιήθηκε ισότονο αραιωτικό υγρό για την αραιώση των δειγμάτων κοπράνων. Αρχικά 0,1 g δείγμα κοπράνων τοποθετήθηκαν σε σωληνάριο falcon μαζί με 10 mL ισότονο αραιωτικό υγρό, έτσι έχουμε την πρώτη αραιώση 10^{-1} . Στη συνέχεια, αφού έγινε ανακίνηση στο Vortex, από την αραιώση αυτή λήφθηκε 1 mL και τοποθετήθηκε σε σωληνάριο με 9 mL αραιωτικού μέσου, έτσι έχουμε την δεύτερη αραιώση 10^{-2} . Η διαδικασία αυτή συνεχίστηκε ως και την 10^{-5} αραιώση.

- **Τεχνική ενσωμάτωσης**

Και στις 3 περιπτώσεις ανίχνευσης των παραπάνω χρησιμοποιήθηκε ως μέθοδος εμβολιασμού η τεχνική της ενσωμάτωσης. 1ml αραιωμένου δείγματος τοποθετήθηκε σε άδειο τρυβλίο και στη συνέχεια προστέθηκε τηγμένο το επιλεγμένο υπόστρωμα. Στη συνέχεια έγινε ομογενοποίηση του υποστρώματος με το δείγμα και ακολούθησε επώαση.

Συγκεκριμένα οι συνθήκες επώασης

1. Για την ανάπτυξη της OMX ήταν 37°C σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες για 24 ώρες
2. Για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών ήταν 37°C σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες για 48 ώρες.
3. Για την ανάπτυξη των μπιφιδοβακτηρίων ήταν 37°C σε αναερόβιες συνθήκες για 48 ώρες.

- **Έλεγχος ζυμών/μυκήτων σε Petrifilm**

Σε μια επίπεδη επιφάνεια τοποθετούμε το Petrifilm και ανασηκώνεται η ημιδιαφανής ταινία ώστε να τοποθετηθεί με μια πιπέτα 1 mL δείγματος στο κυκλικό κέντρο της κάτω ταινίας. Στη συνέχεια η ανασηκωμένη ταινία αφήνεται για να ακουμπήσει την επιφάνεια της κάτω ταινίας και να απλωθεί το δείγμα. Με την βοήθεια διαστολέα ασκήθηκε πίεση στο κέντρο του Petrifilm ώστε το δείγμα να απλωθεί ομοιόμορφα στην κυκλική επιφάνεια. Τέλος τα δείγματα επώαστηκαν για 2-4 ημέρες στους 25°C .



Εικόνα 5:Petrifilm



Εικόνα 6:Διαστολέας

4.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

4.2.1 ΓΑΣΤΡΙΚΟ-ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΥΓΡΟ

- Αρχικά παρασκευάστηκε το συνθετικό γαστρικό υγρό g/L

Υλικά

1. Γλυκόζη : 0,4 g
2. Εκχύλισμα μαγιάς: 3,0 g
3. Πεπτόνη από κρέας: 1,0g
4. Βλεννίνη από στομάχι χοίρων :4,0g
5. NaCl:0,08 g

6. NaHCO₃:0,4g

7. K₂HPO₄:0,04 g

8. KH₂PO₄:0,04 g

9. MgSO₄ 7H₂O:0,008 g

10. Xylan :1,0 g

11. Διαλυτό άμυλο: 3,0g

12. Πηκτίνη: 2,0g

13. TWEEN 80: 1,0 ml

Στη συνέχεια ρυθμίζουμε το pH στο 2,00 με πυκνό HCL (12 N)

• Έπειτα αποστείρωση για 15 min στους 121°C

• Προσθέτουμε τα θερμοευαίσθητα υλικά

Κυστεΐνη :0,5g

Πεψίνη :3,0 g

Μετά την επώαση του γαστρικού υγρού και την λήψη δειγμάτων παρασκευάστηκε το εντερικό υγρό με

- Αύξηση PH στο 8 με προσθήκη 5N NaOH
- Προσθήκη παγκρεατίνης και εκχύλισμα χολής χοίρων σε αναλογία 0,1 και 0,3% w/w

4.2.2 Α ΔΟΚΙΜΗ ΜΕ ΚΑΨΟΥΛΕΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Στην πρώτη δοκιμή χρησιμοποιήσαμε ως δείγμα μικροοργανισμών κάψουλα προβιοτικών μικροοργανισμών που αγοράστηκε από φαρμακείο και περιέχει 14 προβιοτικά στελέχη σε πληθυσμό $>10^9$ cfu/κάψουλα. Χρησιμοποιήθηκε φρέσκο οικιακό ρόδι Κορινθίας (χυμός και σπόροι).

Η Α δοκιμή χωρίστηκε σε 4 διαφορετικές φάσεις, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7:Φάσεις επώασης Α Δοκιμής

A	0 hours	ΑΡΧΙΚΗ ΦΑΣΗ
B	1,5 hours(αφού συλλεχθεί δείγμα μετατρέπουμε το γαστρικό σε εντερικό υγρό)	ΓΑΣΤΡΙΚΗ ΦΑΣΗ
C	2 hours (προσθήκη προβιοτικών στελεχών)	ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΦΑΣΗ
D	24 hours	ΦΑΣΗ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ

ΑΡΧΙΚΗ ΦΑΣΗ Α

Παρασκευάστηκαν τα δείγματα σε κωνικές φιάλες

Πίνακας 8:Δείγματα Α δοκιμής

Δείγμα 1 (S1)	Γαστρικό υγρό	100mL
Δείγμα 2 (S2)	Γαστρικό υγρό +χυμός ροδιού 33,0 mL (100 mL γαστρικό υγρό/33,0 χυμός)	100mL
Δείγμα 3 (S3)	Γαστρικό υγρό+χυμός ροδιού 33,0 mL(+0,018 gr σκόνη προβιοτικών (1/10 κάψουλας))	100mL
Δείγμα 4 (S4)	Γαστρικό υγρό+σπόροι ροδιού 9 gr(+0,018 gr σκόνη προβιοτικών)	100mL

Συλλέχθηκαν 4 δείγματα (4 ml)σε σωληνάρια Eppendorf.

Στη συνέχεια οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν για επώαση στους 37°C για 1,5 ώρα υπό συνθήκες ανάδευσης.

ΓΑΣΤΡΙΚΗ ΦΑΣΗ Β

Αφού συλλέχθηκαν 4 mL δείγματος από κάθε κωνική μετά την επώαση ,το γαστρικό υγρό μετατρέπεται σε εντερικό

Στη συνέχεια τοποθετούνται και πάλι οι κωνικές για επώαση στις ίδιες συνθήκες για 2 ώρες.

ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΦΑΣΗ C

Συλλέχθηκαν και πάλι 4 mL δείγματος από κάθε κωνική. Έπειτα προστέθηκε η σκόνη κάψουλας προβιοτικών στο δείγμα S3 και S4.

Τοποθετήθηκαν όλες οι φιάλες για επώαση στις ίδιες συνθήκες για 24 ώρες.

ΦΑΣΗ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ D

Συλλογή 4mL από κάθε δείγμα σε σωληνάρια Eppendorf.

Τα δείγματα κάθε φάσεως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

Πίνακας 9:Δείγματα από κάθε χρονική φάση επώασης A δοκιμή

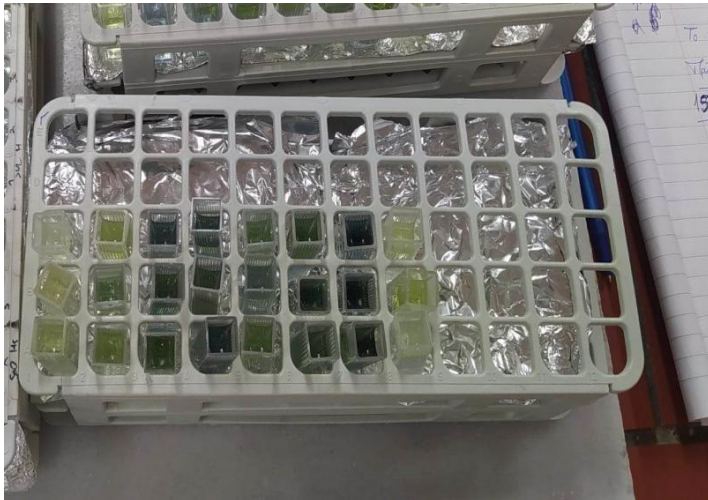
S1A, S1B, S1C, S1D
S2A, S2B, S2C, S2D
S3A, S3B, S3C, S3D
S4A, S4B, S4C, S4D

Αφού ληφθούν όλα τα δείγματα ,εφαρμόζεται η μέθοδος Folin για τον προσδιορισμό του ολικού φαιολικού περιεχομένου στα δείγματα.

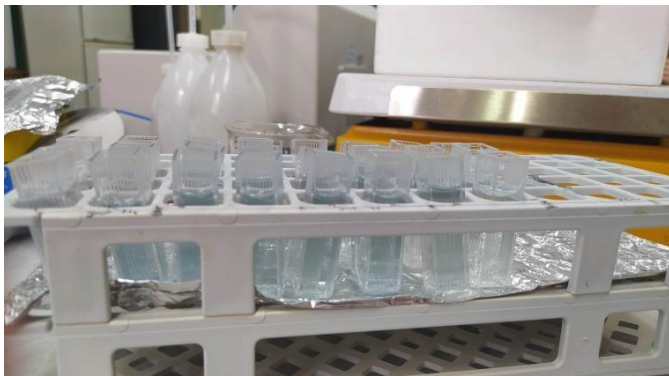
Σε κυψελίδες των 4,0 mL,τοποθετούνται με μικροσύριγγα σε 20 και σε άλλες 40 mL απο κάθε δείγμα ,2500,0 mL απεσταγμένο νερό και 200,0 mL αντιδραστήριο F-C. Μετά από ανάδευση οι κυψελίδες παραμένουν σε σκοτεινό μέρος για 8 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 500,0 mL κορεσμένο διάλυμα Na_2CO_3 και ξανά ανάδευση.

Οι κυψελίδες τοποθετούνται για 30 λεπτά σε υδατόλουτρο με σταθερή θερμοκρασία 40°C σε σκοτάδι.Όταν το χρώμα αλλάξει σε μπλε και οι κυψελίδες έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης στα 750 nm για κάθε δείγμα.

Εικόνα 7 :Οι κυψελίδες του πειράματος πριν την τοποθέτηση σε υδατόλουτρο

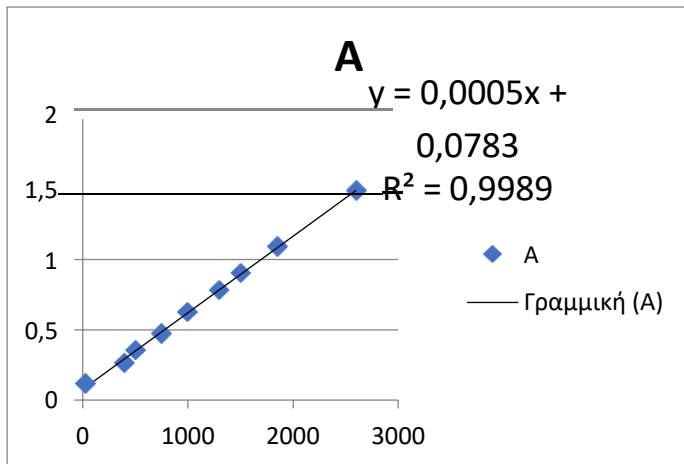


Εικόνα 8:Οι κυψελίδες του πειράματος μετά το πέρας 30 λεπτών στο υδατόλουτρο



Αφού μετρηθεί και η απορρόφηση κάθε δείγματος, ακολουθείται μία σειρά πράξεων ώστε να βρεθεί η Τυπική Απόκλιση (SD).

1. Αφαιρούμε από την απορρόφηση το blank (0.008)
2. Βρίσκουμε την C του γαλλικού οξέος μέσω από την εξίσωση $x=(Y-0,0783)/0,0005$ από την καμπύλη αναφοράς του



Γράφημα 1: πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέως

3. Διορθώνουμε τις τιμές της C σύμφωνα με τον όγκο των δειγμάτων ($C \cdot 10/20$ και $C \cdot 10/40$)
4. Βρίσκουμε τον μέσο όρο των διορθωμένων τιμών
5. Τέλος βρίσκουμε την τυπική απόκλιση (standard deviation SD)

Πίνακα 10: Αποτελέσματα Follin της A δοκιμής

Samples	A (750 nm)				A (750nm)-blank			
	V=20 μ L		V=40 μ L					
S1A	0,383	0,337	0,605	0,702	0,375	0,329	0,597	0,694
S2A	0,400	0,396	0,854	0,834	0,392	0,388	0,846	0,826
S3A	0,455	0,450	0,924	0,970	0,447	0,442	0,916	0,962
S4A	0,491	0,529	1,034	1,038	0,483	0,521	1,026	1,030
S1B	0,257	0,284	0,574	0,471	0,249	0,276	0,566	0,463
S2B	0,445	0,436	0,853	0,843	0,437	0,428	0,845	0,835
S3B	0,486	0,502	0,979	0,938	0,478	0,494	0,971	0,930
S4B	0,443	0,495	0,932	0,965	0,435	0,487	0,924	0,957
S1C	0,177	0,162	0,274	0,297	0,169	0,154	0,266	0,289
S2C	0,404	0,457	0,840	0,867	0,396	0,449	0,832	0,859

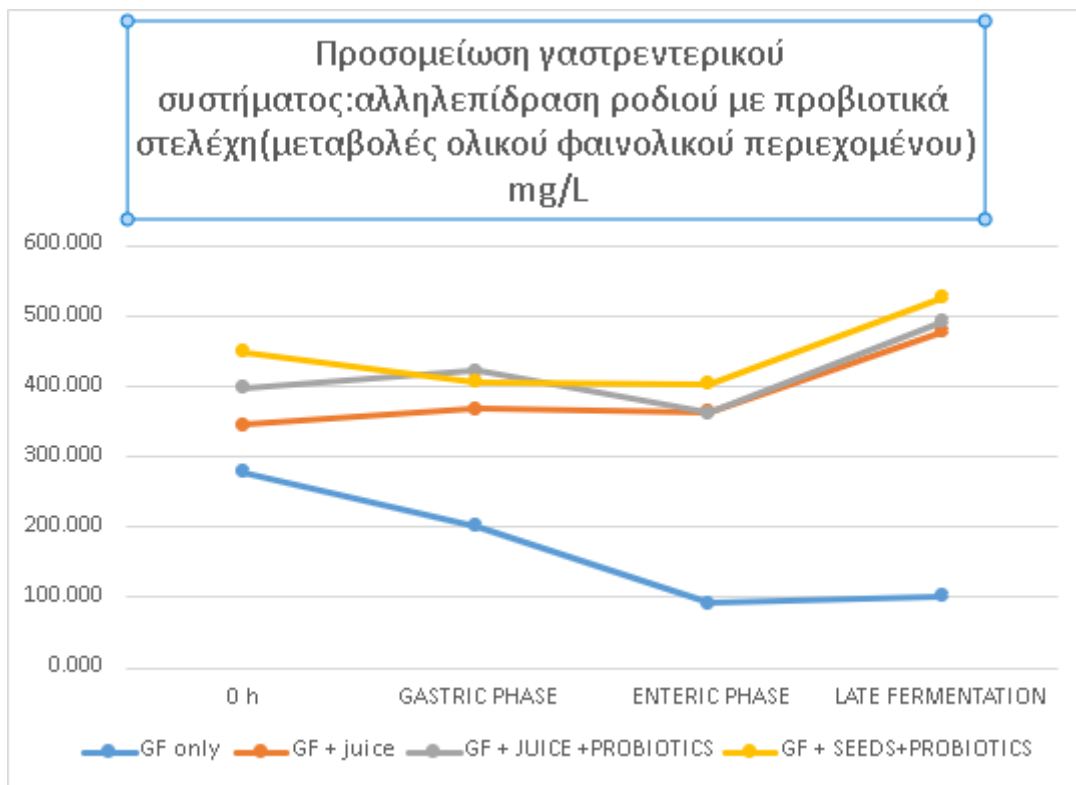
S3C	0,431	0,441	0,799	0,877	0,423	0,433	0,791	0,869
S4C	0,492	0,456	0,902	0,953	0,484	0,448	0,894	0,945
S1D	0,172	0,168	0,314	0,339	0,164	0,160	0,306	0,331
S2D	0,565	0,552	1,035	1,070	0,557	0,544	1,027	1,062
S3D	0,573	0,638	0,999	1,031	0,565	0,630	0,991	1,023
S4D	0,584	0,622	1,065	1,252	0,576	0,614	1,057	1,244

C (mg/L)				Ccorr (mg/L)				C ave (mg/L)	SD
593,400	501,400	1037,400	1231,400	296,700	250,700	259,35	307,85	278,650	27,88150522
627,400	619,400	1535,400	1495,400	313,700	309,700	383,85	373,85	345,275	39,01761354
737,400	727,400	1675,400	1767,400	368,700	363,700	418,85	441,85	398,275	38,26322212
809,400	885,400	1895,400	1903,400	404,700	442,700	473,85	475,85	449,275	33,36826087
341,400	395,400	975,400	769,400	170,700	197,700	243,85	192,35	201,150	30,76705489
717,400	699,400	1533,400	1513,400	358,700	349,700	383,35	378,35	367,525	15,95015674
799,400	831,400	1785,400	1703,400	399,700	415,700	446,35	425,85	421,900	19,53360352
713,400	817,400	1691,400	1757,400	356,700	408,700	422,85	439,35	406,900	35,7336676
181,400	151,400	375,400	421,400	90,700	75,700	93,85	105,35	91,400	12,21454052
635,400	741,400	1507,400	1561,400	317,700	370,700	376,85	390,35	363,900	31,87467647
689,400	709,400	1425,400	1581,400	344,700	354,700	356,35	395,35	362,775	22,31832207
811,400	739,400	1631,400	1733,400	405,700	369,700	407,85	433,35	404,150	26,17591132
171,400	163,400	455,400	505,400	85,700	81,700	113,85	126,35	101,900	21,687823
957,400	931,400	1897,400	1967,400	478,700	465,700	474,35	491,85	477,650	10,90007645

973,400	1103,400	1825,400	1889,400	486,700	551,700	456,35	472,35	491,775	41,82910669
995,400	1071,400	1957,400	2331,400	497,700	535,700	489,35	582,85	526,400	42,69849724

Από τους παραπάνω υπολογισμούς, προκύπτει ο πίνακας 11 και το γράφημα 2 των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων:

Πίνακας 11. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα Δοκιμής Α: αλληλεπίδραση ροδιού με προβιοτικά στελέχη								
	0 h	SD	GASTRI C PHASE	SD	ENTERI C PHASE	SD	LATE FERMENT ATION	SD
GF only	278,650	27,8815 0522	201,150	30,7670548 9	91,400	128,395910	101,900	81,04353839
GF + juice	345,275	39,0176 1354	367,525	15,9501567 4	363,900	183,5782087	477,650	195,5089256
GF + JUICE +PROBIO TICS	398,275	38,2632 2212	421,900	19,5336035 2	362,775	214,9975962	91,7754	211,3537731
GF+ SEEDS +PROBIO TICS	449,275	33,3682 6 0 8 7	406,900	35,7336676	404,150	228,8740616	526,400	214,1870787



Γράφημα 2: Τιμές ολικού φαινολικού φορτίου (mgGAE/L) στις διάφορες φάσεις της γαστρεντερικής προσομείωσης: GF only=Γαστρικό υγρό, GF+juice= Γαστρικό υγρό και χυμός ροδιού, GF+Juice+probiotics=Γαστρικό υγρό και Χυμός ροδιού και Προβιοτικά, GF+Seeds+probiotics= Γαστρικό υγρό και Σπόροι ροδιού και Προβιοτικά

Από το γράφημα παρατηρείται ότι μέχρι την εντερική φάση, σε όλα τα δείγματα δεν υπάρχουν σημαντικές μεταβολές του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Στο τέλος όμως της εντερικής φάσης ζύμωσης (Late Fermentation) παρατηρείται σε όλα τα δείγματα (εκτός του γαστρικού υγρού, GF only) αύξηση του ολικού φαινολικού περιεχομένου. Αυτό μπορεί να συμβαίνει από την αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών που υπάρχουν είτε ως φυσικό μικροβίωμα των σπόρων ροδιού, είτε στις κάψουλες των προβιοτικών. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά του δείγματος με τα προβιοτικά σε σχέση με τα άλλα δείγματα.

4.2.3 Β ΔΟΚΙΜΗ ΜΕ ΡΟΔΙ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ (I)

Στην δεύτερη δοκιμή χρησιμοποιήσαμε ως δείγμα μικροοργανισμών δείγμα από 3 ανθρώπινα κόπρανα (fecal samples) από εθελοντές (μας παραχωρήθηκαν από το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο). Τα κόπρανα ήταν σε αραιωμένη μορφή. Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι και χυμός από φρέσκο οικιακό ρόδι Κορινθίας.

Η γαστροεντερική προσομείωση είχε 5 φάσεις, όπως φαίνονται στον πίνακα 12

Πίνακας 12: Φάσεις επώασης Β Δοκιμής

ΦΑΣΗ	ΩΡΕΣ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ
A	0 hours	ΑΡΧΙΚΗ ΦΑΣΗ
B	1,5 hours GF	ΓΑΣΤΡΙΚΗ ΦΑΣΗ
C	1,5 h GF+2h EF	ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΦΑΣΗ+ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΚΟΠΡΑΝΩΝ 0,1%
D	1,5h GF + 6h EF	ΠΡΩΙΜΗ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ
E	1,5h GF + 20h EF	ΟΨΙΜΗ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

ΑΡΧΙΚΗ ΦΑΣΗ Α

Πρασκευάστηκαν τα δείγματα όπως φαίνονται στον πίνακα

Πίνακας 13: Δείγματα Β Δοκιμής

M1	Γαστρικό υγρό (GF) (40 mL)
M2	Γαστρικό υγρό +χυμός ροδιού (40 mL+10 mL)
M3	Γαστρικό υγρό+ σπόροι ροδιού (40m +10g)
M4	Γαστρικό υγρό+σπόροι ροδιού(+δείγμα κοπράνων 1)
M5	Γαστρικό υγρό+χυμός ροδιού(+δείγμα κοπράνων 1)
M6	Γαστρικό υγρό+σπόροι ροδιού(+δείγμα κοπράνων 2)
M7	Γαστρικό υγρό+σπόροι ροδιού(+δείγμα κοπράνων 3)

Στη συνέχεια σε σωληνάρια Eppendorf τοποθετήθηκαν 2 mL από κάθε κωνική και οι κωνικές μπαίνουν για επώαση στους 37°C υπό ανάδευση για 1,5 ώρα

ΓΑΣΤΡΙΚΗ ΦΑΣΗ Β

Συλλέχθηκαν ξανά 2 mL από κάθε επωασμένη κωνική και στη συνέχεια το γαστρικό υγρό μετατράπηκε σε εντερικό .

Οι κωνικές τοποθετούνται για επώαση στις ίδιες συνθήκες για 2 ώρες

ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΦΑΣΗ C

Συλλέχθηκαν από κάθε κωνική 2mL δείγματος

Έπειτα προστέθηκε το δείγμα κοπράνων 1 στις κωνικές φιάλες M4,M5 ,το δείγμα κοπράνων 2 στην κωνική M6 και το δείγμα κοπράνων 3 στην M7 σε ποσότητα 10 mL

Τα κόπρανα προστέθηκαν σε ποσότητα 0,1% (διάλυση 0,1γρ σε 10 ml αποστειρωμένο ισότονο αραιωτικό υγρό).

Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν όλες οι κωνικές για επώαση στις ίδιες συνθήκες για 6 ώρες

ΠΡΩΙΜΗ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ D

Συλλέχθηκαν 2mL από κάθε κωνική

Ακολούθησε ξανά επώαση στις ίδιες συνθήκες για 20 ώρες

ΟΨΙΜΗ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ E

Σε Eppendorf τοποθετήθηκαν ξανά 2 mL από κάθε κωνική

Τα τελικά δείγματα παρουσιάζονται στον πίνακα

Πίνακας 14 :Δείγματα από κάθε χρονική φάση επώασης B δοκιμή

M1A, M1B, M1C, M1D, M1E
M2A, M2B, M2C, M2D, M2E
M3A, M3B, M3C, M3D, M3E
M4A, M4B, M4C, M4D, M4E
M5A, M5B, M5C, M5D, M5E
M6A, M6B, M6C, M6D, M6E
M7A, M7B, M7C, M7D, M7E

Στην συνέχεια ακολούθησε προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Follin.

Τα αποτελέσματα FOLLIN φαίνονται στον πίνακα 15

Πίνακας 15: Αποτελέσματα Folin της Β Δοκιμής

Samples	A (750 nm) V=20 μ L			A (750nm)-blank			C (mg/L)		
	M1A	0,091	0,100	0,109	0,089	0,098	0,107	21,4	39,400
M2A	0,312	0,317	0,289	0,31	0,315	0,287	463,4	473,400	417,400
M3A	0,282	0,303	0,275	0,28	0,301	0,273	403,4	445,400	389,400
M4A	0,283	0,289	0,271	0,281	0,287	0,269	405,4	417,400	381,400
M5A	0,297	0,271	0,228	0,295	0,269	0,226	433,4	381,400	295,400
M6A	0,246	0,274	0,291	0,244	0,272	0,289	331,4	387,400	421,400
M7A	0,282	0,234	0,323	0,28	0,232	0,321	403,4	307,400	485,400
M1B	0,096	0,103	0,105	0,094	0,101	0,103	31,4	45,400	49,400
M2B	0,262	0,269	0,251	0,26	0,267	0,249	363,4	377,400	341,400
M3B	0,285	0,348	0,361	0,283	0,346	0,359	409,4	535,400	561,400
M4B	0,348	0,344	0,387	0,346	0,342	0,385	535,4	527,400	613,400
M5B	0,272	0,299	0,295	0,27	0,297	0,293	383,4	437,400	429,400
M6B	0,358	0,331	0,310	0,356	0,329	0,308	555,4	501,400	459,400
M7B	0,505	0,537	0,467	0,503	0,535	0,465	849,4	913,400	773,400
M1C	0,052	0,068	0,059	0,05	0,066	0,057	-56,6	-24,600	-42,600
M2C	0,249	0,247	0,211	0,247	0,245	0,209	337,4	333,400	261,400
M3C	0,465	0,505	0,486	0,463	0,503	0,484	769,4	849,400	811,400
M4C	0,536	0,540	0,639	0,534	0,538	0,637	911,4	919,400	1117,400
M5C	0,323	0,327	0,334	0,321	0,325	0,332	485,4	493,400	507,400
M6C	0,559	0,565	0,540	0,557	0,563	0,538	957,4	969,400	919,400
M7C	0,692	0,752	0,676	0,69	0,750	0,674	1223,4	1343,400	1191,400
M1D	0,047	0,045	0,060	0,045	0,043	0,058	-66,6	-70,600	-40,600
M2D	0,227	0,192	0,180	0,225	0,190	0,178	293,4	223,400	199,400
M3D	0,530	0,533	0,500	0,528	0,531	0,498	899,4	905,400	839,400
M4D	0,558	0,536	0,577	0,556	0,534	0,575	955,4	911,400	993,400
M5D	0,323	0,276	0,295	0,321	0,274	0,293	485,4	391,400	429,400
M6D	0,538	0,548	0,517	0,536	0,546	0,515	915,4	935,400	873,400
M7D	0,693	0,797	0,709	0,691	0,795	0,707	1225,4	1433,400	1257,400
M1E	0,046	0,054	0,064	0,044	0,052	0,062	-68,6	-52,600	-32,600
M2E	0,222	0,226	0,202	0,22	0,224	0,200	283,4	291,400	243,400
M3E	0,451	0,616	0,506	0,449	0,614	0,504	741,4	1071,400	851,400
M4E	0,543	0,502	—	0,541	0,500	—	925,4	843,400	—
M5E	0,315	0,330	0,295	0,313	0,328	0,293	469,4	499,400	429,400
M6E	0,580	0,505	0,540	0,578	0,503	0,538	999,4	849,400	919,400
M7E	0,634	0,730	0,726	0,632	0,728	0,724	1107,4	1299,400	1291,400

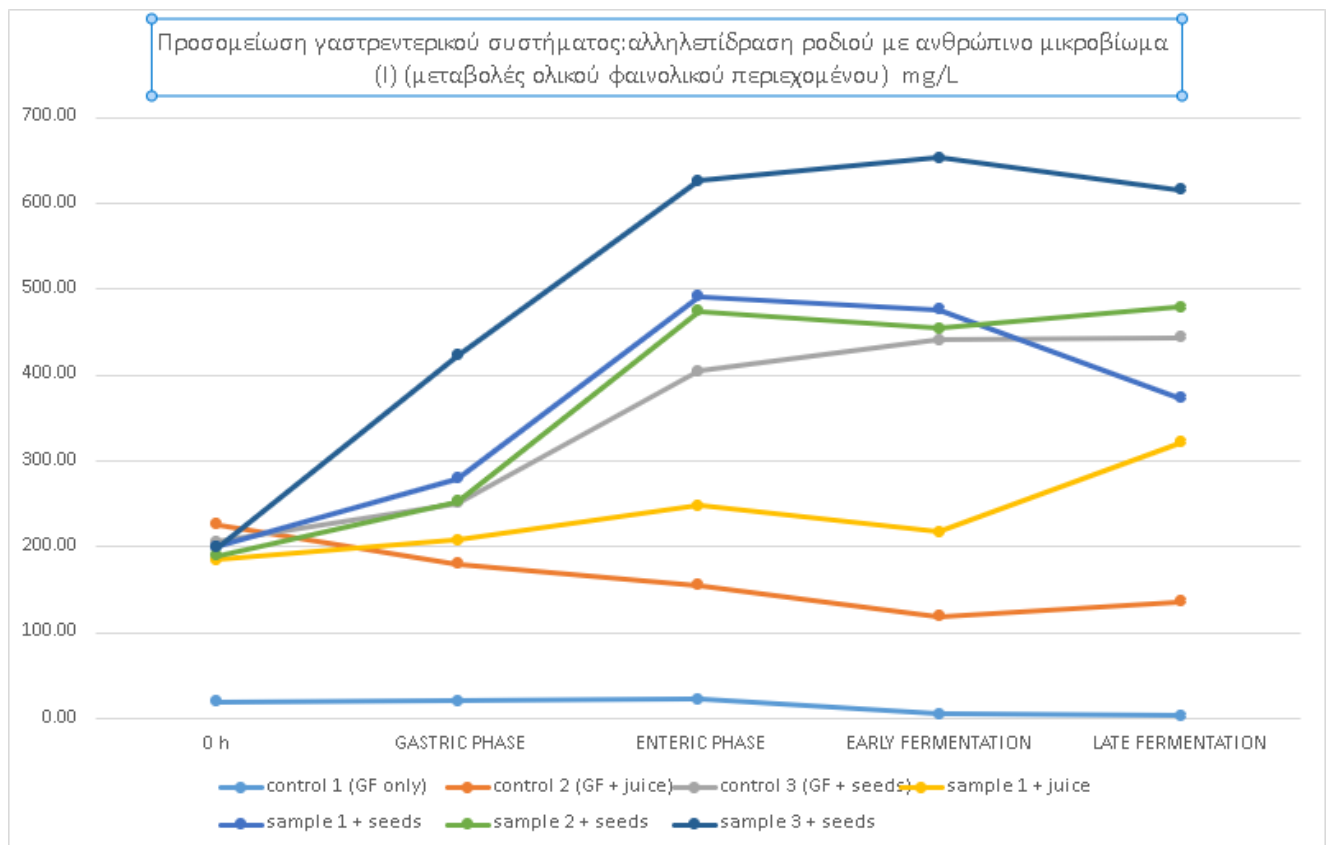
Samples	Ccorr (mg/L)			C ave (mg/L)	SD
	M1A	10,7	19,700		

M2A	231,7	236,700	208,700	225,7	14,933
M3A	201,7	222,700	194,700	206,3666667	14,572
M4A	202,7	208,700	190,700	200,7	9,165
M5A	216,7	190,700	147,700	185,0333333	34,847
M6A	165,7	193,700	210,700	190,0333333	22,723
M7A	201,7	153,700	242,700	199,3666667	44,546
M1B	15,7	22,700	24,700	21,03333333	4,726
M2B	181,7	188,700	170,700	180,3666667	9,074
M3B	204,7	267,700	280,700	251,0333333	40,649
M4B	267,7	263,700	306,700	279,3666667	23,756
M5B	191,7	218,700	214,700	208,3666667	14,572
M6B	277,7	250,700	229,700	252,7	24,062
M7B	424,7	456,700	386,700	422,7	35,043
M1C	-28,3	-12,300	-21,300	-20,63333333	8,021
M2C	168,7	166,700	130,700	155,3666667	21,385
M3C	384,7	424,700	405,700	405,0333333	20,008
M4C	455,7	459,700	558,700	491,3666667	58,347
M5C	242,7	246,700	253,700	247,7	5,568
M6C	478,7	484,700	459,700	474,3666667	13,051
M7C	611,7	671,700	595,700	626,3666667	40,067
M1D	-33,3	-35,300	-20,300	-29,63333333	8,145
M2D	146,7	111,700	99,700	119,3666667	24,420
M3D	449,7	452,700	419,700	440,7	18,248
M4D	477,7	455,700	496,700	476,7	20,518
M5D	242,7	195,700	214,700	217,7	23,643
M6D	457,7	467,700	436,700	454,0333333	15,822
M7D	612,7	716,700	628,700	652,7	56,000
M1E	-34,3	-26,300	-16,300	-25,63333333	9,018
M2E	141,7	145,700	121,700	136,3666667	12,858
M3E	370,7	535,700	425,700	444,0333333	84,014
M4E	462,7	421,700		442,2	28,991
M5E	234,7	249,700	214,700	233,0333333	17,559
M6E	499,7	424,700	459,700	461,3666667	37,528
M7E	553,7	649,700	645,700	616,3666667	54,308

Από τους παραπάνω υπολογισμούς, προκύπτει ο πίνακας 16 και το γράφημα 3 των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων:

Πίνακας 16: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα Δοκιμής Β: αλληλεπίδραση ροδιού με ανθρώπινο μικροβίωμα Ι

	0 h	SD	GASTRIC PHASE	SD	ENTERIC PHASE	SD	EARLY FERMENTATION	SD	LATE FERMENTATION	SD
control 1 (GF only)	19,70	9,00	21,03	4,73	22,3	15,5	5,80	5,4	3,03	2,0
control 2 (GF + juice)	225,70	14,93	180,37	9,07	155,37	21,39	119,37	24,42	136,37	12,8
control 3 (GF + seeds)	206,37	14,57	251,03	40,65	405,03	20,01	440,70	18,25	444,03	84,0
sample 1 + juice	185,03	34,85	208,37	14,57	247,70	5,57	217,70	23,64	321,37	155,4
sample 1 + seeds	200,70	9,17	279,37	23,76	491,37	58,35	476,70	20,52	373,03	121,5
sample 2 + seeds	190,03	22,72	252,70	24,06	474,37	13,05	454,03	15,82	479,37	66,7
sample 3 + seeds	199,37	44,55	422,70	35,04	626,37	40,07	652,70	56,00	616,37	54,3



Γράφημα 3: Τιμές ολικού φαινολικού φορτίου (mgGAE/L) στις διάφορες φάσεις της γαστρεντερικής προσομείωσης : GF only=Γαστρικό υγρό, GF+juice= Γαστρικό υγρό και χυμός ροδιού, GF+seeds=Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού, sample 1+juice= Γαστρικό υγρό και χυμός ροδιού και δείγμα κοπράνων 1, sample 1+seeds=Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού και δείγμα κοπράνων 1, sample 2+seeds= Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού και δείγμα κοπράνων 2, sample 3+seeds= Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού και δείγμα κοπράνων 3

Παρατηρούμε από το γράφημα 3. ότι σημαντικότερες μεταβολές και κυρίως αύξηση προς τις τελευταίες φάσεις στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο, φαίνονται κυρίως στα δείγματα με σπόρους ροδιού, είτε με γαστρικό υγρό, είτε με ανθρώπινα κόπρανα, ενώ τα δείγματα με χυμό ροδιού δεν δείχνουν σημαντικές μεταβολές. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι τα συγκεκριμένα δείγματα κοπράνων είχαν υποστεί επεξεργασία και επομένως είναι πιθανόν να μην είχαν ενεργούς πληθυσμούς μικροοργανισμών ώστε να επηρεάσουν σημαντικά την μεταβλητή που μετρούμε, δηλαδή το ολικό φαινολικό περιεχόμενο.

4.2.4. Γ ΔΟΚΙΜΗ ΜΕ ΡΟΔΙ ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ (II)

Στην τρίτη δοκιμή χρησιμοποιήσαμε ως δείγμα μικροοργανισμών δείγμα από δύο άλλα ανθρώπινα κόπρανα από εθελοντές (μας παραχωρήθηκαν από το Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο). Εκ των οποίων το ένα δείγμα F1 ήταν από άτομο που πάσχει από την ασθένεια Crohn's και το άλλο δείγμα F2 ήταν από υγιές άτομο. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι σπόροι από φρέσκο οικιακό ρόδι Κορινθίας καθώς οι σπόροι είχαν μεγαλύτερο ολικό φαινολικό περιεχόμενο σύμφωνα με τις προηγούμενες δοκιμές.

Η γαστροεντερική προσομείωση είχε 5 φάσεις, όπως φαίνονται στον πίνακα 17

Πίνακας 17: Φάσεις Γ Δοκιμής

A	0 hours	ΑΡΧΙΚΗ ΦΑΣΗ
B	1,5 hours GF	ΓΑΣΤΡΙΚΗ ΦΑΣΗ
C	1,5 h GF+2h EF	ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΦΑΣΗ+ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΚΟΠΡΑΝΩΝ
D	1,5h GF + 6h EF	ΠΡΩΙΜΗ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ
E	1,5h GF + 20h EF	ΟΨΙΜΗ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ

ΑΡΧΙΚΗ ΦΑΣΗ Α

Παρασκευάστηκαν τα δείγματα σε κωνικές φιάλες

Πίνακας 18: Δείγματα Γ Δοκιμής

M1	gastric fluid (GF)(40 mL)
M2	GF + seeds(40mL+10g)
M3	GF + seeds(+feces 1 (crohns disease))
M4	GF + seeds (+ feces 2 (healthy))

Συλλέχθηκαν από κάθε κωνική 2mL δείγματος σε σωληνάρια Eppendorf

Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν οι κωνικές για επώαση στους 37°C υπό συνθήκες ανάδευσης για 1,5 ώρα

ΓΑΣΤΡΙΚΗ ΦΑΣΗ Β

Συλλέχθηκαν από κάθε κωνική 2mL δείγματος

Στη συνέχεια το γαστρικό υγρό μετατράπηκε σε εντερικό και τοποθετήθηκαν πάλι οι κωνικές για επώαση στις ίδιες συνθήκες για 2 ώρες

ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΦΑΣΗ C

Σε σωληνάρια Eppendorf τοποθετήθηκαν άλλα 2mL από κάθε κωνική

Στη συνέχεια προστέθηκε το δείγμα κοπράνων F1(δείγμα από εθελοντή με νόσο του Crohn) στην κωνική M3 και το δείγμα κοπράνων F2(δείγμα από υγιή εθελοντή) στην κωνική M4 σε ποσότητα 10 mL.

Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν οι κωνικές για επώαση στις ίδιες συνθήκες για 6 ώρες

ΠΡΩΙΜΗ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ D

Συλλέχθηκαν 2mL από κάθε κωνική

Ακολούθησε ξανά επώαση στις ίδιες συνθήκες για 20 ώρες.

ΟΨΙΜΗ ΕΝΤΕΡΙΚΗ ΖΥΜΩΣΗ E

Συλλέχθηκαν από κάθε κωνική άλλα 2 mL δείγματος σε σωληνάρια Eppendorf.

Τα τελικά δείγματα παρουσιάζονται στον πίνακα

Πίνακας 19 :Δείγματα από κάθε χρονική φάση επώασης Γ δοκιμή

M1A, M1B, M1C, M1D, M1E
M2A, M2B, M2C, M2D, M2E
M3A, M3B, M3C, M3D, M3E
M4A, M4B, M4C, M4D, M4E

Στην συνέχεια ακολούθησε προσδιορισμός ολικού φαινολικού περιεχομένου με την μέθοδο Follin.

Τα αποτελέσματα FOLLIN φαίνονται στον πίνακα 20

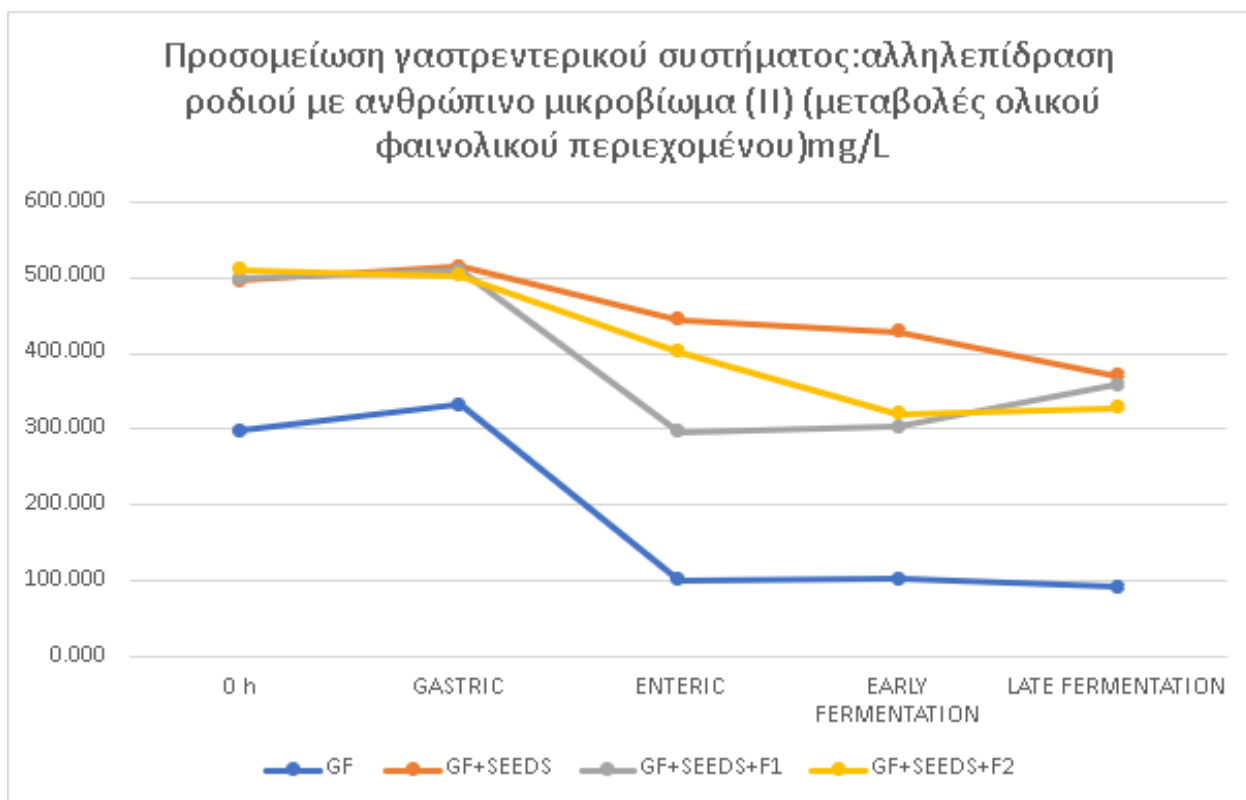
Πίνακας 20:Αποτελέσματα Folin της Γ Δοκιμής

Samples	A (750 nm) V=20 μL		A (750nm)- blank		C (mg/L)		Ccorr (mg/L)		C ave (mg/L)	SD standard deviation
	M1A	0.376	0.381	0.374	0.379	591.4	601.4	295.7	300.7	298.2
M2A	0.577	0.577	0.575	0.575	993.4	993.4	496.7	496.7	496.7	0.00
M3A	0.598	0.561	0.596	0.559	1035.4	961.4	517.7	480.7	499.2	26.16
M4A	0.613	0.568	0.611	0.566	1065.4	975.4	532.7	487.7	510.2	31.82
M1B	0.41	0.415	0.408	0.413	659.4	669.4	329.7	334.7	332.2	3.54
M2B	0.596	0.596	0.594	0.594	1031.4	1031.4	515.7	515.7	515.7	0.00
M3B	0.577	0.602	0.575	0.6	993.4	1043.4	496.7	521.7	509.2	17.68
M4B	0.579	0.588	0.577	0.586	997.4	1015.4	498.7	507.7	503.2	6.36
M1C	0.164	0.199	0.162	0.197	167.4	237.4	83.7	118.7	101.2	24.75
M2C	0.457	0.592	0.455	0.59	753.4	1023.4	376.7	511.7	444.2	95.46
M3C	0.35	0.404	0.348	0.402	539.4	647.4	269.7	323.7	296.7	38.18
M4C	0.515	0.451	0.513	0.449	869.4	741.4	434.7	370.7	402.7	45.25
M1D	0.186	0.178	0.184	0.176	211.4	195.4	105.7	97.7	101.7	5.66
M2D	0.523	0.496	0.521	0.494	885.4	831.4	442.7	415.7	429.2	19.09
M3D	0.396	0.37	0.394	0.368	631.4	579.4	315.7	289.7	302.7	18.38
M4D	0.366	0.435	0.364	0.433	571.4	709.4	285.7	354.7	320.2	48.79
M1E	0.166	0.179	0.164	0.177	171.4	197.4	85.7	98.7	92.2	9.19
M2E	0.504	0.398	0.502	0.396	847.4	635.4	423.7	317.7	370.7	74.95
M3E	0.447	0.432	0.445	0.43	733.4	703.4	366.7	351.7	359.2	10.61
M4E	0.464	0.354	0.462	0.352	767.4	547.4	383.7	273.7	328.7	77.78

Από τους παραπάνω υπολογισμούς, προκύπτει ο πίνακας 21 και το γράφημα 4 των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων:

Πίνακας 21: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα Δοκιμής Γ: αλληλεπίδραση ροδιού με ανθρώπινο μικροβίωμα II

	0 h	SD	GASTRIC	SD	ENTERIC	SD	EARLY FERMENTATION	SD	LATE FERMENTATION	SD
GF	298,2 00	3,536	332,200	3,53 6	101,20 0	24,74 9	101,700	5,657	92,200	9,192
GF+SEE DS	496,7 00	0,000	515,000	0,00 0	444,20 0	95,45 9	429,200	19,09 2	370,700	74,953
GF+SEE DS +F1	499,2 00	26,16 3	509,200	17,6 78	296,70 0	38,18 4	302,700	18,38 5	359,200	10,607
GF+SEE DS +F2	510,2 00	31,82 0	503,200	6,36 4	402,70 0	45,25 5	320,000	48,79 0	328,700	77,782



Γράφημα 4: Τιμές ολικού φαινολικού φορτίου (mgGAE/L) στις διάφορες φάσεις της γαστρεντερικής προσομείωσης : GF =Γαστρικό υγρό, GF+seeds=Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού ,GF+SEEDS+F1=Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού και δείγμα κοπράνων 1, GF+SEEDS+F2=Γαστρικό υγρό και σπόροι ροδιού και δείγμα κοπράνων 2

Όπως φαίνεται στο γράφημα 4, παρατηρούνται σημαντικές μεταβολές στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο των δειγμάτων κατά την διάρκεια των διαφορετικών φάσεων του μοντέλου προσομείωσης γαστρεντερικού συστήματος. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε σημαντική μείωση του ολικού φαινολικού περιεχομένου στην εντερική φάση που σταθεροποιείται μέχρι την πρώτη φάση εντερικής ζύμωσης (early fermentation). Ιδιαίτερα, όμως τα δείγματα με το ανθρώπινο μικροβίωμα (F1 και F2) δείχνουν πολύ μεγαλύτερη μείωση σε σχέση με το δείγμα ελέγχου με σκέτο γαστρικό υγρό και σπόρους ροδιού (GF+SEEDS). Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι υπάρχουν ενεργοί μικροοργανισμοί στα κόπρανα, οι οποίοι μεταβολίζουν τις πολυφαινόλες των σπόρων ροδιού και μεταβάλλουν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Επίσης, στο τέλος της όψιμης φάσης εντερικής ζύμωσης (late fermentation) παρατηρούμε ότι στο μεν δείγμα ελέγχου με σκέτο γαστρικό υγρό και σπόρους ροδιού (GF+SEEDS) συνεχίζεται η μείωση, όμως στα άλλα δύο δείγματα με το ανθρώπινο μικροβίωμα (F1 και F2) παρατηρείται μία μικρή αύξηση στο ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Και αυτό μπορεί επίσης να οφείλεται

στους ενεργούς μεταβολικά μικροοργανισμούς των δειγμάτων κοπράνων που χρησιμοποιήθηκαν στην δοκιμή.

Τα αποτελέσματα της μικροβιολογικής ανάλυσης των δειγμάτων έδειξαν ότι και στα δύο δείγματα υπήρχαν ενεργοί μικροοργανισμοί οι οποίοι καταμετρήθηκαν με καλλιεργητική μέθοδο (μέθοδος τρυβλίων), όπως φαίνεται στον πίνακα 22.

Πίνακας 22: Καταμέτρηση μικροοργανισμών των δειγμάτων κοπράνων που χρησιμοποιήθηκαν στην Γ δοκιμή

ΔΕΙΓΜΑ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	N (cfu/ml)
F1(νόσος Crohn)	BHI (αερόβιο)	$9,5 \cdot 10^4$
	BHI (αναερόβιο)	$>10^6$
	MRS (αναερόβιο)	$5 \cdot 10^2$
	PETRIFILM- Ζύμες/ Μύκητες	0
	Bifidobacteria (TOS)	$>3 \cdot 10^4$
F2(υγιής)	BHI (αερόβιο)	$6,8 \cdot 10^5$
	BHI (αναερόβιο)	$1,7 \cdot 10^6$
	MRS (αναερόβιο)	$8,5 \cdot 10^5$
	PETRIFILM- Ζύμες/ Μύκητες	10^4
	Bifidobacteria (TOS)	$>3 \cdot 10^4$

Παρατηρούμε ότι ο συνολικός αριθμός της μεσόφιλης χλωρίδας σε αερόβιο περιβάλλον είναι πολυπληθέστερος σε βακτήρια στο δείγμα του υγιούς ανθρώπου, ενώ οι καλλιέργειες σε αναερόβιο περιβάλλον παρουσιάζουν μεγαλύτερο αριθμό στο δείγμα κοπράνων από τον ασθενή εθελοντή.

Δεν βρέθηκε σημαντικός αριθμός οξυγαλακτικών βακτηρίων στο δείγμα του ασθενούς, σε αντίθεση με τον υγιή που βρέθηκε αριθμός της τάξεως $8,5 \cdot 10^5$ cfu/ml .

Σε ότι αφορά τις ζύμες και τους μύκητες ο ασθενής παρουσίασε μηδενικό αριθμό και ο υγιής παρουσίασε να έχει 10^4 cfu/ml.

Τέλος ο έλεγχος για τα μπιφιδοβακτήρια έδειξε να μην υπάρχουν διαφορές μεταξύ του ασθενούς και του υγιούς εθελοντή με αριθμό αποικιών $>3 \cdot 10^4$.

Κεφάλαιο 5 Συμπεράσματα

Είναι εμφανές πως η μικροχλωρίδα του γαστρεντερικού σωλήνα αλληλεπιδρά με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο των τροφίμων και συγκεκριμένα το ρόδι. Όπως έδειξαν τα αποτελέσματα δεν υπάρχει στατιστικά μεγάλη διαφορά στις μεταβολές του ολικού φαινολικού περιεχομένου ανάμεσα στο μικροβίωμα ενός υγιούς ανθρώπου και ενός πάσχοντα από την ασθένεια Crohn's, αν και υπάρχουν μερικές διαφορές σύμφωνα με τους μικροβιολογικούς ελέγχους που έγιναν στα κόπρανα και των δύο, στον αριθμό μικροοργανισμών. Είναι εμφανές όμως ότι και στις δύο περιπτώσεις υπάρχουν μεταβολές και αλληλεπιδράσεις με τις πολυφαινόλες, οι οποίες μπορεί να βασίζονται στους ενεργούς μικροοργανισμούς στα κόπρανα, οι οποίοι μεταβολίζουν τις πολυφαινόλες του ροδιού και μεταβάλλουν το ολικό φαινολικό περιεχόμενο. Η συγκεκριμένη εργασία ήταν ένα μικρό δείγμα της αλληλεπίδρασης αυτής και χρειάζεται να διεξαχθούν περαιτέρω πειραματικές δοκιμές για μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Alvarez, D., Xiong, Y.L., Castillo, M., Payne, F.A., Garrido, M.D.** (2012). Textural and viscoelastic properties of pork frankfurters containing canola-olive oils, rice bran, and walnut. *Meat Science*, 39 (1): 8-15: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0309174012001027>
- **Avila-Escalante, M.L., Coop-Gamas, F., Cervantes-Rodrigues, M., Mendez-Iturbide, D., Aranda-Gonzalez, I.I.** (2020). The effect of Diet in oxidative stress and metabolic diseases-Clinically controlled trials. *Journal of Food Biochemistry*, 44 (5): e13191: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32160647/>
- **Aula, A.-M.** (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*, 7: 407-429: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-008-9095-3>
- **Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I.** (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science AAAS*, 307 (5717): 1915-1920: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15790844/>
- **Benshitrit, R.C., Levi, C.S., Tal, S.L., Shimoni, E., Lesmes, U.** (2012). Development of oral food - grade delivery systems: current knowledge and future challenges. *Food and Function Journal*, 3 (1): 10-21: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21993691/>
- **Caleja, C., Barros, L., Antonio, A.L., Carocho, M., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, I.C.F.R.** (2016). Fortification of yogurts with different antioxidant preservatives: A comparative study between natural and synthetic additives. *Food Chemistry*, 210: 262-268: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814616306422>
- **Caleja, C., Barros, L., Antonio, A.L., Ciric A., Sokovic, M., Oliveira, M.B.P.P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R.** (2015). Foeniculum vulgare Mill. as natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. *Journal of Functional Foods*, 12: 428-438: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614003958>
- **Chen, J., Shu, Y., Chen, Y., Ge, Z., Zhang, C., Cao, J., Li, X., Wang, Y., Sun, C.** (2022). Evaluation of Antioxidant Capacity and Gut Microbiota Modulatory Effects of Different Kinds of Berries. *Antioxidants (Basel)*, 11(5): 1020: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9137550/>

- **Chen, J.-R., Liu, X.-M., Chen, Z.-Y., Zhang, Y.-S., Zhang, Y.-H.** (2016). Mulberry anthocyanin biotransformation by intestinal probiotics. *Food Chemistry*, 213: 721-727: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814616310548>
- **Correa-Filho, L.C., Lourenco, S.C., Duarte, D.F., Moldao-Martins, M., Alves, V.D.** (2019). Microencapsulation of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Pomace Ethanolic Extract by Spray Drying: Optimization of Process Conditions. *Applied Sciences*, 9 (3): 612: <https://www.mdpi.com/2076-3417/9/3/612>
- **Couteau, D., McCartney, A.L., Gibson, G.R., Williamson, G., Faulds, C.B.** (2001). Isolation and Characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 90 (6): 873-881: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11412317/>
- **Deledda, A., Annunziata, G., Tenore, G.C., Palmas, V., Manzin, A., Velluzzi, F.** (2021). Diet -Derived Antioxidants and Their Role in Inflammation, Obesity and Gut Microbiota Modulation. *Antioxidants*, 10 (5): 7-8: <https://www.mdpi.com/2076-3921/10/5/708>
- **Derakhshan, Z., Ferrante, M., Tadi, M., Ansari, F., Heydari, A., Hosseini, M.S., Conti, G.O., Sadrabad, E.K.** (2018). Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food and Chemical Toxicology*, 114: 108-111: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691518300887>
- **Farre, R., Fiorani, M., Rahiman, S.A., Matteoli, G.** (2020). Intestinal Permeability, Inflammation and the Role of Nutrients. *Nutrients*, 12 (4): 1185: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/4/1185>
- **Fernandes, P.A.R., Le Bourvellec, C., Renard, C.M.G.C., Nunes, F.M., Bastos, R., Coelho, E., Wessel, D.F., Coimbra, M.A., Cardoso, S.M.** (2019). Revisiting the chemistry of apple pomace polyphenols. *Food Chemistry*, 294: 9-18: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814619308015>
- **Galanakis, C.M., Tsatalas, P., Charalambous, Z., Galanakis, I.M.** (2018). Control of microbial growth in bakery products fortified with polyphenols recovered from olive mill wastewater. *Environmental Technology & Innovation*, 10: 1-15: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S235218641730384X>
- **Gavahian M., Khaneghah, A.M., Lorenzo, J.M., Munekata, P.E.S., Garcia-Mantrana, I., Collado, M.C., Melendez-Martinez, A., Barba, F.J.** (2019). Health

benefits of olive oils and its componets: Impacts on gut microbiota antioxidant activities and preventionof noncommunicable diseases. *Trends in Food Science & Technology*, 88: 220-227: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224419300779>

- **Gonzalez-Hunt, C.P., Wadhwa, M., Sanders, L.H.** (2018). DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes. *Current Opinion in Toxicology*, 7: 87-94: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2468202017301341>
- **Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad, M.C.W., Barikmon, I., Hvattum, E., Remberg, S.F., Wold, A.-B., Haffner, K., Baugerod, H., Andersen, L.F., Jacobs, D.R., Blomhoff, R.** (2002). A Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants. *The Journal of Nutrition*, 132 (3): 461-471: <https://academic.oup.com/jn/article/132/3/461/4687290>
- **Han, Y. & Xiao, H.** (2020). Whole Food-Based Approaches to Modulating Gut Microbiota and Associated Diseases. *Annual Reviews Full-Text article*, 11: 119-143: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31951487/>
- **Hanske, L., Engst, W., Loh, G., Sczesny, S., Blaut, M., Braune, A.** (2013). Contribution of gut bacteria to the metabolism of cyanidin 3-glucoside in human microbiota- associated rats. *British Journal of Nutrition*, 109 (8): 1433-1441: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22906731/>
- **Jahan, I., Haque, A., Hashem, A., Rima, F.J., Akhter, S., Hossain, A.** (2018). Formulation of Value Added Beef Meatballs with Pomegranate (*Punica granatum*) Extract as a Source of Natural Antioxidant. *Journal of Meat Science and Technology*, 6 (1): 12-18: http://www.jakraya.com/journal/pdf/17-jmstArticle_3.pdf
- **Jabbar, A.S.** (2016). Chapter 11 – Digestive system. In the book: *Introduction to Human Physiology*: 236-262: https://www.researchgate.net/publication/311274630_Introduction_to_Human_Physiology
- **Jiang, S., Liu, H., Li, C.** (2021). Dietary Regulation of Oxidative Stress in Chronic Metabolic Diseases. *Foods*, 10 (8): 1854: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/8/1854>
- **Krishnamurthy, P. & Wadwani, A.** (2012). Chapter 1 - Antioxidant Enzymes and Human Health. In: El-Missiry, M.A. (ed). *Antioxidant Enzyme*: 3-18: <https://www.intechopen.com/chapters/39554>
- **Lewis, C.** (2014). Doctoral Dissertation: A biocultural analysis of ethnic variation in colorectal cancer incidence and mortality in the United States from 1988 to 2006. Thesis

for: Doctorate, Advisor: Willey, A.:
[https://www.researchgate.net/publication/270579103 Doctoral Dissertation A biocultural analysis of ethnic variation in colorectal cancer incidence and mortality in the United States from 1988 to 2006](https://www.researchgate.net/publication/270579103_Doctoral_Dissertation_A_biocultural_analysis_of_ethnic_variation_in_colorectal_cancer_incidence_and_mortality_in_the_United_States_from_1988_to_2006)

- **Li, Z., Summanen, P.H., Komoriya, T., Henning, S.M., Lee, R.-P., Carlson, E., Heber, D., Finegold, S.M.** (2015). Pomegranate ellagitannins stimulate growth of gut bacteria in vitro: Implications for prebiotic and metabolic effects. *Anaerobe*, 34: 164-168: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1075996415300226>
- **Lourenco, S.C., Moldao-Martins, M., Alves, V.D.** (2019). Antioxidants of Natural Plant Origins: From Sources to Food Industry Application. *Molecules*, 24 (22): 4132: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/22/4132#B67-molecules-24-04132>
- **Naliyadhara, N., Kumar, A., Gangwar, S.K., Devanarayanan, T.N., Hegde, M., Alqahtani, M.S., Abbas, M., Sethi, G., Kunnumakkara, A.** (2023). Interplay of dietary antioxidants and gut microbiome in human health: What has been learnt thus far? *Journal of Functional Foods*, 100: 105365: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464622004352>
- **NIH (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases).** (2017). Your Digestive System & How it Works. Available online (05/01/2023): <https://www.niddk.nih.gov/health-information/digestive-diseases/digestive-system-how-it-works>
- **Oroian, M. & Escriche, I.** (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74: 10-36: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996915001817>
- **Paredes-Lopez, O., Cervantes-Ceja, M., Vigna-Perez, M., Hernandez-Perez, T.** (2010). Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life. A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65 (3): 299- 308: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20645129/>
- **Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A.** (2017). Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 8416763: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5551541/>
- **Rajoka, M.S.R., Thirumdas, R., Mehwish, H.M., Umair, M., Khurshid, M., Haygat, H.F., Phimolsiripol, Y., Pallares, N., Marti-Quijal, F.J., Barba, F.J.** (2021). Role of

Food Antioxidants in Modulating Gut Microbial Communities: Novel Understandings in Intestinal Oxidative Stress Damage and Their Impact on Host Health. *Antioxidants (Basel)*, 10 (10): 1563: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8533511/>

- **Sender, R., Fuchs, S., Milo, R.** (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, 14 (8): e1002533: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4991899/>
- **Song, H., Shen, X., Chu, Q., Zheng, X.** (2021). Pomegranate fruit pulp polyphenols reduce diet-induced obesity with modulation of gut microbiota in mice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102 (5): 1968-1977: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.11535>
- **Thursby, E. & Juge, N.** (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474 (11): 1823-1836: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5433529/>
- **Zhao, R., Long, X., Yang, J., Du, L., Zhang, X., Li, J., Hou, C.** (2019). Pomegranate peel polyphenols reduce chronic low-grade inflammatory responses by modulating gut microbiota and decreasing colonic tissue damage in rats fed a high-fat diet. *Food & Function*, 10 (12): https://www.researchgate.net/publication/337233759_Pomegranate_peel_polyphenols_reduce_chronic_low-grade_inflammatory_responses_by_modulating_gut_microbiota_and_decreasing_colonic_tissue_damage_in_rats_fed_a_high-fat_diet
- **Flores, M., and D. Welch.** (1992). Section 6. Mycology: culture media, p.6.7.1-6.7.3. In : H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- **Suburbia Kumar Nandycorresponding and KV Venkatesh.**(2014).Study of CFU for individual microorganisms in mixed cultures with a known ratio using MBRT. <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-014-0038-7>
-