



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**«Επίδραση των προϊόντων της ζύμωσης πρεβιοτικών ενώσεων από
τον εντερικό μικροβιόκοσμο παιδιών με Διαταραχές Φάσματος του
Αυτισμού στην έκφραση στεγανών συνδέσμων σε ένα *in vitro*
σύστημα »**

Πτυχιακή εργασία

**ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ
218001**



Αθήνα, 2022



HAROKOPIO UNIVERSITY

**SCHOOL OF LIFE SCIENCES AND EDUCATION
DEPARTMENT OF NUTRITION AND DIETETICS**

**«Effect of fermentation supernatants of prebiotic compounds from the
intestinal microbiota of children with Autism Spectrum Disorders on
the expression of tight junctions in an in vitro system»**

Bachelor thesis

**ANASTASOPOULOU MARIA
218001**



Athens, 2022



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

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

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

**ΚΥΡΙΑΚΟΥ ΑΔΑΜΑΝΤΙΝΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ) Αναπληρώτρια
Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας και Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα**

**ΤΕΝΤΑ ΡΩΞΑΝΗ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης
Διαιτολογίας και Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**ΠΛΕΤΣΑ ΒΑΣΙΛΙΚΗ, Κύρια Ερευνήτρια, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας,
Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών**

Η Αναστασοπούλου Μαρία δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1)** Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2)** Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.
- 3)** Όπου υφίστανται δικαιώματα άλλων δημιουργών έχουν διασφαλιστεί όλες οι αναγκαίες άδειες χρήσης ενώ το αντίστοιχο υλικό είναι ευδιάκριτο στην υποβληθείσα εργασία.

**....στους γονείς και τους αγαπημένους μου με την αστείρευτη
στήριξη και κατανόηση τους....**

$$\text{Εγώ} = \frac{1}{\text{Γνώση}}$$

Albert Einstein

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με τη ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας και συγγραφής της παρούσας πτυχιακής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν, με όποιον τρόπο, στην εκπόνησή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου την κ. Κυριακού Αδαμαντίνη που μου έδωσε την ευκαιρία να συμμετάσχω σε μια καινοτόμο μελέτη στα πλαίσια της πτυχιακής μου εργασίας, αλλά και για το ενδιαφέρον και την άμεση ανταπόκρισή της για οποιοδήποτε ζήτημα που αναζητήσα την βοήθειά της . Θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα άλλα δύο μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, την κ. Τέντα Ρωξάνη και την κ. Πλέτσα Βασιλική για το ενδιαφέρον τους προς την πτυχιακή μου εργασία.

Ευχαριστώ βαθύτατα την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Γεωργία Σαξάμη για την εκπαίδευση που μου παρείχε, το ουσιαστικό ενδιαφέρον που έδειξε και την πολύτιμη βοήθειά της σε όλα τα επίπεδα.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου για την ζωτικής σημασίας στήριξη τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, αλλά και τους κοντινούς μου ανθρώπους που έδειξαν βαθιά κατανόηση τον τελευταίο χρόνο.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη στα Ελληνικά.....	9
Περίληψη στα Αγγλικά.....	10
Κατάλογος Εικόνων.....	11
Κατάλογος Πινάκων.....	12
Συντομογραφίες.....	13

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφ.1 Εντερικός Μικροβιόκοσμος.....	14
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά εντερικού μικροβιόκοσμου.....	14
1.1.1 Ορισμός	14
1.1.2 Μικροοργανισμοί που τον αποτελούν.....	14
1.1.3 Λειτουργικός ρόλος.....	16
1.2 Από τι επηρεάζεται ο εντερικός μικροβιόκοσμος.....	17
1.3 Δυσβίωση.....	20
1.3.1 Ορισμός.....	20
1.3.2 Νεύρωση του εντέρου και επίδραση της δυσβίωσης.....	20
1.3.3 Διαταραχές στο Φάσμα του Αυτισμού και δυσβίωση.....	22
Κεφ.2 Πρεβιοτικά	24
2.1 Πρεβιοτικά	24
2.1.1 Τι είναι τα πρεβιοτικά.....	24
2.1.2 Ποια είναι τα πιο γνωστά πρεβιοτικά.....	24
2.2 Β- γλυκάνες και <i>Pleurotus eryngii</i>	25
2.2.1 Β- γλυκάνες- δράσεις.....	25
2.2.2 Μανιτάρια και <i>Pleurotus eryngii</i>	26
2.3 Επίδραση των γλυκάνων στον εντερικό μικροβιόκοσμο.....	28
2.3.1 Μηχανισμός επίδρασης στον εντερικό μικροβιόκοσμο.....	28
2.3.2 Επίδραση στον εντερικό μικροβιόκοσμο ασθενών με ΔΑΦ.....	28
Κεφ. 3 Εντερικός Φραγμός.....	30
3.1 Ορισμός.....	30
3.2 Λειτουργικός ρόλος του εντερικού φραγμού.....	31

3.2.1 Συνδέσεις και Στεγανές συνδέσεις(TJ).....	31
3.2.2 Δομή και φυσιολογία TJ.....	32
3.2.3 Πρωτεΐνες των στεγανών συνδέσεων.....	33
3.3 Φλεγμονή και στεγανές συνδέσεις- επίδραση σε ΚΝΣ.....	35
3.3.1 Ρύθμιση στεγανών συνδέσεων.....	35
3.3.2 Μηχανισμοί επίδρασης της φλεγμονής στο κεντρικό νευρικό σύστημα – ΔΑΦ.....	36
3.3.3 Επίδραση πρεβιοτικών σε στεγανές συνδέσεις.....	36

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφ 4. Υλικά και Μέθοδοι.....	38
4.1 Σκοπός.....	38
4.2 Κριτήρια ένταξης εθελοντών.....	38
4.3 Προϊόντα ζύμωσης.....	38
4.4 Καλλιέργειες κυττάρων.....	39
4.5 Επιδράσεις στα κύτταρα.....	40
4.5.1. Επίστρωση των κυττάρων σε πιάτο 12 θέσεων.....	40
4.5.2 Επίδραση των κυττάρων με τα υπερκείμενα ζύμωσης.....	40
4.5.3 Επίδραση των κυττάρων με το λιποπολυσακχαρίτη (LPS).....	41
4.6 Απομόνωση του ολικού mRNA.....	41
4.7 Σύνθεση cDNA.....	42
4.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).....	42
1.9 Στατιστική Ανάλυση.....	45
Κεφ 5. Αποτελέσματα.....	46
5.1. Χαρακτηριστικά δείγματος εθελοντών.....	46
5.2. Αποτελέσματα έκφρασης TJs για το σύνολο των εθελοντών.....	46
5.2.1. Αποτελέσματα έκφρασης του γονιδίου ZO-1 για το σύνολο των εθελοντών.....	47
5.2.2.Αποτελέσματα έκφρασης του γονιδίου occludin για το σύνολο των εθελοντών.....	48
5.2.3.Αποτελέσματα έκφρασης του γονιδίου claudin-1 για το σύνολο των εθελοντών.....	50
Κεφ 6.Συζήτηση.....	52
Βιβλιογραφία.....	56

Περίληψη στα Ελληνικά

Οι Διαταραχές στο Φάσμα του Αυτισμού (ΔΑΦ) αποτελούν ένα σύνολο νευροαναπτυξιακών διαταραχών. Συχνά, ωστόσο, εμφανίζονται εντερικές διαταραχές, που ενδεχομένως συνδέονται με τη διαφορετική σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου των παιδιών με ΔΑΦ σε σχέση με αυτή των υγιών ατόμων (φαινόμενο που πιθανόν σχετίζεται με τον άξονα εντέρου-εγκεφάλου). Η κατάσταση αυτή προκαλεί φλεγμονή και έκκριση κυτταροκινών στο έντερο, οδηγώντας σε διαταραχές στην ακεραιότητα του εντερικού φραγμού και ανατροφοδότηση της φλεγμονής λόγω της εισόδου παθογόνων μικροοργανισμών και βλαβερών ουσιών. Τα πρεβιοτικά προάγουν την εύρυθμη λειτουργία του εντερικού φραγμού μέσω της επίδρασής τους στον δυσβιωτικό μικροβιόκοσμο, ο οποίος τροποποιείται και παράγει μεταβολίτες που ενισχύουν τις στεγανές συνδέσεις μεταξύ των κυττάρων του εντερικού φραγμού, επιδιορθώνοντας την ακεραιότητά του. Το εδώδιμο μανιτάρι *Pleurotus eryngii* είναι πλούσιο σε β-γλυκάνες, οι οποίες αποτελούν ένα τύπο διαιτητικών ινών με πιθανή πρεβιοτική δράση.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι η μελέτη της επίδρασης των προϊόντων ζύμωσης του μανιταριού *Pleurotus eryngii* από τον εντερικό μικροβιόκοσμο παιδιών με Διαταραχές Φάσματος του Αυτισμού, στην έκφραση στεγανών συνδέσεων σε ένα *in vitro* μοντέλο που περιλαμβάνει την καρκινική σειρά επιθηλιακών κυττάρων του παχέος εντέρου Caco-2 διεγερμένη με το λιποπολυσακχαρίτη (LPS).

Πραγματοποιήθηκε ζύμωση του μανιταριού *Pleurotus eryngii* από τον εντερικό μικροβιόκοσμο πέντε παιδιών με ΔΑΦ, όπου η ινουλίνη (γνωστό πρεβιοτικό) ήταν ο θετικός μάρτυρας, ενώ το βασικό διάλυμα της ζύμωσης εμβολιασμένο αλλά χωρίς πηγή άνθρακα, ήταν ο αρνητικός μάρτυρας. Τα κύτταρα εκτέθηκαν στα υπερκείμενα (Fermentation Supernatants, FS) από τη ζύμωση του *P.eryngii* (FS-PEWS), της ινουλίνης (FS-INU) και του αρνητικού μάρτυρα (FS-NC). Στην αρχή επώαστηκαν τα Caco-2 κύτταρα με τα FS και ακολούθησε διέγερση με LPS. Τέλος, εφαρμόστηκε RT-PCR για τη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης τριών γονιδίων των πρωτεϊνών που δομούν τις στεγανές συνδέσεις (ZO-1, occludin και claudin-1).

Τα αποτελέσματα της εφαρμογής της RT-PCR έδειξαν πως η έκφραση των τριών γονιδίων ήταν σημαντικά αυξημένη στα κύτταρα που επέδρασε το FS-PEWS, σε σχέση με αυτά που διεγέρθηκαν με LPS και με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC), οδηγώντας στο συμπέρασμα πως τα προϊόντα ζύμωσης των εδώδιμων μανιταριών του είδους *P. eryngii* θα μπορούσαν να ασκήσουν ευεργετικές επιδράσεις ως προς την διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού.

Λέξεις κλειδιά: Διαταραχές Φάσματος του Αυτισμού, εντερικός φραγμός, εντερικός μικροβιόκοσμος, *Pleurotus eryngii*, στεγανές συνδέσεις.

Abstract

Autism Spectrum Disorders (ASD) is a set of neurodevelopmental disorders, characterized by important social impairments. The children with ASD are often reported with gastrointestinal problems that are possibly linked to their dysbiotic microbiota (a phenomenon maybe related to the gut-brain axis). This proinflammatory environment induces the secretion of cytokines in the intestine, leading to disturbances in the integrity of the intestinal barrier and feedback inflammation due to the entry of pathogenic microorganisms and harmful substances in the circulation. Prebiotics promote the proper function of the intestinal barrier through their effect on the dysbiotic microbiota, which is modified and produces metabolites that strengthen the tight junctions between the cells of the intestinal barrier leading to the repair of its integrity. The edible mushroom *Pleurotus eryngii* is rich in β -glucans, which are a type of dietary fiber with potential prebiotic activity.

The purpose of this thesis is to study the effect of *Pleurotus eryngii* mushroom fermentation products with the intestinal microbiota of ASD children, on the expression levels of tight junctions in an *in vitro* model using the colon cancer cell line Caco-2 stimulated with lipopolysaccharide (LPS).

Fermentations were carried out with faecal inoculum from five ASD children, inulin (INU) a well-known prebiotic was used as a positive control, while the negative control (NC) included the basal medium of the fermentation without any carbohydrate source. The fermentation supernatants of the mushroom *Pleurotus eryngii* (FS-PEWS), of inulin (FS-INU) and of the negative control (FS-NC) were used to challenge the Caco-2 cells. The cells were incubated with FSs followed by stimulation with LPS. RT-PCR was then applied to measure the expression levels of three tight junction proteins: ZO-1, occludin and claudin-1.

The results of RT-PCR showed that the expression of the three genes was significantly increased in the cells exposed to FS-PEWS, compared to those stimulated with LPS, but also to those exposed to the negative control (FS-NC), leading to the conclusion that the fermentation products of the edible mushroom *P. eryngii* could exert beneficial effects in maintaining the integrity of the intestinal barrier.

Key words: Autism Spectrum Disorders, intestinal barrier, intestinal microbiota, *Pleurotus eryngii*, tight junctions.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Τυπική κατανομή των μικροβίων ενός φυσιολογικού ατόμου στον γαστρεντερικό σωλήνα...	16
Εικόνα 2. Επικοινωνία εγκεφάλου-εντέρου.....	22
Εικόνα 3. Δομή β-γλυκάνων. α) Δομή β-γλυκάνων που προέρχονται από μανιτάρια b) α) Δομή β-γλυκάνων που προέρχονται από δημητριακά.....	26
Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση εντερικού φραγμού.....	31
Εικόνα 5. Ανατομία εντερικού φραγμού, συστατικά συνδέσεων.....	35

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Επιδράσεις βιοδραστικών συστατικών του <i>Pleurotus eryngii</i>	27
Πίνακας 2. Υπερκείμενα μελέτης και συντομογραφίες των υποστρωμάτων.....	39
Πίνακας 3. Αλληλουχίες ανοδικών και καθοδικών των εκκινήτων.....	44
Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά εθελοντών (Μέσος όρος και τυπική απόκλιση).....	46

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΑΝΣ	Αυτόνομο Κεντρικό Σύστημα
ΔΑΦ	Διαταραχές στο Φάσμα του Αυτισμού
ΕΝΣ	Εντερικό Νευρικό Σύστημα
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
FS	Fermentation Supernatants
FS-INU	Υπερκείμενο ζύμωσης της πρεβιοτικής ένωσης ινουλίνη[2% (w/v)]
FS-NC	Υπερκείμενο ζύμωσης του αρνητικού μάρτυρα (θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, εμβολιασμένο με δείγμα από τον εντερικό μικροβιόκοσμο του κάθε εθελοντή, χωρίς πηγή άνθρακα)
FS-PEWS	Υπερκείμενο ζύμωσης (fermentation supernatant, FS) του μανιταριού <i>Pleurotus eryngii</i> LGAM 216 καλλιεργημένο σε άχυρο σιταριού (wheat straw, WS) (αναλογία 100%)
GOS	Γαλακτοολιγοσακχαρίτες
LPS	Λιποπολυσακχαρίτης
RT-PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου
TJ	Tight Junction

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ

1.1 Γενικά χαρακτηριστικά εντερικού μικροβιόκοσμου

1.1.1 Ορισμός

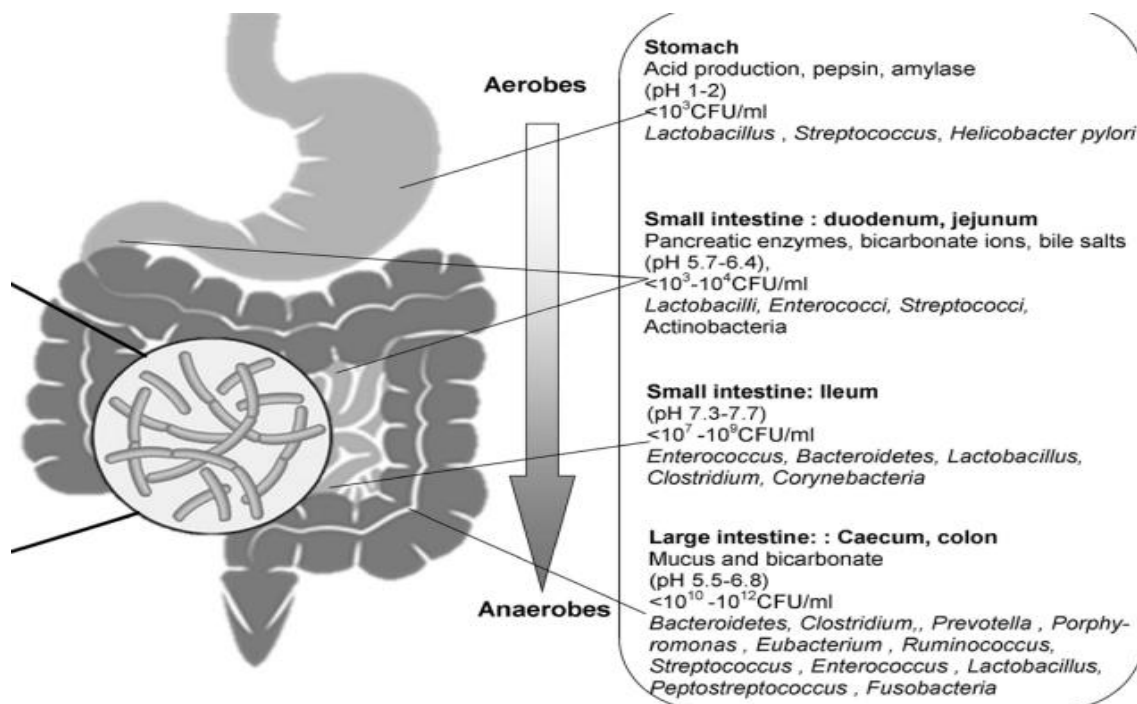
Ο εντερικός μικροβιόκοσμος αποτελεί σημαντικό μέρος του σύνθετου οικοσυστήματος που δημιουργείται στο περιβάλλον του εντέρου των ανθρώπων, των ζώων και των εντόμων. Στον ανθρώπινο οργανισμό μικροβιακοί πληθυσμοί δημιουργούν κοινότητες κατά μήκος ολόκληρου το γαστρεντερικού σωλήνα, με τη μεγαλύτερη ποσότητα και ποικιλότητα μικροβίων να εντοπίζεται στο έντερο. Τα είδη των μικροοργανισμών που περιλαμβάνει το έντερο είναι βακτήρια, ιοί, αρχαία και ευκάρυα (Chumpitazi et al., 2014) □ με τα βακτήρια να είναι τα πολυπληθέστερα και να προσεγγίζουν σε αριθμό τα 10^{14} . Η συμβίωση μεταξύ του οργανισμού και του εντερικού μικροβιόκοσμου είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση τοπικών και συστημικών αποκρίσεων του ξενιστή, όπως η προστασία από παθογόνους μικροοργανισμούς, η ανάπτυξη και η διατήρηση της ομοιόστασης των κυττάρων του ανοσοποιητικού και η πέψη πολυσακχαριτών για τους οποίους ο άνθρωπος δεν διαθέτει τα κατάλληλα πεπτικά ένζυμα. (Tavares Da Silva et al., 2013) □

1.1.2 Μικροοργανισμοί που τον αποτελούν

Μικροβιακοί πληθυσμοί εγκαθίστανται κατά μήκος ολόκληρου το γαστρεντερικού σωλήνα, ξεκινώντας από τον οισοφάγο και καταλήγοντας στο παχύ έντερο. Πιο συγκεκριμένα, στον άνω οισοφάγο έχει εντοπιστεί μικρή ποικιλία μικροβιακών πληθυσμών, με κυρίαρχα να είναι βακτήρια του γένους *Streptococcus*. Σε αντίθεση με άλλες περιοχές του γαστρεντερικού σωλήνα που η ποικιλότητα σε μικροοργανισμούς σχετίζεται με οφέλη στην υγεία, στον οισοφάγο η αυξημένη ποικιλότητα σχετίζεται με χρόνια φλεγμονή και δυσπλασία. Προχωρώντας στον στόμαχο, η ποικιλία είναι επίσης περιορισμένη, κυρίως λόγω της υψηλής

οξύτητας του περιβάλλοντος, που επιτρέπει μόνο στα βακτήρια που είναι ανθεκτικά σε χαμηλό pH να αναπτυχθούν (Chumpitazi et al., 2014) □ Έτσι, το μικροβιακό φορτίο είναι μικρότερο στον στόμαχο σε σχέση με το έντερο (στον στόμαχο υπάρχουν 10^2 – 10^4 CFU/ml βακτήρια, ενώ στο παχύ έντερο φτάνουν τα 10^{10} – 10^{12} CFU/ml). Υπό υγιείς συνθήκες, τα περισσότερα βακτήρια στον στόμαχο ανήκουν στα φύλα Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, και Proteobacteria, με κυρίαρχο γένος το *Streptococcus*.

Κατά μήκος του λεπτού εντέρου το μικροπεριβάλλον και κατ' επέκταση, οι μικροβιακοί πληθυσμοί, διαφοροποιούνται. Στο δωδεκαδάκτυλο εντοπίζονται χολικά οξέα, παγκρεατικές εκκρίσεις και αντιμικροβιακοί παράγοντες, που σε συνεργασία με τη γρήγορη διέλευση της τροφής εμποδίζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών σε πυκνότητα(10^3 – 10^4 CFU/ml βακτήρια) και ποικιλία, με τα φύλα Firmicutes και Actinobacteria να κυριαρχούν. Στην νήστιδα οι συνθήκες είναι πιο ευνοϊκές (10^3 – 10^7 CFU/ml βακτήρια) και επικρατούν τα γένη *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Streptococcus*. Τέλος, στον ιλεό το μικροβιακό φορτίο φτάνει τα 10^9 CFU/ml, με τους προαιρετικά αερόβιους να κυριαρχούν, εκτός από την περιοχή κοντά στην ειλεοτυφλική βαλβίδα, που ομοιάζει με το μικροβιακό περιβάλλον του παχέως εντέρου, με κυρίαρχους τους αναερόβιους (Adak & Khan, 2019) □ Στο παχύ έντερο το μικροβιακό φορτίο φτάνει τα 10^{10-12} CFU/ml (Brock, 2005) και απαρτίζεται ως επί το πλείστον από βακτήρια των φύλων Firmicutes και Bacteroidetes, των οποίων η αναλογία αποτελεί δείκτη για την ύπαρξη παθολογικών καταστάσεων. Στον αυλό του παχέως εντέρου επικρατούν τα γένη: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, , *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* and *Ruminococcus* , αλλά και τα είδη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, ενώ στον βλεννογόνο τα *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* and *Akkermansia*. Κάποια παθογόνα, όπως τα *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *E.coli* και *Bacteroides fragilis* μπορεί να βρίσκονται στο παχύ έντερο, σε μικρότερο ποσοστό (0,1 %) (Adak & Khan, 2019), ενώ υπάρχει και ένας μικρός αριθμός δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών που αποτελούν φυσιολογικό μέρος του εντερικού μικροβιόκοσμου, συμβιώνουν αρμονικά με τους υπόλοιπους πληθυσμούς και μπορεί να δράσουν ως παθογόνοι όταν διαταραχθεί η ομοιόσταση του περιβάλλοντος του εντέρου (Milani, Duranti, Bottacini, Casey, Turroni, Mahony, Belzer, Palacio, et al., 2017).



Εικόνα 1. Τυπική κατανομή των μικροβίων ενός φυσιολογικού ατόμου στον γαστρεντερικό σωλήνα (Adak & Khan, 2019)□

1.1.3. Λειτουργικός ρόλος

Η σχέση μεταξύ του εντερικού μικροβιόκοσμου και του ξενιστή προσφέρει αμοιβαία οφέλη. Από την σκοπιά του ξενιστή, ο εντερικός μικροβιόκοσμος θα μπορούσε να θεωρηθεί ως ένα όργανο με τις δικές του διακριτές λειτουργίες, αποτελούμενο από διάφορες κυτταρικές σειρές μικροβίων που επικοινωνούν μεταξύ τους και με τον ξενιστή. Οι απαραίτητες λειτουργίες που επιτελεί προς όφελος του ξενιστή περιλαμβάνουν, αρχικά, μεταβολικές διεργασίες, όπως η ζύμωση άπεπτων συστατικών της τροφής, με επακόλουθη απελευθέρωση μεταβολικών προϊόντων (Iebba et al., 2016)□ που πολλές φορές δρουν ως βιοδραστικά μόρια, όπως τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου. Οι συγκεκριμένοι μεταβολίτες αποτελούν σημαντικές πηγές ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, ενισχύοντας τον εντερικό φραγμό του βλεννογόνου, ενώ έχουν και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Gomaa, 2020)□

Δεύτερον, σημαντική είναι η συμβολή του στο ανοσοποιητικό σύστημα. Τα μικρόβια του εντέρου καλύπτοντας την επιφάνεια του επιθηλίου εμποδίζουν την άμεση επαφή του περιεχομένου του εντερικού σωλήνα με αυτό, αλλά και λειτουργώντας με ανταγωνιστικούς μηχανισμούς (κατανάλωση των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών, παραγωγή αντιμικροβιακών πεπτιδίων) περιορίζουν και σκοτώνουν βακτήρια,

χωρίς να διαπερνούν τον εντερικό φραγμό (Adak & Khan, 2019) □ Ο αποικισμός του εντέρου από πρώιμη ηλικία είναι απαραίτητος για την ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος. Πειράματα σε αξενικά ζώα (που δεν διαθέτουν εντερικό μικροβιόκοσμο) έδειξαν πως η ανοσία του εντερικού βλεννογόνου τους ήταν ανεπαρκώς ανεπτυγμένη και παρουσίαζαν μικρότερους μεσεντέριους λεμφαδένες και μειωμένο αριθμό ανοσοκυττάρων, όπως πλασματοκύτταρα που παράγουν IgA , και T- κύτταρα με αποτέλεσμα την εξασθενημένη ικανότητα καταπολέμησης παθογόνων βακτηρίων (Takiishi et al., 2017).

Τρίτον, εκτός από την άμεση χημική και μεταβολική αλληλεπίδραση που επηρεάζει εντερικές λειτουργίες όπως η εντερική κινητικότητα, η πέψη, η συγκομιδή ενέργειας και η συμβολή στο ανοσοποιητικό και τον εντερικό φραγμό, η επικοινωνία του ξενιστή με τους μικροοργανισμούς διαμεσολαβεί και από μια σειρά μονοπατιών σηματοδότησης που περιλαμβάνει διάφορα μόρια και επεκτείνεται σε πολλά όργανα επηρεάζοντας λειτουργίες τους, όπως τον μεταβολισμό των λιπιδίων και των φαρμάκων στο ήπαρ, τον μεταβολισμό της γλυκόζης στο πάγκρεας, αλλά και γνωσιακές λειτουργίες στον εγκέφαλο (Iebba et al., 2016) □ Αυτή η επικοινωνία διαμεσολαβεί από πολλά μόρια μικροβιακής προέλευσης που περιλαμβάνουν λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs), δευτερογενή χολικά οξέα και μεταβολίτες της τρυπτοφάνης, που διαδίδουν σήματα, κυρίως μέσω αλληλεπίδρασης με εντεροενδοκρινικά κύτταρα, κύτταρα εντεροχρωμαφίνης και το ανοσοποιητικό σύστημα του βλεννογόνου, ωστόσο μερικά διασχίζουν τον εντερικό φραγμό, εισέρχονται στη συστηματική κυκλοφορία και μπορεί να διασχίσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Martin et al., 2018). Το σύνολο αυτών των σύνθετων αλληλεπιδράσεων συνιστούν μια σειρά αξόνων. Καθένας τέτοιος άξονας είναι ουσιαστικά ένα δυναμικό χημικό μονοπάτι επικοινωνίας μεταξύ συγκεκριμένων κυτταρικών οδών του ξενιστή και μιας σειράς μικροβιακών ειδών και δραστηριοτήτων (Nicholson et al., 2012). Ο μηχανισμός με τον οποίο γίνεται αυτή η σηματοδότηση δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή, αλλά σίγουρα χρησιμοποιεί νευρικά, ενδοκρινικά, ανοσοποιητικά και μεταβολικά μονοπάτια (Dinan & Cryan, 2017).

Όσων αφορά την επίδραση του εντερικού μικροβιόκοσμου στην ανάπτυξη του εγκεφάλου και την νευρογένεση, γνωρίζουμε πως η αλληλεπίδρασή του με το κεντρικό νευρικό σύστημα διαμεσολαβεί από έναν τέτοιο άξονα, ο οποίος ονομάζεται άξονας εντέρου-εγκεφάλου (gut-brain-axis). Μελέτες ισχυρίζονται πως ο εντερικός μικροβιόκοσμος παίζει κάποιο ρόλο σε νοσήματα όπως η κατάθλιψη, η αγχώδης διαταραχή, το Άλτσχάιμερ και συμπτωματολογίες που σχετίζονται με Διαταραχές στο Αυτιστικό Φάσμα, χωρίς ωστόσο να έχει εξακριβωθεί ο μηχανισμός πίσω από αυτή τη συσχέτιση (Strandwitz, 2018) □

1.2 Από τι επηρεάζεται ο εντερικός μικροβιόκοσμος

Ο αρχικός αποικισμός του εμβρυϊκού εντέρου πιθανόν συμβαίνει κατά τη διάρκεια της ενδομήτριας ζωής μέσω του αποικισμού του πλακούντα. Περαιτέρω αποικισμός συμβαίνει μετά τη διέλευση από τον κόλπο κατά τη γέννηση ή μετά από επαφή με τα μικρόβια του περιβάλλοντος στην περίπτωση της καισαρικής τομής. Οι μικροβιακοί πληθυσμοί εμπλουτίζονται ποσοτικά και ποιοτικά καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης μέσω της επαφής με το εξωτερικό περιβάλλον και της διατροφής (Sanlier & Kocabas, 2021; Quigley, 2017).

Παρότι οι λειτουργίες του εντερικού μικροβιόκοσμου και το εντερικό μικροβίωμα (δηλαδή το σύνολο των γονιδίων των μικροβίων που τον αποτελούν) (Μεντής et al., 2013) □ είναι παρόμοια ανάμεσα σε υγιείς οργανισμούς, η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου διαφέρει από άτομο σε άτομο (Lozupone et al., 2012) □ Ανάλογα με το βακτηριακό γένος που επικρατεί στον εντερικό μικροβιόκοσμο ενός ατόμου, τα άτομα έχουν ταξινομηθεί σε 3 διακριτές κατηγορίες (εντερότυποι). Στον πρώτο κυριαρχούν βακτήρια από το γένος *Bacteroides*, στον δεύτερο κυριαρχούν από το *Prevotella*, ενώ στον τρίτο κυριαρχούν από το *Ruminococcus* (Chumpitazi et al., 2014).

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που έχουν κάποια επίδραση στην σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου, είναι οι εξείς:

Γενετικοί παράγοντες: Συγκεκριμένοι γονότυποι έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένες ποικιλότητες μικροοργανισμών και μικροβιακές κοινотικές δομές, καθώς και συγκεκριμένα αλληλόμορφα σχετικών γονιδίων συσχετίζονται με συγκεκριμένες συνθέσεις μικροοργανισμών στον εντερικό μικροβιόκοσμο. Ακόμα, κάποια γονίδια που σχετίζονται με τη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου φαίνεται να σχετίζονται και με νοσήματα όπως η παχυσαρκία, η σχιζοφρένεια, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 και φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου (Bander et al., 2020) □

Λήψη αντιβιοτικών: Με την αλόγιστη λήψη των αντιβιοτικών καταστρέφονται εκτός από τα παθογόνα, και τα μη παθογόνα μικρόβια-μέλη του φυσικού μικροβιόκοσμου τα οποία είναι σημαντικά για την διατήρηση της ισορροπίας στον εντερικό μικροβιόκοσμο και κατά συνέπεια και της υγείας του ξενιστή. Η λήψη αντιμικροβιακών φαρμάκων πολλές φορές έχει ως αποτέλεσμα την διαταραχή της σύνθεσης του εντερικού μικροβιόκοσμου, μια κατάσταση που ονομάζεται δυσβίωση. Τα αντιβιοτικά διαταράσσουν τον ανταγωνιστικό μηχανισμό αποκλεισμού μέσω του οποίου ο μικροβιόκοσμος αναστέλλει τα παθογόνα (Gomaa, 2020) □

Ηλικία: Η σύσταση του μικροβιόκοσμου παραμένει ασταθής, με φτωχή ποικιλότητα μέχρι την ηλικία των 2-3 ετών, που πλέον αποκτά την ποικιλία και την ποσότητα ενός ενήλικα (Milani, Duranti, Bottacini, Casey, Turrioni, Mahony, Belzer, Delgado Palacio, et al., 2017) □ Τα πρώτα βακτήρια που αποικίζουν το έντερο είναι αερόβια και καταναλώνουν οξυγόνο, δημιουργώντας τις συνθήκες που επιτρέπουν τον αποικισμό των αναερόβιων βακτηρίων, όπως τα φύλα που κυριαρχούν στην ενήλικη ζωή (Firmicutes και Bacteroidetes). Η ποικιλότητα παραμένει σταθερή στα υγιή άτομα μέχρι την γήρανση (> 65 ετών), όπου μειώνεται και παρατηρείται αύξηση των δυνητικά παθογόνων μικροβίων. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην φυσική αύξηση των προφλεγμονωδών παραγόντων, αλλά και στον περιορισμό της ποικιλίας στην διατροφή (Gomaa, 2020) □

Διατροφή: Η διατροφή αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τη ρύθμιση της σύστασης του ίδιου του μικροβιόκοσμου, αλλά και της επικοινωνίας του με τον ξενιστή. Αυτός ο ρόλος είναι εμφανής από τα πρώτα στάδια της ζωής, που οι ολιγοσακχαρίτες του μητρικού γάλακτος συμμετέχουν στην επικράτηση συγκεκριμένων ωφέλιμων μικροοργανισμών, αλλά και στην ωρίμανση του εντερικού μικροβιόκοσμου στην πρώιμη βρεφική ηλικία. Ακολουθεί η ένταξη των στερεών τροφών, με την οποία παρατηρείται και αύξηση του βακτηριακού πλούτου, ενώ στους ηλικιωμένους πάλι αυτή μειώνεται, πιθανώς λόγω του περιορισμού της ποικιλίας στην διατροφή.

Τα συστατικά της τροφής αλληλεπιδρούν άμεσα με τους μικροοργανισμούς και είτε προωθούν, είτε αναστέλλουν την ανάπτυξή τους, ανάλογα με την ικανότητα να τα χρησιμοποιούν επιλεκτικά ως υποστρώματα ενέργειας. Η ικανότητα αυτή προσφέρει ένα πλεονέκτημα δίνοντας την δυνατότητα σε όσους μικροοργανισμούς την διαθέτουν να πολλαπλασιάζονται εις βάρος λιγότερο ικανών μελών. Το φαινόμενο αυτό αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι η δίαιτα εκτός από την πυκνότητα των μικροοργανισμών επηρεάζει και την κινητική της ανάπτυξής τους. Τα κύρια συστατικά της τροφής που συμμετέχουν σε αυτόν τον μηχανισμό είναι οι άπεπτοι υδατάνθρακες που εντοπίζονται στις διαιτητικές ίνες. Μεταξύ αυτών σημαντικές είναι οι γλυκάνες, τις οποίες βρίσκουμε κυρίως σε φυτά, μύκητες και φύκη (Zmora et al., 2018) □

Υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που φαίνεται να παίζουν ρόλο στη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου, όπως η άσκηση, το κάπνισμα, το φύλο, αλλά δεν υπάρχουν τόσο επαρκή ευρήματα όσο για τους προαναφερθέντες (Bander et al., 2020) □

1.3 Δυσβίωση

1.3.1 Ορισμός

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος βρίσκεται σε ευβιοτική κατάσταση όταν υπερέχουν τα είδη που πιθανόν προσφέρουν κάποιο όφελος στον ξενιστή (ανήκουν κατά βάση στα φύλα Firmicutes και Bacteroidetes), σε αντίθεση με τα παθογόνα είδη, όπως στελέχη του φύλου Proteobacteria (Enterobacteriaceae) που υπάρχουν σε πολύ μικρό ποσοστό. Στην κατάσταση της δυσβίωσης διαταράσσεται η ισορροπία αυτή και μεταβάλλεται η σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Τόσο τα εξωγενή παθογόνα όσο και τα δυνητικά ενδογενή παθογόνα επωφελούνται από την δυσβίωση (Iebba et al., 2016) □ Ακόμα, κατά την δυσβίωση διαταράσσεται τόσο η ομοιότητα των μικροβίων, όσο και του ξενιστή, γεγονός που οδηγεί στο να θεωρείται συνυπεύθυνη για πολλαπλές συστηματικές δυσλειτουργίες του οργανισμού που παρατηρούνται στην παθογένεση καρδιομεταβολικών, νευροανοσοποιητικών και νευροσυμπεριφορικών καταστάσεων. Οι διαφοροποιήσεις του εντερικού μικροβιόκοσμου συμβάλουν και στην παθοφυσιολογία διάφορων γαστρεντερικών καταστάσεων, όπως οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, λειτουργικά σύνδρομα του εντέρου, τροφικές αλλεργίες, παχυσαρκία και νόσοι του ήπατος, που σε γενικότερη εικόνα φαίνεται να ξεκινούν από την τοπική, και στη συνέχεια συστηματική φλεγμονή που προκαλείται (Fattorusso et al., 2019) □

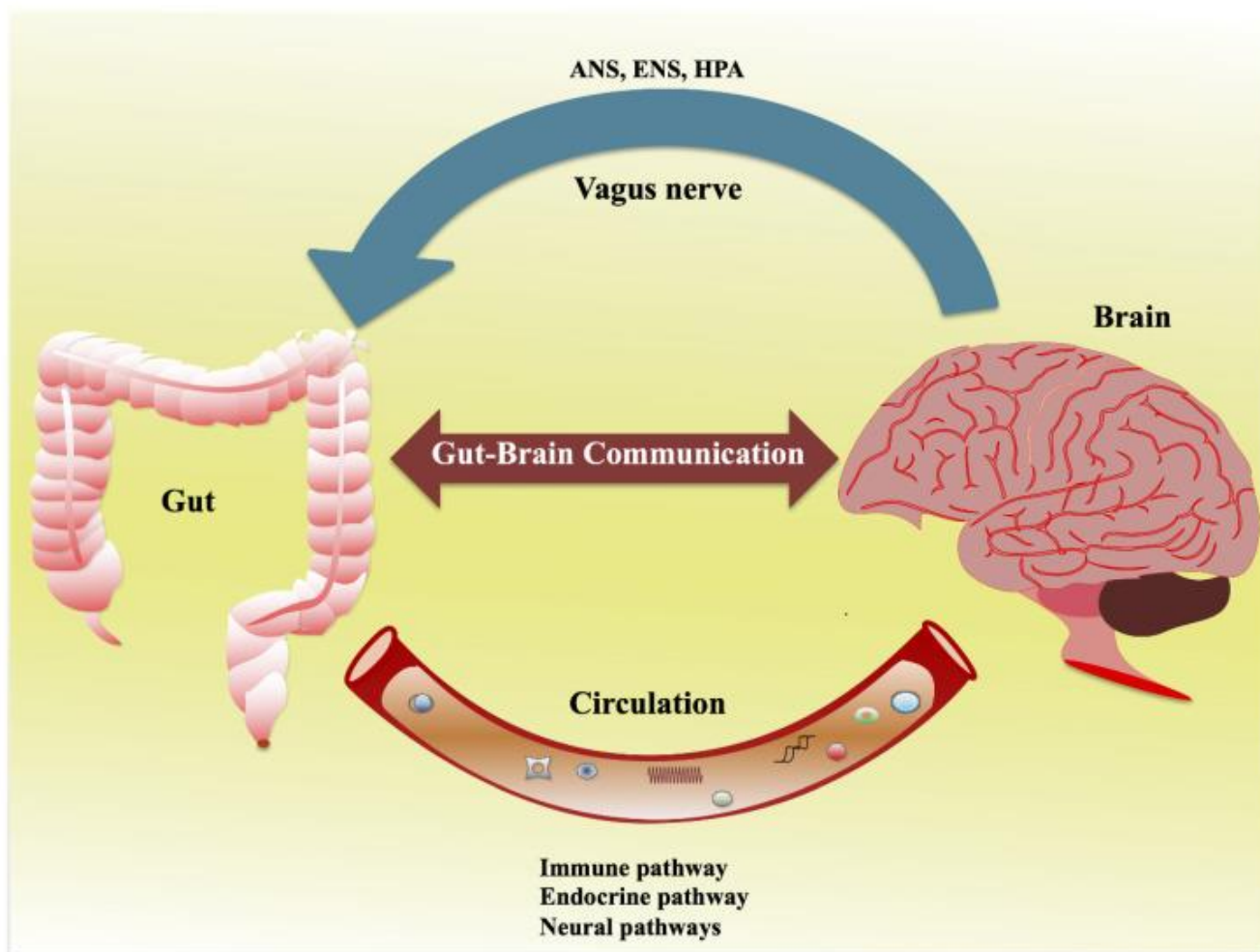
1.3.2 Νεύρωση του εντέρου και επίδραση δυσβίωσης.

Τα μηνύματα που προέρχονται από τους αισθητήρες του εντέρου ταξιδεύουν μέσω του πνευμονογαστρικού νεύρου (εξέχουσα πτυχή του Αυτόνομου Νευρικού Συστήματος, και συγκεκριμένα του Παρασυμπαθητικού Σκέλους) στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), το οποίο ρυθμίζει τα αντανακλαστικά και τις εναλλαγές της διάθεσης και του εγκεφάλου. Αντίστροφα, ο εγκέφαλος αποστέλλει μηνύματα για να μετατονίσει τη φυσιολογία του εντέρου και τις λειτουργίες του. Προσαγωγοί και απαγωγοί νευρώνες μεταφέρουν μηνύματα και συνδέουν νευρωνικά μονοπάτια που ανήκουν στο Αυτόνομο Νευρικό Σύστημα (ΑΝΣ), το Εντερικό Νευρικό Σύστημα (ΕΝΣ) (σύνθετο δίκτυο νευρώνων που εντοπίζεται στα τοιχώματα του εντέρου και είναι υπεύθυνο για την εγγενή νεύρωση και ρύθμιση των λειτουργιών του εντέρου) αλλά και

στον Άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (θα αναλυθεί περαιτέρω στο κεφάλαιο για τον εντερικό φραγμό). Κάθε μονοπάτι σχετίζεται στενά και ρυθμίζεται από αρκετούς διασυσχετικούς και νευροχυμικούς παράγοντες (Suganya & Koo, 2020; Yang et al., 2020) □

Πρόσφατες μελέτες ερευνούν το πως μπορεί ο εντερικός μικροβιόκοσμος να επηρεάζει τις λειτουργίες του ΚΝΣ και ΕΝΣ. Μερικοί μικροοργανισμοί, όπως στελέχη από το γένος *Lactobacillus*, και προϊόντα μικροοργανισμών, όπως οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS), η σεροτονίνη, το γάμμα-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), διαπερνούν το ανοσοποιητικό σύστημα του εντερικού βλεννογόνου και ενεργοποιούν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Νευροπεπτίδια και ορμόνες, όπως η ντοπαμίνη, σεροτονίνη, GABA, SCFA, εκκρίνονται από την προκαλούμενη διέγερση των εντερικών νευρώνων λόγω των κυτταροκινών και επηρεάζουν τις λειτουργίες του εγκεφάλου (νευρογένεση, λειτουργίες νευρόγλοιων, εναπόθεση μυελίνης, διαμόρφωση συνάψεων και λειτουργία του αιματοεγκεφαλικού φραγμού κ.ά.) μέσω της ανίχνευσής τους από το πνευμονογαστρικό νεύρο (Sanlier & Kocabas, 2021) □ Το περιβάλλον του εντέρου γίνεται αισθητό από το πνευμονογαστρικό νεύρο στη περίπτωση της εντερικής φλεγμονής που προκαλείται από τη δυσβίωση επειδή διαθέτει υποδοχείς κυτταροκινών και χημειοκινών, και η παρουσία των συγκεκριμένων μορίων επηρεάζει την ανάπτυξη των νευρόγλοιων και μπορεί να μεταδοθεί στον εγκέφαλο. Αυτή η σηματοδότηση επηρεάζει την ενεργοποίηση των μικρογλοίων και τη νευροφλεγμονή, πιθανόν, οδηγώντας στις γαστρεντερικές συνοσηρότητες που παρατηρούνται σε παιδιά με αυτισμό (Davoli-Ferreira et al., 2021) □

Τα επίπεδα των κυτταροκινών στο πλάσμα, όπως ο μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας-β (TGF-β), η ιντερλευκίνη-1β (IL-1β), η IL-6, η IL-18 και ο παράγοντας νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) είναι αυξημένα σε παιδιά με ΔΑΦ. Αυτή η κατάσταση συνδέεται άμεσα με τη σοβαρότητα των προβλημάτων συμπεριφοράς στη ΔΑΦ, ενώ παράλληλα η έκθεση στο στρες προκαλεί αλλαγές στη σύνθεση του μικροβιόκοσμου. Η διαταραχή, λοιπόν, της σύνθεσης του εντερικού μικροβιόκοσμου, και κατ' επέκταση της παραγωγής αυτών των μεταβολιτών μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του ΚΝΣ και ΕΝΣ (Sanlier & Kocabas, 2021) .



Εικόνα 2. Επικοινωνία εγκεφάλου-εντέρου (Suganya & Koo, 2020) □

1.3.3 Διαταραχές στο Φάσμα του Αυτισμού και δυσβίωση.

Οι Διαταραχές στο Φάσμα του Αυτισμού (ΔΑΦ) είναι ένα σύνολο νευροαναπτυξιακών διαταραχών οι οποίες περιλαμβάνουν δυσκολίες στην επικοινωνία και την κοινωνικοποίηση σε συνδυασμό με υιοθέτηση περιοριστικών και επαναλαμβανόμενων συμπεριφορών. Χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ετερογένεια, καθώς υπάρχει ένα ευρύ φάσμα συμπεριφορικών εκδηλώσεων της διαταραχής (Dinan & Cryan, 2017) □ Ο επιπολασμός των ΔΑΦ παγκοσμίως ανέρχεται στο 0,1%-0,8% (Fombonne, 2009) □ Η αιτιολογία των ΔΑΦ δεν είναι γνωστή μέχρι σήμερα. Παραδοσιακά, η έρευνα εστίαζε σε γενετικούς παράγοντες, παρ' ότι μικρή μερίδα των πασχόντων είχε βρεθεί με κάποιο σχετικό γενετικό υπόβαθρο (Dinan & Cryan, 2017) □ Πιθανόν ευθύνεται ένας συνδυασμός γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων.

Παρά τον συμπεριφορικό ορισμό, πολλά παιδιά με ΔΑΦ εμφανίζουν ιατρικής φύσης συννοσηρότητες, οι οποίες περιλαμβάνουν και γαστρεντερικές διαταραχές (Tan et al., 2021). Οι κυριότερες είναι η χρόνια δυσκοιλιότητα ή διάρροια, που φαίνεται να συνυπάρχουν με ΔΑΦ σε ποσοστό 30-50%, με το φαινόμενο αυτό να μην είναι πλήρως κατανοητό. Πρόσφατες έρευνες ισχυρίζονται ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος και οι μεταβολίτες του μπορεί να συνδέονται με αυτές τις συννοσηρότητες, ενώ ενδέχεται να υπάρχει κάποια επίδραση και στα συμπεριφορικά συμπτώματα των ΔΑΦ (Kang et al., 2018) □ Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται σθεναρά καθώς η σοβαρότητα των αλλαγών στην γαστρεντερική οδό και οι εντερικές διαταραχές που συνυπάρχουν με την νόσο αυξάνεται αναλογικά με τα συμπεριφορικά συμπτώματα (Tan et al., 2021). □ Ακόμα, έχει παρατηρηθεί έναρξη της νόσου μετά από αντιμικροβιακή θεραπεία (όψιμος αυτισμός) αλλά και μείωση συμπτωμάτων του αυτισμού με λήψη αντιβιοτικής θεραπείας έναντι βακτηρίων που βρίθουν στις δυσβιωτικές καταστάσεις, και επανεμφάνισή τους με τον τερματισμό αυτής (Jayachandran et al., 2018) □ Ενδιαφέρον είναι πως σε μια μελέτη που έγινε μεταφορά μικροβιακών κοινοτήτων του εντέρου ασθενών με ΔΑΦ σε ποντίκια που δεν είχαν δικό τους εντερικό μικροβιόκοσμο (germ-free), εμφάνισαν χαρακτηριστικές αυτιστικές συμπεριφορές (επαναλαμβανόμενη συμπεριφορά, μειωμένη κίνηση και μειωμένη επικοινωνία σε σύγκριση με ποντίκια που αποικίστηκαν με δείγματα μικροβιακών κοινοτήτων από τυπικά αναπτυσσόμενους οργανισμούς) (Strati et al., 2017) □

Η σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος σε παιδιά με ΔΑΦ διαφέρει σε σχέση με αυτή των ατόμων με φυσιολογική ανάπτυξη (Strati et al., 2017) □ Υπό διερεύνηση βρίσκεται ακόμα εάν αυτό προκύπτει από την αύξηση των παθογόνων μικροβίων, ή τη μείωση αυτών που προσφέρουν οφέλη στην υγεία (Kang et al., 2018) □ Σε κάθε περίπτωση, το φαινόμενο της δυσβίωσης που παρατηρείται χαρακτηρίζεται από μειωμένους πληθυσμούς από το φύλο *Bacteroidetes*, το γένος *Bifidobacterium*, το οποίο μέσω των αντιφλεγμονωδών δράσεων του θα μπορούσε να ασκεί κάποιο προστατευτικό ρόλο στις ΔΑΦ, καθώς και των πληθυσμών των γενών *Prevotella* και *Coprococcus*, που είναι υπεύθυνα για την ζύμωση των υδατανθράκων. Από την άλλη, τα γένη *Lactobacillus*, *Clostridium* και *Desulfovibrio* είναι αυξημένα. Ειδικότερα για τα *Clostridium* spp. και *Desulfovibrio* spp., η επιβάρυνση των εκδηλώσεων ενδεχομένως πυροδοτείται από τις νευροτοξίνες και τις κυτταροτοξικές ουσίες αντίστοιχα, η οποίες αποτελούν παραπροϊόντα του μεταβολισμού τους. Αυξημένοι έχουν βρεθεί και ορισμένοι ζυμομύκητες. Οι πληθυσμοί του *Candida albicans* είναι 2 φορές υψηλότεροι στο έντερο παιδιών με ΔΑΦ. Για τον μηχανισμό με τον οποίο συμβάλει στην εκδήλωση συμπεριφορικών εκδηλώσεων, υπεύθυνες έχουν αναφερθεί διάφορες τοξίνες που μπορεί να παράγει. (Li et al., 2017; Fattorusso et al., 2019; Hughes et al., 2018) □

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΠΡΕΒΙΟΤΙΚΑ

2.1 Πρεβιοτικά

2.1.1 Τι είναι τα πρεβιοτικά

Η τελευταία αναθεώρηση του ορισμού των πρεβιοτικών έγινε το 2017 από την Διεθνή Επιστημονική Ένωση Προβιοτικών και Πρεβιοτικών (International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics, ISAAP), ως «υπόστρωμα που χρησιμοποιείται επιλεκτικά από μικροοργανισμούς του ξενιστή που έχουν όφελος για την υγεία» (Gibson et al., 2017) □ Ωστόσο, για να θεωρηθεί ένα συστατικό ως πρεβιοτικό, θα πρέπει επιπρόσθετα να είναι ανθεκτικό στην οξύτητα του στομάχου, την υδρόλυση των πεπτικών ενζύμων και την γαστρεντερική απορρόφηση, να υφίσταται ζύμωση από τον εντερικό μικροβιόκοσμο και να προωθεί την ανάπτυξη των βακτηρίων που είναι ωφέλιμα για τον ξενιστή (Guarino et al., 2020) □ Αυτά τα άπεπτα συστατικά της τροφής έχουν χρησιμοποιηθεί στον άνθρωπο με σκοπό την αύξηση συγκεκριμένων μικροβιακών πληθυσμών, η οποία θα επιφέρει τα αντίστοιχα οφέλη στην υγεία. Έτσι, τα πρεβιοτικά δεν είναι απλά ενισχυτικά της ανάπτυξης των “καλών” βακτηρίων του εντερικού μικροβιόκοσμου, αλλά έχουν αναγνωριστεί και για την ολιστική επίδρασή τους στον μεταβολισμό και την φυσιολογία του οργανισμού. Μάλιστα, αποτελούν αρκετά δημοφιλή διαιτητική προσέγγιση για την τροποποίηση του εντερικού μικροβιόκοσμου σε διάφορες ασθένειες στις οποίες αυτός διαταράσσεται, καθώς είναι αποτελεσματικά, ασφαλή, προσβάσιμα και οικονομικά προσιτά (Sanders et al., 2019) □

2.1.2 Ποια είναι τα πιο γνωστά πρεβιοτικά

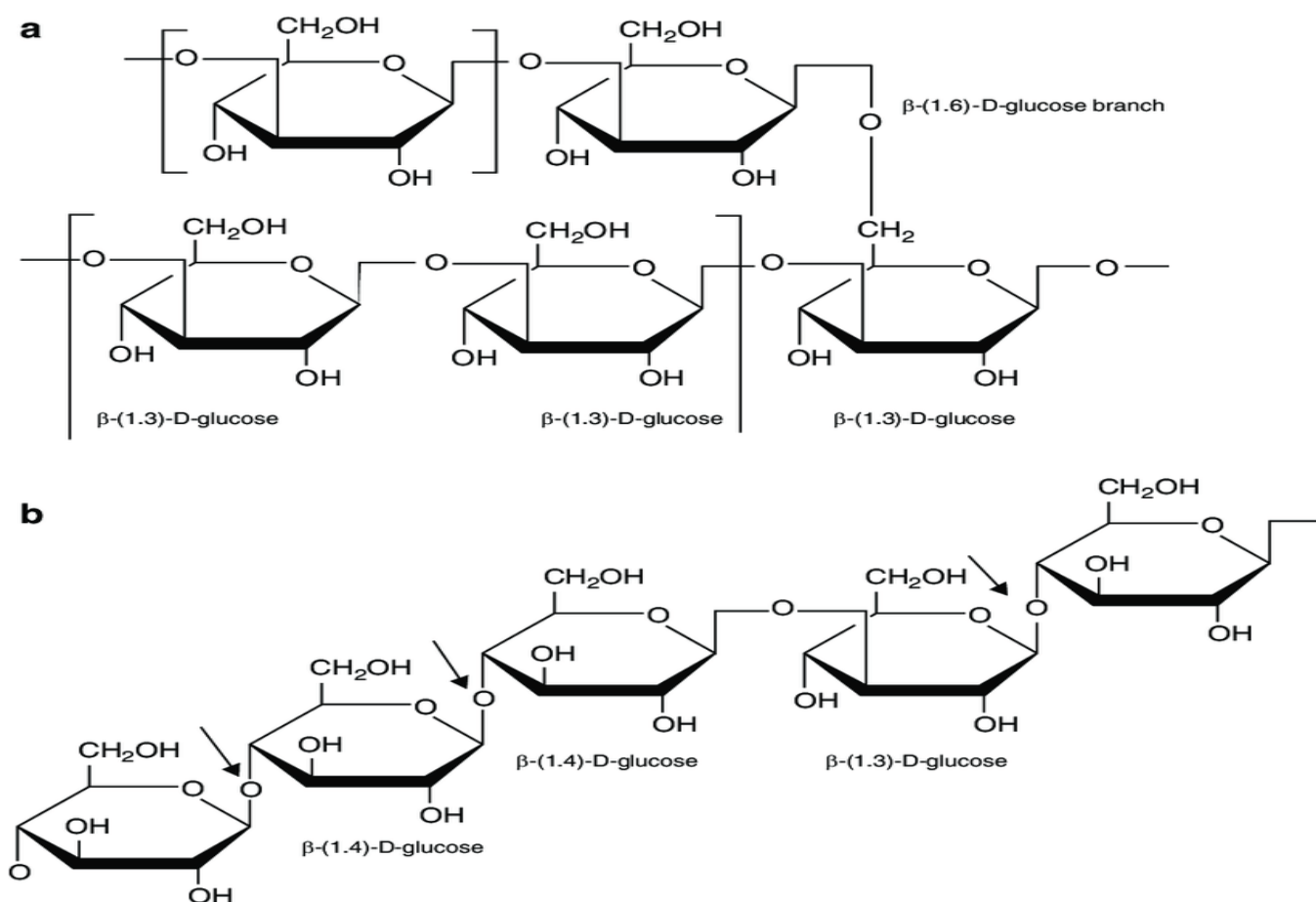
Τα αναγνωρισμένα και ενδελεχώς μελετημένα πρεβιοτικά είναι οι φρουτοολιγοσακχαρίτες (FOS), οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS) και η ινουλίνη. Φαίνεται να προωθούν την ανάπτυξη κυρίως των βακτηριακών γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* (Zmora et al., 2018; Suganya & Koo, 2020) □ Τρόφιμα που θεωρούνται πλούσιες πηγές πρεβιοτικών είναι τα μανιτάρια, η βρώμη, το κριθάρι, τα φύκια και τρόφιμα πλούσια σε φυτικές ίνες (Jayachandran et al., 2018) □ Πρεβιοτικά βρίσκονται ακόμα και στο μητρικό γάλα: είναι οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες και ενεργοποιούν την ανάπτυξη πληθυσμών, όπως τα *Bifidobacteria* (Milani, Duranti, Bottacini, Casey, Turrone, Mahony, Belzer, Delgado Palacio, et al., 2017) □

Με την εξέλιξη των τεχνικών μελέτης του μικροβιώματος, όπως οι μέθοδοι αλληλούχησης υψηλής απόδοσης, έχουν εμπλουτιστεί οι γνώσεις μας σχετικά με τη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου και είναι εφικτό να αναγνωριστούν και άλλες ουσίες- υποψήφια πρεβιοτικά που επηρεάζουν τον αποικισμό (Gibson et al., 2017) □

2.2 Β- γλυκάνες και *Pleurotus eryngii*

2.2.1 Β- γλυκάνες- δράσεις

Οι β-γλυκάνες είναι πολυμερή του μονοσακχαρίτη β-D-γλυκόζη, ενωμένα με β-1,3, β-1,4 ή β-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς □ Οι δομές των β-γλυκάνων ποικίλουν ανάλογα με τις διάφορες πηγές τους . Στα μανιτάρια οι β-γλυκάνες έχουν βραχείς β(1,6) δεσμούς με διακλαδώσεις από τον β(1,3) σκελετό, ενώ οι β-γλυκάνες της βρόμης και του κριθαριού έχουν γραμμικούς β(1,4) δεσμούς, που διαχωρίζουν τη βραχύτερη αλυσίδα του β (1,3) σκελετού. Οι β-γλυκάνες διαφορετικής προέλευσης διαφέρουν και ως προς τη βιολογική τους δράση, ανάλογα με τον χημικό τους τύπο (Jayachandran et al., 2018) □



Εικόνα 3. Δομή β-γλυκάνων. α) Δομή β-γλυκάνων που προέρχονται από μανιτάρια β) α) Δομή β-γλυκάνων που προέρχονται από δημητριακά (Abuajah, 2019).

Παρότι η μελέτη των β-γλυκάνων έχει ξεκινήσει πρόσφατα, τα φυσικά προϊόντα που τις περιέχουν χρησιμοποιούνται προς όφελος τις υγείας του ανθρώπου εδώ και χιλιάδες χρόνια. Οι β-γλυκάνες που προέρχονται από την βρόμη και το κριθάρι μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων και βοηθούν στην διατήρηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Από την άλλη, Οι β- γλυκάνες που προέρχονται από τα μανιτάρια θεωρούνται ισχυρό ανοσοδιεγερτικό και ανταγωνιστής κατά των καλοθών και κακοήθων όγκων. Αναφορικά με τον εντερικό μικροβιόκοσμο, ενισχύουν την υποστήριξη που προσφέρει στην ακεραιότητα του εντέρου μέσω παραγώγων που προκύπτουν από τις ζυμώσεις τους, την συγκομιδή ενέργειας αλλά και την προστασία του ξενιστή από παθογόνους μικροοργανισμούς. Είναι υποψήφιος πρεβιοτικές ουσίες, καθώς έχει αποδειχθεί *in vivo* και *in vitro* ότι προωθούν την ανάπτυξη των γενών *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* (Jayachandran et al., 2018; Zhu et al., 2015; Mitsou et al., 2020; Kerezoudi et al., 2021)□

2.2.2 Μανιτάρια και *Pleurotus eryngii*

Υπάρχουν πολλές φυσικές πηγές β-γλυκανών, όμως σε μεγαλύτερο βαθμό παρασκευάζονται στα κυτταρικά τοιχώματα των μυκήτων, με τους πιο σημαντικούς παραγωγούς να ανήκουν στους Ασκομύκητες και στους Βασιδιομύκητες. Στους Βασιδιομύκητες ανήκουν εδώδιμα και μη μανιτάρια, τα οποία μπορούν να συλλεχθούν από τη φύση, ή να καλλιεργηθούν. Πιο συγκεκριμένα, μερικά είδη του γένους *Pleurotus* spp., αναγνωρίζεται ότι είναι από τις πιο σημαντικές πηγές β-γλυκανών (Zhu et al., 2015)□ Το είδος *Pleurotus eryngii* ή Πλευρότους ο Ερύγγιος είναι εδώδιμο και φαρμακευτικό, ευρέως διαδεδομένο στην Μεσόγειο, την Κεντρική Ευρώπη, την Κεντρική Ασία και την Βόρεια Αφρική. Συνιστά το ένα από τα δύο είδη του γένους *Pleurotus* (το άλλο είναι το *Pleurotus Oyster*) που μπορεί να επιβιώσει στην ρίζα ή το στέλεχος ζωντανών φυτών της οικογένειας των Σελινοειδών. Περιέχει διάφορα βιοδραστικά συστατικά, των οποίων οι επιδράσεις φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 1 (Stajić et al., 2009).

Πίνακας 1. Επιδράσεις βιοδραστικών συστατικών του *Pleurotus eryngii* (Stajić et al., 2009) □

Βιοδραστικά συστατικά	Επιδράσεις							
	Ανοσοτροποποιητικό	Αντικαρκινικό	Αντι - υπερχοληστερολαιμικό	Αντιβακτηριακό	Αντιικό	Αντιμυκητιακό	Αντιοξειδωτικό	Αντιοστεοπορωτικό
β 1,3- γλυκάνες	χ	χ						
Λοβαστατίνη			χ					
Πλευρερίνη					χ			
Ερυγγίνη						χ		
Ριβονουκλεάση	χ				χ			
17β- Οιστραδιόλη								χ
Ερυγγολυσίνη		χ		χ				
Εργοθειονίνη							χ	
Πρωτεΐνη xb68AB					χ			

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι υδατοδιαλυτοί πολυσακχαρίτες που διαθέτει αποτελούν τα κυριότερα δραστικά συστατικά του, τα οποία έχουν κατηγοριοποιηθεί φαρμακολογικά ως τροποποιητές βιολογικής απόκρισης, λόγω της ενίσχυσης του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή που προκαλούν (Stajić et al., 2009) □ Συγκεκριμένα, υπολογίζεται πως διαθέτει εξαιρετικά υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκάνες τύπου α και τύπου β σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη του γένους *Pleurotus* (Avni et al., 2017) □

Το συγκεκριμένο μανιτάρι, πέραν της υψηλής περιεκτικότητας σε β-γλυκάνες, έχει και υψηλή διατροφική αξία. Περιέχει υδατάνθρακες (9,6% του νωπού βάρους), με σημαντικό μέρος τους να αποτελείται από διαιτητικές ίνες (4,64 % του νωπού βάρους, 4,11% να είναι αδιάλυτες και 0,53% διαλυτές). Η συνολική περιεκτικότητα σε άζωτο είναι περίπου 5,3%, με την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη να κυμαίνεται μεταξύ 1,88% και 2,65%. Ακόμα, τους βασιδιομύκητες χαρακτηρίζουν σημαντικές συγκεντρώσεις βιταμινών (C, A, B3, B2, B1 και D) και μετάλλων (K, Mg, Na και Ca), πολύ χαμηλές ποσότητες λιπιδίων (0,8% του νωπού βάρους) αλλά και υψηλή υγρασία (μεταξύ 86,6% και 91,7%) και τους καθιστούν προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί πως τα χημικά και διατροφικά χαρακτηριστικά

των βασιδιομυκήτων γενικότερα εξαρτώνται από το στέλεχος, το αναπτυξιακό στάδιο, αλλά και τον τύπο του θρεπτικού υποστρώματος (Stajic et al., 2009) □

2.3 Επίδραση των γλυκάνων στον εντερικό μικροβιόκοσμο

2.3.1 Μηχανισμός επίδρασης στον εντερικό μικροβιόκοσμο

Τα πεπτικά ένζυμα στον άνθρωπο μπορούν να διασπάσουν λίγους από τους γλυκοζιτικούς δεσμούς των πολυσακχαριτών του αμύλου, μέσω της παγκρεατικής αμυλάσης και της αμυλάσης του σιέλου, και τους δισακχαρίτες σουκρόζη και λακτόζη, μέσω των ενζύμων σουκράση και λακτάση που βρίσκονται στην ψυκτροειδή παρυφή των κυττάρων του εντέρου. Οι υδατάνθρακες που διαφεύγουν άπεπτοι στο παχύ έντερο, όπως διάφορες γλυκάνες, αποτελούν υποστρώματα προς ζύμωση για τα βακτήρια του εντέρου (Holscher, 2017) □ Ενώ το ανθρώπινο γονιδίωμα κωδικοποιεί περιορισμένο αριθμό γλυκοζιτικών υδρολασών και μη πολυσακχαριτικών λυασών (carbohydrate-active enzymes ή CAZymes), που είναι υπεύθυνες για την πέψη των γλυκάνων, το μικροβίωμα φαίνεται να κωδικοποιεί δεκάδες χιλιάδες από αυτά τα ένζυμα. Τα βακτήρια που μπορούν να αποικοδομήσουν τις γλυκάνες λέγονται πρωτογενείς αποικοδομητές και περιλαμβάνουν τα γένη *Bacteroides*, *Bifidobacterium* και *Ruminococcus*. Το ανταγωνιστικό τους πλεονέκτημα έγκειται στην ικανότητά τους να προβλέπουν την βακτηριακή πυκνότητα με βάση τα πρότυπα αποικοδόμησης των γλυκάνων. Για παράδειγμα, στο γένος *Bacteroides*, η γενετική γκάμα αυτών των CAZymes είναι προγνωστική μιας επαγόμενης από την γλυκάνη ανταγωνιστικότητας συγκεκριμένων βακτηριακών πληθυσμών, και παίζει σημαντικό ρόλο στην εγκαθίδρυση της προσαρμοστικότητας των μελών αυτού του γένους στο έντερο. Κατά την έλλειψη τροφής, τα βακτήρια μπορούν να κάνουν μεταστροφή σε διάφορες πηγές ενέργειας, χρησιμοποιώντας αισθητικούς και ρυθμιστικούς μηχανισμούς που ελέγχουν την έκφραση γονιδίων. Είδη που μπορούν εύκολα να προσαρμοστούν στις μεταβαλλόμενες πηγές ενέργειας, όπως μέλη του φύλου *Bacteroidetes*, που διαθέτουν αρκετά μεγάλο αριθμό γονιδίων που κωδικοποιούν CAZymes, ευνοούνται. Η πρωτογενής αποικοδόμηση των γλυκάνων έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση γλυκόζης, η οποία στη συνέχεια ζυμώνεται από δευτερογενείς αποικοδομητές και απελευθερώνονται ουσίες όπως οξικό, προπιονικό, μυρμηκικό, βουτυρικό, γαλακτικό και ηλεκτρικό οξύ (SCFAs), και ξεκινά ένα σύνθετο διασταυρούμενο μεταβολικό δίκτυο (Zmora et al., 2018)

2.3.2 Επίδραση στον εντερικό μικροβιόκοσμο ασθενών με ΔΑΦ

Ο ρόλος του εντερικού μικροβιόκοσμου στη διάγνωση, την παρακολούθηση και τη θεραπεία των ΔΑΦ δεν είναι ακόμη σαφής και η αμφίδρομη σχέση του με το νευρικό σύστημα καθιστά δύσκολη τη δημιουργία σχέσης αιτίου-αποτελέσματος (Sanlier & Kocabas, 2021) □ Από τις διάφορες θεραπείες που έχουν προταθεί για τις ΔΑΦ, μεγάλο ενδιαφέρον έχουν προσελκύσει τα πρεβιοτικά. Η αλλαγή της σύνθεσης του εντερικού μικροβιόκοσμου που μπορεί να προκαλέσουν τα πρεβιοτικά μπορεί να επηρεάσει τα συμπτώματα ή και την εξέλιξη του Συνδρόμου μέσω των ανοσολογικών, ενδοκρινικών και άμεσων νευρολογικών μονοπατιών. Τοπικά, αυτές οι παρεμβάσεις μπορούν να μετατοπίσουν την μικροβιακή κοινότητα προς τα ωφέλιμα βακτήρια και να περιορίσουν αυτά που παράγουν παθογόνες ενώσεις. Αυτά τα ωφέλιμα βακτήρια μπορεί να αυξήσουν την παραγωγή μικροβιακών μεταβολιτών, πχ SCFAs , και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, που με τη σειρά τους ενισχύουν την λειτουργία του εντερικού φραγμού και μειώνουν την φλεγμονή του εντέρου, αλλά και τη συστηματική φλεγμονή (Tan et al., 2021) □

Λίγες μελέτες παρέμβασης έχουν διενεργηθεί με χορήγηση πρεβιοτικών σε παιδιά με ΔΑΦ. Τα αποτελέσματά τους ωστόσο ήταν θετικά, με βελτίωση στην εκδήλωση των συμπεριφορικών συμπτωμάτων (αντικοινωνικότητα, ευερεθιστότητα), αλλά και των γαστρεντερικών διαταραχών (Grimaldi et al., 2018; Sanctuary et al., 2019).

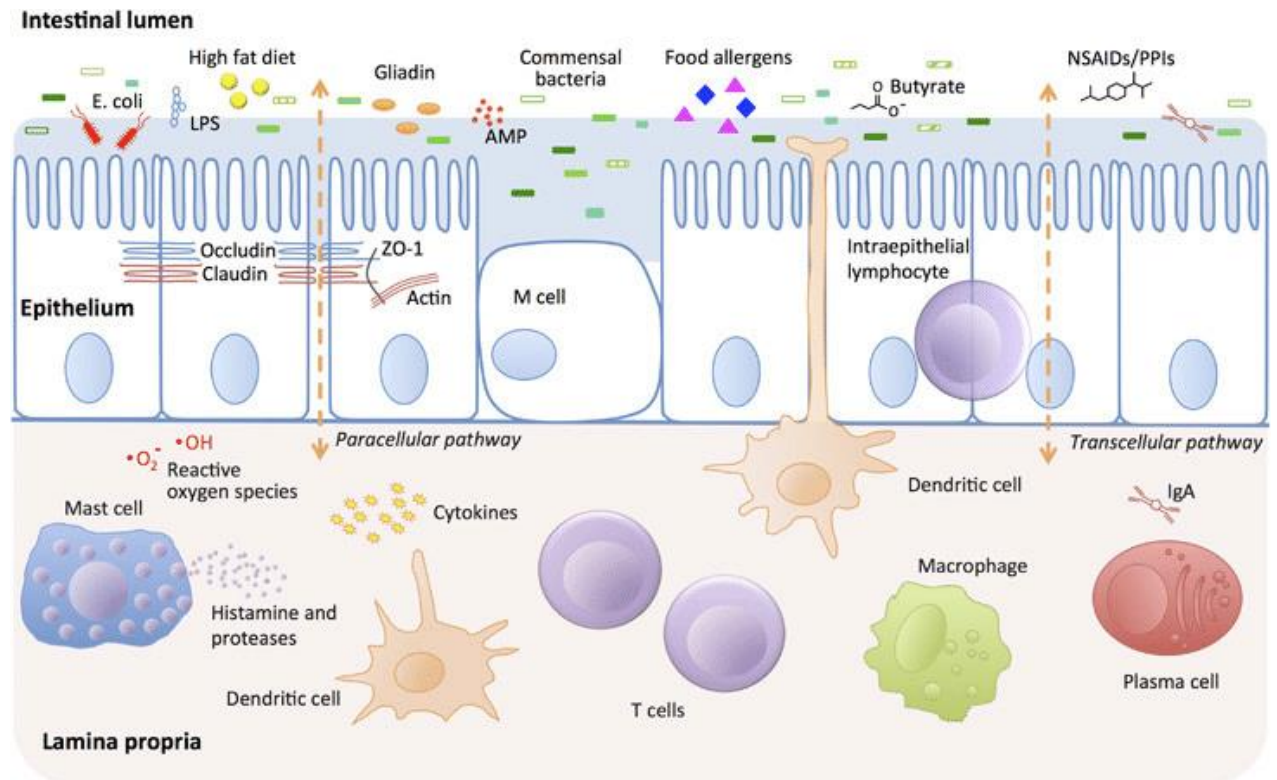
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΦΡΑΓΜΟΣ

3.1 Ορισμός

Η εσωτερική επιφάνεια του αυλού του γαστρεντερικού σωλήνα από το στόμαχο μέχρι τον πρωκτό καλύπτεται από μία ενιαία στοιβάδα επιθηλιακών κυττάρων, που ενώνονται μεταξύ τους κατά μήκος των αιχμών του αυλού των επιφανειών με στεγανές συνδέσεις. Στο επιθήλιο αυτό περιλαμβάνονται εξωκρινή κύτταρα που εκκρίνουν βλέννα στο εσωτερικό του αυλού, αλλά και ενδοκρινή κύτταρα που απελευθερώνουν ορμόνες στην αιματική κυκλοφορία (Vander, 2001). Ένας από τους σημαντικότερους ρόλους του επιθηλίου αυτού στο έντερο είναι η πέψη της τροφής και η απορρόφηση θρεπτικών συστατικών και διατροφικών παραγόντων. Ωστόσο, εκτός αυτού, ένα υγιές επιθήλιο παρέχει και έναν βιοχημικό και φυσιολογικό φραγμό, αποτελώντας την διεπαφή μεταξύ εσωτερικού και εξωτερικού περιβάλλοντος. Εμποδίζει την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών, τοξινών και αλλεργιογόνων από τον αυλό στους ιστούς του βλεννογόνου (Suzuki, 2020)□

Όσον αφορά τα συστατικά του εντερικού φραγμού και τις επιμέρους λειτουργίες τους, σε πρώτο στάδιο στον αυλό αποικοδομούνται βακτήρια και αντιγόνα από το γαστρικό οξύ και τον παγκρεατικό χυμό. Έπειτα, τα “καλά” βακτήρια του μικροβιόκοσμου αναστέλλουν τον αποικισμό παθογόνων παραγόντων με την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, την τροποποίηση του pH του περιεχομένου του αυλού και ανταγωνίζοντας τα παθογόνα για θρεπτικά συστατικά. Στη συνέχεια, υπάρχει το μικροκλίμα κοντά στο επιθήλιο αποτελούμενο από το μη αναδευόμενο στρώμα νερού, γλυκοκάλυκες και το στρώμα βλέννας που εμποδίζει τη βακτηριακή προσκόλληση και περιέχει αντιμικροβιακά προϊόντα, που εκκρίνονται από τα κύτταρα Paneth και ανοσοσφαιρίνη A (IgA), που εκκρίνουν τα εντεροκύτταρα. Κάτω από το μη αναδευόμενο στρώμα νερού, τους γλυκοκάλυκες και το στρώμα βλέννας, υπάρχει το μονόστιβο επιθήλιο που περιλαμβάνει κύτταρα Paneth, εντεροκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα που διαχωρίζονται με το κορυφαίο σύμπλεγμα συνδέσεων (M. Camilleri et al., 2012; Schoultz & Keita, 2020). Το χόριο είναι ένα στρώμα συνδετικού ιστού που βρίσκεται ακριβώς κάτω από τα επιθηλιακά κύτταρα και αποτελείται από έμφυτα και προσαρμοστικά ανοσοκύτταρα, όπως ουδετερόφιλα, T-ρυθμιστικά κύτταρα, μακροφάγα και

μαστοκύτταρα (Schoultz & Keita, 2020) □ Παίζει καθοριστικό ρόλο στην καλλιέργεια της υγιούς επικοινωνίας μεταξύ του μικροβιόκοσμου και των κυττάρων του ανοσοποιητικού (Chelakkot et al., 2018) □



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση εντερικού φραγμού (König et al., 2016).

3.2 Λειτουργικός ρόλος του εντερικού φραγμού

3.2.1 Συνδέσεις και Στεγανές συνδέσεις(TJ)

Για τη διατήρηση της ακεραιότητας του φραγμού, τον σπουδαιότερο ρόλο παίζουν τα επιθηλιακά κύτταρα. Η ακεραιότητα του εντερικού φραγμού επιτρέπει τη διαπερατότητα βασικών ιόντων, θρεπτικών ουσιών και νερού, αλλά περιορίζει την είσοδο βακτηριακών τοξινών και παθογόνων. Η μεταφορά μορίων μέσω της επιθηλιακής στιβάδας πραγματοποιείται μέσω τριών κύριων οδών: της διακυτταρικής οδού με παθητική διάχυση μέσα από τις κυτταρικές μεμβράνες, της διακυτταρικής οδού με τη μεσολάβηση του φορέα/υποδοχέα και της παρακυτταρικής οδού με παθητική διάχυση μεταξύ των παρακείμενων κυττάρων (Chelakkot et al., 2018) □

Στον παρακυτταρικό χώρο μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, από την κορυφή έως τη βάση της πλαγιοβασικής μεμβράνης υπάρχουν τρία σύνολα μεσοκυττάρων συνδέσεων. Από το εσωτερικό του αυλού και προς την αιματική ροή πρώτες είναι οι στεγανές συνδέσεις (Tight Junctions ή TJ), που ρυθμίζουν τη ροή των ιόντων, του νερού και των μικρών μορίων μέσω της σύνθεσης πρωτεϊνών στο σύμπλεγμα των συνδέσεων. Κάτω από τις στεγανές συνδέσεις υπάρχουν οι συνδέσεις προσκόλλησης (Adherence Junctions), οι οποίες είναι σημαντικές για τη σηματοδότηση των κυττάρων και την αποκατάσταση του επιθηλίου, και τελευταία τα δεσμοσώματα που υποστηρίζουν τη σταθερότητα του επιθηλίου. Όλες μαζί αποτελούν το κορυφαίο σύμπλεγμα συνδέσεων, το οποίο υποστηρίζει το πυκνό φράγμα των μικρολαχνών και ρυθμίζει τη λειτουργία του εντερικού φραγμού και τη μεταφορά των ουσιών παρακυτταρικά (Michael Camilleri, 2019; Bischoff et al., 2014)□

Οι στεγανές συνδέσεις, είναι το πιο κορυφαίο συστατικό των επιθηλιακών συνδέσεων. Εκτός από τις σηματοδοτικές τους ιδιότητες και την ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης, έχουν διττό ρόλο στη ρύθμιση της μεταφοράς των μορίων. Διακυτταρικά, μεταξύ της κορυφαίας και της πλαγιοβασικής περιοχής κυττάρου, συντελούν στην διατήρηση ενσωματωμένων στην μεμβράνη πρωτεϊνών στην κορυφαία ή πλαγιοβασική περιοχή επικουρώντας την διατήρηση της πολικότητας της. Στην παρούσα πτυχιακή θα εστιάσουμε στην παρακυττάρια οδό, που ρυθμίζουν την διάχυση νερού, ηλεκτρολυτών και μικρών μορίων μεταξύ γειτονικών κυττάρων από τον αυλό προς τον μεσοκυττάριο χώρο και το συνδετικό ιστό και αντίστροφα. Αυτό εξαρτάται από τον αριθμό και την πολυπλοκότητα των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, που αποτελούν συστατικά τους (Dokladny et al., 2016).

3.2.2 Δομή και φυσιολογία TJ

Οι στεγανές συνδέσεις σχηματίζουν μια συνεχή δομή που ομοιάζει με ζώνη. Αποτελούνται από ένα σύνολο διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και τη κυτταροπλασματική πλάκα, ένα σύνθετο δίκτυο πρωτεϊνών-ικριωμάτων και πρωτεϊνών-τελεστών, που συνδέει τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με τον κυτταροσκελετό ακτινομουσίνης του κυττάρου. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των στεγανών συνδέσεων χωρίζονται σε 3 ομάδες: 1)Τις πρωτεΐνες με 1 διαμεμβρανικό σκέλος, στις οποίες ανήκουν τα μόρια προσκόλλησης συνδέσεων (Junctional adhesion molecules [JAM]), η Crb3 (ομόλογο πρωτεΐνης Crumbs 3) και ο CAR (υποδοχέας ιού coxsackie και αδενοϊού).

2)Τις πρωτεΐνες με 3 διαμεμβρανικά σκέλη, όπως η Bves (επικαρδιακή ουσία αιμοφόρων αγγείων)

3) Τις πρωτεΐνες με 4 διαμεμβρανικά σκέλη, στις οποίες ανήκουν η αποφραξίνη (occludin), κλαουδίνη (claudins) και η τρισελουλίνη (tricellulin). Πρόκειται για ενσωματωμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες που επεκτείνονται μέχρι τους παρακυτταρικούς χώρους (Günzel & Yu, 2013)□

Πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής πλάκας είναι οι ζονουλίνες (zonula occludens [ZO]), και η κιγκουλίνη (cingulin), που αλληλεπιδρούν με τον κυτταροσκελετό και παίζουν τον ρόλο του ικριώματος, αλλά έχουν και σηματοδοτικό ρόλο. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες συνδέουν γειτονικά κύτταρα με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω των πρωτεϊνών-ικριωμάτων. Μαζί με τις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες σηματοδότησης, οι πρωτεΐνες στεγανών συνδέσεων ενεργοποιούν μια πληθώρα κυτταρικών διεργασιών για τη διατήρηση της ακεραιότητας του φραγμού (Chelakkot et al., 2018)□

3.2.3 Πρωτεΐνες των στεγανών συνδέσεων

Αν και είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι στεγανές συνδέσεις είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ακεραιότητας του φραγμού, η ακριβής λειτουργία κάθε πρωτεΐνης τους μεμονωμένα παραμένει αδιευκρίνιστη. Ωστόσο, μπορούν να παρουσιαστούν αδρά οι λειτουργίες των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στη παρούσα εργασία:

ZO: Η ζονουλίνη-1 ήταν η πρώτη πρωτεΐνη που αναγνωρίστηκε ως δομική πρωτεΐνη των στεγανών συνδέσεων το 1986 (Stevenson et al., 1986)□ Οι ζονουλίνες είναι μέλη της ομόλογης οικογένειας των σχετιζόμενων με την μεμβράνη γουανυλικών κινασών (Membran-Associated Guanylate Kinase ή MAGUK). Το ήμισυ του αμινοτελικού τους άκρου είναι δομημένο όπως άλλες MAGUK πρωτεΐνες και περιλαμβάνει :

1) Τρεις περιοχές PDZ. Το PDZ είναι ακρωνύμιο των 3 πρώτων πρωτεϊνών στις οποίες ανακαλύφθηκαν αυτές οι περιοχές: PSD95 (πρωτεΐνη μετασυναπτικής πυκνότητας), Dlg1 (καταστολέας μεγάλου όγκου δίσκου *Drosophila*) και ZO-1 (πρωτεΐνη zonula occludens-1)

2) Μία Src homology-3 (SH3) δομή

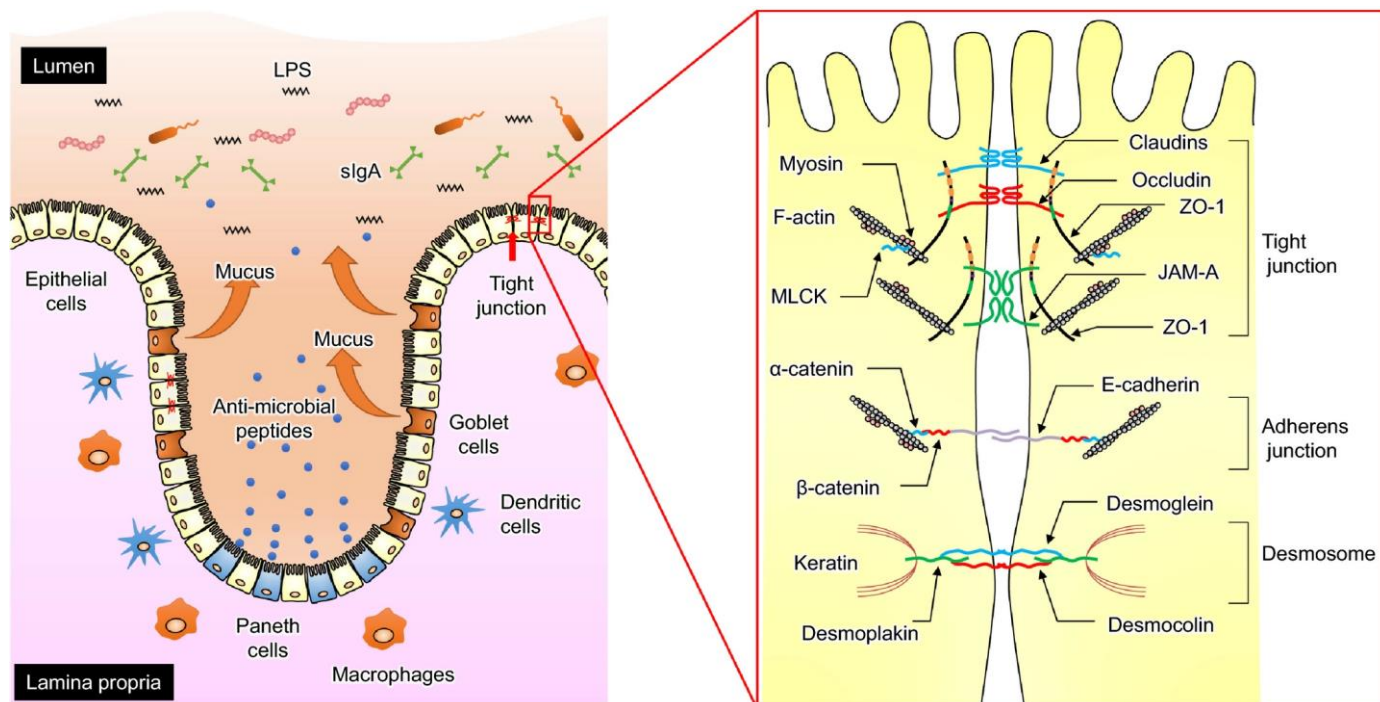
3) Μία περιοχή ομόλογη των γουανυλικών κινασών (GUK) (Fanning & Anderson, 2009)□

Όσον αφορά τα μοτίβα δέσμευσης μεταξύ των διαμεμβρανικών πρωτεϊνών και των πρωτεϊνών της κυτταροπλασματικής πλάκας, η πρώτη PDZ δομή (PDZ1), δεσμεύεται με τις κλαουδίνες, η τρίτη PDZ δομή (PDZ3) δεσμεύεται με τα JAM και η U5-GUK δομή δεσμεύεται με την αποφραξίνη και την τρισελουλίνη. Το καρβοξυτελικό άκρο δεσμεύεται με την F-ακτίνη του κυτταροσκελετού ή με άλλες πρωτεΐνες δέσμευσης της ακτίνης, όπως η πρωτεΐνη 4.1 και η κορτακτίνη (Fanning & Anderson, 2009)□

Κλαουδίνες: Οι περισσότερες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των στεγανών συνδέσεων ανήκουν στην οικογένεια των κλαουδίνων, η οποία περιλαμβάνει τουλάχιστον 27 μέλη. Είναι τετρασπανίνες, δηλαδή διαθέτουν τέσσερις έλικες που η καθεμία διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και ενώνονται μεταξύ τους, σχηματίζοντας μια ενδοκυτταρική και δύο εξωκυτταρικές θηλιές. Το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο τους βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα (Tsukita et al, 2018). Με βάση τη λειτουργία εντός των στεγανών συνδέσεων, οι κλαουδίνες μπορούν να ομαδοποιηθούν σύμφωνα με τις ιδιότητες φραγμού ή σχηματισμού καναλιών για διαφορετικές διαλυμένες ουσίες. Οι κλαουδίνες 1, 3, 5, 11, 14, και 19, για παράδειγμα, έχουν χαρακτηριστεί κυρίως ως “σφραγιστικές”, ενώ οι κλαουδίνες 2, 10a, 10b, 15 και 17 κυρίως σχηματίζουν κανάλια (Heinemann & Schuetz, 2019) □ Πλήθος μελετών δείχνουν ότι η υπερέκφραση ή υποέκφραση των κλαουδίνων, και οι φυσικές ή τεχνητά εισαγόμενες μεταλλάξεις τους, προκαλούν αλλαγές στην παρακυτταρική διαπερατότητα (Günzel & Yu, 2013) □

Σε επίπεδο αμινοξέων, είναι χαρακτηριστική μια αλληλουχία εντός της μιας εξωκυτταρικής θηλιάς και ένα μοτίβο δέσμευσης PDZ στο καρβοξυτελικό άκρο, μέσω του οποίου η πλειονότητα των ανθρώπινων κλαουδίνων είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει με περιοχές PDZ που διαθέτουν οι πρωτεΐνες-ικριώματα που σχετίζονται με τη στεγανή σύνδεση (Günzel & Yu, 2013) □ Ακόμα, η προλίνη 134 στην έλικα TM α3 προκαλεί μια κάμψη στην έλικα, η οποία είναι πιθανό να ρυθμίζει την μορφολογία και την προσκόλληση των σκελών των στεγανών συνδέσεων. Αυτή η δομή δημιουργεί παράλληλα περιοχές πρόσδεσης με άλλες πρωτεΐνες, όπως βακτηριακές τοξίνες (πχ η εντεροτοξίνη του *Clostridium perfringens*)(Heinemann & Schuetz, 2019) □

Αποφραξίνες (οκλουντίνες): οι αποφραξίνες είναι παρόμοιας αρχιτεκτονικής με τις κλαουδίνες όντας τετρασπανίνες, που το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο τους βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, δεν είναι ομόλογες, διαφέρουν στο μήκος και τη δομή του κυτταροπλασματικού τους σκέλους και τις εξωκυτταρικές θηλιές. Το κυτοσολικό καρβοξυτελικό άκρο της αποφραξίνης σχηματίζει μια δομή περιελιγμένης σπείρας, διμερίζεται και συνδέεται με τις ZO-πρωτεΐνες της κυτταροπλασματικής πλάκας. Αυτή η δομή σχηματίζει μια ισχυρά θετικά φορτισμένη επιφάνεια που δεσμεύει την ZO-1, αλληλεπιδρώντας κυρίως με την περιοχή GUK. Αξιοσημείωτο είναι πως η φωσφορυλίωση της σερίνης εντός του όξινου μοτίβου δέσμευσης του τυλιγμένου πηνίου αποφραξίνης αυξάνει σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης, άρα και μείωση της διακυτταρικής διαπερατότητας (Heinemann & Schuetz, 2019) □



Εικόνα 5. Ανατομία εντερικού φραγμού, συστατικά συνδέσεων (Suzuki, 2020)

3.3 Φλεγμονή και στεγανές συνδέσεις- επίδραση σε ΚΝΣ

3.3.1 Ρύθμιση στεγανών συνδέσεων

Οι στεγανές συνδέσεις είναι απαραίτητα συστατικά του εντερικού φραγμού που βοηθούν τόσο στην ρύθμιση της διαπερατότητας στο νερό, τα ιόντα και τα θρεπτικά συστατικά, όσο και στην παρεμπόδιση της εισόδου των παθογόνων. Υπό κανονικές συνθήκες, τα συστατικά των στεγανών συνδέσεων υπόκεινται σε δυναμική ρύθμιση (Takiishi et al., 2017) □ Ο μηχανισμός ρύθμισης είναι περίπλοκος και ασαφής. Οι πρωτεΐνες των στεγανών συνδέσεων ρυθμίζονται από πολλαπλές πρωτεΐνες σηματοδότησης και μόρια σηματοδότησης. Πολλά μόρια που εμπλέκονται σε αυτές τις διαδικασίες μεταγωγής σήματος, συμπεριλαμβανομένων μικρών πρωτεϊνών που δεσμεύουν GTP και κινάσων τυροσίνης, όπως c-*Src*, c-*Yes* και πρωτεϊνική κίνησή C (PKC), έχει βρεθεί ότι εντοπίζονται στις στεγανές συνδέσεις, υποδεικνύοντας τον κεντρικό ρόλο τους στη διατήρηση της ακεραιότητας των συνδέσεων. Η μετα-μεταφραστική φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών των συνδέσεων αλλάζει δραστικά την κατανομή και τον κύκλο εργασιών της μεμβράνης. Η μετα-μεταφραστική φωσφορυλίωση της αποφραξίνης στα υπολείμματα σερίνης και θρεονίνης έχει μελετηθεί ευρέως και είναι υπεύθυνη για το άνοιγμα και τη σφράγιση στεγανών συνδέσεων (Chelakkot et al., 2018) □

Σπουδαίος, ωστόσο είναι και ο ρόλος των κυτταροκινών όπως έχει φανεί σε ένα πλήθος παθολογικών καταστάσεων. Οι δράσεις διαφόρων κυτταροκινών φαίνεται να αυξάνουν την διαπερατότητα του εντερικού φραγμού, όπως ο TNFα, ένας βασικός παράγοντας στην ενδοκύττωση της αποφραξίνης με τη μεσολάβηση της caveolin-1, που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του εντέρου. Η ιντερφερόνη-γ επιδρά στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών των συνδέσεων με τον κυτταροσκελετό ακτινομυοσίνης και μειώνει την έκφραση της ZO-1 (Chelakkot et al., 2018) □

3.3.2 Μηχανισμοί επίδρασης της φλεγμονής στο κεντρικό νευρικό σύστημα – ΔΑΦ

Εντερική φλεγμονή μπορεί να προκληθεί από τη δυσβίωση, όπως προαναφέρθηκε, μέσω της αλληλεπίδρασης των αυξημένων επιβλαβών βακτηρίων με τους τοπικούς ανοσοποιητικούς μηχανισμούς και τα μεσεγγυματικά κύτταρα. Ως εκ τούτου, το έντερο είναι μια πιθανή πηγή και της χρόνιας φλεγμονής χαμηλού βαθμού που παρατηρείται συστηματικά σε ασθενείς με ΔΑΦ (Davoli-Ferreira et al., 2021) □

Ο άμεσος τρόπος επίδρασης της φλεγμονής στο κεντρικό νευρικό σύστημα περιλαμβάνει νευρωνικά μονοπάτια. Η αλλαγή του φλεγμονώδους περιβάλλοντος του εντέρου είναι το σήμα που λαμβάνουν οι προσαγωγές ίνες του πνευμονογαστρικού νεύρου, που εκφράζουν πολυάριθμους υποδοχείς κυτταροκινών και χημειοκινών (περαιτέρω ανάλυση έχει προηγηθεί στο κεφάλαιο Νεύρωση του εντέρου και δυσβίωση) (Davoli-Ferreira et al., 2021). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παραγωγή μιας προφλεγμονώδους ενδοτοξίνης που ονομάζεται λιποπολυσακχαρίτης (LPS) και ασκεί σημαντική επιρροή στη ρύθμιση του κεντρικού νευρικού συστήματος, αυξάνοντας την δραστηριότητα περιοχών που σχετίζονται με τον έλεγχο των συναισθημάτων, όπως η αμυγδαλή (Mangiola et al., 2016) □

Ο έμμεσος τρόπος αφορά την διαπερατότητα του εντερικού φραγμού. Λόγω των βλαβών στην ακεραιότητα και την διαπερατότητα του εντερικού φραγμού από τις κυτταροκίνες, επιτρέπεται η αυξημένη μεταφορά συγκεκριμένων μεταβολιτών των βακτηρίων του εντέρου και μορίων που σχετίζονται με τα μικρόβια στο μεσεντέριο λεμφικό ιστό, έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση συστηματικής φλεγμονώδους αντίδρασης, ενισχύοντας και τις τοπικές ανοσολογικές αποκρίσεις (Suganya & Koo, 2020) □

3.3.3 Επίδραση πρεβιοτικών σε στεγανές συνδέσεις.

Τα πρεβιοτικά προάγουν την εύρυθμη λειτουργία του εντερικού φραγμού μέσω της τροποποίησης των εντερικών στεγανών συνδέσεων (Rose et al., 2021). Η *in vitro* επίδραση προϊόντων ζύμωσης ινουλίνης έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική ανοδική ρύθμιση των γονιδίων που ελέγχουν τις TJ, συμπεριλαμβανομένων

των occludin, claudin-3 και ZO-1 (Uerlings et al., 2020). Η επίδραση με φρουκτοολιγοσακχαρίτες, έχει ως αποτέλεσμα την ανακατανομή επιλεγμένων πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένων των ZO-1 και της αποφραξίνης, κοντά στις συνδέσεις (Wongkrasant et al., 2020). Ακόμα, μελέτες *in vivo* και *in vitro* έδειξαν ότι η προληπτική αγωγή με γαλακτοολιγοσακχαρίτες έχει ως αποτέλεσμα την ανοδική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων ZO-1, occludin και claudin-1 σε ποντίκια που χορηγήθηκε LPS (Wang et al., 2021). Τέλος, η *in vitro* επίδραση των υπερκειμένων ζύμωσης του μανιταριού *P. eryngii* από τον μικροβιόκοσμου ηλικιωμένων στην κυτταρική σειρά Caco-2 οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων των occludin, claudin-1 και ZO-1 (Saxami et al, 2021)

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης είναι η μελέτη της επίδρασης των προϊόντων ζύμωσης του μανιταριού *Pleurotus eryngii* LGAM 216 από τον εντερικό μικροβιόκοσμο παιδιών με Διαταραχές Φάσματος του Αυτισμού, στην έκφραση στεγανών συνδέσεων σε ένα *in vitro* μοντέλο που περιλαμβάνει την καρκινική σειρά κυττάρων του παχέος εντέρου Caco-2 διεγερμένη με το λιποπολυσακχαρίτη (LPS).

4.2 Κριτήρια ένταξης εθελοντών

Η στρατολόγηση των εθελοντών έγινε στο πλαίσιο του Ερευνητικού προγράμματος με τίτλο: « Ανάπτυξη *in vitro* μοντέλου εντερικής ζύμωσης για την μελέτη των Διαταραχών Φάσματος του Αυτισμού» που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών (ΕΒΒΙΦΑΜ) – Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο Αθηνών. Στρατολογήθηκαν πέντε παιδιά ηλικίας 4-10 ετών που είχαν διαγνωστεί με Διαταραχή Φάσματος Αυτισμού. Οι κηδεμόνες των εθελοντών ενημερώθηκαν για το πρωτόκολλο και στη συνέχεια υπέγραψαν Συμφωνητικό Εθελοντικής Συμμετοχής. Από την μελέτη αποκλείστηκαν παιδιά που είχαν λάβει αντιβίωση τους τελευταίους 2 μήνες πριν την έναρξη της μελέτης, είχαν καταναλώσει προβιοτικά ή/και πρεβιοτικά ένα μήνα πριν από τη μελέτη. Εθελοντές με σοβαρές νεφρικές ή ηπατικές νόσους, στεφανιαία νόσο, καρκίνο και οποιαδήποτε παθολογική κατάσταση αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Σε όλους τους εθελοντές έγινε λήψη σωματομετρικών χαρακτηριστικών (σωματικό βάρος και ύψος), καταγραφή τριήμερου ερωτηματολογίου καταγραφής τροφίμων και καταγραφή ερωτηματολογίου γαστρεντερικών συμπτωμάτων.

4.3 Προϊόντα ζύμωσης

Για τη λήψη των υπερκειμένων ζύμωσης που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε *in vitro* ζύμωση του μανιταριού *Pleurotus eryngii* LGAM 216. Το συγκεκριμένο στέλεχος μύκητα ανήκει στη Συλλογή του Εργαστηρίου Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου και καλλιεργήθηκε σε άχυρο σιταριού (wheat straw, WS) υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ.

Ζερβάκη. Τα μανιτάρια λυοφιλοποιήθηκαν, κονιορτοποιήθηκαν και παραδόθηκαν στο ΕΒΒΙΦΑΜ για την πραγματοποίηση της ζύμωσης από τον εντερικό μικροβιόκοσμο παιδιών με ΔΑΦ. Επιπλέον, εκτός από το μανιτάρι, χρησιμοποιήθηκε το αρνητικό δείγμα ελέγχου της ζύμωσης, (negative control, NC), που περιλάμβανε το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας της ζύμωσης, εμβολιασμένο με τον εντερικό μικροβιόκοσμο του κάθε εθελοντή, χωρίς καμία πηγή άνθρακα. Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε το θετικό δείγμα ελέγχου της ζύμωσης, η πρεβιοτική ένωση ινουλίνη (Πίνακας 2). Η *in vitro* ζύμωση των υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε από τον εντερικό μικροβιόκοσμο των πέντε παιδιών με αυτισμό (κάθε εθελοντής και μία επανάληψη του πειράματος) και για την παραλαβή των υπερκείμενων, λήφθηκαν δείγματα 24 ώρες μετά την *in vitro* ζύμωση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 10.000g για 30min στους 4°C. Τέλος, τα υπερκείμενα διηθήθηκαν μέσω φίλτρου, μεγέθους 33mm (Millex) και ακολούθησε αποθήκευση στους -20°C.

Πίνακας 2. Υπερκείμενα μελέτης και συντομογραφίες των υποστρωμάτων

Υπερκείμενα μελέτης	Συντομογραφία
Υπερκείμενο ζύμωσης (fermentation supernatant, FS) του μανιταριού <i>Pleurotus eryngii</i> LGAM 216 καλλιεργημένο σε άχυρο σιταριού (wheat straw, WS) (αναλογία 100%)	FS-PEWS
Υπερκείμενο ζύμωσης του αρνητικού μάρτυρα (θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, εμβολιασμένο με δείγμα από τον εντερικό μικροβιόκοσμο του κάθε εθελοντή, χωρίς πηγή άνθρακα)	FS-NC
Υπερκείμενο ζύμωσης της πρεβιοτικής ένωσης ινουλίνη [2% (w/v)]	FS-INU

4.4 Καλλιέργειες κυττάρων

Η επίδραση των υπερκειμένων έγινε στην κυτταρική σειρά Caco-2, που αποτελούν επιθηλιακά κύτταρα, προερχόμενα από το αδενοκαρκίνωμα παχέος εντέρου του ανθρώπου (ATCC HTB-37). Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) με σταθερή γλουταμίνη ([PAN-Biotech](#)), εμπλουτισμένο με 1% πενικιλίνη/ στρεπτομυκίνη (10.000 U/mL / 10.000 µg/mL, Biochrom) και εμβρυϊκό βόειο ορό 10% (FBS, PAN-Biotech). Οι καλλιέργειες των κυττάρων διατηρούνταν σε φλάσκες, μέσα σε επωαστικό κλίβανο με 5% CO₂ και σταθερή θερμοκρασία επώασης στους 37°C καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Η ανακαλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιούνταν όταν η επιφάνειας της φλάσκας καλύπτονταν σε ποσοστό περίπου 80% από τα κύτταρα. Έπειτα το θρεπτικό υλικό

αφαιρούνταν από την φλάσκα με ακόλουθη πλύση με διάλυμα PBS (Phosphate Buffer Saline – Takara) και προσθήκη κατάλληλης ποσότητας διαλύματος τρυψίνης (Trypsin/EDTA Solution 10x), με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Ακολούθως, η φλάσκα τοποθετούνταν στον κλίβανο επώασης για 4-6 min και η διαδικασία ολοκληρωνόταν με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θρεπτικού υλικού.

4.5 Επιδράσεις στα κύτταρα

Για τις επιδράσεις των υπερκειμένων ζύμωσης στην κυτταρική σειρά Caco-2, πραγματοποιήθηκε επίστρωση των κυττάρων σε ειδικό πιάτο 12 θέσεων και επώαση για 24 ώρες. Ακολούθησε επίδραση των προϊόντων ζύμωσης για 48 ώρες και έπειτα έκθεση στο λιποπολυσακχαρίτη (LPS) για 24 ώρες. Τα βήματα της κάθε διαδικασίας παρατίθενται αναλυτικά παρακάτω.

4.5.1. Επίστρωση των κυττάρων σε πιάτο 12 θέσεων

- ✓ Ανακαλλιέργεια των κυττάρων και φυγοκέντρηση του περιεχομένου της φλάσκας προς επίστρωση στις 1500 rpm για 2min
- ✓ Αφαίρεση του υπερκειμένου και προσθήκη 3-4 ml PBS
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 1500 rpm για 2min και αφαίρεση του υπερκειμένου
- ✓ Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θρεπτικού υλικού και ανάδευση
- ✓ Ανάμειξη 50 μl χρωστικής Trypan Blue (Gibco™) και 50 μl από την καλλιέργεια σε σωλήνα τύπου Eppendorf
- ✓ Τοποθέτηση του μείγματος σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer και καταμέτρηση των κυττάρων
- ✓ Υπολογισμός της συγκέντρωσης των κυττάρων και προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας θρεπτικού υλικού ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση (60.000 κύτταρα/mL)
- ✓ Επώαση στον κλίβανο για 24 ώρες

4.5.2 Επίδραση των κυττάρων με τα υπερκείμενα ζύμωσης

α) Απόψυξη των υπερκειμένων από τους -20°C, διήθηση εκ νέου μέσω φίλτρου μεγέθους 22 mm (Millex)

- β) Ανάμειξη κάθε υπερκειμένου με το θρεπτικό υλικό σε κατάλληλη αναλογία, ώστε να προκύψει η επιθυμητή συγκέντρωση (2% v/v)
- γ) Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα πιάτα και προσθήκη 1mL από το υπερκείμενο ζύμωσης
- δ) Επώαση στον κλίβανο για 48 ώρες

4.5.3 Επίδραση των κυττάρων με το λιποπολυσακχαρίτη (LPS)

Το LPS αποτελεί ενδοτοξίνη και ακέραιο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των Gram (-) βακτηρίων που προκαλεί βλάβη στη διαπερατότητα του εντερικού φραγμού. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ο βακτηριακός λιποπολυσακχαρίτης (LPS) απομονωμένος από το βακτήριο *E.coli* (Cayman Chemical Company O55:B5 Hem 19660) σε συγκέντρωση 100 ng/mL. Πιο συγκεκριμένα,

- α) Πραγματοποιήθηκε απόψυξη του διαλύματος LPS (stock 0,1 μg/mL) από τους -20°C
- β) Ακολούθησε ανάμειξη του διαλύματος LPS με θρεπτικό υλικό DMEM σε κατάλληλη αναλογία, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση (100 ng/mL)
- γ) Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα πιάτα και προσθήκη 1mL από το μίγμα του θρεπτικού υλικού με το LPS
- δ) Επώαση στον κλίβανο για 24 ώρες

4.6 Απομόνωση του ολικού mRNA

Μετά την ολοκλήρωση των χειρισμών, το θρεπτικό υλικό από κάθε πιάτο αφαιρούνταν και ακολουθούσε η διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA των κυττάρων σύμφωνα με τα παρακάτω βήματα:

- 1) Λύση κυττάρων: προσθήκη 500 μL NucleoZOL (Macherey Nagel) σε κάθε θέση και μεταφορά του κάθε δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα τύπου Eppendorf
- 2) Καθαρισμός προσμίξεων: προσθήκη 200 μL νερού ddH₂O και ανακίνηση δια χειρός για 15sec. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 12.200 g για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Παραλαβή 620 μL της υδατικής φάσης που περιλαμβάνει το RNA και μεταφορά σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα τύπου Eppendorf
- 3) Κατακρήμνιση: προσθήκη 600 μL ισοπροπανόλης, επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση στις 12.000 g για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Αφαίρεση υπερκείμενου

4) Πλύση: έκλυση του ιζήματος που περιλαμβάνει το RNA με προσθήκη 500 μL αιθανόλης 75%, φυγοκέντρηση στις 8.000 g για 3 min σε θερμοκρασία δωματίου και αφαίρεση υπερκείμενου. Επανάληψη διαδικασίας εις τριπλούν

5) Ανασύσταση RNA: ανασύσταση του ιζήματος με την προσθήκη 20-40 μL ddH₂O

6) Φωτομέτρηση RNA: Η ποσότητα του απομονωμένου RNA προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά. Έγινε μέτρηση στα 260 nm. Σημαντικό στοιχείο κατά τη φωτομέτρηση είναι οι λόγοι $A_{260/280}$, καθώς αποτελεί δείκτη καθαρότητας του απομονωμένου RNA, και η τιμή πρέπει να είναι $\geq 1,8$ καθώς και ο λόγος $A_{260/230}$, καθώς δείχνει το βαθμό επιμόλυνσης του RNA, και πρέπει να είναι ≥ 2 .

Η διαδικασία διενεργήθηκε βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Dueren, Germany)(Saxami et al, 2021).

4.7 Σύνθεση cDNA

Το ολικό RNA μετατράπηκε cDNA (αντίστροφη μεταγραφή), παρουσία του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης. Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (6110A, Takara) με εκκινητές από μίγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών. Συγκεκριμένα, η διαδικασία της σύνθεσης του cDNA περιλάμβανε τα ακόλουθα βήματα :

1) Χρήση 1 μg ολικού RNA ως μήτρα

2) Ανάμειξη του RNA με ddH₂O, 2 μL τυχαίων εξαμερών εκκινητών (Random 6 mers, 50 μM) και 1 μL μίγματος τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTP Mixture, 10mM), ώστε να προκύψει τελικός όγκος 10 μL

3) Επώαση για 5min στους 65 °C στον θερμοκυκλοποιητή Primus 96 Plus, για αποδιάταξη του RNA και προσκόλληση των εκκινητών

4) Επώαση στον πάγο για τουλάχιστον 1min, για διατήρηση της μονόκλωνης κατάστασης του RNA

5) Προσθήκη σε κάθε δείγμα:

4 μL 5x PrimeScript Buffer, για την αντίστροφη μεταγραφάση

0,5 μL (20 units) αναστολέα Rnaσών (RNase Inhibitor, 40 U/ μL)

1 μL (200 units) αντίστροφης μεταγραφάσης (PrimeScript RTase 200 U/ μL)

4,5 μL ddH₂O σε τελικό όγκο 10 μL

6) Επώαση στους 37 °C για 15 min για την ενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης, έπειτα στους 42 °C για 30 min για την για τη σύνθεση cDNA και τέλος στους 70°C για 15 min για να την διακοπή της δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης, με τη χρήση του θερμοκυκλοποιητή Primus 96 Plus.

Η διαδικασία διενεργήθηκε βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan)(Saxami et al, 2021).

4.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού *in vitro*. Συγκεκριμένα, η ποσοτική PCR επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών στόχων. Το είδος της ποσοτικής PCR που εφαρμόστηκε στη συγκεκριμένη μελέτη είναι η Real-Time PCR, στην οποία η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας, όπως είναι η SYBR Green I. Η συγκεκριμένη χρωστική ανήκει στις μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές, που παρουσιάζουν ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερες στο διάλυμα και φθορίζουν όταν ενσωματώνονται στη μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA. Ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος (Kubista et al, 2006).

Κατά τη σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου, οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του mRNA ενός γονιδίου-στόχου, προσδιορίζονται σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα ενός παράλληλα ενισχυόμενου mRNA, ενός κατάλληλου ενδογενούς εκφραζόμενου γονιδίου-ελέγχου (internal control). Το C_T εκφράζει τον αριθμό των κύκλων ενίσχυσης που απαιτούνται, ώστε ο φθορισμός να αγγίξει το επίπεδο κατωφλίου. Επιπλέον, πραγματοποιείται σύγκριση των C_t τιμών των δειγμάτων προς ανάλυση με τις αντίστοιχες τιμές ενός δείγματος-αναφοράς. Οι τιμές C_t του mRNA-στόχου, τόσο των δειγμάτων προς εξέταση όσο και του δείγματος-αναφοράς, κανονικοποιούνται ως προς τις αντίστοιχες τιμές του ενδογενούς γονιδίου-ελέγχου. Η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης χαρακτηρίζεται μαθηματικά από την εξίσωση $RQ=2^{-\Delta\Delta C_t}$, όπου:

- RQ είναι η ποσότητα των μεταγράφων του γονιδίου στο δείγμα
- ΔC_t είναι η διαφορά των κύκλων κατωφλίου του γονιδίου-στόχου και του γονιδίου αναφοράς ($\Delta C_T = C_T (\text{γονιδίου-στόχου}) - C_T (\text{γονιδίου αναφοράς})$)
- Το $\Delta\Delta C_T$ είναι η διαφορά των ΔC_T του γονιδίου-στόχου και του γονιδίου αναφοράς ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{γονιδίου-στόχου}) - \Delta C_T (\text{γονιδίου αναφοράς})$)

Ο υπολογισμός του $2^{-\Delta\Delta CT}$ για το γονίδιο-στόχο δείχνει τα επίπεδα έκφρασής του, συγκριτικά με αυτά του γονιδίου αναφοράς. Εξ' ορισμού, για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι $RQ = 1$, οπότε η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με τον εαυτό του ισούται με 1. Αν το $2^{-\Delta\Delta CT}$ είναι μεγαλύτερο του 1 υποδηλώνεται αυξημένη έκφραση του γονιδίου-στόχου, σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς, αν είναι από 0 έως 1 σημειώνεται υποέκφραση (Livak & Schmittgen, 2001).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση των προϊόντων ζύμωσης του μανιταριού *Pleurotus eryngii*, ως προς την έκφραση των γονιδίων της *occludin*, της *claudin-1* και της *zonulin-1*(*ZO-1*), τα οποία αποτελούν γονίδια των στεγανών συνδέσμων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της διαπερατότητας του εντερικού φραγμού. Ως γονίδιο-ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της β-ακτίνης (*b-act*) που εκφράζεται ιδιοστατικά (housekeeping gene) σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Οι αλληλουχίες των ανοδικών και καθοδικών εξειδικευμένων εκκινητών (Eurofins, Genomics) που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στον θερμοκυκλοποιητή πραγματικού χρόνου ABI StepOne (Applied Biosystems), χρησιμοποιώντας ειδικά πιάτα 96 θέσεων MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plates (0.1 mL) (Applied Biosystems) και το κιτ KAPA SYBR®FAST Qpcr Master Mix (2x) Universal (Kapa Biosystems, KK4601) υπό τις συνθήκες: 95 °C για 3 min ακολουθούμενο από 40 κύκλους των 95 °C για 15 sec και 60 °C για 1 min και τελευταίο ένα κύκλο των 95 °C για 15 sec, 60 °C για 1 min και 95 °C για 15 sec. Κάθε αντίδραση περιείχε 10 μL SYBR Green, 0,4 μL χρωστική καρβοξυ-X-ροδαμίνη (ROX), 6,8 μL ddH₂O, 2μL cDNA ως μήτρα, 0,4 μL από τους ανοδικούς και καθοδικούς εκκινητές του γονιδίου και είχε ένα διπλότυπο.

Πίνακας 3. Αλληλουχίες ανοδικών και καθοδικών των εκκινητών.

	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Tm(°C)	GC% περιεκτικότητα	Βιβλ. Αναφορά
1	<i>Claudin-1</i> F	TGGTCAGGCTCTCTTCACTG (20)	59,4	55%	(Chen et al., 2019)
2	<i>Claudin-1</i> R	TTGGATAGGGCCTTGGTGTT (20)	57,3	50%	(Chen, et al, 2019)
3	<i>ZO-1</i> F	TTCACGCAGTTACGAGCAAG (20)	57,3	50%	(Chen, et al, 2019)
4	<i>ZO-1</i> R	TTGGTGTTTGAAGGCAGAGC (20)	57,3	50%	(Chen, et al, 2019)
5	<i>Occludin</i> F	ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC (22)	58,4	45.5%	(Chen, et al, 2019)

6	<i>Occludin</i> R	GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT (22)	58,4	45.5%	(Chen, et al, 2019)
7	<i>b-actin</i> F	GCGCGGCTACAGCTTCA (17)	57,6	64,7%	(Saxami et al., 2016)
8	<i>b-actin</i> R	CTTAATGTCACGCACGATTTC (22)	58,4	45,5%	(Saxami, et al, 2016)

1.9 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού πακέτου IBM SPSS Statistics 21 και το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% ($p < 0.05$). Ο έλεγχος κανονικότητας έγινε με τον έλεγχο των Shapiro-Wilk. Πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων, τόσο ανά εθελοντή όσο και στο σύνολο των εθελοντών, για το κάθε υπόστρωμα, αντίστοιχα. Οι συνεχείς μεταβλητές, παρουσιάστηκαν ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση (standard deviation, SD) και η σύγκριση μεταξύ των μέσων όρων των μετρήσεων των μεταβλητών έγινε με το παραμετρικό τεστ Paired sample signed rank test είτε με το μη παραμετρικό τεστ Wilcoxon matched-pairs signed-rank test.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Χαρακτηριστικά δείγματος εθελοντών

Τα χαρακτηριστικά των εθελοντών που συμπεριλήφθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη παρατίθενται στο ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά εθελοντών (Μέσος όρος και τυπική απόκλιση).

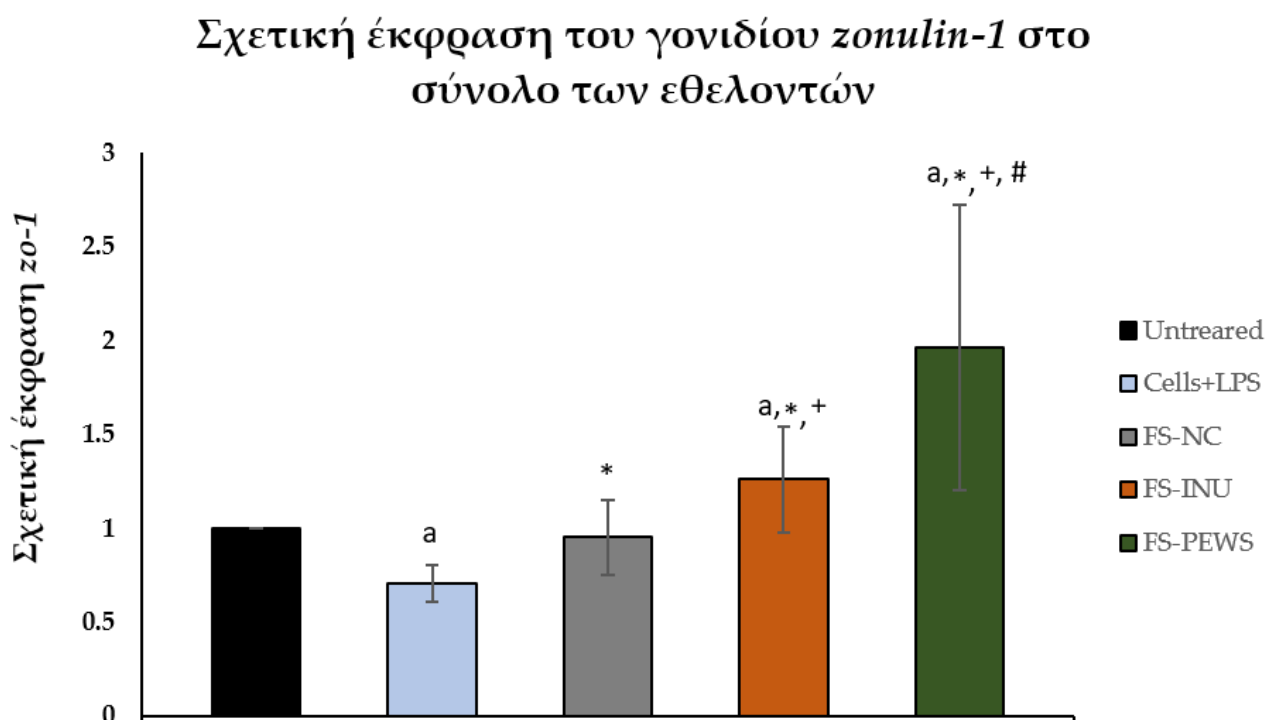
Δημογραφικά χαρακτηριστικά	
Φύλο	5 αγόρια
Ηλικία	5.5 ± 1.27
Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά	
Βάρος (kg)	22.8 ± 4.91
Ύψος (cm)	114.8 ± 9.62
BMI (kg·m ⁻²)	17.2 ± 2.78

5.2. Αποτελέσματα έκφρασης TJs για το σύνολο των εθελοντών

Στο πείραμα αυτό εξετάστηκε η πιθανή προληπτική επιδιορθωτική δράση των προϊόντων ζύμωσης του μανιταριού *Pleurotus eryngii* στη λειτουργία του εντερικού φραγμού των επιθηλιακών κυττάρων Caco-2, αφού στη συνέχεια εκτέθηκαν σε LPS για τη δημιουργία βλαβών. Για τον σκοπό αυτό, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα mRNA των γονιδίων των πρωτεϊνών που αποτελούν δομικά και λειτουργικά μέρη των στεγανών

συνδέσμων: *ZO-1*, *occludin* και *claudin-1*. Στη συνέχεια παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα για το κάθε γονίδιο, όσον αφορά το σύνολο των εθελοντών.

5.2.1. Αποτελέσματα έκφρασης του γονιδίου *ZO-1* για το σύνολο των εθελοντών



Διάγραμμα 1. Σχετική έκφραση του γονιδίου *ZO-1*, μετά από την επώαση των *FS-PEWS*, *FS-INU*, *FS-NC* και *LPS* στην κυτταρική σειρά *Caco-2*, στο σύνολο των εθελοντών ($n=5$). *Untreated*: *Caco-2* κύτταρα καλλιεργημένα μόνο σε θρεπτικό υλικό. Για τα αποτελέσματα οι τιμές εκφράζονται ως: $\mu.o. \pm T.A.$ *Untreated*: κύτταρα καλλιέργειας χωρίς

καμία επίδραση, *Cells+LPS*: κύτταρα καλλιέργειας που διεγέρθηκαν με *LPS*, *FS-NC*: Υπερκείμενο ζύμωσης του αρνητικού μάρτυρα (θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, εμβολιασμένο με δείγμα από τον εντερικό μικροβιόκοσμο του κάθε εθελοντή, χωρίς πηγή άνθρακα), *FS-INU*: Υπερκείμενο ζύμωσης της πρεβιοτικής ένωσης ινουλίνη [2% (w/v)], *FS-PEWS*: Υπερκείμενο ζύμωσης (*fermentation supernatant*, *FS*) του μανιταριού *Pleurotus eryngii* LGAM 216 καλλιεργημένο σε άχυρο σιταριού (*wheat straw*, *WS*) (αναλογία 100%) * στατιστικά σημαντικό συγκρινόμενο με το *LPS* ($p<0,05$), † στατιστικά σημαντικό συγκρινόμενο με το *NC* ($p<0,05$), α στατιστικά σημαντικό συγκρινόμενο με το *Untreated* ($p<0,05$), # στατιστικά σημαντικό συγκρινόμενο με το *INU* ($p<0,05$).

Η επώαση στην κυτταρική σειρά Caco-2 με το *FS-PEWS* οδήγησε σε υπερέκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης *ZO-1* η οποία ήταν σημαντική σε σύγκριση με τα *untreated* κύτταρα [*FS-PEWS*: $1,96 \pm 0,7596$ vs *untreated*: $1,000 \pm 0,000$ ($p=0,005$)], με τον αρνητικό μάρτυρα [*FS-PEWS*: $1,96 \pm 0,7596$ vs *FS-NC*: $0,951 \pm 0,1968$ ($p=0,005$)], αλλά και με το *LPS* [*FS-PEWS*: $1,96 \pm 0,7596$ vs *Cells+LPS*: $0,705 \pm 0,0971$ ($p=0,005$)]. Η υπερέκφραση που παρατηρήθηκε με το συγκεκριμένο χειρισμό ήταν σημαντική σε σύγκριση και με τον θετικό μάρτυρα [*FS-PEWS*: $1,96 \pm 0,7596$ vs *FS-INU*: $1,26 \pm 0,28$ ($p=0,013$)].

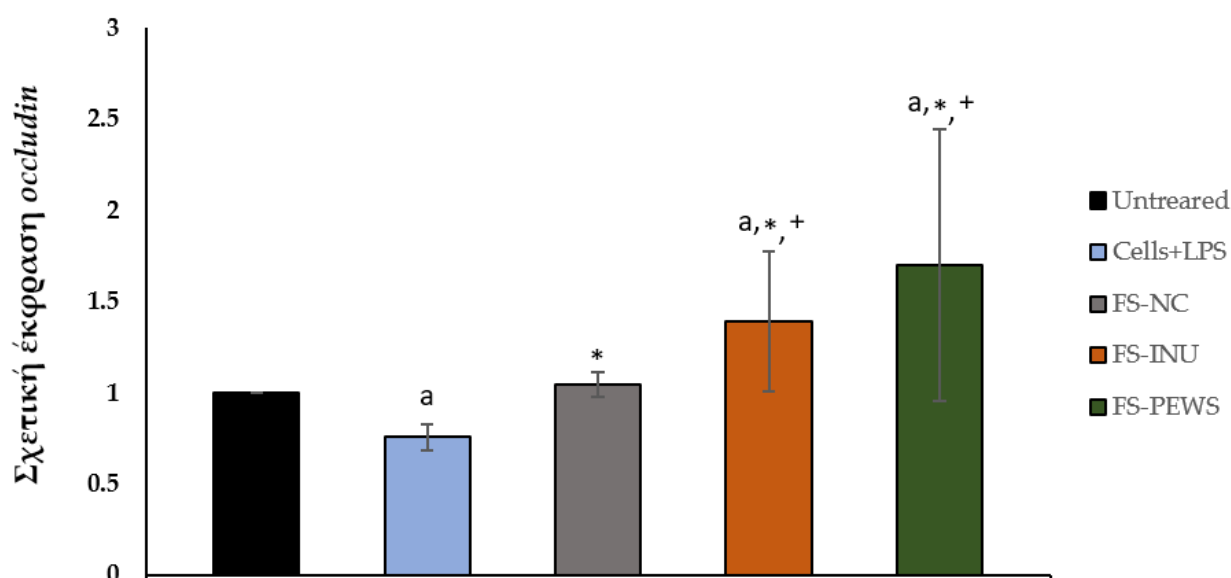
Επιπλέον, η επώαση των κυττάρων με το θετικό μάρτυρα (*FS-INU*) οδήγησε σε υπερέκφραση, που ήταν σημαντική σε σύγκριση με τα *untreated* κύτταρα [*FS-INU*: $1,26 \pm 0,28$ vs *untreated*: $1,000 \pm 0,000$ ($p=0,017$)] και με τον αρνητικό μάρτυρα [*FS-INU*: $1,26 \pm 0,28$ vs *FS-NC*: $0,951 \pm 0,1968$ ($p=0,008$)].

Η επώαση στην κυτταρική σειρά Caco-2 με τον αρνητικό μάρτυρα (*FS-NC*) οδήγησε σε μειωμένη έκφραση, η οποία, ωστόσο, ήταν σημαντικά υψηλότερη από αυτήν που παρατηρήθηκε μετά την επώαση των κυττάρων μόνο με *LPS* [*FS-NC*: $0,951 \pm 0,1968$ vs *Cells+LPS*: $0,705 \pm 0,0971$ ($p=0,005$)].

Τέλος, η επώαση των κυττάρων με *LPS* οδήγησε σε μειωμένη έκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης *ZO-1*, που ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τα *untreated* κύτταρα [*Cells+LPS*: $0,705 \pm 0,0971$ vs *untreated*: $1,000 \pm 0,000$ ($p<0,001$)], με το υπερκείμενο του μανιταριού [*Cells+LPS*: $0,705 \pm 0,0971$ vs *FS-PEWS*: $1,96 \pm 0,7596$ ($p=0,005$)] αλλά και με το υπερκείμενο της ινουλίνης [*Cells+LPS*: $0,705 \pm 0,0971$ vs *FS-INU*: $1,26 \pm 0,28$ ($p<0,001$)].

5.2.2. Αποτελέσματα έκφρασης του γονιδίου *occludin* για το σύνολο των εθελοντών

Σχετική έκφραση του γονιδίου *occludin* στο σύνολο των εθελοντών



Διάγραμμα 2. Σχετική έκφραση του γονιδίου *occludin*, μετά από την επώαση των FS-PEWS, FS-INU, FS-NC και LPS στην κυτταρική σειρά Caco-2, στο σύνολο των εθελοντών ($n=5$). Untreated: Caco-2 κύτταρα καλλιεργημένα μόνο σε θρεπτικό υλικό. Για τα αποτελέσματα οι τιμές εκφράζονται ως: μ.ο. $\pm$ T.A. Untreated: κύτταρα καλλιέργειας χωρίς καμία επίδραση, Cells+LPS: κύτταρα καλλιέργειας που διεγέρθηκαν με LPS, FS-NC: Υπερκείμενο ζύμωσης του αρνητικού μάρτυρα (θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, εμβολιασμένο με δείγμα από τον εντερικό μικροβιόκοσμο του κάθε εθελοντή, χωρίς πηγή άνθρακα), FS-INU: Υπερκείμενο ζύμωσης της πρεβιοτικής ένωσης ινουλίνη [2% (w/v)], FS-PEWS: Υπερκείμενο ζύμωσης (fermentation supernatant, FS) του μανιταριού *Pleurotus eryngii* LGAM 216 καλλιεργημένο σε άχυρο σιταριού (wheat straw, WS) (αναλογία 100%) * στατιστικά σημαντικό συγκρινόμενο με το LPS ($p<0,05$), † στατιστικά σημαντικό συγκρινόμενο με το NC ($p<0,05$), a στατιστικά σημαντικό συγκρινόμενο με το Untreated ($p<0,05$), # στατιστικά σημαντικό συγκρινόμενο με το INU ($p<0,05$).

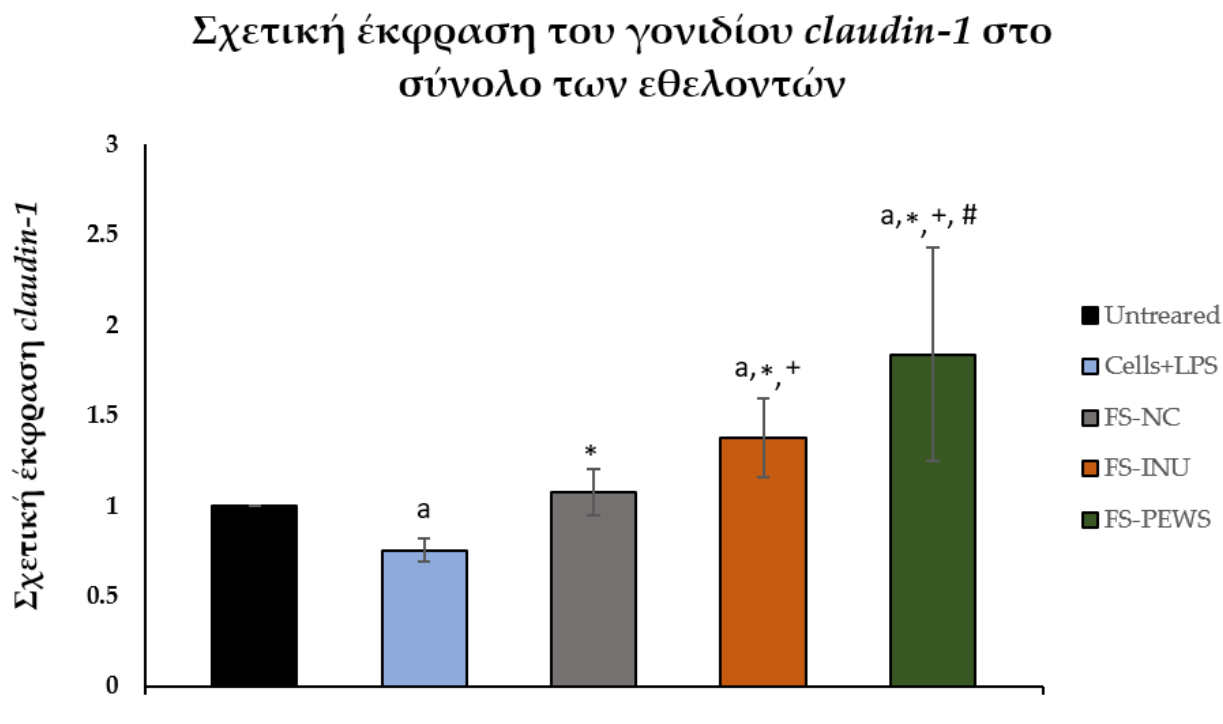
Η επώαση στην κυτταρική σειρά Caco-2 με το FS-PEWS οδήγησε σε υπερέκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης *occludin* η οποία ήταν σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με τα untreated κύτταρα [FS-PEWS: $1,697 \pm 0,7437$ vs untreated: $1,000 \pm 0,000$ ($p=0,005$)], με τον αρνητικό μάρτυρα [FS-PEWS: $1,697 \pm 0,7437$ vs FS-NC: $1,044 \pm 0,06415$ ($p=0,005$)], αλλά και με το LPS [FS-PEWS: $1,697 \pm 0,7437$ vs Cells+LPS: $0,756 \pm 0,0726$ ($p=0,005$)]. Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου μετά από την επώαση με το FS-PEWS παρουσίασε τάση αύξησης σε σύγκριση και με τον θετικό μάρτυρα [FS-PEWS: $1,697 \pm 0,7437$ vs FS-INU: $1,392 \pm 0,385$ ($p=0,074$)].

Αναφορικά με τον θετικό μάρτυρα (FS-INU), η επώαση των κυττάρων οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης, που ήταν σημαντική σε σύγκριση με τα untreated κύτταρα [FS-INU: $1,392 \pm 0,385$ vs untreated: $1,000 \pm 0,000$ ($p=0,011$)] και με τον αρνητικό μάρτυρα [FS-INU: $1,392 \pm 0,385$ ($p=0,074$) vs FS-NC: $1,044 \pm 0,06415$ ($p=0,012$)].

Αξιοσημείωτο είναι πως η επώαση των κυττάρων με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC) οδήγησε σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου, η οποία ήταν σημαντική σε σχέση με την επώαση των κυττάρων μόνο με LPS [FS-NC: $1,044 \pm 0,06415$ vs Cells+LPS: $0,756 \pm 0,0726$ ($p<0,001$)].

Η επώαση στην κυτταρική σειρά Caco-2 με LPS οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του γονιδίου *occludin*, που ήταν σημαντική σε σχέση με τα untreated κύτταρα [Cells+ LPS: $0,756 \pm 0,0726$ vs untreated: $1,000 \pm 0,000$ ($p<0,001$)]. Η έκφραση του γονιδίου ήταν σημαντικά χαμηλότερη από την έκφραση που παρατηρήθηκε με την επώασή τους με το υπερκείμενο του μανιταριού [Cells+ LPS: $0,756 \pm 0,0726$ vs FS-PEWS: $1,697 \pm 0,7437$ ($p=0,005$)] αλλά και με το υπερκείμενο της ινουλίνης [Cells+ LPS: $0,756 \pm 0,0726$ vs FS-INU: $1,392 \pm 0,385$ ($p=0,001$)].

5.2.3. Αποτελέσματα έκφρασης του γονιδίου *claudin-1* για το σύνολο των εθελοντών



Διάγραμμα 3. Σχετική έκφραση του γονιδίου *claudin-1*, μετά από την επώαση των FS-PEWS, FS-INU, FS-NC και LPS στην κυτταρική σειρά Caco-2, στο σύνολο των εθελοντών ($n=5$). Untreated: Caco-2 κύτταρα καλλιεργημένα μόνο σε

θρεπτικό υλικό . Για τα αποτελέσματα οι τιμές εκφράζονται ως: μ.ο. $\pm$ T.A. *Untreated*: κύτταρα καλλιέργειας χωρίς καμία επίδραση, *Cells+LPS*: κύτταρα καλλιέργειας που διεγέρθηκαν με LPS, *FS-NC*: Υπερκείμενο ζύμωσης του αρνητικού μάρτυρα (θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, εμβολιασμένο με δείγμα από τον εντερικό μικροβιόκοσμο του κάθε εθελοντή, χωρίς πηγή άνθρακα), *FS-INU*: Υπερκείμενο ζύμωσης της πρεβιοτικής ένωσης ινουλίνη[2% (w/v)], *FS-PEWS*: Υπερκείμενο ζύμωσης (*fermentation supernatant*, FS) του μανιταριού *Pleurotus eryngii* LGAM 216 καλλιεργημένο σε άχυρο σιταριού (*wheat straw*, WS) (αναλογία 100%) * στατιστικά σημαντικό συγκρινόμενο με το LPS ($p<0,05$), † στατιστικά σημαντικό συγκρινόμενο με το NC ($p<0,05$), α στατιστικά σημαντικό συγκρινόμενο με το *Untreated* ($p<0,05$), # στατιστικά σημαντικό συγκρινόμενο με το INU ($p<0,05$).

Η επώαση στην κυτταρική σειρά Caco-2 με το FS-PEWS οδήγησε σε υπερέκφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης *claudin-1* η οποία ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τα *untreated* κύτταρα [FS-PEWS: $1,838 \pm 0,58816$ vs *untreated*: $1,000 \pm 0,000$ ($p=0,001$)], με τον αρνητικό μάρτυρα [FS-PEWS: $1,838 \pm 0,58816$ vs FS-NC: $1,044 \pm 0,13058$ ($p=0,006$)], αλλά και με το LPS [FS-PEWS: $1,838 \pm 0,58816$ Cells+LPS: $0,754 \pm 0,06499$ ($p<0,001$)]. Υπερέκφραση παρατηρήθηκε και σε σύγκριση με τον θετικό μάρτυρα [FS-PEWS: $1,838 \pm 0,58816$ vs FS-INU: $1,375 \pm 0,21747$ ($p=0,018$)].

Επίσης, η επώαση των κυττάρων με το θετικό μάρτυρα (FS-INU) οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου που ήταν σημαντική σε σύγκριση με τα *untreated* κύτταρα [FS-INU: $1,375 \pm 0,21747$ vs *untreated*: $1,000 \pm 0,000$ ($p<0,001$)] και με τον αρνητικό μάρτυρα [FS-INU: $1,375 \pm 0,21747$ vs FS-NC: $1,075 \pm 0,13058$ ($p=0,005$)].

Αξιοσημείωτο είναι και σε αυτό το γονίδιο πως η επώαση των κυττάρων με τον αρνητικό μάρτυρα (FS-NC) οδήγησε σε υψηλότερη έκφραση η οποία ήταν σημαντική σε σχέση με την έκφραση που παρατηρήθηκε με την επώαση των κυττάρων μόνο με LPS [FS-NC: $1,075 \pm 0,13058$ vs Cells+LPS: $0,754 \pm 0,06499$ ($p<0,001$)].

Τέλος, η επώαση των κυττάρων με LPS οδήγησε σε μειωμένη έκφραση του γονιδίου, που ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τα *untreated* κύτταρα [Cells+ LPS: $0,754 \pm 0,06499$ vs *untreated*: $1,000 \pm 0,000$ ($p<0,001$)], με την έκφραση που παρατηρήθηκε μετά την επώασή τους με το υπερκείμενο του μανιταριού [Cells+ LPS: $0,754 \pm 0,06499$ vs FS-PEWS: $1,838 \pm 0,58816$ ($p<0,001$)], αλλά και με το υπερκείμενο της ινουλίνης [Cells+ LPS: $0,754 \pm 0,06499$ vs FS-INU: $1,375 \pm 0,21747$ ($p<0,001$)].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο εντερικός φραγμός συμμετέχει σημαντικά στη ρύθμιση της ομοιόστασης του εντέρου, ενώ διαταραχές στην ακεραιότητά του σχετίζονται με αύξηση της διαπερατότητάς του και φλεγμονή λόγω της εισόδου παθογόνων μικροοργανισμών και βλαβερών ουσιών. Αυτή η κατάσταση ωθεί την ανάπτυξη διάφορων γαστρεντερικών και συστηματικών ασθενειών, όπως το Σύνδρομο Ευερέθιστου εντέρου, οι Φλεγμονώδεις Νόσοι του Εντέρου, ο Σακχαρώδης Διαβήτης και η Πολλαπλή Σκλήρυνση (Arrieta et al., 2006; Groschwitz & Hogan, 2009) □ Τα πρεβιοτικά προάγουν την εύρυθμη λειτουργία του εντερικού φραγμού μέσω της τροποποίησης των εντερικών στεγανών συνδέσεων (Rose et al., 2021) και η αναδόμηση ενός διαταραγμένου φραγμού μέσω αυτών αποτελεί αντικείμενο εντατικής έρευνας τα τελευταία χρόνια (Camilleri, 2021; Saxami et al., 2016; Saxami et al., 2021) □ Πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις επιδράσεις των πρεβιοτικών στη λειτουργία του εντερικού φραγμού εξετάζοντας τους ολιγοσακχαρίτες χωρίς να λάβουν υπόψη τη ζύμωση που λαμβάνει χώρα στο έντερο και τον πιθανό μηχανισμό και τις συνεργιστικές δράσεις που μπορεί να αναπτυχθούν μεταξύ των μεταβολιτών που παράγονται (Uerlings et al., 2020; Wu et al., 2020) □ Επιπλέον, οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί και εξετάζουν τα προϊόντα ζύμωσης έχουν εξετάσει μόνο γνωστές πρεβιοτικές ενώσεις, όπως η ινουλίνη και οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (Pham et al., 2018; Uerlings et al., 2020) □

Στις Διαταραχές στο Φάσμα του Αυτισμού η σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος διαφέρει σε σχέση με αυτή των ατόμων με φυσιολογική ανάπτυξη (Strati et al., 2017) □ Παρατηρείται, λοιπόν, δυσβίωση, η οποία μπορεί να ευθύνεται για την εντερική φλεγμονή που παρατηρείται σε παιδιά με ΔΑΦ, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των αυξημένων επιβλαβών βακτηρίων με τους τοπικούς ανοσοποιητικούς μηχανισμούς και τα μεσεγχυματικά κύτταρα (Davoli-Ferreira et al., 2021). Η παρουσία των κυτταροκινών στο έντερο λόγω της φλεγμονής οδηγεί σε διαταραχές στην ακεραιότητα του εντερικού φραγμού, πράγμα που εντείνει την φλεγμονή όπως προαναφέρθηκε (Suganya & Koo, 2020). □

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση των προϊόντων ζύμωσης του μανιταριού *Pleurotus eryngii*, υποψήφιου πρεβιοτικού, από τον εντερικό μικροβιόκοσμο παιδιών με Διαταραχές Φάσματος του Αυτισμού, ως προς την έκφραση στεγανών συνδέσεων σε ένα *in vitro* μοντέλο που περιλάμβανε την καρκινική σειρά κυττάρων του παχέος εντέρου Caco-2, διεγερμένη με το λιποπολυσακχαρίτη (LPS). Το *Pleurotus eryngii* είναι βρώσιμο μανιτάρι που έχει ήδη εξεταστεί ως προς το πρεβιοτικό δυναμικό του. Είναι πλούσιο σε β-γλυκάνες και μπορεί να ενισχύσει την παρουσία ωφέλιμων βακτηρίων (*Lactobacillus*

spp. και *Bifidobacterium* spp.), καθώς και την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (Mitsou et al., 2020)□

Η ZO-1 είναι πρωτεΐνη της κυτταροπλασματικής πλάκας, που αλληλεπιδρά με τον κυτταροσκελετό και παίζει τον ρόλο του ικριώματος, έχοντας παράλληλα και σηματοδοτικό ρόλο. Οι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες συνδέουν γειτονικά κύτταρα με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μέσω των πρωτεϊνών-ικριωμάτων, όπως η ZO-1 (Chelakkot et al., 2018)□ Στη παρούσα μελέτη, η προ-επώαση των κυττάρων Caco-2 με FS-PEWS οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου ZO-1 σε σύγκριση με τα untreated κύτταρα και τα κύτταρα που διεγέρθηκαν με LPS (Διάγραμμα 1), υποδεικνύοντας την πιθανή προστατευτική δράση των προϊόντων ζύμωσης του *P. eryngii* κατά της βλάβης του εντερικού φραγμού. Η αύξηση της έκφρασης ήταν μάλιστα σημαντικά υψηλότερη και από την αύξηση της έκφρασης του γονιδίου που παρατηρήθηκε μετά από την επίδραση με FS-INU, με την ινουλίνη να θεωρείται αναγνωρισμένο πρεβιοτικό. Σε αυτό το πλαίσιο, οι Uerlings και συνεργάτες (2020) παρατήρησαν αυξημένη έκφραση των γονιδίων *zonulin-1*, *claudin-1* και *claudin-3* σε κύτταρα IPEC-J2 με την επίδραση υπερκειμένου από ζύμωση ινουλίνης, σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου υποδηλώνοντας ότι οι μεταβολίτες που προκύπτουν από τη διαδικασία ζύμωσης θα μπορούσαν είναι υπεύθυνοι για την ενίσχυση της λειτουργίας του εντερικού φραγμού (Uerlings et al., 2020). *In vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν δείξει ότι η χορήγηση προληπτικά γαλακτοολιγοσακχαριτών σε ποντίκια που εκτίθενται σε LPS είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *zonulin-1*, *occludin* και *claudin-1* (Wang et al., 2021; Wongkrasant et al., 2020). Οι Sheng και συνεργάτες (2020), έδειξαν ότι η προχορήγηση ξυλοολιγοσακχαριτών για 21 ημέρες σε ποντίκια C57BL/6 προστάτευσε την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού αυξάνοντας τα επίπεδα έκφρασης των TJ (Sheng et al., 2020)□

Η *occludin* ανήκει στις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των TJ και αλληλεπιδρά με το σύνθετο δίκτυο πρωτεϊνών-ικριωμάτων, όπως η ZO-1, της κυτταροπλασματικής πλάκας που συνδέουν αυτές τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες με τον κυτταροσκελετό ακτινομοσίνης του κυττάρου (Günzel & Yu, 2013). Το κυτοσολικό καρβοξυτελικό άκρο της *occludin* σχηματίζει μια ισχυρά θετικά φορτισμένη επιφάνεια που δεσμεύει την ZO-1, με την συγγένεια αυτής δέσμευσης να αυξομειώνεται μέσω φωσφορυλιώσεων και να ρυθμίζει την διακυτταρική διαπερατότητα (Heinemann & Schuetz, 2019)□ Πολλές *in vitro* και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι τα επίπεδα έκφρασης της *occludin* ήταν μειωμένα σε διαταραγμένο εντερικό φραγμό (Al-Sadi et al., 2011; Chelakkot et al., 2018; Lee et al., 2018). Στην παρούσα μελέτη, η επώαση των κυττάρων Caco-2 με FS-PEWS οδήγησε σε σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου *occludin*, σε σύγκριση με τα untreated κύτταρα και τα κύτταρα που διεγέρθηκαν με LPS (Διάγραμμα 2).

Αυτά τα ευρήματα ενισχύουν περαιτέρω την πιθανή προληπτική δράση των προϊόντων ζύμωσης του *P. eryngii* στην απορρύθμιση του εντερικού φραγμού. Αναφορικά με άλλα πρεβιοτικά, η προληπτική δράση των γαλακτοολιγοσακχαριτών (GOS) έναντι της διαταραχής του εντερικού φραγμού καταδείχθηκε από τους Akbari και συνεργάτες (Akbari et al., 2015) □ Πιο συγκεκριμένα, οι συγγραφείς πρότειναν ότι τα GOS είχαν κυρίως προληπτική επίδραση στην εντερική βλάβη που προκλήθηκε από τη δεοξυνιβαλενόλη σε μια σειρά μοντέλων *in vitro* και σε μια *in vivo* μελέτη σε ποντίκια. Πιο πρόσφατα, οι Wang και συνεργάτες (2021) έδειξαν ότι η ενδογαστρική χορήγηση GOS σε ποντίκια μείωσε τη βλάβη του εντερικού φραγμού που προκλήθηκε από LPS στη νήστιδα και τον ειλέο και ρύθμισε τις TJ, υποδηλώνοντας ότι οι GOS μπορεί να λειτουργήσουν ως προστατευτικοί παράγοντες για την υγεία του εντέρου (Wang et al., 2021) □

Η claudin-1 είναι επίσης διαμεμβρανική πρωτεΐνη των TJ. Με βάση τη λειτουργία τους, οι κλαουδίνες μπορούν να ομαδοποιηθούν σύμφωνα με τις ιδιότητες φραγμού ή σχηματισμού καναλιών για διαφορετικές διαλυμένες ουσίες. Οι κλαουδίνες 1, 3, 5, 11, 14, και 19, έχουν χαρακτηριστεί κυρίως ως “σφραγιστικές”, ενώ οι κλαουδίνες 2, 10a, 10b, 15 και 17 κυρίως σχηματίζουν κανάλια (Heinemann & Schuetz, 2019) □ Η claudin-1, λοιπόν, είναι ένα σημαντικό συστατικό των TJ και έχει προταθεί ότι συμμετέχει σημαντικά στη ρύθμιση της ακεραιότητας των TJ. Στην παρούσα μελέτη, η επώαση των κυττάρων Caco-2 με FS-PEWS οδήγησε σε σημαντική ανοδική ρύθμιση του γονιδίου της claudin-1.

Το μανιτάρι *Pleurotus eryngii* ή Πλευρότους ο Ερύγγιος είναι εδώδιμο και φαρμακευτικό είδος που περιέχει ποικιλία βιοδραστικών συστατικών, με τους υδατοδιαλυτούς πολυσακχαρίτες να αποτελούν τη σημαντικότερη κατηγορία (Stajić et al., 2009). Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες είναι η υψηλότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα είδη του γένους *Pleurotus* (Avni et al., 2017) □ αλλά και σε σχέση με άλλα εδώδιμα είδη φτάνοντας το $38.7\% \pm 5.4$ (%w/w) (Mitsou et al., 2020) □ Οι β-γλυκάνες που προέρχονται από τα μανιτάρια ενισχύουν την ακεραιότητα του εντέρου μέσω των μεταβολιτών που προκύπτουν από τις ζυμώσεις τους από τον εντερικό μικροβιόκοσμο (Jayachandran et al., 2018). Το γεγονός αυτό μπορεί να αποτελεί πιθανή εξήγηση του προστατευτικού ρόλου που εμφανίζουν τα προϊόντα ζύμωσης του *P. eryngii* στα πειράματα της παρούσας εργασίας ως προς τις βλάβες του εντερικού φραγμού. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης προϊόντων δημητριακών που περιέχουν β-γλυκάνες και της λειτουργίας του εντερικού φραγμού. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμένες μελέτες που εξετάζουν τις β-γλυκάνες που προέρχονται από βρώσιμα μανιτάρια. Σύμφωνα με τη μελέτη των Mao και συνεργάτες (2019), η χορήγηση Lentinan (προέρχεται από μανιτάρια *Lentinula edodes*) ανακούφισε από τη διάρροια που προκλήθηκε από τον ροταϊό (RV) σε χοιρίδια και βελτίωσε τη λειτουργία του φραγμού (Mao et al., 2019). Σε μια άλλη μελέτη, το Lentinan λειτούργησε προστατευτικά

για την εντερική ακεραιότητα και τον εντερικό τραυματισμό σε ένα μοντέλο χοιριδίου που διεγέρθηκε με LPS (Wang et al., 2021)□

Οι άμεσες επιδράσεις του FS-PEWS στη σύνθεση του εντερικού μικροβιόκοσμου θα μπορούσε να είναι μια λογική εξήγηση για τις παρατηρούμενες αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης των TJs. Έχει αναφερθεί σε μελέτες ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος μπορεί να επηρεάσει τον εντερικό φραγμό, ιδιαίτερα όσον αφορά την αναδόμηση και συντήρηση των TJs (Alam & Neish, 2018)□ Στην παρούσα μελέτη, η σύγκριση μεταξύ του FS-PEWS και του FS-NC οδήγησε σε σημαντικές διαφορές και για τα τρία γονίδια (*ZO-1*, *occludin* και *claudin-1*). Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην πρεβιοτική δυναμική του *P.eryngii* που επίδρασε στον δυσβιωτικό εντερικό μικροβιόκοσμο των παιδιών με ΔΑΦ, με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων ζύμωσης των "καλών" βακτηρίων που ενίσχυσαν την έκφραση των πρωτεϊνών των TJs. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως η επώαση του εντερικού μικροβιόκοσμου ατόμων με ΔΑΦ με πρεβιοτικά είχε ως αποτέλεσμα την ενίσχυση των ωφέλιμων βακτηριακών πληθυσμών (Duque et al., 2021)□□ωστόσο δεν υπάρχει αντίστοιχη μελέτη που να διερευνά την προεπάωση του μικροβιόκοσμου με κάποιο πρεβιοτικό και την επίδραση του υπερκειμένου σε κύτταρα. Είναι αξιοσημείωτο ότι η επώαση των κυττάρων Caco-2 με FS-NC και για τα τρία γονίδια οδήγησε σε σημαντική αύξηση των TJs σε σύγκριση με τα κύτταρα Caco-2 που διεγέρθηκαν με LPS, υποδεικνύοντας ότι ο μικροβιόκοσμος του εντέρου των εθελοντών θα μπορούσε να έχει θετικό αντίκτυπο στην αποκατάσταση των TJs, αλλά σίγουρα σε μικρότερη κλίμακα από την ενισχυμένη του μορφή, έπειτα από την επίδραση της ινουλίνης ή του *P.eryngii*.

Συμπερασματικά, τα προϊόντα ζύμωσης των εδώδιμων μανιταριών του είδους *P. eryngii* θα μπορούσαν να ασκήσουν ευεργετικές επιδράσεις ως προς την διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού, επηρεάζοντας την έκφραση των *ZO-1*, *occludin* και *claudin-1*. Απαραίτητη είναι η διενέργεια κλινικών μελετών, ώστε να επιβεβαιωθεί η ευεργετική δράση που διαφαίνεται στα *in vitro* μοντέλα και να εδραιωθούν πιθανές συστάσεις για τη χρήση τους.

Βιβλιογραφία

- ❖ Abuajah, C. I. (2019). Functional Components and Medicinal Properties of Food. In *Reference Series in Phytochemistry* (Issue October). https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_39
- ❖ Adak, A., & Khan, M. R. (2019). An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 76(3), 473–493. <https://doi.org/10.1007/S00018-018-2943-4>
- ❖ Akbari, P., Braber, S., Alizadeh, A., Verheijden, K. A. T., Schoterman, M. H. C., Kraneveld, A. D., Garssen, J., & Fink-Gremmels, J. (2015). Galacto-oligosaccharides Protect the Intestinal Barrier by Maintaining the Tight Junction Network and Modulating the Inflammatory Responses after a Challenge with the Mycotoxin Deoxynivalenol in Human Caco-2 Cell Monolayers and B6C3F1 Mice. *The Journal of Nutrition*, 145(7), 1604–1613. <https://doi.org/10.3945/JN.114.209486>
- ❖ Alam, A., & Neish, A. (2018). *Role of gut microbiota in intestinal wound healing and barrier function. Tissue Barriers*, 1–22. doi:10.1080/21688370.2018.153959
- ❖ Al-Sadi, R., Khatib, K., Guo, S., Ye, D., Youssef, M., & Ma, T. (2011). Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 300(6), 1054–1064. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.00055.2011/ASSET/IMAGES/LARGE/ZH30061159340008.JPEG>
- ❖ Arrieta, M. C., Bistritz, L., & Meddings, J. B. (2006). Alterations in intestinal permeability. *Gut*, 55(10), 1512–1520. <https://doi.org/10.1136/GUT.2005.085373>
- ❖ Avni, S., Ezove, N., Hanani, H., Yadid, I., Karpovsky, M., Hayby, H., Gover, O., Hadar, Y., Schwartz, B., & Danay, O. (2017). Olive Mill Waste Enhances α-Glucan Content in the Edible Mushroom *Pleurotus eryngii*. *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 1564, 18(7), 1564. <https://doi.org/10.3390/IJMS18071564>

- ❖ Bander, Z. Al, Nitert, M. D., Mousa, A., & Naderpoor, N. (2020). The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020, Vol. 17, Page 7618, 17(20), 7618. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17207618>
- ❖ Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J. D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A., & Wells, J. M. (2014). Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*, 14(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/S12876-014-0189-7/TABLES/8>
- ❖ Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, R., Van Meerveld, B. G., & Verne, G. N. (2012). Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 24(6), 503. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2982.2012.01921.X>
- ❖ Camilleri, M. (2021). Human intestinal barrier: Effects of stressors, diet, prebiotics, and probiotics. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 12(1). <https://doi.org/10.14309/CTG.0000000000000308>
- ❖ Camilleri, M. (2019). Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut*, 68(8), 1516–1526. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2019-318427>
- ❖ Chelakkot, C., Ghim, J., & Ryu, S. H. (2018). Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & Molecular Medicine* 2018 50:8, 50(8), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0126-x>
- ❖ Chen, M., Liu, Y., Xiong, S., Wu, M., Li, B., Ruan, Z., & Hu, X. (2019). Dietary L-tryptophan alleviated LPS-induced intestinal barrier injury by regulating tight junctions in a Caco-2 cell monolayer model. *Food & Function*, 10(5), 2390–2398. <https://doi.org/10.1039/C9FO00123A>
- ❖ Chumpitazi, B. P., Hollister, E. B., Oezguen, N., Tsai, C. M., McMeans, A. R., Luna, R. A., Savidge, T. C., Versalovic, J., & Shulman, R. J. (2014). Gut microbiota influences low fermentable substrate diet efficacy in children with irritable bowel syndrome. *Gut Microbes*, 5(2), 165–175. https://doi.org/10.4161/GMIC.27923/SUPPL_FILE/KGMI_A_10927923_SM0001.ZIP

- ❖ Davoli-Ferreira, M., Thomson, C. A., & McCoy, K. D. (2021). Microbiota and Microglia Interactions in ASD. *Frontiers in Immunology*, 12.
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.676255>
- ❖ Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2017). The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 46(1), 77–89.
<https://doi.org/10.1016/J.GTC.2016.09.007>
- ❖ Dokladny, K., Zuhl, M. N., & Moseley, P. L. (2016). Intestinal epithelial barrier function and tight junction proteins with heat and exercise. *Journal of Applied Physiology*, 120(6), 692–701.
<https://doi.org/10.1152/JAPPLPHYSIOL.00536.2015/ASSET/IMAGES/LARGE/ZDG9991516140003.JPEG>
- ❖ Duque, A. L. R. F., Demarqui, F. M., Santoni, M. M., Zanelli, C. F., Adorno, M. A. T., Milenkovic, D., Mesa, V., & Sivieri, K. (2021). Effect of probiotic, prebiotic, and synbiotic on the gut microbiota of autistic children using an in vitro gut microbiome model. *Food Research International*, 149.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2021.110657>
- ❖ Fanning, A. S., & Anderson, J. M. (2009). Zonula Occludens-1 and -2 Are Cytosolic Scaffolds That Regulate the Assembly of Cellular Junctions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165(1), 113–120. <https://doi.org/10.1111/J.1749-6632.2009.04440.X>
- ❖ Fattorusso, A., Di Genova, L., Dell’isola, G. B., Mencaroni, E., & Esposito, S. (2019). Autism Spectrum Disorders and the Gut Microbiota. *Nutrients*, 11(3).
<https://doi.org/10.3390/NU11030521>
- ❖ Fombonne, E. (2009). Epidemiology of Pervasive Developmental Disorders. *Pediatric Research* 2009 65:6, 65(6), 591–598. <https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e31819e7203>
- ❖ Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature*

- Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(8), 491–502.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
- ❖ Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* 2020 113:12, 113(12), 2019–2040.
<https://doi.org/10.1007/S10482-020-01474-7>
 - ❖ Grimaldi, R., Gibson, G. R., Vulevic, J., Giallourou, N., Castro-Mejía, J. L., Hansen, L. H., Leigh Gibson, E., Nielsen, D. S., & Costabile, A. (2018). A prebiotic intervention study in children with autism spectrum disorders (ASDs). *Microbiome*, 6(1).
<https://doi.org/10.1186/S40168-018-0523-3>
 - ❖ Groschwitz, K. R., & Hogan, S. P. (2009). Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1), 3–20.
<https://doi.org/10.1016/J.JACI.2009.05.038>
 - ❖ Guarino, M. P. L., Altomare, A., Emerenziani, S., Di Rosa, C., Ribolsi, M., Balestrieri, P., Iovino, P., Rocchi, G., & Cicala, M. (2020). Mechanisms of Action of Prebiotics and Their Effects on Gastro-Intestinal Disorders in Adults. *Nutrients* 2020, Vol. 12, Page 1037, 12(4), 1037. <https://doi.org/10.3390/NU12041037>
 - ❖ Günzel, D., & Yu, A. S. L. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiological Reviews*, 93(2), 525–569.
<https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00019.2012/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0021326520007.JPEG>
 - ❖ Heinemann, U., & Schuetz, A. (2019). Structural Features of Tight-Junction Proteins. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 6020, 20(23), 6020.
<https://doi.org/10.3390/IJMS20236020>
 - ❖ Holscher, H. D. (2017). Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* 2017, 8(2): 172–184. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756>
 - ❖ Hughes, H. K., Rose, D., & Ashwood, P. (2018). The Gut Microbiota and Dysbiosis in Autism Spectrum Disorders. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 2018 18:11, 18(11), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S11910-018-0887-6>

- ❖ Iebba, V., Totino, V., Gagliardi, A., Santangelo, F., Cacciotti, F., Trancassini, M., Mancini, C., Cicerone, C., Corazziari, E., Pantanella, F., & Schippa, S. (2016). Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota SuMMARY. *New Microbiologica*, 39, 1–12.
- ❖ Lee, B., Moon, K. M., & Kim, C. Y. (2018). Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *Journal of Immunology Research*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2645465>
- ❖ 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>
- ❖ Kang, D.-W., Esra Ilhan, Z., Isern, N. G., Hoyt, D. W., Howsmon, D. P., Shaffer, M., Lozupone, C. A., Hahn, J., Adams, J. B., Krajmalnik-Brown, R., & Onderdonk, A. B. (2018). Anaerobes in the microbiome Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders. *Anaerobe*, 49, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.12.007>
- ❖ Kerezoudi, E. N., Mitsou, E. K., Gioti, K., Terzi, E., Avgousti, I., Panagiotou, A., Koutrotsios, G., Zervakis, G. I., Mountzouris, K. C., Tenta, R., & Kyriacou, A. (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 and Function*, 12(4), 1529–1546. <https://doi.org/10.1039/d0fo02581j>
- ❖ König, J., Wells, J., Cani, P. D., García-Ródenas, C. L., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F., & Brummer, R. J. (2016). Human intestinal barrier function in health and disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 7(10). <https://doi.org/10.1038/CTG.2016.54>
- ❖ Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjö, R., Strö, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), 95-125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>

- ❖ Li, Q., Han, Y., Dy, A. B. C., & Hagerman, R. J. (2017). The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11.
<https://doi.org/10.3389/FNCEL.2017.00120>
- ❖ Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408.
<https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- ❖ Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., & Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 2012 489:7415, 489(7415), 220–230. <https://doi.org/10.1038/nature11550>
- ❖ Madigan, Martinko Bender, Buckley και Stahl, Brock Βιολογία των Μικροοργανισμών Τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 2018
- ❖ Mangiola, F., Ianiro, G., Franceschi, F., Fagioli, S., Gasbarrini, G., & Gasbarrini, A. (2016). Gut microbiota in autism and mood disorders. *World Journal of Gastroenterology*, 22(1), 361–368. <https://doi.org/10.3748/WJG.V22.I1.361>
- ❖ Mao, X., Hu, H., Xiao, X., Chen, D., Yu, B., He, J., ... Wang, J. (2019). *Lentinan administration relieves gut barrier dysfunction induced by rotavirus in a weaned piglet model. Food & Function.* doi:10.1039/c8fo01764f
- ❖ Martin, C. R., Osadchiy, V., Kalani, A., & Mayer, E. A. (2018). The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 6(2), 133.
<https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2018.04.003>
- ❖ Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Delgado Palacio, S., Arbolea Montes, S., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., de Vos, W., Gueimonde, M., Margolles, A., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(4).
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17/ASSET/ED052CD5-7DCD-4E0A-9A04-078E72A30134/ASSETS/GRAPHIC/ZMR0041724720010.JPEG>
- ❖ Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., Belzer, C., Palacio, S. D., Montes, S. A., Mancabelli, L., Lugli, G. A., Rodriguez, J. M., Bode, L., Vos, W. de,

- Gueimonde, M., Margolles, A., Sinderen, D. van, & Ventura, M. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 81(4).
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00036-17>
- ❖ Mitsou, E. K., Saxami, G., Stamoulou, E., Kerezoudi, E., Terzi, E., Koutrotsios, G., Bekiaris, G., Zervakis, G. I., Mountzouris, K. C., Pletsa, 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>
 - ❖ Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson, S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086), 1262–1267.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1223813>
 - ❖ Pham, V. T., Seifert, N., Richard, N., Raederstorff, D., Steinert, R., Prudence, K., & Hasan Mohajeri, M. (2018). The effects of fermentation products of prebiotic fibres on gut barrier and immune functions in vitro. *PeerJ*, 2018(8), e5288.
<https://doi.org/10.7717/PEERJ.5288/SUPP-3>
 - ❖ Quigley, E. M. M. (2017). Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Current Neurology and Neuroscience Reports 2017 17:12*, 17(12), 1–9.
<https://doi.org/10.1007/S11910-017-0802-6>
 - ❖ Rose, E. C., Odle, J., Blikslager, A. T., & Ziegler, A. L. (2021). Probiotics, Prebiotics and Epithelial Tight Junctions: A Promising Approach to Modulate Intestinal Barrier Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13).
<https://doi.org/10.3390/IJMS22136729>
 - ❖ Sanctuary, M. R., Kain, J. N., Chen, S. Y., Kalanetra, K., Lemay, D. G., Rose, D. R., Yang, H. T., Tancredi, D. J., Bruce German, J., Slupsky, C. M., Ashwood, P., Mills, D. A., Smilowitz, J. T., & Angkustsiri, K. (2019). Pilot study of probiotic/colostrum supplementation on gut function in children with autism and gastrointestinal symptoms. *PloS One*, 14(1).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0210064>
 - ❖ Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews*

Gastroenterology & Hepatology 2019 16:10, 16(10), 605–616.

<https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>

- ❖ Sanlier, N., & Kocabas, Ş. (2021). The effect of probiotic, prebiotic and gut microbiota on ASD: A review and future perspectives. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1973957>
- ❖ Saxami, G., Karapetsas, A., Lamprianidou, E., Kotsianidis, I., Chlichlia, A., Tassou, C., Zoumpourlis, V., & Galanis, A. (2016). Two potential probiotic lactobacillus strains isolated from olive microbiota exhibit adhesion and anti-proliferative effects in cancer cell lines. *Journal of Functional Foods*, 24, 461–471. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2016.04.036>
- ❖ Saxami G., Kerezoudi E., Mitsou E., Koutrotsios G., Zervakis G., 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*, 9:2071 DOI:10.3390/ microorganisms9102071
- ❖ Sheng, K., He, S., Sun, M., Zhang, G., Kong, X., Wang, J., & Wang, Y. (2020). Synbiotic supplementation containing: *Bifidobacterium infantis* and xylooligosaccharides alleviates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis. *Food and Function*, 11(5), 3964–3974. <https://doi.org/10.1039/d0fo00518e>
- ❖ Schoultz, I., & Keita, Å. V. (2020). The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/CELLS9081909>
- ❖ Stajić, M., Vukojević, J., & Duletić-Lauević, S. (2009). Biology of *pleurotus eryngii* and role in biotechnological processes: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(1), 55–66. <https://doi.org/10.1080/07388550802688821>
- ❖ Stevenson, B. R., Siliciano, J. D., Mooseker, M. S., & Goodenough, D. A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *Journal of Cell Biology*, 103(3), 755–766. <https://doi.org/10.1083/JCB.103.3.755>
- ❖ Strandwitz, P. (2018). Neurotransmitter modulation by the gut microbiota. *Brain Research*, 1693, 128–133. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2018.03.015>
- ❖ Strati, F., Cavalieri, D., Albanese, D., De Felice, C., Donati, C., Hayek, J., Jousson, O., Leoncini, S., Renzi, D., Calabrò, A., & De Filippo, C. (2017) *New evidences on the altered*

gut microbiota in autism spectrum disorders. Microbiome, 5(1):24.

<https://doi.org/10.1186/s40168-017-0242-1>

- ❖ Suganya, K., & Koo, B. S. (2020). Gut-Brain Axis: Role of Gut Microbiota on Neurological Disorders and How Probiotics/Prebiotics Beneficially Modulate Microbial and Immune Pathways to Improve Brain Functions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 1–29. <https://doi.org/10.3390/IJMS21207551>
- ❖ Suzuki, T. (2020). Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *Animal Science Journal*, 91(1). <https://doi.org/10.1111/ASJ.13357>
- ❖ Takiishi, T., Fenero, C. I. M., & Câmara, N. O. S. (2017). Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1373208>, 5(4).
- ❖ Tan, Q., Orsso, C. E., Deehan, E. C., Kung, J. Y., Tun, H. M., Wine, E., Madsen, K. L., Zwaigenbaum, L., & Haqq, A. M. (2021). Probiotics, prebiotics, synbiotics, and fecal microbiota transplantation in the treatment of behavioral symptoms of autism spectrum disorder: A systematic review. *Autism Research*, 14(9), 1820–1836. <https://doi.org/10.1002/AUR.2560>
- ❖ Tavares Da Silva, S., Araújo, C., Santos, D., & Bressan, J. (2013). Intestinal microbiota; relevance to obesity and modulation by prebiotics and probiotics MICROBIOTA INTESTINAL; RELEVANCIA PARA LA OBESIDAD Y LA MODULACIÓN DE LOS PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS Resumen. *Nutr Hosp*, 28(4), 1039–1048. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.4.6525>
- ❖ Tsukita, S., Tanaka, H., & Tamura, A. (2018). *The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. Trends in Biochemical Sciences*. doi:10.1016/j.tibs.2018.09.008
- ❖ Uerlings, J., Schroyen, M., Willems, E., Tanghe, S., Bruggeman, G., Bindelle, J., & Everaert, N. (2020). Differential effects of inulin or its fermentation metabolites on gut barrier and immune function of porcine intestinal epithelial cells. *Journal of Functional Foods*, 67. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2020.103855>
- ❖ Vander A., S. J., LUCIANO D. 2001. Φυσιολογία του Ανθρώπου, Μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού, Τόμος Ι, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης

- ❖ Yang, J., Fu, X., Liao, X., & Li, Y. (2020). Effects of gut microbial-based treatments on gut microbiota, behavioral symptoms, and gastrointestinal symptoms in children with autism spectrum disorder: A systematic review. *Psychiatry Research*, 293, 113471. <https://doi.org/10.1016/J.PSYCHRES.2020.113471>
- ❖ Wang, G., Sun, W., Pei, X., Jin, Y., Wang, H., Tao, W., Xiao, Z., Liu, L., & Wang, M. (2021). Galactooligosaccharide pretreatment alleviates damage of the intestinal barrier and inflammatory responses in LPS-challenged mice. *Food & Function*, 12(4), 1569–1579. <https://doi.org/10.1039/D0FO03020A>
- ❖ Wongkrasant, P., Pongkorpsakol, P., Ariyadamrongkwan, J., Meesomboon, R., Satitsri, S., Pichyangkura, R., Barrett, K. E., & Muanprasat, C. (2020). A prebiotic fructo-oligosaccharide promotes tight junction assembly in intestinal epithelial cells via an AMPK-dependent pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 129. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2020.110415>
- ❖ Wu, Y., Zhang, X., Han, D., Ye, H., Tao, S., Pi, Y., Zhao, J., Chen, L., & Wang, J. (2020). Short administration of combined prebiotics improved microbial colonization, gut barrier, and growth performance of neonatal piglets. *ACS Omega*, 5(32), 20506–20516. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.0C02667/SUPPL_FILE/AO0C02667_SI_001.PDF
- ❖ Zhu, F., Du, B., Bian, Z., & Xu, B. (2015). Beta-glucans from edible and medicinal mushrooms: Characteristics, physicochemical and biological activities. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 165–173. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2015.01.019>
- ❖ 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>
- ❖ Μεντής, Α.-φα, Γύπας, Φ., Μεντής, Α., Δημόσιας Υγείας, Ε., Ινστιτούτο Παστέρ, Ε., Βιολογίας, Τ., & και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ε. (2013). *Human enteric microbiome: Its role in health and disease* Λέξεις ευρετηρίου Ανθρώπινο μικροβίωμα Εντερική μικροχλωρίδα Μεταγονιδιωματική. 30(3), 272–288. <http://commonfund.nih.gov/hmp/>

