ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

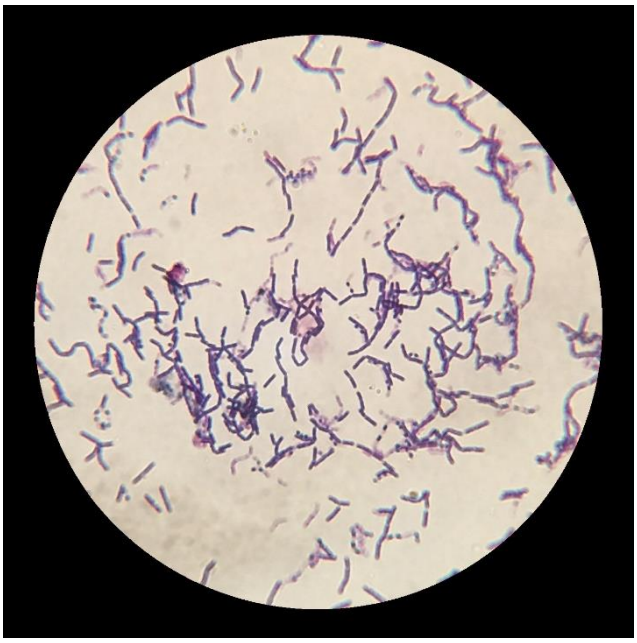
Σχολή Επιστημών Υγείας και Αγωγής

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής

«Έλεγχος προβιοτικών ιδιοτήτων σε στελέχη του γένους *Lactobacillus*»

Πτυχιακή εργασία

Ακτύπη Ουρανία



Αθήνα, 2019



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Σχολή Επιστημών Υγείας και Αγωγής

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

(Επιβλέπουσα) Αδαμαντίνη Κυριακού
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Μαρία Κώτσου
Μέλος Ε.Ε.ΔΙ.Π, Τμήμα Μικροβιολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Τζώρτζης Νομικός
Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η Ακτύπη Ουρανία

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.

Στην οικογένειά μου,

που με στηρίζει σε κάθε βήμα μου.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Αδαμαντίνη Κυριακού, που με εμπιστεύθηκε για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας και για την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια αυτής.

Θα ήθελα επίσης να απευθύνω τις θερμές ευχαριστίες μου στην Δρ. Μαρία Κώτσου, για την μεγάλη βοήθειά της στις πειραματικές διαδικασίες, στο συγγραφικό κομμάτι, καθώς επίσης και στην στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας, κ. Τζώρτζη Νομικό, για τις πολύτιμες παρατηρήσεις και επεξηγήσεις του πάνω στην εργασία αυτή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα και μέλος ΕΤΕΠ του ΕΒΒΙΦΑΜ κ. Ευδοκία Μήτσου, καθώς και το μέλος ΕΤΕΠ του ΕΒΒΙΦΑΜ κ. Γιώτα Λιανέα, για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή τους στο πειραματικό μέρος της εργασίας μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη στα Ελληνικά……σελ.8

Περίληψη στα Αγγλικά……σελ.10

Κατάλογος Εικόνων……σελ.12

Κατάλογος Πινάκων……σελ.13

Κατάλογος Σχημάτων……σελ.14

Συντομογραφίες……σελ.15

ΕΙΣΑΓΩΓΗ……σελ.16

1. Εντερικός μικροβιόκοσμος……σελ.16

1.1 Ο ενδογενής μικροβιόκοσμος: Ορισμός και σύνθεση……σελ.16

1.2 Μικροβιακό οικοσύστημα και ανοσία στο βλεννογόνο……σελ.17

2. Προβιοτικά……σελ.19

2.1 Ορισμός των προβιοτικών……σελ.19

2.2 Χαρακτηριστικά των προβιοτικών……σελ.21

2.3 Βακτήρια του γένους *Lactobacillus* ως προβιοτικά……σελ.23

2.4 Οφέλη των προβιοτικών στην υγεία……σελ.25

2.4.1 Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ προβιοτικών και ξενιστή……σελ.25

2.4.2 Ανθρώπινη υγεία……σελ.26

2.4.3 Υγεία των ζώων……σελ.27

2.4.4 Προστασία των φυτών……σελ.28

2.5 Επιλογή προβιοτικών στελεχών……σελ.28

2.5.1 Προβιοτικές ιδιότητες……σελ.29

2.5.2 *In vitro* δοκιμές για την ανίχνευση πιθανών προβιοτικών στελεχών……σελ.30

3. Οι επιδράσεις των προβιοτικών βακτηρίων στο μεταβολισμό των λιπιδίων……σελ.32

3.1 Υπερχοληστερολαιμία και καρδιαγγειακές παθήσεις……σελ.32

3.2 Προβιοτικά και επιδράσεις στη μείωση της χοληστερόλης……..σελ.33

3.2.1 *In vitro* μελέτες για τη μείωση της χοληστερόλης από προβιοτικά βακτήρια…..σελ.34

3.2.2 Υπό μελέτη υποχοληστερολαιμικοί μηχανισμοί……σελ.38

3.2.2.1 Δραστικότητα υδρολάσης των χολικών αλάτων……..σελ.38

3.2.2.1.1 Μηχανισμός δράσης της υδρολάσης των χολικών αλάτων στη μείωση της χοληστερόλης……σελ.38

3.2.2.1.2 Αναγνώριση των BSH ομολόγων στο γονιδίωμα των προβιοτικών βακτηρίων……σελ.41

3.2.2.1.3 Τα γονίδια των BSH ενζύμων στα προβιοτικά βακτήρια……σελ.41

3.2.2.2 Αφομοίωση χοληστερόλης……σελ.41

3.2.2.2.1 Πιθανοί μηχανισμοί απομάκρυνσης της χοληστερόλης από τα προβιοτικά βακτήρια……σελ.41

ΣΚΟΠΟΣ……σελ.44

ΚΕΦ.1: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ……σελ.45

Προέλευση υποψήφιων προβιοτικών στελεχών του γένους *Lactobacillus*……σελ.45

Φύλαξη, προετοιμασία και έλεγχος καθαρότητας των βακτηριακών στελεχών……σελ.46

1.1 Έλεγχος δραστικότητας της υδρολάσης των χολικών αλάτων……σελ.46

1.2 Δοκιμασία αφομοίωσης χοληστερόλης……σελ.47

ΚΕΦ.2: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ……σελ.50

ΚΕΦ.3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ……σελ.51

Έλεγχος καθαρότητας των βακτηριακών στελεχών……σελ.51

2.1 Έλεγχος δραστικότητας της υδρολάσης των χολικών οξέων……σελ.51

2.2 Δοκιμασία αφομοίωσης χοληστερόλης……σελ.55

ΚΕΦ.4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ……σελ.63

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ……σελ.67

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ……σελ.68

Περίληψη στα ελληνικά

Εισαγωγή: Τα προβιοτικά στελέχη είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν οφέλη υγείας στον ξενιστή. Από τις επιθυμητές ιδιότητες των προβιοτικών, είναι σημαντικές αυτές που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της χοληστερόλης και έχουν υποχοληστερολαιμικές επιδράσεις. Η παρουσία του ενζύμου της υδρολάσης των χολικών αλάτων (BSH) και η ικανότητα αφομοίωσης χοληστερόλης αποτελούν δύο από τις πιο συχνές *in vitro* δοκιμασίες για τις οποίες ελέγχονται τα προβιοτικά στελέχη.

Σκοπός: Η μελέτη στελεχών του γένους *Lactobacillus,* που έχουν ήδη ελεγχθεί για κάποια προβιοτικά χαρακτηριστικά, ως προς την τη δραστικότητα της BSH και ως προς την ικανότητα του κάθε στελέχους να αφομοιώνει τη χοληστερόλη από το θρεπτικό μέσο στο οποίο καλλιεργείται.

Υλικά-μέθοδοι: Δέκα στελέχη *L. gasseri*, τρία στελέχη *L. crispatus*, δύο στελέχη *L. delbrueckii delbrueckii*, τρία στελέχη *L.acidophillus*, επτά στελέχη *L. rhamnosus*, ένα *L. plantarum*, ένα *L. fermentum*, ένα *L. Salivarius*, τρία στελέχη *L. paracasei paracasei* και ένα στέλεχος *Lactobacillus* spp., τα οποία έχουν απομονωθεί από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών νεογνών (Συλλογή Χαροκοπείου Πανεπιστημίου), εξετάστηκαν ως προς τη δραστικότητα της BSH, με θετικό μάρτυρα το *L. acidophillus* DSM 20079. Για την δοκιμασία της δράσης της υδρολάσης χρησιμοποιήθηκαν «ενεργοποιημένες» καλλιέργειες και έγινε επώαση των στελεχών σε θρεπτικό υλικό που περιείχε MRS agar με 0.5 % (w/v) sodium taurodeoxycholate για 72 ώρες.

Για τη δοκιμασία της αφομοίωσης της χοληστερόλης από το καλλιεργητικό μέσο εξετάστηκαν όσα από τα παραπάνω στελέχη εμφάνισαν θετική δράση BSH. Χρησιμοποιήθηκαν «ενεργοποιημένες» καλλιέργειες και έγινε αναερόβια επώαση για 24 ώρες σε τροποποιημένο MRS Broth συμπληρωμένο με oxgall 0.3 % (w/v) και υδατοδιαλυτή μορφή χοληστερόλης (polyoxyethanyl-cholesteryl sebacate; Sigma). Μετά την 24ωρη αναερόβια επώαση, υπολογίστηκε η ξηρή βιομάζα των βακτηρίων κάθε δείγματος, καθώς και προσδιορίστηκε φωτομετρικά η ποσότητα χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό.

Αποτελέσματα: Από τα υπό μελέτη στελέχη, δραστικότητα της BSH εμφάνισαν τέσσερα στελέχη *L. gasseri* (C5, C15, C32 , C45), ένα στέλεχος *L. crispatus* (C1), ένα στέλεχος *L.*

delbrueckii delbrueckii (AnLB40), ένα στέλεχος *L. acidophillus* (AnLB16) και ένα στέλεχος *Lactobacillus* spp. (C39).

Από τη δοκιμασία αφομοίωσης χοληστερόλης προέκυψε ότι σχεδόν όλα τα στελέχη, εκτός του AnlB16, είχαν σημαντική απομάκρυνση χοληστερόλης από το υπερκείμενο υγρό σε σχέση με το ανεμβολίαστο δείγμα. Όταν συγκρίθηκαν με το θετικό μάρτυρα, ως προς την απομάκρυνση χοληστερόλης ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας , προέκυψε ότι όλα τα στελέχη, μαζί και το στέλεχος AnlB16, είχαν απομακρύνει χοληστερόλη σε αντίστοιχο βαθμό με αυτόν που είχε ο μάρτυρας.

Συμπεράσματα: Από τα 32 υποψήφια προβιοτικά στελέχη του γένους *Lactobacillus* που ελέγχθηκαν ως προς τη δραστικότητα του ενζύμου της υδρολάσης των χολικών αλάτων, είναι θετικά τα 9 στελέχη.

Από τη δοκιμασία αφομοίωσης της χοληστερόλης, φάνηκε ότι όλα τα στελέχη που ελέγχθηκαν κατάφεραν να απομακρύνουν τη χοληστερόλη κοντά στα επίπεδα απομάκρυνσης που παρουσιάζει ο θετικός μάρτυρας, DSM 20079.

Τα αποτελέσματα αυτά εμφανίζουν ενδιαφέρον ως πρώτη προσέγγιση για την ανίχνευση των ιδιοτήτων απομάκρυνσης της χοληστερόλης από τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη αλλά απαιτείται να σχεδιαστούν επιπλέον δοκιμές για την επιβεβαίωση σε *in vitro* συστήματα αξιολόγησης και στην συνέχεια σε *in vivo*.

Λέξεις κλειδιά: Προβιοτικές ιδιότητες, λακτοβάκιλλοι, υδρολάση χολικών αλάτων, αφομοίωση χοληστερόλης.

Περίληψη στα αγγλικά

Introduction: Probiotics are living microorganisms which, when administered in sufficient amounts, confer health benefits to the host. The desired properties of probiotics include those that affect cholesterol metabolism and have hypocholesterolemic effects. The presence of bile salt hydrolase (BSH) and the ability to assimilate cholesterol are two *in vitro* assays frequently used in order to test the probiotic strains for their ability to have an impact on cholesterol levels.

Purpose: To test *Lactobacillus* strains, which already have been characterized as potential probiotics, for the presence of BSH, as well as for their ability to assimilate cholesterol from the culture medium.

Materials-Methods: Ten strains of *L. gasseri*, three strains of *L. crispatus*, three strains of *L. acidophilus,* seven strains of *L. rhamnosus*, one *L. fermentum* , one *L. salivarius* , three strains of *L. paracasei paracasei* and a strain of *Lactobacillus* spp., which have been isolated from the intestinal microbiota of healthy neonates, (Culture Collection of Harokopio University) were tested for BSH activity. *L. acidophilus* DSM 20079 was used as a positive control strain. In order to test the activity of hydrolase, "activated" cultures were used and the strains were incubated in MRS agar medium supplemented with 0.5 % (w/v) sodium taurodeoxycholate for 72 h.

Only the strains that exhibited positive activity of BSH were tested for cholesterol assimilation from the culture medium. "Activated" cultures were used and anaerobic incubation was carried out for 24 hours in modified MRS Broth supplemented with oxgall 0.3% (w/v) and water soluble cholesterol (polyoxyethanyl cholesteryl sebacate; Sigma). At the end of incubation, dry biomass of the bacteria was meaured, and the amount of cholesterol remaining in the supernatant was determined photometrically.

Results: Positive activity of the BSH was exhibited by four strains of *L. gasseri* (C5, C15, C32, C45), one *L. crispatus* (C1), one *L. delbrueckii delbrueckii* (AnLB40), one L *acidophilus* (AnLB16), and the strain of *Lactobacillus* spp. (C39).

The cholesterol assimilation assay revealed that almost all of the strains, (except AnlB16 strain), had significant cholesterol removal from the supernatant compared to the un-inoculated substrate. When compared to positive control DSM 20079, for cholesterol removal expressed per gram of dry biomass it was shown that all strains, (the strain AnB16 included),

had removed cholesterol approximately at the same levels compared to the positive control DSM 20079.

Conclusions: Between the 32 potential probiotic strains tested for BSH activity, 9 strains showed positive activity of the enzyme. All these strains were able to assimilate cholesterol per gr of dry biomass approximately at the same levels compared to the positive control DSM 20079.

These results support the cholesterol removal properties of these potential probiotic strains, but further testing is required in order to confirm those findings through *in vitro* assessment systems followed by *in vivo* procedures.

Key words: Probiotic properties, Lactobacillus, bile salt hydrolase, cholesterol assimilation.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Μικροβιακός αποικισμός του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα. Προσαρμοσμένη από (1, 2)……σελ.18

Εικόνα 2: Η χοληστερόλη ως πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση χολικών οξέων και ο υποχοληστεολαιμικός ρόλος της υδρολάσης των χολικών αλάτων (BSH)……σελ.39

Εικόνα 3: (Α) Η χημική δομή των χολικών οξέων, η αντίδραση που καταλύεται από τα ένζυμα υδρολάσες των χολικών αλάτων (BSHs) και η ανίχνευση της δραστικότητας της BSH (3, 4)……σελ.39

Εικόνα 4: Χαρακτηριστική εικόνα Gram θετικών λακτοβακίλλων στο μικροσκόπιο (μεγέθυνση x100)……σελ.51

Εικόνα 5α και Εικόνα 5β: Παρουσιάζονται τα τρυβλία της μίας από τις τρεις επαναλήψεις όλων των υπό μελέτη στελεχών……..σελ.53

Εικόνα 6: Παρουσιάζονται στο στερεοσκόπιο τα στελέχη που εμφάνισαν θετική δράση υδρολάσης. Για σύγκριση παρουσιάζεται και το στέλεχος C72, που δεν εμφάνισε καθόλου τη χαρακτηριστική εικόνα του ιζήματος και θεωρείται αρνητικό στη δράση της υδρολάσης……..σελ.54

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Προβιοτικοί μικροοργανισμοί. Προσαρμογή από (5-7)……σελ.20
Πίνακας 2: Βασικά και επιθυμητά κριτήρια επιλογής προβιοτικών στελεχών για εμπορική εφαρμογή (8)……σελ.29
Πίνακας 3: Λίστα πιθανών προβιοτικών βακτηρίων τα οποία δείχνουν δραστικότητα του ενζύμου υδρολάσης των χολικών αλάτων……σελ.35
Πίνακας 4: Σύνοψη των κυριότερων ευρημάτων σχετικά με τα προβιοτικά που επιδρούν στη μείωση της χοληστερόλης……σελ.36
Πίνακας 5: Επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη για έλεγχο προβιοτικών ιδιοτήτων……σελ.45
Πίνακας 6: Παρουσίαση της εμφάνισης δραστικότητας της υδρολάσης των χολικών αλάτων (BSH)……σελ.51
Πίνακας 7: Η ημιποσοτική μέτρηση της δραστικότητας του ενζύμου BSH……σελ.52
Πίνακας 8: Μετρήσεις της ξηρής βιομάζας (g) των βακτηρίων……σελ.55
Πίνακας 9: Αποτελέσματα της φωτομέτρησης των δειγμάτων……σελ.55
Πίνακας 10: Συγκέντρωση χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο……σελ.56
Πίνακας 11: Σύγκριση των στελεχών σε σχέση με το ανεμβολίαστο ως προς τη χοληστερόλη που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό (μg/ml), με χρήση του t-test……σελ.57
Πίνακας 12: Ποσοστό χοληστερόλης που απομάκρυνε το κάθε στέλεχος από το θρεπτικό μέσο……σελ.58
Πίνακας 13: Συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε (mg/ml) ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηρίων……σελ.59
Πίνακας 14: Σύγκριση των στελεχών σε σχέση με το θετικό control DSMZ ως προς τη χοληστερόλη που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο (mg/ml) ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας των βακτηρίων, με χρήση του t-test……σελ.60
Πίνακας 15: Αποτελέσματα του ελέγχου της γραμμικής συσχέτισης μεταξύ της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε και της ξηρής βιομάζας των βακτηρίων σε κάθε στέλεχος, με χρήση του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson……σελ.61

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης της χοληστερόλης.....σελ.56

Σχήμα 2: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/ml) που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό…..σελ.57

Σχήμα 3: Ποσοστό χοληστερόλης που απομάκρυνε το κάθε στέλεχος από το θρεπτικό μέσο…….σελ.58

Σχήμα 4: Συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε (mg/ml) ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηρίων……σελ.59

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

LAB	Lactic Acid Bacteria
ΕΒΒΙΦΑΜ	Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών
BSH	Bile Salt hydrolase
GRAS	Generally Recognized As Safe
CFU	Colony formimg Units
EPS	Exopolysaccharides (Εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Εντερικός μικροβιόκοσμος

1.1 Ο ενδογενής μικροβιόκοσμος: Ορισμός και σύνθεση

Πριν από λίγα χρόνια, οι μικροοργανισμοί που μας κινούσαν το ενδιαφέρον ήταν ουσιαστικά τα ανθρώπινα παθογόνα βακτήρια, αλλά σήμερα, όλο και περισσότερες μελέτες στοχεύουν στο να αναγνωρίσουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μικροβιόκοσμου και της ανθρώπινης φυσιολογίας (9). Ο όρος μικροβιόκοσμος αναφέρεται στον πληθυσμό των μικροοργανισμών που υπάρχει σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον (χώμα, ωκεανός, έντερο, δέρμα, κόλπος κλπ.), συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, των ιών, των αρχαίων, των πρωτόζωων και των μυκήτων. Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει δέκα φορές περισσότερους μικροοργανισμούς από ό,τι ανθρώπινα κύτταρα (10). Οι άνθρωποι φιλοξενούν διαφορετική μικροχλωρίδα στα διαφορετικά σημεία του σώματος . Μπορούμε έτσι να διακρίνουμε τη μικροβιακή χλωρίδα του δέρματος, του στόματος, του εντέρου, του κόλπου και των αεραγωγών (11).

Σήμερα, το ανθρώπινο μικροβίωμα μπορεί να θεωρηθεί ως ένα επιπρόσθετο ανθρώπινο όργανο από άποψη φυσιολογίας, έχοντας βασικούς ρόλους ως όργανο (12). Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί περιέχονται στο γαστρεντερικό σωλήνα (GIT) και ανέρχονται σε περίπου 10^{14} κύτταρα, που αποτελεί το ένα από τα πιο πυκνά οικοσυστήματα (13). Αυτοί οι μικροοργανισμοί είναι στο μεγαλύτερο μέρος τους, περίπου 70%, βακτήρια αυστηρά αναερόβια (14).

Τα φύλα Firmicutes (*Clostridum leptum* και *Clostridum coccoides*) και Bacteroidetes είναι τα δύο κυρίαρχα φύλα που αντιπροσωπεύουν περίπου το 90% των βακτηρίων που απαντώνται στο παχύ έντερο . Το τρίτο κυρίαρχο φύλο είναι το Actinobacteria με μόνο περίπου 3% (15). Στον κόλπο, τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* είναι τα κυρίαρχα βακτήρια (70% του πληθυσμού), ακόμη και αν μπορεί να περιλαμβάνοντα ορισμένοι μικροοργανισμοί που υπάρχουν επίσης στο γαστρεντερικό σωλήνα (16). Υπάρχει μια τεράστια ποικιλομορφία στα είδη των βακτηρίων που αποτελούν τον εντερικό μικροβιόκοσμο, με περίπου 1000 διαφορετικά είδη βακτηρίων (17). Εκτός αυτού, υπάρχει επίσης συγκεκριμένος βακτηριακός πληθυσμός και συγκεκριμένη ποικιλία ανάλογα με την περιοχή του γαστρεντερικό σωλήνα.

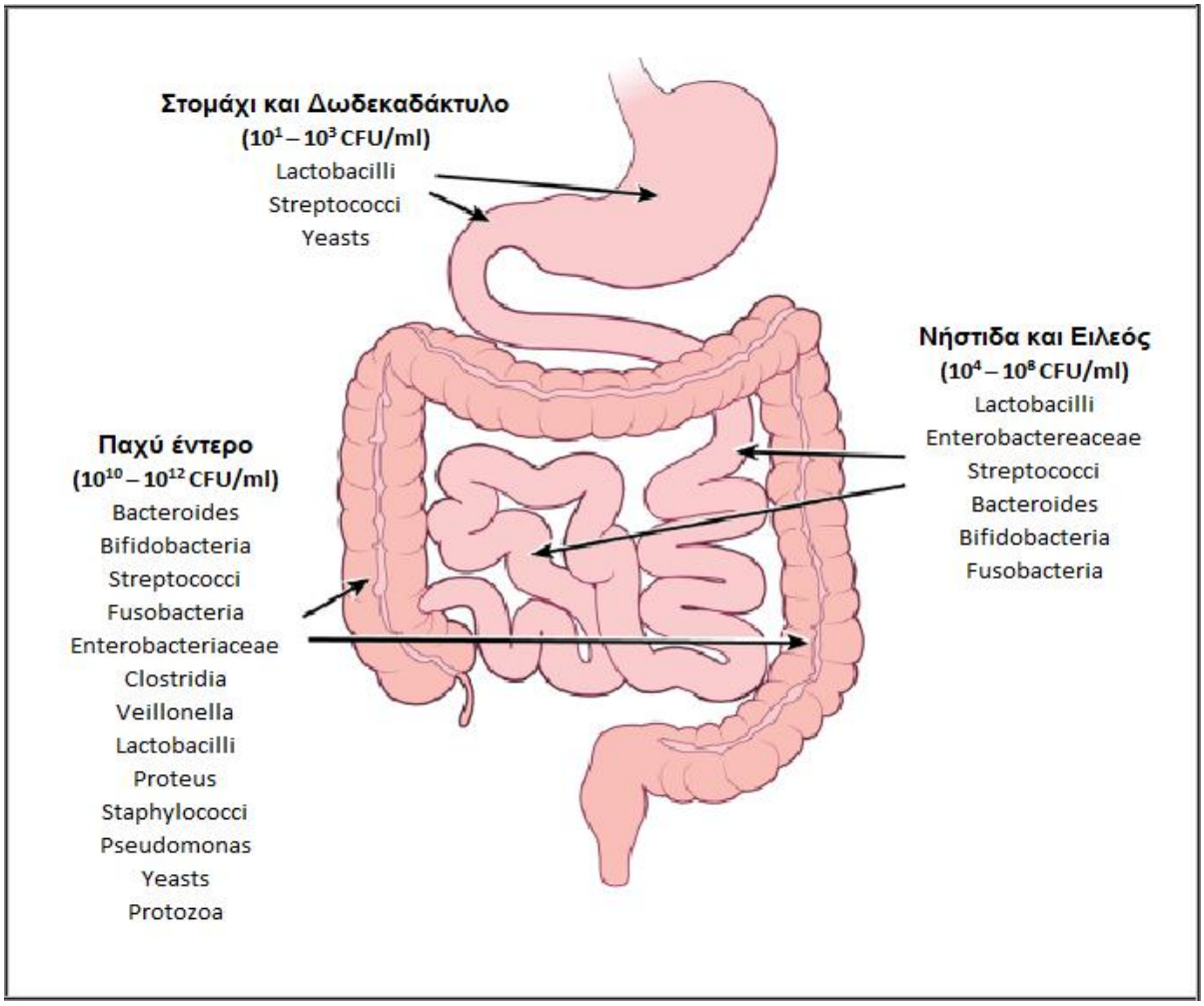
Για παράδειγμα, κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, οι βακτηριακοί πληθυσμοί διαφέρουν από το άνω έως το κάτω μέρος του σωλήνα, αλλά και μεταξύ του εντερικού βλεννογόνου και του περιεχομένου του αυλού (18, 19). Επιπλέον, ακόμη και αν σε επίπεδο φύλου, η σύνθεση είναι σχετικά παρόμοια από το ένα άτομο στο άλλο, έχει παρατηρηθεί σημαντική μεταβλητότητα σε επίπεδο είδους μεταξύ των ατόμων (18).

Η αφθονία και οι αναλογίες τους ποικίλλουν μεταξύ των ατόμων και συνδέονται με τις μακροπρόθεσμες διατροφικές συνήθειες του ατόμου (20). Το μικροβίωμα αντιπροσωπεύει μια τεράστια ποικιλομορφία όσον αφορά τα βακτηριακά είδη και τις λειτουργίες αυτών. Είναι ενδιαφέρον να κατανοήσουμε τον τρόπο με τον οποίο μπορούμε να μελετήσουμε τη σύνθεσή τους έτσι ώστε να έχουμε μια καλύτερη κατανόηση στην αλληλεπίδρασή τους με τον ξενιστή. Πράγματι, φαίνεται ότι αυτό το «όργανο» συμμετέχει στην ανθρώπινη υγεία και θα ήταν πολύ σημαντικό να γίνει περαιτέρω μελέτη της φυσιολογίας, της παθολογίας, της διάγνωσης, της θεραπείας και της πρόληψης των αλλοιώσεων στη δομή της μικροβιακής κοινότητας (12).

1.2 Μικροβιακό οικοσύστημα και ανοσία στο βλεννογόνο

Η γνώση σχετικά με τη μικροβιακή σύνθεση του εντερικού οικοσυστήματος για την υγεία και τις ασθένειες εξακολουθεί να είναι περιορισμένη. Το μικροβίωμα του εντέρου σχηματίζει ένα ποικίλο και δυναμικό οικοσύστημα, συμπεριλαμβανομένων των Βακτηρίων, των Αρχαίων και Ευκάρυων τα οποία έχουν προσαρμοστεί ώστε να ζουν στην επιφάνεια του βλεννογόνου του εντέρου ή στο εσωτερικό του αυλού του εντέρου (2) (Εικόνα 1).

- Στομάχι και δωδεκαδάκτυλο: Φιλοξενούν πολύ χαμηλούς αριθμούς μικροοργανισμών: $<10^3$ βακτηριακών κυττάρων ανά γραμμάριο εντερικού περιεχομένου
- Νήστιδα και ειλεός: Ο αριθμός των βακτηρίων σταδιακά αυξάνεται από 10^4 κύτταρα στη νήστιδα σε 10^8 κύτταρα ανά γραμμάριο εντερικού περιεχομένου στον τελικό ειλεό
- Παχύ έντερο: Πυκνοκατοικημένο από αναερόβιους μικροοργανισμούς: περίπου 10^{12} κύτταρα ανά γραμμάριο εντερικού περιεχομένου



Εικόνα 1: Μικροβιακός αποικισμός του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα. Προσαρμοσμένη από (1, 2).

Τα περισσότερα βακτηριακά κύτταρα στα δείγματα κοπράνων δεν μπορούν να καλλιεργηθούν σε μέσα καλλιέργειας. Σε επίπεδο βακτηριακών ειδών και στελεχών, η μικροβιακή ποικιλομορφία μεταξύ των ατόμων είναι εξαιρετικά αξιοσημείωτη: κάθε άτομο φιλοξενεί τη δική του χαρακτηριστική βακτηριακή σύνθεση, η οποία καθορίζεται εν μέρει από τον γονότυπο του ξενιστή και από τον αρχικό βακτηριακό αποικισμό κατά τη γέννηση μέσω της κάθετης μεταφοράς των γονιδίων.

Ο εντερικός μικροβιόκοσμος παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ανοσίας, τη θρέψη και την υγεία. Το εντερικό περιβάλλον είναι γνωστό ότι υπόκειται σε αλλαγές κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων της ζωής ενός παιδιού. Αμέσως μετά τη γέννηση, το έντερο του παιδιού κυριαρχείται από ένα φάσμα προαιρετικά ανερόβιων βακτηρίων, όπως είναι βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae και του γένους *Streptococcus* και γένους

Staphylococcus. Μόλις το διαθέσιμο οξυγόνο έχει καταναλωθεί, αυξάνονται τα αυστηρά ανερόβια βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των ειδών του *Bifidobacterium*, *Bacteroides* και *Clostridium.* Στο τέλος του πρώτου έτους της ζωής, ο εντερικός μικροβιόκοσμος αποτελείται στο μεγαλύτερο μέρος του από αναερόβια βακτήρια.

Κατά τον απογαλακτισμό, οι πληθυσμοί των *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* παραμένουν ιδιαίτερα άφθονοι στον εντερικό μικροβιόκοσμο, ακόμη και μετά την εισαγωγή των στερεών τροφών. Πράγματι, ορισμένα προβιοτικά είδη από αυτά τα γένη είναι σε θέση να ελέγχουν τη σύνθεση του μικροβιόκοσμου λόγω της παραγωγής του γαλακτικού και του οξικού οξέος στο περιβάλλον του εντέρου, και τα προϊόντα αυτά παίζουν ευεργετικό ρόλο στην διατήρηση της υγείας του ξενιστή. Στους υγιείς ενήλικες, η βακτηριακή σύνθεση των κοπράνων σταθεροποιείται με την πάροδο του χρόνου. Η φυσιολογική αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηρίων του εντέρου και του ξενιστή τους αποτελεί μια συμβιωτική σχέση (21).

Σημαντική επίδραση στην ανοσολογική λειτουργία θεωρείται ότι έχουν τα βακτήρια του ανώτερου εντέρου, λόγω της παρουσίας ενός μεγάλου αριθμού οργανωμένων λεμφοειδών δομών στο βλεννογόνο του λεπτού εντέρου (επιθέματα Peyer's). Το επιθήλιο τους είναι εξειδικευμένο για την πρόσληψη και αναγνώριση των αντιγόνων και περιέχουν λεμφικά βλαστικά κέντρα για επαγωγή προσαρμοστικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Στο παχύ έντερο, οι μικροοργανισμοί μπορούν να πολλαπλασιαστούν με τη ζύμωση διαθέσιμων υποστρωμάτων από τη διατροφή ή τις ενδογενείς εκκρίσεις.

Το έντερο αποτελεί το πιο σημαντικό όργανο το οποίο σχετίζεται με την ανοσολογική λειτουργία του σώματος: περίπου το 60% των ανοσολογικών κυττάρων του σώματος είναι παρόντα στον εντερικό βλεννογόνο. Το ανοσοποιητικό σύστημα ελέγχει τις ανοσοαποκρίσεις έναντι διατροφικών πρωτεϊνών προλαμβάνοντας τις τροφικές αλλεργίες, και έναντι παθογόνων μικροοργανισμών όπως ιών (ροταϊός, ιός πολιομυελίτιδας), βακτηρίων (Salmonella, Listeria, Clostridium, κ.λπ.) και παρασίτων (Τοξόπλασμα) (22).

2. Προβιοτικά

2.1 Ορισμός των προβιοτικών

Ο όρος ''προβιοτικό'' αρχικά χρησιμοποιήθηκε ως αντώνυμο της λέξης «αντιβιοτικό». Προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «προ» και «βίος» το οποίο σημαίνει «για ζωή» (23), και

έχει υποβληθεί σε αρκετές αναθεωρήσεις τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Ο ορισμός έχει πρόσφατα βελτιωθεί από μια ομάδα ειδικών που ανατέθηκε από την Υπηρεσία Τροφίμων και Γεωργίας του Οργανισμού των Ηνωμένων Εθνών (FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), και είναι πλέον κοινώς αποδεκτό να ορίζονται ως προβιοτικά «οι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες προσφέρουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή» (24). Ο ορισμός αυτός απαιτεί ο όρος «προβιοτικό» να εφαρμόζεται σε ζωντανούς μικροοργανισμούς που έχουν τεκμηριωμένο ευεργετικό αποτέλεσμα (25), παρόλο που έχει βρεθεί ότι και παρασκευάσματα νεκρών κυττάρων καθώς και συστατικών των κυττάρων, μπορούν επίσης να έχουν ορισμένα αποτελέσματα στην προαγωγή της υγείας (26, 27).

Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να προστεθούν σε πολλούς διαφορετικούς τύπους προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων, των φαρμάκων και των συμπληρωμάτων διατροφής (7).

Στελέχη του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα προβιοτικά σε τρόφιμα και ζωοτροφές (Πίνακας 1). Άλλοι μικροοργανισμοί, όπως ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* και ορισμένα στελέχη των *Escherichia coli* και *Bacillus*, χρησιμοποιούνται επίσης ως προβιοτικά. Βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για τη ζύμωση τροφίμων ήδη από την αρχαιότητα, χρησιμοποιούνται επίσης τώρα και για την προάσπιση της υγείας. Τα LAB θεωρούνται GRAS (Γενικά Αναγνωρισμένα ως Ασφαλή), δηλαδή δεν έχουν αναφερθεί παθογόνες ή λοιμογόνες ιδιότητες. Για το χρήση των LAB ως προβιοτικά, πρέπει να ληφθούν υπόψη ορισμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά, όπως το χαμηλό κόστος, η διατήρηση της βιωσιμότητάς τους κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση, η ευκολία εφαρμογής τους στα προϊόντα και η αντοχή τους στις φυσικοχημικές επεξεργασίες (7).

Πίνακας 1: Προβιοτικοί μικροοργανισμοί. Προσαρμογή από (5-7).

***Lactobacillus* species**	***Bifidobacterium* species**	**Others**
L. acidophilus	*B. adolescentis*	*Bacillus cereus*
L. amylovorus	*B. animalis*	*Clostridium butyricum*

L. brevis	*B. breve*	*Enterococcus faecalis*[a]
L. casei	*B. bifidum*	*Enterococcus faecium*[a]
L. rhamnosus	*B. infantis*	*Escherichia coli*
L. crispatus	*B. lactis*	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoriss*
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus*	*B. longum*	*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*
L. fermentum		*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Dextranicum*
L. gasseri		*Pediococcus acidilactici*
L. helveticus		*Propionibacterium freudenreichii*[a]
L. johnsonii		*Saccharomyces boulardii*
L. lactis		*Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophiles*
L. paracasei		*Sporolactobacillus inulinus*[a]
L. plantarum		
L. reuteri		
L. salivarius		
L. gallinarum[a]		

[a]κυρίως εφαρμόζεται σε ζώα

Ο όρος πρεβιοτικά αναφέρεται στις άπεπτες ουσίες που παρέχουν μια ευεργετική φυσιολογική επίδραση στον ξενιστή με επιλεκτική διέγερση την ευνοϊκή ανάπτυξη ή δραστηριότητα ενός περιορισμένου αριθμού των ενδογενών βακτηρίων. Τέλος, συμβιωτικά ονομάζονται τα προϊόντα εκείνα που περιέχουν τόσο προβιοτικά όσο και πρεβιοτικά (22).

2.2 Χαρακτηριστικά των προβιοτικών

Τα προβιοτικά βακτήρια θα πρέπει να έχουν μια ποικιλία ιδιοτήτων έτσι ώστε να είναι αποδεκτά ως προβιοτικά. Αρχικά, τα προβιοτικά έχουν δράση β-D-γαλακτοσιδάσης καθώς και πρωτεολυτική δράση για τη διαδικασία της ζύμωσης (28). Τα χαρακτηριστικά των προβιοτικών θα καθορίσουν την ικανότητά τους να επιβιώνουν στην ανώτερη πεπτική οδό και να αποικίζουν τον εντερικό αυλό του παχέος εντέρου για μια απροσδιόριστη χρονική περίοδο. Τα προβιοτικά είναι ασφαλή για την κατανάλωση από τον άνθρωπο και δεν αναφέρεται κάποια παθογένεια ή παραγωγή οποιωνδήποτε τοξινών από αυτά τα στελέχη (29, 30). Επιπλέον, ορισμένα προβιοτικά θα μπορούσαν να παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες όπως οι βακτηριοσίνες. Ως εκ τούτου, το πιθανό όφελος για την υγεία θα εξαρτηθεί από το χαρακτηριστικό προφίλ των προβιοτικών. Στον άνθρωπο, οι αλληλεπιδράσεις με τα προβιοτικά, μπορούν να συμβούν σε βιοχημικό, ανοσολογικό και επίπεδο φυσιολογίας. Μερικά προβιοτικά στελέχη, αλλά όχι όλα, μπορούν να μειώσουν τον εντερικό χρόνο διέλευσης της τροφής, να βελτιώσουν την ποιότητα των μυϊκών συσπάσεων στο λεπτό έντερο (31) και να αυξήσουν προσωρινά τον ρυθμό μίτωσης στα εντεροκύτταρα, το οποίο είναι πιθανό να ενισχύει την ανάπλαση του εντερικού βλεννογόνου (7, 32).

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα προβιοτικά είναι στελέχη του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Γενικά τα περισσότερα προβιοτικά είναι Gram θετικά βακτήρια, συνήθως αρνητικά στη δοκιμασία καταλάσης, έχουν σχήμα ράβδων με στρογγυλεμένα άκρα και εμφανίζονται σε ζεύγη, μικρές ή μεγάλες αλυσίδες (29). Δεν έχουν μαστίγια, δεν κινούνται, δεν σχηματίζουν σπόρια και δεν είναι ανθεκτικά στο αλάτι. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για τα περισσότερα προβιοτικά είναι 37 ° C, αλλά μερικά στελέχη όπως το *L. casei* προτιμούν τους 30 ° C, και το βέλτιστο pH για την αρχική ανάπτυξη είναι 6.5-7.0 (29).

Το *L. acidophilus* είναι μικροαερόφιλο με αναερόβιες αναφορές και ικανότητα αερόβιας ανάπτυξης. Το γένος *Bifidobacterium* είναι αναερόβιο, αλλά ορισμένα είδη είναι αερο-ανεκτικά. Τα περισσότερα προβιοτικά βακτήρια είναι επιλεκτικά στις διατροφικές τους ανάγκες και αναπτύσσονται μόνο εάν υπάρχουν ειδικά θρεπτικά συστατικά στο μέσο καλλιέργειάς τους (33-36). Όσον αφορά τα προβιοτικά ζύμωσης είναι είτε υποχρεωτικά ομοζυμωτικά (π.χ. *L. acidophilus, L. helvelicas*), είτε υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά (π.χ., *L. brevis, L. reuteri*), είτε προαιρετικά ετεροζυμωτικά (π.χ., *L. casei, L. plantarum*) (37). Επιπλέον, τα προβιοτικά παράγουν μια ποικιλία ευεργετικών ουσιών όπως αντιμικροβιακές ουσίες, γαλακτικό οξύ, υπεροξείδιο του υδρογόνου και μια ποικιλία βακτηριοσινών (38, 39). Τα

προβιοτικά έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τον μικροβιόκοσμο του ξενιστή και να ανταγωνίζονται το παθογόνο, βακτηριακό, ιικό και μυκητιακό μικροβίωμα (39).

2.3 Βακτήρια του γένους *Lactobacillus* ως προβιοτικά

Το γένος *Lactobacillus* περιλαμβάνει διάφορα Gram θετικά προαιρετικά αναερόβια ή μικροαερόφιλα βακτήρια σχήματος ράβδου. Πρόκειται για ένα σημαντικό τμήμα της ομάδας των βακτηρίων γαλακτικού οξέος (LAB) τα οποία μπορούν να μετατρέψουν τα σάκχαρα εξόζης σε γαλακτικό οξύ, δημιουργώντας έτσι ένα όξινο περιβάλλον το οποίο αναστέλλει την ανάπτυξη πολλών ειδών επιβλαβών βακτηρίων (40). Στους ανθρώπους, τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* υπάρχουν φυσιολογικά στον κόλπο, στο γαστρεντερικό σωλήνα (37) και είναι μαζί με τα *Bifidobacterium,* τα πρώτα βακτήρια που αποικίζουν το έντερο του βρέφους μετά τη γέννηση (41).

Ορισμένα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* χρησιμοποιούνται για την παρασκευή γιαουρτιού, τυριού, λάχανου, τουρσιού, ψωμιού με προζύμι, κρασιού και άλλων ζυμωμένων προϊόντων (42, 43). Σε όλες τις περιπτώσεις, τα σάκχαρα μεταβολίζονται σε γαλακτικό οξύ, δημιουργώντας έτσι ένα εχθρικό περιβάλλον για τους μικροοργανισμούς που προκαλούν αλλοίωση και επιτρέπουν με αυτό τον τρόπο τη συντήρηση των τροφίμων.

Πρόσφατα, έχει υπάρξει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον για τα βακτήρια του γαλακτικού οξέως (LAB), ειδικά στελέχη του γένους *Lactobacillus,* λόγω των ευεργετικών τους επιδράσεων στην υγεία συμπεριλαμβανομένων των αντιχοληστερολαιμικών, αντιδιαβητικών, αντιπαθογόνων και αντικαρκινογόνων ιδιοτήτων, καθώς και τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος (44-51). Το *Lactobacillus plantarum*, το οποίο αποτελεί το κυρίαρχο είδος *Lactobacillus* σε στοματικό και εντερικό ανθρώπινο βλεννογόνο, έχει την ικανότητα να επιβιώνει το πέρασμα στον ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα και να εγκαθίσταται για κάποιο σύντομο χρονικό διάστημα στο έντερο ύστερα από την κατανάλωσή του (47, 50, 52). Στελέχη του γένους *Lactobacillus* χρησιμοποιούνται συχνά σε προϊόντα που καταναλώνει ο άνθρωπος και μπορούν να βρεθούν ως προβιοτικά σε παιδικές τροφές, ζυμωμένα γάλατα και διάφορα φαρμακευτικά παρασκευάσματα. (51, 53, 54).

Τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* έχουν λάβει τεράστια προσοχή λόγω των ευεργετικών ιδιοτήτων τους στην υγεία (55). Ωστόσο, ένα πολύ σημαντικό γεγονός που μερικές φορές

παραβλέπεται από τους επιστήμονες είναι ότι οι τα περισσότερα βακτήρια δεν σχηματίζουν σταθερούς και αριθμητικά σημαντικούς πληθυσμούς στην ανθρώπινη εντερική οδό, ειδικά στο λεπτό έντερο (55). Επιπλέον, στην έρευνα για τη ρύθμιση των εντερικών επιπέδων των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* μετά από τη λήψη εμπορικών προβιοτικών συμπληρωμάτων διατροφής για μια εβδομάδα, παρατηρήθηκε στο έντερο σημαντική αύξηση μόνο στα *Lactobacillus acidophilus*, η οποία αύξηση εξαφανίστηκε ύστερα από μερικές ημέρες (56). Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η βραχυχρόνια καθημερινή πρόσληψη ζωντανών προβιοτικών κυττάρων είναι ανεπαρκής στη διαμόρφωση των επιπέδων των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* στο έντερο. Είδη του γένους *Lactobacillus* όπως: *Lactobacillus acidophilus, L. casei, L. paracasei, L. rhamnosus, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, L. brevis, L. johnsonii, L. plantarum και L. fermentum* χρησιμοποιούνται συχνά ως προβιοτικά. Αν και τα βακτήρια του γένους *Lactobacillus* περιγράφονται συχνά ως ενδογενή κάτοικοι του ανθρώπινου εντερικού σωλήνα, είναι πιο πιθανό να είναι αυτόχθονες της στοματικής κοιλότητας ή των ζυμωμένων τροφών (55, 56).

Τα βακτήρια του είδους *Lactobacillus* συνήθως επιλέγονται ως προβιοτικά επειδή εμφανίζουν πολλές κρίσιμες ιδιότητες όπως είναι: η υψηλή αντοχή σε χολικά οξέα, η ικανότητα πρόσφυσης σε εντερικές επιφάνειες, η αντοχή σε χαμηλό pH και σε γαστρικό χυμό, η αναστολή δυνητικά παθογόνων ειδών (αντιμικροβιακή δράση), η αντοχή σε αντιβιοτικά, η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών και η απομάκρυνση της χοληστερόλης (57-59).

Βακτηριακά στελέχη του γένους *Lactobacillus,* χρησιμοποιούνται εδώ και αρκετές δεκαετίες ως προβιοτικά. Ακόμα, δεν έχουν γίνει ξεκάθαροι οι μοριακοί μηχανισμοί στους οποίους βασίζεται η προβιοτική τους δράση. Δύο στελέχη του γένους *Lactobacillus*, το *L. rhamnosus* GG και το *L. plantarum* WCFS1, έχουν μελετηθεί λεπτομερώς και μεταλλάξεις αυτών των στελεχών μας έχουν βοηθήσει πολύ στην κατανόηση της αλληλεπίδρασής τους με τον ξενιστή. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκαν αρκετά απροσδόκητα αποτελέσματα τα οποία αφήνουν περισσότερες ερωτήσεις παρά απαντήσεις. Τα αρχικά αποτελέσματα των μελετών πάνω στις εφαρμογές των προβιοτικών είναι ελπιδοφόρα, παρόλα αυτά απαιτείται περαιτέρω έρευνα, όχι μόνο για να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα αλλά και για να διερευνηθεί ο τρόπος δράσης αυτών των προβιοτικών (60).

2.4 Οφέλη των προβιοτικών στην υγεία

Η έρευνα γύρω από τα προβιοτικά υποδηλώνει μια σειρά πιθανών ευεργετικών δράσεων για την υγεία του οργανισμού-ξενιστή. Τα πιθανά αποτελέσματα μπορούν να αποδοθούν μόνο σε δοκιμασμένα στελέχη και όχι σε ολόκληρη την ομάδα των προβιοτικών. Τα προβιοτικά έχει αποδειχθεί ότι παρέχουν ποικίλα οφέλη στην υγεία των ανθρώπων, των ζώων και των φυτών. Ωστόσο, η βιωσιμότητα των μικροοργανισμών καθ όλη τη διάρκεια της επεξεργασίας και της αποθήκευσης, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εφαρμογή των ισχυρισμών για τις επιπτώσεις στην υγεία. Επομένως, τα οφέλη για την υγεία πρέπει να τεκμηριώνονται με το συγκεκριμένο στέλεχος και την ειδική δοσολογία (2).

2.4.1 Μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ προβιοτικών και ξενιστή

Η συμβίωση μεταξύ του μικροβιόκοσμου και του ξενιστή μπορεί να βελτιστοποιηθεί με φαρμακολογική ή διατροφική παρέμβαση στο εντερικό μικροβιακό οικοσύστημα, με τη χρήση προβιοτικών (22).

<u>Ανοσολογικά οφέλη</u>

- Ενεργοποιούν τα τοπικά μακροφάγα για να αυξήσουν την αντιγονοπαρουσίαση στα Β λεμφοκύτταρα και την παραγωγή της εκκριτικής ανοσοσφαιρίνης Α (IgA) τόσο τοπικά όσο και συστηματικά
- Ρυθμίζουν τα προφίλ κυτταροκινών
- Προκαλούν μειωμένη απόκριση στα αντιγόνα των τροφίμων

<u>Μη-ανοσολογικά οφέλη</u>

- Βοηθούν στην πέψη των τροφών και ανταγωνίζονται τους παθογόνους παράγοντες για τα θρεπτικά συστατικά
- Παράγουν βακτηριοσίνες για αναστολή των παθογόνων
- «Καθαρίζουν» τις ρίζες υπεροξειδίου
- Διεγείρουν την παραγωγή επιθηλιακής βλέννας
- Ενισχύουν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού
- Ανταγωνίζονται για προσκόλληση τα παθογόνα
- Τροποποιούν τις τοξίνες που προέρχονται από παθογόνα

2.4.2 Ανθρώπινη υγεία

Τα προβιοτικά εμφανίζουν πολλά οφέλη στην υγεία πέραν της βασικής θρεπτικής τους αξίας (61). Αυτά τα στοιχεία έχουν τεκμηριωθεί από επιστημονικές δοκιμές που έχουν πραγματοποιηθεί στον άνθρωπο ή σε ζώα, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν από νόμιμες ερευνητικές ομάδες και δημοσιεύτηκαν σε επιστημονικά περιοδικά (8, 39). Ορισμένα από αυτά τα οφέλη έχουν τεκμηριωθεί και καθιερωθεί, ενώ άλλα έχουν δείξει υποσχόμενα αποτελέσματα σε ζωικά μοντέλα, με τις ανθρώπινες μελέτες να εκκρεμούν και να απαιτούνται για την τεκμηρίωση αυτών των ισχυρισμών (8). Τα οφέλη των προβιοτικών βακτηρίων είναι συγκεκριμένα για κάθε στέλεχος και όχι καθολικά. Επομένως, δεν παρέχουν όλα τα στελέχη του ίδιου είδους όλα τα προτεινόμενα οφέλη και δεν είναι όλα αποτελεσματικά απέναντι σε συγκεκριμένες καταστάσεις υγείας (8).

Τα προβιοτικά χρησιμοποιούνται σε ζυμωμένα τρόφιμα εδώ και αιώνες. Ωστόσο, στις μέρες μας έχει υποστηριχθεί ότι τα προβιοτικά μπορούν να εξυπηρετήσουν μια διπλή λειτουργία λόγω του πιθανού οφέλους στην υγεία. Στα ζυμωμένα τρόφιμα, το όφελος της υγείας μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω με τη συμπλήρωση των ειδών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (62). Στελέχη του είδους *L. acidophilus, Bifidobacterium* spp. και *L. casei*, αποτελούν τις πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενες προβιοτικές καλλιέργειες με εδραιωμένα οφέλη στην ανθρώπινη υγεία σε γαλακτοκομικά προϊόντα, ενώ ο ζυμομύκητας *Saccharomyces cerevisiae* και ορισμένα είδη *E.coli* και *Bacillus* χρησιμοποιούνται επίσης ως προβιοτικά (63).

Έχει βρεθεί ότι τα βρέφη που παρουσιάζουν τροφικές αλλεργίες εμφανίζουν ανισορροπία μεταξύ ευεργετικών και δυνητικά επιβλαβών βακτηρίων, δηλ. μειωμένα βακτήρια των γενών *Lactobacillus, Bifidobacterium και Enterococcus* και αυξημένα κολίμορφα και βακτήρια του είδους *Staphylococcus aureus* και του γένους *Clostridium.* Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι μικροοργανισμοί του ανθρώπινου σώματος μπορεί να παίζουν είτε επιβλαβή είτε προστατευτικό ρόλο στις αλλεργίες. Με βάση αυτά τα δεδομένα, έχουν διεξαχθεί σε παιδιά πολλές κλινικές δοκιμές που αφορούν τη χρήση των προβιοτικών στο πλαίσιο των αλλεργικών διαταραχών. Ωστόσο, δεν μπορεί να διεξαχθεί ακόμη κανένα οριστικό αποτέλεσμα (64).

Αρκετές μελέτες έχουν τεκμηριώσει τα θετικά αποτελέσματα των προβιοτικών σε διάφορες γαστρεντερικές και εξω-εντερικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων των συμπτωμάτων

πρόληψης και ανακούφισης της διάρροιας του ταξιδιώτη και της διάρροιας που σχετίζεται με αντιβιοτικά (65), των ιδιοπαθών φλεγμονωδών νόσων του εντέρου (65), της δυσανεξίας στη λακτόζη (66) και του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου. Ορισμένα προβιοτικά έχουν επίσης εξεταστεί σε σχέση με τη μείωση του επιπολασμού του ατοπικού εκζέματος (67), τις κολπικές μολύνσεις και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (68), τη συμβολή τους στην αδρανοποίηση των παθογόνων μικροβίων στο έντερο, τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, τη βελτίωση της ανοσολογικής αντίδρασης σε υγιείς ηλικιωμένους (69), και την κίρρωση του ήπατος.

Τα προβιοτικά προορίζονται επίσης για να βοηθήσουν με φυσικό τρόπο το εντερικό μικροβίωμα του σώματος. Ορισμένα προβιοτικά παρασκευάσματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόληψη της διάρροιας που προκαλείται από αντιβιοτικά ή για τη θεραπεία της διαταραχής της μικροβιακής ανισορροπίας που σχετίζεται με τα αντιβιοτικά. Υπάρχουν κλινικές ενδείξεις για το ρόλο των προβιοτικών στη μείωση της χοληστερόλης και την επίδρασή τους στο μεταβολισμό των λιπιδίων του ανθρώπου. Τα προβιοτικά έχουν πιθανή ανασταλτική επίδραση έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών του σώματος, ειδικά στην παιδική ηλικία (70). Η αντι-γονοτοξικότητα, η αντι-μεταλλαξιογένεση και η αντι-καρκινογένεση αποτελούν σημαντικές δυνητικές λειτουργικές ιδιότητες των προβιοτικών, οι οποίες έχουν αναφερθεί πρόσφατα. Έχουν παρατηρηθεί δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν ότι η κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση συνδέεται με χαμηλότερο επιπολασμό του καρκίνου του παχέος εντέρου, πράγμα που υποδηλώνει ότι τα προβιοτικά είναι ικανά να μειώσουν τον κίνδυνο καρκίνου αναστέλλοντας τους καρκινικούς και προ-καρκινινικούς παράγοντες και τα βακτήρια τα οποία είναι ικανά να μετατρέψουν τους προ-καρκινικούς παράγοντες σε καρκινικούς (8).

2.4.3 Υγεία των ζώων

Τα προβιοτικά, αν και παραδοσιακά χρησιμοποιούνται στην ανθρώπινη τροφή, βρίσκουν εφαρμογή πλέον και στην τροφή των ζώων με την ανάπτυξη εμπλουτισμένων ζωοτροφών με μικροοργανισμούς προς όφελος των ζώων. Ο μικροβιόκοσμος στις γαστρεντερικές οδούς των ζώων παίζει βασικό ρόλο στις φυσιολογικές πεπτικές διαδικασίες και στη διατήρηση της υγείας του ζώου. Τα προβιοτικά μπορούν να έχουν ευεργετική δράση στην μικροβιακή ισορροπία του εντέρου του ζώου ξενιστή. Τα εμπορικά προβιοτικά για ζωική χρήση, φαίνεται

ότι βελτιώνουν τις επιδόσεις των ζώων, αυξάνοντας την ημερήσια αύξηση βάρους και την αποδοτικότητα των ζωοτροφών στα βοοειδή, βελτιώνοντας την παραγωγή γάλακτος στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, βελτιώνοντας την υγεία και την απόδοση των νεαρών μοσχαριών (71) και βελτιώνοντας την ανάπτυξη των κοτόπουλων (72). Τα προβιοτικά μπορούν να προσκολληθούν στο τοίχωμα του βλεννογόνου, να προσαρμοστούν στις ανοσολογικές αποκρίσεις (73) και να ανταγωνιστούν τα παθογόνα βακτήρια για προσκόλληση στη βλέννα (74, 75). Τα προβιοτικά παρέχουν στο ζώο πρόσθετη πηγή θρεπτικών ουσιών και πεπτικών ενζύμων (76, 77). Μπορούν να διεγείρουν τη σύνθεση των βιταμινών του Β-συμπλέγματος και να ενισχύσουν την αύξηση της ανάπτυξης των μη παθογόνων προαιρετικά αναερόβιων και Gram θετικών βακτηρίων με την παραγωγή ανασταλτικών παραγόντων όπως πτητικά λιπαρά οξέα και υπεροξείδιο του υδρογόνου Αυτοί οι παράγοντες αναστέλλουν την ανάπτυξη των βλαβερών βακτηρίων, βοηθώντας στην αντίσταση του ξενιστή απέναντι στα εντερικά παθογόνα (74, 78), καθώς και ενισχύουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή έναντι παθογόνων μικροοργανισμών (79).

2.4.4 Προστασία των φυτών

Όσο πιο ευεργετικά είναι τα βακτήρια και οι μύκητες, τόσο πιο «γόνιμο» είναι το έδαφος. Αυτοί οι μικροοργανισμοί διασπούν την οργανική ύλη στο έδαφος σε μικρά, χρησιμοποιήσιμα μέρη τα οποία μπορούν να απαρροφηθούν από τα φυτά μέσω των ριζών τους. Όσο πιο υγιές είναι το έδαφος, τόσο μικρότερη είναι η ανάγκη για χημικά φυτοφάρμακα και λιπάσματα. Θεωρείται ότι ορισμένοι προβιοτικοί μικροοργανισμοί μπορούν να αποδώσουν άμεσα οφέλη στο φυτό δρώντας ως παράγοντες βιοελέγχου για τα φυτά. Τα προβιοτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται για τα φυτά, έχουν απομονωθεί και έχουν αναπτυχθεί εμπορικά με σκοπό να χρησιμοποιηθούν για βιολογικό έλεγχο των ασθενειών των φυτών ή ως βιολιπάσματα (80). Αυτοί οι μικροοργανισμοί εκπληρώνουν σημαντικές λειτουργίες για τα φυτά καθώς ανταγωνίζονται διάφορα φυτοπαθογόνα, προκαλούν ανοσία ή προάγουν την ανάπτυξη (80, 81). Η αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηρίων και μυκήτων με τα φυτά-ξενιστές έχει αποδείξει την ικανότητά τους να προάγουν την ανάπτυξη των φυτών και να καταστέλλουν τα παθογόνα στα φυτά σε αρκετές μελέτες (82, 83).

2.5 Επιλογή προβιοτικών στελεχών

2.5.1 Προβιοτικές ιδιότητες

Η σημασία ορισμένων τεχνολογικών και φυσιολογικών χαρακτηριστικών των προβιοτικών στελεχών αναγνωρίστηκε εδώ και πολύ καιρό. Οι Gordon, Macrae και Wheater (84) δήλωσαν ότι για να επιτευχθεί επιτυχής έκβαση της θεραπείας με Lactobacillus ήταν απαραίτητο το παρασκεύασμα να πληροί τις ακόλουθες απαιτήσεις: η καλλιέργεια πρέπει να αποτελείται από μικροοργανισμό ο οποίος υπάρχει φυσιολογικά στο έντερο, να μην είναι παθογόνος, να είναι ικανός να αποικίσει αποτελεσματικά το έντερο και να είναι δυνατή η χορήγησή του σε υψηλές συγκεντρώσεις (107-109 cfu ανά mL του προϊόντος). Παρόλο που έχουν αναγνωριστεί και έχουν προταθεί πολυάριθμα κριτήρια επιλογής των προβιοτικών στελεχών, έχει γίνει μια συμφωνία σχετικά με τα βασικότερα κριτήρια επιλογής, τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 2 (24).

Πίνακας 2: Βασικά και επιθυμητά κριτήρια επιλογής προβιοτικών στελεχών για εμπορική εφαρμογή (8).

Κριτήρια	**Ιδιότητες**
Κριτήρια ασφάλειας	Προέλευση
	Παθογένεια και μολυσματικότητα
	Τοξικότητα
	Μεταβολική δραστηριότητα (π.χ αντίσταση στα αντιβιοτικά)
Τεχνολογικά κριτήρια	Γενετικά σταθερά στελέχη
	Επιθυμητή βιωσιμότητα κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση
	Καλές αισθητικές ιδιότητες
	Αντίσταση στους φάγους
	Ικανότητα για παραγωγή μεγάλης κλίμακας
Λειτουργικά κριτήρια	Αντοχή στο γαστρικό οξύ και στους πεπτικούς χυμούς

	Αντοχή στα χολικά οξέα
	Προσκόλληση στην επιφάνεια του βλεννογόνου
	Επιβεβαιωμένες και αξιολογημένες θετικές επιπτώσεις στην υγεία
Επιθυμητά κριτήρια και κριτήρια φυσιολογίας	Ανταγωνιστική δραστηριότητα προς τα εντερικά παθογόνα (π.χ. Helicobacter pylori, Candida albicans)
	Ανοσορύθμιση
	Μεταβολισμός της χοληστερόλης
	Μεταβολισμός της λακτόζης
	Αντιμυκητιακές και αντικαρκινικές ιδιότητες

2.5.2 *In vitro* δοκιμές για την ανίχνευση πιθανών προβιοτικών στελεχών

Οι *in vitro* δοκιμές είναι κρίσιμες για να αξιολογηθεί η ασφάλεια των προβιοτικών μικροοργανισμών καθώς και για να γίνουν γνωστά τα χαρακτηριστικά των στελεχών που μελετούνται καθώς και του προβιοτικού μηχανισμού δράσης τους. Ωστόσο, οι διαθέσιμες δοκιμασίες δεν είναι ακόμα πλήρως επαρκείς για την πρόβλεψη της λειτουργικότητας των προβιοτικών μικροοργανισμών μέσα στο ανθρώπινο σώμα. Επίσης, τα διαθέσιμα δεδομένα που προκύπτουν για συγκεκριμένα στελέχη από *in vitro* δοκιμές, δεν επαρκούν για να τα περιγράψουν ως προβιοτικά. Για τα προβιοτικά που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση απαιτείται τεκμηρίωση της αποτελεσματικότητάς τους με δοκιμές σε ανθρώπους. Ενδείκνυνται οι κατάλληλες ειδικές δοκιμές *in vitro* οι οποίες σχετίζονται με *in vivo* αποτελέσματα. Για παράδειγμα, η *in vitro* αντίσταση στα χολικά άλατα αποδείχθηκε ότι σχετίζεται με την γαστρική επιβίωση των βακτηρίων *in vivo* (85). Μια λίστα με τις κύριες *in vitro* δοκιμασίες που χρησιμοποιούνται σήμερα για τη μελέτη των προβιοτικών στελεχών παρουσιάζεται παρακάτω. Όλες αυτές οι δοκιμές απαιτούν επιβεβαίωση, ωστόσο, με *in vivo* απόδοση (24):

- Αντοχή στην γαστρική οξύτητα

- Αντοχή στα χολικά οξέα
- Προσκόλληση σε βλεννογόνο ή / και ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα και κυτταρικές σειρές
- Αντιμικροβιακή δράση ενάντια σε δυνητικά παθογόνα βακτήρια
- Ικανότητα μείωσης της πρόσφυσης των παθογόνων ουσιών στις επιφάνειες
- Δραστηριότητα υδρολάσης χολικών αλάτων
- Αντοχή στα σπερματοκτόνα (εφαρμόζεται σε προβιοτικά για κολπική χρήση)

Είναι αποδεκτό ότι ένα αποτελεσματικό προβιοτικό για την υγεία του ανθρώπου θα πρέπει να είναι ανθρώπινης προέλευσης. Τα κύρια κριτήρια για την επιλογή των προβιοτικών στελεχών είναι η αντοχή στα οξέα και στα χολικά άλατα, η επιβίωση δια μέσου του γαστρεντερικού σωλήνα, η ικανότητα προσκόλλησης στον επιθηλιακό ιστό του εντέρου, ο προσωρινός αποικισμός, ο ανταγωνισμός έναντι των παθογόνων και η δραστηριότητα υδρολάσης των χολικών αλάτων (24, 86).

Η υψηλή αντοχή των προβιοτικών στελεχών στο γαστρικό οξύ απαιτείται για μια επιτυχή διέλευση μέσω του στομάχου και συχνά αξιολογείται από την ικανότητά τους να επιβιώνουν σε χαμηλές τιμές pH για 3 ώρες, έναν μέσο χρόνο διέλευσης μέσω του στομάχου.

Επιπλέον, για μια σίγουρη επιβίωση και διέλευση μέσω του δωδεκαδάκτυλου στο εντερικό σημείο δράσης, τα βακτηριακά στελέχη θα πρέπει να παρουσιάζουν επαρκή αντοχή στις χολικές εκκρίσεις. Η ιδιότητα αυτή γενικά αξιολογείται με *ίη vitro* δοκιμή της ανάπτυξης των στελεχών σε μέσα καλλιέργειας τα οποία περιέχουν χολικά άλατα (87).

Η προσκόλληση στις επιφάνειες του βλεννογόνου μπορεί να παρατείνει την πιθανή αποτελεσματικότητα των προβιοτικών στελεχών και επομένως η ικανότητα προσκόλλησης θεωρείται σημαντικό κριτήριο επιλογής (88, 89). Οι ιδιότητες προσκόλλησης των δυνητικών προβιοτικών στελεχών *Lactobacillus* έχουν αξιολογηθεί *in vitro* με τη χρήση ανθρώπινων εντερικών επιθηλιακών κυτταρικών γραμμών προερχόμενων από καρκίνωμα του παχέος εντέρου, όπως κύτταρα Caco-2 και HT-29 (89, 90). Τα κύτταρα Caco-2 εκφράζουν μια μορφολογική και λειτουργική διαφοροποίηση ύστερα από μεταφορά τους στο καλλιεργητικό μέσο και παρουσιάζουν χαρακτηριστικά ώριμων εντεροκυττάρων (89).

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των εντερικών βακτηριακών στελεχών του γένους *Lactobacillus* έχουν προσδιοριστεί με την αναστολή της δραστικότητας των εντερικών παθογόνων βακτηρίων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο κηλίδων στο άγαρ (spot agar method), τη μέθοδο διάχυσης στο άγαρ (agar well diffusion method) και τη δοκιμασία προσκόλλησης επιθηλίου / βλεννογόνου (86). Για την αξιολόγηση της ασφάλειας νέων προβιοτικών βακτηριακών στελεχών του γένους *Lactobacillus,* συνιστάται επίσης η προσεκτική αξιολόγηση των στελεχών στην αντίσταση σε αντιβιοτικά (91).

Βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) με δραστικότητα του ενζύμου υδρολάση των χολικών αλάτων (BSH), έχει αναφερθεί ότι μειώνουν τα επίπεδα χοληστερόλης, μέσω της αλληλεπίδρασής τους στον μεταβολισμό των χολικών αλάτων του ξενιστή (92). Στελέχη του γένους *Lactobacillus* με δραστικότητα της BSH έχουν ένα πλεονέκτημα στην επιβίωση και τον αποικισμό του χαμηλότερου τμήματος του λεπτού εντέρου, όπου λαμβάνει χώρα ο εντεροηπατικός κύκλος και συνεπώς η δραστικότητα της BSH μπορεί να θεωρηθεί ως ένας σημαντικός αποικιστικός παράγοντας (93). Η Sanders (54) πρότεινε τον μηχανισμό με βάση την ικανότητα ορισμένων προβιοτικών στελεχών του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* να προκαλούν ενζυματική αποσύζευξη των χολικών οξέων, αυξάνοντας τους ρυθμούς της απέκκρισής τους. Η χοληστερόλη, η οποία αποτελεί το πρόδρομο μόριο των χολικών οξέων, μετατρέπεται σε χολικά οξέα τα οποία αντικαθιστούν εκείνα που χάνονται κατά τη διάρκεια της απέκκρισης, οδηγώντας έτσι σε μείωση της χοληστερόλης στον ορό.

3. Οι επιδράσεις των προβιοτικών βακτηρίων στο μεταβολισμό των λιπιδίων

3.1 Υπερχοληστερολαιμία και καρδιαγγειακές παθήσεις

Παρόλο που η χοληστερόλη αποτελεί ένα πολύ σημαντικό μόριο για τους ιστούς του σώματος, η αυξημένη χοληστερόλη του αίματος αποτελεί έναν μεγάλο παράγοντα κινδύνου για τις καρδιαγγειακές παθήσεις (94). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) προβλέπει ότι μέχρι το 2030, οι καρδιαγγειακές παθήσεις θα παραμείνουν η κύρια αιτία θανάτου, η οποία πλήττει περίπου 23,6 εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο (95). Έχει αναφερθεί ότι η υπερχοληστερολαιμία συμβάλλει στο 45% των καρδιακών προσβολών στη Δυτική Ευρώπη και στο 35% των καρδιακών προσβολών στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη (96). Ο κίνδυνος καρδιακής προσβολής είναι τρεις φορές υψηλότερος στα άτομα με

υπερχοληστερολαιμία, σε σύγκριση με τα άτομα που έχουν φυσιολογικό προφίλ λιπιδίων στο αίμα.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας τόνισε ότι η διατροφή υψηλή σε λιπαρά, αλάτι και προστιθέμενη ζάχαρη και χαμηλή σε σύνθετους υδατάνθρακες, φρούτα και λαχανικά, οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου (95). Πρόσφατες προσεγγίσεις για τη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης στο αίμα περιλαμβάνουν τη διατροφική διαχείριση, την τροποποίηση της συμπεριφοράς, την τακτική άσκηση και τη θεραπεία με φάρμακα (97).

Μια από τις πιο αποτελεσματικές και συνηθισμένες προσεγγίσεις για την πρόληψη της νόσου σήμερα, είναι η χρήση στατίνων, οι οποίες συγκεκριμένα αναστέλλουν την *de novo* σύνθεση της χοληστερόλης (98-101). Ωστόσο, οι δυσμενείς παρενέργειες (102) και η μικρή συνολική μείωση κατά 25% των θανατηφόρων και μη περιστατικών που σχετίζονται με την καρδιαγγειακή νόσο (100), υποδεικνύουν την ανάγκη για πρόσθετες προσεγγίσεις για την πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου. Η έλλειψη στοιχείων που συσχετίζουν την κατανάλωση της διαιτητικής χοληστερόλης με τα επίπεδα χοληστερόλης στον ορό (103), , έχει εγείρει ερωτήματα σχετικά με την εγκυρότητα μιας δίαιτας περιορισμένη σε χοληστερόλη ως προληπτικό μέτρο, γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι οι αλλαγές στον τρόπο ζωής δεν μπορούν από μόνες τους να μειώσουν την ευαισθησία στην ανάπτυξη της καρδιαγγειακής νόσου. Σήμερα υπάρχουν όλο και περισσότερα αποδεικτικά στοιχεία ότι ορισμένοι προβιοτικοί οργανισμοί έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν πολλαπλές πτυχές του μεταβολισμού της χοληστερόλης του ξενιστή (104-107), με αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό (105, 108-110) και τελικά την καλύτερα έκβαση της καρδιαγγειακής νόσου (111).

3.2 Προβιοτικά και επιδράσεις στη μείωση της χοληστερόλης

Από τότε που ο Shaper et al. (112) και αργότερα ο Mann (109), παρατήρησαν ότι οι άνδρες πολεμιστές από τη φυλή των Samburu και των Maasai στην Αφρική, έδειξαν μία μείωση στην χοληστερόλη του ορού ύστερα από κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων γάλακτος το οποίο είχε υποστεί ζύμωση με ένα άγριο στέλεχος *Lactobacillus,* υπήρξε σημαντικό ενδιαφέρον σχετικά με τις ευεργετικές ιδιότητες των γαλακτοκομικών προϊόντων τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση, και περιέχουν στελέχη του γένους *Lactobacillus* και/ή *Bifidobacterium*, στον μεταβολισμό των λιπιδίων του ανθρώπου. Αρκετές μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει μια

μέτρια μείωση της χοληστερόλης λόγω της δράσης των γαλακτοκομικών προϊόντων τα οποία έχουν υποστεί ζύμωση με συγκεκριμένα στελέχη προβιοτικών βακτηρίων (113-116).

Παρόλα αυτά, ο ρόλος των ζυμωμένων γαλακτοκομικών προϊόντων ως παράγοντες μείωσης της χοληστερόλης ακόμη παραμένει διφορούμενος, καθώς οι κλινικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν οδηγήσει σε ποικίλα δεδομένα, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα (117, 118). Η από του στόματος χορήγηση προβιοτικών έχει αποδειχθεί ότι μειώνει σημαντικά τα επίπεδα χοληστερόλης κατά 22 έως 33% (92, 105) ή εμποδίζει την αύξηση των επιπέδων χοληστερόλης σε ποντίκια τα οποία τρέφονται με δίαιτα εμπλουτισμένη με λίπος (119).

3.2.1 *In vitro* μελέτες για τη μείωση της χοληστερόλης από προβιοτικά βακτήρια

Από πολλές *in vitro* μελέτες, έχουν προταθεί αρκετοί μηχανισμοί για την πιθανή δράση των προβιοτικών βακτηρίων στη μείωση της χοληστερόλης (120-127). Αυτοί περιλαμβάνουν τις φυσιολογικές δράσεις των τελικών προϊόντων βραχείας αλύσου λιπαρών οξέων της ζύμωσης (ιδιαίτερα του προπιονικού οξέως), η αποσταθεροποίηση και συν-καθίζηση των μικκυλίων που περιέχουν χοληστερόλη (128), την αποσύζευξη των χολικών αλάτων από το ένζυμο υδρολάση των χολικών αλάτων (BSH) και την μετέπειτα συν-καθίζηση των μορίων χοληστερόλης σε όξινο pH (121), την ενσωμάτωση της χοληστερόλης στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα για μείωση των επιπέδων χοληστερόλης (120, 129), τη δέσμευση της χοληστερόλης στην επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων και τη δέσμευση των χολικών οξέων σε βακτηριακούς εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες (EPS) (130), την παραγωγή πρωτεϊνών που μειώνουν τη χοληστερόλη από προβιοτικά (131), τη μετατροπή της ζοληστερόλης σε κορποστανόλη (132) και την οξείδωση της χοληστερόλης από οξειδάσες της χοληστερόλης (133). Αυτές οι υποθέσεις χρειάζεται να επιβεβαιωθούν με περεταίρω μελέτες σε ζώα και ανθρώπους, και οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών βακτηρίων στη μείωση της χοληστερόλης παραμένουν ασαφείς.

Οι περισσότερες από τις υποθέσεις που τέθηκαν μέχρι σήμερα βασίζονται σε πειράματα *in vitro* και έχουν γίνει λίγες προσπάθειες για την αξιολόγηση των πιθανών υποχοληστερολαιμικών μηχανισμών που βασίζονται σε *in vivo* δοκιμές. Οι περισσότερες από τις *in vivo* δοκιμές που διεξήχθησαν έως τώρα έχουν επικεντρωθεί σε μεγάλο βαθμό στην επαλήθευση των υποχοληστερολαιμικών επιδράσεων των προβιοτικών, και όχι των

σχετικών μηχανισμών. Μία σύνοψη των κυριότερων ευρημάτων σχετικά με τα προβιοτικά που μπορούν να επιδράσουν στη μείωση της χοληστερόλης παρουσιάζεται παρακάτω (Πίνακας 4).

Έχει παρατηρηθεί σημαντική σχέση μεταξύ της αφομοίωσης της χοληστερόλης από στελέχη του γένους *Lactobacillus* και τον βαθμό αποσύζευξης των χολικών οξέων (120). Το ένζυμο υδρολάση (BSH), η οποία ευθύνεται για την αποσύζευξη των χολικών αλάτων κατά τη διάρκεια της εντεροηπατικής κυκλοφορίας, έχει ανιχνευθεί σε αρκετά είδη LAB τα οποία βρίσκονται στο γαστρεντερικό σωλήνα (Πίνακας 3) (92, 134-136). Έχει επίσης προταθεί ότι η δραστικότητα της BSH θα πρέπει να είναι αναγκαία προϋπόθεση στην επιλογή των προβιοτικών μικροοργανισμών με ιδιότητες που επιδρούν στη μείωση της χοληστερόλης, καθώς οι οργανισμοί οι οποίοι δεν μπορούν να προκαλέσουν αποσύζευση δε φαίνεται να είναι σε θέση να αφαιρέσουν χοληστερόλη από το καλλιεργητικό μέσο σε σημαντικό βαθμό (123).

Πίνακας 3: Λίστα πιθανών προβιοτικών βακτηρίων τα οποία δείχνουν δραστικότητα του ενζύμου υδρολάσης των χολικών αλάτων.

Προβιοτικοί οργανισμοί με δράση BSH	**Αναφορές**
Bifidobacterium adolescentis	(137)
B. animalis	(137)
B. breve	(137)
B. infantis	(138)
B. longum	(138)
Bifidobacterium sp.	(139, 140)
Lactobacillus acidophilus	(140, 141)
L. casei	(140, 141)

Προβιοτικοί οργανισμοί με δράση BSH	**Αναφορές**
L. fermentum	(142)
L. gasseri	(137, 140)
L. helveticus	(137)
L. paracasei subsp. paracasei	(143)
L. rhamnosus	(137, 143)
L. plantarum	(44, 93)

Πίνακας 4: Σύνοψη των κυριότερων ευρημάτων σχετικά με τα προβιοτικά που επιδρούν στη μείωση της χοληστερόλης.

No.	**Προβιοτικός οργανισμός**	**Πειραματικό Σύστημα**	**Σημαντικά ευρήματα**	**Αναφορά**
1	Άγνωστος (ζυμωμένο γάλα)	Φυλές των Maasai στην Αφρική	Χαμηλή χοληστερόλη	(109)
2	Άγνωστος (γιαούρτι)	Άνθρωποι	Μειωμένη χοληστερόλη	(144)
3	*Lactobacillus acidophilus*	Καλλιεργητικά μέσα	Αφαίρεση χοληστερόλης Καλύτερη επιβίωση σε καλλιεργητικό μέσο με χοληστερόλη	(120)
4	*Bifidobacterium*	Καλλιεργητικά μέσα	Αφαίρεση χοληστερόλης	(124)
5	*L. acidophilus*	Καλλιεργητικά μέσα	Αφομοίωση χοληστερόλης	(126)

No.	**Προβιοτικός οργανισμός**	**Πειραματικό Σύστημα**	**Σημαντικά ευρήματα**	**Αναφορά**
6	Γάλα ζυμωμένο με προβιοτικά	Αρουραίοι	Αποτελεσματική μείωση της χοληστερόλης	(145)
7	*L. reuteri*	Ποντίκια	Μειωμένη χοληστερόλη αίματος Μειωμένα τριγλυκερίδια	(146)
8	Γάλα με *Bifidobacterium*	Αρουραίοι, Άνθρωποι	Μειωμένη χοληστερόλη Μειωμένα τριγλυκερίδια Μειωμένη LDL Αυξημένη HDL	(147)
9	Γιαούρτι που περιέχει *B. lactis* ή *B. longum*	Αρουραίοι	Μειωμένη χοληστερόλη Μειωμένα τριγλυκερίδια Μειωμένη LDL Αυξημένη HDL	(148)
10	*L. plantarum*	Καλλιεργητικά μέσα	Αφομοίωση χοληστερόλης	(149)
11	*L. bulgaricus* και *L. acidophilus*	Άνθρωποι	Μειωμένη χοληστερόλη	(150)
12	*Lactobacillus sporogenes*	Άνθρωποι	Μειωμένη χοληστερόλη Μειωμένη LDL-χοληστερόλη	(151)
13	*L. acidophilus*	Άνθρωποι	Μειωμένη χοληστερόλη	(152)
14	*E. faecium*	Άνθρωποι	Μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης Μειωμένα τριγλυκερίδια Μειωμένη LDL Αυξημένη HDL	(153)
15	Υδρολάση των χολικών αλάτων	Άνθρωποι	Μειωμένη LDL-χοληστερόλη Μειωμένη ολική χοληστερόλη	(154)

No.	Προβιοτικός οργανισμός	Πειραματικό Σύστημα	Σημαντικά ευρήματα	Αναφορά
	(BSH) ενεργή σε μικροενθυλάκωση - *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242		Μειωμένη apoB-100 Μειωμένη μη-HDL-χοληστερόλη	

3.2.2 Υπό μελέτη υποχοληστερολαιμικοί μηχανισμοί

3.2.2.1 Δραστικότητα υδρολάσης των χολικών αλάτων

3.2.2.1.1 Μηχανισμός δράσης της υδρολάσης των χολικών αλάτων στη μείωση της χοληστερόλης

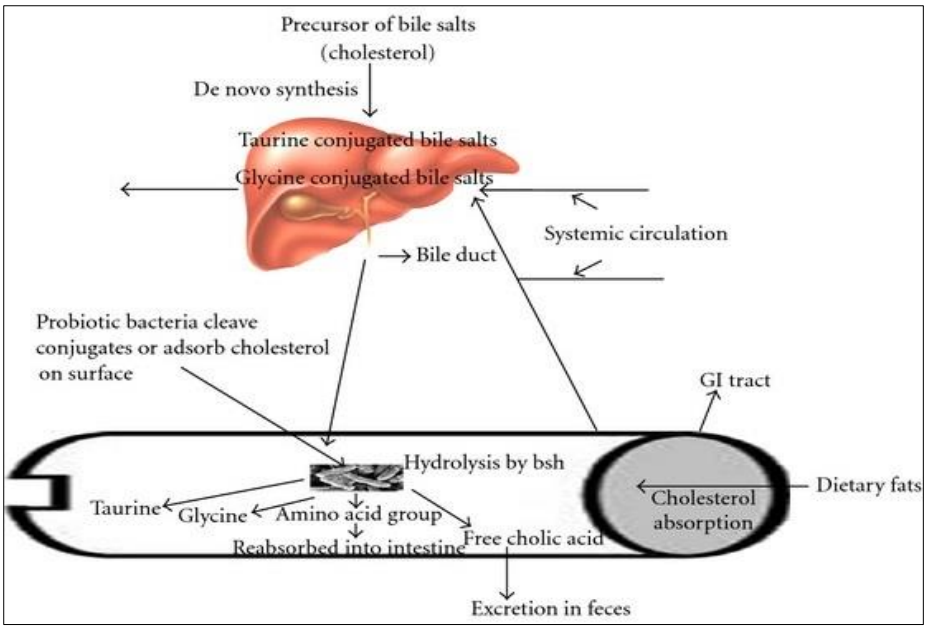
Η χολή είναι ένα κίτρινο-πράσινο υδατικό διάλυμα του οποίου τα κύρια συστατικά είναι τα χολικά οξέα, η χοληστερόλη, τα φωσφολιπίδια και η χρωστική ουσία biliverdin (155). Συντίθεται στα περικεντρικά ηπατοκύτταρα του ήπατος, αποθηκεύεται και συμπυκνώνεται στη χοληδόχο κύστη και απελευθερώνεται στο δωδεκαδάκτυλο μετά την πρόσληψη τροφής. Η χολή λειτουργεί ως ένα βιολογικό απορρυπαντικό που γαλακτωματοποιεί και διαλυτοποιεί τα λιπίδια, παίζοντας έτσι ουσιαστικό ρόλο στην πέψη του λίπους. Αυτή η ιδιότητα της χολής παρέχει επίσης ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, κυρίως μέσω της διάλυσης των βακτηριακών μεμβρανών (156).

Τα χολικά οξέα είναι κορεσμένες, υδροξυλιωμένες C-24 κυκλοπεντανοφαινανθρενο-στερόλες συντιθέμενες από χοληστερόλη στα ηπατοκύτταρα. Τα δύο πρωτογενή χολικά οξέα που συντίθενται στο ανθρώπινο ήπαρ είναι το χολικό οξύ και το χηνοδεοξυχολικό οξύ. Τα χολικά οξέα μεταβολίζονται περαιτέρω από το ήπαρ μέσω σύζευξης (N-άκυλο-αμίδωση) σε γλυκίνη ή ταυρίνη, μια τροποποίηση που μειώνει το Pka σε περίπου 5. Έτσι, στο φυσιολογικό pH, τα συζευγμένα χολικά οξέα είναι σχεδόν πλήρως ιονισμένα και μπορούν να ονομαστούν χολικά άλατα (155). Τα κύρια χολικά οξέα, το χολικό και το χηνοδεοξυχολικό οξύ, συντίθενται *de novo* στο ήπαρ από τη χοληστερόλη. Η διαλυτότητα του υδρόφοβου στεροειδούς πυρήνα αυξάνεται με σύζευξη (ως N-ακυλο-αμίδιο) με γλυκίνη (γλυκοσυζευγμένα) ή ταυρίνη (ταυροσυζευγμένα) πριν από την έκκριση. Τα προκύπτοντα μόρια είναι συνεπώς αμφιπολικά και μπορούν να διαλυτοποιήσουν λιπίδια για να σχηματίσουν μικτά μικκύλια.

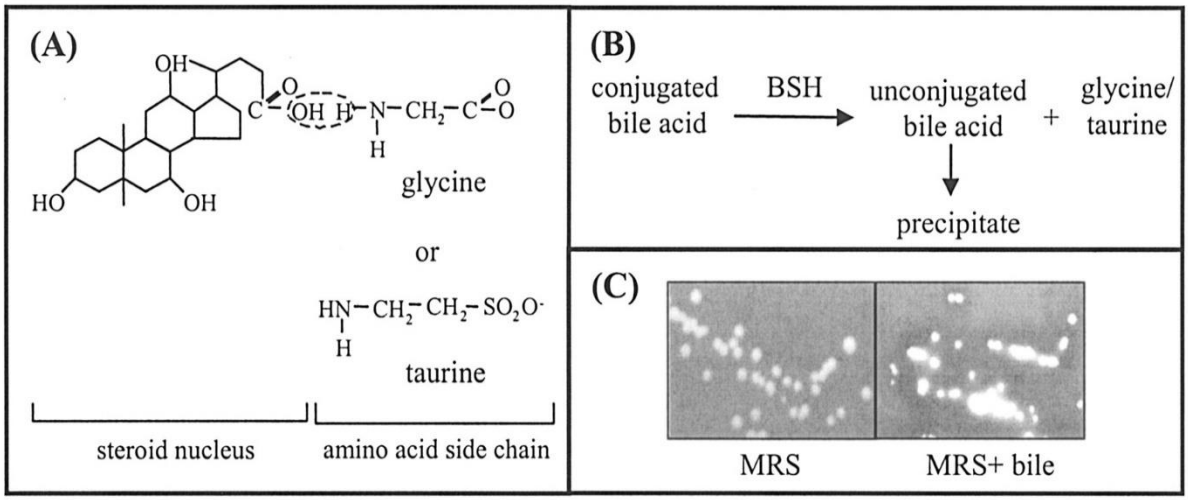
Τα χολικά οξέα διατηρούνται σε σταθερά επίπεδα αποτελεσματικά υπό φυσιολογικές συνθήκες μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται εντεροηπατική ανακύκλωση. Συζευγμένα και μη συζευγμένα χολικά οξέα απορροφώνται μέσω παθητικής διάχυση κατά μήκος ολόκληρου του εντέρου και μέσω ενεργής μεταφοράς στο τελικό τμήμα του ειλεού (155). Τα επαναπορροφούμενα χολικά οξέα εισέρχονται στην κυκλοφορία της πυλαίας φλέβας και προσλαμβάνονται από τα ηπατοκύτταρα, συζευγνύονται εκ νέου και εκκρίνονται εκ νέου σε χολή. Περίπου το 5% των χολικών οξέων (0,3 έως 0,6 g) ημερησίως διαφεύγουν της επιθηλιακής απορρόφησης και μπορούν να τροποποιηθούν εκτενώς από τα ενδογενή εντερικά βακτήρια (157).

Ένας σημαντικός μετασχηματισμός είναι η αποσύζευξη, μια αντίδραση που πρέπει να συμβεί προτού γίνουν περαιτέρω τροποποιήσεις (158). Η αποσύζευξη καταλύεται από τα ένζυμα υδρολάσες των χολικών αλάτων (BSH), τα οποία υδρολύουν τον αμιδικό δεσμό και απελευθερώνουν το τμήμα της γλυκίνης / ταυρίνης από τον στεροειδή πυρήνα (Εικόνα 2, Εικονα 3). Αυτά τα ένζυμα είναι ένα μη αλλοστερικά, μη ευαίσθητα στο οξυγόνο, βρίσκονται μέσα στα βακτηριακά κύτταρα και η δραστικότητά τους εξαρτάται από το βέλτιστο pH (5 ~ 6) και την επαρκή πυκνότητα βιομάζας (4). Τα οξέα που προκύπτουν ονομάζονται μη συζευγμένα ή αποσυζευγμένα χολικά οξέα.

Τα αποσυζευγμένα χολικά άλατα απορροφώνται λιγότερο αποτελεσματικά από τα αντίστοιχα συζευγμένα, με αποτέλεσμα την απέκκριση μεγαλύτερων ποσοτήτων ελεύθερων χολικών οξέων στα κόπρανα. Επίσης, τα ελεύθερα χολικά άλατα είναι λιγότερο αποτελεσματικά στην διαλυτοποίηση και την απορρόφηση των λιπιδίων στο έντερο. Ως εκ τούτου, η αποσύζευξη των χολικών αλάτων θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση της χοληστερόλης στον ορό είτε αυξάνοντας τις απαιτήσεις χοληστερόλης για *de novo* σύνθεση χολικών οξέων για να αντικαταστήσουν εκείνα που χάνονται στα κόπρανα είτε μειώνοντας τη διαλυτότητα της χοληστερόλης και ως εκ τούτου την απορρόφηση της χοληστερόλης μέσω του εντερικού αυλού.



Εικόνα 2: Η χοληστερόλη ως πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση χολικών οξέων και ο υποχοληστερολαιμικός ρόλος της υδρολάσης των χολικών αλάτων (BSH).



Εικόνα 3 (4): (Α) Η χημική δομή των χολικών οξέων. Τα πρωτογενή χολικά οξέα συντίθενται στο ήπαρ από χοληστερόλη και συζεύγνυνται είτε με γλυκίνη είτε με ταυρίνη πριν από την έκκριση. Η καρβοξυλομάδα του χολικού οξέος και η αμινομάδα του αμινοξέος συνδέονται με έναν αμιδικό δεσμό. (Β) Η αντίδραση καταλύεται από τα ένζυμα υδρολάσες των χολικών αλάτων (BSHs). Οι BSHs διασπούν την πεπτιδική σύνδεση των χολικών οξέων, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της ομάδας των αμινοξέων από τον στεροειδή πυρήνα. Τα χολικά οξέα τα οποία προκύπτουν είναι μη συζευγμένα και καθιζάνουν σε χαμηλό pH. (Γ) Ανίχνευση της δραστικότητας της BSH (3). *Το L. plantarum* ύστερα από ανάπτυξη για όλη τη νύχτα σε υγρό MRS, προστέθηκε σε MRS agar (Difco) (α) ή MRS agar εμπλουτισμένο με 0,2% (γλυκοδεοξυχολικό οξύ) (GDCA, Sigma) (β) και επωάστηκε αναερόβια για 48 ώρες. Το λευκό

ίζημα γύρω από τις αποικίες (λόγω της καθίζησης των μη συζευγμένων χολικών οξέων) και η εκκαθάριση του καλλιεργητικού μέσου είναι ενδεικτικά της δραστηριότητας της BSH (3).

3.2.2.1.2 Αναγνώριση των BSH ομολόγων στο γονιδίωμα των προβιοτικών βακτηρίων

Τα γονίδια τα οποία μπορούν να κωδικοποιήσουν τα ένζυμα BSH στις αλληλουχίες του γονιδιώματος των δυνητικά προβιοτικών βακτηρίων, είναι διαθέσιμα σε δημόσιες βάσεις δεδομένων [National Center for Biotechnology Information genome (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) και Joint Genome Institute microbial genomics (http://genome.jgi-psf.org/)]. Αρκετά στελέχη (π.χ., *Lactobacillus plantarum* WCFS1) διαθέτουν περισσότερα από ένα ομόλογο BSH, τα οποία δεν είναι πανομοιότυπα. Ο γενετικός τόπος των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα BSH δεν είναι ο ίδιος σε όλα τα στελέχη και σε περιπτώσεις όπου υπάρχουν περισσότερα από ένα γονίδια, αυτά δεν βρίσκονται στην ίδια περιοχή του χρωμοσώματος.

3.2.2.1.3 Τα γονίδια των BSH ενζύμων στα προβιοτικά βακτήρια

Δεδομένου ότι παρατηρήθηκε μεταβλητότητα των φαινοτύπων των BSH ενζύμων σε απομονωμένα στελέχη ορισμένων ειδών (137, 141, 159, 160), θεωρείται ότι τα γονίδια BSH μπορεί να έχουν αποκτηθεί οριζόντια (160). Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος του NCFM *L. acidophilus* αποκάλυψε ότι αυτό το στέλεχος διαθέτει δύο BSH γονίδια (BSH-A και BSH-B). Η προβλεπόμενη αλληλουχία των ενζύμων BSH που κωδικοποιούνται από αυτούς τους γενετικούς τόπους μοιράζεται ένα υψηλότερο επίπεδο ομοιότητας με τα ένζυμα BSH από άλλα είδη *Lactobacillus* παρά το ένα με το άλλο, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να έχουν αποκτηθεί από διαφορετικές πηγές (161). Εν ολίγοις, το ένζυμο BSH υπάρχει σε όλα τα στελέχη του γένους *Bifidobacterium* και *Lactobacillus* τα οποία σχετίζονται με το γαστρεντερικό περιβάλλον, αλλά τα γονίδια των ενζύμων BSH μπορούν δυνητικά να έχουν αποκτηθεί από αυτά τα στελέχη από άλλους εντερικούς μικροοργανισμούς (π.χ. *L. monocytogenes*).

3.2.2.2 Αφομοίωση χοληστερόλης

3.2.2.2.1 Πιθανοί μηχανισμοί απομάκρυνσης της χοληστερόλης από τα προβιοτικά βακτήρια

Υπάρχουν ορισμένα στοιχεία τα οποία έχουν προκύψει από *in vitro* μελέτες που υποστηρίζουν την υπόθεση ότι ορισμένα βακτήρια μπορούν να αφομοιώσουν (προσλάβουν) τη χοληστερόλη στο λεπτό έντερο. Αναφέρεται ότι τα *L. acidophilus* και *B. bifidum* έχουν την ικανότητα να αφομοιώνουν τη χοληστερόλη σε *in vitro* μελέτες, αλλά μόνο παρουσία χολικών αλάτων και υπό αναερόβιες συνθήκες (120, 162).

Επίσης, φαίνεται να απαιτείται ένα ζωντανό και συνεχώς αναπτυσσόμενο προβιοτικό στέλεχος για να επιτευχθεί αυτό το αποτέλεσμα (163, 164). Σε μια μελέτη όπου μελετήθηκαν οι μηχανισμοί απομάκρυνσης χοληστερόλης από στελέχη *Bifidobacterium*, οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ταυτόχρονα η βακτηριακή αφομοίωση και η καταβύθιση της χοληστερόλης συνέβαλαν στην απομάκρυνση της χοληστερόλης (124). Οι Noh et al. (122) παρατήρησαν ότι το *L. acidophilus* ATCC 43121 προσλαμβάνει χοληστερόλη κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η χοληστερόλη που αφομοιώθηκε από τα κύτταρα είναι πιθανό να είχε ενσωματωθεί στην κυτταρική μεμβράνη κατά τη διάρκεια της κυτταρικής ανάπτυξης αφού διαπιστώθηκε ότι το μεγαλύτερο μέρος της χοληστερόλης που αφομοιώθηκε από το μέσο παρέμεινε άθικτο μέσα στο κύτταρο και ότι δεν είχε υποβαθμιστεί μεταβολικά ενδοκυτταρικά (122).

Ωστόσο, παρά τις αναφορές αυτές, υπάρχει αβεβαιότητα σχετικά με το αν τα βακτήρια αφομοιώνουν τη χοληστερόλη ή αν η χοληστερόλη συν-καθιζάνει με τα χολικά άλατα. Έχουν διεξαχθεί μελέτες για την αντιμετώπιση αυτού του ζητήματος. Οι Klaver και Meer (121) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η απομάκρυνση της χοληστερόλης από το μέσο στο οποίο αναπτύσσονταν τα *L. acidophilus* και *Bifidobacterium* sp. δεν οφειλόταν σε αφομοίωση, αλλά συνέβαινε λόγω δραστηριότητας αποσύζευξης των χολικων αλάτων. Το ίδιο ζήτημα εξετάστηκε από τους Tahri et al. (125), με συγκρουόμενα αποτελέσματα και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ένα μέρος της απομακρυνόμενης χοληστερόλης βρίσκεται στα βακτηριακά κύτταρα και ότι η αφομοίωση της χοληστερόλης και η δραστηριότητα αποσύζευξης των χολικών οξέων μπορεί να συμβαίνουν ταυτόχρονα.

Ο Usman (127) ανέφερε ότι στελέχη του *Lactobacillus gasseri* θα μπορούσαν να απομακρύνουν τη χοληστερόλη από τα μέσα καλλιέργειας μέσω της δέσμευσής της σε κυτταρικές επιφάνειες. Εφόσον υπήρχε μια σημαντική διακύμανση στην ικανότητα σύνδεσης της χοληστερόλης σε 28 διαφορετικά στελέχη του *L. gasseri,* προτάθηκε ότι η

ιδιότητα δέσμευσης της χοληστερόλης φαίνεται να σχετίζεται με συγκεκριμένα στελέχη καθώς και με συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης. Αυτή η διαφορά προέρχεται από τα διαφορετικά χημικά και δομικά χαρακτηριστικά των πεπτιδογλυκανών που υπάρχουν στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα (127).

Οι Kimoto et al. (129) αργότερα υποστήριξαν μια τέτοια υπόθεση αξιολογώντας την απομάκρυνση της χοληστερόλης από το *L. lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* N7 υπό διάφορες συνθήκες ανάπτυξης. Τα κύτταρα τα οποία αναπτύσσονταν συγκρίθηκαν με εκείνα τα οποία δεν αναπτύσσονταν (ζωντανά αλλά με αναστολή της ανάπτυξής τους σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα) και με νεκρά κύτταρα (είχαν θανατωθεί με θερμότητα). Παρατηρήθηκε ότι, αν και τα κύτταρα που αναπτύσσονταν απομάκρυναν περισσότερη χοληστερόλη από τα νεκρά κύτταρα, τα νεκρά κύτταρα μπορούσαν ακόμη να απομακρύνουν κάποιο μέρος της χοληστερόλης από τα μέσα καλλιέργειας, υποδεικνύοντας ότι ένα μέρος της χοληστερόλης ήταν συνδεδεμένο με την κυτταρική επιφάνεια. Οι συγγραφείς επίσης προσδιόρισαν ότι τα λιπίδια των προβιοτικών βακτηρίων εντοπίζονται κυρίως στη μεμβράνη, υποδηλώνοντας ότι η χοληστερόλη που απομακρύνθηκε από το καλλιεργητικό μέσο από το στέλεχος N7, ενσωματώθηκε στην κυτταρική μεμβράνη και είναι πιθανό να έχει μεταβάλλει την κατανομή των λιπαρών οξέων των κυττάρων (129). Η αφομοιωμένη χοληστερόλη από τα κύτταρα παρέμεινε σε σταγονίδια ή εγκλείσματα, αντί να υποβαθμιστεί, για να χρησιμοποιηθεί αργότερα ως μεταβολικός πρόδρομος (165). Η ενσωμάτωση της χοληστερόλης στην κυτταρική μεμβράνη αύξησε τη συγκέντρωση των κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων, οδηγώντας σε αυξημένη αντοχή στη μεμβράνη και στη συνέχεια υψηλότερη κυτταρική αντίσταση προς την λύση (164).

Οι Lye et al. (164) επίσης αξιολόγησαν περαιτέρω αυτόν τον μηχανισμό προσδιορίζοντας τις πιθανές θέσεις της ενσωματωμένης χοληστερόλης εντός της μεμβρανικής διπλοστοιβάδας των φωσφολιπιδίων των προβιοτικών κυττάρων. Ανιχνευτές φθορισμού ενσωματώθηκαν στην διπλοστοιβάδα της μεμβράνης των προβιοτικών κυττάρων τα οποία αναπτύχθηκαν απουσία και παρουσία χοληστερόλης. Αυξημένη χοληστερόλη βρέθηκε στις περιοχές των ουρών των φωσφολιπιδίων, των άνω φωσφολιπιδίων και των πολικών κεφαλών της διπλοστοιβάδας των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης σε κύτταρα τα οποία είχαν αναπτυχθεί παρουσία χοληστερόλης σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, το οποίο υποδεικνύει την ενσωμάτωση της χοληστερόλης σε αυτές τις περιοχές.

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη στελεχών του γένους *Lactobacillus,* που έχουν ήδη ελεγχθεί για κάποια προβιοτικά χαρακτηριστικά ως προς την επίδραση που είναι ικανά να έχουν αυτά τα στελέχη στα επίπεδα χοληστερόλης *in vitro*. Στο πρώτο πείραμα ελέγχεται η προβιοτική ιδιότητα της δραστικότητας του ενζύμου υδρολάση των χολικών οξέων (BSH). Στο δεύτερο πείραμα, τα στελέχη του γένους *Lactobacillus* τα οποία εμφάνισαν δραστικότητα του ενζύμου της υδρολάσης, ελέγχονται με τη δοκιμασία της αφομοίωσης χοληστερόλης, κατά την οποία προσδιορίζεται ποσοτικά η ικανότητα του κάθε στελέχους να αφομοιώνει τη χοληστερόλη από το θρεπτικό μέσο στο οποίο καλλιεργείται.

ΚΕΦ 1: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Προέλευση υποψήφιων προβιοτικών στελεχών του γένους *Lactobacillus*

Τα υπό μελέτη στελέχη ανήκουν στην Συλλογή του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και η απομόνωση τους έγινε από υγιή νεογνά έως 3 μηνών, για τα οποία έχουμε στοιχεία για το φύλο, τον τρόπο σίτισης και την ηλικία. Από τα δείγματα κοπράνων των νεογνών αυτών έγινε απομόνωση μικροβιακών στελεχών και επιλέχθηκαν τα στελέχη που ακολουθούν (Πίνακας 5) για τον έλεγχο πιθανών προβιοτικών ιδιοτήτων, τα οποία ανήκουν στο γένος *Lactobacillu*s.

Πίνακας 5: Επιλεγμένα βακτηριακά στελέχη για έλεγχο προβιοτικών ιδιοτήτων

ΣΤΕΛΕΧΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	**ΕΙΔΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ (ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ)**
C5, C9, C15, C28, C32, C45, C59, C72, C74, AnLB21	*Lactobacillus gasseri* (sequencing)
C1, C51, AnlB30	*Lactobacillus crispatus* (sequencing)
AnLB18, AnLB40	*Lactobacillus delbrueckii delbrueckii* (API)
AnLB16, AnLB26, AnLB49	*Lactobacillus acidophilus 3 ή Lactobacillus acidophilus 1* (API)
C39	*Lactobacillus* spp. (δεν έχει γίνει ταυτοποίηση)
DSM 20079	*Lactobacillus acidophilus* (αγορασμένο από συλλογή)
AnLB9, AnLB11, AnLB13, AnlB15, AnlB25	*Lactobacillus rhamnosus* (API)
C44, C58	*Lactobacillus rhamnosus* (sequencing)
AnLB48	*Lactobacillus plantarum* (API)
AnLB29	*Lactobacillus fermentum* (API)
C60	*Lactobacillus salivarius* (sequencing)
C68, C70	*Lactobacillus paracasei paracasei* (sequencing)
AnLB47	*Lactobacillus paracasei paracasei* (API)

Φύλαξη, προετοιμασία και έλεγχος καθαρότητας των βακτηριακών στελεχών

Τα παραπάνω στελέχη ανακαλλιεργήθηκαν από καλλιέργειες που φυλάσσονταν σε διάλυμα γλυκερόλης 30% στους – 80^{o} C. Πραγματοποιήθηκαν 3 ανακαλλιέργειες σε τρυβλία με MRS agar, προκειμένου στα πειράματα να χρησιμοποιηθούν «ενεργοποιημένες» καλλιέργειες» (86). Στη συνέχεια έγινε μία υγρή καλλιέργεια για κάθε ένα από τα στελέχη σε 5ml MRS broth. Οι στερεές καλλιέργειες επωάστηκαν σε αναερόβιο θάλαμο στους 37^{o} C για 48 ώρες, ενώ οι υγρές για 24 ώρες. Ο έλεγχος της καθαρότητας των βακτηριακών στελεχών επιβεβαιώθηκε με την τεχνική της χρώσης Gram σε δείγματα που παραλάβαμε από τις υγρές καλλιέργειες για όλα τα στελέχη.

1.1 Έλεγχος δραστικότητας της υδρολάσης των χολικών αλάτων

Για τον έλεγχο της δραστικότητας του ενζύμου υδρολάση των χολικών αλάτων, την ημέρα του πειράματος, οι «ενεργοποιημένες» υγρές καλλιέργειες MRS Broth αναδεύτηκαν καλά και στη συνέχεια μεταφέρθηκε όλο το περιεχόμενό τους σε πλαστικά falcon. Τα falcon φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 rpm για 5 min στους 25 °C. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ποσότητα MRS Broth (1 ml ή 1,5 ml ή 2 ml) αποστειρωμένο, ανάλογα με την ποσότητα ιζήματος του κάθε στελέχους με στόχο να πετύχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση για το εμβόλιο, η οποία είναι μεταξύ $1*10^{8}$ – $9*10^{8}$ cfu/ml. Η καταμέτρηση του εμβολίου έγινε μετά από διαδοχικές αραιώσεις σε buffered peptone water με την μέθοδο pour plate σε τρυβλία MRS agar.

Τα τρυβλία τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της δραστικότητας του ενζύμου υδρολάσης των χολικών οξέων περιείχαν τροποποιημένο θρεπτικό υλικό MRS agar με 0.5 % (w/v) sodium taurodeoxycholate (Sigma Aldrich) και 0.37 g/l CaCl2. Αυτά τα τρυβλία παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο των de Toit et al., 1998 (135). Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν 6 χάρτινα δισκία διαμέτρου 6mm τα οποία είχαν εμποτιστεί για 1 min με τα εμβόλια των υπό μελέτη στελεχών. Σε όλα τα τρυβλία στο κέντρο τοποθετούνταν το στέλεχος αναφοράς DSM 20079, το οποίο εμφανίζει δραστικότητα του ενζύμου της υδρολάσης (θετικός μάρτυρας) (166) και περιφερειακά πέντε από τα υπό μελέτη στελέχη. Στη συνέχεια τα τρυβλία επωάστηκαν σε αναερόβιο θάλαμο στους 37 °C για 72 ώρες.

Ο έλεγχος της δραστικότητας της υδρολάσης έγινε με παρατήρηση της ύπαρξης ζώνης λευκού ιζήματος γύρω ή κάτω από τα χάρτινα εμποτισμένα δισκία μετά την συμπλήρωση των 72 ωρών. Τα στελέχη που παρουσιάζουν την χαρακτηριστική εικόνα της δημιουργίας ιζήματος στο υπόστρωμα γύρω από το εμβόλιο, θεωρούνται ως θετικά στη δραστικότητα του ενζύμου BSH. Αυτή η μέτρηση της δραστικότητας BSH είναι κυρίως ποιοτική ενώ ενδεικτικά προδιορίστηκε και η ζώνη του λευκού ιζήματος γύρω από τα χάρτινα δισκία ως μια ημιποσοτική προσέγγιση. Ο τύπος που χρησιμοποιείται είναι ο εξής: Δραστικότητα BSH = (Διάμετρος ιζήματος – Διάμετρος δισκίου) / 2, δηλαδή η δραστικότητα του ενζύμου υπολογίζεται αφαιρώντας από τη διάμετρο του ιζήματος, τη διάμετρο του δισκίου (6mm), και διαιρώντας αυτή τη διαφορά κατά 2. Για κάθε στέλεχος πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις.

1.2 Δοκιμασία αφομοίωσης χοληστερόλης

Η ικανότητα των βακτηριακών καλλιεργειών να αφομοιώνουν τη χοληστερόλη προσδιορίστηκε με μια τροποποιημένη μέθοδο που περιγράφεται από τους Michael et al., 2016 (167). Το μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε για τη δοκιμασία πρόσληψης χοληστερόλης ήταν αποστειρωμένο τροποποιημένο MRS Broth (mMRS) συμπληρωμένο με oxgall και υδατοδιαλυτή μορφή χοληστερόλης (polyoxyethanyl-cholesteryl sebacate; Sigma).

Για τη σύνθεση του mMRS διαλύθηκε η ποσότητα σκόνης MRS Broth που χρειάζονται τα 400 mL σε 360 ml dH2O. Έγινε επίσης προσθήκη 1,2 g oxbile (0,3% w/v στον τελικό όγκο), για να μιμηθούμε κατά προσέγγιση τα επίπεδα των χολικών οξέων στο εντερικό σύστημα. Αυτό το θρεπτικό υλικό μοιράστηκε από 9 ml σε κάθε σωληνάκι και ακολούθησε αποστείρωση. Επίσης διαλύθηκαν 500 mg polyoxyethenyl-cholesteryl sebacate σε 50 ml dH20 (συγκέντρωση polyoxyethenyl-cholesteryl sebacate: 10 mg/ml) και ακολούθησε αποστείρωση με διήθηση με τη χρήση βακτηριολογικών φίλτρων (Puradisc^{TM} 25 mm).

Στη συνέχεια προστέθηκε 1 ml από το διάλυμα αυτό στα παραπάνω σωληνάκια με το mMRS (τελική συγκέντρωση polyoxyethenyl-cholesteryl sebacate: 1 mg/ml στην καλλιέργεια). Ακολουθεί εμβολιασμός κάθε σωλήνα με 100 μl από την 24ωρη «ενεργοποιημένη» υγρή καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών και αναερόβια επώαση των σωλήνων για 24 ώρες, στους 37 °C. Για κάθε στέλεχος γίνονται 3 επαναλήψεις. Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε μόνο για τα στελέχη τα οποία είχε βρεθεί ότι έχουν θετική δράση του ενζύμου υδρολάσης,

δηλαδή για τα στελέχη: C1, C5, C15, C32 , C39, C45, AnlB16 και Anlb40. Χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DSM 20079 ως θετικός μάρτυρας (166), το στέλεχος C72 ως αρνητικός μάρτυρας (επιλέχθηκε επειδή δεν έδειξε δραστικότητα υδρολάσης στο 1^{ο} πείραμα) καθώς και ανεμβολίαστοι σωλήνες (εμβολιασμένοι με 100 μl αποστειρωμένο MRS Broth). Μετά την επώαση μεταφέρθηκε όλο το περιεχόμενο του σωλήνα, ύστερα από καλή ανάδευση, σε προζυγισμένο αποστειρωμένο falcon των 15 ml και φυγοκεντρήθηκε για 10 min στις 4000 rpm στους 25^{ο} C. Ύστερα μεταφέρθηκε μόνο το υπερκείμενο σε νέα falcon των 15 ml για περαιτέρω επεξεργασία με σκοπό την καταμέτρηση χοληστερόλης με φωτομέτρηση, ενώ τα falcon που περιείχαν το ίζημα (δηλαδή την βιομάζα των βακτηρίων) μεταφέρθηκαν στον αποξηραντή για ξήρανση στους 100^{ο} C για τουλάχιστον 2 ώρες. Μετά την ξήρανση ακολούθησε ζύγιση των falcon που περιείχαν την ξηρή βιομάζα των βακτηρίων, η οποία και υπολογίστηκε με ακρίβεια.

Τα falcon τα οποία περιείχαν το υπερκείμενο υγρό επεξεργάστηκαν στη συνέχεια περαιτέρω για ποσοτικό προσδιορισμό της χοληστερόλης στο καθένα από αυτά. Η φύλαξή τους μέχρι την επεξεργασία για τη φωτομέτρηση έγινε στους -20^{ο} C. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της χοληστερόλης στο υπερκείμενο διάλυμα δημιουργήθηκε αρχικά η καμπύλη αναφοράς της χοληστερόλης και ο προσδιορισμός της χοληστερόλης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με μία χρωματομετρική μέθοδο που περιγράφεται από τους Mirlohi et al., 2012 (168).

<u>Προετοιμασία της πρότυπης καμπύλης απορρόφησης:</u>

Για την πρότυπη καμπύλη απορρόφησης της χοληστερόλης διαλύθηκαν 0,01 g χοληστερόλης (SIGMA26740) σε 10 ml αιθανόλης (αναμονή για διάλυση περίπου 2 ώρες), οπότε δημιουργήθηκε η συγκέντρωση **1000 μg/ml (1)**. Από αυτό μεταφέρθηκαν 5 ml σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 5 ml αιθανόλη. Το δεύτερο σωληνάκι θα έχει συγκέντρωση **500μg/ml (2)**. Από αυτό μεταφέρθηκαν 5 ml σε γυάλινο κοντό δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 5 ml αιθανόλη, οπότε το σωληνάκι αυτό θα έχει συγκέντρωση **250 μg/ml (3)**. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε άλλες 4 φορές και προέκυψαν τα σωληνάκια με συγκέντρωση **125 μg/ml (4)**, **62,5 μg/ml (5), 31,25 μg/ml (6) και 15,625 μg/ml (7)**. Όλα τα σωληνάκια καλύφθηκαν με parafilm για να μην εξατμιστεί η αιθανόλη και αλλάξουν οι συγκεντρώσεις.

Μέθοδος προσδιορισμού της χοληστερόλης:

Σε ψηλούς γυάλινους σωλήνες προστέθηκαν: α) για τα σωληνάκια όλων των συγκεντρώσεων [σωληνάκια **(1)** έως **(7)**] χοληστερόλης της πρότυπης καμπύλης: 1 ml από τα παραπάνω σωληνάκια, 1 ml MRS Broth, 1 ml pure ethanol και 2 ml KOH 33%, β) για κάθε δείγμα: 1 ml δείγματος, 2 ml pure ethanol και 2 ml KOH 33%, γ) για το τυφλό: 1 ml MRS Broth, 2 ml pure ethanol και 2 ml KOH 33%. Ακολούθησε ανάδευση του κάθε ψηλού σωλήνα σε vortex για 10 sec και μετά επώαση στους 37 ^{0} C για 15 min. Στη συνέχεια για σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 2 ml dH2O και 3 ml n-hexane και ακολούθησε πάρα πολύ καλή ανάδευση σε vortex (~20 sec). Οι σωλήνες επωάστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Παρατηρήθηκε ο διαχωρισμός των στοιβάδων και παραλήφθηκε με προσοχή 1 ml από την ανώτερη διαυγή στοιβάδα, το οποίο τοποθετήθηκε σε νέο γυάλινο κοντό δοκιμαστικό σωλήνα. Στη συνέχεια ακολούθησε εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου. Μόλις εξατμίζονταν οι διαλύτες, το στόμιο κάθε σωλήνα κλεινόταν με parafilm και φυλασσόταν στο ψυγείο έως ότου αυτή η διαδικασία πραγματοποιηθεί για όλα τα σωληνάκια. Μετά την εξάτμιση, σε κάθε κοντό δοκιμαστικό σωλήνα έγινε προσθήκη 2 ml o-phthaldaldehyde solution (0,05 g o-phthaldaldehyde διαλυμένα σε 100 ml acetic acid) και 0.5 ml πυκνό H_2SO_4. Ακολούθησε καλή ανάδευση σε vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Μετά το πέρας των 10 λεπτών μετρήθηκε η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 550 nm σε UV φασματοφωτόμετρο ύστερα από καλή ανάδευση.

Τα στελέχη συγκρίθηκαν για τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απέμεινε στο μέσο καλλιέργειας. Επίσης, συγκρίθηκαν ως προς το ποσοστό χοληστερόλης που απομάκρυνε το κάθε στέλεχος από το θρεπτικό μέσο με χρήση της εξίσωσης: $\mathbf{\% \pi = C_{ΑΠΟΜΑΚΡ} * 100 / C_{ΑΝΕΜΒ} = (C_{ΑΝΕΜΒ} - C_{ΔΕΙΓΜ}) * 100 / C_{ΑΝΕΜΒ}}$ (Εξίσωση 1), και τέλος, ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης (mg/ml) που απομάκρυναν ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηρίων, η οποία υπολογίστηκε σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση: $\mathbf{A = C_{ΑΠΟΜΑΚΡ} / W = (C_{ΑΝΕΜΒ} - C_{ΔΕΙΓΜ}) / W}$ (Εξίσωση 2), όπου το $C_{ΑΝΕΜΒ}$ είναι η συγκέντρωση της χοληστερόλης στο ανεμβολίαστο σε mg/ml, το $C_{ΔΕΙΓΜ}$ είναι η συγκέντρωση της χοληστερόλης που απέμεινε στο θρεπτικό μέσο στο κάθε δείγμα σε mg/ml και το W είναι η ξηρή βιομάζα των βακτηρίων σε g.

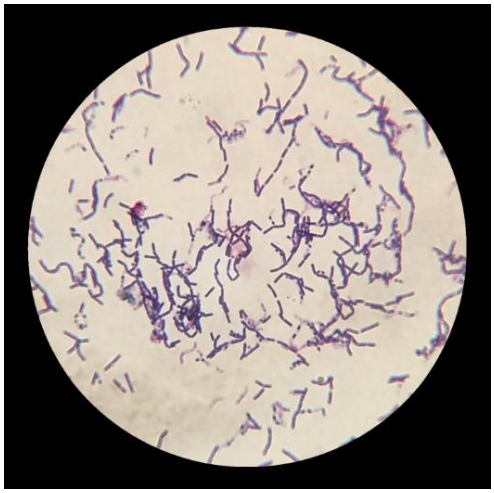
ΚΕΦ 2: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος της αφομοίωσης χοληστερόλης έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα SigmaStat. Πραγματοποιήθηκαν t-test (σε επίπεδο σημαντικότητας $p<0.05$) για τη σύγκριση της συγκέντρωσης χοληστερόλης που απέμεινε στο θρεπτικό υλικό κάθε δείγματος σε σχέση με το ανεμβολίαστο θρεπτικό υλικό καθώς και για τη σύγκριση της συγκέντρωσης χοληστερόλης που απομάκρυνε κάθε στέλεχος ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηρίων σε σχέση με το θετικό control DSMZ. Επίσης υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson (σε επίπεδο σημαντικότητας $p<0,05$) για τον έλεγχο ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ της ξηρής βιομάζας των βακτηρίων και της συγκέντρωσης χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από κάθε στέλεχος.

ΚΕΦ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Έλεγχος καθαρότητας των βακτηριακών στελεχών

Όλα τα στελέχη στη χρώση Gram εμφάνισαν χαρακτηριστική εικόνα Gram θετικών λακτοβακίλλων (χρωματισμένοι μπλε ράβδοι σε μικρές/μεγάλες ομάδες ή σε σειρά) (Εικόνα 4), εκτός από το στέλεχος AnlB49, το οποίο φάνηκε να έχει μικτή εικόνα (παρουσία χρωματισμένων κόκκινων κόκκων). Αυτό αποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο στέλεχος είχε επιμόλυνση και έτσι τα αποτελέσματά του δε θα ληφθούν υπόψη.



Εικόνα 4: Χαρακτηριστική εικόνα Gram θετικών λακτοβακίλλων στο μικροσκόπιο (μεγέθυνση x100).

2.1 Έλεγχος δραστικότητας της υδρολάσης των χολικών οξέων

Τα αποτελέσματα της δραστικότητας της υδρολάσης για τα υπό εξέταση στελέχη του γένους *Lactobacillus* παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακας 6, Πίνακας 7) και τις εικόνες που ακολουθούν (Εικόνα 5α, Εικόνα 5β, Εικόνα 6).

Πίνακας 6: Παρουσίαση της εμφάνισης δραστικότητας της υδρολάσης των χολικών αλάτων (BSH).

ΣΤΕΛΕΧΗ	**ΔΡΑΣΗ ΕΝΖΥΜΟΥ BSH**
C1, C5, C15, C32, C39 (169), C45, AnlB16 (170), AnlB40, DSMZ	**(+)**
C9, C28, C44, C51, C58, C59, C60, C68, C70, C72, C74, AnlB9, AnlB11, AnlB13, AnlB15, AnlB18, AnlB21, AnlB25, AnlB26, AnlB29, AnlB30, AnlB47, AnlB48	**(-)**

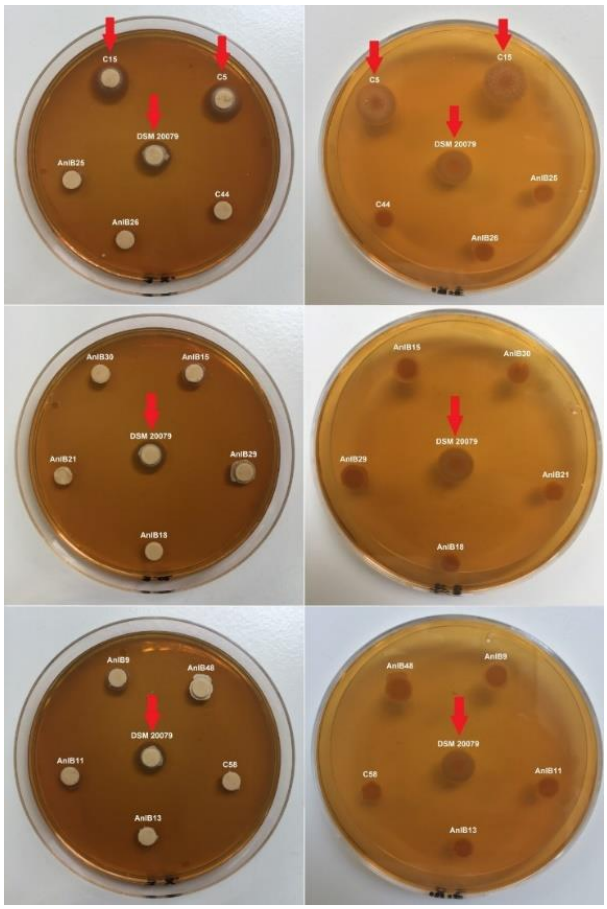
Πίνακας 7: Η ημιποσοτική μέτρηση της δραστικότητας του ενζύμου BSH.

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	**ΔΙΑΜΕΤΡΟΣ ΙΖΗΜΑΤΟΣ (mm)**	**ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ BSH (mm)**
C1	14,34	4,17
C5	12,5	3,25
C15	12,5	3,25
C32	9,34	1,67
C39 (169)	8,5	1,25
C45	10,34	2,17
AnlB16 (170)	14	4
AnlB40	8,32	1,16
DSMZ	11	2,5

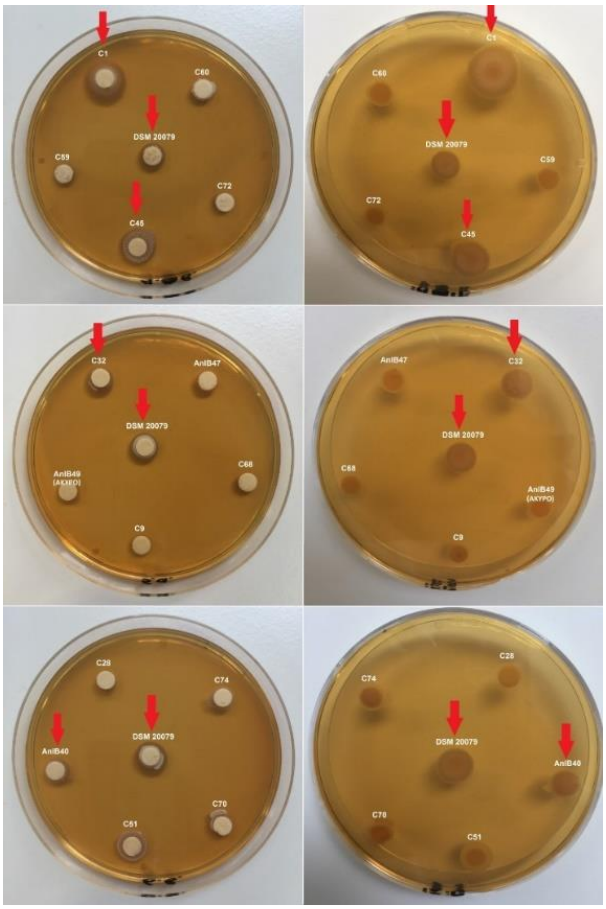
Ο μέσος όρος των τριών επαναλήψεων της διαμέτρου του ιζήματος (mm), για κάθε στέλεχος που εμφάνισε θετική δραστικότητα υδρολάσης, εμφανίζεται στον Πίνακα 7. Επίσης στον ίδιο πίνακα παρουσιάζεται μια ημιποσοτική μέτρηση της δραστικότητας του ενζύμου BSH (mm) με τη χρήση του τύπου: **[Διάμετρος ιζήματος (mm) – Διάμετρος δισκίου (mm)] / 2 = [Διάμετρος ζώνης (mm) – 6 (mm)] / 2.** Το στέλεχος με τη μεγαλύτερη διάμετρο είναι εκείνο που εμφανίζει και τη μεγαλύτερη δραστικότητα του ενζύμου BSH.

Παρατηρούμε ότι τα στελέχη με τη μεγαλύτερη δραστικότητα υδρολάσης φαίνεται να είναι τα C1 (4,17 mm) και AnlB16 (4 mm), ενώ στη συνέχεια ακολουθούν τα στελέχη C5 (3,25 mm) και C15 (3,25 mm). Αυτά τα 4 στελέχη εμφάνισαν δραστικότητας υδρολάσης μεγαλύτερη από το στέλεχος αναφοράς DSM 20079 (2,5 mm). Μετά το στέλεχος αναφοράς, το στέλεχος με την αμέσως μεγαλύτερη δραστικότητα του ενζύμου BSH είναι το C45 (2,17 mm). Στη συνέχεια ακολουθούν με σειρά φθίνουσας δραστικότητας τα στελέχη C32 (1,67 mm), C39 (1,25 mm) και τέλος το AnlB40 (1,16), το οποίο εμφάνισε ίζημα σχεδόν μόνο από την πίσω πλευρά του χάρτινου δισκίου.

Στη συνέχεια ακολουθούν φωτογραφίες των τρυβλίων του συγκεκριμένου πειράματος μετά τις 72 ώρες επώασης στον αναερόβιο θάλαμο.

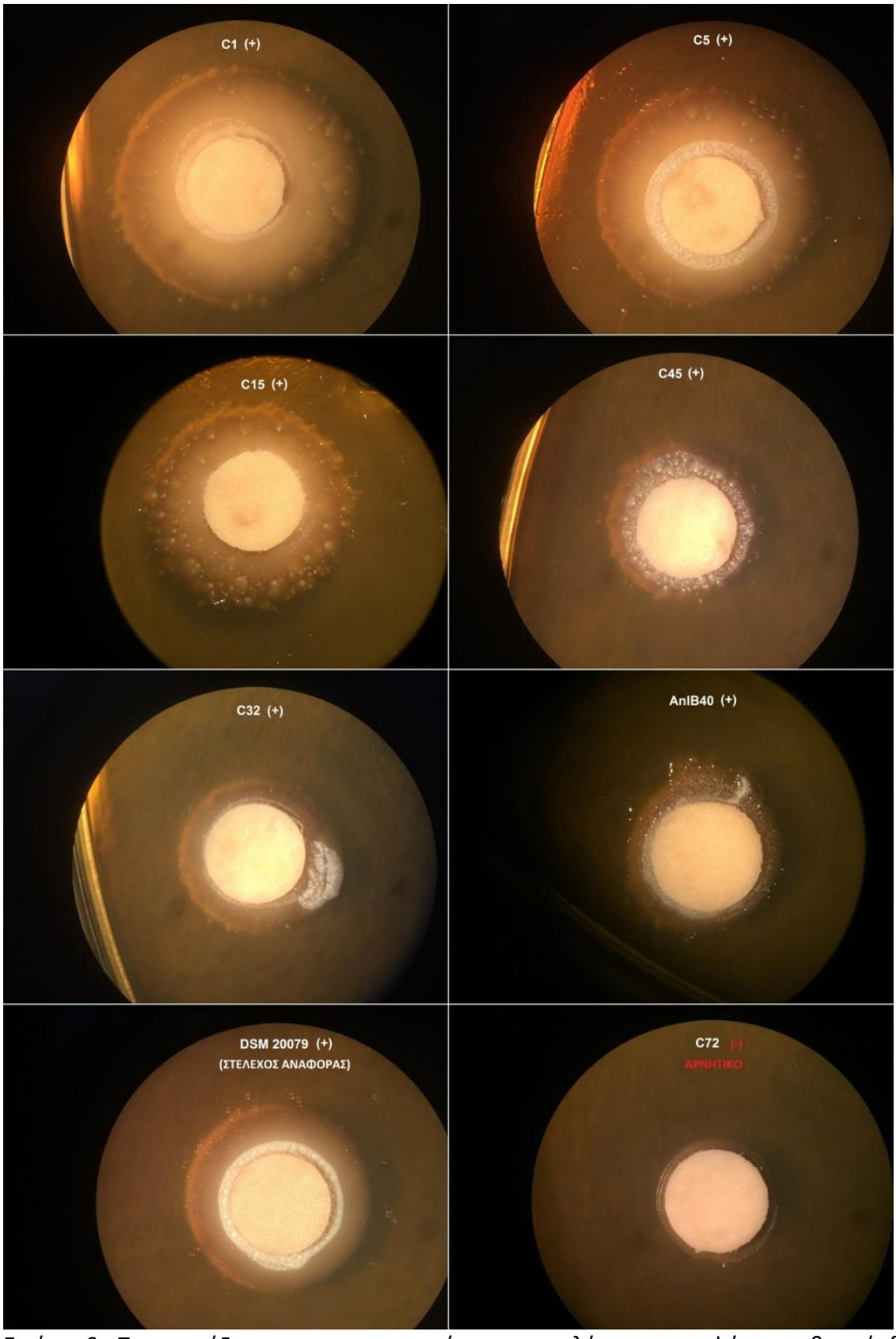


Εικόνα 5α



Εικόνα 5β

Εικόνα 5α και Εικόνα 5β: Παρουσιάζονται τα τρυβλία της μίας από τις τρεις επαναλήψεις όλων των υπό μελέτη στελεχών. Τα στελέχη που έχουν εμφανίσει θετική δραστηριότητα υδρολάσης έχουν σημανθεί με κόκκινο βέλος. Σε όλα τα τρυβλία στο κέντρο είναι τοποθετημένο το στέλεχος αναφοράς DSM 20079 (θετικός μάρτυρας), το οποίο δημιουργεί σε όλες τις επαναλήψεις ίζημα, επιβεβαιώνοντας την βιβλιογραφία. Κάθε τρυβλίο έχει φωτογραφηθεί από την από πάνω πλευρά (1^{η} στήλη) καθώς και την από κάτω πλευρά (2^{η} στήλη).



Εικόνα 6: Παρουσιάζονται στο στερεοσκόπιο τα στελέχη που εμφάνισαν θετική δράση υδρολάσης. Για σύγκριση παρουσιάζεται και το στέλεχος C72, που δεν εμφάνισε καθόλου τη χαρακτηριστική εικόνα του ιζήματος και θεωρείται αρνητικό στη δράση της υδρολάσης.

2.2 Δοκιμασία αφομοίωσης χοληστερόλης

Στον επόμενο πίνακα (Πίνακας 8) παρουσιάζονται οι μετρήσεις της ξηρής βιομάζας (g) των βακτηρίων. Ο υπολογισμός αυτός έγινε, για κάθε δείγμα, με την αφαίρεση της μάζας του άδειου προζυγισμένου falcon από τη μάζα του ίδιου falcon μετά την ξήρανση.

Πίνακας 8: Μετρήσεις της ξηρής βιομάζας (g) των βακτηρίων.

Ξηρή Βιομάζα Βακτηρίων (g)										
Στελέχη	**C1**	**C5**	**C15**	**C32**	**C39**	**C45**	**AnlB16**	**AnlB40**	**DSMZ**	**C72**
No. 1	0,0124	0,0132	0,0082	0,0162	0,0091	0,01	0,0103	0,0067	0,0076	0,005
No. 2	0,0079	0,0102	0,0067	0,0175	0,0088	0,0114	0,0096	0,0084	0,0118	0,0141
No. 3	0,0106	0,0114	0,0079	0,0141	0,009	0,011	0,0095	0,0077	0,0144	0,0129
Mean	0,0103	0,0116	0,0076	0,0159	0,0089	0,0108	0,0098	0,0076	0,0112	0,0135

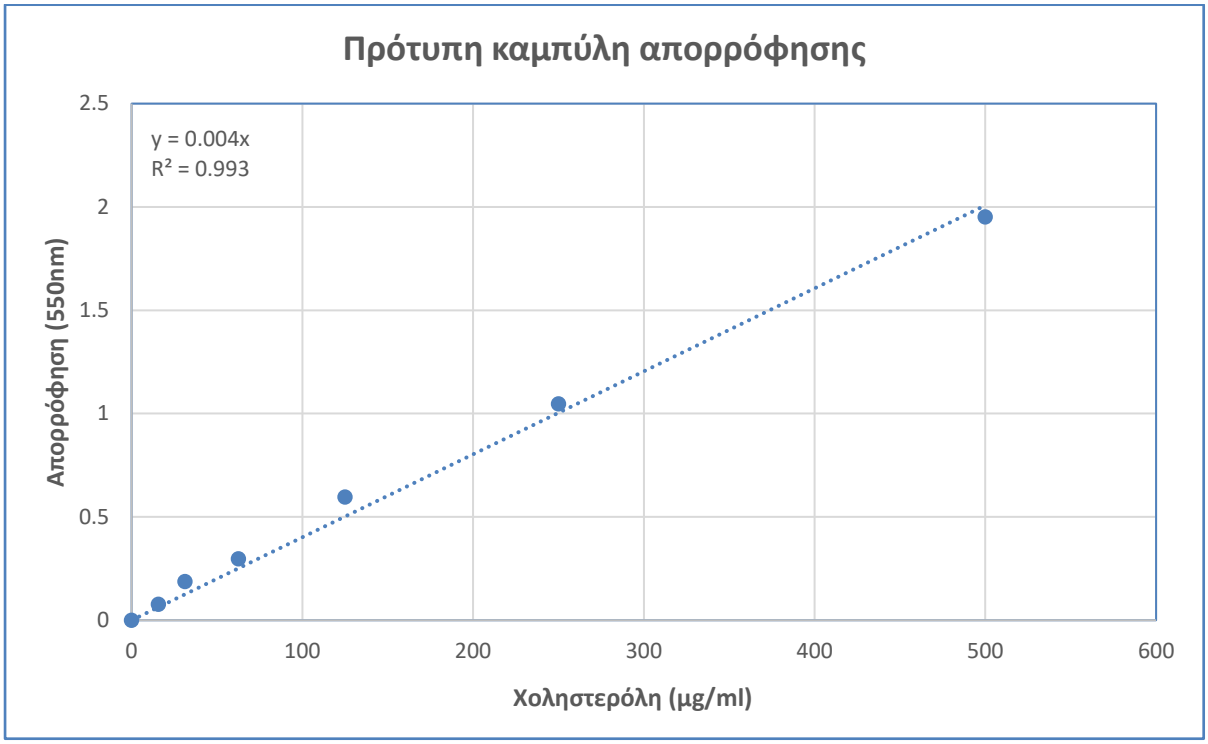
Οι μετρήσεις των απορροφήσεων των δειγμάτων στα 550nm σε UV φασματοφωτόμετρο παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Αποτελέσματα της φωτομέτρησης των δειγμάτων.

Μετρήσεις απορροφήσεων											
Στελέχη	**C1**	**C5**	**C15**	**C32**	**C39**	**C45**	**AnlB16**	**AnlB40**	**DSMZ**	**C72**	**Ανεμβ.**
No. 1	0,673	0,354	0,655	0,489	0,525	0,644	0,625	0,575	0,603	0,507	0,791
No. 2	0,571	0,525	0,6	0,512	0,67	0,358	0,576	0,463	0,725	0,558	0,783
No. 3	0,556	0,642	0,638	0,626	0,601	0,536	0,782	0,622	0,638	0,403	0,731
Mean	0,6	0,507	0,631	0,542	0,599	0,513	0,661	0,554	0,655	0,489	0,768

Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης της χοληστερόλης, η οποία δημιουργήθηκε με σκόνη χοληστερόλης που είναι διαλυτή σε αιθανόλη (SIGMA26740).

Σχήμα 1: Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης της χοληστερόλης.



Εξίσωση συγκέντρωσης χοληστερόλης:

Ελεύθερη χοληστερόλη διαλυτή σε αιθανόλη (μg/ml) = Απορρόφηση (550nm) / 0.004

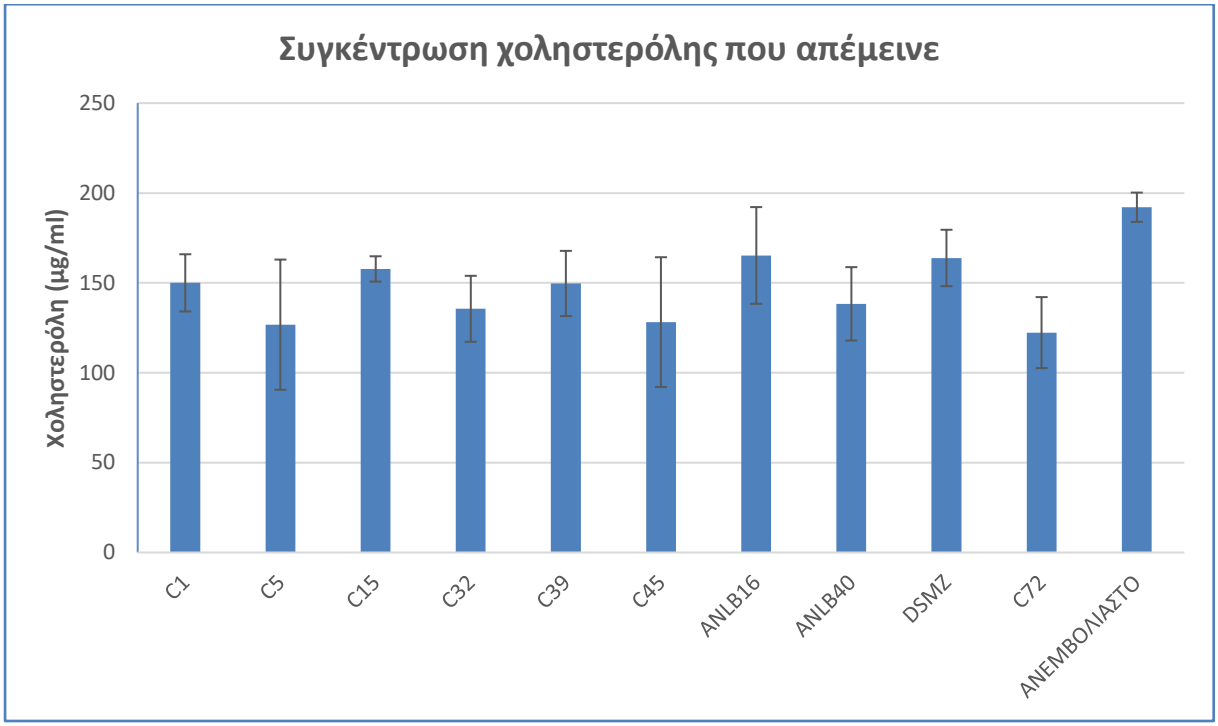
Με τη χρήση της παραπάνω εξίσωσης υπολογίστηκε για κάθε δείγμα η συγκέντρωση της χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν εμφανίζονται παρακάτω (Πίνακα 10, Σχήμα 2) καθώς και οι αντίστοιχες στατιστικές αναλύσεις τους (Πίνακας 11).

Πίνακας 10: Συγκέντρωση χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο.

Συγκέντρωση χοληστερόλης που απέμεινε (μg/ml)											
Στελέχη	**C1**	**C5**	**C15**	**C32**	**C39**	**C45**	**AnlB16**	**AnlB40**	**DSMZ**	**C72**	**Ανεμβ.**
No. 1	168.25	88.5	163.75	122.25	131.25	161	156.25	143.75	150.75	126.75	197.75
No. 2	142.75	131.25	150	128	167.5	89.5	144	115.75	181.25	139.5	195.75
No. 3	139	160.5	159.5	156.5	150.25	134	195.5	155.5	159.5	100.75	182.75

Mean	150	126.75	157.75	135.58	149.67	128.17	165.25	138.34	163.84	122.34	192.08
St. Dev.	15.92	36.21	7.04	18.34	18.13	36.11	26.9	20.42	15.71	19.749	8.15

Σχήμα 2: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/ml) που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό.



Πίνακας 11: Σύγκριση των στελεχών σε σχέση με το ανεμβολίαστο ως προς τη χοληστερόλη που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό (μg/ml), με χρήση του t-test.

Σύγκριση με το ανεμβολίαστο ως προς τη χοληστερόλη που απέμεινε										
Αποτελέσματα t-test (διάστημα εμπιστοσύνης p<0,05)										
Στελέχη	**C1**	**C5**	**C15**	**C32**	**C39**	**C45**	**AnlB16**	**AnlB40**	**DSMZ**	**C72**
Τιμή p	0,015	0,038	0,005	0,008	0,021	0,040	**0,174**	0,013	**0,051**	0,005

Από τα αποτελέσματα του t-test, παρατηρούμε ότι σχεδόν όλα τα στελέχη (C1, C5, C15, C32, C39, C45, AnlB40, C72) έχουν σημαντική στατιστική διαφορά (p<0,05) όταν συγκρίνονται με το ανεμβολίαστο ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο, το οποίο σημαίνει ότι όλα αυτά τα στελέχη απομάκρυναν ένα σημαντικό μέρος της χοληστερόλης σε σχέση με το ανεμβολίαστο. Το στέλεχος που φαίνεται να μην έχει μειώσει

στατιστικά σημαντικά τη συγκέντρωση χοληστερόλης στο υπερκείμενο σε σχέση με το ανεμβολίαστο είναι το AnlB16 (p=0,174>0,05). Τέλος, το στέλεχος DSMZ, το οποίο χρησιμοποιούμε και ως θετικό control στη δοκιμασία αφομοίωσης χοληστερόλης, φαίνεται να έχει ένα πολύ οριακό p (p=0,051), το οποίο και πρέπει οπωσδήποτε να σημειωθεί.

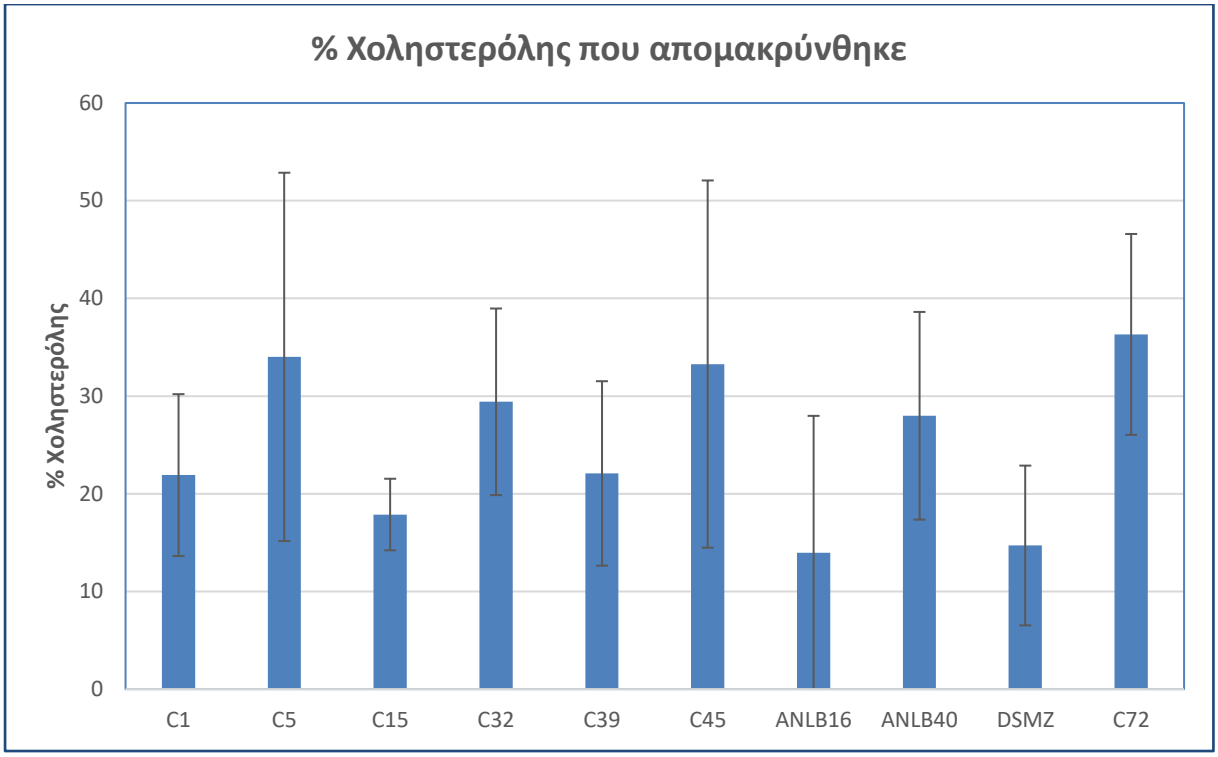
Στη συνέχεια υπολογίστηκε το ποσοστό της χοληστερόλης που απομάκρυνε το κάθε στέλεχος με βάση την Εξίσωση (1) (Πίνακας 12, Σχήμα 3), καθώς και η συγκέντρωση χοληστερόλης (mg/ml) που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηρίων σύμφωνα με την Εξίσωση (2). Τα κανονικοποιημένα αποτελέσματα της απομάκρυνσης χοληστερόλης ως προς την ξηρή βιομάζα εμφανίζονται παρακάτω (Πίνακας 13, Σχήμα 4), ακολουθούμενα από τις αντίστοιχες στατιστικές αναλύσεις (Πίνακας 14).

Πίνακας 12: Ποσοστό χοληστερόλης που απομάκρυνε το κάθε στέλεχος από το θρεπτικό μέσο.

% Χοληστερόλης που απομακρύνθηκε										
Στελέχη	**C1**	**C5**	**C15**	**C32**	**C39**	**C45**	**AnlB16**	**AnlB40**	**DSMZ**	**C72**
No. 1	12.41	53.93	14.75	36.36	31.67	16.18	18.65	25.16	21.52	34.01
No. 2	25.68	31.67	21.91	33.36	12.80	53.41	25.03	39.74	5.64	27.38
No. 3	27.64	16.44	16.96	18.52	21.78	30.24	-1.78[α]	19.05	16.96	47.55
Mean	21.91	34.01	17.87	29.41	22.08	33.28	13.97	27.98	14.71	36.31
St. Dev.	8.29	18.85	3.67	9.55	9.44	18.80	14.01	10.63	8.18	10.28

[α]Η αρνητική τιμή που προκύπτει λόγω πειραματικού σφάλματος είναι πρακτικά αδύνατη.

Σχήμα 3: Ποσοστό χοληστερόλης που απομάκρυνε το κάθε στέλεχος από το θρεπτικό μέσο.

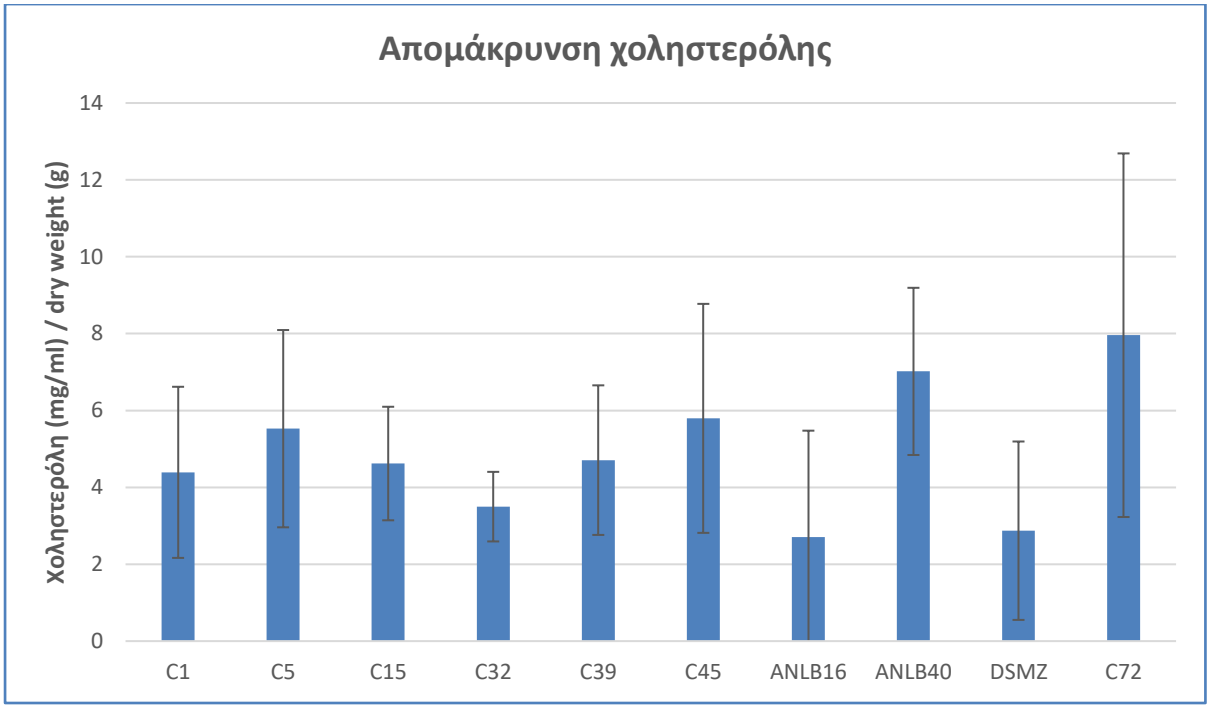


Πίνακας 13: Συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε (mg/ml) ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηρίων.

Χοληστερόλη που απομακρύνθηκε (mg/ml) ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηρίων										
Στελέχη	**C1**	**C5**	**C15**	**C32**	**C39**	**C45**	**AnlB16**	**AnlB40**	**DSMZ**	**C72**
No. 1	1.92	7.85	3.46	4.31	6.68	3.11	3.48	7.21	5.44	13.07
No. 2	6.24	5.96	6.28	3.66	2.79	9.00	5.01	9.09	0.92	3.73
No. 3	5.01	2.77	4.12	2.52	4.65	5.28	-0.36	4.75	2.26	7.08
Mean	4.39	5.53	4.62	3.50	4.71	5.80	2.71	7.02	2.87	7.96
St. Dev.	2.23	2.57	1.48	0.91	1.95	2.98	2.77	2.18	2.32	4.73

[α]Η αρνητική τιμή που προκύπτει λόγω πειραματικού σφάλματος είναι πρακτικά αδύνατη.

Σχήμα 4: Συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε (mg/ml) ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηρίων.



Πίνακας 14: Σύγκριση των στελεχών σε σχέση με το θετικό control DSMZ ως προς τη χοληστερόλη που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο (mg/ml) ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας των βακτηρίων, με χρήση του t-test.

Σύγκριση με το θετικό control DSMZ ως προς τη χοληστερόλη που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηρίων									
Αποτελέσματα t-test (διάστημα εμπιστοσύνης p<0,05)									
Στελέχη	**C1**	**C5**	**C15**	**C32**	**C39**	**C45**	**AnlB16**	**AnlB40**	**C72**
Τιμή p	0,459	0,255	0,333	0,686	0,353	0,251	0,941	0,0870	0,170

Από τα αποτελέσματα του t-test, παρατηρούμε ότι συγκρίνοντας τα στελέχη σε σχέση με το θετικό control DSMZ, ως προς την απομάκρυνση χοληστερόλης από το υπερκείμενο (mg/ml) ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας των βακτηρίων, κανένα δεν έχει στατιστικά σημαντική διαφορά από αυτό (p>0,05). Αυτό μας δείχνει ότι όλα τα στελέχη έχουν απομακρύνει χοληστερόλη κοντά στα επίπεδα απομάκρυνσης που εμφανίζει το θετικό control, χωρίς να υπάρχουν στελέχη με στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα απομάκρυνσης χοληστερόλης αλλά και χωρίς να υπάρχουν στελέχη με στατιστικά σημαντικά μικρότερα επίπεδα απομάκρυνσης χοληστερόλης. Με αυτή τη μέθοδο σύγκρισης, το στέλεχος AnlB16,

το οποίο δεν φάνηκε να έχει απομακρύνει στατιστικά σημαντική συγκέντρωση χοληστερόλης όταν συγκρίθηκε με το ανεμβολίαστο, εδώ που συγκρίνεται με το θετικό control DSMZ ως προς την απομάκρυνση χοληστερόλης ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηρίων, εμφανίζεται να μην έχει στατιστική διαφορά από αυτό, δηλαδή απομακρύνει χοληστερόλη σε παρόμοια επίπεδα με το θετικό control. Άρα, όλα τα στελέχη που ελέγχονται στη δοκιμασία αφομοίωσης χοληστερόλης μπορούν να θεωρηθούν ικανά να προσλαμβάνουν ένα μέρος της χοληστερόλης από το καλλιεργητικό μέσο.

Για έλεγχο της παρουσίας θετικής συσχέτισης μεταξύ της συγκέντρωσης χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό και της ξηρής βιομάζας των βακτηρίων, υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson μεταξύ αυτών των δύο μεταβλητών (Πίνακας 15).

Πίνακας 15: Αποτελέσματα του ελέγχου της γραμμικής συσχέτισης μεταξύ της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε και της ξηρής βιομάζας των βακτηρίων σε κάθε στέλεχος, με χρήση του συντελεστή γραμμικής συσχέτισης του Pearson.

Αποτελέσματα γραμμικής συσχέτισης του Pearson										
Στελέχη	**C1**	**C5**	**C15**	**C32**	**C39**	**C45**	**AnlB16**	**AnlB40**	**DSMZ**	**C72**
Συντελεστής συσχέτισης (r)	-0.727	0.679	-0.993	**0.855**	**0.976**	**0.928**	0.398	0.608	0.405	0.0732
Τιμή p	0.482	0.525	0.0742	0.348	0.139	0.244	0.74	0.584	0.734	0.953
Αριθμός δειγμάτων	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Από τον υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης του Pearson (για συνεχείς και κανονικά κατανεμημένες μεταβλητές), παρατηρούμε ότι τα στελέχη C39, C45 αλλά και το C32, φαίνεται να έχουν ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών ($r>0.8$). Παρόλα αυτά, λόγω του μικρού αριθμού των μετρήσεων που διαθέτουμε για κάθε στέλεχος (μόλις 3 ζευγάρια τιμών), η συσχέτιση αυτή δε φαίνεται να είναι στατιστικά σημαντική για κανένα από τα στελέχη ($p>0.05$). Άρα δεν μπορούμε να συμπεράνουμε για κανένα στέλεχος ότι

υπάρχει σίγουρη θετική συσχέτιση μεταξύ της απομάκρυνσης χοληστερόλης και της ξηρής βιομάζας των βακτηρίων αλλά ούτε μπορούμε ούτε να απορρίψουμε με σιγουριά αυτή τη συσχέτιση. Η αρνητική συσχέτιση που φαίνεται να υπάρχει μεταξύ των μεταβλητών στα στελέχη C1 και C15 είναι πλασματική, δεν έχει κάποια βιολογική σημασία και την θεωρούμε τυχαία.

ΚΕΦ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από το πείραμα ελέγχου της δραστικότητας του ενζύμου της υδρολάσης των χολικών αλάτων προέκυψαν ορισμένα στελέχη τα οποία φάνηκε να έχουν θετική δραστικότητα του ενζύμου. Τα στελέχη αυτά εμφάνισαν τη χαρακτηριστική εικόνα της ύπαρξης ζώνης λευκού ιζήματος γύρω από τα χάρτινα εμποτισμένα δισκία. Το στέλεχος *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079, όπως ήταν αναμενόμενο από τη βιβλιογραφία (166), εμφάνισε δραστικότητα του ενζύμου της υδρολάσης των χολικών αλάτων και αυτό επιβεβαιώθηκε με παρατήρηση της λευκής ζώνης ιζήματος γύρω από το εμποτισμένο δισκίο.

Από τη βιβλιογραφία, έχει παρατηρηθεί σημαντική σχέση μεταξύ της αφομοίωσης της χοληστερόλης από στελέχη του γένους *Lactobacillus* και τον βαθμό αποσύζευξης των χολικών οξέων που προκαλεί το ένζυμο υδρολάση (120). Έχει επίσης προταθεί ότι η δραστικότητα της BSH θα πρέπει να είναι αναγκαία προϋπόθεση στην επιλογή των προβιοτικών μικροοργανισμών με ιδιότητες που επιδρούν στη μείωση της χοληστερόλης, καθώς θεωρείται ότι οι οργανισμοί οι οποίοι δεν μπορούν να προκαλέσουν αποσύζευση δε φαίνεται να είναι σε θέση να αφαιρέσουν χοληστερόλη από το καλλιεργητικό μέσο σε σημαντικό βαθμό (123).

Επομένως, τα στελέχη τα οποία εμφάνισαν θετική δραστικότητα του ενζύμου της υδρολάσης (με σειρά φθίνουσας δραστικότητας: C1, AnlB16, C5, C15, DSM 20079, C45, C32, C39, AnlB40), μπορεί να αποτελούν πιθανά προβιοτικά στελέχη και επιλέχθηκαν για να ελεγχθούν περαιτέρω ως προς την απομάκρυνση χοληστερόλης από το καλλιεργητικό μέσο.

Στο πείραμα της απομάκρυνσης της χοληστερόλης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος DSM 20079 ως θετικός μάρτυρας (166) και το C72 ως αρνητικός μάρτυρας, για το λόγο ότι δεν είχε εμφανίσει καθόλου δραστικότητα του ενζύμου υδρολάσης και έτσι θεωρήθηκε ότι εξαιτίας της απουσίας αυτής της προβιοτικής ιδιότητας δεν θα είναι ικανό να απομακρύνει χοληστερόλη σε σημαντικό βαθμό από το καλλιεργητικό μέσο.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το πείραμα της απομάκρυνσης χοληστερόλης, για το οποίο ελέγχθηκαν τα στελέχη που είχαν εμφανίσει θετική δραστικότητα της υδρολάσης, φάνηκε ότι όλα τα στελέχη εμφάνισαν μείωση της χοληστερόλης από το καλλιεργητικό μέσο. Μάλιστα, όλα τα στελέχη φάνηκαν να είναι ικανά να απομακρύνουν

μεγαλύτερη συγκέντρωση χοληστερόλης από το θετικό control DSMZ, με μοναδική εξαίρεση το στέλεχος AnlB16, το οποίο εμφάνισε μικρότερη απομάκρυνση από το DSMZ. Παρόλα αυτά, οι διαφορές μεταξύ των στελεχών στην απομάκρυνση χοληστερόλης δεν είναι στατιστικά σημαντικές και επίσης υπάρχουν πολύ μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των τριών επαναλήψεων κάθε στελέχους, οπότε η ιεράρχηση των στελεχών ως προς την απομάκρυνση χοληστερόλης δεν έχει μεγάλη σημασία.

Μετά την κανονικοποίηση της απομάκρυνσης χοληστερόλης ως προς την ξηρή βιομάζα των βακτηρίων σε κάθε στέλεχος, τα δυο στελέχη που φαίνεται να έχουν την μεγαλύτερη απομάκρυνση είναι το C72 και το AnlB40, χωρίς όμως αυτή η διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική, εξ αιτίας της μεγάλης διακύμανσης των μετρήσεων.

Ακόμα και μετά την κανονικοποίηση της απομάκρυνσης της χοληστερόλης ως προς την ξηρή βιομάζα των βακτηρίων κάθε στελέχους, υπήρχε μεγάλη διακύμανση μεταξύ των τριών μετρήσεων κάθε στελέχους. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί εν μέρει από την συγκαταβύθιση της χοληστερόλης μαζί με τα αποσυζευγμένα χολικά άλατα, η οποία συμβαίνει όταν το pH γίνεται λιγότερο από 5.5 (121). Από τη στιγμή που το πείραμα πραγματοποιήθηκε χωρίς έλεγχο του pH, είναι πιθανό ότι μέρος της χοληστερόλης που υπήρχε στο καλλιεργητικό μέσο να συγκαταβυθίστηκε όταν το pH έπεσε κάτω από 5.5, λόγω βακτηριακής ζύμωσης και σχηματισμού λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου. Η ποσότητα της χοληστερόλης που συγκαταβυθίζεται με τα χολικά οξέα σε κάθε βακτηριακή καλλιέργεια μπορεί να διαφέρει μεταξύ των επαναλήψεων λόγω διακυμάνσεων στην ανάπτυξη των βακτηρίων, και ως εκ τούτου, στο τελικό pH του μέσου.

Σε όλα τα στελέχη παρατηρούμε μεγάλες διαφορές μεταξύ των τριών επαναλήψεων και ίσως να είναι αναγκαίος ο μεγαλύτερος αριθμός επαναλήψεων για κάθε στέλεχος για να μπορέσουμε να βγάλουμε κάποιο πιο σίγουρο αποτέλεσμα σχετικά με την ποσοτικοποίηση της ικανότητας απομάκρυνσης χοληστερόλης από κάθε στέλεχος. Αυτό δείχνει ότι η ικανότητα των βακτηρίων να αφομοιώνουν χοληστερόλη εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ανάπτυξή τους σε κάθε μία από τις τρεις επαναλήψεις, ίσως αντανακλώντας το στάδιο ανάπτυξης του κάθε εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε. Πράγματι, οι Tahri et. al. (124), πρότειναν ότι η ικανότητα ορισμένων κυττάρων να προσλαμβάνουν χοληστερόλη στην

κυτταρική τους μεμβράνη συνδεόταν με τη φάση ανάπτυξής τους, καθώς τα κύτταρα τα οποία δεν αναπτύσσονταν δεν είχαν την ίδια αλληλεπίδραση με τη χοληστερόλη.

Επίσης παρατηρούμε ότι το στέλεχος C72, το οποίο είχαμε επιλέξει ως αρνητικό μάρτυρα στο πείραμα αφομοίωσης χοληστερόλης, εμφανίζεται να απομακρύνει σε μεγάλο βαθμό χοληστερόλη. Το γεγονός αυτό ήταν μη αναμενόμενο, μιας και το C72 δεν εμφανίζει δραστικότητα του ενζύμου της υδρολάσης, οπότε δεν προκαλεί την αποσύζευξη των χολικών αλάτων έτσι ώστε αυτά με τη σειρά τους να συγκαταβυθίζονται με τη χοληστερόλη σε χαμηλό pH, και έτσι να εξηγηθεί ο μεγάλος βαθμός απομάκρυνσης της χοληστερόλης (121). Το αποτέλεσμα αυτό φαίνεται να οδηγεί στο συμπέρασμα ότι εμπλέκονται κι άλλοι μηχανισμοί στην απομάκρυνση της χοληστερόλης από το θρεπτικό υλικό, οι οποίοι έχουν εξίσου σημαντική επίδραση με τον μηχανισμό της αποσύζευξης των χολικών οξέων. Οι μηχανισμοί που επιδρούν στην απομάκρυνση χοληστερόλης, εκτός της αποσύζευξης των χολικών αλάτων, μπορεί να είναι η πρόσληψη της χοληστερόλης μέσα στο κύτταρο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του κυττάρου και στη συνέχεια η ενσωμάτωσή της στην κυτταρική μεμβράνη, καθώς και η δέσμευση της χοληστερόλης στις κυτταρικές επιφάνειες ζωντανών ή και νεκρών κυττάρων, η οποία σχετίζεται με συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης και η διαφορά αυτή προέρχεται από τα διαφορετικά χημικά και δομικά χαρακτηριστικά των πεπτιδογλυκανών που υπάρχουν στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα (127).

Τελικά, όλα τα υπό εξέταση στελέχη φαίνεται να είναι ικανά να απομακρύνουν χοληστερόλη από το μέσο καλλιέργειας σε κάποιο βαθμό, χωρίς όμως να γνωρίζουμε εάν έχουν τη δυνατότητα να ασκήσουν υποχοληστερολαιμική επίδραση *in vivo.* Είναι αναγκαίο να λάβουμε υπόψη μας την ικανότητα επιβίωσης αυτών των στελεχών σε συνθήκες προσομοίωσης των συνθηκών που επικρατούν στη γαστρεντερική οδό, όπως είναι η αντοχή τους στην οξύτητα και στα χολικά άλατα, να εξεταστεί η ικανότητα προσκόλλησής τους στο εντερικό επιθήλιο, η παραγωγή κυτταροκινών, η ευαισθησία τους σε αντιβιοτικά καθώς και οι αντιμικροβιακές τους ιδιότητες. Αυτά τα χαρακτηριστικά απαιτούνται για να μπορέσουμε να θεωρήσουμε αυτά τα στελέχη ως πιθανά προβιοτικά. Αντίστοιχοι έλεγχοι πάνω σε αυτά τα χαρακτηριστικά, έχουν ήδη διεξαχθεί σχεδόν για όλα τα στελέχη που ελέγχθηκαν στο πείραμα της απομάκρυνσης της χοληστερόλης (C1, C5, C15, C32, C45, AnlB16, C72), με εξαίρεση τα στελέχη AnlB40 και C39, τα οποία δεν έχουν εξεταστεί ακόμα ως προς όλες αυτές τις ιδιότητες.

Συνοψίζοντας, απαιτούνται επιπρόσθετες *in vitro* μελέτες, εστιασμένες στον προσδιορισμό της ικανότητας απομάκρυνσης της χοληστερόλης του κάθε στελέχους, σε μια ποικιλία καλλιεργητικών μέσων και συνθηκών ανάπτυξης, με ταυτόχρονο έλεγχο του pH, καθώς και των μηχανισμών που επιδρούν στη διαδικασία αφομοίωσης. Πρέπει επίσης να αξιολογηθεί *in vitro* περαιτέρω η επίδραση του κάθε στελέχους στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο και στη συνολική μεταβολική δραστηριότητα του εντέρου, σε περιβάλλον μικτής καλλιέργειας και μικτού υποστρώματος, πριν από το σχεδιασμό κλινικών δοκιμών παρέμβασης (105).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα στελέχη – απομονώσεις από τον εντερικό μικροβιόκοσμο νεογνών, που ανήκουν στο γένος Lactobacillus και ελέγχθηκαν ως προς τη δραστικότητα του ενζύμου της υδρολάσης των χολικών αλάτων, προέκυψε ότι εμφανίζουν δραστικότητα του ενζύμου τα 9 από τα 32 στελέχη.

Από τη δοκιμασία αφομοίωσης της χοληστερόλης, για την οποία ελέγχθηκαν όλα τα στελέχη τα οποία εμφάνισαν θετική δραστικότητα του ενζύμου BSH, φάνηκε ότι όλα τα στελέχη, εκτός του AnlB16, κατάφεραν να απομακρύνουν χοληστερόλη σε σημαντικό βαθμό σε σχέση με το ανεμβολίαστο δείγμα, ενώ η απομάκρυνση της χοληστερόλης ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας δεν παρουσίαζε σημαντικές διαφορές από τον θετικό μάρτυρα DSMZ 20079 για κανένα από τα στελέχη.

Τα αποτελέσματα αυτά εμφανίζουν ενδιαφέρον ως πρώτη προσέγγιση για την ανίχνευση των ιδιοτήτων απομάκρυνσης της χοληστερόλης από τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη. Απαιτείται να σχεδιαστούν επιπλέον δοκιμές για την επιβεβαίωση σε *in vitro* συστήματα αξιολόγησης και στην συνέχεια σε *in vivo*.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. International journal of food microbiology. 1998;41(2):85-101. Epub 1998/08/15.
2. Guarner F, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics October 2011. Journal of clinical gastroenterology. 2012;46(6):468-81. Epub 2012/06/13.
3. Dashkevicz MP, Feighner SD. Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active Lactobacillus spp. Applied and environmental microbiology. 1989;55(1):11-6. Epub 1989/01/01.
4. Begley M, Hill C, Gahan CG. Bile salt hydrolase activity in probiotics. Applied and environmental microbiology. 2006;72(3):1729-38. Epub 2006/03/07.
5. Prado FC, Parada JL, Pandey A, Soccola CR. Trends in non-dairy probiotic beverages. Food Research International. 2008;41(2):111-23.
6. Leroy F, Falony G, Vuys LD. Latest Developments in Probiotics. In: Toldrá F, editor. Meat Biotechnology: SpringerEditors; 2008.
7. Song D, Ibrahim S, Hayek S. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. In: Rigobelo EC, editor. Probiotics: INTECH; 2012.
8. Vasiljevic T, Shah NP. Probiotics—From Metchnikoff to Bioactives. International Dairy Journal. 2008(18):714-28.
9. Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. Nature. 2012;489(7415):250-6. Epub 2012/09/14.
10. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. Gastroenterology. 2009;136(1):65-80. Epub 2008/11/26.
11. Miquel S, Martin R, Thomas M, Bermudez-Humaran LG, Langella P. The Indigenous Microbiota and its Potential to Exhibit Probiotic Properties. In: Carmo KVaAPd, editor. Probiotics and Prebiotics: Current Research and Future Trends. UK: Caister Academic Press; 2015.
12. Baquero F, Nombela C. The microbiome as a human organ. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2012;18 Suppl 4:2-4. Epub 2012/06/08.
13. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science. 2005;307(5717):1915-20. Epub 2005/03/26.
14. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. Science. 2008;320(5883):1647-51. Epub 2008/05/24.
15. Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. Environmental microbiology. 2009;11(10):2574-84. Epub 2009/07/16.
16. Martin R, Soberon N, Vazquez F, Suarez JE. [Vaginal microbiota: composition, protective role, associated pathologies, and therapeutic perspectives]. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica. 2008;26(3):160-7. Epub 2008/03/25. La microbiota vaginal: composicion, papel protector, patologia asociada y perspectivas terapeuticas.
17. Wang H, Wei C-X, Min L, Zhu L-Y. Good or bad: gut bacteria in human health and diseases. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2018.
18. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. Science. 2005;308(5728):1635-8. Epub 2005/04/16.
19. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Verstraelen H, Osowska S, Doerffel Y. Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. Gastroenterology. 2008;135(2):568-79. Epub 2008/06/24.
20. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science. 2011;334(6052):105-8. Epub 2011/09/03.
21. Talarico ST, Santos FE, Brandt KG, Martinez MB, Taddei CR. Anaerobic bacteria in the intestinal microbiota of Brazilian children. Clinics (Sao Paulo). 2017;72(3):154-60. Epub 2017/03/30.

22. World Gastroenterology Organisation practice guideline: Probiotics and prebiotics. Arab journal of gastroenterology : the official publication of the Pan-Arab Association of Gastroenterology. 2009;10(1):33-42. Epub 2009/03/01.
23. Hamilton-Miller JM, Gibson GR, Bruck W. Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic'. The British journal of nutrition. 2003;90(4):845. Epub 2003/10/14.
24. FAO/WHO. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada: 2002 30 April-1 May 2002. Report No.
25. Reid G. Modulating the vaginal microbiome: the need for a bridge between science and practice. Seminars in reproductive medicine. 2014;32(1):28-34. Epub 2014/01/07.
26. Lau S. Oral application of bacterial lysate in infancy diminishes the prevalence of atopic dermatitis in children at risk for atopy. Beneficial microbes. 2014;5(2):147-9. Epub 2013/07/28.
27. Adams CA. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. Nutrition research reviews. 2010;23(1):37-46. Epub 2010/04/21.
28. Shihata A, Shah NP. Proteolytic profile of yogurt and probiotic bacteria. International Dairy Journal. 2000;10(5-6):401-8.
29. Wright Av, Axelsson L. Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In: Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, Wright Av, editors. Lactic Acid Bacteria, Microbial and Functional Aspects. 4th ed: CRC Press, Boca Raton, FL; 2011.
30. Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, et al. Demonstration of safety of probiotics -- a review. International journal of food microbiology. 1998;44(1-2):93-106. Epub 1998/12/16.
31. Husebye E, Hellstrom PM, Sundler F, Chen J, Midtvedt T. Influence of microbial species on small intestinal myoelectric activity and transit in germ-free rats. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2001;280(3):G368-80. Epub 2001/02/15.
32. Banasaz M, Norin E, Holma R, Midtvedt T. Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with Lactobacillus rhamnosus GG. Applied and environmental microbiology. 2002;68(6):3031-4. Epub 2002/06/01.
33. Vera Pingitore E, Hebert EM, Sesma F, Nader-Macias ME. Influence of vitamins and osmolites on growth and bacteriocin production by Lactobacillus salivarius CRL 1328 in a chemically defined medium. Canadian journal of microbiology. 2009;55(3):304-10. Epub 2009/04/17.
34. Hébert EM, Raya RR, Giori GSd. Evaluation

of Minimal Nutritional Requirements of Lactic Acid

Bacteria Used in Functional Foods. In: Walker JM, Spencer JF, Spencer ALRd, editors. Methods in Biotechnology. Totowa: Humana Press; 2004. p. 139-50.
35. Letort C, Juillard V. Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of Streptococcus thermophilus. Journal of applied microbiology. 2001;91(6):1023-9. Epub 2002/02/20.
36. Hayek SA, Ibrahim SA. Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review

Food and Nutrition Sciences. 2013(4):73-87.
37. Barrangou R, Lahtinen SJ, Ibrahim F, Ouwehand AC. Genus Lactobacillus. In: Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, Wright Av, editors. Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. 4th ed2011.
38. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American journal of clinical nutrition. 2001;73(2 Suppl):365S-73S. Epub 2001/02/07.
39. Gorbach SL. Probiotics in the third millennium. Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver. 2002;34 Suppl 2:S2-7. Epub 2002/11/01.

40. Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(42):15611-6. Epub 2006/10/13.
41. Walker WA. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. Annals of nutrition & metabolism. 2013;63 Suppl 2:8-15. Epub 2013/11/15.
42. Siragusa S, De Angelis M, Calasso M, Campanella D, Minervini F, Di Cagno R, et al. Fermentation and proteome profiles of Lactobacillus plantarum strains during growth under food-like conditions. Journal of proteomics. 2014;96:366-80. Epub 2013/11/16.
43. De Vuyst L, Van Kerrebroeck S, Harth H, Huys G, Daniel HM, Weckx S. Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? Food microbiology. 2014;37:11-29. Epub 2013/11/16.
44. Kumar M, Verma V, Nagpal R, Kumar A, Gautam SK, Behare PV, et al. Effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on gene expressions and genotoxicity during AFB(1)-induced hepatocellular carcinoma. Gene. 2011;490(1-2):54-9. Epub 2011/10/04.
45. Kumar M, Verma V, Nagpal R, Kumar A, Behare PV, Singh B, et al. Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B(1)-induced liver carcinogenesis in rats. The British journal of nutrition. 2012;107(7):1006-16. Epub 2011/08/06.
46. Kumar M, Kumar A, Nagpal R, Mohania D, Behare P, Verma V, et al. Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. International journal of food sciences and nutrition. 2010;61(5):473-96. Epub 2010/03/02.
47. Kumar, Mohania, Poddar. A probiotic fermented milk prepared by mixed culture reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in rats challenged with pathogens. International Journal of Probiotics and Prebiotics. 2009;4(3):211–7.
48. Yadav H, Jain S, Sinha PR. Formation of oligosaccharides in skim milk fermented with mixed dahi cultures, Lactococcus lactis ssp diacetylactis and probiotic strains of lactobacilli. The Journal of dairy research. 2007;74(2):154-9. Epub 2007/02/13.
49. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. The American journal of physiology. 1999;276(4 Pt 1):G941-50. Epub 1999/04/13.
50. Bengmark, Ahrne, Molin, Jeppsson. Intestinal colonizing lactobacilli. . Journal of Nutrition 1998;14(8):585–94.
51. Nagpal R, Yadav H, Puniya AK, Singh K, Jain S, Marotta F. Potential of Probiotics and Prebiotics for Synbiotic Functional Dairy Foods : an Overview. International Journal of Probiotics & Prebiotics. 2017;2(2/3):75-84.
52. Niedzielin K, Kordecki H, Birkenfeld B. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of Lactobacillus plantarum 299V in patients with irritable bowel syndrome. European journal of gastroenterology & hepatology. 2001;13(10):1143-7. Epub 2001/11/17.
53. Nagpal R, Behare PV, Kumar M, Mohania D, Yadav M, Jain S, et al. Milk, milk products, and disease free health: an updated overview. Critical reviews in food science and nutrition. 2012;52(4):321-33. Epub 2012/02/16.
54. Sanders TA. Food production and food safety. BMJ. 1999;318(7199):1689-93. Epub 1999/06/18.
55. Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. Applied and environmental microbiology. 2008;74(16):4985-96. Epub 2008/06/10.
56. Taverniti V, Scabiosi C, Arioli S, Mora D, Guglielmetti S. Short-term daily intake of 6 billion live probiotic cells can be insufficient in healthy adults to modulate the intestinal bifidobacteria and Lactobacilli. J Funct Foods. 2013:482–91.
57. Tulumoglu S, Yuksekdag ZN, Beyatli Y, Simsek O, Cinar B, Yasar E. Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. Anaerobe. 2013;24:36-42. Epub 2013/09/24.
58. Ruiz L, Margolles A, Sanchez B. Bile resistance mechanisms in Lactobacillus and Bifidobacterium. Frontiers in microbiology. 2013;4:396. Epub 2014/01/09.

59. Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. International journal of environmental research and public health. 2014;11(5):4745-67. Epub 2014/05/27.
60. Venema K, Carmo APd. Probiotics and Prebiotics: Current Research and Future Trends. U.K.: Caister Academic Press; 2015.
61. FAO/WHO. Health and Nutrition Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria.

Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Cordoba, Argentina: 2001.
62. Shah NP. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of dairy science. 2000;83(4):894-907. Epub 2000/05/03.
63. de Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. Advances in biochemical engineering/biotechnology. 2008;111:1-66. Epub 2008/05/08.
64. Compare D, Nardone G. The role of gut microbiota in the pathogenesis and management of allergic diseases. European review for medical and pharmacological sciences. 2013;17 Suppl 2:11-7. Epub 2014/01/21.
65. Marteau P, Seksik P, Jian R. Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. The British journal of nutrition. 2002;88 Suppl 1:S51-7. Epub 2002/09/07.
66. de Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics--compensation for lactase insufficiency. The American journal of clinical nutrition. 2001;73(2 Suppl):421S-9S. Epub 2001/02/07.
67. Gueimonde M, Kalliomaki M, Isolauri E, Salminen S. Probiotic intervention in neonates--will permanent colonization ensue? Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. 2006;42(5):604-6. Epub 2006/05/19.
68. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. The American journal of clinical nutrition. 2001;73(2 Suppl):444S-50S. Epub 2001/02/07.
69. Ibrahim F, Ruvio S, Granlund L, Salminen S, Viitanen M, Ouwehand AC. Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier. FEMS immunology and medical microbiology. 2010;59(1):53-9. Epub 2010/03/20.
70. Twetman S, Stecksen-Blicks C. Probiotics and oral health effects in children. Int J Paediatr Dent. 2008;18(1):3-10. Epub 2007/12/19.
71. Krehbiel CR, Rust SR, Zhang G, Gilliland SE. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. Journal of Animal Science. 2002.
72. Kalavathy R, Abdullah N, Jalaludin S, Ho YW. Effects of Lactobacillus cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. British poultry science. 2003;44(1):139-44. Epub 2003/05/10.
73. Patterson JA, Burkholder KM. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Poultry science. 2003;82(4):627-31. Epub 2003/04/25.
74. Jin LZ, Marquardt RR, Zhao X. A strain of Enterococcus faecium (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic Escherichia coli K88 to porcine small intestine mucus. Applied and environmental microbiology. 2000;66(10):4200-4. Epub 2000/09/30.
75. Vine NG, Leukes WD, Kaiser H, Daya S, Baxter J, Hecht T. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. Journal of fish diseases. 2004;27(6):319-26. Epub 2004/06/11.
76. Wang Y, Zha L, Xu Z. [Effects of probiotics on Penaeus vannamei pond sediments]. Ying yong sheng tai xue bao = The journal of applied ecology. 2006;17(9):1765-7. Epub 2006/12/07.
77. Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. Annual review of nutrition. 2002;22:283-307. Epub 2002/06/11.
78. Musa HH, Wu SL, Zhu CH, Seri HI, Zhu GQ. The Potential Benefits of Probiotics in Animal Production and Health. Journal of Animal and Veterinary Advances. 2009;8(2):313-21.

79. Balcazar JL, Rojas-Luna T, Cunningham DP. Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) following immersion challenge with Vibrio parahaemolyticus. Journal of invertebrate pathology. 2007;96(2):147-50. Epub 2007/06/05.
80. Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Applied microbiology and biotechnology. 2009;84(1):11-8. Epub 2009/07/02.
81. Nelson LM. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Prospects for New Inoculants. Crop Management. 2004;10:301-5.
82. Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. J Ind Microbiol Biotechnol. 2007;34(10):635-48. Epub 2007/08/01.
83. Perrig D, Boiero ML, Masciarelli OA, Penna C, Ruiz OA, Cassan FD, et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of Azospirillum brasilense, and implications for inoculant formulation. Applied microbiology and biotechnology. 2007;75(5):1143-50. Epub 2007/03/09.
84. Gordon D, Macrae J, Wheater DM. A Lactobacillus preparation for use with antibiotics. Lancet. 1957;272(6975):899-901. Epub 1957/05/04.
85. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. Journal of dairy science. 1987;70(1):1-12. Epub 1987/01/01.
86. Kotsou MG, Mitsou EK, Oikonomou IG, Kyriacou AA. In VitroAssessment of Probiotic Properties ofLactobacillusStrains from Infant Gut Microflora. . Food Biotechnology. 2008;22(1):1–17.
87. O'Sullivan DJ. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. Journal of agricultural and food chemistry. 2001;49(4):1751-60. Epub 2001/04/20.
88. Ouwehand AC, Tuomola EM, Tolkko S, Salminen S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. International journal of food microbiology. 2001;64(1-2):119-26. Epub 2001/03/17.
89. Blum S, Reniero R, Schiffrin E, Crittenden R, Mattila-Sandholm T, Ouwehand A, et al. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. . Trends in Food Science & Technology. 1999;10(12):405–10.
90. Tuomola EM, Salminen SJ. Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures. International journal of food microbiology. 1998;41(1):45-51. Epub 1998/06/19.
91. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. International journal of food microbiology. 2003;82(1):1-11. Epub 2002/12/31.
92. De Smet I, De Boever P, Verstraete W. Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. The British journal of nutrition. 1998;79(2):185-94. Epub 1998/04/16.
93. De Smet I, Van Hoorde L, Vande Woestyne M, Christiaens H, Verstraete W. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. The Journal of applied bacteriology. 1995;79(3):292-301. Epub 1995/09/01.
94. Aloğlu H, Öner Z. Assimilation of cholesterol in broth, cream, and butter by probiotic bacteria. European Journal of Lipid Science and Technology. 2006;108(9):709-13.
95. Cardiovascular diseases (CVDs). Fact sheet 317. WHO, Geneva, Switzerland. Available at: http://tinyurl.com/br89ujf. [database on the Internet]. 2015.
96. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. Lancet. 2004;364(9438):937-52. Epub 2004/09/15.
97. Dunn-Emke S, Weidner G, Ornish D. Benefits of a low-fat plant-based diet. Obesity research. 2001;9(11):731. Epub 2001/11/15.
98. McLaren JE, Michael DR, Ashlin TG, Ramji DP. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. Progress in lipid research. 2011;50(4):331-47. Epub 2011/05/24.

99. Buckley ML, Ramji DP. The influence of dysfunctional signaling and lipid homeostasis in mediating the inflammatory responses during atherosclerosis. Biochimica et biophysica acta. 2015;1852(7):1498-510. Epub 2015/04/19.
100. Taylor KS, Heneghan CJ, Farmer AJ, Fuller AM, Adler AI, Aronson JK, et al. All-cause and cardiovascular mortality in middle-aged people with type 2 diabetes compared with people without diabetes in a large U.K. primary care database. Diabetes care. 2013;36(8):2366-71. Epub 2013/02/26.
101. Michael DR AT, Buckley ML, Ramji DP. Macrophages, lipid metabolism and gene expression in atherogenesis: A therapeutic target of the future? Clinical Lipidology. 2012;7:37-48.
102. Banach M, Rizzo M, Toth PP, Farnier M, Davidson MH, Al-Rasadi K, et al. Statin intolerance - an attempt at a unified definition. Position paper from an International Lipid Expert Panel. Expert opinion on drug safety. 2015;14(6):935-55. Epub 2015/04/25.
103. Christie C. Proposed Dietary Guidelines 2015 and Implications for Cardiovascular Disease and Diabetes. The Journal of cardiovascular nursing. 2015;30(5):375-8. Epub 2015/08/12.
104. Huang Y, Wu F, Wang X, Sui Y, Yang L, Wang J. Characterization of Lactobacillus plantarum Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. Journal of dairy science. 2013;96(5):2816-25. Epub 2013/03/19.
105. Pereira DI, Gibson GR. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. Applied and environmental microbiology. 2002;68(9):4689-93. Epub 2002/08/30.
106. Gorenjak M, Gradisnik L, Trapecar M, Pistello M, Kozmus CP, Skorjanc D, et al. Improvement of lipid profile by probiotic/protective cultures: study in a non-carcinogenic small intestinal cell model. The new microbiologica. 2014;37(1):51-64. Epub 2014/02/18.
107. Yoon HS, Ju JH, Kim H, Lee J, Park HJ, Ji Y, et al. Lactobacillus rhamnosus BFE 5264 and Lactobacillus plantarum NR74 Promote Cholesterol Excretion Through the Up-Regulation of ABCG5/8 in Caco-2 Cells. Probiotics and antimicrobial proteins. 2011;3(3-4):194-203. Epub 2011/12/01.
108. Fuentes MC, Lajo T, Carrion JM, Cune J. Cholesterol-lowering efficacy of Lactobacillus plantarum CECT 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolaemic adults. The British journal of nutrition. 2013;109(10):1866-72. Epub 2012/09/29.
109. Mann GV. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. The American journal of clinical nutrition. 1974;27(5):464-9. Epub 1974/05/01.
110. Rerksuppaphol S, Rerksuppaphol L. A Randomized Double-blind Controlled Trial of Lactobacillus acidophilus Plus Bifidobacterium bifidum versus Placebo in Patients with Hypercholesterolemia. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR. 2015;9(3):KC01-4. Epub 2015/05/09.
111. Sun J, Buys N. Effects of probiotics consumption on lowering lipids and CVD risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Annals of medicine. 2015;47(6):430-40. Epub 2015/09/05.
112. Shaper AG, Wright DH. Intracardiac Thrombosis and Embolism in Endomyocardial Fibrosis in Uganda. British heart journal. 1963;25(4):502-8. Epub 1963/07/01.
113. Agerbaek M, Gerdes LU, Richelsen B. Hypocholesterolaemic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. European journal of clinical nutrition. 1995;49(5):346-52. Epub 1995/05/01.
114. Bertolami MC, Faludi AA, Batlouni M. Evaluation of the effects of a new fermented milk product (Gaio) on primary hypercholesterolemia. European journal of clinical nutrition. 1999;53(2):97-101. Epub 1999/04/01.
115. Agerholm-Larsen L, Raben A, Haulrik N, Hansen AS, Manders M, Astrup A. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. European journal of clinical nutrition. 2000;54(4):288-97. Epub 2000/04/04.
116. Schaafsma G, Meuling WJ, van Dokkum W, Bouley C. Effects of a milk product, fermented by Lactobacillus acidophilus and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. European journal of clinical nutrition. 1998;52(6):436-40. Epub 1998/07/31.

117. de Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. The American journal of clinical nutrition. 2000;71(2):405-11. Epub 2000/01/29.
118. Taylor GR, Williams CM. Effects of probiotics and prebiotics on blood lipids. The British journal of nutrition. 1998;80(4):S225-30. Epub 1999/01/30.
119. Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF. Effect of Lactobacillus reuteri on the prevention of hypercholesterolemia in mice. Journal of dairy science. 2000;83(3):401-3. Epub 2000/04/06.
120. Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. Applied and environmental microbiology. 1985;49(2):377-81. Epub 1985/02/01.
121. Klaver FA, van der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile salt-deconjugating activity. Applied and environmental microbiology. 1993;59(4):1120-4. Epub 1993/04/01.
122. Noh DO, Kim SH, Gilliland SE. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of Lactobacillus acidophilus ATCC 43121. Journal of dairy science. 1997;80(12):3107-13. Epub 1998/01/22.
123. Tahri K, Grill JP, Schneider F. Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria. Current microbiology. 1997;34(2):79-84. Epub 1997/02/01.
124. Tahri K, Grill JP, Schneider F. Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. Current microbiology. 1996;33(3):187-93. Epub 1996/09/01.
125. Tahri K, Crociani J, Ballongue J, Schneider F. Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. Letters in applied microbiology. 1995;21(3):149-51. Epub 1995/09/01.
126. Lin M-Y, Chen T-W. Reduction of Cholesterol by Lactobacillus acidophilus in Culture Broth. Journal of Food and Drug Analysis 8(2):97-102. 2000.
127. Usman, Hosono A. Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by Lactobacillus gasseri strains. Journal of dairy science. 1999;82(2):243-8. Epub 1999/03/09.
128. Trautwein EA, Rieckhoff D, Erbersdobler HF. Dietary inulin lowers plasma cholesterol and triacylglycerol and alters biliary bile acid profile in hamsters. The Journal of nutrition. 1998;128(11):1937-43. Epub 1998/11/10.
129. Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. Cholesterol removal from media by lactococci. Journal of dairy science. 2002;85(12):3182-8. Epub 2003/01/07.
130. Pigeon RM, Cuesta EP, Gililliand SE. Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria. Journal of dairy science. 2002;85(11):2705-10. Epub 2002/12/19.
131. Kim Y, Whang JY, Whang KY, Oh S, Kim SH. Characterization of the cholesterol-reducing activity in a cell-free supernatant of Lactobacillus acidophilus ATCC 43121. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2008;72(6):1483-90. Epub 2008/06/10.
132. Chiang YR, Ismail W, Heintz D, Schaeffer C, Van Dorsselaer A, Fuchs G. Study of anoxic and oxic cholesterol metabolism by Sterolibacterium denitrificans. Journal of bacteriology. 2008;190(3):905-14. Epub 2007/11/28.
133. Ahire JJ, Bhat AA, Thakare JM, Pawar PB, Zope DG, Jain RM, et al. Cholesterol assimilation and biotransformation by Lactobacillus helveticus. Biotechnology letters. 2012;34(1):103-7. Epub 2011/09/08.
134. Smet D, Hoorde v, Saeyer D, Woestyne V, Verstraete. In vitro study of bile salt hydrolase (BSH) activity of BSH isogenic Lactobacillus plantarum 80 strains and estimation of cholesterol lowering through enhanced BSH activity. Microbial Ecology in Health and Disease. 1994;7(6):315–29.
135. du Toit M, Franz CM, Dicks LM, Schillinger U, Haberer P, Warlies B, et al. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. International journal of food microbiology. 1998;40(1-2):93-104. Epub 1998/05/26.

136. Walker DK, Gilliland SE. Relationship among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. Journal of dairy science. 1993;76(4):956-61. Epub 1993/04/01.
137. Tanaka H, Doesburg K, Iwasaki T, Mierau I. Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. Journal of dairy science. 1999;82(12):2530-5. Epub 2000/01/12.
138. Tanaka H, Hashiba H, Kok J, Mierau I. Bile salt hydrolase of Bifidobacterium longum-biochemical and genetic characterization. Applied and environmental microbiology. 2000;66(6):2502-12. Epub 2000/06/01.
139. Grill JP, Cayuela C, Antoine JM, Schneider F. Isolation and characterization of a Lactobacillus amylovorus mutant depleted in conjugated bile salt hydrolase activity: relation between activity and bile salt resistance. Journal of applied microbiology. 2000;89(4):553-63. Epub 2000/10/29.
140. Wood, Holzapfel. The Genera of Lactic Acid Bacteria. . London: UK: Blackie Academy; 1995.
141. Corzo G, Gilliland SE. Measurement of bile salt hydrolase activity from Lactobacillus acidophilus based on disappearance of conjugated bile salts. Journal of dairy science. 1999;82(3):466-71. Epub 1999/04/09.
142. Pereira DI, McCartney AL, Gibson GR. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing Lactobacillus fermentum strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. Applied and environmental microbiology. 2003;69(8):4743-52. Epub 2003/08/07.
143. Moser SA, Savage DC. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. Applied and environmental microbiology. 2001;67(8):3476-80. Epub 2001/07/27.
144. Mann G. A factor in yoghurt which lowers cholesterolemia in man. Arthrosclerosis. 1977;26:335-30.
145. Grunewald K. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by Lactobacillus acidophilus. Journal of Food Science. 1982(47):2078–9.
146. Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF. Evidence for hypocholesterolemic effect of Lactobacillus reuteri in hypercholesterolemic mice. Journal of dairy science. 1998;81(9):2336-40. Epub 1998/10/24.
147. Xiao JZ, Kondo S, Takahashi N, Miyaji K, Oshida K, Hiramatsu A, et al. Effects of milk products fermented by Bifidobacterium longum on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. Journal of dairy science. 2003;86(7):2452-61. Epub 2003/08/09.
148. Abd El-Gawad I, El-Sayed E, Hafez S, El-Zeini H, Saleh F. The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. International Dairy Journal. 2005;15(1):37–44.
149. Kumar R, Grover S, Batish VK. Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing Lactobacillus plantarum strains in Sprague-Dawley rats. The British journal of nutrition. 2011;105(4):561-73. Epub 2010/10/07.
150. Lin SY, Ayres JW, Winkler W, Jr., Sandine WE. Lactobacillus effects on cholesterol: in vitro and in vivo results. Journal of dairy science. 1989;72(11):2885-99. Epub 1989/11/01.
151. Mohan JC, Arora R, Khalilullah M. Preliminary observations on effect of Lactobacillus sporogenes on serum lipid levels in hypercholesterolemic patients. The Indian journal of medical research. 1990;92:431-2. Epub 1990/12/01.
152. Gilliland FD, Mahler R, Hunt WC, Davis SM. Preventive health care among rural American Indians in New Mexico. Preventive medicine. 1999;28(2):194-202. Epub 1999/02/27.
153. Klein A, Friedrich U, Vogelsang H, Jahreis G. Lactobacillus acidophilus 74-2 and Bifidobacterium animalis subsp lactis DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. European journal of clinical nutrition. 2008;62(5):584-93. Epub 2007/04/19.
154. Jones ML, Martoni CJ, Parent M, Prakash S. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active Lactobacillus reuteri NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. The British journal of nutrition. 2012;107(10):1505-13. Epub 2011/11/10.

155. Vlahcevic Z, Heuman D, Hylemon P. Physiology and pathophysiology of enterohepatic circulation of bile acids. In: D Z, T B, editors. Hepatology: A Textbook of Liver Disease. 3rd ed. Philadelphia: USA: Saunders; 1996. p. 376–417.
156. Begley M, Sleator RD, Gahan CG, Hill C. Contribution of three bile-associated loci, bsh, pva, and btlB, to gastrointestinal persistence and bile tolerance of Listeria monocytogenes. Infection and immunity. 2005;73(2):894-904. Epub 2005/01/25.
157. Bortolini O, Medici A, Poli S. Biotransformations on steroid nucleus of bile acids. Steroids. 1997;62(8-9):564-77. Epub 1997/08/01.
158. Battag AK, Salen G, Arora R, Shefer S, Batta M, Person A. Side Chain Conjugation Prevents Bacterial 'I-Dehydroxylation of Bile Acids. The Journal of biological chemistry. 1990;265(19).
159. Franz CM, Specht I, Haberer P, Holzapfel WH. Bile salt hydrolase activity of Enterococci isolated from food: screening and quantitative determination. Journal of food protection. 2001;64(5):725-9. Epub 2001/05/12.
160. Elkins CA, Moser SA, Savage DC. Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in Lactobacillus johnsonii 100-100 and other Lactobacillus species. Microbiology. 2001;147(Pt 12):3403-12. Epub 2001/12/12.
161. McAuliffe O, Cano RJ, Klaenhammer TR. Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in Lactobacillus acidophilus NCFM. Applied and environmental microbiology. 2005;71(8):4925-9. Epub 2005/08/09.
162. RašićI JL, Vujičić F, Škrinjar M, Vulić M. Assimilation of cholesterol by some culture of lactic acid bacteria and bifidobacteria. Biotechnology letters. 1992;14(1):39-44.
163. Liong M, Shah N. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. International Dairy Journal. 2005;15(4):391–8.
164. Lye HS, Rusul G, Liong MT. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. Journal of dairy science. 2010;93(4):1383-92. Epub 2010/03/27.
165. Li G. Intestinal probiotics: ınteractions with bile salts and reduction of cholesterol. Environmental Science. 2012;12:1180–6.
166. Al-Saleh AA, Metwalli AAM, Abu-Tarboush HM. Bile Salts and Acid Tolerance and Cholesterol Removal from Media by some Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. 2006.
167. Michael DR, Moss JW, Calvente DL, Garaiova I, Plummer SF, Ramji DP. Lactobacillus plantarum CUL66 can impact cholesterol homeostasis in Caco-2 enterocytes. Beneficial microbes. 2016;7(3):443-51. Epub 2016/02/04.
168. Mirlohi M, Madany G, Hassanzadeh A, Yahay MJ. On the Colorimetric Method for Cholesterol Determination in the Laboratory Media. International Journal of Biological Chemistry. 2012;6(1):37-41.
169. Σταυρόπουλος Χ. In vitro μελέτη βιολογικών δραστηριοτήτων των υποψήφιων προβιοτικών στελεχών που έχουν απομονωθεί από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών νεογνών: Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο; 2018.
170. Μουρτζίνη Α. Έλεγχος προβιοτικών ιδιοτήτων σε στελέχη που έχουν απομονωθεί από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών νεογνών. [Μεταπτυχιακή Εργασία, ΠΜΣ Εφαρμοσμένης Διαιτολογίας – Διατροφής]. In press.