



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ: ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ : ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ
ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ

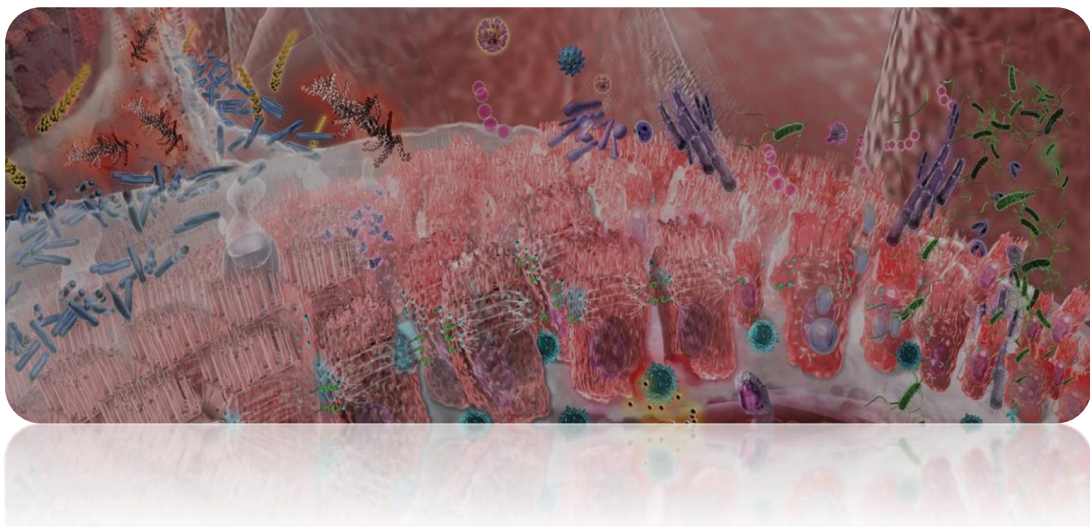
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

In vitro ζύμωση πλούσιων σε β-γλυκάνες βρώσιμων μανιταριών από τον
εντερικό μικροβιόκοσμο: επίδραση στη διαπερατότητα του εντέρου

ΚΕΡΕΖΟΥΔΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

(Α.Μ. : 4421804)



Αθήνα, 2020



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ: ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ : ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ
ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ**

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

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

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

Η Κερεζούδη Ευαγγελία δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

...στον πατέρα μου...

***Για όλες τις ερωτήσεις που δεν έκανες στις
αμέτρητες απαντήσεις που μου έδωσες...***

Σε ευχαριστώ!

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την περάτωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της.

Αρχικά, στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κ. Κυριακού Αδαμαντίνη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από τα χρόνια ακόμα των προπτυχιακών μου σπουδών, την επιστημονική της καθοδήγηση, τις υποδείξεις της, την επιμονή της, τη συμπαράστασή της, τη συνεχή της υποστήριξη και το αμείωτο ενδιαφέρον της από την αρχή μέχρι το τέλος. Την ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε και για το αίσθημα του οικογενειακού περιβάλλοντος, που διαμορφώθηκε καθόλη τη διάρκεια αυτής της συνεργασίας.

Βαθιές ευχαριστίες θα ήθελα να δώσω στην μεταδιδακτορική φοιτήτρια και φίλη μου Σαξάμη Γεωργία, για την εκπαίδευση που μου παρείχε, τις πολύτιμες συμβουλές της, την άψογη συνεργασία μας, την υπομονή της και τις ατελείωτες ώρες δουλειάς ακόμα και εις βάρος του προσωπικού της χρόνου. Η πρακτική, αλλά κυρίως η ηθική και ψυχολογική της υποστήριξη ήταν καταλυτική για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια κ. Τέντα Ρωξάνη για την ευγενική παροχή του απαραίτητου εξοπλισμού, χωρίς τον οποίο δε θα ήταν εφικτή η πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας και τη διδακτορική της φοιτήτρια Μουστάκα Καλλιόπη, η οποία με βοήθησε πρακτικά και ουσιαστικά καθόλη τη διάρκεια αυτού του έτους. Ευχαριστώ επίσης τη Μήτσου Ευδοκία, για τη βοήθεια που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου προσπάθειας και τους συνεργάτες του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, χάρη στους οποίους εξασφαλίστηκε η βασική πρώτη ύλη για την πραγματοποίηση του συγκεκριμένου ερευνητικού προγράμματος.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν καθόλη τη διάρκεια αυτής της τόσο απαιτητικής χρονιάς για εμένα και έκαναν την κάθε δυσκολία να είναι πιο εύκολη με αυτούς πλάι μου.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ, όμως θέλω να το δώσω στην οικογένειά μου, η οποία πάντα με υποστηρίζει και με υπομένει, ακόμα και στις στιγμές εξάντλησης και συνεχούς πίεσης, υπενθυμίζοντάς μου πόσο σημαντική είναι η δύναμη που κρύβουμε μέσα μας, καθοδηγώντας με πάντα με αγάπη!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	9
Abstract.....	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	12
Α΄ ΜΕΡΟΣ : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	13
ΚΕΦ. 1 : Μύκητες - Βασιδιομύκητες.....	13
1.1. Ορισμός.....	13
1.2. Τι είναι τα μανιτάρια;	13
1.3. <i>Pleurotus eryngii</i>	14
1.3.1. Ορισμός και Συστηματική κατάταξη	14
1.3.2. Καλλιέργεια	15
1.3.3. Διατροφική αξία	16
1.4. Πώς συνδέονται οι β-γλυκάνες με τα μανιτάρια;	18
1.5. Ποια είναι τα οφέλη της κατανάλωσης β-γλυκανών στην υγεία;	19
1.6. Ποια είναι η πρεβιοτική δράση των μανιταριών;	20
ΚΕΦ. 2 : Εντερικός Μικροβιόκοσμος.....	22
2.1. Ορισμός και χρησιμότητα	22
2.2. Σύσταση και δομή	23
2.2.1. Διατομική διαφοροποίηση	26
2.2.2. Ενδοατομική διαφοροποίηση	27
2.2.2.1. Ηλικία.....	28
2.2.2.2. Διατροφή	29
2.3. Πώς τα πρεβιοτικά επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο;.....	32
ΚΕΦ. 3 : Βλεννογόνιος Εντερικός Φραγμός.....	33
3.1. Ορισμός και χρησιμότητα	33
3.2. Σύσταση και δομή	34
3.3. Φυσιολογία εντερικής διαπερατότητας.....	36
3.4. Κυτταρική σύνδεση εντερικού επιθηλίου	37
3.5. Αποφρακτικές ενώσεις (tight junctions)	38
3.5.1. Αποφραξίνες (Occludin)	39
3.5.2. Κλαουδίνες (Claudin)	40
3.6. Μακρομόρια σχετιζόμενα με τις αποφρακτικές ενώσεις	42

3.6.1. Πρωτεΐνες αποφρακτικών συνδέσεων (zonula occludens)	43
3.7. Διαταραχή οργάνωσης εντερικού φραγμού και πρεβιοτικά	43
Β' ΜΕΡΟΣ: ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	46
ΚΕΦ. 1: Υλικά και Μέθοδοι	46
1.1. Σκοπός	46
1.2. Χαρακτηριστικά εθελοντών	46
1.3. Προϊόντα ζύμωσης	47
1.4. Βακτηριακός λιπο-πολυσακχαρίτης (LPS)	47
1.5. Κυτταροκαλλιέργειες	48
1.5.1. Κυτταρικές σειρές	48
1.5.2. Ανακαλλιέργεια Κυττάρων (split)	48
1.6. Επώαση των κυττάρων Caco-2 με τα προϊόντα ζύμωσης (FS) και τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS) ..	49
1.6.1. Έλεγχος της βιωσιμότητας των Caco-2 κυττάρων με τη μέθοδο trypan blue (dye exclusion test)	49
1.6.2. Εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης των FS και του LPS με την μέθοδο MTT	50
1.7. Απομόνωση ολικού RNA	52
1.8. Ηλεκτροφόρηση RNA	53
1.9. Σύνθεση cDNA	54
1.10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)	55
1.11. Στατιστική επεξεργασία	57
ΚΕΦ. 2 :Αποτελέσματα	58
2.1. Χαρακτηριστικά δείγματος εθελοντών	58
2.2. Επίδραση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στη βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2: Καταμέτρηση μέσω της χρωστικής Trypan Blue	58
2.3. Επίδραση των υπερκείμενων της ζύμωσης ή/και του LPS στη βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2: Καταμέτρηση με τη μέθοδο MTT	59
2.3.1. Εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης του FS-PEWS με τη μέθοδο MTT	59
2.3.2. Εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης του LPS με την μέθοδο MTT	61
2.4. Αποτελέσματα έκφρασης <i>TJs</i>	63
2.4.1. Αποτελέσματα έκφρασης <i>TJs</i> για το σύνολο των εθελοντών	63
2.5. Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων ανά εθελοντή	65
2.5.1. Αποτελέσματα έκφρασης <i>ZO-1</i> ανά εθελοντή	65
2.5.1.1. Αποτελέσματα έκφρασης <i>ZO-1</i> πρώτου εθελοντή	66
2.5.1.2. Αποτελέσματα έκφρασης <i>ZO-1</i> δεύτερου εθελοντή	68
2.5.1.3. Αποτελέσματα έκφρασης <i>ZO-1</i> τρίτου εθελοντή	70
2.5.2. Αποτελέσματα έκφρασης <i>occludin</i> ανά εθελοντή	72
2.5.2.1. Αποτελέσματα έκφρασης <i>occludin</i> πρώτου εθελοντή	73
2.5.2.2. Αποτελέσματα έκφρασης <i>occludin</i> δεύτερου εθελοντή	74

2.5.2.3. Αποτελέσματα έκφρασης <i>occludin</i> τρίτου εθελοντή.....	76
2.5.3. Αποτελέσματα έκφρασης <i>claudin-1</i> ανά εθελοντή	78
2.5.3.1. Αποτελέσματα έκφρασης <i>claudin-1</i> πρώτου εθελοντή.....	79
2.5.3.2. Αποτελέσματα έκφρασης <i>claudin-1</i> δεύτερου εθελοντή	81
2.5.3.3. Αποτελέσματα έκφρασης <i>claudin-1</i> τρίτου εθελοντή	83
2.5.4. Αποτελέσματα έκφρασης για το σύνολο των <i>TJs</i> ανά εθελοντή	85
ΚΕΦ. 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	87
Βιβλιογραφία.....	93

Περίληψη

Ο επιθηλιακός εντερικός φραγμός προστατεύει το γαστρεντερικό βλεννογόνο και παίζει καταλυτικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του ξενιστή, ενώ η διαπερατότητά του μπορεί να ρυθμιστεί από τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Τα πρεβιοτικά, διεγείρουν την ανάπτυξη ευεργετικών βακτηριακών πληθυσμών και μπορούν να συμβάλουν στην ενίσχυση του εντερικού φραγμού. Το εδώδιμο μανιτάρι *Pleurotus eryngii*, δύναται να προσφέρει ποικίλα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία, λόγω των πολλαπλών βιοδραστικών συστατικών του, με κυρίαρχες τις β-γλυκάνες, οι οποίες αποτελούν ένα τύπο διαιτητικών ινών με γνωστή πρεβιοτική δράση.

Η συγκεκριμένη μελέτη είχε ως στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης των προϊόντων ζύμωσης του *P. eryngii*, στα επίπεδα έκφρασης των στεγανών συνδέσμων (TJs) *in vitro*, στην καρκινική σειρά παχέος εντέρου Caco-2 διεγερμένη με λιποπολυσακχαρίτη (LPS).

Τα μανιτάρια *P. eryngii* καλλιεργήθηκαν σε δύο διαφορετικά υποστρώματα (PEWS και PEWSGM) και ζυμώθηκαν από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών ηλικιωμένων σε μοντέλο στατικής καλλιέργειας. Τα υπερκείμενα των ζυμώσεων αυτών χρησιμοποιήθηκαν για την επώαση κυττάρων Caco-2 υπό τρεις διαφορετικές συνθήκες:

- προ-επώαση: επώαση αρχικά με FS και στη συνέχεια έκθεση σε LPS
- συν-επώαση: επώαση με FS και LPS ταυτόχρονα
- μετά-επώαση: αρχικά έκθεση σε LPS και στη συνέχεια επώαση με FS

Η επίδραση των FS και LPS στη βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2 αξιολογήθηκε με τη μέθοδο κυτταροτοξικότητας MTT και στη συνέχεια εφαρμόστηκε RT-PCR για τη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των στεγανών συνδέσμων (*ZO-1*, *occludin* και *claudin-1*), χρησιμοποιώντας ως αρνητικό μάρτυρα το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας της ζύμωσης, χωρίς καμία πηγή άνθρακα, αλλά εμβολιασμένο με τον εντερικό μικροβιόκοσμο του κάθε εθελοντή.

Τα δεδομένα που προέκυψαν υποστηρίζουν πως και τα δύο προϊόντα ζύμωσης των μανιταριών που προέρχονται από διαφορετικά καλλιεργητικά υποστρώματα συνετέλεσαν σε σημαντική αύξηση της γονιδιακής έκφρασης των TJs (*ZO-1*, *occludin*, *claudin-1*) με παρόμοιο τρόπο σε σχέση με τα κύτταρα που δεν έχει γίνει κάποιος χειρισμός (untreated κύτταρα), έπειτα και από τους τρεις χειρισμούς στο σύνολο των εθελοντών. Επίσης οδήγησαν και σε αυξημένη έκφραση των στεγανών συνδέσμων σε σχέση με το LPS.

Συμπερασματικά, τα συστατικά των εδωδιμων μανιταριών του *P. eryngii*, μετά από τη ζύμωσή τους από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών ηλικιωμένων εθελοντών θα μπορούσαν να ασκήσουν ευεργετικές επιδράσεις, εξασφαλίζοντας τη διατήρηση της ακεραιότητας της εντερικής διαπερατότητας σε καταστάσεις διαρρέοντος εντέρου, επηρεάζοντας την έκφραση των *ZO-1*, *occludin* και *claudin-1*.

Λέξεις κλειδιά: εντερικός φραγμός, *Pleurotus eryngii*, στεγανοί σύνδεσμοι, πρεβιοτικό, εντερικός μικροβιόκοσμος

Abstract

Intestinal epithelial barrier protects the gastrointestinal mucosa and plays a key role in the maintenance of the host homeostasis, while its permeability can be modulated by gut microbiota. Prebiotics stimulate the growth of beneficial bacteria and may contribute to the enhancement of the intestinal barrier. *Pleurotus eryngii*, an edible mushroom, offers various health benefits due to its multiple bioactive components, such as beta-glucans, a type of dietary fiber with promising prebiotic potential.

The aim of the study was to investigate the effect of *P. eryngii* mushrooms fermentation products (FS) on the expression levels of tight junctions genes (TJs) in Caco-2 cells stimulated by bacterial lipopolysaccharide (LPS).

The mushrooms were cultivated in two different substrates (PEWS and PEWSGM) and they were fermented using faecal inoculum from healthy elderly donors, in an *in vitro* static model. Caco-2 cells were incubated with fermentation supernatants (PEWS or PEWSGM) under three different conditions:

- Pre-treatment: incubation initially with FS and then challenged with LPS
- Co-treatment: incubation with FS and LPS simultaneously
- Post-treatment: initially challenged with LPS and then incubation with FS

The effect of FS and LPS on the viability of Caco-2 cells was evaluated by the MTT assay and Reverse transcription PCR was applied to measure the expression levels of *zonulin-1*, *occludin* and *claudin-1* TJs. FS - deprived of carbon source, was used as a negative control.

Our data suggest that both mushroom fermentation supernatants from different cultivation substrates strongly impact the TJs expression (*ZO-1*, *occludin*, *claudin-1*) in a similar way to untreated cells, after all three conditions in the total of volunteers, while they also exhibited increased expression levels of TJs compared to LPS.

In conclusion, our data highlighted the potential positive effects of the rich in beta glucans mushrooms of *P. eryngii* on the intestinal barrier integrity, by promoting the overexpression of *tight junctions*, fueling further efforts to elucidate their manifold role (i.e. prebiotic) in human health.

Keywords: intestinal barrier, *Pleurotus eryngii*, tight junctions, prebiotic, gut microbiota

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Μανιτάρι <i>Pleurotus eryngii</i>	15
Εικόνα 2. Δομή και είδος διακλαδώσεων β-γλυκανών από διαφορετικές πηγές	18
Εικόνα 3. Κατανομή των μικροβιακών πληθυσμών κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού	24
Εικόνα 4. Μεταβολές στο μικροβιακό οικοσύστημα του ανθρώπινου εντέρου που σχετίζονται με την ηλικία και πιθανοί παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη σύσταση των μικροοργανισμών σε διαφορετικά στάδια της ζωής	27
Εικόνα 5. Η διαδικασία της πέψης των επιμέρους διατροφικών υποστρωμάτων στο λεπτό και στο παχύ έντερο.	30
Εικόνα 6. Επιδράσεις διαφόρων τύπων διατροφής στον εντερικό μικροβιόκοσμο, στη βλεννογόνια στιβάδα και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.	31
Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση εντερικού επιθηλίου	35
Εικόνα 8. Διαστρωμάτωση αμυντικών μηχανισμών του εντερικού επιθηλίου	36
Εικόνα 9. Δομική παρουσίαση κυτταρικών συνδέσεων του εντερικού επιθηλίου	38
Εικόνα 10. Δομή μηχανικού φραγμού εντερικών επιθηλιακών κυττάρων	39
Εικόνα 11. Δομική παρουσίαση διαμεμβρανικών στεγανών συνδέσεων και πρωτεϊνών των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου	42
Εικόνα 12. Δομική αναπαράσταση εντερικού φραγμού σε κατάσταση υγείας και νόσου	44
Εικόνα 13. Παράδειγμα μικροσκοπικής παρατήρησης έπειτα από χρώση trypan blue με χρήση αιματοκυτταρόμετρου Newbauer	50
Εικόνα 14. Παράδειγμα μακροσκοπικής παρατήρησης πιάτου 96 θέσεων έπειτα από μέθοδο κυτταροτοξικότητας MTT.	51
Εικόνα 15. Πήκτωμα αгарόζης από την ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου RNA	54

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Διατροφική και χημική σύνθεση του <i>Pleurotus eryngii</i>	17
Πίνακας 2. Συντομογραφίες υποστρωμάτων προς εξέταση.	47
Πίνακας 3. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.	56
Πίνακας 4. Η επίδραση των FS-PEWS και FS-PEWSGM στην έκφραση των γονιδίων <i>ZO-1</i> , <i>occludin</i> και <i>claudin-1</i> , για το σύνολο των εθελοντών, έπειτα από την πραγματοποίηση των τριών διαφορετικών χειρισμών (FS/LPS, FS+LPS, LPS/FS)	64

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1. Η % βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2 μετά την επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις του λιποπολυσακχαρίτη LPS (80 ng/mL, 100 ng/mL, 120 ng/mL) για 3 ώρες επώασης	58
Διάγραμμα 2. Η % βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2 έπειτα από την επώαση των κυττάρων με το προϊόν ζύμωσης του μανιταριού PEWS σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (2% v/v, 5% v/v, 8% v/v) για 3, 4, 24, 48 και 72 ώρες επώασης.....	60
Διάγραμμα 3. Η% βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2, μετά την επώαση των κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις του LPS (100 ng/mL, 120 ng/mL, 150 ng/mL) για 3, 4, 24, 48 και 72 ώρες επώασης.....	61
Διάγραμμα 4. Η % βιωσιμότητα των Caco-2 κυττάρων, έπειτα από την συνεπώαση του FS-PEWS + LPS (2% v/v FS-PEWS + 100 ng/mL LPS, 2% v/v FS-PEWS + 120 ng/mL LPS, 2% v/v FS-PEWS + 150 ng/mL LPS, 5% v/v FS-PEWS + 100 ng/mL LPS, 5% v/v FS-PEWS + 120 ng/mL LPS και 5% v/v FS-PEWS + 150 ng/mL LPS) για 4 και 48 ώρες επώασης.....	62
Διάγραμμα 5(A,B,Γ). Η επίδραση της επώασης των FS-PEWS και FS-PEWSGM στην κυτταρική σειρά Caco-2, ως προς την έκφραση της ZO-1 σε κάθε εθελοντή, έπειτα από την πραγματοποίηση των τριών διαφορετικών χειρισμών (FS/LPS, FS+LPS, LPS/FS).....	66
Διάγραμμα 6(A,B,Γ). Η επίδραση της επώασης των FS-PEWS και FS-PEWSGM στην κυτταρική σειρά Caco-2, ως προς την έκφραση της <i>occludin</i> σε κάθε εθελοντή, έπειτα από την πραγματοποίηση των τριών διαφορετικών χειρισμών (FS/LPS, FS+LPS, LPS/FS).....	72
Διάγραμμα 7(A,B,Γ). Η επίδραση της επώασης των FS-PEWS και FS-PEWSGM στην κυτταρική σειρά Caco-2, ως προς την έκφραση της <i>claudin-1</i> σε κάθε εθελοντή, έπειτα από την πραγματοποίηση των τριών διαφορετικών χειρισμών (FS/LPS, FS+LPS, LPS/FS).....	79

Α΄ ΜΕΡΟΣ : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ. 1 : Μύκητες - Βασιδιομύκητες

1.1. Ορισμός

Οι μύκητες ανήκουν στα Ευκάρυα, μία από τις τρεις κατηγορίες κυτταρικών μορφών ζωής στον πλάνήτη μας και σύμφωνα με το αναθεωρημένο ταξινομικό σύστημα του Whittaker (Whittaker, 1969) από την ομάδα του Ruggiero αποτελούν ένα από τα επτά βασίλεια στα οποία κατατάσσονται τα έμβια όντα (Ruggiero, και συν., 2015). Το Βασίλειο των Μυκήτων διαιρείται σε 7 φύλα, 35 τάξεις και 129 γένη (Hibbett, et al., 2007). Οι μύκητες είναι οι ετερότροφοι, ευκαρυωτικοί οργανισμοί, οι οποίοι ζουν προσλαμβάνοντας οργανικές ενώσεις από το περιβάλλον και αναπτύσσονται ως σαπρόφυτα ή δημιουργώντας συμβιωτική ή παρασιτική σχέση με κάποιον ξενιστή (Ζερβάκης, 2014).

Οι μυκηλιακοί μύκητες περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων δύο μεγάλα ταξινομικά φύλα, τους Ασκομύκητες και τους Βασιδιομύκητες οι οποίοι, είναι υπεύθυνοι για το σχηματισμό μανιταριών και διαφοροποιούνται ανάλογα με την κατασκευή των αναπαραγωγικών τους οργάνων στα οποία παράγονται τα σπόρια τους (Δήμου, 2005). Οι Βασιδιομύκητες αποτελούν μεγάλο τμήμα της καταγεγραμμένης και προστατευμένης φυσικής βιοποικιλότητας του οικοσυστήματος, καθώς μέρος των μυκήτων αυτών σχηματίζουν τα εδώδιμα μανιτάρια, ενώ αποτελούν και παθογόνα φυτών, ζώων κ.ά. Ανάλογα με την πηγή ενέργειας που χρησιμοποιούν διακρίνονται σε 3 κατηγορίες. Στους σαπροφυτικούς, που αποικοδομούν κυρίως κυτταρίνη και λιγνίνη, ενώ υπάρχουν και είδη, που δρουν ως συμβιωτικά, ως ενδόφυτα (π.χ. λειχήνες), παράσιτα και ως παθογόνα ζώων και ανθρώπων (Chang & Miles, 2004).

1.2. Τι είναι τα μανιτάρια;

Το 1992 ως μανιτάρι ορίστηκε κάθε μακρομύκητας με διακριτικό σώμα καρποφορίας που μπορεί να είναι, είτε υπόγειο, είτε επίγειο, αρκετά μεγάλο, ώστε να φαίνεται με γυμνό οφθαλμό και να μπορεί να συλλεχθεί με το χέρι (Chang & Miles, 1992). Τα μανιτάρια μπορούν να διακριθούν σε επιμέρους κατηγορίες, χωρίς παρόλα αυτά να είναι απόλυτη η κατηγοριοποίησή τους, αφού μπορεί να εμφανίζουν παραπάνω από μία ιδιότητα. Διαχωρίζονται σε:

1. Εδώδιμαμανιτάρια, τα οποία είναι σαρκώδη.
2. Φαρμακευτικάμανιτάρια, τα οποία εμφανίζουν φαρμακευτικές δράσεις.
3. Δηλητηριώδημανιτάρια, τα οποία έχουν αποδειχθεί ή μπορεί να εμφανίσουν επιβλαβή επίδραση στον καταναλωτή.
4. «Άλλαμανιτάρια», των οποίων οι ιδιότητές τους δεν έχουν προσδιοριστεί επαρκώς.

(Chang S.-T. , 2008)

Αποτελούν σημαντική διατροφική πηγή και είναι αρκετά διαδεδομένα σε παγκόσμια κλίμακα, καθώς φαίνεται πως εκτός από τα διατροφικά οφέλη που παρέχουν στον ανθρώπινο οργανισμό εμφανίζουν και μία πληθώρα ευεργετικών ιδιοτήτων (Swann & Hibbett, 2007). Ταμανιτάρια εμφανίζουν αρκετές διαφορές σε σχέση με τα ζώα και τα φυτά, λόγω της ιδιαίτερης βιολογικής τους οργάνωσης, συνδυάζουν όμως διατροφικά συστατικά και από τα δυο αυτά βασίλεια, παρέχοντας ένα ξεχωριστό διατροφικό προφίλ. Εκτός από τις ευεργετικές τους ιδιότητες, διακρίνονται και για τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, όπως είναι το άρωμα, η γεύση και η υφή (Stachowiak & Reguła, 2012). Στην παρούσα διπλωματική μελέτη θα μελετηθούνμανιτάρια που προέρχονται από το είδος *Pleurotus eryngii*.

1.3. *Pleurotus eryngii*

1.3.1. Ορισμός και Συστηματική κατάταξη

Τομανιτάρι *Pleurotus eryngii* ή Πλευρώτους ο Ερυγγίος γνωστό και ως «βασιλιάς στρείδι», ανήκει στα εδώδιμαμανιτάρια και περιλαμβάνει τρεις ποικιλίες, το *P.eryngii* ποικιλία *eryngii*, *P. eryngii* ποικιλία *ferulae*, και το *P.eryngii* ποικιλία *nebrodensis* (Εικόνα 1). Εντοπίζεται στις μεσογειακές περιοχές της Ευρώπης, της Μέσης Ανατολής και της Βόρειας Αφρικής (Zervakis & Balis, 1996), ενώ επίσης καλλιεργείται και σε μέρη της Ασίας π.χ. Κίνα, Ιαπωνία, Ν.Κορέα (Moonmoon, Uddin, Ahmed, Shelly, & Khan, 2010). Ταξινομείται στο Βασίλειο των Μυκήτων (*Fungi*), στο Φύλο των Βασιδιομυκήτων (*Basidiomycota*), στην Υποδιαίρεση *Agaricomycetes*, στην Τάξη *Agaricales*, στην Οικογένεια *Pleurotaceae* και στο Γένος *Pleurotus* (Quel, 1872).



Εικόνα 1. Μανιτάρι *Pleurotus eryngii*. (Roberto, 2020)

Αποτελεί το ένα από τα δύο μεγαλύτερα είδη του γένους *Pleurotus*, το οποίο περιλαμβάνει επίσης και το μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* και το είδος αυτό αναπτύσσεται παρασιτικά στη ρίζα ή τη βάση των φυτών (Zervakis, Venturella, & Papadopoulou, 2001) της οικογένειας *Apiaceae*, δηλαδή κοινώς της οικογένειας σέλινου, καρότου ή μαϊντανού (Lindley, 1836). Αναπτύσσεται σε ομάδες από το Σεπτέμβριο έως τον Ιούνιο και διαθέτει χαρακτηριστικά παχύ, ελαστικό, καφέ, μπεζ ή καφέ-μπεζ με μερικές διασκορπισμένες ανοικτές καφέ κηλίδες σαρκωμένο στέλεχος, καθώς και ένα μικρό κυρτό, λείο, κυκλικό μυδοειδούς σχήματος και ελαφρώς ελικοειδή μαυρισμένο πύλο. Παράλληλα, έχει λεπτά ελάσματα, μέτριου μεγέθους πυκνότητας, χωρίς εμφανείς αναστομώσεις, χρώματος κρεμ και ανοιχτού μπεζ-πορτοκαλί (Zervakis & Balis, 1996).

Το *P.eryngii* περιγράφεται πλέον ως «ομάδα ειδών» λόγω των σημαντικών μορφολογικών διαφορών του (Lewinsohn, Wasser, Reshetnikov, Hadar, & Nevo, 2002), την ύπαρξη ποικίλων ισοενζύμων (Zervakis, Sourdis, & Balis, 1994) και γενετικών χαρακτηριστικών, τα οποία παρουσιάζονται ως απόρροια των γεωγραφικών ή/και οικολογικών διαφορών στο περιβάλλον που αναπτύσσεται (Lewinsohn, Nevo, Wasser, Hadar, & Beharav, 2001).

1.3.2. Καλλιέργεια

Αυτό το είδος καλλιεργείται επιτυχώς παρουσία διαφόρων υλικών φυτικής προέλευσης, που προέρχονται και από λιγνοκυτταρικά υπολείμματα, όπως πριονίδι, ζαχαροκάλαμο, κέλυφος βαμβακέλαιου, ψιλοκομμένο άχυρο ρυζιού, φλοιός ρυζιού με ή χωρίς διάφορα συμπληρώματα, απορρίμματα ελαιολάδου, φλούδα πορτοκαλιού και μίσχους σταφυλιών (Peng, Lee, & Tsai, 2000). Συγκεκριμένα, το άχυρο σίτου αποτελεί το κύριο γεωργικό παραπροϊόν, που παράγεται

από την παραγωγή σιταριού και είναι ένα από τα πιθανά υποστρώματα καλλιέργειας, όπως αναφέρθηκε, που χρησιμοποιείται ευρέως για την καλλιέργεια εδώδιμων μανιταριών και ειδικά του γένους *Pleurotus*. Αποτελείται από περίπου 35-45% κυτταρίνη, 20-30% ημικυτταρίνη και 8-15% λιγνίνη (Jeznabadi, Jafarpour, & Eghbalsaied, 2016). Αντίστοιχα, μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον φαίνεται να υπάρχει για τη χρήση υποστρώματος καλλιέργειας προερχόμενο από την παραγωγή προϊόντων οινοποίησης. Είναι γνωστό, πως το 80% της συνολικής παραγωγής σταφυλιών χρησιμοποιείται για την παραγωγή κρασιού και το υπόλοιπο 20% απορρίπτεται συνήθως, ως απόβλητο. Τα κύρια απόβλητα παραπροϊόντα κατά την οινοποίηση είναι οι μίσχοι (βόστρυχες), οι οινολάσπες και τα στέμφυλα (φλοιοί και γίγαρτα) και χρησιμοποιούνται ως πρώτη ύλη για βιομηχανικές διεργασίες βιομετατροπής, μέσω της διαδικασίας ζύμωσης στερεάς κατάστασης (SSF) (Papadaki, Kachrimanidou, Papanikolaou, Philippoussis, & Diamantopoulou, 2019).

Αυτού του τύπου η επιτυχής καλλιεργητική ικανότητα, του συγκεκριμένου στελέχους μανιταριού, βασίζεται στο πολυενζυμικό σύστημα που διαθέτει, το οποίο αποτελείται από τα ένζυμα λακάση, μη-οξειδωτική υπεροξειδάση και οξειδάση της αρυλαλκοόλης (Cohen, Persky, & Hadar, 2002). Ως αποτέλεσμα αυτής της ιδιότητας το *P. eryngii* καταβολίζει συστατικά του κάθε υποστρώματος και είναι σε θέση να συμμετέχει σε πολλές βιοτεχνολογικές διαδικασίες, όπως η παραγωγή αιθανόλης, η βιοαποικοδόμηση τοξικών βιομηχανικών αποβλήτων και η επακόλουθη χρήση του καταναλισκόμενου υλικού ως ζωοτροφή, παράγοντας βιομάζα με αξιόλογες διαιτητικές και φαρμακευτικές ιδιότητες, ενώ ταυτόχρονα ενισχύονται τα χαρακτηριστικά του καρποσώματος του (Zervakis, και συν., 2014).

1.3.3. Διατροφική αξία

Ο τύπος και η ποσότητα των θρεπτικών συστατικών που περιέχει τελικά, εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις συνθήκες καλλιέργειας του μανιταριού (Peng, Lee, & Tsai, 2000). Η μυρωδιά και η γεύση του χαρακτηρίζονται ως ήπιες (Manzi, Gambelli, Marconi, Vivanti, & Pizzoferrato, 1999) και διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, απαραίτητα αμινοξέα και υδατάνθρακες που το καθιστούν ιδανικό υποκατάστατο διατροφής αντί του κρέατος, ενώ αντίθετα έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και σχεδόν μηδενική περιεκτικότητα σε χοληστερόλη. Το πλούσιο σε ημικυτταρίνες τοίχωμά του συμπεριλαμβάνει β-γλυκάνες, γλυκουρονοξυλομαννάνη, πηκτικές ουσίες και χιτίνη και δρα ως σημαντική πηγή διαιτητικών ινών (Cheung, 2008). Ακόμα, το *P. eryngii* διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνες του

συμπλέγματος Β (Β1, Β2, Β12), είναι πλούσιο και σε βιταμίνες C, D, E και σε φυλλικό οξύ, καθώς επίσης αποτελεί μια αξιόλογη πηγή φωσφόρου, καλίου, σιδήρου, ψευδαργύρου, ασβεστίου, μαγνησίου, μαγγανίου και χαλκού (Maftoun, και συν., 2015).

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες που διαθέτει το συγκεκριμένο είδος αποτελούν τα πιο δραστικά συστατικά αυτού του μανιταριού, ενώ υπολογίζεται πως διαθέτει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε γλυκάνες τύπου α και τύπου β σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα είδη μανιταριών του γένους *Pleurotus* (Avni, και συν., 2017). Οι πολυσακχαρίτες αυτοί φαίνεται να εμφανίζουν αυξημένη βιοδραστικότητα, προσδίδοντάς του πολλές ενδιαφέρουσες βιολογικές δραστηριότητες, όπως αντικαρκινική, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, ηπατοπροστατευτική, υπολιπιδαιμική, αντιμικροβιακή, υπογλυκαιμική, ανοσοδιεγερτική, αντιαλλεργική και οιστρογονική (Fu, Liu, & Zhang, 2016). Όλες οι προαναφερθείσες θετικές επιδράσεις αυτού του μανιταριού στην υγεία του ανθρώπου, φαίνεται να οφείλονται στην πληθώρα των συστατικών που διαθέτει, όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 που παρατίθεται παρακάτω.

Πίνακας 1. Διατροφική και χημική σύνθεση του *Pleurotus eryngii*. Οι τιμές έχουν μετρηθεί σε ξηρό βάρος (Reis, Barros, Martins, & Ferreira, 2012).

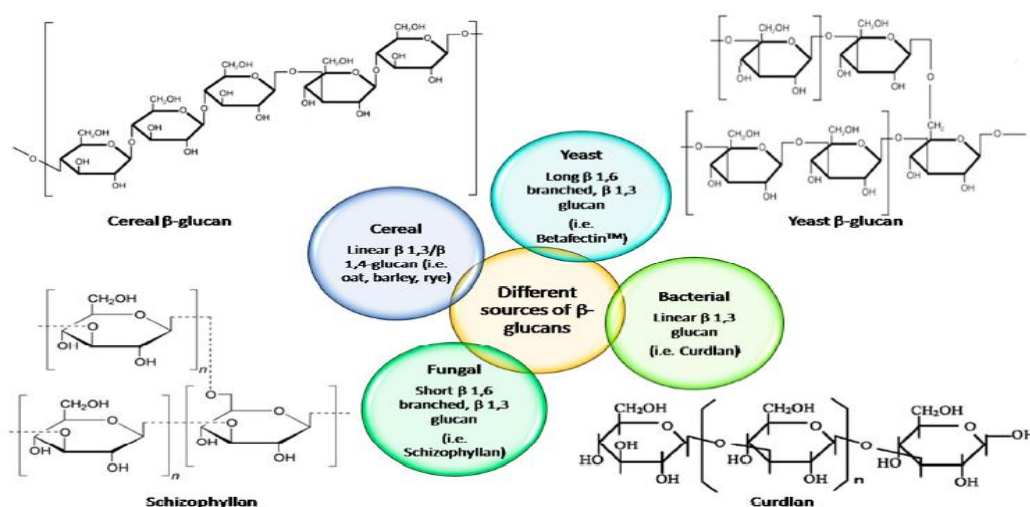
Θρεπτικά συστατικά	Σύσταση
Διατροφική αξία (% x 100 g)	
Υγρασία	93.09
Πρωτεΐνες	19.11
Λιπίδια	2.62
Ολικοί Υδατάνθρακες	51.71
Διαιτητικές ίνες	19.79
β-γλυκάνες (g/ 100g επί ξηρού)	38
β-γλυκάνες % (υδατοδιαλυτές)	16.8
β-γλυκάνες % (μη- υδατοδιαλυτές)	83.2
Ενέργεια (kcal/ 100 g fw)	39.84
Ελεύθερα σάκχαρα (g/100 g fw)	
Ολικά σάκχαρα	8.67
Μαννιτόλη	0.60
Σουκρόζη	0.03
Φρουκτόζη	0.03
Τρεχαλόζη	8.01
Τοκοφερόλες (μg/ 100 g fw)	
Ολική τοκοφερόλη	4.86
α – Τοκοφερόλη	0.25
β – Τοκοφερόλη	2.16
γ – Τοκοφερόλη	1.83
δ – Τοκοφερόλη	0.62

Λιπαρά Οξέα (% συνολικών λ.ο.)	
C16:0	12.8
C18:0	1.7
C18:1n9	12.3
C18:2n6	68.8
SFA(%)	17.4
MUFA(%)	13.1
PUFA(%)	69.4

f.w.: νωπό βάρος; C16:0 (παλμιτικό οξύ); C18:0 (στεατικό οξύ); C18:1n9c (ολεικό οξύ); C18:2n6c (λινολεικό οξύ); SFA (κορεσμένα λιπαρά οξέα); MUFA (μονοακόρεστα λιπαρά οξέα); PUFA (κορεσμένα λιπαρά οξέα)

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

Οι β-γλυκάνες ανήκουν στο κλάσμα των φυτικών ινών, στις διαιτητικές ίνες και απαντώνται ως άπεπτοι πολυσακχαρίτες, που αποτελούνται από μονομερή D-γλυκόζης, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μέσω β-γλυκοζιτικών δεσμών. Οι γλυκάνες υπάρχουν ως συστατικά στις ζύμες, τους μύκητες (συμπεριλαμβανομένων και των μανιταριών), σε μερικά βακτήρια, σε φύκια και σε δημητριακά όπως η βρώμη και το κριθάρι (Du, Meenu, Liu, & Xu, 2019). Συγκεκριμένα οι β-γλυκάνες εμφανίζουν σημαντικές διαφορές στη μακρομοριακή δομή τους ανάλογα με τις πηγές προέλευσής τους και μπορεί να εμφανίζονται, είτε ως γραμμικές αλυσίδες, είτε ως διακλαδισμένες δομές, όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 2. Οι β-1,3-D-γλυκάνες καθώς και οι β-1,4-D-γλυκάνες εντοπίζονται στα κυτταρικά τοιχώματα ανώτερων φυτών, καθώς και σε σπόρους ή δημητριακά, ενώ οι β-1,6-D-γλυκάνες όπως και οι β-1,3-D-γλυκάνες συντίθενται από μύκητες και ζύμες και αποτελούν βασικά βιοδραστικά συστατικά των μανιταριών, τα οποία μπορεί να περιέχονται, είτε στο κυρίως σώμα του μανιταριού, είτε στα σπόρια και στο μυκήλιό του (Zhu, Du, Bian, & Xu, 2015).



Εικόνα 2. Δομή και είδος διακλαδώσεων β-γλυκανών από διαφορετικές πηγές. (Du, Meenu, Liu, & Xu, 2019)

Η περιεκτικότητα των μανιταριών σε β-γλυκάνες επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες και εμφανίζει διακυμάνσεις, καθώς εξαρτάται από τις συνθήκες ανάπτυξης, τις ποικιλίες των μανιταριών και το βαθμό ωρίμανσης του καρποφόρου σώματος του μανιταριού, με τη βέλτιστη περιεκτικότητα να εμφανίζεται την περίοδο πριν την ωρίμανση των σπορίων (Stachowiak & Reguła, 2012). Συνήθως η περιεκτικότητα των μανιταριών σε β-γλυκάνες κυμαίνεται από 0.21 έως 0.53g/100g ξηρής μάζας εκ των οποίων το 54-82% ανήκει στις αδιάλυτες ίνες, ενώ το 16-46% ανήκει στις διαλυτές ίνες. Τη μέγιστη περιεκτικότητα στο μυκητιακό κυτταρικό τοίχωμα διαθέτουν οι β-1,3-γλυκάνες, που αποτελούν και το 65-90% όλων των β-γλυκανών του μύκητα. Οι φυσικές και θεραπευτικές ιδιότητες τους, εξαρτώνται από το μοριακό βάρος, τη χημική σύσταση, των αριθμό των διακλαδώσεων των πλάγιων αλυσίδων, καθώς και τη διαμόρφωσή τους στο χώρο. Ταυτόχρονα, η διαλυτότητα τους στο νερό ποικίλλει και βασίζεται στη διαφορετική δομή τους ανάλογα με το είδος των μανιταριών, αφού ακόμα και μικρές αλλαγές στη δομή, τους προσδίδουν διαφορετικές ιδιότητες και περαιτέρω δράσεις ως πρόσθετα τροφίμων (Zhu, Du, Bian, & Xu, 2015).

1.5. Ποια είναι τα οφέλη της κατανάλωσης β-γλυκανών στην υγεία;

Ποικίλες μελέτες έχουν αναδείξει τα τελευταία χρόνια την πολυδιάστατη επίδραση της κατανάλωσης τροφίμων πλούσιων σε β-γλυκάνες για τον ανθρώπινο οργανισμό. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η αυξημένη κατανάλωση συγκεκριμένων β-γλυκανών, όπως αυτές που προέρχονται από τα μανιτάρια, διαθέτουν αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδη και ανοσορρυθμιστική δραστηριότητα. Επιπλέον, οι β-γλυκάνες φαίνεται πως διαθέτουν και υποχοληστερολαιμικές, υποτριγλυκεριδαιμικές ιδιότητες μειώνοντας, τόσο την ολική χοληστερόλη, την LDL χοληστερόλη, ενώ ταυτόχρονα φαίνεται να συνεισφέρουν στη μείωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων και στην αύξηση της HDL χοληστερόλης (Zhu, Du, Bian, & Xu, 2015). Παράλληλα, προάγουν την υγεία μέσω της δράσης τους ως αντιϊικά, καρδιοπροστατευτικά, προστατευτικά του ήπατος, ακτινοπροστατευτικά, αντιδιαβητικά, αντιοξειδωτικά, αντιβακτηριακά και αντιβιοτικά (Jayachandran, Chen, Man, & Xu, 2018).

Μεταξύ των σημαντικότερων υποδοχέων, που προσδένονται οι β-γλυκάνες είναι η δεκτίνη-1, ο υποδοχέας τύπου 3 του συμπληρώματος (CR3) γνωστό και ως σύμπλεγμα διαφοροποίησης (CD) 11b / (CD) 18 και η λανγκερίνη (Sima, Vannucci, & Vetvicka, 2018). Η δεκτίνη-1 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου II, η οποία εντοπίζεται στα λευκοκύτταρα και εκφράζεται κυρίως στα ουδετερόφιλα, τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα.

Αλληλεπιδρώντας με την εκάστοτε γλυκάνη φωσφορυλιώνεται ο ανοσουποδοχέας ενεργοποίησης της τυροσίνης (ITAM) και αυτή η διαμεμβρανική σηματοδότηση προκαλεί διάφορες βιολογικές επιδράσεις, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής υπεροξειδίου, την αύξηση της φαγοκυττάρωσης και την επαγωγή τελεστών κυτοκινών ή αντιμυκητιακών. Όσον αφορά, τον CR3, πρόκειται για έναν υποδοχέα που αποτελεί μέρος της οικογένειας β2 της ιντεγκρίνης. Βρίσκεται κυρίως στα ουδετερόφιλα, στα μακροφάγα και στα φυσικά κύτταρα δολοφόνους. Ως μέρος του συστήματος συμπληρώματος, τα οποία προσδίδουν την έμφυτη ανοσία, ο CR3 είναι ο κύριος υποδοχέας που εμπλέκεται στην εκκαθάριση των iC3b-οψωνινοποιημένων παθογόνων μυκήτων από έναν οργανισμό, ενεργοποιώντας διαδικασίες κυτταροτοξικότητας, όπως η φαγοκυττάρωση και η αποκοκκίωση.

Πρόσφατες πειραματικές μελέτες, που διερεύνησαν τα μονοπάτια σηματοδότησης, που ενεργοποιούνται από την παρουσία β-γλυκανών, έδειξαν ότι ο πυρηνικός παράγοντας NF-kB ενεργοποιείται μέσω της δραστηριότητας του αναστολέα της β-κινάσης του NF-kB και της επακόλουθης μεταβολής της φωσφορυλίωσης και της αποικοδόμησης του παράγοντα IκBa, ο οποίος αναστέλει τον NF-kB (Legentil, και συν., 2015). Σημαντικό ρόλο σε αυτό το μονοπάτι διαθέτει και η τυροσινική κινάση (SYK), η οποία δρα συνεργιστικά με το CR3, προκειμένου να επιτευχθεί ανοσολογική ενεργοποίηση των κυττάρων και κυτταροτοξική δραστηριότητα (Li, και συν., 2019). Τέλος, η λανγκερίνη, η οποία επίσης ανήκει στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες τύπου II, εκφράζεται πιο συχνά στα κύτταρα Langerhans, φέροντας έναν τύπο C λεκτίνης και αποτελείται από δύο βασικά μέρη, μια περιοχή που αναγνωρίζει υδατάνθρακες εξαρτώμενη από το ασβέστιο και μια περιοχή που μπορεί να σχηματίσει τριμερή (Jong, και συν., 2010). Παρόλα αυτά, η τρέχουσα κατανόηση της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης που εμφανίζεται μετά την πρόσδεση όλων των διαφορετικών τύπων β-γλυκανών παραμένει ατελής, καθώς επίσης και η διερεύνηση όλων των ανταγωνιστικών υποδοχέων, που είναι πιθανώς ικανοί να δεσμεύουν τις β-γλυκάνες και να επηρεάζουν την αποικοδόμησή τους και την αξιοποίησή τους από τα κύτταρα.

1.6. Ποια είναι η πρεβιοτική δράση των μανιταριών;

Το 2004 ο ορισμός των πρεβιοτικών ουσιών αναθεωρήθηκε από την ομάδα του Gibson, όπου πλέον ως πρεβιοτικό θεωρήθηκε «ένα επιλεκτικά ζυμωθέν συστατικό, που επιτρέπει συγκεκριμένες αλλαγές τόσο στη σύνθεση όσο και στη δραστηριότητα της εντερικής μικροχλωρίδας, παρέχοντας ωφέλιμες αλλαγές σε αυτήν» (Gibson, Probert, Van Loo, Rastall, &

Roberfroid, 2004). Παρόλο που όλα τα πρεβιοτικά ανήκουν ταυτόχρονα στις διαιτητικές ίνες, δε διαθέτουν όλες οι διαιτητικές ίνες πρεβιοτική δράση. Η ταξινόμηση ενός συστατικού τροφίμου ως πρεβιοτικό απαιτεί επιστημονική απόδειξη ότι το συστατικό αυτό έχει την ικανότητα να:

- Είναι ανθεκτικό στη γαστρική οξύτητα, στην υδρόλυση από τα ένζυμα των θηλαστικών και στην απορρόφηση από τον ανώτερο γαστρεντερικό σωλήνα.
- Ζυμώνεται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο.
- Διεγείρει επιλεκτικά την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των εντερικών βακτηρίων που σχετίζονται ενδεχομένως με την υγεία.

(Slavin, 2013)

Οι β-γλυκάνες, όπως ήδη αναφέρθηκε φαίνεται να εμφανίζουν πιθανή πρεβιοτική δράση στον ανθρώπινο οργανισμό και απασχολούν έντονα το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας, αφού διαθέτουν τα κριτήρια για την ταξινόμησή τους ως πρεβιοτικές ουσίες. Από την άλλη, αποτελούν επίσης κύρια συστατικά των μανιταριών, όπως ήδη περιγράφηκε, καθώς η ανικανότητα των υδατανθράκων, που περιέχονται στα μανιτάρια, να διασπαστούν και να απορροφηθούν, όπως είναι, τα κατατάσσουν ως δυνητική πηγή πρεβιοτικών. Τα μανιτάρια έχουν χρησιμοποιηθεί από την αρχαιότητα, όχι μόνο ως πηγή τροφής αλλά και ως πηγή ιατροφαρμακευτικών δυνατοτήτων. Οι ιδιότητες αυτές των μανιταριών έχουν επιβεβαιωθεί μέσω εντατικής έρευνας που διεξάγεται παγκοσμίως, εδώ και δεκαετίες (Aida, Shuhaimi, Yazid, & Maaruf, 2009). Σήμερα, πολλά διαφορετικά είδη *Pleurotus* καλλιεργούνται σε καθολικό επίπεδο, λόγω και του μικρού κύκλου ζωής τους, της υψηλής ικανότητας αναπαραγωγικότητάς τους, της υφής, της γεύσης, του αρώματός τους, της πληθώρας τρόπων μαγειρικής παρασκευής και όλων των ευεργετικών δράσεων που φαίνεται να φέρουν στον ανθρώπινο οργανισμό (Deepalakshmi & Mirunalini, 2014). Ως αποτέλεσμα, λόγω όλων αυτών των χαρακτηριστικών τους, η ανάπτυξη ενός πιθανού πρεβιοτικού από οικονομικά και σε αφθονία υλικά, όπως είναι τα μανιτάρια, θεωρείται μία ιδανική επιλογή.

ΚΕΦ. 2 : Εντερικός Μικροβιόκοσμος

2.1. Ορισμός και χρησιμότητα

Ο άνθρωπος, όπως και όλοι οι πολυκύτταροι οργανισμοί αποικίζεται από μία πληθώρα ζωντανών μικροοργανισμών στο σύνολο του σώματός του. Είναι γνωστό, πως οι μικροοργανισμοί που «κατοικούν» στο ανθρώπινο σώμα, είναι κυρίως βακτήρια, τα οποία αποτελούν και εντονότατο αντικείμενο παγκόσμιου ερευνητικού ενδιαφέροντος, ενώ ανιχνεύονται και οι υπόλοιπες μορφές κυτταρικής ζωής, δηλαδή τα ευκάρια και τα αρχαία, αλλά και μη κυτταρικής, όπως οι ιοί, οι οποίες δεν έχουν μελετηθεί ακόμα επαρκώς (Sekiron, Russel , Antunes, & Finlay, 2010). Τα τελευταία χρόνια μετά την ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος το επιστημονικό ενδιαφέρον έχει μετατοπιστεί στη χαρτογράφηση του ανθρώπινου μικροβιόκοσμου και ειδικά του εντερικού μικροβιόκοσμου, που ορίζεται ως «το σύνολο των μικροοργανισμών που αποικίζουν τον εντερικό αυλό των ζωντανών οργανισμών».

Υψηλής ποιότητας δεδομένα έχουν προκύψει, έπειτα από την ολοκλήρωση του US Human Microbiome Project (HMP) (The Human Microbiome Project Consortium., 2012) και του European Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT) (Qin, και συν., 2010) με τα περισσότερα δεδομένα να προέρχονται από δείγματα κοπράνων και σε μικρότερο βαθμό από βιοψίες εντερικού βλεννογόνου και από αναθεωρημένα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών έχει υπολογιστεί ότι ο συλλογικός ανθρώπινος εντερικός μικροβιόκοσμος ενός ατόμου περίπου 70 κιλών αποτελείται από $3,8 \times 10^{13}$ βακτηριακά κύτταρα (Sender, Fuchs, & Milo, 2016) διαθέτοντας περισσότερα από 35.000 βακτηριακά είδη (Sittipo, Shim, & Lee, 2019), όταν το σύνολο των κυττάρων στο ανθρώπινο σώμα είναι 3×10^{13} κύτταρα (αναλογία 1:1) (Sender, Fuchs, & Milo, 2016). Η πλειονότητα των βακτηρίων αυτών, που εντοπίζονται στο παχύ έντερο, είναι μη παθογόνα, έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται υπό αναερόβιες συνθήκες και συνυπάρχουν με τα εντεροκύτταρα διαμορφώνοντας με τον ξενιστή μία συμβιωτική σχέση. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος προσδίδει σημαντικές μεταβολικές, ανοσολογικές και εντεροπροστατευτικές λειτουργίες στο υγιές άτομο (Jandhyala, και συν., 2015). Πλέον χαρακτηρίζεται ως όργανο με ενδοκρινή δράση, αφού διευκολύνει τη μετατροπή των θρεπτικών συστατικών και της ενέργειας, που προκύπτουν από την κατανάλωση τροφής και παράγει πολυάριθμους μεταβολίτες που ενεργοποιούν μονοπάτια σηματοδότησης, μέσω των συγγενών υποδοχέων τους, οι οποίοι ρυθμίζουν το μεταβολισμό του ξενιστή (Li, και συν., 2020). Ταυτόχρονα, παρόλο

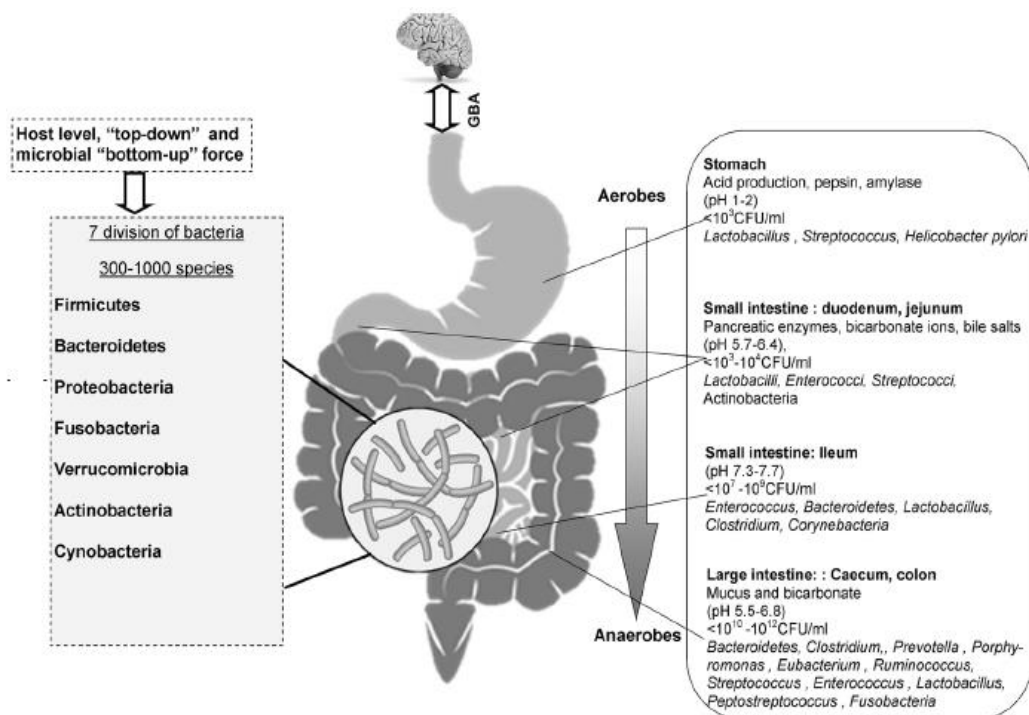
που η βιολογική επίδραση των γονιδίων των μεταβολιτών αυτών, παραμένει ελάχιστα καθορισμένη, έχει αποδειχθεί ευρέως ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος δρα πολυσυστημικά. Συγκεκριμένα, έχει την ικανότητα να ρυθμίζει την άμυνα του ανοσοποιητικού συστήματος, παρέχοντας προστασία έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών που εισβάλλουν στον οργανισμό του ξενιστή μέσω της δράσης του εντερικού φραγμού, να μεταβολίζει τα χολικά οξέα και τα ξενοβιοτικά, να εξασφαλίζει την εύρυθμη λειτουργία του εγκεφάλου και την ομοιόσταση του οστικού μεταβολισμού, να συνθέτει αμινοξέα, λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFA) και βιταμίνες (κυρίως βιταμίνη K, B12) (Busnelli, Manzini, & Chiesa, 2019).

Παρόλα αυτά, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως οι λειτουργίες αυτές παραμένουν σταθερές σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των ατόμων, ενώ η ισορροπία του εντερικού μικροβιόκοσμου κάθε ατόμου χαρακτηρίζεται από ένα συγκεκριμένο συνδυασμό βακτηριακών ειδών, ένα «μικροβιακό αποτύπωμα» (Rinninella, και συν., 2019). Αυτό προκύπτει από την επίδραση ποικίλων περιβαλλοντικών, γενετικών και συμπεριφοριστικών παραγόντων, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται μεγάλη διατομική και ενδοατομική ποικιλότητα στο σύνολο του πληθυσμού, γεγονός που δυσκολεύει την αναγωγή των αποτελεσμάτων των ερευνητικών μελετών σε γενικό επίπεδο, ενώ από την άλλη αποτελεί ένα εξαιρετικό εργαλείο για την εξασφάλιση, μελλοντικά, κάποιου είδους στοχευμένης και εξατομικευμένης παρέμβασης σε κάθε άτομο (Healey, Murphy, Brough, Butts, & Coad, 2017).

2.2. Σύσταση και δομή

Η γαστρεντερική οδός αποτελείται ανατομικά από το στομάχι, το λεπτό έντερο και το παχύ έντερο. Το κάθε επιμέρους τμήμα ανάλογα με τις λειτουργίες που επιτελεί διαθέτει ένα διακριτό μικροπεριβάλλον, το οποίο επιτρέπει την ανάπτυξη συγκεκριμένων μικροβιακών πληθυσμών (Adak & Mojibur R., 2018). Το μικροπεριβάλλον αυτό, υπό φυσιολογικές συνθήκες, ευνοεί κυρίως την ανάπτυξη βακτηρίων από επτά κυρίαρχα φύλα: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia και Cyanobacteria. Μεταξύ αυτών, τα βακτήρια των φύλων Bacteroidetes (κυρίαρχα γένη: *Alistipes*, *Bacteroides* και *Prevotella*) και Firmicutes (κυρίαρχα γένη: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Blautia*, *Roseburia*, *Ruminococcus* και *Faecalibacterium*) αποτελούν περισσότερο από το 90% του συνολικού πληθυσμού του εντερικού μικροβιόκοσμου, με δευτερεύουσας έκτασης τα βακτήρια αυτά που προέρχονται από τα φύλα Actinobacteria (κυρίαρχο γένος: *Bifidobacterium*), Verrucomicrobia (κυρίαρχο γένος: *Akkermansia*) και Proteobacteria (κυρίαρχο γένος: *Escherichia*)

(Jandhyala, και συν., 2015). Παρόλο που αυτό το γενικό προφίλ παραμένει δυναμικά σταθερό, η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου, παρουσιάζει χωρικές διαφορές κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού, όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 3, εμφανίζοντας σταδιακή αύξηση του αριθμού των μικροβιακών πληθυσμών καθόλου του μήκους της, καθώς και διαφοροποιήσεις και στην αναλογία τους κατά το πλάτος του γαστρεντερικού σωλήνα (Sekirov, Russel , Antunes, & Finlay, 2010).



Εικόνα 3. Κατανομή των μικροβιακών πληθυσμών κατά μήκος της γαστρεντερικής οδού (Adak & Mojibur R., 2018).

Αρχικά, από το ύψος του οισοφάγου έως το στομάχι εντοπίζονται 10^1 έως 10^3 βακτήρια ανά γραμμάριο περιεχομένου (Jandhyala, και συν., 2015), με το γένος *Streptococcus*, να κυριαρχεί στον οισοφάγο και το γένος *Helicobacter* στο στομάχι, το οποίο καθορίζει τη σύσταση του γαστρικού μικροβιόκοσμου. Συγκεκριμένα, όταν το *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) εντοπίζεται στο στομάχι συνοδεύεται και από μια πλούσια ποικιλία και άλλων γενών, όπως τα *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Haemophilus* και *Rothia*, ενώ η ποικιλότητα αυτή διαταράσσεται όταν αποκτά παθολογικό φαινότυπο (Adak & Mojibur R., 2018). Προχωρώντας κατά μήκος του λεπτού εντέρου, τα βακτήρια αυξάνονται από 10^3 (στο δωδεκαδάκτυλο), 10^4 (στη νησιδα) έως 10^9 (στον ειλεό) ανά γραμμάριο περιεχομένου. Η ποικιλομορφία των βακτηριακών πληθυσμών στο δωδεκαδάκτυλο είναι περιορισμένη, με τα φύλα Firmicutes και Actinobacteria να κυριαρχούν, καθώς λειτουργεί ως οδός ταχείας διέλευσης των τροφών και

διαθέτει υψηλή περιεκτικότητά σε χολικά οξέα, παγκρεατικές εκκρίσεις, αντιμικροβιακούς παράγοντες και οξυγόνο. Από την άλλη, η νήστιδα υποστηρίζει το βακτηριακό αποικισμό, ευνοώντας κυρίως την ανάπτυξη Gram θετικών αερόβιων και προαιρετικών αναερόβιων βακτηρίων, όπως τα γένη των *Lactobacilli*, *Enterococci* και *Streptococci*. Στην έναρξη του τμήματος του ειλεού κυριαρχούν τα αερόβια γένη π.χ. *Corynebacteria*, ενώ στο τελικό τμήμα του ειλεού πλησίον της ειλεοτυφλικής βαλβίδας εντοπίζονται Gram αρνητικά, αναερόβια βακτήρια, παρόμοια με αυτά που αποικίζουν το κόλον (π.χ. γένη *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacteroidetes*, *Clostridium*).

Ο πληθυσμός των βακτηρίων κορυφώνεται στο κόλον και στο κατιόν κόλον, όπου εκεί εντοπίζονται 10^{10} έως 10^{12} βακτήρια ανά γραμμάριο περιεχομένου (Sekiron, Russel, Antunes, & Finlay, 2010). Στο παχύ έντερο, ο αριθμός των αναερόβιων βακτηρίων υπερβαίνει αυτόν των αερόβιων και κυριαρχείται κυρίως από τα φύλα των Firmicutes και Bacteroidetes και εμφανίζεται εξαιρετικά μεγάλη ποικιλία γενών, όπως τα *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Ruminococcus*, τα οποία εντοπίζονται κυρίως στον αυλό του, ενώ στις βλενογόννιες στιβάδες κυριαρχούν τα γένη *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* και *Akkermansia*. Τέλος, μπορεί να εμφανίζονται σε πολύ μικρή αφθονία (0,1%), ορισμένα βακτήρια γνωστά ως παθογόνα, αλλά όχι με παθολογική δράση σε αυτές τις συγκεντρώσεις, όπως το *Campylobacter jejuni*, το *Salmonella enterica*, το *Vibrio cholerae*, το *E coli* και το *Bacteroides fragilis* (Adak & Mojibur R., 2018).

Εκτός από αυτή τη διαμήκη ποικιλότητα των μικροβιακών πληθυσμών στο γαστρεντερικό αυλό, εντοπίζεται επίσης και αξονική διαφοροποίηση από τον αυλό προς την επιφάνεια του βλεννογόνου του εντέρου. Τα κυρίαρχα μικροβιακά γένη, των οποίων οι συγκεντρώσεις ανιχνεύονται σε υλικό κενώσεων είναι τα *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* και *Ruminococcus*, ενώ τα γένη *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* και *Akkermansia* είναι αυτά που εντοπίζονται κυρίως στις βλεννογόνιες στιβάδες και στις επιθηλιακές κρύπτες του λεπτού εντέρου, έπειτα από βιοψίες (Jandhyala, και συν., 2015). Συνεπώς, καθίσταται σαφές, πως λόγω της ποικιλομορφίας των μικροβιακών πληθυσμών στον εντερικό αυλό, διαφοροποιείται και το είδος των ερευνητικών μεθοδολογικών προσεγγίσεων, προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Παρόλα αυτά, η διεξαγωγή πρωτοκόλλων που περιλαμβάνουν τη λήψη ιστολογικών δεδομένων, μέσω εντερικής βιοψίας, διαθέτουν πρακτικές δυσκολίες,

λόγω ζητημάτων βιοηθικής, με άμεση απόρριψη την ανεπιτυχή πολλές φορές συσχέτιση του εντερικού μικροβιόκοσμου με παθήσεις του εντέρου (Μεντής & Γύπας, 2013).

2.2.1. Διατομική διαφοροποίηση

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα εν γένει κυρίαρχα εντερικά βακτήρια, που εντοπίζονται σε ενήλικο πληθυσμό, φαίνεται ότι διέπονται από σταθερότητα, καθόλη την πάροδο του χρόνου. Ωστόσο, μελέτες παρατήρησης ανέδειξαν το φαινόμενο της δια- και ενδο-ατομικής μεταβλητότητας της σύστασης των εντερικών μικροβιακών πληθυσμών, η οποία φαίνεται να οφείλεται σε ποικίλους παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο, η κατανάλωση αντιβιοτικών, η παρουσία νόσου και το είδος διατροφής (Healey, Murphy, Brough, Butts, & Coad, 2017).

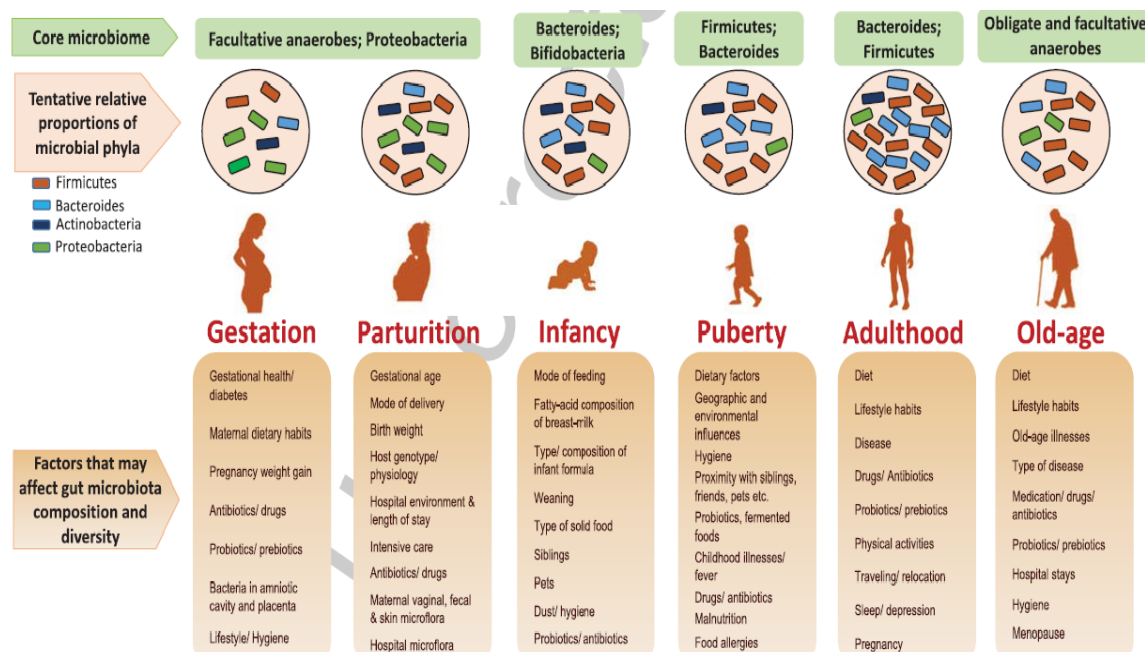
Το 2011 προτάθηκε από το Consortium MetaHIT, ο όρος του «εντερότυπου», περιγράφοντας τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου ως "πυκνοκατοικημένες περιοχές σε ένα πολυδιάστατο χώρο κοινοτικής σύστασης", οι οποίες είναι ανεξάρτητες από την ηλικία, το φύλο, το πολιτισμικό υπόβαθρο και τη γεωγραφική προέλευση του κάθε ατόμου, αλλά μπορούν να ανταποκριθούν διαφορετικά στη διατροφή και τα αντιβιοτικά. Ανάλογα με το είδος του περιεχόμενου μικροβιακού πληθυσμού σε κόπρανα, που εντοπίζεται σε μεγαλύτερη αφθονία σε ένα άτομο μπορεί να καταταχθεί σε τρεις επιμέρους κατηγορίες εντεροτύπου του υγιούς πληθυσμού. Τον Εντερότυπο τύπου 1, ο οποίος χαρακτηρίζεται από υψηλούς πληθυσμούς του γένους *Bacteroides*, τον Εντερότυπο τύπου 2, στον οποίο αφθονούν βακτήρια του γένους *Prevotella* και τον Εντερότυπο τύπου 3, ο οποίος σχετίζεται με υψηλότερους πληθυσμούς του γένους *Ruminococcus* (είδος Firmicutes) (Arumugam, και συν., 2011).

Αναλυτικότερα, οι βακτηριακοί πληθυσμοί που ανήκουν στον Εντερότυπο Τύπου 1 διαθέτουν σακχαρολυτικές και πρωτεολυτικές δυνατότητες, όπως αποδεικνύεται από την παρουσία γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα όπως πρωτεάσες, εξωαμινιδάσες και γαλακτοσιδάσες (Jandhyala, και συν., 2015). Λαμβάνοντας υπόψη αυτήν την πληθώρα ενζυματικών συνόλων, πιθανολογείται, πως αυτοί οι οργανισμοί αντλούν ενέργεια μέσω της διατροφικής κατανάλωσης υδατανθράκων και εμπλέκονται στη σύνθεση της βιοτίνης, της ριβοφλαβίνης, του παντοθενικού και του ασκορβικού οξέος. Ο Εντεροτύπος τύπου 2 συνοδεύεται κυρίως από την αποικοδόμηση των γλυκοπρωτεϊνών βλεννίνης, που είναι υπεύθυνες για την ευθυγράμμιση των στιβάδων του βλεννογόνου του εντέρου και λαμβάνει μέρος στη σύνθεση της θειαμίνης και του φολικού οξέος, ενώ ο Εντεροτύπος τύπου 3 επίσης συσχετίζεται με την αποικοδόμηση βλεννίνης και με την μεμβρανική μεταφορά σακχάρων. Από

την άλλη, νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι ο διαχωρισμός αυτός δεν είναι τόσο απλός, καθώς δεν είναι γνωστοί οι περιβαλλοντικοί και γενετικοί παράγοντες που καθορίζουν τη διαμόρφωση του εκάστοτε εντερότυπου και πως στην πραγματικότητα υπάρχουν πολλές ενδιάμεσες καταστάσεις στο ανθρώπινο έντερο (Adak & Mojibur R., 2018). Εξαιτίας της εξαγωγής συμπερασμάτων μέσω υλικού κενώσεων, οι οποίες δεν είναι αντιπροσωπευτικές του μικροβιακού συνόλου του εντερικού αυλού, αναμένεται η διεξοδικότερη και βαθύτερη ανάλυση με στόχο την εύρεση ενός αξιόπιστου «ατομικού εντερότυπου» τόσο σε υγιή πληθυσμό, όσο και σε πληθυσμό που υφίσταται συνθήκες εντερικής δυσβίωσης λόγω παρουσίας νόσου.

2.2.2. Ενδοατομική διαφοροποίηση

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος υφίσταται ποικίλες μεταβολές καθόλη τη διάρκεια της ζωής του ατόμου (Εικόνα 4), με κυριότερους παράγοντες επίδρασης να αναφέρονται η ηλικία, το φύλο, η παρουσία νόσου, η διατροφή, η κατανάλωση αντιβιοτικών και ο γενικός τρόπος ζωής (Healey, Murphy, Brough, Butts, & Coad, 2017).



Εικόνα 4. Μεταβολές στο μικροβιακό οικοσύστημα του ανθρώπινου εντέρου που σχετίζονται με την ηλικία και πιθανοί παράγοντες που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τη σύσταση των μικροοργανισμών σε διαφορετικά στάδια της ζωής. (Nagral, και συν., 2018)

2.2.2.1. Ηλικία

Όσον αφορά τις χρονικές πτυχές της εγκατάστασης και εξέλιξης της σύστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου, έχει αποδειχθεί ότι ο ανθρώπινος γαστρεντερικός αυλός αποικίζεται όχι μόνο έπειτα από τη γέννηση του εμβρύου, αλλά πρόσφατες ενδείξεις υποστηρίζουν τον αποικισμό του εντερικού αυλού καθόλη τη διάρκεια της κύησης μέσα στην μήτρα της μέλλουσας μητέρας, η οποία μέχρι σήμερα θεωρούνταν μικροβιακά στείρο περιβάλλον (Perez-Muñoz, Arrieta, Ramer-Tait, & Walter, 2017). Η ανάπτυξη του εντερικού μικροβιόκοσμου κατά τη βρεφική ηλικία θεωρείται ότι συνεισφέρει καταλυτικά στην ωρίμανση του ανοσοποιητικού συστήματος του νεογνού και μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στην μετέπειτα εμφάνιση ατοπικών, αυτοάνοσων και φλεγμονωδών ασθενειών (Healey, Murphy, Brough, Butts, & Coad, 2017).

Η περίοδος αναφοράς, κατά την οποία εγκαθίσταται η διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμου του ατόμου, είναι η μεταγεννητική περίοδος, κατά την οποία το νεογνό μεταφέρεται από το ελεγχόμενο περιβάλλον της μήτρας σε έναν κόσμο γεμάτο μικρόβια, κατά την οποία η επιφάνεια του δέρματος και οι βλεννογόνοι του νεογνού σταδιακά αποικίζονται από μικροοργανισμούς. Ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν πως η σύσταση του μικροβιακού φορτίου στον εντερικό αυλό των νεογνών καθορίζεται κυρίως από το είδος του τοκετού (φυσιολογικός τοκετός ή καισαρική), την έκθεση του νεογνού στα μικρόβια του περιβάλλοντος, την ενδεχόμενη κατανάλωση αντιβιοτικών κατά τους πρώτους μήνες ζωής του και από το είδος της βρεφικής τροφής (μητρικός θηλασμός ή/και συμπληρωματική χορήγηση φόρμουλας γάλακτος) (Healey, Murphy, Brough, Butts, & Coad, 2017). Το πρωτογενές μικροβιακό φορτίο που προκύπτει έπειτα από τη γέννα του νεογνού εμφανίζεται εν γένει ασταθές και στερείται ποικιλότητας, ενώ σε βάθος χρόνου, περίπου ηλικίας 3 ετών, διαφοροποιείται παρουσιάζοντας σταθερότητα και ομοιότητα με αυτό ενός ενήλικα κατά 40%-60%. Παρόλα αυτά, ο εντερικός μικροβιόκοσμος παιδιών και εφήβων παρουσιάζει διαφορές στην αναλογία των *Bacteroides* και *Bifidobacterium* σε σχέση με αυτού των ενηλίκων.

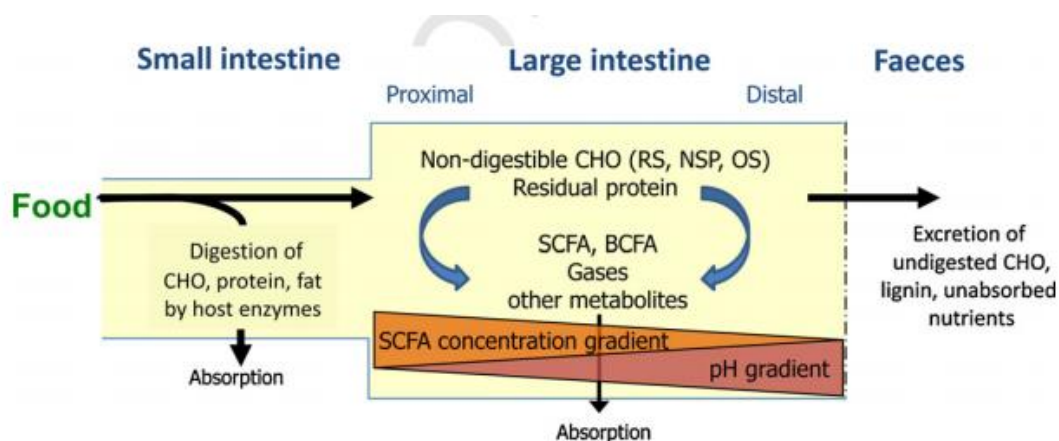
Αντίστοιχα, παρόλο που ο εντερικός μικροβιόκοσμος σε μεγάλο βαθμό διατηρείται σε μια σταθερή κατάσταση από την 3^η έως την 7^η δεκαετία της ζωής ενός ατόμου, οι αναλογίες των *Bifidobacteria*, *Firmicutes* και *Fecalibacterium prausnitzii* τείνουν να μειώνονται, ενώ παρατηρείται αύξηση των *E.coli*, *Proteobacteria* και *Staphylococcus* (Jandhyala, και συν., 2015). Η αύξηση αυτών των πληθυσμών έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση νοσογόνων καταστάσεων,

οι οποίες συνοδεύονται από χαμηλού βαθμού χρόνια φλεγμονώδη απόκριση και έκκριση κυτταροκινών, οι οποίες σε συνδυασμό με διατροφικά προβλήματα που παρουσιάζονται συνήθως σε άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών, οδηγούν σε δυσβιωτική κατάσταση του εντερικού αυλού (Keenan, Marco, Ingram, & Martin, 2015). Γενικότερα, η γήρανση σχετίζεται με μια αναπόφευκτη χρονοεξαρτώμενη μείωση της φυσιολογικής λειτουργικότητας και της ομοιοστατικής ικανότητας του ανθρώπινου οργανισμού, με αποτέλεσμα τη δια βίου συσσώρευση βλαβών τόσο σε μοριακό όσο και σε κυτταρικό επίπεδο (Αη, και συν., 2018). Παρόλα αυτά, χωρίς να έχει διευκρινισθεί ακόμα εάν ένας δυσλειτουργικός γαστρεντερικός αυλός αποτελεί την αιτία ή το αποτέλεσμα του γήρατος, έχει υπονοηθεί ότι η διατήρηση της ομοιόστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου, είναι ζωτικής σημασίας για την επίτευξη της υγιούς γήρανσης και επομένως η αποκατάσταση αυτής της ομοιόστασης μπορεί να είναι υποστηρικτικό μέσο για την ανθρώπινη μακροζωία (Nagrai, και συν., 2018).

2.2.2.2. Διατροφή

Η διατροφή εξακολουθεί να είναι ο πιο σημαντικός καθοριστικός παράγοντας στη διαμόρφωση της σύνθεσης, της ποικιλομορφίας και της αφθονίας του εντερικού μικροβιόκοσμου ενός ατόμου, έπειτα από τη γέννησή του καθόλη τη διάρκεια της ζωής του. Έχει προταθεί πως οι τροποποιήσεις που προκαλούνται, λόγω αλλαγών στις διατροφικές συνήθειες ενός ατόμου, στη σύσταση των μικροβιακών πληθυσμών του γαστρεντερικού σωλήνα, προκύπτουν χάρη στη σακχαρολυτική ικανότητα της εκάστοτε βακτηριακής κοινότητας που τον αποικίζει. Επιπλέον, το περιβάλλον του εντερικού αυλού, όπως το pH, η διαθεσιμότητα του υποστρώματος και οι συγκεντρώσεις χολικών αλάτων δύνανται να επηρεάσουν την επιβίωση των βακτηριακών ειδών, παράγοντες οι οποίοι εξαρτώνται άμεσα από το είδος της διατροφής (Εικόνα 5) (Healey, Murphy, Brough, Butts, & Coad, 2017).

Η ημερήσια σύσταση των γευμάτων τόσο στις κύριες κατηγορίες μακροθρεπτικών συστατικών (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπαρά) όσο και σε μικροθρεπτικά συστατικά, επηρεάζει τις πεπτικές εκκρίσεις, την απορρόφηση και το χρόνο διέλευσης της τροφής κατά μήκος του γαστρεντερικού αυλού. Καθημερινά, καταλήγουν άπεπτα στο παχύ έντερο περίπου

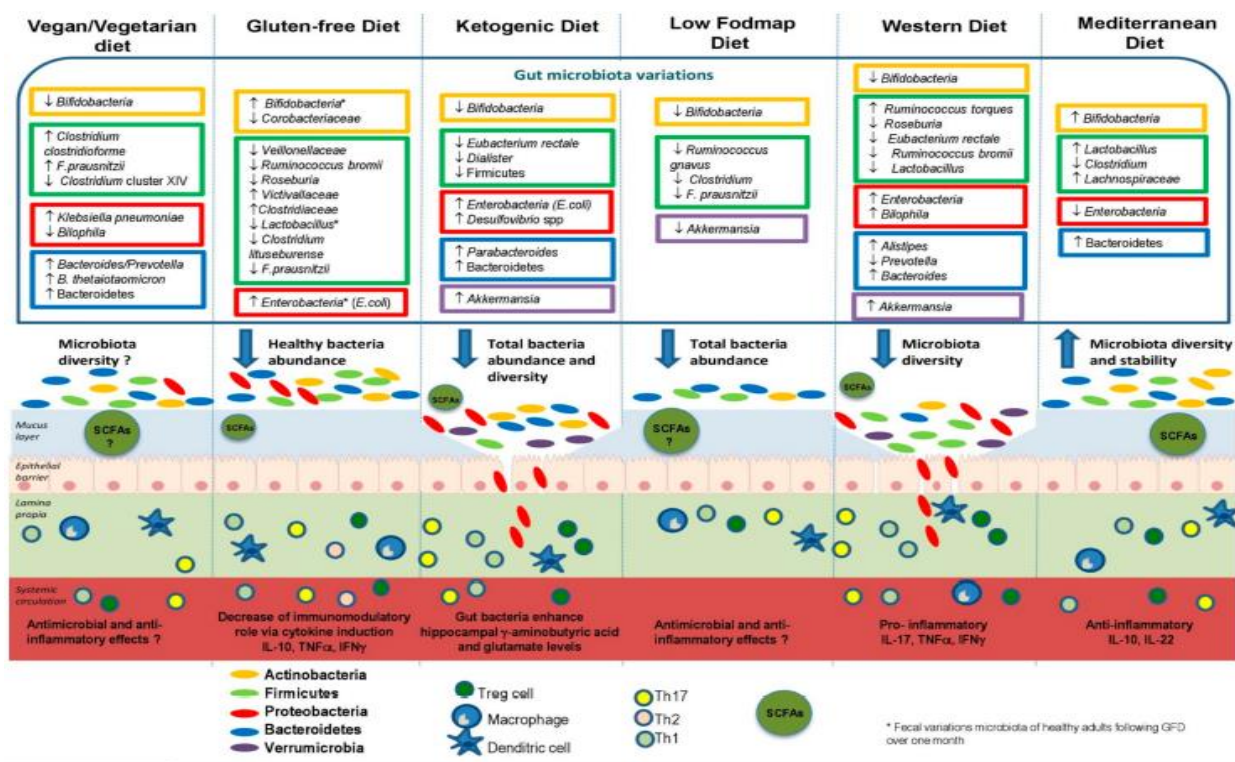


Εικόνα 5. Η διαδικασία της πέψης των επιμέρους διατροφικών υποστρωμάτων στο λεπτό και στο παχύ έντερο. CHO υδατάνθρακες, RS : ανθεκτικό άμυλο NSP: μη αμυλούχος πολυσακχαρίτης, OS: ολιγοσακχαρίτης, SCFA: λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας, BCFA: λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλυσίδας. (Scott, Gratz, Sheridan, Flint, & Duncan, 2013)

40 γρ. υδατανθράκων, 12 με 18 γρ. πρωτεϊνών και 2 με 10 γρ. λίπους, τα οποία χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα των μικροβιακών πληθυσμών του εντέρου (Scott, Gratz, Sheridan, Flint, & Duncan, 2013). Οι μικροοργανισμοί που ενδημούν εκεί τα διασπούν σε μικρότερες ενώσεις, ενώ ταυτόχρονα προκύπτουν και ενδογενή συστατικά όπως βλέννες, απόβλητα των μικροοργανισμών κ.α. Τα συστατικά αυτά ζυμώνονται στη συνέχεια από τους μικροοργανισμούς και από τις ζυμώσεις αυτές παράγεται μεταβολική ενέργεια και μεταβολίτες, οι οποίοι διαφοροποιούνται ανάλογα με το είδος του υποστρώματος (Jandhyala, και συν., 2015). Ταυτόχρονα, εκτός από τα επιμέρους συστατικά της διατροφής καταλυτικό ρόλο φαίνεται να διαθέτουν και τα διατροφικά πρότυπα, τα οποία ακολουθεί το κάθε άτομο (Εικόνα 6). Μελέτες έχουν δείξει πως η ποικιλότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου ελαττώνεται όταν αντικαθίσταται μία διατροφή, που βασίζεται στην υψηλή κατανάλωση υδατανθράκων (φρούτα, λαχανικά, καρποί) π.χ. Μεσογειακό διατροφικό πρότυπο, με μία που βασίζεται στην υψηλή κατανάλωση λίπους (κορεσμένα λιπαρά, ενεργειακά πυκνά τρόφιμα) π.χ. Δυτικού τύπου διατροφικό πρότυπο (Filippo, και συν., 2010) (Bailey & Holscher, 2018).

Η «Δυτικού» τύπου Διατροφή (WD), αποτελεί το πιο κοινό πλέον διατροφικό πρότυπο που ακολουθείται από τους περισσότερους ανθρώπους των ανεπτυγμένων και αναπτυσσόμενων χωρών, καθώς συνδέεται με την οικονομική ανάπτυξη. Η WD βασίζεται στην κατανάλωση λίπους, ζωικών πρωτεϊνών και ραφινάρισμένων σακχάρων. Η ομάδα της M. Medina έδειξε ότι ένας συνδυασμός δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά / υψηλής περιεκτικότητας σε ζάχαρη σε ποντίκια οδήγησε σε κατάσταση δυσβίωσης με αυξημένες συγκεντρώσεις των *Bacteroides* spp. και *Ruminococcus torques* (Martinez-Medina, και συν., 2014). Μια άλλη μελέτη που προσδιόρισε τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου

εθελοντών από τη Βενεζουέλα, το Μαλάουι και τις Ηνωμένες Πολιτείες, ανεξάρτητα από την ηλικία τους, επεσήμανε τη σημαντικά μικρότερη ποικιλότητα των μικροβιακών πληθυσμών του αμερικάνικου πληθυσμού, που υπερκαταναλώνει WD διατροφή, σε σχέση με τους άλλους πληθυσμούς, με το γένος *Prevotella* να ανιχνεύεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Yatsunenko, και συν., 2012). Παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά την μείωση της ποικιλομορφίας της σύστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου εμφανίζονται και έπειτα από κατανάλωση άλλων διατροφικών προτύπων κυρίως σε υγιή πληθυσμό αν και δεν υπάρχουν ξεκάθαρα συμπεράσματα, όπως η διατροφή χωρίς γλουτένη (Palma, Nadal, Collado, & Sanz, 2009) (Garcia-Mazcorro, Noratto, & Remes-Troche, 2018), η κετογονική διατροφή (Jornayvaz, και συν., 2010) (Lindefeldt, και συν., 2019), η διατροφή χαμηλή σε υδατάνθρακες βραχείας αλύσου (low FODMAPs) (McIntosh, και συν., 2016) (Staudacher, και συν., 2017) και η χορτοφαγικού τύπου διατροφή (Matijašić, και συν., 2014) (Zimmer, και συν., 2012).



Εικόνα 6. Επιδράσεις διαφόρων τύπων διατροφής στον εντερικό μικροβιόκοσμο, στη βλεννογόνια στιβάδα και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. (Rinninella, και συν., 2019)

Αντίθετα, η Μεσογειακού τύπου διατροφή (MD) φαίνεται να είναι η μόνη που σίγουρα ενισχύει την ποικιλομορφία των μικροβιακών πληθυσμών του γαστρεντερικού αυλού. Η MD, με επίκεντρο την κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, ελαιόλαδου, ξηρών καρπών, οσπρίων και δημητριακών ολικής αλέσεως έχει συνδεθεί με αρκετά οφέλη για την υγεία. Η πρόσφατη μελέτη των Garcia-Mantrana και συν. (2018) έδειξε ότι η υψηλότερη προσκόλληση στη MD σχετίζεται με αυξημένο λόγο Firmicutes/Bacteroidetes (Garcia-Mantrana, Selma-Royo, Alcantara, & Collado, 2018). Επιπλέον, αυξημένα ποσοστά των bifidobacteria, καθώς και συνολικών λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFA) συσχετίστηκαν με μεγαλύτερη κατανάλωση τροφίμων φυτικής προέλευσης, πλούσιων σε φυτικές πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Τέλος, η Mitsou και συν. (2017) επιβεβαίωσαν αυτά τα ευρήματα, συσχετίζοντας θετικά την προσκόλληση στη MD και την αύξηση των συνολικών βακτηρίων του εντερικού μικροβιόκοσμου, καθώς και αύξηση του λόγου των Bifidobacteria/*E. Coli* και των ολικών SCFAs, καθώς και μείωση των επιπέδων *E. coli* (Mitsou, και συν., 2017). Όλα αυτά τα ευρήματα αναδεικνύουν τη σύνδεση μεταξύ της προσκόλλησης στη MD και τη βελτίωση στην ποικιλομορφία και τον αριθμό των μικροβιακών πληθυσμών που συντελούν τον εντερικό μικροβιόκοσμο.

2.3. Πώς τα πρεβιοτικά επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο;

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, ο κύριος σκοπός των πρεβιοτικών είναι να ευνοήσουν την ανάπτυξη ορισμένων ευεργετικών βακτηρίων όπως είναι τα στελέχη των γενών *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Akkermansia*, *Fecalibacterium*, *Roseburia*, *Bacteroides* και *Prevotella*, τα οποία παρουσιάζουν ευεργετικά οφέλη στην υγεία του ξενιστή, ενώ παράλληλα φαίνεται να καταστέλλουν την ανάπτυξη των βλαβερών βακτηριακών στελεχών του γένους *Clostridium* και *Bacteroides* (Yang, και συν., 2020). Τα κύρια πρεβιοτικά που είναι αναγνωρισμένα είναι οι Β-φρουκτάνες/ ινουλίνη-τύπου φρουκτάνες (φρουκτάνη αγαύης, ινουλίνη ρίζας ραδικιού, ινουλίνη αγκινάρας Ιερουσαλήμ, φρουκτοολιγοσακχαρίτης σουκρόζης), οι αραβυνοξυλάνες, οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες, η λακτουλόζη, καθώς και η ραφινόζη (Swanson, και συν., 2020). Από την άλλη και ορισμένοι σύνθετοι υδατάνθρακες μακράς αλύσου που βρίσκονται σε τρόφιμα, όπως στο σιτάρι, στη βρώμη, στα μανιτάρια, στο σκόρδο, στο κρεμμύδι, στα σπαράγγια, στη σόγια, στη μπανάνα (Mitsou, και συν., 2011) στην πατάτα (Baxter, και συν., 2019) και στη γλυκοπατάτα (Liu, και συν., 2020) έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον ως πιθανές εναλλακτικές πηγές πρεβιοτικών (Scholz-Ahrens, 2016).

Τα τελευταία χρόνια γίνεται διεξοδική έρευνα για την εύρεση νέων πιθανών πρεβιοτικών ουσιών, με στόχο την προαγωγή της υγείας μέσω του εντερικού μικροβιόκοσμου. Οι διαφορετικές επιδράσεις της κάθε ουσίας στους μικροβιακούς πληθυσμούς, καθιστά δύσκολη τη σύγκριση μεταξύ των ουσιών, ώστε να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την ενδεχόμενη πρεβιοτική τους δράση. Το γεγονός αυτό, οδήγησε στη δημιουργία ενός εργαλείου ποσοτικοποίησης για τη μέτρηση της πρεβιοτικής δράσης ουσιών *in vitro*. Ο Πρεβιοτικός Δείκτης (Pi), όπως ονομάστηκε υποθέτει ότι η αύξηση των *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* αποτελεί θετικό εύρημα, ενώ αρνητικό αποτέλεσμα εμφανίζεται από την αύξηση των *Bacteroides* και *Clostridium*. Οι αριθμητικές αλλαγές των μικροβιακών πληθυσμών αυτών των ομάδων εισάγονται στην εξίσωση σχετικά με τα αρχικά τους επίπεδα. Δεδομένου ότι είναι αδύνατο προς το παρόν να απαριθμηθούν τακτικά όλες οι βακτηριακές ομάδες που αποικίζουν τον εντερικό αυλό, είναι πολύ σημαντική η ενσωμάτωση των συνολικών βακτηριακών πληθυσμών στον υπολογισμό του Πρεβιοτικού Δείκτη. Τέλος, τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την μέτρησή του αξιολογούνται ποιοτικά και δεν υπάρχουν διακρίσεις μεταξύ ενός καλού, μέσου ή κακού πρεβιοτικού αποτελέσματος.

$$\text{Πρεβιοτικός Δείκτης} = \text{Bif} / \text{Total} - \text{Bac} / \text{Total} + \text{Lac} / \text{Total} - \text{Clos} / \text{Total}$$

Όπου Bif: *Bifidobacterium*, Bac: *Bacteroides*, Lac: *Lactobacillus*, Clos: *Clostridium*. (Palframan, Gibson, & Rastall, 2003)

ΚΕΦ. 3 : Βλεννογόνιος Εντερικός Φραγμός

3.1. Ορισμός και χρησιμότητα

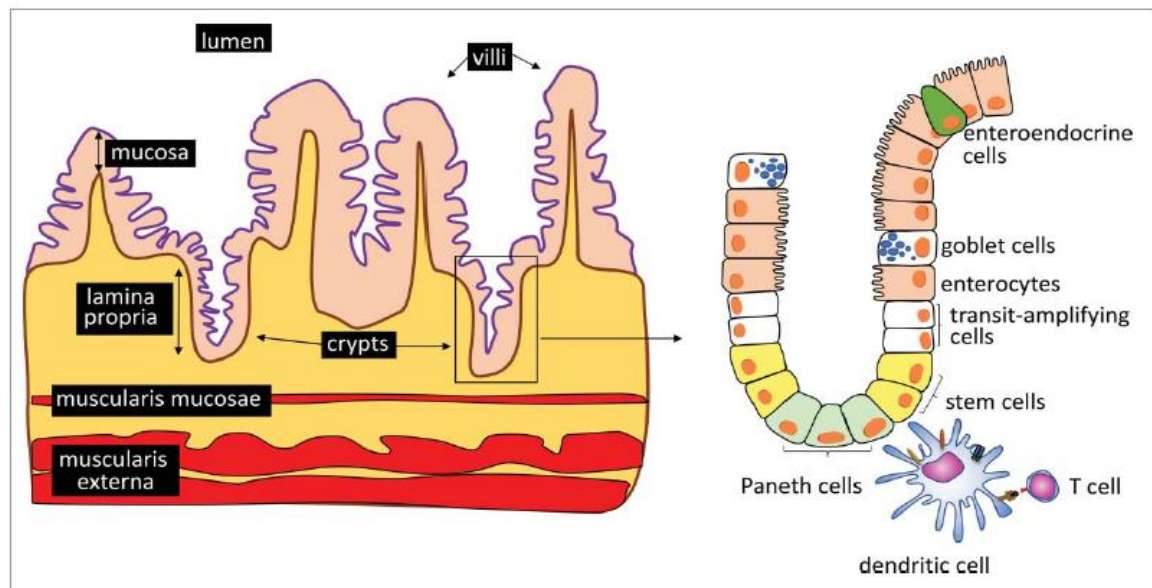
Όπως παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, ο γαστρεντερικός αυλός διαθέτει ένα περίπλοκο ρόλο, αφού πρέπει να λειτουργεί σα δομή με διττό σύστημα διαπερατότητας, η οποία επιτρέπει τόσο την πέψη, την απορρόφηση και τη μεταφορά των απαραίτητων θρεπτικών ουσιών από τον εντερικό σωλήνα στην κυκλοφορία και τους ιστούς και αφετέρου την πρόληψη της διείσδυσης λοιμογόνων μικροοργανισμών, επιβλαβών αντιγόνων του αυλού και προφλεγμονωδών παραγόντων σε φυσιολογικά στείρους ιστούς. Το 2004 ο Cummings και συν. χρησιμοποίησαν τον όρο «εντερικός φραγμός» για να περιγράψουν την πολύπλοκη δομή που διαχωρίζει το εσωτερικό εντερικό περιβάλλον από το εξωτερικό περιβάλλον του

γαστρεντερικού αυλού (Cumplings, και συν., 2004). Το πολύπλοκο αυτό σύστημα αποτελείται από επιμέρους τμήματα με φυσική, βιοχημική και ανοσολογική προστασία που εμποδίζουν την είσοδο των περισσότερων παθογόνων στο εντερικό επιθήλιο. Χωρίς έναν άθικτο και σωστά λειτουργικό εντερικό φραγμό, αυτές οι ουσίες μπορούν να διεισδύσουν στους ιστούς, να διαχυθούν στο αίμα και μέσω της λεμφικής κυκλοφορίας να διαταράξουν την ομοιόσταση των φυσιολογικά στείων ιστών (Groschwitz & Hogan, 2009).

3.2. Σύσταση και δομή

Ο εντερικός φραγμός καλύπτει περίπου 400 m² και απαιτεί την κατανάλωση του 40% της ημερήσιας ενεργειακής δαπάνης του ανθρωπίνου σώματος προκειμένου να επιτελέσει τις λειτουργίες του (Bischoff, και συν., 2014). Αποτελείται από μια πολωμένη και διαπερατή μονοστιβάδα επιθηλιακών κυττάρων, η οποία περιέχει τουλάχιστον επτά λειτουργικά ξεχωριστούς τύπους εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (IECs), οι οποίοι προκύπτουν από τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα εντός της περιοχής της κρύπτης του εντέρου (Εικόνα 7). Συνεπώς, τα αρχέγονα κύτταρα διαφοροποιούνται σε: (1) απορροφητικά εντεροκύτταρα που αποτελούν περισσότερο από το 90% όλων των επιθηλιακών κυττάρων και ρυθμίζουν την παρακυττάρια οδό μέσω στεγανών συνδέσεων, (2) τα καλυκοειδή κύτταρα που εκκρίνουν βλεννίνη, (3) τα εντεροενδοκρινικά κύτταρα που εκκρίνουν ορμόνες και λειτουργούν ως ρυθμιστές της εντερικής κινητικότητας, (4) τα κύτταρα Paneth που εκκρίνουν αντιμικροβιακούς και αυξητικούς παράγοντες, (5) τα “μικροπτυχημένα κύτταρα” (microfold cells - κύτταρα M), που επικαλύπτουν τα επιθέματα του Peyer και ενεργοποιούν ανοσολογικές αποκρίσεις, (6) τα “κύτταρα κυπέλλου” (cup cells), με άγνωστη μέχρι στιγμής λειτουργία και (7) τα “φουσκωτά κύτταρα” (tuft cells), που συμμετέχουν στην ανοσοαπόκριση, με όχι πλήρως εξακριβωμένο τρόπο (Natividad & Verdu, 2013); (Mu, Kirby, Reilly, & Luo, 2017). Με εξαίρεση τα κύτταρα Paneth, τα οποία βρίσκονται κυρίως στη βάση της κρύπτης του λεπτού εντέρου και ανανεώνονται περίπου κάθε 18-23 ημέρες, όλοι οι υπόλοιποι τύποι των εντερικών επιθηλιακών

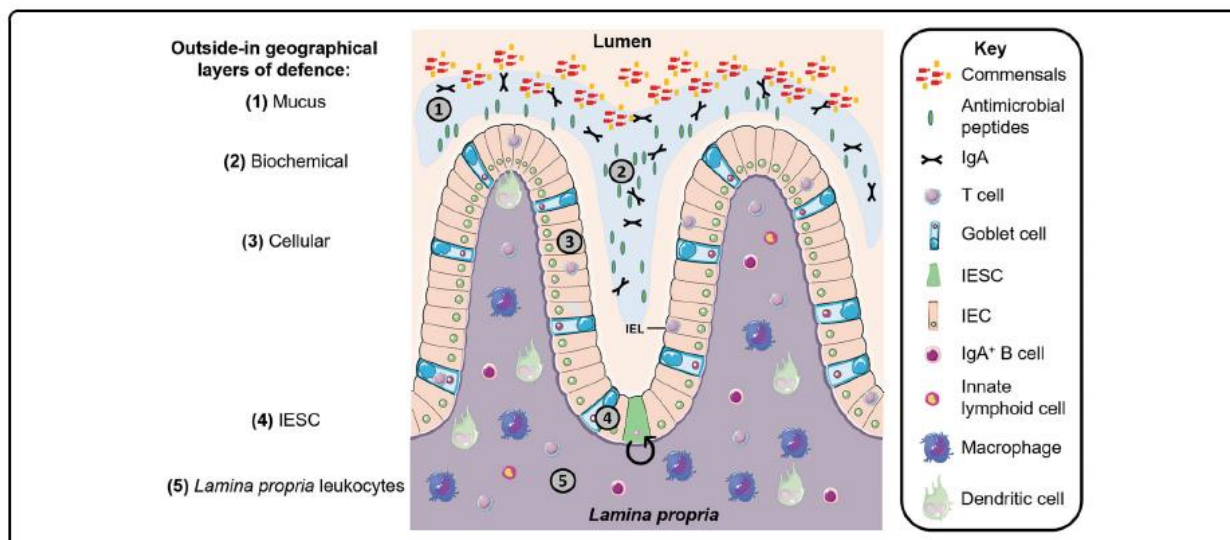
κυττάρων βρίσκονται στο λεπτό και στο παχύ έντερο και υφίστανται συνεχή ανανέωση κάθε 3-5 ημέρες (Ouellette & Selsted, 1996).



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση εντερικού επιθηλίου. (Takiishi, Morales Fenero, & Câmara, 2017)

Οι εξειδικευμένες προσαρμογές του εντερικού βλεννογόνου των θηλαστικών εκπληρώνουν δύο φαινομενικά αντίθετες λειτουργίες, επιτρέποντας από την μία πλευρά, μια ειρηνική συνύπαρξη με τον εντερικό μικροβιόκοσμο, χωρίς να προκαλέσουν χρόνια φλεγμονή και από την άλλη παρέχουν μια ελεγχόμενη φλεγμονώδη και αμυντική απόκριση υπό την απειλή παθογόνων παραγόντων (Hooper, Littman, & Macpherson, 2012) (Maynard, Elson, Hatton, & Weaver, 2012). Για να επιτευχθεί αυτός ο σκοπός, το επιθήλιο αποτελείται από τρεις κύριες γραμμές άμυνας (Εικόνα 8), των οποίων η αλληλεπίδραση επιτρέπει τη διατήρηση της ισορροπημένης διαπερατότητας. Πρώτον, το βιολογικό φράγμα, το οποίο αποτελείται από τον εντερικό μικροβιόκοσμο που αποικίζει φυσιολογικά τον εντερικό αυλό και είναι υπεύθυνο για την προστασία έναντι σε αποικισμό από παθογόνους μικροοργανισμούς. Σε δεύτερο επίπεδο, το ανοσοποιητικό φράγμα, το οποίο αποτελείται από λεμφοειδή ιστό (GALT), T λεμφοκύτταρα (τύπου μνήμης και ρυθμιστικά), B λεμφοκύτταρα που παράγουν την ανοσοσφαιρίνη A (IgA), εγγενή λεμφοειδή κύτταρα ομάδας 3 (ILC3), μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα, που εδράζουν στην υποκείμενη χοριακή στιβάδα του εντέρου (lamina propria) (Assimakopoulos, Triantos, Maroulis, & Gogos, 2018). Η τρίτη γραμμή άμυνας περιλαμβάνει το μηχανικό φράγμα, που αποτελείται από τα στενά στιχισμένα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και από τα τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα. Αυτά έρχονται στην πλησιέστερη δυνατή επαφή μεταξύ τους στην κορυφαία περιοχή των πλάγιων περιοχών των κυτταρικών μεμβρανών τους χάρη στην

παρουσία συγκεκριμένων δομών που ονομάζονται «στεγανές συνδέσεις» (TJs), οι οποίες διασυνδέουν τα κύτταρα και περιορίζουν τη διέλευση ιόντων, μορίων και κυττάρων μέσω του παρακυτταρικού χώρου (Bischoff, και συν., 2014).



Εικόνα 8. Διαστρωμάτωση αμυντικών μηχανισμών του εντερικού επιθηλίου. IgA: Ανοσοσφαιρίνη Α, IEL: Ενδοεπιθηλιακά λεμφοκύτταρα, IEC: επιθηλιακά κύτταρα εντέρου, IESC: επιθηλιακά θλαστοκύτταρα εντέρου. (Thoo, Noti, & Krebs, 2019)

3.3. Φυσιολογία εντερικής διαπερατότητας

Εν γένει, η μεταφορά ουσιών στο λεπτό έντερο επιτελείται με δύο επιμέρους τρόπους για μικρού μεγέθους μόρια. Πρώτον, μέσω της διακυττάριας οδού, διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων, η οποία ρυθμίζεται κυρίως από εκλεκτικούς μεταφορείς αμινοξέων, ηλεκτρολυτών, λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας και σακχάρων. Εναλλακτικά, πραγματοποιείται μέσω της παρακυττάριας οδού, διαμέσου των στεγανών συνδέσεων (TJs) που συνδέουν τα επιθηλιακά κύτταρα μεταξύ τους, οι οποίες είναι μερικώς διαπερατές στο νερό και σε μικρά διαλυτά μόρια, των οποίων η δράση ρυθμίζεται από ενδοκυτταρικά σύμπλοκα εντοπισμένα στη διασταύρωση των τμημάτων της κορυφαίας-πλευρικής μεμβράνης και κατά μήκος της πλευρικής μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων (Groschwitz & Hogan, 2009). Η διαπερατότητα αυτή ελαττώνεται κατά μήκος του λεπτού εντέρου, από το ανώτερο προς το κατώτερο πεπτικό, αλλά και κατά μήκος των εντερικών λαχνών, από την κρύπτη προς την κορυφή, σε ένα δεδομένο τμήμα εντέρου (Davis, Santa Ana, Morawski, & Fordtran, 1982).

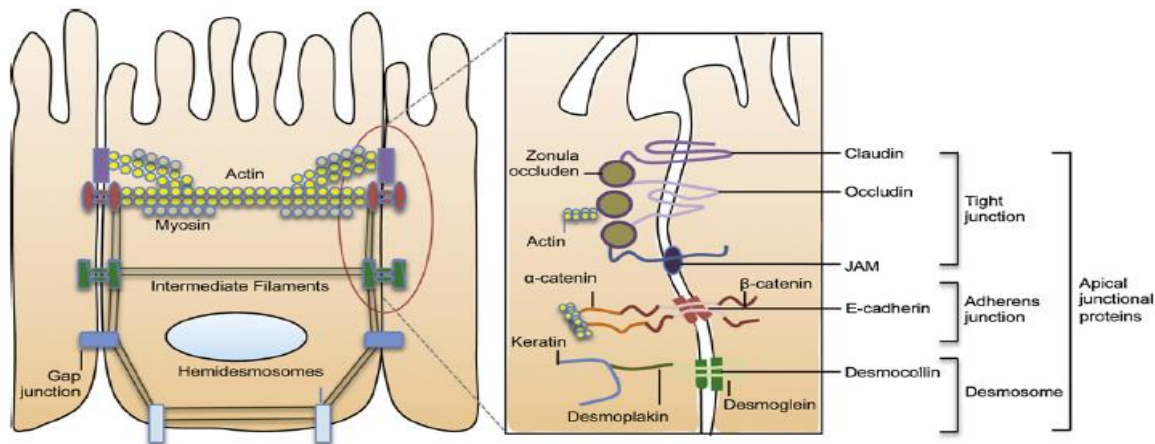
Οι διαφορές αυτές οφείλονται σε διαφορές του αριθμού των νηματίων που γεφυρώνουν το χάσμα μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων και συγκεκριμένα στο σημείο των αποφρακτικών ενώσεων το χάσμα αυτό είναι περίπου 20 nm και διασχίζεται από διασταυρούμενα ινίδια. Έτσι, οι αποφρακτικές ενώσεις της νήστιδας είναι διαπερατές από μόρια διαμέτρου 0,75 - 0,80 nm, ενώ του ειλεού από μόρια διαμέτρου 0,22-0,25 nm. Έχει διαπιστωθεί ότι η μεταφορά διαμέσου του εντερικού επιθηλίου γίνεται κατά 90% με την παρακυττάρια οδό, η οποία επιτρέπει μόνο παθητική μεταφορά, ενώ η διακυττάρια οδός απαιτεί κατανάλωση ενέργειας, για αυτό κάθε φορά που ένα θετικά φορτισμένο ιόν μεταφέρεται διακυττάρια ένα αντίθετα φορτισμένο ιόν μεταφέρεται από την παρακυττάρια οδό, μέσω των αποφρακτικών ενώσεων, ώστε να διατηρηθεί η διαφορά δυναμικού (Ma & Anderson, 2006). Τέλος, η τρίτη οδός, μέσω της οποίας μάλιστα είναι δυνατή η δίοδος ουσιών μεγάλου μοριακού βάρους, αποτελούν οι περιοχές απόπτωσης του επιθηλίου στις κορυφές των εντερικών λαχνών (Claude, 1978).

3.4. Κυτταρική σύνδεση εντερικού επιθηλίου

Η επαφή μεταξύ των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων περιλαμβάνει 3 στοιχεία, που μπορούν να αναγνωριστούν σε υπερδομικό επίπεδο (Εικόνα 9):

1. τις αποφρακτικές ή στενές ή στεγανές συνδέσεις (TJs), οι οποίες είναι διακυτταρικές συνδέσεις παρακείμενων κυτταροπλασματικών μεμβρανών, εντοπιζόμενες στο κορυφαίο τμήμα της πλάγιας μεμβρανικής επιφάνειας. Ο δομικός και λειτουργικός τους ρόλος έγκειται στη δημιουργία δύο επιμέρους φραγμών: (1) μεταξύ του κορυφαίου και του πλαγιοβασικού τμήματος της κυτταρικής μεμβράνης καθορίζουν την πολικότητα των κυττάρων, εμποδίζοντας την ελεύθερη διάχυση και ανταλλαγή πρωτεϊνικών και λιπιδικών μορίων μεταξύ τους και (2) μεταξύ του εξωτερικού (κορυφαίου) και του εσωτερικού (βασικού) τμήματος του επιθηλίου στο οποίο συμμετέχουν οι αποφρακτικές ενώσεις, που καθορίζουν την παρακυττάρια διαπερατότητα (Groschwitz & Hogan, 2009)
2. τις συνδέσεις πρόσφυσης (AJs), οι οποίες είναι συμπλέγματα πρωτεϊνών στην πλευρική μεμβράνη του επιθηλιακού κυττάρου και εμφανίζονται στα σημεία επαφής μεταξύ των κυττάρων. Σχηματίζονται από αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών-προσαρμογέων και του κυτταροσκελετού, καθώς συνδέονται με μικροϊνίδια ακτίνης μέσω της αλληλεπίδραξης καδερινών (δεσμοκολλίνες και δεσμογλείνες) με τις κατενίνες (α , β και γ) (Groschwitz & Hogan, 2009)

3. τα δεσμοσώματα, τα οποία βρίσκονται κάτω από τις AJs, αλλά συνδέονται με ενδιάμεσα ινίδια κερατίνης και όχι ακτίνης, των οποίων ο βασικός ρόλος είναι η εξασφάλιση δύναμης και ακαμψίας της επιθηλιακής στιβάδας, προκειμένου μαζί με τις AJs να εξασφαλιστεί η βέλτιστη μηχανική σύνδεση των γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων (Ma & Anderson, 2006)

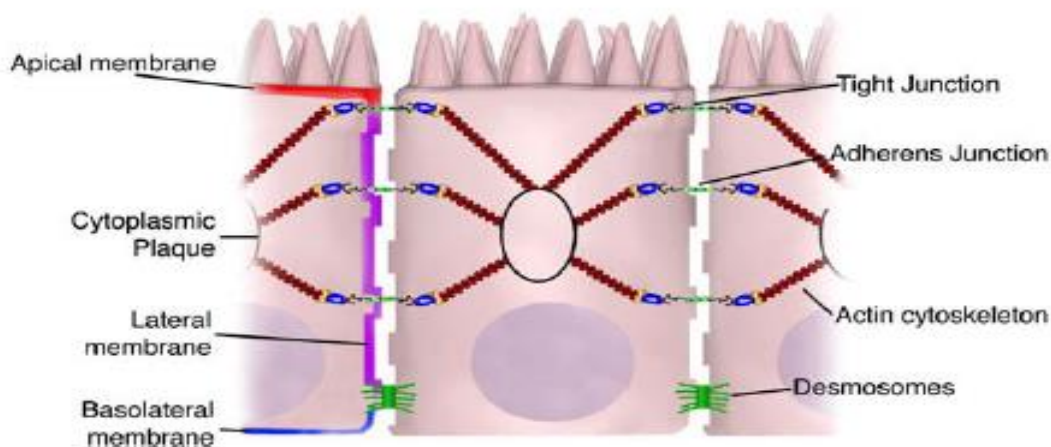


Εικόνα 9. Δομική παρουσίαση κυτταρικών συνδέσεων του εντερικού επιθηλίου. (Groschwitz & Hogan, 2009)

3.5. Αποφρακτικές ενώσεις (tight junctions)

Η εξέλιξη της τεχνολογίας, με την ανάπτυξη της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, που εμφανίστηκε στη δεκαετία του 1960, ανέδειξε κατά την ανάλυση των επιθηλιακών κυττάρων, μια σειρά φαινομένων σύντηξης, όπου το διάστημα μεταξύ των γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων εξαλείφθηκε (Staehelin, 1973). Η χημική δομή των υπεύθυνων μορίων, για αυτή την κατάσταση απετέλεσε αντικείμενο έντονου επιστημονικού ενδιαφέροντος τις τελευταίες δεκαετίες, καθώς φάνηκε πως διαφέρουν μορφολογικά από τις AJs και τα δεσμοσώματα και εντοπίζονται μεταξύ γειτονικών κυτταρικών μεμβρανών, όταν αυτές απέχουν 15 - 20 nm μεταξύ τους (Tsukita, Furuse, & Itoh, 2001). Σήμερα οι γνώσεις μας έχουν διευρυνθεί από αυτές τις αρχικές παρατηρήσεις, αφού οι TJs βρέθηκαν να αποτελούνται από 4 μοναδικές οικογένειες διαμεμβρανικών πρωτεϊνών: τις αποφραξίνες ή οκλουδίνες (occludin), τις κλαουδίνες (claudin), τα συνδετικά μόρια προσκόλλησης (JAMs) και τις "tricellulin" (Lee, 2015). Οι ενδοκυτταρικές περιοχές αυτών των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με κυτταροσολικές πρωτεΐνες - ικρίωματα, όπως οι κύριες πρωτεΐνες αποφρακτικών συνδέσεων "zonula okludens" (ZO) και η

“cingulin”, οι οποίες με τη σειρά τους διευκολύνουν την πρόσδεση των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών στον κυτταροσκελετό της ακτίνης (Chelakkot, Ghim, & Ryu, 2018).



Εικόνα 10. Δομή μηχανικού φραγμού εντερικών επιθηλιακών κυττάρων. (Natividad & Verdu, 2013)

Η συσταλτική ικανότητα του δακτυλίου ακτομυοσίνης υπόκειται σε ρυθμιστικό έλεγχο μέσω φωσφορυλίωσης της ελαφράς αλυσού της μυοσίνης (myosin light chain, MLC), η οποία φωσφορυλιώνεται παρουσία των κινάσων της ελαφράς αλυσού της μυοσίνης (myosin light chain kinase, MLCK) και της Rho-σχετιζόμενης κινάσης (Rho-associated kinase, ROCK), επιτυγχάνοντας τη συσταλτικότητα του δακτυλίου ακτίνης-μυοσίνης και την περαιτέρω ρύθμιση τη παρακυττάριας οδού διέλευσης, εξασφαλίζοντας την ακεραιότητα του φραγμού των TJs (Ma, Nighot, & Al-Sadi, 2018). Παρόλο που, είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι TJs είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού, η ακριβής λειτουργία μεμονωμένα των πρωτεϊνών που τις συντελούν παραμένει ακόμα αόριστη.

3.5.1. Αποφραξίνες (Occludin)

Το πρώτο μέλος των αποφρακτικών ενώσεων, η αποφραξίνη, περιγράφηκε μόλις το 1993 από την ομάδα του Furuse, καθώς απομονώθηκε πρώτη φορά σε καλλιέργειες ηπατοκυττάρων κοτόπουλου με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (Furuse, και συν., 1993). Εκφράζεται κυρίως στις TJs, που εδρεύουν σε επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και σε αστροκύτταρα, νευρώνες (Bauer, και συν., 1999) και δενδριτικά κύτταρα, αλλά όχι σε ινοβλάστες (Rescigno, και συν., 2001). Συντηρείται μεταξύ των διαφορετικών ειδών (~ 90% ομολογία) διαθέτοντας μη εξειδικευμένους για κάθε ιστό υποτύπους, παρόλο που διαθέτει 2 ισομορφές παραγόμενες από το εναλλακτικό μάτισμα του mRNA (Muresan, Paul, &

Goodenough, 2000) και είναι το μέλος που εκφράζεται πάντα εντοπιζόμενο στο κορυφαίο τμήμα της πλάγιας κυτταρικής μεμβρανικής επιφάνειας, γι' αυτό θεωρείται ο πιο αξιόπιστος ανοσοϊστοχημικός δείκτης των αποφρακτικών ενώσεων (Traweger, και συν., 2002).

Η αποφραξίνη με μοριακό βάρος ~ 65 kDa, αποτελείται από 504 αμινοξέα. Το αμινοτελικό τμήμα της είναι ενδοκυττάριο, βραχύ, μήκους 57 αμινοξέων και περιέχει μια αλληλουχία WW (PPYP), η οποία βρίσκεται στο κέντρο του μορίου και συμμετέχει στην αλληλεπίδραση με άλλα πρωτεϊνικά μόρια (Gonzalez-Mariscal, Betanzos, Nava, & Jaramillo, 2003). Τα τέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα, που τη συντελούν, αποτελούνται από κομμάτια 21-24 αμινοξέων με τις δυο εξωκυττάρειες αγκύλες να έχουν μήκος 43 αμινοξέα η καθεμία και την ενδοκυττάρια αγκύλη, μήκους 10 αμινοξέων. Σημειώνεται ότι και οι δυο εξωκυττάρειες αγκύλες περιέχουν σε μεγάλο βαθμό υπολείμματα τυροσίνης και γλυκίνης (ποσοστό 60%) και πολύ λίγα φορτισμένα αμινοξέα, όμως η λειτουργική σημασία αυτής της παρατήρησης δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί. Το εξαιρετικά μακρύ καρβοξυτελικό τμήμα (50% της αλληλουχίας) έχει διάφορες θέσεις που πιθανόν μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλα μακρομόρια καθώς και αρκετές θέσεις φωσφορυλίωσης, αφού είναι πλούσιο σε υπολείμματα σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης. Πρόκειται για μια σε μεγάλο βαθμό υδρόφοβη ακολουθία που φέρει φορτισμένα αμινοξέα (Chiba, Osanai, Murata, Kojima, & Sawada, 2008). Πρόσφατη ανασκόπηση μελετών ανέδειξε πως αποφραξίνη με υψηλό βαθμό φωσφορυλίωσης σε θέσεις σερίνης/θρεονίνης σχετίζεται με περιορισμό της παρακυττάριας διαπερατότητας, ενώ η αποφωσφορυλίωσή της σε αντίστοιχες θέσεις σερίνης/θρεονίνης ή η φωσφορυλίωση του μορίου σε θέσεις τυροσίνης σχετίζεται με αύξηση της παρακυττάριας διαπερατότητας, καθώς εμποδίζει την αλληλεπίδραση της αποφραξίνης με τις ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες ZO-1, ZO-2, ZO-3 οδηγώντας σε διάσπαση από το σύμπλεγμα JAM (Cummins, 2012).

3.5.2. Κλαουδίνες (Claudin)

Οι κλαουδίνες περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1998 (Furuse, Fujita, Hiiragi, Fujimoto, & Tsukita, 1998) και η ανακάλυψή τους αποτέλεσε κομβικό σημείο για την κατανόηση των TJs, καθώς αποδείχτηκαν πολύ κρίσιμες για το σχηματισμό των ινιδίων των αποφρακτικών ενώσεων (Saitou, και συν., 1998). Παρόλο που δεν παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τις αποφραξίνες, ανήκουν στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και αποτελούνται και αυτές από τέσσερα διαμεμβρανικά τμήματα. Διαθέτουν δύο εξωκυττάρειες αγκύλες διαφορετικού μεγέθους η μία από την άλλη, αφού η μία αγκύλη αποτελείται από 41-55 φορτισμένα αμινοξέα και δύναται να

σχηματίζει ιοντοεκλεκτικές παρακυττάρειες διόδους και η δεύτερη αποτελείται από 10-21 αμινοξέα, είναι υδρόφοβη και φαίνεται να είναι υπεύθυνη για τις διακυτταρικές επαφές (ομοτυπικές ή ετεροτυπικές) (Ma, Nighot, & Al-Sadi, 2018). Το πολύ βραχύ αμινο-τελικό τους άκρο και το καρβοξυτελικό άκρο, του οποίου το τμήμα PDZ αλληλεπιδρά με τις ενδοκυττάρειες πρωτεΐνες ZO (ZO-1, ZO-2, and ZO-3), είναι τα δύο διαμεμβρανικά τμήματα που εντοπίζονται ενδοκυτταρικά, με το δεύτερο να είναι αυτό που προσδίδει τη σταθερότητα στην πρωτεΐνη (Groschwitz & Hogan, 2009).

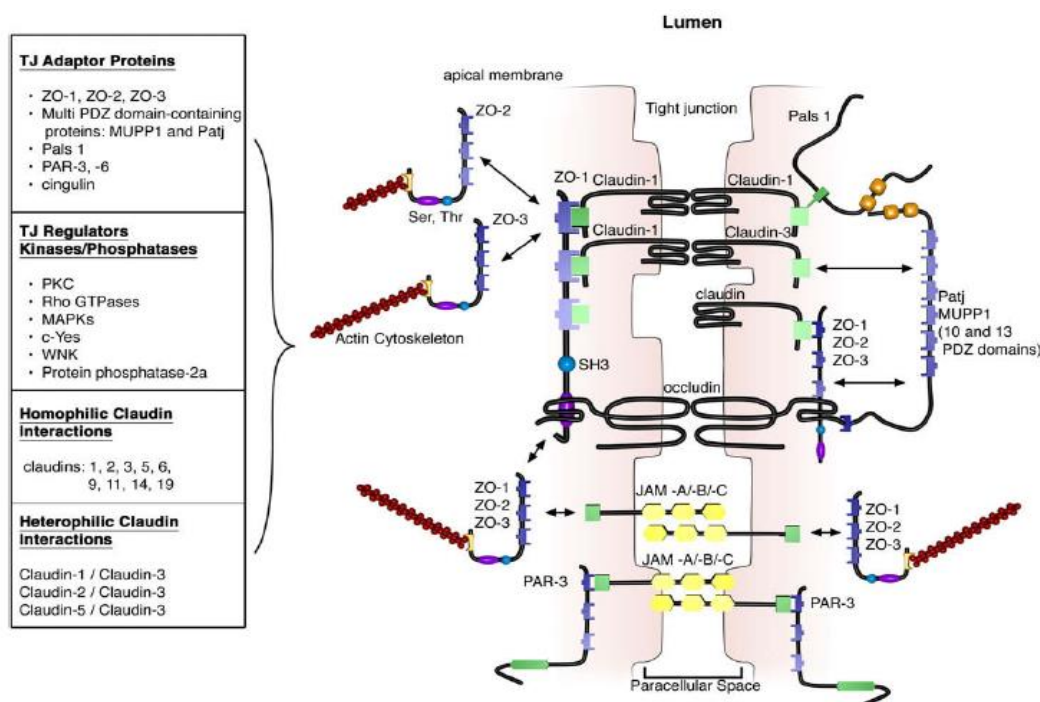
Οι κλαουδίνες ανήκουν σε υπεροικογένεια πρωτεϊνών που αριθμεί συνολικά 27 μέλη, (Slifer & Blikslager, 2020) χωρίς ακόμα να είναι γνωστή η λειτουργία όλων, με μοριακά βάρη που κυμαίνονται από 20 έως 27 kDa (Ma, Nighot, & Al-Sadi, 2018). Ανάλογα με τη λειτουργία που εκτελούν διακρίνονται σε δύο τύπους: αυτές που εμπλέκονται στο σχηματισμό φραγμού, μειώνοντας τη παρακυττάρια διαπερατότητα και εκείνων που δημιουργούν πόρους, αυξάνοντας την παρακυττάρια διαπερατότητα (Shen L. , Weber, Raleigh, Yu, & Turner, 2011). Η αυξημένη μεμβρανική έκφραση των κλαουδινών που συντελούν στη δημιουργία του φραγμού (κλαουδίνες -1, -3, -4, -5, -8, -11, -14, 18 και -19), οδηγεί σε ένα ισχυρότερο επιθηλιακό φράγμα, περιορίζοντας περαιτέρω την κίνηση των περιεχομένων του αυλού μέσω του παρακυτταρικού χώρου. Από την άλλη, η αυξημένη μεμβρανική έκφραση των κλαουδινών που σχηματίζουν πόρους (κλαουδίνες -2, -10a / -10b, -15, -16 και -17) μειώνει την κυτταρική επιλεκτικότητα των περιεχομένων του αυλού, που μπορούν να περάσουν μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, αυξάνοντας έτσι την παρακυτταρική διαπερατότητα (Günzel & Yu, 2013). Κάθε κλαουδίνη, που σχηματίζει πόρους εμφανίζει ειδικότητα ως προς το είδος του ιοντικού φορτίου (κατιόντα ή ανιόντα) καθώς και επιλεκτικότητα ως προς το ιοντικό μέγεθος, αυξάνοντας έτσι τη διαπερατότητα για ιόντα με βάση τα χαρακτηριστικά διαπερατότητας που.

Στη γαστρεντερική οδό η έκφραση των TJs εξαρτάται από το τμήμα και την ηλικία του ιστού. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζωικά μοντέλα υποστηρίζουν πως οι κλαουδίνες 2,3,7 και 15 εκφράζονται εντονότερα κατά μήκος του εντερικού αυλού (Slifer & Blikslager, 2020). Για παράδειγμα, η κλαουδίνη - 2 εκφράζεται κανονικά στο ανθρώπινο λεπτό έντερο, αλλά αναφέρεται ότι εκφράζεται μόνο στην κρυπτική στήλη των εμβρύων και απουσιάζει στο ενήλικο κόλον υπό ομοιοστατικές συνθήκες (Luettig, Rosenthal, Barmeyer, & Schulzke, 2015). Άλλες κλαουδίνες, όπως η κλαουδίνη - 13 σε ζωικά μοντέλα ανιχνεύτηκε μόνο στο κόλον, ενώ η κλαουδίνη - 18 μόνο στο δωδεκαδάκτυλο και τη νήστιδα. Αντίστοιχα, η έκφραση της κλαουδίνης - 8 έχει φανεί να αυξάνεται προοδευτικά από το λεπτό έντερο προς το κόλον, ενώ η έκφραση

της κλαουδίνης - 15 το αντίθετο (Günzel & Yu, 2013). Συνεπώς, ο μεγάλος αριθμός και τα διαφορετικά πρότυπα έκφρασης των κλαουδινών αποκάλυψαν έναν απροσδόκητο βαθμό πολυπλοκότητας και λεπτότητας στον έλεγχο της διαπερατότητας του εντερικού φραγμού.

3.6. Μακρομόρια σχετιζόμενα με τις αποφρακτικές ενώσεις

Κάτω από τις αποφρακτικές ενώσεις υπάρχουν αρκετά μακρομόρια που σχηματίζουν την αποφρακτική πλάκα (tight junctional plaque) (Εικόνα 11), της οποίας η δομή σχηματίζεται κυρίως από πρωτεΐνες που περιέχουν τις εξελικτικά διατηρημένες περιοχές "PDZ", μήκους 80-90 αμινοξέων. Οι πρωτεΐνες που περιέχουν αυτές τις περιοχές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, μέσω των περιοχών "PDZ", εξασφαλίζοντας την προσκόλληση αυτών των πρωτεϊνών στον κυτταροσκελετό, με στόχο την κυτταρική σηματοδότηση. Ομάδες πρωτεϊνών που διαθέτουν "PDZ" περιοχές είναι: 1) Οι πρωτεΐνες ZO (ZO-1, ZO-2, ZO-3). 2) Οι μεμβρανικές, ανεστραμμένες πρωτεΐνες της γουανυλικής κινάσης (MAGIs): MAGI-1 και MAGI-3. 3) Η πολυ-PDZ πρωτεΐνη MUPP1. 4) Η πρωτεΐνη στόχος Ras AF-6 / afadin και 5) οι ομάδες PAR-3, PAR-6, PALS-1 και PATJ, οι οποίες σχηματίζουν σύμπλοκα πολυπρωτεϊνών που εμπλέκονται στην επίτευξη επιθηλιακής πολικότητας μεταξύ της βασικής και κορυφαίας περιοχής των κυττάρων.



Εικόνα 11. Δομική παρουσίαση διαμεμβρανικών στεγανών συνδέσεων και πρωτεϊνών των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου. (Groschwitz & Hogan, 2009)

3.6.1. Πρωτεΐνες αποφρακτικών συνδέσεων (zonula occludens)

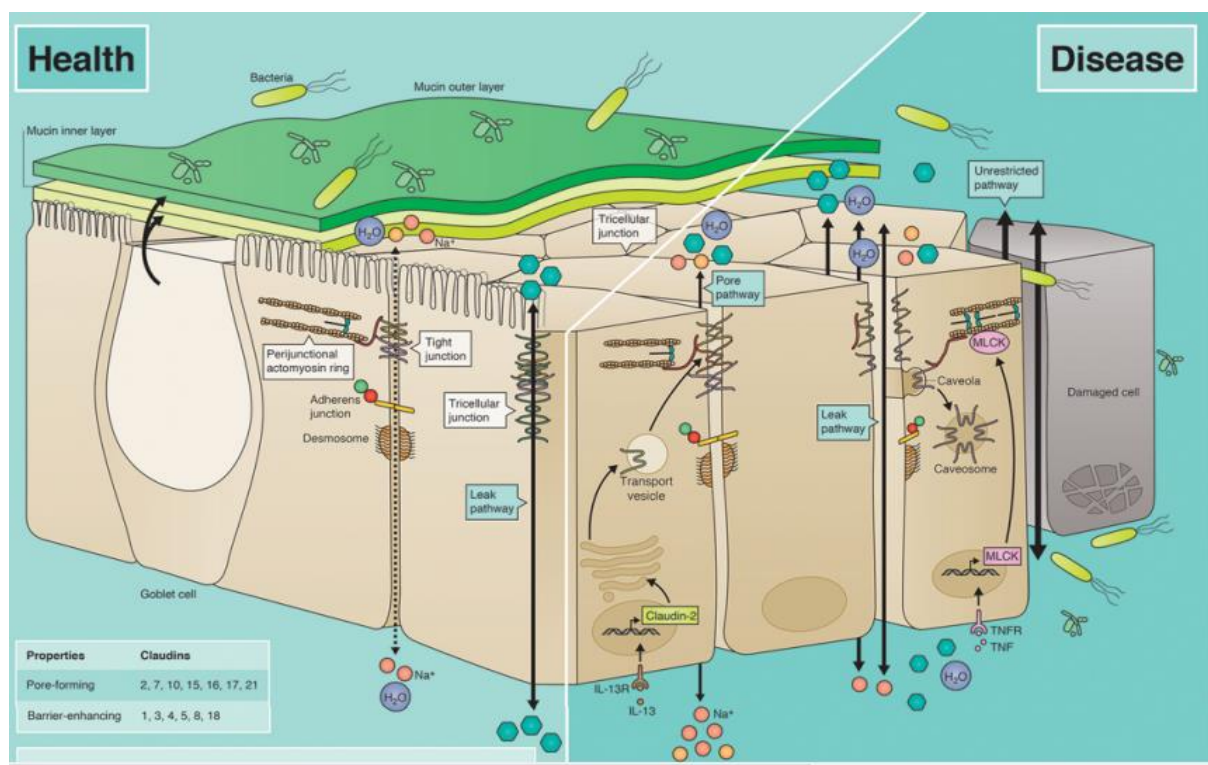
Οι πρωτεΐνες αποφρακτικών συνδέσεων zonula occludens (ZO) ήταν οι πρώτες ειδικές πρωτεΐνες των TJs που ανακαλύφθηκαν και μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί οι τρεις τύποι ZO-1, -2 και -3. Το 1986 η ZO-1 (220 kDa) ήταν η πρώτη πρωτεΐνη που αναγνωρίστηκε, μέσω της παραγωγής ενός συγκεκριμένου μονοκλωνικού αντισώματος που δημιουργήθηκε έναντι ενός παρασκευάσματος ηπατικών μεμβρανών (Stevenson, Siliciano, Mooseker, & Goodenough, 1986) και στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν οι ZO-2 (160 kDa) (Gumbiner, Lowenkopf, & Apatira, 1991) και ZO-3 (130 kDa) (Balda, Gonzalez-Mariscal, Matter, Cereijido, & Anderson, 1993) ως πρωτεΐνες που συν-κατακρημνίστηκαν με την ZO-1. Παρουσιάζουν και οι τρεις παρόμοια δομική οργάνωση, με την αμινοτελική περιοχή τους να διαθέτει 3 PDZ τμήματα, ακολουθούμενη από ένα τμήμα SH3 (Src homology 3), ένα τμήμα GUK (γουανυλική κινάση), κατατάσσοντάς τες στην οικογένεια πρωτεϊνών MAGUK (μεμβρανο-σχετιζόμενη γουανυλική κινάση) και ένα τμήμα πλούσιο σε προλίνη (Guillemot, Paschoud, Pulimeno, Foglia, & Citi, 2008).

Είναι ενδιαφέρον ότι πολλές πρωτεΐνες TJs συνδέονται με την μισή αμινοτελική περιοχή των ZO, ενώ η καρβοξυτελική περιοχή αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τον κυτταροσκελετό και την κυτταροσκελετική ακτίνη (Fanning, Ma, & Anderson, 2002). Όλες αλληλεπιδρούν άμεσα με τις περισσότερες από τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες TJs, όπως η αποφραξίνη, η κλαουδίνη, το JAM, η "tricellulin" και ο CAR (υποδοχέας coxsackievirus και αδενοϊού). Η αλληλεπίδραση της ZO-1 με το καρβοξυτελικό άκρο των κλαουδινών πραγματοποιείται μέσω του τμήματος PDZ-1, ενώ το JAM και η αποφραξίνη έρχονται σε επαφή με τα τμήματα PDZ 2 και 3. Η σύνδεση των κλαουδινών μέσω του πρώτου τμήματος PDZ των ZO-1 και ZO-2 είναι ζωτικής σημασίας για τον προσδιορισμό του πότε και πού πολυμερίζονται οι κλαουδίνες (Bauer, Zweimueller-Mayer, Steinbacher, Lametschwandtner, & Bauer, 2010).

3.7. Διαταραχή οργάνωσης εντερικού φραγμού και πρεβιοτικά

Η ομοίωση του εντερικού φραγμού μπορεί να διαταραχθεί, μέσω της δυσλειτουργίας και αποδιοργάνωσης των TJs πρωτεϊνών, η οποία είναι αποτέλεσμα ποικίλων πιθανών παραγόντων, όπως η μικροβιακή αποικοδόμηση και η έκθεση σε βακτηριακές τοξίνες με αποτέλεσμα την ενδοτοξαιμία, η έκθεση σε κυτταροτοξικούς παράγοντες, η έκθεση σε προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, όπως η IFN γ και ο TNF α , (Slifer & Blikslager, 2020) η ύπαρξη νοσογόνων παθήσεων, όπως η κοιλιοκοκάκη, η εντερική ισχαιμία, το σύνδρομο ευερέθιστου

εντέρου, οι τροφικές αλλεργίες, ο Σ.Δ. Τύπου Ι, η παχυσαρκία, η νόσος του Parkinson, η κατάθλιψη, ο αυτισμός και το άσθμα (Vancamelbeke & Vermeire, 2017). Η απώλεια της ακεραιότητας των στεγανών συνδέσεων οδηγεί στο σχηματισμό μιας κατάστασης, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλής χωρητικότητας και μη επιλεκτικότητας διαπερατότητας μορίων, η οποία μπορεί να επιτρέψει την απεριόριστη κίνηση μικροοργανισμών και μεγάλων πρωτεϊνών στο διακυτταρικό χώρο των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου, δημιουργώντας ένα «διαρρέον έντερο» (Εικόνα 12) (Hollander & Kaunitz, 2020). Η αδυναμία ταχείας επιδιόρθωσης των στεγανών συνδέσεων προκειμένου να αποκατασταθεί η εύρυθμη λειτουργία του επιθηλιακού φραγμού είναι επιζήμια για τον ασθενή, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε πολύ σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, όπως σήψη και η δυσλειτουργία πολλαπλών οργάνων, ανάλογα και με την σοβαρότητα της εκάστοτε προϋπάρχουσας παθολογίας (Assimakopoulos, Triantos, Maroulis, & Gogos, 2018). Ως εκ τούτου, η κατανόηση παραγόντων που μπορούν να ρυθμίσουν την πολυπλοκότητα των στεγανών συνδέσεων κατά την επιδιόρθωση του «τραυματισμένου» εντερικού επιθηλίου, είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη μελλοντικών θεραπευτικών στόχων για την αντιμετώπιση ασθενειών.



Εικόνα 12. Δομική αναπαράσταση εντερικού φραγμού σε κατάσταση υγείας και νόσου (France & Turner, 2017)

Στα πλαίσια αυτής της αναζήτησης η ερευνητική κοινότητα εξετάζει τα τελευταία χρόνια τη δράση αναγνωρισμένων και υποψήφιων πρεβιοτικών ουσιών, με στόχο την αποκατάσταση ενός διαταραγμένου εντερικού φραγμού. Η μελέτη του Cani και συν. (2009) σε παχύσαρκα ποντίκια, τα οποία κατανάλωσαν διατροφή πλούσια σε πρεβιοτικά (ολιγοφρουκτόζη) σε σύγκριση με αυτά που κατανάλωσαν διατροφή πλούσια σε μη ζυμώσιμες διαιτητικές ίνες (μικροκρυσταλλική κυτταρίνη) έδειξε αύξηση της έκφρασης του mRNA της ZO-1 και της *occludin* στη νήστιδα των ποντικών, υποδηλώνοντας τη βελτίωση των στεγανών συνδέσεων και της διαπερατότητας του εντέρου στην ομάδα που έλαβε τα πρεβιοτικά (Cani, και συν., 2009). Επιπρόσθετα, διατροφή εμπλουτισμένη με ξυλο-ολιγοσακχαρίτες *in vivo* σε μη παχύσαρκα, διαβητικά (NOD) ποντίκια οδήγησε σε αυξημένη έκφραση της *occludin* ορού πλάσματος και βελτίωση της διακυτταρικής διαπερατότητας του εντερικού φραγμού (Hansen, και συν., 2019). Μια πιο πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ποντίκια, στα οποία χορηγήθηκε ινουλίνη 1% μέσω νερού ταυτόχρονα με κατανάλωση διατροφής δυτικού τύπου για 4 εβδομάδες, συνεισέφερε στη διόρθωση της διαπερατότητας του εντερικού φραγμού μέσω βελτίωσης της δομής του εσωτερικού στρώματος του εντερικού επιθηλίου (Schroeder, και συν., 2017). Αντίθετα, η Johnson-Henry και συν. (2017) έδειξαν πως η έκθεση *in vitro* Caco-2 κυττάρων σε ινουλίνη ή βραχείας αλύσου φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες (10% wt:v), είτε πριν είτε έπειτα από διατάραξη του εντερικού φραγμού με χορήγηση *E.coli*, δεν ήταν ικανή να επιδιορθώσει την κυτταρική διαπερατότητα αξιολογώντας την έκφραση της ZO-1 (Johnson-Henry, και συν., 2014).

Ευεργετικά αποτελέσματα αναδείχθηκαν επίσης για τη δράση υπερκείμενων προϊόντων ζύμωσης προερχόμενων από επώαση με ινουλίνη ή αραβινοξυλο-ολιγοσακχαρίτες στην λειτουργία του εντερικού φραγμού, αφού φάνηκε πως οδηγούν σε αύξηση της κυτταρικής διαπερατότητας και έπειτα από έκθεση σε λιποπολυσακχαρίτη (LPS), συνεισφέρουν στην αύξηση των αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, σε *in vitro* μοντέλο συγκαλλιέργειας Caco-2 και THP1-Blue κυττάρων (Van den Abbeele, και συν., 2018). Πειράματα *in vitro* σε LS174T κύτταρα προέβαλλαν την ικανότητα των γαλακτο-ολιγοσακχαριτών να ενισχύουν τη δράση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη δράση των βλεννοπαραγωγών κυττάρων, που συντελούν στην εύρυθμη λειτουργία του εντερικού φραγμού (Bhatia, και συν., 2014). Παρόμοια ευρήματα προέκυψαν έπειτα από την *in vitro* επώαση υπερκείμενων προϊόντων ζύμωσης ξυλο-ολιγοσακχαριτών και μαλτοδεξτρίνης στην παραγωγή βλέννης του εντερικού επιθηλίου, σε συγκαλλιέργεια Caco-2 και HT29-MTX-E12 κυττάρων, ενώ συγκεκριμένα η επώαση με υπερκείμενα προϊόντα ζύμωσης β-γλυκανών βρώμης περιεκτικότητας 28% και β-γλυκανών

βρώμης περιεκτικότητας 94% οδήγησαν στην αύξηση αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών και στη βελτίωση της κυτταρικής διαπερατότητας διαρρέοντος εντερικού φραγμού (Pham, και συν., 2018). Τέλος, η χορήγηση *per os* για 2 εβδομάδες σε αρσενικά ποντίκια του πλούσιου σε β-γλυκάνες *Saccharomyces cerevisiae* (1mL) πριν από πρόκληση θερμικού στρες (25 min σε $\theta=45^{\circ}\text{C}$) συνεισέφερε στην αποφυγή της μειωμένης λειτουργικότητας των βλεννοπαραγωγών κυττάρων και βελτίωση, αλλά όχι επιδιόρθωση της έκφρασης των στεγανών συνδέσεων του εντερικού φραγμού (Ducray, και συν., 2019), ενώ η χορήγηση *ex vivo* του ίδιου παράγοντα έδειξε να μειώνει την παρακυτταρική διαπερατότητα έπειτα από πρόκληση χημικού στρες (Mall, et al., 2018).

Β' ΜΕΡΟΣ: ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦ. 1: Υλικά και Μέθοδοι

1.1. Σκοπός

Η συγκεκριμένη μελέτη είχε ως στόχο τη διερεύνηση της επίδρασης των προϊόντων ζύμωσης του *Pleurotus eryngii*, στα επίπεδα έκφρασης των στεγανών συνδέσεων *in vitro*, στην καρκινική σειρά παχέος εντέρου Caco-2 διεγερμένη με λιποπολυσακχαρίτη (LPS).

1.2. Χαρακτηριστικά εθελοντών

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα προϊόντα ζύμωσης των μανιταριών (Fermentation Supernatants - FS) που απομονώθηκαν στα πλαίσια του Ερευνητικού προγράμματος με ακρωνύμιο *FUNglucan* στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών (ΕΒΒΙΦΑΜ) – Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών. Για το σκοπό αυτό, στρατολογήθηκαν άτομα ηλικίας > 65 ετών, τα οποία είχαν φυσιολογικό βάρος ($\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$), δεν είχαν λάβει αντιβιοτικά τους τελευταίους δύο μήνες πριν την έναρξη της μελέτης και δε βρίσκονταν σε διαδικασία απώλειας σωματικού βάρους. Ασθενείς αυτοάνοσων νοσημάτων (π.χ. Ιδιοπαθής Φλεγμονώδης Νόσος του Εντέρου), άτομα που έπασχαν από Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου, όσοι αντιμετώπιζαν κάθε είδους

δυσκοιλιότητα ή διάρροια, καθώς και άτομα με σοβαρές νεφρικές ή ηπατικές νόσους, στεφανιαία νόσο, καρκίνο και οποιαδήποτε παθολογική κατάσταση του θυρεοειδούς αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Ακόμα, οι εθελοντές δεν κατανάλωσαν συμπληρώματα διατροφής ή εμπλουτισμένα τρόφιμα που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο όπως προβιοτικά, πρεβιοτικά και συνβιοτικά για 2 εβδομάδες πριν τη δειγματοληψία.

1.3. Προϊόντα ζύμωσης

Πραγματοποιήθηκε *in vitro* ζύμωσημανιταριών, με το στέλεχος *Pleurotus eryngii* LGAM 216 τα οποία είχαν καλλιεργηθεί σε δύο διαφορετικά υποστρώματα (PEWS - σε 100% άχυρο σίτου και PEWSGM - σε υπόστρωμα άχυρο σίτου: στέμφυλα σε αναλογία 1:1), από τον εντερικό μικροβιόκοσμο τριών υγιών εθελοντών ηλικίας > 65 ετών. Για την παραλαβή των υπερκείμενων, λήφθηκαν δείγματα από την *in vitro* ζύμωση την χρονική στιγμή $t=24$ ώρες, ακολούθησε φυγοκέντριση στις 10.000g για 30min στους 4°C. Τέλος, τα υπερκείμενα διηθήθηκαν μέσω φίλτρου, μεγέθους 33mm (Millex) και ακολούθησε αποθήκευση στους -20°C. Στη συγκεκριμένη μελέτη εκτός από τα υποστρώματα των μανιταριών χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας της ζύμωσης, χωρίς καμία πηγή άνθρακα, αλλά εμβολιασμένο με τον εντερικό μικροβιόκοσμο του κάθε εθελοντή, όπως αναφέρονται και στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Συντομογραφίες υποστρωμάτων προς εξέταση.

Περιγραφή	Συντομογραφία
Αρνητικός μάρτυρας (βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς πηγή άνθρακα)	NC
<i>Pleurotus eryngii</i> LGAM 216 σε 100% άχυρο σίτου (wheat straw-WS)	PEWS
<i>Pleurotus eryngii</i> LGAM 216 σε υπόστρωμα άχυρο σίτου:στέμφυλα (grape marc-GM) σε αναλογία 1:1 (w/w)	PEWSGM

1.4. Βακτηριακός λιπο-πολυσακχαρίτης (LPS)

Προκειμένου να προκληθεί βλάβη στη διαπερατότητα του εντερικού φραγμού χρησιμοποιήθηκε ο βακτηριακός λιπο-πολυσακχαρίτης (LPS) απομονωμένος από το βακτήριο *E.coli* (Cayman Chemical Company O55:B5 Hem 19660). Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η

επίδραση του LPS σε Caco-2 κύτταρα σε συγκεντρώσεις 80 ng/ μ L έως 200 ng/ μ L. Η ενδοτοξίνη ή λιποπολυσακχαρίτης (LPS), αποτελεί ακέραιο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των gram (-) βακτηρίων. Η απελευθέρωσή του στην κυκλοφορία του αίματος επάγει την έκφραση διαφόρων κυτταροκινών και ανοσολογικών αποκρίσεων, ενεργοποιώντας τον παράγοντα του συμπληρώματος και τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, η οποία μπορεί να είναι ευεργετική για την άμυνα του οργανισμού, όταν πραγματοποιείται κατά έναν ελεγχόμενο τρόπο (Tobias, Tarring, & Gegner, 1999). Σε φυσιολογικά υγιή άτομα, οι συγκεντρώσεις LPS στο πλάσμα κυμαίνονται από μη ανιχνεύσιμα επίπεδα έως 0,2 ng/mL. Ασθενείς με διαταραχές στην εντερική διαπερατότητα και τη λειτουργικότητα των TJs, όπως νόσος του Crohn, νεκρωτική εντεροκολίτιδα, οξεία παγκρεατίτιδα, αλκοολική ηπατική νόσος κ.ά. εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα LPS στο πλάσμα που κυμαίνονται έως 2 έως 10 ng/mL. Νεότερα δεδομένα αναδεικνύουν πως η επίδραση του LPS σε συγκεντρώσεις έως 100 ng/mL δεν προκαλεί κυτταρικό θάνατο σε *in vitro* καλλιέργειες Caco-2 κυττάρων, οδηγώντας όμως σε παραβίαση της επιθηλιακής ακεραιότητας και διαταραχές στη διαπερατότητα των TJs (Guo, Al-Sadi, Said, & Ma, 2013) (Tanoue, Nishitani, Kanazawa, Hashimoto, & Mizuno, 2008).

1.5. Κυτταροκαλλιέργειες

1.5.1. Κυτταρικές σειρές

Η κυτταρική σειρά Caco-2, έχει προέλθει από αδеноκαρκίνωμα παχέος εντέρου ανθρώπου. Τα κύτταρα Caco-2 (ATCC HTB-37) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με σταθερή γλουταμίνη (Biosera), εμπλουτισμένα με 1% πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη (10.000 U/mL / 10.000 μ g/mL, Biochrom) καθώς και με εμβρυϊκό βόειο ορό 10% (FBS, Biochrom), στους 37 °C και σε 5% CO₂.

1.5.2. Ανακαλλιέργεια Κυττάρων (split)

Η ανακαλλιέργεια κυττάρων πραγματοποιείται όταν τα κύτταρα έχουν καλύψει την επιφάνεια της φλάσκας στην οποία καλλιεργούνται κατά 70-80%, προκειμένου να αραιωθούν. Εν συντομία, πραγματοποιείται παρατήρηση της φλάσκας στο μικροσκόπιο, τα κύτταρα τα οποία είναι προσκολλημένα στην επιφάνεια της φλάσκας θεωρούνται υγιή, ενώ τα επιπλέοντα κύτταρα στο θρεπτικό υλικό θεωρούνται νεκρά. Αφαιρείται το θρεπτικό υλικό και ακολουθεί

πλύση των κυττάρων με PBS (Phosphate Buffer Saline - Takara), ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα του ορού τα οποία είναι αναστολείς της τρυψίνης. Κατόπιν προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος τρυψίνης (Trypsin/EDTA Solution 10x). Τέλος, όταν τα κύτταρα αποκολληθούν ακολουθεί η προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θρεπτικού υλικού.

1.6. Επώαση των κυττάρων Caco-2 με τα προϊόντα ζύμωσης (FS) και τον λιποπολυσακχαρίτη (LPS)

Προκειμένου να αξιολογηθεί η επίδραση των προϊόντων ζύμωσης στην αποκατάσταση της διαπερατότητας του εντερικού φραγμού πραγματοποιήθηκαν τρία διαφορετικά είδη χειρισμών. Οι χειρισμοί περιελάμβαναν:

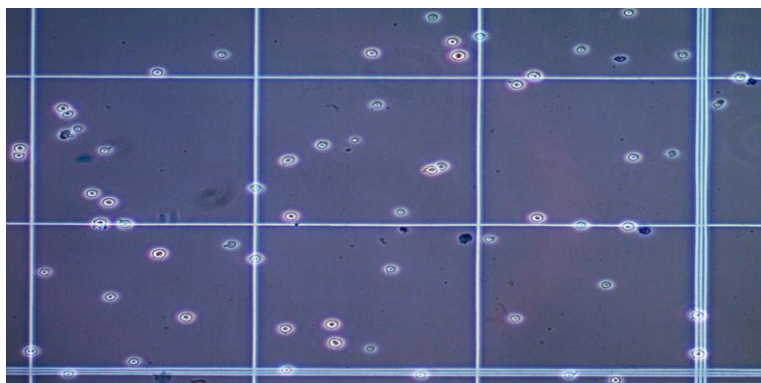
- 1) Προ-επώαση: Επώαση της κυτταρικής σειράς Caco-2, με τα προϊόντα ζύμωσης των μανιταριών PEWS και PEWSGM για 48 ώρες και έπειτα έκθεση στο λιποπολυσακχαρίτη (LPS) για 24 ώρες
- 2) Συν-επώαση: Ταυτόχρονη επώαση της κυτταρικής σειράς Caco-2 με τα προϊόντα ζύμωσης των δύο μανιταριών (PEWS και PEWSGM) και με το λιποπολυσακχαρίτη (LPS) για 48 ώρες
- 3) Μετά-επώαση: Έκθεση της κυτταρικής σειράς Caco-2 στο λιποπολυσακχαρίτη (LPS) για 24 ώρες και έπειτα επώαση της σειράς με τα προϊόντα ζύμωσης PEWS και PEWSGM για 48 ώρες

1.6.1. Έλεγχος της βιωσιμότητας των Caco-2 κυττάρων με τη μέθοδο trypan blue (dye exclusion test)

Η χρωστική μπλε του τρυπανίου (trypan blue) είναι μία ένωση μικρού μοριακού βάρους και προέρχεται από την τολουιδίνη $C_{14}H_{16}N_2$. Προσφέρει τη δυνατότητα διάκρισης μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων, αφού εισέρχεται εύκολα σε κύτταρα, που έχουν υποστεί βλάβη, δηλαδή σε νεκρά κύτταρα λόγω της κατεστραμμένης κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης. Έτσι, τα ζωντανά κύτταρα και τα κύτταρα σε πρώιμο στάδιο απόπτωσης παραμένουν αχρωμάτιστα, ενώ τα νεκρά βαμμένα μπλε κύτταρα παρατηρούνται στο οπτικό μικροσκόπιο και καταμετρούνται με τη χρήση αιματοκυτταρόμετρου Newbauer (Louis & Siegel, 2011). Το ποσοστό βιωσιμότητας μιας φυσιολογικά αναπτυσσόμενης κυτταροκαλλιέργειας

πρέπει να είναι >95% και υπολογίζεται ως % βιωσιμότητας = (αριθμός βιώσιμων κυττάρων / συνολικός αριθμός κυττάρων) × 100 (Banfalvi, 2016).

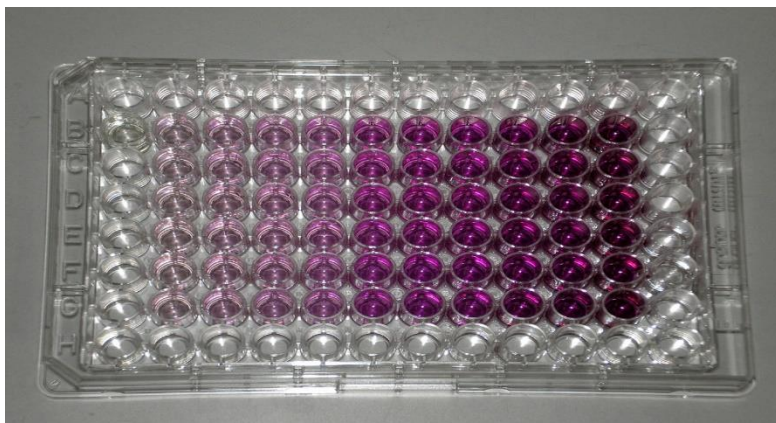
Η δοκιμασία trypan blue εφαρμόστηκε για την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης του LPS, ώστε να μην είναι τοξικό για τα Caco-2 κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της παραπάνω δοκιμασίας εξετάστηκαν οι παρακάτω συγκεντρώσεις του LPS: 80 ng/mL, 100 ng/mL και 120 ng/mL.



Εικόνα 13. Παράδειγμα μικροσκοπικής παρατήρησης έπειτα από χρώση trypan blue με χρήση αιματοκυτταρόμετρου Newbauer. (MicroDok, 2020)

1.6.2. Εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης των FS και του LPS με την μέθοδο MTT

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



Εικόνα 14. Παράδειγμα μακροσκοπικής παρατήρησης πιάτου 96 θέσεων έπειτα από μέθοδο κυτταροτοξικότητας MTT. (Wikipedia, 2020)

Για τον έλεγχο της επίδρασης των προϊόντων ζύμωσης και του LPS στην κυτταρική σειρά Caco-2, πραγματοποιήθηκαν πειράματα βιωσιμότητας με την μέθοδο MTT (3{4,5-διμέθυλθειαζολ-2-yl}-2,5 βρωμίδιο του διφαινυλοτετραζολίου) με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης τους ώστε να μην προκαλούν κυτταροτοξικότητα.

Για τον έλεγχο της βιωσιμότητας με την μέθοδο MTT, εξετάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών: 1%, 2%, 5%, 8% και 10%. Ακόμα, για κάθε μία από τις παραπάνω συγκεντρώσεις, μελετήθηκαν διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης στην κυτταρική σειρά Caco-2: 3, 4, 24, 48 και 72 ώρες. Τα κύτταρα που δεν επώαστηκαν με το προϊόν ζύμωσης των μανιταριών χρησιμοποιήθηκαν ως θετικό δείγμα ελέγχου (Untreated), ενώ ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας της ζύμωσης, χωρίς καμία πηγή άνθρακα (NC) (Πίνακας 1). Για τον έλεγχο της βιωσιμότητας με την μέθοδο MTT, εξετάστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις για τον λιποπολυσακχαρίτη: 100 ng/mL, 120 ng/mL και 150 ng/mL. Κάθε μία από τις παραπάνω συγκεντρώσεις του LPS, ελέγχθηκε σε διαφορετικούς χρόνους επώασης: 3, 4, 24, 48 και 72 ώρες. Ως αρνητικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που δεν επώαστηκαν με το λιποπολυσακχαρίτη. Αρχικά, τα κύτταρα Caco-2 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM και επιστρώθηκαν σε πιάτο 96 θέσεων. Ακολούθησε επώαση της κυτταρικής σειράς για 3, 4, 24, 48 και 72 ώρες, είτε με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των προϊόντων ζύμωσης, είτε με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του λιποπολυσακχαρίτη. Τέλος, εξετάστηκε η συνεπώαση των προϊόντων ζύμωσης (FS-PEWS ή FS-PEWSGM) με το LPS σε επιλεγμένες συγκεντρώσεις.

Μετά την παρέλευση των διάφορων χρονικών περιόδων, σε κάθε θέση των πιάτων προστέθηκε 15μL φιλτραρισμένου διαλύματος MTT (5mg/mL) και ακολούθησε επώαση στον κλίβανο κυτταροκαλλιέργειας για 4 ώρες. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν 100 μL DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο-dimethylsulfoxide) για να διαλυτοποιηθούν οι κρύσταλλοι φορμαζανίου. Τέλος, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 540 nm χρησιμοποιώντας την συσκευή Tecan (Biotek), ενώ η συλλογή των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού Gen5.

1.7. Απομόνωση ολικού RNA

Για την απομόνωση RNA, τα Caco-2 κύτταρα, αναπτύχθηκαν σε πιάτο καλλιέργειας 6 θέσεων (100.000 ή 135.000 κύτταρα/ θέση) και επώαστηκαν με το διάλυμα NucleoZOL (Macherey Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή με κάποιες τροποποιήσεις (Macherey-Nagel, 2015). Η διαδικασία της απομόνωσης στα CaCo-2 κύτταρα περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

- 1) **Ομογενοποίηση:** Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού σε κάθε θέση του πιάτου, προσθήκη 1mL NucleoZOL και μεταφορά του κάθε δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου Eppendorf
- 2) **Καθαρισμός προσμίξεων:** Προσθήκη 400 μL νερού ddH₂O και ανακίνηση δια χειρός για 15 sec. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση σε 11.900 g για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Παραλαβή 800 μL της υδατικής φάση και μεταφορά σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου Eppendorf
- 3) **Κατακρήμνιση του ολικού RNA:** Προσθήκη 800 μL ισοπροπανόλης, επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση σε 11.900 g για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαίρεση υπερκείμενου
- 4) **Πλύση του RNA:** Έκπλυση ιζήματος με προσθήκη 500 μL αιθανόλης 75%, φυγοκέντρηση σε 8.000 g για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου και αφαίρεση υπερκείμενου. Επανάληψη διαδικασίας τρεις φορές
- 5) **Ανασύσταση του RNA:** Επαναδιαλυτοποίηση ιζήματος με προσθήκη 20-40 μL ddH₂O
- 6) **Φωτομέτρηση RNA:** Η ποιότητα και η ποσότητα του απομονωμένου RNA προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά (260 nm) και με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2 %

1.8. Ηλεκτροφόρηση RNA

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ποσότητα και η ποιότητα του απομονωμένου RNA, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης, η αποτελεί μία την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο διαχωρισμού, χαρακτηρισμού και απομόνωσης τμημάτων νουκλεϊκών οξέων, καθώς πρόκειται για μία απλή, γρήγορη και αρκετά ευαίσθητη τεχνική (Campbell & Reece, 2010). Οι αναμενόμενες ζώνες- θραύσματα για την εξασφάλιση ποιοτικά απομονωμένου RNA περιλαμβάνουν την εμφάνιση των ζωνών 28 S, 18 S και 5S, που αποτελούν χαρακτηριστικά μόρια του ριβοσωμικού RNA (Vendrely, Alexandron, De Sousa Lechner, & Coirault, 1968). Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2 % περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

1) Προετοιμασία του πηκτώματος αγαρόζης

- Διάλυμα αγαρόζης 1,8 g (Agarose -Nippon Genetics Europe GmbH Fast Gene) σε 150 ml ρυθμιστικού διαλύματος τρις- οξικού- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέος (Tris-Acetate-EDTA , TAE Buffer 50x, Biosolve) και διαλυτοποίηση με βοήθεια θέρμανσης
- Προσθήκη 1,5 μL χρωστικής GelRed (Nucleic Acid Stain 10000X Water, Biotium)
- Τοποθέτηση του διαλύματος αγαρόζης στο κατάλληλα συναρμολογημένο καλούπι (δίσκο) της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αναμονή 20-30 min μέχρι την πήξη του διαλύματος
- Τοποθέτηση του δίσκου με το πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προσθήκη διαλύματος TAE 1x, έως την επαρκή κάλυψη του πηκτώματος και προσεκτική αφαίρεση της χτένας

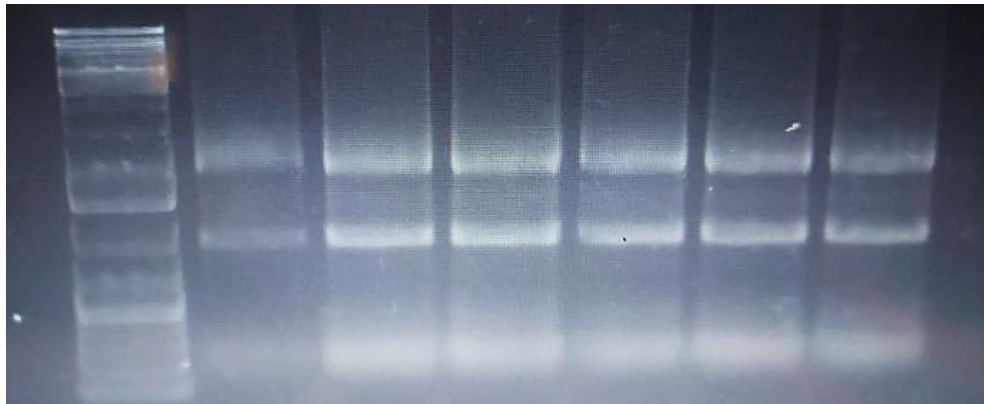
2) Προετοιμασία των απομονωμένων δειγμάτων RNA

- Ανάμειξη 1μL των δειγμάτων RNA προς ηλεκτροφόρηση με 1μL χρωστικής ουσίας (Thermo Scientific 6x DNA Loading Dye)
- Ανάμειξη 4μL του δείγματος μάρτυρα προς ηλεκτροφόρηση με 1μL χρωστικής ουσίας (Thermo Scientific Generuler 1kb Plus DNA Ladder 0,5 μg/μL)
- Τοποθέτηση όλων των δειγμάτων στις θέσεις του πηκτώματος

3) Ηλεκτροφόρηση και ανίχνευση του RNA

- Σύνδεση της συσκευής ηλεκτροφόρησης με το τροφοδοτικό και εφαρμογή σταθερής τάσης 100 Volt, έντασης 200mA σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 min

- Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) με τη χρήση του μηχανήματος UVP (Biospectrum) και ανάγνωση των αποτελεσμάτων με τη χρήση του λογισμικού UVP Software



Εικόνα 15. Πήκτωμα αγαρόζης από την ηλεκτροφόρηση του απομονωμένου RNA, σε κύτταρα Caco-2 από την επώαση (1) untreated κυττάρων (2) FS-PEWS 2% v/v, (3) FS-NC 2% v/v, (4) LPS 100 ng/mL, (5) FS-PEWS 2% v/v, (6) FS-PEWS 2% v/v + LPS 100 ng/mL. Στήλη M: 1000 bp DNA Marker. Διακρίνονται οι 3 ζώνες που αντιστοιχούν στα 28S, 18S και 5S RNA.

1.9. Σύνθεση cDNA

Κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα του RNA, τα οποία μετατράπηκαν σε cDNA μόρια, παρουσία του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο του PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (6110A, Takara) με εκκινητές προερχόμενους από μίγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών. Συγκεκριμένα, η διαδικασία της σύνθεσης του cDNA περιελάμβανε τα ακόλουθα βήματα:

- Χρήση 1 μg ολικού RNA ως μήτρα
- Ανάμιξη του RNA με ddH₂O, 2 μL τυχαίων εξαμερών εκκινητών (Random 6 mers, 50 μM) και 1 μL μίγματος τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTP Mixture, 10mM) σε τελικό όγκο 10 μL
- Επώαση για 5 min στους 65 °C με τη χρήση του θερμοκυκλοποιητή Primus 96 Plus, για αποδιάταξη του RNA
- Επώαση στον πάγο για τουλάχιστον 1 min, για διατήρηση της μονόκλωνης κατάστασης του RNA

- Προσθήκη σε κάθε δείγμα 4 μL 5x PrimeScript Buffer, 0,5 μL (20 units) αναστολέα Rnaσών (RNase Inhibitor, 40 U/ μL), 1 μL (200 units) αντίστροφης μεταγραφάσης (PrimeScript RTase 200 U/ μL) και 4,5 μL ddH₂O σε τελικό όγκο 20 μL
- Επώση στους 37 °C για 15 min, έπειτα στους 42 °C για 30 min και τέλος στους 70°C για 15 min με τη χρήση του θερμοκυκλοποιητή Primus 96 Plus

1.10. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων της έκφρασης των γονιδίων, αποτελεί πλέον βασικό εργαλείο στα περισσότερα εργαστήρια μοριακής βιολογίας. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) βασίζεται στη κλασσική PCR και χρησιμοποιείται για να ενισχύσει τμήματα DNA, ενώ παράλληλα επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων. Η μέτρηση της ποσότητας πραγματοποιείται καθόλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας, η οποία είναι ανάλογη του παραγόμενου προϊόντος και σχετίζεται με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Μια τέτοια ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική, η οποία χρησιμοποιήθηκε στο παρόν πρωτόκολλο, είναι η SYBR green I, η οποία ανήκει στις μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές ουσίες, διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm, αλλά δε φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα, παρά μόνο όταν δεσμεύεται στο DNA κατά τη σύνθεσή του (Bookout & Mangelsdorf, 2003).

Μέσω της σχετικής ποσοτικοποίησης με τη μέθοδο $\Delta\Delta C_t$ παρουσιάζονται οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA ενός γονιδίου-στόχου, σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα ενός παράλληλα ενισχυόμενου mRNA, ενός κατάλληλου ενδογενούς εκφραζόμενου γονιδίου - ελέγχου (internal control). Επιπλέον, πραγματοποιείται σύγκριση των C_T τιμών των δειγμάτων προς ανάλυση με τις αντίστοιχες τιμές ενός δείγματος-αναφοράς. Οι τιμές C_T του mRNA-στόχου, τόσο των δειγμάτων προς εξέταση όσο και του δείγματος-αναφοράς, κανονικοποιούνται ως προς τις αντίστοιχες τιμές του ενδογενούς γονιδίου-ελέγχου. Η κανονικοποίηση ως προς το ενδογενές γονίδιο απαιτείται για τη διόρθωση των πιθανών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες οφείλονται σε διαφορετική συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (cDNA) ή σε διαφορές στην αποδοτικότητα της αντίδρασης ενίσχυσης. Η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης χαρακτηρίζεται μαθηματικά από την εξίσωση $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, όπου RQ η σχετική ποσότητα μεταγράφων του αντίστοιχου γονιδίου, ΔC_t η διαφορά του C_t του εξεταζόμενου γονιδίου από το

C_t του γονιδίου της ακτίνης και $\Delta\Delta C_t$ η διαφορά του ΔC_t του εκάστοτε δείγματος από το ΔC_t του δείγματος αναφοράς. Εξ' ορισμού, για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι $2^{-\Delta\Delta C_t} = 2^0 = 1$. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες φορές είναι αυξημένη ή αντίστοιχα μειωμένη η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου στόχου στα δείγματα αυτά, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς (Schmittgen & Livak, 2008). Τέλος, αξιολογήθηκε η εξειδίκευση των εκκινητών και ο σχηματισμός διμερών των εκκινητών για κάθε ζεύγος ξεχωριστά από την ανάλυση της καμπύλης θερμικής αποδιάταξης στο τέλος της αντίδρασης (melting curve analysis).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση των τριών διαφορετικών χειρισμών, που περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα, στην έκφραση των γονιδίων της *occludin*, της *claudin-1* και της *ZO-1*, που σχετίζονται με τη διαπερατότητα του εντερικού φραγμού. Το γονίδιο της β -ακτίνης (*b-act*) που εκφράζεται ιδιοστατικά (housekeeping gene) σε όλους τους κυτταρικούς τύπους, χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων και οι αλληλουχίες των ανοδικών και καθοδικών εξειδικευμένων εκκινητών (Eurofins, Genomics) που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε στο θερμοκυκλοποιητή πραγματικού χρόνου ABI StepOne (Applied Biosystems), χρησιμοποιώντας ειδικά πιάτα 96 θέσεων MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plates (0.1 mL) (Applied Biosystems) και το κιτ KAPA SYBR®FAST Qpcr Master Mix (2x) Universal (Kapa Biosystems, KK4601) υπό τις συνθήκες: 95 °C για 3 min ακολουθούμενο από 40 κύκλους των 95 °C για 15 sec και 60 °C για 1 min και τελευταίο ένα κύκλο των 95 °C για 15 sec, 60 °C για 1 min και 95 °C για 15 sec. Κάθε αντίδραση περιείχε 10 μ L SYBR Green, 0,4 μ L χρωστική καρβοξυ-X-ροδαμίνη (ROX), 6,8 μ L ddH₂O, 2 μ L cDNA ως μήτρα και 0.4 μ L από τους ανοδικούς και καθοδικούς εκκινητές για το εκάστοτε γονίδιο. Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε εις διπλούν και το γονίδιο της β -ακτίνης που εκφράζεται ιδιοστατικά (housekeeping gene) χρησιμοποιήθηκε για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα γονίδια παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

A/A	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' -> 3')	Tm (°C)	GC % περιεκτικότητα	Αναφορά
1	<i>Claudin-1F</i>	TGGTCAGGCTCTCTTCACTG (20)	59.4	55%	(Chen, και συν., 2019)
2	<i>Claudin-1R</i>	TTGGATAGGGCCTTGGTGTT (20)	57.3	50%	(Chen, και συν., 2019)

3	<i>ZO-1-F</i>	TTCACGCAGTTACGAGCAAG (20)	57.3	50%	(Chen, και συν., 2019)
4	<i>ZO-1-R</i>	TTGGTGTTTGAAGGCAGAGC (20)	57.3	50%	(Chen, και συν., 2019)
5	<i>Occludin-F</i>	ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC (22)	58.4	45.5%	(Chen, και συν., 2019)
6	<i>Occludin-R</i>	GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT (22)	58.4	45.5%	(Chen, και συν., 2019)
7	<i>b-actin-F</i>	GCGCGGCTACAGCTTCA (17)	57.6	64.7%	(Saxami, και συν., 2016)
8	<i>b-actin-R</i>	CTTAATGTCACGCACGATTTC (22)	58.4	45.5%	(Saxami, και συν., 2016)

1.11. Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 21. Ο έλεγχος της κανονικότητας της κατανομής των συνεχών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία κανονικότητας Shapiro-Wilk test σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας $\alpha=0,05$ και οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν ως προς τη διαφοροποίηση των τριών ειδών χειρισμών στην έκφραση των *ZO-1*, *occludin*, *claudin* για το σύνολο των εθελοντών, ανά υπόστρωμα καλλιέργειας μανιταριού WS ή WSGM και αντίστοιχα ανά εθελοντή. Οι συνεχείς μεταβλητές, που κατανεμήθηκαν κανονικά, εκφράστηκαν στους τελικούς πίνακες και τα διαγράμματα, που παρουσιάζονται παρακάτω ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση, ενώ για τον έλεγχο των συγκρίσεων μεταξύ των ομάδων αυτής της κατηγορίας, πραγματοποιήθηκε έλεγχος διαφοράς μέσων των δύο ανεξάρτητων δειγμάτων (2 Independent Samples - T test). Οι συνεχείς μεταβλητές, που δεν ακολούθησαν την κανονική κατανομή, παρουσιάζονται στους τελικούς πίνακες και τα διαγράμματα, ως διάμεσος (1ο τεταρτημόριο – 3ο τεταρτημόριο) και η σύγκριση των μέσων τιμών μεταξύ των ομάδων αυτής της κατηγορίας πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο Mann-Whitney test. Οι έλεγχοι αυτοί επίσης πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$.

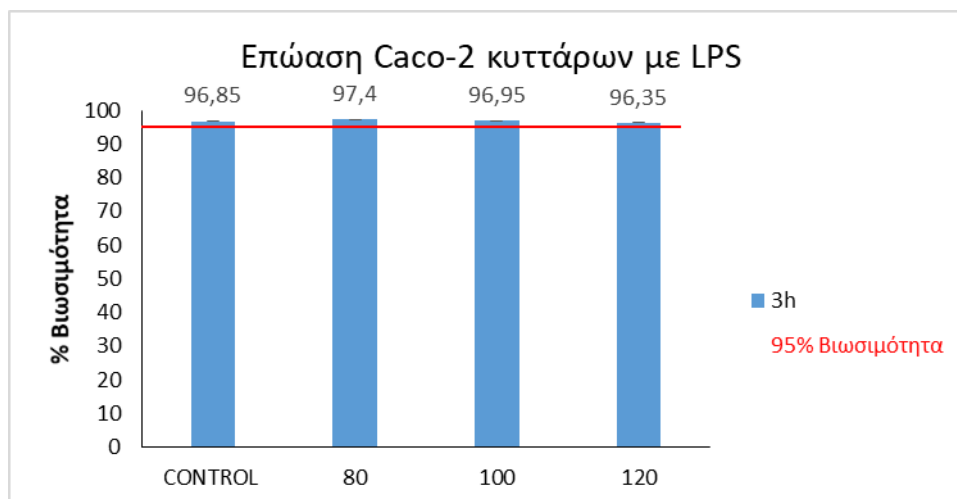
ΚΕΦ. 2 :Αποτελέσματα

2.1. Χαρακτηριστικά δείγματος εθελοντών

Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 3 τυχαία δείγματα εθελοντών, από τους 8 συνολικά που συμμετείχαν στη μελέτη της *in vitro* ζυμωσης του προγράμματος με ακρωνύμιο FUNglucan και το 66,6 % του δείγματος ήταν γυναίκες. Στο σύνολο τους οι εθελοντές της παρούσας μελέτης είχαν Ηλικία $71,67 \pm 8,15$ έτη, Βάρος = $63,37 \pm 0,32$ kg, Ύψος = $1,61 \pm 0,14$ m και Δ.Μ.Σ. = $24,94 \pm 4,62$ kg/m².

2.2. Επίδραση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) στη βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2: Καταμέτρηση μέσω της χρωστικής Trypan Blue

Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την δοκιμασία Trypan Blue, έπειτα από την επώαση της κυτταρικής σειράς Caco-2 με τον λιποπολυσακχαρίτη σε συγκεντρώσεις 80 ng/mL, 100 ng/mL και 120 ng/mL για 3 ώρες.



Διάγραμμα 1. Η % βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2 μετά την επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις του λιποπολυσακχαρίτη LPS (80 ng/mL, 100 ng/mL, 120 ng/mL) για 3 ώρες επώασης. LPS: Λιποπολυσακχαρίτης, Control: κύτταρα που δεν επωάστηκαν με το LPS

Όπως παρουσιάζεται και στο Διάγραμμα 1, καμία από τις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις του LPS δεν ήταν κυτταροτοξική για την ανάπτυξη των κυττάρων, καθώς όλες οι συγκεντρώσεις οδήγησαν σε βιωσιμότητα των κυττάρων > 95%. Ακόμα, τα κύτταρα που δεν επωάστηκαν με το

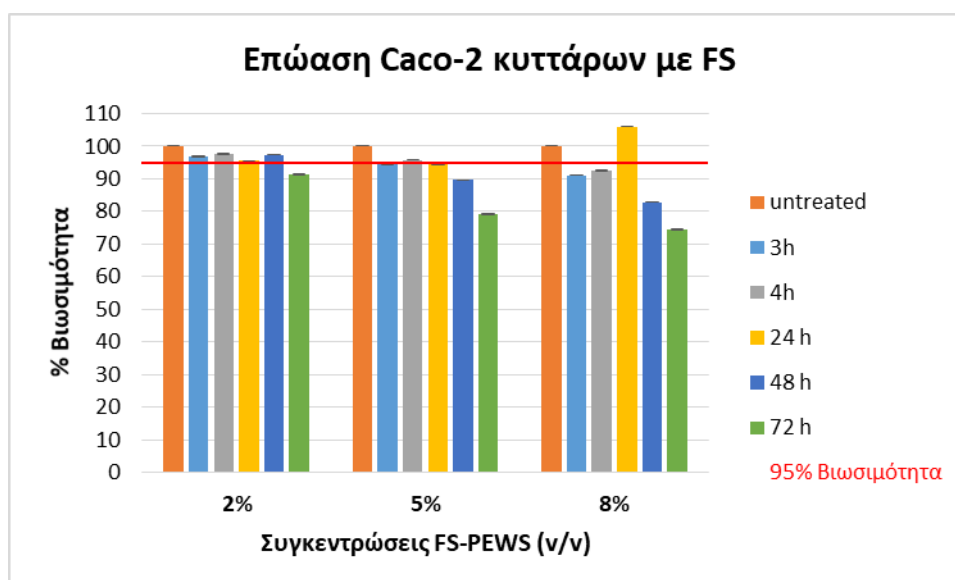
LPS (Untreated) παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα βιωσιμότητας σε σύγκριση με τα κύτταρα που επώαστηκαν με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του LPS (control:βιωσιμότητα 96,85%, LPS 100 ng/mL: βιωσιμότητα 96,95%, LPS 120 ng/mL: βιωσιμότητα 96,35%), ενώ η μεγαλύτερη βιωσιμότητα εμφανίστηκε κατά την επώαση των κυττάρων με το LPS σε συγκέντρωση 80 ng/mL (βιωσιμότητα 97,4%). Ακολούθησε περαιτέρω έλεγχος και αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων μετά από την επίδραση των παραπάνω συγκεντρώσεων του LPS με τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας MTT.

2.3. Επίδραση των υπερκείμενων της ζύμωσης ή/και του LPS στη βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2: Καταμέτρηση με τη μέθοδο MTT

Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο MTT, παρουσιάζονται στα Διαγράμματα 2-4. Εξετάστηκε η βιωσιμότητα των Caco-2 κυττάρων, έπειτα από την επώαση τους είτε με το FS-PEWS (συγκεντρώσεις 1% v/v, 2% v/v, 5% v/v, 8% v/v, 10% v/v) (Διάγραμμα 2) είτε με το LPS (συγκεντρώσεις 80 ng/mL, 100 ng/mL, 120 ng/mL, 150 ng/mL, 200 ng/mL) (Διάγραμμα 3) για 3, 4, 24, 48 και 72 ώρες. Ακόμα εξετάστηκαν διάφοροι συνδυασμοί, έπειτα από την επώαση των κυττάρων με το FS-PEWS και με τον λιποπολυσακχαρίτη LPS, στην κυτταρική σειρά Caco-2 για τις ίδιες χρονικές στιγμές (Διάγραμμα 4).

2.3.1. Εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης του FS-PEWS με τη μέθοδο MTT

Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα βιωσιμότητας της κυτταρικής σειράς Caco-2, έπειτα από επώαση με το FS-PEWS σε συγκεντρώσεις 2% v/v, 5% v/v και 8% v/v για 3, 4, 24, 48 και 72 ώρες.



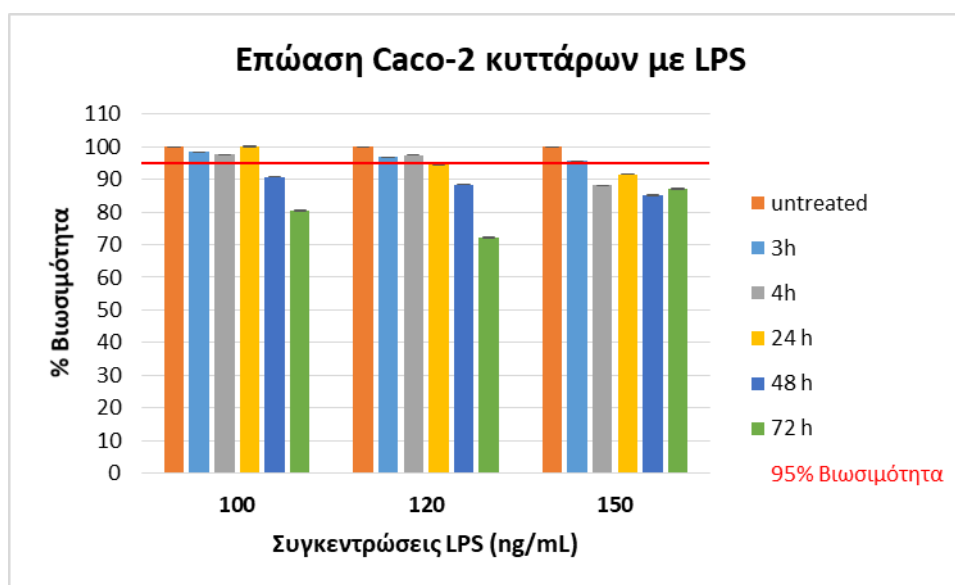
Διάγραμμα 2. Η % βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2 έπειτα από την επώαση των κυττάρων με το προϊόν ζύμωσης του μανιταριού PEWS σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (2% v/v, 5% v/v, 8% v/v) για 3, 4, 24, 48 και 72 ώρες επώασης. FS: προϊόν ζύμωσης, PEWS: *Pleurotus eryngii* στέλεχος Zheng (216), untreated: κύτταρα που δεν επώαστηκαν με το FS-PEWS

Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 2, η βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2 αναστέλλεται με όσο και χρονό εξαρτώμενο τρόπο. Η συγκέντρωση 2% v/v για το προϊόν ζύμωσης του μανιταριού PEWS, αναδεικνύεται ως η βέλτιστη, καθώς τα επίπεδα βιωσιμότητας παραμένουν >95% για τις 48 ώρες επώασης. Για την ίδια χρονική στιγμή, οι συγκεντρώσεις του FS-PEWS 5% v/v (89,65%) και 8% v/v (82,80%) αναστέλλουν σημαντικά την βιωσιμότητα των κυττάρων. Επιπλέον, ως προς τις συγκεντρώσεις του FS-PEWS 1% v/v και 10% v/v (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται), απορρίφθηκαν εξ αρχής, καθώς το FS-PEWS σε συγκέντρωση 1% v/v οδήγησε σε αρκετά υψηλή επιβίωση των Caco-2 κυττάρων σε ποσοστό 99,78% για 3 ώρες επώασης και 97,43% για 48 ώρες επώασης. Επομένως η 1% v/v συγκέντρωση απορρίφθηκε ως μη επαρκής για την εύρεση κάποιου είδους βιολογικής επίδρασης. Αντιθέτως, τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία κυτταροτοξικότητας εντόπισαν υψηλή κυτταροτοξική δράση στη βιωσιμότητα των κυττάρων, έπειτα από επώαση τους με το FS-PEWS σε συγκέντρωση 10% v/v (3 ώρες επώασης: βιωσιμότητα 90,79% και 48 ώρες επώασης: βιωσιμότητα 67,87%).

Συνεπώς, από τα παραπάνω ευρήματα ως βέλτιστη συγκέντρωση του προϊόντος ζύμωσης του μανιταριού PEWS επιλέχθηκε η συγκέντρωση 2% v/v, καθώς παρουσιάζεται ως μη κυτταροτοξική για το χρόνο επώασης των κυττάρων τις 48 ώρες.

2.3.2. Εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης του LPS με την μέθοδο MTT

Στο Διάγραμμα 3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την επώαση της κυτταρικής σειράς Caco-2, με το λιποπολυσακχαρίτη LPS σε συγκεντρώσεις 100 ng/mL, 120 ng/mL και 150 ng/mL, για 3,4,24,38 και 72 ώρες επώασης.

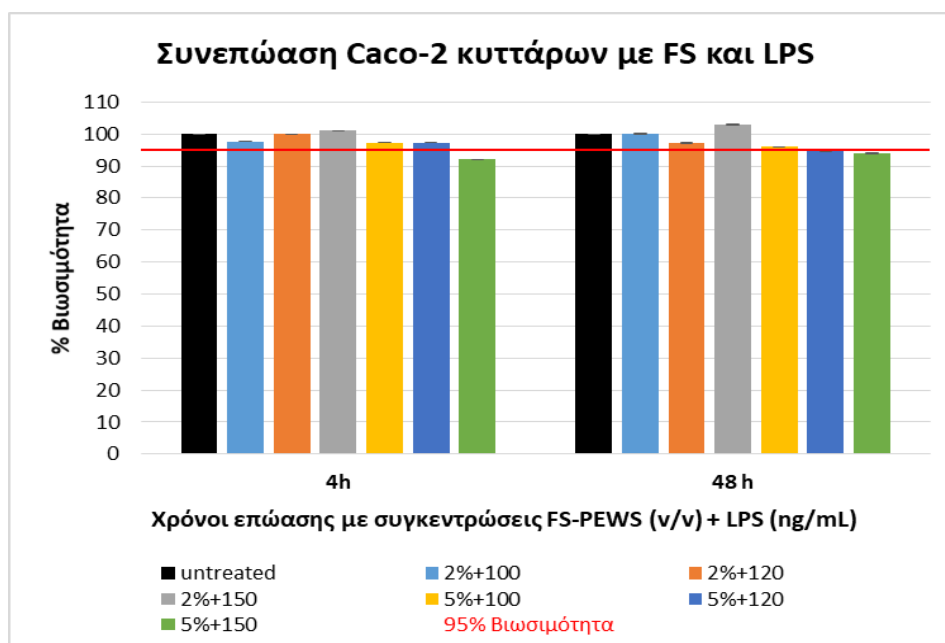


Διάγραμμα 3. Η% βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2, μετά την επώαση των κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις του LPS (100 ng/mL, 120 ng/mL, 150 ng/mL) για 3, 4, 24, 48 και 72 ώρες επώασης. LPS: Λιποπολυσακχαρίτης, untreated: κύτταρα που δεν επώαστηκαν με το LPS

Όπως παρατηρείται στο Διάγραμμα 3, καθόλη τη διάρκεια των 72 ωρών επώασης των κυττάρων Caco-2 παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων του LPS, παρουσιάστηκε αναστολή στην βιωσιμότητα των κυττάρων με χρόνο και δόσο εξαρτώμενο τρόπο. Το LPS σε συγκέντρωση 100 ng/mL, οδήγησε σε βιωσιμότητα των κυττάρων σε ποσοστό 100% κατά τις πρώτες 24 ώρες επώασης και σε ποσοστό 90,72% έπειτα από 48 ώρες επώασης. Οι συγκεντρώσεις 120 ng/mL και 150 ng/mL εμφάνισαν σημαντική αναστολή στην βιωσιμότητα των κυττάρων από τις πρώτες 24 ώρες επώασης με τον λιποπολυσακχαρίτη. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση 120 ng/mL επηρέασε σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2 σε 24 ώρες επώασης με το LPS (3 ώρες: βιωσιμότητα 96,79 % και 24 ώρες: βιωσιμότητα 94,35%), η αναστολή στην βιωσιμότητα των κυττάρων αυξήθηκε περαιτέρω στις 48 ώρες επώασης (βιωσιμότητα: 88,33%), ενώ στις 72 ώρες επώασης η επιβίωση των κυττάρων έφτασε σε ποσοστό 72,1%. Όσον αφορά, τη συγκέντρωση 150 ng/mL κατά τις 3 πρώτες ώρες επώασης φάνηκε να μην επηρεάζει σημαντικά τη βιωσιμότητα των κυττάρων (βιωσιμότητα: 95,56%), ενώ στη συνέχεια παρουσίασε κυτταροτοξική δράση, έπειτα από 24 και 48 ώρες επώασης

(βιωσιμότητα: 91,51% και 85,15% αντίστοιχα). Συνεπώς, από τα παραπάνω ευρήματα προκύπτει ότι η συγκέντρωση 100 ng/mL, αποτελεί τη βέλτιστη και μη κυτταροτοξική συγκέντρωση για τον λιποπολυσακχαρίτη, ενώ ως χρόνος επώασης επιλέχθηκαν οι 24 ώρες.

Προκειμένου να αξιολογηθούν περαιτέρω οι συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν για το προϊόν ζύμωσης (FS-PEWS) και για το λιποπολυσακχαρίτη LPS, και να επιβεβαιωθεί ότι οι συγκεντρώσεις παραμένουν μη κυτταροτοξικές για τα κύτταρα, όταν βρίσκονται σε συνθήκες συν επώασης, μελετήθηκε η συνεπώαση του FS-PEWS σε συγκέντρωση 2% v/v ή 5% v/v με το LPS, σε συγκεντρώσεις 100 ng/mL, 120 ng/mL και 150 ng/mL για 48 ώρες, όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 4.



Διάγραμμα 4. Η % βιωσιμότητα των Caco-2 κυττάρων, έπειτα από την συνεπώαση του FS-PEWS + LPS (2% v/v FS-PEWS + 100 ng/mL LPS, 2% v/v FS-PEWS + 120 ng/mL LPS, 2% v/v FS-PEWS + 150 ng/mL LPS, 5% v/v FS-PEWS + 100 ng/mL LPS, 5% v/v FS-PEWS + 120 ng/mL LPS και 5% v/v FS-PEWS + 150 ng/mL LPS) για 4 και 48 ώρες επώασης. FS: προϊόν ζύμωσης, PEWS: *Pleurotus eryngii* στέλεχος Zheng (216), LPS: Λιποπολυσακχαρίτης, untreated: κύτταρα που δεν επώαστηκαν με FS-PEWS+LPS

Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 4, από την συνεπώαση των κυττάρων Caco-2, με το FS-PEWS (συγκέντρωση 2% v/v) και με το LPS (σε συγκεντρώσεις 100, 120 και 150 ng/ml) για 4 ώρες, δεν παρατηρείται σημαντική αναστολή στην βιωσιμότητα των κυττάρων σε καμία από τις παραπάνω συγκεντρώσεις (2% v/v +100 ng/mL:βιωσιμότητα 97,66%, 2% v/v + 120 ng/mL: βιωσιμότητα 100 % και 2% v/v + 150 ng/mL: βιωσιμότητα 101%). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται για τις ίδιες συνθήκες συν επώασης και για τις 48 ώρες επώασης χωρίς

σημαντική αναστολή στην βιωσιμότητα των κυττάρων (2% v/v + 100 ng/mL: βιωσιμότητα 100 %, 2% v/v + 120 ng/mL: βιωσιμότητα 97,24 % και 2% v/v + 150 ng/mL: βιωσιμότητα 103 %).

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα από τη συνεπώαση του προϊόντος ζύμωσης του μανιταριού PEWS σε συγκέντρωση 5% v/v με το LPS (σε συγκεντρώσεις 100, 120 και 150 ng/ml) για 4 και 24 ώρες, παρατηρείται τόσο και χρόνο εξαρτώμενη αναστολή στην βιωσιμότητα των κυττάρων (5% v/v + 100 ng/mL: βιωσιμότητα 97,32%, 5% v/v + 120 ng/mL: βιωσιμότητα 97,32% και 5% v/v + 150 ng/mL: βιωσιμότητα 92,01%, έναντι 48 ωρών επώασης 5% v/v + 100 ng/mL: βιωσιμότητα 95,94%, 5% v/v + 120 ng/mL: βιωσιμότητα 94,51% και 5% v/v + 150 ng/mL: βιωσιμότητα 93,84%).

Συγκεντρωτικά και λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω αναλύσεις, ταυτοποιήθηκαν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις και οι χρόνοι επώασης για τα FS-PEWS και για το LPS. Πιο συγκεκριμένα:

- 1) Προ-επώαση: Επώαση της κυτταρικής σειράς Caco-2, με το προϊόν ζύμωσης του μανιταριού (PEWS ή PEWSGM) σε συγκέντρωση 2% v/v για 48 ώρες και έπειτα επώαση με το LPS σε συγκέντρωση 100 ng/mL για 24 ώρες
- 2) Συν-επώαση: Ταυτόχρονη επώαση της κυτταρικής σειράς Caco-2 με το FS των μανιταριών (PEWS ή PEWSGM) σε συγκέντρωση 2% v/v και του LPS σε συγκέντρωση 100 ng/mL για 48 ώρες.
- 3) Μετά-επώαση: Επώαση της κυτταρικής σειράς Caco-2 με το LPS σε συγκέντρωση 100 ng/mL για 24 ώρες και έπειτα επώαση με το FS των μανιταριών (PEWS ή PEWSGM) σε συγκέντρωση 2% v/v για 48 ώρες.

2.4. Αποτελέσματα έκφρασης *TJs*

2.4.1. Αποτελέσματα έκφρασης *TJs* για το σύνολο των εθελοντών

Προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση της επώασης των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών PEWS και PEWSGM στην κυτταρική σειρά Caco-2 διεγερμένη με LPS, ως προς την αποκατάσταση του εντερικού φραγμού, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα mRNA των στεγανών συνδέσμων: *ZO-1*, *occludin* και *claudin-1* έπειτα από την επίδραση των τριών διαφορετικών ειδών χειρισμών. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της έκφρασης των γονιδίων *ZO-1*, *occludin* και *claudin-1* για το σύνολο των εθελοντών.

Πίνακας 4. Η επίδραση των FS-PEWS και FS-PEWSGM στην έκφραση των γονιδίων ZO-1, occludin και claudin-1, για το σύνολο των εθελοντών, έπειτα από την πραγματοποίηση των τριών διαφορετικών χειρισμών (FS/LPS, FS+LPS, LPS/FS). Untreated: κύτταρα καλλιέργειας χωρίς καμία επίδραση.

		UNTREATED	FS-PEWS	FS-NC1	LPS1	FS-PEWSGM	FS-NC2	LPS2
ZO-1	FS/LPS	1.000 ± 0.000	1.317 ± 0.672 *	0.843 ± 0.216 *	0.568 ± 0.108 †	1.283 ± 0.253 a, **	1.215 ** (0.740 , 1.220)	0.577 ± 0.720 ‡
	FS+LPS	1.000 ± 0.000	1.025 *, † (1.000, 2.040)	0.707 ± 0.246	0.628 ± 0.234	0.968 ± 0.055 ‡	0.815 ± 0.074	0.748 ± 0.246
	LPS/FS	1.000 ± 0.000	1.005 * (0.870 , 1.760)	1.125 ± 0.151 *	0.657 ± 0.110 †	0.935 a, ** (0.920 , 0.940)	0.845 ± 0.169	0.575 (0.520 , 0.880)
Occludin	FS/LPS	1.000 ± 0.000	1.210 ± 0.392 *	0.983 ± 0.222 *	0.718 ± 0.060 †	1.190 ± 0.365 **	1.272 ± 0.067 **	0.630 ± 0.102 ‡
	FS+LPS	1.000 ± 0.000	1.070 * (0.870 , 4.480)	0.812 ± 0.315	0.742 ± 0.166	1.038 ± 0.161 ‡, **	0.792 ± 0.037	0.702 ± 0.124
	LPS/FS	1.000 ± 0.000	1.285 *, a (1.170 , 1.680)	1.390 * (1.112, 1.420)	0.740 ± 0.150 †	1.147 ± 0.997 a, **	1.32 ** (0.91 , 1.39)	0.638 ± 0.211 ‡
Claudin-1	FS/LPS	1.000 ± 0.000	0.800 (0.710 , 1.300)	0.895 * (0.890 , 1.020)	0.775 ± 0.111 †	1.075 ± 0.237 **	1.227 ± 0.104 **	0.728 ± 0.049 ‡
	FS+LPS	1.000 ± 0.000	0.910 (0.720 , 4.220)	0.908 ± 0.353	0.712 ± 0.210	1.008 ± 0.115	0.977 ± 0.256	0.890 ± 0.199
	LPS/FS	1.000 ± 0.000	1.020 † (0.720 , 1.030)	1.090 * (1.050 , 1.580)	0.765 ± 0.206 †	0.907 ± 0.172	1.025 ± 0.329 **	0.545 ‡ (0.500 , 0.980)

Για τα αποτελέσματα, που ακολουθούν την κανονική κατανομή οι τιμές εκφράζονται ως: μ.ο. ± T.A. - Independent Samples t Test. Για τα μη κανονικά χαρακτηριστικά οι τιμές εκφράζονται ως: διάμεσος (Q1 – Q3) - Mann Whitney Test. a: στατιστικά σημαντικό από Untreated (p<0,05), † στατιστικά σημαντικό από FS NC1 (p<0,05), ‡ στατιστικά σημαντικό από FS NC2 (p<0,05), * στατιστικά σημαντικό με LPS1 (p<0,05), ** στατιστικά σημαντικό με LPS2 (p<0,05)

Γονίδιο ZO-1. Κατά την επώαση της κυτταρικής σειράς Caco-2 με τα προϊόντα ζύμωσης και των δύο μανιταριών (FS-PEWS και FS-PEWSGM), ως προς τους χειρισμούς FS/LPS και LPS/FS, παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση του στεγανού συνδέσμου ZO-1, σε σύγκριση με το LPS, για το σύνολο των εθελοντών [χειρισμός FS/LPS. FS-PEWS: 1.317±0.672 vs LPS1: 0.568±0.108 (p=0.041), FS-PEWSGM: 1.283±0.253 vs LPS2: 0.577±0.720 (p=0.001), χειρισμός LPS/FS. FS-PEWS: 1.005 (0.870-1.760) vs LPS1: 0.657±0.110 (p=0.004), FS-PEWSGM: 0.935 (0.920-0.940) vs LPS2: 0.575 (0.520-0.880) (p=0.010)]. Ως προς τον χειρισμό FS+LPS,

σημαντική αύξηση εμφανίστηκε μόνο έπειτα από την επίδραση του προϊόντος ζύμωσης FS-PEWS ($p=0.013$).

Γονίδιο *occludin*. Αντίστοιχα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση μετά την επίδραση των προϊόντων ζύμωσης και από τα δύο μανιτάρια κατά τους χειρισμούς FS/LPS και LPS/FS [χειρισμός FS/LPS. FS-PEWS: 1.210 ± 0.392 vs LPS1: 0.718 ± 0.060 ($p=0.027$), FS-PEWSGM: 1.190 ± 0.365 vs LPS2: 0.630 ± 0.102 ($p=0.012$), χειρισμός LPS/FS. FS-PEWS: $1.285(1.170-1.680)$ vs LPS1: 0.740 ± 0.150 ($p=0.004$), FS-PEWSGM: 1.147 ± 0.997 vs LPS2: 0.638 ± 0.211 ($p<0.001$)], για το σύνολο των εθελοντών. Ως προς τον χειρισμό FS+LPS σημαντική αύξηση εμφανίστηκε στην έκφραση μόνο έπειτα από την επίδραση του προϊόντος ζύμωσης FS-PEWSGM ($p=0.002$).

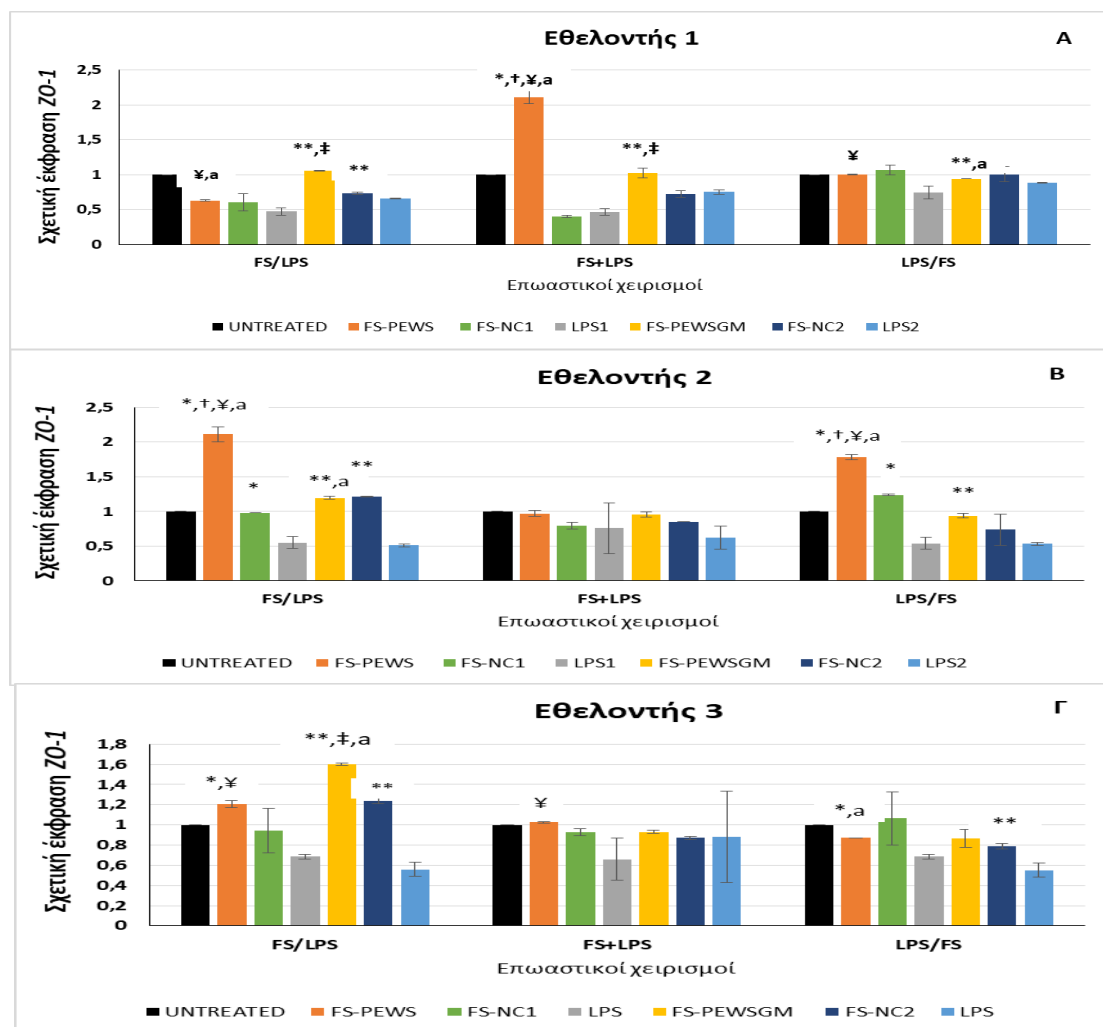
Γονίδιο *claudin-1*. Σχετικά με την έκφραση του γονιδίου *claudin-1* και για τους τρεις χειρισμούς, παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου μόνο στην περίπτωση της επώασης των κυττάρων με το FS-PEWSGM για τον χειρισμό FS/LPS ($p=0.015$).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι στην περίπτωση της επώασης της κυτταρικής σειράς Caco-2, με τον αρνητικό μάρτυρα της ζύμωσης (FS-NC) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση και των τριών γονιδίων (*ZO-1*, *occludin* και *claudin-1*) για τους χειρισμούς FS/LPS και LPS/FS, σε σύγκριση με το LPS για το σύνολο των εθελοντών, εκτός από την περίπτωση του χειρισμού LPS/FS στην έκφραση του γονιδίου της *ZO-1*.

2.5. Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων ανά εθελοντή

2.5.1. Αποτελέσματα έκφρασης *ZO-1* ανά εθελοντή

Στα παρακάτω διαγράμματα 5(A,B,Γ) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την επίδραση της επώασης των FS-PEWS και FS-PEWSGM στην κυτταρική σειρά Caco-2, ως προς την έκφραση του στεγανού συνδέσμου *ZO-1* σε κάθε εθελοντή ξεχωριστά, έπειτα από την πραγματοποίηση των τριών διαφορετικών χειρισμών (FS/LPS, FS+LPS, LPS/FS), καθώς επίσης και την επίδραση του FS-NC (FS-NC1, FS-NC2) και LPS (LPS1, LPS2) στα επίπεδα έκφρασης του παραπάνω γονιδίου.



Διάγραμμα 5. (Α,Β,Γ). Η επίδραση της επώασης των FS-PEWS και FS-PEWSGM στην κυτταρική σειρά Caco-2, ως προς την έκφραση της ZO-1 σε κάθε εθελοντή, έπειτα από την πραγματοποίηση των τριών διαφορετικών χειρισμών (FS/LPS, FS+LPS, LPS/FS). Untreated: κύτταρα καλλιέργειας χωρίς καμία επίδραση, FS: υπερκείμενο προϊόν ζύμωσης, PEWS: *Pleurotus eryngii* στέλεχος Zheng (216) σε υπόστρωμα WS, NC1: Αρνητικός μάρτυρας (θασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς υπόστρωμα) πιάτου με FS-PEWS, LPS1: Λιποπολυσακχαρίτης πιάτου με FS-PEWS, PEWSGM: *Pleurotus eryngii* στέλεχος Zheng (216) σε υπόστρωμα WS: GM αναλογίας 1:1, NC2: Αρνητικός μάρτυρας (θασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς υπόστρωμα) πιάτου με FS-PEWSGM, LPS2: Λιποπολυσακχαρίτης πιάτου με FS-PEWSGM. α στατιστικά σημαντικό με Untreated ($p < 0,05$), † στατιστικά σημαντικό με NC1 ($p < 0,05$), ‡ στατιστικά σημαντικό από NC2 ($p < 0,05$), * στατιστικά σημαντικό με LPS1 ($p < 0,05$), ** στατιστικά σημαντικό με LPS2 ($p < 0,05$), ¥ στατιστικά σημαντικό από WSGM ($p < 0,05$)

2.5.1.1. Αποτελέσματα έκφρασης ZO-1 πρώτου εθελοντή

Όσον αφορά τον πρώτο εθελοντή (Διάγραμμα 5Α), παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ως προς την έκφραση της ZO-1, έπειτα από την επίδραση του FS-PEWS στην κυτταρική σειρά Caco-2 κατά το χειρισμό FS+LPS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $2,105 \pm 0,092$ ($p=0,037$)], ενώ στο χειρισμό FS/LPS φάνηκε να οδηγεί σε μειωμένα επίπεδα ($p=0,017$) και στο χειρισμό LPS/FS δεν παρουσίασε διαφορά από τα untreated κύτταρα ($p=0,500$).

Η έκφραση της *ZO-1* ήταν σημαντικά υψηλότερη μετά την επίδραση του FS-PEWS σε σχέση με το LPS1 [LPS1: $0,465 \pm 0,050$ vs FS-PEWS: $2,105 \pm 0,092$ ($p=0,002$), στον χειρισμό FS+LPS. Αντίστοιχα, στους άλλους δύο χειρισμούς ήταν οριακά υψηλότερη η έκφραση της *ZO-1*, σε σχέση με το LPS1 [χειρισμός FS/LPS. LPS1: $0,470 \pm 0,057$ vs FS-PEWS: $0,630 \pm 0,014$ ($p=0,060$), χειρισμός LPS/FS. LPS1: $0,745 \pm 0,092$ vs FS-PEWS: $1,005 \pm 0,007$ ($p=0,058$)].

Η σύγκριση της έκφρασης της *ZO-1* μετά την επίδραση του FS-PEWS σε σχέση με το FS-NC1, οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης έπειτα από το χειρισμό FS+LPS [FS-NC1: $0,400 \pm 0,014$ vs FS-PEWS: $2,105 \pm 0,092$ ($p=0,001$)], ενώ στους άλλους δύο χειρισμούς δεν εντοπίστηκε σημαντική διαφοροποίηση [χειρισμός FS/LPS. FS-NC1: $0,605 \pm 0,120$ vs FS-PEWS: $0,630 \pm 0,014$ ($p=0,798$), χειρισμός LPS/FS. FS-NC1: $1,070 \pm 0,071$ vs FS-PEWS: $1,005 \pm 0,007$ ($p=0,325$)].

Όσον αφορά, την επίδραση του FS-PEWSGM αυτή δεν εμφάνισε τόσο έντονες μεταβολές στην έκφραση της *ZO-1*. Παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της *ZO-1* στο χειρισμό FS/LPS αν και οριακά μη σημαντική σε σχέση με τα untreated κύτταρα [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,055 \pm 0,007$ ($p=0,058$)] και σημαντικά μειωμένα στο χειρισμό LPS/FS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $0,940 \pm 0,000$ ($p=0,001$)], ενώ στην περίπτωση του χειρισμού FS+LPS δεν υπήρξε κάποια διαφοροποίηση ανάμεσα στο FS-PEWSGM και στα untreated κύτταρα [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,020 \pm 0,071$ ($p=0,758$)].

Ακόμα, το FS-PEWSGM εμφάνισε σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης της *ZO-1* σε σχέση με το LPS2 και στα τρία είδη χειρισμών [χειρισμός FS/LPS. LPS2: $0,665 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $1,055 \pm 0,007$ ($p<0,001$), χειρισμός FS+LPS. LPS2: $0,750 \pm 0,028$ vs FS-PEWSGM: $1,020 \pm 0,071$ ($p=0,038$), χειρισμός LPS/FS. LPS2: $0,885 \pm 0,028$ vs FS-PEWSGM: $0,940 \pm 0,000$ ($p=0,008$)].

Επιπρόσθετα, η επώαση των Caco-2 κυττάρων με το FS-PEWSGM οδήγησε σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα σε σχέση με το FS-NC2 για τους χειρισμούς FS/LPS [FS-NC2: $0,730 \pm 0,014$ vs FS-PEWSGM: $1,055 \pm 0,007$ ($p=0,001$)] και FS+LPS [FS-NC2: $0,725 \pm 0,050$ vs FS-PEWSGM: $1,020 \pm 0,071$ ($p=0,040$)], ενώ δεν εντοπίστηκε σημαντική διαφορά κατά το χειρισμό LPS/FS [FS-NC2: $1,005 \pm 0,106$ vs FS-PEWSGM: $0,940 \pm 0,000$ ($p=0,477$)].

Σε σύγκριση της έκφρασης της *ZO-1* μεταξύ των προϊόντων ζύμωσης των δύο τύπων μανιταριών, προέκυψε ότι κατά τους χειρισμούς FS/LPS τα επίπεδα στο FS-PEWSGM ήταν αυξημένα σε σύγκριση με το FS-PEWS [FS-PEWSGM: $1,055 \pm 0,007$ vs FS-PEWS: $0,630 \pm 0,014$

($p=0,001$)] και κατά τους χειρισμούς LPS/FS [FS-PEWSGM: $0,940 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,005 \pm 0,007$ ($p=0,006$)] και FS+LPS [FS-PEWSGM: $1,020 \pm 0,071$ vs FS-PEWS: $2,105 \pm 0,092$ ($p=0,001$)] ήταν μειωμένα σε σχέση με το FS-PEWS.

Συνοψίζοντας, στον 1^ο εθελοντή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της ZO-1 σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), με το LPS (LPS1) και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC1), μετά την επώαση του FS-PEWS στα Caco-2 κύτταρα, μόνο έπειτα από το χειρισμό FS+LPS. Αντίθετα, η επώαση με το FS-PEWSGM οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερη έκφραση αναφορικά με το LPS (LPS2) έπειτα και από τους τρεις χειρισμούς, ενώ σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες (FS-NC2) στους χειρισμούς FS/LPS και FS+LPS. Παρατηρήθηκε ότι ανάμεσα στα δύο ζυμωμένα μανιτάρια εμφανίστηκαν διαφορές στην επίδραση που ασκούν στην έκφραση του γονιδίου της ZO-1 και επίσης διαφορές ως προς τον χειρισμό που ασκήθηκε. Παράλληλα, εντοπίστηκε πως η επώαση με το FS-NC1 του συγκεκριμένου εθελοντή δε φάνηκε να διαφέρει στα επίπεδα έκφρασης του εξεταζόμενου στεγανού συνδέσμου σε σχέση με αυτή του LPS1 και στα τρία είδη χειρισμών, ενώ μόνο το FS-NC2 οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης της ZO-1 σε σχέση με το LPS2 για το χειρισμό FS/LPS.

2.5.1.2. Αποτελέσματα έκφρασης ZO-1 δεύτερου εθελοντή

Όσον αφορά το δεύτερο εθελοντή (Διάγραμμα 5B), η επώαση του FS-PEWS με την κυτταρική σειρά Caco-2, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης της ZO-1, κατά τους χειρισμούς FS/LPS και LPS/FS, διαφέροντας σημαντικά από τα untreated κύτταρα [χειρισμός FS/LPS. untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $2,115 \pm 0,106$ ($p=0,043$), χειρισμός LPS/FS. untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,785 \pm 0,035$ ($p=0,020$)], ενώ κατά το χειρισμό FS+LPS δεν εντοπίστηκε καμία σημαντική διαφοροποίηση της δράσης του FS-PEWS σε σχέση με τα untreated κύτταρα [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $0,970 \pm 0,042$ ($p=0,500$)].

Επίσης, η έκφραση της ZO-1 έπειτα από την επίδραση του FS-PEWS ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με το LPS1 στους χειρισμούς FS/LPS. [LPS1: $0,550 \pm 0,085$ vs FS-PEWS: $2,105 \pm 0,106$ ($p=0,004$)] και LPS/FS [LPS1: $0,540 \pm 0,085$ vs FS-PEWS: $1,785 \pm 0,035$ ($p=0,003$)], ενώ κατά τον χειρισμό FS+LPS [LPS1: $0,760 \pm 0,368$ vs FS-PEWS: $0,970 \pm 0,042$ ($p=0,507$)] δεν παρουσιάστηκε καμία διαφορά.

Αναφορικά με τα επίπεδα έκφρασης της ZO-1 μετά την επίδραση του FS-PEWS, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα της ζύμωσης (FS-NC1), παρατηρήθηκε ότι ήταν σημαντικά υψηλότερα

κατά τους χειρισμούς FS/LPS [FS-NC1: $0,980 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $2,115 \pm 0,106$ ($p=0,004$)] και LPS/FS [FS-NC1: $0,240 \pm 0,014$ vs FS-PEWS: $1,785 \pm 0,035$ ($p=0,002$)]. Κατά τον χειρισμό FS+LPS, η έκφραση ήταν υψηλότερη χωρίς όμως να φτάνει τα επίπεδα της σημαντικότητας, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα [FS-NC1: $0,795 \pm 0,050$ vs FS-PEWS: $0,970 \pm 0,042$ ($p=0,063$)].

Από την άλλη, η επίδραση της επώασης του FS-PEWSGM στην κυτταρική σειρά Caco-2, δεν εμφάνισε τόσο έντονες μεταβολές στην έκφραση της ZO-1. Σημαντικά στατιστική αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της ZO-1, σε σχέση με τα untreated κυτταρά εντοπίστηκε μόνο στην περίπτωση του χειρισμού FS/LPS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,195 \pm 0,021$ ($p=0,049$)], ενώ στους άλλους δύο χειρισμούς δεν εντοπίστηκε κάποιου είδους διαφοροποίηση [χειρισμός FS+LPS. untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $0,955 \pm 0,035$ ($p=0,323$), χειρισμός LPS/FS. untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $0,940 \pm 0,028$ ($p=0,205$)].

Στην περίπτωση του LPS2, το FS-PEWSGM εμφάνισε σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης της ZO-1 για όλες τις περιπτώσεις χειρισμών [χειρισμός FS/LPS. LPS2: $0,515 \pm 0,021$ vs FS-PEWSGM: $1,195 \pm 0,021$ ($p=0,001$), χειρισμός LPS/FS. LPS2: $0,535 \pm 0,021$ vs FS-PEWSGM: $0,940 \pm 0,028$ ($p=0,004$)], εκτός από τον FS+LPS [LPS2: $0,615 \pm 0,163$ vs FS-PEWSGM: $0,955 \pm 0,035$ ($p=0,102$)].

Συγκριτικά με το FS-NC2 δεν υπήρξε κάποια διαφοροποίηση σε κανέναν από τους τρεις χειρισμούς, [χειρισμός FS/LPS. FS-NC2: $1,215 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $1,195 \pm 0,021$ ($p=0,333$), χειρισμός LPS/FS. FS-NC2: $0,740 \pm 0,226$ vs FS-PEWSGM: $0,940 \pm 0,028$ ($p=0,341$)], παρόλο που στην περίπτωση του χειρισμού FS+LPS υπήρξε αύξηση αλλά οριακά μη στατιστικά σημαντική [FS-NC2: $0,850 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $0,955 \pm 0,035$ ($p=0,052$)].

Τέλος, παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών που προέρχονται από τα δύο διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας. Κατά τους χειρισμούς FS/LPS [FS-PEWSGM: $1,195 \pm 0,021$ vs FS-PEWS: $2,115 \pm 0,106$ ($p=0,007$)] και LPS/FS [FS-PEWSGM: $0,940 \pm 0,028$ vs FS-PEWS: $1,785 \pm 0,035$ ($p=0,001$)], η έκφραση της ZO-1 ήταν υψηλότερη στο FS-PEWS, σε σχέση με το FS-PEWSGM, ενώ κατά τον χειρισμό FS+LPS, η έκφραση της ZO-1 δεν παρουσίασε διαφορά μεταξύ των δύο προϊόντων ζύμωσης [FS-PEWSGM: $0,955 \pm 0,035$ vs FS-PEWS: $0,970 \pm 0,042$ ($p=0,738$)].

Συνοψίζοντας, στον 2^ο εθελοντή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της ZO-1 σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), με το LPS (LPS1) και με τον αρνητικό

μάρτυρα (FS-NC1), μετά την επώαση με το FS-PEWS στα Caco-2 κύτταρα, στους χειρισμούς FS/LPS και LPS/FS. Παράλληλα, η επώαση με το FS-PEWSGM οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης αναφορικά με το LPS (LPS2) για τους ίδιους χειρισμούς με το FS-PEWS. Παρατηρήθηκε ότι ανάμεσα στα δύο ζυμωμένα μανιτάρια εμφανίστηκαν διαφορές στην επίδραση που ασκούν στην έκφραση του γονιδίου της ZO-1, η οποία ωστόσο ήταν παρόμοιας εικόνας ως προς το είδος χειρισμού που ασκήθηκε. Παράλληλα, εντοπίστηκε πως η επώαση με το FS-NC1 του συγκεκριμένου εθελοντή συνοδεύτηκε από αυξημένη έκφραση της ZO-1 σε σχέση με αυτή του LPS1, έπειτα από τους χειρισμούς FS/LPS και LPS/FS, ενώ το FS-NC2 οδήγησε σε σημαντική αύξηση σε σχέση με το LPS2 μόνο για το χειρισμό FS/LPS.

2.5.1.3. Αποτελέσματα έκφρασης ZO-1 τρίτου εθελοντή

Όσον αφορά τον τρίτο εθελοντή (Διάγραμμα 5Γ), η επώαση του FS-PEWS στην κυτταρική σειρά Caco-2, ως προς την έκφραση της ZO-1, δε μεταβλήθηκε σημαντικά σε σχέση με τα untreated κύτταρα για τους χειρισμούς FS/LPS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,205 \pm 0,035$ ($p=0,077$)] και FS+LPS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,025 \pm 0,007$ ($p=0,126$)], ενώ στην περίπτωση του LPS/FS μειώθηκε σημαντικά [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $0,870 \pm 0,000$ ($p<0,001$)].

Αντίθετα, παρουσίασε σημαντική αύξηση σε σχέση με το LPS (LPS1) για τους χειρισμούς FS/LPS [LPS1: $0,685 \pm 0,021$ vs FS-PEWS: $1,205 \pm 0,035$ ($p=0,003$)] και LPS/FS [LPS1: $0,685 \pm 0,021$ vs FS-PEWS: $0,870 \pm 0,000$ ($p=0,007$)], ενώ δεν υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση στην περίπτωση του FS+LPS [LPS1: $0,660 \pm 0,212$ vs FS-PEWS: $1,025 \pm 0,007$ ($p=0,136$)].

Συγκριτικά με το FS-NC (FS-NC1) δε φάνηκε να διαφέρει η δράση του FS-PEWS στην έκφραση της ZO-1 σε κανέναν από τους τρεις χειρισμούς [χειρισμός FS/LPS. FS-NC1: $0,945 \pm 0,219$ vs FS-PEWS: $1,205 \pm 0,035$ ($p=0,240$)], χειρισμός FS+LPS. FS-NC1: $0,925 \pm 0,035$ vs FS-PEWS: $1,025 \pm 0,007$ ($p=0,059$)], χειρισμός LPS/FS. FS-NC1: $1,065 \pm 0,262$ vs FS-PEWS: $0,870 \pm 0,000$ ($p=0,402$)].

Η επίδραση του FS-PEWSGM κατά το χειρισμό FS/LPS οδήγησε στα μέγιστα επίπεδα έκφρασης της ZO-1, τα οποία ήταν σημαντικά αυξημένα σε σχέση με τα untreated κύτταρα [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,600 \pm 0,014$ ($p=0,011$)]. Στους άλλους δύο χειρισμούς δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση σε σχέση με τα untreated κύτταρα

[LPS/FS untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $0,865 \pm 0,092$ ($p=0,090$) και FS+LPS untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $0,930 \pm 0,014$ ($p=0,090$)].

Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της *ZO-1*, μετά την επίδραση με το FS-PEWSGM, σε σχέση με το LPS2 κατά τον χειρισμό FS/LPS [LPS2: $0,560 \pm 0,071$ vs FS-PEWSGM: $1,600 \pm 0,014$ ($p=0,002$)]. Στους υπόλοιπους δύο χειρισμούς δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές [LPS/FS, LPS2: $0,550 \pm 0,071$ vs FS-PEWSGM: $0,865 \pm 0,092$ ($p=0,062$) και [FS+LPS, LPS2: $0,880 \pm 0,453$ vs FS -PEWSGM: $0,930 \pm 0,014$ ($p=0,890$)].

Η σύγκριση με τον αρνητικό μάρτυρα της ζύμωσης του FS-PEWSGM κατά τον χειρισμό FS/LPS έδειξε ότι η έκφραση της *ZO-1* ήταν σημαντικά υψηλότερη έπειτα από την επίδραση του FS-PEWSGM [FS-NC2: $1,240 \pm 0,028$ vs FS-PEWSGM: $1,600 \pm 0,014$ ($p=0,004$)]. Αναφορικά με το χειρισμό LPS/FS δεν παρατηρήθηκε διαφορά ανάμεσα στις δύο επιδράσεις [FS-NC2: $0,790 \pm 0,028$ vs FS-PEWSGM: $0,865 \pm 0,092$ ($p=0,385$)], ενώ κατά το χειρισμό FS+LPS εντοπίστηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης έπειτα από την επίδραση του FS-PEWSGM, τα οποία όμως δε διέφεραν οριακά από το FS-NC2 [FS-NC2: $0,870 \pm 0,014$ vs FS-PEWSGM: $0,930 \pm 0,014$ ($p=0,051$)].

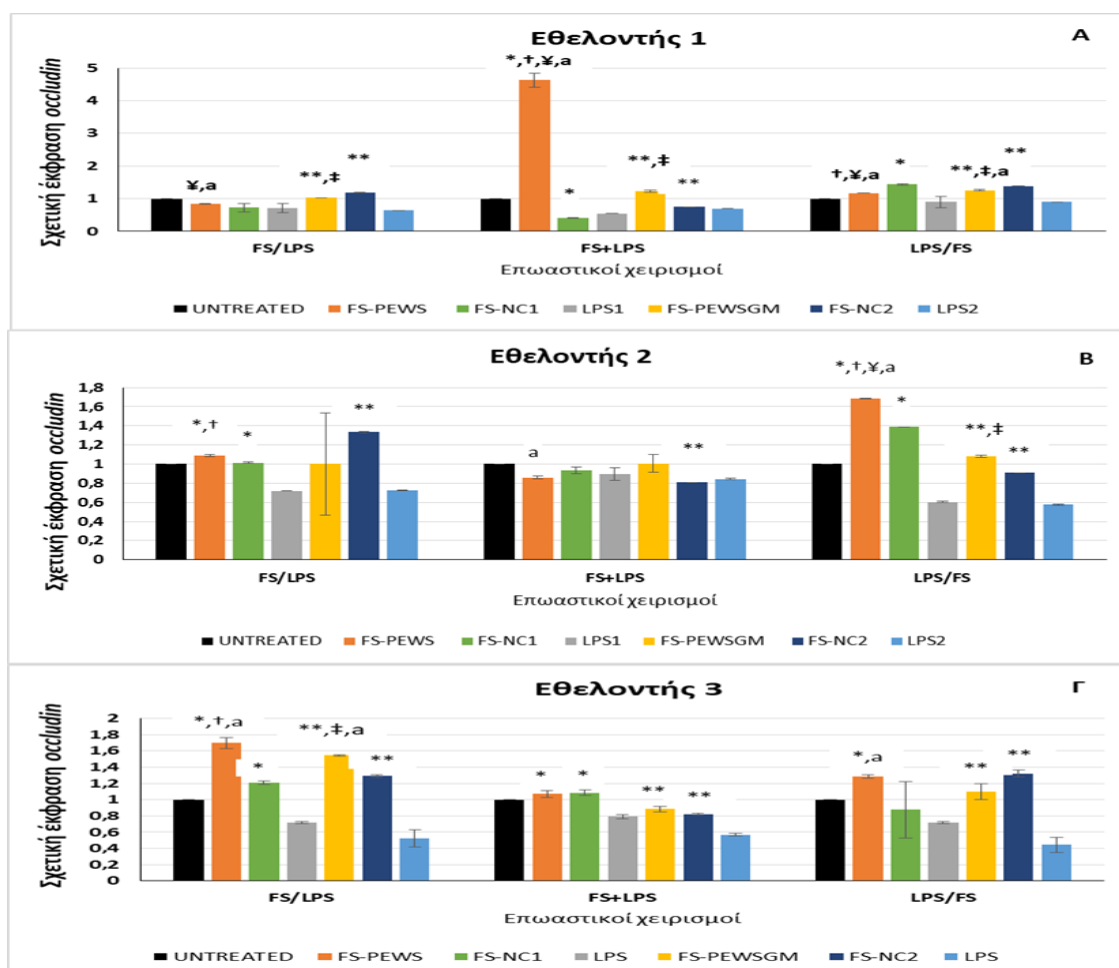
Στον τρίτο εθελοντή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της *ZO-1* μετά την επίδραση του FS-PEWSGM, σε σχέση με το FS-PEWS, στο χειρισμό FS/LPS [FS-PEWS: $1,205 \pm 0,035$ vs FS-PEWSGM: $1,600 \pm 0,014$ ($p=0,005$)]. Στον χειρισμό LPS/FS δε φάνηκε να υπάρχει καμία διαφοροποίηση, έπειτα από την επίδραση του FS-PEWSGM σε σχέση με το FS PEWS [FS -PEWS: $0,870 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $0,865 \pm 0,092$ ($p=0,946$)], ενώ στον χειρισμό FS+LPS μειώθηκε σημαντικά η έκφραση της *ZO-1* σε σχέση με το FS-PEWS [FS-PEWS: $1,025 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $0,930 \pm 0,014$ ($p=0,014$)].

Συνοψίζοντας, στον 3^ο εθελοντή παρατηρήθηκε διακύμανση των επιπέδων έκφρασης της *ZO-1*, μετά την επώαση με το FS-PEWS στα Caco-2 κύτταρα. Συγκεκριμένα, εμφανίστηκαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), έπειτα από τους χειρισμούς FS/LPS και FS+LPS και σημαντικά αυξημένα επίπεδα αναφορικά με το LPS (LPS1) μόνο έπειτα από το χειρισμό FS/LPS. Από την άλλη η επώαση με το FS-PEWSGM οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερη έκφραση του εν λόγω στεγανού συνδέσμου σε σχέση τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), το LPS (LPS2) και τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC2) μόνο για το χειρισμό FS/LPS. Παρατηρήθηκε ότι ανάμεσα στα δύο ζυμωμένα μανιτάρια εμφανίστηκαν διαφορές στην επίδραση που ασκούν στην έκφραση του γονιδίου της *ZO-1* και επίσης διαφορές ως προς το είδος χειρισμού που ασκήθηκε. Παράλληλα, εντοπίστηκε πως η επώαση με το FS-NC1 του

συγκεκριμένου εθελοντή δε φάνηκε να διαφέρει στα επίπεδα έκφρασης της ZO-1 σε σχέση με αυτή του LPS1 έπειτα και από τους τρεις χειρισμούς, ενώ το FS-NC2 οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης της ZO-1 σε σχέση με το LPS2 για τους χειρισμούς FS/LPS και LPS/FS.

2.5.2. Αποτελέσματα έκφρασης *occludin* ανά εθελοντή

Στα Διαγράμματα 6 (Α,Β,Γ), παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την επίδραση της επώασης των FS-PEWS και FS-PEWSGM στην κυτταρική σειρά Caco-2, ως προς τα επίπεδα έκφρασης του στεγανού συνδέσμου *occludin* στους εθελοντές 1, 2 και 3 στους τρεις χειρισμούς (FS/LPS, FS+LPS, LPS/FS).



Διάγραμμα 6. (Α,Β,Γ).Η επίδραση της επώασης των FS-PEWS και FS-PEWSGM στην κυτταρική σειρά Caco-2, ως προς την έκφραση της *occludin* σε κάθε εθελοντή, έπειτα από την πραγματοποίηση των τριών διαφορετικών χειρισμών (FS/LPS, FS+LPS, LPS/FS). Untreated: κύτταρα καλλιέργειας χωρίς καμία επίδραση, FS: υπερκείμενο προϊόν ζύμωσης, PEWS: *Pleurotus eryngii* στέλεχος Zheng (216) σε υπόστρωμα WS, NC1: Αρνητικός μάρτυρας (βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς υπόστρωμα) πιάτου με FS-PEWS, LPS1: Λιποπολυσακχαρίτης πιάτου με FS-PEWS, PEWSGM: *Pleurotus eryngii* στέλεχος Zheng (216) σε υπόστρωμα WS: GM αναλογίας 1:1, NC2: Αρνητικός μάρτυρας (βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς υπόστρωμα) πιάτου με FS-PEWSGM, LPS2: Λιποπολυσακχαρίτης πιάτου με FS-PEWSGM. α στατιστικά σημαντικό με Untreated ($p<0,05$), † στατιστικά σημαντικό με NC1 ($p<0,05$), ‡ στατιστικά σημαντικό από NC2 ($p<0,05$), * στατιστικά σημαντικό με LPS1 ($p<0,05$), ** στατιστικά σημαντικό με LPS2 ($p<0,05$), ζ στατιστικά σημαντικό από WSGM ($p<0,05$)

2.5.2.1. Αποτελέσματα έκφρασης *occludin* πρώτου εθελοντή

Όσον αφορά τον πρώτο εθελοντή (Διάγραμμα 6A), παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση ως προς την έκφραση της *occludin*, έπειτα από επώαση των κυττάρων Caco-2 με το FS-PEWS κατά το χειρισμό FS+LPS, διαφέροντας σημαντικά από τα untreated κύτταρα [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $4,630 \pm 0,092$ ($p=0,026$)] και στο χειρισμό LPS/FS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,170 \pm 0,000$ ($p<0,001$)], ενώ φάνηκε να εμφανίζει σημαντικά μειωμένα επίπεδα στο χειρισμό FS/LPS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $0,845 \pm 0,007$ ($p=0,021$)].

Παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση στην έκφραση της *occludin*, έπειτα από την επίδραση του FS-PEWS σε σχέση με το LPS (LPS1) κατά το χειρισμό FS+LPS [LPS1: $0,540 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $4,630 \pm 0,092$ ($p=0,001$)], ενώ όσον αφορά τα δύο άλλα είδη χειρισμών το FS-PEWS δεν εμφάνισε σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης της *occludin*, σε σχέση με το LPS(LPS1) [χειρισμός FS/LPS. LPS1: $0,715 \pm 0,134$ vs FS-PEWS: $0,845 \pm 0,007$ ($p=0,305$)], χειρισμός LPS/FS. LPS1: $0,895 \pm 0,163$ vs FS-PEWS: $1,170 \pm 0,000$ ($p=0,139$)].

Συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα FS-NC (FS-NC1), το FS-PEWS οδήγησε σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα της έκφρασης της *occludin* κατά το χειρισμό FS+LPS [FS-NC1: $0,415 \pm 0,007$ vs FS-PEWS: $4,630 \pm 0,092$ ($p=0,001$)], ενώ έπειτα από το χειρισμό LPS/FS εμφάνισε σημαντικά μικρότερα επίπεδα σε σχέση με το FS-NC [FS-NC1: $1,435 \pm 0,021$ vs FS-PEWS: $1,170 \pm 0,000$ ($p=0,003$)] και κατόπιν του χειρισμού FS/LPS [FS-NC1: $0,730 \pm 0,127$ vs FS-PEWS: $0,845 \pm 0,007$ ($p=0,330$)] δε φάνηκε να διαφέρουν μεταξύ τους.

Από την άλλη, η επώαση των Caco-2 κυττάρων με το FS-PEWSGM δεν εμφάνισε τόσο έντονες μεταβολές στην έκφραση της *occludin*. Σε σχέση με τα untreated κύτταρα, η δράση του FS-PEWSGM φάνηκε να μη διαφέρει σημαντικά στα επίπεδα έκφρασης της *occludin*, σε όλους τους χειρισμούς εκτός από τον LPS/FS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,260 \pm 0,028$ ($p=0,049$)].

Σε σχέση με το LPS (LPS2), το FS-PEWSGM εμφάνισε σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης της *occludin* έπειτα και από τα τρία είδη χειρισμών [χειρισμός FS/LPS. LPS2: $0,640 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,025 \pm 0,007$ ($p<0,001$)], χειρισμός FS+LPS. LPS2: $0,690 \pm 0,000$ vs FS-

PEWSGM: $1,225 \pm 0,035$ ($p=0,003$), χειρισμός LPS/FS. LPS2: $0,895 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $1,260 \pm 0,028$ ($p=0,003$).

Το FS-PEWSGM παρουσίασε σημαντικά αυξημένα επίπεδα σε σχέση με το FS-NC (FS-NC2) για το χειρισμό FS+LPS [FS-NC2: $0,745 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $1,225 \pm 0,035$ ($p=0,003$)], ενώ σημαντικά μειωμένα επίπεδα εντοπίστηκαν έπειτα από τους χειρισμούς FS/LPS [FS-NC2: $1,190 \pm 0,014$ vs FS-PEWSGM: $1,025 \pm 0,007$ ($p=0,005$)] και LPS/FS [FS-NC2: $1,390 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,260 \pm 0,028$ ($p=0,023$)].

Μεταξύ των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών που προέρχονται από τα δύο διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας η επίδρασή του FS-PEWSGM κατά τους χειρισμούς FS/LPS και LPS/FS οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα αντίστοιχα της έκφρασης της *occludin* σε σχέση με το FS-PEWS [χειρισμός FS/LPS. FS-PEWSGM: $1,025 \pm 0,007$ vs FS-PEWS: $0,845 \pm 0,007$ ($p=0,002$), χειρισμός LPS/FS. FS-PEWSGM: $0,940 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,005 \pm 0,007$ ($p=0,046$)], ενώ έπειτα από το χειρισμό FS+LPS εμφάνισε σημαντικά μειωμένα επίπεδα [FS-PEWSGM: $1,225 \pm 0,035$ vs FS-PEWS: $4,630 \pm 0,092$ ($p=0,002$)].

Συνοψίζοντας, στον 1^ο εθελοντή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της *occludin* σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), με το LPS (LPS1) και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC1), μετά την επώαση του FS-PEWS στα Caco-2 κύτταρα, μόνο έπειτα από το χειρισμό FS+LPS. Αντίθετα, η επώαση με το FS-PEWSGM οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερη έκφραση αναφορικά με το LPS (LPS2) έπειτα και από τους τρεις χειρισμούς, ενώ σε σχέση με τους αρνητικούς μάρτυρες (FS-NC2) μόνο έπειτα από το χειρισμό FS+LPS. Παρατηρήθηκε ότι ανάμεσα στα δύο ζυμωμένα μανιτάρια εμφανίστηκαν διαφορές στην επίδραση που ασκούν στην έκφραση του γονιδίου της *occludin* και επίσης διαφορές ως προς τον χειρισμό που ασκήθηκε. Παράλληλα, εντοπίστηκε πως η επώαση με το FS-NC1 του συγκεκριμένου εθελοντή φάνηκε να οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του εξεταζόμενου στεγανού συνδέσμου σε σχέση με αυτή του LPS1 μόνο έπειτα από το χειρισμό LPS/FS, ενώ το FS-NC2 οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης της *occludin* σε σχέση με το LPS2 έπειτα και από τα τρία είδη χειρισμού.

2.5.2.2. Αποτελέσματα έκφρασης *occludin* δεύτερου εθελοντή

Όσον αφορά το δεύτερο εθελοντή (Διάγραμμα 6B), η επώαση της κυτταρικής σειράς Caco-2 με το FS-PEWS, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της

occludin, κατά το χειρισμό LPS/FS, διαφέροντας σημαντικά από τα untreated κύτταρα [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,685 \pm 0,007$ ($p=0,005$)], ενώ παρουσιάστηκε μείωση έπειτα από το χειρισμό FS+LPS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $0,860 \pm 0,014$ ($p=0,045$)] και κατά το χειρισμό FS/LPS παρουσιάστηκε αύξηση αλλά όχι στατιστικά σημαντική [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,090 \pm 0,014$ ($p=0,070$)].

Συγκριτικά με το LPS (LPS1), η έκφραση της *occludin*, παρουσία του FS-PEWS, αυξήθηκε κατά το χειρισμό LPS/FS LPS (LPS1) [LPS1: $0,605 \pm 0,007$ vs FS-PEWS: $1,685 \pm 0,007$ ($p<0,001$)] και το FS/LPS [LPS1: $0,720 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,090 \pm 0,014$ ($p=0,001$)], ενώ δεν εντοπίστηκε σημαντική διαφοροποίηση κατά το χειρισμό FS+LPS [LPS1: $0,895 \pm 0,064$ vs FS-PEWS: $0,860 \pm 0,014$ ($p=0,527$)].

Συγκριτικά με το FS-NC (FS-NC1), η έκφραση της *occludin*, εμφανίστηκε αυξημένη έπειτα από την επίδραση του FS-PEWS κατά το χειρισμό LPS/FS [FS-NC1: $1,390 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,685 \pm 0,007$ ($p<0,001$)] και το FS/LPS FS NC (FS-NC1) [FS-NC1: $1,015 \pm 0,007$ vs FS-PEWS: $1,090 \pm 0,014$ ($p=0,022$)], αλλά κατά το χειρισμό FS+LPS δεν εντοπίστηκε καμία σημαντική διαφοροποίηση της δράσης του FS-PEWS σε σχέση με το FS NC (FS-NC1) [FS-NC1: $0,935 \pm 0,035$ vs FS-PEWS: $0,860 \pm 0,014$ ($p=0,108$)].

Από την άλλη, η επώαση της κυτταρικής σειράς Caco-2 με το FS-PEWSGM δεν οδήγησε σε κάποια σημαντική διαφοροποίηση στην έκφραση της *occludin* σε σχέση με τα untreated κύτταρα έπειτα από κανένα είδος χειρισμού [χειρισμός FS/LPS. untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,000 \pm 0,537$ ($p=1,000$)], χειρισμός FS+LPS. untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,005 \pm 0,092$ ($p=0,951$), χειρισμός LPS/FS. untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,080 \pm 0,014$ ($p=0,079$)].

Επιπρόσθετα, δεν εντοπίστηκε σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στο FS-PEWSGM και στο LPS (LPS2) για τους χειρισμούς FS/LPS και FS+LPS [χειρισμός FS/LPS. LPS2: $0,725 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $1,000 \pm 0,537$ ($p=0,544$)], χειρισμός FS+LPS. LPS2: $0,845 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $1,005 \pm 0,092$ ($p=0,134$)], ενώ στην περίπτωση του χειρισμού LPS/FS εντοπίστηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της *occludin* [LPS2: $0,575 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $1,080 \pm 0,014$ ($p<0,001$)].

Συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα FS-NC (FS-NC2) η επίδραση του FS-PEWSGM συνετέλεσε στην αυξημένη έκφραση της *occludin*, κατά το χειρισμό LPS/FS [FS-NC2: $0,910 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,080 \pm 0,014$ ($p=0,003$)], ενώ δεν υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση

έπειτα από τα άλλα είδη χειρισμών [χειρισμός FS/LPS. FS-NC2: $1,335 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $1,000 \pm 0,537$ ($p=0,471$), χειρισμός FS+LPS. FS-NC2: $0,810 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,005 \pm 0,092$ ($p=0,095$)].

Μεταξύ των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών που προέρχονται από τα δύο διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας η επίδρασή του FS-PEWSGM, σε σχέση με του FS-PEWS οδήγησε σε σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης της *occludin*, κατά το χειρισμό LPS/FS [FS-PEWSGM: $1,080 \pm 0,014$ vs FS-PEWS: $1,685 \pm 0,007$ ($p<0,001$)], ενώ έπειτα από τα άλλα δύο είδη χειρισμών (FS+LPS και FS/LPS) δεν εντοπίστηκε κάποια σημαντική διαφορά [χειρισμός FS+LPS. FS-PEWSGM: $1,005 \pm 0,092$ vs FS-PEWS: $0,860 \pm 0,014$ ($p=0,158$), χειρισμός FS/LPS. FS-PEWSGM: $1,000 \pm 0,537$ vs FS-PEWS: $1,090 \pm 0,014$ ($p=0,070$)].

Συνοψίζοντας, στον 2^ο εθελοντή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της *occludin* σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), με το LPS (LPS1) και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC1), μετά την επώαση με το FS-PEWS στα Caco-2 κύτταρα, στο χειρισμό LPS/FS και υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με το LPS (LPS1) και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC1) στο χειρισμό FS/LPS. Παράλληλα, η επώαση με το FS-PEWSGM οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερη έκφραση σε σχέση με το LPS (LPS2) και τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC2) μόνο έπειτα από το χειρισμό LPS/FS. Παρατηρήθηκε ότι ανάμεσα στα δύο ζυμωμένα μανιτάρια εμφανίστηκαν διαφορές στην επίδραση που ασκούν στην έκφραση του γονιδίου της *occludin*, η οποία διέφερε και ως προς το είδος χειρισμού που ασκήθηκε. Παράλληλα, εντοπίστηκε πως η επώαση με το FS-NC1 και το FS-NC2 του συγκεκριμένου εθελοντή φάνηκε να οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου στεγανού συνδέσμου σε σχέση με αυτή του LPS1 και του LPS2, έπειτα από τους χειρισμούς FS/LPS και LPS/FS.

2.5.2.3. Αποτελέσματα έκφρασης *occludin* τρίτου εθελοντή

Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 6Γ για τον τρίτο εθελοντή, η επώαση της κυτταρικής σειράς Caco-2 με το FS-PEWS, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα της έκφρασης της *occludin*, σε σύγκριση με τα untreated κύτταρα, κατά το χειρισμό FS/LPS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,695 \pm 0,064$ ($p=0,006$)] και το LPS/FS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,285 \pm 0,021$ ($p=0,033$)], ενώ δεν εντοπίστηκε διαφοροποίηση έπειτα από το χειρισμό FS+LPS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,285 \pm 0,021$ ($p=0,033$)].

Αναφορικά με τη δράση του LPS (LPS1), το FS-PEWS προκάλεσε αύξηση της έκφρασης της *occludin*, έπειτα και από τους τρεις χειρισμούς [χειρισμός FS/LPS. LPS1: $0,720 \pm 0,014$ vs FS-PEWS: $1,695 \pm 0,064$ ($p=0,002$), χειρισμός FS+LPS. LPS1: $0,790 \pm 0,028$ vs FS-PEWS: $1,070 \pm 0,042$ ($p=0,016$), χειρισμός LPS/FS. LPS1: $0,720 \pm 0,014$ vs FS-PEWS: $1,285 \pm 0,021$ ($p=0,001$)].

Επιπρόσθετα, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα FS-NC (FS-NC1), το FS-PEWS οδήγησε σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης της *occludin*, μόνο έπειτα από το χειρισμό FS/LPS [FS-NC1: $1,205 \pm 0,021$ vs FS-PEWS: $1,695 \pm 0,064$ ($p=0,009$)], αλλά ως προς τους χειρισμούς FS+LPS και LPS/FS δεν εντοπίστηκε καμία σημαντική διαφοροποίηση [χειρισμός FS+LPS. FS-NC1: $1,085 \pm 0,035$ vs FS-PEWS: $1,070 \pm 0,042$ ($p=0,738$), χειρισμός LPS/FS. FS-NC1: $0,875 \pm 0,346$ vs FS-PEWS: $1,285 \pm 0,021$ ($p=0,237$)].

Αναφορικά με την επίδραση της επώασης του FS-PEWSGM στα επίπεδα έκφρασης της *occludin*, εντοπίστηκε σημαντική αύξηση, σε σχέση με τα untreated κύτταρα, έπειτα από το χειρισμό FS/LPS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,545 \pm 0,007$ ($p=0,006$)], ενώ δεν παρουσιάστηκε κάποια διαφοροποίηση έπειτα από τους άλλους δύο χειρισμούς [χειρισμός FS+LPS. untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $0,885 \pm 0,035$ ($p=0,136$), χειρισμός LPS/FS. untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,110 \pm 0,099$ ($p=0,389$)].

Συγκριτικά με το LPS (LPS2), η έκφραση του γονιδίου αυξήθηκε έπειτα από την επίδραση του FS-PEWSGM και στους τρεις χειρισμούς [χειρισμός FS/LPS. LPS2: $0,525 \pm 0,106$ vs FS-PEWSGM: $1,545 \pm 0,007$ ($p=0,005$), χειρισμός FS+LPS. LPS2: $0,570 \pm 0,014$ vs FS-PEWSGM: $0,885 \pm 0,035$ ($p=0,007$), χειρισμός LPS/FS. LPS2: $0,445 \pm 0,092$ vs FS-PEWSGM: $1,110 \pm 0,099$ ($p=0,021$)].

Από την άλλη η έκφραση της *occludin*, σε σχέση με το αρνητικό μάρτυρα FS-NC (FS-NC2), έπειτα από την επώαση με το FS-PEWSGM αυξήθηκε μόνο έπειτα από το χειρισμό FS/LPS [FS-NC2: $1,290 \pm 0,014$ vs FS-PEWSGM: $1,545 \pm 0,007$ ($p=0,002$)], ενώ δεν εντοπίστηκε σημαντική διαφοροποίηση έπειτα από τους δύο άλλους χειρισμούς [χειρισμός FS+LPS. FS-NC2: $0,820 \pm 0,014$ vs FS-PEWSGM: $0,885 \pm 0,035$ ($p=0,137$), χειρισμός LPS/FS. FS-NC2: $1,320 \pm 0,042$ vs FS-PEWSGM: $1,110 \pm 0,099$ ($p=0,102$)].

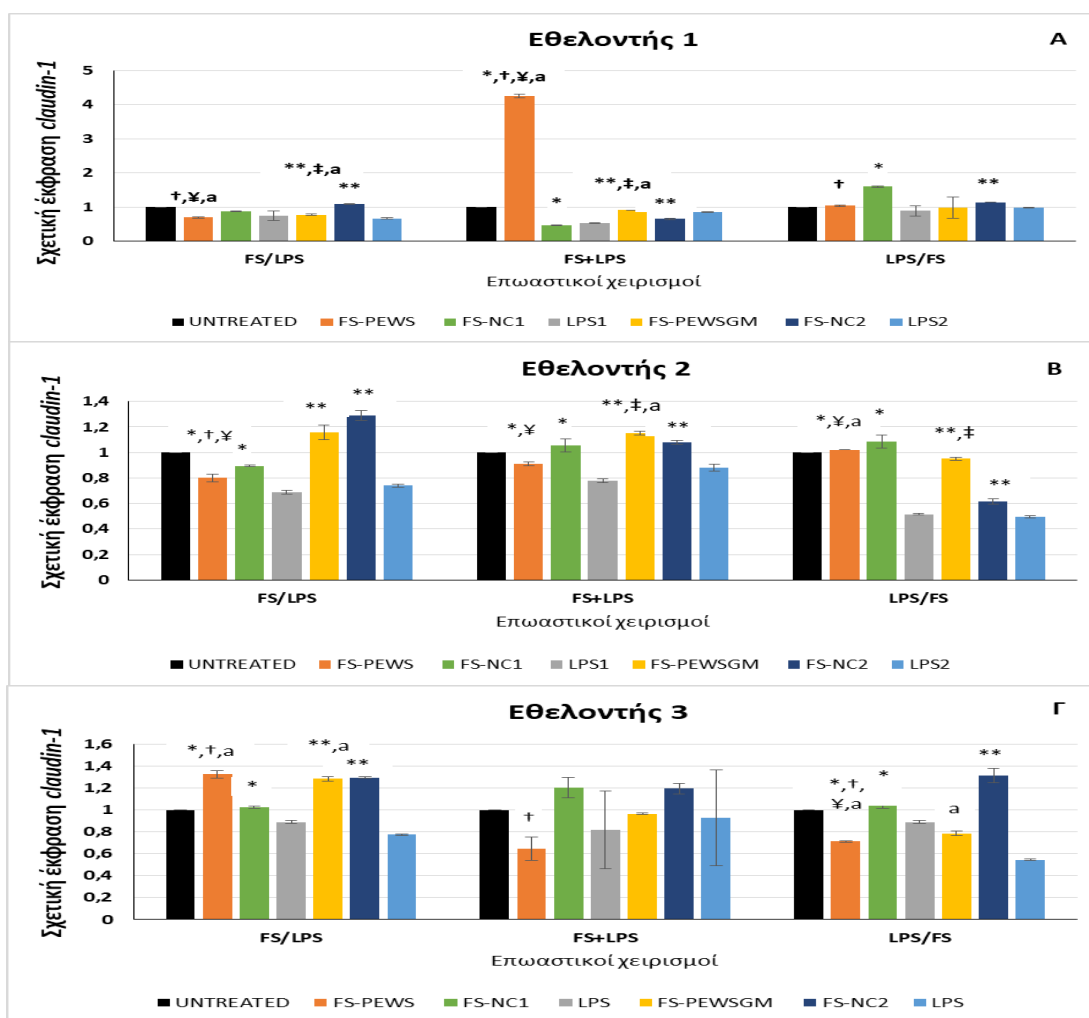
Τέλος, το FS-PEWS εμφάνισε σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης της *occludin* σε σχέση με το FS-PEWSGM στην περίπτωση του χειρισμού FS+LPS [FS-PEWSGM: $0,885 \pm 0,035$ vs FS-PEWS: $1,070 \pm 0,042$ ($p=0,042$)], γεγονός το οποίο δεν επαναλήφθηκε έπειτα από το χειρισμό

LPS/FS [FS-PEWSGM: $1,10 \pm 0,099$ vs FS-PEWS: $1,285 \pm 0,021$ ($p=0,123$)] και το χειρισμό FS/LPS [FS-PEWSGM: $1,545 \pm 0,007$ vs FS-PEWS: $1,695 \pm 0,064$ ($p=0,080$)].

Συνοψίζοντας, στον 3^ο εθελοντή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της *occludin* σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), με το LPS (LPS1) και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC1), μετά την επώαση με το FS-PEWS στα Caco-2 κύτταρα, για το χειρισμό FS/LPS και υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με το LPS (LPS1) και για τα άλλα δύο είδη χειρισμών. Παράλληλα, η επώαση με το FS-PEWSGM οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερη έκφραση της *occludin*, με παρόμοιο τρόπο με αυτό του FS-PEWS, δηλαδή αυξημένα επίπεδα σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), με το LPS (LPS2) και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC2) για το χειρισμό FS/LPS και υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με το LPS (LPS2) και για τα άλλα δύο είδη χειρισμών. Παρατηρήθηκε ότι ανάμεσα στα δύο ζυμωμένα μανιτάρια εμφανίστηκε όμοια εικόνα στην επίδραση που ασκούν στην έκφραση του γονιδίου της *occludin*, η οποία επαναλήφθηκε και ως προς το είδος χειρισμού που ασκήθηκε. Παράλληλα, εντοπίστηκε πως η επίδραση του FS-NC1 και του FS-NC2 του συγκεκριμένου εθελοντή φάνηκε να οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου στεγανού συνδέσμου σε σχέση με αυτή του LPS1 και του LPS2, έπειτα από τους χειρισμούς FS/LPS και FS+LPS, ενώ έπειτα από το χειρισμό LPS/FS μόνο το FS-NC2 οδήγησε σε υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με το LPS2.

2.5.3. Αποτελέσματα έκφρασης *claudin-1* ανά εθελοντή

Στα Διαγράμματα 7 (Α,Β,Γ), παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την επίδραση της επώασης των FS-PEWS και FS-PEWSGM στην κυτταρική σειρά Caco-2, ως προς τα επίπεδα έκφρασης του στεγανού συνδέσμου *claudin-1* στους εθελοντές 1, 2 και 3 στους τρεις χειρισμούς (FS/LPS, FS+LPS, LPS/FS).



Διάγραμμα 7. (Α,Β,Γ). Η επίδραση της επώασης των FS-PEWS και FS-PEWSGM στην κυτταρική σειρά Caco-2, ως προς την έκφραση της claudin-1 σε κάθε εθελοντή, έπειτα από την πραγματοποίηση των τριών διαφορετικών χειρισμών (FS/LPS, FS+LPS, LPS/FS). Untreated: κύτταρα καλλιέργειας χωρίς καμία επίδραση, FS: υπερκείμενο προϊόν ζύμωσης, PEWS: *Pleurotus eryngii* στέλεχος Zheng (216) σε υπόστρωμα WS, NC1: Αρνητικός μάρτυρας (βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς υπόστρωμα) πιάτου με FS-PEWS, LPS1: Λιποπολυσακχαρίτης πιάτου με FS-PEWS, PEWSGM: *Pleurotus eryngii* στέλεχος Zheng (216) σε υπόστρωμα WS: GM αναλογίας 1:1, NC2: Αρνητικός μάρτυρας (βασικό μέσο καλλιέργειας χωρίς υπόστρωμα) πιάτου με FS-PEWSGM, LPS2: Λιποπολυσακχαρίτης πιάτου με FS-PEWSGM. α στατιστικά σημαντικό με Untreated ($p < 0,05$), † στατιστικά σημαντικό με NC1 ($p < 0,05$), ‡ στατιστικά σημαντικό από NC2 ($p < 0,05$), * στατιστικά σημαντικό με LPS1 ($p < 0,05$), ** στατιστικά σημαντικό με LPS2 ($p < 0,05$), ¥ στατιστικά σημαντικό από WSGM ($p < 0,05$)

2.5.3.1. Αποτελέσματα έκφρασης claudin-1 πρώτου εθελοντή

Όσον αφορά τον πρώτο εθελοντή (Διάγραμμα 7Α), η επώαση της κυτταρικής σειράς Caco-2, με το FS-PEWS, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης της claudin-1, σε σύγκριση με τα untreated κύτταρα, κατά το χειρισμό FS+LPS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $4,260 \pm 0,057$ ($p=0,008$)], ενώ έπειτα από το χειρισμό FS/LPS τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου εμφανίστηκαν σημαντικά μειωμένα [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $0,695 \pm 0,021$ ($p=0,031$)], ενώ στην περίπτωση του χειρισμού LPS/FS δεν εμφανίστηκε κάποια διαφοροποίηση [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,040 \pm 0,014$ ($p=0,156$)].

Επιπρόσθετα, η έκφραση της *claudin-1*, σε σύγκριση με το LPS (LPS1), αυξήθηκε σημαντικά μόνο στην περίπτωση του χειρισμού FS+LPS [LPS1: $0,535 \pm 0,007$ vs FS-PEWS: $4,260 \pm 0,057$ ($p < 0,001$)], ενώ στα άλλα δύο είδη χειρισμών δεν εντοπίστηκε σημαντική διαφοροποίηση [χειρισμός FS/LPS. LPS1: $0,745 \pm 0,134$ vs FS-PEWS: $0,695 \pm 0,021$ ($p = 0,655$), χειρισμός LPS/FS. LPS1: $0,890 \pm 0,156$ vs FS-PEWS: $1,040 \pm 0,014$ ($p = 0,307$)].

Συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα FS-NC (FS-NC1), η επώαση με το FS-PEWS οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου μόνο κατά το χειρισμό FS+LPS [FS-NC1: $0,465 \pm 0,007$ vs FS-PEWS: $4,260 \pm 0,057$ ($p < 0,001$)], ενώ αντίθετη εικόνα παρουσιάστηκε στα άλλα δύο είδη χειρισμών [χειρισμός FS/LPS. FS-NC1: $0,880 \pm 0,014$ vs FS-PEWS: $0,695 \pm 0,021$ ($p = 0,009$), χειρισμός LPS/FS. FS-NC1: $1,600 \pm 0,028$ vs FS-PEWS: $1,040 \pm 0,014$ ($p = 0,002$)].

Η επίδραση της επώασης των κυττάρων με το FS-PEWSGM σε σύγκριση με τα untreated κυτταρα, συνοδεύτηκε από σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης της *claudin-1*, κατά τους χειρισμούς FS/LPS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $0,780 \pm 0,014$ ($p = 0,029$)] και LPS+FS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $0,910 \pm 0,000$ ($p < 0,001$)], ενώ δε φάνηκε να διαφέρει σημαντικά στο χειρισμό LPS/FS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $0,958 \pm 0,318$ ($p = 0,958$)].

Ακόμα, η επώαση των κυττάρων με το FS-PEWSGM οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης της *claudin-1* σε σχέση με το LPS (LPS2), μόνο έπειτα από τα είδη χειρισμών FS/LPS [LPS2: $0,670 \pm 0,014$ vs FS-PEWSGM: $0,780 \pm 0,014$ ($p = 0,016$)] και FS+LPS [LPS2: $0,860 \pm 0,014$ vs FS-PEWSGM: $0,910 \pm 0,000$ ($p = 0,037$)], ενώ δεν παρουσιάστηκε διαφοροποίηση κατά το χειρισμό LPS/FS [LPS2: $0,985 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $0,985 \pm 0,318$ ($p = 1,000$)].

Τέλος, συγκριτικά με το FS-NC (FS-NC2) παρουσιάστηκαν σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου για το χειρισμό FS/LPS [FS-NC2: $1,095 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $0,780 \pm 0,014$ ($p = 0,001$)] και σημαντικά αυξημένα επίπεδα έπειτα από το χειρισμό FS + LPS [FS-NC2: $0,655 \pm 0,021$ vs FS-PEWSGM: $0,910 \pm 0,000$ ($p = 0,003$)], ενώ δεν εντοπίστηκε σημαντική διαφοροποίηση στην περίπτωση του χειρισμού LPS/FS [FS-NC2: $1,145 \pm 0,005$ vs FS-PEWSGM: $0,958 \pm 0,318$ ($p = 0,555$)].

Μεταξύ των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών που προέρχονται από τα δύο διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας η επίδραση του FS-PEWSGM παρουσίασε σημαντικά

μειωμένα επίπεδα έκφρασης της *claudin-1*, κατά τους χειρισμούς FS+LPS [FS-PEWSGM: $0,910 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $4,260 \pm 0,057$ ($p < 0,001$)] και FS/LPS [FS-PEWSGM: $0,780 \pm 0,014$ vs FS-PEWS: $0,695 \pm 0,021$ ($p = 0,042$)], ενώ στο χειρισμό LPS/FS [FS-PEWSGM: $0,985 \pm 0,318$ vs FS-PEWS: $1,040 \pm 0,014$ ($p = 0,830$)] δεν εντοπίστηκε διαφορά μεταξύ τους.

Συνοψίζοντας, στον 1^ο εθελοντή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της *claudin-1* σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), με το LPS (LPS1, LPS2) και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC1, FS-NC2), μετά την επώαση τόσο του FS-PEWS και του FS-PEWSGM στα Caco-2 κύτταρα, μόνο έπειτα από το χειρισμό FS+LPS. Παρατηρήθηκε ότι ανάμεσα στα δύο ζυμωμένα μανιτάρια εμφανίστηκε όμοια εικόνα στην επίδραση που ασκούν στην έκφραση του γονιδίου της *claudin-1*, η οποία επαναλήφθηκε και ως προς το είδος χειρισμού που ασκήθηκε. Παράλληλα, εντοπίστηκε πως η επώαση με το FS-NC1 του συγκεκριμένου εθελοντή φάνηκε να οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του εξεταζόμενου στεγανού συνδέσμου σε σχέση με αυτή του LPS1 μόνο έπειτα από το χειρισμό LPS/FS, ενώ το FS-NC2 οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης της *claudin-1* σε σχέση με το LPS2 έπειτα από τα είδη χειρισμού FS/LPS και LPS/FS.

2.5.3.2. Αποτελέσματα έκφρασης *claudin-1* δεύτερου εθελοντή

Όσον αφορά το δεύτερο εθελοντή (Διάγραμμα 7B), η επώαση των κυττάρων Caco-2 με το FS-PEWS, οδήγησε σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα στην έκφραση της *claudin-1*, στον χειρισμό LPS/FS, σε σχέση με τα untreated κύτταρα [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,200 \pm 0,000$ ($p = 0,002$)], ενώ δεν υπήρξε κάποια διαφοροποίηση κατά τους άλλους δύο χειρισμούς [χειρισμός FS/LPS. untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $0,800 \pm 0,028$ ($p = 0,063$), χειρισμός FS+LPS. untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $0,910 \pm 0,014$ ($p = 0,070$)].

Αναφορικά με το LPS (LPS1) η επώαση των κυττάρων με το FS-PEWS εμφάνισε σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης της *claudin-1*, έπειτα και από τους τρεις χειρισμούς [χειρισμός FS/LPS LPS1: $0,690 \pm 0,014$ vs FS-PEWS: $0,800 \pm 0,028$ ($p = 0,003$), χειρισμός FS+LPS LPS1: $0,780 \pm 0,014$ vs FS-PEWS: $0,910 \pm 0,014$ ($p = 0,017$), χειρισμός LPS/FS. LPS1: $0,515 \pm 0,007$ vs FS-PEWS: $1,020 \pm 0,000$ ($p = 0,004$)].

Συγκριτικά με το FS-NC (FS-NC1), η επώαση των κυττάρων με το FS-PEWS είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου κατά το χειρισμό FS/LPS [FS-NC1: $0,895 \pm 0,007$ vs FS PEWS: $0,800 \pm 0,028$ ($p = 0,044$)], ενώ στους άλλους δύο χειρισμούς δεν

παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις [χειρισμός FS+LPS.FS-NC1: $1,055 \pm 0,050$ vs FS-PEWS: $0,910 \pm 0,014$ ($p=0,058$), χειρισμός LPS/FS.FS-NC1: $1,085 \pm 0,050$ vs FS-PEWS: $1,020 \pm 0,000$ ($p=0,204$)].

Από την άλλη, η επίδραση της επώασης του FS-PEWSGM στην κυτταρική σειρά Caco-2, οδήγησε σε σημαντική αύξηση ως προς τα επίπεδα έκφρασης της *claudin-1*, σε σχέση με τα untreated κύτταρα, έπειτα από το χειρισμό FS+LPS, [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,150 \pm 0,014$ ($p=0,042$)], ενώ δεν εντοπίστηκε σημαντική διαφοροποίηση για τα άλλα δύο είδη χειρισμών [χειρισμός FS/LPS. untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,160 \pm 0,057$ ($p=0,156$), χειρισμός LPS/FS. untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $0,950 \pm 0,014$ ($p=0,126$)].

Ακόμα, συγκριτικά με το LPS (LPS2), η επώαση των κυττάρων με το FS-PEWSGM αύξησε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου έπειτα και από τα τρία είδη χειρισμού [χειρισμός FS+LPS. LPS2: $0,880 \pm 0,028$ vs FS-PEWSGM: $1,150 \pm 0,014$ ($p=0,007$), χειρισμός FS/LPS. LPS2: $0,740 \pm 0,014$ vs FS-PEWSGM: $1,160 \pm 0,057$ ($p=0,010$), χειρισμός LPS/FS. LPS2: $0,495 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $0,950 \pm 0,014$ ($p=0,001$)].

Αναφορικά με το FS-NC (FS-NC2), η επώαση με το FS-PEWSGM οδήγησε σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης της *claudin-1*, έπειτα από τους χειρισμούς LPS/FS [FS-NC2: $0,615 \pm 0,021$ vs FS-PEWSGM: $0,950 \pm 0,014$ ($p=0,003$)] και FS+LPS [FS-NC2: $1,080 \pm 0,014$ vs FS-PEWSGM: $1,150 \pm 0,014$ ($p=0,038$)], ενώ δεν εντοπίστηκε διαφορά για τον τρίτο χειρισμό [χειρισμός FS/LPS. FS-NC2: $1,290 \pm 0,042$ vs FS-PEWSGM: $1,160 \pm 0,057$ ($p=0,122$)].

Τέλος, μεταξύ των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών που προέρχονται από τα δύο διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας η επώαση με το FS-PEWSGM οδήγησε σε σημαντικά μειωμένα επίπεδα έκφρασης της *claudin-1*, σε σχέση με το FS-PEWS, έπειτα από τους χειρισμούς FS/LPS [FS-PEWSGM: $1,160 \pm 0,057$ vs FS-PEWS: $0,800 \pm 0,028$ ($p=0,015$)] και FS+LPS [FS-PEWSGM: $1,150 \pm 0,014$ vs FS-PEWS: $0,910 \pm 0,014$ ($p=0,003$)], ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε στο χειρισμό LPS/FS [FS-PEWSGM: $0,950 \pm 0,014$ vs FS-PEWS: $1,020 \pm 0,000$ ($p=0,020$)].

Συνοψίζοντας, στον 2^ο εθελοντή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της *claudin-1* σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells) και με το LPS (LPS1) μετά την επώαση με το FS-PEWS στα Caco-2 κύτταρα, στο χειρισμό LPS/FS. Παράλληλα, η επώαση με το FS-PEWSGM οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερη έκφραση αναφορικά με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), με το LPS (LPS2) και τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC2) μόνο έπειτα από το

χειρισμό FS+LPS. Παρατηρήθηκε ότι ανάμεσα στα δύο ζυμωμένα μανιτάρια εμφανίστηκαν διαφορές στην επίδραση που ασκούν στην έκφραση του γονιδίου της *claudin-1*, η οποία διέφερε και ως προς το είδος χειρισμού που ασκήθηκε. Από την άλλη, εντοπίστηκε πως η επώαση με το FS-NC1 και το FS-NC2 του συγκεκριμένου εθελοντή φάνηκε να οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου στεγανού συνδέσμου σε σχέση με αυτή του LPS1 και του LPS2, έπειτα και από τα τρία είδη χειρισμών.

2.5.3.3. Αποτελέσματα έκφρασης *claudin-1* τρίτου εθελοντή

Όσον αφορά τον τρίτο εθελοντή (Διάγραμμα 7Γ), η επώαση της κυτταρικής σειράς Caco-2 με το FS-PEWS, οδήγησε σε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της *claudin-1*, σε σχέση με τα untreated κύτταρα κατά το χειρισμό FS/LPS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $1,325 \pm 0,035$ ($p=0,033$)], σε σημαντική μείωση των επιπέδων κατά το χειρισμό LPS/FS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $0,715 \pm 0,007$ ($p=0,011$)], ενώ κατά το χειρισμό FS+LPS δεν εντοπίστηκε κάποια διαφοροποίηση [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWS: $0,645 \pm 0,106$ ($p=0,133$)].

Παρόμοια εικόνα παρουσιάστηκε και σε σχέση με το LPS (LPS1), όπου η επώαση των κυττάρων με το FS-PEWS, συνεισέφερε στην αύξηση της έκφρασης του γονιδίου, έπειτα από το χειρισμό FS/LPS [LPS1: $0,890 \pm 0,014$ vs FS-PEWS: $1,325 \pm 0,035$ ($p=0,004$)] και στη μείωση της έκφρασης έπειτα από το χειρισμό LPS/FS [LPS1: $0,890 \pm 0,014$ vs FS-PEWS: $0,715 \pm 0,007$ ($p=0,004$)], ενώ δεν εντοπίστηκε διαφοροποίηση στο χειρισμό FS+LPS [LPS1: $0,820 \pm 0,354$ vs FS-PEWS: $0,645 \pm 0,106$ ($p=0,572$)].

Συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα FS-NC (FS-NC1), η επώαση με το FS-PEWS οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της *claudin-1* μόνο στο χειρισμό FS/LPS [FS-NC1: $1,025 \pm 0,007$ vs FS-PEWS: $1,325 \pm 0,035$ ($p=0,007$)], αλλά στους άλλους δύο χειρισμούς οδήγησε σε μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου [χειρισμός LPS/FS. FS-NC1: $1,040 \pm 0,028$ vs FS-PEWS: $0,715 \pm 0,007$ ($p=0,004$)], χειρισμός FS+LPS. FS-NC1: $1,205 \pm 0,092$ vs FS-PEWS: $0,645 \pm 0,106$ ($p=0,004$)].

Αναφορικά με την επίδραση της επώασης των κυττάρων με το FS-PEWSGM ως προς τα επίπεδα έκφρασης της *claudin-1*, εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου, σε σχέση με τα untreated κύτταρα, έπειτα από το χειρισμό FS/LPS

[untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $1,285 \pm 0,021$ ($p=0,033$)], ενώ παρουσίασε σημαντική μείωση έπειτα από το χειρισμό LPS/FS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS-PEWSGM: $0,785 \pm 0,021$ ($p=0,044$)], ενώ δεν εντοπίστηκε σημαντική διαφορά στο χειρισμό FS+LPS [untreated: $1,000 \pm 0,000$ vs FS- PEWSGM: $0,965 \pm 0,050$ ($p=0,500$)].

Συγκριτικά με το LPS(LPS2), η επώαση με το FS-PEWSGM οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου κατά τους χειρισμούς FS/LPS [LPS2: $0,775 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $1,285 \pm 0,021$ ($p=0,001$)] και LPS/FS [LPS2: $0,545 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $0,785 \pm 0,021$ ($p=0,004$)], ενώ στην περίπτωση του χειρισμού FS+LPS [LPS2: $0,930 \pm 0,438$ vs FS-PEWSGM: $0,965 \pm 0,050$ ($p=0,921$)] δεν εντοπίστηκε κάποια διαφοροποίηση μεταξύ τους.

Σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα FS-NC (FS-NC2), η επώαση των κυττάρων με το FS-PEWSGM, κατέδειξε σημαντικά χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης της *claudin-1*, έπειτα από τους χειρισμούς FS+LPS, LPS/FS [χειρισμός FS+LPS. FS-NC2: $1,195 \pm 0,005$ vs FS-PEWSGM: $0,965 \pm 0,050$ ($p=0,043$), χειρισμός LPS/FS. FS-NC2: $1,315 \pm 0,064$ vs FS-PEWSGM: $0,785 \pm 0,021$ ($p=0,008$)], ενώ δεν παρουσιάστηκε διαφορά στο χειρισμό FS/LPS [FS-NC2: $1,295 \pm 0,007$ vs FS-PEWSGM: $1,285 \pm 0,021$ ($p=0,592$)].

Τέλος, μεταξύ των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών, που προέρχονται από τα δύο διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας, η επώαση με το FS-PEWSGM σε σχέση με το FS-PEWS οδήγησε σε σημαντική μείωση των επιπέδων έκφρασης της *claudin-1*, έπειτα από το χειρισμό LPS/FS [FS-PEWSGM: $0,785 \pm 0,021$ vs FS-PEWS: $0,715 \pm 0,007$ ($p=0,047$)], ενώ δεν εντοπίστηκαν διαφοροποιήσεις στα άλλα είδη χειρισμών [χειρισμός FS/LPS. FS-PEWSGM: $1,285 \pm 0,021$ vs FS-PEWS: $1,325 \pm 0,035$ ($p=0,304$), χειρισμός FS+LPS. FS-PEWSGM: $0,965 \pm 0,050$ vs FS-PEWS: $0,645 \pm 0,106$ ($p=0,061$)].

Συνοψίζοντας, στον 3^ο εθελοντή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της *claudin-1* σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), με το LPS (LPS1) και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC1), μετά την επώαση με το FS-PEWS στα Caco-2 κύτταρα, για το χειρισμό FS/LPS. Παράλληλα, η επώαση με το FS-PEWSGM οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερη έκφραση του εξεταζόμενου στεγανού συνδέσμου, με παρόμοιο τρόπο με αυτό του FS-PEWS, δηλαδή αυξημένα επίπεδα σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells) και με το LPS (LPS2) για το χειρισμό FS/LPS. Παρατηρήθηκε ότι ανάμεσα στα δύο ζυμωμένα μανιτάρια εμφανίστηκε όμοια εικόνα στην επίδραση που ασκούν στην έκφραση του γονιδίου της *claudin-1*, η οποία επαναλήφθηκε και ως προς το είδος χειρισμού που ασκήθηκε. Παράλληλα, εντοπίστηκε πως η

επώαση με το FS-NC1 και το FS-NC2 του συγκεκριμένου εθελοντή φάνηκε να οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου στεγανού συνδέσμου σε σχέση με αυτή του LPS1 και του LPS2, έπειτα από τους χειρισμούς FS/LPS και LPS/FS.

2.5.4. Αποτελέσματα έκφρασης για το σύνολο των *TJs* ανά εθελοντή

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα που προέκυψαν από την ανάλυση του κάθε εθελοντή σε σχέση με την έκφραση του κάθε *TJ*, εντοπίστηκε διακύμανση στα τελικά ευρήματα μεταξύ των εθελοντών, γεγονός που κατέστησε απαραίτητη την εξατομικευμένη αξιολόγηση ως προς την έκφραση όλων των στεγανών συνδέσμων για κάθε εθελοντή ξεχωριστά.

Όσον αφορά τον πρώτο εθελοντή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της *ZO-1*, της *occludin* και της *claudin-1* σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), με το LPS (LPS1) και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC1), μετά την επώαση του FS-PEWS στα Caco-2 κύτταρα, μόνο έπειτα από το χειρισμό FS+LPS. Από την άλλη, η επώαση με το FS-PEWSGM κατά τον ίδιο χειρισμό (FS+LPS), οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερη έκφραση και των τριών γονιδίων σε σύγκριση με το LPS (LPS2) και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC2). Κατά τη σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα στον ίδιο χειρισμό, ενώ για τα γονίδια *ZO-1*, *occludin* δεν παρουσιάστηκαν διαφορές με τον θετικό μάρτυρα, ως προς το γονίδιο *claudin-1* παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασής του μετά από την επώαση με το FS-PEWSGM. Συνεπώς, καθίσταται σαφές πως μεταξύ των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών, που προέρχονται από τα δύο διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας παρουσιάζεται παρόμοια εικόνα στην έκφραση των στεγανών συνδέσμων με το χειρισμό FS+LPS να είναι αυτός που φαίνεται να παρουσιάζει τη βέλτιστη εικόνα για το συγκεκριμένο εθελοντή, αφού τουλάχιστον αυξάνει την έκφραση και των τριών στεγανών συνδέσμων σε σχέση με την επίδραση του LPS και του αρνητικού μάρτυρα (NC).

Όσον αφορά το δεύτερο εθελοντή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της *ZO-1*, της *occludin* σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), με το LPS (LPS1) και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC1) και σημαντικά αυξημένα επίπεδα της *claudin-1* σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells) και με το LPS (LPS1) μετά την επώαση με το FS-PEWS στα Caco-2 κύτταρα, έπειτα από το χειρισμό LPS/FS. Από την άλλη διαφοροποιημένη εικόνα παρατηρήθηκε, με τον χειρισμό LPS/FS να προκαλεί αύξηση της έκφρασης στα γονίδια *occludin* και *claudin-1* μετά από την επώαση των Caco-2 κυττάρων με το μανιτάρι PEWSGM σε σχέση με

το LPS2 και σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα (NC2), ενώ η έκφραση ήταν στα ίδια επίπεδα με εκείνη που εμφανίστηκε στον θετικό μάρτυρα (untreated cells). Για το γονίδιο *ZO-1* ο ίδιος χειρισμός αύξησε τα επίπεδα της έκφρασης μετά από την επώαση με το PEWSGM, μόνο ως προς το LPS2. Συνεπώς, καθίσταται σαφές πως μεταξύ των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών, που προέρχονται από τα δύο διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας, παρά τις κάποιες διαφοροποιήσεις, παρουσιάζεται παρόμοια εικόνα στην έκφραση των στεγανών συνδέσμων με το χειρισμό LPS/FS να είναι αυτός που φαίνεται να παρουσιάζει τη βέλτιστη εικόνα για το συγκεκριμένο εθελοντή, αφού τουλάχιστον αυξάνει την έκφραση και των τριών στεγανών συνδέσμων σε σχέση με την επίδραση του LPS.

Τέλος, όσον αφορά τον τρίτο εθελοντή παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της έκφρασης της *occludin* και της *claudin-1* σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), με το LPS (LPS1) και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC1) και σημαντικά αυξημένα επίπεδα της *ZO-1* σε σχέση με το LPS (LPS1) μετά την επώαση με το FS-PEWS στα Caco-2 κύτταρα, έπειτα από το χειρισμό FS/LPS. Από την άλλη, η επώαση με το FS-PEWSGM οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης της *ZO-1*, της *occludin* σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells), με το LPS (LPS2) και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC2) και σημαντικά αυξημένα επίπεδα της *claudin-1* σε σχέση με τον θετικό μάρτυρα (untreated cells) και με το LPS (LPS2) μόνο έπειτα από το χειρισμό FS/LPS. Συνεπώς, καθίσταται σαφές πως μεταξύ των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών, που προέρχονται από τα δύο διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας παρουσιάζεται παρόμοια εικόνα στην έκφραση των στεγανών συνδέσμων με το χειρισμό FS/LPS να είναι αυτός που φαίνεται να παρουσιάζει τη βέλτιστη εικόνα για το συγκεκριμένο εθελοντή, αφού τουλάχιστον αυξάνει την έκφραση και των τριών στεγανών συνδέσμων σε σχέση με την επίδραση του LPS.

Άρα, αξιολογώντας ολιστικά τα παραπάνω ευρήματα, παρατηρείται πως η έκφραση μεταξύ των στεγανών συνδέσμων παρουσιάζει επαναλήψιμότητα για συγκεκριμένο είδος χειρισμού, στο οποίο ο εκάστοτε εθελοντής εμφανίζει τη βέλτιστη επίδραση των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη.

ΚΕΦ. 3: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ρόλος των πρεβιοτικών αναδεικνύεται έντονα τα τελευταία χρόνια, στοχεύοντας στη ρύθμιση και την προστασία του εντερικού φραγμού. Οι ήδη υπάρχουσες ερευνητικές μελέτες εστιάζουν στην ωφέλιμη δράση τους, επισημαίνοντας τη σημαντικότητά τους ως μέσο για την εξασφάλιση ενός υγιούς γαστρεντερικού συστήματος σε περιπτώσεις διαταραγμένης διαπερατότητας του εντερικού φραγμού και κατά συνέπεια της εντερικής λειτουργικότητας, που σχετίζεται με ποικίλες παθολογικές καταστάσεις (Vancamelbeke & Vermeire, 2017). Παρόλα αυτά, ελάχιστες είναι οι μελέτες, οι οποίες έχουν εξετάσει την επίδραση προϊόντων ζύμωσης τροφίμων πλούσιων σε β-γλυκάνες, τα οποία φαίνεται πως διαθέτουν πρεβιοτική δράση, στη λειτουργικότητα διαρρέοντος εντερικού φραγμού (Van den Abbeele, και συν., 2018) (Pham, και συν., 2018) (Uerlings, και συν., 2020). Για αυτό το λόγο, στη συγκεκριμένη μελέτη σκοπός ήταν η διερεύνηση της επίδρασης των προϊόντων ζύμωσης των μανιταριών του μακρομύκητα *Pleurotus eryngii* (PEWS και PEWSGM), από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών ηλικιωμένων ατόμων (≥ 65 ετών), στα επίπεδα έκφρασης των στεγανών συνδέσμων (*ZO-1*, *occludin*, *claudin-1*) *in vitro*, μέσω προσομοίωσης των συνθηκών διαρρέοντος εντέρου, χρησιμοποιώντας ως μέσο πρόκλησης πιθανών βλαβών στον εντερικό φραγμό το λιποπολυσακχαρίτη (LPS) έπειτα από τρία είδη χειρισμού. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης υποστηρίζουν τη θετική επίδραση των εξεταζόμενων προϊόντων ζύμωσης στην ενίσχυση της λειτουργικότητας του εντερικού φραγμού, όπως αυτή εκτιμήθηκε με τη χρήση ενός *in vitro* μοντέλου σε Caco-2 κύτταρα.

Συγκεκριμένα, επωάζοντας τα προϊόντα ζύμωσης των μανιταριών, που προέρχονται από τα δύο διαφορετικά υποστρώματα καλλιέργειας, στην κυτταρική σειρά Caco-2, αναδείχτηκε η ικανότητα τους να εξασφαλίζουν παρόμοια γονιδιακή έκφραση των *TJs* (*ZO-1*, *occludin*, *claudin-1*) με τα *untreated* κυτταρα, έπειτα και από τους τρεις χειρισμούς στο σύνολο των εθελοντών. Εξίσου ενθαρρυντικά, ήταν και τα ευρήματα που προέκυψαν συγκριτικά με τη δράση και των δύο μανιταριών ως προς αυτή του LPS, καθώς εντοπίστηκαν στατιστικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης της *ZO-1* και της *occludin* για όλους τους χειρισμούς, καθώς επίσης και ενισχυμένη έκφραση της *claudin-1*, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική, αναδεικνύοντας τη δυνατότητα των μανιταριών να συνεισφέρουν θετικά στην ανασυγκρότηση του εντερικού φραγμού μετά από την απορρύθμιση που προκλήθηκε μέσω του LPS. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τη διαφορετική δομική κινητικότητα που ανιχνεύεται μεταξύ αυτών

των πρωτεϊνών, αφού μελέτες υποστηρίζουν πως η ZO-1 και η occludin, αλληλεπιδρούν εντονότερα μεταξύ τους λειτουργώντας ως στατικό, αλλά ταυτόχρονα ενεργό δραστήριο σύμπλοκο, το οποίο σχετίζεται κυρίως με τη διαρρέουσα παρακυτταρική διαπερατότητα, ενώ η claudin-1, φαίνεται να επηρεάζεται λιγότερο από τη δράση τους και να παρουσιάζει κατά κύριο λόγο ακινησία κατά την μετακίνηση μορίων, μέσω της συμμετοχής της στην παρακυτταρική διαπερατότητα μέσω πόρων (Shen, Weber, & Turner, 2014), (Shen L. , Weber, Raleigh, Yu, & Turner, 2011) (France & Turner, 2017).

Παράλληλα, εξετάζοντας τα αποτελέσματα της έκφρασης των *TJs*, έπειτα από τα τρία είδη χειρισμών πραγματοποιήθηκε εξατομικευμένη προσέγγιση αξιολόγησης του εκάστοτε εθελοντή. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τον πρώτο εθελοντή, εντοπίστηκαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα έκφρασης για όλες τις εξεταζόμενες *TJs*, κυρίως έπειτα από το χειρισμό FS+LPS, που σημαίνει πως στο συγκεκριμένο εθελοντή η επώαση με τα FS παρουσιάζει κυρίως επιδιορθωτικό χαρακτήρα στη λειτουργικότητα του εντερικού φραγμού. Αναφορικά με το δεύτερο εθελοντή, η επώαση των Caco-2 κυττάρων με τα FS των μανιταριών οδήγησε σε σημαντική αύξηση της έκφρασης των ZO-1, occludin και claudin-1, κυρίως έπειτα από το χειρισμό LPS/FS, υποδεικνύοντας μία τάση για επιδιορθωτικό χαρακτήρα στη διαταραγμένη διαπερατότητα του εντερικού φραγμού του. Από την άλλη, ο τρίτος εθελοντής παρουσίασε σημαντική αύξηση της έκφρασης και των τριών *TJs*, έπειτα από το χειρισμό FS/LPS, που πιθανά σημαίνει πως τα μανιτάρια εμφανίζουν κυρίως προστατευτικό χαρακτήρα στην πρόκληση παρακυτταρικής βλάβης του εντερικού φραγμού στο συγκεκριμένο εθελοντή. Μία πιθανή αιτιολογία για τη σημαντική διατομική διαφοροποίηση που προκύπτει ανάμεσα στους εθελοντές, είναι η διαφορετικότητα του εντερικού μικροβιόκοσμου που παρουσιάζουν οι εθελοντές.

Η διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων ως προς το είδος του χειρισμού (προληπτική ή επιδιορθωτική), επιβεβαιώνεται και από την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία, η οποία παρουσιάζεται διχασμένη ως προς το είδος της πιθανής δράσης των πλούσιων σε β-γλυκάνες τροφίμων σε παρόμοια μοντέλα διαρρέοντος εντερικού φραγμού. Αν και δεν υπάρχουν αρκετές ερευνητικές μελέτες, σχετικά με την επίδραση των β-γλυκανών προερχόμενων από εδώδιμα μανιτάρια, στη λειτουργικότητα του εντερικού φραγμού, υπάρχουν δεδομένα τα οποία έρχονται σε συμφωνία με τα παρόντα ευρήματα. Συγκεκριμένα σύμφωνα με τη μελέτη των Wang και συν. (2019) ο πολυσακχαρίτης λεντινάνη (LNT), που απομονώθηκε από το μανιτάρι *Lentinus edodes*, χορηγήθηκε σε χοιρίδια, μέσω της τροφής τους, τα οποία στη συνέχεια

εκτέθηκαν σε LPS ενδοπεριτοναϊκά, δηλαδή πραγματοποιήθηκε χειρισμός προληπτικής δράσης. Στη συνέχεια παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της *claudin-1*, χωρίς ωστόσο να είναι στατιστικά σημαντική, αλλά όχι διαφορετική από αυτή των untreated κυττάρων, δημιουργώντας μία τάση για προστασία του εντερικού φραγμού από το στρεσογόνο παράγοντα (Wang, και συν., 2019). Στην παρούσα εργασία, παρόλο που το πειραματικό πλαίσιο ήταν διαφορετικό, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της *claudin-1* κατά τον χειρισμό FS/LPS, μετά από επώαση με το μανιτάρι PEWSGM, όταν εξετάστηκαν συνολικά οι τρεις εθελοντές, ενώ σε όλους τους άλλους χειρισμούς δεν παρατηρήθηκε διαφορά από τα untreated κύτταρα (θετικός μάρτυρας). Για την επώαση με το μανιτάρι PEWS δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά από τον θετικό μάρτυρα σε όλους τους χειρισμούς.

Παρόμοια ευρήματα προέκυψαν και στην μελέτη των Ducray και συν. (2019), όπου έπειτα πάλι από χορήγηση μέσω της τροφής β-γλυκανών προερχόμενων από το μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* σε ποντίκια, τα οποία στη συνέχεια εκτέθηκαν σε θερμικό στρες εμφάνισαν αύξηση των *ZO-1*, *occludin* και *claudin-1* σε σχέση με το στρεσογόνο παράγοντα, αλλά σημαντικά μικρότερη από αυτά που δεν εκτέθηκαν σε στρες, παρουσιάζοντας προληπτικό χαρακτήρα (Ducray, και συν., 2019). Ο Sheng και συν. (2020) έδειξαν, ότι η προ-χορήγηση ξυλοολιγοσακχαριτών για 21 ημέρες μέσω ενδογαστρικού ασκού σε αρσενικά ποντίκια, ήταν ικανή να προστατεύσει τη διαπερατότητα του εντερικού φραγμού αυξάνοντας την έκφραση των *ZO-1*, *occludin* και *claudin-1*, έπειτα από χορήγηση διαλύματος θειϊκού νατρίου δεξτράνης (DSS, 2,5% w/v), σε σχέση με την ομάδα που δεν εκτέθηκε καθόλου στο στρεσογόνο παράγοντα και είχε λάβει μη εμπλουτισμένο υδατικό διάλυμα (προληπτική δράση) (Sheng, και συν., 2020). Ακόμη, σε θηλυκά ποντίκια, τα οποία έλαβαν αντί νερού 2% v/v διάλυμα ισομαλτοδεξτρίνης (IMD) (πλούσιο σε α-γλυκάνες) για 2 εβδομάδες και στη συνέχεια έλαβαν διάλυμα θειϊκού νατρίου δεξτράνης (DSS, 2,5% v/v) μαζί με IMD, προκειμένου να τους προκληθεί μία ήπιας μορφής κολίτιδα, φάνηκε πως τα επίπεδα πρωτεϊνών *ZO-1* και *claudin-3*, κατά μήκος του εγκάρσιου και κατιόντος κόλου, ήταν σε παρόμοια επίπεδα σε σύγκριση με την ομάδα που δεν έλαβε IMD ή DSS, παρουσιάζοντας προληπτική δράση ενάντια στη νόσο (Arai, και συν., 2017). Πρόσφατα φάνηκε πως σε αρσενικά ποντίκια, τα οποία έλαβαν διατροφή πλούσια (35%) σε α-κυτταρίνη για 2 εβδομάδες και στη συνέχεια εκτέθηκαν σε LPS ενδοπεριτοναϊκά, εμφάνισαν παρόμοια έκφραση της *claudin-1* και της *occludin* του εντερικού επιθηλίου, σε σχέση με την ομάδα που δεν εκτέθηκε στο στρεσογόνο παράγοντα, αναδεικνύοντας τον προστατευτικό

χαρακτήρα της α-κυτταρίνης στη διατάραξη του εντερικού φραγμού προληπτικά (Di Caro, και συν., 2019).

Μία ακόμα πρόσφατη μελέτη έδειξε πως η χορήγηση μέσω της τροφής β-γλυκανών προερχόμενων από το μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* σε ποντίκια στα οποία ταυτόχρονα χορηγήθηκε θειϊκό νάτριο δεξτράνης (DSS, 3% w/v) για 7 ημέρες, προκαλώντας τους κολίτιδα, οδήγησαν σε σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης των *ZO-1*, *occludin* και *claudin-1* σε σχέση με το στρεσογόνο παράγοντα εμφανίζοντας παρόμοια επίπεδα με τα untreated κύτταρα, παρουσιάζοντας επιδιορθωτική μορφή δράσης (Han, Fan, Yao, Yang, & Han, 2017). Σε άλλη μελέτη, πολυσακχαρίτες απομονωμένοι από το σώμα μανιταριών *Dictyophora indusiata*, αύξησαν την έκφραση κυρίως των *ZO-1* και *claudin-1*, αλλά όχι τόσο της *occludin*, καθώς επίσης μείωσαν τα επίπεδα του παραγόμενου LPS σε ποντίκια, τα οποία είχαν εκτεθεί σε αντιβιοτικά ευρέως φάσματος (Kanwal, και συν., 2018). Τέλος, η μελέτη του Cani και συν. (2009) σε παχύσαρκα ποντίκια, τα οποία κατανάλωσαν διατροφή πλούσια σε πρεβιοτικά (ολιγοφρουκτόζη) σε σύγκριση με αυτά που κατανάλωσαν διατροφή πλούσια σε μη ζυμώσιμες διαιτητικές ίνες (μικροκρυσταλλική κυτταρίνη) συνοδεύτηκε από αύξηση της έκφρασης του mRNA της *ZO-1* και της *occludin* στη νήστιδα των ποντικών, υποδηλώνοντας την επιδιορθωτική δράση τους, μέσω της βελτίωσης της λειτουργικότητας των στεγανών συνδέσεων και της διαπερατότητας του εντέρου στην ομάδα που έλαβε τα πρεβιοτικά (Cani, και συν., 2009).

Η δράση των β-γλυκανών στην υγεία του ξενιστή, όπως αυτές που βρίσκονται σε ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση (PEWS: 38,7% και PEWSGM 42,2% w/w) στο κυτταρικό τοίχωμα των μανιταριών *Pleurotus eryngii*, αποδεδειγμένα παρουσιάζουν πρεβιοτικές, ανοσορυθμιστικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, επηρεάζοντας τη λειτουργικότητα του εντερικού επιθηλίου (Mitsou, και συν., 2020) (Jayachandran, Chen, Man, & Xu, 2018) (Fu, Liu, & Zhang, 2016). Εκτιμάται ότι οι β-γλυκάνες επιδρούν στον εντερικό μικροβιόκοσμο, ενισχύοντας την παρουσία συγκεκριμένων μικροοργανισμών που θεωρούνται ωφέλιμοι για την υγεία του ξενιστή, όπως στελέχη των γενών *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Akkermansia*, *Fecalibacterium*, *Roseburia*, *Bacteroides* και *Prevotella*, όπως επίσης ενισχύουν και την παραγωγή ενώσεων που προκύπτουν κατά την αποικοδόμησή τους π.χ. λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFA), διακλαδισμένα αμινοξέα βραχείας αλύσου (BSCFA), οι οποίες λειτουργούν με διαφορετικούς τρόπους στον ξενιστή (ενίσχυση του εντερικού φραγμού, σηματοδοτικά μόρια, υποστρώματα για τα επιθηλιακά κύτταρα κ.α.) (Feng, Wang, Wang, Huang, & Wang, 2018) (Corrêa, Fachi, Vieira, Sato, & Vinolo, 2016) (Yang, και συν., 2020) (Besten, και συν., 2013). Στη συγκεκριμένη

μελέτη, δεν εντοπίστηκε διαφορά στην έκφραση των στεγανών συνδέσμων, ανάμεσα στα προϊόντα ζύμωσης των μανιταριών που προέρχονται από διαφορετικά καλλιεργητικά υποστρώματα, έπειτα από επώαση σε Caco-2 κύτταρα. Το εύρημα αυτό πιθανόν να μπορεί να αιτιολογηθεί, καθώς από αποτελέσματα, τα οποία δεν παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη, είχε φανεί πως στο σύνολο των εθελοντών οι πρεβιοτικοί δείκτες των συγκεκριμένων μανιταριών δε διέφεραν σημαντικά ($p=0,674$) μεταξύ τους. Τα μανιτάρια, που προέρχονται από δύο καλλιεργητικά υλικά (PEWS, PEWSGM), εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα μικροβιακών πληθυσμών, με τα *Lactobacillus group* και *Bifidobacterium spp.*, να αυξάνονται σημαντικά έπειτα από 24 ώρες ζύμωσης, καθώς επίσης και τα επίπεδα των λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs) με εντονότερες τις αυξήσεις του βουτυρικού, οξικού και προπιονικού οξέος (Mitsou, και συν., 2020). Μελέτες αναφέρουν την ικανότητα των ενώσεων με πρεβιοτική δράση π.χ. ινουλίνη ή των προϊόντων, που προκύπτουν κατόπιν της ζύμωσής τους από τον εντερικό μικροβιόκοσμο, π.χ. βουτυρικό οξύ, να εμποδίζουν την προσκόλληση των παθογόνων μικροοργανισμών, όπως κάποια στελέχη του *E.coli*, του οποίου το κυτταρικό τοίχωμα είναι πλούσιο σε LPS. Έχει παρατηρηθεί ότι ανταγωνίζονται την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς, που εντοπίζονται στην επιφάνεια των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (Schulthess, και συν., 2019), επηρεάζοντας ταυτόχρονα την έκφραση των *ZO-1* και *occludin*, αλλά όχι της *claudin-1* (Monteagudo-Mera, Rastall, Gibson, Charalampopoulos, & Chatzifragkou, 2019), κυρίως έπειτα από συνθήκες προεπώασης με πρεβιοτικά (Shoaf, Mulvey, Armstrong, & Hutkins, 2006) (Li, και συν., 2020). Η ικανότητα αυτή όμως δεν έγκειται μόνο στην αντιμικροβιακή τους δυνατότητα, αλλά και σε πιο άμεσες δράσεις, όπως η κυτταρική σηματοδότηση του ξενιστή και δεν έχουν πλήρως διερευνηθεί (Wu, και συν., 2017). Η αύξηση της συγκέντρωσης των SCFAs, και κυρίως του βουτυρικού οξέος, έπειτα από τη ζύμωση των συγκεκριμένων μανιταριών πιθανόν να αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο για την επίδραση τους στη διατήρηση της λειτουργικότητας του εντερικού φραγμού, καθώς μελέτες υποστηρίζουν τη ικανότητα του συγκεκριμένου λιπαρού οξέος να αυξάνει την έκφραση των *TJs*, έπειτα από έκθεση των εντεροκυττάρων σε στρεσογόνους παράγοντες, όπως το LPS (Feng, Wang, Wang, Huang, & Wang, 2018).

Συμπερασματικά, γίνεται αντιληπτό πως η επίδραση των συστατικών των εδώδιμων μανιταριών του είδους *Pleurotus eryngii* θα μπορούσαν να ασκήσουν ευεργετικές επιδράσεις, εξασφαλίζοντας τη διατήρηση της ακεραιότητας της εντερικής διαπερατότητας σε καταστάσεις διαρρέοντος εντέρου, επηρεάζοντας την έκφραση των *ZO-1*, *occludin* και *claudin-1*. Το *in vitro* μοντέλο που ακολουθήθηκε στο πλαίσιο της συγκεκριμένης μελέτης για τη διερεύνηση της

επίδρασης των υπερκείμενων προϊόντων ζύμωσης στη λειτουργία του εντερικού φραγμού, έπειτα από επώαση τους με την κυτταρική σειρά Caco-2, θα μπορούσε να αποτελεί μελλοντικό εργαλείο αξιολόγησης για παρόμοιες ερευνητικές προσεγγίσεις. Η δυνητική δραστηριότητα των βιοενεργών εκχυλισμάτων των μανιταριών στη φυσιολογία του εντερικού επιθηλίου άρχισε μόλις να αποκαλύπτεται, προσφέροντας νέες εναλλακτικές λύσεις στις επιλογές, τόσο της προληπτικής όσο και της φαρμακοθεραπευτικής προσέγγισης νοσημάτων που σχετίζονται με αυτή. Βασική παράμετρος στην ικανότητα δράσης των β-γλυκανών αναδεικνύεται ξανά η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου, η οποία φαίνεται να καθορίζει καταλυτικά την αξιοποίηση των δραστικών αυτών συστατικών των εν λόγω μανιταριών, παρουσιάζοντας μία τάση τόσο για προληπτικό όσο και επιδιορθωτικό χαρακτήρα, με στόχο την εξασφάλιση φυσιολογικής εντερικής διαπερατότητας. Για αυτό το λόγο, απαιτούνται περαιτέρω έρευνες προκειμένου να αποσαφηνιστούν οι επιπτώσεις των εδώδιμων μανιταριών στην υγεία του εντέρου, πραγματοποιώντας καλά σχεδιασμένες μελέτες κυρίως μέσω διατροφικών παρεμβάσεων, ώστε να επιβεβαιωθεί η ευεργετική δράση που διαφαίνεται από τα *in vitro* πειράματα, να διευκρινιστεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης τους με τη χρήση πειραματόζων και να εδραιωθούν συστάσεις για τη χρήση τους, λαμβάνοντας υπόψη τον παράγοντα της εξατοκισμένης προσέγγισης.

Βιβλιογραφία

- Adak, A., & Mojibur R., K. (2018). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(3), σσ. 473-493.
- Aida, Shuhaimi, M., Yazid, M., & Maaruf, A. (2009). Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(11-12), σσ. 567-575.
- An, R., Wilms, E., Masclee, A., Smidt, H., Zoetendal, E., & Jonkers, D. (2018). Age-dependent changes in GI physiology and microbiota: time to reconsider? *Gut*, 67(12), σσ. 2213-2222.
- Arai, C., Sakurai, T., Koya-Miyata, S., Arai, S., Taniguchi, Y., Kamiya, T., . . . Fukuda, S. (2017). Isomaltodextrin Prevents DSS-induced Colitis by Strengthening Tight Junctions in Mice. *Food Science and Technology Research*, 23(2), σσ. 305-317.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D., Yamada, T., Mende, D., . . . Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), σσ. 174-180.
- Assimakopoulos, S. F., Triantos, C., Maroulis, I., & Gogos, C. (2018). The Role of the Gut Barrier Function in Health and Disease. *Gastroenterology Research*, 11(4), σσ. 261-263.
- Avni, S., Ezove, N., Hanani, H., Yadid, I., Karpovsky, M., Hayby, H., . . . Danay, O. (2017). Olive Mill Waste Enhances in the Edible Mushroom *Pleurotus eryngii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(7), σσ. 1564-1575.
- Bailey, M. A., & Holscher, H. (2018). Microbiome-Mediated Effects of the Mediterranean Diet on Inflammation. *Advances in Nutrition*, 9(3), σσ. 193-206.
- Balda, M. S., Gonzalez-Mariscal, L., Matter, K., Cereijido, M., & Anderson, J. (1993). Assembly of the Tight Junction: The Role of Diacylglycerol. *The Journal of Cell Biology*, 123(2), σσ. 293-302.
- Banfalvi, G. (2016). Measurement of Membrane permeability. Στο G. Banfalvi, *Permeability of Biological Membranes* (σσ. 117-119). Springer International Publishing.
- Bauer, H., Stelzhammer, W., Fuchs, R., Weiger, T., Danninger, C., Probst, G., & Krizbai, I. (1999). Astrocytes and neurons express the tight junction-specific protein occludin in vitro. *Experimental Cell Research*, 250(2), σσ. 434-438.
- Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A., & Bauer, H. (2010). The Dual Role of Zonula Occludens (ZO) Proteins. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010(4), σσ. 1-10.
- Baxter, N. T., Schmidt, A., Venkataraman, A., Kim, K., Waldron, C., & Schmidt, T. (2019). Dynamics of Human Gut Microbiota and Short-Chain Fatty Acids in Response to Dietary Interventions With Three Fermentable Fibers. *mBio*, 10(1), σσ. e02566-18.
- Besten, G. d., Eunen, K., Groen, A., Venema, K., Reijngoud, D.-J., & Bakker, B. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), σσ. 2325-2340.
- Bhatia, S., Prabhu, P., Benefiel, A., Miller, M., Chow, J., Davis, S., & Gaskins, H. (2014). Galacto-oligosaccharides may directly enhance intestinal barrier function through the modulation of goblet cells. *Nutrition & Food Research*, 59(3), σσ. 566-573.
- Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J.-D., Serino, M., . . . Wells, J. (2014). Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*, 14(1), σ. 189.

- Bookout, A. L., & Mangelsdorf, D. (2003). Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nuclear Receptor Signaling*, 1(1), σ. e012.
- Busnelli, M., Manzini, S., & Chiesa, G. (2019). The Gut Microbiota Affects Host Pathophysiology as an Endocrine Organ: A Focus on Cardiovascular Disease. *Nutrients*, 12(1), σσ. 79-111.
- Campbell, N. A., & Reece, J. (2010). Βιολογία. Στο Ν. Μοσχονάς (Επιμ.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτη.
- Cani, P. D., Possemiers, S., Van de Wiele, T., Guiot, Y., Everard, A., Rottier, O., . . . Delzenne, N. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, 58(8), σσ. 1091-1103.
- Chang, S., & Miles, P. (1992). Mushrooms biology a new discipline. *Mycologist*, 6, σσ. 64-65.
- Chang, S.-T. (2008). Overview of Mushroom Cultivation and Utilization as Functional Foods. Στο P. C. Cheung (Επιμ.), *Mushrooms as Functional Foods* (σσ. 1-33). China, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Chang, S.-T., & Miles, P. (2004). *Mushrooms Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. (2 εκδ.). Washington: CRC Press.
- Chelakkot, C., Ghim, J., & Ryu, S. (2018). Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(8), σσ. 103-111.
- Chen, M., Liu, Y., Xiong, S., Wu, M., Li, B., Ruan, Z., & Hu, X. (2019). Dietary L-Tryptophan alleviated LPS-induced intestinal barrier injury by regulating tight junctions in Caco-2 cell monolayer model. *Food & Function*, 10(5), σσ. 2390-2398.
- Cheung, P. C. (2008). Nutritional Value and Health Benefits of Mushrooms. Στο P. C. Cheung, *Mushrooms as functional foods* (σσ. 92-130). John Wiley & Sons, Inc.
- Chiba, H., Osanai, M., Murata, M., Kojima, T., & Sawada, N. (2008). Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(3), σσ. 588-600.
- Claude, P. (1978). Morphological factors influencing transepithelial permeability: A model for the resistance of the Zonula Occludens. *The Journal of Membrane Biology*, 39(2-3), σσ. 219-232.
- Cohen, R., Persky, L., & Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(5), σσ. 582-594.
- Corrêa, R. O., Fachi, J., Vieira, A., Sato, F., & Vinolo, M. (2016). Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & Translational Immunology*, 5(4), σ. e73.
- Cummings, J. H., Antoine, J.-M., Azpiroz, F., Bourdet-Sicard, R., Brandtzaeg, P., Calder, P., . . . Watzl, B. (2004). PASSCLAIM--gut Health and Immunity. *European Journal of Nutrition*, 43(Suppl 2), σσ. 118-173.
- Cummins, P. M. (2012). Occludin: One Protein, Many Forms. *Molecular and Cellular Biology*, 32(2), σσ. 242-250.
- Davis, G. R., Santa Ana, C., Morawski, S., & Fordtran, J. (1982). Permeability Characteristics of Human Jejunum, Ileum, Proximal Colon and Distal Colon: Results of Potential Difference Measurements and Unidirectional Fluxes. *Gastroenterology*, 83(4), σσ. 844-850.
- Deepalakshmi, K., & Mirunalini, S. (2014). *Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal of Biochemical Technology*, 5(2), σσ. 718-726.

- Di Caro, V., Alcamo, A. M., Cummings, J. L., Clark, R. S., Novak, E. A., Mollen, K. P., . . . Aneja, R. K. (2019). Effect of dietary cellulose supplementation on gut barrier function and apoptosis in a murine model of endotoxemia. *PLoS ONE*, *14*(12), σ. e0224838.
- Du, B., Meenu, M., Liu, H., & Xu, B. (2019). A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of β -Glucan. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(16), σσ. 4032-4050.
- Ducray, H., Globa, L., Pustovyy, O., Morrison, E., Vodyanoy, V., & Sorokulova, I. (2019). Yeast fermentate prebiotic improves intestinal barrier integrity during heat stress by modulation of the gut microbiota in rats. *Journal of Applied Microbiology*, *127*(4), σσ. 1192-1206.
- Fanning, A. S., Ma, T., & Anderson, J. (2002). Isolation and Functional Characterization of the Actin Binding Region in the Tight Junction Protein ZO-1. *The FASEB Journal*, *16*(13), σσ. 1835-1837.
- Feng, Y., Wang, Y., Wang, P., Huang, Y., & Wang, F. (2018). Short-Chain Fatty Acids Manifest Stimulative and Protective Effects on Intestinal Barrier Function Through the Inhibition of NLRP3 Inflammasome and Autophagy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *49*(1), σσ. 190-205.
- Filippo, C. D., Cavalieri, D., Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J., Massart, S., . . . Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of National Academy of Sciences*, *107*(33), σσ. 14691-14696.
- France, M. M., & Turner, J. (2017). The mucosal barrier at a glance. *Journal of Cell Science*, *130*(2), σσ. 307-314.
- Fu, Z., Liu, Y., & Zhang, Q. (2016). A Potent Pharmacological Mushroom: *Pleurotus eryngii*. *Fungal Genomics & Biology*, *6*(1), σσ. 139-144.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin. *The Journal of Cell Biology*, *141*(7), σσ. 1539-1550.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1993). Occludin: A Novel Integral Membrane Protein Localizing at Tight Junctions. *The Journal of Cell Biology*, *123*(6), σσ. 1777-1788.
- Garcia-Mantrana, I., Selma-Royo, M., Alcantara, C., & Collado, M. (2018). Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. *Frontiers in Microbiology*, *9*, σ. 890.
- Garcia-Mazcorro, J. F., Noratto, G., & Remes-Troche, J. (2018). The Effect of Gluten-Free Diet on Health and the Gut Microbiota Cannot Be Extrapolated from One Population to Others. *Nutrients*, *10*(10), σ. 1421.
- Gibson, G. R., Probert, H., Van Loo, J., Rastall, R., & Roberfroid, M. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, *17*(2), σσ. 259-275.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., & Jaramillo, B. (2003). Tight junction proteins. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, *81*(1), σσ. 1-44.
- Groschwitz, K. R., & Hogan, S. (2009). Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *124*(1), σσ. 3-20.
- Guillemot, L., Paschoud, S., Pulimeno, P., Foglia, A., & Citi, S. (2008). The cytoplasmic plaque of tight junctions: A scaffolding and signalling center. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1778*(3), σσ. 601-613.

- Gumbiner, B., Lowenkopf, T., & Apatira, D. (1991). Identification of a 160 kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(8), σσ. 3460-3464.
- Günzel, D., & Yu, A. (2013). Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. *Physiological Reviews*, 93(2), σσ. 525-569.
- Guo, S., Al-Sadi, R., Said, H., & Ma, T. (2013). Lipopolysaccharide Causes an Increase in Intestinal Tight Junction Permeability in Vitro and in Vivo by Inducing Enterocyte Membrane Expression and Localization of TLR-4 and CD14. *The American Journal of Pathology*, 182(2), σσ. 375-387.
- Han, F., Fan, H., Yao, M., Yang, S., & Han, J. (2017). Oral administration of yeast β -glucan ameliorates inflammation and intestinal barrier in dextran sodium sulfate-induced acute colitis. *Journal of Functional Foods*, 35, σσ. 115-126.
- Hansen, C. H., Larsen, C., Petersson, H., Zachariassen, L., Vegge, A., Lauridsen, C., . . . Hansen, A. (2019). Targeting gut microbiota and barrier function with prebiotics to alleviate autoimmune manifestations in NOD mice. *Diabetologia*, 62(9), σσ. 1689-1700.
- Healey, G. R., Murphy, R., Brough, L., Butts, C., & Coad, J. (2017). Interindividual variability in gut microbiota and host response. *Nutrition Reviews*, 75(12), σσ. 1059-1080.
- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J., Blackwell, M., Cannon, P., Eriksson, O., . . . Kirk, P. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* III, 111(Pt A), σσ. 509-547.
- Hollander, D., & Kaunitz, J. (2020). The “Leaky Gut”: Tight Junctions but Loose Associations? *Digestive Diseases and Sciences*, 65(5), σσ. 1277-1287.
- Hooper, L. V., Littman, D., & Macpherson, A. (2012). Interactions between the Microbiota and the Immune System. *Science*, 336(6086), σσ. 1268-1273.
- Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), σσ. 8787-8803.
- Jayachandran, M., Chen, J., Man, S., & Xu, B. (2018). A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 61, σσ. 101-110.
- Jeznabadi, E. K., Jafarpour, M., & Eghbalsaied, S. (2016). King oyster mushroom production using various sources of agricultural wastes in Iran. *International Journal of Recycling of organic waste in agriculture*, 5(1), σσ. 17-24.
- Johnson-Henry, K. C., Pinnell, L., Waskow, A., Irrazabal, T., Martin, A., Hausner, M., & Sherman, P. (2014). Short-Chain Fructo-oligosaccharide and Inulin Modulate Inflammatory Responses and Microbial Communities in Caco2-bbe Cells and in a Mouse Model of Intestinal Injury. *The Journal of Nutrition*, 144(11), σσ. 1725-1733.
- Jong, M. A., Vriend, L., Theelen, B., Taylor, M., Fluitsma, D., Boekhout, T., & Geijtenbeek, T. (2010). C-type lectin Langerin is a β -glucan receptor on human Langerhans cells that recognizes opportunistic and pathogenic fungi. *Molecular Immunology*, 47(6), σσ. 1216-1225.
- Jornayvaz, F. R., Jurczak, M., Lee, H.-Y., Birkenfeld, A., Frederick, D., Zhang, D., . . . Shulman, G. (2010). A high-fat, ketogenic diet causes hepatic insulin resistance in mice, despite increasing energy expenditure and preventing weight gain. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 299(5), σσ. 808-815.

- Kanwal, S., Joseph, T., Owusu, L., Xiaomeng, R., Meiqi, L., & Yi, X. (2018). A Polysaccharide Isolated from *Dictyophora indusiata* Promotes Recovery from Antibiotic-Driven Intestinal Dysbiosis and Improves Gut Epithelial Barrier Function in a Mouse Model. *Nutrients*, 10(8), σσ. 1003-1023.
- Keenan, M. J., Marco, M., Ingram, D., & Martin, R. (2015). Improving healthspan via changes in gut microbiota and fermentation. *Age*, 37(5), σσ. 98-108.
- Lee, S. H. (2015). Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intestinal Research*, 13(1), σσ. 11-18.
- Legentil, L., Paris, F., Ballet, C., Trouvelot, S., Daire, X., Vetvicka, V., & Ferrières, V. (2015). Molecular Interactions of β -(1 $\rightarrow$ 3)-Glucans with Their Receptors. *Molecules*, 20(6), σσ. 9745-9766.
- Lewinsohn, D., Nevo, E., Wasser, S., Hadar, Y., & Beharav, A. (2001). Genetic diversity in populations of the *Pleurotus eryngii* complex in Israel. *Mycological Research*, 105(8), σσ. 941-951.
- Lewinsohn, D., Wasser, S., Reshetnikov, S., Hadar, Y., & Nevo, E. (2002). The *Pleurotus eryngii* species-complex in Israel: distribution and morphological description of a new taxon. *Mycotaxon*, 81, σσ. 51-67.
- Li, D., Bai, C., Zhang, Q., Li, Z., Shao, D., & Li, X. (2019). β -1,3-Glucan/CR3/SYK pathway-dependent LC3B-II accumulation enhanced the fungicidal activity in human neutrophils. *Journal of Microbiology*, 57(4), σσ. 263-270.
- Li, L.-L., Wang, Y.-T., Zhu, L.-M., Liu, Z.-Y., Ye, C.-Q., & Qin, S. (2020). Inulin with different degrees of polymerization protects against diet-induced endotoxemia and inflammation in association with gut microbiota regulation in mice. *Scientific Reports*, 10(1), σσ. 978-989.
- Li, X., Linlin, L., Cao, Z., Li, W., Li, H., Lu, C., . . . Liu, Y. (2020). Gut microbiota as an “invisible organ” that modulates the function of drugs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 121, σ. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109653.
- Lindfeldt, M., Eng, A., Darban, H., Bjerkner, A., Zetterström, C., Allander, T., . . . Prast-Nielsen, S. (2019). The ketogenic diet influences taxonomic and functional composition of the gut microbiota in children with severe epilepsy. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 5(1), σσ. doi.org/10.1038/s41522-018-0073-2.
- Lindley, J. (1836). *A natural system of botany*. (2nd εκδ.). London: W. Nicol.
- Liu, M., Li, X., Zhou, S., Wang, T., Zhou, S., Yang, K., . . . Wang, J. (2020). Dietary Fiber Isolated From Sweet Potato Residues Promotes a Healthy Gut Microbiome Profile. *Food & Function*, 11(1), σσ. 689-699.
- Louis, K. S., & Siegel, A. (2011). Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. Στο M. J. Stoddart (Επιμ.), *Mammalian Cell Viability Methods and Protocols* (σσ. 7-12). Humana Press.
- Luettig, J., Rosenthal, R., Barmeyer, C., & Schulzke, J. (2015). Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. *Tissue Barriers*, 3(1-2), σ. e977176.
- Ma, T. Y., & Anderson, J. (2006). Physiology of the Gastrointestinal Tract. Στο L. Johnson, K. Barrett, F. Ghishan, J. Merchant, H. Said, & J. Wood (Επιμ.). Academic Press.
- Ma, T. Y., Nighot, P., & Al-Sadi, R. (2018). Tight Junctions and the Intestinal Barrier. Στο H. M. Said (Επιμ.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (6th εκδ., σσ. 587-639). Academic Press.
- Macherey-Nagel. (2015). *RNA Isolation User manual NucleoZOL*. Macherey-Nagel.

- Maftoun, P., Johari, H., Soltani, M., Malik, R., Othman, N., & El Enshasy, H. (2015). The Edible Mushroom *Pleurotus* spp.: I. Biodiversity and Nutritional Values. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 4(2), σσ. 67-83.
- Mall, J. P., Löfvendahl, L., Lindqvist, C., Brummer, R., Keita, Å., & Schoultz, I. (2018). Differential Effects of Dietary Fibres on Colonic Barrier Function in Elderly Individuals With Gastrointestinal Symptoms. *Scientific Reports*, 8(1), σσ. 13404-13414.
- Manzi, P., Gambelli, L., Marconi, S., Vivanti, V., & Pizzoferrato, L. (1999). Nutrients in edible mushrooms – an inter-species comparative study. *Food Chemistry*, 65(4), σσ. 477-482.
- Martinez-Medina, M., Denizot, J., Dreux, N., Robin, F., Billard, E., Bonnet, R., . . . Barnich, N. (2014). Western diet induces dysbiosis with increased *E. coli* in CEABAC10 mice, alters host barrier. *Gut*, 63(1), σσ. 116-124.
- Matijašić, B. B., Obermajer, T., Lipoglavšek, L., Grabnar, I., Avguštin, G., & Rogelj, I. (2014). Association of Dietary Type With Fecal Microbiota in Vegetarians and Omnivores in Slovenia. *European Journal of Nutrition*, 53(4), σσ. 1051-1064.
- Maynard, C. L., Elson, C., Hatton, R., & Weaver, C. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), σσ. 231-241.
- McIntosh, K., Reed, D., Schneider, T., Dang, F., Keshteli, A., Palma, G., . . . Vanner, S. (2016). FODMAPs alter symptoms and the metabolome of patients with IBS: a randomised controlled trial. *Gut*, 66(7), σσ. 1241-1251.
- MicroDok. (2020). *Trypan blue dye & Haemocytometer*. Ανάκτηση April 29, 2020, από Microdok: <https://microdok.com/trypan-blue-haemocytometer/>
- Mitsou, E. K., Kakali, A., Antonopoulou, S., Mountzouris, K., Yannakoulia, M., Panagiotakos, D., & Kyriacou, A. (2017). Adherence to the Mediterranean diet is associated with the gut microbiota pattern and Gastrointestinal Characteristics in an Adult Population. *British Journal of Nutrition*, 117(12), σσ. 1645-1655.
- Mitsou, E. K., Saxami, G., Stamoulou, E., Kerezoudi, E., Terzi, E., Koutrotsios, G., . . . Kyriacou, A. (2020). Effects of rich in β -glucans edible mushrooms on aging gut microbiota characteristics: an in vitro study. *Molecules*, 25(12), σσ. 2806-2830.
- Mitsou, E., Kougia, E., Nomikos, T., Yannakoulia, M., Mountzouris, K., & Kyriacou, A. (2011). Effect of banana consumption on faecal microbiota: A randomised, controlled trial. *Anaerobe*, 17(6), σσ. 384-387.
- Monteagudo-Mera, A., Rastall, R., Gibson, G., Charalampopoulos, D., & Chatzifragkou, A. (2019). Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(16), σσ. 6463-6472.
- Moonmoon, M., Uddin, M., Ahmed, S., Shelly, N., & Khan, M. (2010). Cultivation of different strains of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) on saw dust and rice straw in Bangladesh. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(4), σσ. 341-345.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), σσ. 55-63.
- Mu, Q., Kirby, J., Reilly, C., & Luo, X. (2017). Leaky Gut As a Danger Signal for Autoimmune Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 8, σσ. 598-608.

- Muresan, Z., Paul, D., & Goodenough, D. (2000). Occludin 1B, a variant of the tight junction protein occludin. *Molecular Biology of the Cell*, 11(2), σσ. 627-634.
- Nagpal, R., Mainali, R., Ahmadi, S., Wang, S., Singh, R., Kavanagh, K., . . . Yadav, H. (2018). Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights. *Nutrition and Healthy aging*, 4(4), σσ. 267-285.
- Natividad, J. M., & Verdu, E. (2013). Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacological Research*, 69(1), σσ. 42-51.
- Ouellette, A. J., & Selsted, M. (1996). Paneth cell defensins: Endogenous peptide components of intestinal host defense. *The FASEB Journal*, 10(11), σσ. 1280-1289.
- Palframan, R., Gibson, G., & Rastall, R. (2003). Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Letters in Applied Microbiology*, 37(4), σσ. 281-284.
- Palma, G. D., Nadal, I., Collado, M., & Sanz, Y. (2009). Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *British Journal of Nutrition*, 102(8), σσ. 1154–1160.
- Papadaki, A., Kachrimanidou, V., Papanikolaou, S., Philippoussis, A., & Diamantopoulou, P. (2019). Upgrading Grape Pomace through *Pleurotus* spp. Cultivation for the Production of Enzymes and Fruiting Bodies. *Microorganisms*, 7(7), σσ. 207-220.
- Peng, J. T., Lee, C., & Tsai, Y. (2000). Effect of rice bran on the production of different king oyster mushroom strains during bottle cultivation. *Journal of Agricultural Research of China*, 49(3), σσ. 60-67.
- Perez-Muñoz, M. E., Arrieta, M.-C., Ramer-Tait, A., & Walter, J. (2017). A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*, 5(1), σσ. doi:10.1186/s40168-017-0268-4 .
- Pham, V. T., Seifert, N., Richard, N., Raederstorff, D., Steinert, R., Prudence, K., & Mohajeri, M. (2018). The effects of fermentation products of Prebiotic Fibres on Gut Barrier and Immune Functions in Vitro. *Peer Journal*, 6(1), σ. e5288.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K., Manichanh, C., . . . Liang, H. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic. *Nature*, 464(7285), σσ. 59-65.
- Quel. (1872). *GBIF Backbone Taxonomy*. Ανάκτηση December 10, 2019, από Global Biodiversity Information Facility: <https://www.gbif.org/species/7853533>
- Reis, F. S., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. (2012). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), σσ. 191-197.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., . . . Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers. *Nature Immunology*, 2(4), σσ. 361-367.
- Rinninella, E., Cintoni, M., Raoul, P., Lopetuso, L., Scaldaferri, F., Pulcini, G., . . . Mele, M. (2019). Food Components and Dietary Habits: Keys for a Healthy Gut Microbiota Composition. *Nutrients*, 11(10), σ. 2393.

- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiaro, G., Gasbarrini, A., & Mele, M. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7(1), σσ. 14-36.
- Roberto. (2020). *The kingdom of Mushrooms*. Ανάκτηση April 27, 2020, από MONDO FUNGHI: <https://www.mondofunghi.com/en/pleurotus-eryngii.html>
- Ruggiero, M. A., Gordon, D., Orrell, T., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R., . . . Kirk, P. (2015). A Higher Level Classification of All Living Organisms. *Plos One*, 10(4), σσ. 1-60.
- Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., . . . Tsukita, S. (1998). Occludin-deficient Embryonic Stem Cells Can Differentiate into Polarized Epithelial Cells Bearing Tight Junctions. *The Journal Of Cell Biology*, 141(2), σσ. 397-408.
- Saxami, G., Karapetsas, A., Lamprianidou, E., Kotsianidis, I., Chlichlia, A., Tassou, C., . . . Galanis, A. (2016). Two potential probiotic lactobacillus strains isolated from olive microbiota exhibit adhesion and anti-proliferative effects in cancer cell lines. *Journal of Functional Foods*, 24, σσ. 461-471.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), σσ. 1101-1108.
- Scholz-Ahrens, K. E. (2016). Prebiotics, Probiotics, Synbiotics and Foods with Regard to Bone Metabolism. Στο C. M. Weaver, R. Daly, & H. Bischoff-Ferrari, *Nutritional Influences on Bone Health* (σσ. 153-167). Switzerland: Springer International Publishing.
- Schroeder, B. O., Birchenough, G., Stahlman, M., Arike, L., Johansson, M., Hansson, G., & Backhed, F. (2017). Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration. *Cell Host & Microbe*, 23(1), σσ. 27-40.
- Schulthess, J., Pandey, S., Capitani, M., Rue-Albrecht, K., Arnold, I., Franchini, F., . . . Powrie, F. (2019). The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity*, 50(2), σσ. 432-445.
- Scott, K. P., Gratz, S., Sheridan, P., Flint, H., & Duncan, S. (2013). The Influence of Diet on the Gut Microbiota. *Pharmacological Research*, 69(1), σσ. 52-60.
- Sekirov, I., Russell, S., Antunes, L., & Finlay, B. (2010). Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 90(3), σσ. 859-904.
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*, 14(8), σ. e1002533.
- Shen, L., Weber, C. R., & Turner, J. R. (2014). The Tight Junction Protein Complex Undergoes Rapid and Continuous Molecular Remodeling. *The Journal of Cell Biology*, 181(4), σσ. 683-695.
- Shen, L., Weber, C., Raleigh, D., Yu, D., & Turner, J. (2011). Tight Junction Pore and Leak Pathways: A Dynamic Duo. *Annual Review of Physiology*, 73(1), σσ. 283-309.
- Shen, L., Weber, C., Raleigh, D., Yu, D., & Turner, J. (2011). Tight Junction Pore and Leak Pathways: A Dynamic Duo. *Annual Review of Physiology*, 73(1), σσ. 283-309.
- Sheng, K., He, S., Sun, M., Zhang, G., Kong, X., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Synbiotic supplementation containing Bifidobacterium infantis and xylooligosaccharides alleviates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis. *Food & Function*, 11(5), σσ. 3964-3974.

- Shoaf, K., Mulvey, G., Armstrong, G., & Hutkins, R. (2006). Prebiotic Galactooligosaccharides Reduce Adherence of Enteropathogenic Escherichia coli to Tissue Culture Cells. *Infection and Immunity*, 74(12), σσ. 6920–6928.
- Sima, P., Vannucci, L., & Vetvicka, V. (2018). β -glucans and cholesterol (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 41(4), σσ. 1799-1808.
- Sittipo, P., Shim, J.-w., & Lee, Y. (2019). Microbial Metabolites Determine Host Health and the Status of Some Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), σσ. 5296-5322.
- Slavin, J. (2013). Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients*, 5(4), σσ. 1417-1435.
- Slifer, Z. M., & Blikslager, A. (2020). The Integral Role of Tight Junction Proteins in the Repair of Injured Intestinal Epithelium. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), σσ. 972-982.
- Stachowiak, B., & Reguła, J. (2012). Health-promoting potential of edible macromycetes under special consideration of polysaccharides: a review. *European Food Research and Technology*, 234(3), σσ. 369-380.
- Staehelin, L. (1973). Further Observations on the Fine Structure of Freeze-Cleaved Tight Junctions. *Journal of Cell Science*, 13(3), σσ. 763-786.
- Staudacher, H. M., Lomer, M., Farquharson, F., Louis, P., Fava, F., Franciosi, E., . . . Whelan, K. (2017). A Diet Low in FODMAPs Reduces Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome and A Probiotic Restores Bifidobacterium Species: A Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology*, 153(4), σσ. 936-947.
- Stevenson, B. R., Siliciano, J., Mooseker, M., & Goodenough, D. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *The Journal of Cell Biology*, 103(3), σσ. 755-766.
- Swann, E., & Hibbett, D. (2007, April 20). *The Tree of Life Web Project*. Ανάκτηση February 20, 2018, από <http://tolweb.org/Basidiomycota/20520/2007.04.20>.
- Swanson, K., Vos, W., Martens, E., Gilbert, J., Menon, R., Soto-Vaca, A., . . . Slavin, J. (2020). Effect of fructans, prebiotics and fibres on the human gut microbiome assessed by 16S rRNA-based approaches: a review. *Beneficial Microbes*, 11(2), σσ. 101-129.
- Takiishi, T., Morales Feneno, C., & Câmara, N. (2017). Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers*, 5(4), σ. doi: 10.1080/21688370.2017.1373208.
- Tanoue, T., Nishitani, Y., Kanazawa, K., Hashimoto, T., & Mizuno, M. (2008). In vitro model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264.7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 374(3), σσ. 565-569.
- The Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), σσ. 207-214.
- Thoo, L., Noti, M., & Krebs, P. (2019). Keep calm: the intestinal barrier at the interface of peace and war. *Nature*, 10(11), σσ. 849-862.
- Tobias, P. S., Tapping, R., & Gegner, J. (1999). Endotoxin Interactions with Lipopolysaccharide-Responsive Cells. *Clinical Infectious Diseases*, 28(3), σσ. 476-481.

- Traweger, A., Fang, D., Liu, Y.-C., Stelzhammer, W., Krizbai, I., Fresser, F., . . . Bauer, H. (2002). The Tight Junction-specific Protein Occludin Is a Functional Target of the E3 Ubiquitin-protein Ligase Itch. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), σσ. 10201-10208.
- Tsukita, S., Furuse, M., & Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(4), σσ. 285-293.
- Uerlings, J., Schroyen, M., Willems, E., Tanghe, S., Bruggeman, G., Bindelle, J., & Everaert, N. (2020). Differential effects of inulin or its fermentation metabolites on gut barrier and immune function of porcine intestinal epithelial cells. *Journal of Functional Foods*, 67, σ. 103855.
- Van den Abbeele, P., Taminiau, B., Pinheiro, I., Duysburgh, C., Jacobs, H., Pijls, L., & Marzorati, M. (2018). Arabinoxyloligosaccharides and inulin impact inter-individual variation on microbial Variation on Microbial Metabolism and Composition, Which Immunomodulates Human Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(5), σσ. 1121-1130.
- Vancamelbeke, M., & Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 11(9), σσ. 821-834.
- Vendrely, R., Alexandrov, K., De Sousa Lechner, M., & Coirault, Y. (1968). Fractionation of Ribonucleic Acids by 'Sephadex' Agarose Gel Electrophoresis. *Nature*, 218(5138), σσ. 293-294.
- Wang, X., Wang, W., Wang, L., Yu, C., Zhang, G., Zhu, H., . . . Liu, Y. (2019). Lentinan modulates intestinal microbiota and enhances barrier integrity in a piglet model challenged with lipopolysaccharide. *Food & Function*, 10(1), σσ. 479-489.
- Whittaker, R. (1969, January). New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*, 163(3863), σσ. 150-160.
- Wikipedia. (2020, April 15). *MTT Assay*. Ανάκτηση April 29, 2020, από Wikipedia: https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay
- Wu, R. Y., Abdullah, M., Määtänen, P., Pilar, A., Scruten, E., Johnson-Henry, K., . . . Sherman, P. (2017). Protein kinase C δ signaling is required for dietary prebiotic induced strengthening of intestinal epithelial barrier function. *Scientific Reports*, 7(1), σσ. 40820-40830.
- Yang, Q., Qi, L., Biju, B., Belobrajdic, D., Feng, Q.-J., & Zhang, W. (2020). Role of Dietary Nutrients in the Modulation of Gut Microbiota: A Narrative Review. *Nutrients*, 12(2), σ. 381.
- Yatsunenko, T., Rey, F., Manary, M., Trehan, I., Dominguez-Bello, M., Contreras, M., . . . Gordon, J. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), σσ. 222-227.
- Zervakis, G. I., Ntougias, S., Gargano, M., Besi, M., Polemis, E., Typas, M., & Venturella, G. (2014). A reappraisal of the *Pleurotus eryngii* complex- New species and taxonomic combinations based on the application of a polyphasic approach and an identification key to *Pleurotus* taxa associated with Apiaceae plants. *Fungal Biology*, 118(9-10), σσ. 814-834.
- Zervakis, G. I., Venturella, G., & Papadopoulou, K. (2001). Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species-complex as determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. *Microbiology*, 147(11), pp. 3183-3194.
- Zervakis, G., & Balis, C. (1996). A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycological Research*, 100(6), σσ. 717-731.

- Zervakis, G., Sourdis, J., & Balis, C. (1994). Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. *Mycological Research*, 98(3), σσ. 329-341.
- Zhu, F., Du, B., Bian, Z., & Xu, B. (2015). β -Glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, σσ. 165-173.
- Zimmer, J., Lange, B., Frick, J.-S., Sauer, H., Zimmermann, K., Schwiertz, A., . . . Enck, P. (2012). A vegan or vegetarian diet substantially alters the human colonic faecal microbiota. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66(1), σσ. 53-60.
- Δήμου, Δ. Μ. (2005). Μύκητες- Μανιτάρια. Εισαγωγή στη βιολογία των Μακρομηκύτων. *Πρακτικά Συνεδρίου Ελληνικής Εταιρείας Εθνοφαρμακολογίας «Βρώσιμα & Θεραπευτικά Μανιτάρια»*, (σσ. 17-23). Καστοριά.
- Ζερβάκης, Γ. (2014). Πανεπιστημιακές Σημειώσεις με τίτλο << Εισαγωγή στη Μυκητολογία >>. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών : Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής.
- Μεντής, Α.-Φ., & Γύπας, Φ. (2013). Ανθρώπινο μικροβίωμα του εντέρου Ο ρόλος του στην υγεία και στη νόσο. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής*, 30(3), σσ. 272-288.