ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ: ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΥ ΣΤΟΝ ΟΣΤΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ.

ΚΕΡΕΖΟΥΔΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

(Α.Μ. : 214038)

Αθήνα, 2018

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ: ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΝΗ (Επιβλέπουσα) , Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Επιστήμη Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΤΕΝΤΑ ΡΩΞΑΝΗ, Επίκουρη Καθηγήτρια, Επιστήμη Διαιτολογίας- Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΖΕΡΒΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Η Κερεζούδη Ευαγγελία δηλώνω υπεύθυνα ότι:

1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.

2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

…στη μητέρα μου…

Χωρίς τη δική της υποστήριξη και βοήθεια δε θα ήταν τίποτα εφικτό!

Σε ευχαριστώ!

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σε αυτή την πρώτη μου επίσημη ερευνητική προσπάθεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με στήριξαν και με βοήθησαν να φέρω εις πέρας αυτό το τόσο απαιτητικό έργο! Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κ. Κυριακού Αδαμαντίνη, για την ευκαιρία που μου έδωσε, ώστε να εμπλακώ ενεργά σε μία πρωτοποριακή και πολύ ενδιαφέρουσα επιστημονική έρευνα, καθώς και για τη συνεχή υποστήριξη και κατανόησή της σε όλη τη διάρκεια αυτής μου της προσπάθειας. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μήτσου Ευδοκία, για τη συνεχή στενή παρακολούθηση και ενεργή βοήθεια από την αρχή μέχρι το τέλος της έρευνας, καθώς και για τις τόσες πολλές ώρες που μου αφιέρωσε, ώστε να μου εξηγήσει και την παραμικρή λεπτομέρεια! Ο ρόλος της ήταν πολύ καθοριστικός για την επιτυχή ολοκλήρωση της πτυχιακής μου μελέτης!

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συμφοιτήτριά και συνεργάτιδά μου στην παρούσα έρευνα, Αυγουστή Ιφιγένεια, με την οποία συνεργαστήκαμε άψογα και πάντα η μία φρόντιζε να συμπληρώνει την άλλη, όπου χρειαζόταν!

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν κατά τη διάρκεια αυτής της τόσο δύσκολης χρονιάς για μένα και ιδιαίτερα την οικογένειά μου, που πάντα ήταν δίπλα μου υποστηρίζοντας κάθε μου απόφαση και διώχνοντας κάθε μου αγωνία!

Πίνακας Περιεχομένων

Κατάλογος εικόνων Κατάλογος Πινάκων 8

Κατάλογος Διαγραμμάτων 8

Περίληψη 9

Abstract 10

Α΄ ΜΕΡΟΣ : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 11

ΚΕΦ. 1 : Μύκητες - Βασιδιομύκητες 11

1.1. Ορισμός 11

1.2. Τι είναι τα μανιτάρια; 12

1.3. *Ganoderma lucidum* 13

1.4. Πώς συνδέονται οι β-γλυκάνες με τα μανιτάρια; 15

1.5. Ποια είναι η πρεβιοτική δράση των μανιταριών; 16

ΚΕΦ. 2 : Εντερικός Μικροβιόκοσμος 18

2.1. Ορισμός 18

2.2. Ποιοι μικροοργανισμοί περιλαμβάνονται , πού βρίσκονται και από πού προέρχονται; 18

2.3. Ποια είναι η σύνδεση του εντερικού μικροβιώματος με τη διατροφή; 22

2.4. Πώς τα πρεβιοτικά επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο; 22

2.5. Ποια είναι η δράση της ινουλίνης; 23

2.6. Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου- SCFA 24

ΚΕΦ. 3: Οστά και Σκελετικό Σύστημα 26

3.1. Ορισμός 26

3.2. Ποια είναι η λειτουργία και η σύστασή του οστίτη ιστού; 26

3.3. Ανάπτυξη του οστού και Οστικός Μεταβολισμός 27

3.4. Διαταραχές του οστικού μεταβολισμού 29

3.5. Ορισμός Οστεοπόρωσης 30

3.6. Τύποι Οστεοπόρωσης 30

3.7. Παθοφυσιολογία της Οστεοπόρωσης 31

3.8. Διατροφικοί παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση και τη θεραπευτική αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης 32

3.8.1. Ασβέστιο 32

3.8.2. Βιταμίνη D 33

3.8.3. Πρωτεΐνες 33

3.8.4. Νάτριο 34

3.8.5. Αλκοόλ 34

3.8.6. Καφεΐνη 34

3.9. Βιοχημικοί Δείκτες Οστικού Μεταβολισμού 34
3.9.1. Οστεοκαλσίνη Ορού 35
3.9.2. Παραθορμόνη 35
3.10. Συσχέτιση του εντερικού μικροβιόκοσμου με τον οστικό μεταβολισμό 37
Β΄ ΜΕΡΟΣ: ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 39
ΚΕΦ. 1: Υλικά και Μέθοδοι 39
1.1. Σκοπός 39
1.2. Χαρακτηριστικά εθελοντριών-Αξιολόγηση 39
1.3. Ανθρωπομετρικές μετρήσεις και Διατροφική αξιολόγηση 39
1.4. Πρωτόκολλο για την εκχύλιση των πολυσακχαριτών (β-γλυκανών) από μανιτάρια του *Ganoderma lucidum* 40
1.5. Δειγματοληψία και επεξεργασία κοπράνων 41
1.6. Πρωτόκολλο *in vitro* ζύμωσης σε στατικές καλλιέργειες (Static batch culture fermentations) 41
1.7. Κυτταροκαλλιέργειες 44
1.7.1. Κυτταρική σειρά MG-63 οστεοβλαστικού φαινοτύπου 44
1.8. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT 45
1.8.1. Αρχή της μεθόδου 45
1.8.2. Όργανα-Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα 45
1.8.3. Πρωτόκολλο 45
1.9. Προσδιορισμός των δεικτών του οστικού μεταβολισμού 46
1.9.1. Οστεοπροτεγερίνη (OPG) 46
1.9.2. Ανθρώπινο OPG Elisa Kit - Αρχή της μεθόδου 46
1.9.3. RANKL 47
1.9.4. Ανθρώπινο TNFSF11/RANKL ELISA Kit -Αρχή της μεθόδου 47
1.9.5. Όργανα-Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα για τα kit 48
1.9.6. Πρωτόκολλο 48
1.10. Στατιστική επεξεργασία 49
ΚΕΦ. 2 :Αποτελέσματα 51
2.1. Χαρακτηριστικά δείγματος εθελοντριών 51
2.2. Αποτελέσματα 3ήμερου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων 52
2.3. Αποτελέσματα δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας MTT 53
2.4. Αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των δεικτών του οστικού μεταβολισμού στα κύτταρα MG-63 60
ΚΕΦ. 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ 68
Βιβλιογραφία 71
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 77

Α.ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΗΤΙΚΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 77
Β. ΤΡΙΗΜΕΡΟ ΗΜΕΡΟΛΟΓΙΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ 81

Κατάλογος εικόνων

ΕΙΚΟΝΕΣ	ΣΕΛΙΔΕΣ
1	11
2	12
3	20
4	27
5	28
6	30

Κατάλογος Πινάκων

ΠΙΝΑΚΕΣ	ΣΕΛΙΔΕΣ
1	13
2	50
3	51
4	55
5	56
6	57
7	58

Κατάλογος Διαγραμμάτων

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ	ΣΕΛΙΔΕΣ
1	53
2	53
3	54
4	54
5	60
6	60
7	61
8	62
9	62
10	63
11	64
12	65
13	65

Περίληψη

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος αποτελεί ένα σύνθετο, πυκνό (~10^{12} κύτταρα), δυναμικό μικροβιακό οικοσύστημα, με καθοριστικό ρόλο για την υγεία του ξενιστή. Πρόσφατα δεδομένα έχουν επισημάνει το ρόλο του εντερικού μικροβιόκοσμου και των διαφόρων μεταβολιτών του στην υγεία των οστών και στη διατήρηση της οστικής μάζας μέσω μηχανισμών, που δεν έχουν διευκρινισθεί ακόμα. Έτσι, η ενίσχυση των μικροβίων στο έντερο π.χ. από πρεβιοτικά μπορεί να αποτελέσει έναν εύλογο στόχο στην καταπολέμηση των εκφυλιστικών ασθενειών των οστών. Οι άπεπτοι πολυσακχαρίτες και ιδιαίτερα οι β-γλυκάνες φαίνεται να έχουν υποσχόμενη πρεβιοτική δράση, καθώς και ανοσορυθμιστικά και αντιφλεγμονώδη αποτελέσματα. Η παρούσα πτυχιακή μελέτη στοχεύει στη διερεύνηση των επιδράσεων των προϊόντων *της in vitro* ζύμωσης μανιταριών και των πλούσιων σε β-γλυκάνες εκχυλισμάτων τους από τον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο σε ανθρώπινους οστεοβλάστες. Τα μανιτάρια προέρχονται από το είδος *Ganoderma lucidum*. Τα λυοφιλοποιημένα μανιτάρια LGAM 9720 (2% β κ.β.) και τα πλούσια σε β-γλυκάνες εκχυλίσματα (1% κ.β.) αξιολογήθηκαν για την πιθανή πρεβιοτική τους δράση μετά από τη ζύμωσή τους σε ένα μοντέλο ζυμώσεως στατικής καλλιέργειας, χρησιμοποιώντας ως εμβόλιο εντερικό μικροβιόκοσμο από 3 υγιείς και 3 οστεοπενικές μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ινουλίνη. Τα υπερκείμενα από τις ζυμώσεις συλλέχθηκαν αρχικά (0 ώρες) και μετά από 24 ώρες ζύμωσης, επεξεργάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την παρέμβαση στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοβλαστών MG-63. Η επίδραση των επεξεργασμένων υπερκείμενων των ζυμώσεων στη βιωσιμότητα των κυττάρων αυτών, αξιολογήθηκε με τη δοκιμασία MTT, ενώ η αξιολόγηση των παραμέτρων του οστικού μεταβολισμού, συγκεκριμένα της OPG (οστεοπροτεγερίνη) και του RANKL (ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-Β του πυρηνικού παράγοντα) πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Elisa με εμπορικά διαθέσιμα kit.. Επίσης υπολογίστηκε και ο λόγος OPG/ RANKL, ο οποίος αποτελεί σημαντικό δείκτη οστικής υγείας.Τα αποτελέσματα που προκύπτουν υποδεικνύουν ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος κάθε εθελόντριας παίζει σημαντικό ρόλο στη βιωσιμότητα και τη φυσιολογία των οστεοβλαστικών κυττάρων. Η επίδραση του ακατέργαστου μανιταριού *Ganoderma lucidum* έναντι του αντίστοιχου εκχυλίσματος β-γλυκάνης διαφέρει ως προς τη βιωσιμότητα, όσον αφορά την αξιολόγηση του εμβολίου κάθε συμμετέχοντα στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MG-63. Στην οστική ανακατασκευή φαίνεται ότι η επίδραση της ινουλίνης 2% είναι αντίστοιχη με του μάρτυρα, σε όλους τους δείκτες (OPG, RANKL, OPG/ RANKL), υπονοώντας πως διαθέτει μία πιθανή ευεργετική οστεοβλαστική δραστηριότητα και συνεισφέρει θετικά στην οστική ανακατασκευή. Επίσης το πλούσιο σε β-γλυκάνες εκχύλισμα του Ganoderma lucidum, συνεισφέρει θετικά στην οστική ανακατασκευή σε όλες τις ομάδες γυναικών, ως προς τον λόγο OPG/ RANKL, αφού δεν εμφανίζει διαφορά από τον πρότυπο μάρτυρα, αλλά ούτε και από την ινουλίνη.

Λέξεις κλειδιά: εντερικός μικροβιόκοσμος, *Ganoderma lucidum*, εκχύλισμα β-γλυκανών, πρεβιοτικό, οστική υγεία

Abstract

Gut microbiota is a complex, dense and a dynamic microbial ecosystem which seems to be a key determinant of host health. Recent data have highlighted the role of intestinal microbiota and its various metabolites in bone health and bone mass maintenance through mechanisms, that have not been elucidated yet. Thus, modulating gut microbiota through the consumption of prebiotics can be a legitimate goal in therapy of degenerative bone diseases. Indigestible polysaccharides and particularly beta-glucans appear to have promising prebiotic activity as well as immunomodulatory and anti-inflammatory effects.

This study aims to investigate the effects of the *in vitro* fermentation products of mushrooms with gut microbiota, on human osteoblasts. Lyophilized mushrooms LGAM 9720 (2% w/v) and their rich in beta-glucans extracts (1% w/v) of Ganoderma lucidum were evaluated for their potential prebiotic activity as a result of a static culture fermentation model, using faecal inoculum from 3 healthy and 3 osteopenic postmenopausal women. Inulin was used as positive control.

Fermentation supernatants were collected initially (0 hours) and after 24 hours of fermentation, processed and used for intervention on the human MG-63 cell line. The effect of the processed supernatants in the viability of these cells was assessed by the MTT assay, while evaluation of bone metabolism parameters, namely OPG (Osteoprotegerin) and RANKL (Receptor activator of Nuclear factor kappa-B ligand) was performed by the Elisa method by commercially available kits.

The outcoming results indicate that gut microbiota of each volunteer plays an important role in the viability and physiology of osteoblastic cells. Also, the effect of crude *Ganoderma lucidum* mushroom on the viability of MG-63 cells, differentiates from the corresponding of β-glucan extract on the same cells. Respectively, in bone reconstruction protocol inulin (2% w/v) has similar impact on the bone parameters (OPG, RANKL, OPG/RANKL) as the control, implying for a potential beneficial activity in bone reconstruction. The co-incubation of MG-63 cells with the rich in beta-glucans extract of G.lucidum results in high OPG/RANKL ratios (similar to control and to inulin) in osteopenic as well as in healthy women.

Keywords: gut microbiota, *Ganoderma lucidum*, β-glucan extracts, prebiotic, bone health

Α΄ ΜΕΡΟΣ : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ. 1 : Μύκητες - Βασιδιομύκητες

1.1. Ορισμός

Οι μύκητες είναι ετερότροφοι, ευκαρυωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι ζουν προσλαμβάνοντας οργανικές ενώσεις από το περιβάλλον και αναπτύσσονται ως σαπρότροφα ή δημιουργώντας συμβιωτική ή παρασιτική σχέση με κάποιον ξενιστή. (Ζερβάκης, 2014) Οι (Ruggiero, et al., 2015) στην εργασία τους, επαναπροσδιορίζουν το αποδεκτό, για χρόνια, ταξινομικό σχήμα του (Whittaker, 1969) , προτείνοντας 7 Βασίλεια, ανάμεσα στα οποία περιλαμβάνεται το Βασίλειο των Μυκήτων που διαιρείται σε 7 φύλα, 35 τάξεις και 129 γένη (Hibbett, et al., 2007) . Ο θαλλός των μυκήτων έχει πολύ μικρές διαστάσεις, τις οποίες δεν μπορεί να διακρίνει ο γυμνός οφθαλμός, ενώ όταν σχηματίσουν καρποφορίες μπορεί να εκτείνονται από μερικά δέκατα του χιλιοστού έως και μισό μέτρο, τότε γίνονται ορατοί. Παράλληλα, διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο μοιάζει με αυτό των φυτικών κυττάρων με χαρακτηριστική διαφορά πως στο τοίχωμα αυτό των μυκήτων δεν υπάρχει κυτταρίνη, αλλά χιτίνη ή άλλες υδατανθρακικές ενώσεις. Το κυτταρικό αυτό τοίχωμα των μυκήτων αποτελείται από πολυσακχαρίτες κατά 80-90%, ενώ ολοκληρώνεται με ένα σύμπλεγμα από πρωτεΐνες, λιποειδή, πολυφωσφορικά και ανόργανα άλατα. (Δήμου)

Το σώμα τους, το μυκήλιο, δημιουργείται από τις υφές, οι οποίες είναι διακλαδισμένα νημάτια μικρής διαμέτρου και περιέχουν τα κύτταρα των μυκήτων. Στο πρωτόπλασμα περιέχονται ουσιαστικά τα κυτταρικά οργανίδια, καθώς και οι πυρήνες των κυττάρων. Ο πολλαπλασιασμός των υφών επιτυγχάνεται μέσω της αύξησης του πρωτοπλάσματος, της επιμήκυνσης και της διακλάδωσης της υφής, καθώς και μέσω του μιτωτικού πολλαπλασιασμού των πυρήνων. Με αυτόν τον τρόπο, κάθε πολυπύρηνος οργανισμός που δημιουργείται μπορεί να αναπτυχθεί σε καινούργιο μυκήλιο. Επιπλέον, οι υφές τους διακρίνονται σε υφές, οι οποίες φέρουν κατά διαστήματα εγκάρσια διαφράγματα (septa) και σε υφές οι οποίες διαθέτουν ενιαίο εσωτερικό χώρο. (Δήμου)

Οι Βασιδιομύκητες, έχουν υφές που φέρουν εγκάρσια διαφράγματα και η αναπαραγωγή τους πραγματοποιείται μέσω των σπορίων που σχηματίζονται από εξειδικευμένες υφές. Τα σπόρια αυτά μπορεί να είναι, είτε εγγενούς, είτε αγενούς

αναπαραγωγής, ενώ η μορφολογία τους ποικίλλει, με αποτέλεσμα να καθίσταται δύσκολη η αναγνώρισή τους, η οποία και βασίζεται στη μικροσκοπική παρατήρηση των βασιδιοσπορίων που παράγουν. Στην περίπτωση της εγγενούς αναπαραγωγής, προηγείται σεξουαλική σύζευξη πυρήνων-γαμετών του αντίθετου φύλου και το μυκήλιο που σχηματίζεται εμφανίζει ένα νέο γονότυπο. Στην εγγενή αναπαραγωγή, τα σπόρια ονομάζονται βασιδιοσπόρια και σχηματίζονται σε αναπαραγωγικά όργανα που ονομάζονται βασίδια. Στην αντίθετη περίπτωση της αγενούς αναπαραγωγής, τα σπόρια ονομάζονται κονίδια και σχηματίζονται με μιτωτικό πολλαπλασιασμό πυρήνων. Ο σχηματισμός πραγματοποιείται στους κονιδιοφόρους, που με τη σειρά τους σχηματίζονται, είτε από τις μυκηλιακές υφές, είτε στο εσωτερικό ή την επιφάνεια σύνθετων καρποφοριών αγενούς αναπαραγωγής. (Swann & Hibbett, 2007).

Εικόνα 1. Βασιδιομύκητας x 400. Σχηματική αναπαράσταση των βασιδίων και των βασιδιοσπορίων. (Gregory, 2016)

1.2. Τι είναι τα μανιτάρια;

Οι μυκηλιακοί βασιδιομύκητες σχηματίζουν μεγάλα καρποσώματα, που ονομάζονται μανιτάρια, ενώ οι (Chang & Miles, 1992) όρισαν τα μανιτάρια ως «ένα μακρομύκητα με διακριτικό σώμα καρποφορίας που μπορεί να είναι, είτε υπόγειο, είτε επίγειο, αρκετά μεγάλο, ώστε να φαίνεται με γυμνό οφθαλμό και να μπορεί να συλλεχθεί με το χέρι». (Lindequist, Niedermeyer, & Jülich, 2005) Τα μανιτάρια περνούν το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους, υπό μορφή απλού μυκηλίου στο έδαφος, στα δέντρα, στα φύλλα και σε πολλά άλλα μέρη του βιοπεριβάλλοντος. Αποτελούν σημαντική πηγή τροφής για τον άνθρωπο και αποτελούν διατροφικές επιλογές σε παγκόσμια κλίμακα ,καθώς φαίνεται πως εκτός από τα διατροφικά οφέλη που παρέχουν στον ανθρώπινο οργανισμό εμφανίζουν και μία πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων που θα αναφερθούν παρακάτω. (Swann & Hibbett, 2007). Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη θα μελετήσουμε μανιτάρια που προέρχονται από το είδος *Ganoderma lucidum*.

1.3. *Ganoderma lucidum*

Το είδος *Ganoderma lucidum* ή αλλιώς το «γανόδερμα το λαμπερό», όπως προκύπτει από τη μετάφρασή του λατινικού ονόματός του, ανήκει στην κατηγορία των βασιδιομυκήτων που προκαλούν λευκές σήψεις στα υποστρώματα στα οποία αναπτύσσεται. Σχηματίζει μεγάλου μεγέθους, σκουρόχρωμα, «ξυλοποιημένα» μανιτάρια, γυαλιστερά στην πάνω επιφάνειά τους. Ταξινομείται στο φύλο των Βασιδιομυκήτων *(Basidiomycota)* - στην Υποδιαίρεση *Agaricomycotina* - στην Τάξη *Polyporales* - στην Οικογένεια *Ganodermataceae* και στο Γένος *Ganoderma*. (Hogan, 2013).

Εικόνα 2. Μανιτάρια *Ganoderma lucidum* (Unknown, 2012)

Το *Ganoderma lucidum* διαθέτει πικρή γεύση και έχει παρακινήσει το ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα, καθώς αποτελούσε από την αρχαιότητα συχνή διατροφική επιλογή, κυρίως των Ασιατικών πληθυσμών και εμπειρικά εμφανίστηκαν οι πρώτες ενδείξεις για τις ευεργετικές επιδράσεις που πιθανά να διαθέτει στην υγεία. Ακόμα και σήμερα στις χώρες αυτές, θωρείται , πως προάγει την υγεία και συμβάλλει στη μακροβιότητα καταπολεμώντας μία πληθώρα ασθενειών (Wasser, Coates, Blackman, Cragg, & Levine, 2005). Το μανιτάρι θεωρείται εδώδιμο, αλλά λόγω της ξυλώδους υφής του καταναλώνεται κυρίως με τη μορφή αφεψήματος ή υπό μορφή συμπληρωμάτων διατροφής. Για το λόγο αυτό ανήκει και στα “φαρμακευτικά” (medicinal) μανιτάρια. (Paterson, 2006) Αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες, φυτικές ίνες, ολιγοσακχαρίτες, τριτερπενοειδή, πεπτίδια, πρωτεΐνες, αλκοόλες, φαινόλες, ιχνοστοιχεία όπως ο ψευδάργυρος, ο χαλκός, το ιώδιο, το σελήνιο και ο σίδηρος, από βιταμίνες και αμινοξέα. (Wachtel-Galor, Yuen, Buswell, & Benzie, 2011)

Μελέτες έχουν δείξει ότι οι υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες που διαθέτει το συγκεκριμένο είδος και ειδικά οι β-D-γλυκάνες αποτελούν τα πιο δραστικά συστατικά αυτού του μανιταριού. (Batra, Sharma, & Khajuria, 2013) Οι πολυσακχαρίτες που διαθέτει φαίνεται να εμφανίζουν αυξημένη βιοδραστικότητα, προσδίδοντάς του ανοσοτροποποιητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές (Ferreira, et al., 2014), υπογλυκαιμικές, αντιμικροβιακές και ανοσοενισχυτικές ιδιότητες (Taofiq, et al., 2017), ενώ φαίνεται να διαθέτει και αντιοξειδωτικές, κυτταροτοξικές, αντιμεταστατικές ιδιότητες, δράση κατά του ιού HIV, νευροπροστατευτικές ιδιότητες, καθώς και μείωση των συμπτωμάτων παθολογικής φύσεως στο ουροποιητικό σύστημα των αντρών. (Bishop, Kao , Xu, Glucina, Paterson, & Ferguson, 2015) Όλες οι προαναφερθείσες θετικές επιδράσεις αυτού του μανιταριού στην υγεία του ανθρώπου, φαίνεται να οφείλονται στην πληθώρα των συστατικών που διαθέτει, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 που παρατίθεται παρακάτω.

Πίνακας 1. Διατροφική και χημική σύνθεση του *Ganoderma lucidum*. Οι τιμές έχουν μετρηθεί σε ξηρό βάρος. (Taofiq, et al., 2017)

Σύσταση	Μέσος όρος ± SD
Διατροφική αξία (g/100 g)	
Λιπίδια	2.50 ± 0.02
Πρωτεΐνες	6.72 ± 0.04
Ανόργανα Στοιχεία	2.4 ± 0.2
Διαθέσιμοι Υδατάνθρακες	38.0 ± 0.7
Ολικοί Υδατάνθρακες	88.4 ± 0.2
Ενέργεια (kcal/ 100 g)	201 ± 3
NaCl	0.42 ± 0.02
Ελεύθερα σάκχαρα (g/100 g)	
Φρουκτόζη	2.15 ± 0.04
Τοκοφερόλες (μg/ 100 g)	
α – Τοκοφερόλη	18.1 ± 0.2
β - Τοκοφερόλη	123 ± 7
Λιπαρά Οξέα (%)	
C16:0	21.3 ± 0.3
C18:0	5.8 ± 0.2
C18:1n9	12.7 ± 0.1
C18:2n6	42.4 ± 0.1
SFA(%)	39.3 ± 0.4
MUFA(%)	14.3 ± 0.1
PUFA(%)	46.4 ± 0.3
Ολικό περιεχόμενο από βιομόρια	
Πολυσακχαρίτες (mg αμύλου/ g)	15.4 ± 0.2
Τερπενοειδή (mg λιναλοόλη/ g)	27.2 ± 0.7
Τριτερπενοειδή (mg ουρσολικού οξέος/ g)	5.6 ± 0.5

1.4. Πώς συνδέονται οι β-γλυκάνες με τα μανιτάρια;

Οι β-γλυκάνες συνδέονται ολοένα και πιο ισχυρά με την ιατρική και φαρμακευτική βιβλιογραφία, λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν στον ανθρώπινο οργανισμό, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Ανήκουν στις διαιτητικές ίνες και απαντώνται ως άπεπτοι πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από μονομερή D-γλυκόζης ενωμένα με β-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Συγκεκριμένα οι β-γλυκάνες μπορεί να εμφανίζονται, είτε ως γραμμικές αλυσίδες, είτε ως διακλαδισμένες δομές ανάλογα πάντα με την προέλευση τους. Οι β-1,3-D-γλυκάνες καθώς και οι β-1,4-D-γλυκάνες παρουσιάζονται στα κυτταρικά τοιχώματα ανώτερων φυτών και σε σπόρους ή δημητριακά ενώ οι β-1,6-D-γλυκάνες όπως και η β-1,3-D-γλυκάνες συντίθενται από μύκητες και ζύμες. Οι κυριότερες πηγές β-γλυκανών είναι τα δημητριακά και συγκεκριμένα η βρώμη και το κριθάρι, οι ζύμες, τα μανιτάρια, τα φύκια καθώς και κάποια βακτήρια. (Rop, Mlcek, & Jurikova, 2009)

Αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των ανώτερων μυκήτων και εντοπίζονται και στα μανιτάρια, όπως αναφέρθηκε, στα οποία μπορεί να περιέχονται, είτε στο κυρίως σώμα του μανιταριού, είτε στα σπόρια και στο μυκήλιό του. Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε β-γλυκάνες εμφανίζει διακυμάνσεις και εξαρτάται από το βαθμό ωρίμανσης του σώματος του μανιταριού, με τη βέλτιστη περιεκτικότητα να εμφανίζεται την περίοδο πριν την ωρίμανση των σπορίων (Stachowiak & Reguła, 2012). Συνήθως η περιεκτικότητα των μανιταριών σε β-γλυκάνες κυμαίνεται από 0.21 έως 0.53g/100g ξηρής μάζας εκ των οποίων το 54-82% ανήκει στις αδιάλυτες ίνες, ενώ το 16-46% ανήκει στις διαλυτές ίνες. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι το γεγονός, πως η διαλυτότητα αυξάνεται με την επίδραση της θέρμανσης, με αποτέλεσμα το μαγείρεμα των μανιταριών να συνεισφέρει θετικά σε αυτό, καθώς οι διαλυτές ίνες είναι οι πιο ευεργετικές και συγκεντρώνουν τη μεγαλύτερη προσοχή της επιστημονικής κοινότητας. Δομικά οι β-γλυκάνες εμφανίζουν διαφοροποιήσεις ως προς τις πλευρικές αλυσίδες τους και αυτό τις καθιστά μοναδικές ως προς τα διάφορα είδη των μυκήτων. Οι β-γλυκάνες με τη μέγιστη περιεκτικότητα στο μυκητιακό κυτταρικό τοίχωμα είναι οι β-1,3-γλυκάνες, που αποτελούν και το 65-90% όλων των β-γλυκανών του μύκητα (Rop, Mlcek, & Jurikova, 2009). Παρόλα αυτά, στα μανιτάρια συναντώνται και άλλες μορφές β-γλυκανών, οι οποίες είναι οι β-(1,6), καθώς και οι β-(1,4). Ερευνητικά έχει αποδειχθεί πως οι β-γλυκάνες επιδρούν στην ανοσορύθμιση ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή των αντισωμάτων, ενώ σημαντικές

είναι και οι αντικαρκινικές δράσεις που πιθανά προσφέρουν κυρίως οι β-(1,3) γλυκάνες με επιπλέον β-(1, 6) σημεία διακλάδωσης. (Aida, Shuhaimi, Yazid, & Maaruf, 2009)

Επιπρόσθετα , φαίνεται ότι η αυξημένη κατανάλωση συγκεκριμένων β-γλυκανών μπορεί να επιδράσει και στην παραγωγή της ινσουλίνης, αυξάνοντας την κατά 25%, με αποτέλεσμα να διερευνάται η πιθανή ευεργετική της δράση στην αντιμετώπιση του Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου ΙΙ. Παράλληλα, ορισμένες β-γλυκάνες φαίνεται πως προωθούν την δραστικότητα των μακροφάγων με άμεση συνέπεια να αυξάνεται και η παραγωγή των IL-1, IL-6 και IL-8, οι οποίες συμβάλλουν στην ενεργοποίηση και την παραγωγή και άλλων λευκοκυττάρων.. Επιπλέον, οι β-γλυκάνες φαίνεται πως διαθέτουν και υποχοληστερολαιμικές ιδιότητες μειώνοντας, τόσο την ολική χοληστερόλη, όσο και την LDL χοληστερόλη σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ζωικά μοντέλα, ενώ ταυτόχρονα φαίνεται να συνεισφέρουν στη μείωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και στην αύξηση της HDLχοληστερόλης. Συνδυαστικά με τα παραπάνω, έχει φανεί πως τα χαμηλά επίπεδα της χοληστερόλης συνδέονται με αύξηση της έκκρισης της λεπτίνης, η οποία είναι μία πολύ σημαντική ορμόνη για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς ελέγχει το αίσθημα της πείνας. Γι΄αυτό φαίνεται πως υποστηρίζεται η συμπληρωματική χορήγηση β-γλυκανών, αλλά απαιτείται περαιτέρω έρευνα της σχέσης αυτής, η οποία πιθανόν να αναδείξει σημαντικά οφέλη για το λιπιδαιμικό προφίλ του ανθρώπινου οργανισμού μετά τη συμπληρωματική χορήγηση β-γλυκανών. (Rop, Mlcek, & Jurikova, 2009)

1.5. Ποια είναι η πρεβιοτική δράση των μανιταριών;

Ο αναθεωρημένος ορισμός των πρεβιοτικών ουσιών δόθηκε το 2004 από το Gibson και τους συνεργάτες του, όπου ως πρεβιοτικό θεωρούνταν πλέον «ένα επιλεκτικά ζυμωθέν συστατικό, που επιτρέπει συγκεκριμένες αλλαγές τόσο στη σύνθεση όσο και στη δραστηριότητα της εντερικής μικροχλωρίδας, παρέχοντας ωφέλιμες αλλαγές σε αυτήν» . (Gibson, Probert, Van Loo, Rastall, & Roberfroid, 2004)

Τα τελευταία χρόνια, η επιστημονική κοινότητα δίνει μεγάλη έμφαση στην έρευνα για την εύρεση εναλλακτικών πηγών πρεβιοτικών, η οποία μέχρι τώρα, έχει οδηγήσει στους βασιδιομύκητες ως υποψήφια πηγή, αφού όπως αναφέρθηκε οι β-γλυκάνες που περιέχουν, φαίνεται να εμφανίζουν πιθανή πρεβιοτική δράση στον ανθρώπινο οργανισμό. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον εκδηλώνεται στα μανιτάρια, τα οποία εκτιμώνται τόσο λόγω της γεύσης τους, της υφής τους, του αρώματός τους, όσο και από την πληθώρα των ευεργετικών οφελών τους για

τον ανθρώπινο οργανισμό. Επιπλέον η καλλιέργεια τους είναι οικονομική, εμφανίζουν μεγάλη παραγωγή εξαιτίας της μεγάλης ζήτησης που υπάρχει από τους καταναλωτές παγκοσμίως και οι τρόποι μαγειρικής παρασκευής τους άφθονοι. (Sánchez, 2010)

Για αυτό το λόγο διερευνάται έντονα η δράση τους ως εναλλακτική πηγή πρεβιοτικών, καθώς η πρεβιοτική τους ικανότητα έγκειται στο ότι ο ανθρώπινος οργανισμός δε διαθέτει τα απαραίτητα παγκρεατικά ένζυμα για να υδρολύσει τους β-γλυκοζυτικούς δεσμούς στο ανώτερο γαστρεντερικό σύστημα και με αυτόν τον τρόπο οι ουσίες αυτές γίνονται ανθεκτικές στα πεπτικά ένζυμα του στομάχου. Ως εκ τούτου καταλήγουν να υφίστανται ζύμωση από τα βακτήρια του εντερικού μικροβιόκοσμου και να αυξάνουν την ανάπτυξη των ευεργετικών βακτηρίων του εντέρου. Αυτό το γεγονός, τα καθιστά υποσχόμενα ως πρεβιοτικά, καθώς συμβαδίζουν με τον ορισμό των πρεβιοτικών ουσιών. (Aida, Shuhaimi, Yazid, & Maaruf, 2009)

ΚΕΦ. 2 : Εντερικός Μικροβιόκοσμος

2.1. Ορισμός

Ως εντερικός μικροβιόκοσμος ορίζεται το σύνολο των μικροοργανισμών που αποικίζουν τον εντερικό αυλό των ζωντανών οργανισμών.

Σήμερα, γνωρίζουμε ότι το ανθρώπινο σώμα αποτελείται κατά πλειοψηφία από Βακτήρια, ενώ ανιχνεύονται και οι υπόλοιπες μορφές κυτταρικής ζωής (ευκάρυα, αρχαία), αλλά και μη κυτταρικής, όπως οι ιοί. Τα βακτήρια ανέρχονται περίπου σε 10^{14} κύτταρα, δηλαδή τουλάχιστον 10 φορές περισσότερα από τα συνολικά κύτταρα του ξενιστή. (Sekirov, Russel , Antunes, & Finlay, 2010) Οι έρευνες σχετικά με την πιθανή επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στην εκδήλωση οποιασδήποτε μορφής νοσηρότητας έχουν ενταθεί και αποτελούν αντικείμενο συστηματικής μελέτης πολλών ερευνητών. Στο πλαίσιο αυτής της «αναζήτησης» δημιουργήθηκε και το Πρόγραμμα του Ανθρώπινου Μικροβιώματος (Human Microbiome Project- HMP), προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι παράγοντες εκείνοι που επιδρούν στη σύσταση του ανθρώπινου μικροβιώματος και σχετίζονται με τον πληθυσμό, το γονότυπο, την ηλικία, την πιθανή ύπαρξη νόσου, την πιθανά χορηγούμενη φαρμακευτική αγωγή και το περιβάλλον έκθεσης του ανθρώπινου οργανισμού. (The NIH HMP Working Group, Peterson, Garges, & et al., 2009) Μέχρι σήμερα , έχει καλλιεργηθεί περίπου το 30% του συνόλου του ανθρωπίνου μικροβιώματος (Duenas, et al., 2015) , ενώ γνωρίζουμε και ότι κάθε άτομο σε κάθε θηλαστικό είδος, περιλαμβανομένου του Homo sapiens, διαθέτει πρακτικά ένα μοναδικό μικροβιόκοσμο, κάτι δηλαδή ως «μικροβιακό αποτύπωμα». (Μεντής & Γύπας, 2013)

2.2. Ποιοι μικροοργανισμοί περιλαμβάνονται , πού βρίσκονται και από πού προέρχονται;

Ο αποικισμός των μικροβιακών στελεχών που συντελούν το ανθρώπινο μικροβίωμα εντοπίζονται σε κάθε κοιλότητα του ανθρώπινου σώματος , η οποία επικοινωνεί με το εξωτερικό περιβάλλον, όπως είναι το δέρμα, η γαστρεντερική οδός, η ουρογεννητική οδός και η αναπνευστική οδός. Ο ξενιστής παρέχει τροφή και χώρο ανάπτυξης στους μικροβιακούς πληθυσμούς, ενώ αντλεί και πολλά οφέλη για τις μεταβολικές και αμυντικές λειτουργίες του οργανισμού του. Οι κύριες λειτουργίες που αποδίδονται στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο είναι ο καταβολισμός των άπεπτων φυτικών ινών, ο μεταβολισμός των χολικών αλάτων, η σύνθεση βιταμινών και κυρίως της βιταμίνης Κ και Β12, ο καταβολισμός λιπαρών

οξέων, η ρύθμιση των φλεγμονωδών αντιδράσεων του οργανισμού, καθώς και η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Το παχύ έντερο του ανθρώπινου οργανισμού, που ανήκει στη γαστρεντερική οδό, φαίνεται να «φιλοξενεί» το 70 % του συνολικού μικροβιακού πληθυσμού, καθώς είναι πλουσιότερο σε υποστρώματα , τα οποία ευνοούν την ανάπτυξη μικροοργανισμών, σε σύγκριση με άλλες οδούς και φαίνεται να εμφανίζει περίπου 400−500 διαφορετικά είδη μικροβίων, τα οποία και συνιστούν τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Αναλυτικότερα, αποτελείται κυρίως από αναερόβιους πληθυσμούς που ανήκουν στη πλειοψηφία τους σε δύο μεγάλες ομάδες, τα Φύλα των *Bacteroidetes* και των *Firmicutes*, καθώς και στα Φύλα των *Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria*, και *Cyanobacteria*, τα οποία εμφανίζονται σε μικρότερους πληθυσμούς, όπως αντικατοπτρίζεται και στην εικόνα 3. (Μεντής & Γύπας, 2013)

Ο αριθμός των μικροβιακών κυττάρων του εντερικού μικροβιόκοσμου εμφανίζει σταδιακή αύξηση καθόλου το μήκος της γαστρεντερικής οδού. Αρχικά, από το ύψος του στομάχου έως το δωδεκαδάκτυλο εντοπίζονται 10 έως 10^3 βακτήρια ανά γραμμάριο περιεχομένου με κύριους εκπροσώπους βακτήρια του γένους *Lactobacillus*, ενώ προχωρώντας προς τη νήστιδα και τον ειλεό αυξάνονται σε 10^4 έως 10^7 βακτήρια ανά γραμμάριο περιεχομένου, με τους κυρίαρχους βακτηριακούς πληθυσμούς να προέρχονται από τις οικογένειες τα *Actinobacteria* και τους *Bacilli*. Τέλος, ο πληθυσμός τους κορυφώνεται στο παχύ έντερο , όπου εκεί εντοπίζονται 10^{11} έως 10^{12} βακτήρια ανά γραμμάριο περιεχομένου με κύριους εκπροσώπους από τα *Bacteroidetes* και τα *Lachnospiraceae*. (Sekirov, Russel , Antunes, & Finlay, 2010)

Από την άλλη εμφανίζονται διαφοροποιήσεις και στην αναλογία των μικροοργανισμών και κατά το πλάτος του γαστρεντερικού σωλήνα, καθώς φαίνεται να εντοπίζεται διαφορά στο περιεχόμενο εντός του γαστρεντερικού αυλού και του υλικού της κένωσης. Στο εσωτερικό του επιθηλίου , έπειτα από βιοψίες, εντοπίζονται πληθυσμοί από τα γένη *Clostridium, Lactobacillus* και *Enterococcus*. Αντιδιαμετρικά, το υλικό της κένωσης είναι πλούσιο σε *Bacteroides*, *Bifidobacterium, Streptococcus*, μέλη *Enterobacteriaceae, Enterococcus, Clostridium*, *Lactobacillus*, και *Ruminococcus*. (Sekirov, Russel , Antunes, & Finlay, 2010) Έτσι καθίσταται σαφές, ότι οι μικροβιακοί πληθυσμοί που σχετίζονται με τη βλεννογόνια στιβάδα διαφέρουν από εκείνους που εντοπίζονται στον εντερικό αυλό, με αποτέλεσμα να προσεγγίζεται διαφορετικά ανάλογα με το είδος της έρευνας ο έλεγχος για την επίδραση των μικροβιόκοσμων σε νοσογόνες καταστάσεις. Ιδανικά, για τη συσχέτιση του εντερικού

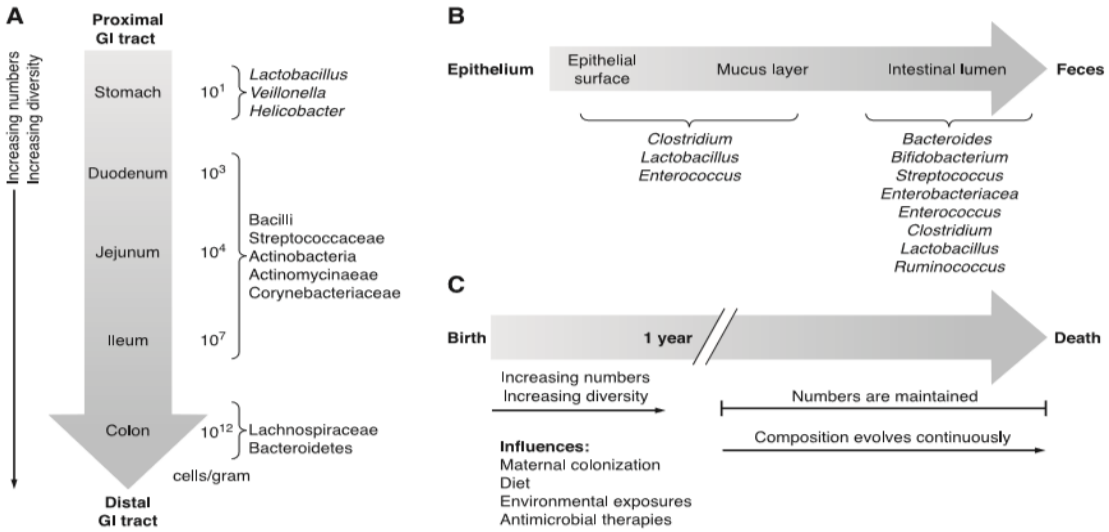
μικροβιόκοσμου με παθήσεις του εντέρου θα ήταν προτιμότερο να χρησιμοποιούνται βιοψίες του εντερικού βλεννογόνου αντί για δείγματα κοπράνων, γεγονός το οποίο σε καθημερινή πράξη είναι δύσκολο. (Μεντής & Γύπας, 2013)

Όσον αφορά τις χρονικές πτυχές της εγκατάστασης και συντήρησης των μικροβίων και των παραγόντων που επηρεάζουν τη μικροβιακή σύνθεση, έχει αποδειχθεί ότι ο ανθρώπινος γαστρεντερικός αυλός αποικίζεται από τη γέννηση κιόλας του εμβρύου. Η περίοδος αναφοράς, κατά την οποία ο οργανισμός του ανθρώπου επηρεάζεται περισσότερο στη διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμού του, είναι η μεταγεννητική περίοδος, κατά την οποία το ελεύθερο μικροβίων νεογνό μεταφέρεται από το στείρο περιβάλλον της μήτρας σε έναν κόσμο γεμάτο μικρόβια και κατά την οποία η επιφάνεια του δέρματος και οι βλεννογόνοι του νεογνού σταδιακά αποικίζονται από μικροοργανισμούς. Υπάρχουν διαφοροποιήσεις ακόμα και από τον τρόπο γέννησης του βρέφους, αφού έχει αποδειχθεί πως κατά το φυσιολογικό τοκετό, ο εντερικός μικροβιόκοσμος του βρέφους αποικίζεται από στελέχη του κόλπου της μητέρας, ενώ κατά την καισαρική τομή ο εντερικός αυλός των νεογνών αυτών εμφανίζει διαφορετική σύσταση σε σχέση με εκείνα που γεννήθηκαν με φυσιολογικό τοκετό και αποικίζεται από πληθυσμούς του νοσοκομειακού περιβάλλοντος. (Sekirov, Russel , Antunes, & Finlay, 2010) Διαφορές εμφανίζονται ακόμα και μεταξύ υγιών ατόμων που κατοικούν σε αναπτυσσόμενες ή αναπτυγμένες χώρες. Ο τοκετός των παιδιών στις αναπτυγμένες χώρες λαμβάνει χώρα σε νοσοκομειακά ιδρύματα με υψηλά μέτρα υγιεινής εξασφαλίζοντας έτσι τη μέγιστη δυνατή περίθαλψη, γεγονός που έχει ως συνέπεια το μικροβιακό εντερικό φάσμα των νεογέννητων να είναι λιγότερο ευρύ σε σχέση με εκείνο των αντίστοιχων νεογνών στις αναπτυσσόμενες χώρες. (Μεντής & Γύπας, 2013)

Γι’ αυτό το λόγο, κατά τη διάρκεια του πρώτου έτους ζωής, εμφανίζεται μικροβιακή αστάθεια και παρατηρείται διαδοχή των μικροβιακών πληθυσμών, ενώ μετά το τέλος του πρώτου έτος, το μικροβίωμα σταθεροποιείται, εμφανίζει τη μέγιστη δράση του πάνω στο ανοσοποιητικό σύστημα του παιδιού και δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες αλλαγές από αυτόν του ενήλικου ατόμου. Όμως, η ολοκλήρωση των επικρατέστερων βακτηριακών πληθυσμών , δε σταθεροποιείται μέχρι τουλάχιστον τα δυόμισι πρώτα χρόνια της ζωής του παιδιού. Από την άλλη, η σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου στους ηλικιωμένους ανθρώπους (>65 ετών) ποικίλλει μεταξύ των ατόμων και διαφέρει από εκείνη των νεότερων. Παρ’ ότι οι φυσιολογικές αλλαγές που αφορούν τη μάσηση, την κατάποση και την πέψη των τροφών εμφανίζονται σταδιακά ολοένα εντονότερα με την πάροδο της ηλικίας και διαμορφώνουν τον εντερικό

μικροβιόκοσμο των ηλικιωμένων, ίσως ο πλέον σημαντικότερος, αλλά και ευκολότερα μεταβαλλόμενος παράγοντας είναι οι διαιτητικές συνήθειές τους , οι οποίες στη συνέχεια με τη σειρά τους επηρεάζουν και την υγεία των ηλικιωμένων. (Μεντής & Γύπας, 2013)

Πρόσφατη μελέτη σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ανέδειξε μία ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των ολικών επιπέδων των ολικών οιστρογόνων που ανευρίσκονται στα ούρα των γυναικών αυτής της κατηγορίας και της ποικιλίας των μικροβίων που εντοπίζονται στα κόπρανά τους. Αυτά τα μη ωοθηκικά συστημικά οιστρογόνα συσχετίστηκαν έντονα με τη λειτουργική δραστηριότητα της β-γλυκουρονιδάσης των κοπράνων. Τα προεμμηνοπαυσιακά γυναικεία επίπεδα οιστρογόνων, τα οποία είχαν συλλεχθεί κατά τη διάρκεια των εμμηνορρυσιακών κύκλων, ήταν εντελώς άσχετα με τον εντερικό μικροβιόκοσμο των εθελοντριών. Ο εντερικός μικροβιακός πλούτος και οι λειτουργίες του, που συμπεριλαμβάνουν αλλά δεν περιορίζονται μόνο στη β-γλυκουρονιδάση, επηρεάζουν τα επίπεδα των μη ωοθηκικών οιστρογόνων μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας. Οι ερευνητές εντόπισαν μία αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ των επιπέδων των οιστρογόνων στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και της ποικιλότητας του εντερικού μικροβιόκοσμού τους. Έτσι, ο εντερικός μικροβιόκοσμος πιθανότατα επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης σχετιζόμενων με τα οιστρογόνα καταστάσεων σε ηλικιωμένους ενήλικες. (Flores, et al., 2012)



Εικόνα 3. Χωρικές και χρονικές πλευρές της σύνθεσης του εντερικού μικροβιώματος. Α: παραλλαγές σε μικροβιακούς πληθυσμούς και σύνθεση καθόλου το μήκος της γαστρεντερικής οδού. Β: Διαχρονικές μεταβολές στη μικροβιακή σύνθεση του εντέρου. C: Χρονικές πτυχές της εγκατάστασης και συντήρησης των μικροβίων και των παραγόντων που επηρεάζουν τη μικροβιακή σύνθεση. (Sekirov, Russel , Antunes, & Finlay, 2010)

2.3. Ποια είναι η σύνδεση του εντερικού μικροβιώματος με τη διατροφή;

Οι μικροοργανισμοί που ενδημούν στο παχύ έντερο διασπούν σε μικρότερες ενώσεις τα άπεπτα συστατικά των τροφών μας που καταλήγουν εκεί, αλλά και ενδογενή συστατικά όπως βλέννες, απόβλητα των μικροοργανισμών κ.α. Τα συστατικά αυτά ζυμώνονται στη συνέχεια από τους μικροοργανισμούς και από τις ζυμώσεις αυτές παράγεται μεταβολική ενέργεια και μεταβολίτες, από τους οποίους οι σημαντικότεροι είναι τα λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας (SCFAs). Τα συστατικά δηλαδή της τροφής μας επηρεάζουν τα υποστρώματα των μικροοργανισμών που καταλήγουν στο παχύ έντερο και κατά συνέπεια και τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Όπως διαφαίνεται και παραπάνω, ήδη έχουμε αντιληφθεί πως οι μικροοργανισμοί του εντέρου εμφανίζουν μεγάλο εύρος ποικιλίας και πρόσφατες έρευνες προτείνουν πως ο εντερικός μικροβιόκοσμος του μεγαλύτερου τμήματος του πληθυσμού θα μπορούσε να κατηγοριοποιηθεί σε μία από τις τρεις ομάδες ή «εντερότυπους» ανάλογα με την επικράτηση των γενών: 1) Στον εντερότυπο , όπου επικρατεί το γένος *Bacteriodes* 2) Στον εντερότυπο , όπου επικρατεί το γένος *Prevotella* και 3) Στον εντερότυπο , όπου επικρατεί το γένος *Ruminococcus* . Φυσικά, σήμερα νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι ο διαχωρισμός αυτός δεν είναι τόσο απλός και πως στην πραγματικότητα υπάρχουν πολλές ενδιάμεσες καταστάσεις στο ανθρώπινο έντερο . Η επικράτηση του κάθε εντερότυπου καθορίζεται κυρίως από διατροφικούς παράγοντες, ενώ γίνεται εμφανές πια ότι το κάθε άτομο διαθέτει σταθερά στελέχη βακτηρίων στον εντερικό μικροβιόκοσμό του, αν και η σύνθεση αυτή μπορεί να μεταβάλλεται. Επομένως, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι οι ξενιστές με τα συμβιωτικά βακτήριά τους , διαμορφώνονται και εξελίσσονται παράλληλα αλληλεπιδρώντας συνεχώς, έχοντας ως ερέθισμα τη διατροφή. Όταν η ισορροπία αυτή διαταράσσεται (δυσβίωση) για ποικίλους λόγους, όπως η επαναλαμβανόμενη και ακατάσχετη χρήση αντιβιοτικών ή η κατάχρηση οινοπνεύματος, μπορεί να δημιουργηθούν παθολογικές καταστάσεις, όπως χαμηλού βαθμού χρόνια φλεγμονή του εντέρου ή μεταβολικές διαταραχές. (Μεντής & Γύπας, 2013)

2.4. Πώς τα πρεβιοτικά επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο;

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, ο κύριος σκοπός των πρεβιοτικών είναι να σηματοδοτήσουν την ανάπτυξη ορισμένων ευεργετικών βακτηρίων όπως είναι τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium,* καθώς και του γένους *Lactobacillus* τα οποία παρουσιάζουν ευεργετικά οφέλη στην υγεία του ξενιστή, ενώ παράλληλα φαίνεται να

καταστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών των γενών *Clostridium* και *Bacteroides*. Τα κύρια πρεβιοτικά που είναι αναγνωρισμένα και διατίθενται στο εμπόριο είναι οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, η ινουλίνη, οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες, η λακτουλόζη καθώς και η πολυδεξτρόζη. Ερευνητικό ενδιαφέρον για πιθανή πρεβιοτική δράση ,επίσης παρουσιάζουν η μαννιτόλη, η μαλτοδεξτρίνη, η ραφινόζη και η σορβιτόλη. Από την άλλη και ορισμένοι σύνθετοι υδατάνθρακες μακράς αλύσου που βρίσκονται σε τρόφιμα, όπως τα δημητριακά, τα μανιτάρια, τα βότανα, οι ρίζες ραδικιών, η σόγια και οι πατάτες έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον ως πιθανές εναλλακτικές πηγές πρεβιοτικών. Τα κύρια οφέλη που παρουσιάζουν τα πρεβιοτικά στον ξενιστή είναι:

- Η βελτίωση της πεπτικής λειτουργίας.
- Η βελτίωση της λειτουργικότητας του ανοσοποιητικού συστήματος.
- Η ελαχιστοποίηση της συχνότητας και της διάρκειας των εντερικών λοιμώξεων.
- Η ενδυνάμωση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού.

(Lam & Cheung, 2013)

Για αυτό το λόγο η διεξοδική έρευνα στο κομμάτι ανεύρεσης πρεβιοτικών ουσιών οδήγησε στη δημιουργία ενός εργαλείου ποσοτικοποίησης για τη μέτρηση της πρεβιοτικής δράσης ουσιών in vitro και ονομάζεται Πρεβιοτικός Δείκτης-Prebiotic Index (Pi). Ο Πρεβιοτικός Δείκτης εμφανίζει θετικό αποτέλεσμα από την αύξηση των *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*, ενώ αρνητικό αποτέλεσμα εμφανίζεται από την αύξηση των *Bacteroides* και *Clostridium.*

Πρεβιοτικός Δείκτης = Bif / Total – Bac/Total + Lac/Total – Clos/Total

ΌπουBif: *Bifidobacterium*, Bac: *Bacteroides*, Lac: *Lactobacillus*, Clos: *Clostridium*. (Aida, Shuhaimi, Yazid, & Maaruf, 2009)

2.5. Ποια είναι η δράση της ινουλίνης;

Τα τελευταία χρόνια, καθώς η βιβλιογραφία διεισδύει ολοένα και περισσότερο στις πηγές των πρεβιοτικών ουσιών, η ινουλίνη έχει κερδίσει το ενδιαφέρον ως αναγνωρισμένο πλέον πρεβιοτικό. Ανήκει σε μία ευρύτερη ομάδα που ονομάζεται ITF- Inulin type fructans , η οποία περιέχει τόσο την ινουλίνη όσο και τους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (FOS) και την ολιγοφρουκτόζη. Η ολιγοφρουκτόζη παράγεται από μερική υδρόλυση της ινουλίνης και περιέχει 2 έως 8 μόρια φρουκτόζης, ενώ οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες έχουν παρόμοια δομή με αυτή της ολιγοφρουκτόζης με τη διαφορά ότι περιέχουν 2 έως 4 μόρια φρουκτόζης. Η

ινουλίνη παράγεται από διάφορα φυτά στη φύση, ενώ δομικά αποτελείται από μία αλυσίδα φρουκτόζης που συντελείται από 2 έως 60 μονάδες φρουκτόζης συνδεδεμένες με β-2,1 δεσμούς και από ένα μόριο γλυκόζης συνδεδεμένο στη θέση C2 της τελικής μονάδας φρουκτόζης. Η δράση της ινουλίνης έγκειται στο ότι είναι ανθεκτική στα πεπτικά ένζυμα του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς περιέχει β-(2,1) γλυκοζιτικούς δεσμούς, όπου τα πεπτικά ένζυμα δεν μπορούν να επέμβουν και να διασπάσουν. Συγκαταλέγεται ως εκ τούτου στους άπεπτους ολιγοσακχαρίτες που καταλήγουν στο παχύ έντερο με σκοπό τη ζύμωση τους από τους μικροοργανισμούς και ιδιαίτερα από προβιοτικούς μικροοργανισμούς, όπως τα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*. Επιπρόσθετα, η ινουλίνη ως πρεβιοτικό αυξάνει και την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου και συγκεκριμένα του οξικού οξέος ως τελικό προϊόν ζυμώσεως. (Kolida, Tuohy, & Gibson, 2002)

Από την άλλη, η ινουλίνη εκτός από την πρεβιοτική της δράση, έχει κερδίσει το ενδιαφέρον και ως συστατικό λειτουργικών τροφίμων επιδεικνύοντας σημαντικά οφέλη για τον ανθρώπινο οργανισμό. Κύριες πηγές της, είναι το εκχύλισμα από ρίζες ραδικιών ,τα κρεμμύδια, τα σκόρδα, οι μπανάνες, η πικραλίδα, τα πράσα και τα σπαράγγια. Χρησιμοποιείται ευρέως ως υποκατάστατο λίπους καθώς και ως υποκατάστατο γλυκιάς γεύσης . Η κατανάλωση ινουλίνης σε συνδυασμό με μία διατροφή αυξημένων υδατανθράκων και χαμηλών λιπαρών φαίνεται να συνεισφέρει θετικά στη μείωση των λιποειδών του πλάσματος, μειώνοντας την ηπατική λιπογένεση, καθώς και τη συγκέντρωση των τριακυλογλυκερολών του πλάσματος. Τέλος, η κατανάλωση συμπληρωμάτων ινουλίνης φαίνεται από έρευνες που έχουν γίνει, να συνεισφέρει στη μείωση των επιπέδων της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης σε γυναίκες με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου ΙΙ. Όλες αυτές οι παράμετροι, δείχνουν πως πιθανά η ινουλίνη να δρα προστατευτικά για την εμφάνιση του Μεταβολικού Συνδρόμου. (Nishimura, Ohkawara , Kanayama, Kitagawa, Nishimura, & Nishihira, 2014)

2.6. Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου- SCFA

Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFA), αποτελούν τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης των άπεπτων συστατικών των τροφών στο πεπτικό σύστημα με τη δράση αναερόβιων μικροοργανισμών και έχει αποδειχθεί ότι ασκούν πολλαπλά θετικές επιδράσεις στον ενεργειακό μεταβολισμό των θηλαστικών. Οι άπεπτοι υδατάνθρακες όπως η κυτταρίνη, οι ξυλάνες, το ανθεκτικό άμυλο, η ινουλίνη, οι β-γλυκάνες καθώς και άλλα άπεπτα συστατικά

που περιέχονται στην τροφή του ανθρώπου, δεν μπορούν να διασπαστούν από τα ανθρώπινα ένζυμα, με αποτέλεσμα να καταλήγουν να αποικοδομούνται στον κόλον μετά από ζύμωση που υφίστανται από τους μικροοργανισμούς του εντέρου. Μέσω της διαδικασίας αυτής, αποδίδεται ενέργεια, η οποία οδηγεί στην αύξηση των βακτηριακών πληθυσμών, ενώ ταυτόχρονα παράγονται και τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFA). Τα κυριότερα λιπαρά οξέα που παράγονται είναι το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ και το βουτυρικό οξύ. (Besten, Van Eunen, Groen, Venema, Reijngoud, & Bakker, 2013)

Υπάρχουν κάποια οφέλη προς τον οργανισμό που φαίνεται πως αποδίδονται στην παραγωγή αυτών των λιπαρών οξέων και αυτά είναι η αντιφλεγμονώδης δράση τους, οι υπογλυκαιμικές και υποχοληστερολαιμικές τους ιδιότητες, ενώ αποτελούν και πηγή ενέργειας. Επιπλέον, τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου και ιδιαίτερα το βουτυρικό οξύ αποτελεί πηγή ενέργειας για την ανάπτυξη του εντερικού επιθηλίου, αφού επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση καθώς και τη διαμόρφωση της γονιδιακής έκφρασης των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. (Tremaroli & Bäckhed, 2012) Τα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου αντλούν το 60 - 70% της απαιτούμενης ενέργειας που χρειάζονται από τα προϊόντα των μικροβιακών ζυμώσεων που γίνονται στο έντερο, ενώ ταυτόχρονα το οξικό και το προπιονικό οξύ μεταφέρονται στο ήπαρ μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας και χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα για την λιπογένεση και την νεογλυκογένεση. Η ποσότητα καθώς και οι τύποι των λιπαρών οξέων που παράγονται είναι ανάλογοι με την ποσότητα, το είδος των υδατανθράκων που καταναλώνεται καθώς και με τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου του ξενιστή. Τέλος, τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου συμβάλλουν στην ομοιόσταση του ξενιστή μειώνοντας το pH του εντερικού αυλού αποτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών. (Alonso & Guarner, 2013)

ΚΕΦ. 3: Οστά και Σκελετικό Σύστημα

3.1. Ορισμός

Το ανθρώπινο σώμα αποτελείται από 213 οστά στο σύνολό του. Κάθε οστό συμμετέχει σε έναν κύκλο μεταβολικών και φυσιολογικών αλλαγών, προκειμένου να είναι ικανό να προσαρμόζεται σε οποιαδήποτε κατάσταση και να έχει την ικανότητα να διατηρεί την αντοχή του, απομακρύνοντας τα παλαιά και φθαρμένα τμήματα των οστών και αντικαθιστώντας τα με νέα. Τα οστά ανάλογα με τη μορφολογία τους, μπορούν να χωριστούν σε επιμέρους κατηγορίες, οι οποίες περιλαμβάνουν τα μακρά οστά, τα πλατιά οστά, τα βραχέα οστά και τα ακανόνιστα οστά. (Clarke, 2008)

3.2. Ποια είναι η λειτουργία και η σύστασή του οστίτη ιστού;

Το σκελετικό σύστημα διαθέτει μία πληθώρα λειτουργιών, οι οποίες συνοψίζονται στις ακόλουθες. Αρχικά, παρέχει δομική στήριξη των μαλακών ιστών του ανθρώπινου σώματος, προστατεύει τα ζωτικά όργανα (εγκέφαλος, καρδιά, πνεύμονες) , συμμετέχει στην αιμοποίηση στο εσωτερικό του μυελού των οστών και στην αποθήκευση αλάτων και αυξητικών παραγόντων. Κάθε οστό ανάλογα με την περιεκτικότητά του σε άλατα, την ηλικία του, αποτελείται από δύο επιμέρους μορφές ιστού, το συμπαγή ιστό (κατά 80%) και το σπογγώδη ιστό (κατά 20%). Ο συμπαγής ιστός εντοπίζεται περιφερικά στα τοιχώματα του οστού και στις εξωτερικές επιφάνειές του ενώ, ο σπογγώδης ιστός βρίσκεται στα σώματα των σπονδύλων, στα άκρα των μακρών οστών, στα βραχέα οστά και ανάμεσα στις συμπαγείς επιφάνειες των πλατιών οστών. Παράλληλα, ο οστίτης ιστός σχηματίζεται από την ασβεστοποιημένη μεσοκυττάρια ουσία και από τα οστεοκύτταρα, τους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες. (Clarke, 2008)

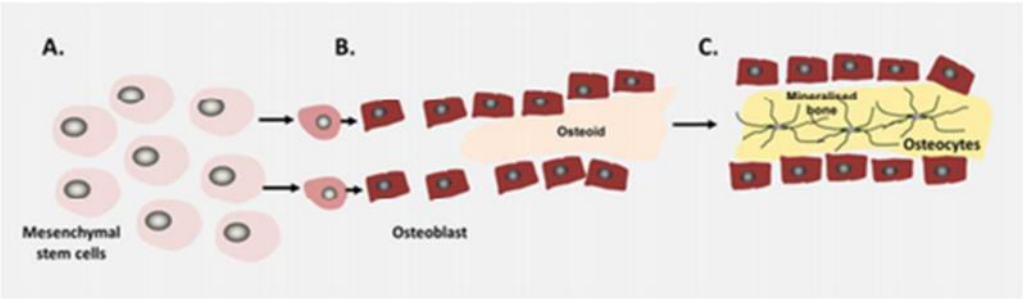
Η θεμέλια ουσία παράγεται κατά 60% από ανόργανα στοιχεία (άλατα οργανωμένα σε κρυστάλλους υδροξυαπατίτη που αυξάνουν την αντοχή του οστού σε συμπιεστικά φορτία) και κατά 40% από οργανικά στοιχεία (κολλαγόνο τύπου Ι, πρωτεογλυκάνες, μη κολλαγονικές πρωτεΐνες, κυτταροκίνες και αναπτυξιακούς παράγοντες). Η μεσοκυττάρια ουσία αποτελείται από τη θεμέλια ουσία και από ινίδια κολλαγόνου. Από την άλλη, οι οστεοβλάστες αποτελούν τα κύτταρα εκείνα, τα οποία επενδύουν εσωτερικά το οστό και είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των συστατικών της θεμέλιας ουσίας του κολλαγόνου και των μη κολλαγονούχων πρωτεϊνών. Τα κύτταρα αυτά λειτουργούν σε ομάδες κατά μήκος της επιφάνειας του οστού

και προέρχονται από αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα , τα οποία εμφανίζουν ικανότητες πολλαπλασιασμού έως ότου ωριμάσουν. Τα οστεοκύτταρα είναι τελικού σταδίου διαφοροποίησης οστεοβλάστες, που εντοπίζονται σε μικρές κοιλότητες στη θεμέλια ουσία και είναι υπεύθυνα για τον έλεγχο της εξωκυττάριας συγκέντρωσης του ασβεστίου και του φωσφόρου. Τέλος, οι οστεοκλάστες σηματοδοτούν την αποικοδόμηση του οστίτη ιστού , καθώς είναι πολυπύρηνα κύτταρα με απορροφητικές ικανότητες , τα οποία εμφανίζονται με ακανόνιστο σχήμα στις επιφάνειες των οστών και αφού προσδεθούν στις οστικές επιφάνειες με τη βοήθεια ειδικών πρωτεϊνικών υποδοχέων, των ιντεγκρινών, απελευθερώνουν οξέα και πρωτεολυτικά ένζυμα για τη διάσπαση του οστού. (Clarke, 2008)

3.3. Ανάπτυξη του οστού και Οστικός Μεταβολισμός

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα οστά υφίστανται μία διαδικασία συνεχούς ανάπτυξης, μοντελοποίησης και μεταβολικών αλλαγών, καθόλη τη διάρκεια της ζωής τους. Η ραγδαία ανάπτυξή τους εμφανίζεται κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και της εφηβείας. Σε αυτή τη χρονική περίοδο, οι χόνδροι πολλαπλασιάζονται στις επιφυσιακές και μεταφυτικές περιοχές των μακριών οστών, έτσι ώστε στη συνέχεια να σχηματίζεται ένα πρωτογενές νέο οστό. Όταν το οστό φτάσει στην τελική του ανάπτυξη, παύει να αναγεννάται με αποτέλεσμα την ολοκληρωμένη οστεοποίηση και του αυξητικού χόνδρου. (Clarke, 2008)

Τα οστά, με την τελική μορφή τους ως οστεοκύτταρα, μπορούν να αναπτυχθούν με τη συνεργιστική δράση των οστεοβλαστών, οι οποίοι παίζουν αναγεννητικό ρόλο και των οστεοκλαστών , οι οποίοι συμμετέχουν στην απόπτωση των οστικών κυττάρων. (Εικόνα 4.) Οι οστεοκλάστες, απορροφούν την περιττή οστική ουσία, πέπτωντας συστατικά της θεμέλιας ουσίας. Αντίθετα, οι οστεοβλάστες παράγουν κολλαγόνο και καθώς παγιδεύονται εντός της θεμέλιας ουσίας μετατρέπονται σε οστεοκύτταρα, ενεργοποιώντας την απορρόφηση του οστού από τους οστεοκλάστες. (Raggatt & Partridge, 2010)

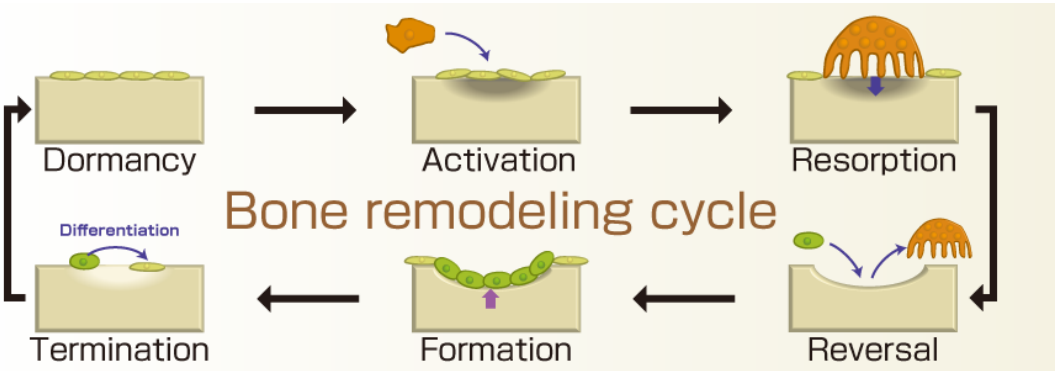


Εικόνα 4. Σχηματικό διάγραμμα που απεικονίζει το σχηματισμό ενδομεμβρανικού οστού. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες και σχηματίζουν άμεσα οστά. Α. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα του συνδετικού ιστού συμπυκνώνονται και διαφοροποιούνται σε οστεοβλάστες. Β. Οι ώριμοι οστεοβλάστες εκκρίνουν έναν τύπο κολλαγόνου (Τύπος Ι) που ονομάζεται οστεοειδές. Γ. Το κολλαγόνο αυτό ανοργανοποιείται για να σχηματίσει ένα κέντρο οστεοποίησης. Οι οστεοβλάστες τελικά διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα και παγιδεύονται μέσα στο νεοσυντιθέμενο οστό. (Kenkre & Bassett, 2017)

Το 1990 διατυπώνεται για πρώτη φορά ο όρος οστικός μεταβολισμός από τον Frost. (Frost, 1990) Σήμερα ορίζουμε τον οστικό μεταβολισμό ως τη διαδικασία εκείνη, με την οποία ανανεώνεται το οστό προκειμένου, ο σκελετός να έχει την ικανότητα να ρυθμίζει τη δική του συντήρηση και επιδιόρθωση, ώστε να εξασφαλίζεται κυρίως η ομοιόστασή του, στην περιεκτικότητά του σε ασβέστιο και φώσφορο. Ο κύκλος αναδιαμόρφωσης των οστών είναι μια ισχυρά ρυθμιζόμενη διαδικασία που αντικαθιστά παλαιά και κατεστραμμένα οστά με νέα και πραγματοποιείται μέσα σε μία βασική μονάδα (Basic Multicellular Unit- BMU). Η βασική αυτή πολυκυτταρική μονάδα του οστού αποτελεί τη μετάπτωση της μικροκατασκευαστικής μονάδας (BSU), όταν αυτή βρίσκεται σε διαδικασία ανακατασκευής. Η BMU αποτελείται από οστεοκλάστες, οστεοβλάστες και τριχοειδή αγγεία και απαιτεί τη συντονισμένη δράση των τεσσάρων μεγάλων τύπων οστικών κυττάρων : των οστικών επενδυτικών κύτταρων, των οστεοκυττάρων, των οστεοβλαστών και των οστεοκλαστών. (Hadjidakis & Androulakis, 2006)

Ο κύκλος αυτός πραγματοποιείται σε 5 επιμέρους φάσεις. Ξεκινάει από τη φάση ηρεμίας, όπου η ελεύθερη επιφάνεια της μεταβολικής μονάδας (BMU) ταυτίζεται με τη μικροκατασκευαστική του μονάδα (BSU) και επιστρώνεται από ανενεργά πεπλατυσμένα επενδυτικά κύτταρα, τα οποία προς το παρόν είναι μεταβολικά ανενεργά. Συνεχίζει με τη φάση της ενεργοποίησης, όπου διεγείρονται οι προ- οστεοκλάστες και μετατρέπονται σε οστεοκλάστες, οι οποίοι αφού συνδεθούν με πολυπύρηνα γιγαντοκύτταρα συγκεντρώνονται και αυτοί στην επιφάνεια της μονάδας και διαρκεί και στους δύο τύπους οστού περίπου 5-7 ημέρες. Η 3^{η} φάση του κύκλου, η φάση της απορρόφησης, διαρκεί 3-4 εβδομάδες στο σπογγώδες τμήμα του οστού και αντίστοιχα 6-10 εβδομάδες στο φλοιώδες τμήμα του οστού,

όπου δρουν σταδιακά οι οστεοκλάστες με την απορροφητική τους ικανότητα και αφαιρούν το περιεχόμενο της μονάδας. Στην επόμενη φάση, της κυτταρικής αναστροφής, οι οστεοκλάστες απομακρύνονται από τον πυθμένα της μονάδας και στη θέση τους εμφανίζονται οστεοβλάστες με τη δράση αυξητικών παραγόντων όπως ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας TGF-1 και ο ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας IGF-1. Οι παράγοντες αυτοί διεγείρουν τα αρχέγονα μεσεγχυματικά κύτταρα και οδηγούν στη δημιουργία των προ- οστεοβλαστών και οστεοβλαστών. Το στάδιο αυτό διαρκεί 7 ημέρες στο φλοιώδες οστό και 5 ημέρες στο σπογγώδες οστό. Ο κύκλος ολοκληρώνεται με τη φάση της οστικής παραγωγής, η οποία διαρκεί 2-3 μήνες στο φλοιώδες οστό και 145 ημέρες στο σπογγώδες οστό, όπου οι οστεοβλάστες εναποθέτουν σταδιακά το οστό, το οποίο θα είναι ισότοπο με αυτό που αρχικά απορροφήθηκε . (Εικόνα 5.) (Hadjidakis & Androulakis, 2006)



Εικόνα 5. Κύκλος οστικής αναδιαμόρφωσης. (Takenaka, 2011)

Η αναδιαμόρφωση των οστών αρχίζει πριν από τη γέννηση ενός ατόμου και ολοκληρώνεται με το θάνατο του. Η διαδικασία αυτή φαίνεται να αυξάνεται στις γυναίκες από την εμμηνόπαυση και στη συνέχεια επιβραδύνεται με την περαιτέρω γήρανση, αλλά συνεχίζει με ταχύτερο ρυθμό από ό, τι στις γυναίκες που βρίσκονται πριν από την εμμηνόπαυση. Η αναδημιουργία των οστών πιστεύεται ότι αυξάνεται ήπια στους ηλικιωμένους άντρες. (Clarke, 2008)

3.4. Διαταραχές του οστικού μεταβολισμού

Το 1994 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας όρισε την εμφάνιση των διαταραχών του οστικού μεταβολισμού, που πιθανά να εμφανιστούν με την πάροδο της ηλικίας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω , με βάση τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την μέτρηση

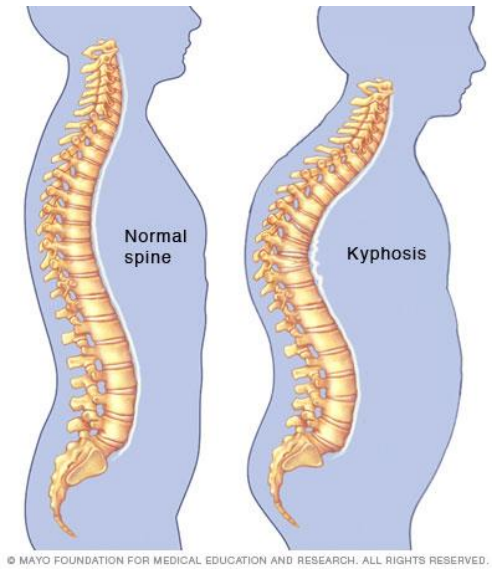
οστικής πυκνότητας , ως οστεοπενία και οστεοπόρωση. Η αρχική εμφάνιση διαταραχής της πυκνότητας των οστών του ανθρώπινου σώματος, που ονομάζεται οστεοπενία, με βάση το δείκτη T-Score, όπως αυτός προκύπτει από την μέτρηση οστικής πυκνότητας, τεκμηριώνει την ύπαρξη της οστεοπενίας, όταν οι τιμές του κυμαίνονται από -1.0 έως -2.5 . Αντίστοιχα, στην περίπτωση της οστεοπόρωσης , οι τιμές του T- Score, που υποδηλώνουν την ύπαρξή της, είναι μικρότερες του – 2.5 . (WHO, 1994)

3.5. Ορισμός Οστεοπόρωσης

Ως οστεοπόρωση ορίζεται η συστηματική σκελετική ασθένεια που χαρακτηρίζεται από χαμηλή οστική πυκνότητα και υποβάθμιση της μικροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού , με άμεσο αποτέλεσμα την αύξηση της ευθραυστότητας των οστών και του κινδύνου για κάταγμα. (4th International Symposium on Osteoporosis and Consensus Development Conference, 1993)Ο ορισμός αυτός, έπειτα αναθεωρήθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και ως οστεοπόρωση σήμερα ορίζεται η σκελετική διαταραχή που προδιαθέτει σε αυξημένο κίνδυνο κατάγματος. Έτσι, δίνεται έμφαση στην αντοχή των οστών και στον κίνδυνο κατάγματος και όλα τα θεραπευτικά σχήματα που συστήνονται στοχεύουν στην μείωση αυτού του κινδύνου. (WHO, 1994)

3.6. Τύποι Οστεοπόρωσης

Η οστεοπόρωση εμφανίζεται σε δύο διαφορετικές μορφές, την οστεοπόρωση τύπου I και στην οστεοπόρωση Τύπου II. Η οστεοπόρωση τύπου I εμφανίζεται σε νεαρότερες μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, κατά τα 15 χρόνια μετά την εμμηνόπαυση και εμφανίζεται προοδευτική απώλεια της οστικής μάζας που ετησίως κυμαίνεται σε ποσοστό 1-2% και διαρκεί για 5-10 χρόνια ή και περισσότερο. (Σταματοπούλου & Τσεκούρα, 2014) Στην Ελλάδα υπολογίζεται πως το 30% των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών έχει κλινικά ευρήματα οστεοπόρωσης τύπου I. Αυτή η μορφή προσβάλλει κυρίως τα σπογγώδη οστά, με κύριους εκπροσώπους τα σπονδυλικά σώματα και το περιφερικό άκρο της κερκίδας. Αποτέλεσμα αυτής της απώλειας οστού είναι η εμφάνιση των σπονδυλικών καταγμάτων, η έντονη ραχιαλγία και η σταδιακή απώλεια του αναστήματος με συνοδευτική κύφωση. Άμεση συνέπεια αυτής της κατάστασης είναι η σημαντική μείωση του αναστήματος σε αυτές τις γυναίκες. Όταν η κύφωση και η απώλεια ύψους είναι έντονες , τότε φαίνεται να δημιουργούνται σοβαρές κινησιολογικές διαταραχές συνδυασμένες με παραμορφώσεις εικόνας «πιθηκοειδούς» στάσης. (Ζαμπέλας, 2011)(Εικόνα 6.)



Εικόνα 6. Κλινική Εικόνα Κύφωσης σε ασθενείς με Οστεοπόρωση Τύπου Ι (Mayo Clinic, 2014)

Η οστεοπόρωση τύπου ΙΙ εμφανίζεται σε ηλικιωμένους, άνω των 70 ετών και των δύο φύλων με τρεις φορές μεγαλύτερη εμφάνιση στις γυναίκες σε σύγκριση με τους άντρες. Οφείλεται πιθανότατα σε ανεπάρκεια της βιταμίνης D και του ασβεστίου, καθώς και σε υπερίσχυση των καταβολικών διεργασιών έναντι των αναβολικών του οστού. Προσβάλλει κυρίως τα φλοιώδη οστά και χαρακτηρίζεται από κατάγματα του περιφερικού σκελετού και συχνότερα του άνω άκρου του μηριαίου οστού. Το 25% των γυναικών ηλικίας άνω 70 ετών εμφανίζει κατάγματα οφειλόμενα κατά κύριο λόγο στην οστεοπόρωση, προσβάλλει και τα δύο φύλα, αλλά σε υπερδιπλάσια συχνότητα τις γυναίκες απ' ό,τι τους άνδρες, ενώ αυτού του είδους τα κατάγματα αποτελούν βασική αιτία νοσηρότητας και αυξημένης θνητότητας στην τρίτη ηλικία. (Σταματοπούλου & Τσεκούρα, 2014)

3.7. Παθοφυσιολογία της Οστεοπόρωσης

Ο κύκλος της ανακατασκευής ενός οστού χαρακτηρίζεται από εξισορρόπηση της οστικής απορρόφησης και της αναδημιουργίας του οστού. Η βασική αιτία πρόκλησης της οστεοπόρωσης είναι η δημιουργία ενός μακροχρόνιου αρνητικού ισοζυγίου οστού. Αυτό το αρνητικό ισοζύγιο πιθανά να οφείλεται είτε σε αυξημένη οστεοκλαστική δραστηριότητα και σύγχρονη φυσιολογική οστεοβλαστική δράση είτε σε φυσιολογική οστεοκλαστική δράση και ταυτόχρονα σε μειωμένη οστεοβλαστική δράση. Η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση προκύπτει μοιραία, λόγω της αύξησης του ρυθμού απορρόφησης του οστού. Άμεση συνέπεια αυτής της αύξησης είναι η εμφάνιση αυξημένων τιμών αλκαλικής φωσφατάσης και

οστεοκαλσίνης στον ορό, με αποτέλεσμα να γίνεται αντιληπτό το γεγονός ότι εμφανίζεται με αυτόν τον τρόπο μία αυξημένη δραστηριότητα των οστεοβλαστών, που συνοδεύεται από τη χαρακτηριστική μείωση των οιστρογόνων σε αυτήν την ηλικία. (Lane, 2006) Αυτή η μείωση διαταράσσει τη δράση των ορμονών που σχετίζονται με το μεταβολισμό του ασβεστίου και των παραγόμενων κυτταροκινών από τους οστεοβλάστες όπως η IL-1, η IL-6, ο TGF- β, η προσταγλαδίνη E2 και ο IGF-1 και ο IGF-2. (Ζαμπέλας, 2011)

Η διαδικασία αυτή της ραγδαίας εξέλιξης της οστικής απώλειας αρχίζει αμέσως μετά την εμμηνόπαυση. Τόσο τα σπογγώδη οστά, όσο και τα φλοιώδη οστά χάνουν ανόργανα συστατικά, όμως η απώλεια και ο καταβολισμός του σπογγώδους ιστού είναι χαρακτηριστικά μεγαλύτερη και προσεγγίζει το 5-20 % της απώλειας των ανόργανων στοιχείων του οστού, σε σύγκριση με αυτήν του φλοιώδους οστού. Για αυτό το λόγο, η οστεοπόρωση συνδέεται ισχυρότερα με κατάγματα σε σπονδύλους, στον αυχένα της κεφαλής του μηριαίου οστού και στην κερκίδα. (Warriner, et al., 2011) Με την πάροδο της ηλικίας (>65 ετών) ο ρυθμός απώλειας της οστικής μάζας μειώνεται, με αποτέλεσμα να μην εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της πιθανότητας κατάγματος σε άντρες και γυναίκες. (WHO, 1994)

3.8. Διατροφικοί παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση και τη θεραπευτική αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης

Η ισορροπημένη διατροφή αποτελεί έναν από τους κυριότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επιδρούν στην απόκτηση της γενετικά προκαθορισμένης κορυφαίας οστικής μάζας. Για αυτό το λόγο μεγάλη έμφαση δίνεται στην επαρκή πρόσληψη ασβεστίου, βιταμίνης D, πρωτεΐνης ,καθώς και στην περιορισμένη κατανάλωση νατρίου, καφεΐνης και αλκοόλ. (Ζαμπέλας, 2011)

3.8.1. Ασβέστιο

Το μεγαλύτερο ποσοστό ασβεστίου (99%) εντοπίζεται στα οστά και στα δόντια διαθέτοντας δομικό ρόλο. Όλη η ποσότητα ασβεστίου που υπάρχει στο ανθρώπινο σώμα προέρχεται αποκλειστικά από τη διατροφή και για αυτό το λόγο η εξασφάλιση της επαρκούς πρόσληψης του, αποτελεί βασική προϋπόθεση για την εμφάνιση της μέγιστης κορυφαίας οστικής μάζας. Το ασβέστιο που προσλαμβάνεται μέσω της τροφής απορροφάται από τον εντερικό βλεννογόνο με τη συνεργιστική δράση της βιταμίνης D, ενώ στους ενήλικες μόλις ένα ποσοστό 30% απορροφάται από το έντερο και για αυτό το λόγο αλλάζει η συνιστώμενη

διατροφική πρόσληψή του ανάλογα με την ηλικία. Οι κυριότερες διαιτητικές πηγές ασβεστίου είναι όλα τα γαλακτοκομικά προϊόντα (γάλα, γιαούρτι, τυρί), καθώς επίσης και τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά (μπρόκολο, λάχανο, ραδίκια, σπανάκι, γογγύλια), τα φασόλια, τα ολόκληρα δημητριακά, το σουσάμι και τα προϊόντα του, το ταχίνι, ο χαλβάς, τα λιπαρά ψάρια και αυτά τα οποία καταναλώνονται με τα κόκαλα (π.χ. σαρδέλα). Ιδανικά τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν την πρώτη επιλογή πρόσληψης ασβεστίου, αφού έχουν την ικανότητα να απορροφούνται και απουσία της βιταμίνης D και όλες οι προαναφερόμενες πηγές συνιστώνται βοηθητικά. (Διονυσιώτης, και συν., 2018)

3.8.2. Βιταμίνη D

Η βιταμίνη D αποτελεί προιόν φυτικών πηγών και της χοληκαλσιφερόλης και έχει την ικανότητα να παράγεται, έπειτα από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία στο δέρμα του ανθρώπου. Οι πρόδρομες μορφές της μετατρέπονται στο ήπαρ σε 25-υδροξυβιταμίνη D και στη συνέχεια μεταφέρεται στα νεφρά, όπου μετατρέπεται στην ενεργό μορφή της ως 1,25-διυδροξυβιταμίνη D. Η διαιτητική πρόσληψη της βιταμίνης D δεν είναι τόσο υψηλή, καθώς οι πηγές της είναι περιορισμένες με κύριους εκπροσώπους τους κρόκους αυγών, τα λιπαρά ψάρια (τόνος, σολομός, σαρδέλα, σκουμπρί) και τα γαλακτοκομικά προϊόντα και προϊόντα μαργαρίνης εμπλουτισμένα με βιταμίνη D. Η συνιστώμενη ημερήσια πρόσληψη της βιταμίνης D αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας, με αποτέλεσμα να απαιτείται η εξωγενής χορήγηση συμπληρωμάτων, ώστε να καλύπτονται οι ημερήσιες ανάγκες. (Διονυσιώτης, και συν., 2018)

3.8.3. Πρωτεΐνες

Η υψηλή πρόσληψη πρωτεΐνης συνοδεύεται από αυξημένη νεφρική απέκκριση του ασβεστίου, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται έντονα ο μεταβολισμός του ασβεστίου και η εξασφάλιση των ημερήσιων αναγκών του. Από την άλλη πλευρά, η μειωμένη πρόσληψη πρωτεϊνών κάτω από τις ημερήσιες ανάγκες, ιδιαίτερα κατά την περίοδο της ανάπτυξης, έχει ως άμεσο επακόλουθο τη μείωση της ανάπτυξης και τη μείωση στο σχηματισμό του φλοιώδους οστού και άρα την ελάττωση της κορυφαίας οστικής μάζας. (Διονυσιώτης, και συν., 2018)

3.8.4. Νάτριο

Το νάτριο συνεισφέρει αρνητικά στην απέκκριση του ασβεστίου. Μελέτες έχουν δείξει πως η αυξημένη πρόσληψη νατρίου, έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την αυξημένη απέκκριση ασβεστίου, αφού για κάθε 2,3 γρ. νατρίου που αποβάλλονται από τα νεφρά συμπαρασύρονται 40-60 mg ασβεστίου. Οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες είναι ιδιαίτερα ευάλωτες από τη σχέση αυτή, καθώς έχει φανεί ότι η κατανάλωση επιπλέον νατρίου την ημέρα κατά 1 γρ. οδηγεί σε 1% επιπλέον απώλεια οστικής μάζας. Για αυτό το λόγο συστήνεται η μέτρια κατανάλωση νατρίου. (Διονυσιώτης, και συν., 2018)

3.8.5. Αλκοόλ

Η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ συσχετίζεται με μειωμένη οστική πυκνότητα και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καταγμάτων, είτε λόγω της κυτταροτοξικής δράσης που φαίνεται να προκαλεί στους οστεοβλάστες , είτε επιδρώντας σε ορμόνες που σχετίζονται με τον οστικό μεταβολισμό. Επιπρόσθετα, ευρήματα ερευνών καταδεικνύουν την άμεση συσχέτιση μεταξύ αυξημένης κατανάλωσης αλκοόλ και των μειωμένων συγκεντρώσεων ασβεστίου στον ορό, καθώς και των αυξημένων επιπέδων της παραθορμόνης. Για αυτό το λόγο συστήνεται η μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, αφού η μακροχρόνια κατάχρησή του φέρει δυσμενείς επιπτώσεις στην εμφάνιση και την εξέλιξη της οστεοπόρωσης. (Διονυσιώτης, και συν., 2018)

3.8.6. Καφεΐνη

Η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων καφεΐνης (>8 ποτήρια/ημέρα) φαίνεται να αυξάνουν την απέκκριση ασβεστίου στα ούρα και συσχετίζονται με την απώλεια οστικής μάζας σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, καθώς φαίνεται πως όσα άτομα καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες καφεΐνης τείνουν να καταναλώνουν μικρές ποσότητες γαλακτοκομικών προϊόντων. (Διονυσιώτης, και συν., 2018)

3.9. Βιοχημικοί Δείκτες Οστικού Μεταβολισμού

Οι δείκτες του σχηματισμού οστών είναι προϊόντα ενεργών οστεοβλαστών που εκφράζονται κατά τη διάρκεια των διαφορετικών φάσεων της ανάπτυξης οστεοβλαστών. Θεωρούνται ότι αντανακλούν διάφορες πτυχές της λειτουργίας των οστεοβλαστών και του σχηματισμού οστού, αφού κατά την ανακατασκευή των οστών εκλύονται προϊόντα του μεταβολισμού τους, όπως ένζυμα ή συστατικά της θεμέλιας ουσίας στην κυκλοφορία του

αίματος είτε αποβάλλονται μέσω των ούρων. Για αυτό το λόγο οι τιμές των δεικτών αυτών μετριούνται στον ορό ή στο πλάσμα. (Seibel, 2005)

3.9.1. Οστεοκαλσίνη Ορού

Η οστεοκαλσίνη του ορού είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύεται με τον υδροξυαπατίτη και έχει μοριακό βάρος 5.8kDa.Συντίθεται αποκλειστικά από τους οστεοβλάστες, τους οδοντοβλάστες σε μικρότερες ποσότητες και από τα υπερτροφικά χονδροκύτταρα. Συμμετέχει στην ικανότητα πρόσδεσης του ασβεστίου με τις πρωτεΐνες παρουσία του 3 -γ-καρβοξυγλουταμικού οξέος (Gla) που εξαρτάται από τη βιταμίνη Κ. Προηγούμενες έρευνες έχουν δείξει ότι η οστεοκαλσίνη εμπλέκεται στη διαδικασία της οστεοειδούς ανοργανοποίησης, καθώς η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται κυρίως, κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης του σχηματισμού οστού. Παρόλο που είναι γνωστή όμως εδώ και περισσότερα από 20 χρόνια, η ακριβής της λειτουργία δεν έχει ακόμη καθοριστεί. (Seibel, 2005)

Η οστεοκαλσίνη αποτελεί έναν ειδικό δείκτη για τη λειτουργία των οστεοβλαστών. Εκτιμάται ότι, αμέσως μετά την απελευθέρωσή της από τους οστεοβλάστες, το μεγαλύτερο μέρος της νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης ενσωματώνεται στην εξωκυτταρική μήτρα των οστών, όπου αποτελεί περίπου το 15% . Τα επίπεδα της ανοσοαντιδραστικής καλσιτονίνης στον ορό έχουν δείξει ότι συσχετίζονται καλά με το ρυθμό σχηματισμού οστού .Ωστόσο, το πεπτίδιο αυτό υπόκειται άμεσα σε ταχεία αποικοδόμηση στον ορό, έτσι ώστε ταυτόχρονα να κυκλοφορούν τόσο τα ακέραια πεπτίδια όσο και τα διαφόρων μεγεθών θραύσματα της καλσιτονίνης. Τα επίπεδα της οστεοκαλσίνης ακολουθούν έναν κιρκάδιο ρυθμό που χαρακτηρίζεται από μία πτώση των επιπέδων της κατά τις πρωινές ώρες με ελάχιστη τιμή στις μεσημεριανές ώρες και αυξάνεται σταδιακά με μέγιστη τιμή γύρω στα μεσάνυχτα. Τέλος, η οστεοκαλσίνη έχει ευρεία διαθεσιμότητα, υψηλή ειδικότητα και χαμηλή ενδοατομική μεταβλητότητα. (Seibel, 2005)

3.9.2. Παραθορμόνη

Η παραθορμόνη παράγεται από τους παραθυρεοειδείς αδένες και αποτελεί την κύρια ορμόνη, η οποία επιδρά στην αναδιαμόρφωση των οστών. Εξαρτάται από τη συγκέντρωση ασβεστίου, αφού ρυθμίζει το μεταβολισμό του και δρα άμεσα πάνω στα εκκριτικά κύτταρα των αδένων , μέσω αντίστοιχων διαμεμβρανικών υποδοχέων. Η μείωση της συγκέντρωσης του ασβεστίου του πλάσματος διεγείρει την έκκριση της παραθορμόνης και αντίστοιχη αύξησή της

μειώνει την έκκρισή της. Βιβλιογραφικά φαίνεται πως η ορμόνη αυτή ακολουθεί ένα κιρκάδιο ρυθμό με μεγιστοποίηση της έκκρισής της νωρίς το πρωί και σταδιακή μείωση αργά το πρωί και μια δεύτερη, χαμηλότερη κορύφωση το απόγευμα, πιθανότατα σχετιζόμενο με τις μεταβολές ασβεστίου, φωσφορικού οξέος και καλσιτριόλης, τα οποία μπορούν να τροποποιηθούν με τη διατροφική πρόσληψη αυτών των συστατικών. Στην πραγματικότητα, τα επίπεδα της PTH μειώνονται κατά περίπου 20% κάτω από τον ετήσιο μέσο όρο κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και αντικατοπτρίζουν τις ετήσιες διακυμάνσεις της συγκέντρωσης της βιταμίνης D και της οστικής ανακατασκευής. (Chiavistelli, Giustina, & Mazziotti, 2015)

Η παραθορμόνη εξασκεί πολλαπλές δράσεις, οι οποίες αυξάνουν τη συγκέντρωση του ασβεστίου στο πλάσμα του αίματος, αντισταθμίζοντας έτσι, τη μειωμένη συγκέντρωσή του, η οποία σηματοδοτεί την έκκριση αυτής της ορμόνης. Έτσι αρχικά αυξάνει την οστική απορρόφηση από τους οστεοκλάστες, η οποία επιφέρει μεταφορά ασβεστίου και φωσφορικών ιόντων από το οστό στο εξωκυττάριο υγρό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να διεγείρεται άμεσα ο σχηματισμός της 1,25- διυδροξυβιταμίνης D3, η οποία στη συνέχεια αυξάνει την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου. Τέλος, αυξάνει άμεσα τη νεφρική επαναρρόφηση του ασβεστίου , μειώνοντας έτσι την απέκκρισή του στα ούρα. Για αυτό το λόγο η παραθορμόνη έχει αποτελέσει αντικείμενο έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος, καθώς η λειτουργικότητά της σαν αναβολικός παράγοντας, την έχει κατατάξει στις θεραπευτικές επιλογές για την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης. Αποτελεί το μόνο φάρμακο που έχει εγκριθεί από την FDA για τη θεραπεία της οστεοπόρωσης, που διεγείρει τον σχηματισμό οστού όταν χορηγείται καθημερινά. Παρόλα αυτά, η συνεχής έγχυσή της προκαλεί σοβαρή απώλεια οστού σύμφωνα με τα γνωστά καταβολικά αποτελέσματά της. Είναι ενδιαφέρουσα η διττή φύση της καθώς, ενώ η συνεχής έγχυση της PTH προκαλεί οστική απώλεια, η διαλείπουσα χορήγηση PTH προκαλεί σχηματισμό οστού. Αυτό το αναβολικό χαρακτηριστικό της PTH την καθιστά μια ιδιαίτερα ελκυστική θεραπεία για τους ασθενείς με οστεοπόρωση, σε σύγκριση με τις άλλες διαθέσιμες θεραπείες, όπως τα διφωσφονικά και η ραλοξιφαίνη, τα οποία δρουν με διακοπή ή επιβράδυνση της οστικής απορρόφησης. (Qin, Raggatt, & Partridge, 2004)

3.10. Συσχέτιση του εντερικού μικροβιόκοσμου με τον οστικό μεταβολισμό

Όπως ήδη αναφέρθηκε ο εντερικός μικροβιόκοσμος επηρεάζει τον ανθρώπινο οργανισμό σε πολλά επίπεδα, συμπεριλαμβανομένων των δράσεων που ασκεί σε ανοσολογικό και μεταβολικό επίπεδο. Πρόσφατες έρευνες συσχετίζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο με τον οστικό μεταβολισμό, αφού η επίδραση του μικροβιώματος στο ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου φαίνεται να επηρεάζει την οστεοκλαστογέννεση σε συνδυασμό με μειωμένη έκκριση κυτταροκινών, οι οποίες παράγονται σε μεγαλύτερο βαθμό στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, λόγω ραγδαίας μείωσης των συγκεντρώσεων οιστρογόνων τους στον ορό. Αρκετές μελέτες δείχνουν ότι η χαμηλού βαθμού φλεγμονή επηρεάζει το φυσιολογικό κύκλο των οστών και παίζει βασικό ρόλο στις παθολογικές σκελετικές καταστάσεις, όπως η οστεοπόρωση. Συγκεκριμένα τα μέτρια αυξημένα επίπεδα ορού υψηλής ευαισθησίας C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (hsCRP), φαίνεται να σχετίζονται με χαμηλή οστική πυκνότητα, αυξημένη οστική απορρόφηση, απώλεια οστικής μάζας και αυξημένο κίνδυνο κατάγματος. Σύμφωνα με αυτά τα στοιχεία, η συμπλοκοποίηση του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNFa) με τις φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και την ιντερλευκίνη 1 (IL-1) οδηγεί σε μείωση των δεικτών επαναρρόφησης των οστών σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ειδικά στην αρχή της εμμηνόπαυσης. (Ohlsson & Sjögren , 2015) Συνεπώς, η ανισορροπία κατά τη διάρκεια του οστικού μεταβολισμού μπορεί να οδηγήσει σε οστική απώλεια και οστεοπόρωση. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η απουσία του εντερικού μικροβιόκοσμου σε ποντίκια που δεν είναι αποικισμένα από μικροοργανισμούς οδηγεί σε αυξημένη οστική μάζα, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ποντίκια (CONV-R), ενώ και η αυξημένη οστική μάζα συσχετίστηκε με μειωμένη έκφραση των φλεγμονωδών κυτταροκινών και μειωμένη οστεοκλαστογέννεση. Ακόμα, πρωτόκολλα, τα οποία εστίασαν στη χορήγηση αντιβιοτικών και την επίδρασή τους στον εντερικό μικροβιόκοσμο κατέδειξαν αλλαγή τόσο στη σύσταση του μικροβιόκοσμου, όσο και μείωση στην οστική μάζα των εθελοντών. Αντιθέτως, η χορήγηση προβιοτικών και πρεβιοτικών ουσιών που επιδρούν άμεσα στο εντερικό μικροβίωμα και το ανοσοποιητικό σύστημα, φαίνεται να έχουν ευεργετική επίδραση στην οστική μάζα, λόγω των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων τους. (Ohlsson & Sjögren , 2015)

Η επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στα οστά και οι επιδράσεις της διατροφής σε αυτά είναι ακόμα αδιευκρίνιστη. Μια δημοφιλής θεωρία, είναι ότι οι διαιτητικές ίνες (ανθεκτικές στην πέψη) φθάνουν στο παχύ έντερο έντερο, όπου το μικροβιακό φορτίο της

περιοχής ζυμώνει την ίνες και τις μετατρέπει σε λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFA). Το προκύπτον περιβάλλον με μειωμένο pH έχει θεωρηθεί ότι μειώνει τη συμπλοκοποίηση στοιχείων, όπως ο σχηματισμός του φωσφορικού ασβεστίου και σηματοδοτεί την αύξηση των συγκεντρώσεων και την απορρόφηση των στοιχείων που σχετίζονται με τον οστικό μεταβολισμό, όπως είναι το ασβέστιο. Παράλληλα, τα λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας επηρεάζουν τις οδούς σηματοδότησης, οι οποίες μεταβάλλουν τον μεταβολισμό ή τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του εντέρου. Αυτό υποδηλώνει ότι, οι προκαλούμενες αλλαγές στο μικροβίωμα από τις διαιτητικές ίνες, που αυξάνουν τη ζύμωση μπορεί να παράγουν ισχυρά μόρια σηματοδότησης, τα οποία θα μπορούσαν να έχουν εκτεταμένες επιδράσεις, πιθανώς συμπεριλαμβανομένης της αλλοιώσεως της απορρόφησης των αλάτων. (Weaver, 2015)Παρόλα αυτά, απαιτούνται ακόμα περισσότερες μελέτες, προκειμένου να διευκρινιστεί ο ακριβής μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ του εντερικού μικροβιόκοσμου και του οστικού μεταβολισμού.

Β΄ ΜΕΡΟΣ: ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ. 1: Υλικά και Μέθοδοι

1.1. Σκοπός

Η συγκεκριμένη μελέτη είχε ως στόχο τη διερεύνηση των επιδράσεων των προϊόντων της ζύμωσης του *Ganoderma lucidum* (μανιτάρια και πλούσια σε β-γλυκάνες εκχυλίσματα από τα μανιτάρια) από τον εντερικό μικροβιόκοσμο σε καλλιέργειες οστεοβλαστών, προσπαθώντας να προσομοιάσει *in vitro* την πιθανή πρεβιοτική δράση του μανιταριού.

1.2. Χαρακτηριστικά εθελοντριών-Αξιολόγηση

Για την παρούσα μελέτη στρατολογήθηκαν γυναίκες ηλικίας 55 έως 65 ετών (± 3 έτη), που βρίσκονταν στην εμμηνόπαυση, είχαν φυσιολογικό βάρος (BMI <30 kg/m^2), δεν είχαν λάβει αντιβιοτικά τους τελευταίους δύο μήνες πριν την έναρξη της μελέτης και δε βρίσκονταν σε διαδικασία απώλειας σωματικού βάρους. Άτομα που λάμβαναν συμπληρώματα διατροφής, που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των οστών (Ca, βιταμίνη D, cod oil) για 6 μήνες πριν τη λήψη των δειγμάτων αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Αποκλείστηκαν, επίσης, ασθενείς αυτοάνοσων νοσημάτων (π.χ. Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης Νόσος του Εντέρου), άτομα που έπασχαν από Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου, όσοι αντιμετώπιζαν κάθε είδους δυσκοιλιότητα ή διάρροια, καθώς και άτομα με σοβαρές νεφρικές ή ηπατικές νόσους, στεφανιαία νόσο, καρκίνο και οποιαδήποτε παθολογική κατάσταση του θυρεοειδούς. Οι εθελόντριες δεν κατανάλωσαν συμπληρώματα διατροφής ή εμπλουτισμένα τρόφιμα που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο όπως προβιοτικά, πρεβιοτικά και συνβιοτικά.

1.3. Ανθρωπομετρικές μετρήσεις και Διατροφική αξιολόγηση

Στην αρχή της μελέτης όλα τα άτομα έλαβαν οδηγίες προκειμένου να μην αλλάξουν τις διατροφικές τους συνήθειες πριν τη δειγματοληψία, να μην ακολουθήσουν κάποια δίαιτα περιορισμένου θερμιδικού περιεχομένου και να διατηρήσουν το υπάρχον σωματικό τους βάρος. Πραγματοποιήθηκε διατροφική αξιολόγηση των συμμετεχόντων, ανθρωπομετρικές μετρήσεις (σωματικού βάρους, ύψους, δείκτη μάζας σώματος, οστικής πυκνότητας με οστεοπυκνόμετρο DEXA), αιμοληψία και επιπλέον, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της

φυσικής δραστηριότητας των εθελοντριών μέσα από ένα σύντομο ερωτηματολόγιο 7 ερωτήσεων (PAQ). Έτσι, συλλέχθηκαν τα απαραίτητα δεδομένα για το διαχωρισμό των εθελοντριών σε δύο επιμέρους ομάδες: τις εθελόντριες με φυσιολογική οστική πυκνότητα και τις εθελόντριες με οστεοπενία.

Στη συνάντηση, όπου λήφθηκαν όλα τα απαραίτητα δεδομένα, έλαβε χώρα και μια μικρή συνέντευξη στην οποία η κάθε εθελόντρια ενημερωνόταν για τη διαδικασία καταγραφής ενός 3ήμερου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων για δύο ημέρες καθημερινές και μία ημέρα εντός σαββατοκύριακου πριν από την ημέρα της συλλογής της κένωσης.

1.4. Πρωτόκολλο για την εκχύλιση των πολυσακχαριτών (β-γλυκανών) από μανιτάρια του *Ganoderma lucidum*

Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν οι β-γλυκάνες από τα μανιτάρια του *Ganoderma lucidum*, ως υπόστρωμα για ζύμωση από τον εντερικό μικροβιόκοσμο των εθελοντριών , ήταν απαραίτητη η εκχύλιση τους από τα λυοφιλιωμένα μανιτάρια και στη συνέχεια η λυοφιλίωσή τους. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν αναλογικά η ακόλουθη για 10 g λυοφιλιωμένου δείγματος (μανιταριού) που εμβαπτίστηκε σε 400 ml H2O (1:40 g/ml):

- Θέρμανση στους 95^{0}C για πέντε ημέρες (περίπου 50 ώρες).
- Φυγοκέντρηση στις 10.000 g για 15 min στους 2 ^{0}C.
- Συμπύκνωση στο rotary evaporator μέχρι τελικού όγκου 30-40 ml.
- Συντήρηση του συμπυκνωμένου δείγματος στο ψυγείο για 24 ώρες και της αιθανόλης που θα χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση στην κατάψυξη στους -80° C.
- Ανάδευση για 30 min, μετά από προσθήκη της αιθανόλης στο συμπυκνωμένο δείγμα με αναλογία 1:1.
- Φυγοκέντρηση στις 10.000 g για 15 min στους 2 ^{0}C.
- Παραλαβή διηθήματος.
- Λυοφιλίωση για 24 h.

(Wang, Zhang, Zhao, Wang, Wu, & Yao, 2010)
(Chen, Wang, Zhang, & Huang, 2012)
(Ruthes, Smiderle, & Iacomini, 2015)
(Synytsya, et al., 2009)

1.5. Δειγματοληψία και επεξεργασία κοπράνων

Στην πρώτη συνάντηση, αφού πραγματοποιήθηκαν οι απαραίτητες μετρήσεις, δόθηκε στις εθελόντριες ένας πλαστικός προζυγισμένος συλλέκτης, ώστε να φέρουν μέσα σε αυτόν, το δείγμα της κένωσης την ημέρα της δειγματοληψίας. Η πλήρης κένωση της κάθε εθελόντριας συλλέχθηκε εντός του συστήματος πλαστικού συλλέκτη-σακούλας και μεταφέρθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών (Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ.), το συντομότερο δυνατόν (≤ 2 ώρες από την ώρα κένωσης) για μικροβιολογική ανάλυση. Η πλήρης κένωση ζυγίστηκε σε εργαστηριακό ζυγό και ομογενοποιήθηκε μηχανικά. Η ομογενοποιημένη ποσότητα κοπράνων μεταφέρθηκε σε falcon μέσα σε δοχείο με πάγο εντός του αναερόβιου θαλάμου και επεξεργάστηκε (η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στη συνέχεια) για τον εμβολιασμό των υποστρωμάτων με πηγή άνθρακα που θα υποστούν ζύμωση (ινουλίνη 1%, ινουλίνη 2%, μανιτάρι *Ganoderma lucidum* και εκχύλισμα β-γλυκανών μανιταριού *Ganoderma lucidum*) .

1.6. Πρωτόκολλο *in vitro* ζύμωσης σε στατικές καλλιέργειες (Static batch culture fermentations)

Η διαδικασία περιελάμβανε πριν από την παραλαβή των κοπράνων – εμβολίων από τις εθελόντριες την προετοιμασία των υποστρωμάτων. Για το σκοπό αυτό έπρεπε να προετοιμαστούν και να αποστειρωθούν από την προηγούμενη ημέρα, το μέσο αραίωσης του εμβολίου των κοπράνων (faecal slurry), δηλαδή to Phosphate-buffered saline και το Βασικό Υλικό της καλλιέργειας (Basal culture medium) στο οποίο διαλυτοποιείται η πηγή άνθρακα και γίνεται η ζύμωση.

Για το Phosphate-buffered saline (PBS) ακολουθήθηκε η ακόλουθη συνταγή:

- 8 g/L NaCl
- 0.2 g/L KCL
- 1.15 g/L Na2HPO4
- 0.2 g/L KH2PO4

Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 7.3.

Το PBS χρησιμοποιήθηκε για τη προετοιμασία του εμβολίου από κόπρανα - faecal slurry (20% w/v δηλαδή ομογενοποιήθηκαν 20g κοπράνων σε 100ml PBS) (Palframan, Gibson, & Rastall, 2002)

Για το Βασικό Υλικό της καλλιέργειας ακολουθήθηκε η εξής συνταγή:

Basal culture medium (Rycroft, Jones, Gibson, & Rastall , 2001)**:**

- 2 g/L peptone water
- 2 g/L yeast extract
- 0.1 g/L NaCL
- 0.04 g/L K2HPO4
- 0.04 g/L KH2PO4
- 0.01 g/L MgSO4.7H2O
- 0,01 CaCl2.6H2O (ή 0,01 g/L CaCl2.2H2O)
- 2 g/L NaHCO3
- 0.5 g/L cysteine-HCl
- 0.5 g/L bile salts
- 0.005 g/L hemin (διαλυμένη σε λίγες σταγόνες 1 M NaOH) (0,005-0,02 g άλλοι)
- 0.2 ml/L Tween 80 10 μl/L vitamin K1 (10 μg/ml)

Ρύθμιση του pH του διαλύματος στο 7.0 με 1M HCl (Rycroft, Jones, Gibson, & Rastall , 2001)

Το Basal culture medium στη συνέχεια τροποποιήθηκε γιατί μετά από έλεγχο που έγινε στη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς φάνηκε ότι εμφάνιζε κυτταροτοξικότητα. Στις τροποποιήσεις που έγιναν αφαιρέθηκε η ρεζαζουρίνη και έγινε υποδεκαπλασιασμός των συγκεντρώσεων της αιμίνης (hemin) (Zhang, Huang, Zeng, Wu, & Peng, 2013)και του Tween-80. (Hamzeloo-Moghadam, Taiebi, Mosaddegh, Eslami Tehrani, & Esmaeili, 2014)

Το Basal culture medium μοιράστηκε ανά 45ml σε φιάλες Durham και τα διαλύματα αποστειρώθηκαν στους 121° C για 15min. Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, το βασικό υλικό καλλιέργειας μεταφέρθηκε εντός αναερόβιου θαλάμου προκειμένου να προ-αναχθεί για περίπου 12 ώρες πριν την παραλαβή της κένωσης.

Την ημέρα της *in vitro* ζύμωσης, αφού έφτασε ο προζυγισμένος συλλέκτης με την πλήρη κένωση ζυγίστηκε σε εργαστηριακό ζυγό με ακρίβεια 0.1g, διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα PBS pH 7.3 (20%w/v) (faecal slurry) και ομογενοποιήθηκε μηχανικά σε κατάλληλο όργανο (Stomacher, Seward, USA), μέχρι να καταστεί οπτικά ομοιογενές το εμβόλιο (περίπου 20sec).

Την ίδια ημέρα ζυγίστηκαν εντός αποστειρωμένου αλουμινόχαρτου τα λυοφιλιωμένα μανιτάρια (0.9g), τα εκχυλίσματά τους (0.45g) και η ινουλίνη (0.45g και 0.9g). Τα ζυγισμένα

υποστρώματα μεταφέρθηκαν στα δοχεία Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας μέσα στον αναερόβιο θάλαμο. Επιπλέον, σε δύο δοχεία Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας προστέθηκε η ινουλίνη, ενώ στο πείραμα συμπεριλήφθηκε και ένα δοχείο Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς πηγή άνθρακα (αρνητικός μάρτυρας, NC).

Όλα τα δοχεία εμβολιάστηκαν ασηπτικά με 10% (v/v) από το εμβόλιο κοπράνων (5ml faecal slurry σε 45ml basal medium) και οι στατικές καλλιέργειες (50ml) επωάστηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37 oC για 24h (με βιδωμένα χαλαρά καπάκια). Στους χρόνους 0h, 8h και 24h απομακρύνθηκαν από τον αναερόβιο θάλαμο τα αντίστοιχα δείγματα (φυλάχθηκαν σε πάγο μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας), προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι βιοχημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις [υπερκείμενα για κυτταροκαλλιέργειες, ποσοτικός μοριακός προσδιορισμός μικροοργανισμών (1 mL), προσδιορισμός λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (1 mL)].

Για την επίδραση των προϊόντων της ζύμωσης στην κυτταροκαλλιέργεια (χρόνο 0h) ελήφθησαν δείγματα όγκου 2 X 2ml σε αποστειρωμένα eppendorf 2 ml (τα δείγματα στα eppendorfs φυλάχθηκαν σε πάγο μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας στον αναερόβιο). Στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 20.000g για 15min στους 4 ^{o}C και μεταφέρθηκε το υπερκείμενο σε νέο αποστειρωμένο eppendorf εντός του θαλάμου νηματικής ροής. (στους -80 ^{o}C)

Για την αντίστοιχη παρέμβαση των προϊόντων της ζύμωσης μετά από 24h ελήφθη το υπόλοιπο της καλλιέργειας σε σωλήνες falcon 50ml και φυγοκεντρήθηκαν στις 4000rpm (3200g) για 40 min στους 4 ^{o}C. Μετά τη φυγοκέντρηση, τοποθετήθηκαν οι σωλήνες σε στατώ προσεκτικά στο θάλαμο νηματικής ροής και συλλέχθηκε το υπερκείμενο με αναρρόφηση. Στη συνέχεια έγινε διήθηση με με μικροβιολογικό ηθμό (διάμετρος 0,2μm). Τέλος, τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -80 ^{o}C.

Τα υποστρώματα που εμβολιάστηκαν ήταν τα ακόλουθα:

<u>Υποστρώματα :</u>

- **Μανιτάρι *Ganoderma Lucidum* BS LGAM9720**
  - αναλογία 2% (w/v) (0.9g), κωδικός GLBS
- **Εκχύλισμα μανιταριού *Ganoderma lucidum* BS LGAM9720**
  - σε αναλογία 1% (w/v) (0.45g), κωδικός GLBSE

- **Ινουλίνη**

  ο ως θετικός μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση (Orafti® GR, BENEO- Orafti, Oreye, Belgium) σε αναλογία 1% (w/v) (0.45g), κωδικός INU1

- **Ινουλίνη**

  ο ως θετικός μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση (Orafti® GR, BENEO- Orafti, Oreye, Belgium) σε αναλογία 2% (w/v) (0.9g), κωδικός INU2

- **Αρνητικός μάρτυρας (Negative Control)**

  μη προσθήκη πηγής άνθρακα, κωδικός NC

1.7. Κυτταροκαλλιέργειες

1.7.1. Κυτταρική σειρά MG-63 οστεοβλαστικού φαινοτύπου

Η κυτταρική σειρά MG-63, που επιλέχθηκε προκειμένου να επιδράσουμε σε αυτήν τα υπερκείμενα των ζυμώσεων, παρότι έχει προέλθει από ανθρώπινο οστεοσάρκωμα, παρουσιάζει πολλά από τα χαρακτηριστικά των οστεοβλαστών. Έχει την ικανότητα σύνθεσης οστεοκαλσίνης και κολλαγόνου τύπου I και εμφανίζει αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης μετά τη χορήγηση 1,25-$(OH)_2D_3$. Για αυτό το λόγο, χρησιμοποιείται ευρέως ως μοντέλο μελέτης της οστεοβλαστικής συμπεριφοράς.

Τα κύτταρα MG-63 [American Type Cell Culture (ATCC), Bethesda, Md] καλλιεργήθηκαν σε τριβλία κυτταροκαλλιεργειών επιφάνειας 75 cm^2. Διατηρήθηκαν, σε θρεπτικό υλικό RPMI (Gibco #61870-010), εμπλουτισμένα με γλουταμίνη 2 mM (Invitrogen #25030-081), Hepes 10 mM (Invitrogen #15630-080), πενικιλλίνη (100 U/mL), στρεπτομυκίνη (100 μg/mL) καθώς και με εμβρυϊκό βόειο ορό 5% (FBS, Gibco #310108-165), σε κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας στους 37ºC και σε 5% CO_2. (Lajeunesse, Frondoza, Schoffield , & Sacktor , 1990), (Lajeunesse, Kiebzak , Frondoza , & Sacktor , 1991), (Franceschi, James, & Zerlauth , 1985), (Boyan, Schwartz, Bonewald , & Swain, 1989)

1.8. Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT

1.8.1. Αρχή της μεθόδου

Πρόκειται για μία χρωματομετρική δοκιμή με την ουσία MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για μελέτες κυτταροτοξικότητας και κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Είναι γρήγορη και ακριβής, δεν απαιτεί τη χρήση ραδιοϊσοτόπων και μπορεί να μετρήσει ταυτόχρονα μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Το άλας του τετραζολίου διασπάται μέσω του ενζύμου διυδρογενάση που εντοπίζεται στα ενεργά μιτοχόνδρια των ζωντανών κυττάρων και παράγονται οι κρύσταλλοι φορμαζανίου, οι οποίοι έχουν σκούρο μπλε-μωβ χρώμα. Καθώς η διάσπαση του άλατος του τετραζολίου πραγματοποιείται μόνο σε μεταβολικά ενεργά κύτταρα, η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη με τον αριθμό των ζωντανών κυττάρων που βρίσκονται στην καλλιέργεια και κατ΄ αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός του ποσοστού τους και η ποσοτικοποίηση της κυτταροτοξικότητας των επιδράσεων. (Mosmann, 1983)

1.8.2. Όργανα-Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Στη συνέχεια αναφέρεται ο κατάλληλος τεχνικός εξοπλισμός, τα αντιδραστήρια και τα αναλώσιμα υλικά για τη διεξαγωγή του πειράματος:

- Καταγραφέας απορρόφησης ELISA (Elisa reader Powerwave, BioTek).
- Αυτόματες πιπέτες.
- Tips (10 μL,200μL, 1000μL).
- Πλακίδια 96 θέσεων (Corning).
- MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)(Sigma).
- DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Fischer).

1.8.3. Πρωτόκολλο

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM-10% FBS σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετήθηκαν 750 κύτταρα σε τελικό όγκο 150μL και υποβλήθηκαν σε 48 ώρες επώαση υπό την επίδραση των GLBS, GLBSE, POWS, POWSE, ενώ υπήρχαν και θέσεις με κύτταρα NC σε αραιώσεις 1:8 και 1:16.

Μετά την παρέλευση 48 ωρών, σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκε ποσότητα 15μL (συγκέντρωσης 5mg/mL) φιλτραρισμένου διαλύματος MTT και ακολούθησε επώαση στον

κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας για 4 ώρες. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν 100 μL DMSO, για να διαλυτοποιηθούν οι κρύσταλλοι φορμαζανίου. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540 nm με τη χρήση του καταγραφέα απορρόφησης ELISA, ενώ η συλλογή των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Gen5.

1.9. Προσδιορισμός των δεικτών του οστικού μεταβολισμού

1.9.1. Οστεοπροτεγερίνη (OPG)

Η Οστεοπροτεγερίνη (OPG) είναι πανομοιότυπη με τον ανασταλτικό παράγοντα της οστεοκλαστογέννεσης (OCIF), ο οποίος αποτελεί ένα διαλυτό μέλος της οικογένειας των υποδοχέων νεκρωτικών παραγόντων όγκου, που αναστέλλει την οστεοκλαστογέννεση. Η OPG θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της οστικής απορρόφησης τροποποιώντας τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Αποτελεί έναν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης και την έναρξη της καρδιαγγειακής νόσου, ενώ ταυτόχρονα μπορεί να λειτουργήσει ως ένας διαλυτός παράγοντας στη ρύθμιση της οστικής μάζας, καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία της οστεοπόρωσης που συνδέεται με αυξημένη δραστηριότητα οστεοκλαστών. Το σύστημα OPG μπορεί να διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της οστεολυτικής οστικής νόσου στο πολλαπλό μυέλωμα και η στόχευση σε αυτό το σύστημα μπορεί να έχει θεραπευτικές προοπτικές. Η OPG παίζει επίσης ρόλο στο αγγειακό σύστημα. (Yasuda, et al., 1998), (Ohmori, et al., 2002), (Kiechl, et al., 2004), (Simonet, et al., 1997), (Croucher, et al., 2001), (Brandstrom, Stiger, Lind, Kahan, Melhus, & Kindmark, 2002)

1.9.2. Ανθρώπινο OPG Elisa Kit - Αρχή της μεθόδου

Το πρότυπο προϊόν που χρησιμοποιείται σε αυτό το kit είναι η ανασυνδυασμένη OPG, μια 55KDa γλυκοπρωτεΐνη. Το ανθρώπινο kit ELISA της OriGene OPG βασίστηκε στην τυποποιημένη τεχνολογία ανίχνευσης ανοσοπροσροφητικού σάντουιτς. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντίκι, ειδικό για την OPG είχε επικαλυφθεί σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Τα πρότυπα (NSO, E22-L401) και τα δείγματα δοκιμής προστέθηκαν στις θέσεις, προστέθηκε ένα βιοτινυλιωμένο πολυκλωνικό αντίσωμα ανίχνευσης από κατσίκι, ειδικό για την OPG και στη συνέχεια ακολούθησε έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Έπειτα

προστέθηκε το σύμπλοκο AvidinBiotin-υπεροξειδάσης και τα μη δεσμευμένα συζυγή σύμπλοκα εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Η υπεροξειδάση του χρένου (HRP) με υπόστρωμα την τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB) χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση της ενζυμικής αντίδρασης της HRP. Η TMB καταλύθηκε από την HRP για να παραχθεί ένα προϊόν κυανού χρώματος που άλλαξε σε κίτρινο μετά από προσθήκη όξινου διαλύματος τερματισμού. Η πυκνότητα του κίτρινου χρώματος ήταν ανάλογη με την ποσότητα ανθρώπινου OPG των δειγμάτων που περιέχονταν στην πλάκα.

1.9.3. RANKL

Ο ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-Β του πυρηνικού παράγοντα (RANKL), ο οποίος είναι επίσης γνωστός ως μέλος 11 της οικογένειας προσδέματος των παράγοντων νέκρωσης όγκων (TNFSF11), είναι μια πρωτεΐνη που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο TNFSF11. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί ένα μέλος της οικογένειας των κυτταροκινών του παράγοντα νέκρωσης όγκου (TNF), που είναι ένας προσδέτης για την οστεοπροτεγερίνη και λειτουργεί ως βασικός παράγοντας για τη διαφοροποίηση και την ενεργοποίηση των οστεοκλαστών. Αυτό το γονίδιο χαρτογραφείται στο χρωμόσωμα 13q14.11. Η στοχευμένη διάσπαση του σχετικού γονιδίου σε ποντίκια οδήγησε σε σοβαρή οστεοπέτρωση και έλλειψη οστεοκλαστών. Οι ελλειμματικοί ποντικοί εμφάνισαν ελαττώματα στην πρώιμη διαφοροποίηση των λεμφοκυττάρων Τ και Β και απέτυχαν να σχηματίσουν λοβο-κυψελιδικές μαστικές δομές κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Αυτό το γονίδιο μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ενισχυμένη επαναρρόφηση των οστών στη χυμική υπερασβεστιαιμία σε περίπτωση κακοήθειας. (Asselin-Labat, et al., 2010), (Luan, et al., 2012)

1.9.4. Ανθρώπινο TNFSF11/RANKL ELISA Kit -Αρχή της μεθόδου

Το ανθρώπινο kit ELISA της OriGene TNFS11 βασίστηκε στην τυποποιημένη τεχνολογία ανίχνευσης ανοσοπροσροφητικού σάντουιτς. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντίκι, ειδικό για τον TNSF11 είχε επικαλυφθεί σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Τα πρότυπα (NSO, G64-D245) και τα δείγματα δοκιμής προστέθηκαν στις θέσεις, προστέθηκε ένα βιοτινυλιωμένο πολυκλωνικό αντίσωμα ανίχνευσης από κατσίκι, ειδικό για τον TNSF11 και στη συνέχεια ακολούθησε έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Έπειτα προστέθηκε το σύμπλοκο AvidinBiotin-υπεροξειδάσης και τα μη δεσμευμένα συζυγή σύμπλοκα εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Η υπεροξειδάση του χρένου (HRP) με υπόστρωμα την τετραμεθυλοβενζιδίνη (TMB) χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση της ενζυμικής αντίδρασης

της HRP. Η TMB καταλύθηκε από την HRP για να παραχθεί ένα προϊόν κυανού χρώματος που άλλαξε σε κίτρινο μετά από προσθήκη όξινου διαλύματος τερματισμού. Η πυκνότητα του κίτρινου χρώματος ήταν ανάλογη με την ποσότητα ανθρώπινου TNSF11 των δειγμάτων που περιέχονταν στην πλάκα.

1.9.5. Όργανα-Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα για τα kit

Στη συνέχεια αναφέρεται ο κατάλληλος τεχνικός εξοπλισμός, τα αντιδραστήρια και τα αναλώσιμα υλικά για τη διεξαγωγή του πειραμάτων :

- Καταγραφέας απορρόφησης ELISA (Elisa reader Powerwave, BioTek).
- Αυτόματες πιπέτες.
- Tips (10 μL,200μL, 1000μL).
- Πλακίδια 96 θέσεων (Corning).
- Buffer ξεπλύματος PBS.
- Λυοφιλιοποιημένο ανασυνδυασμένο πρότυπο OPG (10ng/tube×2).
- Βιοτινυλιωμένο μη ανθρώπινο OPG αντίσωμα 130μl(αραίωση 1:100).
- Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) 130μl(αραίωση 1:100).
- Αραιωμένο δείγμα buffer 30 ml .
- Αραιωμένο αντίσωμα buffer 12ml.
- Αραιωμένο ABC buffer 12ml.
- Παράγοντας TMB ανάπτυξης χρώματος 10ml.
- Διάλυμα παράγοντα TMB διακοπής 10ml.

1.9.6. Πρωτόκολλο

Το διάλυμα εργασίας ABC και ο παράγοντας ανάπτυξης χρώματος TMB έπρεπε να διατηρηθούν ζεστά στους 37 ° C για 30 λεπτά πριν από τη χρήση. Κατά την αραίωση των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων, έπρεπε να αναμειχθούν πλήρως και ομοιόμορφα. Για κάθε πείραμα ετοιμάστηκε η τυπική καμπύλη ανίχνευσης της OPG και του TNFSF11 αντίστοιχα. Η συνέχεια του πρωτοκόλλου ήταν η ακόλουθη:

1. Αρχικά προστέθηκε ποσοστό 0,1 ml ανά θέση των προτύπων διαλυμάτων 6000pg / ml, 3000pg / ml, 1500pg / ml, 750pg / ml, 375pg / ml, 187,5pg / ml, 93,7pg / m ανθρώπινου OPG στην προ-επικαλυμμένη μικροπλάκα των 96 θέσεων. Ενώ στην περίπτωση του TNFSF11 προστέθηκε ποσοστό 0.1 ml ανά εκβάθυνση των πρότυπων διαλυμάτων των 5000 μg / ml, 2500 μg / ml, 1250 μg / ml, 625 μg / ml, 313 μg / ml, 156 μg / ml, 78 μg / ml ανθρώπινου στην

μικροπλάκα των 96 θέσεων. Στη συνέχεια προστέθηκε 0,1 ml του ρυθμιστικού διαλύματος αραιωτικού δείγματος μέσα στις θέσεις ελέγχου και προστέθηκε 0,1 ml από κάθε σωστά αραιωμένο δείγμα των υπερκείμενων καλλιεργειών ανθρώπινων κυττάρων.

2. Η κάθε πλάκα σφραγίστηκε και επωάστηκε στους 37°C για 90 λεπτά.

3. Αφαιρέθηκε το κάλυμμα και απορρίφθηκε το περιεχόμενο της πλάκας.

4. Προστέθηκε 0,1 ml βιοτινυλιωμένου μη ανθρώπινου διαλύματος OPG αντισώματος και TNSFS11 αντισώματος αντίστοιχα σε κάθε θέση και επωάστηκε η πλάκα στους 37 ° C για 60 λεπτά.

5. Η πλάκα ξεπλύθηκε 3 φορές με 0.01M PBS και κάθε φορά αφήσαμε το ρυθμιστικό πλύσης να παραμείνει στις θέσεις για 1 λεπτό και έπειτα απορρίφθηκε το ρυθμιστικό πλύσης.

6. Προστέθηκε 0,1 ml παρασκευασμένου διαλύματος ABC σε κάθε θέση και επωάστηκε η πλάκα στους 37 ° C για 30 λεπτά.

7. Η πλάκα ξεπλύθηκε 5 φορές με 0.01M PBS και κάθε φορά αφήσαμε το ρυθμιστικό πλύσης να παραμείνει στις θέσεις για 1-2 λεπτά και έπειτα απορρίφθηκε το ρυθμιστικό πλύσης.

8. Προστέθηκαν 90 μl προετοιμασμένου παράγοντα ανάπτυξης χρώματος TMB σε κάθε θέση και επωάστηκε η πλάκα στους 37 ° C για 25-30 λεπτά.

9. Προστέθηκε 0,1 ml παρασκευασμένου διαλύματος τερματισμού TMB σε κάθε θέση, όπου το χρώμα άλλαξε αμέσως σε κίτρινο χρώμα.

10. Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 450 nm σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλακών εντός 30 λεπτών μετά την προσθήκη του διαλύματος διακοπής.

1.10. Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 21. Οι εθελόντριες που έλαβαν μέρος στην μελέτη ήταν συνολικά 6, οι οποίες διαχωρίστηκαν σε n=3 υγιείς ως προς την οστική πυκνότητα και n=3 με οστεοπενία. Καθώς, όλες ήταν γυναίκες, που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση και δεν είχαν λάβει αντιβιοτικά τους τελευταίους δύο μήνες πριν την έναρξη της μελέτης, δεν λάμβαναν συμπληρώματα διατροφής, που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των οστών (Ca, βιταμίνη D, cod oil) για 6 μήνες πριν τη λήψη των δειγμάτων, δεν κατανάλωναν συμπληρώματα διατροφής που σχετίζονται με τη λειτουργία του εντέρου (προβιοτικά, πρεβιοτικά, φυτικές ίνες) για 2 εβδομάδες πριν τη λήψη των δειγμάτων, δεν έπασχαν από αυτοάνοσα νοσήματα (π.χ. Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης Νόσος του Εντέρου), από Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου, από

δυσκοιλιότητα ή διάρροια, από σοβαρές νεφρικές ή ηπατικές νόσους, στεφανιαία νόσο, καρκίνο και οποιαδήποτε παθολογική κατάσταση του θυρεοειδούς, δεν πραγματοποιήθηκε στατιστικός έλεγχος για αυτούς τους παράγοντες που αποτελούν και τα κριτήρια επιλογής του δείγματος.

Ο έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής των συνεχών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία κανονικότητας Kolmogorov-Smirnov (One Sample Kolmogorov Smirnov Normality Test) σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας α=0,05 και οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν ως προς τη διαφοροποίηση της οστικής υγείας των εθελοντριών. Οι συνεχείς μεταβλητές, που κατανεμήθηκαν κανονικά, εκφράστηκαν στους τελικούς πίνακες που παρουσιάζονται παρακάτω ως μέσος όρος ± τυπική απόκλιση, ενώ για τον έλεγχο της παρέμβασης σε κάθε ομάδα χωριστά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος διαφοράς μέσων των δύο ανεξάρτητων δειγμάτων (2 Independent Samples - T test). Οι συνεχείς μεταβλητές, που δεν ακολούθησαν τη κανονική κατανομή, παρουσιάζονται στους τελικούς πίνακες ως διάμεσος (1ο τεταρτημόριο – 3ο τεταρτημόριο) και η σύγκριση των μέσω τιμών μεταξύ των 3 ομάδων πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο Kruskal- Wallis test. Οι έλεγχοι αυτοί επίσης πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας α=0,05. Από την άλλη, οι κατηγορικές μεταβλητές που εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα έχουν εκφραστεί ως απόλυτες και σχετικές συχνότητες (%) και οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων ως προς τις κατηγορικές μεταβλητές πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση πινάκων συνάφειας και εφαρμογή της δοκιμασίας Χ2 (Chi-Square test). Τέλος, για τη σύγκριση μεταξύ >3 ομάδων, οι οποίες δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon test.

ΚΕΦ. 2 :Αποτελέσματα

2.1. Χαρακτηριστικά δείγματος εθελοντριών

Στη μελέτη έλαβαν μέρος συνολικά 6 άτομα και το 100% του δείγματος ήταν γυναίκες. Στο σύνολο των 6 γυναικών οι 3 γυναίκες είχαν φυσιολογική οστική μάζα (50%) με ηλικία 58,33 ± 3,51 έτη και Δ.Μ.Σ.= 24,8±3,4 kg/m^2 και οι υπόλοιπες 3 έπασχαν από οστεοπενία (50%) με ηλικία 54 ± 2,65 έτη και Δ.Μ.Σ. = 22,52±2,22 Kg/m^2 . Μετά την κατανομή των εθελοντριών στις 2 ομάδες προέκυψε η ακόλουθη κατανομή αυτών, με τα αντίστοιχα περιγραφικά στοιχεία, όπως αυτά συλλέχθηκαν πριν την έναρξη της μελέτης (πίνακας 2) και όπως είναι εμφανές δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς αυτά.

Πίνακας 2.Περιγραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά την έναρξη της μελέτης.

Στοιχεία εθελοντριών	***Υγιής οστική μάζα N=3***	***Παθολογική οστική μάζα (οστεοπενία) N=3***	***p- value***
Ηλικία (έτη)	58,33±3,51	54±2,65	0,163
Σωματικό Βάρος (Kg)	65±10,82	61,33±3,06	0,602
Ύψος (m)	1,62±0,02	1,65±0,07	0,432
Δείκτη Μάζας Σώματος (Kg/m2)	24,8±3,4	22,52±2,22	0,384
Καθιστική ζωή (ώρες / καθημερινές ημέρες)	23,33±23,63	35±18,03	0,534
Μέτρια φυσική δραστηριότητα (MET λεπτά/εβδομάδα)	480(240-4440)	0(0-280)	0,487
Περπάτημα (MET λεπτά/εβδομάδα)	4620±2117,15	1254±1329,45	0,08
Συνολική φυσική δραστηριότητα (MET λεπτά/εβδομάδα)	7580±6776,24	1440,67±1248,13	0,255
Κάπνισμα	0,33±0,58	0,67±0,58	0,5

Για τα αποτελέσματα, που ακολουθούν την κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± Τ.Α. - Independent Samples t Test. Για τα μη κανονικά χαρακτηριστικά οι τιμές εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1 – Q3) - Mann Whitney Test.

2.2. Αποτελέσματα 3ήμερου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων

Αφού παραδόθηκε το ημερολόγιο αυτό από τις εθελόντριες την ημέρα της δειγματοληψίας στους υπεύθυνους, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Nutritionist Pro, προκειμένου να υπολογιστούν οι συνολικές τιμές για το μέσο όρο της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης (kcal/day), της ημερήσιας πρωτεϊνικής πρόσληψης (% pro/day, g pro/day), της ημερήσιας πρόσληψης υδατανθράκων (% CHO/day, g CHO/ day), της ημερήσιας πρόσληψης σακχάρων (g sugar/day), της ημερήσιας πρόσληψης διαιτητικών ινών (g fibers/day), της ημερήσιας πρόσληψης λίπους (% fat/day, g fat/day), της ημερήσιας πρόσληψης χοληστερόλης (mg chol/day), της ημερήσιας πρόσληψης κορεσμένων λιπαρών οξέων (g saturated fat/day), της ημερήσιας πρόσληψης μονοακόρεστων λιπαρών οξέων (g MUFA/day), της ημερήσιας πρόσληψης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (g PUFA/day), της ημερήσιας πρόσληψης αλκοόλ (% alcohol/day, g alcohol/day), της ημερήσιας πρόσληψης ασβεστίου (mg Ca/day)και της ημερήσιας πρόσληψης βιταμίνης D (μg Vit D/day) για κάθε μία εθελόντρια. Με τα αποτελέσματα των διατροφικών χαρακτηριστικών να παρουσιάζονται στον πίνακα 3, όπου φαίνεται να υπάρχει οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο ως προς το μέσο όρο της ποσοστιαίας ημερήσιας διατροφικής πρόσληψης της πρωτεΐνης ως προς το σύνολο της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης (p=0,046), ενώ άλλες στατιστικά σημαντικές διαφορές δε φαίνεται να εντοπίστηκαν ως προς κανένα άλλο μακροθρεπτικό ή μικροθρεπτικό συστατικό.

Πίνακας 3.Διατροφικά στοιχεία του δείγματος έπειτα από την καταγραφή του 3ήμερου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων.

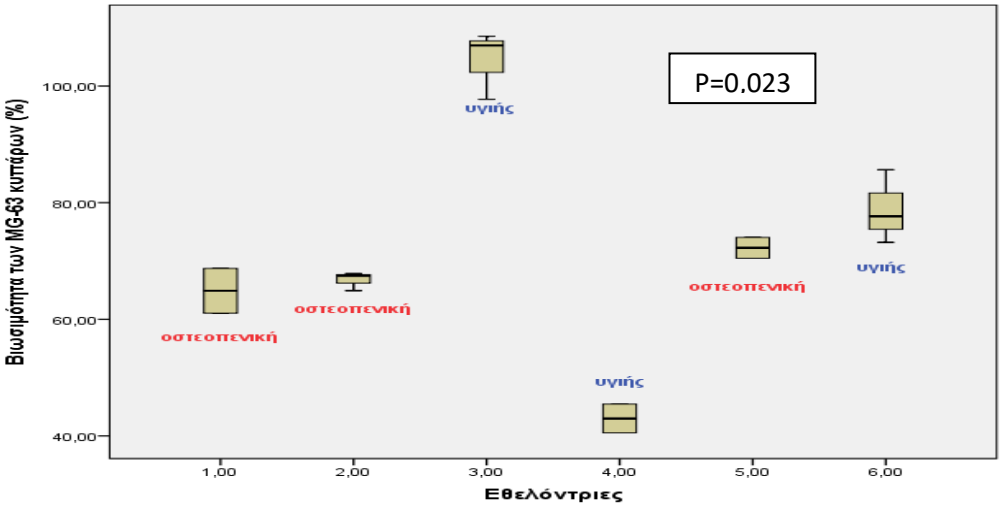
Στοιχεία εθελοντριών	*Υγιής οστική μάζα N=3*	*Παθολογική οστική μάζα (οστεοπενία) N=3*	*p- value*
Συνολική Ημερήσια Ενεργειακή Πρόσληψη (Kcal/d)	1624,547±551,643	2447,825±690,99	0,182
Πρωτεΐνη (%)	16 (15,1-16,3)	12,3 (11,7-12,3)	**0,046**
Πρωτεΐνη (gr/d)	63,67±16,55	74,11±19,48	0,518
Υδατάνθρακες (%)	40,77±9,31	46,83±6,2	0,401
Υδατάνθρακες (gr/d)	162,34±25,8	293,29±90,41	0,073
Σάκχαρα (gr/d)	54,01±19,48	124,35±102,24	0,307
Διαιτητικές Ίνες (gr/d)	20,94±8,3	27,54±10,21	0,434
Λίπος (%)	40,3±7,39	40,93±6,11	0,914
Λίπος (gr/d)	77,65±40,35	114,39±38,73	0,319
Χοληστερόλη (mg/d)	166,87 (120,33-184,46)	305,83 (156,08-308,23)	0,513

Κορεσμένα λιπαρά οξέα (gr/d)	17,86±9,9	33,01±20,25	0,309
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (gr/d)	40,71±21,01	58,94±20,01	0,339
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (gr/d)	13,57±7,11	16,11±4,67	0,632
Αλκοόλ (%)	8,1 (4,05-14,2)	0 (0-2,32)	0,246
Αλκοόλ (gr/d)	3,9 (1,95-5)	0 (0-0,55)	0,246
Ασβέστιο (mg/d)	773,65±597,9	872,05±583,19	0,848
Βιταμίνη D (μg/d)	1,09 (0,85-10,12)	0,75 (0,44-2,9)	0,513

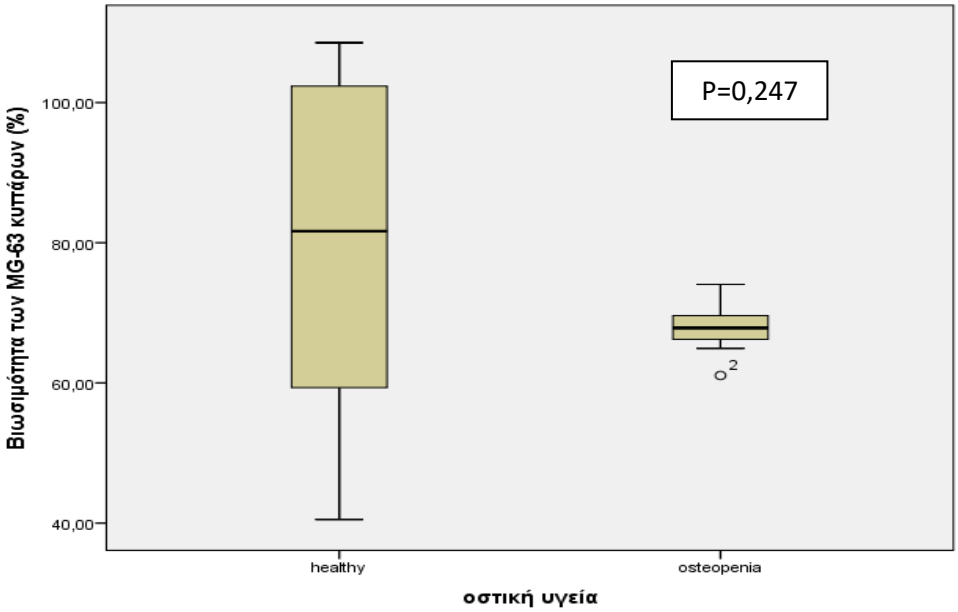
Για τα αποτελέσματα, που ακολουθούν την κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± Τ.Α. - Independent Samples t Test. Για τα μη κανονικά χαρακτηριστικά οι τιμές εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1 – Q3)- Mann Whitney Test.

2.3. Αποτελέσματα δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας MTT

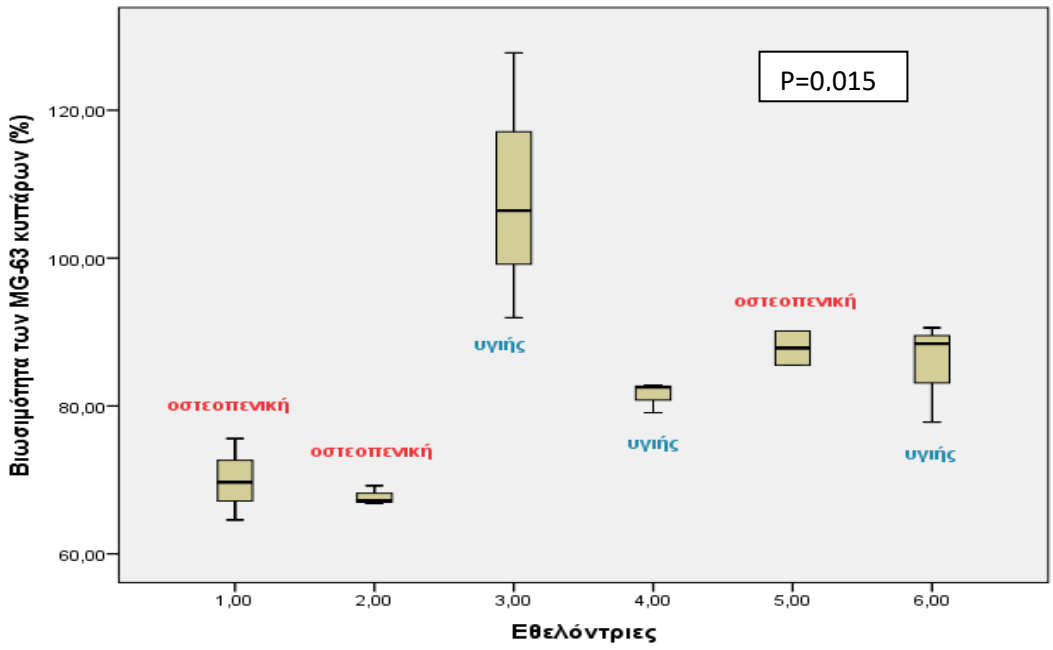
Τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας επεξεργάστηκαν στατιστικά και συγκρίθηκε το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων MG-63 ως προς το σύνολο των εθελοντριών, καθώς και ως προς κάθε μία ομάδα (υγιείς, οστεοπενικές). Οι συγκρίσεις περιελάμβαναν αρχικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την επίδραση του αρνητικού μάρτυρα ζύμωσης κάθε εθελόντριας μετά από 24 ώρες (δηλαδή την επίδραση του «εντερικού μικροβιόκοσμου» της κάθε εθελόντριας χωρίς την παρουσία των υποστρωμάτων) (NC) στις αραιώσεις 1:8 και 1:16 για το σύνολο των εθελοντριών και τη διαφορά των μέσων όρων ανάμεσα στις υγιείς και στις οστεοπενικές εθελόντριες μετά την επίδραση του αρνητικού μάρτυρα ζύμωσης (NC), της ινουλίνης 1% (INU1), της ινουλίνης 2% (INU2), του μανιταριού *Ganoderma lucidum* (GLBS) και του εκχυλίσματος των β-γλυκανών του *Ganoderma lucidum* (GLBSE) στις αραιώσεις 1:8 και 1:16, όπως παρουσιάζονται στα διαγράμματα 1-4.



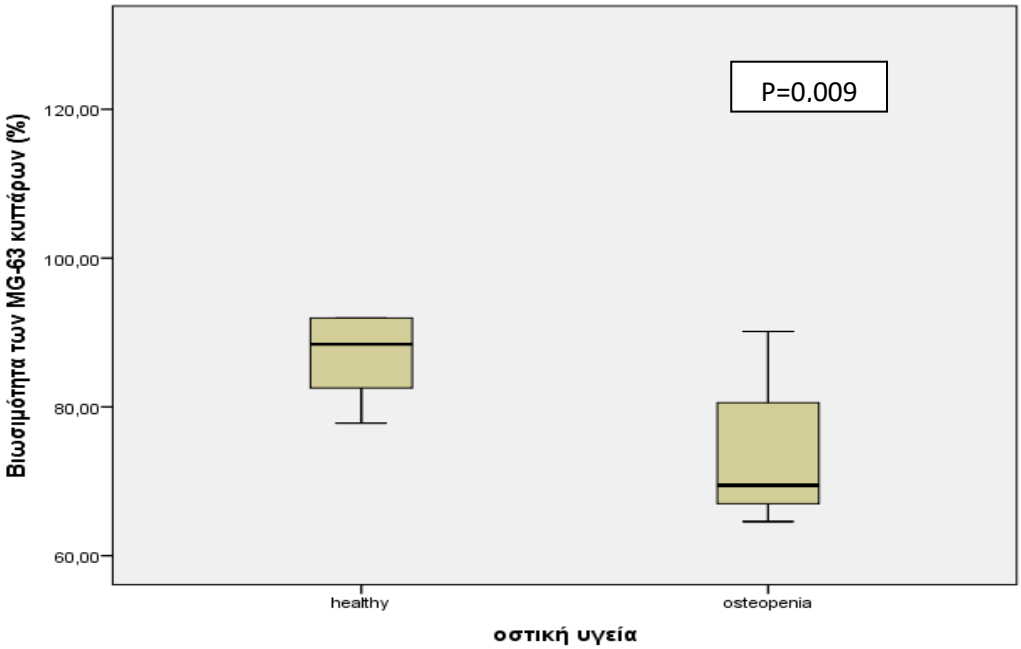
Διάγραμμα 1. Η βιωσιμότητα % των κυττάρων MG-63 μετά την επίδραση του αρνητικού μάρτυρα (NC),όταν επιδρούμε με το προιόν της 24ωρης ζύμωσης (αραίωση 1:8) με εμβόλιο κοπράνων από τις 6 διαφορετικές εθελόντριες.



Διάγραμμα 2. Η βιωσιμότητα % των κυττάρων MG-63 μετά την επίδραση του αρνητικού μάρτυρα (NC) ως προς τις ομάδες οστικής υγείας, όταν επιδρούμε με το προιόν της 24ωρης ζύμωσης (αραίωση 1:8) με εμβόλιο κοπράνων.



Διάγραμμα 3. Η βιωσιμότητα % των κυττάρων MG-63 μετά την επίδραση του αρνητικού μάρτυρα(NC), όταν επιδρούμε με το προιόν της 24ωρης ζύμωσης (αραίωση 1:16) με εμβόλιο κοπράνων από τις 6 διαφορετικές εθελόντριες.



Διάγραμμα 4. Η βιωσιμότητα % των κυττάρων MG-63 μετά την επίδραση του αρνητικού μάρτυρα(NC) ως προς τις ομάδες οστικής υγείας, όταν επιδρούμε με το προιόν της 24ωρης ζύμωσης (αραίωση 1:16) με εμβόλιο κοπράνων.

Στο διάγραμμα 1, στην αραίωση 1:8, τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος κάθε εθελόντριας παίζει σημαντικό ρόλο στη βιωσιμότητα των MG-63 κυττάρων, καθώς από τη σύγκριση όλων των εθελοντριών μεταξύ τους εντοπίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,023), όμως αυτή η διαφορά εξισορροπείται όταν συγκρίνονται οι δύο ομάδες (υγιείς- οστεοπενικές) μεταξύ τους, καθώς δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη βιωσιμότητα των MG-63 κυττάρων (p= 0,247). Αυτό εξασφαλίζει πως υπάρχει ομοιογένεια στη βιωσιμότητα των κυττάρων στο δείγμα μας. Από την άλλη πλευρά στα διαγράμματα 3 και 4, στην αραίωση 1:16, τα δεδομένα που παρουσιάζονται φαίνεται να εντοπίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη βιωσιμότητα των MG-63 κυττάρων τόσο ως προς το σύνολο των εθελοντριών (p=0,015), όσο προς τις δύο ομάδες υγιών και οστεοπενικών εθελοντριών (p=0,009). Σε αυτή την αραίωση όμως δεν μπορούμε να εξασφαλίσουμε πως η επίδραση στο δείγμα θα οφείλεται στους εξωτερικούς παράγοντες που θα επιδράσουμε ή στην υπάρχουσα κυτταροτοξικότητα, λόγω της υψηλής αραίωσης. Για αυτό το λόγο τα επόμενα πρωτόκολλα τα πραγματοποιήσαμε σε αραίωση 1:8.

Πίνακας 4. Η βιωσιμότητα % των κυττάρων MG-63 στις ομάδες οστικής υγείας των εθελοντριών σε αραίωση 1:8 μετά από 0 και 24 ώρες ζύμωση με εμβόλιο κοπράνων.

	Υγιής οστική μάζα N=9	***Παθολογική οστική μάζα (οστεοπενία) N=9***	***p- value υγιείς VS οστεοπενικές***
NC_0 ώρες_ αραίωση 1:8	71,6±24	76,31±11,7	0,616
NC_24 ώρες_ αραίωση 1:8	79,47±25,89	67,8±4,1	0,247
INU1_24 ώρες_ αραίωση 1:8	18,18 (9,27-42,45)	66,04 (12-70,41)	0,063
INU2_24 ώρες_ αραίωση 1:8	29,62±22,29	77,46±19,02	**<0,001***
GLBS_24 ώρες_ αραίωση 1:8	10,15 (9,48-18,97)	23,56 (9,91-25,35)	0,057
GLBSE_24 ώρες _ αραίωση 1:8	16,99 (8,75-79,71)	11,18(10,48,79,71)	0,728

NC: Αρνητικός μάρτυρας INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v) INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) GLBS: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο GLBSE: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα. Για τα αποτελέσματα, που ακολουθούν την κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± Τ.Α. - Independent Samples t Test. Για τα μη κανονικά χαρακτηριστικά οι τιμές εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1 – Q3)- Mann Whitney Test. *στατιστικά σημαντικό (p<0,05)

Πίνακας 5. Η βιωσιμότητα % των κυττάρων MG-63 στις ομάδες οστικής υγείας των εθελοντριών σε αραίωση 1:16 μετά από 0 και 24 ώρες ζύμωση με εμβόλιο κοπράνων.

	Υγιής οστική μάζα N=9	*Παθολογική οστική μάζα (οστεοπενία) N=9*	*p- value υγιείς VS οστεοπενικές*
NC_0 ώρες_ αραίωση 1:16	86,2±21,28	89,16±6,59	0,717
NC_24 ώρες_ αραίωση 1:16	88,43(80,81-99,19)	69,46(66,9-83,04)	**0,009***
INU1_24 ώρες_ αραίωση 1:16	76,01±15,04	75,22±5,52	0,905
INU2_24 ώρες_ αραίωση 1:16	87,02(48-100,03)	74,89(73,17-108,6)	0,908
GLBS_24 ώρες_ αραίωση 1:16	32,8(9,23-35,68)	34,18(18,63-53,21)	0,149
GLBSE_24 ώρες _ αραίωση 1:16	64,97±37,69	70,46±30,51	0,744

NC: Αρνητικός μάρτυρας INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v) INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) GLBS: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο GLBSE: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα. Για τα αποτελέσματα, που ακολουθούν την κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± Τ.Α. - Independent Samples t Test. Για τα μη κανονικά χαρακτηριστικά οι τιμές εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1 – Q3)- Mann Whitney Test. *στατιστικά σημαντικό (p<0,05)

Οι συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν στους πίνακες 4 και 5 ανέδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες εθελοντριών (υγιείς, οστεοπενικές), έπειτα από την επίδραση των προϊόντων της ζύμωσης της ινουλίνης 2 (p<0,001) στην αραίωση 1:8 , καθώς και έπειτα από την επίδραση του αρνητικού μάρτυρα (p=0,009) στην αραίωση 1:16, υποδηλώνοντας ισχυρότερη επίδραση των μεταβολιτών που υπάρχουν στα δείγματα αυτά στη βιωσιμότητα των MG-63 κυττάρων στις οστεοπενικές εθελόντριες στην 1^{η} περίπτωση και αντίστοιχα στις υγιείς εθελόντριες στη 2^{η} περίπτωση. Παρατηρούμε επίσης ότι εμφανίστηκε οριακά μη σημαντική διαφορά, έπειτα από την επίδραση των προϊόντων της ζύμωσης του μανιταριού *Ganoderma lucidum* (p=0,057) στην αραίωση 1:8, καθώς και έπειτα από την επίδραση των προϊόντων της ζύμωσης της ινουλίνης 1 (p=0,063) στην αραίωση 1:8, υποδεικνύοντας μία πιθανή τάση για εμφάνιση ισχυρότερης επίδρασης στη βιωσιμότητα των κυττάρων στις οστεοπενικές εθελόντριες έναντι των υγιών.

Πίνακας 6. Η βιωσιμότητα % των κυττάρων MG-63 στις ομάδες οστικής υγείας σε αραίωση 1:8 μετά από 24 ώρες ζύμωση με εμβόλιο κοπράνων.

	Σύνολο εθελοντριών N=18	*Υγιής οστική μάζα N=9*	*Παθολογική οστική μάζα (οστεοπενία) N=9*
NC	74,02±19,46 †	79,47±25,89 †,‡	67,84(64,92-70,48)
INU1	21,87(10,22-66,04) *	18,18(9,27-42,45) *	66,04(11,99-70,41)
INU2	59,75(24,76-80,1)	24,76(10,88-50,27) *	78,32(60,64-85,5)
GLBS	14,56(9,8-23,64) *,‡	10,15(9,48-18,97) *,‡	23,56(9,91-25,35) *,‡
GLBSE	12,07(10,48-53,36) *	16,99(8,75-44,3) *	11,18(10,48-79,71)

NC: Αρνητικός μάρτυρας INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v) INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) GLBS: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο GLBSE: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα. Για τα αποτελέσματα, που ακολουθούν την κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± Τ.Α. - Independent Samples t Test. Για τα μη κανονικά χαρακτηριστικά οι τιμές εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1 – Q3)- Mann Whitney Test.*: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με NC (p<0,05) †: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU1 (p<0,05) ‡: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 (p<0,05)

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν τη βιωσιμότητα των κυττάρων MG-63 στις ομάδες οστικής υγείας σε αραίωση 1:8 μετά από 24 ώρες ζύμωση με εμβολιασμό κοπράνων ως προς το σύνολο και τις δύο επιμέρους ομάδες των εθελοντριών (υγιείς, οστεοπενικές). Συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι της κάθε ομάδας με τον αρνητικό μάρτυρα, την ινουλίνη 1% και την ινουλίνη 2%. Όσον αφορά τον αρνητικό μάρτυρα οι συσχετίσεις έδειξαν να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την επίδραση με την ινουλίνη 1% (p<0,001) με υψηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων που συν-επωάστηκαν με το NC σε σύγκριση με τα κύτταρα που συν-επωάστηκαν με τα προϊόντα ζύμωσης της ινουλίνης 1. Στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ του αρνητικού μάρτυρα και της ινουλίνης βρέθηκε και στην ομάδα των υγιών εθελοντριών (p<0,001) με πάλι υψηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων NC σε σύγκριση με τα κύτταρα που συν-επωάστηκαν με την ινουλίνη 1. Στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 αυτών εμβολίων (p=0,475). Συγκρίνοντας τον αρνητικό μάρτυρα με την ινουλίνη 2% δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο σύνολο των εθελοντριών οριακά (p=0,053), καθώς και στην ομάδα των οστεοπενικών (p=0,211), ενώ φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική

υψηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων NC σε σύγκριση με τα κύτταρα που συν-επωάστηκαν με την ινουλίνη 2 στην ομάδα των υγιών εθελοντριών (p=0,001). Η συν-επώαση με τα προϊόντα ζύμωσης του μανιταριού *Ganoderma lucidum* (GLBS) προκάλεσε σημαντικά χαμηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σύγκριση με την επώαση με τα προϊόντα ζύμωσης της ινουλίνης 2 ως προς το σύνολο των εθελοντριών (p<0,001), την ομάδα των υγιών εθελοντριών (p=0,009) και την ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών (p<0,001). Παράλληλα, το GLBS συγκρινόμενο με το NC εμφάνισε στατιστικά σημαντική χαμηλότερη βιωσιμότητα στην συνολική ομάδα των εθελοντριών (p<0,001), στην ομάδα των υγιών (p=0,001) και στην ομάδα των οστεοπενικών (p=0,001).Μία ακόμα στατιστικά σημαντική διαφορά με αυξημένη βιωσιμότητα κυττάρων του NC ήταν αυτή με το εκχύλισμα του *Ganoderma lucidum*, όπου στο σύνολο των εθελοντριών εμφάνισε p<0,001, στην ομάδα των υγιών p=0,003, ενώ στην ομάδα των οστεοπενικών δεν υπήρξε κάποια σημαντική διαφορά (p=0,179). Τέλος, το εκχύλισμα του *Ganoderma lucidum* συγκρινόμενο με την ινουλίνη 1% δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη βιωσιμότητα των κυττάρων που επέδρασε τόσο στο σύνολο του δείγματος (p=0,032), όσο και στις δύο επιμέρους ομάδες (υγιείς p=0,562/ οστεοπενικές p=0,317).

Πίνακας 7. Η βιωσιμότητα % των κυττάρων MG-63 στις ομάδες οστικής υγείας σε αραίωση 1:16 μετά από 24 ώρες ζύμωση με εμβόλιο κοπράνων.

	Σύνολο εθελοντριών N=18	***Υγιής οστική μάζα N=9***	***Παθολογική οστική μάζα (οστεοπενία) N=9***
NC	83,3±15,99	88,43(80,81-99,19)	73,59±9,43
INU1	75,54±9,92	76,01±15,04	75,22±5,52
INU2	81,25±23,49	87,02(48-100,03)	74,89(73,17-108,6)
GLBS	30,82±15,11 *,‡	32,8(9,23-35,68) *,‡	34,18(18,63-53,21) *,‡
GLBSE	67,88±33,09	64,97±37,69	70,46±30,51

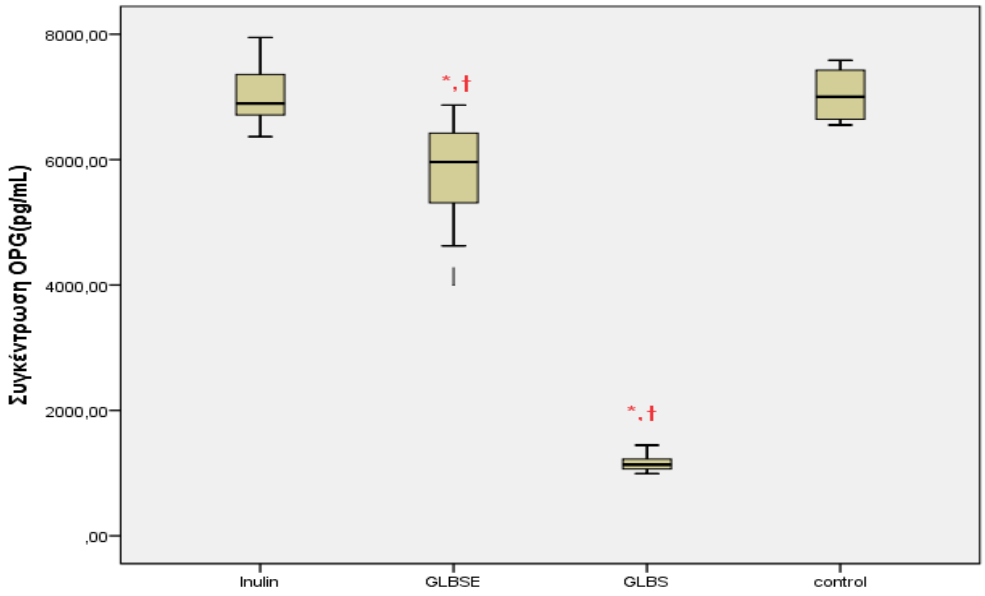
NC: Αρνητικός μάρτυρας INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v) INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) GLBS: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο GLBSE: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα. Για τα αποτελέσματα, που ακολουθούν την κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± Τ.Α. - Independent Samples t Test. Για τα μη κανονικά χαρακτηριστικά οι τιμές εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1 – Q3)- Mann Whitney Test.*: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με NC (p<0,05) †: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU1 (p<0,05) ‡: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 (p<0,05)

Στον Πίνακα 7 παρατίθενται τα αποτελέσματα που αφορούν τη βιωσιμότητα των κυττάρων MG-63 στις ομάδες οστικής υγείας σε αραίωση 1:16 μετά από 24 ώρες ζύμωση με εμβολιασμό κοπράνων ως προς το σύνολο και τις δύο επιμέρους ομάδες των εθελοντριών (υγιείς, οστεοπενικές) . Συγκρίθηκαν οι μέσοι όροι της κάθε ομάδας με τον αρνητικό μάρτυρα, την ινουλίνη 1% και την ινουλίνη 2%. Όσον αφορά τον αρνητικό μάρτυρα οι συσχετίσεις έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με την ινουλίνη 1% τόσο στην περίπτωση του συνόλου των εθελοντριών (p=0,115), όσο και στις περιπτώσεις των υγιών εθελοντριών (p=0,126) και των οστεοπενικών εθελοντριών (p=0,666). Συγκρίνοντας τον αρνητικό μάρτυρα με την ινουλίνη 2% δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο σύνολο των εθελοντριών (p=0,772), καθώς και στην ομάδα των υγιών εθελοντριών (p=0,630) και στην ομάδα των οστεοπενικών (p=0,298). Τα προϊόντα της ζύμωσης του *Ganoderma lucidum* (GLBS) προκάλεσαν σημαντικά χαμηλότερη βιωσιμότητα στα κύτταρα που επέδρασαν σε σύγκριση με τα κύτταρα που συν-επωάστηκαν με τα προϊόντα ζύμωσης της ινουλίνης 2 ως προς το σύνολο των εθελοντριών (p<0,001), την ομάδα των υγιών εθελοντριών (p=0,001) και την ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών (p=0,001). Παράλληλα, το GLBS συγκρινόμενο με το NC εμφάνισε στατιστικά σημαντική χαμηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων στην συνολική ομάδα των εθελοντριών (p<0,001), στην ομάδα των υγιών (p=0,001) και στην ομάδα των οστεοπενικών (p<0,001). Συγκρίνοντας το NC με το εκχύλισμα του *Ganoderma lucidum* (GLBSE) δεν υπήρξε κάποια στατιστικά αξιοσημείωτη διαφορά ως προς το όλες τις εθελόντριες (p=0,97), τις υγιείς εθελόντριες (p=0,068) και τις οστεοπενικές εθελόντριες (p=0,776). Τέλος, το εκχύλισμα του *Ganoderma lucidum* (GLBSE) συγκρινόμενο με την ινουλίνη 1% δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη βιωσιμότητα των κυττάρων τόσο στο σύνολο του δείγματος (p=0,374), όσο και στις δύο επιμέρους ομάδες (υγιείς – p=0,514/ οστεοπενικές – p=0,657).

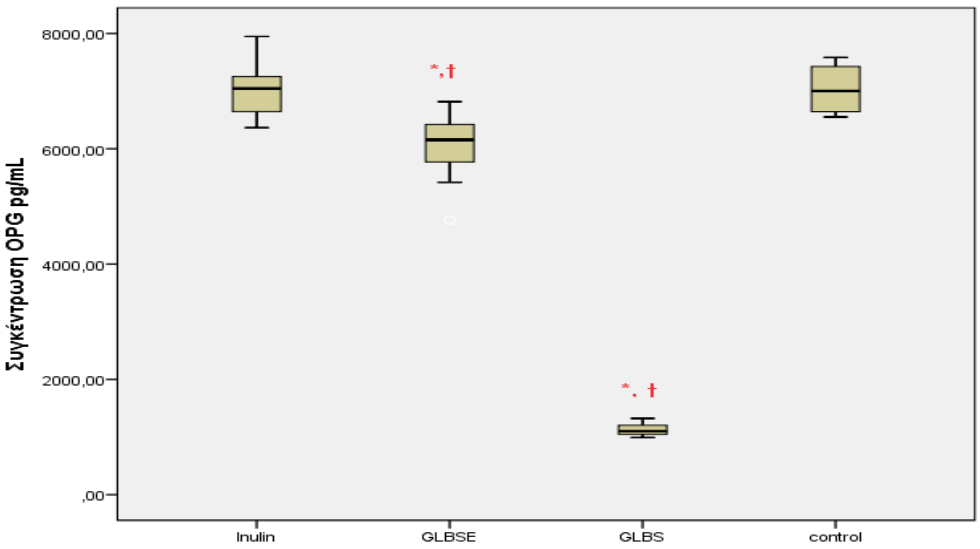
2.4. Αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των δεικτών του οστικού μεταβολισμού στα κύτταρα MG-63

Τα αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των δεικτών του οστικού μεταβολισμού (OPG, RANKL) επεξεργάστηκαν στατιστικά και συγκρίθηκε η συγκέντρωση των οστικών δεικτών που περιέχονταν στο δείγμα της κάθε εθελόντριας ως προς το σύνολο των εθελοντριών, καθώς και ως προς κάθε μία ομάδα (υγιείς, οστεοπενικές). Οι συγκρίσεις περιελάμβαναν τις τιμές που μετρήθηκαν και στους δύο δείκτες ως προς το δείγμα ελέγχου (control) και ως προς την

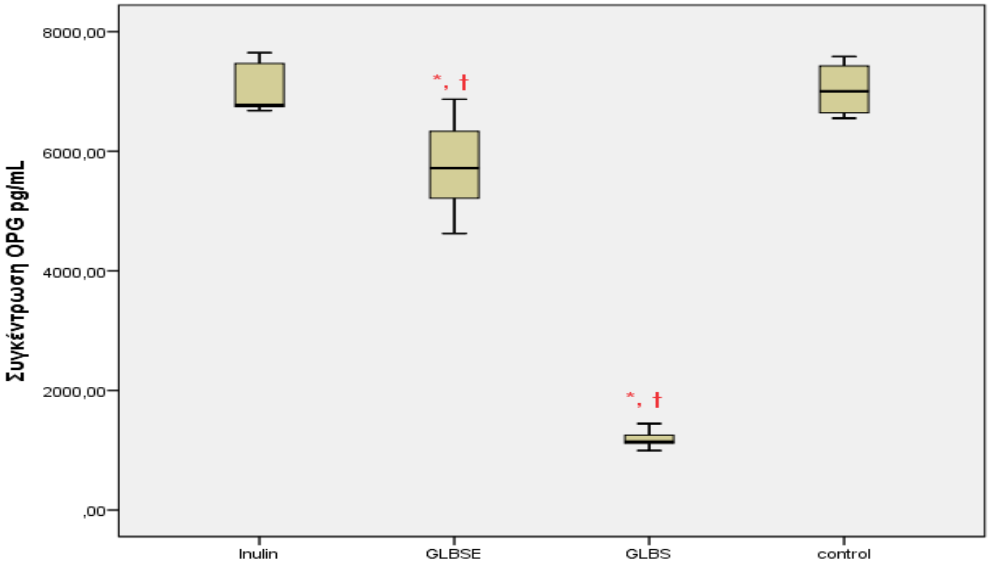
ινουλίνη 2 (INU) στην αραίωση 1:8 για το σύνολο των εθελοντριών και τη διαφορά των μέσων όρων ανάμεσα στις υγιείς και στις οστεοπενικές εθελόντριες ως προς το μανιτάρι *Ganoderma lucidum* (GLBS) και του εκχυλίσματος του *Ganoderma lucidum* (GLBSE), όπως παρουσιάζονται στα διαγράμματα 5-13.



Διάγραμμα 5: Προσδιορισμός συγκέντρωσης OPG σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, GLBS, GLBSE στο σύνολο των εθελοντριών. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) GLBS: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο GLBSE: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα OPG: Οστεοπροτεγερίνη *: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control (p<0,05) †: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 (p<0,05)



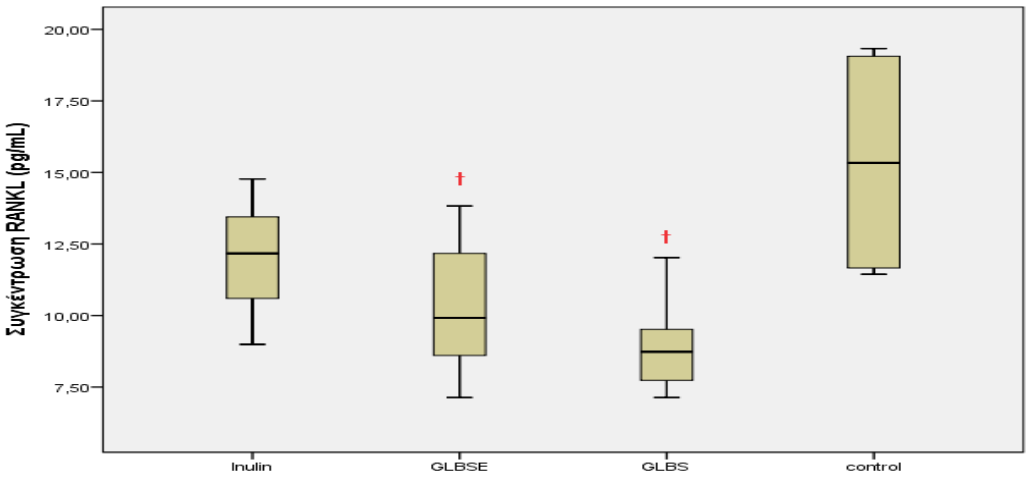
Διάγραμμα 6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης OPG σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, GLBS, GLBSE στις υγιείς εθελόντριες. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) GLBS: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο GLBSE: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα OPG: Οστεοπροτεγερίνη *: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control (p<0,05) †: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 (p<0,05)



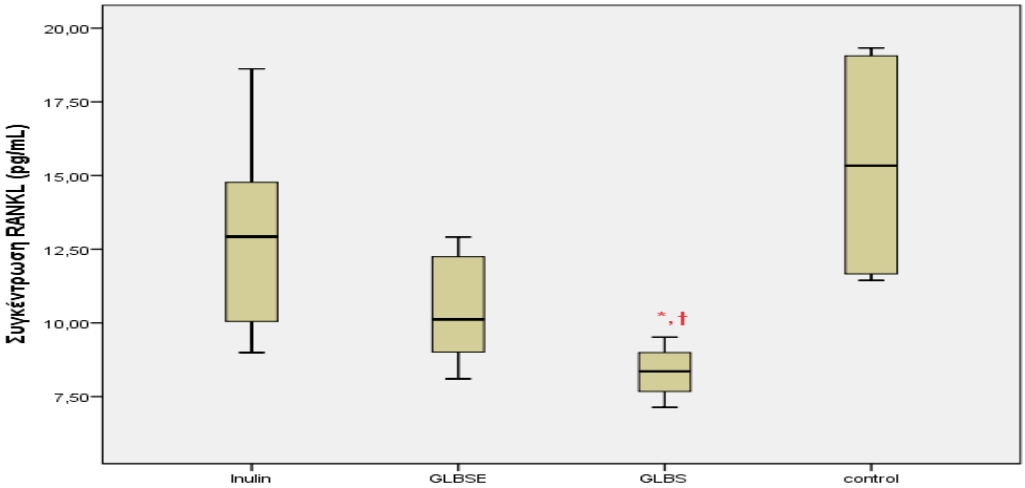
Διάγραμμα 7. Προσδιορισμός συγκέντρωσης OPG σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, GLBS, GLBSE στις οστεοπενικές εθελόντριες. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) GLBS: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο GLBSE: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα OPG: Οστεοπροτεγερίνη *: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control (p<0,05) †: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 (p<0,05).

Στα παραπάνω διαγράμματα 5,6,7 παρουσιάζεται ο προσδιορισμός συγκέντρωσης OPG σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, GLBS, GLBSE στο σύνολο των εθελοντριών, στην ομάδα των υγιών εθελοντριών και στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών. Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ινουλίνης και του control για καμία από τις τρεις ομάδες με p=0,992, p=0,965 και p=0,670 αντίστοιχα, γεγονός που σημαίνει πως η ινουλίνη προκάλεσε εξίσου ευεργετική οστεοβλαστική δράση με το δείγμα ελέγχου. Στην περίπτωση του δείγματος του μανιταριού *Ganoderma lucidum* (GLBS) υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη δράση της ινουλίνης στο σύνολο των εθελοντριών (p<0,001), στην ομάδα των υγιών εθελοντριών (p<0,001) και στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών

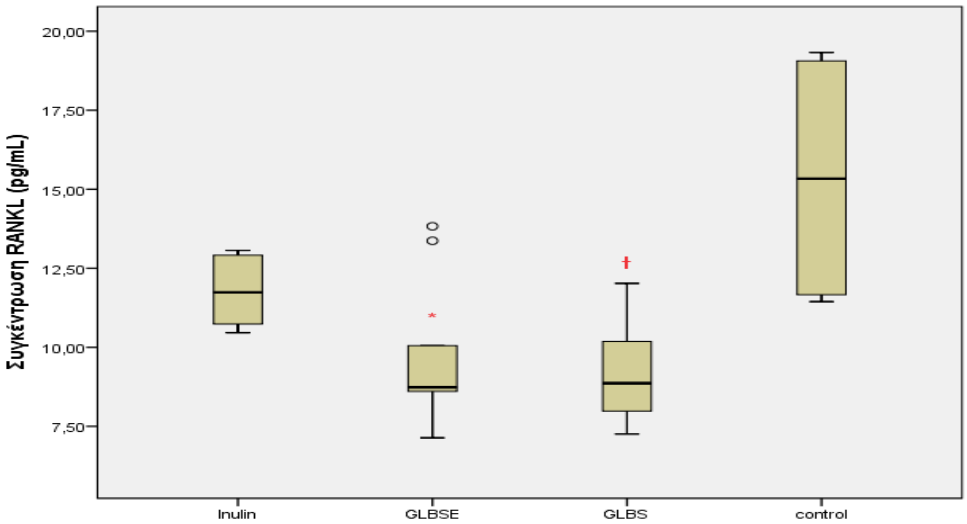
(p=0,001). Συγκρίνοντας το GLBS με το control εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά και για τις τρεις ομάδες, όπου p<0,001 και για τις τρεις περιπτώσεις. Παράλληλα, στην περίπτωση του εμβολιασμού του εκχυλίσματος του μανιταριού *Ganoderma lucidum* (GLBSE) υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη δράση της ινουλίνης στο σύνολο των εθελοντριών (p<0,001), στην ομάδα των υγιών εθελοντριών (p=0,005) και στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών (p=0,026).Τέλος, το GLBSE συγκρινόμενο με το control εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά για τη δράση του, τόσο ως προς το σύνολο των εθελοντριών (p=0,007), όσο και ως προς τις υγιείς (p=0,013) και ως προς τις οστεοπενικές εθελόντριες (p=0,017).



Διάγραμμα 8. Προσδιορισμός συγκέντρωσης RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, GLBS, GLBSE στο σύνολο των εθελοντριών. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) GLBS: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο GLBSE: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα RANKL: ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-Β του πυρηνικού παράγοντα (*: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control (p<0,05) †: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 (p<0,05).



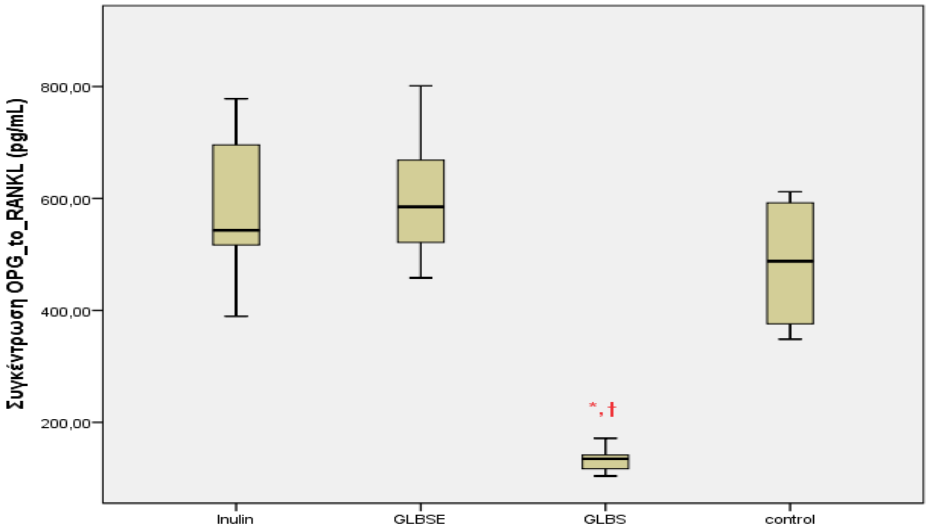
Διάγραμμα 9. Προσδιορισμός συγκέντρωσης RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, GLBS, GLBSE στις υγιείς εθελόντριες. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) GLBS: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο GLBSE: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα RANKL: ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-Β του πυρηνικού παράγοντα *: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control (p<0,05) †: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 (p<0,05).



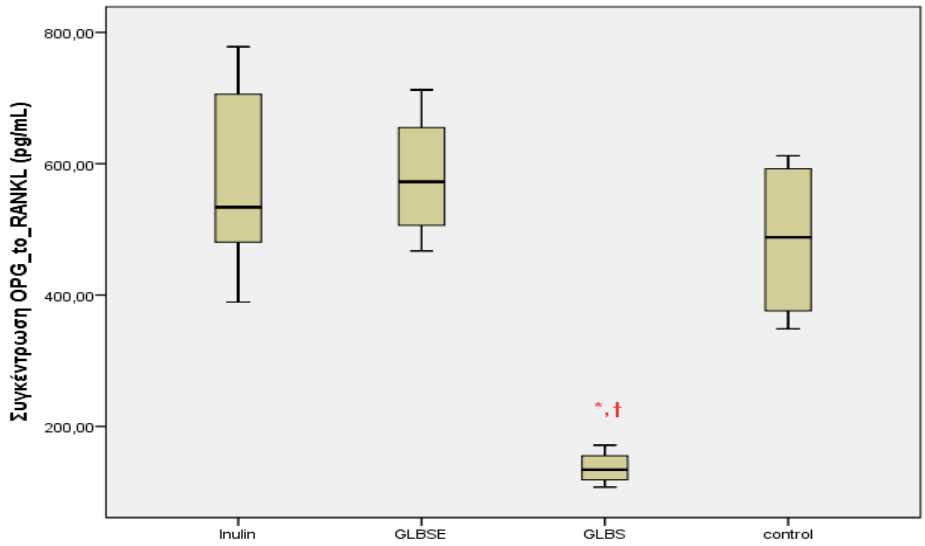
Διάγραμμα 10. Προσδιορισμός συγκέντρωσης RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, GLBS, GLBSE στις οστεοπενικές εθελόντριες. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) GLBS: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο GLBSE: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα RANKL: ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-Β του πυρηνικού παράγοντα *: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control (p<0,05) †: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 (p<0,05)

Στα παραπάνω διαγράμματα 8,9,10 παρουσιάζεται ο προσδιορισμός συγκέντρωσης RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, GLBS, GLBSE στο σύνολο των εθελοντριών, στην ομάδα των υγιών εθελοντριών και στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών. Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ινουλίνης και του control για καμία από τις τρεις ομάδες με p=0,112, p=0,374 και p=0,192 αντίστοιχα, γεγονός που σημαίνει πως η ινουλίνη προκάλεσε εξίσου οστεοκλαστική δράση με το control. Στην περίπτωση του δείγματος του μανιταριού *Ganoderma lucidum* (GLBS) υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη δράση της ινουλίνης στο σύνολο των εθελοντριών (p<0,001), στην ομάδα των υγιών εθελοντριών (p=0,021) και στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών

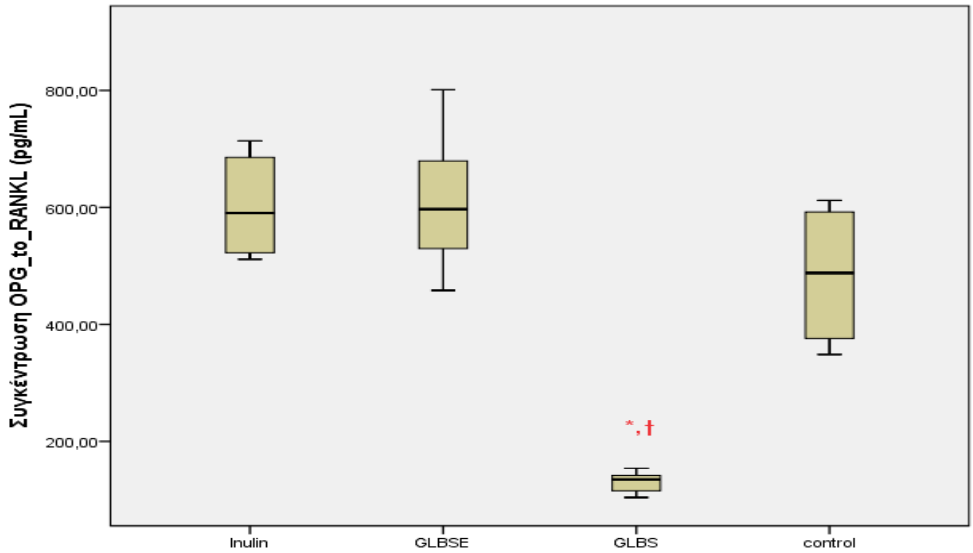
(p=0,007). Συγκρίνοντας το GLBS με το δείγμα ελέγχου δεν εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά οριακά για το σύνολο των εθελοντριών, όπου p=0,054 και για την ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, όπου p=0,062, ενώ στην περίπτωση των υγιών γυναικών υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά με p=0,045. Παράλληλα, στην περίπτωση του δείγματος του εκχυλίσματος του μανιταριού *Ganoderma lucidum* (GLBSE) υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη δράση της ινουλίνης στο σύνολο των εθελοντριών (p=0,011), ενώ στην ομάδα των υγιών εθελοντριών (p=0,098) και στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών (p=0,076) δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά. Τέλος, το GLBSE συγκρινόμενο με το control εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά για τη δράση του, μόνο ως προς την ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών (p=0,003), ενώ ως προς το σύνολο των γυναικών (p=0,085) και ως προς τις υγιείς (p=0,102) δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά.



Διάγραμμα 11. Προσδιορισμός συγκέντρωσης λόγου OPG/RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, GLBS, GLBSE στο σύνολο των εθελοντριών. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) GLBS: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο GLBSE*: Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα OPG/RANKL: Οστεοπροτεγερίνη/ Ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-Β του πυρηνικού παράγοντα *: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control (p<0,05) †: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 (p<0,05).



Διάγραμμα 12. Προσδιορισμός συγκέντρωσης λόγου OPG/RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, GLBS, GLBSE στις υγιείς εθελόντριες. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) GLBS: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο GLBSE: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα OPG/RANKL:Οστεοπροτεγερίνη/ Ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-Β του πυρηνικού παράγοντα *: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control (p<0,05) †: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 (p<0,05).



Διάγραμμα 13. Προσδιορισμός συγκέντρωσης λόγου OPG/RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, GLBS, GLBSE στις οστεοπενικές εθελόντριες. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) GLBS: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο GLBSE: *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα OPG/RANKL:Οστεοπροτεγερίνη/ Ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-Β του πυρηνικού παράγοντα *: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control (p<0,05) †: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 (p<0,05).

Στα παραπάνω διαγράμματα 11,12,13 παρουσιάζεται ο προσδιορισμός συγκέντρωσης του λόγου OPG/RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, GLBS, GLBSE στο σύνολο των εθελοντριών, στην ομάδα των υγιών εθελοντριών και στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ινουλίνης και του control για καμία από τις τρεις ομάδες με p=0,156, p=0,364 και p=0,117. Στην περίπτωση του δείγματος του μανιταριού *Ganoderma lucidum* (GLBS) υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη δράση της ινουλίνης στο σύνολο των εθελοντριών (p<0,001), στην ομάδα των υγιών εθελοντριών (p=0,001) και στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών (p<0,001). Συγκρίνοντας το GLBS με το control εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά για το σύνολο των εθελοντριών, όπου p=0,012 , για την ομάδα των υγιών γυναικών, όπου p=0,011 και για την ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, όπου p=0,011. Φαίνεται όμως ότι το δείγμα του εκχυλίσματος του μανιταριού *Ganoderma lucidum* (GLBSE) δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την επίδραση της ινουλίνης στο σύνολο των εθελοντριών (p=0,775), στην ομάδα των υγιών εθελοντριών (p=0,867) και στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών (p=0,0848). Τέλος, το GLBSE συγκρινόμενο με το control δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά για τη δράση του, ως προς όλες τις ομάδες με p=0,075, p=0,150 και p=0,109 αντίστοιχα.

ΚΕΦ. 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ανθρωπομετρικών και περιγραφικών στοιχείων του δείγματος που εντάχθηκε στην παρούσα μελέτη, καθώς και των δεδομένων της διατροφικής πρόσληψής του σε μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά και των στοιχείων που αφορούν τη φυσική δραστηριότητα, μπορέσαμε να εξασφαλίσουμε την ομοιογένεια του δείγματός μας. Η μοναδική διαφορά που εντοπίστηκε ήταν σε επίπεδο ημερήσιας ποσοστιαίας πρόσληψης πρωτεΐνης, με οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις υγιείς και στις οστεοπενικές εθελόντριες με την πρόσληψη της δεύτερης ομάδας να είναι υψηλότερη, γεγονός που θα μπορούσε να ληφθεί ως συγχυτικός παράγοντας σε μία ενδεχόμενη μελέτη με μεγαλύτερο δείγμα εθελοντριών.

Η διαδικασία προσδιορισμού της βιωσιμότητας των κυττάρων MG-63 , ανέδειξε ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος κάθε εθελόντριας παίζει σημαντικό ρόλο στη βιωσιμότητα των MG-63 κυττάρων με αυξημένη βιωσιμότητα να εμφανίζεται στις υγιείς εθελόντριες έναντι των οστεοπενικών. Αλλά συγκρίνοντας τις δύο επιμέρους ομάδες μεταξύ τους, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη βιωσιμότητα, γεγονός που εξασφάλισε την ομοιογένεια του δείγματος . Αυτό το εύρημα ήταν καθοριστικό προκειμένου να εξασφαλιστεί πως η πιθανή θετική ή αρνητική επίδραση στα οστικά κύτταρα, οφείλεται αποκλειστικά στους διαφορετικούς χειρισμούς που πραγματοποιήσαμε και όχι στην αρχική φύση του δείγματος που είχε παραληφθεί από την κάθε εθελόντρια. Τα περαιτέρω ευρήματα που προέκυψαν από τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας, διέκριναν μία θετική επίδραση των προϊόντων ζύμωσης της ινουλίνης 2% στη βιωσιμότητα των MG-63 κυττάρων ιδιαίτερα στις οστεοπενικές εθελόντριες, ενώ η δράση της συγκρινόμενη με την επίδραση του ακατέργαστου μανιταριού *Ganoderma lucidum* στη βιωσιμότητα των MG-63 κυττάρων ήταν στατιστικά ισχυρότερη τόσο στο σύνολο του δείγματος, όσο και σε κάθε επιμέρους ομάδα. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να επιλεγεί σαν ένας από τους χειρισμούς για τον προσδιορισμό των οστικών δεικτών στο επόμενο πρωτόκολλο που πραγματοποιήθηκε.

Ο προσδιορισμός των δεικτών του οστικού μεταβολισμού της Οστεοπροτεγερίνης (OPG) και του Ενεργοποιητή υποδοχέα του συνδέτη κάππα-Β του πυρηνικού παράγοντα (RANKL) πραγματοποιήθηκε στα υπερκείμενα της καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, GLBS και GLBSE. Τα ευρήματα που προέκυψαν ανέδειξαν την ευεργετική επίδραση της ινουλίνης 2%, η οποία συγκρινόμενη με το control δείγμα δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά για

κανένα δείκτη οστικού μεταβολισμού, υπονοώντας πως διαθέτει μία πιθανή ευεργετική οστεοβλαστική δραστηριότητα και συνεισφέρει θετικά στην οστική ανακατασκευή. Αξιοσημείωτη είναι και η επίδραση του εκχυλίσματος των β-γλυκανών που προκύπτει από το *Ganoderma lucidum*, καθώς μπορεί να μην εμφάνισε εξαρχής ως προς την OPG κάποια θετική επίδραση στην ανάπτυξη των οστεοβλαστών, αλλά εν τέλει στο λόγο OPG/RANKL φάνηκε να συνεισφέρει θετικά στην οστική ανακατασκευή σε όλες τις ομάδες γυναικών, αφού δεν είχε διαφορά από τον μάρτυρα (control), αλλά ούτε και από την ινουλίνη. Το αποτέλεσμα αυτό προέκυψε πιθανόν λόγω της σημαντικά μειωμένης δράσης του RANKL, που φαίνεται ότι προκαλεί το GLBSE στις οστεοπενικές γυναίκες (σε σχέση με το control p=0,003) και σε σχέση με την ινουλίνη στο σύνολο των γυναικών (p=0,011). Αντίθετα, το ακατέργαστο μανιτάρι *Ganoderma lucidum* δεν εμφάνισε κάποια σημαντική δραστηριότητα ως προς την ενίσχυση της οστικής μάζας, ενώ φάνηκε να επιδρά σημαντικά μόνο στη μείωση της οστεοκλαστογέννεσης. Αντίστοιχες επιδράσεις έχουν εμφανιστεί μετά από διεξαγωγή μελετών κυρίως σε φυσικά εκχυλίσματα βοτάνων, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στην Κίνα για τις θεραπευτικές τους δυνατότητες, που προέρχονται από φυτά όπως η *Melia azedarach* (αγριοπασχαλιά), το *Corydalis turtschaninovii*, το *Cynanchum atratum* (Κύναγχο) (Mukudai, et al., 2014) , το *Panax ginseng* (ginseng) (Park, et al., 2016) και ο *Foeniculum vulgare* (μάραθος) (Kim, Kim, Lee, & Kim, 2012). Αυτή η επιστημονική διερεύνηση για εύρεση φυσικών παρασκευασμάτων για την αντιμετώπιση της απώλειας οστικής πυκνότητας και την αντιμετώπιση της οστεοπόρωσης ενισχύει ακόμα εντονότερα την ανάγκη για διεξαγωγή περισσότερων κλινικών μελετών, προκειμένου να διευκρινιστεί ο μηχανισμός δράσης όλων αυτών των εκχυλισμάτων.

Συνοψίζοντας αξίζει να αναφερθεί ότι η επίδραση στον εντερικό μικροβιόκοσμο έχει αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη στρατηγική στη φαρμακολογική στόχευση χρόνιων μεταβολικών ασθενειών, συμπεριλαμβανομένης της οστεοπόρωσης. Η επιστημονική κοινότητα έχει προσανατολιστεί στην προσπάθεια της συσχέτισης αυτών των δυο παραμέτρων και τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα δείχνουν πως πιθανά η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες διαφέρει ανάλογα με τη οστική μάζα τους. (Wang, et al., 2017) Οι έρευνες έχουν ήδη αρχίσει να αναδεικνύουν τα πρώτα ευρήματα σε ζωικά μοντέλα, όπου παρουσιάζονται στοιχεία σχετικά με την επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στους δείκτες του οστικού μεταβολισμού μέσα σε ένα μοντέλο συσχέτισης και με τους παράγοντες IGF – 1, TNF- a και IL- 6. (Yan, et al., 2016) Τα εδώδιμα μανιτάρια και όπως φαίνεται και τα εκχυλίσματά τους θα μπορούσαν να ασκήσουν ευεργετικές επιδράσεις

στις συνθετικές και μεταβολικές παραμέτρους του εντερικού μικροβιόκοσμου. Η δυνητική δραστηριότητα των βιοενεργών εκχυλισμάτων των μανιταριών στη φυσιολογία των οστών έχει αποκαλυφθεί επί του παρόντος, προσφέροντας νέες εναλλακτικές λύσεις στις επιλογές της φαρμακοθεραπείας. Για αυτό το λόγο, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι επιπτώσεις των εδώδιμων μανιταριών στην υγεία των οστών, βάσει των σημερινών ανθρώπινων σκελετικών συστημάτων και των μηχανισμών οστικής ανακατασκευής, πραγματοποιώντας καλά σχεδιασμένες μελέτες με μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών.

Βιβλιογραφία

4th International Symposium on Osteoporosis and Consensus Development Conference, R. (1993). Consensus Development Conference: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *The American Journal Of Medicine, 94*(6), σσ. 646-650.

Aida, Shuhaimi, M., Yazid, M., & Maaruf, A. (2009). Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science & Technology, 20*(11-12), σσ. 567-575.

Alonso, V. R., & Guarner, F. (2013). Linking the gut microbiota to human health. *British Journal of Nutrition, 109*(2), σσ. 21-26.

Asselin-Labat, M.-L., Vaillant, F., Sheridan, J., Pal, B., Wu, D., Simpson, E., και συν. (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature, 465*(7299), σσ. 798-802.

Batra, P., Sharma, A., & Khajuria, R. (2013). Probing Lingzhi or Reishi medicinal mushroom Ganoderma lucidum (higher Basidiomycetes): a bitter mushroom with amazing health benefits. *International Journal of Medicinal Mushrooms, 15*(2), σσ. 127-43.

Besten, G. d., Van Eunen, K., Groen, A., Venema, K., Reijngoud, D.-J., & Bakker, B. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota and host energy metabolism. *Journal Of Lipid Research, 54*(9), σσ. 2325-2340.

Bishop, K. S., Kao , C., Xu, Y., Glucina, M., Paterson, R., & Ferguson, L. (2015). From 2000 years of Ganoderma lucidum to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry, 114*, σσ. 56-65.

Boyan, B., Schwartz, Z., Bonewald , L., & Swain, L. (1989). Localization of 1,25-(OH)2D3-responsive alkaline phosphatase in osteoblast-like cells (ROS 17/2.8, MG 63, and MC 3T3) and growth cartilage cells in culture. *Journal of Biological Chemistry, 264*(20), σσ. 11879-11886.

Brandstrom, H., Stiger, F., Lind, L., Kahan, T., Melhus, H., & Kindmark, A. (2002). A single nucleotide polymorphism in the promoter region of the human gene for osteoprotegerin is related to vascular morphology and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 293*(1), σσ. 13-17.

Chang, S., & Miles, P. (1992). Mushrooms biology a new discipline. *Mycologist, 6*, σσ. 64-65.

Chen, W., Wang, W.-P., Zhang, H.-S., & Huang, Q. (2012). Optimization of ultrasonic - assisted extraction of water - soluble polysaccharides from Boletus edulis mycelia using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers, 87*(1), σσ. 614-619.

Chiavistelli, S., Giustina, A., & Mazziotti, G. (2015). Parathyroid hormone pulsatility: physiological and clinical aspects. *Bone Research, 3*, σ. 14049.

Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 3*, σσ. 131-139.

Croucher, P. I., Shipman, C., Lippitt, J., Perry, M., Asosingh, K., Hijzen, A., και συν. (2001). Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood, 98*(13), σσ. 3534-3540.

Duenas, M., Munoz-Gonzalez, I., Cueva, C., Jiménez-Girón , A., Sánchez-Patán , F., Santos-Buelga , C., και συν. (2015). A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *BioMed Research International, 15*, σσ. 1-15.

Ferreira, I. C., Heleno, S., Reis, F., Stojkovic, D., Queiroz, M., Vasconcelos, M., και συν. (2014). Chemical features of Ganoderma polysaccharides with antioxidant,antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry, 114*, σσ. 38-55.

Flores, R., Shi, J., Fuhrman, B., Xu, X., Veenstra, T., Gail, M., και συν. (2012). Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study. *Journal of Translational Medicine, 10*, σσ. 1-11.

Franceschi, R., James, W., & Zerlauth , G. (1985). 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 specific regulation of growth, morphology, and fibronectin in a human osteosarcoma cell line. *Journal of Cellular Physiology, 123*(3), σσ. 401-409.

Frost, H. (1990). Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *The Anatomical Record, 226*(4), σσ. 414-422.

Genetics and Microbiology Research Group, P. U. (2018, March 22). *MycoCosm*. Ανάκτηση April 1, 2018, από https://genome.jgi.doe.gov/PleosPC15_1/PleosPC15_1.home.html

Gibson, G. R., Probert, H., Van Loo, J., Rastall, R., & Roberfroid, M. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews, 17*(2), σσ. 259–275.

Gregory, M. J. (2016, February 16). *Biology LibreTexts*. Ανάκτηση 2 20, 2018, από https://bio.libretexts.org/Under_Construction/BioStuff/BIO_102/Laboratory_Exercises/Fungi

Hadjidakis, D. J., & Androulakis, I. (2006). Bone Remodelling. *Annals of the New York Academy of Sciences, 1092*, σσ. 385-396.

Hamzeloo-Moghadam, M., Taiebi, N., Mosaddegh, M., Eslami Tehrani, B., & Esmaeili, S. (2014). The effect of some cosolvents and surfactants on viability of cancerous cell lines. *Research Journal of Pharmacognosy, 1*(3), σσ. 41-45.

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J., Blackwell, M., Cannon, P., Eriksson, O., και συν. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research III, 111*(PT A), σσ. 509-547.

Hogan, C. M. (2013, April). *Encyclopedia Of Life*. Ανάκτηση March 3, 2018, από Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: April 2013 : http://eol.org/pages/1030204/overview

Kenkre, J., & Bassett, J. (2017). The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry, 55*(3), σσ. 1-44.

Kiechl, S., Schett, G., Wenning, G., Redlich, K., Oberhollenzer, M., Mayr, A., και συν. (2004). Osteoprotegerin Is a Risk Factor for Progressive Atherosclerosis and Cardiovascular Disease. *Circulation, 109*(18), σσ. 2175-2180.

Kim, T. H., Kim, H.-J., Lee, S.-H., & Kim, S.-Y. (2012). Potent inhibitory effect of Foeniculum vulgare Miller extract on osteoclast differentiation and ovariectomy-induced bone loss. *International Journal of Molecular Medicine, 29*(6), σσ. 1053-1059.

Kolida, S., Tuohy, K., & Gibson, G. (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition, 87*, σσ. 193-197.

Lajeunesse, D., Frondoza, C., Schoffield , B., & Sacktor , B. (1990). Osteocalcin secretion by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Journal of Bone and Mineral Research, 5*(9), σσ. 915-922.

Lajeunesse, D., Kiebzak , G., Frondoza , C., & Sacktor , B. (1991). Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone Mineral, 14*(3), σσ. 237-250.

Lam, K.-L., & Cheung, P.-K. (2013). Non-digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2*(1), σσ. 45-64.

Lane, N. E. (2006). Epidimiology, Etiology and Diagnosis of Osteoporosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology, 194*, σσ. 3-11.

Lindequist, U., Niedermeyer, T., & Jülich, W.-D. (2005). The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2*(3), σσ. 285-299.

Luan, X., Lu, Q., Jiang, Y., Zhang, S., Wang, Q., Yuan, H., και συν. (2012). Crystal Structure of Human RANKL Complexed with Its Decoy Receptor Osteoprotegerin. *The Journal of Immunology, 189*(1), σσ. 245-252.

Mayo Clinic, S. (2014, June 6). *Mayo Clinic*. Ανάκτηση May 21, 2018, από https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/kyphosis/symptoms-causes/syc-20374205

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods, 65*(1-2), σσ. 55-63.

Mukudai, Y., Kondo, S., Koyama, T., Li, C., Banka, S., Kogure, A., και συν. (2014). Potential anti-osteoporotic effects of herbal extracts on osteoclasts, osteoblasts and chondrocytes in vitro. *BMC Complementary and Alternative Medicine, 14*(1), σσ. 14-29.

Nishimura, M., Ohkawara , T., Kanayama, T., Kitagawa, K., Nishimura, H., & Nishihira, J. (2014). Effects of the extract from roasted chicory (Cichorium intybus L.) root containing inulin-type fructans on blood glucose,lipid metabolism ad fecal properties. *Journal of Traditional and Complementary Medicine, 5*(3), σσ. 1-7.

Ohlsson, C., & Sjögren , K. (2015). Effects of the gut microbiota on bone mass. *Trends in Endocrinology and Metabolism, 26*(2), σσ. 69-74.

Ohmori, H., Makita, Y., Funamizu, M., Hirooka, K., Hosoi, T., Orimo, H., και συν. (2002). Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus. *Journal of Human Genetics, 47*(8), σσ. 400-406.

Palframan, R. J., Gibson, G., & Rastall, R. (2002). Effect of pH and dose on the growth of gut bacteria on prebiotic carbohydrates in vitro. *Anaerobe, 8*(5), σσ. 287-292.

Park, C.-M., Kim, H.-M., Kim, D., Han, H.-J., Noh, H., Jang, J.-H., και συν. (2016). Ginsenoside Re Inhibits Osteoclast Differentiation in Mouse Bone Marrow-Derived Macrophages and Zebrafish Scale Model. *Molecules and Cells, 39*(12), σσ. 855-861.

Paterson, R. R. (2006). Ganoderma - a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry, 67*(18), σσ. 1985-2001.

Qin, L., Raggatt, L., & Partridge, N. (2004). Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism, 15*(2), σσ. 60-65.

Raggatt, L. J., & Partridge, N. (2010). Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *The Journal of Biological Chemistry, 258*(33), σσ. 25103-25108.

Rop, O., Mlcek, J., & Jurikova, T. (2009). Beta- glucans in higher fungi and ther health effects. *Nutrition Reviews, 67*(11), σσ. 624-631.

Ruggiero, M. A., Gordon, D., Orrel, T., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R., και συν. (2015). A Higher Level Classification of All Living Organisms. *Plos One, 10*(4), σσ. 1-60.

Ruthes, A. C., Smiderle, F., & Iacomini, M. (2015). D - glycans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers, 117*, σσ. 753-761.

Rycroft, C., Jones, M., Gibson, G., & Rastall , R. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology, 91*(5), σσ. 878-887.

Sánchez, C. (2010). Cultivation of Pleurotus ostreatus and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology, 85*(5), σσ. 1321–1337.

Seibel, M. J. (2005). Biochemical Markers of Bone Turnover Part I: Biochemistry and Variability. *The clinical Biochemist Reviews, 26*(4), σσ. 97-122.

Sekirov, I., Russel , S., Antunes, L., & Finlay, B. (2010). Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews, 90*(3), σσ. 859-904.

Simonet, W. S., Lacey, D., Dunstan, C., Kelley, M., Chang, M.-S., Luthy, R., και συν. (1997). Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell, 89*(2), σσ. 309-319.

Stachowiak, B., & Reguła, J. (2012). Health-promoting potential of edible macromycetes under special consideration of polysaccharides: a revie. *European Food Research and Technology, 234*(3), σσ. 369-380.

Swann, E., & Hibbett, D. (2007, April 20). *The Tree of Life Web Project*. Ανάκτηση February 20, 2018, από http://tolweb.org/Basidiomycota/20520/2007.04.20.

Synytsya, A., Mícková, K., Synytsya, A., Jablonsky, I., Spevácek, J., Erban, V., και συν. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms Pleurotus ostreatus and Pleurotus eryngii: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers, 76*(4), σσ. 548–556.

Takenaka, K. (2011). *Biomechanics Lab*. Ανάκτηση April 25, 2018, από http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/bf05/biomechHP2011/Res_archives-e.html

Taofiq, O., Heleno, S., Calhelha, R., Alves , M., Barros, L., Gonzalez-Paramas, A., et al. (2017). The potential of Ganoderma lucidum extracts as bioactive ingredients in topical formulations, beyond its nutritional benefits. *Food and Chemical Toxicology, 108*(PT-A), pp. 139-147.

The NIH HMP Working Group, Peterson, J., Garges, S., & et al. (2009). The NIH Human Microbiome Project. *Genome Research, 19*(12), σσ. 2317-2323.

Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature, 489*(7415), σσ. 242-249.

Unknown. (2012, August 15). *Dreamstime*. Ανάκτηση February 24, 2018, από https://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-photography-ganoderma-lucidum-mushroom-forest-thailand-image37383277

Wachtel-Galor, S., Yuen, J., Buswell, J., & Benzie, I. (2011). Ganoderma lucidum (Lingzhi or Reishi) A Medicinal Mushroom. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.

Wang, J., Wang, Y., Gao, W., Wang, B., Zhao, H., Zeng, Y., και συν. (2017). Diversity analysis of gut microbiota in osteoporosis and osteopenia patients. *Peer J*.

Wang, J., Zhang, J., Zhao, B., Wang, X., Wu, Y., & Yao, J. (2010). A comparison study on microwave-assisted extraction of Potentilla anserina L. polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation. *Carbohydrate Polymers, 80*(1), σσ. 84-93.

Warriner, A. H., Patkar, N., Curtis, J., Delzell, E., Gary, L., Kilgore, M., και συν. (2011). Which fractures are most attributable to osteoporosis? *Journal of Clinical Epidimiology, 64*(1), σσ. 46-53.

Wasser, P. S., Coates, P., Blackman, M., Cragg, G., & Levine. (2005). Reishi or Lingzhi (Ganoderma lucidum). Στο *Encyclopedia of Dietary Supplements* (σσ. 603-622). New York: Marcel Dekker.

Weaver, C. M. (2015). Diet, Gut Microbiome, and Bone Health. *Current Osteoporosis Reports, 13*(2), σσ. 125-130.

Whittaker, R. (1969, January). New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science, 163*(3863), σσ. 150-160.

WHO. (1994). Assesment Of Fracture Risk and Its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis. *World Health Organization technical report series, 843*, σσ. 1-136.

Yan, J., Herzog, J., Tsang, K., Brennan, C., Bower, M., Garrett, W., και συν. (2016). Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113*(47), σσ. 554-563.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Mochizuki, S.-I., Yano, K., Fujise, N., και συν. (1998). Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology, 139*(3), σσ. 1329-1337.

Zhang, N., Huang, X., Zeng, Y., Wu, X., & Peng, X. (2013). Study on prebiotic effectiveness of neutral garlic fructan in vitro. *Food Science and Human Wellness, 2*(3-4), σσ. 119-123.

Δήμου, Δ. Μ. (n.d.). *Μύκητες- Μανιτάρια. Εισαγωγή στη βιολογία των Μακρομηκύτων.*

Διονυσιώτης, Ι., Κατσαλήρα, Α., Κοντογιάννη, Μ., Κοσμίδης , Χ., Λαμπροπούλου Αδαμίδου, Κ., Λαμπρινουδάκη, Ε., και συν. (2018). *Κατευθυντήριες γραμμές για τη διάγνωση και την αντιμετώπισης της οστεοπόρωσης στην Ελλάδα.* Αθήνα: Ελληνικό ίδρυμα Οστεοπόρωσης.

Ζαμπέλας, Α. (2011). *Κλινική Διαιτολογία & Διατροφή με στοιχεία παθοφυσιολογίας.* Νικοσία, Κύπρος: Π.Χ. Πασχαλίδης.

Ζερβάκης, Γ. (2014). *Πανεπιστημιακές Σημειώσεις με τίτλο << Εισαγωγή στη Μυκητολογία >>* (2η έκδοση εκδ.). Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής.

Μεντής, Α., & Γύπας, Φ. (2013). Ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου. Ο ρόλος στην υγεία και στη νόσο. *Αρχεία Ελληνικής Εταιρείας, 30*(3), σσ. 272-288.

Σταματοπούλου, Ε., & Τσεκούρα, Μ. (2014). Επιδημιολογικά Δεδομένα σχετικά με την Οστεοπόρωση στην Ελλάδα:Η Συμβολή του Ελληνικού Συλλόγου Υποστήριξης Ασθενών με Οστεοπόρωση. *ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗ, 53*(4), σσ. 319-326.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Α.ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΚΑΙ ΣΥΜΦΩΝΗΤΙΚΟ ΣΥΓΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΡΩΤΗΜΑΤΟΛΟΓΙΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΥ

ΣΤΟΝ

ΟΣΤΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ

ΚΩΔΙΚΟΣ : _____ (συμπληρώνεται από τον υπεύθυνο)

ΣΥΜΦΩΝΗΤΙΚΟ ΕΘΕΛΟΝΤΙΚΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ

ΣΤΗ ΜΕΛΕΤΗ «Επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στον οστικό μεταβολισμό»

Η.....δηλώνω τη συγκατάθεσή μου για να συμμετέχω στην ερευνητική μελέτη με τίτλο «Επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στον οστικό μεταβολισμό». Επιστημονική υπεύθυνος είναι η Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, κα. Κυριακού Αδαμαντίνη. Η μελέτη έχει σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης του εντερικού μικροβιόκοσμου που προέρχεται από γυναίκες που βρίσκονται σε περί ή μετα-εμμηνοπαυσιακή ηλικία, οστεοπορωτικές ή μη, και που έχει επιωαστεί με β-γλυκάνες, στη φυσιολογία και στην παθοφυσιολογία ανθρώπινων οστεοβλαστών.

Περιλαμβάνει την αξιολόγηση της διαιτητικής πρόσληψης και της φυσικής δραστηριότητας, τη λήψη ανθρωπομετρικών μετρήσεων, τη συμπλήρωση ερωτηματολογίων συχνότητας γαστρεντερικών συμπτωμάτων, καθώς και τη δειγματοληψία κοπράνων και αίματος. Πιθανά ερωτήματά μου σχετικά με οποιαδήποτε διαδικασία της μελέτης θα απαντηθούν πλήρως από τους υπεύθυνους της μελέτης. Οποιαδήποτε πληροφορία σχετικά με το άτομό μου και τα αποτελέσματα των μετρήσεων, που θα προκύψουν κατά τη διάρκεια της μελέτης, θα παραμείνουν απόρρητα. Δηλώνω ότι υπογράφω αυτό το Συμφωνητικό Εθελοντικής Συμμετοχής με ελεύθερη βούληση.

Η σημερινή ημερομηνία είναι ...../...../20..

Η εθελόντρια

.....

1. ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ονοματεπώνυμο :

Διεύθυνση:

Τηλέφωνο: E-mail:

2. ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ημερομηνία γέννησης : …….. /…….. /…….. Ηλικία: ……..

Επίπεδο μόρφωσης (πχ. Δημοτικό , Γυμνάσιο κτλ):……..Χρόνια εκπαίδευσης: ……

Οικογενειακή κατάσταση:☐ Άγαμη ☐ Έγγαμη ☐ Άλλο ……

Ποιο είναι το επάγγελμα που ασκείτε τώρα; ……

Κάπνισμα τώρα: ☐ Όχι ☐ Ναι ☐ Στο παρελθόν Πόσα χρόνια; …. Τσιγάρα/ ημέρα; ……

3. ΙΑΤΡΙΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Ιατρικώς διαγνωσμένη πάθηση (π.χ. ΣΔ, υπέρταση, καρδιαγγειακή νόσος, υπερλιπιδαιμία, ηπατική/νεφρική/πνευμονική νόσος κτλ.): ☐ Όχι ☐ Ναι Ποια; ……

Έχετε αλλεργία; ☐ Όχι ☐ Ναι Τι είδους (π.χ. τροφική, άσθμα); ……

Πάσχετε από περιοδοντίτιδα/ουλίτιδα; ☐ Όχι ☐ Ναι

Λαμβάνετε θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα; Όχι ☐ Ναι ☐ Ποια;……..

Ακολουθείτε ειδική δίαιτα; ☐ Όχι ☐ Ναι Ποια; ……

Ακολουθείτε δίαιτα απώλειας βάρους; ☐ Όχι ☐Ναι Ποια; ……

4. ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΛΗΨΗΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ*

Όνομα φαρμάκου	Δόση	Συχνότητα	Διάρκεια	Πάθηση για την οποία λαμβάνεται
……	……	……	……	……
……	……	……	……	……
……	……	……	……	……
……	……	……	……	……
……	……	……	……	……
……	……	……	……	……

*** Στα φάρμακα συμπεριλαμβάνονται και τα συμπληρώματα διατροφής**

Λάβατε μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη το τελευταίο διάστημα; ☐Όχι ☐αι Πότε;……..Ποια;……

5. ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Ύψος: ..... m **Σωματικό βάρος:** ..... kg

BMI: ……..kg/m^2

6. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΦΥΣΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ (IPAQ-SF)

IPAQ_1	Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσες μέρες κάνατε έντονες φυσικές δραστηριότητες όπως άρση βαρών, σκάψιμο, αεροβική γυμναστική ή έντονη ποδηλασία; Να αναφερθούν μόνο οι δραστηριότητες που κάνατε για τουλάχιστον 10 λεπτά.	
IPAQ_2	Πόσο χρόνο (σε λεπτά) καταναλώσατε συνήθως κάνοντας έντονες φυσικές δραστηριότητες σε μία από αυτές τις ημέρες;	
IPAQ_3	Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσες μέρες κάνατε φυσικές δραστηριότητες **μέτριας** έντασης όπως μεταφορά ελαφρού φορτίου, ποδηλασία σε μέτρια ένταση ή διπλό τένις; Μη συμπεριλάβετε το περπάτημα. Να αναφερθούν μόνο οι δραστηριότητες που κάνατε για τουλάχιστον 10 λεπτά.	
IPAQ_4	Πόσο χρόνο (σε λεπτά) καταναλώσατε συνήθως κάνοντας φυσικές δραστηριότητες **μέτριας** έντασης σε μία από αυτές τις ημέρες;	
IPAQ_6	Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσες ημέρες **περπατήσατε** για τουλάχιστον10 λεπτά τη φορά;	
IPAQ_8	Πόσο χρόνο (σε λεπτά) καταναλώσατε συνήθως για **περπάτημα** σε μία από τις παραπάνω ημέρες;	
IPAQ_7	Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 7 ημερών, πόσο χρόνο (σε ώρες συνολικά) καταναλώσατε **καθιστός** στο γραφείο, με φίλους, διαβάζοντας ή καθιστός ή ξαπλωμένος βλέποντας τηλεόραση;	

7. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΕΝΩΣΕΩΝ ΤΙΣ ΤΕΛΕΥΤΑΙΕΣ 7 ΗΜΕΡΕΣ

7.1. ΠΟΣΟ ΣΥΧΝΑ ΕΙΧΑΤΕ ΚΕΝΩΣΕΙΣ ΗΜΕΡΗΣΙΩΣ ΤΙΣ ΤΕΛΕΥΤΑΙΕΣ 7 ΗΜΕΡΕΣ;

0 ΚΑΜΙΑ ΚΕΝΩΣΗ

1 ΜΙΑ ΦΟΡΑ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ

2 ΔΥΟ ΦΟΡΕΣ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ

3 ΤΡΕΙΣ ΦΟΡΕΣ ΗΜΕΡΗΣΙΩΣ

4 ΤΕΣΣΕΡΙΣ Ή ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΦΟΡΕΣ ΤΗΝ ΗΜΕΡΑ

7.2. ΕΙΧΑΤΕ ΜΙΑ Ή ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΕΣ ΥΔΑΡΕΙΣ ΚΕΝΩΣΕΙΣ;

ΝΑΙ ΟΧΙ

7.3. ΠΟΣΕΣ ΥΔΑΡΕΙΣ ΚΕΝΩΣΕΙΣ ΕΙΧΑΤΕ ΤΙΣ ΤΕΛΕΥΤΑΙΕΣ 7 ΗΜΕΡΕΣ; .....

Β. ΤΡΙΗΜΕΡΟ ΗΜΕΡΟΛΟΓΙΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΥ ΣΤΟΝ ΟΣΤΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ

ΤΡΙΗΜΕΡΟ ΗΜΕΡΟΛΟΓΙΟ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΚΩΔΙΚΟΣ : _____ (συμπληρώνεται από τον υπεύθυνο)

Ημερομηνία:..... **Ανακαλούμενη ημέρα:.....**

Ώρα (προσδιορίστε την ώρα των γευμάτων)	Περιγραφή τροφής (αναλυτικά) Είδος τροφής-Τρόπος μαγειρέματος	Εμπορική ονομασία τροφίμου	Ποσότητα τροφίμου	Τόπος κατανάλωσης (πού φάγατε;)	Παράλληλες δραστηριότητες (π.χ.TV, Η/Υ, διάβασμα)	Συνδαιτημόνες (με ποιους φάγατε;)
Πρόγευμα						
Ενδιάμεσα Μεσημεριανό Απογευματινό						
Δείπνο Προ του ύπνου						

Νερό συνολικά μέσα στην ημέρα (ποτήρια):.....

Παίρνετε **συμπληρώματα διατροφής**; ..... Τι είδους και πόσο συχνά; .....

Καταναλώσατε **ποτά με λίγες θερμίδες**:..... Ήπιατε καθόλου **αλκοολούχα ποτά**;.....

Υπάρχει κάτι ασυνήθιστο στη διατροφή σας σήμερα (π.χ. νηστεία, δίαιτα, γιορτή κτλ)/Ήταν η συγκεκριμένη ημέρα αντιπροσωπευτική;.....