



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

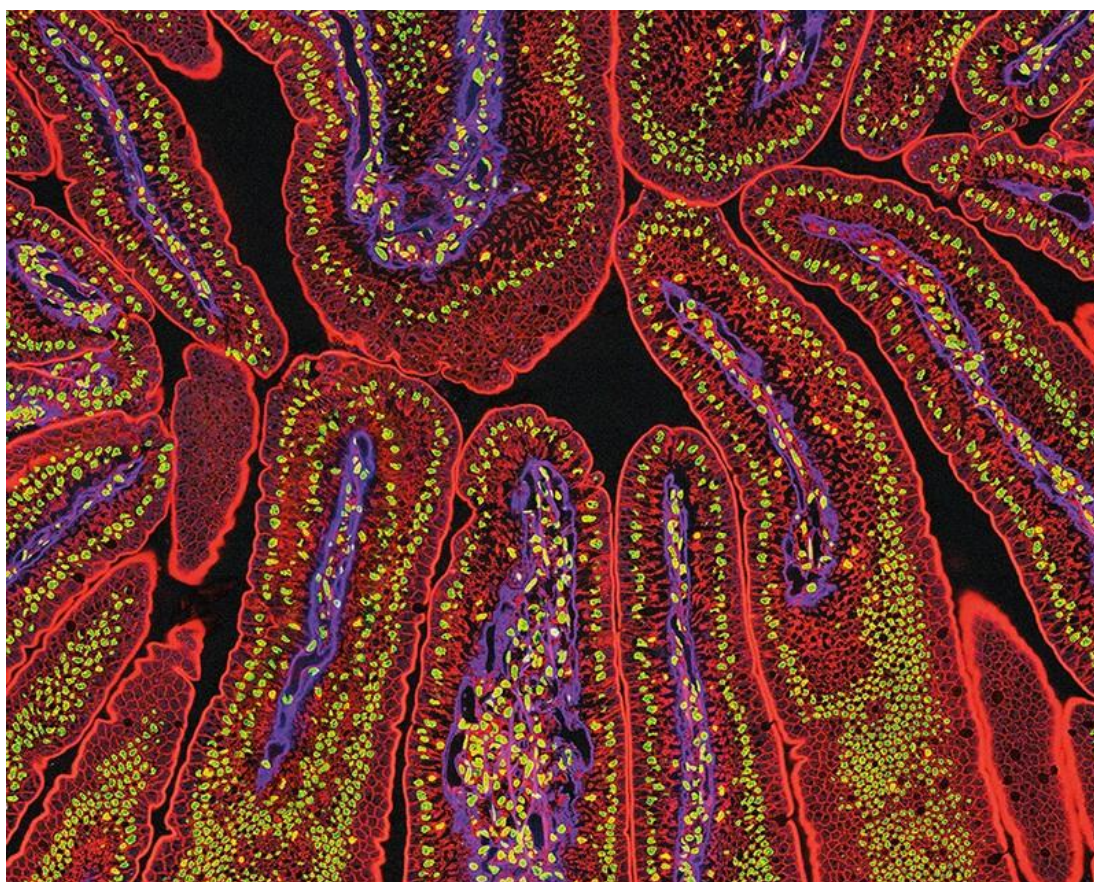
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**Επίδραση της κατανάλωσης σνακ εμπλουτισμένου με μανιτάρια πλούσια σε
β-γλυκάνες στον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών εθελοντών άνω των 60 ετών**

Πτυχιακή εργασία

Γεώργιος Μηλιαράκης



Αθήνα, 2022



HAROKOPIO UNIVERSITY

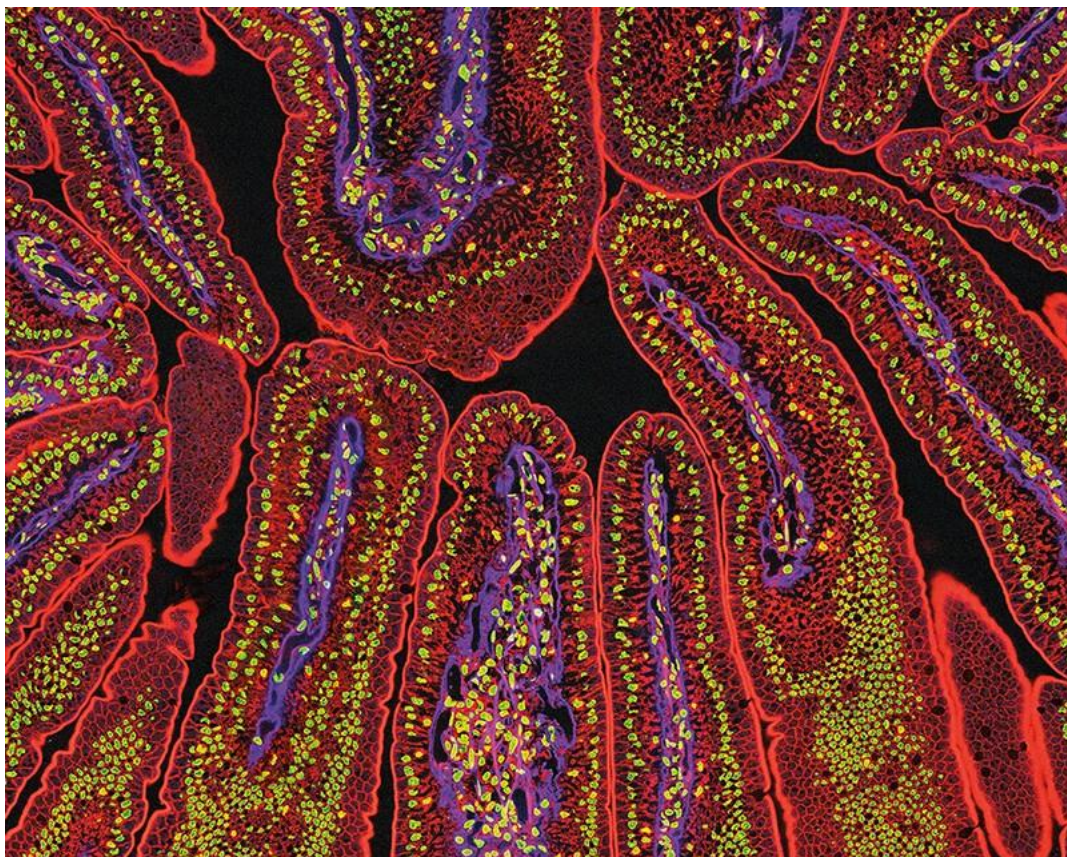
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES AND EDUCATION

DEPARTMENT OF NUTRITION AND DIETETICS

The effect of daily consumption of a novel biscuit enriched with *P. eryngii* on the gut microbiota of healthy elderly subjects.

Bachelor thesis

Georgios Miliarakis



Athens, 2022



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ - ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

**Αδαμαντίνη Κυριακού (Επιβλέπουσα)
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**Μαρία Γιαννακούλια
Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**Γεώργιος Ζερβάκης
Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Γεωπονικό
Πανεπιστήμιο Αθηνών**

Ο Γεώργιος Μηλιαράκης

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα Μαντώ Κυριακού, για τη στήριξη και την ευκαιρία που μου έδωσε να συμμετέχω σε αυτή τη μελέτη, και να κάνω το είδος πτυχιακής που πάντα ήθελα να κάνω, πάνω σε ένα τόσο ενδιαφέρον και πρωτοποριακό αντικείμενο μελέτης. Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Ευαγγελία Κερεζούδη, υπ. διδάκτωρ U.Örebro, για τη μοναδική παρουσία της τόσο σε εργαστηριακά θέματα όσο και θέματα συγγραφής, για την καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθεια της σε όλη τη διαδικασία. Δε μπορώ να παραλείψω ούτε την κα Μήτσου Ευδοκία, ΕΔΙΠ, για την επίσης σημαντική παρουσία και υποστήριξη στο κομμάτι του εργαστηρίου, για την ενεργή βοήθειά της, τις επεξηγήσεις της και τις ατελείωτες ώρες που αφιέρωσε για να μπορέσω να ολοκληρώσω την παρούσα εργασία. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Γεώργιο Ζερβάκη για τα πολύτιμα σχόλια και διορθώσεις.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους φίλους μου που με στήριξαν καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	6
Περίληψη	8
Abstract.....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	10
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	11
1. Μύκητες, μανιτάρια και διατροφή	12
1.1 Μύκητες.....	12
1.2 Τι είναι τα μανιτάρια;.....	12
1.3 Τα μανιτάρια στη διατροφή του ανθρώπου	13
Μακροθρεπτικά συστατικά	13
Μικροθρεπτικά συστατικά	13
1.4 <i>Pleurotus eryngii</i>	14
2. β-γλυκάνες	15
Δομή.....	15
Πηγές και δράσεις.....	15
β-γλυκάνες των δημητριακών	16
β-γλυκάνες των μανιταριών	16
3. Εντερικός μικροβιόκοσμος	17
3.1 Ορισμός	17
3.2 Σύσταση	18
3.3 Ο ρόλος του εντερικού μικροβιόκοσμου στην ομοίωση του Ανθρώπου	20
Αλληλεπιδράσεις εντερικού μικροβιόκοσμου-ξενιστή σε επίπεδο μεταβολισμού	20
Παραγωγή Λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου	21
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	22
<i>Roseburia spp</i>	22
<i>Eubacterium rectale</i>	22
<i>Akkermansia muciniphila</i>	22
De novo βιοσύνθεση βιταμινών	24
Μεταβολισμός χολικών αλάτων και οστικός μεταβολισμός	24
Ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες.....	24
Ανταγωνιστικές σχέσεις με άλλους μικροοργανισμούς.....	25
3.4 Ο ρόλος του εντερικού μικροβιόκοσμου στη Νόσο του Ανθρώπου	25
Εντερικός μικροβιόκοσμος και γαστρεντερικές νόσοι	25
Εντερικός μικροβιόκοσμος και καρδιαγγειακά νοσήματα	25
Εντερικός μικροβιόκοσμος και καρκίνος.....	25
Άξονας εντερικού μικροβιόκοσμου-εγκεφάλου στο ΚΝΣ	27
3.5 Ο ρόλος της διατροφής στον εντερικό μικροβιόκοσμο	27
Άμεσοι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης της τροφής με τον εντερικό μικροβιόκοσμο.....	27
Συστατικά της τροφής ως ρυθμιστές.....	28
Πρεβιοτικά -ορισμός.....	29
Πρεβιοτική δράση των β-γλυκανών από εδώδιμα μανιτάρια.....	29

3.6 Ο εντερικός μικροβιόκοσμος στους ηλικιωμένους.....	19
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	32
1. Μελέτη FUNGLUCAN	32
1.1 Σκοπός.....	32
1.2 Μεθοδολογία υλοποίησης της μελέτης παρέμβασης	32
1.3 Κριτήρια επιλογής εθελοντών	32
2. Πρωτόκολλα δειγματοληψίας και αποθήκευσης βιολογικών δειγμάτων	33
2.1 Σκοπός.....	33
2.2 Πρωτόκολλο δειγματοληψίας, επεξεργασίας και αποθήκευσης κοπράνων.....	33
2.3 Πρωτόκολλο δειγματοληψίας, επεξεργασίας και αποθήκευσης ούρων.....	33
2.4 Πρωτόκολλο δειγματοληψίας, επεξεργασίας και αποθήκευσης αίματος και συστατικών του	33
3. Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού DNA από δείγμα κοπράνων	34
3.1 Σκοπός.....	34
3.2 Αρχή μεθόδου	34
3.3 Αντιδραστήρια	34
3.4 Εξοπλισμός.....	34
3.5 Πειραματική διαδικασία.....	35
I. Πρωτόκολλο για τη λύση των κυττάρων	35
II. Πρωτόκολλο για την κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων:	35
III. Απομάκρυνση του RNA, πρωτεϊνών και καθαρισμός του DNA:	35
4. Ποσοτικός προσδιορισμός βακτηριακού DNA με Real-Time PCR (RT-qPCR)	36
4.1 Σκοπός.....	36
4.2 Αρχή μεθόδου	36
4.3 Αντιδραστήρια	37
4.4 Εξοπλισμός.....	38
4.5 Πειραματική διαδικασία.....	38
5. Στατιστική ανάλυση	39
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	40
Περιγραφικά χαρακτηριστικά δείγματος	40
Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών	42
Ποσοστιαία μεταβολή των μικροβιακών πληθυσμών	42
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

Περίληψη

Εισαγωγή Ο αριθμός των βακτηρίων που αποικούν το ανθρώπινο κόλον υπολογίζεται από 1,3 έως 10 φορές μεγαλύτερος από τον αριθμό των κυττάρων του σώματος. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος αλληλοεπιδρά με τον ανθρώπινο οργανισμό σε πολλά επίπεδα και κατέχει τόσο σημαντικό ρόλο στην ομοιοστάσή του, ώστε να συσχετίζεται με ολόένα αυξανόμενο πλήθος φυσιολογικών λειτουργιών και παθολογικών καταστάσεων. Ο εντερικός μικροβιόκοσμος των ηλικιωμένων εμφανίζει μειωμένη βιοποικιλότητα, γεγονός που τους καθιστά πληθυσμιακή ομάδα η οποία θα μπορούσε να επωφεληθεί από διαιτητικά πρεβιοτικά. Ολόένα ερευνητικό ενδιαφέρον αποκτούν ως πρεβιοτικά οι β-γλυκάνες, ένας σύνθετος πολυσακχαρίτης, και ιδιαίτερα από μανιτάρια.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης της κατανάλωσης ενός μπισκότου εμπλουτισμένου με *P. eryngii* στον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών ατόμων άνω των 60 ετών.

Μεθοδολογία Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της πιλοτικής μελέτης FUNGLCAN. Υγιείς εθελοντές άνω των 60 ετών, απουσία φαρμακευτικής αγωγής, κατανάλωσαν το εμπλουτισμένο μπισκότο και στη συνέχεια το εικονικό για 3 μήνες, με ενδιάμεση περίοδο αποχής 2 μηνών. Κατά τη διάρκεια της παρέμβασης ζητήθηκε από τους εθελοντές να μην αλλάξουν την συνήθη δίαιτά τους και ελέγχθηκε η προσκόλληση των εθελοντών στην παρέμβαση από κατάλληλο προσωπικό ανά 15 ημέρες. Ελέγχθηκε επίσης η γαστρεντερική ανοχή του μπισκότου με εγκεκριμένα ερωτηματολόγια. Στην αρχή και το τέλος κάθε τριμήνου έγιναν ανθρωπομετρικές μετρήσεις και συλλέχθηκαν δείγματα αίματος, ούρων και κοπράνων για αιματολογικές, βιοχημικές, ανοσολογικές, μεταβολομικές, και μικροβιολογικές αναλύσεις. Απομονώθηκε το μικροβιακό DNA από δείγμα κοπράνων, ελέγχθηκε για την καθαρότητα του και υπεβλήθη σε Real Time-qPCR με σκοπό την ποσοτικοποίηση των αντιγράφων του γονιδίου 16S-rRNA ολικών βακτηρίων, καθώς και επιλεγμένων παραγωγών βουτυρικού οξέος, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia* spp, *Eubacterium rectale* και *Akkermansia muciniphila*. Υπολογίστηκαν οι ακριβείς αριθμοί των ανωτέρω μικροβιακών πληθυσμών ως $\log \text{copies}_{16\text{S-RNA}} \text{ g}^{-1}$ κοπράνων καθώς και η μεταβολή (Δ) και ποσοστιαία ($\Delta\%$) μεταβολή τους. Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε στο πρόγραμμα Stata 15.1 και ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε το $p=0.05$.

Αποτελέσματα Δείγμα $N=13$ εθελοντών, 5 άνδρες, 8 γυναίκες, ολοκλήρωσε την παρέμβαση και συμμετείχε στην παρούσα εργασία. Το εμπλουτισμένο μπισκότο φάνηκε να είναι καλά ανεχτό και να μην επιφέρει δυσάρεστα γαστρεντερικά συμπτώματα. Φάνηκε επίσης ότι δεν επιδρά στο βάρος ($p>0.05$). Οι εθελοντές ξεκίνησαν την παρέμβαση με ήδη πολύ υψηλά επίπεδα τόσο στα ολικά βακτήρια όσο και στα επιμέρους στελέχη/ομάδες. Δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στους εξεταζόμενους μικροβιακούς πληθυσμούς $-p>0.05$ σε όλες τις εξεταζόμενες μεταβλητές. Μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών πιθανώς να ενισχύσει κάποιες τάσεις αύξησης που παρατηρήθηκαν σε συγκεκριμένους πληθυσμούς.

Λέξεις κλειδιά: εντερικός μικροβιόκοσμος, *P. eryngii*, β-γλυκάνες, ηλικιωμένοι, βουτυρικό οξύ

Abstract

Introduction There are 1.3-10 times more microbial cells in the human gut than the body cells. The gut microbiota interact with the host on many levels, with growing evidence supporting its central role in human homeostasis and disease. The elders appear to have reduced microbial richness and diversity; therefore, their population can benefit from a prebiotic snack that could enhance their gut microbiota. Increasing scientific interest is drawn to β -glucans as prebiotics, especially from mushrooms.

Aim The aim of this study was to assess the effect of the daily consumption of a novel biscuit (enriched with *P. eryngii* mushrooms rich in β -glucans) on the gut microbiota of healthy subjects over 60 years old.

Methods Healthy subjects of both sexes, above 60 years old, who met the eligibility criteria, were randomly assigned in a double-blind manner to one of the intervention groups, i.e., daily consumption of the novel biscuit (biscuit enriched with mushroom powder containing 3g of β -glucans) or daily consumption of the placebo one for 3 months. After a washout period of 2 months, the subjects consumed the novel biscuit or the placebo one in a cross-over design for another 3 months. Throughout the interventional period, the subjects' dietary intake, anthropometrical data, biochemical markers and food's tolerance markers were monitored with the use of validated questionnaires. The total microbial DNA was extracted from stool samples and underwent qPCR-based quantification of the total bacteria, as well as selected butyrate producers, namely *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia* spp, *Eubacterium rectale* και *Akkermansia muciniphila*. At the beginning (baseline) and the end of each trimester, absolute values, as well as the difference was analyzed and a p -value of <0.05 was considered statistically significant.

Results Sample size $n=13$, 8 female, 5 male subjects. There were no significant differences on anthropometrical measurements and food's tolerance markers, with no recorded side effects between the placebo or mushroom-enriched groups. The baseline levels of the studied microbial populations were comparable between groups, indifferent to the type of biscuit that was consumed ($p>0.05$). No statistically significant difference was noted among the quantified microbial populations, in either group ($p>0.05$). Further sample analysis could amplify certain increase trends observed in selected microbial groups.

Keywords: gut microbiota, *P. eryngii*, β -glucans, elderly, butyrate

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Βιοποικιλότητα εδώδιμων μανιταριών, (Kumar et al, 2021).....	13
Εικόνα 2: μανιτάρι (καρπόσωμα) <i>P. eryngii</i> (Diego Delso, CC BY-SA 3.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=21884669).....	14
Εικόνα 3: Αλληλεπιδράσεις ΕΜ—ξενιστή στον μεταβολισμό των μεθυλομάδων(Krautkramer et al., 2020)	23

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Διατροφική ανάλυση <i>P. eryngii</i> % ξηρού βάρους, (Acay et a., 2021).....	15
Πίνακας 2: Εκτιμήσεις αριθμού σωματικών και βακτηριακών κυττάρων σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες (Sender et al., 2016).....	17
Πίνακας 3: Μεταβολίτες που παράγονται από τον ΕΜ, ανάλογα με τα αρχικά μόρια που χρησιμοποιούνται ως θρεπτικά υποστρώματα(Lamichhane et al., 2018)	20
Πίνακας 4: Ενδεικτικός προγραμματισμός qPCR για προσδιορισμό ολικών βακτηρίων	37
Πίνακας 5: Δεδομένα των εκκινήσεων που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR.....	38
Πίνακας 6:Περιγραφικά χαρακτηριστικά κατά την έναρξη και το τέλος της μελέτης για το σύνολο των εθελοντών (N=13).	41
Πίνακας 7: Ποσοτικός προσδιορισμός μικροβιακών πληθυσμών (qPCR; logcopies16S rRNAg ⁻¹ κοπράνων) στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης για το σύνολο των εθελοντών.	41
Πίνακας 8: Ποσοστιαία διαφορά του ποσοτικού προσδιορισμού των μικροβιακών πληθυσμών (qPCR; logcopies16S rRNA / g κοπράνων) του τέλους σε σχέση με την αρχή της παρέμβασης για το σύνολο των εθελοντών.....	43

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου της ζωής των μανιταριών, (Motta et al, 2021)	12
Σχήμα 2: Δομές β-γλυκανών, (Cerletti et al, 2021)	15
Σχήμα 3: ταξινομική αναπαράσταση της ποικιλομορφίας του εντερικού μικροβιόκοσμου με παραδείγματα. Εντός πλαισίου βρίσκονται παραδείγματα μικροβίων που εκπροσωπούν το 90% των εντερικών μικροβίων. (Rinninnella et al., 2019)	19

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς για την ομάδα των εθελοντών που έλαβε το εικονικό τρόφιμο.	43
Γράφημα 2: Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς για την ομάδα των εθελοντών που έλαβε το εμπλουτισμένο με <i>P.eryngii</i> τρόφιμο	44

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

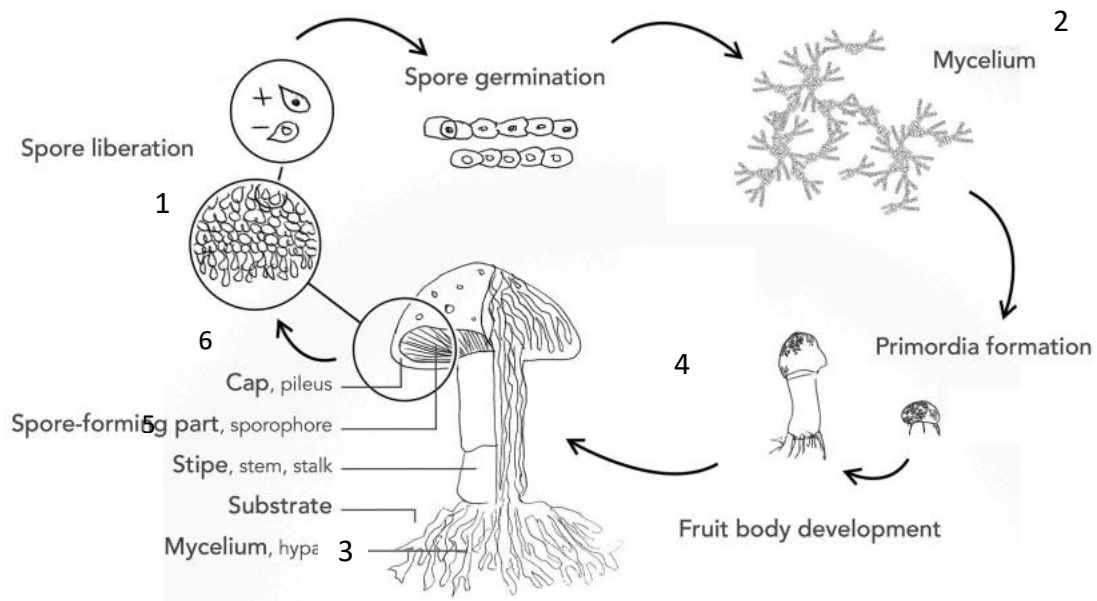
ΕΜ	Εντερικός Μικροβιόκοσμος
ΙΦΝΕ	Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου
ΓΕΣ	Γαστρεντερικός Σωλήνας
SCFA	Short-Chain Fatty Acids, Λιπαρά Οξέα Βραχείας Αλύσου
ΣΕΕ	Σύνδρομο Ευερέθιστου Εντέρου
ΣΔτII	Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου II
WNT	Wingless Int-1
GADD153	Growth-arrest-and-DNA-Damage-inducible gene
ΚΠΕ	Καρκίνος του παχέος εντέρου
PCR	Polymerase Chain Reaction, Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
CVD	CardioVascular Disease, Καρδιαγγειακή Νόσος
TMAO	Trimethylamine N-Oxide N-οξείδιο της τριμεθυλαμίνης
LPS	Lipopolysaccharides, Λιποπολυσακχαρίτες
FS	Fermentation Supernatant, Υπερκείμενο Ζύμωσης
Caco-2	Κύτταρα καρκίνου του παχέος εντέρου
NMR	Nuclear Magnetic Resonance, Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
CRP	C-Reactive Protein, C-Αντιδρώσα Πρωτεΐνη
BHT	Butylated hydroxytoluene, Βουτυρο-υδροξυτολουένιο
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, Αιθυλενοδιαμmino-τετραοξικό οξύ
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells, Μονοπύρρηνα Περιφερικού Αίματος
ΔΜΣ	Δείκτης Μάζας Σώματος

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Μύκητες, μανιτάρια και διατροφή

1.1 Μύκητες

Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί, ετερότροφοι, ωσμότροφοι οργανισμοί και παρουσιάζουν σαπροτροφικές, παρασιτικές ή συμβιωτικές οικολογικές εξειδικεύσεις σε χερσαία ή υδάτινα (κυρίως γλυκού νερού) οικοσυστήματα (Webster & Weber, 2007). Σύμφωνα με πρόσφατη φυλογενετική ανάλυση, το βασίλειο των μυκήτων ταξινομείται σε 9 υποβασίλεια (Dikarya, Mucoromyceta, Zoopagomyceta, Chytridiomyceta, τα οποία περιλαμβάνουν πολλαπλά φύλα, και Aphelidiomyceta, Basidiobolomyceta, Blastocladiomyceta, Olpidiomyceta, Rozellomyceta, τα οποία περιλαμβάνουν ένα φύλο το καθένα) 28 φύλα και 77 τάξεις (Tedersoo et al., 2018). Στο υποβασίλειο των Δικάρυων υπάγονται τα φύλα Βασιδιομύκητες (Basidiomycota), Ασκομύκητες (Ascomycota) και Εντοριζομύκητες (Entorrhizomycota) (Tedersoo et al., 2018). Οι μύκητες αναπαράγονται με σπόρια (spores, βλ. 1, Σχήμα 1), τα οποία, όταν βρεθούν σε θρεπτικό υπόστρωμα, βλαστάνουν και το αποικίζουν με την ανάπτυξη ενός συστήματος διακλαδισμένων κοίλων σωληνίσκων, που ονομάζονται υφές ("hyphae", βλ. 2, Σχήμα 1) που σχηματίζουν το μυκήλιο ("mycelium", βλ. 3, Σχήμα 1). Το μυκήλιο των βασιδιομυκήτων, που θα μας απασχολήσουν στην παρούσα μελέτη, διαθέτει και εγκάρσια διαφράγματα, τα "septa" (Webster & Weber, 2007).



Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου της ζωής των μανιταριών, (Motta et al, 2021)

1.2 Τί είναι τα μανιτάρια;

Το μανιτάρι είναι το καρπόσωμα ("fruit body", βλ. 4, Σχήμα 1) των μακρομυκήτων, δηλαδή των μυκήτων που σχηματίζουν αναπαραγωγικά όργανα τα οποία είναι ορατά από τον ανθρώπινο οφθαλμό. Οι Miles & Chang (2008) προτείνουν ως ορισμό: «μανιτάρι είναι ο επίγειος ή υπόγειος μακρομύκητας με διακριτό καρπόσωμα που είναι αρκετά μεγάλο, ώστε να είναι ορατό με γυμνό οφθαλμό και να μπορεί να συλλεχθεί με το χέρι». Ο ορισμός αυτός περιγράφει περίπου 20.000 είδη μυκήτων (κυρίως βασιδιομύκητες) και περιλαμβάνει και ορισμένους ασκομύκητες. Συμπεριλαμβάνει επίσης μύκητες (βασιδιομύκητες και ασκομύκητες) που μεγαλώνουν υπόγεια

(Miles & Chang, 2008). Το καρπόσωμα των βασιδιομυκήτων αποτελείται από τον στύπο (“stipe”, βλ. 5, Σχήμα 1) και τον πύλο (“cap” ή “pileus”, βλ. 6, Σχήμα 1)(Motta et al., 2021).

Από τα περίπου 20.000 είδη μυκήτων που σχηματίζουνμανιτάρια, τουλάχιστον 200 θεωρούνται εδώδιμα, ενώ περίπου 25 καταναλώνονται ευρέως (Aida et al. 2009). Τα μανιτάρια επίσης χρησιμοποιούνται ως διατροφο-θεραπευτικά τρόφιμα (nutraceuticals) χάρη στην υψηλή λειτουργική και διατροφική τους αξία. Τα τελευταία χρόνια έχουν λάβει επίσης αξιοσημείωτη προσοχή λόγω της οικονομικής σημασίας τους καθώς και των οργανοληπτικών και θεραπευτικών ιδιοτήτων τους. Δεν είναι εύκολο να διαφοροποιηθούν τα φαρμακευτικά μανιτάρια από τα εδώδιμα, καθώς λίγα φαρμακευτικά μανιτάρια είναι εδώδιμα και πολλά κοινά εδώδιμα μανιτάρια έχουν φαρμακευτικές ιδιότητες (Kumar et al., 2021).



Εικόνα 1: Βιοποικιλότητα εδώδιμων μανιταριών, (Kumar et al, 2021)

1.3 Τα μανιτάρια στη διατροφή του ανθρώπου

Η κατανάλωση μανιταριών, αν και έχει καταγραφεί εδώ και χιλιάδες χρόνια, τα τελευταία χρόνια μόνο παρουσιάζει σημαντική αύξηση. Τα μανιτάρια καταναλώνονται για την υφή, το άρωμα και τη γεύση τους και είναι άριστη επιλογή για τη διατροφική τους αξία και τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες.(Reis et al., 2017) Συγκεκριμένα, η χρήση των μανιταριών για φαρμακευτικούς λόγους είχε ήδη εξαπλωθεί σημαντικά από την αρχαιότητα στους πολιτισμούς της Ελλάδας, της Ρώμης, της Κίνας και της Ινδίας και εδώ και αιώνες, αποτελούν μέρος της παραδοσιακής ανατολικής ιατρικής, με κάποια από αυτά να εμφανίζουν - εκτός των ήδη αναφερθέντων - και ψυχοτροπικές δράσεις (Motta et al., 2021)

Μακροθρεπτικά συστατικά

Όσον αφορά τα μακροθρεπτικά συστατικά, ενδιαφέρον παρουσιάζει το χαμηλό ενεργειακό τους περιεχόμενο σε συνδυασμό με τα χαμηλά λιπαρά και την υψηλή περιεκτικότητα σε εδώδιμες ίνες (**Error! Reference source not found.**) (Acay et al., 2021). Ιδιαίτερα σημαντικοί υδατάνθρακες είναι οι β-γλυκάνες, μέσω των οποίων ασκούν κυρίως τις δράσεις που αφορούν την παρούσα μελέτη και οι οποίες θα συζητηθούν στο Κεφ. 2.

Μικροθρεπτικά συστατικά

Τα μανιτάρια έχουν μελετηθεί αρκετά και για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και το αντιοξειδωτικό τους περιεχόμενο. Συγκεκριμένα έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί

φαινολικές ενώσεις, τοκοφερόλες (βιταμίνη Ε), ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) και καροτενοειδή (βιταμερή βιταμίνης Α) (Ferreira et al., 2009). Οι Kozarski et al., 2015, στη μελέτη τους περιγράφουν την παρουσία επίσης φλαβονοειδών, βιταμίνης D₂, και ιχνοστοιχείων όπως ψευδάργυρο (Zn), χαλκό (Cu), μαγγάνιο (Mn), σίδηρο (Fe) και σελήνιο (Se) (Kozarski et al., 2015).

1.4 *Pleurotus eryngii*



Εικόνα 2: μανιτάρι (καρπόσωμα) *P. eryngii* (Diego Delso, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=21884669>)

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε δικάρυο στέλεχος του είδους *Pleurotus eryngii*, της οικογένειας Pleurotaceae, της τάξης Agaricales, που υπάγεται στο φύλο Basidiomycota (βασιδιομύκητες) (Ζερβάκης, 1992). Το εδώδιμο αυτό μανιτάρι αρχικά καλλιεργήθηκε στην Ιταλία, όπου είναι γνωστό ως “cardoncello” (Kim et al., 2013; L. Y. Liu et al., 2013). Καλλιεργείται επίσης ευρέως στην Ευρώπη, τη Μέση Ανατολή και τη Βόρεια Αμερική καθώς και σε πολλά μέρη της Ασίας (Choi et al., 2009). Σύμφωνα με τους Zervakis & Balis (1996), ο πύλος του ώριμου *P. eryngii* έχει μέγεθος 4,0-12,5 cm, σχήμα ως επί το πλείστον επίπεδο και κυκλικό, λείο, ξηρή υφή, χρώμα ζεστό καφέ έως ανοιχτό μπεζ έως μπεζ καφέ, με πολυάριθμες μπεζ καφέ έως ανοιχτό καφέ σκάμους, με ομοιόμορφο ή ελαφρώς καμπυλωτό χείλος, γυρισμένο προς τα έξω. Τα ελάσματα του είναι λεπτά, φαρδιά, όχι ιδιαίτερα πυκνά και συντρέχουν ολόκληρα στην κορυφή του στίπου, χωρίς αναστομώσεις, χρώματος κρεμ έως ιβουάρ έως ανοιχτό μπεζ-πορτοκαλί. Ο στύπος έχει μέγεθος 1,5-3,5 x 0,5-2,5 cm, είναι κεντρικός και σπάνια υποκεντρικός, κυρίως κυλινδρικός, συμπαγής, με κροκίδωση κυρίως γύρω από τη βάση του, χρώματος κρεμ έως ιβουάρ. Η σάρκα του είναι σφιχτή αλλά μερικές φορές ελαστική, συμπαγής, χρώματος λευκού έως κρεμ. Το άρωμα του είναι από ήπιο έως προσομοιάζει με γλυκάνισο (Zervakis & Balis, 1996). Η γεύση του είναι ήπια και μοναδικά ευχάριστη. Τα καρποσώματα του *P. eryngii* είναι εύκολο να καλλιεργηθούν (Koutrotsios et al., 2018; Rodriguez Estrada & Royse, 2007) με υψηλή απόδοση και τα προϊόντα τους είναι δημοφιλή στην αγορά λόγω των αξιολογών οργανοληπτικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν.

Το συγκεκριμένο μανιτάρι είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ακόρεστα λιπαρά οξέα, βιταμίνες και άλλα θρεπτικά συστατικά ενώ είναι ισχνό σε λίπος, γεγονός που το κάνει ένα τρόφιμο υψηλής ποιότητας αλλά χαμηλής ενέργειας (Koutrotsios et al., 2018; Zhang et al., 2020). Έρευνες έχουν δείξει ότι αυτό το εδώδιμο μανιτάρι διαθέτει ένα ευρύ φάσμα φαρμακευτικών ιδιοτήτων, είναι υψηλής θρεπτικής αξίας και οι πολυσακχαρίτες του είναι σημαντικές δραστικές ενώσεις (He et al., 2016; Roncero-Ramos & Delgado-Andrade, 2017). Οι πολυσακχαρίτες του *P. eryngii* ελκύουν ολοένα αυξανόμενο ενδιαφέρον λόγω των αντιοξειδωτικών, αντι-

νεοπλασματικών, ανοσορυθμιστικών, αντιβακτηριακών, αντι-υπερλιπιδαιμικών και άλλων ιδιοτήτων τους (Zhang et al., 2020). Οι πολυσακχαρίτες του και συγκεκριμένα οι β-γλυκάνες του θα σχολιαστούν εκτενέστερα στο επόμενο κεφάλαιο.

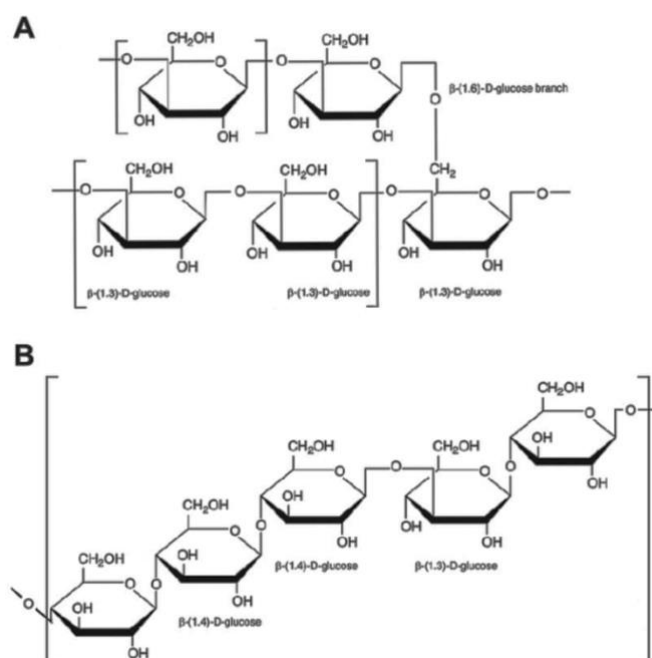
Πίνακας 1: Διατροφική ανάλυση *P. eryngii* % ξηρού βάρους, (Acay et al., 2021)

Διατροφική σύσταση ανά 100g ξηρού τροφίμου	Μέσος όρος $\pm$ SD
Ενέργεια (Kcal)	3,8 Kcal
Υδατάνθρακες (g)	68,4 $\pm$ 0,59
Λίπη (g)	3,34 $\pm$ 0,02
% εκ των οποίων κορεσμένα λ.ο. (SFA)	18,25 $\pm$ 0,97
% εκ των οποίων μονοακόρεστα λ.ο. (MUFA)	44,5 $\pm$ 2,45
% εκ των οποίων πολυακόρεστα λ.ο. (PUFAs)	37,2 $\pm$ 2,05
Πρωτεΐνες (g)	15,93 $\pm$ 0,06
Εδώδιμες ίνες (g)	24,6 $\pm$ 0,05
Τέφρα (g)	9,9 $\pm$ 0,01

2. β-γλυκάνες

Δομή

Οι β-γλυκάνες είναι βασικά συστατικά των μανιταριών και εντοπίζονται επίσης στη βρώμη, στο κριθάρι, σε ζύμες, βακτήρια και φύκη. Είναι σύνθετοι πολυσακχαρίτες, υδατανθρακικά πολυμερή που αποτελούνται από μονομερή β-D-γλυκόζης ενωμένα με β-γλυκοζιτικούς δεσμούς. Συγκεκριμένα, συνδέονται με β-1,3, β-1,4 ή β-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Murphy et al., 2021)



Σχήμα 2: Δομές β-γλυκανών, (Cerletti et al., 2019)

Πηγές και δράσεις

Στις διάφορες φυσικές πηγές β-γλυκανών υπάρχει μια ποικιλία δομών που οφείλονται σε διαφορετικές αναλογίες β-1,3/β-1,4 δεσμών, στην παρουσία/απουσία διακλαδώσεων με β-

1,6 δεσμούς, σε διαφορετικό βαθμό πολυμερισμού, σε διακυμάνσεις στο μοριακό βάρος και στη διαλυτότητα. (Murphy et al., 2021) Σε μύκητες, ζύμες, φύκη και βακτήρια απαντώνται μακριές β-1,3 αλυσίδες με β-1,6 διακλαδώσεις (**Error! Reference source not found.**, A). Από την άλλη, στα δημητριακά απαντώνται β-1,3 και β-1,4 σε διάφορες αναλογίες με πλήρη απουσία β-1,6 δεσμών και διακλαδώσεων (**Error! Reference source not found.**,B) (Cerletti et al., 2021). Ανάλογα με την πηγή και τη δομή τους, οι β-γλυκάνες έχουν αρκετά διαφορετικές επιδράσεις στον οργανισμό οι οποίες θα συζητηθούν παρακάτω.

β-γλυκάνες των δημητριακών

Στα δημητριακά οι β-γλυκάνες απαντώνται στην αλευρώνη (πρωτεΐνες αποθηκευμένες ως κόκκοι στα κύτταρα των σπόρων), στο υπο-αλευρωνικό στρώμα και στο κυτταρικό τοίχωμα των ενδοσπορίων. Υψηλότερο γλυκανικό περιεχόμενο συναντάται στο κριθάρι, έπειτα στη βρώμη και χαμηλότερο στο σιτάρι και το ρύζι.

Οι β-γλυκάνες από δημητριακά, έχουν κυρίως μεταβολικές δραστηριότητες, όπως για παράδειγμα τη μείωση της χοληστερόλης και της γλυκόζης αίματος. Αυτές οι 1,3-1,4 β-γλυκάνες χαρακτηρίζονται ως εδωδιμες ίνες μετά την πρόσληψή τους και ασκούν τις μεταβολικές τους δράσεις λόγω αυτού του μηχανισμού. Ο β-1,3 σκελετός κάνει τις β-γλυκάνες διαλυτές εδωδιμες ίνες, λόγω της αδυναμίας των ενζύμων στον γαστρεντερικό σωλήνα να τον πέψουν (Murphy et al., 2021).

β-γλυκάνες των μανιταριών

Οι β-γλυκάνες στα μανιτάρια είναι οι βασικοί πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τους τοιχώματος (Cerletti et al., 2021; Jayachandran et al., 2018; Murphy et al., 2021; Zhu et al., 2015). Εμφανίζουν και αυτές γαστρεντερικές/μεταβολικές δράσεις αλλά φαρμακολογικά ταξινομούνται ως τροποποιητές βιολογικής ανταπόκρισης (biological response modifiers, BRMs). (Murphy et al., 2021). Ειδικότερα, οι μυκητιακές β-γλυκάνες φαίνεται να έχουν ένα περισσότερο ανοσο-ρυθμιστικό προφίλ δράσεων που οδήγησε και στη μελέτη τους ως συμπληρωματικές θεραπείες σε λοιμώδη νοσήματα και στον καρκίνο (Dai et al., 2021; el Enshasy & Hatti-Kaul, 2013; Gargano et al., 2017; Motta et al., 2021; Murphy et al., 2020; Tung et al., 2020). Αξίζει να σημειωθεί ότι δε φαίνεται να έχουν κυτταροτοξική δράση στα καρκινικά κύτταρα ή σε όγκους, αλλά να δρουν ενεργοποιώντας κύτταρα του ανοσοποιητικού (Q. Wang et al., 2017).

Τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες φαρμάκου-μάρτυρα έδειξαν ότι εκχύλισμα από μυκήλια *Agaricus blazei* Murill, *Hericium erinaceus* και *Grifola frondosa*, μειώνει τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτταροκινών στο αίμα και βελτιώνει τα συμπτώματα και την ποιότητα ζωής σε ασθενείς με ΙΦΝΕ (Ιδιοπαθείς Φλεγμονώδεις Νόσους του Εντέρου). Επιπροσθέτως, μείωσαν τα συμπτώματα αλλεργίας και άσθματος. Συγκεκριμένα μείωσαν τις ανοσοσφαιρίνες-E (IgE) και τη βασεοφιλική ευαισθησία στις αλλεργίες, καθώς και αύξησαν τα επίπεδα του ανταγωνιστή του υποδοχέα της ιντερλευκίνης 1 (IL-1, IL-1ra), την ιντερλευκίνη 7 (IL-7), τα T-ρυθμιστικά κύτταρα, δενδριτικά κύτταρα και την έκφραση της Ig, Killer Ig υποδοχέων και γονιδίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (HLA) σε ασθενείς με πολλαπλό μυέλωμα (Hetland et al., 2021). Το ίδιο σκεύασμα, φάνηκε να μειώνει και σε υγιείς εθελοντές τις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες IL-1β, τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF-α), την ιντερλευκίνη-17 (IL-17) και την ιντερλευκίνη 2 (IL-2) (Johnson et al., 2009) και τις ενδοκυτταρικές ελεύθερες ρίζες (ROS) (Johnson et al., 2012). Τα παραπάνω μόρια είναι βασικοί μεσολαβητές της γενικευμένης φλεγμονής και στη νόσο από τον SARS-CoV-2, συνεπώς η συμπληρωματική χρήση του ανωτέρω

σκευάσματος θα μπορούσε να έχει προληπτική ή θεραπευτική δράση ως προς τη νόσο (Hetland et al., 2021).

Τα μανιτάρια με την υψηλή περιεκτικότητά τους σε σύνθετους πολυσακχαρίτες, όταν αυτά καταναλωθούν φρέσκα ή αποξηραμένα, αποτελούν σημαντική πηγή θρεπτικών υποστρωμάτων για τους μικροοργανισμούς του γαστρεντερικού σωλήνα (ΓΕΣ) του ανθρώπου και του ποντικού, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα και από τις *in vitro* μελέτες σε κυτταρικές σειρές (Aida et al., 2009; Cerletti et al., 2021; Ferrão et al., 2017; Hetland et al., 2021; Khan et al., 2018; X. Liu et al., 2020; Mitsou et al., 2020; N. Kerezoudi et al., 2021; Yin et al., 2020). Ασκούν αφενός μεν θετική επίδραση στο γαστρεντερικό μικροβιόκοσμο, αφετέρου δε, έχουν αντιμυκητιακή, αντιβιοτική και αντιϊκή δράση (Acay et al., 2021; Dai et al., 2021; Hetland et al., 2021; Reis et al., 2017; Wani et al., 2021). Η προβιοτική δράση των μανιταριών καθώς και οι άλλες τους επιδράσεις στον εντερικό μικροβιόκοσμο θα συζητηθούν πιο αναλυτικά στο Κεφ. 3.5.

3. Εντερικός μικροβιόκοσμος

3.1 Ορισμός

Ο άνθρωπος, όπως και άλλοι ανώτεροι οργανισμοί, παρουσιάζουν συμβιωτική σχέση με ένα μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών οι οποίοι ζουν στις επιφάνειες του σώματος και στις κοιλότητες που έχουν επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον (Ferrão et al., 2017; World Gastroenterology Organisation (WGO), 2014). Ο όρος «εντερικός μικροβιόκοσμος» (ΕΜ) περιγράφει το σύνολο των βακτηρίων, αρχαίων, μυκήτων, πρωτόζωων και ιών που αποικούν τον γαστρεντερικό σωλήνα και έχουν συν-εξελιχθεί με τον ξενιστή αναπτύσσοντας μια σύνθετη και αμοιβαία ωφέλιμη σχέση (συμβιωτική) (Thursby & Juge, 2017a). Ο όρος εντερικός μικροβιόκοσμος ή εντερικό μικροβίωμα προτιμάται έναντι των όρων «εντερική χλωρίδα» ή «φυσιολογική χλωρίδα» καθώς διαιωνίζουν την απαρχαιωμένη ταξινόμηση των βακτηρίων στο βασίλειο των φυτών (World Gastroenterology Organisation (WGO), 2014).

Πίνακας 2: Εκτιμήσεις αριθμού σωματικών και βακτηριακών κυττάρων σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες (Sender et al., 2016)

population segment	body weight [kg]	age [y]	blood volume [L]	RBC count [$10^{12}/L$]	colon content [g]	bac. conc. [$10^{11}/g$ wet] ⁽¹⁾	total human cells [10^{12}] ⁽²⁾	total bacteria [10^{12}]	B:H
ref. man	70	20–30	4.9	5.0	420	0.92	30	38	1.3
ref. woman	63		3.9	4.5	480	0.92	21	44	2.2
young infant	4.4	4 weeks	0.4	3.8	48	0.92	1.9	4.4	2.3
infant	9.6	1	0.8	4.5	80	0.92	4	7	1.7
elder	70	66	3.8 ⁽³⁾	4.8	420	0.92	22	38	1.8
obese	140		6.7	5.0 ⁽⁴⁾	610 ⁽⁵⁾	0.92	40	56	1.4

⁽¹⁾ No significant change in bacteria concentrations in relation to high variation for the reference man [40,43].

⁽²⁾ Assuming RBCs account for 84% of the total host cells as observed for the reference man.

⁽³⁾ Decrease of 24% in the blood volume, according to [44].

⁽⁴⁾ No significant change in the hematocrit in obesity [45].

⁽⁵⁾ We could not find any direct measurements of the colonic volume for obese individuals in the literature, yet from an indirect analysis the volume increases with weight and plateaus at about 600 mL [46].

Στο μεγαλύτερο μέρος της σχετικής βιβλιογραφίας, ο αναφερόμενος εκτιμώμενος αριθμός των βακτηρίων που αποικούν το κόλον ανέρχεται σε $\sim 10^{14}$ κύτταρα ή αναφέρεται ότι είναι 10 φορές μεγαλύτερος από τον αριθμό των σωματικών κυττάρων (Deschasaux et al., 2018; Ferrão et al., 2017; Koh & Bäckhed, 2020; Rinninella, Raoul, Cintoni, Franceschi, Miggiano, et al., 2019; Strandwitz, 2018; Thursby & Juge, 2017a; Valdes et al., 2018). Σύμφωνα με τους Sender et al (2016), η εκτίμηση αυτή, που συναντάμε συνήθως στη βιβλιογραφία, χρονολογείται στην δεκαετία του '70 (Luckey, 1972). Στη μελέτη τους λοιπόν χρησιμοποιούν σύγχρονα μαθηματικά

μοντέλα με βάση την κυτταρική, καθώς και τη σωματική μάζα, τη σύσταση και την πυκνότητα του νερού, για να εκτιμήσουν τον συνολικό αριθμό των κυττάρων του ανθρώπινου σώματος και των βακτηρίων που το αποικούν. Για τον «άντρα αναφοράς, 70 κιλών» ο λόγος βακτήρια/σωματικά κύτταρα (B/H) εκτιμάται σε 1.3 ($\approx 1:1$) και ο αριθμός των βακτηρίων $3.8 \cdot 10^{13}$ ενώ για τη «γυναίκα αναφοράς, 63 κιλών» 2.2 ($\approx 2:1$) και $4.4 \cdot 10^{13}$ αντίστοιχα (Sender et al., 2016).

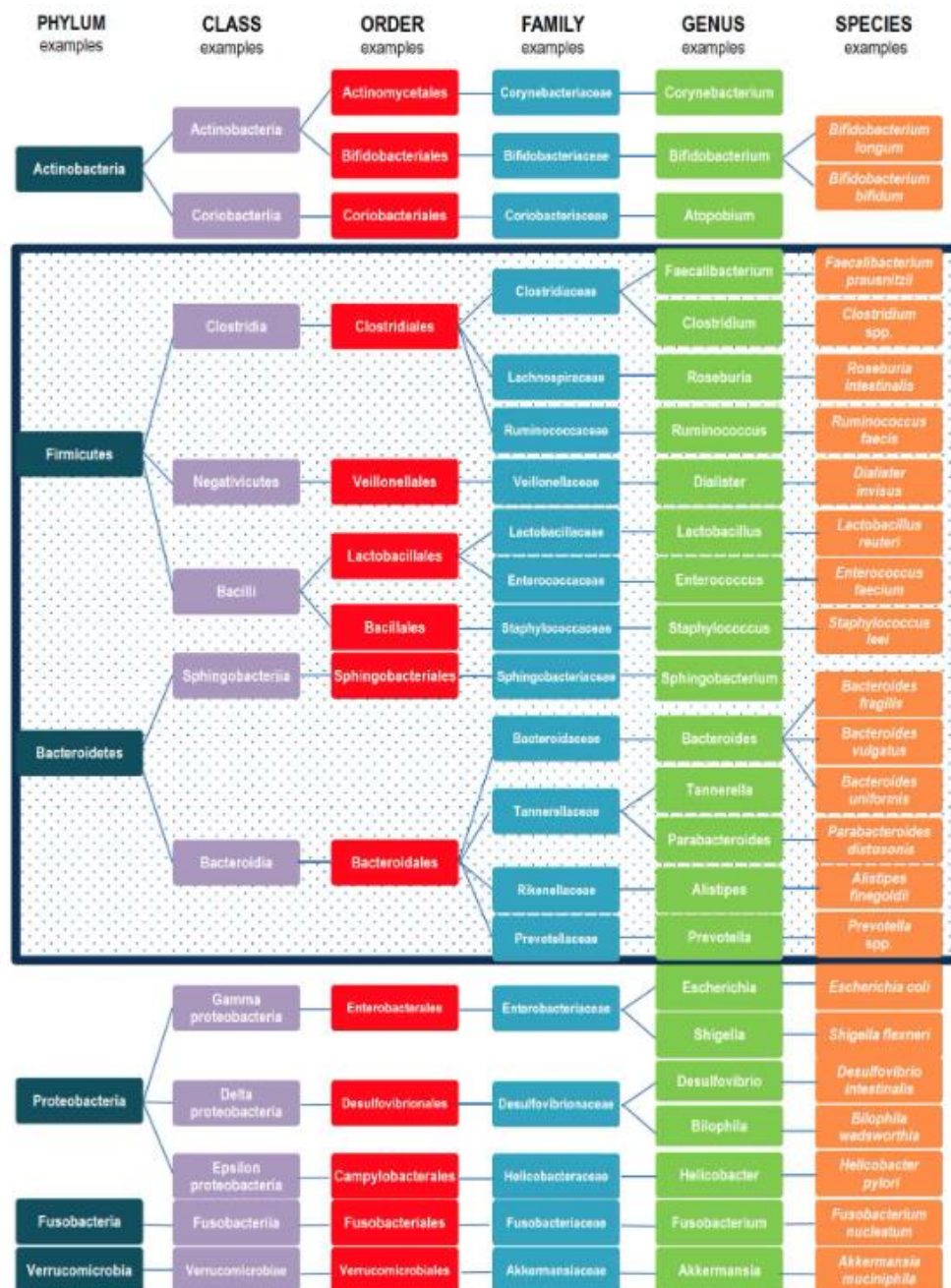
Ο εντερικός μικροβιόκοσμος- σε συμβιωτική σχέση με τον ξενιστή- έχει πολλούς ρόλους: από τη συμμετοχή στο μεταβολισμό θρεπτικών συστατικών, τη διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του εντερικού βλεννογόνου, τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού, μέχρι την προστασία από παθογόνα (Rinninella, Raoul, Cintoni, Franceschi, Miggianno, et al., 2019; Thursby & Juge, 2017a). Οι ρόλοι του μικροβιόκοσμου θα περιγραφούν στις ενότητες 3.3 και 3.4. Ωστόσο η ομοιοσύνη του εντερικού μικροβιόκοσμου μπορεί να διαταραχθεί με αποτέλεσμα την αλλαγή στη σύσταση του μικροβιόκοσμου, κατάσταση που περιγράφεται ως δυσβίωση (Thursby & Juge, 2017a)

3.2 Σύσταση

Κάθε άτομο φέρει μοναδική σύσταση εντερικού μικροβιόκοσμου, η οποία επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η οδός γέννησης, η ηλικία, το φύλο, η διατροφή, η γεωγραφία, ο τρόπος ζωής και τα φάρμακα (Rinninella, Raoul, Cintoni, Franceschi, Miggianno, et al., 2019).

Μέχρι τη δεκαετία του '90, οι μόνες μέθοδοι που μας επέτρεπαν να μελετήσουμε τον εντερικό μικροβιόκοσμο ήταν οι καλλιέργειες και η μικροσκοπία (WE & LV, 1974) οι οποίες είναι αρκετά απαιτητικές σε χρόνο και κόστος. Το σημαντικότερο όμως μειονέκτημα τους είναι ότι δε μπορούν να αποτυπώσουν σε ικανοποιητικό βαθμό το σύνολο των μικροβιακών πληθυσμών που αποικούν στον ΓΕΣ. Γι' αυτό πλέον το εντερικό μικροβίωμα μελετάται κυρίως με τεχνικές υψηλής απόδοσης και χαμηλού κόστους. Η πλειονότητα των τεχνικών αυτών βασίζεται στην απομόνωση του DNA και στην ενίσχυση του γονιδίου του 16S ριβοσωμικού RNA (rRNA), μιας και υπάρχει σε όλα τα βακτήρια και αρχαία, δεν έχει μεταβληθεί σημαντικά κατά την εξέλιξη. Ταυτόχρονα περιέχει 9 περιοχές που εμφανίζουν ποικιλομορφία και χρησιμοποιούνται για να ταυτοποιήσουν τα διάφορα είδη. Οι τεχνικές αυτές συνδυάζονται με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και τη μετα-γενομική αλληλούχηση για να χαρακτηρίσουν τα διάφορα μικροβιακά στελέχη (Rinninella, Raoul, Cintoni, Franceschi, Abele, et al., 2019; Thursby & Juge, 2017a). Οι Almeida et al., ανακάλυψαν πρόσφατα με μετα-γενομική ανασύνθεση γονιδιωμάτων 1952 νέα είδη βακτηρίων που δεν έχουν καλλιεργηθεί στο παρελθόν (Almeida et al., 2019).

Τα κυρίαρχα φύλα βακτηρίων που εντοπίζονται στο έντερο είναι τα Firmicutes, Bacteroidetes (Σχήμα 3), Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria και τα Verrucomicrobia, με τα πρώτα 4 να εκπροσωπούν 90% των μικροβίων. Τα Firmicutes αποτελούνται από πάνω από 200 γένη όπως *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* και *Ruminococcus*. Τα γένη *Clostridium* εκπροσωπούν το 95% των Firmicutes. Τα Bacteroidetes εκπροσωπούνται κυρίως από τα γένη *Bacteroides* και *Prevotella*. Τα Actinobacteria είναι αναλογικά πολύ λιγότερο άφθονα και εκπροσωπούνται από το γένος *Bifidobacterium* κυρίως (Rinninella et al., 2019).



Σχήμα 3: ταξινομική αναπαράσταση της ποικιλομορφίας του εντερικού μικροβιόκοσμου με παραδείγματα. Εντός πλαισίου βρίσκονται παραδείγματα μικροβίων που εκπροσωπούν το 90% των εντερικών μικροβίων. (Rinninnella et al., 2019)

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος στους ηλικιωμένους

Η σύσταση του ΕΜ στην ενήλικη ζωή είναι σχετικά σταθερή, αλλά πάντα υπάρχει η πιθανότητα να διαταραχτεί από διάφορα γεγονότα ζωής (Claesson et al., 2012a). Σε άτομα άνω των 65 ετών οι μικροβιακές κοινότητες μεταβάλλονται με αυξημένη αφθονία των Bacteroidetes και του συμπλέγματος IV των Clostridia (Claesson et al., 2011; Odumaki et al., 2016), σε σχέση με νεότερα άτομα, στα οποία το σύμπλεγμα XIVa είναι πιο άφθονο (Claesson et al., 2011). Παρατηρείται μείωση επίσης στα αναερόβια βακτήρια, όπως αυτά του γένους *Bifidobacterium* (Odumaki et al., 2016).

Με τη γήρανση, οι φυσιολογικές, κινητικές και αισθητηριακές λειτουργίες του ανθρώπου αλλάζουν. Αρχικά, φυσιολογική οδοντική έκπτωση και μείωση στη μυϊκή μάζα μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητα μάσησης, η οποία περιορίζει τις διατροφικές επιλογές. Έπειτα γαστρεντερικές διαταραχές σχετίζονται επίσης με την ηλικία, όπως η δυσφαγία, η λειτουργική

δυσπεψία, η γαστροοισοφαγική παλινδρόμηση, η καθυστερημένη εντερική διέλευση, η εκκολπωματίτιδα, η αυξημένη συχνότητα δυσκοιλιότητας και η ακράτεια κοπράνων και αερίων. Όλα τα παραπάνω, καθώς και διαταραχές στη γεύση, στο αίσθημα δίψας, στην όσφρηση και την πέψη σε συνδυασμό με δυσσπορρόφηση και το αυξημένο αίσθημα κορεσμού των ηλικιωμένων, μπορούν να οδηγήσουν σε ανισορροπίες στη διαιτητική πρόσληψη και τελικά να διαταράξουν τον EM (Lynch et al., 2015).

Οι Jeffery et al. ανέλυσαν με ποσοτική PCR (qPCR) τον EM 371 ηλικιωμένων (>65 ετών) ατόμων και κατέληξαν σε 4 κατηγορίες (modules) φύλων και γενών: την κατηγορία πυρήνα (Core) που περιέχει τις ταξινομικές μονάδες που εντοπίζονται στην πλειονότητα των δειγμάτων και έχουν υψηλή αθροιστική αφθονία, την κατηγορία συσχετισμένων με ποικιλομορφία, υγεία και υγιεινές δίαιτες πλούσιες σε ίνες (Diversity-Associated), την κατηγορία γενών που έχουν συσχετιστεί με μακροχρόνια κατ'οίκον φροντίδα (Long-stay-Associated) και την κατηγορία ήσσονος πυρήνα (χαμηλότερης ποικιλομορφίας) (Reduced Core). Οι κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας πυρήνα είναι τα γένη *Bacteriodes*, *Alistipes*, *Parabacteroides*, *Faecalibacterium* και *Ruminococcus*. Τα συσχετισμένα γένη με την ποικιλομορφία εκπροσωπούνται από τα *Coprococcus*, *Prevotella* και *Catenibacterium*. Από την άλλη, τα γένη που συσχετίζονται πιο ισχυρά με μακροχρόνια κατ'οίκον φροντίδα είναι τα *Anaerotruncus*, *Desulfovibrio* και *Coprobaecillus*. Τέλος, τα γένη που εκπροσωπούν την κατηγορία του ήσσονος πυρήνα είναι τα *Bacteroides*, *Parabacteroides* και *Alistipes* (Jeffery et al., 2015).

3.3 Ο ρόλος του εντερικού μικροβιόκοσμου στην ομοιοστάση του Ανθρώπου

Η βιβλιογραφία σχετικά με τους διάφορους ρόλους του EM είναι τεράστια και συνεχώς αναδύονται νέες ή επιβεβαιώνονται παλιότερες συσχετίσεις του με την ομοιοστάση του οργανισμού, τόσο σε *in vitro* δοκιμές όσο και σε ζωικά πρότυπα (Alvaro et al., 2008; Bäckhed et al., 2005; Behera et al., 2020; Corrêa-Oliveira et al., 2016a, 2016b; Q. Feng et al., 2018; Koh & Bäckhed, 2020; Lin & Zhang, 2017a, 2017b; Martin et al., 2018; Morrison & Preston, 2016a; Neis et al., 2015; Sekirov et al., 2010; Strandwitz, 2018; Tang et al., 2017; Thursby & Juge, 2017a; Valdes et al., 2018) και μελέτες ανθρώπων εθελοντών. Στη συνέχεια θα αναπτυχθούν οι κυριότεροι ρόλοι του EM σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.

Αλληλεπιδράσεις εντερικού μικροβιόκοσμου-ξενιστή σε επίπεδο μεταβολισμού

Πίνακας 3: Μεταβολίτες που παράγονται από τον EM, ανάλογα με τα αρχικά μόρια που χρησιμοποιούνται ως θρεπτικά υποστρώματα (Lamichhane et al., 2018)

Θρεπτικά υποστρώματα	Μεταβολίτες που παράγονται
Υδατάνθρακες	SCFAs (Οξικό, Προπιονικό, Βουτυρικό, Βαλερικό), διακλαδισμένα CFAs, BCFAs (Ισο-βουτυρικό, Ισο-βαλερικό), αέρια (CO ₂ και CH ₄), ολιγομερή (Δισακχαρίτες, Ολιγοσακχαρίτες), καρβοξυλικά οξέα (ηλεκτρικό, γαλακτικό), Μεθανόλη, Αιθανόλη
Πρωτεΐνες	SCFAs (Οξικό, Προπιονικό, Βουτυρικό, Βαλερικό), διακλαδισμένα CFAs, BCFAs (Ισο-βουτυρικό, Ισο-βαλερικό), αέρια (CO ₂ , H ₂ S, NH ₄ και CH ₄), βιογενείς αμίνες, αμινοξέα, φαινόλες, π-κρεζόλες, ινδόλες
Λίπος	Συζευγμένα λιπαρά οξέα, (τρι)ακυλογλυκερόλες, σφιγγομυελίνη, χοληστερόλη, φωσφατίδυλοχολίνες, φωσφοαιθανολαμίνες
Χολίνες	Μεθυλαμίνη, Διμεθυλαμίνη, Τριμεθυλαμίνη (TMA), Οξείδιο της TMA

Βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα	Λιποπολυσακχαρίτης Α, Πεπτιδογλυκάνες, Σφίγγομυελίνη, Φωσφοαιθανολαμίνες
Χολικά άλατα	Χολικό, Υοχολικό, Δεόξυχολικό, Χηνοδεόξυ χολικό, α-μουριχολικό, β-μουριχολικό, ω-μουριχολικό, ταυροχολικό
Βιταμίνες	Βιταμίνη Κ, Βιταμίνη Β ₁₂ , Βιοτίνη (Β ₇), Φυλλικό οξύ (Β ₉), Θειαμίνη (Β ₁), Ριβοφλαβίνη (Β ₂), Πυριδοξίνη(Β ₆)
Πολυφαινόλες	Υδροξυφαινυλ-προπιονικό οξύ, πυροκατεχόλη, εντεροδιόλη
Πολυαμίνες	Putrescine, Cadaverine, Spermidine
Πτητικές οργανικές ενώσεις	Αλδεΐδες, κετόνες, αλκάνια, θειο-οργανικά, Benzenoids,
Ενδοκανναβινοειδή	N-παλμιτόυλο-αιθανολαμίνη, 2-Αραχιδονόυλογλυκερόλη, N-ολεο-αιθανολαμίνη
N-ακέτυλο ενώσεις	N-ακέτυλο-τρυπτοφάνη, N-ακέτυλο-κυστεΐνη, N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνη
Άλλες	γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), εξωπολυσακχαρίτες, φαινολικό οξύ, βενζυλο- και φαινυλο-παράγωγα, ορμόνες

Παραγωγή Λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου

Τα βακτήρια του παχέος εντέρου παράγουν ένζυμα μεταβολισμού υδατανθράκων που τους δίνουν την ικανότητα να ζυμώνουν σύνθετους πολυσακχαρίτες (όπως οι β-γλυκάνες) παράγοντας μεταβολίτες, όπως τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (Short-Chain Fatty Acids, SCFA). Όπως προκύπτει και απ' την ονομασία τους, πρόκειται για καρβοξυλικά οξέα με μικρή ανθρακική αλυσίδα. Κυρίως έχουν μελετηθεί το οξικό οξύ, το προπιονικό και το βουτυρικό με 2, 3 και 4 άνθρακες αντίστοιχα.

Τα λιπαρά οξέα αυτά, το προπιονικό, το βουτυρικό και το οξικό, εντοπίζονται στο κόλον συνήθως σε αναλογία 1:1:3. Αυτά τα λιπαρά οξέα απορροφώνται γρήγορα από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου που συμμετέχουν στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στη χημειοταξία, στη διαφοροποίηση, στον πολλαπλασιασμό και στην απόπτωση των κυττάρων (Corrêa-Oliveira et al., 2016). Είναι καλά τεκμηριωμένη η θέση ότι τα SCFA, και ειδικά το βουτυρικό είναι σημαντικά υποστρώματα για τη διατήρηση του εντερικού επιθηλίου. Συγκεκριμένα επηρεάζουν την παραγωγή κυτταροκινών, διεγείροντας για παράδειγμα την παραγωγή της IL-18, μιας ιντερλευκίνης που συμμετέχει στη διατήρηση και επιδιόρθωση του εντερικού επιθηλίου. Τα SCFA φαίνεται επίσης να ρυθμίζουν τον ηπατικό μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων μέσω συμπληρωματικών μηχανισμών. Επιπροσθέτως, τα SCFA φαίνεται να συμμετέχουν της ρύθμιση της όρεξης μέσω της ρύθμισης της νευρωνικής δραστηριότητας και των σπλαχνικών αντανεκλαστικών άμεσα, μέσω υποδοχέων που εκφράζονται σε νευρώνες του περιφερικού, αυτόνομου και σωματικού νευρικού συστήματος. Οι Yan et al, ανέφεραν ότι τα SCFA επάγουν την έκκριση του ινσουλινομορφου αυξητικού παράγοντα 1 (IGF-1) που προάγει την ανάπτυξη των οστών (Yan & Charles, 2017). Άλλοι ερευνητές έδειξαν ότι τα SCFA ρυθμίζουν το μεταβολισμό των οστεοκλαστών και την οστική μάζα in vivo (Behera et al., 2020). Τέλος, το προπιονικό και το βουτυρικό δρουν ως επιγενετικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης δρώντας ως αναστολείς της απο-ακετυλάσης των ιστονών. (Morrison & Preston, 2016).

Το οξικό οξύ παράγεται από τα περισσότερα αναερόβια βακτήρια του εντέρου και απελευθερώνεται στους περιφερικούς ιστούς (Thursby & Juge, 2017b).

Το προπιονικό παράγεται μέσω της πορείας είτε του ηλεκτρικού είτε της προπανεδιόλης, ανάλογα με την υδατανθρακική πρώτη ύλη. Παράγεται κυρίως από βακτήρια του φύλου Bacteroidetes και απορροφάται από το ήπαρ. Εκεί ενεργοποιεί τη γλυκονεογένεση. Η *A. muciniphila* είναι ένας βασικός παραγωγός (Thursby & Juge, 2017b).

Το βουτυρικό παράγεται από υδατάνθρακες μέσω της κύριας γλυκολυτικής πορείας με οξείδωση προς ακετύλο-CoA και συμπύκνωση προς ακετοακετύλο-CoA. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, παράγεται κυρίως από Firmicutes, όπως τα *F. prausnitzii*, *E. rectale* και *Roseburia* spp. Αποτελεί σημαντική πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, ενώ είναι γνωστό και για τις αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ιδιότητές του (Thursby & Juge, 2017b). Ακόμα, φαίνεται να έχει έναν διττό και ίσως παράδοξο ρόλο καθώς ευνοεί τον πολλαπλασιασμό των υγιών εντεροκυττάρων ενώ συγχρόνως ενεργοποιεί την διαφοροποίηση και την απόπτωση στα μεταλλαγμένα (Martin-Gallausiaux et al., 2021; Morrison & Preston, 2016). Όσον αφορά την ακεραιότητα του επιθηλίου, φαίνεται ότι παίζει ρόλο στις στεγανές συνάψεις των εντεροκυττάρων μεταξύ τους, διατηρώντας τον φραγμό του εντέρου και προστατεύοντας από την διαρροή μικροβιακών συστατικών (Morrison & Preston, 2016).

Στην παρούσα εργασία μελετώνται τα είδη *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia* spp, *Eubacterium rectale* και *Akkermansia muciniphila*.

Faecalibacterium prausnitzii

Το *F. Prausnitzii* είναι από τα πιο πολυπληθή είδη που εντοπίζονται στο έντερο του ανθρώπου και ζώων, απαρτίζοντας περίπου το 5% του EM. Είναι αναερόβιος Gram θετικός βάκιλος και ανήκει στο σύμπλεγμα των *Clostridium leptum*, των Firmicutes. Χαρακτηριστικό του είναι η ζύμωση πολυσακχαριτών όπως βουτυρικό οξύ. Μπορεί επίσης να ζυμωθεί προς οξικό οξύ, D-γαλακτικό και φορμικό. Τα προϊόντα του μεταβολισμού του αξιοποιούνται και από τον ξενιστή και από άλλα βακτήρια (Leylabadlo et al., 2020a). Σύμφωνα με δημοσιευμένα δεδομένα, η σχετική αφθονία του μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης (bio-marker) εντερικής υγείας στον άνθρωπο. Χαρακτηριστικά, εμφανίζεται μειωμένη στον Σακχαρώδη Διαβήτη τύπου II (ΣΔτII), στις ΙΦΝΕ, το ΣΕΕ, την παχυσαρκία, την πολλαπλή σκλήρυνση, ψυχιατρικές και νευρολογικές διαταραχές, Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια και Μη-Αλκοολική Στεατοηπατίτιδα (Leylabadlo et al., 2020b).

***Roseburia* spp**

Τα *Roseburia* spp. είναι Gram θετικοί βάκιλοι που ταξινομικά ανήκουν επίσης στο σύμπλεγμα *Clostridium coccoides* των Firmicutes. Επίσης βρίσκονται σε σχετικές αφθονίες 5-15% του EM κι έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν σύνθετους πολυσακχαρίτες στις βουτυρικό οξύ. Παράγουν επίσης βιταμίνες του συμπλέγματος Β (Hillman et al., 2020). Μεταβολές στους πληθυσμούς τους μπορούν να επηρεάσουν πολλά μεταβολικά μονοπάτια και συνδέονται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως ΣΕΕ, παχυσαρκία, ΣΔτII, νευρολογικά νοσήματα και αλλεργίες (Tamanai-Shacoori et al., 2017).

Eubacterium rectale

Το *E. rectale* είναι επίσης αναερόβιος Gram θετικοί βάκιλοι, που ανήκουν στο φύλο των Firmicutes, στην οικογένεια *Lachnospiraceae*. Ανιχνεύονται σε σχετική αφθονία >0.1% στο 90% των υγιών ενηλίκων. Ζυμώνουν σύνθετους πολυσακχαρίτες και παράγουν κυρίως βουτυρικό οξύ (Karcher et al., 2020). Μειώνεται χαρακτηριστικά στις ΙΦΝΕ (Mukherjee et al., 2020).

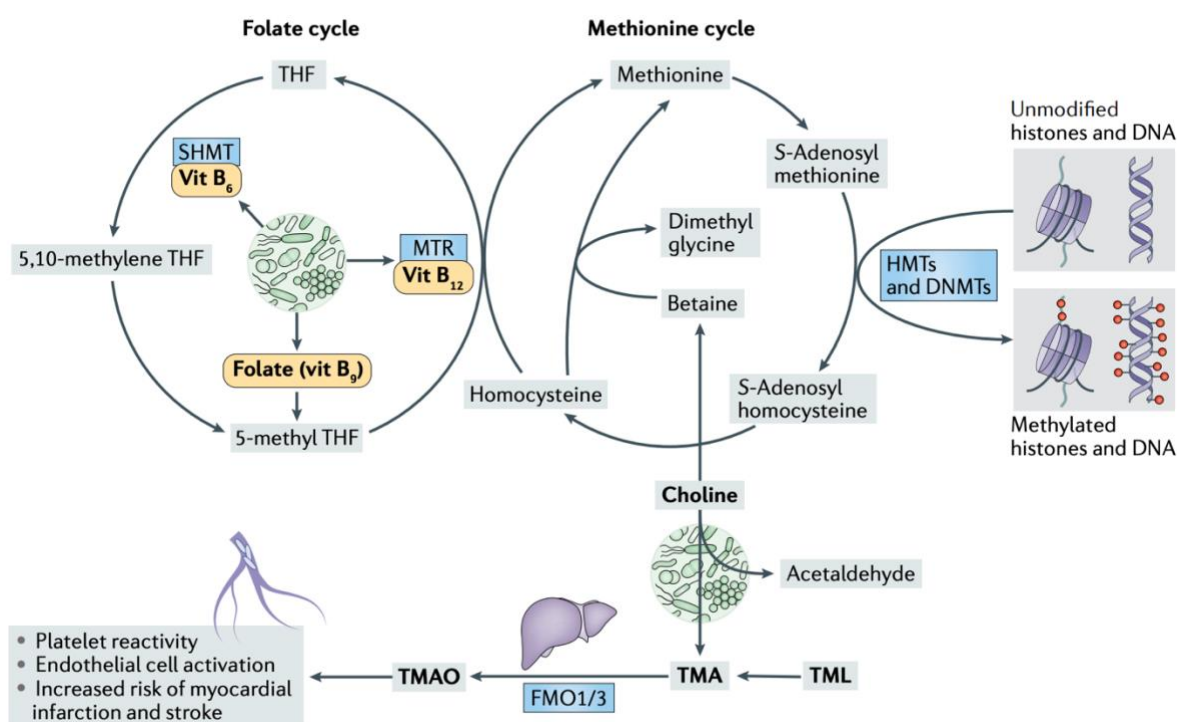
Akkermansia muciniphila

Η *A. muciniphila* απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά το 2004. Πρόκειται για ένα Gram αρνητικό αναερόβιο βακτήριο του φύλου Verrucomicrobia και απαρτίζει το 1-4% του EM. Παράγει ένα ευρύ φάσμα ενζύμων που αποικοδομούν τη βλεννίνη της βλέννας, η οποία

αποτελεί και τη μοναδική της πηγή άνθρακα και αζώτου. Τα προϊόντα του μεταβολισμού της χρησιμοποιούνται ως θρεπτική ύλη από άλλα μικρόβια (Verhoog et al., 2019). Πολλές έρευνες δείχνουν την πιθανή συμμετοχή της σε εντερικές και μεταβολικές διαταραχές. Πράγματι, επηρεάζει το μεταβολισμό της γλυκόζης και του λιπώδους ιστού και τα επίπεδά της συνδέονται αντίστροφα με φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως οι ΙΦΝΕ, η παχυσαρκία και ο ΣΔΤΙΙ (IG et al., 2019).

Μεταβολισμός βιταμινών και μεθυλίων

Ο κύκλος των μεθυλομάδων, είναι μία «παγκόσμια» μεταβολική διαδικασία που στηρίζεται στον κύκλο του φυλλικού οξέος για τη μεταφορά μεθυλίων ($-CH_3$). Διάφορα ενδιάμεσα του κύκλου λειτουργούν ως συνυποστρώματα σε αρκετές βιοσυνθετικές πορείες, όπως σε μονοπάτια των πουρινών, στη διαθεσιμότητα δοτών μεθυλομάδων και στην οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου μέσω *trans*-θειώσης (transsulfuration). Επιπλέον, ο μεταβολισμός των μεθυλομάδων παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυογένεση, στη διατήρηση των βλαστοκυττάρων, στην αιμοποίηση, στη μεθυλίωση του DNA και των ιστονών και στη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Δεδομένης της «παγκόσμιας» φύσης αυτού του κύκλου, ο οποίος συναντάται σε όλα τα βασίλεια της ζωής, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστών θηλαστικών και ΕΜ διαμεσολαβούνται και από ενδιάμεσα αυτού του κύκλου (Krautkramer et al., 2020). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3, οι παραγόμενες από τον ΕΜ βιταμίνες (B₆, B₉ και B₁₂) συμμετέχουν στον κύκλο του φυλλικού οξέος του ξενιστή, ο οποίος σε σύζευξη με τον κύκλο της μεθειονίνης οδηγεί στη μεθυλίωση των ιστονών και του DNA.



Εικόνα 3: Αλληλεπιδράσεις ΕΜ—ξενιστή στον μεταβολισμό των μεθυλομάδων (Krautkramer et al., 2020)

Ο μεταβολισμός της χολίνης από τον ΕΜ επίσης συνδέεται με τον κύκλο της μεθειονίνης και γενικά των μεθυλομάδων του ξενιστή. Το συγκεκριμένο μεταβολικό μονοπάτι θα περιγραφεί στην ενότητα 3.4.

De novo βιοσύνθεση βιταμινών

Κάποια γένη του ΕΜ παράγουν de novo βιταμίνες που δε μπορεί να συνθέσει ο ανθρώπινος οργανισμός σε επαρκείς ποσότητες. Ειδικότερα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι οι βασικοί παραγωγοί βιταμίνης B₁₂, που δε μπορεί να συντεθεί από ζώα, φυτά ή μύκητες. Τα Bifidobacteria είναι οι κύριοι παραγωγοί φυλλικού οξέος (Thursby & Juge, 2017b). Στην περίπτωση του φυλλικού οξέος, η παραγωγή του από τον ΕΜ στην πραγματικότητα ξεπερνάει το προερχόμενο από διαιτητική πρόσληψη. Ο ΕΜ του ανθρώπου παράγει επίσης βιταμίνη Κ, θειαμίνη, ριβοφλαβίνη, νικοτινικό οξύ, βιοτίνη, πυριδοξίνη και παντοθενικό οξύ (Thursby & Juge, 2017b).

Μεταβολισμός χολικών αλάτων και οστικός μεταβολισμός

Τα χολικά άλατα είναι μικρά μεταβολικά μόρια που παράγονται από το ήπαρ. Εκκρίνονται στο λεπτό έντερο και συμμετέχουν στην απορρόφηση του διαιτητικού λίπους (Behera et al., 2020). Τα βακτήρια του εντέρου μεταβολίζουν επίσης ένα μέρος των χολικών αλάτων τα οποία δεν επανααρροφώνται για βιομετατροπή, σε δευτερογενή χολικά άλατα (Thursby & Juge, 2017b). Συγκεκριμένα, αναερόβια βακτήρια μετατρέπουν τα χολικά άλατα κυρίως σε λιθοδεόξυχολικό και δεόξυχολικό οξύ. Μέσω της εντερο-ηπατικής κυκλοφορίας, τα χολικά άλατα περνούν στη συστηματική κυκλοφορία, όπου μπορούν και φτάνουν σε όλα τα όργανα. Ολοένα αυξανόμενα δεδομένα δείχνουν ότι τα χολικά άλατα ρυθμίζουν την οστική ομοιόσταση μέσω διάφορων μονοπατιών στους οστεοκλάστες και τους οστεοβλάστες. Ειδικότερα, η *in vitro* ενεργοποίηση του FXR μονοπατιού από χηνοδεόξυ χολικό οξύ αύξησε την οστεοβλαστική μεταλλοποίηση μέσω της αυξορύθμισης του Runx2 και αύξησε την εξωκυτταρική σηματορρυθμιζόμενη κινάση (ERK) και τη σηματοδότηση β-κατενίνης. Με το βακτηριακό μεταβολισμό σε δευτερογενή χολικά άλατα, αυτά δρουν ως αγωνιστές του μεμβρανικού συζευγμένου με την πρωτεΐνη G υποδοχέα (TGR5) των εντεροκυττάρων και αυξάνουν το γλυκαγονόμορφο πεπτίδιο 1 (GLP-1). Αυτό επιδρά παρακρινικά στα κύτταρα του θυρεοειδή και οδηγεί στην έκκριση καλσιτονίνης η οποία αναστέλλει την επαναρρόφηση του οστού. Από την άλλη, το λιθοχολικό οξύ δρα ως υποκαταστάτης της βιταμίνης D και επηρεάζει τον οστικό μεταβολισμό. Υπερβολική εναπόθεση λιθοχολικού μπορεί να βλάψει τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα των οστεοβλαστών και να μειώσει τη βιωσιμότητά των κυττάρων. Το λιθοχολικό μπορεί να μειώσει τη δραστηριότητα της βιταμίνης D στους οστεοβλάστες και έχει συνδεθεί με μειωμένη παραγωγή οστεοκαλσίνης και έκφραση του γονιδίου RANKL (Behera et al., 2020).

Ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες

Ζωικά πρότυπα χωρίς ΕΜ έχουν ελλείψεις σε πολλά κύτταρα του ανοσοποιητικού και λεμφικούς ιστούς, γεγονός που υποδεικνύει τη σημασία του ΕΜ στην ανάπτυξη τόσο του εντερικού βλεννογόνιου όσο και του συστημικού ανοσοποιητικού συστήματος (Lin & Zhang, 2017). Ο ΕΜ βρίσκεται λοιπόν, σε στενή επαφή με το βλεννογόνο ανοσοποιητικό σύστημα μέσω υποδοχέων των επιθηλιακών κυττάρων που αναγνωρίζουν μοτίβα (PRR), όπως τύπου Toll (TLR) ή NOD (NLR). Αυτοί αναγνωρίζουν μοριακά σήματα από τον ΕΜ κι έτσι μεσολαβούνται διαδικασίες που μπορούν να βελτιώσουν κάποιες ΙΦΝΕ, να διακρίνουν ανάμεσα σε ευεργετικά και παθογόνα βακτήρια ή να αυξήσουν τον αριθμό των ανοσοποιητικών κυττάρων ή τους PRR υποδοχείς (Hevia et al., 2015). Η ανοσολογική δράση που ασκεί ο ΕΜ μέσω των μεταβολικών προϊόντων του έχει μελετηθεί σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις πέραν των ΙΦΝΕ, όπως στον καρκίνο, την αγγειακή φλεγμονή, καρδιαγγειακά και νευρολογικά νοσήματα (Koh & Bäckhed, 2020).

Ανταγωνιστικές σχέσεις με άλλους μικροοργανισμούς

Η ίδια η παρουσία των μικροβίων στον ΓΕΣ επίσης επηρεάζει την αποίκηση από παθογόνα, μέσω ανταγωνισμού για θέσεις πρόσδεσης ή πηγές θρεπτικών συστατικών αλλά και μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών (BaümLer & Sperandio, 2016).

3.4 Ο ρόλος του εντερικού μικροβιόκοσμου στη Νόσο του Ανθρώπου

Υπάρχει πολύ μεγάλη βιβλιογραφία που συσχετίζει τον ΕΜ με πολλές παθολογικές καταστάσεις και νόσους του ανθρώπου και των ζώων. Οπότε, αν και ο πληθυσμός που εξετάζεται σε αυτή τη μελέτη είναι υγιής, θεωρήθηκε θεμιτό το άτομο που διαβάζει την εργασία να έχει μια πιο σφαιρική εικόνα για το ρόλο του ΕΜ στη ζωή του Ανθρώπου και τη συμμετοχή του στην εμφάνιση και εξέλιξη σοβαρών νόσων που απασχολούν το Δυτικό κόσμο το 2022.

Εντερικός μικροβιόκοσμος και γαστρεντερικές νόσοι

Η δυσβίωση στον ΕΜ, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, συμμετέχει στην αιτιολογία διάφορων γαστρεντερικών διαταραχών, ειδικότερα του καρκίνου του παχέος εντέρου (ΚΠΕ) και των ΙΦΝΕ. Ειδικά στην περίπτωση των ΙΦΝΕ, αλλαγές στον ΕΜ παίζουν κεντρικό ρόλο στην έναρξη της νόσου, σε συνδυασμό με το γενετικό υπόβαθρο του ατόμου και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Lane et al., 2017). Στους ασθενείς με ΙΦΝΕ έχουν μελετηθεί αρκετά ο συνολικός αριθμός και η ποικιλομορφία των βακτηρίων και τα συνολικά δεδομένα δείχνουν μείωση και στις δύο παραμέτρους (Mentella et al., 2020). Σε μία πρόσφατη μελέτη 132 ασθενών με ΙΦΝΕ, παρατηρήθηκε λειτουργική δυσβίωση κατά τη διάρκεια των εξάρσεων με μειωμένη μικροβιακή (γονιδιακή) μετάφραση και αύξηση των προαιρετικά αναερόβιων εις βάρος των υποχρεωτικά αναερόβιων (Lloyd-Price et al., 2019).

Εντερικός μικροβιόκοσμος και καρδιαγγειακά νοσήματα

Σύμφωνα με την ανασκόπηση των Witkowski et al, ο ΕΜ φαίνεται να συνδέεται με καρδιαγγειακές νόσους (CVD, CardioVascular Diseases) και προδιαθεσικούς τους παράγοντες με διάφορους τρόπους. Οι πρώτες μελέτες που ανέδειξαν αιτιακή σχέση μεταξύ ΕΜ και CVD εστίασαν σε έναν μετα-οργανισμικό (metaorganismal) μεταβολίτη, το Ν-οξείδιο της τριμεθυλαμίνης (TMAO) που παράγεται έπειτα από κατανάλωση θρεπτικών συστατικών που αφθονούν στην Δυτική δίαιτα (πχ λεκιθίνη, χολίνη, καρνιτίνη). Το γονίδιο των μικροοργανισμών, cut(choline utilization)C/D ευθύνεται για τη μετατροπή της χολίνης σε τριμεθυλαμίνη (TMA). Η TMA έπειτα οξειδώνεται από ηπατικές φλαβινο-μονοοξυγονάσες του ανθρώπου σε TMAO. Το τελευταίο φαίνεται να οδηγεί σε αθηροσκλήρωση, αγγειακή φλεγμονή, καρδιακή ανεπάρκεια, ίνωση και έκπτωση λειτουργίας των νεφρών καθώς και μέσω αιμοπεταλιακής υπερ-απάντησης στη θρόμβωση (Witkowski et al., 2020)(Εικόνα 3).

Ένας άλλος τρόπος με τον οποίο φαίνεται ότι ο ΕΜ επιδρά στις CVD (όπως και στη ΝΑ) είναι η διαρροή και αλλόθεση προϊόντων του ΕΜ στη συστηματική κυκλοφορία (ενδοτοξαιμία). Πολλές έρευνες δείχνουν ότι ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια έχουν διαταραγμένη ακεραιότητα του εντερικού φραγμού και αυξημένα επίπεδα προφλεγμονωδών κυταροκινών. Σε μια πρόσφατη προοδευτική μελέτη ασθενών με κολπική μαρμαρυγή, αυξημένες συγκεντρώσεις LPS προέβλεπαν δυσμενή καρδιακά γεγονότα, προτείνοντας ότι η ενδοτοξαιμία οδηγεί σε CVD επιπλοκές (Witkowski et al., 2020).

Εντερικός μικροβιόκοσμος και καρκίνος

Ο καρκίνος είναι η δεύτερη επικρατέστερη αιτία θανάτου παγκοσμίως (Tomasetti & Vogelstein, 2015). Η καρκινογένεση είναι αποτέλεσμα στοχαστικής ενδοκυτταρικής

συσσώρευσης αυθόρμητων μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή του DNA σε συνδυασμό με περιβαλλοντική έκθεση και τον τρόπο ζωής (Collaboration et al., 2017). Ο ΕΜ φαίνεται να έχει άλλοτε αντικαρκινική κι άλλοτε καρκινογόνο δράση.

Στην περίπτωση του καρκίνου παχέος εντέρου (ΚΠΕ) φαίνεται να είναι αυξημένα τα φύλα Firmicutes και Fusobacteria και μειωμένα τα Proteobacteria. Γένη των Fusobacteria, μάλιστα έχουν ταυτοποιηθεί ως προφλεγμονώδη, ενεργοποιώντας κύτταρα του ανοσοποιητικού προερχόμενα από τον μυελό, όπως μακροφάγα, με εξειδίκευση στα καρκινικά κύτταρα, δένδριτικά κύτταρα και κατασταλτικά κύτταρα προερχόμενα απ' το μυελό (Q. Feng et al., 2018). Αντίθετα, το βουτυρικό και το πριοπιονικό οξύ με την αναστολή των από-ακετυλασών των ιστονών δρουν αντικαρκινικά, όπως φαίνεται από *in vitro* και *in vivo* δοκιμές στον ΚΠΕ και το λέμφωμα (Vivarelli et al., 2019). Επιπροσθέτως, το βουτυρικό φαίνεται να καταστέλλει των πυρηνικό παράγοντα κΒ (NF-κΒ), επάγοντας δράσεις WNT/καταστροφής β-κατενίνης και απόπτωση, ενεργοποιώντας την πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα (MAPK), σηματοδοτώντας την αυξορύθμιση (upregulation) του GADD153 ή την ενεργοποίηση της φωσφορυλίωσης της c-jun N-τελικής κινάσης (JNK). Τα SCFA, με τη ρυθμιστική ανοσοποιητική τους δράση, φαίνεται επίσης να είναι μειωμένα στους ασθενείς με ΚΠΕ (Q. Feng et al., 2018). Οι LPS, όπως αναφέρθηκε και στην περίπτωση της ΝΑ και των CVD, ενεργοποιούν τον μεμβρανικό υποδοχέα TLR4 (της οικογένειας των PRR), ενεργοποιώντας έτσι Τ-κυτταρική διαμεσολαβούμενη απόκριση ενάντια στα καρκινικά κύτταρα (Paulos et al., 2007). Ως TLR4 ενεργοποιητής δρα και το μονοφωσφολιπίδιο Α (MPL) από την *Salmonella enterica* που χρησιμοποιείται συμπληρωματικά στο εμβόλιο κατά του τραχήλου της μήτρας (Raavonen et al., 2009). Τέλος, η μικροβιακή πυριδοξίνη (βιταμίνη Β6) μπορεί να διεγείρει την αντινεοπλασματική ανοσοεπιτήρηση του ξενιστή (Aranda et al., 2014).

Η νεοπλασματική δράση του ΕΜ έχει μελετηθεί περισσότερο στη βάση γονοτοξινών που παράγουν παθολογικά στελέχη. Η πρώτη τέτοια τοξίνη που φάνηκε να συμμετέχει στον ανθρώπινο καρκίνο είναι η πρωτεΐνη CagA του *Helicobacter pylori* (Moss, 2017). Σε λοιμώξεις από παθογόνα, όταν ο ΕΜ βρίσκεται σε δυσβίωση, κάποια βακτήρια αυξάνονται πολύ και παράγουν μεγάλες ποσότητες τοξινών οι οποίες προκαλούν βλάβες στο DNA του ανθρώπου, συμβάλλοντας έτσι στην γενομική αστάθεια, καρκινογένεση και αύξηση στα επιρρεπή κύτταρα. Όταν οι τοξίνες απελευθερωθούν πλησίον του γαστρεντερικού επιθηλίου, προκαλούν βλάβες στο δίκλωνο DNA των κυττάρων, σηματοδοτώντας την παύση του κυτταρικού κύκλου κι επιτρέποντας έτσι την εμφάνιση μεταλλάξεων που τελικά οδηγούν στην καρκινογένεση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η *Escherichia coli* που παράγει την κολιβακτίνη και την τοξίνη CDT (Cytotoxic Distending Toxin) με δράσεις DNAάσης. Επιπλέον, παθογόνα βακτήρια μπορούν να παρέμβουν στα μονοπάτια απόκρισης και επιδιόρθωσης βλαβών DNA, όπως η *Shigella flexneri* που επάγει την αποικοδόμηση της πρωτεΐνης p53 (όπως και η CagA) μέσω της έκκρισης των ενζύμων φωσφατάση της φωσφο-D-ινοσιτόλης (IpgD) και το προσομοιάζον με πρωτεάση κυστεΐνης λοιμογόνο γονίδιο Α (VirA), αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα εισαγωγής μεταλλάξεων κατά την επιδιόρθωση του DNA στα μολυσμένα κύτταρα. Επίσης, τοξίνες όπως η CagA, η FadA (*Fusobacterium nucleatum* effector adhesin A) και η MP (*Bacteroides fragilis* metalloproteinase toxin) μπορούν να αλληλοεπιδρούν (άμεσα ή έμμεσα) με την E-cadherin, διαταράσσοντας έτσι τις διακυτταρικές συνάψεις και ενεργοποιώντας τη σηματοδότηση β-κατενίνης. Η τελευταία πυροδοτεί την κυτταρική απόπτωση και δυνητικά την καρκινομετατροπή των επιρρεπών κυττάρων του ανθρώπου (Vivarelli et al., 2019).

Άξονας εντερικού μικροβιόκοσμου-εγκεφάλου στο ΚΝΣ

Η χυμική ανοσία και το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα συμμετέχουν στην επικοινωνία εντέρου-εγκεφάλου μέσω της ρύθμισης της ανοσολογικής δραστηριότητας και της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών στις ΙΦΝΕ, το ΣΕΕ και τη λειτουργική δυσπεψία (Leue et al., 2017; Powell et al., 2017). Η νόσος Alzheimer's (NA) είναι μια μορφή άνοιας που συνδέεται με την γήρανση και κάποια σηματοδοτικά μονοπάτια του άξονα εντέρου-εγκεφάλου φαίνεται να συμμετέχουν σ' αυτή. Η σύσταση του ΕΜ, όπως αναφέρθηκε νωρίτερα αλλάζει με την ηλικία και περιβαλλοντικούς παράγοντες, ενώ η λειτουργία του βλεννογόνιου εντερικού φραγμού φθίνει και τα βακτηριακά αμυλοειδή και λιποπολυσακχαρίτες (LPS) διαρρέουν προς τη συστηματική κυκλοφορία με την αύξηση της ηλικίας. Αυτές οι τοξίνες μεταφέρονται στο ΚΝΣ λόγω της αυξημένης διαπερατότητας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού που συσχετίζεται με τη γήρανση. Τα αμυλοειδή και οι LPS αυξάνουν τη μικρογλοιακή ενεργοποίηση μέσω TLR-διαμεσολαβούμενης φλεγμονώδους απάντησης και μειώνουν τη φαγοκυττάρωση των αμυλοειδών. Η επακόλουθη φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ή επιδείνωση του νευροεκφυλισμού και τη συσσώρευση β αμυλοειδών πεπτιδίων στη ΝΑ. Μέσω των SCFA φαίνεται ο ΕΜ να παίζει ρόλο και στη νόσο Parkinson (Q. Feng et al., 2018). Μια πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση έδειξε ότι άτομα με Μείζουσα Καταθλιπτική Διαταραχή έχουν μειωμένους πληθυσμούς σε πολλές ταξινομικές βαθμίδες του ΕΜ, ειδικότερα της οικογένειας *Prevotellaceae* και των γενών *Coproccoccus* και *Faecalibacterium* (Sanada et al., 2020).

3.5 Ο ρόλος της διατροφής στον εντερικό μικροβιόκοσμο

Η συνεισφορά της διατροφής στη ρύθμιση του ΕΜ και ο κεντρικός της ρόλος στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ξενιστή και του ΕΜ είναι εμφανής από τα πρώτα στάδια ζωής, όπου οι ολιγοσακχαρίτες του ανθρώπινου γάλακτος συμμετέχουν στην ωρίμανση του ΕΜ των νεογνών (Charbonneau et al., 2016). Στη συνέχεια παρατηρείται αυξημένη βακτηριακή ποικιλομορφία (bacterial richness) με την εισαγωγή στερεών τροφίμων στα βρέφη (Laurson et al., 2017). Τέλος, ο ρόλος της διατροφής στον ΕΜ παρατηρείται με τη μειωμένη μικροβιακή ποικιλομορφία σε πληθυσμούς ευάλωτων (frail) κληνίων ηλικιωμένων σε μακροχρόνια φροντίδα, πιθανόν λόγω κατανάλωσης μικρής ποικιλίας τροφίμων (Claesson et al., 2012b). Στελέχη του ΕΜ δεν είναι μόνο ευαίσθητα σε αναλογίες συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών (Claesson et al., 2012b) αλλά και εμφανίζουν διαφορετικές αποκρίσεις σε εκατομμύρια διαφορετικά χρονικά και γεωγραφικά συγκείμενα (Turnbaugh et al., 2009).

Άμεσοι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης της τροφής με τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Τα θρεπτικά συστατικά μπορούν να αλληλοεπιδρούν με τους μικροοργανισμούς παρέχοντας τα απαραίτητα στοιχεία και την ενέργεια για την ανάπτυξη τους (Zmora et al., 2018). Το γεγονός αυτό δίνει άμεσα ανταγωνιστικό πλεονέκτημα σε συγκεκριμένα μέλη των κοινοτήτων του ΕΜ, κάνοντας τα πιο ικανά να αναπτυχθούν σε σχέση με άλλα, λιγότερο προσαρμοσμένα (Zmora et al., 2018). Αυτή η προσέγγιση είναι συνεπής με την παρατήρηση ότι η διατροφή δεν επηρεάζει μόνο την απόλυτη αφθονία του ΕΜ αλλά και από την κινητική ανάπτυξής τους (Korem et al., 2015).

Το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί έναν περιορισμένο αριθμό υδρολασών γλυκοζυτικών δεσμών και καθόλου λυάσες πολυσακχαριτών (συνολικά καλούνται Carbohydrate-Active Enzymes, CAZymes) (Cantarel et al., 2012). Συνεπώς γλυκάνες όπως το ανθεκτικό άμυλο, η ινουλίνη, η λιγνίνη, η πηκτίνη, η κυταρρίνη και φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες φτάνουν στο παχύ έντερο άπεπτοι (Zmora et al., 2018). Σε αντίθεση με τον άνθρωπο, το εντερικό μικροβίωμα

υπολογίζεται ότι κωδικοποιεί δεκάδες χιλιάδες CAZymes (Cantarel et al., 2012). Τα βακτήρια που μεταβολίζουν σύνθετους πολυσακχαρίτες ονομάζονται πρωτογενείς αποικοδομητές συμπεριλαμβανομένων μελών των γενών *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* (Zmora et al., 2018). Το ανταγωνιστικό της πλεονέκτημα εντοπίζεται και στην ικανότητα πρόβλεψης της βακτηριακής αφθονίας σύμφωνα με μοτίβα αποικοδόμησης των γλυκανών (Eilam et al., 2014). Επί παρουσίας γλυκανών, το γενετικό ρεπερτόριο των CAZymes εντός των *Bacteroides*, επάγει έναν ειδικό-σε επίπεδο ειδών- ανταγωνισμό ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην *in vivo* προσαρμοστικότητα του γένους (Scott et al., 2011; E. D. Sonnenburg et al., 2010). Σε ένδεια τροφής, τα βακτήρια μπορούν να αλλάξουν πηγή ενέργειας χρησιμοποιώντας αισθητηριακούς και ρυθμιστικούς μηχανισμούς (Zmora et al., 2018). Διάφορα μέλη του EM μπορούν να προσαρμοστούν γρήγορα σε εναλλακτικές πηγές ενέργειας, όπως μέλη του φύλου *Bacteroidetes* που έχουν έναν αρκετά μεγάλο αριθμό ενζύμων που μεταβολίζουν υδατάνθρακες (Koropatkin et al., 2012; Martens et al., 2008; J. L. Sonnenburg et al., 2005). Μετά τον πρωτογενή μεταβολισμό των γλυκανών απελευθερώνεται γλυκόζη η οποία ζυμώνεται από τους δευτερογενείς αποικοδομητές σε SFCA, γαλακτικό ή ηλεκτρικό οξύ. Ξεκινάει έτσι ένα σύνθετο μεταβολικό δίκτυο διασταυρούμενης σίτισης (Zmora et al., 2018).

Συστατικά της τροφής ως ρυθμιστές

Το μακροθρεπτικό και μικροθρεπτικό περιεχόμενο της τροφής επηρεάζει σημαντικά τον EM (Zmora et al., 2018). Ανομοιότητες στους πληθυσμούς του EM ανάλογα με τις διατροφικές συνήθειες μπορούν να εξαχθούν από μελέτες ανάμεσα σε πληθυσμούς που διαβιούν σε αστικά-αγροτικά περιβάλλοντα και σε φυτοφάγα-σαρκοφάγα ζώα (Zmora et al., 2018). Διάφορες γενεαλογίες θηλαστικών έχουν συν-εξελιχθεί μαζί με τον εντερικό τους μικροβιόκοσμο και διακρίνονται πιο πολύ με βάση τις διατροφικές τους συνήθειες, παρά με την φυλογενετική ταξινόμηση του ξενιστή: οι βακτηριακές κοινότητες μειώνονται σε βιοποικιλότητα, από χορτοφάγα σε παμφάγα κι από παμφάγα σε σαρκοφάγα και κάθε ομάδα φιλοξενεί χαρακτηριστικούς EM (Ley et al., 2008; Muegge et al., 2011). Ο EM των κυνηγών-τροφοσυλλεκτών, καθώς και αγροτικών/γεωργικών πληθυσμών ανά τον κόσμο, εμφάνισε αυξημένη βακτηριακή βιοποικιλότητα σε σύγκριση με τον EM πληθυσμών σύγχρονων κοινωνιών. Προτείνεται, λοιπόν, ότι οι πρώτοι χρειάζονται ένα ευρύτερα λειτουργικό ρεπερτόριο μικροοργανισμών, ώστε να μεγιστοποιηθεί η πρόσληψη ενέργειας από τις διαιτητικές ίνες, σε αντίθεση με τους τελευταίους που καταναλώνουν κυρίως επεξεργασμένα τρόφιμα -αυτή η σχέση αιτιότητας υπολείπεται επίσημης επιβεβαίωσης (Clemente et al., 2015; de Filippo et al., 2010; Martínez et al., 2015; Obregon-Tito et al., 2015; Schnorr et al., 2014; Smits et al., 2017; Yatsunen et al., 2012). Ωστόσο, ο EM αγροτικών μη-βιομηχανοποιημένων πληθυσμών έτεινε να είναι πιο ομοιόμορφος σε σύσταση σε σχέση με αυτόν των αστικών πληθυσμών, που εμφανίζει μεγαλύτερη βιοποικιλότητα (Martínez et al., 2015). Η παρατήρηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη διασπορά περιττωματικού υλικού στα αγροτικά οικοσυστήματα ή στη μεγαλύτερη ποικιλία τροφίμων που είναι διαθέσιμα στις αστικούς πληθυσμούς (Zmora et al., 2018).

Οι μικροβιακές κοινότητες είναι εξαιρετικά πλαστικές και αποκρίνονται σε κάποιες, αλλά όχι στις όλες τις διατροφικές παρεμβάσεις (Zmora et al., 2018). Στους ανθρώπους, η κατανάλωση διαιτών απαρτιζόμενων κυρίως από ζωικά προϊόντα επάγει την αύξηση σε χολο-ανθεκτικά βακτήρια (*Alistipes*, *Bilophila* και *Bacteroides*) και την εξάντληση των *Firmicutes* που μεταβολίζουν φυτικούς και μυκητιακούς πολυσακχαρίτες (*Roseburia spp*, *Eubacterium rectale* και *Ruminococcus bromii*) (David et al., 2014). Μεταγενομικές και μεταβολομικές αναλύσεις επιβεβαίωσαν τις παρατηρούμενες εναλλαγές μεταξύ της πρωτεϊνικής ζύμωσης και

αποικοδόμησης στις ζωικές (animal-sourced) δίαιτες και της υδατανθρακικής ζύμωσης -σύνθεσης αμινοξέων στις φυτικές (plant-based) δίαιτες (David et al., 2014; Muegge et al., 2011).

Πρεβιοτικά -ορισμός

Οι Ιάπωνες ήταν οι πρώτοι που αναγνώρισαν την αξία των ζυμώσιμων υδατανθράκων, αρχικά ως τροφή για χοίρους και αργότερα στη δεκαετία 1980 με την ταυτοποίηση των ολιγοσακχαριτών στο ανθρώπινο γάλα (International Life Sciences Institute & Nino Binns, 2013). Ωστόσο η έννοια των πρεβιοτικών εμφανίστηκε το 1995 για την τροποποίηση του ΕΜ. Αν και έχουν προταθεί διάφοροι ορισμοί, δεν υπάρχει ακόμα ομόφωνη συμφωνία σε κάποιον. Ο πιο πρόσφατος συμφωνήθηκε το 2010, στο Meeting of the International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP):

«Διαιτητικό πρεβιοτικό είναι κάθε εκλεκτικά ζυμώσιμο συστατικό που οδηγεί σε συγκεκριμένες αλλαγές στη σύσταση ή/και λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου, επιφέροντας έτσι οφέλη στην υγεία του ξενιστή (Gibson et al., 2017).»

Τα πρεβιοτικά που είναι πιο ευρέως γνωστά είναι οι φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες, η λακτουλόζη και η ινουλίνη (Mitsou et al., 2020; Pham et al., 2018). Τα οφέλη των πρεβιοτικών τροφοδοτούν την έρευνα στο πεδίο, ειδικότερα οι β-γλυκάνες (Mitsou et al., 2020), οι οποίες όπως έχει αναφερθεί έχουν πολλές ωφέλιμες για τον Άνθρωπο ιδιότητες. Υπάρχουν λοιπόν αρκετές μελέτες όπως αναφέρθηκε νωρίτερα που μελετούν την πρεβιοτική δράση των μανιταριών (Aida et al., 2009; X. Liu et al., 2020; Y. Liu et al., 2016; Mitsou et al., 2020; N. Kerezoudi et al., 2021; Pham et al., 2018; Slavin, 2013), με ετερογένεια όσον αφορά τον σχεδιασμό, τα κριτήρια επιλογής των εθελοντών και το είδος προϊόντος μανιταριού που χρησιμοποιήθηκε. Συγκεκριμένα υπάρχουν λίγες *in vitro* μελέτες όπου ο εξεταζόμενος πληθυσμός ήταν ηλικιωμένοι (Y. Liu et al., 2016) και χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το καρπόσωμα του μύκητα (λυοφιλοποιημένο) (Boulaka et al., 2020; Mitsou et al., 2020; N. Kerezoudi et al., 2021; Zhao et al., 2018), αντί για εκχύλισμα (Cantu-Jungles et al., 2018; Chaikiang et al., 2015; Rodrigues et al., 2016; Vamanu et al., 2018; Yu et al., 2013).

Πρεβιοτική δράση των β-γλυκανών από εδώδιμα μανιτάρια

Πολύ πρόσφατες *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι τα (πλούσια σε β-γλυκάνες) μανιτάρια *P. eryngii* ασκούν πρεβιοτική δράση, αφενός αυξάνοντας τους σχετικούς πληθυσμούς των *Lactobacilli* και *Bifidobacteria* καθώς και την παραγωγή SCFA σε ζύμωση κοπράνων υγιών ατόμων (Mitsou et al., 2020), αφετέρου φαίνεται να δρουν προστατευτικά στην χαλάρωση των στενών συνδέσεων (tight junctions) των κυττάρων του αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου (Caco-2) (Saxami et al., 2021) και να έχουν γενοπροστατευτικές ιδιότητες (στις ίδιες κυτταρικές σειρές) (Boulaka et al., 2020). Οι μελέτες αυτές θα περιγραφούν συνοπτικά στη συνέχεια.

Στη μελέτη των Mitsou et al. εξετάστηκε η επίδραση της ζύμωσης εδωδιμων μανιταριών πλούσιων σε β-γλυκάνες στη σύνθεση και τους μεταβολίτες του ΕΜ χρησιμοποιώντας *in vitro* στατικές batch καλλιέργειες με επώαση από εμβόλιο κοπράνων από ηλικιωμένα άτομα (n=8). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν (λυοφιλοποιημένα) τα εδώδιμα μανιτάρια *Pleurotus ostreatus*, *eryngii*, *Hericium erinaceus* και *Cyclocybe cylindracea*, προερχόμενα από διάφορα υποστρώματα. Μετά από 24-ωρη ζύμωση μελετήθηκε η σύσταση του ΕΜ με ποσοτική PCR (qPCR) και τα παραγόμενα SCFA με αέρια χρωματογραφία (GC). Το *P. eryngii* ανεξαρτήτως υποστρώματος αύξησε την ανάπτυξη βακτηρίων *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, καθώς και τα παραγόμενα SCFA, ενώ το *P. eryngii* από υπόστρωμα σιτάρι/στέμφυλα σταφυλίου (wheat

straw/grape marc) αύξησε σημαντικά τα εξεταζόμενα στελέχη παραγωγών βουτυρικού οξέος, *F. prausnitzii* και *E. rectale/Roseburia* spp. group (Mitsou et al., 2020).

Οι Saxami et al. μελέτησαν την *in vitro* επίδραση των μεταβολικών προϊόντων που προκύπτουν από τη ζύμωση (fermentation supernatants, FS) του *P. eryngii* από τον EM υγιών ηλικιωμένων, στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων των στενών συνδέσεων (tight junctions, TJ) Caco-2 κυττάρων (κύτταρα αδενοκαρκινώματος παχέος εντέρου), μετά από την πρόκληση βλάβης από LPS. Τα Caco-2 κύτταρα υπέστησαν επίδραση από FS και LPS πριν, μαζί και μετά την επώαση με FS και μετρήθηκε η έκφραση των γονιδίων zonulin-1, occludin και claudin-1. Η επίδραση με FS (προϊόντα της ζύμωσης) από το *P. eryngii* αύξησε σημαντικά την έκφραση των γονιδίων αυτών στο προ-επώαστικό στάδιο, προτείνοντας πιθανή προληπτική δράση. Παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των TJ γονιδίων μετά την επίδραση με LPS. Συνολικά, τα δεδομένα δείχνουν θετικές και πιθανά προστατευτικές δράσεις των *P. eryngii* στην αύξηση της έκφρασης των TJ γονιδίων (Saxami et al., 2021).

Στη μελέτη τους, οι Boulaka et al. εξέτασαν το γονοπροστατευτικό (genoprotective) προφίλ ιδιοτήτων των υπερκείμενων ζυμώσεων (FS) των εδώδιμων μανιταριών *P. ostreatus*, *P. eryngii*, *Hericium erinaceus* και *Cyclocybe cylindracea* σε Caco-2 κύτταρα. Έγινε *in vitro* 24ωρη ζύμωση χρησιμοποιώντας εμβόλιο κοπράνων από υγιείς εθελοντές και τα ανωτέρω στελέχη μανιταριών λυοφιλοποιημένα. Οι κυτταροτοξικές και αντι-γενετοξικές ιδιότητες των FS μελετήθηκαν με χρήση του γενετοξικού παράγοντα tert-βουτυλο-υδρουπεροξείδιο (t-BOOH). Επιπροσθέτως, μελετήθηκε το συνολικό μεταβολικό προφίλ των FS με ομο- και ετεροπυρηνικά πειράματα NMR φασματοσκοπίας (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού) δύο διαστάσεων. Οι ερευνητές με το πέρας των πειραμάτων ταυτοποίησαν συνολικά 37 μεταβολίτες. Τέλος, στατιστική ανάλυση πολλών μεταβλητών ανίχνευσε τις αλλαγές στον EM και ανέδειξε βιο-δείκτες οι οποίοι συνδέονται με τα οφέλη για την υγεία των εδώδιμων μανιταριών (Boulaka et al., 2020; Saxami et al., 2021).

Παλαιότερες μελέτες παρέμβασης χρησιμοποίησαν εκχύλισμα β-γλυκανών από ζύμες για να μελετήσουν την επίδραση του σε λοιμώξεις του αναπνευστικού (Fuller et al., 2017; Graubaum et al., 2012). Ειδικότερα, οι Graubaum et al., χρησιμοποίησαν ένα εκχύλισμα αδιάλυτων β-γλυκανών (Yestimun®, 450 mg/ημέρα) σε διπλά τυφλή, τυχαιοποιημένη φαρμάκου-μάρτυρα δοκιμή και εξέτασαν την επίδρασή του στην επίπτωση του κοινού κρυολογήματος καθώς και στα συμπτώματά του, σε σχέση με εικονικό σκεύασμα (placebo). Τις πρώτες 13 βδομάδες της μελέτης (από τις 26 συνολικά), οι οποίες συνέπεσαν με την εποχή αυξημένων λοιμώξεων, στους εθελοντές που λάμβαναν το εκχύλισμα, η επίπτωση του κρυολογήματος ήταν σημαντικά χαμηλότερη. Επιπλέον, το εκχύλισμα β-γλυκανών φαίνεται να μείωσε τα συμπτώματα του κρυολογήματος όπως πονόλαιμο, βήχα και καταρροή (Graubaum et al., 2012).

Με παρόμοιο σχεδιασμό, οι Fuller et al., χρησιμοποίησαν το εκχύλισμα β-1,3/1,6 γλυκανών από ζύμες Wellmune (250 mg/ημέρα) έναντι εικονικού και εξέτασαν την επίδρασή του στην πρόληψη και ελάττωση της σοβαρότητας των συμπτωμάτων λοιμώξεων του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος υγιών ηλικιωμένων. Η μελέτη είχε διάρκεια 90 ημέρες, διεξήχθη τον χειμώνα και έδειξε ότι η συμπληρωματική χορήγηση του ανωτέρω σκευάσματος μπορεί να δράσει προληπτικά στις λοιμώξεις του ανώτερου αναπνευστικού αλλά και να μειώσει τη διάρκεια των συμπτωμάτων της λοίμωξης (Fuller et al., 2017).

Οι Gaullier et al., χρησιμοποίησαν το εκχύλισμα β-1,3/1,6 γλυκανών από μανιτάρια shiitake (*Lentinus edodes*), Lentinex® (2.5 mg/ημέρα) σε υγιείς ηλικιωμένους σε μια διπλά τυφλή,

τυχαιοποιημένη, διασταυρούμενη, φαρμάκου-μάρτυρα μελέτη. Οι εθελοντές έλαβαν τυχαία για 6 εβδομάδες το φάρμακο ή τον μάρτυρα και στη συνέχεια το μάρτυρα ή το φάρμακο αντίστοιχα, με διάστημα washout 4 εβδομάδων ενδιάμεσα. Το σκεύασμα χαρακτηρίστηκε ασφαλές και καλά ανεχτό. Η βασική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες ήταν η αύξηση στα Β-λεμφοκύτταρα στα άτομα που έπαιρναν το φάρμακο(Gaullier et al., 2011).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Μελέτη FUNGLUCAN

Η παρούσα εργασία αποτελεί μέρος της πιλοτικής μελέτης παρέμβασης με πειραματικό τρόφιμο-σνακ εμπλουτισμένο με μανιτάρια, σε υγιή άτομα άνω των 60 ετών. Η διατροφική αυτή παρέμβαση έχει εγκριθεί από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου (62/03-07-2018) και αποτελεί μέρος του ερευνητικού προγράμματος με τίτλο «Ανάπτυξη καινοτόμου λειτουργικού τροφίμου εμπλουτισμένου με β-γλυκάνες από εδώδιμα μανιτάρια ελληνικών βιοτόπων» (FUNGLUCAN), που χρηματοδοτήθηκε από την ΕΥΔΕ-ΕΤΑΚ (MIS:5031221).

1.1 Σκοπός

Η μελέτη της επίδρασης της κατανάλωσης πειραματικού τροφίμου εμπλουτισμένου με μανιτάρια πλούσια σε β-γλυκάνες στον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών ατόμων >60 ετών.

1.2 Μεθοδολογία υλοποίησης της μελέτης παρέμβασης

Πειραματικό αρτοσκεύασμα εμπλουτισμένο με σκόνη λυοφιλοποιημένων μανιταριών *Pleurotus eryngii* (μέγιστη συγκέντρωση 20% κ.β.), το οποίο παρασκευάστηκε από την Εταιρεία Τροφίμων Ε.Ι. Παπαδόπουλος, αποτέλεσε τη βάση της διπλά τυφλής διασταυρούμενης μελέτης/παρέμβασης. Πιο συγκεκριμένα, 30 εθελοντές, ηλικίας >60 ετών, επιλέχθηκαν με τυχαίο τρόπο μέσω προφορικής διαφήμισης.

Οι εθελοντές κατανάλωσαν με τυχαία σειρά το εμπλουτισμένο τρόφιμο για 3 μήνες και τον εικονικό τρόφιμο για ίσο διάστημα, με ενδιάμεση περίοδο αποχής 2 μηνών. Στην αρχή ($t=0$) και στο τέλος ($t=3m$) κάθε 3μήνου έγινε ενδεδειγμένη διατροφική αξιολόγηση (συμπεριλαμβανομένης και της ποιότητας ζωής) και ελήφθη μικρή ποσότητα αίματος για τις αναλύσεις των βιοχημικών δεικτών. Επίσης συλλέχθηκαν δείγματα ούρων και κοπράνων για την ανάλυση των μικροβιακών πληθυσμών του εντέρου και των μεταβολιτών τους.

Προσδιορίστηκαν μεταβολές στον ΕΜ και βιοχημικές παράμετροι ανοσοαπόκρισης σε κόπρανα, ούρα και αίμα. Ο βαθμός γαστρεντερικής ανοχής των εθελοντών στο πειραματικό τρόφιμο αξιολογήθηκε με κατάλληλο ερωτηματολόγιο. Από τους εθελοντές ζητήθηκε να μην αλλάξουν τη συνήθη δίαιτά τους. Για τον έλεγχο αυτού καθώς και τον έλεγχο της κατανάλωσης του τροφίμου της παρέμβασης, έγιναν μετρήσεις βάρους καθώς και τυχαίες ανακλήσεις 24ώρου 1 φορά/15μέρες από εξειδικευμένο προσωπικό. Σε περίπτωση αποκλίσεων (αλλαγής της συνήθους διαίτας ή/και του βάρους), οι ερευνητές έδωσαν συγκεκριμένες οδηγίες στους εθελοντές. Αν ένας εθελοντής σε 2 αξιολογήσεις καταγραφεί ως «μη συμμορφούμενος» τότε αποκλείεται από τη μελέτη.

1.3 Κριτήρια επιλογής εθελοντών

Τα άτομα που επιλέχθηκαν ήταν σε γενικές γραμμές υγιή. Τα κριτήρια αποκλεισμού από τη μελέτη ήταν το ιστορικό γαστρεντερολογικών νοσημάτων, τα αυτοάνοσα νοσήματα, το ιστορικό επιληπτικών κρίσεων, το ιστορικό στεφανιαίας νόσου, το ιστορικό ηπατικών και νεφρικών παθήσεων, ο σακχαρώδης διαβήτης, η νοσηλεία για πάνω από τέσσερις εβδομάδες και η παρουσία λοίμωξης το τελευταίο μήνα (π.χ. CRP>5mg/dL), οι ακραίες διαιτητικές συμπεριφορές (π.χ. αποκλειστικά χορτοφάγοι), η κατανάλωση αντιβιοτικών τουλάχιστον 2 μήνες πριν την μελέτη και η κατανάλωση συμπληρωμάτων διατροφής καθώς και προβιοτικών ή/και πρεβιοτικών δυο εβδομάδες πριν την μελέτη.

2. Πρωτόκολλα δειγματοληψίας και αποθήκευσης βιολογικών δειγμάτων

2.1 Σκοπός

Η παραλαβή, η επεξεργασία, ο διαχωρισμός και η αποθήκευση δειγμάτων κοπράνων, αίματος και ούρων από τους εθελοντές της μελέτης.

2.2 Πρωτόκολλο δειγματοληψίας, επεξεργασίας και αποθήκευσης κοπράνων

Η πλήρης κένωση κάθε εθελοντή/εθελόντριας μεταφέρθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών (Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ.), αφού είχε προηγουμένως συλλεχθεί εντός προζυγισμένου συστήματος πλαστικού συλλέκτη-σακούλας προς μικροβιολογική ανάλυση (σε ≤ 2 ώρες από την ώρα της κένωσης). Ως ελάχιστο καθαρό βάρος για την κένωση ορίστηκαν τα 35g. Έγινε οπτική και απτική αξιολόγηση ως προς το είδος κένωσης με την κλίμακα Bristol. Στη συνέχεια έγινε ομογενοποίηση του δείγματος και χωρισμός σε περιέκτες Falcon των 15mL. Για την απομόνωση DNA αποθηκεύτηκαν 2g κοπράνων ανά δείγμα. Για τη μέτρηση των παραγόμενων SCFA αποθηκεύτηκαν 1.5g. Για τη μέτρηση της κυτταροτοξικότητας και ως «back up» αποθηκεύτηκαν 10g αντίστοιχα. Όλοι οι παραπάνω τύποι δειγμάτων αποθηκεύτηκαν στους -80°C . Για τη μέτρηση pH συλλέχθηκε 1g σε γυάλινο φιαλίδιο με 1mL απεσταγμένο νερό. Τέλος για τη μέτρηση του ξηρού βάρους, συλλέχθηκαν 2g σε δύο περιέκτες και αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

2.3 Πρωτόκολλο δειγματοληψίας, επεξεργασίας και αποθήκευσης ούρων

Έγινε αξιολόγηση και επεξεργασία των δειγμάτων εντός 2 ωρών από τη συλλογή τους. Τα ούρα αξιολογήθηκαν ως προς το χρώμα και τη διαύγεια και αποθηκεύτηκαν 1mL σε 5 erpendorfs των 2mL. Σε δύο Erpendorf προστέθηκαν 5μL BHT και όλα αποθηκεύτηκαν στους -80°C .

2.4 Πρωτόκολλο δειγματοληψίας, επεξεργασίας και αποθήκευσης αίματος και συστατικών του

Η αιμοληψία έγινε μετά από 12ωρη νηστεία. Συλλέχθηκε 20mL περιφερικό φλεβικό αίμα και χωρίστηκε σε δύο περιέκτες, έναν με αντιπηκτικό EDTA κι έναν χωρίς αντιπηκτικό. Από τον περιέκτη με αντιπηκτικό συλλέχθηκαν 0.5mL αίμα για Γενική Εξέταση Αίματος (στον αυτόματο αναλυτή αίματος BC-3000 Plus, Mindray, China) και 3mL σε Falcon των 15mL για μέτρηση μονοπύρηνων κυττάρων περιφερικού αίματος (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMCs). Ο περιέκτης με το EDTA έπειτα φυγοκεντρήθηκε στα 1560g στους 20°C για 15 λεπτά χωρίς φρένα. Το υπερκείμενο (πλάσμα) αξιολογήθηκε ως προς τη διαύγεια και το χρώμα και έπειτα συλλέχθηκε σε 5 erpendorfs (aliquots) των 2mL, 0.5-1mL ανά aliquot. Συλλέχθηκε 1 mL επίσης από τη λευκή στοιβάδα (buffer coat). Ο περιέκτης χωρίς αντιπηκτικό φυγοκεντρήθηκε στα 2000g για 10 λεπτά με φρένα. Το υπερκείμενο (ορός) συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε ανά 0.5-1mL σε 5 aliquots. Ο ορός και το πλάσμα αποθηκεύτηκαν στους -80°C ενώ οι περιέκτες των PBMCs και λευκής στοιβάδας παραλήφθηκαν και επεξεργάστηκαν άμεσα.

3. Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού DNA από δείγμα κοπράνων

3.1 Σκοπός

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

3.2 Αρχή μεθόδου

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

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

3.3 Αντιδραστήρια

- 0,125g δείγμα κοπράνων από φυαλίδιο gDNA απ' τους -80°C
- Διάλυμα λύσης-lysis buffer (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, και 4% sodium dodecyl sulfate (SDS)).
- Αποστειρωμένα screw-cap tubes με Zirconia beads (0,3g των 0,1mm και 0,1g των 0,5mm).
- Οξικό αμμώνιο 10M
- Ισοπροπανόλη
- 70% αιθανόλη (EthOH) και απόλυτη αιθανόλη
- Ρυθμιστικό διάλυμα-Tris-EDTA buffer
- DNAαση-ελεύθερη RNAασης
- Πρωτεϊνάση K
- Διάλυμα AL (από QIAamp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN®, Hilden, Germany)
- QIAamp στήλη (από QIAamp DNA Stool Mini Kit, QIAGEN®, Hilden, Germany)
- Διάλυμα AW1 (QIAGEN)
- Διάλυμα AW2 (QIAGEN)
- Διάλυμα έκλουσης AE (QIAGEN)

3.4 Εξοπλισμός

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

3.5 Πειραματική διαδικασία

I. Πρωτόκολλο για τη λύση των κυττάρων

- 1) Αφαιρέθηκε το πρώτο δείγμα από τους -80°C , κόπηκαν με νυστέρι 0,125g κοπράνων και ζυγίστηκαν κατευθείαν στα προζυγισμένα screw-cap tubes με τα σφαιρίδια Zirconia. Το Falcon επιστράφηκε στους -80°C .
- 2) Προστέθηκαν 1ml lysis buffer.
- 3) Ακολούθησε ομογενοποίηση σε 4.800Vibers/min για 3min στη συσκευή MiniBeadBeater, και επανάληψη των βημάτων 1-3 για τα υπόλοιπα δείγματα.
- 4) Έγινε επώαση στους 95°C για 15min (με χειροκίνητη ανάδευση κάθε 5 min).
- 5) Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 20.000x g, στους 4°C , για 10 min και μεταφορά υπερκείμενου υγρού σε καινούργια αποστειρωμένα σωληνάκια των 2mL.
- 6) Προστέθηκαν 300μL Lysis buffer και επαναλήφθηκαν τα βήματα από 4-6 συμπληρώνοντας τα σωληνάκια των 2mL με το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης.

II. Πρωτόκολλο για την κατακρήμνιση των νουκλεικών οξέων:

- 6) Ακολούθησε προσθήκη 260μL οξικού αμμωνίου 10M, πολύ καλή ανάδευση και επώαση σε πάγο για 5min.
- 7) Μετά από φυγοκέντρηση στα 16.000x g, στους 4°C , για 10 min, ακολούθησε μεταφορά του υπερκείμενου σε erpendorfs των 1,5mL και προσθήκη ισοπροπανόλης(1:1).
- 8) Κατόπιν επώασης στον πάγο για 30min, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 16.000x g, στους 4°C , για 15 min.
- 9) Απορρίφθηκε η υπερκείμενη φάση και ακολούθησε έκλουση του ιζήματος με 1mL 70% EthOH.
- 10) Μετά την φυγοκέντρηση στα 12.000x g, στους 4°C , για 2 min, απορρίφθηκε η υγρή φάση και τα δείγματα αφέθηκαν με ανοιχτά τα καπάκια σε RT προς ξήρανση για 30 min.
- 11) Ακολούθησε προσθήκη 100μL Tris-EDTA και μετά από 15 min, καλή αναδιάλυση των τοιχωμάτων και ομογενοποίηση των κλασμάτων.

III. Απομάκρυνση του RNA, πρωτεϊνών και καθαρισμός του DNA:

- 12) Προστέθηκαν 2μL DNase-free RNase (10mg/mL) στα δείγματα και επώαστηκαν στους 37°C , για 15 min.
- 13) Ακολούθησε προσθήκη 15μL της πρωτεϊνάσης K, 200μL ρυθμιστικού διαλύματος AL (από το QIAamp® DNA Mini Kit) και μετά από καλή ανάμειξη, επώαση στους 70°C , για 10 min.

- 14) Έγινε προσθήκη 200μL 100% EthOH, καλή ανάδευση και μεταφορά όλου του υγρού μέσα στην QIAamp column (στήλη) και κατόπιν, φυγοκέντρωση στα 20.800x g , σε RT, για 1 min.
- 15) Αφαιρέθηκε όλο το υγρό από την στήλη, προστέθηκαν 500μL AW1 buffer και τα δείγματα στα φυγοκεντρήθηκαν στα 20.800x g , σε RT, για 1 min.
- 16) Ακολούθησε απομάκρυνση όλου του υγρού από την στήλη, προσθήκη 500μL AW2 buffer και φυγοκέντρωση των δειγμάτων στα 20.800x g , σε RT, για 3 min.
- 17) Απορρίφθηκε το υγρό και φυγοκεντρήθηκε η κάθε στήλη στα 20.800x g , σε RT, για 1 min προς ξήρανση.
- 18) Προστέθηκαν στη στήλη 200μL διαλύματος έκλουσης AE, επωάστηκαν σε RT, για 5 min και εν τέλει φυγοκεντρήθηκαν στα 20.800x g , σε RT, για 1 min.
- 19) Τα δείγματα φορτώθηκαν με 1μL δείγματος στην κυψελίδα, φωτομετρήθηκαν στα A_{230} , A_{260} και A_{280} και υπολογίστηκαν τα $A_{260/280}$ και $A_{260/320}$ με σκοπό μέτρηση καθαρότητας και ποσοτικοποίησης του DNA για dsDNA (double-stranded DNA).
- 20) Τέλος τα δείγματα αναδεύθηκαν με vortex και quick spin και μεταφέρθηκαν 40μL σε δύο eppendorfs που αποθηκεύτηκαν στους -80°C. Τα αρχικά eppendorfs αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

4. Ποσοτικός προσδιορισμός βακτηριακού DNA με Real-Time PCR (RT-qPCR)

4.1 Σκοπός

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του βακτηριακού DNA στα δείγματα κοπράνων των εθελοντών.

4.2 Αρχή μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction: PCR) είναι μια επαναστατική μεθοδολογία κλωνοποίησης για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας μιας επιθυμητής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η αντίδραση αυτή βασίζεται στον ενζυμικό πολυμερισμό, «ενίσχυση» ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA-στόχου, το οποίο βρίσκεται ανάμεσα σε δύο ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές (primers). Οι εκκινητές αυτοί είναι σχεδιασμένοι κατά τέτοιο τρόπο, ώστε ο ένας να είναι συμπληρωματικός με τη μία άκρη της αλληλουχίας-στόχου στον ένα κλώνο του DNA και ο άλλος με την άλλη άκρη της αλληλουχίας-στόχου στο συμπληρωματικό κλώνο του DNA. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται η πολυμεράση του DNA βακτηριακής προέλευσης, η οποία συνθέτει δύο νέες αλυσίδες DNA έχοντας ως εκμαγείο τις αλληλουχίες μεταξύ των δύο εκκινητών. Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες είναι μεταξύ τους συμπληρωματικές και μπορούν να σχηματίσουν ένα δεύτερο αντίγραφο της αρχικής αλληλουχίας στόχου. Η επανάληψη των κύκλων θερμικής αποδιάταξης, υβριδοποίησης των εκκινητών και της ενζυμικής σύνθεσης του DNA έχει ως αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση της αρχικής αλληλουχίας στόχου του DNA (Nussbaum et al., 2011) .

Η real-time PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση μικρών ποσοτήτων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA ή RNA σε ένα δείγμα συγκριτικά με ένα πρότυπο διάλυμα. Στηρίζεται στην ίδια αρχή με αυτή της κλασικής PCR, απλά χρησιμοποιείται ειδική χρωστική που προσδένεται στα μόρια DNA και φθορίζει υπό υπεριώδες φως. Στην real-time PCR, το μηχάνημα μετράει τον φθορισμό των δειγμάτων σε κάθε κύκλο και κατασκευάζει καμπύλη φθορισμού ως

προς τον χρόνο. Η καμπύλη του ενισχυμένου τμήματος DNA μπορεί να απεικονιστεί σε μια λογαριθμική γραφική παράσταση και να σχηματιστεί τελικά μια ευθεία γραμμή. Ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται μέχρι ο φθορισμός του προϊόντος να φτάσει μια ουδό (που υπολογίζεται πειραματικά) αποτελεί μέτρο της ποσότητας του γονιδίου- εκμαγείου που υπήρχε στο αρχικό δείγμα -όσο λιγότεροι οι κύκλοι για να φτάσει στην ουδό, τόσο μεγαλύτερη η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας-εκμαγείου(Nussbaum et al., 2011).

Στάδια PCR	θ (°C)	t (sec ή min)
Enzyme activation	95°C	3min
45 κύκλοι 3-step PCR	Denaturation 95°C	3sec
	Annealing 60°C	20sec
	Extension 72°C	19sec
Melting Curves	Cooling from 95°C to 65°C 0,1°C sec-1	5min
Cooling	40°C	30sec

Πίνακας 4: Ενδεικτικός προγραμματισμός qPCR για προσδιορισμό ολικών βακτηρίων

Ο ποσοτικός προσδιορισμός προκύπτει από την τιμή Ct -threshold circle (είναι ο αριθμός των κύκλων της qPCR όπου ο φθορισμός του προϊόντος της φτάνει στο κατώφλι ανίχνευσης της φάσης log-linear όπου η απόδοση της αντίδρασης PCR είναι σταθερή). Καθίσταται η ανάγκη να αποσαφηνιστεί ότι όσο μικρότερο είναι το Ct τόσο μεγαλύτερη θα είναι η ποσότητα του DNA-στόχου στο δείγμα. Η τελική μορφή της ποσοτικοποίησης της PCR είναι εκπεφρασμένη σε δεκαδικό λογάριθμο των αντιγράφων (copies) του 16S-rRNA, δηλαδή $\log \text{copies}_{16\text{S rRNA mL}^{-1}}$ δείγματος, μέσω προτύπων καμπυλών αναφοράς, όπου δίνεται η γραμμική συσχέτιση των copies του 16S-rRNA και των αντίστοιχων τιμών Ct μετά από πολλές πολλαπλές αραιώσεις των στελεχών (101 έως 107 copies). Η αλληλούχηση του 16S-rRNA αποτελεί θεμελιώδες βήμα για τον προσδιορισμό των βακτηρίων. Το 16S-rRNA είναι ένα πολυμορφικό γονίδιο με κοινές περιοχές για όλα τα βακτήρια του ΕΜ και μεταβλητές/υπερμεταβλητές περιοχές ειδικές κάθε φύλου/ομάδας/γένους/είδους βακτηρίου. Χρησιμοποιώντας κατάλληλους εκκινητές (primers) που στοχεύουν στις διάφορες περιοχές του γονιδίου για καθέναν από τους προαναφερθέντες μικροοργανισμούς-στόχους, μπορούμε να τους ανιχνεύσουμε και να τους ποσοτικοποιήσουμε (Rosselli et al., 2016). (Πίνακας 4).

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

4.3 Αντιδραστήρια

- Δείγμα DNA
- Ultra pure H₂O
- Biochrom H₂O
- Γενετικό υλικό-αλληλουχία στόχου των υπό μελέτη δειγμάτων
- Μη ειδική φθορίζουσα χρωστική KAPA SYBR® Green Fast Master Mix (2x) Universal Kit (Kapa Biosystems Inc., USA)

- Ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές-primers Forward και Reverse κατάλληλοι για κάθε μικροοργανισμό (
-
- Πίνακας 5)
- BSA (Bovine Serum Albumin)
- Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης και Mg^{2+}
- Δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs)
- Ταq πολυμεράση (DNA) από *Thermus aquaticus*
- Πρότυπα διαλύματα αντίστοιχων μικροοργανισμών

Πίνακας 5: Δεδομένα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην qPCR

Στόχος	Primers	Αλληλουχία primer (5'-3')	Θ _{υβριδισμού} (°C)	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πρότυπο στέλεχος	Πηγή
Ολικά βακτήρια	Forward	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	60	466	<i>Bacteroides fragilis</i> MM44 (ATCC 25285)	(Nadkarni et al., 2002)
	Reverse	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT				
<i>F. prausnitzii</i>	FPR-2F	GGAGGAAGAAGGTCTTCGG	60	248	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> DSM 17677	(A et al., 2001; J. Feng et al., 2013; R. F. Wang et al., 1996)
	Fprau645R	AATTCCGCCTACCTCTGCACT				
<i>Roseburia</i> spp.- <i>E. rectale</i>	RrecF	GCGGTRCGGCAAGTCTGA	60	81	<i>Roseburia intestinalis</i> DSM 14610	(Walker et al., 2010)
	Rrec630mR	CCTCCGACACTCTAGTMCGAC				
<i>A. muciniphila</i>	AM1	CAGCACGTGAAGGTGGGG	60	327	<i>Akkermansia muciniphila</i> DSM 22959	(Collado et al., 2007; MC et al., 2008)
	AM2	CCTTGGGGTTGGCTTCAGAT				

4.4 Εξοπλισμός

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

4.5 Πειραματική διαδικασία

1) Τα δείγματα υπό μελέτη αφέθηκαν στον πάγο προς ξεπάγωμα και κατόπιν κατάλληλης αραιώσης (με τελική συγκέντρωση 1ng/μL) παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα Master Mix (κατάλληλης συγκέντρωσης διαφορετικής για κάθε μικροοργανισμό) με τα εξής:

Ultra-pure H₂O-PCR grade

Νουκλεοτίδια dNTPs

Φθορίζουσα χρωστική SYBR GREEN (KAPA SYBR Fast Master Mix (2x) Universal Kit, Kapa Biosystems)

0,4μL ή 0,6μL εκκινητών-primers

0,25 μL Bovine Serum Albumin (BSA)

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

3) Τα γυάλινα τριχοειδή τοποθετήθηκαν στην ειδική υποδοχή (καρουζέλ) του θερμικού κυκλοποιητή και ξεκίνησε τρέξιμο του προγράμματος ρυθμισμένο σε κατάλληλες θερμοκρασίες αντίστοιχες για κάθε μικροοργανισμό.

4) Ολοκληρώνοντας, ελήφθησαν τα αποτελέσματα προς επεξεργασία ως $\log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} \text{ mL}^{-1}$ δείγματος.

5. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε στο πρόγραμμα Stata 15.1. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του δείγματος εξετάστηκαν οι μεταβλητές ηλικία, βάρος, BMI, MET μέτριας φυσικής δραστηριότητας, MET περπατήματος, ώρες καθιστικής ζωής και συνολική φυσική δραστηριότητα στην αρχή και το τέλος κάθε τριμήνου. Οι συγκεκριμένες μεταβλητές εξετάστηκαν για την περιγραφή του δείγματος αλλά και με σκοπό να αναγνωριστούν παράγοντες οι οποίοι μπορεί να επηρέασαν τη επίδραση του τροφίμου. Όσον αφορά την επίδραση του εμπλουτισμένου τροφίμου στους μικροβιακούς πληθυσμούς του εντέρου των εθελοντών εξετάστηκαν οι απόλυτοι αριθμοί με κατάλληλους υπολογισμούς ως $\log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} \text{ g}^{-1}$ κοπράνων) των ολικών βακτηρίων, του *F. prausnitzii*, των *Roseburia spp-E. rectale* και της *A. muciniphila* στην αρχή και το τέλος κάθε τριμήνου. Τέλος μελετήθηκε η μεταβολή στους απόλυτους αριθμούς, $\Delta \log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} \text{ g}^{-1}$ κοπράνων καθώς και η ποσοστιαία μεταβολή τους, $\Delta \% \log \text{copies}_{16S \text{ rDNA}} \text{ g}^{-1}$ κοπράνων κατά τη διάρκεια του τριμήνου.

Έγινε έλεγχος κανονικότητας των μεταβλητών τόσο με ιστογράμματα, όσο και με τον έλεγχο Shapiro-Wilk. Για τον έλεγχο της επίδρασης του τροφίμου στις μεταβλητές που ακολουθούν την κανονική κατανομή έγιναν παραμετρικά Independent-Samples t-tests και για τις υπόλοιπες μη παραμετρικοί έλεγχοι Mann-Whitney Independent Samples. Για τον έλεγχο του χρόνου, ως πιθανού παράγοντα που χρειάζεται να ληφθεί υπόψη έγιναν Repeated Measures ANOVA στις ακολουθούσες την κανονική κατανομή μεταβλητές. Ο ίδιος έλεγχος έγινε και στις μη-κανονικής κατανομής αφού προηγήθηκε ταξινόμηση (Ranking).

	Εικονικό τρόφιμο (N=13)	Εμπλουτισμένο σνακ με μανιτάρι <i>P.eryngii</i> (N=13)	p-value για T	Εικονικό τρόφιμο (N=13)	Εμπλουτισμένο σνακ με μανιτάρι <i>P.eryngii</i> (N=13)
	t=αρχή τριμήνου			t=τέλος τριμήνου	
(Kg)	69.00 (62.00,82.10)	70.00 (62.25,80.40)	p= 0.917	71.00 (62.50,80.60)	70.00 (63.25,80.50)
Kg m ⁻²)	25.65 (22.53,28.41)	25.19 (22.81,28.92)	p= 0.894	26.08 (22.63,28.36)	25.71 (22.81,28.81)
h/ εβδομάδα)	28.00 (21.00,47.25)	31.50 (22.57,54.20)	p= 0.938	31.50 (22.75,56.00)	31.50 (22.75,54.20)
δραστηριότητα εβδομάδα)	0.00 (0.00,0.00)	0.00 (0.00,0.00)	p= 0.935	0.00 (0.00,40.00)	0.00 (0.00,7.50)
τημα εβδομάδα)	1386.00 (495.00,2227.50)	594.00 (416.63,2079.00)	p= 0.699	594.00 (416.63,1732.50)	594.00 (239.25,1663.50)
φυσική α (MET min/ άδα)	1386.00 (594.00,2425.50)	1848.00 (528.00,2943.00)	p= 0.911	800.00 (528.00,2425.50)	990.00 (272.25,2079.00)
μα (%)	7.7	7.7	p= 1.000	7.7	7.7

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Περιγραφικά χαρακτηριστικά δείγματος

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε δείγμα N=13 εθελοντών χωρίς υποκείμενα νοσήματα, 8 γυναικών και 5 ανδρών. Ο Μέσος Όρος (ΜΟ) ηλικίας των ατόμων ήταν 65,85 ($\pm 5,17$) έτη. Το ποσοστό 7,7% των εθελοντών ήταν καπνιστές και παρέμειναν κατά τη διάρκεια της παρέμβασης ($p=1,000$). Στην έναρξη της παρέμβασης, δηλαδή για t=αρχή του τριμήνου, για τα άτομα που κατανάλωσαν το εμπλουτισμένο με *P. eryngii* (εφεξής καλείται ομάδα Α) η διάμεσος (Μ) του βάρους για το δείγμα ήταν 70 Kg με ελάχιστο βάρος τα 62,25 Kg και μέγιστο τα 80,40 Kg ενώ για την ομάδα που κατανάλωσε το εικονικό τρόφιμο (εφεξής καλείται ομάδα Β), η Μ του βάρους για το δείγμα ήταν 69 Kg με ελάχιστο τα 62 Kg και μέγιστο τα 82 Kg, με $p=0,917$ ως προς την επίδραση του τροφίμου (

). Στον ίδιο χρόνο ο Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) της ομάδας Α ήταν 25,19 Kg·m⁻² με ελάχιστο ΔΜΣ τα 22,81 Kg·m⁻² και μέγιστο τα 28,92, ενώ της ομάδας Β, 25,65, 22,53 και 28,41 Kg·m⁻² αντίστοιχα, με $p= 0.894$. Όσον αφορά τη φυσική δραστηριότητα, η ομάδα Α είχε Μ 31,50 h/εβδομάδα καθιστικές δραστηριότητες, με ελάχιστο τις 22,57 h/εβδομάδα και μέγιστο τις 54,20, ενώ η ομάδα Β 28, 21 και 47,25 h/εβδομάδα αντιστοίχως, με $p=0,935$. Κανείς/καμία εθελοντής/εθελόντρια δεν έκανε μέτρια φυσική δραστηριότητα, $p=0,935$. Ωστόσο, όσον αφορά το περπάτημα η ομάδα Α είχε 594 MET min/εβδομάδα, με ελάχιστο τα 416,63 και μέγιστο τα 2079, ενώ η ομάδα Β 1386, 495 και 2227,50 MET min/εβδομάδα αντιστοίχως, με $p=0,699$. Στον ίδιο χρόνο, η Μ της συνολικής φυσικής δραστηριότητας ήταν 1848 MET min/εβδομάδα με ελάχιστο τα 528 και μέγιστο τα 2943, ενώ η ομάδα Β είχε 1386, 594 και 2425,50 MET min/εβδομάδα, αντίστοιχα, με $p=0,911$. Συνεπώς, σύμφωνα με τις τιμές p οι οποίες είναι όλες $>0,05$ το δείγμα είναι ομοιογενές, ανεξάρτητα από το είδος του σνακ που καταναλώθηκε.

Στο τέλος της παρέμβασης, δηλαδή για t=τέλος του τριμήνου, η Μ του βάρους για την ομάδα Α ήταν 70 Kg με ελάχιστο βάρος τα 63,25 Kg και μέγιστο τα 80,50 Kg ενώ για την ομάδα Β η Μ του βάρους ήταν 71 Kg με ελάχιστο τα 62,50 Kg και μέγιστο τα 82,60 Kg, με $p=0,996$ για την επίδραση του τροφίμου (T) και $p=0,961$ για την επίδραση του χρόνου (t) (

	Εικονικό τρόφιμο (N=13)	Εμπλουτισμένο σνακ με μανιτάρι <i>P.eryngii</i> (N=13)	p-value για T	Εικονικό τρόφιμο (N=13)	Εμπλουτισμένο σνακ με μανιτάρι <i>P.eryngii</i> (N=13)
	t=αρχή τριμήνου			t=τέλος τριμήνου	
(Kg)	69.00 (62.00,82.10)	70.00 (62.25,80.40)	p= 0.917	71.00 (62.50,80.60)	70.00 (63.25,80.50)
Kg m ⁻²)	25.65 (22.53,28.41)	25.19 (22.81,28.92)	p= 0.894	26.08 (22.63,28.36)	25.71 (22.81,28.81)
h/ εβδομάδα)	28.00 (21.00,47.25)	31.50 (22.57,54.20)	p= 0.938	31.50 (22.75,56.00)	31.50 (22.75,54.20)
δραστηριότητα εβδομάδα)	0.00 (0.00,0.00)	0.00 (0.00,0.00)	p= 0.935	0.00 (0.00,40.00)	0.00 (0.00,7.50)
τημα εβδομάδα)	1386.00 (495.00,2227.50)	594.00 (416.63,2079.00)	p= 0.699	594.00 (416.63,1732.50)	594.00 (239.25,1663.50)
φυσική α (MET min/ άδα)	1386.00 (594.00,2425.50)	1848.00 (528.00,2943.00)	p= 0.911	800.00 (528.00,2425.50)	990.00 (272.25,2079.00)
μα (%)	7.7	7.7	p= 1.000	7.7	7.7

). Στον ίδιο χρόνο ο Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) της ομάδας Α ήταν 25,71 Kg·m⁻² με ελάχιστο ΔΜΣ τα 22,81 Kg·m⁻² και μέγιστο τα 28,81, ενώ της ομάδας Β, 26,08, 22,63 και 28,36 Kg·m⁻² αντίστοιχα, με p= 0,990 για T και p=0,953 για t. Όσον αφορά τη φυσική δραστηριότητα, και οι δύο ομάδες είχαν διάμεσο 31,50 h/εβδομάδα καθιστικές δραστηριότητες, με ελάχιστο τις 22,75 h/εβδομάδα και μέγιστο τις 54,20, ενώ η ομάδα Β 22,75 και 56 h/εβδομάδα αντιστοίχως, με p=0,938 για T και p=0,873 για t. Η Μ για τη μέτρια φυσική δραστηριότητα ήταν και στο τέλος της παρέμβασης 0 MET min/εβδομάδα, αν και εδώ σημειώθηκε μέγιστο 7,50 και 40 MET min/εβδομάδα, με p=0,669 για T και p=0,838 για t. Επίσης, όσον αφορά το περπάτημα, και οι δύο ομάδες είχαν Μ 594 MET min/εβδομάδα, με ελάχιστο τα 239,25 και μέγιστο τα 1663,50 η Α, και 495 και 1732,50 MET min/εβδομάδα αντιστοίχως η Β, με p=0,897 για T και p=0,893 για t. Στον ίδιο χρόνο, η Μ της συνολικής φυσικής δραστηριότητας ήταν 990 MET min/εβδομάδα με ελάχιστο τα 272,25 και μέγιστο τα 2709, ενώ η ομάδα Β είχε 800, 528 και 2425,50 MET min/εβδομάδα, αντίστοιχα, με p=0,625 για T και p=0,969 για t. Συνεπώς, όπως προκύπτει και από τις τιμές p οι οποίες είναι όλες >0,05, τόσο ο παράγοντας τρόφιμο όσο και ο χρόνος (3 μήνες) δεν φαίνεται να επιδρούν στατιστικά σημαντικά στο βάρος, το ΔΜΣ, στην καθιστική ζωή, στη μέτρια φυσική δραστηριότητα, στο περπάτημα ή στη συνολική φυσική δραστηριότητα των εθελοντών. Με άλλα λόγια, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στις αναφερόμενες μεταβλητές, ούτε υπό την επίδραση του χρόνου ούτε του τροφίμου.

Πίνακας 6:Περιγραφικά χαρακτηριστικά κατά την έναρξη και το τέλος της μελέτης για το σύνολο των εθελοντών (N=13).

	Εικονικό τρόφιμο (N=13)	Εμπλουτισμένο σνακ με μανιτάρι <i>P.eryngii</i> (N=13)	p-value για T	Εικονικό τρόφιμο (N=13)	Εμπλουτισμένο σνακ με μανιτάρι <i>P.eryngii</i> (N=13)	p-value για T	p-value για t
	t=αρχή τριμήνου			t=τέλος τριμήνου			
Βάρος (Kg)	69.00 (62.00,82.10)	70.00 (62.25,80.40)	p= 0.917	71.00 (62.50,80.60)	70.00 (63.25,80.50)	p= 0.996	p=0.961
Δ.Μ.Σ. (Kg m ⁻²)	25.65 (22.53,28.41)	25.19 (22.81,28.92)	p= 0.894	26.08 (22.63,28.36)	25.71 (22.81,28.81)	p= 0.990	p=0.953
Καθιστική ζωή (h/ εβδομάδα)	28.00 (21.00,47.25)	31.50 (22.57,54.20)	p= 0.938	31.50 (22.75,56.00)	31.50 (22.75,54.20)	p= 0.938	p=0.873
Μέτρια φυσική δραστηριότητα (MET min/ εβδομάδα)	0.00 (0.00,0.00)	0.00 (0.00,0.00)	p= 0.935	0.00 (0.00,40.00)	0.00 (0.00,7.50)	p= 0.669	p=0.838
Περπάτημα (MET min/ εβδομάδα)	1386.00 (495.00,2227.50)	594.00 (416.63,2079.00)	p= 0.699	594.00 (416.63,1732.50)	594.00 (239.25,1663.50)	p= 0.897	p=0.893
Συνολική φυσική δραστηριότητα (MET min/ εβδομάδα)	1386.00 (594.00,2425.50)	1848.00 (528.00,2943.00)	p= 0.911	800.00 (528.00,2425.50)	990.00 (272.25,2079.00)	p= 0.625	p=0.969
Κάπνισμα (%)	7.7	7.7	p= 1.000	7.7	7.7	p= 1.000	

Πίνακας 7: Ποσοτικός προσδιορισμός μικροβιακών πληθυσμών (qPCR; logcopies16S rRNAg⁻¹κοπράνων) στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης για το σύνολο των εθελοντών.

logcopies _{16S rRNA} g ⁻¹ κοπράνων	Εικονικό τρόφιμο (N=13)	Εμπλουτισμένο σνακ με μανιτάρι <i>P.eryngii</i> (N=13)	p-value για T	Εικονικό τρόφιμο (N=13)	Εμπλουτισμένο σνακ με μανιτάρι <i>P.eryngii</i> (N=13)	p-value για T	p-value για t
	t=αρχή τριμήνου			t=τέλος τριμήνου			
Ολικά βακτήρια	11.84 (11.77,11.90)	11.86 (11.73,11.90)	p=0.763	11.87 (11.65,11.93)	11.85 (11.77,11.95)	p=0.317	p=0.386
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	10.56 (10.34,10.75)	10.60 (10.36,10.77)	p=0.739	10.62 (10.17,10.73)	10.59 (10.44,10.73)	p=0.701	p=0.679
<i>Roseburia spp-Eubacterium rectale group</i>	10.31 (9.84,10.60)	10.44 (9.93,10.71)	p=0.343	10.13 (9.93,10.53)	10.38 (10.17,10.63)	p=0.118	p=0.175
<i>Akkermansia muciniphila</i>	9.71 (8.30,10.38)	10.06 (9.58,10.33)	p=0.590	9.92 (8.75,10.49)	9.97 (8.48,10.40)	p=0.939	p=0.756

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως διάμεσος (Q1 , Q3). T=επίδραση του τροφίμου (t-test, Mann-Whitney test), t= επίδραση του χρόνου (Repeated-Measures ANOVA,Friedman test)

43

Ποσοτικός προσδιορισμός των μικροβιακών πληθυσμών

Στην έναρξη της παρέμβασης, δηλαδή για $t=\text{αρχή του τριμήνου}$, για την ομάδα Α η Μ των ολικών βακτηρίων των εθελοντών εκφρασμένων ως $M (Q_1, Q_3)\log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} g^{-1}$ κοπράνων ήταν 11.84 (11.73,11.90) ενώ για την ομάδα Β οι αντίστοιχες τιμές είναι 11.84 (11.77,11.90), με $p=0,763$ ως προς την επίδραση του τροφίμου (

Πίνακας 7). Οι πληθυσμοί του *F. prausnitzii* της ομάδας Α ήταν 10.60 (10.36,10.77) $\log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} g^{-1}$ κοπράνων, ενώ οι αντίστοιχες τιμές της ομάδας Β ήταν 10.56 (10.34,10.75), με $p=0.739$. Όσον αφορά τους πληθυσμούς του *Roseburia spp.-Eubacterium rectale* group, η ομάδα Α είχε 10.44 (9.93,10.71) $\log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} g^{-1}$ κοπράνων ενώ για την ομάδα Β οι αντίστοιχες τιμές είναι 10.31 (9.84,10.60), με $p=0,739$. Τέλος, οι πληθυσμοί της *A. muciniphila* υπολογίστηκαν 10.06 (9.58,10.33) $\log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} g^{-1}$ κοπράνων, ενώ η ομάδα Β είχε αντίστοιχες τιμές 9.71 (8.30,10.38), $p=0,590$. Συνεπώς, όπως προκύπτει και από τις τιμές του p οι οποίες είναι όλες $>0,05$, η ομάδα που κατανάλωσε εμπλουτισμένο με *P. eryngii* σνακ και αυτή που κατανάλωσε το εικονικό τρόφιμο είχαν μη στατιστικά σημαντικές διαφορές στους πληθυσμούς των ολικών βακτηρίων, του *F. prausnitzii*, του *Roseburia spp.-Eubacterium rectale* group και της *A. muciniphila* στην έναρξη της παρέμβασης. Είναι μάλιστα αρκετά υψηλοί όλοι οι εξεταζόμενοι πληθυσμοί, φανερώνοντας την καλή κατάσταση υγείας των εθελοντών (

$\Delta\% \log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} g^{-1}$ κοπράνων	Εικονικό τρόφιμο (N=13)	Εμπλουτισμένο σνακ με μανιτάρι <i>P.eryngii</i> (N=13)	<i>p-value</i>
Ολικά βακτήρια	0.00 (-1.01,0.89)	-0.08 (-0.80,1.59)	$p=0.494$
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	-0.65 (-1.55,2.53)	-0.56 (-1.85,2.10)	$p=0.939$
<i>Roseburia spp.-Eubacterium rectale</i> group	-1.13 (-2.90,1.47)	-0.29 (-1.26,2.50)	$p=0.493$
<i>Akkermansia muciniphila</i>	1.37 (-1.52,5.12)	-1.47 (-6.50,2.83)	$p=0.120$

Γράφημα 1,Γράφημα 2).

Στο τέλος της παρέμβασης, δηλαδή για $t=\text{τέλος του τριμήνου}$, για την ομάδα Α η Μ των ολικών βακτηρίων των εθελοντών εκφρασμένων ως $M (Q_1, Q_3)\log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} g^{-1}$ κοπράνων ήταν 11.85 (11.77,11.95) ενώ για την ομάδα Β οι αντίστοιχες τιμές είναι 11.87 (11.65,11.93), με $p=0,317$ όσον αφορά την επίδραση του τροφίμου (T) και $p=0,386$ ως προς την επίδραση του χρόνου (t) (

Πίνακας 7). Οι πληθυσμοί του *F. prausnitzii* της ομάδας Α ήταν 10.59 (10.44,10.73) $\log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} g^{-1}$ κοπράνων, ενώ της ομάδας Β, 10.62 (10.17,10.73), με $p=0.701$ για T και $p=0,679$ για t. Όσον αφορά τους πληθυσμούς του *Roseburia spp.-Eubacterium rectale* group, η ομάδα Α είχε 10.38(10.17,10.63) $\log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} g^{-1}$ κοπράνων, ενώ για την ομάδα Β οι αντίστοιχες τιμές ήταν 10.13 (9.93,10.53), με $p=0,118$ για T και $p=0,175$ για t. Τέλος, οι πληθυσμοί της *A. muciniphila* ήταν 9,97(9.58,10.33) $\log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} g^{-1}$ κοπράνων, ενώ η ομάδα Β είχε αντίστοιχες τιμές 9.92 (8.75,10.49), με $p=0,939$ για T και $p=0,756$ για t. Άρα, σύμφωνα και με τις τιμές του p οι οποίες είναι όλες $>0,05$, τόσο το είδος του τροφίμου που καταναλώθηκε αλλά και του χρόνου, δε φάνηκε να επηρέασε στατιστικά σημαντικά τους

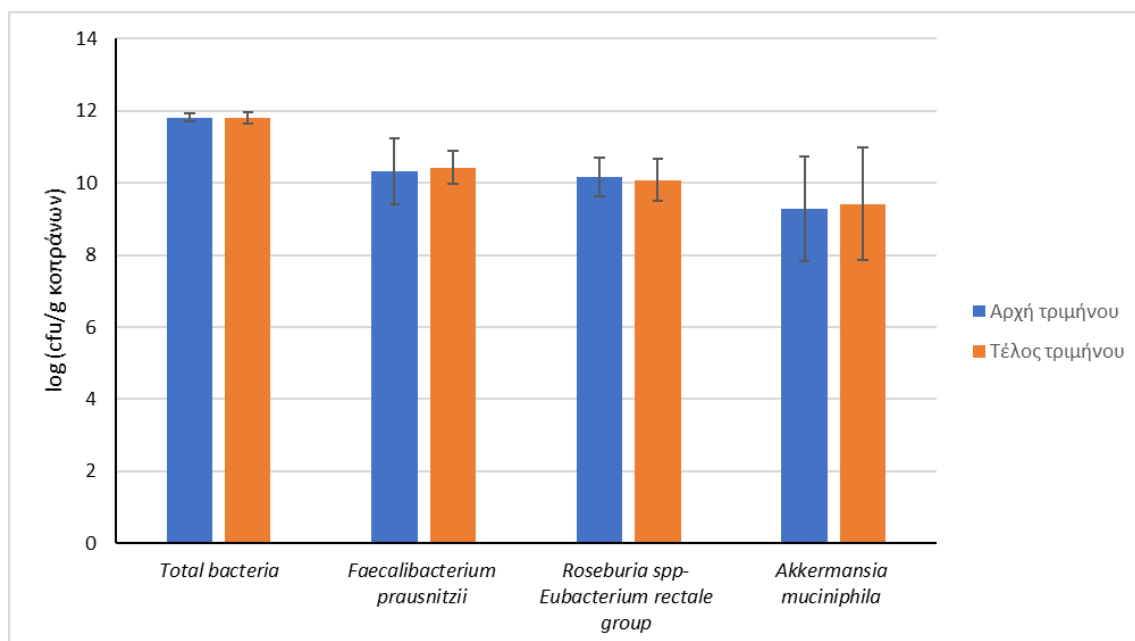
πληθυσμούς των ολικών βακτηρίων, του *F. prausnitzii*, του *Roseburia spp-Eubacterium rectale* group και της *A. muciniphila* στο τέλος της παρέμβασης.

Ποσοστιαία μεταβολή των μικροβιακών πληθυσμών

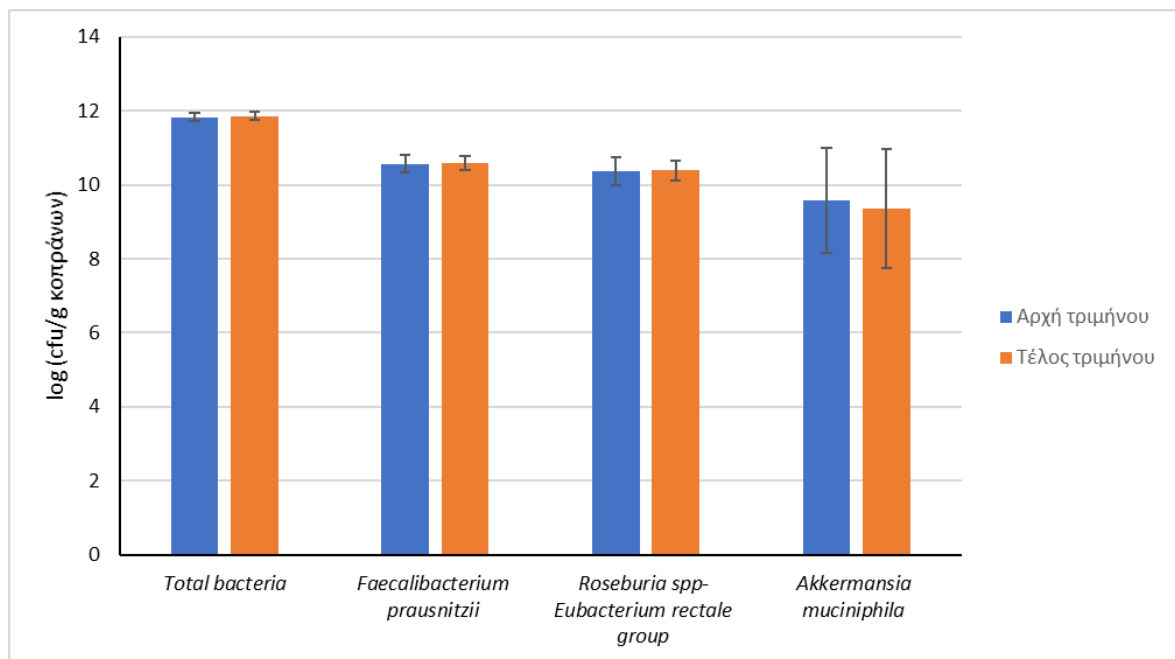
Εξετάζοντας έπειτα την ποσοστιαία μεταβολή των μικροβιακών πληθυσμών κατά τη διάρκεια του τριμήνου εκφρασμένη ως $M(Q_1, Q_3)\Delta\% \log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} g^{-1} \text{κοπράνων}$, η ομάδα που κατανάλωσε το εμπλουτισμένο με *P. eryngii* σνακ (Α) παρουσίασε ελάττωση κατά 0.08% (-0.80,-1.59), ενώ η ομάδα ελέγχου (Β) δεν εμφάνισε μεταβολή 0.00%(-1.01,0.89) και $p=0.494$. Πίνακας 8. Όσον αφορά την ποσοστιαία μεταβολή των πληθυσμών του *F. prausnitzii* στην ομάδα Α, αυτή ήταν -0.56% (-1.85,2.10) ενώ στην ομάδα Β -0.65% (-1.55,2.53), με $p=0.939$. Η ποσοστιαία μεταβολή του *Roseburia spp-Eubacterium rectale* group κατά τη διάρκεια του τριμήνου μετρήθηκε σε -0.29%(-1.26,2.50) για την ομάδα Α και για την ομάδα Β -1.13%(-2.90,1.47), με $p=0.493$. Τέλος, η ποσοστιαία μεταβολή των πληθυσμών της *A. muciniphila* ήταν για την ομάδα Α -1.47%(-6.50,2.83), ενώ για την ομάδα Β ήταν 1.37%(-1.52,5.12). Παρατηρείται μια μικρή μείωση σε όλους τους εξεταζόμενους μικροβιακούς πληθυσμούς, ωστόσο καμία από αυτές δεν είναι στατιστικά σημαντική $p>0.05$. Σύμφωνα με τα δεδομένα, κάποιои εθελοντές καταναλώνοντας το εμπλουτισμένο με *P. eryngii* σνακ αύξησαν τους εξεταζόμενους μικροβιακούς πληθυσμούς, εμφανίζοντας μια τάση αύξησης (Γράφημα 2) η οποία ενδέχεται να γίνει στατιστικά σημαντική σε μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών.

Πίνακας 8: Ποσοστιαία διαφορά του ποσοτικού προσδιορισμού των μικροβιακών πληθυσμών (qPCR; $\log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} / g \text{ κοπράνων}$) του τέλους σε σχέση με την αρχή της παρέμβασης για το σύνολο των εθελοντών.

$\Delta\% \log \text{copies}_{16S \text{ rRNA}} g^{-1} \text{κοπράνων}$	Εικονικό τρόφιμο (N=13)	Εμπλουτισμένο σνακ με μανιτάρι <i>P. eryngii</i> (N=13)	<i>p-value</i>
Ολικά βακτήρια	0.00 (-1.01,0.89)	-0.08 (-0.80,1.59)	$p=0.494$
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	-0.65 (-1.55,2.53)	-0.56 (-1.85,2.10)	$p=0.939$
<i>Roseburia spp.-Eubacterium rectale</i> group	-1.13 (-2.90,1.47)	-0.29 (-1.26,2.50)	$p= 0.493$
<i>Akkermansia muciniphila</i>	1.37 (-1.52,5.12)	-1.47 (-6.50,2.83)	$p= 0.120$



Γράφημα 1: Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς για την ομάδα των εθελοντών που έλαβε το εικονικό τρόφιμο.



Γράφημα 2: Μεταβολές στους μικροβιακούς πληθυσμούς για την ομάδα των εθελοντών που έλαβε το εμπλουτισμένο με *P.eryngii* τρόφιμο

Όπως φαίνεται και στα γραφήματα, και οι δύο ομάδες εθελοντών, όντας υγιείς, ξεκίνησαν την παρέμβαση με πολύ υψηλά ολικά βακτήρια αλλά και επιμέρους μικροβιακούς πληθυσμούς *F. prausnitzii*, *Roseburia spp.-E. Rectale group* και *A. muciniphila*. Τα υψηλά επίπεδα αυτά δεν επέτρεπαν στατιστικά σημαντικές διακυμάνσεις από το εμπλουτισμένο τρόφιμο στο εξεταζόμενο δείγμα. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, ένα μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών ίσως ενισχύσει τις τάσεις αύξησης των μικροβιακών πληθυσμών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Την τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί ραγδαία αύξηση στην έρευνα πάνω στους (τρισεκατομμύρια) μικροοργανισμούς που ζουν πάνω και μέσα στο ανθρώπινο σώμα και στις αλληλεπιδράσεις τους με τον ανθρώπινο οργανισμό (Zmora et al., 2018). Αν και παλαιότερα δεν τους είχε δοθεί ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, δεδομένα πλέον δείχνουν ότι οι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί του ανθρώπινου ολοβιώματος (human holobiont) συμμετέχουν σε ουσιώδεις λειτουργίες στη φυσιολογία του ξενιστή, συμπεριλαμβανομένου του μεταβολισμού, της ανοσίας και της νευρωνικής ανάπτυξης, ενώ διαταραχές στη σύστασή τους συνεισφέρουν σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις (Cho & Blaser, 2012; J. L. Sonnenburg & Bäckhed, 2016). Αξίζει να σημειωθεί ότι σε αντίθεση με το γονιδίωμα του ξενιστή, το μικροβίωμα εμφανίζει αρκετή πλαστικότητα και μπορεί να προσαρμοστεί σε ένα εύρος περιβαλλοντικών και προερχόμενων-από-τον-ξενιστή ερεθισμάτων. Όντας στους περιβαλλοντικούς παράγοντες, η διατροφή αποτελεί βασικό ρυθμιστή της σύστασης των εντερικών μικροοργανισμών και της ρύθμισης των γονιδίων τους, κάνοντάς την ένα ελκυστικό στόχο για παρεμβάσεις και χειρισμούς (Zmora et al., 2018). Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της επίδρασης της κατανάλωσης ενός καινοτόμου τροφίμου, εμπλουτισμένου με edώδιμα μανιτάρια πλούσια σε β-γλυκάνες, στους μικροβιακούς πληθυσμούς του εντερικού μικροβιόκοσμου υγιών ηλικιωμένων.

Η μελέτη FUNGLUCAN, μέρος της οποίας αποτελεί η παρούσα εργασία, εξέτασε πολλές ακόμα παραμέτρους κατά τη διάρκεια της παρέμβασης στο δείγμα των εθελοντών. Μία από αυτές ήταν το προφίλ των πιθανών ανεπιθύμητων γαστρεντερικών δράσεων, δεδομένου του υψηλού περιεχόμενου του εμπλουτισμένου τροφίμου σε ανθεκτικούς πολυσακχαρίτες (β-γλυκάνες). Αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός πως δεν αναφέρθηκε καμία γαστρεντερική ενόχληση στους εθελοντές, γεγονός που καταδεικνύει ότι η κατανάλωση β-γλυκανών στη δοσολογία της παρέμβασης είναι ασφαλής και καλά ανεκτή από το ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα.

Όσον αφορά την επίδραση του εμπλουτισμένου τροφίμου στον ΕΜ των εθελοντών, όπως σχολιάστηκε και νωρίτερα, το δείγμα των εθελοντών ξεκίνησε την παρέμβαση με πολύ υψηλούς μικροβιακούς πληθυσμούς και συνολικά (ολικά βακτήρια) αλλά και στα επιμέρους βουτυρικοπαραγωγά, χωρίς να υπάρχει μεγάλο εύρος μεταβολών. Το εύρημα αυτό είναι συνεπές με την καλή κατάσταση υγείας των εθελοντών. Ως εκ τούτου, στο συγκεκριμένο (μικρό) δείγμα των 13 εθελοντών, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή των εξεταζόμενων μικροβιακών πληθυσμών από την κατανάλωση του εμπλουτισμένου τροφίμου. Ωστόσο, διαφαίνονται τάσεις αύξησης σε κάποιους εθελοντές, οι οποίες δύνανται να ενισχυθούν σε μεγαλύτερο πληθυσμιακό δείγμα.

Σε αναζήτηση στο Pubmed και το Google Scholar, δεν βρέθηκαν δημοσιευμένες δοκιμές με τον ίδιο σχεδιασμό, συνεπώς η συγκεκριμένη μελέτη είναι μάλλον η πρώτη η οποία χρησιμοποίησε το *P. eryngii* ως πηγή β-γλυκανών και εξέτασε την επίδραση του στον ΕΜ υγιών εθελοντών. Στην πρόσφατη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, οι Vlassoroulou et al. εξέτασαν την επίδραση των μυκητιακών β-γλυκανών στην υγεία, σε επίπεδο τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών. Στην ανασκόπηση συμπεριλήφθηκαν μελέτες αξιολόγησης της επίδρασης αποκλειστικά από του στόματος χορήγησης β-γλυκανών σε οποιαδήποτε μορφή και δόση σε υγιή άτομα ή ασθενείς. Έτσι, επιλέχθηκαν 34 τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές οι οποίες και εξετάστηκαν στην ανασκόπηση. Τα μυκητιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως πηγές β-γλυκανών ήταν τα *Saccharomyces cerevisiae*, *Aureobasidium pullulans*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* και *Ganoderma lucidum*, και η χορηγούμενη δόση κυμαίνονταν από 2.5 έως

1000mg ημερησίως για έως 6.5 μήνες. Η κύρια παρατηρούμενη επίδραση ήταν η ανοσορύθμιση, η οποία αφενός μείωσε την επίπτωση και τα συμπτώματα του κρυολογήματος, της γρίπης και άλλων αναπνευστικών λοιμώξεων, αφετέρου βελτίωσε τα αλλεργικά συμπτώματα. Ωστόσο, τα δεδομένα από τις μελέτες είναι ασυνεπή σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο. Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε μια συνολική βελτίωση στη διάθεση και της συνολικής υγείας. Συμπερασματικά, η συμπληρωματική χορήγηση β-γλυκανών είναι καλά ανεκτή και τα οφέλη της για την υγεία εμφανίζονται κυρίως με την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (Vlassoroulou et al., 2021). Το FDA των ΗΠΑ καθώς και του Καναδά ορίζει ως ελάχιστη θεραπευτική δόση β-γλυκανών από βρώμη, για τη βελτίωση καρδιαγγειακών παραμέτρων, τα 3000mg ημερησίως (*Guidance for Industry: Evidence-Based Review System for the Scientific Evaluation of Health Claims* / FDA, n.d.; Kris-Etherton & Dietschy, 1997). Υποστηρίζοντας την προηγούμενη οδηγία, η συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών της επίδρασης των β-γλυκανών από βρώμη στη μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου (στα επίπεδα της LDL-χοληστερόλης (LDL-C), μη-HDL-C και απολιποπρωτεΐνης Β (apoB)) παρατήρησε διάμεσο στη χορηγούμενη ημερήσια δόση τα 3.500mg. Μάλιστα, με ανάλυση μετα-παλινδρόμησης παρατηρήθηκε δοσο-εξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της LDL-C (Ho et al., 2016). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα 2000mg, κοντά στην παραπάνω συνιστώμενη δοσολογία, λαμβάνοντας ωστόσο υπόψη ότι ο εξεταζόμενος πληθυσμός ήταν υγιής και η πηγή των β-γλυκανών θα ήταν τα μανιτάρια, για τα οποία υπάρχουν λιγότερα δεδομένα όσον αφορά την ανοχή υψηλότερων δόσεων.

Ένα βασικό πεδίο αλληλεπίδρασης του EM και του ξενιστή, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα είναι ο μεταβολισμός. Ο EM σε απόκριση της πρόσληψης τροφής από τον ξενιστή, αποικοδομεί, ζυμώνει, μεταβολίζει ό,τι ο ξενιστής δεν είναι σε θέση να πέψει και να απορροφήσει, παράγοντας αναγκαία για τον άνθρωπο μεταβολικά προϊόντα. Σημαντικότερα και αρκετά μελετημένα μεταβολικά προϊόντα του EM είναι τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFA) (Martin-Gallausiaux et al., 2021). Τόσο τα SCFA όσο και οι υπόλοιποι μεταβολίτες του EM, μπορούν πλέον να ανιχνευθούν και να ταυτοποιηθούν με τη βοήθεια της μεταβολομικής. Η μεταβολομική ανάλυση, στο πλαίσιο των πολυ-ομικών (multi-omics) έχει συνεισφέρει ουσιαστικά στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων EM-ξενιστή. Η τεχνολογία της αέριας (GC-MS) και της υγρής χρωματογραφίας (LC-MS) συζευγμένη με τη φασματοσκοπία μάζας (MS), της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), της μικροφασματοσκοπίας Raman και της ενζυμικής και ανοσοχημικής ανάλυσης, μας επιτρέπουν πλέον να ανιχνεύουμε με υψηλή ευαισθησία το σύνολο των μεταβολιτών σε ένα σύστημα (metabolome) καθώς και να αποκτούμε χωρικές πληροφορίες για την στερεοδιάταξή τους (Krautkramer et al., 2020). Στα πλαίσια της μελέτης FUNGLUCAN θα γίνει μεταξύ άλλων και μεταβολομική ανάλυση με μέτρηση των παραγόμενων SCFA. Αυτή η ανάλυση πιθανώς να δείξει *in vivo* αύξηση στα παραγόμενα SCFA, σε αντίθεση με τη μη-στατιστικά-σημαντική επίδραση στους μικροβιακούς πληθυσμούς.

Εν κατακλείδι, όπως αναφέρεται και στην παρούσα εργασία αλλά και στην περισσότερη βιβλιογραφία που χρησιμοποιήθηκε, το πεδίο της πολυ-ομικής ανάλυσης του EM, αν και σχετικά νέο, έχει συνεισφέρει θεμελιωδώς στην κατανόηση που έχουμε για τον ρόλο του και τις αλληλεπιδράσεις με το σώμα μας. Απαιτούνται, ωστόσο, αρκετά δεδομένα από καλά σχεδιασμένες μελέτες παρέμβασης για την ανάδειξη τρόπων διαμόρφωσης του EM μέσω της διατροφής.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A, S., V, R., A, S., G, G., S, B., M, S., L, R.-G., & J, D. (2001). *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(1), 139–145. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00015>
- Acay, H., Dündar, A., Kaçar, S., Firat Baran, M., & Keskin, C. (2021). Investigation of Nutritional Content, Antioxidant Anticancer and Antimicrobial Activities of *Pleurotus eryngii* (DC. Ex Fr.) Quel, Extract Obtained by Different Solvents. *2021 KSU J. Agric Nat*, 24(2), 267–277. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.742646>
- Aida, F. M. N. A., Shuhaimi, M., Yazid, M., & Maaruf, A. G. (2009). Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 20, Issues 11–12, pp. 567–575). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.007>
- Almeida, A., Mitchell, A. L., Boland, M., Forster, S. C., Gloor, G. B., Tarkowska, A., Lawley, T. D., & Finn, R. D. (2019). A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature* 2019 568:7753, 568(7753), 499–504. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0965-1>
- Aranda, F., Bloy, N., Pesquet, J., Petit, B., Chaba, K., Sauvat, A., Kepp, O., Khadra, N., Enot, D., Pfirschke, C., Pittet, M., Zitvogel, L., Kroemer, G., & Senovilla, L. (2014). Immune-dependent antineoplastic effects of cisplatin plus pyridoxine in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2015 34:23, 34(23), 3053–3062. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.234>
- Bäumler, A. J., & Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, 535(7610), 85–93. <https://doi.org/10.1038/NATURE18849>
- Behera, J., Ison, J., Tyagi, S. C., & Tyagi, N. (2020). The role of gut microbiota in bone homeostasis. In *Bone* (Vol. 135). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115317>
- Boulaka, A., Christodoulou, P., Vlassopoulou, M., Koutrotsios, G., Bekiaris, G., Zervakis, G. I., Mitsou, E. K., Saxami, G., Kyriacou, A., Zervou, M., Georgiadis, P., & Pletsas, V. (2020). Genoprotective Properties and Metabolites of β -Glucan-Rich Edible Mushrooms Following Their In Vitro Fermentation by Human Faecal Microbiota. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 3554, 25(15), 3554. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25153554>
- Cantarel, B. L., Lombard, V., & Henrissat, B. (2012). Complex carbohydrate utilization by the healthy human microbiome. *PLOS One*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028742>
- Cantu-Jungles, T. M., Ruthes, A. C., El-Hindawy, M., Moreno, R. B., Zhang, X., Cordeiro, L. M. C., Hamaker, B. R., & Iacomini, M. (2018). In vitro fermentation of *Cookeina speciosa* glucans stimulates the growth of the butyrogenic *Clostridium* cluster XIVa in a targeted way. *Carbohydrate Polymers*, 183, 219–229. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2017.12.020>
- Cerletti, C., Esposito, S., & Iacoviello, L. (2021). Edible Mushrooms and Beta-Glucans: Impact on Human Health. *Nutrients* 2021, Vol. 13, Page 2195, 13(7), 2195. <https://doi.org/10.3390/NU13072195>
- Chaikliang, C., Wichienchot, S., Youravoug, W., & Graidist, P. (2015). Evaluation on prebiotic properties of β -glucan and oligo- β -glucan from mushrooms by human fecal microbiota in fecal batch culture. *Functional Foods in Health and Disease*, 5(11), 395–405. <https://doi.org/10.31989/FFHD.V5I11.209>
- Charbonneau, M. R., O'Donnell, D., Blanton, L. v., Totten, S. M., Davis, J. C. C., Barratt, M. J., Cheng, J., Guruge, J., Talcott, M., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Ilkayeva, O., Wu, C., Struckmeyer, T., Barile, D., Mangani, C., Jorgensen, J., Fan, Y. M., Maleta, K., ... Gordon, J. I. (2016). Sialylated milk oligosaccharides promote microbiota-dependent growth in models of infant undernutrition. *Cell*, 164(5), 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.024>
- Cho, I., & Blaser, M. J. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics* 2012 13:4, 13(4), 260–270. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>

- Choi, U. K., Bajpai, V. K., & Lee, N. H. (2009). Influence of calcinated starfish powder on growth, yield, spawn run and primordial germination of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). *Food and Chemical Toxicology*, 47(11), 2830–2833. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.08.019>
- Claesson, M. J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J. R., Falush, D., Dinan, T., Fitzgerald, G., Stanton, C., van Sinderen, D., O'Connor, M., Harnedy, N., O'Connor, K., Henry, C., O'Mahony, D., Fitzgerald, A. P., Shanahan, F., ... O'Toole, P. W. (2011). Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4586–4591. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1000097107>
- Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S. E., O'connor, E. M., Cusack, S., Harris, H. M. B., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O'sullivan, O., Fitzgerald, G. F., Deane, J., O'connor, M., Harnedy, N., O'connor, K., O'mahony, D., van Sinderen, D., Wallace, M., Brennan, L., ... O'toole, P. W. (2012a). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488(7410), 178–184. <https://doi.org/10.1038/NATURE11319>
- Claesson, M. J., Jeffery, I. B., Conde, S., Power, S. E., O'connor, E. M., Cusack, S., Harris, H. M. B., Coakley, M., Lakshminarayanan, B., O'sullivan, O., Fitzgerald, G. F., Deane, J., O'connor, M., Harnedy, N., O'connor, K., O'mahony, D., van Sinderen, D., Wallace, M., Brennan, L., ... O'toole, P. W. (2012b). Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*, 488(7410), 178–184. <https://doi.org/10.1038/nature11319>
- Clemente, J. C., Pehrsson, E. C., Blaser, M. J., Sandhu, K., Gao, Z., Wang, B., Magris, M., Hidalgo, G., Contreras, M., Noya-Alarcón, Ó., Lander, O., McDonald, J., Cox, M., Walter, J., Oh, P. L., Ruiz, J. F., Rodriguez, S., Shen, N., Song, S. J., ... Dominguez-Bello, M. G. (2015). The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci. Adv.*, 1(3). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500183>
- Collaboration, G. B. of D. C., Fitzmaurice, C., Allen, C., Barber, R. M., Barregard, L., Bhutta, Z. A., Brenner, H., Dicker, D. J., Chimed-Orchir, O., Dandona, R., Dandona, L., Fleming, T., Forouzanfar, M. H., Hancock, J., Hay, R. J., Hunter-Merrill, R., Huynh, C., Hosgood, H. D., Johnson, C. O., ... Naghavi, M. (2017). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncology*, 3(4), 524–548. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2016.5688>
- Collado, M. C., Derrien, M., Isolauri, E., Vos, W. M. de, & Salminen, S. (2007). Intestinal Integrity and Akkermansia muciniphila, a Mucin-Degrading Member of the Intestinal Microbiota Present in Infants, Adults, and the Elderly. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23), 7767–7770. <https://doi.org/10.1128/AEM.01477-07>
- Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J. L., Vieira, A., Sato, F. T., & Vinolo, M. A. R. (2016). Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & Translational Immunology*, 5(4), e73. <https://doi.org/10.1038/CTI.2016.17>
- Dai, R., Liu, M., Nabil, W. N. N., Xi, Z., & Xu, H. (2021). Mycomedicine: A unique class of natural products with potent anti-tumour bioactivities. *Molecules*, 26(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26041113>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. v., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature12820>
- de Filippo, C., Cavalieri, D., di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J. B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G., & Lionetti, P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a

- comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 107(33), 14691–14696. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005963107>
- Deschasaux, M., Bouter, K. E., Prodan, A., Levin, E., Groen, A. K., Herrema, H., Tremaroli, V., Bakker, G. J., Attaye, I., Pinto-Sietsma, S.-J., Raalte, D. H. van, Snijder, M. B., Nicolaou, M., Peters, R., Zwinderman, A. H., Bäckhed, F., & Nieuwdorp, M. (2018). Depicting the composition of gut microbiota in a population with varied ethnic origins but shared geography. *Nature Medicine* 2018 24:10, 24(10), 1526–1531. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0160-1>
- Eilam, O., Zarecki, R., Oberhardt, M., Ursell, L. K., Kupiec, M., Knight, R., Gophna, U., & Ruppin, E. (2014). Glycan degradation (GlyDeR) analysis predicts mammalian gut microbiota abundance and host diet-specific adaptations. *MBio*, 5(4), e01526-14. <https://doi.org/10.1128/mbio.01526-14>
- el Enshasy, H. A., & Hatti-Kaul, R. (2013). Mushroom immunomodulators: Unique molecules with unlimited applications. *Trends in Biotechnology*, 31(12), 668–677. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2013.09.003>
- Feng, J., Tang, H., Li, M., Pang, X., Wang, L., Zhang, M., Zhao, Y., Zhang, X., & Shen, J. (2013). The abundance of fecal *Faecalibacterium prausnitzii* in relation to obesity and gender in Chinese adults. *Archives of Microbiology* 2013 196:1, 196(1), 73–77. <https://doi.org/10.1007/S00203-013-0942-2>
- Feng, Q., Chen, W.-D., & Wang, Y.-D. (2018). Gut Microbiota: An Integral Moderator in Health and Disease. *Frontiers in Microbiology*, 0(FEB), 151. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.00151>
- Ferrão, J., Bell V, Calabrese V, Pimentel L, Pintado M, & Th, F. (2017). Mushroom Nutrition on Microbiota and Potential for Preventative Health. *Journal of Food and Nutrition Research*, 5(4), 226–233. <https://doi.org/10.12691/jfnr-5-4-4>
- Ferreira, I., Barros, L., & Abreu, R. (2009). Antioxidants in Wild Mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1543–1560. <https://doi.org/10.2174/092986709787909587>
- Fuller, R., Moore, M. v., Lewith, G., Stuart, B. L., Ormiston, R. v., Fisk, H. L., Noakes, P. S., & Calder, P. C. (2017). Yeast-derived β -1,3/1,6 glucan, upper respiratory tract infection and innate immunity in older adults. *Nutrition*, 39–40, 30–35. <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2017.03.003>
- 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(3), 548–565. <https://doi.org/10.1080/11263504.2017.1301590>
- Gaullier, J. M., Sleboda, J., Øfjord, E. S., Ulvestad, E., Nurminiemi, M., Moe, C., Albrektsen, T., & Gudmundsen, O. (2011). Supplementation with a soluble β -glucan exported from Shiitake medicinal mushroom, *Lentinus edodes* (Berk.) singer mycelium: a crossover, placebo-controlled study in healthy elderly. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 13(4), 319–326. <https://doi.org/10.1615/INTJMEDMUSHR.V13.I4.10>
- Graubau, H.-J., Busch, R., Stier, H., & Gruenwald, J. (2012). A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Nutritional Study Using an Insoluble Yeast Beta-Glucan to Improve the Immune Defense System. *Food and Nutrition Sciences*, 03(06), 738–746. <https://doi.org/10.4236/FNS.2012.36100>
- Guidance for Industry: Evidence-Based Review System for the Scientific Evaluation of Health Claims | FDA*. (n.d.). Retrieved February 13, 2022, from <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-evidence-based-review-system-scientific-evaluation-health-claims>

- He, P., Zhang, A., Zhou, S., Zhang, F., Linhardt, R. J., & Sun, P. (2016). Structural elucidation of polysaccharide containing 3-O-methyl galactose from fruiting bodies of *Pleurotus citrinopileatus*. *Carbohydrate Research*, 434, 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2016.08.006>
- Hetland, G., Johnson, E., Bernardshaw, S. v., & Grinde, B. (2021). Can medicinal mushrooms have prophylactic or therapeutic effect against COVID-19 and its pneumonic superinfection and complicating inflammation? *Scandinavian Journal of Immunology*, 93(1), e12937. <https://doi.org/10.1111/SJI.12937>
- Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B., & Margolles, A. (2015). Molecular Players Involved in the Interaction Between Beneficial Bacteria and the Immune System. *Frontiers in Microbiology*, 0(NOV), 1285. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01285>
- Hillman, E. T., Kozik, A. J., Hooker, C. A., Burnett, J. L., Heo, Y., Kiesel, V. A., Nevins, C. J., Oshiro, J. M. K. I., Robins, M. M., Thakkar, R. D., Wu, S. T., & Lindemann, S. R. (2020). Comparative genomics of the genus *Roseburia* reveals divergent biosynthetic pathways that may influence colonic competition among species. *Microbial Genomics*, 6(7), e000399. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000399>
- Ho, H. V. T., Sievenpiper, J. L., Zurbau, A., Mejia, S. B., Jovanovski, E., Au-Yeung, F., Jenkins, A. L., & Vuksan, V. (2016). *The effect of oat β -glucan on LDL-cholesterol, non-HDL-cholesterol and apoB for CVD risk reduction: a systematic review and meta-analysis of randomised-controlled trials*. <https://doi.org/10.1017/S000711451600341X>
- IG, M., LR, L., G, I., M, N., G, G., G, R., V, P., A, G., & F, S. (2019). *Akkermansia muciniphila*: key player in metabolic and gastrointestinal disorders. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23(18), 8075–8083. https://doi.org/10.26355/EURREV_201909_19024
- Jayachandran, M., Chen, J., Chung, S. S. M., & Xu, B. (2018). A critical review on the impacts of β -glucans on gut microbiota and human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 61, 101–110. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2018.06.010>
- Jeffery, I. B., Lynch, D. B., & O'Toole, P. W. (2015). Composition and temporal stability of the gut microbiota in older persons. *The ISME Journal* 2016 10:1, 10(1), 170–182. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.88>
- Johnson, E., Førlund, D. T., Hetland, G., Sætre, L., Olstad, O. K., & Lyberg, T. (2012). Effect of AndoSan™ on expression of adhesion molecules and production of reactive oxygen species in human monocytes and granulocytes in vivo. <https://doi.org/10.3109/00365521.2012.660544>, 47(8–9), 984–992. <https://doi.org/10.3109/00365521.2012.660544>
- Johnson, E., Førlund, D. T., Sætre, L., Bernardshaw, S. v., Lyberg, T., & Hetland, G. (2009). Effect of an Extract Based on the Medicinal Mushroom *Agaricus blazei* Murill on Release of Cytokines, Chemokines and Leukocyte Growth Factors in Human Blood Ex Vivo and In Vivo. *Scandinavian Journal of Immunology*, 69(3), 242–250. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3083.2008.02218.X>
- Karcher, N., Pasolli, E., Asnicar, F., Huang, K. D., Tett, A., Manara, S., Armanini, F., Bain, D., Duncan, S. H., Louis, P., Zolfo, M., Manghi, P., Valles-Colomer, M., Raffaetà, R., Rota-Stabelli, O., Collado, M. C., Zeller, G., Falush, D., Maixner, F., ... Segata, N. (2020). Analysis of 1321 *Eubacterium rectale* genomes from metagenomes uncovers complex phylogeographic population structure and subspecies functional adaptations. *Genome Biology* 2020 21:1, 21(1), 1–27. <https://doi.org/10.1186/S13059-020-02042-Y>
- Khan, A. A., Gani, A., Khanday, F. A., & Masoodi, F. A. (2018). Biological and pharmaceutical activities of mushroom β -glucan discussed as a potential functional food ingredient.

- Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 16, 1–13.
<https://doi.org/10.1016/J.BCDF.2017.12.002>
- Kim, M. K., Ryu, J. S., Lee, Y. H., & Kim, H. R. (2013). Breeding of a long shelf-life strain for commercial cultivation by mono-mono crossing in *Pleurotus eryngii*. *Scientia Horticulturae*, 162, 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.08.028>
- Koh, A., & Bäckhed, F. (2020). From Association to Causality: the Role of the Gut Microbiota and Its Functional Products on Host Metabolism. *Molecular Cell*, 78(4), 584–596. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2020.03.005>
- Korem, T., Zeevi, D., Suez, J., Weinberger, A., Avnit-Sagi, T., Pompan-Lotan, M., Matot, E., Jona, G., Harmelin, A., Cohen, N., Sirota-Madi, A., Thaïss, C. A., Pevsner-Fischer, M., Sorek, R., Xavier, R. J., Elinav, E., & Segal, E. (2015). Growth dynamics of gut microbiota in health and disease inferred from single metagenomic samples. *Science*, 349(6252), 1101–1106. <https://doi.org/10.1126/science.aac4812>
- Koropatkin, N. M., Cameron, E. A., & Martens, E. C. (2012). How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.*, 10(5), 323–335. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2746>
- Koutrotsios, G., Kalogeropoulos, N., Kaliora, A. C., & 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(24), 5971–5983. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01532>
- Kozarski, M., Klaus, A., Jakovljevic, D., Todorovic, N., Vunduk, J., Petrović, P., Niksic, M., Vrvic, M. M., & van Griensven, L. (2015). Antioxidants of edible mushrooms. *Molecules*, 20(10), 19489–19525. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES201019489>
- Krautkramer, K. A., Fan, J., & Bäckhed, F. (2020). Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nature Reviews Microbiology* 2020 19:2, 19(2), 77–94. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0438-4>
- Kris-Etherton, P. M., & Dietschy, J. (1997). Design criteria for studies examining individual fatty acid effects on cardiovascular disease risk factors: human and animal studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65(5 Suppl). <https://doi.org/10.1093/AJCN/65.5.1590S>
- Kumar, H., Bhardwaj, K., Sharma, R., Nepovimova, E., Cruz-Martins, N., Dhanjal, D. S., Singh, R., Chopra, C., Verma, R., Abd-Elsalam, K. A., Tapwal, A., Musilek, K., Kumar, D., & Kuča, K. (2021). Potential usage of edible mushrooms and their residues to retrieve valuable supplies for industrial applications. *Journal of Fungi*, 7(6). <https://doi.org/10.3390/JOF7060427>
- Lamichhane, S., Sen, P., Dickens, A. M., Orešič, M., & Bertram, H. C. (2018). Gut metabolome meets microbiome: A methodological perspective to understand the relationship between host and microbe. *Methods (San Diego, Calif.)*, 149, 3–12. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2018.04.029>
- Lane, E. R., Zisman, T. L., & Suskind, D. L. (2017). The microbiota in inflammatory bowel disease: current and therapeutic insights. *Journal of Inflammation Research*, 10, 63–73. <https://doi.org/10.2147/JIR.S116088>
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., Schlegel, M. L., Tucker, T. A., Schrenzel, M. D., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 320(5883), 1647–1651. <https://doi.org/10.1126/science.1155725>
- Leylabadlo, H. E., Ghotaslou, R., Feizabadi, M. M., Farajnia, S., Moaddab, S. Y., Ganbarov, K., Khodadadi, E., Tanomand, A., Sheykhsaran, E., Yousefi, B., & Kafil, H. S. (2020a). The critical role of *Faecalibacterium prausnitzii* in human health: An overview. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104344. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104344>

- Leylabadlo, H. E., Ghotaslou, R., Feizabadi, M. M., Farajnia, S., Moaddab, S. Y., Ganbarov, K., Khodadadi, E., Tanomand, A., Sheykhsaran, E., Yousefi, B., & Kafil, H. S. (2020b). The critical role of *Faecalibacterium prausnitzii* in human health: An overview. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104344. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104344>
- Lin, L., & Zhang, J. (2017). Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunology* 2017 18:1, 18(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/S12865-016-0187-3>
- Liu, L. Y., Li, Z. H., & Liu, J. K. (2013). A new menthane-type monoterpene from *Pleurotus eryngii*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 11(1), 71–73. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60010-2](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60010-2)
- Liu, X., Yu, Z., Jia, W., Wu, Y., Wu, D., Zhang, H., Liu, Z., Yang, Y., Zhang, J., Liu, Y., Tang, C., Wang, W., & Zhu, L. (2020). A Review on Linking the Medicinal Functions of Mushroom Prebiotics with Gut Microbiota. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 22(10), 943–951. <https://doi.org/10.1615/INTJMEDMUSHROOMS.2020035799>
- Liu, Y., Gibson, G. R., & Walton, G. E. (2016). An In Vitro Approach to Study Effects of Prebiotics and Probiotics on the Faecal Microbiota and Selected Immune Parameters Relevant to the Elderly. *PLOS ONE*, 11(9), e0162604. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0162604>
- Lloyd-Price, J., Arze, C., Ananthakrishnan, A. N., Schirmer, M., Avila-Pacheco, J., Poon, T. W., Andrews, E., Ajami, N. J., Bonham, K. S., Brislawn, C. J., Casero, D., Courtney, H., Gonzalez, A., Graeber, T. G., Hall, A. B., Lake, K., Landers, C. J., Mallick, H., Plichta, D. R., ... Huttenhower, C. (2019). Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature* 2019 569:7758, 569(7758), 655–662. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1237-9>
- Luckey, T. D. (1972). Introduction to intestinal microecology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 25(12), 1292–1294. <https://doi.org/10.1093/AJCN/25.12.1292>
- Lynch, D. B., Jeffery, I. B., Cusack, S., O'Connor, E. M., & O'Toole, P. W. (2015). Diet-Microbiota-Health Interactions in Older Subjects: Implications for Healthy Aging. *Interdisciplinary Topics in Gerontology*, 40, 141–154. <https://doi.org/10.1159/000364976>
- Martens, E. C., Chiang, H. C., & Gordon, J. I. (2008). Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe*, 4(5), 447–457. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.09.007>
- Martínez, I., Stegen, J. C., Maldonado-Gómez, M. X., Eren, M. A., Siba, P. M., Greenhill, A. R., & Walter, J. (2015). The gut microbiota of rural papua new guineans: composition, diversity patterns, and ecological processes. *Cell Rep.*, 11(4), 527–538. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.049>
- Martin-Gallausiaux, C., Marinelli, L., Blottière, H. M., Larraufie, P., & Lapaque, N. (2021). Short Chain Fatty Acids – mechanisms and functional importance in the gut. *Proceedings of the Nutrition Society*, 80(1), 37–49. <https://doi.org/10.1017/S0029665120006916>
- MC, C., E, I., K, L., & S, S. (2008). Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(4), 894–899. <https://doi.org/10.1093/AJCN/88.4.894>
- Mentella, M. C., Scaldaferri, F., Pizzoferrato, M., Gasbarrini, A., & Miggiano, G. A. D. (2020). Nutrition, IBD and Gut Microbiota: A Review. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 944, 12(4), 944. <https://doi.org/10.3390/NU12040944>
- Miles, P. G., & Chang, S.-T. (2008). *Mushrooms Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*, 2nd ed.
- Mitsou, E. K., Saxami, G., Stamoulou, E., Kerezoudi, E., Terzi, E., Koutrotsios, G., Bekiaris, G., Zervakis, G. I., Mountzouris, K. C., Pletsas, V., & Kyriacou, A. (2020). Effects of rich in b-glucans

- edible mushrooms on aging gut microbiota characteristics: An in vitro study. *Molecules*, 25(12). <https://doi.org/10.3390/molecules25122806>
- Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082*, 7(3), 189–200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>
- Moss, S. F. (2017). The Clinical Evidence Linking Helicobacter pylori to Gastric Cancer. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 3(2), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.12.001>
- Motta, F., Gershwin, M. E., & Selmi, C. (2021). Mushrooms and immunity. *Journal of Autoimmunity*, 117, 102576. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102576>
- Muegge, B. D., Kuczynski, J., Knights, D., Clemente, J. C., González, A., Fontana, L., Henrissat, B., Knight, R., & Gordon, J. I. (2011). Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science*, 332(6032), 970–974. <https://doi.org/10.1126/science.1198719>
- Mukherjee, A., Lordan, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2020). Gut microbes from the phylogenetically diverse genus Eubacterium and their various contributions to gut health. *Gut Microbes*, 12(1). <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1802866>
- Murphy, E. J., Rezoagli, E., Major, I., Rowan, N. J., & Laffey, J. (2021). *β-Glucan*. <http://research.thea.ie/handle/20.500.12065/3558>
- Murphy, E. J., Rezoagli, E., Major, I., Rowan, N. J., & Laffey, J. G. (2020). *β-Glucan* Metabolic and Immunomodulatory Properties and Potential for Clinical Application. *Journal of Fungi* 2020, Vol. 6, Page 356, 6(4), 356. <https://doi.org/10.3390/JOF6040356>
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148(1), 257–266. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-257>
- N. Kerezoudi, E., K. Mitsou, E., Katerina Gioti, Eirini Terzi, Ifigeneia Avgousti, Alexandra Panagiotou, Georgios Koutrotsios, I. Zervakis, G., C. Mountzouris, K., Roxane Tenta, & Adamantini Kyriacou. (2021). Fermentation of Pleurotus ostreatus and Ganoderma lucidum mushrooms and their extracts by the gut microbiota of healthy and osteopenic women: potential prebiotic effect and impact of mushroom fermentation products on human osteoblasts. *Food & Function*, 12(4), 1529–1546. <https://doi.org/10.1039/D0FO02581J>
- Nussbaum, R. L. 1950-, McInnes, R. R., Willard, H. F., Moschonas, N. K., Saraphidou, T. D., & Phragkoulē, Apostolia. (2011). *Thompson & Thompson : Ιατρική Γενετική*. Ekdoseis P. Ch. Paschalides.
- Obregon-Tito, A. J., Tito, R. Y., Metcalf, J., Sankaranarayanan, K., Clemente, J. C., Ursell, L. K., Zech Xu, Z., van Treuren, W., Knight, R., Gaffney, P. M., Spicer, P., Lawson, P., Marin-Reyes, L., Trujillo-Villarreal, O., Foster, M., Guja-Poma, E., Troncoso-Corzo, L., Warinner, C., Ozga, A. T., & Lewis, C. M. (2015). Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. *Nat. Commun.*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7505>
- Odamaki, T., Kato, K., Sugahara, H., Hashikura, N., Takahashi, S., Xiao, J., Abe, F., & Osawa, R. (2016). Age-related changes in gut microbiota composition from newborn to centenarian: a cross-sectional study. *BMC Microbiology* 2016 16:1, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12866-016-0708-5>
- Paavonen, J., Naud, P., Salmerón, J., Wheeler, C., Chow, S.-N., Apter, D., Kitchener, H., Castellsague, X., Teixeira, J., Skinner, S., Hedrick, J., Jaisamrarn, U., Limson, G., Garland, S., Szarewski, A., Romanowski, B., Aoki, F., Schwarz, T., Poppe, W., ... Dubin, G. (2009). Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection

- and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *The Lancet*, 374(9686), 301–314. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61248-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61248-4)
- Paulos, C. M., Wrzesinski, C., Andrew Kaiser, Hinrichs, C. S., Chieppa, M., Cassard, L., Palmer, D. C., Boni, A., Muranski, P., Yu, Z., Gattinoni, L., Antony, P. A., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2007). Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8+ T cells via TLR4 signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(8), 2197–2204. <https://doi.org/10.1172/JCI32205>
- Pham, V. T., Seifert, N., Richard, N., Raederstorff, D., Steinert, R. E., Prudence, K., & Mohajeri, M. H. (2018). Correction: The effects of fermentation products of prebiotic fibres on gut barrier and immune functions in vitro. *PeerJ*, 6, e5288/correction-1. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.5288/CORRECTION-1>
- Reis, F. S., Martins, A., Vasconcelos, M. H., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science and Technology*, 66, 48–62. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.05.010>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Abele, G., Miggiano, D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). *microorganisms What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases*. 7, 14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms 2019, Vol. 7, Page 14*, 7(1), 14. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7010014>
- Rodrigues, D., Walton, G., Sousa, S., Rocha-Santos, T. A. P., Duarte, A. C., Freitas, A. C., & Gomes, A. M. P. (2016). In vitro fermentation and prebiotic potential of selected extracts from seaweeds and mushrooms. *LWT*, 73, 131–139. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.06.004>
- Rodriguez Estrada, A. E., & Royse, D. J. (2007). Yield, size and bacterial blotch resistance of *Pleurotus eryngii* grown on cottonseed hulls/oak sawdust supplemented with manganese, copper and whole ground soybean. *Bioresource Technology*, 98(10), 1898–1906. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.07.027>
- Roncero-Ramos, I., & Delgado-Andrade, C. (2017). The beneficial role of edible mushrooms in human health. *Current Opinion in Food Science*, 14, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.04.002>
- Rosselli, R., Romoli, O., Vitulo, N., Vezzi, A., Campanaro, S., de Pascale, F., Schiavon, R., Tiarca, M., Poletto, F., Concheri, G., Valle, G., & Squartini, A. (2016). Direct 16S rRNA-seq from bacterial communities: a PCR-independent approach to simultaneously assess microbial diversity and functional activity potential of each taxon. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep32165>
- Sanada, K., Nakajima, S., Kurokawa, S., Barceló-Soler, A., Ikuse, D., Hirata, A., Yoshizawa, A., Tomizawa, Y., Salas-Valero, M., Noda, Y., Mimura, M., Iwanami, A., & Kishimoto, T. (2020). Gut microbiota and major depressive disorder: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 266, 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.JAD.2020.01.102>
- Saxami, G., Kerezoudi, E. N., Mitsou, E. K., Koutrotsios, G., Zervakis, G. I., Pletsa, V., & Kyriacou, A. (2021). Fermentation Supernatants of *Pleurotus eryngii* Mushroom Ameliorate Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction in Lipopolysaccharide-Induced Caco-2 Cells via Upregulation of Tight Junctions. *Microorganisms 2021, Vol. 9, Page 2071*, 9(10), 2071. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9102071>
- Schnorr, S. L., Candela, M., Rampelli, S., Centanni, M., Consolandi, C., Basaglia, G., Turrone, S., Biagi, E., Peano, C., Severgnini, M., Fiori, J., Gotti, R., de Bellis, G., Luiselli, D., Brigidi, P.,

- Mabulla, A., Marlowe, F., Henry, A. G., & Crittenden, A. N. (2014). Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat. Commun.*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4654>
- Scott, K. P., Martin, J. C., Chassard, C., Clerget, M., Potrykus, J., Campbell, G., Mayer, C. D., Young, P., Rucklidge, G., Ramsay, A. G., & Flint, H. J. (2011). Substrate-driven gene expression in *Roseburia inulinivorans*: importance of inducible enzymes in the utilization of inulin and starch. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 108(Suppl. 1), 4672–4679. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000091107>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). *Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Slavin, J. (2013). Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits. *Nutrients*, 5(4), 1417–1435. <https://doi.org/10.3390/NU5041417>
- Smits, S. A., Leach, J., Sonnenburg, E. D., Gonzalez, C. G., Lichtman, J. S., Reid, G., Knight, R., Manjurano, A., Chagalucha, J., Elias, J. E., Dominguez-Bello, M. G., & Sonnenburg, J. L. (2017). Seasonal cycling in the gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers of Tanzania. *Science*, 357(6353), 802–806. <https://doi.org/10.1126/science.aan4834>
- Sonnenburg, E. D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S. K., Firbank, S. J., Bolam, D. N., & Sonnenburg, J. L. (2010). Specificity of polysaccharide use in intestinal bacteroides species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell*, 141(7), 1241–1252. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.005>
- Sonnenburg, J. L., & Bäckhed, F. (2016). Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 2016 535:7610, 535(7610), 56–64. <https://doi.org/10.1038/nature18846>
- Sonnenburg, J. L., Xu, J., Leip, D. D., Chen, C. H., Westover, B. P., Weatherford, J., Buhler, J. D., & Gordon, J. I. (2005). Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. *Science*, 307(5717), 1955–1959. <https://doi.org/10.1126/science.1109051>
- Strandwitz, P. (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Research*, 1693, 128–133. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2018.03.015>
- Tamanai-Shacoori, Z., Smida, I., Bousarghin, L., Loreal, O., Meuric, V., Fong, S. B., Bonnaure-Mallet, M., & Jolivet-Gougeon, A. (2017). *Roseburia* spp.: a marker of health? <http://Dx.Doi.Org/10.2217/Fmb-2016-0130>, 12(2), 157–170. <https://doi.org/10.2217/FMB-2016-0130>
- Tedersoo, L., Sánchez-Ramírez, S., Kõljalg, U., Bahram, M., Döring, M., Schigel, D., May, T., Ryberg, M., & Abarenkov, K. (2018). High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, 90(1), 135–159. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0401-0>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017a). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017b). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Tomasetti, C., & Vogelstein, B. (2015). Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*, 347(6217), 78–81. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1260825>
- Tung, Y.-T., Pan, C.-H., Chien, Y.-W., & Huang, H.-Y. (2020). Edible Mushrooms: Novel Medicinal Agents to Combat Metabolic Syndrome and Associated Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 26(39), 4970–4981. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200831151316>
- Turnbaugh, P. J., Ridaura, V. K., Faith, J. J., Rey, F. E., Knight, R., & Gordon, J. I. (2009). The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl Med.*, 1(6), 6ra14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322>

- Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E., & Spector, T. D. (2018). Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*, 361, 36–44. <https://doi.org/10.1136/BMJ.K2179>
- Vamanu, E., Gatea, F., & Sârbu, I. (2018). In Vitro Ecological Response of the Human Gut Microbiome to Bioactive Extracts from Edible Wild Mushrooms. *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 2128, 23(9), 2128. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23092128>
- Verhoog, S., Taneri, P. E., Díaz, Z. M. R., Marques-Vidal, P., Troup, J. P., Bally, L., Franco, O. H., Glisic, M., & Muka, T. (2019). Dietary Factors and Modulation of Bacteria Strains of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii*: A Systematic Review. *Nutrients* 2019, Vol. 11, Page 1565, 11(7), 1565. <https://doi.org/10.3390/NU11071565>
- Vivarelli, S., Salemi, R., Candido, S., Falzone, L., Santagati, M., Stefani, S., Torino, F., Banna, G. L., Tonini, G., & Libra, M. (2019). Gut Microbiota and Cancer: From Pathogenesis to Therapy. *Cancers* 2019, Vol. 11, Page 38, 11(1), 38. <https://doi.org/10.3390/CANCERS11010038>
- Vlassopoulou, M., Yannakoulia, M., Pletsa, V., Zervakis, G. I., & Kyriacou, A. (2021). Effects of fungal beta-glucans on health - a systematic review of randomized controlled trials. *Food & Function*, 12(8), 3366–3380. <https://doi.org/10.1039/D1FO00122A>
- Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M. D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Parkhill, J., & Flint, H. J. (2010). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME Journal* 2011 5:2, 5(2), 220–230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.118>
- Wang, Q., Sheng, X., Shi, A., Hu, H., Yang, Y., Liu, L., Fei, L., & Liu, H. (2017). β -Glucans: Relationships between Modification, Conformation and Functional Activities. *Molecules* 2017, Vol. 22, Page 257, 22(2), 257. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22020257>
- Wang, R. F., Cao, W. W., & Cerniglia, C. E. (1996). PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(4), 1242. /pmc/articles/PMC167889/?report=abstract
- Wani, S. M., Gani, A., Mir, S. A., Masoodi, F. A., & Khanday, F. A. (2021). β -Glucan: A dual regulator of apoptosis and cell proliferation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 182, 1229–1237.
- WE, M., & LV, H. (1974). Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology*, 27(5), 961–979. <https://doi.org/10.1128/AM.27.5.961-979.1974>
- Webster, J., & Weber, R. (2007). *Introduction to Fungi*. www.cambridge.org/9780521807395
- Witkowski, M., Weeks, T. L., & Hazen, S. L. (2020). Gut Microbiota and Cardiovascular Disease. *Circulation Research*, 127(4), 553–570. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.120.316242>
- World Gastroenterology Organisation (WGO). (2014). *WDHD Handbook on Gut Microbes*.
- Yan, J., & Charles, J. F. (2017). Gut Microbiome and Bone: to Build, Destroy, or Both? *Current Osteoporosis Reports* 2017 15:4, 15(4), 376–384. <https://doi.org/10.1007/S11914-017-0382-Z>
- Yatsunenکو, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., ... Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227. <https://doi.org/10.1038/nature11053>
- Yin, C., Noratto, G. D., Fan, X., Chen, Z., Yao, F., Shi, D., & Gao, H. (2020). The Impact of Mushroom Polysaccharides on Gut Microbiota and Its Beneficial Effects to Host: A Review. *Carbohydrate Polymers*, 250, 116942. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116942>
- Yu, Z. T., Liu, B., Mukherjee, P., & Newburg, D. S. (2013). *Trametes versicolor* Extract Modifies Human Fecal Microbiota Composition In vitro. *Plant Foods for Human Nutrition* 2013 68:2, 68(2), 107–112. <https://doi.org/10.1007/S11130-013-0342-4>

- Zervakis, G., & Balis, C. (1996). A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycological Research*, 100(6), 717–731. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80205-X](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80205-X)
- Zhang, B., Li, Y., Zhang, F., Linhardt, R. J., Zeng, G., & Zhang, A. (2020). Extraction, structure and bioactivities of the polysaccharides from *Pleurotus eryngii*: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 1342–1347. <https://doi.org/10.1016/j.IJBIOMAC.2019.10.144>
- Zhao, R., Yang, W., Pei, F., Zhao, L., & Hu, Q. (2018). In vitro fermentation of six kinds of edible mushrooms and its effects on fecal microbiota composition. *LWT*, 96, 627–635. <https://doi.org/10.1016/j.LWT.2018.06.012>
- Zhu, F., Du, B., Bian, Z., & Xu, B. (2015). β -Glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 165–173.
- Zmora, N., Suez, J., & Elinav, E. (2018). You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2018 16:1, 16(1), 35–56. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0061-2>
- Ζερβάκης, Γ. (1992). Διδακτορική Διατριβή (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών): ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *PLEUROTUS* - Κωδικός: 2370. (n.d.). Retrieved July 18, 2021, from <https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/2370?lang=el#page/8/mode/2up>