ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΥ ΣΤΟΝ ΟΣΤΙΚΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ

Πτυχιακή εργασία

Τερζή Ειρήνη

Α.Μ. 214143



Αθήνα, 2019



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

ΠΛΕΤΣΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ, Ερευνήτρια, Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Η Τερζή Ειρήνη

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΕΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα Κυριακού Αδαμαντίνη, για τις γνώσεις, τις συμβουλές και την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω σε αυτή την ερευνητική προσπάθεια, πάνω σε ένα τόσο ενδιαφέρον και πρωτοποριακό αντικείμενο μελέτης. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Μήτσου Ευδοκία, για την ενεργή βοήθειά της, τις επεξηγήσεις της και τις ατελείωτες ώρες που αφιέρωσε για να μπορέσω να ολοκληρώσω αυτή την πτυχιακή μελέτη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω, όλους όσους με βοήθησαν και ιδιαίτερα, την οικογένειά μου που με στήριξε, για δεύτερη φορά, τόσο κατά τη διάρκεια των φοιτητικών χρόνων όσο και σε αυτή την ερευνητική προσπάθεια.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1 10
1. Εντερικός μικροβιόκοσμος 10
2. Μανιτάρια (είδη, σύνθεση και ιδιότητες) 13
3. Σύνδεση των μανιταριών με τις β-γλυκάνες 14
3.1. *Pleurotus ostreatus* & β-γλυκάνες 14
3.1.1. Μακροσυστατικά 15
3.1.2. Μικροσυστατικά 16
4. Ινουλίνη 18
4.1. Τα οφέλη της ινουλίνης στην υγεία 19
5. Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου- SCFA 20
Κεφάλαιο 2 22
1. Οστά και σκελετός 22
1.2. Οστικά κύτταρα 22
1.3. Η διαδικασία της οστικής αναδιαμόρφωσης 24
2. Οστική Μάζα και Οστική Πυκνότητα 25
2.1. Οστεοπενία και Οστεοπόρωση 25
2.2. Τύποι Οστεοπόρωσης 26
2.3. Αιτιολογία Οστεοπόρωσης 27
2.3.1. Φυλή και Εθνικότητα 27
2.3.2. Έμμηνος Κύκλος 28
2.3.3. Θηλασμός 28
2.3.4. Περιορισμένη σωματική δραστηριότητα 28
2.3.5. Σωματικό βάρος και Δείκτης μάζας σώματος 28
2.3.6. Φάρμακα 29
2.3.7. Αλκοόλ και κάπνισμα 29
2.4. Διατροφή 30
2.4.1. Ασβέστιο & Βιταμίνη D 30
2.4.2. Πρωτεΐνες 31
2.4.3. Βιταμίνη Α 32
2.4.4. Βιταμίνη Κ 32
2.4.5. Φώσφορος 32
2.4.6. Ιχνοστοιχεία (Μαγνήσιο-ψευδάργυρος-Χαλκός) 33
2.4.7. Νάτριο 34
2.4.8. Καφεΐνη και Ανθρακούχα ροφήματα 34
3. Εντερικός μικροβιόκοσμος και οστεοπόρωση 34
3.1. Συσχέτιση του οστικού μεταβολισμού με το ανοσοποιητικό σύστημα 35

3.2. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος ως ρυθμιστής της οστικής μάζας....35
3.3. Εντερικός μικροβιόκοσμος, ορμόνες φύλου και απώλεια οστικής μάζας....36
3.4. Σύνθεση εντερικού μικροβιόκοσμου και απώλεια οστικής μάζας....36
3.5. Προβιοτικά και πρεβιοτικά....36
Κεφάλαιο 3....38
1. Υλικά & Μέθοδοι....38
1.1. Σκοπός:....38
1.2. Χαρακτηριστικά εθελοντριών....38
1.3. Διατροφική αξιολόγηση και Ανθρωπομετρία....38
2. Πρωτόκολλο εκχύλισης β-γλυκανών από το μανιτάρι *P. Ostreatus*....39
3. Δειγματοληψία και επεξεργασία κοπράνων....39
4. Πρωτόκολλο *in vitro* ζύμωσης σε στατικές καλλιέργειες (Static batch culture fermentations)....40
5. Πρωτόκολλο για την απομόνωση του DNA, με τη μέθοδο RBB+C (Repeated Bead Beating Plus Column)....43
5.1. Όργανα και αντιδραστήρια....43
5.2. Πειραματική διαδικασία....43
6. Πρωτόκολλο Real Time-PCR....45
6.1. Αρχή της μεθόδου....45
6.2. Όργανα και αντιδραστήρια....46
6.3. Πειραματική διαδικασία....46
6.4. Προσδιορισμός πρεβιοτικού δείκτη....50
7. Στατιστική επεξεργασία....50
Κεφάλαιο 4....52
1 Αποτελέσματα....52
1.1. Χαρακτηριστικά εθελοντριών....52
1.2. *In vitro* ζύμωση πιθανών πρεβιοτικών υποστρωμάτων από τον εντερικό μικροβιόκοσμο μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών....52
1.3. Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου με τη μέθοδο ποσοτικής PCR (quantitative PCR)....53
1.4. Αποτελέσματα πρεβιοτικού δείκτη....72
1.5. Συζήτηση....74
Βιβλιογραφία....78

Περίληψη στα Ελληνικά

Ο ανθρώπινος εντερικός μικροβιόκοσμος περιέχει 150 φορές περισσότερα γονίδια από τα ανθρώπινα. Συμμετέχει σε πληθώρα μεταβολικών διεργασιών συμπεριλαμβανομένων του μεταβολισμού θρεπτικών συστατικών και φαρμάκων, στη σύνθεση βιταμινών καθώς και στην ανοσορρύθμιση. Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η *in vitro* ζύμωση υποστρωμάτων πλούσιων σε β-γλυκάνες προερχόμενα από τον μύκητα *Pleurotus ostreatus,* από τον εντερικό μικροβιόκοσμο γυναικών με φυσιολογική οστική πυκνότητα και από γυναίκες με οστεοπενία. Επίσης εξετάστηκε η επίδραση της ζύμωσης των υποστρωμάτων στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Κατά την έναρξη της μελέτης πραγματοποιήθηκε εκχύλιση των β-γλυκανών από το μανιτάρι, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα εμπλουτισμένο σε β-γλυκάνες. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην *in vitro* ζύμωση ήταν ινουλίνη 1% (INU1) και 2% (INU2), ως θετικοί μάρτυρες, το μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* (POWS), το εκχύλισμα αυτού (POWSE) και ο αρνητικός μάρτυρας (NC) που δεν περιείχε πηγή άνθρακα. Πραγματοποιήθηκε 24ωρη ζύμωση σε αναερόβιες συνθήκες μετά από εμβολιασμό των υποστρωμάτων με επεξεργασμένο εμβόλιο κοπράνων από τις εθελόντριες. Πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις και εμβολιάζονταν όλα τα υποστρώματα ταυτόχρονα με το εμβόλιο από την ίδια εθελόντρια. Απομονώθηκε το ολικό DNA των μικροοργανισμών και πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις με τη μέθοδο Real Time-PCR, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών βακτηρίων, των *Bacteroides spp, Bifidobacterium spp., Lactobacillus group, Clostridium perfrigens, Clostridium leptum, Faecalibacterium prausnitzii, Roseburia spp.*. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο πρεβιοτικός δείκτης για κάθε υπόστρωμα. Από τις αναλύσεις παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των *Bifidobacteria* στα υποστρώματα INU1, INU2 και POWS, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (NC), στις 24 ώρες, στις εθελόντριες με οστεοπενία. Επίσης παρατηρήθηκε στις ίδιες εθελόντριες, σημαντική αύξηση των *Bacteroides* στο υπόστρωμα POWSE, μετά από 24ωρή ζύμωση, συγκριτικά με το NC και με το POWS. Όσον αφορά τον πρεβιοτικό δείκτη, βρέθηκε θετικός για όλα τα υποστρώματα στο σύνολο των εθελοντριών, ενώ στις εθελόντριες με οστεοπενία, ήταν θετικός στην πλειονότητα των υποστρωμάτων εκτός από το εκχύλισμα του μανιταριού, στο οποίο ο PI βρέθηκε αρνητικός.

Λέξεις κλειδιά: εντερικός μικροβιόκοσμος, οστικός μεταβολισμός, β-γλυκάνες, Pleurotus ostreatus

Abstract

Human gut microbiome contains 150 times more genes than human ones. It participates in numerous metabolic processes including metabolism of nutrients and drugs, in vitamin synthesis as well as in immunomodulation. The aim of the present study is the *in vitro* fermentation of substrates rich in β-glucans derived from the fungus *Pleurotus ostreatus*, from the gut microbiota of women with normal bone density and from women with osteopenia. The effect of fermentation of the substrates on the composition of gut microbiota was also examined. At the beginning of the study, β-glucans were extracted from the fungus *Pleurotus ostreatus*, so that it could be used as a β-glucan rich substrate. The substrates used in the in vitro fermentation were 1% (INU1) and 2% inulin (INU2) as positive controls, *Pleurotus ostreatus* (POWS), its extract (POWSE) and the negative control (sample without carbon source). A 24-hour static batch fermentation was performed in anaerobic conditions after inoculated with faecal slurry from the volunteers. Six replicates were performed and all substrates were inoculated simultaneously with the inoculum (faecal microbiota) of the same volunteer. Total bacterial DNA was isolated and Total bacteria, *Bacteroides* spp, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus group*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium leptum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia* spp., were quantified -using the Real Time-PCR method. The prebiotic index for each substrate was also estimated. A significant increase of *Bifidobacteria* in INU1, INU2 and POWS substrates was observed, compared to the negative control (NC), at 24 hours, in volunteers with osteopenia. Also, at the same volunteers it was observed a significant increase of *Bacteroides* in the POWSE substrate after 24 hours of fermentation compared to NC and POWS. Regarding the prebiotic index, it was positive for all substrates in the total of volunteers. In the osteopenic group the prebiotic index was positive for most substrates except for the mushroom extract, in which PI was found negative.

Keywords: **gut microbiota, bone metabolism, β-glucans, Pleurotus ostreatus**

Κατάλογος εικόνων, πινάκων και διαγραμμάτων

Εικόνα 1. 12
Εικόνα 2. 23
Εικόνα 3. 24
Εικόνα 4 26

Πίνακας 1 18
Πίνακας 2 27
Πίνακας 3 49
Πίνακας 4 52
Πίνακας 5 53
Πίνακας 6 54
Πίνακας 7 55
Πίνακας 8 55
Πίνακας 9 56
Πίνακας 10 56
Πίνακας 11 58

Διάγραμμα 1 62
Διάγραμμα 2 67
Διάγραμμα 3 71
Διάγραμμα 4 72
Διάγραμμα 5 74

Κεφάλαιο 1

1. Εντερικός μικροβιόκοσμος

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος του ανθρώπου έχει γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία χρόνια και οι γνώσεις μας για τα συμβιωτικά είδη και τις λειτουργίες τους έχουν εμπλουτιστεί σημαντικά (Guinane and Cotter, 2013). Περιέχει πάνω από δέκα τρισεκατομμύρια μικροοργανισμούς, με 1000 είδη γνωστά βακτήρια, με περισσότερα από 3 εκατομμύρια γονίδια (150 φορές περισσότερα από τα ανθρώπινα γονίδια) (Phillip, 2015). Περιλαμβάνει όλες τις μορφές κυτταρικής ζωής (βακτήρια, αρχαία και ευκάρυα), αλλά υπερτερούν τα βακτήρια τα οποία ανήκουν κυρίως σε δύο μεγάλα Φύλα τα *Bacteroidetes* και τα *Firmicutes*.

Ο μικροβιόκοσμος του εντέρου βοηθά στην πέψη των συστατικών των τροφίμων που δεν πέπτονται από τον ξενιστή και επηρεάζει σημαντικά το ανοσοποιητικό σύστημα. Επίσης, βοηθάει στην παραγωγή ορισμένων βιταμινών (Β και Κ). Μια συνήθης, υγιής και ισορροπημένη διατροφή έχει αποδειχθεί ότι διατηρεί σταθερό τον εντερικό μικροβιόκοσμο και μειώνει τον κίνδυνο πολλών ασθενειών (Conlon and Bird, 2014). Η σύνδεση μεταξύ της διατροφής, του μικροβιόκοσμου του εντέρου και της υγείας έχει αποδειχθεί σε ζωικά μοντέλα (Houghton et al., 2016). Έχει παρατηρηθεί ότι όταν η δίαιτα των πειραματόζωων μεταβλήθηκε από χαμηλή σε λιπαρά και υψηλή σε φυτικές ίνες σε δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και υψηλή περιεκτικότητα σε ζάχαρη, τροποποιήθηκε και η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου των ζώων: μειώθηκαν σημαντικά τα βακτήρια του φύλου *Bacteroidetes*, ενώ αυξήθηκαν τα βακτήρια των γενών *Bacillus* και *Erysipelotrichi* από το φύλο *Firmicutes* (Clarke et al., 2012).

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος παίρνει μέρος σε διάφορες λειτουργίες που επηρεάζουν σημαντικά τον ξενιστή, όπως οι ακόλουθες:

- **Μεταβολισμός θρεπτικών συστατικών:**

  Ο εντερικός μικροβιόκοσμος λαμβάνει τα θρεπτικά συστατικά, κυρίως από τους υδατάνθρακες της διατροφής. Οι άπεπτοι υδατάνθρακες και ολιγοσακχαρίτες ζυμώνονται από τους μικροοργανισμούς του εντέρου (*Bacteroides, Roseburia, Bifidobacterium, Fecalibacterium, Enterobacteria* κ.α.) και παράγονται λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFA), όπως είναι το βουτυρικό, το προπιονικό και το οξικό οξύ, τα οποία είναι πλούσια πηγή ενέργειας για τον ξενιστή (Macfarlane and Macfarlane, 2003, Sartor, 2008).

  Όσον αφορά τον μεταβολισμό των λιπιδίων, ο εντερικός μικροβιόκοσμος επιδρά θετικά, καταστέλλοντας τη δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στα λιποκύτταρα.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το *Bacteroides thetaiotaomicron* το οποίο αυξάνει την υδρόλυση των λιπιδίων ρυθμίζοντας την έκφραση μίας λιπάσης που δρα συνεργιστικά με την παγκρεατική λιπάση για την πέψη των λιπιδίων (Hooper et al., 2001).

Επίσης, ο εντερικός μικροβιόκοσμος έχει την δυνατότητα να μεταβολίζει τις πρωτεΐνες της διατροφής, μέσω των μικροβιακών πρωτεϊνασών και πεπτιδασών σε συνδυασμό με τις ανθρώπινες πρωτεϊνάσες. Διάφοροι μεταφορείς αμινοξέων που υπάρχουν στην βακτηριακή μεμβράνη διευκολύνουν την είσοδο των αμινοξέων από τον εντερικό σωλήνα στα βακτηριακά κύτταρα. Εκεί, διάφορα γονιδιακά προϊόντα μετατρέπουν τα αμινοξέα σε μικρά σηματοδοτικά μόρια και αντιμικροβιακά πεπτίδια (βακτηριοσίνες). Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η μετατροπή της L-ιστιδίνης σε ισταμίνη μέσω του βακτηριακού ενζύμου, αποκαρβοξυλάση της ισταμίνης, η οποία κωδικοποιείται από τα βακτηριακά γονίδια *hdcA* (Thomas et al., 2012), καθώς και η μετατροπή του γλουταμινικού σε γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) από την αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού, η οποία κωδικοποιείται από τα βακτηρικά γονίδια *gadB* (De Biase and Pennacchietti, 2012).

Η σύνθεση της βιταμίνης Κ και άλλων βιταμινών του συμπλέγματος Β είναι μία άλλη μεταβολική λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου. Έχει παρατηρηθεί ότι είδη του γένους *Bacteroides* μπορούν να συνθέσουν συζευγμένο λινελαϊκό οξύ (CLA), γνωστό για την ευεργετική του δράση έναντι του διαβήτη, της αθηρωμάτωσης και της παχυσαρκίας καθώς και για τις υπολιπιδαιμικές και ανοσορρυθμιστικές του ιδιότητες (Baddini Feitoza et al., 2009, Devillard et al., 2007, Devillard et al., 2009). Τέλος, μελέτες έχουν δείξει ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος συμμετέχει στην διάσπαση διάφορων πολυφαινολών οι οποίες λαμβάνονται μέσω της διατροφής και είναι γνωστές για τις αντιαθηρωματικές και υπολιπιδαιμικές τους ιδιότητες. Παραδείγματα πολυφαινολών είναι οι φλαβονόλες, φλαβονόνες, ανθοκυανιδίνες, ισοφλαβόνες, φλαβόνες, ταννίνες, λιγνάνες κ.α. και βρίσκονται σε πολλά φυτά, φρούτα και προϊόντα φυτικής προέλευσης όπως το τσάι, το κακάο και το κρασί (Marin et al., 2015).

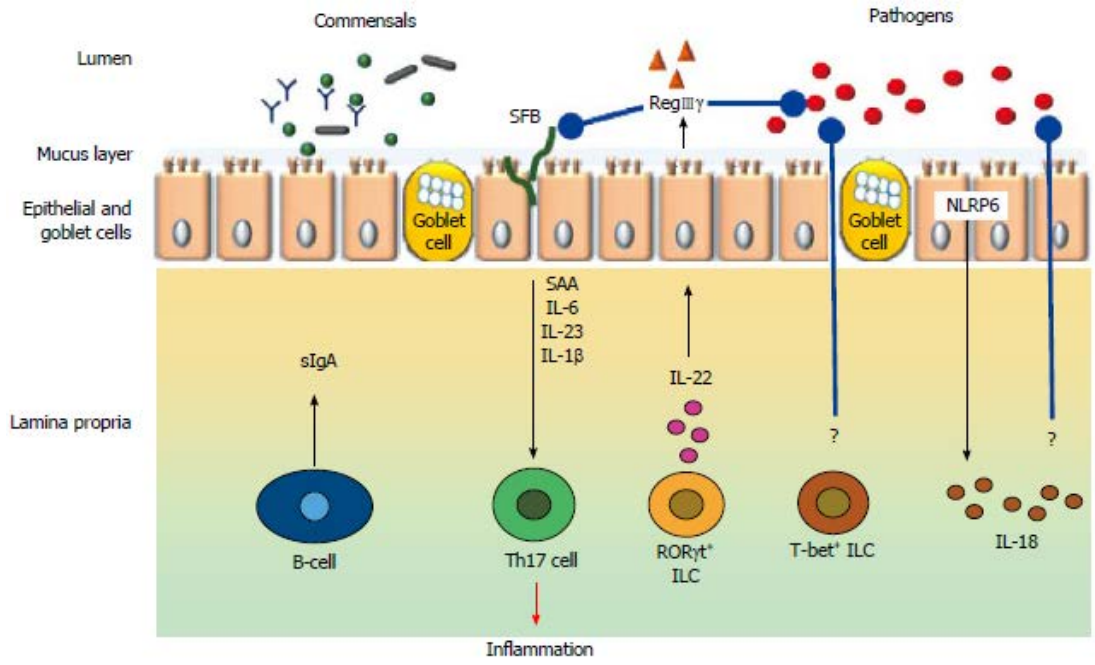
- **Ξενοβιοτικά και μεταβολισμός φαρμάκων:**

  Ο ρόλος του εντερικού μικροβιόκοσμου στον μεταβολισμό των φαρμάκων και των ξενοβιοτικών, αναδύεται ταχύτατα. Οι Clayton και συν. έδειξαν ότι η p-κρεσόλη, μεταβολίτης του εντερικού μικροβιόκοσμου, μπορεί να μειώσει την ικανότητα του ήπατος να μεταβολίζει την ακεταμινοφαίνη μέσω ανταγωνιστικής αναστολής των ηπατικών σουλφοτρανσφερασών (Clayton et al., 2009). Ένα άλλο παράδειγμα όπου ο εντερικός μικροβιόκοσμος επάγει τον μεταβολισμό των φαρμάκων είναι η διάσπαση του

αντικαρκινικού φαρμάκου irinotecan από την μικροβιακή β-γλυκουρονιδάση. Αυτό μπορεί να συμβάλλει στην μείωση των παρενεργειών του φαρμάκου που είναι διάρροια, φλεγμονή και ανορεξία (Wallace et al., 2010). Ωστόσο, η παρέμβαση των μικροοργανισμών του εντέρου στη φαρμακευτική αγωγή και την τοξική αλληλεπίδραση είναι, ακόμα, ένα ανεξερεύνητο (Kang et al., 2013), αλλά ζωτικής σημασίας, πεδίο σπουδών στην φαρμακολογία και την τοξικολογία.

- **Ανοσορρύθμιση:**

  Οι μικροοργανισμοί του εντέρου συμβάλλουν στην ανοσορρύθμιση του εντέρου σε συνδυασμό τόσο με τη φυσική όσο και με την επίκτητη ανοσία (Wu and Wu, 2012). Οι τύποι των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος, οι οποίοι συμμετέχουν στην διαδικασία ανοσορρύθμισης, συμπεριλαμβάνουν τον λεμφοειδή ιστό που σχετίζεται με το έντερο (GALT, gut associated lymphoid tissues), τα ρυθμιστικά T-κύτταρα, τα αντισώματα IgA που παράγουν τα B κύτταρα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα (Εικόνα 1) (Jandhyala et al., 2015).



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση τύπων κυττάρων και μεσολαβητών που εμπλέκονται στην ανοσορρύθμιση στο έντερο. Το μαύρο βέλος δείχνει είτε φυσιολογική έκκριση είτε ενεργοποίηση. Το κόκκινο βέλος δείχνει παθολογικό συμβάν. Τα μπλε βέλη με τα στρογγυλεμένα άκρα δείχνουν παρεμπόδιση των παθογόνων. Το ? δείχνει άγνωστους μηχανισμούς, SFB δείχνει μικρά νηματώδη βακτήρια (Jandhyala et al., 2015).

Η διατήρηση της ισορροπίας του εντερικού μικροβιόκοσμου (συμβίωση) είναι σημαντική για τη διατήρηση της υγείας του ξενιστή, ενώ η διαταραχή αυτής της ισορροπίας σε επίπεδο εντερικών πληθυσμών (δυσβίωση), συνδέεται με εμφάνιση διαφόρων νόσων όπως είναι η αλλεργία, τα αυτοάνοσα νοσήματα, η νόσος του Crohn, η παχυσαρκία, ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 και

η Ελκώδης Κολίτιδα. Ωστόσο, καινούργιες ασθένειες έχουν προστεθεί στη λίστα, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών νοσημάτων, τον καρκίνο του παχέος εντέρου, το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου και της μη- αλκοολικής λιπώδους διήθησης του ήπατος (NAFLD) (Lin et al., 2014).

Η τροποποίηση των εντερικών πληθυσμών προς όφελος της υγείας του ξενιστή, ειδικά όταν επικρατεί κατάσταση δυσβίωσης, μπορεί να γίνει με τη χορήγηση συγκεκριμένων συμπληρωμάτων όπως τα προβιοτικά, τα πρεβιοτικά και συμβιωτικά (συνδυασμός προβιοτικών και πρεβιοτικών) (Vyas and Ranganathan, 2012).

2. Μανιτάρια (είδη, σύνθεση και ιδιότητες)

Μανιτάρι είναι το καρποφόρο σώμα που φέρει τα σπόρια ενός μύκητα και παράγεται συνήθως πάνω από το έδαφος. Φρέσκα και διατηρημένα μανιτάρια καταναλώνονται σε πολλές χώρες ως λιχουδιά, ιδιαίτερα για το χαρακτηριστικό άρωμα και την υφή τους (Kalac, 2013). Είναι γνωστό ότι τα μανιτάρια περιέχουν μια πολύ μεγάλη ποικιλία θρεπτικών (Kalač, 2009) και φαρμακευτικών (Borchers et al., 2004, Lindequist et al., 2005, Poucheret, 2006) βιομορίων. Λόγω αυτών των ιδιοτήτων, τα μανιτάρια αναγνωρίζονται ως φυσική πηγή για την ανάπτυξη φαρμάκων και θρεπτικών συστατικών (Alves et al., 2012). Αρχικά τα μανιτάρια ήταν γνωστά μόνο ως πηγή τροφής και αργότερα ανακαλύφθηκαν οι φαρμακευτικές τους ιδιότητες (Rathee, 2012). Η χρήση των μανιταριών χρονολογείται από τους αρχαίους πολιτισμούς των Αιγυπτίων και των Κινέζων, για την προαγωγή της γενικής υγείας και μακροζωίας. Ο αριθμός των μανιταριών που έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα αντιπροσωπεύει μόνο το 10% των συνολικών μανιταριών που θεωρείται ότι υπάρχουν (Abugri DA, 2016).

Τα μανιτάρια έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες (228 και 249 g / kg ξηρής μάζας) (Bauer Petrovska, 2001), βιταμίνες, διαιτητικές ίνες, απαραίτητα αμινοξέα, ιχνοστοιχεία, όπως είναι το ασβέστιο, το κάλιο (επικρατέστερο), το μαγνήσιο, ο σίδηρος και ο ψευδάργυρος, είναι χαμηλά σε περιεχόμενο θερμίδων και στερούνται χοληστερόλης (Mhanda, 2015). Ένα άλλο σημαντικό συστατικό των μανιταριών είναι οι υδατάνθρακες, οι οποίοι αποτελούν περίπου τη μισή ξηρή μάζα του μανιταριού, ενώ κάποιοι από αυτούς παρουσιάζουν βιοδραστικότητα. Οι υδατάνθρακες παίζουν σημαντικό ρόλο στις φαρμακευτικές ιδιότητες των μανιταριών μέσω των ανοσοδιεγερτικών β-γλυκανών τους, μαζί με άλλους πολυσακχαρίτες (Batbayar et al., 2012). Συγκριτικά με την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, το περιεχόμενο σε λιπίδια είναι χαμηλό και κυμαίνονται κυρίως από 20 έως 30 g/kg ξηρής μάζας. Λόγω των παραπάνω, τα μανιτάρια προσφέρουν σημαντικά οφέλη για την υγεία, αφού διαθέτουν αντιοξειδωτική, αντι-υπερτασική και αντιφλεγμονώδη δράση, μειώνουν τη χοληστερόλη, προστατεύουν το ήπαρ

καθώς επίσης διαθέτουν και αντιδιαβητικές, αντι-ιικές και αντι-μικροβιακές ιδιότητες (Rai, 2005).

3. Σύνδεση των μανιταριών με τις β-γλυκάνες

3.1. *Pleurotus ostreatus* & β-γλυκάνες

Η εμπορική σημασία των πολυσακχαριτών από μύκητες έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον στον τομέα των λειτουργικών τροφίμων. Συνήθως τα καλλιεργημένα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* είναι ενδιαφέροντα λόγω των β-γλυκανών, οι οποίες παρουσιάζουν ανοσορυθμιστικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις και αναλγητικές δράσεις (Smiderle et al., 2008, Bobek and Galbavy, 2001). Τα μανιτάρια του γένους *Pleurotus* καλλιεργούνται σε πολλές χώρες λόγω της υψηλής προσαρμοστικότητάς τους. Ετησίως, η παραγωγή αυτών των μανιταριών υπερβαίνει τους 900.000 τόνους. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά είδη του γένους *Pleurotus* που έχουν φαρμακολογικές ιδιότητες, όπως το *P. florida, P. tuber-regium, P. pulmonarius, P. ostreatus* και *P. eryngi* (R.Ragunathan, 1996). Βιολογικά ενεργές γλυκάνες ή τα σύμπλοκά τους με πρωτεΐνες, καθώς και με άλλους πολυσακχαρίτες, που απομονώνονται από τα καρποσώματα αυτών των ειδών, είναι ενδιαφέροντα για την παρασκευή νέων συμπληρωμάτων διατροφής.

Οι βασιδιομύκητες όπου ανήκει το γένος *Pleurotus* μπορεί να έχουν πολύτιμη συμβολή, διότι συνδυάζουν την ικανότητα ανάπτυξης με αμελητέα χρήση των βιολογικών πηγών και μπορούν να υποστηρίξουν την παραγωγή εμπλουτισμένων τροφίμων. Όντως, το *Pleurotus* spp. είναι ένας ταχέως αναπτυσσόμενος μύκητας που μπορεί να επιτευχθεί με περιορισμένες επενδύσεις κεφαλαίου και τεχνικές τόσο σε εύκρατες όσο και σε τροπικές περιοχές.

Τα είδη του γένους *Pleurotus* μπορούν να θεωρηθούν ως πηγές πρωτεΐνης με καλά επίπεδα σε απαραίτητα αμινοξέα, διαιτητικών ινών με μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά (διακλαδισμένες β-γλυκάνες), βιταμινών, ανόργανων συστατικών και χαμηλού μοριακού βάρους βιοενεργών ουσιών, γνωστές επίσης και ως μυκοχημικές ουσίες. (Rúbia Carvalho GomesCorrêa, 2016) ενώ η θρεπτική αξία του έχει αναγνωριστεί από καιρό (Mattila et al., 2002, P. Manzi, 1999, P. Manzi, 2001).

Επιπλέον, τα *Pleurotus* spp. γίνονται ολοένα και ελκυστικότερες πηγές για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων και λειτουργικών τροφίμων που οφείλονται στις δυνητικές αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, ανοσορρυθμιστικές, αντιφλεγμονώδεις και αντιϋπερτασικές ιδιότητες (Rúbia Carvalho GomesCorrêa, 2016). Παρατηρήθηκε ότι α-γλυκάνη χαμηλού-μοριακού βάρους που απομονώθηκε από το μικκύλιο του *P. ostreatus* ανέστειλε *in vitro* τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου μέσω επαγωγής της απόπτωσης (Lavi et al., 2006).

Η βιοδραστικότητα του *Pleurotus* spp. οφείλεται κυρίως στη σύνθεση των διαιτητικών ινών, η οποία αποτελείται από γλυκάνες, χιτίνη, μαννοπρωτεΐνες, γαλακτομαννάνες, κυτταρίνη και πολυγλυκουρονικά οξέα (Dalonso et al., 2015).

Μεταξύ των συστατικών των διαιτητικών ινών του *Pleurotus* spp., οι β-γλυκάνες είναι το κύριο συστατικό. Αυτοί οι πολυσακχαρίτες έχουν μια κύρια αλυσίδα D-γλυκόζης με β-(1→3) γλυκοσιδικούς δεσμούς με διακλαδώσεις β-(1→6) δεσμών, σε διάφορες ποσότητες (Dalonso et al., 2015). Οι αλυσίδες γλυκόζης των β-γλυκανών είναι ελικοειδείς και δημιουργούν μία μονή ή μια τριπλή έλικα σταθεροποιημένη με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων (Brown and Gordon, 2005, Rop et al., 2009). Η συστοιχία σχετικών μοριακών βαρών των β-γλυκανών είναι ευρείας κλίμακας, και κυμαίνεται από δεκάδες έως χιλιάδες kilodaltons (Rop et al., 2009). Όσον αφορά την ποσότητα των β-γλυκανών, οι αναλύσεις βασίζονται στην ενζυμική υδρόλυση με β-γλυκανάση η οποία έδωσε χαμηλές τιμές. Ως εκ τούτου, συνιστάται ο υπολογισμός της β-γλυκάνης ως διαφορά μεταξύ των συνολικών γλυκανών, (κατά μέτρηση της γλυκόζης που λαμβάνεται μέσω ελεγχόμενης όξινης υδρόλυσης) και τις α-γλυκάνες (με μέτρηση της γλυκόζης που απελευθερώνεται από τις α-γλυκάνες μέσω ενζυμικής υδρόλυσης με α-αμυλάση και αμυλογλυκοσιδάση) (McCleary and Draga, 2016). Χρησιμοποιώντας αυτή την τελευταία προσέγγιση, προσδιορίστικε ότι η συνολική περιεκτικότητα σε γλυκάνες μεταξύ 16 στελεχών του *P. ostreatus*, κυμαινόταν σε εύρος 14-25 g ανά 100 g ξηρού βάρους, με τις β-γλυκάνες να βρίσκονται ανάμεσα στα 10,9-22,9 g ανά 100 g ξηρού βάρους (Koutrotsios et al., 2017), ενώ μια υψηλότερη περιεκτικότητα β-γλυκάνης, δηλ. 32,3 g ανά 100 g ξηρού βάρους, παρατηρήθηκε επίσης σε άλλο στέλεχος του *P. ostreatus* (McCleary and Draga, 2016).

3.1.1. Μακροσυστατικά

Από τα μανιτάρια φυσικού τύπου του γένους *Pleurotus*, μερικά στελέχη των ειδών *P. eryngii, P. ostreautus* και *P. sajor-caju* παρατηρήθηκε ότι ικανοποιούν τις συστάσεις σε πρωτεΐνες για παιδιά και ενήλικες, ενώ στο *P. pulmonarius*, η περιεκτικότητα σε λευκίνη και λυσίνη ήταν περιορισμένη (P. Manzi, 1999). Γενικότερα τα επίπεδα της ιστιδίνης και θρεονίνης στις πρωτεΐνες των *Pleurotus* spp. είναι επίσης ικανοποιητικά σε σχέση με τις συστάσεις για βρέφη. Τα *Pleurotus* spp. έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά.

Αναφορές του παρελθόντος έχουν βρει ότι η περιεκτικότητα σε λίπος κυμαίνεται μεταξύ 1,18 και 4,4 g ανά 100 g ξηρού βάρους στο *P. ostreatus*, μεταξύ 5,97 και 7,5 g ανά 100 g ξηρού βάρους στο *P. eryngii* και μεταξύ 0,9 και 3,84 g ανά 100 g ξηρού βάρους στο *P. sajor-caju* (P. Manzi, 2001, Mattila et al., 2002, A. Dundar, 2008, A. Dundar, 2009, Koutrotsios et al., 2014, P. Manzi, 2004, Ng et al., 2017, S. T. Chang, 1981, Gogavekar et al., 2014, M. F. Da Paz, 2012,

Fernandes et al., 2015, Wang et al., 2001, L. Ancona Mendez, 2005, Gupta et al., 2013, S. W. Chiu, 1998). Το είδος των λιπιδίων που περιέχονται στα μανιτάρια είναι τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, μονο-, δι- και τριγλυκερίδια, στερόλες, εστέρες στερόλης και φωσφολιπίδια. Τα τριγλυκερίδια επικρατούν, ενώ το σκουαλένιο, η εργοστερόλη (ελεύθερη και εστεροποιημένη) και η ουβικινόνη έχουν επίσης αναφερθεί ως δευτερεύοντα συστατικά (Bano and Rajarathnam, 1988).

Μελέτη σε 16 στελέχη του φυσικού τύπου *P. ostreatus*, έδειξε ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα είναι τα πιο διαδεδομένα, και κυμαίνονται από 58,84% έως 80,63% των ολικών λιπαρών οξέων, τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα ήταν μεταξύ 6,76% και 20,29% των συνολικών λιπαρών οξέων και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα ήταν μεταξύ 8,77% και 17,07% των συνολικών λιπαρών οξέων (Koutrotsios et al., 2017).

3.1.2. Μικροσυστατικά

Οι φυσικοί τύποι αλλά και τα καλλιεργημένα μανιτάρια από το γένος *Pleurotus* είναι καλές πηγές ορισμένων βιταμινών της ομάδας Β (A. Dundar, 2009, S. T. Chang, 1981, Bano and Rajarathnam, 1988, Mattila et al., 2001, G. Jaworska, 2015, Rajarathnam, 1986).

Όσον αφορά τη βιταμίνη Β9, τα μανιτάρια περιέχουν μετρίως υψηλή ποσότητα η οποία είναι παρόμοια με αυτή των λαχανικών, όπως το σπανάκι. Επιπλέον, η βιοδιαθεσιμότητα μανιταριών σε φυλλικό οξύ φαίνεται να είναι καλή, σε αντίθεση με τη βιοδιαθεσιμότητα του φυλλικού οξέος από ορισμένα λαχανικά, όπως τα μπιζέλια και το σπανάκι. Υψηλή περιεκτικότητα σε φυλλικό οξύ, παρατηρήθηκε σε ένα στέλεχος του *P. ostreatus* (0,64 mg ανά 100 g ξηρού βάρους) (Mattila et al., 2001) και σε ένα στέλεχος *P. sajor-caju* (1.278 mg ανά 100 g ξηρού βάρους)(Bano and Rajarathnam, 1988). Ανεπάρκεια του φυλλικού οξέος είναι συνήθης σε έγκυες γυναίκες, επειδή η εγκυμοσύνη αυξάνει σημαντικά τις απαιτήσεις σε φυλλικό οξύ, ειδικά σε περιόδους γρήγορης εμβρυϊκής ανάπτυξης. Στη διάρκεια της γαλουχίας, οι απώλειες φυλλικού οξέος στο γάλα αυξάνουν επίσης τις απαιτήσεις (WHO/FAO, 2004).

Όσον αφορά την περιεκτικότητα της βιταμίνης Β12 αναφέρθηκε μόνο για το *P. ostreatus* και βρέθηκε να είναι 0,6 μg ανά 100 g ξηρού βάρους (Mattila et al., 2001). Ωστόσο, μεταξύ των 38 κοινών βρώσιμων μανιταριών που αναλύθηκαν για την περιεκτικότητα σε βιταμίνη Β12, μόνο 9 βρέθηκαν να περιέχουν αυτή τη βιταμίνη, με το *P. ostreatus* να είναι ένα από τα πιο παραγωγικά (A. N. Shivrina, 1965). Ως εκ τούτου, αυτό το μανιτάρι θα μπορούσε να είναι μία καλή πηγή Β12 για τους αυστηρά χορτοφάγους. Η συγκεκριμένη βιταμίνη μπορεί να εισέλθει, εναλλακτικά, στην ανθρώπινη τροφική αλυσίδα μέσω της κατανάλωσης τροφίμων ζωικής

προέλευσης. Στα μανιτάρια, πιθανώς η βιταμίνη να προέρχεται από επιφανειακούς μικροοργανισμούς που μπορούν να τη συνθέσουν (Mattila et al., 2001).

Εκτός από τις βιταμίνες από την ομάδα Β, το γένος το *Pleurotus* περιέχει αυξημένες ποσότητες πρόδρομης βιταμίνης D_2 (εργοκαλσιφερόλη), δηλαδή την εργοστερόλη – ένα συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης του μύκητα. Η περιεκτικότητα σε εργοστερόλη στο *P. ostreatus* κυμαίνεται από 290 έως 754 mg ανά 100 g ξηρού βάρους (S.-J. Huang, 2015, Sapozhnikova et al., 2014, Slawinska et al., 2016). Τα φυσικά επίπεδα της βιταμίνης D_2 στο *Pleurotus* spp. είναι γενικά χαμηλά και εξαιρετικά μεταβλητά: από μη ανιχνεύσιμα (Sapozhnikova et al., 2014) και χαμηλά επίπεδα, όπως 0,3 μg ανά 100 g ξηρού βάρους (Mattila et al., 2001), έως και τιμές στην περιοχή 0.083-0.156 mg ανά 100 g ξηρού βάρους (S.-J. Huang, 2015). Ωστόσο, η βιταμίνη D_2 στα μανιτάρια μετατρέπεται από την εργοστερόλη μέσω UV ακτινοβολίας κατά την ανάπτυξη, μετά τη συγκομιδή καθώς και μετά την ξήρανση του μανιταριού. Μετά την έκθεση της σκόνης του *P. ostreatus*, χωρίς ανιχνεύσιμη ποσότητα βιταμίνης D_2, σε ακτινοβολία 2800-2900 mJ cm^{-2} UVB στους 60-66°C για 10 λεπτά, ανιχνεύθηκαν 11 mg ανά 100 g ξηρού βάρους της βιταμίνης D_2 (Sapozhnikova et al., 2014). Σε παρόμοια μελέτη, η επεξεργασία με 411 mJ cm^{-2} UVB στους 20°C για 10 λεπτά οδήγησε σε σχηματισμό 4,07 mg βιταμίνης D_2 ανά 100 g ξηρού βάρους (Slawinska et al., 2016). Το γεγονός ότι ο εμπλουτισμός σε βιταμίνη D_2 μπορεί να πραγματοποιηθεί μετά από ξήρανση, διευκολύνει σημαντικά τη χρήση τεχνολογίας UV στην επεξεργασία των μανιταριών για να βελτιώσουν τη θρεπτική τους αξία. Εκτιμάται ότι περίπου ένα εκατομμύριο άνθρωποι στον κόσμο έχουν ανεπάρκεια βιταμίνης D όπως βρέφη, έφηβοι, ηλικιωμένοι, έγκυες και θηλάζουσες γυναίκες, αποτελούν τους πλέον εκτεθειμένους πληθυσμούς (WHO/FAO, 2004). Επιπλέον, τα μανιτάρια είναι μια φυσική πηγή βιταμίνης D για ορισμένους καταναλωτές όπως οι χορτοφάγοι και οι αυστηρά χορτοφάγοι, καθώς και τα άτομα με δυσανεξία στη λακτόζη, αφού τα περισσότερα προϊόντα εμπλουτίζονται με βιταμίνη D συμπεριλαμβανομένων των γαλακτοκομικών προϊόντων.

Επίσης το *P. ostreatus* έδειξε μία σημαντική υποχοληστερολαιμική δράση, σε μια κλινική μελέτη με 57 ασθενείς με δυσλιπιδαιμία (32 γυναίκες και 25 άνδρες με μέσο όρο ηλικίας 43 ετών) (I. Schneider, 2011). Σε άλλη μελέτη, δόθηκε ως συμπλήρωμα διατροφής, σκόνη του *P. ostreatus* σε 27 υπερτασικούς άνδρες με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (32 έως 68 ετών) σε ημερήσια δόση των 3 g για 3 μήνες. Φάνηκε ότι τόσο η συστολική όσο και η διαστολική αρτηριακή πίεση μειώθηκε σημαντικά. Παρατηρήθηκε επίσης ότι το *P. ostreatus* μείωσε τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας πλάσματος καθώς και τα επίπεδα της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (M. B. K. Choudhury, 2013). Τέλος σε μελέτη των Jayasuriya et al. το *P.*

ostreatus μείωσε τα επίπεδα μεταγευματικής γλυκόζης στον ορό και αύξησε τα επίπεδα ινσουλίνης σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 (Jayasuriya et al., 2015).

4. Ινουλίνη

Η ινουλίνη είναι ένα γραμμικό πολυμερές με β (2→1)-γλυκοσιδικούς δεσμούς που προέρχεται από την D-φρουκτόζη, ανήκει στην ομάδα των φρουκτανών και συντίθεται από ποικιλία φυτών (Roberfroid, 1993, N. C. Carpita, 1989). Η ινουλίνη είναι ένας υδατάνθρακας που βρίσκεται σε πολλά φυτά, επομένως σε πολλά τρόφιμα, φυτικής προέλευσης, που καταναλώνουν οι άνθρωποι (Πίνακας 1), όπως είναι το κρεμμύδι, το σκόρδο, η αγκινάρα κλπ. Η συγκέντρωση της ινουλίνης σε κάθε φυτό εξαρτάται από την ποικιλία, τον χρόνο μεταξύ της συγκομιδής και τις συνθήκες αποθήκευσης (Whittle, 1982, Cutclife, 1989).

Πίνακας 1: Περιεκτικότητα % σε ινουλίνη, ορισμένων τροφίμων (V. Sousa, 2011)

Φυτά	**Ινουλίνη %**
Κρεμμύδι	2-6
Αγκινάρα	3-10
Ραδίκια	12-15
Πράσο	3-10
Σκόρδο	9-16
Μπανάνα	0,3-0,7
Σίκαλη	0,5-1,5
Κριθάρι	0,5-1,5
Σιτάρι	1-4

Τεχνολογικά, η ινουλίνη που εξάγεται από τα φυτά περνά μέσα από μια διαδικασία ξήρανσης, και παρουσιάζεται σαν μια άμορφη, υγροσκοπική λευκή σκόνη με ουδέτερη οσμή και γεύση. Με αυτόν τον τρόπο χρησιμοποιείται για τον εμπλουτισμό των τροφίμων με διαιτητικές ίνες, διατηρώντας την εμφάνιση και τη γεύση των τυποποιημένων σκευασμάτων.

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε άτομα διαφορετικών ηλικιών παρείχαν αποτελέσματα που εγγυώνται για την ασφάλεια της ινουλίνης και της ολιγοφρουκτόζης (Roberfroid, 1993). Η ινουλίνη έχει χρησιμοποιηθεί για να αξιολογήσει τον ρυθμό σπειραματικής διήθησης με ενδοφλέβια ένεση από το 1931. Αυτή η πρακτική έχει γίνει μια τυπική διαδικασία χωρίς τοξικές επιδράσεις (Price et al., 1978). Επιπλέον, βάσει του ιστορικού της κατανάλωσης τροφίμων που περιέχουν ινουλίνη, από ανθρώπους, δεν υπάρχουν ενδείξεις τοξικών επιδράσεων (Coussement, 1999). Η δόση δυσανεξίας είναι αρκετά υψηλή, πράγμα που επιτρέπει ευρύ φάσμα

θεραπευτικών δόσεων ενώ τα υποκειμενικά γαστρεντερικά συμπτώματα είναι δύσκολο να μετρηθούν (Carabin and Flamm, 1999, Schillinger, 2002).

4.1. Τα οφέλη της ινουλίνης στην υγεία

Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η ινουλίνη δρα ως παράγοντας που επάγει την ανάπτυξη των *Bifidobacteria*. Σαν αποτέλεσμα της χρήσης της, διεγείρεται το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, μειώνονται τα επίπεδα των παθογόνων βακτηρίων στο έντερο, υπάρχει ανακούφιση από τη δυσκοιλιότητα και μειώνεται ο κίνδυνος οστεοπόρωσης μέσω της αύξησης της απορρόφησης των ιχνοστοιχείων και ιδιαίτερα του ασβεστίου. Έτσι, υπάρχει και μειωμένος κίνδυνος αθηροσκλήρωσης μέσω της ελαττωμένης σύνθεσης τριγλυκεριδίων και λιπαρών οξέων στο ήπαρ και άρα μειωμένα επίπεδα αυτών των ενώσεων στο αίμα (Kaur and Gupta, 2002).

Μελέτες σε αρουραίους και χάμστερ και μερικές σε ανθρώπους, έχουν δείξει ότι η ινουλίνη αυξάνει την βιοδιαθεσιμότητα του ασβεστίου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη μεταφορά του ασβεστίου από το λεπτό έντερο στο παχύ και μέσω της ωσμωτικής δράσης της ινουλίνης, μεταφέρεται νερό στο παχύ έντερο, επιτρέποντας στο ασβέστιο να γίνει περισσότερο διαλυτό (Roberfroid, 2002). Η βελτιωμένη βιοδιαθεσιμότητα του ασβεστίου στο κόλον θα μπορούσε επίσης να προέλθει από την υδρόλυση του φυτικού συμπλόκου του ασβεστίου μέσω της δράσης των βακτηριακών φυτασών, απελευθερώνοντας ασβέστιο. Καλύτερη απορρόφηση σχετίζεται με τη μείωση του pH στην περιοχή του ειλεού, στο τυφλό και το κόλον. Η ελάττωση του pH έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση ιονισμένων ιχνοστοιχείων, κάτι που διευκολύνει την παθητική διάχυση, την υπερτροφία του τοιχώματος του τυφλού και την αυξημένη συγκέντρωση πτητικών λιπαρών οξέων, χολικών αλάτων, ασβεστίου, φωσφόρου, φωσφορικού οξέος και σε μικρότερο βαθμό, του μαγνησίου, στο τυφλό (Kaur and Gupta, 2002).

Η υπολιπιδαιμική δράση της ινουλίνης έχει παρατηρηθεί σε μερικές μελέτες με αρουραίους, αν και αυτό είναι αμφιλεγόμενο. Τα πειραματικά δεδομένα μας οδήγησαν στο να υποθέσουμε ότι οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες μπορούν να μειώσουν την ηπατική λιπογένεση, μέσω της αναστολής της γονιδιακής έκφρασης των λιπογενών ενζύμων, με αποτέλεσμα την μειωμένη έκκριση VLDL-τριακυλογλυκερόλης. Αυτή η αναστολή μπορεί να επιτευχθεί μέσω παραγωγής λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου ή μέσω της διαμόρφωσης της ινσουλίνης με μηχανισμούς που δεν έχουν ακόμη εντοπιστεί (Kaur and Gupta, 2002, Roberfroid, 2002, Delzenne et al., 2002).

Η ινουλίνη επηρεάζει την εντερική λειτουργία αυξάνοντας την κινητικότητα του εντέρου (H. Hidaka, 1986, Menne et al., 2000), αυξάνοντας το βάρος των κοπράνων (περίπου 2 γραμμάρια

ανά γραμμάριο ινουλίνης που λαμβάνεται) (Oku, 1994) και μειώνοντας το pH των κοπράνων λόγω ζύμωσης (Menne et al., 2000, Gibson and Roberfroid, 1995).

Έρευνες σε πειραματικά ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι η ινουλίνη έχει αντικαρκινικές ιδιότητες (Pool-Zobel et al., 2002). Σε μία άλλη μελέτη, η προσθήκη ινουλίνης στη δίαιτα αρουραίων μείωσε την καρκινογένεση του παχέος εντέρου (Femia et al., 2002).

Η επίδραση ενός εμπλουτισμένου με ινουλίνη μπισκότου αξιολογήθηκε σε παχύσαρκους ασθενείς με καρδιαγγειακούς παράγοντες κινδύνου. Χωρίς αλλαγές σε ανθρωπομετρικές παραμέτρους και στην αύξηση της πρόσληψης διαλυτών διαιτητικών ινών δεν δημιούργησε καμιά γαστρεντερική ανεπιθύμητη ενέργεια. Η αύξηση της πρόσληψης διαιτητικών ινών (3 g ινουλίνης) από ένα εμπλουτισμένο μπισκότο μείωσε τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης σε παχύσαρκους ασθενείς (de Luis et al., 2010).

5. Λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου- SCFA

Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFA), είναι τα τελικά προϊόντα ζύμωσης των διαιτητικών ινών από τον αναερόβιο εντερικό μικροβιόκοσμο και έχει αποδειχθεί ότι ασκούν ευεργετική επίδραση στον ενεργειακό μεταβολισμό των θηλαστικών. Οι άνθρωποι στερούνται ενζύμων τα οποία είναι υπεύθυνα για την αποικοδόμηση του μεγαλύτερου μέρους των διαιτητικών ινών, όπως είναι η κυτταρίνη, το ανθεκτικό άμυλο και η ινουλίνη (Tremaroli and Backhed, 2012). Επομένως αυτοί οι μη αφομοιώσιμοι υδατάνθρακες περνούν στο ανώτερο γαστρεντερικό σωλήνα ανεπηρέαστοι και ζυμώνονται στο τυφλό και το παχύ έντερο από τον εντερικό μικροβιόκοσμο (Roy et al., 2006). Τα SCFAs είναι απαραίτητα μεταβολικά προϊόντα του εντερικού μικροβιόκοσμου, που απαιτούνται για την εξισορρόπηση του ισοδυνάμου οξειδοαναγωγής που παράγεται στο αναερόβιο περιβάλλον του εντέρου (van Hoek and Merks, 2012) καθώς επίσης, συμβάλλουν και στην ομοιόσταση του ξενιστή μέσω μείωσης του pH με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η ανάπτυξη των παθογόνων μικροοργανισμών (Robles Alonso and Guarner, 2013).

Τα SCFA είναι κορεσμένα αλειφατικά οργανικά οξέα που αποτελούνται από ένα έως έξι άνθρακες εκ των οποίων το οξικό (C2), το προπιονικό (C3) και το βουτυρικό (C4) είναι τα πιο άφθονα (~95%) (Cook and Sellin, 1998). Στο τυφλό και στο παχύ έντερο, το 95% των παραγόμενων SCFA απορροφούνται ταχέως από τα εντεροκύτταρα ενώ το υπόλοιπο 5% εκκρίνεται στα κόπρανα (Topping and Clifton, 2001, Ruppin et al., 1980, Dawson et al., 1964, Rechkemmer et al., 1988). Το βουτυρικό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να ρυθμίζει την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση του εντερικού επιθηλίου (Robles Alonso and

Guarner, 2013) ενώ το οξικό και το προπιονικό αποτελούν ενεργειακά υποστρώματα για τους περιφερικούς ιστούς και το ήπαρ (Bergman, 1990). Ανάλογα με τη διατροφή, η συνολική συγκέντρωση των SCFA μπορεί να μειωθεί από 70 mM έως και 140 mM στην περιοχή του παχέος εντέρου (Topping and Clifton, 2001).

Έχει φανεί ότι τα SCFA μπορούν να διαδραματίσουν βασικό ρόλο στην πρόληψη και τη θεραπεία του μεταβολικού συνδρόμου, των διαταραχών του εντέρου και ορισμένων ειδών καρκίνου (Hu et al., 2010, Gao et al., 2009, Donohoe et al., 2011, Blouin et al., 2011, Scharlau et al., 2009, Tang et al., 2011, Hamer et al., 2008). Σε κλινικές μελέτες η χορήγηση SCFA επηρέασε θετικά τη θεραπεία της ελκώδους κολίτιδας, της νόσου Crohn και της διάρροιας που σχετίζεται με τη λήψη αντιβιοτικών (Binder, 2010, Harig et al., 1989, Breuer et al., 1991, Vernia et al., 1995, Scheppach, 1996, Di Sabatino et al., 2005).

Κεφάλαιο 2

1. Οστά και σκελετός

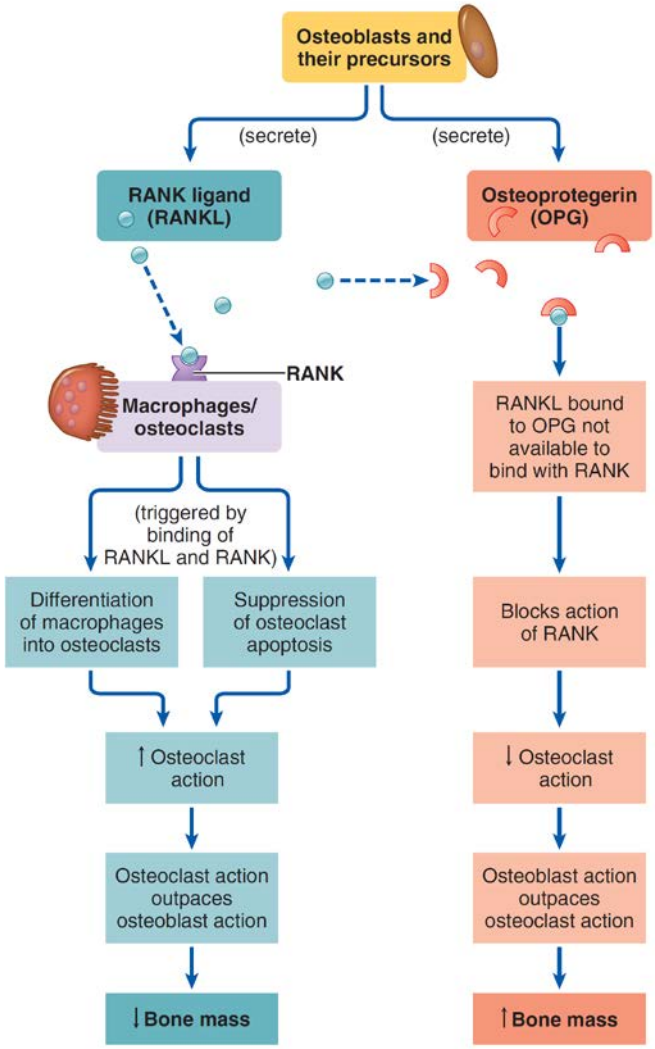
Ο σκελετός ενός ενήλικα έχει συνολικά 213 οστά (Standring, 2004). Κάθε οστό υφίσταται αναδιαμόρφωση συνεχώς, κατά τη διάρκεια της ζωής του ατόμου, με σκοπό: 1) τη συνεχή αναδιάταξη της μικροαρχιτεκτονικής του οστού, ώστε να επιτυγχάνονται οι μέγιστες δυνατές μηχανικές ιδιότητες και 2) τη διατήρηση του επιπέδου των Ca^{2+} στο πλάσμα (Sherwood, 2016).

Το 80% περίπου του σκελετού αποτελείται από φλοιώδη οστίτη ιστό, ενώ το υπόλοιπο 20% αποτελείται από δοκιδωτό ή σπογγώδη οστίτη ιστό, ο οποίος είναι λιγότερο πυκνός από τον φλοιώδη λόγω της αραιής κατασκευής των διασυνδεόμενων οστικών δοκίδων του. Ο σπογγώδης οστίτης ιστός είναι πιο ευαίσθητος στη δράση ή την έλλειψη των οιστρογόνων σε σχέση με τον φλοιώδη. Τα κατάγματα κυρίως, της σπονδυλικής στήλης, που προκαλούνται σε προχωρημένη ηλικία, είναι απόρροια της απώλειας του σπογγώδους οστίτη ιστού (L. Kathleen Mahan, 2014).

1.2. Οστικά κύτταρα

Στο οστό υπάρχουν 3 τύποι κυττάρων, οι οστεοβλάστες, οι οστεοκλάστες και τα οστεοκύτταρα. Οι οστεοβλάστες προέρχονται από τα στρωματικά κύτταρα, έναν τύπο κυττάρων του συνδετικού ιστού στο μυελό των οστών και εκκρίνουν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία στο εσωτερικό της οποίας καθιζάνουν κρύσταλλοι $Ca_3(PO_4)_2$ με αποτέλεσμα την παραγωγή οστίτη ιστού (Sherwood, 2016). Η λειτουργία των οστεοβλαστών ρυθμίζεται μέσω του συμπαθητικού νευρικού συστήματος. Οι οστεοβλάστες διαθέτουν β-αδρενεργικούς υποδοχείς στην επιφάνειά τους, οι οποίοι όταν διεγείρονται αναστέλλουν τον σχηματισμό του οστού και αυξάνουν την οστική απορρόφηση, μειώνοντας έτσι την οστική μάζα (Elefteriou et al., 2005). Αντίθετα, οι οστεοκλάστες είναι τα μόνα κύτταρα που είναι γνωστό ότι μπορούν να απορροφήσουν το οστό. Είναι ενεργοποιημένα πολυπύρηνα κύτταρα που διαφοροποιούνται από τα μακροφάγα, τα οποία είναι κύτταρα ιστών που προέρχονται από τα μονοκύτταρα, έναν τύπο λευκοκυττάρων του αίματος (Sherwood, 2016). Τα πρόδρομα μονοπύρηνα μονοκύτταρα-μακροφάγα έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορους ιστούς, αλλά τα πρόδρομα μονοκύτταρα-μακροφάγα του μυελού των οστών πιστεύεται ότι παράγουν τους περισσότερους οστεοκλάστες.

Τέλος, τα οστεοκύτταρα είναι ανενεργοί οστεοβλάστες εγκλωβισμένοι στα τοιχώματα του οστού που οι ίδιοι έχουν εναποθέσει γύρω τους. Πιο συγκεκριμένα, τα οστεοκύτταρα είναι ο πιο άφθονος κυτταρικός τύπος στα οστά. Υπολογίζεται ότι αποτελούν το 95% όλων των οστικών κυττάρων. Τα οστεοκύτταρα προέρχονται από τους οστεοβλάστες που έχουν υποστεί τερματική διαφοροποίηση κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των οστών και στη συνέχεια έχουν απορροφηθεί από το μη ολοκληρωμένο οστεοειδές. Αυτά τα καλυμμένα κύτταρα, μετά την εναπόθεση των αλάτων γίνονται οστεοκύτταρα και βρίσκονται στα κενά μέσα στο οστό. Τα οστεοκύτταρα έχουν μία εντελώς διαφορετική μορφολογία από τους οστεοβλάστες. Μετά από την απορρόφηση του οστεοβλάστη από την οστική μήτρα, χάνεται πάνω από το 70% των οργανιδίων του και του κυτταροπλάσματός του, και αποκτά μακρά δενδριτική μορφή με αποτέλεσμα να παίρνει σχήμα αστεριού.



Εικόνα 2: Ο ρόλος των οστεοβλαστών στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και της δραστηριότητας των οστεοκλαστών (Sherwood, 2016).

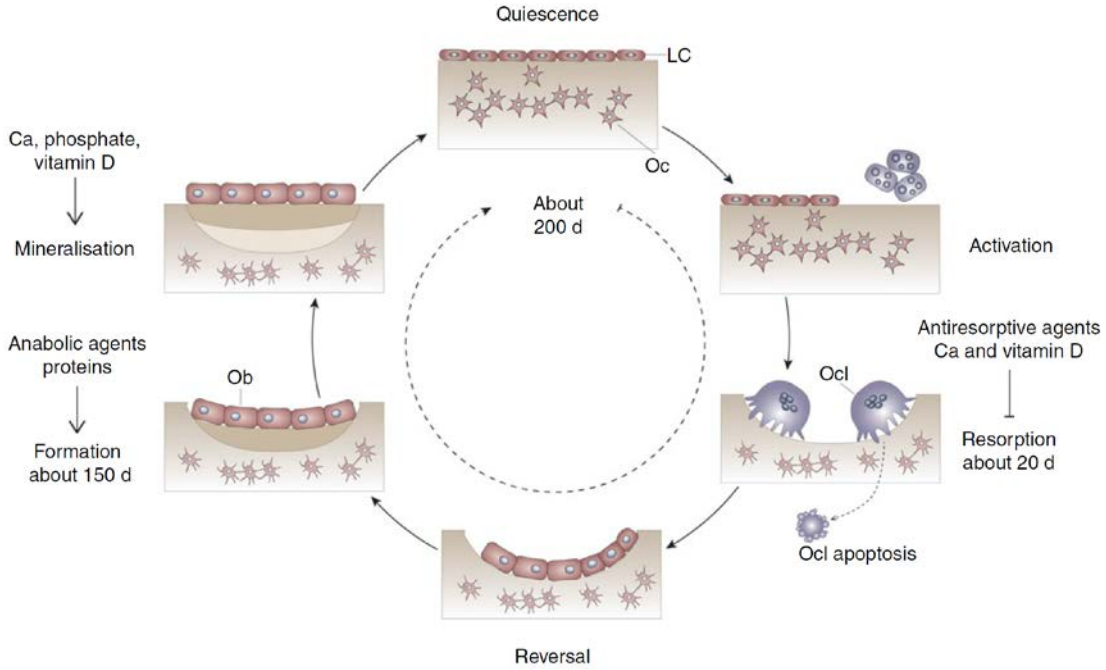
Οι οστεοβλάστες και τα πρόδρομα μονοκύτταρα-μακροφάγα διαθέτουν ένα σύστημα επικοινωνίας που βασίζεται στον προσδέτη του RANK (RANKL) και την οστεοπροτεγερίνη (OPG), οι οποίοι είναι οι διαμεσολαβητές που ρυθμίζουν με αντίθετους τρόπους την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των οστεοκλαστών.

Ο προσδέτης του RANK (RANKL) επάγει τη δράση των οστεοκλαστών. Ο RANKL προσδένεται στη μεμβράνη των μακροφάγων και με αυτόν τον τρόπο διαφοροποιεί τα μακροφάγα σε οστεοκλάστες και τα βοηθά να επιβιώσουν για μεγαλύτερο διάστημα καταστέλλοντας την απόπτωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση της οστικής απορρόφησης και τη μείωση της οστικής μάζας. Αντιθέτως, οι οστεοβλάστες εκκρίνουν στη θεμέλια ουσία, οστεοπροτεγερίνη (OPG), η οποία καταστέλλει τη δράση των οστεοκλαστών. Η OPG δρα ως ένας υποδοχέας παγίδευσης που δεσμεύει και εξουδετερώνει τον προσδέτη RANKL. Επομένως η OPG αποτρέπει τη δέσμευση του RANKL στα μακροφάγα και έτσι επιβραδύνεται η απορροφητική δραστηριότητα

των οστεοκλαστών. Άμεσο αποτέλεσμα είναι η εντονότερη δραστηριότητα των οστεοβλαστών συγκριτικά με αυτή των οστεοκλαστών και η αύξηση της οστικής μάζας (Sherwood, 2016).

1.3. Η διαδικασία της οστικής αναδιαμόρφωσης

Η διαδικασία της οστικής αναδιαμόρφωσης αποτελείται από πέντε στάδια, την ενεργοποίηση, την απορρόφηση, την κυτταρική αντιστροφή, τον σχηματισμό και τον τερματισμό και πραγματοποιείται σε αρκετές εβδομάδες (Εικόνα 3)(Bonjour et al., 2014). Τα συσσωματώματα των οστεοκυττάρων και των οστεοβλαστών που εμπλέκονται στην απορρόφηση και την διαμόρφωση του οστού, σε κάθε περιοχή του οστού που υφίσταται αναδιαμόρφωση, τοποθετούνται μέσα σε προσωρινές ανατομικές δομές γνωστές ως "βασικές πολυκύτταρικές μονάδες" (basic multicellular units, BMU). Κάθε BMU είναι επενδυμένη με οστικά κύτταρα που δημιουργούν ένα μοναδικό περιβάλλον για τον συνδυασμό απορρόφησης-σχηματισμού. Κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής οστικής αναμόρφωσης ο όγκος των οστών δεν αλλάζει (Andersen et al., 2009). Η ενεργή BMU αποτελείται από οστεοκλάστες που καλύπτουν την πρόσφατα εκτεθειμένη οστική επιφάνεια προετοιμάζοντάς την για την εναπόθεση του ¨νέου¨ οστού. Οι



Εικόνα 3: Ο κύκλος αναδιαμόρφωσης του οστού. Ο κύκλος των οστών περιλαμβάνει μια ακολουθία συμβάντων: την ενεργοποίηση, την πρόσληψη οστεοκλαστών (Ocl) για να ξεκινήσει η επαναρρόφηση, την αποικοδόμηση και αφαίρεση του παλαιού οστού, την αναστροφή και τον σχηματισμό του νέου οστού από τους οστεοβλάστες (Ob). Μετά από αυτή τη φάση εμφανίζεται μία περίοδος ηρεμίας (LC: επενδυτικά κύτταρα, Oc: οστεοκύτταρα) (Bonjour et al., 2014).

οστεοβλάστες ακολουθούν τους οστεοκλάστες, εκκρίνοντας και εναποθέτοντας οστεοειδές που δεν περιέχει ανόργανα άλατα. Η σωστή διάταξη των κυττάρων εντός της BMU είναι κρίσιμη

στην εξασφάλιση της σωστής ακολουθίας των φάσεων της αναδιαμόρφωσης των οστών: ενεργοποίηση, απορρόφηση, αντιστροφή, σχηματισμός και τερματισμός (Katsimbri, 2017).

2. Οστική Μάζα και Οστική Πυκνότητα

Με τον όρο οστική μάζα αναφερόμαστε στην περιεκτικότητα του οστού σε ανόργανα στοιχεία και όχι στην οστική πυκνότητα. Ο όρος οστική πυκνότητα χρησιμοποιείται για να περιγράψει την κατάσταση του οστού μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης.

Η ηλικία αποτελεί σημαντικό και καθοριστικό παράγοντα της οστικής πυκνότητας. Στην ηλικία των 40 ετών περίπου, η οστική πυκνότητα ελαττώνεται σταδιακά και στα δύο φύλα αλλά ο ρυθμός της απώλειας του οστού αυξάνεται σε μεγαλύτερο βαθμό στις γυναίκες μετά την ηλικία των 50 ετών ή μετά την εμμηνόπαυση. Σε αυτές τις γυναίκες παρατηρείται μία συνεχής απώλεια του οστού της τάξης του 1-2% το χρόνο, μέσα στην επόμενη δεκαετία. Αυτή η απώλεια της οστικής μάζας είναι αποτέλεσμα μεταβολών σε μηχανισμούς που καθορίζονται ορμονικά και είναι αυτοί που συντονίζουν την διαδικασία αναδιαμόρφωσης των οστών.

Η απώλεια του οστού στις ηλικιωμένες γυναίκες, συνήθως, φτάνει τα 300mg Ca^{2+} την ημέρα, το οποίο αποβάλλεται με τα ούρα και τα κόπρανα. Για να διατηρηθεί το ισοζύγιο του ασβεστίου, θα πρέπει να υπάρχει απορρόφηση του συγκεκριμένου ιχνοστοιχείου, από τα τρόφιμα καθημερινά (L. Kathleen Mahan, 2014).

2.1. Οστεοπενία και Οστεοπόρωση

Ο όρος οστεοπόρωση αναφέρεται για να ορίσει μία συστηματική σκελετική νόσο η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλή οστική μάζα και διαταραχή της μικρο-αρχιτεκτονικής του οστίτη ιστού, με αποτέλεσμα τη μειωμένη αντοχή των οστών στη μηχανική καταπόνηση και τον αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018).

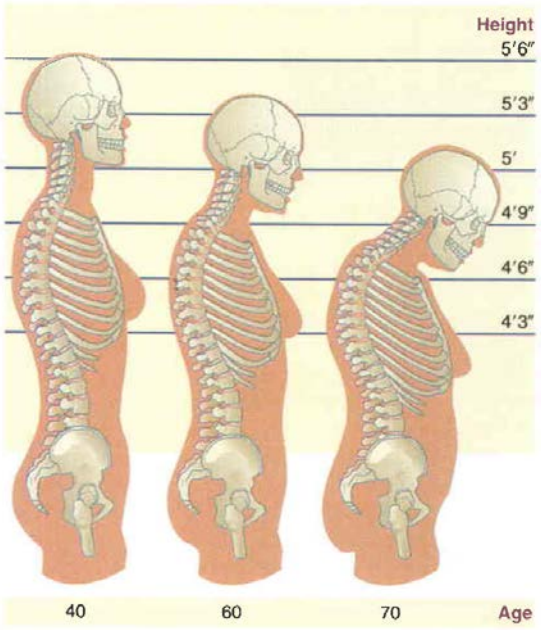
Σύμφωνα με τον WHO, φυσιολογική τιμή της οστικής πυκνότητας θεωρείται όταν είναι εντός της 1 μονάδας σταθερής απόκλισης (SD) από την πυκνότητα ενός νέου ενήλικα του ίδιου φύλου (T-score > -1). Σε άτομα, όπου T-score < -2,5, θεωρείται ότι πάσχουν από οστεοπόρωση, ενώ στα άτομα με ενδιάμεσες τιμές -1> T-score>-2,5 θεωρείται ότι πάσχουν από οστεοπενία (Kanis et al., 1994).

Ο επιπολασμός των οστεοπορωτικών καταγμάτων ποικίλλει μεταξύ των Ευρωπαϊκών χωρών. Στην Ευρώπη η επίπτωση των σπονδυλικών καταγμάτων που έχουν διαγνωσθεί είναι 10,7/1000 γυναίκες και 5,7/1000 άνδρες ετησίως, ενώ αντίστοιχα η επίπτωση των μη σπονδυλικών καταγμάτων είναι 19/1000 γυναίκες και 7,3/1000 άνδρες το χρόνο (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018).

Στην Ελλάδα, το 30% των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών πάσχει κλινικά από τη νόσο, και το 19% των γυναικών και το 11% των ανδρών, άνω των 60 ετών, παρουσιάζουν οστεοπόρωση. Το 25% των γυναικών ηλικίας άνω των 70 ετών εμφανίζει κατάγματα οφειλόμενα κατά κύριο λόγο στην οστεοπόρωση. Από το 1977 έως το 2002 ο επιπολασμός των καταγμάτων αυξήθηκε κατά 100% στη χώρα μας, ωστόσο παρατηρήθηκε μία ήπια αλλά σημαντική μείωση της συχνότητας μέχρι το 2007 (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018).

2.2. Τύποι Οστεοπόρωσης

Η πρωτοπαθής οστεοπόρωση διαχωρίζεται σε δύο τύπους. Ο τύπος 1 αναφέρεται στην μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση ή οστεοπόρωση λόγω έλλειψης οιστρογόνων/ανδρογόνων, εμφανίζεται στις γυναίκες λίγα χρόνια μετά την εμμηνόπαυση και χαρακτηρίζεται κυρίως από απώλεια δοκιδωτού οστίτη ιστού λόγω διακοπής της παραγωγής οιστρογόνων από τις ωοθήκες. Η γεροντική οστεοπόρωση (τύπος 2) εκδηλώνεται στην ηλικία των 70 ετών περίπου ή και αργότερα και προσβάλλει και τα δύο φύλα με τις γυναίκες να προσβάλλονται σε υπερδιπλάσια συχνότητα συγκριτικά με τους άνδρες. Σε αυτόν τον τύπο οστεοπόρωσης ο φλοιώδης και ο δοκιδώδης οστίτης ιστός, αναδιαμορφώνονται, με τον δοκιδώδη να υφίσταται την μεγαλύτερη αναδιαμόρφωση. Η γεροντική οστεοπόρωση χαρακτηρίζεται από κατάγματα του ισχίου και πιθανόν να οφείλεται σε ανεπάρκεια βιταμίνης D και ασβεστίου. Οι γυναίκες με οστεοπόρωση τύπου 2 μπορεί να πάσχουν ταυτόχρονα και από τους δύο τύπους οστεοπόρωσης.



Εικόνα 4: Οι μεταβολές που επέρχονται στην σπονδυλική στήλη, ανάλογα με την ηλικία, λόγω οστεοπόρωσης. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να προκαλέσουν απώλεια ύψους από 15 έως 23 cm (L. Kathleen Mahan, 2014).

Η δευτεροπαθής οστεοπόρωση προκύπτει όταν η απώλεια του οστίτη ιστού είναι επακόλουθο χρήσης κάποιου γνωστού φαρμάκου ή μίας νόσου και αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 5% των ασθενών με οστεοπόρωση. Παραδείγματα νόσων είναι παθήσεις του θυρεοειδούς, των παραθυρεοειδών, Σακχαρώδης Διαβήτης, Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια, Χρόνια διάρροια ή εντερική δυσαπορρόφηση κ.α. Παραδείγματα φαρμάκων είναι τα κορτικοστεροειδή, η κυκλοσπορίνη, το λίθιο, η τετρακυκλίνη, η ηπαρίνη, η μεθοτρεξάτη, κ.α. καθώς και η κατάχρηση οινοπνεύματος και νικοτίνης. Τα κορτικοστεροειδή αναστέλλουν τη δράση των

οστεοβλαστών, παρεμποδίζοντας την απορρόφηση του ασβεστίου και καταστέλλοντας τις ορμόνες του φύλου (L. Kathleen Mahan, 2014, Ελένη Σταματοπούλου, 2014).

2.3. Αιτιολογία Οστεοπόρωσης

Η οστεοπόρωση, ενώ αποτελεί μια διαταραχή άγνωστης αιτιολογίας, οι παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάπτυξή της είναι πολλοί. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να είναι ανθρωπομετρικοί, κληρονομικοί, παθογενετικοί, φαρμακευτικοί και τρόπου ζωής (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης οστεοπόρωσης (L. Kathleen Mahan, 2014)
Οικογενειακό ιστορικό
Γυναικείο φύλο
Λευκή και Ασιατική φυλή
Σαρκοπενία ή ελαφρύς σκελετός
Εξάντληση οιστρογόνων (εμμηνόπαυση, Πρώιμη ωοθηκεκτομή)
Εξάντληση ανδρογόνων με υπογοναδισμό στους άνδρες
Αμηνόρροια στις γυναίκες λόγω υπερβολικής άσκησης
Ηλικία, ιδιαίτερα >60 έτη
Έλλειψη άσκησης
Παρατεταμένη πρόσληψη ορισμένων φαρμάκων (Αντιόξινα που περιέχουν αλουμίνιο, στρεροειδή, τετρακυκλίνες, αντιεπιληπτικά, χορήγηση θυρεοειδικών ορμονών)
Νοσήματα ή καταστάσεις που επηρεάζουν το μεταβολισμό του ασβεστίου και των οστών (Χαμηλό ΣΒ ή χαμηλό σωματικό λίπος, κάπνισμα, υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ, καφεΐνης και διαιτητικών ινών και ανεπαρκής πρόσληψη ασβεστίου ή βιταμίνης D)

Ορισμένοι από τους παραπάνω παράγοντες σχετίζονται ευθέως και με την συχνότητα των καταγμάτων. Με εξαίρεση το κάπνισμα και την υπερβολική πρόσληψη αλκοόλ, η διατροφή και ο τρόπος ζωής έχουν λιγότερη σημασία, αφού δεν έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την συχνότητα των καταγμάτων (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018).

2.3.1. Φυλή και Εθνικότητα

Άτομα της Λευκής και Ασιατικής φυλής, σε σύγκριση με άτομα Μαύρης και Ισπανόφωνης φυλής, εμφανίζουν περισσότερα οστεοπορωτικά κατάγματα και παρουσιάζουν μικρότερη οστική πυκνότητα (L. Kathleen Mahan, 2014).

2.3.2. Έμμηνος Κύκλος

Η διακοπή της έμμηνου ρύσης, σε οποιαδήποτε ηλικία για μεγάλα χρονικά διαστήματα, αποτελεί τον βασικότερο παράγοντα κινδύνου για την εκδήλωση της οστεοπόρωσης. Η αμμηνόρροια που συνοδεύει την μεγάλη απώλεια βάρους σε ασθενείς με ψυχογενή ανορεξία ή σε άτομα που κάνουν εντατικές προπονήσεις, έχει ανάλογη επίδραση στα οστά με την εμμηνόπαυση. Η οστική πυκνότητα σε αθλήτριες με διακοπή της έμμηνου ρύσης, είναι κατά 25-40% χαμηλότερη από αυτήν των υγιών γυναικών της ομάδας ελέγχου. Ακόμα και με την επανεμφάνιση της έμμηνου ρύσης η οστική πυκνότητα αυξάνεται αλλά σταθεροποιείται σε χαμηλότερα επίπεδα από εκείνα των γυναικών της ομάδας ελέγχου (L. Kathleen Mahan, 2014).

2.3.3. Θηλασμός

Σε γυναίκες που θηλάζουν παρατηρείται μια παροδική απώλεια οστικής μάζας, κυρίως στην περιοχή του αυχένα, του μηριαίου και στους σπονδύλους της οσφυϊκής μοίρας. Κατά τη διάρκεια του θηλασμού, είναι απαραίτητο, η μητέρα, να λαμβάνει επαρκείς ποσότητες ασβεστίου και βιταμίνης D ώστε να αναπληρωθούν τα επίπεδα τους στον ορό και στις αποθήκες τους (L. Kathleen Mahan, 2014).

2.3.4. Περιορισμένη σωματική δραστηριότητα

Η έλλειψη άσκησης είναι γνωστό ότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου για την απώλεια οστικής μάζας και την ανάπτυξη οστεοπόρωσης. Η έκθεση των οστών σε εξωτερικές πιέσεις λόγω της σύσπασης των μυών και η διατήρηση του σώματος σε όρθια θέση έναντι της έλξης της βαρύτητας διεγείρουν την δράση των οστεοβλαστών. Άτομα που βρίσκονται σε κατάκλιση για μεγάλο χρονικό διάστημα ή που δεν έχουν την ικανότητα ελεύθερης κίνησης, χάνουν οστική μάζα με μεγάλη ταχύτητα. Γενικότερα, ο περιορισμός της δραστηριότητας στην καθημερινότητα συμβάλλει στην απώλεια της οστικής μάζας, ενώ αντίθετα, ασκήσεις που περιλαμβάνουν το άνω τμήμα του κορμού, έχει φανεί ότι συμβάλλουν στην αύξηση των οστών (L. Kathleen Mahan, 2014).

2.3.5. Σωματικό βάρος και Δείκτης μάζας σώματος

Το ΣΒ επηρεάζει σημαντικά την περιεκτικότητα του οστού σε ανόργανα συστατικά καθώς και την οστική πυκνότητα. Σε ενήλικα άτομα με αυξημένο ΣΒ, έχει παρατηρηθεί μεγαλύτερη οστική πυκνότητα. Αυτό σχετίζεται με το βάρος που φέρουν τα διάφορα σημεία του σκελετού (L. Kathleen Mahan, 2014). Διάφορες παθολογικές καταστάσεις που οδηγούν σε χαμηλό δείκτη μάζας σώματος (BMI<20 Kg/m^2), συμβάλλουν σε αυξημένο κίνδυνο κατάγματος, ανεξάρτητα

από την αιτία που τον δημιούργησε και ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες κινδύνου για κάταγμα που το άτομο πιθανώς έχει (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018).

2.3.6. Φάρμακα

Η λήψη πολλών φαρμάκων μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη οστεοπόρωσης, είτε μέσω παρεμπόδισης στην απορρόφηση ασβεστίου είτε μέσω αυξημένης απώλειας ασβεστίου από τα οστά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αρνητική επίδραση των κορτικοστεροειδών στην οστική πυκνότητα, μέσω της επιρροής που ασκούν στον μεταβολισμό της βιταμίνης D. Ως ημερήσια δόση οριοθετούνται τα 5mg πρεδνιζολόνης για τουλάχιστον 3 μήνες, ωστόσο η επίδραση στον κίνδυνο σπονδυλικών καταγμάτων παραμένει, ανεξάρτητα του χρόνου που έχει παρέλθει από την αγωγή. Επίσης, η χορήγηση μεγάλης ποσότητας θυρεοειδικής ορμόνης συμβάλλει στην απώλεια οστικής μάζας με την πάροδο του χρόνου (L. Kathleen Mahan, 2014, Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018).

2.3.7. Αλκοόλ και κάπνισμα

Το κάπνισμα των τσιγάρων και η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ αποτελούν παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη οστεοπόρωσης. Ακόμα και το κάπνισμα λίγων τσιγάρων την ημέρα διαταράσσει τον ρυθμό του οστικού μεταβολισμού, πιθανόν λόγω τοξικών επιδράσεων στους οστεοβλάστες, με αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων. Όσον αφορά την κατάχρηση οινοπνεύματος, άτομα τα οποία καταναλώνουν πάνω από 2 ποτήρια αλκοόλ την ημέρα, έχουν αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην τοξική επίδραση του αλκοόλ στα κύτταρα του οστού, στην δυσαπορρόφηση του ασβεστίου και της βιταμίνης D αλλά και στην συχνότητα των πτώσεων. Επίσης η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ διακόπτει τη συνεχή ισορροπία ανάμεσα στην απορρόφηση και την ανακατασκευή του οστού, με αποτέλεσμα την αλκοολική οστεοπάθεια. Αυτή η διαταραχή της ισορροπίας μπορεί να είναι αποτέλεσμα της αναστολής της οστεοβλαστικής λειτουργίας και της εναπόθεσης νέου οστού. Η κατάχρηση οινοπνεύματος έχει επίσης συνδεθεί με προβληματική επιμετάλλωση του οστού, μειωμένη σύνθεση οστεοειδούς καθώς και μειωμένο αριθμό και πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών. Όσον αφορά την εφηβική ηλικία, η κατανάλωση αλκοόλ μειώνει την κορυφαία οστική μάζα, με αποτέλεσμα αδύναμα οστά κατά την ενηλικίωση και κατ’ επέκταση πιο επιρρεπή σε κατάγματα. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η κατάχρηση οινοπνεύματος συνοδεύει το κάπνισμα και την μειωμένη λήψη τροφής, παράγοντες που όπως έχουν αναφερθεί συμβάλλουν στην κακή οστική υγεία. Μετα-ανάλυση 18 προοπτικών μελετών έδειξε μία μη γραμμική συσχέτιση ανάμεσα στην κατανάλωση αλκοόλ και στον κίνδυνο κατάγματος. Συγκεκριμένα, άτομα τα οποία

καταναλώνουν έως 1 ποτό την ημέρα έχουν 12% χαμηλότερο κίνδυνο για κάταγμα ισχίου, ενώ άτομα που καταναλώνουν περισσότερα από 4 ποτά την ημέρα έχουν 70% μεγαλύτερο κίνδυνο για κάταγμα ισχίου, συγκριτικά με τα άτομα που απέχουν από το αλκοόλ. (L. Kathleen Mahan, 2014, Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018).

2.4. Διατροφή

Η σωστή διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο στην οστική υγεία, κυρίως προλαμβάνοντας αλλά και, εν μέρει θεραπεύοντας, νοσήματα των οστών. Εκτός από το ασβέστιο, τον φώσφορο και τη βιταμίνη D που είναι απαραίτητα για την φυσιολογική δομή και λειτουργία του σκελετού, πολλά μικροθρεπτικά συστατικά συμβάλουν σημαντικά στην ανάπτυξη και συντήρηση των οστών.

2.4.1. Ασβέστιο & Βιταμίνη D

Κατά την οστική ανάπτυξη, η κατακράτηση του ασβεστίου από τον σκελετό επηρεάζεται από την πρόσληψή του. Επομένως η επίτευξη της κορυφαίας οστικής μάζας κατά την νεαρή ηλικία είναι άμεσα συνδεδεμένη με την κάλυψη των ημερήσιων αναγκών του ατόμου, σε ασβέστιο. Μελέτες ισοζυγίου του ασβεστίου έχουν αναδείξει μία πρόσληψη της τάξης των 1140mg/d για τα αγόρια και των 1300mg/d για τα κορίτσια. Μέσω επιδημιολογικών μελετών, υπάρχει μία συσχέτιση της πρόσληψης ασβεστίου και γάλακτος, κατά την παιδική ηλικία, με την οστική ανάπτυξη και τον κίνδυνο κατάγματος στην παιδική ηλικία και με την οστική πυκνότητα στην ενήλικη ζωή. Μία ημερήσια πρόσληψη ασβεστίου της τάξης των 700-1200mg, πρέπει να επιδιώκεται, ενώ η διόρθωση της ανεπαρκούς πρόσληψης πρέπει να γίνεται πρώτα μέσω της διατροφής και η συμπληρωματική χορήγηση να είναι υποστηρικτική. Η υπερβολική συμπληρωματική χορήγηση ασβεστίου έχει συσχετιστεί με τον σχηματισμό λίθων στο ουροποιητικό σύστημα ή στους νεφρούς, με υπερασβεστιαιμία, με ανεπάρκεια σιδήρου και άλλων δισθενών ανόργανων στοιχείων και με δυσκοιλιότητα.

Η πρόσληψη της βιταμίνης D μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω της διατροφής (D2-εργοκαλσιφερόλη) και να παραχθεί στο δέρμα με τη βοήθεια της ηλιακής ακτινοβολίας (D3-χοληκαλσιφερόλη). Οι έννοιες της έλλειψης και της ανεπάρκειας της συγκεκριμένης βιταμίνης, αναθεωρούνται συνεχώς αφού μέχρι πρόσφατα η βιταμίνη D θεωρείτο σημαντική σε άτομα με μειωμένη έκθεση στον ήλιο (βρέφη, ηλικιωμένοι κλπ). Ωστόσο, έχει φανεί ότι πληθυσμοί σε χώρες με αυξημένη ηλιοφάνεια, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας, έχουν χαμηλές συγκεντρώσεις βιταμίνης D. Οργανισμοί όπως η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) και το Ινστιτούτο Ιατρικής στην Αμερική (Institute of Medicine), έχουν οριοθετήσει την

τιμή της 25(OH)D>50nmol/L να είναι επαρκής και ευεργετική στη μείωση του κινδύνου κατάγματος, ενώ τιμές <30 nmol/L ορίζουν την ανεπάρκεια.

Όσον αφορά την χορήγηση της βιταμίνης D, όταν συνδυάζεται με συμπλήρωμα ασβεστίου είναι αποτελεσματική στη μείωση των μη σπονδυλικών καταγμάτων και ισχίου σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και ηλικιωμένους άνδρες. Η πρόσληψη των 800IU (20μg) την ημέρα έχει συσχετιστεί με μείωση των μη σπονδυλικών καταγμάτων, ενώ πρόσληψη των 700-1000IU την ημέρα έχει συσχετιστεί με μείωση κινδύνου πτώσεων σε ηλικιωμένους. Η συμπληρωματική χορήγηση της D3 (χοληκαλσιφερόλη) είναι πιο αποδοτική συγκριτικά με την D2 (εργοκαλσιφερόλη) (L. Kathleen Mahan, 2014, Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018).

2.4.2. Πρωτεΐνες

Όταν η πρόσληψη του ασβεστίου είναι σε χαμηλά επίπεδα, η υψηλή κατανάλωση πρωτεϊνών φαίνεται να αυξάνει την απώλειά του μέσω των ούρων και να επηρεάζει αρνητικά την οστική υγεία. Αντίθετα, η χρόνια χαμηλή πρωτεϊνική πρόσληψη, που παρατηρείται στον υποσιτισμό, οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα λευκωματίνης, άρα και χαμηλά επίπεδα IGF-1 και ασβεστίου στον ορό. Η παραγωγή του IGF-1 ενεργοποιεί την αναβολική επίδραση των πρωτεϊνών, χωρίς να υπάρχει ταυτόχρονα υπερβολικός σχηματισμός οξέων λόγω καταβολισμού των αμινοξέων. Η διαφορά μεταξύ της αναβολικής και της καταβολικής δράσης έχει ως αποτέλεσμα την τελική αύξηση ή απώλεια του οστού. Επομένως, η πολύ υψηλή ή πολύ χαμηλή πρόσληψη πρωτεϊνών επηρεάζει τόσο την περιεκτικότητα του οστού σε ανόργανα στοιχεία όσο και την οστική πυκνότητα. Οι δίαιτες με μέτρια περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη (1-1,5 gr/Kg σωματικού βάρους ή περίπου 15% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης) έχουν συσχετιστεί με φυσιολογικό μεταβολισμό του ασβεστίου και συμβάλλουν στη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων PTH στον ορό. Η δράση της PTH είναι η ενεργοποίηση των οστεοβλαστών, οι οποίοι αυξάνουν την παραγωγή της IL-6 και άλλων κυτταροκινών, που με τη σειρά τους ενεργοποιούν τους οστεοκλάστες με αποτέλεσμα την επαναρρόφηση του οστού. Αξίζει να σημειωθεί ότι η PTH παρεμποδίζεται από την δράση των οιστρογόνων (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018, L. Kathleen Mahan, 2014).

Σύμφωνα με μετα-ανάλυση τυχαιοποιημένων κλινικών μελετών, η χορήγηση πρωτεϊνών μέσω συμπληρωμάτων σε άτομα τρίτης ηλικίας, συσχετίζεται θετικά με την οστική πυκνότητα στη σπονδυλική στήλη. Όσον αφορά τους ασθενείς με κάταγμα, η ίδια μετα-ανάλυση έδειξε ότι η συμπληρωματική χορήγηση πρωτεϊνών συσχετίζεται με αύξηση της οστικής πυκνότητας και μείωση της οστικής απώλειας, καθώς επίσης φαίνεται να μειώνει και τις μακροχρόνιες μετα-καταγματικές επιπλοκές. Ωστόσο, δεν υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις που να υποστηρίζουν ότι οι

πρωτεΐνες φυτικής προέλευσης είναι κατώτερης ή ανώτερης ποιότητας από τις πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018).

2.4.3. Βιταμίνη Α

Σε μελέτες που έχουν χορηγηθεί αυξημένες ποσότητες βιταμίνης Α σε ζωικά πρότυπα, έχει φανεί αυξημένος κίνδυνος διαφόρων ανωμαλιών του οστίτη ιστού μεταξύ των οποίων είναι η μείωση του μήκους των μακρών οστών, η λέπτυνση του σπογγώδους οστού, η πάχυνση του περιόστεου, η αύξηση της οστικής απορρόφησης και η μείωση του οστικού σχηματισμού. Σύμφωνα με μετα-ανάλυση προοπτικών μελετών, η υψηλή κατανάλωση βιταμίνης Α από ανθρώπους, αυξάνει τον κίνδυνο κατάγματος ισχίου. Αντίθετα η πρόσληψη προβιταμίνης Α (β-καροτένιο) δεν συσχετίζεται με αύξηση του κινδύνου για κάταγμα ισχίου. Εντούτοις, μέχρι και τα τελευταία δεδομένα, δεν μπορεί να οριστεί ανώτατο επίπεδο πρόσληψης βιταμίνης Α, πάνω από το οποίο υπάρχει τοξική επίδραση στην οστική υγεία (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018).

2.4.4. Βιταμίνη Κ

Τόσο η βιταμίνη Κ1 (φυλλοκινόνη, φυτοναδιόνη) όσο και η Κ2 (μενακινόνη, μενατετρανόνη) είναι απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την οστική υγεία. Ο ρόλος της βιταμίνης Κ είναι σημαντικός στην ωρίμανση της οστεοκαλσίνης καθώς και στην μετα-μεταφραστική τροποποίηση άλλων πρωτεϊνών της θεμέλιας ουσίας.

Μετα-ανάλυση επιδημιολογικών μελετών έδειξε ότι υπάρχει αρνητική συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη βιταμίνης Κ και στον κίνδυνο κατάγματος. Επίσης η χορήγηση και των δύο μορφών της βιταμίνης, μέσω συμπληρωμάτων, έχει συσχετιστεί με μείωση της οστικής απώλειας και με μέτρια αύξηση στην οστική πυκνότητα της σπονδυλικής στήλης. Επομένως η βέλτιστη πρόσληψη της βιταμίνης Κ, ειδικά στη μέση και τρίτη ηλικία, είναι σημαντική για την σκελετική υγεία, τη μείωση των καταγμάτων και την ομοιόσταση του ασβεστίου (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018, L. Kathleen Mahan, 2014).

2.4.5. Φώσφορος

Ο φώσφορος υπάρχει πρακτικά σε όλα τα τρόφιμα, με τη μορφή αλάτων. Επομένως η κατανάλωση ποικίλων τροφίμων μπορεί να εξασφαλίσει μια σταθερή πρόσληψη του συγκεκριμένου μετάλλου (1000-1200mg/ημέρα για τις γυναίκες και 1200-1400mg/ημέρα για τους άνδρες). Αντίθετα τα άλατα ασβεστίου δεν είναι ευρέως διαδεδομένα με αποτέλεσμα η επαρκής πρόσληψη των συγκεκριμένων αλάτων να είναι λιγότερο εφικτή και να χρειάζεται συνειδητή επιλογή τροφίμων πλούσιων σε ασβέστιο. Τόσο τα ιόντα φωσφόρου όσο και τα ιόντα

ασβεστίου είναι απαραίτητα σε αναλογία 1:1, ώστε να επιτυγχάνεται η βέλτιστη μετάλλωση των οστών. Η μεγαλύτερη πρόσληψη φωσφόρου σε σύγκριση με την προσλαμβανόμενη ποσότητα ασβεστίου, μπορεί να προκαλέσει μείωση των επιπέδων ιόντων ασβεστίου στον ορό, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της PTH. Η χρόνια διαταραχή της αναλογίας φωσφόρου/ασβεστίου μπορεί να επιφέρει σταδιακή απώλεια του οστού. Σε μια μεγάλη επιδημιολογική μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Βραζιλία σε άτομα άνω των 40 ετών, παρατηρήθηκε ότι η για κάθε 100mg προσλαμβανόμενου φωσφόρου υπήρχε μία αύξηση στον καταγματικό κίνδυνο κατά 9%. Τέλος, σύμφωνα με τη μελέτη NHANES, η υψηλή πρόσληψη φωσφόρου συνδυαστικά με τη επαρκή πρόσληψη ασβεστίου συσχετίζεται με βελτιωμένη οστική υγεία (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018, L. Kathleen Mahan, 2014).

2.4.6. Ιχνοστοιχεία (Μαγνήσιο-ψευδάργυρος-Χαλκός)

Περισσότερο από το 50% του μαγνησίου στο σώμα βρίσκεται στον οστίτη ιστό με το μεγαλύτερο ποσοστό να βρίσκεται στα οστικά κύτταρα, λειτουργώντας και ως συνένζυμα, ενώ μικρότερη ποσότητα βρίσκεται συνδεδεμένη με οστικούς κρυστάλλους. Από μελέτη έχει βρεθεί ότι η πρόσληψη μαγνησίου έχει μία οριακά σημαντική θετική συσχέτιση με την οστική πυκνότητα στο ισχίο, αλλά όχι στην σπονδυλική στήλη ή τον κίνδυνο κατάγματος. Ακόμα, σε άλλες μελέτες όπου έχει χορηγηθεί μαγνήσιο, μέσω συμπληρωμάτων, σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, δεν έχει συσχετιστεί με την μείωση του καταγματικού κινδύνου (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018, L. Kathleen Mahan, 2014).

Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητο ιχνοστοιχείο για μια πληθώρα ενζύμων, σημαντικών για τους οστεοβλάστες, όπως είναι η αλκαλική φωσφατάση η οποία δρα παρουσία ψευδαργύρου. Επίσης ο ψευδάργυρος βοηθά στη σύνθεση κολλαγόνου και άλλων προϊόντων. Ωστόσο, από μελέτες, έχει βρεθεί μη σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στην πρόσληψη του συγκεκριμένου ιχνοστοιχείου με τον κίνδυνο κατάγματος στους άνδρες καθώς επίσης, η συμπληρωματική χορήγηση ψευδαργύρου στις γυναίκες δεν έχει σημαντική επίδραση στην οστική πυκνότητα (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018, L. Kathleen Mahan, 2014).

Ο χαλκός είναι ένα ιχνοστοιχείο απαραίτητο για τη διασύνδεση μορίων κολλαγόνου και ελαστίνης. Ωστόσο, η αύξηση της διαιτητική πρόσληψης χαλκού σε άνδρες και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, δεν επιδρά σημαντικά στον καταγματικό κίνδυνο ισχίου (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018, L. Kathleen Mahan, 2014).

2.4.7. Νάτριο

Η υψηλή πρόσληψη νατρίου, σε συνδυασμό με τη χαμηλή πρόσληψη ασβεστίου μπορεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη οστεοπόρωσης, καθώς προκαλεί την απέκκριση ασβεστίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι κάθε 2300mg νατρίου που αποβάλλονται από τον οργανισμό, συμπαρασύρουν περίπου 40mg ασβεστίου (L. Kathleen Mahan, 2014).

Από έρευνες, που έχουν πραγματοποιηθεί σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες έχει βρεθεί ότι η υψηλή πρόσληψη νατρίου, της τάξης των 5000-7000mg, συσχετίζεται αρνητικά με την οστική πυκνότητα και κάποιους δείκτες οστικής απορρόφησης. Αντίθετα, σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ή άνδρες κάτι αντίστοιχο δεν έχει βρεθεί (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018, L. Kathleen Mahan, 2014).

2.4.8. Καφεΐνη και Ανθρακούχα ροφήματα

Μελέτες έχουν συσχετίσει την πρόσληψη καφεΐνης με την αυξημένη απέκκριση ασβεστίου στα ούρα και τα κόπρανα. Επίσης η αυξημένη κατανάλωση αναψυκτικών τύπου cola, αλλά όχι άλλων ανθρακούχων ροφημάτων, έχει συσχετιστεί με χαμηλή οστική πυκνότητα.

Από μετα-ανάλυση προοπτικών μελετών και μελετών ασθενών-μαρτύρων έχει συσχετιστεί δοσοεξαρτώμενα, η κατανάλωση καφέ με τον κίνδυνο κατάγματος στις γυναίκες. Για παράδειγμα, γυναίκες που καταναλώνουν 2 φλιτζάνια καφέ την ημέρα έχουν 2% υψηλότερο καταγματικό κίνδυνο, ενώ γυναίκες που καταναλώνουν μέχρι και 8 φλιτζάνια ημερησίως έχουν 54% υψηλότερο κίνδυνο, σε σύγκριση με αυτές που δεν καταναλώνουν καθόλου καφέ. Παράλληλα, εάν η πρόσληψη του ασβεστίου είναι χαμηλή τότε αυτή η επιβαρυντική επίδραση της καφεΐνης στην σκελετική υγεία, αυξάνεται (Ιωάννης Διονυσιώτης, 2018, L. Kathleen Mahan, 2014).

3. Εντερικός μικροβιόκοσμος και οστεοπόρωση

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα κατάγματα που προκαλούνται από την οστεοπόρωση αποτελούν μεγάλη ανησυχία για την υγεία καθώς και τεράστια οικονομική επιβάρυνση για το σύστημα υγείας. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε διδύμους και οικογένειες, έχουν δείξει ότι το 50-85% της μέγιστης οστικής μάζας είναι γενετικά προσδιορισμένο καθώς και ότι υπάρχει κληρονομική συνιστώσα για την απώλεια των οστών κατά την αύξηση της ηλικίας. Ωστόσο, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες φαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικότερο ρόλο σε αυτή την διαδικασία (Ralston and Uitterlinden, 2010).

3.1. Συσχέτιση του οστικού μεταβολισμού με το ανοσοποιητικό σύστημα

Η σχέση μεταξύ φλεγμονής και απώλειας των οστών είναι καλά εδραιωμένη. Για παράδειγμα, σε αυτοάνοσα νοσήματα όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η απορρόφηση των οστών από τους οστεοκλάστες προκαλείται από φλεγμονώδεις κυτταροκίνες που παράγονται από τα ενεργοποιημένα Τ-κύτταρα (Kong et al., 1999). Επίσης η έλλειψη οιστρογόνων που εμφανίζεται κατά την εμμηνόπαυση οδηγεί σε αυξημένο σχηματισμό και παρατεταμένη επιβίωση των οστεοκλαστών. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, μεταξύ των οποίων είναι η απώλεια της ανοσοκατασταλτικής δράσης των οιστρογόνων, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών που προάγουν τον σχηματισμό των οστεοκλαστών καθώς και η απώλεια της άμεσης επίδρασης των οιστρογόνων στους οστεοκλάστες (Martin-Millan et al., 2010, Nakamura et al., 2007). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι μία μικρή φλεγμονή επηρεάζει την φυσιολογική αλληλουχία αναδιαμόρφωσης των οστών και παίζει ρόλο στην παθολογικές καταστάσεις του σκελετού, όπως είναι η οστεοπόρωση. Μέτρια αυξημένα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης (hsCRP) στον ορό, τα οποία χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση χαμηλής συστηματικής φλεγμονής, έχουν συσχετιστεί με μειωμένη οστική πυκνότητα, αυξημένη οστική απορρόφηση, απώλεια οστικής μάζας και αυξημένο καταγματικό κίνδυνο (Pasco et al., 2006, Ding et al., 2008, Schett et al., 2006, Eriksson et al., 2014). Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, η παρεμπόδιση των φλεγμονωδών κυτταροκινών TNF-a και IL-1 οδηγούν σε μείωση των δεικτών της οστικής επαναρρόφησης σε πρώιμα μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Charatcharoenwitthaya et al., 2007). Επιπροσθέτως, έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί *in vivo* σε ποντίκια, έδειξε ότι η εξάντληση των Τ-κυττάρων μέσω θεραπείας με αντισώματα anti-CD4 και anti-CD8, λειτούργησε προστατευτικά στην απώλεια των οστών που προκλήθηκε από την ωοθηκεκτομή (Li et al., 2011). Ο μηχανισμός περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της παραγωγής των Τ-κυττάρων από τον TNF στον μυελό των οστών των συγκεκριμένων ποντικών, ενισχύοντας τον ρόλο των Τ-κυττάρων και των κυτταροκινών που ενεργοποιούνται από αυτά, στον οστικό μεταβολισμό (Roggia et al., 2001). Συνοψίζοντας, η διαταραχή της ισορροπίας στην οστική αναδιαμόρφωση μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια των οστών και οστεοπόρωση.

3.2. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος ως ρυθμιστής της οστικής μάζας

Μελέτες έχουν δείξει ότι η απουσία εντερικού μικροβιόκοσμου σε αξενικά (germ-free) ποντίκια οδηγεί σε αυξημένη οστική μάζα συγκριτικά με τα ποντίκια που έχουν αναπτυχθεί σε φυσιολογικό περιβάλλον (CONV-R) (Sjogren et al., 2012, Li, 2014). Επίσης, φάνηκε ότι ο ρυθμός σχηματισμού των οστών δεν μεταβλήθηκε σημαντικά στα GF ποντίκια, υποδηλώνοντας ότι η αυξημένη οστική μάζα προκαλείται κυρίως από τη μειωμένη οστική απορρόφηση, ως

αποτέλεσμα της αναστολής της παραγωγής των οστεοκλαστών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεταφορά των GF ποντικών σε φυσιολογικό περιβάλλον, οδήγησε στην εξομάλυνση τόσο του δοκιδωτού και του φλοιώδους οστίτη ιστού, όσο και στη συγκέντρωση των $CD4^+$T κυττάρων και των πρόδρομων οστεοκλαστών, μέσα σε 3 εβδομάδες (Sjogren et al., 2012, Li, 2014).

3.3. Εντερικός μικροβιόκοσμος, ορμόνες φύλου και απώλεια οστικής μάζας

Οι Li και συν., εξέτασαν την επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στην απώλεια της οστικής μάζας η οποία επάγεται από την έλλειψη ορμονών του φύλου. Τα ευρήματα των ερευνητών υποστηρίζουν ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι απαραίτητος για τον σχηματισμό του ανοσοποιητικού συστήματος ώστε να ανταποκριθεί στην έλλειψη των ορμονών του φύλου. Επίσης καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επαγωγή της οστικής απώλειας καθώς και στην αύξηση του ανασχηματισμού των οστών σε ποντίκια με έλλειψη ορμονών του φύλου. Αυτό πραγματοποιείται μέσω παροχής των απαιτούμενων αντιγόνων για την εξάπλωση των Τ-κυττάρων στον μυελό των οστών και της αυξημένης παραγωγής του TNF-α. Επιπλέον προτείνουν ότι η σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση της ποσότητας της οστικής απώλειας, σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Sjogren et al., 2012, Li, 2014). Επομένως, μπορεί κάποιος να υποθέσει ότι η αύξηση μιας φλεγμονώδους κατάστασης που προκαλείται από μια δυσμενή σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου, θα οδηγούσε σε μεγαλύτερη απώλεια οστικής μάζας, όταν οι γυναίκες χάσουν τις ανοσοκατασταλτικές δράσεις των οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση.

3.4. Σύνθεση εντερικού μικροβιόκοσμου και απώλεια οστικής μάζας

Η σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου μπορεί να επηρεαστεί από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως είναι η διατροφή, η θεραπεία με αντιβιοτικά και η λήψη πρε- και προβιοτικών. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι η θεραπεία με αντιβιοτικά έχει την ικανότητα να επηρεάζει τόσο τη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου όσο και την οστική μάζα, υποστηρίζοντας ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι ρυθμιστής της ομοιόστασης των οστών (Ohlsson and Sjogren, 2015).

3.5. Προβιοτικά και πρεβιοτικά

Η επίδραση του πρεβιοτικού γαλακτοολιγοσακχαρίτη (GOS) στη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου και στην οστική μάζα έχει αξιολογηθεί τόσο σε αρουραίους όσο και σε ανθρώπους. Στους αρουραίους, η συμπληρωματική χορήγηση GOS, άλλαξε την σύνθεση του

εντερικού μικροβιόκοσμου, με μία αύξηση των *Bifidobacteria* και της οστικής μάζας (Weaver et al., 2011). Σε άλλη μελέτη, χορηγήθηκε GOS μέσω συμπληρώματος, σε κορίτσια στην εφηβεία, για μια περίοδο 3 εβδομάδων ώστε να εξεταστεί η δοσοεξαρτώμενη δράση του συμπληρώματος στην απορρόφηση ασβεστίου (Whisner et al., 2013). Η χορήγηση του GOS βελτίωσε την απορρόφηση του ασβεστίου και προκάλεσε μια παρόμοια αύξηση των *Bifidobacteria*, συγκριτικά με αυτή των αρουραίων. Επιπλέον οι Abrams και συν., έδειξαν ότι η θεραπεία με πρεβιοτικά, επάγει την εναπόθεση μετάλλων στα οστά κατά την εφηβεία (Abrams et al., 2005). Το πρεβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη ήταν ένα μείγμα από φρουκτάνες (ένα είδος βραχείας και μακράς αλύσου ινουλίνης), το οποίο χορηγούνταν ημερησίως, ως συμπλήρωμα διατροφής για ένα χρόνο. Το αποτέλεσμα ήταν μια αύξηση της οστικής πυκνότητας σε ανόργανα συστατικά της τάξης του 47%, συγκριτικά με την ομάδα έλεγχου. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι αυτό το αποτέλεσμα στην οστική πυκνότητα, οφειλόταν κυρίως στην βελτίωση της απορρόφησης του ασβεστίου, ωστόσο η σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου και η πιθανή διαμεσολάβηση του ανοσοποιητικού συστήματος δεν αξιολογήθηκαν.

Η θεραπεία με προβιοτικά έχει ήδη αποδείξει ότι βελτιώνει την οστική μάζα σε ποντίκια με απώλεια οστών. Ωστόσο χρειάζονται περαιτέρω κλινικές μελέτες για τον προσδιορισμό της πιθανής επίδρασης των προβιοτικών και άλλων θεραπειών που ρυθμίζουν τη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου, και το αποτέλεσμα αυτού στην οστική μάζα και στον καταγματικό κίνδυνο σε ασθενείς με οστεοπόρωση (Ohlsson and Sjogren, 2015).

Κεφάλαιο 3

1. Υλικά & Μέθοδοι

1.1. Σκοπός:

Σκοπός της μελέτης είναι η in vitro ζύμωση υποστρωμάτων πλούσιων σε β-γλυκάνες προερχόμενα από τον μύκητα *Pleurotus ostreatus* από τον εντερικό μικροβιόκοσμο γυναικών με φυσιολογική οστική πυκνότητα και από γυναίκες με οστεοπενία. Επίσης εξετάστηκε η επίδραση της ζύμωσης των υποστρωμάτων στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου.

1.2. Χαρακτηριστικά εθελοντριών

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ηλικίας 55-65 ετών (±3 έτη) με Δείκτη Μάζας Σώματος <30 kg/m^2. Οι γυναίκες αυτές, δεν είχαν λάβει αντιβίωση για τους τελευταίους 2 μήνες πριν την έναρξη της μελέτης και δεν βρίσκονταν σε διαδικασία απώλειας βάρους. Προϋπόθεση για την εισαγωγή των γυναικών στην μελέτη ήταν και η αποχή τους από συμπληρώματα διατροφής τα οποία σχετίζονται με τον μεταβολισμό των οστών, όπως βιταμίνη D και Ca^{2+}, για τουλάχιστον 6 μήνες πριν τη λήψη των δειγμάτων. Επίσης άτομα που έπασχαν από αυτοάνοσα νοσήματα, από Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου, από διάρροια ή δυσκοιλιότητα, από στεφανιαία νόσο, από νεφρική ή ηπατική νόσο, από καρκίνο και από οποιαδήποτε παθοφυσιολογική κατάσταση του θυρεοειδούς, αποκλείστηκαν από τη μελέτη καθώς και γυναίκες με ακραίες διατροφικές συμπεριφορές (π.χ. χορτοφαγία). Τέλος οι εθελόντριες απείχαν από την κατανάλωση εμπλουτισμένων τροφίμων που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο όπως προβιοτικά και πρεβιοτικά.

1.3. Διατροφική αξιολόγηση και Ανθρωπομετρία

Κατά την έναρξη της μελέτης δόθηκαν οδηγίες σε όλες τις εθελόντριες να μην αλλάξουν τις διατροφικές τους συνήθειες μέχρι την ημέρα της δειγματοληψίας και να διατηρήσουν το σωματικό τους βάρος χωρίς να μπουν σε διαδικασία απώλειας. Για τη συλλογή των απαραίτητων δεδομένων πραγματοποιήθηκε μία σύντομη συνέντευξη με κάθε εθελόντρια ώστε να της δοθούν οι απαραίτητες οδηγίες για την καταγραφή ενός 3ήμερου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων (καταγραφή δύο ημέρες καθημερινές και μία του σαββατοκύριακου). Εκτός από την διατροφική αξιολόγηση και τις ανθρωπομετρικές μετρήσεις (ύψος, βάρος, BMI, οστική πυκνότητα μέσω DXA), πραγματοποιήθηκε και αιμοληψία καθώς και αξιολόγηση της φυσικής δραστηριότητας μέσω ερωτηματολογίου (PAQ). Με αυτόν τον τρόπο συλλέχθηκαν τα απαραίτητα δεδομένα για τον διαχωρισμό των εθελοντριών σε γυναίκες με οστεοπενία και με φυσιολογική οστική πυκνότητα.

2. Πρωτόκολλο εκχύλισης β-γλυκανών από το μανιτάρι *P. Ostreatus*

Κατά την έναρξη της μελέτης πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση των β-γλυκανών από το λυοφιλιωμένο μανιτάρι *P. ostreatus,* ώστε να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα από τον εντερικό μικροβιόκοσμο των εθελοντριών. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η λυοφιλίωση των β-γλυκανών και η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν αναλογικά ίδια για 10g λυοφιλιωμένου μανιταριού το οποίο εμβαπτίστηκε σε 400ml H_2O (1:40 g/ml):

- *Pleurotus ostreatus*
    - Θέρμανση: 95^oC για περίπου 50h
    - Φυγοκέντριση: 10000xg για 30min στους 2^oC
    - Συμπύκνωση στο rotary evaporator μέχρι τελικού όγκου 30-40ml
    - Εισαγωγή του συμπυκνωμένου δείγματος στο ψυγείο και συντήρησή του για 24h.
    - Εισαγωγή της αιθανόλης, που απαιτείται για την εκχύλιση, στην κατάψυξη στους -80^oC.
    - Προσθήκη αιθανόλης στο συμπυκνωμένο δείγμα, σε αναλογία 1:1 και ανάδευση για 30min στις 200rpm
    - Φυγοκέντριση: 10000xg για 30min στους 4^oC
    - Αφαίρεση υπερκειμένου και παραλαβή διηθήματος
    - Λυοφυλίωση (Heto LyoLab 3000) 24h

(Junlong Wang Ji Zhang, 2009, Ruthes et al., 2015, Andriy Synytsya and Eliška Kováříková, 2009, Wei Chen, 2012)

3. Δειγματοληψία και επεξεργασία κοπράνων

Κατά τη διάρκεια της συνέντευξης, δόθηκε σε κάθε εθελόντρια ένας προ-ζυγισμένος πλαστικός συλλέκτης, στον οποίο οι εθελόντριες θα φέρουν το δείγμα της κένωσης. Την ημέρα της δειγματοληψίας, η πλήρης κένωση της κάθε εθελόντριας μεταφέρθηκε, εντός 2 ωρών, στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών (Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ.) για την μικροβιολογική ανάλυση.

Στο εργαστήριο, ζυγίστηκε το δείγμα στον εργαστηριακό ζυγό και ομογενοποιήθηκε μηχανικά. Στη συνέχεια το δείγμα μεταφέρθηκε σε δοχείο falcon, εισήχθη σε πάγο και επεξεργάστηκε εντός του αναερόβιου θαλάμου (BACTRON™ 1.5 Anaerobic Environmental Chamber, SHELLAB, Cornelius, Oregon). Η πηγή άνθρακα που χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό των

υποστρωμάτων είναι ινουλίνη (Orafti® GR, BENEO-Orafti, Oreye, Belgium) σε αναλογία 1% και 2%, μανιτάρι *Pleurotus ostreatus*, καθώς και εκχύλισμα αυτού.

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

Μία ημέρα πριν από την παραλαβή της κένωσης από τις εθελόντριες, πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία των υποστρωμάτων. Η διαδικασία περιελάμβανε την αποστείρωση των διαλυμάτων Phosphate-buffered saline και Basal culture medium (το βασικό υλικό της καλλιέργειας στο οποίο διαλυτοποιείται η πηγή άνθρακα και πραγματοποιείται η ζύμωση), δηλαδή του μέσου αραίωσης του εμβολίου των κοπράνων (faecal slurry). Το πειραματικό πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Olano-Martin *et al*. (2000) και Rycroft *et al*. (2001) με μικρές τροποποιήσεις (Olano-Martin et al., 2000, Rycroft et al., 2001). Πιο αναλυτικά:

- Για την προετοιμασία του Phosphate-buffered Saline (PBS)- για την προετοιμασία του faecal slurry, 20% w/v:
    - 8 g/L NaCl
    - 0.2 g/L KCL
    - 1.15 g/L Na_2HPO_4
    - 0.2 g/L KH_2PO_4
    - Ρύθμιση του pH στο 7.3
- Για την προετοιμασία του Basal culture medium (Rycroft et al., 2001):
    - 2 g/L peptone water (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
    - 2 g/L yeast extract (Merck KGaA)
    - 0.1 g/L NaCL
    - 0.04 g/L K_2HPO_4
    - 0.04 g/L KH_2PO_4
    - 0.01 g/L $MgSO_4.7H_2O$
    - 0,01 $CaCl_2.6H_2O$ (ή 0,01 g/L $CaCl_2.2H_2O$)
    - 2 g/L $NaHCO_3$
    - 0.5 g/L cysteine-HCl (Merck KGaA)
    - 0.5 g/L bile salts (Oxgall™, BD and Company, Sparks, MD,USA)
    - 0.005 g/L hemin (διαλυμένη σε λίγες σταγόνες 1.0 M NaOH) (Fluka, Sigma-Aldrich, Netherlands) (Zhang, 2013)
    - 0.2 ml/L Tween® 80 (Pancreac Quimica SA, Barcelona, Spain) (Hamzeloo-Moghadam, 2014)

- 10 μl/L vitamin K1 (10 μg/ml) (Fluka, Sigma-Aldrich,Switzerland)

Ρύθμιση του pH στο 7.0 με 1M HCl (Palframan et al., 2002).

Το διάλυμα Basal culture medium χρειάστηκε να τροποποιηθεί στην πορεία, διότι από τις πρώτες δοκιμές που έγιναν της συν-επώασης των οστεοβλαστών με το υπερκείμενο της ζύμωσης, εμφανίστηκε αυξημένη κυτταροτοξικότητα. Πιο αναλυτικά, μειώθηκε η συγκέντρωση των διαλλειμάτων αμίνης και Tween® 80, καθώς και αποφεύχθηκε η προσθήκη ρεζαζουρίνης (Hamzeloo-Moghadam, 2014, Zhang, 2013). Το Basal culture medium μοιράστηκε ανά 45ml σε δοχεία Durham και τα διαλύματα αποστειρώθηκαν στους 121^{o}C για 15min. Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, το βασικό μέσο καλλιέργειας μεταφέρθηκε εντός του αναερόβιου θαλάμου (BACTRON™ 1.5 Anaerobic Environmental Chamber, SHELLAB, Cornelius, Oregon), προκειμένου να προ-αναχθεί για 12h περίπου, πριν την παραλαβή του δείγματος.

Την ημέρα του *in vitro* πειράματος, η πλήρης κένωση της εθελόντριας ζυγίζεται στον εργαστηριακό ζυγό με ακρίβεια 0.1g, διαλυτοποιείται σε διάλυμα PBS, pH 7.3 (20% w/v) (faecal slurry) και ομογενοποιείται μηχανικά σε κατάλληλο όργανο (Stomacher, Seward, USA), μέχρι να καταστεί ομοιογενές το εμβόλιο (για 10-15sec). Την ίδια μέρα ζυγίζεται σε αποστειρωμένο αλουμινόχαρτο και το μανιτάρι (0.9g), το εκχύλισμά του (0.45g) και η ινουλίνη (1% w/v, 0.45g και 2% w/v, 0.9g).

Τα ζυγισμένα υποστρώματα μεταφέρονται υπό αναερόβιες συνθήκες στα δοχεία Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας εντός του αναερόβιου θαλάμου. Επιπλέον, σε δύο δοχεία Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας προστέθηκε η ινουλίνη, ενώ στο πείραμα συμπεριλαμβάνεται και ένα δοχείο Durham με το βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς πηγή άνθρακα (αρνητικός μάρτυρας, NC).

Όλα τα δοχεία εμβολιάζονται ασηπτικά με 10% (v/v) από το εμβόλιο κοπράνων (5ml faecal slurry σε 45ml basal medium) και οι στατικές καλλιέργειες (50ml) επωάζονται υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37^{o}C για 24h.

Στους χρόνους 0h, 8h και 24h απομακρύνονται από τον αναερόβιο θάλαμο τα αντίστοιχα δείγματα (φυλάσσονται στον πάγο μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας), προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι βιοχημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις (υπερκείμενα για κυτταροκαλλιέργειες, 1 ml για τον ποσοτικό προσδιορισμό μικροοργανισμών και 1 ml για τον προσδιορισμό λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου). Η φύλαξη των παραπάνω δειγμάτων γίνεται σε 1.5ml-eppendorfs (αποστειρωμένα, DNA-ase, RNA-ase free), τα οποία βρίσκονται

σε πάγο μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας εντός του αναερόβιου θαλάμου και αποθηκεύονται στους -80^{o}C.

Στον χρόνο 0h ελήφθησαν δείγματα όγκου 2x2ml σε αποστειρωμένα Eppendorf® των 2 ml, τα οποία φυλάσσονται σε πάγο μέχρι την ολοκλήρωση της διαδικασίας εντός του αναερόβιου θαλάμου. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση στα 20.000 x g για 15min στους 4^{o}C και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε εντός του θαλάμου νηματικής ροής (αποθήκευση στους -80^{o}C).

Στο χρόνο 24h λαμβάνουμε το υπόλοιπο της ζύμωσης σε σωλήνες falcon των 50ml και πραγματοποιείται φυγοκέντριση στα 3200xg για 40 min στους 4^{o}C. Στη συνέχεια τοποθετούμε τους σωλήνες σε στατώ και τους μεταφέρουμε στον θάλαμο νηματικής ροής, όπου συλλέχθηκε το υπερκείμενο με αναρρόφηση. Τέλος, διηθείται το κάθε δείγμα με μικροβιολογικό ηθμό (διαμέτρου 0.2μm) και φυλάσσεται στην κατάψυξη (-80^{o}C).

Τα υποστρώματα που εμβολιάστηκαν ήταν τα εξής:

- Καρποφορία *Pleurotus ostreatus* IK 1123 σε κλασσικό υπόστρωμα
    - σε αναλογία 2% (w/v) (0.9g), κωδικός POWS
- Εκχύλισμα καρποφορίας *Pleurotus ostreatus* IK 1123 σε κλασσικό υπόστρωμα
    - σε αναλογία 1% (w/v) (0.45g), κωδικός POWSE
- Ινουλίνη
    - θετικός μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση (Orafti® GR, BENEO- Orafti, Oreye, Belgium) σε αναλογία 1% (w/v) (0.45g), κωδικός INU1
- Ινουλίνη
    - θετικός μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση (Orafti® GR, BENEO-Orafti, Oreye, Belgium) σε αναλογία 2% (w/v) (0.9g), κωδικός INU2
- Αρνητικός μάρτυρας (Negative Control)
    - βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς προσθήκη πηγής άνθρακα, κωδικός NC

5. Πρωτόκολλο για την απομόνωση του DNA, με τη μέθοδο RBB+C (Repeated Bead Beating Plus Column).

5.1. Όργανα και αντιδραστήρια

- Θάλαμος νηματικής ροής
- Φυγόκεντρος
- Mini-Beadbeater™ (BioSpec Products, USA)
- 2 θερμόμετρα και 2 ποτήρια ζέσεως των 1000ml
- Πιπέτες (2x 1000μl, 200 μl, 20 μl, 10 μl)
- Eppendorf® των 2ml, 1.5ml και 1.7ml
- Screw cup tubes των 2ml με σφαιρίδια από ζιργκόνιο, προ-ζυγισμένα
- QIAamp- στήλες (QIAmp DNA stool mini kit, Qiagen, Hilden, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο IMPLEN P330

5.2. Πειραματική διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε βάσει του πρωτοκόλλου των Yu & Morisson, 2004, με τις απαραίτητες αλλαγές ώστε να εφαρμοστεί κατάλληλα στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο (Salonen et al., 2010). Η τελική συγκέντρωση και η καθαρότητα του μικροβιακού DNA ελέγχονται με φασματοφωτόμετρο με τη χρήση προγράμματος dsDNA (double-stranded DNA).

- Προετοιμασία διαλύματος Lysis Buffer:
    - Ανάμειξη 500 mM NaCl, 50mM Tris-HCl με pH 8.0, 50mM EDTA και 4% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) σε ποτήρι ζέσεως.
    - Μεταφορά και φύλαξη του διαλύματος σε δοχείο falcon, σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προετοιμασία διαλύματος TE (tris-EDTA) buffer:
    - Για τελικό όγκο δ/τος $V_{τελ.}$=10ml, αναμειγνύονται:
        - V_{H2O}= 9.88ml
        - $V_{tris\text{-}HCL\ 1M}$= 100μl
        - $V_{EDTA\ 0.5M}$= 20μl
- Προετοιμασία δειγμάτων:
    - Αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα πραγματοποιείται φυγοκέντριση στα 20000xg, στους 4^{o}C για 5 min, δύο φορές. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν τα δείγματα στον

θάλαμο νηματικής ροής και απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Έπειτα πραγματοποιήθηκε αναδιάλυση του ιζήματος με 1000 μl Lysis Buffer και μεταφέρθηκε σε screw cup tube των 2ml με προ-ζυγισμένα 0.4g σφαιριδίων από ζιρκόνιο (0.3 g των 0.1 mm και 0.1g των 0.5mm).

- Ομογενοποίηση με 4800 δονήσεις/min για 3min (180sec), στο Mini-Beadbeater™ (BioSpec Products, USA) ώστε να πραγματοποιηθεί η λύση των κυττάρων.
- Επώαση δειγμάτων σε υδατόλουτρο για 15min στους 95^{o} C και ήπια ανάδευση ανά 5min.
- Φυγοκέντριση στα 20000xg στους 4^{o} C για 5 min, δύο φορές και μεταφορά του υπερκειμένου σε αντίστοιχο Eppendorf® των 2ml.
- Επανάληψη των βημάτων (ii-iv) με 300ml Lysis Buffer, συλλογή του υπερκειμένου και ανάμειξή του στο αντίστοιχο Eppendorf®.

- Καταβύθιση DNA:
  - Σε κάθε Eppendorf® προσθέτουμε 260μl Νιτρικό Αμμώνιο 10M, πραγματοποιείται καλή ανάδευση και επώαση των δειγμάτων σε πάγο για 5min.
  - Φυγοκέντριση στα 16000xg στους 4^{o} C για 10 min.
  - Πραγματοποιείται λήψη του υπερκείμενου από τα Eppendorf® και το ισομοιράζονται σε 2 Eppendorf® των 1.5ml
  - Προσθήκη 650μl ισο-προπανόλης σε κάθε Eppendorf® (1:1 ποσότητα με το υπερκείμενο), καλή ανάμειξη και επώαση για 30min σε πάγο.
  - Φυγοκέντριση στα 16000xg στους 4^{o} C για 15 min και απόρριψη του υπερκειμένου. Προσθήκη 1000μl 70% αιθανόλης ώστε να ξεπλυθεί το ίζημα, φυγοκέντριση στα 12000xg στους 4^{o} C για 2 min, απόρριψη του υπερκειμένου και στέγνωμα για 30min.
  - Αναδιάλυση του ιζήματος με προσθήκη 100μl από TE (tris-EDTA) buffer σε κάθε Eppendorf® και ανάμειξη των δύο aliquots
- Απομάκρυνση RNA, πρωτεϊνών και καθαρισμός:
  - Προσθήκη 2μl RNAse A, ήπια ανάδευση και μεταφορά των δειγμάτων σε επωαστικό θάλαμο για 15min στους 37^{o}C.
  - Προσθήκη από το DNA kit, 15μl Πρωτεϊνάση Κ σε κάθε Eppendorf® μαζί με 200μl buffer AL. Πραγματοποιείται καλή ανάδευση και στη συνέχεια επωάζονται τα δείγματα για 10min στο υδατόλουτρο των 70^{o}C.
  - Προσθήκη 200μl απόλυτης αιθανόλης σε κάθε Eppendorf®, μεταφορά στις στήλες (QIAamp- στήλη) και πραγματοποιείται φυγοκέντριση στα 20800xg για 1min σε θερμοκρασία δωματίου

- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής (collection tube), προσθέτουμε 500μl AW1 buffer και πραγματοποιείται φυγοκέντριση στα 20800xg για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μεταφορά της στήλης σε νέο σωλήνα συλλογής (collection tube), προσθέτουμε 500μl AW2 buffer και πραγματοποιείται φυγοκέντριση στα 20800xg για 1min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντριση στα 20800xg για 1min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να στεγνώσει η στήλη, προσθέτουμε 200μl από το AE buffer και αναμονή για 5min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντριση στα 20800xg για 1min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να περάσει το δ/μα του DNA στο σωλήνα συλλογής.
- Πραγματοποιείται φωτομέτρηση με χρήση τυφλού δ/τος AE buffer 3μl, με σκοπό τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του DNA, σε κάθε δείγμα.
- Αποθήκευση δ/των DNA σε κατάψυξη -20^{o}C.

(Yu and Morrison, 2004).

6. Πρωτόκολλο Real Time-PCR

6.1. Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί εναλλακτική μεθοδολογία της κλωνοποίησης για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας μιας επιθυμητής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η αντίδραση αυτή βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA-στόχου, το οποίο βρίσκεται ανάμεσα σε δύο ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (primers). Οι εκκινητές αυτοί είναι σχεδιασμένοι κατά τέτοιο τρόπο, ώστε ο ένας να είναι συμπληρωματικός με τη μία άκρη της αλληλουχίας-στόχου στη μία αλυσίδα του DNA και ο άλλος με την άλλη άκρη της αλληλουχίας στόχου στη συμπληρωματική αλυσίδα του DNA. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται η πολυμεράση του DNA, η οποία συνθέτει δύο νέες αλυσίδες DNA έχοντας ως εκμαγείο την αλληλουχία μεταξύ των δύο εκκινητών. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες είναι μεταξύ τους συμπληρωματικές και μπορούν να σχηματίσουν ένα δεύτερο αντίγραφο της αρχικής αλληλουχίας στόχου. Η επανάληψη των κύκλων θερμικής αποδιάταξης, υβριδοποίησης των εκκινητών και της ενζυμικής σύνθεσης του DNA έχει ως αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση της αρχικής αλληλουχίας στόχου του DNA.

Η real-time PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση μικρών ποσοτήτων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA ή RNA σε ένα δείγμα συγκριτικά με ένα πρότυπο δ/μα. Στηρίζεται στην ίδια αρχή με αυτή της κλασικής PCR και υπάρχει δυνατότητα, το διπλασιασμένο τμήμα DNA να απεικονιστεί σε μια ημιλογαριθμική γραφική παράσταση και να σχηματιστεί μια ευθεία γραμμή. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται μέχρι το προϊόν να φτάσει μια ουδό (που καθορίζεται αυθαίρετα) αποτελεί μέτρο της ποσότητας της αλληλουχίας-εκμαγείου που υπήρχε στο αρχικό δείγμα- όσο λιγότεροι οι κύκλοι για να φτάσει στην ουδό, τόσο μεγαλύτερη η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας-εκμαγείου (Robert L. Nussbaum, 2011).

6.2. Όργανα και αντιδραστήρια

- PCR (LightCycler®2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Germany)
- Γυάλινα τριχοειδή (capillaries)
- Eppendorf®
- Πιπέτες 100 μl, 10 μl
- Μίγμα αντιδράσεων KAPA SYBR Fast Master Mix (2x) Universal Kit (Kapa Biosystems)
- Κατάλληλοι εκκινητές (primers), για κάθε κατηγορία μικροοργανισμών:
    - *Bifidobacterium* spp.
    - *Lactobacillus group*, συμπεριλαμβανομένων των γενών *Lactobacillus, Pediococcus, Weissella, Leuconostoc*
    - *Clostridium perfringens* group (θειοαναγωγικών κλοστριδίων)
    - *Bacteroides* spp.
    - *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* group,
    - *Clostridial* cluster IV (*Clostridium leptum* group) και
    - *Faecalibacterium prausnitzii*,
- BSA (bovine serum albumin) για την αποφυγή προσκόλλησης του DNA στα τριχοειδή
- Πρότυπα διαλύματα για κάθε μικροοργανισμό

6.3. Πειραματική διαδικασία

Κατά την πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου με τη μέθοδο ποσοτικής PCR (quantitative PCR), στα δείγματα από τις στατικές καλλιέργειες (1ml). Αυτό έγινε με σκοπό να διερευνηθούν πιθανές διαφοροποιήσεις των δειγμάτων, αναλόγως με το υπόστρωμα και την κατάσταση της οστικής υγείας της κάθε εθελόντριας. Οι μικροοργανισμοί προσδιορίστηκαν ποσοτικά (log_{10}

copies/ml) με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (Πίνακας 3) που στοχεύουν σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου 16S rRNA, μέσω ιχνηθέτησης των προϊόντων PCR με φθορίζοντα μόρια και την μέτρηση της έντασης φθορισμού κατά την διάρκεια της αντίδρασης. Πιο αναλυτικά:

- Αραιώνουμε το κάθε δείγμα έτσι ώστε να λαμβάνουμε 10μl DNA ανά αντίδραση PCR, με τη χρήση Ultra pure water ειδικό για την αντίδραση PCR.
- Για κάθε αντίδραση PCR (20μl) χρησιμοποιούνται:
    - 10 μl του Universal Kit, το οποίο στηρίζεται στην τεχνολογία φθορισμού της χρωστικής SYBR Green.
    - 0,4 ή 0,6 μl από κάθε εκκινητή
    - 0,25μl BSA
    - 5μl από το δείγμα DNA (DNA-στόχος)
    - Ανάλογη ποσότητα PCR-grade water
- Στη συνέχεια φορτώνουμε τα δείγματα όπως και το αρνητικό control (NC, περιέχει ότι και τα υπόλοιπα τριχοειδή, εκτός από DNA) στις ειδικές θήκες του μηχανήματος για την πραγματοποίηση της αντίδρασης και φτιάχνουμε το πρόγραμμα της αντίδρασης, το οποίο περιλαμβάνει τα εξής:
    - 3 min στους 95^{o} C για την ενεργοποίηση του ενζύμου (πολυμεράση)
    - 45 κύκλους (αποδιάταξη DNA: 95^{o} C για 3sec – υβριδισμός των εκκινητών στη βέλτιστη θερμοκρασία 20 sec – επιμήκυνση στους 72^{o} C για το ελάχιστο δυνατό διάστημα, ανάλογα με το αναμενόμενο προϊόν)
    - Ανάλυση melting curves για την επιβεβαίωση της ειδικότητας των προϊόντων ενίσχυσης
    - Ψύξη του οργάνου

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μικροοργανισμών υπολογίζεται βάσει του αριθμού των κύκλων της qPCR, στον οποίο ο φθορισμός του προϊόντος της PCR φτάνει στο κατώφλι ανίχνευσης (τιμή Ct, threshold circle). Σε αυτή τη φάση (log-linear phase), η απόδοση της αντίδρασης PCR είναι σταθερή. Επομένως, όσο μικρότερη η τιμή Ct, τόσο μεγαλύτερη η ποσότητα του DNA-στόχου στο δείγμα.

Σε κάθε δείγμα κοπράνων, η ποσοτικοποίηση των βακτηρίων πραγματοποιείται μέσω πρότυπων καμπύλων αναφοράς. Σε αυτές, δίνεται η γραμμική συσχέτιση του δεκαδικού λογάριθμου των αντιγράφων (copies) του γονιδίου του 16S rRNA στον πρότυπο μικροοργανισμό, με τις αντίστοιχες τιμές Ct. Επομένως, ανά περίπτωση, πραγματοποιούνται διαδοχικές δεκαδικές

αραιώσεις (10^1-10^7 αντιγράφων) των βακτηρίων αναφοράς. Αντίστοιχα, και στο ολικό DNA κοπράνων, παράγονται καμπύλες αναφοράς υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες.

Η χρήση του λογισμικού LCS4 4.1.1.2 (Roche Diagnostics GmbH), επιτρέπει την συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων για την παραγωγή καμπύλων αναφοράς, με αποδεκτό εύρος απόδοσης 1.8 με 2.0. Τα τελικά αποτελέσματα εκφράζονται ως $\log_{10}$ copies/ml δείγματος.

Πίνακας 3:Πληροφορίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην μέθοδο real-time PCR

Στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5΄-3΄)	Θερμοκρασία υβριδισμού	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πρότυπο στέλεχος	Παραπομπή
Total Bacteria	Forward Reverse	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	60^{o}C	466	*Bacteroides fragilis* MM44 (ATCC 25285)	(Nadkarni et al., 2002)
***Bacteroides* spp.**	Bac303F Bfr-Fmrev	GAAGGTCCCCCACATTG CGCKACTTGGCTGGTTCAG	60^{o}C	103	*Bacteroides fragilis* MM44 (ATCC 25285)	(Ramirez-Farias et al., 2009)
***Clostridium perfringens* group**	CPF CPR	ATGCAAGTCGAGCGATG TATGCGGTATTAATCTCCCTTT	55^{o}C	120	*Clostridium perfringens* ATCC 13124	(Phong, 2010)
***Bifidobacterium* spp.**	Forward Reverse	TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG CCACATCCAGC(A/G)TCCAC	58^{o}C	243	*Bifidobacterium bifidum* DSM 20456	(Rinttila et al., 2004)
***Lactobacillus* group**	Forward Reverse	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	58^{o}C	341	*Lactobacillus gasseri* DSM 20243	(Rinttila et al., 2004)
***Clostridial cluster IV (Clostridium leptum* group)**	Clep866mF Clept1240mR	TTAACACAATAAGTWATCCACCTGG ACCTTCCTCCGTTTTGTCAAC	55^{o}C	314	*Faecalibacterium prausnitzii* DSM 17677	(Ramirez-Farias et al., 2009)
Faecalibacterium prausnitzii	FPR-2F Fprau645R	GGAGGAAGAAGGTCTTCGG AATTCCGCCTACCTCTGCACT	60^{o}C	248	*Faecalibacterium prausnitzii* DSM 17677	(Feng et al., 2014, Suau et al., 2001, Wang et al., 1996)
Roseburia spp.-Eubacterium rectale	RrecF Rrec630mR	GCGGTRCGGCAAGTCTGA CCTCCGACACTCTAGTMCGAC	60^{o}C	81	*Roseburia intestinalis* DSM 14610	(Walker et al., 2011)

6.4. Προσδιορισμός πρεβιοτικού δείκτη

Μετά την ολοκλήρωση της ζύμωσης στις 24h, αξιολογείται ποιοτικά, η πιθανή πρεβιοτική δράση των υποστρωμάτων, μέσω του πρεβιοτικού δείκτη (Prebiotic Index, PI). Ο PI χρησιμοποιείται για την σύγκριση της πρεβιοτικής δράσης (Olano-Martin et al., 2002) και μπορεί να υπολογιστεί μέσω της παρακάτω εξίσωσης (Palframan et al., 2003):

$$PI = \left(\frac{Bif}{Total}\right) - \left(\frac{Bac}{Total}\right) + \left(\frac{Lac}{Total}\right) - \left(\frac{Clos}{Total}\right)$$

Όπου:

- Bif: $\frac{\text{καταμέτρηση } \textit{του Bifidobacterium spp.} \text{στον χρόνο δειγματοληψίας (24h)}}{\text{καταμέτρηση του } \textit{Bifidobacterium spp.} \text{στο αρχικό εμβόλιο (0h)}}$
- Bac: $\frac{\text{καταμέτρηση σε copies/ml του } \textit{Bacteroides} \text{ spp.στον χρόνο δειγματοληψίας (24h)}}{\text{καταμέτρηση } \textit{του Bacteroides} \text{ spp.στο αρχικό εμβόλιο (0h)}}$
- Lac: $\frac{\text{καταμέτρηση του } \textit{Lactobacillus group} \text{ στον χρόνο δειγματοληψίας (24h)}}{\text{καταμέτρηση του } \textit{Lactobacillus group} \text{ στο αρχικό εμβόλιο (0h)}}$
- Clos: $\frac{\text{καταμέτρηση του } \textit{Clostridium perfringens group} \text{ στον χρόνο δειγματοληψίας (24h)}}{\text{καταμέτρηση του } \textit{Clostridium perfringens group} \text{ στο αρχικό εμβόλιο (0h)}}$
- $Total$: $\frac{\text{καταμέτρηση } \textit{των} \text{ ολικών βακτηρίων στον χρόνο δειγματοληψίας (24h)}}{\text{καταμέτρηση των ολικών βακτηρίων στο αρχικό εμβόλιο (0h)}}$

Μέσω της εξίσωσης αυτής, αξιολογείται ως θετική επίδραση η αύξηση των *Bifidobacterium spp.* και/ή του *Lactobacillus group* και ως αρνητική επίδραση η αύξηση των *Bacteroides* και *Clostridium*. Επίσης, η έκφραση αυτή της εξίσωσης επιτρέπει να κανονικοποιηθούν οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών συγκριτικά με τις αρχικές τιμές, αμβλύνοντας την μεταβλητότητα που έχει δημιουργηθεί, φυσιολογικά, κατά τη διάρκεια της *in vitro* ζύμωσης (Palframan et al., 2003).

7. Στατιστική επεξεργασία

Στα δείγματα (μάρτυρες, μανιτάρια, εκχυλίσματα μανιταριών), ο υπολογισμός του πρεβιοτικού δείκτη βασίζεται στον αριθμό των αντιγράφων του 16S γονιδίου ανά ml δείγματος (copies/ ml δείγματος) ενώ η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών βασίστηκε στη μέση τιμή των $\log_{10}$ των αντιγράφων του 16S γονιδίου ανά ml δείγματος ($\log_{10}$ copies/ ml δείγματος). Οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν τόσο για το σύνολο των εθελοντριών (n=6), όσο και ανά ομάδες ανάλογα με την οστική υγεία (n=3, φυσιολογικές και n=3, οστεοπενικές). Ο έλεγχος κανονικότητας πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο Kolmogorov-Smirnov. Μεταξύ των δειγμάτων για τις χρονικές στιγμές 0h και 24h, η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών και των SCFAs, πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο one way ANOVA και τον έλεγχο ANOVA για

επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (Repeated-Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity). Για κάθε δείγμα, η σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών και των SCFAs, πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο t για εξαρτημένα δείγματα (paired-samples t-test). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% ($p<0.05$) και η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα IBM® SPSS® Statistics version 21. Όσον αφορά τον πρεβιοτικό δείκτη δεν πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση.

Κεφάλαιο 4

1 Αποτελέσματα

1.1.Χαρακτηριστικά εθελοντριών

Στην παρούσα μελέτη έλαβαν μέρος 6 μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Οι 3 από αυτές είχαν παθολογική οστική μάζα, ενώ οι άλλες 3 είχαν φυσιολογική όπως προέκυψε μετά την εξέταση της οστικής πυκνότητας μέσω DXA. Επομένως οι εθελόντριες χωρίστηκαν σε 2 ομάδες ανάλογα με την οστική τους υγεία. Προϋπόθεση για την συμμετοχή των εθελοντριών στη μελέτη ήταν η αποχή τους από την κατανάλωση εμπλουτισμένων τροφίμων που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο, από συμπληρώματα διατροφής τα οποία σχετίζονται με τον μεταβολισμό των οστών, για τουλάχιστον 6 μήνες πριν τη δειγματοληψία καθώς και να μην έχουν λάβει αντιβίωση για τους τελευταίους 2 μήνες. Επίσης άτομα που έπασχαν από αυτοάνοσα νοσήματα, από Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου, από διάρροια ή δυσκοιλιότητα, από στεφανιαία νόσο, από νεφρική ή ηπατική νόσο, από καρκίνο και από οποιαδήποτε παθοφυσιολογική κατάσταση του θυρεοειδούς, αποκλείστηκαν από τη μελέτη καθώς και γυναίκες με ακραίες διατροφικές συμπεριφορές. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται αναλυτικά τα ανθρωπομετρικά τους χαρακτηριστικά σε κάθε ομάδα ξεχωριστά.

Πίνακας 4: Ανθρωπομετρικά στοιχεία των εθελοντριών της μελέτης.

Στοιχεία εθελοντριών	Υγιής οστική μάζα (N=3)	Παθολογική οστική μάζα (N=3)	p-value
Ηλικία (έτη)	58,33 ± 3,51	54 ± 2,65	0,163
Σωματικό Βάρος (Kg)	65±10,82	61,33 ± 3,06	0,602
Ύψος (m)	1,62 ± 0,02	1,65 ± 0,07	0,432
Δείκτης Μάζας Σώματος (Kg/m^2)	24,8 ± 3,4	22,52 ± 2,22	0,384

Τα αποτελέσματα ακολουθούν την κανονική κατανομή και εκφράζονται ως μ.ο. ± τ.α. – Independent Samples t- Test.

Από τον πίνακα 4 δεν παρατηρείται κάποια σημαντική διαφορά ως προς τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των εθελοντριών.

1.2.*In vitro* ζύμωση πιθανών πρεβιοτικών υποστρωμάτων από τον εντερικό μικροβιόκοσμο μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών.

Για την πραγματοποίηση της μελέτης, χρειάστηκε η συλλογή της πλήρους κένωσης της κάθε εθελόντριας. Το δείγμα μεταφέρθηκε στο εργαστήριο εντός 2 ωρών από την κένωση και ομογενοποιήθηκε μηχανικά. Στη συνέχεια, εμβολιάστηκαν με το δείγμα τα υποστρώματα της ινουλίνης 1% (INU1) και 2% (INU2), του μανιταριού (POWS) καθώς και του εκχυλίσματος

αυτού (POWSE) και επωάστηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37^{o}C για 24h. Στα παρακάτω υποκεφάλαια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων του εντερικού μικροβιόκοσμου, κατά την έναρξη (t=0h) και κατά τη λήξη (t=24h) της ζύμωσης.

1.3. Αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου με τη μέθοδο ποσοτικής PCR (quantitative PCR)

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της ποσοτικής PCR, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (One-Way ANOVA) σε όλες τις χρονικές στιγμές (t=0h και t=24h), για το σύνολο των εθελοντριών αλλά και ξεχωριστά για κάθε ομάδα, ανάλογα με την οστική υγεία.

Πίνακας 5: One-Way ANOVA για τους μικροβιακούς πληθυσμούς στο σύνολο των εθελοντριών, στον t=0h, N=6

	NC	INU1	INU2	POWS	POWSE	p
Total Bacteria	10,10 ±0,23	10,12±0,22	10,10± 0,22	10,04 ±0,22	10,16 ±0,23	0,923
Bifidobacteria	8,36 ±0,94	8,38 ±0,96	8,31 ±0,92	8,30 ±0,95	8,39 ±0,92	1,000
Lactobacillus	6,28 ±0,97	6,27 ±0,88	6,23 ±0,96	6,20 ±0,91	6,36 ±0,90	0,999
C. perfrigens	6,23± 0,68	6,30± 0,62	6,28 ±0,66	6,44 ±0,48	6,34 ±0,62	0,981
Bacteroides	9,43±0,23	9,43±0,16	9,43± 0,25	9,45 ±0,23	9,49± 0,20	0,984
C. leptum	9,20±0,43	9,22±0,38	9,20±0,44	9,18±0,39	9,31±0,40	0,981
F. prausnitzii	8,30±0,93	8,33±0,83	8,34±0,83	8,35±0,90	8,37±0,86	1,000
Roseburia	8,39±0,58	8,35±0,58	8,39±0,60	8,35±0,51	8,44±0,54	0,998

NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v), POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123, POWSE: Εκχύλισμα μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123. Τα αποτελέσματα ακολουθούν την κανονική κατανομή και εκφράζονται ως μ.ο. ± τ.α.

Πίνακας 6: One-Way ANOVA για τους μικροβιακούς πληθυσμούς στο σύνολο των εθελοντριών, στον t=24h, N=6

	NC	INU1	INU2	POWS	POWSE	p
Total Bacteria	10,00±0,15	10,29±0,28	10,29±0,27	10,38±0,16$^{\alpha}$	10,20±0,18	**0,051**
Bifidobacteria	8,48±0,93	9,29±1,33	9,47±1,39	9,15±1,25	8,69±1,10	0,590
Lactobacillus	6,34±0,93	7,35±0,83	7,60±1,04	6,90±1,19	6,64±1,00	0,218
C. perfrigens	6,27±0,61	6,21±0,88	6,34±0,99	6,57±0,72	6,50±0,76	0,924
Bacteroides	9,21±0,29	9,60±0,27	9,63±0,35$^{\gamma}$	9,19±0,30	9,75±0,15$^{\alpha,\beta}$	**0,003**
C. leptum	9,12±0,43	9,03±0,54	9,13±0,53	9,31±0,47	9,22±0,41	0,878
F. prausnitzii	7,94±0,68	8,34±0,87	8,43±0,92	8,63±0,96	8,36±1,07	0,763
Roseburia	7,62±0,42	8,11±0,83	8,10±0,78	8,02±0,76	7,79±0,43	0,652

NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v), POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123, POWSE: Εκχύλισμα μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123. Τα αποτελέσματα ακολουθούν την κανονική κατανομή και εκφράζονται ως μ.ο. ± τ.α.. α: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (p<0,05), β: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με μανιτάρι (p<0,05), γ:τάση για αύξηση.

Από τον πίνακα 5 δεν παρατηρείται σημαντική διαφορά των υποστρωμάτων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.

Όσον αφορά τον πίνακα 6 παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στην σύγκριση που πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των εθελοντριών μετά την 24ωρη ζύμωση. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μία τάση για αύξηση των *Total Bacteria* στις 24h, σε σχέση με τον μάρτυρα, η οποία οφείλεται κυρίως στην αύξησή τους στο υπόστρωμα του μανιταριού (p=0.038). Αναφορικά με τα *Bacteroides* υπάρχει μία σημαντική αύξηση, στο εκχύλισμα του μανιταριού (POWSE) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (NC) (p=0.019) αλλά και με το μανιτάρι (POWS) (p=0.015). Επίσης παρατηρήθηκε μία τάση για αύξηση των *Bacteroides* στο υπόστρωμα της ινουλίνης 2% συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (p=0.091) αλλά και με το υπόστρωμα του μανιταριού (p=0.073).

Όσον αφορά τον διαχωρισμό των εθελοντριών με βάση την οστική υγεία, τα αποτελέσματα διαμορφώθηκαν ως εξής:

Πίνακας 7: One-Way ANOVA για τους μικροβιακούς πληθυσμούς στις εθελόντριες με υγιή οστική μάζα, στον t=0h, N=3

	NC	INU1	INU2	POWS	POWSE	p
Total Bacteria	9,96±0,18	10,02±0,18	9,98±0,16	9,89±0,11	1,00±0,12	0,843
Bifidobacteria	7,64±0,80	7,64±0,81	7,60±0,80	7,76±0,80	7,66±0,71	1,000
Lactobacillus	6,20±0,54	6,23±0,45	6,16±0,52	6,12±0,52	6,33±0,42	0,987
C. perfrigens	6,15±0,75	6,20±0,70	6,22±0,67	6,35±0,55	6,27±0,69	0,996
Bacteroides	9,36±0,20	9,42±0,19	9,38±0,21	9,39±0,27	9,51±0,25	0,942
C. leptum	8,91±0,28	8,96±0,26	8,95±0,28	8,90±0,31	9,05±0,28	0,971
F. prausnitzii	7,63±0,90	7,75±0,84	7,77±0,85	7,73±0,93	7,76±0,84	1,000
Roseburia	8,06±0,59	8,05±0,59	8,10±0,65	8,04±0,51	8,13±0,57	1,000

NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v), POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123, POWSE: Εκχύλισμα μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123. Τα αποτελέσματα ακολουθούν την κανονική κατανομή και εκφράζονται ως μ.ο. ± τ.α.

Πίνακας 8: One-Way ANOVA για τους μικροβιακούς πληθυσμούς στις εθελόντριες με υγιή οστική μάζα, στον t=24h, N=3

	NC	INU1	INU2	POWS	POWSE	p
Total Bacteria	9,97±0,05	10,22±0,38	10,26±0,40	10,30±0,22	10,10±0,18	0,606
Bifidobacteria	7,83±0,94	8,76±1,89	8,97±2,00	8,44±1,54	7,98±1,22	0,876
Lactobacillus	6,30±0,68	7,92±0,67	8,04±1,29	7,11±1,47	6,53±1,36	0,299
C. perfrigens	6,24±0,79	6,02±1,18	6,24±1,40	6,28±0,69	6,24±1,02	0,998
Bacteroides	9,29±0,20	9,68±0,35	9,73±0,48	9,00±0,31	9,65±0,13	**0,075**
C. leptum	9,06±0,30	8,92±0,54	9,01±0,61	9,01±0,40	8,99±0,29	0,996
F. prausnitzii	7,62±0,85	8,12±1,22	8,15±1,33	8,07±1,16	7,84±1,42	0,979
Roseburia	7,51±0,40	7,98±0,66	7,98±0,96	7,76±0,96	7,65±0,48	0,908

NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v), POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123, POWSE: Εκχύλισμα μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123. Τα αποτελέσματα ακολουθούν την κανονική κατανομή και εκφράζονται ως μ.ο. ± τ.α.

Από τον πίνακα 7, δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά των υποστρωμάτων συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.

Όσον αφορά τον πίνακα 8 παρατηρείται μία τάση για αύξηση των *Bacteroides* συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Ωστόσο, φαίνεται ότι στο υπόστρωμα του μανιταριού (POWS) υπάρχει μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική.

Πίνακας 9: One-Way ANOVA για τους μικροβιακούς πληθυσμούς στις εθελόντριες με παθολογική οστική μάζα, στον t=0h, N=3

	NC	INU1	INU2	POWS	POWSE	p
Total Bacteria	10,24±0,22	10,23±0,23	10,21±0,24	10,20±0,20	10,31±0,20	0,968
Bifidobacteria	9,08±0,05	9,11±0,09	9,01±0,08	9,00±0,15	9,13±0,11	0,454
Lactobacillus	6,36±1,43	6,30±1,31	6,29±1,43	6,29±1,34	6,39±1,36	1,000
C. perfrigens	6,31±0,77	6,40±0,67	6,35±0,80	6,54±0,50	6,41±0,67	0,995
Bacteroides	9,50±0,27	9,44±0,17	9,47±0,32	9,50±0,22	9,48±0,18	0,997
C. leptum	9,50±0,34	9,48±0,27	9,46±0,45	9,45±0,25	9,58±0,32	0,989
F. prausnitzii	8,96±0,18	8,91±0,18	8,91±0,20	8,96±0,13	8,98±0,08	0,971
Roseburia	8,72±0,40	8,65±0,47	8,67±0,50	8,66±0,31	8,76±0,34	0,997

NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v), POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123, POWSE: Εκχύλισμα μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123. Τα αποτελέσματα ακολουθούν την κανονική κατανομή και εκφράζονται ως μ.ο. ± τ.α.. α: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (p<0,05)

Στον πίνακα 9 δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.

Πίνακας 10: One-Way ANOVA για τους μικροβιακούς πληθυσμούς στις εθελόντριες με παθολογική οστική μάζα, στον t=24h, N=3

	NC	INU1	INU2	POWS	POWSE	p
Total Bacteria	10,03±0,23	10,37±0,20	10,33±0,11	10,46±0,01	10,30±0,12	0,062
Bifidobacteria	9,12±0,15	9,82±0,12$^{\alpha}$	9,97±0,21$^{\alpha}$	9,86±0,25$^{\alpha}$	9,40±0,22	**0,001**
Lactobacillus	6,38±1,31	6,78±0,56	7,16±0,68	6,70±1,13	6,74±0,80	0,896
C. perfrigens	6,30±0,56	6,39±0,67	6,44±0,70	6,86±0,75	6,77±0,45	0,767
Bacteroides	9,12±0,39	9,52±0,19	9,53±0,20	9,38±0,14	9,85±0,10$^{\alpha}$	**0,032**
C. leptum	9,18±0,59	9,15±0,63	9,25±0,54	9,61±0,33	9,44±0,42	0,779
F. prausnitzii	8,25±0,39	8,57±0,50	8,71±0,34	9,19±0,11$^{\alpha}$	8,88±0,16	**0,058**
Roseburia	7,72±0,50	8,24±1,12	8,21±0,74	8,27±0,58	7,93±0,41	0,847

NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v), POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123, POWSE: Εκχύλισμα μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123. Τα αποτελέσματα ακολουθούν την κανονική κατανομή και εκφράζονται ως μ.ο. ± τ.α.. α: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (p<0,05).

Όσον αφορά τις συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν στην ομάδα των εθελοντριών με παθολογική οστική μάζα παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα *Bifidobacteria*, *Bacteroides* και *F. prausnitzii* (πίνακας 10). Πιο συγκεκριμένα υπάρχει μία στατιστικά σημαντική αύξηση των *Bifidobacteria*, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα στα υποστρώματα της ινουλίνης 1% και 2% και στο μανιτάρι (p=0.009, p=0.002 και p=0.006, αντίστοιχα). Επίσης παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση των *Bacteroides*, στο εκχύλισμα του

μανιταριού (p=0.018). Αντίστοιχα, παρατηρείται μία τάση για αύξηση των *F.prausnitzii*, η οποία οφείλεται κυρίως στην στατιστικά σημαντική αύξηση του μικροοργανισμού στο υπόστρωμα του μανιταριού (p=0.040), συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.

Μετά την ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των αποτελεσμάτων με ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (Repeated Measures ANOVA) στο σύνολο των εθελοντριών.

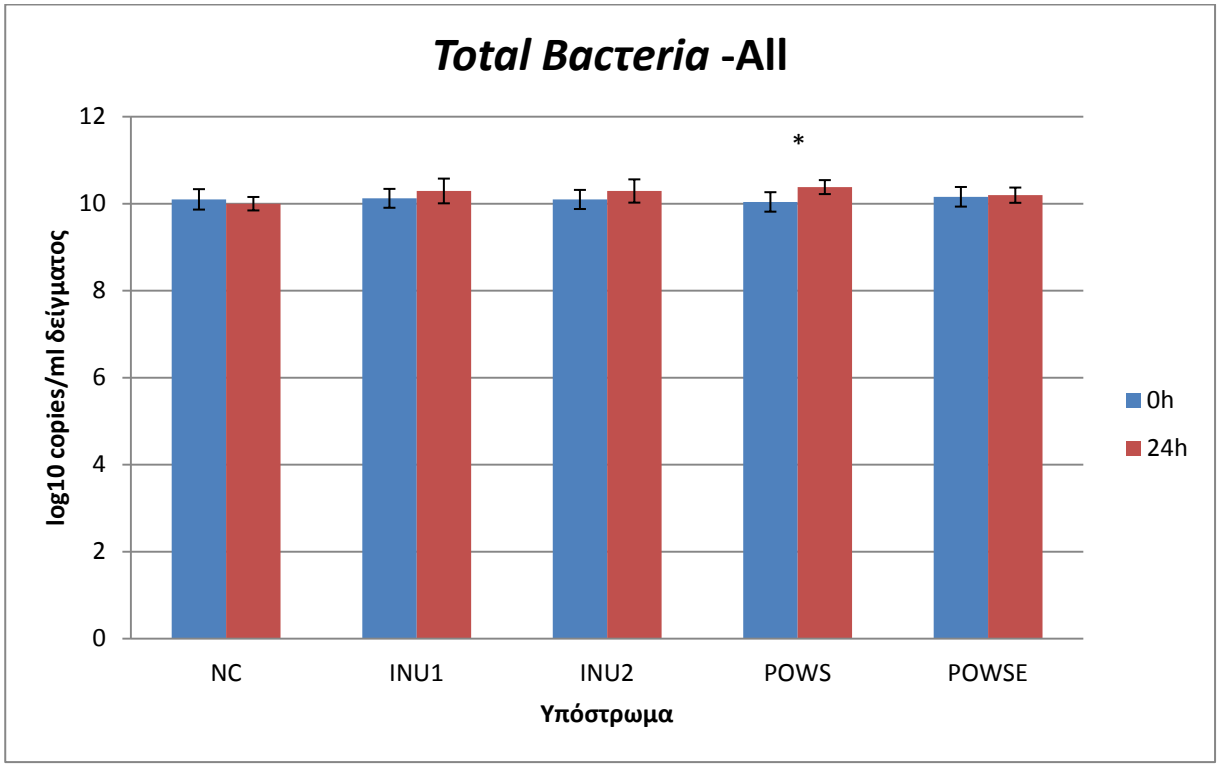
Πίνακας 11: Ανάλυση διακύμανσης για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις στο σύνολο των εθελοντριών για τις χρονικές στιγμές t=0h και t=24h.

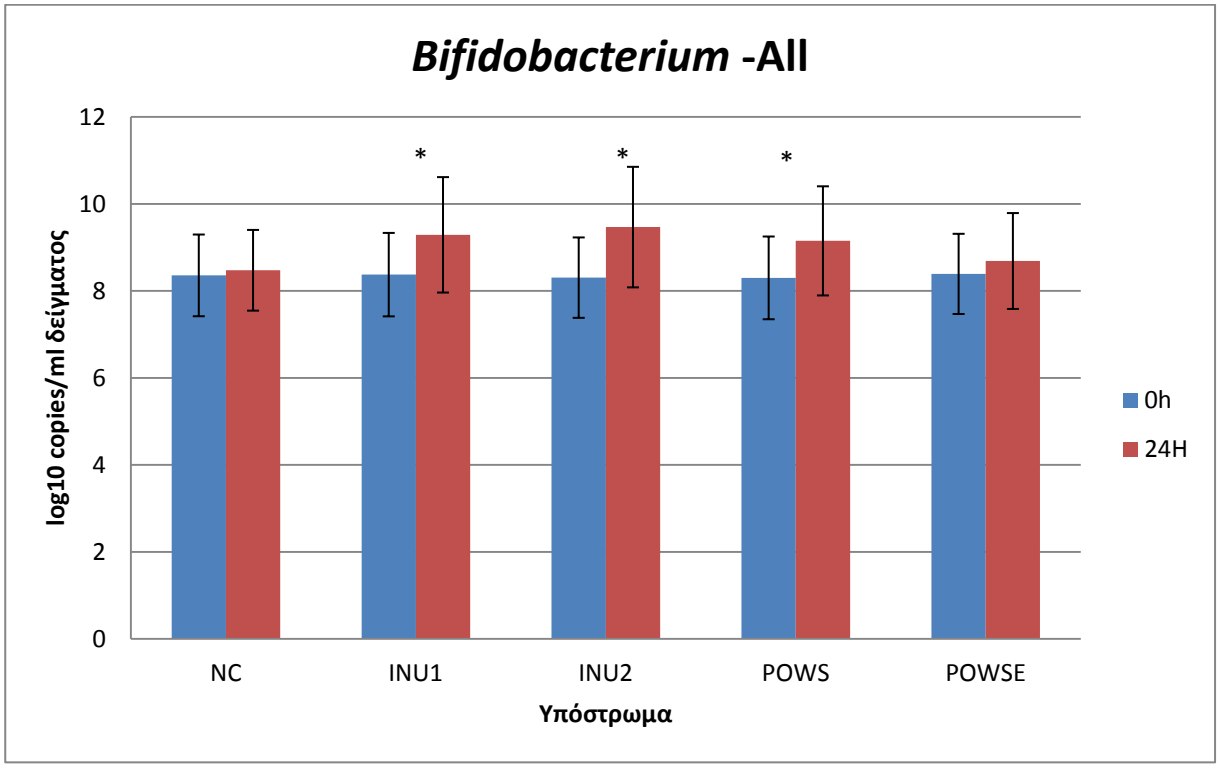
	t=0h					t=24h					
	NC	**INU1**	**INU2**	**POWS**	**POWSE**	**NC**	**INU1**	**INU2**	**POWS**	**POWSE**	**p**
Total Bacteria	10,10 ±0,23	10,12± 0,22	10,10± 0,22	10,04 ±0,22	10,16 ±0,23	10,00±0,15	10,29±0,28$^{\alpha}$	10,29±0,27$^{\alpha}$	10,38±0,16$^{\alpha}$	10,20±0,18	0,461
Bifidobacteria	8,36 ±0,94	8,38 ±0,96	8,31 ±0,92	8,30 ±0,95	8,39 ±0,92	8,48±0,93	9,29±1,33	9,47±1,39	9,15±1,25	8,69±1,10	0,927
Lactobacillus	6,28 ±0,97	6,27 ±0,88	6,23 ±0,96	6,20 ±0,91	6,36 ±0,90	6,34±0,93	7,35±0,83	7,60±1,04	6,90±1,19	6,64±1,00	0,777
C. perfrigens	6,23± 0,68	6,30± 0,62	6,28 ±0,66	6,44 ±0,48	6,34 ±0,62	6,27±0,61	6,21±0,88	6,34±0,99	6,57±0,72	6,50±0,76	0,957
Bacteroides	9,43±0,23	9,43±0,16	9,43± 0,25	9,45 ±0,23	9,49± 0,20	9,21±0,29	9,60±0,27$^{\alpha}$	9,63±0,35$^{\alpha}$	9,19±0,30	9,75±0,15$^{\alpha}$	**0,038**
C. leptum	9,20±0,43	9,22±0,38	9,20±0,44	9,18±0,39	9,31±0,40	9,12±0,43	9,03±0,54	9,13±0,53	9,31±0,47	9,22±0,41	0,973
F. prausnitzii	8,30±0,93	8,33±0,83	8,34±0,83	8,35±0,90	8,37±0,86	7,94±0,68	8,34±0,87	8,43±0,92	8,63±0,96	8,36±1,07	0,961
Roseburia	8,39±0,58	8,35±0,58	8,39±0,60	8,35±0,51	8,44±0,54	7,62±0,42	8,11±0,83	8,10±0,78	8,02±0,76	7,79±0,43	0,951

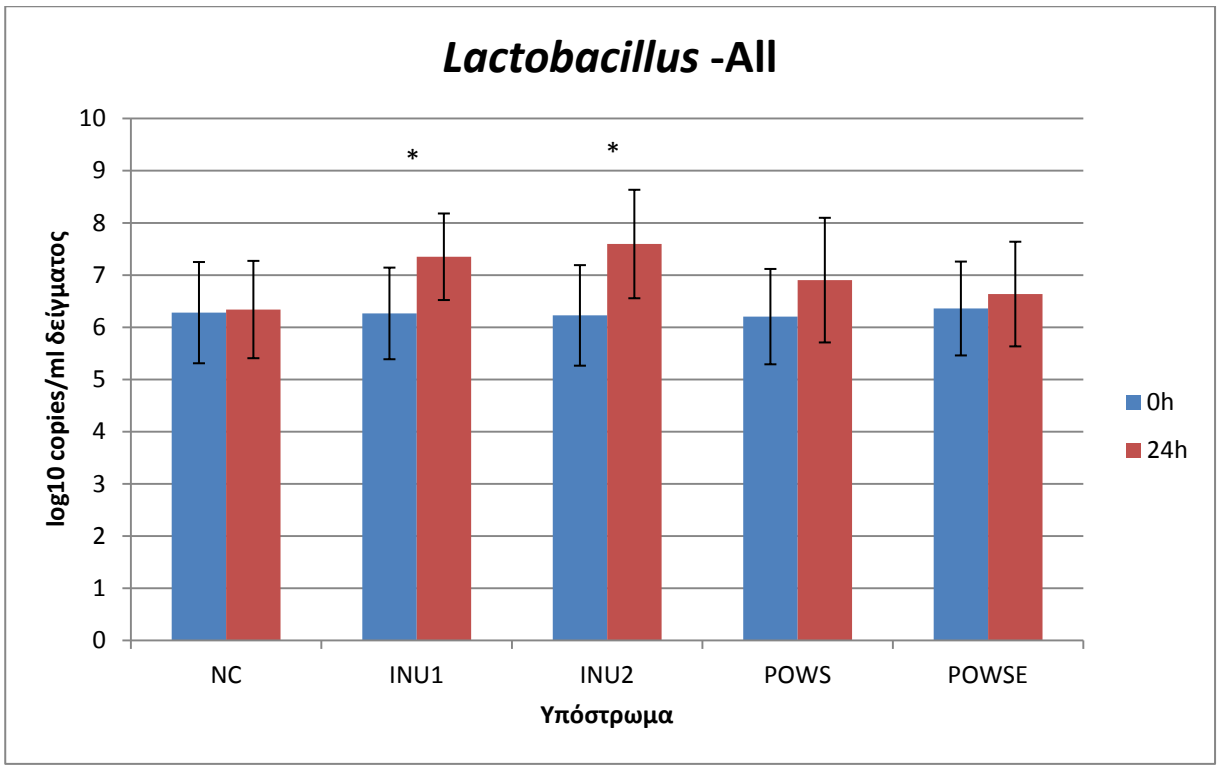
NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v), POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123, POWSE: Εκχύλισμα μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123. Τα αποτελέσματα ακολουθούν την κανονική κατανομή και εκφράζονται ως μ.ο. ± τ.α.. α: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα στη χρονική στιγμή 24h (p<0,05).

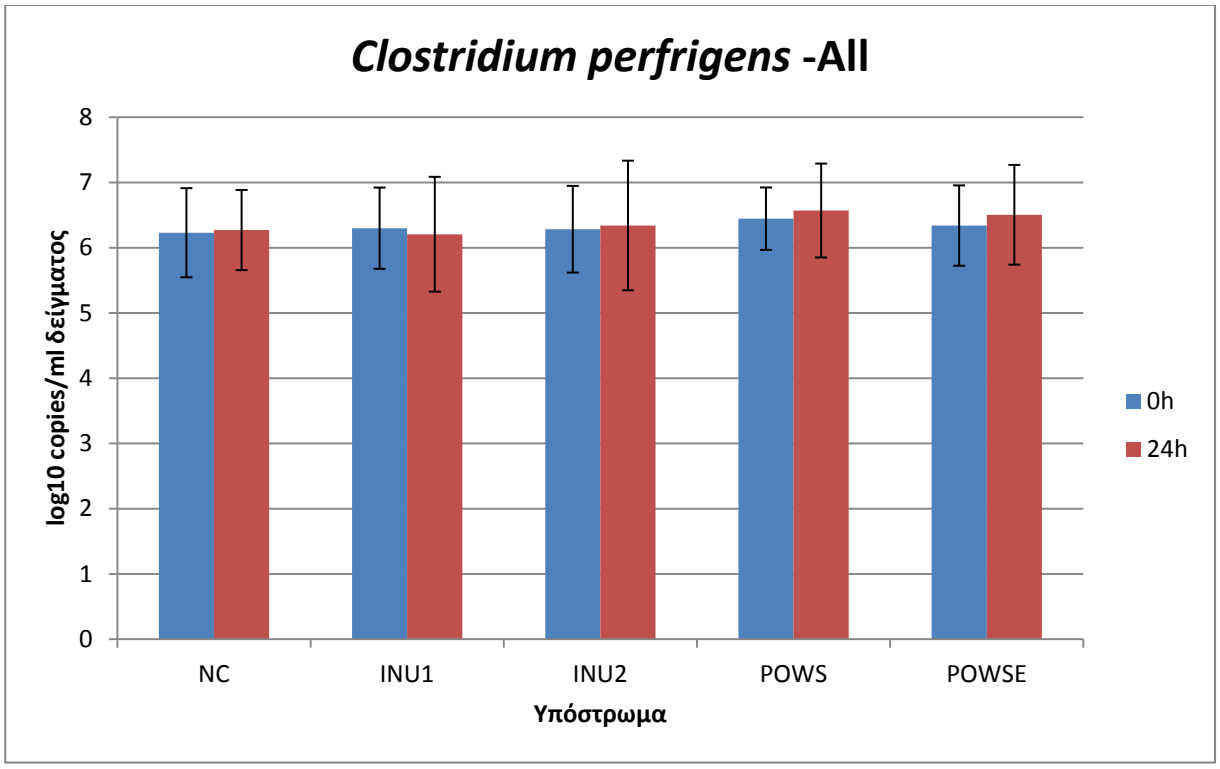
Στον πίνακα 11 παρατηρήθηκε μία σημαντική αύξηση των *Total Bacteria* στα υποστρώματα της ινουλίνης 1% και 2% (p=0.027) αλλά και στο υπόστρωμα του μανιταριού (p=0.005) μετά την 24ωρη ζύμωση συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Επίσης παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση των *Bacteroides* στα υποστρώματα της ινουλίνης 1% (p=0.022), της ινουλίνης 2% (p=0.014) και του εκχυλίσματος του μανιταριού (p=0.002), μετά την 24ωρη ζύμωση.

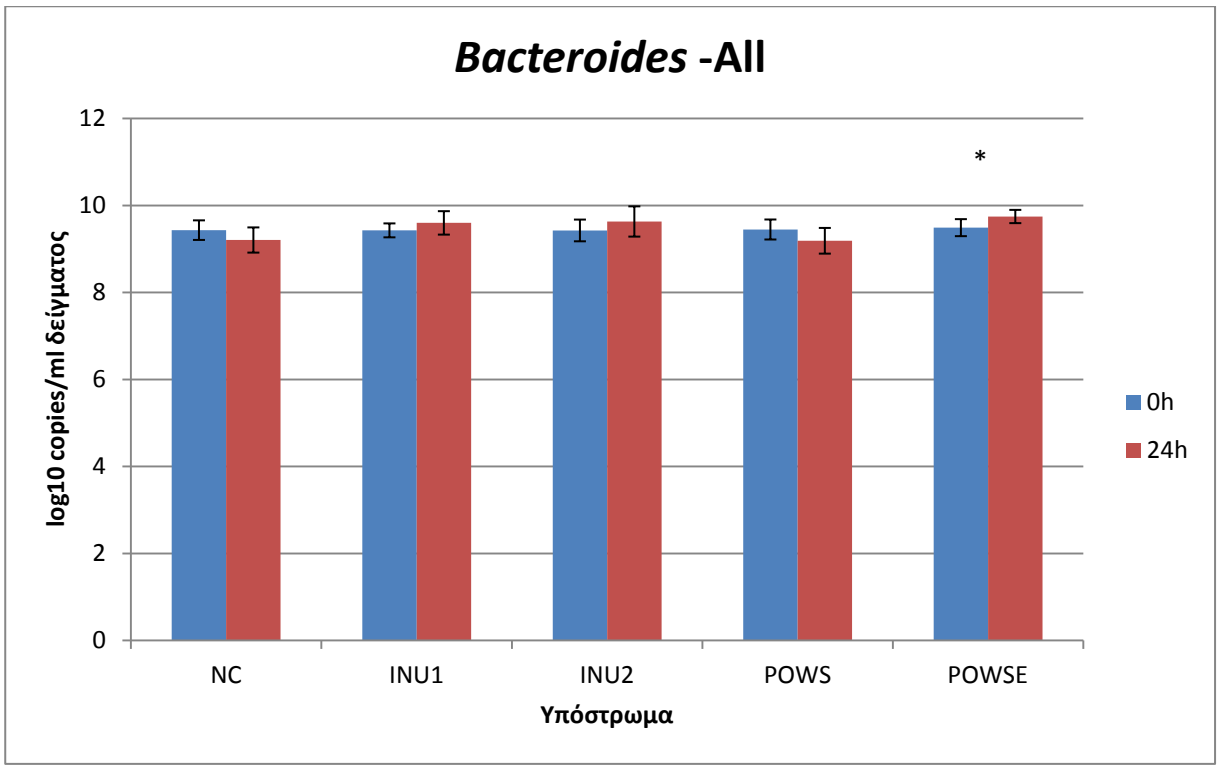
Στη συνέχεια της στατιστικής ανάλυσης των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μία σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών στον χρόνο 0h και μετά από την 24ωρη ζύμωση για κάθε μικροοργανισμό. Οι συγκρίσεις έγιναν τόσο για το σύνολο των εθελοντριών όσο και για κάθε ομάδα ξεχωριστά.

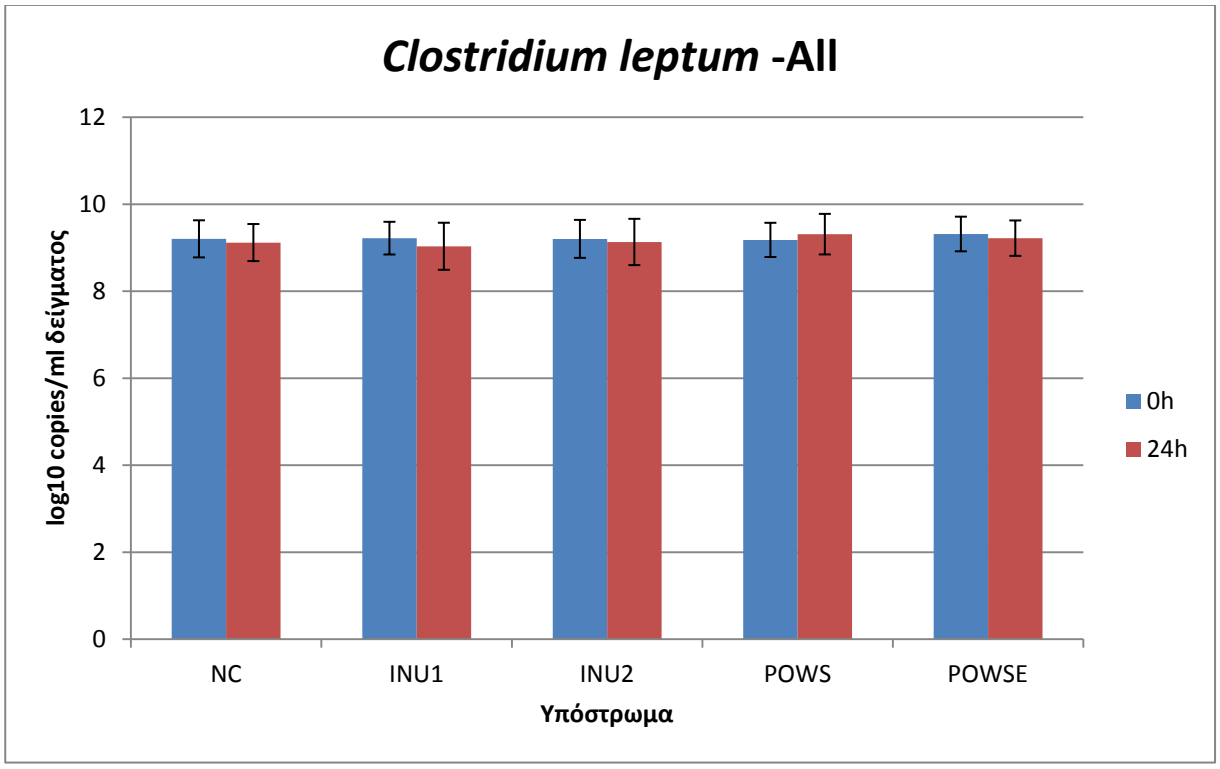

Total Bacteria -All
log10 copies/ml δείγματος
12
10
8
6
4
2
0
*
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h

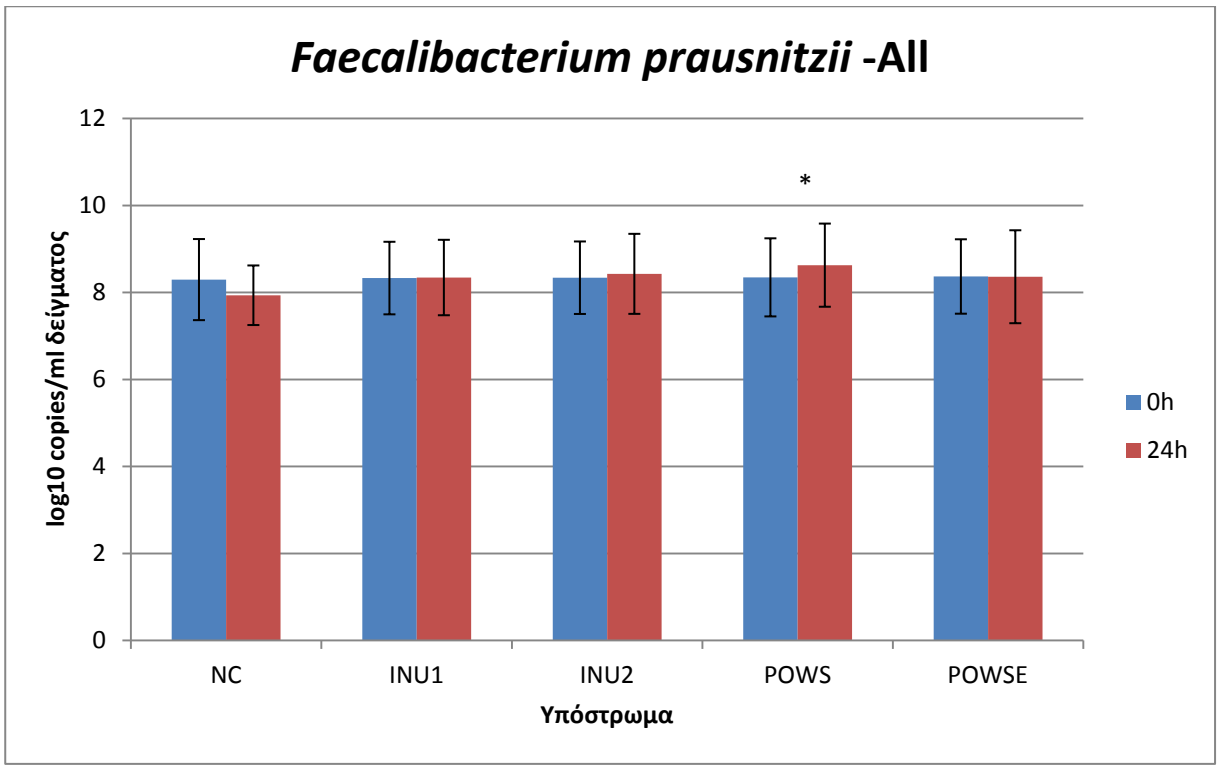

Bifidobacterium -All
log10 copies/ml δείγματος
12
10
8
6
4
2
0
*
*
*
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24H

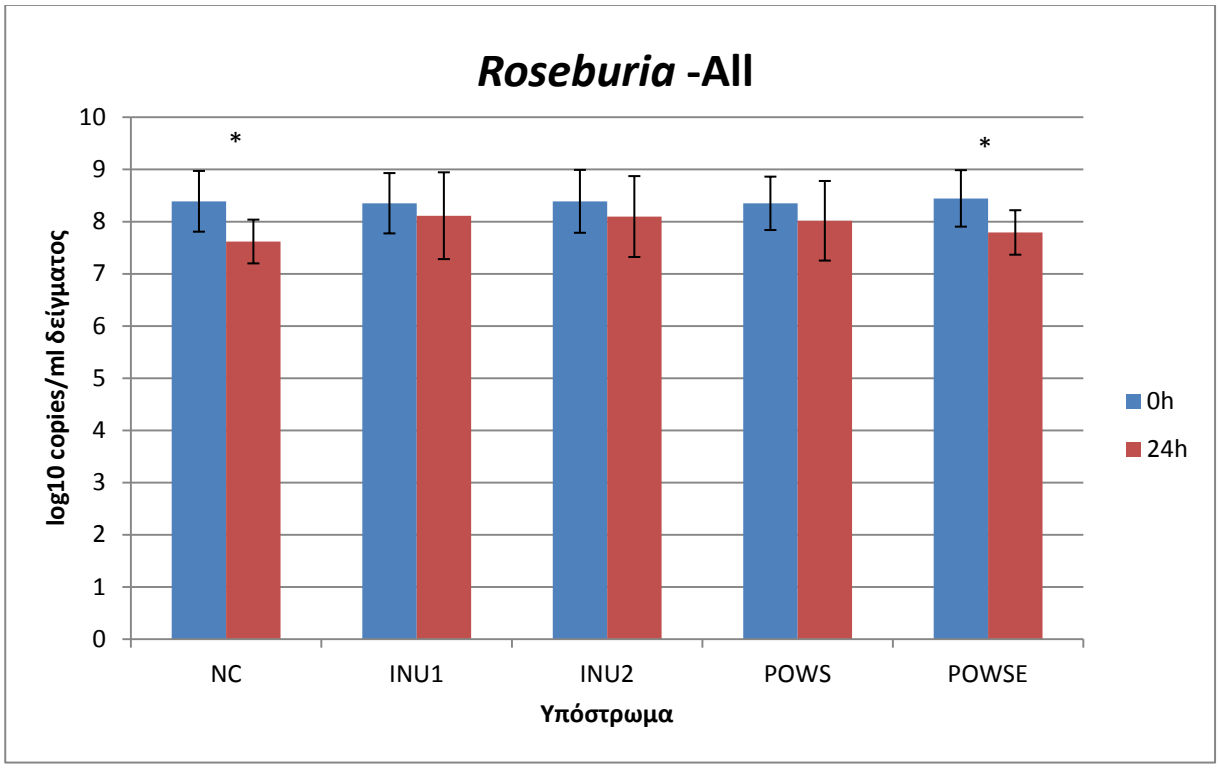

Lactobacillus -All
log10 copies/ml δείγματος
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
*
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h


Clostridium perfrigens -All
log10 copies/ml δείγματος
8
7
6
5
4
3
2
1
0
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h


Bacteroides -All
log10 copies/ml δείγματος
12
10
8
6
4
2
0
*
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h


Clostridium leptum -All
log10 copies/ml δείγματος
12
10
8
6
4
2
0
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h



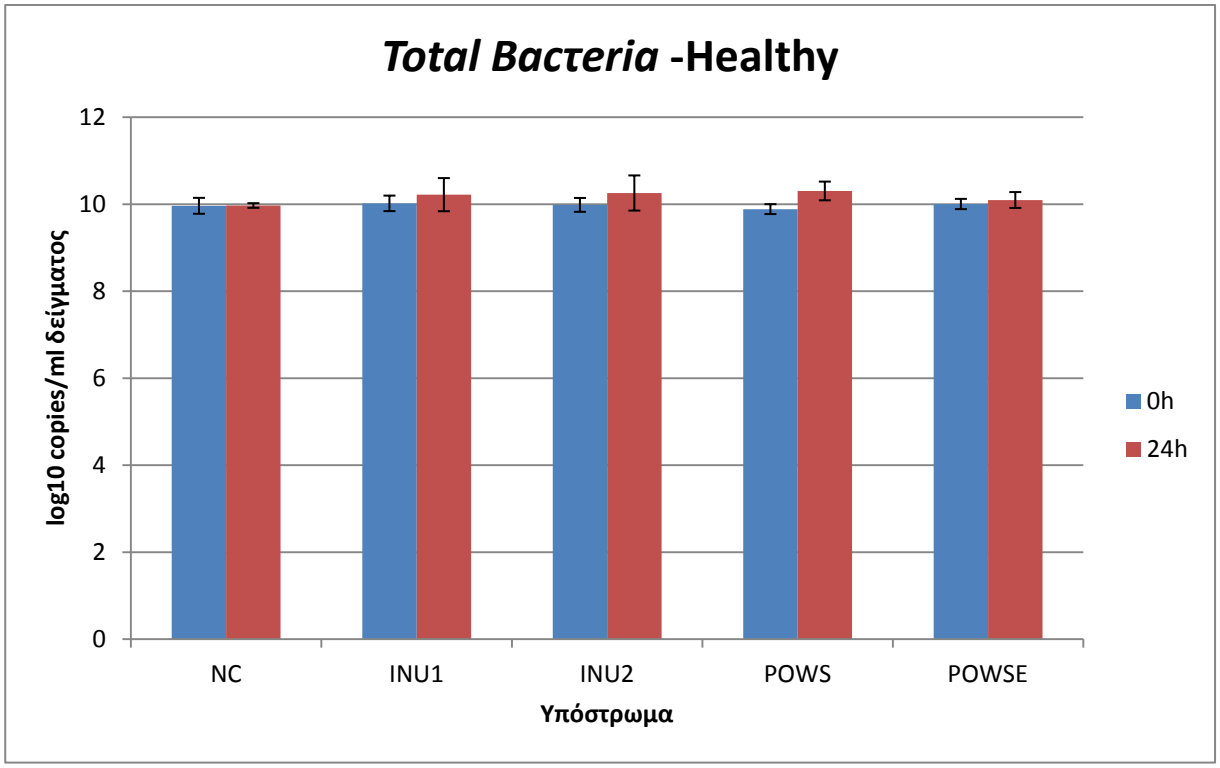


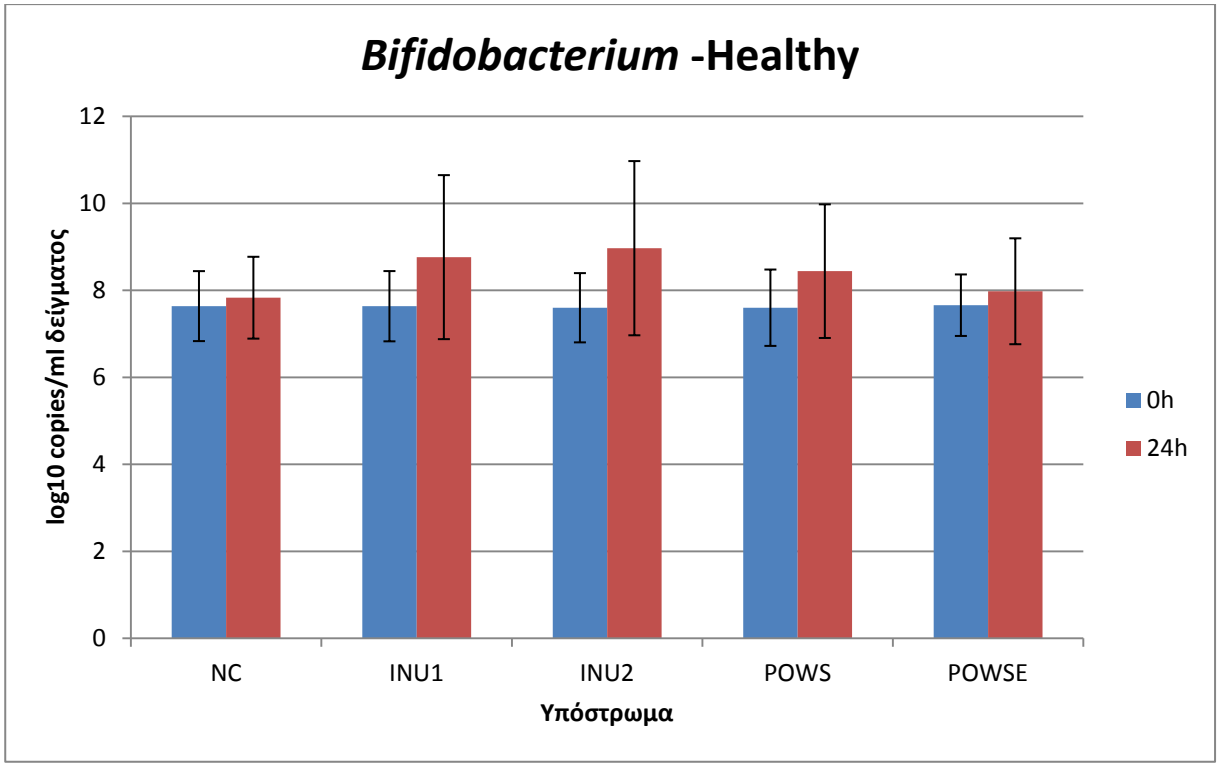
Διάγραμμα 1: Σύγκριση μικροβιακών πληθυσμών στους χρόνους t=0h και t=24h, για το σύνολο των εθελοντριών. NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v), POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123, POWSE: Εκχύλισμα μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123. Τα αποτελέσματα ακολουθούν την κανονική κατανομή και εκφράζονται ως μ.ο. ± τ.α.. *: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον t=0h (p<0,05).

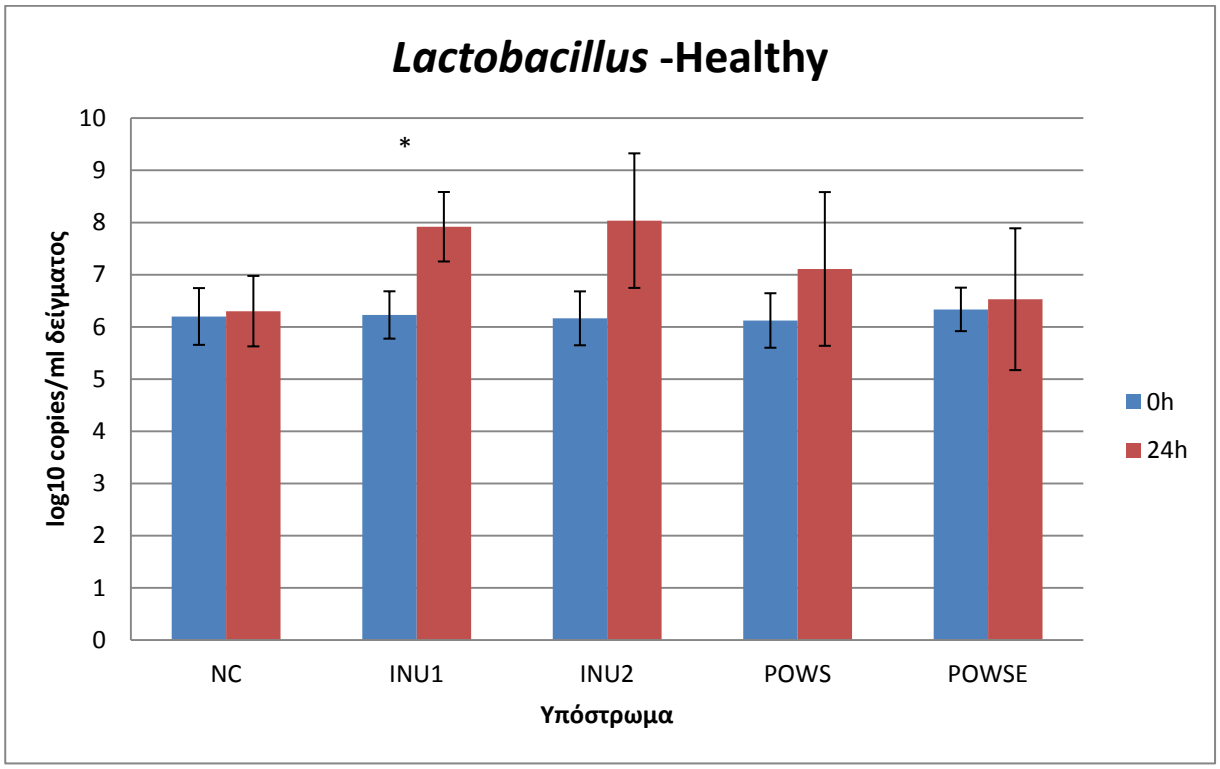
Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση των *Total bacteria* και των *F. prausnitzii* στο υπόστρωμα του μανιταριού (POWS) (p=0.021 και p=0.031,

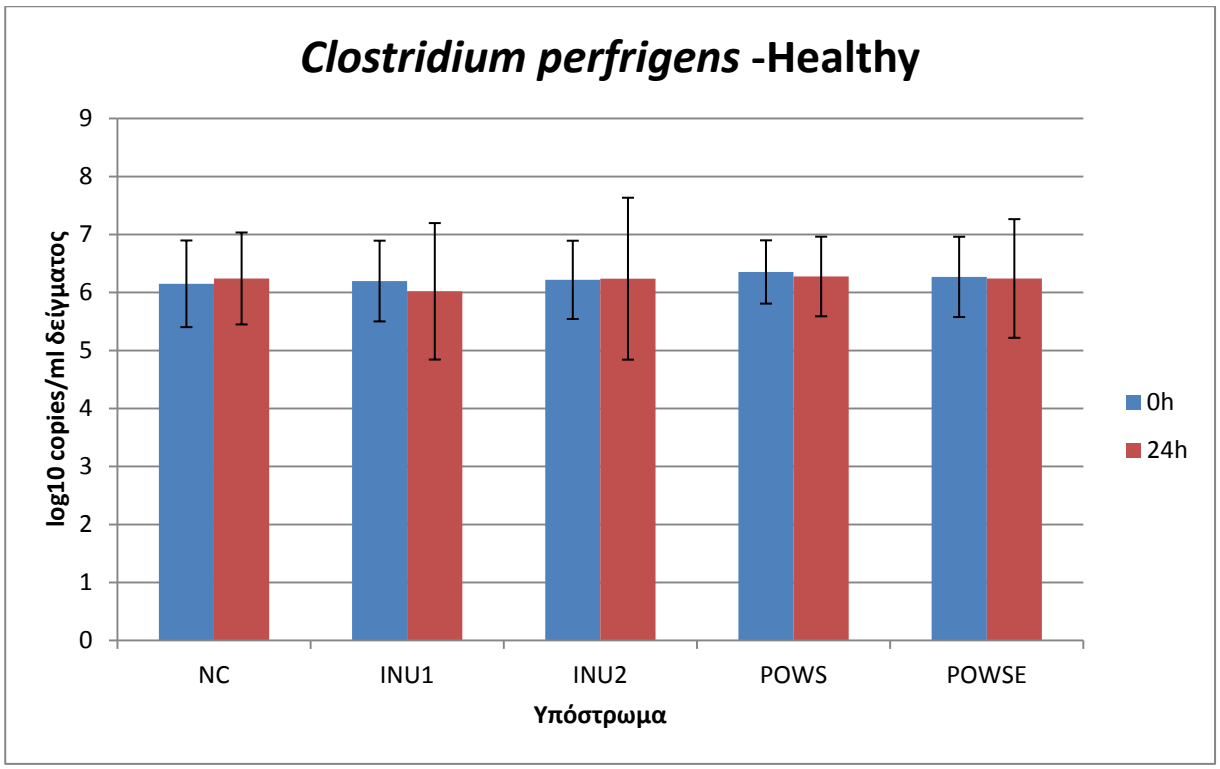
αντίστοιχα) και μία στατιστικά σημαντική αύξηση των *Bifidobacteria* στα υποστρώματα της ινουλίνης 1% (p=0.032) και 2% (p=0.023) και του μανιταριού (p=0.005). Αντίστοιχα παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση των *Lactobacillus* στα υποστρώματα της INU1 (p=0.028) και INU2 (p=0.015), καθώς και των *Bacteroides* στο υπόστρωμα του εκχυλίσματος του μανιταριού (p=0.016), ενώ παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση της *Roseburia* στον αρνητικό μάρτυρα (p=0.008) αλλά και στο εκχύλισμα του μανιταριού (p=0.003), μετά από 24ωρη ζύμωση.

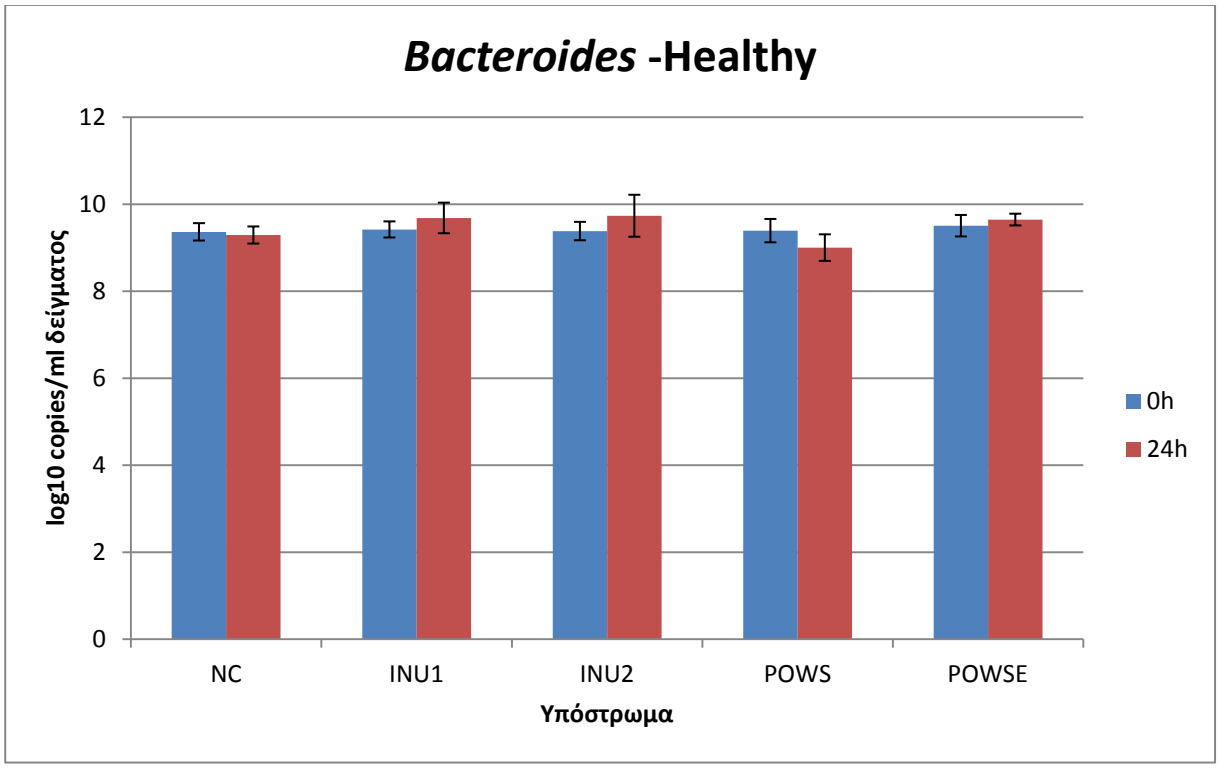
Όσον αφορά τις εθελόντριες με υγιή οστική μάζα οι διαφορές στους μικροβιακούς πληθυσμούς προέκυψαν ως εξής:

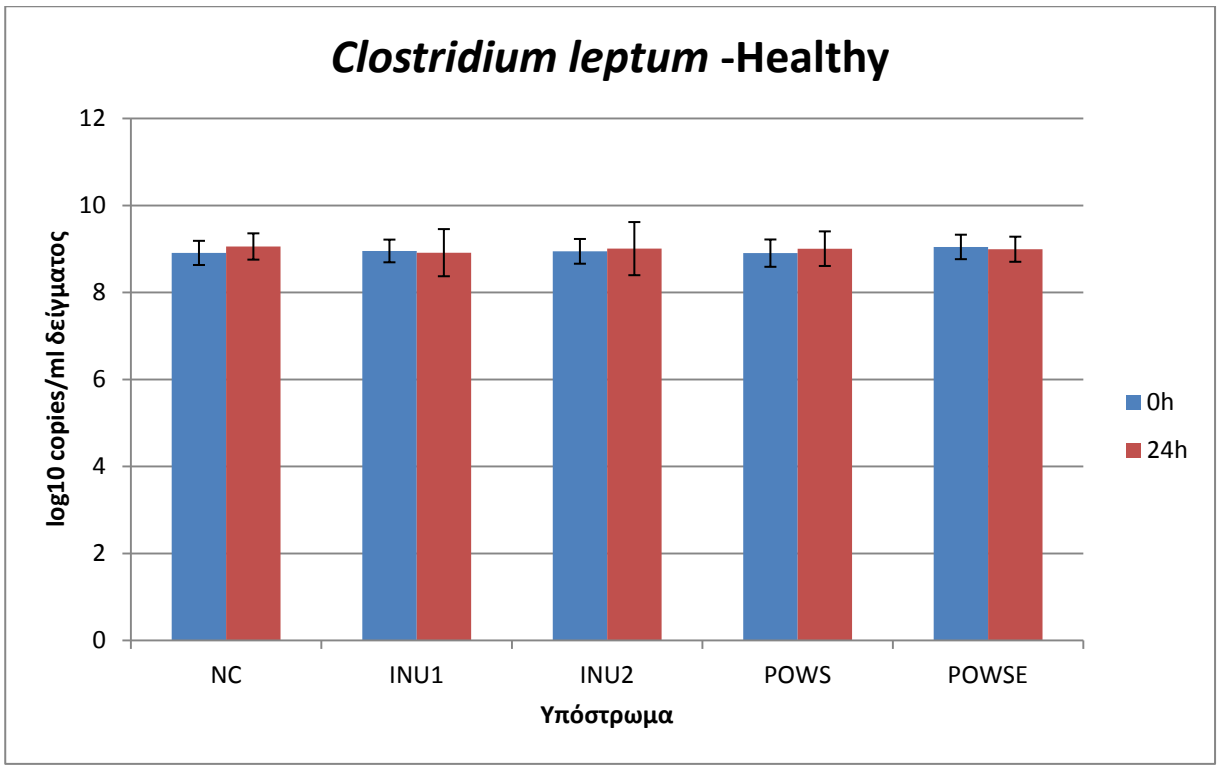


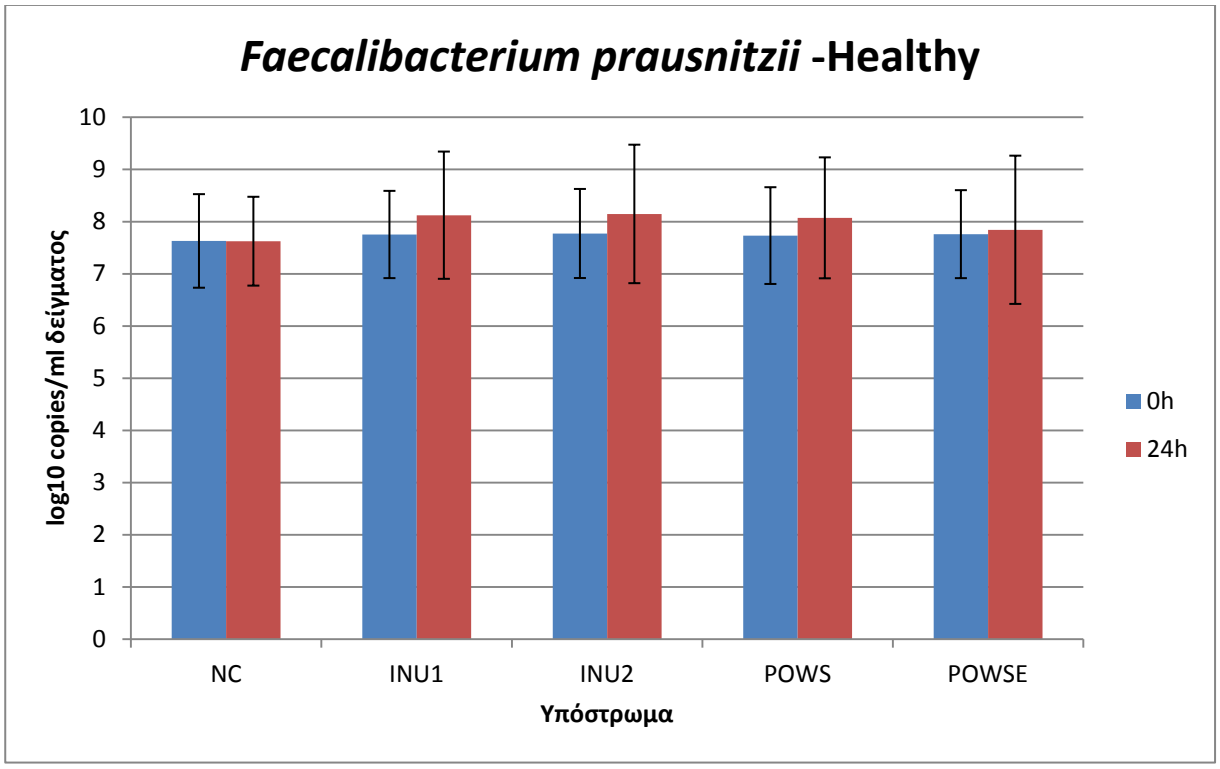

Bifidobacterium -Healthy
log10 copies/ml δείγματος
12
10
8
6
4
2
0
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h

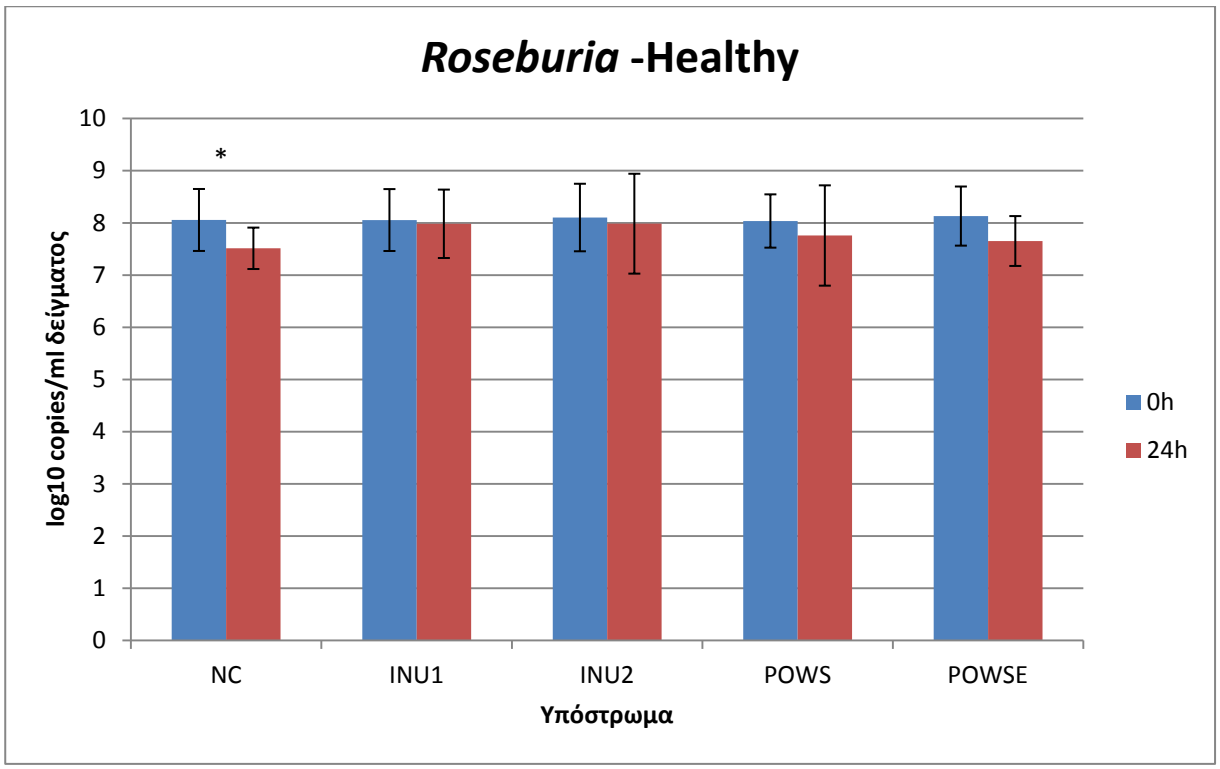

Lactobacillus -Healthy
log10 copies/ml δείγματος
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
*
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h


Clostridium perfrigens -Healthy
log10 copies/ml δείγματος
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h


Bacteroides -Healthy
log10 copies/ml δείγματος
12
10
8
6
4
2
0
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h


Clostridium leptum -Healthy
log10 copies/ml δείγματος
12
10
8
6
4
2
0
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h

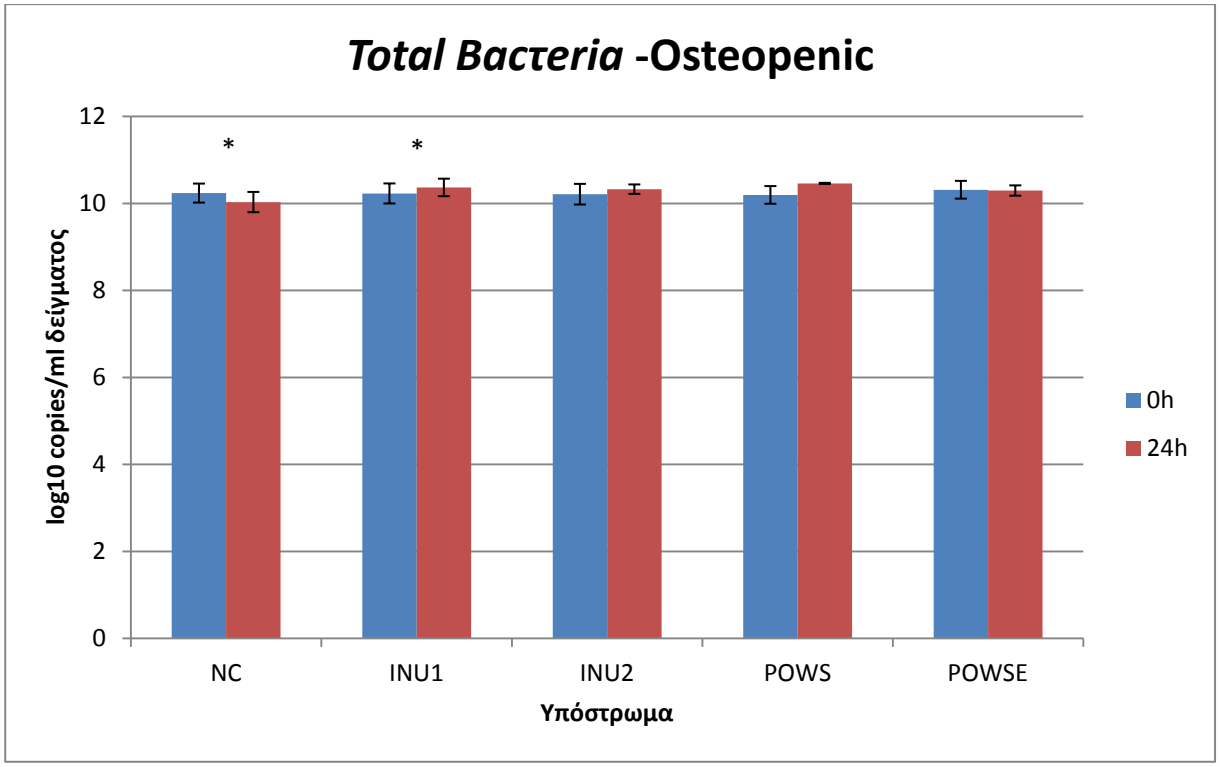

Faecalibacterium prausnitzii -Healthy
log10 copies/ml δείγματος
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h

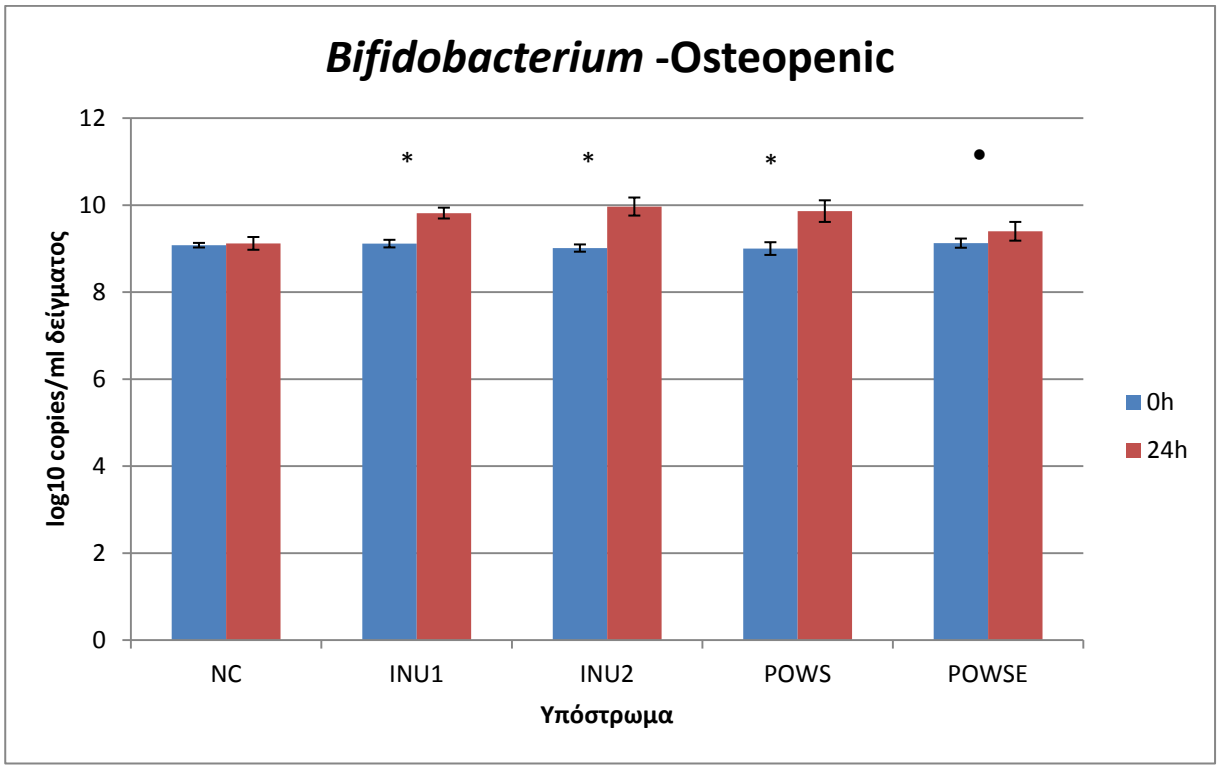


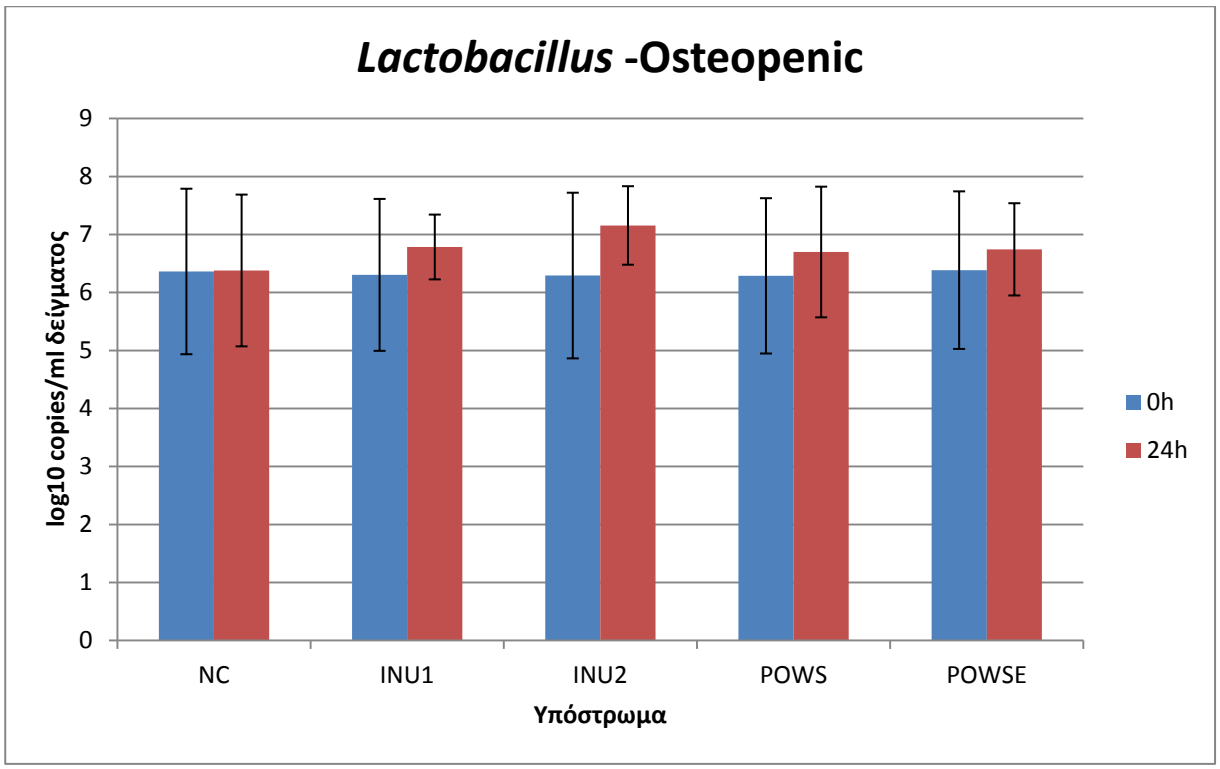
Διάγραμμα 2:Σύγκριση μικροβιακών πληθυσμών στους χρόνους t=0h και t=24h, για τις εθελόντριες με υγιή οστική μάζα. NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v), POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123, POWSE: Εκχύλισμα μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123. Τα αποτελέσματα ακολουθούν την κανονική κατανομή και εκφράζονται ως μ.ο. ± τ.α.. *: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον t=0h (p<0,05).

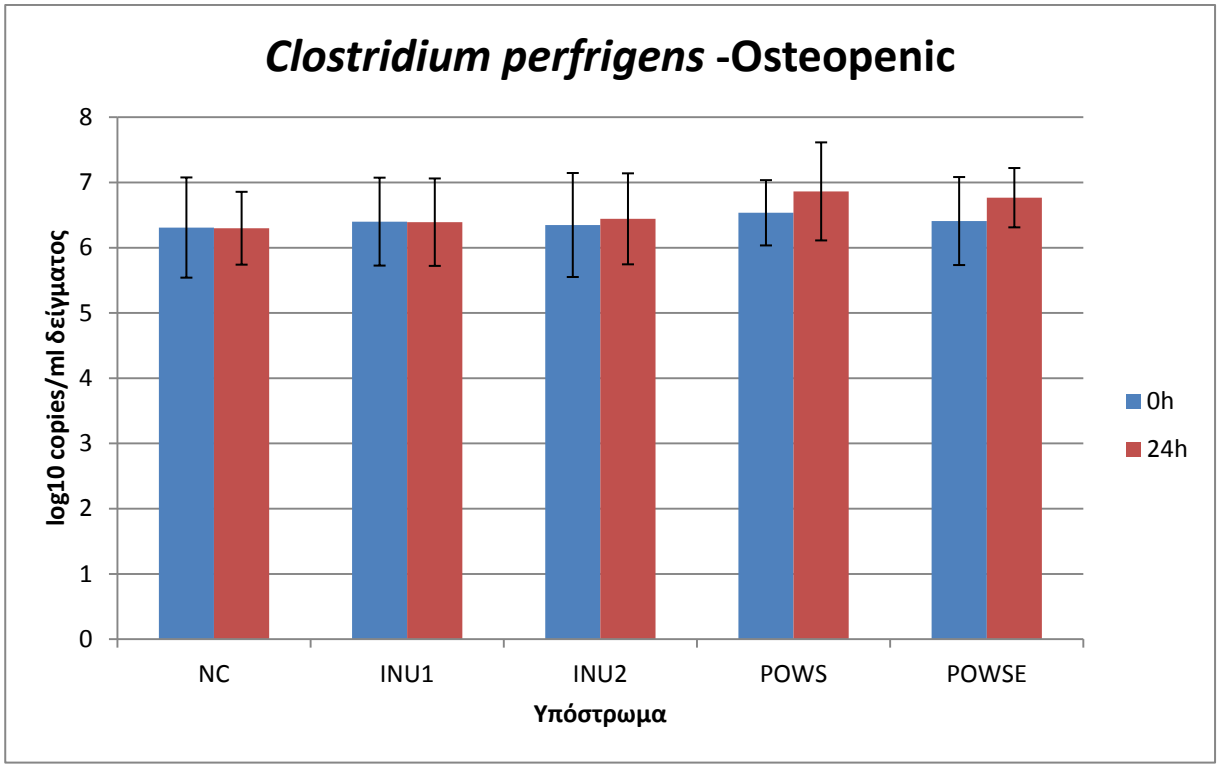
Όσον αφορά την σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών που πραγματοποιήθηκε στην ομάδα των υγιών εθελοντριών, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές μόνο στους πληθυσμούς των *Lactobacillus* και *Roseburia*. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των *Lactobacillus* στο υπόστρωμα της ινουλίνης 1% (p=0.018) μετά την 24ωρη ζύμωση, ενώ αντίθετα, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της *Roseburia* στον αρνητικό μάρτυρα μετά από 24 ώρες (p=0.041).

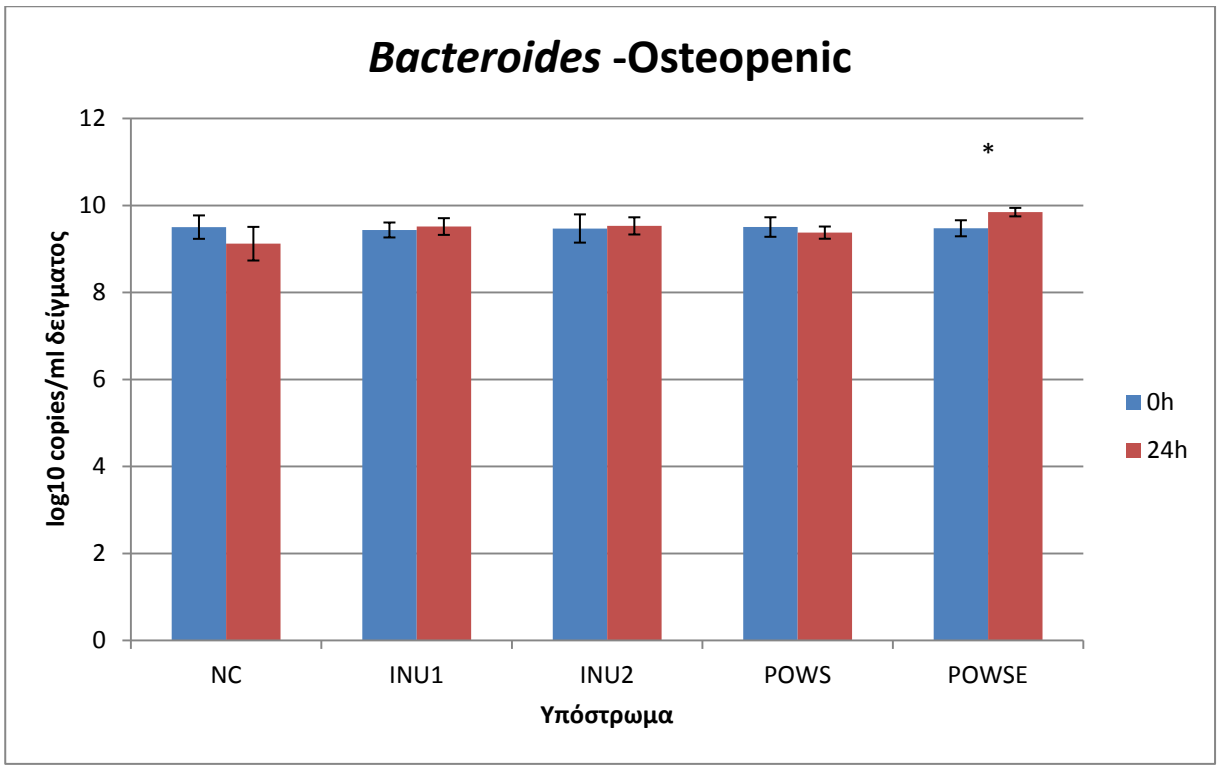
Όσον αφορά τις εθελόντριες με παθολογική οστική μάζα οι διαφορές στους μικροβιακούς πληθυσμούς προέκυψαν ως εξής:

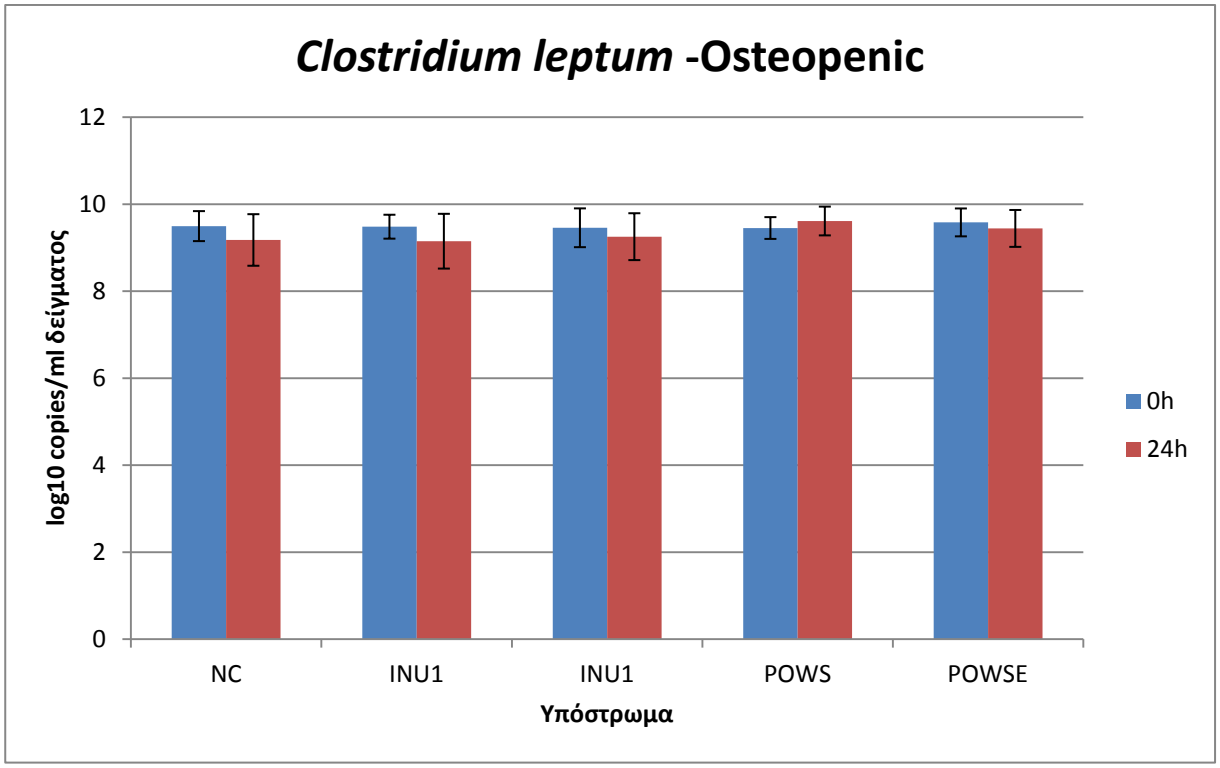

Total Bacteria -Osteopenic
log10 copies/ml δείγματος
12
10
8
6
4
2
0
*
*
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h

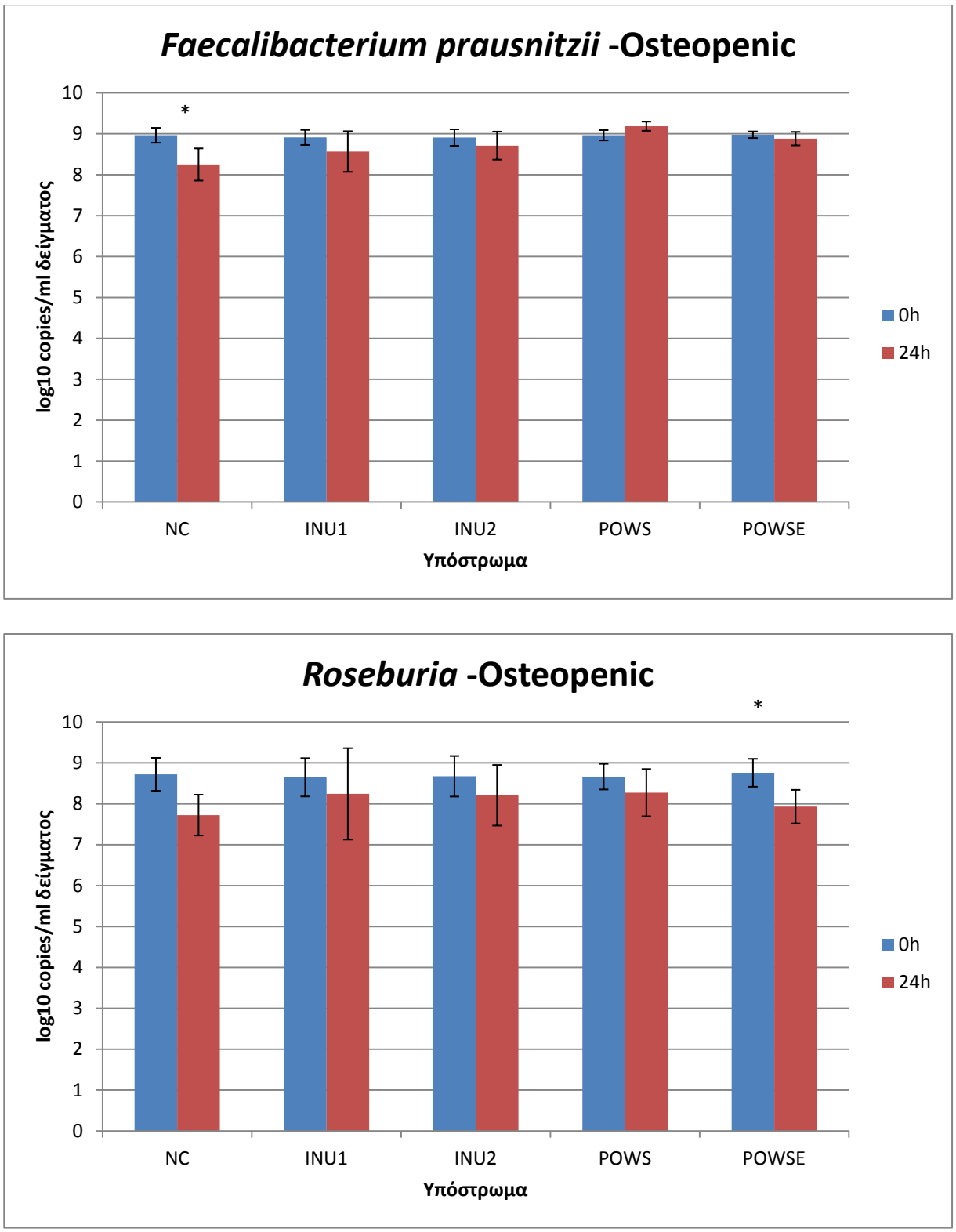

Bifidobacterium -Osteopenic
log10 copies/ml δείγματος
12
10
8
6
4
2
0
*
*
*
•
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h


Lactobacillus -Osteopenic
log10 copies/ml δείγματος
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h


Clostridium perfrigens -Osteopenic
log10 copies/ml δείγματος
0
1
2
3
4
5
6
7
8
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h


Bacteroides -Osteopenic
12
10
8
6
4
2
0
log10 copies/ml δείγματος
*
NC
INU1
INU2
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h


Clostridium leptum -Osteopenic
12
10
8
6
4
2
0
log10 copies/ml δείγματος
NC
INU1
INU1
POWS
POWSE
Υπόστρωμα
0h
24h



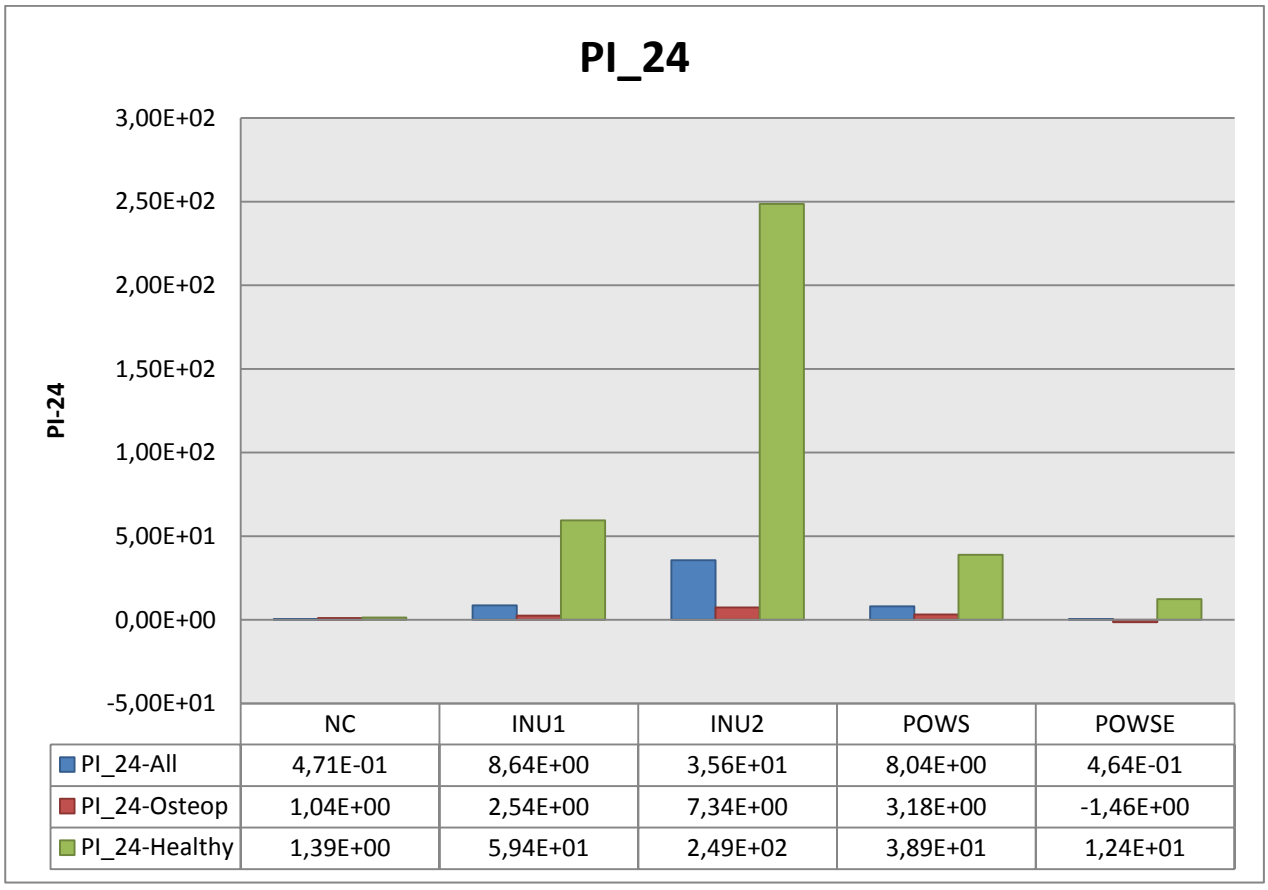
Διάγραμμα 3: Σύγκριση μικροβιακών πληθυσμών στους χρόνους t=0h και t=24h, για τις εθελόντριες με παθολογική οστική μάζα. NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v), POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123, POWSE: Εκχύλισμα μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123. Τα αποτελέσματα ακολουθούν την κανονική κατανομή και εκφράζονται ως μ.ο. ± τ.α.. *: στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον t=0h (p<0,05), •: τάση για αύξηση.

Όσον αφορά την σύγκριση των μικροβιακών πληθυσμών που πραγματοποιήθηκε στην ομάδα των εθελοντριών με παθολογική οστική μάζα, παρατηρήθηκαν περισσότερες αλλαγές μετά την

24ωρη ζύμωση. Πιο συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική μείωση των *Total Bacteria* στον αρνητικό μάρτυρα (p=0.032) και μία στατιστικά σημαντική αύξηση στο υπόστρωμα της ινουλίνης 1% (p=0.022). Στα *Bifidobacteria* παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση στα υποστρώματα της ινουλίνης 1% (p=0.007) και 2% (p=0.025) και στο υπόστρωμα του μανιταριού (p=0.005), καθώς και μία τάση για αύξηση στο υπόστρωμα του εκχυλίσματος (p=0.055). Όσον αφορά τα *Bacteroides*, παρατηρήθηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση στο υπόστρωμα με το εκχύλισμα του μανιταριού (p=0.035). Τέλος τα *F. prausnitzii* και *Roseburia*, εμφάνισαν μία στατιστικά σημαντική μείωση στον αρνητικό μάρτυρα για το *F. prausnitzii* (p=0.028) και στο εκχύλισμα του μανιταριού για τη *Roseburia* (p=0.011).

1.4. Αποτελέσματα πρεβιοτικού δείκτη

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων, υπολογίστηκε ο πρεβιοτικός δείκτης στο σύνολο των εθελοντριών, σε κάθε ομάδα (ανάλογα με την οστική υγεία) αλλά και σε κάθε εθελόντρια ξεχωριστά, ώστε να διερευνηθεί η βιοποικιλότητα του εμβολίου. Τα αποτελέσματα διαμορφώθηκαν ως εξής:



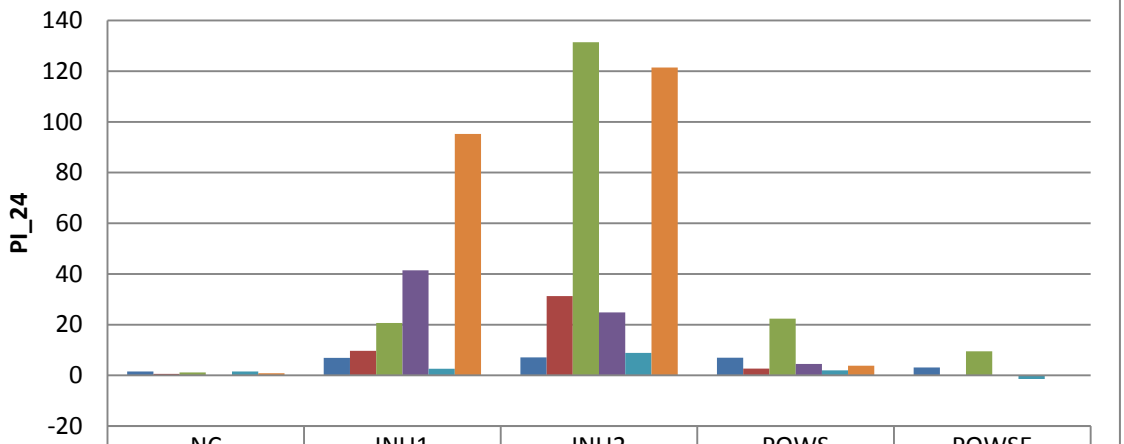
	NC	INU1	INU2	POWS	POWSE
PI_24-All	4,71E-01	8,64E+00	3,56E+01	8,04E+00	4,64E-01
PI_24-Osteop	1,04E+00	2,54E+00	7,34E+00	3,18E+00	-1,46E+00
PI_24-Healthy	1,39E+00	5,94E+01	2,49E+02	3,89E+01	1,24E+01

Διάγραμμα 4:Πρεβιοτικός δείκτης (PI_24) στο σύνολο των εθελοντριών και σε κάθε ομάδα ξεχωριστά. NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), POWS: Μανιτάρι Pleurotus ostreatus WS LGAM1123, POWSE: Εκχύλισμα μανιταριού Pleurotus ostreatus WS LGAM1123.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρούμε ότι ο πρεβιοτικός δείκτης μετά τις 24h, είναι θετικός στο σύνολο των γυναικών με μεγαλύτερη αύξηση στα υποστρώματα της ινουλίνης 1% και 2%. Όσον αφορά τα υποστρώματα του μανιταριού και το εκχύλισμά του, παρατηρείται μεγαλύτερη αύξηση στο POWS συγκριτικά με το POWSE.

Με βάση την οστική υγεία, ο πρεβιοτικός δείκτης ήταν θετικός στην πλειονότητα των υποστρωμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα υποστρώματα της ινουλίνης και του μανιταριού εμφάνισαν θετικό πρεβιοτικό δείκτη και στις 2 ομάδες γυναικών, ενώ το εκχύλισμα εμφάνισε μία πιο διφορούμενη δράση, αφού ο PI των εθελοντριών με παθολογική οστική μάζα βρέθηκε αρνητικός. Επίσης, φάνηκε ότι ο πρεβιοτικός δείκτης στις εθελόντριες με υγιή οστική μάζα ήταν περισσότερο αυξημένος συγκριτικά με τις εθελόντριες με παθολογική οστική μάζα. Συγκεκριμένα παρατηρείται μεγάλη πρεβιοτική δράση των υποστρωμάτων INU1 & INU2 αλλά και του POWS. Αυτό, πρακτικά σημαίνει ότι υπάρχει αύξηση των πληθυσμών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* μετά την ολοκλήρωση της 24ωρης ζύμωσης. Αντίθετα το εκχύλισμα φαίνεται να ευνοεί την αύξηση των *Bacteroides* spp., τόσο στο σύνολο των εθελοντριών όσο και στην ομάδα της οστεοπενίας. Το γεγονός αυτό μειώνει τον πρεβιοτικό δείκτη.

Όσον αφορά τον πρεβιοτικό δείκτη για κάθε εθελόντρια, τα αποτελέσματα παρατίθενται στο επόμενο διάγραμμα.



	NC	INU1	INU2	POWS	POWSE
1η	1,514050738	6,924043424	7,090361707	6,993068907	3,13300701
2η	0,572899126	9,669327883	31,29466978	2,672588186	-0,004245609
3η	1,16731983	20,68700241	131,4579829	22,40340068	9,498066341
4η	-0,02010148	41,43837587	24,85392556	4,525108238	0,033645529
5η	1,514447358	2,619040499	8,88373522	1,991348129	-1,446013567
6η	0,829410639	95,2412502	121,4254552	3,797299717	-0,258075452

Διάγραμμα 5:Πρεβιοτικός δείκτης (PI_24), για κάθε εθελόντρια ξεχωριστά. NC: Αρνητικός μάρτυρας, INU1: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), INU2: Ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v), POWS: Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123, POWSE: Εκχύλισμα μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123. Εθελόντριες $1^{η}$, $2^{η}$ και $5^{η}$: παθολογική οστική μάζα. Εθελόντριες $3^{η}$,$4^{η}$ και $6^{η}$: υγιής οστική μάζα.

Από τους υπολογισμούς, ο πρεβιοτικός δείκτης βρέθηκε θετικός, στην πλειονότητα των υποστρωμάτων, με τη μεγαλύτερη αύξηση στα υποστρώματα της ινουλίνης. Όσον αφορά τα υποστρώματα του μανιταριού (POWS) και του εκχυλίσματός του (POWSE) παρατηρήθηκε ότι το μανιτάρι λειτούργησε ευεργετικά στον εντερικό μικροβιόκοσμο των εθελοντριών, ενώ στο εκχύλισμα, ο πρεβιοτικός δείκτης εμφάνισε αρνητικές τιμές στις 3 από τις 6 εθελόντριες.

1.5.Συζήτηση

Το ανθρώπινο μικροβίωμα αναφέρεται συχνά ως το δεύτερο γονιδίωμά μας και μπορεί να επηρεάσει την έκφραση της γενετικής πληροφορίας, την ανοσορρύθμιση και τον μεταβολισμό του ξενιστή (Grice EA, 2012, Solt I, 2011). Η μικροβιακή ανάλυση και η ανίχνευση των βακτηρίων σε συγκεκριμένα δείγματα μπορεί να πραγματοποιηθεί με βάση την αλληλουχία του DNA των μικροβίων. Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην επίδραση του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* στον εντερικό μικροβιόκοσμο και τον οστικό μεταβολισμό. Επιλέχθηκαν μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (n=6), ηλικίας 55-65ετών (±3 έτη) με Δείκτη Μάζας Σώματος < 30 kg/m^2, εκ των οποίων οι 3 είχαν φυσιολογική οστική μάζα ενώ οι άλλες 3 ήταν οστεοπενικές. Πραγματοποιήθηκε ανθρωπομετρία και διατροφική αξιολόγηση σε κάθε εθελόντρια. Από τα

αποτελέσματα φάνηκε ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος, των γυναικών με οστεοπενία, διαφοροποιήθηκε περισσότερο, συγκριτικά με τον εντερικό μικροβιόκοσμο των γυναικών με υγιή οστική μάζα.

Η διαδικασία της Real Time-PCR, ανέδειξε στατιστικά σημαντική αύξηση των *Bifidobacteria*, στην ομάδα των γυναικών με παθολογική οστική μάζα στα υποστρώματα της ινουλίνης 1% και 2%, καθώς και στο υπόστρωμα του μανιταριού. Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι η ινουλίνη επάγει την ανάπτυξη των *Bifidobacterium* (Rycroft et al., 2001, Wang, 1993, Gibson, 1995, Ramirez-Farias et al., 2009). Τα *Bifidobacteria* βρίσκονται φυσιολογικά στον γαστρεντερικό σωλήνα υγιών ενήλικων ανθρώπων και έχει παρατηρηθεί μία ισχυρή συσχέτιση αυτών με τη ζύμωση ολιγοσακχαριτών. Επομένως τα *Bifidobacteria* αποτελούν έναν χαρακτηριστικό παράγοντα για τον πρεβιοτικό δείκτη. Το γένος *Bifidobacterium* είναι το μοναδικό, από τα γένη των βακτηρίων που δεν παράγει αέρια σαν τελικό προϊόν του μεταβολισμού του (Buchanan, 1974), καθώς επίσης δεν παράγουν καρκινογόνες ουσίες *in vivo*. Όπως και το *Lactobacillus*, τα *Bifidobacteria* είναι σακχαρολυτικά και συχνά θεωρούνται ευεργετικό χαρακτηριστικό (Salyers, 1979).

Από τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων στο σύνολο των εθελοντριών, στον χρόνο t=24h, φάνηκε μία στατιστικά σημαντική αύξηση των *Bacteroides* στο εκχύλισμα του μανιταριού, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (NC) και με το μανιτάρι (POWS). Όσον αφορά τη σύγκριση του αρνητικού μάρτυρα (NC) με το υπόστρωμα του μανιταριού (POWS) δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Ωστόσο, παρατηρήθηκε μία τάση για αύξηση των βακτηρίων στο υπόστρωμα της ινουλίνης 2% συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα αλλά και με το μανιτάρι. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα είδη *Bacteroides* είναι και αυτά, σακχαρολυτικά βακτήρια, και συμμετέχουν σε πολλές ευεργετικές διαδικασίες στον οργανισμό του ξενιστή συμπεριλαμβανομένης της ανοσσορύθμισης. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της διαμεσολάβησής τους για την ενεργοποίηση των Τ-κυττάρων, της βοήθειάς τους στην ανάπτυξη του λεμφοειδή ιστού που σχετίζεται με το έντερο (GALT, gut associated lymphoid tissues) καθώς και της ικανότητάς τους να αποτρέπουν τον αποικισμό, στον γαστρεντερικό σωλήνα, από παθογόνους μικροοργανισμούς. Ωστόσο μπορούν να παράγουν διαφορετικούς τύπους τοξινών και ανταγωνίζονται συγγενικά είδη του εντερικού μικροβιόκοσμου, επομένως είναι απαραίτητο να διατηρείται μία ισορροπία, όσον αφορά τον πληθυσμό των *Bacteroides* (Wexler, 2007, Chatzidaki-Livanis et al., 2017). Από τα παραπάνω μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το υπόστρωμα του μανιταριού (POWS) μπορεί να λειτουργεί προστατευτικά συγκριτικά με την ινουλίνη αλλά και με το εκχύλισμά του (POWSE).

Αναφορικά με τις εθελόντριες με παθολογική οστική μάζα φάνηκε μία, αντίστοιχη, στατιστικά σημαντική αύξηση των *Bacteroides* στον χρόνο t=24h, στο εκχύλισμα του μανιταριού (POWSE) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα (NC). Αναφορικά με τα *Clostridium leptum* δεν φάνηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Ωστόσο, παρατηρείται μία τάση για αύξηση των *F.prausnitzii*, η οποία οφείλεται κυρίως στην στατιστικά σημαντική αύξηση του βακτηρίου στο υπόστρωμα του μανιταριού συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Τα βακτήρια *Clostridium leptum group* αποτελούν την κυριότερη ομάδα βακτηρίων των ανθρώπινων κοπράνων, καταλαμβάνοντας το 16-25% του εντερικού μικροβιόκοσμου (Sghir A, 2000, Lay C, 2005). Αυτή η ομάδα, ονομάζεται και *Clostridial cluster IV* και περιλαμβάνει το *Faecalibacterium prausnitzii* και ορισμένα είδη του *Eubacterium* και *Ruminococcus* (Collins MD, 1994). Τα *Clostridium leptum group* συνεργάζονται με άλλα βακτήρια του εντερικού μικροβιόκοσμου για τη ζύμωση άπεπτων υδατανθράκων της δίαιτας, παράγοντας λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs), εκ των οποίων το βουτυρικό οξύ είναι η κύρια πηγή ενέργειας για το επιθήλιο του παχέος εντέρου, επηρεάζοντας σημαντικά τη λειτουργία του. Το *F. prausnitzii* βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία και αποτελεί το κυριότερο βουτυροπαραγωγό βακτήριο αυτής της ομάδας (Louis P, 2009). Επίσης έχει συνδεθεί με αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις στη γαστρεντερική οδό, κάτι που το καθιστά από τα σημαντικότερα βακτήρια του εντερικού μικροβιόκοσμου (Sokol H, 2008).

Από τις συγκρίσεις που πραγματοποιήθηκαν στους μικροβιακούς πληθυσμούς μετά την 24ωρη ζύμωση φάνηκαν στατιστικά σημαντικές αυξήσεις στην πλειονότητα των βακτηρίων. Αναφορικά με το *Clostridium perfringens* δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Αξίζει να σημειωθεί ότι το *Clostridium perfringens* είναι ένα από τα πιο κοινά παθογόνα κλωστρίδια. Μπορεί να προκαλέσει οξεία τροφική δηλητηρίαση, γάγγραινα, γαστρεντερικές ασθένειες συμπεριλαμβανομένης της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας, διάρροια σχετιζόμενη με αντιβιοτικά καθώς και ενδονοσοκομειακή διάρροια σε ανθρώπους και ιδιαίτερα σε άτομα με ανώριμο ή εξασθενημένο ανοσοποιητικό σύστημα (Uzal, 2014).

Αντίθετα, η *Roseburia* εμφάνισε μία στατιστικά σημαντική μείωση στον αρνητικό μάρτυρα αλλά και στο εκχύλισμα του μανιταριού, μετά από 24ωρη ζύμωση, στο σύνολο των γυναικών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η *Roseburia* ίσως να καταστέλλεται από την συνύπαρξη με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς, εφόσον παρατηρείται και μία γενικότερη μείωση και στα υπόλοιπα υποστρώματα, στις 24 ώρες. Επίσης τα βακτήρια του γένους *Roseburia* είναι υποχρεωτικά αναερόβια και έχει αναφερθεί ότι είναι δύσκολη η ζύμωση σε καλλιέργειες. Τα βακτήρια αυτά που υπάρχουν στο ανθρώπινο έντερο, μεταβολίζουν συστατικά της διατροφής του ανθρώπου, τα οποία διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τον μεταβολισμό

τους. Είναι μέρος των βακτηρίων που παράγουν λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, κυρίως βουτυρικού οξέος, επηρεάζουν την κινητικότητα του παχέος εντέρου, την διατήρηση του ανοσοποιητικού συστήματος και διαθέτουν αντιφλεγμονώδη δράση (Zohreh Tamanai-Shacoori, 2017).

Ο υπολογισμός του πρεβιοτικού δείκτη βρέθηκε θετικός στο σύνολο των γυναικών και φάνηκε περισσότερο αυξημένος στα υποστρώματα της ινουλίνης 1% και 2%. Η αύξηση αυτή θα μπορούσε να οφείλεται σε δοσοεξαρτώμενη δράση της ινουλίνης αφού, καθώς αυξάνεται η περιεκτικότητα της ινουλίνης, αυξάνεται και ο πρεβιοτικός δείκτης. Επίσης παρατηρήθηκε μεγαλύτερη αύξηση του πρεβιοτικού δείκτη στο μανιτάρι συγκριτικά με το εκχύλισμα. Αντίστοιχη αύξηση παρατηρήθηκε και στην ομάδα των υγιών γυναικών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ινουλίνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευκολότερα από τα βακτήρια αφού είναι καθαρός υδατάνθρακας, συγκριτικά με το μανιτάρι, κάτι που θα μπορούσε να εξηγήσει την διαφορά μεταξύ της ινουλίνης και του μανιταριού. Ωστόσο το *Pleurotus ostreatus* περιέχει μακροθρεπτικά και μικροθρεπτικά συστατικά, τα οποία λειτουργούν ευεργετικά για τον ανθρώπινο οργανισμό. Όσον αφορά τις γυναίκες με οστεοπενία ο πρεβιοτικός δείκτης εμφάνισε αρνητική τιμή στο εκχύλισμα του μανιταριού. Το τελευταίο μπορεί να οφείλεται στην στατιστικά σημαντική αύξηση των *Bacteroides* στο υπόστρωμα του POWSE, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Έπειτα από τον υπολογισμό του πρεβιοτικού δείκτη για κάθε εθελόντρια και τη σύγκριση μεταξύ τους, παρατηρήθηκε μεγάλη διαφοροποίηση των τιμών. Επομένως, υπάρχει και μεγάλη διαφοροποίηση της σύστασης του εμβολίου, ανεξάρτητα με την οστική υγεία της κάθε εθελόντριας. Το μέγεθος του δείγματος, στη συγκεκριμένη μελέτη, αποτελεί περιορισμό για την εξαγωγή κάποιου συμπεράσματος όσον αφορά τον πρεβιοτικό δείκτη και την οστική υγεία.

Συνοψίζοντας, ο ανθρώπινος εντερικός μικροβιόκοσμος έχει γίνει αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης τα τελευταία χρόνια, αφού έχει φανεί ότι συμβάλλει σε πληθώρα μεταβολικών διεργασιών, επηρεάζοντας σημαντικά τον ξενιστή. Παρόλα αυτά η διαφοροποίηση του μικροβιόκοσμου ανάμεσα στους ανθρώπους είναι μεγάλη κάτι που επιβάλλει την εξατομίκευση τόσο σε θεραπεία, σε περίπτωση παθήσεων σχετιζόμενες με δυσβίωση, όσο και σε διατροφή. Τέλος, λόγω της πολυπλοκότητας του εντερικού μικροβιόκοσμου, απαιτούνται περισσότερες, τυχαιοποιημένες και καλά σχεδιασμένες μελέτες, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την χρήση πρεβιοτικών (π.χ. μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* και ινουλίνη), την επίδραση αυτών και τον μηχανισμό δράσης τους στον οστικό μεταβολισμό.

Βιβλιογραφία

A. DUNDAR, H. A. A. A. Y. 2008. Yield performances and nutritional contents of three oyster mushroom species cultivated on wheat stalk. *Afr. J. Biotechnol.,* 7**,** 3497-3501.

A. DUNDAR, H. A. A. A. Y. 2009. Effect of using different lignocellulosic wastes for cultivation of Pleurotus ostreatus (Jacq.) P. Kumm. on mushroom yield, chemical composition and nutritional value. *Afr. J. Biotechnol.,* 8**,** 662-666.

A. N. SHIVRINA, L. N. K. A. P. A. Y. (ed.) 1965. *Vitamin B12 content of polyporaceae and Agaricus strains,* Kormovya Belk: i. Fiziol. Aktiyn. Veshchestva Dlya Zhivotnovadstva, Akad. Nauk., SSSR.

ABRAMS, S. A., GRIFFIN, I. J., HAWTHORNE, K. M., LIANG, L., GUNN, S. K., DARLINGTON, G. & ELLIS, K. J. 2005. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *Am J Clin Nutr,* 82**,** 471-6.

ABUGRI DA, M. W., WILLIAN KR 2016. Fatty Acid Profiling in Selected Cultivated Edible and Wild Medicinal Mushrooms in Southern United States. *J Exp Food Chem* 2**,** 1-7.

ALVES, M. J., FERREIRA, I. C., DIAS, J., TEIXEIRA, V., MARTINS, A. & PINTADO, M. 2012. A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Med,* 78**,** 1707-18.

ANDERSEN, T. L., SONDERGAARD, T. E., SKORZYNSKA, K. E., DAGNAES-HANSEN, F., PLESNER, T. L., HAUGE, E. M., PLESNER, T. & DELAISSE, J. M. 2009. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *Am J Pathol,* 174**,** 239-47.

ANDRIY SYNYTSYA, K. M., ALLA SYNYTSYA, IVAN JABLONSKY, JIRÍ SPEVÁCEK, VLADIMÍR ERBAN, & ELIŠKA KOVÁRÍKOVÁ, J. C. 2009. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms Pleurotus ostreatus and Pleurotus eryngii: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers,* 76**,** 548-556.

BADDINI FEITOZA, A., FERNANDES PEREIRA, A., FERREIRA DA COSTA, N. & GONCALVES RIBEIRO, B. 2009. Conjugated linoleic acid (CLA): effect modulation of body composition and lipid profile. *Nutr Hosp,* 24**,** 422-8.

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.

BATBAYAR, S., LEE, D. H. & KIM, H. W. 2012. Immunomodulation of Fungal beta-Glucan in Host Defense Signaling by Dectin-1. *Biomol Ther (Seoul),* 20**,** 433-45.

BAUER PETROVSKA, B. 2001. Protein Fraction in Edible Macedonian Mushrooms. *European Food Research and Technology,* 212**,** 469-472.

BERGMAN, E. N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev,* 70**,** 567-90.

BINDER, H. J. 2010. Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea. *Annu Rev Physiol,* 72**,** 297-313.

BLOUIN, J. M., PENOT, G., COLLINET, M., NACFER, M., FOREST, C., LAURENT-PUIG, P., COUMOUL, X., BAROUKI, R., BENELLI, C. & BORTOLI, S. 2011. Butyrate elicits a metabolic switch in human colon cancer cells by targeting the pyruvate dehydrogenase complex. *Int J Cancer,* 128**,** 2591-601.

BOBEK, P. & GALBAVY, S. 2001. Effect of pleuran (beta-glucan from Pleurotus ostreatus) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon. *Br J Biomed Sci,* 58**,** 164-8.

BONJOUR, J. P., KOHRT, W., LEVASSEUR, R., WARREN, M., WHITING, S. & KRAENZLIN, M. 2014. Biochemical markers for assessment of calcium economy and bone metabolism: application in clinical trials from pharmaceutical agents to nutritional products. *Nutr Res Rev,* 27**,** 252-67.

BORCHERS, A. T., KEEN, C. L. & GERSHWIN, M. E. 2004. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. *Exp Biol Med (Maywood),* 229**,** 393-406.

BREUER, R. I., BUTO, S. K., CHRIST, M. L., BEAN, J., VERNIA, P., PAOLUZI, P., DI PAOLO, M. C. & CAPRILLI, R. 1991. Rectal irrigation with short-chain fatty acids for distal ulcerative colitis. Preliminary report. *Dig Dis Sci,* 36**,** 185-7.

BROWN, G. D. & GORDON, S. 2005. Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cell Microbiol,* 7**,** 471-9.

BUCHANAN, R. G., N. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,* Baltimore, MD, USA,.

CARABIN, I. G. & FLAMM, W. G. 1999. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regul Toxicol Pharmacol,* 30**,** 268-82.

CHARATCHAROENWITTHAYA, N., KHOSLA, S., ATKINSON, E. J., MCCREADY, L. K. & RIGGS, B. L. 2007. Effect of blockade of TNF-alpha and interleukin-1 action on bone resorption in early postmenopausal women. *J Bone Miner Res,* 22**,** 724-9.

CHATZIDAKI-LIVANIS, M., COYNE, M. J., ROELOFS, K. G., GENTYALA, R. R., CALDWELL, J. M. & COMSTOCK, L. E. 2017. Gut Symbiont Bacteroides fragilis Secretes a Eukaryotic-Like Ubiquitin Protein That Mediates Intraspecies Antagonism. *MBio,* 8.

CLARKE, S. F., MURPHY, E. F., NILAWEERA, K., ROSS, P. R., SHANAHAN, F., O'TOOLE, P. W. & COTTER, P. D. 2012. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. *Gut Microbes,* 3**,** 186-202.

CLAYTON, T. A., BAKER, D., LINDON, J. C., EVERETT, J. R. & NICHOLSON, J. K. 2009. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 106**,** 14728-33.

COLLINS MD, L. P., WILLEMS A, CORDOBA JJ, FERNANDEZ-GARAYZABAL J, GARCIA P, CAI J, HIPPE H, FARROW JA 1994. The phylogeny of the genus Clostridium: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol,* 44**,** 812**–**26.

CONLON, M. A. & BIRD, A. R. 2014. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients,* 7**,** 17-44.

COOK, S. I. & SELLIN, J. H. 1998. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther,* 12**,** 499-507.

COUSSEMENT, P. A. 1999. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. *J Nutr,* 129**,** 1412S-7S.

CUTCLIFE, M. S. A. J. A. 1989. Fructan in Onion Bulbs in Relation to Storage Life. *Canadian Journal of Plant Science,* 69**,** 1327-1333.

DALONSO, N., GOLDMAN, G. H. & GERN, R. M. 2015. beta-(1-->3),(1-->6)-Glucans: medicinal activities, characterization, biosynthesis and new horizons. *Appl Microbiol Biotechnol,* 99**,** 7893-906.

DAWSON, A. M., HOLDSWORTH, C. D. & WEBB, J. 1964. Absorption of Short Chain Fatty Acids in Man. *Proc Soc Exp Biol Med,* 117**,** 97-100.

DE BIASE, D. & PENNACCHIETTI, E. 2012. Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in orally acquired bacteria: function, distribution and biomedical implications of the gadBC operon. *Mol Microbiol,* 86**,** 770-86.

DE LUIS, D. A., DE LA FUENTE, B., IZAOLA, O., CONDE, R., GUTIERREZ, S., MORILLO, M. & TEBA TORRES, C. 2010. [Randomized clinical trial with a inulin enriched cookie on risk cardiovascular factor in obese patients]. *Nutr Hosp,* 25**,** 53-9.

DELZENNE, N. M., DAUBIOUL, C., NEYRINCK, A., LASA, M. & TAPER, H. S. 2002. Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. *Br J Nutr,* 87 Suppl 2**,** S255-9.

DEVILLARD, E., MCINTOSH, F. M., DUNCAN, S. H. & WALLACE, R. J. 2007. Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid. *J Bacteriol,* 189**,** 2566-70.

DEVILLARD, E., MCINTOSH, F. M., PAILLARD, D., THOMAS, N. A., SHINGFIELD, K. J. & WALLACE, R. J. 2009. Differences between human subjects in the composition of the faecal bacterial community and faecal metabolism of linoleic acid. *Microbiology,* 155**,** 513-20.

DI SABATINO, A., MORERA, R., CICCOCIOPPO, R., CAZZOLA, P., GOTTI, S., TINOZZI, F. P., TINOZZI, S. & CORAZZA, G. R. 2005. Oral butyrate for mildly to moderately active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther,* 22**,** 789-94.

DING, C., PARAMESWARAN, V., UDAYAN, R., BURGESS, J. & JONES, G. 2008. Circulating levels of inflammatory markers predict change in bone mineral density and resorption in older adults: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab,* 93**,** 1952-8.

DONOHOE, D. R., GARGE, N., ZHANG, X., SUN, W., O'CONNELL, T. M., BUNGER, M. K. & BULTMAN, S. J. 2011. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab,* 13**,** 517-26.

ELEFTERIOU, F., AHN, J. D., TAKEDA, S., STARBUCK, M., YANG, X., LIU, X., KONDO, H., RICHARDS, W. G., BANNON, T. W., NODA, M., CLEMENT, K., VAISSE, C. & KARSENTY, G. 2005. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature,* 434**,** 514-20.

ERIKSSON, A. L., MOVERARE-SKRTIC, S., LJUNGGREN, O., KARLSSON, M., MELLSTROM, D. & OHLSSON, C. 2014. High-sensitivity CRP is an independent risk factor for all fractures and vertebral fractures in elderly men: the MrOS Sweden study. *J Bone Miner Res,* 29**,** 418-23.

FEMIA, A. P., LUCERI, C., DOLARA, P., GIANNINI, A., BIGGERI, A., SALVADORI, M., CLUNE, Y., COLLINS, K. J., PAGLIERANI, M. & CADERNI, G. 2002. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis,* 23**,** 1953-60.

FENG, J., TANG, H., LI, M., PANG, X., WANG, L., ZHANG, M., ZHAO, Y., ZHANG, X. & SHEN, J. 2014. The abundance of fecal Faecalibacterium prausnitzii in relation to obesity and gender in Chinese adults. *Arch Microbiol,* 196**,** 73-7.

FERNANDES, A., BARROS, L., MARTINS, A., HERBERT, P. & FERREIRA, I. C. 2015. Nutritional characterisation of Pleurotus ostreatus (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. produced using paper scraps as substrate. *Food Chem,* 169**,** 396-400.

G. JAWORSKA, K. P., E. BERNAS AND A. DUDA-CHODAK 2015. Nutraceuticals and antioxidant activity of prepared for consumption commercial mushrooms Agaricus bis porus and Pleurotus ostreatus. *J. Food Qual.,* 38**,** 111-122.

GAO, Z., YIN, J., ZHANG, J., WARD, R. E., MARTIN, R. J., LEFEVRE, M., CEFALU, W. T. & YE, J. 2009. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes,* 58**,** 1509-17.

GIBSON, G. R. & ROBERFROID, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr,* 125**,** 1401-12.

GIBSON, G. R. B., E.R. WANG, X. CUMMINGS, J.H. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology,* 108**,** 975–982.

GOGAVEKAR, S. S., ROKADE, S. A., RANVEER, R. C., GHOSH, J. S., KALYANI, D. C. & SAHOO, A. K. 2014. Important nutritional constituents, flavour components, antioxidant and antibacterial properties of Pleurotus sajor-caju. *J Food Sci Technol,* 51**,** 1483-91.

GRICE EA, S. J. 2012. The human microbiome: our second genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics,* 13**,** 151-170.

GUINANE, C. M. & COTTER, P. D. 2013. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therap Adv Gastroenterol,* 6**,** 295-308.

GUPTA, A., SHARMA, S., SAHA, S. & WALIA, S. 2013. Yield and nutritional content of Pleurotus sajor caju on wheat straw supplemented with raw and detoxified mahua cake. *Food Chem,* 141**,** 4231-9.

H. HIDAKA, T. E., T. TAKIZAWA, T. TOKUNAGA AND Y. TASHIRO 1986. Effects of Fructooligosaccharides on Intestinal Flora and Human Health. *Bifidobacteria and Microflora,* 5**,** 37-50.

HAMER, H. M., JONKERS, D., VENEMA, K., VANHOUTVIN, S., TROOST, F. J. & BRUMMER, R. J. 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther,* 27**,** 104-19.

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**,** 41-45.

HARIG, J. M., SOERGEL, K. H., KOMOROWSKI, R. A. & WOOD, C. M. 1989. Treatment of diversion colitis with short-chain-fatty acid irrigation. *N Engl J Med,* 320**,** 23-8.

HOOPER, L. V., WONG, M. H., THELIN, A., HANSSON, L., FALK, P. G. & GORDON, J. I. 2001. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science,* 291**,** 881-4.

HOUGHTON, D., STEWART, C. J., DAY, C. P. & TRENELL, M. 2016. Gut Microbiota and Lifestyle Interventions in NAFLD. *Int J Mol Sci,* 17**,** 447.

HU, G. X., CHEN, G. R., XU, H., GE, R. S. & LIN, J. 2010. Activation of the AMP activated protein kinase by short-chain fatty acids is the main mechanism underlying the beneficial effect of a high fiber diet on the metabolic syndrome. *Med Hypotheses,* 74**,** 123-6.

I. SCHNEIDER, G. K., A. MEYER, U. KRINGS, R. G. BERGER AND A. HAHN 2011. Lipid lowering effects of oyster mushroom (Pleurotus ostreatus) in humans. *J. Funct. Foods,* 3**,** 17-24.

JANDHYALA, S. M., TALUKDAR, R., SUBRAMANYAM, C., VUYYURU, H., SASIKALA, M. & NAGESHWAR REDDY, D. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol,* 21**,** 8787-803.

JAYASURIYA, W. J., WANIGATUNGE, C. A., FERNANDO, G. H., ABEYTUNGA, D. T. & SURESH, T. S. 2015. Hypoglycaemic activity of culinary Pleurotus ostreatus and P. cystidiosus mushrooms in healthy volunteers and type 2 diabetic patients on diet control and the possible mechanisms of action. *Phytother Res,* 29**,** 303-9.

JUNLONG WANG JI ZHANG, B. Z., XIAOFANG WANG, YIQIAN WU, JIAN YAO 2009. A comparison study on microwave-assisted extraction of Potentilla anserina L. polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation. *Carbohydrate Polymers,* 80**,** 84-93.

KALAC, P. 2013. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *J Sci Food Agric,* 93**,** 209-18.

KALAČ, P. 2009. Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry,* 113**,** 9-16.

KANG, M. J., KIM, H. G., KIM, J. S., OH, D. G., UM, Y. J., SEO, C. S., HAN, J. W., CHO, H. J., KIM, G. H., JEONG, T. C. & JEONG, H. G. 2013. The effect of gut microbiota on drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol,* 9**,** 1295-308.

KANIS, J. A., MELTON, L. J., 3RD, CHRISTIANSEN, C., JOHNSTON, C. C. & KHALTAEV, N. 1994. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res,* 9**,** 1137-41.

KATSIMBRI, P. 2017. The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl),* 26.

KAUR, N. & GUPTA, A. K. 2002. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *J Biosci,* 27**,** 703-14.

KONG, Y. Y., FEIGE, U., SAROSI, I., BOLON, B., TAFURI, A., MORONY, S., CAPPARELLI, C., LI, J., ELLIOTT, R., MCCABE, S., WONG, T., CAMPAGNUOLO, G., MORAN, E., BOGOCH, E. R., VAN, G., NGUYEN, L. T., OHASHI, P. S., LACEY, D. L., FISH, E., BOYLE, W. J. & PENNINGER, J. M. 1999. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature,* 402**,** 304-9.

KOUTROTSIOS, G., KALOGEROPOULOS, N., STATHOPOULOS, P., KALIORA, A. C. & ZERVAKIS, G. I. 2017. Bioactive compounds and antioxidant activity exhibit high intraspecific variability in Pleurotus ostreatus mushrooms and correlate well with cultivation performance parameters. *World J Microbiol Biotechnol,* 33**,** 98.

KOUTROTSIOS, G., MOUNTZOURIS, K. C., CHATZIPAVLIDIS, I. & ZERVAKIS, G. I. 2014. Bioconversion of lignocellulosic residues by Agrocybe cylindracea and Pleurotus ostreatus mushroom fungi--assessment of their effect on the final product and spent substrate properties. *Food Chem,* 161**,** 127-35.

L. ANCONA MENDEZ, C. A. S. C., R. BELMAR CASSO AND C. M. CAPETILLO LEAL 2005. Effect of substrate and harvest on the amino acid profile of oyster mushroom (Pleurotus ostreatus). *J. Food Compos. Anal.,* 18**,** 447-450.

L. KATHLEEN MAHAN, S. E.-S. 2014. *Krause's Κλινική Διατροφή,* Αθήνα, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.

LAVI, I., FRIESEM, D., GERESH, S., HADAR, Y. & SCHWARTZ, B. 2006. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom Pleurotus ostreatus induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. *Cancer Lett,* 244**,** 61-70.

LAY C, R.-G. L., HOLMSTRØM K, RAJILIC M, VAUGHAN EE, DE VOS WM, COLLINS MD, THIEL R, NAMSOLLECK P, BLAUT M, DORÉ J. 2005. Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol,* 71**,** 4153–5.

LI, J.-Y. C. B. R. M. A. J. N. W. M. G. A. P. R. 2014. *Gut microbiota plays a pivotal role in the bone loss induced by sex steroid deficiency.*, J. Bone Miner. Res. 29.

LI, J. Y., TAWFEEK, H., BEDI, B., YANG, X., ADAMS, J., GAO, K. Y., ZAYZAFOON, M., WEITZMANN, M. N. & PACIFICI, R. 2011. Ovariectomy disregulates osteoblast and osteoclast formation through the T-cell receptor CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 108**,** 768-73.

LIN, C. S., CHANG, C. J., LU, C. C., MARTEL, J., OJCIUS, D. M., KO, Y. F., YOUNG, J. D. & LAI, H. C. 2014. Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease. *Biomed J,* 37**,** 259-68.

LINDEQUIST, U., NIEDERMEYER, T. H. & JULICH, W. D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med,* 2**,** 285-99.

LOUIS P, F. H. 2009. Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiol Lett,* 294**,** 1-8.

M. B. K. CHOUDHURY, T. R., A. J. KAKON, N. HOQUE, M. AKHTARUZZAMAN, M. M. BEGUM, M. S. K. CHOUDHURI AND M. S. HOSSAIN 2013. Effects of Pleurotus ostreatus on blood pressure and glycemic status of hypertensive diabetic male volunteers. *Bangladesh J. Med. Biochem.,* 6**,** 5-10.

M. F. DA PAZ, C. A. B., R. F. LONGHI AND M. S. V. P. OVIEDO 2012. Determining the basic composition and total phenolic compounds of Pleurotus sajor-caju cultivated in three different substrates by solid state bioprocess. *J. Biotechnol. Biodiversity,* 3**,** 11-14.

MACFARLANE, S. & MACFARLANE, G. T. 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc,* 62**,** 67-72.

MARIN, L., MIGUELEZ, E. M., VILLAR, C. J. & LOMBO, F. 2015. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int,* 2015**,** 905215.

MARTIN-MILLAN, M., ALMEIDA, M., AMBROGINI, E., HAN, L., ZHAO, H., WEINSTEIN, R. S., JILKA, R. L., O'BRIEN, C. A. & MANOLAGAS, S. C. 2010. The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. *Mol Endocrinol,* 24**,** 323-34.

MATTILA, P., KONKO, K., EUROLA, M., PIHLAVA, J. M., ASTOLA, J., VAHTERISTO, L., HIETANIEMI, V., KUMPULAINEN, J., VALTONEN, M. & PIIRONEN, V. 2001. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J Agric Food Chem,* 49**,** 2343-8.

MATTILA, P., SALO-VAANANEN, P., KONKO, K., ARO, H. & JALAVA, T. 2002. Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland. *J Agric Food Chem,* 50**,** 6419-22.

MCCLEARY, B. V. & DRAGA, A. 2016. Measurement of beta-Glucan in Mushrooms and Mycelial Products. *J AOAC Int,* 99**,** 364-73.

MENNE, E., GUGGENBUHL, N. & ROBERFROID, M. 2000. Fn-type chicory inulin hydrolysate has a prebiotic effect in humans. *J Nutr,* 130**,** 1197-9.

MHANDA, F. N., KADHILA-MUANDINGI, N. P., & UEITELE, I. S. E. 2015. Minerals and trace elements in domesticated Namibian Ganoderma species. *African Journal of Biotechnology,* 14**,** 3216-3218.

N. C. CARPITA, J. K. A. T. L. H. 1989. Linkage Structure of Fructans and Fructan Oligomers from Triticum Astivum and Fistuca Arundinaceae Leaves. *Journal of Plant Physiology,* 134**,** 162-168.

NADKARNI, M. A., MARTIN, F. E., JACQUES, N. A. & HUNTER, N. 2002. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology,* 148**,** 257-66.

NAKAMURA, T., IMAI, Y., MATSUMOTO, T., SATO, S., TAKEUCHI, K., IGARASHI, K., HARADA, Y., AZUMA, Y., KRUST, A., YAMAMOTO, Y., NISHINA, H., TAKEDA, S., TAKAYANAGI, H., METZGER, D., KANNO, J., TAKAOKA, K., MARTIN, T. J., CHAMBON, P. & KATO, S. 2007. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell,* 130**,** 811-23.

NG, S. H., ROBERT, S. D., WAN AHMAD, W. A. & WAN ISHAK, W. R. 2017. Incorporation of dietary fibre-rich oyster mushroom (Pleurotus sajor-caju) powder improves postprandial glycaemic response by interfering with starch granule structure and starch digestibility of biscuit. *Food Chem,* 227**,** 358-368.

OHLSSON, C. & SJOGREN, K. 2015. Effects of the gut microbiota on bone mass. *Trends Endocrinol Metab,* 26**,** 69-74.

OKU, T. 1994. Special Physiological Functions of Newly Developed Mono and Oligosaccharides. *Functional Foods.* I. Goldberg ed. Boston, MA: Springer.

OLANO-MARTIN, E., GIBSON, G. R. & RASTELL, R. A. 2002. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *J Appl Microbiol,* 93**,** 505-11.

OLANO-MARTIN, E., MOUNTZOURIS, K. C., GIBSON, G. R. & RASTALL, R. A. 2000. In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *Br J Nutr,* 83**,** 247-55.

P. MANZI, A. A. A. L. P. 2001. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chem.,* 73**,** 321-325.

P. MANZI, L. G., S. MARCONI, V. VIVANTI AND L. PIZZOFERRATO 1999. Nutrients in edible mushrooms: an interspecies comparative study. *Food Chem.,* 65**,** 477-482.

P. MANZI, S. M., A. AGUZZI AND L. PIZZOFERRATO 2004. Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chem.,* 84**,** 201-206.

PALFRAMAN, R., GIBSON, G. R. & RASTALL, R. A. 2003. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Lett Appl Microbiol,* 37**,** 281-4.

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.

PASCO, J. A., KOTOWICZ, M. A., HENRY, M. J., NICHOLSON, G. C., SPILSBURY, H. J., BOX, J. D. & SCHNEIDER, H. G. 2006. High-sensitivity C-reactive protein and fracture risk in elderly women. *JAMA,* 296**,** 1353-5.

PHILLIP, A., GREEN, E.S.J., VOIGT, R.M. 2015. The gastrointestinal microbiome alcohol effects on the composition of intestinal microbiota. *Alcohol. Res.,* 37**,** 223-236.

PHONG, S. F., SHANMUGAVELU, S., THAYALINI, K., NORAINI, S., WONG, H.K. 2010. Detection of Lactobacillus, Bacteroides and Clostridium perfringens in the gastrointestinal contents of chicken fed different diets by real-time PCR. . *Journal of Tropical Agriculture and Food Science,* 38**,** 81-87.

POOL-ZOBEL, B., VAN LOO, J., ROWLAND, I. & ROBERFROID, M. B. 2002. Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. *Br J Nutr,* 87 Suppl 2**,** S273-81.

POUCHERET, P., FONS, F., RAPIOR, S., 2006. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis. *Cryptogamie Mycologie,* 27**,** 311-333.

PRICE, M., SCHWARTZ, R. & HOYT, H. 1978. Evaluation and characteristics of currently available inulin. *Invest Urol,* 16**,** 13-4.

R.RAGUNATHAN, R. G., M.PALANISWAMY, K.SWAMINATHAN 1996. Cultivation of Pleurotus spp. on various agro-residues. *Food Chemistry,* 55**,** 139-144.

RAI, M. T., G.;WASSER, S.P. 2005. Therapeutic potential of mushrooms. *Natural Product Radiance,* 4**,** 246-257.

RAJARATHNAM, Z. B. A. S. 1986. Vitamin values of Pleurotus mushrooms. *Qual. Plant. – Plant Foods Hum. Nutr.,* 36**,** 11-15.

RALSTON, S. H. & UITTERLINDEN, A. G. 2010. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev,* 31**,** 629-62.

RAMIREZ-FARIAS, C., SLEZAK, K., FULLER, Z., DUNCAN, A., HOLTROP, G. & LOUIS, P. 2009. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of Bifidobacterium adolescentis and Faecalibacterium prausnitzii. *Br J Nutr,* 101**,** 541-50.

RATHEE, S. R., D.; RATHEE, D.; KUMAR, V.; RATHEE, P. 2012. Mushrooms as therapeutic agents. *Rev. Bras. Farmacogn,* 22**,** 457–474.

RECHKEMMER, G., RONNAU, K. & VON ENGELHARDT, W. 1988. Fermentation of polysaccharides and absorption of short chain fatty acids in the mammalian hindgut. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol,* 90**,** 563-8.

RINTTILA, T., KASSINEN, A., MALINEN, E., KROGIUS, L. & PALVA, A. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol,* 97**,** 1166-77.

ROBERFROID, M. 1993. Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Crit Rev Food Sci Nutr,* 33**,** 103-48.

ROBERFROID, M. 2002. Functional food concept and its application to prebiotics. *Dig Liver Dis,* 34 Suppl 2**,** S105-10.

ROBERT L. NUSSBAUM, R. R. M. I., HUNTINGTON F. WILLARD 2011. *Ιατρική Γενετική,* Κύπρος, Πασχαλίδης & Broken Hill Publishers LTD.

ROBLES ALONSO, V. & GUARNER, F. 2013. Linking the gut microbiota to human health. *Br J Nutr,* 109 Suppl 2**,** S21-6.

ROGGIA, C., GAO, Y., CENCI, S., WEITZMANN, M. N., TORALDO, G., ISAIA, G. & PACIFICI, R. 2001. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 98**,** 13960-5.

ROP, O., MLCEK, J. & JURIKOVA, T. 2009. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutr Rev,* 67**,** 624-31.

ROY, C. C., KIEN, C. L., BOUTHILLIER, L. & LEVY, E. 2006. Short-chain fatty acids: ready for prime time? *Nutr Clin Pract,* 21**,** 351-66.

RÚBIA CARVALHO GOMESCORRÊA, T. B., ADELAR BRACHT, ROSANE MARINA PERALTA, ISABEL C.F.R.FERREIRA 2016. Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of Pleurotus spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. *Trends in Food Science & Technology,* 50**,** 103-117.

RUPPIN, H., BAR-MEIR, S., SOERGEL, K. H., WOOD, C. M. & SCHMITT, M. G., JR. 1980. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology,* 78**,** 1500-7.

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.

S.-J. HUANG, C.-P. L. A. S.-Y. T. 2015. Vitamin D2 content and antioxidant properties of fruit body and mycelia of edible mushrooms by UV-B. *J. Food Compos. Anal.,* 42**,** 38-45.

S. T. CHANG, O. W. L. A. K. Y. C. 1981. The cultivation and nutritional value of Pleurotus sajor-caju. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.,* 12**,** 58-62.

S. W. CHIU, Y. H. C., S. C. LAW, K. T. CHEUNG AND D. MOORE 1998. Cadmium and manganese in contrast to calcium reduce yield and nutritional values of the edible mushroom Pleurotus pulmonarius. *Mycol. Res.,* 102**,** 449-457.

SALONEN, A., NIKKILA, J., JALANKA-TUOVINEN, J., IMMONEN, O., RAJILIC-STOJANOVIC, M., KEKKONEN, R. A., PALVA, A. & DE VOS, W. M. 2010. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J Microbiol Methods,* 81**,** 127-34.

SALYERS, A. 1979. Energy sources of major intestinal fermentative anaerobes. . *Am. J. Clin. Nutr.,* 32**,** 158-163.

SAPOZHNIKOVA, Y., BYRDWELL, W. C., LOBATO, A. & ROMIG, B. 2014. Effects of UV-B Radiation Levels on Concentrations of Phytosterols, Ergothioneine, and Polyphenolic Compounds in Mushroom Powders Used As Dietary Supplements. *J Agric Food Chem,* 62**,** 3034-3042.

SARTOR, R. B. 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology,* 134**,** 577-94.

SCHARLAU, D., BOROWICKI, A., HABERMANN, N., HOFMANN, T., KLENOW, S., MIENE, C., MUNJAL, U., STEIN, K. & GLEI, M. 2009. Mechanisms of primary cancer prevention by butyrate and other products formed during gut flora-mediated fermentation of dietary fibre. *Mutat Res,* 682**,** 39-53.

SCHEPPACH, W. 1996. Treatment of distal ulcerative colitis with short-chain fatty acid enemas. A placebo-controlled trial. German-Austrian SCFA Study Group. *Dig Dis Sci,* 41**,** 2254-9.

SCHETT, G., KIECHL, S., WEGER, S., PEDERIVA, A., MAYR, A., PETRANGELI, M., OBERHOLLENZER, F., LORENZINI, R., REDLICH, K., AXMANN, R., ZWERINA, J. & WILLEIT, J. 2006. High-sensitivity C-reactive protein and risk of nontraumatic fractures in the Bruneck study. *Arch Intern Med,* 166**,** 2495-501.

SCHILLINGER, W. H. H. A. U. 2002. Introduction to Pre- and Probiotics. *Food Research International,* 35**,** 109-116.

SGHIR A, G. G., SUAU A, ROCHET V, POCHART P, DORE J. 2000. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol,* 66**,** 2263–6.

SHERWOOD, L. 2016. *Εισαγωγή στη φυσιολογία του ανθρώπου:Από τα κύτταρα στα συστήματα,* Αλεξανδρούπολη, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και Σια Ο.Ε.

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.

SLAWINSKA, A., FORNAL, E., RADZKI, W., SKRZYPCZAK, K., ZALEWSKA-KORONA, M., MICHALAK-MAJEWSKA, M., PARFIENIUK, E. & STACHNIUK, A. 2016. Study on vitamin D(2) stability in dried mushrooms during drying and storage. *Food Chem,* 199**,** 203-9.

SMIDERLE, F. R., OLSEN, L. M., CARBONERO, E. R., BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., MARCON, R., SANTOS, A. R., GORIN, P. A. & IACOMINI, M. 2008. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1-->3),(1-->6)-linked beta-glucan isolated from Pleurotus pulmonarius. *Eur J Pharmacol,* 597**,** 86-91.

SOKOL H, P. B., WATTERLOT L, LAKHDARI O, BERMÚDEZ-HUMARÁN LG, GRATADOUX JJ, BLUGEON S, BRIDONNEAU C, FURET JP, CORTHIER G, GRANGETTE C, VASQUEZ N, POCHART P, TRUGNAN G, THOMAS G, BLOTTIÈRE HM, DORÉ J, MARTEAU P, SEKSIK P, LANGELLA P 2008. Faecalibacterium prausnitzii is an antiinflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA,* 105**,** 16731-6.

SOLT I, K. M., OFFER C. 2011. The human microbiome. *Harefuah,* 150**,** 484-488.

STANDRING, S. 2004. *Musculoskeletal system,* New York, Elsevier.

SUAU, A., ROCHET, V., SGHIR, A., GRAMET, G., BREWAEYS, S., SUTREN, M., RIGOTTIER-GOIS, L. & DORE, J. 2001. Fusobacterium prausnitzii and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Syst Appl Microbiol,* 24**,** 139-45.

TANG, Y., CHEN, Y., JIANG, H., ROBBINS, G. T. & NIE, D. 2011. G-protein-coupled receptor for short-chain fatty acids suppresses colon cancer. *Int J Cancer,* 128**,** 847-56.

THOMAS, C. M., HONG, T., VAN PIJKEREN, J. P., HEMARAJATA, P., TRINH, D. V., HU, W., BRITTON, R. A., KALKUM, M. & VERSALOVIC, J. 2012. Histamine derived from probiotic Lactobacillus reuteri suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling. *PLoS One,* 7**,** e31951.

TOPPING, D. L. & CLIFTON, P. M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev,* 81**,** 1031-64.

TREMAROLI, V. & BACKHED, F. 2012. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature,* 489**,** 242-9.

UZAL, F. A., FREEDMAN, J.C., SHRESTHA, A., THEORET, J.R., GARCIA, J., AWAD, M.M., ADAMS, V., MOORE, R.J., ROOD, J.I. AND MCCLANE, B.A., 2014. Towards an understanding of the role of Clostridium perfringens toxins in human and animal disease. *Future Microbiology,* 9**,** 361-377.

V. SOUSA, E. S. A. V. S. 2011. The importance of prebiotics in functional foods and clinical practice. *Food and Nutrition Sciences,* 2**,** 133-144.

VAN HOEK, M. J. & MERKS, R. M. 2012. Redox balance is key to explaining full vs. partial switching to low-yield metabolism. *BMC Syst Biol,* 6**,** 22.

VERNIA, P., MARCHEGGIANO, A., CAPRILLI, R., FRIERI, G., CORRAO, G., VALPIANI, D., DI PAOLO, M. C., PAOLUZI, P. & TORSOLI, A. 1995. Short-chain fatty acid topical treatment in distal ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther,* 9**,** 309-13.

VYAS, U. & RANGANATHAN, N. 2012. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. *Gastroenterol Res Pract,* 2012**,** 872716.

WALKER, A. W., INCE, J., DUNCAN, S. H., WEBSTER, L. M., HOLTROP, G., ZE, X., BROWN, D., STARES, M. D., SCOTT, P., BERGERAT, A., LOUIS, P., MCINTOSH, F., JOHNSTONE, A. M., LOBLEY, G. E., PARKHILL, J. & FLINT, H. J. 2011. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J,* 5**,** 220-30.

WALLACE, B. D., WANG, H., LANE, K. T., SCOTT, J. E., ORANS, J., KOO, J. S., VENKATESH, M., JOBIN, C., YEH, L. A., MANI, S. & REDINBO, M. R. 2010. Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science,* 330**,** 831-5.

WANG, D., SAKODA, A. & SUZUKI, M. 2001. Biological efficiency and nutritional value of Pleurotus ostreatus cultivated on spent beer grain. *Bioresour Technol,* 78**,** 293-300.

WANG, R. F., CAO, W. W. & CERNIGLIA, C. E. 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl Environ Microbiol,* 62**,** 1242-7.

WANG, X. G., G.R. 1993. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol,* 75**,** 373–380.

WEAVER, C. M., MARTIN, B. R., NAKATSU, C. H., ARMSTRONG, A. P., CLAVIJO, A., MCCABE, L. D., MCCABE, G. P., DUIGNAN, S., SCHOTERMAN, M. H. & VAN DEN HEUVEL, E. G. 2011. Galactooligosaccharides improve mineral absorption and bone properties in growing rats through gut fermentation. *J Agric Food Chem,* 59**,** 6501-10.

WEI CHEN, W.-P. W., HUA-SHAN ZHANG, QIN HUANG 2012. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of water-soluble polysaccharides from Boletus edulis mycelia using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers,* 87**,** 614-619.

WEXLER, H. M. 2007. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev,* 20**,** 593-621.

WHISNER, C. M., MARTIN, B. R., SCHOTERMAN, M. H., NAKATSU, C. H., MCCABE, L. D., MCCABE, G. P., WASTNEY, M. E., VAN DEN HEUVEL, E. G. & WEAVER, C. M. 2013. Galacto-oligosaccharides increase calcium absorption and gut bifidobacteria in young girls: a double-blind cross-over trial. *Br J Nutr,* 110**,** 1292-303.

WHITTLE, P. P. R. A. R. 1982. The Carbohydrate Composition of Onions during Long Term Cold Storage. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology,* 57**,** 349-356.

WHO/FAO 2004. *Vitamin and mineral requirements in human nutrition,* Geneva.

WU, H. J. & WU, E. 2012. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes,* 3**,** 4-14.

YU, Z. & MORRISON, M. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques,* 36**,** 808-12.

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**,** 119-123.

ZOHREH TAMANAI-SHACOORI, I. S., LATIFA BOUSARGHIN, OLIVIER LOREAL, VINCENT MEURIC, SHAO BING FONG, MARTINE BONNAURE-MALLET & ANNE JOLIVET-GOUGEON 2017. Roseburia spp.: a marker of health? *Future Microbiol,* 12**,** 157-170.

ΕΛΕΝΗ ΣΤΑΜΑΤΟΠΟΥΛΟΥ, Μ. Τ. 2014. Επιδημιολογικά Δεδομένα σχετικά με την Οστεοπόρωση στην Ελλάδα: Η Συμβολή του Ελληνικού Συλλόγου Υποστήριξης Ασθενών με Οστεοπόρωση. *ΝΟΣΗΛΕΥΤΙΚΗ* 53**,** 319-326.

ΙΩΑΝΝΗΣ ΔΙΟΝΥΣΙΩΤΗΣ, Α. Κ., ΜΕΡΟΠΗ ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗ, ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΟΣΜΙΔΗΣ, ΚΑΛΛΙΟΠΗ ΛΑΜΠΡΟΠΟΥΛΟΥ ΑΔΑΜΙΔΟΥ, ΕΙΡΗΝΗ ΛΑΜΠΡΙΝΟΥΔΑΚΗ, ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΛΥΡΙΤΗΣ, ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΑΚΡΗΣ, ΑΛΕΞΙΑ ΜΠΑΛΑΝΙΚΑ, ΧΡΗΣΤΟΣ ΜΠΑΛΤΑΣ, ΦΩΤΕΙΝΗ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ, ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ, ΣΥΜΕΩΝ ΤΟΥΡΝΗΣ, ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΡΟΒΑΣ. 2018. *Κατευθυντήριες γραμμές για τη διάγνωση και αντιμετώπιση της Οστεπόρωσης στην Ελλάδα,* Αθήνα, Μονογραφίες ΕΛΙΟΣ.