



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ: ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΑΣΚΗΣΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΟΣΤΙΚΟΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ:

ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ

ΟΣΤΕΟΒΛΑΣΤΩΝ

ΓΑΛΑΝΗ ΕΙΡΗΝΗ

(Α.Μ. : 4421733)



ΑΘΗΝΑ, 2020



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ: ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΔΙΑΤΡΟΦΗ & ΑΣΚΗΣΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΕΝΤΑ ΡΩΞΑΝΗ (Επιβλέπουσα), Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Διατροφής – Διαιτολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΑΔΑΜΑΝΤΙΝΗ ΚΥΡΙΑΚΟΥ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Διατροφής – Διαιτολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

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

Η Ειρήνη Γαλάνη δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Κα Τέντα Ρωξάνη για την άμεση ανταπόκριση σε κάθε μου απορία. Η αρωγή της ήταν πολύτιμη για την εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κα Κυριακού Αδαμαντίνη για την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω σε μία καινοτόμα μελέτη με πολλές ιδέες μελλοντικής έρευνας. Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την Κα Μήτσου Ευδοκία για το αμείωτο ενδιαφέρον της καθόλη τη διάρκεια της πανδημίας, την περίοδο κατά την οποία επεξεργαζόμουν τα ερευνητικά δεδομένα. Η συνεχή παρακολούθησή της στο στατιστικό μέρος της πτυχιακής, διευκόλυνε το έργο μου στην εξαγωγή αποτελεσμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την συνεχή εμπύχωση σε μία δύσκολη περίοδο.

Περιεχόμενα

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	7
Περίληψη	9
Abstract	11
Α΄ ΜΕΡΟΣ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ	13
Κεφάλαιο 1	13
1.1 Σύσταση και λειτουργία του οστίτη ιστού	13
1.2 Φυσιολογία και οστικός μεταβολισμός	14
1.3 Φυσιολογία και λειτουργία Οστεοβλαστών	18
1.4 Φυσιολογία και λειτουργία Οστεοκλαστών	20
1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την οστική αναδιαμόρφωση	22
1.6 Ενδοκρινολογικές λειτουργίες του οστικού ιστού	25
1.7 Διατροφικοί παράγοντες που επηρεάζουν την οστική υγεία	26
Κεφάλαιο 2	30
2.1 Εντερικός Μικροβιόκοσμος (ΕΜ)	30
2.2 Ο ρόλος του ΕΜ στην υγεία	32
2.3 Πρεβιοτικά	33
2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο	34
2.5 Επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στην οστική υγεία	35
2.6 Εντερικός μικροβιόκοσμος και SCFAs	38
2.7 SCFA και οστική αναδιαμόρφωση	39
Κεφάλαιο 3	41
3.1 Μανιτάρια	41
3.2 Διατροφική αξία μανιταριών	43
3.3 Οι β-γλυκάνες των μανιταριών	45
3.4 Μανιτάρια <i>Pleurotus ostreatus</i>	46
3.5 Μανιτάρια <i>Ganoderma lucidum</i>	47

Β' ΜΕΡΟΣ: ΠΡΑΚΤΙΚΟ	48
Κεφάλαιο 1	48
1.1 Σκοπός εργασίας	48
1.2 Πειραματικό πρωτόκολλο	48
1.3 Προσδιορισμός SCFA	50
1.4 Στατιστική ανάλυση	51
1.5 Αποτελέσματα	52
1.5.2 Αποτελέσματα ανάλυσης ποσοτικού προσδιορισμού των επιμέρους SCFAs κατά τη διαδικασία ζύμωσης μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων στο σύνολο των εθελοντριών	53
1.5.3 Αποτελέσματα ανάλυσης ποσοτικού προσδιορισμού των επιμέρους SCFAs κατά τη διαδικασία ζύμωσης μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων στις εθελόντριες με υγιή οστική μάζα	76
1.5.4 Αποτελέσματα ανάλυσης ποσοτικού προσδιορισμού των επιμέρους SCFAs κατά τη διαδικασία ζύμωσης μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων στις εθελοντριών με παθολογική οστική μάζα	95
1.6 Συζήτηση	117
1.7 Περιορισμοί και μελλοντική έρευνα	125
Βιβλιογραφία:	127

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.....	14
Εικόνα 2.....	15
Εικόνα 3	18
Εικόνα 4.....	20
Εικόνα 5	21
Εικόνα 6.....	31
Εικόνα 7	35
Εικόνα 8.....	37
Εικόνα 9.....	39
Εικόνα 10.....	41
Εικόνα 11.....	46
Εικόνα 12.....	48

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.....	53
Πίνακας 2.....	76
Πίνακας 3	95

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1.....	56
Διάγραμμα 2.....	58
Διάγραμμα 3.....	60
Διάγραμμα 4.....	62
Διάγραμμα 5.....	64
Διάγραμμα 6	66
Διάγραμμα 7.....	68
Διάγραμμα 8.....	69
Διάγραμμα 9.....	71
Διάγραμμα 10.....	73
Διάγραμμα 11.....	75
Διάγραμμα 12.....	80
Διάγραμμα 13.....	81
Διάγραμμα 14.....	83
Διάγραμμα 15.....	84
Διάγραμμα 16.....	86
Διάγραμμα 17.....	87

Διάγραμμα 18	89
Διάγραμμα 19	90
Διάγραμμα 20	91
Διάγραμμα 21	92
Διάγραμμα 22	94
Διάγραμμα 23	99
Διάγραμμα 24	101
Διάγραμμα 25	103
Διάγραμμα 26	104
Διάγραμμα 27	106
Διάγραμμα 28	107
Διάγραμμα 29	109
Διάγραμμα 30	111
Διάγραμμα 31	113
Διάγραμμα 32	115
Διάγραμμα 33	116

Περίληψη

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος, γνωστός και ως δεύτερη γονιδιακή ομάδα του ανθρώπινου σώματος, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική λειτουργία, στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και στην οστική υγεία, μέσω μηχανισμών που δεν έχουν ανιχνευτεί πλήρως. Η ρύθμιση της ισοροπίας στους μικροβιακούς πληθυσμούς του εντερικού μικροβιόκοσμου μέσω προβιοτικών ή πρεβιοτικών, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της ανάπτυξης ασθενειών που σχετίζονται με τα οστά, όπως η οστεοπόρωση. Οι άπεπτοι πολυσακχαρίτες των μανιταριών και συγκεκριμένα οι β-γλυκάνες, μέσω των ανοσορρυθμιστικών και αντιφλεγμονωδών δράσεων τους, φαίνεται να διαθέτουν παράλληλα και πρεβιοτική δράση. Η παραγωγή βραχείας αλύσου λιπαρών οξέων (SCFA), από τον εντερικό μικροβιόκοσμο μετά από τη ζύμωση πρεβιοτικών ενώσεων, φαίνεται να συμβάλλει στη ρύθμιση του οστικού μεταβολισμού. Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκε η παραγωγή SCFAs, ύστερα από την *in vitro* ζύμωση των μανιταριών *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123 POWS (2% w/v), *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 GLBS (2% w/v) και των πλούσιων σε β-γλυκάνες εκχυλισμάτων τους (POWSE και GLBSE) με εμβόλιο από τον εντερικό μικροβιόκοσμο εμμηνοπαυσιακών γυναικών (n=6), τρεις εκ των οποίων ήταν οστεοπενικές. Τα συγκεκριμένα υποστρώματα, αξιολογήθηκαν για την πιθανή πρεβιοτική τους δράση ως προς την παραγωγή SCFAs, σε ένα μοντέλο ζυμώσεως στατικής καλλιέργειας. Ως θετικός μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε η ινουλίνη σε 2 συγκεντρώσεις INU1 (1% w/v) και INU2 (2% w/v) και ο αρνητικός μάρτυρας, δεν περιείχε πηγή άνθρακα (NC). Τα υποστρώματα επώαστηκαν για 24 ώρες αναερόβια, ύστερα από τον εμβολιασμό τους με δείγμα κοπράνων και λήφθηκαν τα υπερκείμενα σε 0, 8 και 24 ώρες. Κατά τη διάρκεια της *in vitro* αναερόβιας ζύμωσης, υπήρξε σημαντική αλληλεπίδραση των υποστρωμάτων με τον χρόνο επώασης στο σύνολο των εθελοντριών. Τα υποστρώματα POWS και POWSE, παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις συνολικών πτητικών λιπαρών οξέων (total VFAs) στο σύνολο των εθελοντριών σε σχέση με NC και θετικούς μάρτυρες. Στο υπόστρωμα POWS, η ομάδα των οστεοπενικών γυναικών εμφάνισε την υψηλότερη συγκέντρωση συνολικών

πτητικών λιπαρών οξέων (total VFAs), οξικού και βουτυρικού συγκριτικά με την ομάδα των εθελοντριών με καλή οστική πυκνότητα. Το υπόστρωμα GLBS και στις 2 ομάδες, αύξησε σημαντικά τις συγκεντρώσεις και τις μοριακές αναλογίες των BSCFAs και other SCFAs. Τέλος, η δράση των συγκεκριμένων υποστρωμάτων μπορεί να συντελέσει στην βελτίωση της εντερικής βιοποικιλότητας, ενισχύοντας την απελευθέρωση των ευεργετικών για την υγεία του ξενιστή SCFAs, και πιθανώς να αποτελέσει μία καλή στρατηγική, στοχεύοντας στη βελτίωση της εξέλιξης μεταβολικών νοσημάτων των οστών, όπως είναι η οστεοπόρωση.

Λέξεις-κλειδιά: Εντερικός μικροβιόκοσμος, οστική αναδιαμόρφωση, μανιτάρια, πρεβιοτική δράση, οστεοπενία

Abstract

The intestinal microbiome, also known as the second gene group of the human body, plays an important role in immune function, nutrient uptake and bone health through mechanisms that have not been fully elucidated. The restoration of homeostasis in the intestinal microbiota can be acquired through the consumption of probiotics or prebiotics and seems to play an important role in the prevention of bone-related diseases, such as osteoporosis. The indigestible polysaccharides of mushrooms and specifically β -glucans, express immunoregulatory, anti-inflammatory and prebiotic activities. The enhanced production of SCFAs after the fermentation of prebiotics by the intestinal microbiota, appears to regulate the bone metabolism. In the present study, the production of SCFAs was evaluated after the *in vitro* fermentation of *Pleurotus ostreatus* mushrooms WS LGAM1123 POWS (2% w / v), *Ganoderma lucidum* LGAM 9720 GLBS (2% w / v) and of their β -glucan-rich extracts (POWSE and GLBSE), inoculated with the intestinal microbiota. Six apparently healthy women in menopause, were the fecal donors, three of them being osteopenic. The fungal substrates were evaluated for their potential prebiotic activity through the production of SCFAs in a static culture fermentation model. Inulin was used as a positive control in 2 different concentrations INU1 (1% w / v) and INU2 (2% w / v) and the negative control did not contain a carbon source (NC). The substrates were incubated for 24 hours anaerobically, after inoculation and samples were taken at 0, 8 and 24 hours. During the *in vitro* anaerobic fermentation, there was a significant interaction of the substrates with the incubation time in all volunteers. POWS and POWSE substrates showed the highest concentrations of total volatile fatty acids (total VFAs) in all volunteers compared to NC and positive controls. In the group of osteopenic women, POWS exhibited the highest concentration of total volatile fatty acids (total VFAs), acetate and butyrate acids compared to the group of bone-healthy volunteers. Also, GLBS substrate in both groups significantly increased the concentrations and molecular ratios of BSCFAs and other SCFAs. Finally, the consumption of these substrates could improve the intestinal biodiversity and

enhance the SCFAs production, that are beneficial to the host's health. Indeed, they could control the development of metabolic diseases such as osteoporosis.

Keywords: Intestinal microbiome, bone remodeling, mushrooms, prebiotic activity, osteopenia

Α' ΜΕΡΟΣ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

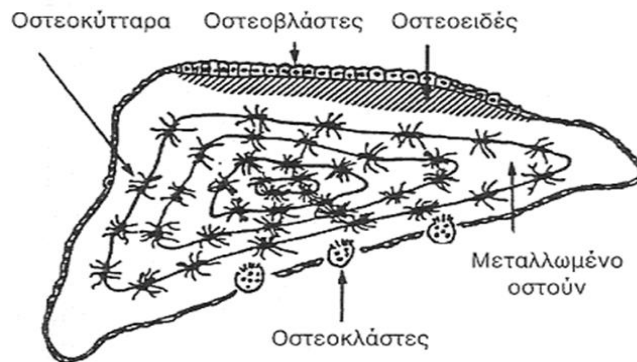
Κεφάλαιο 1

1.1 Σύσταση και λειτουργία του οστίτη ιστού

Το οστόν είναι ένας επιμεταλλωμένος συνδετικός ιστός απαραίτητος για σημαντικές λειτουργίες όπως η μετακίνηση, η στήριξη, η προστασία των μαλακών τμημάτων του ιστού και η αποθήκευση ασβεστίου και φωσφορικών αλάτων (P. A. Downey, et al. 2006).

Τα οστά αποτελούνται από τον οστίτη ιστό, ο οποίος συντίθεται από τα οστεοπρογονικά κύτταρα, οστεοκύτταρα, οστεοβλάστες και οστεοκλάστες (H. K. Datta, et al. 2008). Τα οστεοκύτταρα βρίσκονται στο εσωτερικό των κοιλοτήτων της μεσοκυττάριας ουσίας, παρουσιάζοντας πολλές νευρικές απολήξεις. Οι νευρώνες αυτοί εκτείνονται μέσα σε μικροσκοπικά κανάλια της μεσοκυττάριας ουσίας και ενώνονται με την κυτταρική μεμβράνη των γειτονικών οστεοκυττάρων. Κατά τα 2/3 η μεσοκυττάρια ουσία αποτελείται από ανόργανες ουσίες, ενώ κατά το 1/3 από οργανικές. Οι οργανικές ουσίες αποτελούνται από ινίδια κολλαγόνου, που ενισχύουν την ελαστικότητα και την αντοχή του οστού καθώς και την μεσοινιδώδη ουσία, η οποία αποτελείται από βλεννοσακχαρίτες και μεσοκυττάριο υγρό. Οι μη οργανικές ουσίες αποτελούνται από τα μεταλλικά άλατα, τα οποία έχουν μία κρυσταλλική δομή. Τα κυριότερα εξ' αυτών είναι το ασβέστιο και το φωσφορικό άλας και αποτελούν περίπου το 85% των μετάλλων στα οστά. Μικρότερη αναλογία στην οστική δομή έχει το ανθρακικό ασβέστιο (10%), το θειϊκό μαγνήσιο και το χλωριούχο ασβέστιο (5%). Τα άλατα αυτά περιβάλλουν τα ινίδια κολλαγόνου και προσδίδουν σκληρότητα και ανθεκτικότητα στα οστά. Η ποσότητα των μεταλλικών ουσιών που βρίσκεται στα οστά εξαρτάται από την ηλικία, τη λειτουργική ικανότητα των νεφρών, την ορμονική και την ενζυμική κατάσταση (Clarke, B., et al. 2008).

Η αναδιαμόρφωση των οστών είναι μία περίπλοκη διαδικασία από την οποία το παλαιό οστό αντικαθίσταται από νεό οστό σε ένα κύκλο φάσεων, μέσω μίας διαδικασίας συντονισμένων ενεργειών οστεοπρογονικών κυττάρων, οστεοκύτταρων, οστεοβλαστών και οστεοκλαστών, που αποτελούν την βασική πολυκυτταρική μονάδα (BMU) (T. L. Andersen, et al. 2009; E. M. Hauge, et al. 2001). Η αναδιαμόρφωση του οστού είναι απαραίτητη για την επούλωση των θραυσμάτων, την προσαρμογή σκελετού στη μηχανική χρήση, καθώς και για την ομοιόσταση του ασβεστίου (S. L. Dallas, et al. 2013). Από την άλλη πλευρά, μια ανισορροπία της οστικής αναδιαμόρφωσης έχει ως αποτέλεσμα διάφορα μεταβολικά νοσήματα των οστών, όπως είναι η οστεοπόρωση και η οστεοπέτρωση (C. Sobacchi, et al.2013).

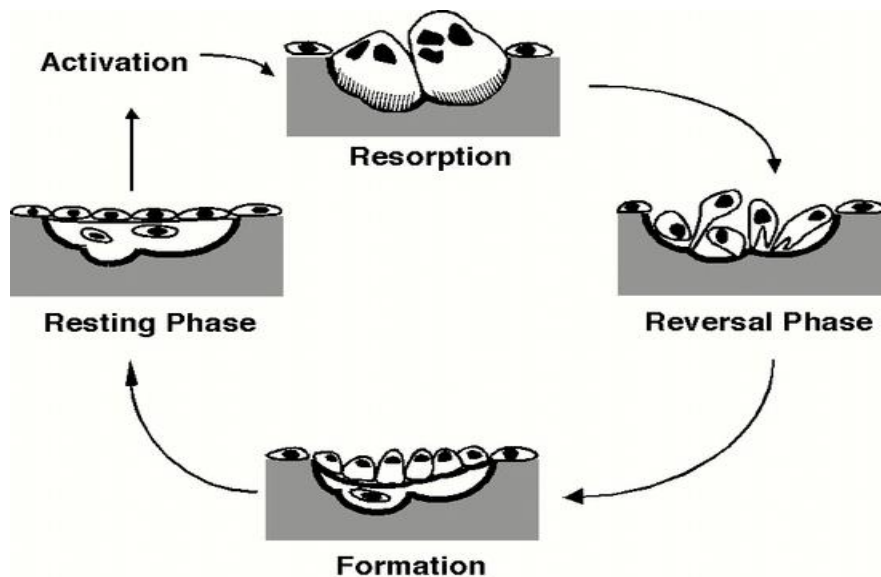


Εικόνα 1. Σχηματική παράσταση μίας βασικής πολυκυτταρικής μονάδας σπογγώδους οστού (Λυρίτης Γ.Π., 1996)

1.2 Φυσιολογία και οστικός μεταβολισμός

Τα οστά είναι λειτουργικοί ιστοί με μόνιμες μεταβολικές αλλαγές και συνεχή παραγωγή νέου ιστού. Ένας ενήλικος υγιής σκελετός αποτελείται από περίπου 213 οστά, τα οποία υφίστανται κατά τη διάρκεια της ζωής του συνεχόμενη τροποποίηση και αναδιαμόρφωση μέσω βιοχημικών διεργασιών (Standring S, 2004). Η διαμήκη και ακτινική ανάπτυξη του οστού παρατηρείται κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας και της εφηβίας. Για την διαμόρφωση ενός υγιούς οστού, σημαντικό ρόλο παίζουν τόσο η

απάντηση στις φυσιολογικές αποκρίσεις, όσο και οι μηχανικές δυνάμεις που υφίσταται. Συγκεκριμένα, τα οστά μπορούν να αναδιαμορφωθούν από την απάντηση των οστεοβλαστών και οστεοκλαστών σε βιοχημικές διεργασίες. Η οστική ανακατασκευή έχει ως σκοπό τη συνεχή ανανέωση του οστίτη ιστού, διαδικασία η οποία προφυλάσσει τον ανθρώπινο σκελετό από φθορές, επακόλουθα κατάγματα και παράλληλα διατηρεί την αντοχή και την ομοιόσταση των μετάλλων του. Έτσι, η αναδόμηση αυτή ξεκινάει από την γέννηση και σταματάει στο τέλος της ζωής του ατόμου (Kobayashi S, et al. 2003). Ο ρυθμός της οστικής ανακατασκευής είναι ταχύτερος σε περιοχές που δέχονται υψηλή μηχανική πίεση π.χ. σιαγόνες, ενώ είναι βραδύτερος στις πλευρές. Η αναδιαμόρφωση των οστών μπορεί να επηρεαστεί από τον υποπαραθυρεοειδισμό (Ubara Y, et al. 2005), νεφρική οστεοδυστροφία (Ubara Y, et al. 2003) ή την θεραπεία με αναβολικούς παράγοντες (Lindsay R, et al. 2006). Η ισορροπία μεταξύ σχηματισμού οστού και επαναρρόφησης, όπως προαναφέρθηκε, είναι απαραίτητη και εξαρτάται από τη δράση αρκετών τοπικών παραγόντων όπως οι ορμόνες, οι κυτταροκίνες, οι χημειοκίνες, και η βιομηχανική διέγερση (Anderson HC, 2003; Sjogren, K., et al. 2012; Burger EH, et al. 2003).



Εικόνα 2 Ο κύκλος της οστικής αναδιαμόρφωσης (Baron R., 2008).

Στα οστά γίνεται διαρκώς ανταλλαγή της ύλης, δηλαδή συνεχής απορρόφηση και εναπόθεση ουσιών. Ο οστίτης ιστός αποικοδομείται συνεχώς από τους οστεοκλάστες

και ανασχηματίζεται από οστεοβλάστες. Οι οστεοκλάστες είναι υπεύθυνοι για την απομάκρυνση κατεστραμμένων οστεοκυττάρων και μεσοκυττάριας ουσίας, ενώ οι οστεοβλάστες συμβάλλουν στην επαναδόμησή της. Η οστική ανακατασκευή διακρίνεται σε 5 φάσεις. Στην πρώτη φάση η μεταβολική μονάδα του οστού ταυτίζεται με την κατασκευαστική του μονάδα. Κατά την δεύτερη φάση ενεργοποιείται η διαδικασία της αναδιαμόρφωσης του οστού με την διέγερση, μέσω του παράγοντα M-CSF, και πρόσληψη πρόδρομων μονοκυτταρικών μακροφάγων από την κυκλοφορία του αίματος, τη σύντηξή τους στη μεταβολική επιφάνεια των οστών και το σχηματισμό πολυκυτταρικών προ-οστεοκλαστών (Roodman GD, 1999). Οι προ-οστεοκλάστες, κατά την τρίτη φάση της εναπορρόφησης, δεσμεύονται στη μήτρα του οστού μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υποδοχέων ιντεγκρίνης, που αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα μεταβολικά μονοπάτια στην λειτουργία και την ωρίμανση των οστεοκλαστών και της RGD (αργινίνη, γλυκίνη και ασπαραγίνη), που αποτελούν πρωτεΐνες της επιμεταλλωμένης οστικής επιφάνειας οι οποίες είτε είναι ήδη παρούσες, είτε παράγονται από τους οστεοκλάστες. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για το σχηματισμό δακτυλοειδών ζωνών διαμερισματοποίησης των απορροφημένων οστεοκλαστών (Grigoriadis AE, et al. 1994; Rodan SB, et al. 1997). Παρόλα αυτά, ο χρόνος δράσης τους είναι σημαντικά περιορισμένος λόγω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των πυρήνων τους. Τα οιστρογόνα και ο TGF- β μπορούν να ελαττώσουν την οστική αποδόμηση μέσω της διέγερσης απόπτωσης των οστεοκλαστών (Hughes DE, et al. 1996).

Η οστική απορρόφηση έχει διάρκεια 2 – 4 εβδομάδων κατά την οποία οι επιστρατευόμενοι στην ελεύθερη επιφάνεια οστεοκλάστες εναπορροφούν (διαβρώνουν) προοδευτικά την θεμέλια ουσία, αδειάζοντας έτσι το περιεχόμενο της μεταβολικής μονάδας. Τόσο ο σχηματισμός του οστεοκλάστη, όσο και η ενεργοποίηση και απορρόφηση της οστεοβλαστικής διαδικασίας, ρυθμίζονται απ' την αναλογία του ενεργοποιητή – υποδοχέα NF- κ B (RANKL) με την οστεοπροτεγερίνη (OPG), την IL-6, την IL-1, τον παράγοντα διέγερσης μακροφάγων M-CSF, την διάφορα μεταβολικά νοσήματα των οστών, παραθορμόνη (PTH), 1,25-διυδροξυβιταμίνη D και καλσιτονίνη (Boyle WJ, et al.

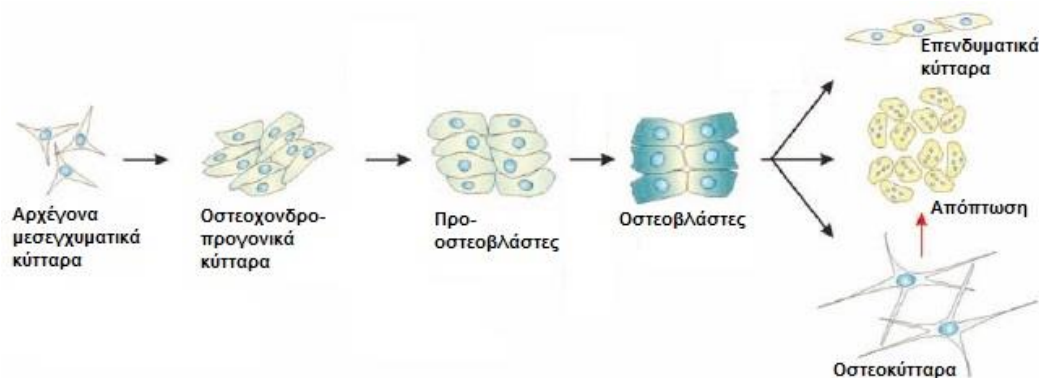
2003; Blair HC, et al. 2004). Η ενσωμάτωση των οστεοκλαστών οδηγεί στην αυξημένη έκκριση ανιόντων υδρογόνου μέσω των αντλιών πρωτονίων H^+ - ΑΤΡάσης και των διαύλων χλωριδίου, με αποτέλεσμα την μείωση του pH (όξινο -4,5) στη μήτρα των οστών και βοηθώντας με αυτόν το τρόπο στην κινητοποίηση των μετάλλων του οστού (Delaisse JM, et al. 2003).

Κατά τη διάρκεια της τέταρτης φάσης, λαμβάνει χώρα η διαδικασία της αναστροφής. Η συγκεκριμένη διαδικασία πραγματοποιείται αμέσως μετά την εναπορρόφηση, όπου οι κοιλότητες που περιέχουν μία ποικιλία μονοπυρηνικών κυττάρων, οστεοκυττάρων και προ-οστεοβλαστών, απελευθερώνονται από το οστικό πλέγμα με σκοπό την εκκίνηση του σχηματισμού νέου οστού. Μέχρι τώρα παραμένει άγνωστη η σηματοδότηση που συνδέει τον τερματισμό της οστικής εναπορρόφησης με την αναδιαμόρφωση του νέου οστού. Πρόσφατες όμως μελέτες, τείνουν να συνδέουν την ρύθμιση με παράγοντες προερχόμενους από το οστικό πλέγμα όπως TGF- β , IGF-1, IGF-2, μορφογενετικές πρωτεΐνες οστού, PDGF ή παράγοντα ανάπτυξης ινοβλαστών (Hock JM, et al. 2004; Locklin RM, et al. 1999). Η συγκέντρωση του TGF- β στο οστικό πλέγμα συσχετίζεται με τους ιστομορφομετρικούς δείκτες της οστικής μεταβολής, καθώς και με την οστεοκαλσίνη ορού και με την ειδική αλκαλική φωσφατάση οστών. Επίσης ο TGF- β απελευθερώνεται από το οστικό πλέγμα μειώνοντας την απορρόφηση των οστεοκλαστών, αναστέλλοντας έτσι την παραγωγή RANKL από τους οστεοβλάστες (Smith et al. 2002). Η φάση της αναστροφής μπορεί να κρατήσει έως 4-5 εβδομάδες, ενώ ο σχηματισμός μπορεί να διαρκέσει έως τέσσερις μήνες έως ότου η νέα δομική μονάδα σχηματιστεί πλήρως (Tolar J, et al. 2004).

Ο σχηματισμός οστού χρειάζεται 4 – 6 μήνες για να ολοκληρωθεί. Συγκεκριμένα, κατά την τελική φάση της οστικής παραγωγής, οι οστεοβλάστες συνθέτουν νέο οργανικό κολλαγόνο και από το οστικό πλέγμα, απελευθερώνουν μικρά μεμβρανώδη κυστίδια που συγκεντρώνουν ασβέστιο και φώσφορο, καταστέλλοντας έτσι τα ένζυμα που εμποδίζουν την μεταλλοποίηση, όπως τα πυροφωσφορικά άλατα και οι πρωτεογλυκάνες (Anderson HC, 2003).

1.3 Φυσιολογία και λειτουργία Οστεοβλαστών

Οι οστεοβλάστες είναι κυβοειδή κύτταρα που βρίσκονται κατά μήκος της οστικής επιφάνειας και αποτελούν το 4-6% του συνολικού πληθυσμού των οστικών κυττάρων (M. Capulli, et al. 2014). Προέρχονται από πολυδύναμα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSC) και καθορίζουν τον οστικό σχηματισμό και την πολύκυτταρική μονάδα BMU (Sjogren, K., et al. 2012). Συγκεκριμένα παίζουν κύριο ρόλο στην παραγωγή του οργανικού μέρους της θεμέλιας ουσίας του σκελετού (κολλαγόνο τύπου I, οστεονεκτίνη, οστεοκαλσίνη, γλυκοζαμινογλυκάνες, οστεοποντίνη, οστική σιαλοπρωτεΐνη, βιτρονεκτίνη, φιβρονεκτίνη), στη ρύθμιση της οστεοκλαστογένεσης μέσω παραγωγής των RANKL, OPG και M-CSF ενώ, επιπλέον αποτελούν πηγή αυξητικών παραγόντων, χημειοκινών και κυτταροκινών τα οποία δρουν στα αιμοποιητικά κύτταρα και συμμετέχουν στην ανάπτυξη και διατήρηση του μυελού των οστών. Μορφολογικά, περιβάλλονται από ένα εκτεταμένο διασωληνωτό δίκτυο οστεοκυττάρων, το οποίο συνδέεται με τα κύτταρα της οστικής επιφάνειας, δηλαδή με άλλους οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα, δημιουργώντας έτσι ένα λειτουργικό συγκύτιο επικοινωνίας (Burger EH, et al. 2003).



Εικόνα 3 Σχηματική απεικόνιση της διαφοροποίησης των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων σε οστεοβλάστες (De Gorter et al. 2013).

Κατά τη διαδικασία του σχηματισμού οστού εναποθέεται μία κολλαγονούχα ουσία, ενισχύοντας την καθίζηση κρυστάλλων υδροξυαπατίτη στο εσωτερικό των οστών. Το διασωληνωτό πλέγμα ασβεστοποιείται μέσω της έκκρισης κολλαγόνου τύπου I από τους οστεοβλάστες. Κατά την ολοκλήρωση του σχηματισμού οστού, τα οστεοκύτταρα

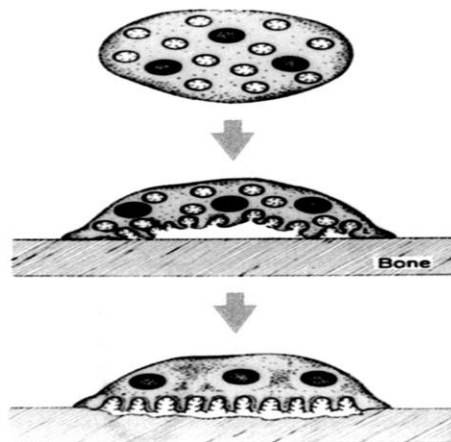
μπορούν να ρυθμίσουν την εισροή και την εκροή ιόντων εντός και εκτός του εξωκυττάριου υγρού των οστών, λειτουργώντας ως ένας φυσικός φραγμός του οστικού αίματος, αλλά διατηρώντας την ικανότητα να επαναδιαφοροποιήσουν οστεοβλάστες κατά την έκθεση σε παραθυρεοειδή ορμόνη ή μηχανική δύναμη (Dobnig H, et al. 1995).

Συγκεκριμένα η σύνθεση του οστικού πλέγματος από τους οστεοβλάστες εμφανίζεται σε 2 κυρίως βήματα. Στην πρώτη φάση οι οστεοβλάστες πρωτεΐνες κολλαγόνου, κυρίως κολλαγόνο τύπου I, μη κολλαγονούχες πρωτεΐνες (OCN, οστεονεκτίνη, BSP II και οστεοποντίνη) και πρωτεογλυκάνης συμπεριλαμβανομένης της ντεκορίνης και της διγλυκάνης, οι οποίες όπως προαναφέραμε αποτελούν το οργανικό πλέγμα. Στη συνέχεια, ακολουθεί η ανοργανοποίηση του οστικού πλέγματος, η οποία χωρίζεται επίσης σε 2 φάσεις: τη φυσαλιδώδη και την ινιδιακή φάση. Κατά την φυσαλιδώδη φάση, τα κυστίδια του πλέγματος (τμήματα με μεταβλητή διάμετρο κυμαίνονται από 30nm έως 200 nm), συνδέονται με πρωτεογλυκάνες και άλλα ανόργανα συστατικά. Λόγω της αρνητικής τους επιβάρυνσης, οι θειωμένες πρωτεογλυκάνες ακινητοποιούν τα ιόντα ασβεστίου που είναι αποθηκευμένα μέσα στα κυστίδια του πλέγματος (Y. Yoshiko, et al. 2007; V. E. Arana-Chavez, et al. 1995). Όταν οι οστεοβλάστες εκκρίνουν ένζυμα που αποικοδομούν τις πρωτεογλυκάνες, τα ιόντα ασβεστίου απελευθερώνονται και διασχίζουν το ασβέστιο που παρουσιάζεται στις μεμβράνες κυψελίδων. Αυτοί οι δίαυλοι σχηματίζονται από πρωτεΐνες που ονομάζονται αητεΐνίνες (Y. Yoshiko, et al. 2007). Επίσης, οι ενώσεις που περιέχουν φωσφορικά άλατα αποικοδομούνται από την αλκαλική φωσφατάση που εκκρίνεται από τους οστεοβλάστες, απελευθερώνοντας έτσι φωσφορικά ιόντα μέσα στα κυστίδια του πλέγματος. Στη συνέχεια, φωσφορικά ιόντα και ιόντα ασβεστίου διαπερνούν τον πυρήνα των κυστιδίων, σχηματίζοντας τους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη (M. J. Glimcher, 1998). Κατά την φάση της επιμετάλλωσης, ο υπερκορεσμός των ιόντων ασβεστίου και φωσφορικών ιόντων στο οστικό πλέγμα οδηγούν στη ρήξη αυτών των δομών, και οι κρύσταλλοι υδροξυαπατίτη εξαπλώνονται (G. Boivin, et al. 2008). Σε αυτό το στάδιο, οι ώριμοι οστεοβλάστες, αφού επιτύχουν τις

διαδικασίες των οστεοκυττάρων, μπορούν είτε να υποβληθούν σε απόπτωση είτε να γίνουν οστεοκύτταρα ή επενδυτικά κύτταρα (S. C.Manolagas, 2000).

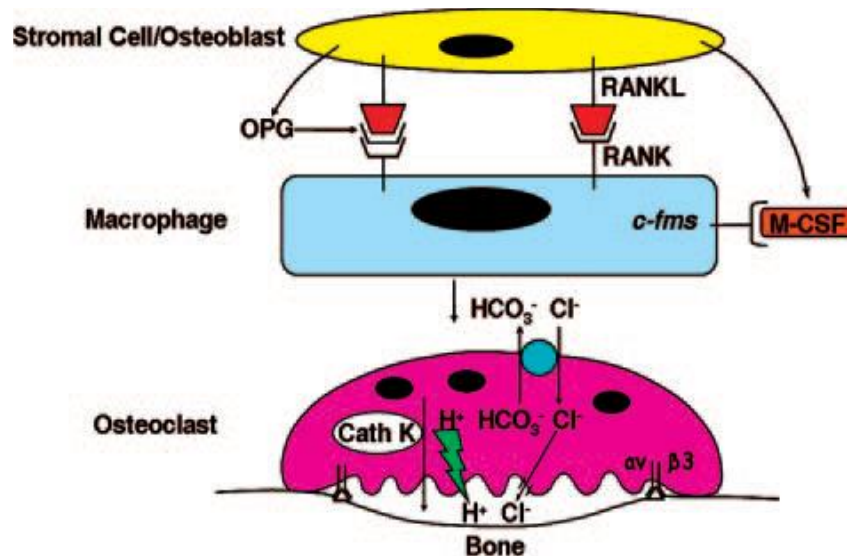
1.4 Φυσιολογία και λειτουργία Οστεοκλαστών

Οι οστεοκλάστες είναι μεγάλα πολυπυρηνικά κύτταρα έχουν άφθονο κυτταρόπλασμα, πολλαπλά συστήματα Golgi, πολλά μιτοχόνδρια και είναι ικανά να επανααρροφήσουν το οστό. Προέρχονται από αιματοποιητικά βλαστοκύτταρα, σχετίζονται με τα μονοκύτταρα/μακροφάγα και προέρχονται από αποικίες κοκκιοκυττάρων-μακροφάγων (CFU-GM). Οι οστεοκλάστες δεσμεύονται στο πλέγμα των οστών μέσω υποδοχέων ιντεγκρίνης (Sjogren, K., et al. 2012). Το RANKL και το M-CSF είναι δύο κυτταροκίνες κρίσιμες για το σχηματισμό των οστεοκλαστών, την επιβίωση και τη διαφοροποίησή τους (Teitelbaum SL, et al. 2003). Η οστεοπροτεγερίνη (OPG) είναι μία εκκρινόμενη πρωτεΐνη συνδεδεμένη στη μεμβράνη των οστεοκλαστών, η οποία δεσμεύει το RANKL και λόγω υψηλής συγγένειας, αναστέλλει τη δράση των υποδοχέων της RANKL (Cohen MM Jr, 2006). Η οστική επανορρόφηση εξαρτάται από την έκκριση ιόντων υδρογόνου και του ενζύμου της καθεψίνης K από τους οστεοκλάστες. Συγκεκριμένα, τα ιόντα υδρογόνου ενισχύουν την οστική επανορρόφηση, διαλύοντας το ανόργανο συστατικό της οστικής μήτρας, ενώ η καθεψίνη K αφομοιώνει το πρωτεϊνικό πλέγμα, που αποτελείται κυρίως από κολλαγόνο τύπου 1 (Blair HC, et al. 2004).



Εικόνα 4 Οστεοκλάστης τη στιγμή της προσκόλλησής του στην οστική επιφάνεια (Steven L. Teitelbaum, 2008).

Οι οστεοβλάστες μπορούν επίσης να αποτελέσουν πηγή M-CSF που απαιτείται για την οστεοκλαστογένεση. Ένα άλλο παράδειγμα είναι η Ιντερλευκίνη 18 (IL-18) η οποία βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στις οστεοβλαστικές κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, κάποιες ορμόνες και τοπικοί παράγοντες μπορούν να δράσουν στους οστεοβλάστες για να ευοδώσουν ή να αναστείλλουν την οστεοκλαστογένεση. Συγκεκριμένα, στους ενεργοποιητές περιλαμβάνεται η καλσιτριόλη, η PTH, ο TNF- α , οι προσταγλανδίνες E2, η IL-1, η IL-6, η IL-11 και η IL-17. Ενώ στους ανασταλτές περιλαμβάνονται διάφορες ιντερλευκίνες (IL-4, IL-12, IL-13, IL-18). Τέλος, ιντερφερόνη γάμμα (IF- γ) φαίνεται να δρα ανασταλτικά στη λειτουργία των οστεοκλαστών (Takayanagi H, et al. 2000).



Εικόνα 5 Η οστεοκλαστική διαφοροποίηση και λειτουργία. Πρόδρομα μόρια των οστεοβλαστών παράγουν τις οστεοκλαστικές κυτοκίνες RANKL και M-CSF, οι οποίες αναγνωρίζουν τους αντίστοιχους υποδοχείς τους RANK και c-fms σε μακροφάγα κύτταρα, κυρίως από τον μυελό των οστών. Το OPG, που επίσης συντίθεται από κύτταρα οστεοβλαστών, είναι δέκτης υποδοχής που δεσμεύει το RANKL, εμποδίζοντας την αλληλεπίδραση του με το RANK. Το RANKL και M-CSF επαρκούν για την ωρίμανση των οστεοκλαστών. Ο οστεοκλάστης σε επαφή με το οστό, πολώνεται μέσω σημάτων που προέρχονται από μήτρα του οστού που μεταδίδονται μέσω της ανβ3 ιντεγκρίνης, επιτρέποντας στο κύτταρο να σχηματίσει ένα απομονωμένο μικροπεριβάλλον μεταξύ του εαυτού του και της οστικής επιφάνειας. Το μικροπεριβάλλον αυτό, είναι όξινο λόγω της μεσολαβούμενης εξωκυτταρικής μεταφοράς πρωτονίων (H^+ +ATPase). Ενώ ενδοκυτταρικός του οστεοκλάστη το pH διατηρείται ηλεκτροουδέτερο λόγω ανταλλαγής HCO_3^-/Cl^- . Το όξινο μικροπεριβάλλον κινητοποιεί το ορυκτό των οστών, αποικοδομώντας το έτσι μέσω της καθεψίνης K (Steven L. Teitelbaum, 2008).

1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την οστική αναδιαμόρφωση

Η οστική δομή δεν παρέχει μόνο στήριξη των οστικών κυττάρων, αλλά έχει επίσης καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας των οστικών μορίων μέσω ενζυμικών και ορμονικών αλληλεπιδράσεων (R. Zohar, 2012). Η ρύθμιση της οστικής ομοιόστασης, επιτυγχάνεται από έναν πολύπλοκο κύκλο συντονισμένων δράσεων των οστεοκλαστών, οστεοβλαστών και οστεοκυττάρων. Ο σχηματισμός, ο πολλαπλασιασμός τους, διαφοροποίηση και η δραστηριότητά τους ελέγχεται από τοπικούς και συστηματικούς παράγοντες (K. B. Emerton, et al. 2010). Οι ιντεγκρίνες είναι τα βασικότερα μόρια που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση μεταξύ οστικών κυττάρων και μήτρα οστού (P. J. Marie, 2002). Οι οστεοβλάστες αλληλεπιδρούν με το οστικό πλέγμα μέσω των ιντεγκρινών, που αναγνωρίζουν και δεσμεύουν τα RGD (αργινίνη, γλυκίνη και ασπαραγίνη), και άλλες βασικές ενώσεις που υπάρχουν στις πρωτεΐνες οστικής μήτρας όπως η οστεοποντίνη, η φμπρονεκτίνη, το κολλαγόνο και η σιαλοπρωτεΐνη (T. C. A. Phan, et al. 2004). Οι πιο συνηθισμένες ιντεγκρίνες που υπάρχουν στους οστεοβλάστες είναι οι $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ και $\alpha 5\beta 1$ και παίζουν σημαντικό ρόλο στην οργάνωση τους στην επιφάνεια του οστού κατά την διάρκεια της οστεοειδούς σύνθεσης (S. Khosla, et al. 2012).

Οι τοπικοί παράγοντες περιλαμβάνουν αυτοκρινή και παρακρινή δράση μορίων, όπως είναι οι αυξητικούς παράγοντες (GF), οι κυτοκίνες και προσταγλανδίνες που παράγονται από τα οστικά κύτταρα και από την οστική μήτρα κατά τη διαδικασία της οστικής εναπορρόφησης (L. J. Robinson, et al. 2009). Στους συστηματικούς παράγοντες που είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση της οστικής ομοιόστασης περιλαμβάνονται η παραθορμόνη (PTH), η καλσιτονίνη, η 1,25-διυδροξυβιταμίνη D3 (καλσιτριόλη), τα γλυκοκορτικοειδή, τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα. Παρόμοια με την PTH, η PTHrP (Parathyroid Hormon related Protein), η οποία επίσης δεσμεύεται με υποδοχέα PTH, έχει επίσης αναφερθεί ότι επηρεάζει την αναδιαμόρφωση του οστού (Väänänen K, 2005).

Το οιστρογόνο παίζει, επίσης, καθοριστικό ρόλο για την ομοιόσταση του οστικού ιστού. Η μείωση του επιπέδου των οιστρογόνων κατά την εμμηνόπαυση είναι η κύρια

αιτία απώλειας οστού και οστεοπόρωση (S. Cenci, 2000). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το οιστρογόνο διατηρεί την ομοιόσταση των οστών καθώς εμποδίζει την υπερβολική επανορρόφηση του, καταστέλλοντας τον σχηματισμό οστεοκλαστών και αναστέλλοντας την απόπτωση των οστεοβλαστών και των οστεοκυττάρων (T. Negishi-Koga, et al. 2012). Στην ουσία, ο μηχανισμός με τον οποίο δρα το οιστρογόνο φαίνεται να είναι η αναστολή της σύνθεσης οστεοκλασματογόνου κυτταροκίνης (RANKL) από οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα. Ενώ παράλληλα διεγείρουν τους οστεοβλάστες παράγοντας οστεοπροτεγερίνη (OPG), υποδοχέα του RANK σε οστεοκλάστες, που αναστέλλει την οστεοκλαστογένεση (T. Negishi-Koga, et al. 2011). Επιπρόσθετα, το οιστρογόνο φαίνεται να αναστέλλει τον σχηματισμό οστεοκλαστών και μέσω της μείωσης των επιπέδων άλλων οστεοκλαστικών κυτταροκινών όπως IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α , TNF- β , και M-CSF (K. Suzuki, et al. 2008). Πρόσφατα, έχει προταθεί ότι μια άλλη κατηγορία μορίων που ονομάζονται σεμαφορίνες εμπλέκονται στην επικοινωνία των οστικών κυττάρων κατά την αναδιαμόρφωση των οστών (M. Hayashi, et al. 2012). Οι σεμαφορίνες περιλαμβάνουν μια μεγάλη οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών που δεν είναι μόνο δεσμευμένες σε κυτταρικές μεμβράνες, αλλά υπάρχουν και ως διαλυτές μορφές που βρίσκονται σε ένα ευρύ φάσμα ιστών και που φαίνεται ότι εμπλέκονται σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες όπως ως ανοσολογική απόκριση, οργανογένεση και καρδιαγγειακή ανάπτυξη. Συγκεκριμένα, οι οστεοκλάστες εκφράζουν έναν παράγοντα που ονομάζεται Sema4D που αναστέλλει τον σχηματισμό οστού κατά την εναπορρόφηση του (T. Negishi-Koga, et al. 2012; C. Zhao, et al. 2006). Το Sema4D που εκφράζεται σε οστεοκλάστες δεσμεύεται στον υποδοχέα του (Plexin-B1) που υπάρχει στους οστεοβλάστες και αναστέλλει τον IGF-1, απαραίτητο για τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (T. Negishi-Koga, et al. 2012), γεγονός που υποδηλώνει ότι οι οστεοκλάστες καταστέλλουν τον σχηματισμό οστού με έκφραση του Sema4D.

Αντιστρόφως, ένα άλλο μέλος της οικογένειας των σεμαφορινών (Sema3A) έχει βρεθεί σε οστεοβλάστες και θεωρείται αναστολέας της οστεοκλαστογένεσης (C. Zhao, et al. 2006). Έτσι, κατά τη διάρκεια του κύκλου της οστικής αναδιαμόρφωσης, οι οστεοκλάστες αναστέλλουν τον σχηματισμό οστού με έκφραση Sema4D, προκειμένου να ξεκινήσει

επαναρρόφηση οστού, ενώ οι οστεοβλάστες σηματοδοτούν με Sema3A την καταστολή την οστική απορρόφηση, πριν από τον σχηματισμό οστού (C. Zhao, et al. 2006).

Ένας ακόμα παράγοντας είναι η ephrinB2, ένα μόριο που εκφράζεται προσκολλημένο στην πλασματική μεμβράνη των ώριμων οστεοκλαστών, που δεσμεύονται σε αντίστοιχα ephrinB4, τα οποία βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη των οστεοβλαστών. Η σύνδεση ephrinB2 / ephrinB4 συνοδεύεται με αμφίδρομη σηματοδότηση, που προάγει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, ενώ η αντίστροφη σηματοδότηση (ephrinB4 / ephrinB2) αναστέλλει την οστεοκλασματογένεση. Έτσι, η οδός ephrinB2 / ephrinB4 μπορεί να εμπλέκεται στο τέλος της οστικής εναπορρόφησης, και να οδηγεί στη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών στο (L. F. Bonewald, 2011).

Εκτός από τους οστεοκλάστες και τους οστεοβλάστες, έχει αποδειχθεί ότι τα οστεοκύτταρα παίζουν βασικούς ρόλους κατά την οστική αναδιαμόρφωση (G. Y. Rochefort, et al. 2010). Συγκεκριμένα, υπό την επίδραση πολλών παραγόντων, τα οστεοκύτταρα δρουν ως διαχειριστές αφού είναι οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την οστεοβλαστική και οστεοκλαστική δραστηριότητα (J. Klein-Nulend, et al. 1995). Το μηχανικό φορτίο διεγείρει το οστεοκύτταρο για την παραγωγή παραγόντων που ασκούν αναβολική δράση επί του οστού όπως PGE2, προστακυκλίνη (PGI2) και IGF-1 (D. C. Genetos, et al. 2007; X. L. Lu, et al. 2012; A. G. Robling, et al. 2008). Παράλληλα όμως, το μηχανικό φορτίο μειώνει τους αναβολικούς παράγοντες και διεγείρει τα οστεοκύτταρα για την παραγωγή σλεροσίνης και DKK-1, που είναι αναστολείς της δράσης των οστεοβλαστών (A. Gaudio, et al. 2010; L. F. Bonewald, et al. 2008), καθώς επίσης και ειδικοί παράγοντες που διεγείρουν την τοπική οστεοκλαστογένεση (Poole, et al. 2005). Η Σκληροσίνη είναι προϊόν του γονιδίου SOST και είναι γνωστό ότι είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του ανασχηματισμού οστού, δρώντας ανταγωνιστικά στην λειτουργία των οστεοβλαστών (Noble, et al. 1997).

Η απόπτωση των οστεοκυττάρων έχει φανεί ότι δρα ως σηματοδότηση για την τοπική πρόσληψη οστεοκλαστών (D. Vanderschueren, 2004; S. Kousteni, et al. 2002; F. Boabaid, et al.

2001). Έχει αναφερθεί επίσης ότι οι οστεοκλάστες απορροφούν αποπτωτικά οστεοκύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι οστεοκλάστες μπορούν να απομακρύνουν τα νεκρά οστεοκύτταρα ή / και τους οστεοβλάστες αφού έχουν ολοκλήρωση τη φάση της αναδιαμόρφωσης (Cerri, et al. 2003; Taniwaki, et al. 1998; Kennedy, et al. 2012). Μέσω του μηχανικού φορτίου, τα οστεοκύτταρα εκφράζουν, υψηλό λόγο RANKL / OPG, αύξηση στα επίπεδα αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και μονοκυτταρική χημειοελκυστική πρωτεΐνη-1 (CCL2) προάγοντας έτσι την τοπική αύξηση της οστεοκλαστογένεσης (A. C. Wu, et al. 2013; A. R. Guntur, et al. 2012).

1.6 Ενδοκρινολογικές λειτουργίες του οστικού ιστού

Πρόσφατες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις ενδοκρινικές λειτουργίες των οστών που είναι σε θέση επηρεάζουν άλλα όργανα (G.Karsenty et al. 2012). Συγκεκριμένα, η οστεοκαλσίνη που παράγεται από τους οστεοβλάστες έχει αποδειχθεί ότι δρα σε άλλα όργανα (C. B. Confavreux, 2011). Στην καρβοξυλιωμένη της μορφή η οστεοκαλσίνη έχει υψηλή χημική συγγένεια με τους κρυστάλλους υδροξυαπατίτη που παραμένουν στο οστικό πλέγμα κατά τη διάρκεια της μεταλλοποίησης του οστού. Η αποκαρβοξυλιωμένη μορφή της οστεοκαλσίνης, δείχνει να έχει μικρότερη χημική συγγένεια με μέταλλα και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, μεταφέρονται σε άλλα όργανα (C. H. Li, et al. 2007). Έχει φανεί ότι η αποκαρβοξυλιωμένη οστεοκαλσίνη έχει κάποιες επιδράσεις στο πάγκρεας, στο λιπώδη ιστό, στους όρχεις και στο νευρικό σύστημα. Στο πάγκρεας, η οστεοκαλσίνη δρα ως ρυθμιστής της έκκρισης και ευαισθησίας της παγκρεατικής ινσουλίνης ως καθώς και για τον πολλαπλασιασμό των β παγκρεατικών – κυττάρων (M. Ferron, et al. 2008). Στο λιπώδη ιστό, η οστεοκαλσίνη διεγείρει το γονίδιο της αδιπονεκτίνης, που με τη σειρά της ενισχύει την ευαισθησία στην ινσουλίνη (L. D. Quarles, 2008). Στους όρχεις, η οστεοκαλσίνη μπορεί να δεσμευτεί σε έναν ειδικό υποδοχέα στα κυττάρων Leydig , ενισχύοντας τη σύνθεση τεστοστερόνης και, συνεπώς, να αυξήσει τη γονιμότητα (Oury, et al. 2013). Επιπλέον, η οστεοκαλσίνη έχει φανεί να διεγείρει τη σύνθεση των νευροδιαβιβαστών μονοαμίνης στον ιππόκαμπο και

να αναστέλλει τη σύνθεση γ-αμινοβουτυρικού οξέος (GABA), βελτιώνοντας έτσι τις δεξιότητες μάθησης και μνήμης (A. Martin, et al. 2011). Μια άλλη ενδοκρινική λειτουργία του οστικού ιστού προωθείται από τα οστεοκύτταρα. Τα κύτταρα αυτά είναι σε θέση να ρυθμίζουν τα το μεταβολισμό των φωσφορικών αλάτων με την παραγωγή FGF23, η οποία δρα σε άλλα όργανα συμπεριλαμβανομένου του παραθυρεοειδούς αδένος και των νεφρών, με στόχο τη μείωση των επιπέδων φωσφορικών αλάτων (L. D. Quarles, 2008; M. Sato, 2013). Τα οστεοκύτταρα, επίσης, ενεργούν στο ανοσοποιητικό σύστημα τροποποιώντας το μικροπεριβάλλον σε πρωτεύοντα λεμφοειδή όργανα (M. C. Walsh, et al. 2006). Όχι μόνο τα οστεοκύτταρα αλλά και οστεοβλάστες και οι δραστηριότητες των οστεοκλαστών είναι γνωστό ότι επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Η ανακάλυψη της αλληλεπίδρασης επικοινωνίας μεταξύ σκελετικών και το ανοσοποιητικό σύστημα οδήγησε σε ένα νέο τομέα σπουδών που ονομάζεται οστεο-ανοσολογία (Qin J, et al. 2010).

1.7 Διατροφικοί παράγοντες που επηρεάζουν την οστική υγεία

Η διατροφή και ο τρόπος ζωής, με τη σειρά τους, φαίνεται να επηρεάζουν τους βιοχημικούς δείκτες που εμπλέκονται στην οστική αναδιαμορφωση. Όπως είναι γνωστό, αρκετά από τα θρεπτικά συστατικά που καταναλώνουμε καθημερινά μπορεί να έχουν θετική ή αρνητική επίδραση στην σκελετική υγεία. Επιδρούν στο ρυθμό του οστικού μεταβολισμού, στο ενδοκρινικό ή/και παρακρινικό σύστημα και στην ομοιόσταση του ασβεστίου και άλλων μετάλλων ή ιχνοστοιχείων (Cashman K.D, et al. 2007). Πρόσφατες μελέτες παρουσιάζουν ότι η ανεπάρκεια της βιταμίνης D είναι συχνή σε παιδιά και εφήβους, επηρεάζοντας έτσι την υγεία των οστών τους κατά τη φάση της ανάπτυξης. Σαφώς, οι χρόνιες διατροφικές διαταραχές όπως η νευρική ανορεξία συνδέονται με υψηλά ποσοστά εναπορρόφησης οστού και οστεοπόρωσης καθώς και αυξημένο κίνδυνο κατάγματος. Σε άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως η παχυσαρκία, η απώλεια βάρους μέσω διατροφικής παρέμβασης, σχετίζεται με μεταβολές τόσο στην

οστική πυκνότητα όσο και στην βελτίωση της οστικής αναδιαμόρφωσης (Bonofiglio D, et al. 2001; Carter LM, et al. 2001)

Συγκεκριμένα, το ασβέστιο, ένα ιχνοστοιχείο που βρίσκεται σε αφθονία στον οργανισμό, με το 99% αυτού να εντοπίζεται στα οστά και στα δόντια (Lanham-New, S.A, et al. 2008). Στους ενήλικες, , μόνο το 30% περίπου (από το προσλαμβανόμενο ασβέστιο σε ημερήσια βάση) απορροφάται από το έντερο και στις εγκύους το 50% (Ζαμπέλας, Α., 2011). Η έλλειψη ασβεστίου συνοδεύεται από μειωμένη οστική αναδιαμόρφωση και σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καταγμάτων στη νεαρή όσο και ενήλικη ζωή, ενώ τα άτομα που έχουν μειωμένη πρόσληψη-απορρόφηση ασβεστίου κατά την νεαρή τους ηλικία τείνουν να μην αποκτούν την γενετικά προκαθορισμένη οστική μάζα (JW, 2005).

Η βιταμίνη D είναι ένα από τα βασικότερα θρεπτικά συστατικά για τη διατήρηση της σκελετικής υγείας. Μία από τις κύριες ιδιότητες της βιταμίνης D είναι η ρύθμιση της αποβολής του ασβεστίου μέσω των νεφρών και αντίστοιχα η κινητοποίηση του ασβεστίου από τα οστά. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διατήρηση της ομοιόστασης του ασβεστίου του ορού (Sunyecz, J., 2008). Η βιταμίνη D είναι λιποδιαλυτή βιταμίνη και εντοπίζεται σε λίγα λιπαρά τρόφιμα, όπως είναι τα ψάρια, το αυγό, το βούτυρο, το κόκκινο κρέας και στο δέρμα των πουλερικών. Έτσι λόγω της περιορισμένης παρουσίας της σε τρόφιμα, η βιομηχανία τροφίμων έχει προχωρήσει στον εμπλουτισμό κάποιων, όπως του γάλακτος, του γιαουρτιού, της μαργαρίνης και δημητριακών πρωινού (Cashman K.D, et al. 2007; Λυρίτης, Γ.Π 2013).

Παρόλα αυτά, ο κύριος παράγοντας διατήρησης των επιπέδων της βιτ D είναι η D είναι η ενδογενής της σύνθεση που πραγματοποιείται όταν το δέρμα εκτίθεται σε UVB ακτινοβολία (Cashman K.D, et al. 2007). Πιο συγκεκριμένα, η UVB ακτινοβολία απορροφάται από την 7-δευδροχοληστερόλη που υπάρχει στο δέρμα για να σχηματιστεί την 26η προβιταμίνη D3, ένα ασταθές μόριο, που γρήγορα μετατρέπεται σε βιταμίνη D3 μέσω της θερμότητας. Η βιταμίνη D3 βγαίνει στον εξωκυττάριο χώρο και αναρροφάται εντός των τριχοειδών από την πρωτεΐνη σύνδεσης της βιταμίνης D (DBP). Μέσω των τριχοειδών, η βιταμίνη D μεταφέρεται στο ήπαρ που υφίσταται υδροξυλίωση και

σχηματίζεται η 25-υδροξυβιταμίνη D. Η τελευταία συνδέεται πάλι στην DBP και μεταφέρεται στα νεφρά όπου ελευθερώνεται εντός του νεφρικού σωληναρίου και υφίσταται υδροξυλίωση ώστε να σχηματιστεί η 1,25-διυδροξυβιταμίνη D, που αποτελεί την βιολογικά ενεργή μορφή της βιταμίνης D και υπεύθυνη για την ομοιοστασία του ασβεστίου (Sunyecz, J., 2008). Δεδομένα δείχνουν ότι η έλλειψη βιταμίνης D συμβάλλει σημαντικά στην οστεοπόρωση λόγω της μη επαρκούς επαναρρόφησης του ασβεστίου, της αυξημένης οστικής απώλειας και της εξασθένησης των μυών. Αντίθετα, η αύξηση της βιταμίνης D μπορεί να μειώσει σημαντικά τον κίνδυνο οστικών καταγμάτων στους ηλικιωμένους (Sunyecz, J., 2008). Η έλλειψη βιταμίνης D έχει ως αποτέλεσμα την ανεπαρκή επιμετάλλωση του οστού, που είναι γνωστή ως οστεομαλακία. Στις βιομηχανικές χώρες, η ραχίτιδα και η οστεομαλακία συναντώνται σπάνια. Η έλλειψη μετρίου βαθμού της βιταμίνης D είναι συνηθισμένες και μπορεί να αποτελέσει προδιάθεση για οστεοπόρωση. Η επαρκής πρόσληψη βιταμίνης D κατά την εγκυμοσύνη κρίνεται απαραίτητη, καθώς υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι μητέρες με έλλειψη της 25-υδροξυβιταμίνης D γεννούν παιδιά με μειωμένη οστική μάζα, το οποίο μπορεί να αποτελέσει παράγοντα κινδύνου για οστεοπόρωση στην μετέπειτα ζωή (Harvey NC et al., 2007).

Η πρωτεΐνη αποτελεί περίπου το 50% του όγκου του οστού και το ένα τρίτο της οστικής επιφάνειας. Η πρωτεΐνη που βρίσκεται στην επιφάνεια του οστού, υφίσταται συνεχή ανακατασκευή κατά τη διαδικασία του οστικού μεταβολισμού. Η πρωτεΐνη έχει χαρακτηριστεί τόσο ως επιβαρυντική αλλά και ως ωφέλιμη για την σκελετική υγεία. Οι δίαιτες υψηλές σε πρωτεΐνη (ειδικά οι δίαιτες υψηλές σε ζωική πρωτεΐνη), είχε φανεί να οδηγούν σε αύξηση της νεφρικής απέκκρισης ασβεστίου και σε οστική απώλεια. Από την άλλη πλευρά φαίνεται ότι η σκελετική υγεία δεν αφορά απλά τα οστά αλλά όλο το μυοσκελετικό σύστημα. Έτσι, η απώλεια οστικής μάζας (οστεοπενία) και απώλεια μυϊκής μάζας (σαρκοπενία) που επέρχονται με την ηλικία είναι αλληλοεξαρτώμενες. Οι παράγοντες, λοιπόν, που επηρεάζουν την μυϊκή ανάπτυξη και

διατήρηση, συμπεριλαμβανομένης και της πρόσληψης πρωτεΐνης, επηρεάζουν και την οστική μάζα (Harvey NC et al., 2007).

Σημαντικός επίσης φαίνεται να είναι ο ρόλος και της βιταμίνης Κ, σύμφωνα με δημοσιευμένες μελέτες, καθώς βελτιώνει την οστική πυκνότητα (BMD) των οστεοπορωτικών ατόμων μειώνοντας σημαντικά τα ποσοστά καταγμάτων τους (Weber, P., 2001). Η φυλλοκινόνη είναι η πιο μελετημένη μορφή βιταμίνης Κ σε σχέση με την σκελετική υγεία. Αποτελέσματα τυχαιοποιημένων, ελεγχόμενων κλινικών δοκιμών δεν υποστηρίζουν προστατευτική επίδραση της φυλλοκινόνης στην οστική απώλεια του ισχίου στους ηλικιωμένους, προβάλλοντας ότι τα θετικά αποτελέσματα στην σκελετική υγεία μπορεί να αντανakλούν την επίδραση των συνολικά υγιεινών προτύπων διατροφής (Shea, et al. 2008). Τέλος, μία τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή μελέτησε τη χορήγηση φυλλοκινόνης σε συνδυασμό με ασβέστιο και βιταμίνη D για 2 έτη, προβάλλοντας μια μέτρια συνεργιστική δράση στην ενίσχυση της οστικής πυκνότητας (Bolton-Smith, et al., 2007).

Επιπλέον, η βιταμίνη C αποτελεί σημαντικό συμπαράγοντα σύνθεσης του κολλαγόνου, της υδροξυπρολίνης και της υδροξυλυσίνης και φαίνεται να προάγει την κινητοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης, η οποία αποτελεί δείκτη σχηματισμού οστεοβλαστών. Επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν θετική συσχέτιση μεταξύ βιταμίνης C και οστικής μάζας, ενώ χαμηλές προσλήψεις συνδέονται με ταχύτερο ρυθμό οστικής απώλειας. Από πρόσφατη μελέτη προέκυψε το συμπέρασμα ότι η υψηλότερη πρόσληψη βιταμίνης C σχετιζόταν με λιγότερα κατάγματα. Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν σημαντικές κλινικές μελέτες που να τεκμηριώνουν αυτές τις συσχετίσεις μέχρι σήμερα (JW, 2005).

Επιπλέον το νάτριο θεωρείται από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την απέκκριση ασβεστίου στα ούρα. Το νάτριο και το ασβέστιο μοιράζονται τα ίδια συστήματα μεταφοράς στο εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, έτσι κάθε 2,3g. νατρίου που αποβάλλονται από τα νεφρά, αποβάλλουν επίσης 40-60mg ασβεστίου. Σε ενήλικες γυναίκες βρέθηκε ότι κάθε επιπλέον γραμμάριο νατρίου την ημέρα αντιστοιχεί σε 1%

επιπλέον απώλεια οστικής πυκνότητας το χρόνο και ότι η απώλεια αυτή μπορεί να προληφθεί με μείωση της ποσότητας του προσλαμβανόμενου νατρίου μέσω της διατροφής, αυξάνοντας παράλληλα την ποσότητα του ασβεστίου. Γενικά, μία πρόσληψη άλατος της τάξης των 6g. (2400mg νατρίου), ιδιαίτερα κατά την περίοδο επίτευξης της κορυφαίας οστικής μάζας, θεωρείται ιδανική για την ομοιόσταση του ασβεστίου και μπορεί να αποτελέσει ευεργετικό μέσο για την πρόληψη της οστεοπόρωσης (Ζαμπέλας, 2011).

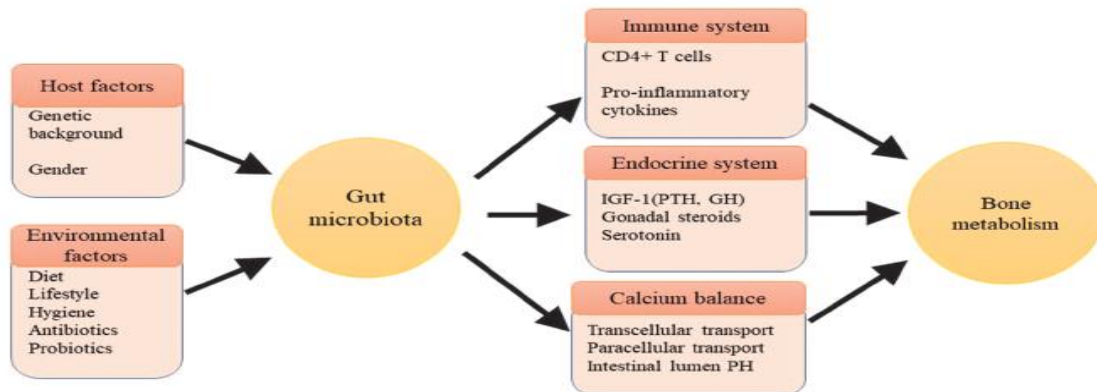
Τέλος, ένα από τα βασικότερα ανόργανα μέταλλα που καθημερινά προσλαμβάνουμε από την διατροφή μας είναι το μαγνήσιο. Το 60% του μαγνησίου που έχουμε στο σώμα μας βρίσκεται στα οστά, ρυθμίζοντας την ποιότητα και την ανθεκτικότητά τους, καθώς ενισχύει την ανάπτυξη κρυστάλλων του υδροξυαπατίτη (Ζαμπέλας, 2011). Έτσι η διατήρηση της ομοιοστασίας του στον οργανισμό παίζει καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της οστικής υγείας. Πειραματικές και επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι τόσο η χαμηλή όσο και η υψηλή ποσότητα μαγνησίου έχουν επιβλαβείς επιδράσεις στα οστά. Η έλλειψη μαγνησίου συμβάλλει στην αύξηση της οστεοκλαστικής δραστηριότητας και στη μείωση της οστεοβλαστικής, προωθώντας έτσι την οστεοπόρωση. Από την άλλη πλευρά, ενώ υπάρχουν αρνητικές επιδράσεις των υψηλών επιπέδων μαγνησίου στην οστική υγεία, παρόλα αυτά οι μηχανισμοί δεν είναι καλά μελετημένοι (Castiglioni, et al. 2013).

Κεφάλαιο 2

2.1 Εντερικός Μικροβιόκοσμος (ΕΜ)

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι μία συλλογή μικροοργανισμών που αποικίζουν τη γαστρεντερική οδό και αποτελείται από περίπου 10 τρισεκατομμύρια βακτήρια (Smit TH, et al. 2012). Ο αριθμός των υποχρεωτικά αναερόβιων βακτηρίων, όπως αυτά που ανήκουν στα βακτηριακά φύλα Bacteroidetes και Firmicutes, υπερέχει των αερόβιων και προαιρετικά αναερόβιων βακτηρίων (Smit TH, et al. 2012; Tolar J, et al. 2004). Βάσει των

ρόλων τους στη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας του εντέρου, οι μικροοργανισμοί μπορούν να ταξινομηθούν σε ωφέλιμα, επιβλαβή και ουδέτερα βακτήρια. Τόσο τα περιστασιακά, όσο και τα βακτήρια που ανήκουν στο εντερικό περιβάλλον, μπορούν να διαμορφώσουν την εντερική μικροβιακή σύνθεση.



Εικόνα 6 Ρυθμιστές του εντερικού μικροβιόκοσμου και μηχανισμοί με τους οποίους το μικροβιακό φορτίο του εντέρου ρυθμίζει τον μεταβολισμό των οστών. Ρυθμίζει τον μεταβολισμό των οστών μέσω διαφόρων οδών, συμπεριλαμβανομένου του ανοσοποιητικού συστήματος, του ενδοκρινικού συστήματος, και ασκεί επιρροές στην ισορροπία του ασβεστίου (Org E, et al. 2015).

Μελέτες σε πειραματόζωα (Kovacs A, et al. 2011; Benson AK, et al. 2010; Esworthy RS, et al. 2010; Goodrich JK, et al. 2014) και μελέτες σε δίδυμα (Turnbaugh PJ, et al. 2016; Kashtanova DA, et al. 2016) έδειξαν ότι το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή είχε σημαντικό αντίκτυπο τόσο στην αφθονία του εντερικού μικροβιόκοσμου όσο και στην προδιάθεση για τον αποικισμό παθογόνων παραγόντων (π.χ *Escherichia coli*). Αν και εξακολουθεί να αμφισβητείται, το φύλο μπορεί να είναι ένας άλλος παράγοντας υπεύθυνος για τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Επιπλέον, η διατροφή, ο τρόπος ζωής, η τήρηση της υγιεινής, η θεραπεία με αντιβιοτικά και προβιοτικά, συμβάλλουν επίσης στη διαμόρφωση της σύνθεσης του εντερικού μικροβιόκοσμου (Gibson GR, et al. 1995; Fujisaka S, et al. 2016). Οι επιδράσεις της διατροφής και των αντιβιοτικών στην εντερική μικροβιακή ισορροπία εξαρτώνται επίσης από το γενετικό υπόβαθρο του ξενιστή (Leamy LJ, et al. 2014; Sekhon BS, et al. 2010).

2.2 Ο ρόλος του ΕΜ στην υγεία

Το σύνολο των μικροοργανισμών που έχουν αναπτύξει συμβιωτική σχέση με το ανθρώπινο σώμα αποτελεί τον ανθρώπινο μικροβιόκοσμο. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος, στον οποίο παρατηρούνται και οι υψηλότεροι μικροβιακοί πληθυσμοί άλλωστε, είναι γνωστός και ως η δεύτερη γονιδιακή ομάδα του ανθρώπινου σώματος, αφού ο αριθμός των μικροοργανισμών στο σώμα υπερέχει των ανθρώπινων κυττάρων κατά 10: 1, δηλαδή υπάρχουν περισσότερα από 10 τρισεκατομμύρια βακτήρια που κωδικοποιούν 100 φορές περισσότερα γονίδια από αυτά που κωδικοποιεί το ανθρώπινο γονιδίωμα. Έτσι, ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι γνωστός ως η "δεύτερη δεξαμενή γονιδίων" του ανθρώπινου σώματος (Serino M, et al. 2012).

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος προσκολλάται στον εντερικό βλεννογόνο για να σχηματίσει ένα προστατευτικό φράγμα για την υπεράσπιση από την εισβολή εξωτερικών παθογόνων μικροοργανισμών. Παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική λειτουργία, την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών και παίρνει μέρος σε σημαντικές μεταβολικές διεργασίες του ξενιστή. Οι μεταβολές στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου αλλά και των μικροβιακών μεταβολιτών, ένα φαινόμενο γνωστό και ως δυσβίωση, μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στις μεταβολικές διεργασίες του ξενιστή, και έχει συσχετιστεί με την ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών όπως η ελκώδης κολίτιδα, (Wright EK, et al. 2015) και η νόσος του Crohn (Sze MA, et al. 2016). Η δυσβίωση έχει συσχετιστεί με πολλές άλλες κοινές μεταβολικές νόσους, συμπεριλαμβανομένης της παχυσαρκίας (Ussar S, et al. 2016) του διαβήτη (Pevsner-Fischer M, et al. 2017) και άλλες ασθένειες σχετιζόμενες με το ενδοκρινικό σύστημα, καθώς και καρδιαγγειακές παθήσεις (Rosser EC, et al. 2016). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων που περιέχουν προβιοτικά έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της χοληστερόλης στο αίμα, η οποία μπορεί να βοηθήσει στην πρόληψη της παχυσαρκίας, του διαβήτη, των καρδιαγγειακών παθήσεων και του εγκεφαλικού επεισοδίου (Lieske J.C., et al. 2005).

Είναι γνωστό ότι οι μεταβολές στον εντερικό μικροβιόκοσμο μπορεί να αλλάξουν την απορρόφηση των θρεπτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας του ξενιστή να προσλαμβάνει ενέργεια από τα τρόφιμα. Επίσης οι μικροοργανισμοί του εντέρου συμμετέχουν στη βιοσύνθεση κάποιων βιταμινών, συμπεριλαμβανομένης της κοβαλαμίνης (B12), της βιοτίνης (B7), του φολικού οξέος (B9), της θειαμίνης (B1), της φωσφορικής πυριδοξάλης (B6), του παντοθενικού οξέος (B3), βιταμίνης K και του τετραϋδροφολικού (Dash S, et al. 2015; Petra AI, et al. 2015). Οι βιταμίνες που μεταβολίζονται στο έντερο έχουν λειτουργίες σε όλο το σώμα, συμπεριλαμβανομένης της ρύθμισης του μεταβολισμού των πρωτεϊνών, του σχηματισμού των ερυθρών αιμοσφαιρίων, της συντήρησης του κεντρικού νευρικού συστήματος, του μεταβολισμού των υδατανθράκων και των λιπών, της ρύθμιση της διαίρεσης και επιδιόρθωσης των κυττάρων, της καρδιακής λειτουργίας, της ρύθμιση της πήξης του αίματος και της διατήρησης της οστικής μάζας (Xin Xu, et al. 2017). Η διατήρηση ή η αποκατάσταση της ισορροπίας των μικροβιακών πληθυσμών στον εντερικό μικροβιόκοσμο μπορεί να επιτευχθεί με την κατανάλωση διατροφικών συμπληρωμάτων όπως τα προβιοτικά, πρεβιοτικά και συμβιοτικά (Gagliardi et al. 2018).

2.3 Πρεβιοτικά

Σύμφωνα με τη Διεθνή Επιστημονική Ένωση για τα Προβιοτικά και Πρεβιοτικά (ISAPP), πρεβιοτικά ορίζονται τα μη εύπεπτα συστατικά τροφίμων, που διεγείρουν επιλεκτικά την ανάπτυξη ή τη δραστηριότητα ορισμένων βακτηρίων (π.χ. bifidobacteria, lactobacilli) στο παχύ έντερο προς όφελος του ξενιστή (Gibson, et al. 1995). Συγκεκριμένα, οι ολιγοσακχαρίτες και φρούτοολιγοσακχαρίτες δεν πέπτονται από τον ξενιστή και φτάνουν στο κόλον, όπου ζυμώνονται από σακχαρολυτικά βακτήρια (π.χ. γένος *Bifidobacterium*). Μερικά παραδείγματα συστατικών των τροφίμων που καταναλώνονται καθημερινά και λειτουργούν ως πρεβιοτικά είναι: η ινουλίνη, οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες, η λακτουλόζη, παράγωγα γαλακτόζης και β-γλυκανών. Έτσι οι υδατάνθρακες που κατατάσσονται στην κατηγορία των πρεβιοτικών έχουν αντοχή στη γαστρική δραστηριότητα (υδρόλυση) καθώς και την άμεση γαστρεντερική

απορρόσφηση, υφίστανται ζύμωση από εντερικά βακτήρια και προκαλούν την εκλεκτική αύξηση ή και δραστηριότητα των εντερικών βακτηρίων που συμβάλλουν στην υγεία και την ευεξία του ξενιστή (Roberfroid, 1999).

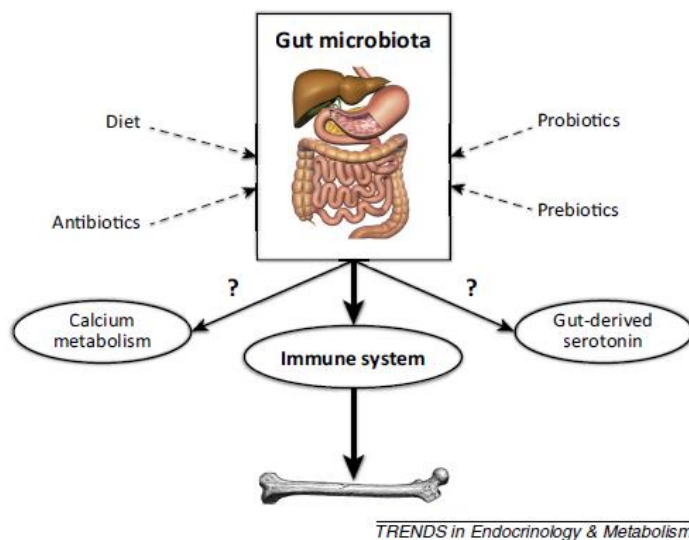
Οι ευεργετικές ιδιότητες των πρεβιοτικών, σχετίζονται με την ανάπτυξη των ευεργετικών βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Bifidobacterium* και *Lactobacillus*. Μελέτες έχουν αναφέρει ότι η ο πολλαπλασιασμός των συγκεκριμένων βακτηρίων, συνδέεται με την μείωση των δυνητικά παθογόνων *Bacteroides*, *Clostridia*, *Eubacteria*, *Enterobacteria* και *Enterococci*. Επίσης, τα οφέλη των πρεβιοτικών έχουν συσχετισθεί με αναστολή παθογένειας του εντέρου, μείωση των επιπέδων λιπιδίων, πρόληψη καρκίνου στο κόλον, σύνθεσης βιταμινών και αυξημένη απορρόφηση ασβεστίου (Gibson, et al. 1995).

Τέλος, η κατανάλωση των πρεβιοτικών φαίνεται να επιτρέπει την αύξηση των βακτηρίων που παράγουν βουτυρικό οξύ. Το βουτυρικό οξύ παρέχει ενέργεια στα εντεροκύτταρα και φαίνεται ότι συσχετίζεται με τις αντικαρκινικές ιδιότητες των πρεβιοτικών. Το προπιονικό οξύ που επίσης παράγεται από τη ζύμωση των πρεβιοτικών, φαίνεται να βοηθάει στη μείωση της χοληστερόλης και στη βελτίωση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα (Olano-Martin, 2009).

2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Η κληρονομικότητα και οι περιβαλλοντικές συνθήκες, συμπεριλαμβανομένης της διατροφής, θα μπορούσαμε να πούμε ότι αποτελούν τους βασικότερους παράγοντες στη διαμόρφωση της σύστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου. Σε μελέτες διδύμων και των ζευγαριών μητέρων-θυγατέρων, παρατηρείται παρόμοια σύσταση στον εντερικό μικροβιόκοσμο, υποδεικνύοντας έτσι, ότι η κληρονομικότητα επηρεάζει τον εντερικό μικροβιόκοσμο (Turnbaugh PJ, et al. 2009; De Filippo C, et al. 2010). Εντούτοις, τα μονοζυγωτικά όσο και τα διζυγωτικά ενήλικα δίδυμα μοιράζονται εξίσου κοινό περιβάλλον και διατροφικές συνήθειες και ενδεχομένως τα γονίδια να μην παίζουν τον απόλυτο ρόλο (De Filippo C, et al. 2010).

Χαρακτηριστικές διαφορές στον εντερικό μικροβιόκοσμο παρατηρούμε σε διάφορους πληθυσμούς, συμπεριλαμβανομένων των παιδιών στην Ιταλία και τη Μπουρκίνα Φάσο (Yatsunenکو T, et al. 2012), και των παιδιών και των ενηλίκων στο Μαλάουι, τη Βενεζουέλα και τις ΗΠΑ (Lidia Ibáñez, et al. 2019). Αν και γενετικά διαφορετικοί, αυτοί οι πληθυσμοί διαφέρουν επίσης σε πολλούς άλλους παράγοντες που ενδεχομένως επηρεάζουν τη μικροβιακή σύνθεση, όπως είναι οι περιβαλλοντικές συνθήκες, η υγιεινή, η διατροφή και η χρήση αντιβιοτικών. Οι πολιτιστικοί παράγοντες, ιδιαίτερα η διατροφή, μπορεί να είναι καθοριστικής σημασίας για τη διαμόρφωση του εντερικού μικροβιόκοσμου.



Εικόνα 7 Ο εντερικός μικροβιόκοσμος ως προτεινόμενος ρυθμιστής της οστικής μάζας. Πρόσφατες μελέτες σε ποντίκια αποδεικνύουν ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος είναι ρυθμιστής της οστικής μάζας κυρίως μέσω επιδράσεων στο ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο με τη σειρά του ρυθμίζει την οστεοκλαστογένεση. Ωστόσο, δεν μπορούν να αποκλειστούν πλήρως οι άλλοι πιθανοί μηχανισμοί, όπως ο μεταβολισμός του ασβεστίου και η ρύθμιση της σεροτονίνης (Hernandez CJ, et al. 2016).

2.5 Επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στην οστική υγεία

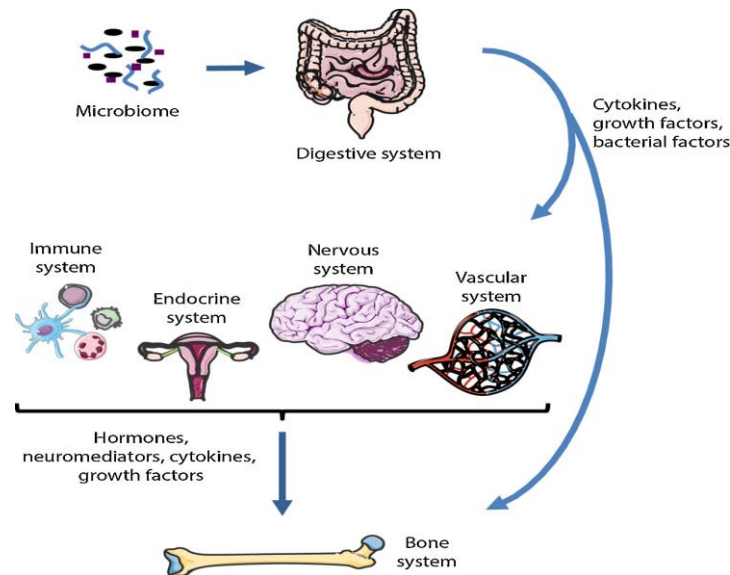
Μελέτες των τελευταίων ετών, δείχνουν όλο και μεγαλύτερη συσχέτιση μεταξύ του εντερικού μικροβιόκοσμου και της οστικής μάζας (Sjögren K, et al. 2012). Σε πειραματόζωα, φαίνεται να επηρεάζει την υγεία του οστού και τη ρύθμιση της ανάπτυξής του, μέσω του ανοσοποιητικού συστήματος και της έκκρισης κυτταροκινών (Pacifci R., 2015). Τα

ανοσοκύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των Τ-λεμφοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων, αλληλεπιδρούν με τον εντερικό μικροβιοκοσμο στο εντερικό επιθήλιο και μεταναστεύουν στους λεμφαδένες για να ενεργοποιήσουν είτε προ- είτε αντι-φλεγμονώδεις ανοσοαποκρίσεις. Αυτά τα κύτταρα επίσης μπορούν να απελευθερώνουν διαλυτούς προ- ή αντι-φλεγμονώδεις μεσολαβητές ή κυτταροκίνες στην κυκλοφορία και με αυτόν τον μηχανισμό να ρυθμίσουν την οστική αναδιαμόρφωση. Επιπροσθέτως, τα ενεργοποιημένα ανοσοκύτταρα μπορούν να μεταναστεύουν στα οστά, όπου μπορούν άμεσα να ρυθμίσουν την αναδιαμόρφωση τους μέσω της απελευθέρωσης προϊόντων, συμπεριλαμβανομένου του ισχυρού παράγοντα επαγωγής οστεοκλαστών, οστεοκλαστογόνου κυτταροκίνης (RANKL) ή άλλων οστικών ενεργών μορίων (Belkaid Y, et al. 2014). Επίσης, τα προερχόμενα από εντερική βακτηριακή ζύμωση, βραχείας αλύσου λιπαρά οξέα δρουν ως ρυθμιστές των ανοσοκυττάρων. Συντίθενται στο κόλον, όπου μπορούν να δρουν ως πηγή ενέργειας για επιθηλιακά εντερικά κύτταρα, αλλά επίσης μπορούν να προάγουν τη δραστηριότητα των ρυθμιστικών Τ κυττάρων και έτσι να αναστέλλουν τις αποκρίσεις των ανοσοκυττάρων (Arpaia N, et al. 2013; Smith PM, et al. 2013; Huttenhower C, et al. 2014).

Μεταβολές του εντερικού μικροβιόκοσμου έχουν παρατηρηθεί παράλληλα σε κλινικές καταστάσεις οστεοπενίας. Για παράδειγμα, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου συνδέεται με μεγάλες μεταβολές στους μικροοργανισμούς του εντέρου (Ghishan FK, et al. 2011) και οι ασθενείς με φλεγμονώδη νόσο του εντέρου είναι επίσης σε ομάδα υψηλού κινδύνου για οστεοπενία, οστεοπόρωση και καταγμάτων λόγω οστικής ευθραυστότητας (Ghishan FK, et al. 2011; Li JY, et al. 2016). Η οστεοπενία που σχετίζεται με τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου έχει αποδοθεί σε μειωμένη απορρόφηση ασβεστίου, μειωμένα επίπεδα κυκλοφορίας της βιταμίνης D και βιταμίνης K ή αυξημένη εναπορρόφηση οστού μετά από θεραπεία με γλυκοκορτικοειδή (Li JY, et al. 2016). Πρόσφατες μελέτες όμως έχουν δείξει ότι η συστηματική φλεγμονή στο έντερο σχετίζεται με αυξημένη παραγωγή ισχυρών οστεοκλαστογόνων κυτταροκινών, που συνεισφέρουν σημαντικά στην απώλεια οστού, ανεξάρτητα από την απορρόφηση

ασβεστίου και άλλων θρεπτικών συστατικών (Carson JA, et al. 2015). Σημειώνεται ότι τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus*, που ανήκουν στα ευεργετικά βακτήρια του εντέρου, βελτιώνουν – μειώνουν τη διαπερατότητα του εντέρου και κατά συνέπεια μπορεί να μειώσουν τη φλεγμονή γεγονός που μπορεί να λειτουργήσει προληπτικά κατά της απώλειας οστικής μάζας (Simons L.A., et al. 2006).

Παρόλο που σε πολλές μελέτες έχει καθιερωθεί η σημασία του εντερικού μικροβιόκοσμου μεγάλη πλειοψηφία μελετών αποτυγχάνει στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τους μηχανισμούς που ευθύνονται για αυτές τις επιδράσεις (de Gorter D, et al. 2013).



Εικόνα 8

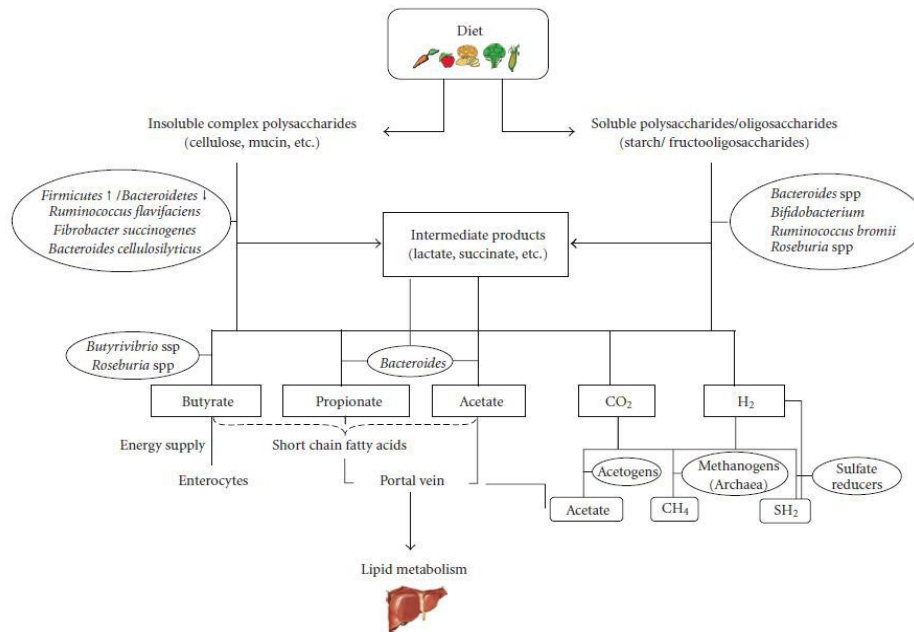
Η σύνδεση μεταξύ του εντερικού μικροβιόκοσμου και του οστού. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας του φραγμού του εντέρου και της ωρίμανσης του πεπτικού συστήματος. Οι τροποποιήσεις οδηγούν σε αυξημένη διάδοση των ενώσεων που προέρχονται από βακτήρια και σε αλλαγές στην έκφραση των κυτταροκινών και των αυξητικών παραγόντων. Ως αποτέλεσμα, εμφανίζονται διαταραχές στις αποκρίσεις των ανοσολογικών, ενδοκρινικών, αγγειακών και νευρικών συστημάτων, τα οποία συμβάλλουν στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και / ή της λειτουργίας των οστικών κυττάρων (Hernandez CJ, et al. 2016).

2.6 Εντερικός μικροβιόκοσμος και SCFAs

Όπως αναφέρθηκε, η κύρια μεταβολική λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου στο κόλον είναι η ζύμωση υπολειμμάτων άπεπτων συστατικών της τροφής μεταξύ των οποίων σύνθετοι υδατάνθρακες όπως διαιτητικές ίνες, πρωτεΐνες και βλέννα, η οποία παράγεται από το επιθήλιο. Οι άπεπτοι υδατάνθρακες είναι μεγάλου μήκους πολυσακχαρίτες, όπως η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη, η πηκτίνη, το ανθεκτικό άμυλο και η διάσπαση αυτών έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μικρής – αλύσου λιπαρών οξέων, βουτυρικού, προπιονικού και οξικού οξέος (Short-ChainFattyAcids–SCFAs). Ο εντερικός μικροβιόκοσμος διαθέτει γονίδια που κωδικοποιούν διάφορα ένζυμα και μεταβολικά μονοπάτια, τα οποία είναι διαφορετικά από αυτά του ξενιστή. Αποτέλεσμα αυτών είναι η παροχή ενέργειας και απορροφήσιμων προϊόντων για τον ξενιστή, καθώς και η εξασφάλιση θρεπτικών συστατικών και ενέργειας για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων (Sanz et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα, η διάσπαση των άπεπτων πολυσακχαριτών ευνοείται όταν στον εντερικό μικροβιόκοσμο η σύσταση περιλαμβάνει μεγαλύτερη αναλογία των βακτηρίων Firmicutes/Bacteroides. Από την άλλη, διαλυτοί και λιγότερο πολύπλοκοι ολιγοσακχαρίτες διασπώνται από άλλα εντερικά μικρόβια, όπως αυτά που ανήκουν στα γένη *Bacteroides* και *Bifidobacterium*, τα οποία ομοίως οδηγούν στη παραγωγή SCFAs (Εικόνα 7).

Το βουτυρικό οξύ χρησιμοποιείται κατά κόρον από τα εντεροκύτταρα και γενικά θεωρείται μεταβολίτης υγείας. Ο κύριος ρόλος του βουτυρικού οξέος είναι να τροφοδοτεί τα εντεροκύτταρα με ενέργεια, αφού μπορεί να καλύψει έως και 70% των ενεργειακών τους αναγκών, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίησή τους (Hamer et al., 2008). Τα άλλα δύο λιπαρά οξέα, το προπιονικό και το οξικό οξύ, μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας μπορούν να μεταβούν στο ήπαρ. Συγκεκριμένα, το οξικό οξύ μπορεί να συμβάλει στο μεταβολισμό των λιπιδίων και της χοληστερόλης με την ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής συνθετάσης του ακέτυλο–συνενζύμου A. Ενώ, όπως έχει φανεί από πειράματα σε ηπατικά κύτταρα ποντικών, το προπιονικό οξύ

πιθανώς να αναστέλλει τη λιπογένεση, διεγείροντας την οξείδωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων (Wolever et al., 1995).



Εικόνα 9

Σχηματικό διάγραμμα με τα κύρια μεταβολικά μονοπάτια των διατροφικών πολύ- και oligo – σακχαριτών και η συμβολή του εντερικού μικροβιόκοσμου (Sanz et al., 2008)

Μια άλλη μεταβολική λειτουργία είναι ο αναερόβιος μεταβολισμός πεπτιδίων και πρωτεϊνών, όπως η ελαστίνη, το κολλαγόνο και τα παγκρεατικά ένζυμα. Το μονοπάτι αυτό φαίνεται να παράγει επίσης SCFAs, καθώς επίσης και τοξικές ουσίες, όπως αμμωνία, αμίνες, φαινόλες και θειόλες. Συγκεκριμένα, η ζύμωση των αμινοξέων αντιπροσωπεύει το 17-38% του συνόλου των παραγόμενων SCFA στο τυφλό και σιγμοειδές του εντέρου (McCabe L, et al. 2015).

2.7 SCFA και οστική αναδιαμόρφωση

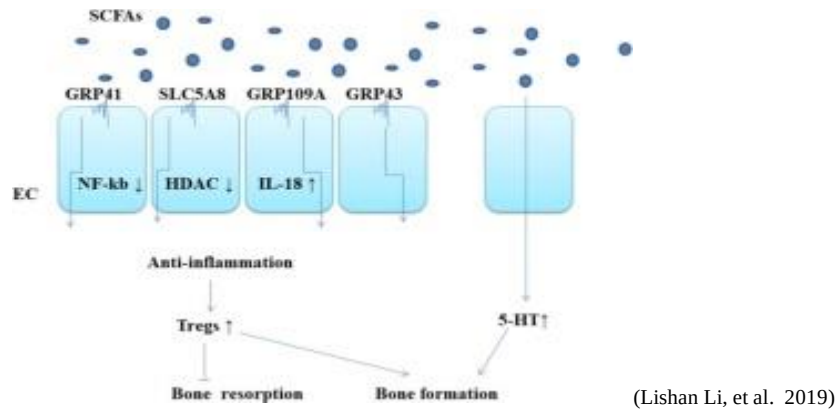
Ενώ πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα προβιοτικά μπορούν να συμβάλλουν στη διατήρηση της οστικής υγείας, οι ακριβείς μηχανισμοί δεν είναι πλήρως σαφείς (Scholz-Ahrens KE, et al. 2007; Coxam V., 2007). Ένας μηχανισμός μέσω του οποίου θα μπορούσε να

αυξηθεί η απορρόφηση του ασβεστίου, περιλαμβάνει τη διαδικασία ζύμωσης των πρεβιοτικών για την απελευθέρωση των SCFA. Έχει αποδειχθεί ότι πολλές πρεβιοτικές ίνες, όπως η ινουλίνη και φρουκτοολιγοσακχαρίτες αυξάνουν την περιεκτικότητα σε SCFA όπως το οξικό, προπιονικό, βουτυρικό, ισοβουτυρικό, βαλερικό και ισοβαλερικό οξύ (Garcia-Vieyra MI, et al. 2014; Weaver CM, et al. 2010). Τα SCFA φαίνεται ότι μπορούν να επηρεάσουν την απορρόφηση του ασβεστίου μέσω πιθανών μηχανισμών. Μπορούν να επηρεάσουν άμεσα το εντερικό επιθήλιο και να ενισχύσουν την απορρόφηση του ασβεστίου, μέσω αυξημένης ενεργής μεταφοράς ασβεστίου και αυξημένης έκφραση των πρωτεϊνών δέσμευσης ασβεστίου (Yang LC, et al. 2012; Trinidad TP, et al. 1996). Η παραγωγή βουτυρικού οξέως και η όξυνση του pH συμβάλλει τόσο στην ανταλλαγή H^+/Ca όσο και στην αύξηση της διαλυτότητας των ανόργανων στοιχείων, καθιστώντας το ασβέστιο πιο απορροφήσιμο (Trinidad TP, et al. 1996).

Τα πρεβιοτικά μπορούν να μεταβάλλουν τη σύνθεση των εντερικών μικροβίων, η οποία μπορεί με τη σειρά της να επηρεάσει την παραγωγή και την αναλογία SCFA και να μεταβάλλει την υγεία των οστών. Ενώσεις όπως οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) και οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS) είναι γνωστό ότι αυξάνουν την αναλογία στα μπιφιδοβακτήρια στο γαστρεντερικό σωλήνα (Weaver CM, et al. 2011; Weaver CM., 2015). Η ινουλίνη και οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS) έχουν αποδειχθεί ότι αλλάζουν τους αριθμούς των βακτηριακών ειδών τόσο στο ανιόν όσο και στο κατιόν τμήμα του έντερου, αυξάνοντας σημαντικά τα μπιφιδοβακτήρια, τους γαλακτοβάκιλλους και τα ευβακτήρια στο ανιόν κόλον, ενώ μειώνουν τα κλωστρίδια στο κατιόν κόλον (Langlands SJ, et al. 2004).

Ο αυξητικός παράγοντας IGF-1 (Insulin-Like Growth Factor-1) είναι γνωστό ότι διεγείρει τον σχηματισμό οστού, με αποτέλεσμα την αύξηση της οστικής μάζας (Schwarzer et al., 2017). Σε μελέτη *in vivo*, η αντιβιοτική θεραπεία μείωσε τη συγκέντρωση των SCFA, IGF-1 και P1NP (Procollagen Type 1 N- Terminal Propeptide) (Yan et al., 2016). Ύστερα από χορήγηση SCFA, τα επίπεδα IGF-1 και οι τιμές οστικής μάζας στα ποντίκια που έλαβαν αντιβιοτικά ήταν τα ίδια με τα ποντίκια που δεν έλαβαν αντιβιοτικά. Ως εκ τούτου, η παραγωγή SCFAs, μπορεί να είναι ένας μηχανισμός μέσω

του οποίου αυξήθηκε ο IGF-1 στον ορό. Η πρωτεΐνη δέσμευσης Insuline Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3) δεν άλλαξε.



Εικόνα 10 Τα SCFAs φαίνεται να έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν την ανάπτυξη των ρυθμιστικών Τ-λεμφοκυττάρων (Tregs), μέσω συγκεκριμένων πρωτεϊνικών υποδοχέων στη μεμβράνη (SLC5A8, GPR41, GPR43, GPR109A), προάγοντας ένα αντιφλεγμονώδες περιβάλλον. Το GPR109A, (Furusawa et al., 2013) που ενεργοποιείται από βουτυρικό, καταστέλλει την φλεγμονή του εντέρου μέσω της έκκρισης IL-18. Το GPR43, (Smith et al., 2013) που ενεργοποιείται από το οξικό οξύ προωθεί την καταστολή της φλεγμονής του εντέρου προκαλώντας απόπτωση φλεγμονωδών κυττάρων. Το GPR41, ενεργοποιείται από βουτυρικό (Lührs et al., 2002), καταστέλλει την φλεγμονή του εντέρου μέσω αναστολής της ενεργοποίησης του NF-kB.

Κεφάλαιο 3

3.1 Μανιτάρια

Τα μανιτάρια είναι τα καρποσώματα που σχηματίζει μεγάλος αριθμός βασιδιομυκήτων ή ασκομυκήτων και σχηματίζονται υπέργεια ή υπόγεια. Αποτελούν τροφή του ανθρώπου από τα αρχαία χρόνια και αποτελούν ακόμα και σήμερα σημαντική πηγή τροφής για τον άνθρωπο, σε παγκόσμια κλίμακα. Οι αρχαίοι Έλληνες, συγκεκριμένα, πίστευαν ότι τα μανιτάρια έδιναν δύναμη στους πολεμιστές στη μάχη και οι Ρωμαίοι θεωρούσαν τα μανιτάρια ως «Τροφή των Θεών». Για αιώνες, ο κινεζικός πολιτισμός πρόσφερε τα μανιτάρια ως υγιεινό φαγητό, ένα «ελιξίριο ζωής». Σήμερα, τα μανιτάρια είναι δημοφιλείς τροφές επειδή έχουν χαμηλό θερμιδικό περιεχόμενο, χαμηλή περιεκτικότητα σε νάτριο και δεν περιέχουν χοληστερόλη. Εκτός αυτού, τα μανιτάρια παρέχουν σημαντικά θρεπτικά συστατικά, όπως το σελήνιο, το

κάλιο, η ριβοφλαβίνη, η νιασίνη, η βιταμίνη D, οι πρωτεΐνες και οι ινώδεις ουσίες. Επιπλέον τα μανιτάρια είναι γνωστά για τις θεραπευτικές τους ιδιότητες, αλλά και για την προληπτική δράση τους απέναντι σε ασθένειες όπως η νόσος του Parkinson, το Alzheimer, η υπέρταση και ο υψηλός κίνδυνος εμφάνισης εγκεφαλικών επεισοδίων. Επίσης, λόγω των αντικαρκινικών ιδιοτήτων που φαίνεται ότι διαθέτουν χρησιμοποιούνται προληπτικά για τη μείωση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου και μετάστασης. Τα μανιτάρια λειτουργούν ως αντιβακτηριακά, ενισχυτικά του ανοσοποιητικού συστήματος και ως παράγοντες μείωσης της χοληστερόλης. Επιπλέον, είναι σημαντικές πηγές βιοδραστικών ενώσεων. Ως αποτέλεσμα αυτών των ιδιοτήτων, ορισμένα εκχυλίσματα μανιταριών χρησιμοποιούνται για την προαγωγή της ανθρώπινης υγείας και βρίσκονται ως συμπληρώματα διατροφής (María E., Valverde, et al. 2015).

Τα μανιτάρια θα μπορούσαν να είναι μια εναλλακτική πηγή νέων αντιμικροβιακών ενώσεων, κυρίως δευτεροταγών μεταβολιτών, όπως τα τερπένια, τα στεροειδή, οι ανθρακινόνες, τα παράγωγα του βενζοϊκού οξέος, οι κινολόνες, αλλά και μερικών πρωτογενών μεταβολιτών όπως το οξαλικό οξύ, τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες. Το *Lentinula edodes* είναι ένα από τα καλύτερα μελετημένα είδη και φαίνεται να έχει αντιμικροβιακή δράση τόσο κατά gram-θετικών όσο και κατά gram αρνητικών βακτηρίων (Alves M., et al. 2012).

Πάνω από 100 βιοδραστικά συστατικά παράγονται από μανιτάρια και μύκητες και οι βασικές φαρμακευτικές χρήσεις είναι αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές, αντιδιαβητικές, αντιαλλεργικές, ανοσορρυθμιστικές, αντιχοληστερολαιμικές, αντι-ιικές, αντιβακτηριακές, αντιπαρασιτικές, αντιμυκητιασικές, αποτοξικές και ηπατοπροστατευτικές (Gargano et al. 2017). Προστατεύουν επίσης από την ανάπτυξη όγκων και τις φλεγμονώδεις διεργασίες (Chang S. T., et al. 2012; Finimundy T. C., et al. 2013; Zhang L., et al. 2011). Οι βιοδραστικές ενώσεις που εντοπίζονται στο μυκήλιο ή/και στα μανιτάρια είναι οι πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λίπη, μεταλλικά στοιχεία, γλυκοσίδες, αλκαλοειδή, πτητικά έλαια, τερπενοειδή, τοκοφερόλες, φαινολικές ενώσεις, καροτενοειδή, λεκτίνες, ένζυμα, ασκορβικό και οργανικά οξέα. Οι πολυσακχαρίτες

μεταξύ των οποίων οι γλυκάνες εμφανίζουν πολύ σημαντική βιολογική δράση και η β-γλυκάνη είναι ο πιο γνωστός και πολυδύναμος μεταβολίτης με ευρύ φάσμα βιολογικών δραστηριοτήτων (Patel S., et al. 2012; Chen J., et al. 2007).

3.2 Διατροφική αξία μανιταριών

Η θρεπτική αξία των εδώδιμων μανιταριών οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, φυτικές ίνες, βιταμίνες, ανόργανα συστατικά και σε χαμηλά επίπεδα λιπαρών (Mattila et al. 2001). Είναι πολύ χρήσιμα για τις χορτοφαγικές δίαιτες, επειδή παρέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα και την υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη από τα περισσότερα άλλα είδη τροφίμων, καλύπτοντας έτσι τις απαιτήσεις των ενηλίκων. Εκτός αυτού, τα εδώδιμα μανιτάρια περιέχουν πολλές διαφορετικές βιοδραστικές ενώσεις με διάφορα οφέλη για την ανθρώπινη υγεία (Flegg et al. 1997).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης, η ωρίμανση και η κατάσταση μετά τη συγκομιδή μπορούν να επηρεάσουν τη χημική σύνθεση και τη θρεπτική αξία των βρώσιμων μανιταριών. Επίσης, παρατηρούνται μεγάλες διακυμάνσεις σε διατροφικά χαρακτηριστικά ακόμα και σε μανιτάρια από μυκηλιακά στελέχη που ανήκουν στο ίδιο είδος (Kalač P, 2013; Reis F. S., et al. 2012). Τα μανιτάρια περιέχουν υψηλό ποσοστό υγρασίας που κυμαίνεται μεταξύ 80 και 95 g / 100 g περίπου. Όπως προαναφέρθηκε, τα βρώσιμα μανιτάρια αποτελούν καλή πηγή πρωτεϊνών, 200-250 g / kg ξηράς ύλης. Τα προφίλ ελεύθερων αμινοξέων των μανιταριών παρουσιάζει αξιοσημείωτες διαφορές μεταξύ υποστρωμάτων. Μεταξύ των ειδών που έχουν μελετηθεί, το *P. ostreatus* παρουσίασε την υψηλότερη περιεκτικότητα FAAs (Tagkouli et al. 2020). Τα πιο άφθονα σε περιεκτικότητα αμινοξέα είναι η λευκίνη, η βαλίνη, η γλουταμίνη, το γλουταμικό και το ασπαρτικό οξύ. Τα μανιτάρια είναι τρόφιμα χαμηλών θερμίδων, δεδομένου ότι παρέχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, 20-30 g / kg ξηράς ύλης. Το λινολεϊκό (C18: 2), το ελαϊκό (C18: 1) και το παλμιτικό (C16: 0) είναι τα κύρια λιπαρά οξέα, που περιέχει. Επίσης, τα βρώσιμα μανιτάρια περιέχουν υψηλές ποσότητες ανόργανων αλάτων και βιταμινών. Συγκεκριμένα, 80-120 g / kg ξηράς ουσίας περιέχουν

κυρίως κάλιο, φώσφορο, μαγνήσιο, ασβέστιο, χαλκό, σίδηρο και ψευδάργυρο (Koutrotsios et al. 2020; Sakellari et al. 2019). Οι υδατάνθρακες όπως η γλυκόζη, η χιτίνη, η τρεχαλόζη και μαννιτόλη βρίσκονται σε υψηλές αναλογίες σε καλλιεργούμενα βρώσιμα μανιτάρια, αλλά η φρουκτόζη και η σακχαρόζη βρίσκονται σε χαμηλές ποσότητες. Εκτός αυτών, περιέχουν επίσης ίνες, β-γλυκάνες, ημικυτταρίνες και πεκτίνες. Τα μανιτάρια, είναι επίσης μια καλή πηγή βιταμινών με υψηλά επίπεδα ριβοφλαβίνης (βιταμίνη B2), νιασίνης και ίχνη βιταμίνης C, B1, B12, D και E. Είναι η μόνη φυτική τροφή που περιέχει βιταμίνη D και ως εκ τούτου είναι το μόνο τρόφιμο με βιταμίνη D για τους χορτοφάγους. Τα αυτοφυή μανιτάρια είναι γενικά εξαιρετικές πηγές βιταμίνης D2 σε αντίθεση με τα καλλιεργούμενα. (Kalač P, 2013; Reis F. S., et al. 2012; Mattila P., et al. 2001; Mdachi S. J. M., et al. 2004; Ouzouni P. K., et al. 2009; Ribeiro B., et al. 2009).

Οι βιοδραστικές πρωτεΐνες αποτελούν επίσης σημαντικό μέρος των λειτουργικών συστατικών στα μανιτάρια και έχουν μεγάλη αξία για το φαρμακευτικό τους δυναμικό. Τα μανιτάρια, όπως προαναφέρθηκε, παράγουν μεγάλο αριθμό πρωτεϊνών και πεπτιδίων με ενδιαφέρουσες βιολογικές δραστηριότητες όπως οι λεκτίνες, οι μυκητιακές ανοσορρυθμιστικές πρωτεΐνες, οι πρωτεΐνες αδρανοποίησης ριβοσωμάτων, οι αντιμικροβιακές πρωτεΐνες, οι ριβονουκλεάσες και λακκάσες (Xu X., et al. 2011).

Οι λεκτίνες είναι μη-ανοσοποιητικές πρωτεΐνες ή γλυκοπρωτεΐνες που δεσμεύονται ειδικά με υδατάνθρακες κυτταρικής επιφάνειας και τα τελευταία χρόνια έχουν ανακαλυφθεί πολλές λεκτίνες μανιταριών (Singh R. S., et al. 2010). Έχουν πολλές φαρμακευτικές δραστηριότητες και διαθέτουν ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες, αντινεοπλασιακή, αντι-ιική, αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση.

Οι μυκηλιακές ανοσορρυθμιστικές πρωτεΐνες είναι μια νέα οικογένεια βιοενεργών πρωτεϊνών που απομονώνονται από μανιτάρια και η εφαρμογή τους έχει φανεί ευεργετική για την ανοσοθεραπεία όγκου, κυρίως λόγω της δραστηριότητάς τους στην καταστολή της εισβολής και της μετάστασης του όγκου (Lin C.-H., et al. 2010). Οι Xu et al. 2011 δημοσίευσαν μια εκτεταμένη και περιεκτική ανασκόπηση των βιοενεργών πρωτεϊνών στα μανιτάρια.

Τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχονται κυρίως σε εδώδιμα μανιτάρια τα οποία μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση της χοληστερόλης στον ορό του αίματος. Η κύρια στερόλη που παράγεται από εδώδιμα μανιτάρια είναι η εργοστερόλη, η οποία παρουσιάζει αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Guillamón E., et al. 2010). Έχει παρατηρηθεί ότι μια διατροφή πλούσια σε στερόλες είναι σημαντική στην πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων (Kalač P, 2013). Το λινολεϊκό οξύ, ένα απαραίτητο λιπαρό οξύ στους ανθρώπους, συμμετέχει σε ένα ευρύ φάσμα φυσιολογικών λειτουργιών μειώνοντας τις καρδιαγγειακές παθήσεις, τα επίπεδα τριγλυκεριδίων, την αρτηριακή πίεση και την αρθρίτιδα (Reis F. S., et al. 2012; Ferreira I. C. F. R., et al. 2009; Heleno S. A., et al. 2012; Hensley K., et al. 2004).

3.3 Οι β-γλυκάνες των μανιταριών

Οι β-γλυκάνες είναι οι κύριοι πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στα μανιτάρια και περίπου το ήμισυ της μάζας των μυκητιακών κυτταρικών τοιχωμάτων τους αποτελείται από β-γλυκάνες (Klis F. M., et al. 2001; McIntosh M., et al. 2005). Οι β-γλυκάνες είναι υπεύθυνες για αντικαρκινικές, ανοσορρυθμιστικές, αντιχοληστερολαιμικές, αντιοξειδωτικές και νευροπροστατευτικές δραστηριότητες πολλών εδωδιμων μανιταριών. Επίσης, αναγνωρίζονται ως ισχυροί ανοσολογικοί διεγέρτες στους ανθρώπους και έχει αποδειχθεί η ικανότητά τους να θεραπεύουν διάφορες ασθένειες. Η βιολογική τους δράση ξεκινά μετά από τη δέσμευσή τους σε έναν υποδοχέα μεμβράνης και στη συνέχεια προκαλούν την έναρξη διάφορων βιολογικών αποκρίσεων (Falch B. H., et al. 2000; Kataoka K., et al. 2002). Οι β-γλυκάνες δεν συντίθενται από ανθρώπους και δεν αναγνωρίζονται από τα ανθρώπινα ανοσοποιητικά συστήματα , έτσι για τον λόγο αυτόν, προκαλούν προσαρμοστικές ανοσολογικές αποκρίσεις (Vetvicka V., et al. 2004). Οι μυκητιακές β-γλυκάνες είναι ιδιαίτερα ευεργετικές για τον άνθρωπο, καθώς ενισχύουν το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα και προστατεύουν από παθογόνους μικροοργανισμούς και από βλαβερές επιδράσεις περιβαλλοντικών καρκινογόνων τοξινών που βλάπτουν το ανοσοποιητικό σύστημα. Αναφέρεται ότι προστατεύουν από μολυσματικές ασθένειες, επίσης έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες και βοηθούν τους ασθενείς με καρκίνο να αναρρώσουν από χημειοθεραπείες και

ακτινοθεραπείες. Εκτός αυτού, αυτές οι ενώσεις είναι επωφελείς για άτομα με ενεργό και αγχωτικό τρόπο ζωής και για αθλητές. Μια μεγάλη μεταβλητότητα σε περιεκτικότητα β-γλυκάνων μπορεί να παρατηρηθεί στα είδη μανιταριών με τη συγκέντρωσή τους να κυμαίνεται από 0,21 έως 0,53 g / 100 g ξηράς βιομάζας (Chen J., et al. 2007; Manzi P., et al. 2000).

3.4 Μανιτάρια *Pleurotus ostreatus*

Το μανιτάρι *Pleurotus ostreatus*, κοινώς γνωστό ως το μανιτάρι Oyster, είναι ένα δημοφιλές, εύκολα αναγνωρίσιμο, βρώσιμο μανιτάρι (εικόνα 8). Βρίσκεται πρωτίστως σε βόρειες περιοχές με υψηλές θερμοκρασίας και ομίχλη. Η παραγωγή του ευνοείται όταν υπάρχει έντονη υγρασία και είναι ένα από τα ευρύτερα μανιτάρια που καλλιεργείται και αναπτύσσεται σε ποικίλα υποστρώματα που το καθιστούν κατάλληλο για εμπορική εκμετάλλευση (Ergönül P. G., et al. 2013; Barros L., et al. 2009).

Αυτό το είδος έχει χρησιμοποιηθεί ως φαρμακευτικό μανιτάρι για μεγάλο χρονικό διάστημα αφού περιέχει αρκετές ενώσεις με σημαντικές φαρμακολογικές / διατροφικές ιδιότητες. Ορισμένες από αυτές τις ουσίες είναι λεκτίνες με ανοσορρυθμιστικές, αντιπολλαπλασιαστικές, αντικαρκινικές δράσεις και φαινολικές ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση. Οι β-γλυκάνες που απομονώθηκαν από το *Pleurotus ostreatus* κατέδειξαν αντιφλεγμονώδη δράση σε αρουραίους με εντερική κολίτιδα και ανέστειλαν τη μετανάστευση των λευκοκυττάρων σε άλλους ιστούς (Jedinak A., et al. 2008).



Εικόνα 11

Το *Pleurotus ostreatus* όπως αποκαλείται, διαθέτει φαρμακευτικές ιδιότητες προάγουν την υγεία (María Elena Valverde, et al. 2015).

3.5 Μανιτάρια *Ganoderma lucidium*

Το *Ganoderma lucidium* ή αλλιώς «μανιτάρι της αθανασίας», κοινώς γνωστό ως Lingzhi ή Reishi, έχει χρησιμοποιηθεί στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική για τη βελτίωση της υγείας και της μακροζωίας για χιλιάδες χρόνια, καθώς και στη θεραπεία των νευρασθενειών, της υπέρτασης, της ηπατοπάθειας και του καρκίνου (εικόνα 9). Είναι ένα από τα πιο δημοφιλή φαρμακευτικά μανιτάρια στην Κίνα, την Ιαπωνία και την Κορέα (Liu G.-Q., et al. 2005; Zhou X. W., et al. 2012).

Επίσης, είναι ένα είδος μανιταριού που συχνά έχει αναφερθεί ότι μειώνει την παχυσαρκία σε ποντίκια μέσω της ρύθμισης του εντερικού μικροβιόκοσμου. Το *Ganoderma lucidium* μειώνει το σωματικό βάρος, τη φλεγμονή και την αντίσταση στην ινσουλίνη σε ποντίκια που τρέφονται με δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά. Επιπλέον, φαίνεται να μειώνει τις αναλογίες των βακτηριακών Φύλων Firmicutes / Bacteroidetes και τα επίπεδα των Proteobacteria που προάγουν την ενδοτοξίνη. Επίσης βελτιώνει την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού και μειώνει την ενδοτοξαιμία. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν ότι το *Ganoderma lucidium* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρεβιοτικό για την πρόληψη της εντερικής δυσβίωσης και για την αντιμετώπιση της παχυσαρκίας και των μεταβολικών διαταραχών σε παχύσαρκα άτομα (Giannenas, I., et al. 2011; Koutrotsios et al. 2019).



Εικόνα 12

Το *Ganoderma lucidum* ή το "μανιτάρι της αθανασίας" (María Elena Valverde, et al. 2015).

Β' ΜΕΡΟΣ: ΠΡΑΚΤΙΚΟ

Κεφάλαιο 1

1.1 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να διερευνήσει την παραγωγή των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου, κύριων μικροβιακών προϊόντων της ζύμωσης των μανιταριών του *Pleurotus ostreatus* και του του *Ganoderma lucidum* και των πλούσιων σε β-γλυκάνες εκχυλισμάτων τους από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εμμηνοπαυσιακών γυναικών, και να διερευνήσει την πιθανή συσχέτιση τους με την οστική υγεία.

1.2 Πειραματικό πρωτόκολλο

Στόχος της *in vitro* πειραματικής διαδικασίας ήταν να γίνει προσομοίωση του εντερικού μικροβιόκοσμου των εμμηνοπαυσιακών γυναικών. Η προσομοίωση πραγματοποιήθηκε μέσω του εμβολιασμού με το δείγμα κοπράνων των εθελοντριών σε κατάλληλα επεξεργασμένα υποστρώματα που περιείχαν τα μανιτάρια (*Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum*), τα πλούσια σε β-γλυκάνες εκχυλίσματά τους, αλλά και ινουλίνη 1% ή ινουλίνη 2% (θετικοί μάρτυρες). Τα συγκεκριμένα υποστρώματα

εμβολιάστηκαν με το δείγμα κοπράνων από κάθε εθελόντρια, επώαστηκαν για 24 ώρες και ελήφθησαν δείγματα σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία της ζύμωσης για βιοχημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις.

Συγκεκριμένα, οι εθελόντριες (n=6) που τηρούσαν τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη, αφού έλαβαν τις κατάλληλες οδηγίες πραγματοποιήσαν κένωση κοπράνων. Έγινε καταγραφή των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών (βάρος, ύψος, ΔΜΣ, οστική πυκνότητα μέσω DEXA), έγινε αιμοληψία, συμπληρώθηκε σύντομο ερωτηματολόγιο φυσικής δραστηριότητας (PAQ) και 3ήμερο ημερολόγιο καταγραφής διαιτητικής πρόσληψης. Με βάση την αξιολόγηση της οστικής πυκνότητας, οι εθελόντριες χωρίστηκαν σε 2 ομάδες, των οστεοπενικών γυναικών (n=3) και των γυναικών με οστική υγεία (n=3).

Συλλέχθηκε ολόκληρη η κένωση, ομογενοποιήθηκε με μηχανική ομογενοποίηση (stomacher) και μεταφέρθηκε σε αναερόβιο θαλάμο όπου και επεξεργάστηκε κατάλληλα για τη δημιουργία του εμβολίου, όπως περιγράφεται στην εργασία των (Mitsou et al., 2020). Η προετοιμασία των υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε πριν την παραλαβή του δείγματος κοπράνων. Την ημέρα έναρξης της *in vitro* ζύμωσης, εντός των δοχείων με το βασικό υλικό καλλιέργειας, προστέθηκαν 2% κ.ο.λυοφιλιωμένων μανιταριών (POWS, GLBS) και 1% κ.ο. των εκχυλισμάτων τους (POWSE, GLBSE), καθώς και ινουλίνη σε 2 συγκεντρώσεις 1% και 2%. Τέλος, στο ένα δοχείο με το βασικό υλικό καλλιέργειας, δεν προστέθηκε πηγή άνθρακα και αποτέλεσε τον αρνητικό μάρτυρα (NC). Στη συνέχεια του πρωτοκόλλου, όλα τα δοχεία εμβολιάστηκαν και οι στατικές καλλιέργειες επώαστηκαν σε αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 24 ώρες. Στους χρόνους 0, 8 και 24h έγινε λήψη των δειγμάτων και πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές και μικροβιολογικές αναλύσεις (Palframan, 2002; Rycroft, 2001; Mitsou et al., 2020).

Υποστρώματα:

❖ Μανιτάρι *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123

- Σε αναλογία 2% (w/v), κωδικός POWS

❖ **Μανιτάρι *Ganoderma Lucidum* LGAM 9720**

- Σε αναλογία 2% (w/v), κωδικός GLBS

❖ **Εκχύλισμα μανιταριού *Pleurotus ostreatus* WS LGAM1123**

- Σε αναλογία 1% (w/v), κωδικός POWSE

❖ **Εκχύλισμα μανιταριού *Ganoderma Lucidum* LGAM 9720**

- Σε αναλογία 1% (w/v), κωδικός GLBSE

❖ **Ινουλίνη συγκέντρωσης 1%**

- Ως θετικός μάρτυρας (για τα εκχυλίσματα) με γνωστή πρεβιοτική δράση (Orafti® GR, BENEIO-Orafti, Oreye, Belgium) σε αναλογία 1% (w/v), κωδικός INU1

❖ **Ινουλίνη συγκέντρωσης 2%**

- Ως θετικός μάρτυρας (για τα μανιτάρια) με γνωστή πρεβιοτική δράση (Orafti® GR, BENEIO-Orafti, Oreye, Belgium) σε αναλογία 2% (w/v), κωδικός INU2

❖ **Αρνητικός μάρτυρας (Negative Control)**

- Μη προσθήκη πηγής άνθρακα, κωδικός NC

1.3 Προσδιορισμός SCFA

Για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου στα δείγματα, εφαρμόστηκε χρωματογραφία τριχοειδούς αερίου (GC) (Mitsou et al., 2020). Αναλυτικά, τα δείγματα (1mL) φυγοκεντρήθηκαν (13.000xg, 15 λεπτά στους 4°C) και 300μL του δείγματος αποθηκεύτηκε στους -80 °C μέχρι να πραγματοποιηθεί η ανάλυση. Την ημέρα της ανάλυσης, τα υπερκείμενα (300μL) φυγοκεντρήθηκαν ξανά (13.000 × g για 5 λεπτά). Στη συνέχεια, 85 μL από κάθε υπερκείμενο αναμίχθηκε με 10 μL 2-αιθυλοβουτυρικού εστέρα (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) και 5 μL υδροχλωρικού οξέος (HCl, 1 M). Δείγματα 1 μL εκχύθηκαν σε χρωματογράφο αερίου (Agilent 6890 GC System, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) με μια στήλη Supelco Nukol™ Capillary GC (μέγεθος x I.D. 30 m × 0,25 mm, df 0,25 μm) (Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, ΗΠΑ). Οι συγκεντρώσεις των SCFA υπολογίστηκαν μέσω βαθμονόμησης του οργάνου με τυποποιημένο μείγμα SCFA (πρότυπο μίγμα πτητικού οξέος Supelco, Sigma – Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Τα ολικά πτητικά λιπαρά οξέα (VFAs) και

μεμονωμένες συγκεντρώσεις SCFA εκφράστηκαν ως $\mu\text{mol/ml}$ και ως γραμμομοριακές αναλογίες (%). Οι ρυθμοί παραγωγής των συνολικών VFA, του οξικού, προπιονικού, βουτυρικού, των BSCFAs: ισο-βουτυρικού, ισοβαλερικού, ισοκαπροϊκού και των άλλων SCFAs: βαλερικού, καπροϊκού και επτανοϊκού οξέως υπολογίστηκαν αφού αφαιρέθηκε η αρχική συγκέντρωση ($t=0\text{h}$) SCFAs από τις ακόλουθες συγκεντρώσεις μετά από 8 ώρες ή 24 ώρες ζύμωσης ($\Delta\text{Ct}8-0$ ή $\Delta\text{Ct}24-0$). (Mitsou et al., 2020).

1.4 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το στατιστικό εργαλείο SPSS (IBM SPSS Statistics Version 24). Τα επίπεδα σημαντικότητας ήταν αμφίπλευρα και η στατιστική σημαντικότητα τέθηκε στο .05. Οι εθελόντριες που έλαβαν μέρος στην έρευνα ήταν συνολικά 6, οι οποίες διαχωρίστηκαν σε δύο ανεξάρτητες ομάδες, $n=3$ υγιείς ως προς την οστική πυκνότητα και $n=3$ με οστεοπενία.

Ο έλεγχος της κανονικότητας των συνεχών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του ελέγχου κανονικότητας Shapiro-Wilk. Οι συνεχείς μεταβλητές για τις οποίες προέκυψε ότι ακολουθούν κανονική κατανομή, εκφράστηκαν στους τελικούς πίνακες ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση, ενώ όσες δεν κατανεμήθηκαν κανονικά, εκφράστηκαν μέσω της διαμέσου και του ενδοτεταρτημοριακού εύρους ($Q1-Q3$).

Προκειμένου να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ως προς τη συγκέντρωση ($\mu\text{mol/ml}$) και τη μοριακή αναλογία (%) των λιπαρών οξέων βραχέως αλύσου καθώς και η στατιστική σημαντικότητα της διαφοράς στη μέση τιμή μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών, εφαρμόστηκε η μέθοδος ANOVA επαναλαμβανόμενων μετρήσεων μετά την προσαρμογή Bonferroni για πολλαπλότητα (Repeated Measures Anova). Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της συγκέντρωσης και της μοριακής αναλογίας των λιπαρών οξέων μεταξύ των χρόνων επώασης ($t0-t8$, $t0-t24$, $t8-t24$) πραγματοποιήθηκε με τους ελέγχους Paired- Samples T-Test (κανονική κατανομή) ή Wilcoxon signed –rank test (μη κανονική κατανομή). Οι

παραπάνω έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν για το σύνολο των εθελοντριών καθώς και για κάθε ανεξάρτητη ομάδα (υγιείς και οστεοπενικές).

1.5 Αποτελέσματα

1.5.1 Χαρακτηριστικά δείγματος εθελοντριών

Στη μελέτη συμμετείχαν συνολικά 6 άτομα και το 100% του δείγματος ήταν γυναίκες. Από το σύνολο των 6 γυναικών, οι 3 είχαν φυσιολογική οστική μάζα (50%) με ηλικία $58,33 \pm 3,51$ έτη και Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) = $24,80 \pm 3,39$ kg/m². Οι άλλες 3 εθελόντριες ήταν οστεοπενικές (50%) ηλικίας $54 \pm 2,65$ ετών και με ΔΜΣ = $22,52 \pm 2,22$ kg/m².

1.5.2 Αποτελέσματα ανάλυσης ποσοτικού προσδιορισμού των επιμέρους SCFAs κατά τη διαδικασία ζύμωσης μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων στο σύνολο των εθελοντριών:

Πίνακας 1 Καταμέτρηση των συγκεντρώσεων (μmol/L) και της μοριακής αναλογίας (%) των SCFAs στο *σύνολο των γυναικών* για τις χρονικές στιγμές t=0h , t=8 και t=24h.

	Baseline (t=0h)							8-h fermentation (t=8h)							24-h fermentation (t=24h)							p over all
	NC	INU1	INU2	POWS	GLBS	POWSE	GLBSE	NC	INU1	INU2	POWS	GLBS	POWSE	GLBSE	NC	INU1	INU2	POWS	GLBS	POWSE	GLBSE	
SCFAs (μmol/ml)																						
Total VFAs	†,‡ 4,38 (3,24-4,77)	* 2,41 (1,89-2,71)	* 2,58 (2,21-3,14)	† 2,92 (2,75-4,20)	† 2,73 (2,51-4,19)	2,64 (2,40-3,07)	* 2,16 (2,10-2,70)	†,‡,a 16,59† (11,34-17,32)	*,a 38,11 (30,13-44,58)	*,a 37,28 (25,43-43,54)	*,a 47,79 (35,11-55,78)	*,a 30,20 (26,21-39,32)	*,a 42,66 (33,91-48,67)	*,a 39,93 (30,44-42,28)	†,‡,a, b 23,68 (19,52-26,24)	*,a, b 43,11 (38,38-61,90)	*,a 36,88 (31,58-61,06)	*,†,‡,a, b 76,06 (69,36-81,49)	*,a, b 49,61 (44,24-54,03)	*,†,‡,a, b 60,27 (57,11-62,20)	*,a 47,06 (43,38-48,31)	** <.001
Acetate	†,‡ 1,45 (0,91-1,88)	* 0,83 (0,71-1,07)	* 0,8 (0,74-0,88)	‡ 0,97 (0,93-1,33)	0,89 (0,82-1,19)	0,89 (0,83-1,03)	* 0,78 (0,77-0,84)	†,‡,a 7,5 (5,31-8,49)	*,a 19,5 (13,35-22,65)	*,a 17,28 (16,24-22,11)	*,a 20,46 (18,65-23,5)	†,‡,a 14,14 (10,73-16,48)	*,a 19,34 (14,21-24,22)	*,a 18,36 (17,42-19,68)	†,‡,a, b 10,32 (8,35-12,39)	*,a, b 23,09 (19,09-34,04)	*,a 25,61 (16,49-35,15)	*,a, b 27,76 (26,2-30,52)	*,a, b 19,53 (17,06-21,97)	*,a 23,67 (19,49-21,97)	*,a 23,67 (19,49-27,33)	** <.001
Propionate	0,52 (0,34-0,67)	0,32 (0,26-0,4)	0,31 (0,21-0,47)	0,33 (0,16-0,38)	0,31 (0,18-0,43)	0,29 (0,24-0,36)	* 0,27 (0,2-0,32)	†,a 2,56 (2,17-2,75)	*,a 5,96 (3,98-8,69)	*,a 5,11 (3,08-9,48)	*,‡,a 8,81 (6,89-13,19)	*,a 7,27 (5,84-8,67)	*,‡,a 9,09 (7,93-13,5)	*,a 6,75 (5,3-9,36)	†,‡,a 3,63 (2,81-4,69)	*,a, b 7,76 (5,76-11,12)	*,a 7,13 (3,92-9,63)	*,†,‡,a, b 12,08 (10,54-18,52)	*,‡,a, b 10,22 (9,38-10,98)	*,†,‡,a, b 14,31 (13,62-16,76)	*,a 8,87 (6,15-9,76)	** =.006
Butyrate	† 1,29 ± 0,72	* 0,74 ± 0,23	1,15 ± 0,24	†,‡ 1,69 ± 0,62	† 1,63 ± 0,51	1,24 ± 0,24	1,01 ± 0,19	†,a 3,8 ± 1,10	*,a 10,78 ± 6,17	a 9,65 ± 5,88	*,a 14,29 ± 8,84	a 8,77 ± 2,27	*,a 10,93 ± 4,07	*,a 10,08 ± 4,96	†,a, b 5,56 ± 1,38	*,a 13,01 ± 8,62	a 10,65 ± 7,92	*,†,‡,a, b 31,33 ± 7,97	*,a, b 13,60 ± 1,62	*,†,a, b 18,26 ± 1,91	a, b 13,31 ± 5,54	** <.001
BSCFAs	0,26 (0,21-0,51)	0,23 (0,11-0,26)	0,17 (0,11-0,24)	0,16 (0,15-0,20)	0,14 (0,12-0,18)	0,14 (0,10-0,16)	*,†,‡ 0,11 (0,08-0,13)	a 0,99 (0,50-1,54)	a 0,42 (0,31-0,85)	a 0,45 (0,38-0,99)	a 0,75 (0,41-1,23)	a 0,86 (0,60-2,06)	†,a 0,98 (0,69-1,43)	a 0,58 (0,58-1,15)	†,‡,a, b 2,39 (1,91-2,60)	*,a, b 0,65 (0,51-1,02)	*,a 0,48 (0,26-0,77)	*,‡,a, b 0,89 (0,52-1,39)	*,†,‡,a, b 3,88 (3,44-4,18)	†,‡,a, b 1,81 (1,35-2,42)	*,‡,a 0,99 (0,46-2,21)	** <.001
Other SCFAs	0,18 (0,12-0,63)	0,11 (0,10-0,27)	0,11 (0,11-0,26)	0,11 (0,10-0,24)	0,10 (0,09-0,18)	0,12 (0,11-0,17)	0,12 (0,10-0,14)	0,71 (0,39-0,77)	0,34 (0,23-0,41)	0,26 (0,19-0,37)	0,27 (0,21-0,54)	0,69 (0,45-1,28)	0,73 (0,39-0,93)	0,40 (0,26-0,85)	†,‡,b 1,21 (0,69-1,75)	*,a 0,38 (0,27-0,45)	*,a 0,26 (0,18-0,36)	*,a, b 0,39 (0,27-0,82)	†,‡,a, b 2,04 (1,43-2,83)	†,‡,a, b 1,27 (1,01-1,83)	‡,a, b 0,54 (0,32-1,65)	** <.001
Molar Ratio (%)																						
Acetate	37,2 ± 10,01	‡ 38,27 ± 5,84	† 31,13 ± 4,48	32,72 ± 2,53	31,86 ± 4,82	34,52 ± 3,64	35,23 ± 3,35	45,84 ± 3,97	a 50,88 ± 6,92	a 54,28 ± 12,58	a 46,76 ± 10,65	‡,a 43,52 ± 2,99	a 45,03 ± 5,41	a 51,12 ± 9,18	‡ 43,3 ± 4,93	*,a 52,75 ± 10,81	*,a 58,6 ± 13,52	†, ‡,a 37,4 ± 2,5	†, ‡,a 39,83 ± 4,53	†, ‡,b 39,13 ± 4,64	‡ 48,12 ± 12	** .008
Propionate	12,94 (10,75-14,16)	13,62 (11,91-17,05)	11,74 (9,05-15,46)	*,† 8,9 (5,84-11,77)	*,† 9,84 (7,02-11,35)	† 10,64 (9,69-11,78)	11,41 (9,52-13,85)	a 16 (15,18-21,52)	14,46 (10,54-30,14)	14,3 (10,61-22,61)	a 18,07 (14,9-28,71)	‡,a 23,01 (19,55-25,56)	‡,a 22,16 (19,69-33,78)	a 20,47 (15,34-23,16)	14,85 (12,64-18,65)	16 (10,84-26)	13,28 (10,49-23,6)	a 15,54 (14,58-24,22)	‡, a 20,5 (18,71-22,18)	*,†,‡, a 24,46 (22,4-28,46)	a 18,44 (14,23-21,08)	.525

Butyrate	‡	‡	*,†	*,†	*,†	*,†	*, †			a	a	a	a	a			a, b	*,†,‡,a, b	a	a, b	a, b	**
	31,21 ± 10,71	31,81± 7,72	44,06 ± 6,16	49,35± 3,56	50,16 ± 5,56	45,08 ± 4,53	43,32 ± 3,69	25,94 ± 1,73	26,97 ± 12,41	25,44 ± 12,26	28,74 ± 13,51	27,46 ± 4,57	25,57 ±2,46	26,01± 10,89	24,45 ± 2,26	25,04 ±12,7	22,19 ± 11,98	40,98 ± 8,06	27,38 ± 1,1	30,51 ± 4,24	28,55 ±11,03	.026
BSCFAs	7,91	9,21	6,33	*,†	*,†,‡	*,†	*,†,‡	†,‡	*, a	*, a	*, a	†,‡	*,†, a	*, a	†,‡, b	*, a	*, a, b	*, a, b	†,‡,a, b	*,‡, a	*,†,‡	**
	(5,6- 12,18)	(5,71- 9,96)	(5,15- 7,71)	5,2	4,6	4,68	4,12	5,6	1,46	1,67	1,57	2,85	2,08	1,59	10,08	1,48	1	1,15	7,91	3,1 (2,24- 3,83	2,4	<.001
Other SCFAs	5,94	6,5	4,72	3,79	*,†,‡	4,56	4,82	†,‡	*, a	*, a	*, a	†,‡	*,†,‡, a	*, a	†,‡	*, a	*, a	*, a	†,‡, b	*,†,‡, a	*,†,‡	**
	(3,38- 14,63)	(4,26- 9,63)	(4,39- 8,09)	(3,55- 5,35)	3,64	(3,37- 4,39)	(4,08- 5,38)	4,02	0,86	0,77	0,64	2,46	1,65	1,09	4,7	0,75	0,61	0,52	4,14	2,16	1,15	<.001

*: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με το NC ($p < 0,05$) κατά την έναρξη ($t = 0h$), μετά από ζύμωση 8 ωρών ($t = 8$ ώρες) ή μετά από ζύμωση 24 ωρών ($t = 24$ ώρες) (Repeated- Measures ANOVA μετά την προσαρμογή Bonferroni για πολλαπλότητα). †: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με INU1 ($p < 0,05$) κατά την έναρξη ($t = 0h$), μετά από ζύμωση 8 ωρών ($t = 8h$) ή μετά από ζύμωση 24 ωρών ($t = 24$ ώρες) (Repeated- Measures ANOVA μετά την προσαρμογή Bonferroni για πολλαπλότητα). ‡: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με INU2 ($p < 0,05$) κατά την έναρξη ($t = 0h$), μετά από ζύμωση 8 ωρών ($t = 8h$) ή μετά από ζύμωση 24 ωρών ($t = 24$ ώρες) (Repeated- Measures ANOVA μετά την προσαρμογή Bonferroni για πολλαπλότητα). **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως [μέση τιμή ± τυπική απόκλιση] όταν ακολουθούν κανονική κατανομή και ως [διάμεσος (ενδοτεταρτημοριακό εύρος)] όταν δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. **:στατιστικά σημαντική επίδραση του χειρισμού στη συγκέντρωση σε κάθε χρόνο επώασης ($t=0$, $t=8h$, $t=24h$).

Αποτελέσματα ανάλυσης στο σύνολο των εθελοντριών για τις συγκεντρώσεις (μmol/mL) των SCFAs κατά τη διαδικασία ζύμωσης μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων.

Υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης στη συγκέντρωση Total_VFA $F(7.928, 46.246)=4.927$, $p<0.001$, δηλαδή η μέση συγκέντρωση Total_VFA μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Επιπλέον, η κύρια επίδραση (main effect) του χειρισμού έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση συγκέντρωση Total_VFA μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,35)=10.132$, $p<0.001$).

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline) η συγκέντρωση Total_VFA ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα υποστρώματα INU1 ($p=0.004$) και INU2 ($p=0.04$), GLBSE ($p=0.002$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC. Επιπλέον, τη χρονική στιγμή 0 (baseline), η συγκέντρωση Total_VFA ήταν σημαντικά υψηλότερη στα υποστρώματα POWS ($p=0.01$) και GLBS ($p=0.046$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU1.

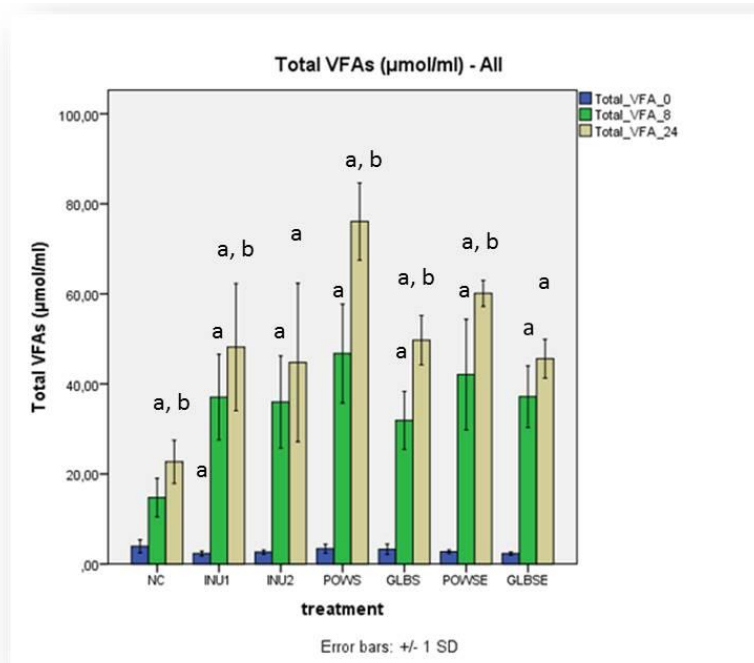
Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), η συγκέντρωση Total_VFA ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη σε όλα τα υποστρώματα, INU1 ($p=0.001$), INU2 ($p=0.001$), POWS ($p<0.001$), GLBS ($p=0.018$), POWSE ($p<0.001$) και GLBSE ($p=0.001$), συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=8h$), η συγκέντρωση Total_VFA ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη σε όλα τα υποστρώματα, INU1 ($p<0.001$), INU2 ($p=0.002$), POWS ($p<0.001$), GLBS ($p<0.001$), POWSE ($p<0.001$) και GLBSE ($p=0.001$), συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC. Επιπλέον, στα υποστρώματα POWS και POWSE, η συγκέντρωση Total_VFA ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p<0.001$, $p=0.01$) και INU2 ($p<0.001$, $p=0.001$).

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών (Wilcoxon signed-rank test) της συγκέντρωσης Total_VFA μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι υπήρξε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης Total_VFA στον αρνητικό μάρτυρα NC ($z=-2.201$, $p=0.028$), στα υποστρώματα INU1 ($z=-2.201$, $p=0.028$), INU2 ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWS ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBS ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWSE ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBSE ($z=-2.201$, $p=0.028$) μετά την 8ωρη και την 24ωρη ζύμωση. Σημαντική αύξηση υπήρξε και μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης στον αρνητικό

μάρτυρα NC ($z=-2.201$, $p=0.028$) και στα υποστρώματα INU1 ($z=-1.992$, $p=0.046$), POWS ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBS ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWSE ($z=-1.992$, $p=0.046$), GLBSE ($z=-2.201$, $p=0.028$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 1

Σύγκριση της συγκέντρωσης των *Total_VFA (μmol/mL)* στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Όπως προέκυψε από την ανάλυση των δεδομένων, υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης στη συγκέντρωση του οξικού οξέος C2 ($F(8.429, 49.170)=4.525$, $p<0.001$), δηλαδή η μέση συγκέντρωση C2 μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Η ανάλυση της κύριας επίδρασης (main effect) του χειρισμού έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά

σημαντική διαφορά στη μέση συγκέντρωση οξικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,35)=6.270$, $p<0.001$).

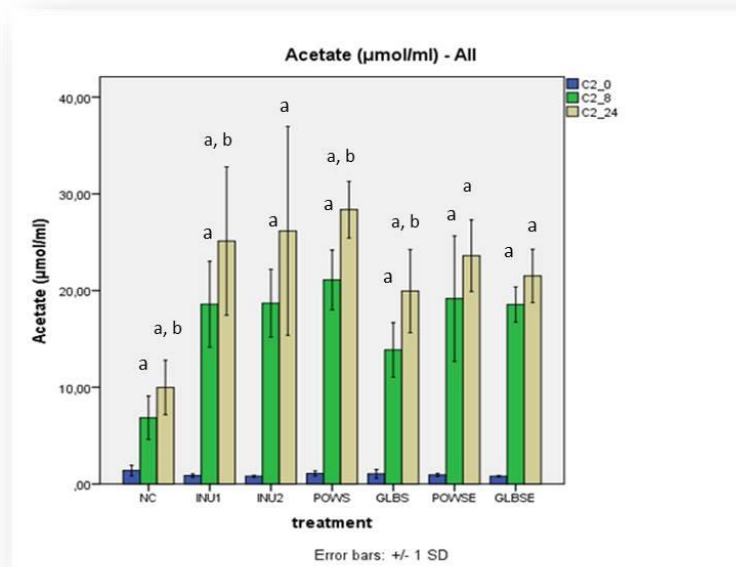
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline) η συγκέντρωση C2 ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα υποστρώματα INU1 ($p=0.032$), INU2 ($p=0.006$) και GLBSE ($p=0.004$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC. Επιπλέον, τη χρονική στιγμή 0 (baseline), η συγκέντρωση C2 ήταν σημαντικά υψηλότερη στο υπόστρωμα POWS ($p=0.013$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU2 .

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), η συγκέντρωση C2 ήταν σημαντικά υψηλότερη σε όλα τα υποστρώματα ($p<0.001$), εκτός από το υπόστρωμα GLBS, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC. Παρατηρήθηκε επίσης σημαντικά χαμηλότερη συγκέντρωση στο υπόστρωμα GLBS συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.02$) και INU2 ($p=0.034$).

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), η συγκέντρωση C2 ήταν σημαντικά υψηλότερη σε όλα τα υποστρώματα – INU1 ($p<0.001$), INU2 ($p<0.001$), POWS ($p<0.001$), GLBS ($p=0.021$), POWSE ($p<0.001$), GLBSE ($p=0.002$)- συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC.

Η ανά ζεύγη σύγκριση (Wilcoxon signed-rank test) των τιμών της συγκέντρωσης C2 μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι υπήρξε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης C2 στον αρνητικό μάρτυρα NC ($z=-2.201$, $p=0.028$) και σε όλα τα υποστρώματα - INU1 ($z=-2.201$, $p=.028$), INU2 ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWS ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBS ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWSE ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBSE ($z=-2.201$, $p=0.028$) - μετά την 8ωρη και την 24ωρη ζύμωση. Σημαντική αύξηση υπήρξε και μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης στον αρνητικό μάρτυρα NC ($z=-2.201$, $p=0.046$) και στα υποστρώματα INU1 ($z=-1.992$, $p=0.046$), POWS ($z=-2.201$, $p=0.028$) , GLBS ($z=-2.201$, $p=0.028$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 2

Σύγκριση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος (C2) ($\mu\text{mol/mL}$) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24\text{h}$, για το σύνολο των γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0\text{h}$ (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon).

Αναφορικά με τη συγκέντρωση του προπιονικού οξέος C3, προέκυψε ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(6.985, 40.744)=6.385$, $p<0.001$), δηλαδή η μέση συγκέντρωση C3 μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Η ανάλυση της κύριας επίδρασης (main effect) του χειρισμού έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση συγκέντρωση προπιονικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,35)=3.723$, $p=0.006$).

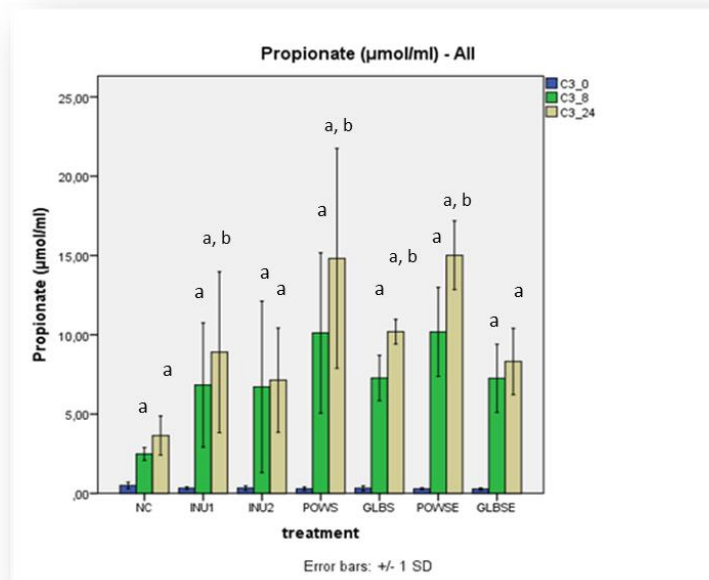
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline) η συγκέντρωση C3 ήταν σημαντικά χαμηλότερη στο υπόστρωμα GLBSE ($p=0.03$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC, ενώ δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές με τα άλλα υποστρώματα.

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), η συγκέντρωση C3 ήταν σημαντικά υψηλότερη σε όλα τα υποστρώματα – INU1 ($p=0.005$), INU2 ($p=0.01$), POWS ($p<0.001$), GLBS ($p=0.001$), POWSE ($p<0.001$), GLBSE ($p=0.001$) – συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC. Παρατηρήθηκε επίσης σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση του C3 στα υποστρώματα POWS ($p=0.038$) και POWSE ($p=0.011$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU2.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), η συγκέντρωση C3 ήταν σημαντικά υψηλότερη σε όλα τα υποστρώματα - INU1 ($p=0.003$), INU2 ($p=0.02$), POWS ($p<0.001$), GLBS ($p<0.001$), POWSE ($p<0.001$), GLBSE ($p=0.002$) - συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση στα υποστρώματα POWS ($p=0.001$) και POWSE ($p<0.001$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU1, καθώς και σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση στα υποστρώματα POWS ($p<0.001$), GLBS ($p=0.015$) και POWSE ($p<0.001$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU2.

Η ανά ζεύγη σύγκριση (Wilcoxon signed-rank test) των τιμών της συγκέντρωσης C3 μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι υπήρξε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης C3 στον αρνητικό μάρτυρα NC ($z=-2.201$, $p=0.028$) και σε όλα τα υποστρώματα - INU1 ($z=-2.201$, $p=0.028$), INU2 ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWS ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBS ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWSE ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBSE ($z=-2.201$, $p=0.028$) - μετά την 8ωρη και την 24ωρη ζύμωση. Σημαντική αύξηση υπήρξε και μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης στα υποστρώματα INU1 ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWS ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBS ($z=-2.201$, $p=0.028$) και POWSE ($z=-2.201$, $p=0.028$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 3

Σύγκριση της συγκέντρωσης του προπιονικού οξέος (C3) ($\mu\text{mol/mL}$) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων έδειξαν ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(9.939, 57.98)=8.094$, $p<0.001$) στη συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος C4, δηλαδή η μέση συγκέντρωση C4 μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Επιπλέον η ανάλυση της κύριας επίδρασης (main effect) του χειρισμού έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση συγκέντρωση βουτυρικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,35)=6.643$, $p<0.001$).

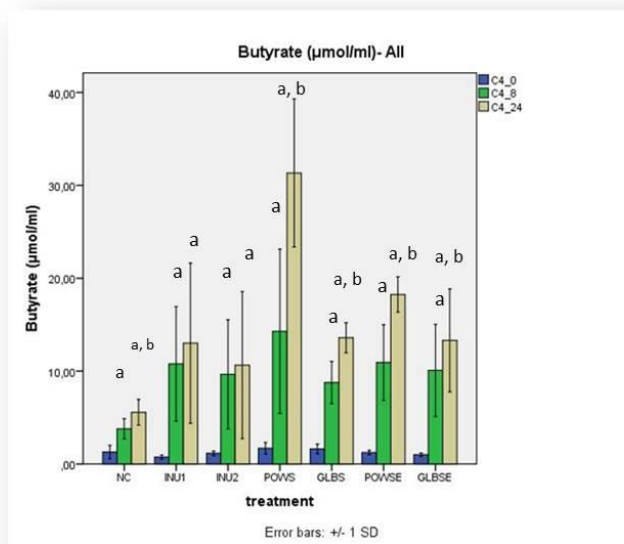
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline) η συγκέντρωση C4 ήταν σημαντικά χαμηλότερη στο υπόστρωμα INU1 ($p=0.038$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC, ενώ στα υποστρώματα POWS ($p=0.001$) και GLBS ($p=0.001$) ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με το υπόστρωμα INU1. Επιπλέον, η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος C4 τη χρονική στιγμή 0 ήταν σημαντικά υψηλότερη στο υπόστρωμα POWS ($p=0.043$) σε σχέση με το υπόστρωμα INU2.

Μετά την 8ωρη ($t=8h$) ζύμωση, η συγκέντρωση C4 ήταν σημαντικά υψηλότερη στα υποστρώματα INU1 ($p=0.029$), POWS ($p=0.002$), POWSE ($p=0.026$) και GLBSE ($p=0.049$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC.

Μετά την 24ωρη ($t=24h$) ζύμωση, σημειώθηκε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση C4 στα υποστρώματα INU1 ($p=0.034$), POWS ($p<0.001$), GLBS ($p=0.023$), POWSE ($p=0.001$), GLBSE ($p=0.028$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC, ενώ στο υπόστρωμα POWS ($p<0.001$) η συγκέντρωση ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με το υπόστρωμα INU1. Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση C4 στα υποστρώματα POWS ($p<0.001$) και POWSE ($p=0.031$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU2.

Η ανά ζεύγη σύγκριση (Paired-Samples T test) των τιμών της συγκέντρωσης C4 μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι μετά από την 8ωρη ($t=8h$) και την 24ωρη ($t=24h$) ζύμωση υπήρξε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης C4 στον αρνητικό μάρτυρα NC ($p=0.004$ και $p=0.001$ αντίστοιχα) και σε όλα τα υποστρώματα - INU1 ($p=0.011$ και $p=0.018$ αντίστοιχα), INU2 ($p=0.017$ και $p=0.033$ αντίστοιχα), POWS ($p=0.019$ και $p<0.001$ αντίστοιχα), GLBS ($p<0.001$ και $p<0.001$ αντίστοιχα), POWSE ($p=0.002$ και $p<0.001$), GLBSE ($p=0.007$ και $p=0.003$ αντίστοιχα). Σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε επίσης και μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης στον αρνητικό μάρτυρα NC ($p=0.002$) και στα υποστρώματα POWS ($p=0.003$), GLBS ($p<0.001$), POWSE ($p=0.012$) και GLBSE ($p=0.002$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 4

Σύγκριση της συγκέντρωσης του βουτυρικού οξέος (C4) (μmol/mL) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των γυναικών. **a:** σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b:** σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Αναφορικά με τη συγκέντρωση των BSCFAs (άθροισμα των συγκεντρώσεων του ισο-βουτυρικού οξέος, ισοβαλερικού οξέος και ισοκαπροϊκού οξέος), όπως φαίνεται στα αποτελέσματα του Πίνακα 1, προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης στη συγκέντρωση BSCFAs ($F(7.791, 45.450)=3.139$, $p=0.007$), δηλαδή η μέση συγκέντρωση BSCFAs μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Επιπλέον, η κύρια επίδραση (main effect) του χειρισμού έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση συγκέντρωση BSCFAs μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,35)=5.565$, $p<0.001$).

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline) η συγκέντρωση BSCFAs ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα υποστρώματα GLBS ($p=0.028$), POWSE ($p=0.009$) και GLBSE ($p<0.001$) συγκριτικά με τον

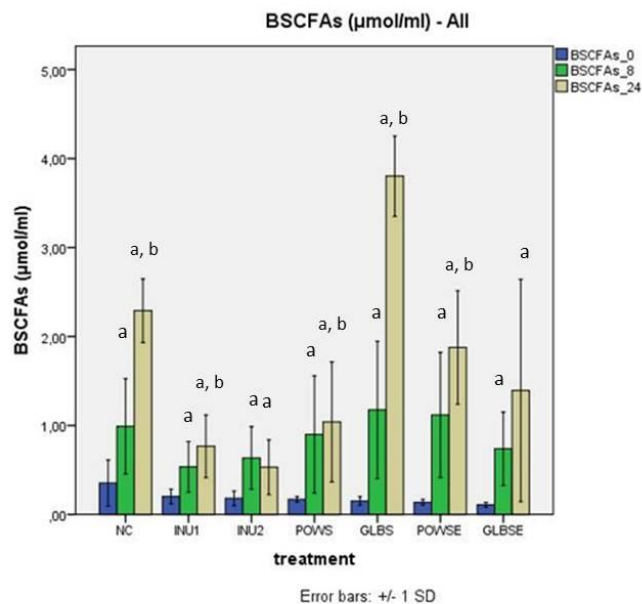
αρνητικό μάρτυρα NC . Επιπλέον, τη χρονική στιγμή 0 (baseline), η συγκέντρωση BSCFAs στο υπόστρωμα GLBSE ήταν σημαντικά χαμηλότερη συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.01$) και INU2 ($p=0.041$).

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των BSCFAs σε κανένα υπόστρωμα συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, ωστόσο παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση στο υπόστρωμα POWSE ($p=0.04$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU1.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), η συγκέντρωση των BSCFAs ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα υποστρώματα INU1 ($p<0.001$), INU2 ($p<0.001$), POWS ($p=0.002$), GLBS ($p=0.049$) και GLBSE ($p=0.006$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC. Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση στα υποστρώματα GLBS ($p<0.001$) και POWSE ($p=0.002$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU1, καθώς και σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση στα υποστρώματα POWS ($p=0.049$), GLBS ($p<0.001$), POWSE ($p<0.001$) και GLBSE ($p=0.018$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU2.

Η ανά ζεύγη σύγκριση (Wilcoxon signed-rank test) των τιμών της συγκέντρωσης BSCFAs μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι υπήρξε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης στον αρνητικό μάρτυρα NC ($z=-1.992$, $p=0.046$) και σε όλα τα υποστρώματα - INU1 ($z=-2.201$, $p=.028$), INU2 ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWS ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBS ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWSE ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBSE ($z=-2.207$, $p=0.027$) - μετά την 8ωρη ζύμωση. Επίσης, σημαντική ήταν η αύξηση της συγκέντρωσης BSCFAs και μετά την 24ωρη ζύμωση τόσο στον αρνητικό μάρτυρα NC ($z=-2.201$, $p=0.028$) όσο και σε όλα τα υποστρώματα - INU1 ($z=-2.201$, $p=.028$), INU2 ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWS ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBS ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWSE ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBSE ($z=-2.201$, $p=0.028$). Σημαντική αύξηση υπήρξε και μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης στον αρνητικό μάρτυρα NC ($z=-2.201$, $p=0.028$) καθώς και στα υποστρώματα INU1 ($z=-1.992$, $p=0.046$), POWS ($z=-2.032$, $p=0.042$), GLBS ($z=-2.201$, $p=0.028$) και POWSE ($z=-1.992$, $p=0.046$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 5

Σύγκριση της συγκέντρωσης των BSCFAs (iC4+iC5+iC6) (μmol/mL) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης στη συγκέντρωση Other_SCFAs ($F(7,176, 41.861)=1.684$, $p=0.138$), ωστόσο η κύρια επίδραση (main effect) του χειρισμού έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση συγκέντρωση Other_SCFAs μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,35)=7.307$, $p<0.001$).

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση Other_SCFAs μεταξύ των υποστρωμάτων και του αρνητικού μάρτυρα καθώς και των υποστρωμάτων INU1 και INU2.

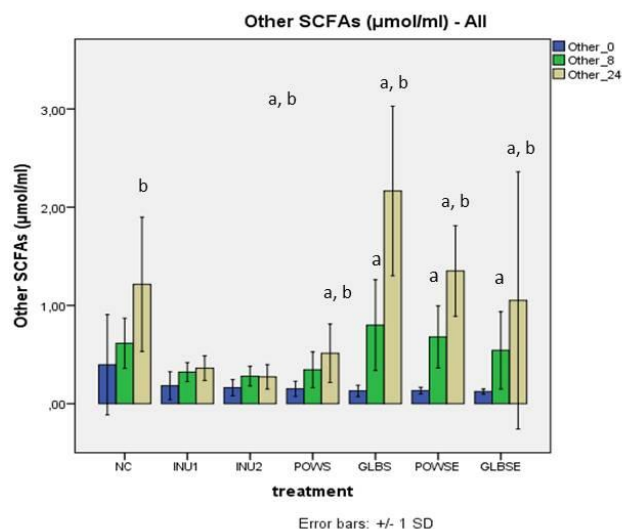
Μετά την 8ωρη ($t=8h$) ζύμωση, η συγκέντρωση Other_SCFAs ήταν σημαντικά χαμηλότερη στο υπόστρωμα INU2 ($p=0.024$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα καθώς και με τα

υποστρώματα GLBS ($p=0.008$) και POWSE ($p=0.014$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση στα υποστρώματα GLBS ($p=0.027$) και POWSE ($p=0.045$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU1.

Μετά την 24ωρη ($t=24h$) ζύμωση, η συγκέντρωση Other_SCFAs ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα υποστρώματα INU1 ($p=0.007$), INU2 ($p=0.001$) και POWS ($p=0.029$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC, ενώ προέκυψε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση στα υποστρώματα GLBS ($p<0.001$) και POWSE ($p=0.001$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU1. Επιπλέον, σημειώθηκε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση στα υποστρώματα GLBS ($p<0.001$), POWSE ($p<0.001$) και GLBSE ($p=0,016$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU2.

Η ανά ζεύγη σύγκριση (Wilcoxon signed-rank test) των τιμών της συγκέντρωσης Other_SCFAs μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι υπήρξε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης μετά από 8ωρη και 24ώρη ζύμωση, καθώς και μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης, στα υποστρώματα GLBS ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWSE ($z=-2.201$, $p=0.028$) και GLBSE ($z=-2.201$, $p=0.028$). Σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης υπήρξε και μετά από 24ωρη ζύμωση καθώς και μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης, στο υπόστρωμα POWS ($z=-2.201$, $p=0.028$), ενώ στον αρνητικό μάρτυρα NC ($z=-2.201$, $p=0.028$) σημειώθηκε σημαντική αύξηση μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 6

Σύγκριση της συγκέντρωσης των *Other_SCFAs* (C5+C6+C7) ($\mu\text{mol/mL}$) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24\text{h}$, για το σύνολο των γυναικών. *a*: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0\text{h}$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). *b*: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Αποτελέσματα ανάλυσης στο σύνολο των εθελοντριών για τις μοριακές αναλογίες (%) των επιμέρους SCFAs κατά τη διαδικασία ζύμωσης μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων.

Υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης της μοριακής αναλογίας (%) του οξικού οξέος (Molar_C2) στο σύνολο των λιπαρών οξέων ($F(7.859, 45.842)=2.549$, $p=0.022$), δηλαδή η μέση τιμή της αναλογίας (%) του οξικού οξέος μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Επιπλέον, η κύρια επίδραση (Main Effect) του χειρισμού έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση μοριακή αναλογία (%) του οξικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,35)=3.511$, $p=0.008$).

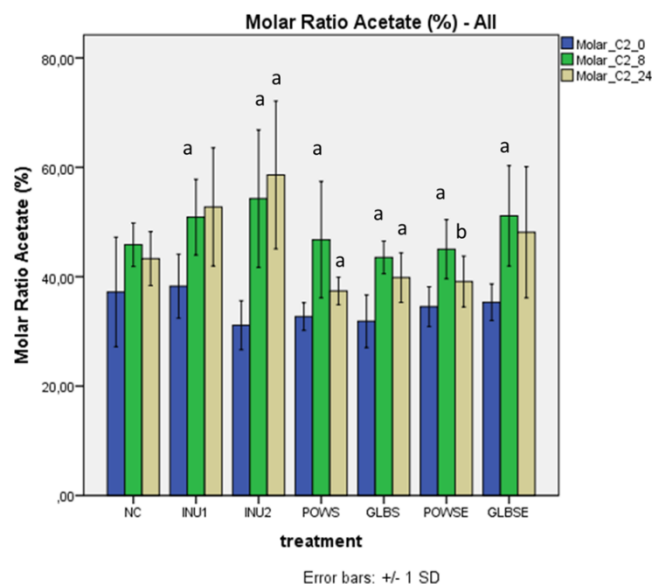
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline) δεν υπήρχαν γενικά σημαντικές διαφορές της μοριακής αναλογίας του οξικού οξέος μεταξύ των υποστρωμάτων, με εξαίρεση το υπόστρωμα INU2, όπου παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη αναλογία του οξικού οξέος ($p=0.03$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU1.

Μετά από την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), επίσης δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποστρωμάτων, με εξαίρεση τα υποστρώματα GLBS και INU2, με τη μοριακή αναλογία του οξικού οξέος να είναι υψηλότερη στο υπόστρωμα INU2 ($p=0.027$) συγκριτικά με το GLBS.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$) προέκυψαν αρκετές σημαντικές διαφορές στη μοριακή αναλογία του οξικού οξέος μεταξύ των υποστρωμάτων. Συγκεκριμένα, ήταν σημαντικά υψηλότερη στο υπόστρωμα INU2 ($p=0,004$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC καθώς και συγκριτικά με τα υποστρώματα POWS ($p<0.001$), GLBS ($p=0.001$), POWSE ($p<0.001$) και GLBSE ($p=0.042$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη μοριακή αναλογία του οξικού οξέος στο υπόστρωμα INU1 συγκριτικά με τα υποστρώματα POWS ($p=0,004$), GLBS ($p=0,013$) και POWSE ($p=0,009$).

Η ανά ζεύγη σύγκριση (Paired-Samples T test) των τιμών της μοριακής αναλογίας (%) του οξικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι μετά από την 8ωρη ($t=8h$) ζύμωση δεν υπήρξε σημαντική αύξηση στον αρνητικό μάρτυρα, ωστόσο σημειώθηκε σημαντική αύξηση σε όλα τα υποστρώματα: INU1 ($p=0,041$), INU2 ($p=0.008$), POWS ($p=0.019$), GLBS ($p=0.001$), POWSE ($p=0.008$), GLBSE ($p=0.024$). Μετά από 24ώρη ζύμωση σημαντική αύξηση συγκριτικά με το baseline, παρατηρήθηκε στα υποστρώματα INU2 ($p=0.007$), POWS ($p=0,003$) και GLBS ($p=0.016$), ενώ μεταξύ 24ώρης και 8ωρης ζύμωσης υπήρξε σημαντική μείωση της μοριακής αναλογίας του οξικού οξέος στο υπόστρωμα POWSE ($p=0.001$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 7

Σύγκριση μοριακής αναλογίας (%) του οξικού οξέος στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon).

Όπως προέκυψε από τα αποτελέσματα της ανάλυσης, υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης της μοριακής αναλογίας (%) του προπιονικού οξέος (Molar_C3) επί του αθροίσματος της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων ($F(9,228, 53.829)=4.926$, $p<0.001$), δηλαδή η μέση τιμή της αναλογίας (%) του προπιονικού οξέος μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Ωστόσο, η κύρια επίδραση (Main Effect) του χειρισμού έδειξε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση μοριακή αναλογία (%) του προπιονικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,35)=0.872$, $p=0.525$).

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), η μοριακή αναλογία του προπιονικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα NC συγκριτικά με τα υποστρώματα POWS ($p=0.024$) και GLBS ($p=0.046$), ενώ σημαντικά υψηλότερη ήταν και στο υπόστρωμα INU1 συγκριτικά με τα υποστρώματα POWS ($p=0.003$), GLBS ($p=0.005$) και POWSE ($p=0.031$).

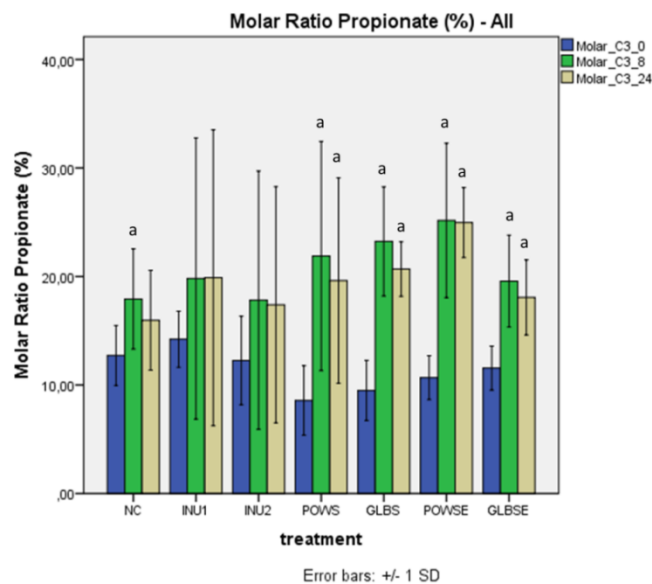
Μετά την 8ωρη ζύμωση δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στη μοριακή αναλογία του προπιονικού οξέος στα διάφορα υποστρώματα συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα και τα

υποστρώματα INU1 και INU2. Ωστόσο, σημειώθηκε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση στα υποστρώματα GLBS ($p=0.032$) και POWSE ($p=0.028$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU2.

Μετά από την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$) η μοριακή αναλογία του προπιονικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη στο υπόστρωμα POWSE συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC ($p=0.004$) και τα υποστρώματα INU1 ($p=0.009$) και INU2 ($p=0.003$). Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη τιμή στο υπόστρωμα GLBS ($p=0.037$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU2.

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της μοριακής αναλογίας (%) του προπιονικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι μετά από την 8ωρη ($t=8h$) ζύμωση υπήρξε σημαντική αύξηση στον αρνητικό μάρτυρα NC ($p=0.046$) και στα υποστρώματα POWS ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBS ($p=0.002$), POWSE ($p=0.005$) και GLBSE ($p=0.008$). Σημαντική αύξηση επίσης σημειώθηκε στα ίδια υποστρώματα POWS ($z=-2.201$, $p=0.028$), GLBS ($p<0.001$), POWSE ($p<0.001$) και GLBSE ($p=0.012$) και μετά την 24ωρη ζύμωση, ωστόσο η αύξηση δεν ήταν σημαντική στον αρνητικό μάρτυρα NC. Μεταξύ 24ωρης και 8ωρης ζύμωσης δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στη μοριακή αναλογία του προπιονικού οξέος.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 8

Σύγκριση μοριακής αναλογίας (%) του προπιονικού οξέος στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired-

*Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon).*

Αναφορικά με τη μοριακή αναλογία (%) του βουτυρικού οξέος (Molar_C4) επί του αθροίσματος της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων, η ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(8,008, 46.712)=3.042$, $p=0.008$), δηλαδή η μέση τιμή της αναλογίας (%) του βουτυρικού οξέος μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Επιπλέον, η κύρια επίδραση (Main Effect) του χειρισμού έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση μοριακή αναλογία (%) του βουτυρικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,35)=2.767$, $p=0.026$).

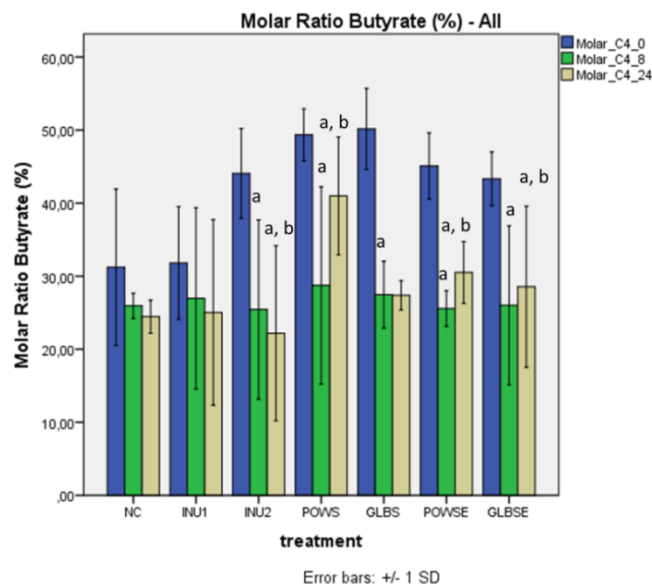
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline) η μοριακή αναλογία του βουτυρικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη στα υποστρώματα INU2, POWS, GLBS, POWSE και GLBSE συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC ($p=0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.001$, $p=0.002$ αντιστοίχως) και το υπόστρωμα INU1 ($p=0.002$, $p<0.001$, $p<0.001$, $p=0.001$, $p=0.004$ αντιστοίχως).

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$) δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές στις τιμές της μοριακής αναλογίας του βουτυρικού οξέος μεταξύ των υποστρωμάτων και του αρνητικού μάρτυρα NC, αλλά ούτε και με τα υποστρώματα INU1 και INU2.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$) η μοριακή αναλογία του βουτυρικού οξέος στο υπόστρωμα POWS ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC ($p=0.002$) και με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.003$) και INU2 ($p=0.001$).

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της μοριακής αναλογίας (%) του βουτυρικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι μετά από την 8ωρη ($t=8h$) ζύμωση υπήρξε σημαντική μείωση στα υποστρώματα INU2 ($p=0.01$), POWS($p=0.019$), GLBS ($p<0.001$), POWSE ($p<0.001$) και GLBSE ($p=0.014$). Σημαντική μείωση επίσης σημειώθηκε στα ίδια υποστρώματα INU2 ($p=0.006$), POWS ($p=0.031$), GLBS ($p<0.001$), POWSE ($p=0.001$) και GLBSE ($p=0.027$) και μετά την 24ωρη ζύμωση. Μεταξύ 24ωρης και 8ωρης ζύμωσης σημαντική μείωση σημειώθηκε στο υπόστρωμα INU2 ($p=0.011$), ενώ σημαντική αύξηση υπήρξε στα υποστρώματα POWS ($p=0.041$), POWSE ($p=0.042$) και GLBSE ($p=0.002$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 9

Σύγκριση μοριακής αναλογίας (%) του θουτυρικού οξέος στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon).

Η ανάλυση των δεδομένων αναφορικά με τη μοριακή αναλογία (%) του BSCFAs (Molar_BSCFAs) -άθροισμα των μοριακών αναλογιών του ισο-βουτυρικού οξέος, ισοβαλερικού οξέος και ισοκαπροϊκού οξέος- έδειξε ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(7,998, 46.655)=5.803$, $p<0.001$), δηλαδή η μέση τιμή του Molar_BSCFAs μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Επιπλέον, η κύρια επίδραση (Main Effect) του χειρισμού έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση τιμή του Molar_BSCFAs μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,35)=8.579$, $p<0.001$).

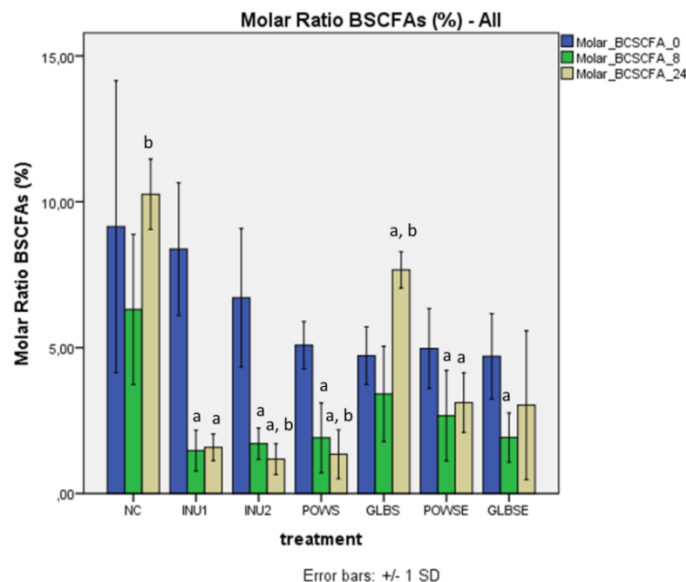
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), οι τιμές του Molar_BSCFAs στα υποστρώματα POWS, GLBS, POWSE και GLBSE ήταν σημαντικά χαμηλότερες συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.03$, $p=0.009$, $p=0.017$, $p=0.006$ αντιστοίχως) και το υπόστρωμα INU1 ($p=0.018$, $p=0.005$, $p=0.01$, $p=0.004$), ενώ σημαντικά χαμηλότερες ήταν και οι τιμές στα υποστρώματα GLBS ($p=0.032$) και GLBSE ($p=0.023$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU2.

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), η τιμή του Molar_BSCFAs ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα συγκριτικά με όλα τα υποστρώματα – INU1 ($p<0.001$), INU2 ($p<0.001$), POWS ($p<0.001$), POWSE ($p=0.013$), GLBSE ($p=0.001$)- με εξαίρεση το υπόστρωμα GLBS. Επιπλέον, η τιμή στο υπόστρωμα GLBS ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.004$) και INU2 ($p=0.02$), ενώ σημαντικά υψηλότερη ήταν και η τιμή στο υπόστρωμα POWSE ($p=0.043$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU1.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), η τιμή του Molar_BSCFAs ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα συγκριτικά με όλα τα υποστρώματα – INU1 ($p<0.001$), INU2 ($p<0.001$), POWS ($p<0.001$), POWSE ($p<0.001$), GLBSE ($p<0.001$)- με εξαίρεση το υπόστρωμα GLBS. Επιπλέον, οι τιμές στα υποστρώματα GLBS και POWSE ήταν σημαντικά υψηλότερες συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p<0.001$ και $p=0.016$ αντιστοίχως) και INU2 ($p<0.001$ και $p<0.001$ αντιστοίχως), ενώ σημαντικά υψηλότερη ήταν και η τιμή στο υπόστρωμα GLBSE ($p=0.011$) συγκριτικά με το INU2.

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών του Molar_BSCFAs μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι μετά από την 8ωρη ($t=8h$) ζύμωση υπήρξε σημαντική μείωση σε όλα σχεδόν τα υποστρώματα – INU1 ($p=0.001$), INU2 ($p=0.003$), POWS ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWSE ($z=-1.992$, $p=0.046$), GLBSE ($p=0.005$)- με εξαίρεση το υπόστρωμα GLBS και τον αρνητικό μάρτυρα. Μετά από την 24ωρη ζύμωση υπήρξε σημαντική μείωση στα υποστρώματα INU1 ($p=0.001$), INU2 ($p=0.003$), POWS ($z=-2.201$, $p=0.028$) και POWSE ($z=-2.201$, $p=0.028$), ενώ σημειώθηκε σημαντική αύξηση στο υπόστρωμα GLBS ($p=0.001$). Μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης, υπήρξε σημαντική μείωση στα υποστρώματα INU2 ($p=0.043$) και POWS ($z=-1.992$, $p=0.046$), ενώ παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των τιμών στο υπόστρωμα GLBS ($p=0.001$) και τον αρνητικό μάρτυρα ($z=-2.201$, $p=0.028$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 10

Σύγκριση μοριακής αναλογίας (%) του BSCFAs στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Από την ανάλυση των δεδομένων προέκυψε επίσης ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(7.504, 43.775)=5.134$, $p<0.001$) στη μοριακή αναλογία (%) του Other_SCFAs (Molar_Other_SCFAs) - άθροισμα των μοριακών αναλογιών του βαλερικού, καπροϊκού και επτανοϊκού οξέος-, δηλαδή η μέση τιμή του Other_Molar_SCFAs μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Επιπλέον, η κύρια επίδραση (Main Effect) του χειρισμού έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση τιμή του Molar_Other_SCFAs μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,35)=13.428$, $p<0.001$).

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), η τιμή του Molar_Other_SCFAs στο υπόστρωμα GLBS ήταν σημαντικά χαμηλότερη συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.004$) και INU2 ($p=0.008$) καθώς και τον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.031$).

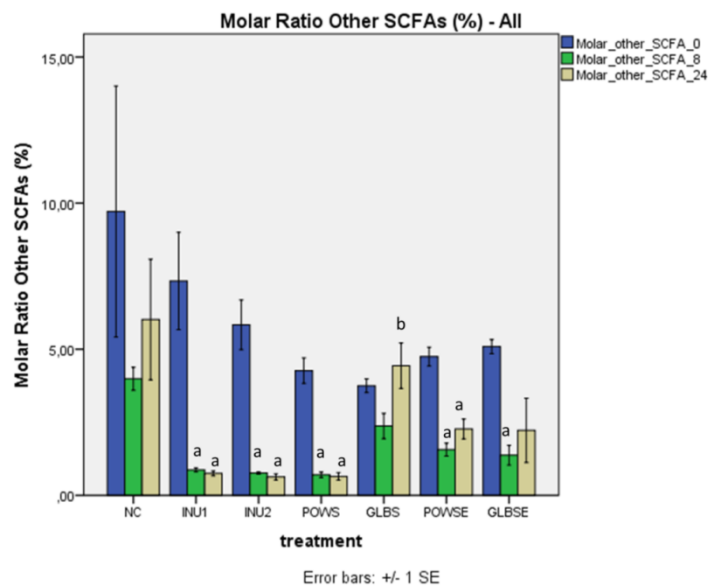
Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), η τιμή του Molar_Other_SCFAs ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα συγκριτικά με τις τιμές σε όλα σχεδόν τα υποστρώματα – INU1 ($p<0.001$), INU2 ($p<0.001$), POWS ($p<0.001$), POWSE ($p=0.007$), GLBSE ($p<0.001$)- με εξαίρεση το

υπόστρωμα GLBS. Επιπλέον, στα υποστρώματα GLBS και POWSE οι τιμές ήταν σημαντικά υψηλότερες συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.003$ και $p=0.024$ αντιστοίχως) και INU2 ($p<0.001$ και $p=0.002$ αντιστοίχως).

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), η τιμή του Molar_Other_SCFAs ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα συγκριτικά με τις τιμές σε όλα σχεδόν τα υποστρώματα - INU1 ($p<0.001$), INU2 ($p<0.001$), POWS ($p<0.001$), GLBSE ($p=0.005$)- με εξαίρεση τα υποστρώματα GLBS και POWSE. Επιπλέον, στα υποστρώματα GLBS, POWSE και GLBSE, οι τιμές ήταν σημαντικά υψηλότερες συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p<0.001$, $p=0.001$, $p=0.035$ αντιστοίχως) και INU2 ($p<0.001$, $p<0.001$ και $p=0.003$ αντιστοίχως).

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών του Molar_BSCFAs μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι μετά από την 8ωρη ($t=8h$) ζύμωση υπήρξε σημαντική μείωση της τιμής του Molar_Other_SCFAs σε όλα σχεδόν τα υποστρώματα - INU1 ($p=0.013$), INU2 ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWS ($p=0.001$), POWSE ($p=0.001$), GLBSE ($z=-2.201$, $p=0.028$)- με εξαίρεση το υπόστρωμα GLBS και τον αρνητικό μάρτυρα. Μετά από 24ωρη ζύμωση σημειώθηκε σημαντική μείωση των τιμών στα υποστρώματα INU1 ($p=0.011$), INU2 ($z=-2.201$, $p=0.028$), POWS ($p=0.001$) και POWSE ($p=0.003$), ωστόσο δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή των τιμών στα υποστρώματα GLBS και GLBSE καθώς και στον αρνητικό μάρτυρα. Μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης η μόνη σημαντική μεταβολή που υπήρξε ήταν η αύξηση της τιμής του Molar_Other_SCFAs στο υπόστρωμα GLBS ($p=0.038$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 11

Σύγκριση μοριακής αναλογίας (%) του *Other_SCFAs* στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon).

1.5.3 Αποτελέσματα ανάλυσης ποσοτικού προσδιορισμού των επιμέρους SCFAs κατά τη διαδικασία ζύμωσης μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων στις εθελόντριες με υγιή οστική μάζα

Πίνακας 2 Καταμέτρηση των συγκεντρώσεων (μmol/L) και της μοριακής αναλογίας (%) των SCFAs στις *εθελόντριες με υγιή οστική μάζα* για τις χρονικές στιγμές t=0h, t=8 και t=24h.

	Baseline (t=0h)							8-h fermentation (t=8h)							24-h fermentation (t=24h)							p over all
	NC	INU1	INU2	POWS	GLBS	POWSE	GLBSE	NC	INU1	INU2	POWS	GLBS	POWSE	GLBSE	NC	INU1	INU2	POWS	GLBS	POWSE	GLBSE	
SCFAs (μmol/ml)																						
Total VFAs	†,‡ 4,68 ± 0,44	*	*	*	*	*	*	†,‡,a 15,33 ±2,20	*,a 40,78 ±7,72	*,a 41,68 ±8,56	*,a 49,72 ±3,51	*,a 32,77 ±6,31	*,a 43,21 ±1,36	*	†,‡,a 20,42 ±5,63	*,a 50,62 ±17,55	*	*,†,‡,a, b 74,35 ±3,57	*,a, b 51,52 ±7,45	*,a, b 60,99 ±3,91	*	**
Acetate	†,‡ 1,64 ±0,54	*	*	*	*	*	*	*,†,‡,a 7,06 ±0,97	*,a 19,15 ±5,22	*,a 18,76 ±4,97	*,a 19,61 ±1,89	*,a 13,95 ±2,80	*,a 19,74 ±3,55	*,a 17,83 ±1,56	†,‡ 8,51 ±3,24	*	*	*,a, b 26,75 ±1,69	a 20,73 ±6,55	*,a, b 24,93 ±4,82	a 20,98 ±1,02	.051
Propionate	†,‡ 0,6 ±0,17	*	*	*	*	*	*	a 2,47 ±0,16	8,42 ±5,39	9,06 ±7,22	12,72 ±6,16	a 7,74 ±1,77	*,a 10,64 ±3,00	a 7,03 ±1,79	2,94 ±1,16	10,28 ±7,57	8,18 ±4,35	*,‡ 18,09 ±9,33	a 10,82 ±0,39	*,a 15,84 ±3,11	a 8,95 ±2,36	**
Butyrate	1,4 ±0,71	0,76 ±0,08	1,12 ±0,2	† 1,51 ±0,23	† 1,63 ±0,65	1,23 ±0,28	0,98 ±0,2	‡, a 3,87 ±0,73	12,17 ±7,01	12,7 ±5,76	15,85 ±8,32	8,91 ±2,62	10,75 ±1,25	11,38 ±3,65	a 5,26 ±1,56	15,39 ±10,83	17,17 ±9,09	*,†,‡,a, b 27,76 ±7,62	a, b 13,8 ±2,05	*,a, b 17,11 ±1,42	a, b 15,46 ±2,67	.076
BSCFAs	0,45 ±0,35	0,22 ±0,87	0,2 ±0,11	0,18 ±0,03	0,17 ±0,05	0,14 ±0,04	0,11 ±0,03	1,24 ±0,56	0,7 ±0,32	0,84 ±0,42	1,17 ±0,91	1,32 ±0,83	1,42 ±0,92	0,68 ±0,34	†,‡ 2,18 ±0,37	0,94 ±0,44	0,68 ±0,35	1,26 ±0,95	†,‡,a, b 3,96 ±0,35	‡,a 1,85 ±0,41	*	**
Other SCFAs	0,21 (0,17-0,81)	0,12 (0,11-0,29)	0,12 (0,11-0,2)	0,11 (0,1-0,17)	0,1 (0,09-0,16)	0,11 (0,11-0,14)	0,13 (0,11-0,13)	†,‡ 0,73 (0,59-0,81)	*	*	*	†,‡ 0,58 (0,55-1,01)	†,‡ 0,65 (0,55-0,77)	*	†,‡ 1,62 (1,23-1,89)	*	*	*	†,‡ 2,63 (2-2,63)	†,‡ 1,11 (0,91-1,53)	*	**
Molar Ratio (%)																						
Acetate	35,26 (28,84-42,05)	‡ 36,68 (36,04-39,45)	† 30,73 (30,5-31,3)	32,39 (31,81-32,48)	35,07 (31,72-35,87)	36,67 (33,92-37,85)	36,22 (35,84-36,42)	48 (45,18-48,06)	48,62 (44,56-49,43)	a 45,75 (42,98-47,1)	40,4 (38,5-40,86)	a 41,34 (41,07-43,38)	47,02 (42,54-49,28)	46,87 (46,87-48,56)	40,14 (37,63-43,59)	49,28 (43,93-49,56)	a 48,66 (45,54-52,17)	†,‡ 36,56 (35,26-36,99)	36,71 (35,57-42,23)	b 41,69 (37,92-43,98)	44,58 (43,09-46,64)	.076
Propionate	12,88 ±4,25	13,1 ±2,48	12,27 ±5,99	11,29 ±1,43	11,45 ±1,9	11,6 ±1,91	12,22 ±1,42	a 16,4 ±3,23	22,51 ±18,41	21,57 ±17,46	25,99 ±13,98	24,23 ±7,57	24,78 ±7,82	19,06 ±5,1	14,05 ±2,4	22,72 ±20,73	20,06 ±16,11	24,29 ±12,52	21,34 ±3,65	a 25,97 ±4,7	19,08 ±4,61	.965
Butyrate	24,93 (22,5-34,07)	26,95 (26,38-33,1)	43,09 (39,12-47,44)	*,† 46,53 (46,74-47,17)	*,† 45,58 (44,76-47,57)	44,09 (41,4-45,57)	44,02 (40,63-44,08)	24,61 (24,18-25,86)	34,55 (23,47-36,47)	34,52 (24,9-38,78)	33,85 (24,03-40,24)	a 26,32 (24,3-29,27)	a 24,57 (23,56-26,03)	26,39 (26,23-32,21)	25,87 (25,35-26,04)	37,07 (24,27-37,3)	30,7 (23,23-35,33)	40,02 (32,85-43,28)	a 26,28 (25,74-27,63)	29,65 (26,8-30,31)	30,8 (29,77-35,28)	.516

BSCFAs	5,99	9,42	6,29	5,25	4,82	4,1	4,08	†,‡	*,a	*	*			*	†,‡	*,a	*	*	†,‡,a	*,‡	*	** .018
	(5,36-12,14)	(7,63-9,51)	(5,35-8,78)	(5,25-5,41)	(4,56-5,6)	(3,98-5,69)	(3,83-5,55)	(6,97-9,42)	(1,4-2,23)	(1,68-2,32)	(1,41-3,02)	(2,85-4,47)	(2,08-4,02)	(1,35-2,15)	(10,13-11,36)	(1,63-2,11)	(1,12-1,75)	(0,99-2,12)	(7,52-8,15)	(2,8-3,37)	(1,02-2,26)	
Other SCFAs	12,53 ±15,6	8,34 ±5,78	6,11 ±2,64	4,37 ±1,44	3,65 ±0,76	4,41 ±0,29	4,99 ±0,61	†,‡ 4,45 ±0,96	* 0,83 ±0,19	* 0,74 ±0,12	* 0,71 ±0,27	*, †,‡ 2,48 ±1,08	*,a 1,53 ±0,53	*,a 0,97 ±0,3	†,‡ 8,61 ±6,18	* 0,85 ±0,18	* 0,75 ±0,25	* 0,65 ±0,3	4,45 ±1,9	* 2,1 ±1,18	*,a 1,02 ±0,27	** .004

*: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με το NC ($p < 0,05$) κατά την έναρξη ($t = 0h$), μετά από ζύμωση 8 ωρών ($t = 8 \text{ ώρες}$) ή μετά από ζύμωση 24 ωρών ($t = 24 \text{ ώρες}$) (Repeated- Measures ANOVA μετά την προσαρμογή Bonferroni για πολλαπλότητα). †: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με INU1 ($p < 0,05$) κατά την έναρξη ($t = 0h$), μετά από ζύμωση 8 ωρών ($t = 8h$) ή μετά από ζύμωση 24 ωρών ($t = 24 \text{ ώρες}$) (Repeated- Measures ANOVA μετά την προσαρμογή Bonferroni για πολλαπλότητα). ‡: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με INU2 ($p < 0,05$) κατά την έναρξη ($t = 0h$), μετά από ζύμωση 8 ωρών ($t = 8h$) ή μετά από ζύμωση 24 ωρών ($t = 24 \text{ ώρες}$) (Repeated- Measures ANOVA μετά την προσαρμογή Bonferroni για πολλαπλότητα). a: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). b: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως [μέση τιμή ± τυπική απόκλιση] όταν ακολουθούν κανονική κατανομή και ως [διάμεσος (ενδοτεταρτημοριακό εύρος)] όταν δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. **:στατιστικά σημαντική επίδραση του χειρισμού στη συγκέντρωση σε κάθε χρόνο επώασης ($t=0$, $t=8h$, $t=24h$)

Αποτελέσματα ανάλυσης στο σύνολο των υγιών εθελοντριών για τις συγκεντρώσεις (μmol/mL) των SCFAs κατά τη διαδικασία ζύμωσης μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων.

Στην ομάδα των υγιών γυναικών, υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του υποστρώματος και του χρόνου επώασης στη συγκέντρωση Total_VFA ($F(7.358, 17.168)=5.581$, $p=.002$), δηλαδή η μέση συγκέντρωση Total_VFA μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με το υπόστρωμα.

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline) η συγκέντρωση Total_VFA ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη στα υποστρώματα INU1 (2.52 ± 0.48 , $p=.003$), INU2 (2.63 ± 0.54 , $p=0.005$), POWS (3.23 ± 0.54 , $p=.033$), POWSE (2.83 ± 0.53 , $p=.009$), GLBSE (2.32 ± 0.31 , $p=.002$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC (4.68 ± 0.44).

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), η συγκέντρωση Total_VFA στην ομάδα των υγιών γυναικών ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη σε όλα τα υποστρώματα, INU1 (40.78 ± 7.72 , $p<.001$), INU2 (41.68 ± 8.56 , $p<.001$), POWS (49.72 ± 3.51 , $p<.001$), GLBS (32.77 ± 6.31 , $p=.002$), POWSE (43.21 ± 1.36 , $p<.001$) και GLBSE (37.28 ± 4.64 , $p<.001$), συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC (15.33 ± 2.20).

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), η συγκέντρωση Total_VFA στην ομάδα των υγιών γυναικών ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη σε όλα τα υποστρώματα, INU1 (50.62 ± 17.55 , $p=.008$), INU2 (47.68 ± 24.14 , $p=.015$), POWS (74.35 ± 3.57 , $p<.001$), GLBS (51.52 ± 7.45 , $p=.007$), POWSE (60.99 ± 3.91 , $p=.001$) και GLBSE (46.74 ± 1.67 , $p=.018$), συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC (20.42 ± 5.63), ενώ στο υπόστρωμα POWS ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη (74.35 ± 3.57) συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 (50.62 ± 17.55 , $p=.03$) και INU2 (47.68 ± 24.14 , $p=.017$).

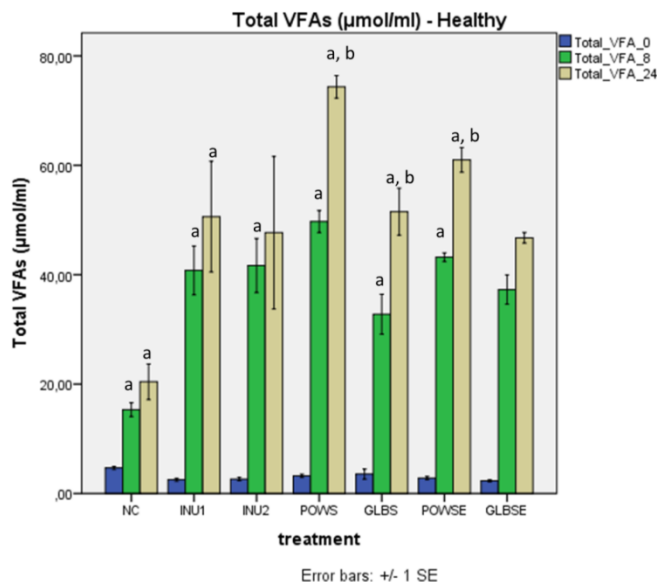
Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της συγκέντρωσης Total_VFA (Paired Sample T-test) μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης Total_VFA στον αρνητικό μάρτυρα NC μετά από 8ωρη ζύμωση (10.65 ± 1.09 , $p=0.01$) και 24ωρη ζύμωση (15.74 ± 3.04 , $p=.035$) συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), ενώ δε σημειώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης. Στο υπόστρωμα INU1 επίσης παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης Total_VFA μετά από 8ωρη ζύμωση (38.26 ± 4.60 , $p=0.014$) και 24ωρη ζύμωση (48.10 ± 10.37 ,

$p=.043$) συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), ενώ δε σημειώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης. Στατιστικά σημαντική αύξηση (39.05 ± 5.25 , $p=.018$) στη συγκέντρωση Total_VFA, σημειώθηκε στο υπόστρωμα INU2 μετά από 8ωρη ζύμωση, συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ 24ωρης ζύμωσης και baseline καθώς και μεταξύ 24ώρης και 8ώρης ζύμωσης.

Στο υπόστρωμα POWS προέκυψε στατιστικά σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση Total_VFA μετά από 8ώρη (46.48 ± 2.16 , $p=.002$) και 24ωρη (71.11 ± 2.35 , $p=.001$) ζύμωση συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), καθώς και μεταξύ 8ώρης και 24ώρης ζύμωσης (24.63 ± 1.55 , $p=.004$). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στο υπόστρωμα GLBS, όπου σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση μετά από 8ώρη (29.21 ± 3.68 , $p=.016$) και 24ωρη (47.95 ± 3.55 , $p=.005$) ζύμωση συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), καθώς και μεταξύ 8ώρης και 24ώρης ζύμωσης (18.74 ± 3.61 , $p=.035$).

Στο υπόστρωμα POWSE προέκυψε στατιστικά σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση Total_VFA μετά από 8ώρη (40.38 ± 0.57 , $p<.001$) και 24ωρη (58.16 ± 2.21 , $p=.001$) ζύμωση συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), καθώς και μεταξύ 8ώρης και 24ώρης ζύμωσης (17.78 ± 1.73 , $p=.009$). Επιπλέον, η συγκέντρωση Total_VFA σημείωσε στατιστικά σημαντική αύξηση στο υπόστρωμα GLBSE μετά από 8ώρη (34.96 ± 2.56 , $p=.005$) και 24ωρη (44.42 ± 1.02 , $p=.001$) ζύμωση συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), ενώ δε σημειώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 12

Σύγκριση της συγκέντρωσης των *Total_VFA* ($\mu\text{mol/mL}$) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24\text{h}$, για τις υγιείς γυναίκες. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0\text{h}$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Η συγκέντρωση του οξικού οξέος (C2), στην ομάδα των υγιών γυναικών, δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του υποστρώματος και του χρόνου επώασης ($F(6.936, 16.185)=2.022$, $p=0.115$). Ωστόσο, σημειώθηκε οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση του οξικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=2.824$, $p=0.051$).

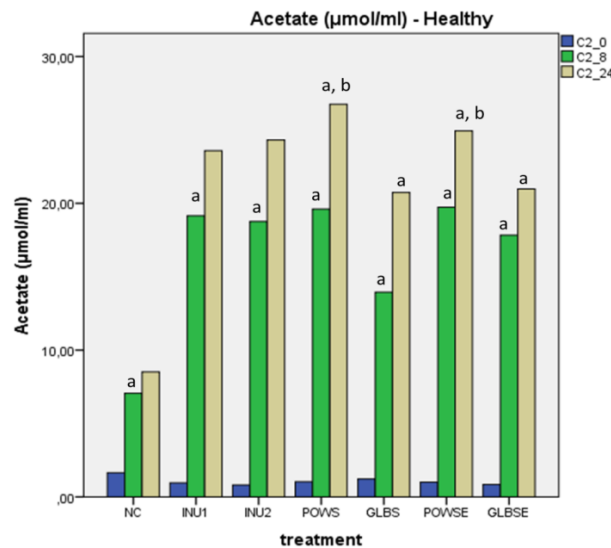
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), η συγκέντρωση του οξικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα, συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.035$), INU2 ($p=0.013$), POWSE ($p=0.048$) και GLBSE ($p=0.016$), ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις του οξικού οξέος στα διάφορα υποστρώματα συγκριτικά με τα INU1 και INU2.

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8\text{h}$), παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη του οξικού οξέος συγκέντρωση σε όλα τα υποστρώματα – INU1 ($p=0.001$), INU2 ($p=0.001$), POWS ($p<0.001$), GLBS ($p=0.025$), POWSE ($p<0.001$) και GLBSE ($p=0.002$)- συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ δεν υπήρξε καμία σημαντική διαφορά στα υποστρώματα συγκριτικά με τα INU1 και INU2.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), οι συγκεντρώσεις του οξικού οξέος στα υποστρώματα INU1 ($p=0.032$), INU2 ($p=0.026$), POWS ($p=0.012$), POWSE ($p=0.021$) αυξήθηκαν περαιτέρω και παρέμειναν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα.

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της συγκέντρωσης του οξικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι μετά από την 8ωρη ($t=8h$) ζύμωση υπήρξε σημαντική αύξηση σε όλα τα υποστρώματα – INU1 ($p=0.028$), INU2 ($p=0.026$), POWS ($p=0.004$), GLBS ($p=0.015$), POWSE ($p=0.011$) και GLBSE ($p=0.003$)- καθώς και στον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.025$). Μετά από 24ωρη ζύμωση σημειώθηκε σημαντική αύξηση των συγκεντρώσεων στα υποστρώματα POWS ($p=0.002$), GLBS ($p=0.03$), POWSE ($p=0.013$) και GLBSE ($p=0.001$), ωστόσο δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή των τιμών στα υποστρώματα INU1 και INU2 καθώς και στον αρνητικό μάρτυρα. Μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης υπήρξε σημαντική αύξηση στα υποστρώματα POWS ($p=0.013$) και POWSE ($p=0.026$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 13

Σύγκριση της συγκέντρωσης του οξικού οξέος (C2) ($\mu\text{mol/mL}$) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, στην ομάδα υγιών γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Σχετικά με τη συγκέντρωση του προπιονικού οξέος (C3), στην ομάδα των υγιών γυναικών, προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του υποστρώματος και του χρόνου επώασης ($F(8,261, 19.276)=2.473, p=0.048$), δηλαδή η μέση συγκέντρωση του προπιονικού οξέος μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με το υπόστρωμα. Ωστόσο, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση του προπιονικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=2.299, p=0.094$).

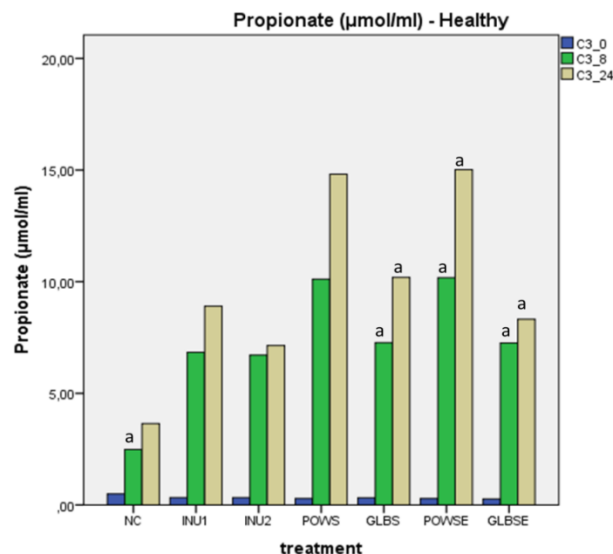
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), η συγκέντρωση του προπιονικού οξέος στον αρνητικό μάρτυρα ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με όλα τα υποστρώματα – INU1 ($p=0.028$), INU2 ($p=0.019$), POWS ($p=0.032$), POWSE ($p=0.016$), GLBSE ($p=0.007$)- εκτός από το υπόστρωμα GLBS. Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση του προπιονικού οξέος στα υποστρώματα INU1 και INU2 συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποστρώματα.

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), υπήρξε αύξηση της συγκέντρωσης του προπιονικού οξέος σε όλα τα υποστρώματα και τον αρνητικό μάρτυρα, με τις τιμές της να είναι σημαντικά υψηλότερες στα υποστρώματα POWS ($p=0.012$) και POWSE ($p=0.039$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές με τα υποστρώματα INU1 και INU2.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), η συγκέντρωση του προπιονικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη στα υποστρώματα POWS ($p=0.003$) και POWSE ($p=0.008$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη τιμή στο υπόστρωμα POWS ($p=0.031$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU2.

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της συγκέντρωσης του προπιονικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης ($t_0-t_8, t_0-t_{24}, t_8-t_{24}$) έδειξε ότι μετά από την 8ωρη ($t=8h$) ζύμωση υπήρξε σημαντική αύξηση στα υποστρώματα GLBS ($p=0.022$), POWSE ($p=0.028$), GLBSE ($p=0.023$) και τον αρνητικό μάρτυρα ($p<0.001$). Μετά την 24ώρη ζύμωση παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στα ίδια υποστρώματα GLBS ($p=0.001$), POWSE ($p=0.013$), GLBSE ($p=0.024$). Δε σημειώθηκαν σημαντικές μεταβολές στη συγκέντρωση του προπιονικού οξέος μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 14

Σύγκριση της συγκέντρωσης του προπιονικού οξέος (C3) ($\mu\text{mol/mL}$) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24\text{h}$, στην ομάδα υγιών γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0\text{h}$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων στην ομάδα των υγιών γυναικών, έδειξαν ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(7.434, 17.347)=3.094$, $p=0.025$) στη συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος (C4), δηλαδή η μέση τιμή της μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Ωστόσο, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=2.476$, $p=0.076$).

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη τιμή της συγκέντρωσης του βουτυρικού οξέος στα υποστρώματα POWS ($p=0.039$) και GLBS ($p=0.02$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU1. Δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές σε σχέση με το υπόστρωμα INU2 και τον αρνητικό μάρτυρα.

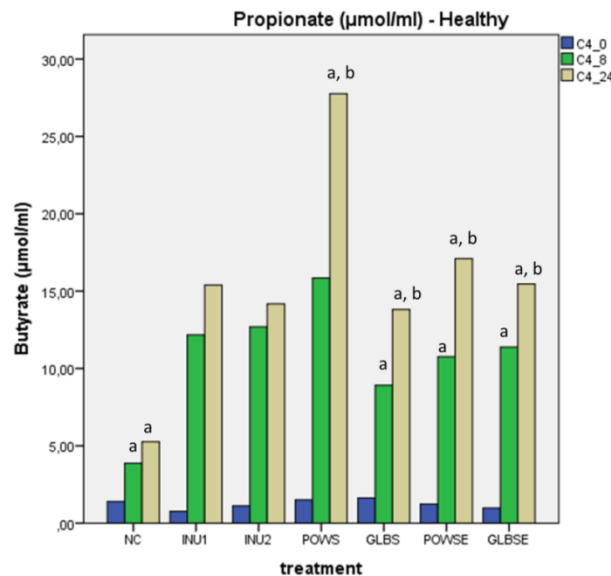
Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8\text{h}$), η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος στα υποστρώματα INU2 ($p=0.048$) και POWS ($p=0.011$) ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα,

ενώ δεν παρατηρήθηκαν άλλες σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα υποστρώματα INU1 και INU2.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$) η συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος στο υπόστρωμα POWS ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.03$), INU2 ($p=0.019$) και τον αρνητικό μάρτυρα ($P=0.001$). Σημαντικά υψηλότερη ήταν επίσης η συγκέντρωση στο υπόστρωμα POWSE ($p=0.036$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα.

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της συγκέντρωσης του βουτυρικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι μετά από την 8ωρη ($t=8h$) ζύμωση υπήρξε σημαντική αύξηση στα υποστρώματα GLBS ($p=0.029$), POWSE ($p=0.004$), GLBSE ($p=0.035$) και τον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.023$). Μετά την 24ωρη ζύμωση σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στα υποστρώματα POWS ($p=0.026$), GLBS ($p=0.007$), POWSE ($p=0.003$) και GLBSE ($p=0.01$) καθώς και στον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.041$). Μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης, στα ίδια υποστρώματα - POWS ($p=0.005$), GLBS ($p=0.007$), POWSE ($p=0.007$) και GLBSE ($p=0.02$) – σημειώθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του βουτυρικού οξέος.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 15 Σύγκριση της συγκέντρωσης του βουτυρικού οξέος (C4) ($\mu\text{mol/mL}$) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, στην ομάδα υγιών γυναικών. a: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). b: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Για τα λιπαρά οξέα διακλαδισμένης αλύσου (b- SCFAs), στην ομάδα των υγιών γυναικών, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(6.641, 15.496)=1.148, p=0.384$). Ωστόσο, προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=4.067, p=0.014$).

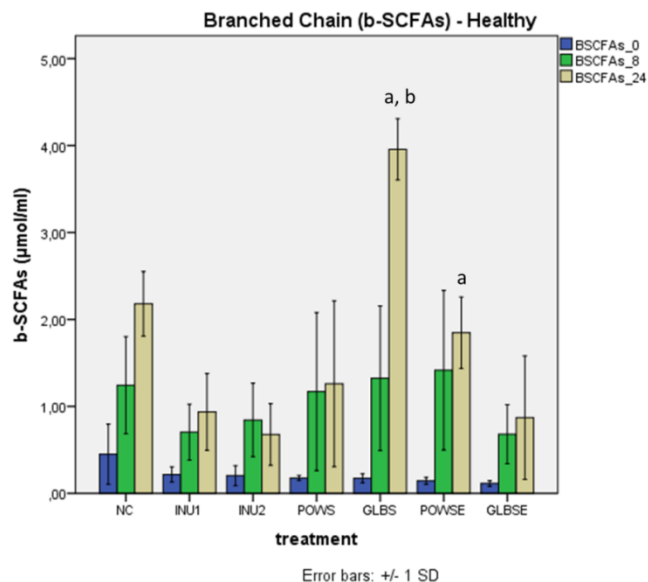
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), η συγκέντρωση των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου (b- SCFAs) ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα, συγκριτικά με τα υποστρώματα POWSE ($p=0.027$) και GLBSE ($p=0.006$), ενώ δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές στις τιμές των υποστρωμάτων συγκριτικά με τα υποστρώματα ινουλίνης 1% w/v (INU1) και 2% w/v (INU2).

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$) δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου στα υποστρώματα συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα και με τα υποστρώματα ινουλίνης INU1 και INU2.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), η συγκέντρωση των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.011$), INU2 ($p=0.004$) και GLBSE ($p=0.005$), ενώ υπήρξε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση στο υπόστρωμα GLBS συγκριτικά με τα INU1 ($p=0.001$) και INU2 ($p<0.001$) καθώς και στο υπόστρωμα POWSE ($p=0.021$) συγκριτικά με το INU2.

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου μεταξύ των χρόνων επώασης ($t_0-t_8, t_0-t_{24}, t_8-t_{24}$) έδειξε ότι μετά από την 8ωρη ($t=8h$) ζύμωση δεν υπήρξαν σημαντικές μεταβολές, ωστόσο μετά από την 24ωρη ζύμωση σημειώθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης στα υποστρώματα GLBS ($p=0.003$) και POWSE ($p=0.021$). Επιπλέον, μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης υπήρξε σημαντική αύξηση στο υπόστρωμα GLBS ($p=0.014$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα:



Διάγραμμα 16

Σύγκριση της συγκέντρωσης των οξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (b-SCFAs) (μmol/mL) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, στην ομάδα υγιών γυναικών. **a:** σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b:** σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Στην ομάδα των υγιών γυναικών, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(6.947, 16.209)=1.149$, $p=0.384$) στη συγκέντρωση των άλλων λιπαρών οξέων βραχέος αλύσου (o-SCFAs). Ωστόσο, προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=15.369$, $p<0.001$).

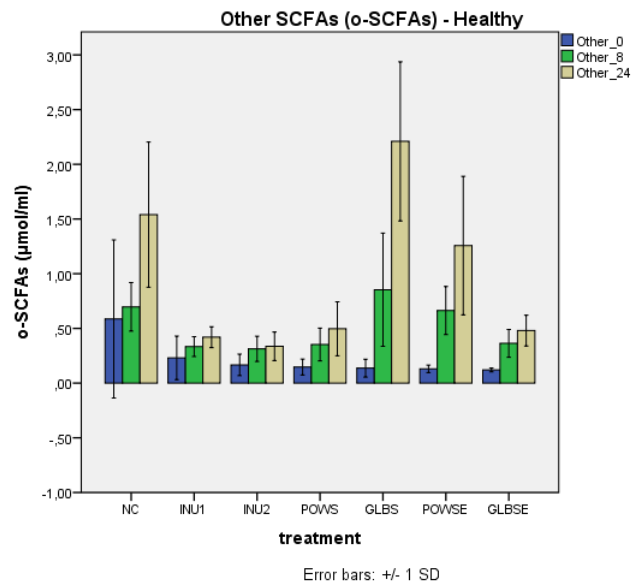
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline) δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση των άλλων λιπαρών οξέων βραχέως αλύσου στα υποστρώματα, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα και με τα υποστρώματα ινουλίνης INU1 και INU2.

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), η συγκέντρωση ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.016$), INU2 ($p=0.009$), POWS ($p=0.023$) και GLBSE ($p=0.021$). Οι τιμές στο υπόστρωμα GLBS ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.011$) και INU2 ($p=0.006$), ενώ επίσης σημαντικά υψηλότερες ήταν στο υπόστρωμα POWSE συγκριτικά με τα INU1 ($p=0.028$) και INU2 ($p=0.015$).

Μετά την 24ωρη ζύμωση (t=24h), η συγκέντρωση των άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (o-SCFAs) ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 (p=0.003), INU2 (p=0.001), POWS (p=0.007) και GLBSE (p=0.009), ενώ στο υπόστρωμα GLBS παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τα INU1 (p=0.001) και INU2 (p<0.001). Επίσης, στο υπόστρωμα POWSE η τιμή ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τα υποστρώματα ινουλίνης INU1 (p=0.01) και INU2 (p=0.003).

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της συγκέντρωσης των άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου μεταξύ των χρόνων επώασης (t0-t8, t0-t24, t8-t24) έδειξε ότι δεν υπήρξαν σημαντικές μεταβολές με την πάροδο του χρόνου ζύμωσης.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 17

Σύγκριση της συγκέντρωσης των άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (o-SCFAs) (μmol/mL) στους χρόνους t=0, t=8 και t=24h, στην ομάδα υγιών γυναικών.

Αποτελέσματα ανάλυσης στο σύνολο των υγιών εθελοντριών για τις μοριακές αναλογίες (%) των επιμέρους SCFAs κατά τη διαδικασία ζύμωσης μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων στην ομάδα των υγιών γυναικών έδειξαν ότι δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης, ως προς τη μοριακή αναλογία (%) του οξικού οξέος (Molar_C2) ($F(8.294, 19.352)=2.549$, $p=0.926$), ούτε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση μοριακή αναλογία (%) του οξικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=2.473$, $p=0.076$).

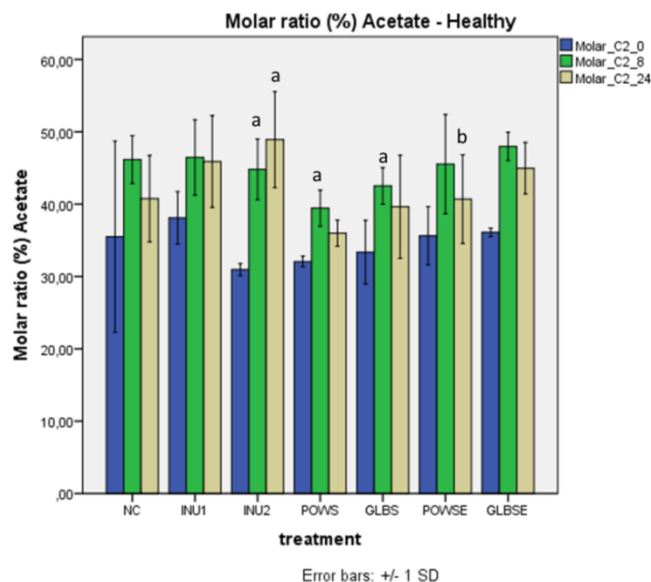
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), δεν προέκυψαν γενικά σημαντικές διαφορές στη μοριακή αναλογία του οξικού οξέος μεταξύ των υποστρωμάτων, με εξαίρεση το υπόστρωμα INU1 στο οποίο η παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη τιμή ($p=0.023$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU2.

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$) δεν προέκυψαν καθόλου σημαντικές διαφορές στη μοριακή αναλογία του οξικού οξέος συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα και τα υποστρώματα INU1 και INU2.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), δεν υπήρχαν γενικά σημαντικές διαφορές, με εξαίρεση την τιμή στο υπόστρωμα POWS που βρέθηκε σημαντικά χαμηλότερη συγκριτικά με τις τιμές στα υποστρώματα INU1 ($p=0.023$) και INU2 ($p=0.015$).

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της μοριακής αναλογίας του οξικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}), έδειξε ότι μετά την 8ωρη ζύμωση υπήρξε σημαντική αύξηση των τιμών στα υποστρώματα INU2 ($p=0.02$), POWS ($p=0.048$) και GLBS ($p=0.049$), ενώ μετά την 24ωρη ζύμωση υπήρξε σημαντική αύξηση στο υπόστρωμα INU2. Μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στο υπόστρωμα POWSE ($p=0.009$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



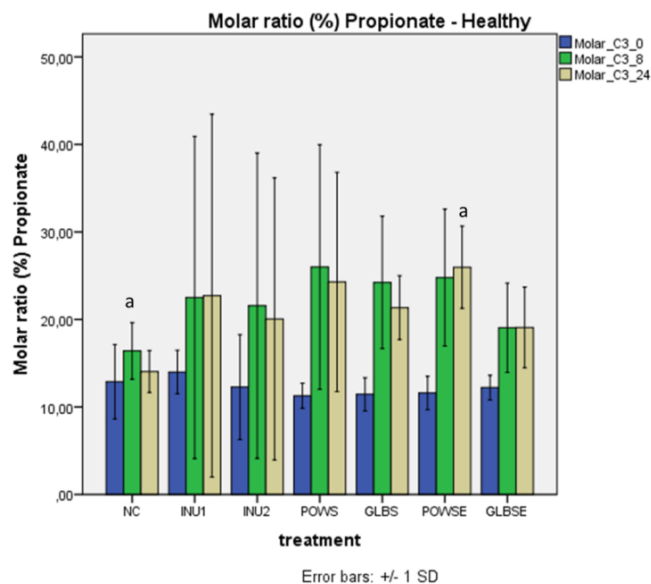
Διάγραμμα 18

Σύγκριση μοριακής αναλογίας (%) του οξικού οξέος στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των υγιών γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon).

Σχετικά με τη μοριακή αναλογία (%) του προπιονικού οξέος (Molar_C3), στην ομάδα των υγιών γυναικών, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(7.145, 16.671)=0.523$, $p=0.808$), ούτε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση μοριακή αναλογία (%) του προπιονικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=0.218$, $p=0.965$) τις χρονικές στιγμές $t=0$, $t=8h$ και $t=24h$.

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της μοριακής αναλογίας του προπιονικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}), έδειξε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές μεταβολές, με εξαίρεση το υπόστρωμα POWSE, όπου σημειώθηκε σημαντική αύξηση ($p=0.023$) μετά την 24ωρη ζύμωση και τον αρνητικό μάρτυρα, στον οποίο υπήρξε σημαντική αύξηση ($p=0.034$) μετά την 8ωρη ζύμωση.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 19

Σύγκριση μοριακής αναλογίας (%) του προπιονικού οξέος στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των υγιών γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

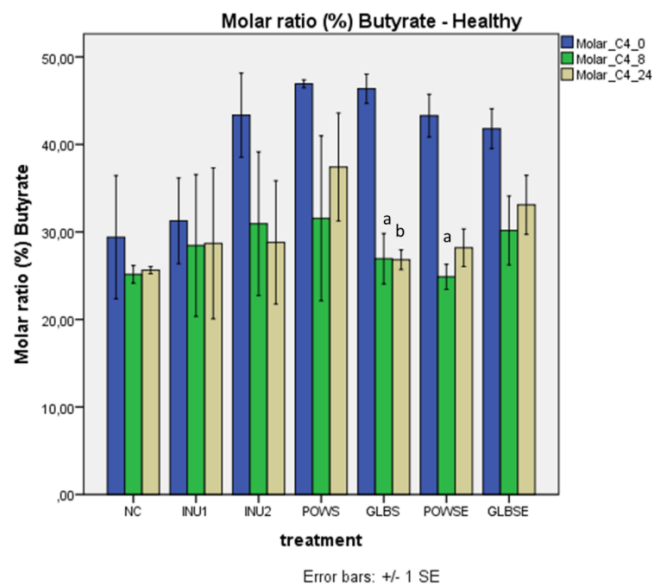
Από την ανάλυση των δεδομένων στην ομάδα των υγιών γυναικών, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(8,212, 19.161)=1.141$, $p=0.382$) της μοριακής αναλογίας (%) του βουτυρικού οξέος (Molar_C4), ούτε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση μοριακή αναλογία (%) του βουτυρικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=0.910$, $p=0.516$).

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), η μέση τιμή της μοριακής αναλογίας του βουτυρικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη στα υποστρώματα POWS ($p=0.006$) και GLBS ($p=0.016$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Επιπλέον, παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερη τιμή στο υπόστρωμα INU1 συγκριτικά με τα υποστρώματα POWS ($p=0.009$) και GLBS ($p=0.023$).

Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές μεταξύ των χειρισμών τις χρονικές στιγμές $t=8h$ και $t=24h$.

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της μοριακής αναλογίας του βουτυρικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t0-t8, t0-t24, t8-t24), έδειξε ότι δεν υπήρχαν γενικά σημαντικές μεταβολές, με εξαίρεση το υπόστρωμα GLBS, όπου σημειώθηκε σημαντική μείωση μετά την 8ωρη ($p=0.037$) και 24ωρη ($p=0.001$) ζύμωση, καθώς και το υπόστρωμα POWSE, στο οποίο υπήρξε σημαντική μείωση ($p=0.028$) μετά την 8ωρη ζύμωση.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 20

Σύγκριση μοριακής αναλογίας (%) του βουτυρικού οξέος στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των υγιών γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon).

Αναφορικά με τη μοριακή αναλογία (%) των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου (Molar b-SCFAs), στην ομάδα των υγιών γυναικών, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(6.918, 16.142)=1.776$, $p=0.161$). Ωστόσο, υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση μοριακή αναλογία (%) των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=3.833$, $p=0.018$).

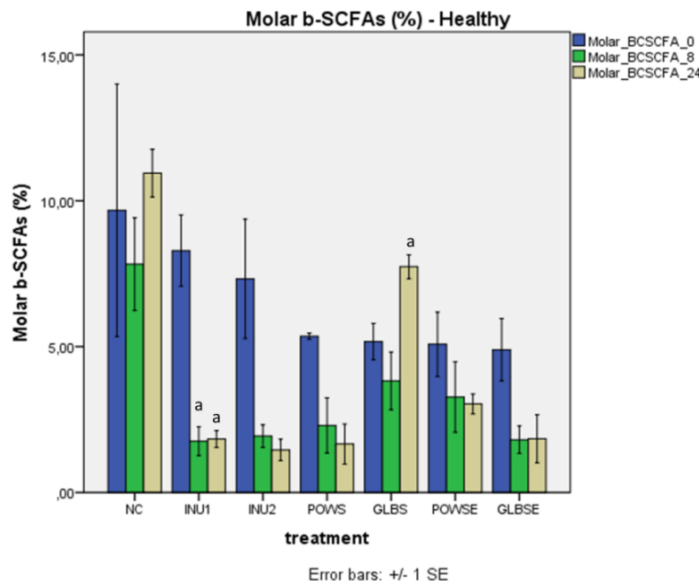
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις τιμές μεταξύ των χειρισμών και των υποστρωμάτων ινουλίνης, αλλά ούτε και με τον αρνητικό μάρτυρα.

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), προέκυψαν σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Συγκεκριμένα, η μοριακή αναλογία (%) των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου στον αρνητικό μάρτυρα ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.01$), INU2 ($p=0.016$), POWS ($p=0.019$) και GLBSE ($p=0.012$).

Μετά την 24ωρη ζύμωση, οι τιμές σε όλα τα υποστρώματα, με εξαίρεση το GLBS, ήταν σημαντικά χαμηλότερες συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα – INU1 ($p=0.001$), INU2 ($p<0.001$), POWS ($p<0.001$), POWSE ($p=0.032$), GLBSE ($p=0.001$). Επίσης, στο υπόστρωμα GLBS η τιμή ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τα υποστρώματα ινουλίνης, INU1 ($p=0.009$) και INU2 ($p=0.002$), ενώ σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με το INU2 ήταν και η τιμή στο υπόστρωμα POWSE ($p=0.032$).

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της μοριακής αναλογίας των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου, μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}), έδειξε ότι δεν υπήρχαν γενικά σημαντικές μεταβολές, με εξαίρεση το υπόστρωμα INU1, όπου σημειώθηκε σημαντική μείωση με τα την 8ωρη ($p=0.043$) και 24ωρη ($p=0.04$) ζύμωση, καθώς και το υπόστρωμα GLBS, στο οποίο υπήρξε σημαντική αύξηση ($p=0.027$) μετά την 24ωρη ζύμωση.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 21

Σύγκριση μοριακής αναλογίας (%) των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των υγιών γυναικών.). **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την

αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b:** σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Στην ομάδα των υγιών γυναικών, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(6.636, 15.484)=0.389$, $p=0.888$) ως προς τη μοριακή αναλογία (%) των άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (Molar o-SCFAs). Ωστόσο, προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=5.567$, $p=0.004$).

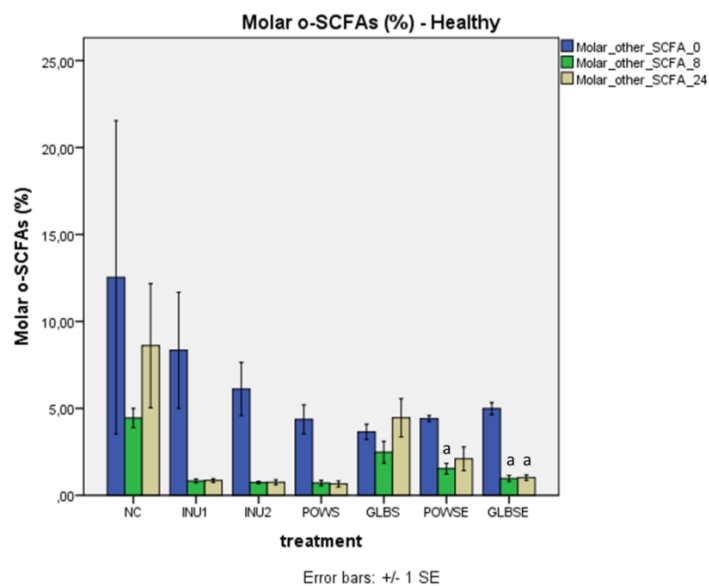
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις τιμές μεταξύ των χειρισμών και των υποστρωμάτων ινουλίνης, αλλά ούτε και με τον αρνητικό μάρτυρα.

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), η μοριακή αναλογία (%) των άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα συγκριτικά με όλα τα υποστρώματα – INU1 ($p<0.001$), INU2 ($p<0.001$), POWS ($p<0.001$), GLBS ($p=0.001$), POWSE ($p<0.001$), GLBSE ($p<0.001$). Επιπλέον, η τιμή στο υπόστρωμα GLBS ήταν σημαντικά υψηλότερη από τις τιμές στα υποστρώματα ινουλίνης, INU1 ($p=0.005$) και INU2 ($p=0.003$).

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), η τιμή στον αρνητικό μάρτυρα παρέμεινε σημαντικά υψηλότερη από τις τιμές σε όλα σχεδόν τα υποστρώματα – INU1 ($p=0.002$), INU2 ($p=0.002$), POWS ($p=0.002$), POWSE ($p=0.006$), GLBSE ($p=0.002$) – με εξαίρεση το υπόστρωμα GLBS.

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της μοριακής αναλογίας των άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου, μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}), έδειξε ότι δεν υπήρχαν γενικά σημαντικές μεταβολές, με εξαίρεση το υπόστρωμα POWSE, όπου σημειώθηκε σημαντική μείωση με τα την 8ωρη ($p=0.026$) ζύμωση, καθώς και το υπόστρωμα GLBSE, στο οποίο υπήρξε σημαντική μείωση μετά την 8ωρη ($p=0.012$) και την 24ωρη ($p=0.01$) ζύμωση.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 22

Σύγκριση μοριακής αναλογίας (%) των άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των υγιών γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

1.5.4 Αποτελέσματα ανάλυσης ποσοτικού προσδιορισμού των επιμέρους SCFAs κατά τη διαδικασία ζύμωσης μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων στις εθελοντριών με παθολογική οστική μάζα

Πίνακας 3 Καταμέτρηση των συγκεντρώσεων (μmol/L) και της μοριακής αναλογίας (%) των SCFAs στις εθελόντριες με παθολογική οστική μάζα για τις χρονικές στιγμές t=0h , t=8 και t=24h.

	Baseline (t=0h)							8-h fermentation (t=8h)							24-h fermentation (t=24h)							p over all							
	NC	INU1	INU2	POWS	GLBS	POWSE	GLBSE	NC	INU1	INU2	POWS	GLBS	POWSE	GLBSE	NC	INU1	INU2	POWS	GLBS	POWSE	GLBSE								
SCFASs (μmol/ml)																													
Total VFAs	3,19 ±1.83	2,13 ±0,60	2,63 ±0,51	3,56 ±1,48	2,99 ±0,69	2,64 ±0,33	2,30 ±0,38	14,13 ±6,32	33,34 ±11,16	30,27 ±9,58	*	43,79 ±16,23	31,00 ±7,84	*	40,94 ±19,27	*	37,07 ±9,78	†,‡,a, b 24,96 ±3,25	*	45,71 ±13,12	*	41,85 ±12,87	*,†,‡ 77,79 ±12,74	*	47,89 ±3,19	*,‡ 59,24 ±1,82	*	44,44 ±6,33	
Acetate	1,14 ±0,54	0,78 ±0,1	0,8 ±0,05	1,15 ±0,34	0,88 ±0,05	0,87 ±0,04	0,78 ±0,01	†,‡ 6,64 ±3,39	*	18,02 ±4,6	18,63 ±2,44	*,a 22,59 ±3,7	a 13,79 ±3,47	*	18,6 ±9,58	*,a 19,28 ±2,07	†,‡,a, b 11,45 ±6,15	*	26,65 ±6,15	*	28,02 ±6,47	*,a 29,99 ±3,26	*,†,‡,a 19,17 ±1,24	*,a 22,28 ±2,43	*,a 22,04 ±4,14	**		.002	
Propionate	0,39 ±0,23	0,3 ±0,006	0,33 ±0,12	0,21 ±0,11	0,23 ±0,11	0,26 ±0,06	0,26 ±0,11	a 2,5 ±0,61	a 5,25 ±1,34	4,36 ±2,06	*,a 7,51 ±2,38	*,a 6,8 ±1,15	*,†,‡, a 9,72 ±3,17	*	7,49 ±2,86	†,a 4,35 ±0,98	*,a 7,53 ±1,17	6,1 ±2,19	*,†,‡,a, b 11,54 ±1,02	*,‡,a, b 9,57 ±0,44	*,†,‡, a 14,19 ±0,21	*,a 7,69 ±2,05	**			.001			
Butyrate	1,19 ±0,88	0,72 ±0,36	1,19 ±0,32	† 1,88 ±0,9	1,63 ±0,49	1,24 ±0,26	1,04 ±0,23	3,72 ±1,57	9,4 ±6,35	6,61 ±5,06	12,73 ±10,91	a 8,64 ±2,46	11,11 ±6,3	8,78 ±6,56	5,86 ±1,44	10,63 ±7,18	7,13 ±6,07	†,‡,,a, b 34,91 ±7,91	a, b 13,39 ±1,5	*,‡, a 19,41 ±1,76	b 11,16 ±7,46	**		.015					
BSCFAs	0,26 ±0,14	0,19 ±0,09	0,16 ±0,04	0,16 ±0,04	* 0,13 ±0,04	* 0,13 ±0,03	* 0,1 ±0,03	0,74 ±0,46	0,37 ±0,12	0,43 ±0,05	a 0,63 ±0,21	1,03 ±0,86	0,82 ±0,36	0,8 ±0,55	†,‡,a, b 2,4 ±0,38	*,a 0,6 ±0,17	*	0,39 ±0,22	*,a 0,82 ±0,28	†,‡,a, b 3,65 ±0,56	‡ 1,91 ±0,92	‡ 1,92 ±1,61	**		.010				
Other SCFAs	0,16 (0,12-0,26)	0,11 (0,1-0,16)	0,11 (0,11-0,18)	0,11 (0,1-0,19)	0,1 (0,1-0,13)	0,13 (0,11-0,15)	0,11 (0,1-0,14)	0,71 (0,44-0,71)	0,36 (0,26-0,38)	0,22 (0,19-0,28)	0,22 (0,19-0,42)	0,81 (0,51-1,01)	0,82 (0,51-0,94)	0,72 (0,46-0,98)	0,91 (0,57-1,21)	0,37 (0,25-0,38)	0,24 (0,17-0,26)	0,33 (0,3-0,66)	†,‡ 1,46 (1,45-2,45)	†,‡, a 1,4 (1,27-1,59)	0,98 (0,6-2,32)			.052					
Molar Ratio (%)																													
Acetate	38,91 ±8,19	38,43 ±4,49	31,31 ±7,03	33,38 ±3,76	30,35 ±5,65	33,42 ±3,65	34,56 ±5,09	‡ 45,51 ±5,31	55,3 ±5,83	63,75 ±10,42	54,09 ±10,8	‡, a 44,53 ±3,59	‡, a 44,53 ±5,04	54,25 ±13,33	‡ 45,85 ±2,32	59,6 ±10,55	*	68,29 ±11,48	†,‡ 38,81 ±2,54	†,‡ 40,03 ±0,71	†,‡, b 37,56 ±2,99	‡ 51,28 ±17,82	**		.015				
Propionate	12,56 ±0,97	14,44 ±3,23	12,25 ±2,37	*,†,‡ 5,86 ±1,25	*,†,‡ 7,55 ±2,04	† 9,76 ±2,01	10,9 ±2,64	19,44 ±6,01	17,12 ±7,67	14,06 ±2,73	17,78 ±5,74	a 22,23 ±1,71	‡ 25,54 ±8,07	20,08 ±4,23	17,87 ±6,01	17,04 ±3,32	14,74 ±3,95	a 14,96 ±1,15	a 20,02 ±1,11	*,†,‡, a 23,98 ±0,99	17,07 ±2,38			.078					
Butyrate	‡ 33,02 ±11,33	‡ 32,35 ±8,72	*,† 44,78 ±4,9	*,† 51,79 ±3,66	*,† 53,96 ±5,05	*,† 46,88 ±4,86	*,† 44,85 ±3,4	26,72 ±1,61	25,48 ±13,48	19,93 ±9,09	25,92 ±12,87	a 27,37 ±5,15	a 26,27 ±2,73	21,86 ±14,08	23,27 ±2,85	21,39 ±11,86	15,58 ±8,85	*,†,‡, a 44,55 ±3,2	a 27,95 ±2,29	‡, a 32,83 ±3,86	b 24,01 ±14,43			.062					

BSCFAs	8,62 ±2,37	8,46 ±2,89	6,09 ±6,14	[*] , [†] 4,81 ±1,18	[*] , [†] 4,28 ±0,83	[*] , [†] 4,86 ±1,0	[*] , [†] 4,51 ±1,35	[†] , [‡] 4,79 ±1,45	[*] 1,18 ±0,49	[*] , a 1,48 ±0,34	[*] 1,52 ±0,66	3,0 ±1,8	[*] , a 2,06 ±0,73	[*] , a 2,03 ±1,04	[†] , [‡] , b 9,57 ±0,47	[*] , a 1,33 ±0,29	[*] , a 0,89 ±0,22	[*] , a 1,03 ±0,21	[†] , [‡] , a 7,59 ±0,67	[*] 3,19 ±1,49	[*] , [†] , [‡] 4,21 ±3,17	** <.001
Other SCFAs	6,89 ±3,04	6,33 ±2,24	5,56 ±1,9	4,16 ±0,85	[*] 3,85 ±0,46	5,08 ±1,06	5,19 ±0,7	[†] , [‡] 3,53 ±0,87	[*] 0,91 ±0,17	[*] 0,78 ±0,08	[*] 0,7 ±0,26	[†] , [‡] 2,26 ±1,28	[*] 1,59 ±0,68	[*] 1,77 ±1,07	3,42 ±2,4	b 0,64 ±0,19	0,5 ±0,24	0,65 ±0,39	[†] , [‡] 4,41 ±2,34	b 2,44 ±0,5	3,43 ±3,69	** .036

*****: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με το NC ($p < 0,05$) κατά την έναρξη ($t = 0h$), μετά από ζύμωση 8 ωρών ($t = 8 \text{ ώρες}$) ή μετά από ζύμωση 24 ωρών ($t = 24 \text{ ώρες}$) (Repeated- Measures ANOVA μετά την προσαρμογή Bonferroni για πολλαπλότητα). **†**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με INU1 ($p < 0,05$) κατά την έναρξη ($t = 0h$), μετά από ζύμωση 8 ωρών ($t = 8h$) ή μετά από ζύμωση 24 ωρών ($t = 24 \text{ ώρες}$) (Repeated- Measures ANOVA μετά την προσαρμογή Bonferroni για πολλαπλότητα). **‡**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με INU2 ($p < 0,05$) κατά την έναρξη ($t = 0h$), μετά από ζύμωση 8 ωρών ($t = 8h$) ή μετά από ζύμωση 24 ωρών ($t = 24 \text{ ώρες}$) (Repeated- Measures ANOVA μετά την προσαρμογή Bonferroni για πολλαπλότητα). **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως [μέση τιμή ± τυπική απόκλιση] όταν ακολουθούν κανονική κατανομή και ως [διάμεσος ± ενδοτεταρτημοριακό εύρος] όταν δεν ακολουθούν κανονική κατανομή.

Αποτελέσματα ανάλυσης στο σύνολο των οστεοπενικών εθελοντριών για τις συγκεντρώσεις (μmol/mL) των SCFAs κατά τη διαδικασία ζύμωσης μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων.

Στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του υποστρώματος και του χρόνου επώασης στη συγκέντρωση Total_VFA ($F(12, 28)=4.147$, $p=.001$), δηλαδή η μέση συγκέντρωση Total_VFA μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με το υπόστρωμα.

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline) δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση Total_VFA μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων.

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), η συγκέντρωση Total_VFA στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη στα υποστρώματα POWS (43.79 ± 16.23 , $p=.01$), POWSE (40.94 ± 19.27 , $p=.018$) και GLBSE (37.07 ± 9.78 , $p<.038$), συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC (14.13 ± 6.32).

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), η συγκέντρωση Total_VFA στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη σε όλα τα υποστρώματα, INU1 (45.71 ± 13.12 , $p=.013$), INU2 (41.85 ± 12.87 , $p=.037$), POWS (77.79 ± 12.74 , $p<.001$), GLBS (47.89 ± 3.19 , $p=.007$), POWSE (59.24 ± 1.82 , $p<.001$) και GLBSE (44.44 ± 6.33 , $p=.019$), συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα NC (24.96 ± 3.25). Επιπλέον, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση Total_VFA στο υπόστρωμα POWS (77.79 ± 12.74) συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 (45.71 ± 13.12 , $p=.001$) και INU2 (41.85 ± 12.87 , $p<.001$), καθώς και στο υπόστρωμα POWSE (59.24 ± 1.82 , $p=.033$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU2 (41.85 ± 12.87).

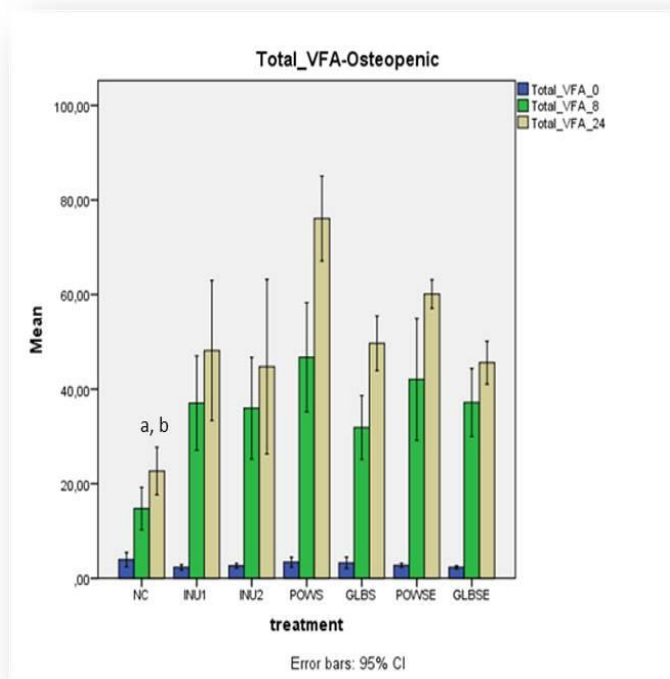
Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της συγκέντρωσης Total_VFA (Paired Sample T-test) μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης Total_VFA στον αρνητικό μάρτυρα NC μετά από 24ωρη ζύμωση (21.76 ± 2.21 , $p=0.01$) συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), καθώς και μεταξύ 24ωρης και 8ωρης ζύμωσης (10.82 ± 1.83 , $p=.027$). Στο υπόστρωμα INU1 επίσης

παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης Total_VFA μετά από 8ωρη ζύμωση (31.2 ± 6.59 , $p=0.042$) και 24ωρη ζύμωση (43.58 ± 7.65 , $p=.029$) συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), καθώς και μεταξύ 24ωρης και 8ωρης ζύμωσης (12.37 ± 1.68 , $p=.018$). Στατιστικά σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση Total_VFA, σημειώθηκε και στο υπόστρωμα INU2, μετά από 8ωρη (27.64 ± 5.68 , $p=.04$) και 24ωρη ζύμωση (39.22 ± 7.47 , $p=.034$), συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), ενώ δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ 24ώρης και 8ώρης ζύμωσης.

Στο υπόστρωμα POWS προέκυψε στατιστικά σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση Total_VFA μετά από 24ώρη ζύμωση (74.23 ± 7.31 , $p=.01$) συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), καθώς και μεταξύ 8ώρης και 24ώρης ζύμωσης (34.01 ± 5.75 , $p=.027$). Στο υπόστρωμα GLBS, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση μετά από 8ώρη (28.00 ± 4.75 , $p=.028$) και 24ωρη (44.90 ± 2.20 , $p=.002$) ζύμωση συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), καθώς και μεταξύ 8ώρης και 24ώρης ζύμωσης (16.89 ± 3.07 , $p=.032$).

Στο υπόστρωμα POWSE προέκυψε στατιστικά σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση Total_VFA μετά από 24ώρη ζύμωση (56.60 ± 1.19 , $p<.001$) συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), ενώ δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές μεταξύ 8ωρης ζύμωσης και του baseline ($t=0h$) καθώς και μεταξύ 24ωρης και 8ωρης ζύμωσης. Επιπλέον, η συγκέντρωση Total_VFA σημείωσε στατιστικά σημαντική αύξηση στο υπόστρωμα GLBSE μετά από 8ώρη (34.77 ± 5.86 , $p=.027$) και 24ωρη (42.13 ± 3.87 , $p=.008$) ζύμωση συγκριτικά με το baseline ($t=0h$), ενώ δε σημειώθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 23

Σύγκριση της συγκέντρωσης των Total_VFA ($\mu\text{mol/mL}$) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για τις οστεοπενικές γυναίκες. *a*: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon). *b*: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired-Samples T-Test ή Wilcoxon).

Επίσης, στο σύνολο των οστεοπενικών γυναικών, υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης στη συγκέντρωση του οξικού οξέος (C2), ($F(12,28)=3.577$, $p=0.003$), δηλαδή η μέση συγκέντρωση οξικού οξέος μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Επιπλέον, η κύρια επίδραση (main effect) του χειρισμού έδειξε ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση συγκέντρωση οξικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=6.490$, $p=0.002$).

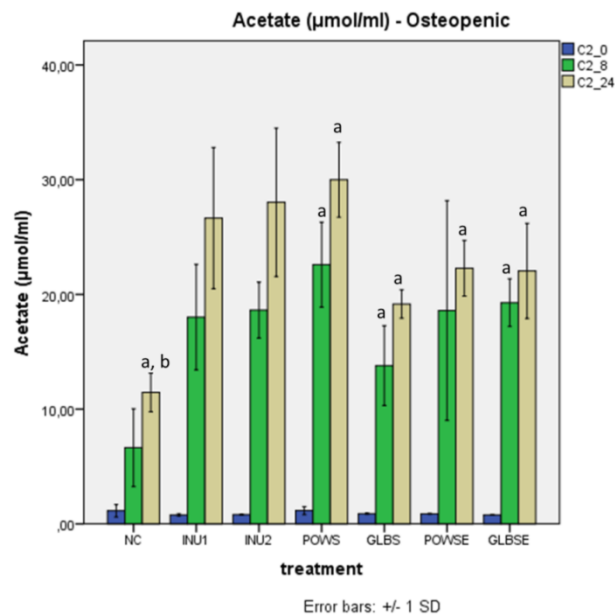
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις τιμές μεταξύ των χειρισμών και των υποστρωμάτων ινουλίνης, αλλά ούτε και με τον αρνητικό μάρτυρα.

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), προέκυψαν σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση του οξικού οξέος σε όλα τα υποστρώματα, με εξαίρεση το GLBS, ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα – INU1 ($p=0.011$), INU2 ($p=0.008$), POWS ($p=0.001$), POWSE ($p=0.008$), GLBSE ($p=0.006$). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές μεταξύ των χειρισμών και των υποστρωμάτων ινουλίνης.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), η συγκέντρωση του οξικού οξέος σε όλα τα υποστρώματα ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα - INU1 ($p<0.001$), INU2 ($p<0.001$), POWS ($p<0.001$), GLBS ($p=0.037$), POWSE ($p=0.006$), GLBSE ($p=0.007$)- ενώ παρατηρήθηκε σημαντικά χαμηλότερη τιμή στο υπόστρωμα GLBS συγκριτικά με τα INU1 ($p=0.042$) και INU2 ($p=0.019$).

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της συγκέντρωσης του οξικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι μετά από την 8ωρη ($t=8h$) ζύμωση υπήρξε σημαντική αύξηση στα υποστρώματα POWS ($p=0.011$), GLBS ($p=0.024$) και GLBSE ($p=0.004$), ενώ σημαντική αύξηση σημειώθηκε επίσης μετά από 24ώρη ζύμωση σε όλους τους χειρισμούς, εκτός από τα υποστρώματα ινουλίνης – NC ($p=0.012$), POWS ($p=0.004$), GLBS ($p=0.002$), POWSE ($p=0.004$), GLBSE ($p=0.012$). Στον αρνητικό μάρτυρα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση ($p=0.04$) και μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 24 Σύγκριση της συγκέντρωσης οξικού οξέος (C2) ($\mu\text{mol/mL}$) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24\text{h}$, στην ομάδα οστεοπενικών γυναικών. a: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0\text{h}$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). b: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση προέκυψε, στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, και ως προς τη συγκέντρωση του προπιονικού οξέος (C3), μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης, ($F(12,28)=5.704$, $p<0.001$), δηλαδή η μέση συγκέντρωση προπιονικού οξέος μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Επίσης, προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση συγκέντρωση προπιονικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=10.631$, $p<0.001$).

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στις τιμές μεταξύ των χειρισμών και των υποστρωμάτων ινουλίνης, αλλά ούτε και με τον αρνητικό μάρτυρα.

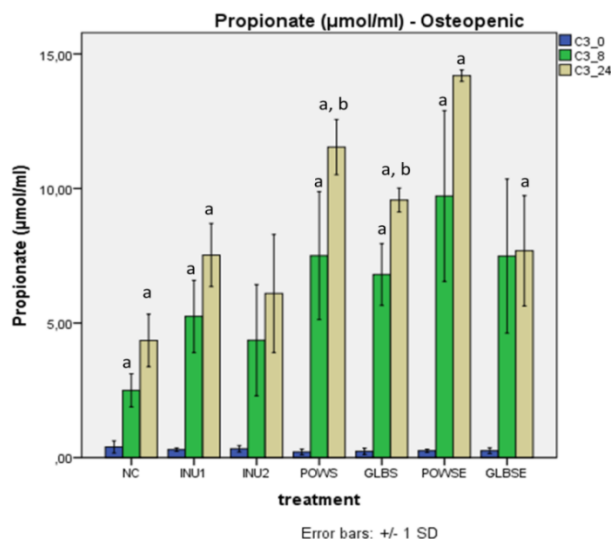
Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8\text{h}$), παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές στα υποστρώματα POWS ($p=0.012$), GLBS ($p=0.027$), POWSE ($p=0.001$) και GLBSE ($p=0.012$) συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ στο υπόστρωμα POWSE η συγκέντρωση του

προπιονικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τα INU1 ($p=0.022$) και INU2 ($p=0.008$).

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), σημαντικά υψηλότερες παρέμειναν οι τιμές στα υποστρώματα INU1 ($p=0.12$), POWS ($p<0.001$), GLBS ($p<0.001$), POWSE ($p<0.001$) και GLBSE ($p=0.009$), συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα. Επίσης, σε σχέση με το υπόστρωμα INU1, οι τιμές ήταν σημαντικά υψηλότερες στα υποστρώματα POWS ($p=0.003$) και POWSE ($p<0.001$). Επιπλέον, παρατηρήθηκαν σημαντικά υψηλότερες τιμές στα υποστρώματα POWS ($p=0.003$), GLBS ($p=0.007$) και POWSE ($p<0.001$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU2.

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της συγκέντρωσης του προπιονικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}) έδειξε ότι μετά την 8ωρη ζύμωση υπήρξε σημαντική αύξηση των τιμών στα υποστρώματα INU1 ($p=0.023$), POWS ($p=0.034$), GLBS ($p=0.012$), POWSE ($p=0.036$) και τον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.029$). Σημαντική αύξηση σημειώθηκε και μετά την 24ωρη ζύμωση στα υποστρώματα INU1 ($p=0.01$), POWS ($p=0.003$), GLBS ($p=0.001$), POWSE ($p<0.001$), GLBSE ($p=0.027$) και τον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.014$). Μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης υπήρξε σημαντική αύξηση στα υποστρώματα POWS ($p=0.036$) και GLBS ($p=0.026$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 25

Σύγκριση της συγκέντρωσης του προπιονικού οξέος (C3) ($\mu\text{mol/mL}$) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24\text{h}$, στην ομάδα οστεοπενικών γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0\text{h}$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Επιπλέον, στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση, ως προς τη συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος (C4), μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης, ($F(12,28)=5.405$, $p<0.001$), δηλαδή η μέση συγκέντρωση βουτυρικού οξέος μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Επίσης, προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση συγκέντρωση βουτυρικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=4.035$, $p=0.015$).

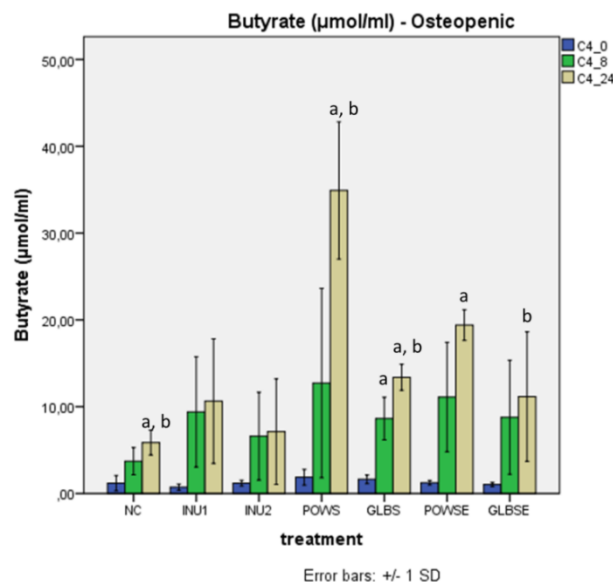
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), δεν υπήρχαν γενικά σημαντικές διαφορές στις τιμές μεταξύ των χειρισμών και των υποστρωμάτων ινουλίνης, αλλά ούτε και με τον αρνητικό μάρτυρα, με εξαίρεση το υπόστρωμα POWS, όπου η μέση συγκέντρωση βουτυρικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη ($p=0.024$) συγκριτικά με το υπόστρωμα INU1.

Μετά την 8ωρη ζύμωση δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές στις τιμές των υποστρωμάτων, σε σύγκριση με τα υποστρώματα ινουλίνης και τον αρνητικό μάρτυρα.

Μετά την 24ωρη ζύμωση, η μέση συγκέντρωση του βουτυρικού οξέος στο υπόστρωμα POWSE ήταν σημαντικά υψηλότερη ($p=0.01$) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ στο υπόστρωμα POWS ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τα υποστρώματα ινουλίνης, INU1 ($p<0.001$) και INU2 ($p<0.001$). Επιπλέον, στο υπόστρωμα POWSE υπήρξε σημαντικά υψηλότερη συγκέντρωση ($p=0.017$) σε σύγκριση με το υπόστρωμα INU2.

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της συγκέντρωσης του βουτυρικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0 - t_8 , t_0 - t_{24} , t_8 - t_{24}) έδειξε ότι μετά την 8ωρη ζύμωση υπήρξε σημαντική αύξηση των τιμών στο υπόστρωμα GLBS ($p=0.037$) καθώς και σημαντική αύξηση στα υποστρώματα POWS ($p=0.018$), GLBS ($p=0.006$) και POWSE ($p=0.002$) μετά την 24ωρη ζύμωση. Μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης, σημειώθηκε σημαντική αύξηση των τιμών στον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.017$) καθώς και στα υποστρώματα POWS ($p=0.038$), GLBS ($p=0.017$) και GLBSE ($p=0.045$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 26

*Σύγκριση της συγκέντρωσης του βουτυρικού οξέος (C4) ($\mu\text{mol/mL}$) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24\text{h}$, στην ομάδα οστεοπενικών γυναικών. **a:** σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0\text{h}$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b:** σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).*

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων, στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, έδειξαν ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης, ($F(8.735, 20.381)=6.314$, $p<0.001$), ως προς τη συγκέντρωση των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου (b-SCFAs), δηλαδή η μέση συγκέντρωση μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Επίσης, προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση συγκέντρωση των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=4.486$, $p=0.01$).

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), η μέση συγκέντρωση ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα σε σχέση με υπόστρωμα GLBSE ($p=0.021$), ενώ δεν παρατηρήθηκαν άλλες σημαντικές διαφορές.

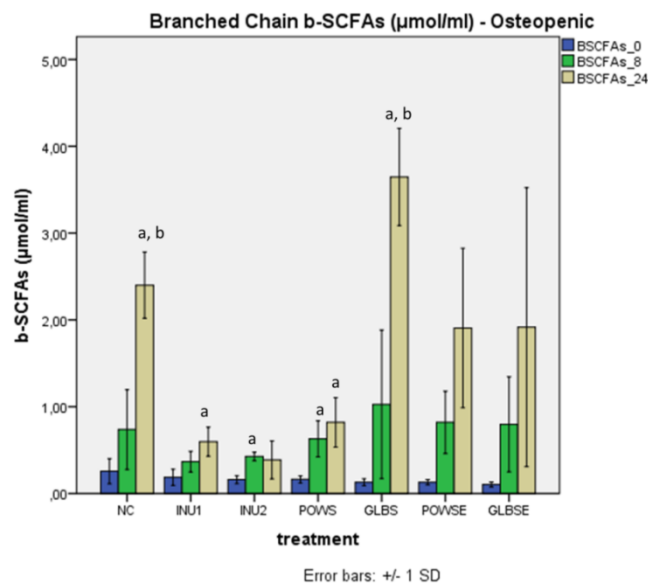
Μετά την 8ωρη ζύμωση δεν προέκυψαν καθόλου σημαντικές διαφορές στις τιμές στους διάφορους χειρισμούς συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα και τα υποστρώματα ινουλίνης.

Μετά την 24ωρη ζύμωση η μέση συγκέντρωση των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα σε σχέση με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.011$), INU2 ($p=0.006$) και POWS ($p=0.023$). Επίσης, στο υπόστρωμα GLBS η συγκέντρωση ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p<0.001$) και INU2 ($p<0.001$), ενώ σημαντικά υψηλότερες τιμές προέκυψαν και στα υποστρώματα GLBSE ($p=0.027$) και POWSE ($p=0.028$) σε σχέση με το υπόστρωμα INU2.

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}), στην

ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, έδειξε ότι μετά την 8ωρη ζύμωση υπήρξε σημαντική αύξηση στα υποστρώματα INU2 ($p=0.039$) και POWS ($p=0.042$), καθώς και σημαντική αύξηση, μετά από 24ωρη ζύμωση, στα υποστρώματα INU1 ($p=0.03$), POWS ($p=0.047$), GLBS ($p=0.01$) και τον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.018$). Μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης, σημειώθηκε σημαντική αύξηση στον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.001$) και το υπόστρωμα GLBS ($p=0.009$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 27

Σύγκριση της συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου (b-SCFAs) ($\mu\text{mol/mL}$) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, στην ομάδα οστεοπενικών γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

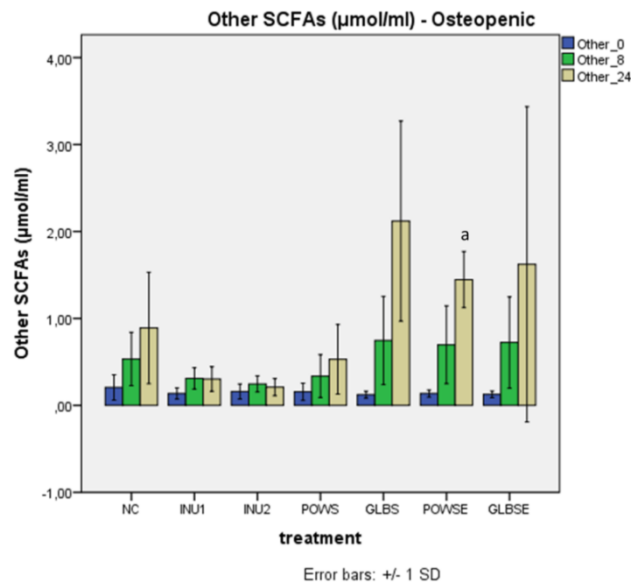
Στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(6.841, 15.962)=0.552$, $p=0.780$), ως προς τη συγκέντρωση των άλλων λιπαρών οξέων βραχέος αλύσου (o-SCFAs), αλλά ούτε και στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=2.806$, $p=0.052$).

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), καθώς και μετά την 8ωρη ζύμωση, δεν παρατηρήθηκαν καθόλου σημαντικές διαφορές ως προς τη συγκέντρωση των άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλυσού στους διάφορους χειρισμούς, συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα και τα υποστρώματα ινουλίνης.

Μετά την 24ωρη ζύμωση (t=24h), παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση μεταξύ των υποστρωμάτων GLBS και POWSE και του υποστρώματος INU1, με τις τιμές να είναι σημαντικά υψηλότερες στα GLBS (p=0.022) και POWSE (p=0.047). Επιπλέον στα ίδια υποστρώματα (GLBS και POWSE) οι τιμές ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με τη συγκέντρωση στο υπόστρωμα INU2 (p=0.006 και p=0.012 αντίστοιχα).

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της συγκέντρωσης άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλυσού μεταξύ των χρόνων επώασης (t0-t8, t0-t24, t8-t24), στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, δεν έδειξε σημαντικές διαφορές, με εξαίρεση το υπόστρωμα POWSE, όπου σημειώθηκε σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση μετά από 24ωρη ζύμωση.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 28

*Σύγκριση της συγκέντρωσης των άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (o-SCFAs) ($\mu\text{mol/mL}$) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24\text{h}$, στην ομάδα οστεοπενικών γυναικών. **a:** σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0\text{h}$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b:** σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).*

Αποτελέσματα ανάλυσης στο σύνολο των οστεοπενικών εθελοντριών για τις μοριακές αναλογίες (%) των επιμέρους SCFAs κατά τη διαδικασία ζύμωσης μεταξύ διαφορετικών υποστρωμάτων.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των δεδομένων, στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, έδειξαν ότι υπήρξε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης, ως προς τη μοριακή αναλογία (%) του οξικού οξέος (Molar_C2) ($F(12,28)=1.898$, $p=0.08$), ωστόσο δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση μοριακή αναλογία (%) του οξικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=2.454$, $p=0.078$).

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις τιμές της μέσης μοριακής αναλογίας του οξικού οξέος στους διάφορους χειρισμούς συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα και τα υποστρώματα ινουλίνης.

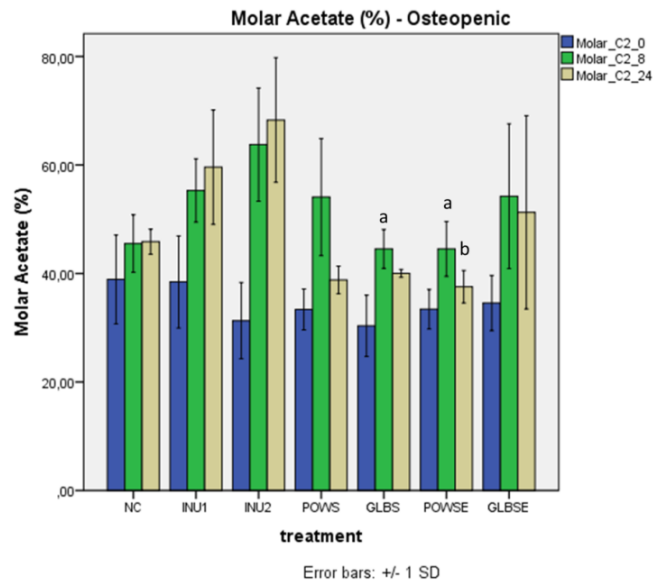
Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8\text{h}$), η μέση μοριακή αναλογία του οξικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη στο υπόστρωμα INU2 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.02$) και με τα υποστρώματα GLBS ($p=0.015$) και POWSE ($p=0.015$). Δεν παρατηρήθηκαν άλλες σημαντικές διαφορές.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24\text{h}$), η μέση μοριακή αναλογία του οξικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη στο υπόστρωμα INU2 συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.09$) και με τα υποστρώματα POWS ($p=0.001$), GLBS ($p=0.002$), POWSE ($p=0.001$) και GLBSE ($p=0.038$). Σημαντικά υψηλότερη ήταν η μέση μοριακή αναλογία του οξικού οξέος και στο υπόστρωμα INU1 σε σχέση με τα υποστρώματα POWS ($p=0.014$), GLBS ($p=0.02$) και POWSE ($p=0.01$).

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της μέσης μοριακής αναλογίας του οξικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}), στην ομάδα των οστεοπενικών

γυναικών, έδειξε ότι υπήρξε σημαντική αύξηση των τιμών στα υποστρώματα GLBS ($p=0.01$) και POWSE ($p=0.006$) μετά την 8ωρη ζύμωση, ενώ σημειώθηκε σημαντική μείωση της τιμής στο υπόστρωμα POWSE ($p=0.044$) μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 29

Σύγκριση μοριακής αναλογίας (%) του οξικού οξέος στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των οστεοπενικών γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Επιπλέον, στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση, ως προς τη μέση μοριακή αναλογία (%) του προπιονικού οξέος (Molar C3), μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης, ($F(12,28)=1.898$, $p=0.08$), δηλαδή η μέση τιμή της μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Ωστόσο, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση μοριακή αναλογία του προπιονικού οξέος μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=2.454$, $p=0.078$).

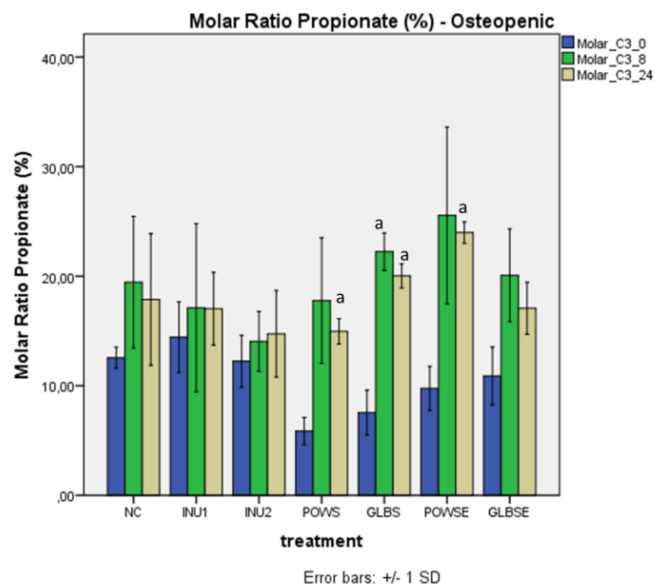
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), η μέση μοριακή αναλογία του προπιονικού οξέος στον αρνητικό μάρτυρα σε σχέση με τα υποστρώματα POWS ($p=0.002$) και GLBS ($p=0.014$). Στο υπόστρωμα POWS η τιμή ήταν σημαντικά χαμηλότερη συγκριτικά με τις τιμές στα υποστρώματα ινουλίνης, INU1 ($p<0.001$) και INU2 ($p=0.003$). Επίσης, σημαντικά χαμηλότερη ήταν η τιμή στο υπόστρωμα GLBS σε σχέση με τις τιμές στα υποστρώματα INU1 ($p=0.002$) και INU2 ($p=0.02$), ενώ σημαντικά χαμηλότερη τιμή παρατηρήθηκε και στο υπόστρωμα POWSE συγκριτικά με το INU1 ($p=0.021$).

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$) δεν παρατηρήθηκαν γενικά σημαντικές διαφορές, με εξαίρεση το υπόστρωμα POWSE όπου η μέση μοριακή αναλογία του προπιονικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη ($p=0.025$) σε σχέση με την τιμή στο υπόστρωμα INU2.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$) επίσης δεν παρατηρήθηκαν γενικά σημαντικές διαφορές, με εξαίρεση πάλι το υπόστρωμα POWSE, όπου η μέση μοριακή αναλογία του προπιονικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τις τιμές στον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.035$) και τα υποστρώματα ινουλίνης, INU1 ($p=0.019$) και INU2 ($p=0.003$).

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της μέσης μοριακής αναλογίας του προπιονικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}), στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, έδειξε ότι υπήρξε σημαντική αύξηση στο υπόστρωμα POWS ($p=0.001$) μετά από 24ωρη ζύμωση, σημαντική αύξηση στο υπόστρωμα GLBS μετά από 8ωρη ($p=0.002$) και 24ωρη ($p=0.005$) ζύμωση, καθώς και σημαντική αύξηση στο υπόστρωμα POWSE ($p=0.003$) μετά από 24ωρη ζύμωση.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 30

Σύγκριση μοριακής αναλογίας (%) του προπιονικού οξέος στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των οστεοπενικών γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(7.885, 18.339)=2.223$, $p=0.075$), ως προς τη μέση μοριακή αναλογία (%) του βουτυρικού οξέος, αλλά ούτε και στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=2.658$, $p=0.062$).

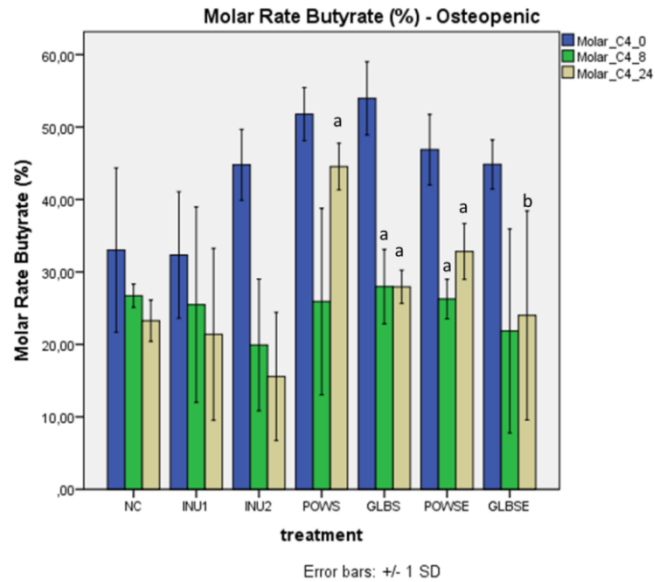
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline), η μέση μοριακή αναλογία του βουτυρικού οξέος ήταν σημαντικά χαμηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα σε σχέση με τα υποστρώματα INU2 ($p=0.046$), POWS ($p=0.004$), GLBS ($p=0.002$), POWSE ($p=0.022$) και GLBSE ($p=0.045$). Επίσης, οι τιμές ήταν σημαντικά υψηλότερες στα υποστρώματα INU2 ($p=0.036$), POWS ($p=0.003$), GLBS ($p=0.001$), POWSE ($p=0.017$) και GLBSE ($p=0.035$) συγκριτικά με την τιμή στο υπόστρωμα INU1.

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$) δεν παρατηρήθηκαν καθόλου σημαντικές διαφορές στη μέση μοριακή αναλογία του βουτυρικού οξέος στους διάφορους χειρισμούς συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα και τα υποστρώματα ινουλίνης.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$) η μέση μοριακή αναλογία του βουτυρικού οξέος ήταν σημαντικά υψηλότερη στο υπόστρωμα POWS σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.006$) και τα υποστρώματα INU1 ($p=0.004$) και INU2 ($p=0.001$). Επίσης, στο υπόστρωμα POWSE η τιμή ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με την τιμή στο υπόστρωμα INU2 ($p=0.021$).

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της μέσης μοριακής αναλογίας του βουτυρικού οξέος μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}), στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, έδειξε ότι υπήρξε σημαντική μείωση της μέσης μοριακής αναλογίας του βουτυρικού οξέος στο υπόστρωμα POWS ($p=0.023$) μετά την 24ωρη ζύμωση, καθώς και σημαντική μείωση στο υπόστρωμα GLBS μετά την 8ωρη ($p=0.003$) και 24ωρη ($p=0.004$) ζύμωση. Σημαντική μείωση παρατηρήθηκε και στο υπόστρωμα POWSE μετά από 8ωρη ($p=0.017$) και 24ωρη ($p=0.028$) ζύμωση, ενώ στο υπόστρωμα GLBSE υπήρξε σημαντική αύξηση ($p=0.023$) μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης.

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 31

Σύγκριση μοριακής αναλογίας (%) του βουτυρικού οξέος στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, για το σύνολο των οστεοπενικών γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Από την ανάλυση των δεδομένων, στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης, ($F(8.441, 19.695)=7.041$, $p<0.001$), ως προς τη μοριακή αναλογία (%) των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου (b-SCFAs), δηλαδή η μέση μοριακή αναλογία μεταβάλλεται διαφορετικά με την πάροδο του χρόνου επώασης ανάλογα με τον χειρισμό. Επίσης, προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στη μέση μοριακή αναλογία των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=10.830$, $p<0.001$).

Τη χρονική στιγμή 0 (baseline) η μέση μοριακή αναλογία των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα σε σχέση με τις τιμές στα υποστρώματα POWS ($p=0.014$), GLBS ($p=0.006$), POWSE ($p=0.015$), GLBSE ($p=0.009$). Επιπλέον προέκυψε σημαντικά υψηλότερη μέση μοριακή αναλογία

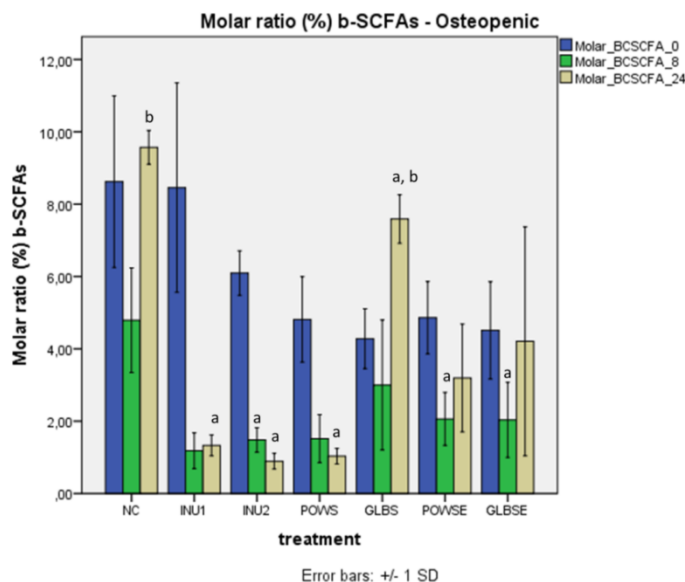
στο υπόστρωμα INU1 συγκριτικά με τα υποστρώματα POWS ($p=0.018$), GLBS ($p=0.008$), POWSE ($p=0.019$) και GLBSE ($p=0.011$).

Μετά την 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), η μέση τιμή στον αρνητικό μάρτυρα μειώθηκε, ωστόσο παρέμεινε σημαντικά υψηλότερη από τις τιμές σε όλα τα υποστρώματα - INU1 ($p=0.001$), INU2 ($p=0.002$), POWS ($p=0.002$), POWSE ($p=0.007$)- με εξαίρεση το υπόστρωμα GLBS.

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t=24h$), η μέση μοριακή αναλογία των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου στον αρνητικό μάρτυρα σημείωσε αύξηση και με εξαίρεση το υπόστρωμα GLBS, παρέμεινε σημαντικά υψηλότερη από τις τιμές σε όλα τα υποστρώματα, INU1 ($p<0.001$), INU2 ($p<0.001$), POWS ($p<0.001$), POWSE ($p<0.001$), GLBSE ($p<0.001$). Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη τιμή στο υπόστρωμα GLBS σε σχέση με την τιμή στα υποστρώματα ινουλίνης, INU1 ($p<0.001$) και INU2 ($p<0.001$), καθώς και σημαντικά υψηλότερη τιμή στο υπόστρωμα GLBSE συγκριτικά με τα υποστρώματα INU1 ($p=0.022$) και INU2 ($p=0.01$).

Η ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της μέσης μοριακής αναλογίας των λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0-t_8 , t_0-t_{24} , t_8-t_{24}), στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, έδειξε ότι υπήρξε σημαντική μείωση στα υποστρώματα INU2 ($p=0.013$), POWSE ($p=0.021$) και GLBSE ($p=0.02$) μετά από 8ωρη ζύμωση, σημαντική μείωση στα υποστρώματα INU1 ($p=0.045$), INU2 ($p=0.004$) και POWS ($p=0.028$) μετά από 24ωρη ζύμωση, ενώ σημειώθηκε σημαντική αύξηση στο υπόστρωμα GLBS ($p=0.047$) μετά από 24ωρη ζύμωση. Μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης, υπήρξε σημαντική αύξηση στον αρνητικό μάρτυρα ($p=0.019$) και στο υπόστρωμα GLBS ($p=0.022$).

Ακολουθεί το σχετικό διάγραμμα.



Διάγραμμα 32

Σύγκριση μοριακής αναλογίας λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλύσου (b-SCFAs) στους χρόνους $t=0$, $t=8$ και $t=24h$, στην ομάδα οστεοπενικών γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t=0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

Στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του χειρισμού (treatment) και του χρόνου επώασης ($F(8.210, 19.157)=1.451$, $p=0.238$), ως προς τη μέση μοριακή αναλογία (%) των άλλων λιπαρών οξέων (o-SCFAs) βραχέος αλύσου, ωστόσο προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές μεταξύ των διαφορετικών χειρισμών ($F(6,14)=3.163$, $p=0.036$).

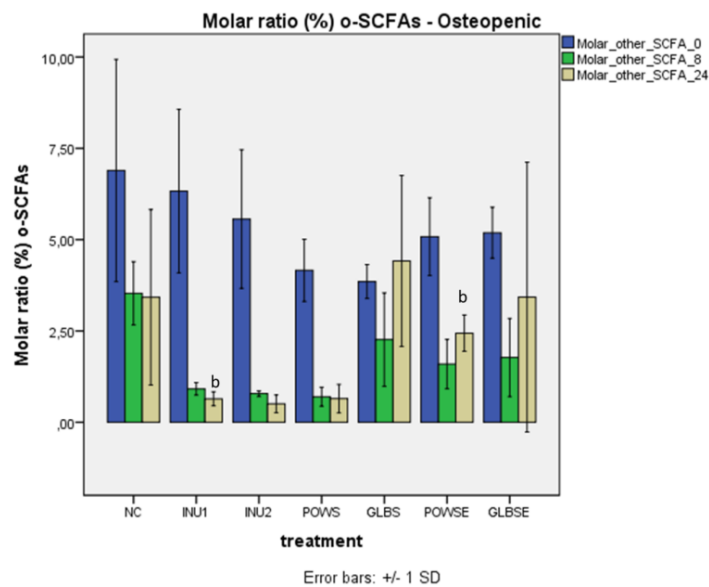
Τη χρονική στιγμή 0 (baseline) παρατηρήθηκε σημαντικά υψηλότερη τιμή στον αρνητικό μάρτυρα από την τιμή στο υπόστρωμα GLBS ($p=0.047$), χωρίς να προκύπτουν άλλες σημαντικές διαφορές σε σχέση με τα υποστρώματα ινουλίνης.

Μετά από 8ωρη ζύμωση ($t=8h$), η μέση μοριακή αναλογία των άλλων λιπαρών οξέων (o-SCFAs) βραχέος αλύσου ήταν σημαντικά υψηλότερη στον αρνητικό μάρτυρα συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποστρώματα – INU1 ($p=0.001$), INU2 ($p=0.001$), POWS

($p < 0.001$), POWSE ($p = 0.008$) και GLBSE ($p = 0.014$) – με εξαίρεση το υπόστρωμα GLBS. Στο υπόστρωμα GLBS η μέση τιμή ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τις τιμές στα υποστρώματα ινουλίνης, INU1 ($p = 0.048$) και INU2 ($p = 0.033$).

Μετά την 24ωρη ζύμωση ($t = 24h$), δεν προέκυψαν σημαντικές διαφορές στις τιμές των υποστρωμάτων σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, ενώ στο υπόστρωμα GLBS η μέση τιμή αυξήθηκε και παρέμεινε σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τις τιμές στα υποστρώματα ινουλίνης, INU1 ($p = 0.029$) και INU2 ($p = 0.025$).

Από την ανά ζεύγη σύγκριση των τιμών της μέσης μοριακής αναλογίας των άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου μεταξύ των χρόνων επώασης (t_0 - t_8 , t_0 - t_{24} , t_8 - t_{24}), στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών, δεν προέκυψαν γενικά σημαντικές διαφορές, με εξαίρεση το υπόστρωμα INU1, όπου σημειώθηκε σημαντική μείωση ($p = 0.044$) μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης, και το υπόστρωμα POWSE, όπου σημειώθηκε σημαντική αύξηση μεταξύ 8ωρης και 24ωρης ζύμωσης ($p = 0.036$).



Διάγραμμα 33

Σύγκριση μοριακής αναλογίας άλλων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (o-SCFAs) στους χρόνους $t = 0$, $t = 8$ και $t = 24h$, στην ομάδα οστεοπενικών γυναικών. **a**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με την αρχική τιμή $t = 0h$ (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon). **b**: σημαντικά διαφορετικό σε σύγκριση με τη ζύμωση 8 ωρών (Paired- Samples T-Test ή Wilcoxon).

1.6 Συζήτηση

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει ένα αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από την δράση των πρεβιοτικών στη συνολική υγεία του ξενιστή (Phan, et al. 2018). Τα μανιτάρια περιέχουν πληθώρα βιοδραστικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των πολυσακχαριτών, που αποτελούνται από γλυκόζη, μαννόζη, γαλακτόζη, φουκόζη, αραβινόζη, γλυκουρονικό οξύ και β-γλυκάνες, οι οποίες φαίνεται να έχουν ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία (Wang, Q et al. 2017; Azmi, et al. 2009). Κατά την αναερόβια εντερική ζύμωση, ακολουθεί μία ποικιλία αντιδράσεων και μεταβολικών διεργασιών που επιτρέπουν τη διάσπαση της οργανικής ύλης και συγχρόνως παράγεται ενέργεια για την εντερική μικροβιακή ανάπτυξη και συντήρηση, αλλά και τελικά μεταβολικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται από τον ξενιστή (Macfarlane GT, et al. 1995). Συγκεκριμένα, η ζύμωση των πρεβιοτικών από εντερικές μικροβιακές κοινότητες έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs) (Besten, et al. 2013). Το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό όξύ είναι τα πιο άφθονα ($\geq 95\%$) SCFAs στο ανθρώπινο κόλον. Αυτοί οι μικροβιακοί μεταβολίτες έχουν συσχετιστεί με πολλές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή, όπως τη μείωση του εντερικού pH δημιουργώντας έτσι δυσμενείς συνθήκες για την ανάπτυξη των παθογόνων μικροβίων, την αύξηση της απορρόφησης των μετάλλων, τη ρύθμιση της εντερικής κινητικότητας και την ενίσχυση του εντερικού επιθηλιακού φραγμού (Takagi et al. 2016).

Παρόλο που έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετά μοντέλα *in vitro* για να διερευνηθούν το ρόλο των διαιτητικών ινών στο εντερικό μικροβιόκοσμο, υπάρχουν λίγες μελέτες που αξιολογούν τις επιδράσεις των βρώσιμων μανιταριών (λυοφιλοποιημένη σκόνη από ολόκληρο το μανιτάρι και εκχύλισμα γλυκανών) στη σύνθεση των εντερικών μικροβίων και στην παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs) (Zhao, et al. 2018; Yu, et al. 2013; Poeker, 2018; Mitsou, et al. 2020). Ωστόσο, είναι γνωστό ότι οι διαφορές στη χημική σύσταση και δομή των πρεβιοτικών, επηρεάζουν τη χρήση τους από το εντερικό μικροβιόκοσμο, τη διαμόρφωση της σύστασης του και, κατά συνέπεια, την παραγωγή

SCFAs (Fehlbaum, et al. 2018). Επιπλέον, φαίνεται ότι με τη σειρά της, η συγκέντρωση και η αναλογία SCFA μεταβάλλει την υγεία των οστών (Weaver CM, et al. 2011; Weaver CM., 2015).

Πρόσφατες μελέτες ανέφεραν τη σχέση μεταξύ του εντερικού μικροβιόκοσμου και της οστεοπόρωσης. Πειράματα σε ζώα, έδειξαν ότι η απώλεια οστού στο μοντέλο μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης, σχετίζεται με την σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου (Li et al., 2016). Συγκεκριμένα, η εξάντληση των οιστρογόνων κατά την εμμηνόπαυση, έχει συσχετιστεί με μειωμένη μικροβιακή ποικιλομορφία (Fuhrman BJ, et al. 2014), ενώ φαίνεται να βελτιώνεται παροδικά η εντερική βιοποικιλότητα με τη χορήγηση πρεβιοτικών (Preidis GA, et al. 2012). Η σχέση αυτή δείχνει να είναι αμφίδρομη, καθώς η μικροβιακή ποικιλία του εντερικού μικροβιόκοσμου, επηρεάζει τα επίπεδα των φυλετικών ορμονών (Adlercreutz et al. 1984; Plottel and Blaser, 2011; Flores et al. 2012). Οι επιδράσεις, λοιπόν, του εντερικού μικροβιόκοσμου στον μεταβολισμό των οστών παρέχουν έναν υποσχόμενο στόχο για την πρόληψη της μετεμμηνοπαυσιακής οστεοπόρωσης (Li et al., 2016).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, σκοπός ήταν η *in vitro* ζύμωση των μανιταριών *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* και των πλούσιων σε β-γλυκάνες εκχυλισμάτων τους από τον εντερικό μικροβιόκοσμο οστεοπενικών και μη οστεοπενικών γυναικών, ώστε να αξιολογηθεί αναλυτικά η παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου ανάλογα με την οστική υγεία και το εντερικό μικροβίωμα των εθελοντριών.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα, όλα τα μυκητιακά υποστρώματα, σημείωσαν σημαντική αύξηση στη συγκέντρωση των ολικών λιπαρών οξέων (VFAs) σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα αλλά και σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης και στις δύο χρονικές στιγμές (8, 24h), για το σύνολο των εθελοντριών. Το μυκητιακό υπόστρωμα του μανιταριού *Pleurotus ostreatus* (POWS) καθώς και το εκχύλισμά του (POWSE), παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις συνολικών πτητικών λιπαρών οξέων (total VFAs) στο σύνολο των εθελοντριών σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα τόσο κατά την 8ωρη ζύμωση όσο και κατά την 24ωρη ζύμωση. Αντίστοιχα, το ίδιο μυκητιακό

υπόστρωμα *Pleurotus ostreatus*, ανέδειξε παρόμοια αποτελέσματα σε πρόσφατη μελέτη (Zhao, et al. 2018), όπου η *in vitro* ζύμωση του ίδιου υποστρώματος (P.Osteartus) προώθησε την ανάπτυξη του *Bifidobacterium* spp. και την υψηλότερη παραγωγή συνολικών SCFAs, οξικού, προπιονικού και βουτυρικού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και την αρχική τιμή επώασης. Στην ομάδα των υγιών γυναικών η συγκέντρωση των VFAs αυξήθηκε σημαντικά σε όλα τα μυκητιακά υποστρώματα τόσο σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, όσο και με την έναρξη της ζύμωσης στις 8 και στις 24 ώρες, εκτός από το υπόστρωμα GLBSE όπου η αύξηση ήταν σημαντική μόνο σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και στις δύο χρονικές στιγμές. Η εικόνα ήταν ελαφρά διαφορετική όσο αφορά τη συγκέντρωση των VFAs στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών. Η αύξηση που σημειώθηκε στη συγκέντρωση των VFAs στα μυκητιακά υποστρώματα ήταν σημαντική μόνο σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, εκτός από το GLBS στις 8 ώρες ζύμωσης. Όμως αξίζει να σημειωθεί ότι στις οστεοπενικές γυναίκες σημειώθηκε στο υπόστρωμα POWS κατά την 24ωρη επώαση υψηλότερη συγκέντρωση VFAs σε σχέση με την ομάδα της οστικής υγείας. Ένα εύρημα που υποστηρίζει ότι η βιοποικιλότητα των βακτηριακών στελεχών φαίνεται να μεταβάλλεται σημαντικά σε εθελοντές με οστεοπόρωση και οστεοπενία, συγκριτικά με τους εθελοντές με φυσιολογική οστική πυκνότητα (Wang et al., 2017). Το POWS, που έχει σχετιστεί με την αύξηση των επιπέδων των βακτηρίων *Bifidobacterium* spp. και *F. prausnitzii* (Zhang et al. 2018), ως υπόστρωμα απέδωσε μετά τη ζύμωσή του στις 24 ώρες υψηλότερη συγκέντρωση VFAs, όχι μόνο σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα αλλά και με τους δύο θετικούς (INU1, INU2), φαινόμενο που παρατηρήθηκε στο σύνολο των γυναικών αλλά και στις επιμέρους ομάδες οστικής υγείας.

Όσο αφορά στην παραγωγή οξικού οξέος, τόσο στο σύνολο των γυναικών όσο και στις γυναίκες με οστεοπενία, παρατηρήθηκε αύξηση της συγκέντρωσης σε όλα τα μυκητιακά υποστρώματα στις 24 ώρες, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και με την αρχική συγκέντρωση έναρξης της ζύμωσης. Το οξικό οξύ, φαίνεται να παράγεται από διάφορες βακτηριακές ομάδες, ενώ η παραγωγή του προπιονικού και του βουτυρικού

οξέος τήνει να έχει μεγαλύτερη σχέση με το είδος του υποστρώματος (Morrison, D. et al. 2016). Επίσης, μεταφέρεται από το έντερο από τη πυλαία φλέβα στο ήπαρ, όπου συμμετέχει στη *de novo* λιπογένεση και μπορεί να μεταβολιστεί σε απομακρυσμένους μύες, στο νεφρό, στην καρδιά και στον εγκέφαλο (Rowland, et al. 2017). Τα bifidobacteria, θεωρούνται ως μία από τους σημαντικότερους παραγωγούς οξικού οξέος και μέσω της αλληλεπίδρασης με άλλες βακτηριακές ομάδες του εντέρου, συμβάλλει αποτελεσματικά στην παραγωγή προπιονικού και βουτυρικού (Poeker, et al. 2018).

Στην ομάδα των υγιών γυναικών η συγκέντρωση του οξικού στις 24 ώρες είναι αντίστοιχα σημαντικά αυξημένη σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης σε όλα τα μυκητιακά υποστρώματα, ενώ σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα μόνο στα POWS, POWSE. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην ομάδα των γυναικών με οστεοπενία τα υποστρώματα POWS και GLBSE σημείωσαν υψηλότερη παραγωγή οξικού οξέος σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και την αρχική τιμή επώασης, αλλά και συγκριτικά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων στην ομάδα των γυναικών με φυσιολογική οστική πυκνότητα. Εδώ και πάλι επιβεβαιώνεται η σημαντική μεταβολή τη εντερικής βιοποικιλότητας των εθελοντριών με οστεοπενία συγκριτικά με καλή οστική πυκνότητα (Wang et al., 2017).

Παρατηρώντας την εικόνα της αναλογίας του οξικού οξέος, ενώ φαίνεται να αυξάνεται κατά την 8ωρη επώαση, παρουσιάστηκε σταδιακή γραμμομοριακή μείωση του οξικού οξέος σχεδόν σε όλα τα υποστρώματα και σε όλες τις ομάδες κατά την 24ωρη ζύμωση, χωρίς να αποκτήσει στατιστική σημαντικότητα. Η μοριακή αναλογία, σημείωσε επίσης μείωση σε όλα τα υποστρώματα κατά την 24ωρη επώαση σε σχέση με θετικούς μάρτυρες σε όλες τις ομάδες οστικής υγείας. Αντίστοιχα, ίδια παρατήρηση για το μυκητιακό υπόστρωμα του *Pleurotus ostreatus*, προέκυψε σε πρόσφατη μελέτη (Mitsou, et al. 2020).

Όσο αφορά στην παραγωγή προπιονικού οξέος, στο σύνολο των εθελοντριών παρουσίασε σημαντικές αυξήσεις σε όλα τα μυκητιακά υποστρώματα και σε όλους τους χρόνους επώασης ως προς τον αρνητικό μάρτυρα και την αρχική συγκέντρωση της

ζύμωσης. Το προπιονικό οξύ, που έχει φανεί ότι ασκεί αντι-λιπογόνο δράση, μείωση της χοληστερόλης, αντιφλεγμονώδη και αντι-καρκινογόνο δράση (Hosseini, et al. 2011), παρουσίασε υψηλότερη συγκέντρωση για το σύνολο των εθελοντριών στα υποστρώματα POWS και POWSE κατά την 24ωρη επώαση σε σχέση με αρνητικό μάρτυρα, θετικούς μάρτυρες, σε σχέση με την εκκίνηση της ζύμωσης και σε σχέση με την 8ωρη ζύμωση. Στην ομάδα των γυναικών με οστεοπενία παρατηρήθηκε αύξηση αντίστοιχα σε όλα τα μυκητιακά υποστρώματα και στις δύο χρονικές στιγμές σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα αλλά και την έναρξη της ζύμωσης με εξαίρεση το GLBSE όπου η αύξηση της συγκέντρωσης του προπιονικού ήταν σημαντική μόνο ως προς τον αρνητικό μάρτυρα. Επίσης, στην ομάδα των γυναικών με οστεοπενία, σημαντική αύξηση σε σχέση με αρνητικό μάρτυρα, θετικούς μάρτυρες και αρχική συγκέντρωση εκκίνησης, παρουσίασε το υπόστρωμα POWSE κατά την 8ωρη και κατά τη 24ωρη επώαση.

Στην ομάδα των μη οστεοπενικών γυναικών, παρατηρείται σημαντική αύξηση του προπιονικού στα υποστρώματα POWS και POWSE σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, τόσο κατά την 8ωρη όσο και κατά την 24ωρη ζύμωση, ενώ μόνο στο POWSE παρατηρήθηκε αύξηση και σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης και στις δύο χρονικές στιγμές. Η εικόνα της μοριακής αναλογίας του προπιονικού οξέος, τόσο για το σύνολο των γυναικών όσο και για τις γυναίκες με οστεοπενία, εμφάνισε σημαντική αύξηση μόνο στο υπόστρωμα POWSE κατά την 24ωρη ζύμωση σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, τους θετικούς μάρτυρες, αλλά και τις αρχικές μοριακές αναλογίες κατά την εκκίνηση και κατά την 8ωρη επώαση. Σε αντίθεση, η ομάδα των εθελοντριών με φυσιολογική οστική πυκνότητα, δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική μεταβολή μοριακής αναλογίας προπιονικού σε κανένα υπόστρωμα, καμία χρονική στιγμή. Έτσι η μεταβολή της εντερικής βιοποικιλότητας φαίνεται να μεταβάλλεται σημαντικά σε εθελοντές με οστεοπενία, συγκριτικά με τους εθελοντές με καλή οστική πυκνότητα (Wang et al., 2017).

Αντίστοιχη εικόνα ως προς τις συγκεντρώσεις εμφάνισε το βουτυρικό οξύ, το οποίο είναι η κύρια πηγή ενέργειας για τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, ρυθμίζει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των εντερικών κυττάρων, ασκεί ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση, διεγείρει την απόπτωση των κυττάρων και εμφανίζει ισχυρές αντικαρκινικές ιδιότητες (Roberfroid, et al. 2010; Hamer, et al. 2012; Zhang, et al. 2018). Στο σύνολο των εθελοντριών παρουσίασε σημαντικές αυξήσεις σχεδόν σε όλα τα υποστρώματα και σε όλους τους χρόνους επώασης ως προς τον αρνητικό μάρτυρα (με εξαίρεση τα GLBS και GLBSE κατά την 8ωρη επώαση και το GLBSE κατά την 24ωρη επώαση) και την αρχική συγκέντρωση κατά την έναρξη της ζύμωσης. Τα υποστρώματα POWS και POWSE εμφάνισα και πάλι την υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, τους θετικούς μάρτυρες και συγκριτικά με την συγκέντρωση στην 8ωρη επώαση, στις 24 ώρες. Στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών σημειώθηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης του βουτυρικού κυρίως στις 24 ώρες, όπου τα POWS και POWSE έδωσαν υψηλότερη συγκέντρωση σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης, τον θετικό μάρτυρα (INU2) και μόνο το POWSE σε σχέση και με τον αρνητικό μάρτυρα. Η ομάδα των εθελοντριών με φυσιολογική οστική πυκνότητα, εμφάνισε σημαντική αύξηση κατά την 8ωρη επώαση μόνο στο υπόστρωμα POWS σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και σημαντική αύξηση κατά την 24ωρη επώαση σημείωσε και πάλι στο υπόστρωμα POWS συγκριτικά με τον αρνητικό μάρτυρα, τους θετικούς μάρτυρες, σε σχέση με την εκκίνηση της ζύμωσης και σε σχέση με την αντίστοιχη συγκέντρωση του υποστρώματος κατά την 8ωρη ζύμωση. Επίσης, το υπόστρωμα POWS τη χρονική στιγμή επώασης 24 ωρών, σημείωσε υψηλότερη συγκέντρωση βουτυρικού οξέος στην ομάδα των γυναικών με οστεοπενία σε σχέση με το αντίστοιχο υπόστρωμα (POWS) της ομάδα οστικής υγείας.

Η εικόνα της μοριακής αναλογίας του βουτυρικού οξέος, τόσο για το σύνολο των γυναικών όσο και για τις γυναίκες με οστεοπενία, εμφάνισε σημαντική αύξηση στο υπόστρωμα POWS κατά την 24ωρη ζύμωση σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, τους θετικούς μάρτυρες αλλά και τις αρχικές μοριακές αναλογίες κατά την εκκίνηση της

ζύμωσης. Σε αντίθεση, η ομάδα των μη οστεοπενικών εθελοντριών, δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική μεταβολή μοριακής αναλογίας βουτυρικού οξέος σε σχέση με NC, INU1 και INU2.

Η μικροβιακή ζύμωση χωρίζεται σε δύο τύπους, σε σακχαρολυτική ζύμωση υδατανθρακών και σε πρωτεολυτική ζύμωση. Η δεύτερη πραγματοποιείται όταν εξαντληθεί η πηγή υδατάνθρακα (Hamer, H., et al. 2012). Τα διακλαδισμένα SCFAs, BSCFAs (ισοβαλερικό, ισοβουτυρικό, ισοκαπροϊκό), παράγονται μέσω ζύμωσης εύπεπτων διακλαδισμένων αμινοξέων, βαλίνης, λευκίνης και ισολευκίνης, που φθάνουν στο παχύ έντερο και διασπώνται (Heimann, E. et al. 2016). Στη συγκεκριμένη μελέτη η συγκέντρωση των BSCFAs σημείωσε σημαντική αύξηση σε όλα τα μυκητιακά υποστρώματα ως προς την έναρξη της ζύμωσης και στις δύο χρονικές στιγμές, όπως επίσης και των Other SCFAs, εκτός από το POWS στις 8 ώρες που η αύξηση δεν έφτασε τα επίπεδα της σημαντικότητας, για το σύνολο των εθελοντριών. Όσο αφορά την συγκέντρωση διακλαδισμένης αλύσου λιπαρών οξέων BSCFAs στο σύνολο των εθελοντριών, φαίνεται να ευνοείται η παραγωγή της, κατά την 24ωρη επώαση, κυρίως στο υπόστρωμα GLBS, όπου παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, τους θετικούς μάρτυρες, συγκριτικά με την συγκέντρωση κατά την εκκίνηση και κατά την 8ωρη επώαση. Σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης BSCFAs παρατηρήθηκε και στις 2 ομάδες οστικής υγείας στο υπόστρωμα GLBS κατά την 24ωρη επώαση, σε σχέση με τους θετικούς μάρτυρες, συγκριτικά με την συγκέντρωση κατά την εκκίνηση και κατά την 8ωρη επώαση.

Η εικόνα της μοριακής αναλογίας των BSCFAs, στο σύνολο των γυναικών σημείωσε σημαντική μείωση σε όλα υποστρώματα τη χρονική στιγμή της 8ωρης ζύμωσης, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα, με εξαίρεση το υπόστρωμα GLBS όπου η μείωση αυτή δεν παρουσίασε σημαντικότητα. Στις 24 ώρες όμως στο ίδιο υπόστρωμα εμφανίστηκε σημαντική αύξηση της αναλογίας των BSCFAs σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης, αλλά και σε σχέση με την 8ωρη επώαση. Το υπόστρωμα GLBS κατά την 24ωρη επώαση στις επιμέρους ομάδες οστικής υγείας σημείωσε σημαντική μοριακή αύξηση των

BSCFAs ως προς την έναρξη της ζύμωσης. Το συγκεκριμένο είδος μανιταριού, έχει φανεί να προωθεί την διατήρηση της εντερικής βιοποικιλότητας, μέσω της ανάπτυξης των ευεργετικών βακτηρίων *Bifidobacterium* (Hu, et al. 2018; Ding et al. 2018).

Όσο αφορά τη συγκέντρωση των άλλων SCFAs στο σύνολο των εθελοντριών, σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης τους παρατηρήθηκε κατά την 8ωρη και την 24ωρη ζύμωση σε όλα τα υποστρώματα σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης. Στην ομάδα με τις γυναίκες με φυσιολογική οστική πυκνότητα δεν προέκυψε καμία διαφορά ως προς τη συγκέντρωση σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης, ενώ στην ομάδα των οστεοπενικών γυναικών φάνηκε ότι αυξάνεται σημαντική η συγκέντρωση των o-SCFAs στις 24 ώρες μετά από τη ζύμωση του POWSE. Η εικόνα της μοριακής αναλογίας των o-SCFAs, στο σύνολο των γυναικών σημείωσε παρόμοια αποτελέσματα με την ποσοστιαία μοριακή αναλογία BCFA. Στο σύνολο των γυναικών και στις μη οστεοπενικές γυναίκες, σημειώθηκε σημαντική μείωση της μοριακής αναλογίας o-SCFAs στα υποστρώματα POWSE και GLBSE τη χρονική στιγμή της 8ωρης και ενίοτε και 24ωρης ζύμωσης, σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης. Στις γυναίκες με οστεοπενία δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στη μοριακή αναλογία των o-SCFAs σε σχέση με την έναρξη της ζύμωσης.

Είναι γνωστό ότι τα διαφορετικά μυκητιακά υποστρώματα διαφοροποιούν τη σύσταση των μικροβιακών πληθυσμών και πιθανόν να επιτρέπει την αύξηση συγκεκριμένων μικροβιακών ομάδων σε διαφορετικές αναλογίες, επηρεάζοντας έτσι και τον πρεβιοτικό δείκτη (Koutrotsios et al., 2019) συνεπώς και την παραγωγή SCFAs. Προηγούμενες μελέτες, έχουν δείξει ότι οι ηλικιωμένοι διατηρούν μειωμένα επίπεδα των γενών *Bacteroides* και *Bifidobacterium* (Gavini, C., 2001) τα οποία παράγουν τα κυριότερα SCFAs (οξικό, προπιονικό, βουτυρικό) και για αυτό τα τελευταία χρόνια διάφορες διατροφικές παρεμβάσεις με πρεβιοτικά στοχεύουν στη μεταβολή της σύστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου, καθώς έχει φανεί ότι ο πληθυσμός των *Bifidobacteria* διαμορφώνεται σημαντικά από την διατροφή (Liu S, et al. 2015). Όλα τα μυκητιακά υποστρώματα μανιταριών, με βάση τα δικά μας αποτελέσματα φάνηκε να

έχουν δράση βελτίωσης της εντερικής μικροβιακής σύνθεσης, αφού συνετέλεσαν σημαντικά στη συγκέντρωση των κυριότερων λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Το μανιτάρι POWS, παρουσίασε στη συγκεκριμένη μελέτη τις υψηλότερες συγκεντρώσεις των κυριότερων λιπαρών οξέων σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα και πιθανώς συντέλεσε στην βελτίωση της βακτηριακής εντερικής αναλογίας των οστεοπενικών γυναικών. Βελτίωσε την μοριακή αναλογία του βουτυρικού και του προπιονικού, λιπαρών οξέων με αντιφλεγμονώδεις δράσεις (Zhang et al. 2018) μετά την 24ωρη επώαση και αύξησε σημαντικά την συγκέντρωση βουτυρικού και οξικού συγκριτικά με τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις της ομάδας των γυναικών με φυσιολογική οστική πυκνότητα. Στην παραγωγή των BSCFAs και other SCFAs, το GLBS φάνηκε να αυξάνει σημαντικά τις συγκεντρώσεις και στις 2 ομάδες όλες τις χρονικές στιγμές, την ίδια στιγμή που τα υπόλοιπα μυκητιακά υποστρώματα παρουσίαζαν μείωση συγκεντρώσεων σε σχέση με αρνητικό μάρτυρα.

Ολοκληρώνοντας, η επίδραση των εδώδιμων μανιταριών των ειδών *Ganoderma luicidum* και *Pleurotus ostreatus* φαίνεται ότι μπορεί να αποτελέσει μία πολύ καλή στρατηγική, στοχεύοντας στην βελτίωση της εξέλιξης μεταβολικών ασθενειών, όπως είναι η οστεοπόρωση. Αυτό ενδεχομένως να μπορεί, εν μέρει, να επιτευχθεί μέσω της κατανάλωσης εδώδιμων μανιταριών, ενισχύοντας τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου και μέσω της απελευθέρωσης των ευεργετικών λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου SCFAs. Οι μηχανισμοί με τους οποίους θα μπορούσε να επιτευχθεί είναι υπό διερεύνηση και περιλαμβάνουν την απορροφησιμότητα του Ca (Wargovich MJ, et al. 1984) και τη μείωση των φλεγμονωδών κυτταροκινών που προωθούν την οστεοκλαστογένεση (Roberfroid, et al. 2010; Yan, et al., 2016).

1.7 Περιορισμοί και μελλοντική έρευνα

Ένας από τους βασικότερους περιορισμούς της μελέτης ήταν ο μικρός αριθμός δείγματος εθελοντών (n=6), καθώς και το μικρό δείγμα σε κάθε ομάδα οστικής υγείας

ξεχωριστά. Ο συγκεκριμένος περιορισμός, δεν μας επιτρέπει να εξάγουμε έγκυρα συμπεράσματα ώστε να προβούμε σε σχεδιασμό διατροφικών παρεμβάσεων. Όμως, είναι μία καλά σχεδιασμένη μεθοδολογικά μελέτη που μας αφήνει περιθώρια μελλοντικού ερευνητικού ενδιαφέροντος, ώστε να αξιολογηθεί σε βάθος και με μεγαλύτερη εγκυρότητα η επιμέρους παραγωγή των ευεργετικών, για την υγεία του ξενιστή, SCFAs. Θα είχε ερευνητικό ενδιαφέρον, να γίνει παράλληλη ανάλυση και συσχέτιση του εντερικού μικροβιόκοσμου των εθελοντών, που χρησιμοποιήθηκε ως εμβόλιο στη ζύμωση, με κάποια άλλη μέθοδο που να παρείχε περισσότερες πληροφορίες για το σύνολο, τη μεταβολή και την αναλογία των μικροοργανισμών. Επίσης, θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω η επίδραση των εδώδιμων μανιταριών και των πλούσιων σε β-γλυκάνες εκχυλισμάτων τους, συνδυαστικά με πρωτόκολλο άσκησης, ώστε να παρατηρηθεί η συμβολή των SCFAs σε άτομα με αυξημένο μεταβολικό στρες και μυϊκή ατροφία.

Βιβλιογραφία

1. Musculoskeletal system. In: Gray's Anatomy, 39th Ed., edited by Standring S, New York, Elsevier, 2004, pp 83–135
2. Kobayashi S, Takahashi HE, Ito A, Saito N, Nawata M, Horiuchi H, Ohta H, Ito A, Iorio R, Yamamoto N, Takaoka K: Trabecular minimodeling in human iliac bone. *Bone* 32: 163–169, 2003
3. Ubara Y, Tagami T, Nakanishi S, Sawa N, Hoshino J, Suwabe T, Kaitori H, Takemoto F, Hara S, Takaichi K: Significance of minimodeling in dialysis patients with adynamic bone disease. *Kidney Int* 68: 833–839, 2005
4. Ubara Y, Fushimi T, Tagami T, Sawa N, Hoshino J, Yokota M, Kaitori H, Takemoto F, Hara S: Histomorphometric features of bone in patients with primary and secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int* 63: 1809–1816, 2003
5. Lindsay R, Cosman F, Zhou H, Bostrom M, Shen V, Cruz J, Nieves JW, Dempster DW: A novel tetracycline labeling schedule for longitudinal evaluation of the short-term effects of anabolic therapy with a single iliac crest biopsy: Early actions of teriparatide. *J Bone Miner Res* 21: 366–373, 2006
6. Roodman GD: Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 27: 1229–1241, 1999
7. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG et al. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 1994;266:443-448.
8. Rodan SB, Rodan GA. Integrin function in osteoclasts. *J.Endocrinol.* 1997;154 Suppl:S47-S56.
9. Hughes DE, Dai A, Tiffie JC et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat.Med.* 1996;2:1132-1136.
10. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL: Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337–342, 2003
11. Blair HC, Athanasou NA: Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. *Histol Histopathol* 19: 189–199, 2004
12. Delaisse JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L: Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclast activities. *Microsc Res Tech* 61: 504–513, 2003
13. Hock JM, Centrella M, Canalis E: Insulin-like growth factor I (IGF-I) has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 122: 254–260, 2004
14. Locklin RM, Oreffo RO, Triffitt JT: Effects of TGFbeta and bFGF on the differentiation of human bone marrow stromal fibroblasts. *Cell Biol Int* 23: 185–194, 1999
15. Smit TH, Burger EH, Huyghe JM: Is BMU-coupling a strain-regulated phenomenon? A finite element analysis. *J Bone Miner Res* 15: 301–307, 2002
16. Smit TH, Burger EH, Huyghe JM: A case for strain-induced fluid flow as a regulator of BMU-coupling and osteonal alignment. *J Bone Miner Res* 17: 2021–2029, 2002
17. Tolar J, Teitelbaum SL, Orchard PJ. Osteopetrosis. *N.Engl.J.Med.* 2004;351:2839-2849
18. Anderson HC: Matrix vesicles and calcification. *Curr Rheumatol Rep* 5: 222–226, 2003
19. Sjogren, K., Engdahl, C., Henning P., Lerner, U. H., Tremaroli, V., Lagerquist, M. K., Backhed, F. & Ohlsson, C. 2012. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *J Bone Miner Res*, 27, 1357-67.
20. Burger EH, Klein-Nuland J, Smit TH: Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodeling osteon: A proposal. *J Biomech* 36: 1452–1459, 2003

21. Dobnig H, Turner RT: Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology* 136: 3632–3638, 1995
22. Teitelbaum SL, Ross FP: Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4: 638–649, 2003.
23. Cohen MM Jr: The new bone biology: Pathologic, molecular, clinical correlates. *Am J Med Genet A* 140: 2646–2706, 2006.
24. Clarke, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3: 131-139, 2008.
25. P. A. Downey and M. I. Siegel, “Bone biology and the clinical implications for osteoporosis,” *Physical Therapy*, vol. 86, no. 1, pp. 77–91, 2006.
26. H. K. Datta, W. F. Ng, J. A. Walker, S. P. Tuck, and S. S. Varanasi, “The cell biology of bone metabolism,” *Journal of Clinical Pathology*, vol. 61, no. 5, pp. 577–587, 2008.
27. T. L. Andersen, T. E. Sondergaard, K. E. Skorzynska et al., “A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone,” *American Journal of Pathology*, vol. 174, no. 1, pp. 239–247, 2009.
28. E. M. Hauge, D. Qvesel, E. F. Eriksen, L. Mosekilde, and F. Melsen, “Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers,” *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 16, no. 9, pp. 1575–1582, 2001.
29. S. L. Dallas, M. Prideaux, and L. F. Bonewald, “The osteocyte: an endocrine cell ... and more,” *Endocrine Reviews*, vol. 34, no. 5, pp. 658–690, 2013.
30. C. Sobacchi, A. Schulz, F. P. Coxon, A. Villa, and M. H. Helfrich, “Osteopetrosis: genetics, treatment and new insights into osteoclast function,” *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 9, no. 9, pp. 522–536, 2013.
31. Λυρίτης Γ.Π. Οστεοπόρωση. Εκδόσεις Preess Line. Αθήνα 1996; 49-50.
32. M. Capulli, R. Paone, and N. Rucci, “Osteoblast and osteocyte: games without frontiers,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 561, pp. 3–12, 2014.
33. Y. Yoshiko, G. A. Candeliere, N. Maeda, and J. E. Aubin, “Osteoblast autonomous Pi regulation via Pit1 plays a role in bone mineralization,” *Molecular and Cellular Biology*, vol. 27, no. 12, pp. 4465–4474, 2007.
34. V. E. Arana-Chavez, A. M. V. Soares, and E. Katchburian, “Junctions between early developing osteoblasts of rat calvaria as revealed by freeze-fracture and ultrathin section electron microscopy,” *Archives of Histology and Cytology*, vol. 58, no. 3, pp. 285–292, 1995.
35. M. J. Glimcher, “The nature of the mineral phase in bone,” in *Metabolic Bone Disease*, M. J. Glimcher, Ed., pp. 23–50, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 1998.
36. G. Boivin, Y. Bala, A. Doublier et al., “The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients,” *Bone*, vol. 43, no. 3, pp. 532–538, 2008.
37. S. C. Manolagas, “Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis,” *Endocrine Reviews*, vol. 21, no. 2, pp. 115–137, 2000.
38. Baron R. *Anatomy and Ultrastructure of Bone – Histogenesis, Growth and Remodeling*. Endotext. South Dartmouth 2008; pp22.
39. Steven L. Teitelbaum: Bone Resorption by Osteoclasts. *Science* 2008, 289:1504–1508

40. Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000;408:600-605.
41. R. Zohar, "Signals between cells and matrix mediate bone regeneration," in *Bone Regeneration*, P. H. Tal, Ed., InTech, 2012, <http://www.intechopen.com/books/bone-regeneration/signalsbetween-cells-and-matrix-mediate-bone-regeneration>.
42. P. J. Marie, "Role of N-cadherin in bone formation," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 190, no. 3, pp. 297–305, 2002.
43. T. C. A. Phan, J. Xu, and M. H. Zheng, "Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease," *Histology and Histopathology*, vol. 19, no. 4, pp. 1325–1344, 2004.
44. S. Khosla, M. J. Oursler, and D. G. Monroe, "Estrogen and the skeleton," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 23, no. 11, pp. 576–581, 2012.
45. K. B. Emerton, B. Hu, A. A. Woo et al., "Osteocyte apoptosis and control of bone resorption following ovariectomy in mice," *Bone*, vol. 46, no. 3, pp. 577–583, 2010.
46. L. J. Robinson, B. B. Yaroslavskiy, R. D. Griswold et al., "Estrogen inhibits RANKL-stimulated osteoclastic differentiation of human monocytes through estrogen and RANKL-regulated interaction of estrogen receptor- α with BCAR1 and Traf6," *Experimental Cell Research*, vol. 315, no. 7, pp. 1287–1301, 2009.
47. Väänänen K, "Mechanism of osteoclast mediated bone resorption— rationale for the design of new therapeutics," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 57, no. 7, pp. 959–971, 2005.
48. S. Cenci, M. N. Weitzmann, C. Roggia et al., "Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α ," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 106, no. 10, pp. 1229–1237, 2000.
49. T. Negishi-Koga and H. Takayanagi, "Bone cell communication factors and Semaphorins," *BoneKEy Reports*, vol. 1, article 183, 2012.
50. T. Negishi-Koga, M. Shinohara, N. Komatsu et al., "Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphoring 4D," *Nature Medicine*, vol. 17, no. 11, pp. 1473–1480, 2011.
51. K. Suzuki, A. Kumanogoh, and H. Kikutani, "Semaphorins and their receptors in immune cell interactions," *Nature Immunology*, vol. 9, no. 1, pp. 17–23, 2008.
52. M. Hayashi, T. Nakashima, M. Taniguchi, T. Kodama, A. Kumanogoh, and H. Takayanagi, "Osteoprotection by semaphoring 3A," *Nature*, vol. 485, no. 7396, pp. 69–74, 2012.
53. T. Negishi-Koga and H. Takayanagi, "Bone cell communication factors and Semaphorins," *BoneKEy Reports*, vol. 1, article 183, 2012.
54. Koutrotsios, G., Kalogeropoulos, N., Kaliora, A. & Zervakis, G.I. (2018) Toward an increased functionality in oyster (*Pleurotus*) mushrooms produced on grape marc or olive mill wastes serving as sources of bioactive compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 5971–5983.
55. Koutrotsios, G., Kalogeropoulos, N., Stathopoulos, P., Kaliora, A. & Zervakis, G.I. (2017). Bioactive compounds and antioxidant activity exhibit high intraspecific variability in *Pleurotus ostreatus* mushrooms and correlate well with cultivation performance parameters. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33, 98. doi: 10.1007/s11274-017-2262-1.

56. C. Zhao, N. Irie, Y. Takada et al., "Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone homeostasis," *Cell Metabolism*, vol. 4, no. 2, pp. 111–121, 2006.
57. M. Hayashi, T. Nakashima, M. Taniguchi, T. Kodama, A. Kumanogoh, and H. Takayanagi, "Osteoprotection by semaphoring 3A," *Nature*, vol. 485, no. 7396, pp. 69–74, 2012.
58. T. Negishi-Koga, M. Shinohara, N. Komatsu et al., "Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphoring 4D," *Nature Medicine*, vol. 17, no. 11, pp. 1473–1480, 2011.
59. L. F. Bonewald, "The amazing osteocyte," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 26, no. 2, pp. 229–238, 2011.
60. G. Y. Rochefort, S. Pallu, and C. L. Benhamou, "Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue," *Osteoporosis International*, vol. 21, no. 9, pp. 1457–1469, 2010.
61. J. Klein-Nulend, C. M. Semeins, N. E. Ajubi, P. J. Nijweide, and E. H. Burger, "Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts— correlation with prostaglandin upregulation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 217, no. 2, pp. 640–648, 1995.
62. D. C. Genetos, C. J. Kephart, Y. Zhang, C. E. Yellowley, and H. J. Donahue, "Oscillating fluid flow activation of gap junction hemichannels induces ATP release from MLO-Y4 osteocytes," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 212, no. 1, pp. 207–214, 2007.
63. X. L. Lu, B. Huo, M. Park, and X. E. Guo, "Calcium response in osteocytic networks under steady and oscillatory fluid flow," *Bone*, vol. 51, no. 3, pp. 466–473, 2012.
64. A. G. Robling, P. J. Niziolek, L. A. Baldrige et al., "Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 9, pp. 5866–5875, 2008.
65. A. Gaudio, P. Pennisi, C. Bratengeier et al., "Increased sclerostin serum levels associated with bone formation and resorption markers in patients with immobilization-induced bone loss," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 95, no. 5, pp. 2248–2253, 2010.
66. L. F. Bonewald and M. L. Johnson, "Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling," *Bone*, vol. 42, no. 4, pp. 606–615, 2008.
67. K. E. S. Poole, R. L. van Bezooijen, N. Loveridge et al., "Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation," *The FASEB Journal*, vol. 19, no. 13, pp. 1842–1844, 2005.
68. B. S. Noble, H. Stevens, N. Loveridge, and J. Reeve, "Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone," *Bone*, vol. 20, no. 3, pp. 273–282, 1997.
69. D. Vanderschueren, L. Vandenput, S. Boonen, M. K. Lindberg, R. Bouillon, and C. Ohlsson, "Androgens and bone," *Endocrine Reviews*, vol. 25, no. 3, pp. 389–425, 2004.
70. S. Kousteni, J.-R. Chen, T. Bellido et al., "Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids," *Science*, vol. 298, no. 5594, pp. 843–846, 2002.
71. F. Boabaid, P. S. Cerri, and E. Katchburian, "Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats," *Tissue and Cell*, vol. 33, no. 4, pp. 318–325, 2001.
72. P. S. Cerri, F. Boabaid, and E. Katchburian, "Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats," *Journal of Periodontal Research*, vol. 38, no. 2, pp. 223–226, 2003.

73. N. N. Taniwaki and E. Katchburian, "Ultrastructural and lanthanum tracer examination of rapidly resorbing rat alveolar bone suggests that osteoclasts internalize dying bone cells," *Cell and Tissue Research*, vol. 293, no. 1, pp. 173–176, 1998.
74. O. D. Kennedy, B. C. Herman, D. M. Laudier, R. J. Majeska, H. B. Sun, and M. B. Schaffler, "Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active proosteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations," *Bone*, vol. 50, no. 5, pp. 1115–1122, 2012.
75. A. C. Wu, N. A. Morrison, W. L. Kelly, and M. R. Forwood, "MCP-1 expression is specifically regulated during activation of skeletal repair and remodeling," *Calcified Tissue International*, vol. 92, no. 6, pp. 566–575, 2013.
76. A. R. Guntur and C. J. Rosen, "Bone as an endocrine organ," *Endocrine Practice*, vol. 18, no. 5, pp. 758–762, 2012.
77. G. Karsenty and M. Ferron, "The contribution of bone to whole organism physiology," *Nature*, vol. 481, no. 7381, pp. 314–320, 2012.
78. C. B. Confavreux, "Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism," *Kidney International*, vol. 79, no. 121, pp. S14–S19, 2011.
79. C. H. Li and S. Amar, "Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model," *Journal of Periodontology*, vol. 78, no. 6, pp. 1120–1128, 2007.
80. M. Ferron, E. Hinoi, G. Karsenty, and P. Ducy, "Osteocalcin differentially regulates β cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 13, pp. 5266–5270, 2008.
81. L. D. Quarles, "Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 12, pp. 3820–3828, 2008.
82. F. Oury, L. Khrimian, C. A. Denny et al., "Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions," *Cell*, vol. 155, no. 1, pp. 228–241, 2013.
83. A. Martin, S. Liu, V. David et al., "Bone proteins PHEX and DMP1 regulate fibroblastic growth factor Fgf23 expression in osteocytes through a common pathway involving FGF receptor (FGFR) signaling," *The FASEB Journal*, vol. 25, no. 8, pp. 2551–2562, 2011.
84. L. D. Quarles, "Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 118, no. 12, pp. 3820–3828, 2008.
85. M. Sato, N. Asada, Y. Kawano et al., "Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism," *Cell Metabolism*, vol. 18, no. 5, pp. 749–758, 2013.
86. M. C. Walsh, N. Kim, Y. Kadono et al., "Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism," *Annual Review of Immunology*, vol. 24, pp. 33–63, 2006.
87. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010; 464:59-65.
88. Serino M, Luche E, Gres S, et al. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut*. 2012; 61:543-553.
89. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2009; 361:2066-2078.
90. Wright EK, Kamm MA, Teo SM, Inouye M, Wagner J, Kirkwood CD. Recent advances in characterizing the gastrointestinal microbiome in Crohn's disease: A systematic review. *Inflamm Bowel Dis*. 2015; 21:1219- 1228.
91. Sze MA, Schloss PD. Looking for a signal in the noise: Revisiting obesity and the microbiome. *MBio*. 2016; 7:pii: e01018-16.

92. Ussar S, Fujisaka S, Kahn CR. Interactions between host genetics and gut microbiome in diabetes and metabolic syndrome. *Mol Metab.* 2016; 5:795-803.
93. Pevsner-Fischer M, Blacher E, Tatirovsky E, Ben-Dov IZ, Elinav E. The gut microbiome and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2017; 26:1-8.
94. Rosser EC, Mauri C. A clinical update on the significance of the gut microbiota in systemic autoimmunity. *J Autoimmun.* 2016; 74:85-93.
95. Dash S, Clarke G, Berk M, Jacka FN. The gut microbiome and diet in psychiatry: Focus on depression. *Curr Opin Psychiatry.* 2015; 28:1-6.
96. Petra AI, Panagiotidou S, Hatzigelaki E, Stewart JM, Conti P, Theoharides TC. Gut-microbiota-brain axis and its effect on neuropsychiatric disorders with suspected immune dysregulation. *Clin Ther.* 2015; 37:984-995.
97. Xin Xu et al. Intestinal microbiota: a potential target for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Bone Res.* 2017; 5:17046
98. Org E, Parks BW, Joo JW et al. Genetic and environmental control of host-gut microbiota interactions. *Genome Res* 2015; 25: 1558–1569
99. Kovacs A, Ben-Jacob N, Tayem H et al. Genotype is a stronger determinant than sex of the mouse gut microbiota. *Microb Ecol* 2011; 61: 423–428.
100. Benson AK, Kelly SA, Legge R et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 18933–18938.
101. Esworthy RS, Smith DD, Chu FF. A strong impact of genetic background on gut microflora in mice. *Int J Inflam* 2010; 2010: 986046.
102. Goodrich JK, Waters JL, Poole AC et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 2014; 159: 789–799.
103. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457: 480–484.
104. Kashtanova DA, Popenko AS, Tkacheva ON et al. Association between the gut microbiota and diet: Fetal life, early childhood, and further life. *Nutrition* 2016; 32: 620–627.
105. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125: 1401–1412.
106. Fujisaka S, Ussar S, Clish C et al. Antibiotic effects on gut microbiota and metabolism are host dependent. *J Clin Invest* 2016; 126: 4430–4443.
107. Leamy LJ, Kelly SA, Nietfeldt J et al. Host genetics and diet, but not immunoglobulin A expression, converge to shape compositional features of the gut microbiome in an advanced intercross population of mice. *Genome Biol* 2014; 15: 552.
108. Sekhon BS, Jairath S. Prebiotics, probiotics and synbiotics: an overview. *J Pharm Educ Res* 2010; 1: 13–36.
109. Roberfroid MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1682S–1687S.
110. Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27: 202–209.
111. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyle L et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr* 2010; 104 (Suppl 2): S1–63.
112. Plaza-Diaz J, Fernandez-Caballero JA, Chueca N et al. Pyrosequencing analysis reveals changes in intestinal microbiota of healthy adults who received a daily dose of immunomodulatory probiotic strains. *Nutrients* 2015; 7: 3999–4015.

113. Ferrario C, Taverniti V, Milani C et al. Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *J Nutr* 2014; 144: 1787–1796.
114. Rampelli S, Candela M, Severgnini M et al. A probiotics-containing biscuit modulates the intestinal microbiota in the elderly. *J Nutr Health Aging* 2013; 17: 166–172.
115. Ahmed M, Prasad J, Gill H et al. Impact of consumption of different levels of *Bifidobacterium lactis* HN019 on the intestinal microflora of elderly human subjects. *J Nutr Health Aging* 2007; 11: 26–31.
116. Charbonneau D, Gibb RD, Quigley EM. Fecal excretion of *Bifidobacterium infantis* 35624 and changes in fecal microbiota after eight weeks of oral supplementation with encapsulated probiotic. *Gut Microbes* 2013; 4: 201–211.
117. Ali T, Lam D, Bronze MS, Humphrey MB. Osteoporosis in inflammatory bowel disease. *Am J Med*. 2009; 122:599-604.
118. Ghishan FK, Kiela PR. Advances in the understanding of mineral and bone metabolism in inflammatory bowel diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011; 300:G191-201.
119. Li JY, Chassaing B, Tyagi AM, Vaccaro C, Luo T, Adams J, Darby TM, Weitzmann MN, Mulle JG, Gewirtz AT, Jones RM, Pacifici R. Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *J Clin Invest*. 2016; 126:2049-2063.
120. Carson JA, Manolagas SC. Effects of sex steroids on bones and muscles: Similarities, parallels, and putative interactions in health and disease. *Bone*. 2015; 80:67-78.
121. Simons L.A., Amansec S.G., Conway P. Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis*. 2006;16:531–535. doi: 10.1016/j.numecd.2005.10.009.
122. Lieske J.C., Goldfarb D.S., de Simone C., Regnier C. Use of a probiotic to decrease enteric hyperoxaluria. *Kidney Int*. 2005;68:1244–1249. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00520.
123. Billoo A.G., Memon M.A., Khaskheli S.A., Murtaza G., Iqbal K., Saeed Shekhani M., Siddiqi A.Q. Role of a probiotic (*Saccharomyces boulardii*) in management and prevention of diarrhoea. *World J. Gastroenterol*. 2006;12:4557–4560. doi: 10.3748/wjg.v12.i28.4557.
124. Parvez S., Malik K.A., Ah Kang S., Kim H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol*. 2006;100:1171–1185. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02963.
125. Chung W.S.F., Walker A.W., Louis P., Parkhill J., Vermeiren J., Bosscher D., Duncan S.H., Flint H.J. Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biol*. 2016;14:1–13.
126. Crittenden R., Playne M.J. Nutrition News. Facts and functions of prebiotics, probiotics and synbiotics. In: Lee Y.K., Salminen S., editors. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. Wiley-Interscience, Kansas State University; Hoboken, NJ, USA: Manhattan, KS, USA: 2008. pp. 535–582.
127. Jakubczyk E., Kosikowska M. Nowa generacja mlecznych produktów fermentowanych z udziałem probiotyków i prebiotyków, produkty synbiotyczne. *Prz. Mlecz*. 2000;12:397–400.

128. Crittenden R., Playne M.J. Prebiotics. In: Lee Y.K., Salminen S., editors. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. John Wiley & Sons Inc.; Hoboken, NJ, USA: 2009. pp. 535–561.
129. Ouwehand A., Derrien M., de Vos W., Tiihonen K., Rautonen N. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. *Curr. Biol.* 2005;16:212–217. doi: 10.1016/j.copbio.2005.01.007.
130. Van Loo J., Clune Y., Bennett M., Collins J.K. The SYNCAN project: Goals, set-up, first results and settings of the human intervention study. *Br. J. Nutr.* 2005;93:S91–S98.
131. Mojka K. Probiotyki, prebiotyki i synbiotyki—Charakterystyka i funkcje. *Probl. Hig. Epidemiol.* 2014;95:541–549.
132. Socha P., Stolarczyk M., Socha J. Wpływ probiotyków i prebiotyków na gospodarkę lipidową. *Pediatr. Współcz. Gastroenterol. Hepatol. Żyw. Dziecka.* 2002;4:85–88.
133. Dicksved J, et al. Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *Isme Journal.* 2008;2:716–727.
134. Turnbaugh PJ, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature.* 2009;457:480–484.
135. De Filippo C, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:14691–14696.
136. Yatsunenko T, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature.* 2012;486:222–227.
137. Lidia Ibáñez, et al. Gut microbiome and bone. *Joint Bone Spine* 86. 2019; 43–47
138. Hernandez CJ, Guss JD, Luna M, Goldring SR. Links between the microbiome and bone. *J Bone Miner Res.* 2016; 31:1638-1646.
139. Sjögren K, Engdahl C, Henning P, Lerner UH, Tremaroli V, Lagerquist MK, Bäckhed F, Ohlsson C. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *J Bone Miner Res.* 2012; 27:1357-1367.
140. Pacifici R. T cells, osteoblasts, and osteocytes: interacting lineages key for the bone anabolic and catabolic activities of parathyroid hormone. *Ann N Y Acad Sci.* 2015
141. Belkaid Y, Hand TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell.* 2014; 157(1):121–41.
142. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veen J, deRoos P, Liu H, Cross JR, Pfeffer K, Coffey PJ, Rudensky AY. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 2013; 504(7480):451–5.
143. Koutrotsios, G., Patsou, M., Mitsou, E.K., Bekiaris, G., Kotsou, M., Tarantilis, P., Pletsas, V., Kyriakou, A. & Zervakis, G.I. (2019). Valorization of olive by-products as substrates for the cultivation of *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus* mushrooms with enhanced functional and prebiotic properties. *Catalysts* 9(6), 537; doi: 10.3390/catal9060537.
144. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly YM, Glickman JN, Garrett WS. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* 2013; 341(6145):569–73.
145. Huttenhower C, Knight R, Brown CT, Caporaso JG, Clemente JC, Gevers D, Franzosa EA, Kelley ST, Knights D, Ley RE, Mahurkar A, Ravel J, White O. Scientists for Advancement of Microbiome R. Advancing the microbiome research community.

146. de Gorter D, ten Dijke P. (2013). Signal Transduction Cascades Controlling Osteoblast Differentiation. In: Rosen C, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 8th ed. American Society for Bone and Mineral Research: John Wiley & Sons; p. 15-24.
147. Bonofiglio D, Maggiolini M, Catalano S, et al. Bone mineral density is inversely related to parathyroid hormone in adolescent girls. *Horm Metab Res* 2001; 33:170-174.
148. Carter LM, Whiting SJ, Drinkwater DT, et al. Self-reported calcium intake and bone mineral content in children and adolescents. *J Am Coll Nutr* 2001;20:502-509.
149. Cashman, K.D., Diet, nutrition, and bone health. *J Nutr*, 2007. 137(11 Suppl): p. 2507S-2512S
150. Lanham-New, S.A., Importance of calcium, vitamin D and vitamin K for osteoporosis prevention and treatment. *Proc Nutr Soc*, 2008. 67(2): p. 163-76.
151. NIH Consensus conference. Optimal calcium intake. NIH Consensus Development Panel on Optimal Calcium Intake. *JAMA*, 1994. 272(24): p. 1942-8.
152. Tagkouli, D., Kaliora, A., Bekiaris, G., Koutrotsios, G., Christea, M., Zervakis, G.I. & Kalogeropoulos, N. (2020). Free amino acids in three *Pleurotus* species cultivated on agricultural and agro-industrial by-products. *Molecules* 25(17), 4015; doi: 10.3390/molecules25174015.
153. JW, N., Osteoporosis: the role of micronutrients. *Am J Clin Nutr.*, 2005.
154. Ζαμπέλας, Α., ed. *Κλινική διαιτολογία και διατροφή με στοιχεία παθολογίας*. 2011.
155. Sunyecz, J., The use of calcium and vitamin D in the management of osteoporosis. *Ther Clin Risk Manag.*, 2008.
156. Λυρίτης, Γ.Π., ed. *Μεταβολικά νοσήματα των οστών* 2013.
157. Harvey NC, M.R., Javaid MK, et al., Maternal 25(OH)-vitamin-D status in late pregnancy and mRNA expression of placental calcium transporter predict intrauterine bone mineral accrual in the offspring. *Bone*. 2007
158. Weber, P., Vitamin K and bone health. *Nutrition*, 2001. 17(10): p. 880-7.
159. De Vuyst, L.; Moens, F.; Selak, M.; Rivière, A.; Leroy, F. Summer Meeting 2013: Growth and physiology of bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 2014, 116, 477–491.
160. Shea, M.K. and S.L. Booth, Update on the role of vitamin K in skeletal health. *Nutr Rev*, 2008. 66(10): p. 549-57.
161. Bolton-Smith, C., et al., Two-year randomized controlled trial of vitamin K1 (phylloquinone) and vitamin D3 plus calcium on the bone health of older women. *J Bone Miner Res*, 2007. 22(4): p. 509-19.
162. Castiglioni, S., et al., Magnesium and osteoporosis: current state of knowledge and future research directions. *Nutrients*, 2013. 5(8): p. 3022-33.
163. Sanz Y, Santacruz A, De Palma G. Insights into the roles of gut microbes in obesity. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2008;2008:829101. Epub 2008 Dec 3
164. Hamer H.M, Jonkers D., Venema K., Vanhoutvin S., Troost F.J., and Brummer R.J, "Review article: the role of butyrate on colonic function," *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 27, no. 2, pp. 104–119, 2008.
165. Wolever T.M.S, Spadafora P.J, Cunnane S.C., and Pencharz P.B, "Propionate inhibits incorporation of colonic [1,2-13C] acetate into plasma lipids in humans," *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 61, no. 6, pp. 1241–1247, 1995.
166. O Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep*. 2006 Jul;7(7):688-93.

167. María Elena Valverde, Talía Hernández-Pérez, Octavio Paredes-López "Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life "Int J Microbiol. 2015; 2015: 376387.
168. Alves M., Ferreira I. F. R., Dias J., Teixeira V., Martins A., Pintado M. A review on antimicrobial activity of mushroom (*Basidiomycetes*) extracts and isolated compounds. *Planta Medica*. 2012;78(16):1707–1718. doi: 10.1055/s-0032-1315370.
169. Chang S. T., Wasser S. P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 2012;14 (2):95–134.
170. Finimundy T. C., Gambato G., Fontana R., et al. Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising *in vitro* antitumor activity. *Nutrition Research*. 2013;33(1):76–84.
171. Zhang L., Fan C., Liu S., Zang Z., Jiao L. Chemical composition and antitumor activity of polysaccharide from *Inonotus obliquus* . *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011;5(7):1251–1260.
172. Koutrotsios, G., Danezis, G., Georgiou, C.A. & Zervakis, G.I. (2020). Elemental content in *Pleurotus ostreatus* and *Cyclocybe cylindracea* mushrooms: Correlations with concentrations in cultivation substrates and effects on the production process. *Molecules* 25(9), 2179; doi: 10.3390/molecules25092179.
173. Patel S., Goyal A. Recent developments in mushrooms as anticancer therapeutics: a review. *3 Biotech*. 2012;2(1):1–15.
174. Chen J., Seviour R. *Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-glucans*. *Mycological Research*. 2007;111(6):635–652.
175. Sakellari, A., Karavoltsos, S., Tagkouli, D., Rizou, C., Sinanoglou, V.J., Zoumpoulakis, P., Koutrotsios, G., Zervakis, G.I. & Kalogeropoulos, N. (2019). Trace elements in *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii* and *P. nebrodensis* mushrooms cultivated on various agricultural by-products. *Analytical Letters* 52, 2692–2709; doi: 10.1080/00032719.2019.1594865.
176. Mattila P., Könkö K., Eurola M., et al. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001;49(5):2343–2348.
177. Wu, F.; Zhou, C.; Zhou, D.; Ou, S.; Zhang, X.; Huang, H. Structure characterization of a novel polysaccharide from *Herichium erinaceus* fruiting bodies and its immunomodulatory activities. *Food Funct*. 2017, 9, 294–306.
178. Flegg P. B., Maw G. Mushrooms and their possible contribution to the world. *Mushroom Journal*. 1997;48:395–403.
179. Kalač P. A review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(2):209–218.
180. Reis F. S., Barros L., Martins A., Ferreira I. C. F. R. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(2):191–197.
181. Mdachi S. J. M., Nkunya M. H. H., Nyigo V. A., Urusa I. T. Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms. *Food Chemistry*. 2004;86(2):179–182.
182. Ouzouni P. K., Petridis D., Koller W.-D., Riganakos K. A. Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry*. 2009;115(4):1575–1580.

183. Ribeiro B., de Pinho P. G., Andrade P. B., Baptista P., Valentão P. Fatty acid composition of wild edible mushrooms species: a comparative study. *Microchemical Journal*. 2009;93(1):29–35.
184. Klis F. M., De Groot P., Hellingwerf K. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 2001;39(1):1–8.
185. McIntosh M., Stone B. A., Stanisich V. A. Curdlan and other bacterial (1→3)- β -D-glucans. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;68(2):163–173.
186. Falch B. H., Espevik T., Ryan L., Stokke B. T. The cytokine stimulating activity of (1→3)- β -D-glucans is dependent on the triple helix conformation. *Carbohydrate Research*. 2000;329(3):587–596.
187. Kataoka K., Muta T., Yamazaki S., Takeshige K. Activation of macrophages by linear (1→3)- β -D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(39):36825–36831.
188. Vetvicka V., Yvin J.-C. Effects of marine β -1,3 glucan on immune reactions. *International Immunopharmacology*. 2004;4(6):721–730.
189. Chen J., Seviour R. Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-glucans. *Mycological Research*. 2007;111(6):635–652.
190. Manzi P., Pizzoferrato L. Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*. 2000;68(3):315–318.
191. Xu X., Yan H., Chen J., Zhang X. Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*. 2011;29(6):667–674.
192. Singh R. S., Bhari R., Kaur H. P. Mushroom lectins: current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010;30(2):99–126.
193. Lin C.-H., Sheu G.-T., Lin Y.-W., et al. A new immunomodulatory protein from *Ganoderma microsporum* inhibits epidermal growth factor mediated migration and invasion in A549 lung cancer cells. *Process Biochemistry*. 2010;45(9):1537–1542.
194. Guillamón E., García-Lafuente A., Lozano M., et al. Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*. 2010;81(7):715–723.
195. Ferreira I. C. F. R., Barros L., Abreu R. M. V. Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*. 2009;16(12):1543–1560.
196. Heleno S. A., Barros L., Martins A., Queiroz M. J. R. P., Santos-Buelga C., Ferreira I. C. F. R. Portugal: chemical compounds with antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012;60(18):4634–4640.
197. Hensley K., Benaksas E. J., Bolli R., et al. New perspectives on vitamin E: γ -tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Biology and Medicine*. 2004;36(1):1–15.
198. Ergönül P. G., Akata I., Kalyoncu F., Ergönül B. Fatty acid compositions of six wild edible mushroom species. *The Scientific World Journal*. 2013;2013:4.
199. Barros L., Baptista P., Correia D. M., Casal S., Oliveira B., Ferreira I. C. F. R. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*. 2007;105(1):140–145.
200. Jedinak A., Sliva D. *Pleurotus ostreatus* inhibits proliferation of human breast and colon cancer cells through p53-dependent as well as p53-independent pathway. *International Journal of Oncology*. 2008;33(6):1307–1313.
201. Giannenas, I.; Tsalie, E.B.; Chronisc, E.F. Consumption of *Agaricus bisporus* mushroom affects the performance, intestinal microbiota composition and

- morphology, and antioxidant status of turkey poult. Anim. Feed Sci. Technol. 2011; 165, 218–229
202. Liu G.-Q., Zhang K.-C. Mechanisms of the anticancer action of *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.: a new understanding. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2005; 47(2):129–135.
 203. Zhou X. W., Su K. Q., Zhang Y. M. Applied modern biotechnology for cultivation of *Ganoderma* and development of their products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012; 93(3):941–963.
 204. María Elena Valverde, Talía Hernández-Pérez, Octavio Paredes-López. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *Int J Microbiol*. 2015; 2015: 376387.
 205. McCabe L, Britton RA, Parameswaran N. Prebiotic and Probiotic Regulation of Bone Health: Role of the Intestine and its Microbiome. *Curr Osteoporos Rep*. 2015 Dec; 13(6):363–71.
 206. Scholz-Ahrens KE, Schrezenmeir J. Inulin and oligofructose and mineral metabolism: the evidence from animal trials. *J Nutr*. 2007; 137:2513S–2523S.
 207. Coxam V. Current data with inulin-type fructans and calcium, targeting bone health in adults. *J Nutr*. 2007; 137:2527S–2533S.
 208. Weaver CM, Martin BR, Story JA, Hutchinson I, Sanders L. Novel fibers increase bone calcium content and strength beyond efficiency of large intestine fermentation. *J Agric Food Chem*. 2010
 209. Yang LC, Wu JB, Lu TJ, Lin WC. The prebiotic effect of *Anoectochilus formosanus* and its consequences on bone health. *The British journal of nutrition*. 2012
 210. Trinidad TP, Wolever TM, Thompson LU. Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. *Am J Clin Nutr*. 1996
 211. Weaver CM, Martin BR, Nakatsu CH, Armstrong AP, Clavijo A, McCabe LD, McCabe GP, Duignan S, Schoterman MH, van den Heuvel EG. Galactooligosaccharides improve mineral absorption and bone properties in growing rats through gut fermentation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011
 212. Weaver CM. Diet, gut microbiome, and bone health. *Curr Osteoporos Rep*. 2015
 213. Langlands SJ, Hopkins MJ, Coleman N, Cummings JH. Prebiotic carbohydrates modify the mucosa associated microflora of the human large bowel. *Gut*. 2004
 214. Schwarzer, M. , Makki, K. , Storelli, G. , Machuca Gayet, I. , Srutkova, D. , Hermanova, P., Heddi, A. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. *Science*, 351, 854–857. 2017
 215. Yan, J. , Herzog, J. W. , Tsang, K. , Brennan, C. A. , Bower, M. A. , Garrett, W. S. , Charles, J. F. Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1113, E7554–E7563. 2016
 216. Furusawa, Y. , Obata, Y. , Fukuda, S. , Endo, T. A. , Nakato, G. , Takahashi, D. , ... Kato, T. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, 504, 446–450. 2013.
 217. Lührs, H. , Gerke, T. , Müller, J. G. , Melcher, R. , Schaubert, J. , Boxberger, F. , ... Menzel, T. Butyrate inhibits NF- κ B activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 37, 458–466. 2002

218. Smith, P. M. , Howitt, M. R. , Panikov, N. , Michaud, M. , Gallini, C. A. , Bohlooly, M. , ... Garrett, W. S. The microbial metabolites, short chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science*, 341, 569–573. 2013
219. Lishan Li, Shitao Rao, Yanzhen Cheng, Xiaoyun Zhuo, Caihong Deng, Ningning Xu, Hua Zhang, Li Yang. Microbial osteoporosis: The interplay between the gut microbiota and bones via host metabolism and immunity. *MicrobiologyOpen*. 2019
220. Wang, J., Zhang, J., Zhao, B., Wang, X., Wu, Y., & Yao, J. A comparison study on microwave-assisted extraction of *Potentilla anserina* L. polysaccharides with conventional method: Molecule weight and antioxidant activities evaluation. *Carbohydrate Polymers*, 80(1), pp. 84-93. 2010
221. Chen, W., Wang, W.-P., Zhang, H.-S., & Huang, Q. Optimization of ultrasonic - assisted extraction of water - soluble polysaccharides from *Boletus edulis* mycelia using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), pp. 614-619. 2012.
222. Ruthes, A. C., Smiderle, F., & Iacomini, M. D - glycans from edible mushrooms: A review on the extraction, purification and chemical characterization approaches. *Carbohydrate Polymers*, 117, pp. 753-761. 2015
223. Synytsya, A., Mícková, K., Synytsya, A., Jablonsky, I., Speváček, J., Erban, V. Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers*, 76(4), pp. 548–556. 2009
224. Rycroft, C., Jones, M., Gibson, G., & Rastall , R. A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), pp. 878-887. 2001
225. Palframan, R. J., Gibson, G., & Rastall, R. Effect of pH and dose on the growth of gut bacteria on prebiotic carbohydrates in vitro. *Anaerobe*, 8(5), pp. 287-292. 2002
226. Phan, CW., Tan, E.YY., Sabaratnam, V. Bioactive Molecules in Edible and Medicinal Mushrooms for Human Wellness. In: Mérillon JM., Ramawat K. (eds) *Bioactive Molecules in Food*. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham. 2018
227. Wang, Q.; Wang, F.; Xu, Z.; Ding, Z. Bioactive Mushroom Polysaccharides: A Review on Monosaccharide Composition, Biosynthesis and Regulation. *Molecules* 2017,22, 955.
228. Azmi, A.; Shuhaimi, M.; Abd Manap, Y.; Maaruf, A.G. Mushroom as a potential source of prebiotics: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 2009,20, 567–575.
229. Macfarlane GT, Gibson GR. Microbiological aspects of production of short-chain fatty acids in the large bowel. In: Cummings JH, Rombeau JL, Sakata T, eds. *Physiological and Clinical Aspects of Short-chain Fatty Acids*. Cambridge (England), New York, NY: Cambridge University Press; 1995:87–105.
230. Besten, G.; van Eunen, K.; Groen, A.; Venema, K.; Reijngoud, D.-J.; Bakker, B. The Role of Short-Chain Fatty Acids in the Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Host Energy Metabolism. *J. Lipid Res.* 2013,54,2325–2340.
231. Takagi, R.; Sasaki, K.; Fukuda, I.; Tanaka, K.; Yoshida, K.-i.; Kondo, A.; Osawa, R. A Single-Batch Fermentation System to Simulate Human Colonic Microbiota for High-Throughput Evaluation of Prebiotics. *PLoS ONE* 2016,11, e0160533.
232. Rowland, I.; Gibson, G.; Heinken, A.; Scott, K.; Swann, J.; Thiele, I.; Tuohy, K. Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* 2017,57, 1–24.

233. Hosseini, E.; Grootaert, C.; Verstraete, W.; Van de Wiele, T. Propionate as a health-promoting microbialmetabolite in the human gut.Nutr. Rev.2011,69, 245–258.
234. Roberfroid, M.; Gibson, G.; Hoyles, L.; McCartney, A.; Rastall, R.; Rowland, I.; Wolvers, D.; Watzl, B.;Szajewska, H.; Stahl, B.; et al. Prebiotic Effects: Metabolic and Health Benefits.Br. J. Nutr.2010,104, S1–S63.
235. Hamer, H.; De Preter, V.; Windey, K.; Verbeke, K. Functional analysis of colonic bacterial metabolism:Relevant to health?Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.2012,302, G1–G9.
236. Zhang, T.; Yang, Y.; Liang, Y.; Jiao, X.; Zhao, C. Beneficial Effect of Intestinal Fermentation of Natural Polysaccharides.Nutrients 2018,10, 1055.
237. Zhao, R.; Yang, W.; Pei, F.; Zhao, L.; Hu, Q.In vitrofermentation of six kinds of edible mushrooms and itseffects on fecal microbiota composition.LWT-Food Sci. Technol.2018,96, 627–635.
238. Yu, Z.; Liu, B.; Mukherjee, P.; Newburg, D.Trametes versicolorExtract Modifies Human Fecal MicrobiotaComposition In vitro.Plant. Food Hum. Nutr. 2013,68, 107–112.
239. Poeker, S.A.; Geirnaert, A.; Berchtold, L.; Greppi, A.; Krych, L.; Steinert, R.E.; de Wouters, T.; Lacroix, C.Understanding the prebiotic potential of different dietary fibers using anin vitrocontinuous adultfermentation model (PolyFermS).Sci. Rep.2018,8, 4318.
240. Gargano, M.L., van Griensven, L.J.L.D., Isikhuemhen, O.S., Lindequist, U., Venturella, G., Wasser, S.P. & Zervakis, G.I. (2017). Medicinal mushrooms: Valuable biological resources of high exploitation potential. Plant Biosystems 151, 548–565.
241. Koutrotsios, G., Patsou, M., Mitsou, E., Bekiaris, G., Kotsou, M., & Tarantilis, P. et al. (2019). Valorization of Olive By-Products as Substrates for the Cultivation of Ganoderma lucidum and Pleurotus ostreatus Mushrooms with Enhanced Functional and Prebiotic Properties. Catalysts, 9(6), 537.
242. Fukuda, S., Toh, H., Hase, K., Oshima, K., Nakanishi, Y., Yoshimura, K., . . . Suzuki, T. (2011). Fukuda, S. et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. Nature 469, 543. Nature, 469(5), 543- 547.
243. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota : introducing the concept of prebiotics. J Nutr 1995; 25: 1401-1412.
244. Koutrotsios, G., Danezis, G., Georgiou, C.A. & Zervakis, G.I. (2020). Elemental content in Pleurotus ostreatus and Cyclocybe cylindracea mushrooms: Correlations with concentrations in cultivation substrates and effects on the production process. Molecules 25(9), 2179; doi: 10.3390/molecules25092179.
245. Tagkouli, D., Kaliora, A., Bekiaris, G., Koutrotsios, G., Christea, M., Zervakis, G.I. & Kalogeropoulos, N. (2020). Free amino acids in three Pleurotus species cultivated on agricultural and agro-industrial by-products. Molecules 25(17), 4015; doi: 10.3390/molecules25174015.
246. Koutrotsios, G., Kalogeropoulos, N., Kaliora, A. & Zervakis, G.I. (2018) Toward an increased functionality in oyster (Pleurotus) mushrooms produced on grape marc or olive mill wastes serving as sources of bioactive compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 66, 5971–5983.
247. Koutrotsios, G., Kalogeropoulos, N., Stathopoulos, P., Kaliora, A. & Zervakis, G.I. (2017). Bioactive compounds and antioxidant activity exhibit high intraspecific variability in Pleurotus ostreatus mushrooms and correlate well with cultivation performance parameters. World Journal of Microbiology and Biotechnology 33, 98. doi: 10.1007/s11274-017-2262-1.

248. Sakellari, A., Karavoltsos, S., Tagkouli, D., Rizou, C., Sinanoglou, V.J., Zoumpoulakis, P., Koutrotsios, G., Zervakis, G.I. & Kalogeropoulos, N. (2019). Trace elements in *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii* and *P. nebrodensis* mushrooms cultivated on various agricultural by-products. *Analytical Letters* 52, 2692–2709; doi: 10.1080/00032719.2019.1594865.
249. Zervakis, G.I. & Koutrotsios, G. (2017). Solid state fermentation of plant residues and agro-industrial wastes for the production of medicinal mushrooms. In *Medicinal Plants and Fungi: Recent Advances in Research and Development*, pp. 365–396. Edited by D.C. Agrawal, H.-S. Tsay, L.-F. Shyur, Y.-C. Wu & S.-Y. Wang. Springer Nature Singapore; doi: 10.1007/978-981-10-5978-0
250. Liu, S., et al., Starch and starch hydrolysates are favorable carbon sources for bifidobacteria in the human gut. *BMC Microbiol*, 2015. 15: p. 54
251. Roberfroid M. B. (1999). Concepts in Functional Foods : The Case of Inulin and Oligofructose. *J.Nutr.* 129 : 1398S-1401S
252. Olano-Martin E., Mountzouris K. C., Gibson G.R. & Rastall R. A (2000) In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *British Journal of Nutrition*, 83: 247-255. UK
253. Vanderhaeghen S, Lacroix C, Schwab C. Methanogen communities in stools of humans of different age and health status and co-occurrence with bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2015; 362:fnv092; PMID:26025070
254. Hamer, H.; De Preter, V.; Windey, K.; Verbeke, K. Functional analysis of colonic bacterial metabolism: Relevant to health? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012, 302, G1–G9.
255. Bereswill S, Fischer A, Plickert R, Haag LM, Otto B, Kuhl AA, Dasti JI, Zautner AE, Muñoz M, Loddenkemper C, et al.. Novel murine infection models provide deep insights into the “menage a trois” of *Campylobacter jejuni*, microbiota and host innate immunity. *PLoS One* 2011; 6:e20953; PMID:21698299
256. Adlercreutz H, Pulkkinen MO, Hamalainen EK, Korpela JT. Studies on the role of intestinal bacteria in metabolism of synthetic and natural steroid hormones. *J. Steroid Biochem.* 1984;20:217–229.
257. Plottel CS, Blaser MJ. Microbiome and malignancy. *Cell Host Microbe.* 2011;10:324–335.
258. Flores R, Shi J, Fuhrman B, Xu X, Veenstra TD, Gail MH, et al. Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study. *J. Transl. Med.* 2012;10:253.
259. Dalile, B.; Oudenhove, L.; Vervliet, B.; Verbeke, K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2019, 16, 461–478.
260. Fuhrman BJ, et al. Associations of the fecal microbiome with urinary estrogens and estrogen metabolites in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(12):4632–4640. doi: 10.1210/jc.2014-2222.
261. Preidis GA, et al. Probiotics stimulate enterocyte migration and microbial diversity in the neonatal mouse intestine. *FASEB J.* 2012;26(5):1960–1969. doi: 10.1096/fj.10-177980.
262. Gavini, C. Differences in the Distribution of Bifidobacterial and Enterobacterial Species in Human Faecal

- Microflora of Three Different (Children, Adults, Elderly) Age Groups. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2001, 13, 40–45.
263. Heimann, E.; Nyman, M.; Pålbrink, A.-K.; Lindkvist-Petersson, K.; Degerman, E. Branched short-chain fatty acids modulate glucose and lipid metabolism in primary adipocytes. *Adipocyte* 2016, 5, 359–368.
264. Morrison, D.; Preston, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 2016, 7, 1–12.