



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Σχολή Επιστημών Υγείας & Αγωγής

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής

ΠΜΣ: Εφαρμοσμένης Διαιτολογίας - Διατροφής

Κατεύθυνση: Μοριακή Διατροφή

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

Διπλωματική Εργασία

Κατσαντώνη Ειρήνη

Αθήνα, 2018



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Σχολή Επιστημών Υγείας & Αγωγής

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας- Διατροφής

ΠΜΣ « Εφαρμοσμένη Διαιτολογία – Διατροφή»

Κατεύθυνση: Μοριακή Διατροφή

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

(Επιβλέπουσα) Αδαμαντίνη Κυριακού
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Μικροβιολογίας, Χαροκόπειο
Πανεπιστήμιο

Ελισάβετ Φραγκοπούλου
Επίκουρη καθηγήτρια, Τμήμα Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Νικόλαος Καλογερόπουλος
Καθηγητής, Τμήμα Χημείας Τροφίμων και Περιβάλλοντος, Χαροκόπειο
Πανεπιστήμιο

Η Κατσαντώνη Ειρήνη δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

Στον σύζυγό μου Τάσο και στην κόρη μου Βάλια που χωρίς την αγάπη και τη συνεχή υποστήριξη τους θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιηθεί αυτή η διπλωματική εργασία.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά, την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Αδαμαντίνη Κυριακού, που μου ανέθεσε ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα για διπλωματική εργασία. Ακόμη περισσότερο για την συμβολή και την καθοδήγηση καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής καθώς και τις πολύ ενδιαφέρουσες συζητήσεις πάνω στο θέμα των προβιοτικών και του μικροβιώματος .

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην Δρ. Μαρία Κώτσου, για την πολύ μεγάλη συνεισφορά της στη πραγματοποίηση αυτής της διπλωματικής σε κόπο, χρόνο και καθοδήγηση τόσο στο πειραματικό, όσο και στο συγγραφικό κομμάτι. Χωρίς την βοήθεια της η διπλωματική αυτή θα ήταν πολύ δύσκολο να πραγματοποιηθεί.

Επίσης ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα και μέλος ΕΤΕΠ του ΕΒΒΙΦΑΜ κ. Ευδοκία Μήτσου για την βοήθεια της στο πειραματικό μέρος και την στατιστική ανάλυση και το μέλος ΕΤΕΠ του ΕΒΒΙΦΑΜ κ. Γιώτα Λιανέα για την βοήθεια και την υποστήριξη στο πειραματικό μέρος της διπλωματικής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής κ. Φραγκοπούλου Ελισάβετ και κ. Νικόλαο Καλογερόπουλο για τις πολύ σημαντικές παρατηρήσεις τους πάνω στο κείμενο της εργασίας αυτής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη στα Ελληνικά.....	σ.8
Περίληψη στα Αγγλικά.....	σ.10
Κατάλογος Εικόνων.....	σ.12
Κατάλογος Πινάκων.....	σ.13
Συντομογραφίες.....	σ.14
Εισαγωγή.....	σ.15
1. Προβιοτικά στελέχη.....	σ.15
1.1 Ορισμός προβιοτικού στελέχους.....	σ.15
1.2 Γένη κύριων προβιοτικών στελεχών.....	σ.16
1.3 Κριτήρια επιλογής προβιοτικού στελέχους.....	σ.17
1.4 Υπό μελέτη προβιοτικές ιδιότητες.....	σ.19
1.4.1 Προσκόλληση στο εντερικό επιθήλιο.....	σ.19
1.4.2 Επίδραση στην παραγωγή κυτταροκινών (IL6).....	σ.22
1.4.3 Ανθεκτικότητα στο pH	σ.24
1.4.4. Ανθεκτικότητα στα χολικά οξέα	σ.25
1.4.5. Έλεγχος για την παρουσία υδρολάσης των χολικών (BSH).....	σ.25
1.5 Πηγές απομόνωσης προβιοτικών στελεχών	σ.27
1.5.1 Γαλακτοκομικά προϊόντα και σχετιζόμενα με αυτά.....	σ.27
1.5.2 Μητρικό γάλα.....	σ.28
1.5.3. Γαστρεντερικός σωλήνας ανθρώπου.....	σ.29
1.5.4 Γαστρεντερικός σωλήνας ζώων.....	σ.29
1.5.5 Μη καθεωρωμένες πηγές απομόνωσης προβιοτικών.....	σ.29
1.6 Οφέλη υγείας διαφόρων προβιοτικών στελεχών	σ.31
1.7 Πιθανοί μηχανισμοί δράσης προβιοτικών.....	σ.38
2. Ο μικροβιόκοσμος στο ανθρώπινο σώμα.....	σ.43
2.1 Σύσταση μικροβιόκοσμου στο ανθρώπινο σώμα.....	σ.43
2.2 Σύσταση μικροβιόκοσμου στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα.....	σ.44

2.3	Σύσταση μικροβιόκοσμου στο παχύ έντερο.....	σ.45
2.4	Ορισμός δυσβίωσης στο έντερο.....	σ.47
Σκοπός.....		σ.48
ΚΕΦ.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....		σ.49
Προέλευση υποψήφιων προβιοτικών στελεχών του γένους <i>Lactobacillus</i>		σ.49
1.1	Έλεγχος ικανότητας προσκόλλησης των στελεχών λακτοβακίλλων σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2).....	σ.49
1.2	Έλεγχος ανθεκτικότητας στο pH των στελεχών λακτοβακίλλων.....	σ.50
1.3	Έλεγχος ανάπτυξης σε χολικά οξέα των στελεχών λακτοβακίλλων.....	σ.51
1.4	Έλεγχος της επίδρασης στελεχών λακτοβακίλλων στην παραγωγή κυτταροκίνης IL-6 μετά από επώαση με επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco2).....	σ.52
1.5	Έλεγχος δράσης υδρολάσης των χολικών οξέων στα στελέχη λακτοβακίλλων.....	σ.54
ΚΕΦ.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....		σ.55
2.1	Έλεγχος προσκόλλησης των στελεχών σε κυτταρικές σειρές Caco-2.....	σ.55
2.2	Έλεγχος ανθεκτικότητας στο pH των στελεχών λακτοβακίλλων.....	σ.55
2.3	Έλεγχος αύξησης παρουσία χολικών οξέων των στελεχών λακτοβακίλλων.....	σ.55
2.4	Έλεγχος της επίδρασης των στελεχών λακτοβακίλλων στην παραγωγή κυτταροκίνης IL-6 από επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco2).....	σ.56
ΚΕΦ.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		
3.1	Έλεγχος ικανότητας προσκόλλησης των στελεχών λακτοβακίλλων σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco2).....	σ.57
3.2	Έλεγχος ανθεκτικότητας στο pH των στελεχών λακτοβακίλλων.....	σ.58
3.3	Έλεγχος ανάπτυξης παρουσία χολικών οξέων των στελεχών λακτοβακίλλων.....	σ.59
3.4	Έλεγχος της επίδρασης των στελεχών λακτοβακίλλων στην παραγωγή κυτταροκίνης IL-6 από επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco2).....	σ.60
3.5	Έλεγχος δράσης υδρολάσης των χολικών οξέων των υπό μελέτη στελεχών.....	σ.61

ΚΕΦ.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	σ.62
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΜΕΘΟΔΟΥ	σ.67
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	σ.69
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	σ.70

Περίληψη στα ελληνικά

Εισαγωγή: Τα προβιοτικά στελέχη είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν οφέλη υγείας στον ξενιστή. Για να θεωρηθεί ένα στέλεχος ενός μικροοργανισμού προβιοτικό πρέπει να έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Τα κριτήρια επιλογής ενός προβιοτικού στελέχους είναι τόσο κριτήρια που αφορούν την ασφάλεια και τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά όσο και επιθυμητά κριτήρια που αφορούν την λειτουργικότητα και την φυσιολογική δράση. Πολύ σημαντικές ιδιότητες για την αρχική επιλογή ενός προβιοτικού στελέχους θεωρούνται η φαινοτυπική και γονοτυπική σταθερότητα, η επιβίωση και ανάπτυξη σε όξινο περιβάλλον και σε χολικά οξέα, η ικανότητα να προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο, η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, η ικανότητα να αναστέλλουν γνωστά παθογόνα και η ευαισθησία τους στα αντιβιοτικά. Από τις επιθυμητές ιδιότητες είναι η δυνατότητα τροποποίησης της ανοσολογικής απόκρισης, ο μεταβολισμός της χοληστερόλης μέσω της δράσης υδρολάσης των χολικών οξέων και ο μεταβολισμός της λακτόζης.

Κύριες πηγές απομόνωσης των προβιοτικών στελεχών αποτελούν ο γαστρεντερικός σωλήνας του ανθρώπου και των ζώων, τα γαλακτοκομικά προϊόντα και σχετιζόμενα με αυτά, το μητρικό γάλα, καθώς και άλλες μη καθιερωμένες πηγές απομόνωσης.

Σκοπός: Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό να διερευνήσει πιθανές προβιοτικές δράσεις στελεχών του γένους *Lactobacillus* τα οποία έχουν απομονωθεί από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών τελειόμηνων βρεφών. Τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη ανήκουν τα είδη *L.rhamnosus*, *L.acidophilus* και *L.salivarius*, ενώ οι προβιοτικές ιδιότητες για τις οποίες θα εξεταστούν είναι η *in vitro* ικανότητα προσκόλλησης σε κύτταρα της κυτταρικής σειράς Caco2 καθώς και η επίδραση τους σε αυτά ως προς την έκκριση της κυτταροκίνης IL-6, η ανθεκτικότητα στο pH και στα χολικά άλατα και η δράση υδρολάσης των χολικών οξέων.

Υλικά-μέθοδοι: Δύο στελέχη *L.acidophilus* (AnLb6 και AnLb17), δύο στελέχη *L.ramnosus* (AnLb46 και AnLb52) και ένα στέλεχος *L.salivarius* (AnLb44), τα οποία έχουν απομονωθεί από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών νεογνών και ανήκουν στη συλλογή του ΕΒΒΙΦΑΜ εξετάστηκαν για προβιοτικές ιδιότητες. Μαζί με αυτά τα στελέχη ελέγχθηκε και το γνωστό στέλεχος *L.acidophilus* DSMZ 20079 το οποίο σε κάποιες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε ως

στέλεχος ελέγχου. Ενεργοποιημένες καλλιέργειες από τα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις δοκιμασίες των προβιοτικών ιδιοτήτων.

Για την δοκιμασία της προσκόλλησης ενεργοποιημένες καλλιέργειες των στελεχών επώαστηκαν με επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2) για 1,5h και στη συνέχεια έγινε χρώση Gram ώστε να είναι δυνατή η καταμέτρηση της προσκόλλησης μικροσκοπικά. Τα αποτελέσματα της προσκόλλησης συγκρίθηκαν με το στέλεχος DSMZ 20079 που δεν εμφανίζει ικανότητα προσκόλλησης.

Για την δοκιμασία της επίδρασης των στελεχών σε κύτταρα Caco2 ως προς την έκκριση της IL-6 και την βιωσιμότητα, έγινε συνεπώαση των κυττάρων με τα πιθανά προβιοτικά στελέχη για 2 ώρες. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο και στα δείγματα που προέκυψαν μετρήθηκε η συγκέντρωση ιντερλευκίνης- 6 (IL-6) από τα κύτταρα, με τη μέθοδο ELISA. Ακόμα, υπολογίστηκε η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την επώαση τους με τα προβιοτικά με τη μέθοδο trypan-blue. Για την δοκιμασία ανθεκτικότητας στο pH έγινε επώαση των στελεχών για 1,5 και 3 ώρες σε συνθήκες pH 2 και 3. Για την δοκιμασία της ικανότητας αύξησης παρουσία χολικών οξέων έγινε επώαση των στελεχών σε θρεπτικό μέσο MRS Broth που περιείχε Oxgall 0.3 % για 24 ώρες. Για την δοκιμασία της δράσης υδρολάσης έγινε επώαση των στελεχών σε θρεπτικό υλικό που περιείχε MRS agar με 0.5 % (w/v) sodium taurodeoxycholate για 72 ώρες.

Αποτελέσματα: Από τα υπό μελέτη στελέχη ικανότητα προσκόλλησης εμφάνισαν τα στελέχη *L. acidophilus* 6 και 17 και *L. salivarius* 44. Ως προς την έκκριση της IL-6 από τα κύτταρα Caco2 μετά από την συν-επώαση με τα υποψήφια προβιοτικά, κανένα στέλεχος δεν εμφάνισε σημαντική διαφορά σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα. Ως προς την αντοχή στο pH όλα τα στελέχη εμφανίστηκαν ανθεκτικά στο pH3 εκτός από το στέλεχος AnLb 17 που στις 3 ώρες μειώθηκε σημαντικά η συγκέντρωσή του ενώ κανένα δεν εμφάνισε ανθεκτικότητα στο pH2. Από τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη, ικανότητα αύξησης παρουσία χολικών οξέων εμφάνισαν τα AnLb 6, 17 και 52 ενώ το AnLb 52 εμφάνισε ικανότητα αύξησης ίδια με του μάρτυρα. Ως προς την δράση υδρολάσης των χολικών οξέων κανένα από τα υπό μελέτη στελέχη δεν εμφάνισε δράση υδρολάσης ενώ εμφάνισε το στέλεχος DSMZ 20079 γεγονός που συμφωνεί με τη διεθνή βιβλιογραφία .

Συμπεράσματα: Από τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη τα *L.acidophilus* AnLb 6, *L.acidophilus* AnLb 17 και το *L.ramnosus* AnLb 52 εμφανίζονται θετικά στις περισσότερες προβιοτικές ιδιότητες χωρίς να εμφανίζουν κυτταροτοξικότητα για τα κύτταρα του επιθηλίου του εντέρου.

Το AnLb 44 επίσης είναι θετικό σε ίδιο αριθμό ιδιοτήτων αλλά δεν εμφανίζει ικανότητα ανάπτυξης παρουσία χολικών οξέων που είναι πολύ σημαντική προβιοτική ιδιότητα. Τα στελέχη αυτά χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Λέξεις κλειδιά: Προβιοτικές ιδιότητες, λακτοβάκιλλοι, προσκόλληση, κυτταροκίνες, υδρολάση χολικών οξέων.

Περίληψη στα αγγλικά

Introduction: Probiotics are live microorganisms that when are given in adequate amounts they confer health benefits to the host. In order to be evaluated as probiotic, the strain of a microorganism must have specific features. The selection criteria for a probiotic strain are essential criteria regarding safety and technological features, as well as desired features regarding functionality and physiological activity. Very important traits for the initial selection of a probiotic strain are considered the phenotypic and genotypic stability, the survival and growth in acidic environment and in bile acids, the ability to adhere to the enteric epithelium, the production of antimicrobial substances, the ability to inhibit known pathogens and antibiotic susceptibility patterns. Some of the desired traits are, the modulation of the immune response through the cytokine production, the cholesterol metabolism through the hydrolase of bile salt (BSH) activity and the lactose metabolism.

The main sources of isolation of probiotic strains are the intestinal track of humans and animals, the dairy products, the human breast milk, as well as non conventional sources of isolation.

Purpose: The purpose of this study is to investigate the possible probiotic traits of *Lactobacillus* strains, isolated from the fecal microbiota of healthy full term infants. The candidate probiotic strains have been classified as *L.rhamnosus*, *L.acidophilus* and *L.salivarius* and they were tested for their ability to adhere on Caco2 cells, as well as their effect on IL-6 production and cell viability, their resistance in extreme pH and bile acids and the bile salt hydrolase activity.

Materials and methods: Two strains of *L.acidophilus* (AnLb6 and AnLb17), two strains of *L.rhamnosus* (AnLb46 and AnLb52) and one strain of *L.salivarius* (AnLb44), isolated from the gut microbiota of healthy full term infants, belonging to the collection of Biology, Biochemistry and Human and Microorganisms Physiology Laboratory where tested for probiotic traits.

Together with these strains was also tested the *L.acidophilus* DSMZ 20079, which was used as control strain. Activated cultures from the strains were used in all the trials of the probiotic traits.

For the adherence trial activated cultures of the strains were incubated with cells from intestinal epithelium (Caco2) for 1.5h and then they were stained with Gram stain in order to count the adherent microbial cells by microscope.

For the IL-6 production by Caco-2 cells, and also Caco-2 viability, cells were co-incubated with lactobacilli for 2 hours. IL-6 levels were measured by ELISA in the supernatants and the viability of the Caco2 cells was measured using the trypan blue method. For the pH resistance the strains were incubated for 1.5h and 3 h under pH2 and pH 3 conditions. For the growth capacity in bile acids the strains were incubated in MRS Broth medium and MRS Broth supplemented with 0.3% Oxgall for 24 h. For the BSH activity the strains were incubated in MRS Agar medium supplemented with 0.5 % (w/v) sodium taurodeoxycholate for 72 h.

Results: From all the tested strains, only the strains *L.acidophilus* AnLb 6, 17 and *L.salivarius* AnLb44 were found adherent to Caco-2 cells. There was no significant difference regarding the IL-6 production or the cells viability compared to the negative control. All the tested strains except AnLb17 were found resistant to pH3, but no one was resistant to pH2. The isolates AnLb 6, 17 and 52 show growth capacity in bile acids, while we have not noticed BSH activity in any tested strain. The control strain DSMZ 20079 was found positive for BSH activity, which is in accordance with previous studies.

Conclusions: The potential probiotic strains of *L.acidophilus* AnLb 6, *L.acidophilus* AnLb 17 and *L.rhamnosus* AnLb 52 were found positive for the most tested probiotic traits. Also, *L.salivarius* AnLb 44 was positive for the same traits but, it doesn't show growth capacity in bile acids. These strains could be further tested as potential probiotics.

Keywords: Probiotic traits, Lactobacillus, adherence, cytokines, bile salt hydrolase.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1 Η επίδραση της IL-6 σε διάφορους τύπους κυττάρων και οι παθολογικές καταστάσεις που προκαλούνται από την χρόνια παραγωγή της.(Toshio Tanaka et al. Cold Spring Harb Perspect Biol 2014;6:a016295).....	σ.24
Εικ.2. Πηγές απομόνωσης προβιοτικών στελεχών και διαδικασία ταυτοποίησης, χαρακτηρισμού και απόδοσης ισχυρισμών υγείας μέσω κλινικών δοκιμών.(Luis Fontana et al, 2013).....	σ.28
Εικ.3 Διάγραμμα των προβιοτικών πηγών και των κριτηρίων επιλογής για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν από ανθρώπους και ζώα (Sirilun S et al. 2010)	σ.30
Εικ.4 Πιθανοί μηχανισμοί δράσης προβιοτικών (Bermudez-Brito, M et.al 2012).....	σ.39
Εικ.5 Παρεμβάσεις για την τροποποίηση εντερικού μικροβιώματος για την επίτευξη αύξηση της ποικιλότητας του και καλύτερης υγείας. Fecal microbiota transplantation: μεταμόσχευση μικροβιώματος κοπράνων, Probiotics: προβιοτικά, Prebiotics: πρεβιοτικά, Postbiotics: μεταβιοτικά (Vieira, Fukumori and Ferreira, 2016.....	σ.41
Εικ.6 Παρεμβάσεις τροποποίησης του μικροβιώματος έτσι ώστε να επιτυγχάνουμε θετικά οφέλη υγείας κατά τα διάφορα ηλικιακά επίπεδα (Vieira, Fukumori and Ferreira, 2016).....	σ.42
Εικ.7 Ανατομία του βλεννογόνου του εντέρου (Pearson education inc. 2011).....	σ.45
Εικ. 8 Δυσβίωση: συνιστάται στην αύξηση των παθογόνων πληθυσμών, σε μειωμένη ποικιλότητα και μείωση των μικροβίων που προσφέρουν οφέλη υγείας στον ξενιστή (Petersen and Round, 2014).....	σ.48
Εικ.9 Αύξηση των στελεχών λακτοβακίλλων σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με sodium taurodeoxycholate	σ.62

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίν.1: Απαιτούμενα και επιθυμητά κριτήρια για την επιλογή προβιοτικών στελεχών (Vasiljevic and Shah, 2008).....	σ.18
Πίν.2: Προβιοτικά στελέχη και ισχυρισμοί υγείας αυτών.....	σ.32
Πιν.3 Φυλογενετική ταξινόμηση των κυριότερων Φύλων, Κλάσεων και Γενών του μικροβιόκοσμου του εντέρου.....	σ.46
Πίνακας 4. Καταμέτρηση των πληθυσμών των λακτοβακίλλων που παραμένουν προσκολλημένοι στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου†	σ.57
Πίνακας 5 Καταμέτρηση των πληθυσμών των λακτοβακίλλων (log10 cfu/mL) μετά από παραμονή σε ακραίες τιμές pH (pH=2, pH=3)υ† cfu/ml σε t= 0 h, t= 1,5 h και t= 3 h.....	σ.58
Πίνακας 6. Καταμέτρηση των πληθυσμών των λακτοβακίλλων (log10 cfu/mL) μετά από ανάπτυξη σε υπόστρωμα με χολικά άλατα†.....	σ.59
Πίνακας 7. Παραγωγή IL-6 μετά από επώαση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (Caco-2) με τα στελέχη των λακτοβακίλλων†.....	σ.60
Πίνακας 8. Δραστικότητα BSH των στελεχών DSMZ 20079, <i>L.plantarum</i> 299v και <i>L.plantarum</i> VSL#3.....	σ.66
Πίνακας 9 Συνολικό προφίλ προβιοτικών ιδιοτήτων των υπό μελέτη λακτοβακίλλων.....	σ.69

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

LAB	Lactic Acid Bacteria
WGSM	Whole-Genome Shotgun Metagenomic Sequencing
NSG	Next Generation Sequencing
LPS	Lipopolysaccharide
SIBO	Small Bacterial Overgrowth
TLRs	Toll-like receptors
SigA	Εκκριτική IgA
BSH	Bile Salt hydrolase
PBS	Phosphate Buffered Saline
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Minimal (essential medium)
CFU	Colony forming Units
EBBIΦAM	Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών

Εισαγωγή

1. Προβιοτικά στελέχη

2.1 Ορισμός προβιοτικού στελέχους

Η ετυμολογία του όρου προβιοτικό προέρχεται από τα συνθετικά “pro” που είναι Λατινική πρόθεση και σημαίνει για και του ελληνικού επιθέτου “βιωτικός” και σημαίνει ότι το συγκεκριμένο στοιχείο μπορεί να προσφέρει προσαρμοστικότητα στις συνθήκες διαβίωσης (1). Πατέρας των σύγχρονων προβιοτικών θεωρείται ο βραβευμένος με Nobel Eli Metchnikoff ο οποίος στο βιβλίο του *The Prolongation of Life* παρατήρησε ότι υπήρχαν βακτήρια στα ζυμωμένα γαλακτοκομικά προϊόντα που παρείχαν οφέλη υγείας σε όσους τα καταλάωναν. Τις τελευταίες δεκαετίες υπάρχει ένα ολοένα αναπτυσσόμενο ενδιαφέρον πάνω στην βασική και κλινική μελέτη των προβιοτικών που έχει ως αποτέλεσμα πάνω από 18000 δημοσιεύσεις στην βιοιατρική βιβλιογραφία ενώ από το 2001-2011 δεκαπλασιάστηκε ο αριθμός τους και κάποιες από αυτές σε επιστημονικά περιοδικά με υψηλή σειρά κατάταξης(2).

Ο όρος προβιοτικό υιοθετήθηκε για πρώτη φορά το 2001 από τον WHO (World Health Organization) και τον FAO (Food and Agricultural Organization) μετά από διαβούλευση των ειδικών των δύο οργανισμών. Έτσι καθορίστηκε ότι αφορά ζωντανούς μικροοργανισμούς οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν οφέλη υγείας στον ξενιστή(3) ενώ το 2002 έγινε η πρώτη προσπάθεια να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών με την έκδοση των οδηγιών *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food* (4). Η προσπάθεια αυτή είχε σαν στόχο να χαρακτηρισθούν καλύτερα οι διαδικασίες για την τεκμηρίωση των ισχυρισμών υγείας. Το 2013 οι εξελίξεις στην έρευνα των προβιοτικών οδήγησαν σε νέα διαβούλευση ειδικών υπό την αιγίδα του ISAPP (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) στο Ηνωμένο Βασίλειο όπου έγιναν περαιτέρω διευκρινήσεις στον καθορισμό του όρου προβιοτικό τον Ιούλιο του 2014 (5). Σύμφωνα με τα τελευταία δεδομένα :

- για την απόδειξη των ισχυρισμών υγείας απαιτούνται ελεγχόμενες μελέτες με καθορισμένο πλαίσιο,
- κάθε ισχυρισμός υγείας σε ένα προϊόν πέρα από το «περιέχει προβιοτικά» πρέπει να τεκμηριώνεται,
- οι ζωντανές καλλιέργειες από τα παραδοσιακά ζυμωμένα τρόφιμα που δεν υπάρχουν αποδείξεις για οφέλη υγείας δεν περιλαμβάνονται στο πλαίσιο των προβιοτικών,

- τα FMT (faecal microbiota transplants) επίσης δεν περιλαμβάνονται στο πλαίσιο των προβιοτικών καθώς δεν περιέχουν καθορισμένα στελέχη βακτηρίων αλλά μείγματα από διάφορα στελέχη βακτηρίων, ζυμών, παρασίτων και ιών.
- ενώ νέα στελέχη βακτηρίων που απομονώνονται από ανθρώπινα δείγματα και έχουν επαρκή στοιχεία για ασφάλεια και αποτελεσματικότητα θεωρούνται προβιοτικά.

Επειδή ο όρος προβιοτικό υπό αυτή την έννοια εμπερικλείει ισχυρισμό υγείας ο EFSA (European Food Safety Authority) δεν τον έχει δεχτεί καθώς θεωρεί ότι το ισχυριζόμενο αποτέλεσμα δεν είναι μετρήσιμο λόγω του γεγονότος ότι η εμπορευματοποίηση των προϊόντων με προβιοτικά γίνεται χωρίς να έχει δοθεί ο κατάλληλος χρόνος για να τεκμηριωθούν τα αποτελέσματα(6).

Για αυτό το λόγο κανένα προβιοτικό δεν έχει τεκμηριώσει ισχυρισμούς υγείας στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

Όμως, οι ισχυρισμοί υγείας όπως η θεραπεία συγκεκριμένων παθήσεων με προβιοτικά είναι μετρήσιμοι και μπορούν να αποδειχθούν με μελέτες παρόμοιου τύπου με αυτές που γίνονται για τα φάρμακα (διπλά-τυφλές, τυχαιοποιημένες, ασθενούς-μάρτυρα, ελεγχόμενες με placebo μελέτες σε ανθρώπους).

1.2 Γένη κύριων προβιοτικών στελεχών

Τα στελέχη των βακτηρίων που έχουν δείξει μέχρι τώρα οφέλη υγείας και θεωρούνται ότι έχουν προβιοτικές ιδιότητες ανήκουν κυρίως στα εξής γένη (7):

- *Lactobacillus*,
- *Bifidobacterium* ,
- *Enterococcus*,
- *Streptococcus*,
- *Pediococcus*,
- *Leuconostoc*,
- *Bacillus*,
- και στο είδος *Escherichia coli*

Τα περισσότερα από αυτά ανήκουν στα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB). Επίσης στελέχη της ζύμης *Saccharomyces* έχουν χαρακτηριστεί ως προβιοτικά.

Η εξέλιξη των τεχνικών ταυτοποίησης των προβιοτικών ειδών έδωσε πολύ μεγαλύτερη ώθηση στην έρευνα πάνω στα προβιοτικά καθώς η βιολογική τους δράση είναι εξειδικευμένη ανά στέλεχος. Μοριακές τεχνικές όπως η Next Generation Sequencing (NSG) και η αλληλούχηση του 16S ριβοσωμικού RNA (για τη φυλογενετική ανίχνευση του στελέχους) βοήθησαν σημαντικά στην ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν. Επίσης με τη Whole-Genome Shotgun Metagenomic Sequencing (WGSM) (όπου μπορούμε να ανιχνεύσουμε το σύνολο του γονιδιώματος του μικροβιώματος και παράλληλα να βρούμε και την λειτουργικότητα του μέσω της μελέτης του γονιδιώματος) έγινε δυνατό να μελετηθούν τόσο μεγάλοι πληθυσμοί δειγμάτων (16S RNA Sequencing) όσο και να γίνει πολύ λεπτομερής ανάλυση του μικροβιώματος (WGSM) (9).

1.3 Κριτήρια επιλογής προβιοτικού στελέχους

Για να θεωρηθεί ένα μικροβιακό στέλεχος προβιοτικό πρέπει να έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Τα κριτήρια επιλογής ενός προβιοτικού στελέχους είναι τόσο απαραίτητα κριτήρια που αφορούν την ασφάλεια και τα τεχνολογικά χαρακτηριστικά όσο και επιθυμητά κριτήρια που αφορούν την λειτουργικότητα και την φυσιολογική δράση (10,11,) όπως φαίνεται στον Πίνακα 1 . Πολύ σημαντικές ιδιότητες για την αρχική επιλογή ενός προβιοτικού στελέχους θεωρούνται η φαινοτυπική και γονοτυπική σταθερότητα καθώς και η πλασμιδιακή, η επιβίωση και ανάπτυξη σε όξινο περιβάλλον και σε χολικά οξέα, η ικανότητα να προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο, η παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών, η ικανότητα να αναστέλλουν τα γνωστά παθογόνα και πρότυπα αντίστασης στα αντιβιοτικά (12). Από τις επιθυμητές ιδιότητες είναι η τροποποίηση της ανοσολογικής απόκρισης μέσω της παραγωγής κυτταροκινών (13), ο μεταβολισμός της χοληστερόλης μέσω της δράσης υδρολάσης των χολικών οξέων(14) και ο μεταβολισμός της λακτόζης(11).

Πίνακας 1. Απαιτούμενα και επιθυμητά κριτήρια για την επιλογή προβιοτικών στελεχών (Vasiljevic and Shah, 2008)

Κριτήρια	Ιδιότητα
Κριτήρια ασφάλειας	Προέλευση Παθογένεση και μολυσματικότητα Τοξικότητα Μεταβολική δραστηριότητα και αντίσταση στα αντιβιοτικά
Τεχνολογικά κριτήρια	Γενετικά σταθερά στελέχη Επιθυμητή βιωσιμότητα κατά την επεξεργασία και την αποθήκευση Καλές αισθητικές ιδιότητες Αντίσταση στους φάγους Δυνατότητα για παραγωγή μεγάλης κλίμακας
Λειτουργικά κριτήρια	Αντοχή στα γαστρικά οξέα και χυμούς Αντοχή στα χολικά οξέα Προσκόλληση στους βλεννογόνους Αξιολογημένα και επιβεβαιωμένα οφέλη υγείας
Επιθυμητά κριτήρια φυσιολογίας	Ανοσορύθμιση Ανταγωνιστική δράση στα παθογόνα π.χ. <i>Helicobacter pylori</i> Μεταβολισμός της χοληστερόλης και λακτόζης Αντιμεταλλαξογόνες και αντικαρκινικές ιδιότητες

Μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι τα προβιοτικά ασκούν την βιολογική δράση τους μέσω του αποικισμού του γαστρεντερικού σωλήνα και με αυτό τον τρόπο κάνουν τροποποίηση του εντερικού μικροβιώματος. Για αυτό το λόγο η ιδιότητα της προσκόλλησης στο εντερικό επιθήλιο θεωρούνταν μία από τις πιο σημαντικές. Η συγκεκριμένη θεωρία έχει όμως καταρριφθεί καθώς συγκεκριμένα προβιοτικά όπως ο *Lactobacillus casei* και το *Bifidobacterium animalis* δεν χρειάζεται να αποικίσουν τον γαστρεντερικό σωλήνα ώστε να εξασκήσουν την δράση τους όπως χρειάζεται για το *Bifidobacterium longum* and *Bacteroides thetaiotaomicron* (15).

Για να μπορέσει τέλος ένα στέλεχος να θεωρηθεί προβιοτικό και να βγει σαν εμπορικό προϊόν στην αγορά πρέπει να ολοκληρωθούν τα παρακάτω βήματα (11):

- Ταυτοποίηση του στελέχους
- Λειτουργικός χαρακτηρισμός που περιλαμβάνει δοκιμασίες *in vitro* και/ή *in vivo*.
- Αξιολόγηση της ασφάλειας με *in vitro* και/ή *in vivo* δοκιμασίες και κλινικές δοκιμές Φάσης I σε ανθρώπους.
- Αξιολόγηση αποδοτικότητας με κλινική δοκιμή Φάσης II με διπλά τυφλή, τυχαιοποιημένη, placebo-ελεγχόμενη.
- Αξιολόγηση αποτελεσματικότητας με κλινική δοκιμή Φάσης III όπου γίνεται διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του προβιοτικού σκευάσματος σε σχέση με υπάρχοντα φάρμακα για συγκεκριμένη ασθένεια.

1.4 Υπό μελέτη προβιοτικές ιδιότητες

1.4.1 Προσκόλληση στο εντερικό επιθήλιο

Η προσκόλληση στο εντερικό επιθήλιο θεωρούνταν μέχρι πρόσφατα η πιο σημαντική προβιοτική ικανότητα καθώς χωρίς αυτήν δεν είναι δυνατό τα προβιοτικά βακτήρια να αποικίσουν τον εντερικό σωλήνα (95).

Μία πρόσφατη συστηματική ανασκόπηση απέτυχε να αποδείξει ότι η δράση των προβιοτικών επιτυγχάνεται μέσω αποικισμού στον γαστρεντερικό σωλήνα(68). Παράλληλα σε μελέτες με λήψη προβιοτικών έγινε φανερό ότι μετά 1-2 εβδομάδες χωρίς λήψη προβιοτικού τα στελέχη πλέον δεν είναι ανιχνεύσιμα στα κόπρανα ενώ μπορούμε να τα ανιχνεύσουμε στον εντερικό βλεννογόνο για όχι πολύ μεγαλύτερο διάστημα (96).

Επίσης οι Ljungh et al. (97) παρατήρησαν ότι μόνο το 10% των τυχαία απομονωμένων λακτοβακίλλων από τον ανθρώπινο εντερικό βλεννογόνο εμφάνιζαν υψηλή προσκόλληση. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι η προσκόλληση είναι σημαντική για κάποια στελέχη του μικροβιόκοσμου και όχι για όλα.

Τα στελέχη όμως που εμφανίζουν έντονη προσκόλληση στο εντερικό επιθήλιο εμφανίζουν ταυτόχρονα άλλες σημαντικές ιδιότητες όπως η τροποποίηση της ανοσιακής απόκρισης. Στελέχη λακτοβακίλλων που παρουσιάζουν έντονη προσκόλληση μπορούν να επιφέρουν ενίσχυση της ανοσιακής απόκρισης με διάφορους τρόπους όπως με την αύξηση της δραστηριότητας των φαγοκυττάρων, ιδιότητα που είναι πολύ σημαντική σε άτομα με κατασταλμένο ανοσοποιητικό (98). Η ειδική εκκριτική IgA (SIgA), η οποία είναι υπεύθυνη για την διατήρηση των συμβιωτικών έξω από τον εντερικό φραγμό(99) αλλά και την αναγνώριση τους από το ανοσιακό σύστημα του οργανισμού και την παραγωγή αντιφλεγμονώδων κυτταροκινών(100) αυξάνει την ικανότητα σύνδεσης των προβιοτικών πάνω από 3 φορές (101). Αντίστροφα προβιοτικά στελέχη όπως τα *Lactobacillus* GG, *Bifidobacterium lactis* Bb-12 (102) και *Saccharomyces boulardii* (103) έχουν βρεθεί ότι αυξάνουν την παραγωγή της SIgA, ενώ άλλα έχουν βρεθεί να αυξάνουν την παραγωγή των TGF- β , IL-10 αλλά και της IL-6 που έμμεσα οδηγούν σε αύξηση της IgA (104-105), αυξάνοντας την ικανότητα τους να προσδένονται στο εντερικό επιθήλιο.

Επίσης η έντονη προσκόλληση στο επιθήλιο μπορεί να βοηθήσει ένα προβιοτικό στέλεχος να αποτρέψει την προσκόλληση ενός παθογόνου(106), αν και αυτό μπορεί να επιτευχθεί και με στελέχη που εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια στους υποδοχείς πρόσδεσης ή είναι σε μεγαλύτερη συγκέντρωση(107).

Ακόμα, τα στελέχη με έντονη προσκόλληση μπορούν να επισπεύσουν την επούλωση του εντερικού ιστού αφού ιστοί που είναι αποικισμένοι με λακτοβάκιλλους επουλώνονται πιο γρήγορα καθώς δεν μπορούν σε αυτούς να προσδεθούν παθογόνα στελέχη όπως το *Escherichia coli* και άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια που καθυστερούν την επούλωση τους (108). Τέλος πρέπει να δίνεται μεγάλη προσοχή σε στελέχη που δεν ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* που θεωρούνται ασφαλή, καθώς πολύ έντονη προσκόλληση στον εντερικό επιθήλιο ιδίως όταν υπάρχει λύση του εντερικού ιστού μπορεί να οδηγήσει σε παθογόνο δράση του στελέχους(110-111).

Τα πειραματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για την μελέτη της προσκόλλησης των προβιοτικών στον εντερικό βλεννογόνο είναι από απλές κυτταροκαλλιέργειες μόνης στιβάδας

που προσομοιάζουν στο εντερικό επιθήλιο μέχρι πολύπλοκα συστήματα που προσομοιάζουν στην λειτουργία ολόκληρου του γαστρεντερικού σωλήνα. Κάποια από τα μοντέλα αυτά είναι:

- Κυτταρικές σειρές από κύτταρα αδενοκαρκινώματος εντέρου που εκφράζουν χαρακτηριστικά των εντεροκυττάρων (130). Από αυτά τα Caco2 και HT29 είναι τα πιο χρησιμοποιημένα που εμφανίζουν ίδιες ιδιότητες με την διαφορά ότι τα HT29 είναι ένας περισσότερο ετερογενής πληθυσμός από κύτταρα που έχουν βλεννοεκκριτικές (κύτταρα Goblet), εντεροενδοκρινικές και απορροφητικές ιδιότητες (131) ενώ τα Caco2 είναι ένας ομοιογενής πληθυσμός κυττάρων (130). Οι κυτταρικές αυτές σειρές χρησιμοποιούνται ξεχωριστά ή καθεμία αν και έχουν αναπτυχθεί συνκαλλιέργειες Caco2/HT29 σε αναλογία 70/30 οι οποίες εμφανίζουν ξεχωριστά μορφολογικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που προσομοιάζουν καλύτερα το εντερικό επιθήλιο (132).
- Μοντέλα όπου έχουμε στάδια που προσομοιάζουν την λειτουργία του γαστρεντερικού συστήματος με χρήση των παραπάνω κυτταρικών σειρών όπως το σύστημα συνεχούς καλλιέργειας τριών σταδίων (133).
- Μη κυτταρικά μοντέλα όπου έχουμε χρήση μόνο της βλέννης του βλεννογόνου (134)

Στην παρούσα εργασία για την μελέτη της προσκόλλησης των προβιοτικών στελεχών χρησιμοποιήθηκαν τα Caco2 κύτταρα. Τα συγκεκριμένα κύτταρα εμφανίζουν διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά ανάλογα σε ποιο στάδιο καλλιέργειας βρίσκονται. Υπάρχουν τρία ξεχωριστά μορφολογικά και λειτουργικά στάδια ανάλογα με το στάδιο καλλιέργειας και αυτά είναι(135):

- το στάδιο μέχρι να γίνει 100% κάλυψη της επιφάνειας της κυτταροκαλλιέργειας (συρροή), όπου δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως η καλλιέργεια και τα κύτταρα είναι ομοιογενώς αδιαφοροποίητα.
- το στάδιο μετά την συρροή μεταξύ της 0 και 20^{ης} μέρας όπου τα κύτταρα είναι ανομοιογενώς πολωμένα και διαφοροποιημένα
- και μετά από 30 ημέρες όπου έχουμε ομοιογενή πόλωση και διαφοροποίηση σε όλη την καλλιέργεια και προσομοιάζουν στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου.

Στα ενδιάμεσα στάδια έχουμε πολύ μεγάλη ανομοιογένεια μεταξύ των κυττάρων της καλλιέργειας ως προς τις λειτουργικές ιδιότητες και την μορφολογία τους .

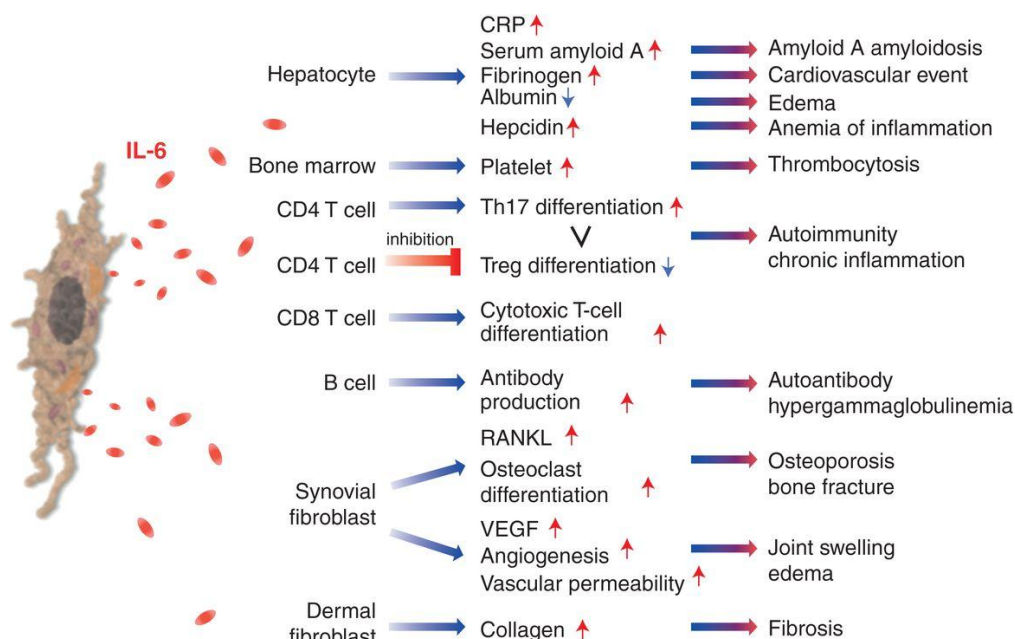
1.4.2 Επίδραση στην παραγωγή κυτταροκινών (IL6)

Ο βλεννογόνος του υγιούς εντέρου αποτελεί ένα φυσικό φραγμό για τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στον αυλό του εντέρου και έρχονται σε επαφή με αυτόν. Για τη λειτουργία του εντερικού φραγμού το ανοσοποιητικό σύστημα του εντέρου αλληλεπιδρά με τον μικροβιόκοσμο με αποτέλεσμα την έκκριση κυτταροκινών οι οποίες μεταφέρουν το σήμα του ερεθίσματος και τροποποιούν περαιτέρω το ανοσοποιητικό. Οι κυτταροκίνες είναι μόρια υπεύθυνα για την μεταγωγή σήματος σε διάφορες πορείες του ανοσοποιητικού συστήματος έχοντας προφλεγμονώδη ή αντιφλεγμονώδη δράση. Το ερέθισμα μπορεί να κατευθύνει την παραγωγή ανάλογων υποσυνόλων των T λεμφοκυττάρων (Th1, Th-2, Th-17/Treg17) καθώς και την παραγωγή αντισωμάτων από τα B λεμφοκύτταρα (128). Τα προβιοτικά στελέχη έχει βρεθεί ότι μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή κυτταροκινών σε κυτταροκαλλιέργειες ανθρώπινων λεμφοκυττάρων είτε προφλεγμονώδων που οδηγούν τα T λεμφοκύτταρα στην παραγωγή Th-1 είτε αντιφλεγμονώδων με παραγωγή Treg.(129). Όμως και άλλοι τύποι κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα του εντέρου όπως τα δενδριτικά, τα μονοκύτταρα και τα B λεμφοκύτταρα, ανταποκρίνονται στα ερεθίσματα από τους μικροοργανισμούς του εντέρου με αποτέλεσμα την παραγωγή κυτταροκινών.

Η παραγωγή των κυτταροκινών από τα προβιοτικά στελέχη αποτελεί ένα ιδιαίτερα αναπτυσσόμενο πεδίο έρευνας καθώς είναι φανερό ότι επηρεάζοντας την ανοσιακή απόκριση του εντέρου του ξενιστή (191-195) είναι δυνατό να έχουμε επίδραση και στην συστηματική ανοσιακή απόκριση(136) βελτιώνοντας την.

Μία από τις πιο σημαντικές προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες είναι η IL-6. Παράγεται στο εντερικό επιθήλιο κατά τα αρχικά στάδια μίας λοίμωξης από παθογόνα, είτε ως απόκριση σε καταστροφή του επιθηλιακού ιστού(137). Είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση του πυρετού που εμποδίζει τον πολλαπλασιασμό των παθογόνων και αυξάνει την παραγωγή των μορίων προσκόλλησης ώστε να μπορούν τα κύτταρα του ανοσοποιητικού να περνούν από τα αγγεία στην περιοχή της λοίμωξης και ενεργοποιεί και άλλους μηχανισμούς καταστροφής των παθογόνων(118).

Στην Εικ.1 φαίνεται η επίδραση που έχει η παραγωγή της IL-6 σε διάφορους τύπους κυττάρων καθώς και οι παθολογικές καταστάσεις που αναπτύσσονται όταν έχουμε παρατεταμένη παράγωγή της από κάποιο χρόνιο ερέθισμα.



Εικ.1 Η επίδραση της IL-6 σε διάφορους τύπους κυττάρων και οι παθολογικές καταστάσεις που προκαλούνται από την χρόνια παραγωγή της.(Toshio Tanaka et al. Cold Spring Harb Perspect Biol 2014 ;6:a016295)

Η IL-6 φαίνεται ότι εμφανίζει και αντιφλεγμονώδεις δράσεις στον οργανισμό (143-144) ενώ στο επίπεδο του εντερικού επιθηλίου εμφανίζει προστατευτικά αποτελέσματα στον βλεννογόνο και τα επιθηλιακά κύτταρα(145).

Μελέτες που έχουν γίνει ως προς την επαγωγή των υποσυνόλων των T λεμφοκυττάρων από την IL-6 έχουν δείξει ότι υπάρχει αλληλεπίδραση της IL-6 με άλλες παραγόμενες κυτταροκίνες για την προαγωγή του φλεγμονώδους φαινοτύπου ή όχι. Έτσι ο συνδυασμός της με την IL-23 έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή Th-17 τα οποία προκαλούν παθογονικό φαινότυπο όταν μεταφέρονται σε μη παχύσαρκα με τάση για διαβήτη ποντίκια, οδηγώντας στην ανάπτυξη διαβήτη τύπου 1 (139). Σε σχέση όμως με τον συνδυασμό της με τον αντιφλεγμονώδη παράγοντα TGF-β υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα(138) καθώς έχει βρεθεί ότι όταν έχουμε ταυτόχρονη παραγωγή του TGF- β τότε οδηγούμαστε σε επαγωγή των Treg17 ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων σε σχέση με τα κυτταροτοξικά Th-17(139,141) ή το αντίθετο(140).

Είναι όμως απαραίτητο να αποσαφηνιστεί ποιος μηχανισμός ισχύει καθώς η ανισορροπία σε συγκεκριμένα μονοπάτια μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη παθολογικών καταστάσεων. Η

ενίσχυση του μονοπατιού των Th-1 και Th-17 μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη αυτοάνοσων ιστοεξαρτώμενων ασθενειών όπως η αρθρίτιδα, η σκλήρυνση κατά πλάκας και ο διαβήτης τύπου 1, ενώ του Th-2 μπορεί να οδηγήσει σε αλλεργίες και συστηματικές αυτοάνοσες ασθένειες(129). Εφόσον αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός θα είναι δυνατό προβιοτικά στελέχη ανάλογα με το προφίλ κυτταροκινών που εμφανίζουν να μπορούν να επιλεγθούν για να επηρεάσουν ευνοϊκά παθολογικές καταστάσεις στις οποίες υπάρχει ανισορροπία μεταξύ των υποσυνόλων των T λεμφοκυττάρων.

Τα μοντέλα μελέτης της παραγωγής κυτταροκινών περιλαμβάνουν την χρήση Caco2 και HT29 κυττάρων(133), ανθρώπινων μονοκύτταρων περιφερικού αίματος (142,146)και μακροφάγων κύτταρων (147).

Μελέτη πάνω στην χρήση των Caco2 δείχνουν χαμηλή ή καθόλου παραγωγή κυτταροκινών σε απουσία λευκοκυττάρων , υποστηρίζοντας την αλληλεπίδραση των λευκοκυττάρων με το επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου(148).

1.4.3 Ανθεκτικότητα στο pH

Η ανθεκτικότητα στο pH αποτελεί μία πολύ σημαντική λειτουργική παράμετρο για τον έλεγχο ενός υποψήφιου προβιοτικού στελέχους διότι εάν το στέλεχος δεν εμφανίζει την αντίστοιχη ιδιότητα δεν θα είναι δυνατό να φτάσει στον εντερικό σωλήνα και να προσφέρει τα οφέλη υγείας στον ξενιστή. Κατά την διέλευση των προβιοτικών στελεχών από το στομάχι εκτίθενται σε συνθήκες pH πολύ χαμηλές, από 1,5 έως και 3 (112) ανάλογα με την ποσότητα της τροφής σε πρωτεΐνη από κρέας η οποία χαμηλώνει το pH. Επίσης τα στελέχη παραμένουν στο στομάχι από 2-6 ώρες (113) ανάλογα με την φυσιολογία του κάθε στομάχου. Είναι λοιπόν απαραίτητο να ελεγχθεί η σταθερότητα των στελεχών σε pH 2 για τουλάχιστον 2 ώρες (114). Στην περίπτωση που κάποιο στέλεχος δεν είναι ανθεκτικό σε αυτές τις συνθήκες θα πρέπει να ληφθούν τα απαραίτητα μέτρα τεχνολογικά, έτσι ώστε να προστατευτεί π.χ. με τον εγκλεισμό του σε εντεροδιαλυτή κάψουλα ώστε να μπορέσει να φτάσει στο έντερο με πλήρη δραστηριότητα(115).

1.4.4. Ανθεκτικότητα στα χολικά οξέα

Μία ακόμα συνθήκη στην οποία πρέπει να εμφανίζουν ικανότητα αντοχής τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη είναι στην επίδραση των χολικών οξέων (127). Η χολή της οποίας κύρια συστατικά είναι τα χολικά οξέα αποθηκεύεται στην χοληδόχο κύστη και από εκεί γίνεται η έκκριση της στο δωδεκαδάκτυλο ώστε να επάγουν τον μεταβολισμό των λιπών (116). Έτσι ξεκινάει μία διαβάθμιση κατά μήκος του εντέρου ως προς την συγκέντρωση χολικών αλάτων που κυμαίνεται μεταξύ 2% και 0,05%, η οποία είναι υπεύθυνη μεταξύ άλλων για την τροποποίηση του εντερικού μικροβιόκοσμου (117).

Τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη πρέπει να ελέγχονται λοιπόν για την ικανότητα τους να αναπτύσσονται παρουσία χολικών αλάτων και μάλιστα έχει βρεθεί ότι είναι απαραίτητο να μπορούν να διατηρούν αυτήν την ικανότητα όταν εκτίθενται σε Oxgall (σκεύασμα αφυδατωμένης χολής) 5% για 30 min το ελάχιστο (114).

1.4.5. Έλεγχος για την παρουσία υδρολάσης των χολικών (BSH)

Η χολή είναι ένα σύνθετο υγρό που περιέχει νερό, ηλεκτρολύτες, φωσφολιπίδια, διάφορα προϊόντα του μεταβολισμού όπως είναι η χολερυθρίνη αλλά και την περίσσεια της χοληστερόλης που πρέπει να αποβληθούν μέσω της γαστρεντερικής οδού. Επίσης περιέχει και τα χολικά οξέα τα οποία είναι υπεύθυνα για τον μεταβολισμό και την απορρόφηση των λιπών αλλά και των λιποδιαλυτών βιταμινών (150). Η χολή και τα χολικά οξέα συντίθενται στο συκώτι και κατά την περίοδο νηστείας του ανθρώπινου οργανισμού αποθηκεύεται στην χοληδόχο κύστη(151). Τα χολικά οξέα παράγονται από την χοληστερόλη ενώ κατά την παραγωγή τους γίνεται σύζευξη με τα αμινοξέα γλυκίνη και ταυρίνη, οπότε έχουμε τον σχηματισμό των συζευγμένων χολικών οξέων(152) ενώ υπάρχει σύστημα επαναπρόσληψης τους μέσω παθητικής διάχυσης και ενεργητικής μεταφοράς από το έντερο (150).

Τα συζευγμένα χολικά οξέα στο λεπτό έντερο μπορούν μέσω ενζύμων που εμφανίζουν δράση υδρολάσης των χολικών οξέων (Bile Salt Hydrolase - BSH) να αποσυζευχθούν παράγοντας μη συζευγμένα(153). Αυτά τα μη συζευγμένα χολικά οξέα μπορούν να μεταβολιστούν περαιτέρω από τον μικροβιόκοσμο του εντέρου σε δευτερογενή και τεταρτογενή χολικά οξέα.(153). Ύπαρξη τέτοιας ενζυμικής δράσης έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν σχεδόν όλα τα κύρια φύλα του εντερικού μικροβιόκοσμου καθώς η συγκεκριμένη δράση βοηθάει τα στελέχη να επιβιώσουν στο εχθρικό για αυτά περιβάλλον των χολικών οξέων(153) ενώ δεν υπάρχει σε φύλα που αναπτύσσονται εκτός του εντέρου(150). Οι BSHs έχει βρεθεί ότι είναι πιο αποτελεσματικές

στην αποσύζευξη των γλυκοσυζευγμένων χολικών οξέων από ότι των ταυροσυζευγμένων χολικών οξέων.

Δεν είναι ακριβώς γνωστή η λειτουργία των ενζύμων που λειτουργούν ως υδρολάσες των χολικών, αλλά υπάρχουν διάφορες υποθέσεις για τις επιδράσεις τους τόσο στον βακτηριακό πληθυσμό που φέρει τέτοια γονίδια όσο και στον ξενιστή τέτοιων μικροοργανισμών.

Οι πιθανές επιδράσεις στους μικροοργανισμούς του εντέρου είναι(150):

- Συνεισφορά στην διατροφική κατάσταση του οργανισμού με την απελευθέρωση και την διαθεσιμότητα τους για μεταβολισμό των αμινοξέων γλυκίνη και ταυρίνη.
- Βελτίωση της ποιότητας της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων που διαθέτουν BSHs με την εισαγωγή χοληστερόλης ή και χολικών οξέων σε αυτήν και συνεπώς αύξηση της ικανότητας τους για προσαρμογή στο εντερικό περιβάλλον
- Μείωση της τοξικότητας των συζευγμένων χολικών οξέων και ιδιαίτερα με γλυκίνη σε συνθήκες χαμηλού pH για τα βακτήρια. Έχει βρεθεί ότι οι BSHs έχουν μάλιστα αυξημένη δραστηριότητα σε συνθήκες χαμηλού pH.
- Αύξηση του αποικισμού του γαστρεντερικού σωλήνα από βακτήρια που εμφανίζουν δράση BSHs.
- Πολλά βακτήρια εμφανίζουν πάνω από μία ομόλογη πρωτεΐνη με δράση υδρολάσης και με δεδομένο ότι οι μη λειτουργικές πρωτεΐνες εξελικτικά χάνονται, οι διαφορετικές δομές της πρωτεΐνης στον ίδιο οργανισμό πιθανώς προσφέρουν προστασία από τα χολικά οξέα σε διαφορετικές συνθήκες στο έντερο.

Η επίδραση των BSHs στην φυσιολογία του ξενιστή είναι:

- Μείωση της χοληστερόλης του πλάσματος. Αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε: α) γιατί τα μη συζευγμένα χολικά οξέα επαναπροσλαμβάνονται λιγότερο από τα συζευγμένα και απαιτείται επιπλέον χοληστερόλη για την σύνθεση τους. β) δεν βοηθούν στην απορρόφηση των λιπών από την κυκλοφορία το ίδιο καλά με τα συζευγμένα(160).
- Μείωση του βάρους του ξενιστή(151) μέσω της μειωμένης απορρόφησης των λιπών.
- Η μείωση της απορρόφησης όμως των λιπών και των λιποδιαλυτών βιταμινών μπορεί να έχει αρνητική επίδραση σε αναπτυσσόμενους οργανισμούς(160).
- Η παραγωγή των δευτερογενών χολικών οξέων έχει συνδεθεί με καταστροφή του DNA, προαγωγή του καρκίνου και αλλαγές στο εντερικό επιθήλιο που οδηγούν σε διάρροια

και φλεγμονή. Ακόμα η αλλαγή της περιεκτικότητας της χολής σε χολικά οξέα οδηγεί σε αύξηση των λίθων στην χοληδόχο κύστη(150).

Η παραγωγή των δευτερογενών χολικών οξέων δημιουργεί ερωτήματα για το αν η ύπαρξη BSHs σε βακτηριακά στελέχη μπορεί να θεωρηθεί προβιοτική ιδιότητα. Όμως μελέτες σε προβιοτικά στελέχη έχουν δείξει ότι είτε τα προβιοτικά δεν έχουν την ικανότητα να παράγουν δευτερογενή χολικά οξέα(154-155) είτε μπορούν να απορροφούν τα ελεύθερα χολικά οξέα στο εσωτερικό του κυττάρου τους(156-158). Καθώς όμως τα ελεύθερα χολικά οξέα είναι δυνατό να μεταβολιστούν από άλλα του μικροβιόκοσμου ίσως θα πρέπει να επιλέγονται στελέχη που να παρουσιάζουν και την ικανότητα της απορρόφησης.

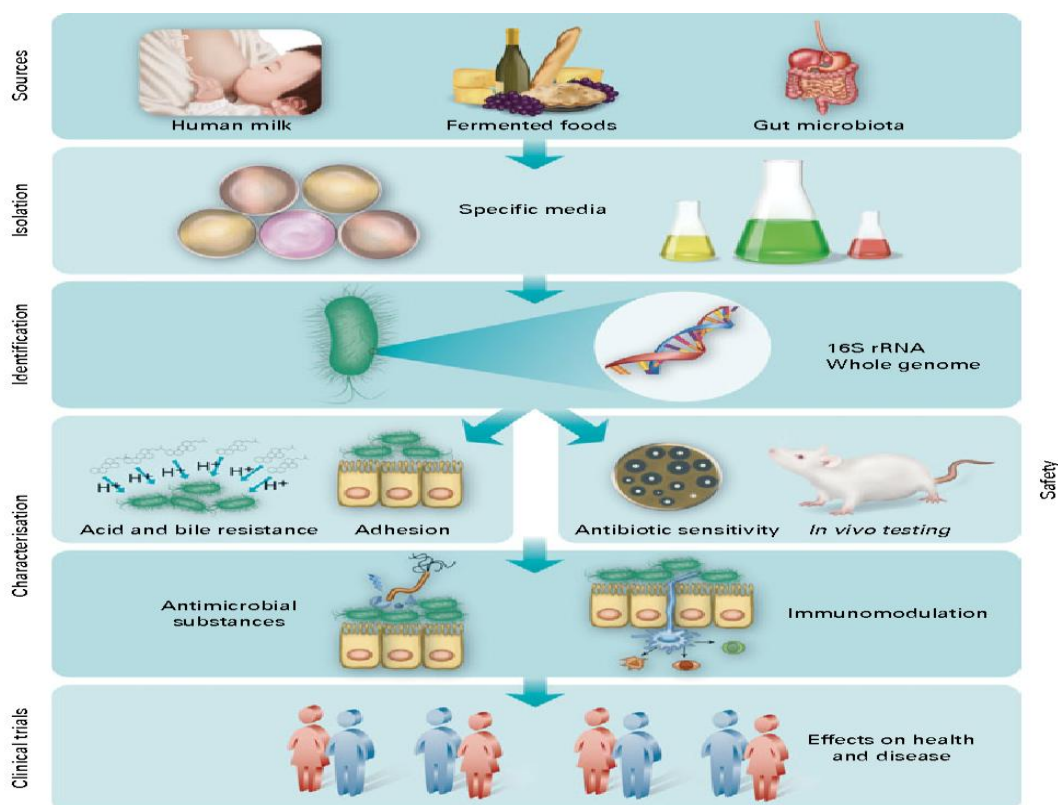
1.5 Πηγές απομόνωσης προβιοτικών στελεχών

Μέχρι σήμερα υπάρχουν αρκετές πηγές προβιοτικών στελεχών που θεωρούνται αποδεκτές. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται τα γαλακτοκομικά και προϊόντα σχετιζόμενα με τα γαλακτοκομικά, το μητρικό γάλα, ο γαστρεντερικός σωλήνας του ανθρώπου αλλά και ζώων και ακόμα ζυμωμένα τρόφιμα, κρέας και φρούτα (Εικ. 1).

1.5.1 Γαλακτοκομικά προϊόντα και σχετιζόμενα με αυτά

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα καθώς και τα προϊόντα που προέρχονται από την ζύμωση αυτών όπως το τυρί, το γιαούρτι, το κεφίρ και άλλα παραδοσιακά προϊόντα ζύμωσης όπως το γάλα από γιακ (Kurut) και το Koumiss έχουν χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση προβιοτικών στελεχών.

Ιδιαίτερα τα παραδοσιακά ζυμωμένα προϊόντα περιέχουν LAB, μπιφιδοβακτήρια, ζύμες αλλά και άλλα στελέχη με προβιοτικές ιδιότητες λιγότερο γνωστά όπως για παράδειγμα το στέλεχος από το γένος *Weisella* που έχει απομονωθεί από ζυμωμένα προϊόντα της Νιγηρίας (16), ενώ στελέχη του *L. plantarum* έχουν απομονωθεί από τυριά της Ιταλίας, της Αργεντινής και της Βουλγαρίας (17-20) και 148 στελέχη LAB έχουν απομονωθεί από το Kurut με κυρίαρχα τα *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus* (21).



Εικ.2 Πηγές απομόνωσης προβιοτικών στελεχών και διαδικασία ταυτοποίησης, χαρακτηρισμού και απόδοσης ισχυρισμών υγείας μέσω κλινικών δοκιμών. (Luis Fontana et al, 2013)

1.5.2 Μητρικό γάλα

Το μητρικό γάλα έχει βρεθεί ότι δεν είναι αποστειρωμένο ακόμα και όταν συλλέγεται ασηπτικά (22) και τα γένη που υπάρχουν σε αυτό είναι διαφορετικά από αυτά του δέρματος (23,24). Επίσης τα στελέχη LAB που περιέχονται στο μητρικό γάλα έχουν ανιχνευθεί στα κόπρανα των βρεφών από τις αντίστοιχες μητέρες (25-26), ενώ από μελέτες σε ανθρώπινα και ζωικά μοντέλα έχει βρεθεί ότι τα βρέφη που είχαν μητρικό θηλασμό ήταν πιο προστατευμένα έναντι στις αλλεργίες και τις γαστρεντερικές λοιμώξεις (27-28). Τα κυρίαρχα βακτήρια στο μητρικό γάλα είναι αρκετά και είναι σταφυλόκοκκοι, στρεπτόκοκκοι, μικρόκοκκοι, λακτοβάκιλλοι, και μπιφιδοβακτήρια (24-26 και 29-31) και τα βρέφη που έχουν μητρικό θηλασμό έχουν σαν κυρίαρχα στελέχη στον εντερικό μικροβιόκοσμο τους λακτοβάκιλλους και μπιφιδοβακτήρια γεγονός που υποδεικνύει ότι τα στελέχη από το μητρικό γάλα εμφανίζουν ιδιαίτερες αποικιστικές ικανότητες. Για αυτό το λόγο το μητρικό γάλα θεωρείται μία πιθανή πηγή για απομόνωση προβιοτικών στελεχών.

1.5.3. Γαστρεντερικός σωλήνας ανθρώπου

Μια ακόμα πηγή για απομόνωση προβιοτικών είναι ο ανθρώπινος γαστρεντερικός σωλήνας. Ο γαστρεντερικός σωλήνας των ενηλίκων είναι αποικισμένος με περισσότερα από 500 διαφορετικά είδη βακτηρίων και τα περισσότερα από τα προβιοτικά στελέχη που χρησιμοποιούμε σήμερα έχουν απομονωθεί από εκεί όπως ο *Lactobacillus gasseri* και ο *Lactobacillus reuteri* (32-33). Προβιοτικά στελέχη έχουν απομονωθεί τόσο από δείγματα κοπράνων υγιών ενηλίκων όσο και από δείγματα βρεφών όπως το *Bifidobacterium longum* (34) και ο *Lactobacillus acidophilus* RY2 (35) αντίστοιχα. Σε αντιστοιχία μάλιστα με την επωφελή δράση που ασκεί το μητρικό γάλα στο μικροβιόκοσμο των βρεφών που έχουν θηλάσει, σε αρκετές μελέτες έχει χρησιμοποιηθεί ο εντερικός μικροβιόκοσμος των βρεφών αυτών για την απομόνωση προβιοτικών στελεχών (36-37).

1.5.4 Γαστρεντερικός σωλήνας ζώων

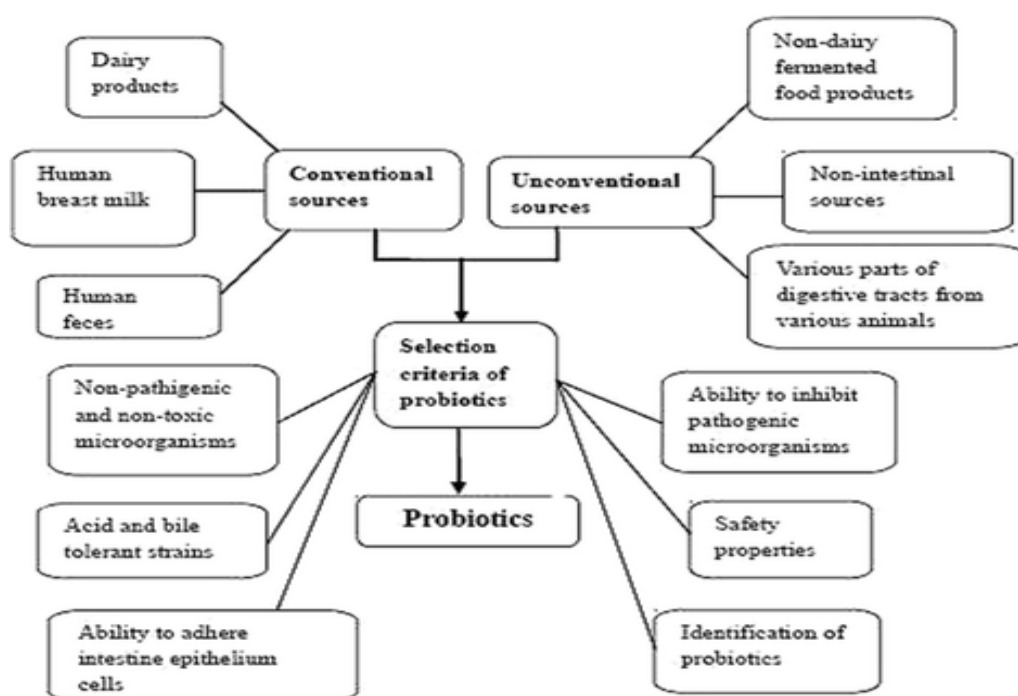
Άλλη μία πηγή προβιοτικών αποτελεί ο γαστρεντερικός σωλήνας από διάφορα ζωικά είδη όπως από γουρούνια, ποντίκια, πτηνά (38), ψάρια και θαλασσινά (39-41) αλλά ακόμα και έντομα όπως το *L. johnsonii* CRL 1647 που απομονώθηκε από τον γαστρεντερικό σωλήνα της μέλισσας *Apis mellifera* και έχει θετική επίδραση στις αποικίες των μελισσών (42).

1.5.5 Μη καθιερωμένες πηγές απομόνωσης προβιοτικών

Προβιοτικά στελέχη έχουν απομονωθεί από μη καθιερωμένες πηγές όπως από τον αέρα και τον χώρο αρτοποιείων που παρασκευάζουν προζύμι, για παράδειγμα στελέχη του *L. plantarum* (43).

Οι διαφορετικές πηγές απομόνωσης των προβιοτικών έχει βρεθεί ότι έχουν επίδραση στις ιδιότητες που εμφανίζουν (38) όπως βλέπουμε στο Διάγραμμα 1. Έτσι προβιοτικά στελέχη που δεν έχουν απομονωθεί από γαστρεντερικό σύστημα είναι πιθανό ότι δεν θα εμφανίσουν παραγωγή βακτηριοσινών (ουσίες που παράγονται από βακτήρια και εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση) αλλά άλλων αντιμικροβιακών ουσιών όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το γαλακτικό και προπιονικό οξύ (44-45). Επίσης προβιοτικά που έχουν απομονωθεί από το γαστρεντερικό ανθρώπων και ζώων έχουν διαφορετικές ιδιότητες από αυτά που απομονώνονται από γαλακτοκομικά προϊόντα. Τα προβιοτικά στελέχη που απομονώνονται από το γαστρεντερικό σωλήνα εμφανίζουν πολλή υψηλότερη ικανότητα

προσκόλλησης στο βλεννογόνο από αυτά των γαλακτοκομικών. Στελέχη του *Bifidobacterium animalis* που απομονώνονται από γαλακτοκομικά δεν εμφανίζουν την ικανότητα να σχηματίζουν συσσωματώματα όπως αυτά του γαστρεντερικού σωλήνα γεγονός που σχετίζεται με την προσκόλληση σε αυτόν (46). Το ίδιο φαινόμενο εμφανίζεται και ως προς την αντοχή στο pH και στην υψηλή συγκέντρωση χολικών οξέων με τα στελέχη που προέρχονται από γαλακτοκομικά να εμφανίζονται πιο ευαίσθητα (47) αν και έχει αναφερθεί και το αντίστροφο για κάποια στελέχη λακτοβακίλλων που απομονώθηκαν από τυρί (48) γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει σταθερά καλύτερα πηγή απομόνωσης προβιοτικών αλλά καθορίζεται ανάλογα το στέλεχος.



Εικ.3 Διάγραμμα των προβιοτικών πηγών και των κριτηρίων επιλογής για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν από ανθρώπους και ζώα (Sornplang and Piya-deatsoontorn, 2016)

Στην **Εικ.3** μπορούμε να δούμε το διάγραμμα των πηγών απομόνωσης προβιοτικών στελεχών καθώς και τα κριτήρια επιλογής ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν από ανθρώπους και ζώα (38).

1.6 Οφέλη υγείας διαφόρων προβιοτικών στελεχών

Μελέτες που έχουν γίνει σε ανθρώπους αλλά και ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι τα προβιοτικά μπορεί να έχουν θετική επίδραση στην πρόληψη ή/και στη θεραπεία κάποιων νόσων όπως :

- Η δυσανεξία στη λακτόζη (51,52)
- Η διάρροια (53)
- Το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου(54)
- Ο καρκίνος του ορθού (55)
- Οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου(56), κυρίως η ελκώδης κολίτιδα αλλά όχι η νόσο του Crohn.Επίσης εμφανίζουν αντιμικροβιακή (57) και αντιφλεγμονώδη δράση (58).

Η δράση όμως των προβιοτικών είναι ειδική ανά στέλεχος και ακόμα και στελέχη που ανήκουν στο ίδιο είδος δεν έχουν τις ίδιες ιδιότητες (59). Για αυτό το λόγο δεν μπορούν να γίνονται γενικεύσεις επί της ωφέλιμης δράσης των προβιοτικών καθώς ακόμα δεν είναι γνωστοί σε πολύ μεγάλο βαθμό οι μηχανισμοί με τους οποίους δρουν ενώ αυτοί μπορεί να είναι πολυπαραγοντικοί.

Στον **Πίνακα 2** παρατίθενται κατάλογος των στελεχών που έχουν μέχρι πρόσφατα πιστοποιηθεί ως προβιοτικά και οι ισχυρισμοί υγείας που έχουν δημοσιευτεί για τα συγκεκριμένα στελέχη (49).

Πίνακας 2. Προβιοτικά στελέχη και ισχυρισμοί υγείας αυτών.

Γένος	Στέλεχος	Ισχυρισμοί υγείας προβιοτικών στελεχών
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. rhamnosus</i> CRL1505	Μείωση της πνευμονικής βλάβης από ιούς
	<i>L. rhamnosus</i> GG	● Πρόληψη και μείωση της σοβαρότητας της ατοπικής δερματίτιδας σε παιδιά και της ανάπτυξης αλλεργίας. ● Πρόληψη της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας σε νεογνήνητα. ● Θεραπεία της οξείας γαστρεντερίτιδας σε παιδιά. ● Μείωση του κινδύνου για λοίμωξη από ρινοϊό σε πρόωρα νεογνά ● Προστασία του ανθρώπινου μυϊκού ιστού στο κόλον από βλάβη προκαλούμενη από LPS.
	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103	Βοήθεια στην απώλεια βάρους σε γυναίκες

Γένος	Στέλεχος	Ισχυρισμοί υγείας προβιοτικών στελεχών
	<i>L. rhamnosus</i> GR-1	Πρόληψη ή θεραπεία στην βακτηριακή κολπίτιδα
	<i>L. rhamnosus</i> HN001	Δυνητικά αντιδιαβητικό
	<i>L. acidophilus</i> ATCC-4495	● Θεραπεία της διάρροιας των ταξιδιωτών ● Αντιμυκητιασική δράση ● Πρόληψη ή θεραπεία της βακτηριακής κολπίτιδας ● Θεραπεία της διάρροιας από <i>C. difficile</i> ● Μείωση των συμπτωμάτων ευερέθιστου εντέρου
	<i>L. plantarum</i> NRRL B-4496	● Πρόληψη της παραγωγής ενδοτοξίνης ● Αντιμικροβιακή δράση ● Μείωση των συμπτωμάτων ευερέθιστου εντέρου

Γένος	Στέλεχος	Ισχυρισμοί υγείας προβιοτικών στελεχών
	<i>L. casei</i> Shirota	• Θεραπεία της λειτουργικής δυσκοιλιότητας ενηλίκων • Θεραπεία της διάρροιας από <i>C. difficile</i> • Μείωση της διάρκειας της προκαλούμενης από αντιβιοτικά διάρροιας σε γηριατρικούς ασθενείς • Μείωση των συμπτωμάτων ευερέθιστου εντέρου • Αποκατάσταση του μικροβιόκοσμου του κόλπου σε ασθενείς με βακτηριακή κολπίτιδα • Θεραπεία της ενδοκολπικής σταφυλοκοκκιάσης.
	<i>L. casei</i> Lcr35	Βελτίωση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας
	<i>L. casei</i> CRL-431	Θεραπεία της λοίμωξης από <i>Salmonella</i>

Γένος	Στέλεχος	Ισχυρισμοί υγείας προβιοτικών στελεχών
	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	● Ενδυνάμωση στην συστημακή ανοσία των ηλικιωμένων ● Αντιβακτηριακή δράση έναντι στο <i>E. coli</i> ● Τροποποίηση της εγκεφαλικής δραστηριότητας
	<i>L. fermentum</i> NCIMB 5221	Πιθανή μείωση της ινσουλινοαντοχής και της υπερχολιστερολιναιμίας .
	<i>L. reuteri</i> NCIMB 30242	Μείωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL)
	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	● Θεραπεία της οξείας γαστρεντερίτιδας σε παιδιά ● Μείωση της διάρκειας διάρροιας σε παιδιά
	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Μείωση των κολικών των βρεφών
	<i>L. reuteri</i> DSM 17938	● Μείωση των κολικών των βρεφών ● Μείωση των γαστρεντερικών

Γένος	Στέλεχος	Ισχυρισμοί υγείας προβιοτικών στελεχών
		διαταραχών στα βρέφη ● Μείωση της συχνότητας σήψης δυσανεξίας θρέψης και διάρκειας παραμονής στο νοσοκομείο των πρόωρων βρεφών.
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. infantis</i>	● Μείωση των συμπτωμάτων του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου ● Μείωση της συχνότητας νεκρωτικής εντεροκολίτιδας σε πρόωρα βρέφη
	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DN-173 010	● Θεραπεία της λειτουργικής δυσκοιλιότητας σε ενήλικες. ● Τροποποίηση της εγκεφαλικής δραστηριότητας ● Μείωση των λοιμώξεων του ουροποιητικού σε παιδιά ● Μείωση της συχνότητας νεκρωτικής εντεροκολίτιδας σε πρόωρα βρέφη
	<i>B. bifidum</i> MB 109/DSMZ 23731	● Μείωση της ολικής χοληστερόλης ● Μείωση της παραμονής σε νοσοκομείο παιδιών με οξεία διάρροια.

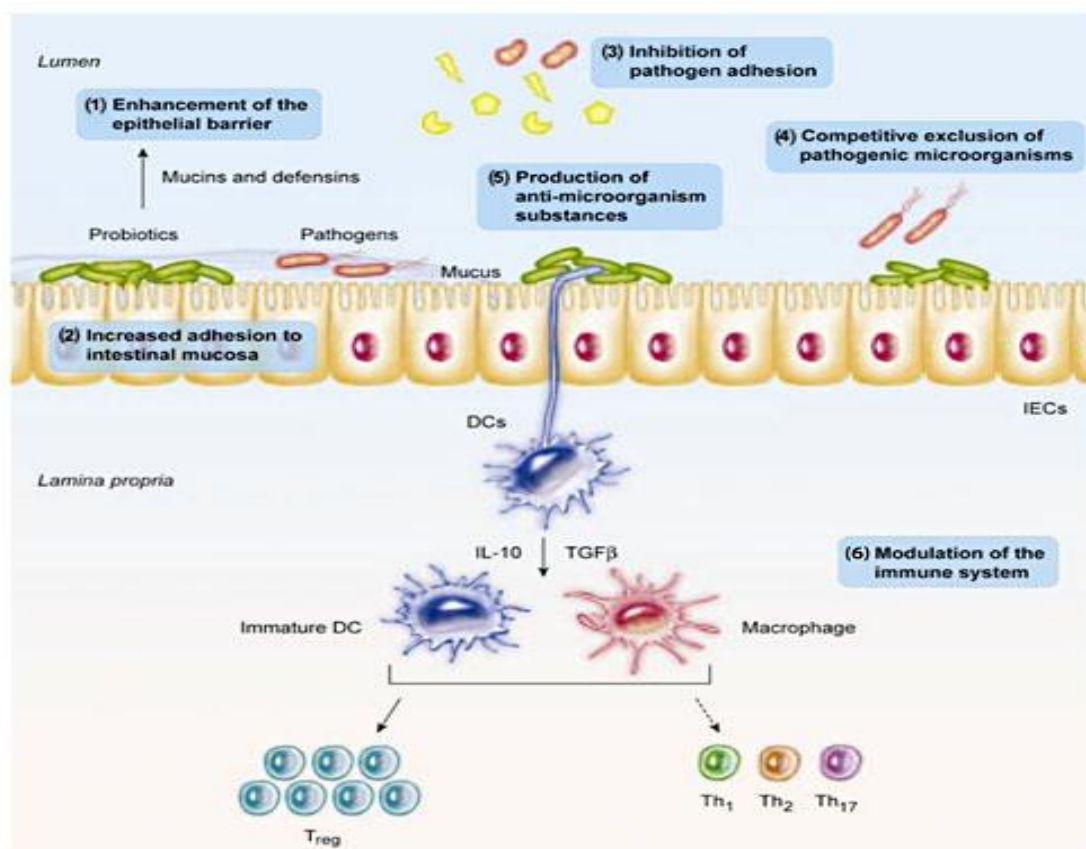
Γένος	Στέλεχος	Ισχυρισμοί υγείας προβιοτικών στελεχών
		● Μείωση της συχνότητας νεκρωτικής εντεροκολίτιδας.
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardi</i>	● Θεραπεία της διάρροιας των ταξιδιωτών ● Θεραπεία του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου ● Θεραπεία της μέτριας ελκώδους κολίτιδας ● Θεραπεία και μείωση της ψευδομεμβρανώδους κολίτιδας από <i>C. difficile</i> ● Θεραπεία της οξείας γαστρεντερίτιδας σε παιδιά
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>	● Μείωση των συμπτωμάτων του ευερέθιστου εντέρου ● Μείωση της νεκρωτικής εντεροκολίτιδας
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> BA28	Καταπολέμηση της λοίμωξης από <i>H. pylori</i> .
<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> Nissle 1917	● Θεραπεία της λειτουργικής δυσκοιλιότητας σε ενήλικες ● Θεραπεία των φλεγμονωδών

Γένος	Στέλεχος	Ισχυρισμοί υγείας προβιοτικών στελεχών
		νόσων του εντέρου ● Θεραπεία των γαστρεντερικών διαταραχών ● Πιθανώς προ-φλεγμονώδης

1.7 Πιθανοί μηχανισμοί δράσης προβιοτικών

Οι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών που έχουν προταθεί και διερευνηθεί ως τώρα παρουσιάζονται στην **Εικ.4** και εστιάζουν κυρίως:

- στην ανταγωνιστική δράση των προβιοτικών στελεχών έναντι άλλων μικροοργανισμών ώστε να επιτευχθεί τροποποίηση του εντερικού μικροβιόκοσμου. Η δράση αυτή επιτυγχάνεται με την ανταγωνιστική προσκόλληση στον βλεννογόνο και το επιθήλιο με στόχο τον αποκλεισμό των παθογόνων και την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών.
- στην τροποποίηση της ανοσολογικής απόκρισης τόσο στο παχύ έντερο αλλά και σε ολόκληρο τον οργανισμό, καθώς το έντερο θεωρείται το πιο μεγάλο ανοσολογικό όργανο(109). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ενδυνάμωσης του εντερικού φραγμού και της τροποποίησης της ανοσολογικής απόκρισης μέσω υποδοχέων όπως οι Toll-like receptors (TLRs) (60).



Εικ. 4 Πιθανοί μηχανισμοί δράσης προβιοτικών (Bermudez-Brito, M et.al 2012)

Στο χόριο του βλεννογόνου του εντέρου και ανάμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα βρίσκονται τα δενδριτικά κύτταρα καθώς τα B και T λεμφοκύτταρα τα οποία επάγουν αντίστοιχα(119):

- Τα δενδριτικά είναι αντιγόνο-παρουσιαστικά κύτταρα που αλληλεπιδρούν με το συμπλήρωμα ώστε να επάγουν την παραγωγή αντισωμάτων από τα B λεμφοκύτταρα καθώς και την παραγωγή των υποπληθυσμών των T λεμφοκυττάρων
- τα B λεμφοκύτταρα παράγουν αντισώματα που βοηθούν στην αναγνώριση των συμβιωτικών και την έμμεση καταπολέμηση των παθογόνων μέσω οψωνοποίησης, ενεργοποίησης του συμπληρώματος και ουδετεροποίησης των βακτηρίων ή των προϊόντων τους (118).
- Τα T λεμφοκύτταρα που δίνουν διάφορα υποσύνολα με κύρια τα Th-1, που είναι υπεύθυνα για τα ενδοκυτταρικά (εντός των μακροφάγων) βακτήρια ιούς και πρωτόζωα, τα Th-2 που είναι υπεύθυνα για την καταπολέμηση των ελμίνθων και των εξωκυτταρικών βακτηρίων (118) και τα Th17/Treg17. Τα Th17 κύτταρα είναι υπεύθυνα για την καταπολέμηση των παθογόνων του εντερικού αυλού διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο

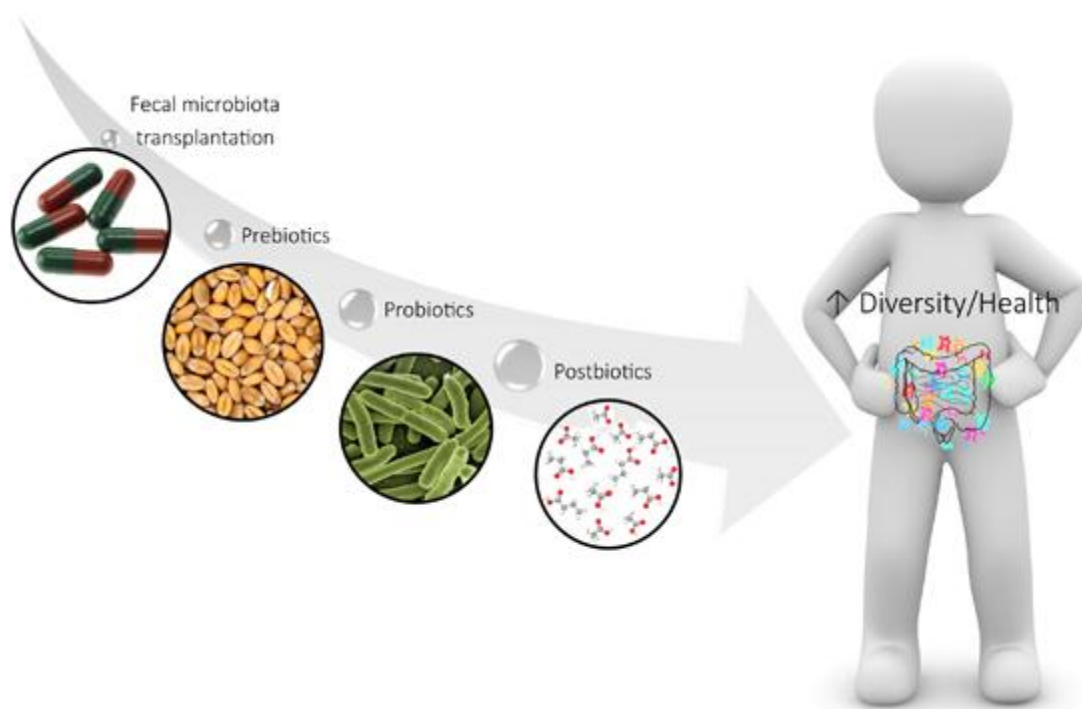
στην ομοιόσταση των βλεννογόνων. Στις περιπτώσεις όπου έχουμε απώλεια των Th-17 πληθυσμών έχουμε μετάβαση ζωντανών μικροοργανισμών από τον αυλό του εντέρου σε εξωεντερικές θέσεις, όπως οι λεμφαδένες του μεσεντέριου. Ταυτόχρονα όμως είναι απαραίτητο η ενεργοποίηση των T κυττάρων από τα συμβιωτικά να μην οδηγεί σε παραγωγή Th-17 αλλά των Treg17 τα οποία δεν είναι κυτταροτοξικά και βοηθούν την τροποποίηση του ανοσολογικού συστήματος ώστε να αναγνωρίζει τα συμβιωτικά και να μην τους επιτίθεται.

Οι TLRs είναι υποδοχείς υπεύθυνοι για την διατήρηση της ομοιόστασης στο έντερο καθώς καταστέλλουν τις προφλεγμονώδεις αποκρίσεις για τα συμβιωτικά βακτήρια και τις προάγουν όταν υπάρχουν παθογόνα που πρέπει να καταπολεμηθούν (61). Αυτό συμβαίνει μέσω συνεργιστικών διαδικασιών μεταξύ του ξενιστή και των συμβιωτικών, όπου με την παραγωγή συγκεκριμένων μορίων όπως η φλαγγελίνη που συνδέονται στους TLRs έχουμε ενεργοποίηση μονοπατιών μεταγωγής σήματος τα οποία είναι αντιφλεγμονώδη. Με αυτόν τον τρόπο οδηγείται η διαφοροποίηση των T κυττάρων προς την κατεύθυνση των ρυθμιστικών Treg17 σε σχέση με τα κυτταροτοξικά Th17 δημιουργώντας ευνοϊκές συνθήκες για την αύξηση των συμβιωτικών. Ακόμα η ενεργοποίηση των TLRs επιδρά και στα B λεμφοκύτταρα, οδηγώντας στην παραγωγή αντισωμάτων όπως η εκκριτική IgA, με βάση την οποία γίνεται η αναγνώριση των προβιοτικών σε σχέση με τα παθογόνα (62), η IgM και συγκεκριμένες υποτάξεις IgG (63).

Η ενδυνάμωση του εντερικού φραγμού από την άλλη πλευρά, αποτελεί σημαντική λειτουργία για την ισχυροποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και για την συνολική υγεία του ανθρώπινου οργανισμού, καθώς διάφορες παθολογικές καταστάσεις έχουν συνδεθεί με την απώλεια του εντερικού φραγμού(64). Αυτοάνοσες ασθένειες όπως η κοιλιοκάκη, οι φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου αλλά και η επιδείνωση των συμπτωμάτων της σκλήρυνσης κατά πλάκας (65), έχουν συνδεθεί με αυτήν. Επίσης και άλλες παθολογικές καταστάσεις όπως η παχυσαρκία, το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου και οι τροφικές αλλεργίες.

Η τροποποίηση του μικροβιόκοσμου του εντέρου θεωρείται ο πιο σημαντικός μηχανισμός δράσης, ιδιαίτερα ως προς την επίδραση στις φλεγμονώδεις νόσους (66). Έχουν προταθεί διάφοροι τρόποι για την επίτευξη της τροποποίησης του μικροβιόκοσμου, με πιο επικρατείς τα προβιοτικά, τα πρεβιοτικά, τα μεταβιοτικά και η μεταμόσχευση μικροβιόκοσμου κοπράνων (faecal microbiota transplantation), (67). Τα πρεβιοτικά σύμφωνα με τον επικαιροποιημένο ορισμό τους είναι ένα υπόστρωμα το οποίο χρησιμοποιείται επιλεκτικά από τους

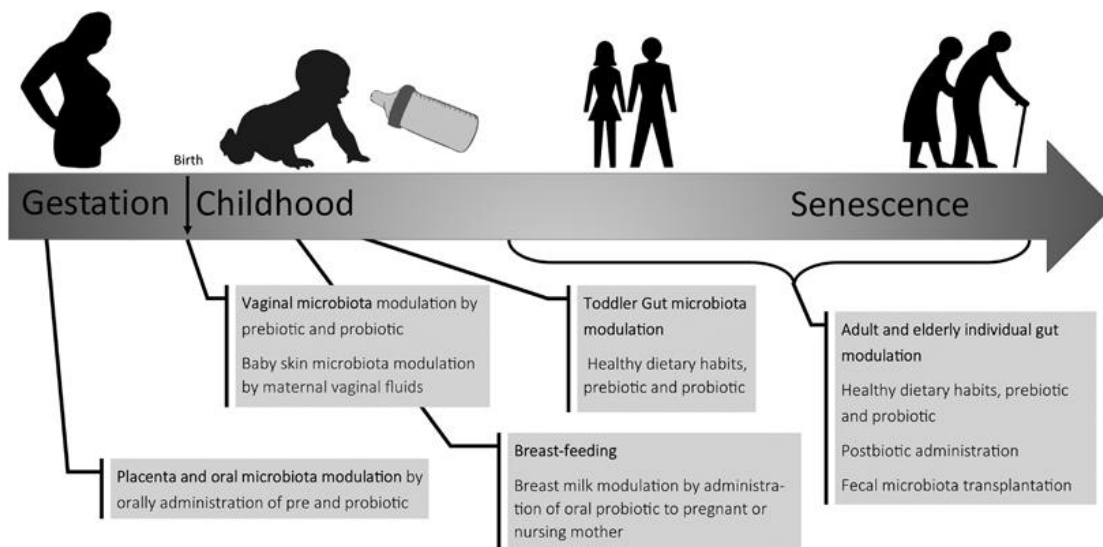
μικροοργανισμούς του ξενιστή προσφέροντας οφέλη υγείας ενώ τα μεταβιοτικά είναι μη ζώντα βακτηριακά προϊόντα ή μεταβολικά παράγωγα των προβιοτικών που έχουν θετική βιολογική δράση στον ξενιστή (**Εικ.5**).



Εικ.5 (Vieira, Fukumori and Ferreira, 2016) Παρεμβάσεις για την τροποποίηση εντερικού μικροβιόκοσμου με στόχο την αύξηση της βιοποικιλότητας του και την υγεία. Fecal microbiota transplantation: μεταμόσχευση μικροβιόκοσμου κοπράνων, Probiotics: προβιοτικά, Prebiotics: πρεβιοτικά, Postbiotics: μεταβιοτικά.

Ο συνδυασμός των παραπάνω παρεμβάσεων έτσι ώστε να έχουμε επιτυχημένη τροποποίηση στο μικροβίωμα του εντέρου και θετικά οφέλη για την υγεία παρατίθενται στην **Εικ.6** (60). Κατά την εγκυμοσύνη η χορήγηση πρεβιοτικών και προβιοτικών από το στόμα μπορεί να βοηθήσει στην τροποποίηση του μικροβιόκοσμου του πλακούντα και του στόματος βοηθώντας στην στοματική υγεία της εγκύου και την ανάπτυξη υγιούς πλακούντα καθώς η περιοδοντική νόσος έχει βρεθεί ότι ευθύνεται για πρόωρο τοκετό(196).Επίσης μπορεί να τροποποιηθεί ο μικροβιόκοσμος του κόλπου έτσι ώστε να μην έχουμε παθογόνα μικρόβια όπως ο β-αιμολυτικός στρεπτόκοκκος που μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την υγεία του νεογέννητου(198). Κατά τον θηλασμό προβιοτικά στελέχη και πρεβιοτικών ίνες HMO (Human Milk Oligosaccharides) περνάνε μέσω του μητρικού γάλακτος στα βρέφη επηρεάζοντας θετικά την ανάπτυξη του μικροβιόκοσμου του εντέρου τους(199). Ο βρεφικός θηλασμός αποτελεί

έναν από τους πιο επιδραστικούς παράγοντες στην ανάπτυξη υγιούς εντερικού μικροβιόκοσμου στην ενήλικη ζωή, καθώς οι μεγαλύτερες φυλογενετικές διαφορές εμφανίζονται μεταξύ των νηπίων ηλικίας τριών ετών που έχουν ή δεν έχουν θηλάσει, σε σχέση με άλλους παράγοντες που επηρεάζουν το μικροβίωμα όπως ο τρόπος γέννησης (8). Μέχρι την ηλικία των τριών χρόνων γίνεται ο καθορισμός της ποικιλομορφίας του εντερικού μικροβιόκοσμου που αποτελεί τον δείκτη υγείας του αλλά και του ξενιστή συνολικά(199). Είναι λοιπόν πολύ σημαντικό στα νήπια να υπάρχει ποικιλότητα ως προς την πρόσληψη πρεβιοτικών ινών από την διατροφή καθώς και παρέμβαση με προβιοτικά σε καταστάσεις όπου απαιτείται, όπως μετά από λήψη αντιβιοτικών(197). Στους υγιείς ενήλικες και ηλικιωμένους η χορήγηση προβιοτικών και πρεβιοτικών μπορεί να διατηρήσει την υγεία του εντέρου αλλά και να προσφέρει άλλα οφέλη υγείας ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο στέλεχος(60). Σε άτομα με προβλήματα υγείας όπου απαιτείται έντονη τροποποίηση του εντερικού μικροβιόκοσμου όπως η λοίμωξη από *Clostridium difficile* , έχουν γίνει προσπάθειες για δραστικότερη παρέμβαση με χρήση μεταμόσχευση κοπράνων από υγιείς δότες(200). Τέλος σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα όπου δεν είναι δυνατό να γίνει χρήση προβιοτικών τα μεταβιοτικά ,τα οποία δεν περιέχουν ζωντανά κύτταρα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ασφάλεια (60).



Εικ.6 Παρεμβάσεις τροποποίησης του μικροβιόκοσμου έτσι ώστε να υπάρχουν θετικά οφέλη υγείας κατά τα διάφορα ηλικιακά επίπεδα (Vieira, Fukumori and Ferreira, 2016).

Τέλος ως προς την δράση των προβιοτικών θα πρέπει να προστεθεί ότι οι μέχρι τώρα μελέτες δεν αποδεικνύουν την επίδραση των προβιοτικών στην μόνιμη αλλαγή της σύνθεσης του μικροβιόκοσμου των κοπράνων των υγιών ενηλίκων (68) και απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για να αποδειχτεί ο συγκεκριμένος μηχανισμός. Εφόσον αποδειχθεί ότι δεν ισχύει τότε η δράση των προβιοτικών δεν θα έγκειται στον αποικισμό του εντέρου και στην αύξηση του πληθυσμού τους αλλά μόνο στην τροποποίηση του υπάρχοντος μικροβιόκοσμου.

ΚΕΦ 2. Ο μικροβιόκοσμος στο ανθρώπινο σώμα

2.5 Σύσταση μικροβιόκοσμου στο ανθρώπινο σώμα

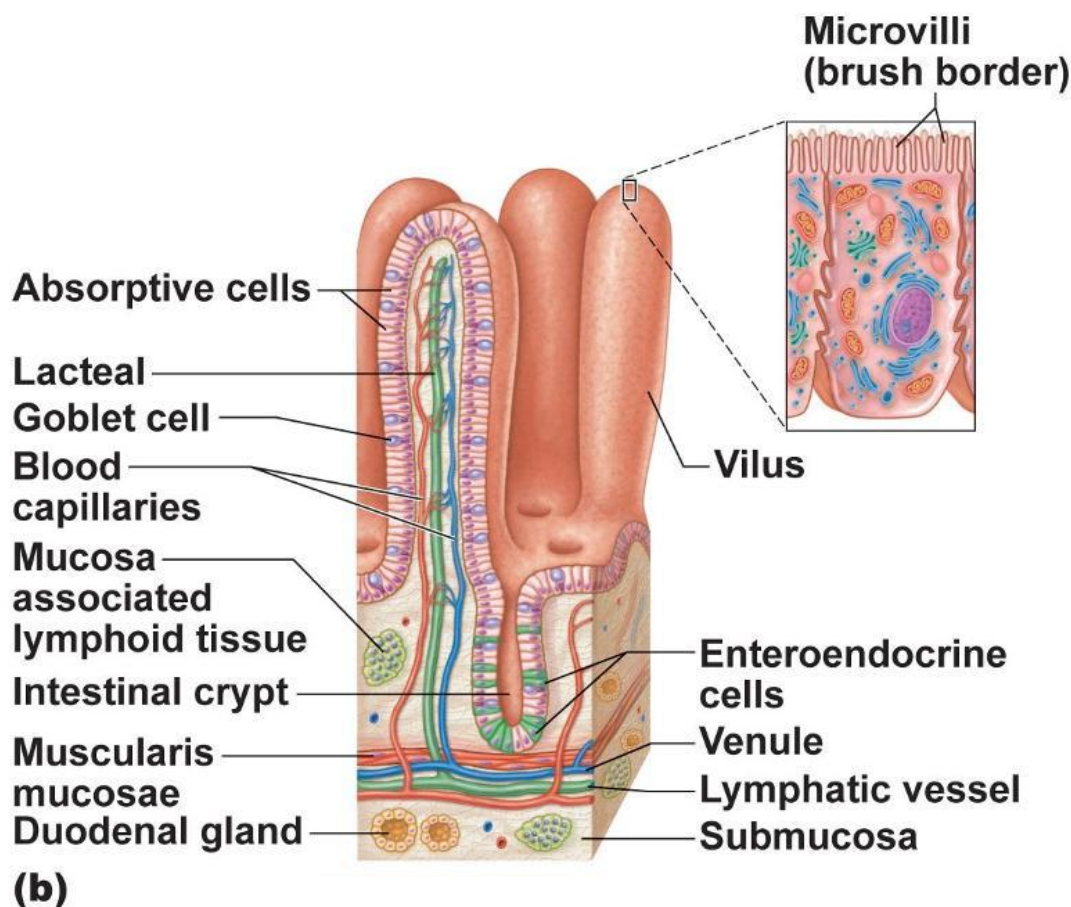
Ο ανθρώπινος μικροβιόκοσμος αποτελείται από ένα σύνολο μικροοργανισμών που εδρεύουν μέσα στο ανθρώπινο σώμα είτε σαν μονήρεις οργανισμοί είτε δημιουργώντας σχηματισμούς που ονομάζονται βιοφίλμ. Τα βιοφίλμ είναι κοινότητες μικροβίων οι οποίες εμφανίζουν πολύ υψηλή μορφή οργάνωσης και είναι προσκολλημένα σε επιφάνειες (70). Σε αυτούς συγκαταλέγονται προκαρυωτικοί οργανισμοί, που είναι τα βακτήρια και τα αρχαία, ευκαρυωτικοί οργανισμοί, που σε αυτούς ανήκουν οι μύκητες και οι ζύμες και τέλος οι ιοί. Από αυτούς τους μικροοργανισμούς κάποιοι είναι παθογόνοι ενώ το μεγαλύτερο μέρος είναι μη παθογόνοι. Από τους μη παθογόνους κάποιοι είναι δυνατό να προξενήσουν βλάβη στον ξενιστή τους μέσω των μεταβολιτών που παράγουν όπως είναι η ΤΜΑΟ (trimethylamine N-oxide) που έχει αθηρογόνο δράση, ενώ υπάρχουν οι συμβιωτικοί οργανισμοί οι οποίοι όχι μόνο δεν προξενούν καμία βλάβη στον ξενιστή τους, αλλά αντίθετα συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης του. Στην πραγματικότητα έχουν δράσεις που είναι απαραίτητες για την διατήρηση της υγείας όπως η παραγωγή απαραίτητων βιταμινών, ο καταβολισμός ουσιών από την τροφή που δεν μπορεί να καταβολίσει ο ξενιστής αλλά και η μορφοποίηση του ανοσοποιητικού μας συστήματος ενισχύοντας αντιφλεγμονώδη μονοπάτια.

Υπάρχουν τουλάχιστον 1000 διαφορετικά είδη από ήδη γνωστά βακτήρια τα οποία έχουν 150 φορές περισσότερα μικροβιακά γονίδια από όσα υπάρχουν σε ολόκληρο το ανθρώπινο γονιδίωμα (71). Το σύνολο των γονιδίων των μικροοργανισμών που εδρεύουν στον ανθρώπινο οργανισμό αποτελεί το ανθρώπινο μικροβίωμα.

Το Human Microbiome Project είναι μία πρωτοβουλία από ερευνητές και ερευνητικά ιδρύματα, το οποίο ιδρύθηκε το 2008 και έχει ως στόχο τη μελέτη του ανθρώπινου μικροβιώματος. Τα πρώτα αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν το 2013 και αφορούσαν την ανάλυση του μικροβιώματος από 18 διαφορετικές περιοχές του ανθρώπινου σώματος (72). Κάθε περιοχή που αναλύθηκε εμφανίζει εντελώς διαφορετικό πρότυπο μικροβιώματος που αντιστοιχεί τόσο στην φυλογενετική ανάλυση του μικροβιόκοσμου ανά περιοχή αλλά και στην διαφορετική λειτουργικότητα της κάθε περιοχής, Π.χ. στην περιοχή του κόλπου όταν δεν έχουμε δυσβίωση επικρατούν οι λακτοβάκιλλοι οι οποίοι εξασφαλίζουν το επιθυμητό χαμηλό pH για την υγεία της περιοχής και εμπλουτίζοντας το μικροβίωμα της περιοχής σε γονίδια παραγωγής του γαλακτικού οξέος (73).

2.6 Σύσταση μικροβιόκοσμου στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σωλήνα

Η σύσταση του μικροβιόκοσμου κατά μήκος του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα έχει μεγάλες διαφοροποιήσεις τόσο ως προς τον αριθμό όσο και ως προς τα είδη που αποικούν τα διάφορα μέρη του. Ξεκινώντας από την στοματική κοιλότητα όπου μαζί με το λεπτό και παχύ έντερο αποτελούν τις περιοχές όπου έχουμε την μεγαλύτερη ποικιλία σε βακτηριακούς πληθυσμούς (70), παρατηρούμε μεγάλη μείωση τόσο στον αριθμό όσο και στην ποικιλία των πληθυσμών του οισοφάγου, του στομάχου καθώς και του δωδεκαδακτύλου. Στη συνέχεια καθώς προχωράμε από το λεπτό στο παχύ έντερο και από εκεί στο σιγμοειδές κόλον έχουμε πολύ μεγάλη αύξηση στον αριθμό και στην ποικιλία των μικροβιακών πληθυσμών όπου φτάνουν στην ύψιστη πυκνότητα σε όλο τον ανθρώπινο οργανισμό(74).



© 2011 Pearson Education, Inc.

Εικ.7 Ανατομία του βλεννογόνου του εντέρου (Pearson education inc. 2011)

Στην **Εικ.7** μπορούμε να δούμε την ανατομία του εντερικού βλεννογόνου με τις λάχνες και τις μικρολάχνες, τις κρύπτες, τα Goblet κύτταρα που εκκρίνουν την εντερική βλέννη, την εντεροενδοκρινικά κύτταρα, καθώς και το αγγειακό, λεμφικό και μυϊκό σύστημα κάτω από αυτόν.

2.3 Σύσταση μικροβιόκοσμου στο παχύ έντερο

Λόγω της αργής κίνησης του εντέρου, του αλκαλικού περιβάλλοντος αλλά και της μεγάλης αύξησης της περιεκτικότητας του βλεννογόνου σε βλέννη (78) το παχύ έντερο είναι η κατεξοχήν περιοχή όπου έχουμε μικροβιακό αποικισμό στο ανθρώπινο έντερο. Ο

μικροβιόκοσμος του εντέρου αποτελείται από αυτόν που είναι συνδεδεμένος με το εντερικό επιθήλιο και την βλέννη που καλύπτει αυτόν που αποτελεί μικρό μέρος του μικροβιώματος και αυτόν που υπάρχει στον αυλό του εντέρου που είναι και το κατεχοχόν τμήμα του. Το 99.9 % του μικροβιόκοσμου του παχέος εντέρου είναι υποχρεωτικά αναερόβια (79) ενώ το 60% της ξηρής μάζας των κοπράνων αποτελείται από βακτήρια(80). Είναι πιθανό ότι μπορεί να υπάρχουν πάνω από 400 διαφορετικά είδη, όμως μόνο 30-40 είδη αποτελούν το 99% των βακτηρίων (75).Ο μικροβιόκοσμος του παχέος εντέρου ολοκληρώνεται με την παρουσία ευκάρυων (μύκητες, ζύμες)(71) και ιών με κύριους αντιπρόσωπους τους βακτηριοφάγους (81).Στον **Πίνακα 3**. παρουσιάζονται τα κυριότερα Φύλα και Γένη του μικροβιόκοσμου του παχέος εντέρου.

Πιν.3 Φυλογενετική ταξινόμηση των κυριότερων Φύλων, Κλάσεων και Γενών του μικροβιόκοσμου του παχέος εντέρου.

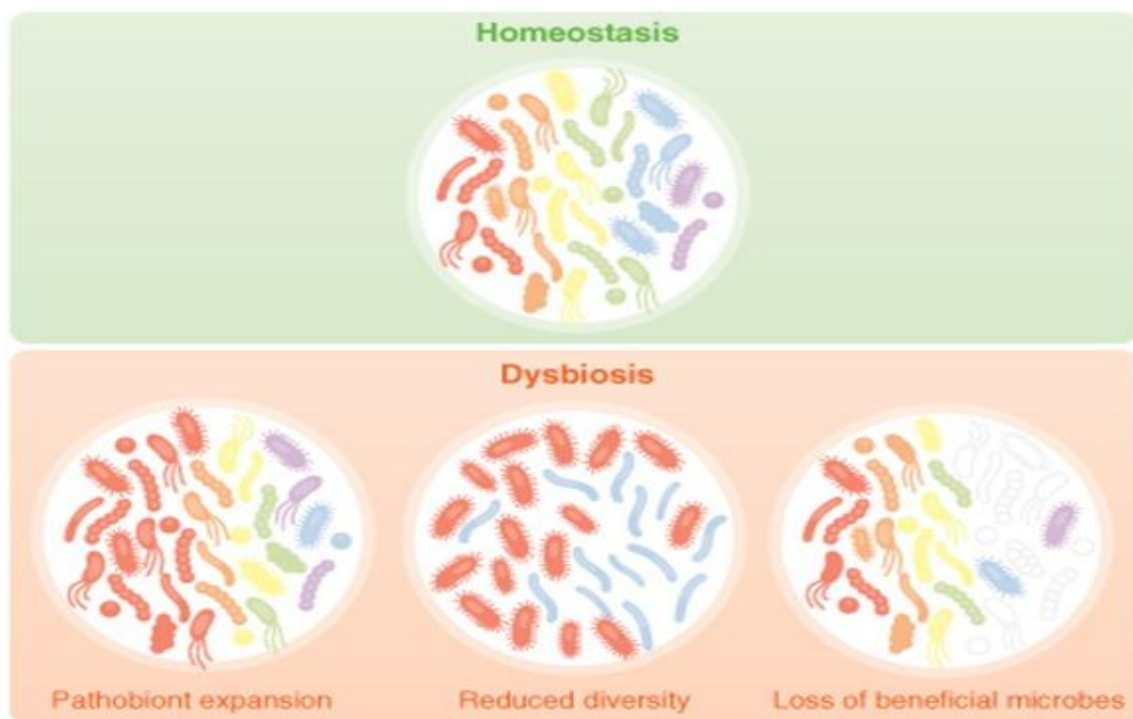
Κατηγορία	Φύλο	Κλάση	Γένος
	<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillus</i>
			<i>Enterococcus</i>
		<i>Clostridia</i>	<i>Ruminococcus</i>
Βακτήρια			<i>Peptostreptococcus</i>
			<i>Clostridium</i>
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Bacteroidia</i>	<i>Bacteroides</i>
			<i>Prevotella</i>
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Desulfovibrio</i>
		<i>Gamaproteobacteria</i>	<i>Escherichia</i>
		<i>Epsilonproteobacteria</i>	<i>Helicobacter</i>
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Bifidobacterium</i>
Αρχαία	<i>Euryarcheota</i>	<i>Methanobacteria</i>	<i>Methanobrevibacter</i>

2.4 Ορισμός δυσβίωσης στο έντερο

Η έννοια της δυσβίωσης είναι πολύ δύσκολο να καθοριστεί. Σε γενικές γραμμές ως δυσβίωση στο έντερο αλλά και γενικά σε όλες τις περιοχές όπου υπάρχει μικροβιόκοσμος , ορίζεται κάθε αλλαγή η οποία συμβαίνει στην σύσταση των συμβιωτικών που εδρεύουν στην συγκεκριμένη περιοχή σε σχέση με την σύσταση που έχουν τα υγιή άτομα και οδηγεί σε ασθένεια(82). Κατά αυτόν τον τρόπο για να ορίσουμε εάν ένα άτομο έχει δυσβίωση θα πρέπει να ελέγξουμε φυλογενετικά το μικροβιόκοσμο του σε σχέση με αυτό ενός υγιούς ατόμου. Είναι όμως δύσκολο με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα να μπορέσουμε να συσχετίσουμε ένα υγιές με ένα δυσβιωτικό μικροβιόκοσμο καθώς υπάρχουν μεγάλες διαφορές στη σύσταση του μεταξύ των υγιών ατόμων ώστε να καθορίσουμε το πρότυπο του υγιούς μικροβιόκοσμου. Περαιτέρω μελέτες που θα βασίζονται πλέον όχι μόνο σε φυλογενετικά στοιχεία αλλά και σε λειτουργικά, με βάση πλέον το μικροβίωμα θα μπορέσουν να δώσουν σαφή ερμηνεία της δυσβίωσης (83).

Στην δυσβίωση έχουμε πτώση των ομοιοστατικών μηχανισμών οι οποίοι διατηρούν σταθερή την σύσταση του μικροβιόκοσμου έτσι ώστε να οδηγούμαστε σε αύξηση των παθογόνων μικροοργανισμών, μείωση των επωφελών συμβιωτικών και της ποικιλότητας του. Αυτό μπορεί να συμβεί με διάφορους τρόπους όπως π.χ. μετά από χρήση αντιβιοτικών και τροφικών δηλητηριάσεων.

Η δυσβίωση είναι πιθανό να είναι υπεύθυνη για την αύξηση της ενδοτοξαμίας δηλαδή την αύξηση της τοξίνης LPS στο αίμα (121) , με αποτέλεσμα χαμηλού βαθμού φλεγμονή (122-123) αλλά και την ανάπτυξη μεταβολικών παθήσεων (122-124) καθώς και παθήσεων του συκωτιού(125).Η χορήγηση προβιοτικών στελεχών έχει δείξει ότι επιτυγχάνει την μείωση της ενδοτοξαμίας, με παράλληλη μείωση των παραγόμενων προφλεγμονώδων κυτταροκινών γεγονός που αποδεικνύει την συμβολή των προβιοτικών στελεχών στην αποκατάσταση της δυσβίωσης.



Εικ.8 Δυσβίωση: Κατά την δυσβίωση οι μηχανισμοί ομοιόστασης του εντερικού μικροβιόκοσμου μειώνονται, με αποτέλεσμα την αύξηση των παθογόνων πληθυσμών, που οδηγεί σε μείωση της ποικιλότητας των μικροβιακών πληθυσμών, σε βάρος των ωφέλιμων μικροβίων (Petersen and Round, 2014).

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη στελεχών του γένους *Lactobacillus* που έχουν απομονωθεί από κόπρανα υγιών νεογνών ως προς την εμφάνιση προβιοτικού προφίλ. Δηλαδή, εάν είναι ανθεκτικά σε περιβάλλον με όξινο pH, εάν αυξάνονται παρουσία χολικών αλάτων, εάν προσκολλώνται σε εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (Caco-2). Τα ίδια στελέχη δοκιμάστηκαν εάν επάγουν την παραγωγή της προφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-6 από τα επιθηλιακά εντερικά κύτταρα, μετά από συν-επώαση. Επίσης ελέγχθηκαν και για τη παρουσία του ενζύμου υδρολάση των χολικών οξέων (BSH).

ΚΕΦ.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Προέλευση υποψήφιων προβιοτικών στελεχών του γένους *Lactobacillus*

Τα υπό μελέτη στελέχη ανήκουν στην συλλογή του ΕΒΒΙΦΑΜ και η απομόνωση τους έγινε από υγιή τελειόμηνα βρέφη τα οποία γεννήθηκαν στο μαιευτήριο «Ελενα Βενιζέλου». Σε συνεργασία με την Νεογνολογική Κλινική του μαιευτηρίου έγινε ενημέρωση των γονέων ενώ βρίσκονταν ακόμη στο μαιευτήριο για την δυνατότητα συμμετοχής των βρεφών τους στην μελέτη. Όσοι γονείς ήθελαν να συμπεριληφθούν στην μελέτη τα βρέφη τους έδωσαν έγγραφη συγκατάθεση. Από αυτά λήφθηκε δείγμα κοπράνων κατά την τέταρτη ημέρα της γέννησης τους, στον ένα μήνα και στους τρεις μήνες από την γέννηση τους. Αρχικά καταγράφηκε το φύλο ο τρόπος γέννησης και η τυχόν λήψη αντιβιοτικών πριν την γέννα από την μητέρα ενώ στις επόμενες λήψεις καταγραφόταν ο τρόπος σίτισης και η λήψη αντιβιοτικών από τα βρέφη. Από τα δείγματα αυτά έγινε απομόνωση μικροβιακών στελεχών τα οποία ταυτοποιήθηκαν φυλογενετικά με μικροβιακές μεθόδους και πιο συγκεκριμένα με το σύστημα API 50CHL (BioMerieux SA, Marcy-I'Etoile, France). Επιλέχθηκαν τα στελέχη που ακολουθούν για τον έλεγχο πιθανών προβιοτικών ιδιοτήτων:

- AnLb 6 *Lactobacillus acidophilus*
- AnLb 17 *Lactobacillus acidophilus*
- AnLb 44 *Lactobacillus salivarius*
- AnLb 46 *Lactobacillus ramnosus*
- AnLb 52 *Lactobacillus ramnosus*
- DSMZ 20079 *Lactobacillus acidophilus* (στέλεχος αναφοράς)

1.1 Έλεγχος ικανότητας προσκόλλησης των στελεχών λακτοβακίλλων σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2).

Για τον έλεγχο της ικανότητας προσκόλλησης των υπό μελέτη στελεχών χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Caco2 (ATCC HTB-37) η οποία δημιουργεί μονή στιβάδα κυττάρων που προσομοιάζει στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε θρεπτικό υλικό Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM, PAA Laboratories GmbH, E15-843) εμπλουτισμένο με γλουταμίνη, αμινοξέα, 10% εμβρυικό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum-FBS) και 100 U mL⁻¹ πενικιλίνη και 100 μg mL⁻¹ στρεπτομυκίνη (πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM). Η καλλιέργεια των Caco2 έγινε πάνω σε αποστειρωμένες καλυπτρίδες που τοποθετήθηκαν μέσα σε πλάκες των 6 βοθρίων και στη συνέχεια επωάστηκαν σε περιβάλλον με 5% CO₂-95%

ατμοσφαιρικό αέρα και θερμοκρασία 37° C. Το αρχικό εμβόλιο των κυττάρων Caco2 είχε συγκέντρωση στο βοθρίο $1,7 \times 10^4$ κύτταρα ανά cm^2 . Κάθε δεύτερη μέρα γινόταν αλλαγή του θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της προσκόλλησης δύο εβδομάδες αφότου έγινε κάλυψη του 100% της επιφάνειας της καλυπτρίδας, ώστε να έχει επιτευχθεί η διαφοροποίηση τους σε εντεροκύτταρα. Για να προετοιμαστούν για την δοκιμασία της προσκόλλησης τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με 3 ml Phosphate Buffer Saline (PBS). Στη συνέχεια προ-επώζονται με 1,8ml πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς αντιβιοτικά, για 30min πριν τον εμβολιασμό τους με τους υπό μελέτη λακτοβακίλλους.

Οι λακτοβακίλλοι οι οποίοι φυλάσσονται σε δ/μα γλυκερόλης στους -80 °C είχαν ανακαλλιεργηθεί τουλάχιστον τρεις φορές σε θρεπτικό υλικό MRS (από εδώ και στο εξής: **ενεργοποιημένες καλλιέργειες**) ενώ έγιναν υγρές καλλιέργειες σε MRS Broth η οποίες επώαστηκαν στους 37 °C αναερόβια για 24 ώρες πριν την δοκιμασία. Οι υγρές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα ξεπλύθηκε τρεις φορές με 5 ml PBS. Στην τελευταία φυγοκέντρηση έγινε επαναιώρηση του ιζήματος των λακτοβακίλλων σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς αντιβιοτικά (εμβόλιο). Οι καταμετρήσεις του αριθμού των λακτοβακίλλων στο εμβόλιο έγιναν μετά από διαδοχικές αραιώσεις σε PBS και καταμέτρηση σε τρυβλία MRS Agar που εμβολιάστηκαν με την μέθοδο ενσωμάτωσης στο θρεπτικό υλικό (pour plate).

Το κάθε βοθρίο εμβολιάστηκε με 200 μl εμβολίου σε τέτοια ποσότητα ώστε να επιτύχουμε συγκέντρωση εμβολίου ανά βοθρίο 1×10^8 - 9×10^8 cfu/ml. Τα βοθρία επώαστηκαν σε περιβάλλον με 5% CO₂-95% ατμοσφαιρικό αέρα για 1,5 ώρα, ξεπλύθηκαν 3 φορές με 5 mL PBS και μονιμοποιήθηκαν για 30 λεπτά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με 3% (w/v) paraformaldehyde σε PBS. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS και αφότου στέγνωσαν βάφτηκαν με χρώση Gram. Η μέτρηση της προσκόλλησης των κυττάρων των λακτοβακίλλων στα κύτταρα Caco2, έγινε με καταμέτρηση 30 οπτικών πεδίων στο μικροσκόπιο με φακό x100. Ο *Lactobacillus acidophilus* DSM20079 χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας, αφού δεν εμφανίζει ιδιότητες προσκόλλησης στα Caco2 κύτταρα (161). Η δοκιμασία της προσκόλλησης επαναλήφθηκε έξι φορές για κάθε στέλεχος (162).

1.2 Έλεγχος ανθεκτικότητας στο pH των στελεχών λακτοβακίλλων

Η δοκιμασία για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας των υπό μελέτη στελεχών σε χαμηλό pH, βασίστηκε στο πρωτόκολλο των Charteris et al., 1998a (163). Ενεργοποιημένες καλλιέργειες των λακτοβακίλλων αφού επώαστηκαν για 24 ώρες σε υγρό υπόστρωμα MRS Broth,

ξεπλύθηκαν τρεις φορές με PBS και στην συνέχεια το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ποσότητα PBS κατάλληλη ώστε να έχουμε συγκεντρώσεις εμβολίου 1×10^8 - 9×10^8 cfu ml⁻¹.

Σε ένα δοχείο DURAM αποστειρώνονται 100 mL saline NaCl 0,5% w/v, και μετά την αποστείρωση προστίθεται και 0,3 gr/100 mL pepsin. Το διάλυμα με την pepsin το χρησιμοποιούμε για να φτιάξουμε δύο νέα διαλύματα με pH 2 και 3 με χρήση πυκνού HCL ώστε να προσομοιάζουν στον γαστρικό χυμό. Για κάθε στέλεχος γίνονται τρεις επαναλήψεις για κάθε pH. Σε κάθε φιαλίδιο μεταφέρεται 1 mL από το διάλυμα με pH 2 ή pH 3, 0,3 mL από το διάλυμα saline (NaCl 0,5% w/v) και 0,2 mL από το εναιώρημα των λακτοβακίλλων στο PBS (εμβόλιο). Αμέσως μόλις γίνει η μεταφορά των λακτοβακίλλων στα όξινα διαλύματα, ξεκινούν άμεσα οι διαδοχικές αραιώσεις για την καταμέτρηση των πληθυσμών, (χρόνος 0 h). Τα φιαλίδια McCartney τοποθετούνται σε υδατόλουτρο (37°C), με ήπια ανάδευση (45 rpm) και σε χρόνο 1,5 h και 3 h γίνονται επίσης καταμετρήσεις των πληθυσμών. Οι καταμετρήσεις γίνονται μετά από διαδοχικές αραιώσεις σε buffered peptone water (0.1% bacteriological peptone και 0,85 NaCl) και εμβολιασμό σε τρυβλία MRS Agar (μέθοδος pour plate). Τα τρυβλία επώαστηκαν σε αναερόβιο θάλαμο, στους 37°C, για 48 ώρες .

Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο *Lactobacillus acidophilus* DSMZ 20079 ο οποίος δεν εμφανίζει ανθεκτικότητα σε pH 2 αλλά εμφανίζει σε pH 3 (163-164).

1.3 Έλεγχος ανάπτυξης σε χολικά οξέα των στελεχών λακτοβακίλλων

Ο έλεγχος της ικανότητας ανάπτυξης παρουσία χολικών αλάτων των στελεχών των λακτοβακίλλων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Kotsou et al., 2008 (163) . Ενεργοποιημένες καλλιέργειες των λακτοβακίλλων αφού επώαστηκαν για 24 ώρες σε υγρές καλλιέργειες MRS Broth φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 rpm για 5 min και στη συνέχεια το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ποσότητα MRS τέτοια ώστε να έχουμε στο εμβόλιο συγκέντρωση κυττάρων λακτοβακίλλων 1×10^8 - 9×10^8 cfus ml⁻¹.

Από κάθε στέλεχος εμβολιαστήκαν σωλήνες με MRS Broth και σωλήνες με MRS Broth+ 0.3% bile (Difco Oxgall 212820), με 50 μl. Για κάθε στέλεχος και κάθε χειρισμό, η διαδικασία επαναλήφθηκε 3 φορές. Η εκτίμηση των ζωντανών μικροβιακών κυττάρων έγινε σε χρόνο 0 h και μετά από 24 h επώασης στους 37 °C σε αναερόβιες συνθήκες. Ακολουθήθηκε η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων σε buffered peptone water (0.1% bacteriological peptone και 0,85 NaCl) και η καταμέτρηση έγινε σε τρυβλία MRS Agar.

Ο έλεγχος της ανθεκτικότητας στα χολικά οξέα έγινε με σύγκριση του αριθμού των κυττάρων ενός στελέχους στις 0 και 24 ώρες παρουσία χολικών αλάτων αλλά και με σύγκριση του

αριθμού των κυττάρων ενός στελέχους στις 24 h παρουσία χολικών αλάτων ή απουσία χολικών αλάτων στο θρεπτικό υλικό (MRS).

1.4 Έλεγχος της επίδρασης στελεχών λακτοβακίλλων στην παραγωγή κυτταροκίνης IL-6 μετά από επώαση με επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco2).

Για τον έλεγχο της επίδρασης των υπό μελέτη στελεχών στην παραγωγή κυτταροκίνης IL-6 χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά Caco2 (ATCC HTB-37) η οποία σχηματίζει μονή στιβάδα κυττάρων που προσομοιάζουν στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε θρεπτικό υλικό Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM, PAA Laboratories GmbH, E15-843) εμπλουτισμένο με γλουταμίνη, αμινοξέα, 10% εμβρυικό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum-FBS) και 100 U mL⁻¹ πενικιλίνη και 100 μg mL⁻¹ στρεπτομυκίνη (πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM). Η καλλιέργεια των Caco2 έγινε πάνω σε πλάκες 6 βοθρίων οι οποίες επώαστηκαν σε περιβάλλον με 5% CO₂-95% ατμοσφαιρικό αέρα και θερμοκρασία 37° C. Το αρχικό εμβόλιο των κυττάρων Caco2 είχε συγκέντρωση στο βοθρίο 1,7x10⁴ κύτταρα ανά cm². Κάθε δεύτερη μέρα γινόταν αλλαγή του θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν για την δοκιμασία της παραγωγής IL-6 δύο εβδομάδες αφότου έγινε κάλυψη του 100% της επιφάνειας του βοθρίου, ώστε να έχει επιτευχθεί η διαφοροποίηση τους σε εντεροκύτταρα. Για να προετοιμαστούν για την δοκιμασία τα κύτταρα ξεπλένονται δύο φορές με 3 ml Phosphate Buffer Saline (PBS). Στη συνέχεια προεπώζονται με 1,8ml πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς αντιβιοτικά για 2 ώρες πριν τον εμβολιασμό τους με τους υπό μελέτη λακτοβάκιλλους.

Χρησιμοποιήθηκαν ενεργοποιημένες καλλιέργειες των στελεχών των λακτοβακίλλων ενώ η υγρή καλλιέργεια σε MRS Broth επώαστηκε για 24 ώρες πριν την δοκιμασία. Οι υγρές καλλιέργειες φυγοκεντρήθηκαν και το ίζημα ξεπλύθηκε τρεις φορές με 5 ml PBS. Στην τελευταία φυγοκέντρηση έγινε επαναιώρηση του ιζήματος των λακτοβακίλλων σε κατάλληλη ποσότητα DMEM χωρίς αντιβιοτικά ώστε να επιτύχουμε συγκέντρωση εμβολίου 1x10⁸-9x10⁸ cfus ανά βοθρίο. Οι καταμετρήσεις των πληθυσμών των λακτοβακίλλων έγιναν μετά από διαδοχικές αραιώσεις σε PBS και καταμέτρηση σε τρυβλία MRS Agar που εμβολιάστηκαν με την μέθοδο pour plate.

Το κάθε βοθρίο εμβολιάστηκε με 200 μl εμβολίου από τα στελέχη των λακτοβακίλλων σε πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς αντιβιοτικά. Τα Caco2 συνεπώζονται με τους λακτοβάκιλλους σε περιβάλλον με 5% CO₂-95% ατμοσφαιρικό αέρα για 2 ώρες.

Μετά από τις δύο ώρες συνεπώασης, απομακρύνουμε το υπερκείμενο από τα βοθρία, το φυγοκεντρούμε και το διηθούμε με βακτηριολογικό φίλτρο και το συλλέγουμε σε σωληνάρια errendorf τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -80°C και στα οποία έγινε η μέτρηση της IL-6 με τη μέθοδο ELISA.

Η δοκιμασία επαναλήφθηκε δύο φορές ανά στέλεχος και οι τιμές της IL-6 των υπό μελέτη λακτοβακίλλων συγκρίθηκαν με αρνητικό μάρτυρα. Για τον αρνητικό μάρτυρα στα βοθρία των Caco2 μπήκε μόνο πλήρες θρεπτικό υλικό DMEM χωρίς αντιβιοτικά (χωρίς λακτοβάκιλλους).

Η μέθοδος ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) είναι ανοσοενζυμική μέθοδος με την οποία μπορούμε να μετρήσουμε την συγκέντρωση ενός ενζύμου ή ενός αντιγόνου σε ένα δείγμα και υπάρχουν δύο κατηγορίες η απλή και η sandwich . Για την πραγματοποίηση της μέτρησης της IL-6 στα στελέχη των λακτοβακίλλων χρησιμοποιήθηκε το kit Human IL-6 51 Quantikine HS ELISA, με κωδικό HS600B της εταιρείας R&D Systems η οποία είναι μέθοδος sandwich δηλαδή η πραγματοποίηση της μέτρησης γίνεται με χρήση δύο αντισωμάτων. Στο συγκεκριμένο kit έχουμε πλάκα με 96 βοθρία στα οποία υπάρχει ειδικό ακινητοποιημένο μονοκλωνικό τιτλοποιημένο αντίσωμα για την IL-6 . Μετά την προσθήκη και επώαση των δειγμάτων με το αντίσωμα έγινε ξέπλυμα ώστε να φύγει η IL-6 η οποία δεν δεσμεύτηκε. Στην συνέχεια προστίθεται δεύτερο αντίσωμα που ανιχνεύει το σύμπλεγμα του αρχικού αντιγόνου –αντισώματος μαζί με ένζυμο που ανιχνεύει και δεσμεύεται στο δεύτερο αντίσωμα. Ακολουθεί νέο ξέπλυμα και προσθήκη μίας χρωμογόνου ουσίας που συνδεόμενη με το ένζυμο παράγει έγχρωμο σύμπλοκο και προσθήκη διαλύματος που σταματάει την αντίδραση. Η μέτρηση του έγχρωμου σχηματιζόμενου συμπλόκου έγινε με το φασματοφωτόμετρο μικροπλακιδίων ELISA Powerwave XS2 (BIOTEK INSTRUMENTS, USA) με χρήση διπλού φάσματος (490/650) για την εξάλειψη παρεμβολών στο χρώμα του συμπλόκου. Τα αποτελέσματα υπολογίζονται με βάση την καμπύλη αναφοράς σε pg/ml.

Εκτός από την μέτρηση της κυτταροκίνης IL-6 έγινε και μέτρηση της βιωσιμότητας των κυττάρων Caco2 μετά από την επώαση τους με τους λακτοβάκιλλους

Για τον έλεγχο της βιωσιμότητας: ξεπλένουμε τα βοθρία δύο φορές με PBS (συλλέγουμε τα υγρά των εκπλύσεων από τα βοθρία σε falcon των 15 ml, ένα falcon ανά βοθρίο). Σε κάθε βοθρίο ρίχνουμε 1 ml τρυψίνη, επωάζουμε με προσοχή μέχρι 10 min σε επωαστικό θάλαμο σε περιβάλλον με 5% CO_2 -95% ατμοσφαιρικό αέρα και θερμοκρασία 37°C . Στη συνέχεια προσθέτουμε σε κάθε βοθρίο 2ml DMEM πλήρες και πιπετάρουμε απαλά ώστε να ξεκολλήσουν όλα τα κύτταρα. Μαζεύουμε τα κύτταρα στα αντίστοιχα σωληνάρια Falcon. Φυγοκεντρούμε τα falcon στις 1000rpm για 5min απομακρύνουμε το υπερκείμενο και

επαναιωρούμε σε DMEM πλήρες. Από το παραπάνω εναιώρημα χρησιμοποιούμε 50μl+50μl trypan blue και μετράμε σε αιματοκυττόμετρο τα νεκρά και ζωντανά κύτταρα. Τα νεκρά λόγω λύσης της κυτταρικής μεμβράνης βάφονται μπλε ενώ τα ζωντανά παραμένουν άσπρα.

Επίσης κάνουμε μικροσκοπική εξέταση για τυχόν ύπαρξη κυττάρων Caco2 του ιζήματος που είχε προκύψει από την φυγοκέντρηση για την παραλαβή του υπερκείμενου στο οποίο μετράμε την ιντερλευκίνη .

1.5 Έλεγχος δράσης υδρολάσης των χολικών οξέων στα στελέχη λακτοβακίλλων

Για την διεξαγωγή του ελέγχου της δράσης BSH ενεργοποιημένες καλλιέργειες των στελεχών εμβολιάστηκαν σε MRS Broth και επώστηκαν για 24 ώρες στους 37 °C στον αναερόβιο θάλαμο. Οι καλλιέργειες στο MRS broth φυγοκεντρήθηκαν για 5 min στις 4000 rpm και στην συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο ενώ το ίζημα επαναιωρήθηκε σε ποσότητα MRS Broth ανάλογα με την ανάπτυξη του κάθε στελέχους ώστε να πετύχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση για το εμβόλιο που είναι μεταξύ 1×10^8 - 9×10^8 cfu/ml. Οι καταμετρήσεις των εμβολίων έγιναν με διαδοχικές αραιώσεις με buffered peptone water και καταμέτρηση σε τρυβλία MRS Agar που εμβολιάστηκαν με 100μl εμβολίου με την μέθοδο pour plate.

Τρυβλία MRS agar στα οποία ενσωματώθηκε 0.5 % (w/v) sodium taurodeoxycholate (Sigma Aldrich) και 0.37 g/l CaCl₂ κατά το πρωτόκολλο των de Toit et al.,1998 (165) εμβολιάστηκαν με τα υπό μελέτη στελέχη λακτοβακίλλων με δύο διαφορετικούς τρόπους:

- με χάρτινα αποστειρωμένα δισκία διαμέτρου 6mm, τα οποία εμποτίστηκαν με το εμβόλιο για ένα λεπτό και μετά τοποθετήθηκαν στο τρυβλίο
- με τοποθέτηση 10μl από το εμβόλιο απευθείας πάνω στο θρεπτικό υλικό.

Για να μπορέσει να απορροφήσει το εμβόλιο το θρεπτικό υλικό τα τρυβλία αφέθηκαν να στεγνώσουν πολύ καλά στον θάλαμο νηματικής ροής.

Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στον αναερόβιο θάλαμο στους 37°C και ελέγχθηκαν για την ανάπτυξη ιζήματος στις 72 ώρες. Τα στελέχη που δημιουργήσαν ζώνης ιζήματος γύρω από την περιοχή εμβολιασμού θεωρούνται θετικά για δράση BSH. Η δράση BSH προσδιορίζεται ημιποσοτικά σύμφωνα με τον τύπο (ολική διάμετρος ζώνης σε mm –διάμετρος δίσκου εμποτισμού σε mm)/2)(168).

ΚΕΦ.2 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

2.1 Έλεγχος προσκόλλησης των στελεχών σε κυτταρικές σειρές Caco-2.

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την ικανότητα προσκόλλησης των υπό μελέτη στελεχών λακτοβακίλλων στην κυτταρική σειρά Caco2 έγινε με την μέθοδο one way Anova. Για κάθε πείραμα υπήρχαν δύο εσωτερικές επαναλήψεις και έγιναν τρία διαφορετικά πειράματα. Σε κάθε εσωτερική επανάληψη καταμετρήθηκαν 30 πεδία. Για να μπορούν τα δεδομένα να ακολουθήσουν κανονική κατανομή και να εφαρμοστεί η μέθοδος one way Anova οι μέσες τιμές των προσκολλήσεων (δύο εσωτερικές επαναλήψεις, σε τρία πειράματα) μετατράπηκαν σε $\log_{10}$ ενώ εφαρμόστηκε το post-hoc test Dunnett T3 . Τα στελέχη ελέγχθηκαν για την ικανότητα προσκόλλησης τους στα κύτταρα Caco2 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα .

2.2 Έλεγχος ανθεκτικότητας στο pH των στελεχών λακτοβακίλλων.

Οι πληθυσμοί των λακτοβακίλλων μετά τις καταμετρήσεις και πριν την στατιστική επεξεργασία τους μετατράπηκαν σε $\log_{10}$ cfu/mL. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την μέθοδο One Way Repeated Measures Analysis of Variance (One Way Repeated Measures ANOVA test) για κάθε ένα στέλεχος ξεχωριστά και στα στελέχη που εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων έγινε σύγκριση ανά ζεύγη με Tukey test ενώ στο στέλεχος 46 όπου δεν ήταν δυνατό να εφαρμοστεί η μέθοδος εφαρμόστηκε η μη παραμετρική μέθοδος Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks.

2.3 Έλεγχος αύξησης παρουσία χολικών οξέων των στελεχών λακτοβακίλλων .

Οι πληθυσμοί των λακτοβακίλλων μετά τις καταμετρήσεις και πριν την στατιστική επεξεργασία τους μετατράπηκαν σε $\log_{10}$ cfu/mL. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την μέθοδο One Way Analysis of Variance και στα στελέχη που εμφάνισαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των χρόνων έγινε σύγκριση ανά ζεύγη με Tukey test. Τα στελέχη AnLb 44 και 46 των οποίων τα αποτελέσματα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή εφαρμόστηκε η μη παραμετρική μέθοδος Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks ενώ οι πολλαπλές συγκρίσεις ανά ζεύγη έγιναν με Tukey test .

2.4 Έλεγχος της επίδρασης των στελεχών λακτοβακίλλων στην παραγωγή κυτταροκίνης IL-6 από επιθηλιακά κύτταρα του έντερου (Caco2).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των υπό μελέτη στελεχών ως προς την επίδραση στην παραγωγή κυτταροκίνης IL-6 σε κύτταρα Caco2 έγινε με one way Anova on rank test σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα λόγω μη ύπαρξης ισότητας στην διακύμανση. Η τιμή της IL-6 εκφράστηκε σε pg/mL. Επίσης έγινε και κανονικοποίηση των τιμών της IL-6 ανά βοθρίο ως προς τον αριθμό κυττάρων Caco2 και η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με one way Anova on rank test σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα λόγω μη ύπαρξης ισότητας στην διακύμανση. Η τιμή της IL-6 εκφράστηκε σε pg/log10 κυττάρων Caco2. Ως προς την βιωσιμότητα η στατιστική επεξεργασία έγινε με one way Anova test.

ΚΕΦ.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Έλεγχος ικανότητας προσκόλλησης των στελεχών λακτοβακίλλων σε επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco-2).

Η ικανότητα των στελεχών των λακτοβακίλλων να προσκολλούνται σε κύτταρα Caco2 εξετάστηκε συγκριτικά με τον μάρτυρα *L.acidophilus* DSMZ 20079 που δεν εμφανίζει ικανότητα προσκόλλησης (161,162). Όπως βλέπουμε στον **Πίνακα 4** τα στελέχη που εμφανίζουν ικανότητα προσκόλλησης είναι ο *L. acidophilus* AnLb 6, ο *L. acidophilus* AnLb 17 και ο *L. salivarius* AnLb 44 καθώς έχουν μεγαλύτερη ικανότητα προσκόλλησης σε σχέση με τον DSMZ 20079 η οποία είναι στατιστικά σημαντική.

Πίνακας 4. Καταμέτρηση των πληθυσμών των λακτοβακίλλων που παραμένουν προσκολλημένοι στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου[†]

Στέλεχος	Αριθμός λακτοβακίλλων (log10)
<i>AnLb 6</i>	2,37 ^a (0.16)
<i>AnLb 17</i>	2,32 ^a (0.09)
<i>AnLb 44</i>	2,30 ^a (0.17)
<i>AnLb 46</i>	1,60 (0.11)
<i>AnLb 52</i>	1,70 (0.24)
<i>DSMZ</i> <i>20079</i>	1,40 (0.12)

[†] Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι και η τυπική απόκλιση εντός παρενθέσεως

^a στατιστικά σημαντική διαφορά στην ικανότητα προσκόλλησης σε σχέση με το στέλεχος DSMZ 20079 ($p<0.05$)

3.2 Έλεγχος ανθεκτικότητας στο pH των στελεχών λακτοβακίλλων

Τα στελέχη των λακτοβακίλλων εξετάστηκαν ως προς την ανθεκτικότητα τους σε pH2 και pH3 μετά από παραμονή στις συνθήκες αυτές για $t = 1,5$ h και $t = 3$ h. Η βιωσιμότητα των λακτοβακίλλων καταμετρήθηκε (cfu/mL) πριν από την παρέμβαση (μείωση του pH), μετά από 1,5 ώρες και 3 ώρες επώασης. Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μετά την στατιστική ανάλυση. Από τα 5 υπό μελέτη στελέχη μόνο ο AnLb 17 δεν εμφάνισε ανθεκτικότητα στο pH3 στις 3 ώρες επώασης, ενώ στο pH2 κανένα στέλεχος δεν εμφάνισε ανθεκτικότητα. Το στέλεχος DSMZ 20079 δεν εμφάνισε αντοχή σε κανένα από τα δύο pH.

Πίνακας 5 Καταμέτρηση των πληθυσμών των λακτοβακίλλων ($\log_{10}$ cfu/mL) μετά από παραμονή σε ακραίες τιμές pH (pH=2, pH=3)† cfu/ml σε $t = 0$ h, $t = 1,5$ h και $t = 3$ h.

Στέλεχος	pH3			pH2		
	0h	1.5h	3h	0h	1.5h	3h
AnLb6	7,44 (0,06)	7,52 (0,06)	7,40 (0,03)	7,44 (0,06)	3,95 (0,04) ^a	<3.00 ^a
AnLb17	6,46 (0,15)	6,34 (0,15)	5,85 (0,11) ^b	6,46 (0,15)	4,94 (0,36) ^a	<3.00 ^a
AnLb44	8,07 (0,10)	7,98 (0,23)	7,97 (0,05)	8,07 (0,10)	<3.00 ^a	<3.00 ^a
AnLb46	7,58 (7,51- 7,63) ^c	7,44 (7,43- 7,45) ^c	7,53 (7,50- 7,63) ^c	7,57 (0,08)	<3.00 ^a	<3.00 ^a
AnLb52	7,40 (0,07)	7,35 (0,14)	7,50 (0,10)	7,40 (0,07)	<3.00 ^a	<3.00 ^a
DSMZ 20079	5,86 (0,03)	5,70 (0,03) ^b	5,62 (0,09) ^a	5,86 (0,03)	5,13 (0,05) ^b	3,77 (0,24) ^a

† Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι και η τυπική απόκλιση εντός παρενθέσεως

^a στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το χρόνο 0 ($p < 0.01$), ^b στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το χρόνο 0 ($p < 0.05$), ^c διάμεσος και εντός παρενθέσεως το 25ο και 75ο εκατοστημόριο.

Όλα τα στελέχη ελέγχθηκαν με one way ANOVA Repeated Measurements εκτός του στελέχους AnLb 46 που ελέγχθηκε με Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks.

3.3 Έλεγχος ανάπτυξης παρουσία χολικών οξέων των στελεχών λακτοβακίλλων

Από τα στελέχη των λακτοβακίλλων που εξετάστηκαν τα AnLb 6, AnLb 17 και AnLb 52 εμφανίζουν ικανότητα ανάπτυξης παρουσία χολικών οξέων, αφού διαφέρουν σημαντικά οι πληθυσμοί τους μετά από 24 ώρες ανάπτυξης παρουσία χολικών, με τον αντίστοιχο πληθυσμό τους πριν από την επίδραση με χολικά. Αξίζει να σημειωθεί ότι το στέλεχος AnLb 52 δεν εμφανίζει σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα, δηλαδή την ανάπτυξη του ίδιου στελέχους χωρίς την παρουσία χολικών μετά από 24h. Τα στελέχη AnLb 44 και AnLb 46 εφόσον πληρούνταν τα κριτήρια για να μελετηθούν στατιστικά με One Way Anova test παρουσιάζουν επίσης ικανότητα αύξησης μετά από 24h. Το στέλεχος DSMZ 20079 επίσης δεν δείχνει ικανότητα ανάπτυξης παρουσία των χολικών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Καταμέτρηση των πληθυσμών των λακτοβακίλλων ($\log_{10}$ cfu/mL) μετά από ανάπτυξη σε υπόστρωμα με χολικά άλατα[†]

Στέλεχος	Χολικά άλατα		Μάρτυρας	
	0h	24h	0h	24h
AnLb6	6,26 (0,23)	7,61 (0,13) ^{a,c}	6,51 (0,05)	8,01 (0,13)
AnLb17	5,52 (0,38)	6,27 (0,14) ^{b,c}	6,03 (0,06)	6,94 (0,19)
AnLb44	6,11 (0,43)	7,26 (0,27)	6,01 (0,05)	8,90 (0,03)
AnLb46	6,07 (0,02)	7,50 (0,46)	6,01 (0,30)	8,21 (0,04)
AnLb52	6,46 (0,27)	8,17 (0,09) ^a	6,35 (0,25)	8,32 (0,02)
DSM 20079	5,88 (0,17)	6,58 (0,27)	5,87 (0,15)	6,71 (0,47)

[†] Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι και η τυπική απόκλιση εντός παρενθέσεως (n=3)

^a Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.001$) μεταξύ του t=0h και του t=24h για τα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό με χολικά άλατα.

^b Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) μεταξύ του t=0h και του t=24h για τα στελέχη που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό με χολικά άλατα.

^c Στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) στις 24h μεταξύ των στελεχών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό με χολικά άλατα και σε θρεπτικό υλικό χωρίς χολικά.

3.4 Έλεγχος της επίδρασης των στελεχών λακτοβακίλλων στην παραγωγή κυτταροκίνης IL-6 από επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Caco2).

Από τα στελέχη των λακτοβακίλλων που εξετάστηκαν, δεν εμφάνισε κανένα στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τον μάρτυρα (αρνητικό control). Παρατηρούμε όμως ότι το στέλεχος AnLb52 όταν επωάζεται μαζί με τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα προκαλεί την έκκριση υψηλότερης συγκέντρωσης IL-6 σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη και με τον μάρτυρα, παρόλο που η διαφορά αυτή δεν φτάνει τα επίπεδα της σημαντικότητας.

Τα στελέχη δεν είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά βιωσιμότητας σε σχέση με τον μάρτυρα.

Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**.

Πίνακας 7. Παραγωγή IL-6 και βιωσιμότητα μετά από επώαση των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (Caco-2) με τα στελέχη των λακτοβακίλλων[†]

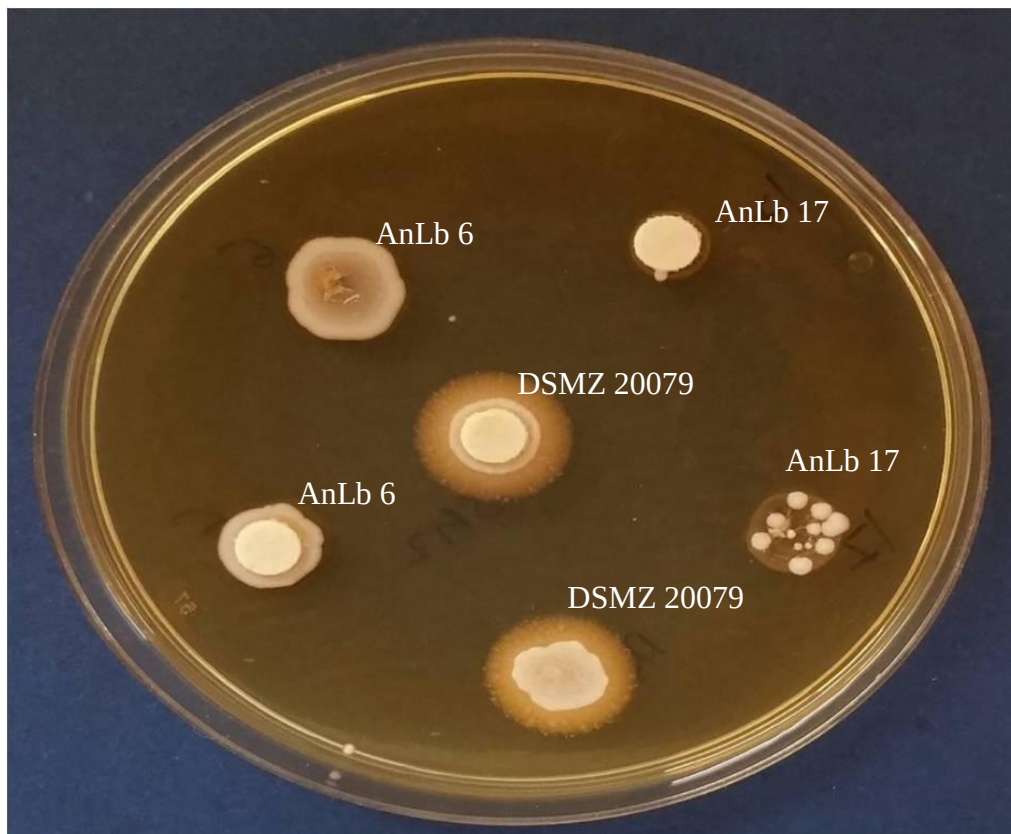
Στέλεχος	IL-6 (pg/ml)	IL-6 (pg/log10 κυττάρων Caco2)	Βιωσιμότητα
AnLb6	0,14 (0,06)	0.0215 (0,009)	90% (5%)
AnLb17	0,16 (0,14)	0.0247 (0,006)	93% (3%)
AnLb44	0,16 (0,10)	0.0228 (0,012)	87% (3%)
AnLb46	0,22 (0,21)	0.0329 (0,003)	90% (3%)
AnLb52	0,55 (0,46)	0.0809 (0,019)	88% (4%)
Μάρτυρας (χωρίς παρουσία λακτοβακίλλων)	0,12 (0,10)	0.0184 (0,005)	90% (6%)
DSMZ 20079	1,11	0,166	87% (3%)

[†] Οι τιμές εκφράζονται ως μέσοι όροι και η τυπική απόκλιση εντός παρενθέσεως (n=2).

Η τιμή της IL-6 για το DSMZ 20079 μετρήθηκε μόνο μία φορά.

3.5 Έλεγχος δράσης υδρολάσης των χολικών οξέων των υπό μελέτη στελεχών

Ο έλεγχος της δράσης υδρολάσης έγινε με παρατήρηση της ύπαρξης ζώνης ιζήματος γύρω από το σημείο όπου έγινε η τοποθέτηση των καλλιιεργειών ανά 24ωρο και μέχρι την συμπλήρωση 72 ωρών. Τα υπό εξέταση στελέχη δεν έδειξαν να έχουν τέτοια δράση σε σχέση με το στέλεχος ελέγχου DSMZ 20079 το οποίο εμφάνισε δράση υδρολάσης με δημιουργία ιζήματος με διάμετρο 14,75mm στις 72 ώρες (Εικ.9).



Εικ.9 Αύξηση των στελεχών λακτοβακίλλων σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με sodium taurodeoxycholate

Στην Εικ.9 φαίνεται η ανάπτυξη των στελεχών σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με 0.5 % (w/v) sodium taurodeoxycholate. Μόνο το στέλεχος DSMZ 20079 παρουσιάζει την χαρακτηριστική εικόνα της κατακρήμνισης στο υπόστρωμα γύρω από το εμβόλιο, που εμφανίζουν τα στελέχη που διαθέτουν το ένζυμο BSH.

Η ημιποσοτική μέτρηση της δραστηριότητας BSH του DSMZ 20079 είναι $(14,75\text{mm}-6,00\text{mm})/2=4,38\text{mm}$.

ΚΕΦ.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα υποψήφια προβιοτικά στελέχη πρέπει να εμφανίζουν ιδιότητες οι οποίες είναι ευεργετικές για τον ξενιστή αλλά και βοηθούν τα ίδια τα στελέχη να επιβιώνουν και να αυξάνονται στο γαστρεντερικό σωλήνα. Η επαφή τους με τα γαστρικά υγρά και το χαμηλό pH που υπάρχει στο στομάχι που είναι από 1,5-3,5 είναι ο πρώτος ανασταλτικός παράγοντας που έχουν να αντιμετωπίσουν κατά την δίοδο τους προς το έντερο. Ο χρόνος παραμονής στο στομάχι ανάλογα με την ποσότητα της τροφής και την κινητικότητα του μπορεί να διαρκέσει από 2-6 ώρες. Στη συνέχεια κατά την είσοδο τους στο λεπτό έντερο έρχονται σε επαφή με την χολή η οποία περιέχει χολικά οξέα τα οποία μπορούν να αποδιοργανώσουν την κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων. Η ικανότητα των βακτηρίων να αναπτύσσονται παρουσία χολικών οξέων οφείλεται τόσο στην δομή της κυτταρικής τους μεμβράνης όσο και στην δράση υδρολάσης που μπορεί να έχουν. Τέλος κατά την εγκατάστασή τους στον γαστρεντερικό σωλήνα η ικανότητα να προσκολλούνται στο εντερικό επιθήλιο τους δίνει την δυνατότητα να το αποικίσουν και να πολλαπλασιαστούν, ιδιότητα που έχει δείχθει ότι επηρεάζει και την ικανότητα τους να επηρεάσουν το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Εφόσον τώρα το προβιοτικό στέλεχος κατορθώσει να επιβιώσει και να αναπτυχθεί, μπορεί να επιδράσει στο ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή μέσω της έκκρισης κυτταροκινών ή της αναστολής της και να το τροποποιήσει.

Από τις παραπάνω προβιοτικές ιδιότητες η ικανότητα ανάπτυξης στα χολικά οξέα θεωρείται ότι είναι παράγοντας ο οποίος είναι περισσότερο επιθυμητός για την επιλογή του προβιοτικού στελέχους. Και αυτό γιατί οι μέχρι τώρα διαθέσιμες μορφές εντεροδιαλυτών κάψουλων και μικροκάψουλων (οι οποίες περιέχουν αλγινικό) μπορούν να προσφέρουν προστασία σε συγκέντρωση χολικών μέχρι 1% συνεπώς δεν είναι αποτελεσματικά στις συνθήκες οι οποίες επικρατούν κατά την αρχή της πέψης(189-190). Ακόμα υπάρχει συγκέντρωση χολικών 0,3% και στο παχύ έντερο όπου τα προβιοτικά πρέπει να δράσουν εκτός κάψουλας. Η δράση της υδρολάσης των χολικών οξέων που παρουσιάζουν κάποια στελέχη, πέρα από τα οφέλη υγείας που μπορεί να προσφέρει στον ξενιστή τους (168,191), τους προσφέρει και αυξημένη ικανότητα επιβίωσης στο λεπτό έντερο και ανάπτυξης στο παχύ (127). Αντίθετα τα στελέχη που είναι ευαίσθητα στο pH μπορούν να μουν σε εντεροδιαλυτή φόρμουλα ενώ σε πρόσφατη μελέτη για την ικανότητα προσκόλλησης στο εντερικό επιθήλιο δείχθηκε ότι δεν είναι απαραίτητη για να μπορέσει το προβιοτικό στέλεχος να έχει οφέλη υγείας στον ξενιστή

του. Αυτό που είναι σημαντικό είναι ο πληθυσμός του να είναι τουλάχιστον 10^6 με 10^8 cfu /g σε σχέση με το περιεχόμενο του εντέρου (169-170), συνεπώς η βιωσιμότητα αναδεικνύεται στον σημαντικότερο παράγοντα μαζί με την ποσότητα του προβιοτικού που περιέχεται σε ένα προβιοτικό προϊόν.

Η ικανότητα προσκόλλησης είναι μία ιδιότητα η οποία εξαρτάται από το στέλεχος (162,171,172). Τα υπό μελέτη στελέχη ανήκουν σε είδη όπως το *L.acidophilus* (171), το *L.ramnosus*(173-174), το *L.salivarius* (175), τα οποία βιβλιογραφικά παρουσιάζουν ικανότητα προσκόλλησης. Από τα στελέχη όμως που εξετάστηκαν κατά την εργασία αυτή και εμφάνισαν ικανότητα προσκόλλησης ήταν τα *L.acidophilus* AnLb 6 και 17 και το *L.salivarius* AnLb 44. Τα στελέχη *L.ramnosus* AnLb 46 και 52 δεν εμφάνισαν ικανότητα προσκόλλησης όπως δεν εμφανίζει και το στέλεχος ελέγχου *L.acidophilus* DSMZ 20079. Τα στελέχη που εμφάνισαν ικανότητα προσκόλλησης είχαν μέτρια προσκόλληση που δεν ξεπερνούσε κατά μέσο όρο τα 400 κύτταρα ανά οπτικό πεδίο (σημαντική διαφορά σε σχέση με τον DSMZ 20079 $p < 0.05$). Τα στελέχη που εμφανίζουν πολύ υψηλή προσκόλληση πρέπει να εξετάζονται με προσοχή καθώς είναι πιθανό να εμφανίζουν παθογένεια (110-111). Ο αριθμός των βακτηρίων που προσκολλούνται στα Caco2 μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν ότι είχε άμεση σχέση με τον αριθμό των βακτηρίων που προστίθεται ανά βοθρίο και ένα σχετικά στενό πεδίο $1 \times 10^8 - 9 \times 10^8$ είχε οριστεί σαν απαραίτητη προϋπόθεση για την διεξαγωγή των δοκιμασιών. Δοκιμασίες στις οποίες ελέγχθηκε η προσκόλληση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις βακτηρίων έδειξαν ότι η τελική συγκέντρωση των βακτηρίων δεν παίζει ρόλο στον αριθμό των βακτηρίων που προσκολλούνται (96). Αυτό που έχει σημασία είναι να προσομοιάζονται οι συνθήκες δέσμευσης στο έντερο το οποίο ανταποκρίνεται σε συγκέντρωση βακίλλων ανά βοθρίο $10^7 - 10^9$. Τα στελέχη του γένους *Lactobacillus* εμφανίζονται πιο ανθεκτικά στις γαστρικές συνθήκες και με μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης σε αυτές σε σχέση με άλλα γένη (176). Στελέχη και από τα τρία είδη των υπό μελέτη λακτοβακίλλων έχουν βρεθεί να εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο pH (178-179) ενώ αυτή η ικανότητα ενισχύεται περισσότερο όταν εξετάζονται στελέχη που έχουν απομονωθεί από το γαστρεντερικό σύστημα. Τα υπό μελέτη στελέχη δεν εμφάνισαν ανθεκτικότητα στο pH2, εμφάνισαν όμως ανθεκτικότητα στο pH3 τα στελέχη AnLb 6, AnLb 44, AnLb 46 και AnLb 52. Οι *L.acidophilus* AnLb 17 και DSMZ 20079 δεν εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε κανένα από τα δύο pH. Ο DSMZ 20079 έχει μελετηθεί ως προς την ανθεκτικότητα του στο pH σε προηγούμενες εργασίες (M.G.Kotsou et al., 2008 και Kirtzalidou

et al.2011) και εμφάνιζε ανθεκτικότητα στο pH3. Η διαφορά αυτή μπορεί να αποδοθεί στην χαμηλότερη συγκέντρωση του DSMZ 20079 που επιτεύχθηκε στην παρούσα μελέτη. Ο μέσος log10 του πληθυσμού του εμβολίου ήταν 5.86 cfu/ml στην παρούσα μελέτη, ενώ στις αναφερόμενες εργασίες ήταν 7.37 (M.G.Kotsou et al., 2008) και 7.97 (Kirtzalidou et al., 2011).

Η ευαισθησία των στελεχών στο pH2 δεν καθιστά μη επιλέξιμα τα συγκεκριμένα στελέχη λακτοβακίλλων ως προβιοτικά καθώς αυτά μπορούν να συνδυαστούν είτε με κάποιο τρόφιμο το οποίο έχει βρεθεί ότι είναι ικανό να τα προστατεύσει από το χαμηλό pH (πρωτεΐνη γάλακτος, γιαούρτι, σοκολάτα) είτε σε κάποια γαστροανθεκτική φόρμουλα (γαστροανθεκτικές κάψουλες, μικροκάψουλες κλπ.) έτσι ώστε να περάσουν από το στομάχι χωρίς να επηρεαστούν από το pH (177).

Παρόμοια με την ανθεκτικότητα στο pH, τα στελέχη που απομονώνονται από το γαστρεντερικό σύστημα εμφανίζουν μεγαλύτερη ικανότητα ανάπτυξης παρουσία χολικών οξέων. Η ικανότητα ανάπτυξης παρουσία χολικών οξέων μπορεί να οφείλεται σε διάφορους προστατευτικούς μηχανισμούς και ένας από αυτούς θεωρείται η δράση υδρολότητας των χολικών οξέων (165). Τα είδη στα οποία ανήκουν οι υπό μελέτη λακτοβάκιλλοι έχουν δώσει μεικτά αποτελέσματα ως προς την ανάπτυξη παρουσία χολικών, ανάλογα με το στέλεχος. Έτσι ο *L.acidophilus* εμφανίζεται τόσο ευαίσθητος (172) όσο και υψηλά ανθεκτικός στα χολικά οξέα (162) ενώ ο *L.ramnosus* φαίνεται πολύ(172) έως μέτρια ευαίσθητος (180). Από τα υπό μελέτη στελέχη αντίθετα το στέλεχος που εμφάνισε ικανότητα ανάπτυξης παρουσία χολικών οξέων παρόμοια με του μάρτυρα ήταν το στέλεχος *L.ramnosus* AnLb 52. Ικανότητα ανάπτυξης παρουσία χολικών οξέων αλλά όχι στα επίπεδα του μάρτυρα (δηλαδή ανάπτυξη χωρίς χολικά) εμφάνισαν και τα στελέχη AnLb 6 και AnLb 17 ενώ περαιτέρω έλεγχος χρειάζεται για τα στελέχη AnLb 44 και 46 καθώς δεν εμφάνισαν ικανότητα ανάπτυξης αλλά συγκρίθηκαν στατιστικά με μη παραμετρικές μεθόδους. Ο DSMZ 20079 δεν εμφάνισε ικανότητα ανάπτυξης στατιστικά σημαντική ($p<0.05$), γεγονός που είναι σύμφωνο με τα αποτελέσματα και άλλων ερευνητών (M.G.Kotsou et al.,2008 και Kirtzalidou et al.,2011). Το στέλεχος DSMZ 20079 εμφάνισε δράση υδρολότητας των χολικών οξέων αλλά ίσως η δράση αυτή να υπόκειται και σε άλλους παράγοντες ώστε να βοηθήσει το στέλεχος να αναπτυχθεί παρουσία χολικών π.χ. σε συγκεκριμένο pH καθώς το βέλτιστο pH για την δράση BSH των βακίλλων έχει βρεθεί ότι είναι ελαφρά όξινο μεταξύ 5 και 6 (184) ενώ μεταξύ διαφορετικών ομολόγων BSH υπάρχει

διαφορετική τιμή βέλτιστου pH (187-188). Επίσης επειδή η δράση BSH του DSMZ μελετήθηκε ως προς το ταυροδεοξυχολικό είναι πιθανό να μην εμφανίζεται στο ταυροχολικό ή σε χολικά οξέα συζευγμένα με γλυκίνη που θεωρούνται και περισσότερο τοξικά (184).

Η ιντερλευκίνη IL-6 ανήκει στην κατηγορία των κυτταροκινών και η επίδραση της στον ανοσοποιητικό σύστημα είναι ρυθμιστική. Μπορεί να έχει προφλεγμονώδη δράση διεγείροντας το ανοσοποιητικό κατά πιθανών εισβολέων αλλά και αντιφλεγμονώδη αναστέλλοντας την παραγωγή του TNF- α και προάγοντας την παραγωγή της αντιφλεγμονώδους IL-10 (181). Επίσης η δράση της εξαρτάται από την παράλληλη παραγωγή του αντιφλεγμονώδους TGF- β ή με την IL-23 καθώς ο συνδυασμός IL-6 και TGF- β οδηγεί στην παραγωγή Treg17 κυττάρων που είναι ανοσορυθμιστικά ενώ ο συνδυασμός IL-6 και IL-23 οδηγεί σε παραγωγή των Th17 κυττάρων που έχουν κυτταροτοξική δράση (182). Συνεπώς ανάλογα με το αν απαιτείται δράση ενάντια στα παθογόνα ή δράση ως προς φλεγμονώδεις νόσους πρέπει να ελέγχεται με ποιους άλλους παράγοντες συνδυάζεται η παραγωγή της IL-6 υπό την επίδραση ενός προβιοτικού στελέχους στα κύτταρα του ξενιστή.

Οι υπό μελέτη λακτοβάκιλλοι δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντική παραγωγή IL-6 κατά την επίδραση τους σε κύτταρα Caco2. Εφαρμόστηκε όμως μη παραμετρικό τεστ λόγω της μεγάλης διαφοράς στην διακύμανση μεταξύ των στελεχών (του στελέχους AnLb 52 με τα υπόλοιπα). Σύμφωνα με όμως με σύγκριση με παραμετρικό τεστ φαίνεται ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική παραγωγή IL-6 σε σχέση με τον αρνητικό μάρτυρα για το AnLb 52, συνεπώς απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την εξακρίβωση αυτού του φαινομένου. Εφόσον ισχύει είναι απαραίτητο να ελεγχθεί εάν παράγονται ταυτόχρονα και άλλοι παράγοντες και ιδιαίτερα TGF- β ή IL-23 ώστε να δούμε εάν το στέλεχος εμφανίζει δράση κατά των παθογόνων ή αντιφλεγμονώδη. Επίσης κανένα στέλεχος δεν εμφάνισε κυτταροτοξική δράση.

Τα υπό εξέταση στελέχη δεν εμφάνισαν δράση BSH. Το μόνο στέλεχος που εμφάνισε δράση υδρολάσης ήταν το στέλεχος ελέγχου το *L.acidophilus* DSMZ 20079. Το συγκεκριμένο στέλεχος έχει βρεθεί ότι παράγει μία πρωτεΐνη με δράση υδρολάσης (167), ενώ στην βιβλιοθήκη του NCBI Identical Proteins βρέθηκαν δύο διαφορετικές καταχωρήσεις για πρωτεΐνες με δράση υδρολάσης, από δύο διαφορετικούς γενετικούς τόπους , οι οποίες μετά από Blast βρέθηκαν ταυτόσημες. Η δραστηριότητα του DSMZ προσδιορίστηκε 4,38 ενώ τα εμπορικά διαθέσιμα στελέχη με την μεγαλύτερη BSH δραστηριότητα είναι ο *L. plantarum* 299ν με δραστηριότητα 1,70 και ο *L. plantarum* του προβιοτικού προϊόντος VSL#3 με δραστηριότητα 2,00 (168).

Στον **Πίνακα 8** φαίνεται η δραστηριότητα των παραπάνω στελεχών.

Πίνακας 8. Δραστικότητα BSH των στελεχών DSMZ 20079, *L.plantarum* 299v και *L. plantarum* VSL#3

ΣΤΕΛΕΧΟΣ	BSH ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ
DSMZ 20079	4,38
<i>L. plantarum</i> 299v	1,70
<i>L. plantarum</i> VSL#3	2,00

Βιβλιογραφικά ο DSMZ 20079 φαίνεται να εμφανίζει μία μόνο πρωτεΐνη με δράση BSH που πιθανόν να περιορίζει την δράση του σε σχέση με στελέχη που εμφανίζουν πολλαπλά ομόλογα της πρωτεΐνης καθώς αυτά μπορούν να έχουν καλύτερη προσαρμογή σε διαφορετικούς τύπους χολικών οξέων ή σε διαφορετικούς χρόνους έκθεσης σε αυτά(185-186). Καθώς το βέλτιστο pH για την δράση BSH των διαφόρων στελεχών είναι ελαφρά όξινο και κυμαίνεται μεταξύ 5 και 6 το στέλεχος θα εμφανίζει δράση BSH σε συγκεκριμένη περιοχή pH, στην οποία όμως θα εμφανίζει σημαντική δράση .

Οι μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να επικεντρωθούν:

- στην επιβεβαίωση της ύπαρξης μοναδικής πρωτεΐνης με δράση BSH και εφόσον αυτό επιβεβαιωθεί σε περαιτέρω διερεύνηση για την επίδραση του pH και των άλλων τύπων χολικών οξέων στην δράση BSH.
- στην μελέτη της επίδρασης του συγκεκριμένου στελέχους στα επίπεδα χοληστερόλης του πλάσματος και στο βάρος με χρήση πειραματόζων και κλινικές μελέτες στον άνθρωπο.
- Στην μελέτη της ικανότητας να μεταβολίζει τα μη συζευγμένα χολικά οξέα σε δευτερογενή ή να τα απορροφά στο εσωτερικό των κυττάρων του ώστε να εξασφαλίζεται η ασφάλεια της χρήσης του.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η συγκεκριμένη μελέτη έγινε με χρήση *in vitro* μεθόδων και μελετήθηκαν μονήρη στελέχη λακτοβακίλλων. Στον μικροβιόκοσμο στο έντερο υπάρχει δυναμική αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων στελεχών των βακτηρίων αλλά και των άλλων μικροοργανισμών που τον αποτελούν με αποτέλεσμα η προς μελέτη δράση να τροποποιείται σημαντικά. Συγκεκριμένα :

- Η ικανότητα προσκόλλησης των στελεχών των λακτοβακίλλων έγινε πάνω σε διαφοροποιημένα κύτταρα Caco2 που προσομοιάζουν στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου. Δεν έχουν όμως άλλα κύτταρα που έχει το εντερικό επιθήλιο όπως είναι τα Goblet κύτταρα που παράγουν βλέννη, τα οποία έχει η κυτταρική σειρά HT29, συνεπώς στερούνται βλεννογόνου και άρα δεν υπάρχει η συνολική δομή του επιθηλίου του εντέρου(130).
- Οι συνθήκες που ελέγχθηκαν οι υπό μελέτη λακτοβάκιλλοι για την ικανότητα προσκόλλησης τους δεν προσομοιάζουν στις συνθήκες λειτουργίας του εντέρου, διότι υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την προσκόλληση όπως ο ήδη υπάρχον μικροβιόκοσμος και η κινητικότητα του εντέρου καθώς και τα βιοδιαθέσιμα θρεπτικά (95).
- Το διάλυμα στο οποίο έγινε η δοκιμασία για τον έλεγχο ανθεκτικότητας στο pH προσομοιάζει στα γαστρικά υγρά μόνο ως προς το pH και την παρουσία πεψίνης. Τα γαστρικά υγρά όμως περιέχουν διαιτητικά στοιχεία τα οποία επηρεάζουν θετικά την επιβίωση των στελεχών όπως μεταβολίσιμοι υδατάνθρακες ή αρνητικά όπως τα χολικά οξέα.
- Το ίδιο ισχύει και για την δοκιμασία των χολικών οξέων καθώς το διάλυμα προσομοιάζει στην παρουσία χολής 0,3% (w/v) ενώ έχουμε μεταβολή της συγκέντρωσης της χολής που κυμαίνεται από 1,5% έως 2% (w / v) στην πρώτη ώρα της πέψης, και μειώνεται στη συνέχεια σε περίπου 0,3% (w / v) (183) αλλά και θρεπτικά στοιχεία από την διατροφή που δρουν προστατευτικά στους βάκιλλους ως προς τα χολικά.
- Ομοίως όπως και στην προσκόλληση η παραγωγή κυτταροκίνης πρέπει να ελεγχθεί και σε άλλες κυτταρικές σειρές καθώς μπορεί να διαφέρουν τα αποτελέσματα ανά κυτταρική σειρά αλλά και η παραγωγή κυτταροκίνης IL-6 να επηρεάζεται όταν τα στελέχη αλληλεπιδρούν με άλλους μικροοργανισμούς του μικροβιόκοσμου.

- Η συγκεκριμένη μέθοδος μέτρησης της δράσης BSH είναι ημιποσοτική. Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων είναι απαραίτητο να γίνει και ποσοτική μέτρηση της BSH με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (high-pressure liquid chromatography - HPLC) και συσχέτιση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων μεταξύ τους. Επίσης η δράση BSH των στελεχών μπορεί να τροποποιείται όταν αυτά αλληλεπιδράσουν με τον μικροβιόκοσμο του εντέρου.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα υπό μελέτη στελέχη ελέγχθηκαν ως προς τις προβιοτικές ιδιότητες της ικανότητας προσκόλλησης, της επίδρασης στην παραγωγή κυτταροκίνης IL-6 από κύτταρα Caco2 και στην βιωσιμότητά τους, της ανθεκτικότητας στο pH, της ανάπτυξης παρουσία χολικών οξέων και της δράσης υδρολάσης των χολικών οξέων. Στον **Πίνακα 9** φαίνεται το συνολικό προφίλ προβιοτικών ιδιοτήτων που εμφάνισαν τα υπό μελέτη στελέχη .

Πίνακας 9 Συνολικό προφίλ προβιοτικών ιδιοτήτων των υπό μελέτη λακτοβακίλλων

	Προσκόλληση	IL6/ κυτταροτοξικότητα	pH2	pH3	Χολικά άλατα	BSH
AnLb6	+	-/-	-	+	+	-
AnLb17	+	-/-	-	-	+	-
AnLb44	+	-/-	-	+	-	-
AnLb46	-	-/-	-	+	-	-
AnLb52	-	-/-	-	+	++	-

Με (+) ή (-) σημαίνεται αντίστοιχα η εμφάνιση ή όχι η ιδιότητα και με (++) όταν η ιδιότητα που εμφανίζεται προσομοιάζει σε αυτή του μάρτυρα. Με κόκκινο σημαίνονται όσα θεωρούνται ότι είναι ευεργετικά για τον ξενιστή

Όπως φαίνεται το στέλεχος το οποίο εμφανίζει τις περισσότερες θετικές ιδιότητες είναι το στέλεχος AnLb 6 και απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση. Τα στελέχη AnLb 17 και το AnLb 52 λόγω της καλής τους ανοχής στα χολικά οξέα καθώς και της θετικής ιδιότητας προσκόλλησης του AnLb 17 επίσης είναι πιθανά στελέχη για περαιτέρω έλεγχο. Το AnLb 44 επίσης εμφανίζει τον ίδιο αριθμό προβιοτικών ιδιοτήτων, όμως δεν εμφανίζει ικανότητα ανάπτυξης παρουσία χολικών οξέων, που είναι πολύ βασική προβιοτική ιδιότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Liddell, Henry George; Scott, Robert (eds.). "βιωτικός". [A Greek-English Lexicon](#) – via [Perseus Project](#).
2. Rijkers G.T., De Vos W.M., Brummer R.J., Morelli L., Corthier G., Marteau P. Health benefits and health claims of probiotics: Bridging science and marketing. *Br. J. Nutr.* 2011;106:1291–1296. doi: 10.1017/S000711451100287X
3. Magdalena Araya, Catherine Stanton, Lorenzo Morelli, Gregor Reid, Maya Pineiro, et al., 2006, "Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation," *Combined 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, 1–4 October 2001, and *Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*, London, Ontario, Canada, 30 April–1 May 2002 [FAO Food and Nutrition paper 85], pp. 1–50, Rome, Italy: World Health Organization (WHO), Food and Agricultural Organization (FAO) [of the United Nations], [ISBN 9251055130](#),
4. ["Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food"](#) (PDF). Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada. 1 May 2002.
5. Hill, C; Guarner, F; Reid, G; Gibson, GR; Merenstein, DJ; Pot, B; Morelli, L; Canani, RB; Flint, HJ; Salminen, S; Calder, PC; Sanders, ME (August 2014). "Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic". *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*. 11 (8): 506–14. doi:[10.1038/nrgastro.2014.66](#)
6. Rijkers GT, de Vos WM, Brummer RJ, Morelli L, Corthier G, Marteau P (2011). ["Health benefits and health claims of probiotics: Bridging science and marketing"](#). *British Journal of Nutrition*. 106 (9): 1291–6. doi:[10.1017/S000711451100287X](#)
7. Fijan, S. (2014). Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), pp.4745-4767.

8. Didari T., Solki S., Mozaffari S., Nikfar S., Abdollahi M. A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin Drug Saf.* 2014;13:227–239. doi: 10.1517/14740338.2014.872627
9. Jovel, J., Patterson, J., Wang, W., Hotte, N., O'Keefe, S., Mitchel, T., Perry, T., Kao, D., Mason, A., Madsen, K. and Wong, G. (2016). Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 7.
10. Vasiljevic, T. and Shah, N. (2008). Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), pp.714-728.
11. Harzallah, D. and Belhadj, H. (2013). Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*.
12. Collado MC, Gueimonde M & Salminen S (2010) Probiotics in adhesion of pathogens: mechanisms of action. *Bioactive Foods Promot Health* 23, 353–370.
13. Yan F & Polk DB (2011) Probiotics and immune health. *Curr Opin Gastroenterol* 27, 496–501.
14. Tsai, C., Lin, P., Hsieh, Y., Zhang, Z., Wu, H. and Huang, C. (2014). Cholesterol-Lowering Potentials of Lactic Acid Bacteria Based on Bile-Salt Hydrolase Activity and Effect of Potent Strains on Cholesterol Metabolism In Vitro and In Vivo. *The Scientific World Journal*, 2014, pp.1-10..
15. Kristensen, N., Bryrup, T., Allin, K., Nielsen, T., Hansen, T. and Pedersen, O. (2016). Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Medicine*, 8(1).
16. Ayeni FA, Sa'nchez B, Adeniyi BA, et al. (2011) Evaluation of the functional potential of Weissella and Lactobacillus isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. *Int J Food Microbiol* 147, 97–104.
17. Zago M, Fornasari ME, Carminati D, et al. (2011) Characterization and probiotic potential of Lactobacillus plantarum strains isolated from cheeses. *Food Microbiol* 28, 1033–1040.
18. Ugarte MB, Guglielmotti D, Giraffa G, et al. (2006) Nonstarter lactobacilli isolated from soft and semihard Argentinean cheeses: genetic characterization and resistance to biological barriers. *J Food Prot* 69, 2983–2991.
19. Georgieva RN, Iliev IN, Chipeva VA, et al. (2008) Identification and in vitro characterization of Lactobacillus plantarum strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses. *J Basic Microbiol* 48, 234–244

20. Georgieva RN, Iliev IN, Chipeva VA, et al. (2008) Identification and in vitro characterization of *Lactobacillus plantarum* strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses. *J Basic Microbiol* 48, 234–244
21. Sun Z, Liu W, Gao W, et al. (2010) Identification and characterization of the dominant lactic acid bacteria from kurut: the naturally fermented yak milk in Qinghai, China. *J Gen Appl Microbiol* 56, 1–10.
22. West PA, Hewitt JH & Murphy OM (1979) Influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J Appl Bacteriol* 46, 269–277.
23. Martin R, Jimé'nez E, Heilig H, et al. (2009) Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 75, 965–969.
24. O'hara AM & Shanahan F (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 7, 688–693.
25. Martin R, Langa S, Reviriego C, et al. (2003) Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 143, 754–758.
26. Solis G, Reyes-Gavilan CG, De los Fernandez N, et al. (2010) Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breastmilk and the infant gut. *Anaerobe* 16, 307–310.
27. Oddy, W. (2017). Breastfeeding, Childhood Asthma, and Allergic Disease. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 70(2), pp.26-36.
28. Schnitzer, M., van der Laan, M., Moodie, E. and Platt, R. (2014). Effect of breastfeeding on gastrointestinal infection in infants: A targeted maximum likelihood approach for clustered longitudinal data. *The Annals of Applied Statistics*, 8(2), pp.703-725
29. Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, et al. (2007) Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation. *Neonatology* 92, 64–66.
30. Martin R, Langa S, Reviriego C, et al. (2004) The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacterio therapy and probiotics. *Trends Food Sci Technol* 15, 121–127.
31. Perez-Cano FJ, Dong K & Yaqoob P (2010) In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology* 215, 996–1004
32. Ryan KA, Jayaraman T, Daly P, et al. (2008) Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach. *Lett Appl Microbiol* 47, 269–274.

33. Hyeong-Jun Lim , So-Young Kim& Wan-Kyu Lee (2004) Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use J. Vet. Sci. (2004), 5(4), 391–395
34. Sru^otkova[´] D, Spanova A, Spano M, et al. (2011) Efficiency of PCR-based methods in discriminating *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* strains of human origin. J Microbiol Methods 87, 10–16.
35. Lin PP, Hsieh YM & Tsai CC (2009) Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* RY2 isolated from healthy infancy feces on the growth and adhesion characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli*. Anaerobe 15, 122–126.
36. Marti[´]n R, Jime[´]nez E, Olivares M, et al. (2006) *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. Int J Food Microbiol 112, 35–43
37. Acharya MR & Shah RK (2002) Selection of human isolates of bifidobacteria for their use as probiotics. Appl Biochem Biotechnol 102 –103, 81–98.
38. Sornplang P, Piyadeatsoontorn S. Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal of Animal Science and Technology*. 2016;58:26. doi:10.1186/s40781-016-0108-2.
39. Chu W, Lu F, Zhu W, et al. (2011) Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorumsensing system. J Appl Microbiol 110, 202–208.
40. Pe[´]rez-Sa[´]nchez T, Balca[´]zar JL, Garc[´]ia Y, et al. (2011) Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. J Fish Dis 34, 499–507
41. Hill JE, Baiano JC & Barnes AC (2009) Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. J Fish Dis 32, 1007–1016.
42. Audisio MC & Beni[´]tez-Ahrendts MR (2011) *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. Benef Microbes 2, 29–34.
43. Scheirlinck I, Van der Meulen R, De Vuyst L, Vandamme P, Huys G. Molecular source tracking of predominant lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs and their production environments. J Appl Microbiol. 2009;106:1081–92. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04094.x

44. El-Mabrok ASW, Hassan Z, Mokhtar AM, Hussain KMA, Kahar FKSBA. Screening of lactic acid bacteria as biocontrol against *Colletotrichum capsici* on chilli Bangi. *Res J Appl Sci.* 2012;7:466–73
45. Sirilun S, Chaiyasut C, Kantachote D, Luxananil P. Characterisation of non human origin probiotic *Lactobacillus plantarum* with cholesterol-lowering property. *Afr J Microbiol Res.* 2010;4:994–1000.
46. Bunesova V, Vlkova E, Rada V, Rockova S, Svobodova I, Jebavy L, Kmet V. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strains isolated from dog faeces. *Vet Microbiol.* 2012;160:501–5. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.06.005.
47. Prasada J, Gilla H, Smarta J, Gopala PK. Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int Dairy J.* 1998;8:993–1002. doi: 10.1016/S0958-6946(99)00024-2.
48. Monteagudo-Mera A, Rodriguez-Aparicio L, Rua J, Martinez-Blanco H, Navasa N, Garcia-Armesto MR, Ferrero MÁ. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *J Funct Foods.* 2012;4:531–41. doi: 10.1016/j.jff.2012.02.014.
49. Fijan S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2014;11(5):4745–4767. doi:10.3390/ijerph110504745.
50. Pelletier X, Laure-Boussuge S & Donazzolo Y (2001) Hydrogen excretion upon ingestion of dairy products in lactose intolerant male subjects: importance of the live flora. *Eur J Clin Nutr* 55, 509–512
51. Pakdaman, M., Udani, J., Molina, J. and Shahani, M. (2015). The effects of the DDS-1 strain of *Lactobacillus* on symptomatic relief for lactose intolerance - a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial. *Nutrition Journal*, 15(1)
52. McFarland (2006) Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 101, 812–822.
53. Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, et al. (2010) The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 59, 325–332.
54. Rafter J, Bennett M, Caderni G, et al. (2007) Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* 85, 488–496.

55. Abraham, B. and Quigley, E. (2017). Probiotics in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 46(4), pp.769-782.
56. Karska-Wysocki B, Bazo M & Smoragiewicz W (2010) Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiol Res* 165, 674–686.
57. Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F., Vilchez-Padial, L. and Gil, A. (2017). Evidence of the Anti-Inflammatory Effects of Probiotics and Synbiotics in Intestinal Chronic Diseases. *Nutrients*, 9(6), p.555.
58. Williams NT (2010) Probiotics. *Am J Health Syst Pharm* 67, 449–458.
59. Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C. and Gil, A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), pp.160-174.
60. Vieira, A., Fukumori, C. and Ferreira, C. (2016). New insights into therapeutic strategies for gut microbiota modulation in inflammatory diseases. *Clinical & Translational Immunology*, 5(6), p.e87
61. Valentini, M., Piermattei, A., Di Sante, G., Migliara, G., Delogu, G. and Ria, F. (2014). Immunomodulation by Gut Microbiota: Role of Toll-Like Receptor Expressed by T Cells. *Journal of Immunology Research*, 2014, pp.1-8.
62. Gutzeit, C., Magri, G. and Cerutti, A. (2014). Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunological Reviews*, 260(1), pp.76-85.
63. Browne, E. (2012). Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors. *Immunology*, 136(4), pp.370-379.
64. König, J., Wells, J., Cani, P., García-Ródenas, C., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F. and Brummer, R. (2016). Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 7(10), pp.e196-e196.
65. Buscarinu, M., Romano, S., Mechelli, R., Pizzolato Umeton, R., Ferraldeschi, M., Fornasiero, A., Reniè, R., Cerasoli, B., Morena, E., Romano, C., Loizzo, N., Umeton, R., Salvetti, M. and Ristori, G. (2017). Intestinal Permeability in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*, 15(1), pp.68-74.
66. Gibson, G., Hutkins, R., Sanders, M., Prescott, S., Reimer, R., Salminen, S., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K., Cani, P., Verbeke, K. and Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)

consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*.

67. Patel RM, Denning PW. Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence? *Clin Perinatol* 2013; 1: 11–25.
68. Kristensen, N., Bryrup, T., Allin, K., Nielsen, T., Hansen, T. and Pedersen, O. (2016). Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Medicine*, 8(1).
69. Li Y H, Tian X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel)* 2012; 12: 2519–2538
70. L.K. Ursell, H.J. Haiser, W. Van Treuren, N. Garg, L. Reddivari, J. Vanamala, et al. The intestinal metabolome: an intersection between microbiota and host *Gastroenterology*, 146 (6) (2014), pp. 1470-1476
71. Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research. *Nature* 2012; 486: 215–221.
72. Tachedjian, G., Aldunate, M., Bradshaw, C. and Cone, R. (2017). The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Research in Microbiology*, 168(9-10), pp.782-792.
73. Ahmedna, M., Goktepe, I. and Juneja, V. (2010). *Probiotics in food safety and human health*. [S.l.]: Taylor & Francis/CRC Press.
74. DiBaise JK, Zhang H, Crowell MD, Krajmalnik-Brown R, Decker GA, Rittmann BE 2008. Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin Proc* 83: 460–469
75. Sherwood, Linda; Willey, Joanne; Woolverton, Christopher (2013). Prescott's Microbiology (9th ed.). New York: McGraw Hill. pp. 713–21. ISBN 9780073402406. OCLC 886600661
76. Parsons, B., Ijaz, U., D'Amore, R., Burkitt, M., Eccles, R., Lenzi, L., Duckworth, C., Moore, A., Tiszlavicz, L., Varro, A., Hall, N. and Pritchard, D. (2017). Comparison of the human gastric microbiota in hypochlorhydric states arising as a result of *Helicobacter pylori*-induced atrophic gastritis, autoimmune atrophic gastritis and proton pump inhibitor use. *PLOS Pathogens*, 13(11), p.e1006653.
77. Bures, J. (2010). Small intestinal bacterial overgrowth syndrome. *World Journal of Gastroenterology*, 16(24), p.2978.

- 78.** Williams SJ, Wreschner DH, Eyre HJ, Sutherland GR, McGuckin MA. MUC13, a novel human cells surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 18327/36.
- 79.** Hao, W. and Lee, Y. (n.d.). Microflora of the Gastrointestinal Tract: A Review. *Public Health Microbiology*, pp.491-502.
- 80.** Guarner, F; Malagelada, J (2003). "Gut flora in health and disease". *The Lancet*. 361 (9356): 512–19. doi:10.1016/S0140-6736(03)12489-0. PMID 12583961
- 81.** Scarpellini E, Ianiro G, Attili F, Bassanelli C, De Santis A, Gasbarrini A (2015). "The human gut microbiota and virome: Potential therapeutic implications". *Dig Liver Dis (Review)*. 47 (12): 1007–12. doi:10.1016/j.dld.2015.07.008
- 82.** Petersen, C. and Round, J. (2014). Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular Microbiology*, 16(7), pp.1024-1033.
- 83.** Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G. and de Vos, W. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & Nutrition*, 6(3), pp.209-240.
- 84.** E.B. Hollister, C. Gao, J. Versalovic Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health *Gastroenterology*, 146 (6) (2014), pp. 1449-1458-
- 85.** Modi, S., Collins, J. and Relman, D. (2014). Antibiotics and the gut microbiota. *Journal of Clinical Investigation*, 124(10), pp.4212-4218.
- 86.** Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nueno-Palop C, Narbad A, Olivares M, Xaus J, Rodriguez JM. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol*. 2005;51(4):270–274.
- 87.** Yasmin, F., Tun, H., Konya, T., Guttman, D., Chari, R., Field, C., Becker, A., Mandhane, P., Turvey, S., Subbarao, P. and Sears, M. (2017). Cesarean Section, Formula Feeding, and Infant Antibiotic Exposure: Separate and Combined Impacts on Gut Microbial Changes in Later Infancy. *Frontiers in Pediatrics*, 5.
- 88.** Sommer, F. and Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota — masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), pp.227-238.
- 89.** Zapata, H. and Quagliarello, V. (2015). The Microbiota and Microbiome in Aging: Potential Implications in Health and Age-Related Diseases. *Journal of the American Geriatrics Society*, 63(4), pp.776-781.

90. Gorvitovskaia, A., Holmes, S. and Huse, S. (2016). Interpreting Prevotella and Bacteroides as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome*, 4(1).
91. Yatsunenko, T.; Rey, F. E.; Manary, M. J.; Trehan, I.; Dominguez-Bello, M. G.; Contreras, M.; Magris, M.; Hidalgo, G.; Baldassano, R. N.; Anokhin, A. P.; Heath, A. C.; Warner, B.; Reeder, J.; Kuczynski, J.; Caporaso, J. G.; Lozupone, C. A.; Lauber, C.; Clemente, J. C.; Knights, D.; Knight, R.; Gordon, J. I. (2012). "Human gut microbiome viewed across age and geography". *Nature*. 486 (7402): 222–27. Bibcode:2012Natur.486..222Y. doi:10.1038/nature11053
92. Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*. 2010;156(pt 11):3216–3223
93. Jernberg C, Sullivan A, Edlund C, Jansson JK. Monitoring of antibiotic-induced alterations in the human intestinal microflora and detection of probiotic strains by use of terminal restriction fragment length polymorphism. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(1):501–506. doi: 10.1128/AEM.71.1.501-506.2005.
94. Cho I, et al. Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature*. 2012;488(7413):621–626. doi: 10.1038/nature11400.
95. Ouwehand, A. and Salminen, S. (2003). In vitro adhesion assays for probiotics and their in vivo relevance: a review. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15(4), pp.175-184.
96. ALANDER, M., SATOKARI, R., KORPELA, R., SAXELIN, M., VILPPONEN-SALMELA, T., MATTILA-SANDHOLM, T. and VON WRIGHT, A. (1999). Persistence of Colonization of Human Colonic Mucosa by a Probiotic Strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after Oral Consumption. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 65(0099-2240/99/\$04.0010), pp.351-354.
97. Ljungh A°, Lan J, Yanagisawa N. Isolation, selection and characteristics of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19. *Microb Ecol Health Dis* 2002; Suppl 3: 4 /6
98. Schiffrin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 515S/20S
99. Brandtzaeg, P. (2007). Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine*, 25(30), pp.5467-5484

100. Mathias, A., Pais, B., Favre, L., Benyacoub, J. and Corthésy, B. (2014). Role of secretory IgA in the mucosal sensing of commensal bacteria. *Gut Microbes*, 5(6), pp.688-695
101. Mathias, A., Duc, M., Favre, L., Benyacoub, J., Blum, S. and Corthésy, B. (2010). Potentiation of Polarized Intestinal Caco-2 Cell Responsiveness to Probiotics Complexed with Secretory IgA. *Journal of Biological Chemistry*, 285(44), pp.33906-33913.
102. Rautava S., Arvilommi H., Isolaur E. Specific probiotics in enhancing maturation of IgA responses in formula-fed infants. *Pediatr. Res.* 2006;60:221–224. doi: 10.1203/01.pdr.0000228317.72933.db.
103. 65. Rodrigues A.C., Cara D.C., Fretez S.H., Cunha F.Q., Vieira E.C., Nicoli J.R., Vieira L.Q. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.* 2000;89:404–414. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.01128.x.
104. 66. He B., Xu W., Santini P.A., Polydorides A.D., Chiu A., Estrella J., Shan M., Chadburn A., Villanacci V., Plebani A., et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A2 class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*. 2007;26:812–826. doi: 10.1016/j.immuni.2007.04.014.
105. 67. Shang L., Fukata M., Thirunarayanan N., Martin A.P., Arnaboldi P., Maussang D., Berin C., Unkeless J.C., Mayer L., Abreu M.T., et al. Toll-like receptor signaling in small intestinal epithelium promotes B-cell recruitment and IgA production in lamina propria. *Gastroenterology*. 2008;135:529–538. doi: 10.1053/j.gastro.2008.04.020.
106. Bibiloni R, Pe´rez PF, de Antoni GL. Will a high adhering capacity in a probiotic strain guarantee exclusion of pathogens from intestinal epithelia? *Anaerobe* 1999; 5: 519/24
107. Lee YK, Lim CY, Teng WL, Ouwehand AC, Tuomola EM, Salminen S. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 3692/7.
108. Elliott SN, Buret A, McKnight W, Miller MJS, Wallace JL. Bacteria rapidly colonize and modulate healing of gastric ulcers in rats. *Am J Physiol* 1998; 275: G425/32.

109. Helgeland L, Brandtzaeg P. Development and function of intestinal B and T cells. *Microb Ecol Health Dis* 2000; 11: 110/ 27
110. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; 61: 136/69.
111. Wilson M, McNab R, Henderson B. *Bacterial Disease Mechanisms*, 1st edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2002: 656.
112. Marieb EN, Hoehn K (2010). *Human anatomy & physiology*. San Francisco: Benjamin Cummings
113. Camilleri M, et al. Relationship between impaired gastric emptying and abnormal gastrointestinal motility. *Gastroenterology*. 1986;91:94
114. Park, S., Hwang, M., Kim, Y., Kim, J., Song, J., Lee, K., Jeong, K., Rhee, M., Kim, K. and Kim, T. (2006). Comparison of pH and Bile Resistance of *Lactobacillus acidophilus* Strains Isolated from Rat, Pig, Chicken, and Human Sources. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(1), pp.35-37.
115. Shori, A. (2017). Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(1), pp.1-5.
116. Martínez-Augustin, O. and Medina, F. (2008). Intestinal bile acid physiology and pathophysiology. *World Journal of Gastroenterology*, 14(37), p.5630.
117. Islam K. B., Fukiya S., Hagio M., Fujii N., Ishizuka S., Ooka T., et al. (2011). Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology* 141 1773–1781 10.1053/j.gastro.2011.07.046
118. Machado, Paulo R. L., Araújo, Maria Ilma A. S., Carvalho, Lucas, & Carvalho, Edgar M.. (2004). Immune response mechanisms to infections. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 79(6), 647-662. <https://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962004000600002>
119. Wijk F, Cheroutre H. Intestinal T cells: facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity. *Semin Immunol*. 2009;21:130–138. doi: 10.1016/j.smim.2009.03.003.
120. Blaschitz, C. and Raffatellu, M. (2010). Th17 Cytokines and the Gut Mucosal Barrier. *Journal of Clinical Immunology*, 30(2), pp.196-203
121. Prakash, S., L. Rodes, M. Coussa-Charley, and C. TomaroDuchesneau. 2011. Gut microbiota: Next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics* 5: 71-86

122. Cani, P. D., J. Amar, M. A. Iglesias, M. Poggi, C. Knauf, D. Bastelica, et al. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-1772.
123. Mehta, N. N., F. C. McGillicuddy, P. D. Anderson, C. C. Hinkle, R. Shah, L. Pruscino, et al. 2010. Experimental endotoxemia induces adipose inflammation and insulin resistance in humans. *Diabetes* 59: 172-181
124. Cani, P. D., R. Bibiloni, C. Knauf, A. Waget, A. M. Neyrinck, N. M. Delzenne, and R. Burcelin. 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470-1481
125. Mutlu, E., A. Keshavarzian, P. Engen, C. B. Forsyth, M. Sikaroodi, and P. Gillevet. 2009. Intestinal dysbiosis: A possible mechanism of alcohol-induced endotoxemia and alcoholic steatohepatitis in rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 33: 1836-1846
126. Rodes, L. (2013). Effect of Probiotics Lactobacillus and Bifidobacterium on Gut-Derived Lipopolysaccharides and Inflammatory Cytokines: An In Vitro Study Using a Human Colonic Microbiota Model. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(4), pp.518-526
127. Ruiz, L., Margolles, A. and Sánchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in Lactobacillus and Bifidobacterium. *Frontiers in Microbiology*, 4.
128. Elmadfa, I., Klein, P. and Meyer, A. (2010). Immune-stimulating effects of lactic acid bacteria in vivo and in vitro. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(03), pp.416-420.
129. Dong, H., Rowland, I. and Yaqoob, P. (2011). Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *British Journal of Nutrition*, 108(03), pp.459-470.
130. Hidalgo-Cantabrana, C., Kekkonen, R., G. de los Reyes-Gavilán, C., Salminen, S., Korpela, R., Gueimonde, M. and Ruas-Madiedo, P. (2014). Effect of bacteria used in food industry on the proliferation and cytokine production of epithelial intestinal cellular lines. *Journal of Functional Foods*, 6, pp.348-355.
131. Gravaghi et al. (2007) Casein phosphopeptide promotion of calcium uptake in HT-29 cells – relationship between biological activity and supramolecular structure. *FEBS Journal* 274:4999-5011.
132. Ferraretto, A., Bottani, M., De Luca, P., Cornaghi, L., Arnaboldi, F., Maggioni, M., Fiorilli, A. and Donetti, E. (2018). Morphofunctional properties of a differentiated

Caco2/HT-29 co-culture as an in vitro model of human intestinal epithelium. *Bioscience Reports*, 38(2), p.BSR20171497.

133. Bahrami, B., Child, M., Macfarlane, S. and Macfarlane, G. (2011). Adherence and Cytokine Induction in Caco-2 Cells by Bacterial Populations from a Three-Stage Continuous-Culture Model of the Large Intestine. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), pp.2934-2942.
134. Kirjavainen, P., Ouwehand, A., Isolauri, E. and Salminen, S. (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 167(2), pp.185-189.
135. Vachon, P. and Beaulieu, J. (1992). Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology*, 103(2), pp.414-423
136. Paineau, D., Carcano, D., Leyer, G., Darquy, S., Alyanakian, M., Simoneau, G., Bergmann, J., Brassart, D., Borner, F. and Ouwehand, A. (2008). Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 53(1), pp.107-113.
137. Tanaka, T., Narazaki, M. and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 6(10), pp.a016295-a016295.
138. Hatton RD. TGF- β in Th17 cell development: the truth is out there. *Immunity*. 2011;34(3):288-290. doi:10.1016/j.immuni.2011.03.009.
139. Singh B, Schwartz JA, Sandrock C, Bellemore SM, Nikoopour E. Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells. *The Indian Journal of Medical Research*. 2013;138(5):591-594.
140. Dienz O, Rincon M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2009;130(1):27-33. doi:10.1016/j.clim.2008.08.018.
141. Konkel, J., Zhang, D., Zanvit, P., Chia, C., Zangarle-Murray, T., Jin, W., Wang, S. and Chen, W. (2017). Transforming Growth Factor- β Signaling in Regulatory T Cells Controls T Helper-17 Cells and Tissue-Specific Immune Responses. *Immunity*, 46(4), pp.660-674.
142. Donkor, O., Ravikumar, M., Proudfoot, O., Day, S., Apostolopoulos, V., Paukovics, G., Vasiljevic, T., Nutt, S. and Gill, H. (2012). Cytokine profile and induction of T helper

- type 17 and regulatory T cells by human peripheral mononuclear cells after microbial exposure. *Clinical & Experimental Immunology*, 167(2), pp.282-295.
143. Xing Z, Gauldie J, Cox G, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(2):311-320.
 144. Wang P, Li N, Li J-S, Li W-Q. The role of endotoxin, TNF- α , and IL-6 in inducing the state of growth hormone insensitivity. *World Journal of Gastroenterology*. 2002;8(3):531-536. doi:10.3748/wjg.v8.i3.531.
 145. O'Reilly S, Cant R, Ciechomska M, van Laar JM. Interleukin-6: a new therapeutic target in systemic sclerosis? *Clinical & Translational Immunology*. 2013;2(4):e4-. doi:10.1038/cti.2013.2.
 146. Dong, H., Rowland, I. and Yaqoob, P. (2011). Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *British Journal of Nutrition*, 108(03), pp.459-470.
 147. Rodes, L. (2013). Effect of Probiotics Lactobacillus and Bifidobacterium on Gut-Derived Lipopolysaccharides and Inflammatory Cytokines: An In Vitro Study Using a Human Colonic Microbiota Model. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(4), pp.518-526.
 148. Parlesak, A., Haller, D., Brinz, S., Baeuerlein, A. and Bode, C. (2004). Modulation of Cytokine Release by Differentiated CACO-2 Cells in a Compartmentalized Coculture Model with Mononuclear Leucocytes and Nonpathogenic Bacteria. *Scandinavian Journal of Immunology*, 60(5), pp.477-485.
 149. Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, et al. (October 2006). ["Comparative genomics of the lactic acid bacteria"](#). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (42): 15611–6.
 150. Begley, M., Hill, C. and Gahan, C. (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), pp.1729-1738.
 151. Martínez-Augustín, O. and Medina, F. (2008). Intestinal bile acid physiology and pathophysiology. *World Journal of Gastroenterology*, 14(37), p.5630.
 152. Hofmann A. F. (1994). "Bile acids," In *The Liver: Biology and Pathobiology* eds Arias I. M., Boyer J. L., Fausto N., Jackoby D. A., Schachter D. A., Shafritz D. A., editors. (New York: Raven Press Ltd;) 677–718

153. Joyce, S., Shanahan, F., Hill, C. and Gahan, C. (2014). Bacterial bile salt hydrolase in host metabolism: Potential for influencing gastrointestinal microbe-host crosstalk. *Gut Microbes*, 5(5), pp.669-674.
154. Gilliland, S. E., and M. J. Speck. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:15–1
155. Takahashi, T., and M. Morotomi. 1994. Absence of cholic acid 7-dehydroxylase activity in the strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *J. Dairy Sci.* 77:3275–3286.
156. Jones, M. L., H. Chen, W. Ouyang, T. Metz, and S. Prakash. 2004. Microencapsulated genetically engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for bile acid deconjugation and its implication in lowering cholesterol. *J. Biomed. Biotechnol.* 1:61–69
157. Kurdi, P., H. Tanaka, H. W. van Veen, K. Asano, F. Tomita, and A. Yokota. 2003. Cholic acid accumulation and its diminution by short-chain fatty acids in bifidobacteria. *Microbiology* 149:2031–2037.
158. Kurdi, P., H. W. van Veen, H. Tanaka, I. Mierau, W. N. Konings, G. W. Tannock, F. Tomita, and A. Yokota. 2000. Cholic acid is accumulated spontaneously, driven by membrane pH, in many lactobacilli. *J. Bacteriol.* 182:6525–6528
159. Hardy, S. and Kleinman, R. (1994). Fat and cholesterol in the diet of infants and young children: Implications for growth, development, and long-term health. *The Journal of Pediatrics*, 125(5), pp.S69-S77.
160. Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., Chakraborty, C., Singh, B., Marotta, F., Jain, S. and Yadav, H. (2012). Cholesterol-Lowering Probiotics as Potential Biotherapeutics for Metabolic Diseases. *Experimental Diabetes Research*, 2012, pp.1-14.
161. Blum, S., Reniero, R., Schiffrin, E.J., Crittenden, R., Mattila-Sandholm, T., Ouwehand, A.C., Salminen, S., von Wright, A., Saarela, M., Saxelin, M., Collins, K., Morelli, L. (1999). Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends Food Sci. Tech.* 10:405–410.
162. Kotsou, M., Mitsou, E., Oikonomou, I. and Kyriacou, A. (2008). In Vitro Assessment of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains from Infant Gut Microflora. *Food Biotechnology*, 22(1), pp.1-17.
163. Charteris, Kelly, Morelli and Collins (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic

- Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), pp.759-768.
- 164.** Goderska, K. and Czarnecki, Z. (2007). Characterization of selected strains from *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 1 (6)(ISSN 1996-0808), pp. 065-078.
 - 165.** M. Du Toit, C. M. A. P. Franz, L. M. T. Dicks 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*, vol. 40, no. 1-2, pp. 93–104, 1998.
 - 166.** Kirtzalidou, E., Pramateftaki, P., Kotsou, M. and Kyriacou, A. (2011). Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe*, 17(6), pp.440-443.
 - 167.** Liang, L., Yi, Y., Lv, Y., Qian, J., Lei, X. and Zhang, G. (2018). A Comprehensive Genome Survey Provides Novel Insights into Bile Salt Hydrolase (BSH) in *Lactobacillaceae*. *Molecules*, 23(5), p.1157
 - 168.** Bosch, M., Fuentes, M., Audivert, S., Bonachera, M., Peiró, S. and Cuñé, J. (2013). *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529: probiotic candidates to reduce cholesterol levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(4), pp.803-809
 - 169.** Marteau P, Pochart P, Bouhnik Y and Rambaud JC. The fate and effects of transiting, non- pathogenic micro-organisms in the human intestine. In *World Review of Nutrition and Dietetics*. Vol. 74. Intestinal Flora, Immunity, Nutrition and Health ed. Simopoulos, A.P., Corring, T. and Rérat, A. Chap. 1, 1993, pp. 1–21. London: Krager
 - 170.** Rambaud, J-C., Bouhnik, Y., Marteau, P. and Pochart, P. Manipulation of the human gut microflora. *Proceedings of the Nutrition Society* 1993; 52: 357–366
 - 171.** Tuomola EM, Salminen SJ. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco- 2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 1998;41:45-51.
 - 172.** Jacobsen C.N, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Møller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, Sandström B, Tvede M, Jakobsen M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65:4949–4956.

173. Gopal P, Prasad J, Smart J, Gill H. In vitro adherence of lactobacillus rhamnosus DR20 and Bifidobacterium lactis DR10 strains and thir antagonistic activity against an enterotoxigenic Escherichia coli. *Int Journal Food Microbiol.* 2001;67:207-216.
174. Fernández MF, Boris S, Barbés C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 2003;94:449–455.
175. Tinrat S, Saraya S, Traidej Chomnawang M. Isolation and characterization of Lactobacillus salivarius MTC 1026 as a potential probiotic. *J Gen Appl Microbiol.* 2011;57(6):365-378.
176. Govender M, Choonara YE, Kumar P, du Toit LC, van Vuuren S, Pillay V. A Review of the Advancements in Probiotic Delivery: Conventional vs. Non-conventional Formulations for Intestinal Flora Supplementation. *AAPS PharmSciTech.* 2014;15(1):29-43. doi:10.1208/s12249-013-0027-1.
177. Kılıç, G. and Karahan, A. (2010). Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Fecal Samples of Healthy Humans and Patients with Dyspepsia, and Determination of Their pH, Bile, and Antibiotic Tolerance Properties. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 18(4), pp.220-229.
178. Bae, H. C., S. H. Choi and M. S. Nam. 2001. Isolation and Identification of Acid- and Bile-Tolerant Lactobacillus salivarius subsp. salivarius from Human Faeces. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14(8):1170-1178.
179. Xanthopoulos V, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N. Characterization of Lactobacillus isolates from infant faeces as dietary adjuncts. *Food Microbiol.* 2000; 17:205–215.
180. Steensberg A, Fischer CP, Keller C, et al. IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285: E433–E437.
181. Singh B, Schwartz JA, Sandrock C, Bellemore SM, Nikoopour E. Modulation of autoimmune diseases by interleukin (IL)-17 producing regulatory T helper (Th17) cells. *The Indian Journal of Medical Research.* 2013;138(5):591-594.
182. Corcoran, B., Stanton, C., Fitzgerald, G. and Ross, R. (2005). Survival of Probiotic Lactobacilli in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), pp.3060-3067.
183. Noriega L, Gueimonde M, Sánchez B, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG. Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival

- at low pH and crossresistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 2004;94(1):79–86.
184. Begley M, Hill C, Gahan CGM. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(3):1729-1738. doi:10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006.
Mc Auliffe, O., R. J. Cano, and T. R. Klaenhammer. 2005. Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4925–4929
 185. Bron, P. A., D. Molenaar, W. M. De Vos, and M. Kleerebezem. DNA micro-array based identification of bile-responsive genes in *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.*, in press
 186. Rani RP, Anandharaj M, Ravindran AD. Characterization of Bile Salt Hydrolase from *Lactobacillus gasseri* FR4 and Demonstration of Its Substrate Specificity and Inhibitory Mechanism Using Molecular Docking Analysis. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:1004. doi:10.3389/fmicb.2017.01004.
 187. Chae, J., Valeriano, V., Kim, G. and Kang, D. (2012). Molecular cloning, characterization and comparison of bile salt hydrolases from *Lactobacillus johnsonii* PF01. *Journal of Applied Microbiology*, 114(1), pp.121-133.
 188. Guerin, D., Vuilleumard, J. C., & Subirade, M. (2003). Protection of bifidobacteria encapsulated in polysaccharide–protein gel against gastric juice and bile. *Journal of Food Protection*, 66 , 2067–2084
 189. Trindade, C. S. F., & Grosso, C. R. F. (2000). The effect of the immobilization of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. *Milchwissenschaft*, 55, 496–499
 190. Joyce, S., Shanahan, F., Hill, C. and Gahan, C. (2014). Bacterial bile salt hydrolase in host metabolism: Potential for influencing gastrointestinal microbe-host crosstalk. *Gut Microbes*, 5(5), pp.669-674.
 191. Bahrami, B., Macfarlane, S. and Macfarlane, G. (2010). Induction of cytokine formation by human intestinal bacteria in gut epithelial cell lines. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), pp.353-363.
 192. . Jiang Y, Lü X, Man C, et al. *Lactobacillus acidophilus* Induces Cytokine and Chemokine Production via NF- κ B and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling

- Pathways in Intestinal Epithelial Cells. *Clinical and Vaccine Immunology* : CVI. 2012;19(4):603-608. doi:10.1128/CVI.05617-11.
193. Reilly, N., Poylin, V., Menconi, M., Onderdonk, A., Bengmark, S. and Hasselgren, P. (2007). Probiotics potentiate IL-6 production in IL-1 β -treated Caco-2 cells through a heat shock-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293(3), pp.R1169-R1179.
 194. Da-Yong Ren, Chang Li, Yan-Qing Qin, et al., "Lactobacilli Reduce Chemokine IL-8 Production in Response to TNF- α and Salmonella Challenge of Caco-2 Cells," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 925219, 9 pages, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/925219>.
 195. Immunomodulatory Effects of Probiotics in the Intestinal Tract. (2008). *Current Issues in Molecular Biology*.
 196. Baskaradoss JK, Geevarghese A, Kutty VR. Maternal periodontal status and preterm delivery: a hospital based case-control study. *J Periodontal Res* 2011; 5: 542–549. [PubMed]
 197. Backhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe* 2015; 5: 690–703. [PubMed]
 198. Olsen, P., Williamson, M., Traynor, V., & Georgiou, C. (2018). The impact of oral probiotics on vaginal Group B Streptococcal colonisation rates in pregnant women: A pilot randomised control study. *Women and birth : journal of the Australian College of Midwives*, 31 1, 31-37.
 199. Fernandez L, Langa S, Martin V, Maldonado A, Jimenez E, Martin R et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 2013; 1: 1–10. [PubMed]
 200. Mattila E, Uusitalo-Seppala R, Wuorela M, Lehtola L, Nurmi H, Ristikankare M et al. Fecal transplantation, through colonoscopy, is effective therapy for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Gastroenterology* 2012; 3: 490–496. [PubMed]