



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ: ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

In vitro έλεγχος της επίδρασης των μεταβολικών προϊόντων του
εντερικού μικροβιόκοσμου στον οστικό μεταβολισμό.

ΑΥΓΟΥΣΤΗ ΙΦΙΓΕΝΕΙΑ

(Α.Μ. : 213008)



ΑΘΗΝΑ, 2018



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ: ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ 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 Αυγουστή Ιφιγένεια 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 προσβάλλει 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 την 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.

*...στον παππού μου Παναγιώτη, που αποτελούσε
πάντα για μένα πρότυπο όχι μόνο επιστήμονα αλλά
κυρίως ανθρώπου...*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στην προσπάθεια μου για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τόσο το εκπαιδευτικό προσωπικό του Πανεπιστημίου αλλά και όλους όσους με στήριξαν και με βοήθησαν, ώστε να μπορέσω να φέρω εις πέρας το δύσκολο αυτό έργο. Κατ' αρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου την κ. Κυριακού Αδαμαντίνη, για το αμείωτο ενδιαφέρον της σε όλες τις φάσεις εκπόνησης της πτυχιακής εργασίας αλλά και για την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόησή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, την κ. Τέντα Ρωξάνη, που συμμετείχε και στην πειραματική διαδικασία και τον κ. Ζερβάκη Γεώργιο για το ενδιαφέρον τους προς την πτυχιακή μου εργασία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Μήτσου Ευδοκία για την ηθική και έμπρακτη συμπαράσταση, καθώς χωρίς την πολύτιμη βοήθειά της και τη συμμετοχή της στην πειραματική διαδικασία δε θα ήταν εφικτή η διεκπεραίωση του πειράματος.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κ. Τζιώτη Αικατερίνη, η οποία έπαιξε καθοριστικό ρόλο στη διεκπεραίωση των πειραμάτων και συνέβαλε σημαντικά στην εξοικείωσή μου με το χειρισμό των καλλιεργειών.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Λιανέα Παναγιώτα, η οποία συμμετείχε στην αρχική μου εκπαίδευση στο χώρο του εργαστηρίου και ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει στην επίλυση πρακτικών προβλημάτων.

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τη συμφοιτήτρια και συνεργάτιδα μου στην παρούσα εργασία, Κερεζούδη Ευαγγελία, με την οποία είχαμε μια άψογη συνεργασία, με αμοιβαίο ενδιαφέρον, κατανόηση και αλληλοϋποστήριξη ακόμα και στις δύσκολες στιγμές αυτής της εργασίας!

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένειά μου, τους φίλους μου και όλους όσους άμεσα ή έμμεσα μου συμπαραστάθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια αυτού του δύσκολου έργου. Σίγουρα χωρίς τη βοήθεια τους, την υπομονή και τη στήριξη τους δε θα είχα καταφέρει να φέρω εις πέρας αυτό το έργο.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη στα Ελληνικά	9
Abstract (Περίληψη στα αγγλικά)	11
Κατάλογος Σχημάτων	12
Κατάλογος Πινάκων	12
Κατάλογος Διαγραμμάτων	13
ΚΕΦ. 1: Εντερικός Μικροβιόκοσμος	14
1.1 Από ποιους μικροοργανισμούς αποτελείται	14
1.2 Ο ρόλος του στις λειτουργίες του οργανισμού	16
1.3 Παράγοντες, που τον επηρεάζουν	18
1.4 Επίδραση διατροφής στον εντερικό μικροβιόκοσμο	19
1.5 Επίδραση πρεβιοτικών στον εντερικό μικροβιόκοσμο	20
1.6 Επίδραση των προβιοτικών στον εντερικό μικροβιόκοσμο	22
1.7 Μέθοδοι αξιολόγησης του εντερικού μικροβιόκοσμου	23
ΚΕΦ. 2: Οστικός Μεταβολισμός	24
2.1 Κύτταρα, που συμμετέχουν στον οστικό μεταβολισμό	25
2.1.1 Οστεοβλάστες και Οστεοκλάστες	27
2.1.2 Οστικοί δείκτες	27
2.2 Οστική πυκνότητα	28
2.2.1 Παράγοντες, που επηρεάζουν την οστική πυκνότητα	29
2.3 Μέθοδοι αξιολόγησης οστικής πυκνότητας	30
2.3.1 Απορροφησιμετρία ακτινών Χ διπλής ενέργειας (DEXA)	30
2.3.2 Ποσοτική υπολογιστική τομογραφία (QCT)	31
2.4 Οστεοπενία	32
2.5 Οστεοπόρωση	33
2.5.1 Επιπολασμός και επιπτώσεις οστεοπόρωσης	34
2.5.2 Τύποι οστεοπόρωσης (I και II)	35
2.5.3 Διάγνωση οστεοπόρωσης	35
2.5.4 Παράγοντες κινδύνου	36
2.5.5 Θεραπείες για οστεοπόρωση	38
2.6 Εμμηνόπαυση και οστικός μεταβολισμός	39

2.6.1 Ο ρόλος των οιστρογόνων στην οστεοπόρωση.....	39
2.7 Ασβέστιο και οστά	40
2.7.1 Ομοιόσταση ασβεστίου	42
2.8 Ο ρόλος της βιταμίνης D.....	42
2.9 Ο ρόλος της παραθορμόνης.....	45
2.10 Διατροφή και οστά	46
2.10.1 Πρωτεΐνη και οστά.....	47
2.10.2 Λιπαρά οξέα και οστά.....	49
2.10.3 Βιταμίνη Α και οστά	50
2.10.4 Βιταμίνη B ₁₂ και οστά	50
2.10.5 Βιταμίνη C και οστά	50
2.10.6 Βιταμίνη K και οστά	51
2.10.7 Κάλιο και οστά	51
2.10.8 Νάτριο και οστά.....	51
2.10.9 Μαγνήσιο και οστά.....	52
2.10.10 Χαλκός και οστά.....	52
2.10.11 Σίδηρος και οστά.....	53
2.10.12 Φθόριο και οστά	53
2.10.13 Σελήνιο και οστά.....	53
2.10.14 Αναψυκτικά τύπου Cola και οστά	53
2.10.15 Αλκοόλ και οστά	54
2.10.16 Κάπνισμα και οστά	54
2.11 Συσχέτιση εντερικού μικροβιόκοσμου και οστικού μεταβολισμού	54
2.11.1 Επίδραση πρεβιοτικών στον οστικό μεταβολισμό.....	56
2.12 Φυσική δραστηριότητα και οστά	58
ΚΕΦ. 3: Μύκητες	61
3.1 Βασιδιομύκητες	61
3.2 Μανιτάρια.....	62
3.2.1 Γενικά	62
3.2.2 Διατροφικά χαρακτηριστικά.....	63
3.2.3 Φαρμακευτικές ιδιότητες	64
3.3 Pleurotus ostreatus.....	64
3.3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	64
3.3.2 Διατροφική αξία.....	65

3.3.3 Φαρμακευτικές ιδιότητες	66
3.4 Ινουλίνη	66
3.5 β-γλυκάνες.....	67
ΚΕΦ. 4: ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	69
4.1. Σκοπός της εργασίας	69
4.2. Υλικά και μέθοδοι.....	69
4.2.1 Χαρακτηριστικά εθελοντριών-Αξιολόγηση	69
4.2.2 Ανθρωπομετρικές μετρήσεις- Διατροφική αξιολόγηση.....	70
4.2.3 Πρωτόκολλο εκχύλισης πολυσακχαριτών (β-γλυκανών) από μανιτάρια του γένους <i>Pleurotus ostreatus</i>	70
4.2.4 Παραλαβή δείγματος και επεξεργασία κοπράνων	71
4.2.5 Πρωτόκολλο <i>in vitro</i> ζύμωσης σε στατικές καλλιέργειες (Static batch culture fermentations).....	71
4.2.6 Κυτταροκαλλιέργειες οστικών κυττάρων	74
4.2.7 Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT	75
4.2.8 Προσδιορισμός των δεικτών του οστικού μεταβολισμού	76
4.2.9 Στατιστική ανάλυση	79
4.3 Αποτελέσματα.....	80
4.3.1 Χαρακτηριστικά δείγματος εθελοντριών	80
4.3.2 Αποτελέσματα 3μερου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων.....	81
4.3.3 Αποτελέσματα δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας MTT	83
4.3.4 Αποτελέσματα από τον προσδιορισμό των δεικτών του οστικού μεταβολισμού στα κύτταρα MG-63.....	88
ΚΕΦ. 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ	97
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	100

Περίληψη στα Ελληνικά

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος αποτελεί ένα σύνθετο οικοσύστημα, που είναι σε διαρκή αλληλεπίδραση και επαφή με τα κύτταρα του ξενιστή αλλά και τα θρεπτικά συστατικά. Πάνω από 90% των κυττάρων στον ανθρώπινο οργανισμό είναι μικρόβια, που εδράζονται κυρίως στον εντερικό σωλήνα, γεγονός, που καθιστά σαφές ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι πολύ σημαντικός για την υγεία του ξενιστή. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος καθορίζεται από πολλούς παράγοντες και για αυτό, είναι μοναδικός για κάθε άτομο, ενώ παρουσιάζει μεγάλη μεταβλητότητα ακόμα και για το ίδιο άτομο ανάλογα με τις συνθήκες. Αν και υπάρχουν λίγες άμεσες αποδείξεις, που συσχετίζουν την οστεοπόρωση ή την οστεοπενία με την κατάσταση του εντερικού μικροβιώματος, ωστόσο, υπάρχουν αρκετές έμμεσες αποδείξεις. Πολλοί από τους παράγοντες κινδύνου, που συσχετίζονται με την ανάπτυξη της οστεοπόρωσης και της οστεοπενίας προκαλούν αλλαγές και στο εντερικό μικροβίωμα. Εντούτοις, η απουσία άμεσης επαφής των οστικών κυττάρων με τα μικρόβια υποδηλώνουν ότι οι επιδράσεις πρέπει να μεσολαβούνται έμμεσα από κύτταρα ή διαλυτούς παράγοντες. Αρκετές μελέτες, μάλιστα, αναφέρουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο ως ρυθμιστή της οστικής μάζας μέσω της μεσολάβησης του ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ. γένεση οστεοκλαστών), της εντερικής απορρόφησης ασβεστίου και της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών (π.χ. σεροτονίνης). Επομένως, η ενίσχυση των εντερικών μικροβίων μέσω της χρήσης πρεβιοτικών μπορεί να θεωρηθεί ως μία πιθανή λύση στην αντιμετώπιση εκφυλιστικών ασθενειών των οστών όπως είναι η οστεοπόρωση. Οι άπεπτοι πολυσακχαρίτες των μανιταριών και κυρίως οι β-γλυκάνες φαίνεται να διαθέτουν μια πιθανή πρεβιοτική δράση λόγω των ανοσορρυθμιστικών, αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών τους δράσεων. Βάσει αυτών των δεδομένων, ο στόχος της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι να διερευνήσει την επίδραση των προϊόντων της *in vitro* ζύμωσης του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* και των πλούσιων σε β-γλυκάνες εκχυλισμάτων του από τον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο γυναικών σε εμμηνόπαυση σε ανθρώπινους οστεοβλάστες. Τα λυοφιλοποιημένα μανιτάρια *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 (2% w/v) και τα πλούσια σε β-γλυκάνες εκχυλίσματά τους (1% w/v) αξιολογήθηκαν, προκειμένου να εκτιμηθεί η πιθανή πρεβιοτική τους δράση, ύστερα από τη ζύμωση τους σε ένα μοντέλο ζυμώσεως στατικής καλλιέργειας, λαμβάνοντας ως εμβόλιο δείγμα κοπράνων (άρα, δείγμα εντερικού μικροβιόκοσμου) από 6 εθελόντριες (3 υγιείς και 3 οστεοπενικές μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η ινουλίνη σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις (1% και 2%). Τα υπερκείμενα από τις ζυμώσεις λήφθηκαν αρχικά στις 0 ώρες και μετά από το πέρας 24 ωρών ζύμωσης, επεξεργάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την παρέμβαση σε ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοβλαστών MG-63. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση των επεξεργασμένων υπερκειμένων των ζυμώσεων στη βιωσιμότητα των κυττάρων αυτών με τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT, ενώ η εκτίμηση των δεικτών του οστικού μεταβολισμού και πιο συγκεκριμένα της οστεοπροτεγερίνης (OPG) και του ενεργοποιητή υποδοχέα του συνδέτη κάππα-B του πυρηνικού παράγοντα (RANKL) υλοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου Elisa με kit εμπορικά διαθέσιμα. Επιπλέον, αξιολογήθηκε και ο λόγος OPG/ RANKL, που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της οστικής υγείας. Ύστερα από στατιστική επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων φάνηκε ότι υπήρχε διαφοροποίηση στη βιωσιμότητα των κυττάρων MG-63 κυττάρων ανάλογα με την εθελόντρια, γεγονός, που δείχνει τη μοναδικότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου σε κάθε ξενιστή. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας των κυττάρων στις οστεοπενικές εθελόντριες, καθώς σε κανένα χειρισμό δεν εντοπίστηκε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων σε σχέση με τον αρνητικό

μάρτυρα, σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των υγιών εθελοντριών ή του συνόλου των εθελοντριών. Ένα τέτοιο αποτέλεσμα, πιθανόν, καταδεικνύει ευνοϊκότερη επίδραση κατά τη ζύμωση των πρεβιοτικών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο των οστεοπενικών, ως προς τη βιωσιμότητα των οστεοβλαστών. Σχετικά με τον προσδιορισμό των δεικτών του οστικού μεταβολισμού, τα αποτελέσματα ανέδειξαν ευεργετική επίδραση της ινουλίνης αντίστοιχη με αυτή του αρνητικού μάρτυρα υποδηλώνοντας μια πιθανή θετική επίδραση της ινουλίνης στην οστεοβλαστική δραστηριότητα και συνεπακόλουθα στην οστική ανακατασκευή. Επιπλέον, το πλούσιο σε β-γλυκάνες εκχύλισμα του *Pleurotus ostreatus* αν και δεν εμφάνισε αρχικά κάποια ευεργετική επίδραση ως προς την OPG, φάνηκε, όμως, να έχει θετική επίδραση στο λόγο OPG/RANKL, ενώ μείωνε σημαντικά τη συγκέντρωση RANKL πάντα σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και την ινουλίνη, αποτέλεσμα, που μπορεί να συνεπάγεται ευεργετική επίδραση στον οστικό ανασχηματισμό.

Λέξεις-κλειδιά: εντερικός μικροβιόκοσμος, *Pleurotus ostreatus*, β-γλυκάνες, πρεβιοτικά, οστική υγεία

Abstract (Περίληψη στα αγγλικά)

Gut microbiota is a complex, microbial ecosystem, which is in constant interaction and communication with the host's cells and the nutrients. Over 90% of the cells in the human body are microbes, a great percentage of them are located in the gastrointestinal tract, a fact that reflects the importance of the gut microbiota for the host's health. Many factors influence the gut microbiota and this is the reason for its uniqueness and its great variability depending on the existing conditions. Even though there are few direct evidences, that correlate the osteoporosis or osteopenia with the gut microbiota, there are many indirect evidences. Many risk factors associated with the development of osteoporosis and osteopenia cause alterations in the gut microbiota, too. Nevertheless, the absence of direct contact between the microbes and the bone cells underpins that the effects are intermediated indirectly by cells or soluble factors. Several studies mention the intestinal microbiome as a regulator of the bone mass through the intermediation of the immune system (ex. Production of osteoclasts), the intestinal calcium absorption and the release of neurotransmitters (ex. Serotonin). Thus, the intensification of gut microbes through the consumption of prebiotics can be considered as a possible solution in the therapy of degenerative bone diseases like osteoporosis. Indigestible polysaccharides of mushrooms and particularly beta-glucans appear to have prebiotic activity as well as immunomodulatory, anti-inflammatory and antioxidant effects. Based on these data, the aim of the study is to investigate the effects of the *in vitro* fermentation products of mushroom *Pleurotus ostreatus* and its rich in beta-glucans extracts by the human intestinal microbiome of post-menopausal women in human osteoblasts. Lyophilized mushrooms *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 (2% w/v) and its rich in beta-glucans extracts (1 % w/v) were evaluated for their potential prebiotic activity as a result of a static culture fermentation model, using faecal inoculum from 6 participants (3 healthy and 3 osteopenic postmenopausal women). Inulin was used as positive control in two different concentrations (1% and 2%). Fermentation supernatants were collected initially (0 hours) and after 24 hours of fermentation, processed and used for the intervention on the human MG-63 cell line. After that, the effect of the processed supernatants on the viability of these cells was assessed by the MTT assay, while evaluation of bone metabolism parameters, namely Osteoprotegerin (OPG) and Receptor activator of Nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) was performed by the Elisa method by commercially available kits. Moreover, we estimated the ratio OPG/RANKL, in order to evaluate the bone health. The statistical analysis of the experimental results indicate the differentiation in the viability of MG-63 cells for each participant, which reflects the uniqueness of subjects' gut microbiota. The results of the cells' viability in osteopenic participants are really interesting, as none of the interventions didn't reduced significantly the viability of cells in accordance with the negative control. This outcome may present a more beneficial effect during the fermentation of prebiotics by the gut microbiome of osteopenic women, as far as the viability of osteoblasts is concerned. Respectively, in bone reconstruction protocol, the outcomes revealed the possible beneficial effect of inulin (2% w/v), which had similar impact on the bone parameters (OPG, RANKL, OPG/RANKL) as the negative control, in osteoblastic activity and hence, in bone reconstruction. Furthermore, the rich in beta-glucans extract of *Pleurotus ostreatus* even if it didn't seem initially to influence positively the OPG, it turned out that it increased the ratio OPG/RANKL, while it reduced significantly the concentration of RANKL in relevance with the negative control and inulin, that may imply beneficial effect on bone remodeling.

Keywords: gut microbiota, *Pleurotus ostreatus*, b-glucans, prebiotics, bone health

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑΤΑ	ΣΕΛΙΔΕΣ
1	16
2	19
3	25
4	30
5	33
6	38
7	47
8	49
9	55
10	57
11	62
12	63
13	65
14	68

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΕΣ	ΣΕΛΙΔΕΣ
1	81
2	82
3	85
4	86

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ	ΣΕΛΙΔΕΣ
1	84
2	84
3	88
4	89
5	89
6	91
7	92
8	93
9	94
10	95
11	95

ΚΕΦ. 1: Εντερικός Μικροβιόκοσμος

Τα τελευταία χρόνια έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον γύρω από τη μελέτη και τον προσδιορισμό του Εντερικού Μικροβιόκοσμου, καθώς φαίνεται ότι διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στις λειτουργίες του οργανισμού. Ειδικότερα, το έντερο είναι ένα εξαιρετικά σύνθετο οικοσύστημα αποτελούμενο από 3 κύρια συστατικά, που είναι μονίμως σε επαφή και αλληλεπίδραση μεταξύ τους: τα κύτταρα του ξενιστή, τα θρεπτικά συστατικά και τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι μία σημαντική ζώσα βιομάζα, που διαδραματίζει ποικίλους ρόλους στη φυσιολογία του ξενιστή σε συνεργασία με τα άλλα συστατικά. Μάλιστα, είναι γνωστό ότι πάνω από το 90% των κυττάρων στον ανθρώπινο οργανισμό είναι μικρόβια, που εδράζονται κυρίως στον εντερικό σωλήνα και αλληλοεπιδρούν με τον ξενιστή τους δημιουργώντας επωφελείς, συμβιωτικές σχέσεις. {Weaver, 2015} Αυτοί οι συμβιωτικοί οργανισμοί γνωστοί και ως μικροβίωμα μπορούν να θεωρηθούν και ως ένα πολυκυτταρικό όργανο, που επικοινωνεί με τον ξενιστή και επηρεάζεται από αυτόν με ποικίλους τρόπους. {Bourlioux, 2003}, {Collins, 2016}

Τα περισσότερα μικρόβια, όπως τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*, που «φιλοξενούνται» στο έντερο είναι ακίνδυνα ακόμα και ωφέλιμα για τον ξενιστή μιας και δρουν συμβιωτικά με αυτόν για να βελτιώσουν την εντερική ακεραιότητα, το μεταβολισμό και να ανταγωνιστούν παθογόνους μικροοργανισμούς. Αντιθέτως, άλλα βακτήρια είναι εν δυνάμει παθογόνα και μπορεί να γίνουν επικίνδυνα για τον ξενιστή. {Bourlioux, 2003}, {Collins, 2016}

Για να επιτευχθεί, λοιπόν, η κατανόηση των συμβιωτικών σχέσεων των εντερικών μικροβίων με τους ξενιστές τους πρέπει πρώτα να χαρακτηριστεί το βασικό μικροβίωμα, δηλαδή, η σύσταση και η λειτουργία του, που είναι συμβατές με τη διατήρηση της υγείας και τα χαρακτηριστικά, τα οποία όταν διαταράσσονται σχετίζονται με εμφάνιση ασθένειας. Ωστόσο, η πολυπλοκότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου δυσχεραίνει τον προσδιορισμό της επιθυμητής κατάστασης τόσο για ένα πληθυσμό όσο και για ένα μεμονωμένο άτομο. {Hernandez, 2016}

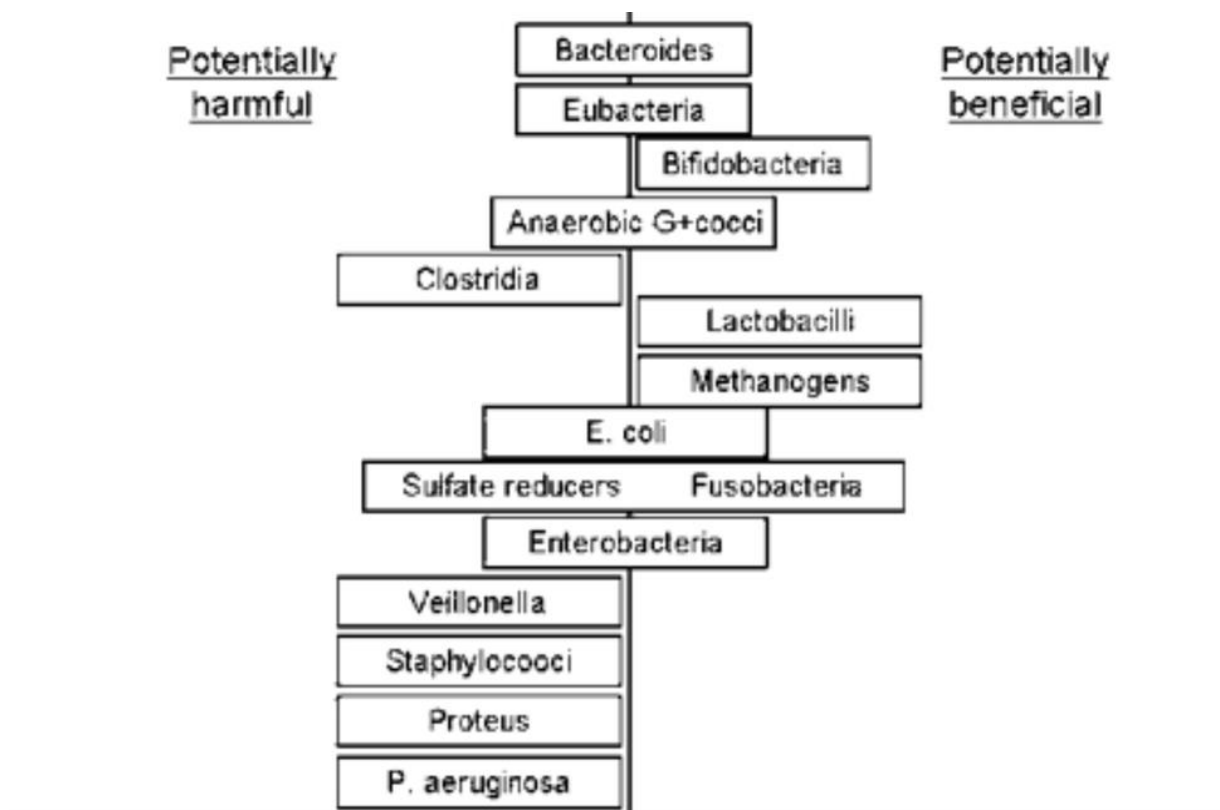
1.1 Από ποιους μικροοργανισμούς αποτελείται

Κάθε άτομο εκτιμάται ότι φιλοξενεί τουλάχιστον 160 διαφορετικά είδη και, αυτή η μεγάλη ποικιλία των ειδών βρίσκεται σε έντονη αντίθεση με την περιορισμένη ποικιλία σε επίπεδο φύλων: το εντερικό μικροβίωμα κυριαρχείται από μέλη μόνο 2 φύλων των Firmicutes και των Bacteroidetes. {Hernandez, 2016} Μέλη των φύλων Πρωτεοβακτήρια (*Proteobacteria*),

Ακτινοβακτήρια (Actinobacteria) και Βερουκομικρόβια (Verrucomicrobes) εμφανίζονται αλλά γενικά αποτελούν λιγότερο σημαντικά συστατικά. Το εντερικό μικροβίωμα περιέχει, επιπλέον, Αρχαία (κυρίως το *Methanobrevibacter smithii*), ευκάρυα (κυρίως ζύμες) και ιούς (πρωτίστως φάγους). Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιώματος είναι αναερόβιοι. {Weaver, 2015} Εντούτοις, παρά τη μεγάλη ετερογένεια στις συστάσεις του εντερικού μικροβιόκοσμου, τα λειτουργικά γενετικά προφίλ είναι αρκετά παρόμοια σε διαφορετικά άτομα. {Lozupone, 2012}

Παρά τη συνέπεια στην εμφάνιση αυτών των βασικών μικροοργανισμών, οι σχετικές τους αναλογίες και τα παρόντα είδη ποικίλουν σε κάθε άτομο. Ωστόσο, εκτός από την ποικιλία στα είδη, που εμφανίζονται σε κάθε άνθρωπο υπάρχουν και διαφορές στην κατανομή των βακτηρίων μέσα στη γαστρεντερική οδό λόγω της εναλλαγής των φυσιολογικών συνθηκών στις διαφορετικές περιοχές της. Αναλυτικότερα, υπάρχει ένας πολύ μικρός πληθυσμός βακτηρίων στο στομάχι επειδή το περιβάλλον είναι υψηλά όξινο (pH της τάξης του 1), και η οξύτητα καταστρέφει σχεδόν όλα τα βακτήρια, που περνούν μέσα από αυτό. Εντούτοις, το άδειασμα του στομάχου επιτρέπει σε ορισμένα βακτήρια να επιζήσουν και να περάσουν μέσα από τον πυλωρικό σφιγκτήρα και κατόπιν μέσα στο δωδεκαδάκτυλο. Συνεπώς, μόνο ένας περιορισμένος αριθμός από ζωντανά βακτήρια φτάνουν στο δωδεκαδάκτυλο. Όταν φτάνουν σε ουδέτερο περιβάλλον (pH της τάξης του 7) τα βακτήρια υπόκεινται σε επιθέσεις από τα χολικά άλατα και τις παγκρεατικές εκκρίσεις. Τα βακτήρια, που μπορούν να αντισταθούν σε αυτό τον τύπο των επιθέσεων μπορούν να αυξηθούν σημαντικά σε μέγεθος όταν φτάνουν στη νήστιδα και διασχίζουν την ειλεοτυφλική βαλβίδα, προκειμένου να φτάσουν στο παχύ έντερο. Τα περισσότερα από τα βακτήρια, που καταφέρνουν να διασχίσουν τα φράγματα του στομάχου και του λεπτού εντέρου είναι ζωντανά και μεταβολικά ενεργά. {Bourlioux, 2003}

Πρέπει να σημειωθεί, ότι οι διαφορετικοί χρόνοι διέλευσης μέσα από τις διάφορες περιοχές του εντέρου καθορίζουν τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων. Σε υγιή άτομα, ο χρόνος διέλευσης από το στόμα στον πρωκτό είναι ανάμεσα στις 55 και 72 ώρες, από τις οποίες 4-6 ώρες είναι από το στόμα στο τυφλό και 54 με 56 ώρες στο παχύ έντερο. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό ότι αυτός ο σύντομος χρόνος διέλευσης μέσα από το λεπτό έντερο δεν επιτρέπει τη βακτηριακή ανάπτυξη, ενώ, στο παχύ έντερο, ο πολύ μεγαλύτερος χρόνος διέλευσης (ανάμεσα και σε άλλους παράγοντες) επιτρέπει στα βακτήρια να φτάσουν σε σημαντικά επίπεδα πληθυσμών. {Bourlioux, 2003}



Σχήμα 1. Πιθανά επιβλαβή και πιθανά ωφέλιμα βακτήρια. {Bourlioux, 2003}

1.2 Ο ρόλος του στις λειτουργίες του οργανισμού

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος, όπως έχει καταστεί ήδη κατανοητό, αποτελεί μια περίπλοκη οικολογική κοινότητα, που μέσω συλλογικών μεταβολικών δραστηριοτήτων και αλληλεπιδράσεων με τον ξενιστή επηρεάζει τόσο τη φυσιολογία των υγιών ατόμων αλλά και την επιρρέπειά τους στην εμφάνιση ασθενειών. Η κατανόηση, λοιπόν, των παραγόντων, που συντελούν στις συνθετικές και λειτουργικές αλλαγές συμβάλλουν στο σχεδιασμό θεραπειών, που στοχεύουν στον εντερικό μικροβιόκοσμο. {Lozupone, 2012}

Η επίτευξη αυτού του στόχου είναι δύσκολη λόγω της τεράστιας ποικιλότητας του εντερικού μικροβιόκοσμου, της βιοποικιλότητας μεταξύ διαφορετικών ατόμων και των χρονικών διακυμάνσεων στη σύσταση ειδικά κατά την εμφάνιση ασθένειας και κατά την πρώιμη ανάπτυξή της. Εντούτοις, τα περισσότερα εντερικά μικρόβια είναι ακίνδυνα ακόμα και επωφελή για τον ξενιστή, καθώς, συνήθως, αναπτύσσουν συνεργιστικές σχέσεις με αυτόν. Από τη μία, ο ξενιστής παρέχει στα βακτήρια εύκολη πρόσβαση σε τροφή και κατάλυμα. Από την άλλη, το εντερικό μικροβίωμα προστατεύει τον ξενιστή από τα εντεροπαθογόνα, βοηθάει στην πέψη σύνθετων τροφών, εξάγει θρεπτικά συστατικά και ενέργεια από τη διατροφή και συμβάλλει στη σύνθεση

απαραίτητων μεταβολιτών όπως η βιταμίνη Β και Κ. Στην πραγματικότητα, εκτιμάται ότι το 10% των μεταβολιτών, που ανιχνεύεται στο αίμα των θηλαστικών προέρχεται από το εντερικό μικροβίωμα. {Hernadez, 2016}, {Lozupone, 2012}

Ειδικότερα, ο εντερικός μικροβιόκοσμος έχει φανεί ότι μπορεί να επηρεάζει τη φυσιολογία του ξενιστή με την παραγωγή συγκεκριμένων μεταβολιτών από τους οποίους οι πιο εκτεταμένα μελετημένοι είναι τα βραχείας αλύσου λιπαρά οξέα (SCFAs). Τα SCFAs παράγονται από εντερικά βακτήρια μέσω της ζύμωσης άπεπτων πολυσακχαριτών και εμπλέκονται στην ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή, στην οποία συμπεριλαμβάνεται η διέγερση των περιφερικών ρυθμιστικών Τ-κυττάρων, η προστασία από μολύνσεις και η ρύθμιση του μεταβολικού ρυθμού και της ενεργειακής ομοιόστασης. {Yan, 2016} Ιδιαίτερη μνεία αποδίδεται στο γένος των Μπιφιδοβακτηρίων (*Bifidobacterium*) και στο γένος των Λακτοβάκιλλων (*Lactobacillus*), που παράγουν γαλακτικό οξύ και έχουν αναγνωριστεί για τις ευεργετικές τους επιδράσεις στον ξενιστή, ιδιαίτερα στην έκφραση των ανοσορρυθμιστικών και ανταγωνιστικών σε παθογόνα μορίων. {Collins, 2016} Επομένως, είναι εμφανές ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος πιθανότατα επηρεάζει τη μεταβολική λειτουργία και ρυθμίζει την έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία του οργανισμού. {Hernadez, 2016}, {Lozupone, 2012}

Η “δυσβίωση”, δηλαδή, η διαταραχή της φυσιολογικής ισορροπίας του εντερικού μικροβιόκοσμου και του ξενιστή έχει συσχετιστεί με έναν αριθμό χρόνιων παθήσεων στους ανθρώπους όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης, η κακή θρέψη, οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, οι νευρολογικές διαταραχές, ορισμένοι τύποι καρκίνου και η καρδιαγγειακή νόσος, ενώ, τα τελευταία χρόνια επισημαίνεται ο ρόλος του στη διασφάλιση της υγείας οργάνων απομακρυσμένων από το έντερο συμπεριλαμβανομένου του δέρματος, των πνευμόνων, των αρτηριών και των οστών. {Ejtahed, 2016}, {Hernadez, 2016}, {Lozupone, 2012} Ειδικότερα, υπάρχουν αρκετοί διαφορετικοί πληθυσμοί ενδοκρινικών κυττάρων στο έντερο, που μπορούν να επηρεαστούν από τον εντερικό μικροβιόκοσμο όπως και ορμόνες, που απελευθερώνονται από ενδοκρινικά κύτταρα, τα οποία διεγείρονται από βακτήρια και τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργία του ξενιστή, καθώς εισέρχονται στην κυκλοφορία και επικοινωνούν άμεσα με τις απολήξεις των σπλαχνικών προσαγωγών νεύρων και των ανοσοποιητικών κυττάρων. {Sjogren, 2012}

Η σύσταση, η ποικιλία και η λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου και η συσχέτισή τους με διάφορες ασθένειες έχουν μελετηθεί εκτεταμένα τόσο σε ζωικά πρότυπα όσο και σε ανθρώπους

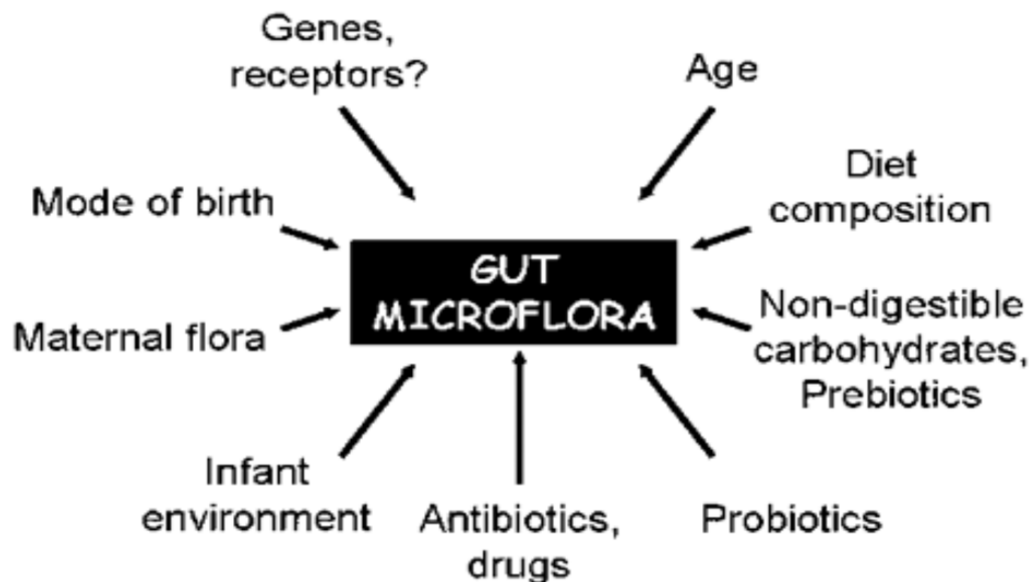
και μπορούν πιθανά να διαμορφώσουν εξατομικευμένες διατροφικές και φαρμακευτικές στρατηγικές. {Hernandez, 2016}, {Lozupone, 2012}, {McCabe, 2015}

1.3 Παράγοντες, που τον επηρεάζουν

Με εδραιωμένη την αντίληψη ότι ο φυσιολογικός εντερικός μικροβιόκοσμος είναι μεταβλητός σε υψηλό βαθμό, πρέπει να μελετηθούν και οι λόγοι για τους οποίους ποικίλει, ώστε, αυτές οι πληροφορίες να χρησιμοποιηθούν για εξατομικευμένες θεραπείες ή κλινικές δοκιμές.

Τα νεογνά γεννιούνται με ένα πρακτικά στείρο έντερο, που αποικείται σε σύντομο χρονικό διάστημα από τη γέννησή τους. Η κυρίαρχη πηγή για τον αρχικό αποικισμό είναι ο μητρικός μικροβιόκοσμος και το περιβάλλον. Ένας άλλος παράγοντας είναι ο τρόπος διατροφής των βρεφών, δηλαδή, εάν θηλάζουν ή εάν τρέφονται με υποκατάστατα μητρικού γάλακτος. Τα βρέφη, που τρέφονται με θηλασμό, διαθέτουν μικροβίωμα, που είναι όχι μόνο πιο πλούσιο σε βακτήρια του γένους *Bifidobacterium*, αλλά, επίσης, περιλαμβάνει πολύ λιγότερα είδη, που θεωρούνται παθογόνα. {Lozupone, 2012}

Ο νεογνικός μικροβιόκοσμος είναι σχετικά ευμετάβλητος και εξελίσσεται σε ένα φυσιολογικό μικροβιόκοσμο ενήλικου με μία αύξηση της ποικιλίας και της σταθερότητας κατά τους πρώτους 24 μήνες της ζωής με τη χρονική πορεία να εξαρτάται από τη διατροφή του νηπίου. Η διαπροσωπική μεταβολή τόσο στις μικροβιακές κοινότητες όσο και στο εύρος των λειτουργικών γονιδίων είναι μεγαλύτερη στα νήπια από τους ενήλικες. Τα αντιβιοτικά, ο θηλασμός και το είδος τοκετού (με φυσικό τρόπο ή καισαρική) έχουν μεγάλες επιπτώσεις στον νηπιακό μικροβιόκοσμο. Ωστόσο, το κατά πόσο οι διαφορές στην πρώιμη φάση της ζωής τελικά επηρεάζουν τη σύσταση του μικροβιώματος του ενήλικου δεν είναι πλήρως κατανοητό. {Lozupone, 2012}



Σχήμα 2. Παράγοντες, που επηρεάζουν τον αποικισμό. {Bourlioux, 2003}

1.4 Επίδραση διατροφής στον εντερικό μικροβιόκοσμο

Ο σχετικός ρόλος της γενετικής και του περιβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένης και της διατροφής, στο σχηματισμό του ανθρώπινου μικροβιώματος δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος, καθώς αυτοί οι παράγοντες συχνά συγχέονται. {Lozupone, 2012} Μελέτες από εκροές ειλεοστομίας έδειξαν ότι μια αύξηση στις διαιτητικές ίνες διεγείρει την αύξηση σε όλο το εύρος των βακτηριακών ειδών. Αντίστοιχα, μια αύξηση στο λίπος διεγείρει μια αύξηση στα μη σποριογόνα αναερόβια βακτήρια και μία μείωση στα βακτήρια γαλακτικού οξέος, ενώ, μια αύξηση στην πρωτεΐνη διεγείρει μια αύξηση στα βακτήρια γαλακτικού οξέος. {Bourlioux, 2003}

Όταν τα βακτήρια φτάνουν στο παχύ έντερο, έχουν πρόσβαση στα θρεπτικά συστατικά, που απαιτούνται για να πολλαπλασιαστούν. Τα θρεπτικά αυτά συστατικά περιλαμβάνουν όλα τα τρόφιμα, που καταναλώνονται αλλά δεν απορροφώνται από τον ξενιστή, που έχουν διασχίσει την ειλεοτυφλική βαλβίδα (φυτικές ίνες και άπεπτα σάκχαρα), υλικά από τον ξενιστή (βλέννα και νεκρά κύτταρα) και μεταβολίτες προερχόμενους από τη δραστηριότητα βακτηριακών ενζύμων ειδικά από την πέψη υδατανθράκων. {Bourlioux, 2003}

Η επαφή ανάμεσα στα βακτήρια και την τροφή προκαλεί ζύμωση, που παράγει πολυάριθμους μεταβολίτες, που ποικίλουν ανάλογα με τα διαθέσιμα υποστρώματα. Αν το υπόστρωμα είναι υδατάνθρακας, τότε προκύπτει τοπική παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας

αλύσου, οδηγώντας κυρίως σε αύξηση του προπιονικού, του οξικού και του βουτυρικού οξέος, που είναι υπεύθυνα για επιδράσεις στη φυσιολογία του ξενιστή. Ειδικότερα, τα οξέα επηρεάζουν το μεταβολισμό του παχέος εντέρου, την ηπατική ρύθμιση των λιπιδίων και των σακχάρων και την προμήθεια των κυττάρων με ενέργεια (π.χ. το βουτυρικό οξύ είναι ένα ενεργειακό υπόστρωμα για τα κύτταρα του παχέος εντέρου). Άλλες επωφελείς επιδράσεις τους περιλαμβάνουν την υδρόλυση των λιπιδίων, την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών (παραγωγή πεπτιδίων και αμινοξέων) και την παραγωγή βιταμινών. Εντούτοις, το γεγονός ότι ο πολλαπλασιασμός των βακτηρίων μπορεί να διεγείρει και δυσμενείς συνέπειες δεν πρέπει να παραβλεφθεί. Τέτοιες επιπτώσεις περιλαμβάνουν την παραγωγή πιθανά καρκινογόνων ουσιών και τοξικών μεταβολιτών και την απενεργοποίηση συγκεκριμένων φαρμάκων. {Bourlioux, 2003}

Ανάμεσα σε υγιείς ενήλικες, οι μακροπρόθεσμες διαφορές στις διατροφές σχετίζονται με 2 βασικά είδη γαστρεντερικών βακτηρίων, τα *Prevotella* και τα *Bacteroides*. Τα *Bacteroides* συσχετίστηκαν με τη μακροπρόθεσμη υιοθέτηση μιας διατροφής πλούσιας σε ζωική πρωτεΐνη, αρκετά αμινοξέα και κορεσμένα λίπη (κατά κύριο λόγο στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες), ενώ, η *Prevotella* συσχετίστηκε με υδατάνθρακες και απλά σάκχαρα (κατά κύριο λόγο σε αγροτικές κοινωνίες). {Lozupone, 2012}

1.5 Επίδραση πρεβιοτικών στον εντερικό μικροβιόκοσμο

Τα πρεβιοτικά είναι συστατικά των τροφών, που λειτουργούν ως υποστρώματα για τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Οι πρεβιοτικές ίνες εξ' ορισμού είναι ανθεκτικές στην απορρόφηση, ενώ υδρολύονται και ζυμώνονται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο του κατώτερου τμήματος του εντέρου. Το επιθυμητό αποτέλεσμα όταν ενσωματώνονται στη διατροφή σε επαρκείς ποσότητες είναι ότι διεγείρουν επιλεκτικά την ανάπτυξη ορισμένων βακτηρίων, που έχουν ωφέλιμες επιδράσεις στον ξενιστή. {Weaver, 2015}

Από την εισαγωγή της, η έννοια των πρεβιοτικών έχει προσελκύσει επιστημονικό, όπως, επίσης και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Ωστόσο, πολλά συστατικά τροφίμων ειδικά πολλοί ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες των τροφών (συμπεριλαμβανομένων και των διαιτητικών ινών) υποστηρίζεται ότι διαθέτουν πρεβιοτική δράση χωρίς τη δέουσα προσοχή στα απαιτούμενα κριτήρια. Δεν είναι όλοι οι διαιτητικοί υδατάνθρακες πρεβιοτικά, για αυτό και έχουν θεσπιστεί κάποια κριτήρια για την ταξινόμηση ενός συστατικού ενός τροφίμου ως πρεβιοτικό. Αυτά τα κριτήρια είναι: 1) Αντίσταση στη γαστρική οξύτητα, στην υδρόλυση από ένζυμα θηλαστικών και τη

γαστρεντερική απορρόφηση 2) Ζύμωση από το εντερικό μικροβίωμα 3) Επιλεκτική διέγερση και/ή ενεργότητα αυτών των εντερικών βακτηρίων, που συμβάλλουν στην υγεία και την ευεξία. Η αντίσταση, στο πρώτο κριτήριο, δε σημαίνει απαραίτητα ότι τα πρεβιοτικά είναι εντελώς άπεπτα αλλά ότι μια σημαντική ποσότητα του συστατικού είναι διαθέσιμη στο έντερο (ειδικά στο παχύ έντερο) για να λειτουργεί σαν υπόστρωμα για τη ζύμωση. Αν και κάθε ένα από αυτά τα κριτήρια είναι σημαντικό, το τρίτο είναι ίσως το πιο δύσκολο για να εκπληρωθεί. {Roberfroid, 2007}

Οι πρεβιοτικές ίνες ποικίλουν σε τύπους και στο μήκος των σακχάρων και των χημικών τους δεσμών. Οι δισακχαρίτες έχουν 2 μονάδες σακχάρων όπως η λακτουλόζη και η λακτιτόλη. Η λακτουλόζη δημιουργείται κατά τη διάρκεια της θερμικής αποστείρωσης του γάλακτος και ήταν ένα από τα πρώτα πρεβιοτικά, που συνδέθηκε με τους πληθυσμούς του εντερικού μικροβιόκοσμου. {Weaver, 2015}

Οι ολιγοσακχαρίτες έχουν ~3–10 μονάδες σακχάρων και περιλαμβάνουν τους βραχέας αλύσου φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS), τους ολιγοσακχαρίτες από σόγια, τους ξυλο-ολιγοσακχαρίτες και τους γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS). Τα πρεβιοτικά μακράς αλύσου με >10 μονάδες σακχάρων περιλαμβάνουν την ινουλίνη (μακράς αλύσου FOS) και τα ανθεκτικά άμυλα. Το μήκος της αλυσίδας μπορεί να επηρεάσει τον τόπο της ζύμωσης στο έντερο με τα πρεβιοτικά με μακρύτερη αλυσίδα να είναι πιθανότερο να φτάσουν στο κατώτερο έντερο. {Weaver, 2015} Διαλυτές ίνες όπως τα FOS διεγείρουν επιλεκτικά την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των συμβιωτικών βακτηρίων, σχετίζονται με οφέλη στην υγεία του ξενιστή και για αυτό αναφέρονται ως πρεβιοτικά. {McLoughlin, 2017}

Όλοι αυτοί οι τύποι πρεβιοτικών έχουν συσχετιστεί με αυξήσεις στα bifidobacteria. Λίγες μελέτες βρήκαν αυξήσεις στους λακτοβακίλλους και μειώσεις στα κολίμορφα βακτήρια. Ωστόσο, αυτές οι μελέτες στόχευσαν μόνο σε λίγους βακτηριακούς πληθυσμούς. {Weaver, 2015} Παρ' όλα αυτά, δεν έχει καθοριστεί η ημερήσια δόση ενός πρεβιοτικού για να έχει πρεβιοτική επίδραση, ενώ φαίνεται ότι επηρεάζεται κυρίως από τον αριθμό των bifidobacteria/g, που καταμετρώνται στα κόπρανα πριν ξεκινήσει η συμπληρωματική χορήγηση πρεβιοτικών στη διατροφή. {Roberfroid, 2007}

Λαμβάνοντας υπόψιν μελέτες σε ανθρώπους αποδεικνύεται ότι η τροποποίηση του εντερικού μικροβιόκοσμου με τη χρήση πρεβιοτικών επηρεάζει την ενεργειακή ομοιόσταση και την πρόσληψη σωματικού βάρους. {Caní, 2009} Παράλληλα, ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχουν

δείξει την αντίστροφη σχέση ανάμεσα στην πρόσληψη διαιτητικών ινών και σε δείκτες συστηματικής φλεγμονής (π.χ. IL-6, TNF-α και CRP). Αν και οι αντιφλεγμονώδεις μηχανισμοί των διαιτητικών ινών δεν έχουν ακόμα διαλευκανθεί, τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs) μπορεί να συμβάλλουν. {McLoughlin, 2017}

Τα SCFAs (π.χ. οξικό, βουτυρικό και προπιονικό) είναι φυσιολογικά ενεργά μεταβολικά προϊόντα παραγόμενα κυρίως από τη ζύμωση διαλυτών διαιτητικών ινών και ανθεκτικών αμύλων από τα συμβιωτικά βακτήρια του παχέος εντέρου. Ένας αριθμός παραγόντων μπορεί να επηρεάσει την παραγωγή SCFA, συμπεριλαμβανομένων των διαθέσιμων υποστρωμάτων για ζύμωση. Παραδείγματος χάριν, διαλυτές ίνες ολιγοσακχαριτών [π.χ. φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες(FOS)] έχουν υψηλότερη απόδοση στην παραγωγή SCFAs από τις διαλυτές ίνες πολυσακχαριτών μακράς αλύσου (π.χ. πηκτίνη). Τα SCFAs μειώνουν το pH του παχέος εντέρου και ευνοούν την ανάπτυξη ωφέλιμων βακτηρίων, όπως τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Αυτά τα βακτήρια είναι πιθανοί παραγωγοί SCFAs και παίζουν ρόλο στη διατήρηση υγιών ανοσολογικών αποκρίσεων. {McLoughlin, 2017}

1.6 Επίδραση των προβιοτικών στον εντερικό μικροβιόκοσμο

Ο ορισμός των προβιοτικών έχει αλλάξει με την πάροδο του χρόνου αλλά πρόσφατα εγκρίθηκε ένας νέος ορισμός από την Εθνική Ένωση Γιαουρτιού και το Διεθνές Ινστιτούτο Επιστήμης της Ζωής στις Ηνωμένες Πολιτείες, που δηλώνει ότι: “Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι κατά την κατάποση σε επαρκείς αριθμούς, προσκομίζουν οφέλη στην υγεία πέρα από τη βασική διατροφή”. Έτσι, ως προβιοτικό χαρακτηρίζεται ένα τρόφιμο, που περιέχει ζωντανά προβιοτικά σε επαρκή ποσότητα μέχρι το τέλος της διάρκειας ζωής του προϊόντος και ασκεί οφέλη στην υγεία του ξενιστή του. Τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα και ερευνημένα είδη ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* και *Saccharomyces*, ιδιαίτερα ο *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. longum*, *B. breve*, *B. Bifidum* και ο *S. cerevisiae boulardii*. {Bourlioux, 2003}

Στην περίπτωση των προβιοτικών τροφίμων, οι επιπτώσεις στην υγεία συνήθως βασίζονται στην τροποποίηση του γαστρεντερικού μικροβιόκοσμου και, άρα, στην επιβίωση κατά τη γαστρεντερική διέλευση. {Schrezenmeir, 2001} Τα προβιοτικά παραμένουν στο γαστρεντερικό σύστημα κατά τη διέλευσή τους για μία μεταβλητή περίοδο χρόνου, με τις προβιοτικές επιδράσεις να είναι πιο πιθανό να προκύψουν αν τα βακτήρια παραμένουν ζωντανά για όσο το δυνατόν

περισσότερο και είναι παρόντα σε μια επαρκώς μεγάλη ποσότητα. Για να πετύχει και να διατηρηθεί η επίδραση, το προβιοτικό πρέπει να χορηγείται επανειλημμένα για να διασφαλιστεί ένα επαρκές επίπεδο πληθυσμού με την πάροδο του χρόνου. {Bourlioux, 2003}

Διαφορετικά στελέχη προβιοτικών βακτηρίων μπορεί να ασκήσουν διαφορετικές επιδράσεις βασισμένες σε συγκεκριμένες ικανότητες και ενζυμικές δραστηριότητες, ακόμα και ανάμεσα σε ένα είδος. Τα συμβιωτικά είναι μια μίξη πρεβιοτικών και προβιοτικών και επομένως, θεωρούνται ότι έχουν συνεργιστικές επιδράσεις. {McLoughlin, 2017}

1.7 Μέθοδοι αξιολόγησης του εντερικού μικροβιόκοσμου

Οι παραδοσιακές μέθοδοι έρευνας στους πληθυσμούς των βακτηριακών κοινοτήτων περιλαμβάνουν την απομόνωση, καλλιέργεια και οπτική μικροσκοπία. Αυτές οι προσεγγίσεις είναι ανεπαρκείς για να αποκτηθούν εκτενή και ακριβή αποτελέσματα για τη δομή και την ποικιλία των μικροβιακών κοινοτήτων σε συγκεκριμένα δείγματα, επειδή η συντριπτική πλειοψηφία των βακτηρίων σε δείγματα κοπράνων είναι αναερόβιοι οργανισμοί και συνεπώς, δεν μπορούν να απομονωθούν εύκολα στο εργαστήριο. {Wang, 2017} Δεδομένου, λοιπόν, ότι η πλειοψηφία του εντερικού μικροβιώματος είναι αναερόβιοι μικροοργανισμοί, οι παραδοσιακές προσεγγίσεις, που περιλαμβάνουν την καλλιέργεια μικροοργανισμών στα μέσα δεν είναι μόνο χρονοβόρες αλλά αδυνατούν να μελετήσουν και τα περισσότερα από τα παρόντα είδη. Επίσης, με αυτό τον τρόπο, μόνο τα ζωντανά βακτήρια μπορούν να εκτιμηθούν. {Weaver, 2015}

Για αυτό το λόγο, η χρήση άλλων μεθόδων έρευνας και αξιολόγησης του εντερικού μικροβιόκοσμου κρίνεται απαραίτητη. Ειδικότερα, η αλληλουχία υψηλής ανάλυσης έχει αρχίσει πρόσφατα να χρησιμοποιείται για την ανάλυση της βακτηριακής ποικιλίας. Αυτή η προσέγγιση ξεπερνά τους περιορισμούς της παραδοσιακής τεχνολογίας και μπορεί αποτελεσματικά να απαθανατίσει τη γονιδιωματική πληροφορία σε μικροοργανισμούς, που δεν είναι καλλιεργήσιμοι και οι οποίοι μπορεί να είναι παθογόνοι ή σημαντικοί για βιολογικές διαδικασίες ανοίγοντας, έτσι, το δρόμο για την ανακάλυψη στρατηγικών, που μπορούν να βελτιώσουν την υγεία και την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών. {Wang, 2017}, {Weaver, 2015}

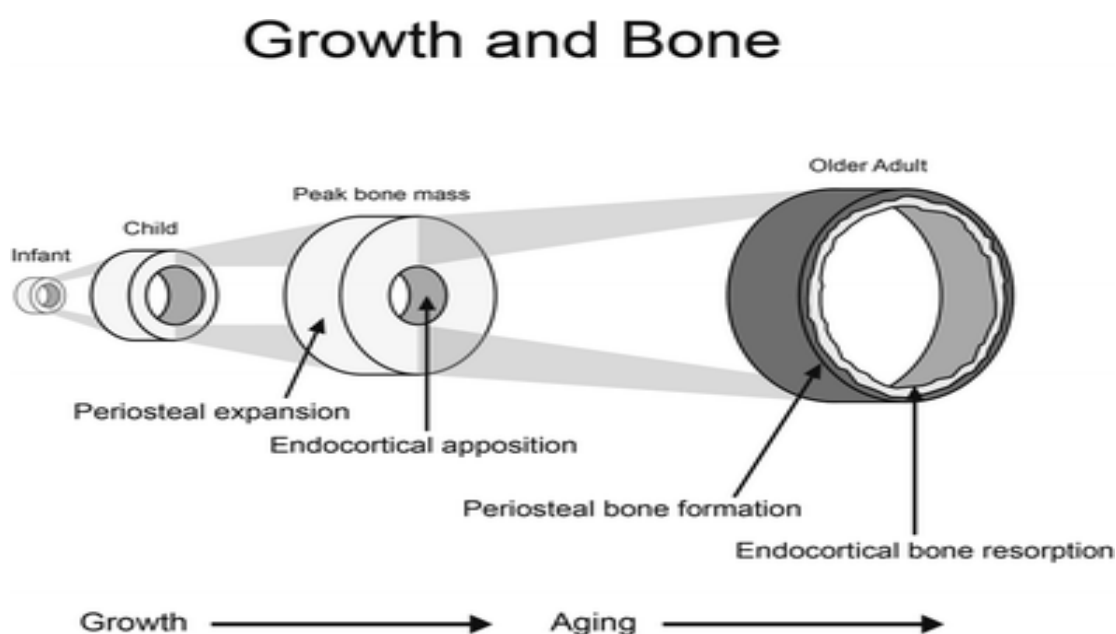
ΚΕΦ. 2: Οστικός Μεταβολισμός

Τα οστά αποτελούνται από ένα οργανικό υπόστρωμα (οστεοειδές), που απαρτίζεται κυρίως από ίνες κολλαγόνου στις οποίες εναποτίθενται άλατα ασβεστίου και φωσφορικά άλατα, σε συνδυασμό με ιόντα υδροξυλίου σε μορφή κρυστάλλων υδροξυαπατίτη. Η ελαστικότητα του δικτύου, που σχηματίζουν οι ίνες κολλαγόνου και η σταθερότητα του υδροξυαπατίτη συνδυάζονται για να δώσουν στο οστό τη μεγάλη ισχύ του. {Vander, 2001}

Το 80% περίπου του σκελετού αποτελείται από συμπαγή ή φλοιώδη οστίτη ιστό, ενώ το υπόλοιπο 20% από δοκιδώδη ή σπογγώδη οστίτη ιστό. Ο δοκιδώδης οστίτης ιστός είναι λιγότερο πυκνός από το φλοιώδη οστίτη ιστό, ενώ είναι και πιο ευαίσθητος στη δράση των οιστρογόνων ή στην έλλειψή τους συγκριτικά με το φλοιώδη ιστό. Για αυτό και η απώλεια δοκιδώδους ιστού σε προχωρημένη ηλικία ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για την πρόκληση καταγμάτων, ιδιαιτέρως εκείνων της σπονδυλικής στήλης. {Vander, 2001} Αλλαγές στη δομή (μέγεθος και σχήμα) και στη σύσταση του οστού (ποσότητα φλοιώδους και δοκιδώδους οστίτη ιστού) προκύπτουν προοδευτικά στην εφηβεία και ως εκ τούτου επηρεάζουν την οστική δύναμη. Το φλοιώδες οστό είναι το συμπαγές οστό, που σχηματίζει το εξωτερικό περίβλημα προστατεύοντας τόσο το μυελό των οστών όσο και το δοκιδώδες οστό. Το δοκιδώδες οστό συντίθεται από ράβδους και πλάκες σε μία σπογγώδη δομή, συμβάλλοντας στην οστική δύναμη του οστού. {Weaver, 2016}

Το οστό είναι ένας ενεργός ιστός, που υπόκειται σε συνεχή ανασχηματισμό μέσω 2 διακριτών διαδικασιών, του οστικού σχηματισμού και της οστικής απορρόφησης βοηθώντας στη διατήρηση της σκελετικής ομοιόστασης. {Mori, 2015} Στους ενήλικες, τα οστά αναδιαμορφώνονται συνεχώς σε διακριτές εστίες, από τη βασική πολυκυτταρική μονάδα (basic, multicellular unit or BMU) μέσω της συζευγμένης αφαίρεσης του οστού με την επαναρρόφηση και την αντικατάστασή του με νέα οστική ουσία και την επακόλουθη μεταλλοποίησή της. Η ισορροπία ανάμεσα στην οστική επαναρρόφηση και στο σχηματισμό μέσα στη βασική πολυκυτταρική μονάδα (BMU) ρυθμίζει το οστικό περιεχόμενο του σκελετού σε ανόργανα στοιχεία. {Fazzalari, 2008} Τα οστικά κύτταρα, που είναι υπεύθυνα για αυτές τις 2 διαδικασίες είναι οι οστεοκλάστες (OCs), που είναι υπεύθυνοι για την απομάκρυνση του παλιού και κατεστραμμένου οστού και οι οστεοβλάστες, που σχηματίζουν νέο οστό για να αντικατασταθεί το προηγούμενο. {Mori, 2015}, {Zeng, 2013} Η τροποποίηση στην ενεργότητα των οστεοκλαστών όπως επίσης, και των οστεοβλαστών οδηγεί σε ασθένειες των οστών. {Mori, 2015}

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ο σκελετός αναπτύσσεται μέσα από τη συντονισμένη δράση της οστικής εναπόθεσης και απορρόφησης, που επιτρέπει στα οστά να διευρυνθούν και να επιμηκυνθούν. Αυτή η διαδικασία της οστικής τροποποίησης ξεκινάει κατά τη διάρκεια της εμβρυακής ανάπτυξης και συνεχίζει μέχρι την επιφυσιακή σύντηξη, συνήθως μέχρι το τέλος της δεύτερης δεκαετίας της ζωής. Ο οστικός σχηματισμός είναι ευαίσθητος στο μηχανικό φορτίο. Κάποια σκελετικά χαρακτηριστικά, όπως η πυκνότητα του φλοιώδους οστίτη ιστού και η δομική δύναμη συνεχίζουν να αυξάνονται και μετά την επιφυσιακή σύντηξη κατά την τρίτη δεκαετία της ζωής. Η ποσότητα των μετάλλων στα οστά αποκτάται από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση και ακολουθεί διακριτά μοτίβα σχετιζόμενα με την ηλικία και το φύλο. Η οστική μάζα αποκτάται σχετικά αργά κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας. {Weaver, 2016}



Σχήμα 3. Οι αλλαγές στη δομική σύνθεση των οστών κατά τη διάρκεια της ζωής. {Weaver, 2016}

2.1 Κύτταρα, που συμμετέχουν στον οστικό μεταβολισμό

Η οστική μάζα είναι ένας καθοριστικός παράγοντας για τον κίνδυνο κατάγματος, που αυξάνεται με την πάροδο της ηλικίας και ρυθμίζεται από μία πολύπλοκη αλληλεπίδραση κυτταρικών, ορμονικών και μεταβολικών μονοπατιών. Σε κυτταρικό επίπεδο 2 τύποι κυττάρων, οι οστεοβλάστες και οι οστεοκλάστες, συνθέτουν και αποδομούν τα οστά κατά τη διάρκεια της ζωής, αντίστοιχα. Ένας τρίτος κυτταρικός τύπος, τα οστεοκύτταρα προκύπτουν από τους οστεοβλάστες και συντονίζουν τη δραστηριότητα οστεοβλαστών και οστεοκλαστών. Επιπλέον, τα επενδυτικά

κύτταρα είναι ένας άλλος τύπος οστίτη ιστού, που προέρχονται από τους οστεοβλάστες. {Charles, 2015}

Ο σκελετός εκκρίνει 2 ορμόνες: τον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών 23 και την οστεοκαλσίνη (OC). Επιπροσθέτως, πρόσφατα γενετικά πειράματα βρήκαν ότι η λεπτίνη, μια ορμόνη που προέρχεται από τα λιποκύτταρα, εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Παράλληλα, η σεροτονίνη, που παράγεται από νευρώνες του εγκεφάλου και από κύτταρα του δωδεκαδακτύλου, φαίνεται ότι ελέγχει την οστική αναδιαμόρφωση. {D'Amelio, 2012} Επίσης, οι στεροειδείς ορμόνες, συμπεριλαμβανομένων των οιστρογόνων και των γλυκοκορτικοειδών επηρεάζουν τα οστικά κύτταρα. {Charles, 2015 }

Τόσο τα έμφυτα όσο και τα επίκτητα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος επηρεάζουν τους οστεοβλάστες και τους οστεοκλάστες μέσα από παράγοντες όπως οι κυτοκίνες. {Charles, 2015} Ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων (Tumor necrosis factor ή TNF ή TNF-α) είναι μια άλλη προφλεγμονώδης κυτταροκίνη, που προωθεί την οστεοκλαστογένεση. {Sjogren, 2012} Ειδικότερα, ο TNF-α πιθανώς στέλνει ένα αυτοκρινές μήνυμα για να ενισχύσει τη σύνθεση του κολλαγόνου τύπου I, να αυξήσει τη δραστηριότητα της οστικής αλκαλικής φωσφατάσης (bone alkaline phosphatase ή bALP) και την εναπόθεση ανόργανων στοιχείων. {Przekora, 2017} Ωστόσο, ενώ, έχει αναγνωριστεί ότι οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες έχουν ένα ρόλο στην επανόρθωση της φυσιολογίας του οστίτη ιστού, υψηλά επίπεδα μπορεί να έχουν μια καταβολική επίδραση στον οστίτη ιστό. {Fazzalari, 2008}

Από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι υπάρχουν και ποικίλοι άλλοι παράγοντες, που διακρίνονται σε Αγγειακούς, Αναβολικούς και Καταβολικούς, οι οποίοι επηρεάζουν τα οστικά κύτταρα. Στους αναβολικούς παράγοντες ανήκει ο αυξητικός παράγοντας αγγειακού ενδοθηλίου (Vascular endothelial growth factor ή VEGF), που είναι απαραίτητος για την οστική ανάπτυξη. Ο VEGF έχει πολλές δράσεις στα οστικά κύτταρα, διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Αντίστοιχα, η ενδοθηλίνη-1 παράγεται από τους οστεοβλάστες και αναστέλλει τη σύνθεση του VEGF. Επιπλέον, η ενδοθηλίνη-1 προάγει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Όπως οι αγγειακοί παράγοντες, έτσι και οι αναβολικοί υπηρετούν πολλαπλές λειτουργίες στα οστά. Για παράδειγμα, οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone morphogenetic proteins ή BMPs) ταυτοποιήθηκαν αρχικά για την ικανότητά τους να διεγείρουν τον οστικό σχηματισμό αλλά είναι πλέον ξεκάθαρο ότι οι δράσεις

τους περιλαμβάνουν τη διέγερση της αγγειογένεσης και την προώθηση της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών. {Fazzalari, 2008}

2.1.1 Οστεοβλάστες και Οστεοκλάστες

Καθώς η δραστηριότητα των οστεοκλαστών καθορίζει το βαθμό (επιφάνεια και βάθος) της επαναρρόφησης (διάβρωση), η δραστηριότητα των οστεοβλαστών καθορίζει το επίπεδο του οστικού σχηματισμού στη βασική πολυκυτταρική μονάδα (BMU). Οι οστεοβλάστες σχηματίζουν το οστό με μια διαδικασία κατά την οποία εναποθέτουν μια κολλαγονούχα θεμέλια ουσία, που ονομάζεται οστεοειδές και προάγουν την καθίζηση των κρυστάλλων υδροξυαπατίτη μέσα στα οστά. {Hart, 2014} Το κολλαγόνο τύπου Ι είναι το βασικό προϊόν, που παράγεται και εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες για να σχηματιστεί ένα πλέγμα το οποίο ακολούθως ασβεστοποιείται. Μόλις περιβληθούν από το ασβεστοποιημένο πλέγμα, οι οστεοβλάστες ονομάζονται οστεοκύτταρα. {Lane, 2006}, {Vander, 2001} Τα οστεοκύτταρα παίζουν, σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία και τη μεταφορά των κυττάρων εντός της οστικής μήτρας. Ιστολογικές παρατηρήσεις υποδηλώνουν ότι τόσο η ακεραιότητα όσο και η τρισδιάστατη οργάνωση του δικτύου οστεοκυττάρων αλλάζουν σε ασθένειες όπως η οστεοπόρωση. {Fazzalari, 2008}

Ο σκελετός χρησιμεύει σε μια θέση για τους μεσεγχυματικούς και αιμοποιητικούς προγόνους. {Weaver, 2015} Οι οστεοβλάστες (osteoblasts ή OB) προέρχονται από πολυδύναμα μεσεγχυματικά κύτταρα στρώματος, ενώ οι οστεοκλάστες (osteoclasts ή OCL) προέρχονται από αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα και πιο συγκεκριμένα, από μυελοειδή αιματοποιητικά κύτταρα. {Sjogren, 2012} Οι οστεοκλάστες είναι μεγάλα πολυπύρρηνα κύτταρα, τα οποία απορροφούν ήδη σχηματοποιημένο οστό, εκκρίνοντας ιόντα υδρογόνου, τα οποία διαλύουν τους κρυστάλλους και υδρολυτικά ένζυμα, που πέπτουν την οστεοειδή ουσία (οστεόλυση). {Vander, 2001} Η οστική απώλεια ανεξαρτήτως αιτίας αντανακλά την αυξημένη λειτουργία των οστεοκλαστών σε σχέση με τους οστεοβλάστες. {Zeng, 2013}

2.1.2 Οστικοί δείκτες

Υπάρχουν οστικοί δείκτες με τους οποίους μπορεί να υπολογιστεί τόσο ο σχηματισμός όσο και η απορρόφηση του οστού. Οι βιοχημικοί αυτοί δείκτες χρησιμοποιούνται ευρέως στην κλινική έρευνα. Η ειδική για τα οστά αλκαλική φωσφατάση πλάσματος αποτελεί δείκτη σχηματισμού του οστού, όπως επίσης και η ολική αλκαλική φωσφατάση πλάσματος και απελευθερώνονται από τους οστεοβλάστες. Αντίστοιχα, οι δείκτες απορρόφησης των οστών, που εκκρίνονται κατά την

οστεοκλαστική δραστηριότητα είναι τα διασταυρούμενα τελοπεπτίδια κολλαγόνου, τα N-τελοπεπτίδια στα ούρα (NTXs) και η ανθεκτική σε τρυγικό όξινη φωσφατάση (tartrate-resistant acid phosphate ή TRAP). Η οστεοκαλσίνη, που θεωρείται δείκτης σχηματισμού του οστού απελευθερώνεται από τους οστεοβλάστες κατά την απορρόφηση της θεμέλιας ουσίας. Η αξία αυτών των δεικτών στην εκτίμηση του κινδύνου κατάγματος πρέπει να γίνεται σε συνεργασία μαζί με άλλους σημαντικούς παράγοντες κινδύνου συμπεριλαμβανομένης και της οστικής πυκνότητας (BMD). {Lane, 2006}

2.2 Οστική πυκνότητα

Η συνολική οστική πυκνότητα (Body Mineral Density ή BMD) είναι το αποτέλεσμα μιας εύθραυστης ισορροπίας ανάμεσα στην οστική επαναρρόφηση από τους οστεοκλάστες και τον οστικό σχηματισμό από τους οστεοβλάστες κατά τη διαδικασία της συνεχούς αναδιαμόρφωσης. Με την πάροδο της ηλικίας η οστεοκλαστική δραστηριότητα προοδευτικά υπερβαίνει την οστεοβλαστική και οδηγεί σε οστική απώλεια. {Tucker, 2014} Μεγαλύτερος οστικός σχηματισμός και/ή λιγότερη οστική επαναρρόφηση οδηγούν σε αύξηση στην περιεκτικότητα των οστών σε ανόργανα στοιχεία και σε οστική πυκνότητα. Τόσο η περιεκτικότητα σε ανόργανα στοιχεία (BMC) όσο και η οστική πυκνότητα (BMD) θεωρούνται καλοί δείκτες οστικής υγείας. {Lee, 2015}

Η οστική πυκνότητα χρησιμοποιείται συμβατικά για να εκτιμηθεί η συνολική οστική δύναμη και εκφράζεται σε γραμμάρια ανόργανων στοιχείων ανά τετραγωνικό εκατοστό (g/cm^2) ή γραμμάρια ανά εκατοστό εις τον κύβο (g/cm^3). Πολλές επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι ο κίνδυνος κατάγματος αυξάνεται όσο μειώνεται η οστική πυκνότητα. Αν και η μέτρηση οστικής πυκνότητας είναι ο τυπικός έλεγχος για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης πριν τη θεραπεία, η έρευνα δείχνει ότι η οστική ποιότητα μπορεί να είναι μια πιο αποτελεσματική μέτρηση. Η οστική ποιότητα αντανακλά την ενσωμάτωση τόσο της οστικής πυκνότητας όσο και της οστικής δύναμης. {Lane, 2006}

Ειδικότερα, η οστική δύναμη αντικατοπτρίζει την ενσωμάτωση 2 κυρίαρχων χαρακτηριστικών: της οστικής πυκνότητας και της οστικής ποιότητας. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization ή WHO) έχει καθορίσει κριτήρια για την εκτίμηση της οστικής κατάστασης σύμφωνα με τα οποία η οστική πυκνότητα (BMD) εκφράζεται ως η σχέση ανάμεσα σε 2 πρότυπα: το T-score και το Z-score (η αναμενόμενη οστική πυκνότητα βάσει της ηλικίας και του φύλου του ατόμου). Το T-score περιγράφει την οστική πυκνότητα ενός ατόμου με την έννοια του

αριθμού των τυπικών αποκλίσεων (SDs) με τις οποίες διαφέρει από τη μέση μέγιστη τιμή σε νέα, υγιή άτομα του ίδιου φύλου. {Lane, 2006}

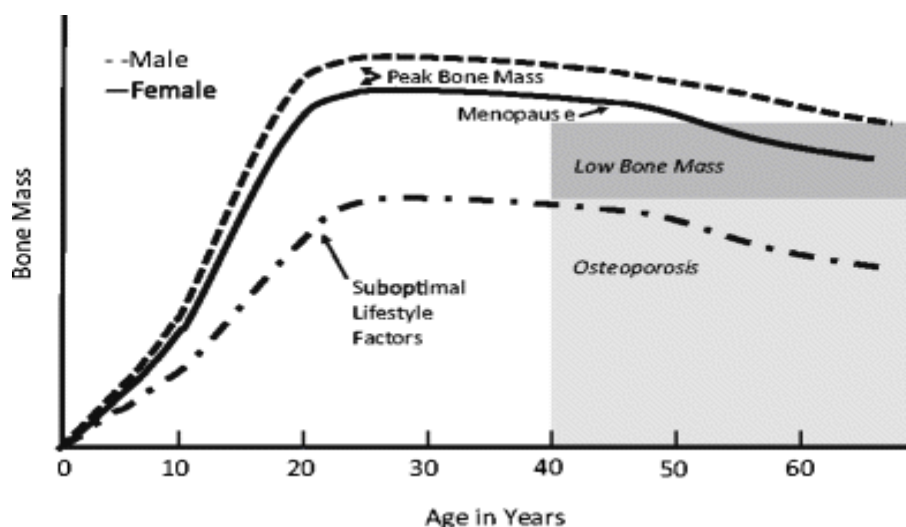
Η οστική δύναμη καθορίζεται από δομικές και υλικές ιδιότητες, που επηρεάζουν τη συνολική οστική ποιότητα. Οι δομικές ιδιότητες του οστού περιλαμβάνουν τη γεωμετρία (μέγεθος και σχήμα) και τη μικροαρχιτεκτονική (π.χ. πάχος δοκιδώδους οστίτη ιστού). Οι υλικές ιδιότητες του οστού περιλαμβάνουν την επιμετάλλωση (αναλογία ανόργανων στοιχείων-μήτρα και μέγεθος κρυστάλλων), σύνθεση κολλαγόνου (τύπος και διασυνδέσεις) και τη συσσώρευση μικροφθορών (όπως μικροκατάγματα). Αυτά τα συστατικά της οστικής δύναμης επηρεάζονται από το ρυθμό με το οποίο το παλιό οστό επαναρροφάται και το νέο οστό δημιουργείται. Σε μεγαλύτερης ηλικίας γυναίκες, ανωμαλίες στη διαδικασία οστικής αναδιαμόρφωσης υποβιβάζουν αυτές τις ιδιότητες, αυξάνοντας την τάση για κάταγμα. {Lane, 2006}

2.2.1 Παράγοντες, που επηρεάζουν την οστική πυκνότητα

Μεγάλος αριθμός μελετών έχουν δείξει συσχέτιση του Δείκτη Μάζας Σώματος (BMI) με την οστική πυκνότητα (BMD). Πράγματι, ένα υψηλότερο BMI έχει συσχετιστεί θετικά με την οστική πυκνότητα (BMD). {Menzel, 2015} Επίσης, πολλές έρευνες δείχνουν ότι η οστική πυκνότητα επηρεάζεται από διατροφικούς παράγοντες, που είτε την ενισχύουν (ασβέστιο, βιταμίνη D) είτε την ελαττώνουν (φώσφορος). {Gerend, 2006}

Επίσης, η ηλικία και η έμμηνος ρύση φαίνεται ότι αποτελούν καθοριστικούς παράγοντες για την οστική πυκνότητα. Έρευνες έδειξαν ότι γυναίκες με φυσιολογική οστική πυκνότητα ήταν συνήθως νεότερες και οι περισσότερες από αυτές είχαν φυσιολογικούς εμμηνορρυσιακούς κύκλους. Η πιθανότητα για φυσιολογική οστική πυκνότητα ήταν 4 φορές μεγαλύτερη στις γυναίκες κάτω των 50 ετών και σχεδόν 8 φορές υψηλότερη σε γυναίκες με τακτικούς εμμηνορρυσιακούς κύκλους. Οι γυναίκες, που δεν είχαν περίοδο δεν είχαν την ευεργετική επίδραση των οιστρογόνων και για αυτό η εμμηνόπαυση αναγνωρίζεται ως ένας εδραιωμένος παράγοντας κινδύνου για τη χαμηλή οστική πυκνότητα στο γυναικείο φύλο. Σχετικά με την επίδραση της ηλικίας φαίνεται ότι οι ίνες κολλαγόνου εκφυλίζονται με την πάροδο του χρόνου και αυτή η διαδικασία μειώνει τη σκληρότητα των οστών. Γενικά, η μείωση στην οστική πυκνότητα (BMD) με την πάροδο της ηλικίας είναι αναπόφευκτη. Η επίδραση της ηλικίας και των εμμήνων κύκλων στην οστική πυκνότητα σε ενήλικες γυναίκες είναι ισχυρότερη από τους διαιτητικούς παράγοντες και δε βασίζεται στην παρουσία άλλων παραγόντων κινδύνου. {Wadolowska, 2013}

Μάλιστα, στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, ο ρυθμός ανασχηματισμού των οστών αυξάνεται δραματικά και παραμένει αυξημένος για περίπου 40 χρόνια μετά τη διακοπή της ωοθηκικής λειτουργίας, οδηγώντας σε συνεχή, προοδευτική απώλεια οστού. Με αυτό το δεδομένο, είναι εμφανής ο σημαντικός ρόλος της Κορυφαίας Οστικής Μάζας για την επίτευξη καλύτερης οστικής πυκνότητας σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Η απόκτηση της Κορυφαίας Οστικής Μάζας ξεκινάει εμβρυϊκά και τυπικά ολοκληρώνεται κατά την ηλικία των 40 ετών, με κύρια συμβολή σε αυτή τη διαδικασία να έχει η ποσότητα του οστού, που αποκτάται κατά την εφηβεία. {Lane, 2006} Η έννοια της Κορυφαίας Οστικής Μάζας αποτυπώνει ευρύτερα την κορυφαία οστική δύναμη, που χαρακτηρίζεται ως η μάζα, η πυκνότητα, η μικροαρχιτεκτονική, οι μηχανισμοί μικροεπιδιορθώσεων και οι γεωμετρικές ιδιότητες, που παρέχουν δομική δύναμη. {Weaver, 2016}



Σχήμα 4. Η οστική μάζα κατά τη διάρκεια της ζωής με τις βέλτιστες και υποβέλτιστες επιλογές τρόπου ζωής. {Weaver, 2016}

2.3 Μέθοδοι αξιολόγησης οστικής πυκνότητας

Η εκτίμηση της Οστικής Πυκνότητας (BMD) είναι το τυπικό εργαλείο, που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης. Αρκετές μέθοδοι απεικόνισης έχουν αναπτυχθεί για να μετρήσουν την οστική πυκνότητα (BMD) όπως η Απορροφησιομετρία ακτίνων Χ Διπλής Ενέργειας (DEXA: Dual-Energy X-ray Absorptiometry) και η Ποσοτική Υπολογιστική Τομογραφία (QCT: Quantitative Computed Tomography). {Lane, 2006}

2.3.1 Απορροφησιομετρία ακτίνων Χ διπλής ενέργειας (DEXA)

Η Απορροφησιομετρία ακτίνων Χ Διπλής Ενέργειας (DEXA) θεωρείται ως η «gold standard» μέθοδος, που χρησιμοποιείται για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης και διατίθεται στα περισσότερα

νοσοκομεία και κλινικές, ενώ έχει χρησιμοποιηθεί και στις περισσότερες μελέτες με Μέγιστη Οστική Μάζα (PBM). Αυτή η εξέταση είναι ικανή να μετρήσει την περιεκτικότητα των οστών σε ανόργανα στοιχεία σε οποιοδήποτε σημείο του σώματος αν και συνήθως χρησιμοποιείται για κεντρικά σημεία (οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης και εγγύς μηριαίο οστό) αλλά και περιφερειακά σημεία, όπως ο περιφερειακός βραχίονας. Σύμφωνα με τις οδηγίες του WHO η διάγνωση της οστεοπόρωσης βασίζεται στις μετρήσεις του DEXA από το εγγύς μηριαίο οστό (ισχίο) ή τη σπονδυλική στήλη. {Lane, 2006}

Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος αυτή βασίζεται στον υπολογισμό του βαθμού με τον οποίο οι ιστοί απορροφούν φωτόνια, τα οποία παράγονται από δύο μονοενεργειακούς σωλήνες ακτινών Χ, δηλαδή, υπολογίζουν την εξασθένηση των ακτινών Χ, καθώς αυτές περνούν μέσα από ιστούς διαφορετικής πυκνότητας. Είναι, λοιπόν, μια τεχνική δισδιάστατης απεικόνισης, που χρησιμοποιεί μια επίπεδη εικόνα για την εκτίμηση των οστών. Αυτή η μέθοδος είναι ιδανική για παιδιά επειδή είναι γρήγορη, ασφαλής, ευρέως διαθέσιμη και ακριβής. {Weaver, 2016} Ένα από τα βασικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι εκθέτει τον ασθενή σε επίπεδα ακτινοβολίας χαμηλότερα του 90% σε σύγκριση με μια τυπική ακτινογραφία θώρακος. Η μονάδα μέτρησης της οστικής πυκνότητας με αυτή την πρακτική είναι τα g/cm^2 , ωστόσο, η οστική πυκνότητα (BMD) καταγράφεται σαν T-score με βάση τη μέτρηση. {Lane, 2006}

2.3.2 Ποσοτική υπολογιστική τομογραφία (QCT)

Η Ποσοτική Υπολογιστική Τομογραφία (QCT) και η Περιφερειακή Ποσοτική Υπολογιστική Τομογραφία (pQCT) είναι τρισδιάστατες τεχνικές, που, επίσης, χρησιμοποιούν την εξασθένηση των ακτινών Χ για να παράγουν οστικές απεικονίσεις. {Weaver, 2016} Η τεχνική QCT χρησιμοποιείται για να μετρηθεί η οστική πυκνότητα (BMD) της οσφυϊκής μοίρας ή άλλων περιφερειακών σημείων. Αν και η οστική πυκνότητα (BMD) μπορεί να μετρηθεί με τη μέθοδο αυτή σε οποιοδήποτε υπολογιστικό τομογραφικό σύστημα, ο εξοπλισμός πρέπει πρώτα να βαθμονομηθεί με τη χρήση μιας κλίμακας βαθμονόμησης, που περιέχει στοιχεία με πρότυπες πυκνότητες υδροξυαπατίτη. {Lane, 2006}

Η ακρίβεια της μέτρησης της οσφυϊκής μοίρας στην πρόβλεψη των καταγμάτων του σημείου αυτού είναι συγκρίσιμη με αυτή της μεθόδου DEXA αλλά έχει το πλεονέκτημα της πραγματικής ογκομετρικής μέτρησης ή τρισδιάστατης (3D) οστικής πυκνότητας (BMD), σε αντίθεση με την aBMD, που αποκτάται με τη μέθοδο DEXA. Η QCT μπορεί να κάνει διαχωρισμό ανάμεσα στο φλοιώδες και το δοκιδώδη οστίτη ιστό και για αυτό, είναι πιο ευαίσθητη σε αλλαγές της οστικής

πυκνότητας (BMD), που προκαλούνται από τον υψηλότερο ρυθμό οστικού κύκλου του δοκιδώδους οστίτη ιστού. Είναι, επίσης, αρκετά ακριβής στην ανίχνευση σκελετικών αλλαγών με την πάροδο του χρόνου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση της πορείας μιας ασθένειας ή των αποτελεσμάτων της θεραπείας για την οστεοπόρωση. {Lane, 2006}

2.4 Οστεοπενία

Ως οστεοπενία ορίζεται η χαμηλή οστική μάζα σε οποιοδήποτε στάδιο της ζωής. Ο WHO ορίζει την οστεοπενία με βάση το T-score για Οστική Πυκνότητα από 1 έως 2.5 τυπικές αποκλίσεις κάτω από τα αποδεκτά όρια. {Mahan, 2014} Πολλαπλοί μηχανισμοί εμπλέκονται στην παθογένεση της οστεοπενίας όπως είναι για παράδειγμα η μειωμένη απόκτηση οστικής μάζας κατά τη διάρκεια της σκελετικής ανάπτυξης, η περιορισμένη φυσική δραστηριότητα, το φτωχό διατροφικό ιστορικό, τροποποιήσεις στα επίπεδα φυλετικών, στεροειδών ορμονών και το γενετικό υπόβαθρο. Επιπροσθέτως, όπως και η οστεοπόρωση έτσι και η οστεοπενία μπορεί να αποτελούν και δευτερογενείς επιπτώσεις φλεγμονωδών διαταραχών όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου ή φαρμακολογικών θεραπειών όπως τα γλυκοκορτικοειδή. {Hernandez, 2016} Περίπου 40% των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών έχουν οστεοπενία. {Demir, 2008}

Μέχρι στιγμής υπάρχουν σχετικά λίγες άμεσες αποδείξεις, που συσχετίζουν την οστεοπόρωση ή την οστεοπενία με την κατάσταση του εντερικού μικροβιώματος αν και υπάρχουν ουσιαστικές έμμεσες αποδείξεις. Μάλιστα, πολλοί από τους παράγοντες κινδύνου, που συσχετίζονται με την ανάπτυξη της οστεοπόρωσης και της οστεοπενίας προκαλούν αλλαγές και στο εντερικό μικροβίωμα. {Hernandez, 2016}

Table 3. Diagnostic Criteria for Osteoporosis and Osteopenia in Postmenopausal Women and Men Older Than 50 Years

<i>Category</i>	<i>Bone mass (BMD derived from DEXA measurement)</i>
Normal	Spinal or hip BMD within 1.0 SD below the young adult female reference mean (T-score ≥ -1.0)
Low bone mass (osteopenia)	Spinal or hip BMD between 1.0 and 2.5 SDs below the young adult female reference mean (T-score < -1.0 and > -2.5)
Osteoporosis	Spinal or hip BMD ≥ 2.5 SDs below the young adult female reference mean (T-score ≤ -2.5)
Severe/established osteoporosis	BMD ≥ 2.5 SDs below the young adult female reference mean and the presence of one or more fragility fractures

BMD = bone mineral density; DEXA = dual energy x-ray absorptiometry; SDs = standard deviations.

Information from reference 6.

Σχήμα 5. Τα κριτήρια διάγνωσης της οστεοπενίας και της οστεοπόρωσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και άνδρες ηλικίας >50 ετών. {Jeremiah, 2015}

2.5 Οστεοπόρωση

Η οστεοπόρωση ορίζεται από το Εθνικό Ίδρυμα Οστεοπόρωσης (National Osteoporosis Foundation) ως μια χρόνια, προοδευτική ασθένεια, που χαρακτηρίζεται από χαμηλή οστική μάζα, υποβάθμιση της μικροαρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού, οστική ευθραυστότητα και μια συνεχή αύξηση του κινδύνου κατάγματος. {Mori, 2015} Ειδικότερα, ο όρος οστεοπόρωση αντιστοιχεί σε μια σκελετική διαταραχή, που διακρίνεται από μειωμένη οστική δύναμη και πυκνότητα προδιαθέτοντας το άτομο για αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων του ισχίου, της σπονδυλικής στήλης και άλλων σκελετικών σημείων. {Collins, 2016}, {Lane, 2006} Αποτελεί ένα παγκόσμιο πρόβλημα, που είναι συχνότερο σε ηλικιωμένους και σε γυναίκες (80%) και θεωρείται μια από τις 10 πιο σημαντικές ασθένειες, που επηρεάζουν τον παγκόσμιο πληθυσμό. Είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στις ανεπτυγμένες χώρες λόγω των πληθυσμών, που γηράσκουν και των μεγαλύτερων προσδόκιμων ζωής. {Gunn, 2013}

2.5.1 Επιπολασμός και επιπτώσεις οστεοπόρωσης

Η οστεοπόρωση έχει επιπολασμό 1 στις 3 γυναίκες 60–70 ετών και περίπου 2 στις 3 γυναίκες ηλικίας 80 ετών ή και μεγαλύτερες. {Weaver, 2016} Παγκοσμίως περίπου 200 εκατομμύρια γυναίκες έχουν οστεοπόρωση. {Lane, 2006} Περίπου 50% των λευκών γυναικών και 20% των λευκών ανδρών έχουν ένα κάταγμα, που σχετίζεται με την οστεοπόρωση κατά τη διάρκεια της ζωής τους και τέτοια κατάγματα εκτιμώνται ότι επηρεάζουν 20 εκατομμύρια Ευρωπαίους. {Collins, 2016}, {Fan, 2013}, {Lane, 2006}

Η οστεοπόρωση αναφέρεται και ως «σιωπηλή ασθένεια» επειδή η οστική απώλεια προκύπτει χωρίς εμφανή συμπτώματα. Στην πράξη, οι πιο πολλοί άνθρωποι δεν είναι ενήμεροι της κατάστασής τους μέχρι να βιώσουν ένα κάταγμα. Περίπου 1 στις 2 γυναίκες ηλικίας άνω των 50 ετών θα βιώσει ένα σχετιζόμενο με την οστεοπόρωση κάταγμα κατά τη διάρκεια της ζωής της. {Gerend, 2006} Τα οστεοπορωτικά κατάγματα συσχετίζονται με σοβαρές επιπλοκές και συμβάλλουν στην αύξηση των δεικτών θνησιμότητας πάνω από 20% στους ηλικιωμένους. {Fan, 2013}

Συχνά ο αυξημένος κίνδυνος αναπηρίας, που συνεπάγεται η οστεοπόρωση επιβάλλει νοσηλεία στο σπίτι και άρα, αυξάνονται τα συνολικά κόστη υγείας. {Kharroubi, 2017} Τα κατάγματα ισχίου είναι τα πιο συχνά και έχουν την πιο δαπανηρή θεραπεία σε έναν πληθυσμό. {Fazzalari, 2008} Επίσης, ο πόνος, οι φυσικοί περιορισμοί, οι αλλαγές στον τρόπο ζωής και την εμφάνιση, που προκαλούνται από τα οστεοπορωτικά κατάγματα μπορεί να έχουν σοβαρές ψυχολογικές επιπτώσεις συμπεριλαμβανομένης της κατάθλιψης, της απώλειας της αυτοεκτίμησης, του άγχους, του φόβου, του θυμού και των τεταμένων διαπροσωπικών σχέσεων. {Lane, 2006}

2.5.2 Τύποι οστεοπόρωσης (I και II)

Οι 2 τύποι πρωτοπαθούς οστεοπόρωσης διαχωρίζονται ανάλογα με το φύλο, την ηλικία εκδήλωσης του κατάγματος και τα είδη των οστών, που εμπλέκονται. Εντούτοις, η οστεοπόρωση πρέπει να θεωρηθεί ως νόσος με μεγάλο εύρος υποτύπων. {Vander, 2001}

Η μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση ή οστεοπόρωση λόγω έλλειψης οιστρογόνων (Τύπος 1) εμφανίζεται στις γυναίκες λίγα χρόνια μετά την εμμηνόπαυση και χαρακτηρίζεται κυρίως από απώλεια δοκιδώδους οστίτη ιστού λόγω διακοπής της παραγωγής οιστρογόνων από τις ωοθήκες. Η οστεοπόρωση τύπου 1 μπορεί να εκδηλωθεί και σε άνδρες κατά την ενήλικη ζωή, στις περιπτώσεις όπου υπάρχει σημαντική έκπτωση της παραγωγής ανδρογόνων αν και οι περιπτώσεις αυτές είναι σπάνιες. {Kharroubi, 2017} Ο τύπος αυτός της οστεοπόρωσης χαρακτηρίζεται από κατάγματα στο εγγύς τμήμα της κερκίδας (κάταγμα τύπου Colle) αλλά και από συντριπτικά κατάγματα των σπονδύλων της οσφυϊκής μοίρας, τα οποία είναι συχνά επώδυνα και παραμορφωτικά. {Mahan, 2014}

Η γεροντική οστεοπόρωση (Τύπος 2) εκδηλώνεται μετά την ηλικία των 65 ετών ή και αργότερα και αφορά και τα δύο φύλα. Στην περίπτωση αυτή και οι 2 τύποι οστίτη ιστού, φλοιώδης και δοκιδώδης, υφίστανται αναδιαμόρφωση, με το δοκιδώδη να υφίσταται τις μεγαλύτερες αλλαγές. Στην τρίτη ηλικία η διαδικασία απορρόφησης του οστού αποσυνδέεται από τη διαδικασία σχηματισμού του οστού. Ο τύπος αυτός οστεοπόρωσης χαρακτηρίζεται από κατάγματα του ισχίου, αν και τα κατάγματα σπονδύλων αυξάνονται, επίσης, με την αύξηση της ηλικίας. {Vander, 2001}

Τέλος, η δευτεροπαθής οστεοπόρωση προκύπτει όταν κάποιο γνωστό φάρμακο ή νόσος προκαλούν απώλεια οστίτη ιστού. {Hart, 2014} Η δευτεροπαθής οστεοπόρωση προκαλείται από καταστάσεις υγείας όπως ενδοκρινικές διαταραχές (π.χ. διαβήτης, υπερθυρεοειδισμός, υπερπαραθυρεοειδισμός), αιματολογικές διαταραχές (π.χ. θαλασσαιμία και κακοήθης αναιμία), γαστρεντερικές παθήσεις (π.χ. σύνδρομο δυσαπορρόφησης και φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου), σοβαρή ηπατοπάθεια, νεφρική ανεπάρκεια, ημιπληγία κ.ά. Πάνω από 30% των περιπτώσεων οστεοπόρωσης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες εκτιμάται ότι είναι από δευτερογενή αιτία. {Jeremiah, 2015}, {Lane, 2006}

2.5.3 Διάγνωση οστεοπόρωσης

Μέχρι πρόσφατα, η διάγνωση και η θεραπεία της οστεοπόρωσης βασιζόταν στην οστική πυκνομετρία. {Wadolowska, 2013} Ο WHO χρησιμοποιεί ένα κατώφλι 2.5 τυπικών αποκλίσεων

(SDs) σαν κριτήριο για τη διάγνωση της οστεοπόρωσης. Ωστόσο, τα T-scores αναπτύχθηκαν για την εκτίμηση της επίπτωσης της οστεοπόρωσης σε πληθυσμούς και όχι για την εκτίμηση της οστεοπόρωσης σε συγκεκριμένους ασθενείς. {Lane, 2006} Πλέον, τόσο η διάγνωση όσο και η θεραπεία της οστεοπόρωσης εστιάζουν στον ατομικό κίνδυνο για τα κατάγματα των οστών. Ωστόσο, αυτή η προσέγγιση απαιτεί τη συλλογή πληροφοριών σχετικά με την εμφάνιση διαιτητικών και μη διαιτητικών παραγόντων κινδύνου για οστικά κατάγματα. {Fazzalari, 2008}, {Wadolowska, 2013}

2.5.4 Παράγοντες κινδύνου

Πολλοί παράγοντες επηρεάζουν τις πιθανότητες μιας γυναίκας να αναπτύξει οστεοπόρωση. Σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται η χαμηλή Κορυφαία Οστική Μάζα, οι ορμονικοί παράγοντες, η χρήση συγκεκριμένων φαρμάκων (π.χ. γλυκοκορτικοειδών), το κάπνισμα, η χαμηλή φυσική δραστηριότητα, η φυλή, το φύλο, το μικρό μέγεθος σώματος, το προσωπικό ή οικογενειακό ιστορικό καταγμάτων, η προχωρημένη ηλικία, η ωοθηκεκτομή, οι διαταραχές εμμήνου ρύσεως, η πρόωρη εμμηνόπαυση και το χαμηλό σωματικό βάρος ή ο χαμηλός Δείκτης Μάζας Σώματος (BMI). Επίσης, υπάρχουν διαιτητικοί παράγοντες, που συμβάλλουν στην εμφάνιση της οστεοπόρωσης όπως η χαμηλή πρόσληψη ασβεστίου, βιταμίνης D και η κατάχρηση αλκοόλ. {Lane, 2006}

Ο αριθμός των παραγόντων κινδύνου για την οστεοπόρωση και τα οστικά κατάγματα, που περιγράφονται στη βιβλιογραφία υπερβαίνουν τους 30 δείχνοντας την ταυτόχρονη επίδραση πολλών παραγόντων κινδύνου για την πρόληψη της οστεοπόρωσης. Πολλές έρευνες βρήκαν ότι η πρόληψη της οστεοπόρωσης εστιάζοντας σε ένα μόνο παράγοντα κινδύνου μπορεί να είναι ανεπαρκής για τη βελτίωση της οστικής υγείας. {Wadolowska, 2013} Δεδομένου ότι κάποια από αυτά τα στοιχεία είναι μη τροποποιήσιμοι παράγοντες (ηλικία, φύλο, κληρονομικότητα), περισσότερη έμφαση πρέπει να δίνεται στους τροποποιήσιμους παράγοντες κινδύνου για τα οστικά κατάγματα. {Gerend, 2006}, {Lane, 2006}

Εκτενέστερα, φαίνεται ότι η παχυσαρκία έχει προστατευτική επίδραση στην ανάπτυξη της οστεοπόρωσης και αρκετές μελέτες δείχνουν μία θετική συσχέτιση ανάμεσα σε υψηλότερες τιμές BMI και την οστική πυκνότητα (BMD). {Demir, 2008}

Αναλυτικότερα, η φυλή καθορίζει την οστική πυκνότητα και τον κίνδυνο κατάγματος. Μελέτες δείχνουν ότι αν και οι γυναίκες έχουν υψηλότερους δείκτες καταγμάτων σε σύγκριση με τους άνδρες συνολικά, αυτές οι διαφορές ποικίλουν ανάλογα με τη φυλή και την ηλικία. Πιο

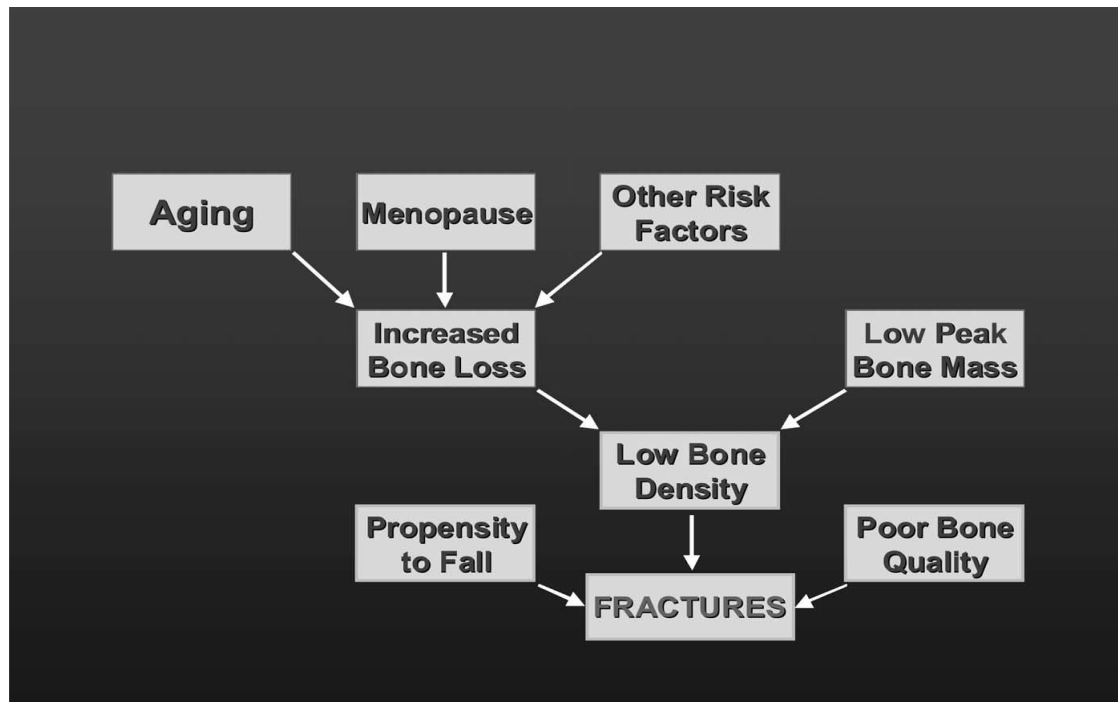
συγκεκριμένα, οι Ασιάτισσες και οι Καυκάσιες βρίσκονται σε μεγαλύτερο κίνδυνο σε σχέση με τις άλλες φυλές. Εντούτοις, και για τα 2 φύλα για όλες τις φυλές και τις εθνικές ομάδες, οι δείκτες αυξάνονται ραγδαία με την ηλικία και επηρεάζουν την επίπτωση του κινδύνου κατάγματος. {Lane, 2006} Η σχετιζόμενη με την ηλικία έκπτωση της οστικής μάζας ξεκινάει περίπου στην ηλικία των 40 ετών. {Demir, 2008}

Μια ισχυρή σχέση ανάμεσα στον κίνδυνο της οστεοπόρωσης, της ηλικίας και του εμμηνορρυσιακού κύκλου επιβεβαιώθηκε. Τα πρώτα χρόνια μετά τη διακοπή της ωοθηκικής λειτουργίας στην εμμηνόπαυση, η οστική απώλεια επιταχύνεται και η οστική μάζα συνεχίζει να μειώνεται με την ηλικία. {Lane, 2006} Ωστόσο, η διάρκεια της εμμηνόπαυσης φαίνεται να είναι πιο σημαντική για την οστεοπόρωση από την ηλικία της εμμηνόπαυσης. {Demir, 2008} Η σχετιζόμενη με την ηλικία μείωση της οστικής πυκνότητας ελαττώνεται σημαντικά 10-15 χρόνια μετά την εμμηνόπαυση και μετά την ηλικία των 65 ετών. Πέρα από αυτό, γύρω στην ηλικία των 65 ετών, οι δείκτες καταγμάτων κυρίως στο ισχίο αυξάνονται σημαντικά. {Fazzalari, 2008} Η φλεγμονή, επίσης, αυξάνει με την ηλικία και επιδεινώνει την οστική απώλεια. {Gunne, 2013} Στην ηλικία από 20-79 έτη, η αναλογία των ατόμων με φυσιολογικές τιμές οστικής μάζας μειώνεται σχεδόν γραμμικά, ενώ η επίπτωση της οστεοπόρωσης αυξάνεται γραμμικά. Επομένως, η ηλικία και ο εμμηνορρυσιακός κύκλος είναι ισχυροί, ανεξάρτητοι παράγοντες κινδύνου για την οστική πυκνότητα και την οστεοπόρωση. {Wadolowska, 2013}

Αρκετές μελέτες έχουν, επίσης, καταγράψει συσχέτιση ανάμεσα στα άτομα με προηγούμενο ιστορικό κατάγματος σε οποιοδήποτε σημείο και κίνδυνο μελλοντικών καταγμάτων σε ισχίο και σπονδυλική στήλη. Γυναίκες με ιστορικό κατάγματος ισχίου των μητέρων τους έχουν περίπου διπλάσιες πιθανότητες για να πάθουν κάταγμα ισχίου σε σχέση με γυναίκες, που δεν έχουν τέτοιο ιστορικό. {Lane, 2006} Άρα, ένα εκτιμώμενο 60–80% της μεταβλητότητας της οστικής μάζας και του κινδύνου οστεοπόρωσης μπορεί να εξηγηθεί με την κληρονομικότητα. Η αέρια οστική πυκνότητα (aBMD) είναι χαμηλότερη σε κόρες γυναικών με οστεοπόρωση και σε γυναίκες με πρώτου βαθμού συγγενείς, που έχουν οστεοπόρωση. Μελέτες σε δίδυμα υποστηρίζουν ότι η γενετική προδιάθεση καθορίζει μέχρι το 80% της Κορυφαίας Οστικής Μάζας, ενώ το υπόλοιπο 20% ρυθμίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες και από τα επίπεδα των ορμονών του φύλου κατά τη διάρκεια της εφηβείας. {Weaver, 2016}

Επιπροσθέτως, έκθεση σε ορισμένα φάρμακα μπορεί να συμβάλλει και/ή να επιταχύνει την οστεοπόρωση. Τα γλυκοκορτικοειδή είναι η πιο συχνή θεραπεία, που επηρεάζει τόσο την οστική

ποιότητα όσο και την ποσότητα. Μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, που έχουν ήδη χαμηλή οστική μάζα είναι πιθανόν να φτάσουν το κατώφλι, που οδηγεί στο κάταγμα πιο νωρίς με τη θεραπεία γλυκοκορτικοειδών σε σχέση με άλλους ασθενείς με αρχικά υψηλότερες τιμές οστικής πυκνότητας. Άλλα φάρμακα, που μπορεί να συμβάλλουν στην εμφάνιση οστεοπόρωσης είναι η ηπαρίνη (μακροχρόνια χρήση), προγεστερόνη (παρεντερική, μακράς δράσης), βενζοδιαζεπίνες (μακράς δράσης), κυτοτοξικά φάρμακα, ανοσοκατασταλτικά κ.ά. {Lane, 2006}



Σχήμα 6. Παθογένεση οστεοπορωτικών καταγμάτων. {Lane, 2006}

2.5.5 Θεραπείες για οστεοπόρωση

Οι συστάσεις του WHO συστήνουν για κάθε άτομο με οστεοπόρωση ή με κίνδυνο εμφάνισής της να λαμβάνει θεραπεία. Η θεραπεία αυτή σχετίζεται τόσο με αλλαγές στον τρόπο ζωής όσο και με φαρμακευτική αγωγή. Αναλυτικότερα, η πρόληψη των πτώσεων είναι προτεραιότητα για τους ασθενείς με οστεοπόρωση, επειδή οι πτώσεις συσχετίζονται περισσότερο με τον κίνδυνο κατάγματος από ότι η οστική πυκνότητα. Συνίσταται ένα συνδυαστικό πρόγραμμα άσκησης, που αποτελείται από ασκήσεις αντιστάσεων, ισορροπίας για την πρόληψη των πτώσεων και προπονήσεις δύναμης και ασκήσεις με βάρη για την πρόληψη της οστεοπόρωσης. {Jeremiah, 2015}

Οι οστεοπορωτικοί ασθενείς πρέπει να συμβουλευονται να κόβουν το κάπνισμα, καθώς έχει φανεί ότι μειώνει την οστική πυκνότητα σε όλα τα σκελετικά σημεία. Η υπερβολική

κατανάλωση αλκοόλ (κατανάλωση > 4 ποτά/ημέρα για τους άνδρες και > 2 ποτά/ημέρα για τις γυναίκες) είναι ένας βασικός παράγοντας κινδύνου για κάταγμα και πρέπει να αποθαρρύνεται. Οι διαιτητικές τροποποιήσεις μπορούν να έχουν, επίσης, ένα ρόλο στη βελτιστοποίηση της οστικής υγείας και να εμποδίσουν ή τουλάχιστον να καθυστερήσουν το ξεκίνημα της οστεοπόρωσης. {Jeremiah, 2015}

Σχετικά με τις φαρμακολογικές θεραπείες για την οστεοπόρωση, αυτές περιλαμβάνουν τα διφωσφονικά, τη ραλοξιφαίνη και την τεριπαρατίδη. Τα διφωσφονικά, που λαμβάνονται από το στόμα αναστέλλουν την οστεοκλαστική δραστηριότητα και θεωρούνται ως η φαρμακολογική θεραπεία πρώτης γραμμής. {Jeremiah, 2015}

2.6 Εμμηνόπαυση και οστικός μεταβολισμός

Η εμμηνόπαυση είναι η μόνιμη διακοπή του καταμήνιου κύκλου κατά τη μέση ηλικία. {Vander, 2001} Αναλυτικότερα, ο εμμηνορρυσιακός κύκλος γίνεται προοδευτικά ακανόνιστος και τελικά παύει στις γυναίκες κοντά στην ηλικία των 50 ετών. Ο τερματισμός της εμμήνου ρύσεως προκαλείται από την παύση της παραγωγής οιστρογόνων και προγεστερόνης στις ωοθήκες. {Hart, 2014}

Η απώλεια της οστικής μάζας, που συσχετίζεται με πρόωρη εμμηνόπαυση είναι το αποτέλεσμα της καταβολικής επίδρασης της έλλειψης οιστρογόνων, η οποία επέρχεται είτε φυσιολογικά είτε μετά από χειρουργική επέμβαση. Όσο νωρίτερα διακόπτεται η ωοθηκική δραστηριότητα τόσο μεγαλύτερη η απώλεια οστικής πυκνότητας (BMD) στα επερχόμενα χρόνια. Για αυτό το λόγο, η διακοπή του έμμηνου κύκλου αποτελεί βασικό παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση οστεοπόρωσης στις γυναίκες. {Cavalli, 2016}

2.6.1 Ο ρόλος των οιστρογόνων στην οστεοπόρωση

Με την έναρξη της εμμηνόπαυσης, οι γυναίκες περνούν μια περίοδο επιταχυνόμενης οστικής απώλειας, όπου χάνουν με ρυθμό 3-5% ανά έτος για περίπου 5-7 χρόνια από την έναρξη της εμμηνόπαυσης. {Mahboub, 2014} Αναλυτικότερα, ανά έτος χάνεται περίπου 2% του φλοιώδους οστίτη ιστού και 5% του δοκιδώδους οστίτη ιστού. {Demir, 2008} Έχει εκτιμηθεί ότι περίπου το 75% των οστών, που χάνονται τα χρόνια μετά την εμμηνόπαυση μπορεί να σχετίζονται με την έλλειψη οιστρογόνων περισσότερο από την ηλικία. {Mahboub, 2014}

Σε κυτταρικό επίπεδο, ο κεντρικός μηχανισμός με τον οποίο η έλλειψη των στεροειδών ορμονών του φύλου διεγείρει την οστική απώλεια είναι μέσω της αύξησης στο σχηματισμό οστεοκλαστών και της διάρκειας ζωής τους. Παράλληλα, περιορίζεται η οστική δόμηση μειώνοντας το προσδόκιμο ζωής των οστεοβλαστών. {Lane, 2006} Η μετεμμηνοπαυσιακή οστική απώλεια θεωρείται ως μια φλεγμονώδης κατάσταση λόγω του αιτιώδους ρόλου του ανοσοποιητικού συστήματος και της παρουσίας αυξημένων επιπέδων φλεγμονωδών κυτταροκινών, που μπορεί να ευθύνονται εν μέρει για την ανάπτυξη οστεοπόρωσης. {Li, 2016}, {Weaver, 2015}

Οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, που παράγονται λόγω της έλλειψης οιστρογόνων είναι υπεύθυνες για την αυξημένη ρύθμιση του σχηματισμού οστεοκλαστών και ορισμένες από αυτές είναι μόρια με εδραιωμένο ρόλο στην οστεοκλαστογένεση και την οστική απώλεια. Ανάμεσα σε αυτά τα μόρια, τα πιο γνωστά εμπλεκόμενα στην οστική απώλεια οφειλόμενη στην έλλειψη οιστρογόνων μοιάζουν να είναι ο TNF-α, η IL-1, η IL-7 και η IL-17. Στους ανθρώπους έχει φανεί ο βασικός ρόλος των T κυττάρων στην μετεμμηνοπαυσιακή οστική απώλεια. Τα T κύτταρα των οστεοπορωτικών ασθενών παράγουν παραπάνω RANKL και TNF-α, διεγείροντας έτσι το σχηματισμό και τη δραστηριότητα των οστεοκλαστών. Επίσης, έχει φανεί ότι η θεραπεία υποκατάστασης ορμονών μειώνει την παραγωγή οστεοκλαστογενικών κυτοκινών στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. {Mori, 2015}

Οι τροποποιήσεις στις ορμόνες του φύλου είναι ένα κυρίαρχο ερέθισμα για την οστική απώλεια στους ανθρώπους και πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι αλλαγές στο εντερικό μικροβίωμα συσχετίζονται με τροποποιήσεις στην ορμονική κατάσταση και την οστική απώλεια. {Hernandez, 2016} Εκτενέστερα, υποστηρίζεται ότι το εντερικό επιθήλιο σχηματίζει ένα στενό φυσιολογικό φραγμό, ώστε να χωρίσει τα διαμερίσματα ιστού των συστημάτων από τη χλωρίδα, που βρίσκεται στον εντερικό αυλό. Η κατάρρευση της ακεραιότητας του φράγματος οδηγεί σε αυξημένη βακτηριακή μετατόπιση, που συχνά έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση χρόνιων ανοσολογικών ασθενειών. Σε απάντηση στη στέρηση των στεροειδών ορμονών του φύλου, ανιχνεύθηκε αυξημένη εντερική διαπερατότητα. Το προτεινόμενο μοντέλο είναι ότι η αυξημένη διαπερατότητα επιτρέπει σε ένα εκτεταμένο εύρος μορίων και σε πιθανά αντιγονικά φορτία να εισέλθουν στον επιθηλιακό υποβλεννογόνο, ξεκινώντας αποκλίνουσες εντερικές και συστηματικές ανοσολογικές αποκρίσεις. {Li, 2016}

2.7 Ασβέστιο και οστά

Η αποθήκευση του ασβεστίου στα οστά χρησιμεύει σαν ένα λειτουργικό απόθεμα για να αντισταθμίσει τις διαιτητικές ελλείψεις ασβεστίου και χρησιμοποιείται για να διατηρηθεί η ομοιόσταση. Πάνω από το 99% του ασβεστίου στον οργανισμό ενός ενήλικα βρίσκεται στο σκελετό ως υδροξυαπατίτης, ενώ το υπόλοιπο 1% συμμετέχει σε πολύ σημαντικές διεργασίες. Το απόθεμα ασβεστίου είναι πολύ μεγάλο σχετικά με τις κυτταρικές και εξωκυτταρικές μεταβολικές αποθήκες ασβεστίου, με αποτέλεσμα η διαιτητική ανεπάρκεια σπάνια να επηρεάζει τις εξαρτώμενες από το ασβέστιο βιοχημικές λειτουργίες. Ωστόσο, μακροχρόνια έλλειψη εξαντλεί το απόθεμα και ακολούθως, μειώνει την οστική μάζα και την οστική δύναμη. {Lane, 2006}, {Weaver, 2015}

Επειδή ο ανθρώπινος σκελετός κατά τη γέννηση περιέχει μόνο το 2–3 % του συνολικού ασβεστίου ενός ενήλικα, οι διαιτητικές απαιτήσεις για ασβέστιο κατά τα πρώτα 20-30 χρόνια της ζωής καθορίζονται κυρίως από τη σκελετική ανάπτυξη. Η μεγαλύτερη ζήτηση για ασβέστιο εμφανίζεται στην εφηβεία, όπου το 26% της ενήλικης οστικής μάζας επιτυγχάνεται. Εντούτοις, η ημερήσια κατανάλωση ασβεστίου στους εφήβους και κυρίως στα κορίτσια βρίσκεται συνήθως κάτω από τις συνιστώμενες προσλήψεις, αυξάνοντας, έτσι, τον κίνδυνο για μειωμένη ανάπτυξη της Κορυφαίας Οστικής Μάζας και οδηγώντας σε αυξημένο κίνδυνο για οστεοπόρωση και κατάγματα στη μετέπειτα ζωή. {Weaver, 2015}

Η αυξημένη πρόσληψη ασβεστίου έχει συσχετιστεί με οστική αύξηση, καταστολή της παραθορμόνης και οστική επαναρρόφηση. Η απορρόφηση ασβεστίου κατά μήκος του εντέρου μπορεί να προκύψει είτε μέσω της ενεργής, εξαρτώμενης από τη βιταμίνη D, διευκολυνόμενης διάχυσης, η οποία λαμβάνει χώρα κυρίως στο λεπτό έντερο είτε μέσω παθητικής απορρόφησης, που διεξάγεται κατά μήκος όλου του εντέρου. Η ποσότητα της παθητικής απορρόφησης αυξάνεται, καθώς αυξάνεται και η πρόσληψη ασβεστίου. {Weaver, 2015}

Στο 90% των τυχαιοποιημένων ελεγχόμενων δοκιμών (RCTs) ανιχνεύθηκε μια στατιστικά και βιολογικά σημαντική επίδραση στην οστική αύξηση σε παιδιά και εφήβους, των οποίων η μέση πρόσληψη ασβεστίου είναι μειωμένη. Παρ' όλα αυτά, φαίνεται ότι η συμπληρωματική χορήγηση ασβεστίου είτε γίνεται με χάπια, εμπλουτισμένα τρόφιμα ή γαλακτοκομικά προϊόντα αυξάνει συνήθως 1-5% τη σκελετική μάζα και τις μετρήσεις πυκνότητας σε παιδιά και εφήβους. Τα σκελετικά σημεία, που διαφαίνεται η επίδραση του ασβεστίου ποικίλουν ευρέως μεταξύ των μελετών. {Weaver, 2016} Ωστόσο, ενδέχεται τρόφιμα πλούσια σε ασβέστιο, όπως το γάλα και το γιαούρτι, να είναι πιο αποτελεσματικά από τα συμπληρώματα, επειδή περιλαμβάνουν κι άλλα

σημαντικά συστατικά, που μπορεί να επιδράσουν στα οστά όπως η βιταμίνη D, οι πρωτεΐνες, το κάλιο και το μαγνήσιο. {Lane, 2006}

2.7.1 Ομοιόσταση ασβεστίου

Η ομοιόσταση του ασβεστίου ή η διαδικασία διατήρησης μιας σταθερής συγκέντρωσης ασβεστίου στον ορό όταν η διαίτα είναι ανεπαρκής εξαρτάται σχεδόν αποκλειστικά από τα αποθέματα ασβεστίου στον οστίτη ιστό. Σε περίπτωση, που η πρόσληψη ασβεστίου είναι ανεπαρκής, η ομοιόσταση ασβεστίου διατηρείται μέσω της απομάκρυνσης ασβεστίου από τα οστά, προκειμένου να εξασφαλιστεί σταθερή συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου στον ορό. Ανάλογα με την ποσότητα ασβεστίου, που απαιτείται η ομοιόσταση μπορεί να επιτευχθεί μέσω της απομάκρυνσης ασβεστίου από 2 βασικές πηγές στο σκελετό: από τα άμεσα κινητοποιούμενα ιόντα ασβεστίου στα υγρά των οστών ή μέσω της διαδικασίας της οστεοκλαστικής απορρόφησης, δηλαδή, από τον ίδιο τον οστίτη ιστό. Η ημερήσια ανακύκλωση των σκελετικών ιόντων ασβεστίου (η μεταφορά τους, δηλαδή, προς και από τα οστά) είναι ιδιαίτερα εντατική. {Vander, 2001}

Η προσαρμογή του ομοιοστατικού μηχανισμού, που ρυθμίζει τα επίπεδα του ασβεστίου στο αίμα επιτυγχάνεται μέσω 2 ρυθμιστικών ορμονών της παραθορμόνης (PTH) και της 1,25 διυδροξυβιταμίνης D₃ (καλσιτριόλη). Το ρυθμιστικό αυτό σύστημα λειτουργεί πιο αποτελεσματικά κατά τα πρώτα στάδια της ζωής και ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια των πρώτων δεκαετιών, ενώ η αποτελεσματικότητά του φθίνει σταδιακά στη μετέπειτα ζωή. {Vander, 2001}

Συνεπώς, η ρύθμιση της συγκέντρωσης του ασβεστίου εξαρτάται από τους νεφρούς, το γαστρεντερικό σωλήνα και τα οστά. Η δράση των νεφρών και του γαστρεντερικού σωλήνα καθορίζουν την τελική πρόσληψη και αποβολή ασβεστίου και άρα, το συνολικό ισοζύγιο ασβεστίου. Αντίθετα, η ανταλλαγή του ασβεστίου μεταξύ του εξωκυττάριου υγρού και των οστών δε μεταβάλλει το συνολικό σωματικό ισοζύγιο του ασβεστίου αλλά επηρεάζει μάλλον την κατανομή του ασβεστίου εντός του σώματος. {Vander, 2001}

2.8 Ο ρόλος της βιταμίνης D

Η βιταμίνη D είναι το πιο γνωστό συστατικό μετά το ασβέστιο, που πιστεύεται ότι προστατεύει την οστική υγεία. {Tucker, 2014} Η βιταμίνη D εξασφαλίζει την επαρκή εντερική απορρόφηση του ασβεστίου από τις διαιτητικές πηγές, διεγείρει την επαναρρόφηση του ασβεστίου στα άπω εσπειραμένα σωληνάρια των νεφρών και για αυτό το λόγο, θεωρείται

απαραίτητη για την ανάπτυξη και τη διατήρηση του σκελετού των θηλαστικών. Οι κύριες πηγές βιταμίνης D είναι η διατροφή και η ηλιακή ακτινοβολία. {Ishimi, 2015}, {Weaver, 2016}

Ο αριθμός των τροφίμων, που περιέχουν φυσικά τη βιταμίνη D σε σημαντικές ποσότητες είναι αρκετά περιορισμένος. Η βιταμίνη D λαμβάνεται από τη δίαιτα ως χολοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₃) κυρίως από τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Οι καλύτερες πηγές της βιταμίνης είναι τα λιπαρά ψάρια, όπως ο σολομός, οι σαρδέλες, ο τόνος και τα ιχθυέλαια, ενώ το βοδινό συκώτι, τα γαλακτοκομικά και ο κρόκος του αυγού συμμετέχουν σε μικρό βαθμό στην κάλυψη των αναγκών σε βιταμίνη D. Η συνεισφορά των τροφίμων φυτικής προέλευσης είναι σαφώς μικρότερη, καθώς η βιταμίνη λαμβάνεται ως εργοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₂) κυρίως από μανιτάρια, που έχουν καλλιεργηθεί στον ήλιο. Για αυτό το λόγο, οι πιο πολλές χορτοφαγικές δίαιτες περιέχουν πολύ λίγη βιταμίνη D. {Tucker, 2014}, {Weaver, 2016} Περίπου το 50% της βιταμίνης D, που προέρχεται από τη διατροφή απορροφάται. Αν και ο ρυθμός απορρόφησης είναι ταχύτερος στο δωδεκαδάκτυλο, το μεγαλύτερο ποσοστό της διαιτητικής βιταμίνης απορροφάται στα κατώτερα σημεία του λεπτού εντέρου. {Grooper, 2007}

Η έκθεση του ανθρώπινου δέρματος στην ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία (μήκος κύματος: 290–315 nm) οδηγεί σε μετατροπή της 7-δεϋδροχοληστερόλης σε προβιταμίνη D₃ στο δέρμα. Η προβιταμίνη D₃ μετατρέπεται ταχέως σε βιταμίνη D₃ (χολοκαλσιφερόλη) με μια διαδικασία εξαρτώμενη από τη θερμότητα. Η υπερβολική έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία υποβαθμίζει τόσο την προβιταμίνη όσο και τη βιταμίνη D₃ σε ανενεργά φωτοπροϊόντα. Η ποσότητα της παραγόμενης βιταμίνης D στο δέρμα εξαρτάται από την προσπίπτουσα γωνία της ηλιακής ακτινοβολίας στο δέρμα, από το γεωγραφικό πλάτος, την εποχή και την ώρα της ημέρας. Άλλοι παράγοντες, που επηρεάζουν αρνητικά τη δερματική παραγωγή της βιταμίνης D είναι το χρώμα δέρματος, η γήρανση ειδικά για ηλικίες >65 ετών και η τοπική εφαρμογή αντηλιακού. {Weaver, 2016}

Η βιταμίνη D₂ και η βιταμίνη D₃ από τις διαιτητικές πηγές ενσωματώνονται σε χυλομικρά και μεταφέρονται με το λεμφικό σύστημα στη φλεβική κυκλοφορία. Η βιταμίνη D (ως D θεωρείται και η D₂ και η D₃), που παράγεται στο δέρμα ή πέπτει από τη διατροφή μπορεί να αποθηκευτεί και να απελευθερωθεί από τα λιποκύτταρα. Η βιταμίνη D στην κυκλοφορία είναι δεσμευμένη σε μια πρωτεΐνη, που τη δεσμεύει και τη μεταφέρει στο συκώτι όπου μετατρέπεται σε 25-υδροξυβιταμίνη D [25(OH)D] από τη D-25-υδροξυλάση. Αυτή είναι η κυρίαρχη μορφή με την οποία κυκλοφορεί η βιταμίνη και χρησιμοποιείται στην κλινική πράξη ως δείκτης για τη μέτρηση της κατάστασης του οργανισμού σε βιταμίνη D. Αυτή η μορφή είναι βιολογικά ανενεργή και πρέπει να

μετατραπεί στα νεφρά στη βιολογικά ενεργή της μορφή την 1,25-υδροξυβιταμίνη D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}$] από το μιτοχονδριακό ένζυμο 25-υδροξυβιταμίνη D-1 α -υδροξυλάση (CYP27B1). Αυτή η διαδικασία γίνεται σε πολλά βήματα. Το ένζυμο CYP27B1 εκφράζεται και εξωνεφρικά σε πολλαπλούς ιστούς όπως στα οστά, στον πλακούντα, στον προστάτη, στα κερατινοκύτταρα, στα μακροφάγα, στα T-λεμφοκύτταρα, στα δένδριτικά κύτταρα, σε αρκετά καρκινικά κύτταρα και στον παραθυροειδή αδένα, για αυτό αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να παράγουν $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Η ενεργή μορφή της βιταμίνης D είναι τοπικά ενεργή και ασκεί αυτό- και παρακρινικές επιδράσεις. {Weaver, 2016}

Ο φώσφορος του ορού, το ασβέστιο, οι αυξητικοί παράγοντες των ινοβλαστών (FGF-23) και άλλοι παράγοντες μπορούν να αυξήσουν ή να μειώσουν τη νεφρική παραγωγή της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Το σύστημα ανατροφοδότησης της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ρυθμίζει τη σύνθεσή της και μειώνει τη σύνθεση και την έκκριση της παραθυροειδούς ορμόνης (PTH) στους παραθυροειδείς αδένες. Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ προκαλεί την αυτοκαταστροφή της διεγείροντας γρήγορα την 25-υδροξυβιταμίνη D-24-υδροξυλάση (CYP24A1), που οδηγεί στον καταβολισμό τόσο της $25(\text{OH})\text{D}$ όσο και της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ σε βιολογικά ανενεργούς, υδατοδιαλυτούς μεταβολίτες όπως το καλσιτροϊκό οξύ. {Weaver, 2016}

Η βιταμίνη D διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στο μεταβολισμό του ασβεστίου και του φωσφόρου και βοηθάει στη διασφάλιση επαρκών επιπέδων αυτών των ανόργανων στοιχείων για τις μεταβολικές λειτουργίες και τη μεταλλοποίηση. {Tucker, 2014}, {Weaver, 2016} Αναλυτικότερα, η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ φαίνεται ότι αυξάνει την αποτελεσματικότητα της εντερικής απορρόφησης ασβεστίου από το 10%–15% σε 30%–40% αλληλοεπιδρώντας με τους VDR-RXR και προάγοντας έτσι την έκφραση ενός επιθηλιακού διαύλου ασβεστίου και μιας πρωτεΐνης, που δεσμεύουν ασβέστιο. Βάσει πειραμάτων, που διεξήχθησαν σε τρωκτικά εκτιμάται ότι η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, επίσης, αυξάνει την εντερική απορρόφηση φωσφόρου από 50%–60% σε σχεδόν 80%. Επιπλέον, η βιταμίνη D προκαλεί έμμεσες επιδράσεις στο ασβέστιο και το φώσφορο ρυθμίζοντας τα επίπεδα της παραθορμόνης (PTH). Οι παραθυροειδείς αδένες έχουν ενζυμική δραστηριότητα CYP27B1 και η τοπική παραγωγή της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ χρησιμοποιώντας τη $25(\text{OH})\text{D}$ σαν υπόστρωμα μπορεί να αναστείλει τη σύνθεση της PTH. {Weaver, 2016}

Η επαρκής πρόσληψη βιταμίνης D είναι ζωτική για τη φυσιολογική σκελετική ανάπτυξη τόσο στην εμβρυϊκή και στην παιδική ηλικία όσο και στη διατήρηση της οστικής υγείας στους ενήλικους. Η βιταμίνη D προάγει την οστική υγεία με τη διατήρηση της PTH σε φυσιολογικά υγιή επίπεδα, διεγείροντας την οστεοβλαστική δραστηριότητα και προωθώντας την οστική μεταλλοποίηση, όπως επίσης, μειώνοντας τον κίνδυνο των πτώσεων και άρα, τον κίνδυνο

κατάγματος. Η έλλειψη βιταμίνης D συσχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα ασβεστίου στον ορό, ένα ερέθισμα, που οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα PTH. Αντιστρόφως, υψηλότερα επίπεδα ασβεστίου, που συσχετίζονται με υψηλότερα επίπεδα 25(OH)D, καταστέλλουν την έκκριση της PTH. Τα επαρκή επίπεδα ασβεστίου και φωσφόρου προωθούν τη μεταλλοποίηση του σκελετού, ενώ σε αντίθετη περίπτωση οι ώριμοι οστεοκλάστες αφαιρούν ασβέστιο και φώσφορο από το οστό για να διατηρήσουν τα επίπεδα του ασβεστίου και του φωσφόρου στο αίμα. {Weaver, 2016}

Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί για να αξιολογήσουν την επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης βιταμίνης D στον κίνδυνο κατάγματος με κάποιες μελέτες να δείχνουν σημαντική μείωση του κινδύνου κατάγματος, ενώ άλλες όχι. Μία από αυτές έδειξε ότι η συμπληρωματική χορήγηση ασβεστίου (1200 mg) και βιταμίνης D₃ (800 IU/day) μειώνει τον αριθμό των καταγμάτων του ισχίου κατά 43% και το συνολικό αριθμό των μη σπονδυλικών καταγμάτων κατά 32%. Μάλιστα, στη δημοσιευμένη προοπτική έρευνα NORA (National Osteoporosis Risk Assessment Study) βρέθηκε ότι σε 76,507 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, οι προσλήψεις βιταμίνης D >600 IU (15 mg) σε σύγκριση με προσλήψεις <200 IU (5 mg) συσχετίστηκαν με 27% λιγότερες πιθανότητες για οστεοπόρωση, ενώ, δε βρέθηκε συσχέτιση με τον τριετή κίνδυνο κατάγματος. Σύμφωνα με δεδομένα από τη Women's Health Initiative, οι πιθανότητες για τον κίνδυνο κατάγματος του ισχίου είναι αντίστροφα συνδεδεμένες με τα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό. Σε 4 τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές βρέθηκαν αποδείξεις για την ωφέλιμη επίδραση της συμπληρωματικής χορήγησης βιταμίνης D στην οστική αύξηση. {Weaver, 2016}

2.9 Ο ρόλος της παραθορμόνης

Η παραθορμόνη (PTH) εκκρίνεται από τα θεμέλια κύτταρα του παραθυροειδή αδένου. Η έκκρισή της επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του ασβεστίου αλλά και του μαγνησίου στο πλάσμα κυρίως. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις του ασβεστίου στα πλάσμα διεγείρουν την έκκριση της PTH και μειώνουν την έκκριση της καλσιτονίνης από το θυρεοειδή αδένου. {Grooper, 2007} Πιο συγκεκριμένα, οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί λειτουργούν με τέτοιο τρόπο για να εμποδίσουν την υπασβεσταιμία τόσο διεγείροντας την παραγωγή όσο και την έκκριση της παραθυροειδούς ορμόνης (PTH). {Bonjour, 2015} Μειώσεις στα επίπεδα ασβεστίου του ορού μπορούν να διεγείρουν την απελευθέρωση της PTH, η οποία αυξάνει τα επίπεδα ασβεστίου του ορού με την προώθηση της οστεοκλαστικής οστικής επαναρρόφησης και της απορρόφησης ασβεστίου στο έντερο, ενώ, παράλληλα, μειώνεται η νεφρική απέκκριση ασβεστίου. {Charles, 2015} Αντίθετα, η καλσιτονίνη

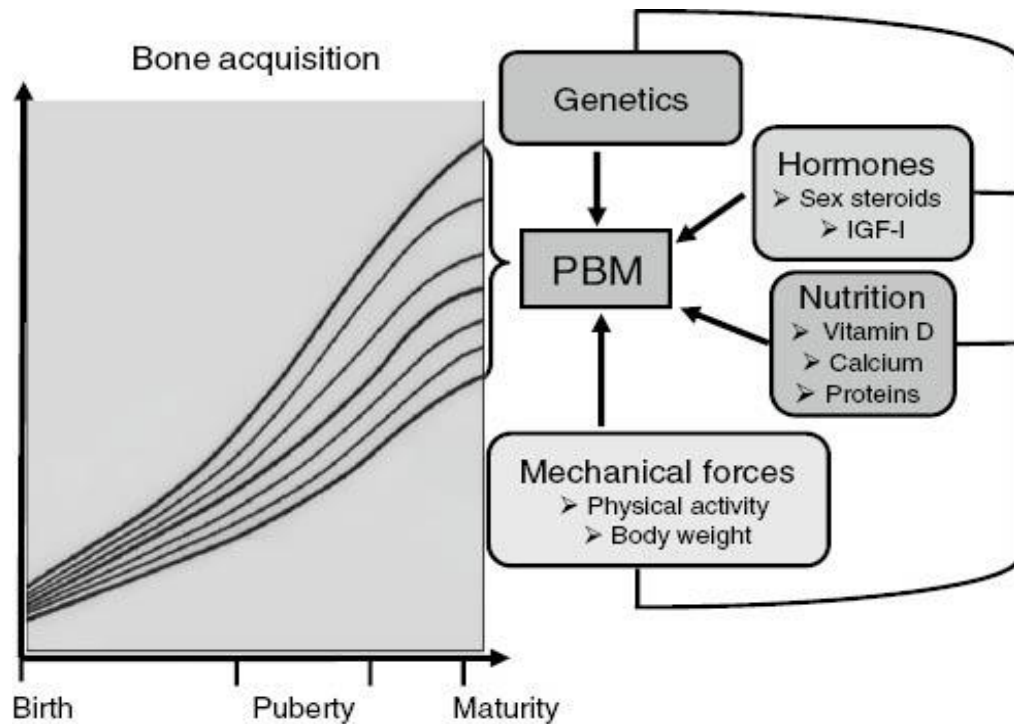
ανταγωνίζεται τη δράση της παραθορμόνης διεγείροντας την πρόσληψη ασβεστίου από το οστό. {Hart, 2014}

Αναλυτικότερα, οι υποδοχείς, που είναι ευαίσθητοι στο ασβέστιο ρυθμίζουν τη συγκέντρωση του ασβεστίου και του μαγνησίου στο αίμα τόσο στον παραθυρεοειδή αδένα όσο και στο νεφρό. Η PTH μόνη της ή με την καλσιτριόλη ενεργεί αυξάνοντας τη συγκέντρωση του ασβεστίου στα εξωκυτταρικά υγρά (πλάσμα) μέσω αλληλεπίδρασης με τους νεφρούς, το έντερο και τα οστά. {Grooper, 2007}

Η ανεπάρκεια της παροχής βιταμίνης D, εκφράζεται με μειωμένη 25-υδροξυβιταμίνη D (25OHD) ορού, που οδηγεί σε δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό και αυξημένους δείκτες οστικής επαναρρόφησης στον ορό. Αυτή η κατάσταση τείνει να εμφανίζεται πιο συχνά με το πέρασμα της ηλικίας. {Bonjour, 2015} Ειδικότερα στα οστά, η PTH αλληλοεπιδρά με υποδοχείς στους οστεοβλάστες, οι οποίοι δίνουν σήμα στους οστεοκλάστες. Στους οστεοκλάστες, λυσοσωματικές πρωτεάσες αποικοδομούν το οστό, προάγοντας την απορρόφηση άμορφων αλάτων ασβεστίου των οστών. {Grooper, 2007}

2.10 Διατροφή και οστά

Τα οστά είναι ένας ζωντανός οργανισμός, που απαιτεί όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη και τη συντήρησή του. Ο οστικός ιστός αποτελείται από υδροξυαπατίτη, μια ένωση φωσφορικού ασβεστίου με μαγνήσιο και ιχνοστοιχεία άλλων ανόργανων στοιχείων. Ο συνδετικός ιστός αποτελείται κυρίως από μια πρωτεΐνη, το κολλαγόνο. Ο ρόλος πολλών μικροθρεπτικών συστατικών στα οστά είναι να βοηθήσουν στη σύνθεση του συνδετικού ιστού. Ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, το μαγνήσιο, ο χαλκός, το μαγγάνιο και η βιταμίνη Κ είναι συμπαράγοντες σε ένζυμα υπεύθυνα για τον οστικό μεταβολισμό και τη σύνθεση του κολλαγόνου. Εκτός από το ασβέστιο και τη βιταμίνη D των οποίων ο ρόλος στον οστικό μεταβολισμό περιεγράφηκε εκτενώς, υπάρχουν και άλλα μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά, που συμβάλλουν στην οστική υγεία. {Weaver, 2016}



Σχήμα 7. Καθοριστικοί παράγοντες της ανάπτυξης οστικής μάζας και δύναμης από τη γέννηση μέχρι την ενηλικίωση. Σε υγιή άτομα, 4 είναι οι κύριοι καθοριστικοί παράγοντες (γενετικοί, ορμόνες, διατροφή και μηχανικές δυνάμεις), που επηρεάζουν την οστική μάζα και δύναμη από τη γέννηση μέχρι το τέλος της δεύτερης δεκαετίας της ζωής. Σε αυτή τη φάση αποκτάται η μέγιστη τιμή, που καλείται Κορυφαία Οστική Μάζα (peak bone mass ή PBM). Όπως φαίνεται στα δεξιά αυτοί οι 4 παράγοντες είναι αλληλένδετοι, καθώς για παράδειγμα, μια αυξημένη πρωτεϊνική πρόσληψη ενισχύει τη θετική επίδραση της φυσικής δραστηριότητας στην οστική ανάπτυξη. Οι καμπύλες του διαγράμματος αριστερά απεικονίζουν το ευρύ φάσμα των τιμών της κορυφαίας οστικής μάζας για κάθε άτομο, που μπορούν να εκτιμηθούν στην ενήλικη ζωή σε υγιή άτομα και των 2 φύλων. Η γενετικά προκαθορισμένη πορεία μπορεί να τροποποιηθεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες και συγκεκριμένα από τη διατροφή και την περιβαλλοντική δραστηριότητα. {Bonjour, 2016}

2.10.1 Πρωτεΐνη και οστά

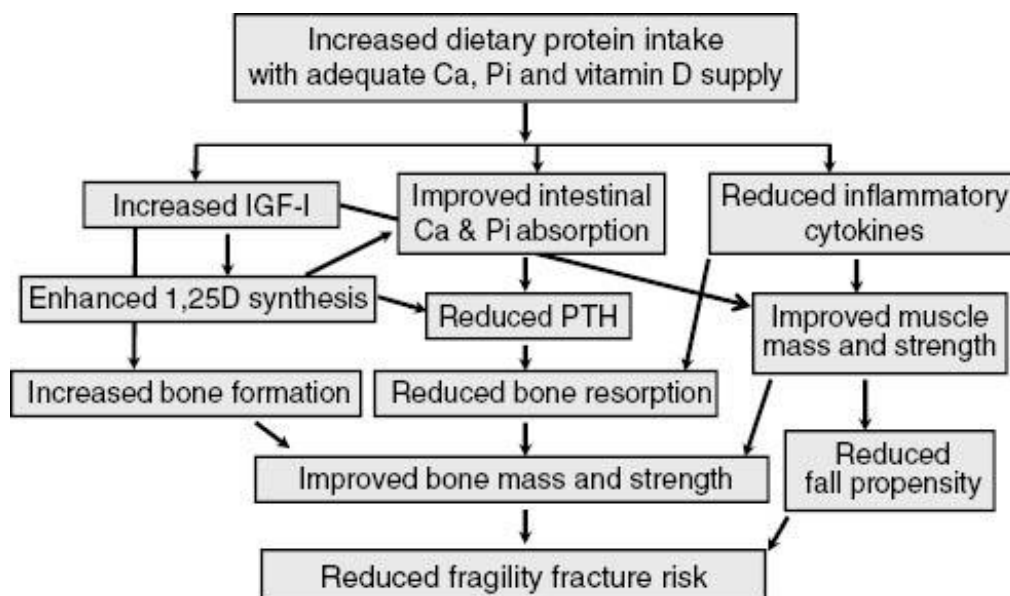
Στην ανάπτυξη και τη διατήρηση οστικών δομών ανθεκτικών σε συνήθεις μηχανικές πιέσεις, η επαρκής διατροφή κατέχει ένα σημαντικό μέρος. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ο πρωτεϊνικός υποσιτισμός από τη βρεφική ηλικία έως την παιδική και την εφηβική έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη οστική μάζα και δύναμη, αυξάνοντας έτσι, τον κίνδυνο για κατάγματα στη μετέπειτα ζωή και είναι συχνά παρόν σε ασθενείς, που υφίστανται κατάγματα ισχίου. Αντίθετα, η υψηλή διαιτητική πρωτεϊνική πρόσληψη, όταν συνδυάζεται με φυσική δραστηριότητα ευνοεί την απόκτηση υγιούς οστικής μάζας. {Bonjour, 2016}

Παρά το γεγονός, ότι η διαιτητική πρωτεΐνη θεωρείται ότι αυξάνει τη νεφρική έκκριση ασβεστίου και δημιουργεί αρνητικό ισοζύγιο ασβεστίου, σε πολλές πληθυσμιακές μελέτες έχει φανεί ότι η πρωτεϊνική πρόσληψη είναι ωφέλιμη για τα οστά. Αναλυτικότερα, η μελέτη Framingham Original έδειξε μια συσχέτιση ανάμεσα στη χαμηλή πρωτεϊνική πρόσληψη και σε μεγαλύτερη οστική απώλεια και κατάγματα ισχίου σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Πρόσφατες έρευνες υποδηλώνουν ότι η επίδραση της πρωτεΐνης στην οστική υγεία μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την πρόσληψη ασβεστίου. Στη μελέτη Framingham Offspring, η πρωτεΐνη συσχετίστηκε θετικά με την οστική πυκνότητα αλλά μόνο σε γυναίκες με χαμηλές προσλήψεις ασβεστίου (<800 mg/d). Η συνολική πρωτεϊνική πρόσληψη δε συσχετίστηκε με τον κίνδυνο κατάγματος του ισχίου. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η μεγαλύτερη πρωτεϊνική πρόσληψη ωφελεί την οστική πυκνότητα (BMD) και προστατεύει ενάντια στον κίνδυνο κατάγματος ενήλικες με επαρκή πρόσληψη ασβεστίου. Άρα, η πρόσληψη ασβεστίου τροποποιεί τη συσχέτιση της διαιτητικής πρωτεΐνης με τις οστικές μετρήσεις. {Sahni, 2014}, {Weaver, 2016}

Μια συστηματική ανασκόπηση της διαιτητικής πρωτεΐνης, της οστικής πυκνότητας και του κινδύνου κατάγματος ανέφερε μια θετική συσχέτιση ανάμεσα στην πρωτεϊνική πρόσληψη και την οστική πυκνότητα και μια αντίστροφη συσχέτιση με του δείκτες οστικής επαναρρόφησης, ενώ, δε βρέθηκε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην πρωτεΐνη και τον κίνδυνο κατάγματος. Δεδομένα από τη μεγάλη, μακρόχρονη μελέτη WHI (Women's Health Initiative) σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έδειξαν ότι οι γυναίκες, που κατανάλωναν περισσότερη πρωτεΐνη είχαν υψηλότερη βασική τιμή οστικής πυκνότητας συνολικά, στο ισχίο αλλά και σε διάφορα σημεία της σπονδυλικής στήλης. Επίσης, οι γυναίκες, που κατανάλωναν μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεΐνης ήταν πιο πιθανό να διατηρήσουν την οστική τους πυκνότητα. Μία συστηματική ανασκόπηση, που περιλάμβανε 61 μελέτες ανέφερε ότι η ποσότητα της οστικής πυκνότητας, που μπορεί να αποδοθεί στην πρωτεΐνη είναι 1–2%. {Beasley, 2014}

Ίσως, όμως, αξίζει να αξιολογηθεί και η προέλευση των πρωτεϊνών, καθώς, από έρευνες βρέθηκε ότι οι φυτικής προέλευσης πρωτεΐνες συσχετίστηκαν με χαμηλότερη οστική πυκνότητα ισχίου στις γυναίκες, ενώ, οι πρωτεΐνες, που προέρχονταν από τα γαλακτοκομικά συσχετίστηκαν με υψηλότερη οστική πυκνότητα ισχίου, με παρόμοιες συσχετίσεις να παρατηρούνται και στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης. Μία πιθανή εξήγηση για αυτό το εύρημα είναι ότι οι γαλακτοκομικές πηγές πρωτεΐνης έχουν υψηλότερο περιεχόμενο σε ασβέστιο από τις μη γαλακτοκομικές πηγές όπως και βιταμίνη D, η οποία μπορεί κι εκείνη να συμβάλλει στην αύξηση της οστικής πυκνότητας. {Langsetmo, 2015} Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η επαρκής

διαιτητική πρόσληψη πρωτεΐνης είναι σημαντική για τη διατήρηση της μυϊκής μάζας κατά τη γήρανση, προστατεύοντας έτσι, από πτώσεις και κατάγματα πέρα από την άμεση επίδραση της στα οστά. {Tucker, 2014}



Σχήμα 8. Θετική επιρροή της πρωτεϊνικής πρόσληψης στα οστά και την υγεία των σκελετικών μυών σε ηλικιωμένους. Με τη γήρανση, η επίδραση της διαιτητικής πρωτεΐνης τόσο στον οστικό όσο και στο σκελετικό μυϊκό αναβολισμό παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της οστεοπόρωσης και της σαρκοπενίας. Η διαιτητική πρωτεΐνη με το ασβέστιο και τη βιταμίνη D συμβάλλουν στη μείωση τόσο της οστικής απώλειας, που οφείλεται στην ηλικία όσο και στην τάση για πτώση, μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τον κίνδυνο κατάγματος. {Bonjour, 2016}

2.10.2 Λιπαρά οξέα και οστά

Τα λιπαρά οξέα είναι σημαντικά από πολλές απόψεις για το μεταβολισμό και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Polyunsaturated fatty acids ή PUFAs) μπορεί να επηρεάζουν την οστική υγεία μέσα από διάφορους περίπλοκους μηχανισμούς συμπεριλαμβανομένων επιδράσεων σε φλεγμονώδεις κυτταροκίνες, ρύθμιση της παραγωγής της προσταγλανδίνης E2 και ενίσχυση της μεταφοράς και κατακράτησης ασβεστίου. Τα απαραίτητα λιπαρά οξέα ω-3 και ω-6 και τα παράγωγά τους, εμπλέκονται στη διαδικασία της διαφοροποίησης των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων σε λιποκύτταρα ή οστεοβλάστες. {Tucker, 2014}

Οι υπάρχουσες μελέτες σχετικά με τις προσλήψεις λιπαρών οξέων και τα κατάγματα έδειξαν αντιφατικά ευρήματα. Η συμπληρωματική χορήγηση ιχθυελαίων έδειξε να έχει προστατευτικό ρόλο σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, αλλά μια άλλη έρευνα σε γυναίκες δεν εντόπισε διαφορά στην επίδραση της χορήγησης ιχθυελαίων και ασβεστίου σε σύγκριση με τη

χορήγηση μόνο ασβεστίου για 12 μήνες. {Tucker, 2014} Αντίθετα, το κορεσμένο λίπος έχει φανεί ότι είναι καταστροφικό για τα οστά των ενηλίκων, πιθανώς, επειδή, ελαττώνει την απορρόφηση ασβεστίου από το έντερο, μειώνει τον οστικό σχηματισμό και ενισχύει την οστική επαναρρόφηση. {Mangano, 2015}

2.10.3 Βιταμίνη A και οστά

Μια αντίστροφη σχέση ανάμεσα στα καροτενοειδή και το λυκοπένιο με βιοχημικούς δείκτες οστικής αναδιαμόρφωσης έχει φανεί σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Ωστόσο, λίγες διαχρονικές μελέτες έχουν εξετάσει τη συσχέτιση ανάμεσα στα καροτενοειδή (εκτός από το β-καροτένιο) με την οστική απώλεια και τον κίνδυνο κατάγματος. Στη μελέτη Framingham Original, η πρόσληψη λυκοπενίου ήταν προστατευτική ενάντια στην απώλεια οστικής πυκνότητας, στην οσφυϊκή μοίρα της σπονδυλικής στήλης σε διάρκεια 4 ετών. Υπάρχουν αποτελέσματα, που δείχνουν τον προστατευτικό ρόλο αρκετών καροτενοειδών στην οστική πυκνότητα και τον κίνδυνο κατάγματος σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας, με πιο συνεπή ευρήματα να εμφανίζονται κατά την πρόσληψη λυκοπενίου. {Sahni, 2015}

2.10.4 Βιταμίνη B₁₂ και οστά

Η μελέτη Framingham υποστηρίζει ότι η βιταμίνη B₁₂ (ίσως όχι το φυλλικό οξύ) μπορεί να είναι ένας καθοριστικός παράγοντας στην οστική υγεία. Στη μελέτη Framingham Offspring συμμετέχοντες με συγκεντρώσεις βιταμίνης B₁₂ στο πλάσμα <148 pM είχαν σημαντικά χαμηλότερη οστική πυκνότητα σε σχέση με αυτούς με μεγαλύτερη συγκέντρωση πλάσματος βιταμίνης B₁₂. Στην ίδια μελέτη ούτε οι συγκεντρώσεις φυλλικού οξέος στο πλάσμα ούτε οι συγκεντρώσεις βιταμίνης B₁₂ στο πλάσμα δε συσχετίστηκαν με απώλεια οστικής πυκνότητας με την πάροδο του χρόνου. Μια μετα-ανάλυση 27 μελετών παρατήρησης ερεύνησε τη σχέση του φυλλικού οξέος και της βιταμίνης B₁₂ με την οστική υγεία και διαπίστωσε μια μείωση 4% στον κίνδυνο κατάγματος για κάθε 50 pM συγκέντρωση της βιταμίνης B₁₂. {Sahni, 2015}

2.10.5 Βιταμίνη C και οστά

Πολλές μελέτες έχουν ενοχοποιήσει το οξειδωτικό στρες στην παθογένεση της οστεοπόρωσης. Αντιοξειδωτικά όπως η βιταμίνη C καταστέλλουν τη δραστηριότητα των οστεοκλαστών μέσω της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Επιπροσθέτως, η βιταμίνη C δρα σα συμπαραγοντας στην προαγωγή της οστεοβλαστικής διαφοροποίησης, στο σχηματισμό

κολλαγόνου και στη σύνθεση της υδροξυπρολίνης και υδροξυλυσίνης. Για αυτό το λόγο, αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν εξετάσει τη συσχέτιση της βιταμίνης C με την οστική πυκνότητα (BMD) και τα κατάγματα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν μια περίπλοκη συσχέτιση, που εμπλέκει την αλληλεπίδραση της βιταμίνης C με διατροφικούς παράγοντες (πρόσληψη βιταμίνης E και ασβεστίου) και μη διατροφικούς παράγοντες (κάπνισμα, χρήση οιστρογόνων/ορμονική θεραπεία μετά την εμμηνόπαυση). {Sahni, 2015}

2.10.6 Βιταμίνη K και οστά

Η βιταμίνη K είναι ένας απαραίτητος παράγοντας για την καρβοξυλίωση της οστεοκαλσίνης, μιας πρωτεΐνης των οστών, που παίζει καθοριστικό ρόλο στην οστική επιμετάλλωση και τον οστικό σχηματισμό. {Weaver, 2016} Η υποκαρβοξυλίωση της οστεοκαλσίνης, ένας δείκτης της έλλειψης βιταμίνης K, συσχετίζεται αντίστροφα με την περιεκτικότητα των οστών σε ανόργανα στοιχεία (BMC) και συνεπώς, συμβάλλει στη σχετιζόμενη με την ηλικία οστική απώλεια και στα κατάγματα. {Sahni, 2015}

Αν και τα πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν μια διεγερτική επίδραση της βιταμίνης K στον οστικό σχηματισμό, η σχέση ανάμεσα στη διατροφική κατάσταση της βιταμίνης και την ανάπτυξη της Κορυφαίας Οστικής Μάζας και δύναμης στους ανθρώπους παραμένει ασαφής. {D'Amelio, 2012}, {Weaver, 2016}

2.10.7 Κάλιο και οστά

Το κάλιο προάγει τη νεφρική κατακράτηση ασβεστίου προστατεύοντας, έτσι, από την απώλεια ασβεστίου και πιθανώς τροποποιώντας τον οστικό μεταβολισμό. Αποτελέσματα από τις μελέτες Framingham έδειξαν ότι το κάλιο και το μαγνήσιο συσχετίστηκαν θετικά με την οστική υγεία. {Mangano, 2015}

2.10.8 Νάτριο και οστά

Δίαιτες υψηλές σε νάτριο έχει φανεί ότι τροποποιούν το μεταβολισμό του ασβεστίου και αυξάνουν την οστική επαναρρόφηση σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Αντίθετα, δίαιτες χαμηλές σε νάτριο φαίνεται ότι είναι προστατευτικές για την οστική υγεία βελτιώνοντας το ισοζύγιο ασβεστίου. Τα φωσφορικά άλατα νατρίου, που βρίσκονται σε επεξεργασμένα τρόφιμα και τυριά, έχει φανεί ότι αυξάνουν τα επίπεδα της παραθορμόνης του ορού, που επιδρούν αρνητικά στον οστικό μεταβολισμό. {Mangano, 2015}

2.10.9 Μαγνήσιο και οστά

Το μαγνήσιο ενισχύει την οστική υγεία και ρυθμίζει την ενεργή εντερική μεταφορά ασβεστίου. {Tucker, 2014} Η εξάντληση του μαγνησίου έχει συσχετιστεί με μειωμένη οστεοβλαστική και οστεοκλαστική δραστηριότητα, οστεοπενία, ευθραυστότητα, αντίσταση στη βιταμίνη D ή μείωση και αντίσταση στην παραθορμόνη. Στις γυναίκες, η χαμηλή πρόσληψη μαγνησίου έχει συσχετιστεί με πιο γρήγορη οστική απώλεια ή χαμηλότερη οστική πυκνότητα (BMD). Αν και η έλλειψη μαγνησίου έχει φανεί ότι είναι επιβλαβής για τη σκελετική υγεία, πρόσληψη ποσοτήτων μεγαλύτερων από τις Συνιστώμενες Διαιτητικές Προσλήψεις (Recommended Dietary Allowance ή RDA) μπορούν δυνητικά να θέσουν κινδύνους. {Orchard, 2014}

Δεδομένα από αρκετές μεγάλες μελέτες συμπεριλαμβανομένων των μελετών Health, Aging και Body Composition έδειξαν θετική συσχέτιση της συνολικής οστικής πυκνότητας με την πρόσληψη μαγνησίου σε λευκές γυναίκες, ενώ, συγχρονικά δεδομένα από τη μελέτη Framingham έδειξαν υψηλότερη οστική πυκνότητα στο ισχίο σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, που κατανάλωναν >2/3 του ισχύοντος RDA για το μαγνήσιο. Βάσει της προοπτικής μελέτης WHI σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, χαμηλότερες βασικές τιμές οστικής πυκνότητας του ισχίου και όλου του σώματος παρατηρήθηκαν σε συμμετέχοντες με χαμηλότερη ημερήσια πρόσληψη μαγνησίου. {Orchard, 2014} Επίσης, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι σε γυναίκες με οστεοπόρωση οι συγκεντρώσεις μαγνησίου του ορού είναι σημαντικά χαμηλότερες σε σχέση με αυτές με φυσιολογική οστική πυκνότητα (BMD). {Tucker, 2014} Ωστόσο, η χαμηλότερη πρόσληψη μαγνησίου δε συσχετίστηκε με μεγαλύτερο κίνδυνο συνολικών καταγμάτων ή ισχίου. {Orchard, 2014}

2.10.10 Χαλκός και οστά

Ο χαλκός είναι απαραίτητος για τη λειτουργία ενός ενζύμου, το οποίο αυξάνει τη διασύνδεση των μορίων κολλαγόνου και ελαστίνης, ενώ, πιθανόν είναι απαραίτητο και για τη λειτουργία άλλων ενζύμων στα οστικά κύτταρα. Δεδομένου ότι έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στις 2 πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας κατά τη χαμηλή πρόσληψη χαλκού, υπάρχει πιθανότητα η έλλειψη αυτού να προκαλεί ελάττωση της μεταλλοποίησης των οστών ιδιαίτερα στους ηλικιωμένους. {Mahan, 2014}

2.10.11 Σίδηρος και οστά

Ο σίδηρος λειτουργεί ως καταλυτικό συνένζυμο στις εξαρτώμενες υδροξυλιώσεις της προλίνης και της λυσίνης κατά τη διαδικασία ωρίμανσης του κολλαγόνου. Ο σίδηρος συμμετέχει, επίσης, στη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση στους οστεοβλάστες και στους οστεοκλάστες. {Mahan, 2014}

2.10.12 Φθόριο και οστά

Το φθόριο προάγει τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών, αυξάνει την αέρια οστική πυκνότητα (aBMD) στους ενήλικες και έχει χρησιμοποιηθεί σε θεραπευτική επιλογή για ασθενείς με οστεοπόρωση. {Weaver, 2016}

2.10.13 Σελήνιο και οστά

Η επαρκής πρόσληψη σεληνίου φαίνεται ότι διαδραματίζει έναν καθοριστικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση οστεοβλαστών/οστεοκλαστών με τη ρύθμιση της κατάστασης των ROS. Έχει αναφερθεί ότι η ανεπάρκεια σεληνίου μπορεί να καθυστερήσει την ανάπτυξη και να αλλάξει τον οστικό μεταβολισμό. Οι συγκεντρώσεις σεληνίου στο αίμα έχουν βρεθεί ότι συσχετίζονται αντίστροφα με το ρυθμό οστικής αναδιαμόρφωσης και έχουν συσχετιστεί θετικά με χαμηλή οστική πυκνότητα (BMD) στους ανθρώπους. Τουλάχιστον 9 σεληνοπρωτεΐνες είναι γνωστές ότι εκφράζονται σε ανθρώπινους εμβρυϊκούς οστεοβλάστες. Οι σεληνοπρωτεΐνες είναι αντιοξειδωτικά ένζυμα, που συμμετέχουν στη προστασία ενάντια στο οξειδωτικό στρες στο μικροπεριβάλλον των οστών, στη διατήρηση του κυτταρικού οξειδοαναγωγικού ισοζυγίου και στον πολλαπλασιασμό/διαφοροποίηση των οστικών κυττάρων. {Zeng, 2013}

2.10.14 Αναψυκτικά τύπου Cola και οστά

Στους ενήλικες, ο περιορισμένος αριθμός επιδημιολογικών μελετών για την κατανάλωση ανθρακούχων ροφημάτων και τη μακροχρόνια οστική υγεία δεν έχει επιτρέψει οποιαδήποτε συμπέρασμα. Παρ' όλα αυτά, αρκετοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την πιθανή συσχέτιση ανάμεσα στην κατανάλωση ανθρακικού και την οστική υγεία, κάποιιοι από τους οποίους περιλαμβάνουν τις επιδράσεις του στο ισοζύγιο ασβεστίου. Στη μακροχρόνια, προοπτική μελέτη Nurses' Health σε επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της πρόσληψης ανθρακικού, παρατηρήθηκε μια σημαντική αύξηση στον κίνδυνο κατάγματος του ισχίου κατά την αυξημένη πρόσληψη ανθρακικού

σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Ωστόσο, δεν εμφανίστηκαν αξιοσημείωτες διαφορές στους κινδύνους σε διαφορετικούς υποτύπους ανθρακούχων ροφημάτων. {Fung, 2014}

2.10.15 Αλκοόλ και οστά

Η χρόνια κατάχρηση αλκοόλ συσχετίζεται με χαμηλή οστική πυκνότητα και υψηλό κίνδυνο κατάγματος. Εντούτοις, μέτρια κατανάλωση αλκοόλ μπορεί να βοηθάει στη διατήρηση της οστικής πυκνότητας σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με την αύξηση των ενδογενών οιστρογόνων ή προωθώντας την έκκριση καλσιτονίνης. Γενικά, βρέθηκε ότι για την ίδια ποσότητα αλκοόλ, που καταναλώνεται ανά εβδομάδα υπάρχουν μεγαλύτερα οφέλη στα άτομα, που πίνουν λιγότερες ποσότητες αλλά πιο συχνά σε σχέση με αυτούς, που καταναλώνουν την ίδια ποσότητα μόνο σε 1-2 μέρες/εβδομάδα. {Mostofsky, 2016}, {Weaver, 2016}

2.10.16 Κάπνισμα και οστά

Έφηβοι, που καπνίζουν και συχνά συνεχίζουν το κάπνισμα στην ενήλικη ζωή, πιθανόν αυξάνουν τον κίνδυνο για οστεοπόρωση και κατάγματα στη μετέπειτα ζωή τους. {Weaver, 2016} Αν και η οστική πυκνότητα είναι χαμηλότερη στους καπνιστές από τους μη καπνιστές δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στους μη καπνιστές και πρώην καπνιστές. Παρομοίως, ο αυξημένος κίνδυνος για κατάγματα του ισχίου στους καπνιστές σε σύγκριση με μη καπνιστές ελαττώνεται αισθητά μετά από 10 χρόνια αποχής από τον καπνό. {Schürer, 2015}

2.11 Συσχέτιση εντερικού μικροβιόκοσμου και οστικού μεταβολισμού

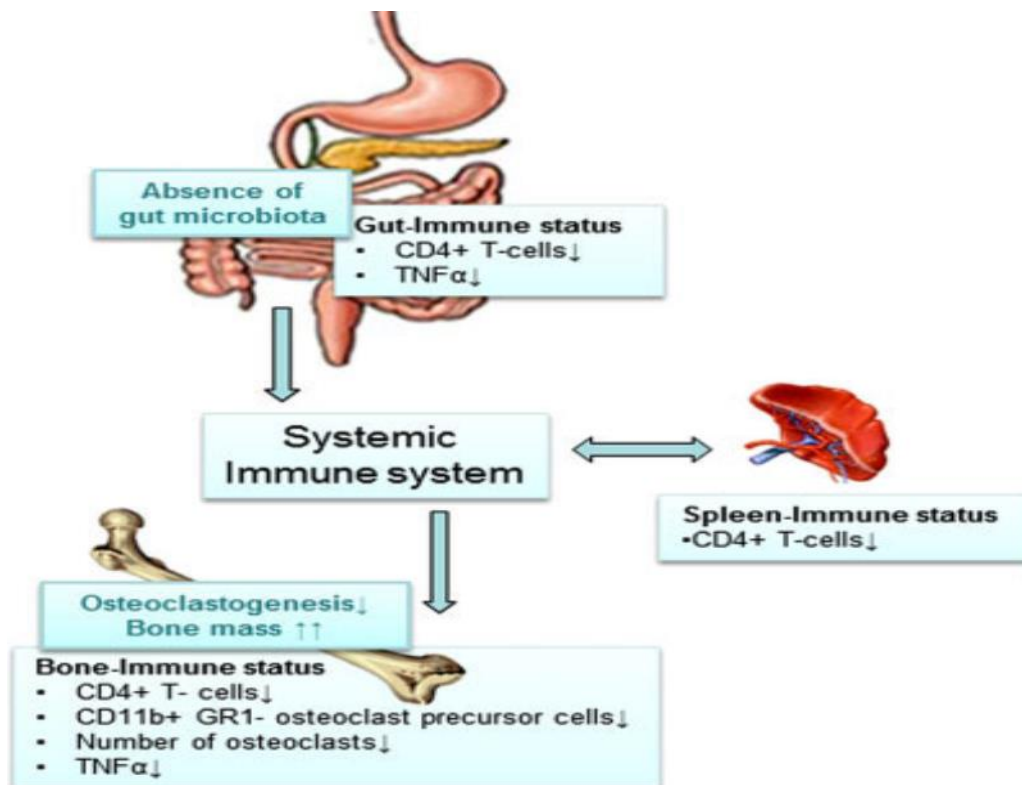
Αν και τα δεδομένα είναι περιορισμένα, αναφέρονται διάφοροι πιθανοί τρόποι με τους οποίους το μικροβίωμα μπορεί να επηρεάσει τον οστικό μεταβολισμό. Η απουσία άμεσης επαφής των οστικών κυττάρων με τα μικρόβια υποδηλώνουν ότι οι επιδράσεις πρέπει να μεσολαβούνται έμμεσα από κύτταρα ή διαλυτούς παράγοντες. {Charles, 2015} Αρκετές μελέτες, μάλιστα, αναφέρουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο ως ρυθμιστή της οστικής μάζας μέσω της μεσολάβησης του ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ. γένεση οστεοκλαστών), της εντερικής απορρόφησης ασβεστίου και της απελευθέρωσης νευροδιαβιβαστών (π.χ. σεροτονίνης). {Yano, 2015} Πιο συγκεκριμένα, η αλληλεπίδραση του μικροβιώματος με το σκελετικό σύστημα μπορεί να ομαδοποιηθεί σε 3 πιθανές κατηγορίες:

1) Στο ανοσοποιητικό σύστημα γνωστό και ως οστεοανοσολογία.

2) Στις ορμονικές οδούς (π.χ. στεροειδείς ορμόνες, παραθορμόνη-PTH και βιταμίνη D).

3) Στην παραγωγή βακτηριακών μεταβολιτών, που μπορούν να δώσουν σήματα στα οστικά κύτταρα. {Charles, 2015}

Παράλληλα, το μικροβίωμα μπορεί να έχει μεγάλη επίδραση στην απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και στην πρόσληψη θερμίδων με άμεσες ή έμμεσες επιδράσεις στον οστικό μεταβολισμό. Ο χρόνιος υποσιτισμός έχει δείξει ότι τροποποιεί το εντερικό μικροβίωμα και συσχετίζεται με μειωμένη οστική ανάπτυξη κατά την εφηβεία. {Hernandez, 2016}



Σχήμα 9. Προτεινόμενος μηχανισμός για τον τρόπο, που ρυθμίζει ο εντερικός μικροβιόκοσμος την οστική μάζα. Απουσία του εντερικού μικροβιώματος οδηγεί σε αυξημένη οστική μάζα σχετιζόμενη με μειωμένο αριθμό οστεοκλαστών ανά οστική επιφάνεια, μειωμένη συχνότητα CD4⁺ T κυττάρων και προγόνων των οστεοκλαστών στο μυελό των οστών και μειωμένη έκφραση της οστεολυτικής κυτταροκίνης TNF-α στα οστά. Προτείνεται ότι η αυξημένη οστική μάζα προκαλείται από λιγότερα CD4⁺ κύτταρα, που επανακυκλοφορούν στο αίμα και στο δευτερογενή λεμφοειδή ιστό, με αποτέλεσμα τη μειωμένη συχνότητα των CD4⁺ T κυττάρων στο μυελό των οστών, που σχετίζεται με μειωμένη έκφραση φλεγμονωδών κυτταροκινών και λιγότερη οστεοκλαστογένεση όταν απουσιάζει η εντερική μικροχλωρίδα. {Sjogren, 2012}

2.11.1 Επίδραση πρεβιοτικών στον οστικό μεταβολισμό

Πολυάριθμοι μηχανισμοί έχουν περιγραφεί για να εξηγήσουν τις πρεβιοτικές επιδράσεις στην οστική υγεία. Πρεβιοτικά όπως η ινουλίνη, η ολιγοφρουκτόζη, οι γλυκοολιγοσακχαρίτες και γαλακτοολιγοσακχαρίτες είναι τα πιο μελετημένα πρεβιοτικά σχετικά με τις επιδράσεις τους στα οστά και έχουν βρεθεί ότι διεγείρουν την απορρόφηση και κατακράτηση αρκετών ανόργανων μεταλλικών στοιχείων, κυρίως του μαγνησίου, του ασβεστίου και του σιδήρου με τα περισσότερα αποτελέσματα να προκύπτουν από πειράματα σε αρουραίους. {Charles, 2015}, {Scholz-Ahrens, 2001}

Οι ζυμώσεις των πρεβιοτικών στο παχύ έντερο από βακτήρια όπως τα bifidobacteria έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFAs) και την επακόλουθη μείωση του pH. Τα SCFAs πιστεύεται ότι μπορούν να επηρεάσουν την απορρόφηση ασβεστίου μέσω 2 μηχανισμών:

1) Τα SCFAs μπορούν να επηρεάσουν άμεσα το επιθήλιο και να ενισχύσουν την απορρόφηση ασβεστίου. Μπορεί, επίσης, να αυξηθεί η μεταφορά παρακυτταρικού ασβεστίου κάτω από αυτές τις συνθήκες και να ενισχυθεί η έκφραση της πρωτεΐνης δέσμησης του ασβεστίου.

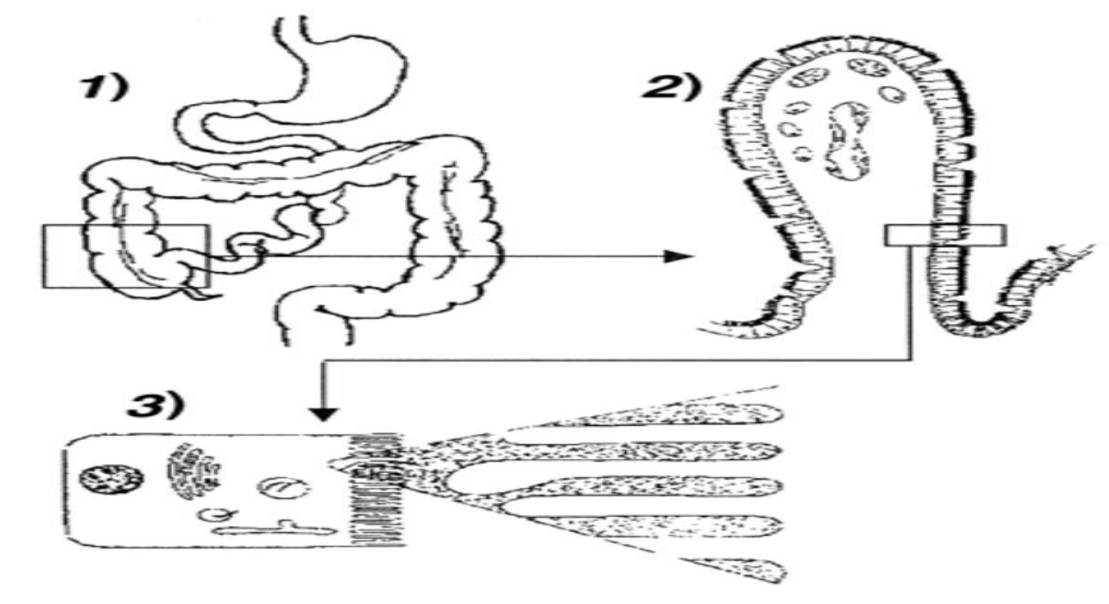
2) Το μειωμένο pH βοηθάει στην ενίσχυση της διαλυτότητας μεταλλικών στοιχείων καθιστώντας το ασβέστιο πιο απορροφήσιμο. Επίσης, το όξινο περιβάλλον, που προκαλείται από τα SCFAs, συσχετίζεται με τη δημιουργία εντεροκυττάρων και με τη βελτίωση της επιφάνειας της περιοχής του παχέος εντέρου κι άρα, με μεγαλύτερη ικανότητα απορρόφησης μεταλλικών στοιχείων. {Collins, 2016}

Επίσης, τα αρνητικά φορτισμένα SCFAs, είναι σε σύζευξη με ιόντα Ca^{2+} ενισχύοντας την παθητική διάχυσή τους μέσα από τη λιποειδική μεμβράνη των εντεροκυττάρων και προάγοντας την ικανότητά τους να δώσουν ένα πρωτόνιο, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανταλλαγή με το αυλικό ασβέστιο μέσα από το σύστημα $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$. {Collins, 2016}

Δεδομένου ότι τα επίπεδα των SCFAs, δε σχετίζονται με οστικά οφέλη, σε όλα τα σημεία του παχέος εντέρου, γίνεται αντιληπτό ότι το σημείο των πρεβιοτικών επιδράσεων ή των μεταβολιτών τους μπορεί, επίσης, να παίζει ρόλο στην οστική αποτελεσματικότητα. {McCabe, 2015} Μάλιστα, έχει φανεί ότι από τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου το βουτυρικό οξύ είναι η προτιμώμενη πηγή ενέργειας των βλεννογονικών κυττάρων του παχέος εντέρου οδηγώντας στο

συμπέρασμα ότι τα SCFAs ίσως λειτουργούν βελτιώνοντας την εντερική υγεία. {Weaver, 2015} Αυτές οι επιδράσεις περιορίζονται με την ηλικία εξαιτίας της μείωσης του αριθμού των bifidobacteria, ίσως λόγω της μειωμένης πρόσληψης ασβεστίου και μαγνησίου. Ωστόσο, φαντάζει δύσκολο ένα μόνο βακτηριακό γένος να παίζει τόσο ζωτικό ρόλο στη σκελετική δύναμη οπότε μάλλον η ερμηνεία του ρόλου των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου είναι πιο περίπλοκη. {Collins, 2016}

Σχήμα 10. Πιθανοί μηχανισμοί, που εμπλέκονται στη διέγερση της απορρόφησης ανόργανων μεταλλικών στοιχείων από μη διασπώμενους ολιγοσακχαρίτες:



1) Σε γαστρεντερικό επίπεδο: το μη διασπώμενο υπόστρωμα περνά μέσα από το λεπτό έντερο και φτάνει στο τυφλό και το παχύ έντερο, όπου λαμβάνει χώρα επιλεκτική ζύμωση από συγκεκριμένα μικρόβια. Ως εκ τούτου, ο αριθμός των κυρίαρχων bifidobacteria και η παραγωγή βραχείας αλύσου λιπαρών οξέων μειώνει το pH οδηγώντας σε αύξηση της διαλυτοποίησης των ανόργανων μεταλλικών στοιχείων.

2) Σε επίπεδο λαχνών: το ύψος των κρυπτών στις λάχνες, ο αριθμός των επιθηλιακών κυττάρων ανά κρύπτη, οι φλέβες στο τυφλό και η παθητική οδός μεταφοράς ασβεστίου αυξάνονται με τους μη διασπώμενους ολιγοσακχαρίτες.

3) Σε κυτταρικό επίπεδο: η έκφραση της καλβιδίνης διεγείρεται και έτσι, διεγείρεται και η οδός της ενεργούς μεταφοράς ασβεστίου. {Scholz-Ahrens, 2001}

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός είναι ότι τα SCFAs επηρεάζουν τη σηματοδότηση μονοπατιών, ρυθμίζοντας την απορρόφηση ανόργανων μεταλλικών στοιχείων ή τροποποιώντας τον εντερικό, κυτταρικό μεταβολισμό ή τον πολλαπλασιασμό. Αυτό υποδηλώνει ότι οι προκαλούμενες από ίνες αλλαγές στο μικροβίωμα, που ενισχύουν τη ζύμωση μπορεί να παράγουν

πιθανά σηματοδοτικά μόρια, με πιθανές επιδράσεις σε μακρινά σημεία, συμπεριλαμβανομένης της τροποποίησης της απορρόφησης ανόργανων μεταλλικών στοιχείων, που ενισχύουν την οστική μάζα. Μια εντελώς διαφορετική θεωρία για το ρόλο του εντερικού μικροβιώματος στα οστά είναι μέσω της τροποποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, καθώς είναι συστήματα, που βρίσκονται σε συνεχή επικοινωνία μεταξύ τους. {Weaver, 2015}

Αρκετά βακτήρια, που συσχετίζονται με την απορρόφηση ασβεστίου και την πρόσληψη SCFAs είναι γνωστοί ζυμωτές ινών συμπεριλαμβανομένων των γενών *Bacteroides* του φύλου *Bacteroidetes* και των *Butyricoccus*, *Oscillibacter* και *Dialister* του φύλου *Firmicutes*. {Weaver, 2015}

Παρά τον περιορισμένο αριθμό ερευνών σε ανθρώπους, σχετικά με την επίδραση των μη διασπώμενων ολιγοσακχαριτών στο μεταβολισμό των ανόργανων μεταλλικών στοιχείων, οι θετικές επιδράσεις της απορρόφησης ασβεστίου μοιάζουν να προκύπτουν κάτω από συνθήκες αυξημένων απαιτήσεων σε ασβέστιο (π.χ. εφηβεία, περίοδος μετά την εμμηνόπαυση). Η έκταση της επίδρασης φαίνεται ότι είναι συγκεκριμένη ανάλογα με τον τύπο του υδατάνθρακα και τη λαμβανόμενη δόση. {Charles, 2015}, {Scholz-Ahrens, 2001} Το εύρημα ότι τα SCFAs ρυθμίζουν την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και την εντερική διαπερατότητα έχει αναδείξει τη δυνατότητα της χρήσης των πρεβιοτικών για την ενίσχυση της απορρόφησης ασβεστίου και μαγνησίου από τον εντερικό αυλό, αυξάνοντας τελικά την αναγέννηση των οστών και προλαμβάνοντας την οστεοπόρωση. {Collins, 2016}

Στη μόνη έρευνα παρέμβασης επαρκούς διάρκειας για να εξεταστούν οι επιδράσεις στην αύξηση της περιεκτικότητας των οστών σε ανόργανα στοιχεία (BMC), ένας συνδυασμός βραχέων και μακράς αλύσου φρουκτοολιγοσακχαριτών έδειξε σημαντικό όφελος. {Weaver, 2016} Αντίστοιχα, μια τυχαιοποιημένη μελέτη παρέμβασης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (μέσος όρος ηλικίας 61 έτη) έδειξαν ότι η θεραπεία με βραχέας αλύσου FOS για 24 μήνες μείωσε τους δείκτες οστικής αναδιαμόρφωσης στον ορό και τα ούρα. {McCabe, 2015}

2.12 Φυσική δραστηριότητα και οστά

Μία από τις προτεινόμενες στρατηγικές, για τη μεγιστοποίηση της Κορυφαίας Οστικής Μάζας και για την ελαχιστοποίηση της οστικής απώλειας, με την πάροδο της ηλικίας, είναι η φυσική δραστηριότητα. Η πιο αποτελεσματική μέθοδος είναι αυτή της μεταφοράς του σωματικού βάρους μέσω διαφόρων δραστηριοτήτων. Ωστόσο, η αύξηση της δύναμης, της ευλυγισίας και της

ισορροπίας είναι, επίσης, καταλυτικές για την ελαχιστοποίηση των πτώσεων και του κινδύνου κατάγματος. Στην ουσία, η φυσική δραστηριότητα ρυθμίζει την οστική αναδιαμόρφωση μέσω του μηχανικού ερεθίσματος, που οδηγεί σε βελτιώσεις στη μεταλλοποίηση και την οστική γεωμετρία. {Menzel, 2015}

Πέρα από τη διατήρηση της οστικής δύναμης, ο κύριος στόχος της άσκησης είναι να αυξήσει τη μυϊκή μάζα και λειτουργία, όπως, επίσης, και η διατήρηση της καλής ισορροπίας και δύναμης, προκειμένου να προληφθούν οι πτώσεις. Συγκεκριμένα, οι ασκήσεις αντιστάσεων γίνονται όλο και πιο σημαντικές με την πάροδο της ηλικίας, με την άσκηση να φαίνεται ότι οδηγεί σε μέτριες αυξήσεις στην οστική πυκνότητα (BMD) της τάξης του 1–2 %. {Cavalli, 2016}

Ο όρος φυσική δραστηριότητα περιλαμβάνει οποιαδήποτε κίνηση του σώματος, που παράγεται από τη μυϊκή σύσπαση με αποτέλεσμα την κατανάλωση ενέργειας πάνω από το επίπεδο ηρεμίας. Η άσκηση είναι μια πιο περιοριστική έννοια, που καθορίζεται ως η σχεδιασμένη, οργανωμένη και επαναλαμβανόμενη φυσική δραστηριότητα, που στοχεύει στη διατήρηση και την ενίσχυση ενός ή περισσότερων συστατικών της φυσικής κατάστασης ή ενός συγκεκριμένου αποτελέσματος στην υγεία, όπως η οστική δύναμη. Στις τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές (RCTs) χρησιμοποιείται ελεγχόμενη άσκηση σαν παρέμβαση για τη βελτίωση της οστικής δύναμης, ενώ, οι περισσότερες από τις διαχρονικές μελέτες μετρούν τη φυσική δραστηριότητα, συμπεριλαμβανομένης της ενεργής μεταφοράς και δραστηριότητες της καθημερινής ζωής. {Weaver, 2016}

Η τακτική φυσική δραστηριότητα στους νέους προάγει την οστική υγεία κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και της εφηβείας. Στη συνιστώμενη φυσική δραστηριότητα (≥ 60 λεπτά/ημέρα), τα παιδιά και οι έφηβοι πρέπει να συμπεριλαμβάνουν ασκήσεις ενδυνάμωσης των οστών τουλάχιστον 3 φορές/εβδομάδα. Εντούτοις, ο αριθμός των νέων, που ακολουθούν τις συστάσεις μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας και ελαττώνεται απότομα στην πρώιμη εφηβεία, μια περίοδο, όπου τα οστά φαίνεται ότι έχουν μεγαλύτερη ανταπόκριση στη φυσική δραστηριότητα. Επιπλέον, κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και της εφηβείας, τα κορίτσια είναι λιγότερο δραστήρια από τα αγόρια χάνοντας, έτσι, την ευκαιρία να βελτιώσουν την οστική τους υγεία. Δυστυχώς, οι καθημερινές ευκαιρίες για μη οργανωμένη φυσική δραστηριότητα έχουν μειωθεί τόσο για τα παιδιά όσο και για τους ενήλικες λόγω της αυξημένης εξάρτησης από τη μη ενεργητική μετακίνηση, της αυτοματοποίησης των δραστηριοτήτων της καθημερινής ζωής και των περισσότερων ευκαιριών για καθιστική ζωή. Επίσης, διαφορές στις ευκαιρίες για φυσική

δραστηριότητα παρουσιάζονται ανάλογα με τα φυλετικά, εθνικά, κοινωνικά και οικονομικά χαρακτηριστικά. {Weaver, 2016}

Αν και η θετική επίδραση της τακτικής φυσικής δραστηριότητας στα οστά έχει επιβεβαιωθεί από έρευνες εδώ και χρόνια, προσφάτως, ξεκίνησε η ποσοτικοποίηση των διαστάσεων, δόσεων και του χρονοδιαγράμματος της φυσικής δραστηριότητας, που χρειάζεται για την απόκτηση της μέγιστης οστικής δύναμης. Σε πολλές σχετιζόμενες με τη φυσική δραστηριότητα τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές (RCTs), χρησιμοποιείται το άλμα σαν κυρίαρχος τύπος άσκησης, επειδή, απαιτεί μεγάλη κινητική δεξιότητα, που επιφορτίζει μηχανικά το κλινικά σημαντικό σημείο του ισχίου τόσο κατά τη διάρκεια της απογείωσης όσο και στην προσγείωση. {Weaver, 2016}

Στην έρευνα EPIC-Potsdam τα ευρήματα σε προεμμηνορρυσιακές και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες υποδηλώνουν ότι οι γυναίκες νεαρής ηλικίας πρέπει να παραμένουν δραστήριες για να αυξάνουν την οστική τους μάζα, ενώ σε μεγαλύτερη ηλικία για να διατηρούν την οστική τους μάζα. {Menzel, 2015} Δεδομένου ότι διαφορετικοί τύποι άσκησης επιφέρουν διαφορετικά οφέλη για την υγεία, καθίσταται απαραίτητη η προώθηση δραστηριοτήτων, που ενσωματώνουν πολλαπλές κινητικές δεξιότητες (π.χ. ποδόσφαιρο, τέννις) ή προωθούν ποικίλα μοτίβα φυσικής δραστηριότητας. {Weaver, 2016}

ΚΕΦ. 3: Μύκητες

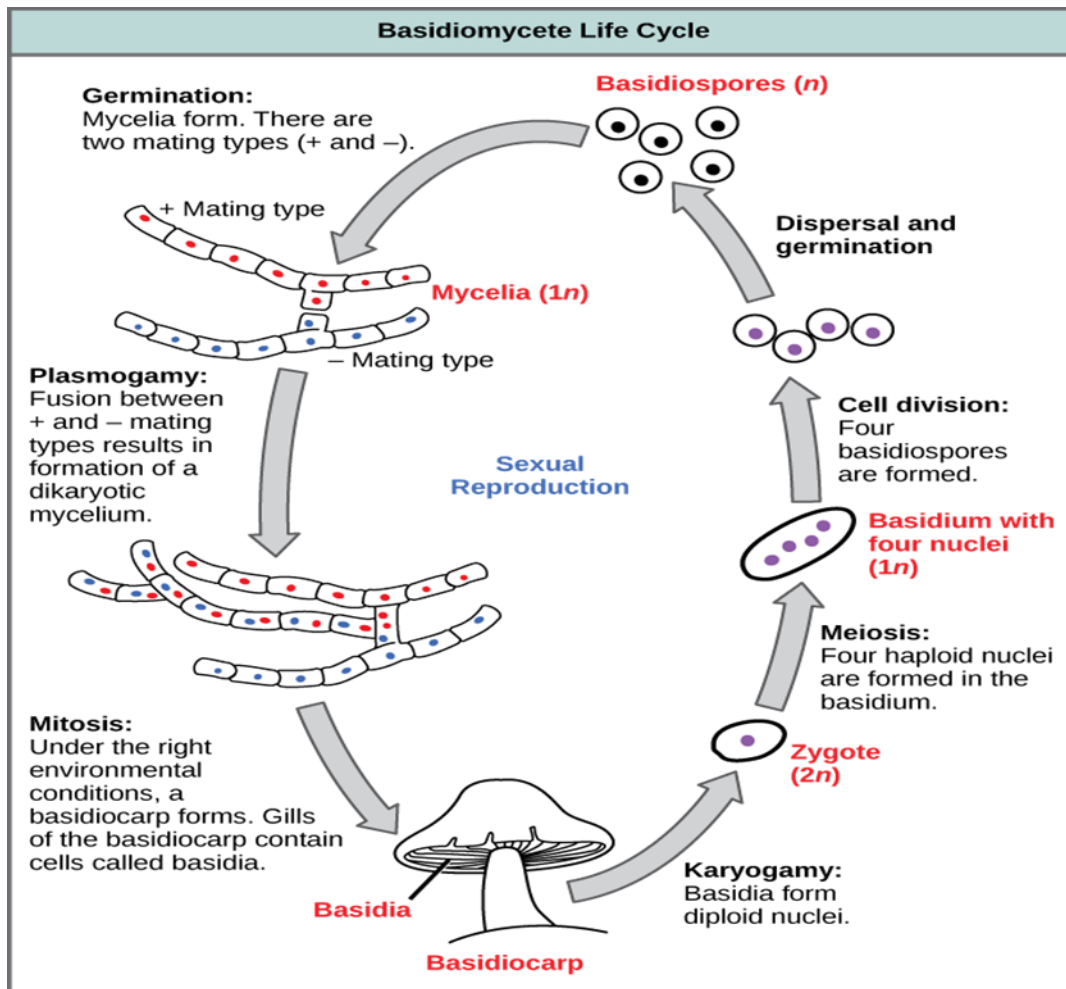
Οι μύκητες αποτελούν ευκαρυωτικούς, ετερότροφους μικροοργανισμούς. Διαβιούν είτε ως παρασιτικοί (βιοτροφικοί) ή ως συμβιωτικοί είτε ως σαπροτροφικοί οργανισμοί. {Madigan, 2014}

Οι μύκητες εμφανίζουν ένα συμπαγές κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο αποτελείται κυρίως από β-γλυκάνες και χιτίνη, ενώ οι περισσότεροι στερούνται οργανιδίων κίνησης. Τέλος, μπορούν να είναι τόσο μονοκύτταροι οργανισμοί (ζύμες) και να αναπαράγονται με εκβλάστηση ή διαίρεση όσο και πολυκύτταροι και να αναπαράγονται αγενώς και εγγενώς κυρίως με τη βοήθεια των σπορίων. {Ζερβάκης, 2014}

Οι οργανισμοί αυτοί είναι πολύ σημαντικοί για τον άνθρωπο είτε ως ωφέλιμοι είτε ως επιβλαβείς. Παίζουν σημαντικό ρόλο στην αποικοδόμηση της οργανικής ύλης σε απλούστερες οργανικές και ανόργανες ενώσεις. Οι μύκητες, επίσης, αποτελούν το σημαντικότερο παράγοντα ασθενειών των φυτών, καθώς και πολλών ασθενειών των ζώων και του ανθρώπου. Τέλος, είναι απαραίτητοι στη βιομηχανία σε διάφορες λειτουργίες, που σχετίζονται με ζυμώσεις, στην παραγωγή διαφόρων τυριών και διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών. {Madigan, 2014}

3.1 Βασιδιομύκητες

Οι βασιδιομύκητες αποτελούν μεγάλο μέρος των καταγεγραμμένων μυκήτων και σχηματίζουν τα εδώδιμαμανιτάρια, ενώ αποτελούν και παθογόνα φυτών και ζώων κ.ά. Οι βασιδιομύκητες είναι συνήθως σαπροτροφικοί και αποικοδομούν κυρίως κυτταρίνη και λιγνίνη. Ωστόσο, υπάρχουν και είδη, που δρουν ως συμβιωτικά, ως ενδόφυτα (π.χ. λειχήνες), παράσιτα και ως παθογόνα ζώων και ανθρώπων. {Rytioja, 2014}



Σχήμα 11. Ο κύκλος της ζωής του βασιδιομύκητα εναλλάσσει τη γενιά με ένα παρατεταμένο στάδιο, στο οποίο δύο πυρήνες (δικάρυο) είναι παρόντες στην υφή.

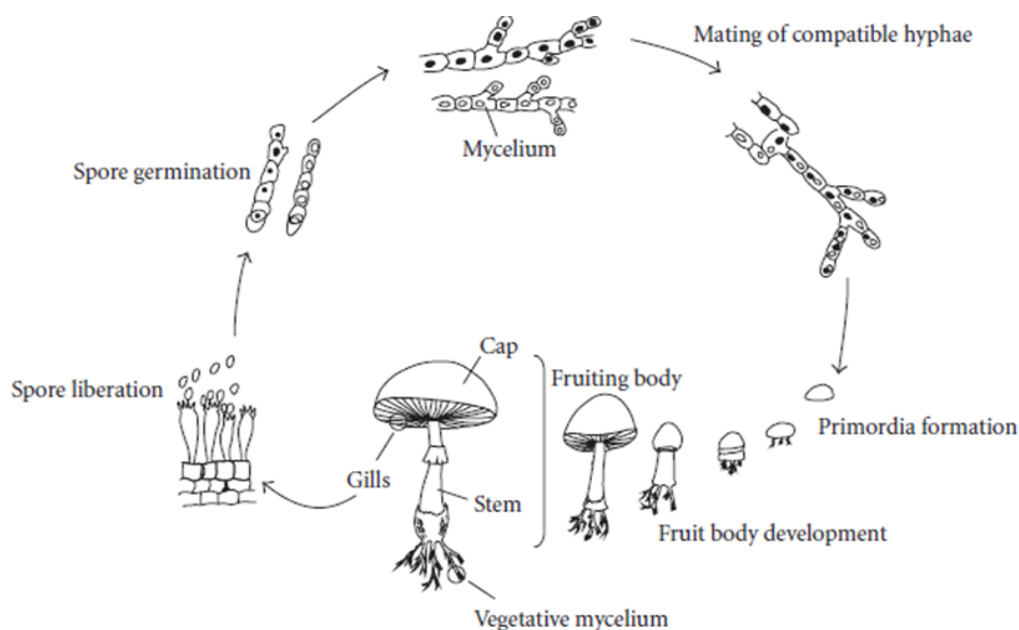
3.2 Μανιτάρια

Ο αριθμός των διαφορετικών ειδών μανιταριών στη Γη εκτιμάται ότι φτάνει τις 140.000, από τα οποία ίσως μόνο ένα 10% είναι γνωστά. Εν τω μεταξύ, από αυτά τα περίπου 14.000 είδη, που είναι γνωστά, το 50% θεωρείται ότι είναι σε ποικίλους βαθμούς βρώσιμο, με πάνω από 2.000 να είναι ασφαλή και περίπου 700 είδη να είναι γνωστό ότι έχουν σημαντικές φαρμακολογικές ιδιότητες. {Lull, 2005}

3.2.1 Γενικά

Τα μανιτάρια είναι βασιδιομύκητες, που σχηματίζουν μεγάλα καρποσώματα (το εδώδιμο μέρος του μανιταριού). Οι μύκητες μανιτάρια ζουν το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους υπό τη μορφή απλού μυκηλίου, στο έδαφος, στα φύλλα ή σε κορμούς δέντρων σε αποσύνθεση. Όταν οι

συνθήκες του περιβάλλοντος γίνουν ευνοϊκές, συνήθως, μετά από περιόδους υγρών και ψυχρών καιρικών συνθηκών, αναπτύσσονται τα καρποσώματα. Τα φυλικά σπόρια των μανιταριών λέγονται βασιδιοσπόρια και σχηματίζονται στο κάτω μέρος των καρποσωμάτων, πάνω σε επίπεδα πλαίσια, που ονομάζονται ελάσματα. Τα ελάσματα αυτά στηρίζονται στον πόλο του μανιταριού. Τα βασιδιοσπόρια των μανιταριών διασκορπίζονται με τη βοήθεια του ανέμου και καταλήγουν σε ένα υγρό και πλούσιο σε οργανικές ουσίες έδαφος, από όπου αρχίζουν ένα νέο κύκλο ζωής. {Madigan, 2014}



Σχήμα 12. Διαγραμματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής των μανιταριών. {Lull, 2005}

3.2.2 Διατροφικά χαρακτηριστικά

Το μεγαλύτερο μέρος της σύστασης των μανιταριών καταλαμβάνει το νερό περίπου (90%), ενώ, από την ξηρά ουσία η πρωτεΐνη καταλαμβάνει ένα 10%–40%, οι υδατάνθρακες 3%–28, το λίπος 2%–8%, οι ίνες 3%–32% και η στάχτη (το ποσοστό της στάχτης είναι το κλάσμα της ξηράς ουσίας, που μένει μετά την αποτέφρωση της οργανικής ύλης στο δείγμα και αποτελείται κυρίως από άλατα, μέταλλα κλπ) είναι 8%–10%. {Lull, 2005} Φαίνεται, λοιπόν, ότι τα μανιτάρια περιέχουν χαμηλά επίπεδα λίπους και χαμηλό ενεργειακό περιεχόμενο αν και περιέχουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών και απαραίτητων αμινοξέων. Διάφορα λειτουργικά συστατικά έχουν βρεθεί στα μανιτάρια συμπεριλαμβανομένων των φαινολικών ενώσεων, των στερολών, των τερπενίων και των κηραμιδίων. Ανάμεσα σε αυτά, οι πολυσακχαρίτες (συγκεκριμένα οι β-D-γλυκάνες) αναγνωρίζονται ως μία από τις κύριες ομάδες συστατικών στα μανιτάρια, που ευθύνονται για

μεγάλο εύρος επιδράσεων στην υγεία. {Villares, 2012} Επιπλέον, είναι γνωστό ότι και τα εκχυλίσματα των μανιταριών μπορεί να έχουν επιδράσεις ευεργετικές για την υγεία όπως ανοσορρυθμιστικές και αντικαρκινικές. {Lull, 2005}

3.2.3 Φαρμακευτικές ιδιότητες

Στην ιατρική πράξη έχει βρεθεί ότι τα μανιτάρια μπορούν να έχουν πολλαπλές εφαρμογές σε ποικίλα ιατρικά θέματα, καθώς, διαθέτουν πλήθος ιατρικών ιδιοτήτων. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι ανοσορρυθμιστικές, οι αντιοξειδωτικές, οι αντικαρκινικές, οι καρδιαγγειακές, οι αντιβακτηριακές, οι αντιπαρασιτικές, οι ηπατοπροστατευτικές, οι αντιδιαβητικές, οι αντιυπερχοληστεραιμικές και οι αντιϊκές ιδιότητες. Τα περισσότερα, εάν όχι όλα, τα μανιτάρια, που ανήκουν στους ανώτερους βασιδιομύκητες περιέχουν βιολογικά ενεργά συστατικά στα καρποσώματά τους, στο καλλιεργούμενο μυκήλιο και στο καλλιεργητικό μέσο. Μάλιστα, οι πολυσακχαρίτες των μανιταριών αποτρέπουν την ογκογένεση, επιδεικνύουν άμεση αντικαρκινική δραστηριότητα ενάντια σε ποικίλους συνεργιστικούς όγκους και αποτρέπουν τη μετάσταση των όγκων. Η δραστηριότητά τους είναι ιδιαίτερα ωφέλιμη όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία. {Fan, 2006}, {Wasser, 2014}

3.3 *Pleurotus ostreatus*

Το μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* είναι ένα από τα πιο ευρέως καλλιεργήσιμα, εδώδιμα μανιτάρια. {Jedinak, 2008} Το όνομά του προκύπτει από την ελληνική λέξη «πλευρωτός» λόγω του χαρακτηριστικού σχήματος και του τρόπου, που αναπτύσσεται η καρποφορία του πάνω στα φυσικά ξυλώδη υποστρώματα. {Ζερβάκης, 2014} Τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* είναι διανεμημένα σε διάφορες περιοχές ανά την υφήλιο από εύκρατες έως τροπικές και αναπτύσσονται σαπροτροφικά σε ένα εύρος θερμοκρασίας από 12-32 °C. {Patel, 2012}

3.3.1 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα είδη του *Pleurotus* όπως και το *Pleurotus ostreatus* ανήκουν ταξινομικά στο φύλο των Βασιδιομυκήτων και παράγουν μανιτάρια (βασιδιοκάρπια) σε σχήμα στρείδιού για αυτό και η κοινή τους ονομασία είναι μανιτάρι «στρείδι» (Oyster Mushroom). {Patel, 2012} Ωστόσο, φυσιολογικά-λειτουργικά ανήκουν στο τεχνητό άθροισμα των μυκήτων «λευκής σήψης». {Ζερβάκης, 2014}

Το χρώμα του μυκηλίου τους κυμαίνεται από λευκό έως καστανό, εμφανίζει ρυθμική ανάπτυξη σε ομόκεντρους κύκλους και είναι συνήθως δικάρυο. Ο πύλος τους είναι είτε μεμβρανώδης ή σαρκώδης και το μέγεθός του κυμαίνεται από 2-20 cm. Όσον αφορά, τα βασιδιοσπόρια έχουν κυλινδρικό ή ελλειψοειδές σχήμα με λεπτά και λεία τοιχώματα. {Ζερβάκης, 2014}



Σχήμα 13. *P. ostreatus* αναπτύσσεται σε ξύλο, που αποσυντίθεται. {Sullivan, 2006}

3.3.2 Διατροφική αξία

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η διατροφική αξία των μανιταριών είναι μεγάλη λόγω της σύστασής τους σε θρεπτικά συστατικά και του χαμηλού ενεργειακού τους περιεχομένου. Ωστόσο, η περιεκτικότητα κάθε μανιταριού σε διάφορα συστατικά εξαρτάται άμεσα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, το στάδιο ωριμότητάς του αλλά και από το υπόστρωμα ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, οι υδατάνθρακες αποτελούν το βασικό συστατικό του *Pleurotus*, με την περιεκτικότητά τους να κυμαίνεται από 46,6% έως 81,8% σε ξηρό βάρος και να απαρτίζονται κυρίως από εξόζες και πεντόζες. Αντίστοιχα, το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του *Pleurotus ostreatus* υπολογίζεται γύρω στο 10,5% και τα λιπαρά, που έχουν προσδιοριστεί αντιστοιχούν στο 1,6% του ξηρού βάρους του. Επίσης, καταλυτικό ρόλο διαδραματίζει το γεγονός ότι τα καρποσώματα του *P.*

ostreatus περιέχουν σημαντικές ποσότητες β-γλυκανών, που είναι συστατικά τόσο των αδιάλυτων αλλά και των διαλυτών διαιτητικών ινών. {Synytsya, 2009}, {Villares, 2012}

3.3.3 Φαρμακευτικές ιδιότητες

Αρκετές ιδιότητες έχουν συσχετιστεί με το *Pleurotus ostreatus*, συμπεριλαμβανομένων αντικαρκινικών, αντιχοληστερολαιμικών, αντιαθηρογενικών και αντιοξειδωτικών δραστηριοτήτων. {Jedinak, 2008} Επίσης, για το *Pleurotus* υπάρχουν αποδείξεις ότι καταπολεμά απλά και σύνθετα στελέχη, ανθεκτικά στα φάρμακα, που έχουν απομονωθεί από τους *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *S.aureus* και είδη των *Candida*, *Streptococcus* και *Enterococcus*. Το μανιτάρι *Pleurotus* περιέχει ουσίες, που διεγείρουν άμεσες ή έμμεσες αντιϊκές επιδράσεις σαν αποτέλεσμα της ανοσοδιεγερτικής δραστηριότητας. Πλευράνες απομονωμένες από τα καρποσώματα του *Pleurotus* διαθέτουν αντιφλεγμονώδεις δράσεις. Πολυσακχαροπεπτίδια εκχυλισμένα από τα καρποσώματα του *Pleurotus ostreatus* έχουν ανακουφιστικές επιδράσεις στη φλεγμονή, τη στεάτωση, τη νέκρωση και την ίνωση ειδικά σε θεραπευτικό σχήμα. {Patel, 2012}

3.4 Ινουλίνη

Η ινουλίνη είναι ένας μη πεπτώμενος ολιγοσακχαρίτης, που ταξινομείται ως διαιτητική ίνα. Η ινουλίνη συνήθως θεωρείται πρεβιοτικό αναφοράς για τον έλεγχο νέων πιθανών πρεβιοτικών. Εμφανίζει, δηλαδή, αντίσταση στη γαστρική οξύτητα, στην υδρόλυση από θηλασικά και στη γαστρική απορρόφηση, ενώ ζυμώνεται από το εντερικό μικροβίωμα και προκαλεί την επιλεκτική διέγερση και δραστηριότητα των εντερικών βακτηρίων, που συσχετίζονται με υγεία και ευεξία. {Roberfroid, 2007} Η ινουλίνη και τα παράγωγά της χρησιμοποιούνται ευρέως στις βιομηχανίες τροφίμων και στις φαρμακευτικές. {Shang, 2018}

Η ινουλίνη είναι ένας τύπος φρουκτόζης, που εκχυλίζεται κυρίως από όργανα φυτών όπως είναι οι κόνδυλοι της ντάλιας και οι ρίζες από *elecampane*, *chicory* και *Jerusalem artichoke*. Η ινουλίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης, ένα γραμμικό πολυμερές με παράγωγα D-φρουκτόζης συνδεδεμένα με β-(2→1) γλυκοσιδικούς δεσμούς. Εξαιτίας των τύπων των γλυκοσιδικών δεσμών, η ινουλίνη δεν μπορεί να υποστεί πέψη από τα πεπτικά ένζυμα των μονογαστρικών ζώων. {Shang, 2018} Πρακτικά η ινουλίνη περιλαμβάνει όλα τα γραμμικά μόρια τα οποία εμφανίζουν β-(2→1) δεσμούς, διαφορετικού μήκους. Εναλλακτικά, χρησιμοποιούνται οι όροι ολιγοφρουκτόζη και φρουκτοολιγοσακχαρίτες, που αποτελούν μείγμα ολιγομερών ινουλίνης. {Roberfroid, 2007}

3.5 β-γλυκάνες

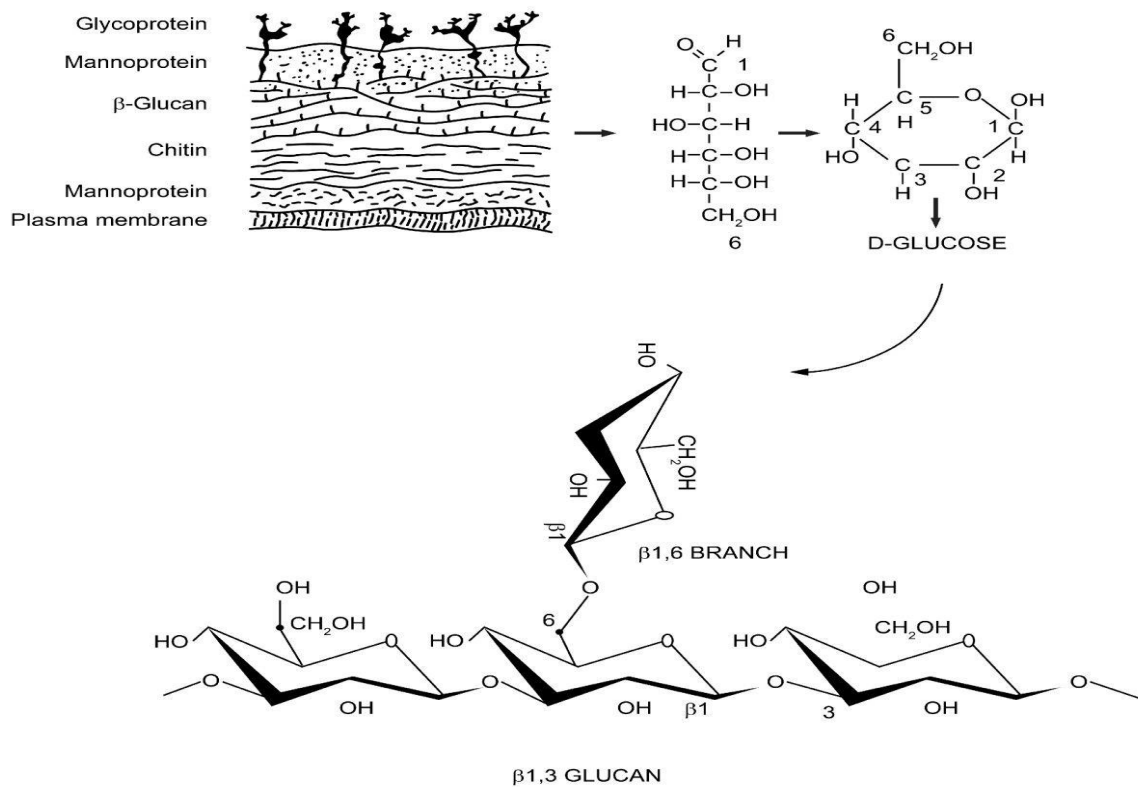
Όπως αναφέρθηκε ως πρεβιοτικά ορίζονται τα επιλεκτικά ζυμώσιμα συστατικά των τροφίμων, που διεγείρουν αλλαγές στη σύνθεση και τη δραστηριότητα του μικροβιόκοσμου της γαστρεντερικής οδού, επιφέροντας οφέλη στη διατροφή και την υγεία του ξενιστή. Σε αυτά τα συστατικά συμπεριλαμβάνονται και οι πολυσακχαρίτες των μανιταριών, οι περισσότεροι από τους οποίους είναι πολυμερή β-γλυκανών, με την κύρια αλυσίδα να αποτελείται από δεσμούς β-(1→3) και κάποιες διακλαδώσεις β-(1→6) όπως, επίσης και χιτίνη, γαλακτάνες και ξυλάνες. Τα πεπτικά ένζυμα, που εκκρίνονται από το πάγκρεας δεν μπορούν να υδρολύσουν το β-γλυκοσιδικό δεσμό, που σημαίνει ότι οι μη πεπτώμενοι υδατάνθρακες των μανιταριών μπορούν να δράσουν ως πρεβιοτικά στη γαστρεντερική οδό. {Friedman, 2016}

Οι πολυσακχαρίτες έχουν μεγάλη δομική ποικιλοότητα και γι' αυτό το λόγο, εμφανίζουν και ποικιλοότητα στη βιολογική τους δράση. {Sullivan, 2006} Οι γλυκάνες συνήθως προσδένονται στις πρωτεΐνες ή στη χιτίνη και είναι συνήθως αδιάλυτες στο νερό. Η κύρια πηγή βιολογικά ενεργών πολυσακχαριτών φαίνεται ότι είναι τα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων, που αποτελούνται κυρίως από σύμπλοκα χιτίνης-γλυκάνης. {Synytsya, 2009}

Εκτενέστερα, όλες οι β-γλυκάνες συνδέονται μεταξύ τους με μία 1→3 γραμμική β-γλυκοσιδική αλυσίδα και διαφέρουν η μία από την άλλη λόγω του μήκους τους και των διακλαδώσεών τους. Οι διακλαδώσεις προέρχονται από τη βασική γλυκοσιδική αλυσίδα με τις 2 κύριες ομάδες διακλάδωσης να είναι η 1→4 ή η 1→6 γλυκοσιδική αλυσίδα. Ωστόσο, στους μύκητες εμφανίζονται 1→6 πλευρικές διακλαδώσεις, ενώ, στα βακτήρια 1→4. {Chan, 2009} Ακόμα, με βάση τη δομή τους διακρίνονται σε ομογλυκάνες (μόνο μόρια γλυκόζης) ή ετερογλυκάνες (κι άλλα μόρια εκτός από γλυκόζη). {Vannucci, 2013}

Οι β-γλυκάνες φαίνεται ότι μπορούν να επιδράσουν θετικά όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου. Ειδικότερα, τα μανιτάρια και οι πολυσακχαρίτες, που προέρχονται από τα μανιτάρια έχει φανεί ότι εμφανίζουν θεραπευτικές ιδιότητες ως προς το μεταβολικό σύνδρομο. {Friedman, 2016} Επιπροσθέτως, έχει φανεί ότι οι β-D-γλυκάνες αυξάνουν την αντίσταση των θηλαστικών ενάντια σε αρκετά παθογόνα βακτηρίων, ιών, πρωτόζωων και μυκήτων. Πολλές έρευνες έχουν αναφέρει την ικανότητα των (1→3)-β-D-γλυκανών να ενεργοποιούν την έμφυτη ανοσία με επιδράσεις στην προσαρμοστική ανοσία, διεγείροντας χυμικές και κυτταρομεσολαβούμενες αποκρίσεις. Οι (1→3)-β-D-γλυκάνες βρέθηκε ότι αυξάνουν την αντιμικροβιακή δραστηριότητα των

μονοκύτταρων και ουδετερόφιλων και ενισχύουν τη λειτουργική δραστηριότητα των μακροφάγων. {Vannucci, 2013} Επίσης, εμφανίζουν αντικαρκινική δράση, τα επίπεδα της οποίας σχετίζονται με το μοριακό βάρος, τις διακλαδώσεις και τη διαλυτότητα στο νερό των β-γλυκανών. {Chan, 2009}



Σχήμα 14. Οι β-γλυκάνες είναι συστατικά-«κλειδιά» του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων. Η βασική υπομονάδα της β-γλυκάνης των μυκήτων είναι η β-D-γλυκόζη συνδεδεμένη με 1→3 γλυκοσιδική αλυσίδα και με 1→6 γλυκοσιδικές διακλαδώσεις. Το μήκος των αλυσίδων των β-γλυκανών από διάφορους μύκητες ποικίλει σε μεγάλο βαθμό. {Chan, 2009}

ΚΕΦ. 4: ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1. Σκοπός της εργασίας

Η συγκεκριμένη εργασία στόχευσε στη μελέτη της επίδρασης των προϊόντων ζύμωσης του *Pleurotus ostreatus* τόσο ολόκληρου του μανιταριού όσο και των πλούσιων σε β-γλυκάνες εκχυλισμάτων του από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών γυναικών, σε καλλιέργειες οστεοβλαστικών κυττάρων, προκειμένου να προσομοιάσει *in vitro* την πιθανή πρεβιοτική δράση του μανιταριού.

4.2. Υλικά και μέθοδοι

4.2.1 Χαρακτηριστικά εθελοντριών-Αξιολόγηση

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν ως εθελόντριες γυναίκες ηλικίας από 55 έως 65 ετών ($\pm$ 3 έτη), που βρίσκονταν στην εμμηνόπαυση, είχαν φυσιολογικό βάρος ($BMI < 30 \text{ kg/m}^2$), δεν είχαν λάβει αντιβίωση τους τελευταίους 2 μήνες πριν την έναρξη της μελέτης και δε βρίσκονταν σε διαδικασία απώλειας σωματικού βάρους. Το κάπνισμα δεν αποτελούσε κριτήριο αποκλεισμού από την έρευνα. Γυναίκες, που λάμβαναν συμπληρώματα διατροφής, που σχετίζονται με το μεταβολισμό των οστών (συμπλήρωμα ασβεστίου, βιταμίνης D και μουρουνέλαιο) έπρεπε να διακόψουν τη χρήση των συμπληρωμάτων 6 μήνες πριν τη λήψη των δειγμάτων. Αντίστοιχα, γυναίκες, που λάμβαναν συμπληρώματα διατροφής σχετιζόμενα με την εντερική λειτουργία (προβιοτικά, πρεβιοτικά, φυτικές ίνες) κλήθηκαν να διακόψουν τη χρήση των συμπληρωμάτων αυτών 2 εβδομάδες πριν τη λήψη των δειγμάτων. Από τη μελέτη αποκλείστηκαν γυναίκες, που πάσχουν από Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσους του Εντέρου (Νόσος Crohn, Ελκώδης Κολίτιδα), Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου αλλά και γυναίκες, που εμφανίζουν οποιοδήποτε είδος διάρροιας ή δυσκοιλιότητας, όπως επίσης, άτομα, που πάσχουν από αυτοάνοσα νοσήματα, γυναίκες, που υποφέρουν από σοβαρές ηπατικές ή νεφρικές παθήσεις, καρκινοπαθείς, άτομα με στεφανιαία νόσο και γυναίκες, που εμφανίζουν διαταραχές στη λειτουργία του θυρεοειδή (υποθυρεοειδισμός, υπερθυρεοειδισμός κλπ). Στην παρούσα έρευνα δε συμπεριλήφθηκαν άτομα, που εμφάνιζαν ακραίες διατροφικές συμπεριφορές (π.χ. χορτοφαγία). Οι γυναίκες, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είχαν είτε φυσιολογική οστική υγεία είτε ήταν οστεοπενικές. Γυναίκες με οστεοπόρωση δε χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη έρευνα.

4.2.2 Ανθρωπομετρικές μετρήσεις- Διατροφική αξιολόγηση

Κατά την έναρξη της μελέτης δόθηκαν σαφείς οδηγίες στις εθελόντριες, ώστε να διατηρήσουν τις διατροφικές τους συνήθειες αμετάβλητες μέχρι τη δειγματοληψία, να μην ακολουθήσουν κάποια δίαιτα μειωμένου θερμιδικού περιεχομένου και να διατηρήσουν το παρόν σωματικό τους βάρος. Πραγματοποιήθηκε διατροφική αξιολόγηση των συμμετεχόντων, μετρήσεις των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών (σωματικό βάρος, ύψος, Δείκτης Μάζας Σώματος, οστική πυκνότητα με οστεοπυκνόμετρο DEXA), αιμοληψία, ενώ, αξιολογήθηκε και η φυσική δραστηριότητα των εθελοντριών μέσα από ένα σύντομο ερωτηματολόγιο αποτελούμενο από 7 ερωτήσεις (PAQ). Με αυτό τον τρόπο, συγκεντρώθηκαν τα απαραίτητα δεδομένα, ώστε να καταταχθούν οι εθελόντριες σε 2 επιμέρους ομάδες. Στην 1^η ομάδα ανήκαν οι εθελόντριες με φυσιολογική οστική πυκνότητα και στη 2^η ομάδα εθελόντριες με οστεοπενία βάσει των αποτελεσμάτων του DEXA. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μια συνάντηση με την κάθε εθελόντρια ατομικά για τη συγκέντρωση όλων των απαραίτητων δεδομένων και μία σύντομη συνεδρία στην οποία η κάθε εθελόντρια ενημερωνόταν για τη διαδικασία συμπλήρωσης ενός 3ήμερου ημερολογίου καταγραφής της διαιτητικής πρόσληψης για 2 καθημερινές ημέρες και μία ημέρα Σαββατοκύριακου. Η καταγραφή των τροφίμων από την εθελόντρια προηγούνταν μία εβδομάδα πριν από την ημέρα συλλογής της κένωσης.

4.2.3 Πρωτόκολλο εκχύλισης πολυσακχαριτών (β-γλυκανών) από μανιτάρια του γένους *Pleurotus ostreatus*

Κατά την έναρξη της μελέτης ήταν απαραίτητη η απομόνωση β-γλυκανών από τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus ostreatus*, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως υπόστρωμα για τη ζύμωση από τον εντερικό μικροβιόκοσμο των εθελοντριών. Για την διεκπεραίωση αυτής της διαδικασίας ήταν απαραίτητη η εκχύλισή τους από τα λυοφυλιωμένα μανιτάρια και η επακόλουθη λυοφιλίωσή τους. Η διαδικασία, που ακολουθήθηκε ήταν αναλογικά η ακόλουθη για 10 g λυοφυλιωμένου δείγματος (μανιταριού), που αναμείχθηκε με 400 mL H₂O, δηλαδή, η αναλογία ήταν 1:40 g:mL. Αναλυτικότερα, η διαδικασία είχε ως εξής:

- ❖ Θέρμανση στους 95 °C για πέντε ημέρες (περίπου 50 ώρες).
- ❖ Φυγοκέντρηση στις 10.000 g για 15 min στους 2 °C.
- ❖ Συμπύκνωση στο ειδικό όργανο rotary evaporator μέχρι τελικού όγκου 30-40 mL.
- ❖ Φύλαξη του συμπυκνωμένου δείγματος στο ψυγείο για 24 ώρες και της αιθανόλης, που απαιτείται για την εκχύλιση, στην κατάψυξη στους -80 °C.

- ❖ Ανάδευση στο μηχάνημα stirrer για 30 min μετά από προσθήκη αιθανόλης στο συμπυκνωμένο δείγμα σε αναλογία 1:1.
 - ❖ Φυγοκέντρηση στις 10.000 g για 15 min στους 2 °C.
 - ❖ Παραλαβή του διηθήματος μετά το πέρας της φυγοκέντρησης.
 - ❖ Λυοφυλίωση για 24 h.
- {Chen, 2012}, {Ruthes, 2015}, {Synytsya, 2009}, {Wang, 2010}

4.2.4 Παραλαβή δείγματος και επεξεργασία κοπράνων

Στην πρώτη συνάντηση με τις εθελόντριες μετά την ολοκλήρωση των απαραίτητων μετρήσεων (ανθρωπομετρικών και αιματολογικών), οι εθελόντριες παρέλαβαν έναν προζυγισμένο, πλαστικό συλλέκτη, προκειμένου, μέσα σε αυτόν, να συλλεχθεί ολόκληρη η κένωση την ημέρα της δειγματοληψίας. Στη συνέχεια, τους δόθηκαν σαφείς οδηγίες, ώστε να διεκπεραιωθεί σωστά η συλλογή της κένωσης. Η πλήρης κένωση της κάθε εθελόντριας συλλέχθηκε εντός του συστήματος πλαστικού συλλέκτη-πλαστικής σακούλας, ενώ, ακολούθως μεταφέρθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών (Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ) το ταχύτερο δυνατόν (≤ 2 ώρες από την ώρα της κένωσης) για μικροβιολογική ανάλυση. Η πλήρης κένωση ζυγίστηκε σε εργαστηριακό ζυγό μαζί με τον πλαστικό συλλέκτη και υπολογίστηκε το καθαρό βάρος της κένωσης. Επίσης, με την οπτική επαφή συλλέχθηκαν πληροφορίες σχετικά με το είδος της κένωσης (υδαρής, φυσιολογική) και έγινε κατάταξή της βάσει της κλίμακας Bristol. Στη συνέχεια, ζυγίστηκαν 20 g από την κένωση και τοποθετήθηκαν σε πλαστική σακούλα μαζί με διάλυμα PBS. Ακολούθησε ομογενοποίηση με μαλάξεις και μηχανική ομογενοποίηση σε μηχάνημα stomacher. Η ομογενοποιημένη ποσότητα κοπράνων μεταφέρθηκε σε 2 falcon μέσα σε δοχείο με πάγο εντός του αναερόβιου θαλάμου και επεξεργάστηκε όπως, περιγράφεται και στη συνέχεια, για τον εμβολιασμό των υποστρωμάτων με πηγή άνθρακα, που θα υποστεί ζύμωση. Ως πηγές άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν ινουλίνη 1%, ινουλίνη 2%, μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* και εκχύλισμα β-γλυκανών μανιταριού *Pleurotus ostreatus*.

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

Η πειραματική διαδικασία απαιτούσε την προετοιμασία των υποστρωμάτων πριν από την παραλαβή του δείγματος των κοπράνων. Για αυτό το λόγο, έπρεπε να προετοιμαστούν και να αποστειρωθούν από την προηγούμενη μέρα, το μέσο αραίωσης του εμβολίου των κοπράνων (faecal slurry), δηλαδή, το Phosphate-buffered saline και το Βασικό Υλικό της Καλλιέργειας (Basal culture medium) στο οποίο γίνεται η διάλυση της πηγής άνθρακα και πραγματοποιείται η ζύμωση.

Για την παρασκευή του Phosphate-buffered saline (PBS) ακολουθήθηκε η εξής συνταγή:

- ❖ 8 g/L NaCl
- ❖ 0.2 g/L KCl
- ❖ 1.15 g/L Na₂HPO₄
- ❖ 0.2 g/L KH₂PO₄

Η ρύθμιση του pH του διαλύματος γίνεται στο 7,3.

Το PBS, δηλαδή, το Phosphate-buffered saline χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του εμβολίου από κόπρανα-faecal slurry (20% w/v, δηλαδή, ομογενοποιήθηκαν 20 g κοπράνων σε 100 mL PBS). {Palframan, 2002}

Για το Βασικό Υλικό της καλλιέργειας (Basal culture medium) χρησιμοποιήθηκε η εξής συνταγή:

- ❖ 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 (διαλυμένες 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)

Το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 7.0 με 1M HCl. {Rycroft, 2001}

Η συνταγή για την παρασκευή του Basal Culture Medium τροποποιήθηκε, καθώς σε έλεγχο, που πραγματοποιήθηκε σχετικά με τη βιωσιμότητα της κυτταρικής σειράς φάνηκε ότι εμφάνιζε κυτταροτοξικότητα. Μετά από δοκιμές αφαιρέθηκε η ρεζαζουρίνη και υποδεκαπλασιάστηκαν οι συγκεντρώσεις της αμίνης (hemin) και του Tween-80. {Hamzeloo-Moghadam, 2014}, {Zhang, 2013}

Μετά από την οριστικοποίηση της συνταγής παρασκευάστηκε το Basal Culture Medium και μοιράστηκε ανά 45 mL σε φιάλες Durham, οι οποίες σημάνθηκαν κατάλληλα. Στη συνέχεια, τα διαλύματα αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 15 min. Μετά το πέρας της αποστείρωσης, το βασικό υλικό καλλιέργειας μεταφέρθηκε εντός του αναερόβιου θαλάμου (κάτω στο θάλαμο με χαλαρά καπάκια), προκειμένου να προαναχθεί για περίπου 12 ώρες πριν την παραλαβή της κένωσης.

Την ημέρα της *in vitro* ζύμωσης, μετά την παραλαβή του δείγματος στον προζυγισμένο συλλέκτη, ζυγίστηκε σε εργαστηριακό ζυγό με ακρίβεια 0.1 g. Μετά την καταγραφή των στοιχείων

έγινε παραλαβή 20 g από την κένωση, που διαλυτοποιήθηκαν σε διάλυμα PBS pH 7.3 (20% w/v) (faecal slurry) και ακολούθως, ομογενοποιήθηκαν μηχανικά με το κατάλληλο όργανο (Stomacher, Seward, USA), ενώ, έγιναν και μαλάξεις με το χέρι μέχρι να καταστεί οπτικά ομοιογενές το εμβόλιο (περίπου 20 sec).

Πριν την παραλαβή του δείγματος είχε προηγηθεί ζύγιση εντός αποστειρωμένων αλουμινόχαρτων του λυοφιλιωμένου μανιταριού (0.9 g), των εκχυλισμάτων του (0.45 g) και της ινουλίνης συγκέντρωσης 1% και 2% (0.45 g και 0.9 g αντίστοιχα). Τα ζυγισμένα υποστρώματα μεταφέρθηκαν εντός του αναερόβιου θαλάμου στα δοχεία Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας. Σε 2 από τα σημασμένα δοχεία Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας προστέθηκαν οι 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις ινουλίνης, ενώ, για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε 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 (5 mL faecal slurry σε 45 mL basal medium) και οι στατικές καλλιέργειες (50 mL) επωάστηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 24 h (με βιδωμένα χαλαρά καπάκια).

Στους χρόνους 0 h, 8 h και 24 h 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 (1mL), προσδιορισμός λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (1 mL)].

Για την επίδραση των προϊόντων της ζύμωσης στην κυτταροκαλλιέργεια (χρόνο 0h) ελήφθησαν δείγματα όγκου 2 X 2 mL σε αποστειρωμένα errendorf 2mL (τα δείγματα στα errendorfs φυλάχθηκαν σε πάγο μέχρι να ολοκληρωθεί η πειραματική διαδικασία στον αναερόβιο θάλαμο). Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 20.000 g για 15 min στους 4 °C και μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο errendorf εντός του θαλάμου νηματικής ροής (στοις -80 °C). {Palframan, 2002}, {Rycroft, 2001}

Μετά το πέρας 24h ελήφθη το υπόλοιπο της καλλιέργειας σε σωλήνες falcon 50 mL και φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 rpm (3200g) για 40 min στους 4 °C. Μετά τη φυγοκέντρωση, οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε στατή εντός του θαλάμου νηματικής ροής και συλλέχθηκε το υπερκείμενο με αναρρόφηση. Ειδικότερα, κρατήθηκαν οι σωλήνες υπό κλίση και προσεκτικά ώστε να μη ληφθεί

και ίζημα, συλλέχθηκε το υπερκείμενο. Ακολούθησε διήθηση με μικροβιολογικό ηθμό (διάμετρος 0,2 μm) και τοποθέτηση των δειγμάτων στα επισημασμένα errendorfs. Τέλος, τα δείγματα φυλάχθηκαν στους $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Τα υποστρώματα, που εμβολιάστηκαν ήταν τα εξής:

Υποστρώματα:

❖ Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123

- Σε αναλογία 2% (w/v), (0.9g), κωδικός POWS

❖ Εκχύλισμα μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123

- Σε αναλογία 1% (w/v), (0.45g), κωδικός POWSE

❖ Ινουλίνη συγκέντρωσης 1%

- Ως θετικός μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση (Orafti® GR, BENEIO-Orafti, Oreya, Belgium) σε αναλογία 1% (w/v), (0.45g), κωδικός INU1

❖ Ινουλίνη συγκέντρωσης 2%

- Ως θετικός μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση (Orafti® GR, BENEIO-Orafti, Oreya, Belgium) σε αναλογία 2% (w/v), (0.9g), κωδικός INU2

❖ Αρνητικός μάρτυρας (Negative Control)

- Μη προσθήκη πηγής άνθρακα, κωδικός NC

4.2.6 Κυτταροκαλλιέργειες οστικών κυττάρων

4.2.6.1 Κυτταρική σειρά MG-63 οστεοβλαστικού φαινοτύπου

Η κυτταρική σειρά MG-63, που χρησιμοποιήθηκε, προκειμένου να γίνει η επίδραση με τα υπερκείμενα των ζυμώσεων έχει προέλθει από ανθρώπινο οστεοσάρκωμα και παρουσιάζει πολλά από τα χαρακτηριστικά των οστεοβλαστών. Αναλυτικότερα, διαθέτει ικανότητα σύνθεσης οστεοκαλσίνης και κολλαγόνου τύπου I, ενώ, εμφανίζει αυξημένα επίπεδα αλκαλικής φωσφατάσης ύστερα από χορήγηση $1,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$. 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 τρυβλία κυτταροκαλλιέργειών 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), πενικιλίνη (100 U/mL), στρεπτομυκίνη (100 µg/mL) καθώς και με εμβρυϊκό βόειο ορό 5% (FBS, Gibco #310108-165), σε κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας στους 37 °C και σε 5% CO₂. {Boyan, 1989}, {Franceschi, 1985}, {Lajeunesse, 1990}, {Lajeunesse, 1991}

4.2.7 Δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT

4.2.7.1 Αρχή της μεθόδου

Πρόκειται για μία χρωματομετρική δοκιμή με την ουσία MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), που χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες κυτταροτοξικότητας και κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Είναι γρήγορη, 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 με αυτόν τον τρόπο, επιτυγχάνεται προσδιορισμός του ποσοστού τους και ποσοτικοποίηση της κυτταροτοξικότητας των επιδράσεων. {Mosmann, 1983}

4.2.7.2 Όργανα-Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα

Στη συνέχεια, γίνεται αναφορά στον τεχνικό εξοπλισμό, τα αντιδραστήρια και τα αναλώσιμα υλικά, που απαιτούνται 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)

4.2.7.3 Πρωτόκολλο

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM-10% FBS σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Σε κάθε πηγαδάκι τοποθετήθηκαν 750 κύτταρα σε τελικό όγκο 150 µL και υποβλήθηκαν σε 48 ώρες επώαση υπό την επίδραση των παραγόντων POWS, POWSE, INU1, INU2, NC, σε αραιώση 1:8.

Μετά την πάροδο 48 ωρών, σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκε ποσότητα 15 μ L (συγκέντρωσης 5mg/mL) φιλτραρισμένου διαλύματος MTT και ακολούθησε επώαση στον κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας για 4 ώρες. Έπειτα, αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν 100 μ L 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 έγινε με τη χρήση του λογισμικού Gen5.

4.2.8 Προσδιορισμός των δεικτών του οστικού μεταβολισμού

4.2.8.1 Οστεοπροτεγερίνη (OPG)

Η οστεοπροτεγερίνη (OPG) είναι πανομοιότυπη με τον ανασταλτικό παράγοντα της οστεοκλαστογένεσης (OCIF), που αποτελεί διαλυτό μέλος της οικογένειας των υποδοχέων νεκρωτικών παραγόντων όγκου, που αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση. Η OPG θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της οστικής απορρόφησης τροποποιώντας τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών. Αποτελεί 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. {Brandstrom, 2002}, {Croucher, 2001}, {Kiechl, 2004}, {Ohmori, 2002}, {Simonet, 1997}, {Yasuda, 1998}

4.2.8.2 Elisa Kit, που ανιχνεύει την ανθρώπινη OPG-Αρχή της μεθόδου

Το πρότυπο προϊόν, που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το kit είναι η ανασυνδυασμένη OPG, μια 55 KDa 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.

4.2.8.3 RANKL

Ο ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-B του πυρηνικού παράγοντα (RANKL), ο οποίος είναι, επίσης, γνωστός ως μέλος της οικογένειας προσδέματος των παραγόντων 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 T και B 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 υπερασβεστιαμία σε περίπτωση κακοήθειας. {Asselin-Labat, 2010}, {Luan, 2012}

4.2.8.4 ELISA Kit, που ανιχνεύει το ανθρώπινο TNFSF11/RANKL -Αρχή της μεθόδου

Το ανθρώπινο kit ELISA της OriGene TNFSF11 βασίστηκε στην τυποποιημένη τεχνολογία ανίχνευσης ανοσοπροσροφητικού σάντουιτς. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα από ποντίκι, ειδικό για τον TNFSF11 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 TNFSF11 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 TNFSF11 των δειγμάτων, που περιέχονταν στην πλάκα.

4.2.8.5 Όργανα-Αντιδραστήρια-Αναλώσιμα για τα Kit

Ακολουθεί η περιγραφή του κατάλληλου τεχνικού εξοπλισμού, των αντιδραστηρίων και των αναλώσιμων υλικών, που είναι απαραίτητα για τη διεξαγωγή του πειράματος:

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

Ο αντίστοιχος τεχνικός εξοπλισμός, τα αντιδραστήρια και τα αναλώσιμα υλικά για τον TNFS11 είναι τα ίδια με αυτά στο kit για την OPG με εξαίρεση το λυοφιλιωμένο ανασυνδυασμένο πρότυπο TNFS11 (10ng/tube $\times$ 2) και το βιοτινυλιωμένο μη ανθρώπινο TNFS11 αντίσωμα 130 μ L (αραίωση 1:100).

4.2.8.6 Πρωτόκολλο Elisa

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 με τρόπο πλήρη και ομοιόμορφο. Για κάθε πείραμα ετοιμάστηκε η τυπική καμπύλη ανίχνευσης της OPG και του TNFSF11 αντίστοιχα. Η πορεία του πρωτοκόλλου ήταν η εξής:

- 1) Αρχικά προστέθηκε ποσοστό 0,1 mL ανά θέση των πρότυπων διαλυμάτων 6000 pg/mL, 3000 pg/mL, 1500 pg/mL, 750 pg/mL, 375 pg/mL, 187,5 pg/mL, 93,7 pg/mL ανθρώπινου OPG στην προ-επικαλυμμένη μικροπλάκα των 96 θέσεων. Αντίστοιχα, στον TNFSF11 προστέθηκε ποσοστό 0,1 mL ανά εκβάθυνση των πρότυπων διαλυμάτων των 5000 μ g/mL, 2500 μ g/mL, 1250 μ g/mL,

625 µg/mL, 313 µg/mL, 156 µg/mL, 78 µg/mL ανθρώπινου TNFSF11 στη 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 καλλιιεργειών 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 TNFSF11 αντίστοιχα σε κάθε θέση και επωάστηκε η πλάκα στους 37 °C για 60 λεπτά.
- 5) Η πλάκα ξεπλύθηκε 3 φορές με 0.01 M 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 λεπτά.
- 7) Η πλάκα ξεπλύθηκε 5 φορές με 0.01 M PBS και κάθε φορά αφέθηκε 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. Προστέθηκε 0,1 mL παρασκευασμένου διαλύματος τερματισμού TMB σε κάθε θέση, όπου το χρώμα άλλαξε αμέσως σε κίτρινο χρώμα.
- 9) Μετρήθηκε η απορρόφηση στα 450 nm σε συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκων εντός 30 λεπτών μετά την προσθήκη του διαλύματος διακοπής.

4.2.9 Στατιστική ανάλυση

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων και των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 21. Οι εθελόντριες, που συμμετείχαν στη μελέτη ήταν συνολικά 6, οι οποίες διαχωρίστηκαν σε 2 ομάδες ανάλογα με την οστική τους πυκνότητα. Στην 1^η ομάδα κατατάχθηκαν οι υγιείς ως προς την οστική πυκνότητα εθελόντριες (n=3), ενώ στη 2^η ομάδα οι εθελόντριες με οστεοπενία (n=3). Δεδομένου ότι όλα τα άτομα, που πήραν μέρος στη μελέτη ήταν γυναίκες, που βρίσκονταν στην εμμηνόπαυση, δεν είχαν λάβει αντιβιοτικά τους τελευταίους 2 μήνες πριν την έναρξη της μελέτης, δε λάμβαναν συμπληρώματα διατροφής, που σχετίζονται με το 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 εμφάνιζαν κάποιο αυτοάνοσο νόσημα (π.χ. Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου),

Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου, δυσκοιλιότητα ή διαρροϊκά επεισόδια, σοβαρές νεφρικές ή ηπατικές παθήσεις, στεφανιαία νόσο, καρκίνο και οποιαδήποτε παθολογική κατάσταση του θυρεοειδούς, δε χρειάστηκε να διεξαχθεί στατιστικός έλεγχος για αυτούς τους παράγοντες, καθώς χρησιμοποιήθηκαν εξ' αρχής ως κριτήρια επιλογής του δείγματος.

Ο έλεγχος κανονικότητας της κατανομής των συνεχών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία κανονικότητας Kolmogorov-Smirnov (One Sample Kolmogorov Smirnov Normality Test) σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $\alpha=0,05$ και οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν ως προς τη διαφοροποίηση της οστικής υγείας των εθελοντριών. Οι συνεχείς μεταβλητές, που κατανέμονταν κανονικά, εκφράστηκαν στους τελικούς πίνακες, που παρουσιάζονται παρακάτω ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση, ενώ, για τον έλεγχο της παρέμβασης σε κάθε ομάδα χωριστά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος διαφοράς μέσω των 2 ανεξάρτητων δειγμάτων (2 Independent Samples – T test). Οι συνεχείς μεταβλητές, που δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή, παρουσιάζονται στους τελικούς πίνακες ως διάμεσος (1^ο τεταρτημόριο-3^ο τεταρτημόριο) και η σύγκριση των μέσων τιμών μεταξύ των 3 ομάδων πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο Kruskal- Wallis test. Το επίπεδο σημαντικότητας και σε αυτούς τους ελέγχους ήταν $\alpha=0,05$. Αντιθέτως, οι κατηγορικές μεταβλητές, που εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα εκφράστηκαν 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 χ^2 (Chi-Square test). Όσον αφορά, τη σύγκριση μεταξύ >3 ομάδων, που δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή χρησιμοποιήθηκε το Wilcoxon test.

4.3 Αποτελέσματα

4.3.1 Χαρακτηριστικά δείγματος εθελοντριών

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 6 άτομα και το 100% του δείγματος ήταν γυναίκες. Από το σύνολο των 6 γυναικών, οι 3 είχαν φυσιολογική οστική μάζα (50%) με ηλικία $58,33 \pm 3,51$ έτη και Δείκτη Μάζας Σώματος ($\Delta\text{Μ}\Sigma$) = $24,80 \pm 3,39$ kg/m². Οι άλλες 3 εθελόντριες ήταν οστεοπενικές (50%) ηλικίας $54 \pm 2,65$ ετών και με $\Delta\text{Μ}\Sigma$ = $22,52 \pm 2,22$ kg/m². Οι εθελόντριες χωρίστηκαν σε 2 ομάδες από όπου προέκυψε και η ακόλουθη κατανομή τους, με τα αντίστοιχα περιγραφικά στοιχεία, όπως αυτά συλλέχθηκαν πριν από την έναρξη της μελέτης (πίνακας 2) και από τα οποία φαίνεται ότι δεν παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς αυτά.

Πίνακας 1. Περιγραφικά χαρακτηριστικά του δείγματος κατά την έναρξη της μελέτης.

<i>Στοιχεία εθελοντριών</i>	<i>Φυσιολογική οστική μάζα N = 3</i>	<i>Μειωμένη οστική μάζα (οστεοπενία) N = 3</i>	<i>p-value</i>
Ηλικία (έτη)	58,33 ± 3,51	54 ± 2,65	0,163
Σωματικό βάρος (kg)	65 ± 10,82	61,33 ± 3,05	0,602
Ύψος (m)	1,62 ± 0,02	1,65 ± 0,07	0,431
Δείκτης 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	1254 ± 1329	0,080
Συνολική φυσική δραστηριότητα (MET λεπτά/εβδομάδα)	7580 ± 6776	1440 ± 1248	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.

4.3.2 Αποτελέσματα 3μερου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων

Μετά τη συμπλήρωση του 3μερου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων από τις εθελόντριες και την παράδοσή του την ημέρα της δειγματοληψίας, 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. Τα αποτελέσματα της επεξεργασίας των διατροφικών χαρακτηριστικών απεικονίζονται στον Πίνακα 3, όπου φαίνεται να υπάρχει οριακά

μια 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, στα άλλα μακροθρεπτικά ή μικροθρεπτικά χαρακτηριστικά δε φαίνεται να παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 2. Διατροφικά στοιχεία του δείγματος έπειτα από την καταγραφή του 3μερου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων.

<i>Στοιχεία εθελοντριών</i>	<i>Φυσιολογική οστική μάζα N = 3</i>	<i>Μειωμένη οστική μάζα (οστεοπενία) N = 3</i>	<i>p-value</i>
Συνολική ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη (Kcal/d)	1624 ± 551	2447 ± 690	0,182
Πρωτεΐνη (%)	16,00 (15,05-16,30)	12,30 (11,65-12,30)	0,046
Πρωτεΐνη (g/d)	63,67 ± 16,55	74,11 ± 19,48	0,518
Υδατάνθρακες (%)	40,77 ± 9,31	46,83 ± 6,20	0,401
Υδατάνθρακες (g/d)	162,34 ± 25,80	293,29 ± 90,41	0,073
Σάκχαρα (g/d)	54,01 ± 19,48	124,35 ± 102,24	0,307
Διαιτητικές ίνες (g/d)	20,94 ± 8,30	27,54 ± 10,21	0,434
Λίπος (%)	40,30 ± 7,39	40,93 ± 6,11	0,914
Λίπος (g/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 (g/d)	17,86 ± 9,90	33,01 ± 20,25	0,309
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (g/d)	40,71 ± 21,10	58,94 ± 20,01	0,339
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (g/d)	13,57 ± 7,11	16,11 ± 4,67	0,632
Αλκοόλ (%)	3,90 (1,95-5,00)	0,00 (0,00-0,55)	0,246
Αλκοόλ (g/d)	8,10 (4,05-14,18)	0,00 (0,00-2,32)	0,246
Ασβέστιο (mg/d)	773 ± 598	872 ± 583	0,848
Βιταμίνη D (μg/d)	1,09 (0,85-10,12)	0,75 (0,44-2,90)	0,513

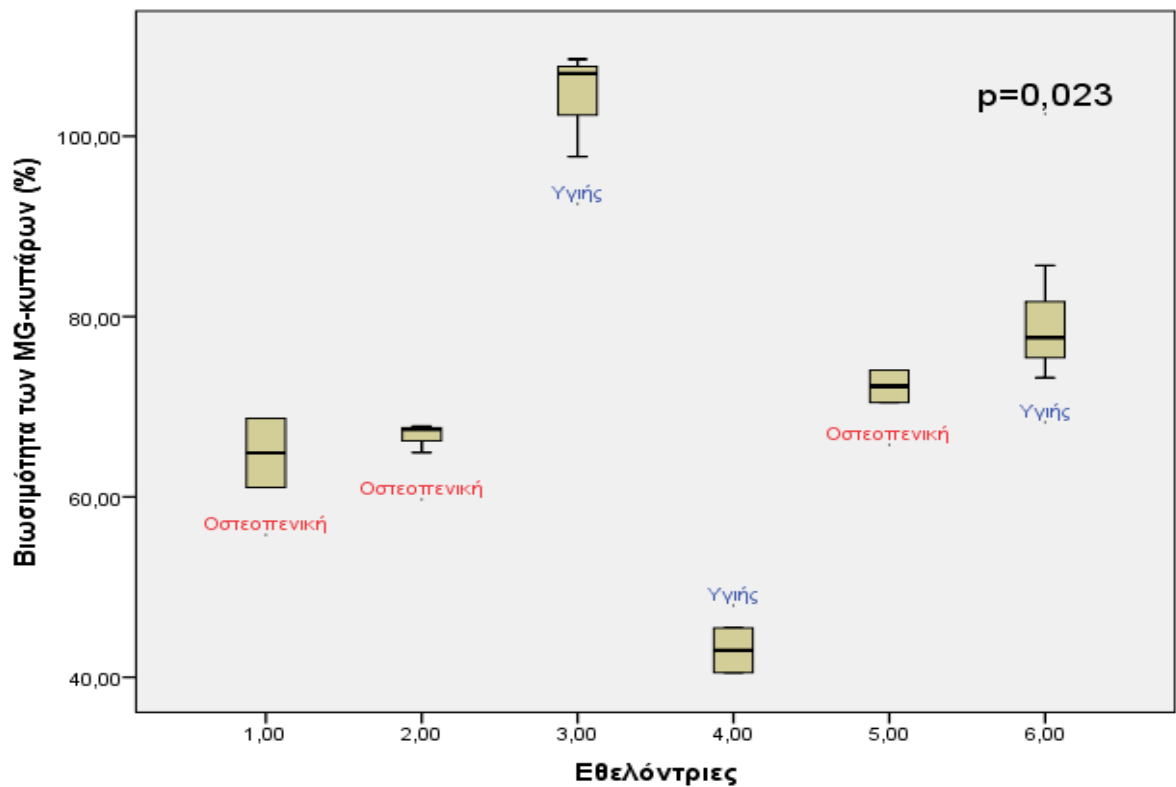
Για τα αποτελέσματα, που ακολουθούν την κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± Τ.Α. - Independent Samples t Test. Για τα μη κανονικά χαρακτηριστικά οι τιμές εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1 – Q3)- Mann Whitney Test.

4.3.3 Αποτελέσματα δοκιμασίας κυτταροτοξικότητας MTT

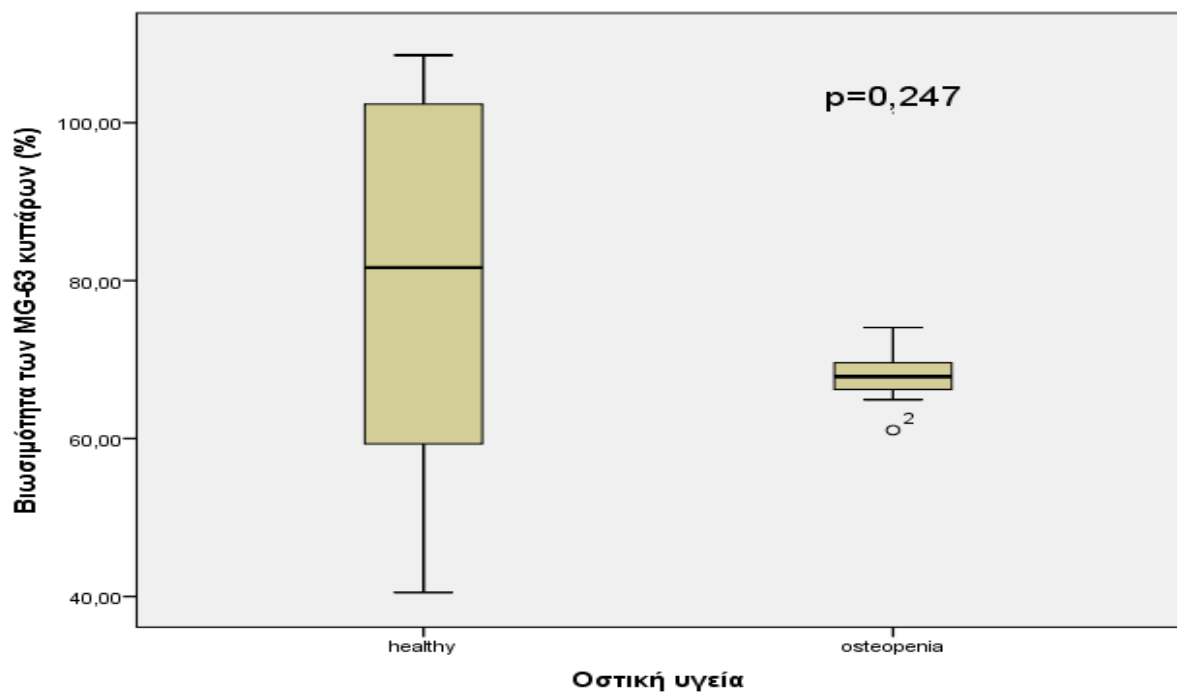
Το σύνολο των εθελοντριών, που πήραν μέρος στη μελέτη ήταν 6, οι οποίες χωρίστηκαν σε 2 ομάδες ανάλογα με την οστική τους πυκνότητα.

Μετά την παραλαβή του δείγματος των κοπράνων από την κάθε εθελόντρια ακολουθούσε η *in vitro* ζύμωση των υποστρωμάτων [μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* (POWS), εκχύλισμα των β-γλυκανών του *Pleurotus ostreatus* (POWSE), ινουλίνη 1% και ινουλίνη 2%, αρνητικός μάρτυρας για 24 ώρες]. Τα δείγματα από το υπερκείμενο των ζυμώσεων αυτών με το ίδιο εμβόλιο (εντερικός μικροβιόκοσμος κάθε εθελόντριας), χρησιμοποιήθηκαν για τη δοκιμασία της κυτταροτοξικότητας σε οστεοβλάστες MG-63.

Τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας επεξεργάστηκαν στατιστικά και συγκρίθηκε το ποσοστό της βιωσιμότητας των κυττάρων MG-63 ως προς το σύνολο των εθελοντριών, καθώς και ως προς κάθε μία ομάδα ξεχωριστά, δηλαδή, στις υγιείς και τις οστεοπενικές. Οι συγκρίσεις, αρχικά, περιλάμβαναν τη βιωσιμότητα των κυττάρων, έπειτα, από την επίδραση του αρνητικού μάρτυρα ζύμωσης κάθε εθελόντριας, ύστερα από 24 ώρες (δηλαδή, την επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου κάθε εθελόντριας χωρίς την παρουσία των υποστρωμάτων) (NC) στην αραιώση 1:8 για το σύνολο των εθελοντριών και τη διαφορά των μέσων όρων μεταξύ των υγιών και των οστεοπενικών γυναικών, που συμμετείχαν στην έρευνα μετά την επίδραση του αρνητικού μάρτυρα ζύμωσης (NC), της ινουλίνης 1% (INU1), της ινουλίνης 2% (INU2), του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* (POWS) και των εκχυλισμάτων των β-γλυκανών του *Pleurotus ostreatus* (POWSE) στην αραιώση 1:8, όπως παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα (διαγράμματα 1-2)



Διάγραμμα 1. Η βιωσιμότητα % των κυττάρων MG-63 μετά την επίδραση του αρνητικού μάρτυρα (NC), (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, (αραίωση 1:8).

Από το διάγραμμα 1, για την αραιώση 1:8, φαίνεται από τα δεδομένα ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος κάθε εθελόντριας συμβάλλει καθοριστικά στη βιωσιμότητα των MG-63 κυττάρων, καθώς από τη σύγκριση όλων των εθελοντριών μεταξύ τους παρουσιάζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,023$). Ωστόσο, αυτή η διαφορά φαίνεται να εξισορροπείται όταν γίνεται σύγκριση μεταξύ των υγιών και των οστεοπενικών μιας και δεν εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη βιωσιμότητα των MG-63 κυττάρων ($p=0,247$). Με αυτό τον τρόπο, εξασφαλίζεται η ομοιογένεια στη βιωσιμότητα των κυττάρων του δείγματος.

Πίνακας 3. Η βιωσιμότητα % των κυττάρων MG-63 στις ομάδες οστικής υγείας των εθελοντριών σε αραιώση 1:8 μετά από 0 και 24 ώρες ζύμωσης με εμβόλιο κοπράνων.

Υποστρώματα	Φυσιολογική οστική μάζα <i>N</i> = 3	Μειωμένη οστική μάζα (οστεοπενία) <i>N</i> = 3	<i>p</i>-value Υγιείς vs. Οστεοπενικές
NC_0 ώρες_	71,60 ± 24,00	76,31 ± 11,70	0,616
NC_24 ώρες_	79,47 ± 25,88	67,80 ± 4,10	0,247
INU1_24 ώρες_	18,18 (9,27-42,45)	66,04 (11,99-70,41)	0,063
INU2_24 ώρες_	29,62 ± 22,29	77,46 ± 19,02	<0,001*
POWS_24 ώρες_	15,32 ± 6,30	48,46 ± 36,87	0,039*
POWSE_24 ώρες_	57,30 ± 33,96	80,09 ± 26,24	0,185

NC: Αρνητικός μάρτυρας INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v) INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) POWS: *Pleurotus ostreatus* WS LGAM 1123 λυοφιλοποιημένο POWSE: *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα. Για τα αποτελέσματα, που ακολουθούν την κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± T.A.- Independent Samples t Test. Για τα χαρακτηριστικά, που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1–Q3)- Mann Whitney Test. *στατιστικά σημαντικό ($p<0,05$)

Με βάση τις συγκρίσεις, που πραγματοποιήθηκαν κατά τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων, όπως παρουσιάζεται και στον πίνακα 3, υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις 2 ομάδες εθελοντριών (υγιείς-οστεοπενικές) μετά από την επίδραση των προϊόντων

της ζύμωσης της ινουλίνης συγκέντρωσης 2% ($p < 0,001$) στην αραιώση 1:8, όπως και έπειτα από την επίδραση του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM 1123 ($p = 0,039$) στην αραιώση 1:8. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ισχυρότερη επίδραση των μεταβολιτών, που υπάρχουν στα δείγματα αυτά στη βιωσιμότητα των MG-63 κυττάρων στις οστεοπενικές εθελόντριες στην περίπτωση της ινουλίνης 2% και του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM 1123. Αξίζει να σημειωθεί ότι εμφανίστηκε οριακά μη σημαντική διαφορά μετά από την επίδραση των προϊόντων της ζύμωσης της ινουλίνης συγκέντρωσης 1% ($p = 0,063$) στην αραιώση 1:8, η οποία μπορεί να υποδηλώνει μια πιθανή τάση για εμφάνιση ισχυρότερης επίδρασης στη βιωσιμότητα των κυττάρων στις οστεοπενικές εθελόντριες σε σχέση με τις υγιείς.

Πίνακας 4. Η βιωσιμότητα % των κυττάρων MG-63 στις ομάδες οστικής υγείας σε αραιώση 1:8 μετά από 24 ώρες ζύμωσης με εμβόλιο κοπράνων.

Υποστρώματα	Σύνολο εθελοντριών N = 6	Φυσιολογική οστική μάζα N = 3	Μειωμένη οστική μάζα N = 3
NC	74,02 ± 19,46 †	79,47 ± 25,88 †, ‡	67,80 ± 4,10
INU1	21,87 (10,22- 66,04) *	23,00 ± 16,96 *	66,04 (11,99- 70,41)
INU2	54,95 ± 31,69	29,62 ± 22,29 *	77,46 ± 19,02
POWS	16,73 (8,71-51,48) *, ‡	15,32 ± 6,30 *	48,46 ± 36,87
POWSE	68,70 ± 31,46 †	57,30 ± 33,96 †	80,09 ± 26,24

NC: Αρνητικός μάρτυρας INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v) INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) POWS: *Pleurotus ostreatus* WS LGAM 1123 λυοφιλοποιημένο POWSE: *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα. Για τα αποτελέσματα, που ακολουθούν την κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως μ.ο. ± Τ.Α. - Independent Samples t Test. Για τα χαρακτηριστικά, που δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή 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 ($p < 0,05$)

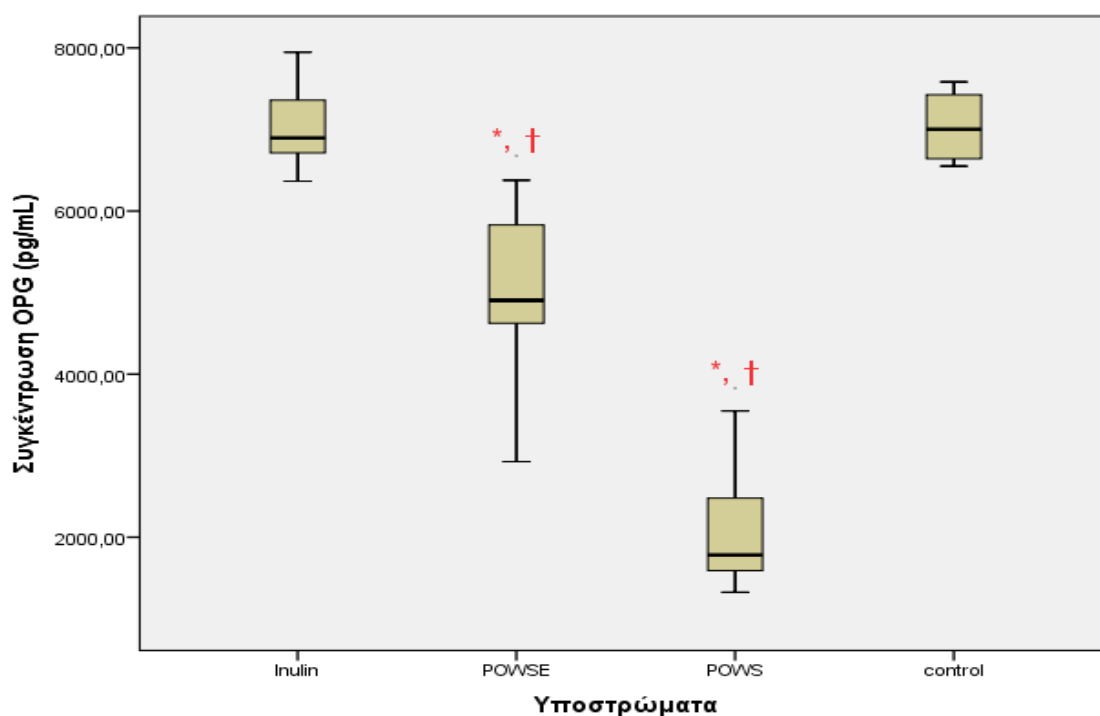
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων προέκυψαν από το μέσο όρο 9 επαναλήψεων για κάθε χειρισμό.

Στον Πίνακα 4 γίνεται παρουσίαση των αποτελεσμάτων, που αφορούν τη βιωσιμότητα των κυττάρων MG-63 στις ομάδες οστικής υγείας σε αραιώση 1:8 μετά από 24 ώρες ζύμωση με

εμβολιασμό κοπράνων ως προς το σύνολο των εθελοντριών αλλά και ως προς τις επιμέρους ομάδες ξεχωριστά (υγιείς, οστεοπενικές). Οι μέσοι όροι της κάθε ομάδας συγκρίθηκαν με τον αρνητικό μάρτυρα, την ινουλίνη 1% και την ινουλίνη 2%. Στο σύνολο των εθελοντριών από τη στατιστική επεξεργασία φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στον αρνητικό μάρτυρα και την επίδραση της ινουλίνης 1% ($p < 0,001$) με υψηλότερη βιωσιμότητα να παρατηρείται στα κύτταρα, που συν-επώαστηκαν με τον αρνητικό μάρτυρα σε σύγκριση με τα κύτταρα, που συν-επώαστηκαν με τα προϊόντα ζύμωσης της ινουλίνης 1%. Στατιστικά σημαντική διαφορά εντοπίστηκε και στην ομάδα των εθελοντριών με φυσιολογική οστική μάζα μεταξύ του αρνητικού μάρτυρα και της ινουλίνης 1% ($p < 0,001$), όπου πάλι η βιωσιμότητα των κυττάρων NC ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με τα κύτταρα, που συν-επώαστηκαν με την ινουλίνη 1%. Αντίθετα, στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 αυτών υποστρωμάτων ($p = 0,475$). Σχετικά με τον αρνητικό μάρτυρα και την ινουλίνη 2% δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στο σύνολο των γυναικών ($p = 0,117$) όπως και στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών ($p = 0,223$), ενώ, στην ομάδα των υγιών εθελοντριών υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη βιωσιμότητα των κυττάρων NC σε σύγκριση με τα κύτταρα, που συν-επώαστηκαν με την ινουλίνη 2% ($p = 0,001$). Η συν-επώαση με τα προϊόντα ζύμωσης του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* (POWS) οδήγησε σε σημαντικά χαμηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σύγκριση με την επώαση με τον αρνητικό μάρτυρα τόσο ως προς το σύνολο των εθελοντριών ($p = 0,001$) αλλά και στις εθελόντριες με φυσιολογική οστική μάζα ($p < 0,001$), ενώ κάτι τέτοιο δε συνέβη στις εθελόντριες με μειωμένη οστική μάζα, που η διαφορά στη βιωσιμότητα δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική ($p = 0,354$). Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι το εμβόλιο του μανιταριού μείωσε σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με το αντίστοιχο εμβόλιο ινουλίνης 2% σε επίπεδο στατιστικά σημαντικό στο σύνολο των εθελοντριών ($p = 0,019$). Εντούτοις, στατιστικά σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε στις επιμέρους ομάδες των εθελοντριών (υγιείς και οστεοπενικές με $p = 0,093$ και $p = 0,102$, αντίστοιχα). Στο εκχύλισμα του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* (POWSE) δεν παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα σε καμία από τις 3 ομάδες, που εξετάστηκαν (σύνολο εθελοντριών, γυναίκες με φυσιολογική οστική μάζα, οστεοπενικές με $p = 0,727$, $p = 0$, και $p = 0,180$, αντίστοιχα). Ωστόσο, η συν-επώαση με τα προϊόντα ζύμωσης του εκχυλίσματος του μανιταριού φάνηκε να οδηγεί σε σημαντικά υψηλότερη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με την ινουλίνη 1% τόσο στο σύνολο των εθελοντριών ($p = 0,010$) όσο και στις εθελόντριες με φυσιολογική οστική πυκνότητα ($p = 0,035$), ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε στις οστεοπενικές γυναίκες, όπου η διαφορά ήταν οριακά στατιστικά μη σημαντική ($p = 0,086$).

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

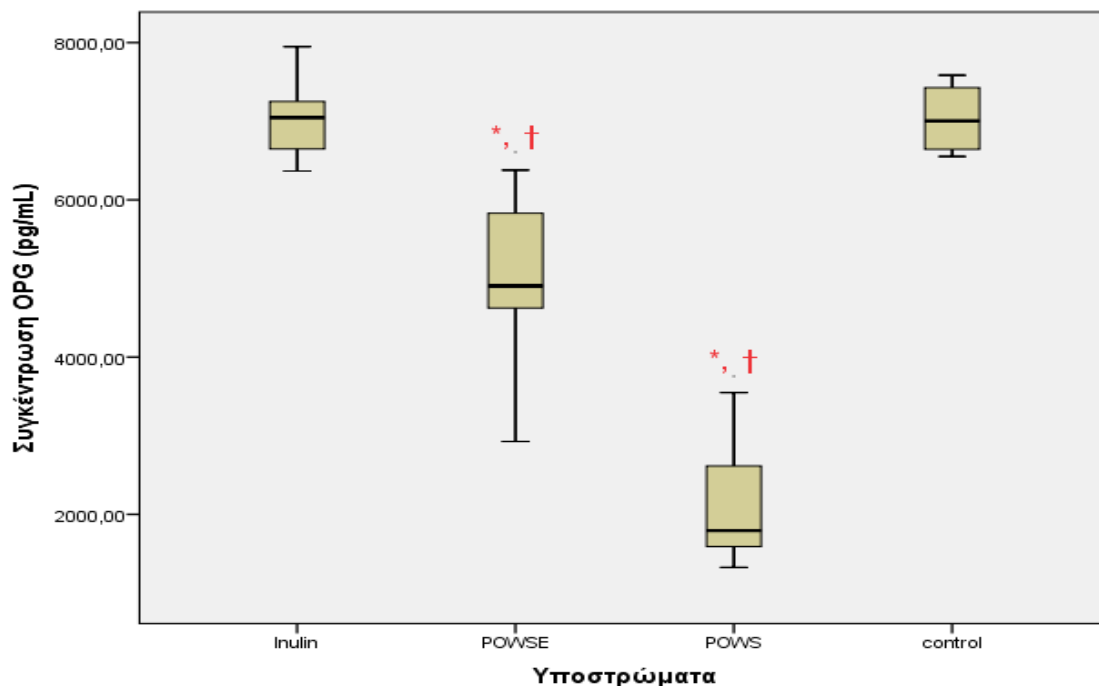
Τα αποτελέσματα, που προέκυψαν από τον προσδιορισμό των δεικτών του οστικού μεταβολισμού (OPG, RANKL) επεξεργάστηκαν στατιστικά και πραγματοποιήθηκε σύγκριση της συγκέντρωσης των οστικών δεικτών, που περιέχονταν στο δείγμα της κάθε εθελόντριας ως προς το σύνολο των εθελοντριών, όπως και ως προς κάθε μία ομάδα (εθελόντριες με φυσιολογική οστική πυκνότητα, οστεοπενικές). Οι συγκρίσεις περιλάμβαναν τις τιμές, που μετρήθηκαν και στους δύο δείκτες ως προς το δείγμα ελέγχου (αρνητικό control) και ως προς την ινουλίνη 2 (INU2) στην αραιώση 1:8 για το σύνολο των εθελοντριών αλλά και τη διαφορά των μέσων όρων ανάμεσα στις υγιείς και στις οστεοπενικές εθελόντριες ως προς το μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* (POWS) και του εκχυλίσματός του *Pleurotus ostreatus* (POWSE). Οι συγκρίσεις, που διεξήχθησαν παρουσιάζονται στα διαγράμματα 3-11.



Διάγραμμα 3. Προσδιορισμός συγκέντρωσης OPG σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (αρνητικό control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, POWS, POWSE στο σύνολο των εθελοντριών. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο POWSE: *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα OPG: Οστεοπροτεγερίνη

*: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control ($p < 0,05$)

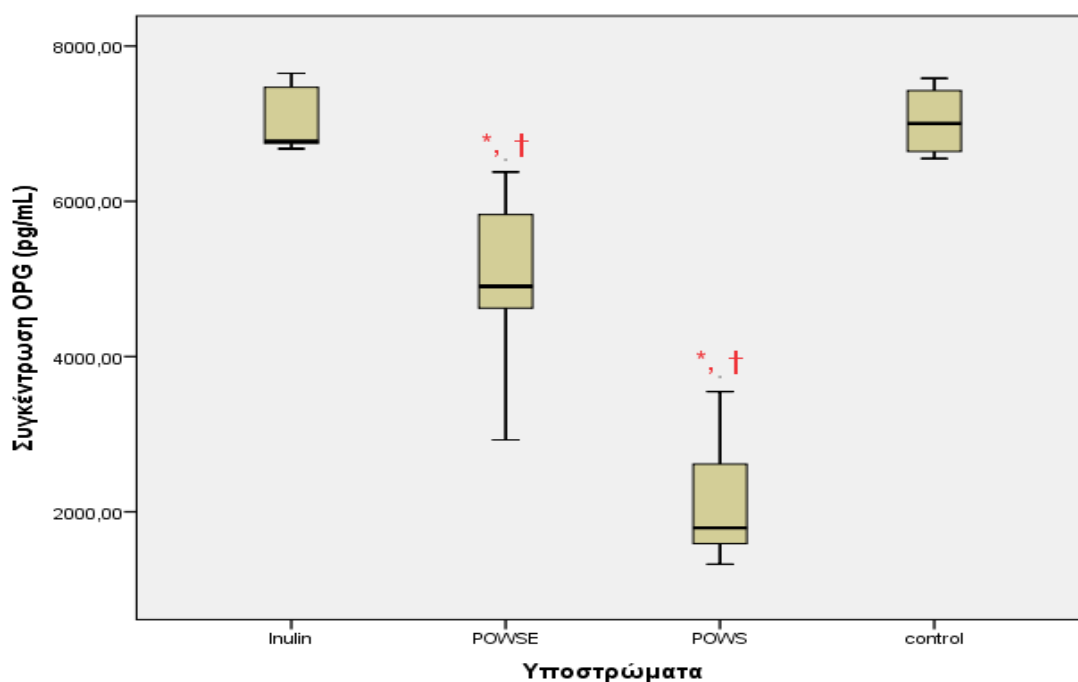
†: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 ($p < 0,05$)



Διάγραμμα 4. Προσδιορισμός συγκέντρωσης OPG σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (αρνητικό control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, POWS, POWSE στις υγιείς εθελόντριες. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο POWSE: *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα OPG: Οστεοπροτεγερίνη

*: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control ($p < 0,05$)

†: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 ($p < 0,05$)

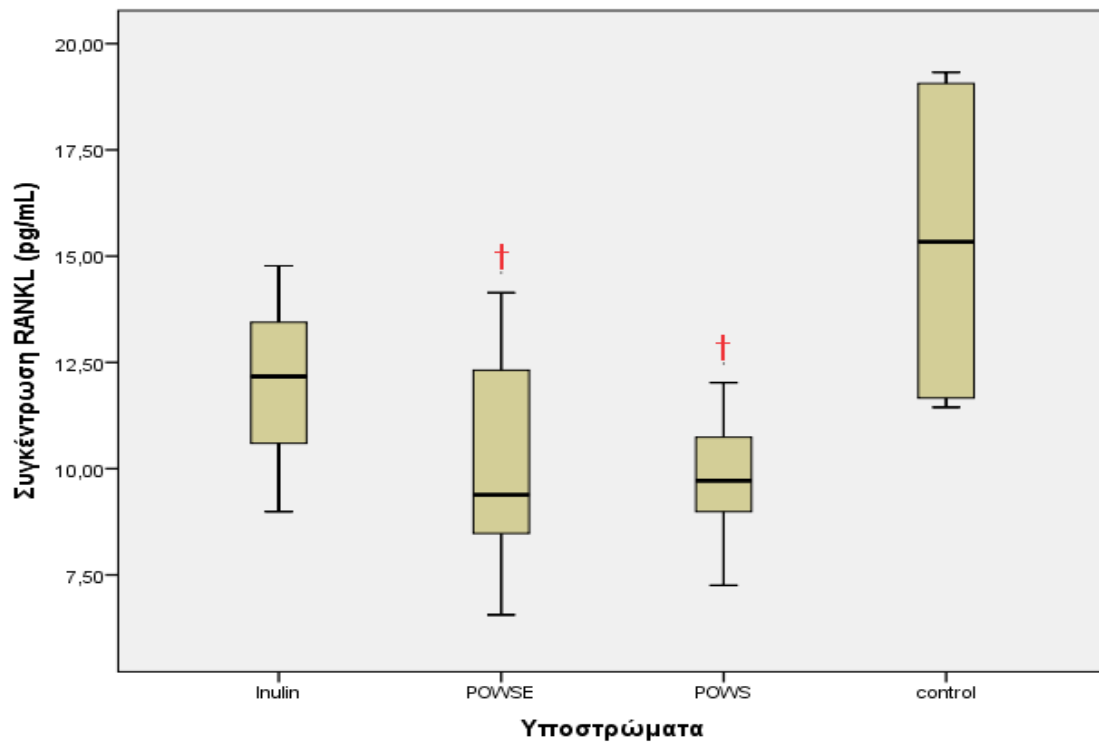


Διάγραμμα 5. Προσδιορισμός συγκέντρωσης OPG σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (αρνητικό control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, POWS, POWSE στις οστεοπενικές εθελόντριες. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο POWSE: *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα OPG: Οστεοπροτεγερίνη

*: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control ($p < 0,05$)

†: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 ($p < 0,05$)

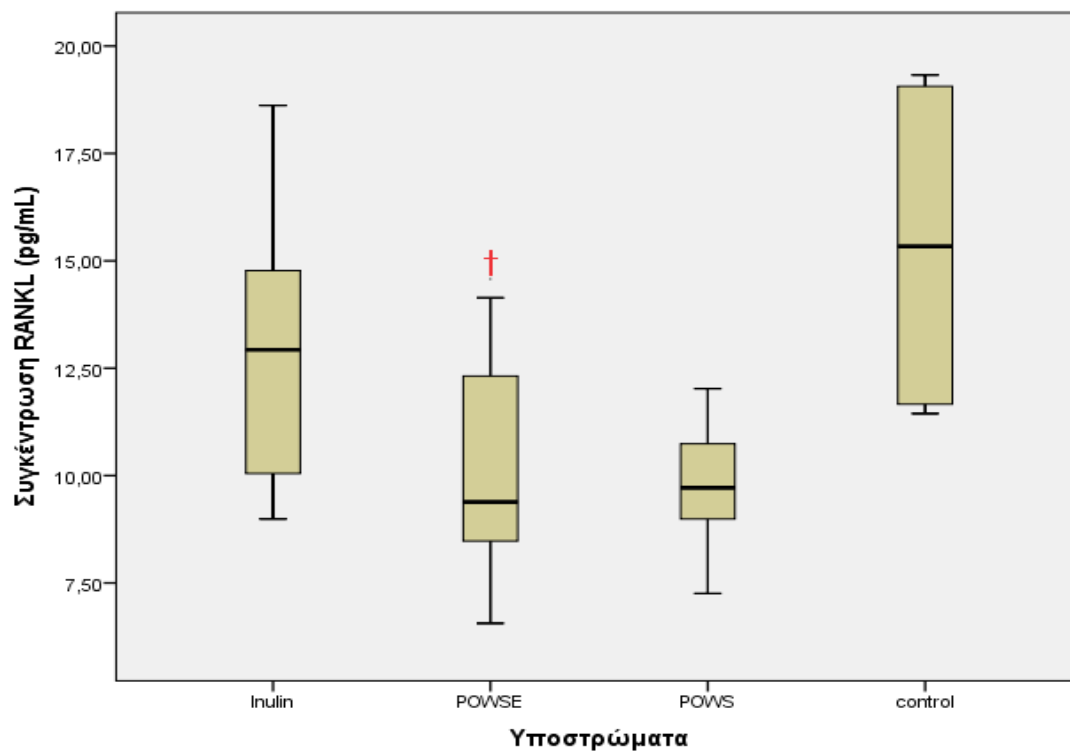
Στα διαγράμματα 3,4,5 απεικονίζεται ο προσδιορισμός συγκέντρωσης OPG σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων ύστερα από 48ωρη επώαση χωρίς (αρνητικό control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, POWS, POWSE στο σύνολο των εθελοντριών, στην ομάδα των γυναικών με φυσιολογική οστική πυκνότητα και στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ινουλίνης και του αρνητικού control για καμία από τις τρεις ομάδες με $p=0,992$, $p=0,965$ και $p=0,670$, αντίστοιχα. Αυτό το γεγονός, υποδηλώνει πως η ινουλίνη προκάλεσε ευεργετική οστεοβλαστική δράση ισάξια με το δείγμα ελέγχου. Όσον αφορά το δείγμα του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* (POWS), εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη δράση της ινουλίνης στο σύνολο των εθελοντριών ($p < 0,001$), στις υγιείς εθελόντριες ($p < 0,001$) και στις οστεοπενικές εθελόντριες ($p < 0,001$). Κατά τη σύγκριση του POWS με το αρνητικό control παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά και στις 3 ομάδες με $p < 0,001$ για τις υγιείς και τις οστεοπενικές και με $p=0,002$ για το σύνολο των εθελοντριών. Αντίστοιχα, στην περίπτωση του εκχυλίσματος του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* (POWSE) υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη δράση της ινουλίνης και στις 3 ομάδες με $p < 0,001$. Επιπλέον, το εκχύλισμα μανιταριού POWSE όταν συγκρίθηκε με το αρνητικό control εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά στη δράση του, τόσο ως προς το σύνολο των εθελοντριών ($p=0,001$) όσο και ως προς τις εθελόντριες με φυσιολογική οστική πυκνότητα ($p=0,002$) και ως προς τις οστεοπενικές ($p < 0,001$).



Διάγραμμα 6. Προσδιορισμός συγκέντρωσης RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (αρνητικό control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, POWS, POWSE στο σύνολο των εθελοντριών. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο POWSE: *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα RANKL: ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-B του πυρηνικού παράγοντα

*: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control ($p < 0,05$)

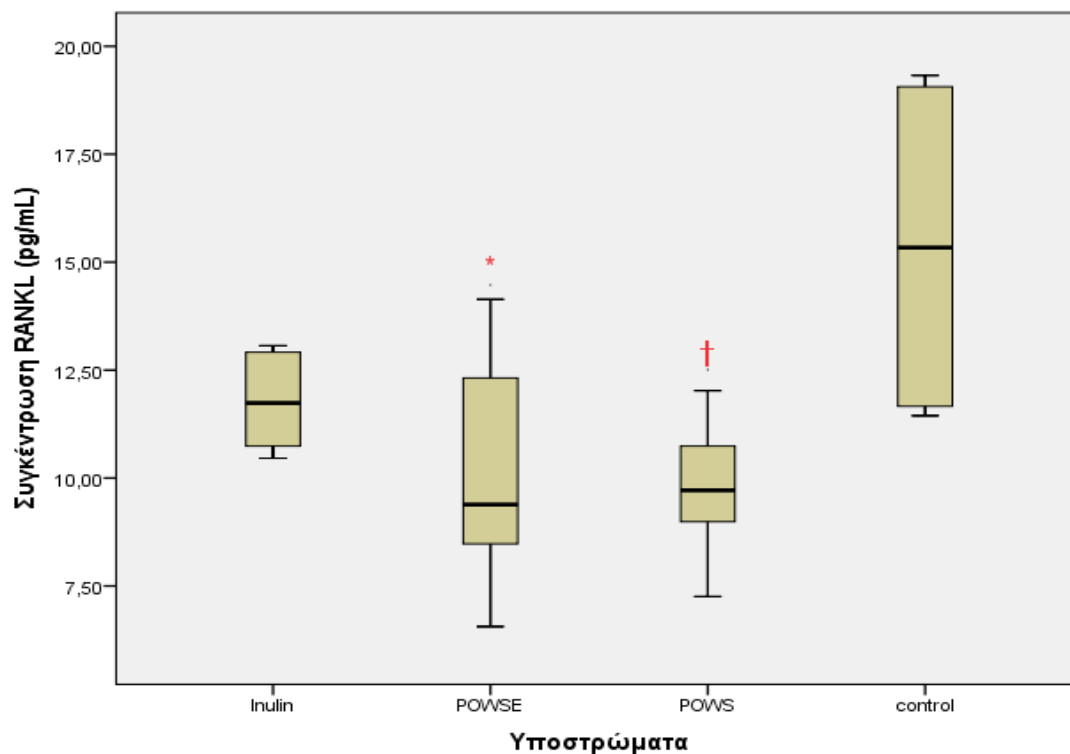
†: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 ($p < 0,05$)



Διάγραμμα 7. Προσδιορισμός συγκέντρωσης RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (αρνητικό control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, POWS, POWSE στις εθελόντριες με φυσιολογική οστική πυκνότητα. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο POWSE: *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα RANKL: ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-B του πυρηνικού παράγοντα

*: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control ($p < 0,05$)

†: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 ($p < 0,05$)



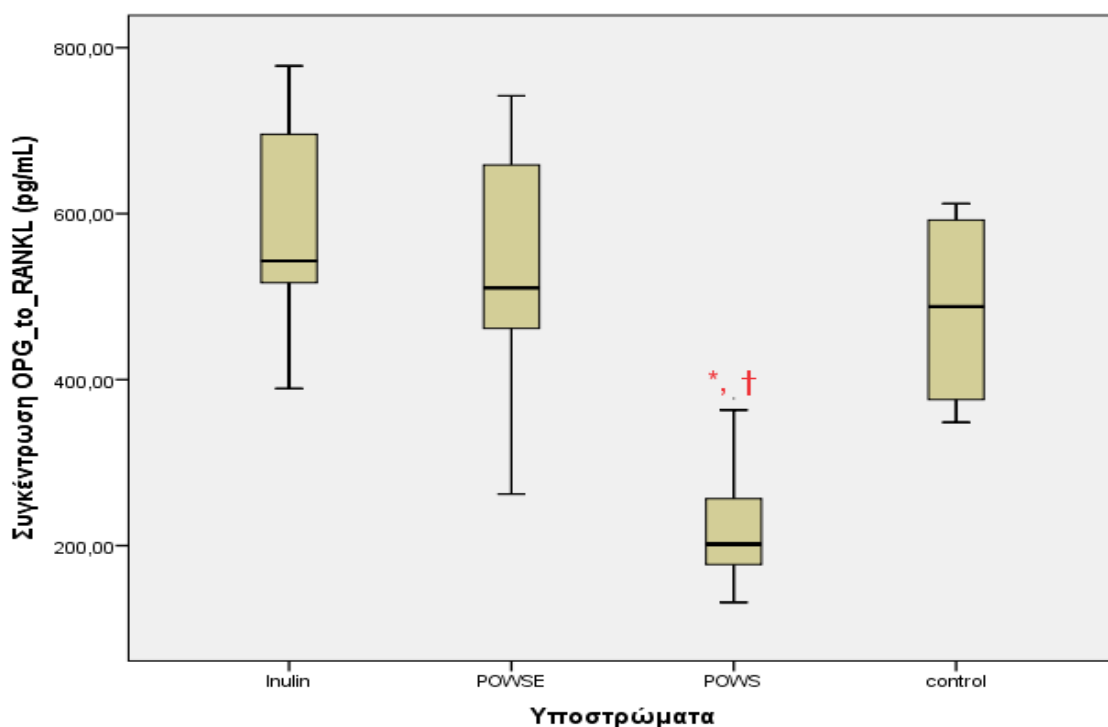
Διάγραμμα 8. Προσδιορισμός συγκέντρωσης RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (αρνητικό control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, POWS, POWSE στις οστεοπενικές εθελόντριες. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο POWSE: *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα RANKL: ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-B του πυρηνικού παράγοντα

*: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control ($p < 0,05$)

†: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 ($p < 0,05$)

Στα διαγράμματα 6,7,8 αποτυπώνεται η συγκέντρωση RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων ύστερα από 48ωρη επώαση χωρίς (αρνητικό control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, POWS, POWSE στο σύνολο των εθελοντριών, στην ομάδα των γυναικών με φυσιολογική οστική πυκνότητα και στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ινουλίνης και του αρνητικού control για καμία από τις τρεις ομάδες με $p=0,112$, $p=0,374$ και $p=0,192$, αντίστοιχα. Αυτό το γεγονός υποδηλώνει πως η ινουλίνη προκάλεσε ευεργετική οστεοκλαστική δράση ισάξια με το αρνητικό control. Όσον αφορά το δείγμα του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* (POWS) εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη δράση της ινουλίνης στο σύνολο των εθελοντριών ($p=0,001$) και στις οστεοπενικές εθελόντριες ($p=0,002$), ενώ, οριακά δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στις υγιείς εθελόντριες ($p=0,065$). Κατά τη σύγκριση του POWS με το αρνητικό control δεν

παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε καμία από τις 3 ομάδες με $p=0,075$ για το σύνολο των εθελοντριών, $p=0,105$ για τις υγιείς και οριακά μη στατιστικά σημαντική διαφορά για τις οστεοπενικές με $p=0,055$. Αντίστοιχα, στην περίπτωση του εκχυλίσματος του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* (POWSE) υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη δράση της ινουλίνης τόσο στο σύνολο των εθελοντριών με $p=0,013$ όσο και στις υγιείς εθελόντριες με $p=0,023$. Ωστόσο, στις οστεοπενικές εθελόντριες δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,092$). Επιπλέον, το εκχύλισμα μανιταριού POWSE όταν συγκρίθηκε με το δείγμα ελέγχου εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά στη δράση του στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών ($p=0,021$). Στις άλλες δύο ομάδες, δηλαδή, στο σύνολο των εθελοντριών και στην ομάδα των γυναικών με φυσιολογική οστική πυκνότητα δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά με $p=0,084$ και $p=0,090$ αντίστοιχα.

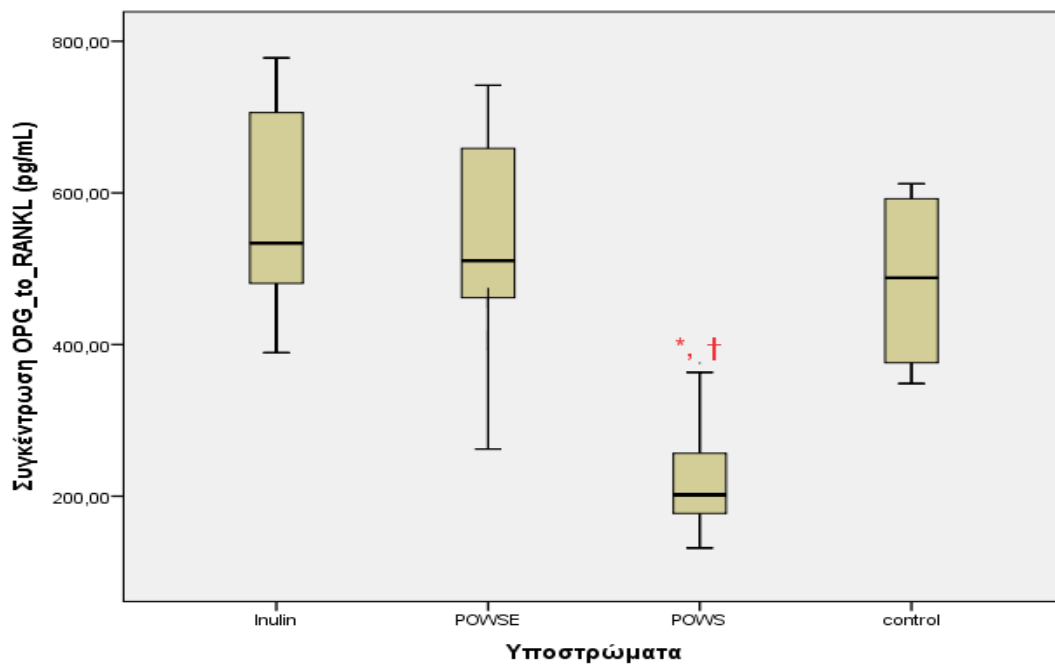


Διάγραμμα 9. Προσδιορισμός συγκέντρωσης λόγου OPG/RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (αρνητικό control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, POWS, POWSE στο σύνολο των εθελοντριών. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο POWSE: *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα

OPG/RANKL: Οστεοπροτεγερίνη/Ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-B του πυρηνικού παράγοντα

*: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control ($p<0,05$)

†: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 ($p<0,05$)

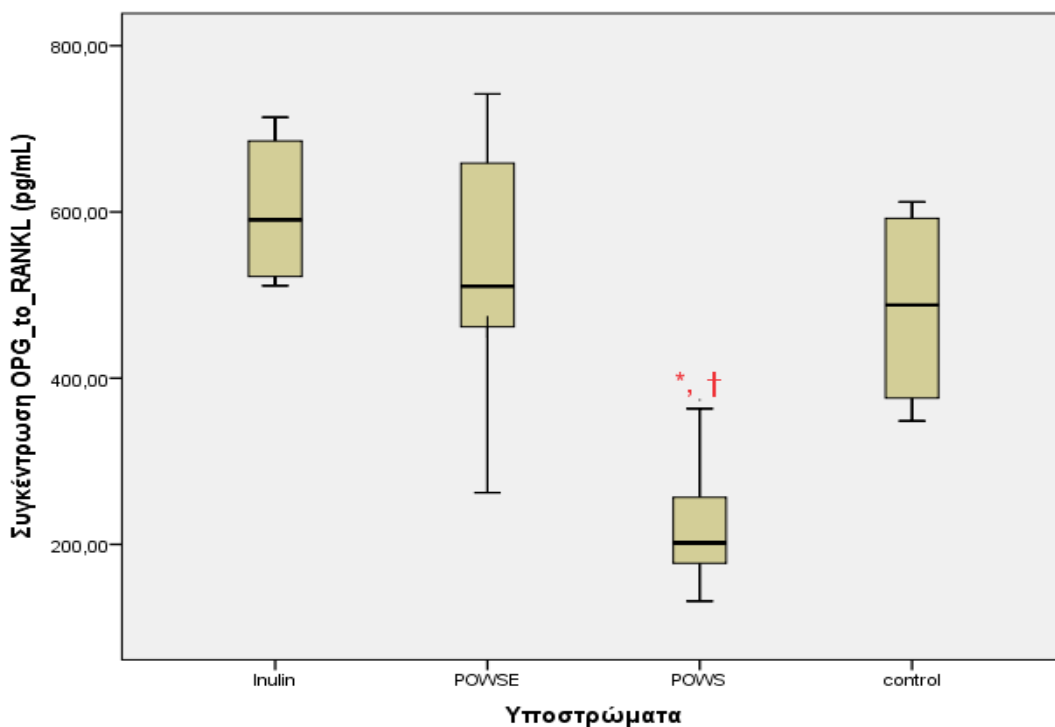


Διάγραμμα 10. Προσδιορισμός συγκέντρωσης λόγου OPG/RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (αρνητικό control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, POWS, POWSE στις εθελόντριες με φυσιολογική οστική πυκνότητα. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο POWSE: *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα

OPG/RANKL: Οστεοπροτεγερίνη/Ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-B του πυρηνικού παράγοντα

*: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control ($p < 0,05$)

†: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 ($p < 0,05$)



Διάγραμμα 11. Προσδιορισμός συγκέντρωσης λόγου OPG/RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων κατόπιν 48ωρης επώασης χωρίς (αρνητικό control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, POWS, POWSE στις οστεοπενικές εθελόντριες. INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο POWSE: *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα

OPG/RANKL: Οστεοπροτεγερίνη/Ενεργοποιητής υποδοχέα του συνδέτη κάππα-B του πυρηνικού παράγοντα

*: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με Control ($p < 0,05$)

†: στατιστικά σημαντικό σε σχέση με INU2 ($p < 0,05$)

Στα διαγράμματα 9, 10, 11 παρουσιάζεται ο προσδιορισμός συγκέντρωσης του λόγου OPG/RANKL σε υπερκείμενο καλλιέργειας MG-63 κυττάρων ύστερα από 48ωρη επώαση χωρίς (αρνητικό control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, POWS, POWSE στο σύνολο των εθελοντριών, στην ομάδα των γυναικών με φυσιολογική οστική πυκνότητα και στην ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών. Δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ινουλίνης και του αρνητικού control για καμία από τις τρεις ομάδες με $p=0,156$, $p=0,364$ και $p=0,117$, αντίστοιχα. Όσον αφορά το δείγμα του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* (POWS) εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη δράση της ινουλίνης και στις 3 ομάδες με $p < 0,001$. Κατά τη σύγκριση του POWS με το αρνητικό control υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο στο σύνολο των εθελοντριών με $p=0,005$ όσο και στις υγιείς με $p=0,007$ αλλά και στις οστεοπενικές με $p=0,018$. Αντίστοιχα, στην περίπτωση του εκχυλίσματος του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* (POWSE) δε φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη δράση της ινουλίνης ούτε στο σύνολο των εθελοντριών ($p=0,333$) ούτε στις υγιείς εθελόντριες ($p=0,627$) αλλά ούτε και στις οστεοπενικές ($p=0,318$). Τέλος, το εκχύλισμα μανιταριού POWSE όταν συγκρίθηκε με το δείγμα ελέγχου δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά στη δράση του σε καμία από τις 3 ομάδες με $p=0,516$ στο σύνολο των εθελοντριών, $p=0,355$ στις υγιείς εθελόντριες και $p=0,922$ στις οστεοπενικές.

ΚΕΦ. 5: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από τα αποτελέσματα των ανθρωπομετρικών μετρήσεων και των περιγραφικών στοιχείων του δείγματος, που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης, καθώς και από τα δεδομένα της διατροφικής πρόσληψης (ανάλυση μακροθρεπτικών και μικροθρεπτικών συστατικών) και τα στοιχεία, που αφορούν τη φυσική δραστηριότητα εξασφαλίστηκε η ομοιογένεια του δείγματος της μελέτης. Η μοναδική διαφορά, που παρατηρήθηκε σε οριακά στατιστικά σημαντικό επίπεδο ήταν στο ποσοστό ημερήσιας πρόσληψης πρωτεΐνης ανάμεσα στις υγιείς και οστεοπενικές εθελόντριες με την πρόσληψη των οστεοπενικών γυναικών να είναι υψηλότερη. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να λειτουργήσει ως συγχυτικός παράγοντας στα αποτελέσματα μιας ενδεχόμενης μελέτης με μεγαλύτερο αριθμό εθελοντριών. Ωστόσο, στην παρούσα έρευνα δε λήφθηκε υπόψιν ως συγχυτικός παράγοντας και ως στοιχείο, που θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα.

Η διαδικασία προσδιορισμού της βιωσιμότητας των κυττάρων MG-63 κυττάρων, έδειξε ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος κάθε εθελόντριας διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη βιωσιμότητα των MG-63 κυττάρων. Το παραπάνω αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο, δεδομένου ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλομορφία και είναι μοναδικός για κάθε άτομο. Για το λόγο αυτό, ο πειραματικός σχεδιασμός της *in vitro* ζύμωσης των υποστρωμάτων, με εμβόλιο τον εντερικό μικροβιόκοσμο κάθε εθελόντριας, έγινε έτσι, ώστε να εμβολιάζονται όλα τα υποστρώματα κάθε φορά με το ίδιο εμβόλιο, ταυτόχρονα, για να μην υπάρχουν διαφορές στο αρχικό εμβόλιο. Κάθε εθελόντρια λειτουργεί ως μια επανάληψη του πειράματος. Έγιναν 3 επαναλήψεις για την ομάδα της φυσιολογικής οστικής πυκνότητας και 3 για την ομάδα των οστεοπενικών εθελοντριών. Η επιλογή μεγαλύτερου δείγματος (περισσότερων εθελοντριών) είναι η ενδεδειγμένη μέθοδος για να ξεπεραστεί μεθοδολογικά αυτό το θέμα, ενώ, άλλοι ερευνητές χρησιμοποιούν ένα σύνθετο δείγμα, που προκύπτει από την ανάμειξη πολλών δειγμάτων, από διαφορετικούς εθελοντές. {Rosch, 2016}, {Wu, 2017} Εντούτοις, κατά τη σύγκριση των 2 επιμέρους ομάδων μεταξύ τους (εθελόντριες με φυσιολογική οστική πυκνότητα και εθελόντριες με μειωμένη οστική πυκνότητα) δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς τη βιωσιμότητα, γεγονός, που εξασφάλισε την ομοιογένεια του δείγματος. Επομένως, βάσει αυτού του δεδομένου οποιαδήποτε πιθανή θετική ή αρνητική επίδραση στα οστικά κύτταρα αποδίδεται αποκλειστικά στα διαφορετικά εμβόλια, που χρησιμοποιήθηκαν και όχι στην αρχική φύση του δείγματος, που δόθηκε από την κάθε εθελόντρια. Από τις στατιστικές αναλύσεις, που προέκυψαν από τον έλεγχο κυτταροτοξικότητας μετά από 24ωρη ζύμωση με το εμβόλιο κοπράνων σε αραιώση 1:8,

διαπιστώθηκε ότι ακόμα και αναγνωρισμένα πρεβιοτικά όπως η ινουλίνη οδηγούν σε μείωση της βιωσιμότητας των MG-63 κυττάρων τόσο στο σύνολο των εθελοντριών όσο και στις υγιείς γυναίκες. Τις ίδιες επιδράσεις φαίνεται να έχει και το ακατέργαστο μανιτάρι POWS. Αντιθέτως, το εκχύλισμα του μανιταριού, που είναι πλούσιο σε β-γλυκάνες εμφανίζει σημαντικά πιο αυξημένη βιωσιμότητα σε σχέση με την ινουλίνη 1%. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι στις οστεοπενικές εθελόντριες σε κανένα χειρισμό δεν εντοπίστηκε σημαντική μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Το γεγονός αυτό, πιθανά υποδηλώνει πως η ζύμωση των πρεβιοτικών από τον εντερικό μικροβιόκοσμο των οστεοπενικών ίσως να έχει πιο ευνοϊκά αποτελέσματα ως προς τη βιωσιμότητα των οστεοβλαστών.

Ο προσδιορισμός των δεικτών του οστικού μεταβολισμού της Οστεοπροτεγερίνης (OPG) και του Ενεργοποιητή του υποδοχέα του συνδέτη κάππα-B του πυρηνικού παράγοντα (RANKL) πραγματοποιήθηκε στα υπερκείμενα της καλλιέργειας MG-63 κυττάρων ύστερα από 48ωρη επώαση χωρίς (αρνητικό control) ή με τα προϊόντα της 24ωρης ζύμωσης των INU2, POWS, POWSE. Τα ευρήματα, που προέκυψαν ανέδειξαν την ευεργετική επίδραση της ινουλίνης 2%, η οποία συγκρινόμενη με το αρνητικό control δείγμα δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά για κανένα δείκτη οστικού μεταβολισμού, υποδηλώνοντας μια πιθανή ευεργετική της δραστηριότητα στους οστεοβλάστες και θετική της συμβολή στον οστικό ανασχηματισμό. Τόσο το ακατέργαστο μανιτάρι όσο και το εκχύλισμα μανιταριού εμφάνισαν στατιστικά σημαντική μείωση στη συγκέντρωση OPG σε όλες τις ομάδες (σύνολο εθελοντριών, υγιείς, οστεοπενικές). Πρέπει, όμως, να επισημανθεί ότι και στις 3 ομάδες το εκχύλισμα των β-γλυκανών του *Pleurotus ostreatus* προκάλεσε υψηλότερη έκκριση οστεοπροτεγερίνης στο υπερκείμενο των κυττάρων σε σχέση με το ακατέργαστο μανιτάρι. Επίσης, το εκχύλισμα των β-γλυκανών του *Pleurotus ostreatus* αν και δεν παρουσίασε από την αρχή κάποια ευεργετική επίδραση ως προς την OPG και κατ' επέκταση ως προς την ανάπτυξη των οστεοβλαστών, φάνηκε, ωστόσο, να επιδρά θετικά στο λόγο OPG/RANKL και άρα, στην οστική ανακατασκευή σε όλες τις μελετώμενες ομάδες, αφού, σε καμία από αυτές δεν εντοπίστηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ως προς το μάρτυρα (αρνητικό control) και ως προς την ινουλίνη, που παρουσίαζαν και τις υψηλότερες τιμές. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε ίσως να αποδοθεί στη στατιστικά σημαντική μείωση της συγκέντρωσης RANKL στο δείγμα με το εκχύλισμα των β-γλυκανών (POWSE) σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (αρνητικό control). Όσον αφορά, το ακατέργαστο μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* δεν εμφάνισε κάποια αξιοσημείωτη επίδραση στη συγκέντρωση της οστεοπροτεγερίνης και κατά συνέπεια, στην ενίσχυση της οστικής μάζας. Εντούτοις, παρατηρήθηκε επίδραση του στη μείωση της συγκέντρωσης του δείκτη RANKL

με στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ινουλίνη τόσο στο σύνολο των εθελοντριών όσο και στις οστεοπενικές εθελόντριες με $p=0,001$ και $p=0,002$, αντίστοιχα και οριακά μη στατιστικά σημαντική διαφορά στις υγιείς εθελόντριες ($p=0,075$). Επίσης, στις οστεοπενικές εθελόντριες οριακά δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στο ακατέργαστο μανιτάρι σε σχέση με το αρνητικό control ($p=0,055$). Παρ' όλα αυτά, στο λόγο OPG/RANKL δεν αποτυπώθηκε κάποια θετική επίδραση του μανιταριού είτε σε σχέση με την ινουλίνη είτε σε σχέση με το αρνητικό control, ενώ, ήταν στατιστικά σημαντικά μειωμένη σε σχέση με αυτά.

Αυτή η επιστημονική προσέγγιση για τη χρήση των πρεβιοτικών και άλλων φυσικών συστατικών, προκειμένου να περιοριστεί η απώλεια οστικής πυκνότητας και μελλοντικά να αναχαιτιστεί η αύξηση του επιπολασμού της οστεοπόρωσης, καθιστά πιο επιτακτική από ποτέ την ανάγκη για σχεδιασμό και διεξαγωγή περισσότερων κλινικών δοκιμών, ώστε να μελετηθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης των συστατικών αυτών.

Εν κατακλείδι, πρέπει να τονιστεί ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος έχει αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια σε πρωτεύουσα συνιστώσα, που καθορίζει την εμφάνιση και την πορεία ποικίλων ασθενειών και μεταβολικών νοσημάτων συμπεριλαμβανομένης και της οστεοπόρωσης. Η επίδραση, λοιπόν, στον εντερικό μικροβιόκοσμο μπορεί να αποτελέσει το εφαλτήριο για μια πιο καινοτόμα φαρμακολογική θεραπεία στον τομέα της οστεοπόρωσης. Το επιστημονικό ενδιαφέρον είναι επικεντρωμένο, λοιπόν, στην προσπάθεια συσχέτισης της οστεοπόρωσης με τον εντερικό μικροβιόκοσμο, με τα υπάρχοντα δεδομένα να υποδηλώνουν πως πιθανόν η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες να παίζει σημαντικό ρόλο και στη διαμόρφωση της οστικής τους μάζας. {McCabe, 2015} Σχετικά με τα εδώδιμα μανιτάρια προσελκύουν το ενδιαφέρον ήδη από την αρχαιότητα λόγω των πιθανών φαρμακευτικών και θεραπευτικών τους δράσεων. {Fan, 2006} Ειδικότερα, οι β-γλυκάνες, που αποτελούν συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων αποτελούν ένα νέο πεδίο έρευνας, που με την πάροδο των ετών κερδίζει περισσότερη αναγνώριση. {Villares, 2012} Η πιθανή ευεργετική δραστηριότητα των βιολογικών εκχυλισμάτων των μανιταριών στον οστικό μεταβολισμό βρίσκεται υπό διερεύνηση από τους φαρμακολόγους. {Charles, 2015} Ωστόσο, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα και ακριβή αποτελέσματα, πρέπει να πραγματοποιηθούν καλά σχεδιασμένες μελέτες ευρύτερης κλίμακας, που θα μελετούν τον ακριβή μηχανισμό δράσης τους σε σχέση με τη φυσιολογία των οστών και τους μηχανισμούς ανακατασκευής τους αλλά και τις επιπτώσεις από την ενδεχόμενη χρήση τους όπως και την ακριβή δοσολογία, που μπορεί να επιφέρει ωφέλιμα αποτελέσματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ASSELIN-LABAT, M. L., VAILLANT, F., SHERIDAN, J. M., PAL, B., WU, D., SIMPSON, E. R., YASUDA, H., SMYTH, G. K., MARTIN, T. J., LINDEMAN, G. J. & VISVADER, J. E. 2010. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature*, 465, 798-802.
- BANO, Z. & RAJARATHNAM, S. 1988. Pleurotus mushrooms. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and role as human food. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 27, 87-158.
- BEASLEY, J. M., LACROIX, A. Z., LARSON, J. C., HUANG, Y., NEUHouser, M. L., TINKER, L. F., JACKSON, R., SNETSELAAR, L., JOHNSON, K. C., EATON, C. B. & PRENTICE, R. L. 2014. Biomarker-calibrated protein intake and bone health in the Women's Health Initiative clinical trials and observational study. *Am J Clin Nutr*, 99, 934-40.
- BONJOUR, J. P. 2016. The dietary protein, IGF-I, skeletal health axis. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 28, 39-53.
- BONJOUR, J. P., BENOIT, V., ATKIN, S. & WALRAND, S. 2015. Fortification of Yogurts with Vitamin D and Calcium Enhances the Inhibition of Serum Parathyroid Hormone and Bone Resorption Markers: A Double Blind Randomized Controlled Trial in Women over 60 Living in a Community Dwelling Home. *J Nutr Health Aging*, 19, 563-9.
- BOURLIOUX, P., KOLETZKO, B., GUARNER, F. & BRAESCO, V. 2003. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002. *Am J Clin Nutr*, 78, 675-83.
- BOYAN, B. D., SCHWARTZ, Z., BONEWALD, L. F. & SWAIN, L. D. 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. *J Biol Chem*, 264, 11879-86.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun*, 293, 13-7.
- CANI, P. D., LECOURT, E., DEWULF, E. M., SOHET, F. M., PACHIKIAN, B. D., NASLAIN, D., DE BACKER, F., NEYRINCK, A. M. & DELZENNE, N. M. 2009. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Am J Clin Nutr*, 90, 1236-43.
- CAVALLI, L., GUAZZINI, A., CIANFEROTTI, L., PARRI, S., CAVALLI, T., METOZZI, A., GIUSTI, F., FOSSI, C., BLACK, D. M. & BRANDI, M. L. 2016. Prevalence of osteoporosis in the Italian population and main risk factors: results of BoneTour Campaign. *BMC Musculoskelet Disord*, 17, 396.
- CHAN, G., CHAN, W., SZE, D. 2009. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 2(1), 25.
- CHARLES, J. F., ERMANN, J. & ALIPRANTIS, A. O. 2015. The intestinal microbiome and skeletal fitness: Connecting bugs and bones. *Clin Immunol*, 159, 163-9.
- 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), 614-619.
- COLLINS, S. & REID, G. 2016. Distant Site Effects of Ingested Prebiotics. *Nutrients*, 8.
- CROUCHER, P. I., SHIPMAN, C. M., LIPPITT, J., PERRY, M., ASOSINGH, K., HIJZEN, A., BRABBS, A. C., VAN BEEK, E. J., HOLEN, I., SKERRY, T. M., DUNSTAN, C. R., RUSSELL, G. R., VAN CAMP, B. & VANDERKERKEN, K. 2001. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*, 98, 3534-40.
- D'AMELIO, P., PANICO, A., SPERTINO, E. & ISAIA, G. C. 2012. Energy metabolism and the skeleton: Reciprocal interplay. *World J Orthop*, 3, 190-8.
- DEMIR, B., HABERAL, A., GEYIK, P., BASKAN, B., OZTURKOGLU, E., KARACAY, O. & DEVECI, S. 2008. Identification of the risk factors for osteoporosis among postmenopausal women. *Maturitas*, 60, 253-6.
- EJTAHED, H. S., SOROUGH, A. R., ANGOORANI, P., LARIJANI, B. & HASANI-RANJBAR, S. 2016. Gut Microbiota as a Target in the Pathogenesis of Metabolic Disorders: A New Approach to Novel Therapeutic Agents. *Horm Metab Res*, 48, 349-58.
- FAN, L., PAN, H., THOMAZ- SOCCOL, A., PANDEY, A., SOCCOL, C. 2006. Advances in Mushroom Research in the Last Decade. *Food Technology and Biotechnology*, 44.
- FAN, T., NOCEA, G., MODI, A., STOKES, L. & SEN, S. S. 2013. Calcium and vitamin D intake by postmenopausal women with osteoporosis in Spain: an observational calcium and vitamin D

- intake (CaVIT) study. *Clin Interv Aging*, 8, 689-96.
- FAZZALARI, N. L. 2008. Bone remodeling: A review of the bone microenvironment perspective for fragility fracture (osteoporosis) of the hip. *Semin Cell Dev Biol*, 19, 467-72.
- FRANCESCHI, R. T., JAMES, W. M. & ZERLAUTH, G. 1985. 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 specific regulation of growth, morphology, and fibronectin in a human osteosarcoma cell line. *J Cell Physiol*, 123, 401-9.
- FRIEDMAN, M. 2016. Mushroom Polysaccharides: Chemistry and Antiobesity, Antidiabetes, Anticancer, and Antibiotic Properties in Cells, Rodents, and Humans. *Foods*, 5.
- FUNG, T. T., ARASARATNAM, M. H., GRODSTEIN, F., KATZ, J. N., ROSNER, B., WILLETT, W. C. & FESKANICH, D. 2014. Soda consumption and risk of hip fractures in postmenopausal women in the Nurses' Health Study. *Am J Clin Nutr*, 100, 953-8.
- GEREND, M. A., ERCHULL, M. J., AIKEN, L. S. & MANER, J. K. 2006. Reasons and risk: factors underlying women's perceptions of susceptibility to osteoporosis. *Maturitas*, 55, 227-37.
- GROOPER S., S. J., GROFF J. 2007. *Διατροφή και Μεταβολισμός*, Τόμος Ι, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- GUNN, C. A., WEBER, J. L. & KRUGER, M. C. 2013. Midlife women, bone health, vegetables, herbs and fruit study. The Scarborough Fair study protocol. *BMC Public Health*, 13, 23.
- 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), 41-45.
- HART M., L. A. 2014. *Παθοφυσιολογία Νόσων*, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- HERNANDEZ, C. J., GUSS, J. D., LUNA, M. & GOLDRING, S. R. 2016. Links Between the Microbiome and Bone. *J Bone Miner Res*, 31, 1638-46.
- ISHIMI, Y. 2015. Osteoporosis and Lifestyle. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 61 Suppl, S139-41.
- JEDINAK, A. & SLIVA, D. 2008. Pleurotus ostreatus inhibits proliferation of human breast and colon cancer cells through p53-dependent as well as p53-independent pathway. *Int J Oncol*, 33, 1307-13.
- JEREMIAH, M. P., UNWIN, B. K., GREENAWALD, M. H. & CASIANO, V. E. 2015. Diagnosis and Management of Osteoporosis. *Am Fam Physician*, 92, 261-8.
- KHARROUBI, A., SABA, E., SMOOM, R., BADER, K. & DARWISH, H. 2017. Serum 25-hydroxyvitamin D and bone turnover markers in Palestinian postmenopausal osteoporosis and normal women. *Arch Osteoporos*, 12, 13.
- KIECHL, S., SCHETT, G., WENNING, G., REDLICH, K., OBERHOLLENZER, M., MAYR, A., SANTER, P., SMOLEN, J., POEWE, W. & WILLEIT, J. 2004. Osteoprotegerin is a risk factor for progressive atherosclerosis and cardiovascular disease. *Circulation*, 109, 2175-80.
- LAJEUNESSE, D., FRONDOZA, C., SCHOFFIELD, B. & SACKTOR, B. 1990. Osteocalcin secretion by the human osteosarcoma cell line MG-63. *J Bone Miner Res*, 5, 915-22.
- LAJEUNESSE, D., KIEBZAK, G. M., FRONDOZA, C. & SACKTOR, B. 1991. Regulation of osteocalcin secretion by human primary bone cells and by the human osteosarcoma cell line MG-63. *Bone Miner*, 14, 237-50.
- LANE, N. E. 2006. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol*, 194, S3-11.
- LANGSETMO, L., BARR, S. I., BERGER, C., KREIGER, N., RAHME, E., ADACHI, J. D., PAPAIOANNOU, A., KAISER, S. M., PRIOR, J. C., HANLEY, D. A., KOVACS, C. S., JOSSE, R. G., GOLTZMAN, D. & CAMOS RESEARCH, G. 2015. Associations of Protein Intake and Protein Source with Bone Mineral Density and Fracture Risk: A Population-Based Cohort Study. *J Nutr Health Aging*, 19, 861-8.
- LEE, A. W. & CHO, S. S. 2015. Association between phosphorus intake and bone health in the NHANES population. *Nutr J*, 14, 28.
- LI, J. Y., CHASSAING, B., TYAGI, A. M., VACCARO, C., LUO, T., ADAMS, J., DARBY, T. M., WEITZMANN, M. N., MULLE, J. G., GEWIRTZ, A. T., JONES, R. M. & PACIFICI, R. 2016. Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *J Clin Invest*, 126, 2049-63.
- LOZUPONE, C. A., STOMBAUGH, J. I., GORDON, J. I., JANSSON, J. K. & KNIGHT, R. 2012. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489, 220-30.
- LUAN, X., LU, Q., JIANG, Y., ZHANG, S., WANG, Q., YUAN, H., ZHAO, W., WANG, J. & WANG, X. 2012. Crystal structure of human RANKL complexed with its decoy receptor osteoprotegerin. *J Immunol*, 189, 245-52.
- LULL, C., WICHERS, H. J. & SAVELKOUL, H. F. 2005. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators Inflamm*, 2005, 63-80.
- MADIGAN M., M. J., PARKER J. 2014. *Βιολογία των Μικροοργανισμών*, Τόμος Ι, Πανεπιστημιακές

Εκδόσεις Κρήτης.

- MAHAN K., E.-S. S. 2014. *Krause's Κλινική Διατροφή*, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.
- MAHBOUB, S. M., AL-MUAMMAR, M. N. & ELAREEFY, A. A. 2014. Evaluation of the prevalence and correlated factors for decreased bone mass density among pre- and post-menopausal educated working women in Saudi Arabia. *J Health Popul Nutr*, 32, 513-9.
- MANGANO, K. M., SAHNI, S., KIEL, D. P., TUCKER, K. L., DUFOUR, A. B. & HANNAN, M. T. 2015. Bone Mineral Density and Protein-Derived Food Clusters from the Framingham Offspring Study. *J Acad Nutr Diet*, 115, 1605-1613 e1.
- MCCABE, L., BRITTON, R. A. & PARAMESWARAN, N. 2015. Prebiotic and Probiotic Regulation of Bone Health: Role of the Intestine and its Microbiome. *Curr Osteoporos Rep*, 13, 363-71.
- MCLOUGHLIN, R. F., BERTHON, B. S., JENSEN, M. E., BAINES, K. J. & WOOD, L. G. 2017. Short-chain fatty acids, prebiotics, synbiotics, and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*, 106, 930-945.
- MENZEL, J., DI GIUSEPPE, R., WIENTZEK, A., KROKE, A., BOEING, H. & WEIKERT, C. 2015. Physical Activity, Bone Health, and Obesity in Peri-/Pre- and Postmenopausal Women: Results from the EPIC-Potsdam Study. *Calcif Tissue Int*, 97, 376-84.
- MORI, G., D'AMELIO, P., FACCIO, R. & BRUNETTI, G. 2015. Bone-immune cell crosstalk: bone diseases. *J Immunol Res*, 2015, 108451.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- MOSTOFSKY, E., MUKAMAL, K. J., GIOVANNUCCI, E. L., STAMPFER, M. J. & RIMM, E. B. 2016. Key Findings on Alcohol Consumption and a Variety of Health Outcomes From the Nurses' Health Study. *Am J Public Health*, 106, 1586-91.
- OHMORI, H., MAKITA, Y., FUNAMIZU, M., HIROOKA, K., HOSOI, T., ORIMO, H., SUZUKI, T., IKARI, K., NAKAJIMA, T., INOUE, I. & HATA, A. 2002. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet*, 47, 400-6.
- ORCHARD, T. S., LARSON, J. C., ALGHOTHANI, N., BOUT-TABAKU, S., CAULEY, J. A., CHEN, Z., LACROIX, A. Z., WACTAWSKI-WENDE, J. & JACKSON, R. D. 2014. Magnesium intake, bone mineral density, and fractures: results from the Women's Health Initiative Observational Study. *Am J Clin Nutr*, 99, 926-33.
- PALFRAMAN, R. J., GIBSON, G. R. & RASTALL, R. A. 2002. Effect of pH and dose on the growth of gut bacteria on prebiotic carbohydrates in vitro. *Anaerobe*, 8, 287-92.
- PATEL, Y., NARAJAN, R., SINGH, V. 2012. Medicinal properties of *Pleurotus* species (Oyster mushroom): A review. *World J Fungal Plant Biol.*, 3, 1-12.
- PRZEKORA, A. & GINALSKA, G. 2017. Chitosan/beta-1,3-glucan/hydroxyapatite bone scaffold enhances osteogenic differentiation through TNF-alpha-mediated mechanism. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 73, 225-233.
- ROBERFROID, M. 2007. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr*, 137, 830S-7S.
- ROSCH, C., TAVERNE, N., VENEMA, K., GRUPPEN, H., WELLS, J. M. & SCHOLS, H. A. 2017. Effects of in vitro fermentation of barley beta-glucan and sugar beet pectin using human fecal inocula on cytokine expression by dendritic cells. *Mol Nutr Food Res*, 61.
- RUTHES, A. C., SMIDERLE, F. R. & IACOMINI, M. 2015. D-glucans from edible mushrooms: a review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydr Polym*, 117, 753-61.
- RYCROFT, C. E., JONES, M. R., GIBSON, G. R. & RASTALL, R. A. 2001. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J Appl Microbiol*, 91, 878-87.
- RYTIOJA, J., HILDEN, K., YUZON, J., HATAKKA, A., DE VRIES, R. P. & MAKELA, M. R. 2014. Plant-polysaccharide-degrading enzymes from Basidiomycetes. *Microbiol Mol Biol Rev*, 78, 614-49.
- SAHNI, S., BROE, K. E., TUCKER, K. L., MCLEAN, R. R., KIEL, D. P., CUPPLES, L. A. & HANNAN, M. T. 2014. Association of total protein intake with bone mineral density and bone loss in men and women from the Framingham Offspring Study. *Public Health Nutr*, 17, 2570-6.
- SAHNI, S., MANGANO, K. M., MCLEAN, R. R., HANNAN, M. T. & KIEL, D. P. 2015. Dietary Approaches for Bone Health: Lessons from the Framingham Osteoporosis Study. *Curr Osteoporos Rep*, 13, 245-55.
- SCHOLZ-AHRENS, K. E., SCHAAFSMA, G., VAN DEN HEUVEL, E. G. & SCHREZENMEIR, J. 2001. Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr*, 73, 459S-464S.
- SCHREZENMEIR, J. & DE VRESE, M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am J Clin Nutr*, 73, 361S-364S.
- SCHURER, C., WALLASCHOFSKI, H., NAUCK, M., VOLZKE, H., SCHOBBER, H. C. & HANNEMANN, A. 2015. Fracture Risk and Risk Factors for Osteoporosis. *Dtsch Arztebl Int*, 112, 365-71.

- SHANG, H. M., ZHOU, H. Z., YANG, J. Y., LI, R., SONG, H. & WU, H. X. 2018. In vitro and in vivo antioxidant activities of inulin. *PLoS One*, 13, e0192273.
- SIMONET, W. S., LACEY, D. L., DUNSTAN, C. R., KELLEY, M., CHANG, M. S., LUTHY, R., NGUYEN, H. Q., WOODEN, S., BENNETT, L., BOONE, T., SHIMAMOTO, G., DEROSE, M., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., TAN, H. L., TRAIL, G., SULLIVAN, J., DAVY, E., BUCAY, N., RENSHAW-GEGG, L., HUGHES, T. M., HILL, D., PATTISON, W., CAMPBELL, P., SANDER, S., VAN, G., TARPLEY, J., DERBY, P., LEE, R. & BOYLE, W. J. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89, 309-19.
- SJOGREN, K., ENGDAHL, C., HENNING, P., LERNER, U. H., TREMAROLI, V., LAGERQUIST, M. K., BACKHED, F. & OHLSSON, C. 2012. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *J Bone Miner Res*, 27, 1357-67.
- SULLIVAN, R., SMITH, J. E., ROWAN, N. J. 2006. Medicinal Mushrooms and Cancer Therapy: translating a traditional practice into Western medicine. *Perspectives in Biology and Medicine*, 49(2), 159-170.
- SYNYTSYA, A., MICKOVA, K., JABLONSKY, I., SLUKOVA, M., COPIKOVA, J. 2009. Mushrooms of Genus *Pleurotus* as a Source of Dietary Fibres and Glucans for Food Supplements.
- SYNYTSYA, A., MICKOVA, K., SYNYTSYA, A., JABLONSKY, I., SPEVACEK, J., ERBAN, V. 2009. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76 (4), 548-556.
- TUCKER, K. L. 2014. Vegetarian diets and bone status. *Am J Clin Nutr*, 100 Suppl 1, 329S-35S.
- VANDER A., S. J., LUCIANO D. 2001. *Φυσιολογία του Ανθρώπου, Μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού*, Τόμος Ι, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- VANNUCCI, L., KRIZAN, J., SIMA, P., STAKHEEV, D., CAJA, F., RAJSIGLOVA, L., HORAK, V. & SAEIH, M. 2013. Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (Review). *Int J Oncol*, 43, 357-64.
- VILLARES, A., MATEO-VIVARACHO, L., GUILLAMON, E. 2012. Structural Features and Healthy Properties of Polysaccharides Occurring in Mushrooms. *Agriculture*, 2, 452-471.
- WADOLOWSKA, L., SOBAS, K., SZCZEPANSKA, J. W., SLOWINSKA, M. A., CZLAPKA-MATYASIK, M. & NIEDZWIEDZKA, E. 2013. Dairy products, dietary calcium and bone health: possibility of prevention of osteoporosis in women: the Polish experience. *Nutrients*, 5, 2684-707.
- WANG, J., WANG, Y., GAO, W., WANG, B., ZHAO, H., ZENG, Y., JI, Y. & HAO, D. 2017. Diversity analysis of gut microbiota in osteoporosis and osteopenia patients. *PeerJ*, 5, e3450.
- 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), 84-93.
- WASSER, S. P. 2014. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed J*, 37, 345-56.
- WEAVER, C. M. 2015. Diet, Gut Microbiome, and Bone Health. *Curr Osteoporos Rep*, 13, 125-30.
- WEAVER, C. M., GORDON, C. M., JANZ, K. F., KALKWARF, H. J., LAPPE, J. M., LEWIS, R., O'KARMA, M., WALLACE, T. C. & ZEMEL, B. S. 2016. The National Osteoporosis Foundation's position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations. *Osteoporos Int*, 27, 1281-1386.
- WU, Q., PI, X., LIU, W., CHEN, H., YIN, Y., YU, H., WANG, X., ZHU, L. 2017. Fermentation properties of Isomaltooligosaccharides are affected by human fecal enterotypes. *Anaerobe*, 48.
- YAN, J., HERZOG, J. W., TSANG, K., BRENNAN, C. A., BOWER, M. A., GARRETT, W. S., SARTOR, B. R., ALIPRANTIS, A. O. & CHARLES, J. F. 2016. Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E7554-63.
- YANO, J. M., YU, K., DONALDSON, G. P., SHASTRI, G. G., ANN, P., MA, L., NAGLER, C. R., ISMAGILOV, R. F., MAZMANIAN, S. K. & HSIAO, E. Y. 2015. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*, 161, 264-76.
- YASUDA, H., SHIMA, N., NAKAGAWA, N., MOCHIZUKI, S. I., YANO, K., FUJISE, N., SATO, Y., GOTO, M., YAMAGUCHI, K., KURIYAMA, M., KANNO, T., MURAKAMI, A., TSUDA, E., MORINAGA, T. & HIGASHIO, K. 1998. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 139, 1329-37.
- ZENG, H., CAO, J. J. & COMBS, G. F., JR. 2013. Selenium in bone health: roles in antioxidant protection and cell proliferation. *Nutrients*, 5, 97-110.
- 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), 119-123.
- ΖΕΡΒΑΚΗΣ, Γ. 2014. Πανεπιστημιακές Σημειώσεις με τίτλο << Εισαγωγή στη Μυκητολογία >> (2η έκδοση εκδ.), Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής.

