



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ «Εφαρμοσμένη Διαιτολογία-Διατροφή»

Κατεύθυνση: Διατροφή και Δημόσια Υγεία

**Διπλωματική εργασία με τίτλο: «Επίδραση υποψήφιων προβιοτικών στελεχών
σε μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή»**

Όνομα φοιτητή: Παπασπύρου Νίκη

Όνομα επιβλέπουσας καθηγήτριας: Κυριακού Αδαμαντίνη

Τριμελής επιτροπή: Κυριακού Αδαμαντίνη

Αντωνοπούλου Σμαραγδή

Φραγκοπούλου Ελισάβετ

Αθήνα, 2017

Η φοιτήτρια Παπασπύρου Νίκη δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας, του τμήματος επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου Αθηνών, με επιβλέπουσα την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στη Μικροβιολογία Κυριακού Αδαμαντίνη. Θα ήθελα λοιπόν να την ευχαριστήσω για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος, για την υποστήριξη και την καθοδήγηση της καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής εργασίας.

Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την καθηγήτρια Δρ. Αντωνοπούλου Σμαραγδή και την επίκουρη καθηγήτρια Δρ. Φραγκοπούλου Ελισάβετ.

Θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Κώτσου Μαρία για την υποστήριξη, τις συμβουλές και τις πολύτιμες γνώσεις της.

Ακόμα, θα ήθελα να εκφράσω ευχαριστίες στη διδακτορική ερευνήτρια Μήτσου Ευδοκία για τη βοήθεια, την αμέριστη συμπαράσταση και την υπομονή της.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στη φοιτήτρια Τραγάρη Πελαγία για την εξαιρετική συνεργασία και τη βοήθεια της κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	10
Abstract.....	10-11
Εισαγωγή	
1.1 Ο εντερικός μικροβιόκοσμος	10
1.2 Σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου.....	10-11
1.3. Λειτουργίες του εντερικού μικροβιόκοσμου	11-12
1.4 Ο εντερικός μικροβιόκοσμος και η διατήρηση της ομοιόστασης	12-13
1.5 Προγεννητική μικροβιακή έκθεση	13-14
1.6 Μικροβιακός αποικισμός και ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης.....	14-15
1.7 Ο ρόλος του εντερικού μικροβιόκοσμου στην υγεία του ξενιστή	15-16
1.8 Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο	16-17
<u>2. Το ανοσοποιητικό σύστημα</u>	
2.1 Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος	18
2.2 Εγγενής και επίκτητη ανοσία	18-19
2.3 Ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα και κύτταρα φυσικοί φονείς.....	19-20
2.4 Μόρια προσκόλλησης	20
2.5 Ο ρόλος της φλεγμονής στο ανοσοποιητικό σύστημα	20-22
2.6 Κυτταροκίνες	22
2.6.1. Τι είναι οι κυτταροκίνες	22
2.6.2. Κατηγορίες κυτταροκινών	22-23
2.6.3. Βασικές λειτουργίες των κυτταροκινών	23
2.6.4. Ο ρόλος τους στην ανοσία και τη φλεγμονή	24-26
<u>3. Προβιοτικά</u>	
3.1. Ορισμός	27
3.2. Προβιοτικές ιδιότητες	27
3.2.1. Η επίδραση τους στον εντερικό μικροβιόκοσμο	27-30
3.2.2. Προσκόλληση των προβιοτικών στο βλεννογόνο και σε επιθηλιακά κύτταρα	30-31

3.2.3 Διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού	32-34
3.2.4. Επίδραση στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων	34
3.2.5. Ανθεκτικότητα στα χολικά άλατα	34-35
3.2.6. Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά	35-36
3.2.7. Αντιμικροβιακή δράση	36
3.2.8. Παραγωγή Μονοξειδίου του αζώτου (NO)	36-39
3.3. Το γένος <i>Lactobacillus</i>	39
3.4. Η επίδραση των λακτοβακίλλων στην ανοσία του ξενιστή	39
3.4.1. Λακτοβάκιλλοι και ρύθμιση της έκκρισης των κυτταροκινών	39-43
3.4.2. Η επίδραση τους στους TLR-υποδοχείς	43-44
4. Σκοπός	44
5.Υλικά και μέθοδοι	45
5.1 Καλλιέργεια λακτοβακίλλων	45
5.2. Καλλιέργεια επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (Caco-2)	45-46
5.3. Προετοιμασία των λακτοβακίλλων	46-47
5.4. Προετοιμασία των κυττάρων Caco-2 για την συν-επώαση	47
5.5 Συν-επώαση λακτοβακίλλων με τα Caco-2	47-48
5.6. Καταμέτρηση εμβολίου-λακτοβακίλλων	48
5.7. Θερμικώς απενεργοποιημένοι λακτοβάκιλλοι	48
5.8. Καταμέτρηση κυττάρων Caco-2	48
5.9. Μέτρηση NO	49-50
5.10. Μέτρηση ιντερλευκίνης-6	50-52
6. Στατιστική ανάλυση	52-53
7. Αποτελέσματα	
7.1 Καταμέτρηση NO	53-57
7.2. Παραγωγή ιντερλευκίνης-6	57-62
7.3 Βιωσιμότητα	62-66
8. Συζήτηση	66-69
9. Βιβλιογραφία	70-77

Περίληψη

Εισαγωγή: Ο εντερικός μικροβιόκοσμος, το σύνολο των μικροοργανισμών που εποίκίζουν το έντερο, διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Βακτήρια, όπως τα προβιοτικά φαίνεται ότι μπορούν να επηρεάσουν τους μηχανισμούς άμυνας του ανθρώπου. Πιθανοί μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών είναι η ικανότητα προσκόλλησης τους στην επιφάνεια του εντερικού αυλού, η βελτίωση της λειτουργίας του φραγμού του βλεννογόνου και η συμμετοχή τους στη φυσική και επίκτητη ανοσία.

Σκοπός: Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό να διερευνήσει την ανοσορρυθμιστική δράση που πιθανόν έχουν ορισμένα υποψήφια προβιοτικά στελέχη από τα είδη *L.rhamnosus*, *L.gasseri* και *L.delbrueckii*. Συγκεκριμένα, θα εξεταστεί η *in-vitro* επίδραση αυτών των στελεχών σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2) στην έκκριση κυτταροκινών και στην παραγωγή NO.

Υλικά-μέθοδοι: Καλλιεργήθηκαν σε αναερόβιες συνθήκες 4 στελέχη του *L.rhamnosus* (C44, C58, AnLb11, AnLb15), 6 στελέχη του *L.gasseri* (C28, C32, C45, C59, C72, C74) και ένα στέλεχος του *L.delbrueckii* (AnLb18), τα οποία έχουν απομονωθεί από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών νεογνών, έχουν εξεταστεί για προβιοτικές ιδιότητες και ανήκουν στη συλλογή του ΕΒΒΙΦΑΜ. Τα μικροβιακά στελέχη επώαστηκαν με επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2) μέσω των ακόλουθων χειρισμών: συνεπώαση των κυττάρων με τα πιθανά προβιοτικά στελέχη για 2 ώρες, συνεπώαση με τα αντίστοιχα θερμικώς απενεργοποιημένα στελέχη για 2 και 24 ώρες. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο και στα δείγματα που προέκυψαν μετρήθηκε η συγκέντρωση ιντερλευκίνης- 6 (IL-6) από τα κύτταρα, με τη μέθοδο Elisa καθώς και η έκλυση ενεργών μορφών αζώτου με βάση την αντίδραση των δειγμάτων με το αντιδραστήριο Griess. Ακόμα, υπολογίστηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την επώαση τους με τα προβιοτικά με τη μέθοδο trypan-blue. Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το *L.acidophilus* DSMZ20079 και το *L.rhamnosus* GG .

Αποτελέσματα: Η συνεπώαση των 11 υποψηφίων προβιοτικών λακτοβακίλων με τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2), δεν προκάλεσε μεταβολές στη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με τον μάρτυρα, τόσο για τα ζωντανά στελέχη όσο και για τα θερμικά

απενεργοποιημένα και ανεξάρτητα από τον χρόνο συνεπώασης. Όσον αφορά την έκκριση ιντερλευκίνης-6, η συν-επώαση με τα στελέχη του *L.rhamnosus*, AnLb11 και AnLb15, μείωσε σημαντικά την έκκριση της στα κύτταρα Caco-2 σε σχέση με το μάρτυρα. Στα επιθηλιακά κύτταρα που πραγματοποιήθηκε συνεπώαση δύο ωρών με τα θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη παρατηρήθηκε ότι τρία στελέχη του *L.gasseri*, το C28, το C72, και το C74 μετέβαλλαν σημαντικά την έκκριση ιντερλευκίνης-6 σε σχέση με το μάρτυρα. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι δύο από τα θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη του *L.rhamnosus*, το C44 και το AnLb15, ένα του *L.gasseri*, το C28, και το AnLb18 του *L.delbrueckii* προκάλεσαν αυξημένη παραγωγή της συγκεκριμένης κυτταροκίνης σε σχέση με τα αντίστοιχα ενεργά μεταβολικά στελέχη, μετά από δύο ώρες συν-επώαση. Στα δείγματα των επιθηλιακών κυττάρων που προέκυψαν από τους χειρισμούς δεν μεταβλήθηκε η παραγωγή του NO.

Συμπεράσματα: Φαίνεται ότι τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη των λακτοβακίλων που εξετάστηκαν δεν εμφανίζουν τοξικότητα στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, μετά από την επαφή τους. Δύο ενεργά μεταβολικά στελέχη του *L.rhamnosus* (AnLb11, AnLb15) μειώνουν την έκκριση της ιντερλευκίνης-6, η οποία ανήκει στις προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. Επίσης ακόμα και όταν είναι θερμικώς απενεργοποιημένα, κάποια από τα στελέχη που εξετάστηκαν μεταβάλλουν την παραγωγή της ιντερλευκίνης-6 σε κύτταρα Caco-2.

Abstract

Introduction: Gut microbiota, the total of microorganisms inhabiting the colon, plays a particularly important role in immune system function. There are numerous scientific data indicating a continuous interaction between gut microbiota and the host's immune system. Probiotics seem to be able to affect human defense mechanisms by their adhesion ability to the surface of the intestinal epithelium, the improvement of barrier integrity and their participation in natural and acquired immunity.

Aim: The aim of the present study is to examine the immunomodulatory effects of some potential probiotic strains of *L.rhamnosus*, *L.gasseri* and *L.delbrueckii*. More specifically, to examine the *in-vitro* effect of the co-incubation of those strains with Caco-2 cells on the secretion of interleukin-6 and NO production.

Methods: Four *L.rhamnosus* strains (C44, C58, AnLb11, AnLb15), 6 *L.gasseri* strains (C28, C32, C45, C59, C72, C74), and one *L.delbrueckii* strain (AnLb18), isolated from healthy infants gut microbiota and examined for probiotic properties (EVVIFAM collection), were cultured in anaerobic conditions. The intestinal epithelial cells (Caco-2) were co-incubated with the bacterial strains as follows: co-incubation with metabolically active strains for 2 hours and co-incubation with heat-inactivated strains for 2 and 24 hours respectively. The concentration of interleukin-6 was measured using Elisa method and the release of active forms of nitrogen (NO) was measured using the Griess reagent, in the supernatant of the cultures. Furthermore, the viability of Caco-2 cells was calculated with trypan-blue method, after their co-incubation with lactobacilli. *L.acidophilus* DSMZ20079 and *L.rhamnosus* GG were used as positive controls.

Results: The co-incubation of all the tested Lactobacilli with Caco-2 cells did not evoke any changes in the cells' viability compared to the control, for both the metabolically active and heat inactivated strains and independently of the time of incubation. The co-incubation of two metabolically active *L.rhamnosus* strains, AnLb11 and AnLb15, reduced significantly the secretion of interleukin-6 in Caco-2 cells compared to control. Three heat-inactivated *L.gasseri* strains C28, C72 and C74 significantly modified the levels of interleukin-6 in Caco-2 cells, after 2 hours of co-incubation, compared to control. The two *L.rhamnosus*, C44 and AnLb15, one

L.gasseri, C28, and the *L.delbrueckii* AnLb18 heat inactivated strains induced higher concentration of interleukin-6 compared to the same active metabolic strains in Caco-2 cells, after 2 hours of co-incubation. Finally the NO production was not influenced by these lactobacilli.

Conclusions: Our data suggest that none of the potential probiotics tested, have any toxic effect on Caco-2 cells, after their co-incubation. Two *L.rhamnosus* strains reduce the interleukin-6 secretion, which is considered a pro-inflammatory cytokine, from Caco-2 cells. Some of these potential probiotics are able to modify the IL-6 production from Caco-2 cells, even when they are heat-inactivated.

Εισαγωγή

1.1 Ο εντερικός μικροβιόκοσμος

Ο ανθρώπινος οργανισμός φιλοξενεί περίπου 100 τρισεκατομμύρια μικροβιακά κύτταρα, δηλαδή 10 φορές περισσότερα από τον αριθμό των κυττάρων του ξενιστή, με τα οποία έχει αναπτύξει συμβιωτική σχέση. Το σύνολο αυτών των μικροοργανισμών που περιλαμβάνει βακτήρια, ευκάρυα, αρχαία και ιούς αποτελεί τον ανθρώπινο μικροβιόκοσμο. Ο μικροβιόκοσμος διαθέτει και εκφράζει στον ανθρώπινο οργανισμό ένα πλήθος γονιδίων που ξεπερνούν περίπου κατά 100 φορές το συνολικό ανθρώπινο γονιδίωμα, ενώ συμμετέχει σε σημαντικές βιολογικές και μεταβολικές λειτουργίες που δεν μπορούν να εκτελεστούν από τον ίδιο τον ξενιστή. Υπάρχει, λοιπόν, μια περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ του ξενιστή, των μικροβίων και του περιβάλλοντος. (Cani, Delzenne, 2011, Dwivedi et al., 2016)

Οι μεγαλύτεροι μικροβιακοί πληθυσμοί εντοπίζονται στη στοματική κοιλότητα όπου φιλοξενούνται 10^8 - 10^{10} μικροβιακά κύτταρα /g σάλιου και στον γαστρεντερικό σωλήνα. Στο στομάχι ο αριθμός των βακτηρίων μειώνεται σε 10^3 CFU/g γαστρικού υγρού, ταυτόχρονα στο δωδεκαδάκτυλο και τη νήστιδα είναι 10^2 - 10^4 CFU ανά γραμμάριο περιεχομένου. Αντιθέτως, στον ειλέο και το κόλον ο αριθμός των βακτηρίων αυξάνεται σε 10^{10} CFU/g και 10^{10} - 10^{12} CFU/g , αντίστοιχα και ο εντερικός μικροβιόκοσμος αποτελεί ένα από τα πιο πυκνά οικοσυστήματα. (Hakansson ,Molin, 2011, Dwivedi et al., 2016)

1.2 Σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου

Ο όρος εντερικός μικροβιόκοσμος αναφέρεται στο σύνολο των μικροοργανισμών που αποικίζουν το έντερο και δεν περιλαμβάνει μόνο τα βακτήρια αλλά και άλλα μικρόβια, όπως μύκητες, αρχαία, ιούς και πρωτόζωα. (Jandhyala, et al., 2015)

Μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος αποτελείται από 500-1000 διαφορετικά είδη μικροβίων, ενώ σε πρόσφατη μελέτη υπολογίστηκαν πάνω από 35.000 διαφορετικά βακτηριακά είδη. (Jandhyala, et al., 2015)

Ο υγιής εντερικός μικροβιόκοσμος αποτελείται κατά κύριο λόγο από τα *Firmicutes* και τα *Bacteroidetes* ενώ ακολουθούν τα *Actinobacteria* και τα *Verrucomicrobia*. Σε γενικές γραμμές η

σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου παραμένει σταθερή, ωστόσο υπάρχουν διαφορές στην κατανομή των ειδών σε διαφορετικά σημεία του εντερικού μικροβιόκοσμου. Για παράδειγμα, στον οισοφάγο φιλοξενούνται 10^1 βακτήρια ανά γραμμάριο περιεχομένου, ενώ στον οισοφάγο και το στομάχι 10^{12} βακτήρια ανά γραμμάριο περιεχομένου. (Jandhyala, et al., 2015)

Στον οισοφάγο, το δωδεκαδάκτυλο και τη νήστιδα φαίνεται ότι το κυρίαρχο είδος είναι ο *Streptococcus*, ενώ στο στομάχι το *Helicobacter*. Στο παχύ έντερο βρίσκεται στο 70% του συνόλου των μικροβίων που υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα και τα κυρίαρχα είδη που το αποικίζουν είναι τα *Firmicutes* και τα *Bacteroidetes*. (Jandhyala, et al., 2015)

1.3. Λειτουργίες του εντερικού μικροβιόκοσμου

Μεταξύ των κύριων μεταβολικών λειτουργιών του εντερικού μικροβιόκοσμου είναι η συνεισφορά του στην αποτελεσματική πέψη της τροφής, η διατήρηση της ακεραιότητας του επιθηλιακού φραγμού και ο αποτελεσματικός μεταβολισμός του λίπους. Ωστόσο, επιδρά θετικά και στη ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης καθώς προλαμβάνει την αύξηση και δράση ξένων αντιγόνων. Ιδιαίτερη σημασία έχει η αλληλεπίδραση μεταξύ του επιθηλιακού φραγμού και των κυττάρων του ανοσοποιητικού. Συγκεκριμένα, μια ρήξη στον επιθηλιακό φραγμό έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση φλεγμονωδών κυττάρων, όπως τα μακροφάγα και τα δενδριτικά κύτταρα, σε παθογόνα και μη παθογόνα βακτήρια του οργανισμού. Αυτή η διαδικασία μπορεί να προκαλέσει μέχρι και καρκίνο αν ο οργανισμός δεν επανέλθει στη φυσιολογική του κατάσταση, καθώς πυροδοτείται η έναρξη της χρόνιας φλεγμονής. Ουσιαστικά στον γαστρεντερικό βλεννογόνο υπάρχει μια διαρκής μάχη ανάμεσα στα φυσιολογικά εντερικά βακτήρια και τα ξένα παθογόνα που εισέρχονται στον οργανισμό. Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό ότι το έντερο είναι διαρκώς σε μια κατάσταση ήπιας ομοιοστατικής φλεγμονής. Αν διαταραχτεί αυτή η ισορροπία μπορούν να ενεργοποιηθούν διαδικασίες παθογένειας. (Türker et al., 2014)

Επιπρόσθετα, ο εντερικός μικροβιόκοσμος ρυθμίζει λειτουργίες του μεταβολισμού, εξουδετερώνει ορισμένα φάρμακα και καρκινογόνα και προστατεύει τον οργανισμό από διάφορα παθογόνα. (Lin et al., 2014)

Αλλαγές στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου μπορούν να προκαλέσουν την εμφάνιση φλεγμονωδών νοσημάτων, όπως τη νόσο του Crohn. Ακόμα, τα βακτήρια του εντέρου μπορούν να ρυθμίσουν την ενεργειακή βιοδιαθεσιμότητα και κατ' αυτό τον τρόπο μπορούν να επηρεάσουν τον έλεγχο του βάρους, την εμφάνιση παχυσαρκίας και ορισμένες μεταβολικές διαταραχές. (Dabrowska, Witkiewicz, 2016)

Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, ο εντερικός μικροβιόκοσμος έχει κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του ξενιστή και στην υγεία. (Lin et al., 2014)

1.4 Ο εντερικός μικροβιόκοσμος και η διατήρηση της ομοιόστασης

Υπάρχουν πολλά επιστημονικά δεδομένα που υποδεικνύουν ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του εντερικού μικροβιόκοσμου και του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις ανοσολογικές αποκρίσεις. (Dwivedi et al., 2016)

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος αποτελεί μέρος του ανοσοποιητικού συστήματος. Επηρεάζει την ανάπτυξη και τη ρύθμιση της ανοσίας του ξενιστή, ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων της βλέννας, τροποποιεί τη γλυκοζυλίωση της βλέννας και παρεμβαίνει στη βακτηριακή προσκόλληση. Ακόμα, επάγει την έκκριση αντιμικροβιακών πεπτιδίων από τα κύτταρα Paneth, ρυθμίζει τις μεταβολές της διαπερατότητας του εντέρου που πραγματοποιούνται λόγω λοίμωξης, άγχους ή φλεγμονής και τέλος επηρεάζει την ανάπτυξη της συστηματικής ανοσίας και της ανοσίας του βλεννογόνου. (Malago, Koninkx, 2011)

Επιπλέον, ο εντερικός μικροβιόκοσμος συμβάλλει στην παραγωγή αντισωμάτων, την ανάπτυξη ανοχής στα αντιγόνα των τροφίμων στη περιοχή της στοματικής κοιλότητας και στο σχηματισμό βλαστικών κέντρων στα λεμφοειδή θυλάκια. Για παράδειγμα έχει παρατηρηθεί ότι σε νεογνά που έχουν ανιχνευτεί τα βακτήρια *Bacteroides fragilis* και *Bifidobacterium spp.* είναι αυξημένη η συγκέντρωση της ανοσοσφαιρίνης Ig-A και IgM. Αυτό είναι σημαντικό για την ανοσία των νεογνών, καθώς η έγκαιρη εγκατάσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μικροβιακή έκθεση του ατόμου σε όλη τη διάρκεια της ζωής του και κατ' επέκταση επηρεάζει την κυτταρική και χυμική ανοσία του ξενιστή. Οι διαταραχές της ισορροπίας στον εντερικό μικροβιόκοσμο συνδέονται με την εμφάνιση

διαφόρων ασθενειών που οφείλονται σε διαταραχές του ανοσοποιητικού, όπως αλλεργίες ή αυτοάνοσα νοσήματα. (Malago, Koninkx, 2011)

Η απουσία των μικροοργανισμών επηρεάζει τη συστηματική ανοσία καθώς μειώνεται η ανοσοσφαιρίνη Α (IgA) του ορού και το μέγεθος της σπλήνας. Αυτή η κατάσταση μπορεί να ανατραπεί μετά από το μικροβιακό αποικισμό του εντέρου ή μετά από χορήγηση βακτηρίων. Κατ' αυτό τον τρόπο κάποια προβιοτικά χρησιμοποιούνται για να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα και να ενισχύσουν τους μηχανισμούς άμυνας του εντέρου. (Malago, Koninkx, 2011)

Η IgA είναι ένα σημαντικό αντίσωμα που εκκρίνεται κατά μήκος της επιφάνειας του εντερικού βλεννογόνου και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσία του βλεννογόνου. Όταν εισέρχονται στον οργανισμό παθογόνα, ένας μικρός αριθμός συμβιωτικών κυττάρων παραμένει στα εντερικά δενδριτικά κύτταρα για αρκετές ημέρες. Αυτά τα κύτταρα περιορίζονται από τους μεσεντέριους λεμφαδένες και επαναλαμβάνουν τη δράση των συμβιωτικών βακτηρίων προκαλώντας την επιλεκτική και τοπική παραγωγή της IgA, που είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό ενός στρώματος του φραγμού του βλεννογόνου που εμποδίζει τη μικροβιακή διείσδυση. (Howarth, Wang, 2013)

1.5 Προγεννητική μικροβιακή έκθεση

Τα μητρικά μονοπύρρηνα κύτταρα του αίματος μπορούν να μεταφέρουν γενετικό υλικό σε μεγαλύτερη συχνότητα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Δεδομένου ότι πολλά από τα βακτήρια είναι παρόντα στα κόπρανα των νεογνών, μπορεί να υποθεθεί ότι πραγματοποιείται στη μήτρα μεταφορά μικροβιακών αντιγόνων κατά την ανάπτυξη του εμβρύου και κατ' επέκταση επιτρέπεται η ανάπτυξη των κατάλληλων ανοσολογικών αποκρίσεων και η δημιουργία του μικροβιόκοσμου κατά τον τοκετό. Επιπλέον, έχει ανιχνευτεί DNA από μπιφιδοβακτήρια και λακτοβάκιλλους στον ανθρώπινο πλακούντα, που μπορεί να βοηθήσει στην ισορροπία του ανοσοποιητικού συστήματος με τον υπό διαμόρφωση εντερικό μικροβιόκοσμο. Αντίστοιχα, έκθεση σε παθογόνα βακτήρια, όπως το *Ureaplasma spp.*, μπορεί να μεταβάλλει την επίκτητη ανοσία και την ανοσία του βλεννογόνου και να αποτελέσει παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας. Μέχρι στιγμής δεν είναι ξεκάθαρο εάν τα βακτηριακά προϊόντα επηρεάζουν απευθείας τη λειτουργία των

οργάνων ή αν οι φλεγμονώδεις αποκρίσεις που λαμβάνουν χώρα στο έμβρυο οδηγούν σε ανισορροπίες στο ανοσοποιητικό σύστημα. (Romano-Keeler, Weitkamp, 2015)

Ακόμα, η έκθεση του εμβρύου σε διατροφικούς παράγοντες μπορεί να επηρεάσει την ανοσοαπόκριση του. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Φιλανδία δόθηκε σε εγκυμονούσες ένας συνδυασμός δύο προβιοτικών στελεχών του *Bifidobacterium lactis* και του *Lactobacillus rhamnosus* GG. Το μικροβιακό DNA στο αμνιακό υγρό σχετίστηκε με αλλαγές στην έκφραση γονιδίων στο πλακούντα που σχετίζονται με τη φυσική ανοσία. (Romano-Keeler, Weitkamp, 2015)

Έχει φανεί ότι η έκθεση της μητέρας σε ένα μικροβιακό περιβάλλον μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη μεταγεννητική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε ότι γυναίκες που είχαν εκτεθεί σε φάρμες ζώων κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είχαν μικρότερες πιθανότητες να γεννήσουν παιδιά με αλλεργίες ή άσθμα. Η προγεννητική μικροβιακή έκθεση μπορεί να επηρεάσει τις αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος αυξάνοντας τον αριθμό και βελτιώνοντας τη λειτουργία των T-ρυθμιστικών κυττάρων του αίματος του ομφάλιου λώρου, που συνδέονται με μείωση των Th2 κυτταροκινών. Η αύξηση της έκκρισης αυτών των κυτταροκινών είναι χαρακτηριστικό της αλλεργικής αντίδρασης. (Fujimura et al., 2010)

1.6 Μικροβιακός αποικισμός και ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης

Τα βρέφη εκτίθενται σε μια πληθώρα μικροβίων κατά τη γέννηση τους, τα οποία μπορεί προέρχονται από διαφορετικά περιβάλλοντα. Κατ' αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται ένας ταχύτατος μικροβιακός αποικισμός. (Clemente et al., 2012)

Τα βρέφη έρχονται σε επαφή με τα μικρόβια κατά τη διαδικασία της γέννησης. Ένας από τους βασικότερους τρόπους μετάδοσης αυτών των μικροβίων από τη μητέρα στο βρέφος φαίνεται να είναι ο τρόπος γέννησης. Έχει φανεί ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος παιδιών που γεννήθηκαν με φυσιολογικό τοκετό παρουσιάζει περισσότερες ομοιότητες με αυτόν της μητέρας τους, ενώ ο μικροβιόκοσμος παιδιών που γεννήθηκαν με καισαρική αποτελείται από βακτήρια που προέρχονται από την επιδερμίδα της μητέρας και το περιβάλλον. Στη συνέχεια,

ο μικροβιόκοσμος του νεογνού υπόκειται σε διαδοχή μικροβιακών ειδών και αντικαθίστανται οι αερόβιοι μικροοργανισμοί από τους αυστηρά αναερόβιους.(Arora, Backhed,2016)

Ο τρόπος γέννησης και οι αλλαγές στη σύσταση του μικροβιόκοσμου επιφέρει αλλαγές και στις ανοσολογικές λειτουργίες του νεογνού κατά τον πρώτο χρόνο της γέννησης του, με τα παιδιά που γεννήθηκαν με καισαρική να εμφανίζουν χαμηλότερο αριθμό μικροβιακών κυττάρων και υψηλότερο αριθμό κυττάρων που εκκρίνουν αντι σώματα. (Clemente et al., 2012)

Επιπλέον, ο εντερικός μικροβιόκοσμος του νεογνού σχετίζεται και με τον τρόπο σίτισης του. Συγκεκριμένα, βρέφη που θηλάζουν κατά τους 4 πρώτους μήνες της ζωής τους εμπλουτίζουν το μικροβίωμα τους με γονίδια που συμβάλλουν στη διάσπαση του γαλακτικού οξέος. Η διακοπή του θηλασμού και η έναρξη της στερεής τροφής είναι σημαντικοί παράγοντες για την έναρξη της ανάπτυξης ενός μικροβιόκοσμου που μοιάζει με αυτό των ενηλίκων, που είναι πιο πλούσιος σε αναερόβια βακτήρια που παράγουν βουτυρικό οξύ. Επιπρόσθετα, μετά τον απογαλακτισμό ο εντερικός μικροβιόκοσμος εμπλουτίζεται με γονίδια που εμπλέκονται στη διάσπαση πολυσακχαριτών, οι οποίοι είναι σε αφθονία στη στερεή τροφή. (Arora , Backhed,2016)

1.7 Ο ρόλος του εντερικού μικροβιόκοσμου στην υγεία του ξενιστή

Η συμβίωση μεταξύ του ξενιστή και του εντερικού μικροβιόκοσμου είναι κρίσιμη για την υγεία μας. Η ισορροπία σε ένα τόσο πυκνό και πολύπλοκο οικοσύστημα είναι σημαντική για τη διατήρηση της ομοιόστασης του ξενιστή. Η διατάραξη αυτής της ισορροπίας και οι μεταβολές στους εντερικούς μικροβιακούς πληθυσμούς οδηγούν στην κατάσταση της δυσβίωσης που συσχετίζεται με σημαντικές παθολογικές καταστάσεις. Συνεπώς, ο εντερικός μικροβιόκοσμος μπορεί να έχει οφέλη στην υγεία βελτιώνοντας γενικά την ανάπτυξη των κυττάρων του ανοσοποιητικού και κατά συνέπεια την ομοιόσταση, αλλά και πιο ειδικά βοηθώντας την πέψη της τροφής, το μεταβολισμό του λίπους, την επιθηλιακή ομοιόσταση στον εντερικό σωλήνα, τη ρύθμιση των νεύρων του εντέρου και προάγοντας την αγγειογένεση. Από την άλλη μεριά, η δυσβίωση σχετίζεται με την εμφάνιση διαφόρων νόσων όπως οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, ο καρκίνος του παχέος εντέρου αλλά και άλλων που δεν εντοπίζονται υποχρεωτικά

μόνο στον εντερικό σωλήνα όπως αλλεργίες, η παχυσαρκία και ο διαβήτης. (Holmes et al.,2011)

Επιπλέον, τα νοσήματα του κυκλοφορικού, ο αυτισμός και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι φαίνεται ότι επηρεάζονται από την κατάσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Ακόμα, ο εντερικός μικροβιόκοσμος σχετίζεται με την ενεργειακή βιοδιαθεσιμότητα και τη μετεγχειρητική ανάρρωση. (Kinross et al., 2011)

1.8 Παράγοντες που επηρεάζουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου, όπως η διατροφή, ο τρόπος γέννησης, η λήψη προβιοτικών, η αυξημένη χρήση αντιβιοτικών, η εμφάνιση αλλεργιών, αυτοάνοσων νοσημάτων και φλεγμονωδών νοσημάτων του εντέρου. (Malago, Koninkx, 2011, Clemente et al., 2012, Türker et al., 2014, Arora, Backhed, 2016)

Η διατροφή του ανθρώπου αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα στη διαμόρφωση της σύστασης του εντερικού μικροβιοκοσμου. Πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει τη συνεισφορά διαφόρων διατροφικών παραγόντων στους εντερικούς μικροβιακούς πληθυσμούς και την επίδραση τους στο ξενιστή. Για παράδειγμα, σε περιοχές με υψηλή κατανάλωση φυτικών ινών υπάρχει πολύ χαμηλότερη εμφάνιση φλεγμονωδών νοσημάτων του εντέρου. Το γεγονός αυτό πιθανόν να αιτιολογείται από τη διαφορετική σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου που επικρατεί στους πληθυσμούς που καταναλώνουν διατροφή πλούσια σε φυτικές ίνες. Οι φυτικές ίνες επάγουν την επικράτηση μικροβιακών στελεχών που μπορούν και τις ζυμώνουν και τα προϊόντα που παράγονται από τη ζύμωση, κυρίως λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας (short chain fatty acids) φαίνεται ότι παρουσιάζουν ανοσορρυθμιστική δράση. Η ανάπτυξη και εξέλιξη πολλών νοσημάτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διατροφή και κατ' επέκταση από την ισορροπία που επικρατεί στον εντερικό μικροβιόκοσμο. (Türker et al.,2014)

Η μακροχρόνια διατήρηση ενός συγκεκριμένου τρόπου διατροφής μπορεί να διαφοροποιήσει τον εντερικό μικροβιόκοσμο. Αναφέρεται ενδεικτικά ότι άτομα που ακολουθούν ένα χορτοφαγικό τρόπο διατροφής με την πάροδο του χρόνου χάνουν την ικανότητα τους να μεταβολίζουν την L-καρνιτίνη που υπάρχει στο κόκκινο κρέας. (Arora , Backhed,2016)

Επιπλέον, η δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες έχει φανεί ότι αυξάνει τον αριθμό των βακτηρίων του γένους *Prevotella*, ενώ η αύξηση των πρωτεϊνών και του λίπους αυξάνει τα βακτήρια του γένους *Bacteroides*. (Arora, Backhed,2016)

Το εντερικό μικροβίωμα είναι εμπλουτισμένο με γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα τα οποία είναι απαραίτητα για το μεταβολισμό ορισμένων μακροθρεπτικών συστατικών, όπως οι σύνθετοι πολυσακχαρίτες. Παρόλα αυτά, το είδος της διατροφής που ακολουθείται μπορεί να επηρεάσει τη σύνθεση και την έκφραση των γονιδίων που υπάρχουν στον εντερικό μικροβιόκοσμο. Σε μια διατροφή που υπάρχει έλλειψη φυτικών πολυσακχαριτών μπορεί να παρατηρηθεί ανάπτυξη των *Bacteroides thetaiotaomicron* στη βλέννα, όπου πραγματοποιείται η έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στο σχηματισμό της. (Arora, Backhed,2016)

Σε γενικές γραμμές η σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου, μετά τα πρώτα 2-3 έτη της ηλικίας, παραμένει σταθερή με την πάροδο του χρόνου. Ωστόσο, μπορεί να μεταβληθεί εξαιτίας εξωτερικών επιδράσεων. Ένας από τους βασικούς παράγοντες που μπορούν να προκαλέσουν άμεσες και σημαντικές διαταραχές στο μικροβιόκοσμο είναι η χορήγηση αντιβιοτικών. (Clemente et al.,2012)

Υπάρχουν αυξανόμενα επιστημονικά δεδομένα που υποδεικνύουν ότι ο εντερικός μικροβιόκοσμος μπορεί να τροποποιηθεί μετά από θεραπεία με αντιβιοτικά. Αυτή η επίδραση μπορεί να ποικίλλει από άτομο σε άτομο. Σε ορισμένα άτομα μπορεί να προκληθεί σημαντική μείωση της βακτηριακής ποικιλότητας, η οποία δεν επανέρχεται ακόμα και αρκετούς μήνες μετά τη θεραπεία. Ο πληθυσμός και το είδος των βακτηρίων μεταβάλλεται μετά τη χρήση αντιβιοτικών και υπάρχει αυξημένη αντίσταση στον αποικισμό που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση ξένων μικροβίων σε σχέση με τα συμβιωτικά βακτήρια. Αυτό μπορεί να προκαλέσει μόνιμες βλάβες στη δομή του μικροβιόκοσμου. (Clemente et al.,2012)

Επιπλέον, η αυξημένη χρήση αντιβιοτικών μπορεί να προκαλέσει την αύξηση γονιδίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στον εντερικό μικροβιόκοσμο. Σε ορισμένες χώρες φάνηκε να μειώνεται ο αριθμός των παθογόνων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά μετά τη μείωση της χορήγησης των συγκεκριμένων συνταγογραφούμενων φαρμάκων. (Clemente et al.,2012)

2. Το ανοσοποιητικό σύστημα

2.1 Ο ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος

Ο βασικός ρόλος του ανοσοποιητικού συστήματος είναι η προστασία του ξενιστή από τους μικροοργανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση στον οργανισμό. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να απειλήσουν την υγεία του ξενιστή μέσα από ένα ευρύ φάσμα παθολογικών μηχανισμών. Για αυτό το λόγο, το ανοσοποιητικό σύστημα χρησιμοποιεί ένα πλήθος πολύπλοκων μηχανισμών προκειμένου να προστατέψει τον ανθρώπινο οργανισμό. Συγκεκριμένα, το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει τη διαφορετική δομή των παθογόνων σε σχέση με τα κύτταρα του ξενιστή. Με αυτό τον τρόπο πυροδοτούνται μηχανισμοί προκειμένου να εξαλειφθούν τα παθογόνα, χωρίς να προκληθεί εκτεταμένη βλάβη στους ιστούς του ξενιστή. (Chaplin, 2006)

2.2 Εγγενής και επίκτητη ανοσία

Ως ανοσία ορίζεται η αντίσταση του οργανισμού σε διάφορες ασθένειες. Η κύρια λειτουργία του ανοσοποιητικού είναι η αναγνώριση και η άμυνα απέναντι σε σώματα που δεν τα αναγνωρίζει ως δικά του, όπως μικρόβια, καρκινικά κύτταρα ή ακόμα μεταμοσχευμένοι ιστοί ή όργανα. (Malago, Koninkx, 2011)

Η εγγενής ανοσία αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας του οργανισμού έναντι της εισβολής παθογόνων. Είναι ένας μη ειδικός μηχανισμός άμυνας που ενεργοποιείται απευθείας ή μέσα σε λίγες ώρες μετά την εισβολή του αντιγόνου. Δεν έχει την ικανότητα ανοσολογικής μνήμης και έτσι δεν αναγνωρίζει παθογόνα στα οποία έχει εκτεθεί ο οργανισμός στο παρελθόν. (Warrington et al., 2011)

Από την άλλη μεριά, η επίκτητη ανοσία είναι ειδική και εξαρτώμενη για το κάθε αντιγόνο και για αυτό το λόγο υπάρχει μια χρονική καθυστέρηση από την έκθεση του οργανισμού μέχρι τη μέγιστη απόκριση του. Διαθέτει ανοσολογική μνήμη και επιτρέπει στο ξενιστή να έχει μια πιο ταχεία και αποτελεσματική αντίδραση όταν εκτεθεί ξανά στο ίδιο αντιγόνο. Η εγγενής και η

επίκτητη ανοσία λειτουργούν συμπληρωματικά προκειμένου να μειώσουν την ευπάθεια του ξενιστή στα παθογόνα. (Warrington et al.,2011)

2.3 Ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα, βασεόφιλα και κύτταρα φυσικοί φονείς

Στην εγγενή ανοσία εμπλέκονται πολυάριθμα κύτταρα, όπως τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα, τα ηωσινόφιλα, τα βασεόφιλα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK).

Στα φαγοκύτταρα ανήκουν δυο κύριες κατηγορίες κυττάρων: τα ουδετερόφιλα και τα μακροφάγα. Οι δυο αυτοί κυτταρικοί τύποι έχουν μια κοινή λειτουργία, τη φαγοκυττάρωση των μικροβίων. Τα ουδετερόφιλα έχουν μικρή χρονική διάρκεια ζωής και περιέχουν κοκκία τα οποία όταν απελευθερώνονται βοηθούν στην καταστροφή των παθογόνων μικροβίων. Τα μακροφάγα δε συμμετέχουν μόνο στη φαγοκυττάρωση αλλά εμπλέκονται και στην εμφάνιση των T-κυττάρων μετά την παρουσία αντιγόνου. (Warrington et al.,2011)

Τα ουδετερόφιλα δεν είναι στατικά κύτταρα, αντιθέτως κινούνται ελεύθερα στο αίμα. Μετακινούνται στο σημείο της φλεγμονής και δρουν μέσω διαδικασιών που περιλαμβάνουν προφλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, μόρια προσκόλλησης, χημειοελκτικά και χημειοκίνες. Τα ουδετερόφιλα μπορούν να φαγοκυτταρώνουν οργανισμούς χρησιμοποιώντας ψευδοπόδια, δηλαδή προεξοχές της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, που σχηματίζουν ένα κυστίδιο δεσμευμένο στη μεμβράνη (φαγόσωμα) γύρω από το παθογόνο. (Parkin et al.,2001)

Τα βασεόφιλα και τα μαστοκύτταρα, αν και είναι λίγα σε αριθμό εμπλέκονται σε ορισμένες από τις πιο σοβαρές αντιδράσεις του ανοσοποιητικού, όπως η αλλεργία, η αναφυλαξία, το αγγειοίδημα και το άσθμα. Τα μαστοκύτταρα συνήθως εντοπίζονται στο συνδετικό ιστό που περιβάλλει τα αιμοφόρα αγγεία, ενώ τα βασεόφιλα υπάρχουν στην κυκλοφορία του αίματος. (Parkin et al.,2001 ,Warrington et al.,2011)

Τα ηωσινόφιλα είναι κοκκιοκύτταρα που διαθέτουν φαγοκυτταρικές ιδιότητες και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην καταστροφή παρασίτων που είναι μεγάλα σε μέγεθος για να φαγοκυτταρωθούν. Επιπλέον, μαζί με τα μαστοκύτταρα και τα βασεόφιλα ελέγχουν τους μηχανισμούς άμυνας της αλλεργίας και του άσθματος. (Warrington et al.,2011)

Τα NK-κύτταρα είναι μεγάλα κοκκώδη λεμφοκύτταρα που έχουν σημαντικό ρόλο στην καταστροφή όγκων και κυττάρων που έχουν μολυνθεί από ιούς. Η καταστροφή των προσβεβλημένων κυττάρων γίνεται μέσα από την απελευθέρωση ενζύμων των κοκκίων των NK κυττάρων που επάγουν την απόπτωση. (Warrington et al.,2011)

2.4 Μόρια προσκόλλησης

Προκειμένου να μπορέσουν τα κύτταρα να ενεργοποιηθούν και να δράσουν αποτελεσματικά στο σημείο της φλεγμονής απαιτείται η αλληλεπίδραση των υποδοχέων των κυττάρων με τους εξωτερικούς παράγοντες, όπως οι κυτταροκίνες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να προσδένονται στους υποδοχείς και σε άλλα μόρια προσκόλλησης. (Parkin et al.,2001)

Τα μόρια προσκόλλησης είναι μόρια που προσδένονται στις επιφάνειες και εμπλέκονται στις αλληλεπιδράσεις των κυττάρων. Η κύρια λειτουργία τους είναι να διευκολύνουν τις διαδικασίες εκείνες που απαιτούν τη στενή επαφή των κυττάρων, π.χ. στην κυτταρική μετανάστευση και τη φαγοκυττάρωση. Τα μόρια προσκόλλησης συνδέονται με κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και κυτταροσκελετικά συστατικά και προκαλούν την αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού, επιτρέποντας στα κύτταρα να κινούνται. Ορισμένα μόρια προσκόλλησης εκφράζονται κυρίως στα λευκοκύτταρα, ενώ άλλα στα ενδοθηλιακά κύτταρα, γεγονός που επιτρέπει την μεταξύ τους επικοινωνία. Ανάλογα με τη δομή και τη λειτουργία τους τα μόρια προσκόλλησης χωρίζονται στα μόρια ενδοκυτταρικής προσκόλλησης, τις ιντεγκρίνες, τις σελεκτίνες και τις καντερίνες. (Parkin et al.,2001)

2.5 Ο ρόλος της φλεγμονής στο ανοσοποιητικό σύστημα

Η φλεγμονή είναι βασική λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος και προκαλείται από οποιονδήποτε παράγοντα μπορεί να απειλήσει την ομοιότητα του οργανισμού. Η οξεία φλεγμονή χαρακτηρίζεται από ταχεία ενεργοποίηση κοκκιοκυττάρων, όπως ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και βασεόφιλα. Η συνεισφορά αυτών των κυττάρων εξαρτάται από το μέρος στο οποίο λαμβάνει χώρα η φλεγμονή. Η μετανάστευση των κοκκιοκυττάρων στα σημεία της φλεγμονής είναι απαραίτητη προκειμένου να εξουδετερωθούν και να απομακρυνθούν οι βλαβεροί παράγοντες. Αυτά τα κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του

ανθρώπινου οργανισμού ενάντια σε βακτήρια, μύκητες, ιούς και παράσιτα. Ο τερματισμός της φλεγμονής πραγματοποιείται με τη μείωση των επιπέδων των κοκκιοκυττάρων και την επιστροφή των μονοπύρηνων κυττάρων (μακροφάγα και λεμφοκύτταρα) στα φυσιολογικά επίπεδα. Κατά τη διάρκεια του τερματισμού της φλεγμονής πραγματοποιείται, επίσης, απόπτωση των ουδετερόφιλων. Ως απόπτωση ορίζεται ο θάνατος των κυττάρων που προλαμβάνει την απελευθέρωση ιστοτοξικών κυτταρικών περιεχομένων. Σε αυτή τη διαδικασία γίνονται μεταβολές στην κυτταρική επιφάνεια των ουδετερόφιλων και μορφολογικές αλλαγές που συμβάλλουν στην αναγνώριση τους από τα φαγοκύτταρα, όπως τα μακροφάγα, με σκοπό να απομακρυνθούν τα νεκρά κύτταρα. Η οξεία φλεγμονώδης αντίδραση είναι αυτοπεριοριζόμενη και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οδηγεί σε αποκατάσταση του ιστού και διατήρηση της ομοιόστασης. Από την άλλη μεριά η παρατεταμένη φλεγμονώδης αντίδραση του οργανισμού ή η απορρύθμιση των μηχανισμών που διακόπτουν τη φλεγμονή μπορούν να οδηγήσουν σε χρόνια φλεγμονή. (Maskrey et al., 2011)

Η φλεγμονή στην οξεία φάση χαρακτηρίζεται από αύξηση της αιματικής ροής και της αγγειακής διαπερατότητας και από συσώρευση λευκοκυττάρων και φλεγμονωδών διαμεσολαβητών, όπως οι κυτταροκίνες. Στη χρόνια φλεγμονή αναπτύσσονται συγκεκριμένες χυμικές και κυτταρικές αποκρίσεις. Και στις δυο περιπτώσεις, ένας αριθμός διαλυτών παραγόντων εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων μέσα από διαδικασίες που αυξάνουν την έκφραση μορίων κυτταρικής προσκόλλησης. Πολλοί από αυτούς τους διαλυτούς παράγοντες ρυθμίζουν την ενεργοποίηση κυττάρων, όπως τα ενδοθηλιακά κύτταρα, οι ινοβλάστες, τα μακροφάγα και τα μαστοκύτταρα καθώς και των νέων φλεγμονωδών κυττάρων, όπως τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα, τα ουδετερόφιλα και τα ηωσινόφιλα. Επίσης, κάποιοι από αυτούς τους διαμεσολαβητές οδηγούν σε συστηματικές φλεγμονώδεις αποκρίσεις, όπως πυρετός, υπόταση, σύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσης, λευκοκυττάρωση και καχεξία. Οι διαλυτοί παράγοντες που μεσολαβούν σε αυτές τις αποκρίσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε τέσσερις κατηγορίες: 1. Φλεγμονώδεις μεταβολίτες των λιπιδίων, όπως ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) και διάφορα παράγωγα του αραχιδονικού οξέος (π.χ.προσταγλαδίνες, λευκοτριένια και λιποξίνες) που παράγονται από κυτταρικά φωσφολιπίδια, 2. Διαλυτές πρωτεάσες (π.χ. παράγοντες θρόμβωσης και κινίνες) που παράγονται από προ-φλεγμονώδη πεπτίδια, 3. Νιτρικό οξείδιο, το οποίο είναι ένας ισχυρός ενδογενής αγγειοδιασταλτικός παράγοντας και ακόμα δεν έχει διερευνηθεί πλήρως ο

ρόλος του στη διαδικασία της φλεγμονής, 4. Κυτταροκίνες, οι οποίες είναι κυτταρικά πολυπεπτίδια και σε ένα μεγάλο βαθμό καθορίζουν τη φλεγμονώδη απόκριση. Για παράδειγμα, καθορίζουν την κυτταρική διήθηση και ενεργοποίηση και τις συστηματικές απαντήσεις στη φλεγμονή. (Feghali, Wright, 1997)

2.6 Κυτταροκίνες

2.6.1. Τι είναι οι κυτταροκίνες

Οι κυτταροκίνες είναι μικρές, μη δομικές πρωτεΐνες με μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 8 έως 40.000 d. Δεν έχουν μια συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων ή μια τρισδιάστατη δομή, επομένως η ταξινόμηση τους γίνεται με βάση τη βιολογική τους δράση. Εκκρίνονται κυρίως από τα λευκοκύτταρα, τα οποία ρυθμίζουν την ανοσία, τη φλεγμονή και την αιμοποίηση, καθώς και από άλλους τύπους κυττάρων.

2.6.2. Κατηγορίες κυτταροκινών

Ο όρος «κυτταροκίνες» είναι η γενική ονομασία, ενώ συμπεριλαμβάνονται σε αυτόν και άλλα ονόματα, όπως λεμφοκίνες (δηλαδή κυτταροκίνες που παράγονται από τα λεμφοκύτταρα), μονοκίνες (κυτταροκίνες που παράγονται από τα μονοκύτταρα), χημειοκίνες (κυτταροκίνες που παράγονται από χημειοτακτικές δραστηριότητες) και ιντερλευκίνες (κυτταροκίνες που παράγονται από τα λευκοκύτταρα και δρουν σε άλλα λευκοκύτταρα). (Dinarello, 2000, Khan, 2008, Zhang, An, 2009)

Ακόμα, στις κυτταροκίνες εντάσσονται οι CSF παράγοντες (Colony Stimulating Factors) οι οποίοι είναι γλυκοπρωτεΐνες που ενισχύουν τον σχηματισμό των αποικιών των αιμοποιητικών κυττάρων. Επηρεάζουν την επιβίωση, τον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των αιμοποιητικών προγονικών κυττάρων και ρυθμίζουν τις λειτουργίες των ώριμων κυττάρων. (Khan, 2008)

Μια επιπρόσθετη κατηγορία των κυτταροκινών είναι οι ιντερφερόνες οι οποίες είναι πρωτεΐνες με αντική δράση και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της φυσικής και

επίκτητης ανοσίας. Χαρακτηρίζονται κυρίως από τον τύπο των κυττάρων που τις εκκρίνει και χωρίζονται σε 2 ομάδες τις ιντερφερόνες τύπου I και τις ιντερφερόνες τύπου II. Οι πρώτες παράγονται από πολλά γονίδια και σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι IFN- α , οι IFN- β , οι IFN- ω , οι IFN- κ , οι IFN- ϵ και οι IFN- λ . Σχεδόν όλοι οι τύποι κυττάρων εκκρίνουν ιντερφερόνες τύπου I, ωστόσο τα αιμοποιητικά κύτταρα είναι η κύρια πηγή των IFN- α και IFN- ω , ενώ οι ινοβλάστες παράγουν κατά κύριο λόγο τις IFN- β . Επιπλέον, τα μακροφάγα, κάτω από κατάλληλες συνθήκες, μπορούν να εκκρίνουν IFN- β . Στις ιντερφερόνες τύπου II κατατάσσεται μόνο η IFN- γ , η οποία ρυθμίζει τη λειτουργία αρκετών συστατικών του ανοσοποιητικού συστήματος. Παράγεται από τα T- λεμφοκύτταρα, τα B- και τα NK- κύτταρα και από κύτταρα με δράση αντιγόνου (APC-Antigen-presenting cell) και συμμετέχει στην κυτταρολυτική δράση των T- λεμφοκυττάρων, των μακροφάγων και των NK-κυττάρων. (Khan, 2008)

2.6.3. Βασικές λειτουργίες των κυτταροκινών

Οι κυτταροκίνες εμπλέκονται σχεδόν σε κάθε πτυχή του ανοσοποιητικού συστήματος και της φλεγμονής, από τις ανοσολογικές αποκρίσεις μέχρι την παραγωγή T-κυττάρων και αντισωμάτων. Ρυθμίζουν έναν μεγάλο αριθμό φυσιολογικών και παθολογικών λειτουργιών, τις φλεγμονώδεις και ανοσολογικές αποκρίσεις και εκκρίνονται σε διάφορες φάσεις της φυσικής και της επίκτητης ανοσίας. (Steinke, Borish, 2006, Khan, 2008)

Πέρα από το ρόλο τους στην ανοσία, εκκρίνονται σε διάφορους ιστούς κατά τη διάρκεια διαδικασιών που δεν σχετίζονται με τις ανοσολογικές αντιδράσεις. Σε γενικές γραμμές, η έκκριση τους είναι σύντομη και αυτοπεριοριζόμενη. Μπορούν να δρουν στα ίδια τα κύτταρα που τις εκκρίνουν (αυτοκρινής δράση) ή σε κοντινά κύτταρα (παρακρινής δράση) ή σε απομακρυσμένα κύτταρα (ενδοκρινής δράση). Παράγονται από πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους και ταυτόχρονα μπορούν να δρουν και σε πολλά διαφορετικά κύτταρα και ιστούς. Έχουν πολλαπλές δράσεις στα ίδια κύτταρα-στόχους και μπορούν να επάγουν ή να αναστείλουν τη σύνθεση άλλων κυτταροκινών. Αφού προσκολληθούν σε συγκεκριμένους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας, οι κυτταροκίνες παράγουν συγκεκριμένα αποτελέσματα. Πολλαπλά σήματα ρυθμίζουν την έκφραση των υποδοχέων τους. Τα κύτταρα-στόχοι ανταποκρίνονται στις κυτταροκίνες με τη σύνθεση νέου mRNA και πρωτεΐνης, τα οποία οδηγούν σε ειδικές βιολογικές αποκρίσεις. (Khan, 2008, Zhang, An, 2009)

2.6.4. Ο ρόλος τους στην ανοσία και τη φλεγμονή

Η φλεγμονή ελέγχεται από ένα πλήθος εξωτερικών διαμεσολαβητών και ρυθμιστών, όπως οι κυτταροκίνες, ο αυξητικός παράγοντας, τα εικοσανοειδη (π.χ. προσταγλαδίνες) και τα πεπτίδια. Οι εξωκυττάρια διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα είναι ιδιαίτερα περίπλοκες και συνοδεύονται από εξίσου περίπλοκους μηχανισμούς ενδοκυτταρικής σηματοδότησης κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης. (Turner et al.,2014)

Οι κυτταροκίνες αποτελούν τους βασικούς διαμεσολαβητές της φλεγμονής, καθώς συμμετέχουν σε οξείες και χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις. Οι κυτταροκίνες μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τη δράση τους στο ανοσοποιητικό σύστημα, με κάποιες από αυτές να εκτελούν συγκεκριμένες δραστηριότητες, που εξαρτώνται από τη θέση και τον τύπο του κυττάρου. (Turner et al.,2014)

Ωστόσο, η ρύθμιση της φλεγμονής από κυτταροκίνες ή από αναστολείς των κυτταροκινών είναι ιδιαίτερα περίπλοκη καθώς το ανοσοποιητικό σύστημα διαθέτει ένα πλήθος βιολογικών μονοπατιών με πολλαπλά στοιχεία που έχουν παρόμοιες δράσεις. Επιπρόσθετα, σχεδόν όλες οι κυτταροκίνες, με εξαίρεση τον ανταγωνιστή του υποδοχέα της IL-1, έχουν αντιφλεγμονώδη αλλά και προφλεγμονώδη δράση. Η δράση τους, λοιπόν, εξαρτάται από τη χρονική στιγμή της απελευθέρωσης τους, το περιβάλλον στο οποίο δρουν, τη παρουσία ανταγωνιστικών ή συνεργιστικών στοιχείων, τον αριθμό των υποδοχέων των κυτταροκινών και την ανταπόκριση του ιστού σε κάθε κυτταροκίνη. (Shaikh, 2011)

Όσον αφορά την οξεία φλεγμονή διάφορες κυτταροκίνες και χημειοκίνες συμμετέχουν και μεσολαβούν στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, όπως η IL-1, ο TNF-α, η IL-6, η IL-11 και η IL-8. Από τις κυτταροκίνες που αναφέρθηκαν, η IL-1 και ο TNF είναι ισχυρά προφλεγμονώδη μόρια που μεσολαβούν στην οξεία φλεγμονή. (Feghali, Wright, 1997)

Από την άλλη μεριά η χρόνια φλεγμονή μπορεί να αναπτυχθεί αφού ο οργανισμός έχει υποστεί οξεία φλεγμονή και μπορεί να διαρκέσει εβδομάδες, μήνες ή ακόμα και χρόνια. Κατά τη χρόνια φλεγμονή οι κυτταροκίνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και αυτό έχει σαν

αποτέλεσμα τη χημειοταξία των μονοκύτταρων στο σημείο της φλεγμονής, όπου ενεργοποιούνται τα μακροφάγα. Τα μακροφάγα συμβάλλουν στη φλεγμονώδη διαδικασία και διατηρούν χαμηλά τα επίπεδα της IL-1 και του TNF, που είναι υπεύθυνοι για ορισμένα κλινικά συμπτώματα, όπως ανορεξία, καχεξία, πυρετό, αϋπνία και λευκοκυττάρωση. (Feghali, Wright, 1997)

Οι κυτταροκίνες που εμπλέκονται στη φλεγμονή χωρίζονται σε δυο κατηγορίες: εκείνες που συνεισφέρουν στη χυμική φλεγμονή και εκείνες που συμμετέχουν στην κυτταρική φλεγμονή. Στην πρώτη περίπτωση ανήκουν η IL-3, η IL-4, η IL-5, η IL-6, η IL-7, η IL-9, η IL-10, η IL-13 και ο TGF-β (Transforming Growth Factor-β). Στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν η IL-1, η IL-2, η IL-3, η IL-4, η IL-7, η IL-9, η IL-10, η IL-12, οι ιντερφερόνες, ο TGF-β και ο TNF-α και -β. (Feghali, Wright, 1997)

Η IL-6 παράγεται από πλήθος κυττάρων. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα, τα T-κύτταρα και οι ινοβλάστες. Η IL-6 αναφέρεται και ως ιντερφερόνη-2 (IFN-2), αυξητικός παράγοντας υβριδώματος/πλασμοκυττώματος, διεγερτικός παράγοντας ηπατοκυττάρων, διεγερτικός παράγοντας B-κυττάρων (BSF-2) και παράγοντας διαφοροποίησης B-κυττάρων (BCDF). Αρχικά, η IL-6 διεγείρει τη σύνθεση πρωτεϊνών οξείας φάσης στο συκώτι, δρα ως αυξητικός παράγοντας των ώριμων B-κυττάρων και επάγει την τελική τους ωρίμανση σε αντισώματα που παράγονται από τα πλασματοκύτταρα. Επιπλέον, συμμετέχει στην ενεργοποίηση και διαφοροποίηση των T-κυττάρων και στην έκφραση των υποδοχέων της IL-2. Μερικές από τις ρυθμιστικές της δράσεις είναι η παρεμπόδιση της παραγωγής του TNF. Έτσι λοιπόν έχει αρνητική δράση στον περιορισμό της απόκρισης στην οξεία φλεγμονή. Έχει παρατηρηθεί αύξηση της παραγωγής της IL-6 σε αρκετές χρόνιες φλεγμονώδεις και αυτοάνοσες διαταραχές, όπως η θυρεοειδίτιδα, ο διαβήτης τύπου 1, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η συστηματική σκλήρυνση, η μεσαγγειακή υπερπλασματική σπειραματονεφρίτιδα, η ψωρίαση αλλά και σε νεοπλάσματα όπως το καρδιακό μύζωμα, το καρκίνωμα των νεφρικών κυττάρων, το πολλαπλό μύελωμα, το λέμφωμα και η λευχαιμία. Η IL-6 έχει θεωρηθεί ως προφλεγμονώδης κυτταροκίνη και συχνά χρησιμοποιείται ως δείκτης για τη συστηματική ενεργοποίηση προφλεγμονώδων κυτταροκινών. Είναι από τις ιντερλευκίνες που έχει ταυτόχρονα προφλεγμονώδη αλλά και αντιφλεγμονώδη δράση. Παρόλο που προάγει την απόκριση πρωτεϊνών οξείας φάσης έχει και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Αυτά τα

πεπτιδικά μόρια μοιράζονται τους ίδιους κυτταρικούς υποδοχείς και έτσι έχουν πολλά κοινά φυσιολογικά χαρακτηριστικά με την IL-6. Επιπλέον, η IL-6 ρυθμίζει προς τα κάτω τη σύνθεση της IL-1 και του TNF. Έχει τη δυνατότητα να μειώνει τη σύνθεση προφλεγμονώδων κυτταροκινών αλλά έχει μικρή επίδραση στην σύνθεση αντιφλεγμονωδών, όπως η IL-10. Η IL-6 επάγει τη σύνθεση γλυκοκορτικοειδών και προωθεί την παραγωγή του IL-1ra. Ταυτόχρονα, παρεμποδίζει την παραγωγή κυτταροκινών με προφλεγμονώδη δράση όπως η GM-CSF, η IFN-γ και η MIP-2. Κατ' αυτό τον τρόπο η IL-6 εντάσσεται και στις αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες. (Shaikh, 2011)

Η IL-10 παράγεται από διάφορους τύπους κυττάρων, από τα CD4⁺ T, τα ενεργοποιημένα CD8⁺ T και τα ενεργοποιημένα B-κύτταρα. Μέλη της οικογενείας των IL-10 είναι η IL-19, η IL-20, η IL-22, η IL-24, η IL-26, η IL-28 και η IL-29. Αυτά τα μέλη της IL-10 έχουν παρόμοια δράση με τις ιντερφερόνες και έχουν αντική δράση. Έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει την παραγωγή της IFN-γ ενεργοποιώντας τα T-κύτταρα. Μια από τις δράσεις της είναι η μείωση του πολλαπλασιασμού των αντιγόνων των T-κυττάρων. Ακόμα, παρεμποδίζει τη δράση της IL-4 και της IL-2. Η IL-10 παράγεται από τα TH2 κύτταρα και παρεμποδίζει τη λειτουργία των TH1 (π.χ. IFN-γ). Για αυτό το λόγο αναφέρεται και ως «αντικυτταροκίνη». Επιπλέον, επιδρά στη διαφοροποίηση των κυτταροτοξικών T-κυττάρων και δρα ως συμπαράγοντας στην αύξηση των T-κυττάρων. Η IL-10 είναι μια από τις σπουδαιότερες αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που υπάρχουν στο ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα. Είναι ισχυρός παρεμποδιστής των Th1 κυτταροκινών, όπως η IL-2 και η IFN-γ. Επίσης, απενεργοποιεί τη σύνθεση των προφλεγμονωδών μονοκυττάρων και μακροφάγων κυτταροκινών. Η IL-10 παρεμποδίζει τη σύνθεση μονοκυττάρων και μακροφάγων που προέρχονται από το TNF-α, την IL-1, την IL-6, την IL-8, την IL-12, τους παράγοντες διέγερσης των κοκκιοκυττάρων, το MIP-1α και MIP-2α. Ακόμα, παρεμποδίζει την παραγωγή κυτταροκινών από ουδετερόφιλα και NK-κύτταρα. Επιπρόσθετα, μειώνει την έκφραση των υποδοχέων του TNF. Σε ασθενείς με χρόνιες νόσους, που σχετίζονται με χρόνιες φλεγμονές, η IL-10 είναι άμεσα μετρήσιμη στο κυκλοφορικό σύστημα. Είναι παρούσα σε επαρκείς συγκεντρώσεις έτσι ώστε να υπάρχει μια φυσιολογική απόκριση του ξενιστή στη συστηματική φλεγμονή. (Commins et al., 2010, Shaikh, 2011)

3. Προβιοτικά

3.1. Ορισμός

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως προβιοτικά ορίζονται οι ζωντανοί οργανισμοί οι οποίοι όταν δοθούν στην κατάλληλη ποσότητα παρέχουν οφέλη στον ξενιστή. Ως προβιοτικά δρουν κυρίως βακτήρια από το γένος *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Ωστόσο, και κάποια άλλα είδη από τα γένη *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* και ορισμένα στελέχη ζυμομυκήτων καθώς και κάποια μη παθογόνα στελέχη του *Escherichia coli*, συμπεριφέρονται ως προβιοτικά. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ήταν τα πρώτα που αναγνωρίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως συμπληρώματα προβιοτικών. Τα οφέλη τους έγιναν γνωστά πρώτη φορά από τον καθηγητή Elie Metchnikoff το 1908, ο οποίος παρατήρησε τις ευεργετικές τους επιδράσεις σε αγρότες που ζούσαν στη Βουλγαρία και είχαν υψηλή κατανάλωση ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. Στη συνέχεια η αύξηση του επιστημονικού ενδιαφέροντος για τη σημασία της διατροφής και του εντερικού μικροβιόκοσμου οδήγησε στην εντατικοποίηση των ερευνών που είχαν ως στόχο τη ταξινόμηση και την ανακάλυψη νέων προβιοτικών στελεχών. (Lin C. et al.,2014, Türker et al.,2014)

3.2. Προβιοτικές ιδιότητες

3.2.1. Η επίδραση τους στον εντερικό μικροβιόκοσμο

Το πεπτικό σύστημα είναι το φυσικό ενδοσυμβιωτικό περιβάλλον των προβιοτικών. Οι λακτοβάκιλλοι εντοπίζονται στο γαστρεντερικό σωλήνα και στη στοματική κοιλότητα. Τα μπιφιδοβακτήρια εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στο γαστρεντερικό σωλήνα. Συμπεριφέρονται ως συμβιωτικά βακτήρια και συμβάλλουν στη διατήρηση ενός υγιούς εντερικού περιβάλλοντος. (Schell et al., 2002, Walter, 2008, Howarth, Wang, 2013)

Τα προβιοτικά έχουν την ικανότητα να παράγουν βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου και να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων με διάφορους μηχανισμούς. Επιπλέον, πιθανόν να έχουν προληπτική δράση ή/και να μειώνουν την ένταση των συμπτωμάτων σε διάφορες νόσους όπως η προκαλούμενη από αντιβιοτικά διάρροια, η διάρροια που οφείλεται σε παθογόνους παράγοντες, οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου κ.α. (Howarth, Wang, 2013)

Πιο συγκεκριμένα, τα προβιοτικά έχουν οφέλη στη λειτουργία του εντέρου και τον εντερικό μικροβιόκοσμο ασθενών που πάσχουν από οι φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου. Τα βακτήρια μπορούν να επηρεάσουν την εμφάνιση αυτών των νοσημάτων, καθώς σε αυτούς τους ασθενείς υπάρχει δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος απέναντι στα βακτήρια της εντερικής μικροχλωρίδας, ενώ ταυτόχρονα υπάρχουν διαφοροποιήσεις του εντερικού μικροβιόκοσμου που έχουν ως αποτέλεσμα την έναρξη φλεγμονής και την ανάπτυξη ανοσολογικών αποκρίσεων απέναντι στο βλεννογόνο. Έχει φανεί ότι τα προβιοτικά από τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* μπορούν να συνεισφέρουν στη διατήρηση της ισορροπίας στον εντερικό μικροβιόκοσμο. (Shadnouch et al., 2015)

Σε μια μελέτη φάνηκε ότι η λήψη προβιοτικών μπορεί να μειώσει τα συμπτώματα της ελκώδους κολίτιδας. Αναλυτικότερα, οι συμμετέχοντες έλαβαν για 12 εβδομάδες ένα εικονικό φάρμακα ή το VSL#3, το οποίο περιέχει *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*. Το 42,9% των ατόμων που έλαβαν τα προβιοτικά παρουσίασαν ύφεση της νόσου, ενώ από τους συμμετέχοντες που έλαβαν το placebo μόνο το 15,7% παρουσίασε βελτίωση.

(Ghouri et al., 2014)

Σε κυτταρικό επίπεδο έχει φανεί ότι η λήψη προβιοτικών μπορεί να επηρεάσει τα δενδριτικά κύτταρα, τα οποία διαμορφώνουν τη βακτηριακή αναγνώριση και τις αποκρίσεις των T-κυττάρων σε ασθενείς με ελκώδη κολίτιδα. Σε μια μελέτη φάνηκε ότι η λήψη προβιοτικών μπορεί να προκαλέσει αύξηση της αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 και μείωση της προφλεγμονώδους IL-12 από τα δενδριτικά κύτταρα του παχέος εντέρου. (Ghouri et al., 2014)

Επιπρόσθετα, τα προβιοτικά μπορούν να βοηθήσουν στη θεραπεία της διάρροιας αλλά και να μειώσουν τη διάρκεια και τα συμπτώματα. Δρουν ανταγωνιστικά με παθογόνους μικροοργανισμούς και παρεμποδίζουν την προσκόλληση τους στην επιφάνεια του βλεννογόνου. Ακόμα, μειώνουν το pH του αυλού του εντέρου και έτσι εμποδίζουν την ανάπτυξη ορισμένων παθογόνων, όπως η *Escherichia coli*. Επίσης, μπορούν να παράγουν απευθείας αντιμικροβιακά

μόρια. Ταυτόχρονα έχουν ανοσορυθμιστική δράση και συνεπώς μειώνουν τη φλεγμονή που μπορεί να προκληθεί από ορισμένα βακτήρια. (Issa, Moucari, 2014)

Σε μια συστηματική ανασκόπηση μελετήθηκαν 56 κλινικές δοκιμές που συμμετείχαν βρέφη και παιδιά τα οποία εμφάνισαν οξεία διάρροια λόγω παθογόνων μικροοργανισμών. Φάνηκε ότι τα προβιοτικά μπορούν να μειώσουν τη διάρκεια της διάρροιας κατά 24 ώρες αλλά και τη συχνότητα των κενώσεων. Συνεπώς, τα προβιοτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με θεραπεία για την αποκατάσταση της ενυδάτωσης καθώς φαίνεται ότι η χρήση τους είναι ασφαλής και ωφέλιμη σε περιπτώσεις οξείας διάρροιας. (Guandalini,2011)

Επιπλέον, ο *Lactobacillus* GG αποτελεί ένα προβιοτικό το οποίο έχει ωφέλιμη δράση σε περιπτώσεις διάρροιας από ροταιό καθώς μπορεί να μειώσει τη διάρκεια της διάρροιας κατά 2.1 ημέρες. (Guandalini,2011)

Πέρα όμως από τη θεραπεία τα προβιοτικά μπορεί να είναι ωφέλιμα και στην πρόληψη της διάρροιας. Σε μια τυχαιοποιημένη διπλά τυφλή κλινική δοκιμή εξετάστηκαν 742 παιδιά τα οποία νοσηλεύονταν σε νοσοκομείο. Μια συχνή ενδοноσοκομειακή επιπλοκή είναι η εμφάνιση διάρροιας. Οι κύριοι παράγοντες που την προκαλούν είναι οι ροταιοί και σπανιότερα το *C.difficile*. Τα παιδιά που συμμετείχαν στη δοκιμή έλαβαν είτε ένα γάλα με *Lactobacillus* GG είτε ένα placebo. Φάνηκε ότι η λήψη του γάλακτος μείωσε την πιθανότητα εμφάνισης γαστρεντερίτιδας και εμετού. Ακόμα, μειώθηκε η πιθανότητα εμφάνισης μόλυνσης του γαστρεντερικού που διαρκεί πάνω από 2 ημέρες. (Guandalini,2011)

Επιπρόσθετα, τα προβιοτικά μπορούν να παρέχουν οφέλη στην προκαλούμενη από αντιβιοτικά διάρροια. Η διάρροια είναι μια κοινή επιπλοκή που μπορεί να εμφανιστεί λόγω της λήψης αντιβιοτικών και συνήθως εμφανίζεται 2-3 βδομάδες μετά τη διακοπή της λήψης των φαρμάκων και πιο σπάνια κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Τα αντιβιοτικά διαταράσσουν τη φυσιολογική μικροχλωρίδα του εντέρου με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται ο μεταβολισμός των υδατανθράκων και η αντιμικροβιακή ικανότητα του εντέρου. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πρόκληση οσμωτικής διάρροιας. (Hickson, 2011)

Σε μια μελέτη φάνηκε ότι ο *L.rhamnosus GG* αυξάνει την παραγωγή της βλενίνης, η οποία βελτιώνει την άμυνα του επιθηλίου και αυξάνει την απορρόφηση του νερού από το έντερο και συνεπώς μπορεί να μειώσει τη διάρροια. (Hickson, 2011)

Σε διαφορετική μελέτη φαίνεται ότι η λήψη προβιοτικών μπορεί να μειώσει τα συμπτώματα της διάρροιας που προκαλείται από αντιβιοτικά σε παιδιά. Οι συμμετέχοντες ήταν παιδιά ηλικίας 6 μηνών έως 10 χρονών και έλαβαν *Lactobacillus casei sps.rhamnosus*. Φάνηκε ότι τα παιδιά που έλαβαν τους λακτοβάκιλλους μείωσαν τη συχνότητα των διαρροιών και αύξησαν τη συνοχή των κοπράνων σε σχέση με την ομάδα που έλαβε το placebo.(Vanderhoof et al., 1999)

Η ευεργετική επίπτωση που έχουν στη δομή του εντερικού μικροβιόκοσμου αιτιολογείται λαμβάνοντας υπόψη ορισμένους από τους μηχανισμούς δράσης τους, όπως η ικανότητα προσκόλλησης τους στην επιφάνεια του εντερικού αυλού, η βελτίωση της λειτουργίας του φραγμού του βλεννογόνου, η συμμετοχή τους στη φυσική και επίκτητη ανοσία και η παραγωγή βακτηριοσινών . Τέλος, ανταγωνίζονται ορισμένα παθογόνα για τις ίδιες θέσεις υποδοχής. (Howarth, Wang, 2013)

3.2.2. Προσκόλληση των προβιοτικών στο βλεννογόνο και σε επιθηλιακά κύτταρα

Η ικανότητα των προβιοτικών να προσκολλώνται σε επιθηλιακά κύτταρα και στην επιφάνεια του βλεννογόνου είναι μια από τις βασικές τους ιδιότητες καθώς επιτρέπει τον αποικισμό στον εντερικό βλεννογόνο, ρυθμίζει τις λειτουργίες του ανοσοποιητικού και δρα ανταγωνιστικά απέναντι στα παθογόνα. (Liong,2011)

Η ικανότητα των λακτοβακίλλων να προσκολλώνται στο γαστρεντερικό βλεννογόνο επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ξενιστή και των βακτηρίων που είναι παρόντα στο γαστρεντερικό σύστημα, μεταβάλλοντας τη μικροβιακή σύνθεση και διεγείροντας το ανοσοποιητικό σύστημα. Η ικανότητα προσκόλλησης τους συνδέεται με τις ιδιότητες τους στην επιφάνεια τους που επηρεάζονται από τη σύσταση, τη δομή και την οργάνωση του κυτταρικού τους τοιχώματος. Ένας μεγάλος αριθμός συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος συμμετέχει στην προσκόλληση, όπως οι πολυσακχαρίτες και οι πρωτεΐνες, τα οποία

συμβάλλουν στις φυσιοχημικές ιδιότητες της βακτηριακής επιφάνειας, όπως η υδροφοβικότητα. (Deerika,Charalamopoulos, 2010)

Μια μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό να διερευνήσει τα συστατικά δυο διαφορετικών φαινοτύπων του *L.rhamnosus* που συμμετέχουν στην ικανότητα προσκόλλησης του σε επιθηλιακά κύτταρα καθώς και την ικανότητα προσκόλλησης του. Φάνηκε ότι και οι δυο φαινότυποι είχαν την ικανότητα να σχηματίζουν συσσωματώματα, ενώ ταυτόχρονα είχαν την ικανότητα της προσκόλλησης η οποία φάνηκε να οφείλετε σε πρωτεΐνες τις επιφάνειας των λακτοβακίλλων και σε ορισμένα λιπαρά οξέα. (Polak-Berecka et al.,2014)

Η προσκόλληση των προβιοτικών επηρεάζεται από πρωτεΐνες του βλεννογόνου που προσδένονται στις ίδιες θέσεις με πρωτεΐνες, όπως οι λεκτίνες. Ακόμα, εξαρτάται από τα επίπεδα της θερμοκρασίας και από το pH όταν λαμβάνουν μέρος σε διαδικασίες ζύμωσης. Έχει φανεί ότι αλλαγές στο pH και στη θερμοκρασία μπορούν να διαφοροποιήσουν την προσκόλληση του *Lactobacillus rhamnosus GG* στην επιφάνεια του βλεννογόνου.

(Howarth, Wang, 2013)

Πρέπει να αναφερθεί ότι οι λακτοβάκιλλοι που έχουν τη δυνατότητα προσκόλλησης θεωρούνται ότι υπερτερούν έναντι άλλων προβιοτικών βακτηρίων, καθώς αυτή η ιδιότητα τους είναι αναγκαία προκειμένου να δράσουν στον εντερικό σωλήνα. (Kotsou et al., 2008)

Σε γενικές γραμμές τα προβιοτικά μπορούν να δρουν ανταγωνιστικά στον αποικισμό των παθογόνων. Για να συμβεί αυτό θα πρέπει, όμως, να επιζήσουν στη γαστρεντερική οδό, να προσκολληθούν και να αποικίσουν τον εντερικό βλεννογόνο. Τα στελέχη των *Lb.acidophilus* και *Bifidobacterium* φαίνεται να είναι πιο ανθεκτικά απέναντι στα χολικά άλατα και στα γαστρικά οξέα σε σχέση με τα *Lb.delbrueckii ssp. bulgaricus* και *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*.(Havenaar, Marteau, 1994)

Η προσκόλληση σε επιθηλιακά κύτταρα έχει φανεί ότι υπάρχει στα *L.gasseri*, *L.acidophilus*, *L. casei* και *Bifidobacterium*. Ο *L.acidophilus* παράγει έναν παράγοντα που του επιτρέπει την προσκόλληση στις ανθρώπινες εντερικές κυτταρικές σειρές.(Havenaar, Marteau, 1994)

3.2.3 Διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού

Η ακεραιότητα του εντερικού φραγμού επηρεάζεται από τις αλλαγές που μπορεί να συμβούν στην εντερική διαπερατότητα, τη σύνθεση της βλεννίνης και την ομοιόσταση μεταξύ του ρυθμού παραγωγής και απόπτωσης των εντεροκυττάρων. Ορισμένα προβιοτικά έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν την εντερική ακεραιότητα. (Howarth, Wang, 2013)

Η διατήρηση της εντερικής ακεραιότητας συντελείται εν μέρει μέσω της βλεννίνης. Η εντερική βλεννίνη είναι μια πρωτεΐνη που αποτελεί το βασικό συστατικό της βλέννας που καλύπτει το επιθήλιο της γαστρεντερικής οδού. Είναι ένα γλυκοζυλιωμένο μακρομόριο που παράγεται από τους επιθηλιακούς ιστούς. Τα καλυκοειδή κύτταρα του εντερικού επιθηλίου συνθέτουν, αποθηκεύουν και εκκρίνουν βλεννίνη προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα του βλεννογόνου. Ακόμα, η βλεννίνη σχηματίζει ένα πήκτωμα και δημιουργεί ένα προστατευτικό στρώμα βλέννας στην επιθηλιακή επιφάνεια που προστατεύει το βλεννογόνο από την υπέρμετρη ανάπτυξη βακτηρίων. Τα μπιφιδοβακτήρια έχουν την ικανότητα να διασπούν τους δεσμούς των γλυκοπρωτεϊνών εντός της βλεννίνης και να διευκολύνουν την επαφή των εντεροβακτηρίων. (Howarth, Wang, 2013)

Ορισμένα προβιοτικά έχουν τη δυνατότητα να αποκαθιστούν τα επίπεδα βλεννίνης στον οργανισμό. Μπορούν να επηρεάσουν τον εντερικό μικροβιόκοσμο και τον εντερικό φραγμό επηρεάζοντας τη σύνθεση μονοσακχαριτών που αποτελούν βασικά συστατικά της βλεννίνης και διαφοροποιώντας την εντερική μορφολογία. Σε γενικές γραμμές, τα προβιοτικά μπορούν να συμβάλλουν στη διατήρηση της εντερικής ακεραιότητας και στην αποκατάσταση της βλεννίνης. (Howarth, Wang, 2013)

Επιπλέον, η προστατευτική δράση των προβιοτικών στη διατήρηση του εντερικού φραγμού συντελείται μέσα από την παραγωγή ορισμένων μορίων, όπως τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου. Σε αυτά συμπεριλαμβάνεται και το βουτυρικό οξύ. Τα λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου βελτιώνουν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού ρυθμίζοντας την έκφραση πρωτεϊνών που συμβάλλουν στη δημιουργία ισχυρών δεσμών. Οι μεταβολίτες που παράγονται από τα *L.rhamnosus GG*, *B.bifidum*, *B.breve*, *Streptococcus thermophilus* και *Ruminococcus gnavus* συνεισφέρουν στην εντερική ομοιόσταση και στην λειτουργία του φραγμού. Ακόμα, σε

κύτταρα Caco-2 η χορήγηση του *B.lactis* βελτιώνει τους δεσμούς των επιθηλιακών κυττάρων και την ακεραιότητα. Σε ζωικά μοντέλα, φάνηκε ότι η από του στόματος χορήγηση βιοδραστικών προϊόντων του *B.infantis* μείωσε την εντερική διαπερατότητα σε ποντίκια με κολίτιδα. Αυτό το αποτέλεσμα οφείλεται στην έκφραση πρωτεϊνών ισχυρών δεσμών μέσα από έναν μηχανισμό που εμπλέκεται η πρωτεϊνική κινάση. (Rao, Samak, 2013)

Ένα ακόμα συστατικό των λακτοβακίλλων που συντελεί στην επιθηλιακή ακεραιότητα στα Caco-2 είναι τα πολυφωσφορικά. Τα πολυφωσφορικά βελτιώνουν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού, μειώνουν το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από τη διάσπαση του και βελτιώνουν την εντερική ομοιόσταση μέσω της ιντεγκρίνης. Διαλυτές πρωτεΐνες του *L.rhamnosus* GG δρουν, επίσης, προστατευτικά στους δεσμούς του επιθηλίου σε περιπτώσεις οξειδωτικού στρες, αναστέλλοντας τη διάσπαση του εντερικού φραγμού που μπορεί να προκληθεί από υπεροξείδιο του υδρογόνου. (Rao, Samak, 2013)

Επίσης, τα προβιοτικά μπορούν να μειώσουν την αύξηση της κυτταρικής διαπερατότητας που προκαλείται από το LPS. Σε μια μελέτη χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά T84 και μετρήθηκε η διαπερατότητα της πριν και μετά τη συνεπώαση με προβιοτικά καθώς επίσης και μετά τη διέγερση τους με LPS. Για το σκοπό της μελέτης χρησιμοποιήθηκε ένα διατροφικό σκεύασμα που περιείχε *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* και δυο στελέχη του *Bifidobacterium lactis*. Φάνηκε ότι στα κύτταρα που είχαν προστεθεί τα προβιοτικά και το LPS παρεμποδίστηκε η σύνθεση του παράγοντα TNFα, ο οποίος μπορεί να μεταβάλλει την κυτταρική διαπερατότητα. Ακόμα, πραγματοποιήθηκε εντερική βιοψία σε ασθενείς με σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου και φάνηκε ότι η προσθήκη των προβιοτικών είχε προστατευτική δράση απέναντι στην αύξηση της διαπερατότητας. (Nébot-Vivinus et al., 2014)

Επιπλέον, φαίνεται ότι οι λακτοβάκιλλοι μπορούν να επηρεάσουν τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων που σχετίζονται με τη διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού. Μια τυχαιοποιημένη διπλά τυφλή δοκιμή πραγματοποιήθηκε με σκοπό να μελετήσει την επίδραση της από του στόματος λήψης στελεχών του *L.plantarum* στην εντερική διαπερατότητα, στην έκφραση πρωτεϊνών ισχυρών δεσμών του επιθηλίου του δωδεκαδακτύλου και στη μεταγραφή γονιδίων στο βλεννογόνο σε υγιή άτομα. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η λήψη του *L.*

plantarum επηρεάζει τη μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στη προσκόλληση και στη δημιουργία ισχυρών δεσμών. (Mujagic et al., 2017)

3.2.4. Επίδραση στον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων

Τα προβιοτικά συμμετέχουν στο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στην κυτταρική απόπτωση. Η απόπτωση είναι ένας μηχανισμός των κυττάρων με σκοπό να ελέγξει τον αριθμό των κυττάρων στους ιστούς και να μειώσει τον αριθμό των ανεξάρτητων κυττάρων. Όταν υπάρχει αύξηση του ρυθμού απόπτωσης σε σχέση με τον πολλαπλασιασμό τότε μπορεί ο οργανισμός να οδηγηθεί σε διάφορες ασθένειες καθώς αυξάνεται η εισβολή παθογόνων και η έκκριση τοξινών. Τα προβιοτικά αναστέλλουν τη φυσιολογική κυτταρική απόπτωση, συνεισφέρουν στην κυτταρική διαφοροποίηση, έχουν κυτταροπροστατευτική δράση και κατ' αυτό τον τρόπο βελτιώνουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο *Lactobacillus GG* έχει φανεί σε μελέτες ότι ρυθμίζει γονίδια που σχετίζονται με την κυτταρική απόπτωση και επάγει τη μεταγραφή γονιδίων που έχουν αντιαποπτωτική δράση, χωρίς ταυτόχρονα να ρυθμίζει προς τα πάνω γονίδια με προφλεγμονώδη δράση, όπως η *S.Typhimurium* που παράγει αντι-αποπτωτικά γονίδια ενεργοποιώντας τον παράγοντα NF-κΒ. Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και μια άλλη έρευνα στην οποία φάνηκε ότι ενισχύθηκε η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μετά από έκθεση των επιθηλιακών κυττάρων Caco-2 στο *Lactobacillus acidophilus* για 20 ώρες. Ακόμα, τα προβιοτικά βοηθούν στην πρόληψη της φλεγμονής που πραγματοποιείται λόγω της κυτταρικής απόπτωσης. Σε μια μελέτη φάνηκε ότι ο *Lactobacillus GG* βοηθά στη μείωση των κυτταροκινών όπως είναι ο TNF-α, η IL-1α και η IL-1γ που εκκρίνονται λόγω της κυτταρικής απόπτωσης σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του παχέος εντέρου. Γενικά, τα προβιοτικά μπορούν να επάγουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέσω έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων που διεγείρουν την κυτταρική ανάπτυξη, ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζουν την δράση αντιαποπτωτικών και αποπτικών πρωτεϊνών που συμβάλλουν στην αποτελεσματική απόκριση των κυτταροκινών στη φλεγμονή και την απόπτωση. (Howarth, Wang, 2013)

3.2.5. Ανθεκτικότητα στα χολικά άλατα

Μια από τις βασικές ιδιότητες των προβιοτικών βακτηρίων είναι η ανθεκτικότητα τους στα χολικά άλατα και η ικανότητα τους να επιβιώνουν στο λεπτό έντερο. Σε γενικές γραμμές, η

ανθεκτικότητα τους εξαρτάται από το στέλεχος. Ωστόσο, τόσο οι λακτοβάκιλλοι όσο και τα μπίφιντοβακτήρια έχουν την ικανότητα να προσαρμόζονται σταδιακά στην παρουσία των αλάτων και να αυξάνεται σταδιακά η ανοχή τους καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των χολικών αλάτων. Η αντίσταση στη χολή επιτυγχάνεται στα προβιοτικά μέσα από την ενεργή εκροή χολικών αλάτων και οξέων, την υδρόλυση των χολικών αλάτων και με αλλαγές στη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης. (Ruiz et al., 2013)

3.2.6. Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά

Τα τελευταία χρόνια αυξάνεται διαρκώς η χορήγηση αντιβιοτικών με αποτέλεσμα να αποτελεί τεράστιο πρόβλημα για τη δημόσια υγεία η ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηρίων. Η υπέρμετρη αυτή χρήση μπορεί να μετατρέψει βακτήρια τα οποία είναι ευπαθή, σε ανθεκτικά στελέχη στα αντιβιοτικά. Η ανησυχία για την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηρίων δεν αφορά μόνο τα παθογόνα, αλλά και τα ωφέλιμα βακτηριακά είδη, όπως τα προβιοτικά στελέχη, τα οποία μπορεί να μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικότητας σε κάποιο αντιβιοτικό. (Sharma et al.,2014)

Υπάρχουν επιστημονικά δεδομένα που αναφέρουν ότι τα συμβιωτικά βακτήρια μπορούν να λειτουργήσουν ως αποθήκες γονιδίων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά και για αυτό το λόγο τα προβιοτικά που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση δεν θα πρέπει να φέρουν τέτοια γονίδια. Σε αυτό το πλαίσιο υπάρχουν ανησυχίες ότι τα προβιοτικά μπορούν να αποθηκεύσουν και να μεταφέρουν γονίδια ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. (Ashraf, Shah,2011)

Σύμφωνα με την EFSA (European Food Safety Authority), η οποία υπολόγισε και ποσοτικοποίησε την αντοχή στα αντιβιοτικά σε βακτήρια του γαλακτικού οξέος, τα στελέχη των *Lactococcus* και *Lactobacillus* θεωρούνται ασφαλή. (Ashraf, Shah,2011)

Οι λακτοβάκιλλοι εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα ανθεκτικών στα αντιβιοτικά ιδιοτήτων, που όμως δεν μεταδίδεται, για αυτό το λόγο θεωρούνται ασφαλή. Σε μια μελέτη φάνηκε ότι οι λακτοβάκιλλοι εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο ναλιδιξικό οξύ, την αζτρεονάμη, την κυκλοσερίνη, τη μετρονιδαζόλη, την καναμυκίνη, την πολυμυξίνη Β και τη στρεπτομυκίνη. Όλα τα στελέχη του *L.acidophilus* εμφάνισαν υψηλή ανθεκτικότητα στο ναλιδιξικό οξύ, ενώ ο

L.casei εμφάνισε υψηλή ανθεκτικότητα στην αζτρεονάμη, την κυκλοσερίνη, την πολυμικίνη Β και τη βαμκομυκίνη. (Ashraf, Shah,2011)

Σε διαφορετική μελέτη απομονώθηκαν 64 στελέχη του *L.paracasei* και του *L. casei* και φάνηκε ότι όλα τα στελέχη ήταν ευπαθή στην αμπικιλίνη και την κλινδαμυκίνη, ενώ εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στη στρεπτομυκίνη και τη γενταμυκίνη. Τρία στελέχη του *L.paracasei* εμφάνισαν ανθεκτικότητα στη τετρακυκλίνη και την ερυθρομυκίνη. (Ashraf, Shah,2011)

Σε γενικές γραμμές, η ανθεκτικότητα των προβιοτικών στα αντιβιοτικά είναι εγγενούς τύπου. Η τετρακυκλίνη, η βαμκομυκίνη και η ερυθρομυκίνη είναι οι πιο συχνές ουσίες στις οποίες εμφανίζουν ανθεκτικότητα τα προβιοτικά. Η εγγενής ανθεκτικότητα δεν εγκυμονεί κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, διότι τα γονίδια ανθεκτικότητας δεν εντοπίζονται σε μεταθετά γενετικά στοιχεία (π.χ. πλασμίδια) και δεν μετακινούνται από στέλεχος σε στέλεχος και επομένως μπορούν να θεωρηθούν ως ασφαλή. (Ashraf, Shah,2011)

3.2.7. Αντιμικροβιακή δράση

Η ικανότητα των προβιοτικών να προσκολλώνται σε κύτταρα και επιφάνειες έχει ως αποτέλεσμα να ανταγωνίζονται διάφορα παθογόνα και να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη τους. Μετά από έλεγχο φάνηκε ότι στελέχη των *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gallinarum*, *L. rhamnosus* και *L. plantarum* παρεμποδίζουν την εντερική ανάπτυξη συγκεκριμένων παθογόνων όπως το *Escherichia coli* και το *Salmonella spp.* Επιπλέον, ορισμένα μπιφιδοβακτήρια που απομονώθηκαν από νεογνά φάνηκε να έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι καολίμορφων και μερικών ακόμα παθογόνων βακτηρίων, χωρίς ταυτόχρονα να έχουν κάποια κυτταροτοξική δράση στο εντερικό επιθήλιο των βρεφών. Επιπροσθέτως, το στέλεχος UCC118 του *Lactobacillus salivarius* μπορεί να προκαλέσει την επαγωγή αντιμικροβιακών γονιδίων σε κυτταρική σειρά Caco-2. Επομένως, τα προβιοτικά ενδεχομένως να εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση και παρεμβαίνοντας σε μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης στα επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή. (Howarth, Wang, 2013)

3.2.8. Παραγωγή Μονοξειδίου του αζώτου (NO)

Το NO είναι ένα δραστικό αέριο που αποτελείται από ένα άτομο αζώτου και ένα άτομο οξυγόνου με ένα μη συζευγμένο ηλεκτρόνιο. Σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει πολλές αντιδράσεις που καταλήγουν είτε στη δημιουργία τοξικών οξειδίων του αζώτου, είτε στην αναστολή της δραστικότητας ενζύμων, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της μικροβιακής αύξησης. Πιο συγκεκριμένα μπορεί να αντιδράσει με ενεργές ρίζες οξυγόνου και να προκαλέσει τη σύνθεση επιβλαβών οξειδωτικών μορίων. (Stern, Zhu, 2014)

Το NO είναι μία κυτταροτοξική ένωση που συμμετέχει σε πολλές φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες, όπως η αγγειοδιαστολή, η νευροδιαβίβαση, σε λειτουργίες του ανοσοποιητικού, σε θρόμβους, στη ρύθμιση της συστολής των λείων μυών και στις διαδικασίες της μνήμης. Έχει αντιμικροβιακή και αντιμυκητιασική δράση. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις δρα προστατευτικά στον εντερικό βλεννογόνο και ρυθμίζει την έκκριση διττανθρακικού από το βλεννογόνο. Στα κύτταρα των θηλαστικών το NO παράγεται από τη συνθετάση του μονοξειδίου του αζώτου (NOS), η οποία καταλύει την οξείδωση της L-αργινίνης σε κιτρουλίνη και NO. (Korhonen et al., 2001, Korhonen et al., 2002, Yarullina et al., 2006)

Στα βακτήρια το NO παράγεται από την απονιτροποίηση των νιτρικών αλάτων από τη νιτρική αναγωγή και μπορεί να αναχθεί περαιτέρω σε υποξείδιο του αζώτου (N_2O). Τα βακτήρια για να αποφύγουν τον σχηματισμό τοξικών αζωτούχων ριζών που δημιουργούνται από το NO, ενεργοποιούν αναγωγικές αντιδράσεις, που διατηρούν το NO σε χαμηλά επίπεδα (nmoles). (Yarullina et al., 2006)

Σε μια μελέτη χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικά στελέχη λακτοβακίλλων που ανήκαν στο *L.plantarum* και στο *L.fermentum* και μετρήθηκε η παραγωγή του NO σε MRS broth. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε ο μεταβολισμός των νιτρικών αλάτων και της L-αργινίνης από τους λακτοβακίλλους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά από την 22ωρη επώαση των προβιοτικών τα στελέχη του *L.fermentum* προκάλεσαν την παραγωγή NO, ενώ δεν υπήρχε η ίδια επίδραση και στα στελέχη του *L.plantarum*. Ακόμα, φάνηκε ότι τα στελέχη του *L.fermentum* μπορούν να προκαλέσουν την έκφραση της νιτρικής αναγωγής σε αναερόβιες συνθήκες. (Verstraete, 2001)

Ωστόσο σε διαφορετική μελέτη φάνηκε ότι οι λακτοβάκιλλοι και συγκεκριμένα στελέχη του *L.plantarum* δεν μπορούν να πραγματοποιήσουν απονιτροποίηση καθώς δεν βρέθηκαν αέρια απονιτροποίησης ενώ φάνηκε ότι αυτά τα στελέχη περιείχαν τη νιτρική αναγωγή. (Yarullina et al., 2006)

Οι θετικοί Gram λακτοβάκιλλοι και μπιφιδοβακτήρια μπορούν να προκαλέσουν τη σύνθεση του NO. Η αντιμικροβιακή τους δράση και ο ρόλος τους στην ανοσία πιθανώς να οφείλεται στη σύνθεση του NO.(Zidek et al., 2010)

Σε μια μελέτη επιβεβαιώνεται ότι οι λακτοβάκιλλοι και τα μπιφιδοβακτήρια μπορούν να επάγουν την παραγωγή του NO. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν επιθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα κύτταρα χοίρων. Τα κύτταρα συνεπώστηκαν για 48 ώρες με 39 διαφορετικά στελέχη λακτοβακίλλων και μπιφιδοβακτηρίων και στη συνέχεια μετρήθηκε η συγκέντρωση του NO μέσα από τη μέτρηση της ποσότητας του NO₂⁻, με βάση την αντίδραση Griess. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στελέχη των *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei/rhamnosus* και *Lactobacillus casei* μπορούσαν να προκαλέσουν την παραγωγή του NO στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, ενώ κανένα από τα μπιφιδοβακτήρια δεν έδειξε να έχει αυτή την ικανότητα. Ακόμα, η παραγωγή του NO αυξήθηκε στα μακροφάγα κύτταρα μετά τη συνεπώαση τους με το *L.casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* και το *Bifidobacterium bifidum*. (Pipenbaher et al., 2009)

Οι λακτοβάκιλλοι μπορούν να προκαλέσουν παραγωγή του NO μέσα από την επαγωγή της συνθετάσης του NO (iNOS) μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-kB. Έχει φανεί ότι το *Lactobacillus rhamnosus* GG επάγει την έκφραση της iNOS και τη σύνθεση του NO σε μακροφάγα και σε ανθρώπινα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. (Korhonen et al., 2001)

Σε άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μακροφάγα κύτταρα ποντικίου και ανθρώπινα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του *Lactobacillus rhamnosus* GG στην έκκριση NO. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η επαφή των μακροφάγων με το *Lactobacillus rhamnosus* GG προκάλεσε σημαντική αύξηση των επιπέδων του NO , μόνο όμως παρουσία της ιντερφερόνης-γ. Αντίστοιχα, στα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα φάνηκε να προκαλείται

αύξηση της συγκέντρωσης NO μόνο με την ταυτόχρονη παρουσία των ιντερλευκίνη-1, TNF-α, και IFN-γ, ενώ απουσία αυτών των κυτταροκινών δεν σημειώθηκε υπήρχε αύξηση του NO. (Korhonen et al., 2001)

3.3. Το γένος *Lactobacillus*

Οι λακτοβάκιλλοι ανήκουν στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος. Χρησιμοποιούν υδατάνθρακες και μέσω της ζύμωσης παράγουν γαλακτικό οξύ, ως τελικό προϊόν. Είναι προαιρετικά αναερόβια, Gram θετικά βακτήρια, αρνητικά στην καταλάση, δε σχηματίζουν σπόρια και αναπτύσσονται καλύτερα σε μικροαεροφιλικές συνθήκες. Μπορούν να αναπτυχθούν σε ποικίλα μέσα, συμπεριλαμβανομένου του MRS στο οποίο εμφανίζονται ως λευκές και βλεννώδεις αποικίες. (Goldstein et al., 2015)

Οι λακτοβάκιλλοι αποτελούνται από 170 διαφορετικά είδη και 17 υποείδη. Στη γαστρεντερική οδό υπάρχουν ποικίλα είδη λακτοβακίλλων. Για παράδειγμα, από τον ανθρώπινο εντερικό σωλήνα έχουν απομονωθεί τα *L.fermentum*, *L.plantarum*, *L.casei* και *L. rhamnosus*, ενώ από το βλεννογόνο του στομάχου έχουν απομονωθεί τα *L.antri*, *L.gastricus*, *L.kalixensis*, *L. reuteri* και *L.ultunensis*. Το *Lactobacillus acidophilus* βρίσκεται φυσικά στη γαστρεντερική οδό και στο στόμα. Τα *L.rhamnosus* και *L.casei* είναι οι συχνότερα απομονωμένοι λακτοβάκιλλοι. (Goldstein et al., 2015)

3.4. Η επίδραση των λακτοβακίλλων στην ανοσία του ξενιστή

3.4.1. Λακτοβάκιλλοι και ρύθμιση της έκκρισης των κυτταροκινών

Τα προβιοτικά στελέχη φαίνεται ότι δρουν και μέσω της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος. Κάποια στελέχη λακτοβακίλλων έχει παρατηρηθεί ότι έχουν ανοσορρυθμιστικές δράσεις, συγκεκριμένα αυξάνουν την κυτταροτοξικότητα των NK-κυττάρων, επάγουν την παραγωγή της INF-γ και επηρεάζουν την έκφραση των κυτταροκινών. Οι λακτοβάκιλλοι είναι ανθεκτικοί στα ένζυμα που υπάρχουν στη στοματική κοιλότητα, έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν κατά τη διαδικασία της πέψης στο στομάχι και στην εντερική οδό και προσκολλώνται στο εντερικό επιθήλιο προκειμένου να δράσουν ως ανοσορρυθμιστικοί παράγοντες. Η χορήγηση λακτοβακίλλων συνδυαστικά με μπιφιδοβακτήρια φαίνεται να

βελτιώνει το ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτό πραγματοποιείται με βελτίωση της συστηματικής και τοπικής ανοσίας και με μείωση των αποκρίσεων του συστηματικού stress. (Cerbo et al., 2016)

Οι λακτοβάκιλλοι έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την έκκριση κυτταροκινών από επιθηλιακά και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος με αποτέλεσμα να προστατεύουν τον ξενιστή σε εντερικές διαταραχές. Αυτή η ιδιότητα τους πιθανώς οφείλεται στην ικανότητα των λακτοβακίλλων να παρεμποδίζουν τη δράση των Th2 κυττάρων. Τα προβιοτικά στελέχη *L.rhamnosus* GG και *L.plantarum* έχει φανεί ότι επάγουν την έκκριση της IL-8 από επιθηλιακά κύτταρα μετά από μόλυνση του οργανισμού με *S.Typhimurium* και κατ' επέκταση βελτιώνουν την άμυνα του οργανισμού απέναντι σε αυτό το παθογόνο. Ακόμα, σε μελέτη που έγινε φάνηκε πως η χορήγηση του *L.reuteri* σε ποντίκια οδήγησε σε παροδική έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών, όπως IL-1α, IL-6 και IFN-γ. Ωστόσο, φαίνεται ότι η παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών στα επιθηλιακά κύτταρα μετά από χορήγηση προβιοτικών είναι παροδική. Εάν συνεχιζόταν η παραγωγή αυτών των κυτταροκινών τότε ο οργανισμός θα οδηγούνταν σε χρόνια φλεγμονή. Για να αποφευχθεί αυτό, τα προβιοτικά βακτήρια αναστέλλουν την παρατεταμένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Ακόμα, τα προβιοτικά επάγουν την παραγωγή ρυθμιστικών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως η IL-10 και ο TGF-β. Η παραγωγή της IL-10 από τα επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να διεγείρει διάφορους μηχανισμούς που καταστέλλουν τη φλεγμονή και προστατεύουν τον οργανισμό από χρόνιες εντερικές φλεγμονές. (Malago, Koninkx, 2011)

Τα προβιοτικά ρυθμίζουν τη σύνθεση και την έκκριση κυτταροκινών μέσα από τον μικροβιακό αποικισμό. Συγκεκριμένα, ο αποικισμός επάγει την έκφραση αντιμικροβιακών πεπτιδίων και ρυθμίζει προς τα κάτω την έκφραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως οι κυτταροκίνες IFN. Αυτός ο μηχανισμός δίνει στα προβιοτικά την ικανότητα να συμμετέχουν στην πρόληψη της φλεγμονής που μπορεί να προκληθεί μετά από συνεχόμενη μικροβιακή έκθεση. (Malago, Koninkx, 2011)

Επίσης, ο ανοσορρυθμιστικός ρόλος των προβιοτικών οφείλεται και στην ικανότητα τους να διεγείρουν κύτταρα της φυσικής ανοσίας. Η χορήγηση των στελεχών *L.fermentum*, *L.plantarum*, *L.paracasei*, *L.reuteri* και *L.brevis* προκαλεί την παραγωγή των κυτταροκινών IL-

1β, IL-2, IL-12, IFN-γ και TNF-α από τα Th1 κύτταρα. Ωστόσο, αυτό δεν ισχύει και για την παραγωγή κυτταροκινών IL-10 και IL-4 από τα Th2 κύτταρα. (Malago, Koninkx, 2011)

Η δράση των προβιοτικών στελεχών στην ανοσορρύθμιση μελετάται από πολλές ερευνητικές ομάδες και τα αποτελέσματα φαίνεται να ποικίλουν ανάλογα με το προβιοτικό στέλεχος που χρησιμοποιείται, τις συνθήκες που εφαρμόζονται (in vitro ή in vivo), τον χρόνο έκθεσης του προβιοτικού με την κυτταρική σειρά, τον τύπο της κυτταρικής σειράς κ.α. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κάποιων από αυτές τις μελέτες.

Σε μια μελέτη αξιολογήθηκε η ικανότητα των προβιοτικών να ρυθμίζουν την παραγωγή κυτταροκινών σε κύτταρα Caco2 και HT29. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το *Lactobacillus rhamnosus*, το *Lactobacillus helveticus*, το *Bifidobacterium animalis*, το *Bifidobacterium breve*, το *Bifidobacterium longum*, το *Streptococcus thermophilus*, το *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, το *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* και το *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii*. Τα βακτήρια συν-επώαστηκαν με τις κυτταρικές σειρές για 8 ώρες και οι κυτταροκίνες που μετρήθηκαν ήταν η IL-1β, η IL-6, η IFN-γ, ο TNF-α, καθώς επίσης και η αντιφλεγμονώδης IL-10 και η χημειοκίνη IL-8. Τα περισσότερα στελέχη δε φάνηκε να επηρεάζουν την παραγωγή της IL-8, με εξαίρεση το *B. longum*, το *B. breve* και το *Pr.freudenreichii PJS* τα οποία αύξησαν σημαντικά την παραγωγή της συγκεκριμένης χημειοκίνης. Η παραγωγή της IL-1β και της IL-6 μειώθηκε με τη συν-επώαση των βακτηρίων. (Hidalgo-Cantabrana et al., 2014)

Επίσης σε άλλη μελέτη φαίνεται να επιβεβαιώνεται ότι τα προβιοτικά επηρεάζουν την έκκριση προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη *Lb.acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* και *Lb. rhamnosus GG*. Τα παραπάνω προβιοτικά συν-επώαστηκαν με ανθρώπινα μονοπύρρηνα κύτταρα του περιφερικού αίματος (PBMC) για 96 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα στελέχη είχαν την ικανότητα να επάγουν την παραγωγή προφλεγμονωδών και αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών από την συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Ωστόσο, το μέγεθος της παραγωγής φάνηκε να διαφέρει ανάλογα με το κάθε στέλεχος. Ακόμα, φάνηκε να αυξάνεται η συγκέντρωση της IL-2. Επιπλέον, τα προβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν φάνηκε να αυξάνουν τη συγκέντρωση των IL-4, IL-10 και

TGF-β στα κύτταρα PBMC. Αυτές οι κυτταροκίνες παρεμποδίζουν την παραγωγή της IL-12 και άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών. (Donkor et al., 2012)

Σε μια ακόμα έρευνα φαίνεται ότι τα προβιοτικά στελέχη διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή καθώς μπορούν να επηρεάσουν την έκκριση των λιποπολυσακχαριτών του εντέρου και των κυτταροκινών. Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν λακτοβάκιλλοι και μπιφιδοβακτήρια και πιο συγκεκριμένα τα στελέχη *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. longum*, και *B. longum infantis*. Ακόμα χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινος εντερικός μικροβιόκοσμος, από εθελοντές στους οποίους χορηγήθηκαν προβιοτικά για 14 ημέρες. Η συγκέντρωση των λιποπολυσακχαριτών φάνηκε να μειώνεται σημαντικά μετά από χορήγηση *B. bifidum*, *L. rhamnosus*, *B. longum* και *B. longum subsp. infantis*. Η μείωση αυτή φάνηκε να εξαρτάται από το χρόνο χορήγησης. Ακόμα, υπήρχαν διαφορές ανάμεσα στα είδη των προβιοτικών που χρησιμοποιήθηκαν και στην ανοσορυθμιστική τους ικανότητα. Συγκεκριμένα, η μείωση του TNF-α ήταν μεγαλύτερη στα *B. animalis*, *L. plantarum*, *B. longum* και *B. longum subsp. infantis*. Όσον αφορά την IL-1β υπήρξε μεγαλύτερη μείωση στη συγκέντρωση της όταν χρησιμοποιήθηκαν τα *L. reuteri*, *L. rhamnosus* και *B. bifidum*. Η συγκέντρωση της IL-4 αυξήθηκε σημαντικά με τα *L. reuteri*, *L. plantarum* και *B. longum subsp. infantis*. Γενικότερα, το *B. longum subsp. infantis* είχε τη μεγαλύτερη ικανότητα να μειώνει τη συγκέντρωση των λιποπολυσακχαριτών και του TNF-α και να αυξάνει τη συγκέντρωση της IL-4. (Rodes, 2013)

Σε ακόμα μια μελέτη υποστηρίζεται η δράση των προβιοτικών στη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος. Για το σκοπό της μελέτης γυναίκες ηλικίας 22-29 ετών χωρίστηκαν σε δυο ομάδες. Η μια ομάδα λάμβανε γάλα το οποίο είχε ζυμωθεί με λακτοβάκιλλους και η άλλη ομάδα λάμβανε ένα κοινό γιαούρτι. Και τα δυο προϊόντα περιείχαν τον *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* και τον *Streptococcus thermophilus*, ενώ το γάλα περιείχε και τον *Lactobacillus rhamnosus* GG. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και στις δυο ομάδες υπήρχε διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος. Στην ομάδα που κατανάλωνε το συμβατικό γιαούρτι παρατηρήθηκε αύξηση των CD69+T βοηθητικών κυττάρων, χωρίς όμως αυτή η αλλαγή να διατηρείται όταν σταματάει η κατανάλωση του συγκεκριμένου προϊόντος. Επιπλέον, και στις δυο ομάδες υπήρξε διέγερση της παραγωγής των προφλεγμονωδών κυτταροκινών INF-γ, IL-1b και TNF-a. Αυτή η αύξηση ήταν μεγαλύτερη στην ομάδα που κατανάλωνε το κοινό γιαούρτι. Όσον αφορά την έκκριση της IL-6 δεν παρατηρήθηκε κάποια

αλλαγή. Ακόμα, μελετήθηκαν *in vitro* και οι επιδράσεις των λακτοβάκιλων σε κυτταρικό επίπεδο. Ο *L.rhamnosus GG* φάνηκε ότι μπορεί να επάγει την ωρίμανση των δενδριτικών κυττάρων, ενώ ο *L. delbrueckii* διέγειρε την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών. (Elmadfa et al., 2010)

3.4.2. Η επίδραση τους στους TLR-υποδοχείς

Η ανοσορυθμιστική δράση των προβιοτικών συντελείται κυρίως μέσω των υποδοχέων Toll Like Receptors (TLR) και της επακόλουθης έκκρισης κυτταροκινών από αυτούς. Οι TLR είναι υποδοχείς αναγνώρισης που εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα, στα δενδριτικά κύτταρα και στα μακροφάγα και είναι υπεύθυνοι για την αναγνώριση συγκεκριμένων παθογόνων, την κατάταξη τους σε παθογόνα και ακίνδυνα μικρόβια και την ανάπτυξη των κατάλληλων αποκρίσεων της φυσικής και επίκτητης ανοσίας. Βρίσκονται σε κυτταρικές επιφάνειες ή εντός των κυττάρων. Η ενεργοποίηση τους οδηγεί στην ενεργοποίηση της μεταγραφής γονιδίων που εμπλέκονται στην κωδικοποίηση προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών. Οι TLR έχουν θεωρηθεί ότι μπορούν να δράσουν ως θεραπευτικοί στόχοι σε διάφορες φλεγμονώδεις νόσους και στον καρκίνο. Τα προβιοτικά μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση αυτών των υποδοχέων και έτσι να ρυθμίσουν τις αποκρίσεις του ανοσοποιητικού συστήματος. (Malago, Koninkx, 2011)

Σε πολλές μελέτες φάνηκε ότι πολλά Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια, καθώς και πολλά συμβιωτικά και παθογόνα βακτήρια επηρεάζουν τους TLR υποδοχείς έτσι ώστε να μεσολαβούν στις ανοσολογικές αποκρίσεις του γαστρεντερικού συστήματος. Έχει φανεί ότι στον ανθρώπινο οργανισμό οι *L.plantarum* και *L.rhamnosus GG* ρυθμίζουν προς τα πάνω την έκφραση και μεταγραφή των TLR. Οι μηχανισμοί σηματοδότησης είναι διαφορετικοί για τα Gram-αρνητικά και τα Gram-θετικά βακτήρια, ωστόσο και στα δυο το αποτέλεσμα είναι η αντιφλεγμονώδης δράση. Τα προβιοτικά βακτήρια επηρεάζουν τη σηματοδότηση των TLR με τέτοιο τρόπο ώστε να ευνοούνται οι αντιφλεγμονώδεις αποκρίσεις, σε αντίθεση με τα παθογόνα βακτήρια που ευνοούν τη σηματοδότηση προφλεγμονωδών αποκρίσεων. (Malago, Koninkx, 2011)

Ακόμα, τα προβιοτικά επηρεάζουν και τους ενδοκυττάριους υποδοχείς TLR. Το DNA των προβιοτικών καθυστερεί την ενεργοποίηση του NF-κΒ σταθεροποιώντας τα επίπεδα του I-κΒ και παρεμποδίζοντας την ουβικιτίνη που είναι εξαρτώμενη από το πρωτεόσωμα . Επίσης, καταστέλλουν την έκφραση του μονοπατιού της MAPK που σχετίζεται με τη φλεγμονή και παρεμποδίζει την έκκριση της IL-8. Έτσι λοιπόν, τα προβιοτικά παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδη δράση και βοηθούν στην πρόληψη εμφάνισης χρόνιων εντερικών φλεγμονών. Επιπλέον, τα προβιοτικά μπορούν να ρυθμίζουν διαφορετικά συστατικά της φλεγμονής που σχετίζονται με τη σηματοδότηση των μονοπατιών του NF-κΒ και της MAPK. Για παράδειγμα, σε μια μελέτη φάνηκε ότι το προβιοτικό *L.reuteri* καταστέλλει την ενεργοποίηση της MAPK και οδηγεί σε μείωση της παραγωγής του TNF από μονοκύτταρα και μακροφάγα.(Malago, Koninkx, 2011)

4. Σκοπός

Με βάση την πρόσφατη βιβλιογραφία τα προβιοτικά στελέχη μπορούν να έχουν ανοσορρυθμιστικές ιδιότητες. Για αυτό το λόγο η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό να μελετήσει την ανοσορρυθμιστική δραστηριότητα που πιθανόν επιδεικνύουν στελέχη από τα είδη *L.rhamnosus*, *L.gasseri* και *L.delbrueckii*, τα οποία έχουν χαρακτηριστεί ως πιθανά προβιοτικά. Πιο συγκεκριμένα θα εξεταστεί η *in vitro* επίδραση των στελεχών αυτών σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2), ως προς την έκκριση κυτταροκινών (ιντερλευκίνης-6) καθώς και στην παραγωγή NO, από τα ευκαρυωτικά κύτταρα.

5. Υλικά και μέθοδοι

Στην εργασία αυτή δοκιμάστηκε η συν-επώαση 11 πιθανών προβιοτικών στελεχών (λακτοβάκιλλοι) με επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2). Συνολικά στα κύτταρα πραγματοποιήθηκαν 3 χειρισμοί :

- Επώαση για 2 ώρες των κυττάρων με ενεργούς μεταβολικά λακτοβακίλλους.
- Επώαση για 2 ώρες των κυττάρων με θερμικά απενεργοποιημένους λακτοβακίλλους (ίδια στελέχη).
- Επώαση για 24 ώρες των κυττάρων με θερμικά απενεργοποιημένους λακτοβακίλλους (ίδια στελέχη).

Σε αυτούς τους χειρισμούς έγινε μια επανάληψη στο χρόνο και μια επανάληψη μέσα στο ίδιο plate. (Morita et al., 2002, Chaiyasut, Sirilun, 2011)

5.1 Καλλιέργεια λακτοβακίλλων

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 4 στελέχη του *L.rhamnosus*, 6 στελέχη του *L.gasseri* και 1 στέλεχος του *L.delbrueckii*, τα οποία έχουν απομονωθεί από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών νεογνών και ανήκουν στη συλλογή του ΕΒΒΙΦΑΜ. Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε και ως θετικός μάρτυρας ένα πρότυπο στέλεχος του *L.acidophilus* (DSMZ20079) και ένα στέλεχος του *L.rhamnosus* GG.

Τα παραπάνω στελέχη ανακαλλιεργήθηκαν από stock καλλιέργειες που φυλάσσονταν στους -80°C. Πραγματοποιήθηκαν 2 ανακαλλιέργειες σε τρυβλία με MRS άγαρ προκειμένου να απομονωθούν αποικίες με τη μέθοδο της γραμμικής διασποράς και ταυτόχρονα να ελεγχθεί η καθαρότητα των αποικιών. Στη συνέχεια έγινε μία υγρή καλλιέργεια σε 5ml MRS broth, ώστε να είναι οι λακτοβάκιλλοι σε κατάλληλη μορφή προκειμένου να έρθουν σε επαφή με τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Οι στερεές καλλιέργειες επώαστηκαν σε αναερόβιες συνθήκες στους 37 °C για 48 ώρες, ενώ οι υγρές για 24ώρες.

5.2. Καλλιέργεια επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου (Caco-2)

Για τα *in vitro* πειράματα χρησιμοποιήθηκαν επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου από την κυτταρική σειρά Caco-2 (ATCC HTB-37). Τα κύτταρα επώαστηκαν σε ειδικό θάλαμο επώασης (Memert inco-2), με σταθερές συνθήκες επώασης (θερμοκρασία 37 °C και ατμόσφαιρα 5% CO₂). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκα με θρεπτικό υλικό που περιείχε:

1. 43.5 ml.DMEM high glucose, w/o glutamine, w/sodium pyruvate (Biosera, LM1112), το οποίο χρησιμοποιείται μόνο για πειράματα *in vitro*
2. 5 ml.Fetal Bovine Serum (FBS), (Biochrom AG, 2D-12247), το οποίο χρησιμοποιείται μόνο για πειράματα *in vitro*
3. 0.5 ml γλουταμίνη 100x, (Biosera, XC-T1715)
4. 0.5 ml αμινοξέα 100x, (Biochrom GmbH, K0293) και

5. 0.5 ml πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη 10.000 U/ml/10.000μg/ml, (Biochrom GmbH, A2213)

Όταν τα κύτταρα κάλυψαν το 80% της επιφάνειας της φλάσκας αποκολλήθηκαν με τη μέθοδο της τρυψινοποίησης και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένες πλάκες των 6 βοθρίων. Αναλυτικά η διαδικασία είναι η ακόλουθη:

- Απομακρύνθηκε από τη φλάσκα το θρεπτικό υλικό με πιπέτα Pasteur.
- Προστέθηκαν 5ml ρυθμιστικού διαλύματος Phosphate- buffered saline- PBS και στη συνέχεια απομακρύνθηκαν (ξέπλυμα). Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα μια φορά προκειμένου να καθαρίσει η φλάσκα από το θρεπτικό υλικό ώστε να μπορέσει να δράσει στη συνέχεια η τρυψίνη.
- Προστέθηκαν 3 ml τρυψίνης με συγκέντρωση 1/10 τα οποία παρέμειναν στη φλάσκα για 7 λεπτά.
- Τα κύτταρα ξεκόλλησαν από την επιφάνεια της φλάσκας και προστέθηκαν 7 ml πλήρους θρεπτικού υλικού (με τη σύσταση που περιγράφεται παραπάνω) προκειμένου να σταματήσει η δράση της τρυψίνης.
- Συλλέχθηκε το υλικό της φλάσκας, τοποθετήθηκε σε falcon των 15ml και φυγοκεντρήθηκε στις 1000 στροφές για 5 λεπτά.
- Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 2 ml πλήρους θρεπτικού υλικού, έτσι ώστε να γίνει το αιώρημα των κυττάρων .
- Σε αποστειρωμένες πλάκες των 6 βοθρίων τοποθετήθηκαν 1.9 ml θρεπτικού υλικού και 0.1 ml κυττάρων.

Τα κύτταρα στα βοθρία επώαστηκαν για 18-22 μέρες σε 2 ml θρεπτικού υλικού. Πραγματοποιήθηκε αλλαγή του θρεπτικού υλικού ανά 48 ώρες και επώαση τους σε θάλαμο στους 37 °C και σε ατμόσφαιρα με 5% CO₂.

5.3. Προετοιμασία των λακτοβακίλλων

Οι 24ωρες υγρές καλλιέργειες (5ml) τοποθετήθηκαν σε falcon των 15ml και φυγοκεντρήθηκαν στις 4.000 στροφές για 5 λεπτά. Απομακρύνθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 5ml PBS και το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε ακόμα μια φορά προκειμένου να απομακρυνθεί το MRS broth. Στη συνέχεια έγινε το αιώρημα των λακτοβακίλλων σε 0.5-6 ml θρεπτικού υλικού χωρίς αντιβιοτικά ώστε η συγκέντρωση τους να είναι 10^7 - 10^8 κύτταρα/ml.

5.4 Προετοιμασία των κυττάρων Caco-2 για την συν-επώαση

Αφαιρέθηκε το θρεπτικό υλικό από τα βοθρία, τα οποία στη συνέχεια ξεπλύθηκαν με 2ml PBS ώστε να απομακρυνθεί το αντιβιοτικό. Το PBS αφαιρέθηκε και προστέθηκε 1.8ml θρεπτικού υλικού χωρίς πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το καινούριο θρεπτικό υλικό για 2 ώρες στον επωαστικό θάλαμο των κυττάρων.

5.5 Συν-επώαση λακτοβακίλλων με τα Caco-2

Στα επιθηλιακά κύτταρα προστέθηκε 0.2ml από το εμβόλιο που ετοιμάστηκε από κάθε πιθανό προβιοτικό στέλεχος λακτοβακίλλου και ακολούθησε συν-επώαση για 2 ώρες. Χρησιμοποιήθηκαν δυο βοθρία για κάθε στέλεχος (επαναλήψεις).

Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν λιπο-πολυσακχαρίδια μικροβιακής προέλευσης από *Escherichia coli*, κατάλληλα για κυτταροκαλλιέργειες, (Sigma, L-6529) σε δύο συγκεντρώσεις (LPS 1 και LPS10) ως μάρτυρες που θα προκαλέσουν την ανοσολογική απόκριση των κυττάρων (θετικά control). Το LPS1είχε συγκέντρωση 1μgr/ml, ενώ το LPS 10, 10 μgr/ml και προστέθηκαν 20λ και 200λ στα βοθρία με 1.98ml και 1.8ml θρεπτικού υλικού αντίστοιχα.

Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του *L.acidophilus* DSMZ20079 ως θετικός μάρτυρας, το οποίο καλλιεργήθηκε με τις ίδιες διαδικασίες όπως τα υπόλοιπα στελέχη.

Τέλος, αρνητικό control ήταν τα βοθρία στα οποία προστέθηκαν μόνο 2ml θρεπτικού υλικού.

Μετά από 2 ώρες συλλέχθηκε το υπερκείμενο από τα βοθρία, τοποθετήθηκε σε errendorf των 2 ml και φυγοκεντρήθηκε στις 4.000 στροφές, για 5 λεπτά, στους 25°C. Το υπερκείμενο που προέκυψε από τη φυγοκέντρηση διηθήθηκε από βακτηριολογικό ηθμό και συλλέχθηκε σε νέο errendorf. Το διήθημα που προέκυψε μοιράστηκε σε 4 errendorf τα οποία περιείχαν από 0.4 ml, με εξαίρεση το πρώτο που περιείχε την ποσότητα που περίσσεψε (αποθήκευση στους -80

°C). Το ίζημα που απέμεινε επίσης συλλέχτηκε (βακτηριακά κύτταρα και νεκρά ευκαρυωτικά που αποκολλήθηκαν) και έγινε αιώρημα σε 1 ml θρεπτικού υλικού καθώς ακολούθησε καταμέτρηση των κυττάρων.

Στα βοθρία πραγματοποιήθηκε 2 φορές ξέπλυμα με 2 ml PBS και το προϊόν που προέκυπτε κάθε φορά συλλέχθηκε σε falcon των 15ml. Στη συνέχεια τοποθετήθηκε 1ml τρυψίνης στα βοθρία προκειμένου να ξεκολλήσουν τα κύτταρα από την επιφάνεια των βοθρίων. Η επώαση διήρκησε για 10 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκαν 2 ml θρεπτικού υλικού. Συλλέχθηκε το περιεχόμενο των βοθρίων στα αντίστοιχα falcon. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 1.000 στροφές, για 5 λεπτά, στους 25°C, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαν-αιωρήθηκε σε 2 ml θρεπτικού.

5.6. Καταμέτρηση εμβολίου-λακτοβακίλλων

Η καταμέτρηση του εμβολίου έγινε με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων. Χρησιμοποιήθηκε 0.1 ml του εμβολίου σε 9.9 ml διαλύματος Ringers και έγιναν διαδοχικές αραιώσεις μέχρι τη 10^{-7} και 10^{-8} . Σε άδεια τρυβλία τοποθετήθηκε 0.1 ml από τα προϊόντα των αραιώσεων και στη συνέχεια τοποθετήθηκε MRS άγαρ. Έτσι προέκυψαν 3 τρυβλία από κάθε στέλεχος και από κάθε αραιώση τα οποία επώαστηκαν σε αναερόβιες συνθήκες για 48 ώρες. Μετά από 2 ημέρες έγινε καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία και υπολογίστηκε ο αριθμός των cfu/ml για το κάθε στέλεχος λακτοβακίλλου.

5.7. Θερμικώς απενεργοποιημένοι λακτοβάκιλλοι

Πέρα από τα ζωντανά στελέχη λακτοβακίλλων πραγματοποιήθηκε και συνεπώαση των κυττάρων Caco-2 με τα ίδια στελέχη μετά τη θερμική απενεργοποίηση τους. Η απενεργοποίηση έγινε σε θερμοκρασία 80°C για 30 λεπτά. Πραγματοποιήθηκε συν-επώαση των στελεχών με τα κύτταρα για 24 ώρες και για 2 ώρες.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε προκειμένου οι λακτοβάκιλλοι να έρθουν σε επαφή με τα κύτταρα ήταν όμοια με αυτή που έγινε στα ενεργά μεταβολικά στελέχη.

5.8. Καταμέτρηση κυττάρων Caco-2

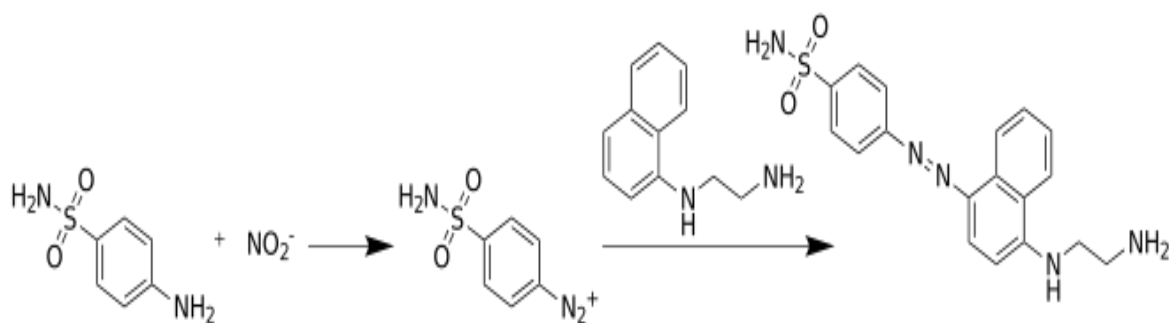
Η καταμέτρηση των κυττάρων έγινε με τη μέθοδο trypan-blue. Τοποθετήθηκε το trypan-blue και τα κύτταρα στο αιματοκυττόμετρο σε αναλογία 1:1 και έγινε η καταμέτρηση των ζωντανών και των νεκρών κυττάρων στο μικροσκόπιο.

Ακόμα, μετρήθηκαν και τα κύτταρα που μπορεί να είχαν μείνει στο ίζημα και προστέθηκαν στο τελικό σύνολο των κυττάρων.

5.9. Μέτρηση NO

Η μέτρηση της συγκέντρωσης NO στα υπερκείμενα δείγματα που προέκυψαν από την συνεπάωση των πιθανών προβιοτικών λακτοβακίλλων με τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2), έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται από τους Laura Green et al.(1982).

Κατά τη μέθοδο αυτή μετρήθηκε το NaNO_2 που παράχθηκε μετά από την αντίδραση των δειγμάτων με το αντιδραστήριο Griess (Sigma Aldrich, 03553). Συγκεκριμένα πραγματοποιείται μια διαδικασία διαζώτωσης σύμφωνα με την αντίδραση:



Η καταμέτρηση έγινε με φωτομετρική μέθοδο σε φωτόμετρο Elisa Biotek- Power wave XS 2 (BIOTEK INSTRUMENTS, USA).

Πρότυπη καμπύλη NaNO_2 :Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης του NaNO_2 προστέθηκαν 0.069gr NaNO_2 σε 1000ml απιονισμένου νερού. Ακολούθησε αραίωση 1/100, η οποία και χρησιμοποιήθηκε. Στη συνέχεια έγινε ανάμειξη με DMEM και ορό και το αντιδραστήριο Griess, στις ποσότητες που φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα που ακολουθεί. Όλα τα δείγματα “φορτώθηκαν” σε 96 βοθρίων δοχείο (well plate), για την μέτρηση της

απορρόφησης στο φωτόμετρο Elisa (540 nm). Τα δείγματα για την πρότυπη καμπύλη κατέλαβαν 2 σειρές (22 θέσεις) στο plate.

Αρίθμηση	DMEM και ορός (μl)	1/100 του 1 mM NO ₂	Αντιδραστήριο Griess (μl)
1	100	0	100
2	99.4	0.6	100
3	98.8	1.2	100
4	97.5	2.5	100
5	95	5	100
6	90	10	100
7	85	15	100
8	80	20	100
9	40	60	100
10	20	80	100
11	0	100	100

Στο ίδιο plate τοποθετήθηκαν και τα δείγματα από τα υπερκείμενα. Σε κάθε βοθρίο τοποθετήθηκαν 100μl από το δείγμα και 100μl από το αντιδραστήριο Griess. Η συνεπώαση διήρκησε 5 λεπτά και στη συνέχεια το plate τοποθετήθηκε στο Elisa προκειμένου να μετρήσει την απορρόφηση των δειγμάτων στα 540 nm.

5.10. Μέτρηση ιντερελυκίνης-6

Η μέτρηση της ιντερελυκίνης-6 στα δείγματα που συλλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε με την ανοσοενζυμική μη ανταγωνιστική μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA) ή αλλιώς με τη μέθοδο ELISA sandwich. Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό κίτ Human IL-6

Quantikine HS ELISA, με κωδικό HS600B, της εταιρείας R&D Systems και το φασματοφωτόμερο μικροπλακιδίων ELISA Powerwave XS2 (BIOTEK INSTRUMENTS, USA).

Η μέθοδος ELISA χρησιμοποιεί τη βασική αρχή της ανοσολογίας σύμφωνα με την οποία ένα αντιγόνο μπορεί να προσδεθεί σε συγκεκριμένο αντίσωμα και με αυτό τον τρόπο να επιτραπεί η ανίχνευση συγκεκριμένων αντιγόνων σε υγρά δείγματα ακόμα και σε μικρές ποσότητες.

Η μέθοδος ELISA sandwich χρησιμοποιείται προκειμένου να ταυτοποιηθούν συγκεκριμένα δείγματα αντιγόνων. Χρησιμοποιούνται μικροπλακίδια 96 βοθρίων στην επιφάνεια των οποίων βρίσκεται γνωστή συγκέντρωση αντισώματος στο οποίο προσδένεται το προς διερεύνηση αντιγόνο. Στη συνέχεια απομακρύνονται οι αδέσμευτες ενώσεις με ξέπλυμα και προστίθεται ένα ειδικό αντίσωμα στο οποίο είναι προσδεμένο ένα ένζυμο ειδικό για το υπό διερεύνηση δείγμα. Με ξέπλυμα απομακρύνονται πάλι οι μη ειδικές ενώσεις και προστίθεται ένα υπόστρωμα το οποίο συμβάλλει στην ανάπτυξη χρώματος προκειμένου να μετρηθεί η απορρόφηση των δειγμάτων. Τέλος, προστίθεται ένα διάλυμα που διακόπτει τη διαδικασία ανάπτυξης χρώματος και τα δείγματα μεταφέρονται στο μηχάνημα ELISA προκειμένου να μετρηθεί η απορρόφηση τους.(Gan,Patel, 2013)

Αναλυτικά, τα βήματα της διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν ως εξής:

1. Τα υπό εξέταση δείγματα ξεπάγωσαν σε πάγο. Όλα τα αντιδραστήρια ήρθαν σε θερμοκρασία δωματίου και προετοιμάστηκε το διάλυμα έκπλυσης (Wash buffer, σε αραιώση 10X σε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό). Επιπλέον, προετοιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις του πρότυπου Human IL-6 HS standard σε μέσο αραιώσης Calibrator Diluent RD6-11, προκειμένου να δημιουργηθεί η πρότυπη καμπύλη της μεθόδου με τις τιμές: 0.078pg/ml-0.156pg/ml-0.313pg/ml-0.625pg/ml-1.25pg/ml-2.5pg/ml-5 pg/ml-10 pg/ml). Το μέσο αραιώσης Calibrator Diluent RD6-11 αποτέλεσε το τυφλό της μεθόδου (Blank-0 pg/ml).
2. Στα βοθρία του μικροπλακιδίου της ELISA μεταφέρθηκαν 100μl του Assay Diluent RD1-75, προκειμένου να ενυδατωθεί το μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο είναι ειδικό για την υπό διερεύνηση ένωση.
3. Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν 100μl από τα πρότυπα, το τυφλό και από τα υπό εξέταση δείγματα. Καλύφθηκε το μικροπλακίδιο και επωάστηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση (300rpm) σε οριζόντιο αναδευτήρα.

4. Μετά τη επώαση, αφαιρέθηκαν τα υπερκείμενα από τα βοθρία, πραγματοποιήθηκε έκπλυση με 200μl διαλύματος wash buffer και απομάκρυνση των υπολειμμάτων του. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε 7 φορές και με αυτό τον τρόπο πραγματοποιήθηκαν συνολικά 8 ξεπλύματα.

5. Στη συνέχεια, προστέθηκαν στα βοθρία 200 μl του διαλύματος του μονοκλωνικού αντισώματος προσδεσμένου με ένζυμο ειδικό για την ιντερλευκίνη-6 (Human IL-6 HS Conjugate). Καλύφθηκε το μικροπλακίδιο και επώαστηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση (300rpm) σε οριζόντιο αναδευτήρα. Μετά την επώαση, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα με την ίδια διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω (βήμα 4).

5. Μετά το ξέπλυμα των αδέσμευτων ενώσεων, προστέθηκαν στα βοθρία 50μl από ένα διάλυμα υποστρώματος (Substrate solution) το οποίο αντιδρά με το ένζυμο του αντισώματος. Τα μικροπλακίδια καλύφθηκαν και επώαστηκαν για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στον εργαστηριακό πάγκο.

6. Μετά την επώαση, τοποθετήθηκε στα βοθρία 50μl από ένα διάλυμα ενίσχυσης χρώματος (amplifier solution), καλύφθηκε το μικροπλακίδιο και επώαστηκε για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου στον εργαστηριακό πάγκο, χωρίς να εκτεθεί στο φως. Η προσθήκη του amplifier solution ξεκινά την ανάπτυξη χρώματος, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη με τη ποσότητα της IL-6 στο αρχικό δείγμα.

7. Μετά την επώαση των 30min, διακόπηκε η ανάπτυξη χρώματος στα βοθρία με την προσθήκη 50μl θειικού οξέος 2N (διάλυμα stop solution).

8. Ο προσδιορισμός της απορρόφησης έγινε στο φασματοφωτόμετρο μικροπλακιδίων ELISA Powerwave XS2H στα 490nm εντός 30min. Πραγματοποιήθηκε διόρθωση των μετρήσεων στα 650 nm. προκειμένου να εξαλειφθούν τυχόν παρεμβολές στο χρώμα.

Η πρότυπη καμπύλη προέκυψε με λογαρίθμηση των γνωστών συγκεντρώσεων της IL-6 προς τους δεκαδικούς λογαρίθμους της απορρόφησης.

6. Στατιστική ανάλυση

Για τις τιμές της μέτρησης NO και ιντερλευκίνης-6 στα δείγματα υπολογίστηκαν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις. Πραγματοποιήθηκαν t-test προκειμένου να συγκριθούν οι τιμές των κυττάρων που είχαν έρθει σε επαφή για 2 ώρες με ζωντανά στελέχη, για 2 και για 24 ώρες με θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη. Ακόμα, έγινε σύγκριση των δειγμάτων των κυττάρων που είχαν συνεπωαστεί με τα πιθανά στελέχη προβιοτικών με εκείνα που είχαν συνεπωαστεί με το αρνητικό control, το Ips 1, το Ips 10, το *L.acidophilus* (DSMZ 20079) και το *L.rhamnosus* GG.

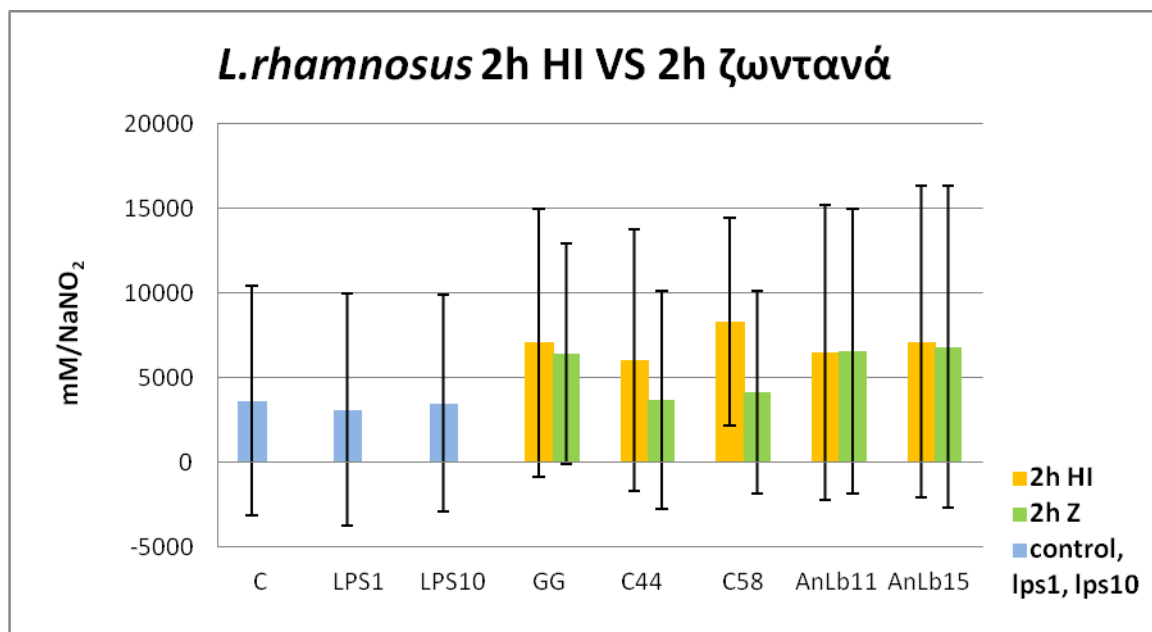
7. Αποτελέσματα

Τα 11 υποψήφια προβιοτικά στελέχη που εξετάστηκαν συν-επώαστηκαν με επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2) σε τρεις χειρισμούς: ενεργά μεταβολικά στελέχη (ζωντανά) για 2 ώρες συν-επώαση, θερμικά απενεργοποιημένα για 2 ώρες συν-επώαση και θερμικά απενεργοποιημένα για 24 ώρες συν-επώαση. Σε όλους τους χειρισμούς χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας η καλλιέργεια των κυττάρων χωρίς να έρθουν σε επαφή με τα στελέχη των λακτοβακίλλων και η καλλιέργεια των κυττάρων μετά από πρόκληση με LPS σε δύο συγκεντρώσεις (LPS1, 10).

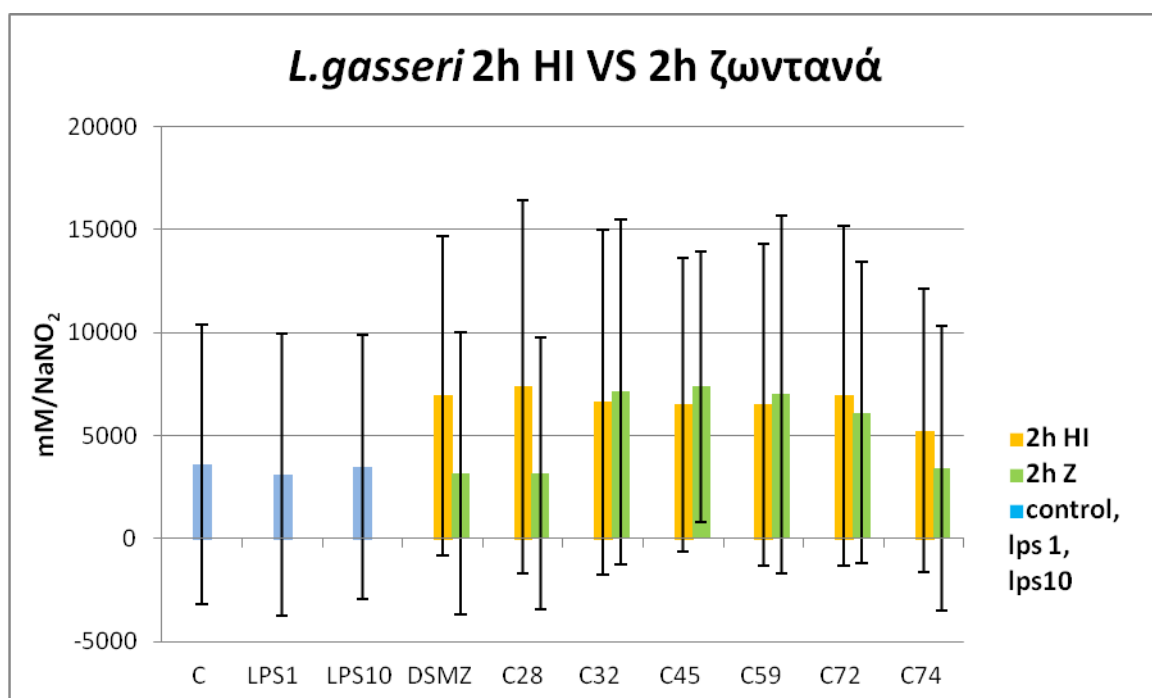
Στη συνέχεια μετρήθηκε η παραγωγή NO και ιντερλευκίνης-6 από τα κύτταρα όπως και η βιωσιμότητα των κυττάρων.

7.1 Καταμέτρηση NO

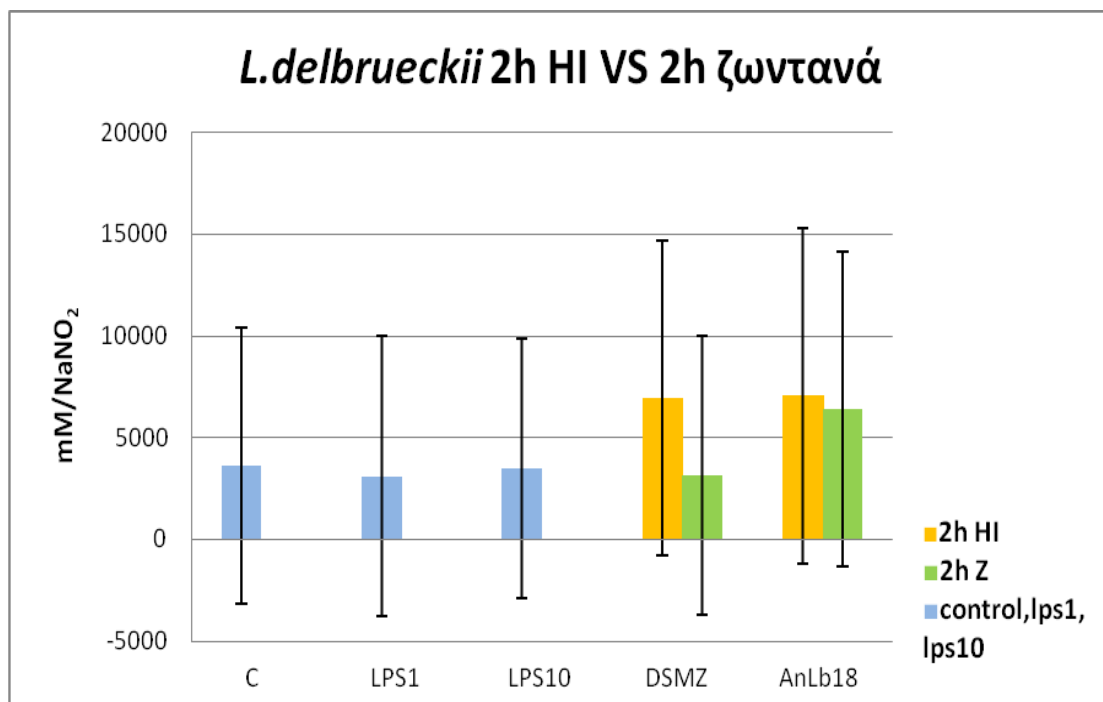
Στα σχήματα 1-3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την καταμέτρηση της συγκέντρωσης του NO (mM/NaNO₂) στο υπερκείμενο της καλλιέργειας των Caco-2 μετά από συνεπώαση για 2 ώρες με ζωντανά και θερμικώς απενεργοποιημένα στελέχη. Στο Σχ.1 που περιλαμβάνει τα στελέχη *L.rhamnosus*, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας το αντίστοιχο γνωστό προβιοτικό στέλεχος *L.rhamnosus* GG. Στα σχήματα 2 και 3 χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχα το στέλεχος *L.acidophilus* DSMZ 20079



Σχήμα 1. Συγκέντρωση του NO σε κύτταρα Caco-2 μετά την 2ωρη επώαση τους με ζωντανά και θερμικά απεργοποιημένα στελέχη του *L.rhamnosus*.



Σχήμα 2. Συγκέντρωση του NO σε κύτταρα Caco-2 μετά την 2ωρη επώαση τους με ζωντανά και θερμικά απεργοποιημένα στελέχη του *L.gasseri*.



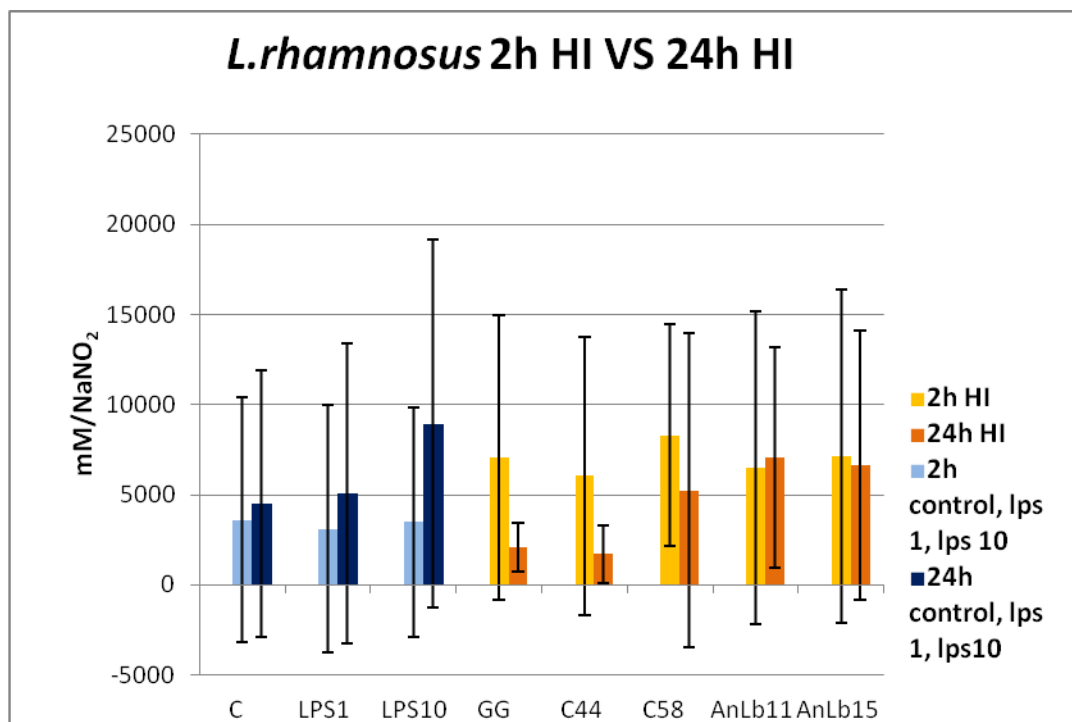
Σχήμα 3. Συγκέντρωση του NO σε κύτταρα Caco-2 μετά την 2ωρη επώαση τους με το ζωντανό και το θερμικώς απενεργοποιημένο στέλεχος του *L.delbrueckii*.

Τα ζωντανά στελέχη του *L.rhamnosus* Anlb11 και Anlb15, το στέλεχος Anlb18 του *L.delbrueckii* και τα στελέχη C32, C45, C59 και C72 του *L.gasseri* προκάλεσαν αύξηση της παραγωγής του NO στα κύτταρα Caco-2 σε σχέση με το control, το lps1 και το lps10, χωρίς όμως αυτή η αύξηση να είναι στατιστικά σημαντική, πιθανόν λόγω των μεγάλων διακυμάνσεων.

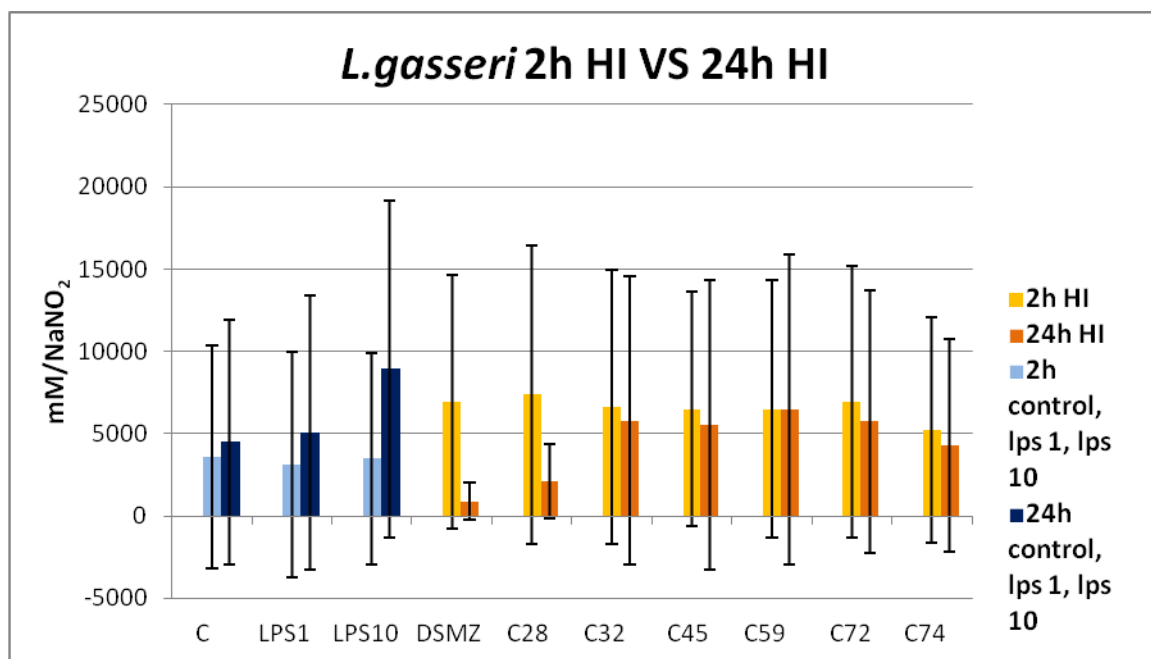
Στα κύτταρα που ήρθαν σε επαφή για 2 ώρες με τα θερμικώς απενεργοποιημένα στελέχη παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής NO σε σχέση με το control, το lps1 και το lps10. Ωστόσο, οι διαφορές αυτές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές.

Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην παραγωγή NO ανάμεσα στα κύτταρα που συνεπώαστηκαν για 2 ώρες με ζωντανά στελέχη λακτοβακίλλων σε σχέση με αυτά που συνεπώαστηκαν για 2 ώρες με τα αντίστοιχα θερμικά απενεργοποιημένα.

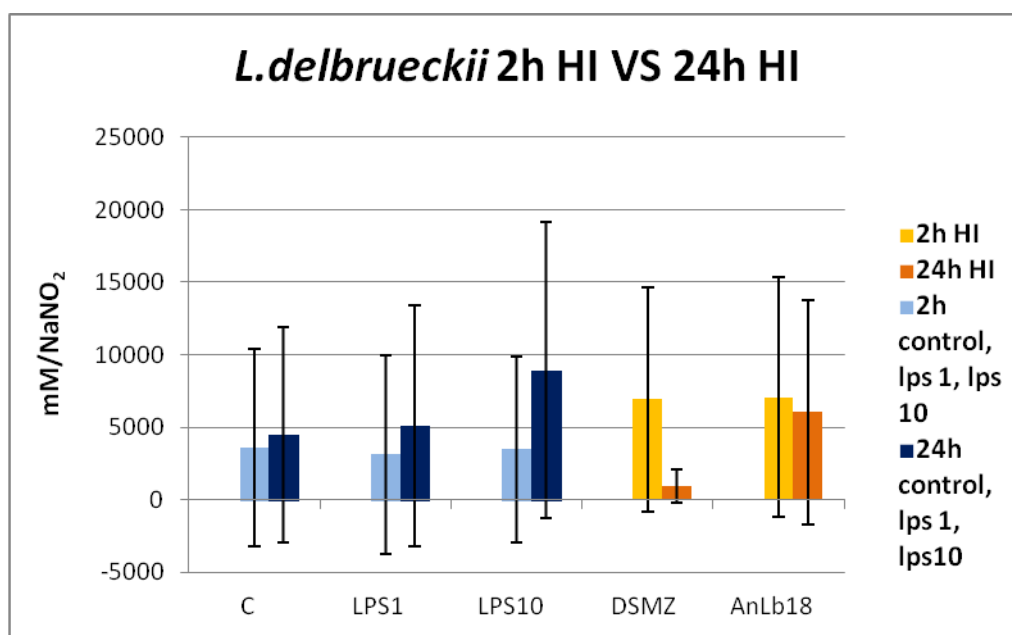
Ακολουθούν τα σχήματα 4-6, όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την έκκριση NO (mM/NaNO₂) σε κύτταρα Caco-2 μετά τη συνεπώαση τους με θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη για 2 και για 24 ώρες.



Σχήμα 4. Έκκριση NO σε κύτταρα Caco-2 μετά τη συνεπώαση τους με θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη του *L.rhamnosus* για 2 και για 24 ώρες.



Σχήμα 5. Έκκριση NO σε κύτταρα Caco-2 μετά τη συνεπώαση τους με θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη του *L.gasseri* για 2 και για 24 ώρες.



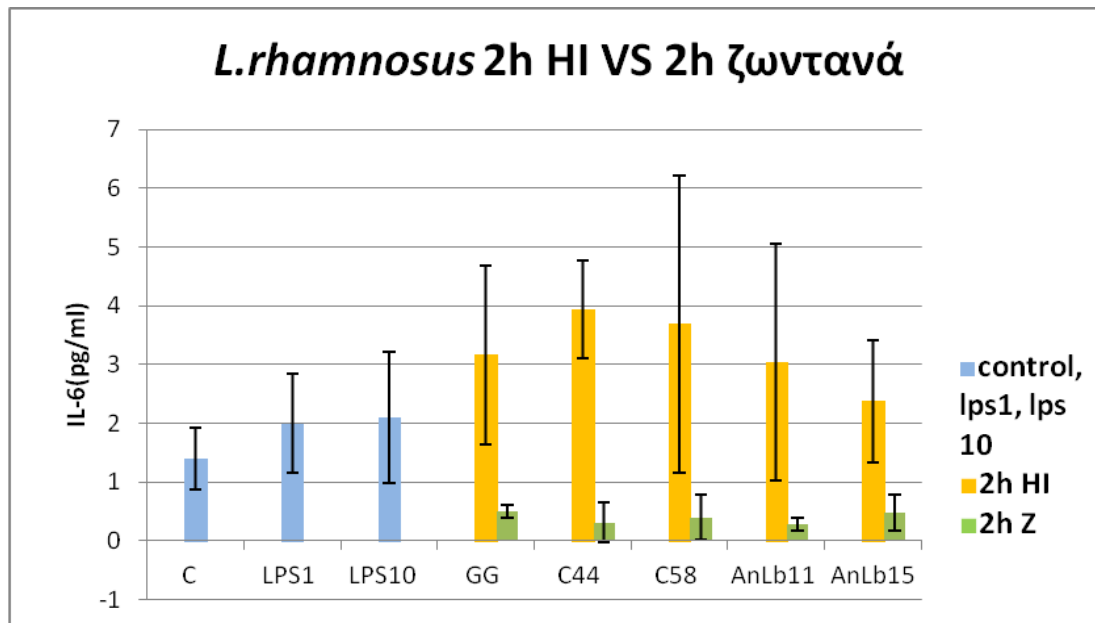
Σχήμα 6. Έκκριση NO σε κύτταρα Caco-2 μετά τη συνεπώαση τους με το θερμικώς απενεργοποιημένο στέλεχος Anlb18 του *L.delbrueckii*.

Όσον αφορά την 24ωρη συνεπώαση των κυττάρων με τα θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη φάνηκε ότι το Anlb11 και το Anlb15 του *L.rhamnosus*, το Anlb18 του *L.delbrueckii* και τα C32,C45, C59 και C72 του *L.gasseri* προκάλεσαν αύξηση στην παραγωγή του NO σε σχέση με το control και το lps1, χωρίς αυτή η αύξηση να είναι στατιστικά σημαντική, πιθανόν λόγω των μεγάλων διακυμάνσεων που παρατηρήθηκαν στις μετρήσεις.

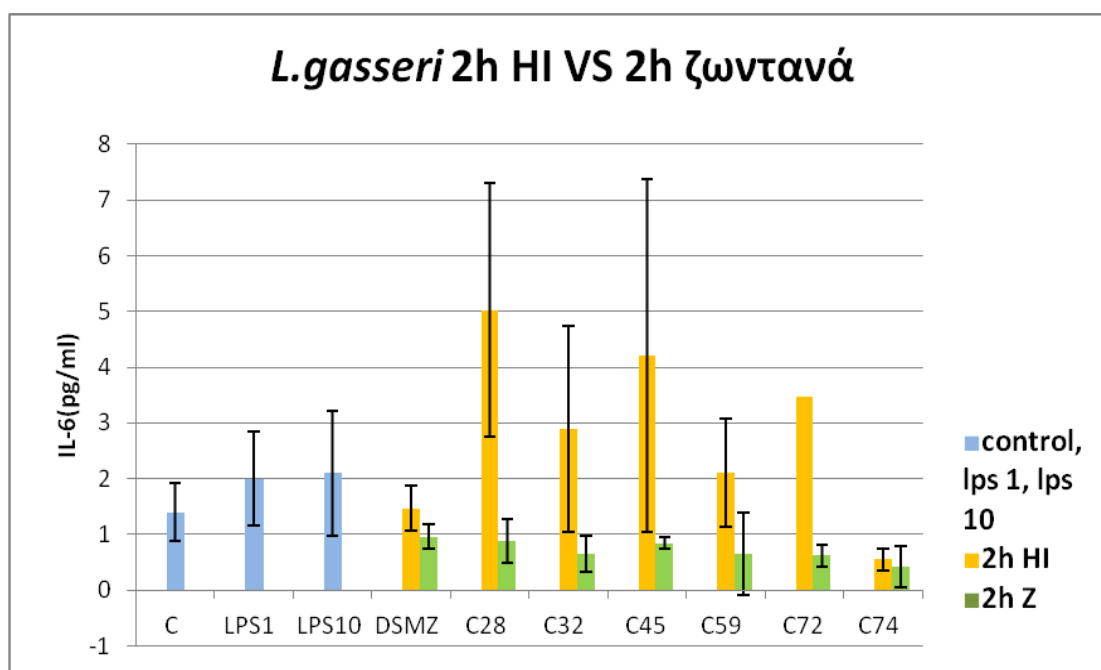
Αντίστοιχα, δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα δείγματα των κυττάρων που συνεπώαστηκαν για 2 και για 24 ώρες με τα θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη.

7.2. Παραγωγή ιντερλευκίνης-6

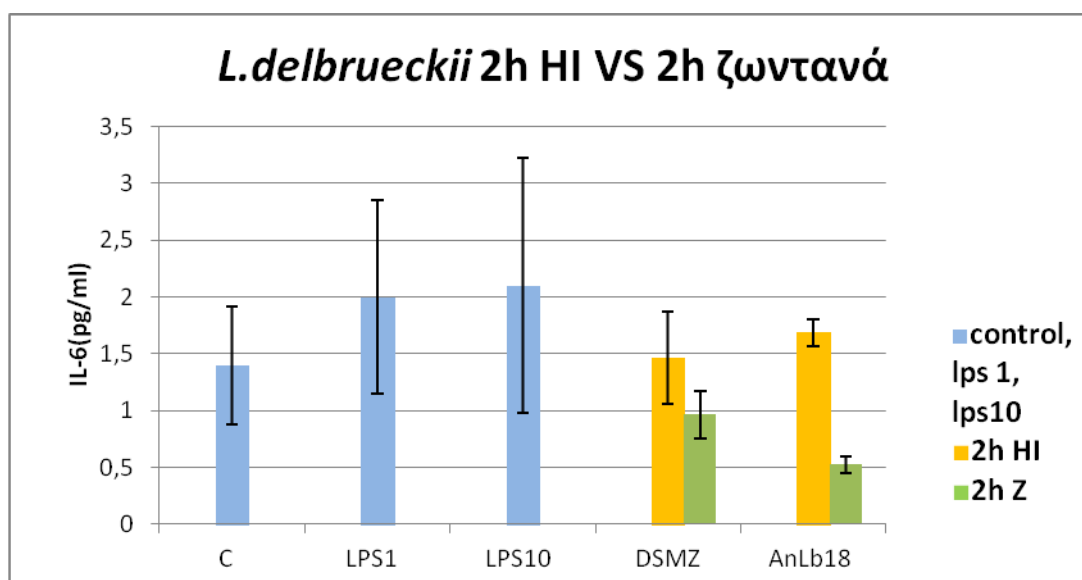
Η συγκέντρωση της ιντερλευκίνης-6 (pg/ml) μετρήθηκε αντίστοιχα στα υπερκείμενα των καλλιεργειών συνεπώασης των λακτοβακίλλων και των Caco-2 κυττάρων. Στα Σχήματα 7,8,9 που ακολουθούν παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις της Il-6 που καταμετρήθηκαν μετά από συνεπώαση για 2 ώρες με ζωντανά και θερμικώς απενεργοποιημένα στελέχη. Στο Σχ.7 που περιλαμβάνει τα στελέχη *L.rhamnosus*, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας το αντίστοιχο γνωστό προβιοτικό στέλεχος *L.rhamnosus* GG. Στα σχήματα 8 και 9 χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχα το στέλεχος *L.acidophilus* DSMZ 20079.



Σχήμα 7. Παραγωγή ιντερλευκίνης-6 σε κύτταρα Caco-2 μετά τη συνεπάωση τους με ζωντανά και θερμικώς απενεργοποιημένα στελέχη του *L.rhamnosus* για 2 ώρες.



Σχήμα 8. Παραγωγή ιντερλευκίνης-6 σε κύτταρα Caco-2 μετά τη συνεπάωση τους με ζωντανά και θερμικώς απενεργοποιημένα στελέχη του *L.gasseri* για 2 ώρες.



Σχήμα 9. Παραγωγή ιντερλευκίνης-6 σε κύτταρα Caco-2 μετά τη συνεπώαση τους με το ζωντανό και το θερμικώς απενεργοποιημένο στελέχος του *L.delbrueckii* για 2 ώρες.

Όλα τα ζωντανά στελέχη των λακτοβακίλλων προκάλεσαν μείωση της συγκέντρωσης της ιντερλευκίνης-6 σε κύτταρα Caco-2 μετά από τη 2ωρη συνεπώαση τους, σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Ωστόσο, αυτή η μείωση ήταν στατιστικά σημαντική μόνο στα στελέχη AnLb11 και AnLb15 του *L.rhamnosus*. Συγκεκριμένα, η τιμή στο control ήταν $1,399 \pm 0,519$ pg/ml ενώ μετά τη συνεπώαση του AnLb11 μειώθηκε στο $0,276 \pm 0,111$ pg/ml ($p=0,04$) και μετά τη συνεπώαση με το AnLb15 μειώθηκε στο $0,4254 \pm 0,302$ pg/ml ($p=0,03$). Ακόμα, φάνηκε να είναι σημαντικά μικρότερη η έκκριση της ιντερλευκίνης-6 μετά τη συνεπώαση των κυττάρων με το AnLb15 σε σχέση με το lps1 ($0,4254 \pm 0,302$ pg/ml και $1,999 \pm 0,850$ pg/ml αντίστοιχα, με $p=0,04$).

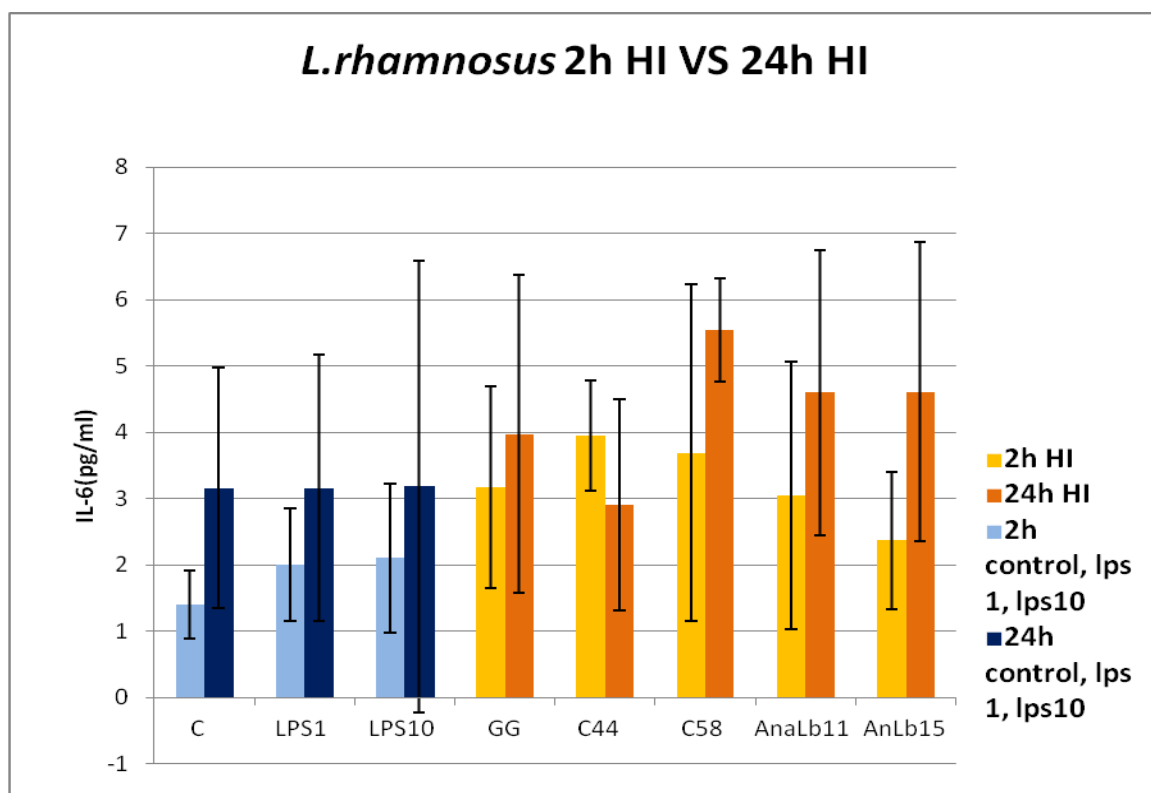
Στα κύτταρα που συνεπώαστηκαν για 2 ώρες με τα θερμικώς απενεργοποιημένα στελέχη φάνηκε ότι το C28 και το C72 του *L.gasseri* προκάλεσαν σημαντική αύξηση της παραγωγής της ιντερλευκίνης-6, σε $5,024 \pm 2,275$ pg/ml το C28 και σε $3,462 \pm 0,000$ pg/ml το C72, σε σχέση με το control ($1,399 \pm 0,519$ pg/ml) ($p=0,02$ και $p=0,03$, αντίστοιχα). Επίσης το C74 φαίνεται ότι προκάλεσε σημαντική μείωση της παραγωγής της ιντερλευκίνης σε σχέση με το control ($0,552 \pm 0,201$ pg/ml V/S $1,399 \pm 0,519$ pg/ml, $p=0,04$)

Στα υπερκείμενα των κυττάρων που συνεπώαστηκαν με τα στελέχη του *L.rhamnosus* (C44, AnLb15), του *L.gasseri* (C28) και του *L.delbrueckii* (AnLb18) παρατηρήθηκε ότι η 2 ωρη συνεπώαση με τα θερμικώς απενεργοποιημένα στελέχη προκάλεσε σημαντικά διαφορετική συγκέντρωση ιντερλευκίνης σε σχέση με τα ζωντανά στελέχη.

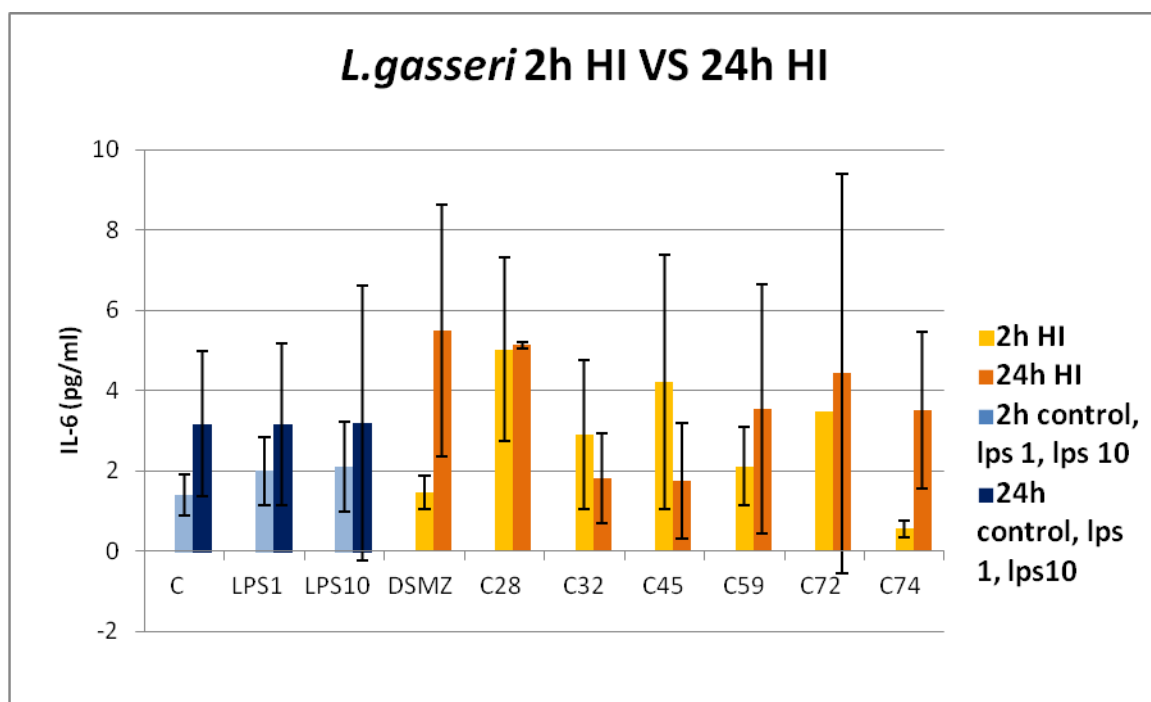
Στα δυο στελέχη του *L.rhamnosus*, το C44 και το AnLb15 οι τιμές στα θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη ήταν σημαντικά υψηλότερες ($3,943 \pm 0,832 \text{ pg/ml}$ και $2,374 \pm 1,0354 \text{ pg/ml}$) από τις αντίστοιχες τιμές των ζωντανών ($0,310 \pm 0,334 \text{ pg/ml}$ και $0,425 \pm 0,302 \text{ pg/ml}$, $p=0,04$ στους 2 χειρισμούς του C44 και $p=0,04$ στους 2 χειρισμούς του AnLb15).

Αντίστοιχα και στα κύτταρα που πραγματοποιήθηκε συνεπώαση με το στέλεχος του *L.gasseri*, C28 υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση της έκκρισης ιντερλευκίνης στα θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη σε σχέση με τα ζωντανά ($5,024 \pm 2,275 \text{ pg/ml}$ και $0,877 \pm 0,396 \text{ pg/ml}$ αντίστοιχα, $p=0,01$). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στο AnLb18 του *L.delbrueckii* με τις τιμές που αφορούν το θερμικά απενεργοποιημένο στέλεχος να είναι $1,684 \pm 0,122 \text{ pg/ml}$ και στο ζωντανό $0,526 \pm 0,074 \text{ pg/ml}$, $p=0,007$.

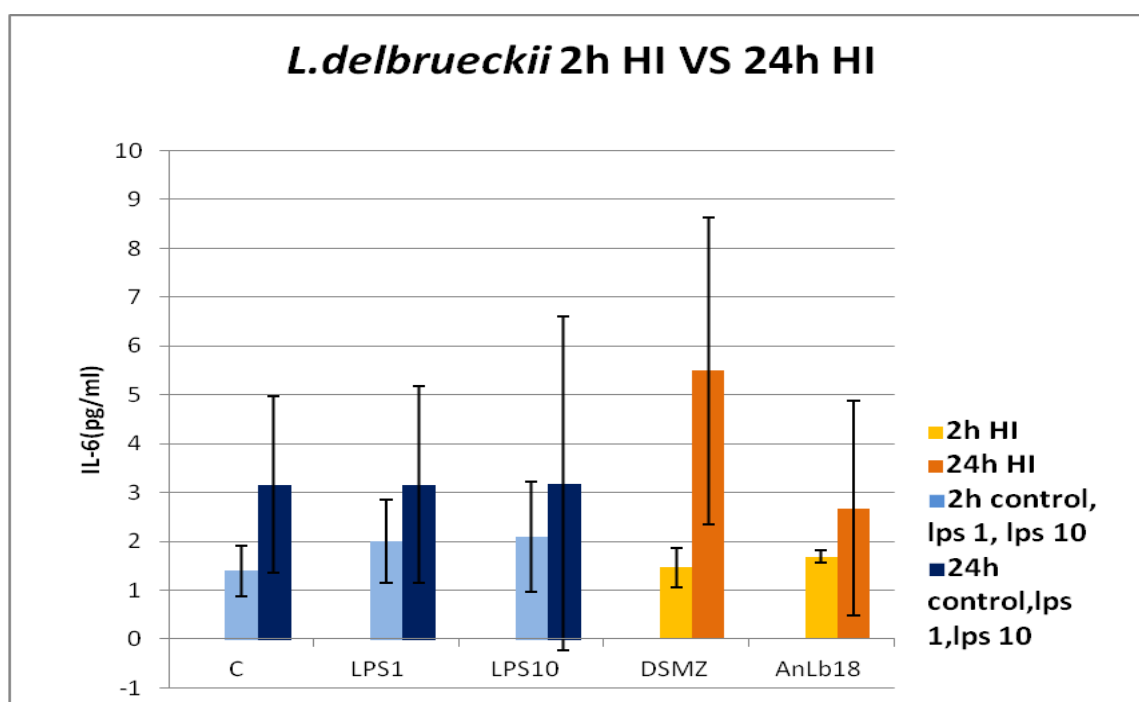
Παρακάτω ακολουθούν τα σχήματα 10, 11, 12 που δείχνουν τη συγκέντρωση της ιντερλευκίνης-6 (pg/ml) σε κύτταρα που συνεπώαστηκαν με απενεργοποιημένα στελέχη των *L.rhamnosus*, *L.gasseri*, και *L.delbrueckii* για 2 και για 24 ώρες.



Σχήμα 10. Παραγωγή ιντερλευκίνης-6 σε κύτταρα Caco-2 μετά από 2ωρη και 24ωρη συνεπώαση με θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη του *L.rhamnosus*.



Σχήμα 11. Παραγωγή ιντερλευκίνης-6 σε κύτταρα Caco-2 μετά από 2ωρη και 24ωρη συνεπώση με θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη του *L.gasseri*.

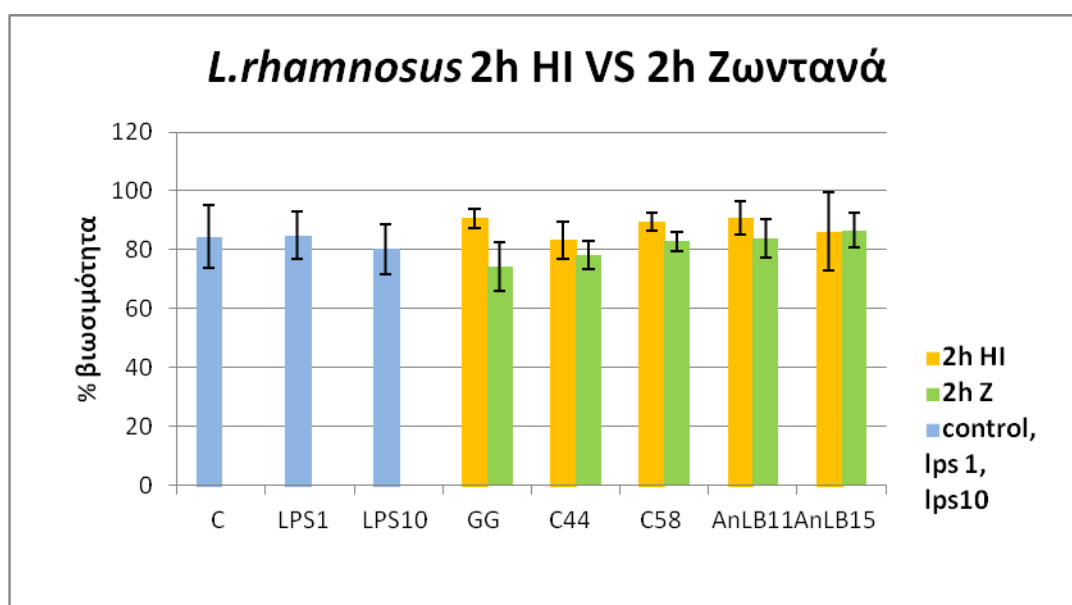


Σχήμα 12. Παραγωγή ιντερλευκίνης-6 σε κύτταρα Caco-2 μετά από 2ωρη και 24ωρη συνεπώση με θερμικώς απενεργοποιημένο στέλεχος του *L.delbrueckii*.

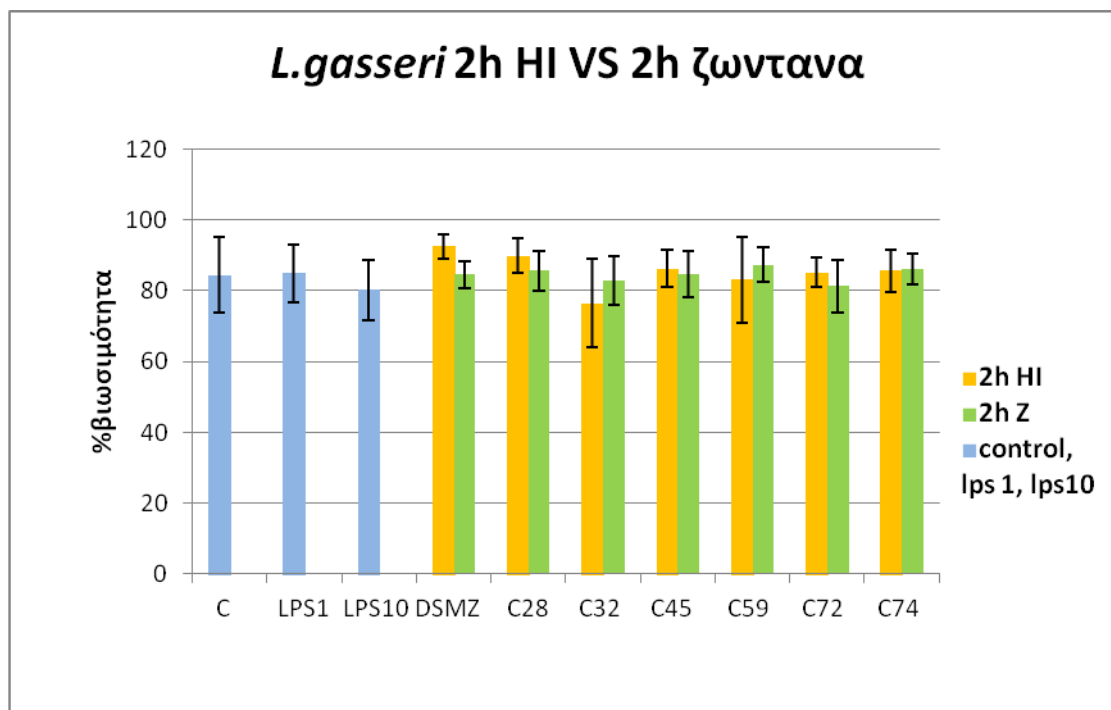
Δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων της ιντερλευκίνης - 6 μετά από επώαση 2 ωρών και 24 ωρών με τα θερμικώς απενεργοποιημένα στελέχη των λακτοβακίλλων.

7.3 Βιωσιμότητα

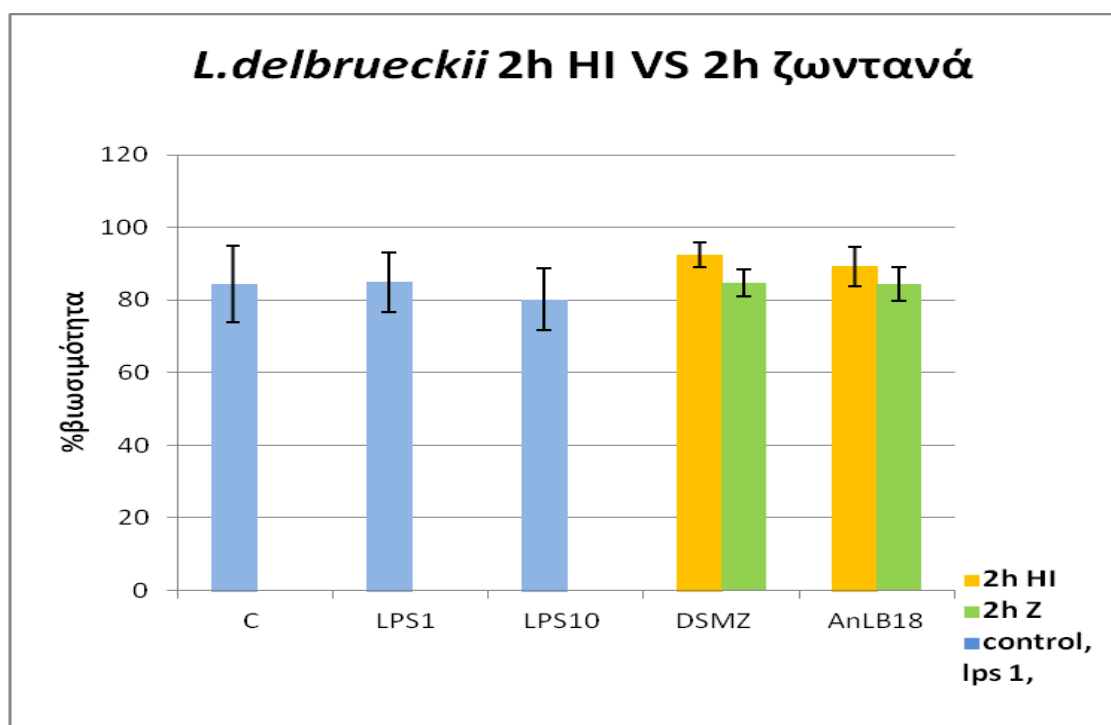
Στα σχήματα 13, 14, 15 που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας (%) των κυττάρων Caco-2, μετά από την συνεπώαση με τους ζωντανούς και τους θερμικά απενεργοποιημένους λακτοβακίλλους. Στο Σχ.13 που περιλαμβάνει τα στελέχη *L.rhamnosus*, χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας το αντίστοιχο γνωστό προβιοτικό στέλεχος *L.rhamnosus* GG. Στα σχήματα 14 και 15 χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχα το στέλεχος *L.acidophilus* DSMZ 20079.



Σχήμα 13. Βιωσιμότητα των κυττάρων μετά τη συνεπώαση τους για 2 ώρες με ζωντανά και θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη του *L.rhamnosus*.



Σχήμα 14. Βιωσιμότητα των κυττάρων μετά τη συνεπάωση τους για 2 ώρες με ζωντανά και θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη του *L.gasseri*.

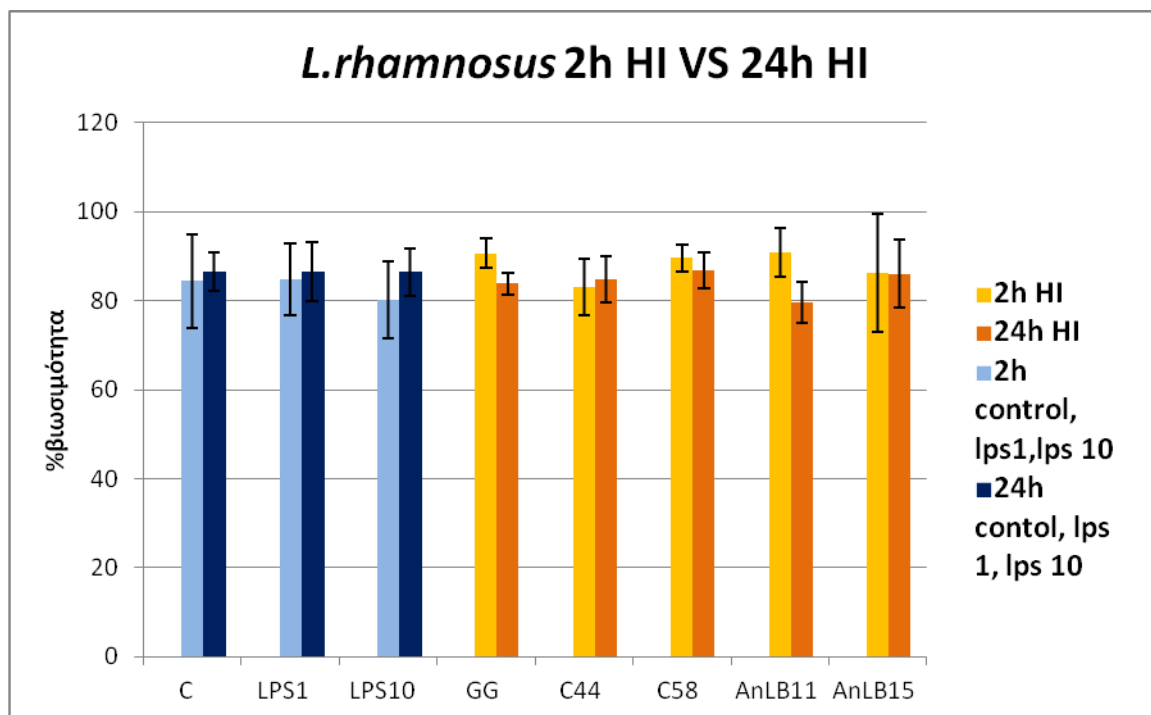


Σχήμα 15. Βιωσιμότητα των κυττάρων μετά τη συνεπάωση τους για 2 ώρες με ζωντανό και θερμικώς απενεργοποιημένο στέλεχος του *L.delbrueckii*.

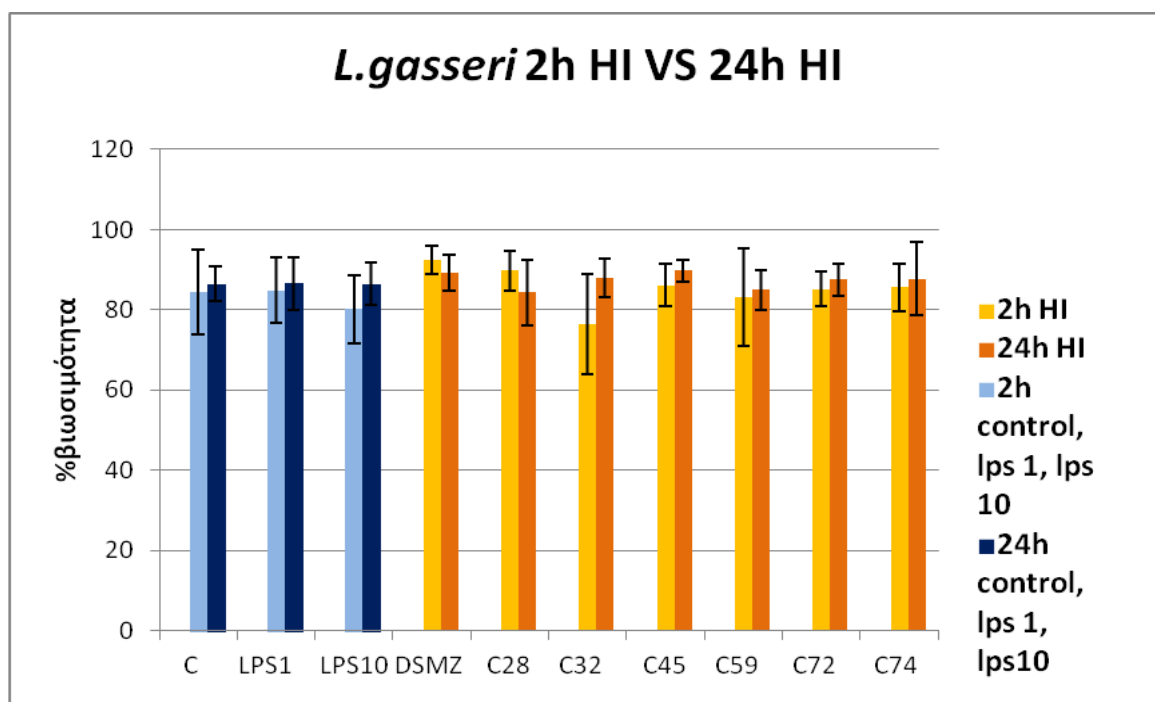
Όσον αφορά τη βιωσιμότητα των κυττάρων μετά τη 2ωρη συνεπώαση τους με τα ζωντανά στελέχη λακτοβακίλλων φάνηκε ότι ο *L.rhamnosus* GG που χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας προκάλεσε μεγαλύτερη θνησιμότητα σε σχέση με τα στελέχη C58, AnLb11 και AnLb15. Συγκεκριμένα, η βιωσιμότητα των κυττάρων που συνεπώαστηκαν με το C58 ήταν $82,82 \pm 3,43$, με το AnLb11 $83,76 \pm 6,48$ και με το AnLb 15 $86,59 \pm 5,97$, ενώ με το *L.rhamnosus* GG ήταν $74,21 \pm 8,40$ (με $p=0,01$, $p=0,02$, $p=0,004$, αντίστοιχα για κάθε στέλεχος σε σύγκριση με το *L.rhamnosus* GG). Στα υπόλοιπα στελέχη δεν υπήρξε κάποια σημαντική στατιστική διαφορά ανάμεσα στις βιωσιμότητες των κυττάρων με τους λακτοβάκιλους, το control, το Ips1, το Ips 10 και τους θετικούς μάρτυρες.

Το Ips 10 φάνηκε ότι επέφερε κάποια μείωση στη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά τη 2ωρη επώαση. Κατ' αυτό τον τρόπο η συνεπώαση των Caco-2 με τα θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη του *L.rhamnosus*, C58, AnLb11 και GG είχε σαν αποτέλεσμα την στατιστικά σημαντική αύξηση της βιωσιμότητας σε σχέση με τα κύτταρα που συνεπώαστηκαν με το Ips10 ($89,65 \pm 3,01$ και $80,19 \pm 8,52$, $p=0,01$, $90,82 \pm 5,46$ και $80,19 \pm 8,52$, $p=0,01$ και $90,69 \pm 3,29$ και $80,19 \pm 8,52$, $p=0,005$). Το ίδιο παρατηρήθηκε και στο στέλεχος του *L.gasseri* C28 ($89,76 \pm 4,88$ και $80,19 \pm 8,52$, $p=0,01$), καθώς και στο στέλεχος AnLb18 του *L.delbrueckii* ($89,28 \pm 5,39$ και $80,19 \pm 8,52$, $p=0,02$). Ακόμα, τα κύτταρα που επώαστηκαν με το θερμικώς απενεργοποιημένο DSMZ 20079 εμφάνισαν μεγαλύτερη βιωσιμότητα σε σχέση με εκείνα που επώαστηκαν με τα στελέχη του *L.gasseri* C32, C45, C72 και C74 και οι διαφορές τους ήταν στατιστικά σημαντικές ($76,48 \pm 12,47$, $86,17 \pm 5,27$, $85,17 \pm 4,24$ και $85,61 \pm 5,99$ αντίστοιχα, σε σχέση με τη βιωσιμότητα του DSMZ που ήταν $92,50 \pm 3,46$).

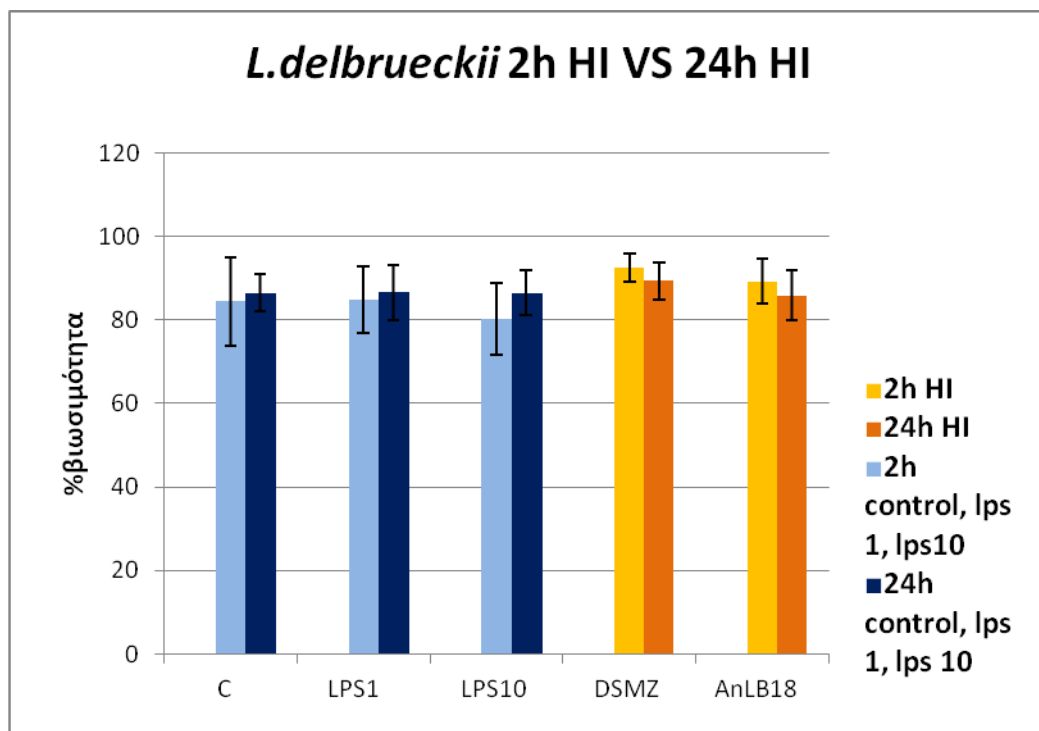
Στα Σχήματα που ακολουθούν (16, 17, 18) εμφανίζονται τα αποτελέσματα της βιωσιμότητας (%) των Caco-2 κυττάρων μετά από την συνεπώαση με απενεργοποιημένα στελέχη των *L.rhamnosus*, *L.gasseri*, και *L.delbrueckii* για 2 και για 24 ώρες.



Σχήμα 16. Βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2 μετά από 2ωρη και 24ωρη επώαση τους με θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη του *L.rhamnosus*.



Σχήμα 17. Βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2 μετά από 2ωρη και 24ωρη επώαση τους με θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη του *L.gasseri*.



Σχήμα 18. Βιωσιμότητα των κυττάρων Caco-2 μετά από 2ωρη και 24ωρη επώαση τους με θερμικώς απενεργοποιημένο στέλεχος του *L.delbrueckii*.

Κατά την 24ωρη επώαση των κυττάρων με τους λακτοβάκιλους δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στα κύτταρα που επωάστηκαν με τα *L.gasseri* και το *L.delbrueckii* και τα control, lps1 και lps10. Το ίδιο συνέβη και με τα *L.rhamnosus*, με εξαίρεση τα κύτταρα που συνεπώαστηκαν με το AnLb11 και παρουσίασαν μικρότερη βιωσιμότητα σε σχέση το control, το lps1 και το lps10 ($76,61 \pm 4,66$ σε σχέση με $86,49 \pm 4,34$, $86,60 \pm 6,55$ και $86,45 \pm 5,37$).

8. Συζήτηση

Από τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνεται ότι η συνεπώαση των 11 υποψηφίων προβιοτικών λακτοβακίλων με τα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2), δεν παρουσιάζει επιπτώσεις στη βιωσιμότητα των κυττάρων σε σχέση με τον μάρτυρα, τόσο για τα ζωντανά στελέχη όσο και για τα θερμικά απενεργοποιημένα και ανεξάρτητα από τον χρόνο συνεπώασης. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι τουλάχιστον υπάρχει μία πρώτη ένδειξη *in vitro* για την ασφάλεια των στελεχών αυτών για τη χρήση τους ως υποψήφια προβιοτικά στελέχη. Θα πρέπει να αναφερθεί, ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων επηρεάζεται σημαντικά από την ίδια την

επεξεργασία τους κατά την εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου. Τα κύτταρα παραμένουν στην επιφάνεια των βοθρίων για 20 μέρες μέχρι να έρθουν σε επαφή με τους λακτοβάκιλους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην απομακρύνονται μετά από την επιφάνεια μόνο με τη τρυψινοποίηση και να χρειάζονται και ήπιο πιπετάρισμα προκειμένου να απομακρυνθούν και να μετρηθούν με τη μέθοδο trypan-blue. Σε αυτή τη διαδικασία είναι πιθανόν να αυξάνεται η θνησιμότητα των κυττάρων λόγω των χειρισμών. Οι ίδιοι χειρισμοί βεβαίως ακολουθούνται για όλα τα στελέχη.

Από τα ζωντανά στελέχη των λακτοβακίλλων που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στη συγκέντρωση της IL-6, μετά από τη συνεπώαση δύο στελεχών του *L.rhamnosus* (Anlb11 και 15) με τα Caco-2 κύτταρα. Δεδομένου ότι η ιντερλευκίνη-6 θεωρείται κυρίως προφλεγμονώδης κυτταροκίνη (γιατί παρουσιάζει και αντιφλεγμονώδεις δράσεις), τα ευρήματα πιθανόν να υποδεικνύουν ότι τα συγκεκριμένα στελέχη του *L.rhamnosus* πιθανόν να μπορούν να περιορίσουν τη διαδικασία της φλεγμονής. Τα αποτελέσματα συνάδουν και με τα ευρήματα ερευνητών που δείχνουν ότι αρκετά προβιοτικά στελέχη συμβάλλουν στην πρόληψη της φλεγμονής μέσω μείωσης των προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Επίσης αποτελέσματα και από άλλες εργασίες δείχνουν ότι ορισμένα στελέχη προβιοτικών, όπως το *L.helveticus*, *B. animalis subsp. lactis*, *B.breve* και *B.longum* μπορούν να μειώσουν την έκφραση ιντερλευκίνης-6 σε κύτταρα Caco-2. (Malago, Koninkx, 2011, Hidalgo-Cantabrana et al., 2014).

Όσον αφορά τη βιωσιμότητα, τα κύτταρα που συνεπώαστηκαν με τα στελέχη του *L.rhamnosus* AnLb11 και AnLb15, εμφάνισαν μικρότερη θνησιμότητα σε σχέση με το γνωστό προβιοτικό στέλεχος (θετικό μάρτυρα) *L.rhamnosus* GG. Ωστόσο, δεν υπήρξε κάποια σημαντική διαφορά στην παραγωγή της κυτταροκίνης ανάμεσα στα στελέχη αυτά και το θετικό μάρτυρα. Πιθανόν όμως τα στελέχη αυτά να είναι πιο ανθεκτικά στην επιβίωσή τους σε σχέση με το *L.rhamnosus* GG, γεγονός βέβαια που πρέπει να επαληθευτεί σε πειραματικά μοντέλα ζώων (*in vivo*).

Επιπλέον, παρατηρήθηκε ότι σε κύτταρα που συνεπώαστηκαν με ορισμένα στελέχη των *L.rhamnosus*, *L.gasseri* και *L.delbrueckii* η παραγωγή ιντερλευκίνης-6 ήταν μεγαλύτερη στα κύτταρα που συνεπώαστηκαν με τα θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη για 2 ώρες σε σχέση με τα αντίστοιχα ζωντανά. Επίσης τα θερμικά απενεργοποιημένα στελέχη του *L.gasseri* C28 και C72, προκαλούν αύξηση της έκκρισης IL-6 σε σχέση με τον μάρτυρα, ενώ το στέλεχος C74, του

ίδιου είδους προκαλεί μείωση σε σχέση με τον μάρτυρα. Η ανοσορρυθμιστική ιδιότητα των λακτοβακίλλων φαίνεται να διατηρείται και μετά τη θερμική απενεργοποίηση τους καθώς υπάρχουν ορισμένα στοιχεία των κυττάρων τους, όπως το κυτταρικό τοίχωμα και το DNA τους που μπορούν να ρυθμίσουν την ανοσολογικές αποκρίσεις του ανθρώπου. Τα μη ενεργά προβιοτικά μπορούν να προκαλέσουν βελτίωση της παραγωγής IgA, να ρυθμίσουν τις αποκρίσεις των T-κυττάρων και να συμμετέχουν στην έκφραση ορισμένων γονιδίων. Κατ' αυτό τον τρόπο υπάρχουν μελέτες που έχουν δείξει ότι τα θερμικώς απενεργοποιημένα στελέχη προβιοτικών μπορούν να επηρεάσουν την έκκριση των κυτταροκινών. (Donkor et al., 2012, Ditu et al., 2014)

Τέλος, η παραγωγή του NO δε φάνηκε να μεταβάλλεται σημαντικά μετά τη συνεπώαση των κυττάρων με τα ζωντανά και τα θερμικώς απενεργοποιημένα στελέχη. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα μελετών που έδειξαν ότι η συνεπώαση λακτοβακίλλων μπορεί να προκαλέσει αύξηση της παραγωγής NO σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα. (Pipenbaheer et al., 2009). Η έκλυση του NO, που φαίνεται ότι επάγεται από την παρουσία κάποιων προβιοτικών μικροβιακών στελεχών, έχει αντιμικροβιακή δράση και θεωρείται ότι προστατεύει την ισορροπία του εντερικού μικροβιόκοσμου, από τα εντερικά παθογόνα (Zidek et al., 2010). Ωστόσο στην παρούσα εργασία υπήρχαν αρκετά μεγάλες διακυμάνσεις ανάμεσα στις μετρήσεις του NO, που πιθανόν αιτιολογούν τη μη-εμφάνιση σημαντικών διαφορών

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας επιβεβαιώνουν ότι τα προβιοτικά στελέχη μπορεί να έχουν ανοσορρυθμιστική και πιθανόν προστατευτική δράση μέσω της έκλυσης του NO. Επίσης φαίνεται ότι οι δράσεις αυτές δεν είναι ενιαίες ούτε σε επίπεδο είδους, αλλά παρουσιάζουν διαφορές μοναδικές για το κάθε στέλεχος, γεγονός που αναδεικνύει την μοναδικότητα του κάθε υποψήφιου προβιοτικού στελέχους και επηρεάζει την επιλογή για τις πιθανές εφαρμογές του ως φαρμακευτική - ενισχυτική αγωγή. Τέλος κανένα από τα στελέχη που εξετάστηκαν δεν εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου.

Τα στελέχη αυτά έχοντας ήδη εξεταστεί και για άλλες ιδιότητες, όπως αντοχή σε χαμηλή οξύτητα, αύξηση παρουσία χολικών αλάτων, αντιμικροβιακή δράση, ευαισθησία σε

αντιβιοτικά, δυνατότητα προσκόλλησης στα Caco-2 κύτταρα (μη-δημοσιευμένα αποτελέσματα), αποτελούν σοβαρές υποψηφιότητες για νέα προβιοτικά στελέχη.

Βιβλιογραφία

1. Arora T., Backhed F.,(2016), The gut microbiota and metabolic disease: current understanding and future perspectives, Journal of Internal Medicine, 339-349
2. Ashraf R., Shah N.P.,(2011), Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products, International Food Research Journal 18(3): 837-853
3. Backhed F., Fraser C., Ringel Y., Sanders M., Sartor R., Sherman P., Versalovic J., Young V., Finlay B.(2012) Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications, Cell Host & Microbe 12,611
4. Cani P, Delzenne N, (2011), The gut microbiome as therapeutic target, Pharmacology & Therapeutics, 130, 202–212
5. Cerbo A., Palmieri B., Aponte M., Morales-Medina J., Iannitti T.,(2016), Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli, J Clin Pathol ,69:187–203.
6. Chaiyasut C, Sirilun S., (2011), Different strains of heat-killed Lactobacilli affected adhesion on Caco-2 and induced interleukin-6, interleukin-10 and interleukin-12 production, African Journal of Microbiology Research Vol. 6(8), pp. 1658-1662, 29
7. Chaplin D., (2006), Overview of the human immune response, J ALLERGY CLIN IMMUNOL, VOLUME 117, NUMBER 2
8. Clemente J., Ursell L., Parfrey L, Knight R.,(2012), The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View, Cell, 148, 1258-1270
9. Commins S., Borish L., Steinke J., (2010), Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines, J Allergy Clin Immunol , 125:53-72.
10. Dabrowska K., Witkiewicz W.,(2016), Correlations of Host Genetics and Gut Microbiome Composition, Frontiers in Microbiology, 7, 1357

11. Deepika G., Charalampopoulos D.,(2010), Surface and Adhesion Properties of Lactobacilli, *Advances in Applied Microbiology*, 70,127-144
12. Dinarello C., (2000), Proinflammatory Cytokines, *Chest.* ,118(2):503-508
13. Ditu L.M., Chifiriuc M. C., Bezirtzoglou E., Marutescu L., Bleotu C., Pelinescu D., Mihaescu G., Lazar V., (2014) ,*Microbial Ecology in Health & Disease* 2014, 25: 23239
14. Donkor O. N., Ravikumar M., Proudfoot O.,Day S. L, Apostolopoulos V., Paukovics G., Vasiljevic T, Nutt S. L., Gill H., (2012), Cytokine profile and induction of T helper type 17 and regulatory T cells by human peripheral mononuclear cells after microbial exposure, *Clinical and Experimental Immunology*, 167: 282–295
15. Dwivedi M, Kumar P., Laddha N., Kemp H., (2016), Induction of regulatory T cells: A role for probiotics and prebiotics to suppress autoimmunity, *Autoimmunity Reviews* 15 , 379–392
16. Elmadfa I., Klein P., Meye A., (2010), Prebiotics and probiotics usefulness against pathologies ,Immune-stimulating effects of lactic acid bacteria in vivo and in vitro, *Proceedings of the Nutrition Society*, 69, 416–420
17. Feghali C., Wright T., (1997), CYTOKINES IN ACUTE AND CHRONIC INFLAMMATION, *Frontiers in Bioscience* 2, 12-26
18. Fujimura K.,Slusher N., Cabana M., Lynch S., (2010),*Expert Rev Anti Infect Ther.*, 8(4): 435–454.
19. Gan S., Patel K.,(2013),Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, research Techniques made simple ,*Journal of Investigative Dermatology* ,Volume 133, 1-3

20. Ghouri Y., Richards D., Rahimi E., Krill J., Jelinek K., DuPont A., (2014)
Systematic review of randomized controlled trials of probiotics, prebiotics, and synbiotics in inflammatory bowel disease, *Clinical and Experimental Gastroenterology*,7, 473–487
21. Goldstein E., Tyrrell K.,Citron D., (2015),*Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities, *Clinical Infectious Diseases*, 60 ,2
22. Green L., Wagner D., Glogowski J., Skipper P., Wishnok J., Tannenbaum S.,(1982),
Analysis of Nitrate, Nitrite, and [¹⁵N]Nitrate in Biological Fluids
23. Guandalini S.,(2011), Probiotics for Prevention and Treatment of Diarrhea, *J Clin Gastroenterol* ,45:149–153
24. Hakansson A., Molin G, (2011), *Gut Microbiota and Inflammation*, 3(6): 637–682.
25. Havenaar J, P.Marteau, (1994), Establishing a scientific basis for probiotic, *Tibtech*,6-8,12
26. Hickson, (2011), Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* infection, *Ther Adv Gastroenterol*, 4(3) 185-197
27. Hidalgo-Cantabrana C., Kekkonen R., Reyes-Gavilan C., Salminen S., Korpela R., Gueimonde M., Ruas-Madiedo P.,(2014), Effect of bacteria used in food industry on the proliferation and cytokine production of epithelial intestinal cellular lines, *JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS*, 6 , 348 –355
28. Holmes E., Li J., Athanasiou T., Ashrafian H., and Nicholson J.,(2011),Understanding the role of gut microbiome–host metabolic signal disruption in health and disease, *Trends in Microbiology*, Vol. 19, No. 7

29. Howarth G., Wang H. ,(2013), Role of Endogenous Microbiota, Probiotics and Their Biological Products in Human Health, *Nutrients*, 5, 58-81
30. Issa I., Moucari R.,(2014), Probiotics for antibiotic-associated diarrhea: Do we have a verdict?, *World J Gastroenterol* , 20(47): 17788-17795
31. Jandhyala S., Talukdar R., Subramanyam C., Vuyyuru H., Sasikala M., and Reddy D., (2015),Role of the normal gut microbiota, *World J Gastroenterol.* ,21 (29): 8787–8803.
32. Khan M.,Role of cytokines, (2008), *Immunopharmacology*, Springer, 266
33. Kinross J., Darzi A., Nicholson J., (2011), Gut microbiome-host interactions in health and disease, *Genome Medicine*, 3:14
34. Korhonen R., Korpela R., Saxelin M., Maki M., Kankaanranta H., Moilanen E., (2001),Induction of Nitric Oxide Synthesis by Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in J774 Macrophages and Human T84 Intestinal Epithelial Cells, *Inflammation*, Vol. 25, No. 4
35. Korhonen R., Korpela R., Moilanen E.,(2002), Signalling Mechanisms Involved in the Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase by *Lactobacillus Rhamnosus* GG, Endotoxin, and Lipoteichoic Acid, *Inflammation*, Vol. 26, No. 5
36. Kotsou M., Mitsou E., Oikonomou I.,Kyriacou A.,(2008), In Vitro Assessment of Probiotic Properties of Lactobacillus Strains from Infant Gut Microflora, *Food Biotechnology*, 22:1–17
37. Lin C ,Chang C, Lu C, Martel J, Ojcius D, Ko Y, Young J., Lai H.,(2014), Impact of the Gut Microbiota, Prebiotics, and Probiotics on Human Health and Disease, *Biomed J* ,37:259-268
38. Liong M.,(2011), Probiotics, Biology genetics and health aspects, Springer, 253-254

39. Malago J., Koninkx J.,(2011), Probiotic Bacteria and Enteric Infections, Springer,263-286
40. Maskrey B., Megson I., Whitfield P., Rossi A.,(2011),Mechanisms of Resolution of Inflammation : A Focus on Cardiovascular Disease, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. ,31:1001-1006
41. Morita H., He F., Fuse T., Ouwehand A., Hashimoto H., Hosoda M., Mizumachi K., Kurisaki J.,(2002), Adhesion of Lactic Acid Bacteria to Caco-2 Cells and Their Effect on Cytokine Secretion, Microbiol. Immunol., 46(4), 293—297
42. Mujagic Z, Vos P., Boekschoten M., Govers C., Pieters H., W. de Wit N., Bron P., Masclee A., Troost F., (2017), The effects of *Lactobacillus plantarum* on small intestinal barrier function and mucosal gene transcription; a randomized double-blind placebo controlled trial,Scientific reports, 7, 40128
43. Nébot-Vivinus M., Harkat C., Bziouche H., Cartier C., Plichon-Dainese R.,Moussa L, Eutamene H., Pishvaie D., Holowacz S., Seyrig C., Piche T.,Theodorou V., Multispecies probiotic protects gut barrier function in experimental models, World J Gastroenterol , 14; 20(22): 6832-6843
44. Parkin J, (2001), An overview of the immune system, Lancet , 357: 1777–89
45. Pipenbaher N., Moeller P., Dolinsek J., Jakobsen M., Weingart H., Cencic A., (2009),Nitric oxide (NO) production in mammalian non-tumorigenic epithelial cells of the small intestine and macrophages induced by individual strains of lactobacilli and bifidobacteria, International Dairy Journal 19 ,166–171
46. Polak-Berecka M ,Paduch A., Skrzypek T., Sroka-Bartnicka A.,(2014), The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*, Antonie van Leeuwenhoek (2014) 106:751–762

47. Rao R., Samak G., (2013), Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications, *Curr Nutr Food Sci.*, 9(2): 99–107.
48. Rodes, Laetitia, Khan A., Arghya P., Coussa-Charley M., Marinescu D., Tomaro-Duchesneau C., Shao W., Kahouli I., Prakash S., (2013), Effect of Probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on Gut-Derived Lipopolysaccharides and Inflammatory Cytokines: An In Vitro Study Using a Human Colonic Microbiota Model, *J. Microbiol. Biotechnol.* , 23(4), 518–526
49. Romano-Keeler J., Weitkamp J., (2015), Maternal influences on fetal microbial colonization and immune development, *Pediatr Res.* , 77(0): 189–195.
50. Ruiz L., Margolles A., Sánchez B., (2013), Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, *Front Microbiol.* , 4: 396.
51. Schell M., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Pessi G., Zwahlen M., Desiere F., Bork P., Delley M., Pridmore R.D., Arigoni F., (2002), The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract , *PNAS* , vol. 99 , no. 22
52. Shadnough M., Hosseini R., Khalilnezhad A., Navai L., Goudarzi H., Vaezjalali M., (2015), Effects of Probiotics on Gut Microbiota in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Double-blind, Placebo-controlled Clinical Trial, *Korean J Gastroenterol* Vol. 65 No. 4, 215-221
53. Shaikh Z., (2011), Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review, *Int. J. of Pharm. & Life Sci.*, 2, 11:, 1247-1263
54. Sharma P., Tomar S., Goswami P., Sangwan V., Singh R., (2014) , Antibiotic resistance among commercially available probiotics, *Food Research International* 57 176–195
55. Steinke J, Borish L., (2006), Cytokines and chemokines, *Allergy Clin. Immunol.*, 117, 2

56. Stern A., Zhu J., (2014), An Introduction to Nitric Oxide Sensing and Response in Bacteria, *Advances in Applied Microbiology*, 87, 187-210
57. Türker N, Toh Z, Karagiannis T, Licciardi P., (2014), *Molecular mechanisms and physiology of disease: Implications for Epigenetics and Health*, Springer, 127-144
58. Turner M., Nedjai B., T., Hurst, D. Pennington, (2014), Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843, 2563–2582
59. Vanderhoof J., Whitney D., Antonson D., Hanner T., Lupo J., and Young R., (1999), Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children, *J Pediatr*, 135:564-8)
60. Verstraete J., (2001), Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli, *Appl Microbiol Biotechnol*, 56:504–507
61. Walter J., (2008), Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 74 no. 16 4985-4996
62. Warrington R., Watson W., Kim H., Antonetti F., An introduction to immunology and immunopathology, (2011), *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 7, (Suppl 1):S1
63. Yarullina D. R., Il'inskaya O. N, Aganov A. V, Silkin N. I., Zverev D. G., (2006), Alternative Pathways of Nitric Oxide Formation in Lactobacilli: Evidence for Nitric Oxide Synthase Activity by EPR, *Microbiology*, Vol. 75, No. 6, pp. 634–638
64. Zhang J., An J., (2007), Cytokines, Inflammation and Pain, *Int Anesthesiol Clin*. Springer; 45(2): 27–37

65. Zidek Z, Kmonickova E., Kostecka P., Tlaskalova- Hogenova H.,(2010), Decisive Role of Lipopolysaccharide in Activating Nitric Oxide and Cytokine Production by the Probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917, Folia Microbiol. 55 (2), 181–189