



ΔΗΜΟΚΡΑΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα :

<< Επίδραση της διακοπής του καπνίσματος στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου. Πειραματική μελέτη σε επίμυες. >>

Της :

ΖΑΧΑΡΙΟΥΔΑΚΗ ΑΝΝΑΣ

A.E.M. : 1293

Επιβλέπων καθηγητής : Υψηλάντης Πέτρος
Αναπληρωτής καθηγητής Πειραματικής Χειρουργικής
Τμήμα Ιατρικής Δ.Π.Θ.
Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής
Έρευνας του τμήματος της Ιατρικής Δ.Π.Θ.

Συνεπιβλέπων καθηγητής : Κουρκουτάς Ιωάννης
Επίκουρος καθηγητής Εφαρμοσμένης Βιοτεχνολογίας
Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής Δ.Π.Θ.
Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας – Ερευνητική ομάδα
Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας και Μοριακής
Βιοτεχνολογίας

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΥΠΟΛΗ 2016

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε χάρη στην βοήθεια και την συνεργασία ανθρώπων που εκτιμώ πολύ. Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους καθηγητές μου, τον Αναπληρωτή καθηγητή Πειραματικής Χειρουργικής κ. Υψηλάντη Πέτρο και τον Επίκουρο καθηγητή Εφαρμοσμένης Βιοτεχνολογίας κ. Κουρκουτά Ιωάννη, που μου έδωσαν την ευκαιρία να συμμετάσχω στην συγκεκριμένη έρευνα. Υπήρξαν πάντα πρόθυμοι να προσφέρουν την βοήθεια και την καθοδήγησή τους τόσο στην διάρκεια του πειραματικού σκέλους όσο και κατά την διάρκεια της συγγραφής της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ, στην υποψήφια Διδάκτορα Σανταρμάκη Βαλεντίνα, για τις γνώσεις που μου πρόσφερε και την υποστήριξή της. Η βοήθεια της ήταν πραγματικά πολύτιμη. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω για τους συμφοιτητές μου, με τους οποίους συνεργάστηκα άψογα κατά την διάρκεια της έρευνας. Οι Εύη Σώμαλου, Δημήτρης Παπαδήμου και Λένια Πανίδου υπήρξαν άψογοι συνεργάτες και καλοί φίλοι. Θα χαιρόμουν να ξανά συνεργαζόμουν οποιαδήποτε στιγμή μαζί τους. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υπόλοιπους φοιτητές και υποψήφιους Διδάκτορες με τους οποίους βρέθηκα στο ίδιο εργαστήριο. Τους ευχαριστώ για τις γνώσεις που μου μετέφεραν, την κατανόηση και τη συνεργασία τους. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για την ανοχή και την υποστήριξή τους σε ότι και αν κάνω. Τέλος θα ήθελα να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ για την οικογένεια μου. Ήταν δίπλα μου σε όλη την διάρκεια των σπουδών μου και φρόντισαν να μην μου λείψει τίποτα. Θα προσπαθώ να τους κάνω περήφανους κάθε μέρα της ζωής μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
1. Στοιχεία ανατομίας και ιστολογίας του εντερικού σωλήνα του επίμου	6
1.1 Λεπτό έντερο	6
1.1.1 Δωδεκαδάκτυλο	7
1.1.2 Νήστιδα	7
1.1.3 Ειλεός	8
1.2 Παχύ έντερο	9
1.2.1 Τυφλό	9
1.2.1 Κόλον	9
2. Βλεννογόنيος εντερικός φραγμός	11
2.1 Μηχανικό σκέλος	11
2.1.1 Επιθηλιακοί παράγοντες	11
2.1.2 Ενδοθηλιακοί παράγοντες	12
2.2 Βιολογικό σκέλος	12
2.3 Ανοσολογικό σκέλος	13
3. Μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου	15
3.1 Μεταβολική λειτουργία της εντερικής μικροχλωρίδας	15
3.2 Ανοσολογική λειτουργία της εντερικής μικροχλωρίδας	16
3.3 Μικροβιακοί πληθυσμοί που ερευνήθηκαν στη μελέτη	17
3.3.1 Λακτοβάκιλλος	17
3.3.2 Σταφυλόκοκος	17
3.3.3 Στρεπτόκοκος	18
3.3.4 Εντεροβακτηρίδια	19
3.3.5 Κολοβακτηρίδια	19
4. Το κάπνισμα και οι επιδράσεις του στον οργανισμό	20
4.1 Επίδραση του καπνίσματος και της διακοπής του στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου	20
4.2 Επίδραση του καπνίσματος στον εντερικό φραγμό	24
4.3 Επίδραση του καπνίσματος στο βάρος	24
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	27
1. Σκοπός της μελέτης	27
2. Πειραματόζωα	27
3. Πειραματικός σχεδιασμός	27

4. Σύστημα έκθεσης σε καπνό τσιγάρου	28
5. Μέτρηση κατανάλωσης τροφής και σωματικού βάρους	28
6. Ιστοληψία	29
7. Μικροβιολογική ανάλυση	29
7.1 Όργανα και υλικά	30
7.2. Παρασκευή θρεπτικών μέσων ανάπτυξης – επίστρωσης και ενσωμάτωσης	31
7.3 Παρασκευή ¼ strength Ringers Solution	32
7.4 Επεξεργασία δειγμάτων	33
7.5 Διαδοχικές αραιώσεις	33
7.6 Καταμέτρηση αποικιών	34
7.7 Μεθοδολογία	34
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	35
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	47
SUMMARY	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κάπνισμα είναι μία από τις πιο βλαβερές συνήθειες, με καταστροφικές επιπτώσεις για τον οργανισμό. Είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη διαφόρων μορφών καρκίνων, όπως του πνεύμονα, της στοματικής κοιλότητας, του λάρυγγα και του οισοφάγου. Ακόμα μπορεί να προκαλέσει καρδιακές παθήσεις, εμφυσημάτα ακόμα και θνησιμότητα. Στις πιο ήπιες επιδράσεις του, αλλά και τις πιο συχνά εμφανιζόμενες, συγκαταλέγονται η φαρυγγίτιδα, η αλλοίωση της γεύσης, η μείωση της αντοχής, ο ίλιγγος και οι νευραλγίες.

Παρά τις όλες βλαβερές επιπτώσεις του τσιγάρου, τα άτομα που αρχίζουν αυτή την συνήθεια δυσκολεύονται να την σταματήσουν. Ο λόγος βρίσκεται στις χιλιάδες ουσίες που περιέχονται στο τσιγάρο και συγκεκριμένα σε αυτές που είναι εθιστικές, όπως η νικοτίνη. Πρόκειται για μια άοσμη και άχρωμη ουσία που απορροφάται αμέσως από τους πνεύμονες του καπνιστή, μπαίνει στην κυκλοφορία του αίματος και φτάνει στον εγκέφαλο. Ο εθισμός στην ουσία της νικοτίνης προέρχεται από τον οργανισμό ο οποίος απαιτεί να του χορηγείται, η ουσία, τακτικά και στις ανάλογες δόσεις, διαφορετικά αναπτύσσει συμπτώματα στέρησης.

Ένας από τους λόγους που μεγάλο μέρος του πληθυσμού αρχίζει το κάπνισμα είναι η απώλεια βάρους. Ένας από τους λόγους που δεν σταματάει αυτή την βλαβερή συνήθεια είναι ο φόβος για την πρόσληψη βάρους. Η αύξηση ή μείωση του βάρους είναι συνδεδεμένα με την κατανάλωση της τροφής κατά την περίοδο του καπνίσματος και κατά την περίοδο της διακοπής του.

Η ιδέα στην οποία βασίστηκε η μελέτη που πραγματοποιήσαμε έγκειται στο ότι οι αλλαγές που πραγματοποιούνται στην μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου κατά την διάρκεια του καπνίσματος, αλλά κατά την διάρκεια της διακοπής του καπνίσματος, είναι υπεύθυνες για την αυξομείωση της κατανάλωσης της τροφής. Σε μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, παρατηρείται το πως η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου είναι υπεύθυνη για διάφορες ασθένειες, για την λειτουργία του μεταβολισμού του οργανισμού, ακόμα και για την εμφάνιση παχυσαρκίας. Έτσι στην συγκεκριμένη έρευνα μελετήθηκαν πρώτιστα οι μεταβολές στην μικροβιακή χλωρίδα και δόθηκε προσοχή και στην μεταβολή της κατανάλωσης της τροφής και αν σχετίζεται με αυτές. Πιο συγκεκριμένα, επίμυες υποβλήθηκαν σε έκθεση σε καπνό τσιγάρου για 8 εβδομάδες και σε διακοπής της έκθεσης από καπνό τσιγάρου για 8 εβδομάδες επιπλέον. Στις 4 και 8 εβδομάδες, κατά την περίοδο της έκθεσης σε καπνό και κατά την περίοδο της διακοπής της έκθεσης, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία από το έντερο των επίμυων. Απομονώθηκε δείγμα από την νήστιδα, τον ειλεό, τα τυφλό και το κόλον. Τα δείγματα αυτά μελετήθηκαν με την μέθοδο των μικροβιολογικών αναλύσεων. Τα βακτήρια που μελετήθηκαν ήταν λακτοβάκιλλοι, σταφυλόκοκκοι, στρεπτόκοκκοι, εντεροβακτηρίδια, κολοβακτηρίδια και γενικά η ολική μεσόφιλη χλωρίδα του εντέρου. Πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των αποικιών των βακτηρίων σε κάθε χρονική στιγμή και παρατηρήθηκαν οι αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στην μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου. Παράλληλα σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν μετρήσεις του βάρους των επίμυων και της κατανάλωσης της τροφής τους.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Στοιχεία ανατομίας και ιστολογίας του εντερικού σωλήνα του επίμου

Ο εντερικός σωλήνας αποτελεί τμήμα της κατώτερης πεπτικής οδού. Αποτελείται από το λεπτό έντερο και το παχύ έντερο.

1.1 Λεπτό έντερο

Το λεπτό έντερο είναι το πιο ελικώδες τμήμα της πεπτικής οδού και εκτείνεται από τον πυλωρό του στομάχου μέχρι την ειλεοτυφλική βαλβίδα στη συμβολή με το παχύ έντερο. Αποτελείται από τρία κύρια τμήματα. Το δωδεκαδάκτυλο, τη νήστιδα και τον ειλεό. Το λεπτό έντερο μεταφέρει χυμό από το στομάχι στο παχύ έντερο. Συνεχίζει την πέψη προσλαμβάνομενων θρεπτικών ουσιών μέσω της δράσης ενζύμων που παράγονται από ενδοτοιχωματικούς αδένες και τους μεγάλους πεπτικούς αδένες (ήπαρ και πάγκρεας). Απορροφά τα τελικά προϊόντα της πέψης τα οποία διασχίζουν το επιθήλιο και καταλήγουν μέσα στα τριχοειδή και τα τυφλά λεμφικά αγγεία (χυλοφόρα) (<< Ιστολογία >>, Wiliam, 2010).

Το τοίχωμα του λεπτού εντέρου αποτελείται, από έξω προς τα μέσα, από τον ορογόνο χιτώνα, τον μυϊκό χιτώνα, τον υποβλεννογόνο χιτώνα, ο οποίος αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό και περιέχει αγγεία και λεμφαγγεία, και τον βλεννογόνο που αποτελείται από το επιθήλιο, το χόριο και τη βλεννογόνια μυϊκή στιβάδα (Miller, 1971 & Boundless, 2016). Ο μυϊκός χιτώνας αποτελείται από δύο στιβάδες λείων μυϊκών ινών, την έξω επιμήκη και την έσω κυκλωτερή. Οι συστολές των μυών παράγουν δυνάμεις οι οποίες συντελούν στη μετακίνηση και στην ανάμειξη του γαστρεντερικού περιεχομένου. Ο έξω μυϊκός χιτώνας έχει δύο στιβάδες, μία σχετικά παχιά εσωτερική στιβάδα κυκλωτερών μυών, των οποίων οι μυϊκές ίνες διατάσσονται με κυκλικό τρόπο γύρω από το σωλήνα έτσι ώστε η σύσπαση τους να προκαλεί στένωση του αυλού, και μία λεπτότερη εξωτερική στιβάδα επιμηκών μυών, των οποίων η συστολή βραχύνει τον σωλήνα (<< Φυσιολογία του Ανθρώπου. Μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού >>, Vander, 2001). Στον αυλό του εντερικού σωλήνα παρατηρούνται πτυχώσεις του βλεννογόνου και της βλεννογονίας μυϊκής στιβάδας και πλάκες του Peyer οι οποίες είναι οργανωμένες συλλογές λεμφοειδών θυλάκων και παίζουν βασικό ρόλο στην εντερική ανοσολογική αντίδραση. Ακόμα περιέχει τα Μ κύτταρα, τα οποία εντοπίζονται ανάμεσα στα κυλινδρικά εντεροκύτταρα σχηματίζοντας κυτταροπλασματικές γέφυρες, οι οποίες διαχωρίζουν τα λεμφοκύτταρα των πλακών του Peyer από τον εντερικό αυλό (<< Gastrointestinal and liver Disease>> Sleisenger and Fordtrans, 1998). Στην επιφάνεια του επιθηλίου εντοπίζονται οι λάχνες και οι κρύπτες που καλύπτονται από ένα κυλινδρικό επιθήλιο αποτελούμενο από επιθηλιακά κύτταρα (Miller, 1971). Πιο αναλυτικά, το σύνολο της επιθηλιακής κάλυψης επιτυγχάνεται από πολυδύναμα κύτταρα τα οποία βρίσκονται στις κρύπτες και μεταναστεύουν από εκεί προς την κορυφή των λαχνών, όπου και διαφοροποιούνται σε απορροφητικά, εκκριτικά, βλεννο-εκκριτικά και ενδοκρινικά κύτταρα. Όταν φτάσουν στην κορυφή της λάχνης αποπίπτουν στον εντερικό αυλό. Τα προαναφερθέντα επιθηλιακά κύτταρα περιβάλλονται από αποφρακτικές ενώσεις επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο τη σύνδεση μεταξύ τους, αλλά και τη διατήρηση της κυτταρικής ποικιλότητας (Cereijido et al., 1988).

Η νεύρωση του λεπτού εντέρου του επίμου πραγματοποιείται από το μυεντερικό και το υποβλεννογόνιο νευρικό πλέγμα. Το υποβλεννογόνιο πλέγμα διαιρείται σε τρεις στιβάδες με τη βαθύτερη από αυτές να έρχεται σε επαφή με την κυκλοτερή μυϊκή στιβάδα μέσω των διάμεσων κυττάρων (Miller, 1971).

Το λεπτό έντερο του επίμου, όπως και του ανθρώπου, εκτελεί κινήσεις μίξεως, προώθησης και περισταλτικές (Miller, 1971).

1.1.1 Δωδεκαδάκτυλο

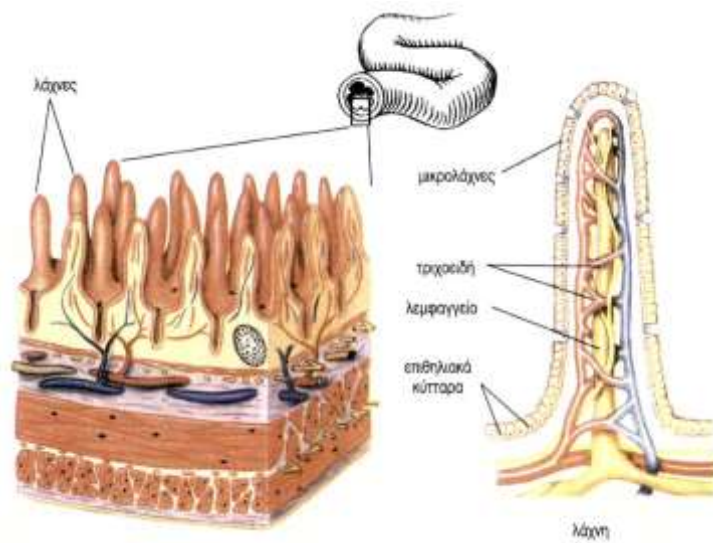
Το δωδεκαδάκτυλο είναι το πρώτο τμήμα του λεπτού εντέρου, εκβάλλει από το στομάχι και είναι υπεύθυνο για τη διάσπαση των τροφών στο λεπτό έντερο. Το μήκος του είναι περίπου 95-100 mm. Η πρώτη μοίρα του δωδεκαδακτύλου είναι το τμήμα που βρίσκεται κοντά στη σπλαχνική επιφάνεια του ήπατος και του δεξιού κοιλιακού τοιχώματος. Η κατιούσα (δεύτερη) μοίρα συνεχίζει από το δεξιό κοιλιακό τοίχωμα με κατεύθυνση προς το δεξί νεφρό. Μεταξύ της πρώτης και δεύτερης μοίρας βρίσκεται η πρώτη καμπή του δωδεκαδακτύλου. Στη συνέχεια, η κατιούσα μοίρα στρέφεται προς την πρώτη μοίρα σχηματίζοντας την ανιούσα μοίρα. Μεταξύ της κατιούσας και της ανιούσας μοίρα βρίσκεται η ουριαία καμπή του δωδεκαδακτύλου. Η ανιούσα μοίρα συνεχίζει μέχρι το τμήμα του εντέρου που σχηματίζει τη νήστιδα. Ανάμεσα στην ανιούσα μοίρα και τη νήστιδα βρίσκεται η νηστιδο-δωδεκαδακτυλική καμπή (Vdoviaková et al., 2016).

1.1.2 Νήστιδα

Η νήστιδα έχει μεγαλύτερη προσαύλια επιφάνεια για έκκριση και απορρόφηση σε σχέση με άλλα τμήματα του λεπτού εντέρου (<< Ιστολογία με Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας. Εισαγωγή στην Ιστοπαθολογία >>, Abraham, 2013). Το μήκος της είναι 890-1300 mm (Vdoviaková et al., 2016). Επίσης, διαθέτει παχύτερο τοίχωμα και ευρύτερο αυλό από τον ειλεό. Ακόμα έχει παχύτερες, υψηλότερες και αριθμητικά περισσότερες λάχνες, οι οποίες καλύπτονται από ακόμα μικρότερες προεξοχές που ονομάζονται μικρολάχνες. Οι λάχνες αυξάνουν την περιοχή επιφάνειας της νήστιδας και έτσι επιτρέπεται μεγαλύτερη απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών σε αυτό το μέρος του λεπτού εντέρου (<< Ιστολογία με Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας. Εισαγωγή στην Ιστοπαθολογία >>, Abraham, 2013). Δεν περιέχει αδένες Brunner στον υποβλεννογόνιο της και ενδεχομένως περιέχει κάποιες πλάκες Peyser στο χόριο. Τέλος περιέχει κύτταρα Paneth που βρίσκονται στη βάση των κρυπών Lieberkuhn (<< Ιστολογία >>, Wiliam, 2010). Η νήστιδα είναι συνήθως κενή, πιο παχιά και με πολλά αγγεία. Οι κυκλοτερείς περιοχές (μόνιμες πτυχώσεις του βλεννογόνου και του υποβλεννογόνιου, που περιβάλλουν τον εντερικό αυλό) του βλεννογόνου της είναι μεγάλες και καλά αναπτυγμένες στο ανώτερο τμήμα της (<< Ιστολογία με Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας. Εισαγωγή στην Ιστοπαθολογία >>, Abraham, 2013).

1.1.3 Ειλεός

Το μήκος του ειλεού κυμαίνεται από 20 έως 30 mm. (Vdovniaková et al., 2016). Στον ειλεό, η αναλογία των καλυκοειδών κυττάρων σε σχέση με τα εντεροκύτταρα είναι μεγαλύτερη. Ακόμα οι πλάκες του Peyer που βρίσκονται στο χόριο είναι πολύ περισσότερες στον ειλεό σε σχέση με αυτές στη νήστιδα. Τα εκκριτικά κύτταρα Paneth είναι ιδιαίτερα άφθονα στη βάση των κρυπτών Lieberkuhn (<< Ιστολογία >>, Wiliam, 2010). Ένα ακόμα χαρακτηριστικό του ειλεού που τον διαχωρίζει από τη νήστιδα είναι η απουσία των αδένων Brunner και η παρουσία βραχύτερων δακτυλοειδών λαχνών (<< Ιστολογία με Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας. Εισαγωγή στην Ιστοπαθολογία >>, Abraham, 2013).



Εικόνα 1. Δομή του λεπτού εντέρου.

<http://ebooks.edu.gr/modules/ebook/show.php/DSGL-A105/321/2155,7805/>

1.2 Παχύ έντερο

Το μήκος του παχέος εντέρου στον επίμυ είναι περίπου 15cm. Αποτελείται από το τυφλό, το κόλον και το ορθό (Hebel and Stromberg, 1986). Η κύρια λειτουργία του παχέος εντέρου είναι η απορρόφηση του νερού. Απορροφά επίσης κάλιο, νάτριο, και χλωριούχο, παράγει τη βλέννα που λιπαίνει τον εντερικό τοίχο και συγκρατεί τα περιττώματα μαζί για την αποβολή (Scanlon, 2011).

Το τοίχωμά του παχέος εντέρου αποτελείται από τρεις στιβάδες, τη βλεννογόνο, την υποβλεννογόνο και τη μυϊκή στιβάδα. Η μυϊκή στιβάδα αποτελείται από την εξωτερική γραμμωτή μυϊκή στιβάδα και την εσωτερική με λείους κυκλοτερείς μύες. Η υποβλεννογόνο στιβάδα αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό και περιέχει αιμοφόρα αγγεία και λεμφαγγεία. Διαχωρίζεται από τον βλεννογόνο μέσω της υποβλεννογόνιας μυϊκής στιβάδας. Στον βλεννογόνο του παχέος εντέρου υπάρχουν αρκετές κρύπτες. Το τοίχωμα του παχέος εντέρου στα αρχικά του τμήματα είναι λεπτό, στη συνέχεια όμως γίνεται παχύτερο λόγω της αύξησης του πάχους της υποβλεννογόνιας και της μυϊκής στιβάδας (Krinke, 2000). Το παχύ έντερο είναι πιο σύντομο και πιο ευρύ από το λεπτό έντερο. Δεν έχει λάχνες που να του προσδίδουν επιπλέον επιφάνεια και οι αποφρακτικές συνδέσεις μεταξύ των επιθηλιακών του κυττάρων είναι πιο στενές σε σχέση με το λεπτό έντερο (Wilson, 2010).

Στο παχύ έντερο υπάρχει πληθώρα κυττάρων. Τα κύτταρα M τα οποία βρίσκονται πάνω στις πλάκες Peyer, τα κύτταρα Paneth και τα εντερο-ενδοκρινικά κύτταρα (Krinke, 2000).

Η νεύρωση του παχέος εντέρου του επίμυ πραγματοποιείται από το μυεντερικό και το υποβλεννογόνο νευρικό πλέγμα. Το υποβλεννογόνο πλέγμα διαιρείται σε τρεις στιβάδες με τη βαθύτερη από αυτές να έρχεται σε επαφή με την κυκλοτερή μυϊκή στιβάδα μέσω των διάμεσων κυττάρων (Osborne, 1998).

Το παχύ έντερο του επίμυ, όπως και του ανθρώπου, εκτελεί κινήσεις μίξεως, προώθησης και περισταλτικές (Osborne, 1998).

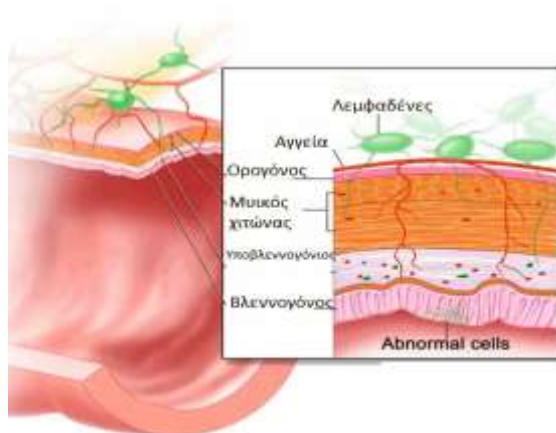
1.2.1 Τυφλό

Το τυφλό αποτελεί την αρχική μοίρα του παχέος εντέρου. (<< Φυσιολογία του Ανθρώπου. Μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού >>, Vander, 2001). Το μήκος του είναι 45-65 mm (Vdoviakoná et al., 2016) . Συνήθως εντοπίζεται στο δεξιό μέρος της περιτοναϊκής κοιλότητας (Hebel and Stromberg, 1986 & Vdoviakoná et al., 2016). Οι στιβάδες του τοιχώματος του τυφλού είναι σημαντικά λεπτότερες από αυτές του υπόλοιπου παχέος εντέρου. Το λεμφαγγειακό του σύστημα είναι, αντίθετα, περισσότερο ανεπτυγμένο. Στο τυφλό αναπτύσσονται κυκλοτερείς βλεννογονικές πτυχές (Krinke, 2000) ενώ απουσιάζουν οι λάχνες. Το τυφλό περιέχει συμβιωτικά βακτήρια, τα οποία αναπαράγονται ταχέως, αναπτύσσονται και αποτελούν πηγή πρωτεϊνών για τον επίμυ, ενώ παράλληλα αποτελεί μία διευρυμένη θήκη που δέχεται το υλικό από τον ειλέο και αρχίζει να συμπιέζει τα προϊόντα διατροφής σε μορφή κοπράνων (Hebel and Stromberg, 1986).

1.2.1 Κόλον

Το κόλον ξεκινά από το τυφλό και το μήκος του είναι 95-100 mm. Το πρώτο μέρος είναι το ανιόν κόλον, το οποίο πορεύεται κρανιακά προς την θωρακική

κοιλότητα. Στη συνέχεια από την αριστερή προς την δεξιά πλευρά βρίσκεται το εγκάρσιο κόλον, το οποίο αποτελεί το δεύτερο τμήμα το κόλου. Στην δεξιά πλευρά της κοιλιακής κοιλότητας, το εγκάρσιο κόλον οδηγεί στο κατιόν κόλον (Vδονιακονά et al., 2016). Στο ουριαίο τμήμα τα κόπρανα, που έχουν ρευστή μορφή στο τυφλό, μετατρέπονται σε κόπρανα (Hebel and Stromberg, 1986). Ενώ το τοίχωμα του αρχικού τμήματος του κόλου είναι παρόμοιο με αυτό του τυφλού προς την περιφέρεια είναι πιο παχύ και πιο σκληρό λόγω της πάχυνσης της υποβλεννογόνιας και της μυϊκής στιβάδας (Whiteley et al., 1996 & Krinke, 2000). Το αρχικό τμήμα του κόλου εμφανίζει κυκλοτερείς βλεννογονικές πτυχές (Krinke, 2000). Το τοίχωμα του ανιόντος κόλου εμφανίζει διαφανείς γραμμοειδείς πτυχές οι οποίες στο εγκάρσιο και στο κατιόν αυξάνουν σε αριθμό. Στη βάση τους αυτές οι πτυχές περιέχουν αγγεία (Osborne, 1998).



Εικόνα 2. Δομή του τοιχώματος του εντέρου.

<http://www.karagiannisathanasios.gr/tupoi-karkinou/karkinos-tou-pakheos-enterou-kai-tou-orthou/>

2. Βλεννογόσιος εντερικός φραγμός

Ο εντερικός σωλήνας λόγω της μεγάλης επιφάνειας που εκτείνεται, αποτελεί ένα από τα κύρια όρια μεταξύ του εντερικού αυλού και του εξωτερικού περιβάλλοντος του εντέρου. Για αυτόν τον λόγο διαθέτει ένα μηχανισμό για την προστασία του οργανισμού και τη διατήρηση της ομοιόστασης του. Αυτός ο μηχανισμός είναι ο βλεννογόσιος εντερικός φραγμός (Farhadi, 2003). Στόχος του βλεννογόσιου εντερικού φραγμού είναι η παρεμπόδιση της εξόδου εντερικών βακτηριδίων και προϊόντων διάσπασής τους και συγκεκριμένα ενδοτοξίνων, σε απομακρυσμένα όργανα και ιστούς (Alexander et al., 1990 & Yang, 2007). Στην επίτευξη αυτού του στόχου συμμετέχουν φυσικοί φραγμοί όπως τα επιθηλιακά κύτταρα και η βλέννα, χημικοί φραγμοί όπως τα αντιμικροβιακά πεπτίδια, και ανοσολογικοί φραγμοί όπως η ανοσοσφαιρίνη Α (Linda Chia-Hui Yu, 2012). Ακόμα, λόγω της εκλεκτικής διαπερατότητας, επιτρέπει τη μεταφορά των θρεπτικών ουσιών από τον εντερικό αυλό στην κυκλοφορία ενώ περιλαμβάνει ανοσολογικούς μηχανισμούς, όπως ανοσοσφαιρίνες και βλεννογονικά λεμφοκύτταρα (Deitch, 1990).

2.1 Μηχανικό σκέλος

Η αποτελεσματική παρεμπόδιση της εξάπλωσης των βακτηρίων επιτυγχάνεται από μη ειδικούς μηχανισμούς οι οποίοι διακρίνονται σε ενδοαυλικούς, επιθηλιακούς και ενδοθηλιακούς (Farhadi, 2003).

Στους επιθηλιακούς παράγοντες ανήκουν ένα υδάτινο στρώμα, το στρώμα βλέννας, τα επιθηλιακά κύτταρα, οι μικρολάχνες τους και οι αποφρακτικές συνδέσεις (Farhadi, 2003).

Στους ενδοθηλιακούς παράγοντες ανήκουν ο συνδετικός ιστός, το ενδοθήλιο των τριχοειδών και η αιματική ροή (Farhadi, 2003).

2.1.1 Επιθηλιακοί παράγοντες

Το έντερο καλύπτεται από μία μονοστοιβάδα επιθηλιακών κυττάρων. Η μονοστοιβάδα αυτή αποτελεί ένα φυσιολογικό φράγμα. Τα επιθηλιακά κύτταρα παράγουν πεπτικά ένζυμα, απορροφούν τα θρεπτικά συστατικά, και αναλαμβάνουν την ανίχνευση των αντιγόνων, εκκρίνοντας αντι-μικροβιακά μόρια, και καθοδηγώντας ανοσολογικές αποκρίσεις του βλεννογόσιου (Artis, 2008). Οι λειτουργίες αυτές πραγματοποιούνται από διάφορα εξειδικευμένα επιθηλιακά κυτταρικά υποσύνολα, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα κύτταρα Μ, τα λαγνοειδή κύτταρα, τα κύτταρα Paneth, και τα ενδοκρινή κύτταρα. Έτσι για την αποτελεσματική λειτουργία του εντερικού φραγμού είναι απαραίτητη η λειτουργική και ανατομική ακεραιότητα του επιθηλίου και η διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον κυτταρικό θάνατο (Barker et al., 2007).

Το εντερικό επιθήλιο καλύπτεται από ένα στρώμα βλέννας. Το στρώμα βλέννας αποτελείται από πολλά βιοδραστικά μόρια, όπως τις βλεννίνες, τις γλυκοπρωτεΐνες, τους τριφυλλοειδείς παράγοντες, τα αντι-μικροβιακά πεπτίδια, και την εκκριτική IgA (SIgA) (McGuckin, 2011). Αποτρέπει την προσκόλληση βακτηρίων, παρασίτων και ιών στα επιθηλιακά κύτταρα και τα προστατεύει από μηχανικές και χημικές κακώσεις. Η ακεραιότητα του στρώματος της βλέννας είναι σημαντική για την αποφρακτική λειτουργία του εντερικού φραγμού (Liboshi et al., 1996).

Οι αποφρακτικές συνδέσεις περιβάλλουν τα επιθηλιακά κύτταρα, τα συνδέουν μεταξύ τους και διατηρούν την πολικότητά τους (Cereijido et al., 1988 & Balda and Matter, 2008). Είναι πρωτεΐνες που σχετίζονται με τις μεμβράνες και καλύπτουν τους μεσοκυττάριους χώρους αποτρέποντας την είσοδο λοιμογόνων παραγόντων (Lodemann, 2010). Είναι σημαντικές για τη σταθερότητα των επιθηλιακών φραγμών δημιουργώντας ένα μηχανικό και φορτισμένο φραγμό με εκλεκτική διαπερατότητα στα μακρομόρια και τα ιόντα. Οι συγκεκριμένες ενώσεις δημιουργούν μία ημιδιαπερατή μεμβράνη η οποία επιτρέπει την παθητική διάχυση του νερού και μικρών μορίων ενώ αποτρέπει τη διαπερατότητα μεγαλομοριακών ουσιών και κυττάρων (Madara, 1990 & Turner, 2006). Επιτρέπουν την διέλευση των θρεπτικών συστατικών των τροφών έξω από τον αυλό, ενώ αποτρέπουν την διαφυγή των βακτηρίων (Ulluwishewa et al., 2011).

Οι λάχνες και οι μικρολάχνες αποτελούν σημαντικό παράγοντα του εντερικού φραγμού. Είναι αρνητικά φορτισμένες και δεν επιτρέπουν σε μόριο του ίδιου φορτίου να διαπεράσει. Ακόμα, λόγω της μικρής απόστασης μεταξύ τους δεν επιτρέπουν τη διόδο σε μεγάλα μόρια (Ulshen, Rollo, 1980). Κατά τον κυτταρικό θάνατο τα νεκρά κύτταρα απομακρύνονται αφήνοντας κενό χώρο στον εντερικό φραγμό. Οι λάχνες βοηθούν στην επούλωση αυτού του κενού προωθώντας στον κενό χώρο τα παρακείμενα κύτταρα ενόσω αυτά διαφοροποιούνται (Moore et al., 1989) ενώ λόγω της σύσπασής τους και την ελάττωση του ύψους τους η επιφάνεια που πρέπει να καλυφθεί μικραίνει (Feil et al., 1989 & Erickson et al., 1990).

2.1.2 Ενδοθηλιακοί παράγοντες

Ο αυλός των αιμοφόρων αγγείων καλύπτεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία επικάθονται στη βασική μεμβράνη και διαμέσου αυτής στο αγγειακό τοίχωμα, δημιουργώντας φραγμό στην εξαγγείωση, τόσο των υγρών και των μακρομορίων, όσο και των έμμορφων συστατικών του (Spring, 1991).

Η επαρκής αιματική παροχή ενός ιστού είναι η απαραίτητη προϋπόθεση για τη διατήρηση όλων των ζωτικών κυτταρικών λειτουργιών. Επομένως η ακεραιότητα του εντερικού φραγμού εξαρτάται από την ικανοποιητική παροχή αίματος στο βλεννογόνο που θα παρέχει τα θρεπτικά συστατικά και κυρίως επαρκή ποσότητα οξυγόνου στα κύτταρα ώστε να δημιουργήσουν ATP για τις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες (Wattanasirichaiagoon et al., 1999).

2.2 Βιολογικό σκέλος

Η εντερική βακτηριακή χλωρίδα και η κινητικότητα του εντέρου ανήκουν στους ενδοαυλικούς παράγοντες του εντερικού φραγμού. Η κινητικότητα του εντέρου, οι εντερικές εκκρίσεις και διάφοροι ανοσολογικοί παράγοντες αποτελούν σημαντικά στοιχεία για τη διατήρηση της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας (Sun et al., 1998).

Η διατήρηση της ισορροπίας του βακτηριακού περιεχομένου της εντερικής χλωρίδας είναι σημαντικός παράγοντας για την αποτροπή ενδεχόμενου αποικισμού του εντέρου από παθογόνα βακτήρια (Sun et al., 1998). Τα βακτήρια που βρίσκονται στο έντερο αποτελούν μία μορφή αντίστασης στον αποικισμό του εντέρου από εξωγενείς μικροοργανισμούς και, ως εκ τούτου, είναι ιδιαίτερα χρήσιμα στην πρόληψη της κατάληψης των ιστών από παθογόνα. Συγκεκριμένα τα βακτήρια του

εντέρου ανταγωνίζονται τα παθογόνα για τις θέσεις προσκόλλησης στα επιθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, τα βακτήρια του εντέρου ανταγωνίζονται τα παθογόνα για την πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών και έτσι διατηρούν το φυσικό τους περιβάλλον με την κατανάλωση όλων των πόρων. Ο ξενιστής παρέχει στα εντερικά βακτήρια τα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται και τα βακτήρια αντιστοίχως υποδεικνύουν στον ξενιστή πόση ποσότητα θρεπτικών συστατικών απαιτείται για την επιβίωσή τους. Μέσω αυτής της συμβιωτικής σχέσης αποφεύγεται η υπερπαραγωγή θρεπτικών συστατικών που ενδεχομένως θα μπορούσαν να εκμεταλλευτούν διάφορα παθογόνα. Τέλος, τα βακτήρια μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη των ανταγωνιστών τους με την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών που ονομάζονται βακτηριοσίνες. Ο ξενιστής μπορεί να ελέγχει την παραγωγή των ουσιών αυτών δεδομένου ότι οι περισσότεροι από αυτές είναι πρωτεϊνικές ενώσεις που αποικοδομούνται από πεπτικές πρωτεάσες (Guarner and Malagelada, 2003).

Η εντερική κινητικότητα συμβάλλει στη διατήρηση φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας και λειτουργίας του βλεννογόνιου φραγμού, διατηρώντας μία ισορροπία μεταξύ της ενδογενούς εντερικής μικροβιακής χλωρίδας και της λειτουργίας των μηχανισμών απομάκρυνσης αυτής, εμποδίζοντας την υπερανάπτυξη των εντερικών βακτηρίων. Οι μεταβολές της εντερικής κινητικότητας και η αύξηση του χρόνου διάβασης του εντερικού περιεχομένου συνδέονται με βακτηριακή υπερανάπτυξη, δυσλειτουργία του εντερικού φραγμού και τη βακτηριακή μετακίνηση (Runkel et al., 1993).

2.3 Ανοσολογικό σκέλος

Η ανοσολογική ομοιόσταση του εντέρου διατηρείται και καθορίζεται από τον εντερικό βλεννογόνο λεμφικό ιστό. Διακρίνεται στην περιοχή αναγνώρισης των αντιγόνων του εντερικού αυλού και επαγωγής της ανοσοαπόκρισης (επαγωγική περιοχή) και στην περιοχή διαφοροποίησης και δραστηριοποίησης των λεμφοκυττάρων, των κοκκιοκυττάρων και των σιτευτικών κυττάρων (δραστική περιοχή) (Taskalova and Hogenova, 2004).

Στις επαγωγικές περιοχές ανήκουν οι πλάκες Peyer του λεπτού εντέρου, οι πλάκες στο κόλον, οι μεσεντέριοι λεμφαδένες, καθώς και οι απομονωμένοι λεμφικοί ιστοί. Οι πλάκες Peyer βρίσκονται στην υποβλεννογόνια στιβάδα μαζί με εξειδικευμένα μεταφορικά κύτταρα χωρίς μικρολάχνες καθώς και δενδριτικά κύτταρα που διαπερνούν το επιθήλιο και δεσμεύουν αντιγόνα στον εντερικό αυλό. Τα δεσμευμένα διαλυτά αντιγόνα και οι μικροοργανισμοί μεταφέρονται από τα μεταφορικά και τα δενδριτικά κύτταρα στην περιοχή κάτω από τη στιβάδα των επιθηλιακών κυττάρων. Ακολούθως τα αντιγόνα είτε καταστρέφονται από τα μακροφάγα είτε δεσμεύονται από τα δενδριτικά κύτταρα και στη συνέχεια παρουσιάζονται στα T-λεμφοκύτταρα που βρίσκονται στην περιφέρεια των πλακών Peyer (Bourlioux et al., 2003).

Στις δραστικές περιοχές ανήκουν το ενδοεπιθήλιο και το χόριο. Στο ενδοεπιθήλιο βρίσκονται λεμφοκύτταρα τα οποία ανιχνεύουν αντιγόνα και κατεστραμμένα επιθηλιακά κύτταρα (McCracken and Lorenz, 2001).

Το χόριο περιέχει κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος όπως B-λεμφοκύτταρα, T-λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, εοσινόφιλα και σιτευτικά κύτταρα. Στο χόριο λαμβάνει χώρα η τελική διαφοροποίηση των B-λεμφοκυττάρων σε πλασματοκύτταρα τα οποία εκκρίνουν ανοσοσφαιρίνη A (IgA). Τα αντισώματα IgA συνδυάζονται με ένα υποδοχέα που παράγεται από τα επιθηλιακά

κύτταρα. Το σύμπλοκο υποδοχέα- IgA μεταφέρεται διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων και εξέρχεται στον εντερικό αυλό (<< Ανοσολογία >>, Goldsby, 2003). Τα αντισώματα IgA είναι ανθεκτικά στην πρωτεόλυση από ένζυμα του εντερικού αυλού και επιφέρουν την προσκόλληση των παθογόνων στην εντερική επιφάνεια και τη μεταφορά τους μέσα στη στιβάδα του χορίου (McCracken and Lorenz, 2001). Ακόμα, τα αντισώματα της IgA συμμετέχουν στη μεταφορά παθογόνων που έχουν περάσει τον εντερικό φραγμό πίσω στον εντερικό αυλό και επιφέρουν την αναστολή της αντιγραφής των ιών που έχουν εισέλθει στα επιθηλιακά κύτταρα (Kaetzel et al., 1991).

3. Μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου

Πολλά είδη βακτηριδίων έχουν εξελιχθεί και προσαρμοστεί να ζουν και να αναπτύσσονται στο έντερο. Ο εντερικός βιότοπος περιέχει 300-500 διαφορετικά είδη βακτηρίων. Το στομάχι και το λεπτό έντερο περιέχουν μόνο λίγα είδη βακτηρίων προσκολλημένα στο επιθήλιο. Η έλλειψη αυτή των βακτηρίων στο ανώτερο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα φαίνεται να οφείλεται στη σύνθεση του αυλού (οξέα, χολή, η έκκριση του παγκρέατος), η οποία σκοτώνει τους περισσότερους μικροοργανισμούς που λαμβάνονται με την κατάποση. Περαιτέρω η προωθητική κινητική δραστηριότητα που αναπτύσσεται προς το τέλος του ειλεού, εμποδίζει τον σταθερό αποικισμό των βακτηρίων σε αυτό το τμήμα του αυλού. Αντίθετα, το παχύ έντερο περιέχει ένα σύνθετο και δυναμικό μικροβιακό οικοσύστημα με υψηλή πυκνότητα ζωντανών βακτηρίων (Guarner and Malagelada, 2003). Γενικά τέσσερις ομάδες ωφέλιμων βακτηρίων είναι κυρίαρχες στο ανθρώπινο έντερο, τα *Bacteroidetes* και τα *Firmicutes*, τα *Proteobacteria* και τα *Actinobacteria*. (Ruth E. Ley et al., 2006 & Hattori and Taylor, 2009).

Η εντερική μικροβιακή χλωρίδα συμμετέχει σε διάφορες λειτουργίες ευεργετικές για τον ξενιστή συμπεριλαμβανομένου της ζύμωσης δύσπεπτων διαιτητικών ινών και άλλων ειδών υποστρωμάτων, στη σύνθεση βιταμινών και αμινοξέων, στην πρόληψη του αποικισμού του εντέρου από παθογόνους μικροοργανισμούς, στην ωρίμανση και τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, τη ρύθμιση απελευθέρωσης ορμονών, και στη ρύθμιση της συμπεριφοράς του εγκεφάλου, μέσω μίας αμφίδρομης νευρωνικής σηματοδότησης ως μέρος του εντερο-εγκεφαλικού άξονα (Guarner and Malagelada, 2003).

3.1 Μεταβολική λειτουργία της εντερικής μικροχλωρίδας

Μία σημαντική λειτουργία της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου είναι η ζύμωση άπεπτων υπολειμμάτων της διατροφής και της ενδογενούς βλέννας που παράγεται από το επιθήλιο. Συνολικά, τα αποτελέσματα αυτής της μεταβολικής δραστηριότητας είναι η απορρόφηση υποστρωμάτων προς όφελος του ξενιστή και η πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, επομένως και ενέργειας, για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηριδίων. Η ζύμωση των υδατανθράκων είναι μία σημαντική πηγή ενέργειας. Στους δύσπεπτους υδατάνθρακες περιλαμβάνονται μεγάλοι πολυσακχαρίτες (ανθεκτικά άμυλα, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτίνες), ορισμένοι ολιγοσακχαρίτες που διαφεύγουν της πέψης, και μη απορροφήσιμα σάκχαρα και αλκοόλες. Το τελικό μεταβολικό σημείο είναι η παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (Guarner and Malagelada, 2003).

Ο αναερόβιος μεταβολισμός πεπτιδίων και πρωτεϊνών από την εντερική μικροβιακή χλωρίδα παράγει επίσης βραχείας αλυσίδας λιπαρά οξέα αλλά, συγχρόνως, παράγει και μία σειρά από δυνητικά τοξικές ουσίες, κάποιες από τις οποίες είναι η αμμωνία, οι αμίνες, οι φαινόλες, οι θειόλες, και οι ινδόλες. Στο τυφλό, το ανιόν κόλον και το δεξιό εγκάρσιο κόλον, η ζύμωση είναι πολύ έντονη με υψηλή παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας, όξινο pH (5-6), και ταχεία βακτηριακή ανάπτυξη. Αντίθετα, τα υποστρώματα στο άπω κόλον είναι λιγότερο διαθέσιμα, το pH είναι κοντά στο ουδέτερο και οι βακτηριακοί πληθυσμοί είναι στη στατική φάση (Guarner and Malagelada, 2003).

Οι μικροοργανισμοί της εντερικής μικροχλωρίδας παίζουν επίσης ρόλο στη σύνθεση βιταμινών και στην απορρόφηση του ασβεστίου, του μαγνησίου, και στην

απορρόφηση του σιδήρου (Guarner and Malagelada, 2003). Οι βιταμίνες είναι απαραίτητα μικροστοιχεία που λειτουργούν ως πρόδρομες ουσίες ενζύμων τα οποία είναι απαραίτητα για διάφορες μεταβολικές διεργασίες. Κάποια μέλη της μικροχλωρίδας του εντέρου είναι σε θέση να παράγουν βιταμίνη Κ, καθώς και πολλές από τις υδατοδιαλυτές βιταμίνες Β, όπως η βιοτίνη, η κοβαλαμίνη, τα φολικά, το νικοτινικό οξύ, το παντοθενικό οξύ, η πυριδοξίνη, η ριβοφλαβίνη και η θειαμίνη (LeBlanc et al., 2013).

3.2 Ανοσολογική λειτουργία της εντερικής μικροχλωρίδας

Οι σχετιζόμενοι με το έντερο, λεμφοειδείς ιστοί, περιέχουν τον μεγαλύτερο πληθυσμό από κύτταρα που είναι ικανά να ενεργοποιήσουν την ανοσολογική απόκριση. Η επαφή μεταξύ του ξενιστή και των βακτηρίων στο έντερο φαίνεται να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του αρμόδιου ανοσοποιητικού συστήματος. Στους ποντικούς και τους αρουραίους, ένα μη παθογόνο νηματοειδές βακτήριο που έρχεται σε επαφή με το επιθήλιο του Peyer διεγείρει την ανάπτυξη των ανοσοποιητικού συστήματος. Ακόμα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροβίων, του επιθηλίου και του λεμφικού ιστού που σχετίζεται με το έντερο εμπλέκονται στη μοντελοποίηση των μηχανισμών μνήμης στη συστηματική ανοσία. Σε αυτήν την αλληλεπίδραση οι συμβιωτικοί οργανισμοί προσπαθούν να παρακάμψουν την ανοσολογική απόκριση μέσω της ποικιλομορφίας της επιφάνειας τους που τους επιτρέπει να διαφεύγουν της ανοσολογικής απόκρισης και να διατηρούν τη θέση τους στην επικράτηση στον εντερικό σωλήνα. Ωστόσο, η άμυνα του ξενιστή προσαρμόζεται και κρατάει υπό έλεγχο τη βακτηριακή ανάπτυξη (Guarner and Malagelada, 2003 & Isono et al., 2007).

Η ανοσολογική απόκριση στα μικρόβια βασίζεται στα έμφυτα και τα προσαρμοστικά συστατικά της ανοσίας, όπως η έκκριση ανοσοσφαιρίνης. Η έμφυτη απόκριση επιτυγχάνεται από λευκά αιμοσφαίρια, όπως ουδετερόφιλα και μακροφάγα που μπορούν να φαγοκυτταρώσουν και να σκοτώσουν τους παθογόνους παράγοντες. Στην έμφυτη απόκριση συμμετέχουν επίσης και τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, τα οποία συντονίζουν την απόκριση του ξενιστή συνθέτοντας ένα ευρύ φάσμα φλεγμονωδών μεσολαβητών και μεταδίδοντας σήματα στα υποκείμενα κύτταρα του βλεννογόνου. Το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα πρέπει να διακρίνει τα πιθανά παθογόνα από τα συμβιωτικά βακτήρια με τη χρήση ενός περιορισμένου αριθμού διαμορφωμένων υποδοχέων. Τα κύτταρα των θηλαστικών εκφράζουν μία σειρά από υποδοχείς Toll, οι οποίοι αναγνωρίζουν συντηρημένα μοτίβα των βακτηρίων τα οποία δεν βρίσκονται στους ευκαρυώτες. (Guarner and Malagelada, 2003).

3.3 Μικροβιακοί πληθυσμοί που ερευνήθηκαν στη μελέτη

3.3.1 Λακτοβάκιλλος

Το γένος *Lactobacillus* ανήκει στο φύλο *Firmicutes*, κλάση *Bacilli*, τάξη *Lactobacillales*, και την οικογένεια *Lactobacillaceae*. Τα είδη *Lactobacillus* είναι ποικιλόμορφα φυλογενετικά, με πάνω από 100 είδη τεκμηριωμένα μέχρι σήμερα (Goh and Klaenhammer, 2009). Λόγω του μεταβολισμού τους οι λακτοβάκιλλοι είναι ανάμεσα στα κυρίαρχα βακτήρια στο εγγύς λεπτό έντερο, όπως στον ειλέο και στη νήστιδα. Αυτό το τμήμα του εντέρου είναι πλούσιο σε υποστρώματα, όπως υδατάνθρακες οι οποίοι προέρχονται από τη διατροφή του ξενιστή και χρησιμοποιούνται ως πηγή θρεπτικών συστατικών από τους λακτοβάκιλλους (Monica Perea Velez et al., 2007). Τυπικά είναι χαμηλού ποσοστού G + C, κατά Gram-θετικά βακτήρια, είναι αρνητικά στη δοκιμασία της καταλάσης, είναι αναερόβια ή αεροανεκτικά, και οξύ-ανεκτικά. Είναι χημειο-οργανότροφα και αυστηρά ζυμωτικά. Βιοχημικά υποδιαιρούνται είτε σε ομοζυμωτικά (κυρίως παράγουν γαλακτικό οξύ μέσω της γλυκολυτικής οδού Embden-Meyerhof (EMP)), σε ετεροζυμωτικά (παράγουν γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, μυρμηκικό οξύ, διοξειδίο του άνθρακα και αιθανόλη, μέσω της οδού της φωσφοκετολάσης (PKP)), ή προαιρετικά ετεροζυμωτικά (ζυμώνουν εξόζες μέσω της EMP και πεντόζες μέσω του PKP) (Goh and Klaenhammer, 2009). Στερούνται τα κυτοχρώματα και βασίζονται στη φωσφορυλίωση του υποστρώματος κατά τη διάρκεια της ζύμωσης των σακχάρων για παραγωγή ενέργειας (Saier, 1996). Τα περισσότερα είδη των λακτοβακίλλων δεν διαθέτουν ικανότητα σύνθεσης διαφόρων αμινοξέων (Goh and Klaenhammer, 2009).

Οι λακτοβάκιλλοι περιλαμβάνουν ένα υψηλό αριθμό ειδών GRAS (γενικά αναγνωρισμένα ως ασφαλή) και πολλά στελέχη είναι μεταξύ των πιο σημαντικών βακτηρίων στη μικροβιολογία τροφίμων και την ανθρώπινη διατροφή, λόγω της συμβολής στα τρόφιμα που παράγονται μέσω ζύμωσης ή για τη χρήση τους ως Προβιοτικά (Salvetti et al., 2012).

Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 30-40 βαθμούς C και το βέλτιστο pH κυμαίνεται στο 5.5 - 6.2 (Salvetti et al., 2012).

Οι λακτοβάκιλλοι φέρουν αντιγόνα πρωτεϊνικής φύσης στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Με τη βοήθεια των επιφανειακών αυτών αντιγόνων προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα με τη μεσολάβηση της φιμπρονεκτίνης. Τα περισσότερα είδη είναι ευαίσθητα στην πενικιλίνη G και τα άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά. Είναι επίσης ευαίσθητοι στην κλινταμυκίνη, στις τετρακυκλίνες και τη χλωραμφαινικόλη, ενώ είναι ανθεκτικοί στη βανκομυκίνη (<< Ιατρική Μικροβιολογία >>, Αντωνιάδης, 2000).

3.3.2 Σταφυλόκοκος

Οι σταφυλόκοκοι υπάγονται στο φύλο των *Firmicutes*, στην κλάση των *Bacilli*, στην τάξη των *Bacillales* και την οικογένεια των *Staphylococcaceae* (<http://www.uniprot.org/taxonomy/?query=staphylococcus&sort=score>). Στο κυτταρικό τους τοίχωμα έχουν πεπτιδογλυκάνη και τειχικό οξύ (<< Ιατρική Μικροβιολογία >>, Αντωνιάδης, 2000). Χαρακτηρίζονται ως Gram θετικά βακτήρια με χαμηλή περιεκτικότητα του DNA σε βάσεις G + C με 0,5 - 1 μm διάμετρο κόκκων. Σχηματίζουν μάζες, αναπτύσσονται σε ομάδες, ζεύγη και περιστασιακά σε μικρές αλυσίδες. Οι ομάδες προκύπτουν επειδή οι σταφυλόκοκοι χωρίζονται σε δύο

επίπεδα. Τα βακτήρια του γένους *Staphylococcus* είναι παθογόνα του ανθρώπου και άλλων θηλαστικών (<< Medical Microbiology >>, Foster, 1996).

Παραδοσιακά χωρίζονται σε δύο ομάδες με βάση την ικανότητά τους να πήζουν το πλάσμα του αίματος (αντίδραση καταλάσης). Οι σταφυλόκοκκοι που είναι θετικοί στην καταλάση αποτελούν τα πιο παθογόνα είδη. Οι σταφυλόκοκκοι που είναι αρνητικοί στην καταλάση είναι τώρα γνωστό ότι περιλαμβάνουν πάνω από 30 άλλα είδη. Η δοκιμή εκτελείται με κατάκλυση ενός άγαρ ή ενός ζωμού καλλιέργειας με αρκετές σταγόνες υπεροξειδίου του υδρογόνου 3%. Οι θετικές στην καταλάση καλλιέργειες βγάζουν φούσκες ταυτόχρονα. Η δοκιμή δεν πρέπει να γίνει σε άγαρ αίματος επειδή το ίδιο αίμα θα παράγει φυσαλίδες. Για να ξεκινήσει η μόλυνση ο παθογόνος σταφυλόκοκκος πρέπει να αποκτήσει πρόσβαση στον ξενιστή και να προσκολληθεί στα κύτταρα ή τους ιστούς του (<< Medical Microbiology >>, Foster, 1996).

Η ευνοϊκότερη θερμοκρασία είναι 35 – 37 βαθμούς κελσίου. Αντέχουν στη ξήρανση του ατμοσφαιρικού αέρα και μπορούν να επιβιώνουν σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων (<< Ιατρική Μικροβιολογία >>, Αντωνιάδης, 2000).

3.3.3 Στρεπτόκοκκος

Οι στρεπτόκοκκοι είναι κατά Gram-θετικοί, μη κινητικοί, μη σπορογόνοι, αρνητικοί στην καταλάση κόκκοι που εμφανίζονται σε ζεύγη ή αλυσίδες (<< Medical Microbiology >>, Patterson, 1996). Ανήκουν στο φύλο *Firmicutes*, κλάση *Bacilli* και στην οικογένεια *Streptococcaceae* (<http://www.uniprot.org/taxonomy/?query=streptococcus&sort=score>). Είναι σφαιρικά ή ωσειδή βακτήρια μεγέθους μικρότερου των 2 μm (<< Ιατρική Μικροβιολογία >>, Αντωνιάδης, 2000). Παλαιότερες καλλιέργειες μπορεί να χάσουν τον κατά Gram-θετικό χαρακτήρα τους. Οι περισσότεροι στρεπτόκοκκοι είναι προαιρετικά αναερόβιοι, και μερικοί είναι υποχρεωτικά (αυστηρά) αναερόβιοι (<< Medical Microbiology >>, Patterson, 1996). Δεν έχουν την ικανότητα να συνθέτουν αίμη και συνεπώς μειονεκτούν ως προς τον αναπνευστικό τους μεταβολισμό. Απαιτούν αρκετούς και ποικίλους θρεπτικούς παράγοντες για να αναπτυχθούν. Για τον λόγο αυτόν, τα θρεπτικά υλικά πρέπει να εμπλουτίζονται με αίμα ή ορό. Ζυμώνουν τη γλυκόζη και άλλους υδατάνθρακες, με κύριο τελικό μεταβολικό προϊόν το γαλακτικό οξύ. Δεν παράγουν αέριο κατά τη ζύμωση της γλυκόζης (<< Ιατρική Μικροβιολογία >>, Αντωνιάδης, 2000).

Οι στρεπτόκοκκοι ταξινομούνται με βάση τη μορφολογία των αποικιών, την αιμόλυση, τις βιοχημικές αντιδράσεις, και (πιο οριστικά) την ορολογική ειδικότητα. Διαιρούνται σε τρεις ομάδες από τον τύπο της αιμόλυσης σε άγαρ αίματος: οι β-αιμολυτικοί (σαφής, πλήρης λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων), οι α αιμολυτικοί (ατελής, πράσινη αιμόλυση), και οι αιμολυτικοί γ (καμία αιμόλυση). Η ορολογική ομαδοποίηση βασίζεται σε αντιγονικές διαφορές στους υδατάνθρακες του κυτταρικού τοιχώματος (ομάδες A έως V), σε τριχίδια-πρωτεΐνες που συνδέονται με το κυτταρικό τοίχωμα, και στην κάψουλα πολυσακχαρίτη στους στρεπτόκοκκους της ομάδας B. Οι στρεπτόκοκκοι είναι μέλη της φυσιολογικής χλωρίδας. Οι παράγοντες μολυσματικότητας της ομάδας A των στρεπτόκοκκων περιλαμβάνουν: (1) την M πρωτεΐνη και τειχικά οξέα για προσκόλληση, (2) μία κάψουλα υαλουρονικού οξέος που αναστέλλει τη φαγοκυττάρωση, (3) άλλα εξωκυτταρικά προϊόντα, όπως πυρετογόνες (erythrogenic) τοξίνες, που προκαλούν το εξάνθημα της οστρακιάς και (4) στρεπτοκινάση, στρεπτοδορνάση (DNase B), και στρεπτολυσίνη. Ορισμένα

στελέχη σχετίζονται με παθήσεις των νεφρών. Η μεσολάβηση του ανοσοποιητικού συστήματος δεν ανακάμπτει τη διάδοση των βακτηρίων. Στα στελέχη που δεν ανήκουν στην ομάδα Α δεν έχουν προσδιοριστεί κάποιοι λοιμογόνιοι παράγοντες (<< Medical Microbiology >>, Patterson, 1996).

3.3.4 Εντεροβακτηρίδια

Τα εντεροβακτηρίδια περιλαμβάνουν Gram – αρνητικά, άσπορα, κινητικά ή ακίνητα βακτήρια, τα οποία ζυμώνουν τη γλυκόζη με ή χωρίς παραγωγή αερίου και ανάγουν τα νιτρικά άλατα σε νιτρώδη. Αναπτύσσονται αερόβιας και προαιρετικά αερόβιας (<< Ιατρική Μικροβιολογία >>, Αντωνιάδης, 2000). Ανήκουν στο φύλο των *Proteobacteria*, στην κλάση *Gammaproteobacteria*, στην τάξη των *Enterobacteriales*, στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae* (<http://www.uniprot.org/taxonomy/?query=enterobacter&sort=score>). Σε αναερόβιες συνθήκες, η ενέργεια προέρχεται από τη ζύμωση σακχάρων, ενώ σε αερόβιες από την οξειδωτική αναπνοή. Η ζύμωση των σακχάρων πραγματοποιείται μέσω του μεταβολικού μονοπατιού Embden-Meyerhof. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι οι 37 βαθμοί Κελσίου. Με βάση τη διάσπαση της λακτόζης ταξινομούνται σε δύο μεγάλες ομάδες. Τα εντεροβακτηρίδια που ζυμώνουν τη λακτόζη και τα εντεροβακτηρίδια που δε ζυμώνουν τη λακτόζη (<< Ιατρική Μικροβιολογία >>, Αντωνιάδης, 2000).

3.3.5 Κολοβακτηρίδια

Τα κολοβακτηρίδια είναι κατά Gram-αρνητικά και άσπορα. Άλλοτε έχουν σχήμα κόκκου και άλλοτε είναι νηματοειδή (<< Ιατρική Μικροβιολογία >>, Αντωνιάδης, 2000). Ανήκουν στο φύλο των *Proteobacteria*, στην κλάση *Gammaproteobacteria*, στην τάξη των *Enterobacteriales*, στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae* (<http://www.uniprot.org/taxonomy/?query=coliform+enterobacteriaceae&sort=score>). Αναπτύσσονται σχηματίζοντας αποικίες διαμέτρου 2-3 mm μετά από 18 ώρες ανάπτυξης στους 37 βαθμούς Κελσίου. Παρόλα αυτά μπορούν και αναπτύσσονται σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (15-45 βαθμούς Κελσίου). Οι κυριότερες ομάδες αντιγόνων με τις οποίες διαχωρίζονται σε ορότυπους είναι το σωματικό αντιγόνο Ο, τα βλεφαριδικά αντιγόνα Η και τα αντιγόνα Κ (<< Ιατρική Μικροβιολογία >>, Αντωνιάδης, 2000).

4. Το κάπνισμα και οι επιδράσεις του στον οργανισμό

Το τσιγάρο είναι ένα μείγμα στερεών και υγρών συστατικών. Στον φρέσκο καπνό έχουν εντοπιστεί περίπου 4.700 διαφορετικές ουσίες. Σε αυτές περιλαμβάνονται ουδέτερα αέρια, οξείδια του άνθρακα, οξείδια του αζώτου, αμίδια, λακτάμες, καρβοξυλικά οξέα, εστέρες, αλδεΐδες, κετόνες, υδρογονάνθρακες, πτητικές ουσίες, μέταλλα, ρίζες. Στον καπνό του τσιγάρου, σε επίπεδο χλιογραμμαρίου, βρίσκονται νερό, μονοξείδιο του άνθρακα, διοξείδιο του άνθρακα και νικοτίνη. Σε επίπεδο πικογραμμαρίου, εντοπίζονται διάφορες ετεροκυκλικές αμίνες και βαρέα μέταλλα (Borgerding and Klus, 2005). Εκτός από τις χημικές ουσίες, έχει τεκμηριωθεί και η παρουσία μικροοργανισμών στα τσιγάρα. Έχει παρατηρηθεί ταχεία ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων, και συσσώρευση μικροβιακών τοξινών (Larsson et al., 2008). Επιπλέον σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε, εντοπίστηκαν στο τσιγάρο πιθανά παθογόνα, όπως *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia*, *Campylobacter*, *Enterococcus*, *Proteus* και *Staphylococcus* (Sapkota et al., 2010).

Το κάπνισμα προκαλεί μέχρι και 90% όλων των καρκίνων του πνεύμονα, και είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για εγκεφαλικό επεισόδιο και καρδιακή προσβολή. Αναγνωρίζεται επίσης ως παράγοντας κινδύνου για μία ποικιλία λοιμώξεων της αναπνευστικής οδού, σε παιδιά και ενήλικες, συμπεριλαμβανομένης της κοινής γρίπης, της πνευμονίας και της φυματίωσης (Arcavi and Benowitz et al., 2004).

4.1 Επίδραση του καπνίσματος και της διακοπής του στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου

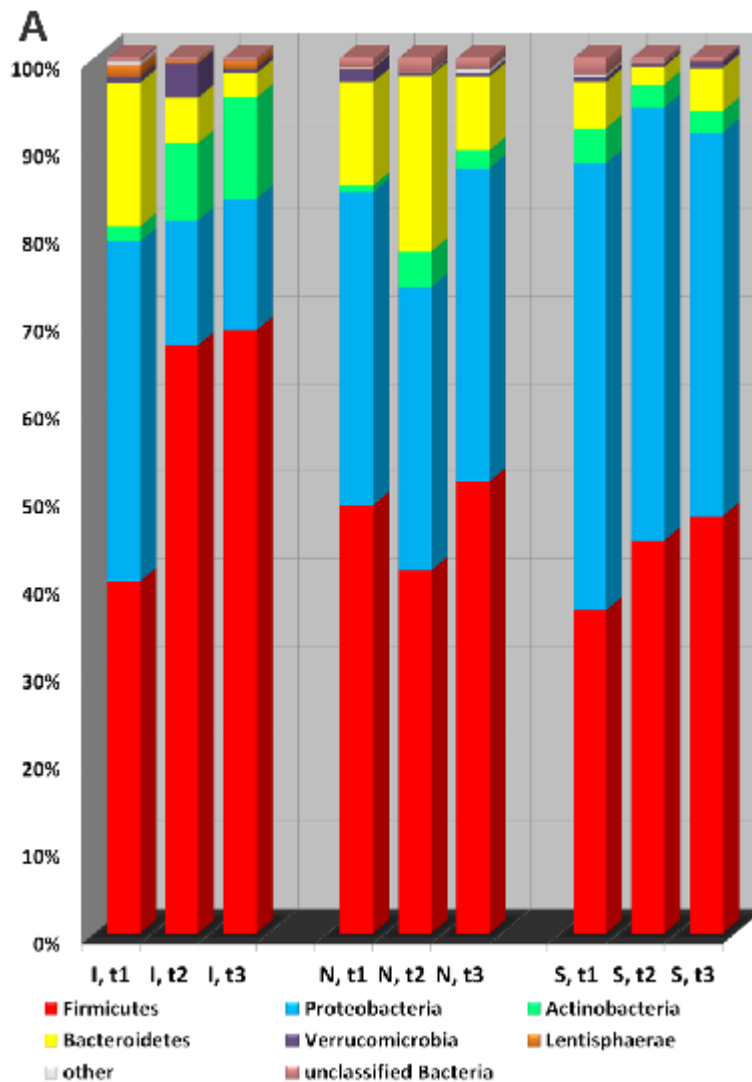
Το κάπνισμα φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στη σύνθεση της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου. Παλαιότερες και νέες μελέτες αποκαλύπτουν μεταβολές στην μικροβιακή χλωρίδα κατά τη διάρκεια του καπνίσματος, αλλά και της διακοπής του.

Ειδικότερα, σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς με την ασθένεια του Chron, παρατηρήθηκαν οι μεταβολές στη μικροχλωρίδα του εντέρου λόγω της επίδρασης του καπνίσματος. Αποκαλύφθηκε πως οι καπνιστές είχαν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά *Bacteroides* και *Prevotella* σε σχέση με τους μη καπνιστές. Επίσης μελετήθηκαν δείγματα από 66 άτομα που δεν πάσχουν από την ασθένεια και παρατηρήθηκε πως τα ποσοστά των δύο ειδών είναι αυξημένα στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές. Αυτό υποδεικνύει πως ίσως το κάπνισμα, και όχι η ασθένεια, είναι υπεύθυνο για αυτή την αύξηση (Benjamin et al., 2011). Μία ακόμα έρευνα που διεξήχθη σε 15 ασθενείς με την ασθένεια του Chron παρουσιάζει πως τα επίπεδα του *Faecalibacterium prausnitzii* είναι χαμηλότερα στους καπνιστές σε σχέση με του μη καπνιστές (Gareth et al., 2014). Έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε ενεργούς καπνιστές κατέδειξε αύξηση του είδους των *Clostridium* (Rogers et al., 2012). Σε μία ακόμα μελέτη σε ασθενείς με την ασθένεια του Chron, αναλύθηκαν 94 γένη και παρατηρήθηκε μειωμένη αναλογία των γενών *Collinsella*, *Enterorhabdus* και *Gordonibacter* στους καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές. Ακόμα βακτήρια, τα οποία αποκαλύφθηκε σε προηγούμενες μελέτες, πως σχετίζονται με την ασθένεια του Chron εμφάνισαν σταθερή μείωση στον πληθυσμό τους στους

καπνιστές σε σχέση με τους μη καπνιστές. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται τα *Akkermansia muciniphila* και *Butyrivibrio pullicaecorum*. Επιπλέον και σε αυτή την έρευνα βρέθηκε πως τα επίπεδα του *Faecalibacterium prausnitzii* ήταν μειωμένα στους καπνιστές (Jorrit L. Opstelten et al., 2016). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την επίδραση του καπνίσματος στη νόσο του Parkinson μελετήθηκαν και οι επιπτώσεις του καπνίσματος στη μικροχλωρίδα του εντέρου. Έγινε εμφανές πως οι καπνιστές είχαν μεγαλύτερη αφθονία των ειδών *Bacteroides* και *Prevotella* σε σχέση με τα είδη *Firmicutes* και *Actinobacteria* (Scheperjans et al., 2015).

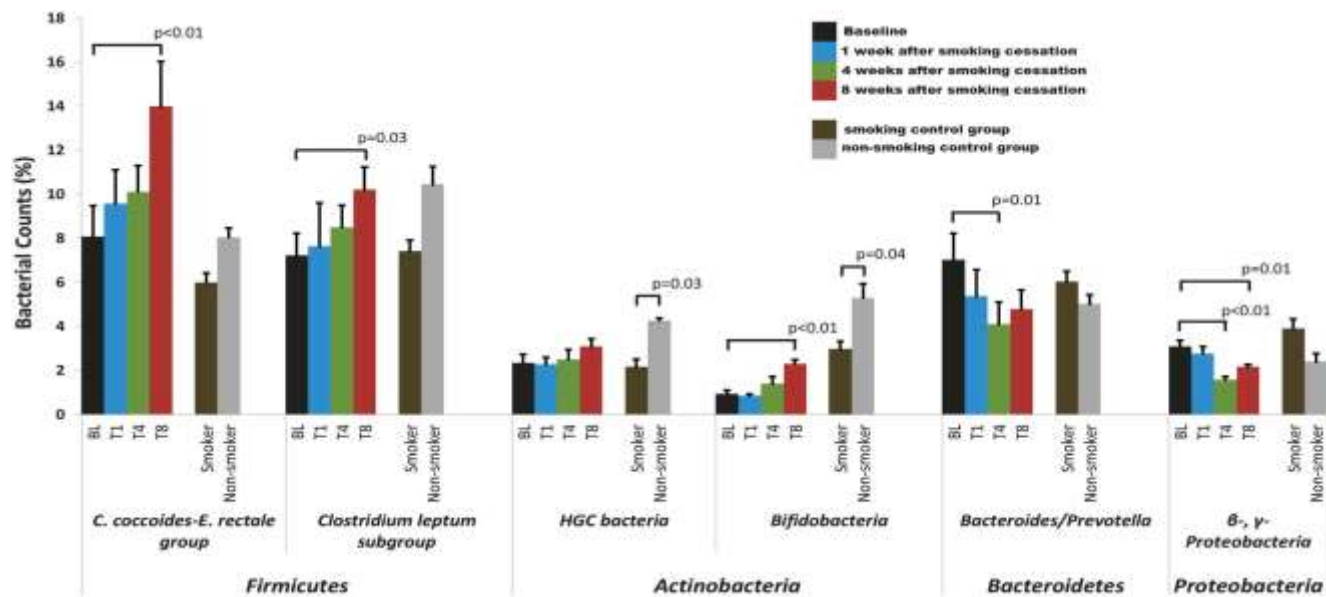
Έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε επίμυες ανέδειξε πως ο πληθυσμός του *Bifidobacterium* αυξήθηκε στο τυφλό έντερο μετά από 4 εβδομάδες έκθεσης σε καπνό (Tomoda et al., 2011). Σε ποντίκια η έκθεση σε καπνό μέσω παθητικής ροής κατέδειξε, και αυτή, αύξηση του είδους των *Clostridium*, αλλά μείωση του φύλου των *Firmicutes* (*Lactococcus* και *Ruminococcus*), της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* και των νηματοειδών βακτηρίων στο τυφλό. Ακόμα παρατηρήθηκε αύξηση μιας ομάδας βακτηρίων που ονομάζεται φύλο των *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (Wang et al., 2012). Μια ακόμα έρευνα σε ποντίκια για την επίδραση της έκθεσης σε καπνό στην μικροχλωρίδα του εντέρου αποκάλυψε αύξηση της δραστηριότητας του είδους *Lachnospiraceae* στο εγγύς και άπω κόλον αλλά όχι στον ειλεό (Liesbeth et al., 2016 & Nakanishi, 2014).

Μετά τη διακοπή του καπνίσματος παρατηρείται, στα άτομα τα οποία κάπνιζαν, μία αύξηση των αλληλουχιών των ειδών *Firmicutes* και *Actinobacteria* και μία ταυτόχρονη μείωση αυτών των *Proteobacteria* και των *Bacteroidetes*. Επίσης ταυτοποιήθηκαν τα φύλα των *Verrucomicrobia*, *Lentisphaerae*, *Tenericutes*, *Cyanobacteria*, *Synergistetes*, *Fusobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *TM7*, *Acidobacteria* και *ODI*. Σε επίπεδο φύλων οι σημαντικότερες αλλαγές παρατηρήθηκαν μεταξύ των περιόδων λίγο πριν τη διακοπή του καπνίσματος και των 4 και 8 εβδομάδων μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν από δύο μελέτες. Η μία επικεντρώθηκε στην αφθονία του 16S rRNA των διαφόρων βακτηρίων χρησιμοποιώντας τις μεθόδους Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism analysis και high-throughput sequencing (Biedermann, 2013).



Εικόνα 3. Σύνθεση Φύλων. Τα αποτελέσματα για την ομάδα παρέμβασης (I) και των ομάδων ελέγχου (nonsmoking= N, smoking = S) δίδονται για δείγματα που λαμβάνονται μία εβδομάδα πριν για διακοπή του καπνίσματος (t1) καθώς και τέσσερις εβδομάδες (t2) έως οκτώ εβδομάδες (t3) έπειτα. Luc Biedermann, Jonas Zeitz, Jessica Mwinyi, Eveline Sutter-Minder, Ateequr Rehman, Stephan J. Ott, Claudia Steurer-Stey, Anja Frei, Pascal Frei, Michael Scharl, Martin J. Loessner, Stephan R. Vavricka, Michael Fried, Stefan Schreiber, Markus Schuppler, Gerhard Rogler. Smoking Cessation Induces Profound Changes in the Composition of the Intestinal Microbiota in Humans. PLOS ONE. March 2013. Volume 8. Issue 3. e59260

Η δεύτερη πραγματοποίησε ακριβή προσδιορισμό των βακτηρίων χρησιμοποιώντας την τεχνική Fluorescence in situ hybridization (FISH). Σε αυτή την δεύτερη μελέτη παρατηρήθηκε, ακόμα, πως η σχετική αφθονία των *C. leptum*, *C. coccoides* και *E. rectale* αυξάνεται σταθερά μετά τη διακοπή του καπνίσματος, φθάνοντας σε σημαντικά ποσοστά κατά την 8^η εβδομάδα μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Επίσης τα είδη *Prevotella* και *Bacteroides* (*Bacteroidetes*) εμφάνισαν μείωση της αφθονίας τους, φτάνοντας σε σημαντικά ποσοστά την 4^η εβδομάδα μετά την διακοπή του καπνίσματος. Επιπλέον ο προσδιορισμός της σχετικής αφθονίας των *b*- και *g*- *Proteobacteria* κατέδειξε μία σημαντική μείωση 4 και 8 εβδομάδες μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Όσον αφορά τα *Actinobacteria* παρατηρήθηκε αύξηση κατά τις 4 και 8 βδομάδες διακοπής του καπνίσματος, και ειδικότερα στο φύλο των *Bifidobacteria* η αύξηση αυτή ήταν εντονότερη στις 8 εβδομάδες μετά τη διακοπή του καπνίσματος (Biedermann, 2014).



Εικόνα 4. Αποτελέσματα FISH σύμφωνα με ειδικούς ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται εντός των 4 βασικών βακτηριακών φύλων (κάτω) και απεικονίζεται ως ποσοστό της βακτηριακών μετρήσεων. Για κάθε ανιχνευτή οι τιμές FISH για την έναρξη (δηλαδή, κατά την διάρκεια του καπνίσματος), καθώς και 1, 4, και 8 εβδομάδες μετά την διακοπή του καπνίσματος απεικονίζονται σε σύγκριση με αυτές των ομάδων ελέγχου των μη καπνιστών και των καπνιστών. Οι ράβδοι σφάλματος δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου (SEM).

Luc Biedermann, Karin Brülisauer, Jonas Zeitz, Pascal Frei, Michael Scharl, Stephan R. Vavricka, Michael Fried, Martin J. Loessner, Gerhard Rogler, and Markus Schuppler. Smoking Cessation Alters Intestinal Microbiota: Insights from Quantitative Investigations on Human Fecal Samples Using FISH. *Inflamm Bowel Dis* 2014;20:1496–1501

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η μικροβιακή σύνθεση μετά τη διακοπή του καπνίσματος υφίσταται παρόμοιες αλλαγές όπως αυτή των παχύσαρκων ατόμων, δηλαδή χαμηλότερο ποσοστό των *Bacteroidetes* και ένα υψηλότερο ποσοστό των *Firmicutes* και *Actinobacteria*. Αυτό υποδεικνύει πως ίσως η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου σχετίζεται με την αυξο-μείωση του βάρους. Ακόμα το κάπνισμα μέσω των αλλαγών που προκαλεί στη μικροβιακή χλωρίδα παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ανοσίας, της ανάπτυξης, της διατροφής αλλά και αρκετών παθήσεων του οργανισμού (Biedermann, 2013).

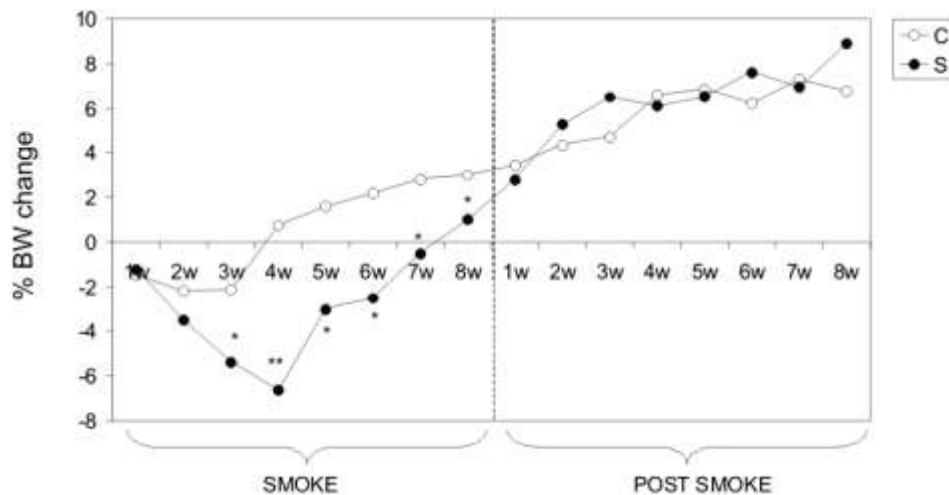
4.2 Επίδραση του καπνίσματος στον εντερικό φραγμό

Το κάπνισμα ασκεί τις επιδράσεις του και στη λειτουργία του εντερικού φραγμού. Η δυσλειτουργία που προκαλείται από αυτές τις επιδράσεις οφείλεται στην καταστροφή της δομής των επιθηλιακών κυττάρων του εντερικού φραγμού και στην ατροφία των εντερικών λαχνών. Ακόμη προκαλείται καταστροφή των αποφρακτικών συνδέσεων μέσω δυσλειτουργίας των πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε αυτές. Λόγω των παραπάνω ο εντερικός φραγμός διασπάται με αποτέλεσμα να προκληθεί βακτηριακή μετακίνηση. Με τον όρο αυτό εννοούμε τη μετακίνηση ενδοαυλικών παραγόντων του εντέρου προς άλλους ιστούς και όργανα με αποτέλεσμα την πρόκληση σηπτικών καταστάσεων, δυσλειτουργιών των οργάνων, μέχρι και θάνατο (Lugen Zuo et al., 2014).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η λειτουργία του εντερικού φραγμού επηρεάζεται αναλόγως με το τμήμα του εντέρου. Στο λεπτό έντερο φαίνεται πως το κάπνισμα προκαλεί μεγαλύτερη ζημιά στον εντερικό φραγμό και ακολούθως αυξημένη βακτηριακή μετακίνηση. Αντιθέτως στο παχύ έντερο η λειτουργία του εντερικού φραγμού παραμένει αμετάβλητη και ίσως και βελτιωμένη (Scheperjans et al., 2015).

4.3 Επίδραση του καπνίσματος στο βάρος

Σε μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε σε επίμυες, οι οποίοι εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου για 4 εβδομάδες, ελέγχθηκε μεταξύ άλλων και η αυξομείωση του βάρους κατά την διάρκεια της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου. Στο τέλος των 4 εβδομάδων, οι επίμυες που εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου, είχαν σημαντικά χαμηλότερο βάρος από τους επίμυες που δεν εκτέθηκαν στον καπνό. Επίσης η πρόληψη τροφής ήταν σημαντικά χαμηλότερη στην ομάδα των επίμυων που εκτέθηκαν σε σχέση με αυτούς που δεν εκτέθηκαν (Tomoda et al., 2011). Ακόμα μια έρευνα επικεντρώθηκε στις επιδράσεις του καπνίσματος και της διακοπής του στο βάρος επίμυων. Οι επίμυες υποβλήθηκαν σε 8 εβδομάδες έκθεσης σε καπνό τσιγάρου. Το βάρος των επίμυων που εκτέθηκαν στο καπνό σημείωσε σημαντική μείωση της πρώτες 4 εβδομάδες σε σχέση με τους επίμυες που δεν εκτέθηκαν σε καπνό. Στη συνέχεια, μέχρι την 8^η εβδομάδα, αν και η μείωση επιβράδυνε σταδιακά, το βάρος των επίμυων που εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου παρέμεινε χαμηλότερο από το βάρος των επίμυων που δεν εκτέθηκαν. Το βάρος των επίμυων που εκτέθηκαν στον καπνό ανακτήθηκε μία βδομάδα μετά τη διακοπή της έκθεσης, παρόλα αυτά δεν ξεπέρασε το βάρος των επίμυων που δεν εκτέθηκαν, καθόλη την διάρκεια της περιόδου της διακοπής της έκθεσης (Ypsilantis et al., 2013).



Εικόνα 5. αλλαγές στο βάρος του σώματος των επίμυων.

Petros Ypsilantis, Maria Politou, Constantinos Anagnostopoulos, Christina Tsigalou, Georgia Kambouroumiti, Alexandros Kortsaris, Constantinos Simopoulos, M.D. Effects of Cigarette Smoke Exposure and Its Cessation on Body Weight, Food Intake and Circulating Leptin, and Ghrelin Levels in the Rat. *Nicotine & Tobacco Research*, Volume 15, Number 1 (January 2013). doi:10.1093/ntr/nts113

Σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε καπνιστές που ήθελαν να διακόψουν το κάπνισμα παρατηρήθηκε αύξηση του σωματικού βάρους με 7 – 8 kg κατά μέσο όρο. Το ενδιαφέρον έγκειται στο ότι αυτή η πρόσληψη βάρους παρατηρείται αν και δεν έχει προκληθεί καμία αλλαγή στις διατροφικές συνήθειες των ατόμων (Biedermann, 2013). Από στατιστικές μελέτες που αφορούν την πρόσληψη βάρους μετά την διακοπή του καπνίσματος έχει παρατηρηθεί ότι ενώ στην πλειοψηφία των ανθρώπων που σταμάτησαν το κάπνισμα εμφανίστηκε αύξηση του σωματικού βάρους, υπάρχει σημαντική μεταβλητότητα στο ποσό της αύξησης του βάρους. Οι διαφορές στην πρόσληψη βάρους μεταξύ όσων σταμάτησαν το κάπνισμα και εκείνων που το συνεχίζουν κυμαίνεται στα 2,6 - 5,3 kg (Veldheer et al., 2015 & Tian et al., 2015). Χρησιμοποιώντας τα δεδομένα από 35 πληθυσμιακές ομάδες μελέτης από όλο τον κόσμο και με σύγκριση 63.403 καπνιστές που σταμάτησαν το κάπνισμα με 388.432 που συνέχισαν να καπνίζουν, διαπιστώθηκε ότι όσοι κόβουν το κάπνισμα αυξάνουν κατά μέσο όρο το βάρος τους με 4,1 κιλά σε 5 χρόνια, σε σύγκριση με αυτούς που συνεχίζουν το κάπνισμα και αυξάνουν το βάρος κατά μέσο όρο με 1,5 kg (Tian et al., 2015). Σε μία άλλη μελέτη, η μεταβολή του βάρους μεταξύ των πρώην καπνιστών ήταν υψηλότερη. Μετά από 8 χρόνια, όσοι έκοψαν το κάπνισμα απέκτησαν κατά μέσο όρο 8,79 kg παραπάνω, όσοι συνέχισαν το κάπνισμα απέκτησαν 2,24 kg παραπάνω (Lycett et al., 2011). Από στατιστικές μελέτες φαίνεται πως το βάρος αυξήθηκε κατά περίπου 1 κιλό το μήνα στους πρώτους τρεις μήνες. Στη συνέχεια, ο ρυθμός αύξησης μειώνεται, οδηγώντας σε μια εκτιμώμενη αύξηση βάρους περίπου 4-5 κιλά ένα χρόνο μετά την διακοπή του καπνίσματος (Henri-Jean Aubin, 2012).

Οι επιδράσεις της διακοπής του καπνίσματος στο Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δύο φύλων και μεταξύ των ηλικιακών ομάδων. Για παράδειγμα, στον 1^ο και 3^ο μήνα μετά τη διακοπή, ο ΔΜΣ των γυναικών αυξάνεται κατά 0,52 στις ηλικίες 18-40, κατά 1,25 στις ηλικίες 41-55, και κατά 1,04 στις ηλικίες 56-64. Αντίστοιχα ο ΔΜΣ των ανδρών είναι αυξημένος κατά 0,95 στις ηλικίες 18-40, κατά 1,33 στις ηλικίες 41-55, και κατά 0,81 στις ηλικίες 56-64 (Kasteridis and Steven T. Yen, 2012).

Η διακοπή του καπνίσματος ίσως προκαλεί αύξηση του σωματικού βάρους, επειδή η νικοτίνη είναι μια ουσία που καταστέλλει τη όρεξη για φαγητό. Επιπλέον, τα στοιχεία δείχνουν ότι η νικοτίνη αυξάνει το βασικό μεταβολικό ρυθμό, και η διακοπή

αυτού του αποτελέσματος οδηγεί σε μείωση των ενεργειακών δαπανών σε μια περίοδο κατά την οποία η όρεξη είναι αυξημένη (Filozof et al., 2004).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να καταγραφούν οι αλλαγές που πραγματοποιούνται στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου μετά τη διακοπή του καπνίσματος. Σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν μετρήσεις του βάρους των επίμυων με στόχο οι αλλαγές στη μικροβιακή χλωρίδα να συσχετιστούν με την αυξομείωση του βάρους κατά τη διάρκεια της διακοπής του καπνίσματος.

2. Πειραματόζωα

Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε επίμυες της φυλής Wistar. Χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί επίμυες, ηλικίας 5-6 μηνών και βάρους 300-500 gr. Οι επίμυες στεγάστηκαν σε πολυανθρακικά κλουβιά, στα οποία τοποθετήθηκε ένα ζώο ανά κλουβί. Η θερμοκρασία στο δωμάτιο φύλαξης τους ήταν 20-22 βαθμοί κελσίου. Ο κύκλος ημέρας : νύχτας ρυθμίστηκε στις 14 : 10 ώρες. Η τροφή τους αποτελούνταν από πέλετ, ενώ στη διάθεσή τους υπήρχε άφθονο νερό. Τα πειραματόζωα διατηρούνταν στις εγκαταστάσεις του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας του τμήματος Ιατρικής του ΔΠΘ το οποίο εδρεύει στην Αλεξανδρούπολη. Αυτές πληρούσαν τις προϋποθέσεις που ορίζονται από τη σχετική νομοθεσία που αφορά την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (Π.Δ. 56/2013).

3. Πειραματικός σχεδιασμός

Για τις ανάγκες της μελέτης οι επίμυες χωρίστηκαν σε δύο ομάδες. Η μία ομάδα περιλάμβανε 29 επίμυες, οι οποίοι τέθηκαν σε διαδικασία έκθεσης σε καπνό τσιγάρου για 8 εβδομάδες και σε διαδικασία διακοπής της έκθεσης για ακόμα 8 εβδομάδες (smokers = S). Η δεύτερη ομάδα περιλάμβανε 22 επίμυες οι οποίοι αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου της ομάδας S για τις 8 εβδομάδες της έκθεσης και τις 8 εβδομάδες της διακοπής της έκθεσης (controls = C).

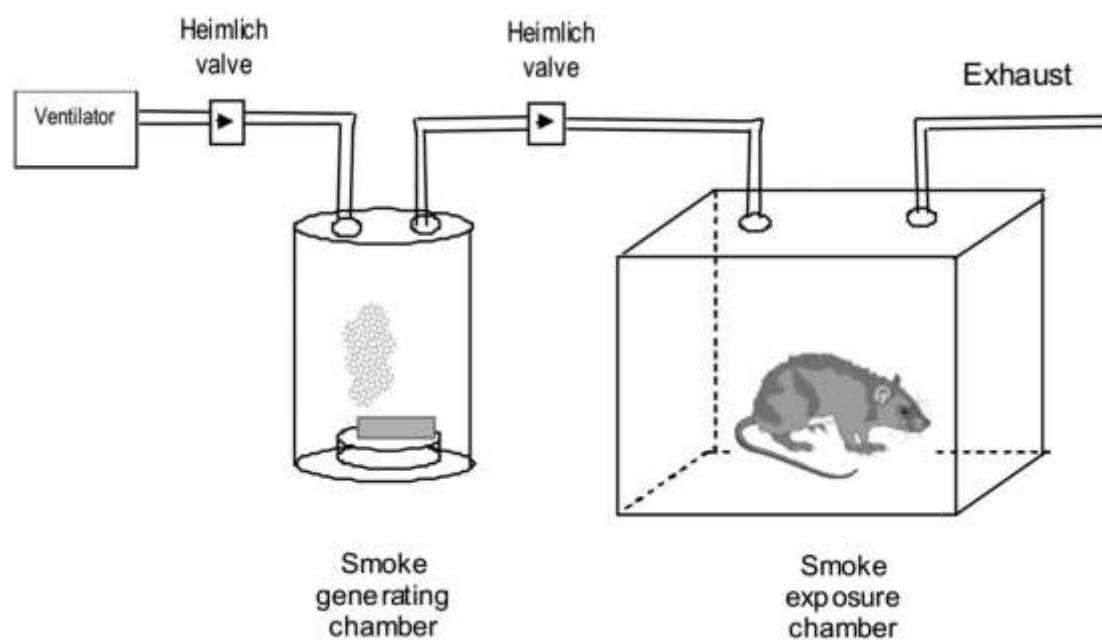
Οι παραπάνω ομάδες χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της μικροβιακής χλωρίδας του εντερικού βλεννογόνου. Από τον κάθε επίμυ πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία ιστών του έντερου, πιο συγκεκριμένα της νήστιδας, του ειλεού, του τυφλού και του κόλου. Ως χρονική στιγμή για τη δειγματοληψία ορίστηκαν για την περίοδο της έκθεσης οι 4 εβδομάδες (S4weeks) και 8 εβδομάδες (S8weeks) και για την περίοδο της διακοπής της έκθεσης οι 4 εβδομάδες (SC4weeks) και οι 8 εβδομάδες (SC8weeks). Στις συγκεκριμένες χρονικές στιγμές λαμβάνονταν δείγμα τόσο από την ομάδα S όσο και από την ομάδα C.

Το πειραματικό πρωτόκολλο έλαβε σχετική έγκριση από την αρμόδια Κτηνιατρική Υπηρεσία της ΠΕ Έβρου (αρ. πρωτ. 317/11-1-2016) εφόσον πληρούσε τις προϋποθέσεις που ορίζονται από τη σχετική νομοθεσία που αφορά την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικούς σκοπούς (Π.Δ. 56/2013).

4. Σύστημα έκθεσης σε καπνό τσιγάρου

Τα τσιγάρα που χρησιμοποιήθηκαν περιείχαν 8 mg πίσσα, 0,6 mg νικοτίνη και 9 mg μονοξειδίου του άνθρακα. Τα επίπεδα αυτά επιλέχθηκαν για να μην εμφανιστούν επιβλαβείς επιπτώσεις στην υγεία των πειραματόζωων από την έκθεση στον καπνό.

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για την έκθεση των επίμυων σε παθητική ροή καπνού τσιγάρου αποτελούταν από τα εξής μέρη: έναν αναπνευστήρα, έναν θάλαμο ροής καπνού και έναν θάλαμο έκθεσης σε καπνό. Τα τμήματα αυτά ήταν εν σειρά συνδεδεμένα με σωλήνες σιλικόνης. Ανάμεσα στον αναπνευστήρα και τον θάλαμο ροής είχε τοποθετηθεί μία βαλβίδα Heimlich που επιτρέπει την κίνηση του αέρα προς μία μόνο κατεύθυνση και δεν επιτρέπει την παλινδρόμηση του καπνού. Ο αναπνευστήρας ρυθμίστηκε να παρέχει 600 ml αέρα προς 4 θαλάμους έκθεσης καπνού κάθε 10 δευτερόλεπτα. Οι επίμυες αφήνονταν στον θάλαμο έκθεσης του καπνού μία + μία ώρες κάθε ημέρα, με μισή ώρα διάλειμμα, ενδιάμεσα, από την έκθεση. Το μονοξείδιο του άνθρακα μέσα στον θάλαμο έκθεσης μετρούνταν ανά 15 λεπτά και τα επίπεδα του διατηρούνταν μεταξύ 150 και 250 ppm. Το μονοξείδιο του άνθρακα μετριόταν με τη χρήση ενός φορητού αναλυτή του μονοξειδίου του άνθρακα (piCO Smokerlyzer Breath CO monitor, Bedfont Scientific, Kent, UK). Οι επίμυες εκτίθονταν στον καπνό μεταξύ 9:00 και 12:00



Εικόνα 6. Σύστημα έκθεσης επίμυων σε καπνό τσιγάρου.

Petros Ypsilantis, Maria Politou, Constantinos Anagnostopoulos, Alexandros Kortsaris, and Constantinos Simopoulos. A Rat Model of Cigarette Smoke Abuse Liability. October 2012. Vol 62, No 5. Pages 395–399

5. Μέτρηση κατανάλωσης τροφής και σωματικού βάρους

Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό την εβδομάδα έναρξης της μελέτης (S0 week) ζυγίστηκαν οι επίμυες και τοποθετήθηκαν στα κλουβιά τους 700 gr τροφής. Κάθε εβδομάδα, καθόλη τη διάρκεια της περιόδου καπνίσματος και της περιόδου διακοπής του καπνίσματος, πραγματοποιούταν καταμέτρηση του βάρους των επίμυων και της τροφής που κατανάλωσαν. Η συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία επικεντρώνεται στις μεταβολές που παρατηρήθηκαν τις εβδομάδες SC4 weeks και SC8 weeks.

6. Ιστοληψία

Για τις ανάγκες της μελέτης πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία ιστών διαφόρων εντερικών τμημάτων. Συγκεκριμένα, απομονώθηκε δείγμα ιστού από τη νήστιδα, τον ειλέο, το τυφλό και το κόλον.

Για τη διαδικασία της ιστοληψίας, οι επίμυες υποβλήθηκαν σε γενική εισπνευστική αναισθησία σεβοφλουρανίου (2% σε οξυγόνο) το οποίο τους χορηγούνταν μέσω προσωπίδας. Κατά τη διάρκεια του χειρουργείου επικρατούσαν στείρες συνθήκες και τα δείγματα αποθηκεύονταν σε πάγο μέχρι τη διαδικασία των μικροβιολογικών αναλύσεων.

7. Μικροβιολογική ανάλυση

Για την καταγραφή της πιθανής μεταβολής της εντερικής μικροβιακής χλωρίδας επίμυων που έχουν υποβληθεί σε καπνό τσιγάρου, έγινε ιστοληψία και μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων. Η δειγματοληψία, όπως αναφέρεται παραπάνω, έγινε σε διάστημα SC4 και SC8 weeks, τα οποία ορίζονται σε 4 εβδομάδες και 8 εβδομάδες αντίστοιχα, από τη διακοπή καπνίσματος. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί που μελετήθηκαν με τη μέθοδο των διαδοχικών, δεκαδικών αραιώσεων είναι οι εξής:

- Θρεπτικό υλικό Standard methods agar (PCA) – CONDA, Spain : για ολική μεσόφιλη χλωρίδα, θερμοκρασία επώασης : 30 βαθμοί κελσίου, χρόνος επώασης : 4 ημέρες (96 ώρες)
- Θρεπτικό υλικό Violet Red Bile Glucose Agar (V.R.B.G.A.) – LAB M, UK : για εντεροβακτηρίδια, θερμοκρασία επώασης : 37 βαθμοί κελσίου, χρόνος επώασης : 1 ημέρα (24 ώρες)
- Θρεπτικό υλικό Violet Red Bile Agar (V.R.B.A.) – LAB M, UK : για κολοβακτηρίδια, θερμοκρασία επώασης : 30 βαθμοί κελσίου, χρόνος επώασης : 1 ημέρα (24 ώρες)
- Θρεπτικό υλικό Bile Esculin Azide Agar (B.E.A.) – MERCK, U.S.A : για στρεπτόκοκκο, θερμοκρασία επώασης : 37 βαθμοί κελσίου, χρόνος επώασης : 2 ημέρες (48 ώρες)
- Θρεπτικό υλικό Baird-Parker medium base (B.P.) – LAB M, UK: για σταφυλόκοκκο, θερμοκρασία επώασης : 37 βαθμοί κελσίου, χρόνος επώασης : 2 ημέρες (48 ώρες)
- Θρεπτικό υλικό de Man, Rogosa and Sharpe Broth (M.R.S. Agar) – LAB M, UK : για λακτοβάκιλλο, θερμοκρασία επώασης : 37 βαθμοί κελσίου, χρόνος επώασης : 4 ημέρες (96 ώρες)

7.1 Όργανα και υλικά

Για τον εργαστηριακό έλεγχο των δειγμάτων, καθώς και για την ανάπτυξη μικροοργανισμών, ήταν απαραίτητα τα παρακάτω όργανα:

Αποστειρωμένα γυάλινα σωληνάκια : χρησιμοποιήθηκαν στις διαδοχικές αραιώσεις.

Αποστειρωμένες φιάλες : οι φιάλες που χρησιμοποιήθηκαν είναι των 1000 ml, 500 ml και 250ml ανάλογα με την ποσότητα του εκάστοτε υλικού που χρειαζόταν να παρασκευαστεί.

Αποστειρωμένα Falcons: falcons των 15 ml για την εναπόθεση του δείγματος του ειλεού, της νήστιδας και του κόλου. Falcons των 50 ml για την εναπόθεση του δείγματος του τυφλού.

Αποστειρωμένες λαβίδες : για την ομογενοποίηση των ιστών

Αλουμινόχαρτο

Απιονισμένο νερό : για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών και του ¼ Ringers Solution

Πιπέτες : πιπέτα 1000 ml για τις διαδοχικές αραιώσεις και τα δείγματα ενσωμάτωσης. Πιπέτα 100 ml για τα δείγματα επίστρωσης.

Αυτόματη πιπέτα (Erppendorf Easypet 4420) : για την εναπόθεση του ¼ Ringers Solution σε σωληνάκια

Τριγωνάκι : για το άπλωμα και την απορρόφηση του δείγματος, που προορίζεται για επίστρωση, στο θρεπτικό υλικό.

Θάλαμοι νηματικής ροής αέρα : ανακυκλώνει τον αέρα και δημιουργεί άσηπτες συνθήκες

Λυχνάρι bunsen : απαραίτητο για τη γρήγορη αποστείρωση ορισμένων μικροαντικειμένων και για τη δημιουργία αποστειρωμένου χώρου

Τριβλία

70 % Αιθανόλη : για αποστείρωση του χώρου, των χεριών και μικροαντικειμένων

Ζυγός (KERN 572/573/KB/DS/FKB/FCB, version 5.7, 12/2009)

Vortex

Φούρνος μικροκυμάτων : για την παρασκευή ζεστού νερού που χρησιμοποιούταν για μούλιασμα

Λεκάνη : για μούλιασμα φιαλών, σωλανακίων και λαβίδων

Υδατόλουτρο : Συσκευή που αποτελείται από μια λεκάνη με απιονισμένο νερό. Υπάρχει θερμομέτρο, λυχνία λειτουργίας και διακόπτης με κλίμακα για τη ρύθμιση της θερμοκρασίας η οποία διατηρείται σταθερή με θερμοστάτη. Χρησιμοποιούταν για την διάλυση του θρεπτικού υλικού στις φιάλες πριν την αποστείρωση και για να μην πηξει το θρεπτικό υλικό μετά την αποστείρωση.

Επωαστήρας : κλίβανοι που χρησιμοποιούταν για την επώαση των καλλιιεργειών των μικροοργανισμών. Λειτουργούν με ηλεκτρικό ρεύμα και διατηρούν σταθερή τη θερμοκρασία με ένα θερμοστάτη με απόκλιση $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Ήταν ρυθμισμένοι στους 37 και 30 βαθμούς κελσίου ανάλογα με το θρεπτικό υλικό και τον μικροοργανισμό που επιθυμούταν να αναπτυχθεί.

Αυτόκαυστο (AUTOCLAVE MOD. 760, CODICE 29960001) : για υγρή αποστείρωση θρεπτικών υλικών επίστρωσης σε θερμοκρασία 121 βαθμούς κελσίου.

Χύτρα : για υγρή αποστείρωση θρεπτικών υλικών ενσωμάτωσης σε θερμοκρασία 121 βαθμούς κελσίου για 15 min.

Κλίβανος Ξηρής αποστείρωσης : για αποστείρωση γυαλικών, λαβίδων και tips.

Θρεπτικό υλικό Standard methods agar (PCA) της εταιρείας CONDA, Spain

Θρεπτικό υλικό Violet Red Bile Glucose Agar (V.R.B.G.A.) της εταιρείας LAB M, UK

Θρεπτικό υλικό Violet Red Bile Agar (V.R.B.A.) της εταιρείας LAB M, UK

Θρεπτικό υλικό Bile Esculin Azide Agar (B.E.A.) της εταιρείας MERCK, U.S.A
Θρεπτικό υλικό Baird-Parker medium base (B.P.) της εταιρείας LAB M, UK
Θρεπτικό υλικό de Man, Rogosa and Sharpe Broth (M.R.S. Broth) της εταιρείας LAB M, UK
Θρεπτικό υλικό Agar No.2 Bacteriological της εταιρείας LAB M, UK
Buffered Peptone Water: της εταιρείας LAB M, UK ισότονο διάλυμα, αποτρέπει την καταστροφή των κυττάρων και σταματάει την ανάπτυξή τους
¼ strength Ringers Solution (tablets) : της εταιρείας LAB M, UK ισότονο διάλυμα, αποτρέπει την καταστροφή των κυττάρων και σταματάει την ανάπτυξή τους
Ορός αυγού X085 : αναμειγνύεται με το B.P.

7.2. Παρασκευή θρεπτικών μέσων ανάπτυξης – επίστρωσης και ενσωμάτωσης

Standard methods agar (PCA) – θρεπτικό ενσωμάτωσης

Το PCA χρησιμοποιούταν για ανάπτυξη ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Τα μικρόβια αναπτύσσονταν στους 30 βαθμούς κελσίου για 4 ημέρες . Σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού περιέχονται 5 gr Casein peptone - 2,5 gr Yeast extract – 1 gr Glucose (anhydrous) – 15 gr bacteriological agar. Το τελικό pH κυμαίνεται στο 7.0 με απόκλιση 0.2 στους 25 βαθμούς κελσίου.

Οδηγίες παρασκευής : σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού διαλύονται 23.5 gr σκόνης. Αποστειρώνονταν στην χύτρα στους 121 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά.

Violet Red Bile Glucose Agar (V.R.B.G.A.) – θρεπτικό ενσωμάτωσης

Το V.R.B.G.A. χρησιμοποιούταν για ανάπτυξη εντεροβακτηρίδια. Τα μικρόβια αναπτύσσονταν στους 37 βαθμούς κελσίου για 24 ώρες. Σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού περιέχονται 3 gr Yeast extract – 7 gr Balanced peptone No.1 – 5 gr Sodium chloride – 1.5 gr Bile salts No.3 – 10 gr Glucose – 0.03 gr Neutral red – 0.002 gr Crystal violet – 12 gr Agar No.2. Το pH κυμαίνεται στο 7.0 με απόκλιση 0.2.

Οδηγίες παρασκευής : σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού διαλύονται 38.5 gr σκόνης. Αποστειρώνονταν στην χύτρα στους 121 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά.

Violet Red Bile Agar (V.R.B.A.) – θρεπτικό ενσωμάτωσης

Το V.R.B.A χρησιμοποιούταν για ανάπτυξη κολοβακτηρίδια. Τα μικρόβια αναπτύσσονταν στους 30 βαθμούς κελσίου για 24 ώρες. Σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού περιέχονται 3 gr Yeast extract – 7 gr Balanced peptone No.1 – 5 gr Sodium chloride – 1.5 gr Bile salts No.3 – 10 gr Glycose - 0.03 gr Neutral red – 0.002 gr Crystal violet – 12 gr Agar No.2. Το pH κυμαίνεται στο 7.4 με απόκλιση 0.2.

Οδηγίες παρασκευής : σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού διαλύονται 38.5 gr σκόνης. Αποστειρώνονταν στην χύτρα στους 121 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά.

Bile Esculin Azide Agar (B.E.A.) – θρεπτικό επίστρωσης

Το B.E.A χρησιμοποιούταν για ανάπτυξη στρεπτόκοκκων. Τα μικρόβια αναπτύσσονταν στους 37 βαθμούς κελσίου για 48 ώρες. Σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού περιέχονται 17 gr peptone from casein – 5 gr Yeast extract – 3 gr peptone – 10 gr Ox bile dried – 5 gr Sodium chloride – 1 gr Aesculin – 0.5 gr Ammonium iron-III citrate – 0.15 gr Sodium azide – 13 gr Agar-agar. Το pH κυμαίνεται στο 7.1 με απόκλιση 0.2.

Οδηγίες παρασκευής : σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού διαλύονται 54.65 gr σκόνης. Αποστειρώνονται στην χύτρα στους 121 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά.

Baird-Parker medium base (B.P.) - θρεπτικό επίστρωσης

Το B.P. χρησιμοποιούταν για ανάπτυξη σταφυλόκοκκου. Τα μικρόβια αναπτύσσονταν στους 37 βαθμούς κελσίου για 48 ώρες.

Οδηγίες παρασκευής : σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού διαλύονται 63.5 gr.

Αποστειρώνεται στο αυτόκαυστο στους 121 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά.

Το θρεπτικό υλικό μετά την αποστείρωση έπρεπε να ψυχθεί στους 48 βαθμούς κελσίου και στην συνέχεια να προστεθεί ορός αυγού (X085). Για τον ορό αυγού προσθέταμε 50 ml στο 1 λίτρο θρεπτικού υλικού.

M.R.S. Agar - θρεπτικό επίστρωσης

Το M.R.S. Agar χρησιμοποιούταν για την ανάπτυξη λακτοβακίλλων. Τα μικρόβια αναπτύσσονταν στους 37 βαθμούς κελσίου για 4 ημέρες. Παρασκευαζόταν αναμειγνύοντας τα θρεπτικά υλικά de Man, Rogosa and Sharpe Broth (M.R.S. Broth) και Agar No.2 Bacteriological. Για το M.R.S. Broth σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού περιέχονται 10 gr mixed peptones – 5 gr Yeast extract – 10 gr Meat extract – 20 gr Glucose – 2 gr Potassium phosphate – 5 gr Sodium acetate – 0.2 gr Magnesium sulphate – 0.05 gr Manganese sulphate – 1.08 Tween 80 – 2 gr Ammonium citrate. Το pH κυμαίνεται στο 6.4 με απόκλιση 0.2.

Οδηγίες παρασκευής : σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού διαλύονται 55 gr σκόνης M.R.S. Broth. Επίσης σε 100 ml απιονισμένου νερού διαλύονται 2 gr σκόνης Agar No.2 Bacteriological. Αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο στους 121 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά.

Buffered Peptone Water

Το Buffered Peptone Water είναι ισότονο διάλυμα που αποτρέπει την καταστροφή των κυττάρων και σταματάει την ανάπτυξή τους. Χρησιμοποιείται κυρίως σε ζωικά δείγματα για ομογενοποίηση και αραίωση.

Οδηγίες παρασκευής : σε 1 λίτρο απιονισμένου νερού διαλύονται 20.1 gr σκόνης. Αποστειρώνονται στο αυτόκαυστο στους 121 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά.

7.3 Παρασκευή ¼ strength Ringers Solution

Το ¼ strength Ringers Solution είναι ισότονο διάλυμα που αποτρέπει την καταστροφή των κυττάρων και σταματάει την ανάπτυξή τους. Χρησιμοποιείται κυρίως σε δείγματα τροφίμων για ομογενοποίηση και αραίωση.

Οδηγίες παρασκευής : σε 500 ml απιονισμένου νερού διαλύεται μία ταμπλέτα. Για την διεξαγωγή μικροβιολογικών αναλύσεων το διάλυμα τοποθετούνταν σε σωληνάκια. Με την χρήση της αυτόματης πιπέτας τοποθετούνταν 9 ml του διαλύματος σε κάθε σωληνάκι. Η ποσότητα έπρεπε να είναι ακριβής. Στη συνέχεια τα σωληνάκια πωματίζονταν με βαμβάκι και αλουμινοχαρτο και αποστειρώνονταν στην χύτρα στους 121 βαθμούς κελσίου για 15 λεπτά.

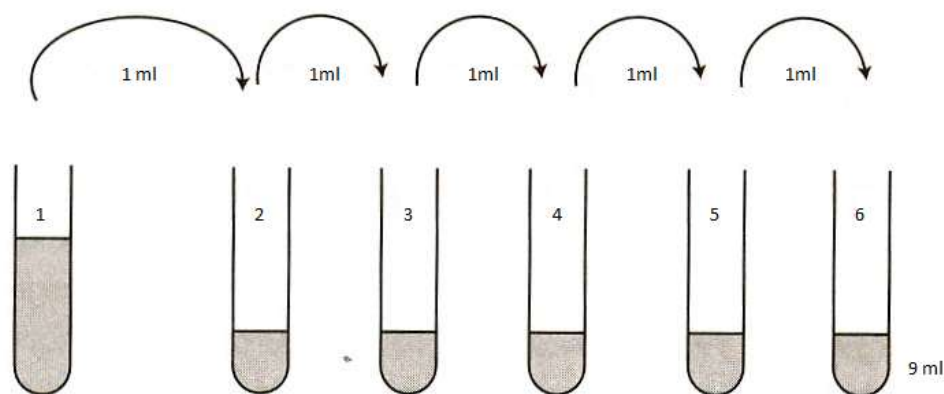
7.4 Επεξεργασία δειγμάτων

Τα δείγματα των ιστών, όταν αφαιρούνταν από τα ζώα, ήταν επικαλυμμένα με το αντίστοιχο εντερικό περιεχόμενο και αίμα. Για την ακεραιότητα των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων έπρεπε να καθαριστούν ώστε στο δείγμα να απομείνουν μόνο τα προσκολλημένα βακτήρια. Για τον καθαρισμό των ιστών, τα δείγματα ξεπλένονταν με αποστειρωμένο διάλυμα Pertone. Στη συνέχεια, γινόταν έντονη ανακίνηση των δειγμάτων σε μηχανήμα vortex (περίπου 15 min) και ακολουθούσε ομοιογενοποίηση των ιστών με αποστειρωμένες λαβίδες.

Η διαδικασία λάμβανε χώρα στον θάλαμο νηματικής ροής με την παρουσία του λυχναριού Bunsen.

7.5 Διαδοχικές αραιώσεις

Οι διαδοχικές αραιώσεις πραγματοποιούνταν στον θάλαμο νηματικής ροής αέρα και με τη χρήση του λυχναριού bunsen για άσηπτες συνθήκες. Το δείγμα τοποθετούνταν κοντά στο λυχνάρι μαζί με τα σωληνάκια που περιέχουν το διάλυμα Ringers για την αποτροπή επιμόλυνσης. Απομακρυνόταν το αλουμινόχαρτο και το βαμβάκι από τα σωληνάκια. Στη συνέχεια από το falcon που περιείχαν το δείγμα (1^η αραιώση), με την πιπέτα των 1000 μl, λαμβάνονταν 1 ml και τοποθετούνταν στο πρώτο σωληνάκι (2^η αραιώση). Το tip της πιπέτας έπρεπε να αλλάξει καθώς μεταβαίναμε από πυκνό προς αραιό διάλυμα. Αντίστοιχα από το πρώτο σωληνάκι λαμβάνονταν 1 ml και τοποθετούνταν στο δεύτερο σωληνάκι (3^η αραιώση). Το tip πάλι έπρεπε να αλλάξει για τον ίδιο λόγο. Η διαδικασία συνεχιζόταν με τον ίδιο τρόπο ανάλογα με τις αραιώσεις που έπρεπε να πραγματοποιηθούν.



Αρχικό δείγμα

Εικόνα 5. Διαδοχικές αραιώσεις.

Κουρκουτάς Ι., Εργαστηριακό φυλλάδιο Μοριακής Μικροβιολογίας

7.6 Καταμέτρηση αποικιών

- Στα τριβλία με θρεπτικό υλικό M.R.S. Agar αναπτύσσονται λακτοβάκιλλοι. Οι αποικίες εμφανίζονται μετά από 4 ημέρες επώασης, είναι αχνές ή άσπρες και το σχήμα τους είναι ακανόνιστο. Ακόμα υπάρχει περίπτωση ανάπτυξης άσπρων αποικιών με μυτερή επιφάνεια. Οι συγκεκριμένες αποικίες δεν είναι αποικίες λακτοβακίλλων και δεν πρέπει να καταμετρούνται.
- Στα τριβλία με θρεπτικό υλικό B.P. αναπτύσσονται σταφυλόκοκκοι. Οι αποικίες εμφανίζονται μετά από 2 ημέρες επώαση, είναι μαύρες, γυαλιστερές και γύρω τους αναπτύσσονται καθαρές ζώνες με διάμετρο 2-5 mm. Οι ζώνες αυτές εμφανίζονται λόγω της αντίδρασης με τον ορό του αυγού που προστίθεται στο θρεπτικό υλικό. Είναι δυνατόν να αναπτυχθούν άλλες αποικίες με άλλη μορφή, όπως καφέ αποικίες που αντιστοιχούν σε μικρόκοκκους, άσπρες αποικίες που αντιστοιχούν σε μύκητες και ματ καφέ αποικίες που αντιστοιχούν σε βάκιλλους ή Proteus.
- Στα τριβλία με θρεπτικό υλικό B.E.A. αναπτύσσονται στρεπτόκοκκοι. Οι αποικίες εμφανίζονται μετά από 2 ημέρες επώαση, είναι μαύρες, γυαλιστερές και περιβάλλονται από μια μαύρη ζώνη. Είναι πιθανόν να αναπτυχθούν γκρι ή ματ αποικίες οι οποίες δεν πρέπει να καταμετρούνται. Επίσης είναι πιθανόν να εμφανιστούν αποικίες με μορφή σταγόνας, οι οποίες δεν αποτελούν αποικία στρεπτόκοκκου.
- Στα τριβλία με θρεπτικό υλικό V.R.B.A. αναπτύσσονται κολοβακτηρίδια. Οι αποικίες εμφανίζονται μετά από 1 ημέρα επώαση, έχουν την μορφή σπορίων με βιολετί χρώμα και διάμετρο μεγαλύτερη ή ίση με 0,5 mm. Το χρώμα τους οφείλεται στην λακτόζη που περιέχεται στο θρεπτικό υλικό.
- Στα τριβλία με θρεπτικό υλικό V.R.B.G.A. αναπτύσσονται εντεροβακτηρίδια. Οι αποικίες εμφανίζονται μετά από 1 ημέρα επώαση, έχουν την μορφή σπορίων που περιβάλλονται από μια ζώνη με έντονο βιολετί χρώμα. Η διάμετρός τους είναι ίση ή μεγαλύτερη από 0,5 mm.
- Στα τριβλία με θρεπτικό υλικό P.C.A. αναπτύσσονται η ολική μεσόφιλη χλωρίδα. Οι αποικίες εμφανίζονται μετά από 4 ημέρες επώαση, δεν έχουν συγκεκριμένο σχήμα, είναι άσπρες ή αχνές.

7.7 Μεθοδολογία

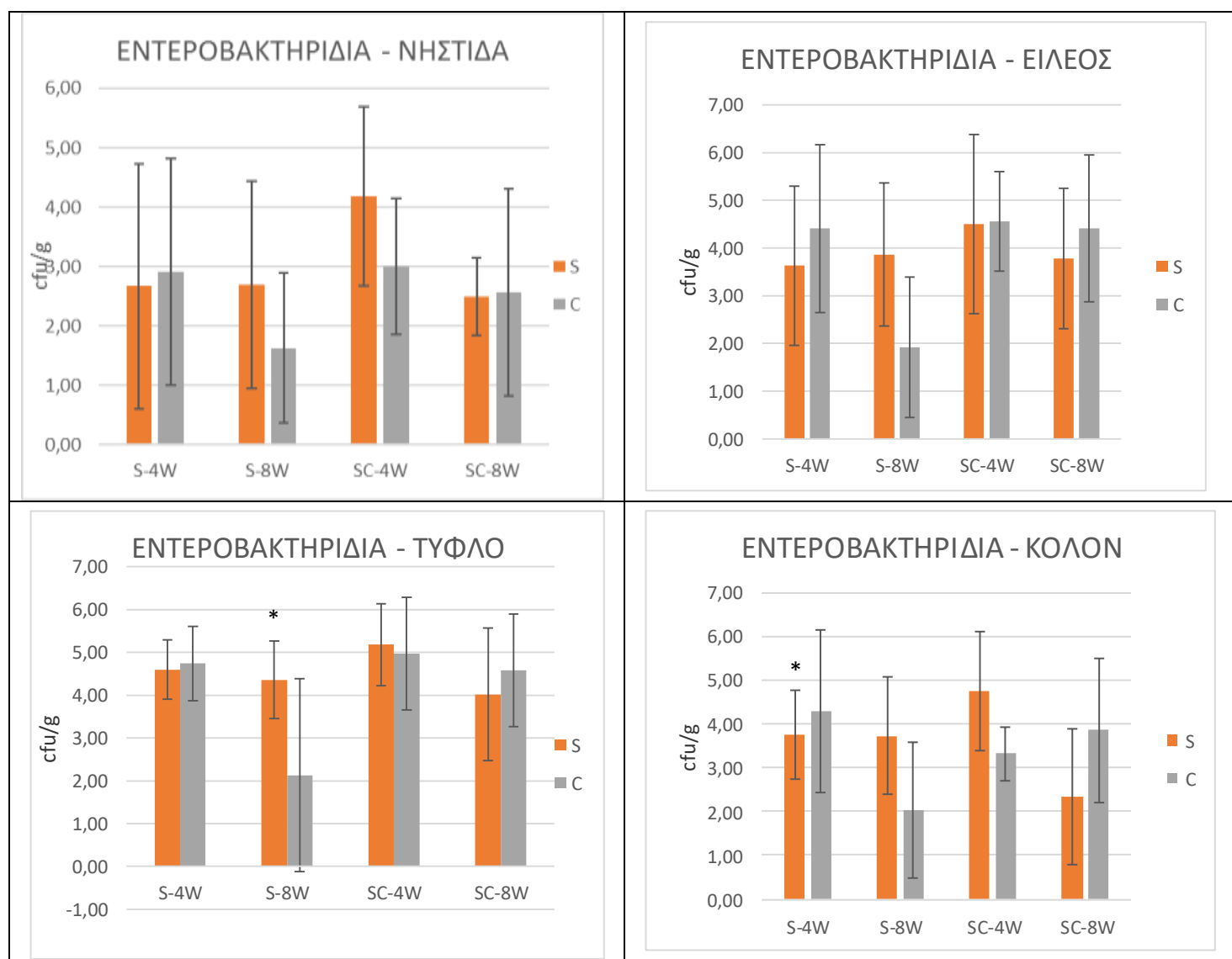
- Ζύγισμα των ιστών
- Καθαρισμός ιστών
- Προσθήκη Peptone στα falcons που περιέχουν τους ιστούς
- Ομογενοποίηση ιστών
- Διαδοχικές αραιώσεις
- Προσθήκη 100 μl δείγματος στα τριβλία με τα θρεπτικά ενσωμάτωσης και άπλωμα του δείγματος μέχρι να απορροφηθεί
- Προσθήκη 1ml δείγματος στα άδεια τριβλία που προορίζονται για ενσωμάτωση
- Προσθήκη των θρεπτικών ενσωμάτωσης στα τριβλία που περιέχουν μόνο το δείγμα
- Επώαση τριβλίων
- Καταμέτρηση αποικιών

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τον πρόγραμμα STATISTIKA version 10 και χρησιμοποιώντας τα εργαλεία ANOVA και t-test. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση του παράγοντα της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου, ως προς την επίδραση που έχουν στην μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου. Πιο αναλυτικά μελετήθηκε το κατά πόσο η έκθεση σε καπνό επιδρά σε κάθε ένα βακτηριακό πληθυσμό στον εντερικό ιστό του επίμυ. Τα αποτελέσματα που εμφανίζουν $p < 0,05$ θεωρούνται στατιστικά σημαντικά.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

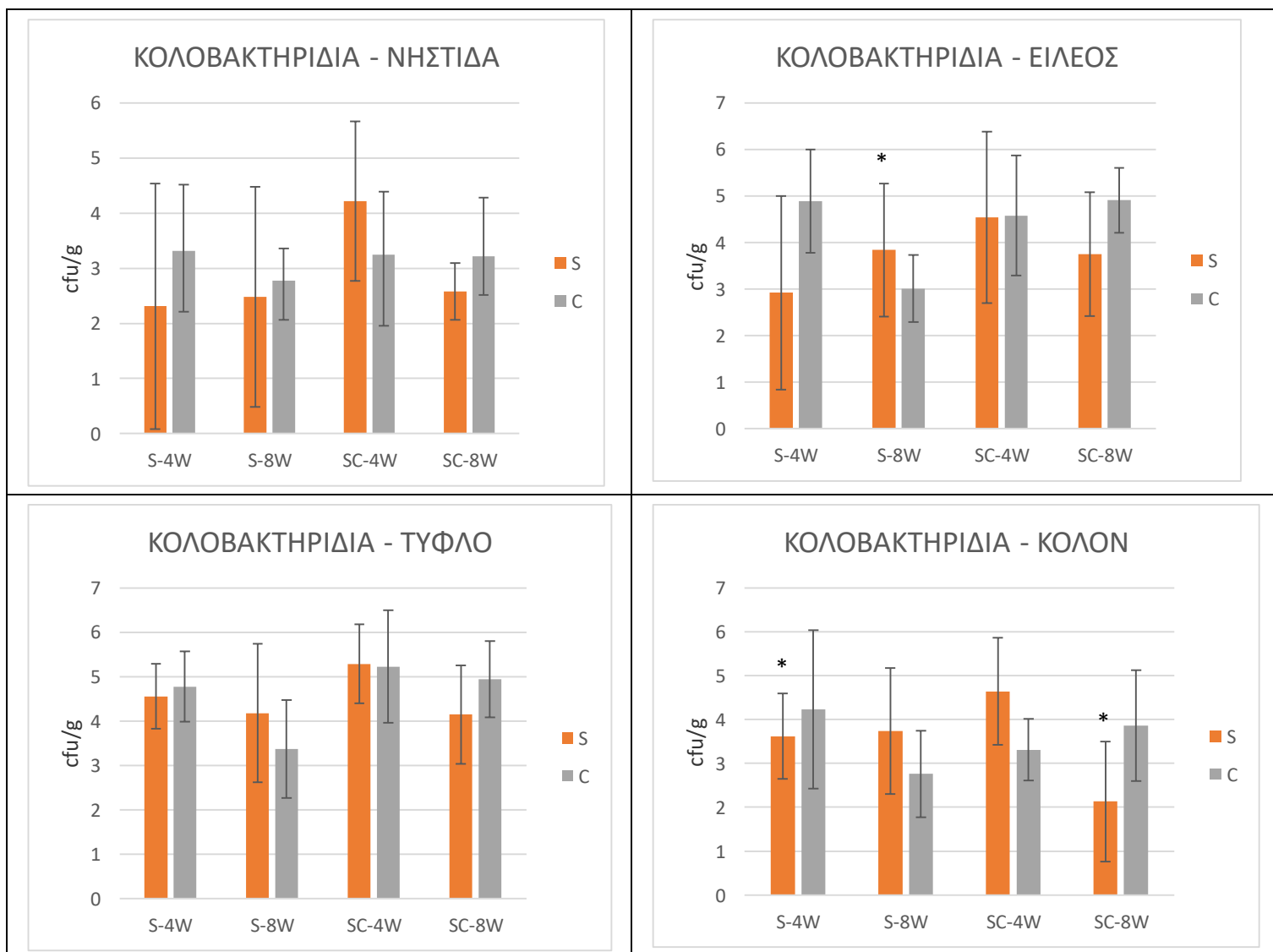
Στην έρευνα που διεξήγαμε, μελετήθηκε η επίδραση της διακοπής του καπνίσματος στην μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο των μικροβιολογικών αναλύσεων παρατηρήθηκαν οι αλλαγές που προκαλούνται στον εντερικό ιστό των επίμυων, στους βακτηριακούς πληθυσμούς των λακτοβακίλλων, των στρεπτόκοκκων, των σταφυλόκοκκων, των εντεροβακτηριδίων, των κολοβακτηριδίων και γενικά της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας του εντέρου. Οι επίμυες εκτέθηκαν σε καπνό τσιγάρου για 8 εβδομάδες και, αντίστοιχα, η περίοδος διακοπής του τσιγάρου διήρκησε ακόμα 8 εβδομάδες. Στις χρονικές περιόδους των 4 εβδομάδων της έκθεσης (S-4weeks) και των 8 εβδομάδων της έκθεσης (S-8weeks) πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία των ιστών. Αντίστοιχα, στις χρονικές περιόδους των 4 εβδομάδων διακοπής της έκθεσης (SC-4weeks) και των 8 εβδομάδων διακοπής της έκθεσης (SC-8weeks) πραγματοποιήθηκε η δειγματοληψία των ιστών. Συγκεκριμένα απομονώθηκε δείγμα από τη νήστιδα, τον ειλέο, το τυφλό και το κόλον. Τα αποτελέσματα, μετά από σύγκριση του κάθε βακτηρίου ξεχωριστά, για τις ομάδες S και C, είναι τα εξής :



Εικόνα 1. Οι μεταβολές του βακτηριακού πληθυσμού των εντεροβακτηριδίων κατά την περίοδο της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου (S-4weeks, S-8weeks) και την περίοδο διακοπής της έκθεσης (SC-4weeks, SC-8weeks) στα ιστολογικά τμήματα της Νήστιδας, του Είλεου, του Τυφλού και του Κόλου. Με αστεράκι συμβολίζεται η στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control vs smoke για κάθε timepoint.

Την 8^η εβδομάδα έκθεσης σε καπνό τσιγάρου παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός των εντεροβακτηριδίων της ομάδας S ήταν σημαντικά υψηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στο τυφλό (παρουσιάζεται στην Εικόνα 1 με αστεράκι).

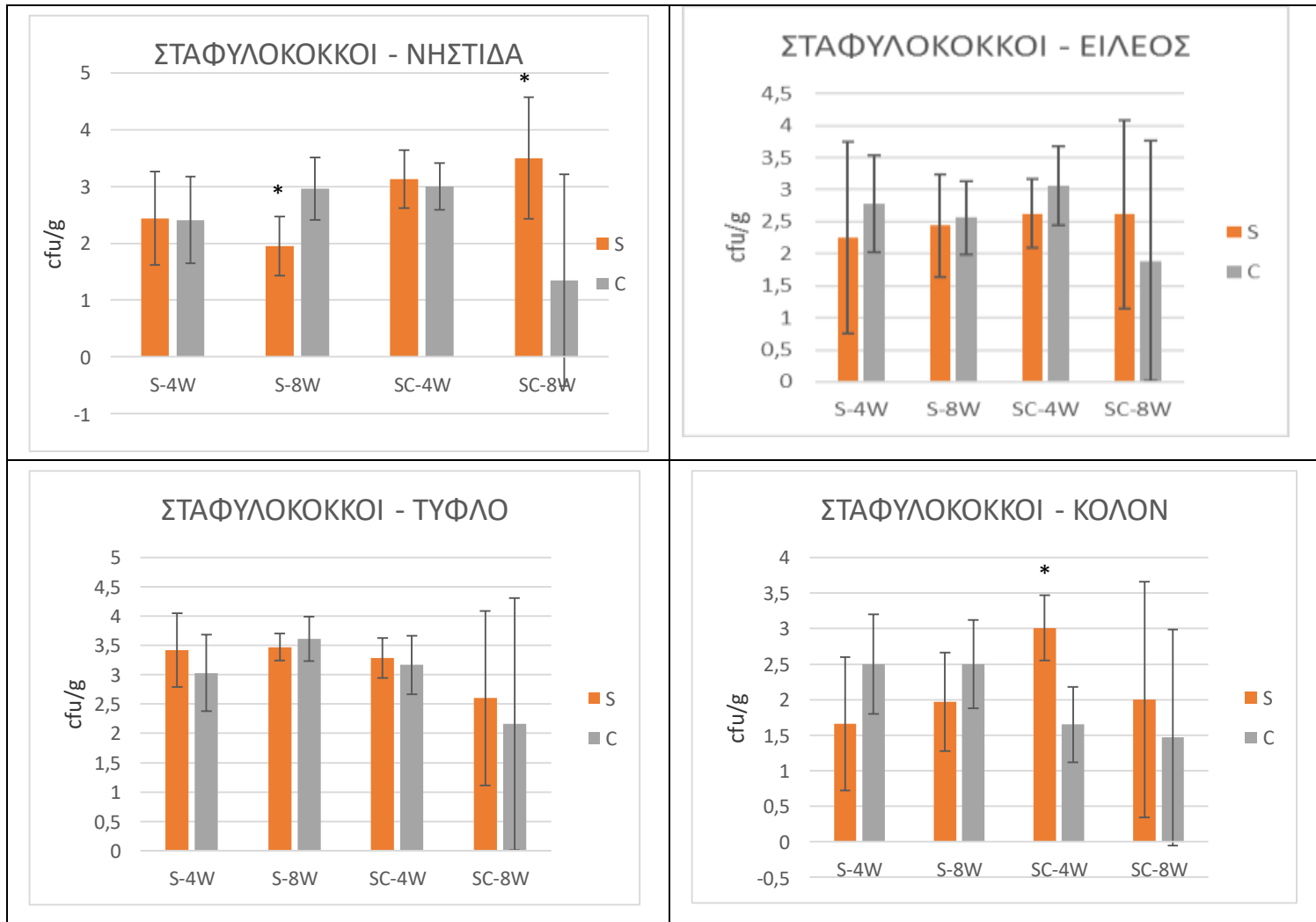
Την 4^η εβδομάδα έκθεσης σε καπνό τσιγάρου παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός των εντεροβακτηριδίων της ομάδας S ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στο κόλον (παρουσιάζεται στην Εικόνα 1 με αστεράκι).



Εικόνα 2. Οι μεταβολές του βακτηριακού πληθυσμού των κολοβακτηριδίων κατά την περίοδο της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου (S-4weeks, S-8weeks) και την περίοδο διακοπής της έκθεσης (SC-4weeks, SC-8weeks) στα ιστολογικά τμήματα της Νήστιδας, του Είλεου, του Τυφλού και του Κόλου. Με αστεράκι συμβολίζεται η στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control vs smoke για κάθε timepoint.

Την 8^η εβδομάδα της έκθεσης παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός των κολοβακτηριδίων της ομάδας S ήταν σημαντικά υψηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στον ειλέο (παρουσιάζεται στην Εικόνα 2 με αστεράκι).

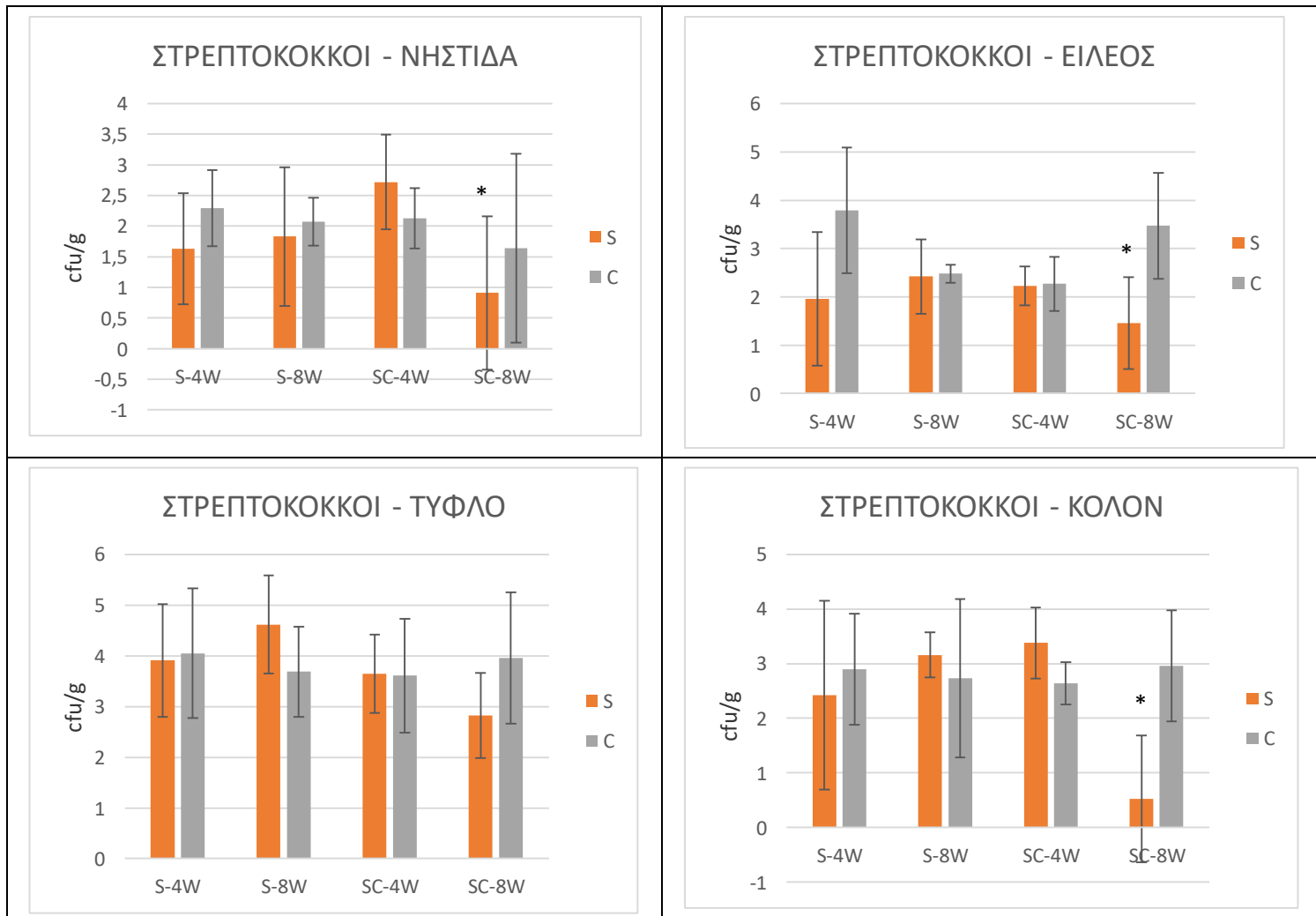
Την 4^η εβδομάδα της έκθεσης παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός των κολοβακτηριδίων της ομάδας S ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στο κόλον (παρουσιάζεται στην Εικόνα 2 με αστεράκι). Επιπλέον την 8^η εβδομάδα διακοπής της έκθεσης παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός των κολοβακτηριδίων της ομάδας S ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στο κόλον (παρουσιάζεται στην Εικόνα 2 με αστεράκι).



Εικόνα 3. Οι μεταβολές του βακτηριακού πληθυσμού των σταφυλόκοκκων κατά την περίοδο της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου (S-4weeks, S-8weeks) και την περίοδο διακοπής της έκθεσης (SC-4weeks, SC-8weeks) στα ιστολογικά τμήματα της Νήστιδας, του Ειλεού, του Τυφλού και του Κόλου. Με αστεράκι συμβολίζεται η στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control vs smoke για κάθε timepoint.

Την 8^η εβδομάδα έκθεσης σε καπνό τσιγάρου, παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός των σταφυλόκοκκων της ομάδας S ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στη νήστιδα (παρουσιάζεται στην Εικόνα 3 με αστεράκι). Επιπλέον την 8^η εβδομάδα διακοπής της έκθεσης, παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός των σταφυλόκοκκων της ομάδας S ήταν σημαντικά υψηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στη νήστιδα (παρουσιάζεται στην Εικόνα 3 με αστεράκι).

Την 4^η εβδομάδα διακοπής της έκθεσης, παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός των σταφυλόκοκκων της ομάδας S ήταν σημαντικά υψηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στο κόλον (παρουσιάζεται στην Εικόνα 3 με αστεράκι).

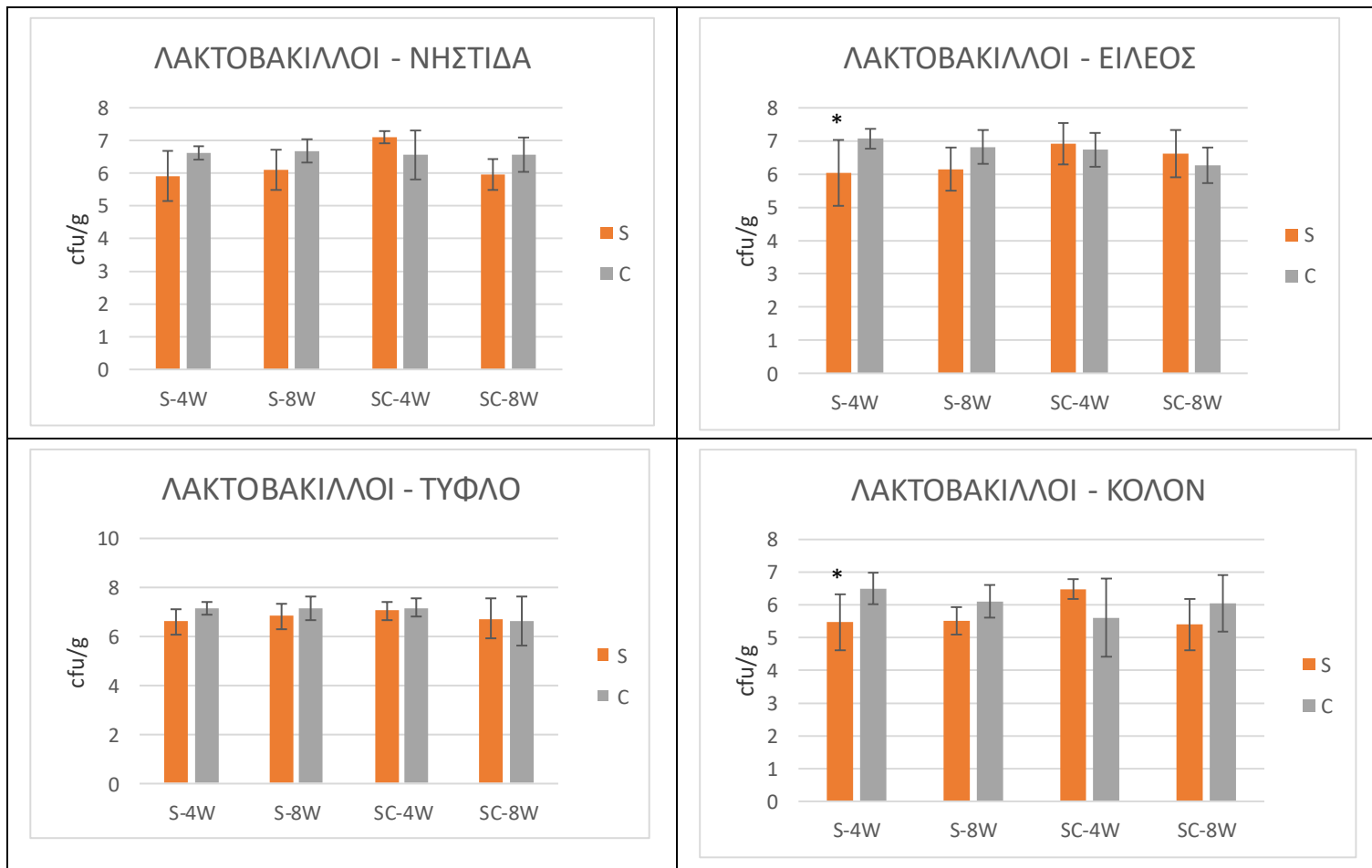


Εικόνα 4. Οι μεταβολές του βακτηριακού πληθυσμού των στρεπτόκοκκων κατά την περίοδο της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου (S-4weeks, S-8weeks) και την περίοδο διακοπής της έκθεσης (SC-4weeks, SC-8weeks) στα ιστολογικά τμήματα της Νήστιδας, του Ειλεού, του Τυφλού και του Κόλου. Με αστεράκι συμβολίζεται η στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control vs smoke για κάθε timepoint.

Την 8^η εβδομάδα διακοπής της έκθεσης, παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός των στρεπτόκοκκων της ομάδας S ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στη νήστιδα (παρουσιάζεται στην Εικόνα 4 με αστεράκι).

Την 8^η εβδομάδα διακοπής της έκθεσης, παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός των στρεπτόκοκκων της ομάδας S ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στον ειλέο (παρουσιάζεται στην Εικόνα 4 με αστεράκι).

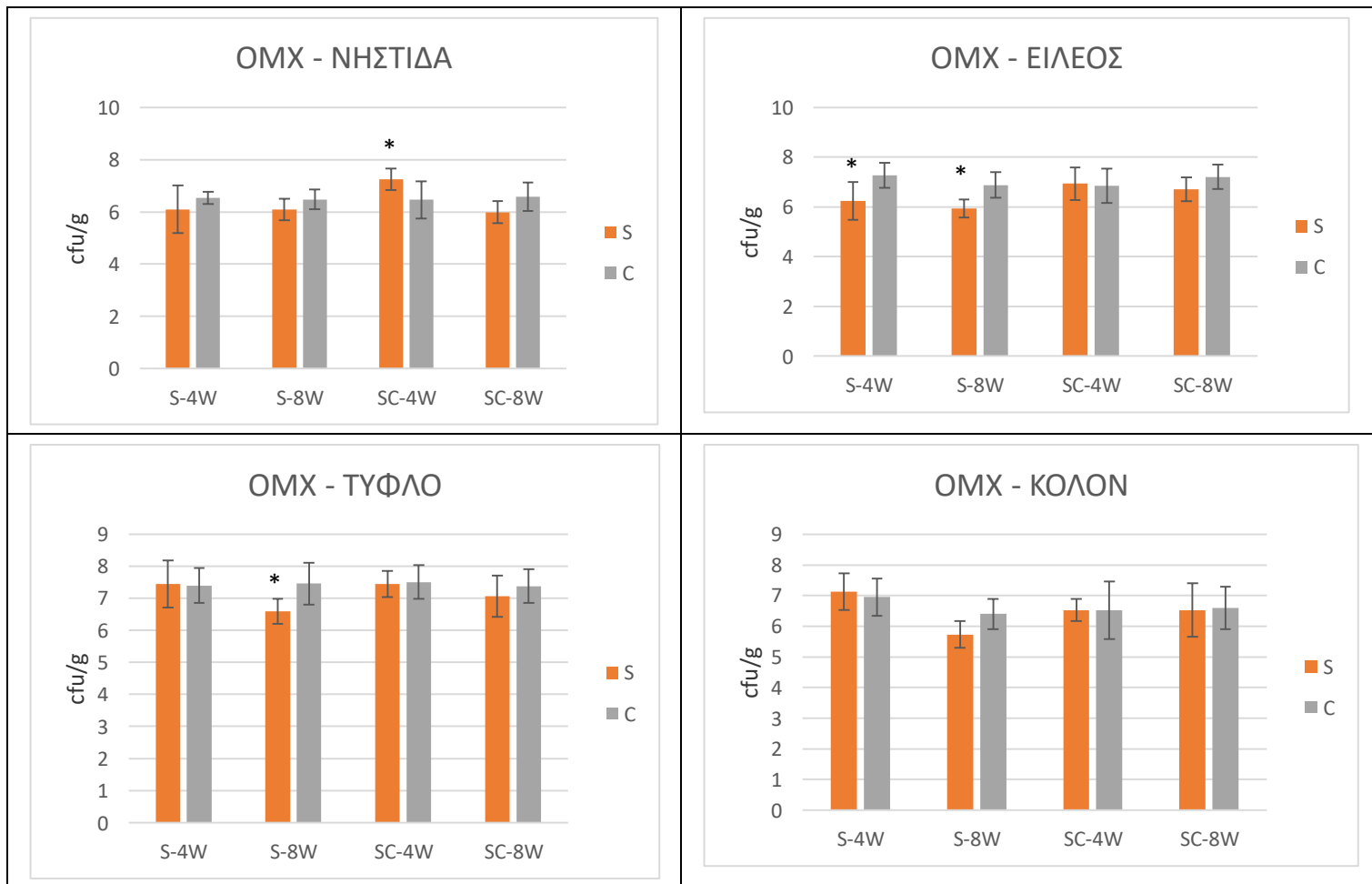
Την 8^η εβδομάδα διακοπής της έκθεσης, παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός των στρεπτόκοκκων της ομάδας S ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στο κόλον (παρουσιάζεται στην Εικόνα 4 με αστεράκι).



Εικόνα 5. Οι μεταβολές του βακτηριακού πληθυσμού των λακτοβακίλλων κατά την περίοδο της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου (S-4weeks, S-8weeks) και την περίοδο διακοπής της έκθεσης (SC-4weeks, SC-8weeks) στα ιστολογικά τμήματα της Νήστιδας, του Ειλεού, του Τυφλού και του Κόλου. Με αστεράκι συμβολίζεται η στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control vs smoke για κάθε timepoint.

Την 4^η εβδομάδα έκθεσης σε καπνό τσιγάρου παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός των λακτοβακίλλων της ομάδας S ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στον ειλέο (παρουσιάζεται στην Εικόνα 5 με αστεράκι).

Την 4^η εβδομάδα έκθεσης σε καπνό τσιγάρου παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός των λακτοβακίλλων της ομάδας S ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στο κόλον (παρουσιάζεται στην Εικόνα 5 με αστεράκι).



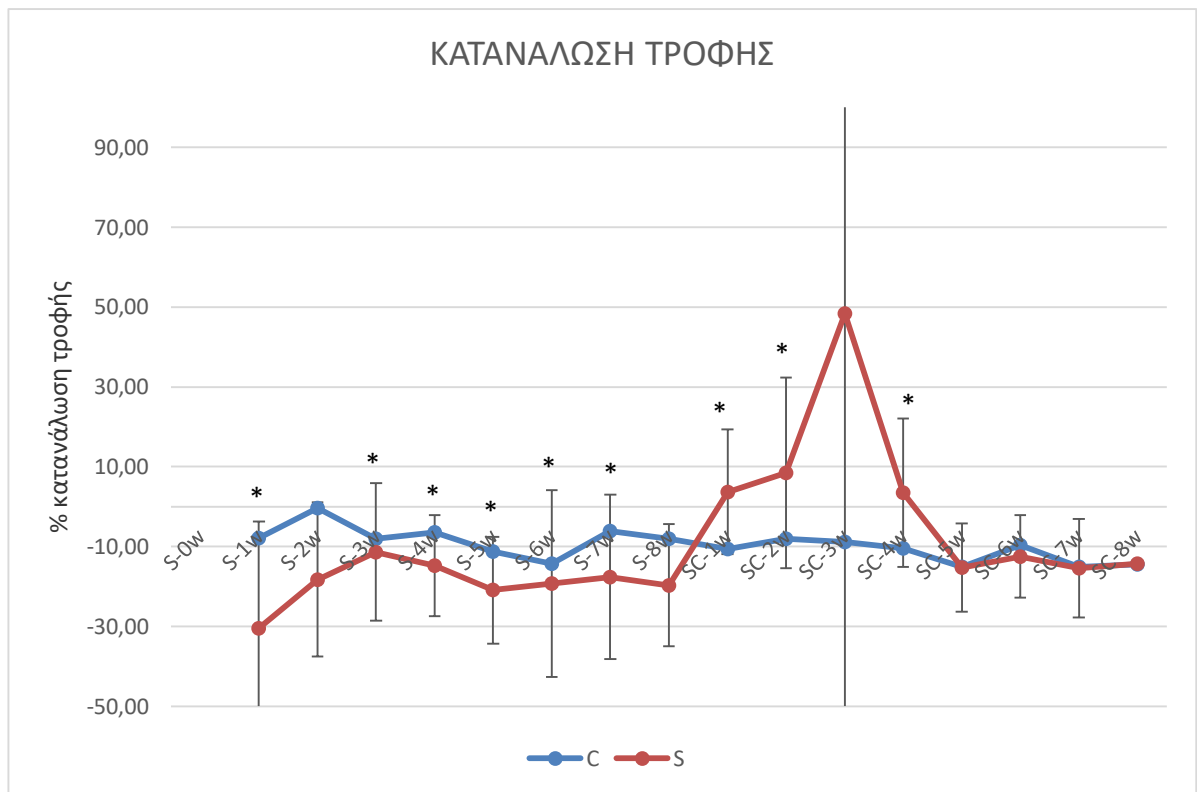
Εικόνα 6. Οι μεταβολές του βακτηριακού πληθυσμού της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (OMX) κατά την περίοδο της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου (S-4weeks, S-8weeks) και την περίοδο διακοπής της έκθεσης (SC-4weeks, SC-8weeks) στα ιστολογικά τμήματα της Νήστιδας, του Ειλεού, του Τυφλού και του Κόλου. Με αστεράκι συμβολίζεται η στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων control vs smoke για κάθε timepoint.

Την 4^η εβδομάδα διακοπής του καπνίσματος, παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός της OMX της ομάδας S ήταν σημαντικά υψηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στη νήστιδα (παρουσιάζεται στην Εικόνα 6 με αστεράκι).

Την 4^η εβδομάδα της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου, παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός της OMX της ομάδας S ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στον ειλέο (παρουσιάζεται στην Εικόνα 6 με αστεράκι). Επίσης την 8^η εβδομάδα της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου, παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός της OMX της ομάδας S ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στον ειλέο (παρουσιάζεται στην Εικόνα 6 με αστεράκι).

Την 8^η εβδομάδα της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου, παρατηρήθηκε πως ο πληθυσμός της OMX της ομάδας S ήταν σημαντικά χαμηλότερος από εκείνον της ομάδας C ($p < 0,05$), στο τυφλό (παρουσιάζεται στην Εικόνα 6 με αστεράκι).

Όσον αφορά την κατανάλωση της τροφής τα αποτελέσματα είναι τα εξής :



Εικόνα 7. Παρουσιάζεται η ποσοστιαία μεταβολή της κατανάλωσης της τροφής της ομάδας S και της ομάδας C. Η μεταβολή υπολογίστηκε με βάση την αρχική τιμή την S-0w. Με αστεράκι παρουσιάζονται τα στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα ανάμεσα στην ομάδα S και την ομάδα C.

Από την σύγκριση στην κατανάλωση τροφής, ανάμεσα στις ομάδες S και C, παρατηρούμε πως στην ομάδα S η κατανάλωση της τροφής ήταν σημαντικά χαμηλότερη ($p < 0,05$) από εκείνη της ομάδας C την 1^η και από την 3^η έως και την 7^η εβδομάδα της περιόδου έκθεσης στον καπνό. Αντιθέτως, την περίοδο διακοπής στην έκθεση στον καπνό, ήταν σημαντικά υψηλότερη ($p < 0,05$) από την 1^η έως και την 4^η εβδομάδα (Εικόνα 7).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην έρευνα που πραγματοποιήσαμε, χρησιμοποιώντας την μέθοδο των μικροβιολογικών αναλύσεων, ανιχνεύτηκαν οι αλλαγές που υφίσταται η μικροβιακή χλωρίδα του εντερικού ιστού, στον επίμυ, τόσο σε μια περίοδο έκθεσης σε καπνό, όσο και σε μια περίοδο διακοπής της έκθεσης. Σκοπός της έρευνας ήταν να παρατηρηθούν οι αλλαγές στους βακτηριακούς πληθυσμούς των εντεροβακτηριδίων, των κολοβακτηριδίων, των σταφυλόκοκκων, των στρεπτόκοκκων, των λακτοβακίλλων και γενικά της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας. Τα τμήματα του εντέρου που μελετήθηκαν, για τις παραπάνω αλλαγές, ήταν η νήστιδα, ο ειλεός, το τυφλό και το κόλον. Από την έρευνα που πραγματοποιήθηκε κατέστη δυνατόν να ανιχνευθούν αλλαγές στα εντεροβακτηρίδια του τυφλού, στα κολοβακτηρίδια του κόλου, στους σταφυλόκοκκους της νήστιδας και του κόλου, στους στρεπτόκοκκους της νήστιδας, του ειλεού και του κόλου, στους λακτοβάκιλλους του ειλεού και του κόλου, και στην ολική μεσόφιλη χλωρίδα της νήστιδας, του ειλεού και του τυφλού.

Και άλλες μελέτες ασχολήθηκαν με τις μεταβολές στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου υπό την επίδραση του καπνίσματος και της διακοπής του. Σύμφωνα με αυτές παρατηρήθηκε μείωση του φύλου των *Firmicutes* και της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* υπό την έκθεση σε καπνό μέσω παθητικής ροής, σε ποντίκια (Wang et al., 2012). Από άλλη έρευνα παρατηρήθηκε πως, μετά τη διακοπή του καπνίσματος, εμφανίζεται μία αύξηση των αλληλουχιών των ειδών *Firmicutes* και *Actinobacteria* και μία ταυτόχρονη μείωση αυτών των *Proteobacteria* και των *Bacteroidetes* (Biedermann, 2013). Πιο αναλυτικά, τα είδη *Prevotella* και *Bacteroides* εμφάνισαν μείωση του πληθυσμού τους, φτάνοντας σε σημαντικά ποσοστά την 4η εβδομάδα μετά την διακοπή του καπνίσματος. Επιπλέον ο προσδιορισμός της σχετικής αφθονίας των *b-* και *g-* *Proteobacteria* κατέδειξε μία σημαντική μείωση 4 και 8 εβδομάδες μετά τη διακοπή του καπνίσματος (Biedermann, 2014). Τα εντεροβακτηρίδια και τα κολοβακτηρίδια ανήκουν στο φύλο των *Proteobacteria*, στην κλάση *Gamma**proteobacteria* και στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*. Οι λακτοβάκιλλοι, οι σταφυλόκοκκοι και οι στρεπτόκοκκοι ανήκουν στο φύλο *Firmicutes*. Επομένως από την επίδραση του καπνού προκαλείται μείωση στον πληθυσμό των εντεροβακτηριδίων, των κολοβακτηριδίων, των λακτοβακίλλων, των σταφυλόκοκκων και των στρεπτόκοκκων. Μετά την διακοπή της έκθεσης προκαλείται μείωση των εντεροβακτηριδίων και των κολοβακτηριδίων και αύξηση των λακτοβακίλλων, των σταφυλόκοκκων και των στρεπτόκοκκων.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός πως η μικροβιακή σύνθεση μετά τη διακοπή του καπνίσματος υφίσταται παρόμοιες αλλαγές όπως αυτή των παχύσαρκων ατόμων, δηλαδή χαμηλότερο ποσοστό των *Bacteroidetes* και ένα υψηλότερο ποσοστό των *Firmicutes* και *Actinobacteria*. (Biedermann, 2013).

Επιπλέον το κάπνισμα προκαλεί μέχρι και 90% όλων των καρκίνων του πνεύμονα, και είναι ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για εγκεφαλικό επεισόδιο και καρδιακή προσβολή. Αναγνωρίζεται επίσης ως παράγοντας κινδύνου για μία ποικιλία λοιμώξεων της αναπνευστικής οδού, σε παιδιά και ενήλικες, συμπεριλαμβανομένης της κοινής γρίπης, της πνευμονίας και της φυματίωσης (Arcavi and Benowitz et al., 2004).

Το κάπνισμα και η διακοπή του επιδρούν και στο μεταβολικό και ορμονικό σύστημα. Η νικοτίνη που περιέχεται στο τσιγάρο αυξάνει την δαπάνη ενέργειας και μειώνει την όρεξη. Για τον παραπάνω λόγο οι καπνιστές μπορεί να χάνουν βάρος (Chiolero et al., 2008). Η διακοπή του καπνίσματος προκαλεί μείωση του

μεταβολικού ρυθμού και αλλαγές στο μεταβολισμό του λιπώδους ιστού. Επίσης επιδρά στις ορμόνες της λεπτίνης και της γκερλίνης, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την ρύθμιση της όρεξης (Yrsilantis et al., 2013). Επιπλέον το κάπνισμα μπορεί να έχει διεγερτική επίδραση και στη ρύθμιση των ορμονών του θυροειδή. Συγκεκριμένα η νικοτίνη στο τσιγάρο μπορεί να είναι υπεύθυνη για την αυξημένη έκκριση ορμονών από τον θυροειδή. Οι ορμόνες της υπόφυσης ρυθμίζονται, και αυτές, από την νικοτίνη που περιέχεται στο τσιγάρο. Έχει αποδειχθεί πως όσο περισσότερη νικοτίνη περιέχεται στο τσιγάρο τόσο περισσότερες ορμόνες της υπόφυσης εκκρίνονται. Τέλος το κάπνισμα επιδρά και στις στεροειδείς ορμόνες, αυξάνοντας την κυκλοφορία της κορτιζόλης (Karoor and Jones, 2005). Όπως παρατηρούμε, και από τα αποτελέσματα της έρευνας μας όσον αφορά την κατανάλωση της τροφής, οι επίμυες της ομάδας S καταναλώνουν μικρότερη ποσότητα τροφής σε σχέση με την ομάδα C κατά την διάρκεια της έκθεσης σε καπνό. Τα αντίθετα αποτελέσματα εμφανίζονται κατά την περίοδο διακοπής της έκθεσης. Οι παραπάνω επιδράσεις, του τσιγάρου και των συστατικών του, στην ρύθμιση των ορμονών της όρεξης μπορούν να εξηγήσουν τις απότομες αυξομειώσεις στην κατανάλωση της τροφής.

Στους ανθρώπους αλλά και σε ζωικά μοντέλα που πάσχουν από παχυσαρκία, παρατηρείται πως οι αλλαγές που πραγματοποιούνται στην μικροβιακή χλωρίδα, δηλαδή η αύξηση του φύλου *Firmicutes* και η μείωση του φύλου *Bacteroidetes*, ενδεχομένως συμβάλουν στην παχυσαρκία, λόγω μεγαλύτερης ενεργειακής συγκομιδής (Ley et al., 2005 & Ley. et al., 2006). Άλλες μελέτες παρουσιάζουν στοιχεία που δείχνουν ότι η μικροχλωρίδα του εντέρου παίζει σημαντικό ρόλο στη συγκομιδή, την αποθήκευση, και τις δαπάνες της ενέργειας που προέρχεται από την διατροφή. Επιπλέον, η σύνθεση της μικροχλωρίδας του εντέρου έχει αποδειχθεί ότι διαφέρει μεταξύ αδύνατων και παχύσαρκων ανθρώπων και ποντικών και αλλάζει γρήγορα σε απόκριση σε διατροφικούς παράγοντες (Krajmalnik-Brown et al., 2012). Ένας μηχανισμός δράσης μπορεί να είναι ο εξής : τα εντεροκύτταρα ανιχνεύουν την παραγωγή των λιπαρών οξέων κοκτικής αλυσίδα που παράγονται από τα βακτήρια του εντέρου και ενεργοποιούν την παραγωγή της λεπτίνης. Η λεπτίνη με την σειρά της μεταφέρει σήματα στον εγκέφαλο ώστε να ρυθμιστούν οι δαπάνες ενέργειας και η όρεξη (Saltiel and Kahn, 2001). Επομένως η κατανάλωση της τροφής συνδέεται με τις αλλαγές στην μικροβιακή χλωρίδα.

Στην έρευνα μας, επιλέχθηκε να μελετηθούν οι βακτηριακοί πληθυσμοί του εντερικού ιστού και όχι του περιεχομένου του εντέρου. Καταφύγαμε στην απόφαση αυτή, ορμώμενοι από την σκέψη πως οι βακτηριακοί πληθυσμοί του περιεχομένου διαμορφώνονται κατά την διέλευσή του από όλα τα τμήματα του εντέρου ενώ με την ανίχνευση μικροβίων που προσκολλώνται στον εντερικό βλεννογόνο προσδιορίζονται με μεγαλύτερη ακρίβεια οι μικροβιακοί πληθυσμοί οι οποίοι αναπτύσσονται σε συγκεκριμένα τμήματα του εντέρου. Επομένως η μικροβιολογική ανάλυση του περιεχομένου δεν θα μπορούσε να μας υποδείξει το τμήμα του εντέρου που διαμορφώνονται οι αλλαγές στους βακτηριακούς πληθυσμούς. Απόδειξη τούτου ήταν το γεγονός που παρατηρήθηκε σε πιλοτικά πειράματα στα οποία διαπιστώσαμε μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του εντερικού ιστού, ενώ ταυτόχρονα δεν υπήρχαν αντίστοιχες μεταβολές στο εντερικό περιεχόμενο.

Έτσι τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την έρευνα μας είναι τα εξής : τα εντεροβακτηρίδια μειώνονται την 4^η εβδομάδα της έκθεσης στο κόλον και αυξάνονται την 8^η εβδομάδα έκθεσης σε καπνό τσιγάρου στο τυφλό. Τα κολοβακτηρίδια αυξάνονται την 8^η εβδομάδα της έκθεσης στον ειλεό, μειώνονται την 4^η εβδομάδα της έκθεσης στο κόλον, και μειώνονται 8^η εβδομάδα διακοπής της έκθεσης στο κόλον. Οι σταφυλόκοκκοι μειώνονται την 8^η εβδομάδα έκθεσης σε

καπνό. Αντίθετα αυξάνονται την 4η εβδομάδα διακοπής της έκθεσης στο κόλον, όπως επίσης αυξάνονται και την 8η εβδομάδα διακοπής της έκθεσης στη νήστιδα. Οι στρεπτόκοκκοι μειώνονται την 8η εβδομάδα διακοπής της έκθεσης στη νήστιδα, στον ειλέο και το κόλον. Οι λακτοβάκιλλοι μειώνονται την 4η εβδομάδα της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου στον ειλέο και στο κόλον. Τέλος η ολική μεσόφιλη χλωρίδα αυξάνεται την 4η εβδομάδα διακοπής της έκθεσης στη νήστιδα, μειώνεται την 4η και 8η εβδομάδα της έκθεσης στον ειλέο, και μειώνεται την 8η εβδομάδα της έκθεσης στο τυφλό.

Τα αποτελέσματα της έρευνας διαφέρουν αλλά και συμφωνούν με άλλων ερευνών. Η μείωση των εντεροβακτηριδίων στο κόλον την 4^η εβδομάδα της έκθεσης συμφωνεί με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών (Wang et al., 2012). Αντιθέτως η αύξηση των εντεροβακτηρίων στο τυφλό κατά την περίοδο της έκθεσης διαφέρει με άλλες έρευνες (Wang et al., 2012). Αυτό ίσως να οφείλεται πως η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο περιεχόμενο του εντέρου και όχι στον εντερικό ιστό. Η αύξηση των κολοβακτηριδίων την 8^η εβδομάδα της έκθεσης έρχεται σε αντίθεση με άλλες έρευνες (Wang et al., 2012). Αυτό όπως αναφέρθηκε και παραπάνω ίσως να οφείλεται πως η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο περιεχόμενο του εντέρου και όχι στον εντερικό ιστό. Τα αποτελέσματα μας όσον αφορά τα υπόλοιπα κολοβακτηρίδια, τους σταφυλόκοκκους και τους λακτοβάκιλλους συμφωνούν με άλλων ερευνών (Wang et al., 2012 & Biedermann, 2013 & Biedermann, 2014). Αντίθετα τα αποτελέσματά μας όσον αφορά τους στρεπτόκοκκους διαφέρουν με άλλες έρευνες. (Wang et al., 2012 & Biedermann, 2013). Αυτό ίσως να οφείλεται πως η μελέτη Wang et al., 2012 πραγματοποιήθηκε στο περιεχόμενο του εντέρου και όχι στον εντερικό ιστό και η μελέτη Biedermann, 2013 πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινο δείγμα. Το καινοτόμο στην συγκεκριμένη έρευνα είναι πως μελετάει τις αλλαγές στη μικροβιακή χλωρίδα του εντερικού ιστού στα διάφορα τμήματά του. Μελλοντικές έρευνες θα πρέπει να επικεντρωθούν στην μελέτη του συγκεκριμένου θέματος καθώς είναι εμφανές πως το κάπνισμα και η διακοπή του επηρεάζουν σε διαφορετικό βαθμό τον κάθε βακτηριακό πληθυσμό σε κάθε τμήμα του εντέρου. Τέλος η σύνδεση των αλλαγών της μικροβιακής χλωρίδας με τις αυξομειώσεις του βάρους και την κατανάλωση της τροφής, κατά την περίοδο του καπνίσματος και της διακοπής του, μπορεί να αποτελέσει ενδιαφέρον έρευνα.

Όσον αφορά την κατανάλωση της τροφής παρατηρούμε πως την περίοδο έκθεσης των πειραματοζώων στον καπνό τσιγάρου μειώθηκε η κατανάλωση της τροφής, η οποία αυξήθηκε σημαντικά τις πρώτες 4 εβδομάδες μετά τη διακοπή της έκθεσης. Τα αποτελέσματα μας αυτά συμφωνούν με άλλων ερευνών στις οποίες παρουσιάζεται πως η κατανάλωση της τροφής μειώνεται κατά την περίοδο της έκθεσης και αυξάνεται απότομα κατά τις πρώτες εβδομάδες της διακοπής της έκθεσης. Στο τέλος της περιόδου της διακοπής της έκθεσης τα επίπεδα της κατανάλωσης της τροφής της ομάδας S τείνουν προς αυτά της ομάδας C (Ypsilantis et al., 2013). Αξίζει να διερευνηθεί σε μελλοντικές μελέτες η πιθανή συσχέτιση των μεταβολών της κατανάλωσης τροφής με τη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου σε ζωικό μοντέλο επίμυ.

Συμπερασματικά παρατηρούμε πως το κάπνισμα και η διακοπή του επιδρά με διαφορετικό βαθμό σε κάθε βακτηριακό πληθυσμό και σε κάθε τμήμα του εντερικού ιστού. Παρατηρούμε πως τα εντεροβακτηρίδια αυξάνονται, από την έκθεση σε καπνό, στο τυφλό και μειώνονται στο κόλον. Τα κολοβακτηρίδια αυξάνονται κατά την περίοδο της έκθεσης στον ειλέο και μειώνονται κατά την περίοδο της έκθεσης και της διακοπής της έκθεσης στο κόλον. Οι σταφυλόκοκκοι μειώνονται κατά την περίοδο της έκθεσης στη νήστιδα και αυξάνονται κατά την περίοδο διακοπής της έκθεσης στο

κόλον και στη νήστιδα. Οι στρεπτόκοκκοι μειώνονται κατά την περίοδο διακοπής της έκθεσης στη νήστιδα, στον ειλεό και στο κόλον. Οι λακτοβάκιλλοι μειώνονται, κατά την περίοδο έκθεσης σε καπνό, στον ειλεό και στο κόλον. Τέλος η ολική μεσόφιλη χλωρίδα μειώνεται, κατά την περίοδο έκθεσης σε καπνό, στον ειλεό και στο τυφλό, και αυξάνεται κατά την περίοδο της διακοπής της έκθεσης στη νήστιδα. Επιπλέον η κατανάλωση της τροφής μειώνεται υπό την επίδραση της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου. Αυξάνεται κατά τις πρώτες εβδομάδες διακοπής της έκθεσης, ενώ στο τέλος της περιόδου της διακοπής της έκθεσης επανέρχεται στα φυσιολογικά επίπεδα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αναφέρεται στις αλλαγές που πραγματοποιούνται στη μικροβιακή χλωρίδα του εντερικού ιστού των επίμυων υπό την επίδραση της έκθεσης σε καπνό τσιγάρου και της διακοπής της. Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό 29 επίμυες τέθηκαν σε διαδικασία έκθεσης σε καπνό τσιγάρου για 8 εβδομάδες και σε διαδικασία διακοπής της έκθεσης για ακόμα 8 εβδομάδες (ομάδα S). Μια δεύτερη ομάδα περιλάμβανε 22 επίμυες οι οποίες αποτελούσαν την ομάδα ελέγχου και δεν υποβλήθηκαν σε οποιαδήποτε διαδικασία (ομάδα C). Στις 4 και 8 εβδομάδες, τόσο της περιόδου έκθεσης σε καπνό, όσο και της περιόδου διακοπής της έκθεσης, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία του εντερικού ιστού από επίμυες των ομάδων S και C. Τα δείγματα απομονώθηκαν από τη νήστιδα, τον ειλεό, το τυφλό και το κόλον. Οι ιστοί καθαρίστηκαν, και μετά την ομογενοποίησή τους, αναλύθηκαν με την μέθοδο των μικροβιολογικών αναλύσεων. Οι πληθυσμοί των βακτηριακών πληθυσμών που μελετήθηκαν ήταν οι λακτοβάκιλλοι, οι σταφυλόκοκκοι, οι στρεπτόκοκκοι, τα εντεροβακτηρίδια, τα κολοβακτηρίδια και η ολική μεσόφιλη χλωρίδα του εντέρου. Από την καταμέτρηση των αποικιών και κατόπιν της στατιστικής ανάλυσης παρατηρήθηκε πως κάποια από τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με υπάρχουσες μελέτες και κάποια διαφέρουν. Την 4^η εβδομάδα έκθεσης σε καπνό παρατηρήθηκε μείωση των εντεροβακτηριδίων στο κόλον, μείωση των κολοβακτηριδίων στο κόλον, μείωση στους λακτοβάκιλλους του ειλεού και του κόλου, και μείωση στην ολική μεσόφιλη χλωρίδα του ειλεού. Την 8^η εβδομάδα έκθεσης σε καπνό παρατηρήθηκε αύξηση στα εντεροβακτηρίδια του τυφλού, αύξηση στα κολοβακτηρίδια του ειλεού, μείωση των σταφυλόκοκκων της νήστιδας, και μείωση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας του ειλεού και του τυφλού. Την 4^η εβδομάδα διακοπής της έκθεσης παρατηρήθηκε αύξηση των σταφυλόκοκκων του κόλου, και αύξηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας της νήστιδας. Τέλος την 8^η εβδομάδα διακοπής της έκθεσης παρατηρήθηκε μείωση των κολοβακτηριδίων του κόλου, αύξηση των σταφυλόκοκκων της νήστιδας, και μείωση των στρεπτόκοκκων της νήστιδας, του ειλεού και του κόλου. Το ενδιαφέρον και καινοτόμο στην συγκεκριμένη έρευνα είναι πως μελετάει τις αλλαγές στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου στα διαφορετικά τμήματά του. Επιπλέον καταμέτρηση της κατανάλωσης της τροφής, φανέρωσε πως οι επίμυες της ομάδας S καταναλώνουν μικρότερη ποσότητα τροφής κατά την περίοδο της έκθεσης σε σχέση με την ομάδα C, ενώ το αντίθετο συμβαίνει κατά την περίοδο διακοπής της έκθεσης. Σύμφωνα και με τα παραπάνω μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα πως τόσο η έκθεση στον καπνό τσιγάρου όσο και η διακοπή της έκθεσης οδήγησαν σε μεταβολές στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου. Αξίζει να διερευνηθεί περαιτέρω η πιθανή συσχέτιση αυτών των μεταβολών με τις μεταβολές στην πρόσληψη τροφής σε αυτές τις περιόδους.

Λέξεις κλειδιά : κάπνισμα, μικροβιακή χλωρίδα, έντερο

Subject of research:

<< Effect of smoking cessation on intestinal microflora. An experimental study in rats. >>

SUMMARY

This project refers to the changes of the microbial flora of the intestinal tissue of rats, under the influence of cigarette smoke and its cessation. According to the experimental design, 29 rats were exposure in cigarette smoke for eight weeks and in a cessation period for another 8 weeks (group S). The second group included 22 rats that were the control group and not subjected to any process (group C). At 4 and 8 weeks of exposure period and cessation period, a sample of intestinal tissue collected from rats in group S and C. The samples were isolated from the jejunum, ileum, the caecum and colon. Tissues were purified, and after homogenization, were analyzed by the method of microbiological analyzes. The bacterial populations that were studied were lactobacilli, staphylococci, streptococci, enterobacteriaceae, coliforms and total mesophilic flora of the intestine. The statistical analyzes of the results make clear that some of our results are consistent with the results of existing studies and some differ. On the 4th week of exposure to cigarette smoke, a reduction of the enterobacteriaceae observed in the colon, a reduction of the coliforms observed in in the colon, a decrease of lactobacilli observed in ileum and colon, and a reduction in the total mesophilic flora observed in ileum. On the 8th week of exposure to cigarette smoke, an increase of enterobacteriaceae observed in the caecum, an increase of the coliforms observed in the ileum, a reduction of the staphylococci observed in jejunum, and a reduction of total mesophilic flora observed in caecum. On the 4th week of cessation period, an increase of the staphylococci observed in colon, and an increase of the total mesophilic flora observed in the jejunum. Finally, on 8th week of cessation period, a reduction of the coliforms observed in colon, an increase of the staphylococci observed in jejunum, and a reduction of streptococci observed in jejunum, ileum and colon. The interesting and innovating of this research is that refers to the changes of the microbial flora in different parts of the intestine. Furthermore, the consumption of food, showed that the rats in group S consume less amount of food during the exposure period compared with the group C, while the opposite occurs during the cessation period. To conclude, both exposure to cigarette smoke and the cessation of it, led to changes of the microbial flora of the intestine. It should, further, investigate the possible association of these changes with changes in food intake in these periods.

Key words: smoking, microflora, intestine

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abraham L. Kierszenbaum, Laura L. Tres. <<Ιστολογία με Στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας. Εισαγωγή στην Ιστοπαθολογία >>, Π. Χ. Πασχαλίδης Αθήνα, 2013
2. Alexander JW, Boyce UT, Babco GF, et al., The process of microbial translocation. *Ann Surg.*, 1990,212: 496-512.
3. Arcavi L, Benowitz NL., Cigarette smoking and infection. *Arch Intern Med.*, 2004, 164: 2206–2216.
4. Artis D., Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol.*, 2008, 8:411–420.
5. Aubin H.J., Farley A., Lycett D., Lahmek P, Aveyard P., Weight gain in smokers after quitting cigarettes: meta-analysis. *BMJ*, 2012, 345: e4439 doi: 10.1136/bmj.e4439 (Published 10 July 2012)
6. Balda M, Matter K., Tight junctions at a glance. *J Cell Sci.*, 2008, 121: 3677-82. DOI: 10.1242/jcs.023887
7. Barker N, et al., Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 2007, 449:1003–1007
8. Benjamin Jane L., Charlotte R.H. Hedin, Andreas Koutsoumpas, Siew C. Ng, Neil E. McCarthy, Natalie J. Prescott, Pedro Pessoa-Lopes, Christopher G. Mathew, Jeremy Sanderson, Ailsa L. Hart, Michael A. Kamm, Stella C. Knight, Alastair Forbes, Andrew J. Stagg, James O. Lindsay and Kevin Whelan., Smokers with Active Crohn’s Disease Have a Clinically Relevant Dysbiosis of the Gastrointestinal Microbiota, *Inflamm Bowel Dis.*, 2011, 000:000–000
9. Biedermann L., Zeitz J., Mwinyi J., Sutter-Minder E., Rehman A., Ott S.J., Steurer-Stey C., Frei A., Frei P., Scharl M., Loessner M.J., Vavricka S.R., Fried M., Schreiber S., Schuppler M., Rogler G., Smoking Cessation Induces Profound Changes in the Composition of the Intestinal Microbiota in Humans. *PLOS ONE*, 2013, Volume 8. Issue 3. e59260
10. Biedermann L., Brülisauer K., Zeitz J., Frei P., Scharl M., Vavricka S.R., Fried M., Loessner M.J., Rogler G., and Schuppler M., Smoking Cessation Alters Intestinal Microbiota: Insights from Quantitative Investigations on Human Fecal Samples Using FISH. *Inflamm Bowel Dis.*,2014, 20:1496–1501
11. Borgerding M, Klus H., Analysis of complex mixtures – cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol.*, 2005, 57: 43–73.
12. Boundless. “Mucosa.” Boundless Anatomy and Physiology. Boundless, 29 Jul. 2016.
13. Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F., Braesco, V., The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," *American Journal of clinical nutrition*, 2003, 78, 675-683
14. Cereijido M, Gonzalez-Meriscal L, Contreras RG., Epithelial tight junctions. *Ann Rev Resp Dis.*, 1988, 138(6Pt2): S17-21.
15. Chiolero A., Faeh D., Paccaud F., and Cornuz J., Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. *Am J Clin Nutr.*, 2008, 87:801–9.
16. Deitch EA., The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg.*, 1990, 403-404

17. Erickson RA, Tarnawski A, Dines G, Stachura J., 16,16-Dimethyl prostaglandin E2 induces villus contraction in rats without affecting intestinal restitution. *Gastroenterology*, 1990, 99: 708–716
18. Farhadi A, Banan A, Fields J, Keshavarzian A. Intestinal barrier: An interface between health and disease. *J Gastroenterol Hepatol.*, 2003, 18:479-497.
19. Feil W, Lacy ER, Wong YM, et al., Rapid epithelial restitution of human and rabbit colonic mucosa. *Gastroenterology.*, 1989, 97:685-701
20. Filozof C, Fernandez Pinilla MC, Fernandez-Cruz A., Smoking cessation and weight gain. *Obes Rev.*, 2004, 5:95-103
21. Foster T., << Medical Microbiology >> 4th edition, Chapter 12, 1996
22. Gareth C. Parkes, Kevin Whelanb, James O. Lindsay., Smoking in inflammatory bowel disease: Impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. *Journal of Crohn's and Colitis.*, 2014, 8, 717–725
23. Goh YJ, Klaenhammer TR, Genomic features of *Lactobacillus* species. *Front Biosci*, 2009, 14:1362–1386. doi:10.2741/3313
24. Goldsby, R.A., Kindt, T.J., Osborne, B.A., Kuby, J., *Immunology*. WH Freeman and Company, 2003
25. Guarner F., Malagelada J.-R., Gut flora in health and disease. *THE LANCET*. February 8, 2003, Vol 360.
26. Hattori, M., Taylor, T.D., The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Research*, 2009, 16, 1-12.
27. Hebel R., Stromberg MW., *Anatomy and Embryology of the laboratory rat*. Woerthsee: BioMed Verlag, 1986
28. Isono, A., Katsuno, T., Sato, T., Nakagawa, T., Kato, Y., Sato, N., Seo, G.i., Suzuki, Y., Saito, Y., *Clostridium butyricum* TO-A culture supernatant downregulates TLR4 in human colonic epithelial cells. *Dig. Dis. Sci.*, 2007, 52, 2963-2971
29. Jorrit L. Opstelten, Jonathan Plassais, MSc, Saskia W. C. van Mil, Emna Achouri, Matthieu Pichaud, Peter D. Siersema, Bas Oldenburg, and Alessandra C. L. Cervino., Gut Microbial Diversity Is Reduced in Smokers with Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis.*, 2016, 22:2070–2077
30. Kaetzel CS, Robinson JK, Chintalacharuvu KR, et al., The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1991, 88:8796-8800
31. Kapoor D. and T. H. Jones, Smoking and hormones in health and endocrine disorders. *European Journal of Endocrinology*, 2005, 152 491–499
32. Kasteridis P. and Steven T. Yen., Smoking Cessation and BodyWeight: Evidence from the Behavioral Risk Factor Surveillance Survey. *HSR: Health Services Research*, 2012, 47:4. DOI: 10.1111/j.1475-6773.2012.01380.x
33. Krajmalnik-Brown R., Zehra-Esra Ilhan, Dae-Wook Kang, John K. DiBaise., Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation, 2012, 27(2): 201–214. *Nutr Clin Pract* doi:10.1177/0884533611436116
34. Krinke GJ., *The laboratory rat*. Academic press., 2000, p 42 – 68
35. Larsson L, Szponar B, Ridha B, et al. Identification of bacterial and fungal components in tobacco and tobacco smoke. *Tob Induc Dis.*, 2008; 4: 4.
36. LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M., Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr Opin Biotechnol.*, 2013, 24(2):160–8

37. Ley, R.E. Backhed, F. Turnbaugh, P. Lozupone, C.A. Knight, R.D. Gordon, J.I., Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 11070–11075.
38. Ley, R.E. Turnbaugh, P.J. Klein, S. Gordon, J.I., Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 2006, 444, 1022–1023.
39. Liboshi Y, Nesu R, Cui L, et al., Adhesive mucous gel layer and mucus release as intestinal barrier in rats. *J Parenter Enteral Nutr.*, 1996, 20:98-104
40. Liesbeth Allais, Frederiek-Maarten Kerckhof, Stephanie Verschuere, Ken R. Bracke, Rebecca De Smet, Debby Laukens, Pieter Van den Abbeele, Martine De Vos, Nico Boon, Guy G. Brusselle, Claude A. Cuvelier and Tom Van de Wiele., Chronic cigarette smoke exposure induces microbial and inflammatory shifts and mucin changes in the murine gut. *Environmental Microbiology*, 2016, doi:10.1111/1462-2920.12934
41. Linda Chia-Hui Yu, Jin-Town Wang, Shu-Chen Wei, Yen-Hsuan Ni., Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: from physiology to pathology. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2012, 3(1): 27-43. doi:10.4291/wjgp.v3.i1.27
42. Lipkin M., Cell renewal in stomach, ileum, colon and rectum. *Gastroenterology*, 1963, 45:721-727.
43. Lodemann, U., Chapter 21 - Effects of probiotics on intestinal transport and epithelial barrier function, in: Watson, R.R., Preedy, V.R. (Eds.), *Bioactive foods in promoting health*. Academic Press, Boston, 2010, pp. 303-333
44. Lugen Zuo, Yi Li1, Honggang Wang, Rong Wu, Weiming Zhu, Wei Zhang, Lei Cao, Lili Gu, Jianfeng Gong, Ning Li, Jieshou Li., Cigarette smoking is associated with intestinal barrier dysfunction in the small intestine but not in the large intestine of mice. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2014, 8, 1710–1722
45. Lycett D, Munafo M, Johnstone E, Murphy M, Aveyard P., Associations between weight change over 8 years and baseline body mass index in a cohort of continuing and quitting smokers. *Addiction*, 2011, 106:188-196.
46. Madara JL. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *Am J Pathol*, 1990, 137: 1273-1281.
47. McCracken, V.J., Lorenz, R.G., The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiology*, 2001, 3, 1-11
48. McGuckin MA, Linden SK, Sutton P, Florin TH., Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat Rev Microbiol.*, 2011, 9:265–278.
49. Miller DL., Rat small intestine: development, composition and effects of perfusion. *Am J Dig Dis.*, 1971, 16:247-54.
50. Monica Perea Velez, Sigrid C.J. De Keersmaecker & Jos Vanderleyden, Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. Centre of Microbial and Plant Genetics, K.U. Leuven, Leuven, Belgium, 2007
51. Moore R, Carlson S, Madara JL., Villus contraction aids repair of intestinal epithelium after injury. *Am J Physiol*, 1989, 257:G274-283.
52. Nakanishi, Y., Sato, T., and Ohteki, T., Commensal Gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization. *Mucosal Immunol.*, 2014, 8: 152–160.
53. Osborne CK., Taxoxifen in the treatment of the breast cancer. *N.Engl. J. Med.*, 1998, 339:1609-18
54. Patterson M. J., <<Medical Microbiology>>.4th edition, Chapter 13, 1996

55. Rogers, Greene, Saint, S., Chenoweth, Malani, Trivedi, I., and Aronoff., Higher rates of *Clostridium difficile* infection among smokers. PLoS ONE, 2012, 7: e42091
56. Runkel NS, Moody FG, Smith GS, et al., Alterations in rat intestinal transit by morphine promote bacterial translocation. Dig Dis, 1993, Sci;38:1530-1536
57. Ruth E. Ley, Peter J. Turnbaugh, Samuel Klein & Jeffrey I. Gordon, Human gut microbes associated with obesity. NATURE, 2006, Vol 444.
58. Saier M.H., JR., Jing-Jing Ye, Klinke S., Nino E., Identification of an Anaerobically Induced Phosphoenolpyruvate-Dependent Fructose-Specific Phosphotransferase System and Evidence for the Embden-Meyerhof Glycolytic Pathway in the Heterofermentative Bacterium *Lactobacillus brevis*. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1996, p. 314–316. Vol. 178. No. 1
59. Salvetti E., Torriani S. E., G. Felis., The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. 2012 Dec;4(4):217-26. DOI 10.1007/s12602-012-9117-8
60. Saltiel AR, Kahn CR., Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature, 2001, 414(6865):799–806. [PubMed: 11742412]
61. Sapkota AR, Berger S, Vogel TM. Human pathogens abundant in the bacterial metagenome of cigarettes. Environ Health Perspect, 2010, 118: 351–356.
62. Scanlon V., Essentials of anatomy and physiology, F.A. Davis Co., Philadelphia, (6th ed.), 2011
63. Scheperjans F., Pekkonen E., Kaakkola S. and Auvinen P., Linking Smoking, Coffee, Urate, and Parkinson's Disease – A Role for Gut Microbiota. Journal of Parkinson's Disease, 2015, 5 255–262. DOI 10.3233/JPD-150557. IOS Press
64. Sleisenger and Fordtrans, Gastrointestinal and liver Disease.6th Edition, 1998, 1:33-36.
65. Spring KR., Handbook of physiology. Am Physiol Social., 1991, Vol IV
66. Sun Z, Wang X, Andersson R., Role of intestinal permeability in monitoring mucosal barrier function. History, methodology and significance of pathophysiology. Digestive Surgery, 1998, 15:386- 397.(24,28).
67. Tian J, Venn A, Otahal P, Gall S., The association between quitting smoking and weight gain: a systemic review and meta-analysis of prospective cohort studies. Obes Rev., 2015, 16:883-901
68. Tlaskalova-Hogenova, H., all, e., Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. Immunology Letters, 2004, 93, 97-108
69. Tomoda, K., Kubo, K., Asahara, T., Andoh, A., Nomoto, K., Nishii, Y., et al., Cigarette smoke decreases organic acids levels and population of bifidobacterium in the caecum of rats. J Toxicol Sci, 2011, 36: 261–266.
70. Turner JR., Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. Am J Pathol., 2006, 169: 1901-1909
71. Ulluwishewa, D.; Anderson, R.C.; McNabb, W.C.; et al., Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. Journal of Nutrition, 2011, 141(5):769–776. PMID: 21430248
72. Ulshen MH, Rollo JL., Pathogenesis of *E. coli* gastroenteritis in mananother mechanism. New England Journal of Medicine, 1980, 302: 99-101.
73. Vander A., J. Sherman, D. Luciano, M. Τσακαλόπουλος, << Φυσιολογία του Ανθρώπου. Μηχανισμοί λειτουργίας του οργανισμού >>. 8^η έκδοση, 2011
74. Vdoviaková K., Petrovová E., Maloveská M., Krešáková L., Teleky J., Mario Zefanias Joao Elias, and Petrášová D., Surgical Anatomy of the

- Gastrointestinal Tract and Its Vasculature in the Laboratory Rat. Gastroenterology Research and Practice., 2016, Vol. 2016 Article ID 2632368
75. Veldheer S, Yingst J, Zhu J, Foulds J., Ten-year weight gain in smokers who quit, smokers who continued smoking and never smokers in the United States, NHANES 2003-2012. *Int J Obes (Lond)*., 2015, 39:1727-1732.
 76. Wang, H., Zhao, J.X., Hu, N., Ren, J., Du, M., and Zhu, M.J., Side-stream smoking reduces intestinal inflammation and increases expression of tight junction proteins. *World J Gastroenterol*, 2012, 18: 2180–2187.
 77. Wattanasirichaigoon S, Menconi MJ, Delude RL, Fink MP, Effect of mesenteric ischemia and reperfusion or hemorrhagic shock on intestinal mucosal permeability and ATP content in rats. *Shock*, 1999, 12:127-133.
 78. Whiteley LO., Purdon GM., Bettran TA., The interactions of diet and colonic microflora in regulating colonic mucosal growth. *Toxicol pathol.*, 1996, 24: 305 – 314
 79. William K. Ovalle, Patrick C. Nahirney. << Ιστολογία >>, 2010
 80. Wilson CG., The transit of dosage forms through the colon. *Int J Pharm*, 2010, 395(1–2):17–25.
 81. Yang PC, He SH, Zheng PY., Investigation into the signal transduction pathway via which heat stress impairs intestinal epithelial barrier function. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(11):1823–1831,
 82. Ypsilantis P., Politou M., Anagnostopoulos C., Tsigalou C., Kambouromiti G., Kortsaris A., Simopoulos C., Effects of Cigarette Smoke Exposure and Its Cessation on Body Weight, Food Intake and Circulating Leptin, and Ghrelin Levels in the Rat. *Nicotine & Tobacco Research*, 2013, Volume 15, Number 1. doi:10.1093/ntr/nts113
 83. Αντωνιάδης Α. Καρτάλη Σ. Λεγάκης Ι.Ν.Σ. Μανιάτης Α. Τσελέντης Ι., << Ιατρική Μικροβιολογία >>. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης. 3^η Έκδοση. Τόμος ΙΙ, 2010

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΕΣ ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ (ελήφθησαν 26/09/16):

1. <http://www.uniprot.org/taxonomy/?query=staphylococcus&sort=score>
2. <http://www.uniprot.org/taxonomy/?query=streptococcus&sort=score>
3. <http://www.uniprot.org/taxonomy/?query=coliform+enterobacteriaceae&sort=score>
4. <http://www.uniprot.org/taxonomy/?query=coliform+enterobacteriaceae&sort=score>

