



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Σχολή Θετικών Επιστημών

Τμήμα Βιολογίας

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης: ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας

Τίτλος Διπλωματικής Εργασίας:

«Μεταβολομική ανάλυση και αντι-γονοτοξικό αποτύπωμα των προϊόντων της *in vitro* ζύμωσης εδώδιμων βασιδιομυκήτων του Ελλαδικού χώρου από το εντερικό μικροβίωμα υγιών εθελοντών».

ΕΛΕΝΗ ΛΙΑΝΟΥ, ΒΙΟΛΟΓΟΣ

A.M.: 81710

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Αμαλία Δ. Καραγκούνη ¹

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή: Αμαλία Δ. Καραγκούνη ¹, Βασιλική Πλέτσα ², Αδαμαντίνη Κυριακού ³

¹ Ομότιμη Καθηγήτρια, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

² Κύρια Ερευνήτρια, Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

³ Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Διατροφής και Διαιτολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Αθήνα, 2019- 2020

Με την περάτωση της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους με βοήθησαν και συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα της Διπλωματικής μου στο ΕΙΕ, Δρ. Βασιλική Πλέτσα, Κύρια Ερευνήτρια στο Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, όπου εκπονήθηκε το σύνολο των πειραμάτων. Με την επιστημονική καθοδήγησή της, τις γνώσεις, τις συνεχείς συμβουλές της και την αδιάκοπη υποστήριξή της κατάφερα να ολοκληρώσω τα πειράματα και τη συγγραφή της Διπλωματικής μου Εργασίας.

Στη συνέχεια, ευχαριστώ θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Παράσχο Χριστοδούλου, που δίχως την πολύτιμη βοήθειά του, όσον αφορά στις NMR αναλύσεις, την υπομονή και τις πολύ χρήσιμες συμβουλές του, θα ήταν αδύνατη η περάτωση των πειραμάτων.

Η βοήθεια της Δρ. Αθηνάς Μπούλακα ήταν εξίσου καθοριστική στις γονοτοξικές αναλύσεις. Με φιλική διάθεση παρείχε συνεχώς την πολύτιμη βοήθειά της, για την οποία της είμαι ευγνώμων.

Τις θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Δρ. Παναγιώτη Γεωργιάδη και την Δρ. Μαρία Ζερβού, Ερευνητές του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, για τη συμβολή τους στην πραγματοποίηση του εργαστηριακού σκέλους της μελέτης καθώς και για τις συνεχείς υποδείξεις που μου παρείχαν.

Σημαντική ήταν και η συμβολή της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας του τμήματος Διατροφής και Διαιτολογίας στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο κ. Αδαμαντίνης Κυριακού, την οποία ευχαριστώ πολύ.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κ. Αμαλία Καραγκούνη, Ομότιμη Καθηγήτρια του τομέα Βοτανικής στο τμήμα Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανάθεση του θέματος και τη δυνατότητα εκπόνησης της Διπλωματικής μου Εργασίας.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Χημικής Καρκινογένεσης και Γενετικής Τοξικολογίας καθώς και του εργαστηρίου Μοριακής Ανάλυσης του Ινστιτούτου Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, με τους οποίους περάσαμε αρκετές ώρες συνεργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και κυρίως τον σύζυγό μου, που με βοηθούσε και με στήριζε ηθικά καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης και της συγγραφής της παρούσας εργασίας, μιας και ήταν μια ιδιαίτερα δύσκολη περίοδος με την αναμονή της έλευσης του γιου μας.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT.....	6
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1. Ανθρώπινος Εντερικός Μικροβιόκοσμος.....	9
1.2. Εντερικός Μικροβιόκοσμος - Επίδραση πρεβιοτικών στον Εντερικό Μικροβιόκοσμο	10
1.2.1. Οι φυσιολογικές λειτουργίες και οι μηχανισμοί δράσης των β-γλυκανών	13
1.2.2. Οι β-(1→3, 1→6) -D-γλυκάνες ως πρεβιοτικά	17
1.2.3. Βασιδιομύκητες (μανιτάρια) πλούσιοι σε β-γλυκάνες	17
1.3. <i>In vitro</i> συστήματα ζύμωσης βασιδιομυκήτων από τον Εντερικό Μικροβιόκοσμο	19
1.4. Παραγωγή μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους	21
1.5. Μεταβολομικές μελέτες σε βιολογικά δείγματα.....	22
1.5.1. Μεταβολομική ανάλυση ολικού μεταβολώματος βιολογικών δειγμάτων	25
1.5.2. Πλεονεκτήματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)	26
1.6. Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	29
2.1. <i>In vitro</i> ζύμωση μυκητιακών στελεχών με εμβόλιο κοπράνων υγιών εθελοντών	30
2.2. <i>Pleurotus ostreatus</i> & <i>Ganoderma lucidum</i> : μελέτη της επίδρασης των προϊόντων της <i>in vitro</i> ζύμωσής τους στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και U-937	30
2.2.1. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη μέθοδο MTT	31
2.2.2. Διερεύνηση και προσδιορισμός της αντιγονοτοξικής δράσης με τη μέθοδο COMET	32
<i>Αρχή της μεθόδου</i>	33
<i>Βιοπληροφορική ανάλυση</i>	37
<i>Πειραματική διαδικασία</i>	38
2.3. Διερεύνηση μεταβολικού αποτυπώματος των προϊόντων ζύμωσης	39
2.3.1. Λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού με ¹ H NMR.....	40
<i>Φασματοσκοπία πρωτονίου με χρήση της παλμική ακολουθίας ¹H NOESY-presat 1D</i>	40
2.3.2. Εύρεση μεταβολιτών με χρήση της βάσης δεδομένων HFMDB (Human Fecal Metabolome Database)	41
2.3.3. Ταυτοποίηση μεταβολιτών με χρήση του λογισμικού Chenomx NMR Suite 6.0.....	42
2.3.4.1. Επεξεργασία φασματικών δεδομένων με χρήση του προγράμματος MestReNova (Mnova)	43

<i>Διόρθωση ως προς τη φάση και τη γραμμική βάση (Baseline correction)</i>	43
<i>Κανονικοποίηση ως προς την κορυφή συντονισμού του TSP και ως προς την ολική περιοχή (Normalization)</i>	44
<i>Τμηματοποίηση του φάσματος σε φασματικές περιοχές (Binning)</i>	44
<i>Υπέρθωση (Superimpose) και ευθυγράμμιση φασμάτων (Alignment)</i>	45
2.3.4.2. Χημειομετρική ανάλυση δεδομένων με το στατιστικό λογισμικό πρόγραμμα SIMCA-P 14.0 (UMETRICS, Umea, Sweden)	46
<i>Μη επιβλεπόμενη ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA)</i>	47
<i>Επιβλεπόμενη ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA)</i>	47
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	49
3.1. Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας (MTT) στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και U-937	50
3.2. Διερεύνηση της γονοπροστατευτικής δράσης στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και U-937.....	51
3.3. Δειγματοχώρος μεταβολομικής ανάλυσης με χρήση φασμάτων 1D ¹ H NMR	52
3.3.1. Υπέρθωση φασμάτων και ευθυγράμμιση με χρήση λογισμικού Mnova	54
3.3.2. Αναγνώριση πιθανών μεταβολιτών από φάσμα μίας διάστασης με χρήση του λογισμικού Chenomx NMR Suite 6.0.	57
3.3.3. Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	75
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	82
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	90

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο Εντερικός Μικροβιόκοσμος (EM) είναι η πιο πολύπλοκη μικροβιακή κοινότητα στον οργανισμό του ανθρώπου, που συνδέεται με διάφορες δραστηριότητες, οι οποίες προάγουν την υγεία. Οι β- (1→3, 1→6) -D-γλυκάνες, που είναι άφθονες στο κυτταρικό τοίχωμα των μυκήτων, είναι πολυσακχαρίτες με διαφορές στη χημική τους δομή και βιοδραστικότητα. Οι μηχανισμοί ρύθμισης της μικροβιακής κοινότητας του εντέρου από μύκητες πλούσιους σε β-γλυκάνες δεν έχουν διερευνηθεί ακόμη πλήρως. Εντούτοις, αυξανόμενες πειραματικές ενδείξεις υποστηρίζουν την πιθανή πρεβιοτική δράση αυτών των μυκήτων και κατά συνέπεια τις ευεργετικές για την υγεία ιδιότητές τους, συμπεριλαμβανομένων των αντικαρκινικών και ανοσορρυθμιστικών τους δράσεων.

Η ανάλυση του μεταβολικού προτύπου (προφίλ) που παράγεται από τις ζυμώσεις πολυσακχαριτών – διατροφικών συστατικών από τον EM, δηλαδή η συστηματική μελέτη των μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους που παράγονται ως αποτέλεσμα της συγκεκριμένης βιολογικής διαδικασίας, είναι εξαιρετικά χρήσιμη διότι παρέχει σημαντικά δεδομένα για την αποτίμηση του ρόλου του στην ομαλή φυσιολογία του οργανισμού αλλά και την απορρύθμισή της. Οι μεταβολομικές μελέτες προϋποθέτουν τον συνδυασμό αναλυτικών τεχνικών υψηλής απόδοσης και προηγμένης τεχνολογίας που επιτρέπουν την πρόσβαση στο ενιαίο μεταβολικό προφίλ όπως ο Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός (NMR) και η Φασματοσκοπία Μάζας (LC-MS, GC-MS, CE-TOF-MS, UPLC-TOF-MS).

Στη συγκεκριμένη Διπλωματική Εργασία διερευνήθηκε αρχικά η επίδραση και η αντι-γονοτοξική δράση των προϊόντων της *in vitro* ζύμωσης των μανιταριών *Pleurotus ostreatus* 1123 και *Ganoderma lucidum* από βακτήρια του εντερικού μικροβιόκοσμου κοπράνων υγιών εθελοντών στις ανθρώπινες κυτταρικές σειρές Caco-2 (επιθηλιακά κύτταρα αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου) και U-937 (μονοκύτταρα – αδιαφοροποίητα μακροφάγα). Ακολούθως, εξετάστηκε το σύνολο των μεταβολιτών που προκύπτουν στα προϊόντα της *in vitro* ζύμωσης των *Pleurotus ostreatus* 1123 και *Ganoderma lucidum* αλλά και των *Pleurotus ostreatus* LGM22, *Pleurotus eryngii* Zheng (216), *Cyclocybe cylindracea* CC2 και *Cyclocybe cylindracea* 505, τα οποία αυξήθηκαν σε υπόστρωμα Wheat Straw (WS, άχυρο), με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Για την ταυτοποίηση των κορυφών συντονισμού του φάσματος χρησιμοποιήθηκαν η βάση δεδομένων κύριων μεταβολιτών του λογισμικού Chenomx NMR Suite 6.0 και βιβλιογραφικά δεδομένα. Με χρήση του προγράμματος Mnova (Mestrelab Research) τα φάσματα ¹H NMR διορθώθηκαν ως προς τη φάση και τη γραμμή βάσης και κανονικοποιήθηκαν με βάση την κορυφή συντονισμού του TSP στα 0 ppm. Εφαρμόστηκε Χημειομετρία με σκοπό την εξαγωγή χημικών πληροφοριών από τα φάσματα NMR. Τα κύρια χημειομετρικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν, αφού ανταποκρίνονται σε μεγάλο αριθμό μεταβλητών, είναι η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) και η παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωρισμό της συστηματικής αλλά μη συσχετιζόμενης ως προς την Y- μεταβλητή (ορθογώνια) διακύμανσης της μήτρας μεταβλητών X (OPLS). Η χημειομετρική ανάλυση των δεδομένων υλοποιήθηκε με το στατιστικό λογισμικό πρόγραμμα SIMCA-P 14.0 (UMETRICS, Umea, Sweden).

Τα αποτελέσματα της εργασίας κατέδειξαν ότι τα προϊόντα της *in vitro* ζύμωσης εδώδιμων μανιταριών από τον EM κοπράνων υγιών εθελοντών ασκούν σημαντική αντι-γονοτοξική δράση ενώ η *in vitro* ζύμωσή τους επιφέρει διακριτές διαφορές στη σύσταση του μεταβολικού αποτυπώματος. Παράγονται λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs) που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των ευεργετικών για την υγεία βακτηρίων καθώς και πλήθος μεταβολιτών που συνθέτουν ένα αποτύπωμα ειδικό για τη διαδικασία της ζύμωσης και την αποτελεσματικότητά της.

ΛΕΞΕΙΣ – ΚΛΕΙΔΙΑ: β-γλυκάνες, SCFA, Εντερικός Μικροβιόκοσμος, Ανάλυση κομητών, NMR-μεταβολομική μελέτη

ABSTRACT

The Gut Microbiota (GM) is the most complex microbial community in the human body, associated with various activities that promote health. The β - (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6) -D-glucans, abundant in the fungal cell wall, are polysaccharides with differences in their chemical structure and bioactivity. The mechanisms through which beta-glucan-rich edible fungi regulate the gut microbial community have not been fully elucidated yet. However, increasing experimental evidence supports their potential prebiotic activity and hence, their health-promoting properties, anti-cancer and immunomodulatory activities included.

The analysis of the metabolic pattern (profile) produced as a result of the fermentation of dietary polysaccharides - nutrients by the intestinal microbiota, that is, the systematic identification of low molecular weight metabolites produced, provides extremely useful data as to the role of GM not only in normal physiology but also in its deregulation and pathogenesis. Metabolomic studies targeting specific metabolic pathways are currently a cornerstone of biological research and require the integration of high-performance analytical, state-of-the-art techniques such as NMR and Mass Spectroscopy (LC-MS, GC-MS, CE-TOF-MS, UPLC-TOF-MS).

In this thesis, we initially investigated the cytotoxic (MTT assay) and geno-protective (Comet assay) effect of the *in vitro* fermentation products of *Pleurotus ostreatus* 1123 and *Ganoderma lucidum* by fecal microbiota of healthy volunteers in Caco-2 (epithelial adenocarcinoma colon) and U-937 (monocyte-macrophage) human cell lines. Subsequently, all metabolites resulting from the *in vitro* fermentation of *Pleurotus ostreatus* 1123 and *Ganoderma lucidum* were analysed by NMR and a similar analysis followed for *Pleurotus ostreatus* LGM22, *Pleurotus eryngii* Zheng (216), *Cyclocybe cylindracea* CC2 and *Cyclocybe cylindracea* 505 *in vitro* fermentation products, all cultivated on Wheat Straw. The Chenomx NMR Suite 6.0 main metabolites database and bibliographic data were used to identify the spectrum resonance peaks. Using the Mnova program (Mestrelab Research) the ^1H NMR spectra were corrected for phase and baseline and normalized based on the TSP resonance peak at 0 ppm. Subsequently, Chemometry was applied to extract chemical information from the NMR spectra. The main chemometric tools used, after responding to a large number of variables, were PCA and the regression of a few least squares by separating the systematic but non-correlated Y-variable (orthogonal) variable matrix X (OPLS). Chemometric analysis of the data was performed with the statistical software program SIMCA-P 14.0 (UMETRICS, Umea, Sweden).

The results of this work showed that the products of *in vitro* fermentation of edible mushrooms by the fecal microbiota of healthy volunteers exert a significant anti-genotoxic effect while they are characterized by distinct differences in the metabolic profile composition. Short-chain fatty acids (SCFAs), linked to the metabolism of probiotic bacteria, as well as a plethora of metabolites, specific for the fermentation process and its effectiveness, are produced.

KEYWORDS: beta-glucans, SCFA, Intestinal Microbiota, Comet assay, NMR-based Metabolomics

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

1D	one-Dimensional
2D	two-Dimensional
ATCC	American Type Culture Collection
tBOOH	Butyl oxide
BSA	Bovine Serum Albumin
CPMG	Carr–Purcell–Meiboom–Gill
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxide
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
GC	Gas Chromatography
HFMDDB	Human Fecal Metabolome Database
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC	Liquid Chromatography
MS	Mass Spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
O-PLS-DA	Orthogonal-Partial Least Squares- Discrimination Analysis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Principal Components Analysis
PI	Propidium Iodide
PLS	Partial Least Squares
PS	Phosphatidylserine
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SCFA	Sort Chain Fatty Acids
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TSP	Trimethylsilylpropionic
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
EM	Εντερικός Μικροβίος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

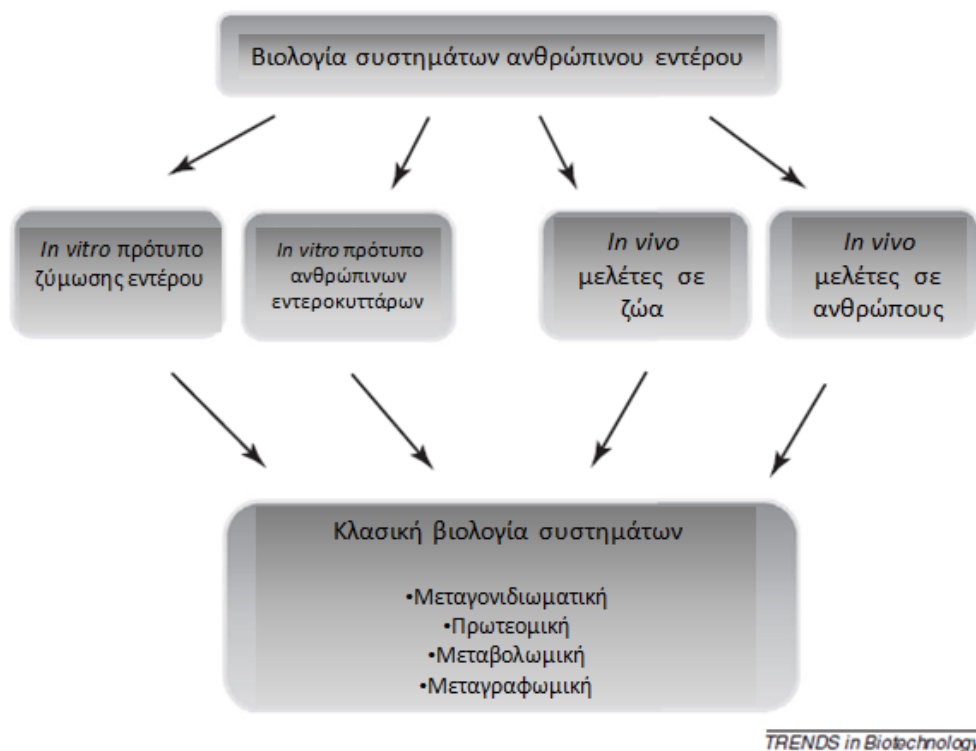
1.1. Ανθρώπινος Εντερικός Μικροβιόκοσμος

Ο ανθρώπινος εντερικός σωλήνας περιέχει μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών μικροοργανισμών, που συνιστούν τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Η τελευταία αποτελείται από μικροβιακά κύτταρα που ανήκουν σε όλες τις μορφές της κυτταρικής ζωής (αρχαία, βακτήρια, ευκάρυα) αλλά και από ιούς (βακτηριοφάγοι) που αποικίζουν το ανθρώπινο έντερο, δημιουργώντας ένα από τα πιο πυκνά οικοσυστήματα (Abbeele et al. 2011). Το βακτηριακό μέρος του μικροβιακού φορτίου του εντέρου είναι το πιο καλά μελετημένο και περιγράφεται καλύτερα σχετικά με τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς. Τα τρισεκατομμύρια των βακτηρίων που αποικούν στο έντερο κάθε ατόμου ανήκουν σε εκατοντάδες διαφορετικά είδη. Η σύνθεση των μικροβίων του εντέρου είναι εξαιρετικά δυναμική και διαφορετική για κάθε άνθρωπο, ενώ υφίσταται διακυμάνσεις ανάλογα με τις αλλαγές κατά τη διάρκεια της ζωής, όπως η ηλικία, η γεωγραφική θέση, η διατροφή, πιθανή φαρμακευτική αγωγή (Sekirov et al. 2010). Η αλληλούχηση του γονιδιώματος των μικροβίων του εντέρου αποκάλυψε την πολυπλοκότητα του γαστρεντερικού μικροβιώματος, με χιλιάδες διαφορετικούς φυλότυπους που ανήκουν κατά κύριο λόγο στα φύλα των *Firmicutes* και *Bacteroidetes*. Μικρότεροι πληθυσμοί ανήκουν στα *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobiota* και *Fusobacteria* (Forster et al. 2016).

Ένας υγιής εντερικός σωλήνας αποτελείται κυρίως από αυστηρά αναερόβιους μικροοργανισμούς. Οι αερόβιοι και οι προαιρετικά αναερόβιοι εμφανίζονται σε πολύ μικρό ποσοστό. Στο έντερο ανιχνεύονται πάνω από 50 διαφορετικά βακτηριακά φύλα με κυρίαρχα τα *Bacteroidetes* και *Firmicutes* σε ποσοστό 90% και τα *Actinobacteria* να έρχονται τρίτα σε ποσοστό 3%. Πιο συγκεκριμένα, τα κυριότερα υποχρεωτικά αναερόβια γένη είναι τα *Bacteroides* (κάποια παρουσιάζουν προφλεγμονώδη δράση), *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium* και *Clostridium*. Στα προαιρετικά αερόβια ανήκουν κυρίως τα εντεροβακτήρια, όπως το *Escherichia coli* (*E.coli*), ενώ υπάρχουν και οι εντερόκοκκοι. Στο φύλο *Firmicutes* ανήκουν γένη των *Streptococcaceae* και *Lactobacillales* ενώ στελέχη των *Actinomycinaeae*, *Corynebacteriaeae*, *Collinsella aerofaciens* ή *Propionibacteria* ανήκουν στα *Actinobacteria* (Plummer et al. 2014).

Η σχέση μεταξύ του μικροβιόκοσμου της εντερικής χώρας και του ξενιστή είναι συμβιωτική. Τόσο ο ξενιστής όσο και τα εντερικά βακτήρια έχουν κοινή ωφέλεια. Ο ξενιστής παρέχει στα εντερικά βακτήρια ένα σταθερό περιβάλλον (συγκεκριμένη θερμοκρασία και pH) καθώς και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά που χρειάζονται για τον πολλαπλασιασμό τους αλλά και την εκτέλεση των βασικών τους λειτουργιών. Τα μικρόβια του εντέρου με τη σειρά τους διευκολύνουν την απορρόφηση των τροφών που έχουν υποστεί πέψη. Πιο συγκεκριμένα, λαμβάνουν μέρος στην αποικοδόμηση των άπεπτων θρεπτικών συστατικών που καταλήγουν στο παχύ έντερο και στην απορρόφησή τους, ενώ συμβάλουν στην κινητικότητα του εντέρου. Παράγουν διάφορα μεταβολικά προϊόντα, με κυριότερα τα οργανικά οξέα βραχείας αλυσίδας (Short Chain Fatty Acids: SCFAs) όπως το βουτυρικό οξύ και βιταμίνες όπως η K και B. Ακόμη, βοηθούν στην απορρόφηση μετάλλων, ενώ βοηθούν στην καταστροφή τοξινών (Markowiak et al. 2017).

Τέλος, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος και στη διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού βλεννογόνου. Ένας υγιής εντερικός μικροβιόκοσμος συμβάλλει στην ανάπτυξη ενός ισορροπημένου αμυντικού συστήματος. Τα συμβιωτικά βακτήρια παράγουν αντιμικροβιακούς παράγοντες και ανταγωνίζονται τους παθογόνους μικροοργανισμούς ως προς τη πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά και την προσκόλληση στο έντερο. Πιο συγκεκριμένα, αποτρέπουν την προσκόλληση των παθογόνων στα αντίστοιχα σημεία στα επιθηλιακά κύτταρα. Λόγω του πλήθους τους, κάνουν χρήση όλων των πηγών ενέργειας, περιορίζοντας με αυτό τον τρόπο την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων. Επίσης, παράγουν ουσίες, όπως οι βακτηριοσίνες που εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων (Li et al. 2019).



Εικόνα 1.1.: Βιολογική προσέγγιση των συστημάτων του ανθρώπινου εντέρου για τη λειτουργική ανάλυση του EM (Payne et al. 2012).

1.2. Εντερικός Μικροβιόκοσμος - Επίδραση πρεβιοτικών στον Εντερικό Μικροβιόκοσμο

Οι αλληλεπιδράσεις των μικροβίων του ανθρώπινου εντέρου και των άπεπτων διαιτητικών συστατικών παίζουν σημαντικούς ρόλους στην υγεία και σε ασθένειες του ανθρώπου και των ζώων, καθώς περιλαμβάνουν μια ποικιλία μεταβολικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της συλλογής και αποθήκευσης ενέργειας. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί του εντέρου αλληλεπιδρούν με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή, παρέχοντας σήματα που προάγουν την ωρίμανση των ανοσολογικών κυττάρων και τη φυσιολογική ανάπτυξη των λειτουργιών του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τους εντερικούς μικροβιακούς πληθυσμούς περιλαμβάνουν τον τρόπο γέννησης, την ηλικία και τη διατροφή (Sun et al. 2018).

Τα βακτήρια του εντερικού σωλήνα έχουν διάφορες μεταβολικές λειτουργίες, όπως ο σχηματισμός διαφόρων τελικών προϊόντων ζύμωσης, η τροποποίηση των χολικών οξέων και ο μεταβολικός μετασχηματισμός των ξενοβιοτικών ενώσεων. Επίσης, σχηματίζουν ένα προστατευτικό φράγμα ενάντια στους παθογόνους μικροοργανισμούς του εντέρου. Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες αρκετές μελέτες ασχολήθηκαν με το ζήτημα εάν τα βακτήρια γαλακτικού οξέος ή / και τα μπιφιδοβακτήρια μπορούν να προάγουν την ανθρώπινη υγεία (Ortwin, 2005).

Πολλοί μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν προβιοτικές δραστηριότητες ανήκουν στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria, LAB). Γενικά, τα LAB είναι μικροοργανισμοί που δεν σχηματίζουν σπόρους, μικροαερόφιλοι, θετικοί κατά Gram και αρνητικοί στην καταλάση. Από την άλλη πλευρά, τα βακτήρια που σχηματίζουν ενδοσπόρια είναι προαιρετικά αερόβια ή αναερόβια και ανήκουν

κυρίως στο γένος *Bacillus*. Το γένος *Bacillus* πλεονεκτεί σε σχέση με τα προβιοτικά LAB, έχοντας υψηλότερη σταθερότητα στη θερμότητα, στα χολικά άλατα και στο χαμηλό γαστρικό pH, λόγω του χαρακτηριστικού σχηματισμού σπορίων. Τα πιο σημαντικά γένη των LAB είναι *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* και *Tetragenococcus* ενώ τα κύρια προβιοτικά είδη είναι *B. animalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. salgaric*, *L. lactis*, *L. johnsonii*, *L. plantarum* και *L. reuteri* (Mousavi et al. 2020).

Μοριακές και γενετικές μελέτες επέτρεψαν τον προσδιορισμό τεσσάρων μηχανισμών που σχετίζονται με τα ευεργετικά αποτελέσματα των προβιοτικών (Markowiak et al. 2017):

1. Ανταγωνισμός μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών.
2. Ανταγωνισμός με παθογόνα για προσκόλληση στο επιθήλιο και για θρεπτικά συστατικά.
3. Ανοσολογική διαμόρφωση του ξενιστή.
4. Αναστολή της παραγωγής βακτηριακών τοξινών.

Οι επεμβατικές μελέτες συχνά σχεδιάζονται για να αυξήσουν τον πληθυσμό των λεγόμενων ευεργετικών βακτηρίων, όπως τα μπιφιδοβακτήρια και οι λακτοβάκιλλοι. Ένας τρόπος για να προωθηθεί η σύνθεση ευεργετικών βακτηρίων είναι η κατανάλωση πρεβιοτικών. Τα πρεβιοτικά είναι μη αφομοιώσιμα συστατικά τροφίμων τα οποία έχουν ευεργετική επίδραση στον ξενιστή με την εκλεκτική διέγερση της ανάπτυξης και / ή της δραστηριότητας των βακτηριακών στελεχών που ήδη κατοικούν στην εντερική κοιλότητα. Τα πρεβιοτικά δεν πέπτονται από τα γαστρεντερικά ένζυμα. Αντ' αυτού, περνούν μέσω της ανώτερης εντερικής οδού μέσα στον εντερικό αυλό, όπου επιλεκτικά ζυμώνονται από τα ευεργετικά βακτήρια.

Τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά και άλλα βρώσιμα φυτά αποτελούν πηγές υδατανθράκων που συνιστούν πιθανά πρεβιοτικά. Τα ακόλουθα μπορούν να αναφερθούν ως τέτοιες δυνητικές πηγές: ντομάτες, αγκινάρες, μπανάνες, σπαράγγια, μούρα, σκόρδο, κρεμμύδια, πράσινα λαχανικά, όσπρια, καθώς και η βρώμη, ο λιναρόσπορος, το κριθάρι και το σιτάρι. Ορισμένα τεχνητά παραγόμενα πρεβιοτικά είναι, μεταξύ άλλων, η λακτουλόζη, οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες, οι φρουκτοολιγοσακχαρίτες, οι μαλτοολιγοσακχαρίτες, οι κυκλοδεξτρίνες και η γαλακτοσακχαρόζη. Η λακτουλόζη αποτελεί σημαντικό μέρος των παραγόμενων ολιγοσακχαριτών (έως 40%). Οι φρουκτάνες, όπως η ινουλίνη και η ολιγοφρουκτόζη, πιστεύεται ότι είναι αυτά που χρησιμοποιούνται ευρέως και με αποτελεσματικό τρόπο από πολλά είδη προβιοτικών (Markowiak et al. 2017).

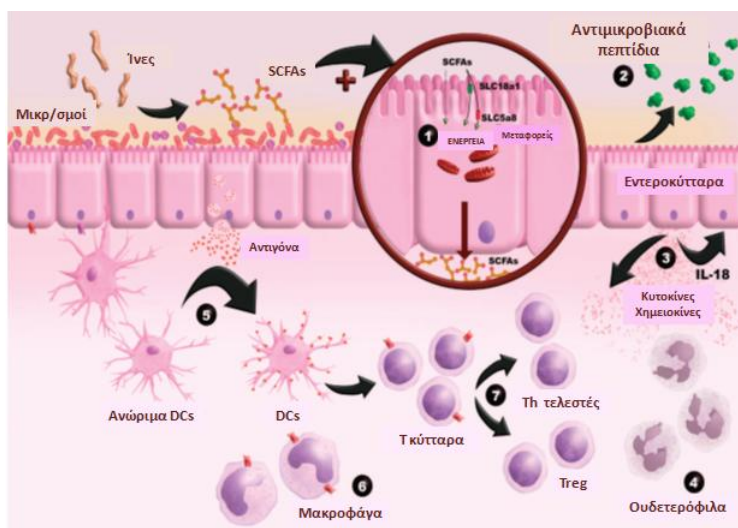
Τα κριτήρια που πληρούν τα πρεβιοτικά ορίστηκαν αρχικά από τους Gibson και Robertfroid το 1995 και στη συνέχεια αναθεωρήθηκαν αρκετές φορές. Σύμφωνα με τον ορισμό τους, ένα πρεβιοτικό είναι ένα μη εύπεπτο συστατικό που επιτρέπει συγκεκριμένες αλλαγές στην ανάπτυξη και / ή στη δραστηριότητα ενός η περιορισμένου αριθμού εντερικών βακτηρίων, προσδίδοντας οφέλη στην υγεία του ξενιστή (Rycroft et al. 2001). Το 2008 αναδιατυπώθηκε ο παραπάνω ορισμός, κι έτσι ορίστηκε ως πρεβιοτικό ένα επιλεκτικά ζυμώσιμο συστατικό που οδηγεί σε συγκεκριμένες αλλαγές στη σύνθεση και / ή στη δράση του μικροβιακού φορτίου του εντέρου, παρέχοντας έτσι οφέλη στην υγεία του ξενιστή (Gibson et al. 2010).

Τα πρεβιοτικά, λοιπόν, πρέπει να πληρούν ορισμένα κριτήρια που αποδεικνύονται με πειράματα *in vivo* σε ζώα και κυρίως σε κλινικές μελέτες. Τα πρεβιοτικά πρέπει να είναι μη εύπεπτα (ανθεκτικά στο γαστρικό οξύ, στην ενζυμική πέψη και στην εντερική απορρόφηση), να ζυμώνονται από τον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο αλλά όχι από τους δυνητικά παθογόνους μικροοργανισμούς και να προωθούν την επιλεκτική ανάπτυξη και δραστηριότητα των εντερικών βακτηρίων. Αναφορικά, λοιπόν, με την επίδρασή τους στο μικροβίωμα του εντέρου, αυξάνουν τη δράση των μπιφιδοβακτηρίων και μειώνουν την ανάπτυξη των σηπτικών / παθογόνων βακτηρίων (Hutkins et al. 2016).

Οι υδατάνθρακες, όπως οι διαιτητικές ίνες, είναι πιθανά πρεβιοτικά. Τα πρεβιοτικά και οι διαιτητικές ίνες είναι όροι που χρησιμοποιούνται εναλλακτικά για τα συστατικά τροφίμων που δεν πέπτονται στο γαστρεντερικό σωλήνα. Μια σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών των δύο όρων είναι ότι τα πρεβιοτικά ζυμώνονται από αυστηρά καθορισμένες ομάδες μικροοργανισμών ενώ οι διαιτητικές ίνες χρησιμοποιούνται από την πλειονότητα των μικροοργανισμών του παχέος εντέρου. Ως εκ τούτου, τα πρεβιοτικά μπορεί να είναι μια διαιτητική ίνα, αλλά οι διαιτητικές ίνες δεν είναι πάντοτε ένα πρεβιοτικό. Οι ακόλουθοι μη-αμυλούχοι πολυσακχαρίτες θεωρούνται διαιτητικές ίνες: κυτταρίνη, ημικυτταρίνη, πηκτίνες, ουσίες που λαμβάνονται από θαλάσσια άλγη, καθώς και λακτουλόζη, ολιγοσακχαρίτες σόγιας, ινουλίνες, φρουκτοολιγοσακχαρίτες, γαλακτοολιγοσακχαρίτες, ξυλολιγοσακχαρίτες, και ισομαλτοολιγοσακχαρίτες. Με βάση τον αριθμό των μονομερών που συνδέονται μαζί, τα πρεβιοτικά μπορούν να ταξινομηθούν ως: δισακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες (3-10 μονομερή) και πολυσακχαρίτες. Τα πλέον ελπιδοφόρα πρεβιοτικά που πληρούν τα κριτήρια για την ταξινόμηση των πρεβιοτικών ουσιών, όπως αποδεικνύεται με *in vitro* και *in vivo* μελέτες, είναι σάκχαρα όπως οι φρουκτάνες, που αποτελούνται από την ινουλίνη και τους φρουκτοολιγοσακχαρίτες (FOS), οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες (GOS), ισομαλτοολιγοσακχαρίτες (IMO), ξυλολιγοσακχαρίτες (XOS), τρανσγαλακτοολιγοσακχαρίτες (TOS), ολιγοσακχαρίτες σόγιας (SBOS), γλυκόζης και αμύλου, καθώς και ολιγοσακχαρίτες προερχόμενοι από τους πολυσακχαρίτες πηκτίνη, κυτταρίνη, ημικυτταρίνη συνιστούν πρεβιοτικά (Davani-Davari et al. 2019).

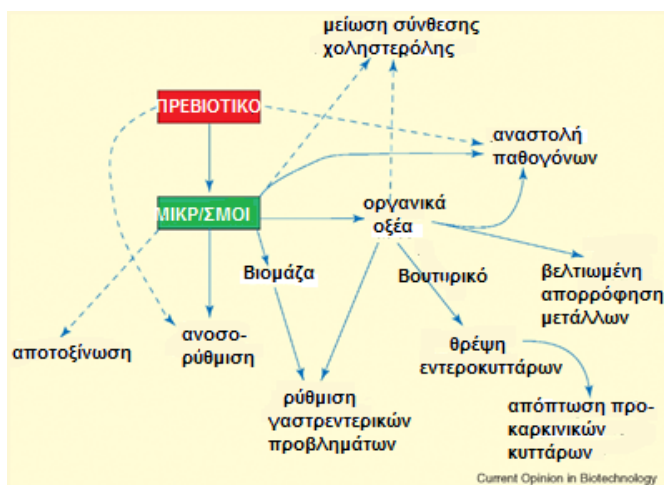
Αναφορικά με τον μηχανισμό δράσης των πρεβιοτικών, σκοπός τους είναι να διεγείρουν την ανάπτυξη και τη δραστηριότητα των ευεργετικών βακτηρίων στη γαστρεντερική οδό, κάτι που αποτελεί σημαντικό όφελος για την υγεία του ξενιστή. Μέσω μηχανισμών που συμπεριλαμβάνουν παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών και τον ανταγωνισμό για επιθηλιακή προσκόλληση και για θρεπτικά συστατικά, το εντερικό μικροβίωμα δρα ως φραγμός για τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Τελικά προϊόντα του μεταβολισμού των υδατανθράκων είναι, ως επί το πλείστον, λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs), δηλαδή οξικό, βουτυρικό και προπιονικό οξύ, που στη συνέχεια χρησιμοποιούνται από τον ξενιστή ως πηγή ενέργειας (Grajek et al. 2005), ενώ συνδέουν τους μικροοργανισμούς με το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Εικόνα 1.2.).

Εικόνα 1.2.: Τα SCFAs χρησιμοποιούνται ως πηγή ενέργειας εντός των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (1), τα οποία εκκρίνουν αντιμικροβιακά πεπτιδικά στην εξωτερική τους επιφάνεια (2). Τα SCFAs ρυθμίζουν την παραγωγή ανοσοποιητικών διαμεσολαβητών τους, συμπεριλαμβανομένης της IL-18, μιας βασικής κυτταροκίνης για την επιδιόρθωση και διατήρηση της επιθηλιακής ακεραιότητας, και άλλες κυτταροκίνες και χημειοκίνες (3). Τα SCFAs ρυθμίζουν, επίσης, τη διαφοροποίηση, τη στρατολόγηση και την ενεργοποίηση των ανοσοκυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ουδετερόφιλων (4), των δενδριτικών (5), των μακροφάγων (6) και των T λεμφοκυττάρων (7). Τα SCFAs αλληλεπιδρούν με τα ουδετερόφιλα και ρυθμίζουν την πρόσληψή τους και επιβίωση στους ιστούς (4). Γενικά, αυτοί οι βακτηριακοί μεταβολίτες παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση με τη μείωση ορισμένων προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως TNF-α και παραγωγή IL-12 από μακροφάγα και δενδριτικά, ενώ αλλάζουν την ικανότητά τους να συλλάβουν αντιγόνα και να διεγείρουν T κύτταρα. Επιπλέον, τα SCFAs ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των T λεμφοκυττάρων μέσω άμεσων επιδράσεων σε αυτά τα κύτταρα (για παράδειγμα, προκαλώντας τη δημιουργία Tregs) (7) (Corrêa-Oliveira et al. 2016).



Πέραν των SCFAs, όμως, ο εντερικός μικροβίος παράγει και μια σειρά άλλων ενώσεων, ως προϊόντα του μεταβολισμού και των υπόλοιπων μακρομορίων. Οι βιογενείς αμίνες ή πολυαμίνες (Biogenic amines, BAs), συμπεριλαμβανομένων της ισταμίνης, της τυραμίνης, της καδαβερίνης, της σπερμίνης, της σπερμιδίνης και της πατρεσκίνης, είναι μεταβολίτες που παράγονται από την αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων, με σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες για τα ευκαρυωτικά και τα προκαρυωτικά κύτταρα. (Pugin et al. 2017). Τα δευτερογενή χολικά οξέα που προέρχονται από πρωτογενή χολικά οξέα, μεταβολίτες που προκύπτουν από τον καταβολισμό της τρυπτοφάνης, το προπιονικό μιδαζόλιο που παράγεται από ιστιδίνη και τριμεθυλαμίνη, η φωσφατιδυλοχολίνη, η χολίνη και η L-καρνιτίνη, που προκύπτουν από τροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά είναι μερικοί ακόμη μεταβολίτες που εντοπίζονται στον ανθρώπινο οργανισμό από το μεταβολισμό του μικροβιακού φορτίου του εντέρου (Tsvetikova et al. 2020).

Ως αποτέλεσμα της ζύμωσης υδατανθράκων, το γένος *Bifidobacterium* ή το γένος *Lactobacillus* μπορεί να παράγει ορισμένες ενώσεις που αναστέλλουν την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών του γαστρεντερικού συστήματος, καθώς επίσης και να οδηγήσει σε μείωση του εντερικού pH. Το 1997 και το 2003, οι Bovee – Oudenhoven et al. μελέτησαν τη χρήση λακτουλόζης στην πρόληψη των λοιμώξεων από *Salmonella Enteritidis* σε μοντέλο αρουραίου. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι η οξίνιση του εντέρου που προέκυψε ως αποτέλεσμα της ζύμωσης λακτουλόζης προκάλεσε τη μειωμένη ανάπτυξη των παθογόνων και αυξημένη μετανάστευση παθογόνων από το έντερο. Αποδείχθηκε, επίσης, ότι η χορήγηση προβιοτικών αυξάνει την απορρόφηση μετάλλων, κυρίως μαγνησίου και ασβεστίου (Cremon et al. 2018).



Εικόνα 1.3.: Σχηματική παρουσίαση των πιθανών μηχανισμών προβιοτικής δράσης. Οι συμπαγείς γραμμές δείχνουν σχετικά καλά εδραιωμένους τρόπους δράσης. Οι διακεκομμένες γραμμές δείχνουν λιγότερο καλά εδραιωμένους τρόπους προβιοτικής δράσης (Ouweland et al. 2005).

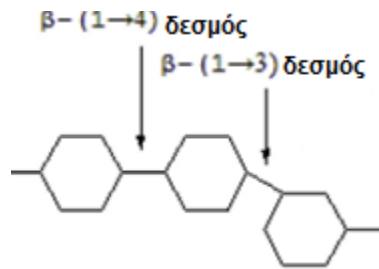
Η πλειοψηφία των προβιοτικών προέρχεται από μη εύπεπτους ολιγοσακχαρίτες. Λίγες σχετικά μελέτες έχουν μέχρι τώρα επικεντρωθεί σε μη εύπεπτους πολυσακχαρίτες μακράς αλυσίδας, όπως οι β-γλυκάνες, σε σχέση με τις δυνατότητές τους ως νέα προβιοτικά.

1.2.1. Οι φυσιολογικές λειτουργίες και οι μηχανισμοί δράσης των β-γλυκανών

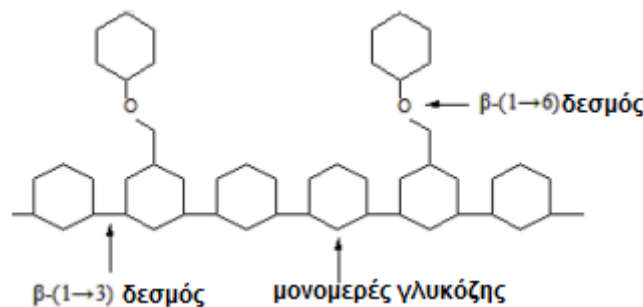
Οι β-γλυκάνες είναι πολυσακχαρίτες που απαντώνται σε διάφορες φυτικές πηγές, όπως δημητριακά (κριθάρι, βρώμη και σε πολύ μικρότερο βαθμό στην σίκαλη και το σιτάρι), στο κυτταρικό τοίχωμα του *Saccharomyces cerevisiae* (ζύμη αρτοποιίας) και των βακτηρίων, καθώς και σε ορισμένα είδη μυκήτων (*Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*,

Histoplasma capsulatum), φυκών και πολλών ειδών μανιταριών (*Reishi*, *Shiitake*, *Maitake*) (Vetvicka et al. 2007).

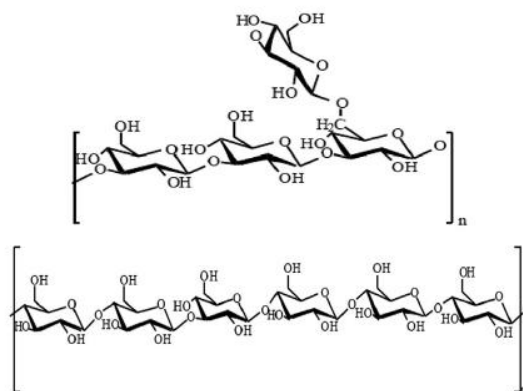
Όσον αφορά στη δομή τους, οι β-γλυκάνες αποτελούνται από μονομερή γλυκόζης ενωμένα με γλυκοσιδικό δεσμό. Ειδικότερα, γνωστός είναι ο β-(1→3) και ο β-(1→4) δεσμός (**Εικόνα 1.4.**), οι οποίοι συνδέουν σε ένα γραμμικό σκελετό κατάλοιπα γλυκοπυρανοσουλίου, καθώς και ο β-(1→6) δεσμός (**Εικόνα 1.5.**), ο οποίος συνδέει μια διακλαδισμένη γλυκόζη στο σταθερό γραμμικό σκελετό. Έτσι, δημιουργούνται οι β-(1→3, 1→4)-D γλυκάνες, με γραμμική δομή, και οι β-(1→3, 1→6)- D γλυκάνες, με διακλαδισμένη δομή (**Εικόνα 1.6.**). β-γλυκάνες, που προέρχονται από δημητριακά καθώς και η κυτταρίνη, είναι πολυσακχαρίτες καταλοίπων γλυκόζης με β-(1→3, 1→4) δεσμούς. β-γλυκάνες από λειχήνες μπορεί να περιέχουν είτε (1→3, 1→4) είτε (1→3, 1→6) δεσμούς (Zhu et al. 2015).



Εικόνα 1.4.: Τρόπος σύνδεσης με (1→3, 1→4) δεσμούς των μονομερών γλυκόζης σε β-D γλυκάνες (Bai et al. 2019).



Εικόνα 1.5.: Τρόπος σύνδεσης με (1→3, 1→6) δεσμούς των μονομερών γλυκόζης σε β-D γλυκάνες (Bai et al. 2019).

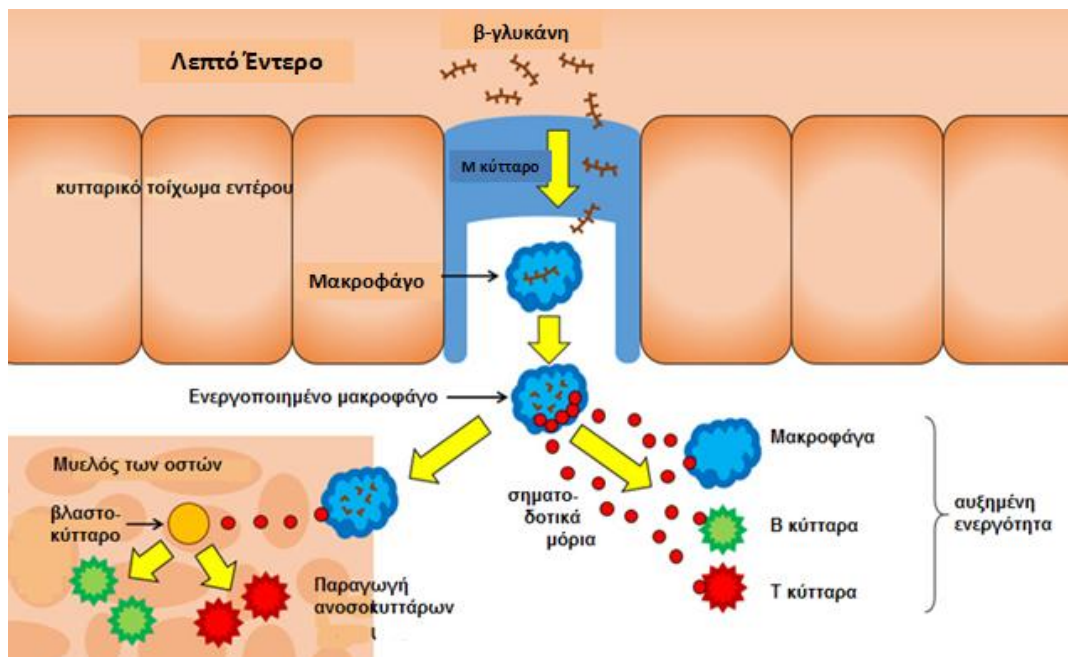


Εικόνα 1.6.: Αναπαράσταση της στερεοδιαμόρφωσης των β-(1→3, 1→6)- D γλυκανών (πάνω σχήμα) και των β-(1→3, 1→4)- D γλυκανών (κάτω σχήμα) (Zhu et al. 2016).

Οι β-γλυκάνες μπορεί να είναι αδιάλυτες (*Saccharomyces cerevisiae*) ή υδατοδιαλυτές (δημητριακά), γεγονός που σχετίζεται με τον βαθμό πολυμερισμού. β-γλυκάνες με βαθμό πολυμερισμού αρκετά μεγάλο είναι συνήθως εντελώς αδιάλυτες στο νερό (Bai et al. 2019). Ακόμη, ο βαθμός διακλάδωσης επηρεάζει τη διαλυτότητα. Έτσι, β-(1→3)-D γλυκάνες με γραμμικό σκελετό είναι πιο διαλυτές σχετικά με τις β-(1→3, 1→4)-D γλυκάνες σε επίσης γραμμικό σκελετό. β-(1→3, 1→6)-D γλυκάνες με τη διακλαδισμένη γλυκόζη είναι λιγότερο διαλυτές. Βέβαια, η διακλαδισμένη β-(1→3, 1→6)-D γλυκάνη είναι ανθεκτική και ζυμώνεται σχεδόν πλήρως στο τυφλό και στο κόλον από τους μικροοργανισμούς, με κύρια προϊόντα ζύμωσης τα SCFAs (Vaikousi et al. 2004).

Οι β-γλυκάνες που προέρχονται από δημητριακά συνεχίζουν να κυριαρχούν στη συνολική παραγωγή. Δεύτερη μεγαλύτερη πηγή β-γλυκανών θεωρείται η ζύμη και τρίτη κύρια πηγή β-γλυκανών τα μανιτάρια. Οι β-γλυκάνες από μύκητες επιδρούν θετικά σε ορισμένες ασθένειες, όπως ο καρκίνος, διάφορες μικροβιακές λοιμώξεις, η υπερχοληστερολαιμία και ο διαβήτης. Οι β-(1→3, 1→4)-γλυκάνες των δημητριακών συμβάλλουν στη μείωση της γλυκόζης και της χοληστερόλης στο αίμα, μειώνοντας συνεπώς τις πιθανότητες για παχυσαρκία και καρδιαγγειακές παθήσεις. Αντίθετα, οι β-(1→3, 1→4)-γλυκάνες από μικροοργανισμούς τείνουν να εμφανίζουν καλύτερες αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις και αντι-ϊικές δράσεις. Οι γλυκάνες από το μυκήλιο και το καρποφόρο σώμα του *Pleurotus ostreatus* διαθέτουν ανοσορυθμιστικές λειτουργίες, επάγουν τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων, ενεργοποιούν τα μακροφάγα (παραγωγή NO, παραγωγή ενεργών ριζών οξυγόνου, φαγοκυττάρωση, παραγωγή TNF-α) και επάγουν κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από κύτταρα NK (Natural Killers). Η ενεργοποίηση μακροφάγων από β-(1→3, 1→6)-γλυκάνες, μέσω της οδού σηματοδότησης TLR4 / NF-κB οδήγησε στη ρύθμιση της παραγωγής NO, IL-1β, IL-6 και TNF-α και των επιπέδων έκφρασης mRNA των iNOS, IL-1β, IL-6 και TNF-α σε RAF264.7 μακροφάγα. Επιπλέον, ως ανοσορυθμιστές, οι β-(1→3, 1→6)-γλυκάνες έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν ανθρώπινα δενδριτικά κύτταρα (DCs) ενεργοποιώντας πολλαπλές οδούς σηματοδότησης και έκκρισης των κυτταροκινών TNF, IL-1β, IL-6, IL-12 και της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 (Bai et al. 2019).

Οι υποδοχείς που αναγνωρίζουν β-γλυκάνες περιλαμβάνουν δεκτίνη-1, CR3 (Complement receptor 3), TLR4 και TLR2 (Toll-like receptor). Η δεκτίνη-1 είναι ο κύριος υποδοχέας β-γλυκανών σε μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα και ουδετερόφιλα, επάγοντας διάφορες ανοσοαποκρίσεις κατά την αναγνώριση β-γλυκάνης, συμπεριλαμβανομένης της φαγοκυττάρωσης, της παραγωγής πολλών κυτταροκινών και χημειοκινών και της παραγωγής του μεταβολίτη αραχιδονικού οξέος. Στο παρακάτω σχήμα απεικονίζεται συνοπτικά η ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος μετά την είσοδο των β-γλυκανών στο λεπτό έντερο. Στο λεπτό έντερο τα Microfold cells (κύτταρα M) διαθέτουν τη μοναδική ικανότητα μεταφοράς μικροοργανισμών και σωματιδίων από το έντερο σε ανοσοκύτταρα που βρίσκονται σε μια υποκείμενη δομή M (Kobayashi et al. 2019). Μπορούν, έτσι, να μεταφέρουν μόρια β-γλυκάνης από το έντερο σε μακροφάγα που βρίσκονται στη δομή αυτή. Μετά την πρόσληψη των β-γλυκανών από τα μακροφάγα, τα μεγάλα μόρια β-γλυκάνης εγκολλώνονται και κατακερματίζονται σε θραύσματα β-γλυκάνης μικρότερου μεγέθους. Τα μακροφάγα στέλνουν σηματοδοτικά μόρια β-γλυκάνης σε άλλα ανοσοκύτταρα, γεγονός που αυξάνει την ενεργότητά τους. Ορισμένα μακροφάγα μεταφέρονται στο μυελό των οστών και διεγείρουν την παραγωγή ανοσοκυττάρων (**Εικόνα 1.7.**) (Chi-Fung et al. 2009).



Εικόνα 1.7.: Η πρόσληψη και οι επακόλουθες δράσεις της β-γλυκάνης στα ανοσοκύτταρα. Οι β-γλυκάνες προσλαμβάνονται από τα μακροφάγα, κατακερματίζονται σε μικρότερα θραύσματα και παράγονται σηματοδοτικά μόρια β-γλυκάνης, τα οποία είτε ενεργοποιούν άλλα ανοσοκύτταρα είτε συμβάλλουν στην εκ νέου παραγωγή ανοσοκυττάρων (Graaff et al. 2018).

Οι β-γλυκάνες θεωρούνται, επίσης πιθανοί αντικαρκινικοί παράγοντες, εμποδίζοντας την ανάπτυξη όγκων. Για παράδειγμα, οι β-γλυκάνες από τη ζύμη έχουν αντικαρκινικές δράσεις χωρίς τοξικότητα σε φυσιολογικά κύτταρα ποντικού, ενώ οι β-γλυκάνες του ενδοφυτικού *Diaporthe sp.* μειώνουν το ρυθμό πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων του ανθρώπινου μαστού (MCF-7) και των ηπατοκυτταρικών καρκινωμάτων (HepG2-C3A). Το Lentinan, μια τυπική β-(1→3,1→6)-γλυκάνη που απομονώθηκε από το *Lentinus edodes*, προκάλεσε μιτοχονδριακή απόπτωση των S180 καρκινικών κυττάρων. Η β-γλυκάνη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει τη δραστηριότητα της πρωτεάσης legumain, που περιλαμβάνει την εγκόλπωση του μορίου αυτού σε μακροφάγα μέσω του υποδοχέα της δεκτίνης-1. Η imprime PGG είναι μια διαλυτή β-(1→3, 1→6)-γλυκάνη προερχόμενη από ζύμη, που έχει χορηγηθεί επιτυχώς ενδοφλεβίως. Έχει ένα νέο μοτίβο PAMP (pathogen-associated molecular pattern) που συνδέεται και ενεργοποιεί τα κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος, προκαλώντας ένα βιοχημικό καταρράκτη ανοσο-ενεργοποίησης και αντικαρκινικής επίθεσης (Bai et al. 2019).

Τέλος, οι β-γλυκάνες χαρακτηρίζονται από κυτταρο-προστατευτικές και γονο-προστατευτικές δράσεις έναντι τοξικών παραγόντων. Μια μελέτη περιέγραψε αυτές τις δράσεις της β-γλυκάνης έναντι της τοξικότητας της AFB₁ (aflatoxin-B₁), *in vitro* σε λεμφοκύτταρα κοτόπουλου. Είναι γνωστό ότι η AFB₁ είναι ισχυρός γονοτοξικός παράγοντας και αυξάνει τον κίνδυνο χρόνιων παθήσεων, όπως ως καρκίνος σε ανθρώπους και ζώα, λόγω μεταλλαξιγένεσης. Η κυτταροπροστασία μπορεί να είναι συνέπεια επίδρασης της β-γλυκάνης στον κυτταρικό κύκλο, συμβάλλοντας στην επιδιόρθωση ή τον αποκλεισμό μεταλλάξεων. Έτσι, παρουσία β-γλυκανών επιδιορθώνονται τα κατεστραμμένα τμήματα του DNA των λεμφοκυττάρων (Zimmermann et al. 2015). Άλλες μελέτες ανέφεραν προστατευτικές δράσεις της β-γλυκάνης έναντι οξειδωτικών βλαβών του DNA σε V79 κύτταρα πνευμόνων από χάμστερ (Bresgen et al. 2003). Αναφορικά με τις γονο-προστατευτικές δράσεις της, μια από αυτές έγκειται στο γεγονός ότι η β-γλυκάνη συμβάλλει στη μείωση της γονοτοξικότητας που προκαλείται από αντι-νεοπλασματικά φάρμακα, όπως η κυκλοφωσφαμίδη (cyclophosphamide), κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας του καρκίνου (Tohamy et al. 2003).

1.2.2. Οι β-(1→3, 1→6) -D-γλυκάνες ως πρεβιοτικά

Μεταξύ διαφορετικών υδατανθράκων οι β-γλυκάνες, λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους, διαθέτουν αξιολογες βιολογικές δράσεις, ευεργετικές για την υγεία. Ενώ δεν έχουν ακόμη ταξινομηθεί ως πρεβιοτικά, διερευνώνται έντονα οι πρεβιοτικές τους δράσεις εδώ και μια δεκαετία. Σε αντίθεση με τα ήδη γνωστά πρεβιοτικά που έχουν περιορισμένη δομική ετερογένεια (όπως φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες και γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες), οι β-γλυκάνες από διαφορετικές πηγές και με διαφορετικές τροποποιήσεις διαθέτουν υψηλότερο βαθμό δομικής ετερογένειας. Το γεγονός ότι οι β-γλυκάνες μπορούν να έχουν ποικίλες και διαφορετικές δομικές μορφές, τις καθιστά σημαντικές ως υποψήφιες πρεβιοτικές ενώσεις (Lam et al. 2020).

Οι β-γλυκάνες πληρούν ορισμένα κριτήρια που καθιστούν τους πολυσακχαρίτες πρεβιοτικά. Αρχικά, επιδρούν ευεργετικά στον μικροβιόκοσμο του γαστρεντερικού σωλήνα, αποτρέποντας ασθένειες του παχέος εντέρου και του πεπτικού συστήματος. Οι διαλυτές β-γλυκάνες, κυρίως από τα δημητριακά, ζυμώνονται από τους μικροοργανισμούς του παχέος εντέρου, παράγοντας, μεταξύ άλλων, λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs), όπως οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ, τα οποία έχουν ανοσορρυθμιστική δράση, αποτρέπουν την παχυσαρκία και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων του παχέος εντέρου, αναστέλλοντας, έτσι, την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων. Οι β-γλυκάνες, ως κλάσμα διαιτητικών ινών, αποτελούν σημαντική πηγή ενέργειας, διεγείροντας την ανάπτυξη, τη δραστηριότητα και την επιβίωση προβιοτικών βακτηριακών στελεχών, όπως *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, ενώ αναστέλλεται η ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων (*E.coli*, *Clostridium celatum* και *Bacterioides*). Έτσι, προάγεται η ανάπτυξη της ωφέλιμης εντερικής μικροχλωρίδας, βελτιώνεται η λειτουργία του βλεννογόνου του λεπτού εντέρου και των κολονοκυττάρων, ενώ παράλληλα μειώνεται ο κίνδυνος μη ειδικής φλεγμονής και καρκίνου του παχέος εντέρου (Lam et al. 2018).

Μέσω της ζύμωσης τους από τους μικροοργανισμούς του παχέος εντέρου και της παραγωγής SCFAs, οι β-γλυκάνες συμβάλλουν στην πρόληψη και τη θεραπεία του διαβήτη και κατ' επέκταση και των καρδιαγγειακών παθήσεων. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, λόγω των αντιοξειδωτικών, αντικαρκινικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων τους, τα SCFAs παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του γαστρεντερικού και του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, μειώνουν τη χοληστερόλη. Τα SCFAs είναι σε θέση να ρυθμίζουν το μεταβολισμό της γλυκόζης και της χοληστερόλης ενεργώντας στον υποδοχέα ελεύθερων λιπαρών οξέων 2 και 3 (Ffr 2/3). Μέσω αυτών των υποδοχέων, τα SCFAs μπορούν να αυξήσουν τη συγκέντρωση των γαστρεντερικών ορμονών, όπως το γλυκαγόνο (glucagon-like peptide 1, GLP-1) και το πεπτίδιο YY (peptide YY, PYY). Το PYY προκαλεί πρόσληψη γλυκόζης στους σκελετικούς μύες και τους λιπώδεις ιστούς, ενώ το GLP-1 μειώνει έμμεσα τη γλυκόζη στο αίμα, αυξάνοντας τη συγκέντρωση ινσουλίνης και μειώνοντας την παραγωγή γλυκαγόνου στο πάγκρεας. Η χρήση προπιονικού οξέος συνέβαλε στη μείωση της σύνθεσης χοληστερόλης σε συκώτια αρουραίων (Ciecierska et al. 2019).

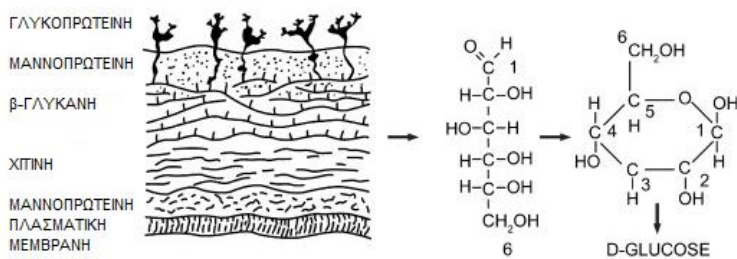
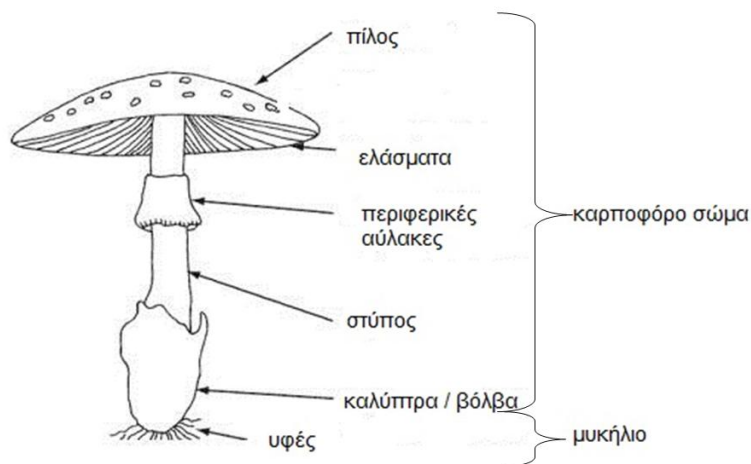
1.2.3. Βασιδιομύκητες (μανιτάρια) πλούσιοι σε β-γλυκάνες

Τα μανιτάρια χρησιμοποιούνται εδώ και χιλιάδες χρόνια τόσο ως τροφή όσο και για ιατρικούς λόγους. Ωστόσο, δεν υπάρχει ακόμη πλήρης διαλεύκανση των μηχανισμών μέσω των οποίων τα μανιτάρια προάγουν την υγεία μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τον μικροβιόκοσμο της εντερικής χώρας. Έχει αποδειχθεί πως τα μανιτάρια δύνανται να παρεμποδίσουν τη δράση διαφόρων αλλεργιογόνων, να μειώσουν τα επίπεδα της χοληστερόλης καθώς και να αποτρέψουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Αναφορικά με τα δομικά τους χαρακτηριστικά, τα μανιτάρια είναι πλούσια σε υδατάνθρακες, όπως χιτίνη, ημικυτταρίνη, α- και β-γλυκάνες, μαννάνες, ξυλάνες και γαλακτάνες, τα οποία τα καθιστούν κατάλληλα

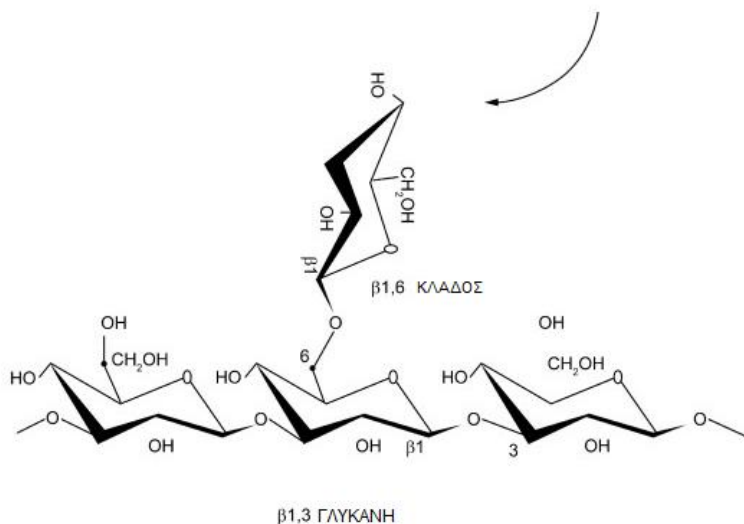
ως πρεβιοτικά. Τα μανιτάρια λειτουργούν ως πρεβιοτικά ενισχύοντας την ανάπτυξη των ευεργετικών μικροοργανισμών στο έντερο, παρέχοντας έτσι οφέλη για την υγεία του ξενιστή (Sawangwan et al. 2018). Ο αριθμός των μανιταριών που είναι μέχρι σήμερα ταυτοποιημένα αντιπροσωπεύει μόνο το 10% των συνολικών μανιταριών που θεωρητικά υπάρχουν. Μανιτάρια πλούσια σε πολυσακχαρίτες, ειδικά σε β-γλυκάνες, μπορεί να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα ως «φαρμακευτικά» μανιτάρια (Jayachandran et al. 2017).

Οι βασιδιομύκητες είναι τα γνωστά μανιτάρια. Αποτελούνται από το καρποφόρο σώμα με τα σπόρια και το μυκήλιο με τις υφές, όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 1.8.** Αναγνωρίζονται ως λειτουργικά τρόφιμα για τις βιοδραστικές ενώσεις τους, μεταξύ των οποίων οι β-γλυκάνες, που προσφέρουν ποικίλες ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία. Οι περισσότερες β-γλυκάνες προέρχονται από τα καρποφόρα σώματα των μανιταριών. Οι β-γλυκάνες από μανιτάρια αποτελούνται από (1→3, 1→6) δεσμούς μεταξύ των μονομερών γλυκόζης και είναι συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος **Εικόνα 1.9.** Φαίνεται να είναι πολύ διαφορετικές από τις β-γλυκάνες που προέρχονται από βρώμη και κριθάρι. Συνεισφέρουν στην άμυνα κατά της ογκογένεσης και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι βασιδιομύκητες του γένους *Ganoderma* και *Pleurotus* είναι χαρακτηριστικά μανιτάρια πλούσια σε β-γλυκάνες (Zhu et al. 2015).

Εικόνα 1.8.: Χαρακτηριστική δομή ενός βασιδιομύκητα



Εικόνα 1.9.: Η β-γλυκάνη είναι ένα από τα βασικά συστατικά του μυκητιακού κυτταρικού τοιχώματος. Η βασική υπομονάδα της μυκητιακής β-γλυκάνης είναι β-D-γλυκόζη, όπου η 1→3 γλυκοσιδική αλυσίδα συνδέεται με 1→6 γλυκοσιδικούς κλάδους. Το μήκος και οι κλάδοι της β-γλυκάνης ποικίλουν στους διάφορους μύκητες (Rasjidi et al. 2015).



1.3. *In vitro* συστήματα ζύμωσης βασιδιομυκήτων από τον Εντερικό Μικροβιόκοσμο

Τα *in vitro* πρότυπα ζύμωσης έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλές εφαρμογές, που είναι σημαντικές για τον προσδιορισμό του ρόλου των μικροοργανισμών τόσο στην υγεία όσο και στην ασθένεια. Λόγω των περιορισμένων δυνατοτήτων δειγματοληψίας του ανθρώπινου παχέος εντέρου, είναι δύσκολο να μελετηθεί η μικροβιακή δραστηριότητα *in vivo*. Αρχικά, τα *in vitro* πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν για να μελετηθεί η επίδραση των συστατικών των τροφίμων στη γονοτοξική δραστηριότητα της μικροχλωρίδας. Για παράδειγμα, με *in vitro* μελέτες, αποδείχθηκε ότι η αύξηση του χρόνου κατακράτησης (που κυμαίνεται από 20 έως 120 ώρες) αυξάνει την έκφραση των ενζύμων που πιστεύεται ότι εμπλέκονται στην παραγωγή γονοτοξικών ενώσεων, όπως είναι η αζορεδουκτάση, β-γλυκοσιδάση και νιτρο-ρεδουκτάση. Μείωση της ενεργότητας αυτών των ενζύμων επιτεύχθηκε με προσθήκη ινουλίνης ή γαλακτο-ολιγοσακχαριτών (GOS) (McBain et al. 2001). Για να μελετηθεί η επίδραση των συστατικών των τροφίμων και των φαρμάκων στον μεταβολισμό των μικροοργανισμών του εντέρου έχουν διεξαχθεί στο παρελθόν πολλά *in vitro* πειράματα. Ωστόσο, υπήρξαν αντικρουόμενες απόψεις ως προς το αν το αποτέλεσμα τέτοιων πειραμάτων αντιστοιχεί στην *in vivo* κατάσταση, στον άνθρωπο ή στα ζώα. Μια πρώτη επικύρωση των συμβατικών *in vitro* προτύπων παρέχεται από πρόσφατα αναπτυχθέντα μοριακά εργαλεία, που επέτρεψαν να χαρακτηριστεί ο μικροβιόκοσμος των *in vitro* πειραμάτων με υψηλή φυλογενετική ανάλυση. Προέκυψε ότι τα *in vitro* πρότυπα μπορούν να προσομοιάσουν τη σύσταση των μικροοργανισμών του εντέρου (Maathuis et al. 2010). Εκτός από τη συνολική μικροβιακή σύνθεση, ειδικές δραστηριότητες μπορούν επίσης να διατηρηθούν *in vitro*. Ύστερα από εμβολιασμό *in vitro* προτύπων με δείγμα κοπράνων ενός ατόμου, των οποίων τα υπάρχοντα ένζυμα χαρακτηρίζονται είτε από περιορισμένη είτε από αυξημένη ενεργότητα σε *in vivo* συνθήκες, διαπιστώθηκε πως αυτή η ενεργότητα διατηρείται στην αντίστοιχη *in vitro* μικροβιακή κοινότητα (Possemiers et al. 2008).

Μια άλλη πρόωπη πτυχή που μελετήθηκε χρησιμοποιώντας *in vitro* πρότυπα ήταν η επίδραση των διατροφικών συστατικών στη μικροβιακή σύνθεση, όπου ο στόχος ήταν να αυξηθούν τα επίπεδα των πιθανώς ωφέλιμων μικροβίων, όπως τα μπιφιδοβακτήρια. Αυτό ξεκίνησε με την έρευνα σχετικά με την ινουλίνη και τους φρουκτο-ολιγοσακχαρίτες, τα πλέον μελετημένα «μπιφιδογενή» υποστρώματα. Επιπλέον, έχουν ερευνηθεί η λακτουλόζη, το άμυλο, η πολυδεξτρόζη, η ξυλιτόλη, οι γαλακτο-ολιγοσακχαρίτες και η αραβινοξυλάνη. Επίσης μελετήθηκαν οι συνεργιστικές επιδράσεις προβιοτικών και πρεβιοτικών καθώς και η παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs), κυρίως οξικού, προπιονικού και βουτυρικού. Ειδικά το βουτυρικό χρήζει μεγάλης προσοχής, καθώς είναι ένα απαραίτητο «καύσιμο» για τα κύτταρα του εντέρου, αποτελώντας πηγή ενέργειας για τα κολονοκύτταρα και αναστέλλοντας την καρκινογένεση στο κόλον. Μείωση του βουτυρικού και των βουτυροπαραγωγών βακτηρίων έχει συσχετισθεί με ασθένειες του παχέος εντέρου, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου και η νόσος του Crohn. Επιπλέον, έχει δείχθει ότι το προπιονικό και το οξικό έχουν ευεργετικές επιδράσεις στον ξενιστή, επηρεάζοντας τη ρύθμιση της όρεξης και τον μεταβολισμό της χοληστερόλης αντίστοιχα. Η αναλογία μεταξύ μεμονωμένων SCFAs και της συνολικής ποσότητας SCFAs που παράγονται ποικίλλει ανάλογα με την πηγή του πρεβιοτικού (Uerlings et al. 2020).

Παρόλο που το περιβάλλον δεν είναι ανάλογο με αυτό ενός ξενιστή, τα *in vitro* πρότυπα έχουν τη δυνατότητα να μιμούνται τις μικροβιακές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο εσωτερικό του ανθρώπινου εντέρου, τόσο ως προς τη σύνθεση όσο και ως προς τη δραστηριότητα. Έτσι έχουν αρκετές ομοιότητες με τα αποτελέσματα *in vivo* μελετών που λαμβάνουν χώρα σε ζώα και ανθρώπους, ενώ παράλληλα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εργαλεία για την ανίχνευση των επιδράσεων διαφόρων συστατικών τροφίμων ή φαρμάκων στη μικροβιακή σύνθεση και δραστηριότητα. Ειδικότερα, νέες εξελίξεις, όπως η δημιουργία ενός τεχνητού βλεννογόνου περιβάλλοντος, μπορεί να επιτρέψει σε αυτά τα *in vitro* πρότυπα να διευρύνουν το τρέχον φάσμα εφαρμογών τους. Δεδομένου ότι οι αλληλεπιδράσεις

ξενιστή-μικροοργανισμών φαίνεται να ενέχονται σε πλήθος ασθενειών και διαταραχών, η σωστή «μίμηση» αυτής της αλληλεπίδρασης γίνεται όλο και περισσότερο σημαντική (Venema et al. 2013).

Τα *in vitro* πρότυπα ζύμωσης αντιπροσωπεύουν μια καινοτόμο τεχνολογική πλατφόρμα, που επιτρέπει τη διεξαγωγή ερευνών τόσο ως προς την ύπαρξη μικροβιακών ειδών στο έντερο όσο και τη μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Αποτελούνται είτε από στατικές καλλιέργειες, είτε από απλά ή πολλαπλά πρότυπα συνεχούς ροής. Χαρακτηρίζονται από μια ποικιλία διαφορετικών τεχνικών εμβολιασμού με επεξεργασμένο διάλυμα κοπράνων, όπου εμπεριέχονται οι μικροοργανισμοί του εντέρου, και επωάζονται υπό φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας, pH και παροχής οξυγόνου. Οι καλλιέργειες λαμβάνουν χώρα σε αναερόβιους θαλάμους, με συγκεκριμένη παροχή αζώτου και διοξειδίου του άνθρακα (Payne et al. 2012).

Όσον αφορά στα γενικά χαρακτηριστικά (Macfarlane et al. 2007), στους περιορισμούς (Venema et al. 2013) αλλά και στις προοπτικές (Payne et al. 2012) των *in vitro* προτύπων, ισχύουν τα παρακάτω:

Γενικά χαρακτηριστικά των *in vitro* προτύπων

- ✓ Απλή στατική καλλιέργεια κλειστού τύπου ή ημισυνεχή ή συνεχή συστήματα καλλιέργειας
- ✓ Μειωμένα έξοδα λειτουργίας
- ✓ Εύκολη ρύθμιση
- ✓ Ταχεία δειγματοληψία και μάλιστα δυνατότητα δυναμικής δειγματοληψίας σε διαφορετικές θέσεις εντός του εντέρου, πέραν των δειγμάτων κοπράνων
- ✓ Τα συνεχή συστήματα καλλιέργειας επιτρέπουν τον ακριβή χειρισμό των μεταβλητών του περιβάλλοντος
- ✓ Χρήσιμα για μηχανιστικές μελέτες, όπως χρήση ραδιενεργά σημασμένων ισοτόπων
- ✓ Διευκολύνουν τη χρήση ραδιενεργών, τοξικών και γονοτοξικών ουσιών
- ✓ Δεν υπάρχουν ηθικοί περιορισμοί
- ✓ Δημιουργία υποθέσεων όσον αφορά στον αντίκτυπο διαφόρων συστατικών τροφίμων στο ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα
- ✓ Χρησιμοποιώντας δείγματα κοπράνων διαφορετικών ανθρώπων, μελετάται η διαπροσωπική μεταβλητότητα στις μικροβιακές διεργασίες

Πιθανοί περιορισμοί των *in vitro* προτύπων

- ✓ Δεν υπάρχει λειτουργικότητα ανοσοποιητικού ή νευροενδοκρινικού συστήματος
- ✓ Άλλοι βιοτικοί παράγοντες συνήθως δεν ενσωματώνονται στα πρότυπα (π.χ. απορροφητικές διεργασίες, εκκρίσεις του πεπτικού συστήματος ή αμυντικά συστήματα)
- ✓ Τα επιθηλιακά και άλλα εντερικά βιοφίλμ συνήθως δεν ανακαλλιεργούνται
- ✓ Δύσκολο να ελεγχθούν αλλαγές στη δομή της μικροβιακής κοινότητας μετά τον εμβολιασμό, ιδιαίτερα σε κλειστού τύπου καλλιέργεια

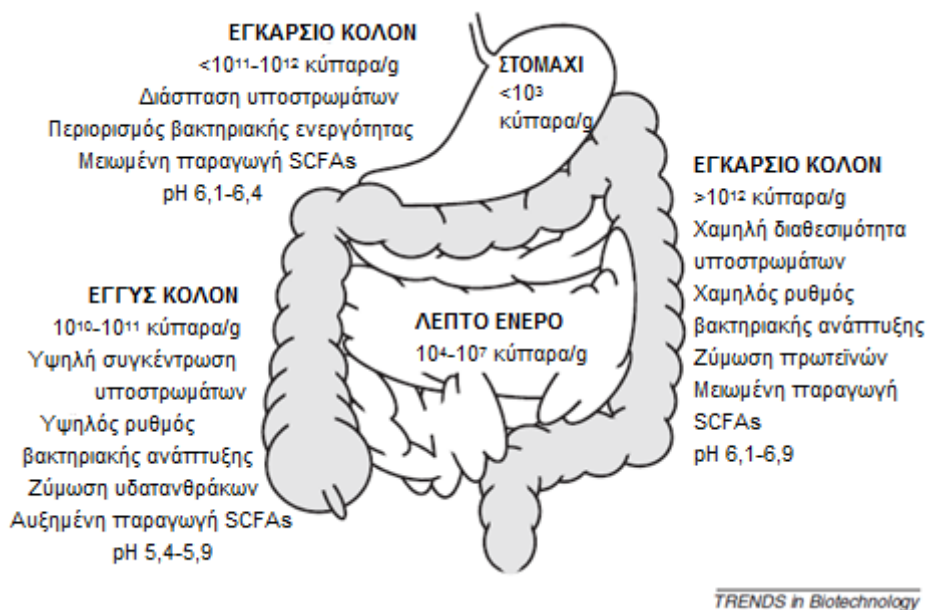
Προοπτικές των *in vitro* προτύπων

- ✓ Αξιολογείται η λειτουργική σταθερότητα του *in vitro* μικροβιώματος
- ✓ Εφαρμογή τεχνολογιών «omics» στην *in vitro* ζύμωση
- ✓ Μοντελοποίηση μικροβίων "ασθενών"
- ✓ Συνδυασμός *in vitro* προτύπων

1.4. Παραγωγή μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους

Οι μεταβολίτες, είναι μόρια μικρού μοριακού βάρους, τα οποία λαμβάνουν μέρος στις μεταβολικές αντιδράσεις, είτε ως αντιδρώντα είτε ως ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα βιολογικά συστήματα, καθώς αποτελούν ιδανικούς δείκτες κατανόησης των φαινοτύπων διαφόρων ασθενειών, παρέχοντας μια άμεση Εικόνα της βιοχημικής δραστηριότητας του οργανισμού. Πρόκειται για μόρια στα οποία συμπεριλαμβάνονται οι υδατάνθρακες, τα λιπίδια, τα αμινοξέα, τα νουκλεϊκά οξέα και τα οργανικά οξέα (Zhang et al. 2011).

Εξειδικευμένα μέλη της εντερικής μικροχλωρίδας κατά τον μεταβολισμό τους ακολουθούν βιοχημικές οδούς και παράγουν μια ποικιλία ενζύμων που ποικίλουν ανάλογα με τις διατροφικές συνήθειες του ξενιστή. Αυτή η μεταβολική ικανότητα εκτιμάται ότι κωδικοποιείται από ένα σύνολο 2-4 εκατομμυρίων μικροβιακών γονιδίων, το οποίο είναι 70-140 φορές μεγαλύτερο από αυτό του ξενιστή. Αρχικές διαδικασίες πέψης στο ανθρώπινο έντερο απαιτούν συγκεκριμένες μικροβιακές γλυκοσιδάσες που παράγονται από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς. Αυτά τα μικρόβια υδρολύουν μη αφομοιώσιμους πολυσακχαρίτες (π.χ. άμυλο, διαλυτές και αδιάλυτες διαιτητικές ίνες) και πρωτεΐνες (**Εικόνα 1.10.**) ή έμφυτες βλέννες (γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες υψηλού μοριακού βάρους) που καταλήγουν στο παχύ έντερο. Επακόλουθη μικροβιακή ζύμωση των υδρολυμένων πολυσακχαριτών στο παχύ έντερο, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs), όπως οξικό, προπιονικό και βουτυρικό οξύ, λιπαρών οξέων διακλαδισμένης αλυσίδας (Branched chain fatty acids: BCFAs), καθώς και γαλακτικό, μυρμηκικό, αιθανόλη και μικτά αέρια (π.χ. CH₄, CO₂ και H₂) (Lv, 2019).



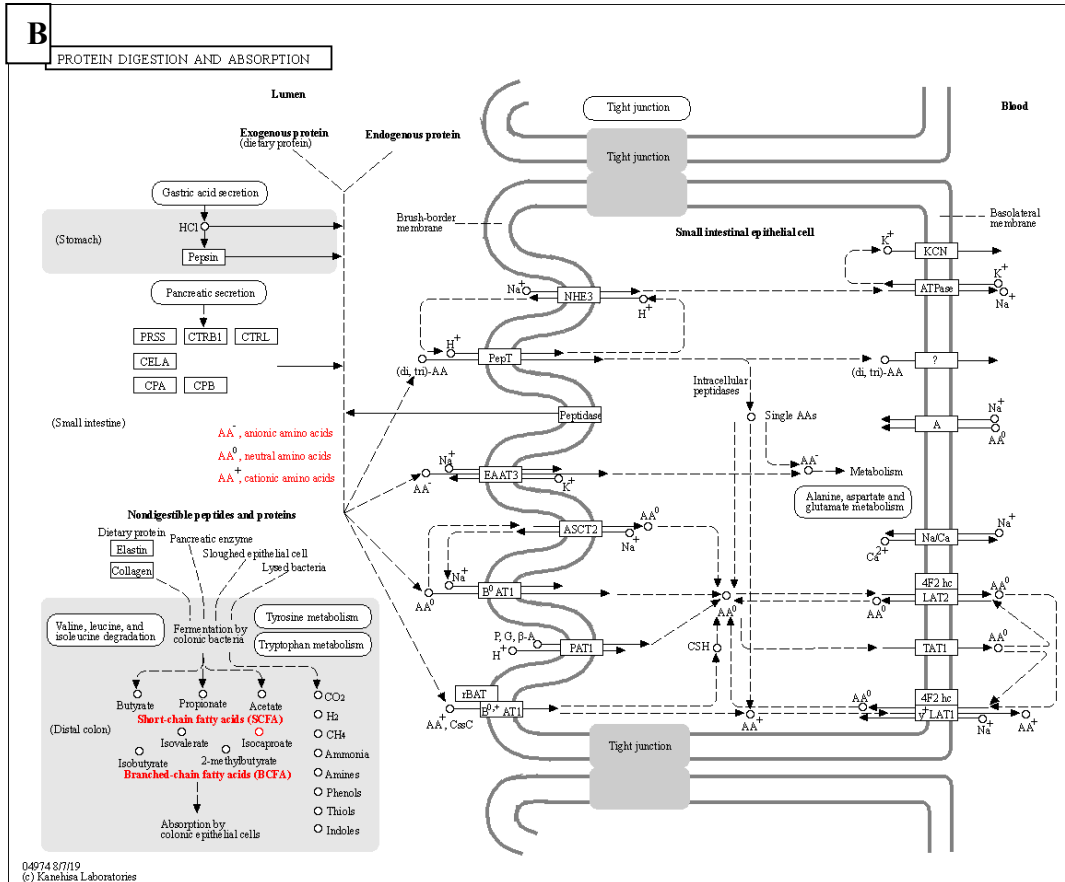
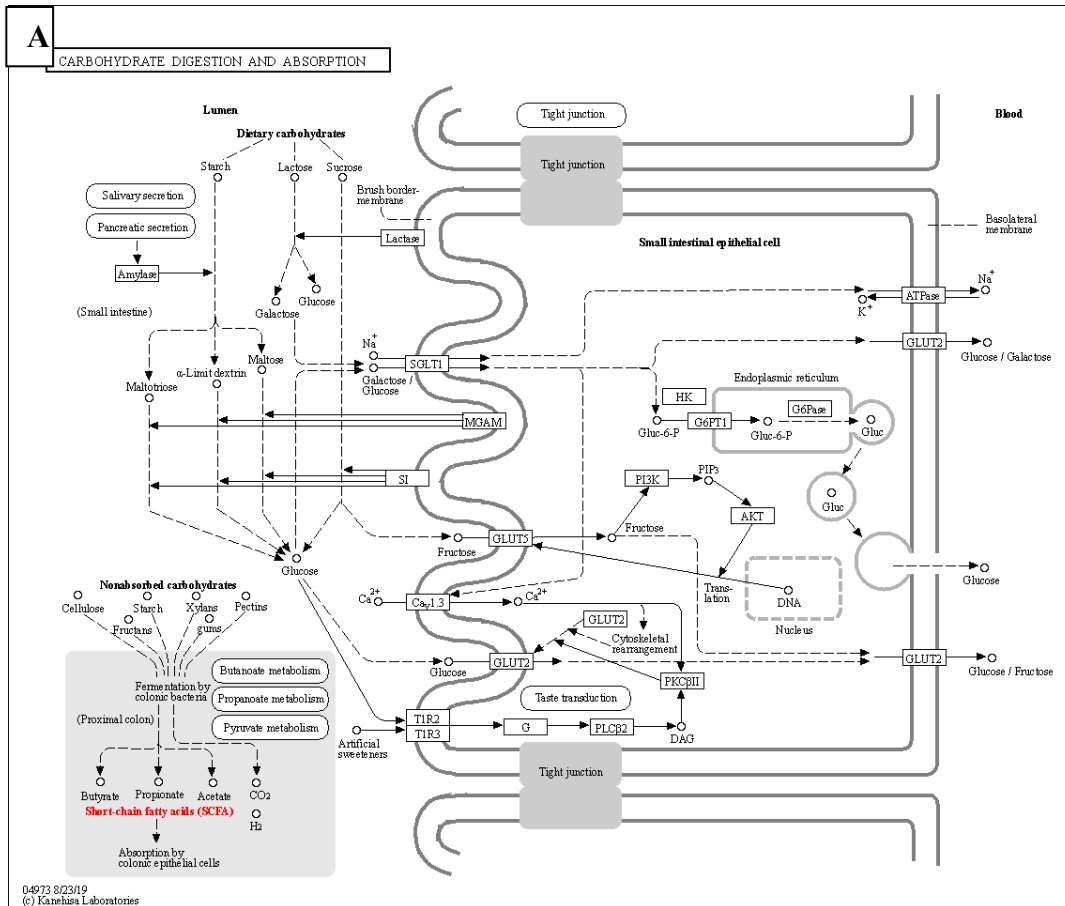
Εικόνα 1.10.: Σχηματική αναπαράσταση της ανθρώπινης γαστρεντερικής οδού: η ποσότητα βακτηρίων ανά γραμμάριο εντερικών περιεχομένων, η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και η βακτηριακή ζυμωτική δραστηριότητα που συνήθως απαντάται σε υγιή άτομα (Payne et al. 2012).

Όσον αφορά στα SCFAs, είναι οργανικά οξέα που παράγονται μέσα στον εντερικό αυλό από βακτηριακή ζύμωση κυρίως άπεπτων διαιτητικών υδατανθράκων και σε μικρότερο βαθμό από ενδογενείς πρωτεΐνες επιφανειακών κυττάρων του βλεννογόνου. Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί προτιμούν να ζυμώνουν υδατάνθρακες και ως εκ τούτου η σακχαρολυτική βακτηριακή ζύμωση εμφανίζεται κυρίως στο

εγγύς κόλον (**Εικόνα 1.11.A.**), ενώ η πρωτεολυτική ζύμωση λαμβάνει χώρα κυρίως στο απομακρυσμένο κόλον (**Εικόνα 1.11.B.**), όπου εξάγονται ζυμωμένοι υδατάνθρακες. Ενώ η ζύμωση υδατανθράκων οδηγεί στην παραγωγή SCFAs, η πρωτεϊνική ζύμωση οδηγεί στην παραγωγή διαφόρων τοξικών μεταβολιτών, όπως τα διακλαδισμένης αλυσίδας λιπαρά οξέα (Branched Chain Fatty Acids: BCFAs), η αμμωνία, οι ενώσεις που περιέχουν θείο, οι ινδόλες και οι φαινόλες. Η παραγωγή αυτών των τοξικών μεταβολιτών και η μικρότερη διαθεσιμότητα SCFAs εμπλέκονται σε διάφορες παθογένειες (Hamer et al. 2008). Δεδομένου των παραπάνω καθώς και ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί προτιμούν να ζυμώσουν τους υδατάνθρακες έναντι των πρωτεϊνών, η προσθήκη περισσότερων υδατανθράκων στα *in vitro* πρότυπα μπορεί να οδηγήσει προς μια πιο υγιή κατάσταση. Για παράδειγμα, η προσθήκη του πολυσακχαρίτη ινουλίνης οδήγησε σε σημαντική μείωση της παραγωγής τοξικών πρωτεολυτικών μεταβολιτών, μιας και ενισχύθηκε η σακχαρολυτική ζύμωση έναντι της πρωτεολυτικής (Nuenen et al. 2009).

1.5. Μεταβολομικές μελέτες σε βιολογικά δείγματα

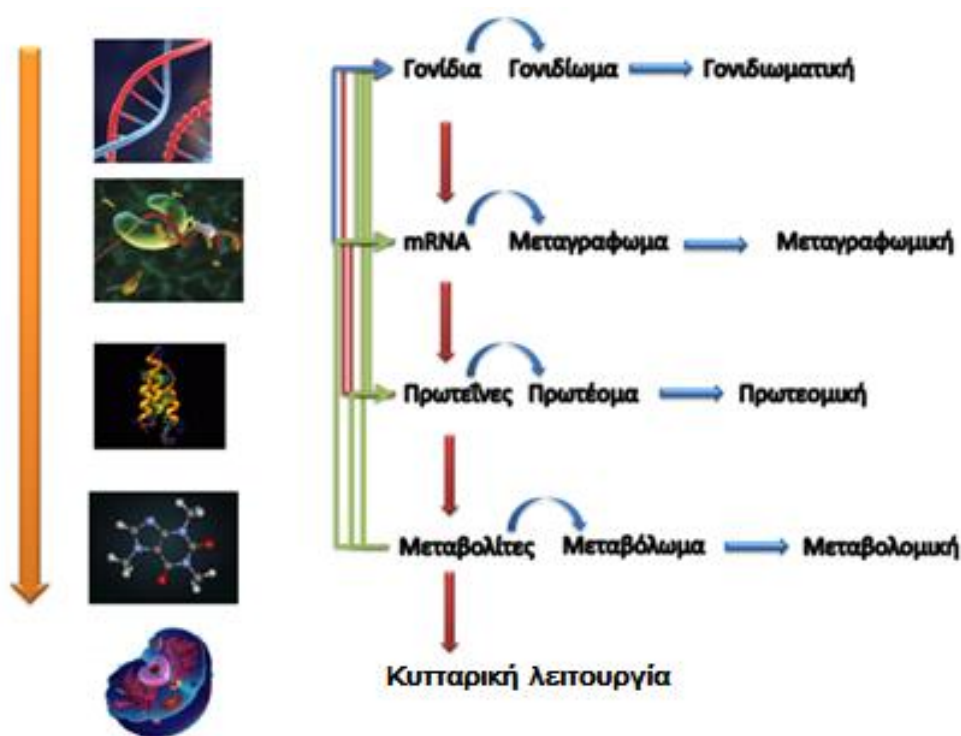
Η μεταβολομική συνιστά έναν πολλά υποσχόμενο τομέα των ολιστικών προσεγγίσεων τύπου «omics», με στόχο τη συνολική ανάλυση μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους, δηλαδή πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών που απαρτίζουν το μεταβολισμό σε ένα βιολογικό δείγμα. Η μεταβολομική στοχεύει στον προσδιορισμό της απόκρισης του μεταβολισμού και άρα των επιπέδων των μεταβολιτών σε διάφορους στρεσογόνους παράγοντες και στη σχέση τους με το φαινότυπο του οργανισμού. Η πρώτη δημοσίευση για τη μεταβολομική έγινε από τους Robinson και Pauling το 1971 (Linus et al. 1971). Έκτοτε, μεταβολομικές μελέτες εφαρμόστηκαν σε διάφορους τομείς, συμπεριλαμβανομένων των μελετών βιολογικής τοξικότητας, της αναγνώρισης βιοδεικτών, της ανάπτυξης φαρμάκων και των περιβαλλοντικών μελετών (Matich et al. 2019).



Εικόνα 1.11.: Τα μεταβολικά μονοπάτια διάσπασης πρωτεϊνών και υδατανθράκων στον ανθρώπινο εντερικό σωλήνα, όπως καταγράφονται στη βάση δεδομένων KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). A: Υδατάνθρακες διασπώνται με τη βοήθεια ενζύμων και η ζύμωση των μη αφομοιώσιμων σακχάρων οδηγεί στην παραγωγή SCFAs. B: Πρωτεΐνες πέπτονται από γαστρικά και παγκρεατικά ένζυμα, ενώ η διάσπαση των άπεπτων πεπτιδίων και ο μεταβολισμός των αμινοξέων οδηγούν στην παραγωγή SCFAs και BCFA.

Πρόσφατα έχει αποδειχθεί πως η μεταβολομική παρέχει σημαντικές δυνατότητες σε πολλούς τομείς, όπως στην τοξικολογία, στη διατροφή, στον καρκίνο. Μεταβολομική ανάλυση βιορευστών ή ιστών έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στους τομείς της φυσιολογίας και της διάγνωση τόσο διαφόρων ασθενειών όσο και ορισμένων μορφών καρκίνου (Li Wang et al. 2018). Αντιπροσωπεύει μια από τις νέες «omics» προσεγγίσεις και αξιοποιεί τη μοναδική για κάθε άνθρωπο παρουσία και συγκέντρωση των μικρών μορίων στους ιστούς και τα σωματικά υγρά (σάλιο, αίμα, ούρα), ώστε να διαμορφωθεί ένα «αποτύπωμα» που μπορεί να είναι μοναδικό για το άτομο και τις επιδράσεις του περιβάλλοντος σε αυτό (Kussmann et al. 2006). Δύναται, ακόμη, να παράσχει μια ολοκληρωμένη Εικόνα της συνολικής διατροφικής πρόσληψης με μέτρηση του μεταβολικού προφίλ από τα σωματικά υγρά, συμβάλλοντας στην απόκτηση πληροφοριών αναφορικά με τις μεταβολικές οδούς που σχετίζονται με την ανθρώπινη διατροφή. Υπάρχουν πολλές διατροφικές επιδημιολογικές μελέτες που υπόκεινται σε σφάλματα, επειδή δεν υπάρχουν αντικειμενικοί βιοδείκτες για όλα τα θρεπτικά συστατικά και τα τρόφιμα. Η μεταβολική, επομένως, μπορεί να είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνική για τον αντικειμενικό προσδιορισμό διατροφικών βιοδεικτών, συνδυάζοντας τους μοριακούς μηχανισμούς με τη διατροφή που επηρεάζει την ανθρώπινη υγεία (Bhupathiraju et al. 2019).

Η μεταβολομική επιτρέπει την παράλληλη μέτρηση των ενδογενών και εξωγενών μεταβολιτών στα δείγματα με αποτέλεσμα το μεταβολικό αποτύπωμα (προφίλ) που προκύπτει να μπορεί να προσφέρει μια Εικόνα των αλλαγών τους όσον αφορά στις κυτταρικές αποκρίσεις σε διάφορες διαταραχές, όπως σε ασθένειες ή και σε φαρμακευτικές αγωγές. Αυτό καθιστά τους μεταβολίτες εξαιρετικούς υπονήφιους για βιοδείκτες και ιδιαίτερα χρήσιμους για τον προσδιορισμό βιοχημικών μονοπατιών, που επηρεάζονται σε ασθένειες ή κατά τη διάρκεια της θεραπείας τους (Smolinska et al. 2012).



Εικόνα 1.12.: Ροή των «ομικών» διαδικασιών.

Η μεταβολομική συμπληρώνει άλλες προσεγγίσεις «omics», όπως η γονιδιωματική, η μεταγραφωμική και η πρωτεομική. Πρωτεομικές, γονιδιωματικές (ειδικά συγκριτική γονιδιωματική που επικεντρώνεται στη συσχέτιση γονιδιωματικών αλληλουχιών με κάποια ασθένεια) και μεταγραφωμικές αναλύσεις πραγματοποιούνται για την ανάλυση των επιπτώσεων διαφόρων φυσικών και ανθρωπογενών ενώσεων στους οργανισμούς του περιβάλλοντος. Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν συνήθως να προσφέρουν συσχετίσεις μεταξύ του φαινοτύπου και της απόκρισης του οργανισμού στις πιέσεις του περιβάλλοντος σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή (Cornelis et al. 2014). Η μεταβολομική, από την άλλη πλευρά, αντικατοπτρίζει την πραγματική κατάσταση του οργανισμού, υποδεικνύοντας το προφίλ διαφόρων μεταβολιτών, όπως αμινοξέα, πεπτίδια, υδατάνθρακες, λιπίδια και νουκλεοτίδια. Επομένως, η τεχνολογία της μεταβολομικής, σε αντίθεση με άλλα «omics», αντιπροσωπεύει το μοριακό φαινότυπο, επειδή οι μεταβολίτες και οι συγκεντρώσεις τους αντικατοπτρίζουν άμεσα την κατάσταση των κυττάρων/ιστών (**Εικόνα 1.12.**) (Matich et al. 2019). Επιπροσθέτως, σε αντίθεση με άλλες προσεγγίσεις «omics», η μεταβολομική δε βασίζεται στη χαρτογράφηση των δεδομένων που δημιουργούνται σε έναν οργανισμό αναφοράς. Ως αποτέλεσμα, έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη πολυάριθμων οργανισμών προτύπων και μη προτύπων, τονίζοντας την ευελιξία αυτής της προσέγγισης (Jaeger et al. 2017).

1.5.1. Μεταβολομική ανάλυση ολικού μεταβολώματος βιολογικών δειγμάτων

Πρόκειται για τη συστηματική μελέτη του συνόλου των μεταβολιτών σε ένα βιολογικό δείγμα ή δείγμα τροφίμου, που περιλαμβάνει τα ακόλουθα διαδοχικά βήματα: (α) την πειραματική τεχνική, βασισμένη σε τεχνικές όπως φασματοσκοπία MS (Mass Spectrometry), NMR (Nuclear Magnetic Resonance), FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) σχεδιασμένη να υποδεικνύει χαμηλού μοριακού βάρους ενώσεις, και (β) πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων (Workentine et al. 2010).

Κοινές αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόζονται στη μεταβολική είναι NMR, GC/MS και LC/MS. Κάθε τεχνική, ωστόσο, είναι συνυφασμένη τόσο με πλεονεκτήματα όσο και με μειονεκτήματα. Μια τεχνική που χρησιμοποιείται σε μια μεταβολομική μελέτη θα πρέπει να είναι (α) μη εκλεκτική, (β) ευαίσθητη, (γ) υψηλής διακριτικής ανάλυσης, (δ) επαναλήψιμη, και (ε) ποσοτική. Οι πλέον χρησιμοποιούμενες αναλυτικές μέθοδοι οι οποίες επιτρέπουν τον διαχωρισμό, την ανίχνευση, τον χαρακτηρισμό και την ποσοτικοποίηση μικρού μοριακού βάρους μορίων είναι κυρίως: η φασματομετρία μάζας (MS) η οποία συνήθως απαντάται συζευγμένη είτε με υγρή (LC), ή/και με αέρια (GC) αλλά και με υψηλής πίεσης (UPLC) χρωματογραφία, η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση συζευγμένη είτε με φασματομετρία μάζας (CE-MS) ή με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (CE-NMR). Παρότι αναλύσεις με τεχνικές όπως NMR, GC-MS, LC-MS και UPLC-MS προτιμώνται σε μεγάλης κλίμακας μελέτες η μεταβολομική δεν περιορίζεται στη χρήση μόνο αυτών των αναλυτικών τεχνικών (Zhang et al. 2020). Στις εναλλακτικές αναλυτικές μεθόδους συμπεριλαμβάνονται αν και σε μικρότερο βαθμό η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) συνδυαστικά με φασματοσκοπία απορρόφησης ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), η φασματομετρία συστοιχίας φωτοδιόδων ή ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές και η φασματοσκοπία υπερώδους με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) (Villas-Boas, 2013).

Όσον αφορά στο πεδίο της μεταβολομικής στα βιορευστά, το NMR παρέχει μια υψηλής απόδοσης τεχνική για την ταυτοποίηση του προφίλ των βιολογικών υγρών. Η φασματοσκοπία NMR πλεονεκτεί σε σχέση με τις τεχνικές GC/MS και LC/MS, διότι το δείγμα δεν καταστρέφεται και δε χρειάζεται προεπεξεργασία (απομόνωση συστατικών με χρήση ρητινών ή κάποιας στήλης διαχωρισμού). Από την άλλη, η φασματοσκοπία μάζας (MS) παρουσιάζει αυξημένη ευαισθησία ως προς τη φασματοσκοπία NMR, απαραίτητη για την ανίχνευση συστατικών χαμηλής συγκέντρωσης. Ωστόσο,

πρέπει να χρησιμοποιείται συνδυασμός διαφορετικών αναλυτικών τεχνολογιών για να αποκτηθεί μια ευρεία προσέγγιση του μεταβολώματος (Zhang et al. 2011).

Τα στάδια μιας ολοκληρωμένης μεταβολομικής ανάλυσης για οποιαδήποτε από τις παραπάνω μεθόδους είναι (Zhang et al. 2020):

- συλλογή και απομόνωση του βιολογικού δείγματος και αναστολή ή τερματισμό της ενζυμικής δράσης
- απομόνωση ελεύθερων μεταβολιτών από το βιολογικό δείγμα
- παραγωγή των απομονωμένων μεταβολιτών στο δείγμα (για GC/MS)
- προετοιμασία δείγματος για ανάλυση (προσθήκη διαλυτών, εσωτερικού προτύπου, ρυθμιστικού διαλύματος)
- αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των κορυφών που αντιστοιχούν σε μεταβολίτες από τα φάσματα που προέκυψαν
- κανονικοποίηση φασμάτων
- τμηματοποίηση φασμάτων και πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση στα τελικά δεδομένα
- εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τις ομαδοποιήσεις των δειγμάτων και των υπεύθυνων μεταβολιτών για τις διακρίσεις
- εξαγωγή συμπερασμάτων σε επίπεδο μεταβολικών μονοπατιών

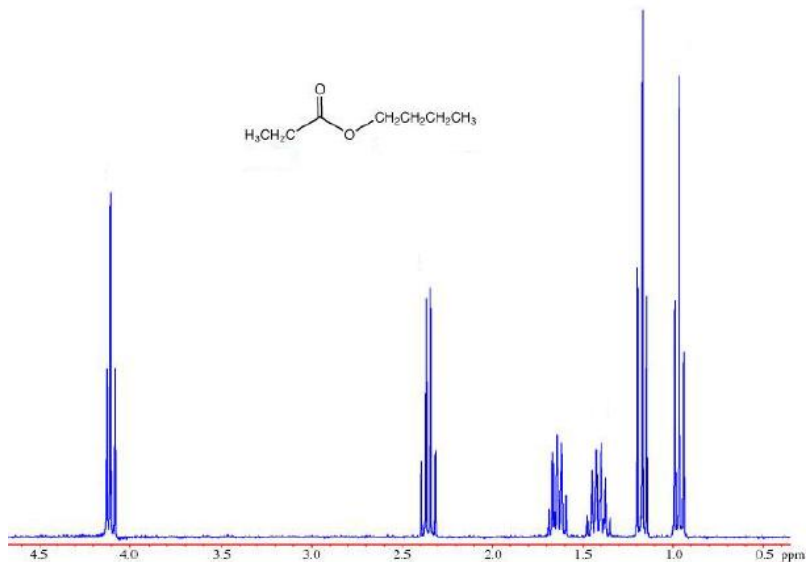
Η αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα Διπλωματική Εργασία είναι η φασματοσκοπία NMR.

1.5.2. Πλεονεκτήματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

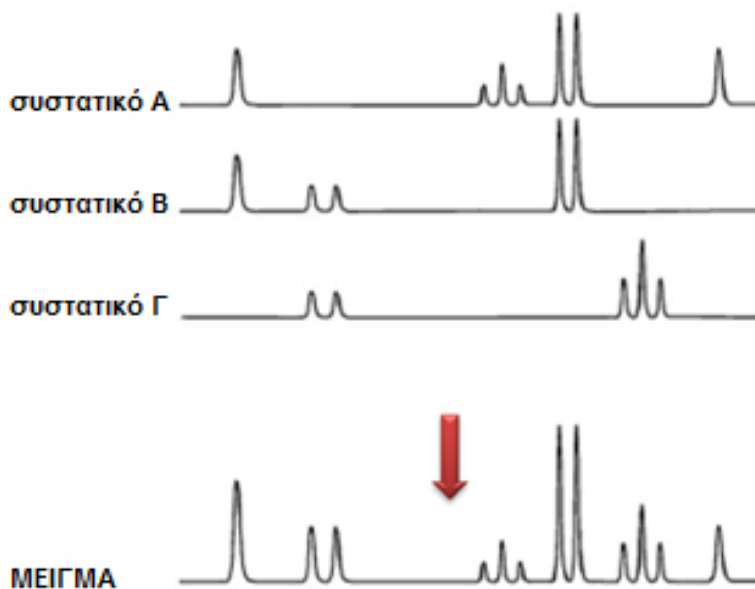
Το NMR είναι μια μέθοδος όπου οι πυρήνες σε ένα μαγνητικό πεδίο απορροφούν και επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Αυτή η ενέργεια έχει μια συγκεκριμένη συχνότητα συντονισμού που εξαρτάται από την ισχύ του μαγνητικού πεδίου και τις μαγνητικές ιδιότητες του ισότοπου των ατόμων, επιτρέποντας την παρατήρηση ειδικών κβαντικών μαγνητικών ιδιοτήτων του ατομικού πυρήνα. Το NMR χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση μεταβολιτών σε βιορευστά και σε άλλα βιοστοιχεία (El et al. 2020), ενώ προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα μεταξύ των οποίων:

- Αποτελεί μια μη καταστροφική τεχνική, υπό την έννοια ότι το δείγμα μπορεί να ανακτηθεί μετά την ανάλυση.
- Η παρασκευή των δειγμάτων είναι εύκολη, δεδομένου ότι δεν απαιτείται κάποιος διαχωρισμός και οι χρόνοι λήψης είναι σύντομοι (συνολικά της τάξης των λεπτών) τουλάχιστον σε ότι αφορά στα απλά πειράματα μίας διάστασης.
- Επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό πολλών οργανικών συστατικών ακόμα και χαμηλής συγκέντρωσης.
- Η ταυτοποίηση ενώσεων μπορεί να υποστηριχθεί από μια σειρά ενημερωμένων λογισμικών και βάσεων δεδομένων.
- Η χρήση διδιάστατης φασματοσκοπίας NMR, όπως πειράματα ομοπυρηνικού συσχετισμού ^1H - ^1H COSY (Correlation Spectroscopy) και ^1H - ^1H TOCSY (Total Correlation Spectroscopy), και ετεροπυρηνικού συσχετισμού ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) και ^1H - ^{13}C HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), επιτρέπει τον αδιαμφισβήτητο χαρακτηρισμό των μεταβολιτών.

- Μια μεγάλη ποσότητα πληροφοριών διατίθεται από ένα μονοδιάστατο (1D) φάσμα ^1H NMR, που περιλαμβάνει: 1) χημικές μετατοπίσεις, 2) πολλαπλότητα σήματος, 3) σταθερές ομοπυρηνικές συζεύξεις (^1H - ^1H), 4) σταθερές ετεροπυρηνικές συζεύξεις (^{14}N - ^1H ή ^{31}P - ^1H ή ^{13}C - ^1H), 5) το ολοκλήρωμα του σήματος, 6) τη σταθερότητα του σήματος, 7) το χρόνο εφesuχασμού (Εικόνα 1.13., 1.14.).



Εικόνα 1.13: Χαρακτηριστικό φάσμα NMR οργανικής ένωσης, όπου απορροφάται ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία από έναν πυρήνα (^1H ή ^{13}C) και ακολουθεί διέγερση. Στη συνέχεια με αποδιέγερση εκπέμπεται ακτινοβολία, η οποία καταγράφεται στα φάσματα (Yamazawa et al. 2012).



Εικόνα 1.14.: Τα φάσματα μιγμάτων είναι αθροίσματα των αντίστοιχων φασμάτων καθενός συστατικού.

1.6. Σκοπός της παρούσας μελέτης

Οι β-γλυκάνες ανήκουν σε μια ομάδα πολυσακχαριτών που ανευρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα βακτηρίων, μυκήτων, μανιταριών καθώς και δημητριακών (Grajek et al. 2005) και θεωρούνται τροποποιητές των βιολογικών αποκρίσεων με ευεργετικές για την υγεία δράσεις, όπου συμπεριλαμβάνονται οι ανοσορυθμιστικές και αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Ωστόσο, ο μοριακός μηχανισμός που ενέχεται στην αντικαρκινική δράση τους δεν είναι επαρκώς κατανοητός (Bai et al. 2019). Η αλληλεπίδρασή τους με τον εντερικό μικροβιόκοσμο του ανθρώπου αποτελεί αντικείμενο έντονης έρευνας τα τελευταία χρόνια, καθώς διερευνάται η πρεβιοτική τους δράση και κατά πόσο αυτή ευθύνεται για τις ανοσορυθμιστικές και αντικαρκινικές τους ιδιότητες. Η επίδραση των β-γλυκανών των εδώδιμων μανιταριών στον εντερικό μικροβιόκοσμο αποτυπώνεται και σε μια σειρά μεταβολιτών (Grajek et al. 2005) που παράγονται κατά την πέψη των μυκητιακών πολυσακχαριτών από το εντερικό μικροβίωμα (Yang et al. 2013). Συνεπώς, η ταυτοποίηση των μεταβολιτών αυτών μέσω ολιστικών προσεγγίσεων NMR μεταβολομικής ανάλυσης και η ανάδειξη βιοδεικτών που σχετίζονται με τις ευεργετικές επιδράσεις των εδώδιμων μανιταριών με υψηλή περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες, απετέλεσε τον κύριο στόχο της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας. Σε αυτή την κατεύθυνση έπρεπε να εφαρμοστεί η μεθοδολογία NMR με κατάλληλες προσαρμογές και να αναπτυχθούν εργαλεία που επιτρέπουν την αναγνώριση βιοδεικτών της καλής λειτουργίας ή της παθολογίας του οργανισμού σε δείγμα κοπράνων. Τέλος, στο πλαίσιο της μελέτης της αντι-καρκινικής δράσης διερευνήθηκαν παράλληλα οι αντι-γονοτοξικές τους ιδιότητες με δοκιμή COMET.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. *In vitro* ζύμωση μυκητιακών στελεχών με εμβόλιο κοπράνων υγιών εθελοντών

Η διαδικασία της *in vitro* στατικής καλλιέργειας διεξήχθη στο εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Διαιτολογίας – Διατροφής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, με επιβλέπουσα την Αν. Καθηγήτρια Α. Κυριακού, από όπου εφαρμόστηκε ειδικό πρωτόκολλο, σύμφωνα με τους Olano et al. (2000) και Rycroft et al. (2001), με μικρές τροποποιήσεις. Ειδικότερα, μια σειρά από φιάλες των 250 mL με 90 mL βασικού μέσου καλλιέργειας εμβολιάστηκαν με 10 mL εναιωρήματος κοπράνων - fecal slurry (1:5). Οι προς μελέτη βασιδιομύκητες, δηλαδή τα πιθανά πρεβιοτικά, προστέθηκαν σε λυοφιλιωμένη μορφή (το καρποφόρο σώμα τους) επίσης σε συγκέντρωση 0,5%, 1%, 2% (w/v), ενώ παράλληλα διεξήχθη ζύμωση παρουσία ινουλίνης (θετικός μάρτυρας) και απουσία πηγής άνθρακα (αρνητικός μάρτυρας). Από τις καλλιέργειες ελήφθησαν δείγματα κατά την έναρξη (t=0 h) και σε προκαθορισμένα χρονικά σημεία της ζύμωσης (8 και 24 ώρες) για περαιτέρω αναλύσεις όπως απαρίθμηση βακτηρίων, ανάλυση SCFAs και άλλων μεταβολιτών, προσδιορισμός πρεβιοτικού δείκτη. Οι διαδικασίες επώασης και επεξεργασίας διεξήχθησαν υπό αναερόβιες συνθήκες. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 10.000xg για 30 min στους 4 °C και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε διήθηση του υπερκείμενου εναιωρήματος μέσω φίλτρου 0,20 μm. Τα τελικά δείγματα, που συνιστούν και τα «προϊόντα ζύμωσης», καταψύχθηκαν στους -20 °C και στάλθηκαν στο Ινστιτούτο Χημική Βιολογίας (Εργαστήριο Χημικής Καρκινογένεσης & Γενετικής Τοξικολογίας – Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών, όπου διεξήχθησαν οι ακόλουθες πειραματικές διαδικασίες όπως αναλύονται παρακάτω.

Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία εξετάστηκαν ως προς την πρεβιοτική τους δράση οι εξής βασιδιομύκητες (μανιτάρια): *Pleurotus ostreatus* 1123, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* LGM22, *Pleurotus eryngii* Zheng(216), *Cyclocybe cylindracea* CC2 και *Cyclocybe cylindracea* 505. Το *Ganoderma lucidum* αναπτύχθηκε σε καλλιεργητικό υπόστρωμα BS (πριονίδι) ενώ όλοι οι υπόλοιποι σε καλλιεργητικό υπόστρωμα WS (άχυρο). Όλοι είχαν επιλεγεί με βάση την υψηλή περιεκτικότητά τους σε β-γλυκάνες και κατά το πέρας της ανάπτυξής τους λυοφιλιώθηκε το καρποφόρο σώμα κάθε μανιταριού. Η εν λόγω διαδικασία στο σύνολό της έλαβε χώρα στο εργαστήριο Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας του τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γ. Ζερβάκη.

2.2. *Pleurotus ostreatus* & *Ganoderma lucidum*: μελέτη της επίδρασης των προϊόντων της *in vitro* ζύμωσης τους στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και U-937

Η ανθρώπινη επιθηλιακή κυτταρική σειρά Caco-2 [Caco2] (ATCC® HTB-37™) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως μοντέλο του εντερικού επιθηλιακού φραγμού και προέρχεται από ανθρώπινο αδενοκαρκίνωμα του παχέος εντέρου. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας αντι-καρκινικών παραγόντων. Μία από τις σπουδαίες ιδιότητές της είναι η ικανότητά της να υπόκειται σε αυθόρμητη διαφοροποίηση σε συνθήκες καλλιέργειας σε μονοστοιβάδα κυττάρων με πολλές ιδιότητες χαρακτηριστικές των ώριμων εντεροκυττάρων. Η κυτταρική σειρά Caco-2 είναι ετερογενής και περιέχει κύτταρα με ελαφρώς διαφορετικές ιδιότητες (Sambuy et al. 2005).

Η κυτταρική σειρά U-937 (ATCC® CRL-1593.2™), που αρχικά απομονώθηκε από ιστοκυτταρικό λέμφωμα ενός άνδρα 37 ετών με μυελοειδή λευχαιμία, χρησιμοποιήθηκε ευρέως σε αιματολογικές μελέτες. Είναι ανθρώπινη πρόδρομη μονοκυτταρική σειρά, που μπορεί *in vitro*, να διαφοροποιηθεί είτε σε διάφορους τύπους μακροφάγων είτε σε δενδριτικά κύτταρα με διάφορους παράγοντες διαφοροποίησης. Πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα αποκτούν τον «προσκολλημένο»

φαινότυπο και εμφανίζουν διάφορες ιδιότητες τυπικών μακροφάγων. Τόσο τα μακροφάγα όσο και τα δενδριτικά κύτταρα είναι αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα, με τα δενδριτικά κύτταρα που προέρχονται από αυτά, εξυπηρετούν τρεις κύριες λειτουργίες του ανοσοποιητικού συστήματος: την φαγοκυττάρωση, την αντιγονο-παρουσίαση και την παραγωγή κυτταροκινών (Minafra et al. 2011).

Όσον αφορά στις συνθήκες ανακαλλιέργειας των παραπάνω κυτταρικών σειρών, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

→ κυτταρική σειρά Caco-2

Τα κύτταρα Caco-2 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, κατάλληλο για κύτταρα που προσκολλώνται, με προσθήκη 10% ορού εμβρύου βοός (FBS) και 1% πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονταν σε φλάσκες σε κλίβανο επώασης με σταθερή θερμοκρασία 37 °C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH.

→ κυτταρική σειρά U-937

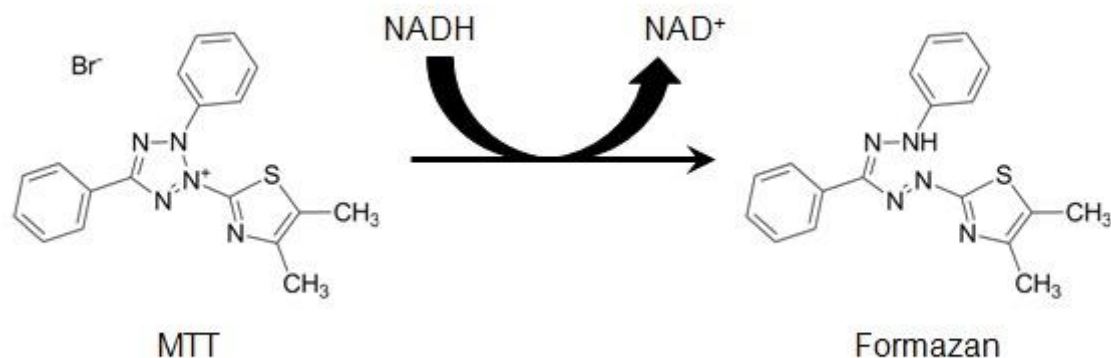
Τα κύτταρα U-937 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό RPMI 1640, κατάλληλο για αιωρούμενα κύτταρα, στο οποίο είχε προστεθεί 10% ορός εμβρύου βοός (FBS) και 1% πενικιλίνη / στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονταν σε φλάσκες σε κλίβανο επώασης με σταθερή θερμοκρασία 37 °C και παροχή 5% CO₂, που είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση του pH.

2.2.1. Προσδιορισμός της βιωσιμότητας των κυττάρων με τη μέθοδο MTT

Η δοκιμασία MTT (βρωμιούχου 3-(4,5-διμεθυλοθειαζολ-2-υλο)-2,5-διφαινυλοτετραζολίου) ήταν ο πρώτος προσδιορισμός ομοιογενούς κυτταρικής βιωσιμότητας που αναπτύχθηκε για μια μορφή 96-πηγαδιών. Το υπόστρωμα MTT παρασκευάζεται σε διάλυμα που προστίθεται σε κυτταρική καλλιέργεια, συνήθως σε τελική συγκέντρωση 0,2-0,5 mg / mL και επώαζεται για 1 έως 4 ώρες. Η ποσότητα φορμαζάνης (πιθανώς άμεσα ανάλογη προς τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων) μετράται καταγράφοντας μεταβολές στην απορρόφηση στα 570 nm. Τα βιώσιμα κύτταρα με ενεργό μεταβολισμό μετατρέπουν το MTT σε ένα πορφυρό προϊόν φορμαζάνης με μέγιστη απορροφητικότητα κοντά στα 570 nm (**Εικόνα 2.1**). Όταν τα κύτταρα πεθαίνουν, χάνουν την ικανότητα να μετατρέπουν το MTT σε φορμαζάνη. Επομένως, ο σχηματισμός χρώματος χρησιμεύει ως ένας χρήσιμος και κατάλληλος δείκτης μόνο των βιώσιμων κυττάρων. Ο ακριβής κυτταρικός μηχανισμός του μετασχηματισμού του MTT σε φορμαζάνη δεν είναι επαρκώς κατανοητός, αλλά πιθανόν εμπλέκει αντίδραση με NADH ή παρόμοια αναγωγικά μόρια (μιτοχονδριακά ένζυμα) που μεταφέρουν ηλεκτρόνια στο MTT. Η αρχή αυτής της μεθόδου είναι ότι μόνο τα ζωντανά κύτταρα διαθέτουν ενεργές μιτοχονδριακές αφυδρογονάσες που μπορούν να κάνουν αυτή τη μετατροπή, ενώ τα νεκρά κύτταρα όχι.

Το προϊόν φορμαζάνης του τετραζολίου MTT συσσωρεύεται ως αδιάλυτο ίζημα μέσα στα κύτταρα, λόγω της διάσπασης του δακτυλίου του τετραζολίου από συγκεκριμένα ένζυμα, τις αφυδρογονάσες και εναποτίθεται κοντά στην κυτταρική επιφάνεια και στο μέσο καλλιέργειας. Η φορμαζάνη πρέπει να διαλυτοποιηθεί πριν από την καταγραφή των μετρήσεων απορρόφησης. Διάφορες μέθοδοι διαλυτοποίησης περιλαμβάνουν χρήση οξινισμένης ισοπροπανόλης, DMSO, διμεθυλοφορμαμιδίου, SDS και συνδυασμούς απορρυπαντικού και οργανικού διαλύτη. Η ποσότητα του παραγόμενου σήματος εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους που περιλαμβάνουν: τη συγκέντρωση του MTT, τη διάρκεια της περιόδου επώασης, τον αριθμό των βιώσιμων κυττάρων και τη μεταβολική τους δραστηριότητα. Η μετρούμενη απορρόφηση είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της παραγόμενης

χρωστικής. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μείωση του MTT είναι ένας δείκτης που αντικατοπτρίζει τον μεταβολισμό των βιώσιμων κυττάρων και όχι τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων (Riss et al. 2016).



Εικόνα 2.1.: Το διαλυμένο MTT μετατρέπεται σε ένα αδιάλυτο ιώδες φορμαζάνιο λόγω της διάσπασης του δακτυλίου του τετραζολίου από συγκεκριμένα ένζυμα, τις αφυδρογονάσες.

Τα προϊόντα ζύμωσης των *Pleurotus ostreatus* 1123 και *Ganoderma lucidum* εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα ανάσχεσης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε καλλιέργειες κυττάρων Caco-2 και U-937, μετά τη χορήγησή τους σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις 1, 5 και 10 % (v / v) επί του θρεπτικού μέσου.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Sigma–Aldrich, η δοκιμασία στην περίπτωση προσκολλώμενων κυττάρων (Caco-2) ξεκινά με την επίστρωση των κυττάρων σε πλάκα μικροτιλοδότησης (96-well plate) με προσθήκη 5×10^3 κυττάρων ανά πηγάδι. Στις ακριανές σειρές της πλάκας δεν προστίθενται κύτταρα, ώστε να παρέχεται προστασία από την εξάτμιση. Έπειτα από περίπου 24 ώρες και αφού τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί, αφαιρείται το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό και προστίθενται σε κάθε πηγάδι 200 μ L από τα προς χορήγηση διαλύματα επιθυμητής συγκέντρωσης. Για αιωρούμενα κύτταρα (U-937) παραλείπεται η αρχική επίστρωση. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επωάζονται για τον απαιτούμενο χρόνο (συνήθως 24-72 ώρες) σε κλίβανο με σταθερή θερμοκρασία 37 °C και παροχή 5% CO₂. Μετά το πέρας αυτού του χρόνου, προστίθενται 10 μ L διαλύματος MTT αρχικού πυκνού stock διαλύματος (5 mg / mL). Ακολουθεί επώαση για 3 ώρες και μετά από προσθήκη 110 μ L SDS πραγματοποιείται άλλη μία επώαση για 3 ώρες υπό ανάδευση. Τελικό στάδιο της δοκιμασίας αποτελεί η φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 590 και 570 nm και η κατάλληλη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων μέσω t-test ώστε να υπολογιστεί η % βιωσιμότητα για κάθε σημείο, η οποία προκύπτει από τουλάχιστον τρεις με πέντε επαναλήψεις.

2.2.2. Διερεύνηση και προσδιορισμός της αντιγονοτοξικής δράσης με τη μέθοδο COMET

Το ανθρώπινο DNA εκτίθεται σε εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες που μπορεί να τροποποιήσουν τη δομή του. Αυτές οι δομικές τροποποιήσεις έχουν καταστροφικές συνέπειες, καθώς επηρεάζουν την αντιγραφή και την μεταγραφή και μπορούν να καταλήξουν σε μεταλλάξεις και χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Μπορεί να έχουν μία από τις εξής μορφές: σπασίματα στο σταθερό φωσφοδιεστερικό σκελετό, που επηρεάζουν τον ένα ή και τους δύο κλώνους (μονόκλιωνα /single strand ή

δίκλωνα/double strand ρήγματα), οξειδωση ή αλκυλίωση βάσεων, ομοιοπολική σύνδεση μεγάλων μορίων, όπως πρωτεΐνες, με βάσεις DNA, χιαστοί δεσμοί μεταξύ νουκλεοτιδίων των απέναντι αλυσίδων DNA, απουρινικές και απυριμιδικές θέσεις (APsites). Αν και τα μονόκλωνα ρήγματα δεν είναι τόσο επιβλαβή όσο τα δίκλωνα, είναι τοξικά για τα κύτταρα καθώς επηρεάζουν την αντιγραφή και την μεταγραφή του DNA. Τα συστήματα επιδιόρθωσης DNA, που περιλαμβάνουν διάφορες ομάδες πρωτεϊνών, επιδιορθώνουν ή/και τροποποιούν την πλειονότητα των βλαβών του DNA προτού να συμβούν μόνιμες αλλαγές του γονιδιώματος (Poetsch, 2020).

Αρχή της μεθόδου

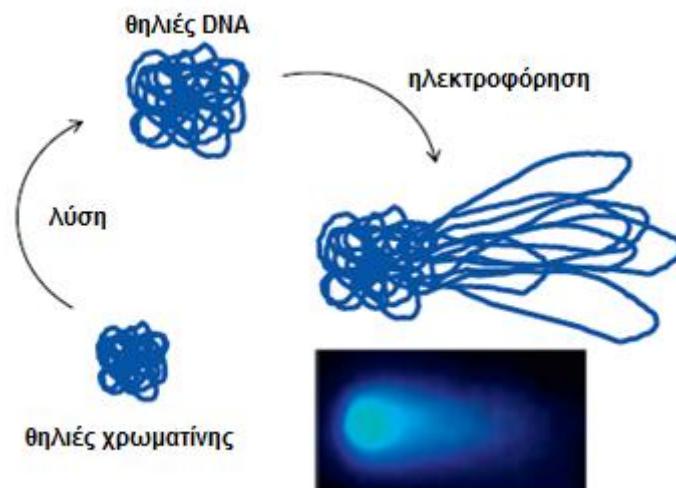
Η πιο απλή προσέγγιση για τη μέτρηση της επιδιόρθωσης του DNA είναι να προκληθεί βλάβη στο DNA των κυττάρων και στη συνέχεια να παρακολουθηθεί η ταχύτητα που επιδιορθώνονται αυτές οι βλάβες με το πέρασμα του χρόνου. Οι περισσότεροι τύποι κυττάρων επιδιορθώνουν τα ρήγματα στο DNA πάρα πολύ γρήγορα. Αντίθετα, η επιδιόρθωση οξειδωμένων πουρινών / πυριμιδινών με εκτομή βάσεων απαιτεί περισσότερο χρόνο. Εναλλακτικά, η ικανότητα επιδιόρθωσης ενός κυτταρικού εκχυλίσματος (cell extract) μπορεί να εκτιμηθεί *in vitro*, όπου ο πυρήνας καθίσταται προσβάσιμος σε πρωτεΐνες, αναστολείς, δεοξυριβονουκλεοτίδια κ.α. Επιπλέον, πληροφορίες σχετικά με την επιδιόρθωση του DNA μπορούν να προκύψουν από την εφαρμογή της δοκιμασίας των κομητών (comet assay ή single-cell gel electrophoresis) σε κυτταρικές σειρές.

Η μέθοδος comet είναι μια ευαίσθητη, γρήγορη και χαμηλού κόστους τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση διαλυμένων μονόκλωνων ή δίκλωνων αλυσίδων DNA (strand breaks, SBs) καθώς και το ποσοστό επιδιόρθωσής τους, σε επίπεδο μεμονωμένων κυττάρων, ενώ εφαρμόζεται συχνά σε ανθρώπινα δείγματα. Από την πρώτη περιγραφή της δοκιμασίας σε ουδέτερες συνθήκες από τους Östling και Johanson το 1984 (Ostling and Johanson 1984) και την αλκαλική δοκιμασία από τον Singh και τους συνεργάτες του το 1988 (Singh et al. 1988), έχουν αναπτυχθεί αρκετές νέες παραλλαγές και τροποποιήσεις. Αυτές περιλαμβάνουν τη χρήση ειδικών ενζύμων που επιδιορθώνουν βλάβες, όπως είναι οι οξειδωμένες βάσεις που προκαλούνται από δραστικές ρίζες οξυγόνου στο DNA, την αξιολόγηση βλαβών του DNA, που επάγονται από μόρια που προσδένονται επάνω στο DNA, και το συνδυασμό της δοκιμασίας κομητών και της φθορίζουσας *in situ* υβριδοποίησης (comet-FISH) για τη διερεύνηση και επιδιόρθωση βλαβών γονιδιακών περιοχών του DNA. Με τη μέθοδο αυτή δε διακρίνεται το είδος της βλάβης του DNA (μονόκλωνα ρήγματα, δίκλωνα ρήγματα). Επίσης, δεν επιτρέπει τη διάκριση των αποπτωτικών από τα νεκρά κύτταρα καθώς και τη μέτρηση του μεγέθους των θραυσμάτων του DNA, αφού δε διαχωρίζονται κατά το σύντομο χρονικό διάστημα της ηλεκτροφόρησης (Azqueta et al. 2014).

Αν και η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται ευρέως, οι φυσικοί μηχανισμοί για το μετασχηματισμό της μορφολογίας του DNA δεν ήταν πλήρως κατανοητοί για πολύ καιρό. Προτάθηκαν διαφορετικές υποθέσεις για να εξηγήσουν πώς σχηματίζεται η ουρά του κομήτη. Μία από αυτές βασίστηκε στο σχηματισμό κομητών μετά από επεξεργασία κυττάρων με παράγοντες που προκαλούν θραύσεις κλώνων DNA (ιονίζουσα ακτινοβολία, ελεύθερες ρίζες κλπ.). Η εξήγηση, που φαίνεται απλή, είναι πως η ουρά του κομήτη σχηματίζεται από γραμμικά θραύσματα DNA. Τα θραύσματα είναι μονόκλωνης και δίκλωνης έλικας, υπό αλκαλικές και ουδέτερες συνθήκες αντίστοιχα. Ως εκ τούτου, το πρωτόκολλο σε ουδέτερες συνθήκες ανιχνεύει θραύσεις διπλής έλικας ενώ η αλκαλική δοκιμασία είναι ευαίσθητη σε θραύσεις μονής έλικας (Afanasieva et al. 2018).

Το 1975, οι Cook και Brazell, σε μια προσπάθεια να μελετήσουν τη δομή του πυρήνα, πρότειναν τη λύση του κυττάρου με NaCl υψηλής μοριακότητας. Ως αποτέλεσμα, το κυτταρόπλασμα, οι μεμβράνες και το πυρηνόπλασμα διασπάστηκαν, τα νουκλεοσώματα αποδιοργανώθηκαν και παρέμεινε μία πυρηνική

μήτρα αποτελούμενη από RNA, πρωτεΐνες και DNA, η οποία ονομάζεται νουκλεοειδές. Σύμφωνα, λοιπόν, με τη μέθοδο που προτάθηκε από τον Cook και την ομάδα του, το DNA προσδένεται κατά διαστήματα στον πυρήνα του νουκλεοειδούς με αποτέλεσμα να αποτελεί ένα σύνολο από υπερελικωμένες θηλιές και να μην εμφανίζεται ως γραμμικό μόριο. Όταν η υπερελίκωση χαλαρώνει, κάτι που συμβαίνει με την παρουσία μονόκλωνων ρηγμάτων, τότε οι θηλιές εκτείνονται έξω από το νουκλεοειδές και γύρω από τον πυρήνα του, σχηματίζοντας μία στεφάνη. Σε ένα νουκλεοειδές, το DNA διατηρεί την αρχική του αρνητική υπερελίκωση λόγω της οργάνωσης του σε νουκλεοσώματα. Αφού το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο, κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης οι θηλιές αυτές μετακινούνται προς την άνοδο της συσκευής σχηματίζοντας την ουρά του κομήτη, ενώ το άθικτο γενετικό υλικό παραμένει στο νουκλεοειδές σχηματίζοντας την κεφαλή του κομήτη (Εικόνα 2.2.). Το σχήμα, το μέγεθος και η κατανομή του γενετικού υλικού σε κεφαλή και ουρά στον κομήτη σχετίζεται με το μέγεθος της βλάβης DNA. Η έκταση της μετακίνησης του DNA κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης εξαρτάται άμεσα από τη βλάβη που θα υποστεί στα κύτταρα. Η βλάβη του γενετικού υλικού εκτιμάται είτε μέσω οπτικής είτε αυτοματοποιημένης ανάλυσης των εικόνων των κομητών με ειδικά υπολογιστικά προγράμματα (Cook et al. 1975).



Εικόνα 2.2.: Συνοπτική παρουσίαση της μεθόδου COMET, όπου με την κυτταρική λύση προκύπτουν εν τέλει οι γονιδιωματικές θηλιές, οι οποίες αναπτύσσονται στην ηλεκτροφόρηση και δημιουργείται η μορφή ενός κομήτη (Afanasiyeva et al. 2018).

Το πρωτόκολλο ανάλυσης κομητών περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Östling και Johanson το 1984 (Ostling and Johanson 1984). Η προσέγγιση αναφέρεται στην έξοδο του DNA από κύτταρα ενσωματωμένα σε αгарόζη σε γυάλινη επιφάνεια – πλακάκια, μετά τη λύση τους σε ουδέτερο διάλυμα για την απομάκρυνση κυτταρικών και πυρηνικών μεμβρανών και πρωτεϊνών (Εικόνα 2.3.). Υπό αυτές τις συνθήκες, ένα μικρό κλάσμα του γονιδιωματικού DNA εκτείνεται προς την άνοδο και σχηματίζει κατά την ηλεκτροφόρηση μια ουρά, που μπορεί να εμφανιστεί με φθοριοχρώματα. Ο ρυθμός μετανάστευσης DNA εκτιμήθηκε ως η σχετική ένταση φθορισμού στην ουρά. Αυτή η σχετική ποσότητα DNA στην ουρά ήταν ανάλογη με τη δόση της ιονίζουσας ακτινοβολίας. Έτσι, το επίπεδο εξόδου – μετανάστευσης του DNA φαίνεται να είναι ένα μέτρο της βλάβης του DNA σε μεμονωμένα κύτταρα.

Μια τροποποίηση αυτής της ηλεκτροφόρησης (η οποία εφαρμόζεται πιο συχνά τώρα) προτάθηκε από το Singh και τους συνεργάτες του το 1988 (Singh et al. 1988). Σε αντίθεση με το αρχικό πρωτόκολλο, η λύση πραγματοποιήθηκε με απορρυπαντικά και υψηλή ιοντική ισχύ, ενώ η ηλεκτροφόρηση έγινε υπό αλκαλικές συνθήκες (pH>13) και τα πλακάκια ουδετεροποιήθηκαν πριν τη χρώση. Παρατηρήθηκε η ίδια τάση: το επίπεδο της εξόδου – μετανάστευσης του DNA εξαρτάται από τη δόση των μεταλλαξογόνων που

προκάλεσαν θραύσεις της έλικας του DNA. Οι συγγραφείς υποστήριξαν ότι η αλκαλική ηλεκτροφόρηση, όταν πραγματοποιείται μετανάστευση του μονόκλωνου (μετουσιωμένου) DNA, θα αυξήσει την ευαισθησία σε περισσότερους τύπους βλάβης του DNA. Επιπλέον, η κυτταρική λύση με απορρυπαντικά και υψηλή αλατότητα εξασφάλιζε πιο ολοκληρωμένη αφαίρεση πρωτεϊνών (Singh et al. 1988).

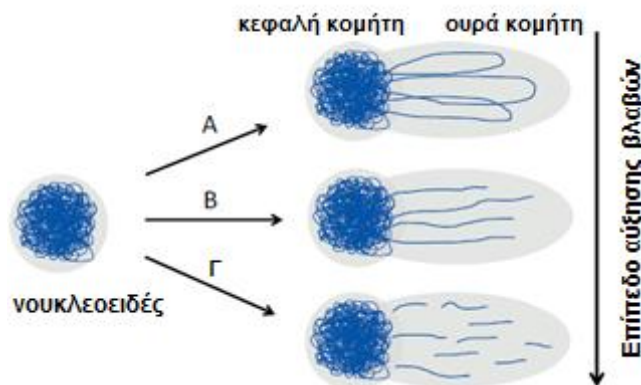


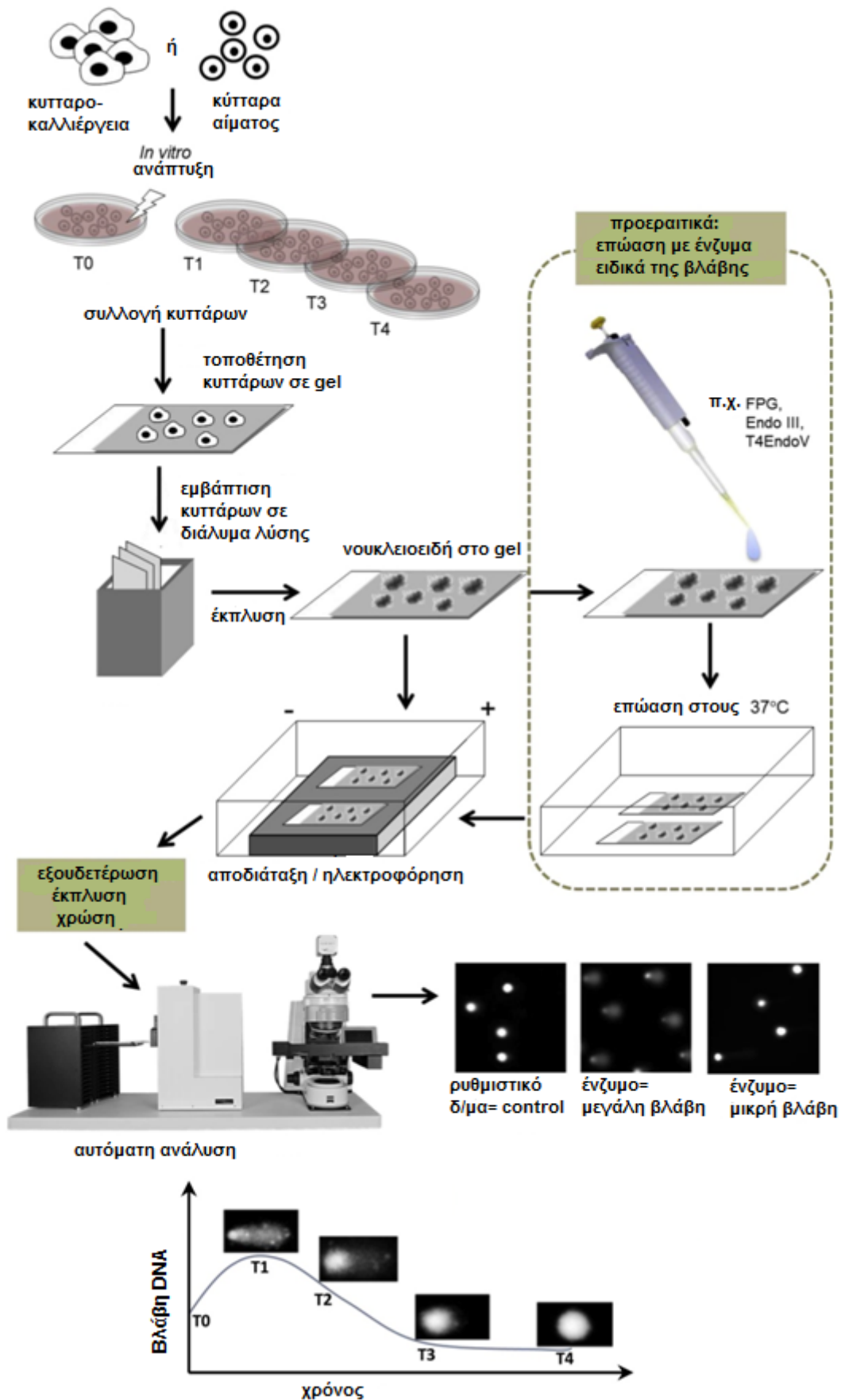
Εικόνα 2.3.: Κύρια βήματα της γενικής διαδικασίας κατά τη δοκιμή κομήτη: τα κύτταρα είναι ενσωματωμένα σε αгарόζη στη γυάλινη επιφάνεια μιας μικροσκοπικής πλάκας (Α), που έχει προκληθεί λύση για να παραχθούν νουκλεοειδή (Β) και ηλεκτροφορήθηκαν για να αποκτήσουν κομήτες (Γ).

Υπάρχει μια παραλλαγή του πρωτοκόλλου της δοκιμασίας κομητών που ενισχύει την ευαισθησία και προσφέρει τη δυνατότητα ανίχνευσης μεγαλύτερου εύρους αλλοιώσεων DNA, περιλαμβάνοντας ένα επιπλέον βήμα: μετά την κυτταρική λύση το νουκλεοειδές επωάζεται με μια ειδική για τη βλάβη ενδονουκλεάση. Αυτό σημαίνει πως τα ένζυμα αναγνωρίζουν ειδικά τις αλλοιώσεις και τέμνουν την περιοχή του σακχαροφωσφορικού σκελετού. Έτσι, οι θραύσεις των κλώνων που προκλήθηκαν από το ένζυμο συνυφαίνονται με την παρουσία των αλλοιώσεων. Για παράδειγμα, η ενδονουκλεάση III αναγνωρίζει οξειδωμένες πυριμιδίνες και τις αποκόπτει, η T4 ενδονουκλεάση V αναγνωρίζει διμερή πυριμιδίνης κι έτσι είναι σημαντική για την ανίχνευση βλαβών επαγόμενων από UV ακτινοβολία (Smith et al. 2006).

Η ουρά του κομήτη μπορεί να περιέχει εκτεταμένους βρόγχους ή θραύσματα DNA, ανάλογα με το επίπεδο βλάβης του DNA (Εικόνα 2.4.) σε συνθήκες ηλεκτροφόρησης. Ωστόσο, η μείωση στο κλάσμα DNA που μπορεί να μεταναστεύσει στην ουρά του κομήτη αξίζει ιδιαίτερη προσοχή. Η δοκιμασία του κομήτη περιορίζεται σε σχέση με το μέγεθος των μορίων που μπορεί να μεταναστεύσει μέσα από τους πόρους της αгарόζης. Το τυπικό μήκος της ουράς του κομήτη αντιστοιχεί περίπου στο μήκος περιγράμματος των μεγαλύτερων βρόγχων και κυμαίνεται εντός της περιοχής των 200 kb. Επομένως, οι βρόγχοι μεγαλύτερου μεγέθους αδυνατούν να μεταναστεύσουν στην ουρά. Για το λόγο αυτό ακόμη και σε πολύωρη ηλεκτροφόρηση (>2 h), το ποσοστό DNA στις ουρές των κομητών παραμένει σταθερό.

Εικόνα 2.4.: Ανάλογα με το επίπεδο των βλαβών του DNA, οι ουρές του κομήτη σε ουδέτερες συνθήκες μπορεί να σχηματιστούν από εκτεταμένους βρόγχους DNA, όπου οι βλάβες είναι ήπιες (Α), ή από θραύσματά του που είτε διατηρούν (με ένα από τα άκρα) σύνδεση με πρωτεΐνες του νουκλεοειδούς (Β) είτε χάνουν όχι (Γ). Στις τελευταίες περιπτώσεις οι βλάβες είναι εντονότερες (Afanasiyeva et al. 2018).





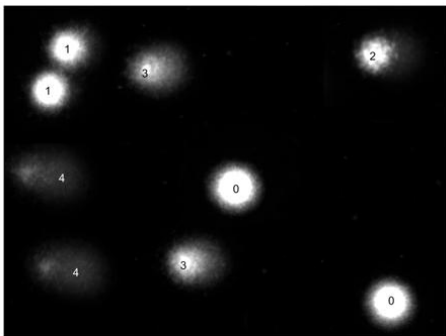
Εικόνα 2.5.: Αναπαράσταση κυτταρικής επιδιόρθωσης. Τα νουκλειοειδή μπορούν είτε να επωαστούν με ένζυμα ειδικά για πρόκληση βλάβης είτε όχι. Ο σχηματισμός και η επιδιόρθωση των βλαβών του DNA μελετάται με την πάροδο του χρόνου (T0,T1,T2,T3,T4) και απαιτούνται πολλαπλές κυτταρικές επωάσεις (Langie et al. 2019).

Συνεπώς, διαφορετικές εκδοχές της μεθόδου χρησιμοποιούνται προκειμένου να ανιχνευθούν διαφορετικά είδη και διαφορετικά επίπεδα βλάβης του DNA. Εναιώρημα κυττάρων αναμιγνύεται με αгарόζη χαμηλού σημείου τήξεως και απλώνεται πάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Μετά τη λύση των κυττάρων με διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης αλάτων και απορρυπαντικών, ακολουθεί επώαση με αλκαλικό διάλυμα προκειμένου να ξεδιπλωθεί η διπλή έλικα και να πραγματοποιηθεί ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση σε ουδέτερες συνθήκες, μετά από επώαση με ουδέτερο διάλυμα, επιτρέπει την ανίχνευση μονόκλωνων και δίκλωνων ρηγμάτων και κάποιων απουρινικών και απυριμιδινικών θέσεων. Αντίθετα, η ηλεκτροφόρηση σε αλκαλικές συνθήκες, μετά από επώαση με αλκαλικό διάλυμα, καθιστά δυνατή την ανίχνευση μονόκλωνων και δίκλωνων ρηγμάτων, την πλειοψηφία των απουρινικών και απυριμιδινικών θέσεων καθώς και συμπλόκων τα οποία είναι ασταθή σε αλκαλικές συνθήκες (Gajski et al. 2020). Το τελικό στάδιο της μεθόδου είναι μια ανάλυση των πλακιδίων μετά από ηλεκτροφόρηση και χρώση. Ο απλούστερος τρόπος εκτίμησης της αποτελεσματικότητας της εξόδου του DNA από τα νουκλεοειδή είναι η απαρίθμηση κομητών. Οι δύο παράμετροι που συνήθως μετριοούνται είναι η σχετική ποσότητα του DNA στις ουρές και το μήκος της ουράς (**Εικόνα 2.5.**) (Afanasieva et al. 2018).

Βιοπληροφορική ανάλυση

Οι διαφορετικές προσεγγίσεις για την ανάλυση των κομητών περιλαμβάνουν τα εξής:

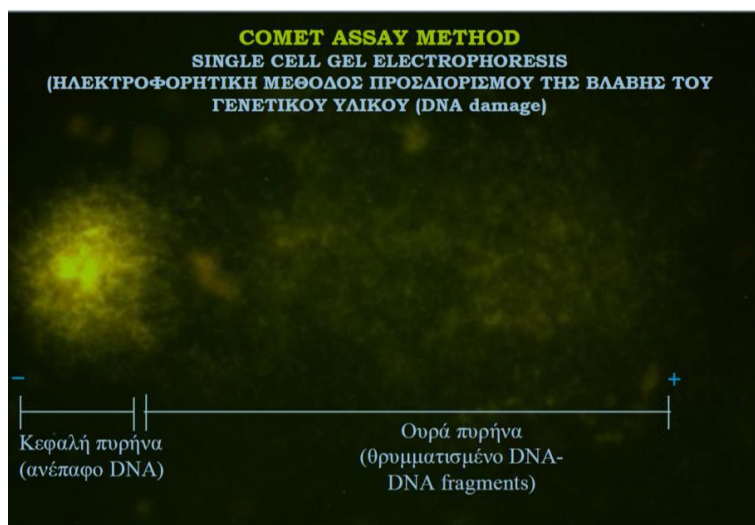
1. Μέτρηση του μήκους της ουράς του κομήτη σε φωτομικρογραφία, μέθοδος η οποία παρέχει περιορισμένες πληροφορίες, καθώς το μήκος της ουράς αυξάνεται μόνο στα χαμηλότερα επίπεδα βλάβης και σύντομα γίνεται μέγιστο, μειώνοντας έτσι το εύρος της δοκιμής.
2. Ταξινόμηση κομητών οπτικά, συνήθως σε πέντε κατηγορίες: 0 → μη κατεστραμμένα κύτταρα (κομήτες με καθόλου ή ελάχιστα ανιχνεύσιμες ουρές) και 1-4 → αυξανόμενες εντάσεις ουράς (**Εικόνα 2.6.**).
3. Ανάλυση Εικόνας με κάμερα συνδεδεμένη με τον υπολογιστή και με κατάλληλο λογισμικό. Οι εικόνες των κομητών επιλέγονται από τον χειριστή.
4. Αυτοματοποιημένα συστήματα, τα οποία αναζητούν κομήτες και διεξάγουν την ανάλυση με ελάχιστη ανθρώπινη παρέμβαση (Collins et al. 2008).



Εικόνα 2.6.: Παραδείγματα κομητών από ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις πέντε κατηγορίες.

Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται ορισμένες παρατηρήσεις. Πρώτον, ο οπτικός έλεγχος είναι αρκετά σημαντικός, μιας και πρέπει να ταξινομηθούν οι κομήτες με προσοχή. Η οπτική κατηγοριοποίηση σε μία από τις 5 κατηγορίες, τείνει να είναι ταχύτερη από την ανάλυση Εικόνας με τον υπολογιστή. Προφανώς μπορεί να υπάρχουν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών χειριστών, γι' αυτό και είναι ασφαλέστερο όλα τα δείγματα να αναλύονται από τον ίδιο χειριστή. Δεύτερον, η ανάλυση Εικόνας μπορεί να προσφέρει μεγάλη πληροφόρηση, όπως είναι η συνολική έκταση κάθε κομήτη, το μήκος ουράς του, η % ποσότητα DNA στο κεφάλι και στην ουρά. Τα κύτταρα από διαφορετικούς ιστούς ή διαφορετικά είδη

μπορεί να διαφέρουν σε μήκος ουράς (Collins et al. 2008). Στην **Εικόνα 2.7.** παρουσιάζεται η μορφή ενός κομήτη.



Εικόνα 2.7.: Νουκλεοειδές σε σχήμα κομήτη όπως προκύπτει μετά από ηλεκτροφόρηση με την μέθοδο comet. Διακρίνεται η κεφαλή του κομήτη, που αποτελείται από το άθικτο γενετικό υλικό, καθώς και η ουρά του κομήτη, που αποτελείται από το θρυμματισμένο γενετικό υλικό. Το χαρακτηριστικό σχήμα του κομήτη προκύπτει από την μετακίνηση των θραυσμάτων του γενετικού υλικού προς τον θετικό πόλο της ηλεκτροφορητικής συσκευής

Πειραματική διαδικασία

Σκοπός της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας ήταν να προσδιοριστεί κατά πόσο τα προϊόντα *in vitro* ζύμωσης, που διεξήχθη παρουσία ινουλίνης ή λυοφιλιωμένης μορφής μανιταριού *Pleurotus ostreatus* 1123 είτε *Ganoderma lucidum*, προστατεύουν τις κυτταρικές σειρές U-937 και Caco-2 έναντι των γονοτοξικών επιπτώσεων του βουτυλοξειδίου (tBOOH), ισχυρού γονοτοξικού παράγοντα ο οποίος προκαλεί βλάβες στο DNA ήδη μια ώρα μετά τη χορήγηση (Plazar et al. 2007).

Η ινουλίνη ή η λυοφιλιωμένη μορφή μανιταριού *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum*, προστέθηκαν σε αναλογία 0,5, 1 και 2% (w / v) επί βασικού μέσου ζύμωσης που περιείχε εμβόλιο κοπράνων υγιών εθελοντών στις *in vitro* καλλιέργειες. Τα προϊόντα ζύμωσης παρουσία των παραπάνω μανιταριών προστέθηκαν στις κυτταρικές σειρές σε αναλογίες 1% και 5% (v / v) επί του θρεπτικού μέσου με τη διαδικασία που περιγράφεται στην §2.1. Ύστερα από 72 ώρες επώασης το θρεπτικό υλικό απομακρύνθηκε και ακολούθησε επώαση σε νέο θρεπτικό υλικό για 1 ώρα σε συγκεκριμένη συγκέντρωση του οξειδωτικού παράγοντα (500 μM tBOOH). Στη συνέχεια συλλέχθηκε το περιεχόμενο από κάθε πηγαδάκι σε φιαλίδιο τύπου erpendorf και προστέθηκαν 0,5 mL PBS σε κάθε πηγαδάκι ώστε να συλλεχθεί ό,τι είχε απομείνει στο erpendorf. Έγιναν δύο εκπλύσεις με PBS με ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις στις 2.000 στροφές / λεπτό για 5 λεπτά. Στο τέλος έγινε καταμέτρηση κυττάρων και προστέθηκαν στο ίζημα 10 μL PBS / 20.000 κύτταρα. Τα φιαλίδια τύπου erpendorf διατηρήθηκαν σε πάγο.

Καθαρές αντικειμενοφόρες πλάκες εκπλύθηκαν με αλκοόλη και εμβαπτίσθηκαν σε 1% standardagarose (1 g αγαρόζης / 100 mL H₂O). Αφού έγινε στεγανοποίηση του πίσω μέρους με καθαρό χαρτί εμποτισμένο με νερό, διατηρήθηκαν για 24 ώρες σε στεγνό, καθαρό και σκοτεινό μέρος. Στη συνέχεια, 10 μL ιζήματος με PBS από τα φιαλίδια τύπου erpendorf αναμείχθηκαν με 130 μL 1%

lowmeltingagarose (1 g αγαρόζης / 100 mL PBS, σε υδατόλουτρο στους 37 °C) και μεταφέρθηκαν με πιπέτα στις αντικειμενοφόρες πλάκες με standardagarose. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κάθε πλάκα υπήρχαν 2 gels με αιώρημα κυττάρων για την επαναληψιμότητα της μεθόδου. Οι αντικειμενοφόρες πλάκες, αφού καλύφθηκαν με καλυπτρίδα, τοποθετήθηκαν για 40 λεπτά σε εμποτισμένο χαρτί με αποσταγμένο νερό στους 4 °C. Ακολούθησε απομάκρυνση της καλυπτρίδας και οι αντικειμενοφόρες πλάκες εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα λύσης (LysisBuffer (2,5 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris, ρύθμιση pH=10 με NaOH 10 M) + 1% Triton) όπου και παρέμειναν για 2 ώρες στους 4 °C, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η κυτταρική λύση.

Στη συνέχεια, το διάλυμα λύσης απομακρύνθηκε και οι πλάκες μεταφέρθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προστέθηκε διάλυμα ηλεκτροφόρησης (electrophoresisbuffer: 0,3 M NaOH, 1 mM EDTA), όπου οι πλάκες παρέμειναν για 35 λεπτά ώστε να πραγματοποιηθεί αποδιάταξη του γενετικού υλικού. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση στους 4 °C για 30 λεπτά στα 25 V και η ένταση του ρεύματος διατηρήθηκε σταθερή στα 255 mA. Τέλος, οι πλάκες απομακρύνθηκαν από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και εκπλύθηκαν για 10 λεπτά με διάλυμα εξουδετέρωσης (neutralizedbuffer: 0,4 M Tris, ρύθμιση pH=7,5 με HCl). Μετά την εξουδετέρωση πραγματοποιήθηκαν 2 διαδοχικές εκπλύσεις με αποσταγμένο νερό και οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε σκοτεινό μέρος για 24 ώρες ώστε να στεγνώσουν.

Η βλάβη του γενετικού υλικού εκτιμήθηκε με μικροσκοπική παρατήρηση των πλακών. Τα νουκλεοειδή παρατηρήθηκαν μετά από χρώση με προσθήκη 1mL διαλύματος SYBRGOLD (0,01 μL / mL TE, όπου TE: 10 mM Tris pH=7,4, 1 mM EDTA pH=8). Συγκεκριμένα, τα βαμμένα νουκλεοειδή εξετάστηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού σε μεγέθυνση 100X (Zeiss-epifluorescencemicroscope). Τα νουκλεοειδή εμφανίστηκαν ως κομήτες. Την ουρά αποτελούσαν τα θραύσματα τα οποία μετακινήθηκαν προς το θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης, λόγω του αρνητικού τους φορτίου, ενώ την κεφαλή αποτελούσε το άθικτο γενετικό υλικό. Σε κάθε πλάκα αναλύθηκαν περίπου 150 κύτταρα και τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το λογισμικό ImageJ. Τα επίπεδα βλάβης του γενετικού υλικού εκφράστηκαν μέσω του λογισμικού ως το ποσοστό του γενετικού υλικού που αντιστοιχεί στην ουρά του κομήτη (% DNAtail).

2.3. Διερεύνηση μεταβολικού αποτυπώματος των προϊόντων ζύμωσης

Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία, εξετάστηκε, παρουσία ή απουσία υποστρώματος, το σύνολο των μεταβολιτών που προκύπτουν στα προϊόντα της *in vitro* ζύμωσης των *Pleurotus ostreatus* 1123, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* LGM22, *Pleurotus eryngii* Zheng (216), *Cyclocybe cylindracea* CC2 και *Cyclocybe cylindracea* 505 με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR). Η ινουλίνη ή η λυοφιλιωμένη μορφή μανιταριού προστέθηκαν σε αναλογία 2% (w/v) σε βασικό υπόστρωμα που περιείχε εμβόλιο κοπράνων υγιών εθελοντών στις *in vitro* καλλιέργειες. Τα δείγματα με τα προϊόντα ζύμωσης του μικροβιακού φορτίου του εντέρου παρουσία των παραπάνω μανιταριών λυοφιλιώθηκαν, προκειμένου να ταυτοποιηθούν ενώσεις χαμηλής συγκέντρωσης. Από falcon των 50 mL με υπερκείμενο *in vitro* καλλιέργειας ελήφθη ποσότητα 1 mL και τοποθετήθηκε σε προζυγισμένο φιαλίδιο τύπου erpendorf. Πραγματοποιήθηκε εκ νέου ζύγιση, προκειμένου να υπολογιστεί η ακριβής ποσότητα προσθήκης, και το erpendorf τοποθετήθηκε στους -80 °C για περίπου 1 ώρα. Στη συνέχεια, εισήχθη για εξάχνωση μέχρι ξηρού σε συσκευή λυοφιλίωσης. Μετά την ξήρανση ζυγίστηκε το erpendorf και υπολογίστηκε η ποσότητα του καθαρού ιζήματος που απέμεινε. Σε καθαρό erpendorf μεταφέρθηκε ποσότητα ίση με 10 mg από το ίζημα. Ακολούθως, τα δείγματα ανασυστάθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH=7,2) με δευτεριωμένο νερό (D₂O). Στο δείγμα

προστέθηκε διάλυμα πρότυπου αντιδραστηρίου μετά νατρίου άλατος 3-(τριμεθυλσυλνυλ)προπιονικού-2,2,3,3-d4 οξέος (3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3-d4 acid sodium salt -TSP-d4) σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM. Ο τελικός όγκος ήταν 600 μ L, επομένως προστέθηκαν 60 μ L πρότυπου διαλύματος TSP και 540 μ L ρυθμιστικού διαλύματος με D₂O. Ακολούθησε ανάμιξη με vortex για 1 min και τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην κατάψυξη (-20 °C) για 24 ώρες. Πριν τη μέτρηση τα δείγματα αποψύχονταν σταδιακά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 min πριν τη μεταφορά τους σε μικροσωληνίσκους NMR 5 mm και την τοποθέτησή τους στο φασματογράφο NMR.

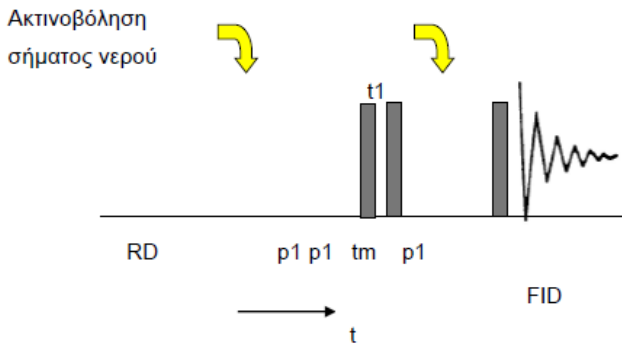
2.3.1. Λήψη φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού με ¹H NMR

Ένας τύπος NMR φασματοσκοπίας είναι το ¹H (πρωτονίου) NMR. Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός πρωτονίων είναι η εφαρμογή πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στη φασματοσκοπία NMR σε σχέση με τους πυρήνες ¹H εντός των μορίων μιας ουσίας, προκειμένου να προσδιοριστεί η δομή των μορίων της. Το πρωτόνιο (πυρήνας ¹H υδρογόνου) είναι ο πιο ευαίσθητος πυρήνας (εκτός από το τρίτιο) και συνήθως αποδίδει ισχυρά σήματα (Roselet et al. 2020). Το φάσμα του NMR (χημική μετατόπιση) εξαρτάται από την προστασία που παρέχουν τα ηλεκτρόνια γύρω από τον πυρήνα. Το φάσμα του ¹H-NMR προσδιορίζεται από τη διαφορά (σε ppm) μεταξύ της συχνότητας του παρατηρηθέντος πρωτονίου και ενός πρωτονίου αναφοράς από έναν μεταβολίτη αναφοράς, όπως είναι το TSP, το οποίο θέτει την αρχή του άξονα στα 0 ppm. Η ένταση του σήματος εξαρτάται από τον αριθμό των πανομοιότυπων πυρήνων και η παρουσία σύνθετων δειγμάτων δεν παρεμβαίνει στη μετρούμενη ένταση. Αυτό επιτρέπει την εκτέλεση ποσοτικοποίησης (Dunn et al. 2005).

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε αισθητήρας τριπλού συντονισμού [(¹H{¹³C/¹⁵N}) 5 mm PFG Automatable Triple Resonance probe]. Τα φάσματα ¹H λήφθηκαν σε φασματογράφο Varian 600 MHz (συχνότητα συντονισμού 599,9 MHz). Τα πειράματα διεξήχθησαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και εφαρμόστηκε η παλμική ακολουθία NOESY-presat 1D, ώστε να είναι εφικτή η ανάδειξη κορυφών χαμηλού σήματος που αντιστοιχούν σε μεταβολίτες μικρής περιεκτικότητας, καθώς και η εξασθένιση του σήματος του ύδατος κατά ένα παράγοντα 10⁵ που είναι σημαντικός όταν μελετώνται δείγματα βιολογικών υγρών (Maccaferri et al. 2012). Συλλέχθηκαν 32 σαρώσεις, ενώ το πειραματικό εύρος ήταν 9615Hz και χρησιμοποιήθηκε 90 μοιρών παλμός διέγερσης των πυρήνων ¹H. Προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση των κορυφών συντονισμού του φάσματος χρησιμοποιήθηκαν βιβλιογραφικά δεδομένα που αντλήθηκαν από τη βάση δεδομένων HFMDB (Human Fecal Metabolome Data Base) και τη βάση δεδομένων κύριων μεταβολιτών του λογισμικού Chenomx NMR Suite 6.0.

Φασματοσκοπία πρωτονίου με χρήση της παλμική ακολουθίας ¹H NOESY-presat 1D

Η ακολουθία 1D-NOESY-presat χρησιμοποιείται συνήθως στις μελέτες μεταβολικού προφίλ εκχυλίσματος κοπράνων. Για τη λήψη του φάσματος ¹H χρησιμοποιήθηκε η ακολουθία της **Εικόνας 2.8** και περιλαμβάνει δύο χρονικά διαστήματα, κατά τα οποία ακτινοβολείται εκλεκτικά η κορυφή που αντιστοιχεί στα πρωτόνια του ύδατος (χρόνος εφησυχασμού RD=1,5 sec και χρόνος μίξης tm=400 ms). Η παρατεταμένη ακτινοβόληση του ύδατος εμποδίζει την αποδιέγερση της μαγνήτισης των πρωτονίων του, αυξάνοντας έτσι το δυναμικό εύρος στη λήψη του σήματος FID (Free Induction Decay), που πρακτικά σημαίνει ότι αναδεικνύονται κορυφές χαμηλού σήματος που αντιστοιχούν σε μεταβολίτες μικρής περιεκτικότητας. Με τη χρήση του μεγάλου χρόνου ακτινοβόλησης επιτυγχάνεται η εξασθένιση του σήματος του ύδατος κατά έναν παράγοντα 10⁵, που είναι πολύ σημαντικός όταν μελετώνται δείγματα βιολογικών υγρών (Gabbani et al. 2017).



Εικόνα 2.8.: Παλμική ακολουθία NOESY-presat.

2.3.2. Εύρεση μεταβολιτών με χρήση της βάσης δεδομένων HFMDB (Human Fecal Metabolome Database)

Κάθε μεταβολίτης κοπράνων είναι συνδεδεμένος με μια βάση δεδομένων (Human Metabolome Database, HMDB), που παρέχει μια περιεκτική περιγραφή του κάθε μεταβολίτη, συμπεριλαμβανομένης της δομής του, της ομάδας της οργανικής ένωσης που ανήκει, των φυσικοχημικών δεδομένων του. Επιπλέον, γίνεται αναφορά σε φάσματα που αποκτήθηκαν με NMR, GC-MS ή LC-MS, παρέχονται πληροφορίες για μεταβολικά μονοπάτια, ενζυμικά δεδομένα, γενετικά δεδομένα και συνδέσεις με άλλες δημόσιες βάσεις δεδομένων (Karu et al. 2018).

Human Fecal Metabolome

TMIC The Metabolomics Innovation Centre Quantitative metabolomics services for biomarker discovery and validation.

Browsing Human Fecal Metabolites

Filter by metabolite status (default all):

Detected and quantified Detected but not quantified Expected but not quantified Predicted

Clear Apply Filter

Displaying metabolites 21 - 40 of 6738 in total

« First » Prev 1 2 3 4 5 6 ... Next » Last »

HMDB ID	CAS Number	Name	Structure	Formula	Average Mass	Monoisotopic Mass
HMDB0000060	541-50-4	Acetoacetic acid		C ₄ H ₆ O ₃	102.0896	102.031694058
HMDB0000062	541-15-1	L-Carnitine		C ₇ H ₁₅ NO ₃	161.1999	161.105193351
HMDB0000064	57-00-1	Creatine		C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	131.1332	131.069476547

Concentration Details

Metabolite	HMDB0000062 (L-Carnitine)
Biospecimen	Feces
Status	Detected and Quantified
Data source	Referenced
Concentration	19.87 +/- 11.39 nmol/g wet feces
Age	Adult (>18 years old)
Sex	Both
Condition	Normal

Comments

Wet feces samples (n=12) were used in the study. Instrument: LC-MS. Technology specification: HPLC-MS/MS and DIMS/MS using Biocrates P-180 kit.

Showing metabocard for L-Carnitine (HMDB0000062)

Identification Taxonomy Ontology Physical properties Spectra Biological properties

Concentrations Links References XML

enzymes (12) transporters (4) Show 15 proteins Show Metabolites with Similar Structures

Record Information

Version	4.0
Status	Detected and Quantified
Creation Date	2005-11-16 15:48:42 UTC
Update Date	2019-04-16 17:00:51 UTC
HMDB ID	HMDB0000062

Metabolite Identification

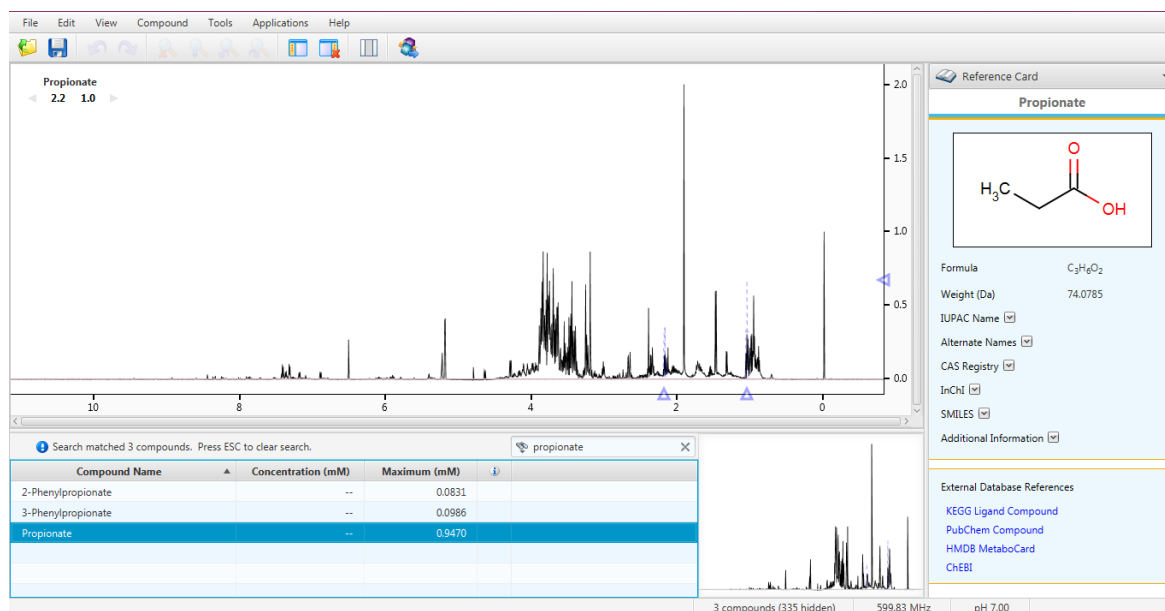
Common Name	L-Carnitine
Description	Carnitine is not an essential amino acid, it can be synthesized in the body. However, it is providing energy to muscles (including the heart) that some researchers are now recommend supplements in the diet, particularly for people who do not consume much red meat (the carnitine). Carnitine has been described as a vitamin, an amino acid, or a metabimin (i.e.
Structure	
Synonyms	Value
	(-)-Carnitine
	(-)-L-Carnitine

Εικόνα 2.9.: Στιγμιότυπα από τη βάση δεδομένων ανθρώπινων περιττωματικών μεταβολιτών (HFMDB).

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν μεταβολίτες που αναφέρονται στην HMDB. Στην **Εικόνα 2.9**, παρουσιάζεται η πορεία ανεύρεσης διαφόρων δεδομένων των μεταβολιτών που ανευρίσκονται στα ανθρώπινα περιττώματα.

2.3.3. Ταυτοποίηση μεταβολιτών με χρήση του λογισμικού **Chenomx NMR Suite 6.0**.

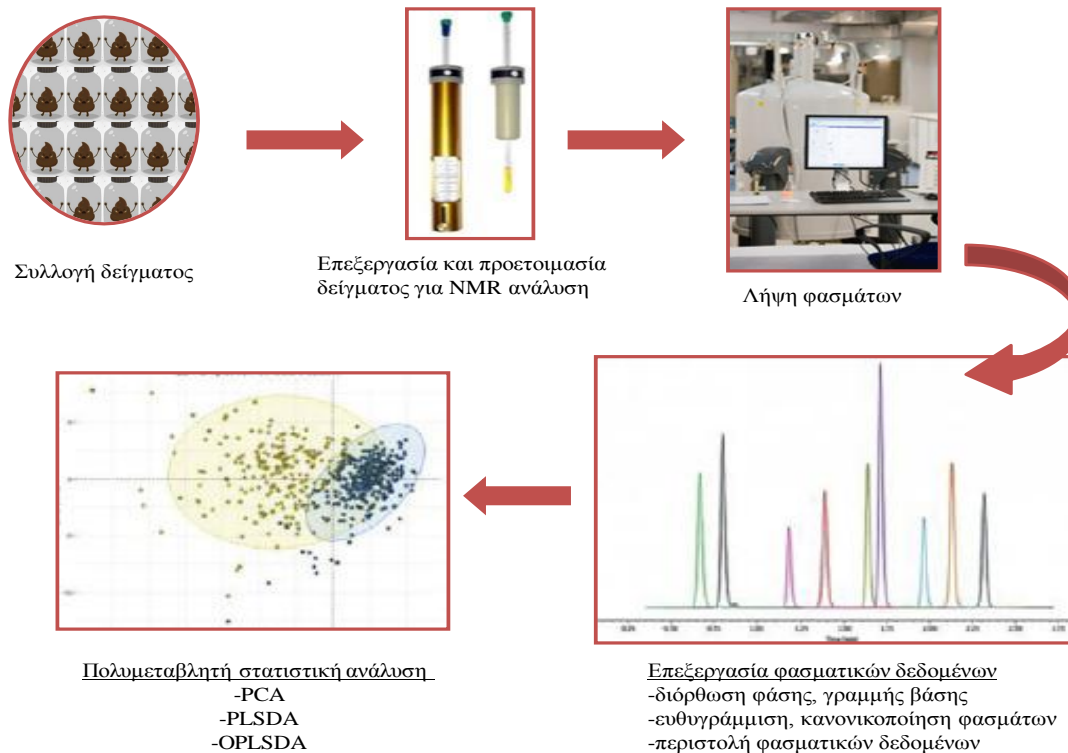
Με το λογισμικό αυτό ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη των διαφόρων μεταβολιτών που αναφέρονται βιβλιογραφικά, στα φάσματα που ελήφθησαν με φασματοσκοπία NMR. Το συγκεκριμένο πρόγραμμα αποτελεί μια βάση δεδομένων πρότυπων μεταβολιτών, όπου καθορίζεται ποιοι μεταβολίτες υπάρχουν με βάση τον αλγόριθμο του λογισμικού, ενώ επιλέγονται οι μεταβολίτες με τη μεγαλύτερη πιθανότητα να ανευρίσκονται στο δείγμα. Ειδικότερα, αφού εισήχθη το ληφθέν φάσμα από το φασματογράφο στο συγκεκριμένο λογισμικό, επιλέχθηκαν φασματικές περιοχές. Όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 2.10**, οι υποψήφιοι μεταβολίτες που αναζητούνται, μπορούν να επιλεγθούν και να δηλωθούν στην κορυφή οι χημικές μετατοπίσεις τους στο φάσμα.



Εικόνα 2.10.: Στιγμιότυπο επιφάνειας εργασίας *Chenomx*.

2.3.4. Στάδια μεταβολομικής ανάλυσης NMR και Χημειομετρία

Η μεταβολομική μελέτη με Πυρηνικό Μαγνητικό Συντονισμό, όπως και κάθε άλλη μεταβολομική ανάλυση με χρήση οποιασδήποτε άλλης τεχνικής, προϋποθέτει μία σειρά βημάτων που είναι σημαντικά στην επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων, ώστε να οδηγήσουν σε ολοκληρωμένα και ασφαλή αποτελέσματα (**Εικόνα 2.11**). Η μαθηματική επεξεργασία των δεδομένων και η χρήση πολυμεταβλητής στατιστικής ανάλυσης αποτελούν τα βήματα αυτά.



Εικόνα 2.11.: Διάγραμμα ροής μεταβολομικής ανάλυσης με χρήση Φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού.

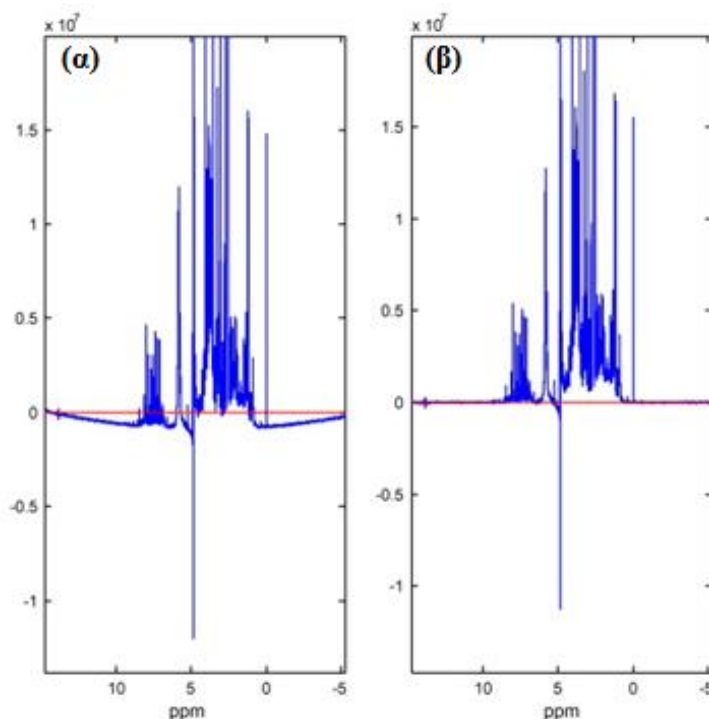
2.3.4.1. Επεξεργασία φασματικών δεδομένων με χρήση του προγράμματος MestReNova (Mnova)

Η προ-επεξεργασία των φασματικών δεδομένων είναι θεμελιώδους σημασίας για την επιτυχία οποιασδήποτε μεταβολομικής προσέγγισης. Αρχικά, η διαχείριση μεγάλου όγκου δεδομένων απαιτεί την περιστολή τους με μεθόδους όπως η τμηματοποίηση του φάσματος σε φασματικές περιοχές και ολοκλήρωση αυτών, εφαρμογή μαθηματικών αλγορίθμων, ώστε να αντισταθμιστούν οι μετατοπίσεις των κορυφών συντονισμού λόγω διακύμανσης του pH, κεντροποίηση, κανονικοποίηση και κλιμάκωση. Κατόπιν της λήψης NMR φασμάτων πραγματοποιήθηκε διόρθωση ως προς τη φάση και τη γραμμή βάσης και κανονικοποίηση με βάση την κορυφή συντονισμού της ένωσης αναφοράς με εσωτερικό πρότυπο TSP. Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα Mnova 10.0.0. της εταιρείας Mestrelab Research, Chemistry Software Solutions (Ισπανία) με σκοπό την απεικόνιση, επεξεργασία, ανάλυση και αναφορά των 1D δεδομένων.

Διόρθωση ως προς τη φάση και τη γραμμή βάσης (Baseline correction)

Συνήθως, το πρώτο βήμα της προεπεξεργασίας δεδομένων είναι η μετακίνηση της γραμμής βάσης. Οι στρεβλώσεις της γραμμής βάσης επηρεάζουν όχι μόνο τη στατιστική ανάλυση αλλά και την ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών. Αυτές οι στρεβλώσεις μπορεί να διορθωθούν με πολλούς διαφορετικούς τρόπους, αλλά συνήθως εφαρμόζεται αυτοματοποιημένη διόρθωση γραμμής βάσης (Εικόνα 2.12.). Μετά τη διόρθωση γραμμής βάσης, φασματικές περιοχές που δεν αντιστοιχούν σε

ενδογενείς μεταβολίτες συχνά απομακρύνονται. Ως εκ τούτου, το φάσμα εκτός των ορίων 0,2-10,0 ppm συχνά αφαιρείται. Μια άλλη περιοχή του φάσματος που συνήθως αποκλείεται ανήκει στο διαλύτη νερό. Παρόλο που χρησιμοποιούνται τεχνικές καταστολής νερού, το σήμα του νερού κυριαρχεί στο φάσμα μεταξύ 4,7 ppm και 5,0 ppm. Η διακύμανση που περιέχεται στο σήμα νερού δεν παρουσιάζει ενδιαφέρον και παρεμβαίνει στην ανάλυση δεδομένων (Roos et al. 2012).



Εικόνα 2.12.: Παράδειγμα φάσματος πριν (α) και μετά (β) τη διόρθωση της γραμμής βάσης (Bao et al. 2012).

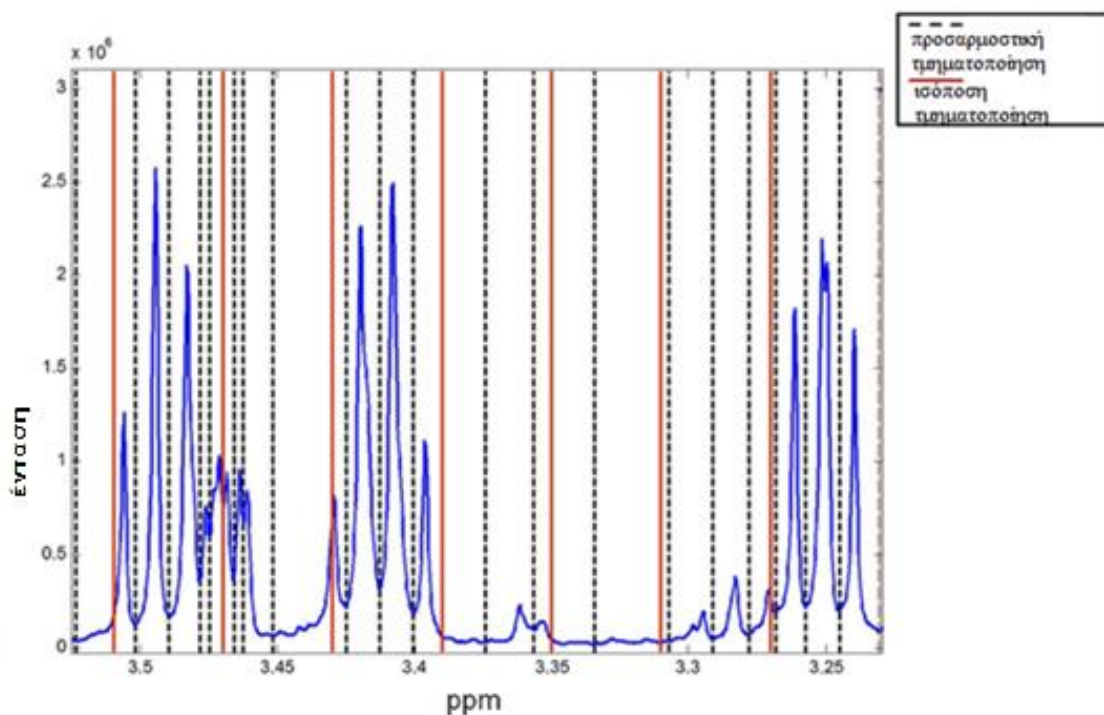
Κανονικοποίηση ως προς την κορυφή συντονισμού του TSP και ως προς την ολική περιοχή (Normalization)

Με αυτό το βήμα προεπεξεργασίας υπολογίζονται παραλλαγές στις συνολικές συγκεντρώσεις δειγμάτων. Ο κύριος στόχος είναι να καταστούν όλα τα δείγματα συγκρίσιμα μεταξύ τους, για παράδειγμα με την κατάργηση ή ελαχιστοποίηση της συνολικής ποσότητας υλικού ανά δείγμα ή των διαλυτών. Άλλες διαφοροποιήσεις, όπως στο χρόνο εφησυχασμού, μπορεί να διορθωθούν με κανονικοποίηση (Jaroszewski et al. 1996). Στην παρούσα εργασία, η κανονικοποίηση έγινε με βάση την κορυφή συντονισμού της ένωσης αναφοράς με εσωτερικό πρότυπο TSP, καθώς και ως προς την ολική περιοχή του φάσματος.

Τμηματοποίηση του φάσματος σε φασματικές περιοχές (Binning)

Η πολυμεταβλητή ανάλυση των μεταβολικών δεδομένων NMR γίνεται χρησιμοποιώντας είτε ποσοτικά ή βαθμολογημένα ολοκληρώματα συγκεκριμένων φασματικών κορυφών. Ένα φάσμα NMR, αφού εξαιρεθούν ορισμένα σήματα (π.χ. νερό), περιέχει περίπου 22.000 σημεία δεδομένων (μεταβλητές). Προκειμένου να τμηματοποιηθούν τα σημεία, χρησιμοποιείται συνήθως η μέθοδος binning (που ονομάζεται επίσης bucketing), όπου τα φάσματα χωρίζονται σε τμήματα (κλάδοι) και η συνολική έκταση μέσα σε κάθε κλάδο υπολογίζεται ότι αντιπροσωπεύει το αρχικό φάσμα. Επομένως, μερικές μικρές

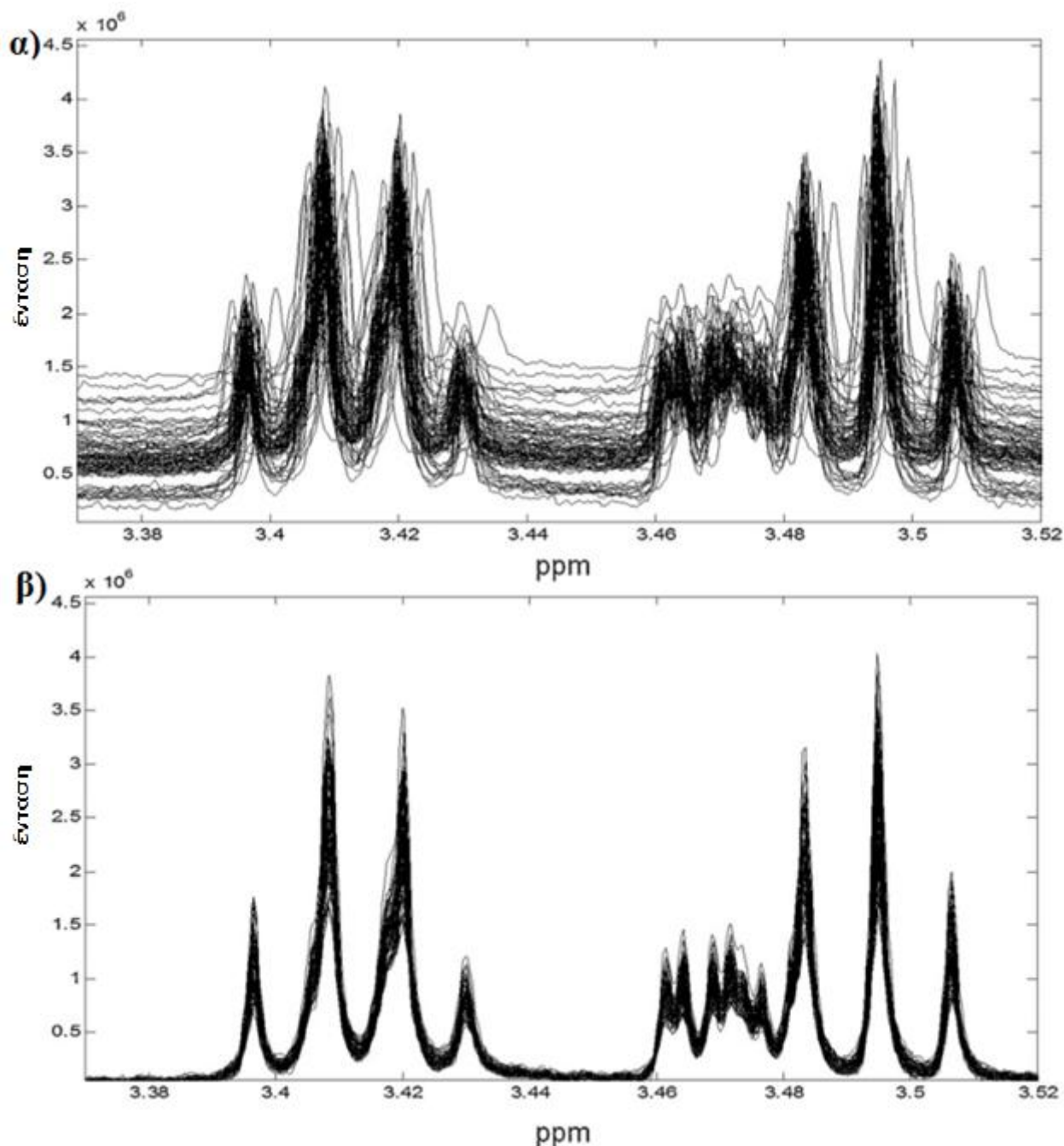
μετατοπίσεις κορυφών μπορεί να αφαιρεθούν με φασματική τμηματοποίηση. Υπάρχουν πολλοί τύποι φασματικής τμηματοποίησης. Ωστόσο, ο συνηθέστερος τύπος είναι η ισόποση τμηματοποίηση, όπου κάθε φάσμα διαιρείται σε ομοιόμορφα απομονωμένες περιοχές με φασματικό πλάτος 0,04 ppm. Το μειονέκτημα της ισόποσης τμηματοποίησης είναι η έλλειψη ευελιξίας των ορίων, οπότε αν μια κορυφή είναι διαχωρισμένη μεταξύ δύο κάδων, μπορεί να επηρεάσει σημαντικά τα δεδομένα προς ανάλυση. Προκειμένου να αποφευχθεί αυτή η διάσπαση των κορυφών, εφαρμόστηκαν μέθοδοι που βασίζονται σε προσαρμοστική τμηματοποίηση των κορυφών, ώστε κάθε κλάδος να καλύπτει μόνο πλήρεις κορυφές (Εικόνα 2.13.) (Worley et al. 2015).



Εικόνα 2.13.: Ένα παράδειγμα προσαρμοστικής και ισόποσης τμηματοποίησης που διεξάγεται επί ενός θραύσματος φάσματος NMR (Smolinska et al. 2012).

Υπέρθωση (Superimpose) και ευθυγράμμιση φασμάτων (Alignment)

Ένα από τα πιο συχνά προβλήματα με τα προφίλ NMR, για μια πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων, είναι η παρουσία μετατοπισμένων κορυφών στα διάφορα φάσματα. Οι μετατοπίσεις μπορεί να οφείλονται σε παράγοντες, όπως μεταβολές του pH και της θερμοκρασίας, αλλαγές της συγκέντρωσης άλατος, της συνολικής αραίωσης και της σχετικής συγκέντρωσης σε συγκεκριμένα ιόντα. Όλες αυτές οι παράμετροι επηρεάζουν τις μεταβολές των κορυφών, αν και δεν επηρεάζονται όλες οι κορυφές στην ίδια έκταση. Ένα ουσιαστικό βήμα στην προεπεξεργασία είναι η προσαρμογή των μετατοπισμένων κορυφών, δηλαδή ευθυγράμμισή τους με διαφορετικούς αλγορίθμους. Πριν την ευθυγράμμιση, τα διαφορετικά φάσματα τοποθετούνται σε ένα κοινό φάσμα και γίνεται υπέρθεση των κορυφών τους (Εικόνα 2.14.) (Kurosu et al. 2001).



Εικόνα 2.14.: Παράδειγμα φάσματος NMR: (α) πριν από τη διόρθωση της γραμμής βάσης και την ευθυγράμμιση και (β) μετά τη διόρθωση της γραμμής βάσης και την ευθυγράμμιση (Smolinska et al. 2012).

2.3.4.2. Χημειομετρική ανάλυση δεδομένων με το στατιστικό λογισμικό πρόγραμμα SIMCA-P 14.0 (UMETRICS, Umea, Sweden)

Τα αναλυτικά πειράματα περιλαμβάνουν μετρήσεις που διεξάγονται ώστε να εξαχθούν πληροφορίες για φυσικά συστήματα. Τα ποσοτικά δεδομένα που προκύπτουν από τις μετρήσεις αυτές είναι αριθμοί που εκφράζονται σε διάφορες φυσικές μονάδες και συχνά είναι δύσκολο να συσχετισθούν άμεσα με το επιστημονικό πρόβλημα λόγω μεγάλου μεγέθους. Σε αυτό ακριβώς το στάδιο διαχείρισης δεδομένων επεμβαίνει ο κλάδος της Χημειομετρίας (Chemometrics) για να μελετήσει την ύπαρξη συσχέτισης (Smolinska et al. 2012). Ο όρος της χημειομετρίας εισήχθη από τους Svant Wold (Σουηδία)

και Bruce Kowalski (ΗΠΑ). Σύμφωνα με τη Διεθνή Κοινότητα Χημειομετρίας, που ιδρύθηκε το 1974, χημειομετρία είναι ο κλάδος της χημείας που χρησιμοποιεί μαθηματικές και στατιστικές μεθόδους για το σχεδιασμό ή την επιλογή βέλτιστων διαδικασιών και πειραμάτων ανάλυσης χημικών δεδομένων (Salonen et al. 2020).

Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία εφαρμόστηκε χημειομετρία με σκοπό την εξαγωγή χημικών πληροφοριών από τα φάσματα NMR. Η χημειομετρία εφαρμόζει μαθηματικές ή στατιστικές μεθόδους, αποσκοπώντας στη συσχέτιση των μετρήσεων που αφορούν σε ένα χημικό σύστημα, με στόχο την προβολή πολυπαραμετρικών δεδομένων σε λίγες διαστάσεις (≤ 3), που μπορούν να αναπαρασταθούν γραφικά. Για το λόγο αυτό, εφαρμόστηκε πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων (multivariate data analysis), με στόχο την εξαγωγή της χημικής πληροφορίας από τα πολύπλοκα σύνολα δεδομένων της φασματοσκοπίας NMR. Τα κύρια χημειομετρικά εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν, αφού ανταποκρίνονται σε μεγάλο αριθμό μεταβλητών, είναι η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA) και η παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων με διαχωρισμό της συστηματικής αλλά μη συσχετιζόμενης ως προς την Y- μεταβλητή (ορθογώνια) διακύμανσης της μήτρας μεταβλητών X (OPLS). Η χημειομετρική ανάλυση των δεδομένων υλοποιήθηκε με το στατιστικό λογισμικό πρόγραμμα SIMCA-P 14.0 (UMETRICS, Umea, Sweden). Οι παραπάνω μέθοδοι εφαρμόστηκαν προκειμένου να επιτευχθεί α) μια σφαιρική θεώρηση των δεδομένων, β) η ταξινόμηση και διάκριση των δειγμάτων και γ) εξαγωγή μοντέλου παλινδρόμησης.

Μη επιβλεπόμενη ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA)

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA) είναι μια μονοδιάστατη τεχνική που μετατρέπει τον πολυδιάστατο χώρο δεδομένων σε ένα μοντέλο με μικρότερο αριθμό παραγόντων, επιτρέποντας σε κάποιον να σχεδιάσει εύκολα, να απεικονίσει και να ομαδοποιήσει πολλαπλά δεδομένα. Κάθε παράγοντας (Principal Component, PC) είναι ένας γραμμικός συνδυασμός των κοινών χαρακτηριστικών των αρχικών μεταβλητών με ορθογώνια τοποθέτηση. Η μεταβολή των φασματικών δεδομένων περιγράφεται από λιγότερους παράγοντες, σε σύγκριση με τον αριθμό των αρχικών μεταβλητών. Ως τεχνική ομαδοποίησης, η PCA χρησιμοποιείται συνηθέστερα για να προσδιορίσει εάν ένα δείγμα είναι διαφορετικό από το άλλο, ποιες μεταβλητές συμβάλλουν περισσότερο στη διαφορά αυτή και εάν αυτές οι μεταβλητές συνεισφέρουν με τον ίδιο τρόπο (δηλαδή συσχετίζονται) ή είναι ανεξάρτητες (δηλαδή ασυσχέτιστες) η μία από την άλλη. Η βασική χρησιμότητα της PCA είναι η προβολή ενός πίνακα δεδομένων πολλών μεταβλητών σε ένα διανυσματικό χώρο λίγων διαστάσεων (2 έως 5), ώστε να είναι δυνατή η επισκόπηση των δεδομένων και να αναδειχτούν πιθανές ομαδοποιήσεις των παρατηρήσεων, τάσεις καθώς και έκτροπες παρατηρήσεις (outliers). Η ύπαρξη έκτροπων παρατηρήσεων επηρεάζει όλες τις μεθόδους ελαχίστων τετραγώνων, οι οποίες χρησιμοποιούνται ευρέως στην πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων. Ωστόσο, η PCA μπορεί να ανιχνεύσει αυτές τις παρατηρήσεις. Επιπλέον, η επισκόπηση αυτή αποκαλύπτει τη συσχέτιση μεταξύ παρατηρήσεων και μεταβλητών. Κάθε σημείο αντιπροσωπεύει ένα μόνο φάσμα και τα σημεία που βρίσκονται κοντά το ένα με το άλλο έχουν παρόμοια προφίλ (Mrówczyńska et al. 2020).

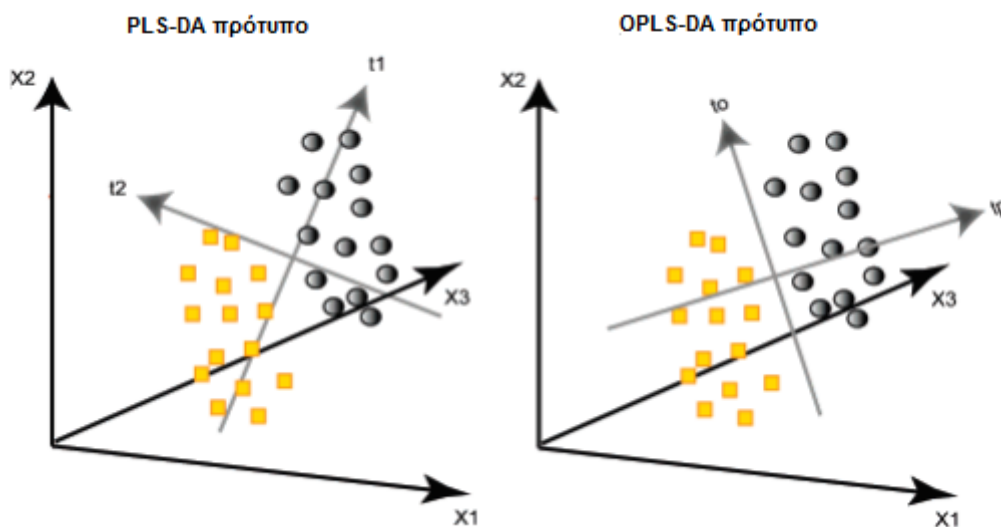
Επιβλεπόμενη ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA)

Σε αντίθεση με το PCA, η PLS-DA (Partial Least Squares - Discrimination Analysis) είναι μια επιβλεπόμενη τεχνική ταξινόμησης, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ενισχύσει το διαχωρισμό μεταξύ των ομάδων με τις παρατηρήσεις, με την περιστροφή των συνιστωσών PCA με τέτοιο τρόπο ώστε να

επιτυγχάνεται ένας μέγιστος διαχωρισμός μεταξύ των κατηγοριών. Η PLS-DA είναι κατάλληλη για υψηλά συσχετισμένες μεταβλητές. Η επιβλεπόμενη παλινδρόμηση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) στοχεύει στην οικοδόμηση ενός γραμμικού μοντέλου παλινδρόμησης, που προβλέπει ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό από το μετρούμενο πολυπαραμετρικό σήμα. Μάλιστα, η PLS χρησιμοποιείται όταν αναζητείται μια ποσοτική σχέση ανάμεσα σε δύο πίνακες δεδομένων X και Y . Συγκεκριμένα, αναζητούνται συνιστώσες του πίνακα X ως ανεξάρτητες μεταβλητές που προβλέπουν με τον καταλληλότερο τρόπο το Y (εξαρτημένες μεταβλητές) (Smolinska et al. 2012).

Η μέθοδος OPLS-DA (Orthogonal Partial Least Squares - Discrimination Analysis) είναι μια πρόσφατη τροποποίηση/επέκταση της PLS. Το πλεονέκτημά της έγκειται στη δυνατότητά της να διαχωρίζει τη συστηματική διακύμανση στο X σε δύο τμήματα, το ένα σχετίζεται γραμμικά με το Y και το άλλο δε σχετίζεται (ορθογώνιο στο Y). Επιπλέον, οι άσχετες παραλλαγές φιλτράρονται και χαρακτηρίζονται ως θόρυβος. Η μέθοδος OPLS-DA χρησιμοποιείται ανάλογα προς την PLS-DA για τη διάκριση των δειγμάτων και την ταξινόμησή τους σε ομάδες (Genneback et al. 2013).

Η **Εικόνα 2.15.** περιγράφει γεωμετρικά τη διαφορά ανάμεσα σε πρότυπα PLS-DA και OPLS-DA. Στο αριστερό τμήμα, οι PLS συνιστώσες $t1$ και $t2$ δε διακρίνουν τη διαφοροποίηση ανάμεσα στις ομάδες από την εντός των ομάδων διακύμανση, με συνεπακόλουθο οι αντίστοιχες συνιστώσες φορτίων PLS να αναμιγνύουν τους δύο τύπους διακύμανσης και να μην είναι δυνατή η ορθή ερμηνεία των διαγραμμάτων φορτίου που υποδηλώνουν ποιες ανεξάρτητες μεταβλητές συμβάλλουν στην ταξινόμηση των δειγμάτων σε διαφορετικές κλάσεις. Αντίθετα, στο δεξί τμήμα οι συνιστώσες φορτίων OPLS διαχωρίζουν τους δύο τύπους διαφοροποιήσεων. Η κύρια συνιστώσα πρόβλεψης ($t1p$) πλαισιώνει τη διαφοροποίηση ανάμεσα στα δείγματα. Η ορθογώνια συνιστώσα ($t2o$) πλαισιώνει την εντός διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων (Wiklund et al. 2008).

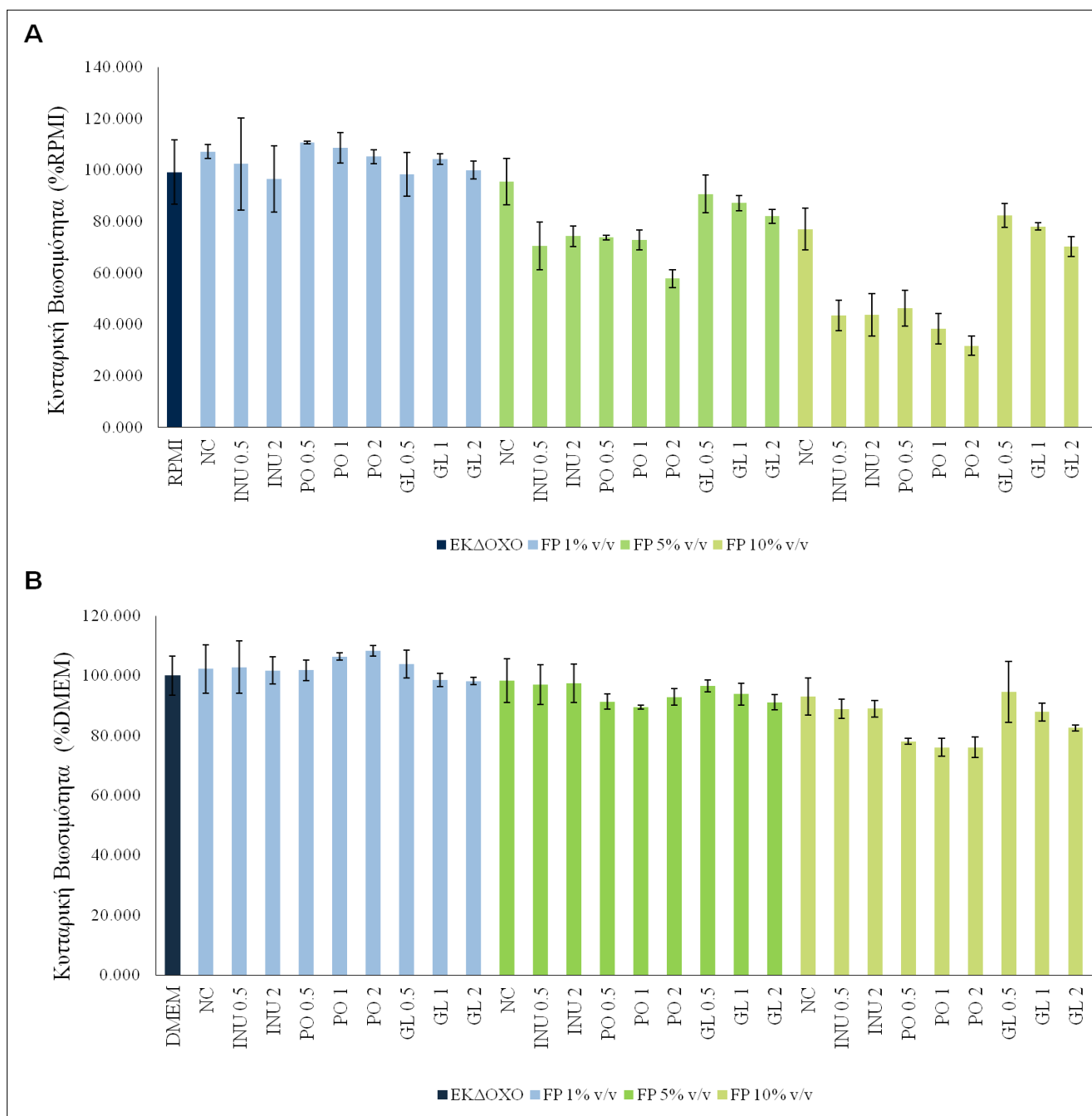


Εικόνα 2.15.: Διαφορά ανάμεσα στα πρότυπα PLS-DA και OPLS-DA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Προσδιορισμός κυτταρικής βιωσιμότητας (MTT) στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και U-937

Η κυτταροτοξική δράση των προϊόντων ζύμωσης των *Pleurotus ostreatus* 1123 και *Ganoderma lucidum* προσδιορίστηκε με δοκιμή αναστολής της κυτταρικής βιωσιμότητας (MTT) σε καλλιέργειες κυτάρων Caco-2 και U-937, μετά από επίδραση των προϊόντων *in vitro* ζύμωσης που διεξήχθη παρουσία λυοφιλωμένης μορφής μανιταριού ως πηγή άνθρακα, σε αναλογία 0,5, 1 και 2% (w/v), σε βασικό υπόστρωμα που περιείχε, πέρα από τη λυοφιλωμένη μορφή των μανιταριών, εμβόλιο κοπράνων υγιών εθελοντών (§2.2.1). Ενδεικτικά, τα αποτελέσματα για τα δύο μανιτάρια εμφανίζονται στην **Εικόνα 3.1.**



Εικόνα 3.1.: Κυτταροτοξική δράση των προϊόντων ζύμωσης του EM, παρουσία των μανιταριών *Ganoderma lucidum* και *Pleurotus ostreatus*, στα (A) U937 και στα (B) Caco-2 κύτταρα. Πραγματοποιήθηκε επώαση κυττάρων με προϊόντα ζύμωσης συγκέντρωσης 1, 5 και 10 % v/v του καλλιεργητικού μέσου.

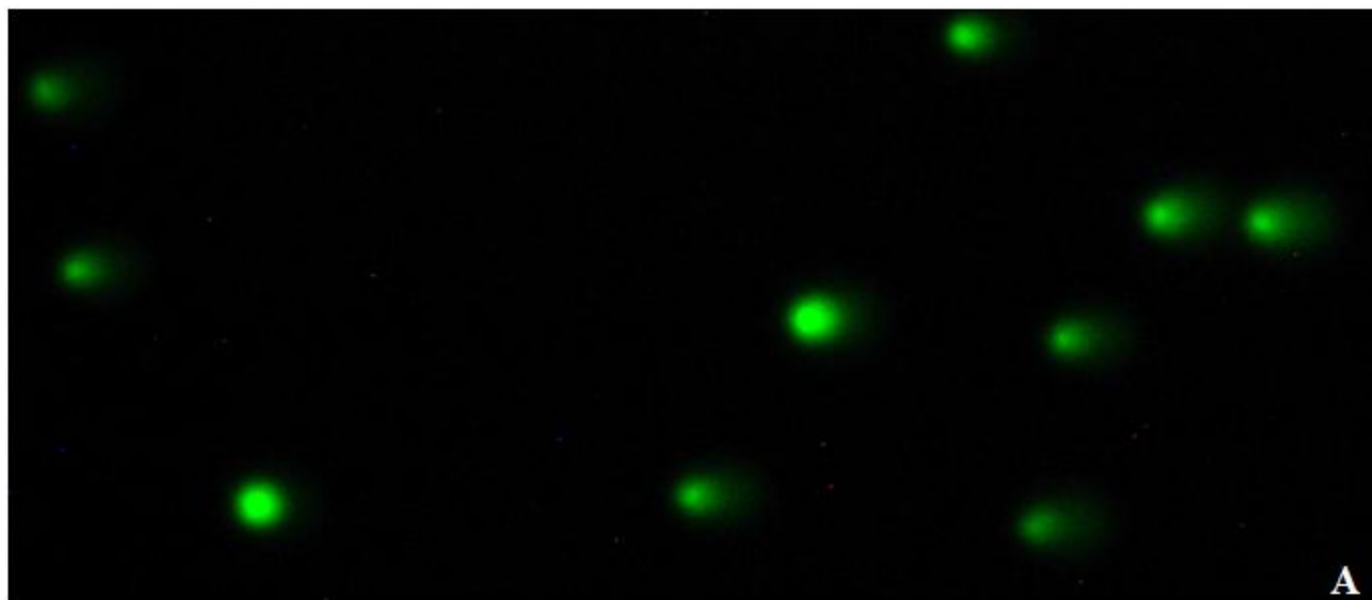
Προϊόντα ζύμωσης: NC: χωρίς πηγή άνθρακα, INU 0.5: ινουλίνη (0.5% w/v), INU 1: ινουλίνη (1 % w/v), INU 2: ινουλίνη (2 % w/v), PO 0.5: *P.ostreatus* (0.5% w/v), PO 1: *P.ostreatus* (1 % w/v), PO 2: *P.ostreatus* (2 % w/v), GL 0.5: *G. lucidum* (0.5% w/v), GL 1: *G.lucidum* (1 % w/v), GL 2: *G.lucidum* (2 % w/v)

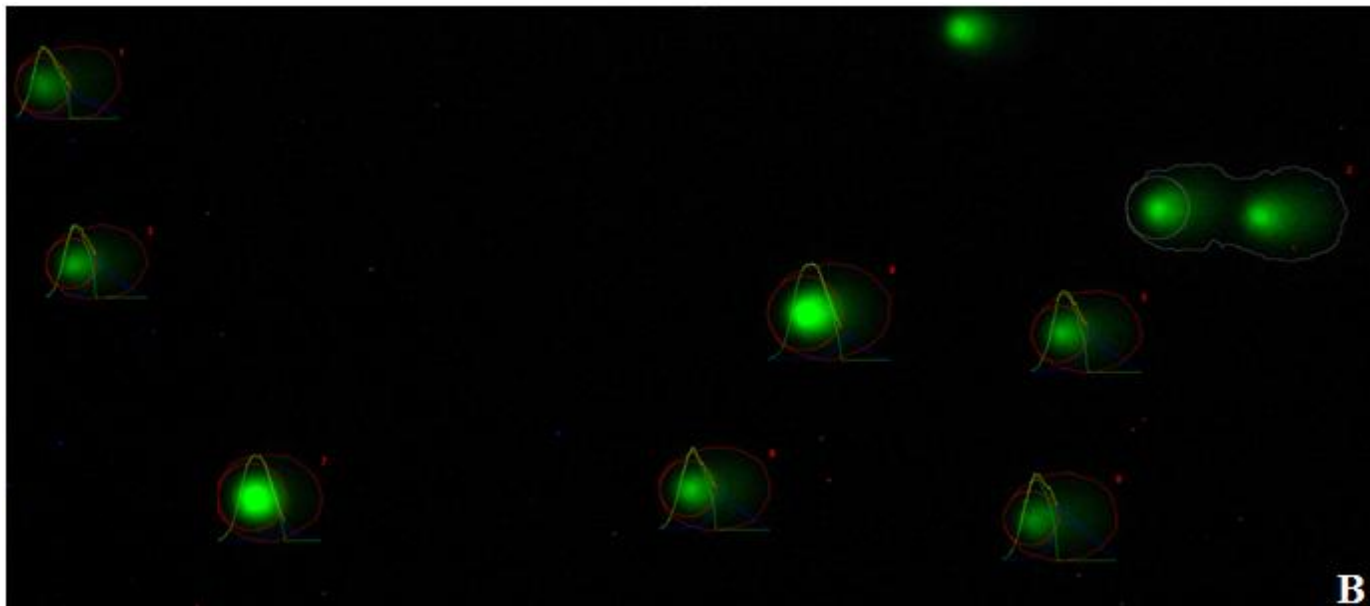
Παρατηρήθηκε ανάσχεση της βιωσιμότητας καθώς αυξάνεται η αναλογία του προϊόντος στο θρεπτικό μέσο κυτταροκαλλιέργειας, πολύ πιθανά λόγω της αυξανόμενης συγκέντρωσης των όξινων κυτταροτοξικών μεταβολιτών που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Η κυτταρική σειρά U-937 εμφάνισε μεγαλύτερη ευαισθησία στις κυτταροτοξικές επιπτώσεις των μεταβολιτών της ζύμωσης.

3.2. Διερεύνηση της γονοπροστατευτικής δράσης στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και U-937

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία διερευνήθηκε στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και U-937, η γονοπροστατευτική δράση των προϊόντων *in vitro* ζύμωσης, παρουσία ινουλίνης ή λυοφιλιωμένης μορφής μανιταριού *Pleurotus ostreatus* 1123 είτε *Ganoderma lucidum*, έναντι των βλαβών που επάγονται από το γονοτοξικό παράγοντα βουτυλοξειδίο (tBOOH). Η ινουλίνη ή η λυοφιλιωμένη μορφή του εκάστοτε μανιταριού προστέθηκαν σε αναλογία 0,5, 1 και 2% (w/v) σε βασικό μέσο/υπόστρωμα με εμβόλιο κοπράνων υγιών εθελοντών στις *in vitro* καλλιέργειες, τα προϊόντα ζύμωσης προστέθηκαν στις κυτταρικές σειρές σε αναλογίες 1% και 5% (v/v) (§2.2.1), δηλαδή σε δόσεις μη κυτταροτοξικές, και τέλος ο οξειδωτικός παράγοντας tBOOH προστέθηκε στις κυτταροκαλλιέργειες σε συγκέντρωση 500 μ M. Τα αποτελέσματα ήταν ορατά σε οπτικό μικροσκόπιο.

Όπως αναλύθηκε στην §2.2.2, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ImageJ για την ανάλυση των αποτελεσμάτων που καταγράφηκαν από τη μικροσκοπική παρατήρηση. Ειδικότερα, στο συγκεκριμένο λογισμικό έγινε αυτόματη καταμέτρηση των κομητών που εντοπίστηκαν στις πλάκες και μάλιστα αποδόθηκε και το ποσοστό των κατεστραμμένων πυρηνικών DNA (TailDNAPercent %). Στις ακόλουθες εικόνες (Εικόνα 3.2.A,B) φαίνονται ενδεικτικά ορισμένοι κομήτες όπως παρουσιάστηκαν από το λογισμικό ImageJ.





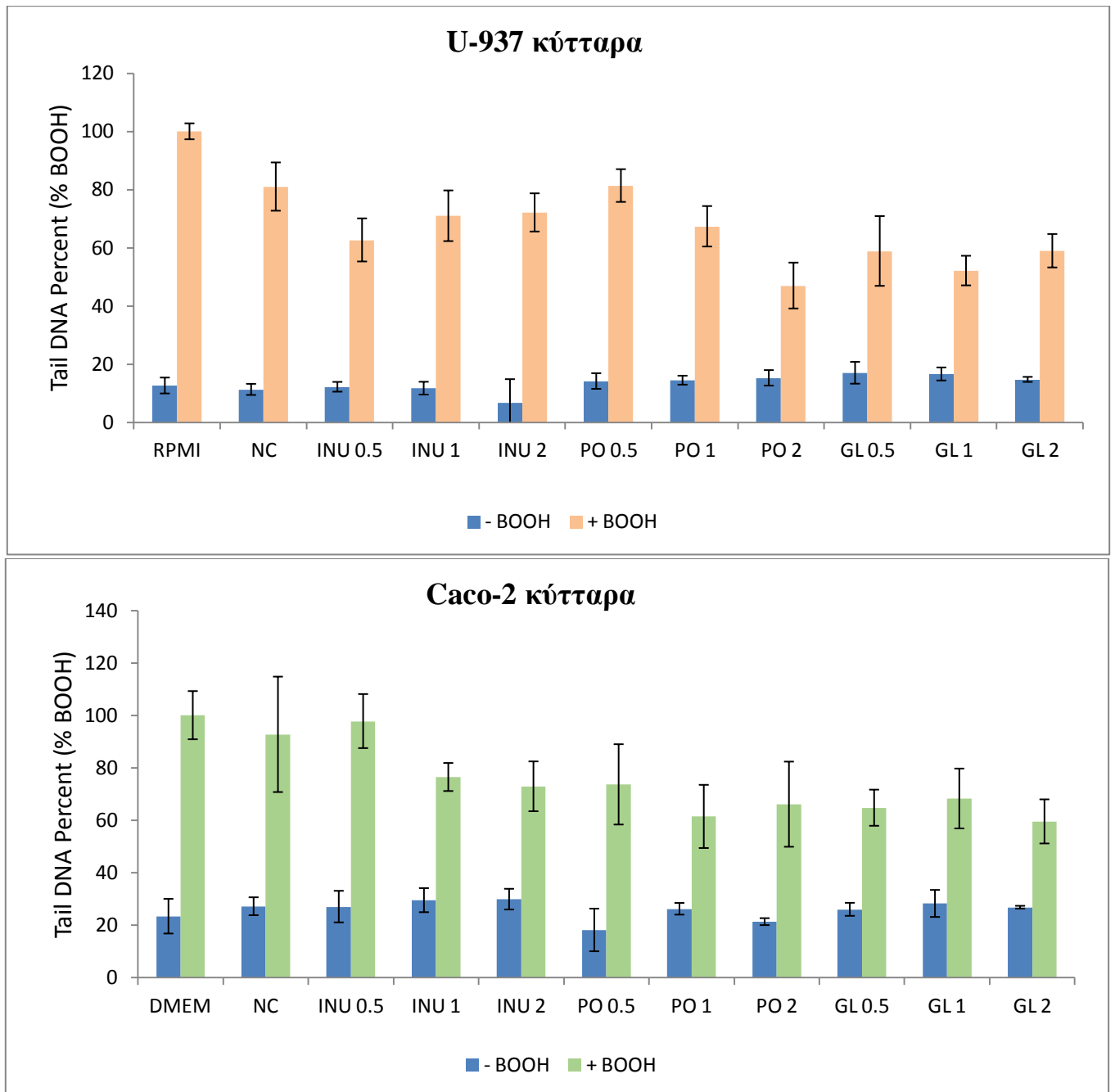
Εικόνα 3.2.: Στην Εικόνα Α παρουσιάζονται οι κομήτες όπως ακριβώς αποτυπώθηκαν από την κάμερα του μικροσκοπίου. Στην Εικόνα Β παρουσιάζονται οι ίδιοι κομήτες, αλλά ύστερα από την επεξεργασία μέσω του λογισμικού ImageJ. Πιο αναλυτικά, τα κύτταρα έχουν απαριθμηθεί αυτόματα, ενώ όσα είναι αναρίθμητα αποτελούν θόρυβο. Τα κύτταρα που περιβάλλονται με κόκκινο πλαίσιο αποτελούν ευδιάκριτο κομήτη, ενώ τα κύτταρα που περιβάλλονται με γκρι πλαίσιο έχουν αφαιρεθεί αυτόματα.

Τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν από όλες τις δοκιμές με το γονοτοξικό παράγοντα tBOOH, παρουσιάζονται διαγραμματικά παρακάτω.

Είναι φανερό ότι τα προϊόντα *in vitro* ζύμωσης των ειδών *Pleurotus ostreatus* και *Ganoderma lucidum* ασκούν αξιοσημείωτη γονο-προστατευτική δράση έναντι των DNA βλαβών που επάγονται από τον ισχυρό γονοτοξικό παράγοντα tBOOH και στις δυο κυτταρικές σειρές. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μείωση των βλαβών του DNA είναι στατιστικά σημαντική παρουσία των προϊόντων ζύμωσης μόλις σε συγκέντρωση 1% του καλλιεργητικού μέσου.

3.3. Δειγματοχώρος μεταβολομικής ανάλυσης με χρήση φασμάτων 1D ¹H NMR

Επί τη βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε μεταβολομική ανάλυση. Ελήφθησαν συνολικά 16 φάσματα *in vitro* ζυμώσεων παρουσία των *Pleurotus ostreatus* 1123, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* LGM22, *Pleurotus eryngii* Zheng (216), *Cyclocybe cylindracea* CC2 και *Cyclocybe cylindracea* 505, απουσία πηγής άνθρακα (αρνητικοί μάρτυρες, NC: negative control) και παρουσία πρεβιοτικού υποστρώματος ινουλίνης (θετικοί μάρτυρες, INU2: 2 μg inulin / mL καλλιέργειας) για δύο χρονικές περιόδους (0 ώρες και 24 ώρες ζύμωσης). Το καλλιεργητικό υπόστρωμα όλων των μανιταριών ήταν το άχυρο (Wheat Straw, WS).



Εικόνα 3.3.: Γονοπροστατευτική δράση των προϊόντων ζύμωσης του EM, παρουσία των μανιταριών *Ganoderma lucidum* και *Pleurotus ostreatus*, σε U-937 και Caco-2 κύτταρα. Τα ποσοστά κατεστραμμένου DNA είναι μικρότερα ύστερα από επίδραση των προϊόντων ζύμωσης του EM. Τα γραφήματα απεικονίζουν τα αποτελέσματα της επώασης των κυττάρων με προϊόντα ζύμωσης σε συγκέντρωση 1% (v/v) επί του καλλιεργητικού μέσου.

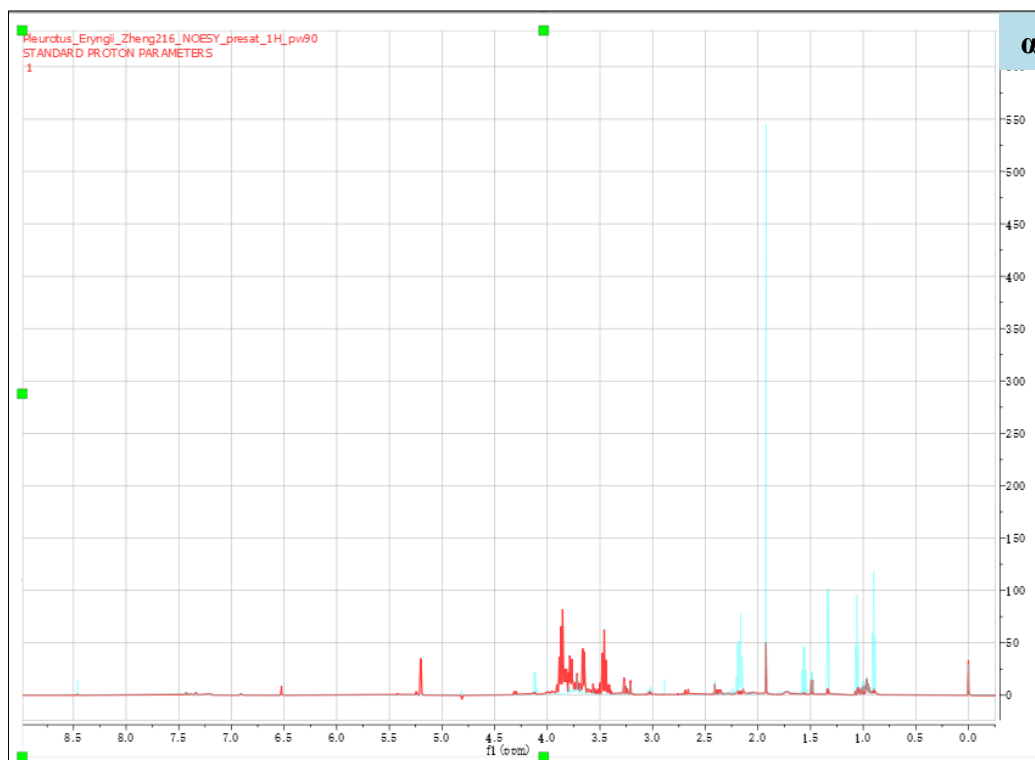
Προϊόντα ζύμωσης: NC: χωρίς πηγή άνθρακα, INU 0.5: ινουλίνη (0.5% w/v), INU 1: ινουλίνη (1 % w/v), INU 2: ινουλίνη (2 % w/v), PO 0.5: *P.ostreatus* (0.5% w/v), PO 1: *P.ostreatus* (1 % w/v), PO 2: *P.ostreatus* (2 % w/v), GL 0.5: *G. lucidum* (0.5% w/v), GL 1: *G.lucidum* (1 % w/v), GL 2: *G.lucidum* (2 % w/v)

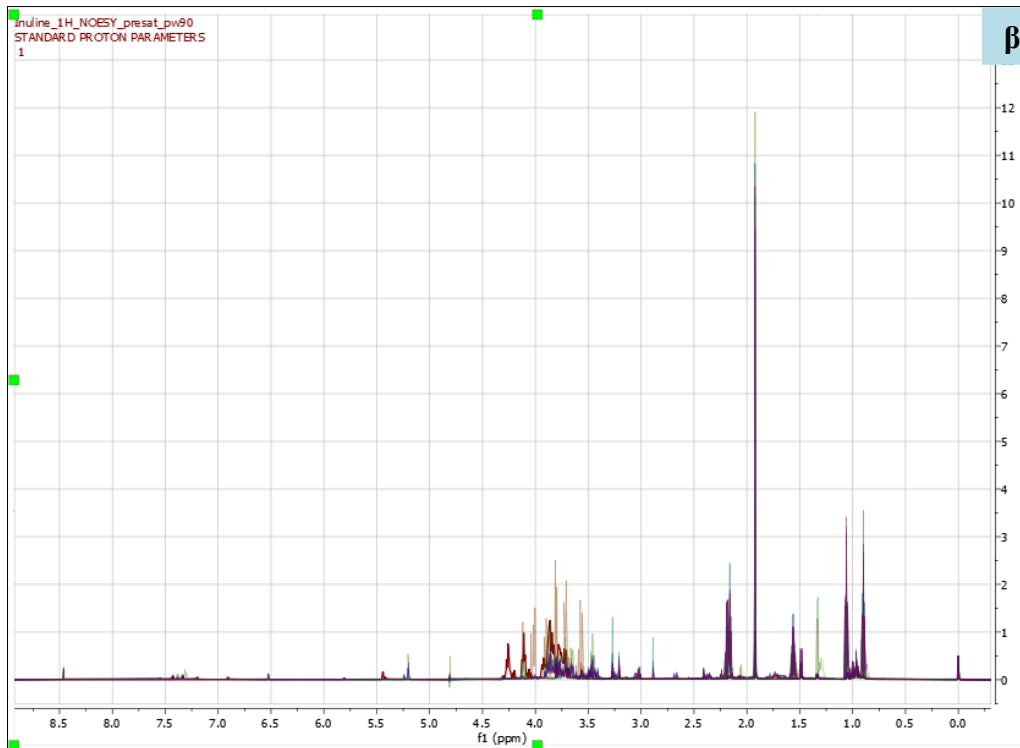
Πίνακας 3.1.: Τα δείγματα που αναλύθηκαν με NMR και οι κωδικές τους ονομασίες.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΑΝΙΤΑΡΙΟΥ	ΩΡΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ ΑΠΟ <i>in vitro</i> ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	ΚΩΔΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΜΑΝΙΤΑΡΙΟΥ
<i>Pleurotus ostreatus</i> 1123	WS	0	POWS_0
<i>Pleurotus ostreatus</i> 1123	WS	24	POWS_24
<i>Pleurotus ostreatus</i> LGM22	WS	0	POLWS_0
<i>Pleurotus ostreatus</i> LGM22	WS	24	POLWS_24
<i>Pleurotus eryngii</i> Zheng (216)	WS	0	PEWS_0
<i>Pleurotus eryngii</i> Zheng (216)	WS	24	PEWS_24
<i>Cyclocybe cylindracea</i> CC2	WS	0	CC2WS_0
<i>Cyclocybe cylindracea</i> CC2	WS	24	CC2WS_24
<i>Cyclocybe cylindracea</i> 505	WS	0	CC505WS_0
<i>Cyclocybe cylindracea</i> 505	WS	24	CC505WS_24
<i>Ganoderma lucidum</i>	BS	0	Ga_0
<i>Ganoderma lucidum</i>	BS	24	Ga_24
NEGATIVE CONTROL	WS	0	NC_0
NEGATIVE CONTROL	WS	24	NC_24
INULIN 2%	WS	0	INU2_0
INULIN 2%	WS	24	INU2_24

3.3.1. Υπέρθηση φασμάτων και ευθυγράμμιση με χρήση λογισμικού Μπονα

Τα φάσματα που ανακτήθηκαν ύστερα από την επεξεργασία των δειγμάτων με NMR, διορθώθηκαν ως προς τη φάση και τη γραμμή βάσης και κανονικοποιήθηκαν ως προς την ολική περιοχή καθώς και ως προς το εσωτερικό πρότυπο TSP, προκειμένου να είναι δυνατή η περαιτέρω ανάλυση. Ύστερα από υπέρθεση των φασμάτων, έγινε εμφανής η διαφοροποίησή τους ως προς τους μεταβολίτες τους (Εικόνα 3.4.).

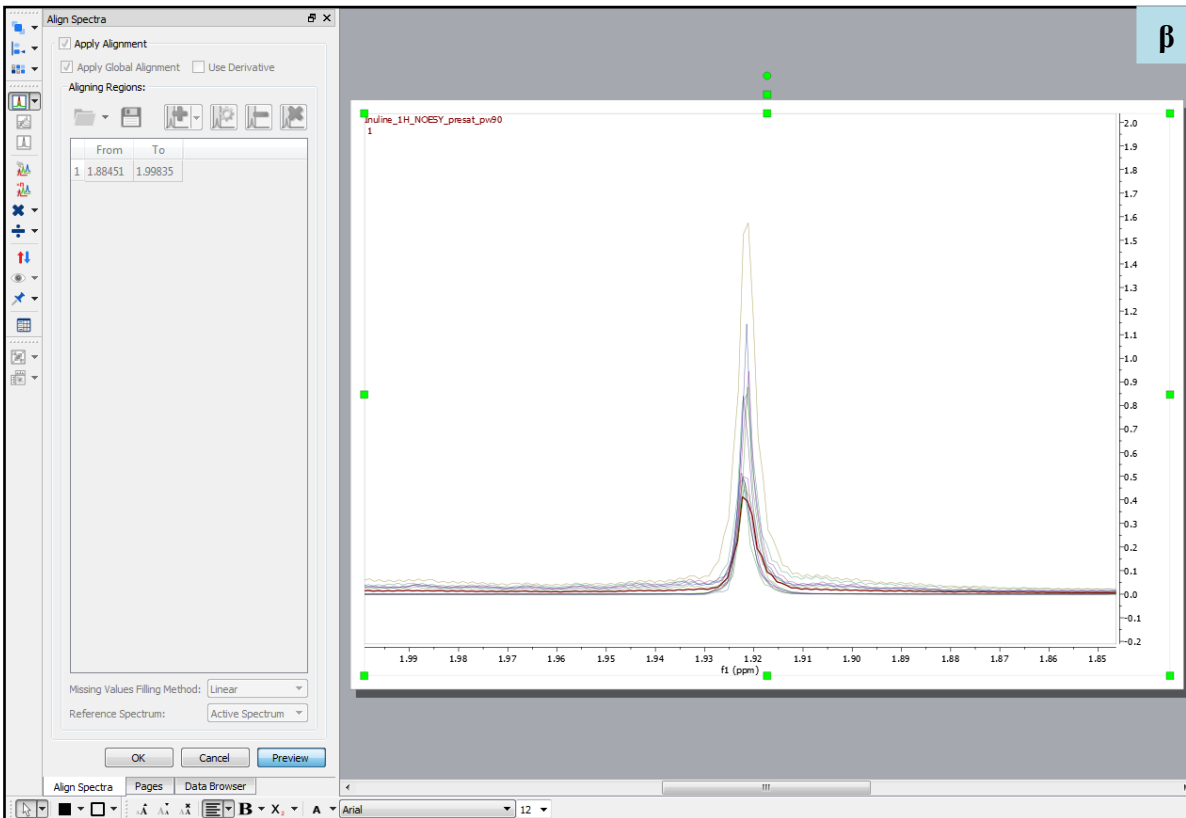
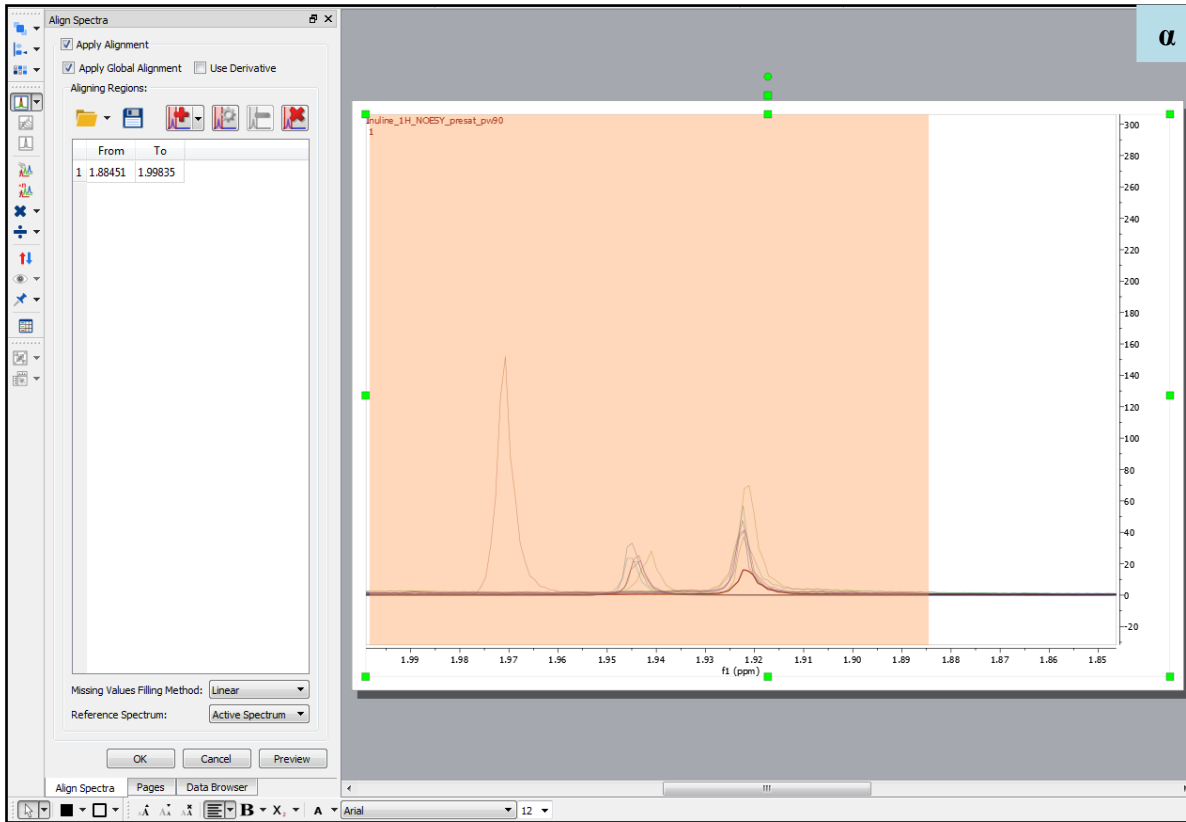




Εικόνα 3.4.: Υπέρθυση των φασμάτων. Στην (α) Εικόνα έγινε υπέρθεση δύο μεμονωμένων φασμάτων του *Pleurotus eryngii* Zheng (216) για τις χρονικές στιγμές 0 (κόκκινο χρώμα) και 24 ώρες (γαλάζιο χρώμα), με εμφανή τη διαφοροποίηση των μεταβολιτών και την παραγωγή SCFAs (1,00-2,50 ppm). Στην (β) Εικόνα έγινε υπέρθεση των φασμάτων και των 16 δειγμάτων.

Η χημική μετατόπιση έχει μεγάλη σημασία για τη φασματοσκοπία NMR, επειδή αντανακλά το χημικό περιβάλλον των υπό παρακολούθηση πυρήνων, παρέχοντας λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη δομή ενός μορίου. Αν και η χημική μετατόπιση ενός πυρήνα σε ένα μόριο θεωρείται γενικά ότι είναι αρκετά σταθερή, υπάρχει ένας αριθμός πειραματικών παραγόντων (pH, συγκέντρωση άλατος, διαλύτης, ανομοιογένεια πεδίου κ.λπ.) που μπορεί να προκαλέσουν μικρές ή και αρκετά σημαντικές διαφορές στις χημικές μετατοπίσεις. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στη μεταβολομική, όπου, για παράδειγμα, ορισμένοι σημαντικοί μεταβολίτες, όπως το κιτρικό οξύ ή η ταυρίνη, έχουν κορυφές των οποίων οι χημικές μετατοπίσεις κυμαίνονται με ανεξέλεγκτο τρόπο από δείγμα σε δείγμα. Αυτές οι παραλλαγές μπορούν προκαλούν ψευδή ομαδοποίηση δειγμάτων σε χημειομετρικά πρότυπα.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση και των 16 φασμάτων. Ακολουθήθηκε η μέθοδος «align spectra», στην οποία είναι δυνατή τόσο η ολική όσο και η τμηματική ευθυγράμμιση. Στην Εικόνα που ακολουθεί φαίνεται η ευθυγράμμιση μιας φασματικής περιοχής, η οποία δηλώνεται αριστερά στο πλαίσιο. Στην **Εικόνα 3.5α**, η φασματική περιοχή που παρουσιάζεται δεν έχει ευθυγραμμιστεί, εν αντιθέσει με την **Εικόνα 3.5β**.

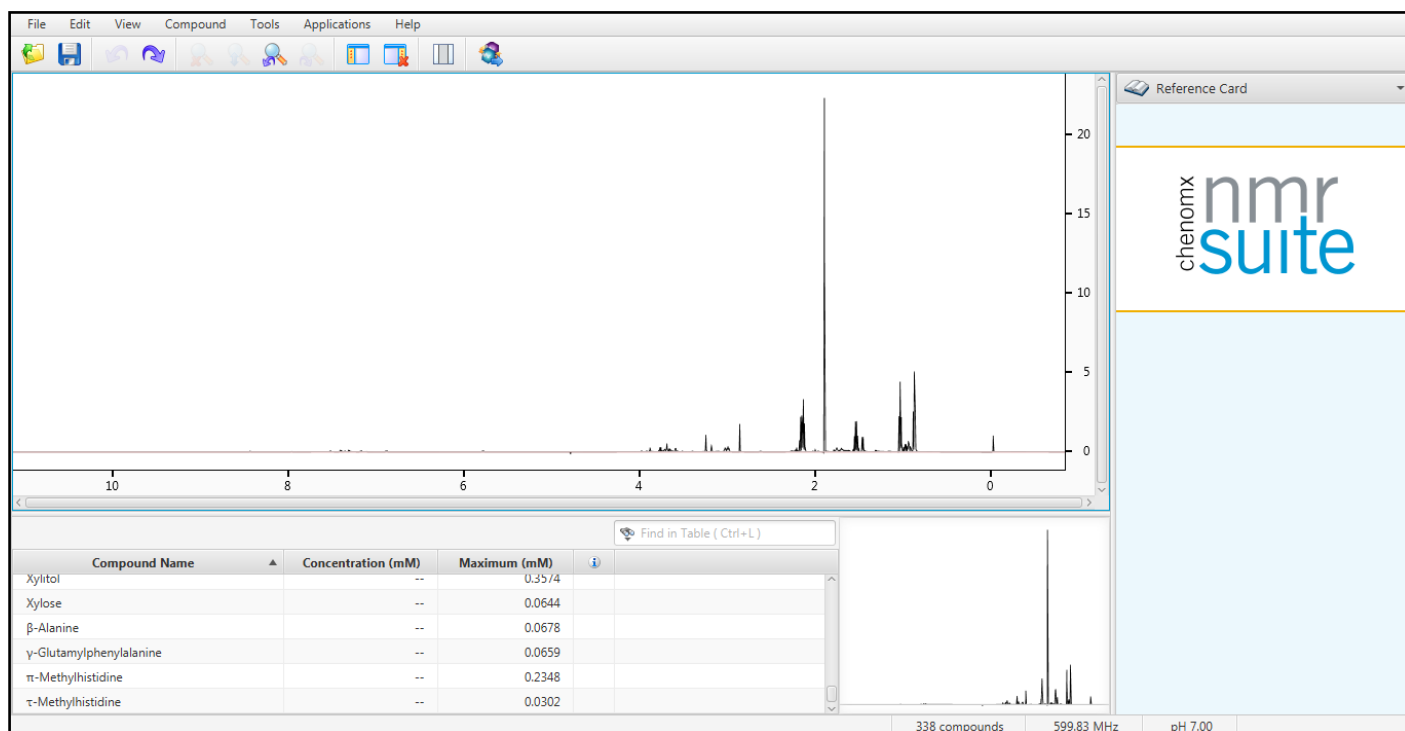


Εικόνα 3.5.: Ενθυγράμμιση φασμάτων. Στην (α) Εικόνα παρουσιάζεται μια φασματική περιοχή πριν την ενθυγράμμιση και στη (β) Εικόνα παρουσιάζεται η ίδια φασματική περιοχή μετά την ενθυγράμμιση.

3.3.2. Αναγνώριση πιθανών μεταβολιτών από φάσμα μίας διάστασης με χρήση του λογισμικού Chenomx NMR Suite 6.0.

Σε συνέχεια της προεπεξεργασίας των φασματικών δεδομένων, πραγματοποιήθηκε αναγνώριση πιθανών μεταβολιτών στις 0 και 24 ώρες, σε ένα από τα παραπάνω φάσματα, μιας και δεν παρατηρήθηκε μεγάλη διαφοροποίηση στις κορυφές των φασμάτων. Επιλέχθηκε το φάσμα που αντιστοιχεί στο δείγμα *Pleurotus ostreatus* 1123 και αναγνωρίστηκαν μεταβολίτες τόσο κατά την έναρξη της ζύμωσης (χρονική στιγμή 0 ωρών) όσο και κατά το πέρας αυτής (χρονική στιγμή 24 ωρών).

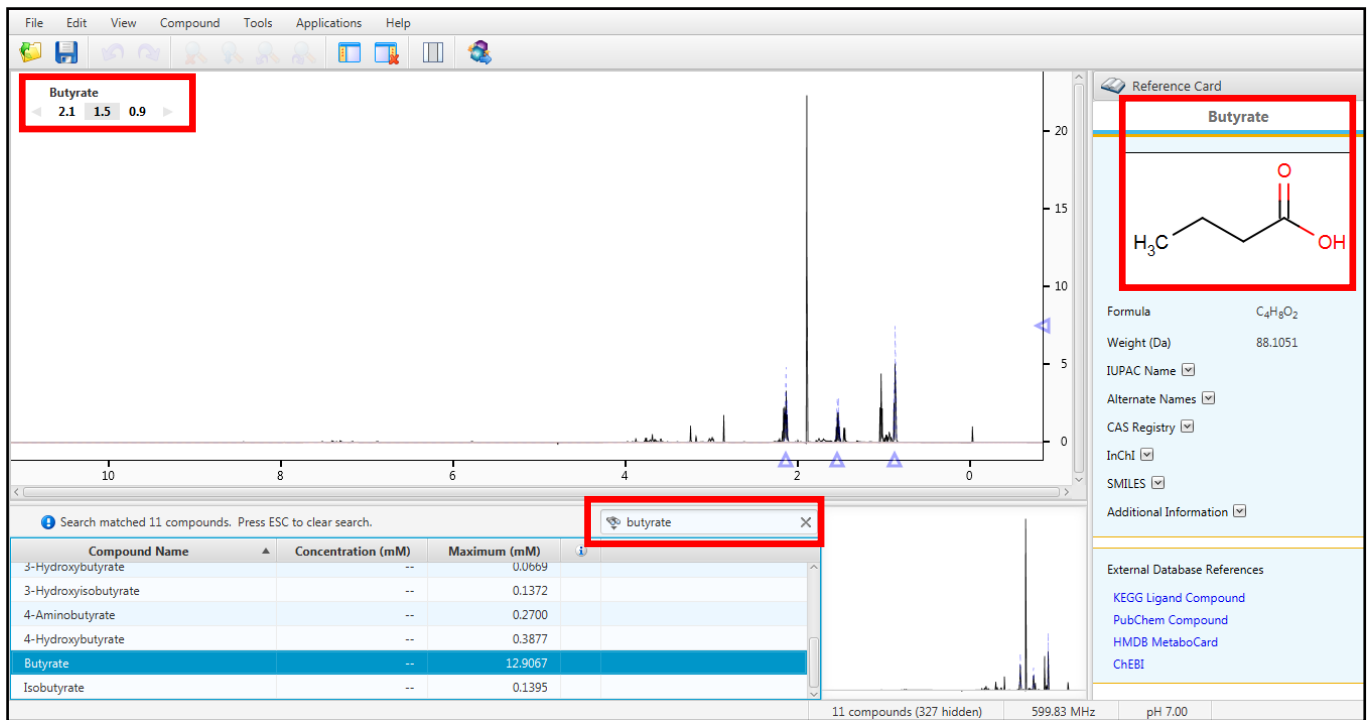
Αρχικά, εισήχθη το φάσμα στο λογισμικό Chenomx NMR Suite 6.0 (Εικόνα 3.6).



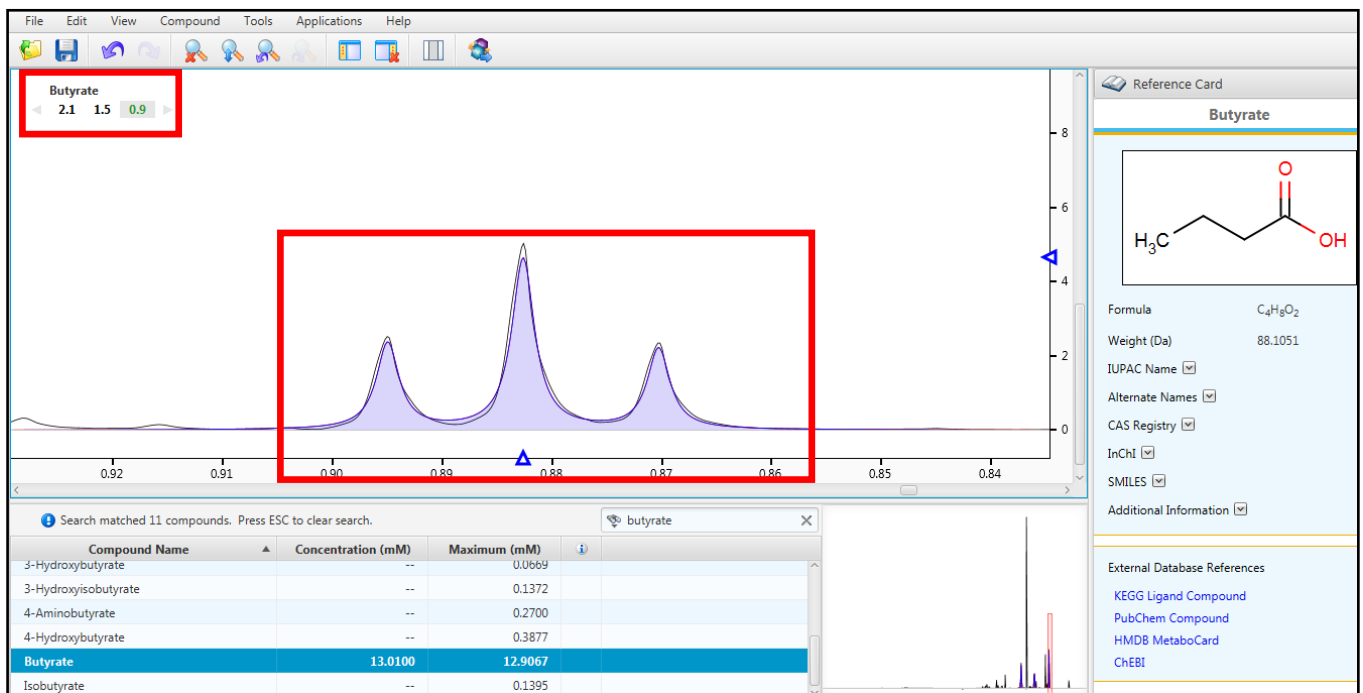
Εικόνα 3.6.: Στιγμιότυπο επιφάνειας εργασίας Chenomx.

Ακολούθως, έγινε αναζήτηση των μεταβολιτών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το βουτυρικό παρουσίασε χημικές μετατοπίσεις στα 0,9, 1,5 και 2,1 ppm, όπως φαίνεται στην ένδειξη της γραμμής χημικών μετατοπίσεων (Εικόνα 3.7.).

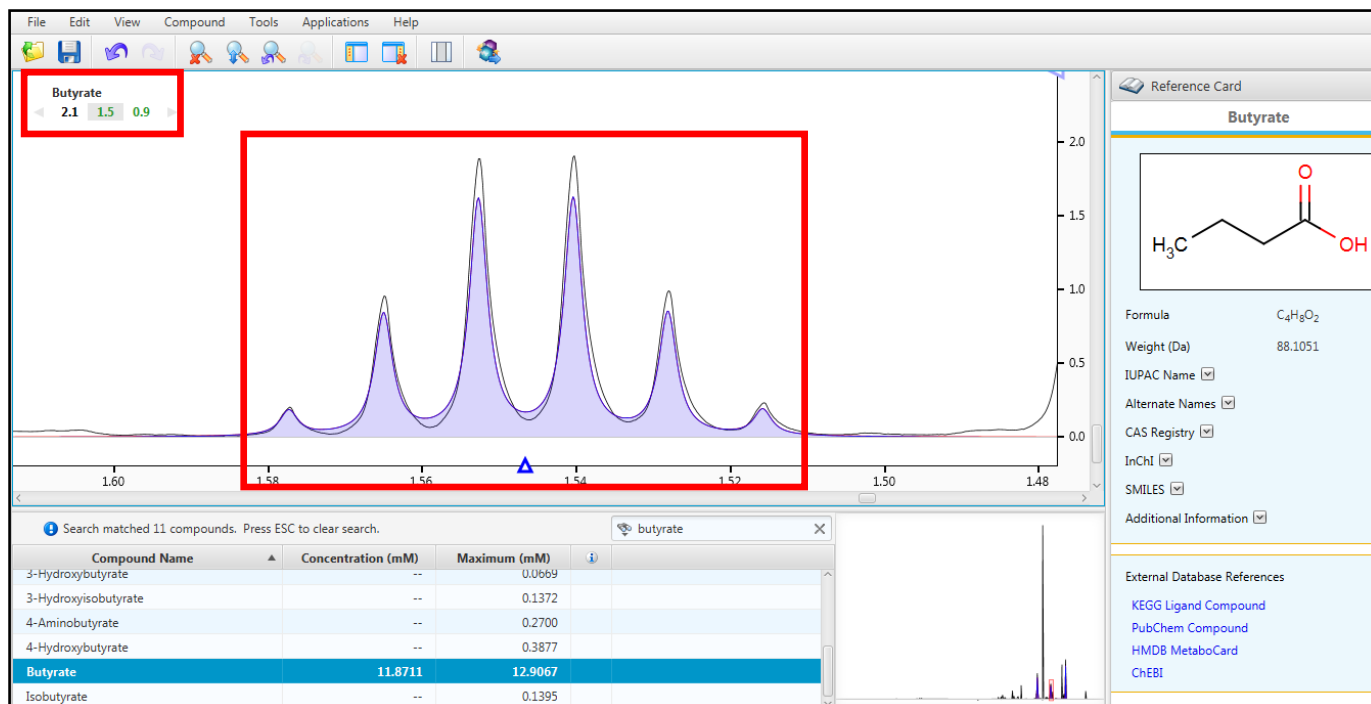
Επιλέγοντας ξεχωριστά κάθε χημική μετατόπιση της καρτέλας κορυφών, έγινε έλεγχος ποια από αυτές δίνει αληθώς θετικές κορυφές (πράσινο χρώμα). Επιπρόσθετη πληροφορία είναι και η εύρεση της πολλαπλότητας. Η πολλαπλότητα είναι το πρότυπο κορυφών που παρατηρείται για ένα συγκεκριμένο υδρογόνο στο φάσμα ^1H NMR. Επομένως, για τη χημική μετατόπιση των 0,9 ppm η μπλε περιοχή ανεύρεσης του βουτυρικού ταυτίστηκε με τη λευκή περιοχή του φάσματος, γεγονός που υποδεικνύεται από την αλλαγή χρώματος της ένδειξης της γραμμής χημικών μετατοπίσεων σε πράσινο, ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε τριπλή κορυφή στο φάσμα (Εικόνα 3.8.). Ανάλογα, στις χημικές μετατοπίσεις των 1,5 ppm (Εικόνα 3.9.) και 2,1 ppm (Εικόνα 3.10.) εντοπίστηκε και πάλι ο μεταβολίτης βουτυρικό, λόγω αλλαγής χρώματος της ένδειξης σε πράσινο, με πολλαπλή και τριπλή κορυφή αντίστοιχα.



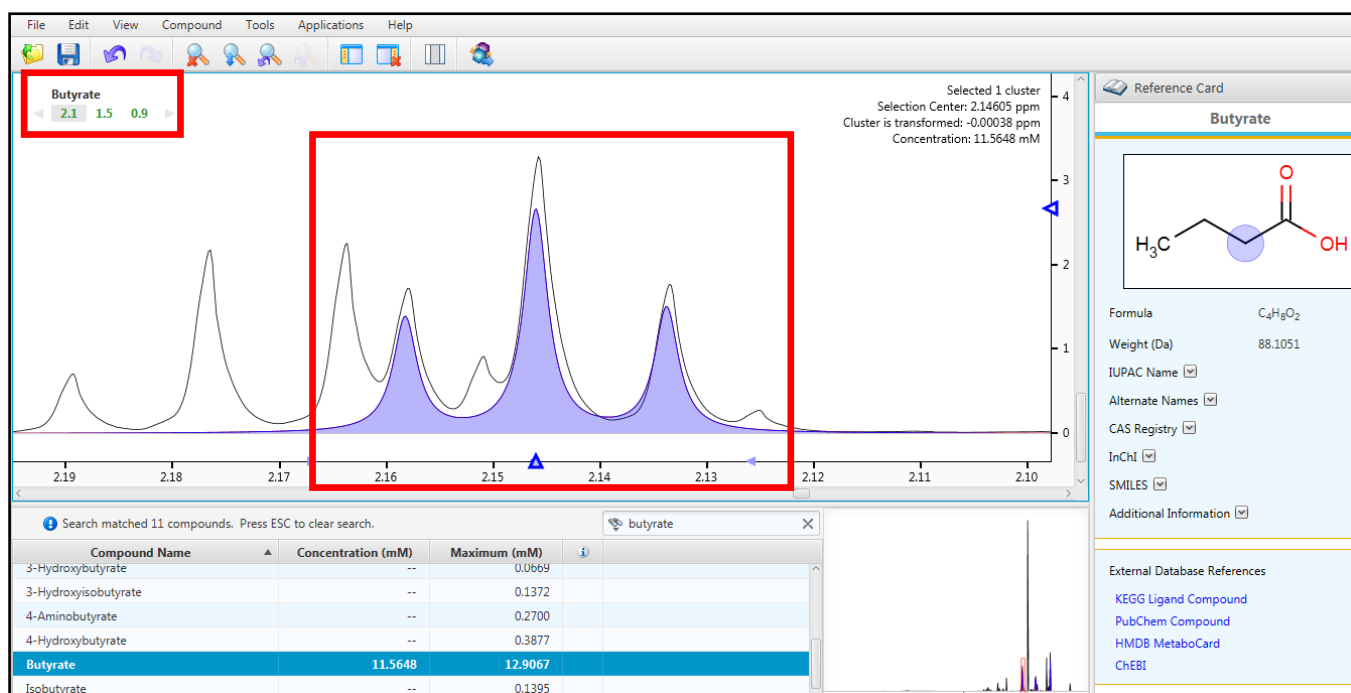
Εικόνα 3.7.: Στιγμιότυπο μονοδιάστατου φάσματος πρωτονίου με ανάδειξη των χημικών μετατοπίσεων ^1H του βουτρικού.



Εικόνα 3.8.: Στιγμιότυπο με τη χημική μετατόπιση του βουτρικού στα 0,9 ppm.



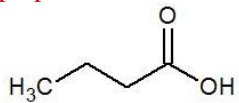
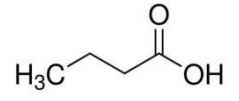
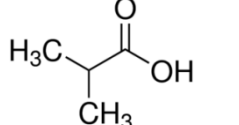
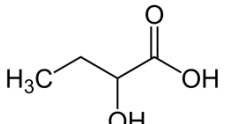
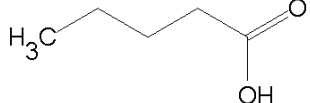
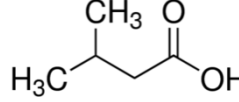
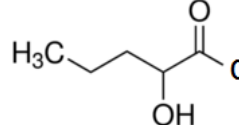
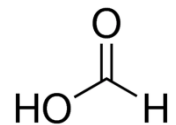
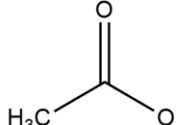
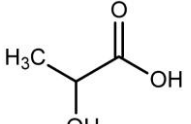
Εικόνα 3.9.: Στιγμιότυπο με τη χημική μετατόπιση του βουτροικού στα 1,5 ppm.



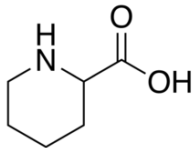
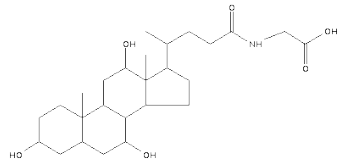
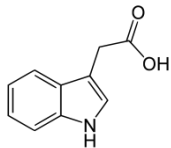
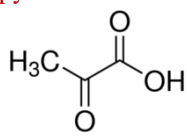
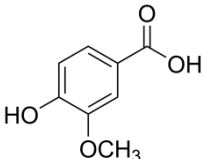
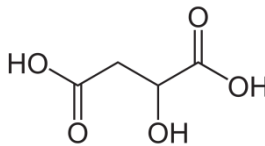
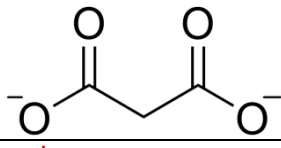
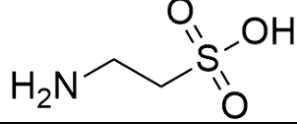
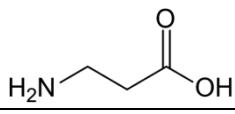
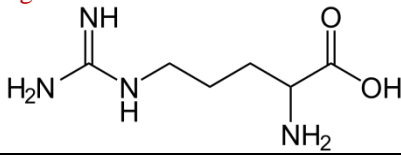
Εικόνα 3.10.: Στιγμιότυπο με τη χημική μετατόπιση του βουτροικού στα 2,1 ppm.

Με την παραπάνω διαδικασία αναγνωρίστηκαν συνολικά 72 μεταβολίτες, εκ των οποίων 12 μεταβολίτες εντοπίστηκαν μόνο σε δείγμα των 0 ωρών και 7 μεταβολίτες μόνο σε δείγμα των 24 ωρών, και οι οποίοι αναφέρονται βιβλιογραφικά ως μεταβολίτες περιττωμάτων, καθώς και στη βάση δεδομένων HMDB. Παρακάτω παρουσιάζονται οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν, η χημική μετατόπιση και η πολλαπλότητα του καθενός (Πίνακας 3.2.).

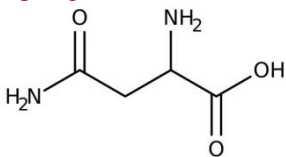
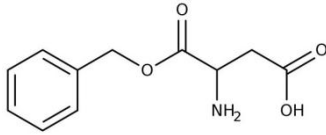
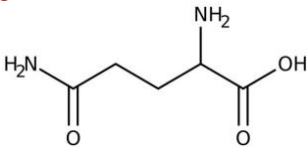
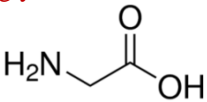
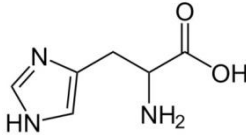
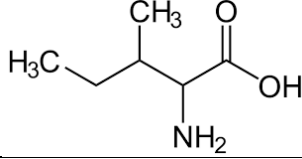
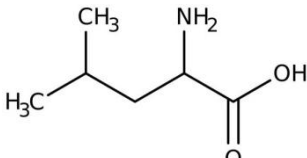
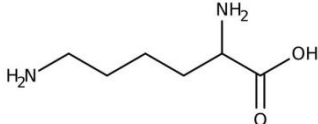
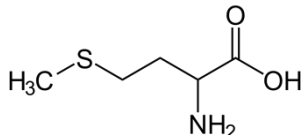
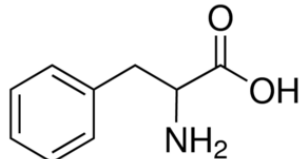
Πίνακας 3.2.: Οι συνολικοί μεταβολίτες που εντοπίστηκαν στα φάσματα με τις χημικές μετατοπίσεις σε ppm των υδρογόνων της κάθε ένωσης και την πολλαπλότητα των ανθράκων.

SCFAs	Χημική μετατόπιση ^1H (ppm)						
	0 hours				24 hours		
propionate 	-				2,2 (q)	1,1 (t)	
butyrate 	-				2,1 (t)	1,6 (m)	0,9 (t)
isobutyrate 	1,0 (d)(d)				1,1 (d)(d)		
2-hydroxybutyrate 	0,9 (t)				0,9 (t)		
valerate 	-				0,9 (t)		
isovalerate 	0,9 (d)				0,9 (d)		
2-hydroxyvalerate 	0,9 (t)				0,9 (t)		
formate 	8,4 (s)				8,5 (s)		
acetate 	1,9 (s)				1,9 (s)		
Other acids	0 hours				24 hours		
lactate 	1,3 (d)				1,3 (d)		

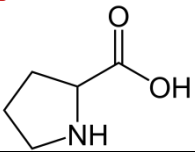
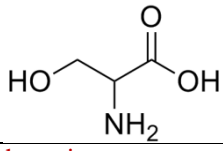
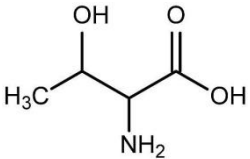
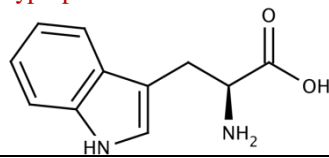
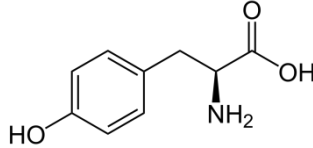
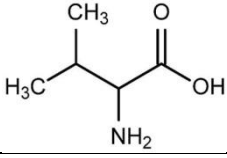
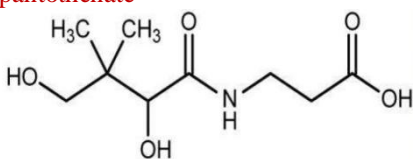
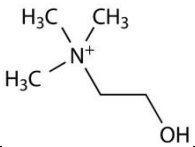
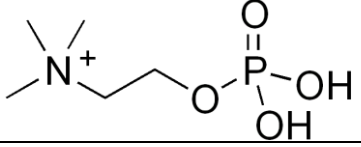
Συνέχεια Πίνακα 3.2.

<p>pipecolate</p> 	1,8				1,8		
<p>glycocholate</p> 	1,7 (m)				0,9 (s)		
<p>indole-3-acetate</p> 	3,7 (s)				3,6 (s)		
<p>pyruvate</p> 	2,4 (s)				2,4 (s)		
<p>vanillate</p> 	3,9 (s)				3,9 (s)(s)		
<p>malate</p> 	4,3 (m)	2,7 (m)			4,3 (d)		
<p>malonate</p> 	3,1 (s)				3,1 (s)		
<p>taurine</p> 	-				3,4 (t)	3,2 (t)	
Animoacids	0 hours				24 hours		
<p>alanine</p> 	1,5 (d)				1,5 (d)		
<p>arginine</p> 	1,7 (m)				1,7 (m)		

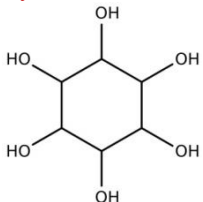
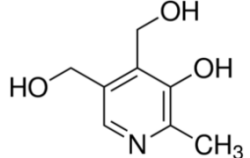
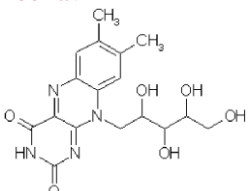
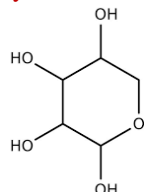
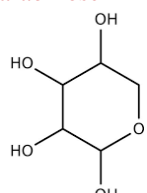
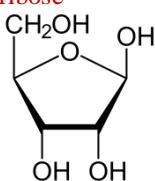
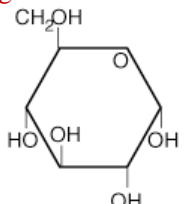
Συνέχεια Πίνακα 3.2.

<p>asparagine</p> 	4,0 (m)				6,9 (s)		
<p>aspartate</p> 	2,8 (d)(d)	2,7 (m)			-		
<p>glutamine</p> 	6,9 (d)				6,9 (d)		
<p>glycine</p> 	3,5 (s)				3,6 (s)		
<p>histidine</p> 	7,9 (s)	7,1 (s)					
<p>isoleucine</p> 	1,0 (d)				1,0 (d)		
<p>leucine</p> 	1,7 (m)	1,0 (d)(d)			1,0 (d)		
<p>lysine</p> 	3,0 (t)				-		
<p>methionine</p> 	2,1 (s)				2,1 (s)		
<p>phenylalanine</p> 	7,4 (d)	7,3 (d)			7,4 (d)	7,3 (d)	

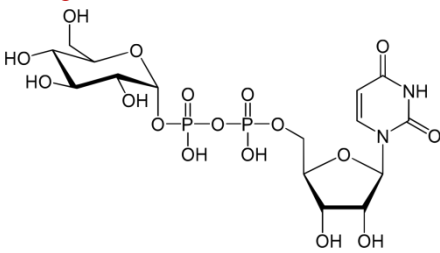
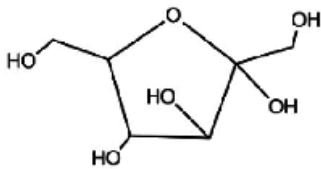
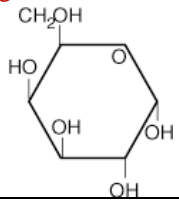
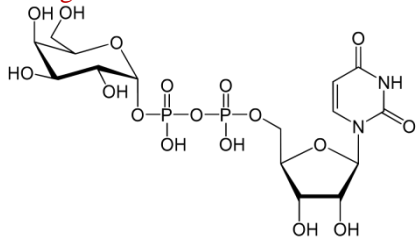
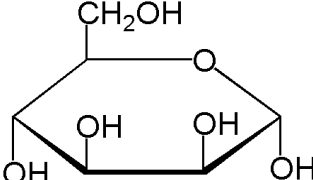
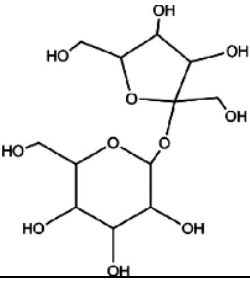
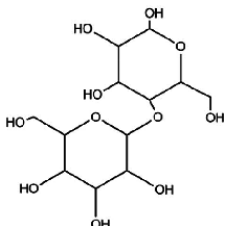
Συνέχεια Πίνακα 3.2.

<p>proline</p> 	2,3 (m)	2,1 (m)			-		
<p>serine</p> 	3,8 (s)				-		
<p>threonine</p> 	1,3 (d)				-		
<p>tryptophan</p> 	7,3 (s)	7,2 (d)			7,3 (s)	7,2 (d)	
<p>tyrosine</p> 	7,2 (d)	6,9 (d)			7,2 (d)	6,9 (d)	
<p>valine</p> 	3,6 (d)	1,0 (d)(d)			1,0 (d)		
Vitamins	0 hours				24 hours		
<p>pantothenate</p> 	4,0 (s)	0,9 (s)(s)			4,0 (s)	0,9 (s)	
<p>choline</p> 	3,2 (s)				3,2 (s)		
<p>o-phosphocholine</p> 	4,2 (m)	3,2 (s)			4,2 (m)	3,2 (s)(s)(s)	

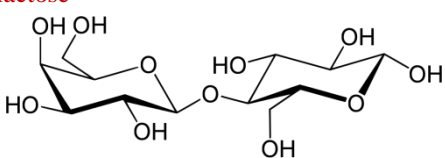
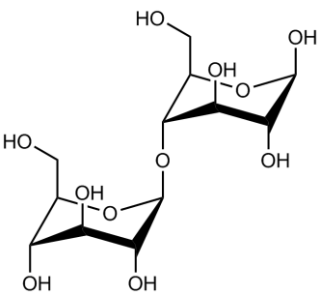
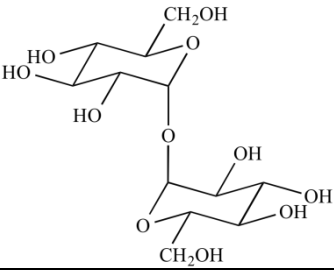
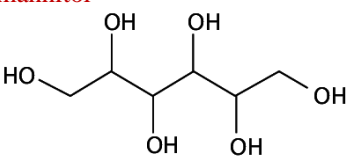
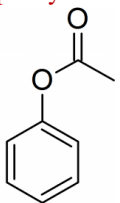
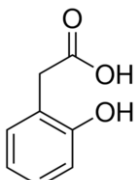
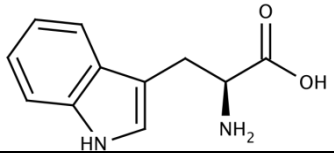
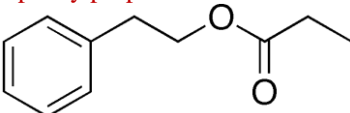
Συνέχεια Πίνακα 3.2.

<p>myo-Inositol</p> 								
	3,5 (m)				-			
<p>pyridoxine</p> 								
	2,5 (s)				-			
<p>riboflavin</p> 								
	4,4	2,5			4,4			
Sugars	0 hours				24 hours			
<p>xylose</p> 								
	5,2 (d)				4,6			
<p>arabinose</p> 								
	5,2 (d)	3,9 (m)			5,2 (d)	3,9 (m)		
<p>ribose</p> 								
	4,0 (m)				-			
<p>glucose</p> 								
	3,5 (m)				4,6 (d)			

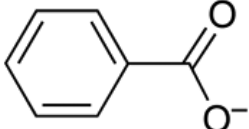
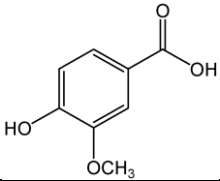
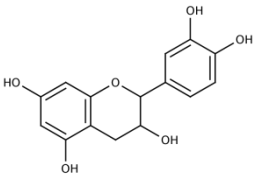
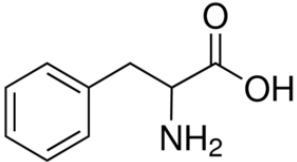
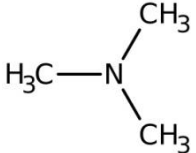

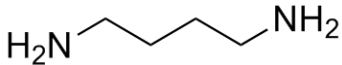
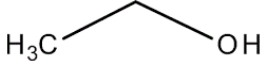
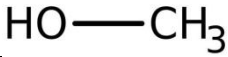
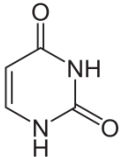
Συνέχεια Πίνακα 3.2.

<p>UDP-glucose</p> 	3,5 (m)				-		
<p>fructose</p> 	4,0 (m)	3,5 (m)			3,9 (q)	3,8 (d)	
<p>galactose</p> 	4,0 (d)	3,9 (d)	3,5		4,1 (m)	3,9 (d)	
<p>UDP-galactose</p> 	3,8 (m)				3,9 (q)		
<p>mannose</p> 	3,9 (m)				3,9 (m)		
<p>sucrose</p> 	5,4 (d)	4,2 (d)	4,0 (t)	3,7 (d)	3,7 (s)		
<p>maltose</p> 	3,8 (m)				3,9 (q)		

Συνέχεια Πίνακα 3.2.

<p>lactose</p> 	3,9	3,5 (m)			5,2 (d)		
<p>cellobiose</p> 	5,2 (d)				5,2 (d)		
<p>trehalose</p> 	5,2 (d)				-		
<p>mannitol</p> 	3,8 (m)				3,8 (d)		
Phenolic components	0 hours				24 hours		
<p>phenylacetate</p> 	7,3 (d)				7,3 (d)	3,5 (s)	
<p>2-hydroxyphenylacetate</p> 	7,2 (d)	6,9 (d)			6,9 (d)		
<p>tryptophan</p> 	7,3 (s)(s)	7,2 (d)			7,5 (d)	7,3 (s)(s)	7,2 (d)
<p>2-phenylpropionate</p> 	7,4 (d)				7,4 (d)		

Συνέχεια Πίνακα 3.2.

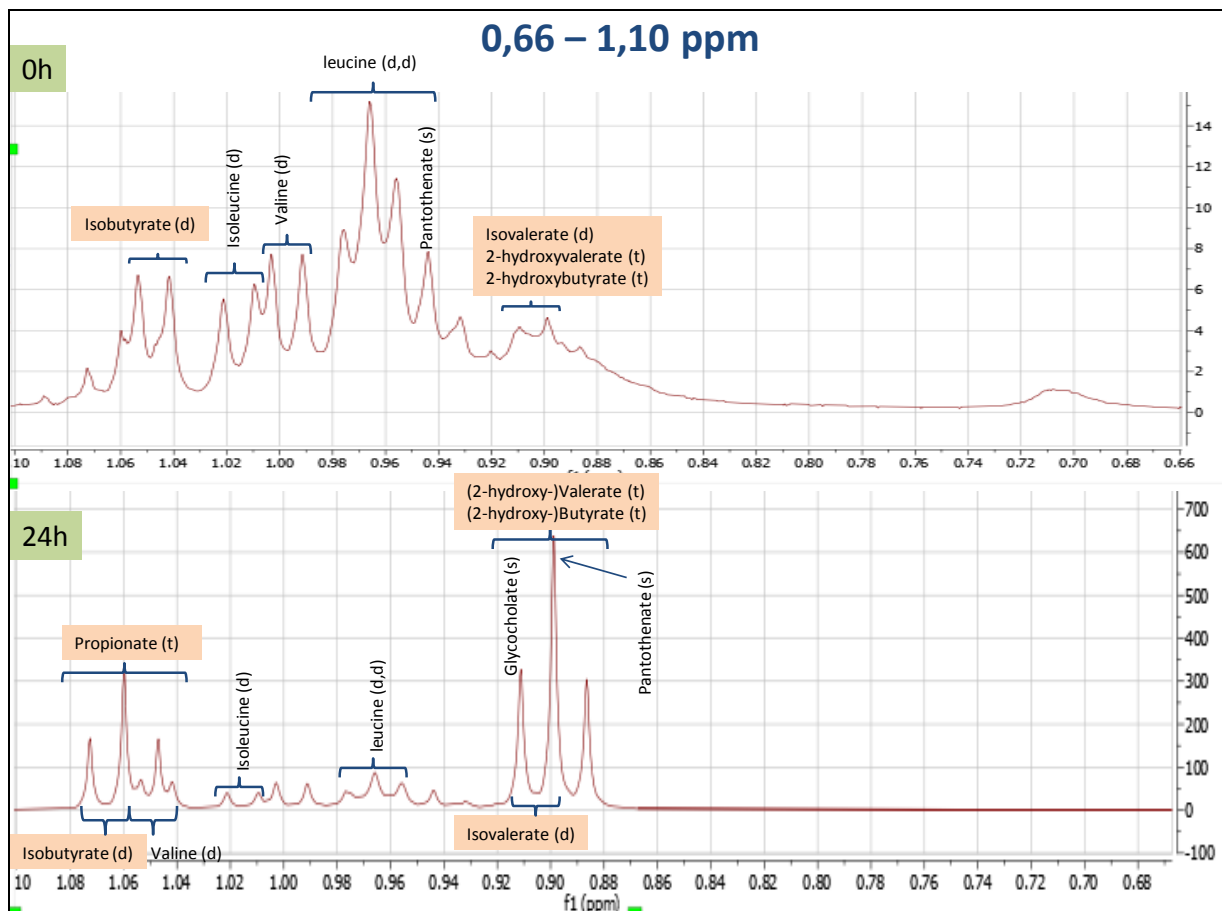
benzoate 	7,9 (d)				7,9 (d)		
ferulate 	7,3 (s)				3,9 (s)		
epicatechin 	4,3				-		
phenylalanine 	7,4 (d)	7,3 (d)			7,4 (d)		
Biogenic amines	0 hours				24 hours		
trimethylamine 	-				2,9		
cadaverine 	3,0 (t)				-		
putrescine 	-				3,0 (m)		
Others	0 hours				24 hours		
ethanol 	-				1,2 (t)		
methanol 	3,3 (s)				3,3 (s)		
uracil 	5,8 (d)				5,8 (d)		

Η πολλαπλότητα υποδηλώνεται κάθε φορά με τα αρχικά s (simple), για απλή κορυφή, d (double) για διπλή κορυφή, t (triple), για τριπλή κορυφή, q (quadruple), για τετραπλή κορυφή και m (multiple) για πολλαπλή κορυφή. Κάθε μεταβολική ομάδα εντοπίζεται σε συγκεκριμένη χημική μετατόπιση υδρογόνων. Τα SCFAs αναμένονται, έτσι, από 1 ppm έως 2,5 ppm, ενώ φαινολικές ενώσεις με βενζολικό δακτύλιο στο μόριό τους απατώνται στα 6,5 ppm έως 8 ppm.

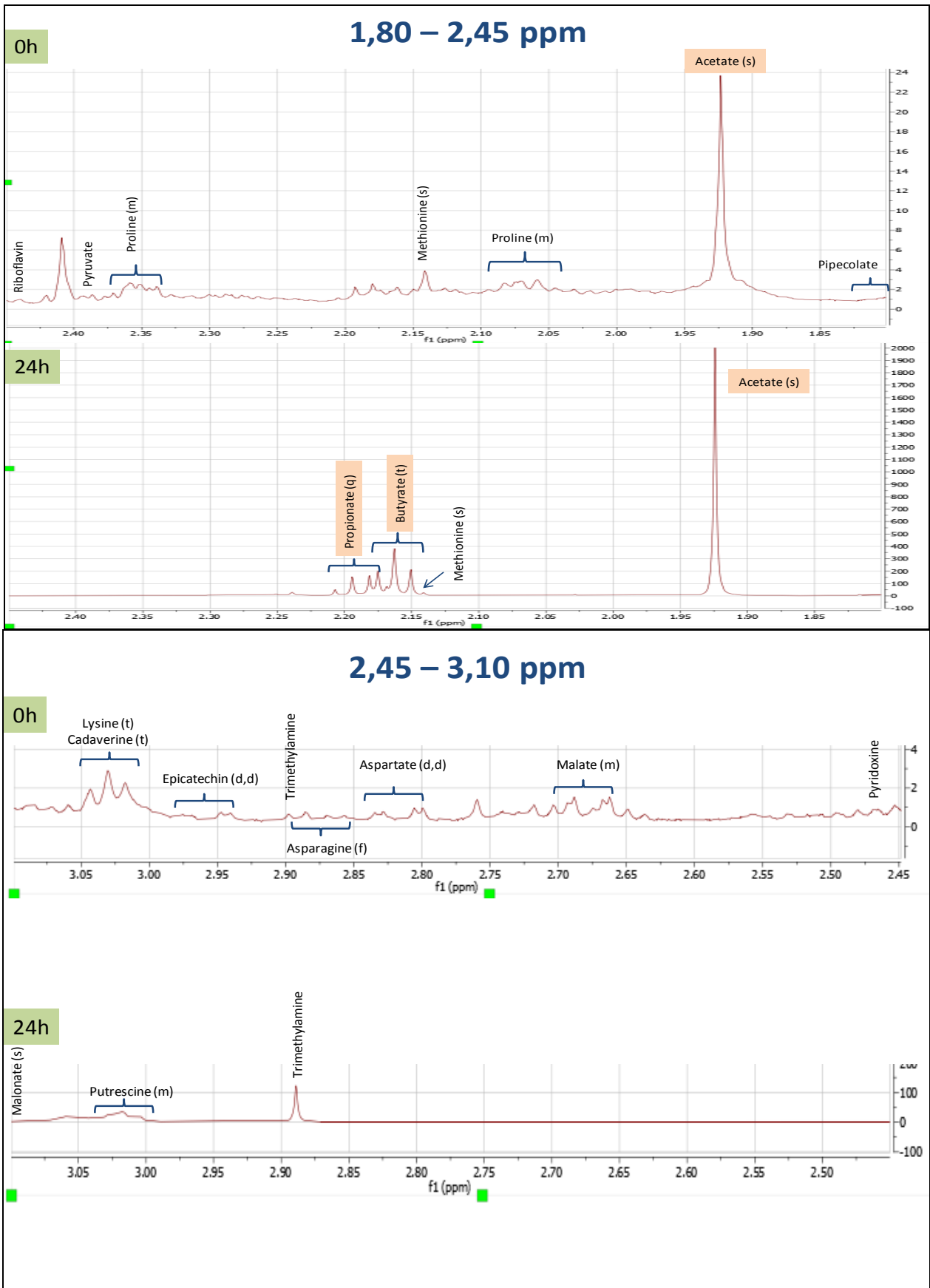
Είναι φανερό πως υπάρχει διαφοροποίηση στο συνολικό μεταβόλωμα μετά το πέρας της ζύμωσης. Είναι προφανές ότι ο μεταβολισμός των υδατανθράκων οδηγεί σε παραγωγή λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs), όπως προπιονικό, βουτυρικό, ισοβουτυρικό, βαλερικό, ισοβαλερικό, φορμικό και οξικό οξύ. Σημαντικές διαφοροποιήσεις μετά το πέρας 24 ωρών παρατηρήθηκαν και σε άλλους μεταβολίτες. Ορισμένα σάκχαρα και αμινοξέα απουσιάζουν στα δείγματα των 24 ωρών, ενώ αμίνες που δεν υπήρχαν σε δείγματα των 0 ωρών, εντοπίστηκαν στις 24 ώρες.

Ύστερα από την αναγνώριση των μεταβολιτών με πειράματα 1D - ^1H NMR, έγινε τοποθέτηση των μεταβολιτών στα φάσματα και ακολούθως αντιπαράθεση των φασμάτων των δύο χρονικών περιόδων (0 ώρες και 24 ώρες). Τα παρακάτω φάσματα της **Εικόνας 3.17.** ανήκουν σε δείγματα από *in vitro* ζύμωση παρουσία *Pleurotus ostreatus* 1123.

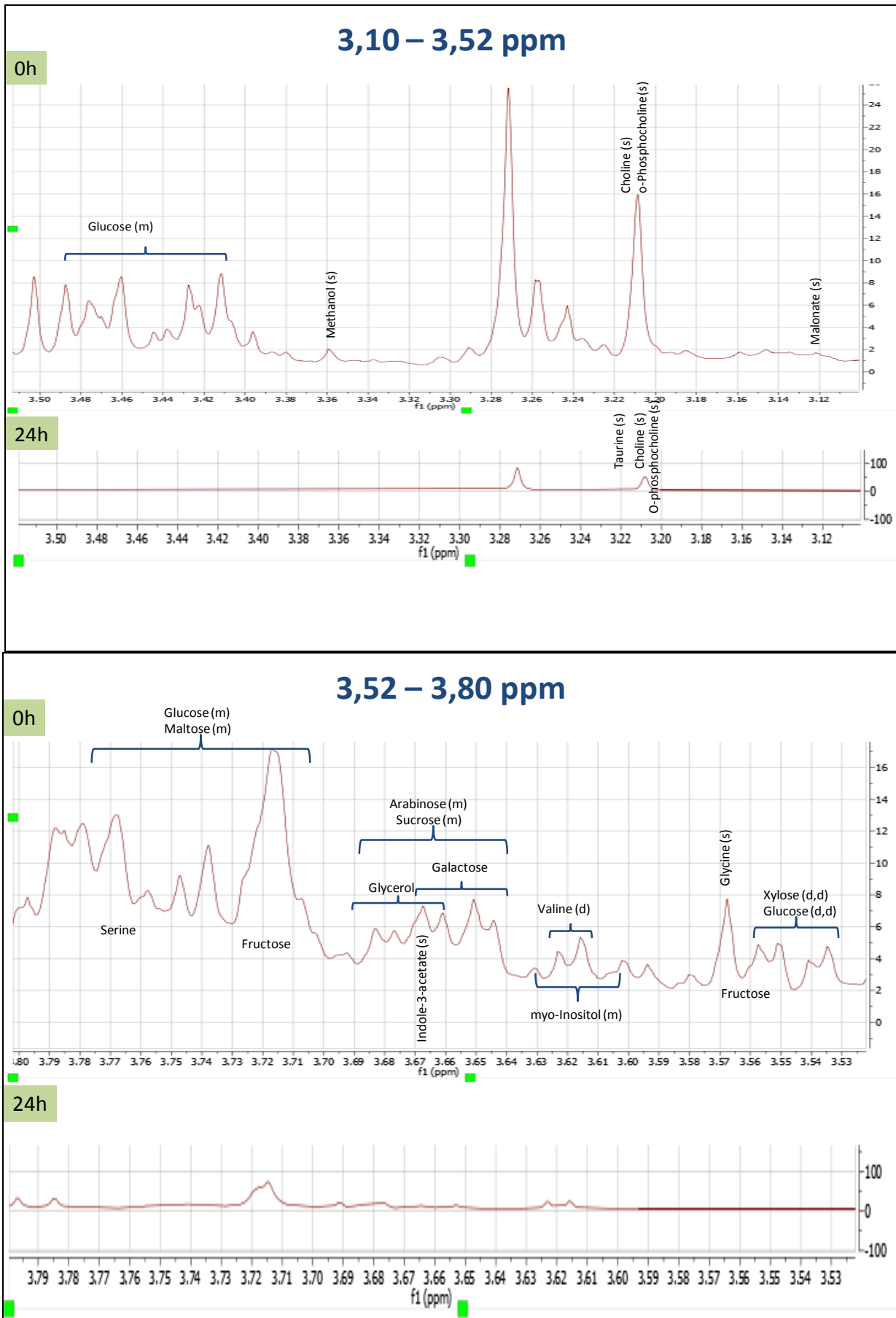
Εικόνα 3.17.: Αντιπροσωπευτικό φάσμα ^1H NMR των προϊόντων ζύμωσης έπειτα από 0 και 24 ώρες ζύμωσης, με χαρακτηριστικές μετατοπίσεις των αναγνωρισθέντων μεταβολιτών. Εντοπίστηκαν 72 μεταβολίτες, συμπεριλαμβανομένων αμινοξέων, μικρής αλυσίδας λιπαρών οξέων (SCFAs), αμινών, σακχάρων και αρωματικών ενώσεων. Τα SCFAs υποδεικνύονται σε πορτοκαλί πλαίσια. Η πολλαπλότητα υποδηλώνεται κάθε φορά με τα αρχικά s (simple) για απλή κορυφή, d (double) για διπλή κορυφή, t (triple) για τριπλή κορυφή, q (quadruple) για τετραπλή κορυφή και m (multiple) για πολλαπλή κορυφή.

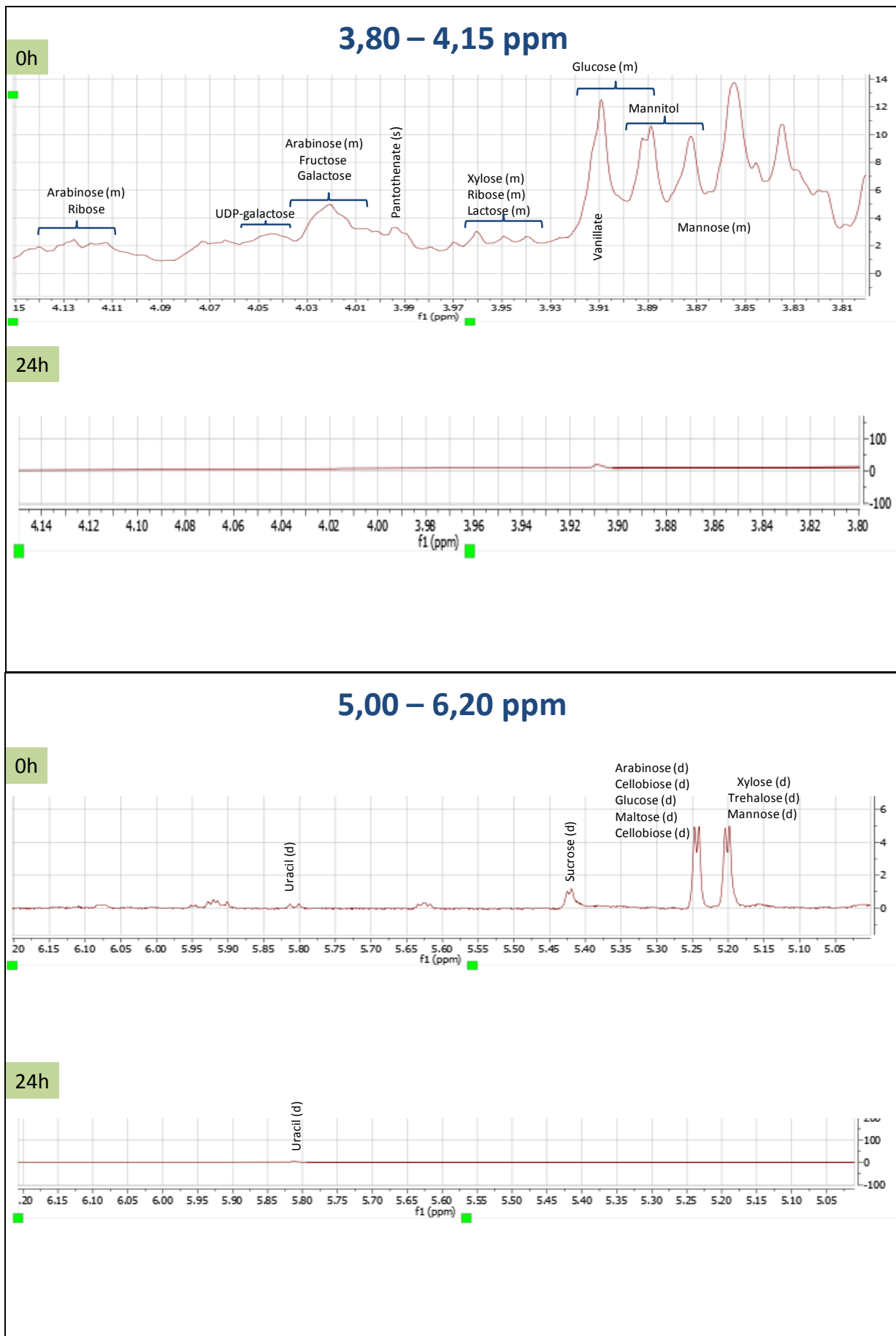


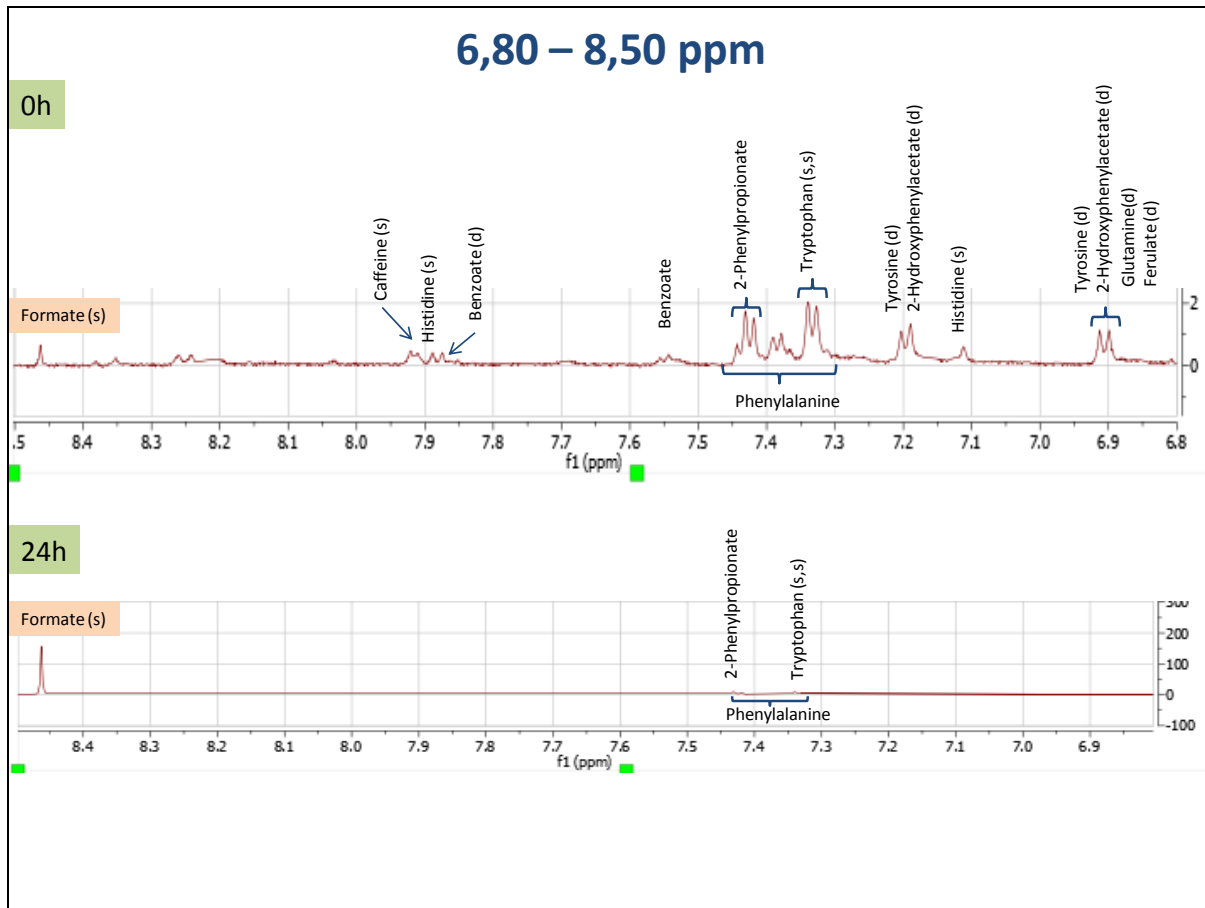
Συνέχεια Εικόνας 3.17.



Συνέχεια Εικόνας 3.17.







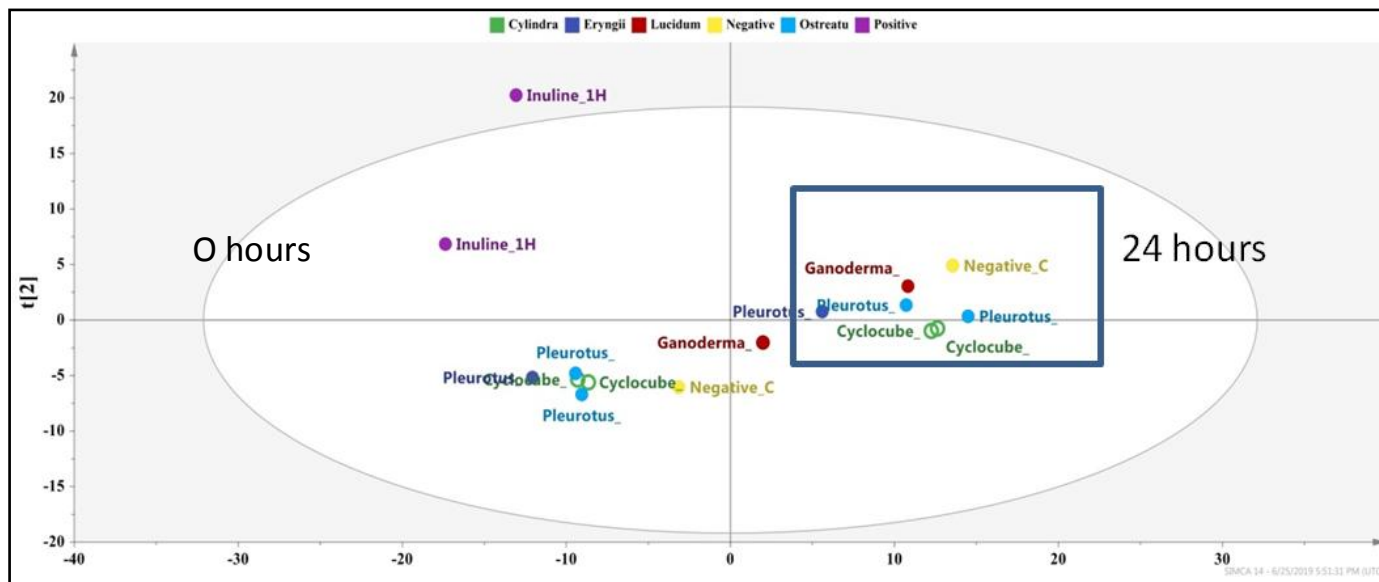
Εικόνα 3.17.: Αντιπροσωπευτικό φάσμα ¹H NMR των προϊόντων ζύμωσης έπειτα από 0 και 24 ώρες ζύμωσης, με χαρακτηριστικές μετατοπίσεις των αναγνωρισθέντων μεταβολιτών. Εντοπίστηκαν 72 μεταβολίτες, συμπεριλαμβανομένων αμινοξέων, μικρής αλυσίδας λιπαρών οξέων (SCFAs), αμινών, σακχάρων και αρωματικών ενώσεων. Τα SCFAs υποδεικνύονται σε πορτοκαλί πλαίσια. Η πολλαπλότητα υποδηλώνεται κάθε φορά με τα αρχικά s (simple) για απλή κορυφή, d (double) για διπλή κορυφή, t (triple) για τριπλή κορυφή, q (quadruple) για τετραπλή κορυφή και m (multiple) για πολλαπλή κορυφή.

3.3.3. Πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση

Αφού ελήφθη το NMR μεταβολικό προφίλ 16 συνολικά δειγμάτων, τα δείγματα υπεβλήθησαν σε πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση. Τα φασματικά δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση σε κύριες συνιστώσες (PCA) (§2.3.8.) με στόχο την επισκόπηση της κατανομής των μελετώμενων υποστρωμάτων και της ενδεχόμενης ομαδοποίησής τους. Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η απόκριση σε επίπεδο μεταβολιτών, κατόπιν επώασης με α) ινουλίνη, β) μετά από *in vitro* ζυμώσεις παρουσία των λυοφιλιωμένων μορφών των μανιταριών *Pleurotus ostreatus* 1123, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* LGM22, *Pleurotus eryngii* Zheng (216), *Cyclocybe cylindracea* CC2, *Cyclocybe cylindracea* 505 και γ) χωρίς πηγή άνθρακα (αρνητικός μάρτυρας) σε 2 χρονικές περιόδους (χρόνος 0 και μετά από ζύμωση 24 ωρών).

Το διάγραμμα διασποράς της Εικόνας 3.18. ανέδειξε την επίδραση των μανιταριών που εξετάστηκαν στα δείγματα. Θα πρέπει να τονιστεί ότι παρά τον περιορισμένο δειγματοχώρο (16 δείγματα),

καθώς και την πολύπλοκη προ-επεξεργασία για τη λήψη των δειγμάτων, η μεταβολομική μελέτη με εφαρμογή NMR επιτυγχάνει τη διάκριση των δειγμάτων που έχουν υποβληθεί σε ζύμωση παρουσία μανιταριού σε σχέση με τα υπόλοιπα. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα δείγματα με ινουλίνη, τα οποία απομακρύνονται από το σύνολο των δειγμάτων. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι η ινουλίνη προστίθεται σε καθαρή μορφή, εν αντιθέσει με τα υπόλοιπα δείγματα.

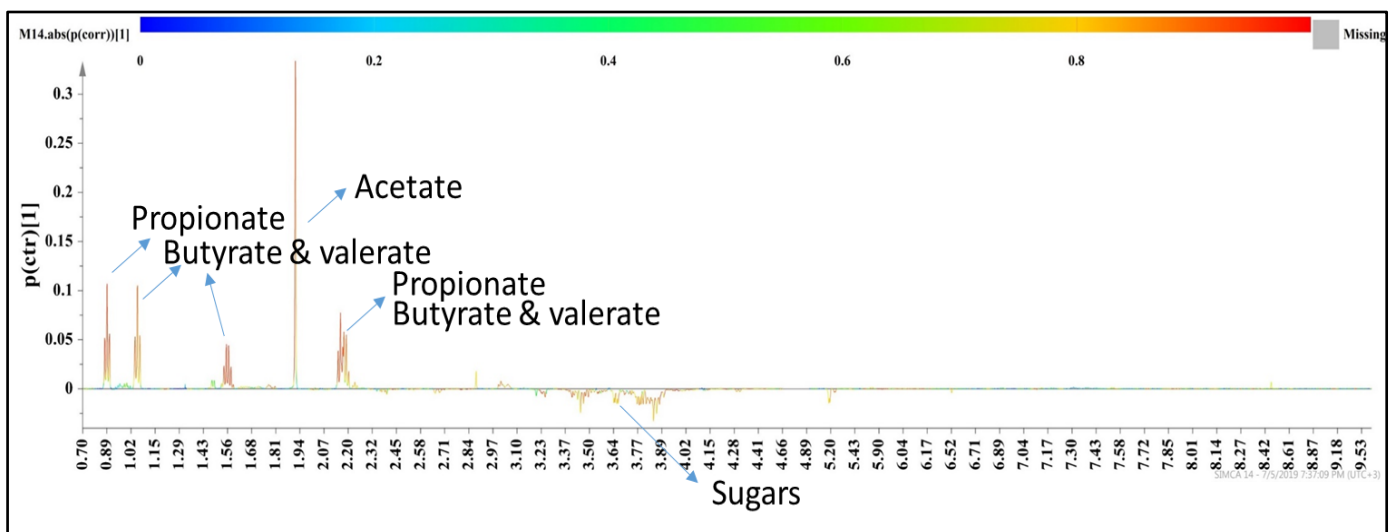
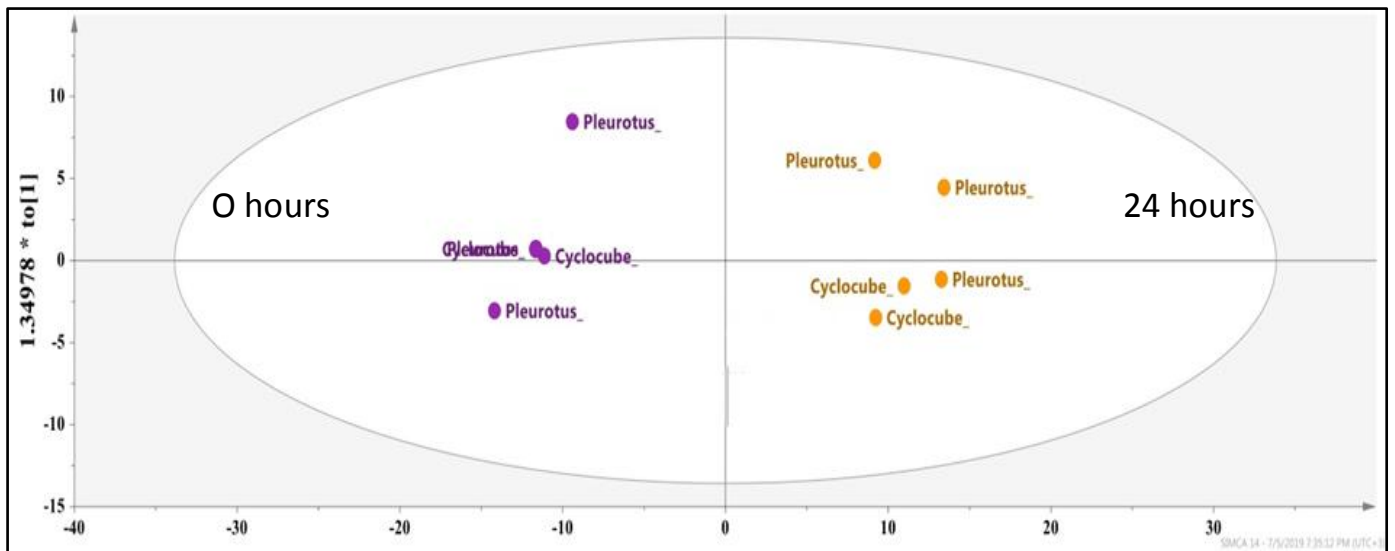


Εικόνα 3.18.: PCA ανάλυση στα NMR φασματικά δεδομένα ως προς τις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες. Δεξιά παρουσιάζονται η ομάδα δειγμάτων μετά από ζύμωση 24 ωρών παρουσία μανιταριού ή ινουλίνης. Με μωβ χρώμα παρουσιάζονται τα δείγματα με ινουλίνη που αποτελούν τις έκτροπες τιμές (outliers) της ανάλυσης. Παρατηρείται διαφοροποίηση των δειγμάτων τα οποία έχουν υποβληθεί σε ζύμωση 24 ωρών ως προς την PCI.

Η περαιτέρω διερεύνηση της ανάδειξης πιθανών μεταβολιτών-βιοδεικτών που συσχετίζονται με τη ζύμωση παρουσία μανιταριού, πραγματοποιήθηκε με Επιβλεπόμενη Ορθογώνια Παλινδρόμηση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (OPLS-DA). Στη μέθοδο αυτή δε συμπεριλήφθησαν τα δείγματα της ινουλίνης, μιας και στην PCA ανάλυση αποτέλεσαν έκτροπες τιμές, τα δείγματα του μανιταριού *Ganoderma lucidum*, μιας και στην PCA ανάλυση δεν υπήρξε διαχωρισμός των 0 και 24 ωρών των δειγμάτων αυτών λόγω του χαμηλού πρεβιοτικού δείκτη, και τα δείγματα NC (αρνητικοί μάρτυρες), μιας και στην PCA ανάλυση απομακρύνονται από τα υπόλοιπα δείγματα κυρίως στις 0 ώρες.

Ακολούθως εξήχθη το διάγραμμα φορτίου S-line, ένα διάγραμμα που ουσιαστικά αναπαριστάνει ένα φάσμα πρωτονίου NMR αναδεικνύοντας τις φασματικές γραμμές που είναι υπεύθυνες για τη διάκριση των δειγμάτων. Το διάγραμμα ακολουθεί ένα χρωματικό κώδικα (μπλε προς κόκκινο) ανάλογα με τη συνεισφορά των φασματικών γραμμών στη διάκριση των δύο ομάδων των δειγμάτων, δηλαδή της ομάδας των 0 ωρών και της ομάδας των 24 ωρών.

Σαφέστατα η OPLS (Εικόνα 3.19.) ομαδοποιεί τα δείγματα σε σχέση με την ζύμωση μετά από 24 ώρες με υποστρώματα μανιταριών. Επιπλέον, στο διάγραμμα φορτίου S-line καταγράφονται οι μεταβολίτες με θετική (πάνω) και αρνητική (κάτω) συσχέτιση ως προς την 24ωρη ζύμωση με υποστρώματα μανιταριών.



Εικόνα 3.19.: Πάνω: Διάγραμμα της OPLS-DA ανάλυσης στα NMR φασματικά δεδομένα ως προς τις δύο πρώτες κύριες συνιστώσες. Δεξιά παρουσιάζεται η ομάδα δειγμάτων μετά από ζύμωση 24 ωρών παρουσία μανιταριού. Κάτω: Διάγραμμα φορτίου S-line. Η χρωματική αλλαγή στις φασματικές κορυφές σχετίζεται με το μέγεθος της συνεισφοράς στην αντίστοιχη ομάδα δειγμάτων.

Από το διάγραμμα φορτίου S-line προκύπτει ότι οι κορυφές πάνω από τον οριζόντιο άξονα είναι αυτές που χαρακτηρίζουν τα δείγματα που τοποθετούνται στο πρώτο και τέταρτο τεταρτημόριο (δείγματα μετά από 24 ώρες ζύμωσης) και αντιπροσωπεύουν μεταβολίτες που συνεισφέρουν στις 24 ώρες (SCFAs). Αντιθέτως, οι κορυφές κάτω από τον οριζόντιο άξονα είναι αυτές που χαρακτηρίζουν τα δείγματα που τοποθετούνται στο δεύτερο και τρίτο τεταρτημόριο (δείγματα κατά την έναρξη της ζύμωσης) και αντιπροσωπεύουν μεταβολίτες που συνεισφέρουν στις 0 ώρες (σάκχαρα, αμινοξέα κ.α.). Από αυτές, οι κορυφές που είναι χρωματισμένες με πιο έντονο κίτρινο ή πορτοκαλί χρώμα συνεισφέρουν περισσότερο στη διάκριση των ομάδων σε σχέση με αυτές που είναι χρωματισμένες με μπλε ή γαλάζιο χρώμα. Πράγματι, με έντονο πορτοκαλί χρωματίζονται οι κορυφές των SCFAs. Επομένως, από το διάγραμμα φορτίου S-line κατέστη σαφής η θετική συσχέτιση των SCFAs ως προς την 24ωρη ζύμωση με υποστρώματα μανιταριών, γεγονός που τα καθιστά βιοδείκτες συσχετιζόμενους με πρεβιοτική δράση.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πολλά είδη μανιταριών είναι γνωστά για τις ευεργετικές ιδιότητές τους αιώνες τώρα, ειδικά στην Άπω Ανατολή όπου χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως τρόφιμα ή θεραπευτικά μέσα. Τα τελευταία χρόνια μελετάται το περιεχόμενό τους σε βιοδραστικές ενώσεις και αποκαλύπτεται ο κρίσιμος ρόλος των μηκυτιακών πολυσακχαριτών στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος, την πρόληψη του καρκίνου, την αποφυγή της υπεργλυκαιμίας και υπερχολοστερολαιμίας και γενικά στη διατήρηση της καλής υγείας του οργανισμού (Silva-Sena et al. 2018, Chen et al. 2011). Στα εδώδιμα μανιτάρια οι β-(1→3)-D-γλυκάνες και κυρίως οι β-(1→3, 1→6)-D-γλυκάνες είναι μια μεγάλη ομάδα βιοπολυμερών, απαραίτητα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος, που διαφέρουν ως προς την αναλογία και τη διευθέτηση των 1→3, 1→4 και 1→6-β-γλυκοσιδικών δεσμών (Laroche et al. 2007). Τα δομικά χαρακτηριστικά των β-γλυκανών καθορίζουν τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητές τους (Du et al. 2019) ενώ θεωρούνται υποψήφια πρεβιοτικά, επειδή οι πληθυσμοί των ευεργετικών βακτηρίων αυξάνονται ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής τους με τον εντερικό μικροβίοκοσμο (Huttenhower et al. 2012). Η σχέση των αντι-καρκινικών και ανοσορρυθμιστικών ιδιοτήτων των μανιταριών και των β-γλυκανών με την ενδεχόμενη πρεβιοτική τους δράση αποτελεί αντικείμενο έντονης έρευνας την τελευταία δεκαετία (Jayachandran et al. 2017), ενώ υπάρχουν επίσης πειραματικά ευρήματα που υποστηρίζουν τη γονο-προστατευτική τους δράση *in vitro* (Zimmermann et al. 2015, Kerche-Silva et al. 2017, Madrigal-Bujaidar et al. 2015), *in vivo* (Tohamy et al. 2003, Silva-Sena et al. 2018, Souza-Silva et al. 2018) αλλά και σε ασθενείς που έχουν υποστεί εκτομή πολύποδα (Turunen et al. 2016). Ένα κεντρικό ερώτημα που παραμένει ανοικτό είναι σε ποιο βαθμό ευθύνονται για τις ευεργετικές επιδράσεις των εδώδιμων μανιταριών μεταβολίτες που παράγονται κατά τη διάρκεια της πέψης τους από τους μικροοργανισμούς του εντερικού σωλήνα, ερώτημα που για να απαντηθεί απαιτείται μελέτη των μηχανισμών.

Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, τα τελευταία 20 χρόνια διερευνάται η ποικιλότητα των ελληνικών μανιταριών και έχουν ήδη καταγραφεί 2800 είδη (Zervakis et al. 2004), πολλά εκ των οποίων, ειδικά οι βασιδιομυκήτες που εμφανίζουν υψηλή περιεκτικότητα β-γλυκανών, καλλιεργούνται και μελετώνται εντατικά ώστε να αξιοποιηθούν στην ανάπτυξη και παραγωγή νέων λειτουργικών τροφίμων (neutraceuticals). Το IXB-EIE (Εργαστήριο Χημικής Καρκινογένεσης & Γενετικής Τοξικολογίας – Εργαστήριο Μοριακής Ανάλυσης) δραστηριοποιείται έντονα προς την κατεύθυνση της Αγροδιατροφής, τα τελευταία δύο χρόνια μέσα από το έργο FUNglucan που χρηματοδοτείται από τη ΔΡΑΣΗ ΕΘΝΙΚΗΣ ΕΜΒΕΛΕΙΑΣ «ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ» ΕΣΠΑ 2014-2020 ΕΠΑνΕΚ: «Ανάπτυξη καινοτόμου λειτουργικού τροφίμου εμπλουτισμένου με β-γλυκάνες από εδώδιμα μανιτάρια ελληνικών βιοτόπων» Τ1ΕΔΚ-03404. Στο πλαίσιο της υλοποίησης του έργου εκπονήθηκε και η παρούσα Διπλωματική Εργασία. Σημειώνεται ότι πριν την έναρξη των στοχευμένων ως προς τα προϊόντα ζύμωσης πειραμάτων που απετέλεσαν το κύριο αντικείμενο αυτής της εργασίας, προηγήθηκαν πειράματα διερεύνησης της απευθείας επίδρασης λυοφιλωμένη σκόνης ολόκληρου μανιταριού (*Pleurotus ostreatus* 1123 και *Ganoderma lucidum*) στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Caco-2 και U-937. Μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα και αφού προσδιορίστηκαν οι κυτταροτοξικές δόσεις (Caco-2: LD₅₀=100 μg / mL, U-937: LD₅₀=200 μg / mL), διερευνήθηκε ο κυτταρικός θάνατος που παρατηρήθηκε με κυτταρομετρία ροής (FACS) καθώς και με ανοσοστύπωμα κατά Western. Έπειτα από διπλή χρώση των κυττάρων με αννεξίνη V-FITC και ιωδιούχο προπίδιο (PI), διαπιστώθηκε πως η αιτία του επαγόμενου θανάτου οφείλεται κυρίως σε νέκρωση και όχι σε απόπτωση. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με ανοσοστύπωμα κατά Western της πυρηνικής πρωτεΐνης PARP-1. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης διερεύνησης παρατίθενται εν συντομία στο ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.

Στόχος της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας ήταν να διερευνηθούν οι αντι-γονοτοξικές και πρεβιοτικές ιδιότητες εδώδιμων μανιταριών (βασιδιομυκήτων) του ελλαδικού χώρου με υψηλή περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες. Βασικό μεθοδολογικό εργαλείο αποτέλεσε ένα σύστημα *in vitro* ζύμωσης των μυκητιακών πολυσακχαριτών από το ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα κοπράνων υγείων εθελοντών

(εμβόλιο κοπράνων) (Yang et al. 2013). Δείχθηκε ότι: (Α) τα προϊόντα της *in vitro* ζύμωσης των γενών *Pleurotus* και *Ganoderma* ασκούν σημαντική γονο-προστατευτική δράση έναντι των βλαβών του DNA που επάγονται από το γονοτοξικό παράγοντα tBOOH στις παραπάνω κυτταρικές σειρές, ενώ (Β) κατά τη διάρκεια της *in vitro* ζύμωσης των μανιταριών *Pleurotus ostreatus* 1123, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* LGM22, *Pleurotus eryngii* Zheng (216), *Cyclocybe cylindracea* CC2, *Cyclocybe cylindracea* 505 παράγονται, εκτός των λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (SCFAs) που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των ευεργετικών για την υγεία βακτηρίων του εντερικού μικροβιακού φορτίου (προβιοτικά) και την ανοσορύθμιση, μεταβολίτες που συνθέτουν ένα αποτύπωμα ειδικό για τη διαδικασία της ζύμωσης και την αποτελεσματικότητά της.

Σε ό, τι αφορά στο **Συμπέρασμα (Α)**, τα αποτελέσματά μας τεκμηριώνουν τη γονο-προστατευτική δράση των προϊόντων ζύμωσης και είναι σε ευρύτερη συμφωνία με προηγούμενες βιβλιογραφικές αναφορές, τα ευρήματα των οποίων αναφέρονται εν συντομία: Χαμηλές συγκεντρώσεις καθαρής (>95%) β-γλυκάνης σιτηρών (1-10% επί του θρεπτικού υποστρώματος) αναστέλλουν πλήρως τις DNA βλάβες που επάγονται από την αφλατοξίνη B1 (AFB1) σε λεμφοκύτταρα κοτόπουλου και διατηρώντας την ακεραιότητα του DNA, αποτρέπουν τον κυτταρικό θάνατο των λεμφοκυττάρων (Zimmermann et al. 2015). Οι αφλατοξίνες είναι ισχυρά καρκινογόνα που ανευρίσκονται φυσικά στο περιβάλλον και συχνά επιμολύνουν τρόφιμα και ζωοτροφές. Η AFB1 είναι η πλέον ισχυρή γονοτοξική, ηπατοκαρκινογόνος αφλατοξίνη. Χορήγηση δόσεων 400 και 700 mg / kg bw β-(1→3, 1→6)-γλυκάνης του *S. cerevisiae* (καθαρότητα 96%) μειώνει τις DNA βλάβες που επάγονται από 1,0 mg/ kg bw AFB1 σε απομονωμένα από το ζώο ηπατοκύτταρα ποντικών, όπως διαπιστώθηκε με δοκιμή Comet (Madrigal-Bujaidar et al. 2015). Η αποτίμηση της δράσης του tBotryosphaeran (BOT), εξωκυτταρικού β-D-γλυκάνης βιοπολυμερούς υδατανθράκων τύπου (1→3, 1→6) που παράγεται από τον ενδοφυτικό μύκητα *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, σε ινοβλάστες πνεύμονος ινδικού χοιριδίου V79 (Chinese hamster lung fibroblasts) και κύτταρα ηπατοκαρκινώματος επίμυος HTC μέσω δοκιμής Comet και μικροπυρήνων, κατέδειξε τη δυνατότητά του να μειώνει τις κλαστογονικές επιπτώσεις των doxorubicin, H₂O₂, και benzo[a]pyrene (Kerche-Silva et al. 2017). Η αντι-μεταλλαξογόνος δράση του BOT αποτιμήθηκε επίσης σε νεαρά (6-8 εβδομάδων) και ηλικιωμένα (18 μηνών) ποντίκια Swiss albino και των δύο φύλων. Η χορήγηση του BOT (7,5, 15, 30 mg / kg bw / ημέρα) δεν είχε γονοτοξικές και κυτταροτοξικές επιπτώσεις όπως δείχτηκε με δοκιμή μικροπυρήνων σε περιφερικό αίμα (PB) και κύτταρα μυελού των οστών (BMCs), ενώ αντίθετως παρατηρήθηκε χαμηλότερη συχνότητα μικροπυρήνων στα BMCs. Η δόση 30 mg / kg bw / ημέρα προκάλεσε σημαντική μείωση των βλαβών που επάγονται από κυκλοφωσφαμίδη στα αρσενικά ποντίκια (Silva-Sena et al. 2018). Τα ανασταλτικά αποτελέσματα της β-γλυκάνης κριθαριού στην πρόκληση χρωμοσωμικών ανωμαλιών διερευνήθηκαν στον μυελό των οστών και στα σπερματογονικά κύτταρα ποντικών, όπου χορηγήθηκαν αντι-νεοπλασματικά φάρμακα. Η προεπεξεργασία με δόση β-γλυκάνης 100 mg / kg bw, ip μείωσε το συνολικό αριθμό κυττάρων με δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες που σημειώθηκαν μετά τη θεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη (CP) (2,5 mg / kg bw, ip), αδριαμυκίνη (ADR) (12 mg / kg bw, ip) και cis-diamminedichloroplatinum-II (cisplatin) (5 mg / kg bw, ip) κατά περίπου 41,1, 26,9 και 57,7% στον μυελό των οστών και 44,4, 55 και 57,1% στα σπερματογονικά κύτταρα, αντίστοιχα. Αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσε να αποδοθεί στην ικανότητά της β-γλυκάνης να παγιδεύει τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται κατά τη διάρκεια της βιομετατροπής αυτών των αντι-νεοπλαστικών φαρμάκων. Η β-γλυκάνη αποκατέστησε επίσης σε σημαντικό βαθμό τη μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων του μυελού των οστών που είχε κατασταλεί από τα αντι-νεοπλασματικά φάρμακα. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η β-γλυκάνη παίζει ρόλο στη μείωση της γονοτοξικότητας που προκαλείται από αντι-νεοπλασματικά φάρμακα κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας του καρκίνου (Tohamy et al. 2003). Στόχος μιας άλλης μελέτης ήταν η επαλήθευση των ευεργετικών αποτελεσμάτων των β-D-γλυκανών του *S. cerevisiae* και της γλουταμίνης έναντι του Cytarabine / Ara-C, μετά από

αξιολόγηση της βλάβης του DNA σε λευκοκύτταρα των εντερικών κυττάρων σε ποντίκια Balb / C που έλαβαν β-D-γλυκάνη (80 mg / kg), γλουταμίνη (150 mg / kg) ή και τα δύο, για 21 ημέρες. Τις δύο τελευταίες ημέρες αυτής της περιόδου, χορηγήθηκε Ara-C (1,8 mg / ζώο) με ενδοπεριτοναϊκή ένεση κάθε 12 ώρες. Τα ζώα στα οποία χορηγήθηκε Ara-C παρουσίασαν τον υψηλότερο γονοτοξικό δείκτη, σημαντική λευκοπενία και μείωση στον μιτωτικό δείκτη των εντερικών κρυπτικών κυττάρων. Η χορήγηση β-D-γλυκάνης προστάτευε τα λευκοκύτταρα από τον κατακερματισμό του DNA που προκαλείται από το Ara-C. Η γλουταμίνη σε συνδυασμό με τη β-D-γλυκάνη μείωσε τη λευκοπενία. Έτσι, η χρήση β-D-γλυκάνης και γλουταμίνης αποδείχθηκε ευεργετική για το έντερο (Souza-Silva et al. 2018). Τέλος, η κατανάλωση β-γλυκάνης βρώμης, σε ημερήσια δόση 3 g ως μέρος της καθημερινής πρόσληψης ψωμιού για 3 μήνες, από ασθενείς που έχουν υποστεί εκτομή πολύποδα (polypectomized patients) μείωσε σημαντικά τη γονοτοξικότητα του υδατικού εκχυλίσματος των κοπράνων τους (Turunen et al. 2016). Είναι προφανές, με βάση τα παραπάνω, ότι η πρόσληψη β-γλυκανών συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας του γενετικού υλικού το οποίο προσβάλλεται συνεχώς από ενδογενείς (ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού) αλλά και εξωγενείς γονοτοξικούς παράγοντες (ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε περιβαλλοντικά μεταλλαξογόνα και καρκινογόνα). Φαίνεται επίσης ότι οι β-γλυκάνες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την άμβλυση των παρενεργειών των χημειοθεραπευτικών παραγόντων κατά τη διάρκεια της αντικαρκινικής θεραπείας. Σημειώνεται ότι όλα τα παραπάνω αφορούν απευθείας χορήγηση β-γλυκανών σε καθαρή μορφή.

Η απομόνωση και ο καθαρισμός β-γλυκανών απόμανιτάρια εξακολουθεί να είναι πολύ δύσκολη διαδικασία λόγω της πολυπλοκότητας της δομής και των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους. Ταμανιτάρια είναι ούτως ή άλλως πλούσια σε υδατάνθρακες (χιτίνη, ημικυτταρίνη, α- και β-γλυκάνες, μαννάνες, ξυλάνες και γαλακτάνες) και λειτουργούν ως πρεβιοτικά, ενισχύοντας την ανάπτυξη των ευεργετικών μικροοργανισμών στο έντερο, παρέχοντας έτσι οφέλη για την υγεία του ξενιστή (Sawangwan et al. 2018), ενώμανιτάρια πλούσια σε β-γλυκάνες, διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα, γεγονός που τα καθιστά κατάλληλα ως «φαρμακευτικά»μανιτάρια (Jayachandran et al. 2017). Έχει αποδειχθεί πως ταμανιτάρια μπορούν επίσης να παρεμποδίσουν τη δράση αλλεργιογόνων, να μειώσουν τα επίπεδα της χοληστερόλης και να αποτρέψουν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Επομένως, οι ευεργετικές επιδράσεις τους στην ανθρώπινη υγεία μπορεί να αποδοθούν στο πλήθος των βιοδραστικών ενώσεων που εμπεριέχουν, μεταξύ των οποίων, οι πολυσακχαρίτες και ειδικότερα οι β-γλυκάνες αποτελούν αντικείμενο έντονης έρευνας τα τελευταία χρόνια διότι οι επιδράσεις τους είναι πλειοτροπικές και υποστηρίζονται από συνεχώς αυξανόμενο όγκο πειραματικών δεδομένων. Ταμανιτάρια του γένους *Ganoderma* και *Pleurotus*, που επιλέχθηκαν αρχικά στην παρούσα εργασία, είναιμανιτάρια πλούσια σε β-γλυκάνες (Zhu et al. 2015). Όλα δε τα γένη/είδημανιταριών που χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω ως πηγές άνθρακα στην *in vitro* ζύμωση (*Pleurotus ostreatus* 1123, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* LGM22, *Pleurotus eryngii* Zheng(216), *Cyclocybe cylindracea* CC2 και *Cyclocybe cylindracea* 505), αναπτύχθηκαν σε καλλιεργητικό υπόστρωμα (άχυρο) που ενίσχυσε την ήδη υψηλή περιεκτικότητά τους σε β-γλυκάνες (~40%) και σε κάθε περίπτωση λυοφιλώθηκε το καρποφόρο σώμα, όπου κυρίως ανευρίσκονται οι συγκεκριμένοι πολυσακχαρίτες (Koutrotsios et al. 2019).

Είναι η πρώτη φορά που διερευνάται η γονο-προστατευτική δράση εδώδιμωνμανιταριών με ενισχυμένη περιεκτικότητα β-γλυκανών μετά από την *in vitro* ζύμωσή τους από τους μικροοργανισμούς του εντερικού σωλήνα κοπράνων υγιών εθελοντών, δηλαδή μέσω ενός συστήματος που μιμείται τη ζύμωση των ινών αυτών από τον εντερικό μικροβίοκοσμο του παχέος εντέρου *in vivo*, σε μια προσπάθεια να γεφυρωθεί και άρα γεφυρώνει το χάσμα μεταξύ εργαστηριακών ευρημάτων και κλινικής παρέμβασης. Το γεγονός ότι ακόμα και πολύ μικρή συγκέντρωση των προϊόντων ζύμωσης (1% επί του θρεπτικού υποστρώματος) ασκεί γονο-προστατευτική δράση είναι εξαιρετικά σημαντικό. Το πεδίο των ευεργετικών για την υγεία επιδράσεων τωνμανιταριών με υψηλή περιεκτικότητα σε β-γλυκάνες σαφώς διευρύνεται ως

προς μια εξόχως σημαντική παράμετρο, την προστασία του γενετικού υλικού και μάλιστα σε ηλικιωμένους.

Πολυάριθμες μελέτες προτείνουν ότι ο μεταβολισμός θρεπτικών συστατικών του ξενιστή (ανθρώπινος οργανισμός) από τον εντερικό μικροβίοκοσμο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αιτιολογία ή και την εξέλιξη μιας σειράς γαστρεντερικών παθήσεων, όπως η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Inflammatory Bowel Disease, IBD), το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου (Irritable Bowel Syndrome, IBS), ο καρκίνος του παχέος εντέρου και η διάρροια που σχετίζεται με αντιβιοτικά. Πρόσφατα έχει επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι το εντερικό μικροβίωμα του ανθρώπου πιθανώς να εμπλέκεται στην παχυσαρκία, το διαβήτη αλλά και σε νευρολογικές και ψυχικές διαταραχές (Gut-Brain axis) (Greenblum et al. 2011, Marchesi et al. 2016, Bastiaanssen et al. 2019). Ο κρίσιμος ρόλος που φαίνεται να διαδραματίζει ο μεταβολισμός του μικροβίοκοσμου της εντερικής χώρας στον ανθρώπινο οργανισμό και την υγεία ενθαρρύνει την έρευνα σχετικά με τον προσδιορισμό των μεταβολικών οδών, ιδιαίτερα αυτών που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των διαιτητικών θρεπτικών συστατικών. Αυτός ο τομέας ήταν και το επίκεντρο της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας.

Σε ό, τι αφορά, επομένως, στο **Συμπέρασμα (B)**, το ολικό μεταβολικό αποτύπωμα των προϊόντων ζύμωσης διερευνήθηκε περαιτέρω με εφαρμογή φασματοσκοπίας NMR, πράγμα που οδήγησε στην αναγνώριση 72 μεταβολιτών που εμπλέκονται στις μεταβολικές διαδικασίες του μικροβιακού φορτίου του ανθρώπινου εντερικού σωλήνα. Μεταξύ των μεταβολιτών αναγνωρίστηκαν αμινοξέα, αμίνες, λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας και φαινολικά – αντιοξειδωτικά μόρια. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση. Η πιλοτική μελέτη ανέδειξε τη σαφή διαφοροποίηση των υποστρωμάτων που υποβλήθηκαν σε 24ωρη ζύμωση ως προς την 1η κύρια συνιστώσα. Σε μια προσπάθεια να συσχετιστούν τα NMR φασματικά δεδομένα με το πως ο μεταβολισμός του εντερικού μικροβιώματος επιδρά στον ξενιστή τα πρότυπα παλινδρόμησης ανέδειξαν πιθανούς βιοδείκτες που συνδέονται με τον μεταβολισμό του μικροβιακού φορτίου της εντερικής χώρας. Μεταξύ των μεταβολιτών που αναδείχθηκαν, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πιλοτικής χημειομετρικής μελέτης, παρουσιάζεται μεταξύ άλλων αύξηση των επιπέδων των λιπαρών οξέων βουτυρικού, προπιονικού και οξικού οξέος στην ομάδα δειγμάτων των 24 ωρών ζύμωσης ενώ αύξηση των επιπέδων στην φασματική περιοχή των μονο- και ολιγο-σακχαριτών στην ομάδα δειγμάτων των 0 ωρών. Τα ληφθέντα αποτελέσματα συνάδουν με βιβλιογραφικά δεδομένα σε ό, τι αφορά στη διαφοροποίηση αυτή και επιχειρείται η επεξήγηση τους στις επόμενες παραγράφους.

Ο μεταβολισμός του εντερικού μικροβίοκοσμου βασίζεται κυρίως στα διατροφικά υποστρώματα που δεν έχουν αφομοιωθεί στην ανώτερη πεπτική οδό του ξενιστή (στη συγκεκριμένη περίπτωση ολιγοσακχαρίτες από τα υποστρώματα μανιταριών). Ο εντερικός μικροβίοκοσμος μέσω της σακχαρολυτικής βακτηριακής ζύμωσης παράγει ευεργετικούς μεταβολίτες για τον ξενιστή, όπως για παράδειγμα τα λιπαρά οξέα (Flint et al. 2012). Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι σε περίπτωση περιορισμένου φορτίου υδατανθράκων τα βακτήρια στρέφονται σε άλλες εναλλακτικές πηγές ενέργειας με αποτέλεσμα την παραγωγή μεταβολιτών επιζήμιων για την ανθρώπινη υγεία (Oliphant et al. 2019).

Τα τρία πιο συχνά εντοπιζόμενα SCFAs σε δείγματα κοπράνων που προέρχονται από τον μεταβολισμό των άπεπτων υδατανθράκων είναι το οξικό, το προπιονικό και το βουτυρικό, που συνήθως υπάρχουν σε αναλογίες που κυμαίνονται από 3: 1: 1 έως 10: 2: 1. Αυτά τα τρία κύρια SCFAs αποδίδουν πολύ διαφορετικούς αλλά σημαντικούς ρόλους στον άνθρωπο ξενιστή. Το βουτυρικό είναι αναμφισβήτητο το πιο σημαντικό SCFA για την ανθρώπινη υγεία. Αποτελεί τη βασική πηγή ενέργειας για τα ανθρώπινα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου όπως, επίσης, έχει πιθανή αντικαρκινική δραστηριότητα μέσω της ικανότητάς του να προκαλεί απόπτωση των καρκινικών κυττάρων του παχέος εντέρου. Παράλληλα, παρουσιάζει την ικανότητα να ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση αναστέλλοντας τις αποακετυλάσες των ιστονών (Steliou et al. 2012). Υπάρχουν, επίσης, ενδείξεις ότι το βουτυρικό μπορεί να ενεργοποιήσει την εντερική γλυκονογένεση (IGN) με ευεργετικά αποτελέσματα στη γλυκόζη αίματος και την ομοιόσταση

(Vadder et al. 2013). Το προπιονικό είναι, επίσης, πηγή ενέργειας για τα επιθηλιακά κύτταρα. Μεταφέρεται από μέσω του κυκλοφορικού συστήματος στο ήπαρ όπου διαδραματίζει ενεργό ρόλο στη γλυκονογένεση. Θεωρείται ότι είναι ένα σημαντικό μόριο στη σηματοδότηση του κορεσμού λόγω της αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς του εντέρου (G πρωτεϊνούχος υποδοχέας, GPR) GPR 41 και GPR 43 (Brown et al. 2003). Η μετατροπή του προπιονικού σε γλυκόζη στην εντερική γλυκονογένεση προωθεί άμεσα την ομοίωση μειώνοντας την παραγωγή της ηπατικής γλυκόζης (Vadder et al. 2013). Το οξικό είναι το πιο άφθονο SCFA και είναι ένας απαραίτητος μεταβολίτης για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Μέσα στο ανθρώπινο σώμα, το οξικό μεταφέρεται στους περιφερειακούς ιστούς και χρησιμοποιείται στον μεταβολισμό και τη λιπογένεση χοληστερόλης. Επιπλέον, πρόσφατες *in vivo* μελέτες δείχνουν ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της όρεξης (Frost et al. 2014).

Με βάση τα παραπάνω, αναδεικνύεται η αναγκαιότητα και η σημασία της μελέτης ως προς την εύρεση βιοδεικτών σχετικών με τον μεταβολισμό των μικροοργανισμών του εντερικού σωλήνα και τις επιπτώσεις του στον ανθρώπινο οργανισμό. **Η Διπλωματική αυτή Εργασία προτείνει τη χρήση της φασματοσκοπίας NMR και κατάλληλων εργαλείων της Χημειομετρίας ως ένα φτηνό, αξιόπιστο και γρήγορο μέσο για την κατανόηση των μεταβολικών οδών που διέπουν τον εντερικό μικροβίοκοσμο και την αλληλεπίδρασή του με τον ανθρώπινο οργανισμό.** Μελλοντικός στόχος της μελέτης είναι η συλλογή περισσότερων δειγμάτων, ώστε να αναδειχθούν και άλλοι μεταβολίτες που μπορεί να συνεισφέρουν στη σύνδεση του μεταβολισμού του μικροβιώματος του εντέρου με την απελευθέρωση ευεργετικών για τον ανθρώπινο οργανισμό μεταβολιτών. Ανάμεσα στους μεταβολίτες στους οποίους στοχεύει μελλοντικά η μελέτη είναι η ανάδειξη των διαιτητικών πολυφαινολών ως σημείο αναφοράς του εντερικού μικροβίοκοσμου, αφού από τη μία έχει εκτεταμένη ικανότητα μεταβολισμού των φυτοχημικών, ιδιαίτερα των πολυφαινολών, ενώ από την άλλη υπάρχουν εκτενείς αποδείξεις ότι συνεισφέρουν σε μεγάλο βαθμό στη σύνθεση των μικροβίων του εντέρου με γνωστό αντίκτυπο στον ανθρώπινο οργανισμό (Marín et al. 2015, Landete et al. 2016).

Συνοψίζοντας, στην παρούσα Διπλωματική Εργασία:

(α) Χαρακτηρίστηκαν μανιτάρια του γένους *Pleurotus* και *Ganoderma* ως προς τη γονο-προστατευτική τους δράση αλλά και ως προς το μεταβολικό τους αποτύπωμα. Τα συγκεκριμένα γένη μανιταριών είναι γνωστά για την υψηλή περιεκτικότητά τους σε β-γλυκάνες. Είναι σημαντικό ότι τα πειράματα αφορούσαν στα προϊόντα της *in vitro* ζύμωσης των μανιταριών από τον εντερικό μικροβίωση δείγματος κοπράνων υγιών εθελοντών και δείχθηκε ότι τα προϊόντα ζύμωσης των ειδών *Pleurotus ostreatus 1123* και *Ganoderma lucidum* μειώνουν τις βλάβες που επάγονται από το γονοτοξικό παράγοντα tBOOH στις καρκινικές κυτταρικές σειρές Caco-2 και U-937.

(β) Χαρακτηρίστηκε το μεταβολικό αποτύπωμα της *in vitro* ζύμωσης των μανιταριών *Pleurotus ostreatus 1123*, *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus LGM22*, *Pleurotus eryngii Zheng (216)*, *Cyclocybe cylindracea CC2*, *Cyclocybe cylindracea 505*. Από τη μεταβολομική ανάλυση προέκυψε ότι παρήχθησαν, κυρίως, λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (SCFAs) ενώ αναγνωρίστηκαν συνολικά 72 μεταβολίτες, μεταξύ των οποίων φαινολικά συστατικά και αμίνες. Η περαιτέρω μεταβολομική ανάλυση θα αναδείξει τις επιδράσεις των συγκεκριμένων μεταβολικών ομάδων στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποδεικνύουν ότι η μεταβολομική ανάλυση με ¹H NMR είναι μια εξαιρετικά χρήσιμη προσέγγιση στην προσπάθεια να αναγνωρισθούν μελλοντικά κι άλλοι σημαντικοί βιοδείκτες που αντανακλούν και αναδεικνύουν τις ευεργετικές επιδράσεις των μανιταριών στην υγεία του ανθρώπου. Η NMR μεθοδολογία σε συνδυασμό με τα εργαλεία Χημειομετρίας που αναπτύχθηκαν επιτρέπουν την αναγνώριση βιοδεικτών, σε δείγμα κοπράνων, που αποτυπώνουν τις διακυμάνσεις του μεταβολισμού του

Εντερικού Μικροβιώκοσμου συναρτήσει της Διατροφής και αντανακλούν την καλή λειτουργία ή την παθολογία του ανθρώπινου οργανισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbeele P.V.D., Wiele T.V.D., Verstraete W., Possemiers S. (2011). “Microorganisms: A Novel Concept.”
- Afanasieva K., Sivolob A. (2018). “Physical Principles and New Applications of Comet Assay.” *Biophysical Chemistry* 238: 1–7.
- Azqueta A., Slyskova J., Langie S.A.S., Gaivão I., Collins A.R. (2014). “Comet Assay to Measure DNA Repair : Approach and Applications.”: 1–8.
- Bai J., Ren Y., Li Y., Fan M. (2019). “Physiological Functionalities and Mechanisms of β -Glucans.” *Trends in Food Science & Technology* 88: 57–66.
- Bao Q., Feng J., Chen F., Mao W., Liu Z., Liu K., Liu C. (2012). “A New Automatic Baseline Correction Method Based on Iterative Method.” *Journal of Magnetic Resonance*: 35–43.
- Bastiaanssen T.F.S., Cowan C.S.M., Claesson M.J., Dinan T.G., Cryan J.F. (2019). “Making Sense of ... the Microbiome in Psychiatry.”: 37–52.
- Bhupathiraju S.N., Hu F.B. (2019). “Use of Metabolomics in Improving Assessment of Dietary Intake.”: 82–98.
- Bovee – Oudenhoven I.M.J., Termont D.S.M.L., Weerkamp A.H., Faassen – Peters M.A.W., Meer R.V.D. (1997). “Dietary Calcium Inhibits the Intestinal Colonization and Translocation Of.”: 550–57.
- Bresgen N., Eckl P. (2003). “Protective Effects of Fungal (1/3) - b - D -Glucan Derivatives against Oxidative DNA Lesions in V79 Hamster Lung Cells.”: 153–60.
- Brown A.J., Goldsworthy S.M., Barnes A.A., Eilert M.M., Tcheang L., Daniels D., Muir A. I., Wigglesworth M.J., Kinghorn I., Fraser N.J., Pike N.B., Strum J.C., Steplewski K.M., Murdock P.R., Holder J.C., Marshall F.H., Szekeres P.G., Wilson S., Ignar D.M., Foord S.M., Wise A., Dowell S.J. (2003). “The Orphan G Protein-Coupled Receptors GPR41 and GPR43 Are Activated by Propionate and Other Short Chain Carboxylic Acids * with GIRK G Protein-Regulated Potassium Channels In.”: 11312–19.
- Chen S.N., Nan F.H., Chen S., Wu J.F., Lu C.L., Soni M.G. (2011). “Safety Assessment of Mushroom b - Glucan: Subchronic Toxicity in Rodents and Mutagenicity Studies.”: 2890–98.
- Chi-Fung C.G., Keung C.W., Man-Yuen S.D. (2009). “The Effects of β -Glucan on Human Immune and Cancer Cells.”: 1–11.
- Ciecierska A., Drywień M.E., Hamulka J., Sadkowski T. (2019). “Nutraceutical Functions of beta-Glucans.”: 315–24.
- Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G., Gaivão I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C.C., Stetina R. (2008). “The Comet Assay: Topical Issues.”: 143–51.
- Cook P.R., Brazell I.A. (1975). “Supercoils in Human Dna.”: 261–79.
- Cornelis M.C., Hu F.B. (2014). “NIH Public Access.”: 1–18.

- Corrêa-Oliveira R., Fachi J.L., Vieira A., Sato F.T., Vinolo M.A.R. (2016). "Regulation of Immune Cell Function by Short-Chain Fatty Acids.": 1–8.
- Cremon C., Barbaro M.R., Ventura M., Barbara G. (2018). "Pre- and Probiotic Overview." *Current Opinion in Pharmacology*: 87–92.
- Davani-Davari D., Negahdaripour M., Karimzadeh I., Seifan M., Mohkam M., Masoumi S.J., Berenjian A., Ghasemi Y. (2019). "Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications.": 1–27.
- Du B., Meenu M., Liu H., Xu B. (2019). "A Concise Review on the Molecular Structure and Function Relationship of β -Glucan."
- Dunn W.B., Ellis D.I. (2005). "Metabolomics: Current Analytical Platforms and Methodologies." 285-294.
- El M., El H., Van Der Wel P.C.A. (2020). "Use of Solid-State NMR Spectroscopy for Investigating Polysaccharide-Based Hydrogels: A review" *Carbohydrate Polymers*: 116276.
- Flint H.J., Scott K.P., Duncan S.H., Louis P., Forano E. (2012). "Microbial Degradation of Complex Carbohydrates in the Gut.": 289–306.
- Forster S.C., Browne H.P., Anonye B.O., Kumar N., Neville B.A., Stares M.D., Goulding D., Lawley T.D. (2016). "Culturing of 'Unculturable' Human Microbiota Reveals Novel Taxa and Extensive Sporulation." *Nature*.
- Frost G., Sleeth M.L., Sahuri-Arisoylu M., Lizarbe B., Cerdan S., Brody L., Anastasovska J., Ghourab S., Hankir M., Zhang S., Carling D., Swann J.R., Gibson G., Viardot A., Morrison D., Thomas E.L., Bell J.D. (2014). "The Short-Chain Fatty Acid Acetate reduces appetite Via a Central Homeostatic Mechanism." *Nature Communications*: 1–11.
- Gabbani T., Marsico M., Bernini P., Lorefice E., Grappone C., Biagini M.R., Milani S., Annese V. (2017). "Metabolomic Analysis with $^1\text{H-NMR}$ for Non-Invasive Diagnosis of Hepatic Fibrosis Degree in Patients with Chronic Hepatitis C." *Digestive and Liver Disease*: 1338-1344.
- Gajski G., Gerić M., Semren T.Ž., Lovaković B.T., Oreščanin V., Pizent A. (2020). "Application of the Comet Assay for the Evaluation of DNA Damage from Frozen Human Whole Blood Samples: Implications for Human Biomonitoring.": 58–65.
- Genneback N., Malm L., Hellman U., Waldenström A., Mörner S. (2013). "Using OPLS-DA to Find New Hypotheses in Vast Amounts of Gene Expression Data — Studying the Progression of Cardiac Hypertrophy in the Heart of Aorta Ligated Rat." *Gene*: 27–36.
- Gibson G.R., Scott K.P., Rastall R.A., Tuohy K.M., Hotchkiss A., Dubert-Ferrandon A., Gareau M., Murphy E.F., Saulnier D., Loh G., Macfarlane S., Delzenne N., Ringel Y., Kozianowski G., Dickmann R., Lenoir-Wijnkoop I., Walker C., Buddington R. (2010). "Dietary Prebiotics: Current Status and New Definition.": 1–19.
- Graaff P., Govers C., Wichers H., Debets R. (2018). "Consumption of β -Glucans to Spice up T Cell Treatment of Tumors." *Expert opinion on biological therapy*.
- Grajek W., Olejnik A., Sip A. (2005). "Probiotics, Prebiotics and Antioxidants as Functional Foods.": 665–71.

- Greenblum S., Turnbaugh P.J., Borenstein E. (2011.) “Metagenomic Systems Biology of the Human Gut Microbiome Reveals Topological Shifts Associated with Obesity and in Inflammatory Bowel Disease.”
- Hamer H.M., Jonkers D., Venema K., Vanhoutvin S., Troost F.J., Brummer R.J. (2008). “The Role of Butyrate on Colonic Function.”: 104–19.
- Hutkins R.W., Krumbeck J.A., Bindels L.B., Cani P.D., Fahey G.J., Goh Y.J., Hamaker B., Martens E.C., Mills D.A., Rastal R.A., Vaughan E., Sanders M.E. (2016). “Prebiotics: Why Definitions Matter.”: 1–7.
- Huttenhower C., Gevers D., Knight R., Abubucker S., Badger J.H., Chinwalla A.T., Creasy H.H., Earl A.M., Fitzgerald M.G., Fulton R.S., Giglio M.G., Hallsworth-Pepin K., Lobos E.A., Madupu R., Venter A., Wills R.K., White O. (2012). “Structure, Function and Diversity of the Healthy Human Microbiome.” *Nature*: 207–14.
- Jaeger D., Winkler A., Mussgnug J.H., Kalinowski J., Goesmann A., Kruse O. (2017). “Time - Resolved Transcriptome Analysis and Lipid Pathway Reconstruction of the Oleaginous Green Microalga *Monoraphidium Neglectum* Reveal a Model for Triacylglycerol and Lipid Hyperaccumulation.” *Biotechnology for Biofuels*: 1–34.
- Jaroszewski J.W., Berenstein D., Sløk F.A., Simonsen P.E., Agger M.K. (1996). “Determination of Diethylcarbamazine, an Antifilarial Drug, in Human Urine by ¹H-NMR Spectroscopy.”: 543–49.
- Jayachandran M., Xiao J., Xu B. (2017). “A Critical Review on Health Promoting Benefits of Edible Mushrooms through Gut Microbiota.” *International Journal of Molecular Sciences*.
- Karu N., Deng L., Slae M., Guo An C., Sajed T., Huynh H., Wine E., Wishart D.S. (2018). “A Review on Human Fecal Metabolomics: Methods, Applications and the Human Fecal Metabolome Database.” *Analytica Chimica Acta*: 1–24.
- Kerche-Silva L.E., Cólus I.M.S., Malini M., Mori M.P., Dekker R.F.H., Barbosa-Dekker A.M. (2017). “*In vitro* protective effects of botryosphaeran, a (1 → 3;1 → 6)-β-D-glucan, against mutagens in normal and tumor rodent cells.” *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*: 29–36.
- Kobayashi N., Takahashi D., Takano S., Kimura S. (2019). “The Roles of Peyer’s Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases.”: 1–15.
- Koutrotsios G., Patsou M., Mitsou K. E., Bekiaris G., Kotsou M., Tarantilis A.P., Pletsas V., Kyriacou A., Zervakis I.G. (2019). “Valorization of Olive By-Products as Substrates for the Cultivation of *Ganoderma Lucidum* and *Pleurotus Ostreatus* Mushrooms with Enhanced Functional and Prebiotic Properties.”
- Kurosu H., Ookubo T., Tuchiya H., Ando I., Watanabe J. (2001). “Polar Packing Structure in Copolyester Comprising 4-Hydroxy Benzoic Acid and 6-Hydroxy-2-Naphthoic Acid as Studied by High Resolution Solid State ¹³C NMR Spectroscopy and Quantum Chemistry.”: 153–62.
- Kusmann M., Affolter M. (2006). “OMICS-Driven Biomarker Discovery in Nutrition and Health.”: 758–87.

- Lam K.L., Keung H.Y., Ko K.C., Kwan H.S., Cheung P.C.K. (2018). "In Vitro Fermentation of Beta-Glucans and Other Selected Carbohydrates by Infant Fecal Inoculum: An Evaluation of Their Potential as Prebiotics in Infant Formula." *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*: 20–24.
- Lam K.L., Cheng W.Y., Su Y., Li X., Wu X., Wong K.H., Kwan H.S., Cheung P.C.K. (2020). "Use of Random Forest Analysis to Quantify the Importance of the Structural Characteristics of Beta-Glucans for Prebiotic Development." *Food Hydrocolloids*: 106001.
- Landete J.M., Arqués J., Medina M., Gaya P., Rivas B., Muñoz R. (2016). "Bioactivation of Phytoestrogens: Intestinal Bacteria and Health." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*: 1826–43.
- Langie S.A.S., Azqueta A., Boutet-Robinet E., Duthie S., Ladeira C., Møller P., Collins A.R., Godschalk R.W.L. (2019). "DNA Repair as a Human Biomonitoring Tool: Comet Assay Approaches." *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*: 71–87.
- Laroche C., Michaud P. (2007). "New Developments and Prospective Applications for β (1, 3) Glucans.": 59–73.
- Li W., Yang Q., Liu X. (2018). "Application of Metabolomics in Cancer Research: As a Powerful Tool to Screen Biomarker for Diagnosis, Monitoring and Prognosis of Cancer Abstract The Overview of Metabolomics The Application of Metabolomics in Cancer." *IMedPub Journals*: 1–8.
- Li W., Deng Y., Chu Q., Zhang P. (2019). "Gut Microbiome and Cancer Immunotherapy." *Cancer Letters*: 41–47.
- Linus P., Robinson A.B., Teranishi R., Cary P. (1971). "Quantitative Analysis of Urine Vapor and Breath by Gas-Liquid Partition Chromatography.": 2374–76.
- Lv X.C. (2019). "Polysaccharide Peptides from Ganoderma Lucidum Ameliorate Lipid Metabolic Disorders and Gut Microbiota Dysbiosis in High-Fat Diet-Fed Rats.": 48–58.
- Maathuis A., Rajilic-Stojanovic M., Heilig H.G.H.J., Venema K., Willem M.V., Smidt H. (2010). "Evaluating the Microbial Diversity of an in Vitro Model of the Human Large Intestine by Phylogenetic Microarray Analysis.": 3270–81.
- Maccaferri S., Klinder A., Cacciatore S., Chitarrari R., Honda H., Luchinat C., Bertini I., Carnevali P., Gibson G.R., Brigidi P., Costabile A. (2012). "In Vitro Fermentation of Potential Prebiotic Flours from Natural Sources: Impact on the Human Colonic Microbiota and Metabolome." *Molecular Nutrition and Food Research*: 1342–52.
- Macfarlane G.T., Macfarlane S. (2007). "Models for Intestinal Fermentation: Association between Food Components, Delivery Systems, Bioavailability and Functional Interactions in the Gut.": 156–62.
- Madrigal-Bujaidar E., Morales-González J.A., Sánchez-Gutiérrez M., Izquierdo-Vega J.A., Reyes-Arellano A., Álvarez-González I., Pérez-Pasten R., Madrigal-Santillán E. (2015). "Prevention of Aflatoxin B1-Induced DNA Breaks by β -D-Glucan.": 2145–58.
- Marchesi J.R., Adams D.H., Fava F., Gerben D.A.H., Hirschfield G.M., Hold G., Nabil Q.M., Kinross J., Smidt H., Tuohy K.M., Thomas L.V., Zoetendal E.G., Hart A. (2016). "The Gut Microbiota and

- Host Health: A New Clinical Frontier.”: 330–39.
- Marín L., Miguélez E.M., Villar C.J., Lombó F. (2015). “Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties.”
- Markowiak P., Śliżewska K. (2017). “Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health.” *Nutrients*.
- Matich E.K., Chavez S.N.G., Aga D.S., Atilla-Gokcumen G.E. (2019). “Applications of Metabolomics in Assessing Ecological Effects of Emerging Contaminants and Pollutants on Plants.” *Journal of Hazardous Materials*: 527–35.
- Mcbain A.J., Macfarlane G.T.Å. (2001). “Modulation of Genotoxic Enzyme Activities by Non- Digestible Oligosaccharide Metabolism in in-Vitro Human Gut Bacterial Ecosystems.”: 50.
- Minafra L., Di Cara G., Albanese N.N., Cancemi P. (2011). “Proteomic Differentiation Pattern in the U937 Cell Line.” *Leukemia Research*: 226–36.
- Mousavi K.A., Abhari K., Eş I., Soares M.B., Oliveira R.B.A., Hosseini H., Rezaei M., Balthazar C.F., Silva R., Cruz A.G., Ranadheera C.S., Sant’Ana A.S. (2020) . “Interactions between Probiotics and Pathogenic Microorganisms in Hosts and Foods: A Review.” *Trends in Food Science & Technology*: 205–18.
- Mrówczyńska M., Sztubecki J., Greinert A. (2020). “Compression of Results of Geodetic Displacement Measurements Using the PCA Method and Neural Networks.” *Measurement*: 107693.
- Nuenen M.H.M.C, Diederick M.P., Venema K. (2009). “The Effect of Various Inulins and Clostridium Difficile on the Metabolic Activity of the Human Colonic Microbiota in Vitro.” *Microbial Ecology in Health and Disease*: 2235.
- Olano M.E., Mountzouris K.C., Gibson G.R., Rastall R.A. (2012.) “In Vitro Fermentability of Dextran, Oligodextran and Maltodextrin by Human Gut Bacteria.” *British Journal of Nutrition*: 246–55.
- Oliphant K., Allen-Vercoe E. (2019). “Macronutrient Metabolism by the Human Gut Microbiome: Major Fermentation by- Products and Their Impact on Host Health.”: 1–15.
- Ortwin S. (2006). “Micro-Organisms as Feed Additives – Probiotics.”: 161–67.
- Ostling D., Johanson K.J. (1984). “Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells.”: 291–98.
- Ouwehand A.C., De Vos W.M., Derrien M., Tiihonen K. (2005). “Prebiotics and Other Microbial Substrates for Gut Functionality.”: 212–17.
- Payne A.N., Zihler A., Chassard C., Lacroix C. (2012). “Advances and Perspectives in in Vitro Human Gut Fermentation Modeling.” *Trends in Biotechnology*: 17–25.
- Plazar J., Zegura B., Lah T.T., Filipi M. (2007). “Protective Effects of Xanthohumol against the Genotoxicity of (IQ) and Tert- Butyl Hydroperoxide (t -BOOH) in HepG2 Human Hepatoma Cells.”: 1–8.
- Plummer N., Bull M. (2014). “Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease.” *Integrative*

- Poetsch A.R. (2020). “The Genomics of Oxidative DNA Damage , Repair , and Resulting Mutagenesis.” *Computational and Structural Biotechnology Journal: 207–19.*
- Possemiers S., Rabot P.S., Espín J.C., Bruneau A., Philippe C., González-Sarrías A., Heyerick A., Tomas-Barberan F.A., De Keukeleire D., Verstraete W. (2008). “Eubacterium Limosum Activates Isoxanthohumol from Hops (*Humulus Lupulus* L.) into the Potent Phytoestrogen 8-Prenylnaringenin In Vitro and in Rat Intestine.” *The Journal of Nutrition: 1310-6.*
- Pugin B., Barcik W., Westermann P., Heider A., Wawrzyniak M., Hellings P., Akdis C.A., O’Mahony L. (2017). “A Wide Diversity of Bacteria from the Human Gut Produces and Degrades Biogenic Amines.” *Microbial Ecology in Health and Disease.*
- Rasjidi I., Susanto C. (2015). “Ganoderma Lucidum Polysaccharide Peptide (GLPP) for the Cancer Treatment.” *Indonesian Journal of Clinical Pharmacy: 120–28.*
- Riss T.L., Moravec R.A., Niles A.L., Duellman S., Benink H.A., Worzella T.J., Minor L. (2016). “Cell Viability Assays (Promega).” *Assay Guidance Manual.*
- Rooi J.J., Eilers P.H.C. (2012). “Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems Mixture Models for Baseline Estimation.” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems: 56–60.*
- Roselet S.L., Kumari J.P. (2020). “H NMR – A Validation Tool for Supramolecular Complexes of a Cyclodextrin with Antidiabetic Drugs.” *Materials Today: Proceedings: 4–9.*
- Rycroft C.E., Jones M.R. , Gibson G.R. , Rastall R.A. (2001). “A Comparative in Vitro Evaluation of the Fermentation Properties of Prebiotic Oligosaccharides.” *Journal of Applied Microbiology: 878–87.*
- Salonen T., Ahrens B., Bovens M., Eliaerts J., Huhtala S., Nordgaard A., Alberink I. (2020). “Chemometrics in Forensic Chemistry — Part II: Standardized Applications – Three Examples Involving Illicit Drugs.” *Forensic Science International: 110138.*
- Sambuy Y., Angelis I.De, Ranaldi G., Scarino M.L. , Stamatii A. , Zucco F. (2005). “The Caco-2 Cell Line as a Model of the Intestinal Barrier: Influence of Cell and Culture-Related Factors on Caco-2 Cell Functional Characteristics.” *Cell Biology and Toxicology: 1–2.*
- Sawangwan T., Wansanit W., Pattani L., Noysang C. (2018). “Study of Prebiotic Properties from Edible Mushroom Extraction.” *Agriculture and Natural Resources: 519–24.*
- Sekirov I., Russell S.L., Caetano A.L.M., Finlay B.B. (2019). “Gut Microbiota in Health and Disease.”: 859–904.
- Silva-Sena G.G., Malini M., Delarmelina J.M., Vencioneck D.J.C., Gervásio S.V., Soares L.M.A., Costa P.T.M., Barbosa-Dekker A.M., Dekker R.F.H., Paula F., Pimentel B.M.C. (2018). “In Vivo Antimutagenic and Antiatherogenic effects of the (1→3)(1→6)-β-D-Glucan Botryosphaeran.” *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis: 6–14.*
- Singh P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988). “Technique for Quantitation Damage in Individual of Low Levels of DNA Cells.”: 184–91.
- Smith C.C., Donovan M.R.O., Martin E.A. (2006). “HOGG1 Recognizes Oxidative Damage Using the

Comet Assay with Greater Specificity than FPG or ENDOIII.”: 185–90.

- Smolinska A., Blanchet L., Buydens L.M.C., Wijmenga S.S. (2012). “NMR and Pattern Recognition Methods in Metabolomics : From Data Acquisition to Biomarker Discovery: A Review.” *Analytica Chimica Acta*: 82–97.
- Souza-Silva M.P., Sousa R.V., Simão A.A., Cesar P.H.S., Trento M.V.C., Marcussi S. (2018). “Protective Effect of β -D-Glucan and Glutamine on the Genomic Instability Induced by Cytarabine / Ara-C in BALB / c Mice.” *International Journal of Biological Macromolecules*: 559–64.
- Steliou K., Boosalis M.S., Perrine S.P., Faller D.V. (2012). “Butyrate Histone Deacetylase Inhibitors.”: 192–98.
- Sun X., Jia Z. (2018). “Microbiome Modulates Intestinal Homeostasis against in Fl Ammatory Diseases.” *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 97–105.
- Tohamy A.A., El-Ghor A.A., Nahas S.M.E., Noshay M.M. (2003). “Beta-Glucan Inhibits the Genotoxicity of Cyclophosphamide, Adriamycin and Cisplatin.” *Mutation research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*: 45—53.
- Tsvetkova S.A., Koshel E.I. (2020). “ Microbiota and cancer: host cellular mechanisms activated by gut microbial metabolites.” *International Journal of Medical Microbiology*: 151425.
- Turunen K.T., Pletsas V., Georgiadis P., Triantafyllidis J.K. , Karamanolis D., Kyriacou A. (2016). “Impact of β -Glucan on the Fecal Water Genotoxicity of Polypectomized Patients.” *Nutrition and cancer*: 560—567.
- 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*: 103855.
- Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Goncalves D., Vinera J., Zitoun C., Duchamp A., Bäckhed F., Mithieux G. (2013). “Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits.” *Cell*: 84-96
- Vaikousi H., Biliaderis C.G., Izydorczyk M.S. (2004). “Solution Flow Behavior and Gelling Properties of Water-Soluble Barley (1/3, 1/4) - β -Glucans Varying in Molecular Size.”: 119–37.
- Venema K., Abbeele P.V.D. (2013). “Experimental Models of the Gut Microbiome.” *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*: 115–26.
- Vetvicka V., Vetvickova J. (2007). “Physiological effects of different types of β -Glucan.”: 225–31.
- Villas-Boas S.G. (2013). “Analytical Techniques & Applications of Metabolomics in Systems Medicine and Systems Biotechnology.” *Computational and Structural Biotechnology*: 1.
- Wiklund S., Johansson E., Sjöström L., Mellerowicz E.J., Edlund U., Shockcor J.P., Gottfries J., Moritz T., Trygg J. (2008). “Visualization of GC / TOF-MS-Based Metabolomics Data for Identification of Biochemically Interesting Compounds Using OPLS Class Models.”: 115–22.
- Workentine M.L., Harrison J.J., Weljie A., Tran V.A., Stenroos P., Tremaroli V., Vogel H.J., Ceri H.,

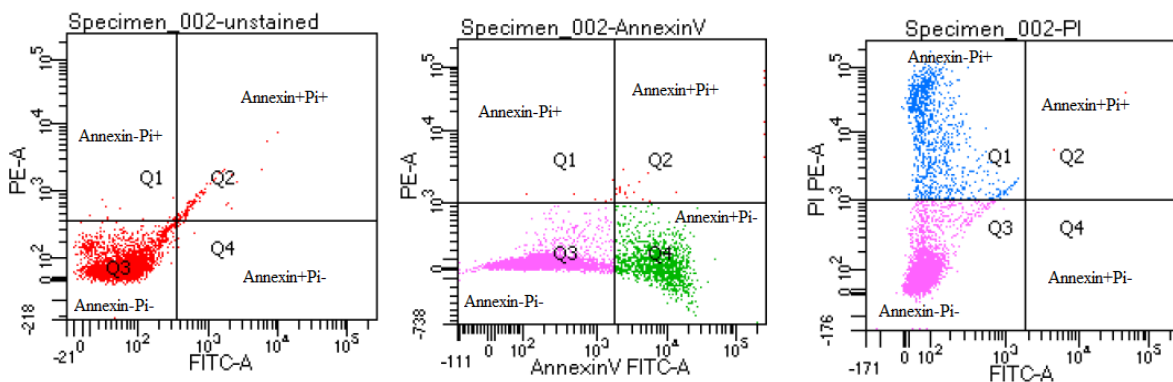
- Turner R.J. (2010). "Phenotypic and Metabolic Profiling of Colony Morphology Variants Evolved from *Pseudomonas Fluorescens* Biofilms.": 1565–77.
- Worley B., Powers R. (2015). "Generalized Adaptive Intelligent Binning of Multiway Data." *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*: 42–46.
- Yamazawa A., Moriya S., Kikuchi J. (2012). "Metabolic Sequences of Anaerobic Fermentation on Glucose-Based Feeding Substrates Based on Correlation Analyses of Microbial and Metabolite Profiling."
- Yang J., Martínez I., Walter J., Keshavarzian A., Rose D.J. (2013). "In vitro Characterization of the Impact of Selected Dietary Fibers on Fecal Microbiota Composition and Short Chain Fatty Acid Production." *Anaerobe*: 74–81.
- Zervakis G.I., Dimou D.M., Polemis E. (2004). "Fungal Diversity and Conservation in the Mediterranean Area: Recent Advances in the Inventory of Greek Macromycetes."
- Zhang A., Sun H., Wang P., Han Y., Wang X. (2011). "Recent and Potential Developments of Biofluid Analyses in Metabolomics." *Journal of Proteomics*: 1079–88.
- Zhang Z., Zhang S., Yang J., Yi P., Xu P., Yi M., Peng W. (2020). "Integrated Transcriptomic and Metabolomic Analyses to Characterize the Anti-Cancer effects of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate in Human Colon Cancer Cells." *Toxicology and Applied Pharmacology*: 115100.
- Zhu F., Du B., Bian Z., Xu B. (2015). "β-Glucans from Edible and Medicinal Mushrooms: Characteristics, Physicochemical and Biological Activities." *Journal of Food Composition and Analysis*: 165–73.
- Zhu F., Du B., Bian Z., Xu B. (2016). "A Critical Review on Production and Industrial Applications of Beta- Glucans." *Food hydrocolloids*: 275–88.
- Zimmermann C.E.P., Cruz I.B.M., Cadoná F.C., Machado A.K., Assmann C., Schlemmeret K.B., Zanette R.A., Leal D.B.R., Santurio J.M. (2015). "Cytoprotective and Genoprotective Effects of β-Glucans against Aflatoxin B1 -Induced DNA Damage in Broiler Chicken Lymphocytes." *Toxicology In Vitro*: 538–43.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Προσδιορισμός του είδους του κυτταρικού θανάτου στις κυτταρικές σειρές U-937 και Caco-2

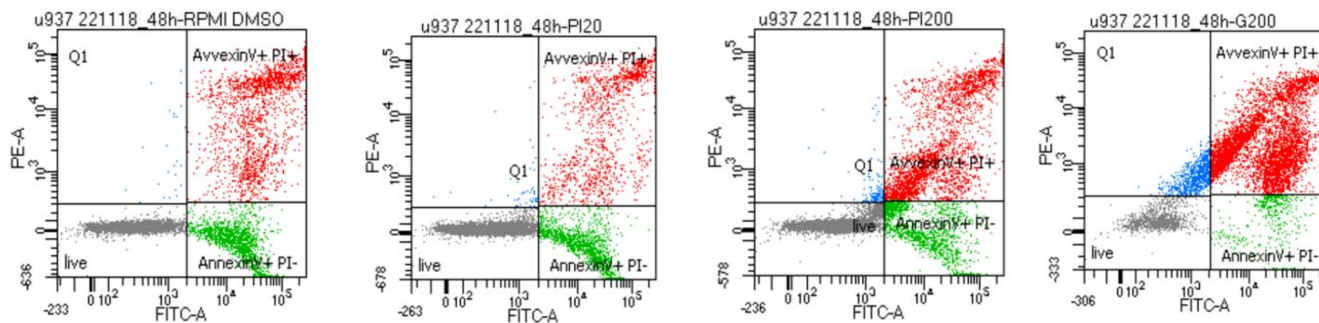
Διερευνήθηκε το είδος του κυτταρικού θανάτου (νέκρωση ή απόπτωση) που παρατηρήθηκε στις κυτταρικές σειρές Caco-2 και U-937 με κυτταρομετρία ροής (FACS) καθώς και με ανοσοστύπωμα κατά Western.

Σε αποπτωτικά κύτταρα, το φωσφολιπίδιο της μεμβράνης φωσφατιδυλοσερίνη (phosphatidylserine, PS) μετατοπίζεται από το εσωτερικό προς το εξωτερικό στρώμα της πλασματικής μεμβράνης, εκθέτοντας το PS στο εξωτερικό κυτταρικό περιβάλλον. Η αννεξίνη V (Annexin V) είναι μια πρωτεΐνη 35-36 kDa με Ca^{2+} -εξαρτώμενη σύνδεση σε φωσφολιπίδια. Έχει υψηλή συγγένεια για PS και δεσμεύεται στην εκτεθειμένη PS στην αποπτωτική κυτταρική επιφάνεια. Έπειτα από χρώση των κυττάρων με αννεξίνη V-FITC και ιωδιούχο προπίδιο (PI), τα αποτελέσματα έδειξαν πως ο θάνατος των εν λόγω κυττάρων οφείλεται κυρίως σε νέκρωση. Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικά τα γραφήματα που απεικονίζουν δοκιμές των μαρτύρων – δειγμάτων αναφοράς για κάθε κυτταρική σειρά, όπου δεν είχε προηγηθεί συγκαλλιέργεια με λυοφιλωμένα μανιτάρια (Εικόνα I.1.). Δεν παρατηρούνται νεκρωτικά κύτταρα, δηλαδή κύτταρα διπλά θετικά για αννεξίνη V-FITC και PI, μιας και τα κύτταρα που δε συγκαλλιεργούνται με κάποιον κυτταροτοξικό παράγοντα, ακολουθούν τη φυσιολογική αποπτωτική οδό κυτταρικού θανάτου.



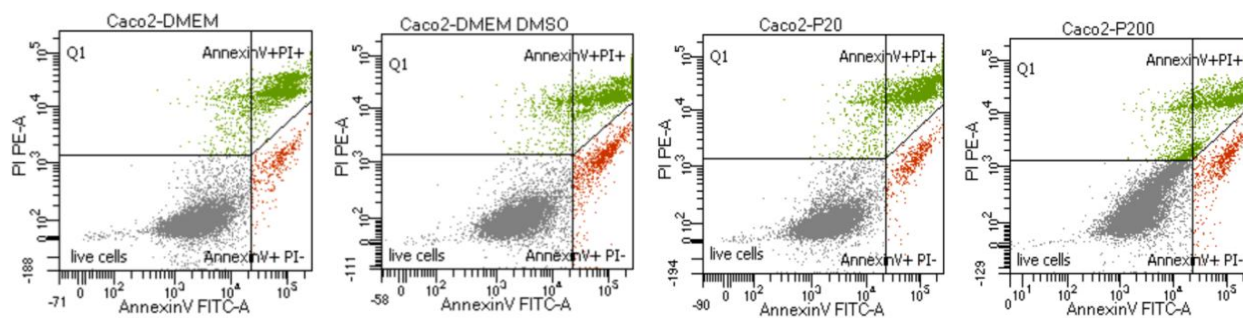
Εικόνα I.1.: Στο πρώτο γράφημα από αριστερά τα κύτταρα είναι στην πλειονότητά τους ζωντανά, δηλαδή διπλά αρνητικά για αννεξίνη V-FITC και PI. Στο μεσαίο γράφημα, πέραν των ζωντανών κυττάρων, εμφανίζονται και κύτταρα με πρόωμη απόπτωση, δηλαδή θετικά για αννεξίνη V-FITC και αρνητικά για PI. Στο τελευταίο γράφημα, πέραν των ζωντανών κυττάρων, εμφανίζονται αρνητικά για αννεξίνη V-FITC και θετικά για PI. Κύτταρα με ώριμη απόπτωση-νεκρωτικά, δηλαδή διπλά θετικά για αννεξίνη V-FITC και PI υπάρχουν σε μικρό ποσοστό.

Κατά το νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, η έκθεση του PS συμπίπτει με τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης σε PI. Κατά συνέπεια, τα κύτταρα μετακινούνται αμέσως από το κάτω αριστερό τεταρτημόριο (AnnexinV-/PI-) στο άνω δεξιό τεταρτημόριο του γραφήματος (AnnexinV+/PI+), δίχως να περάσουν από το ενδιάμεσο στάδιο AnnexinV+/PI-. Πράγματι, στα παρακάτω γραφήματα είναι φανερό πως ένα υψηλό ποσοστό κυττάρων εντοπίζεται με AnnexinV+/PI+ και ιδιαίτερα για τα U-937 κύτταρα, με τις υψηλές συγκεντρώσεις μανιταριών (P200, G200). Παρόλο που ορισμένα U-937 κύτταρα ακολουθούν και την αποπτωτική οδό (AnnexinV+/PI-), το αντίστοιχο ποσοστό αποπτωτικών Caco-2 κυττάρων είναι αρκετά μειωμένο, με τη νεκρωτική οδό να υπερισχύει τόσο για κύτταρα που είχαν επωαστεί με τη μικρότερη συγκέντρωση *Pleurotus ostreatus* (P20) όσο και για κύτταρα που είχαν επωαστεί με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση *Pleurotus ostreatus* 1123 (P200) (Εικόνα I.2., I.3.).



Εικόνα I.2.: Στα γραφήματα εμφανίζεται σε 48 ώρες ο πληθυσμός U-937 κυττάρων που είτε είναι ζωντανά είτε έχουν μπει στην αποπτωτική οδό κυτταρικού θανάτου (AnnexinV+/PI-) είτε στη νεκρωτική οδό (AnnexinV+/PI+). Το ποσοστό κυττάρων με νέκρωση είναι αρκετά υψηλότερο από το ποσοστό κυττάρων με απόπτωση, κυρίως για κύτταρα που είχαν επωαστεί με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση *Pleurotus ostreatus* 1123 (P200) και *Ganoderma lucidum* (G200).

P20: *Pleurotus ostreatus* 1123 20μg/mL, P200: *Pleurotus ostreatus* 1123 200μg/mL, G200: *Ganoderma lucidum* 200μg/mL

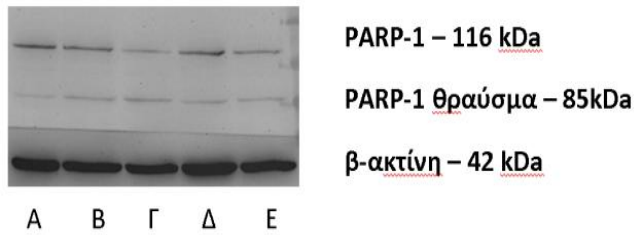


Εικόνα I.3.: Στα γραφήματα εμφανίζεται σε 48 ώρες ο πληθυσμός Caco-2 κυττάρων που είτε είναι ζωντανά είτε έχουν μπει στην αποπτωτική οδό κυτταρικού θανάτου (AnnexinV+/PI-) είτε στη νεκρωτική οδό (AnnexinV+/PI+). Το ποσοστό κυττάρων με νέκρωση είναι μεν υψηλό, όμως, αρκετά κύτταρα παρέμειναν ζωντανά. Νεκρωτική επίδραση παρουσίασε η επώαση με *Pleurotus ostreatus* 1123.

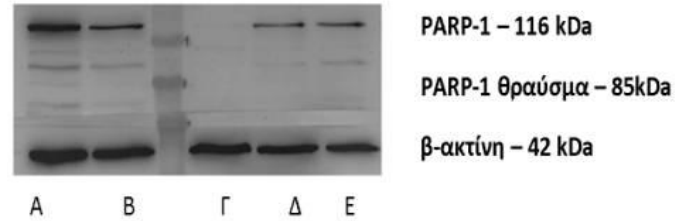
P20: *Pleurotus ostreatus* 1123 20μg/mL, P200: *Pleurotus ostreatus* 1123 200μg/mL

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με ανοσοστύπωμα κατά Western της πυρηνικής πρωτεΐνης PARP-1 και της Caspase-3. Η PARP-1 είναι μια πρωτεΐνη της οποίας η πρωτεόλυση από ενεργοποιημένες κασπάσες (στην προκειμένη περίπτωση από το ενεργό θραύσμα της Caspase-3 των 17/19 kDa) προς ένα θραύσμα 85kDa είναι δείκτης αποπτωτικού θανάτου. Η ανοσοαποτύπωση έδειξε πως ο κυτταρικός θάνατος δεν είναι αποπτωτικός, μιας και δεν εντοπίστηκε σε καμία από τις δύο κυτταρικές σειρές που εξετάστηκαν το θραύσμα των 85kDa της πρωτεΐνης PAPR-1, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της κυτταρομετρίας ροής (**Εικόνα I.4.**). Η ανοσοαποτύπωση για την πρωτεολυμένη πρωτεΐνη Caspase-3 κατέδειξε το ενεργό θραύσμα σε Caco-2, όμως στα U-937 κύτταρα δεν είναι εμφανές, κάτι που πιθανότατα οφείλεται σε κάποιο τεχνικό σφάλμα.

(i) Caco2



(ii) U937



Εικόνα 1.4.: Προσδιορισμός κυτταρικού θανάτου με ανοσοαποτύπωμα κατά Western. Ανίχνευση πρωτεολυτικής πέψης της PARP1 σε εκχυλίσματα που προέρχονταν από (i) κύτταρα εντερικού επιθηλίου Caco-2 και (ii) ανθρώπινα προ-μονοκύτταρα U-937. Και στις δύο κυτταρικές σειρές χορηγήθηκε διαλυτοποιημένη σε DMSO μορφή ολόκληρων μανιταριών των ειδών *Ganoderma lucidum* και *Pleurotus ostreatus* 1123, σε συγκεντρώσεις 20μg/mL, 200μg/mL για 48 ώρες. Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς την επίδραση των μανιταριών, ενώ η β-ακτίνη (42kDa) χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικός ποσοτικός μάρτυρας.

A=DMEM στα Caco-2 (i) και RPMI στα U-937 (ii), B=Pleurotus ostreatus 1123 20μg/mL, Γ=Pleurotus ostreatus 1123 200μg/mL, Δ=Ganoderma lucidum 20μg/mL, E=Ganoderma lucidum 200μg/mL.