ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Μεταπτυχιακή Μελέτη

‘’Επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στον οστικό μεταβολισμό’’

Παναγιώτου Αλεξάνδρα

(ΑΜ:4421634)



Αθήνα, 2019



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Αδαμαντίνη Κυριακού (Επιβλέπουσα καθηγήτρια)Αναπληρώτρια Καθηγήτρια,Επιστήμη Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Ρωξάνη Τέντα, Επίκουρη Καθηγήτρια, Επιστήμη Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Γεώργιος Ζερβάκης, Καθηγητής, Επιστήμη Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Η Αλεξάνδρα Παναγιώτου 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 την ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

«Όλες οι ασθένειες ξεκινούν από το έντερο»,

Ιπποκράτης, πατέρας της μοντέρνας ιατρικής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη αποτέλεσε κομμάτι του μεταπτυχιακού προγράμματος ‘’Διατροφή και Δημόσια Υγεία’’ κατά την περίοδο 2017-2019 , με επιβλέπουσα την κα. Αδαμαντίνη Κυριακού, αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Το μεγαλύτερό της μέρος εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας του Ανθρώπου και Μικροοργανισμών (Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ.) του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών, καθώς και ένα μικρός μέρος στο Εργαστήριο Γενικής & Γεωργικής Μικροβιολογίας του τμήματος Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Σε αυτή την ενότητα θα ήθελα να προσφέρω κάποιες ευχαριστίες σε ανθρώπους που με βοήθησαν προς την περάτωση της διπλωματικής αυτής και χωρίς την στήριξή τους δεν θα κατόρθωνα να φέρω εις πέρας. Πιο συγκεκριμένα: τις **6 εθελόντριες** μία προς μία για την όμορφη συνεργασία-προθυμία να συμμετάσχουν και να αποτελέσουν ένα πολύ μικρό αλλά διόλου ασήμαντο τμήμα της πρωτοποριακής αυτής μελέτης, στην επιβλέπουσα μου**, κα. Αδαμαντίνη Κυριακού** (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών) για την εμπιστοσύνη, αμέριστη στήριξη, καθοδήγηση, υπομονή και πολύτιμη αρωγή που αδιαλείπτως μου προσέφερε, στην **κα. Ευδοκία Μήτσου** (διδακτορική ερευνήτρια του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου Αθηνών) για την αδιάκοπη και ευπρόσδεκτη υποστήριξη, μετάδοση γνώσεων, εμπειρίας αλλά και συμβουλών από την αρχή μέχρι το τέλος, στην **κα. Τέντα Ρωξάνη** (Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Ανθρώπου, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών) για τις διορθώσεις- καίριες παρατηρήσεις που προσέφερε, στην **κα. Κατερίνα Γιώτη** (Υποψήφια Διδάκτωρ) για την βοήθεια της και εκπαίδευσή της στο εργαστήριο, στον **κ. Γιώργο Ζερβάκη** (Καθηγητής στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών) για τις τροποποιήσεις που έκανε πάνω στο επιστημονικό του πεδίο, στον **κ. Γιώργο Κουτρώτσιο** (Διδάκτωρ, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών) για την βοήθεια του στο εργαστήριο και την μετάδοση γνώσεων, στην **κα. Θάλεια Τσιάκα** (Υποψήφια Διδάκτρωρ, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών) για τις επιστημονικές γνώσεις της πάνω στον εργαστηριακό εξοπλισμό στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, στους **συμφοιτητές** μου που δουλέψαμε μαζί αρμονικά, ανταλλάζοντας γνώσεις και απόψεις χρήσιμες καθ’όλη την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας καθώς και στο **προσωπικό** του εργαστηρίου στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών για την φιλικώς προσκείμενη στάση τους αλλά και διάθεσή τους.

Εν κατακλείδι, σίγουρα αν δεν υπήρχαν όλοι οι προαναφερθέντες καθηγητές-συνεργάτες που από καρδιάς ευγνωμονώ, δεν θα μπορούσα να εκπονήσω τέτοιου είδους μελέτη, χωρίς ωστόσο να παραβλέψω να ευχαριστήσω ακόμα πιο ‘’εν τω βάθει τη καρδία’’την οικογένεια μου, **Αθηνά και Φώτη**, οι οποίοι με στηρίζουν έμπρακτα και εξακολουθούν να το κάνουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ……..9

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ……10

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ……11

ΠΕΡΙΛΗΨΗ……13

ABSTRACT……15

Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο:ΤΟ ΜΑΝΙΤΑΡΙ *GANODERMA LUCIDUM* ΚΑΙ ΟΙ Β-ΓΛΥΚΑΝΕΣ ΤΟΥ

1.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ……....19

1.2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΜΥΚΗΤΩΝ……19

1.2.2 ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ-ΟΡΙΣΜΟΣ……20

1.2.3 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΜΥΚΗΤΩΝ……..20

1.3 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΜΑΝΙΤΑΡΙΩΝ……...20

1.3.1 ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΣΕ ΑΜΙΝΟΞΕΑ……20

1.3.2 ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ……..21

1.3.3 ΛΙΠΗ……21

1.3.4 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑ……..21

1.4.1 Β-ΓΛΥΚΑΝΕΣ (Β-GLUCANS)……22

1.4.2 ΔΟΜΗ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ……22

1.4.3 ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ……..23

1.4.4 ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ……23

1.4.4.1 ΑΝΟΣΟΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ……23

1.4.4.2 ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ……23

1.4.4.3 ΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΑΙΜΙΑΣ……24

1.4.4.4 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ……24

1.4.4.5 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ……24

1.5.1 ΜΑΝΙΤΑΡΙ *GANODERMA LUCIDUM*-ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ-ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ……25

1.5.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ ΤΟΥ *GANODERMA LUCIDUM* ……26

1.5.3 ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ ΤΟΥ *GANODERMA LUCIDUM*……..26

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο: ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΥ ΚΑΙ ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΤΟΥΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

2.1.1 ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ-ΟΡΙΣΜΟΣ……27

2.1.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΥ……....27

2.1.3 ΠΩΣ Ο ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ ΕΠΙΔΡΑ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ……28

2.2.1 ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ-ΟΡΙΣΜΟΣ……28

2.2.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ-ΟΦΕΛΗ……29

2.3.1 ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ-ΟΡΙΣΜΟΣ……29

2.3.2 ΕΙΔΗ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ……29

2.3.3 ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ……....29

2.4.1ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΒΡΑΧΕΙΑΣ ΑΛΥΣΟΥ (SHORT CHAIN FATTY ACIDS) ……31

2.4.2 ΠΩΣ Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ SHORT CHAIN FATTY ACIDS ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ……33

2.5 ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ……35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο:ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ

3.1 ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ-ΟΡΙΣΜΟΣ……....35

3.1.2 ΕΙΔΗ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ……...36

3.1.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ……36

3.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ……....36

3.3.1 ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΟΓΕΝΝΕΣΗ……37

3.3.2 ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΕΣ-ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΣΚΕΛΕΤΟΥ……37

3.3.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΩΝ ΤΩΝ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΩΝ……38

3.3.4 *IN VITRO* ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΟΣΤΟΥ……38

3.4 ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΠΟΡΡΩΣΗ……39

3.5 ΠΩΣ Η ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ ΡΥΘΜΙΖΕΙ-ΕΛΕΓΧΕΙ ΤΟΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ……..41

3.6 ΠΩΣ ΤΑ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ ΄΄ΔΡΟΥΝ΄΄ ΣΤΑ ΟΣΤΑ……..…41

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ……...44

Β.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ……..……..46

5.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ ΤΟΥ ΜΑΝΙΤΑΡΙΟΥ *GANODERMA LUCIDUM*……..….46

5.1.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΨΗΛΩΝ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ……...…...46

5.1.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ……..…46

5.1.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΚΥΜΜΑΤΩΝ……...47

5.2 ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕ ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΙΚΗ ΕΞΑΤΜΙΣΗ ΥΠΟ ΕΛΑΤΤΩΜΕΝΗ ΠΙΕΣΗ……....47

5.3.1 ΜΕΤΡΗΣΗ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ……48

5.3.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΓΛΥΚΑΝΩΝ……..……50

5.4.1 ΣΤΡΑΤΟΛΟΓΗΣΗ ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΩΝ……51

5.4.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ (ΚΟΠΡΑΝΩΝ) ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΩΝ……...51

5.4.3. *IN VITRO* ΖΥΜΩΣΗ ΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΣΕ ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΑΝΙΤΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΙΝΟΥΛΙΝΗΣ –STATIC BATCH CULTURE FERMENTATION……52

5.4.3.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΜΒΟΛΙΟΥ-ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ……53

5.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΟΠΡΑΝΩΝ……56

5.6 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΥΠΟ ΧΡΗΣΗ REAL TIME-POLYMERASE CHAIN REACTION (qPCR) METHOD……..58

5.7 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ-PREBIOTIC INDEX-PI_{24}……..……61

5.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ……...…61

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ……...63

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο:ΣΥΖΗΤΗΣΗ…….....83

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8Ο:ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ……...…..88

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Δομή β-γλυκάνων……..…..22

Εικόνα 2: Το μανιτάρι *Ganoderma lucidum* στη φύση…….……25

Εικόνα 3: Δομή γανοδερικού οξέος…….……...26

Εικόνα 4: Μικροοργανισμοί εντέρου…….28

Εικόνα 5: Προϊόντα βακτηριακής ζύμωσης λεπτού και παχέος εντέρου……..……32

Εικόνα 6: Μετατροπή μέσω βακτηριακών cross-feeding πρεβιοτικών ενώσεων σε βουτυρικό οξύ ……..33

Εικόνα 7: Κύτταρα των οστών……35

Εικόνα 8: Βασικά στάδια οστεοβλαστογέννεσης……..……37

Εικόνα 9: Ο εντερικός μικροβιόκοσμος ως προτεινόμενος ρυθμιστής οστικής μάζας……..40

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Κωδικοί υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα με την αντίστοιχη ερμηνεία τους……54

Πίνακας 2: Συμβολισμοί φιαλιδίων και η ερμηνεία τους…….55

Πίνακας 3: Ενδεικτικός προγραμματισμός της qPCR για τα ολικά βακτήρια……59

Πίνακας 4: Βέλτιστες θερμοκρασίες υβριδισμού-annealing των υπό εξέταση μικροοργανισμών……..59

Πίνακας 5: Μέθοδος και απόδοση των ολικών γλυκάνων (%)…….....63

Πίνακας 6: Ποσοτικός προσδιορισμός μικροβιακών πληθυσμών (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml κοπράνων) των εθελοντριών ως προς το σύνολο(n=6) στον αρχικό χρόνο δειγματοληψίας (t=0h)…….64

Πίνακας 7: Ποσοτικός προσδιορισμός μικροβιακών πληθυσμών (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml κοπράνων) των εθελοντριών ως προς το σύνολο (n=6) στον τελικό χρόνο δειγματοληψίας (t=24h)…….…..65

Πίνακας 8: Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml κοπράνων) των υγιών εθελοντριών (n=3) στον αρχικό χρόνο δειγματοληψίας (t=0h)……66

Πίνακας 9: Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακοών πληθυσμών (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml κοπράνων) των υγιών εθελοντριών (n=3) στον τελικό χρόνο δειγματοληψίας (t=24h)…….….66

Πίνακας 10: Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml κοπράνων) των εθελοντριών σε οστεοπενική κατάσταση (n=3) στον αρχικό χρόνο δειγματοληψίας
(t=0h)…….....67

Πίνακας 11: Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακοών πληθυσμών (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml κοπράνων) των εθελοντριών σε οστεοπενική κατάσταση (n=3) στον τελικό χρόνο δειγματοληψίας (t=24h)……..…...67

Πίνακας 12: Επίδραση στους μικροβιακούς πληθυσμούς των εθελοντριών κατά τη ζύμωση των υποστρωμάτων……..68

Πίνακας 13: Μικροβιακές αλλαγές των υγιών εθελοντριών κατόπιν ζύμωσης των υποστρωμάτων……..70

Πίνακας 14: Μικροβιακές αλλαγές των εθελοντριών σε οστεοπενική κατάσταση κατόπιν ζύμωσης των υποστρωμάτων……70

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του Bifidobacterium spp. στις εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h (p<0,05)……72

Γράφημα 2 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Lactobacillus group* στις εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h (p<0,05)…….….73

Γράφημα 3: Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς *του Roseburia spp.-Eubacterium rectale group* στις εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h (p<0,05)……73

Γράφημα 4 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Clostridium perfringens group* στις εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων…….....74

Γράφημα 5 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Clostridium leptum group* στις εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων…….....74

Γράφημα 6 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Faecalibacterium prausnitzii* στις εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων…….75

Γράφημα 7 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Lactobacillus group* στις υγιείς εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h (p<0,05)…….....76

Γράφημα 8 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Roseburia spp- Eubacterium rectale group* στις υγιείς εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h (p<0,05)……...……76

Γράφημα 9 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Clostridium leptum group* στις υγιείς εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων……..…77

Γράφημα 10 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς των Total Bacteria στις οστεοπενικές εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****=σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h (p<0,05).....77

Γράφημα 11 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Bifidobacterium spp*.στις οστεοπενικές εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h (p<0,05)……...…..78

Γράφημα 12: Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Faecalibacterium prausnitzii* στις οστεοπενικές εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h (p<0,05)…….78

Γράφημα 13: Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Roseburia spp.-Eubacterium rectale group* στις οστεοπενικές εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h (p<0,05)……..……79

Γράφημα 14 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Clostridium leptum group* στις οστεοπενικές εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων…….…..79

Γράφημα 15 : Πρεβιοτικοί δείκτες -PI_{24} για τα διαφορετικά υποστρώματα στις εθελόντριες με υγιή οστική πυκνότητα…….….80

Γράφημα 16 : Πρεβιοτικοί δείκτες -PI_{24} για τα διαφορετικά υποστρώματα στις οστεοπενικές εθελόντριες……81

Γράφημα 17 : Πρεβιοτικοί δείκτες -PI24 για τα διαφορετικά υποστρώματα στο σύνολο των εθελοντριών ……..…81

Γράφημα 18 : Πρεβιοτικός δείκτης -PI24 όλων των υποστρωμάτων σε κάθε μία εθελόντρια..82

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Ο εντερικός μικροβιόκοσμος (ΕΜ) είναι ένα ετερογενές οικοσύστημα, μοναδικό για κάθε ξενιστή, αποτελούμενο από τουλάχιστον 100 τρισεκατομμύρια μικροοργανισμούς, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία. Οι τροποποιήσεις που υφίστανται ο ΕΜ από διάφορους παράγοντες (δυσβίωση), έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση ασθενειών όπως φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, μεταβολικά νοσήματα, αλλά προσφάτως και με νοσήματα σχετιζόμενα με τον οστικό μεταβολισμό. Δεν έχει ωστόσο γίνει πλήρως κατανοητός ο ρόλος και οι μηχανισμοί της εντερικής μικροβιακής ποικιλομορφίας στη ρύθμιση του οστικού μεταβολισμού.

Τα πρεβιοτικά είναι ενώσεις που δεν πέπτονται από τον ξενιστή και καταλήγουν στο παχύ έντερο, ενισχύοντας συγκεκριμένα ευεργετικά βακτήρια και επιφέροντας όφελος στον ξενιστή. Η πιθανή πρεβιοτική δράση των β-γλυκάνων που προέρχονται από μανιτάρια έχει προσελκύσει τα τελευταία χρόνια το επιστημονικό ενδιαφέρον.

Σκοπός: Η διερεύνηση του πρεβιοτικού ρόλου του μανιταριού Ganoderma lucidum και του πλούσιου σε β-γλυκάνες εκχυλίσματος του in vitro, μετά από ζύμωση με εμβόλιο-κοπράνων τόσο υγιών όσο και οστεοπενικών μετεμμηνοπαυσιακών εθελοντριών.

Μεθοδολογία: Πραγματοποιήθηκε in vitro ζύμωση τόσο σε μανιτάρι Ganoderma lucidum LGAM 9720 2% (w/v) όσο και στο πλούσιο σε β-γλυκάνες εκχύλισμά του 1% (w/v), με εμβόλιο κοπράνων από έξι μετεμμηνοπαυσιακές εθελόντριες (τρεις υγιείς και τρεις οστεοπενικές). Χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας η ινουλίνη 1% , 2% (w/v). Δείγματα ελήφθησαν πριν την έναρξη της ζύμωσης (t=0h) και στο τέλος αυτής (t=24h). Έγινε η ποσοτική καταμέτρηση με τη μέθοδο real-time PCR (16S rRNA), μετά από απομόνωση του ολικού μικροβιακού DNA των δειγμάτων, στα : ολικά βακτήρια, Bifidobacterium spp., Lactobacillus group , Clostridium perfringens group, Bacteroides spp., Clostridium leptum group, Faecalibacterium prausnitzii και Roseburia spp-Eubacterium rectale group. Η πρεβιοτική δράση των ζυμώμενων υποστρωμάτων, υπολογίστηκε με τη βοήθεια του πρεβιοτικού δείκτη PI24.

Αποτελέσματα: Στο σύνολο των εθελοντριών οι λακτοβάκιλλοι αυξήθηκαν σημαντικά στην ινουλίνη 2%, όπως επίσης και το Bacteroides spp. στην ινουλίνη (1% και 2%) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Όσον αφορά τις γυναίκες σε οστεοπενική κατάσταση, παρουσιάστηκε αύξηση των ολικών βακτηρίων, του Bifidobacterium spp. μετά από την 24-ωρη ζύμωση της ινουλίνης (1% και 2%), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Επίσης τα ολικά βακτήρια και το Bifidobacterium spp. αυξήθηκαν σημαντικά στην ινουλίνη 1% σε σχέση με τον πληθυσμό τους στον χρόνο μηδέν, ενώ το Bifidobacterium spp. παρουσίασε σημαντική αύξηση και στο υπόστρωμα της ινουλίνης 2%. Το Bacteroides spp. αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με τον μάρτυρα μετά την ζύμωση του πλούσιου σε β-γλυκάνες εκχυλίσματος.

Το Roseburia spp-Eubacterium rectale group μειώθηκε σημαντικά τόσο μετά τη ζύμωση του μανιταριού όσο και του εκχυλίσματός του συγκρινόμενο με τα επίπεδα του πληθυσμού του στην αρχή (t=0), στις οστεοπενικές γυναίκες αλλά και στο σύνολο των εθελοντριών.

Ο πρεβιοτικός δείκτης PI24 βρέθηκε θετικός τόσο στο σύνολο των εθελοντριών αλλά και στις δύο κατηγορίες οστικής πυκνότητας στα δύο εξεταζόμενα υποστρώματα, με υψηλότερες τιμές για το εκχύλισμα του μανιταριού.

Συμπεράσματα: Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι μετά από την in vitro ζύμωση του μανιταριού και του πλούσιου σε β-γλυκάνες εκχυλίσματός του, από τον ΕΜ μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με φυσιολογική και οστεοπενική οστική πυκνότητα, παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς, τόσο στο σύνολο των εθελοντριών, όσο και στις γυναίκες με οστεοπενία. Ο πρεβιοτικός δείκτης ήταν θετικός σε όλες τις ομάδες τόσο για το μανιτάρι, όσο και για το εκχύλισμά του, με μεγαλύτερες τιμές για το εκχύλισμα.

Λέξεις-κλειδιά: εντερικός μικροβιόκοσμος, μανιτάρι Ganoderma lucidum, β-γλυκάνες, οστική πυκνότητα, μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες.

ABSTRACT

Background: Gut microbiota is recognized as a dense, heterogeneous microbial ecosystem, consisting of more than 100 trillion symbiotic microorganisms, which play a fundamental role in human homeostasis. Dysbiotic ecosystem conditions may impact the gut microbial abundance, diversity and viability, a situation related to a variety of diseases such as inflammatory bowel diseases, metabolic diseases, recently associated also to bone metabolism diseases. However, the mechanisms the gut microbiota may affect the bone health are not fully understood.

On the other hand, prebiotics are non-digestible ingredients fermented by commensal gut microbiota and selectively stimulate a limited number of bacteria confering health benefits to the host. Recently, the potential prebiotic activity of beta-glucans derived from mushrooms, has started to be invistigated.

Aim: To investigate the potential prebiotic effect of both Ganoderma lucidum mushroom and its rich in beta-glucans extract, after in vitro fermentation with faecal inoculum from healthy and osteopenic postmenopausal volunteers.

Methods: It was conducted in vitro fermentation in a batch-culture model with faecal inoculum from six postmenopausal women (three healthy and three osteopenic) of the mushroom Ganoderma lucidum LGAM 9720 (2% w/v) and its rich in beta-glucans extract (1% w/v) as well. Inulin was used as a positive control, 1% (w/v) and 2% (w/v). Samples were collected before (t=0h) and at the end of fermentation (t=24h). Total bacteria, Bifidobacterium spp., Lactobacillus group, Clostridium perfringens group, Bacteroides spp., Clostridium leptum group, Faecalibacterium prausnitzii and Roseburia spp-Eubacterium rectal group, were quantified using real-time PCR method (16S rRNA).The prebiotic activity of the fermented substrates, was estimated with the prebiotic index (PI24).

Results: Lactobacilli were significantly increased after fermentation in inulin 2%, compared to negative control. Bacteroides spp. displayed a significant increase in inulins (1% and 2%). Regarding the osteopenic volunteers, total bacteria and Bifidobacterium spp. displayed a significant increase, after the inulin fermentation (1%& 2%) compared to the negative control. Total bacteria and Bifidobacterium spp. were significantly increased in inulin 1% compared to their population at the start point (t=0h), while Bifidobacterium spp. indicated a significant increase using inulin 2% as substrate as well. Bacteroides spp showed a significant increase in the rich in beta- glucans extract compared to the negative control.

Also, Roseburia spp-Eubacterium rectale group indicated a significant reduce in mushroom substrate and its extract, compared to its initial population (t=0h) not only in osteopenic volunteers but in the total of volunteers as well.

The prebiotic index (PI24) showed a positive prebiotic effect for both the mushroom Ganoderma lucidum substrate and its rich in beta –glucans extract (reaching always higher values), in the total of volunteers and also in the two separate bone density groups (healthy and osteopenic volunteers).

Conclusions: In this study, the in vitro fermentation of the mushroom Ganoderma lucidum and its rich in beta-glucans extract with feacal inoculum from healthy and osteopenic

postmenopausal women, resulted in profound alterations of the gut microbiota in the osteopenic women and also in the total of volunteers.The prebiotic index indicated positive values for both the mushroom and its extract, (reaching higher values in the beta-glucans extract), in all groups of the volunteers.

Keywords: gut microbiota, Ganoderma lucidum mushroom, beta-glucans, bone density, postmenopausal women.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

WHO	**Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας**
Παράγοντας NF-Kβ	**Πυρηνικός παράγοντας –κΒ**
NFAT	**Πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων Τ κυττάρων**
IL -12, IL-6, IL-10	**Ιντερλευκίνη-12, Ιντερλευκίνη-6, Ιντερλευκίνη-10**
TNF	**Παράγοντας νέκρωσης όγκου**
LDL	**Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας**
HDL	**Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας**
DNA	**Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ**
GIT	**Γαστρεντερικός σωλήνας**
IBD	**Φλεγμονώδης νόσος του εντέρου**
SCFAs	**Λιπαρά οξέα Βραχείας Αλύσου**
IgA	**Ανοσοσφαιρίνη Α**
FOS	**Φωσφοολιγοσακχαρίτες**
GOS	**Γαλακτοολιγοσακχαρίτες**
OB	**Οστεοβλάστες**
OC	**Οστεοκλάστες**
BMD	**Οστική Πυκνότητα**
RANKL	**Ενεργοποιητής υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα κάππα-β**
OS	**Οξειδωτικό στρες**
ROS	**Δραστικές ρίζες οξυγόνου**
Anti-CD-4, anti-CD-8	**Μονοκλωνικά αντισώματα CD-4, CD-8**
TNF-α	**Παράγοντας καρκινικής νέκρωσης άλφα**
GF	**Αξενικά πειραματόζωα**
GALT	**Λεμφοειδής ιστό που σχετίζεται με το έντερο**
RT	**Θερμοκρασία δωματίου**

Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{ο} :ΤΟ ΜΑΝΙΤΑΡΙ *GANODERMA LUCIDUM* ΚΑΙ ΟΙ Β-ΓΛΥΚΑΝΕΣ ΤΟΥ

1.1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σύμφωνα με τον WHO, ως διατροφή του ανθρώπου ορίζεται το σύνολο των τροφίμων αλλά και ροφημάτων που επιλέγει να καταναλώσει κάποιος, σε σχέση με τις διατροφικές του ανάγκες. Τα τρόφιμα είναι προϊόντα είτε φυτικής είτε ζωικής προέλευσης. Τα μανιτάρια αν και δεν αποτελούν βασικό τρόφιμο σε κάποιους λαούς, σε κάποιους άλλους διακατέχουν ιδιαίτερη θέση στον πολιτισμό και στην κουλτούρα τους. Τα μανιτάρια καταναλώνονται σε πολλές χώρες, είτε φρέσκα είτε διατηρημένα σαν λιχουδιά, ειδικότερα για το ιδιαίτερο άρωμα και την υφή τους. Η Κίνα αποτελεί κορυφαίο παραγωγό, με πάνω από 20 καλλιεργημένα είδη. Αλλά και σε πολλές χώρες της Κεντρικής και Ανατολικής Ευρώπης συλλέγονται αυτοφυή είδη. Περίπου 200 εδώδιμα αυτοφυή είδη καταναλώνονται σε διάφορα μέρη του κόσμου. Η συλλογή των μανιταριών σε δάση αποτελεί μέρος της πολιτιστικής κληρονομιάς καθώς και ψυχαγωγική δραστηριότητα καθώς και δραστηριότητα με οικονομική σημασίαγια ένα μεγάλο μέρος του πληθυσμού.(WHO, 2018, Kalac 2012).

Αρκετά από τα εδώδιμα μανιτάρια θεωρούνται και λειτουργικά τρόφιμα και καταναλώνονται ως συμπληρώματα διατροφής με διάφορα οφέλη για την υγεία. Αξιοσημείωτο είναι ότι μπορούν να καταναλωθούν από διαβητικούς και καρδιοπαθείς ασθενείς εξ αιτίας της χαμηλής περιεκτικότητας σε άμυλο και χοληστερόλη. Επιπροσθέτως, το ένα τρίτο του σιδήρου που περιέχουν βρίσκεται σε βιοδιαθέσιμη μορφή. Το περιεχόμενο των πολυσακχαριτών χρησιμοποιείται ως φάρμακο για τον καρκίνο, ακόμα και για την καταπολέμηση του HIV. Επομένως περιέχουν πληθώρα θρεπτικών συστατικών που παρατίθενται αναλυτικά στη συνέχεια (Wani *et al*., 2010).

1.2.1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΜΥΚΗΤΩΝ

Οι μύκητες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα οργανισμών στη φύση και διαφέρουν από τα βακτήρια, άλγη και πράσινα φυτά . Απαρτίζουν το τρίτο από τα πέντε Βασίλεια σύμφωνα με την παλιά κατάταξη του Whitaker, περιλαμβάνουν έξι φύλα και έχουν διαστάσεις που δεν μπορούν να φανούν ‘’δια γυμνού οφθαλμού’’, γίνονται όμως ορατοί όταν σχηματίσουν καρποφορίες που μπορεί να εκτείνονται από μερικά δέκατα του χιλιοστού έως και μισό μέτρο. Στη φύση αν και έχουν βρεθεί περίπου 100.000 είδη μυκήτων, εικάζουν ότι υπάρχουν και άλλοι οι οποίοι δεν έχουν συλλεχθεί ακόμα. Διαβιούν σε διάφορα οικοσυστήματα όπως στο έδαφος, στο νερό λιμνών και θαλασσών καθώς και στον αέρα.(Παντίδου nd, Δήμου nd).

Η ξαφνική εμφάνισή τους μετά τις πρώτες βροχές του φθινοπώρου, η ποικιλομορφία των ειδών αλλά και των χρωμάτων τους, καθώς και η παρουσία τους, έχει συνδεθεί με μυστήρια και λαϊκούς μύθους. Τα μανιτάρια άρχισαν να προσελκύουν το ενδιαφέρον από την αρχαιότητα και από τότε θεωρούνταν εξαιρετική τροφή. Πρώτα οι Αιγύπτιοι και οι Βαβυλώνιοι και αργότερα οι Έλληνες και οι Ρωμαίοι γνώριζαν πολλά για τα εδώδιμα μανιτάρια και τα συνέλλεγαν συστηματικά. Στη κεντρική και Βόρεια Ευρώπη, αλλά ειδικότερα στην Ανατολική Ευρώπη (Ρωσία, Πολωνία) υπάρχει μακροχρόνια παράδοση στην συλλογή αυτοφυών μανιταριών.(Aida, 2009, Διαμαντή nd).

Στην Άπω Ανατολή και ειδικότερα στην Κίνα και Ιαπωνία, τα μανιτάρια καταλαμβάνουν βασική θέση στην καθημερινή διατροφή τους αλλά και ως συμπλήρωμα διατροφής. Η παράδοσή τους

ξεκινάει γύρω στο 600 μ.Χ., όπου τοποθετεί τα μανιτάρια να χρησιμοποιούνται ως προϊόντα με φαρμακευτικές ιδιότητες. Στην Κίνα, στην Ιαπωνία, στην Κορέα, καθώς και σε άλλες Ασιατικές χώρες, τα φαρμακευτικά μανιτάρια έχουν ξεχωριστή θέση στην σύγχρονη έρευνα και στην κλινική πρακτική, εφόσον έχουν κάποιες ενώσεις με μοναδικές ιδιότητες, οι οποίες προσδίδουν στον άνθρωπο μοναδικά οφέλη. (Aida, 2009, Διαμαντή nd).

1.2.2 ΜΑΝΙΤΑΡΙΑ-ΟΡΙΣΜΟΣ

Ως μανιτάρι ορίζεται «ο μακρομύκητας με διακριτά καρποσώματα, τα οποία μπορεί να βρίσκονται είτε πάνω από το έδαφος (επίγεια) είτε κάτω από το έδαφος (υπόγεια)».Επιπλέον, οι μακρομύκητες έχουν μεγάλα καρποσώματα τα οποία φαίνονται δια γυμνού οφθαλμού και μπορούν να συλλεχθούν με το χέρι. Το καρπόσωμα σχηματίζεται από ευρύ μυκήλιο κυρίως υπόγεια, σαν αποτέλεσμα της διαδικασίας της καρποφορίας. Ο χρόνος ζωής των καρποσωμάτων είναι συνήθως 10-14 μέρες. (Miles and Chang 1997, Kalac 2012).

Εξελικτικά τα μανιτάρια υπήρχαν στη γη ακόμα πριν εμφανιστεί ο άνθρωπος, όπως αποδεικνύεται από τα απολιθώματα της κατώτερης κρητικής περιόδου. Συνεπώς, υπάρχει η πιθανότητα ο άνθρωπος να χρησιμοποίησε τα μανιτάρια σαν τροφή όταν ήταν τροφοσυλλέκτης και κυνηγός. Τα μανιτάρια προσφέρουν τεράστιες εφαρμογές, είτε ως τρόφιμα είτε ως φάρμακα. Έχουν βρεθεί να είναι αποτελεσματικά κατά του καρκίνου, της μείωσης της χοληστερόλης, του στρες, της αϋπνίας, του άσθματος, σε αλλεργίες και διαβήτη. Λόγω της υψηλής ποσότητας σε πρωτεΐνες, μπορούν να καλύψουν το κενό σε περίπτωση μειωμένης πρόσληψης πρωτεϊνών. (Wani *et al*., 2010).

1.2.3 ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΜΥΚΗΤΩΝ

Μανιτάρια σχηματίζονται από τους Ασκομύκητες και Βασιδιομύκητες . Οι δυο μεγάλες αυτές ταξινομικές κατηγορίες (Φύλα) χωρίζονται με βάση την κατασκευή των αναπαραγωγικών τους οργάνων που δίνουν τα σπόρια τους. Οι μύκητες είναι χημειοργανότροφοι-ετερότροφοι ευκαριωτικοί οργανισμοί, δηλαδή προσλαμβάνουν οργανικές ουσίες από ζώντες ή νεκρούς οργανισμούς.(Δήμου nd).

Οι τρεις μεγαλύτερες κατηγορίες που κατατάσσονται οι μύκητες είναι σαπροτροφικοί, παρασιτικοί και μυκορριζικοί. Οι μεν σαπροτροφικοί, θεωρούνται οι πιο σημαντικοί αποικοδομητές . Τρέφονται αποδομώντας τις οργανικές ενώσεις νεκρών κυττάρων άλλων οργανισμών φυτικών και ζωικών , γεγονός πολύ σημαντικό για τον πλανήτη και τους βιότοπους. Οι δε παρασιτικοί, ζουν ως παράσιτα σε ζωντανούς οργανισμούς (φυτά ή ζώα), προσλαμβάνοντας έτσι τις ενώσεις που χρειάζονται για την ανάπτυξη τους. Και εν τέλει οι μυκορριζικοί αναπτύσσουν συμβιωτικές σχέσεις με τις ρίζες των δέντρων, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο και οι δύο οργανισμοί –φυτό και μύκητας τις απαραίτητες συνθήκες διαβίωσης τους (Δήμου nd, Kalac 2012).

1.3 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΜΑΝΙΤΑΡΙΩΝ

1.3.1 ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟ ΣΕ ΑΜΙΝΟΞΕΑ

Η πρωτεΐνη αποτελεί σημαντικό συστατικό των μανιταριών και κυμαίνεται μεταξύ 19-39% του ξηρού βάρους. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη εξαρτάται από την σύνθεση του υποστρώματος, το μέγεθος του πίλου, τον χρόνο της συγκομιδής και το είδος του μανιταριού. Σχετικά με την

ποσότητα ακατέργαστης πρωτεΐνης κατατάσσεται κάτω από τα ζωικά προϊόντα, αλλά πολύ πιο πάνω από άλλα τρόφιμα συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος. Τα μανιτάρια περιέχουν συνήθως 19 -35% πρωτεΐνες σε σύγκριση με 7,3% το ρύζι, 12,7% το σιτάρι, 38,1% η σόγια και 9,4% στο ξηρό βάρος, το καλαμπόκι (Wani *et al.,* 2010).

Είναι ιδανικά για χορτοφάγους, επειδή περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα που βρίσκονται στις ζωικές πρωτεΐνες, καθώς τα σημαντικότερα αμινοξέα που περιέχονται είναι η λευκίνη, η βαλίνη, η γλουταμίνη, το ασπαρτικό οξύ καθώς και το γλουταμινικό οξύ. (Valverde *et al.,* 2015). Επί παραδείγματι, η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών στα μανιτάρια Pleurotus είναι 90% ενώ στο κρέας 99%, η οποία όμως μειώνεται κατά την αποθήκευσή τους. (Wani *et al.,* 2010). Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο παρέμεινε σχεδόν σταθερό κατά την διάρκεια της ξήρανσης με αέρα των μανιταριών στους 40^{o}C, ενώ το βράσιμο νωπών μανιταριών προκάλεσε σημαντική μείωση. (Kalac, 2012).

Σχετικά με τα αμινοξέα, η μεθειονίνη είναι το πιο περιορισμένο αμινοξύ. Το περιεχόμενο σε αργινίνη, γλυκίνη, σερίνη, μεθειονίνη και θρεονίνη μειώθηκε σε κονσέρβα P.ostreatus, ενώ η 12-μηνη αποθήκευση σε κατάψυξη είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση σε αλανίνη, γλουταμίνη, κυστείνη και τυροσίνη.(Jaworska *et al.,* 2011).

1.3.2 ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ

Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε υδατάνθρακες ανέρχεται σε 50-65% του ξηρού βάρους. Τα ελεύθερα σάκχαρα ανέρχονται περίπου σε 11% και 24% των υδατανθράκων σε βάρος επί ξηρού. Η μαννιτόλη, η οποία ονομάζεται και σάκχαρο του μανιταριού, αποτελεί το 80% του συνόλου των ελεύθερων σακχάρων. (Wani *et al.,* 2010).

Εκτός από τους μονοσακχαρίτες και τα παράγωγά τους περιέχονται ολιγοσακχαρίτες καθώς και γλυκάνες, οι οποίες είτε είναι δομικά συστατικά, είτε αποθησαυριστικές ουσίες. (Kalac, 2012).

Η χιτίνη είναι υδατο-διαλυτή στο νερό, πολυσακχαρίτης που περιέχει μόρια N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης συνδεδεμένα με β –(1,4) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Αποτελεί το 80-90% των κυτταρικών τοιχωμάτων . Για τον άνθρωπο είναι δύσπεπτη και μειώνει την αφομοίωση των άλλων συστατικών του μανιταριού. Θεωρείται ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα μανιτάρια περιέχουν γλυκογόνο και χιτίνη, πολυσακχαρίτες που εμφανίζονται στα ζώα, όχι όμως άμυλο και κυτταρίνη όπως είναι τυπικό για τα φυτά. (Kalac, 2012).

1.3.3 ΛΙΠΗ

Στα μανιτάρια, η περιεκτικότητα σε λιπαρά είναι πολύ χαμηλή σε σχέση με τους υδατάνθρακες και τις πρωτεΐνες. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι αυτά που κυριαρχούν στα καρποσώματα των μανιταριών. Είναι πλούσια σε λινολενικό οξύ και περιέχουν 4,48% λίπη στο επί ξηρού βάρος. Θεωρούνται καλή πηγή λιπών και μετάλλων, καθώς το κλάσμα του λίπους των μανιταριών αποτελείται κυρίως από ακόρεστα λιπαρά οξέα. (Wani *et al.,* 2010).

1.3.4 ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΛΛΑ

Τα μανιτάρια αποτελούν μία από τις καλύτερες πηγές βιταμινών όπου η περιεκτικότητα τους ποικίλει ανάλογα με τα χαρακτηριστικά της καλλιέργειας καθώς και τις συνθήκες συλλογής. Ειδικότερα, υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη D_2 , B1, B12 , B2 , C, φυλλικού οξέος και

νιασίνης .Επιπροσθέτως, τα μανιτάρια περιέχουν τέφρα 80-120g/Kg επί ξηρής μάζας στην οποία απαντάται το κάλιο, ο φώσφορος, το μαγνήσιο, το ασβέστιο, ο χαλκό , ο σίδηρος, ο ψευδάργυρος, το μαγγάνιο και το σελήνιο.(Stachowiak *et al*., 2012, Wani *et al*., 2010).

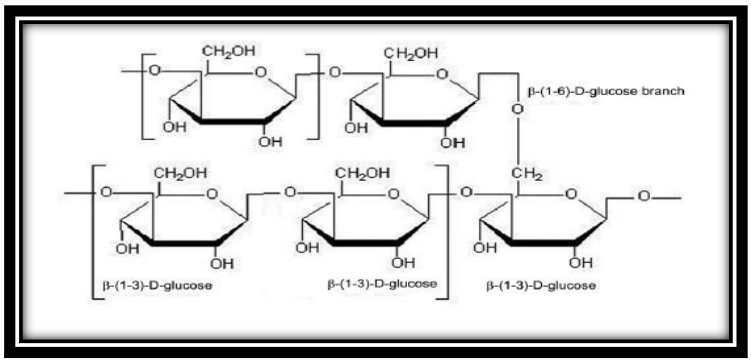
1.4.1 Β-ΓΛΥΚΑΝΕΣ (β-GLUCANS)

Οι β-γλυκάνες είναι υδατάνθρακες που βρίσκονται στα κυτταρικά τοιχώματα βακτηρίων, μυκήτων, ζυμών, αλγών, λειχήνων και φυτών όπως η βρώμη και το κριθάρι. Είναι γνωστοί και αλλιώς ως: β-1, 3-γλυκάνη και β-1, 6-γλυκάνη.Οι ζύμες και τα μανιτάρια περιέχουν β-1, 3-γλυκάνη, ενώ οι σπόροι των δημητριακών (βρώμη και κριθάρι) περιέχουν 1, 3 και 1, 4 δεσμούς. (Rahar *et al*, 2011). Η ποικιλομορφία τους είναι αποτέλεσμα μεταξύ των διαφορετικών δεσμών μονάδων γλυκοπυρανόζης. Η συμπύκνωση μπορεί να συμβεί με οποιαδήποτε υδροξυλική ομάδα οποιουδήποτε ατόμου άνθρακα και έχει ως αποτέλεσμα την διαμόρφωση α- ή β-ανωμερών, λόγω του ότι υπάρχουν τουλάχιστον οκτώ διαφορετικοί τρόποι με τους οποίους δυο μονάδες μονομερών μπορούν να ενωθούν. Η ποικιλία των γλυκανών έχει αυξηθεί από υποκαταστάσεις δακτυλίων σακχάρων και από διακλάδωση των αλυσίδων. Ωστόσο, μόνο λίγα πολυμερή της γλυκόζης υπάρχουν στην φύση.(Rop *et al.,* 2009).

Οι β-γλυκάνες παρουσιάζουν διαφορές ως προς τη βιολογική δραστηριότητα λόγω των διαφόρων μοριακών βαρών, δομών και συχνοτήτων των διακλαδώσεων και της διαλυτότητας . Είναι ένα από τα σημαντικότερα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των ανώτερων μυκήτων και αυτά τα οποία προσδίδουν τις ευεργετικές ιδιότητες στα μανιτάρια, τα οποία μπορεί να περιέχονται είτε στο κυρίως σώμα του μανιταριού είτε στα σπόρια και στο μυκήλιο. Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε β-γλυκάνες εξαρτάται από τον βαθμό ωρίμανσης του σώματος του μανιταριού, με βέλτιστη τη περίοδο πριν την ωρίμανση των σπορίων . Συνήθως κυμαίνεται από 0.21 έως 0.53g/100g επί ξηρής μάζας εκ των οποίων το μεγαλύτερο ποσοστό (54-82%) ανήκει στις αδιάλυτες ίνες ενώ το 16-46% ανήκει στις διαλυτές. (Stachowiak *et al*., 2012, Li *et al*, 2013).

1.4.2 ΔΟΜΗ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ

Από δομικής άποψης οι β-γλυκάνες των μυκήτων αποτελούνται κατά 65-90% από αλυσίδες γλυκόζης με β-(1,3) δεσμούς και διακλαδώσεις με β-(1,6) δεσμούς. Υπάρχουν διάφοροι υποδοχείς που αναγνωρίζουν τις β-γλυκάνες, όπως σύμφωνα με τον Brown και τους συνεργάτες η Δεκτίνη-1(Dectin-1)αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα (PRR) ο οποίος αναγνωρίζει ένα πλήθος γλυκανών από μύκητες και φυτά. Εντούτοις, η αναγνώριση και ο χαρακτηρισμός των υποδοχέων των β-γλυκανών είναι κάτι το πολύπλοκο.(Li *et al*, 2013, Fesel and Zuccaro, 2016).



Εικόνα 1: Δομή β-γλυκανών (Rahar S. *et al*., 2011)

1.4.3 ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ

Η β-γλυκάνη είναι ανθεκτική στο οξύ, επομένως περνάει από το στομάχι σχεδόν αμετάβλητη. Τα μακροφάγα που βρίσκονται στον βλεννογόνο του εντερικού τοιχώματος παραλαμβάνουν τα μόρια της β-γλυκάνης μέσω των υποδοχέων β-γλυκάνης. Ακολουθεί άμεση ενεργοποίηση και αργότερα ταξιδεύουν στους τοπικούς λεμφαδένες (Payer's Patch), σαν μέρος της φυσικής λειτουργίας αντιγόνου για την απελευθέρωση των κυτταροκινών και την πρόκληση ενεργοποίησης της cis συστηματικής ανοσίας. Όταν λαμβάνεται από το στόμα, μειώνει την χοληστερόλη του αίματος εμποδίζοντας την απορρόφησή της από τα τρόφιμα στο στομάχι και στο έντερο, ενώ όταν χορηγούνται με ένεση, οι β-γλυκάνες μπορούν να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα, αυξάνοντας χημικές ουσίες που αποτρέπουν τις λοιμώξεις. (Rahar *et al*., 2011).

Αναφέρεται ότι επιτυγχάνεται μεγαλύτερη απορρόφηση των β-γλυκανών όταν λαμβάνονται με άδειο στομάχι. Τα εντεροκύτταρα διευκολύνουν την μεταφορά των β-1, 3 γλυκανών και παρόμοιων ενώσεων σε όλο το εντερικό κυτταρικό τοίχωμα στην λέμφο, όπου ξεκινούν να αλληλεπιδρούν τα μακροφάγα για να ενεργοποιήσουν την ανοσολογική λειτουργία. Μελέτες έχουν επιβεβαιώσει ότι τόσο μεγάλα όσο και μικρά τμήματα β-γλυκανών έχουν βρεθεί στον ορό, γεγονός που δείχνει ότι απορροφώνται από τον εντερικό σωλήνα. (Rahar *et al*., 2011).

1.4.4 ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ

1.4.4.1 ΑΝΟΣΟΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Οι β-γλυκάνες είναι ισχυροί ανοσορυθμιστές με επιδράσεις τόσο στην έμφυτη όσο και στην επίκτητη ανοσία. Η δεκτίνη-1, η οποία είναι ένας διαμεμβρανικός πρωτεινικός υποδοχέας τύπου ΙΙ, δεσμεύει β-1,3 και β-1,6-γλυκάνες και μπορεί να προκαλέσει την έναρξη, αλλά και να ρυθμίσει την έμφυτη ανοσοαπόκριση. Η δεκτίνη-1 έχει βρεθεί σε μακροφάγα, ουδετερόφιλα και δενδριτικά κύτταρα. Εμπλέκονται διάφορα σηματοδοτικά μόρια, όπως ο πυρηνικός παράγοντας Κβ (NF-Κβ) , πρωτεΐνη προσαρμογής σήματος (CARD9) και ο πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων Τ κυττάρων (NFAT). Με αυτό τον τρόπο απελευθερώνονται κυτταροκίνες, όπως οι ιντερλευκίνη (IL) -12, IL-6, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF) –α και η IL-10. (Rahar *et al*., 2011).

1.4.4.2 ΑΝΤΙΔΙΑΒΗΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Η κατανάλωση β-γλυκανών που βρίσκονται στη βρώμη και στους μύκητες προκαλούν μείωση της ελεύθερης γλυκόζης του αίματος, όπως παρατηρείται σε πειραματόζωα και κλινικές δοκιμές. Επί παραδείγματι, οι β-γλυκάνες που παραλαμβάνονται με εκχύλιση από ζεστό νερό των καρποσωμάτων του *Agaricus blazei* εμφανίζουν αντιυπεργλυκαιμική, αντιυπερτριγλυκεριδική, αντιυπερχοληστερολαιμική και αντιαρτηριοσκληρωτική δραστηριότητα σε διαβητικούς αρουραίους. Οι β-γλυκάνες από βρώμη έχουν χρησιμοποιηθεί σε πολλές κλινικές μελέτες για την μείωση της γλυκόζης και την μείωση της μεταγευματικής γλυκαιμίας. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι το αλεύρι από βρώμη είναι περισσότερο αποτελεσματικό από πίτουρο βρώμης, γεγονός που επεξηγείται από την τριπλάσια σε περιεκτικότητα ποσότητα β-γλυκάνης στο αλεύρι βρώμης. (Rahar *et al*., 2011).

1.4.4.3 ΔΡΑΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗΣ ΥΠΕΡΤΡΙΓΛΥΚΕΡΙΔΑΙΜΙΑΣ

Η δυσλιπιδαιμία μπορεί να προκληθεί είτε από αντίσταση στην ινσουλίνη είτε από τη δράση των αδιποκυταροκινών. Στο διαβήτη, τα λιπώδη κύτταρα είναι ανθεκτικά στην ινσουλίνη και κατά συνέπεια, η ινσουλίνη που λειτουργεί για τη δέσμευση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στους μυς είναι μειωμένη, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η σύνθεση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης των ελεύθερων λιπαρών οξέων. Επομένως, το χαρακτηριστικό της δυσλιπιδαιμίας σε ασθενείς με διαβήτη είναι η υπερτριγλυκεριδαιμία. Οι β-γλυκάνες έχουν δείξει να μειώνουν την χοληστερόλη LDL και να αυξάνουν την HDL.(Rahar *et al.*, 2011).

Παρατηρήθηκε ότι η κατανάλωση βρώμης προκαλεί μείωση της χοληστερόλης, της ολικής και της LDL-χοληστερόλης. Η μείωση αυτή οφείλεται στις β-γλυκάνες που περιέχονται στη βρώμη. Σε μια μελέτη παρέμβασης με 20 υπερχοληστερολαιμικούς άνδρες ασθενείς, όπου χορηγήθηκε πίτουρο βρώμης, παρατηρήθηκε ότι είναι πιο αποτελεσματικό στη μείωση της χοληστερόλης, συγκρινόμενο με το πίτουρο σιταριού. Επιπροσθέτως, το κριθάρι (πλούσιο και αυτό σε β-γλυκάνες) φάνηκε να έχει παρόμοια επίδραση στη μείωση της χοληστερόλης με τη βρώμη.(Chen and Raymond., 2008, Rahar *et al.*, 2011).

1.4.4.4 ΑΝΤΙΚΑΡΚΙΝΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι οι β-γλυκάνες διαθέτουν αντικαρκινικές ιδιότητες καθότι έχουν χρησιμοποιηθεί ως ανοσοενισχυτική θεραπεία για τον καρκίνο από το 1980, κυρίως στην Ιαπωνία. Σε μελέτες που έχουν γίνει σε μύες, η β-1,3-γλυκάνη σε συνδυασμό με γ-ιντερφερόνη ανέστειλε την ανάπτυξη όγκων και τη μετάσταση στο ήπαρ. (Rimsten *et al*., 2003). Μελέτες σε ασθενείς με προχωρημένο στάδιο καρκίνου του στομάχου και του παχέος εντέρου χορήγησαν β-1,3-γλυκάνες από μανιτάρια Shiitake σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, έχοντας ως αποτέλεσμα να τους παραταθεί η διάρκεια ζωής. Προκλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι ένα προϊόν της β-γλυκάνης από ζύμη, το imprime PGG, όταν συνδυαστεί με συγκεκριμένα μονοκλωνικά αντισώματα ή εμβόλια προσφέρει σημαντική βελτίωση μακροπρόθεσμα στην επιβίωση του ασθενή κατά του καρκίνου, συγκρινόμενο με τη χορήγηση σκέτων μονοκλωνικών αντισωμάτων. Σύμφωνα με το Hong και τους συνεργάτες του, αυτός ο μηχανισμός δράσης είναι αποτελεσματικός έναντι σε ένα ευρύ φάσμα καρκίνων όταν χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία ενεργοποιούν ή προσδένονται στον όγκο .(Hong *et al*., 1950).

1.4.4.5 ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ

Η β-γλυκάνη από βρώμη έχει αποδειχθεί ότι παρουσιάζει αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι των *E. coli* και *B. subtilis*. Σε μία μελέτη, συγκρίνοντας κατιονική και φυσική β-γλυκάνη, η τελευταία φαίνεται να αναστέλλει την ανάπτυξη των προαναφερθέντων βακτηρίων περίπου 35%, ενώ στην κατιονική φαίνεται να προκαλείται 80% αναστολή αυτών των μικροοργανισμών. (Shin *et al*., 2005).

1.5.1 ΜΑΝΙΤΑΡΙ *GANODERMA LUCIDUM*-ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ-ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Ο μύκητας *Ganoderma lucidum*(ή αλλιώς μανιτάρι Reishi) και συγγενή είδη χρησιμοποιείται συνήθως στην παραδοσιακή ιατρική και έχει υπάρξει οικονομικά σημαντικό είδος στην ανατολική Ασία και πιο συγκεκριμένα, στην Κίνα, Ιαπωνία και Κορέα για πάνω από 4.000 χρόνια. (Sanodiya *et al*., 2009). Είναι μύκητας που αναπτύσσεται σαπροτροφικά ή παρασιτικά και αναφέρεται και ως ΄΄Μανιτάρι της Αθανασίας΄΄ και ΄΄ο Θεός των βοτάνων΄΄. (Al-Obaidi *et al*., 2016, Shah *et al*., 2014). Οι φαρμακολογικές του ιδιότητες είναι ευρέως διαδεδομένες. Μια σύγχρονη φαρμακολογική έρευνα έχει δείξει ότι το *Ganoderma lucidum* παρουσιάζει πολλαπλές θεραπευτικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων των αντικαρκινικών, αντιυπερτασικών , αντι-ιικών και ανοσορυθμιστικών ιδιοτήτων. Επιπλέον, παράγει μια μεγάλη ποικιλία βιοενεργών ενώσεων, με αναγνωρισμένες περισσότερες από 400 διαφορετικές ενώσεις καθιστώντας αυτόν τον μύκητα ένα ‘’εργοστάσιο’’για βιολογικά χρήσιμες ενώσεις. Τα τριτερπενοειδή και οι πολυσακχαρίτες είναι οι δυο κύριες κατηγορίες βιο- δραστικών ενώσεων. Επιπροσθέτως, ο βασιδιομύκητας αυτός, όπως και άλλοι λευκής σήψης, εκκρίνει ένζυμα που μπορούν να αποσυνθέσουν αποτελεσματικά την κυττταρίνη και την λιγνίνη, ένζυμα τα οποία μπορεί να αποδειχτούν χρήσιμα για την αξιοποίηση της βιομάζας.(Chen *et al*., 2012).

Ανήκει στην οικογένεια *Ganodermataceae*, με 219 είδη της οικογένειας να ανήκουν στο γένος *Ganoderma*. Το χρώμα καθώς και το σχήμα του ποικίλλουν από μαύρο και κόκκινο μέχρι άσπρο και κίτρινο. Είναι ένα μεγάλο, σκούρο ξυλώδες μανιτάρι και εξωτερικά είναι γυαλιστερό (από τις ελληνικές λέξεις «γάνος» που σημαίνει λαμπερός και τη λέξη δέρμα). Καλλιεργείται σε ξύλο, άχυρο ή πριονίδι. Λόγω της ξυλώδους υφής του βρίσκεται στο εμπόριο ως σκόνη, συμπλήρωμα διατροφής, τσάι, ακόμη και έλαιο. Από τα κύρια συστατικά που περιέχει το *Ganoderma lucidum* είναι υδατάνθρακες 26-28%, πρωτεΐνη 7-8%, λιποειδή 3- 5%, ακατέργαστες ίνες 59% καθώς και τέφρα 1,8% . (Bishop *et al*., 2015).

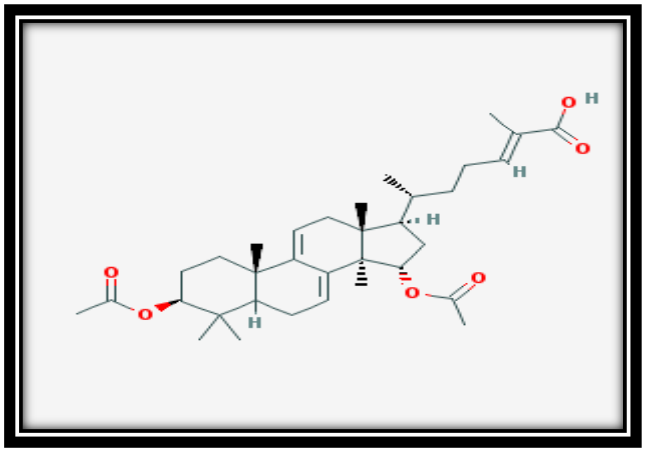


Εικόνα 2: Το μανιτάρι *Ganoderma lucidum* καλλιεργούμενο σε αγροβιομηχανικά παραπροϊόντα (Zervakis & Koutrotsios, 2018)

Έχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, καθώς περιλαμβάνει οφέλη τα οποία υποστηρίζονται επιστημονικά. Τα οφέλη αυτά οφείλονται σε μια πληθώρα βιοενεργών συστατικών που περιέχει όπως τα τριτερπένια, τους πολυσακχαρίτες (β-γλυκάνες), στερόλες, φαινόλες καθώς και τις γλυκοπρωτεΐνες, ουσίες που περιγράφονται εκτενέστερα στη συνέχεια. (Bishop *et al*., 2015).

1.5.2 ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ ΤΟΥ *GANODERMA LUCIDUM*

Τα τριτερπενοειδή είναι μια από τις κύριες ομάδες θεραπευτικών συστατικών στο *G. lucidum*, από τα οποία έχουν απομονωθεί πάνω από 150. Αποτελούν μία σημαντική υπο-ομάδα των τερπενίων καιαποτελούνται από έξι μονάδες ισοπροπενίου. Είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους οι οποίες φαίνεται ότι επηρεάζουν την κυτταρική απόπτωση, την αγγειογένεση καθώς και τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Έχουν παρατηρηθεί διαφορές στο προφίλ των τριτερπενοειδών που παράγονται στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Επί παραδείγματι, η περιεκτικότητά τους είναι εξαιρετικά χαμηλή σε καλλιεργημένα μυκήλια, αλλά σημαντικά αυξημένη στις καταβολές μανιταριών (μικρά μανιτάρια) καθώς και εμφανώς μειωμένη η περιεκτικότητα κατά την διάρκεια σχηματισμού καρποσωμάτων. Ο σημαντικότερος υπότυπος των τριτερπενίων είναι το γανοδερικό οξύ το οποίο αποτελείται από 4 κυκλικά και 2 γραμμικά ισοπρένια και υπάρχουν στοιχεία που αποδίδουν κυρίως σε αυτή την ένωση το πλήθος των ωφέλιμων ιδιοτήτων του μανιταριού. (Bishop *et al*., 2015).(Εικόνα 3)



Εικόνα 3: Δομή γανοδερικού οξέος (PubChem Database)

1.5.3 ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ ΤΟΥ *GANODERMA LUCIDUM*

Οι πολυσακχαρίτες είναι η άλλη κύρια ομάδα βιοδραστικών συστατικών που βρίσκονται στο *G.lucidum*. Είναι κυρίως ετεροπολυμερείς ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους και η γλυκόζη αποτελεί το κυριότερο συστατικό του μορίου ενώ ενώνεται με μόρια όπως η ξυλόζη, η μαννόζη, η γαλακτόζη καθώς και η φουκόζη. Μεταξύ των πολυσακχαριτών, οι υδατοδιαλυτες 1,3-β-και 1,6-β-γλυκάνες, είναι οι πιο δραστικές ανοσορυθμιστικές ενώσεις. Το *G.lucidum* κωδικοποιεί δυο συνθετάσες 1,3-β-γλυκάνης και επτά πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των β-γλυκανών Αυτές οι πρωτεΐνες είναι καλά διατηρημένες εκτός από το *G. lucidum* και σε άλλους μύκητες όπως το *S. cerevisiae,* το *P. chrysosporium* και το *P. placenta,* υποδηλώνοντας την σημασία τους στην βιοσύνθεση των μυκητιακών πολυσακχαριτών. (Bishop *et al*., 2015).

Επιπροσθέτως, περιέχει χιτίνη, έναν πολυσακχαρίτη που η δομή του είναι ανάλογη με της κυτταρίνης και ανιχνεύεται κυρίως στα οστρακόδερμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{ο} :ΠΡΟΙΟΝΤΑ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΥ ΚΑΙ ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΤΟΥΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

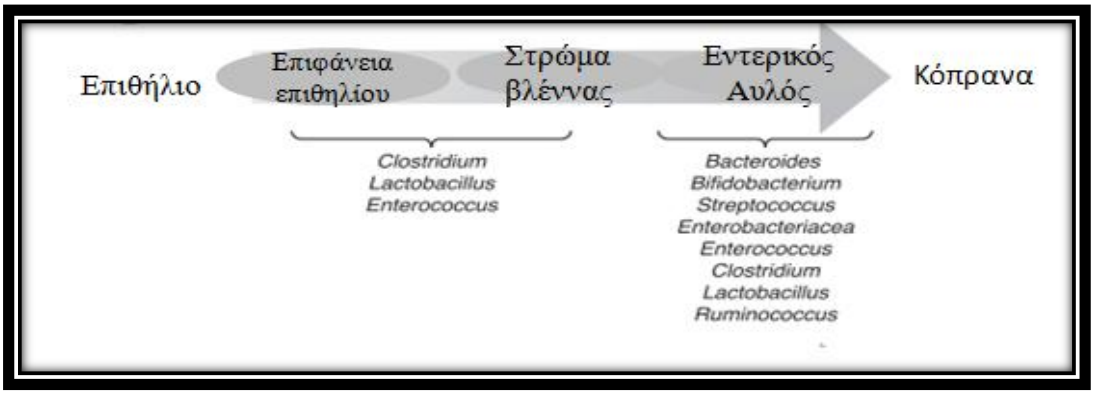
2.1.1 ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ-ΟΡΙΣΜΟΣ

Η ποικιλόμορφη κοινοπραξία των βακτηρίων, των αρχαίων, των μυκήτων, των πρωτοζώων και των ιών που βρίσκονται μέσα στο ανθρώπινο σώμα απαρτίζουν τον ανθρώπινο μικροβιόκοσμο. Σύμφωνα με τα δεδομένα των τελευταίων ετών το σύνολο αυτό των μικροοργανισμών επηρεάζει σημαντικά την ενεργειακή ομοιόσταση, τον μεταβολισμό, την υγεία του εντέρου, την ανοσολογική απόκριση και την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος του ξενιστή. Καθίσταται δυναμικό και υπόκεινται σημαντικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της ζωής του ξενιστή, ενώ επηρεάζεται η δομή του και η λειτουργία του από διάφορους παράγοντες, όπως η διατροφή, το περιβάλλον, οι ιατρικές παρεμβάσεις και ασθένειες. (Shreiner *et al*., 2015, Cho *et al*., 2012).

Ο ανθρώπινος μικροβιόκοσμος αποτελείται από περισσότερους από 100 τρισεκατομμύρια συμβιωτικούς μικροοργανισμούς, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη υγεία και ασθένεια. Πιο συγκεκριμένα ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι ένας ετερογενές οικοσύστημα που αποτελείται από βακτήρια, αρχαία, ευκάρυα και ιούς και εντοπίζεται κυρίως στο παχύ έντερο. Η μεγαλύτερη κατηγορία μικροοργανισμών είναι τα βακτήρια που ανέρχονται σε 10^{14} περίπου μικροβιακά κύτταρα και 5 εκατομμύρια γονίδια (γνωστά ως μικροβίωμα) (Weaver 2015). Επομένως το εντερικό μικροβίωμα μεταφέρει περίπου 150 φορές περισσότερα γονίδια από αυτά που βρίσκονται στο συνολικό ανθρώπινο γονιδίωμα (Whisner *et al*., 2013). Τα μικρόβια του εντέρου είναι στην πλειονότητά τους αναερόβια. Ως εκ τούτου, οι παραδοσιακές προσεγγίσεις που αφορούν την καλλιέργεια μικροοργανισμών στα διάφορα θρεπτικά μέσα είναι πολύ χρονοβόρες, αλλά μπορούν να αξιολογήσουν μόνο ένα μικρό μέρος που ανταποκρίνεται στις καλλιεργητικές τεχνικές. Η μεθοδολογία που ακολουθείται πλέον στηρίζεται σε μοριακές τεχνικές δηλαδή στην απομόνωση του ολικού μικροβιακού DNA από τα δείγματα (κόπρανα, ιστοί από βιοψίες) και στην περαιτέρω ταυτοποίηση των μικροβιακών πληθυσμών. Η πρόοδος των μεθόδων ανίχνευσης των μικροβιακών κοινοτήτων καθώς και των μεταβολών που μπορεί να συμβούν στη δομή τους μετά από παρεμβάσεις βοηθά σημαντικά στη μελέτη του εντερικού μικροβιόκοσμου αλλά και των παραγόντων που τον επηρεάζουν με στόχο τη βελτίωση της υγείας .(Whisner *et al*., 2013, Weaver , 2015).

2.1.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΕΝΤΕΡΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΥ

Το παχύ έντερο εκτιμάται ότι περιέχει πάνω από 70% όλων των μικροοργανισμών στο ανθρώπινο σώμα. Αξιοσημείωτο είναι ότι το ανθρώπινο έντερο έχει επιφάνεια όση ένα γήπεδο τένις (200 m^2).Στην πλειοψηφία του αποτελείται από αναερόβιους μικροοργανισμούς. Παρόλο που υπάρχουν μέχρι και σήμερα διαφορετικά 50 βακτηριακά φύλα, στον εντερικό μικροβιόκοσμο κυριαρχούν μόνο 2: τα Bacteroidetes και τα Firmicutes. Ακολουθούν σε μικρότερες αναλογίες τα βακτηριακά φύλα Proteobacteria, Verrucomicrobia, Actinobacteria, Fusobacteria, και Cyanobacteria. Μια πρόσφατη ανάλυση έδειξε ότι ο ανθρώπινος εντερικός μικροβιόκοσμος αποτελείται από πάνω από 35.000 βακτηριακά είδη (Frank *et al*., 2007, Sekirov *et al*., 2010).



Εικόνα 4:Μικροοργανισμοί εντέρου (Sekirov *et al.*, 2010).

2.1.3 ΠΩΣ Ο ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ ΕΠΙΔΡΑ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ

Μεταξύ των λειτουργιών του εντερικού μικροβιόκοσμου είναι η αποτελεσματική πέψη της τροφής, η διατήρηση του επιθηλιακού φραγμού, ο μεταβολισμός του λίπους, η αποτοξίνωση τοξικών μεταβολικών προϊόντων και η ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης προλαμβάνοντας την αύξηση και δράση ξένων αντιγόνων. Είναι αξιοσημείωτη η αλληλεπίδραση μεταξύ του επιθηλιακού φραγμού και των κυττάρων του ανοσοποιητικού. (Türker *et al*.,2014)

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι όταν μεταβάλλεται η σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου από έναν "φυσιολογικό" φαινότυπο (κατάσταση δυσβίωσης) , μεταβάλλεται και η συμβιωτική σχέση μεταξύ του ξενιστή και του εντερικού μικροβιόκοσμου με αποτέλεσμα τη πρόκληση διαφόρων ασθενειών όπως είναι οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (IBD), το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου, η παχυσαρκία, οι αλλεργίες, διάφορα αυτοάνοσα νοσήματα και νευρικές διαταραχές .(Quince *et al*., 2015, Codling *et al.*, 2010, Kadooka *et al.*, 2010, Karimi *et al*., 2015, Wang *et al*., 2014).

2.2.1 ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ-ΟΡΙΣΜΟΣ

Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που προσφέρουν ευεργετικές επιδράσεις στον οργανισμό όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες. Ένας μικροοργανισμός για να χαρακτηριστεί ως προβιοτικό, θα πρέπει να πληροί συγκεκριμένα κριτήρια όπως:

- ✓ Να είναι ασφαλής για ανθρώπινη κατανάλωση και να μην προκαλεί παθογόνες ή τοξικές επιδράσεις.
- ✓ Να προέρχεται από το γαστρεντερικό σύστημα υγιούς ανθρώπου, έτσι ώστε να θεωρείται ασφαλής για τον άνθρωπο και να προσαρμόζεται καλύτερα στο οικοσύστημα του εντέρου.
- ✓ Να είναι ανθεκτικός στα γαστρικά και χολικά άλατα, καθώς και στα πεπτικά ένζυμα για να επιτρέψουν την επιβίωσή του μετά την διέλευσή του από τον γαστρεντερικό σωλήνα.
- ✓ Να επιτρέπει την ανίχνευση παραμέτρων που επιβεβαιώνουν μια θετική επίδραση στον εντερικό μικροβιόκοσμο, όπως βιωσιμότητα, προσκόλληση στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και ικανότητα αναπαραγωγής στο ανθρώπινο έντερο. (De Vrese & Schrezenmeir, 2008).

2.2.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΔΡΑΣΗΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ-ΟΦΕΛΗ

Κάποιοι προτεινόμενοι μηχανισμοί μέσω των οποίων δρουν περιλαμβάνουν: μείωση της εντερικής διαπερατότητας με ρύθμιση της ανώτερης στενής ένωσης των πρωτεϊνών, αύξηση της έκκρισης της μουκίνης (mucin) από τα goblet κύτταρα (goblet cell), αύξηση της έκκρισης ενώσεων με αντιμικροβιακή δράση που αποτρέπουν τον αποικισμό από παθογόνα, παραγωγή SCFAs, διέγερση της έκκρισης IgA, μείωση pH του εντερικού αυλού και ενίσχυση των ανοσοποιητικών κυττάρων να προωθούν την αντίσταση σε μέλη του φυσικού μικροβιόκοσμου ενώ παράλληλα παρέχουν προστασία έναντι των παθογόνων.(Gallo *et al*., 2016). Οι πιο κοινοί χρησιμοποιούμενοι προβιοτικοί οργανισμοί περιλαμβάνουν είδη από τα γένη *Lactobacillus, Bifidobacterium* , αλλά και *Bacillus* και *Streptococcus* καθώς και η ζύμη *Saccharomyces boulardii*. Είναι πολύ σημαντικό να επιβιώσουν στο όξινο περιβάλλον του στομάχου και τα χολικά άλατα και τέλος να αποικίσουν στο έντερο. Τα προβιοτικά φαίνεται να προσφέρουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή χωρίς να μετατρέπει το μικροβίωμά του μόνιμα αλλά παροδικά.(Ceapa *et al*., 2013, Gaerzia-Mazcorro *et al*., 2011). Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το *Bifidobacterium longum* (JCM 1217) προστατεύει από το εντερο-αιμορραγικό τροφογενές παθογόνο *E. Coli* O157:H7.(Fukuda *et al*., 2011).

2.3.1 ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ-ΟΡΙΣΜΟΣ

Ως πρεβιοτικό ορίζεται ‘’ένα επιλεκτικά άπεπτο ζυμώμενο συστατικό που επιτρέπει συγκεκριμένες αλλαγές, στην σύνθεση και /ή στον εντερικό μικροβιόκοσμο και παρέχει οφέλη στην υγεία του ξενιστή, με επιλεκτική ανάπτυξη και ενεργοποίηση ενός ή περιορισμένου αριθμού βακτηρίων στο κόλον ’’.(Bode, 2012, Gibson and Roberfroid, 1995). Τα πρεβιοτικά προστατεύουν το επιθήλιο του εντέρου αυξάνοντας το στρώμα βλέννας, επιμηκύνοντας τις μικρολάχνες, αυξάνοντας τον αριθμό των επιθηλιακών κυττάρων και αποτρέποντας την προσκόλληση παθογόνων στελεχών στα επιθηλιακά κύτταρα.(Lemnon *et al*., 2014, Mendis *et al*., 2016). Σε πρόσφατη δημοσιευμένη μελέτη σε πειραματόζωα φάνηκε πως όταν τα ζώα στερήθηκαν τις διαιτητικές ίνες, υποβαθμίστηκε η προστατευτική βλέννα, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την εισβολή μικροοργανισμών από το φυσικό μικροβιόκοσμο του εντέρου αλλά και παθογόνων.(Desai *et al.*, 2016).

Τα πρεβιοτικά ως συστατικά των τροφίμων χρησιμεύουν ως υποστρώματα για τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Είναι ανθεκτικά στη πέψη, και υδρολύονται και ζυμώνονται από τους μικροοργανισμούς του εντέρου. Τα πρεβιοτικά αλλάζουν τη δομή του εντερικού μικροβιόκοσμου, υποστηρίζοντας την ανάπτυξη κάποιων μικροοργανισμών εκλεκτικά, ενώ δεν διευκολύνουν την αύξηση κάποιων άλλων. (Weaver, 2015).

2.3.2 ΕΙΔΗ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ

Οι πρεβιοτικές ίνες ποικίλλουν ως προς τα είδη των υδατανθράκων και τα μήκη των αλυσίδων αλλά και στους χημικούς δεσμούς. Οι δισακχαρίτες έχουν δύο μονάδες σακχάρων όπως λακτουλόζη ή λακτιτόλη. Η λακτουλόζη ήταν ένα από τα πρώτα πρεβιοτικά που φάνηκε ότι επηρεάζει τους μικροβιακούς πληθυσμούς εντέρου (Weaver, 2015).

Οι ολιγοσακχαρίτες έχουν περίπου 3-10 μονάδες σακχάρων και σε αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι: φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες βραχείας αλύσου (FOS), ολιγοσακχαρίτες σόγιας, ξυλο-ολιιγοσακχαρίτες και γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS). (Roberfroid *et al*., 2010).Τα FOS είναι

ως επί το πλείστον β-(2-1) ολιγομερή φρουκτόζης τύπου ινουλίνης που συχνά εξάγονται από φυτά της οικογένειας Compositae όπως το κιχώριο. Παράγονται από ινουλίνη χρησιμοποιώντας μια ενδο-ινουλινάση (endoinulinase), η οποία διασπά τα πολυμερή σε ολιγομερή με ή χωρίς Glc στο αναγωγικό άκρο. Επιπροσθέτως, τα FOS μπορούν να συντεθούν με τρανσ-φρουκτοζυλίωση (transfructosylation) χρησιμοποιώντας β-γαλακτοσιδάσες από μύκητες ή βακτήρια και σουκρόζη ως υπόστρωμα. (Bode, 2012).

Τα GOS είναι ολιγομερή με βαθμό πολυμερισμού μεταξύ 3 και 10 (συνήθως 3, 4 και 5) και συντίθενται από λακτόζη με ενζυματική τρανσ-γαλακτοζυλίωση χρησιμοποιώντας ως υποκατάστατο β-γαλακτοσιδάσες από μύκητες, βακτήρια και λακτόζη.(Bode, 2012).

Πρεβιοτικά μεγαλύτερης αλύσου, δηλαδή άνω των 10 μονάδων περιλαμβάνουν την ινουλίνη (FOS μακράς αλύσου) και ανθεκτικά άμυλα. Είναι σημαντικό ότι το μήκος της αλυσίδας μπορεί να επηρεάσει τη θέση που θα γίνει η ζύμωση στο έντερο, με τα πρεβιοτικά που έχουν πιο μακριά αλυσίδα να φτάνουν στο χαμηλότερο μέρος του εντέρου (Roberfroid *et al*., 2010).

2.3.3 ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ

Έχει αποδειχτεί ότι τα πρεβιοτικά βελτιώνουν έναν μεγάλο αριθμό χρόνιων φλεγμονωδών καταστάσεων, με μεγάλο ενδιαφέρον στο μεταβολισμό του ασβεστίου και της υγείας των οστών. Αυτές οι καινοτόμες διατροφικές ίνες έχει δειχτεί ότι αυξάνουν την απορρόφηση του ασβεστίου στο κατώτατο έντερο σε προκλινικές μελέτες και ανθρώπινες μελέτες εξίσου. Αν και τα δεδομένα σε ανθρώπους είναι περιορισμένα, οι πρεβιοτικές επιδράσεις που σχετίζονται με τα οστά έχουν δοκιμαστεί , τόσο στο υψηλότερο σημείο της οστικής μάζας κατά την εφηβεία καθώς και όταν μειώνεται μετά την έμμηνο ρύση.(Whisner *et al*. 2017).

Τα τρόφιμα τα οποία περιέχουν μεγάλες ποσότητες πρεβιοτικών καταναλώνονται εδώ και αιώνες με πρόσληψη μεγαλύτερη από 135 g/ημέρα, όπως εκτιμήθηκε σε πληθυσμούς από κυνηγούς-τροφοσυλλέκτες, ενώ στις χώρες του Δυτικού κόσμου η κατανάλωση μειώνεται σε 1-4γρ.για την Βόρειο Αμερική και σε 3-11γρ. για τη Δυτική Ευρώπη. (Whisner *et al*.2016). Ανιχνεύονται σε ένα σύνολο τροφίμων όπως τα λαχανικά, οι κόνδυλοι και τα δημητριακά. Πιο συγκεκριμένα, οι πρεβιοτικές ίνες εντοπίζονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στην ρίζα κιχωρίου, στα πράσσα, στις αγκινάρες της Ιερουσαλήμ, στα σπαράγγια, στο σκόρδο, στο κρεμμύδι, στο σιτάρι, στη βρώμη και στη σόγια. Δεδομένου ότι πολλά τρόφιμα περιέχουν φυσικά πρεβιοτικά, είναι σημαντικό να αξιολογηθεί και η αποτελεσματικότητά τους στον εντερικό μικροβιόκοσμο. (Scholz-Ahrens, 2016).

Από τα φρούτα που έχουν πιθανές πρεβιοτικές επιδράσεις είναι η μπανάνα. Έχει αναφερθεί ότι περιέχει καλή πηγή ανθεκτικού αμύλου τύπου II (σε κόκκους-granulated) και φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) με σημαντικές διακυμάνσεις στις ποσότητες της φρουκτάνης. Σε μία τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή οι Mitsou και οι συνεργάτες χωρίζοντας σε 3 ομάδες 34 υγιείς εθελόντριες, συμπέραναν ότι η καθημερινή κατανάλωση μπανάνας στα πλαίσια μιας σωστής διατροφικής συμπεριφοράς, μπορεί να προκαλέσει την αύξηση των βακτηρίων του γένους Bifidobacterium σε υγιείς γυναίκες που αντιμετωπίζουν προβλήματα σωματικού βάρους. (Mitsou *et al*., 2011).

Σε πρόσφατη ανασκόπηση φάνηκε ότι τα πρεβιοτικά προκαλούν στο παχύ έντερο αύξηση στους πληθυσμούς των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* όταν χορηγούνται σε δόσεις μέχρι 20 g/

ημέρα για παρεμβάσεις από 7 έως 64 ημέρες (Ariefdjohan *et al* 2013). Επίσης διαπιστώθηκε αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων του γένους *Lactobacillus* και μείωση του πληθυσμού του *E.coli* . Επομένως, όταν ενσωματώνονται στη διατροφή σε επαρκείς ποσότητες, θα διεγείρουν επιλεκτικά την ανάπτυξη ορισμένων βακτηρίων που έχουν ωφέλιμες επιδράσεις στον ξενιστή. Επί του παρόντος, γνωρίζουμε λίγα για τις ιδιότητες των νέων ινών που ενισχύουν την υγεία των οστών πέρα από την αντοχή τους στην πέψη (Ito al, 1990, Ballongue *et al*.1997).

2.4.1 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΒΡΑΧΕΙΑΣ ΑΛΥΣΟΥ (SHORT CHAIN FATTY ACIDS)

Τα SCFA είναι μικροβιακοί μεταβολίτες του εντέρου με σημαντική επίδραση σε μοριακούς μηχανισμούς του ξενιστή, εξ αιτίας των ρόλων τους ως υποστρώματα και /ή σαν σηματοδοτικά μόρια (Neves *et al*., 2015). Αποτελούν τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης των διαιτητικών ινών από το αναερόβιο εντερικό μικροβιόκοσμο και έχει αποδειχτεί ότι ασκούν πολλές θετικές επιδράσεις στον ενεργειακό μεταβολισμό των θηλαστικών. Οι μη αφομοιώσιμοι υδατάνθρακες περνούν το ανώτερο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα το οποίο δεν τους επηρεάζει και ζυμώνονται στο τυφλό έντερο και στο παχύ έντερο από το αναερόβιο μικροβιόκοσμο του τυφλού και του παχέος εντέρου. Τα προϊόντα της ζύμωσης είναι πολλές ομάδες μεταβολιτών, εκ των οποίων τα SCFAs αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα.(Besten *et al*., 2013). Τα SCFAs είναι κορεσμένα αλειφατικά οργανικά οξέα τα οποία αποτελούνται από ένα έως έξι άνθρακες εκ των οποίων το οξικό (C2), το προπιονικό (C3) και το βουτυρικό (C4) είναι τα πιο άφθονα (95%).Τα προαναφερθέντα βρίσκονται κατά προσέγγιση σε μοριακή αναλογία στο παχύ έντερο και στα κόπρανα 60:20:20 (Binder *et al*., 2010, Besten *et al*., 2013).

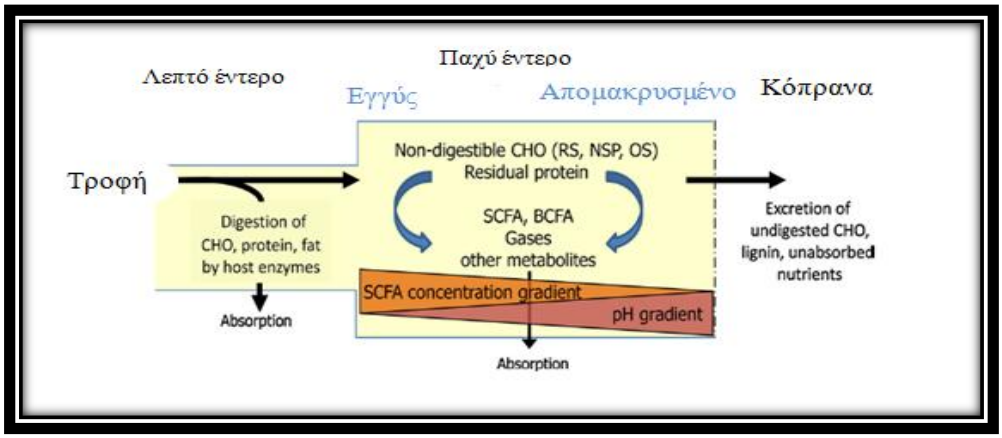
Οι διαφορετικοί τύποι και ποσότητες των μη αφομοιώσιμων υδατανθράκων οι οποίοι φτάνουν στο τυφλό και το παχύ έντερο εξαρτώνται από την ημερήσια πρόσληψη και το είδος της τροφής αντίστοιχα. Τα κυριότερα συστατικά των ινών που περνάνε το ανώτερο τμήμα του εντέρου είναι πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων, ολιγοσακχαρίτες και ανθεκτικά άμυλα. Η μέση διατροφή δυτικού τύπου περιέχει περίπου 20-25γρ. ινών ημερησίως, ενώ η διατροφή πλούσια σε φρούτα και λαχανικά μπορεί να φτάσει και 60γρ./ημέρα. Η ζύμωση των υδατανθράκων που φθάνουν στο τυφλό αποδίδουν 400–600 mmol SCFAs/ημέρα, κάτι που αντιστοιχεί σε παραγωγή SCFAs 0.24-0.38 σωματικού βάρους $-^{1}$ h^{-1} , ισοδύναμο με 10% των ανθρώπινων θερμιδικών απαιτήσεων. Επομένως, εξαρτώμενη από τη διατροφή, η συνολική συγκέντρωση των SCFAs κυμαίνεται από 70 έως 140 Mm στο εγγύς κόλον και από 20 έως 70 Mm στο απομακρυσμένο κόλον. (Besten *et al*., 2013).

Επιπλέον, παράγοντες που σχετίζονται με τον ξενιστή όπως ο χρόνος διέλευσης, μπορούν να παίζουν σημαντικό ρόλο στη συνολική ποσότητα που εκκρίνεται στα κόπρανα (Oufir *et al*., 2000).

Αρκετά ερευνητικά δεδομένα δείχνουν ότι τα SCFAs μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και θεραπεία του μεταβολικού συνδρόμου, διαταραχών του εντέρου, ορισμένων ειδών καρκίνου, ελκώδης κολίτιδας, νόσου του Crohn’s και διάρροια που σχετίζεται με αντιβιοτικά. (Besten *et al*., 2013).

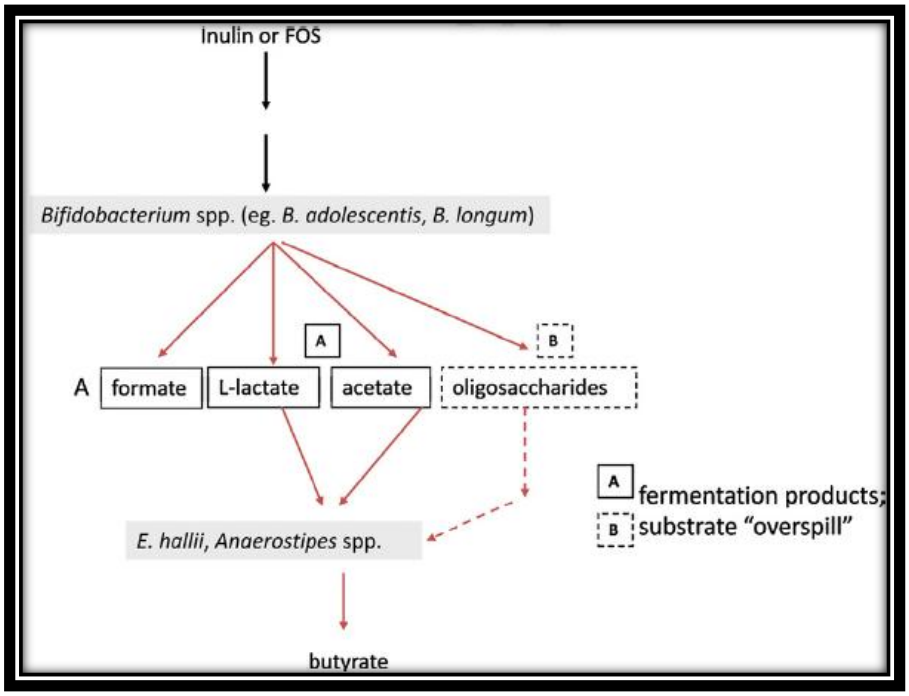
Στα βακτηριακά φύλα Bacteroidetes, Firmicutes και Actinobacteria ανήκουν τα περισσότερα στελέχη που υπάρχουν στο παχύ έντερο, με πολλαπλά ένζυμα ικανά να αποικοδομήσουν πολύπλοκα υποστρώματα. Με τη δράση των μικροβιακών στελεχών μεταβολίζεται μια σεβαστή ποικιλία υποστρωμάτων, όπου τα υποστρώματα υπόκεινται σε μεταβολές και στο τέλος

ζυμώνονται με τη συνεργασία πολλών ομάδων μικροοργανισμών που δημιουργούν συντροφικές σχέσεις. Ο μικροβιακός μεταβολισμός και ζύμωση των διατροφικών υδατανθράκων καταλήγει στον σχηματισμό λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου καθώς και αερίων. Τα κυρίαρχα προϊόντα της βακτηριακής αυτής ζύμωσης είναι τα: οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ χαμηλώνοντας το pH του παχέος εντέρου. Αν και αδύναμα οξέα, τα προαναφερθέντα επηρεάζουν την μικροβιακή σύνθεση, ποικιλομορφία και υγεία του ξενιστή, χρησιμοποιώντας το βουτυρικό οξύ ως πηγή ενέργειας από τα κύτταρα του παχέος εντέρου. (Scott *et al*., 2013).



Εικόνα 5: Προϊόντα βακτηριακής ζύμωσης λεπτού και παχέος εντέρου (Scott *et al*., 2013).

Σε μια μελέτη ο Duncan και οι συνεργάτες του παρατήρησαν ότι μια μείωση του συνολικού υδατανθρακικού περιεχομένου διαμέσου της διατροφής οδήγησε σε ανάλογη σημαντική μείωση του πληθυσμού Roseburia/E. Rectale group, γεγονός που σχετίζεται ισχυρά με την μείωση επιπέδων του βουτυρικού οξέως στο κοπρανικό περιεχόμενο .(Duncan *et al.*, 2007). Εφόσον τα μπιφιντοβακτηρίδια δεν παράγουν βουτυρικό οξύ, το εναλλακτικό μονοπάτι είναι η διασταυρωτή σίτιση (cross-feeding) από άλλα βακτήρια των προϊόντων ζύμωσης τα οποία αφθονούν στο παχύ έντερο, όπως το *Eubacterium hallii* και *Anaerostipes caccae*, τα οποία μετατρέπουν το γαλακτικό οξύ σε βουτυρικό. Επιπροσθέτως, το A. caccae μπορεί να αξιοποιήσει τα μονομερή της φρουκτόζης που απελευθερώνονται σε βουτυρικό εξίσου.(Εικόνα 6).(Duncan *et al.*, 2004, Belenguer *et al.*, 2006, Falony *et al.*, 2006).



Εικόνα 6: Μετατροπή μέσω βακτηριακού cross-feeding πρεβιοτικών ενώσεων σε βουτυρικό οξύ (Scott *et al*., 2013).

2.4.2 ΠΩΣ Η ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ SHORT CHAIN FATTY ACIDS ΕΠΗΡΕΑΖΕΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΤΟΥ ΠΑΧΕΟΣ ΕΝΤΕΡΟΥ

Η διατροφή και το μικροπεριβάλλον του εντέρου αλληλεπιδρούν με τα βακτήρια του. Η ζύμωση των ινών που οδηγούν σε υψηλές ποσότητες SCFAs, μειώνουν το pH στο κόλον, το οποίο με την σειρά του επηρεάζει την σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου και με την σειρά του την παραγωγή σε SCFAs. Η πτώση αυτή του pH επηρεάζει διττά τη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Σε μελέτες που έχουν γίνει *in vitro*, αλλά και σε πειραματόζωα, φάνηκε ότι το χαμηλό pH μεταβάλλει την σύνθεση των μικροβίων του εντέρου και ότι αποτρέπει την υπερβολική ανάπτυξη παθογόνων μικροβίων ευαίσθητων στο pH όπως τα Enterobacteriaceae και τα Clostridia. Καθώς η συγκέντρωση σε SCFAs μειώνεται από το εγγύς προς το απομακρυσμένο κόλον, το pH αυξάνεται από το τυφλό στο ορθό. (Besten *et al*., 2013).

Επιπρόσθετα, διαφορετικές μελέτες έδειξαν ότι σε pH 5.5 τα βουτυροπαραγωγά βακτήρια όπως τα *Roseburia* spp. και το *Faecalibacterium prausnitzii* (και τα δυο ανήκουν στο φύλο Firmicutes) αποτελούν το 20% του συνολικού πληθυσμού. Καθώς οι διαιτητικές ίνες αρχίζουν και μειώνονται στα πιο απομακρυσμένα μέρη του παχέος εντέρου, το pH του εντερικού αυλού αυξάνεται στο 6.5 και τα βουτυροπαραγωγά βακτήρια εξαφανίζονται σχεδόν πλήρως, ενώ αφθονούν τα βακτήρια του γένους Bacteroides που σχετίζονται με την παραγωγή του οξικού και του προπιονικού οξέος. (Besten *et al*., 2013).

Επιπροσθέτως, δεν έχουν όλα τα SCFAs την ίδια επίδραση. Ενδεικτικά, το βουτυρικό αποτελεί πρωτογενή πηγή ενέργειας για τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου, ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και την απόπτωση αυτών των κυττάρων. Το οξικό χρησιμοποιείται ως χοληστερόλη ή είναι πρόδρομο του λιπαρού οξέος και μεταβολίζεται στους περιφερικούς ιστούς, ενώ το προπιονικό με την σειρά του μεταβολίζεται στο ήπαρ και

συμμετέχει στην ρύθμιση του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων.(Cani and Knauf, 2016).

2.5 ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Ο μεγάλος αριθμός των μικροοργανισμών που κατοικούν στις επιφάνειες του σώματος των θηλαστικών έχουν εξελιχθεί παράλληλα με το ανοσοποιητικό τους σύστημα. Αν και πολλά από τα μικρόβια επιτελούν λειτουργίες οι οποίες είναι χρήσιμες για τις λειτουργίες του ξενιστή, κάποιες φορές μπορούν να τον θέσουν σε απειλή με διάφορες παθολογίες. Το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών παίζει σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της ομοιόστασης του ξενιστή , εξασφαλίζοντας έτσι ισορροπία μεταξύ ξενιστή-μικροβίων. (Hooper *et al*., 2012).

Εκατομμύρια χρόνια συνύπαρξης έχουν διαμορφώσει στενές διασυνδέσεις ανάμεσα στη φυσιολογία των μικροβιακών κοινοτήτων και των ξενιστών που εκτίνονται πέρα από τις μεταβολικές λειτουργίες. Αυτές οι διασυνδέσεις είναι ιδιαίτερα φανερές ανάμεσα στον εντερικό μικροβιόκοσμο και το ανοσοποιητικό. Οι πυκνές κοινότητες βακτηρίων του κατώτερου εντέρου ($\geq 10^{12}$ / cm^3 εντερικού περιεχομένου) ξεχωρίζουν από το επιθηλιακό στρώμα των κυττάρων του ξενιστή (10 mm) σε μια μεγάλη περιοχή επιφάνειας (~200 m^2 στους ανθρώπους). Τα βακτήρια επομένως που κατοικούν εκεί μπορούν ευκαιριακά να εισβάλλουν στον ιστό του ξενιστή και να προκαλέσουν σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής και της σηψαιμίας. Το ανοσοποιητικό σύστημα προσαρμόζεται και διατηρεί τη συμβιωτική σχέση μεταξύ ξενιστή-μικροβιόκοσμου. (Hooper *et al*., 2012).

Μια σημαντική κινητήρια δύναμη στην εξέλιξη του ανοσοποιητικού των θηλαστικών, ήταν η ανάγκη να διατηρηθεί η ισορροπία μεταξύ του ξενιστή και του φυσικού μικροβιόκοσμου. Το εντερικό ανοσοποιητικό σύστημα αντιμετωπίζει μοναδικές προκλήσεις σε σχέση με άλλα όργανα, καθώς πρέπει συνεχώς να έρχεται σε αντιπαράθεση με το τεράστιο μικροβιακό φορτίο και τις διάφορες αλλαγές οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν παθολογίες. Επομένως, η σημαντικότερη λειτουργία του εντερικού ανοσοποιητικού συστήματος είναι να ελέγχει την έκθεση των βακτηρίων στους ιστούς του ξενιστή σε δυο διακριτά επίπεδα. Το πρώτο είναι η ελαχιστοποίηση της άμεσης επαφής του εντερικού μικροβιόκοσμου με την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων (στρωματοποίηση) και το αμέσως επόμενο είναι ο περιορισμός των μικροοργανισμών που εισβάλλουν σε σημεία του εντέρου και εκτίθενται στο ανοσοποιητικό σύστημα (διαμερισματοποίηση). (Hooper *et al*., 2012).

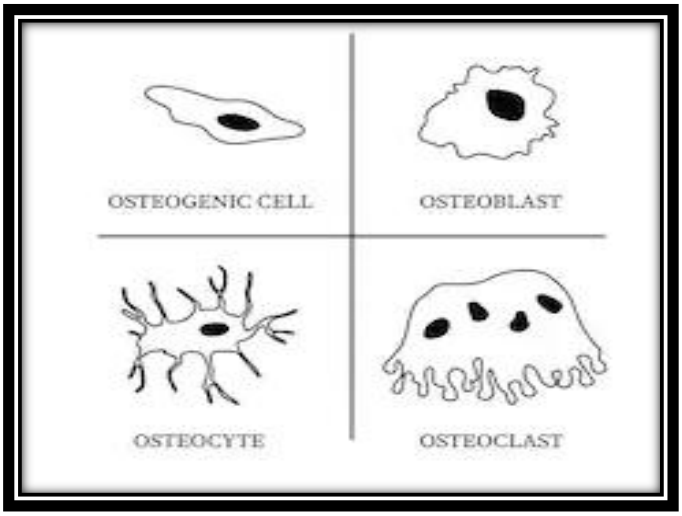
Στο παχύ έντερο υπάρχουν δυο δομικά διακριτά στρώματα βλέννας, το εξωτερικό στρώμα που περιέχει μεγάλο αριθμό βακτηρίων και το εσωτερικό που είναι ανθεκτικό στην βακτηριακή διείσδυση, σε αντίθεση με το λεπτό έντερο, το οποίο στερείται διακριτές εσωτερικές και εξωτερικές στοιβάδες. (Johansson *et al*., 2011). Ακολούθως, η διαμερισματοποίηση εξαρτάται εν μέρει από τις αντιμικροβικές πρωτεΐνες, οι οποίες εκκρίνονται από το εντερικό επιθήλιο. (Vaishnava *et al*., 2011).

Η διαστρωμάτωση των βακτηρίων του εντερικού μικροβιόκοσμου στον εντερικό αυλό του επιθηλιακού φραγμού εξαρτάται από την εκκρινόμενη ανοσοσφαιρίνη Α (IgA). Η εξειδικευμένη IgA παράγεται από τα δενδριτικά κύτταρα που βρίσκονται στο έντερο και τα οποία ελέγχουν τον μικρό αριθμό των βακτηρίων που διεισδύουν στην ανώτερη επιφάνεια του επιθηλίου. Τα κύτταρα αυτά αντιδρούν με τα Β- και Τ- κύτταρα στις πλάκες Peyer , προκαλώντας τα Β-κύτταρα να παράγουν IgA απευθείας κατά των εντερικών βακτηρίων.(Roberfroid *et al.* 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{ο}:ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ

3.1 ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ-ΟΡΙΣΜΟΣ

Ο σκελετός των σπονδυλωτών αποτελείται από δυο συγκεκριμένους ιστούς, τους χόνδρους και τα οστά. Τα οστά με την σειρά τους είναι απαραίτητα για τον άνθρωπο, καθώς ο κύριος ρόλος τους είναι να παρέχουν στήριξη του κορμού, προστατεύουν τα όργανα, συνεισφέρουν στην αιμοποίηση και αποθηκεύουν μεταλλικά στοιχεία. Τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται στα οστά είναι τα εξής: οι οστεοβλάστες (OB), οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την σύνθεση και την μεταλλοποίηση του οστού, ακολουθούν οι οστεοκλάστες (OC) οι οποίοι εμπλέκονται στην απορρόφηση του οστού και τέλος τα οστεοκύτταρα τα οποία βρίσκονται άφθονα στον σκελετό του ενήλικα.(Εικόνα 7) Για να είναι ακέραιος ο σκελετός απαιτείται μία δυναμική ισορροπία ανάμεσα στον οστικό σχηματισμό και την οστική απορρόφηση. Όμως, είναι πιθανό εάν για οποιοδήποτε λόγο υπάρξει δυσλειτουργία σε αυτές τις διαδικασίες, μπορεί να εμφανιστεί πάθηση, γνωστή ως οστεοπόρωση. (Trzeciakiewicz *et al.*, 2009).



Εικόνα 7: Κύτταρα των οστών (VectorStock)

Επομένως, ως οστεοπόρωση ορίζεται η διαταραχή που χαρακτηρίζεται από την απώλεια του οστού και αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων και ευθραυστότητας των οστών, συνήθως στο ισχίο, στον καρπό και στην σπονδυλική στήλη. Έχει υπολογιστεί ότι επηρεάζει 200 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως, εξίσου άνδρες και γυναίκες. Παρόλο που η διάγνωση της νόσου εξαρτάται από την ποσοτική εκτίμηση της οστικής πυκνότητας , η οποία είναι βασικός καθοριστικός παράγοντας, η κλινική σημασία της οστεοπόρωσης έγκειται στα κατάγματα που προκύπτουν. Σύμφωνα με τον WHO κριτήρια διάγνωσης είναι η οστική πυκνότητα BMD 2.5 SDs κάτω από την μέση μέγιστη οστική μάζα σε ένα μέσο νέο, υγιή ενήλικα. (Soen *et al.*, 2013). Σχετίζεται με παράγοντες κινδύνου όπως ορμονική ανισορροπία, αυξημένο οξειδωτικό στρες και χρόνια φλεγμονή. Ο μεταβολισμός του ασβεστίου μαζί με οιστρογόνα και ανδρογόνα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στον κύκλο των οστών. Χαμηλά επίπεδα οιστρογόνων στις μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες και χαμηλά επίπεδα τεστοστερόνης σε υπογοναδικούς άνδρες αυξάνουν την οστική απορρόφηση. (Cauley, 2015, Funaro *et al.*, 2013).

3.1.2 ΕΙΔΗ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ

Εκτός από την μετα-εμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση η οποία επηρεάζει το 30% των γυναικών, υπάρχουν πολλές αιτίες δευτερογενούς οστεοπόρωσης που εμφανίζονται σε σχεδόν 30-60% των ανδρών και άνω του 50% προ-εμμηνοπαυσιακών γυναικών. Επιπλέον, και στα παιδιά η οστεοπόρωση μπορεί να είναι πρωτογενής λόγω κάποιας ενδογενούς ανωμαλίας των οστών (συνήθως γενετικής προέλευσης) ή δευτερογενής λόγω κάποιας ιατρικής κατάστασης ή θεραπείας. Η πιο συχνή κατάσταση στην προηγούμενη κατηγορία είναι η ατελής οστεογένεση, στην οποία υπάρχει μια υποβόσκουσα ανωμαλία στην σύνθεση της οστικής μήτρας, συνήθως λόγω ελαττωματικής σύνθεσης κολλαγόνου τύπου Ι.(Faienza *et al.*, 2013)

Το 1997, το Διεθνές Ίδρυμα Οστεοπόρωσης δημοσίευσε κατευθυντήριες οδηγίες για την διάγνωση και την διαχείριση της οστεοπόρωσης . Αυτές περιλαμβάνουν την ανάπτυξη νέων τεχνικών μέτρησης των οστών, συμπεριλαμβανομένων μεθόδων αξιολόγησης κινδύνου κατάγματος και μεθόδων που έχουν δείξει ότι μειώνουν τον κίνδυνο καταγμάτων σε ευπαθή σημεία. Επομένως, σκοπός των οδηγιών είναι να προάγουν μια ενιαία προσέγγιση για την διαχείριση της οστεοπόρωσης στην Ευρώπη. (Kanis *et al*., 2013).

3.1.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗΣ

Η πυκνότητα των οστών συχνά σχετίζεται με το T-score ή Z-score, καθώς και τα δύο αποτελούν μονάδες της τυπικής απόκλισης (SD). Καθένα με την σειρά τους ,το T-score περιγράφει τον αριθμό των SD κατά τις οποίες η οστική πυκνότητα σε ένα άτομο διαφέρει από την μέση τιμή που αναμένεται σε νεαρά υγιή άτομα. Ο λειτουργικός αριθμός της οστεοπόρωσης βασίζεται στο T-score για οστική πυκνότητα που εκτιμάται στο ισχίο (femoral neck) και ορίζεται σαν η τιμή για BMD 2.5 SD ή κάτω από τον μέσο όρο για νεαρές γυναίκες (T-score είναι μικρότερο ή ίσο με το -2.5 SD).Το Z-score από την άλλη, περιγράφει τον αριθμό της SD κατά την οποία η BMD σε ένα άτομο διαφέρει από τον μέσο όρο που σχετίζεται με το φύλο και την ηλικία. Επομένως, χρησιμοποιείται πιο πολύ σε παιδιά και εφήβους. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα διαγνωστικά κριτήρια για άνδρες χρησιμοποιούν το ίδιο εύρος αναφοράς όπως και στις γυναίκες. Αυτό προέκυψε τυχαία διότι για κάθε ηλικία και BMD στο μηρό, ο κίνδυνος κατάγματος του ισχίου ή του σημαντικότερου οστεοπορωτικού κατάγματος είναι το ίδιο σε άνδρες και γυναίκες. Παρά ταύτα ο T-score δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλάξ με διαφορετικές τεχνικές και σε διαφορετικές θέσεις, εφόσον ο επιπολασμός της οστεοπόρωσης και η αναλογία των ατόμων που κατανέμεται σε οποιαδήποτε διαγνωστική κατηγορία θα ποικίλουν όπως και ο κίνδυνος κατάγματος (Kanis *et al*., 2013).

3.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Καθώς ο επιπολασμός της νόσου αυτής επικρατεί σε παγκόσμιο επίπεδο, σύμφωνα με το Διεθνές Ίδρυμα Οστεοπόρωσης (International Osteoporosis Foundation-IOF) , η ασθένεια αυτή αναμένεται να αποτελέσει σοβαρό λόγο ανησυχίας για την δημόσια υγεία με άνω από 200 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως να υποφέρουν λόγω αυτής. Με βάση τα δεδομένα:

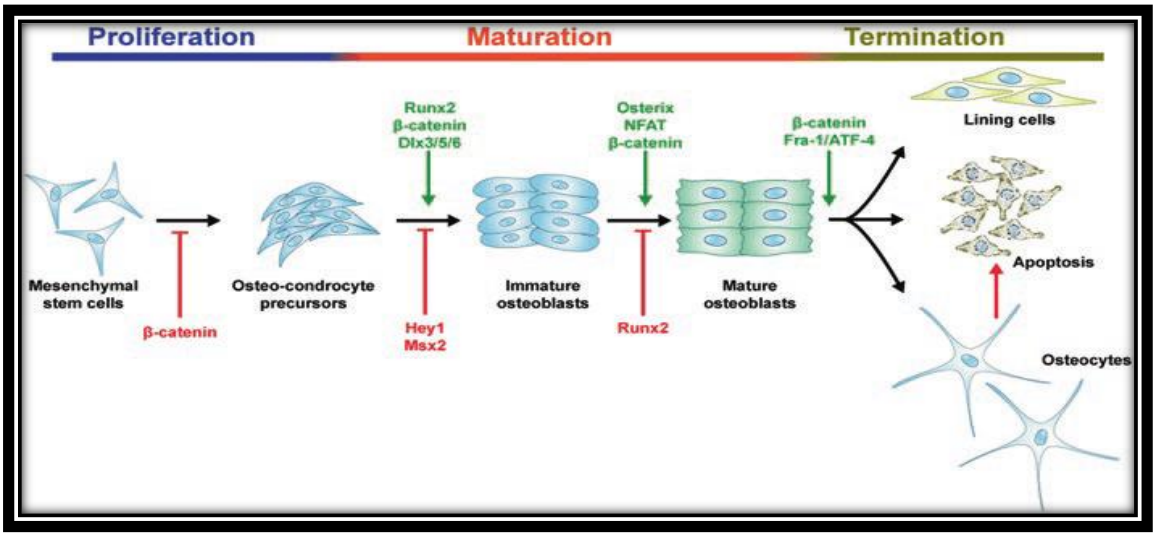
- ✓ Περίπου το 30% των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών θα εμφανίσουν οστεοπόρωση σε Ηνωμένες Πολιτείες και Ευρώπη.
- ✓ Τουλάχιστον το 40% αυτών των γυναικών, αλλά και το 15-30% των ανδρών θα υποστούν ένα ή περισσότερα περιστατικά καταγμάτων στη ζωή τους.

Στην Ευρώπη ο επιπολασμός για τα σπονδυλικά κατάγματα έτσι όπως καθορίζεται από τα ακτινολογικά κριτήρια αυξάνεται όσο αυξάνεται και η ηλικία και στα δύο φύλα και είναι σχεδόν τόσο υψηλός στους άνδρες όσο στις γυναίκες:

- ✓ 12% στις γυναίκες (6-21%) και
- ✓ 12% στους άνδρες (8-20%) (κάτι που μπορεί να εξηγηθεί από ατύχημα στο χώρο εργασίας των ανδρών) (IOF, 2017).

3.3.1 ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΟΓΕΝΝΕΣΗ

Κατά την διαδικασία της οστεοβλαστογέννεσης περιλαμβάνονται διάφορα στάδια, όπως, πολλαπλασιασμός, σύνθεση εξωκυτταρικής μήτρας, ωρίμανση και μεταλλοποίηση. Κάθε στάδιο ρυθμίζεται από παράγοντες που συντονίζονται από την έκφραση της μεγαλύτερης μεταγραφής. Οι σημαντικότεροι μεταφραστικοί παράγοντες που ελέγχουν τον σχηματισμό των οστών είναι : Runx2, Osterix, b-catenin, activating transcription factor-4(ATF-4), activator protein-1 (AP-1) κ.α. (Εικόνα 8).Επιπλέον, η έκφραση όλων αυτών των παραγόντων διαμορφώνονται από διάφορες ορμόνες (παραθυροειδείς ορμόνες, οιστρογόνα, γλυκοκορτικοστεροειδή και 1,25-διϋδροξυβιταμίνη D). Οι κυτταροκίνες και οι αυξητικοί παράγοντες που παράγονται από οστεοβλάστες και άλλα κύτταρα επιδρούν στην διαφοροποίηση και στην διαδικασία της ωρίμανσης που ενώνονται με τις πρωτεΐνες του οστού της εξωκυττάριας μήτρας. Με την σειρά τους οι ώριμοι οστεοβλάστες που βρίσκονται στην μήτρα του οστού γίνονται οστεοκύτταρα. (Trzeciakiewicz *et al.*, 2009).



Εικόνα 8: Βασικά στάδια οστεοβλαστογένεσης (Gasser A.J., 2017)

3.3.2 ΟΣΤΕΟΚΛΑΣΤΕΣ-ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΟΥ ΣΚΕΛΕΤΟΥ

Οι οστεοκλάστες (OC) ρυθμίζουν την οστεοκλαστογένεση και διαδραματίζουν έναν άμεσο και σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας των οστεοκλαστών μέσα στο μικροπεριβάλλον των οστών. Προερχόμενοι από αιμοποιητικούς προγόνους (μονοκύτταρα/μακροφάγα) στο μυελό των οστών, σχηματίζονται από την συγχώνευση πρόδρομων κυττάρων. Επιπροσθέτως, είναι υπεύθυνοι για την οστική απορρόφηση και επομένως για την φυσιολογική ανάπτυξη του σκελετού. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την οστεοβλαστογένεση και την οστεοκλαστογένεση. Είναι μείζονος σημασίας η διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ

αυτών των κυτταρικών διεργασιών που σχετίζονται με τον οστικό σχηματισμό και την απορρόφηση αντίστοιχα. Σε ενδεχόμενη ανισορροπία μεταξύ αυτής της διαδικασίας λόγω γήρανσης, θα μπορούσε να ακολουθηθεί μείωση της οστικής πυκνότητας και συνεπώς αύξηση του κινδύνου της οστεοπόρωσης. (Trzeciakiewicz *et al.*, 2009).

Οι ΟC αναπτύσσονται από πρόδρομα κύτταρα μυελού των οστών υπό την επιρροή της κυτταροκίνης RANKL(ενεργοποιητής του συμπλόκου NF-Kb). Τοιουτοτρόπως, αλλάζει ο αριθμός των πρόδρομων ΟC ή η ικανότητά τους για διαφοροποίηση που θα μπορούσε να επηρεάσει την οστική μάζα. (Sjogren *et al*., 2012).Τα $CD4^+$ Τ-κύτταρα ρυθμίζουν την οστική απώλεια διεγείροντας την οστεοκλαστογένεση υπό την μεσολάβηση του RANKL δίνοντας μια πιθανή εξήγηση στην οστεοπόρωση. (Marie PJ, 2008).

3.3.3 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΩΝ

Ο σχηματισμός των οστών είναι μια ισχυρά ρυθμιζόμενη διαδικασία που χαρακτηρίζεται από μία σειρά από γεγονότα που αρχίζουν με την δέσμευση των οστεπρογονικών κυττάρων σε μεσεγχυματικά κύτταρα, με την διαφοροποίηση τους σε ανώριμους προ-οστεοβλάστες και εν συνεχεία σε ώριμους λειτουργικούς οστεοβλάστες (Marie PJ, 2008).

Οι οστεβλάστες από μορφολογικής άποψης έχουν ένα κυβοειδές σχήμα και σχηματίζουν μια πυκνή μονοστοιβάδα κυττάρων στην επιφάνεια του οστού. Από λειτουργικής άποψης, είναι εξειδικευμένα κύτταρα μέσα στα οστά και παράγουν εξωκυτταρική μήτρα καθώς επίσης ρυθμίζουν και την μεταλλοποίηση. Πιο συγκεκριμένα, ο οστίτης ιστός αποτελείται από κρυστάλλους υδροξυαπατίτη και μια αφθονία από εξωκυτταρικές μητρικές πρωτεΐνες (όπως κολλαγόνο τύπου Ι, οστεοκαλσίνη, οστεονεκτίνη, οστεοποντίνη, σιαλοπρωτεΐνη οστών και πρωτεογλυκάνες) οι οποίες εκκρίνονται και εναποτίθενται από ώριμους οστεοβλάστες. Οι οστεοβλάστες προέρχονται από πρόδρομους που ξεκινούν από τον μυελό των οστών. Αυτοί οι πρόδρομοι είναι πολυδύναμα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε πολλά είδη ειδικών κυττάρων των ιστών, όπως οστεοβλάστες, μυοβλάστες, αδιποκύτταρα και χονδροκύτταρα. Κάθε μονοπάτι διαφοροποίησης μπορεί να ρυθμιστεί ειδικά με παράγοντες μεταγραφής (Trzeciakiewicz *et al.*, 2009).

3.3.4 *IN VITRO* ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΜΟΝΤΕΛΑ ΓΙΑ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ

Χρησιμοποιούνται κατά κόρον μοντέλα κυττάρων *in vitro* για να διερευνηθεί η οστεοβλαστική διαφοροποίηση, η λειτουργία και ο αντίκτυπος σε διάφορους φαρμακολογικούς παράγοντες και διατροφικά μόρια. Επομένως, γίνεται χρήση αθάνατων κυτταρικών σειρών (επί παραδείγματι οστεοβλαστικά κύτταρα μυών, τα MC3T3-E1) ή γενετικά άτυπες κυτταρικές σειρές που προέρχονται από όγκους, όπως από ανθρώπινο οστεοσάρκωμα, τα MG-63 . Εντούτοις, υπάρχει μια γενική αμφισβήτηση κατά πόσο η προέλευση των όγκων και οι γενετικές μεταβολές των καλλιεργειών των κυττάρων μπορεί να ταιριάξουν με την *in vivo* φυσιολογία. Γι' αυτόν επακριβώς τον λόγο ως *in vitro* μοντέλα χρησιμοποιούνται κύτταρα από πρόδρομους πρωταρχικούς οστεοβλάστες νεογνών τρωκτικών ή μεσεγχυματικά κύτταρα μυελού των οστών των μυών (Trzeciakiewicz *et al.*, 2009).

3.4 ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ ΚΑΙ ΟΣΤΕΟΠΟΡΩΣΗ

Σε μία μελέτη του 2014 που εκπονήθηκε από τον Li και τους συνεργάτες του, θέλησαν να διερευνήσουν τον ρόλο του εντερικού μικροβιόκοσμου σε σχέση με την οστική απώλεια που προκαλείται από έλλειψη στεροειδών ορμονών του φύλου. Πειραματόζωα χωρίς μικροβιόκοσμο (germ-free GF) και πειραματόζωα με εντερικό μικροβιόκοσμο (EM) υποβλήθηκαν σε αγωγή με Leuprolide, έναν ανταγωνιστή της ορμόνης γοναδοτροπίνης (GnRH) που ‘’μπλοκάρει’’ την παραγωγή ορμονών του φύλου. Έδειξαν ότι μεγαλύτερη οστική απώλεια (φλοιώδη και σπογγώδη) υπήρξε στα πειραματόζωα με EM, αποδεικνύοντας ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος κατέχει διπλό ρόλο στην απώλεια οστού που ευθύνεται από την έλλειψη ορμονών του φύλου.(Li *et al*., 2014).

Επιπροσθέτως, τα επίπεδα του C-terminal telopeptide-CTX (δείκτης απορρόφησης του οστού) παρουσίασαν αύξηση στο αίμα των πειραματόζωων με EM πειραματόζωων αλλά όχι στους αξενικούς μύες, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι τα GF πειραματόζωα προστατεύονται από την ενισχυμένη απορρόφηση του οστού. Επομένως, συνοψίζοντας συμπεραίνεται ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στο μέγεθος της απώλειας της οστικής μάζας σε μετα-εμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Αν λόγω δυσβίωσης του εντερικού μικροβιόκοσμου προκληθεί φλεγμονώδες περιβάλλον, οι γυναίκες θα παρουσίαζαν μεγαλύτερες απώλειες σε οστική μάζα, διότι χάνεται η προστατευτική-ανοσοκατασταλτική δράση των οιστρογόνων μετά την εμμηνόπαυση.(Ohlsson and Sjögren , 2015).

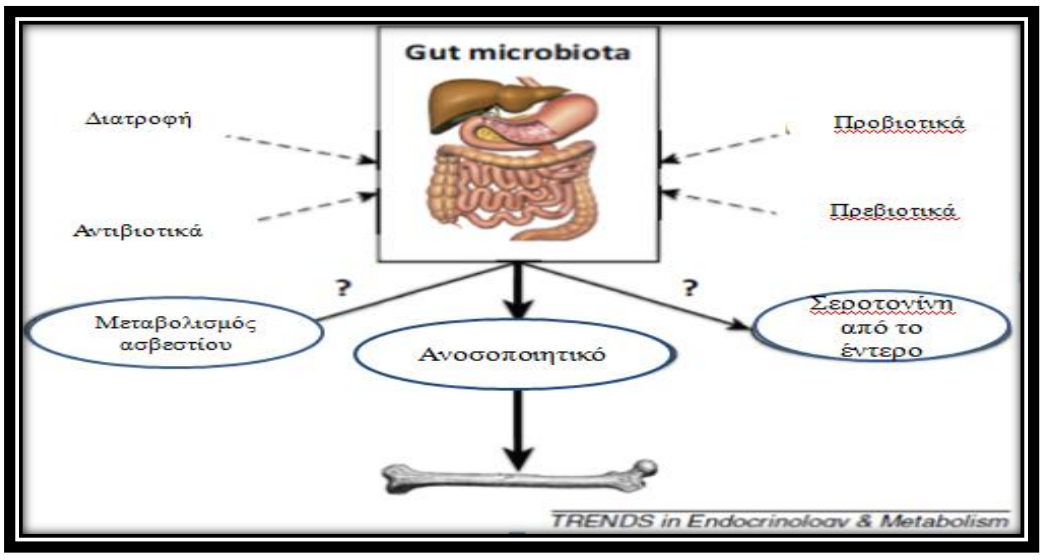
Για να διατηρηθεί η δομική ακεραιότητα, ο σκελετός πρέπει συνεχώς να αναδιαμορφώνει και να επισκευάζει τις μικρές ρωγμές που αναπτύσσονται στο ‘’πορώδες’’ οστό που υπάρχουν στους σπονδύλους, στην λεκάνη και στα μακριά οστά.

Η έλλειψη οιστρογόνων αυξάνει τον σχηματισμό ΟC με αύξηση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων και παρέχει μια μεγαλύτερη ομάδα πρόδρομων οστεοκλαστών (OCP). Ο αυξημένος σχηματισμός και η ενεργοποίηση των ΟC οδηγούν σε πορώδες φλοιό και αυξάνουν την επαναπορρόφηση στις δοκιδωτές επιφάνειες. Επιπροσθέτως, η μείωση των οιστρογόνων αυξάνει την διάρκεια ζωής των OCs, κάτι που οδηγεί σε παρατεταμένη απώλεια οστικής μάζας, βαθύτερες κοιλότητες και δοκιδωτή δίοδο, κάτι που αυξάνει την ευθραυστότητα του οστού. Το γεγονός αυτό συμβάλλει σε μεγαλύτερη και βραδύτερη περίοδο οξείας φάσης απώλειας οστού. Η απώλεια του οστού αντισταθμίζεται εν μέρει με την αύξηση του σχηματισμού του οστού, λόγω αυξημένης οστεοβλαστογένεσης. Με την σειρά του τροφοδοτείται με την αύξηση των μεσεγχυματικών προγονικών κυττάρων ικανών να δεσμευτούν στη γενεαλογική σειρά των ΟΒ και με αυτόν τον τρόπο προάγουν τον πολλαπλασιασμό των πρόωρων πρόδρομων ΟΒ. Η αύξηση του σχηματισμού των οστών περιορίζεται από την αύξηση της απόπτωσης των OBs, που προκαλούνται από την έλλειψη των οιστρογόνων. Παρόλο που η έλλειψη οιστρογόνων αυξάνει την ένταση του σχηματισμού των οστών, παρουσιάζεται ανισορροπία μεταξύ σχηματισμού και επαναρρόφησης του οστού. Αν και ο μηχανισμός με τον οποίο η ανεπάρκεια οιστρογόνων προκαλεί απώλεια οστικής μάζας φαίνεται πιο πολύπλοκος, η αλληλεπίδραση μεταξύ ανεπάρκειας οιστρογόνου και ανοσοποιητικών κυττάρων μπορεί να διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ρύθμιση της απορρόφησης των οστών στην μετα-εμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση. Στην πραγματικότητα, τα οιστρογόνα είναι γνωστός ρυθμιστής του ανοσοποιητικού συστήματος και των λειτουργιών των Τ-κυττάρων.(Faienza *et al.*, 2013).

Τα αξενικά ζώα (germ-free-GF) είναι πειραματόζωα – συνήθως ποντίκια – τα οποία γεννιούνται κάτω από στείρες συνθήκες, διαβιούν σταθερά σε αποστειρωμένο περιβάλλον με στόχο να μην έχουν καθόλου φυσικό μικροβιόκοσμο. Χρησιμοποιούνται κατά κόρον ως πειραματικά μοντέλα σε μελέτες σχετικές με τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Τα GF ζώα έχουν ανώριμο ανοσοποιητικό σύστημα, όχι και τόσο καλή σύνδεση λεμφοειδή ιστού με έντερο (GALT) και μειωμένο αριθμό $CD4^+$ Τ κυττάρων στον σπλήνα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος επηρεάζει συστημικά το ανοσοποιητικό σύστημα. (Ohlsson and Sjögren, 2015).

Σε μια πρόσφατη μελέτη οι Sjorgen και οι συνεργάτες έδειξαν ότι τα GF ζώα έχουν αυξημένη οστική μάζα σε σχέση με αντίστοιχα πειραματόζωα που έχουν εντερικό μικροβιόκοσμο (gnotobiotic). Επιπροσθέτως, υπήρξε αύξηση 39% στον σπογγώδη και φλοιώδη ιστό των GF ζώων εν συγκρίσει με τα αντίστοιχα με ΕΜ .(Sjogren, *et al*. 2012).Από την άλλη υπήρξε μια μείωση των ΟC σε καλλιέργειες *in vitro* μυελού των οστών των GF ζώων, λιγότερα πρόδρομα κύτταρα ΟC, καθώς και μειωμένη συχνότητα $CD4^+$ Τ κυττάρων σε σύγκριση με τα πειραματόζωα με ΕΜ . Εν αντιθέσει ο ρυθμός οστικής σύνθεσης στα GF ζώα δεν μεταβλήθηκε σημαντικά, δείχνοντας ότι η αύξηση της οστικής μάζας οφείλεται σε μείωση της οστικής απορρόφησης λόγω μειωμένης οστεοκλαστογένεσης. Τα GF ζώα έχουν μειωμένη έκφραση των οστεολυτικών κυτταροκινών IL-6 και TNFa στο οστό. Συμπερασματικά, υποθέτεται ότι η αυξημένη οστική μάζα οφείλεται στη μειωμένη κυκλοφορία των CD4+ στο αίμα και στον λεμφικό ιστό και έχοντας ως συνέπεια την χαμηλή συχνότητα των CD4+ Τ κυττάρων και στον μυελό. (Ohlsson and Sjögren, 2015).

Η αύξηση της οστικής μάζας των GF ζώων δεν προκλήθηκε από τον μεταβολισμό του ασβεστίου, εν συγκρίσει με τα gnotobiotic πειραματόζωα, λόγω του ότι το ασβέστιο στον ορό και οι ορμόνες που ρυθμίζουν την ομοιόσταση του ασβεστίου βρέθηκαν σε φυσιολογικά επίπεδα. Αντιθέτως, η κυκλοφορούσα σεροτονίνη μειώθηκε σε GF ζώα, χωρίς ωστόσο να παρουσιάσει σημαντική μεταβολή στα αντίστοιχα gnotobiotic πειραματόζωα. Επομένως, προτείνεται ότι ο πιο πιθανός μηχανισμός με τον οποίο ο εντερικός μικροβιόκοσμος επηρεάζει την οστική μάζα περιλαμβάνει ανοσο-κατευθυνόμενες μεταβολές οι οποίοι μειώνουν την οστεοκλαστογένεση. (Ohlsson and Sjögren, 2015).



Εικόνα 9: Ο εντερικός μικροβιόκοσμος ως προτεινόμενος ρυθμιστής οστικής μάζας (Ohlsson and Sjögren, 2015).

3.5 ΠΩΣ Η ΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ ΡΥΘΜΙΖΕΙ-ΕΛΕΓΧΕΙ ΤΟΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ

Η μικροβιακή σύνθεση του εντέρου μπορεί να διαταράσσει την ομοιόσταση του ξενιστή μεταβάλλοντας την οστική πυκνότητα και προκαλώντας οστεοπόρωση. Γεγονός που ‘εγκυμόνησε’ την επιτακτική ανάγκη για έρευνα της ύπαρξης συνδέσμου του εντερικού μικροβιόκοσμου με τον οστικό φαινότυπο. Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε αξενικούς μύες έδειξε ότι τα οστικά κύτταρα τα οποία φέρουν υποδοχείς της σεροτονίνης είναι μειωμένα και η σηματοδότησή της αναστέλλει τον οστικό σχηματισμό.(Bliziotes, M. *Et al*., 2006, Yadav, V. K. *Et al*., 2008). Όπως προαναφέρθηκε, η οστική απώλεια προκαλεί φλεγμονή και ως συνέπεια ακολουθεί ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού μέσω των Τ-κυττάρων. Τα TH17 κύτταρα καθώς και οι κυτταροκίνες TNF και IL-1 β προάγουν την οστική απορρόφηση προκαλώντας οστεοκλαστογένεση. Συνεπώς στη μελέτη αυτή τα αξενικά ποντίκια εν συγκρίσει με τα συμβατικά έχουν αυξημένη οστική πυκνότητα επιβεβαιώνοντας ότι η μικροβιακή ρύθμιση της λειτουργίας των Τ-κυττάρων, τα επίπεδα σεροτονίνης και κυτταροκινών θα μπορούσαν να συνεισφέρουν στην οστική ομοιόσταση.(Sommer, F., & Bäckhed, F. , 2013).

Πολλές κλινικές μελέτες έχουν συσχετίσει τον υπερβολικό πολλαπλασιασμό των βακτηρίων στο έντερο με μειωμένη BMD. Έχει αποδειχτεί ότι σε ασθενείς με μικρή βακτηριακή ανάπτυξη στο λεπτό έντερο έχουν βρεθεί χαμηλές τιμές BMD, οστεομαλακία, υψηλά επίπεδα προφλεγμονωδών κυτταροκινών TNF- και IL-1,καθώς και αυξημένη λειτουργία των οστεοκλαστών. Επιπροσθέτως, τα εντερικά βακτήρια λόγω του ότι επεξεργάζονται τα θρεπτικά συστατικά που είτε υπάρχουν είτε καταλήγουν στον εντερικό βλεννογόνο, δημιουργούν ανεπάρκεια θρεπτικών, όπως εντερική απορρόφηση του ασβεστίου, του φωσφορικού και της βιταμίνης D, γεγονός που συμβάλλει στην εκδήλωση της οστεοπόρωσης. Οι μελέτες αυτές δεν μπορούν με απόλυτη σιγουριά να αποδείξουν την αμοιβαία αυτή σχέση που δεν αμφισβητείται, αλλά ενισχύεται. Ανατρέχοντας μια δεκαετία πριν σε μελέτες που διεξήχθησαν σε αξενικούς μύες συνδέονται με την ανάπτυξη του οστικού ιστού. Έχοντας ως τεκμήριο ότι απουσιάζει ο ΕΜ αρχής γενομένης, παρουσιάζονται φυσιολογικές και μεταβολικές τροποποιήσεις, όπως μειωμένη απορρόφηση θερμίδων, βιταμινών και θρεπτικών συστατικών, χαμηλό ύψος και μειωμένο βάρος και μέγεθος οργάνων, μη ωρίμανση διαφόρων συστημάτων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της οστικής μάζας, όπως ανοσοποιητικό, αγγειακό, ενδοκρινικό εντερικό και νευρικό σύστημα. (Ibá˜nez *et al*., 2018).

3.6 ΠΩΣ ΤΑ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ ‘’ΔΡΟΥΝ’’ ΣΤΑ ΟΣΤΑ

Καθώς η εντερική δυσβίωση συνδέεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις και με την απώλεια των οστών, οι αλλαγές του εντερικού μικροβιόκοσμου φαίνεται να σχετίζονται με την δυσβίωση, χωρίς ωστόσο να είναι πλήρως κατανοητές οι λειτουργικές αλλαγές του εντερικού περιβάλλοντος. Τα βακτήρια εκφράζουν μια ποικιλία γονιδίων τα οποία μπορούν και ανταποκρίνονται στα ερεθίσματα του περιβάλλοντος, γονίδια τα οποία κωδικοποιούν ένζυμα που εμπλέκονται στην παραγωγή μεταβολιτών, επί παραδείγματι, λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, διακλαδιζώμενα λιπαρά οξέα, παράγωγα χολικού οξέος και βιταμίνες. Τα υποστρώματα αυτά παρέχονται εν μέρει από πρεβιοτικά διαδραματίζοντας κρίσιμο σημείο στο είδος των μεταβολιτών που θα παραχθούν από τον εντερικό μικροβιόκοσμο.(McCabe *et al*., 2015)

Όσο αφορά την υγεία των οστών τα πιο ελπιδοφόρα πρεβιοτικά θωρούνται οι μη-εύπεπτοι ολιγοσακχαρίτες, όπως οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες (GOS), οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS), η ολιγοφρουκτόζη και η ινουλίνη. (Roberfroid *et al*. 2010).Έχει αποδειχτεί ότι οι β-γλυκάνες που βρίσκονται μέσα στα δημητριακά όταν συμπεριληφθούν μέσα στα τρόφιμα έχουν πρεβιοτικές ιδιότητες λόγω του ότι περνούν άθικτες στον γαστρεντερικό σωλήνα –ιδιότητα που έχει επιβεβαιωθεί σε *in vitro* μελέτες και σε πειραματόζωα να διεγείρουν εκλεκτικά την ανάπτυξη και την δραστηριότητα μικρού αριθμού ευεργετικών βακτηρίων του εντέρου όπως λακτοβάκιλοι και μπιφιντοβακτήρια (Bigliardi & Galati, 2013). (Jaskari et al., 1998, Kontula *et al*., 1998, Snart *et al*., 2006).

Ωστόσο πολλές μελέτες εδώ και χρόνια έχουν εντοπίσει την ευεργετική δράση που έχουν τα πρεβιοτικά στο μεταβολισμό των οστών ειδικότερα στην ενίσχυση της απορρόφησης του ασβεστίου, τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους σε υγιείς αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις. Όσον αφορά την υγιή κατάσταση, αρσενικοί αρουραίοι που τους χορηγήθηκε GOS ή ινουλίνη για 4 εβδομάδες, θηλυκοί αρουραίοι με πολυδεξτρόζη για 4 εβδομάδες και θηλυκοί μύες χορηγούμενοι με φρουκτόζη αγαύης και ινουλίνη για 6 εβδομάδες εμφάνισαν μια αύξηση στην απορρόφηση του ασβεστίου.(Macfarlane S, *et al*., 2006, Scholz-Ahrens KE, *et al*., 2007, Chonan O *et al*., 1995, Roberfroid MB *et al*., 2002, Legette LL *et al*., 2012) .Από την άλλη μελέτες που σχετίζονται με αύξηση της απορρόφησης του ασβεστίου σε συνδυασμό με λήψη πρεβιοτικών βρέθηκαν και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως αρσενικοί αρουραίοι που έχουν υποστεί γαστρεκτομή υποβαλλούμενοι σε αγωγή είτε με FOS είτε με ανυδρίτη ΙΙΙ της διφρουκτόζης.(Ohta A *et al.,* 1998, Shiga K *et al*., 2006). Διάφορες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και σε κοτόπουλα που τους χορηγήθηκε ινουλίνη παρατηρώντας μια αύξηση τόσο στο μεταβολισμό των οστών όσο και στο περιεχόμενο ασβεστίου, εν αντιθέσει με τους χοίρους όπου η ινουλίνη δεν εμφάνισε κάποια θετική επίδραση στα οστά.(Ortiz LT *et al.,* 2009, Varley PF *et al*., 2010).

Επιπροσθέτως, μελέτες και σε ανθρώπους φανερώνουν ότι η λήψη πρεβιοτικών παρουσιάζει μια ευνοϊκή εικόνα στο μεταβολισμό του ασβεστίου. Σε μελέτες, η χορήγηση των FOS σε εφήβους και νεαρά κορίτσια προκάλεσε αύξηση της απορρόφησης του ασβεστίου από την $9^{η}$ ημέρα, $3^{η}$ εβδομάδα μέχρι 1 έτος. (Van den Heuvel EG *et al.,* 1999, Griffin IJ *et al.,* 2002, Abrams SA *et al.,* 2005). Επιπλέον, σε μια διπλά τυφλή κλινική μελέτη στην οποία συμμετείχαν μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (μέσος όρος ηλικίας 72 ±6.4 έτη) , μετά από 6 εβδομάδες θεραπείας με FOS, παρατήρησαν αυξημένη απορρόφηση ασβεστίου και μαγνησίου.(Holloway L, *et al.,* 2007).

Έχει δειχθεί επίσης, ότι τα πρεβιοτικά βοηθούν στην οστεοβλαστική/οστεοκλαστική ικανότητα με βασική προϋπόθεση την κατάσταση και το είδος του πρεβιοτικού που χρησιμοποιείται. Σε μια μελέτη οι Garcia-Vieyra M.I *et al* παρατήρησαν ότι η φρουκτάνη αγαύης και η ινουλίνη όταν χορηγήθηκαν σε θηλυκούς μύες σε διάστημα 6 εβδομάδων, τα επίπεδα οστεοκαλσίνης του ορού αυξήθηκαν.(Garcia-Vieyra MI *et al.,* 2014).

Σε μια άλλη τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη παρέμβασης σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με οστεοπόρωση, μετά από θεραπεία για 24 μήνες με ασβέστιο ή με ασβέστιο και βραχείας αλύσου FOS, φάνηκε ότι στην ομάδα με το πρεβιοτικό παρατηρείται μεγαλύτερη επιβράδυνση της απώλειας οστικής πυκνότητας τόσο συνολικά όσο και στη σπονδυλική στήλη (Slevin MM *et al.,* 2014).

Συνοψίζοντας, ακόμα και αν υπάρχουν μελέτες ως προς τις ευεργετικές επιδράσεις των πρεβιοτικών στο μεταβολισμό των οστών, οι ακριβείς μηχανισμοί δεν είναι ξεκάθαρα κατανοητοί, κάτι που σίγουρα οφείλεται στο είδος του πρεβιοτικού που εμφανίζεται μέσα στο τρόφιμο ή ακόμα και στο συνδυασμό του, στην ποσότητα και ενδεχομένως στην μακροχρόνια λήψη του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^{Ο}: ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι να διερευνηθεί *in vitro* η πρεβιοτική δράση του μύκητα *Ganoderma lucidum*, στον εντερικό μικροβιόκοσμο μετεμμηνοπαυσιακών εθελοντριών. Με το εμβόλιο κοπράνων από έξι εθελόντριες (τρεις υγιείς -τρεις οστεοπενικές) πραγματοποιήθηκε *in vitro* ζύμωση των υποστρωμάτων (μανιτάρι *Ganoderma lucidum* και εκχύλισμα μανιταριού *G.lucidum* πλούσιο σε β-γλυκάνες). Πιο συγκεκριμένα, στη παρούσα διπλωματική εξετάστηκε:

1) Η ποσοτικοποίηση οκτώ μικροοργανισμών του εντερικού μικροβιόκοσμου, μέσω qPCR μεθόδου και
2) Η πρεβιοτική δράση των ζυμώμενων υποστρωμάτων, μέσω πρεβιοτικού δείκτη (PI_{24}) .

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^{Ο}:ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ ΤΟΥ ΜΑΝΙΤΑΡΙΟΥ *GANODERMA LUCIDUM*

Σκοπός του πειράματος είναι η εκχύλιση των δειγμάτων μανιταριού *Ganoderma lucidum* προς απομόνωση και παραλαβή των β-γλυκάνων για περαιτέρω μελέτη. Αξιοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι προς εύρεση της βέλτιστης απόδοσης των β-γλυκάνων. Οι μέθοδοι αναλύονται ακολούθως.

5.1.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΨΗΛΩΝ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΩΝ

- Αντιδραστήρια
  - Λυοφιλιωμένα δείγματα μανιταριού *Ganoderma lucidum* LGAM 9720
  - Απιονισμένο νερό (dH_2O)
- Εξοπλισμός
  - Συσκευή υδατόλουτρου
  - Υάλινη φιάλη 500ml
  - Αναλυτικός ζυγός ακριβείας
  - Υάλινος ογκομετρικός σωλήνας 1000ml

- Πρωτόκολλο

1)Ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας 10 gr. από τα δείγματα μανιταριών.

2)Προστίθενται σε υάλινη φιάλη των 500ml τα ζυγισμένα δείγματα μαζί με 400ml απιονισμένου νερού (dH_2O).

3)Τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 100 ^{o}C για 50 h.

4)Τα δείγματα των μανιταριών φυγοκεντρούνται, αφού πρώτα μεταφερθούν σε πλαστικούς σωλήνες από πολυπροπυλένιο με βιδωτό πώμα των 50mL, σε 10.000x g, για 15min, στους 2 ^{0}C, προς συλλογή υπερκείμενου υγρού.(Ruthes *et al.*, 2015)

5.1.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΥΠΕΡΗΧΩΝ

- Αντιδραστήρια
- Λυοφιλιωμένα δείγματα μανιταριού *Ganoderma lucidum* LGAM 9720
- Απιονισμένο νερό (dH_2O)

- Εξοπλισμός
  - Μηχάνημα υπερήχων (dr.hielscher-UP 200s Ultraschallprozessor)
  - Θερμόμετρο
  - Φυγόκεντρος

- Πρωτόκολλο

1)Ζυγίζονται 2g μανιταριού και τοποθετούνται σε 110ml dH_2O (αναλογία 1:55) σε υάλινη φιάλη με πάγο.

2)Τοποθετούνται στην συσκευή υπερήχων με amplitude 600W και pulse sequence 15:5 και εξετάζεται η επίδραση των υπερήχων σε τρεις διαφορετικούς χρόνους, 10min, 20 min και 40 min. Η θερμοκρασία ελέγχεται με θερμόμετρο.

3) Φυγοκεντρούνται σε 5.000 rpm για 10min, στους 2 ^{0}C, προς συλλογή υπερκείμενου υγρού. (Chen *et al.*, 2012).

5.1.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ

- Αντιδραστήρια
  - Λυοφιλιωμένα δείγματα μανιταριού *Ganoderma lucidum* LGAM 9720
  - dH_2O
- Εξοπλισμός
  - Μηχάνημα μικροκυμάτων
  - Φυγόκεντρος

- Πρωτόκολλο

1)Ζυγίζονται 2g μανιταριού και προστίθενται 40ml dH_2O σε υάλινη φιάλη.

2)Τοποθετούνται στην συσκευή μικροκυμάτων (Microwave) με μαγνήτη σε 64^0 C, 300μPower και εξετάζεται η επίδραση των μικροκυμάτων για 10 min.

3) Φυγοκεντρούνται σε 5.000rpm για 10min, στους 2 ^{0}C, προς συγκέντρωση υπερκειμένου. (Wang *et al.*, 2010).

5.2 ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕ ΠΕΡΙΣΤΡΟΦΙΚΗ ΕΞΑΤΜΙΣΗ ΥΠΟ ΕΛΑΤΤΩΜΕΝΗ ΠΙΕΣΗ

- Σκοπός

Σκοπός της συμπύκνωσης είναι η γρήγορη απομάκρυνση των διαλυτών του υπερκειμένου του υπό μελέτη μανιταριού προς παραλαβή μικρότερου όγκου για ευκολότερο χειρισμό.

- Αντιδραστήρια
- Απιονισμένο νερό (dH_2O)
- Δείγματα μανιταριού *Ganoderma lucidum* LGAM 9720
- Αιθανόλη

- Εξοπλισμός
- Συσκευή περιστρεφόμενης εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (BÜCHI Rotavapor R-114)
- Φυγόκεντρος
- Συσκευή λυοφιλίωσης (Heto LyoLab 3000)
- Υάλινη κωνική φιάλη των 500 mL
- Πλαστικοί σωλήνες προπυλενίου με βιδωτό πώμα των 50ml
- Συσκευή κυκλοανάδευσης (Heidolph Unimax 1010)

- Πρωτόκολλο

1)Γίνεται απόσταξη του υπερκείμενου υγρού των δειγμάτων σε συσκευή περιστρεφόμενης εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (Rotary evaporator).

2) Τίθεται σε λειτουργία ο βραστήρας και ρυθμίζεται στους 55-60 ^{o}C, αφού ακολουθεί διοχέτευση νερού στον ψυκτήρα με τοποθέτηση της αντλίας κενού και πίεσης 75 mbar .

3) Ζυγίζεται το δείγμα μαζί με τη φιάλη, σημειώνεται η ένδειξη του βάρους και κατόπιν εφαρμόζεται το δείγμα προς εξάτμιση έως μικρού όγκου.(περίπου να είναι το 10% του αρχικού όγκου).

4) Μετά τον τερματισμό της λειτουργίας σημειώνεται η ένδειξη του βάρους και εν συνεχεία, προστίθεται αιθανόλη όγκου 1:1, αφού αρχικά σημειωθεί ο συνολικός όγκος (δείγματος και αιθανόλης).

5) Ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή κυκλοανάδευσης σε 200 rpm για 30min στους 4 ^{0}C.

6) Μετά την ανάδευση σημειώνεται ο όγκος λόγω εξάτμισης της αιθανόλης και μεταφέρεται ισόποσα σε σωλήνες προπυλενίου με βιδωτό πώμα των 50ml, για φυγοκέντρηση στα 10.000x g, για 30min, στους 4 ^{0}C.

7) Παραλαμβάνεται το διήθημα και οι πλαστικοί σωλήνες προπυλενίου αποθηκεύονται στους 4^{o}C για 24 ώρες και κατόπιν λυοφυλιοποιούνται για 2 ημέρες προς πλήρη αφυδάτωση.

5.3.1 ΜΕΤΡΗΣΗ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ

- Σκοπός

Σκοπός του πειράματος είναι ο προσδιορισμός των πολυσακχαριτών β-γλυκάνων από το μανιτάρι *Ganoderma lucidum* LGAM9720 για περαιτέρω μελέτη. Ο υπολογισμός των β-γλυκάνων έγινε με αφαίρεση της ποσότητας των α-γλυκανών από τις ολικές γλυκάνες. Η καταμέτρηση των γλυκανών έγινε με την χρήση του Mushroom and yeast assay kit (Megazyme Int., Ireland).

- Αρχή μεθόδου

Οι 1,3:1,6-β-D-Glucan, 1,3-β-D-Glucans και α-glucans διαλυτοποιούνται σε συμπυκνωμένο (37% 10N) Υδροχλωρικό οξύ και έπειτα υδρολύονται εκτενώς με 1,3N HCl στους 100 ^{0}C για 2 ώρες. Η υδρόλυση σε D- glucans επιτυγχάνεται με επώαση με μείγμα υπερκάθαρων ενζύμων exo-1,3-β- glucanase και β-glucosidase. Ενώ κάποιες β-glucans είναι διαλυτές σε ζεστό νερό ή ζεστό KOH, οι διαλύτες αυτοί δεν είναι δραστικοί στη διάλυση γλυκανών από μανιτάρια και μύκητες. Η ανάλυση αυτών των γλυκανών απαιτεί προηγουμένως μερική οξυ υδρόλυση για την αφαίρεση ιδιοτήτων γελοποίησης και ομοιοπολικών δεσμών με άλλους πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες.

- Αντιδραστήρια

- Δείγματα εκχυλίσματος μανιταριού υπό μελέτη
- Κρυσταλλικό οξικό οξύ
- Υδροξείδιο του Καλίου (KOH)

- Κρυσταλλικό υδροχλωρικό οξύ (HCl)
- Αντιδραστήριο GOPOD
- dH_2O

➢ Εξοπλισμός

- Μηχάνημα κονιορτοποίησης
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας
- Φυγόκεντρος
- Αυτόματη πιπέτα των 100 μL και 10mL
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Υάλινος ογκομετρικός κύλινδρος των 100 mL
- Σιφώνι των 10mL
- Υάλινος δοκιμαστικός σωλήνας των 10 mL
- Φιαλίδια μικρού όγκου από πολυπροπυλένιο
- pHμετρο
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Υδατόλουτρο
- Φίλτρα Whatman GF/A glass
- Φασματοφωτόμετρο ορατού υπεριώδους
- Κυψελίδα από πολυπροπυλένιο οπτικής διαδρομής 1cm και όγκου 1mL

➢ Παρασκευή διαλυμάτων

- **Ρυθμιστικό διάλυμα Οξικού Νατρίου-Sodium acetate buffer (200 mM pH 5)**

Σε 900ml dH_2O διαλύονται 11,6 ml κρυσταλλικού οξικού οξέος (1,05 g/ml).Ρυθμίζεται το pH του στο 5 με NaOH 4M (16g / 100ml) και προστίθεται dH_2O έως τελικού όγκου 1L. Διατηρείται στους 4 ^{o}C για 1 χρόνο.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα Οξικού Νατρίου-Sodium acetate buffer (1,2 M pH 3,8)**

Σε 800ml dH_2O διαλύονται 69.6 ml κρυσταλλικού οξικού οξέος (1,05 g/ml). Ρυθμίζεται το pH στο 3,8 με NaOH 4M (16g / 100ml) και προστίθεται dH_2O έως τελικού όγκου 1L. Διατηρείται στους 4 ^{o}C για 1 χρόνο.

- **Διάλυμα Υδροξειδίου του καλίου-Pottassium Hydroxide (2M)**

Σε 800ml dH_2O διαλύονται 112 g KOH,αναδεύονται στον αναδευτήρα και προστίθεται dH_2O έως τελικού όγκου 1L.

- **Διάλυμα Υδροχλωρικού οξέος -HCl (37 % v/v)**

Σε 630ml dH_2O διαλύονται 370ml κρυσταλλικού υδροχλωρικού οξέος, αναδεύονται στον αναδευτήρα και προστίθεται dH_2O έως τελικού όγκου 1L.

- **Προετοιμασία αντιδραστηρίων του Kit**
- Πρωτόκολλο

1) Προστίθενται 8 ml sodium acetate buffer (pH 5) σε υάλινο μπουκάλι (bottle 1), ως παρέχεται, με συνολικό όγκο 10 ml. Αφού χωρισθεί ισομερώς σε μικρότερους όγκους, φυλάσεται σε φιαλίδια μικρού όγκου από πολυπροπυλένιο και αποθηκεύεται στους -20^oC με πάγο.
2) Διαλύεται το περιεχόμενο του υάλινου μπουκαλιού (bottle 2), ως παρέχεται.
3) Σε 1 l dH_2O προστίθεται το περιεχόμενο του υάλινου μπουκαλιού (bottle 3), ως παρέχεται, και διατηρείται στους 4^0C.
4) Διαλύεται το περιεχόμενο του υάλινου μπουκαλιού (bottle 4) ως παρέχεται στο bottle 3, καθώς χωρίζεται σε φιαλίδια μικρού όγκου από πολυπροπυλένιο προς αποθήκευση. Διατηρείται στους 4 ^0C για 2-3 μήνες ή στους -20 ^0C για >1 χρόνο.
5) Διαλύεται το περιεχόμενο του υάλινου μπουκαλιού (bottle 5), καθώς και του (bottle 6), ως παρέχονται ξεχωριστά έκαστο.

5.3.2 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΓΚΥΚΑΝΩΝ

- **Διαλυτοποίση και μερική υδρόλυση των ολικών γλυκανών, D γλυκόζης σε ολισακχαρίτες, σουρκόζης και ελεύθερης D- γλυκόζης**
- Πρωτόκολλο

1) Γίνεται κονιορτοποίηση των δειγμάτων μανιταριών σε μηχάνημα κονιορτοποίησης προς παραλαβή κόκκων < 0,5mm.
2) Ζυγίζονται 0,1g δείγματος και τοποθετούνται σε υάλινο σωλήνα.
3) Προστίθονται 2ml HCl (37 % v/v) στον απαγωγό με ανάδευση με vortex και μεταφέρονται σε πάγο.
4) Αναδεύονται κάθε 15min με συνολική διάρκεια 2h.
5) Ακολουθεί προσθήκη 4ml dH_2O με ανάδευση με vortex 10sec και προσθήκη 6ml dH_2O με ανάδευση με vortex πάλι 10sec.
6) Μεταφέρονται με στατό οι υάλινοι σωλήνες σε καυτό υδατόλουτρο στους 100^oC , αφού χαλαρώνουν τα καπάκια.
7) Ακολουθεί ερμητικό σφράγισμα των καπακιών μετά από 5 min προς αποφυγή εξάτμισης και επώαση στο υδατόλουτρο για 2 h.
8) Αφήνονται τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθενται σε καινούργιους υάλινους σωλήνες 6 ml KOH 10M.
9) Μεταφέρονται ποσοτικά το περιεχόμενο κάθε υάλινου σωλήνα, αφού έχουν κυκλοαναδευτεί, σε ογκομετρική φιάλη και ξεπλένονται με Sodium acetate buffer (200 mM pH 5).
10) Ρυθμίζεται ο όγκος και ακολουθεί ανακίνηση 20 φορές.
11) Ακολουθεί φιλτράρισμα του κάθε εναιωρήματος με whatman GF/A glass filter paper και φυγοκεντρούνται στα 1.500x g για 10min.

- **Μέτρηση Ολικών γλυκανών, D γλυκόζης σε σουρκόζη και ελεύθερης D- γλυκόζης**
- **Παρασκευή blank reagent**

Σε υάλινο σωλήνα προστίθονται 0,2 ml Sodium acetate buffer (200 mM pH 5) μαζί με 3 ml GOPOD reagent.

- Πρωτόκολλο
  1) Σε υάλινους σωλήνες τοποθετούνται 100μl από τα υπερκείμενα των δειγμάτων μετά την μερική υδρόλυση που έγινε στο προηγούμενο βήμα.
  2) Προστίθενται 0,1 ml από το bottle 1, στους υάλινους σωλήνες ανακινούνται με vortex για 10 sec.
  3) Ακολουθεί επώαση στο υδατόλουτρο στους 40 ^{0}C για 1h.
  4) Προστίθονται 3 ml από το διάλυμα GOPOD σε κάθε υάλινο σωλήνα και επωάζονται στους 40 ^{0}C για 20 min.
  5) Γίνεται φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 510 nm και καταγράφονται οι τιμές των απορροφήσεων εν συγκρίσει με το blank προς υπολογισμό τιμών σε υπολογιστικό φύλλο excel.

5.4.1 ΣΤΡΑΤΟΛΟΓΗΣΗ ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΩΝ

Μετά την προετοιμασία του μανιταριού (crude) και των β-γλυκάνων του από την εκχύλιση εν συνεχεία ακολούθησε η στρατολόγηση των εθελοντριών προς παραλαβή βιολογικού τους υλικού (κόπρανα) για την μελέτη του εντερικού τους μικροβιόκοσμου. Στη μελέτη αυτή συμμετείχαν έξι γυναίκες μετεμμηνοπαυσιακές (τρεις υγιείς-τρεις οστεοπενικές με βάση το T-score) ηλικίας 50-63 χρόνων και BMI 19-25kg/m^2 , κάποιες εκ των οποίων καπνίστριες. Τα κριτήρια αποκλεισμού περιελάμβαναν:

- ✓ Γαστρεντερικές παθήσεις, όπως Ιδιοπαθείς Νόσοι του εντέρου, Σύνδρομο Ευερέθιστου εντέρου, οξεία/χρόνια διάρροια,
- ✓ Χρόνιες παθήσεις, όπως οξεία νεφρική νόσος, οξεία ηπατική νόσος, στεφανιαία νόσος, υπερ-παραθυρεοειδισμό, καρκίνο, αυτοάνοσο νόσημα, ιστορικό επιληπτικών κρίσεων
- ✓ Ακραία διατροφική συμπεριφορά
- ✓ Αποχή από τη λήψη συμπληρωμάτων διατροφής ασβεστίου, βιταμίνης D για τουλάχιστον 6 μήνες πριν από τη συμμετοχή στη μελέτη , από την κατανάλωση προ-/πρε-βιοτικών για τουλάχιστον 2 εβδομάδες , καθώς και αντιβίωσης για τουλάχιστον 2 μήνες .

Για τον προσδιορισμό της διατροφικής συμπεριφοράς, τους δόθηκε τριήμερο ημερολόγιο καταγραφής τροφίμων, δυο καθημερινές καταγραφές και μια το σαββατοκύριακο. Όλες οι εθελόντριες συναίνεσαν πρώτα με γραπτή συγκατάθεση της συμμετοχής τους στην μελέτη και το πρωτόκολλο αυτό εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

5.4.2 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ(ΚΟΠΡΑΝΩΝ) ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΩΝ

Η πλήρης κένωση της κάθε εθελόντριας μεταφέρθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών (Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ.),αφού πρωτίστως είχε συλλεχθεί εντός προζυγισμένου συστήματος πλαστικού συλλέκτη-σακούλας προς μικροβιολογική ανάλυση (σε ≤ 2 ώρες από την ώρα της κένωσης).

5.4.3 *IN VITRO* ΖΥΜΩΣΗ ΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΣΕ ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΜΑΝΙΤΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΙΝΟΥΛΙΝΗΣ –STATIC BATCH CULTURE FERMENTATIONS

- Σκοπός

Σκοπός της μεθόδου είναι να πραγματοποιηθεί ζύμωση με το εμβόλιο κοπράνων των εθελοντριών (οστεοπενικές και υγιείς) σε στατικές καλλιέργειες του μανιταριού *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 σε αναλογία 2% (w/v) , του εκχυλίσματος του σε αναλογία 1% (w/v) και της ινουλίνης, ως θετικού μάρτυρα (αναλογία 1% και 2% (w/v) υπό αναερόβιες συνθήκες. Η *in vitro* ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε έξι επαναλήψεις για κάθε υπόστρωμα, με εμβόλιο κοπράνων και από τις έξι εθελόντριες (υγιείς και οστεοπενικές).

- Αντιδραστήρια

  - Απιονισμένο νερό (dH_2O)
  - NaCl
  - KCl
  - Na_2HPO_4
  - KH_2PO_4
  - Ρυθμιστικό διάλυμα με pH 7 και pH 4
  - Peptone water
  - Yeast extract
  - K_2HPO_4
  - MgSO4.7H2O
  - CaCl2.6H2O
  - $NaHCO_3$
  - Cysteine-HCl
  - Bile salts
  - Hemin
  - Tween
  - Vitamin K1
  - Ινουλίνη (Orafti® GR, BENEO-Orafti, Oreye, Belgium)
  - Μανιτάρι *Ganoderma lucidum* LGAM 9720
  - Εκχύλισμα μανιταριού *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 σε αναλογία 1% (w/v)

- Εξοπλισμός
  - Αναλυτικός ζυγός
  - Υάλινη φιάλη των 500ml και 1.00ml
  - Συσκευή pHμετρου
  - Μαγνητικός αναδευτήρας
  - Υάλινες φιάλες Durham
  - Μηχάνημα αυτόκαυστου
  - Συσκευή Stomacher (Seward, USA)
  - Πλαστική σακούλα κατάλληλη για stomacher
  - Αποστειρωμένος συλλέκτης
  - Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου των 100 και 1000 μL

- Αποστειρωμένα tip
- Αποστειρωμένη σπάτουλα
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου με βιδωτό πώμα των 25ml και των 50mL
- Υάλινες φιάλες αποστείρωσης Durham
- Φιαλίδια μικρού όγκου από πολυπροπυλένιο (ελεύθερα από DNA-ase και RNA-ase)
- Συσκευή θαλάμου υπό αναερόβιες συνθήκες (BACTRON™ 1.5 Anaerobic Environmental Chamber, SHELLAB, Cornelius, Oregon)
- Φυγόκεντρος
- Θάλαμος νηματικής ροής- laminar air flow
- Πλαστικές αποστειρωμένες σύριγγες των 20ml και 5ml με βελόνα
- Αποστειρωμένο φίλτρο 0,20μm

5.4.3.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΜΒΟΛΙΟΥ-ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

- **Ρυθμιστικό διάλυμα Phosphate-Buffered Saline (PBS) για τη προετοιμασία του faecal slurry 20% (v/w)-εμβολίου (Palframan R.J. *et al* 2002):**

Ζυγίζονται με την βοήθεια αναλυτικού ζυγού τα κάτωθι αντιδραστήρια:

- 0,8 g NaCl,
- 0,02g KCl,
- 0,115 g Na_2HPO_4
- 0,02g KH_2PO_4

Τοποθετούνται σε ποτήρι ζέσεως με την προσθήκη 100ml dH_2O. Ρυθμίζεται το διάλυμα σε pH 7,3 και εφόσον αποστειρωθεί στους 121 ^{0}C για 15 min, φυλάσσεται σε ψυκτικό θάλαμο στους 4^{o}C.

- **Εμβόλιο-Feacal Slurry:**

Τοποθετούνται από αποστειρωμένο συλλέκτη σε σακούλα κατάλληλη για stomacher 20g κοπράνων του εθελοντή μαζί με 100ml PBS pH 7.3 (20%w/v) (faecal slurry) και ακολουθεί χειροκίνητη μάλαξη και μηχανική ομογενοποίηση σε κατάλληλο όργανο stomacher(Stomacher, Seward, USA), το οποίο προσομοιάζει κινήσεις του στομάχου υπό φυσιολογική ταχύτητα έως ότου καταστεί οπτικά ομοιογενές για περίπου 20 sec. Κατόπιν ολοκλήρωσης συλλέγεται σε φιαλίδια πολυπροπυλενίου με βιδωτό πώμα των 50ml.

- **Βασικό Μέσο καλλιέργειας-Basal Medium Culture (BMC) (Rycroft *et al*. 2001):**

Σε ποτήρι ζέσεως προστίθενται 400ml dH_2O και τα επακόλουθα αντιδραστήρια αφού πρωτίστως ζυγιστούν σε αναλυτικό ζυγό:

- 0,8 g peptone water (Merck KGaA, Darmstadt, Germany),
- 0,8g yeast extract (Merck KGaA),
- 0,04g NaCL (Merck KGaA),
- 0,016g $K_2HPO_{4(}$ Merck KGaA),
- 0,016g KH_2PO_4 (Merck KGaA),
- 0,004g $MgSO_4.7H_2O$ (Merck KGaA),
- 0,004g $CaCl_2.6H_2O$ (Merck KGaA),
- 0,8g $NaHCO_{3(}$ Merck KGaA),
- 0,2228g cysteine-HCl (Merck KGaA),
- 0,2 g αφυδατωμένα bile salts (Oxgall^{TM}, BD and Company, Sparks, MD,USA),

- 0,0002g hemin (διαλυμένη σε λίγες σταγόνες 1 M NaOH-φυλαγμένη στο ψυγείο) (Fluka, Sigma-Aldrich, Netherlands),
- 0,08 μLTween (Pancreac Quimica SA, Barcelona, Spain), και
- 4μL vitamin K_1(φυλαγμένη στο ψυγείο)(Fluka, Sigma-Aldrich,Switzerland),

Ρυθμίζονται όλα τα παραπάνω σε pH 7.0 με 1M HCl και διαμοιράζονται σε 5 υάλινες φιάλες αποστείρωσης Durham με 45ml ισόποσα με συμβολισμούς οι οποίοι επεξηγούνται παρακάτω και ακολούθως αποστειρώνονται οι φιάλες στους 121 ^{0}C για 15 min. Κατόπιν αποστείρωσης, αφήνονται για λίγο σε RT και κατόπιν σε αναερόβιο θάλαμο για να προαναχθούν για 12h περίπου.

Ακολουθεί συμβολικός πίνακας με την αντίστοιχη ερμηνεία χάριν ευκολίας χειρισμού.(Πίνακας 1)

Πίνακας 1: Κωδικοί υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα με την αντίστοιχη ερμηνεία τους.

ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	ΕΡΜΗΝΕΙΑ
NC	Negative Control-Αρνητικός Μάρτυρας, βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς προσθήκη πηγής άνθρακα
INU1	Βασικό μέσο καλλιέργειας με ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v) ως θετικός μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση (Orafti® GR, BENEO-Orafti, Oreye, Belgium)
INU2	Βασικό μέσο καλλιέργειας με ινουλίνη σε αναλογία 2% (w/v) ως θετικός μάρτυρας με γνωστή πρεβιοτική δράση(Orafti® GR, BENEO-Orafti, Oreye, Belgium)
GLBS	Καρποφορία *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 σε κλασικό υπόστρωμα (100% sawdust beech σε αναλογία 2% (w/v))
GLBSE	Εκχύλισμα καρποφορίας *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 σε κλασικό υπόστρωμα σε αναλογία 1% (w/v)

- **<u>Πρωτόκολλο:</u>**

1) Σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας ζυγίζονται τα υποστρώματα σε αποστειρωμένο αλουμινόχαρτο (έχοντας τους ίδιους αντίστοιχους συμβολισμούς όπως και οι υάλινες φιάλες αποστείρωσης Durham).

2) Μεταφέρονται σε αναερόβιες συνθήκες τα ζυγισμένα υποστρώματα και τα αντίστοιχα υάλινα μπουκάλια Durham(που περιέχουν τα 45ml BMC) μαζί με το feacal slurry (20%w/v) μέσα στον αναερόβιο θάλαμο.

3) Ακολουθεί ασηπτικός εμβολιασμός των υάλινων μπουκαλιών Durham. Πρώτα προστίθενται τα αντίστοιχα υποστρωμάτα με καλή ανάδευση και μετά 10% (v/v) εμβολίου (5ml feacal slurry) με καλή ανάδευση ακολούθως.

4) Επωάζονται οι στατικές καλλιέργειες υπό αναερόβιες συνθήκες στους 37oC για 24h με χαλαρωμένα καπάκια. Στο NC δείγμα εφόσον δεν υπάρχει προσθήκη υποστρώματος γίνεται ανάδευση μόνο με το 10% (v/v) εμβολίου (5ml feacal slurry).

5) Σε χρόνους 0h, και 24h λαμβάνονται δείγματα από τις στατικές καλλιέργειες προς προσδιορισμό μοριακών και μικροβιολογικών διεργασιών (ποσοτικός προσδιορισμός μικροοργανισμών-gDNA και υπολογισμός PI_{24}, τα οποία έπονται και περιγράφονται στο επόμενο κεφάλαιο).

Χρόνος 0h:

6) Αρχικά σημειώνονται τα φιαλίδια μικρού όγκου από πολυπροπυλένιο με τους εξής συμβολισμούς (Πίνακας 2):

Πίνακας 2: Συμβολισμοί φιαλιδίων και η ερμηνεία τους.

ΣΥΜΒΟΛΙΣΜΟΣ	ΕΡΜΗΝΕΙΑ
1.NC.0 gDNA	Πρώτη εθελόντρια, negative control, 0h, για μοριακό προσδιορισμό
1.INU1.0 gDNA,	Πρώτη εθελόντρια INU1, 0h, για μοριακό προσδιορισμό
1.INU2.0 gDNA,	Πρώτη εθελόντρια, INU2, 0h, για μοριακό προσδιορισμό
1. GLBS.0 gDNA	Πρώτη εθελόντρια, GLBS, 0h, για μοριακό προσδιορισμό
1.GLBSE.0 gDNA	Πρώτη εθελόντρια GLBSE, 0h, για μοριακό προσδιορισμό

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Κάθε εθελόντρια έχει διαφορετικό κωδικό και διαφορετική χρονική στιγμή της επώασης (π.χ η δεύτερη εθελόντρια έχει μπροστά το 2 και ο χρόνος από 0, γίνεται 24).

7) Σε αποστειρωμένα φιαλίδια μικρού όγκου από πολυπροπυλένιο τοποθετούνται 1ml από κάθε υάλινο μπουκάλι Durham στο αντίστοιχο σεσημασμένο φιαλίδιο και φυλάσσονται στον πάγο έως ότου ολοκληρωθεί η διαδικασία υπό αναερόβιες συνθήκες.

8)Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 20.000x g, για 15min,στους 4^{o}C και σε θάλαμο laminar air flow, αφού πρώτα έχει τοποθετηθεί UV για αποστείρωση για 20 min., παραλαμβάνονται σε αποστειρωμένα φιαλίδια μικρού όγκου από πολυπροπυλένιο 1,5ml του υπερκειμένου των φυγοκεντρούντων για την φύλαξή τους σε πάγο στους -80^{o}C.

Χρόνος 24h:

9) Παραλαμβάνονται υπό αναερόβιες συνθήκες σε σεσημασμένα αποστειρωμένα φιαλίδια μικρού όγκου από πολυπροπυλένιο 1ml από κάθε υάλινο μπουκάλι Durham και ακολούθως φυλάσσονται σε πάγο στους -80^{o}C.

10) Σε 5 σωλήνες προπυλενίου με βιδωτό πώμα των 50mL σεσημασμένοι ομοίως με τα υάλινα μπουκάλια Durham, μεταγγίζονται τα υπολείποντα μετά την ζύμωση, μέσα στον αναερόβιο θάλαμο.

11) Ακολουθεί φυγοκέντριση των σωλήνων σε 10.000x g, για 30min,στους 4^{o}C.

12) Επισημαίνονται 5 σύριγγες των 20ml και 5 σύριγγες των 5ml με βελόνα ομοίως. Σε θάλαμο laminar air flow συλλέγεται το υπερκείμενο με προσοχή και υπό κλίση με μία κίνηση, έτσι ώστε να μην διαταραχθεί το ίζημα και συλλεχθεί. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας όλες οι σύριγγες φυλάσσονται στον πάγο.

13) Σε καινούργιους αποστειρωμένους σωλήνες προπυλενίου με βιδωτό πώμα των 25mL(2 σωλήνες για κάθε από 5 treatments), με την χρήση αποστειρωμένου φίλτρου 0,20μm συλλέγονται 12ml σε κάθε σωλήνα, επομένως 24ml στο σύνολο από κάθε treatment.

14)Ακολουθεί φύλαξη στον πάγο στους -80^{o}C.

(Olano-Martin *et al*. (2000), Rycroft *et al*. (2001)).

5.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΚΟΠΡΑΝΩΝ

- Σκοπός

Σκοπός του πειράματος είναι ο καθαρισμός, η παραλαβή καθώς και ποσοτικοποίηση του ολικού μικροβιακού δεοξυριβονουκλεικού οξέως (DNA) των ζυμώμενων *in vitro* δειγμάτων κοπράνων προς περαιτέρω επεξεργασία.

- Αρχή μεθόδου

Τα δείγματα κοπράνων αποτελούν ένα από τα πιο περίπλοκα βιολογικά υλικά για απομόνωση βακτηριακού DNA λόγω του ότι περιέχουν υπολείμματα ανθρώπινου DNA, DNA από τις διάφορες τροφές αλλά και πληθώρα αναστολέων. Η απομόνωση DNA κοπράνων δεν παύει όμως να αντιπροσωπεύει ένα απαραίτητο βήμα στην απόκτηση καλής ποιότητας καθαρού και ακέραιου DNA και ακριβής αναγνώρισης της μικροβιακής σύνθεσης και ποικιλομορφίας.(Panek *et al*., 2018).

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη μελέτη είναι η μέθοδος Repeated Bead Beating Plus Column (RBB+C) με κάποιες βελτιστοποιήσεις-τροποποιήσεις για εφαρμογές στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο που περιγράφεται εκτενέστερα παρακάτω.(Yu and Morrison, 2004), (Salonen *et al*., 2010).

- Αντιδραστήρια
  - Δείγματα μανιταριών και εκχυλισμάτων τους υπό μελέτη
  - Διάλυμα λύσης-lysis buffer (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, και 4% sodium dodecyl sulfate (SDS)).
  - Αποστειρωμένα zirconia beads (0,3g των 0,1mm και 0,1g των 0,5mm).
  - Οξικό αμμώνιο 10M

- Ισοπροπανόλη
- 70% αιθανόλη-EthOH και απόλυτη αιθανόλη
- Ρυθμιστικό διάλυμα-Tris-EDTA buffer
- DNαση-ελεύθερη RNαση
- Πρωτεινάση Κ
- Διάλυμα AL (από QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany)
- QIAamp στήλη (από QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany)
- Διάλυμα AW1 (Qiagen)
- Διάλυμα AW2 (Qiagen)
- Διάλυμα έκλουσης AE (Qiagen)

➢ Εξοπλισμός

- Αποστειρωμένα φιαλίδια μικρού όγκου από πολυπροπυλένιο των 1,7ml και 2ml
- Αυτόματη πιπέτα μεταβλητού όγκου των 10μl, 20μl, 100μl και 1.000μl
- Ποτήρια ζέσεως των 250 mL και θερμόμετρο υψηλών θερμοκρασιών
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Ομογενοποιητής Mini-Beadbeater™ (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA)
- Φυγόκεντρος BECKMAN Avanti ™ 30 Centrifuge
- Φασματοφωτόμετρο ορατού υπεριώδους IMPLEN P330

➢ Πρωτόκολλο

Α) Για την λύση των κυττάρων:

1) Τα δείγματα μεταφέρονται σε πάγο προς απόψυξη και φυγοκεντρούνται προς απόρριψη υπερκείμενης φάσης στα 20.000x g, στους 4^{o}C, για 10 min.

2)Προστίθενται 1ml lysis buffer καθώς και αποστειρωμένα zirconia beads.

3) Ακολουθεί ομογενοποίηση σε 4.800Vibers/min για 3min, και επώαση στους 95^{o}C για 15min (με χειροκίνητη ανάδευση κάθε 5 min).

4)Ακολουθεί πάλι φυγοκέντρηση στα 20.000x g, στους 4^{o}C, για 10 mim και μεταφορά υπερκειμένου υγρού σε καινούργια αποστειρωμένα σωληνάκια των 2ml.

5)Προστίθενται 300μl lysis buffer και επαναλαμβάνονται τα βήματα από 2-4 έως τελικής ενοποίησης της υγρής φάσης.

Β)Καθίζηση-Καταβύθιση των νουκλεικών οξέων:

6)Ακολουθεί προσθήκη 260μl οξικού αμμωνίου 10Μ, πολύ καλή ανάδευση και επώαση σε πάγο για 5min.

7)Μετά από φυγοκέντρηση στα 16.000x g, στους 4^{o}C, για 10 mim, ακολουθεί μεταφορά του υπερκειμένου σε eppendorfs των 1,5ml και προσθήκη ισοπροπανόλης(1:1).

8)Κατόπιν επώασης στον πάγο για 30min,τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 16.000x g, στους 4^{o}C, για 15 mim.

9)Απορρίπτεται η υπερκείμενη φάση και ακολουθεί ξέπλυμα του ιζήματος με 1ml 70% Eoth.

10) Μετά την φυγοκέντρηση στα 12.000x g, στους 4oC, για 2 mim, απορρίπτεται η υγρή φάση και τα δείγματα αφήνονται με ανοιχτά τα καπάκια σε RT προς ξήρανση για 30 min.

11)Επακολουθεί προσθήκη 100μl Tris-EDTA και μετά από 15 min, καλή αναδιάλυση των τοιχωμάτων και ενοποίηση των κλασμάτων.

Γ) Απομάκρυνση του RNA, πρωτεϊνών και καθαρισμός του DNA:

12)Προστίθενται 2μl DNase-free RNase (10mg/mL) στα δείγματα καθώς και επωάζονται στους 37oC, για 15 min.

13) Ακολουθεί προσθήκη 15μL της πρωτεϊνάσης K, 200μL ρυθμιστικού διαλύματος AL (από το QIAamp® DNA Mini Kit) και μετά από καλή ανάμειξη, επώαση στους 70°C ,για 10 min.

14) Έπεται προσθήκη 200μL 100% EthOH, καλή ανάδευση και μεταφορά όλου του υγρού μέσα στην QIAamp column (στήλη) κατόπιν φυγοκέντρησης στα 20.800x g , σε RT, για 1 min.

15) Απομακρύνεται όλο το υγρό από την στήλη, προστίθενται 500μL AW1 buffer και φυγοκεντρούνται τα δείγματα στα 20.800x g , σε RT, για 1 min.

16) Ακολουθεί απομάκρυνση όλου του υγρού από την στήλη, προσθήκη 500μL AW2 buffer και φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 20.800x g , σε RT, για 3 min.

17) Απορρίπτεται το υγρό και φυγοκεντρείται η κάθε στήλη στα 20.800x g , σε RT, για 1 min προς ξήρανση.

18) Προστίθεται στη στήλη 200μL διαλύματος έκλουσης AE, επωάζεται σε RT, για 5 min και εν τέλει φυγοκεντρείται στα 20.800x g , σε RT, για 1 min.

19) Τα δείγματα φορτώνονται με 3 μl δείγματος στην κυψελίδα και φωτομετρούνται στα A_{230}, A_{260}, A_{280}, A_{320}, $A_{260/280}$ και $A_{260/320}$ προς μέτρηση καθαρότητας και ποσοτικοποίησης του DNA για dsDNA (double-stranded DNA).

20)Μετά την μέτρηση, μοιράζονται σε δυο πλαστικά σωληνάκια και αποθηκεύονται στους -80^{o}C.

5.6 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΟΠΡΑΝΩΝ ΥΠΟ ΧΡΗΣΗ REAL TIME-POLYMERASE CHAIN REACTION(qPCR) METHOD

- Αρχή μεθόδου

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) αποτελεί μια ενζυμική μέθοδο ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού έως και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που καθίσταται απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς, όπως ηλεκτροφόρηση, ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων κ.ά. για να διερευνηθούν αν υπάρχουν διαφοροποιήσεις ανάλογα με το υπόστρωμα και την κατάσταση της οστικής υγείας της κάθε εθελόντριας. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από τρία βασικά στάδια, τα οποία αναφέρονται στον πίνακα 3 (Παλαιολόγου Δ., Κεφάλαιο 7). Επιπροσθέτως, τα στάδια αυτά επαναλαμβάνονται για 45 κύκλους στον θερμικό κυκλοποιητή. Μετά τον τελευταίο κύκλο της κάθε ενίσχυσης ακολούθησε ανάλυση της melting curve προς προσδιορισμό ειδικότητας της ενίσχυσης του προϊόντος, καθώς και ψύξης του μηχανήματος ως το έσχατο στάδιο.(Castillo *et al*., 2006).

Πίνακας 3: Ενδεικτικός προγραμματισμός της qPCR για τα ολικά βακτήρια:

ΣΤΑΔΙΑ PCR	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ(^{o}C)	ΧΡΟΝΟΣ (sec ή min)
Enzyme Activation	95^{o}C	3min
3 STEP PCR	Denaturation 95^{o}C	3 sec
	Annealing 60 ^{o}C	20 sec
	Extension 72 ^{o}C	19 sec
Melting Curves	95 ^{o}C	0 sec
	65 ^{o}C	15 sec
	95 ^{o}C	0 sec
Cooling	40 ^{o}C	30 sec

Στη μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των πληθυσμών των μικροοργανισμών που μετρήθηκαν σε $\log_{10}$copies/ml. Τα βακτήρια τα οποία ποσοτικοποιήθηκαν προς χρήση πρεβιοτικού δείκτη κάθε υποστρώματος με ερευνητικό ενδιαφέρον ως προς την δράσης τους στον οστικό μεταβολισμό καθώς και ελέγχου βουτυροπαραγωγής δράσης (τα τρία τελευταία) είναι τα εξής: 1) Ολικά βακτήρια, 2) *Bifidobacterium spp*., 3) *Lactobacillus group* που περιλαμβάνει είδη των γενών *Lactobacillus, Pediococcus, Weissella* και *Leuconostoc*), 4) *Clostridium perfringens* group, 5) *Bacteroides sp*., 6) *Clostridium leptum group*, 7) *Faecalibacterium prausnitzii* και 8) *Roseburia spp-Eubacterium rectale* group.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός προκύπτει από την τιμή Ct -threshold circle (είναι ο αριθμός των κύκλων της qPCR όπου ο φθορισμός του προϊόντος της φτάνει στο κατώφλι ανίχνευσης της φάσης log-linear phase όπου η απόδοση της αντίδρασης PCR είναι σταθερή). Καθίσταται ανάγκη να αποσαφηνιστεί ότι όσο μικρότερο είναι το Ct τόσο μεγαλύτερη θα είναι η ποσότητα του DNA-στόχου στο δείγμα. Η τελική μορφή της ποσοτικοποίησης της PCR είναι εκπεφρασμένη σε (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml δείγματος), μέσω προτύπων καμπυλών αναφοράς, όπου δίνεται η γραμμική συσχέτιση των copies του 16S rRNA και των αντίστοιχων τιμών Ct μετά από πολλές πολλαπλές αραιώσεις των στελεχών (10^1 έως 10^7 copies).Η αλληλούχιση του 16S-rRNAαποτελεί θεμελιώδες βήμα για τον προσδιορισμό των βακτηρίων, με δομή που ακολουθεί μεταβλητές και υπερμετάβλητες περιοχές χρησιμοποιώντας κατάλληλα εκκινητικά μόρια (primers) που στοχεύουν στο γονίδιο αυτό για κάθε ένα από τους προαναφερθέντες μικροοργανισμούς-στόχους. (Rosselli, R.*et al.*, 2016).(Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Βέλτιστες θερμοκρασίες υβριδισμού-annealing των υπό εξέταση μικροοργανισμών.

Μικροοργανισμός-στόχος	Εκκινητής-Primer	Αλληλουχία primer (5'-3')	Annealing-Υβριδισμός (^{o}C)	Παραπομπή
Total Bacteria	Forward	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	60ºC	Nadkarni *et al*., 2002
	Reverse	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT		
Bifidobacterium spp.	Forward	TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG	58ºC	Rintilla *et al*., 2004
	Reverse	CCACATCCAGC(A/G)TCCAC		
Lactobacillus group	Forward	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	58ºC	Rintilla *et al*., 2004
	Reverse	CACCGCTACACATGGAG		
Clostridium	CPF	ATGCAAGTCGAGCGATG	55ºC	Phong *et al*.,

perfringens group	CPR	TATGCGGTATTAATCTCCCTTT		2010
Bacteroides spp.	Bac303F Bfr-Fmrev	GAAGGTCCCCCACATTG CGCKACTTGGCTGGTTCAG	60^{o}C	Ramirez-Farias *et al*., 2009
Clostridium leptum group	Clep866mF Clept1240mR	TTAACACAATAAGTWATCCACCTGG ACCTTCCTCCGTTTTGTCAAC	55^{o}C	Ramirez-Farias *et al*., 2009
Faecalibacterium prausnitzii	FPR-2F Fprau645R	GGAGGAAGAAGGTCTTCGG AATTCCGCCTACCTCTGCACT	60^{o}C	Feng *et al.*, 2014, Suau *et al*., 2001, Wang, Cao & Cerniglia, 1996
Roseburia spp.-Eubacterium rectale	RrecF Rrec630mR	GCGGTRCGGCAAGTCTGA CCTCCGACACTCTAGTMCGAC	60^{o}C	Walker *et al*., 2011

Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό LCS4 4.1.1.2 (Roche Diagnostics GmbH Germany), με βέλτιστη απόδοση 1.8-2 καθώς και σύγκριση με πρότυπες καμπύλες αναφοράς.

- Αντιδραστήρια
  - Δείγματα μανιταριών και εκχυλισμάτων τους υπό μελέτη
  - Ultra pure H_2O
  - Biochrom H_2O
  - Γενετικό υλικό-αλληλουχία στόχου των υπό μελέτη δειγμάτων
  - Μη ειδική φθορίζουσα χρωστική KAPA SYBR® Fast Master Mix (2x) Universal Kit (Kapa Biosystems Inc., USA)
  - Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές-primers Forward και Reverse κατάλληλοι για κάθε μικροοργανισμό
  - BSA (Bovine serum Albumin)
  - Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg2+
  - Νουκλεοτίδια (dNTPs)
  - DNA πολυμεράση
  - Πρότυπα διαλύματα αντίστοιχων μικροοργανισμών

- Εξοπλισμός
  - Θερμικός κυκλοποιητής LightCycler®2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) και το λογισμικό πρόγραμμα LCS4 4.1.1.2 (Roche Diagnostics GmbH).
  - Υάλινα τριχοειδή (capillaries) και τους υποδοχείς τους (capillaries adaptors)

- Πρωτόκολλο

1)Τα δείγματα υπό μελέτη αφήνονται στον πάγο προς ξεπάγωμα και κατόπιν κατάλληλης αραίωσης (με τελική συγκέντρωση 1ng/μl και 10ng/μl) ετοιμάζεται ρυθμιστικό διάλυμα Master Mix (κατάλληλης συγκέντρωσης διαφορετικής για κάθε μικροοργανισμό) με τα εξής:

- Ultra pure H_20-PCR grade
- Νουκλεοτίδια dNTPs
- Φθορίζουσα χρωστική SYBR GREEN(KAPA SYBR Fast Master Mix (2x) Universal Kit, Kapa Biosystems)
- 0,4μl ή 0,6μl εκκινητών-primers
- 0,25 μl Bovine Serum Albumin (BSA)

2)Ακολουθεί φόρτωμα των capillaries τριχοειδών με 15μl από Master Mix και 5μl από κάθε γενετικό υλικό-αλληλουχία στόχου.

3)Τα γυάλινα τριχοειδή τοποθετούνται στην ειδική υποδοχή (καρουζέλ) του θερμικού κυκλοποιητή και ξεκινάει τρέξιμο του προγράμματος ρυθμισμένο σε κατάλληλες θερμοκρασίες αντίστοιχες για κάθε μικροοργανισμό.
4) Ολοκληρώνοντας, λαμβάνονται τα αποτελέσματα προς επεξεργασία σε log10copies/ml δείγματος.

5.7 ΥΠΟΛΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΟΥ ΔΕΙΚΤΗ-PREBIOTIC INDEX-PI_{24}

Για την ποιοτική αξιολόγηση της πρεβιοτικής δράσης των υποστρωμάτων μετά από 24h έχει προταθεί ένας πρεβιοτικός δείκτης (PI_{24} = E/A) ο οποίος ορίζεται ως ΄΄ η αύξηση των μπιφιντοβακτηρίων εκφραζόμενη ως ο απόλυτος αριθμός των « νέων » cfu / g των κοπράνων (E) διαιρούμενο με την ημερήσια δόση (g) της πρεβιοτικής πρόσληψης (A)΄΄ (Roberfroid, 2007). Ο δείκτης PI χρησιμοποιείται συνήθως ως πρότυπο για τη σύγκριση των διαφόρων πρεβιοτικών υδατανθράκων.(Lam *et al*., 2013). Για να θεωρηθεί ότι ασκεί μια ευνοϊκή επίδραση θα πρέπει οι πληθυσμοί των *Bifidobacterium* spp. και/ή του *Lactobacillus* group να βρίσκονται σε αύξηση και σε αντίστοιχη μείωση οι μη ευεργετικοί μικροοργανισμοί, όπως, *Bacteroides spp και τα* κλωστρίδια. Με αυτό τον τρόπο ο PI_{24} αυτός υπερτερεί ως προς την κανονικοποίηση των πληθυσμών των μικροοργανισμών σε σχέση με την αρχική τους συγκέντρωση. Σύμφωνα με Palframan *et al*., χρησιμοποιήθηκε η κάτωθι εξίσωση:

$$PI_{24} =((Bif_{24h}/Bif_{0h})/(Total_{24h}/Total_{0h})) + ((Lac_{24h}/Lac_{0h})/(Total_{24h}/Total_{0h}))-$$

$$((Bac_{24h}/Bac_{0h})/(Total_{24h}/Total_{0h}))– ((Clos_{24h}/Clos_{0h})/(Total_{24h}/Total_{0h}))$$

όπου:

24h:καταμέτρηση μετά από 24h,

0h:καταμέτρηση σε 0h (αρχικό εμβόλιο)

Bif= *Bifidobacterium spp.*,

Total=ολικά βακτήρια,

Lac=*Lactobacillus group*,

Bac=*Bacteroides spp*.και

Clos=*Clostridium perfingens group.*

(Palframan *et al*., 2003).

5.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η στατιστική ανάλυση και επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα IBM® SPSS® Statistics version 21.Το συνολικό δείγμα των εθελοντών ήταν n=6, όπου και ισο-μοιράστηκαν σε 3 υγιείς (n=3) και 3 οστεοπενικές (n=3). Προϋπόθεση για πολλούς στατιστικούς ελέγχους, αποτελεί η συνεχής μεταβλητή να ακολουθεί κανονική κατανομή. Επομένως, ο έλεγχος κανονικότητας της κατανομής διεξήχθη με Kolmogorov-Smirnov test (One-Sample Kolmogorov-Smirnov test) στο σύνολο των παρατηρήσεων, όπου όλες φάνηκε να ακολουθούν κανονική κατανομή. Όσο αφορά την σύγκριση των υπό εξέταση treatments έγινε

σε μέσες τιμές των δεκαδικών λογαρίθμων των αντιγράφων του 16S γονιδίου/ml δείγματος (log_{10}copies/ml δείγματος).Τα αποτελέσματα του PI_{24} στηρίζονται στον αριθμό των αντιγράφων του 16S γονιδίου/ml δείγματος (copies/ml δείγματος), χωρίς ωστόσο να υπόκεινται σε στατιστική ανάλυση πέραν αυτού. Για τον έλεγχο πιθανής συσχέτισης ανάμεσα σε μια ποσοτική και μια κατηγορική μεταβλητή με δυο κατηγορίες μέσα στο δείγμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος t-test σε εξαρτημένα κατά ζεύγη δείγματα (paired-samples T-test) για να ελεγχθεί αν οι παρατηρήσεις του ενός δείγματος αντιστοιχίζουν μια προς μια με τις παρατηρήσεις του άλλου έχοντας μια κοινή ιδιότητα. Οι συνεχείς μεταβλητές που παρατίθενται εν συνεχεία με την μορφή πινάκων παρουσιάζουν την μορφή μέσος όρος ± τυπική απόκλιση.

Για να αξιολογηθεί η σχέση ανάμεσα σε μια ποσοτική και μια κατηγορική μεταβλητή με περισσότερες από δυο κατηγορίες ακολούθησε ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (One-way ANOVA). Συγκρίθηκε One-way ANOVA των μικροβιακών πληθυσμών καθώς και των SCFAs ανά εξεταζόμενα δείγματα για t=oh και t=24h, καθώς και ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων (Repeated- Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity).Οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν με επίπεδο σημαντικότητας ορισμένο στο 5% ($p<0,05$).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ Β-ΓΛΥΚΑΝΩΝ ΤΟΥ ΜΑΝΙΤΑΡΙΟΥ *GANODERMA LUCIDUM*

Για την παραλαβή και απομόνωση των β-γλυκάνων από τον μύκητα *Ganoderma lucidum* πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις με νερό με τρεις διαφορετικές μεθόδους ώστε να βρεθεί η καλύτερη απόδοση, με χρήση υψηλών θερμοκρασιών, υπερήχων και μικροκυμάτων. Αφού εκχυλίστηκαν οι ολικές γλυκάνες, μετρήθηκε σε φασματοφωτόμετρο η συγκέντρωσή τους έτσι ώστε να επιλεχθεί η βέλτιστη μέθοδος. Συγκρίνοντας και τις τρεις μεθόδους, όπως φαίνεται και στον πίνακα 4, η εκχύλιση σε υψηλές θερμοκρασίες αποτελεί την μέθοδο με την μεγαλύτερη απόδοση, επί παραδείγματι 51,6% TG, εν συγκρίσει με τις άλλες μεθόδους. Παρακάτω ακολουθεί ο πίνακας με τα αποτελέσματα.

Πίνακας 5: Μέθοδος και απόδοση των ολικών γλυκάνων (%).

ΜΕΘΟΔΟΣ	ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΓΛΥΚΑΝΩΝ (%)
Υπέρηχοι (10 min)	23,4%
Υπέρηχοι (20 min)	28,5%
Υπέρηχοι (40 min)	25,1%
Μικροκύματα (10min)	14,3%
Υψηλή θερμοκρασία(50h)	51,6%

6.2 *IN VITRO* ΖΥΜΩΣΗ ΣΕ ΣΤΑΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΤΩΝ ΠΙΘΑΝΩΝ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Τα πιθανά πρεβιοτικά υποστρώματα, μανιτάρι *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 σε αναλογία 2% (w/v) και εκχύλισμα από το ίδιο μανιτάρι πλούσιο σε β-γλυκάνες σε αναλογία 1% (w/v) υποβλήθηκαν σε ζύμωση με το εμβόλιο κοπράνων των εθελοντριών (οστεοπενικές και υγιείς) σε στατικές καλλιέργειες, υπό αναερόβιες συνθήκες. Χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας στη ζύμωση η ινουλίνη ως γνωστό πρεβιοτικό, σε δύο συγκεντρώσεις 1% και 2% (w/v) και αρνητικός μάρτυρας (θρεπτικό μέσο χωρίς πηγή άνθρακα) με το ίδιο εμβόλιο κοπράνων.

Η *in vitro* ζύμωση πραγματοποιήθηκε σε έξι επαναλήψεις για κάθε υπόστρωμα για 24 ώρες, με εμβόλιο κοπράνων από κάθε μία από τις έξι εθελόντριες (υγιείς και οστεοπενικές), με δείγματα που ελήφθησαν πριν ξεκινήσει η ζύμωση (t=0) και στο τέλος (t=24h), για όλους τους χειρισμούς.

6.3 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΟΝ ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΩΝ ΤΗΣ IN VITRO ΖΥΜΩΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Μέσω της μοριακής μεθόδου qPCR (quantitative PCR) πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός του εντερικού μικροβιόκοσμου και των έξι εθελοντριών. Ισομοιράζοντας τις εθελόντριες ανάλογα με την οστική τους κατάσταση σε υγιείς n=3 (ηλικίας =58,33± 3,51, B.M.I.= 24,8±3,4 kg/m^2) και σε οστεοπενικές n=3 (ηλικίας=54 ± 2,65, B.M.I.= 22,52±2,22 Kg/m^2), διερευνήθηκε η επίδραση των υποστρωμάτων στους μικροβιακούς πληθυσμούς μετά από την 24h ζύμωση των υποστρωμάτων. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί που εξετάστηκαν εντός του κάθε δείγματος σε βάθος χρόνου είναι τα ολικά βακτήρια, το *Bifidobacterium spp*., το *Lactobacillus group* , το *Clostridium perfringens* group, το *Bacteroides spp*., καθώς και οι βουτυροπαραγωγοί, *Clostridium leptum group, Faecalibacterium prausnitzii* και *Roseburia spp-Eubacterium rectale group*. Ακολουθούν οι πίνακες με τα επεξεργασμένα αποτελέσματα παρουσιασμένα σε t=0h και t=24h ως προς το σύνολο των εθελοντριών (n=6) και αντίστοιχα ως προς την οστική τους κατάσταση σε υγιείς (n=3) και οστεοπενικές (n=3). Επιπλέον, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε λογαριθμική μορφή των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml δείγματος) και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας έχει οριστεί στο 5% (p=0,05).

Πίνακας 6: Ποσοτικός προσδιορισμός μικροβιακών πληθυσμών (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml κοπράνων) των εθελοντριών ως προς το σύνολο(n=6) στον αρχικό χρόνο δειγματοληψίας (t=0h).

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	NC	INU1	INU2	GLBS	GLBSE	P OVERALL
Total bacteria, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	10,10±0,23	10,12±0,22	10,10±0,22	10,04±0,22	10,09±0,28	0,979
***Bifidobacterium spp.*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	8,36±0,94	8,38±0,96	8,31±0,92	8,36±1,03	8,36±1,01	1,000
***Lactobacillus group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,28±0,97	6,27±0,88	6,23±0,96	6,03±0,90	6,24±0,94	0,990
***Clostridium perfringens* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,23±0,68	6,30±0,62	6,28±0,66	5,69±0,93	6,33±0,60	0,498
***Bacteroides spp*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,43±0,23	9,43±0,16	9,43±0,25	9,39±0,23	9,43±0,24	0,998
***Clostridium leptum group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,20±0,43	9,22±0,38	9,20±0,44	9,14±0,47	9,27±0,45	0,992
Faecalibacterium prausnitzii, , (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	8,30±0,93	8,33±0,83	8,34±0,83	8,26±1,02	8,35±0,87	1,000
Roseburia spp-Eubacterium rectale	8,39±0,58	8,35±0,58	8,39±0,60	8,43±0,59	8,40±0,60	

group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)						1,000

Οι παράμετροι ακολουθούν κανονική κατανομή και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ±τυπική απόκλιση (μ.ο ±SD)., πραγματοποιήθηκε One-Way ANOVA-Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, όπου **NC**:negative control (αρνητικός μάρτυρας), **INU1**: ινουλίνη 1% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **INU2**: ινουλίνη 2% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **GLBS:** μύκητας *Ganoderma lucidum*, **GLBSE:** εκχύλισμα μύκητα *Ganoderma lucidum.*

Πίνακας 7: Ποσοτικός προσδιορισμός μικροβιακών πληθυσμών (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml κοπράνων) των εθελοντριών ως προς το σύνολο (n=6) στον τελικό χρόνο δειγματοληψίας (t=24h)

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	**NC**	**INU1**	**INU2**	**GLBS**	**GLBSE**	**P OVERALL**
Total bacteria, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	10,00±0,15	10,29±0,28	10,29±0,27	10,00±0,39	10,07±0,23	0,166
***Bifidobacterium spp.*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	8,48±0,93	9,29±1,33	9,47±1,39	8,66±1,22	8,94±1,24	0,608
***Lactobacillus group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,34±0,93	7,35±0,83	7,60±1,04	6,16±1,23	7,06±1,01	0,090
***Clostridium perfringens* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,27±0,61	6,21±0,88	6,34±0,99	6,10±0,83	6,21±0,91	0,992
***Bacteroides spp*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,21±0,29	9,60±0,27	9,63±0,35	9,45±0,27	9,44±0,20	0,099
***Clostridium leptum group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,12±0,43	9,03±0,54	9,13±0,53	9,11±0,44	9,04±0,39	0,993
Faecalibacterium prausnitzii, , (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	7,94±0,68	8,34±0,87	8,43±0,92	8,12±0,99	8,25±0,70	0,862
***Roseburia spp-Eubacterium rectale* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	7,62±0,42	8,11±0,83	8,10±0,78	7,67±0,44	7,91±0,69	0,570

Οι παράμετροι ακολουθούν κανονική κατανομή και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ±τυπική απόκλιση (μ.ο ±SD)., πραγματοποιήθηκε One-Way ANOVA-Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, όπου **NC**:negative control (αρνητικός μάρτυρας), **INU1**: ινουλίνη 1% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **INU2**: ινουλίνη 2% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **GLBS:** μύκητας *Ganoderma lucidum*, **GLBSE:** εκχύλισμα μύκητα *Ganoderma lucidum.*

Στον αρχικό χρόνο του εμβολιασμού κοπράνων (πίνακας 6) δεν εμφανίζεται κάποια σημαντική διαφοροποίηση στους αρχικούς πληθυσμούς των μικροοργανισμών σε όλες τις εθελόντριες, δεδομένου ότι τόσο σε κάθε υπόστρωμα όσο και στους μάρτυρες (ένας αρνητικός, δύο θετικοί ινουλίνη σε αναλογία 1% και 2%) φαίνεται η ομοιομορφία του εμβολίου-κοπράνων. Ωστόσο, μετά από την 24h ζύμωση των μικροοργανισμών (πίνακας 7), φαίνεται ότι τα γένη *Lactobacillus* και *Bacteroides* εμφάνισαν μια τάση προς αύξηση του πληθυσμού τους εν συγκρίσει με τον αρνητικό μάρτυρα , με p overall=0,090 και p overall=0,099 αντίστοιχα. Επιπλέον, το *Bacteroides* spp παρουσίασε μια τάση προς αύξηση, όταν ζυμώθηκε στο υπόστρωμα της ινουλίνης σε αναλογία 2% (w/v) εν συγκρίσει με τον αρνητικό μάρτυρα (9,63±0,35 vs. 9,21±0,29 ,με p=0,092).

Πίνακας 8: Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml κοπράνων) των υγιών εθελοντριών (n=3) στον αρχικό χρόνο δειγματοληψίας (t=0h).

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	NC	INU1	INU2	GLBS	GLBSE	P OVERALL
Total bacteria, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	9,96±0,18	10,02±0,18	9,98±0,16	9,90±0,11	9,91±0,21	0,897
***Bifidobacterium spp.*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	7,64±0,80	7,64±0,81	7,60±0,80	7,56±0,83	7,55±0,78	1,000
***Lactobacillus group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,20±0,54	6,23±0,45	6,16±0,52	5,86±0,47	6,14±0,49	0,896
***Clostridium perfringens* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,15±0,75	6,20±0,70	6,22±0,67	5,41±1,03	6,23±0,73	0,665
***Bacteroides spp*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,36±0,20	9,42±0,19	9,38±0,21	9,31±0,23	9,36±0,30	0,984
***Clostridium leptum group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	8,91±0,28	8,96±0,26	8,95±0,28	8,83±0,39	8,96±0,34	0,985
Faecalibacterium prausnitzii, , (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	7,63±0,90	7,75±0,84	7,77±0,85	7,55±1,04	7,70±0,78	0,998
***Roseburia spp-Eubacterium rectale* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	8,06±0,59	8,05±0,59	8,10±0,65	8,09±0,61	8,06±0,60	1,000

Οι παράμετροι ακολουθούν κανονική κατανομή και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ±τυπική απόκλιση (μ.ο ±SD)., πραγματοποιήθηκε One-Way ANOVA-Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, όπου **NC**:negative control (αρνητικός μάρτυρας), **INU1**: ινουλίνη 1% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **INU2**: ινουλίνη 2% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **GLBS:** μύκητας *Ganoderma lucidum*, **GLBSE:** εκχύλισμα μύκητα *Ganoderma lucidum*.

Πίνακας 9: Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακοών πληθυσμών (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml κοπράνων) των υγιών εθελοντριών (n=3) στον τελικό χρόνο δειγματοληψίας (t=24h).

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	NC	INU1	INU2	GLBS	GLBSE	P OVERALL
Total bacteria, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	9,97±0,05	10,22±0,38	10,26±0,40	9,78±0,48	9,92±0,26	0,450
***Bifidobacterium spp.*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	7,83±0,94	8,76±1,89	8,97±2,00	7,90±1,36	8,29±1,53	0,868
***Lactobacillus group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,30±0,68	7,92±0,67	8,04±1,29	6,10±1,40	6,76±1,38	0,186
***Clostridium perfringens* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,24±0,79	6,02±1,18	6,24±1,40	5,88±1,18	6,02±1,19	0,994
***Bacteroides spp*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,29±0,20	9,68±0,35	9,73±0,48	9,41±0,38	9,30±0,09	0,363
***Clostridium leptum group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,06±0,30	8,92±0,54	9,01±0,61	8,81±0,36	8,81±0,15	0,926
Faecalibacterium prausnitzii, , (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	7,62±0,85	8,12±1,22	8,15±1,33	7,56±1,24	7,91±0,92	0,946
***Roseburia spp-Eubacterium rectale* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	7,51±0,40	7,98±0,66	7,98±0,96	7,41±0,38	7,72±1,01	0,811

Οι παράμετροι ακολουθούν κανονική κατανομή και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ±τυπική απόκλιση (μ.ο ±SD)., πραγματοποιήθηκε One-Way ANOVA-Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, όπου **NC**:negative control (αρνητικός μάρτυρας), **INU1**: ινουλίνη 1% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **INU2**: ινουλίνη 2% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **GLBS:** μύκητας *Ganoderma lucidum*, **GLBSE:** εκχύλισμα μύκητα *Ganoderma lucidum*.

Κατηγοριοποιώντας τις έξι εθελόντριες σε δυο ομάδες ανάλογα με την οστική τους υγεία, στις υγιείς εθελόντριες δεν υπήρξε κάποια ουσιαστική διαφοροποίηση των μικροοργανισμών ούτε στο αρχικό στάδιο, πριν από την έναρξη των ζυμώσεων, ούτε και μετά τις ζυμώσεις , έτσι όπως φαίνεται από τους πίνακες 8 και 9 .

Πίνακας 10: Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml κοπράνων) των εθελοντριών σε οστεοπενική κατάσταση (n=3) στον αρχικό χρόνο δειγματοληψίας (t=0h)

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	NC	INU1	INU2	GLBS	GLBSE	P OVERALL
Total bacteria, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	10,24±0,22	10,23±0,23	10,21±0,24	10,18±0,24	10,26±0,23	0,993
***Bifidobacterium spp.*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,08±0,05	9,11±0,09	9,01±0,08	9,16±0,15	9,17±0,10	0,350
***Lactobacillus group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,36±1,43	6,30±1,31	6,29±1,43	6,20±1,31	6,35±1,40	1,000
***Clostridium perfringens* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,31±0,77	6,40±0,67	6,35±0,80	5,96±0,95	6,43±0,59	0,942
***Bacteroides spp*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,50±0,27	9,44±0,17	9,47±0,32	9,48±0,24	9,49±0,20	0,998
***Clostridium leptum group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,50±0,34	9,48±0,27	9,46±0,45	9,46±0,34	9,57±0,32	0,993
Faecalibacterium prausnitzii, , (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	8,96±0,18	8,91±0,18	8,91±0,20	8,96±0,12	8,99±0,17	0,967
***Roseburia spp-Eubacterium rectale* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	8,72±0,40	8,65±0,47	8,67±0,50	8,78±0,38	8,73±0,45	0,996

Οι παράμετροι ακολουθούν κανονική κατανομή και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ±τυπική απόκλιση (μ.ο ±SD)., πραγματοποιήθηκε One-Way ANOVA-Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, όπου **NC**:negative control (αρνητικός μάρτυρας), **INU1**: ινουλίνη 1% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **INU2**: ινουλίνη 2% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **GLBS:** μύκητας *Ganoderma lucidum*, **GLBSE:** εκχύλισμα μύκητα *Ganoderma lucidum.*

Πίνακας 11: Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml κοπράνων) των εθελοντριών σε οστεοπενική κατάσταση (n=3) στον τελικό χρόνο δειγματοληψίας (t=24h).

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	NC	INU1	INU2	GLBS	GLBSE	P OVERALL
Total bacteria, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	10,03±0,23	10,37±0,20	10,33±0,11	10,21±0,10	10,23±0,03	0,146
***Bifidobacterium spp.*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,12±0,15	9,82±0,12	**9,97±0,21***	9,43±0,31	9,59±0,45	**0,026***
***Lactobacillus group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,38±1,31	6,78±0,56	7,16±0,68	6,23±1,35	7,37±0,62	0,576
***Clostridium perfringens* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,30±0,56	6,39±0,67	6,44±0,70	6,32±0,43	6,40±0,74	0,998
***Bacteroides spp*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,12±0,59	9,52±0,63	9,53±0,54	9,49±0,29	9,58±0,44	0,205
***Clostridium leptum group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,18±0,23	9,15±0,29	9,25±0,20	9,40±0,03	9,27±0,11	0,975
Faecalibacterium prausnitzii, , (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	8,25±0,39	8,57±0,50	8,71±0,34	8,67±0,06	8,59±0,20	0,507
Roseburia spp-	7,72±0,50	8,24±1,12	8,21±0,74	7,94±0,38	8,10±0,27	

***Eubacterium rectale* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**						0,868

Οι παράμετροι ακολουθούν κανονική κατανομή και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ±τυπική απόκλιση (μ.ο ±SD)., πραγματοποιήθηκε One-Way ANOVA-Ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα, όπου **NC**:negative control (αρνητικός μάρτυρας), **INU1**: ινουλίνη 1% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **INU2**: ινουλίνη 2% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **GLBS:** μύκητας *Ganoderma lucidum*, **GLBSE:** εκχύλισμα μύκητα *Ganoderma lucidum*., * = στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα ($p<0,05$)

Όσο αφορά την εντερική ποικιλομορφία των εθελοντριών σε οστεοπενική κατάσταση πριν από τη ζύμωση των υποστρωμάτων, δεν εμφανίστηκε κάποια αξιοσημείωτη διαφοροποίηση (πίνακας 10), χωρίς ωστόσο να συμβαίνει το ίδιο και μετά το πέρας της 24h ζύμωσης. Πιο συγκεκριμένα, οι μικροοργανισμοί του γένους *Bifidobacterium* εμφανίζουν σημαντική άνοδο (p overall=0,026<0,05) εν συγκρίσει με τον αρνητικό μάρτυρα. Επιπρόσθετα, και οι δυο θετικοί μάρτυρες (ινουλίνη 1% και ινουλίνη 2%) παρουσίασαν αυξητικές τάσεις συγκρινόμενοι με τον αρνητικό μάρτυρα, ειδικότερα η ινουλίνη σε χαμηλότερη συγκέντρωση 1% υποδήλωσε τάση προς αύξηση όταν συγκρθηκε με τον αρνητικό μάρτυρα,(9,82±0,12 vs. 9,12±0,15) με p=0,066, καθώς και η ινουλίνη σε αναλογία 2% εμφάνισε σημαντική αύξηση όταν ομοίως συγκρίθηκε με τον μάρτυρα χωρίς πηγή άνθρακα (9,97±0,21 vs. 9,12±0,15) με p= 0,024<0,05 (πίνακας 11).

6.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΖΥΜΩΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΣΤΟΝ ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΩΝ

Σε δύο διαφορετικούς δειγματοληπτικούς χρόνους (t=0h και t=24h) πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μέσων όρων για κάθε έναν από τους πέντε χειρισμούς όχι μόνο ως προς το σύνολο των εθελοντριών, αλλά και ως προς την κάθε οστική ομάδα. Στους κάτωθι πίνακες τα αποτελέσματα έχουν επεξεργαστεί με ένα πιο αυστηρό έλεγχο, (Repeated- Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity) συγκρίνοντας τους μικροοργανισμούς του εντερικού περιβάλλοντος της κάθε εθελόντριας μετά από την 24h ζύμωση με τον αρνητικό μάρτυρα και τους θετικούς μάρτυρες (ινουλίνη 1% και 2%).

Πίνακας 12: Επίδραση στους μικροβιακούς πληθυσμούς των εθελοντριών κατά τη ζύμωση των υποστρωμάτων .

	t=0h					**t=24h**					
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	**NC**	**INU1**	**INU2**	**GLBS**	**GLBSE**	**NC**	**INU1**	**INU2**	**GLBS**	**GLBSE**	**P OVERALL**
Total bacteria, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	10,10±0,23	10,12±0,22	10,10±0,22	10,04±0,22	10,09±0,28	10,00±0,15	10,29±0,28	10,29±0,27	10,00±0,39	10,07±0,23	0,390
***Bifidobacterium spp.*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	8,36±0,94	8,38±0,96	8,31±0,92	8,36±1,03	8,36±1,01	8,48±0,93	9,29±1,33	9,47±1,39	8,66±1,22	8,94±1,24	0,926
***Lactobacillus group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,28±0,97	6,27±0,88	6,23±0,96	6,03±0,90	6,24±0,94	6,34±0,93	7,35±0,83	**7,60±1,04 *a**	6,16±1,23	7,06±1,01	0,466
***Clostridium perfringens* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,23±0,68	6,30±0,62	6,28±0,66	5,69±0,93	6,33±0,60	6,27±0,61	6,21±0,88	6,34±0,99	6,10±0,83	6,21±0,91	0,874
***Bacteroides spp*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,43±0,23	9,43±0,16	9,43±0,25	9,39±0,23	9,43±0,24	9,21±0,29	**9,60±0,27 ***	**9,63±0,35 ***	9,45±0,27	9,44±0,20	0,291
Clostridium						9,12±0,4	9,03±0,5	9,13±0,5	9,11±0,4	9,04±0,3	

***leptum group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,20±0,43	9,22±0,38	9,20±0,44	9,14±0,47	9,27±0,45	3	4	3	4	9	1,000
Faecalibacterium prausnitzii, , (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	8,30±0,93	8,33±0,83	8,34±0,83	8,26±1,02	8,35±0,87	7,94±0,68	8,34±0,87	8,43±0,92	8,12±0,99	8,25±0,70	0,980
***Roseburia spp-Eubacterium rectale* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	8,39±0,58	8,35±0,58	8,39±0,60	8,43±0,59	8,40±0,60	7,62±0,42	8,11±0,83	8,10±0,78	7,67±0,44	7,91±0,69	0,938

Οι παράμετροι ακολουθούν κανονική κατανομή και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ±τυπική απόκλιση (μ.ο ±SD)., πραγματοποιήθηκε Ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων-Repeated- Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity, όπου **NC**:negative control (αρνητικός μάρτυρας), **INU1**: ινουλίνη 1% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **INU2**: ινουλίνη 2% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **GLBS:** μανιτάρι *Ganoderma lucidum*, **GLBSE:** εκχύλισμα μύκητα *Ganoderma lucidum*, *****= στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα στο χρόνο t=24h ($p<0,05$), a= στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μύκητα G.lucidum στο χρόνο t=24h ($p<0,05$).

Στον πίνακα 12 παρουσιάζονται οι μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς στο σύνολο των εθελοντριών. Εν γένει, παρατηρείται αύξηση των total bacteria, *Lactobacillus group* και *Bacteroides spp,* μετά από την 24h ζύμωση των θετικών μαρτύρων, ινουλίνη σε αναλογία 1% και 2%, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και το μανιτάρι.

Ειδικότερα, όσον αφορά τα ολικά βακτήρια, αυτά παρουσίασαν τάση για αύξηση στην ινουλίνη σε αναλογία 1% σε σύγκριση τόσο με τον αρνητικό μάρτυρα (10,29±0,28 vs 10,00±0,15) με p=0,079 , όσο και με το μανιτάρι *Ganoderma lucidum* (10,29±0,28 vs. 10,00±0,39) με p=0,076. Αντιστοίχως, τάση για αύξηση εμφανίστηκε στα ολικά βακτήρια και στην ινουλίνη 2% όταν αυτή συγκρίθηκε είτε με τον αρνητικό μάρτυρα (10,29±0,27 vs 10,00±0,15) με p=0,080, είτε με το μανιτάρι (10,29±0,27 vs 10,00±0,39) με p=0,077.

Σχετικά με το *Lactobacillus* group,εμφάνισε τάση για αύξηση στα υποστρώματα της ινουλίνη 1% εν συγκρίσει με τον αρνητικό μάρτυρα (7,35±0,83 vs. 6,34±0,93) με p=0,098 , και ομοίως εν συγκρίσει με το μανιτάρι (7,35±0,83 vs. 6,16±1,23) με στατιστικά οριακή αύξηση p=0,054. Στο υπόστρωμα της ινουλίνης 2% αυξήθηκαν σημαντικά οι πληθυσμοί των λακτοβακίλλων συγκρινόμενοι με τον αρνητικό μάρτυρα (7,60±1,04 vs. 6,34±0,93) με $p=0,043<0,05$, καθώς και συγκρινόμενοι με το μανιτάρι (7,60±1,04 vs 6,16±1,23) με $p=0,022<0,05$.

Τελευταίος μικροοργανισμός ο οποίος ευνοήθηκε μετά από την 24h ζύμωση είναι το γένος *Bacteroides*, όπου και στους δυο πρεβιοτικούς μάρτυρες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση, σε σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα, στην ινουλίνη 1% (9,60±0,27 vs. 9,21±0,29), με $p=0,022<0,05$, και στην ινουλίνη 2% (9,63±0,35 vs. 9,21±0,29) με $p=0,014<0,05$.

Πίνακας 13: Μικροβιακές αλλαγές των υγιών εθελοντριών κατόπιν ζύμωσης των υποστρωμάτων.

	t=0h					t=24h					
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	**NC**	**INU1**	**INU2**	**GLBS**	**GLBSE**	**NC**	**INU1**	**INU2**	**GLBS**	**GLBSE**	**P OVERALL**
Total bacteria, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	9,96±0,18	10,02±0,18	9,98±0,16	9,90±0,11	9,91±0,21	9,97±0,05	10,22±0,38	10,26±0,40	9,78±0,48	9,92±0,26	0,185
***Bifidobacterium spp.*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	7,64±0,80	7,64±0,81	7,60±0,80	7,56±0,83	7,55±0,78	7,83±0,94	8,76±1,89	8,97±2,00	7,90±1,36	8,29±1,53	0,961
***Lactobacillus group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,20±0,54	6,23±0,45	6,16±0,52	5,86±0,47	6,14±0,49	6,30±0,68	7,92±0,67	8,04±1,29	6,10±1,40	6,76±1,38	0,364
***Clostridium perfringens* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	6,15±0,75	6,20±0,70	6,22±0,67	5,41±1,03	6,23±0,73	6,24±0,79	6,02±1,18	6,24±1,40	5,88±1,18	6,02±1,19	0,184
***Bacteroides spp*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	9,36±0,20	9,42±0,19	9,38±0,21	9,31±0,23	9,36±0,30	9,29±0,20	9,68±0,35	9,73±0,48	9,41±0,38	9,30±0,09	0,281
***Clostridium leptum group*, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	8,91±0,28	8,96±0,26	8,95±0,28	8,83±0,39	8,96±0,34	9,06±0,30	8,92±0,54	9,01±0,61	8,81±0,36	8,81±0,15	0,965
Faecalibacterium prausnitzii, , (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	7,63±0,90	7,75±0,84	7,77±0,85	7,55±1,04	7,70±0,78	7,62±0,85	8,12±1,22	8,15±1,33	7,56±1,24	7,91±0,92	0,980
***Roseburia spp-Eubacterium rectale* group, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)**	8,06±0,59	8,05±0,59	8,10±0,65	8,09±0,61	8,06±0,60	7,51±0,40	7,98±0,66	7,98±0,96	7,41±0,38	7,72±1,01	0,968

Οι παράμετροι ακολουθούν κανονική κατανομή και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ±τυπική απόκλιση (μ.ο ±SD)., πραγματοποιήθηκε Ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων-Repeated- Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity, όπου **NC**:negative control (αρνητικός μάρτυρας), **INU1**: ινουλίνη 1% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **INU2**: ινουλίνη 2% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **GLBS:** μανιτάρι *Ganoderma lucidum*, **GLBSE:** εκχύλισμα μύκητα *Ganoderma lucidum.*,

Στις εθελόντριες που βρίσκονταν σε φυσιολογική οστική κατάσταση ο μοναδικός μικροοργανισμός που υποδεικνύεται να έχει αυξητικές τάσεις μετά τον τελικό χρόνο δειγματοληψίας (t=24h) σύμφωνα με τον πίνακα 13 είναι το γένος *Lactobacillus*. Συγκεκριμένα, μια ανοδική τάση του πληθυσμού του φάνηκε να υπάρχει στο υπόστρωμα της ινουλίνης 1% έναντι του μανιταριού *G.lucidum* (7,92±0,67 vs. 6,10±1,40) με p=0,077, όσο και το στο υπόστρωμα της ινουλίνης 2% έναντι του αρνητικού μάρτυρα (8,04±1,29 vs. 6,30±0,68) με p=0,091, αλλά και της τελευταίας έναντι του μανιταριού (8,04±1,29 vs 6,10±1,40) με p=0,063.

Πίνακας 14: Μικροβιακές αλλαγές των εθελοντριών σε οστεοπενική κατάσταση κατόπιν ζύμωσης των υποστρωμάτων.

ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ	**NC**	**INU1**	**INU2**	**GLBS**	**GLBSE**	**NC**	**INU1**	**INU2**	**GLBS**	**GLBSE**	**P OVERALL**
Total bacteria, (log10copies$_{16S\text{-}rRNA}$ /ml)	10,24±0,22	10,23±0,23	10,21±0,24	10,18±0,24	10,26±0,23	10,03±0,23	**10,37±0,20^{a}**	**10,33±0,11^{a}**	10,21±0,10	10,23±0,03	0,812
***Bifidobacterium spp.*, (log10copies$_{16S\text{-}}$**	9,08±0,05	9,11±0,09	9,01±0,08	9,16±0,15	9,17±0,10	9,12±0,15	**9,82±0,12***	**9,97±0,21*b**	9,43±0,31	9,59±0,45	0,054

$_{rRNA}$ /ml)											
***Lactobacillus group,* (log10copies$_{16S-rRNA}$ /ml)**	6,36±1,43	6,30±1,31	6,29±1,43	6,20±1,31	6,35±1,40	6,38±1,31	6,78±0,56	7,16±0,68	6,23±1,35	7,37±0,62	0,950
***Clostridium perfringens* group, (log10copies$_{16S-rRNA}$ /ml)**	6,31±0,77	6,40±0,67	6,35±0,80	5,96±0,95	6,43±0,59	6,30±0,56	6,39±0,67	6,44±0,70	6,32±0,43	6,40±0,74	0,986
***Bacteroides spp,* (log10copies$_{16S-rRNA}$ /ml)**	9,50±0,27	9,44±0,17	9,47±0,32	9,48±0,24	9,49±0,20	9,12±0,59	9,52±0,63	9,53±0,54	9,49±0,29	**9,58±0,44***	0,705
***Clostridium leptum group,* (log10copies$_{16S-rRNA}$ /ml)**	9,50±0,34	9,48±0,27	9,46±0,45	9,46±0,34	9,57±0,32	9,18±0,23	9,15±0,29	9,25±0,20	9,40±0,03	9,27±0,11	0,996
Faecalibacterium prausnitzii, , (log10copies$_{16S-rRNA}$ /ml)	8,96±0,18	8,91±0,18	8,91±0,20	8,96±0,12	8,99±0,17	8,25±0,39	8,57±0,50	8,71±0,34	8,67±0,06	8,59±0,20	0,772
***Roseburia spp-Eubacterium rectale* group, (log10copies$_{16S-rRNA}$ /ml)**	8,72±0,40	8,65±0,47	8,67±0,50	8,78±0,38	8,73±0,45	7,72±0,50	8,24±1,12	8,21±0,74	7,94±0,38	8,10±0,27	0,982

Οι παράμετροι ακολουθούν κανονική κατανομή και οι τιμές εκφράζονται ως μέσος όρος ±τυπική απόκλιση (μ.ο ±SD)., πραγματοποιήθηκε Ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων-Repeated- Measures ANOVA after Bonferroni's adjustment for multiplicity, όπου **NC**:negative control (αρνητικός μάρτυρας), **INU1**: ινουλίνη 1% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **INU2**: ινουλίνη 2% (w/v) ως θετικός μάρτυρας, **GLBS:** μανιτάρι *Ganoderma lucidum*, **GLBSE:** εκχύλισμα μύκητα *Ganoderma lucidum.*, , a=στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα στο χρόνο t=24h, *****=στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα σε t=24h ($p<0,05$), b= στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το μανιτάρι *Ganoderma lucidum* σε t=24h ($p<0,05$),

Στις εθελόντριες σε οστεοπενική κατάσταση τρείς μικροοργανισμοί από τους ήδη οκτώ που μελετήθηκαν απεικόνισαν αξιοσημείωτες μεταβολές, τα ολικά βακτήρια, το *Bifidobacterium* spp. και το *Bacteroides* spp. (πίνακας 14).

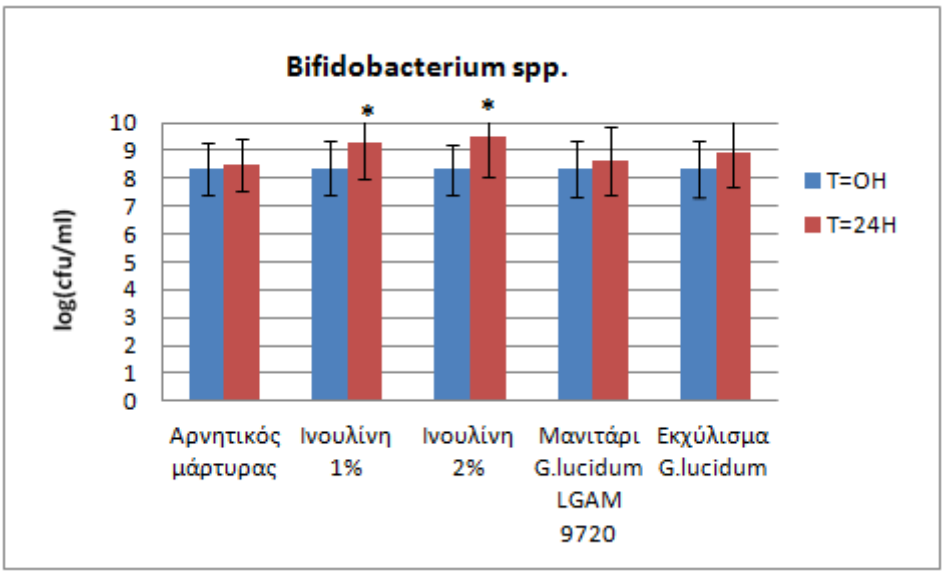
Πιο συγκεκριμένα, τα ολικά βακτήρια εμφάνισαν μια σημαντική αύξηση του πληθυσμού τους μετά το πέρας της 24h ζύμωσης της των δυο ινουλίνων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις , εν συγκρίσει με τον αρνητικό μάρτυρα, η ινουλίνη 1% (10,37±0,20 vs. 10,03±0,23) με $p=0,023<0,05$ και η ινουλίνη 2% (INU2= 10,33±0,11 vs. 10,03±0,23) με $p= 0,040<0,05$.

Από την άλλη, το *Bifidobacterium spp.* παρουσίασε εμφανείς πληθυσμιακές διαφορές τόσο στο αρχικό χρόνο όσο και στον τελικό χρόνο δειγματοληψίας. Στην αρχική δειγματοληψία (t=0h) ο πληθυσμός του παρουσίασε τάση για αύξηση στο εκχύλισμα του μανιταριού σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα ινουλίνη 2% (9,17±0,10 vs. 9,08±0,05) με $p=0,079$. Στην τελική δειγματοληψία (t=24 h) τα βακτήρια του γένους εμφανίζονται να αυξάνονται συνολικά οριακά (p overall=0,054). Ειδικότερα, στο υπόστρωμα της ινουλίνης 1% παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (9,82±0,12 vs. 9,12±0,15, με $p=0,011<0,05$. Στην ινουλίνη 2% φάνηκε μια σημαντική αύξηση του μικροοργανισμού εν συγκρίσει τόσο με τον αρνητικό μάρτυρα (9,97±0,21 vs. 9,12±0,15) με $p=0,004<0,05$, όσο και με το μανιτάρι *Ganoderma lucidum* (9,97±0,21 vs 9,43±0,31) με $p=0,036<0,05$.Επιπλέον, στο πλούσιο σε β-γλυκάνες εκχύλισμα του μανιταριού διαπιστώθηκε τάση προς αύξηση εν συγκρίσει με το αρνητικό κοντρόλ (9,59±0,45 vs. 9,12±0,15) με $p=0,064$.

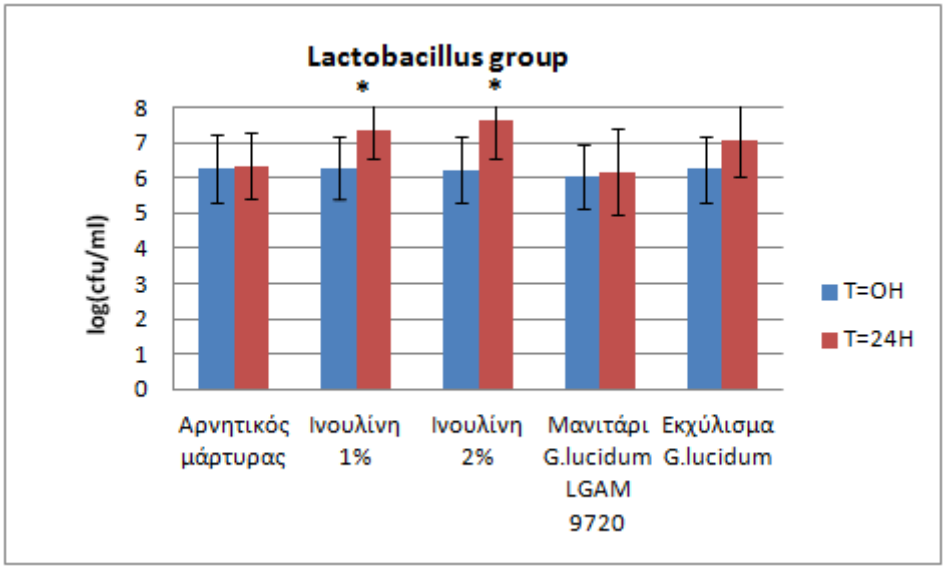
Τέλος, στο βακτήριο *Bacteroides spp.* διαπιστώθηκαν πληθυσμιακές μεταβολές σε όλα τα υποστρώματα μετά από την 24h ζύμωση όταν συγκρίθηκαν όλα με τον αρνητικό μάρτυρα. Πιο συγκεκριμένα, τάση για αύξηση εμφανίστηκε στην ινουλίνη σε αναλογία 1% (9,52±0,63 vs. 9,12±0,59) με p=0,072, στην ινουλίνη σε αναλογία 2% (9,53±0,54 vs. 9,12±0,59) με p=0,063 και στο μανιτάρι (9,49±0,29 vs. 9,12±0,59) με p=0,087. Στο εκχύλισμα του μανιταριού παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση (9,27±0,11 vs. 9,12±0,59) με p=0,040<0,05, πάλι συγκρινόμενο με τον αρνητικό μάρτυρα.

6.5 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΡΙΩΝ ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΖΥΜΩΣΗ

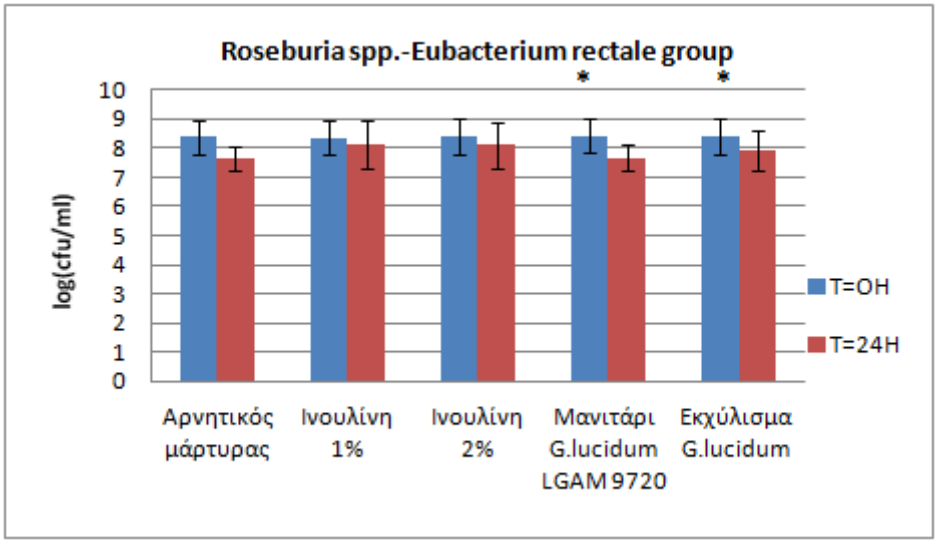
Για να ανιχνευτεί όχι μόνο η ανάπτυξη αλλά και η έκβαση της πορείας του εντερικού μικροβιόκοσμου στο υπόστρωμα πριν και μετά τον εμβολιασμό με τα κόπρανα, συγκρίνονται αν υπάρχει κάποια διαφοροποίηση του κάθε μικροοργανισμού με τον εκάστοτε χειρισμό στον αρχικό χρόνο ως προς το σύνολο των εθελοντριών και ομαδοποιημένα κατά υγιείς και οστεοπενικές. Συνολικά στις εθελόντριες , παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις στα γένη του *Bifidobacterium και Lactobacillus* και στην ομάδα του *Roseburia spp.-Eubacterium rectale.* Στην υγιή κατάσταση φαίνεται να τροποποιούνται σημαντικά τα γένη του *Lactobacillus* και *Roseburia spp.-Eubacterium rectale.* Στις οστεοπενικές γυναίκες υποδηλώνονται περισσότερες στατιστικά σημαντικές αλλαγές στα total bacteria, *Bifidobacterium,* και σε δυο βουτυροπαραγωγά , τα *Faecalibacterium prausnitzii* και *Roseburia spp.-Eubacterium rectale.* Τα γραφήματα 1-14 που έπονται αναλύονται πιο λεπτομερώς.



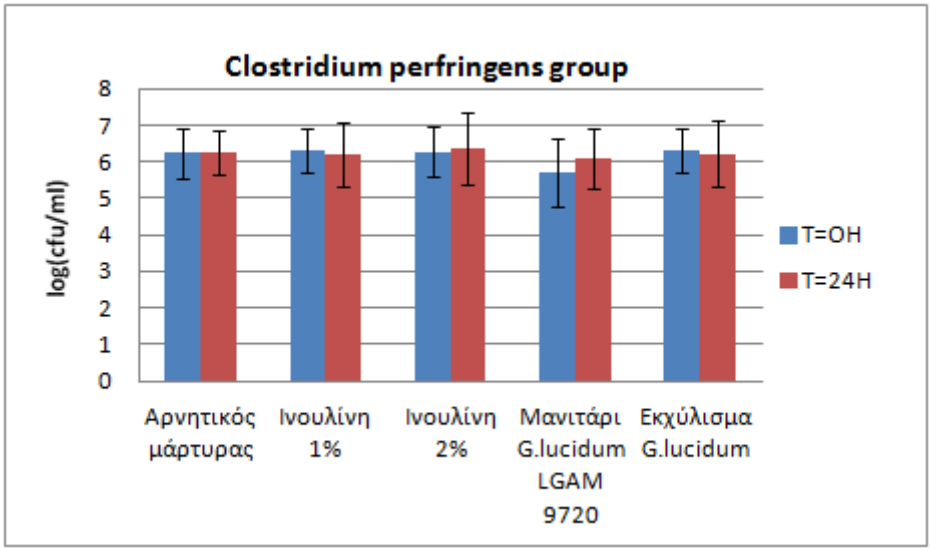
Γράφημα 1 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Bifidobacterium spp.* στις εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h (p<0,05).



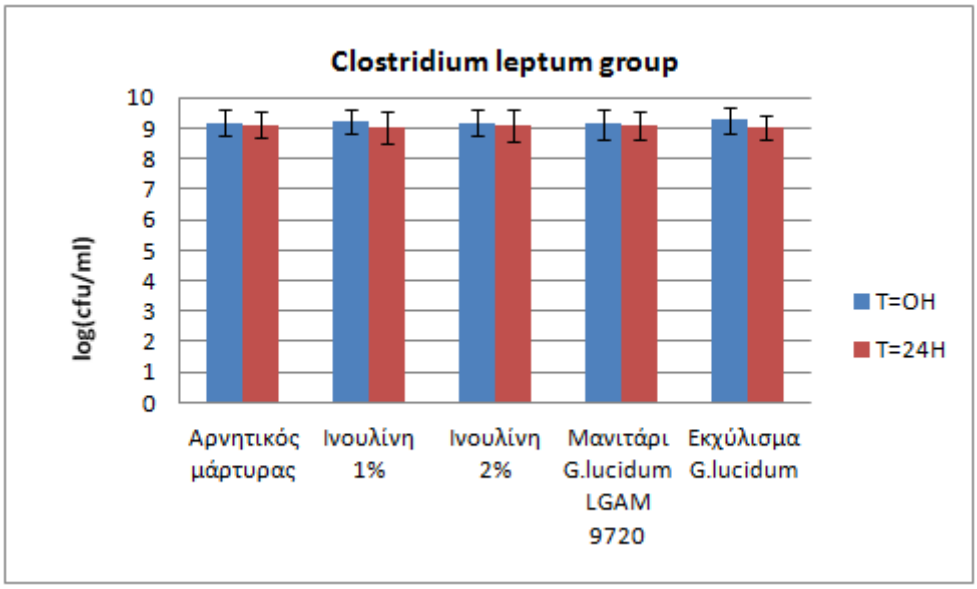
Γράφημα 2 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Lactobacillus group* στις εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h ($p<0,05$).



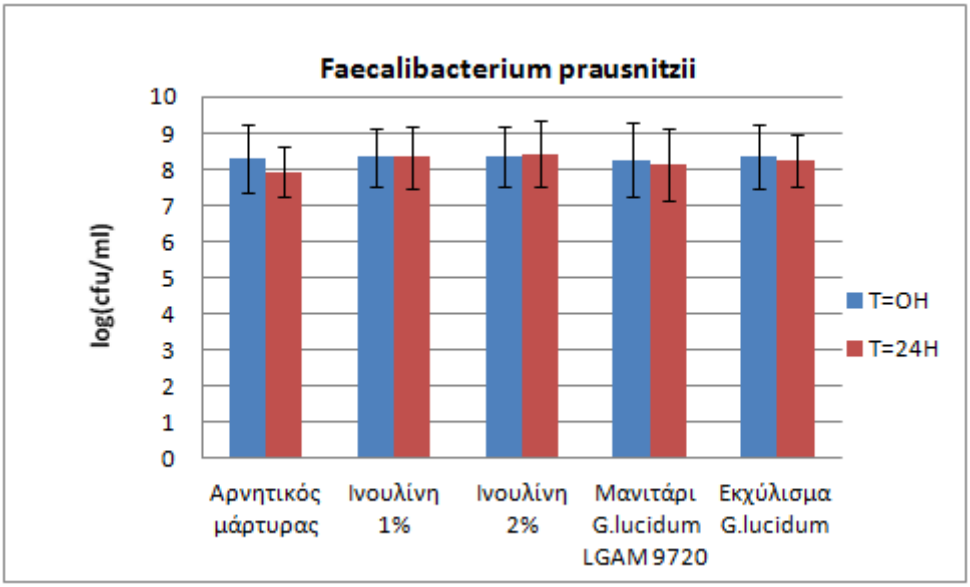
Γράφημα 3 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς *του Roseburia spp.-Eubacterium rectale group* στις εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h ($p<0,05$).



Γράφημα 4 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Clostridium perfringens group* στις εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων.



Γράφημα 5 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Clostridium leptum group* στις εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων.

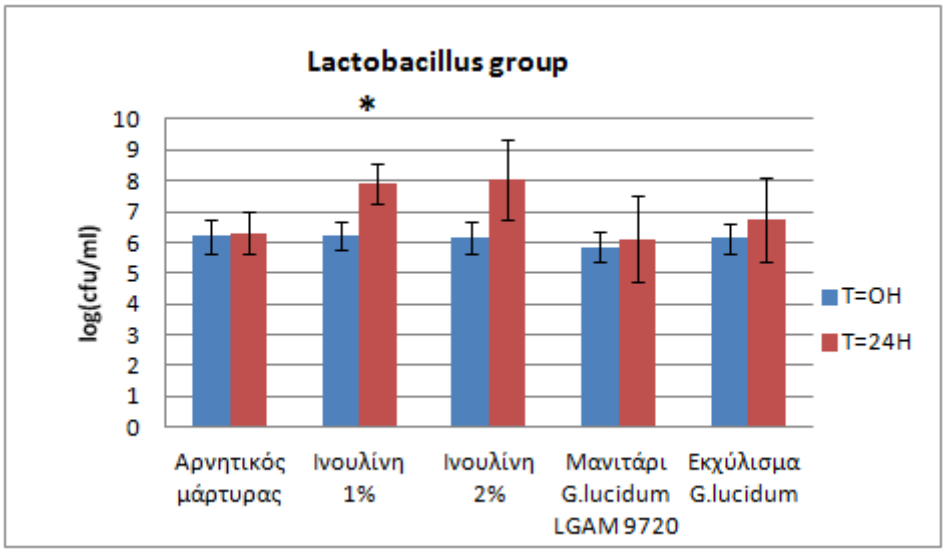


Γράφημα 6 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Faecalibacterium prausnitzii* στις εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων.

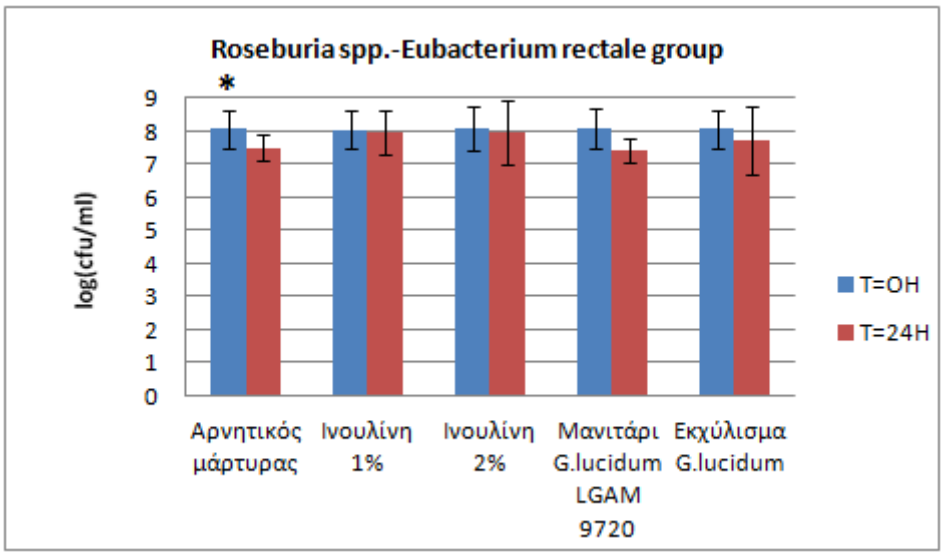
Στο σύνολο των εθελοντριών οι μικροοργανισμοί που παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές στο φορτίο τους είναι τα γένη του *Bifidobacterium, Lactobacillus* και η ομάδα *Roseburia spp.-Eubacterium rectale* (γράφηματα 1-3). Τα *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* αυξήθηκαν σημαντικά στα υποστρώματα των δυο θετικών μαρτύρων: το *Bifidobacterium* στην ινουλίνη 1% (8,38±0,96, vs. 9,29±1,33), με p=0,032<0,05, το *Bifidobacterium* στην ινουλίνη 2% (8,31±0,92 vs. 9,47±1,39),με p=0,023 <0,05, το *Lactobacillus* στην ινουλίνη 1% (6,27±0,88 vs.7,35±0,83) με p=0,028 <0,05, και το *Lactobacillus* στην ινουλίνη 2% (6,23±0,96, vs.7,6±1,04) με p=0,015<0,05. Επιπλέον, ο πληθυσμός του *Bifidobacterium* παρουσιάζει τάση για αύξηση σε σχέση με τον αρχικό χρόνο, στον αρνητικό μάρτυρα (8,36±0,94,vs. 8,48±0,93, p=0,098) και στο εκχύλισμα του μανιταριού (8,36±1,01 vs. 8,94±1,24, p=0,068).

Όσον αφορά την ομάδα *Roseburia spp.-Eubacterium rectale,* εμφάνισε σημαντική μείωση σε σχέση με t=0h στο μανιτάρι *Ganoderma lucidum* (8,43±0,59 vs.7,67±0,44) με p=0,003, καθώς και στο πλούσιο σε β-γλυκάνες εκχύλισμά του (8,4±0,6 vs.7,91±0,69) με p=0,017. Οριακή τάση προς μείωση παρουσίασε η ίδια ομάδα στον αρνητικό μάρτυρα μετά από την 24ωρη επίδραση του εμβολίου (8,39±0,58 vs. 7,62±0,42) με p=0,08.

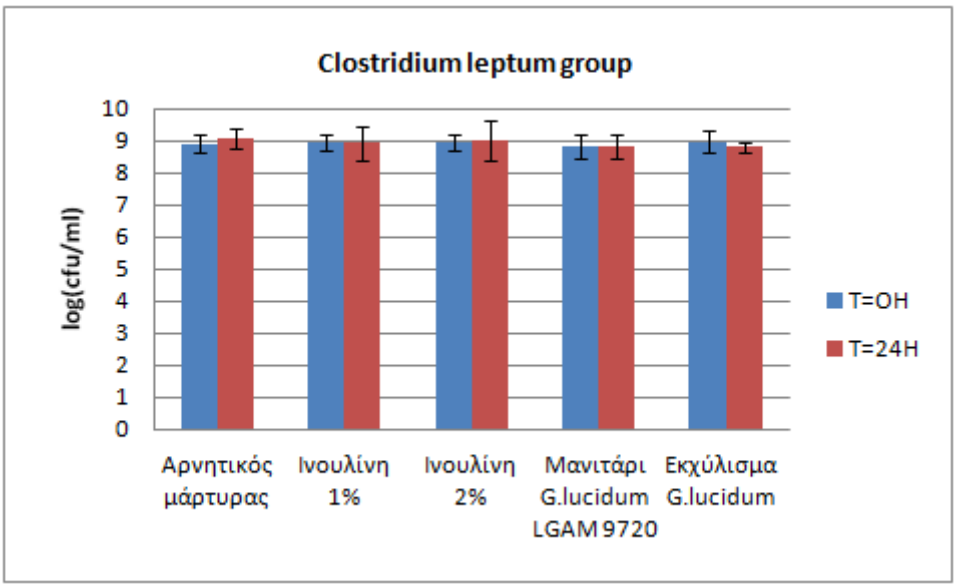
Επιπροσθέτως, κάποιοι μικροοργανισμοί εμφάνισαν τάση για μεταβολές των πληθυσμών τους, χωρίς ωστόσο να είναι αξιοσημείωτες (γραφήματα 4-6). Το *Clostridium perfringens group* εμφάνισε τάση για αύξηση του πληθυσμού στο υπόστρωμα του μανιταριού (5,69±0,93 vs. 6,1±0,83, p=0,067). Το *C.leptum* εμφάνισε τάση για μείωση του πληθυσμού του (9,27±0,45 vs. 9,04±0,39) στο εκχύλισμά του μανιταριού *G.lucidum* με p=0,065. Τέλος, το είδος *Faecalibacterium prausnitzii* ομοίως μειώθηκε χωρίς στατιστική σημαντικότητα στον αρνητικό μάρτυρα (8,3±0,93 vs.7,94±0,68) με p=0,090.



Γράφημα 7 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Lactobacillus group* στις υγιείς εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h ($p<0,05$).



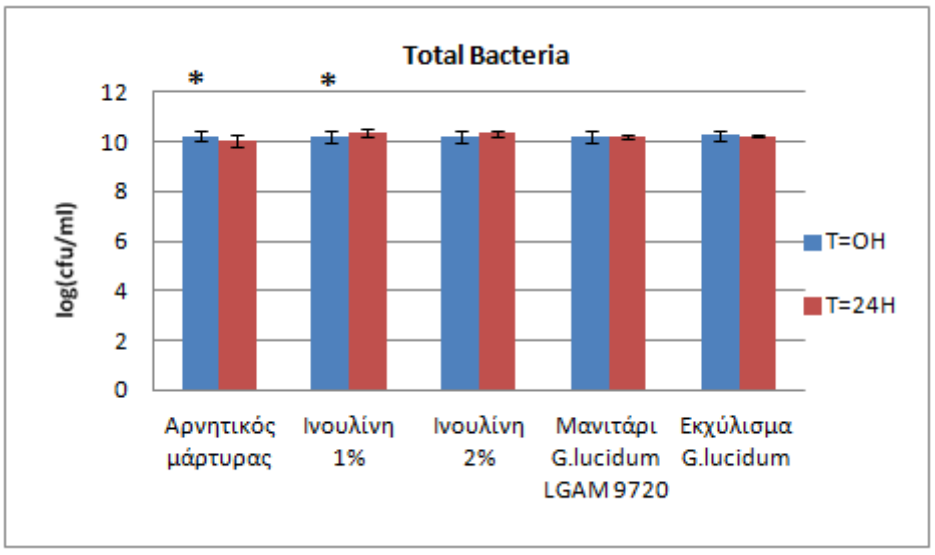
Γράφημα 8 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Roseburia spp- Eubacterium rectale group* στις υγιείς εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h ($p<0,05$).



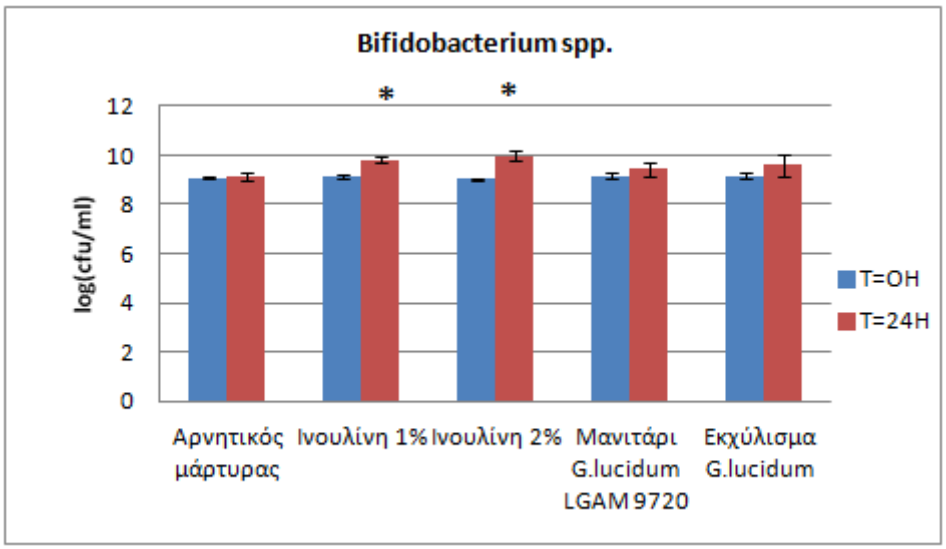
Γράφημα 9 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Clostridium leptum group* στις υγιείς εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων.

Σχετικά με τις υγιείς εθελόντριες εντοπίστηκαν κάποιες αλλαγές στον εντερικό τους μικροβιόκοσμο με το πέρας της 24h ζύμωσης, έτσι όπως παρουσιάζονται στα γραφήματα 7-9. Το *Lactobacillus* αυξήθηκε σημαντικά στο υπόστρωμα ινουλίνης σε αναλογία 1% (w/v), (6,23±0,45 vs. 7,92±0,67) με p=0,018<0,05, αλλά και στην ινουλίνη 2% (w/v) τείνει προς αύξηση (6,16±0,52 vs. 8,04±1,29) με p=0,066.

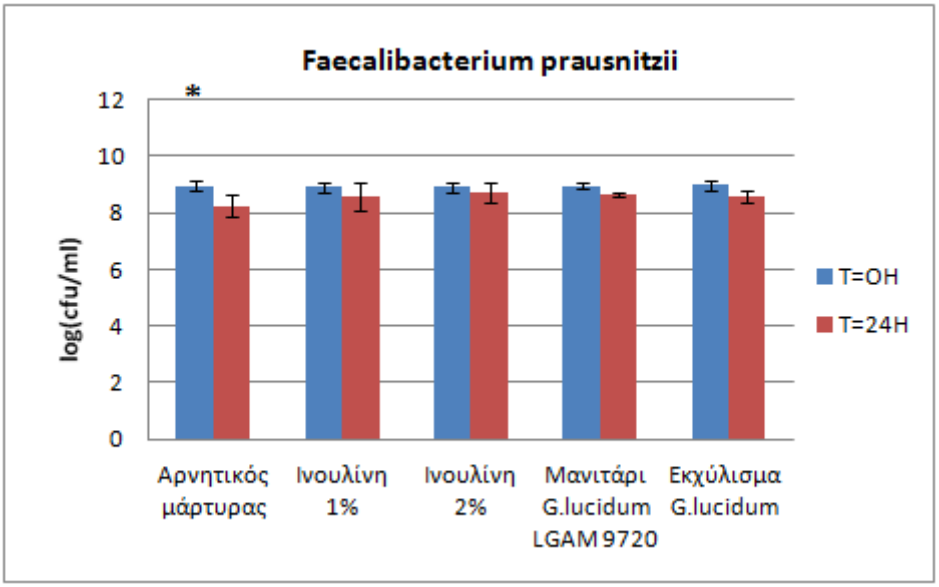
Επιπλέον, το *Roseburia spp.-Eubacterium rectale group,* μειώθηκε σημαντικά στον αρνητικό μάρτυρα (8,06±0,59 vs. 7,51±0,4) με p=0,041<0,05, ενώ μια τάση προς αύξηση παρουσίασε το *C.leptum group* στον αρνητικό μάρτυρα (8,91±0,28 vs. 9,06±0,3) με p=0,070.



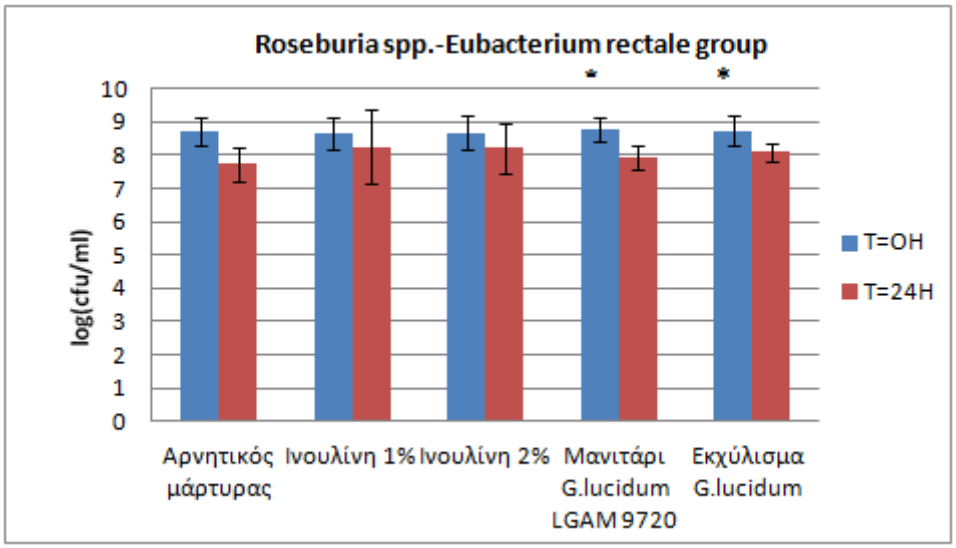
Γράφημα 10 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς των Total Bacteria στις οστεοπενικές εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h (p<0,05).



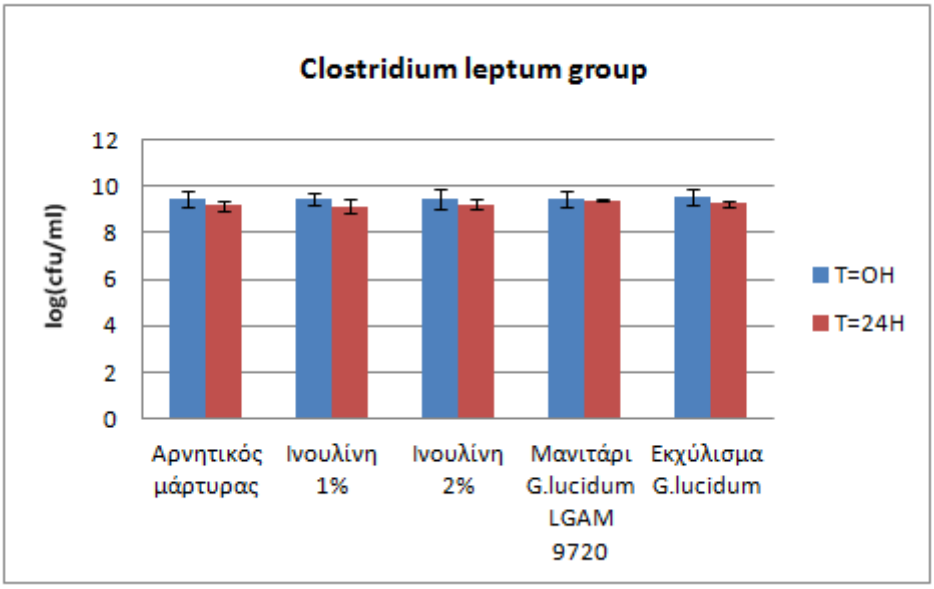
Γράφημα 11 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Bifidobacterium spp*.στις οστεοπενικές εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h ($p<0,05$).



Γράφημα 12: Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Faecalibacterium prausnitzii* στις οστεοπενικές εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h ($p<0,05$).



Γράφημα 13: Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Roseburia spp.-Eubacterium rectale group* στις οστεοπενικές εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων, *****= σημαντική διαφορά σε σχέση με τον χρόνο t=0h ($p<0,05$).



Γράφημα 14 : Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς του *Clostridium leptum group* στις οστεοπενικές εθελόντριες μετά τη ζύμωση των διαφόρων υποστρωμάτων.

Όσον αφορά την ομάδα των γυναικών με οστεοπενία εμφανίζονται σημαντικές μεταβολές σε σχέση με τον αρχικό χρόνο δειγματοληψίας, στα ολικά βακτήρια, στο *Bifidobacterium* spp., στο είδος *Faecalibacterium prausnitzii* και στην ομάδα *Roseburia spp.-Eubacterium rectale* (γραφήματα 10-13).

Σχετικά με τα ολικά βακτήρια εμφανίζουν σημαντική μείωση στον αρνητικό μάρτυρα (10,24±0,22 vs. 10,03±0,23) με $p=0,032<0,05$, ενώ σημαντική αύξηση στην ινουλίνη σε αναλογία 1% (w/v) (10,23±0,23 vs. 10,37±0,2) με $p=0,022<0,05$. Το *Bifidobacterium* spp.

υυξήθηκε σημαντικά και στις δυο ινουλίνες ,ειδικότερα η ινουλίνη 1% (9,08±0,05 vs.9,12±0,15, με p=0,007<0,05) και η ινουλίνη 2% (9,11±0,09 vs. 9,82±0,12, με p=0,025<0,05).

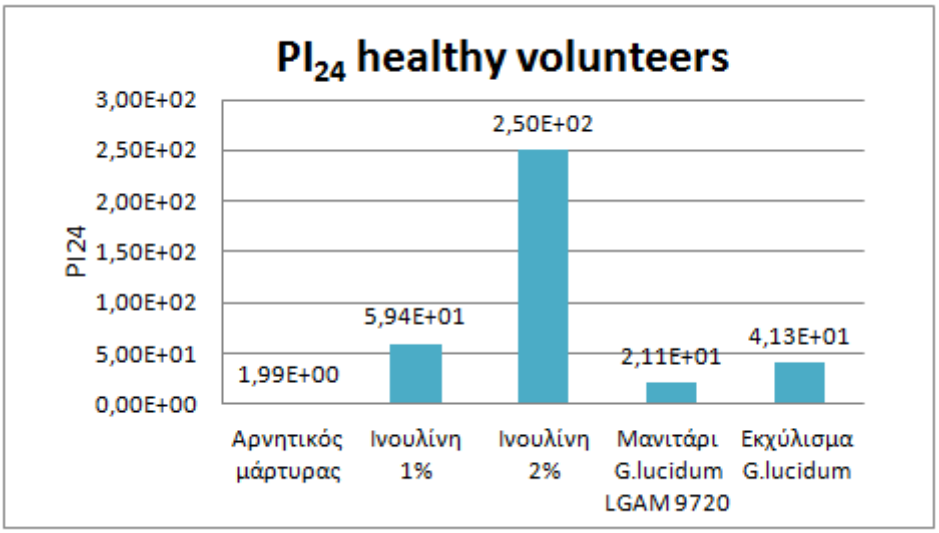
Το *Faecalibacterium prausnitzii* μειώθηκε σημαντικά στον αρνητικό μάρτυρα. (8,96±0,18 vs. 8,25±0,39) σε σχέση με την αρχική τους συγκέντρωση με p=0,028,

Η ομάδα του *Roseburia spp.-Eubacterium rectale* εμφάνισε πτωτική τάση (8,72±0,4 vs. 7,72±0,5) με p=0,090, στον αρνητικό μάρτυρα. Η ίδια ομάδα μειώθηκε σημαντικά στο μανιτάρι (8,78±0,38 vs. 7,94±0,38 με p=0,005), αλλά και στο εκχύλισμά του (8,73±0,45 vs. 8,1±0,27, με p=0,043<0,05).

Η ομάδα του *C.leptum* παρουσιάζει τάση προς μείωση στο υπόστρωμα της ινουλίνης σε αναλογία 2% (9,46±0,45 vs. 9,25±0,2) με p= 0,063 και στο εκχύλισμα του μύκητα (9,57±0,32 vs. 9,27±0,11) με p=0,064, συγκρινόμενα με t=0h. (γράφημα 14).

6.6 ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

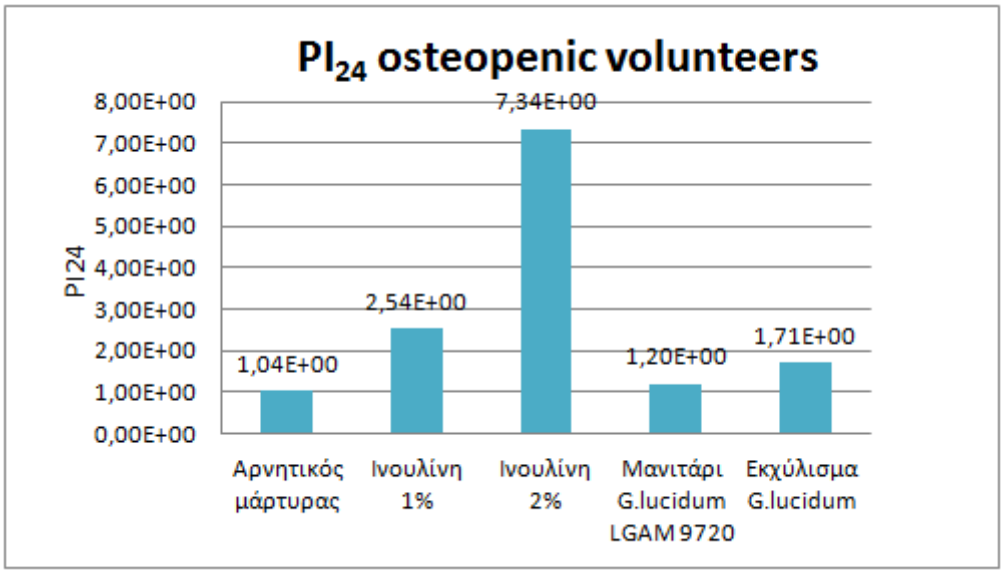
Προκειμένου τόσο να αξιολογηθεί όσο και να συγκριθεί η πρεβιοτική δράση των υποστρωμάτων (ινουλίνη 1% , ινουλίνη 2% , μανιτάρι *Ganoderma lucidum*, εκχύλισμα μανιταριού *Ganoderma lucidum*), μετά από 24ωρη επώαση, χρησιμοποιήθηκε ο πρεβιοτικός δείκτης PI_{24}. Οι 6 εθελόντριες έχουν ομαδοποιηθεί κατά υγιείς (n=3) και οστεοπενικές (n=3), με συμμετοχή των *Bifidobacterium* spp. και *Lactobacillus* group στην πρεβιοτική αυτή εξίσωση, να ασκούν μια θετική δράση, εν αντιθέσει με τα *Bacteroides* spp *και τα Clostridium perfringens group* να παρουσιάζουν αρνητική δράση. Στα παρακάτω γραφήματα ακολουθούν οι PI_{24} ανάλογα με την οστική κατάσταση των εθελοντριών και ως προς το σύνολο.



Γράφημα 15 : Πρεβιοτικοί δείκτες -PI_{24} για τα διαφορετικά υποστρώματα στις εθελόντριες με υγιή οστική πυκνότητα .

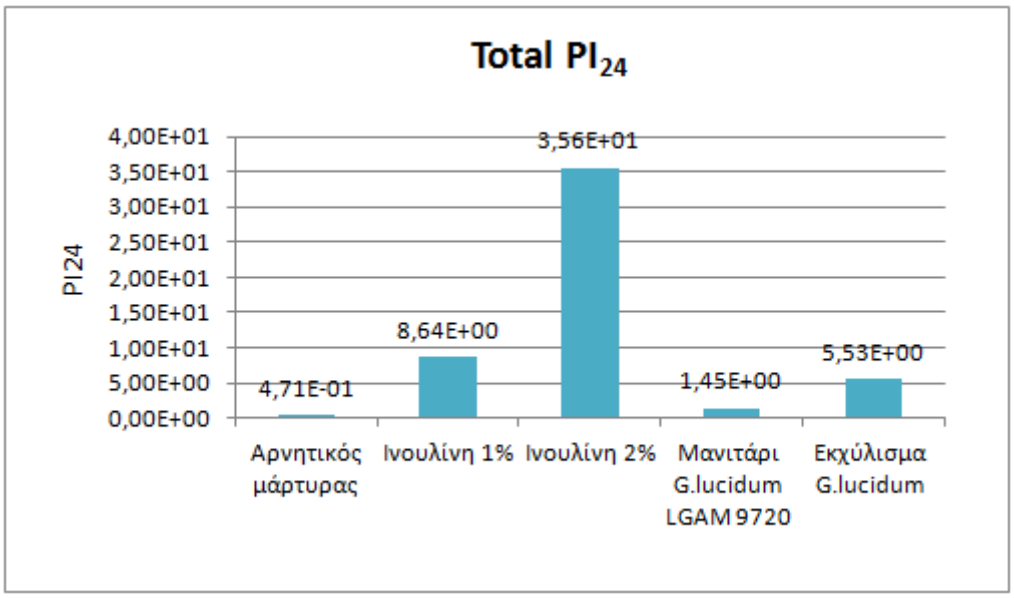
Στο γράφημα 15 παρουσιάζονται οι θετικοί πρεβιοτικοί δείκτες στα διαφορετικά υποστρώματα, για τις υγιείς εθελόντριες. Καθίσταται εμφανές πως η ινουλίνη με συγκέντρωση 2% αποτελεί το

χειρισμό με την υψηλότερη ευεργετική πρεβιοτική δράση ($PI_{24=}$ 2,50E+0,2). Είναι αξιοσημείωτο πως ο θετικός PI_{24} του εκχυλίσματος του μανιταριού είναι πιο υψηλός από το μανιτάρι *G.lucidum* (4,13E+0,1 vs. 2,11E+0,1).



Γράφημα 16 : Πρεβιοτικοί δείκτες -PI_{24} για τα διαφορετικά υποστρώματα στις οστεοπενικές εθελόντριες .

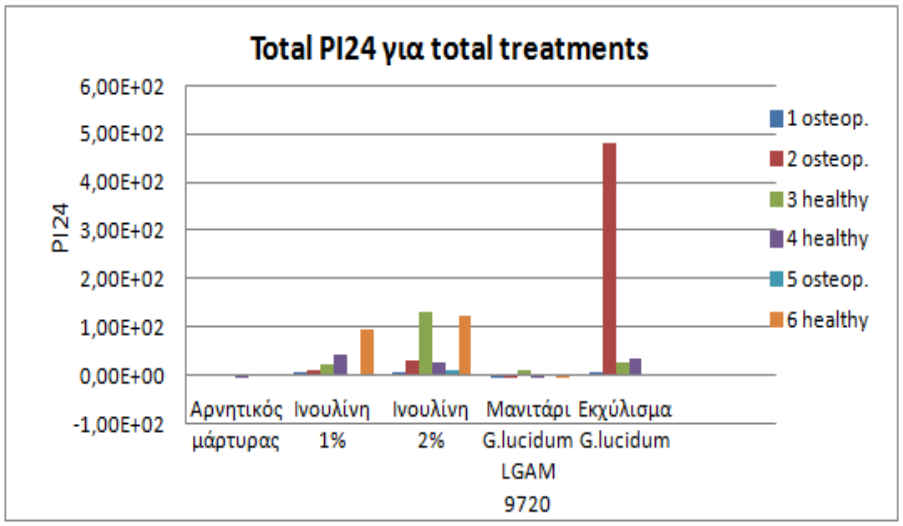
Όμοια θετική εικόνα παρουσιάστηκε και στους πρεβιοτικούς δείκτες των υποστρωμάτων στις οστεοπενικές γυναίκες . Στο γράφημα 16, απεικονίζεται η θετική πρεβιοτική δράση των δυο θετικών μαρτύρων σε διαφορετικές αναλογίες, ινουλίνης 1% PI_{24}= 2,54E και ινουλίνης 2% PI_{24}= 7,34E. Επιπροσθέτως, θετική είναι και η πρεβιοτική δράση στο μανιτάρι *G.lucidum* και στο αντίστοιχο πλούσιο σε β-γλυκάνες εκχύλισμά του, με μια μικρή υπεροχή του εκχυλίσματος έναντι του μανιταριού.



Γράφημα 17 : Πρεβιοτικοί δείκτες -PI_{24} για τα διαφορετικά υποστρώματα στο σύνολο των εθελοντριών

Παρατηρείται μια δοσοεξαρτώμενη δράση της ινουλίνης σε σχέση με τον PI_{24}, όπου φαίνεται πως όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της ινουλίνης τόσο παρουσιάζει αύξηση και ο PI_{24}, κάτι που συνάδει και με το γράφημα 17 που απεικονίζει τον PI_{24} όλων των εθελοντριών με μια ολιστική εικόνα. Θετική επίδραση του PI_{24} εμφανίστηκε τόσο στο μανιτάρι *G.lucidum* όσο και στο εκχύλισμά του, με το τελευταίο να αξιοποιείται καλύτερα ως υπόστρωμα από τους ευεργετικούς μικροοργανισμούς ανεξαρτήτως οστικής υγείας.

Μπορεί στη συνολική προσέγγιση του PI_{24}, όσο και στην ομαδοποιημένη των εθελοντριών βάσει της οστικής κατάστασης (υγιείς n=3, οστεοπενικές n=3) να εμφανίζονται θετικοί οι πρεβιοτικοί δείκτες για όλα τα υποστρώματα, όταν όμως γίνεται ανάλυση για την κάθε μία εθελόντρια, τότε η εικόνα δεν είναι ίδια, όπως φαίνεται από το γράφημα 18. Το εδώδιμο μανιτάρι *G.lucidum* παρουσιάζει αρνητικό PI_{24} στην $1^{η}$ και $2^{η}$ εθελόντρια με οστεοπενία, αλλά και στην $4^{η}$ και $6^{η}$ υγιή εθελόντρια (η $4^{η}$ έχει αρνητικό δείκτη και στον αρνητικό μάρτυρα).Παρά τη βιοποικιλότητα των εμβολίων (εντερικός μικροβιόκοσμος), οι πρεβιοτικοί δείκτες ήταν θετικοί στην ινουλίνη για όλες τις εθελόντριες.



Γράφημα 18 : Πρεβιοτικοί δείκτες -PI_{24} όλων των υποστρωμάτων σε κάθε μία εθελόντρια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος αποτελεί ένα μοναδικό και αναντικατάστατο οικοσύστημα του ξενιστή, που συσχετίζεται με τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού, αλλά και με την εμφάνιση ασθενειών όταν αυτό διαταράσσεται (δυσβίωση). Τα τελευταία χρόνια η λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου σχετίζεται επίσης με διαταραχές του οστικού μεταβολισμού. Τα πρεβιοτικά, ως άπεπτοι πολυσακχαρίτες καθίστανται ικανά να τροποποιήσουν τη δομή και την λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου ευνοώντας την υγεία του ανθρώπου. Οι β-γλυκάνες που απομονώνται από τον μύκητα *Ganoderma lucidum* ανφέρεται ότι διαθέτουν πιθανή πρεβιοτική δράση αλλά και ανοσορυθμοστική και αντικαρκινική (Sanodiya *et al*., 2009, Bishop *et al*., 2015). Ωστόσο, αν και μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα έχουν συνδέσει τον εντερικό μικροβιόκοσμο με την διαταραχή της οστικής πυκνότητας δεν είναι ακόμα ξεκάθαρο ποιο ρόλο και με ποιους μηχανισμούς επιδρά το εντερικό μικροβίωμα στον οστικό μεταβολισμό. (Bliziotes, M. *Et al*., 2006, Yadav, V. K. *Et al*., 2008). Συνεπώς, λόγω της περιορισμένης βιβλιογραφίας, η δράση των πρεβιοτικών ως 'διαμορφωτές' του εντερικού μικροβιόκοσμου και η πιθανή συμβολή τους στον μεταβολισμό των οστών ευελπιστεί να γεφυρώσει αυτό το ερευνητικό κενό.

Στη παρούσα μελέτη, μετά από την ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων φάνηκε ότι στο σύνολο των εθελοντριών παρατηρήθηκε τάση προς αύξηση των ολικών βακτηρίων κατόπιν ζύμωσης της ινουλίνης σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις (ινουλίνη 1% & 2%) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Επιπλέον, οι λακτοβάκιλλοι παρουσίασαν αυξητική τάση μετά από ζύμωση της ινουλίνης 1%, ενώ στην ινουλίνη 2% αυξήθηκαν σημαντικά σε σχέση ομοίως με τον αρνητικό μάρτυρα. Σημαντική αύξηση απεικόνισε επίσης και το *Bacteroides* spp. όταν και οι δύο γνωστοί πρεβιοτικοί μάρτυρες συγκρίθηκαν με τον αρνητικό μάρτυρα. Με τη χρήση του paired t-test, σημαντική αύξηση φάνηκε στους λακτοβακίλλους και στο *Bifidobacterium* spp. μετά τη ζύμωση της ινουλίνης και στις δύο συγκεντρώσεις, επίσης τάση προς αύξηση του *Clostridium perfringens* group μετά τη ζύμωση του μανιταριού καθώς και του *Bifidobacterium* spp. μετά τη ζύμωση του πλούσιου σε β-γλυκάνες εκχυλίσματος του μανιταριού, σε σχέση με τον αρχικό χρόνο ζύμωσης (t=0).

Στην υγιή οστική ομάδα, ο μοναδικός μικροοργανισμός που υποδήλωσε τάση προς αύξηση μετά την ζύμωση της ινουλίνης 2%, είναι οι λακτοβάκιλλοι εν συγκρίσει με τον αρνητικό μάρτυρα, μετά από την ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων.

Αναφορικά με τις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες σε οστεοπενία, μετά από ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, αποτυπώθηκε σημαντική αύξηση των ολικών βακτηρίων,του *Bifidobacterium* spp., και τάση του *Bacteroides* spp. μετά από την 24-ωρη ζύμωση της ινουλίνης και στις δυο συγκεντρώσεις (1% & 2%), σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Επίσης, τα μπιφιντοβακτήρια αυξήθηκαν οριακά συνολικά, καθώς και εμφάνισαν μια τάση προς αύξηση στο εκχύλισμα πλούσιο σε β-γλυκάνες εν συγκρίσει με τον αρνητικό μάρτυρα. Συγκρίνοντας τους μικροβιακούς πληθυσμούς με τον (t=0h), τα ολικά βακτήρια αυξήθηκαν σημαντικά στην ινουλίνη 1% , όπως και τα *Bifidobacterium* spp. αυξήθηκαν σημαντικά και στις δυο συγκεντρώσεις της ινουλίνης (1%& 2%). Όσον αφορά το *Bacteroides* spp, μετά από ανάλυση διακύμανσης επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, κατόπιν της 24-ωρη ζύμωσης βρέθηκε με μια αυξητική τάση στο μανιτάρι καθώς και με σημαντική αύξηση στο πλούσιο σε β-γλυκάνες εκχύλισμα, όταν και τα δύο συγκρίθηκαν με τον αρνητικό μάρτυρα.

Από την άλλη, τα δύο βουτυρικο-παραγωγά *Clostridium leptum group* και *Faecalibacterium prausnitzii* δεν φαίνεται να ευνοούνται από την παρουσία του μανιταριού και του εκχυλίσματός του, αλλά ούτε και από την ινουλίνη, σε σχέση με t=0h. Επίσης, η ομάδα *Roseburia* spp-*Eubacterium rectale group* μειώθηκε σημαντικά μετά την 24-ωρη ζύμωση τόσο του μανιταριού όσο και του εκχυλίσματός του συγκρινόμενο με τα αρχικά επίπεδα του πληθυσμού, στις γυναίκες σε οστεοπενία αλλά και στο σύνολο των εθελοντριών.

Ο πρεβιοτικός δείκτης PI_{24} βρέθηκε θετικός σε όλες τις ομάδες τόσο για το μανιτάρι, όσο και για το εκχύλισμά του, δίνοντας υψηλότερες τιμές στο με εκχύλισμα του *Ganoderma lucidum* συγκρινόμενο με το μανιτάρι. Εξετάζοντας μια προς μια όλες τις εθελόντριες βρέθηκε τόσο σε δυο εκ των τριών υγιών όσο σε δυο εκ των τριών οστεοπενικών αρνητική πρεβιοτική δράση στο μανιτάρι *Ganoderma lucidum* (μια από τις υγιείς παρουσίασε αρνητική δράση και στον αρνητικό μάρτυρα).

Στη μελέτη αυτή δεν παρουσιάστηκαν διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων οστικής πυκνότητας των εθελοντριών, πιθανόν γιατί το δείγμα ήταν πολύ μικρό και δεν ήταν δυνατή τέτοια σύγκριση. Επίσης δεν ήταν στο σκοπό της μελέτης η ύπαρξη ομάδας γυναικών πριν από την εμμηνόπαυση, έτσι ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ αυτών και των εθελοντριών σε εμμηνόπαυση. Στο πλαίσιο άλλων μελετών, ο De Vrese M., παρατήρησε σημαντική αύξηση στα επίπεδα των *E. coli, Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp. και *Bacteroides spp.* εξετάζοντας τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών με καρκίνο του μαστού και συσχετίζοντας την έλλειψη οιστρογόνων οφειλόμενη στην μετεμμηνοπαυσιακή κατάσταση με την εντερική μικροβιακή ποικιλομορφία. (De Vrese.M, 2009).

Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η ινουλίνη ζυμώθηκε από τον εντερικό μικροβιόκοσμο όλλων των εθελοντριών, σε διαφορετικό βαθμό βέβαια, γεγονός που διασφαλίζει ότι ο χειρισμός και η προετοιμασία όλων των εμβολίων δεν τα απενεργοποίησε. Επίσης όπως αναμενόνταν ως γνωστό πρεβιοτικό ο θετικός μάρτυρας είχε ως αποτέλεσμα θετικό πρεβιοτικό δείκτη. Τα ευρήματα της μελέτης, συμπίπτουν με τα αποτελέσματα άλλων ερευνών. Ανατρέχοντας στην βιβλιογραφία, είναι αξιοσημείωτο πως πρεβιοτικά τύπου ινουλίνη παρουσιάζουν μπιφιντογενή δράση, ευνοώντας την διέγερση ανάπτυξης διαφόρων γενών του γένους *Bifidobacterium*. Η ινουλίνη, ως πρεβιοτικό, συγκαταλέγεται στην κατηγορία των φρουκτανών (Inulin-type fructans) μαζί με τους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες και την ολιγοφρουκτόζη με τους β-2,1-γλυκοζιδικούς δεσμούς (2-1, fructosyl-fructose glycosidic bonds) αντιστέκονται στην ενζυματική πέψη και στα γαστρικά υγρά και καταλήγουν στο παχύ έντερο όπου επιτελείται η μικροβιακή ζύμωση. Από τις ζυμώσεις αυτές παράγονται λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου, με κυρίαρχο το οξικό οξύ. (Greg Kelly, ND, 2008). Σύμφωνα με μελέτες, είδη του γένους *Lactobacillus*, όπως το *L.acidophilus*, το *L. casei*, το *L. delbruekii* και του *Bifidobacterium*, όπως το *Bifidobacterium longum*, θεωρούνται αναγνωρισμένα βακτήρια τα οποία προάγουν την υγεία του εντέρου και ενισχύονται από την πρεβιοτική δράση.(Gibson and Roberfroid , 1995 Roberfroid *et al.*, 2010). Το γένος *Lactobacillus* ανήκοντας σε μια μεγάλη ομάδα, τα γαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria-LAB), παράγοντας γαλατικό οξύ ως κυρίαρχο τελικό προϊόν στο γαστρεντερικό σωλήνα, προάγει ευεργετικές ιδιότητες και επιδρά στην υγεία του ξενιστή, σημαντικός λόγος που το κάνει να εξετάζεται. (Jens Walter, 2008). Επιπρόσθετα, είναι αξιοσημείωτο πως τα Bifidobacteria σε πληθώρα ερευνών εμφανίζουν προβιοτική δράση, ενώ τα ίδια μεταβολίζουν την ινουλίνη. Τα συγκεκριμένα βακτήρια, ανήκουν στο φύλο Actinobacteria και αντιπροσωπεύουν περίπου το 3% του ανθρώπινου μικροβιόκοσμου ενός ενήλικα, με το

Bifidobacterium longum ένα από τα κυρίαρχα είδη, παράγουν γαλακτικό και οξικό οξύ ως τελικά προϊόντα της ζύμωσης, με το φορμικό οξύ και την αιθανόλη σε λίγο μικρότερες ποσότητες. (Matsuki T.,*et al*. 2002, Van der Meulen R, *et al*.2006).

Οι Shuhaimi Y.S, et al., απέδειξαν την πιθανή πρεβιοτική δράση των πολυσακχαριτών από εκχυλίσματα του μανιταριού *G.lucidum*, αφού παρατήρησαν αύξηση του πληθυσμού των *Bifidobacterium* spp. όταν ζυμώθηκαν σε στατικές καλλιέργειες μετά από 18h ζύμωση εν αντιθέσει με την παρούσα μελέτη που η καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών έγινε μετά από 24h.(Shuhaimi Y.S, et al., 2012). Πιθανόν να έπρεπε να ληφθούν δείγματα και σε ενδιάμεσες χρονικές στιγμές, διασφαλίζοντας την πιθανή ολοκλήρωση της διαδικασίας σε μικρότερο χρόνο. Τα είδη του *Bacteroides* spp, συμβιούν στο περιβάλλον του εντέρου και του προσδίδουν μια σταθερότητα, καθώς ως σακχαρολυτικοί μικροοργανισμοί παράγουν ηλεκτρικό οξύ, οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ και προπιονικό οξύ, συμμετέχοντας σε μια πολύ σημαντική διαδικασία στην περίπτωση των πρεβιοτικών, την πρωτεολυτική ζύμωση. Αντιπροσωπεύει μέχρι και το 20% της ανθρώπινης μικροβιακής ποικιλότητας του παχέος εντέρου, κατατάσσοντάς το στο φύλο Bacteroidetes, με επικρατέστερο το *Bacteroides thetaiotaomicron*. Από την άλλη όμως, όταν κάποιες συνθήκες το ευνοούν, όπως σε μία κατάσταση διαταραχής της ομοιοστασίας του εντερικού περιβάλλοντος, μπορεί να μετατραπεί σε ευκαιριακό παθογόνο δημιουργώντας ένα αφιλόξενο περιβάλλον, όπως το *Bacteroides fragilis*. (Ley Re *et al*., 2006, MacFarlane GT, Cummings JH. 1991).

Από τα ευρήματα αυτής της μελέτης ήταν ότι τα μπιφιντοβακτήρια εμφάνισαν τάση προς αύξηση στο πλούσιο σε β-γλυκάνες εκχύλισμα εν συγκρίσει με τον αρνητικό μάρτυρα, καθώς και το *Bacteroides* spp. εμφάνισε τάση προς αύξηση στο μανιτάρι και σημαντική αύξηση στο εκχύλισμα, εν συγκρίσει και τα δυο με τον αρνητικό μάρτυρα. Μια πιθανή εξήγηση μεταξύ των δύο αυτών μικροοργανισμών θα μπορούσε να αποδοθεί στη συνεργιστική δράση τους, όπου τα μεταβολικά προϊόντα ζύμωσης του ενός να ευνοούν την ανάπτυξη του άλλου. Σε μια μελέτη, οι Rios-Covian, D. et al., έδειξαν ότι κάποια Bifidobacteria παράγουν εξωπολυσακχαρίτες, τα οποία είναι σύνθετα πολυμερή από διάφορες μονάδες πολυσακχαριτών, όπου απελευθερώνονται *in situ* στο παχύ έντερο και μπορούν πιθανά να λειτουργήσουν ως ζυμώμενα υποστρώματα για τα στελέχη του *Bacteroides*. Τα αποτελέσματα αυτά παρατηρήθηκαν στη ζύμωση με μικρές ποσότητες από εξωπολυσακχαρίτες και ινουλίνη (0.3% w/v), με εμβόλιο κοπράνων σε στατικές καλλιέργειες όπου μεταβλήθηκε η σύνθεση των SCFAs και τα επίπεδα των *Bacteroides* και *Bifidobacterium*.(Rios-Covian, D. et al., 2013).

Στον αντίποδα όμως, τρία ομάδες βακτηρίων παρουσίασαν μείωση σε όλες τις περιπτώσεις των πληθυσμών τους,το *Clostridium leptum* group, *Faecalibacterium prausnitzii* και ειδικότερα το *Roseburia* spp.-*Eubacterium rectale* . Τα ευρήματα αυτά είναι λίγο ασαφή σε σχέση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία Οι τρεις ομάδες βακτηρίων ανήκουν στο φύλο Firmicutes, έχοντας την κοινή ιδιότητα να ζυμώνουν άπεπτες ίνες στο παχύ έντερο προς παραγωγή βουτυρικού οξέος. Το βουτυρικό οξύ, έχει μελετηθεί αρκετά ως ένα από τα κυρια προϊόντα των ζυμώσεων του εντερικού μικροβιόκοσμου και θεωρείται να επιδρά ευεργετικά στο εντερικό επιθήλιο του ξενιστή. (Miquel, S. *et al*., 2014, Lopetuso *et al*., 2013). Οι Duncan *et al*. παρατήρησαν ότι αν κάποιος ακολουθεί ένα διαιτητικό πρότυπο με μειωμένη υδατανθρακική πρόσληψη, θα εμφανίσει ανάλογη σημαντική μείωση του πληθυσμού *Roseburia-E. rectale* group, και συνεπώς μειωμένα επίπεδα βουτυρικού οξέως στα κόπρανα (Duncan *et al*., 2007). Επίσης, οι Li *et al*., μελετώντας τους πολυσακχαρίτες από το στέλεχος του *G.lucidum* S3 (GLP S3) ως θεραπεία

στην χρόνια παγκρεατίτιδα σε μύες παρατήρησαν ότι αυξήθηκαν ευεργετικά βακτήρια όπως, *Lactobacillales, Roseburia* και *Lachnospiraceae* (Li k., *et al*., 2016). Επομένως, μια πιθανή εξήγηση που θα μπορούσε να δοθεί είναι ότι οι άλλοι μικροοργανισμοί που διαβιούν στον εντερικό μικροβιόκοσμο πιθανά να ζυμώνουν πιο γρήγορα τα πρεβιοτικά μεταβολίζοντας τα, και τα μεταβολικά προϊόντα που δημιουργούνται να μην αφήνουν περιθώριο ανάπτυξης των βουτυροπαραγωγών. Επίσης και ο χρόνος ανάπτυξής τους θα μπορούσε να διαφέρει σημαντικά σχετικά με τον υπόλοιπο εντερικό μικροβιόκοσμο, δηλαδή σε ενδεχόμενη επόμενη δειγματοληψία μετά από 48h, ο πληθυσμός τους να εμφάνιζε διαφοροποιήσεις. Επιπροσθέτως, λόγω ανταγωνιστικής δράσης, οι άλλοι μικροοργανισμοί που απαρτίζουν τον μοναδικό εντερικό μικροβιόκοσμο της κάθε εθελόντριας να παράγουν βιοενεργές ουσίες που δρουν δυνητικά βακτηριοστατικά στον πληθυσμό τους προκαλώντας μείωση, χωρίς ωστόσο να τον θανατώνουν.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δείχνουν ότι πιθανά το εκχύλισμα του μανιταριού Ganoderma lucidum να έχει μπιφιντογενή δράση, ιδιαίτερα στις οστεοπενικές εθελόντριες. Χρειάζεται όμως περαιτέρω μελέτη με μεγαλύτερο αριθμό εθελοντριών για να ξεπεραστεί το «πρόβλημα» της επαναλιψημότητας που προκύπτει από τη βιοποικιλότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου ανά ξενιστή.

Συνοψίζοντας, η σύσταση και η λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου έχει διεγείρει το ενδιαφέρον του επιστημονικού κόσμου και πιο συγκεκριμένα στην υπόθεση συμμετοχής κάποιων συστατικών του στη ρύθμιση του οστικού μεταβολισμού. Η υπόθεση αυτή θα μπορούσε να έχει πρακτικές συνέπειες γιατί μέσω της διατροφής (πρεβιοτικά) θα είναι δυνατή η τροποποίηση του εντερικού μικροβιόκοσμου, με πιθανά οφέλη σε διαταραχές του οστικού μεταβολισμού, όπως η οστεοπόρωση. Χρειάζεται όμως περαιτέρω μελέτη και προσεκτικά οργανωμένες μελέτες παρέμβασης για να γίνει δυνατή μία τέτοια εφαρμογή.

Οι β-γλυκάνες από το βιοδραστικό εκχύλισμά του *G.lucidum* θα μπορούσαν να αποτελούν μέλλον στην βιομηχανία τροφίμων, εμπλουτισμένες σε καινοφανή τρόφιμα (novel foods) όπου όχι μόνο θα ενισχύουν αλλά και θα προάγουν τον σχηματισμό οστικής πυκνότητας σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που ήδη νοσούν από οστεοπενία. Ο εμπλουτισμός των β-γλυκάνων του μανιταριού θα μπορούσε να προστεθεί σε ψωμί , όπως αντιστοίχως μελέτησαν οι Knucles και οι συνεργάτες , δηλ. τον εμπλουτισμό γλυκάνων από βρώμη ή κριθάρι, προσπαθώντας να υπερπηδήσουν το εμπόδιο του υψηλού ιξώδους των β-γλυκανών που δημιουργείται κατά την επεξεργασία και σχετίζεται ενδεχομένως με το μοριακό βάρος. (Lyly *et al.*,2003, Knucles *et al.,* 1997). Επιπλέον, προληπτικά και η δημιουργία ενός τυριού με προσθήκη β-γλυκάνων από το *G.lucidum* ως λειτουργικό τρόφιμο θα μπορούσε να ενισχύσει τον οστικό ανασχηματισμό των γυναικών προς αποφυγή εμφάνισης μεταβολικών νοσημάτων, όπως οστεοπόρωση, μετά την εμμηνόπαυση. Τέλος, με την πάροδο του χρόνου τα εδώδιμα μανιτάρια απασχολούν σε μεγάλο βαθμό τον τομέα της φαρμακευτικής, με τις εξαίρετες ιδιότητες τους να πρωτοστατούν ως συμπληρώματα διατροφής, ωστόσο καθίσταται αδήριτη ανάγκη να διεξαχθούν περισσότερες έρευνες για τον ρόλο τους στον οστικό ανασχηματισμό.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Στους περιορισμούς της μελέτης συγκαταλέγονται το μέγεθος του δείγματος των εθελοντριών που κλήθηκαν να συμμετάσχουν διότι ήταν πιθανόν μικρό (n=6) και στα ερωτηματολόγια

καταγραφής τροφίμων που κλήθηκαν να συμπληρώσουν οι εθελόντριες, το σφάλμα ανάκλησης της μνήμης στην προσπάθεια τους να καταγράψουν τις διατροφικές τους συνήθειες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Α) ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

Abrams SA, Griffin IJ, Hawthorne KM, Liang L, Gunn SK, Darlington G, et al. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. Am J Clin Nutr. 2005;82:471–6.

Agger S, Lopez-Gallego F, Schmidt-Dannert C, Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete Coprinus cinereus, Mol Microbiol. 2009 Jun; 72(5):1181-95.

Aguilera, J. M. (2018). The Food Matrix: Implications in Processing, Nutrition and Health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1–43. doi:10.1080/10408398.2018.1502743.

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

Al-Obaidi, J. R., Saidi, N. B., Usuldin, S. R., Hussin, S. N., Yusoff, N. M., and Idris, A. S. (2016). Comparison of different protein extraction methods for gel-based proteomic analysis of ganoderma spp. Protein J., 35, 100-106.

Ariefdjohan, MW.; Brown-Esters, ON.; Savaiano, DA. Ch. 38 Intestinal microflora and diet in health. In: Coulston, AM.; Boushey, CJ.; Ferruzzi, MG., editors. Nutrition in the prevention and treatment of disease. 3rd. Elsevier, Inc.; 2013. p. 719-738.

Ballongue J, Schumann C, Quignon P. Effects of feeding lactitol on colonic microbiota and enzymatic activity. Scand J Gastroenterol. 1997; 32:41–4. [PubMed: 27035190]

Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P, Lobley GE, et al., Two routes of metabolic cross-feeding between Bifidobacterium adolescentis and butyrate-producing anaerobes from the human gut. Applied and Environment Microbiology 2006;72:3593–9.

Besten G., Eunen K. , Groen K. A., Venema K., Reijngoud D. J., Bakker M. K., The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism, Journal of Lipid Research Volume 54, 2013.

Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. Trends in Food Science & Technology, 31 (2), 118-129, http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2013.03.006.

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

Bliziotes, M. et al. Serotonin transporter and receptor expression in osteocytic MLO-Y4 cells. Bone 39,1313–1321 (2006).

Bode L., Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama, (2012),Glycobiology, Volume 22, Issue 9, 1 September 2012, Pages 1147–1162, https://doi.org/10.1093/glycob/cws074.

Buliga, G. S., Brant, D. A., & Fincher, G. B. (1986). The sequence statistics and solution configuration of a barley (1—>3), (1—>4)-/b-D-glucan. Carbohydrate Research, 157, 139-156.

Cani PD, Knauf C., (2016), How gut microbes talk to organs: The role of endocrine and nervous routes, Molecular Metabolism, review.

Castillo M. , M. Martı´n-Oru´e S., G. Manzanilla E., Badiola I., Martı´n M. , Gasa J., Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR, Veterinary Microbiology 114 (2006) 165–170.

Cauley, J. A. (2015). Estrogen and bone health in men and women. Steroids, 99(Part A), 11–15.

Ceapa C, Wopereis H, Rezaiki L, et al. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2013;27:139–155.

Chen J, Raymond K. b-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. Vasc Health Risk Manag 2008;4:1265-72.

Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: At the interface of health and disease. Nat Rev Genet 2012;13:260–270.

Chonan O,Watanuki M. Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption in rats. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 1995;41:95–104.

Codling C, O'Mahony L, Shanahan F, Quigley EMM, Marchesi JR.(2010) A molecular analysis of fecal and mucosal bacterial communities in irritable bowel syndrome. Dig Dis Sci 2010;55:392e7.

David Rios-Covian, Silvia Arboleya, Ana M., Hernandez-Barranco, Jorge R. Alvarez-Buylla, Patricia Ruas-Madiedo, Miguel Gueimonde and Clara G. de los, Reyes-Gavilan, Interactions between Bifidobacterium and Bacteroides Species in Cofermentations Are Affected by Carbon Sources, Including Exopolysaccharides Produced by Bifidobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 2013, 79(23):7518. DOI: 10.1128/AEM.02545-13

Dehariya P, Vyas D, Kashaw SK. Mushroom nutraceuticals on different substrates. Int J Pharm Pharm Sci. 2013;5:88–90.

Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, et al. A dietary fiber-deprived gut microbiota degrades the colonic mucus barrier and enhances pathogen susceptibility. Cell 2016;167:1339–1353 e1321.

De Vrese, M.(2009), Health benefits of probiotics and prebiotics in women, Menopause International, 15(1), 35-40.

De Vrese, M., & Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics.Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 111, 1-66. DOI: 10.1007/10_2008_097.

Đudarić L., Fužinac-Smojver A., Muhvić D., Giacometti J., (2015), The role of polyphenols on bone metabolism in osteoporosis, Food Research International 77 (2015) 290–298.

Duncan SH, Belenguer A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. Applied and Environment Microbiology 2007;73:1073–8.

Duncan SH, Louis P, Flint HJ. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human feces, that produce butyrate as a major fermentation product. Applied and Environment Microbiology, 2004;70:5810–7.

Eriksson, A.L. et al. (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, 418–423.

Faienza F. M, Ventura A., Marzano F., Cavallo L., Postmenopausal Osteoporosis: The Role of Immune System Cells, Clin Dev Immunol. 2013; 2013: 575936.

Falony G, Vlachou A, Verbrugghe K, De Vuyst L. Cross-feeding between Bifidobacterium longum BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose. Applied and Environment Microbiology 2006;72:7835–41.

Fesel H. P., Zuccaro A., β-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. Fungal Genetics and Biology, Volume 90, May 2016, Pages 53-60.

Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. Proc Natl Acad Sci USA 104: 13780–13785, 2007.

Fukuda S, Toh H, Hase K, et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. Nature 2011;469:543–547.

Funaro, M., Bolyakov, A., Gimenez, E., Herman, M., & Paduch, D. (2013). Low testosterone—An important predictor of low mineral bone density in young men—Our own experience and a review of literature. Advances in Sexual Medicine, 3(3A), 19–33.

Gallo A, Passaro G, Gasbarrini A, et al. Modulation of microbiota as treatment for intestinal inflammatory disorders: An up to date. World J Gastroenterol 2016;22:7186–7202.

Garcia-Mazcorro JF, Lanerie DJ, Dowd SE, et al. Effect of a multi-species synbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing. FEMS Microbiol Ecol 2011;78:542–554.

Garcia-Vieyra MI, Del Real A, Lopez MG. Agave fructans: their effect on mineral absorption and bone mineral content. JMed Food. 2014;17:1247–55.

Gasser A.J., Chapter 2:Bone Physiology and Biology, Bone Toxicology, September 2017, DOI: 10.1007/978-3-319-56192-9_2.

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. The Journal of Nutrition, 125 (6), 1401-1412.

Griffin IJ, Davila PM, Abrams SA. Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes. Br J Nutr. 2002;87 Suppl 2:S187 91.

Hoa T. H., Wang L-C, The Effects of Temperature and Nutritional Conditions on Mycelium Growth of Two Oyster Mushrooms (Pleurotus ostreatus and Pleurotus cystidiosus), Mycobiology. 2015 Mar; 43(1): 14–23.

Holloway L, Moynihan S, Abrams SA, Kent K, Hsu AR, Friedlander AL. Effects of oligofructose-enriched inulin on intestinal absorption of calcium and magnesium and bone turnover markers in postmenopausal women. Br J Nutr. 2007;97:365–72.

Hong F, Yan J, Baran JT, Allendorf DJ, Hansen RD, Ostroff GR, et al. Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. J Immunol 1950;173:797-806.

Hooper L.V., Littman D. R, MacphersonA.J., Interactions Between the Microbiota and the Immune System, 8 JUNE 2012 VOL 336 SCIENCE.

Hooper LV, Macpherson AJ. (2010)Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. Nat Rev Immunol 2010;10:159e69.

Huerou-Luron IL, Blat S, Boudry G. Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. Nutr Res Rev 2010;23:23e36.

Ibáñez, L., Rouleau, M., Wakkach, A., & Blin-Wakkach, C. (2018). Gut microbiome and bone. Joint Bone Spine. doi:10.1016/j.jbspin.2018.02.008.

International Osteoporosis Foundation, Osteoporosis& Musculoskeletal disorders, Epidemiology, IOF 2017, https://www.iofbonehealth.org/epidemiology.

Ito M, Deguchi Y, Miyamori A, Matsumoto K, Kikuchi H, Matsumoto K, et al. Effects of administration of galactooligosaccarides on the human faecal microflora, stool weight and abdominal sensation. Microb Ecol Health Dis. 1990; 3:285–92.

Jaskari, J., Kontula, P., Siitonen, A., Jousimies-Somer, H., Mattila-Sandholm, T., Poutaten, K. (1998). Oat -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for Bifidobacterium and Lactobacillus strains. Applied Microbiology and Biotechnology, 49 (2), 175-181. DOI: 10.1007/s002530051155.

Jaworska G, Berna´s E. and Mickowska B, Effect of production process on the amino acid content of frozen and canned Pleurotus ostreatus mushrooms. Food Chem 125:936–943 (2011).

Johansson M. E. V. ,. Larsson J. M. H , Hansson G. C., The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108 (suppl. 1), 4659 (2011).

Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, Ogawa A, Ikuyama K, Akai Y, et al. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (Lactobacillus gasseri SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. Eur J Clin Nutr 2010;64:636e43.

Kalac P., A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms, Sci Food Agric 2013; 93: 209–218.

Kanis A.J, McCloskey V. E., Johansson H., Cooper C., Rizzoli R., Reginster Y.-J., European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women, (2013), Osteoporosis International, January 2013, Volume 24, Issue 1, pp 23–57.

Karimi G, Sabran MR, Jamaluddin R, Parvaneh K, Mohtarrudin N, Ahmad Z, et al. The anti-obesity effects of Lactobacillus casei strain Shirota versus Orlistat on high fat diet-induced obese rats. Food Nutr Res 2015;59:1e9.

Kelly G., ND (2008), Inulin-Type Prebiotics – A Review: Part 1, Alternative Medicine Review Volume 13, Number 4.

Knuckles B.E., Hudson C.A., Chiu M.M., Sayre R.N. (1997). Effect of pGlucan Barley Fractions in High-Fiber Bread and Pasta. Cereal Foods World, 42 (2), 94-99.

Kontula, P., Jaskari, J., Nollet, L., De Smet, I., Von Wright, A., Poutanen, K., Mattila Sandholm, T. (1998). The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on a fermented oat bran product: Effects on the gastrointestinal microbiota. Applied Microbiology and Biotechnology, 50 (2), 246-252.

Koutrotsios G., Mountzouris K.C., Chatzipavlidis I. , Zervakis G. I, 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 Chemistry 161 (2014) 127–135.

Kunz C, Kuntz S, Rudloff S. Intestinal flora. Adv Exp Med Biol, 639: 67–79, 2009.

Kurt, S., & Buyukalaca, S. (2010). Yield performances and changes in enzyme activities of Pleurotus spp. (P. ostreatus and P. sajor-caju) cultivated on different agricultural wastes. Bioresource Technology, 101, 3164–3169.

Lam, Ka-Lung, Peter Chi-Keung Cheung, Non digestible long chain beta-glucans as novel prebiotics (Review), 2013, Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.09.001.

Legette LL, Lee W, Martin BR, Story JA, Campbell JK, Weaver CM. Prebiotics enhance magnesium absorption and inulin-based fibers exert chronic effects on calcium utilization in a postmenopausal rodent model. J Food Sci. 2012;77:H88–94.

Lennon G, Balfe A, Earley H, et al. Influences of the colonic microbiome on the mucous gel layer in ulcerative colitis. Gut Microbes 2014;5:277–285.

Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell 124:837–848

Li, J.Y. et al. (2011) Ovariectomy disregulates osteoblast and osteoclast formation through the T-cell receptor CD40 ligand. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 768–773

Li, J-Y. et al. (2014) Gut microbiota plays a pivotal role in the bone loss induced by sex steroid deficiency. J. Bone Miner. Res. 29 (Suppl. 1), 1029.

Li, K., Zhuo, C., Teng, C., Yu, S., Wang, X., Hu, Y., Qu, J. (2016). Effects of Ganoderma lucidum polysaccharides on chronic pancreatitis and intestinal microbiota in mice. International Journal of Biological Macromolecules, 93, 904–912. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.029

Li X., Wang J., Wang W., Liu C., Sun S., Gu J., Wang X., Boraschi D., Huang Y., Qu D.,(2013), Immunomodulatory Activity of a Novel, Synthetic Betaglucan (β-glu6) in Murine Macrophages and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, PLoS ONE 8(11) .

Lopetuso, L. R., Scaldaferri, F., Petito, V., & Gasbarrini, A. (2013), Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis, Gut Pathogens 5(1), 23.

Lyly M., Salmenkallio-Marttila M., Suortti T., Autio K., Poutanen K. and Lahteenmaki L. (2003). Influence of Oat b—ducan Preparations on the Perception of Mouthfeel and on Rheological Properties in Beverage Prototypes. Cereal Chemistry, 80 (5), 536-541.

MacFarlane GT, Cummings JH. 1991. The colonic flora, fermentation and large bowel digestive function, p 51–92 In Phillips SF, Pemberton JH, Shorter RG, editors. (ed), The large intestine: physiology, patho-physiology and disease. Raven Press Ltd., New York, NY.

MacFarlane S, Macfarlane GT, Cummings JH. Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. Aliment Pharmacol Ther.2006;24:701–14.

Manning TS, Gibson GR. Prebiotics. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2004;18:287–298. doi: 10.1016/j.bpg.2003.10.008.

Marcobal A, Barboza M, Froehlich JW, Block DE, German JB, Lebrilla CB, et al.(2010) Consumption of human milk oligosaccharides by gut-related microbes. J Agric Food Chem 2010;58:5334e40.

Marie PJ (2008) Transcription factors controlling osteoblastogenesis. Arch Biochem Biophys 473, 98–105.

Martin-Millan, M. et al. (2010) The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. Mol. Endocrinol. 24, 323–334

Matsui H, Takahashi T, Øverby A, Murayama SY, Yoshida H, Yamamoto Y, et al.(2015) Mouse models for assessing the protective efficacy of Lactobacillus gasseri SBT2055 against Helicobacter suis infection associated with the development of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Helicobacter 2015;20:291e8.

Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Oyaizu H, Tanaka R. 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. Appl. Environ. Microbiol. 68:5445–5451.

Mendis M, Leclerc E, Simsek S. Arabinoxylans, gut microbiota and immunity. Carbohydr Polym 2016;139:159–166.

Miles G.P, Chang S-T,(1997), Mushroom Biology, Concise Basics and Current Develpoments, World Scientific Publishing Co.Pte.Ltd.

Miquel, S., Martín, R., Bridonneau, C., Robert, V., Sokol, H., Bermúdez-Humarán, L. G., Langella, P. (2014). Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium Faecalibacterium prausnitzii. Gut Microbes, 5(2), 146–151. doi:10.4161/gmic.27651

Mitsou EK, Kougia E., Nomikos Tz., Yannakoulia M., Mountzouris K.C., Kyriacou A, (2011), Effect of banana consumption on faecal microbiota: A randomised, controlled trial, Clinical Microbiology, Anaerobe 17 (2011) 384e387.

Mountzouris, K. C., Balaskas, C., Fava, F., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., & Fegeros, K. (2006). Profiling of composition and metabolic activities of the colonic microflora of growing pigs fed diets supplemented with prebiotic oligosaccharides. Anaerobe, 12(4), 178–185. doi:10.1016/j.anaerobe.2006.04.001.

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, 257–266.

Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. Gastroenterology 136: 65–80, 2009.

Neves AL, Chilloux J, Sarafian MH, et al. (2015) The microbiome and its pharmacological targets: therapeutic avenues in cardiometabolic diseases. Curr Opin Pharmacol 25, 36–44.

Noor, Z., Kania, N., & Setiawan, B. (2014). Tibia bone properties at different time course of ovariectomized rats. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders, 13(1), 91 (eCollection 2014).

Ohlsson C and Sjögren K. (2015), Effects of the gut microbiota on bone Mass,Trends Endocr. Metab. 26(2): 69-74.

Ohta A, Motohashi Y, Sakai K, HirayamaM, Adachi T, Sakuma K. Dietary fructooligosaccharides increase calcium absorption and levels of mucosal calbindin-D9k in the large intestine of gastrectomized rats. Scand J Gastroenterol. 1998;33:1062–8.

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. British Journal of Nutrition 83, 247-255

Ortiz LT, Rodriguez ML, Alzueta C, Rebole A, Trevino J. Effect of inulin on growth performance, intestinal tract sizes, mineral retention and tibial bone mineralisation in broiler chickens. Br Poult Sci. 2009;50:325–32.

Oufir LE, Barry JL, Flourié B, et al. (2000) Relationships between transit time in man and in vitro fermentation of dietary fiber by fecal bacteria. Eur J Clin Nutr 54, 603–609.

Palframan, R. J., Gibson, G., & Rastall, R. (2002). Effect of pH and dose on the growth of gut bacteria on prebiotic carbohydrates in vitro. Anaerobe, 8(5),287-292. doi:10.1006/anae.2002.0434.

Palframan, R., Gibson, G.R., Rastall, R.A., 2003. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. Letters in Applied Microbiology, 37, 281–284

Panek, M., Čipčić Paljetak, H., Barešić, A., Perić, M., Matijašić, M., Lojkić, I.,Verbanac, D. (2018). Methodology challenges in studying human gut microbiota – effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. Scientific Reports, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-23296-4.

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.

PubChem, Open Chemistry Database, ganoderic acid A, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/471002#section=Top.

Quince C, Ijaz UZ, Loman N, Eren AM, Saulnier D, Russell J, et al. Extensive modulation of the fecal metagenome in children with crohn's disease during exclusive enteral nutrition. Am J Gastroenterol 2015;110:1718e29.

Rahar S., Swami G., Nagpal N., Nagpal M. A., Singh G.S, Preparation, characterization, and biological properties of b-glucans, Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research, Apr-Jun 2011, Vol 2,Issue 2.

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*. British Journal of Nutrition 101, 541-550.

Rimsten L., Stenberg T., Anderson R., Anderson A, Åman P., Determination of b-Glucans Molecular Weight Using SEC with Calcofluor Detection in Cereal Extracts. Cereal Chem 2003;80:485-90.

Rinttilä, 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. Journal of Applied Microbiology 97, 1166-1177.

Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. Br J Nutr. 2010; 104:S1–63. [PubMed: 20920376]

Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: The concept revisited. The Journal of Nutrition, 137 (3), 830S-837S.

Roberfroid MB, Cumps J, Devogelaer JP. Dietary chicory inulin increases whole-body bone mineral density in growing male rats. J Nutr. 2002;132:3599–602.

Rop O., Mlcek J., Jurikova J., Beta-glucans in higher fungi and their health effects, Nutrition Reviews Vol. 67(11):624–631.

Rosselli, R., Romoli, O., Vitulo, N., Vezzi, A., Campanaro, S., de Pascale, F.,Squartini, A. (2016). Direct 16S rRNA-seq from bacterial communities: a PCR-independent approach to simultaneously assess microbial diversity and functional activity potential of each taxon. Scientific Reports, 6(1). doi:10.1038/srep32165.

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

Salonen, A., Nikkilä, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilić-Stojanović, 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. Journal of Microbiological Methods 81, 127-134.

Sanodiya, B., Thakur, G., Baghel, R., Prasad, G., and Bisen, P. (2009). Ganoderma lucidum: A potent pharmacological macrofungus. Curr. Pharm. Biotechnol., 10(8), 717-742.

Scholz-Ahrens KE, Ade P, Marten B, Weber P, Timm W, Acil Y, et al. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. J Nutr. 2007;137:838S–46.

Scholz-Ahrens KE (2016) Prebiotics, probiotics, synbiotics and foods with regard to bone metabolism. In: Weaver CM, Daly RM, Bischoff-Ferrari HA (eds) Nutritional influences on bone health. Springer, Cham, pp 153–167.

Scott, K. P., Gratz, S. W., Sheridan, P. O., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2013). The influence of diet on the gut microbiota. Pharmacological Research, 69(1), 52–60. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.020.

Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Caetano L., Antunes M., Finlay BB, (2010) Gut microbiota in health and disease. Physiol Rev 90, 859–904

Shah, P., Modi, H., Shukla, M., and Lahiri, S. K. (2014). Preliminary phytochemical analysis and antibacterial activity of Ganoderma lucidum collected from dang district of gujarat, india. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 3, 246-255.

Shiga K, Nishimukai M, Tomita F, Hara H. Ingestion of difructose anhydride III, a non-digestible disaccharide, improves postgastrectomy osteopenia in rats. Scand J Gastroenterol. 2006;41:1165–73.

Shreiner AB, Kao JY, Young VB. The gut microbiome in health and in disease. Curr Opin Gastroenterol 2015;31:69–75.

Shuhaimi Y.S., Arbakariya M., Fatimah A., Khalilah A.B., Anas A.K., Yazid A.M. Effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on the growth of Bifidobacterium spp. as assessed using Real-time PCR. Int. Food Res. J. 2012;19:1199–1205.

Sjogren, K. Engdahl C, Henning P, Lerner UH, Tremaroli V, Lagerquist MK, Bäckhed F, Ohlsson C., (2012) The gut microbiota regulates bone mass in mice. J. Bone Miner. Res. 27, 1357–1367.

Slevin MM, Allsopp PJ, Magee PJ, Bonham MP, Naughton VR, Strain JJ, et al. Supplementation with calcium and short-chain fructo-oligosaccharides affects markers of bone turnover but not bone mineral density in postmenopausal women. J Nutr. 2014;144:297–304.

Soen, S., Fukunaga, M., Sugimoto, T., Sone, T., Fujiwara, S., Endo, N., Tomomitsu, T. (2013). Diagnostic criteria for primary osteoporosis: Year 2012 revision. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 31(3), 247–257.

Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota — masters of host development and physiology. Nature Reviews Microbiology, 11(4), 227–238. doi:10.1038/nrmicro2974

Snart, J., Bibiloni, R., Grayson, T., Lay, C., Zhang, H., Allison, G. E., Laverdiere, J. K., Temelli, F., Vasanthan, T., Bell, R., & Tannock, G. W. (2006). Supplementation of the diet with high-viscosity beta-glucan results in enrichment for lactobacilli in the rat cecum. Applied and Environmental Microbiology, 72 (3), 1925-1931.

Srinivasan, S., Koenigstein, A., Joseph, J., Sun, L., Kalyanaraman, B., Zaidi, M., & Avadhani, N. (2010). Role of mitochondrial reactive oxygen species in osteoclast differentiation. Annals of the New York Academy of Sciences, 1192, 245–252.

Stachowiak B., Regula J., Health-promoting potential of edible macromycetes under special consideration of polysaccharides: a review. Eur Food Res Technol (2012), 234: 369-380.

Suau, A., Rochet, V., Sghir, A., Gramet, G., Brewaeys, S., Sutren, M., Rigottier-Gois, L., Doré, J., 2001. *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. Systematic and Applied Microbiology 24, 139-145.

Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. World J Gastroenterol 11: 1131–1140, (2005).

Tanaka M., Nakayama J. , Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life, Allergology International 66 (2017) 515e522.

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

Trzeciakiewicz A., Habauzit V., Horcajada M. N., (2009), When nutrition interacts with osteoblast function: molecular mechanisms of polyphenols, Nutrition Research Reviews (2009), 22, 68–81.

Türker N, Toh Z, Karagiannis T, Licciardi P., (2014), Molecular mechanisms and physiology of disease: Implications for Epigenetics and Health, Springer, 127-144.

Vaishnava S., Yamamoto M., Severson M. K.,. Ruhn A. K., Yu X.,Koren O., Ley R.,Wakeland E.K., Hooper L. V., The antibacterial lectin RegIIIγ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine, Science. 2011 Oct 14; 334(6053): 255–258.

Valverde ME., Hernández-Pérez , Paredes-López, Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. International Journal of Microbiology, (2015) pages: 14.

Van den Heuvel EG, Muys T, van Dokkum W, Schaafsma G. Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents. Am J Clin Nutr. 1999;69:544–8.

Van der Meulen R, Adriany T, Verbrugghe K, de Vuyst L. 2006. Kinetic analysis of bifidobacterial metabolism reveals a minor role for succinic acid in the regeneration of NAD+ through its growth-associated production. Appl. Environ. Microbiol. 72:5204–5210

Varley PF, McCarney C, Callan JJ, O'Doherty JV. Effect of dietary mineral level and inulin inclusion on phosphorus, calcium and nitrogen utilisation, intestinalmicroflora and bone development. J Sci Food Agric. 2010;90:2447–54.

VectorStock, Bone Cells, https://www.vectorstock.com/royalty-free-vector/bone-cells-osteon-flat-style-vector-22664404.

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. The ISME Journal 5, 220-230.

Walter J., Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research, Appl. Environ. Microbiol. 2008, 74(16):4985. DOI: 10.1128/AEM.00753-08.

Wang, R.F., Cao, W.W., Cerniglia, C.E., 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. Applied and Environmental Microbiol 62,1242-1247.

Wang Y, Kasper LH. The role of microbiome in central nervous system disorders. Brain Behav Immun 2014;38:1e12.

Wani B. A., Bodha R. H., Wani A. H., Nutritional and medicinal importance of mushrooms, Journal of Medicinal Plants Research Vol. 4(24), pp. 2598-2604, 18 December, 2010.

Weaver Connie M., Diet, Gut Microbiome, and Bone Health, Curr Osteoporos Rep.(2015) April ; 13(2): 125–130. doi:10.1007/s11914-015-0257-0.

Whisner, CM.,Weaver, CM. Probiotics and Prebiotics in Food, Nutrition and Health: Interactions of probiotics and prebiotics with minerals. Semih, Ötleş, editor. CRC Press; Boca Rotan FL: 2013. p. 200-231.

Whisner C.M., Castillo F. Luisa, Prebiotics, Bone and Mineral Metabolism, (2017), Calcif Tissue Int. DOI 10.1007/s00223-017-0339-3.

World Health Organization, Health topics, Nutrition, WHO 2018, http://www.who.int/topics/nutrition/en/.

Yadav, V. K. et al. Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. Cell 135, 825–837 (2008).

Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. Nature 2012;486:222e7.

Yu Z., Morrison M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. BioTechniques 36:808-812.

Zervakis, G. & Balis, C. (1996). A pluralistic approach on the study of Pleurotus spieces, with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. Mycological Research 100, 717-731.

Zervakis G. & Koutrotsios G. (2018), Chapter 12, Solid-state fermentation of plant residues and agro-industrial wastes from production of medicinal mushrooms.

Zervakis, G and Labareze, J. (1992). Taxonomic relationships within the fungal genus Pleurotus as determined by isoelectric focusing analysis of enzyme patterns. Journal of General Microbiology 138, 635-645.

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.

Β) ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

Δημήτρης Μ. Δήμου, Γ., Μυκητολόγος, Μύκητες-Μανιτάρια,Εισαγωγή στη βιολογία των μακρομυκήτων.

Διαμαντή Μ.Στεφάνου, Τα μανιτάρια της Ελλάδος, οι σπουδαιότεροι εδώδιμοι, δηλητηριώδεις και ξυλοσηπτικοί μύκητες της χώρας μας, εκδόσεις Ίων.

Παλαιολόγου Δ., Κατσαρέλη Ε. και Παπανικολάου Γ., (2015), Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, Κεφάλαιο 7, Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών

Παντίδου Ε. Μαρία, Μανιτάρια από τα ελληνικά δάση, Μουσείο Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας.

Παπαδογιάννης, ΙΝ., Σαμανίδου, Β.Φ., Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Θεσσαλονίκη 2001.

Παπανικολάου, Γ., Παλαιολόγου, Δ., Κατσαρέλη, Ε. (2015), Απομόνωση DNA, Κεφάλαιο 5, Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.

Ζερβάκης, Γ. (1992). Γενετική και ταξινομική ανάλυση μυκήτων του γένους Pleurotus. Διδακτορική Διατριβή. Τμήμα Γεωργικής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.