



# ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

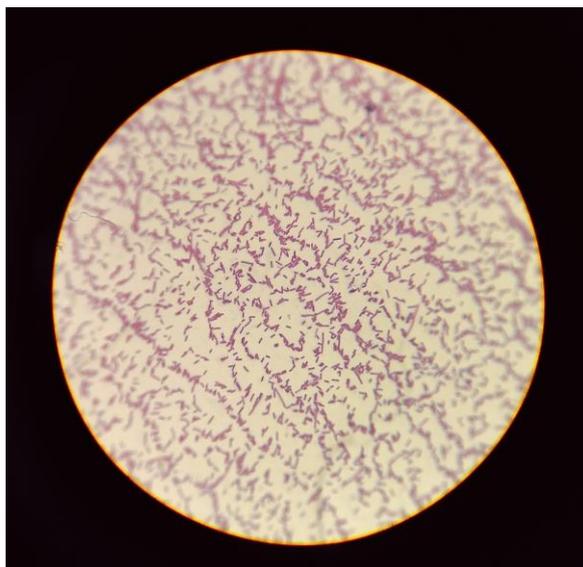
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**«Έλεγχος ικανότητας απομάκρυνσης της χοληστερόλης *in vitro* από στελέχη  
λακτοβακίλλων»**

Πτυχιακή μελέτη

**Πρελορέντζου Τζώρτζια**



Αθήνα, 2021



# **ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

## **Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**Αδαμαντίνη Κυριακού (Επιβλέπουσα)**

**Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μικροβιολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**Μαρία Κώτσου**

**Μέλος Ε.Ε.ΔΙ.Π., Τμήμα Μικροβιολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

**Τζώρτζης Νομικός**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Η Πρελορέντζου Τζώρτζια

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1)** Είμαι η 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.

Στην οικογένειά μου που είναι πάντα δίπλα μου.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την επιβλέπουσα της πτυχιακής μου μελέτης, αναπληρώτρια καθηγήτρια κ. Αδαμαντίνη Κυριακού, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου αναφορικά την εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής μελέτης καθώς και για την καθοδήγησή της καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής και βιβλιογραφικής διαδικασίας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Μαρία Κώτσου, για την μεγάλη της βοήθεια στις πειραματικές διαδικασίες, τη στατιστική ανάλυση και τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

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

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω τις θερμές μου ευχαριστίες στην υποψήφια διδάκτορα και μέλος ΕΤΕΠ του ΕΒΒΙΦΑΜ κ. Ευδοκία Μήτσου, καθώς και στο μέλος ΕΤΕΠ του ΕΒΒΙΦΑΜ κ. Γιώτα Λιανέα, για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξή τους στο πειραματικό μέρος της εργασίας μου.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Περίληψη στα Ελληνικά .....	7
Περίληψη στα Αγγλικά .....	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ .....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ .....	11
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....	12
ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	14
1. Ο ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ .....	14
1.1. ΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ: ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ .....	14
1.2. Ο ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ: ΠΡΩΙΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΙΑ .....	16
1.2.1. ΠΡΩΙΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ .....	16
1.2.2. ΑΝΟΣΙΑ ΣΤΟ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟ .....	18
2. ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ .....	20
2.1. ΟΡΙΣΜΟΣ .....	20
2.2. ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ .....	23
2.2.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟΝ ΞΕΝΙΣΤΗ .....	23
2.2.2. ΟΦΕΛΗ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ .....	24
2.3. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ .....	28
2.3.1 ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ .....	28
2.3.2 <i>IN VITRO</i> ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ....	29
2.4. ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ <i>LACTOBACILLUS</i> ΩΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ .....	31
2.4.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ .....	31
2.4.2. ΣΤΕΛΕΧΗ <i>LACTOBACILLUS</i> ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ .....	34
3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ .....	36
3.1. ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ .....	36
3.2. ΑΝΤΙΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ .....	38
3.2.1. ΑΦΟΜΟΙΩΣΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ .....	43
3.2.1.1. ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ .....	43
3.2.1.2. <i>IN VIVO</i> ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ .....	49
ΣΚΟΠΟΣ .....	57
ΚΕΦ 1: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	58
Προέλευση των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών του γένους <i>Lactobacillus</i> .....	58
Προετοιμασία και έλεγχος καθαρότητας βακτηριακών στελεχών .....	59
1.1. Δοκιμασία αφομοίωσης χοληστερόλης .....	60
1.2. Προπείραμα .....	64
ΚΕΦ 2: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ .....	67
ΚΕΦ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	68
Προετοιμασία και έλεγχος καθαρότητας των βακτηριακών στελεχών .....	68
Δοκιμασία αφομοίωσης χοληστερόλης .....	69
ΚΕΦ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	90
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	95

## Περίληψη στα Ελληνικά

**Εισαγωγή:** Τα προβιοτικά είναι ζώντες μικροοργανισμοί οι οποίοι, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσδίδουν οφέλη στην υγεία του ξενιστή. Πρόσφατες μελέτες έχουν συνδέσει τα προβιοτικά με την πρόληψη καρδιαγγειακών παθήσεων μέσω της δράσης τους στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης που απορροφώνται από τον εντερικό αυλό. Οι αντιχοληστερολαιμικές ιδιότητες των στελεχών του γένους *Lactobacillus* σχετίζονται με την αφομοίωση της χοληστερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες των προβιοτικών κυττάρων.

**Σκοπός:** Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνήσει στελέχη του γένους *Lactobacillus*, που έχουν ήδη ελεγχθεί για κάποια προβιοτικά χαρακτηριστικά, ως προς την ικανότητα τους να αφομοιώνουν τη χοληστερόλη από το θρεπτικό μέσο στο οποίο καλλιεργούνται. Η αφομοίωση της χοληστερόλης από το κάθε στέλεχος προσδιορίζεται ποσοτικά.

**Υλικά-μέθοδοι:** Έντεκα στελέχη *L. rhamnosus*, δέκα στελέχη *L. gasseri*, επτά στελέχη *L. acidophilus*, τρία στελέχη *L. paracasei paracasei*, τρία στελέχη *L. crispatus*, ένα στέλεχος *L. plantarum*, δύο στελέχη *L. delbrueckii delbrueckii*, δυο στελέχη *L. salivarius*, δυο στελέχη *L. fermentum*, ένα *L. brevis* και τρία στελέχη *Lactobacillus* spp., τα οποία έχουν απομονωθεί από τον εντερικό μικροβιόκοσμο υγιών νεογνών (Συλλογή Χαροκοπείου Πανεπιστημίου), εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα αφομοίωσης χοληστερόλης από το καλλιεργητικό μέσο.

Για τη δοκιμασία της αφομοίωσης της χοληστερόλης χρησιμοποιήθηκαν «ενεργοποιημένες» καλλιέργειες και έγινε αναερόβια επώαση για 24 ώρες σε τροποποιημένο MRS Broth συμπληρωμένο με oxgall 0.3 % (w/v) και υδατοδιαλυτή μορφή χοληστερόλης (polyoxyethanylethyl sebacate; Sigma). Μετά την 24ωρη αναερόβια επώαση, υπολογίστηκε η ξηρή βιομάζα των βακτηριακών κυττάρων κάθε δείγματος, ενώ προσδιορίστηκε φωτομετρικά και η ποσότητα χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό.

**Αποτελέσματα:** Από τη δοκιμασία αφομοίωσης χοληστερόλης προέκυψε ότι τα στελέχη AnIB 40 (*L. delbrueckii delbrueckii*), AnIB 44 (*L. salivarius*) και AnIB 48 (*L. plantarum*) είχαν στατιστικά σημαντική απομάκρυνση χοληστερόλης από το υπερκείμενο υγρό σε σχέση με το ανεμβολίαστο δείγμα. Όταν τα στελέχη συγκρίθηκαν μεταξύ τους, ως προς την αφομοίωση χοληστερόλης ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας, προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές απομάκρυνσης χοληστερόλης μεταξύ του AnIB 40 και των στελεχών C50, C70, AnLb 29, AnLb 51, C51, AnLb 38, AnLb 23, AnLb 47, AnLb 6, AnLb1, AnLb 10, AnLb 17, AnLb9, AnLb 46, AnLb 52, AnLb 15, AnLb 11, C5 και C58.

**Λέξεις κλειδιά:** λακτοβάκιλλοι, αντιχοληστερολαιμικές ιδιότητες, αφομοίωση χοληστερόλης

## Περίληψη στα Αγγλικά

**Introduction:** Probiotics are living microorganisms which, when administered in sufficient quantities, provide benefits to the host. Recent studies have linked probiotics to the prevention of cardiovascular disease through their action in lowering the levels of cholesterol absorbed by the intestinal tract. The anticholesterol properties of *Lactobacillus* strains are related to the assimilation of cholesterol in the cell membranes of probiotic cells.

**Aim:** The aim of the present study is to investigate the ability of *Lactobacillus* isolates, which have already been tested for some probiotic characteristics, to assimilate cholesterol from their substrate.

**Materials-Methods:** Eleven *L. rhamnosus*, ten *L. gasseri*, seven *L. acidophilus*, three *L. paracasei paracasei*, three *L. crispatus*, one *L. plantarum*, two *L. delbrueckii delbrueckii*, two *L. salivarius*, two *L. fermentum*, one *L. brevis* and three *Lactobacillus spp.*, which have been isolated from the intestinal microbiota of healthy neonates (Harokopio University Collection), were tested for their ability to assimilate cholesterol from the culture medium.

"Activated" cultures were used for the cholesterol assimilation test and anaerobic incubation was carried out for 24 hours in modified MRS Broth supplemented with 0.3% oxgall (w / v) and water soluble cholesterol (polyoxyethanyl-cholesteryl sebacate; Sigma). After 24 hours of anaerobic incubation, the dry biomass of the bacterial cells of each sample was calculated, while the amount of cholesterol remaining in the supernatant was determined photometrically.

**Results:** The cholesterol assimilation test revealed that the strains AnIB 40 (*L. delbrueckii delbrueckii*), AnIB 44 (*L. salivarius*) and AnIB 48 (*L. plantarum*) had a statistically significant removal of cholesterol from the supernatant compared to the unvaccinated sample. When the strains were compared with each other, in terms of the cholesterol assimilation per gram of dry biomass, statistically significant differences in cholesterol removal were obtained between strains AnIB 40 and strains C50, C70, AnLb 29, AnLb 51, C51, AnLb 38, AnLb 23, AnLb 47, AnLb 6, AnLb1, AnLb 10, AnLb 17, AnLb9, AnLb 46, AnLb 52, AnLb 15, AnLb 11, C5 and C58. The strains AnLb16 and AnLb18 appear close to the amount of cholesterol assimilated by AnLb40.

**Keywords:** *Lactobacillus*, anticholesterolic properties, cholesterol assimilation

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1 (Lye, Rahmat-Ali, & Liong, Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract, 2010): (A) Κύτταρα του στελέχους <i>L. bulgaricus</i> FTDC που καλλιεργήθηκαν απουσία χοληστερόλης. (B) Κύτταρα του στελέχους <i>L. bulgaricus</i> FTDC που καλλιεργήθηκαν παρουσία χοληστερόλης. Η χοληστερόλη ενσωματώθηκε στην κυτταρική μεμβράνη (Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης).....	49
Εικόνα 2 (Tomaro-Duchesneau, Jones, Shah, Jain, Saha, & Prakash, 2014): (a) Η απορρόφηση της χοληστερόλης από τα επιθηλιακά εντεροκύτταρα. (b) Η χορήγηση προβιοτικών στελεχών ενισχύει την αφομοίωση της χοληστερόλης από τα βακτηριακά κύτταρα, μειώνει την απορρόφησης της από τα εντεροκύτταρα και αυξάνει την απέκκρισή της στα κόπρανα.....	50
Εικόνα 3: Χαρακτηριστική εικόνα Gram θετικών λακτοβακίλλων στο μικροσκόπιο (μεγέθυνση x100).....	68

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Προβιοτικοί Μικροοργανισμοί ( Προσαρμογή από (Zuccotti, et al., 2008; Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vygyuru, Sasikala, & Reddy, 2015; WGO, 2017).....	22
Πίνακας 2: Στελέχη <i>Lactobacillus</i> θετικά ως προς την υδρολάση χολικών αλάτων (BSH).....	39
Πίνακας 3: Στελέχη του γένους <i>Lactobacillus</i> με τη μεγαλύτερη ικανότητα <i>in vitro</i> αφομοίωσης της χοληστερόλης.....	48
Πίνακας 4: ευρήματα <i>in vivo</i> δοκιμών μείωσης ή αναστολής αύξησης των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό από στελέχη λακτοβακίλλων.....	51
Πίνακας 5: Υπό μελέτη προβιοτικά στελέχη του γένους <i>Lactobacillus</i> .....	58
Πίνακας 6: Απορροφήσεις χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος (Προπείραμα).....	65
Πίνακας 7: Μετρήσεις ξηρής βιομάζας (g) των βακτηριακών στελεχών.....	69
Πίνακας 8: Αποτελέσματα απορροφήσεων μετά από φωτομέτρηση των δειγμάτων.....	71
Πίνακας 9: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό για κάθε στέλεχος.....	72
Πίνακας 10: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό για τα στελέχη <i>L. rhamnosus</i> .....	74
Πίνακας 11: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό για τα στελέχη <i>L. gasseri</i> .....	75
Πίνακας 12: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό για τα στελέχη <i>L. acidophilus</i> .....	76
Πίνακας 13: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό για τα υπόλοιπα στελέχη ( <i>Lactobacillus spp.</i> ).....	77
Πίνακας 14: Σύγκριση των <i>Lactobacillus spp.</i> με το ανεμβολίαστο-control ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό (μg/mL), με χρήση της μεθόδου πολλαπλών συγκρίσεων Dunnett.....	79

Πίνακας 15: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών <i>L. rhamnosus</i> .....	80
Πίνακας 16: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών <i>L. gasseri</i> .....	81
Πίνακας 17: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών <i>L. acidophilus</i> .....	82
Πίνακας 18: Σύγκριση μεταξύ των κανονικοποιημένων μετρήσεων των στελεχών <i>L. acidophilus</i> με τη χρήση του Tukey test ( $p<0.05$ ).....	84
Πίνακας 19: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας των υπόλοιπων βακτηριακών στελεχών ( <i>Lactobacillus spp.</i> ).....	84
Πίνακας 20: Σύγκριση μεταξύ των κανονικοποιημένων μετρήσεων των υπόλοιπων στελεχών με τη χρήση του Tukey test ( $p<0.05$ ).....	86
Πίνακας 21: Σύγκριση των κανονικοποιημένων μετρήσεων μεταξύ του AnLb 40 και όλων των υπό μελέτη στελεχών με τη χρήση του Tukey test ( $p<0.05$ ).....	88
Πίνακας 22: Σύγκριση των κανονικοποιημένων μετρήσεων μεταξύ του AnLb 16 και AnLb 18 και όλων των υπό μελέτη στελεχών με τη χρήση του Tukey test ( $p<0.05$ ).....	89

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Απορροφήσεις χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος (Προπείραμα).....	66
Σχήμα 2: Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης της χοληστερόλης.....	72
Σχήμα 3: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομάκρυναν από το μέσο καλλιέργειας τα στελέχη <i>L. rhamnosus</i> .....	75
Σχήμα 4: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομάκρυναν από το μέσο καλλιέργειας τα στελέχη <i>L. gasseri</i> .....	76
Σχήμα 5: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομάκρυναν από το μέσο καλλιέργειας τα στελέχη <i>L. acidophilus</i> .....	77
Σχήμα 6: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομάκρυναν από το μέσο καλλιέργειας τα υπόλοιπα στελέχη.....	78
Σχήμα 7: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών <i>L. rhamnosus</i> .....	81
Σχήμα 8: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών <i>L. gasseri</i> .....	82
Σχήμα 9: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών <i>L. acidophilus</i> .....	83
Σχήμα 10: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας των υπόλοιπων βακτηριακών στελεχών ( <i>Lactobacillus spp.</i> ).....	85

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

LAB	Lactic Acid Bacteria
WGO	World Gastroenterology Organisation
AMP	Antimicrobial Peptides
SCFAs	Short-chain Fatty Acids
GRAS	Generally Recognized As Safe
BSH	Bile Salt Hydrolase
CVD	Cardiovascular Disease
ΕΒΒΙΦΑΜ	Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών
ΠΟΥ	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
MRS	Man-Rogosa-Sharpe
STDEV	Standard Deviation

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1. Ο ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ

### 1.1. ΤΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΜΙΚΡΟΒΙΩΜΑ: ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ

Η μελέτη των μικροβίων που φιλοξενούνται στο ανθρώπινο σώμα καθώς και της σχέσης τους με την ανθρώπινη υγεία είναι τόσο παλιά όσο και η ίδια η μικροβιολογία (Lloyd-Price, Abu-Ali, & Huttenhower, 2016). Ο καθορισμός ενός κοινού ορισμού από την επιστημονική κοινότητα για το σύνολο των μικροοργανισμών που αποικίζουν το ανθρώπινο σώμα υπήρξε δύσκολος. Ο όρος «μικροβιόκοσμος» αναφέρεται σε μια κοινότητα μικροοργανισμών που καταλαμβάνουν μια συγκεκριμένη τοποθεσία ή οικότοπο. Αντίθετα, ο όρος «μικροβίωμα» είναι πιο σύνθετος και περιλαμβάνει τόσο το σύνολο των μικροβίων που κατοικούν σε μια συγκεκριμένη τοποθεσία του σώματος όσο και το ίδιο το περιβάλλον στο οποίο αυτά κατοικούν (Ursell, Metcalf, Wegener Parfrey, & Knight, 2012; Young, 2017). Τέτοια περιβάλλοντα για το ανθρώπινο σώμα αποτελούν το έντερο, η στοματική κοιλότητα, το δέρμα, η ουρογεννητική οδός αλλά και σχεδόν κάθε άλλη κοιλότητα του σώματος (Shafquat, Joice, Simmons, & Huttenhower, 2014).

Ο αριθμός των μικροβιακών κυττάρων που φιλοξενούνται από το ανθρώπινο σώμα κυμαίνεται από 10 έως 100 τρισεκατομμύρια, ξεπερνώντας κατά πολύ τα ανθρώπινα κύτταρα (Ursell, Metcalf, Wegener Parfrey, & Knight, 2012; Bana & Cabreiro, 2019). Στο γαστρεντερικό σωλήνα, όπως και στους υπόλοιπους βιότοπους του σώματος, η συντριπτική πλειοψηφία της μικροβιακής βιομάζας ανήκει στα βακτήρια, με πάνω από 500 στελέχη να έχουν ανακαλυφθεί (Khare & Gaur, 2020), ενώ σε μικρότερους αριθμούς απαντώνται επίσης αρχαία, ευκαρυωτικά κύτταρα, κυρίως μύκητες, ιοί και πρωτόζωα, με ένα μεγάλο αριθμό μικροβιακών ειδών να παραμένει ακόμη ανεξερεύνητος (Lloyd-Price, Abu-Ali, & Huttenhower, 2016; Ursell, Metcalf, Wegener Parfrey, & Knight, 2012). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως ενώ τα μικρόβια που έχουν αποικίσει τον άνθρωπο-ξενιστή έχουν προέλθει από το περιβάλλον του, η σύνθεση του μικροβιώματος, και ιδιαίτερα στο έντερο, εμφανίζει σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με

αυτήν των ελεύθερων μικροβιακών κοινοτήτων (Ursell , Metcalf, Wegener Parfrey, & Knight, 2012).

Το οικοσύστημα του εντέρου, κυρίως του παχέος, είναι ο πιο ευρέως μελετημένος βιότοπος του ανθρώπινου σώματος χάρη στην αξιοσημείωτη ποικιλομορφία του. Σήμερα έχουν αναγνωριστεί πάνω από 1000 διαφορετικά βακτηριακά είδη της εντερικής μικροχλωρίδας, με μια πρόσφατη μελέτη να εκτιμά ότι η συνολική βιομάζα της περιλαμβάνει πάνω από 35000 βακτηριακά είδη. Ο προσδιορισμός αλληλουχίας γονιδιώματος (sequencing) βοήθησε στην προσπάθεια ταυτοποίησης των εντερικών βακτηρίων. Τα στελέχη που κυριαρχούν ανήκουν κυρίως σε δύο φύλα, τα Bacteroidetes και Firmicutes, και ακολουθούν τα φύλα Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia και Fusobacteria, αν και μεταξύ των ατόμων η αναλογία διαφέρει (Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015; WGO, 2017). Μάλιστα, το φύλο των Bacteroidetes έχει αναταξινομηθεί σε πέντε γένη: *Alistipes*, *Prevotella*, *Paraprevotella*, *Parabacteroides* και *Odoribacter*. Δεδομένα από αναλύσεις κοπράνων διευρύνουν διαρκώς αυτή τη λίστα (Lloyd-Price, Abu-Ali, & Huttenhower, 2016).

Πολλές άλλες κοιλότητες του σώματος καλύπτονται από μικροβιακά οικοσυστήματα, με κυρίαρχο μικροβιακό είδος τα βακτήρια (Lloyd-Price, Abu-Ali, & Huttenhower, 2016). Κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, από τον οισοφάγο προς το ορθό, εμφανίζεται σημαντική διαφορά στην ποικιλομορφία και τον αριθμό των βακτηρίων. Τα βακτήρια του γαστρεντερικού σωλήνα κυμαίνονται από  $10^1$  ανά γραμμάριο περιεχομένου στον οισοφάγο και το στομάχι, έως  $10^{12}$  ανά γραμμάριο περιεχομένου στο παχύ έντερο και το ορθό. Στους οικότοπους του στόματος, του οισοφάγου, του δωδεκαδακτύλου και της νήστιδας, το μικροβίωμα φαίνεται να κυριαρχείται από βακτηριακά κύτταρα του γένους *Streptococcus*. Το *Helicobacter* αποτελεί το κυρίαρχο γένος που υπάρχει στο στομάχι και η αναλογία του καθορίζει το συνολικό μικροβιακό τοπίο του γαστρικού μικροβιόκοσμου (Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015). Στο δέρμα, ανάλογα με τα τοπικά του χαρακτηριστικά (ξηρό, υγρό ή σμηγματογόνο) εντοπίζεται και η αντίστοιχη μικροβιακή σύνθεση στην οποία κυριαρχούν τα βακτηριακά γένη *Corynebacterium*, *Propionibacterium* και *Staphylococcus*. Στις γυναίκες, ο υγιής κόλπος περιέχει ένα από τα πιο καλά δομημένα μικροβιακά οικοσυστήματα, το οποίο κυριαρχείται από στελέχη του γένους *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* ή *L. gasseri*). Η μικροβιακή ποικιλομορφία του γυναικείου κόλπου καθορίζεται από παράγοντες

όπως η φυλή, η εθνικότητα, η εγκυμοσύνη και η διατροφή (Lloyd-Price, Abu-Ali, & Huttenhower, 2016) .

Άλλοι σημαντικοί οικότοποι διαθέτουν μικρότερη μικροβιακή βιομάζα η οποία είναι δύσκολο να αναγνωρισθεί. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο πνεύμονας, ένας οικότοπος που ελλείπει λοίμωξης ή νόσου θεωρείται σχεδόν απόλυτα αποστειρωμένος. Το γεγονός αυτό καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέρον τον εντοπισμό των φυσιολογικών κατοίκων του. Αντίστοιχο ενδιαφέρον παρουσιάζουν το μητρικό γάλα και ο πλακούντας καθώς είναι γνωστό ότι συμβάλλουν στη δημιουργία ενός υγιούς μικροβιόκοσμου για το νεογνό και κατεπέκταση ενός καλά δομημένου ανοσολογικού συστήματος (Lloyd-Price, Abu-Ali, & Huttenhower, 2016).

Η εξαιρετική ποικιλομορφία και η ιδιαίτερη προσαρμοστικότητα του ανθρώπινου μικροβιόκοσμου συνδέονται στενά με τη διατήρηση της υγείας του ξενιστή. Η προσαρμογή των μικροβίων στις φυσιολογικές μεταβολές του ξενιστή εξυπηρετεί πληθώρα λειτουργιών στις οποίες συγκαταλέγονται ο καταβολισμός διαιτητικών ινών, η βιοσύνθεση βιταμινών και αμινοξέων, η ωρίμανση των ιστών του ξενιστή, η διαμόρφωση του ανοσοποιητικού του συστήματος κ.ά. (Bana & Cabreiro, 2019; Zhang, Lv, Pan, & Zhang, 2018). Αντίστοιχα, η υψηλή ποικιλομορφία συνδέεται στενά με το πρότυπο ενός υγιούς μικροβιώματος καθώς μείωσή της θα σήμαινε την εξασθένηση της ικανότητας μιας μικροβιακής κοινότητας να αποκλείει παθογόνα μικρόβια ή μικρόβια-μέλη της που γίνονται επιζήμια υπό διαταραχή, όπως το *Candida albicans*. Μάλιστα, μια σχετική έλλειψη στην εντερική ποικιλομορφία είναι εμφανής παρουσία χρόνιων νόσων όπως η παχυσαρκία, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, ο διαβήτης τύπου I και II (Lloyd-Price, Abu-Ali, & Huttenhower, 2016).

## **1.2. Ο ΕΝΤΕΡΙΚΟΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΚΟΣΜΟΣ: ΠΡΩΙΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΙΑ**

### **1.2.1. ΠΡΩΙΜΟΣ ΑΠΟΙΚΙΣΜΟΣ**

Εξελίξεις στις τεχνολογίες προσδιορισμού αλληλουχίας γονιδιώματος και στη βιοπληροφορική έχουν πλέον επιτρέψει στους επιστήμονες να μελετήσουν εκτενέστερα τον εντερικό

μικροβιόκοσμο, τη λειτουργία και τις αλληλεπιδράσεις του με τον ξενιστή, καθιερώνοντας πλέον ότι ένας υγιής εντερικός μικροβιόκοσμος είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνος για τη γενική υγεία του οργανισμού. Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαμόρφωση του φυσιολογικού εντερικού μικροβιόκοσμου περιλαμβάνουν τον τρόπο γέννησης (κολπικός ή με καισαρική τομή), τη διατροφή κατά τη βρεφική ηλικία (μητρικό γάλα ή υποκατάστατα του μητρικού γάλακτος), τη διατροφή στην ενήλικη ζωή (vegan ή με βάση το κρέας), την χρήση αντιβιοτικών φαρμάκων (εκτεταμένη ή μη) και εν μέρει τον γονότυπο του ξενιστή (Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015; WGO, 2017).

Η γέννηση αντιπροσωπεύει την πρώτη σημαντική έκθεση του ανθρώπινου οργανισμού σε πολύπλοκους μικροβιότοπους και αποτελεί τον πρωταρχικό μηχανισμό για τη διαγενεακή μεταφορά μικροβίων από τη μητέρα στο νεογνό (Dominguez-Bello, Godoy-Vitorino, Knight, & Blaser, 2019). Ο τρόπος γέννησης καθορίζει τα είδη των μικροβίων που θα αποικίσουν αρχικά το βρεφικό έντερο (Milani, et al., 2017). Το έντερο των βρεφών που γεννιούνται κολπικά κυριαρχείται από μικροοργανισμούς που εντοπίζονται στο μητρικό κόλπο, όπως τα γένη *Lactobacillus* και *Prevotella*. Αντίθετα, το έντερο των βρεφών που γεννιούνται με καισαρική τομή εμφανίζει μικροβιακές κοινότητες από τον μικροβιόκοσμο του δέρματος της μητέρας, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα γένη *Streptococcus*, *Corynebacterium* και *Propionibacterium* (Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015).

Έως την ηλικία των 3 ετών, ο βρεφικός εντερικός μικροβιόκοσμος σταθεροποιείται και αποκτά τη μορφή του μικροβιώματος των ενηλίκων με ποσοστό ομοιότητας 40%-60%. Από την 3η έως την 7η δεκαετία της ζωής, η κατανομή των στελεχών φαίνεται σε γενικές γραμμές να παραμένει σε σταθερή κατάσταση, χωρίς ωστόσο να λείπουν χωρικές και χρονικές μεταβολές για τις οποίες είναι υπεύθυνα τα διατροφικά πρότυπα, ο τρόπος ζωής και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες (Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015). Ο εμπλουτισμός του εντερικού μικροβιώματος από βακτηριακά στελέχη των γενών *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* και του *Faecalibacterium prausnitzii* ήδη από τη βρεφική ηλικία, φαίνεται να αποτελεί καθοριστικό παράγοντα ενός υγιούς μικροβιώματος στην ενήλικη ζωή (Lloyd-Price, Abu-Ali, & Huttenhower, 2016; Milani, et al., 2017).

## 1.2.2. ΑΝΟΣΙΑ ΣΤΟ ΒΛΕΝΝΟΓΟΝΟ

Η ομοιόσταση, ως φυσιολογική προϋπόθεση για την υγεία του εντερικού μικροβιώματος, υποβάλλει το ανοσοποιητικό σύστημα σε μία δύσκολη θέση κατά την οποία πρέπει να είναι ανεκτικό προς τα ευεργετικά μικρόβια που αποικίζουν το έντερο και παράλληλα αποτρεπτικό στην υπερανάπτυξη των παθογόνων μικροβίων (Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015). Το εντερικό μικροβίωμα αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι στην εκπαίδευση του ανοσοποιητικού συστήματος και ο αποικισμός του από ευεργετικά γένη, ήδη από τα πρώτα στάδια της ζωής, προάγει ανοσολογική ανοχή και κατά συνέπεια μπορεί να εξασθενήσει ή να αποτρέψει την εμφάνιση φλεγμονωδών διαταραχών και αυτοάνοσων ασθενειών (Lloyd-Price, Abu-Ali, & Huttenhower, 2016). Η ανοσοδιαμόρφωση του εντέρου αφορά τη συνεργασία του εντερικού μικροβιώματος τόσο με το ενδογενές όσο και με το προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα. Πολλά, αν όχι όλα, τα κύτταρα και τα συστατικά του ανοσοποιητικού συστήματος, που συμμετέχουν στην ανοσορυθμιστική διαδικασία, είναι παρόντα στο λεπτό και το παχύ έντερο όπως λεμφοειδείς ιστοί, μακροφάγα, ρυθμιστικά και βοηθητικά T κύτταρα, η ανοσοσφαιρίνη A (IgA) κ.ά. (Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015).

Ένας μεγάλος αριθμός οργανωμένων λεμφοειδών δομών στο βλεννογόνο του λεπτού (επιθέματα Peyer's) και του παχέος εντέρου (απομονωμένα λεμφοειδή θυλάκια) επιτρέπουν την αλληλεπίδραση μεταξύ μικροβίων και ανοσοποιητικού συστήματος. Τα επιθηλιακά κύτταρα πάνω από αυτές τις δομές επιδίδονται στη λήψη και την αναγνώριση αντιγόνων επάγοντας προσαρμοστικές ανοσολογικές αποκρίσεις (WGO, 2017). Ο εντερικός λεμφοειδής ιστός αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο συστατικό του ανοσοποιητικού συστήματος στο σώμα. Σύμφωνα με μία σχετική μελέτη, η εξασθενημένη ανάπτυξη των επιθεμάτων Peyer's και των λεμφοειδών θυλακίων στο έντερο ποντικών που δεν διέθεταν εντερικό μικροβιόκοσμο υπονοεί το σημαντικό ρόλο του τελευταίου στη διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος (Gopalakrishnan, Helmink, Spencer, Reuben, & Wargo, 2018; Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015).

Στη βάση των εντερικών κρυπτών του λεπτού εντέρου τα επιθηλιακά κύτταρα περιλαμβάνουν κύτταρα Paneth, τα οποία εκκρίνουν αντιμικροβιακά πεπτίδια (AMP) (Gopalakrishnan,

Helmink, Spencer, Reuben, & Wargo, 2018). Η παραγωγή αυτή έχει βρεθεί ότι συνδέεται με δύο βακτηριακά είδη, τα *Bacteroides thetaiotaomicron* και *Lactobacillus innocua*. Τα AMP ενεργούν κυρίως διαταράσσοντας τις δομές στην επιφάνεια παθογόνων μικροβίων. Επιπλέον, η ικανότητα των στελεχών *Lactobacillus sp.* να παράγουν γαλακτικό οξύ αυξάνει την αντιμικροβιακή δραστηριότητα της λυσοζύμης που εκκρίνεται από τα κύτταρα Paneth στο λεπτό έντερο. Δεδομένου ότι το στρώμα της βλέννας του λεπτού εντέρου είναι ασυνεχές και ανεπαρκές, σε αντίθεση με αυτό του παχέος εντέρου, η παρουσία αντιμικροβιακών πρωτεϊνών παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία του (Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015).

Μεταβολίτες που παράγονται από βακτήρια του εντέρου μπορούν επίσης να επηρεάσουν την τοπική ανοσία. Η ζύμωση των διαιτητικών ινών που διέφυγαν από τη διαδικασία της πέψης από εντερικά βακτήρια έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFAs) όπως βουτυρικό, προπιονικό και οξικό οξύ, που αποτελούν πλούσιες πηγές ενέργειας για τον ξενιστή (Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015). Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι τα SCFAs αυξάνουν την ανοσία μέσω της αύξησης της παραγωγής της ανοσοσφαιρίνης A (IgA). Η IgA δρα κυρίως αποκλείοντας τη βακτηριακή προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα (Gopalakrishnan, Helmink, Spencer, Reuben, & Wargo, 2018). Τα τελευταία χρόνια ενισχύεται η υπόθεση ότι τα SCFAs έχουν επιπλέον κατασταλτικό ρόλο στη δημιουργία όγκων, με περισσότερες μελέτες να είναι απαραίτητες (Lloyd-Price, Abu-Ali, & Huttenhower, 2016). Τέλος, προσαρμοστικές ανοσοαποκρίσεις, που διαμορφώνονται περαιτέρω από τα εντερικά μικρόβια, επηρεάζουν τη διαφοροποίηση των T κυττάρων σε T ρυθμιστικά κύτταρα (Tregs) και T βοηθητικά κύτταρα 17 (Th17). Η διατήρηση των T κυττάρων στο επίπεδο του εντέρου, που επηρεάζει ποικιλοτρόπως την ανοσία του, διευκολύνεται από βακτηριακούς μεταβολίτες όπως τα SCFAs (Gopalakrishnan, Helmink, Spencer, Reuben, & Wargo, 2018).

Γίνεται λοιπόν σαφές πως απαραίτητη προϋπόθεση για τη διαμόρφωση ενός υγιούς εντερικού μικροβιώματος αποτελεί η παρουσία ενός συνόλου μικροβιακών ειδών που μπορούν να πραγματοποιήσουν πολυάριθμες και καθοριστικές για την υγεία του ξενιστή λειτουργίες. Παρά το γεγονός πως ο εντερικός μικροβιόκοσμος διαθέτει την ικανότητα να αντιστέκεται στη

διαταραχή που μπορεί να προκύψει από εξωτερικούς παράγοντες όπως η διαίτα, τα παθογόνα μικρόβια και τα αντιβιοτικά, σε ορισμένες περιπτώσεις είναι απαραίτητη η από του στόματος χορήγηση ζώντων μικροοργανισμών για την αποκατάσταση των ωφέλιμων μικροβιακών πληθυσμών (Lloyd-Price, Abu-Ali, & Huttenhower, 2016).

## **2. ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ**

### **2.1. ΟΡΙΣΜΟΣ**

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ορίζει τα προβιοτικά ως ζώντες μικροοργανισμούς οι οποίοι, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσδίδουν όφελος στην υγεία του ξενιστή (Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015). Η διατύπωση επιλέχθηκε προσεκτικά για να περιλαμβάνει όλους τους δυνητικούς τρόπους λήψης των προβιοτικών μικροβίων από τον ξενιστή. Επομένως, λέξεις όπως «κατανάλωση» και «κατάποση» ήταν πολύ περιοριστικές και γι'αυτό επιλέχθηκε το ρήμα «χορηγούνται» (Reid, 2016). Επιπλέον, ο όρος «προβιοτικά» θα πρέπει να προορίζεται αυστηρά για ζώντα μικρόβια που έχουν αποδειχθεί, μέσω μελετών σε ανθρώπους, ότι προσδίδουν όφελος στην υγεία (WGO, 2017). Παρ'όλα αυτά, η πλειονότητα των προβιοτικών προϊόντων στην αγορά δεν έχει υποβληθεί σε κατάλληλες δοκιμές για επαλήθευση αυτού (Reid, 2016).

Στο παρελθόν, ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνταν μόνο όσοι είχαν αναγνωριστεί στα προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση (Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015). Σήμερα, τρόφιμα ζωικής προέλευσης όπως το νωπό γάλα, ή ζωικής και φυτικής προέλευσης που έχουν υποστεί ζύμωση, θα μπορούσαν να αποτελέσουν πλούσιες πηγές για απομόνωση πιθανών προβιοτικών στελεχών. Δεδομένου ότι το μητρικό γάλα έχει αποδειχθεί ως ένας σημαντικός παράγοντας στον αποικισμό του άσηπτου εντέρου του νεογνού, έχει προταθεί η χρήση του ως πηγή προβιοτικών στελεχών. Επίσης, προβιοτικά στελέχη θα μπορούσαν να απομονωθούν και από το γαστρεντερικό σωλήνα και τα περιττώματα ενηλίκων, παιδιών και βρεφών. Ως καλύτερες πηγές προβιοτικών που προορίζονται για ανθρώπινη χρήση, συστήνονται ο ανθρώπινος εντερικός μικροβιόκοσμος και τροφές βρώσιμες για τον άνθρωπο, προκειμένου να εξασφαλιστεί η διατήρηση της υγείας και

η καλύτερη δυνατή προσκόλληση στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα του ξενιστή (Shokryazdan, Jahromi, Liang, & Ho, 2017).

Σήμερα, τα προβιοτικά στελέχη διατίθενται σε διάφορες μορφές. Όταν απομονωθούν από τις πηγές τους μπορούν να προστεθούν σε άλλα τρόφιμα, υγρά, σκόνες ή κάψουλες και να διατεθούν ως συμπληρώματα διατροφής ή φάρμακα. Είναι εύκολα προσβάσιμα και βρίσκονται στα περισσότερα παντοπωλεία, φαρμακεία, ακόμη και ηλεκτρονικά καταστήματα (Reid, 2016; Shahrokhi & Nagalli, 2020). Μάλιστα, η ζήτησή τους φαίνεται να επηρεάζεται από τον αριθμό των στελεχών που αναφέρονται στις ετικέτες των προβιοτικών προϊόντων, λόγω της πεποίθησης ότι όσο περισσότερα τόσο το καλύτερο (Reid, 2016). Είναι πλέον συνηθισμένο στον τομέα των προβιοτικών προϊόντων να συμπεριλαμβάνονται πολλαπλά στελέχη. Ωστόσο, μια τέτοια προσέγγιση θα πρέπει να αποδεικνύει επιστημονικά ότι οι κοινοί μηχανισμοί δράσης μεταξύ των διαφορετικών στελεχών προάγουν ένα κοινό θετικό αποτέλεσμα στην ανθρώπινη υγεία (WGO, 2017).

Μία μεγάλη κατηγορία προβιοτικών βακτηρίων αποτελούν τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB), μιας και εκτός από τη ζύμωση των τροφίμων (μέσω της παραγωγής γαλακτικού οξέος) μπορούν να προσδώσουν και σημαντικά οφέλη στην ανθρώπινη υγεία (WGO, 2017). Από την ομάδα των LAB, το γένος *Lactobacillus* ήταν το πρώτο που ανακαλύφθηκε ενώ άλλα είδη LAB με αποδεδειγμένη προβιοτική δράση αποτελούν τα *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* και *Leuconostoc* (Pereira, Coelho, Magalhães Júnior, Thomaz-Soccol, & Soccol, 2018; Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015). Εκτός των LAB, τα προβιοτικά περιλαμβάνουν ακόμη βακτηριακά γένη όπως τα *Bifidobacterium*, *Bacillus* και *Streptococcus thermophilus*, ορισμένες ζύμες (*Saccharomyces boulardii*) καθώς και ορισμένα στελέχη του *E.coli* (στέλεχος Nissle 1917) (Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015; WGO, 2017). Σε σύγχρονα προβιοτικά προϊόντα έχει χρησιμοποιηθεί και το *Clostridium butyricum*, που εγκρίθηκε πρόσφατα από την Ευρωπαϊκή Ένωση (WGO, 2017) (ΠΙΝΑΚΑΣ 1).

Η χορήγηση ενός πρεβιοτικού θα μπορούσε ενδεχομένως να αυξήσει την ευεργετική επίδραση των προβιοτικών. Τα πρεβιοτικά ορίζονται ως συστατικά τροφίμων που περιέχουν άπεπτους ολιγοσακχαρίτες (όπως γαλακτοολιγοσακχαρίτες και ινουλίνη) οι οποίοι, μόλις εισέλθουν στο παχύ έντερο, μεταβολίζονται από συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη του εντερικού μικροβιόκοσμου παράγοντας λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs) τα οποία με τη σειρά τους προσδίδουν θετικές επιπτώσεις στην υγεία του ξενιστή. Όταν προβιοτικό και πρεβιοτικό υφίστανται μαζί στο ίδιο προϊόν, το τελευταίο ονομάζεται συνβιοτικό (Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015).

Πίνακας 1: Προβιοτικοί Μικροοργανισμοί ( Προσαρμογή από (Zuccotti, et al., 2008; Jandhyala, Talukdar, Subramanyam, Vuyyuru, Sasikala, & Reddy, 2015; WGO, 2017)

<b>Βακτηριακό Γένος</b>	<b>Βακτηριακά στελέχη</b>	
<b><i>Lactobacillus</i></b>	<i>L. acidophilus</i> spp.	<i>L. rhamnosus</i> GG
	<i>L. acidophilus</i> LA-1	<i>L. reuteri</i>
	<i>L. casei</i> spp.	<i>L. delbrueckii</i> subsp.
	<i>L. paracasei</i>	<i>bulgaricus</i>
	<i>L. satsumensis</i>	<i>L. plantarum</i> 299 V
	<i>L. plantarum</i> spp.	<i>L. johnsonii</i>
	<i>L. gasseri</i> SBT2055	<i>L. fermentum</i> KLD
	<i>L. amylovorus</i> CP1563	<i>L. salivarius</i> LS01
	<i>L. kefir</i>	<i>L. helveticus</i>
<b><i>Bifidobacteria</i></b>	<i>B. bifidum</i>	<i>B. breve</i>
	<i>B. infantis</i>	<i>B. longum</i>
	<i>B. teentensis</i>	<i>B. animalis</i>
<b>Άλλα βακτήρια</b>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	<i>Streptococcus thermophilus</i>

	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Bacillus (B. clausii και B. subsp. thermophilus</i>	<i>Subtilis</i>
<b>Μύκητες</b>	<i>Saccharomyces boulardii</i>		

## 2.2. ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ

### 2.2.1. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΕ ΤΟΝ ΞΕΝΙΣΤΗ

Οι λειτουργίες των προβιοτικών είναι άρρηκτα συνυφασμένες τόσο με τα μικροβιακά στελέχη που αποικίζουν τον εντερικό βλεννογόνο όσο και με τα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα. Οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ προβιοτικών στελεχών και ξενιστή, ανάλογα με τα οφέλη που προσφέρουν στην ανθρώπινη υγεία, ταξινομούνται ως εξής:

#### Ανοσολογικά οφέλη

- Ενεργοποίηση τοπικών μακροφάγων με σκοπό την αύξηση της έκκρισης ανοσοσφαιρίνης A (IgA) και της αντιγονικής παρουσίας σε Β λεμφοκύτταρα
- Ρύθμιση έκκρισης κυταροκινών
- Ανοχή σε αντιγόνα τροφίμων

#### Μη ανοσολογικά οφέλη

- Δημιουργία δυσμενούς περιβάλλοντος για παθογόνα μικρόβια μέσω ρύθμισης του pH
- Ανταγωνισμός με παθογόνα μικρόβια σε θρεπτικά συστατικά και θέσεις προσκόλλησης του εντερικού βλεννογόνου
- Ενεργοποίηση παραγωγής βλέννας στο εντερικό επιθήλιο
- Παραγωγή βακτηριοσινών για αναστολή ανάπτυξης παθογόνων μικροβίων
- Τροποποίηση παθογόνων τοξινών
- Αντιοξειδωτική δράση και απομάκρυνση ριζών υπεροξειδίου
- Διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού βλεννογόνου
- Ρύθμιση της περισταλτικότητας του εντέρου

- Πέψη και βελτίωση της απορρόφησης θρεπτικών συστατικών
- Παραγωγή ευεργετικών ενώσεων, όπως βιταμίνες, λιπαρά οξέα βραχείας αλύσου (SCFAs) κ.ά. (Shokryazdan, Jahromi , Liang, & Ho, 2017; WGO, 2017)

Δεν είναι εύκολο να δοθεί μία σαφής απάντηση για τον τρόπο με τον οποίο ένα στέλεχος μπορεί να επηρεάσει την υγεία του εκάστοτε ανθρώπινου οργανισμού. Δεδομένα επιστημονικών μελετών αναφέρουν ότι ένα προβιοτικό στέλεχος αντιδρά ανάλογα με τη θέση του εντερικού βλεννογόνου στην οποία προσκολλάται (Reid, 2016). Επίσης οι μηχανισμοί δράσης που αφορούν τα προβιοτικά δεν πρέπει να γενικεύονται για κάθε είδος αλλά να χαρακτηρίζουν συγκεκριμένα στελέχη (Islam, 2016). Στη μελέτη των Cadieux et al. (Cadieux, et al., 2008), βακτηριακά στελέχη του ίδιου είδους, και συγκεκριμένα τα *Lactobacillus reuteri* SD2112 (ATCC 55730) και *Lactobacillus reuteri* RC-14, διέφεραν στον τρόπο αλληλεπίδρασης με τον ξενιστή, με το πρώτο να δρα αναστέλλοντας εντερικά παθογόνα και το τελευταίο να παράγει βιοεπιφανειοδραστικές ουσίες παρεμποδίζοντας την προσκόλληση ουροπαθογόνων στον εντερικό βλεννογόνο (Cadieux, et al., 2008).

Οι ανωτέρω μηχανισμοί ευνοούν τη δημιουργία ενός υγιούς εντερικού περιβάλλοντος με επακόλουθες ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Μία διαταραχή της ομοιόστασής του μπορεί να οδηγήσει σε πληθώρα ανεπιθύμητων συμπτωμάτων όπως διάρροια, κοιλιακό άλγος, διάτρηση εντέρου κ.ά. Για το λόγο αυτό, υψηλής ποιότητας μετα-αναλύσεις διερευνούν τα οφέλη των προβιοτικών στελεχών στοχεύοντας στη χρήση τους ως θεραπεία και πρόληψη εντερικών κι άλλων νόσων (Shokryazdan, Jahromi , Liang, & Ho, 2017; WGO, 2017; Khare & Gaur, 2020).

### **2.2.2. ΟΦΕΛΗ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ**

Ολοένα και περισσότερες μελέτες αποδεικνύουν την επίδραση των προβιοτικών στελεχών σε κάθε μέρος του εντερικού ιστού συμπεριλαμβανομένων του εντερικού επιθηλίου, της βλέννας, των εντερικών νεύρων και αγγείων, των λείων μυών που ελέγχουν την εντερική περισταλτικότητα καθώς και του εντερικού λεμφοειδούς ιστού που έχει την ικανότητα να επικοινωνεί με το ανοσοποιητικό σύστημα (Dudek-Wicher, Junka, Paleczny, & Bartoszewicz, 2020). Αν και ο πλήρης μηχανισμός της ανοσολογικής δράσης των προβιοτικών δεν είναι

πλήρως κατανοητός, υπήρξαν ορισμένα αξιοσημείωτα ευρήματα στο παρελθόν. Έρευνες διαπίστωσαν ότι τα προβιοτικά ενισχύουν το ανοσοποιητικό σύστημα, παίζοντας σημαντικό ρόλο τόσο στην έμφυτη όσο και στην προσαρμοστική ανοσία και αυξάνοντας τη συνολική αποτελεσματικότητά της (Shahrokhi & Nagalli, 2020). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της ενεργοποίησης μακροφάγων και κυτταροτοξικών Τ κυττάρων, ρυθμίζοντας την παραγωγή ανοσοσφαιρίνης (IgA), τροποποιώντας το προφίλ έκφρασης κυτταροκινών κ.ά. (Dudek-Wicher, Junka, Paleczny, & Bartoszewicz, 2020; Wilkins & Sequoia, 2017). Μάλιστα, μία πρόσφατη ανασκόπηση που διερευνά την επίδραση των προβιοτικών στελεχών έναντι ιογενών αναπνευστικών λοιμώξεων υπογράμμισε την ευεργετική επίδραση των προβιοτικών στην ανοσοαπόκριση και κατεπέκταση στη βελτίωση της εμφάνισης και της διάρκειας των συμπτωμάτων (Lopez-Santamarina, et al., 2021).

Ένα από τα μεγαλύτερα οφέλη των προβιοτικών στην υγεία του ξενιστή είναι η επίδρασή τους στην ανάπτυξη του ανθρώπινου μικροβιώματος με τρόπο που εξασφαλίζει μια σωστή ισορροπία μεταξύ παθογόνων και απαραίτητων για την υγεία βακτηρίων. Πολυάριθμες μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν υποδείξει ότι η παραγωγή ενδογενών αντιβακτηριακών παραγόντων και ο ανταγωνισμός ορισμένων προβιοτικών στην προσκόλληση και τα απαραίτητα για την ανάπτυξη του κυττάρου θρεπτικά συστατικά, προάγουν την ακεραιότητα του εντερικού φραγμού και περιορίζουν την παρουσία παθογόνων μικροβίων (Dudek-Wicher, Junka, Paleczny, & Bartoszewicz, 2020; Quigley, 2019). Αξιοσημείωτο είναι το εύρημα ορισμένων μελετών ότι τα ευεργετικά προβιοτικά στελέχη που εισέρχονται και προσκολλώνται στην εντερική οδό υστερούν κατά πολύ σε αριθμό από τα στελέχη που κατοικούν φυσιολογικά στον εντερικό βλεννογόνο. Δεδομένα από πειράματα ανταγωνισμού μεταξύ προβιοτικών και παθογόνων στελεχών, έδειξαν ότι η αναλογία των λακτοβακίλλων που μπόρεσαν να αντικαταστήσουν και να ανταγωνιστούν παθογόνα μικρόβια ήταν πολύ μικρότερη συγκριτικά με την αναλογία των λακτοβακίλλων που κατοικούν στον εντερικό βλεννογόνο (Reid, 2016).

Μια ενδιαφέρουσα πτυχή των προβιοτικών στελεχών είναι η ικανότητα ορισμένων να παρέχουν αποτελέσματα μακριά από την «έδρα» τους. Αυτό μπορεί να συμβεί μέσω της πραγματικής μεταφοράς είτε του ίδιου του μικροοργανισμού, για παράδειγμα από το έντερο στους μαστικούς αδένες της θηλάζουσας γυναίκας, είτε μέσω μορίων που παράγουν και προσροφώνται στο έντερο (Reid, 2016). Βακτήρια του ανθρώπινου εντέρου, όπως τα

*Lactobacillus brevis* και *Bifidobacterium dentium*, έχουν την ικανότητα να παράγουν νευροδιαβιβαστές που στέλνουν σήματα στο ΚΝΣ (Dudek-Wicher, Junka, Paleczny, & Bartoszewicz, 2020), μειώνοντας ακόμη και την αίσθηση του πόνου μέσω ενεργοποίησης υποδοχέων οπιοειδών και ενδοκανναβινοειδών (Shahrokhi & Nagalli, 2020; Markowiak & Śliżewska, 2017). Το γεγονός αυτό γεννά την υπόθεση ότι η χορήγηση προβιοτικών θα μπορούσε με κάποιον τρόπο να επηρεάσει όχι μόνο τη διάθεση και τη μνήμη, αλλά ακόμη και το τι τρώμε και επομένως πόσο αργά ή γρήγορα μπορούν να εξελιχθούν παθολογικές καταστάσεις όπως η παχυσαρκία, ο διαβήτης κλπ (Reid, 2016).

Τα προβιοτικά στελέχη μπορούν να ασκήσουν αντικαρκινική δράση μέσω της επίδρασής τους στην ανοσορύθμιση. Οι πιθανοί προβιοτικοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί για την αναστολή της καρκινογένεσης περιλαμβάνουν την ικανότητα ορισμένων προβιοτικών να ρυθμίζουν την παραγωγή αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της καρκινογένεσης, να ενεργοποιούν φαγοκύτταρα για την εξάλειψη καρκινικών κυττάρων σε πρώιμο στάδιο (Górska, Przystupski, Niemczura, & Kulbacka, 2019) καθώς και να δεσμεύουν και να αποικοδομούν δυνητικά μεταλλαξιγόνα (Pereira, Coelho, Magalhães Júnior, Thomaz-Soccol, & Soccol, 2018; Ljungh & Wadström, 2006). Η στοματική χορήγηση προβιοτικών φαίνεται να παίζει κάποιο προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου (Javanmard, et al., 2018), ενώ αρκετές μελέτες έχουν βρει αρνητική συσχέτιση μεταξύ της κατανάλωσης γαλακτοκομικών προϊόντων και του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου (Górska, Przystupski, Niemczura, & Kulbacka, 2019). Επί του παρόντος, είναι αποδεκτό ότι τα περισσότερα προβιοτικά προϊόντα είναι γενικά ασφαλή και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπλήρωμα διατροφής στην πρόληψη και τη θεραπεία του καρκίνου (Taherian, et al., 2019). Ωστόσο, μεγάλη προσοχή πρέπει να δίνεται στην περίπτωση ανοσοκατεσταλμένων ασθενών (Doron & Snyderman, 2015) ενώ απαιτούνται καλά σχεδιασμένες, τυχαιοποιημένες μελέτες σε ανθρώπους ώστε να αποκτήσουν την αποδοχή ως εναλλακτική θεραπεία για τον έλεγχο του καρκίνου (Javanmard, et al., 2018).

Τέλος, πρόσφατες ανακαλύψεις έχουν συνδέσει τα προβιοτικά με την πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων λόγω της δράσης τους στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό του αίματος (Pereira, Coelho, Magalhães Júnior, Thomaz-Soccol, & Soccol, 2018). Η

δράση των προβιοτικών στοχεύει στη μείωση της απορροφούμενης χοληστερόλης από το εντερικό επιθήλιο μέσω ποικίλων μηχανισμών όπως η αφομοίωση και ενσωμάτωση χοληστερόλης στις κυτταρικές μεμβράνες των προβιοτικών, η ενζυματική αποσύνδεση των χολικών αλάτων, η μετατροπή της χοληστερόλης σε κοπροστανόλη πριν την απορρόφηση και η επακόλουθη απέκκρισή της στα κόπρανα κ.ά. (Kumar, et al., 2012). Ευρήματα μελετών σχετικά με τη χορήγηση προβιοτικών σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς υποδεικνύουν την ευεργετική τους επίδραση στα επίπεδα της συνολικής και της LDL χοληστερόλης, στην αρτηριακή πίεση, στα επίπεδα της γλυκόζης ακόμη και στο Δείκτη Μάζας Σώματος. Συνεπώς, ολοένα και περισσότερες μελέτες διερευνούν την πτυχή της αλλαγής του εντερικού μικροβιόκοσμου με προβιοτικά ως προσέγγιση για την πρόληψη ή /και τη θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων (Thushara, Gangadaran, Solati, & Moghadasian , 2016).

Ολοένα και περισσότερες μελέτες διεξάγονται με στόχο τον εντοπισμό των προβιοτικών στελεχών που παράγουν τα πιο ευεργετικά αποτελέσματα για κάθε ανθρώπινη ασθένεια και την επακόλουθη χρήση τους στη δημιουργία της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής για τους ασθενείς. Τα προβιοτικά μπορούν να ανακουφίσουν από πολλά και διαφορετικά συμπτώματα, με την προϋπόθεση ότι χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες (Shahrokhi & Nagalli, 2020). Η επίδραση των προβιοτικών στην παιδική διάρροια βρέθηκε ότι έχει τη μεγαλύτερη στατιστικά σημαντική προστατευτική σχέση, εμφανίζοντας επτά διαφορετικά στελέχη που ασκούν προληπτική δράση για την εκδήλωσή της (Shahrokhi & Nagalli, 2020). Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες του Παγκόσμιου Οργανισμού Γαστρεντερολογίας, τα περισσότερα προβιοτικά προϊόντα είναι ασφαλή για τον γενικό υγιή πληθυσμό. Ωστόσο, παραμένει δύσκολο να γνωρίζουμε εάν ένας ασθενής θα επωφεληθεί από τη λήψη ενός συγκεκριμένου προβιοτικού (Wieërs, et al., 2020). Οι συστάσεις χορήγησής τους σε κλινικό επίπεδο, και κυρίως σε άτομα με μειωμένη ανοσολογική λειτουργία (Wilkins & Sequoia, 2017) ή σοβαρή υποκείμενη ασθένεια, θα πρέπει να περιορίζονται καλύτερα σε επίπεδο στελέχους και σε ενδείξεις με αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα από μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε ανθρώπους (WGO, 2017).

## 2.3. ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

### 2.3.1 ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Για να ταξινομηθεί ένα βακτηριακό στέλεχος ως προβιοτικό, πρέπει να πληρεί ορισμένες προϋποθέσεις. Αυτές περιλαμβάνουν την ασφάλεια του ξενιστή (να είναι γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές-GRAS), τεχνολογικά χαρακτηριστικά, όπως η σταθερότητα αποθήκευσης του στελέχους, και τεκμηριωμένα οφέλη για την υγεία. Για τη διασφάλιση της υγείας του ξενιστή, ο μικροοργανισμός πρέπει να είναι ανθρώπινης προέλευσης και να χαρακτηρίζεται με ακρίβεια μέσα από μελέτες υψηλής ποιότητας (Hogáčková, Plocková, & Demnerová, 2018; Doron & Snyderman, 2015). Επίσης, πρέπει να διαθέτει ορισμένες λειτουργικές ιδιότητες που θα του εξασφαλίσουν τον υψηλότερο βαθμό βιωσιμότητας στο γαστρεντερικό σωλήνα (Khare & Gaur, 2020; Zuccotti, et al., 2008). Αυτές περιλαμβάνουν:

- Αντοχή στην γαστρική οξύτητα
- Προσκόλληση στη βλέννα και τα ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα για την αντιμετώπιση της περισταλτικότητας του εντέρου
- Αντιμικροβιακή και ανταγωνιστική δραστηριότητα κατά πιθανών παθογόνων μικροβίων
- Δραστηριότητα ενζύμου υδρολάσης χολικών αλάτων (BSH) και αντοχή σε χολικά άλατα
- Επίδραση στις ανθρώπινες μεταβολικές δραστηριότητες (π.χ. αφομοίωση χοληστερόλης, δραστηριότητα λακτάσης, παραγωγή βιταμινών)

Εκτός από τα γενικά κριτήρια προσδιορισμού, όταν ένα προβιοτικό στέλεχος προορίζεται για μια συγκεκριμένη χρήση, κρίνεται απαραίτητη η διεξαγωγή επιπλέον *in vivo* δοκιμών (Shokryazdan, Jahromi, Liang, & Ho, 2017).

### 2.3.2 *IN VITRO* ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει παρατηρηθεί ένα εντυπωσιακό ρεκόρ δημοσιεύσεων για τη μελέτη προβιοτικών στελεχών και τη χρήση τους σε κλινικές δοκιμές, χρησιμοποιώντας *in vitro* και *in vivo* προσεγγίσεις. Σήμερα, η ανάπτυξη της γονιδιωματικής προσέγγισης έχει συντελέσει σημαντικά στην εκτίμηση των προβιοτικών χαρακτηριστικών (Seddik, Bendali, Gancel, Fliss, Spano, & Drider, 2017).

Πολλές φαινοτυπικές μέθοδοι ταυτοποίησης προβιοτικών στελεχών έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν με τις πιο γνωστές να περιλαμβάνουν τη χρώση Gram, τη μελέτη αποικιών και μορφολογίας κυττάρων, τις απαιτήσεις ανάπτυξης, την ενζυματική παραγωγή και τις μεταβολικές δραστηριότητες. Σήμερα, η χρήση τέτοιων μεθόδων, λόγω λειτουργικών ελλείψεων, έχει περιοριστεί μόνο στην αρχική εξέταση των απομονωμένων προϊόντων. Ειδικά στην περίπτωση βραδέως αναπτυσσόμενων μικροοργανισμών, αυτές οι μέθοδοι μπορεί να αποβούν δύσκολες και ιδιαίτερες χρονοβόρες. Εναλλακτικά, η γονοτυπική ταυτοποίηση μικροβίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση ειδών και τη διαφοροποίηση μικροβιακών στελεχών. Από όλες τις μεθόδους, η ανάλυση αλληλουχίας γονιδίου 16 S rRNA είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος μικροβιακής αναγνώρισης χάρη στην ακρίβεια και την ικανότητα ταυτοποίησης ταξινομικών σχέσεων μεταξύ μικροβιακών στελεχών του ίδιου είδους (Shokryazdan, Jahromi, Liang, & Ho, 2017).

Κάθε προβιοτικό προϊόν που λαμβάνεται από το στόμα πρέπει να είναι ανθεκτικό στα οξέα και τα χολικά άλατα που θα συναντήσει κατά τη διέλευσή του από το γαστρεντερικό σωλήνα του ξενιστή (Dunne, et al., 2001). Ο χρόνος διέλευσης κυμαίνεται από μία έως τρεις με τέσσερις ώρες ανάλογα με το άτομο, τη διατροφή και άλλες προϋποθέσεις. Στο στομάχι, το pH θα μπορούσε να φτάσει ως τη χαμηλή τιμή του 1,5. Η ανοχή στα γαστρικά οξέα και τη χολή, εκτός από την επιβίωση του στελέχους, διασφαλίζει και την επιτυχία της προσκόλλησης και του αποικισμού του στον εντερικό βλεννογόνο καθώς και τη μεταβολική δραστηριότητα και ακεραιότητα των βακτηριακών του κυττάρων (Shokryazdan, Jahromi, Liang, & Ho, 2017). Η ιδιότητα αντοχής του στελέχους στο γαστρικό σωλήνα μπορεί να ελεγχθεί *in vitro* μέσω

καλλιέργειάς του σε συνθήκες διαφορετικού pH με την παρουσία ενζύμων, όπως πεψίνη, λυσοζύμη και αμυλάση, γαστρικού χυμού χοίρου και παγκρεατικού οξέος, και επακόλουθη καταμέτρηση των αποικιών του (Pereira, Coelho, Magalhães Júnior, Thomaz-Soccol, & Soccol, 2018; Hu, Yuan, Yue, & Guo, 2018).

Τα συζευγμένα χολικά άλατα είναι γνωστό ότι έχουν μια ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη τόσο των Gram-αρνητικών (όπως *Escherichia coli* και *Enterococcus genera*) όσο και Gram-θετικών βακτηρίων. Ωστόσο, ορισμένα Gram-θετικά βακτήρια όπως τα στελέχη του γένους *Lactobacillus*, έχουν την ικανότητα παραγωγής του ενζύμου υδρολάση χολικών αλάτων (BSH) το οποίο υδρολύει το δεσμό των χολικών αλάτων με τα αμινοξέα γλυκίνη και ταυρίνη (Shokryazdan, Jahromi, Liang, & Ho, 2017). Η δραστηριότητα της υδρολάσης BSH παρέχει στα στελέχη τη δυνατότητα χρήσης των απελευθερωμένων αμινοξέων ως πηγές άνθρακα και αζώτου αλλά κυρίως την αντίσταση των στελεχών στην παρουσία της χολής στον εντερικό αυλό και το πλεονέκτημα επιβίωσης (Smet, Hoorde, Woestyne, Christiaens, & Verstraete, 1995). Η δραστηριότητα της BSH αξιολογείται *in vitro* με καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε MRS agar που περιέχει συζευγμένα χολικά οξέα. Στο τρυβλίο που αναπτύσσεται το στέλεχος με την BSH, παρατηρείται ίζημα χολικού άλατος (Shokryazdan, Jahromi, Liang, & Ho, 2017; Guo C., et al., 2011).

Η μικροβιακή προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα του γαστρικού σωλήνα είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που περιλαμβάνει δύο μεμβράνες, αυτή των μικροβιακών και αυτή των ανθρώπινων κυττάρων, και εξαρτάται από τη φυσικοχημική σύνθεση της επιφάνειας των προβιοτικών στελεχών (Pereira, Coelho, Magalhães Júnior, Thomaz-Soccol, & Soccol, 2018). Η ιδιότητα αυτή έχει αξιολογηθεί *in vitro* με την προσκόλληση κυττάρων *Lactobacillus* σε ανθρώπινα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα όπως τα Caco-2 που προέρχονται από καρκίνωμα του παχέος εντέρου (Shokryazdan, Jahromi, Liang, & Ho, 2017).

Γενικά, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των προβιοτικών περιλαμβάνουν την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών ή βακτηριοσινών και τη συσσωμάτωση με το παθογόνο κύτταρο. Μεταξύ των αντιμικροβιακών ενώσεων που παράγονται από τα στελέχη του γαλακτικού οξέος

(LAB), τα περισσότερα μελετημένα είναι τα οργανικά οξέα, ιδιαίτερα το γαλακτικό και το οξικό οξύ τα οποία προκαλούν μείωση του pH στο γαστρεντερικό σωλήνα. Επιπλέον ορισμένα είδη LAB διαθέτουν ένζυμα που καταλύουν τη μείωση του οξυγόνου και την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου το οποίο έχει οξειδωτική δράση στο παθογόνο κύτταρο. Ακολούθως, οι βακτηριοσίνες είναι πεπτίδια που συντίθενται στα ριβοσώματα μερικών βακτηριακών στελεχών που έχουν αντιμικροβιακή δράση απέναντι σε βακτήρια (Shokrgazdan, Jahromi, Liang, & Ho, 2017). Η παραγωγή αντιμικροβιακού μεταβολίτη μπορεί να αξιολογηθεί σε στερεό θρεπτικό υλικό μέσω της αναστολής ανάπτυξης αποικιών του παθογόνου στελέχους γύρω από τις αποικίες του προβιοτικού (Pereira, Coelho, Magalhães Júnior, Thomaz-Soccol, & Soccol, 2018). Τέλος, η ανταγωνιστική δραστηριότητα μεταξύ προβιοτικών και παθογόνων στελεχών μπορεί να περιλαμβάνει ανταγωνισμό σε θρεπτικά συστατικά, στην προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα και τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος εις βάρος παθογόνων στελεχών (Pereira, Coelho, Magalhães Júnior, Thomaz-Soccol, & Soccol, 2018).

## **2.4. ΣΤΕΛΕΧΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *LACTOBACILLUS* ΩΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ**

### **2.4.1. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΥΓΕΙΑ**

Μεταξύ των προβιοτικών στελεχών, το γένος *Lactobacillus* έχει κατακτήσει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας χάρη στις πολυάριθμες δράσεις του στην ανθρώπινη υγεία (Zhang, Lv, Pan, & Zhang, 2018). Αποτελεί τη μεγαλύτερη ομάδα των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (LAB) (Seddik, Bendali, Gancel, Fliss, Spano, & Drider, 2017) και στελέχη του χρησιμοποιούνται στην παρασκευή ζυμωμένων ζωικών και φυτικών προϊόντων καθώς και συντηρητικών, καλλυντικών και φαρμάκων (WGO, 2017; Zhang, Lv, Pan, & Zhang, 2018). Η ασφαλής και μη παθογόνος φύση τους σε συνδυασμό με προβιοτικές ιδιότητες όπως η προσκόλληση και ο αποικισμός στα επιθηλιακά κύτταρα, ο ανταγωνισμός με παθογόνα μικρόβια και ο σχηματισμός αντιμικροβιακών ενώσεων (υπεροξειδίου του υδρογόνου και βακτηριοσινών) έχουν συμβάλει στην ευρεία χρήση τους για την αποκατάσταση και τη συντήρηση του υγιούς εντερικού μικροβιόκοσμου (Khare & Gaur, 2020).

Το γένος *Lactobacillus* περιλαμβάνει προαιρετικά αναερόβια Gram-θετικά βακτηριακά στελέχη σε σχήμα ράβδου, με 183 διαφορετικά είδη να έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα. Τα στελέχη

των λακτοβακίλλων που κατοικούν στο γαστρεντερικό σωλήνα περιλαμβάνουν τα *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. satsumensis* και *L. johnsonii* (Zhang, Lv, Pan, & Zhang, 2018; WGO, 2017). Οι ποσότητες των λακτοβακίλλων στην ανθρώπινη γαστρεντερική οδό ποικίλλουν, ανάλογα με τη θέση τους μέσα στο έντερο και την ηλικία του ξενιστή. Η απομόνωσή τους από κόπρανα νεογνών αποδεικνύει ότι είναι από τα πρώτα βακτηριακά στελέχη που αποικίζουν τον εντερικό βλεννογόνο. Ωστόσο, μελέτες σε περιττώματα ενηλίκων έχουν εντοπίσει ότι οι λακτοβάκιλλοι αντιπροσωπεύουν μόνο το 0,01 με 0,06% όλων των εντερικών βακτηριακών ειδών ενός ενήλικα (Zhang, Lv, Pan, & Zhang, 2018).

Τα περισσότερα προβιοτικά στελέχη λακτοβακίλλων που χρησιμοποιούνται σήμερα προέρχονται είτε από ζυμωμένα τρόφιμα είτε από τον υγιή εντερικό μικροβιόκοσμο του ανθρώπου. Χάρη στον υψηλό επιπολασμό τους σε τρόφιμα που καταναλώνονται καθημερινά και στην παρουσία τους στο φυσιολογικό εντερικό μικροβιόκοσμο, θεωρείται ότι έχουν χαμηλό επίπεδο μολυσματικότητας (WGO, 2017). Με την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (US FDA) να έχει αναγνωρίσει τα στελέχη λακτοβακίλλων ως διεθνώς ασφαλή (GRAS), τα περισσότερα προβιοτικά προϊόντα που τα περιέχουν χρησιμοποιούνται με ασφάλεια από τον γενικό πληθυσμό (WGO, 2017; Seddik, Bendali, Gancel, Fliss, Spano, & Drider, 2017). Ωστόσο, η χρήση τους σε άτομα με εξασθενημένη ανοσολογική λειτουργία ή σοβαρή υποκείμενη ασθένεια θα πρέπει να περιορίζεται σε επίπεδο στελέχους και σε ενδείξεις μελετών σε ανθρώπους με αποδεδειγμένη αποτελεσματικότητα (WGO, 2017).

Πολυάριθμες επιστημονικές μελέτες έχουν αποδείξει την επίδραση των λακτοβακίλλων στη διατήρηση και την αποκατάσταση της υγείας του ξενιστή (WGO, 2017). Η άσκηση των προβιοτικών τους οφελών εξαρτάται από τη βέλτιστη προσαρμογή τους στο εντερικό περιβάλλον του ξενιστή η οποία θα εξασφαλίσει την επιβίωση και τον αποικισμό τους. Τα βακτήρια αυτά διαθέτουν συγκεκριμένες στρατηγικές επιβίωσης απέναντι στις ανεπιθύμητες περιβαλλοντικές πιέσεις του ανθρώπινου γαστρεντερικού σωλήνα, όπως είναι τα οξέα, η χολή, η οξειδωση και η όσμωση. Για το λόγο αυτό συντονίζουν τη γονιδιακή τους έκφραση με στόχο να αλλάξουν διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως την κυτταρική διαίρεση, τη σύνθεση της μεμβράνης και το μεταβολισμό του DNA. Δεδομένου ότι κωδικοποιούν γονίδια που

εμπλέκονται στην αποδόμηση πολυσακχαριτών, τα στελέχη του γένους *Lactobacillus* προσαρμόζονται κατάλληλα στα διαμερίσματα του γαστρεντερικού σωλήνα, που περιέχει αφθονία μη εύπεπτων υδατανθράκων. Χάρη στις ανωτέρω προσαρμοστικές τους λειτουργίες, οι λακτοβακίλλοι μπορούν να καλλιεργηθούν σε συγκεκριμένα θρεπτικά περιβάλλοντα και να μελετηθούν εκτενώς στο εργαστήριο (Zhang, Lv, Pan, & Zhang, 2018).

Η ικανότητα των στελεχών *Lactobacillus* για προσκόλληση στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα, είναι ένας ακόμη σημαντικός προβιοτικός παράγοντας που τα χαρακτηρίζει (Reid, 2016). Η συγκόλληση στις βλεννογονικές επιφάνειες του εντέρου δημιουργεί ένα βιοφίλμ που συμβάλλει στην ενίσχυση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού (Khare & Gaur, 2020), μέσω επιδράσεων που περιλαμβάνουν τη διαμόρφωση του κυτταροσκελετού, την επαγωγή παραγωγής βλέννας και την πρόληψη της απόπτωσης επιθηλιακών κυττάρων. Η προσκόλληση στον εντερικό βλεννογόνο επάγει ακόμη την αντιμικροβιακή προστασία των λακτοβακίλλων λόγω του ανταγωνισμού τους στις θέσεις προσκόλλησης και τα θρεπτικά συστατικά του αυλού με παθογόνα μικρόβια. Τέλος, η σύνθεση αντιμικροβιακών μεταβολιτών, όπως γαλακτικό οξύ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, βακτηριοσίνες και φαινυλακτικό οξύ, ασκεί άμεσες αντιπαθογόνες δράσεις. Συγκεκριμένα, η παραγωγή του γαλακτικού οξέος προκαλεί μείωση του pH του εντερικού περιβάλλοντος αναστέλλοντας την ανάπτυξη μολυσματικών βακτηρίων (Zhang, Lv, Pan, & Zhang, 2018). Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες των λακτοβακίλλων, όπως μελετήθηκαν για το στελέχος *L. plantarum*, είναι ενδιαφέρουσες και στον τομέα της ασφάλειας των τροφίμων (Seddik, Bendali, Gancel, Fliss, Spano, & Drider, 2017).

Η αλληλεπίδραση των λακτοβακίλλων με τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα συμβάλλει στη διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Οι λακτοβακίλλοι, εκτός από τα εντερικά κύτταρα, φαίνεται να αλληλεπιδρούν και με ένα σύνολο εντερικών ανοσολογικών κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων και των ρυθμιστικών T κυττάρων (Tregs), τα οποία διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη διατήρηση της ανοσοποιητικής ομοιόστασης σε πολλές ασθένειες (Reid, 2016). Τα στελέχη *Lactobacillus acidophilus* (Azad, Sarker, Li, & Yin, 2018) και *Lactobacillus salivarius* LS01 (Reid, 2016) έχουν συσχετιστεί με την ενεργοποίηση της ανοσοαπόκρισης μέσω της αλληλεπίδρασής τους με τα κύτταρα Tregs. Αντιοξειδωτικές ιδιότητες *in vitro* σάρωσης ελεύθερων ριζών και υπεροξειδίου του υδρογόνου έχουν

εντοπιστεί στα βακτήρια *Lactobacillus casei* και *Lactobacillus acidophilus* (Jain, Yadav, & Sinha, 2009).

Τα στελέχη του γένους *Lactobacillus* μπορούν επίσης να ασκήσουν ευεργετική επίδραση στην ανάπτυξη του ξενιστή, βελτιώνοντας το σωματικό του βάρος. Σε πρόσφατη μελέτη, το στελέχος *L. gasseri* SBT2055 αποδείχτηκε αποτελεσματικό κατά της παχυσαρκίας μέσω της πρόληψης της αύξησης του σωματικού βάρους και της συσσώρευση λίπους σε παχύσαρκους ενήλικες (Crovesy, Ostrowski, Ferreira, Rosado, & Soares-Mota, 2017). Επίσης, σε μία μελέτη των Nakamura et al. με 197 εθελοντές με παχυσακία 1<sup>ου</sup> βαθμού, η χορήγηση του *Lactobacillus amylovorus* CP1563 σημείωσε στατιστικά σημαντικές διαφορές στο ποσοστό σωματικού λίπους, στο πλήρες σωματικό και σπλαχνικό λίπος, τα τριγλυκερίδια, την ολική και την LDL χοληστερόλη, τη διαστολική αρτηριακή πίεση και στα επίπεδα της γλυκόζης και της ινσουλίνης υπέρ της ομάδας δοκιμής του στελέχους (Nakamura, et al., 2016). Η ευεργετική επίδραση φαίνεται να είναι μεγαλύτερη όταν η χορήγηση του στελέχους γίνεται μέσω γάλακτος ή γιαουρτιού παρά με τη μορφή κάψουλας (Sun & Buys, 2015). Τέλος, μελέτες έχουν υποδείξει ότι πολλά στελέχη βελτιώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα μακρο- και μικρο-θρεπτικών συστατικών όπως βιταμινών απαραίτητων για τον ξενιστή (Zhang, Lv, Pan, & Zhang, 2018).

#### **2.4.2. ΣΤΕΛΕΧΗ *LACTOBACILLUS* ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ ΑΣΘΕΝΕΙΩΝ**

Πολλά προβιοτικά στελέχη λακτοβακίλλων έχουν μελετηθεί ως προς την αποτελεσματική τους χρήση στη θεραπεία και πρόληψη ασθενειών. Σε μία μελέτη που αφορούσε τους πιθανούς μηχανισμούς πρόληψης της αλλεργίας, οι ερευνητές επέλεξαν ένα μείγμα τριών στελεχών *Lactobacillus* (*L. rhamnosus* LOCK0900, *L. rhamnosus* LOCK0908 και *L. casei* LOCK0919) για να τα εξετάσουν ως προς τις ανοσορρυθμιστικές τους ιδιότητες σε ένα μοντέλο ποντικών. Τα ευρήματα κατέδειξαν πιθανή αποτελεσματικότητα της χρήσης των συγκεκριμένων στελεχών στην πρόληψη της αυξημένης διαπερατότητας του εντέρου και της έναρξης της αλλεργίας (Kozakova, et al., 2016). Με την ανακούφιση των συμπτωμάτων αλλεργίας έχει συσχετιστεί και το στέλεχος *L. acidophilus* (Ouwehand, Nermes, Collado, Rautonen, Salminen, & Isolauri, 2009). Επιπλέον, το στέλεχος *L. helveticus* NS8, βρέθηκε προστατευτικό κατά των ασθενειών που σχετίζονται με τη φλεγμονή, ενώ ενθαρρυντικά είναι και τα ευρήματα πρόσφατων μελετών

σχετικά με την πιθανή χρήση των λακτοβακίλλων στη θεραπεία στοματικών ασθενειών (Zhang, Lv, Pan, & Zhang, 2018).

Το 2017 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Γαστρεντερολογίας (WGO, 2017) υπέδειξε τα στελέχη *Lactobacillus* που έχουν βρεθεί αποτελεσματικά στη θεραπεία και την πρόληψη γαστρεντερικών παθήσεων. Τρία στελέχη του γένους *Lactobacillus* (*L. acidophilus* CL1285, *L. casei* Lbc80r και *L. rhamnosus* CLR2) φάνηκε να έχουν ισχυρή προληπτική δράση με τη διάρροια που σχετίζεται με τα αντιβιοτικά (AAD). Ακόμη, ισχυρές ενδείξεις συνέδεσαν τη θεραπεία της λοίμωξης από το *Helicobacter pylori* με τη χρήση δύο προβιοτικών, του *S. boulardii* I-745 και του μείγματος *L. helveticus* R52 με *L. rhamnosus* R11, καθώς αντιστάθμιζαν πολλά από τα ανεπιθύμητα συμπτώματα. Επιπλέον, η πρόληψη μετεγχειρητικών επιπλοκών συσχετίστηκε με ένα συνβιοτικό που περιείχε τα στελέχη *Pediococcus pentosaceus* 5-33: 3, *Leuconostoc mesenteroides* 77: 1, *L. paracasei ssp. paracasei* F19 και *L. plantarum* 2362 (WGO, 2017). Τέλος, μια σειρά ελεγχόμενων μελετών σε άτομα που καταλάωναν γιαούρτι με ζωντανές βακτηριακές καλλιέργειες επιβεβαίωσαν την επίδραση των στελεχών *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* στη βελτίωση του μεταβολισμού της λακτόζης και επομένως στη μείωση των συμπτωμάτων που σχετίζονται με αυτήν (WGO, 2017; Zhang, Lv, Pan, & Zhang, 2018).

Αρκετά στελέχη λακτοβακίλλων έχουν διερευνηθεί και ως προς την ικανότητα μείωσης των επιπέδων χοληστερόλης στο πλάσμα του ξενιστή. Το *Lactobacillus acidophilus* είναι ίσως από τα πιο καλά μελετημένα προβιοτικά είδη και έχει συσχετιστεί με πολλά οφέλη για την υγεία, συμπεριλαμβανομένης της μείωσης της ολικής και της LDL χοληστερόλης στον ορό (Cho & Kim, 2015). Οι Wu et al. συγκεντρώνοντας το 2017 τα ευρήματα των σημαντικότερων *in vitro* και *in vivo* δοκιμών που εξέταζαν την επίδραση στελεχών *Lactobacillus* στο λιπιδαιμικό προφίλ, υποστήριξαν πως οι λακτοβάκιλλοι, εκτός από την ολική και την LDL χοληστερόλη, μπορούν να επιδράσουν και στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων και της HDL χοληστερόλης, με μηχανισμούς που παραμένουν ακόμη ασαφείς (Wu, Zhang, Ren, & Ruan, 2017). Ομοίως, σε μία μελέτη η χορήγηση των στελεχών *Lb. plantarum* B23, *Lb. acidophilus* LA15 και *Lb. kefir* D17 σε μοντέλα ποντικών οδήγησε σε σαφή μείωση των τριγλυκεριδίων και των επιπέδων ολικής και LDL χοληστερόλης στον ορό, ενώ σε άλλη μελέτη, η χορήγηση ενός σκευάσματος που περιείχε *Lb.*

*plantarum* CECT 7527, *Lb. plantarum* CECT 7528, και *Lb. plantarum* CECT 7529 μείωσε τη χοληστερόλη του ορού σε 60 υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς (Seddik, Bendali, Gancel, Fliss, Spano, & Drider, 2017). Σε επίπεδο τροφίμων, η επίδραση της κατανάλωση προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση από στελέχη λακτοβακίλλων, όπως γάλα, γιαούρτι και τυρί, στο λιπιδαιμικό πορφύλλ παραμένει διφορούμενη (Taylor & Williams, 1998; Lye, Rusul, & Liong, 2010).

### **3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ**

#### **3.1. ΥΠΕΡΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΕΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ**

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν καταδείξει ότι υψηλές τιμές χοληστερόλης στον ορό του αίματος, και κυρίως της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), αποτελούν τον κυριότερο παράγοντα κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων (CVD) οι οποίες καταγράφουν τα υψηλότερα ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως (Michael, Moss, Calvente, Garaïona, Plummer, & Ramji, 2016; Wu, Zhang, Ren, & Ruan, 2017). Η οξείδωση της LDL χοληστερόλης στα αιμοφόρα αγγεία οδηγεί στο σχηματισμό αθηρωματικών πλάκων οι οποίες αποτελούν την κυριότερη αιτία πρόκλησης καρδιακής προσβολής. Σύμφωνα με επιδημιολογικά δεδομένα, ο κίνδυνος καρδιακής προσβολής σε άτομα με υπερχοληστερολαιμία είναι τρεις φορές υψηλότερος σε σύγκριση με εκείνους που εμφανίζουν φυσιολογικό λιπιδαιμικό προφίλλ στο αίμα (Karr, 2017). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) έχει προβλέψει ότι μέχρι το 2030 οι καρδιαγγειακές παθήσεις θα παραμείνουν η κύρια αιτία θανάτου επηρεάζοντας σχεδόν 23 εκατομμύρια ανθρώπους σε ολόκληρο τον κόσμο (Οοί & Liong, 2010). Μάλιστα, κλινικές μελέτες αναφέρουν ότι για κάθε αύξηση της τάξης του 1 mmol στα επίπεδα της χοληστερόλης στον ορό του αίματος, ο κίνδυνος εμφάνισης στεφανιαίας νόσου αυξάνεται κατά 35%, ενώ, μια μικρή μείωση της χοληστερόλης στον ορό κατά 1% μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και εμφράγματος κατά 2-3% (Bosch, Fuentes, Audivert, Bonachera, Peiró, & Cuñé, 2014).

Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν δύο κύριες πηγές χοληστερόλης (i) η χοληστερόλη που βιοσυντίθεται εσωτερικά από το συκώτι (ενδογενής χοληστερόλη) και (ii) η χοληστερόλη που προσλαμβάνεται μέσω της διατροφής, κυρίως από τρόφιμα που περιέχουν ζωικά λίπη

(Howles, 2016). Το διαιτητικό λίπος, με την επίδραση της χολής, μετατρέπεται σε μικκύλια και στη συνέχεια απορροφάται από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα ως μονογλυκερίδια, λιπαρά οξέα και χοληστερόλη. Τα τελευταία εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και με τη μορφή λιποπρωτεϊνών μεταφέρονται σε όλους τους ιστούς του σώματος (Ma, Zhang, Lu, Zhang, Pang, & Lv, 2019; Khare & Gaur, 2020). Σύμφωνα με τον ΠΟΥ, δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, αλάτι και απλά σάκχαρα και ταυτόχρονα χαμηλή σε σύνθετους υδατάνθρακες, φρούτα και λαχανικά, οδηγεί σε αυξημένο κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων (Ooi & Liong, 2010). Οι αλλαγές στον τρόπο ζωής και τη διατροφή σε ανθρώπους με υπερχοληστερολαιμία κρίνονται επιτακτικές. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή εμφανίζει χαμηλή συμμόρφωση από τους ασθενείς και σε επίπεδο θεραπείας μπορεί να επιτύχει μόνο μια μέτρια βελτίωση (Wu, Zhang, Ren, & Ruan, 2017; Michael, Moss, Calvente, Garaiova, Plummer, & Ramji, 2016).

Φάρμακα, όπως οι στατίνες, παρ'ότι μειώνουν αποτελεσματικά τη de novo σύνθεση της χοληστερόλης (Michael, Moss, Calvente, Garaiova, Plummer, & Ramji, 2016), εμφανίζουν παρενέργειες σε αρκετούς ασθενείς. Παράλληλα, η φαρμακευτική θεραπεία των καρδιαγγειακών νοσημάτων αποτελεί μια διαδικασία υψηλού κόστους για τον ασθενή καθώς λαμβάνεται σχεδόν για όλη του τη ζωή (Miremadi, Ayyash, Sherkat, & Stojanovska, 2014). Τα ανωτέρω σε συνδυασμό με την αποτυχία επίτευξης των λιπιδαιμικών στόχων στην πλειονότητα των ασθενών (Tomago-Duchesneau, Jones, Shah, Jain, Saha, & Prakash, 2014), έχουν στρέψει το ενδιαφέρον των ερευνητών στην αναζήτηση εναλλακτικών επιλογών θεραπείας, όπως αυτή των συμπληρωμάτων διατροφής (Bendali, Kerdouche, Hamma-Faradji, & Drider, 2017).

Τα τελευταία χρόνια, όλο και περισσότερες μελέτες ερευνούν την αποτελεσματικότητα των βιοδραστικών συστατικών των λειτουργικών τροφίμων στην προάσπιση της υγείας και την πρόληψη ασθενειών. Τα θετικά ευρήματα συνιστούν τα λειτουργικά τρόφιμα ως μια πιθανή ευνοϊκή διατροφική προσέγγιση για τη μείωση της ολικής χοληστερόλη στον ορό, ειδικά για τους ασθενείς στους οποίους η φαρμακευτική θεραπεία κρίνεται ακατάλληλη λόγω αυξημένου κόστους, ασφάλειας ή προσωπικής προτίμησης (Bosch, Fuentes, Audivert, Bonachera, Peiró, & Cuñé, 2014). Μάλιστα αναφορές δείχνουν ότι τα λειτουργικά τρόφιμα που

περιέχουν προβιοτικά στελέχη θα μπορούσαν να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου μέσω προβιοτικών μηχανισμών που εξετάζονται έως σήμερα. Συνεπώς, ο χαρακτηρισμός των βιοδραστικών συστατικών, του τύπου και του αριθμού των προβιοτικών στελεχών που περιέχονται στα λειτουργικά τρόφιμα κρίνεται αναγκαίος (Miremadi, Ayyash, Sherkat, & Stojanovska, 2014).

### 3.2. ΑΝΤΙΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΑΙΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΩΝ

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που εισέρχονται στην γαστρεντερική οδό εξουδετερώνονται από τις όξινες συνθήκες του στομάχου και αργότερα από τις εντερικές εκκρίσεις του παγκρέατος και της χολής. Η χολή αποτελείται από χοληστερόλη, φωσφολιπίδια, χρωστικές ουσίες, ηλεκτρολύτες και συζευγμένα με αμινοξέα (γλυκίνη ή ταυρίνη) χολικά οξέα (Khare & Gaur, 2020). Σε φυσιολογικό pH τα συζευγμένα χολικά οξέα είναι πλήρως ιονισμένα και ονομάζονται χολικά άλατα. Τα συζευγμένα χολικά άλατα διαλυτοποιούν το διαιτητικό λίπος συμβάλλοντας στην αποτελεσματική απορρόφησή του από τα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Η εντερική επαναπορρόφηση των χολικών οξέων είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της εντεροηπατικής τους κυκλοφορίας (Ticho, Malhotra, Dudeja, Gill, & Alrefai, 2019).

Ορισμένα προβιοτικά στελέχη είναι σε θέση να υδρολύουν ενζυμικά τη σύζευξη γλυκίνης ή ταυρίνης στα χολικά άλατα παράγοντας υπολείμματα αμινοξέων και ελεύθερα χολικά άλατα. Τα αποσυζευγμένα χολικά άλατα παρουσιάζουν μειωμένη διαλυτότητα και επαναπορροφώνται με μικρότερη αποτελεσματικότητα από το λεπτό έντερο, σε σύγκριση με τα συζευγμένα, οδηγώντας σε αυξημένη αποβολή τους στα κόπρανα. Για την αποκατάσταση της ομοιόστασης, ο οργανισμός αντικαθιστά τα απεκκρινόμενα χολικά άλατα με νέα χρησιμοποιώντας τη χοληστερόλη που κυκλοφορεί στο αίμα (Miremadi, Ayyash, Sherkat, & Stojanovska, 2014). Έτσι, η χοληστερόλη του πλάσματος μειώνεται καθώς:

- i) υπάρχει αυξημένη απαίτηση για χοληστερόλη με σκοπό τη *de novo* σύνθεση νέων χολικών αλάτων (Yamasaki, et al., 2020),
- ii) η διαιτητική χοληστερόλη που δεν απορροφάται λόγω έλλειψης χολικών αλάτων απεκκρίνεται στα κόπρανα (Wang, Huang, Xia, Xiong, & Ai, 2019),
- iii) τα αποσυζευγμένα χολικά άλατα συνκαταβυθίζονται με χοληστερόλη στον εντερικό αυλό υπό τις όξινες συνθήκες ( $\text{pH} \leq 5.5$ ) που δημιουργούν τα στελέχη *Lactobacillus*, αυξάνοντας την απέκκρισή της στα κόπρανα (Begley, Hill, & Gahan, 2006).

Η αποσύζευξη των χολικών αλάτων καταλύεται από ένα ένζυμο που διαθέτουν ορισμένα προβιοτικά στελέχη, την υδρολάση χολικών αλάτων (BSH) (Shokryazdan, Jahromi, Liang, & Ho, 2017). Η παρουσία των γονιδίων που κωδικοποιούν την BSH έχουν εντοπιστεί σε αρκετά στελέχη *Lactobacillus* όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Μελέτες έχουν συνδέσει στελέχη λακτοβακίλλων ενεργά στη BSH, με την απομάκρυνση της χοληστερόλης *in vitro* (Tanaka, Doesburg, Iwasaki, & Mierau, 1999; Corzo & Gilliland, 1999; Grill, Cayuela, Antoine, & Schneider, 2000). Μάλιστα, τα στελέχη *Lactobacillus plantarum* εμφανίζονται ως τα περισσότερο υποσχόμενα BSH-ενεργά στελέχη για την απομάκρυνση της χοληστερόλης *in vitro* (Jones, Chen, Ouyang, Metz, & Prakash, 2004). Ορισμένες μελέτες αναφέρουν ότι τα χαμηλά επίπεδα του εντερικού pH που δημιουργούνται μέσω της παραγωγής γαλακτικού οξέος από στελέχη λακτοβακίλλων, ευνοούν την έκκριση της BSH (Miremadi, Ayyash, Sherkat, & Stojanovska, 2014) και ταυτόχρονα δημιουργούν συνθήκες συν-καταβύθισης χολικών αλάτων με χοληστερόλη (Begley, Hill, & Gahan, 2006). Παράλληλα, *in vivo* μελέτες που εντόπισαν αυξημένη απέκκριση χολικών αλάτων στα κόπρανα ποντικών και ταυτόχρονη μείωση της χοληστερόλης του ορού, μετά από λήψη στελεχών *Lactobacillus* με δραστηριότητα BSH, υπέδειξαν την πιθανή αντιχοληστερολαιμική επίδραση των ενεργών ως προς την BSH στελεχών (Yamasaki, et al., 2020; Lim, Loke, Ho, & Tan, 2020; Wang, Huang, Xia, Xiong, & Ai, 2019; Guo C.-F., Zhang, Yuan, Li, & Yue, 2018).

Πίνακας 2: Στελέχη *Lactobacillus* θετικά ως προς την υδρολάση χολικών αλάτων (BSH)

Στέλεχος	Βιβλιογραφική αναφορά
<i>L. acidophilus</i>	(Corzo & Gilliland, 1999; McAuliffe, Cano, & Klaenhammer, 2005)
<i>L. casei</i>	(Guo C.-F., Zhang, Yuan, Li, & Yue, 2018)
<i>L. fermentum</i>	(Kumar, et al., 2013)
<i>L. gasseri</i>	(Rani, Anandharaj, & Ravindran, 2017)
<i>L. helveticus</i>	(Tanaka, Doesburg, Iwasaki, & Mierau, 1999)
<i>L. paracasei subsp. paracasei</i>	(Moser & Savage, 2001)
<i>L. rhamnosus</i>	(Moser & Savage, 2001)

<b><i>L. plantarum</i></b>	(Su, et al., 2020; Ren, Sun, Wu, Yao, & Guo, 2011)
<b><i>L. fermentum</i></b>	(Kumar, et al., 2013)

Ωστόσο, έχουν δημοσιευθεί μελέτες που δεν επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση μεταξύ της δραστηριότητας BSH και της ανοχής στη χολή (Ahn, Kim, Lim, Baek, & Kim, 2003; Moser & Savage, 2001), ενώ είναι γνωστό πως υπάρχουν μικροοργανισμοί που επιβιώνουν στον εντερικό αυλό και δεν εμφανίζουν δραστηριότητα BSH (Vinderola & Reinheimer, 2003). Μάλιστα, σε μία μελέτη βρέθηκε πως μόνο το 12,8% των στελεχών *Lactobacillus* που απομονώθηκαν από κόπρανα υγιών ανθρώπων ήταν θετικά στη BSH (Bosch, Fuentes, Audivert, Bonachera, Peiró, & Cuñé, 2014). Επιπλέον, σε μία μελέτη των Culprepper et al. (Culprepper, et al., 2019), προβιοτικά στελέχη με δραστηριότητα υδρολάσης BSH απέτυχαν να μειώσουν τα επίπεδα χοληστερόλης *in vivo* (Culprepper, et al., 2019), ενώ υπάρχουν και *in vitro* μελέτες που απέτυχαν να βρουν συσχέτιση μεταξύ των θετικών ως προς την BSH στελεχών και της απομάκρυνσης της χοληστερόλης από το μέσο καλλιέργειας (Ramasamy, Abdullah, Wong, Karuthan, & Ho, 2010).

Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν πως η ικανότητα απομάκρυνσης χοληστερόλης δε συνδέεται πάντοτε με το βαθμό αποσύζευξης των χολικών αλάτων. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην ανάγκη διερεύνησης άλλων πιθανών μηχανισμών με τους οποίους τα προβιοτικά στελέχη μπορούν να επιδράσουν στα επίπεδα της χοληστερόλης του πλάσματος του ξενιστή (Horáčková, Plocková, & Demnerová, 2018). Αυτοί περιλαμβάνουν:

- i) τη μείωση της απορρόφησης της χοληστερόλης μέσω αφομοίωσης ή σύνδεσής της στα κύτταρα των προβιοτικών στελεχών που κατοικούν στον εντερικό αυλό (Miremadi, Ayyash, Sherkat, & Stojanovska, 2014),
- ii) την εντερική μετατροπή της χοληστερόλης σε κοπροστανόλη και την απέκκρισή της στα κόπρανα (Lye, Rusul, & Liong, 2010),
- iii) την αναστολή της έκφρασης του μεταφορέα εντερικής χοληστερόλης NPC1L1 στα εντεροκύτταρα από βακτήρια και επακόλουθη αναστολή της απορρόφησης χοληστερόλης (Huang & Zheng, The probiotic *Lactobacillus acidophilus* reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells, 2010),

ν) τη δράση των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου SCFA (κυρίως του προπιονικού οξέος) που παράγονται από τη ζύμωση άπεπτων πολυσακχαριτών από προβιοτικά στελέχη και μπορούν να εμποδίσουν τη σύνθεση της ηπατικής χοληστερόλης ή / και να ανακατευθύνουν τη χοληστερόλη του πλάσματος προς το ήπαρ (Preter, Coopmans, Rutgeerts, & Verbeke, 2006),  
vi) τη δέσμευση χολικών αλάτων από ορισμένα στελέχη λακτοβακίλλων (Fukushima & Nakano, 1996).

Η μετατροπή της χοληστερόλης σε κοπροστανόλη αποτελεί έναν εύλογο μηχανισμό απομάκρυνσής της από τον εντερικό αυλό. Η μετατροπή καταλύεται από το ένζυμο αναγωγάση χοληστερόλης που διαθέτουν ορισμένα βακτήρια. Η κοπροστανόλη απορροφάται λιγότερο αποτελεσματικά από τα ανθρώπινα εντερικά κύτταρα σε σύγκριση με το μόριο της χοληστερόλης, οδηγώντας σε μειωμένα επίπεδα χοληστερόλης στον ορό του αίματος. Η μετατροπή της χοληστερόλης σε κοπροστανόλη από βακτήρια έχει μελετηθεί από τους Chiang et al. (Chiang, Ismail, Heintz, Schaeffer, Dorsselaer, & Fuchs, 2008), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η αναγωγάση χοληστερόλης καταλύει το μετασχηματισμό της χοληστερόλης σε χοληστερόλη-4-εν-3-όνη, ένα ενδιάμεσο μόριο στη μετατροπή της χοληστερόλης σε κοπροστανόλη (Chiang, Ismail, Heintz, Schaeffer, Dorsselaer, & Fuchs, 2008). Σε μια *in vitro* μελέτη, οι Lye et al. (Lye, Rusul, & Liong, 2010) εντόπισαν ενδοκυτταρική και εξωκυτταρική αναγωγάση χοληστερόλης στα στελέχη *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* και *L. casei* ATCC 393, που καλλιεργήθηκαν παρουσία χοληστερόλης. Οι αυξημένες συγκεντρώσεις κοπροστανόλης στο μέσο καλλιέργειας συνοδεύτηκαν και από μείωση της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο μέσο (Lye, Rusul, & Liong, 2010). Το 2014 οι Antharam et al. μέτρησαν τα επίπεδα χοληστερόλης και κοπροστανόλης σε δείγματα κοπράνων εθελοντών και ταυτοποίησαν 63 εντερικά μικρόβια που σχετίζονται με τα υψηλά επίπεδα κοπροστανόλης στα κόπρανα και με δραστηριότητες μείωσης της χοληστερόλης στον ορό (Antharam, et al., 2016).

Ένας ακόμη μηχανισμός που έχει προταθεί για την αναστολή απορρόφησης της χοληστερόλης από το λεπτό έντερο αφορά τη ρύθμιση των επιπέδων της εντερικής πρωτεΐνης NPC1L1 από βακτήρια. Η πρωτεΐνη NPC1L1 εκφράζεται από τα εντεροκύτταρα στο δωδεκαδάκτυλο και την νήστιδα και διαδραματίζει βασικό ρόλο στην απορρόφηση της εντερικής χοληστερόλης και συγκεκριμένα στην ενδοκυττάρωσή της στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου (Wang, Chu, Ge, Li, Yan, & Song, 2009). Θεωρητικά, η μειωμένη έκφραση της NPC1L1 στο λεπτό έντερο θα

μπορούσε να μειώσει την ποσότητα χοληστερόλης που απορροφάται επηρεάζοντας έτσι και τα επίπεδα της χοληστερόλης στον ορό (Wang, Chu, Ge, Li, Yan, & Song, 2009). Οι Hang et al. εντόπισαν ότι η καθημερινή χορήγηση του στελέχους *L. acidophilus* ATCC 4356 σε αρουραίους οδήγησε σε σημαντική μείωση της LDL και της συνολικής χοληστερόλης στον ορό μέσω ρύθμισης της πρωτεΐνης NPC1L1 από το προβιοτικό στέλεχος (Huang, Wang, Cheng, & Zheng, 2010). Στο εργαστήριο, η μειωμένη έκφραση της πρωτεΐνης NPC1L1 από κύτταρα Caco-2 συσχετίστηκε με εξωκυτταρικούς μεταβολίτες που εκκρίνονται από το στέλεχος *L. fermentum* CAAS 18078 κατά τη διάρκεια της επώασης (Huang & Zheng, The probiotic *Lactobacillus acidophilus* reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells, 2010).

Το 2014 οι Bosch et al. μελέτησαν τις αντιχοληστερολαιμικές ιδιότητες τριών στελεχών του *Lb. plantarum* (CECT 7527, 7528 και 7529) που απομόνωσαν από τα περιττώματα υγιών παιδιών (Bosch, Fuentes, Audivert, Bonachera, Peiró, & Cuñé, 2014). Και στα τρία στελέχη, αλλά ειδικά στο CECT 7529, εντοπίστηκε η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων προπιονικού οξέος. Το προπιονικό οξύ χρησιμοποιείται κυρίως ως γλυκονογόνο υπόστρωμα στο ήπαρ και μπορεί να προκαλέσει μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στο αίμα είτε αναστέλλοντας τη σύνθεση ηπατικής χοληστερόλης είτε αναδιανέμοντας τη χοληστερόλη από το πλάσμα στο ήπαρ. Επιπλέον, το προπιονικό οξύ έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, που μπορεί να συμβάλλουν στην αναστολή του πρώιμου σταδίου της αθηροσκλήρωσης. Τα *in vitro* αποτελέσματα της μελέτης επιβεβαιώθηκαν στη συνέχεια με μία ελεγχόμενη, τυχαιοποιημένη δοκιμή σε 60 εθελοντές που χωρίστηκαν σε δύο ομάδες, την ομάδα που λάμβανε καθημερινά για 12 εβδομάδες ένα μείγμα των τριών στελεχών *Lb. plantarum* και την ομάδα εικονικού φαρμάκου (placebo). Η σημαντική μείωση κατά 13,6% στα συνολικά επίπεδα χοληστερόλης στο πλάσμα των εθελοντών που έλαβαν το προβιοτικό, προτείνει τη χρήση του προβιοτικού στην αντιμετώπιση της υπερχοληστερολαιμίας (Bosch, Fuentes, Audivert, Bonachera, Peiró, & Cuñé, 2014).

### 3.2.1. ΑΦΟΜΟΙΩΣΗ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

#### 3.2.1.1. ΠΙΘΑΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Το 1985, οι Gilliland et al. μελέτησαν δύο στελέχη του *Lactobacillus acidophilus* ως προς την ικανότητά τους να αναστείλουν την αύξηση των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό χοίρων που τρέφονταν με υπερλιπιδαιμική δίαιτα. Από *in vitro* δοκιμές είχε προηγουμένως βρεθεί ότι τα δύο στελέχη ήταν ανθεκτικά στην παρουσία της χολής ωστόσο μόνο το ένα είχε την ικανότητα απομάκρυνσης της χοληστερόλης από το εργαστηριακό μέσο ανάπτυξης. Διαπιστώθηκε ότι μόνο το στέλεχος που είχε πετύχει *in vitro* απομάκρυνση χοληστερόλης μπόρεσε να πετύχει και αναστολή αύξησης της χοληστερόλης στον ορό. Το γεγονός αυτό οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι ορισμένα στελέχη του *L. acidophilus* δρουν απευθείας στο μόριο της χοληστερόλης στον εντερικό αυλό, μέσω αφομοίωσης ή δέσμευσης της χοληστερόλης στα βακτηριακά κύτταρα. Η παρουσία χολικών αλάτων στο μέσο ανάπτυξης φάνηκε να αποτελεί προϋπόθεση για την *in vitro* αφομοίωση της χοληστερόλης από το *L. acidophilus* (Gilliland, Nelson, & Maxwell, 1985)

Οι Klaver & Meer αργότερα ισχυρίστηκαν ότι η απομάκρυνση της χοληστερόλης σε *in vitro* δοκιμασίες οφείλεται αποκλειστικά σε συγκαταβύθιση της χοληστερόλης με αποσυζευγμένα χολικά άλατα σε τιμές pH χαμηλότερες του 5,5 και όχι σε αφομοίωσή της από βακτηριακά στελέχη (Klaver & Meer, 1993). Ωστόσο, το 1996, οι Tahri et al παρατήρησαν πως η απομάκρυνση της χοληστερόλης από το μέσο ανάπτυξης στελεχών του γένους *Bifidobacterium*, παρουσία χολικών αλάτων, προκλήθηκε τόσο από αφομοίωση της χοληστερόλης από ζωντανά, αναπτυσσόμενα κύτταρα όσο και από συν-καθίζηση της χοληστερόλης με χολικά άλατα υπό συνθήκες χαμηλού pH. Η αφομοιωμένη χοληστερόλη δεν είχε υποβαθμιστεί μεταβολικά (Tahri, Grill, & Schneider, 1996). Η αφομοίωση της χοληστερόλης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης βακτηριακών κυττάρων σε μέσο που περιείχε χοληστερόλη διαπιστώθηκε επίσης από τους Noh et. al. (Noh, Kim, & Gilliland, Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121, 1997). Μέρος της χοληστερόλης που αφομοιώθηκε από τα κύτταρα του *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 δεν αποικοδομήθηκε μεταβολικά αλλά ανακτήθηκε στα κλάσματα της μεμβράνης των κυττάρων (Noh, Kim, & Gilliland, Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121, 1997).

Το 1999, οι Usman & Hosono πρότειναν ότι η απομάκρυνση της χοληστερόλης από το μέσο καλλιέργειας οφειλόταν αποκλειστικά σε σύνδεσή της στις κυτταρικές επιφάνειες των βακτηρίων και όχι σε αφομοίωση. Μάλιστα, η ικανότητα σύνδεσης της χοληστερόλης στη βακτηριακή επιφάνεια μελετήθηκε για 28 διαφορετικά στελέχη του *Lactobacillus gasseri* και φάνηκε να είναι ειδική ως προς το στάδιο ανάπτυξης και το στέλεχος (Usman & Hosono, 1999).

Διαφορετική προσκόλληση χοληστερόλης ανάλογα με τη φάση ανάπτυξης διαπίστωσαν και οι Kimoto et al. (Kimoto, Ohmomo, & Okamoto, Cholesterol removal from media by lactococci, 2002). Μάλιστα, συγκρίνοντας την ποσότητα της χοληστερόλης που συνδέθηκε με ζωντανά κύτταρα του *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* N7 με αυτήν που συνδέθηκε με κύτταρα του ίδιου στελέχους που είχαν θανατωθεί με θερμότητα. Η απομάκρυνση της χοληστερόλης από το μέσο καλλιέργειας ήταν μεγαλύτερη για τα αναπτυσσόμενα κύτταρα ωστόσο μία μικρή μείωση σημειώθηκε και για τα νεκρά. Το εύρημα αυτό οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι μέρος της χοληστερόλης συνδέθηκε με κάποιον τρόπο στην επιφάνεια των νεκρών κυττάρων, αφού δεν ήταν δυνατό να αφομοιωθεί από αυτά. Ωστόσο, η μεγάλη διαφορά μεταξύ ζωντανών και νεκρών κυττάρων ως προς την αφαίρεση της χοληστερόλης από το καλλιεργητικό μέσο συνδέθηκε με την ικανότητα των αναπτυσσόμενων κυττάρων να αφομοιώνουν χοληστερόλη. Συνεπώς, προτάθηκε ότι τα αναπτυσσόμενα κύτταρα απομάκρυναν τη χοληστερόλη από το μέσο καλλιέργειας είτε μέσω σύνδεσης της χοληστερόλης στην κυτταρική τους μεμβράνη είτε μέσω αφομοίωσής της από αυτά. Παράλληλα, οι ερευνητές διαπίστωσαν μία διαφορά στην κατανομή των λιπαρών οξέων της μεμβράνης των κυττάρων που αναπτύχθηκαν παρουσία χοληστερόλης. Η αυξημένη συγκέντρωση των κορεσμένων και ακόρεστων λιπαρών οξέων στα κύτταρα αυτά οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η χοληστερόλη ενσωματώθηκε στην κυτταρική μεμβράνη και άλλαξε τη σύνθεση των λιπαρών οξέων (Kimoto, Ohmomo, & Okamoto, Cholesterol removal from media by lactococci, 2002).

Παρόμοια ευρήματα παρατηρήθηκαν και από άλλες μελέτες που ακολούθησαν. Τα περισσότερα υπό μελέτη στελέχη λακτοβακίλλων που αναπτύχθηκαν παρουσία χοληστερόλης,

μπορούσαν να απομακρύνουν μέρος αυτής από το καλλιεργητικό μέσο. Οι μηχανισμοί που προτάθηκαν ήταν η αφομοίωση και η σύνδεση της χοληστερόλης στην κυτταρική μεμβράνη των ζωντανών κυττάρων. Απομάκρυνση της χοληστερόλης από το μέσο παρατηρήθηκε και για τα νεκρά και υπό αναστολή με ρυθμιστικό διάλυμα κύτταρα, μέσω σύνδεσης στη μεμβράνη (Liong & Shah, Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains, 2005; Lye, Rahmat-Ali, & Liong, Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract, 2010).

Οι Lye et al. επίσης βρήκαν ότι η αφομοίωση της χοληστερόλης είναι μεγαλύτερη στα στελέχη που καλλιεργήθηκαν παρουσία αποσυζευγμένων χολικών αλάτων (Lye, Rahmat-Ali, & Liong, Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract, 2010). Τα τελευταία έχει βρεθεί ότι αυξάνουν τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης σε υδατοδιαλυτές ουσίες (Schröder, Rathner, Caspary, & Stein, 1996). Έτσι οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι τα χολικά άλατα αύξησαν τη διαπερατότητα της μεμβράνης των λακτοβακίλλων, οδηγώντας σε αυξημένη πρόσληψη χοληστερόλης και άρα υψηλότερη αφομοίωσή της από τα κύτταρα (Lye, Rahmat-Ali, & Liong, Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract, 2010).

Οι θέσεις ενσωμάτωσης της χοληστερόλης στην κυτταρική μεμβράνη μελετήθηκαν περαιτέρω από τους Lye et al. (Lye, Rusul, & Liong, 2010) με τη χρήση ανιχνευτών φθορισμού. Ο εμπλουτισμός της σημασμένης χοληστερόλης εντοπίστηκε κυρίως στις ουρές των φωσφολιπιδίων, στα ανώτερα φωσφολιπίδια και στις πολικές κεφαλές της φωσφολιπιδικής κυτταρικής διπλοστιβάδας. Επιπλέον, βρήκαν ότι τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε μέσα που περιείχαν χοληστερόλη ήταν πιο ανθεκτικά στους υπερήχους και την ενζυματική λύση σε σύγκριση με αυτά που αναπτύχθηκαν απουσία χοληστερόλης (Lye, Rusul, & Liong, 2010). Έτσι πρότειναν ότι η ενσωμάτωση της χοληστερόλης ενισχύει το περίβλημα των βακτηριακών κυττάρων και αυξάνει την αντίστασή τους σε περιβαλλοντικούς παράγοντες (Lye, Alias, Rusul, & Liong, 2012). Πράγματι, έχει βρεθεί ότι η χοληστερόλη αυξάνει την αντοχή της κυτταρικής μεμβράνης του μυκοπλάσματος που δε διαθέτει κυτταρικό τοίχωμα (Efrati, Rottem, & Razin,

1981). Συνεπώς, η ενσωμάτωση της χοληστερόλης στην κυτταρική μεμβράνη θα μπορούσε να ωφελήσει και την επιβίωση των λακτοβακίλλων στο γαστρεντερικό σωλήνα.

Στη μελέτη των Miremadi et al. το 2014 (Miremadi, Ayyash, Sherkat, & Stojanovska, 2014) αποδείχτηκε ότι όλα τα υπό μελέτη στελέχη λακτοβακίλλων που αναπτύχθηκαν παρουσία χοληστερόλης ήταν ικανά να απομακρύνουν τη χοληστερόλη από το μέσο καλλιέργειας. Η παρουσία της χοληστερόλης ενίσχυσε την ανάπτυξη των στελεχών και προκάλεσε αλλαγές στην κατανομή των λιπαρών οξέων στην κυτταρική μεμβράνη. Το γεγονός αυτό φανερώνει ότι η απομάκρυνση της χοληστερόλης από το μέσο πραγματοποιήθηκε μέσω προσρόφησης της στις κυτταρικές μεμβράνες. Ομοίως με τους Lye et al. το 2010, οι Miremadi et al. παρατήρησαν μία μικρή απομάκρυνση χοληστερόλης και στην περίπτωση των νεκρών και ανεσταλμένων βακτηριακών κυττάρων υπονοώντας πιθανή σύνδεση χοληστερόλης με αυτά. Η διακύμανση στην απομάκρυνση χοληστερόλης μεταξύ των στελεχών συσχετίστηκε με τις διαφορές στη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (παρουσία πεπτιδογλυκανών) και τη διαφορετική ανοχή στα χολικά άλατα, με τα στελέχη που εμφάνισαν μεγαλύτερη ανοχή να απομακρύνουν και περισσότερη χοληστερόλη (Miremadi, Ayyash, Sherkat, & Stojanovska, 2014).

Το 2017 η μελέτη των Lim et al. διερεύνησε την αποτελεσματική μείωση της χοληστερόλης από 12 στελέχη LAB που αναπτύχθηκαν παρουσία χοληστερόλης και απουσία χολικών αλάτων. Η αφομοίωση της χοληστερόλης φάνηκε να είναι ειδική για κάθε στέλεχος, με τα *P. acidilactici* LAB4 (98,7%) και *L. plantarum* LAB12 (98,3%) να αποδίδουν την μεγαλύτερη αφαίρεση χοληστερόλης στο μέσο ανάπτυξης μέσω αφομοίωσής της στα βακτηριακά κύτταρα. Το γεγονός ότι η χοληστερόλη δεν αποσπάστηκε μετά από πολλαπλές εκπλύσεις φανερώνει την ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ της αφομοιωμένης χοληστερόλης και του στελέχους. Τα τρέχοντα ευρήματα υπονοούν ότι η παρουσία χολικού άλατος δεν αποτελεί προϋπόθεση για άμεση μείωση της χοληστερόλης στα μέσα ανάπτυξης (Lim, Lim, & Ramasamy, 2017) παρά την επικρατούσα ιδέα ότι οι μικροοργανισμοί που δε μπορούν να αποσυζεύξουν χολικά άλατα δεν μπορούν και να απομακρύνουν χοληστερόλη από το μέσο καλλιέργειας (Anandharaj & Sivasankari, 2014).

Το 2019 οι Syakila et al. χρησιμοποίησαν τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης (HPTLC), μία νέα, πιο ευαίσθητη και αποδοτική εργαστηριακή μέθοδο, με σκοπό τον

ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από μέσα καλλιέργειας 12 διαφορετικών βακτηρίων του γαλακτικού οξέος, παρουσία και απουσία χολικών αλάτων. Όλα τα στελέχη LAB παρουσίασαν διαφορετικών βαθμών μείωση της χοληστερόλης στο μέσο τόσο παρουσία (14-69%) όσο και απουσία (19-59%) χολικών αλάτων υπογραμμίζοντας ότι η αφομοίωση της χοληστερόλης εξαρτάται από το στέλεχος και η παρουσία χολικών αλάτων δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αφαίρεση της χοληστερόλης από το μέσο ανάπτυξης. Παρ'όλα αυτά, η μειωμένη ικανότητα ορισμένων στελεχών να αφομοιώσουν χοληστερόλη παρουσία συζευγμένων χολικών αλάτων συνδέθηκε με την αντιμικροβιακή δράση των τελευταίων εναντίον των βακτηριακών κυττάρων, εμποδίζοντας την ανάπτυξή τους και πιθανώς την αφομοίωση της χοληστερόλης. Επιπλέον, με τη χρήση ανιχνευτών φθορισμού, η αφομοιωμένη χοληστερόλη εντοπίστηκε κυρίως στην εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων (Syakila, Lim, Agatonovic-Kustrin, Lim, & Ramasamy, 2019).

Ευρήματα μελετών υποδεικνύουν ότι η χοληστερόλη που αφομοιώνεται από τα βακτηριακά κύτταρα δεν αποικοδομείται, αλλά αποθηκεύεται στο κύτταρο με τη μορφή εγκλεισμάτων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αργότερα ως μεταβολικός πρόδρομος (Pereira & Gibson, 2002). Από την άλλη, η χοληστερόλη που προσκολλάται στην επιφάνεια του βακτηριακού κυττάρου, μπορεί να επηρεαστεί δομικά και χημικά από την παρουσία των πεπτιδογλυκανών του κυτταρικού τοιχώματος (Ooi & Liong, 2010).

Συνοψίζοντας τα ευρήματα των ανωτέρω *in vitro* μελετών:

- Η απομάκρυνση της χοληστερόλης από το μέσο καλλιέργειας οφείλεται τόσο στην άμεση αλληλεπίδρασή της με τα βακτηριακά κύτταρα όσο και στην συγκαταβύθιση χοληστερόλης με αποσυζευγμένα χολικά άλατα.
- Η αλληλεπίδραση της χοληστερόλης με τα βακτηριακά κύτταρα περιλαμβάνει τόσο σύνδεσή της με τις κυτταρικές μεμβράνες όσο και αφομοίωσή της από αυτά (Εικόνα 1).
- Η αφομοίωση επιτυγχάνεται στο στάδιο της ανάπτυξης ζωντανών βακτηριακών κυττάρων.
- Τα νεκρά και υπό αναστολή κύτταρα έχουν την ικανότητα σύνδεσης μιας μικρής ποσότητας χοληστερόλης στις κυτταρικές τους μεμβράνες.
- Η αφομοίωση της χοληστερόλης αλλάζει την κατανομή των λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης, υποδηλώνοντας την ενσωμάτωσή της σε αυτήν. Η ενσωμάτωση χοληστερόλης ευνοεί την επιβίωση του βακτηριακού στελέχους.

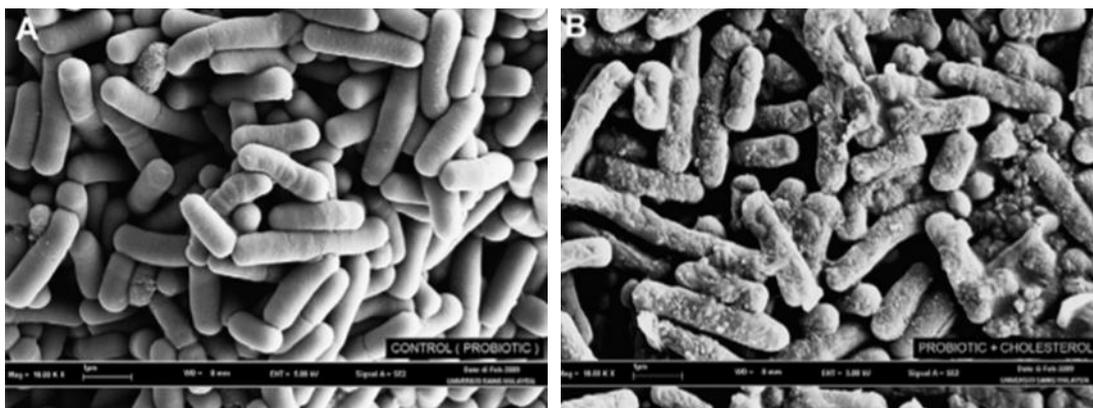
- Η αφομοιωμένη χοληστερόλη δεν υποβαθμίζεται μεταβολικά.
- Η αφομοίωση της χοληστερόλης φαίνεται να είναι ειδική για το κάθε στέλεχος καθώς εξαρτάται από την παρουσία πεπτιδογλυκανών στο κυτταρικό τοίχωμα (Usman & Hosono, 1999).
- Η παρουσία χολικών αλάτων φαίνεται να μην είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την απομάκρυνση της χοληστερόλης από τα βακτηριακά στελέχη. Ωστόσο:
  - Η αντιμικροβιακή δράση των συζευγμένων χολικών αλάτων στις καλλιέργειες στελεχών μη ανθεκτικών στη χολή φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξή τους και συνεπώς την αφομοίωση της χοληστερόλης (Syakila, Lim, Agatonovic-Kustrin, Lim, & Ramasamy, 2019)
  - Η παρουσία αποσυζευγμένων χολικών αλάτων στο μέσο καλλιέργειας πιθανώς αυξάνει τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης ευνοώντας την αφομοίωση της χοληστερόλης (Schröder, Rathner, Caspary, & Stein, 1996)

Στον Πίνακα 3 παρατίθενται στελέχη *Lactobacillus* με τη μεγαλύτερη ικανότητα *in vitro* αφομοίωσης της χοληστερόλης.

Πίνακας 3: Στελέχη του γένους *Lactobacillus* με τη μεγαλύτερη ικανότητα *in vitro* αφομοίωσης της χοληστερόλης

Πίνακας 3: Στελέχη του γένους <i>Lactobacillus</i> με τη μεγαλύτερη ικανότητα <i>in vitro</i> αφομοίωσης της χοληστερόλης	
Στέλεχος <i>Lactobacillus</i>	Βιβλιογραφική αναφορά
<b><i>L. acidophilus</i> ATCC 43121</b>	(Noh, Kim, & Gilliland, 1997)
<b><i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> N7</b>	(Kimoto, Ohmomo, & Okamoto, Cholesterol removal from media by lactococci, 2002)
<b><i>L. plantarum</i> LAB12</b>	(Lim, Lim, & Ramasamy, 2017)
<b><i>L. plantarum</i> LAB12</b>	(Syakila, Lim, Agatonovic-Kustrin, Lim, & Ramasamy, 2019)
<b><i>L. plantarum</i> (CECT 7527, 7528 και 7529)</b>	(Bosch, Fuentes, Audivert, Bonachera, Peiró, & Cuñé, 2014)
<b><i>L. reuteri</i> NCIMB 701089</b>	(Tomaro-Duchesneau, Jones, Shah, Jain, Saha, &

	Prakash, 2014)
<b><i>L. bulgaricus</i> FTCC 0411, <i>L. bulgaricus</i> FTDC 1311 και <i>L. casei</i> ATCC 393 (παρουσία oxgall)</b>	(Lye, Rahmat-Ali, & Liong, Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract, 2010)
<b><i>L. acidophilus</i> και <i>L. casei</i></b>	(Liong & Shah, Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains, 2005)

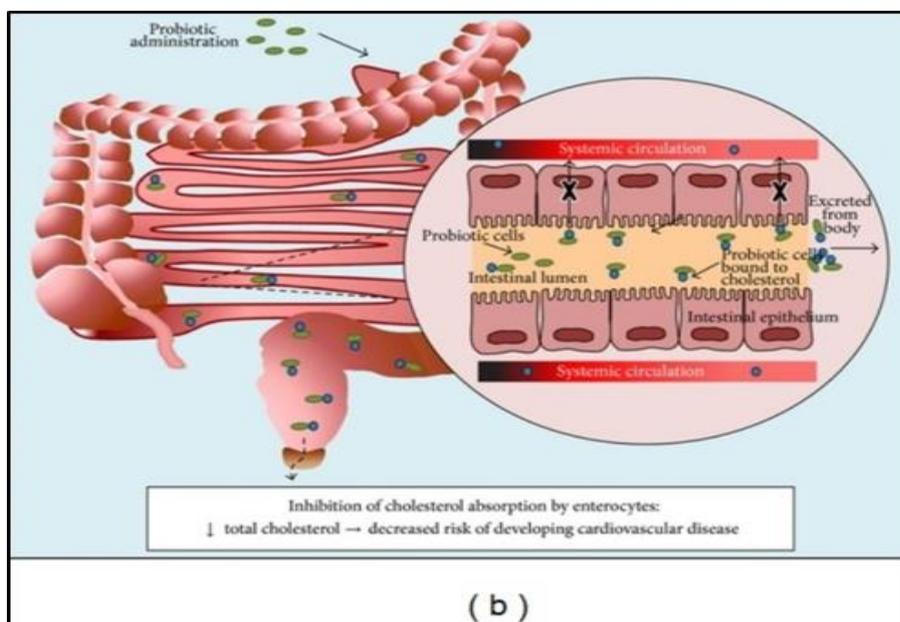
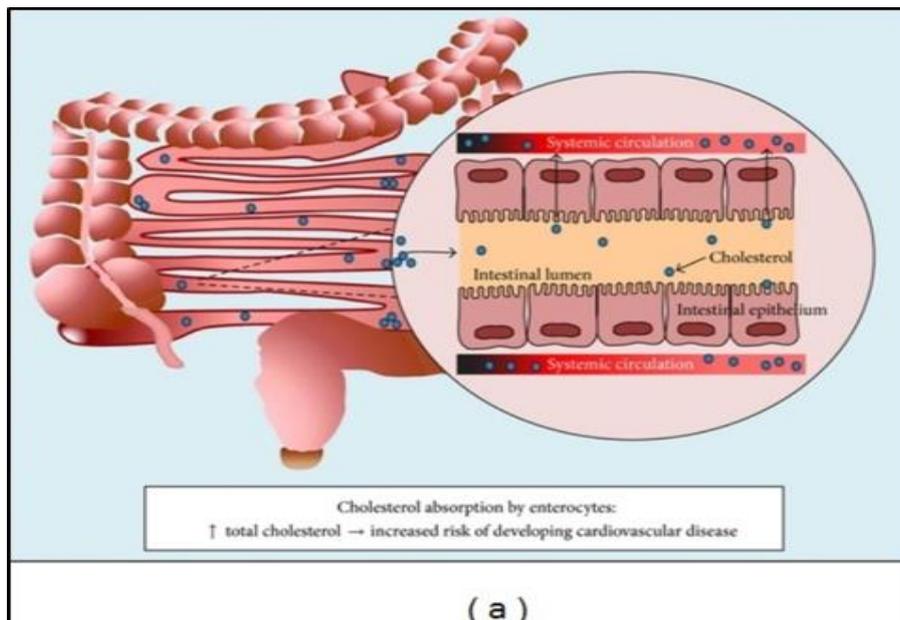


Εικόνα 1 (Lye, Rahmat-Ali, & Liong, Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract, 2010): (A) Κύτταρα του στελέχους *L. bulgaricus* FTDC που καλλιεργήθηκαν απουσία χοληστερόλης. (B) Κύτταρα του στελέχους *L. bulgaricus* FTDC που καλλιεργήθηκαν παρουσία χοληστερόλης. Η χοληστερόλη ενσωματώθηκε στην κυτταρική μεμβράνη (Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης).

### 3.2.1.2. *IN VIVO* ΔΟΚΙΜΕΣ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Η αφομοίωση της χοληστερόλης από τα βακτηριακά στελέχη του εντερικού αυλού θα μείωνε σημαντικά την απορρόφησή της από τα εντεροκύτταρα και θα οδηγούσε σε μείωση της χοληστερόλης στον ορό (Εικόνα 2). Η αποσαφήνιση των μηχανισμών με τους οποίους τα βακτήρια απομακρύνουν τη χοληστερόλη από το καλλιεργητικό μέσο θα αποτελούσε πρόδρομο για πολλές *in vivo* μελέτες με σκοπό τη μελλοντική χορήγηση αυτών των στελεχών στη θεραπεία και την πρόληψη της υπεροχοληστερολαιμίας. Οι περισσότερες *in vivo* μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι στιγμής, έχουν επικεντρωθεί κυρίως στην επαλήθευση των

αντιχοληστερολαιμικών επιδράσεων των προβιοτικών, παρά στην εξακρίβωση των εμπλεκόμενων μηχανισμών (Ooi & Liong, 2010).



Εικόνα 2 (Tomaro-Duchesneau, Jones, Shah, Jain, Saha, & Prakash, 2014): (a) Η απορρόφηση της χοληστερόλης από τα επιθηλιακά εντεροκύτταρα. (b) Η χορήγηση προβιοτικών στελεχών ενισχύει την αφομοίωση της χοληστερόλης από τα βακτηριακά κύτταρα, μειώνει την απορρόφηση της από τα εντεροκύτταρα και αυξάνει την απέκκρισή της στα κόπρανα.

Τα σημαντικότερα ευρήματα *in vivo* δοκιμών που αφορούν τη μείωση ή την αναστολή της αύξησης των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό από στελέχη λακτοβακίλλων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 4: ευρήματα *in vivo* δοκιμών μείωσης ή αναστολής αύξησης των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό από στελέχη λακτοβακίλλων

**Ευρήματα *in vivo* δοκιμών μείωσης ή αναστολής αύξησης των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό από στελέχη λακτοβακίλλων**

<b>Στέλεχος <i>Lactobacillus</i></b>	<b>Πειραματικό μοντέλο</b>	<b>Οφέλη</b>	<b>Βιβλιογραφική αναφορά</b>
<b>Άγνωστο (γάλα που έχει υποστεί ζύμωση)</b>	φυλές Maasai στην Αφρική	μείωση χοληστερόλης	(Mann & Spoerry, Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai, 1974)
<b>Άγνωστο (γιαούρτι)</b>	άνθρωπος	μειωμένη χοληστερόλη	(Mann, A factor in yoghurt which lowers cholesterolemia in man , 1977)
<b>Προβιοτικό γάλα που έχει υποστεί ζύμωση</b>	αρουραίοι	μείωση της χοληστερόλης	(Grunewald, 1982)
<b><i>L. reuteri</i></b>	ποντίκια	μειωμένη χοληστερόλη μειωμένα τριγλυκερίδια	(Taranto, Medici, Perdigon, Holgado, & Valdez, 1998)
<b><i>L. bulgaricus</i> και <i>L. acidophilus</i></b>	άνθρωπος	μειωμένη χοληστερόλη	(Lin, Ayres, Winkler, & Sandine, 1989)

<b><i>Lactobacillus sporogenes</i></b>	άνθρωπος	μειωμένη ολική και LDL χοληστερόλη	(Mohan, Arora, & Khalilullah, 1990)
<b><i>L. acidophilus</i></b>	άνθρωπος	μειωμένη χοληστερόλη	(Gilliland, Mahler, Hunt, & Davis, 1999; Cho & Kim, 2015)
<b>BSH ενεργό <i>Lactobacillus reuteri</i> NCIMB 30242</b>	άνθρωπος	μειωμένη LDL-χοληστερόλη μειωμένη ολική χοληστερίνη μειωμένη apoB-100 μειωμένη μη-HDL-χοληστερόλη	(Jones M. , Martoni, Parent, & Prakash, 2011)
<b>Συνβιοτικό που περιείχε <i>L. acidophilus</i> ATCC 4962, φρουκτοολιγοσακχαρίτες, ινουλίνη και μαννιτόλη</b>	υπερχοληστερολαιμικοί χοίροι	μειωμένη συγκέντρωση εστέρων χοληστερόλης στο μόριο της LDL αυξημένη συγκέντρωση εστέρων χοληστερόλης στο μόριο της HDL	(Liong, Dunshea, & Shah, 2007)
<b><i>L. pentosus</i> KF923750</b>	ποντίκια	μειωμένα επίπεδα ολικής, LDL	(Bendali, Kerdouche, Hamma-Faradji)

		χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων	, & Drider, 2017)
<b><i>L. fermentum</i> NCMR 2826 και FIX</b>	αρουραίοι Wistar	μειωμένη χοληστερόλη	(Thumu & Halami, 2020)
<b><i>Lactobacillus casei</i> YBJ02</b>	ποντίκια	μειωμένη ολική, LDL χοληστερόλη και τριγλυκερίδια	(Quigley, 2019)
<b><i>L. plantarum</i></b>	άνθρωπος	μειωμένη συνολική και LDL χοληστερόλη	(Fuentes, Lajo, Carrión, & Cuñé, 2013)
<b><i>Lactobacillus plantarum</i> 299v</b>	άνθρωπος	βελτιωμένη αγγειακή ενδοθηλιακή λειτουργία και μειωμένη συστηματική φλεγμονή	(Malik, et al., 2018)
<b><i>Lactobacillus plantarum</i> Q180</b>	Εθελοντές με υψηλότερο ποσοστό των μικροοργανισμών <i>R. bromii</i> , <i>K. alysoides</i> , <i>B. Intestinihominis</i> και <i>F. plautii</i> στα κόπρανα	με διατήρηση των μεταγευματικών λιπιδίων σε υγιή επίπεδα	(Park, et al., 2020)
<b><i>L. plantarum</i> CECT 7527, <i>L. plantarum</i> CECT 7528, και <i>L. plantarum</i> CECT 7529</b>	άνθρωπος με υψηλές αρχικές τιμές ολικής χοληστερόλης	μείωση της ολικής, της LDL χοληστερόλης και της οξειδωμένης	(Seddik, Bendali, Gancel, Fliiss, Spano, & Drider, 2017)

		LDL χοληστερόλης	
<b><i>L. acidophilus</i>, <i>L. lactis</i> και <i>L. plantarum</i></b>	άνθρωπος	μείωση της ολικής χοληστερόλης	(Wang, et al., 2018)
<b>Συνβιοτικό με <i>L. sporogenes</i> και ινουλίνη</b>	a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials	επίδραση σε τριγλυκερίδια και HDL χοληστερόλη	(Wu, Zhang, Ren, & Ruan, 2017)
<b><i>L. reuteri</i> και <i>L. plantarum</i></b>	a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials	μείωση ολικής και LDL χοληστερόλης	(Wu, Zhang, Ren, & Ruan, 2017)
<b><i>L. reuteri</i> NCIMB 11951, <i>L. reuteri</i> NCIMB 701089 και <i>L. acidophilus</i> ATCC 314</b>	συνθήκες προσωμοίωσης του γαστρεντερικού σωλήνα	αφομοίωση του χοληστερόλης	(Tomaro-Duchesneau, Jones, Shah, Jain, Saha, & Prakash, 2014)

Εκτός από την επαλήθευση της αντιχοληστερολαιμικής επίδρασης των ανωτέρω προβιοτικών στελεχών, κάποιες μελέτες προχώρησαν και στη διερεύνηση των πιθανών μηχανισμών που οδήγησαν στη μείωση της χοληστερόλης στον ορό. Αυτές οι υποθέσεις συγκεντρώνονται παρακάτω:

- Στη μελέτη των Liong et al. (Liong, Dunshea, & Shah, 2007), η χορήγηση του συνβιοτικού (*L. acidophilus* ATCC 4962, φρουκτοολιγосακχαρίτες, ινουλίνη και μαννιτόλη) σε υπερχοληστερολαιμικούς χοίρους επηρέασε τη δομή των λιποπρωτεϊνών. Στο μόριο της LDL παρατηρήθηκε μειωμένη συγκέντρωση εστέρων χοληστερόλης και ταυτόχρονα υψηλότερη συγκέντρωση τριακυλογλυκερόλης. Τα σωματίδια της LDL που είναι εμπλουτισμένα με τριακυλογλυκερόλη είναι πιο ευαίσθητα στην υδρόλυση και την απομάκρυνση από το αίμα, ενώ η απώλεια εστέρων χοληστερόλης σχηματίζει μικρότερα και πυκνότερα LDL σωματίδια οδηγώντας σε μεγαλύτερη απομάκρυνση χοληστερόλης από το αίμα. Επιπλέον, το μόριο της HDL που είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά της

χοληστερόλης από το αίμα στο ήπαρ, εμφάνισε υψηλότερη συγκέντρωση εστεροποιημένης χοληστερόλης. Έτσι, οι ερευνητές πρότειναν ότι το συνβιοτικό προκάλεσε υποχοληστερολαιμική επίδραση μέσω αλλαγής στη δομή των λιποπρωτεϊνικών μεταφορέων.

- Στη μελέτη των Thumu & Halami (Thumu & Halami, 2020) το βελτιωμένο λιπιδαιμικό προφίλ των αρουραίων που έλαβαν τα στελέχη *L. fermentum* NCMR 2826 και FIX συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση των ευεργετικών στελεχών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* στα κόπρανα των ζώων και μειωμένη παρουσία του *Escherichia coli*. Το εύρημα αυτό υπογράμμισε την γενικότερη ευεργετική δράση του *L. fermentum* ως προβιοτικό στέλεχος (Thumu & Halami, 2020).
- Οι Qian et al. (Qian, et al., 2019), εκτός από τη σημαντική επίδραση του *Lactobacillus casei* YBJ02 στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της ολικής και της LDL χοληστερόλης, πρότειναν επίσης πως η παρουσία του *L. casei* YBJ02 στον εντερικό αυλό θα μπορούσε να καταστείλλει την έκφραση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπιδίων (PPAR $\gamma$ , CEBP /  $\alpha$  και SREBP-1c) (Qian, et al., 2019).
- Οι Malik et al. (Malik, et al., 2018) υπέθεσαν πως η βελτιωμένη αγγειακή ενδοθηλιακή λειτουργία και η μειωμένη συστηματική φλεγμονή στους ασθενείς με στεφανιαία νόσο, προήλθαν από τη δράση μεταβολιτών του εντερικού μικροβιώματος που παρήχθησαν μετά τη χορήγηση του προβιοτικού *Lactobacillus plantarum* 299v. Ωστόσο, η διαπίστωση αυτή απαιτεί περαιτέρω δοκιμές (Malik, et al., 2018).
- Στη μελέτη των Park et al. (Park, et al., 2020), η χορήγηση του *L. plantarum* Q180 βοήθησε στη διατήρηση των μεταγευματικών λιπιδίων σε υγιή επίπεδα για τους εθελοντές που παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό των *R. bromii*, *K. alysoides*, *B. Intestinihominis* και *F. plautii* στα κόπρανα. Η μελέτη απέτυχε να βρει κάποια στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ των λιπιδαιμικών δεικτών και των εντερικών μικροβίων και μεταβολιτών ωστόσο μπορεί να αποτελέσει πρόδρομο κάποιας επόμενης κλινικής δοκιμής σε εθελοντές με υψηλά ποσοστά εντεροβακτηρίων *R. bromii*, *K. alysoides*, *B. Intestinihominis* και *F. plautii* (Park, et al., 2020).
- Η αποτελεσματικότητα των στελεχών *L. plantarum* στη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ φάνηκε να είναι ανάλογη με τον καρδιαγγειακό κίνδυνο των εθελοντών, καθώς σημαντικές μειώσεις στα λιπίδια του αίματος σημειώθηκαν μόνο στα άτομα που είχαν υψηλές αρχικές τιμές ολικής χοληστερόλης (Seddik, Bendali, Gancel, Fliss, Spano, & Drider, 2017).

Μέχρι σήμερα, μόνο ένα προβιοτικό προϊόν έχει εγκριθεί για τη θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων. Το προϊόν-Cardionina™, διαθέσιμο στον Καναδά, τις ΗΠΑ και την Ευρώπη, περιέχει κάψουλες με 2 δισεκατομμύρια εγκλεισμένα βακτήρια *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242, τα οποία έχουν κλινικά αποδειχθεί ότι μειώνουν την LDL χοληστερόλη κατά 11,6% σε ενήλικες με υπερχοληστερολαιμία (Jones, Martoni, & Prakash, 2012).

Ευρήματα *in vivo* μελετών σε ανθρώπους και ζώα προτείνουν έντονα ότι τα προβιοτικά στελέχη, κυρίως τα *L. acidophilus* and *L. plantarum*, έχουν τη δυνατότητα βελτίωσης της μεταβολικής πορείας των λιποειδών (Nazir, Hussain, Hamid, & Song, 2018), αλλά ο ακριβής μηχανισμός δράσης με τον οποίο αυτά διαμεσολαβούν στη μείωση των επιπέδων χοληστερόλης στον ορό δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινιστεί (Kumar, et al., 2012). Περισσότερες *in vitro* αλλά κυρίως *in vivo* μελέτες απαιτούνται με σκοπό την αποσαφήνιση του πιθανού προληπτικού και θεραπευτικού ρόλου των προβιοτικών στην εμφάνιση της υπερχοληστερολαιμίας.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνήσει στελέχη του γένους *Lactobacillus*, που έχουν ήδη ελεγχθεί για κάποια προβιοτικά χαρακτηριστικά, ως προς την ικανότητα τους να αφομοιώνουν τη χοληστερόλη από το θρεπτικό μέσο στο οποίο καλλιεργούνται. Η αφομοίωση της χοληστερόλης από το κάθε στέλεχος προσδιορίζεται ποσοτικά.

## ΚΕΦ 1: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Πρόελευση των υπό μελέτη βακτηριακών στελεχών του γένους *Lactobacillus*

Τα στελέχη που μελετήθηκαν (Πίνακας 5) ανήκουν στην Συλλογή του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου και η απομόνωση τους έγινε από υγιή νεογνά έως 3 μηνών. Όλα τα στελέχη διατηρήθηκαν στην κατάψυξη, αποθηκευμένα στους  $-80^{\circ}\text{C}$  σε διάλυμα γλυκερόλης 30% v / v.

Πίνακας 5: Υπό μελέτη προβιοτικά στελέχη του γένους *Lactobacillus*

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	ΕΙΔΟΣ <i>LACTOBACILLUS</i> (ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ)
C44 C58	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (sequencing)
AnLB 1 AnLB 9 AnLB 10 AnLB 11 AnLB 13 AnLB 15 AnLB 25 AnLB 46 AnLB 52	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (API)
C5 C9 C15 C28 C32 C45 C59 C72 C74 AnLB 21	<i>Lactobacillus gasseri</i> (sequencing)
AnLB 2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1 ή <i>Lactobacillus acidophilus</i> 3

AnLB 6 AnLB16 AnLB 17 AnLB 26 AnLB 49	(API)
DSMZ (DSM 20079)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (από συλλογή)
C68 C70	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i> (sequencing)
AnLB 47	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i> (API)
C1 C51 AnLB 30	<i>Lactobacillus crispatus</i> (sequencing)
AnLB 48	<i>Lactobacillus plantarum</i> (API)
AnLB 18 Anlb40	<i>Lactobacillus delbrueckii delbrueckii</i> (API)
AnLB 44 C60	<i>Lactobacillus salivarius</i> (sequencing)
AnLB 23 AnLB 29	<i>Lactobacillus fermentum</i> (API)
AnLB 38	<i>Lactobacillus brevis</i>
AnLB 51 C50 C39	<i>Lactobacillus spp.</i> (δεν έχει γίνει ταυτοποίηση)

### Προετοιμασία και έλεγχος καθαρότητας βακτηριακών στελεχών

Κάθε βακτηριακό στέλεχος ανακαλλιεργήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές, δύο σε αποστειρωμένα τρυβλία με De Man-Rogosa-Sharpe agar (MRS agar) και μία σε αποστειρωμένο υγρό θρεπτικό υλικό MRS broth, με σκοπό να «ενεργοποιηθεί» πριν από την πειραματική χρήση (Kotsou, Mitsou, Oikonomou, & Kyriacou, 2008).

Οι καλλιέργειες επώαστηκαν σε αναερόβιο θάλαμο στους 37 °C, οι στερεές για 48 ώρες, ενώ οι υγρές για 24 ώρες. Η βιωσιμότητα των βακτηριακών στελεχών στις στερεές καλλιέργειες ελέγχθηκε μακροσκοπικά. Η καθαρότητα των βακτηριακών στελεχών επιβεβαιώθηκε με μικροσκοπική παρατήρηση μετά από χρώση Gram σε δείγματα που ελήφθησαν από τις δεύτερες στερεές καλλιέργειες για όλα τα στελέχη (Moyes, Reynolds & Breakwell, 2009). Καθαρές θεωρήθηκαν οι καλλιέργειες που περιείχαν Gram θετικούς βακίλους.

### **1.1. Δοκιμασία αφομοίωσης χοληστερόλης**

Η ικανότητα των βακτηριακών στελεχών να αφομοιώνουν τη χοληστερόλη από το μέσο καλλιέργειας αξιολογήθηκε σύμφωνα με μια τροποποιημένη μέθοδο που περιγράφηκε από τους Pereira & Gibson (Pereira & Gibson, 2002). Το μέσο καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε ήταν τροποποιημένο MRS Broth (mMRS), που προετοιμάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, συμπληρωμένο με χολικά οξέα (oxgall; dehydrated fresh bile) και υδατοδιαλυτή μορφή χοληστερόλης (polyoxyethanylesteryl sebacate; Sigma C1145-16). Συγκεκριμένα, για τη σύνθεση του mMRS διαλύθηκε η ποσότητα σκόνης MRS Broth που χρειάζονται τα 1500 mL σε 1350 mL απιονισμένου νερού (dH<sub>2</sub>O). Στο διάλυμα προστέθηκαν επίσης 4,5 g oxgall (0,3% w/v στον τελικό όγκο), προκειμένου να γίνει προσομοίωση της παρουσίας των χολικών οξέων του εντερικού αυλού (SJOVALL, 1959) και επειδή έχει βρεθεί ότι η ικανότητα των βακτηρίων να αντιστέκονται στην τοξικότητα του oxgall είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με άλλα είδη χολικών οξέων, οδηγώντας έτσι σε καλύτερη ανάπτυξη και υψηλότερη αφομοίωση της χοληστερόλης (Parvez, Kim, Lee, & Kim, 2006; Lye, Rusul, & Liong, 2010). Αυτό το θρεπτικό υλικό μοιράστηκε από 9mL σε γυάλινα σωληνάκια και ακολούθησε αποστείρωση.

Την ημέρα του πειράματος παρασκευάστηκε το διάλυμα χοληστερόλης το οποίο προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό της κάθε καλλιέργειας με την παρακάτω διαδικασία: 1 mL από το διάλυμα χοληστερόλης συγκέντρωσης 1 mg/mL προστέθηκε στα 9mL mMRS του κάθε σωλήνα, προκειμένου να προκύψει η τελική συγκέντρωση χοληστερόλης 0,1mg/mL για το θρεπτικό υλικό της κάθε καλλιέργειας (Tomaro-Duchesneau, Jones, Shah, Jain, Saha, & Prakash, 2014 ; Lye, Rusul, & Liong, 2010). Για τη δημιουργία του διαλύματος χοληστερόλης, 1000 mg polyoxyethanylesteryl sebacate (SIGMA 1145-16) διαλύθηκαν σε 100 mL dH<sub>2</sub>O, οπότε προέκυψε διάλυμα χοληστερόλης συγκέντρωσης 10 mg/mL που αποστειρώθηκε με διήθηση

με τη χρήση βακτηριολογικού φίλτρου (Puradisc™ 25 mm) και αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε περαιτέρω αραιώση του διαλύματος χοληστερόλης ως εξής: 10mL διαλύματος χοληστερόλης με συγκέντρωση 10mg/mL προστέθηκαν σε 90mL dH2O οπότε προέκυψε η συγκέντρωση 1 mg/mL. Από αυτό το διάλυμα προστέθηκε 1 ml στα σωληνάκια με το mMRS. Έτσι, προέκυψαν σωληνάκια mMRS των 10mL τελικής συγκέντρωσης χοληστερόλης 0,1 mg/mL ή 100μg/mL.

Ακολούθησε εμβολιασμός κάθε σωλήνα με 100 μL από την 24ωρη «ενεργοποιημένη» υγρή καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών (μετά από καλή ανάδευση) και αναερόβια επώαση των σωληνών για 24 ώρες, στους 37 °C. Για κάθε στέλεχος έγιναν 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις. Τα στελέχη χωρίστηκαν σε δύο ομάδες προκειμένου να εξασφαλιστεί η καλύτερη δυνατή διαχείριση των χρόνων του πειράματος. Ανεμβολίαστοι σωλήνες (εμβολιασμένοι με 100 μL αποστειρωμένου MRS Broth) χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες και για τις δύο ομάδες (Pereira & Gibson, 2002). Για κάθε ομάδα δημιουργήθηκαν 3 ανεμβολίαστοι σωλήνες (σύνολο ανεμβολίαστων σωληνών: 2 x 3 = 6).

Μετά την επώαση ακολούθησε καλή ανάδευση με vortex και όλο το περιεχόμενο του σωλήνα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένο αποστειρωμένο falcon των 15 mL και φυγοκεντρήθηκε για 5 min στις 4000 rpm στους 25°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε με προσοχή σε νέα falcon των 15 mL για περαιτέρω επεξεργασία με σκοπό την καταμέτρηση της χοληστερόλης με φωτομέτρηση. Τα falcon που περιείχαν το ίζημα (δηλαδή την βιομάζα των βακτηρίων) μεταφέρθηκαν στον αποξηραντή για ξήρανση στους 100°C για περίπου 2 ώρες. Μετά την ξήρανση ακολούθησε ζύγιση των falcon που περιείχαν την ξηρή βιομάζα των βακτηρίων, η οποία και υπολογίστηκε με ακρίβεια σύμφωνα με τη εξίσωση:

$W_{\text{τελικό}} - W_{\text{αρχικό}} = W_{\text{βιομάζας}}$  (Εξίσωση 1),  
όπου  $W_{\text{αρχικό}}$ : το βάρος του άδειου falcon και  $W_{\text{τελικό}}$ : το βάρος του ίδιου falcon μετά την ξήρανση.

Τα falcon τα οποία περιείχαν το υπερκείμενο υγρό επεξεργάστηκαν περαιτέρω για τον ποσοτικό προσδιορισμό της χοληστερόλης που απέμεινε σε καθένα από αυτά. Η φύλαξή τους μέχρι την επεξεργασία για τη φωτομέτρηση έγινε στους -20°C.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της χοληστερόλης στο υπερκείμενο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε η τροποποιημένη χρωματομετρική μέθοδος που περιγράφηκε από τους Rudel και Morris (Rudel & Morris, 1973), μέθοδος που ακολουθείται από πολλές πρόσφατες μελέτες προσδιορισμού απομάκρυνσης χοληστερόλης *in vitro* (Rudel & Morris, 1973). Η τελική συγκέντρωση χοληστερόλης προσδιορίστηκε μέσω σύγκρισης με μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης αποτελούμενη από δείγματα γνωστής συγκέντρωσης χοληστερόλης (0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150 και 1000μg/mL), όπως παρουσιάζεται παρακάτω (Tomago-Duchesneau, Jones, Shah, Jain, Saha, & Prakash, 2014).

#### **Προετοιμασία της πρότυπης καμπύλης απορρόφησης:**

Για την πρότυπη καμπύλη απορρόφησης της χοληστερόλης διαλύθηκαν 1 mL από το διάλυμα χοληστερόλης (polyoxyethanyl-cholesteryl sebacate; Sigma C1145) συγκέντρωσης 10 mg/mL, που φυλάσσεται στους -20°C, σε 9 mL mMRS οπότε δημιουργήθηκε η συγκέντρωση 1000 μg/mL (1). Από το διάλυμα αυτό (1) μεταφέρθηκαν:

- 1,5 mL σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 8,5 mL mMRS οπότε προέκυψε η συγκέντρωση 150mg/mL (2),
- 1,2 mL σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 8,8 mL mMRS οπότε προέκυψε η συγκέντρωση 120mg/mL (3),
- 1 mL σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 mL mMRS οπότε προέκυψε η συγκέντρωση 100mg/mL (4),
- 0,8 mL σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9,2 mL mMRS οπότε προέκυψε η συγκέντρωση 80mg/mL (5),
- 0,6 mL σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9,4 mL mMRS οπότε προέκυψε η συγκέντρωση 60mg/mL (6),
- 0,4 mL σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9,6 mL mMRS οπότε προέκυψε η συγκέντρωση 40mg/mL (7),
- 0,2 mL σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9,8 mL mMRS οπότε προέκυψε η συγκέντρωση 20mg/mL (8).
- 10 mL mMRS χρησιμοποιήθηκαν για το τυφλό δείγμα συγκέντρωσης 0mg/mL (9).

#### **Μέθοδος προσδιορισμού της χοληστερόλης:**

Σε ψηλούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν:

- 1 mL δείγματος, δηλαδή 1 mL από:
  - (α) τα σωληνάκια όλων των συγκεντρώσεων χοληστερόλης της πρότυπης καμπύλης [(1) έως (9)] και
  - (β) τα falcon με το υπερκείμενο (μετά από καλή ανάδευση με vortex)
- 2 mL καθαρής αιθανόλης και
- 2 mL KOH 33%

Ακολούθησε ανάδευση του κάθε διαλύματος με vortex για 10 sec και μετά επώαση στους 37 °C για 15 min. Τα διαλύματα επανήλθαν σε θερμοκρασία δωματίου με τρεχούμενο νερό.

Στη συνέχεια σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν:

- 2 mL dH<sub>2</sub>O και
- 3 mL n-hexane.

Ακολούθησε καλή ανάδευση σε vortex για περίπου 1-2 sec. Οι σωλήνες επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min. Παρατηρήθηκε ο διαχωρισμός των στιβάδων και παραλήφθηκε 1 mL από την ανώτερη διαυγή στιβάδα (με προσοχή να μη γίνει ανάδευση) και τοποθετήθηκε σε νέο γυάλινο κοντό δοκιμαστικό σωλήνα. Ακολούθησε εξάτμιση των διαλυτών με ρεύμα αζώτου ώστε να εξατμιστούν πλήρως οι διαλύτες, με το στόμιο κάθε σωλήνα να κλείνεται αμέσως με parafilm ώστε η χοληστερόλη να μην έρθει σε επαφή με το οξυγόνο και οξειδωθεί (Mirlohi , Madany , Hassanzadeh, & Yahay , 2012). Οι σωλήνες φυλάχθηκαν στο ψυγείο έως ότου ολοκληρωθεί η διαδικασία για όλα τα δείγματα. Μετά την εξάτμιση, τα δείγματα χωρίστηκαν σε ομάδες των 10 που επεξεργάστηκαν με τη σειρά. Για κάθε υποομάδα, το ξηρό υλικό του κάθε κοντού σωλήνα διαλύθηκε με:

- 2 mL o-phthalaldehyde solution (0,05 g o-phthalaldehyde διαλυμένα σε 100 ml acetic acid) και
- 0,5 mL πυκνό H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Ακολούθησε καλή ανάδευση με vortex για 1-2 sec και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Μετά το πέρας των 10 λεπτών, μετρήθηκε η απορρόφηση του κάθε δείγματος στα 550 nm σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών ELISA Reader BioTek, εντός 15 λεπτών, ύστερα από καλή ανάδευση του κάθε δείγματος με πιπέτα (Rudel & Morris, 1973). Η συγκέντρωση χοληστερόλης που απέμεινε στο θρεπτικό μέσο του κάθε στελέχους προσδιορίστηκε με τη

χρήση της πρότυπης καμπύλης απορρόφησης (Tomaro-Duchesneau, Jones, Shah, Jain, Saha, & Prakash, 2014).

Τα στελέχη συγκρίθηκαν σε σχέση με το ανεμβολίαστο (control) ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το μέσο καλλιέργειας. Η συγκέντρωση που απομακρύνθηκε προκύπτει σύμφωνα με την εξίσωση:

$C_{\text{απομακρύνθηκε}} = C_{\text{αρχικό}} - C_{\text{απέμεινε}}$

$C_{\text{απομακρύνθηκε}} = 100\mu\text{g/mL} - C_{\text{δείγματος}}$  (Εξίσωση 2)

(Syakila, Lim, Agatonovic-Kustrin, Lim, & Ramasamy, 2019).

Τέλος, τα στελέχη συγκρίθηκαν μεταξύ τους και ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης ( $\mu\text{g/mL}$ ) που απομάκρυνε κάθε στέλεχος ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών κυττάρων, η οποία υπολογίστηκε σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$A = C_{\text{απομακρύνθηκε}} / W = (C_{\text{αρχικό}} - C_{\text{δείγματος}}) / W$  (Εξίσωση 3)

(Tomaro-Duchesneau, Jones, Shah, Jain, Saha, & Prakash, 2014), όπου το  $C_{\text{αρχικό}}$  είναι η συγκέντρωση της χοληστερόλης που προστέθηκε αρχικά στο θρεπτικό μέσο ( $100 \mu\text{g/mL}$ ), το  $C_{\text{δείγματος}}$  είναι η συγκέντρωση της χοληστερόλης που ανακτήθηκε στο υπερκείμενο του κάθε δείγματος (και των ανεμβολίαστων σωλήνων) σε  $\mu\text{g/mL}$  και το  $W$  είναι η ξηρή βιομάζα των βακτηριακών κυττάρων σε  $\text{g}$ .

## 1.2. Προπείραμα

Πριν από την ημέρα του πειράματος, πραγματοποιήθηκε προπείραμα με σκοπό να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση χοληστερόλης που πρέπει να περιέχει το μέσο καλλιέργειας των λακτοβακίλλων έτσι ώστε να παρουσιάζεται όσο το δυνατόν ακριβέστερη η διάκριση των αποτελεσμάτων απορρόφησης μεταξύ των βακτηριακών στελεχών.

Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκαν θρεπτικά υλικά με τροποποιημένο mMRS και oxgall (0,3% w/v) διαφορετικών συγκεντρώσεων υδατοδιαλυτής χοληστερόλης (polyoxyethanyl-cholesteryl sebacate; Sigma C1145):  $0,5\text{mg/mL}$ ,  $0,2\text{mg/mL}$ ,  $0,1\text{mg/mL}$ ,  $0,05\text{mg/mL}$ . Κάθε θρεπτικό υλικό εμβολιάστηκε με  $100\mu\text{L}$  από την 24ωρη ενεργοποιημένη υγρή καλλιέργεια τριών στελεχών

λακτοβακίλλων: των AnLB 48, C70 και DSM 20079. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν και ανεμβολίαστοι σωλήνες για κάθε συγκέντρωση χοληστερόλης ως αρνητικοί μάρτυρες. Για κάθε δείγμα διαφορετικής συγκέντρωσης και εμβολίου πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον 2 επαναλήψεις για να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου. Τα θρεπτικά υλικά επώαστηκαν αναερόβια για 24 ώρες. Η χρωματομετρική μέθοδος προσδιορισμού της χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο διάλυμα πραγματοποιήθηκε για το κάθε δείγμα όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 1.

Η συγκέντρωση χοληστερόλης που απέμεινε σε κάθε θρεπτικό υλικό, ως αποτέλεσμα 2 ανεξάρτητων επαναλήψεων, παρουσιάζεται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Απορροφήσεις χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος (Προπείραμα)

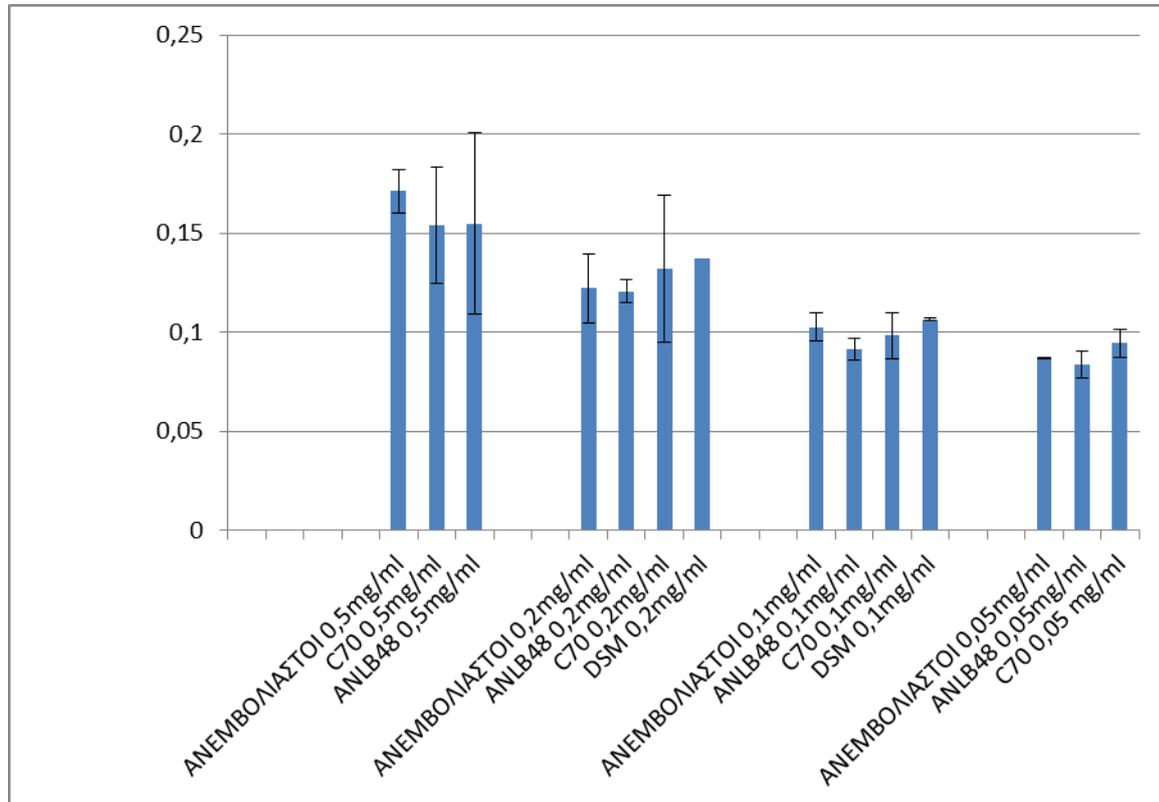
<b>Απορροφήσεις χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος (Προπείραμα)</b>		
<b>Δείγματα</b>	<b>Απορροφήσεις</b>	
	<b>MEAN</b>	<b>STDEV</b>
ANEMΒΟΛΙΑΣΤΟΙ 0,5mg/ml	0,17125	0,01096
C70 0,5mg/ml	0,153833	0,029506
ANLB48 0,5mg/ml	0,154833	0,045674
ANEMΒΟΛΙΑΣΤΟΙ 0,2mg/ml	0,12225	0,017324
ANLB48 0,2mg/ml	0,1205	0,005766
C70 0,2mg/ml	0,131833	0,037136
DSM 0,2mg/ml	0,1375	
ANEMΒΟΛΙΑΣΤΟΙ 0,1mg/ml	0,1025	0,007071
ANLB48 0,1mg/ml	0,0915	0,005635
C70 0,1mg/ml	0,098167	0,011471
DSM 0,1mg/ml	0,1065	0,000707
ANEMΒΟΛΙΑΣΤΟΙ 0,05mg/ml	0,08675	0,000354
ANLB48 0,05mg/ml	0,0835	0,006946

C70 0,05 mg/ml

0,094333

0,007286

Σχήμα 1: Απορροφήσεις χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος (Προπείραμα)



Τα αποτελέσματα ωστόσο δεν παρείχαν σαφή συμπεράσματα αναφορικά με το ποια συγκέντρωση θεωρείται η βέλτιστη πιθανώς λόγω του μικρού αριθμού των μετρήσεων που διαθέτουμε για κάθε στέλεχος (μόλις 2). Έτσι, η αρχική συγκέντρωση της χοληστερόλης του πειράματος επιλέχθηκε με βάση την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας στην οποία παρόμοιες μελέτες προσδιορισμού απομάκρυνης χοληστερόλης από στελέχη λακτοβακίλλων με χρωματομετρικές μεθόδους παρατήρησαν μείωση χοληστερόλης όταν οι λακτοβάκιλλοι αναπτύσσονταν σε καλλιεργητικό μέσο MRS με συγκέντρωση χοληστερόλης μεταξύ 0,07 και 0,1mg/mL (Mirlohi , Madany , Hassanzadeh, & Yahay , 2012 ; Tomaro-Duchesneau, Jones, Shah, Jain, Saha, & Prakash, 2014). Συνεπώς, στο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση χοληστερόλης 0,1mg/mL ή 100 μg/mL.

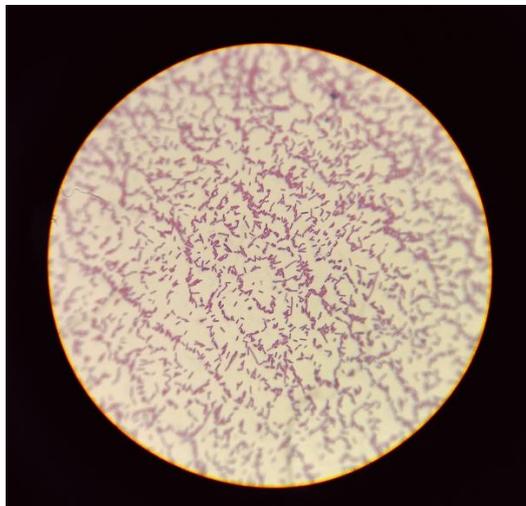
## ΚΕΦ 2: ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για τη διασφάλιση της επαναληψιμότητας της μεθόδου, τα πειραματικά αποτελέσματα εκφράστηκαν ως ο μέσος όρος ( $\pm$  τυπική απόκλιση του μέσου όρου) τριών μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν με ξεχωριστούς πειραματικούς χειρισμούς για το κάθε βακτηριακό στέλεχος. Οι τιμές των μέσων όρων (MEAN) και των τυπικών αποκλίσεων (STDEV) υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το Microsoft Excel. Οι στατιστικοί υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πρόγραμμα SigmaStat, σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0,05$  (σημαντική διαφορά). Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τη μέθοδο ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA), σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0,05$ , με σκοπό την αξιολόγηση στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των μέσων όρων των δειγμάτων. Τα δεδομένα που αναλύθηκαν ελέγχθηκαν ως προς το αν ακολουθούν κανονική κατανομή (Normality test) καθώς και ως προς την ισότητα των διακυμάνσεων (Equality of Variance test). Τα δείγματα χωρίστηκαν ανά είδος *Lactobacillus*. Στα είδη που βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, πραγματοποιήθηκε Dunnett's test (σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ ) με το οποίο συγκρίθηκε η συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το καλλιεργητικό μέσο για κάθε στέλεχος σε σχέση με το ανεμβολίαστο θρεπτικό υλικό (control). Επίσης τα στελέχη συγκρίθηκαν μεταξύ τους και ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών κυττάρων με τη χρήση του Tukey test (σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0.05$ ).

## ΚΕΦ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Προετοιμασία και έλεγχος καθαρότητας των βακτηριακών στελεχών

Το στέλεχος C60 δεν ανέπτυξε αποικίες στο θρεπτικό μέσο γι'αυτό και αφαιρέθηκε από την πειραματική διαδικασία. Η χρώση Gram επιβεβαίωσε την καθαρότητα των βακτηριακών στελεχών που εμφάνισαν χαρακτηριστική εικόνα Gram θετικών λακτοβακίλλων (χρωματισμένοι μπλε-μωβ βάκιλλοι σε σειρά ή σε μικρές και μεγάλες ομάδες) (Εικόνα 3). Το στέλεχος AnLB 52 εμφάνισε εικόνα πολύ κοντών μπλε βακίλλων αλλά θεωρήθηκε καθαρό και συμπεριλήφθηκε στο πείραμα. Ωστόσο, το στέλεχος AnLB 49 εμφάνισε εικόνα κόκκινων κόκκων γεγονός που αποδεικνύει ότι πιθανώς επιμολύνθηκε κι έτσι τα αποτελέσματά του δε λήφθηκαν υπόψη.



Εικόνα 3: Χαρακτηριστική εικόνα Gram θετικών λακτοβακίλλων στο μικροσκόπιο (μεγέθυνση x100).

### Δοκιμασία αφομοίωσης χοληστερόλης

Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 7) παρουσιάζονται οι μετρήσεις της ξηρής βιομάζας (g) των βακτηριακών στελεχών. Ο υπολογισμός αυτός, για κάθε δείγμα, έγινε σύμφωνα με την Εξίσωση 1.

Πίνακας 7: Μετρήσεις ξηρής βιομάζας (g) των βακτηριακών στελεχών

Ξηρή Βιομάζα Βακτηρίων (g)									
Στελέχη	DSMZ	C1	C5	C9	C15	C28	C32	C39	C44
No. 1	0,0065	0,0105	0,0074	0,0057	0,0061	0,0040	0,0042	0,0064	0,0101
No. 2	0,0095	0,0062	0,0067	0,0047	0,0046	0,0043	0,0052	0,0061	0,0096
No. 3	0,0063	0,0062	0,0104	0,0053	0,0076	0,0084	-0,0023 <sup>a</sup>	0,0060	0,0095
MEAN	0,0074	0,0076	0,0082	0,0052	0,0061	0,0056	0,0024	0,0062	0,0097
	C45	C50	C51	C58	C59	C68	C70	C72	C74
No. 1	0,0078	0,0080	0,0133	0,0112	0,0073	0,0109	0,0156	0,0091	0,0103
No. 2	0,0080	0,0080	0,0116	0,0111	0,0074	0,0100	0,0151	0,0069	0,0086
No. 3	0,0059	0,0418	0,0116	0,0096	0,0074	0,0076	0,0155	0,0079	0,0098
MEAN	0,0072	0,0193	0,0122	0,0106	0,0074	0,0095	0,0154	0,0080	0,0096
	AnLb1	AnLb2	AnLb6	AnLb9	AnLb10	AnLb11	AnLb13	AnLb15	AnLb16
No. 1	0,0153	0,0122	0,0124	0,0155	0,0188	0,0085	0,0074	0,0093	0,0040
No. 2	0,0128	0,0131	0,0117	0,0143	0,0203	0,0099	0,0078	0,0090	0,0043
No. 3	0,0152	0,0112	0,0111	0,0139	0,0194	0,0081	0,0066	0,0095	0,0035
MEAN	0,0144	0,0122	0,0117	0,0146	0,0195	0,0088	0,0073	0,0093	0,0039
	AnLb17	AnLb18	AnLb21	AnLb23	AnLb25	AnLb26	AnLb29	AnLb30	AnLb38
No. 1	0,1072	0,0029	0,0082	0,0099	0,0072	0,0079	0,0134	0,0049	0,0091
No. 2	0,0078	0,0053	0,0043	0,0076	0,0080	0,0123	0,0150	0,0048	0,0124
No. 3	0,0068	0,0034	0,0034	0,0096	0,0055	0,0105	0,0139	0,0039	0,0116
MEAN	0,0406	0,0039	0,0053	0,0090	0,0069	0,0102	0,0141	0,0045	0,0110
	AnLb40	AnLb44	AnLb46	AnLb47	AnLb48	AnLb51	AnLb52		
No. 1	0,0057	0,0138	0,0102	0,0077	0,0162	0,0132	0,0107		
No. 2	0,0099	0,0116	0,0151	0,0095	0,0178	0,0159	0,0151		

<b>No. 3</b>	-0,0022 <sup>a</sup>	0,0095	0,0145	0,0099	0,0184	0,0142	0,0147	
<b>MEAN</b>	0,0045	0,0116	0,0133	0,0090	0,0175	0,0144	0,0135	

<sup>a</sup>Οι αρνητικές τιμές που προκύπτουν λόγω πειραματικού σφάλματος είναι πρακτικά αδύνατες και δε λαμβάνονται υπόψιν.

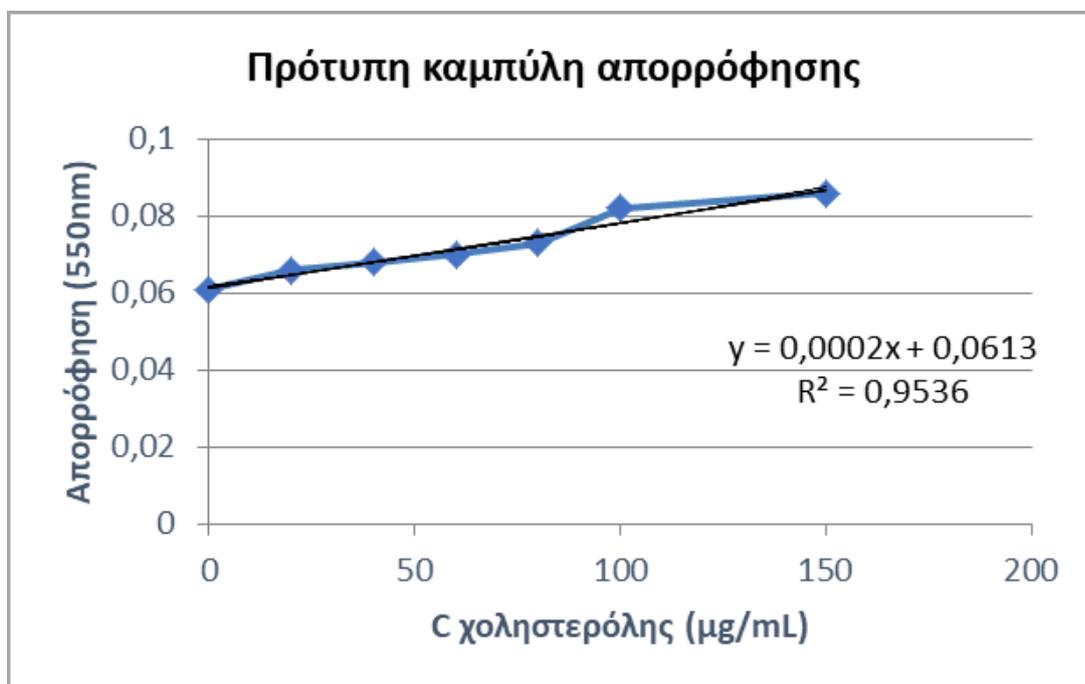
Οι μετρήσεις των απορροφήσεων των δειγμάτων στα 550 nm σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών ELISA Reader BioTek 550nm, παρουσιάζονται στον Πίνακα 8. Υπάρχουν 6 μετρήσεις για τα ανεμβολίαστα δείγματα, τρεις για καθεμία από τις δύο ομάδες των συνολικών δειγμάτων που επεξεργάστηκαν.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα απορροφήσεων μετά από φωτομέτρηση των δειγμάτων.

<b>Μετρήσεις απορροφήσεων (550 nm)</b>									
<b>Στελέχη</b>	<b>DSMZ</b>	<b>C1</b>	<b>C5</b>	<b>C9</b>	<b>C15</b>	<b>C28</b>	<b>C32</b>	<b>C39</b>	<b>C44</b>
<b>No. 1</b>	0,071	0,065	0,076	0,075	0,073	0,071	0,076	0,07	0,071
<b>No. 2</b>	0,067	0,075	0,078	0,071	0,068	0,068	0,072	0,067	0,071
<b>No. 3</b>	0,068	0,074	0,074	0,068	0,073	0,073	0,071	0,073	0,071
<b>MEAN</b>	0,06867	0,07133	0,076	0,07133	0,07133	0,07067	0,073	0,07	0,071
	<b>C45</b>	<b>C50</b>	<b>C51</b>	<b>C58</b>	<b>C59</b>	<b>C68</b>	<b>C70</b>	<b>C72</b>	<b>C74</b>
<b>No. 1</b>	0,071	0,083	0,074	0,073	0,072	0,072	0,072	0,071	0,062
<b>No. 2</b>	0,072	0,072	0,07	0,077	0,066	0,07	0,074	0,066	0,068
<b>No. 3</b>	0,07	0,078	0,075	0,07	0,076	0,07	0,075	0,073	0,081
<b>MEAN</b>	0,071	0,07767	0,073	0,07333	0,07133	0,07067	0,07367	0,07	0,07033
	<b>AnLb1</b>	<b>AnLb2</b>	<b>AnLb6</b>	<b>AnLb9</b>	<b>AnLb10</b>	<b>AnLb11</b>	<b>AnLb13</b>	<b>AnLb15</b>	<b>AnLb16</b>
<b>No. 1</b>	0,079	0,065	0,069	0,078	0,067	0,066	0,073	0,077	0,07
<b>No. 2</b>	0,072	0,07	0,079	0,065	0,076	0,083	0,072	0,072	0,071
<b>No. 3</b>	0,072	0,063	0,085	0,072	0,072	0,072	0,067	0,072	0,07
<b>MEAN</b>	0,07433	0,066	0,07767	0,07167	0,07167	0,07367	0,07067	0,07367	0,07033
	<b>AnLb17</b>	<b>AnLb18</b>	<b>AnLb21</b>	<b>AnLb23</b>	<b>AnLb25</b>	<b>AnLb26</b>	<b>AnLb29</b>	<b>AnLb30</b>	<b>AnLb38</b>
<b>No. 1</b>	0,073	0,077	0,074	0,075	0,074	0,074	0,075	0,069	0,074
<b>No. 2</b>	0,077	0,072	0,076	0,076	0,074	0,07	0,071	0,077	0,074
<b>No. 3</b>	0,074	0,066	0,072	0,068	0,068	0,068	0,074	0,07	0,069
<b>MEAN</b>	0,07467	0,07167	0,074	0,073	0,072	0,07067	0,07333	0,072	0,07233
	<b>AnLb40</b>	<b>AnLb44</b>	<b>AnLb46</b>	<b>AnLb47</b>	<b>AnLb48</b>	<b>AnLb51</b>	<b>AnLb52</b>		<b>ANEMB.</b>
<b>No. 1</b>	0,057	0,057	0,076	0,07	0,06	0,075	0,074	<b>No. 1-A</b>	0,069
<b>No. 2</b>	0,058	0,056	0,07	0,074	0,066	0,07	0,07	<b>No. 2-A</b>	0,084
<b>No. 3</b>	0,059	0,065	0,068	0,075	0,062	0,072	0,069	<b>No. 3-A</b>	0,075
<b>MEAN</b>	0,058	0,05933	0,07133	0,073	0,06267	0,07233	0,071	<b>No. 1-B</b>	0,073
								<b>No. 2-B</b>	0,068
								<b>No. 3-B</b>	0,072
								<b>MEAN</b>	0,0735

Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται η πρότυπη καμπύλη απορρόφησης της χοληστερόλης, η οποία δημιουργήθηκε με την υδατοδιαλυτή χοληστερόλη polyoxyethenyl-cholesteryl sebacate (SIGMA 1145-16). Από την καμπύλη αφαιρέθηκε η τιμή απορρόφησης που αντιστοιχούσε στη συγκέντρωση 120μg/mL γιατί λόγω πειραματικού σφάλματος ήταν μικρότερη από την τιμή απορρόφησης της συγκέντρωσης 100μg/mL (πρακτικά αδύνατο).

Σχήμα 2: Πρότυπη καμπύλη απορρόφησης της χοληστερόλης.



#### Εξίσωση συγκέντρωσης χοληστερόλης:

Ελεύθερη υδατοδιαλυτή χοληστερόλη (μg/mL) = (Απορρόφηση (550nm) - 0,0613) / 0,0002  
(Εξίσωση 4)

Με τη χρήση της εξίσωσης 4 υπολογίστηκε η συγκέντρωση χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό για κάθε δείγμα (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό για κάθε στέλεχος

Συγκέντρωση χοληστερόλης που απέμεινε στο υπερκείμενο υγρό (μg/mL)									
Στελέχη	DSMZ	C1	C5	C9	C15	C28	C32	C39	C44
No. 1	48,5	18,5	73,5	68,5	58,5	48,5	73,5	43,5	48,5
No. 2	28,5	68,5	83,5	48,5	33,5	33,5	53,5	28,5	48,5

<b>No. 3</b>	33,5	63,5	63,5	33,5	58,5	58,5	48,5	58,5	48,5
<b>MEAN</b>	36,8333	50,1667	73,5	50,1667	50,1667	46,8333	58,5	43,5	48,5
<b>STDEV</b>	10,4083	27,5379	10	17,5594	14,4338	12,5831	13,22876	15	0
	<b>C45</b>	<b>C50</b>	<b>C51</b>	<b>C58</b>	<b>C59</b>	<b>C68</b>	<b>C70</b>	<b>C72</b>	<b>C74</b>
<b>No. 1</b>	48,5	108,5	63,5	58,5	53,5	53,5	53,5	48,5	3,5
<b>No. 2</b>	53,5	53,5	43,5	78,5	23,5	43,5	63,5	23,5	33,5
<b>No. 3</b>	43,5	83,5	68,5	43,5	73,5	43,5	68,5	58,5	98,5
<b>MEAN</b>	48,5	81,8333	58,5	60,1667	50,1667	46,8333	61,8333	43,5	45,1667
<b>STDEV</b>	5	27,5379	13,2288	17,5594	25,1661	5,7735	7,63763	18,0278	48,5627
	<b>AnLb1</b>	<b>AnLb2</b>	<b>AnLb6</b>	<b>AnLb9</b>	<b>AnLb10</b>	<b>AnLb11</b>	<b>AnLb13</b>	<b>AnLb15</b>	<b>AnLb16</b>
<b>No. 1</b>	88,5	18,5	38,5	83,5	28,5	23,5	58,5	78,5	43,5
<b>No. 2</b>	53,5	43,5	88,5	18,5	73,5	108,5	53,5	53,5	48,5
<b>No. 3</b>	53,5	8,5	118,5	53,5	53,5	53,5	28,5	53,5	43,5
<b>MEAN</b>	65,1667	23,5	81,8333	51,8333	51,8333	61,8333	46,8333	61,8333	45,1667
<b>STDEV</b>	20,2073	18,0278	40,4145	32,532	22,5462	43,1084	16,0728	14,4338	2,88675
	<b>AnLb17</b>	<b>AnLb18</b>	<b>AnLb21</b>	<b>AnLb23</b>	<b>AnLb25</b>	<b>AnLb26</b>	<b>AnLb29</b>	<b>AnLb30</b>	<b>AnLb38</b>
<b>No. 1</b>	58,5	78,5	63,5	68,5	63,5	63,5	68,5	38,5	63,5
<b>No. 2</b>	78,5	53,5	73,5	73,5	63,5	43,5	48,5	78,5	63,5
<b>No. 3</b>	63,5	23,5	53,5	33,5	33,5	33,5	63,5	43,5	38,5
<b>MEAN</b>	66,8333	51,8333	63,5	58,5	53,5	46,8333	60,1667	53,5	55,1667
<b>STDEV</b>	10,4083	27,5379	10	21,7945	17,3205	15,2753	10,4083	21,7945	14,4338
	<b>AnLb40</b>	<b>AnLb44</b>	<b>AnLb46</b>	<b>AnLb47</b>	<b>AnLb48</b>	<b>AnLb51</b>	<b>AnLb52</b>		<b>ANEMB.</b>
<b>No. 1</b>	-21,5 <sup>a</sup>	-21,5 <sup>a</sup>	73,5	43,5	-6,5 <sup>a</sup>	68,5	63,5	<b>No. 1-A</b>	38,5
<b>No. 2</b>	-16,5 <sup>a</sup>	-26,5 <sup>a</sup>	43,5	63,5	23,5	43,5	43,5	<b>No. 2-A</b>	113,5
<b>No. 3</b>	-11,5 <sup>a</sup>	18,5	33,5	68,5	3,5	53,5	38,5	<b>No. 3-A</b>	68,5
<b>MEAN</b>	-16,5 <sup>a</sup>	-9,83333 <sup>a</sup>	50,1667	58,5	6,83333	55,1667	48,5	<b>No. 1-B</b>	58,5
<b>STDEV</b>	5	24,6644	20,8167	13,2288	15,2753	12,5831	13,2288	<b>No. 2-B</b>	33,5
								<b>No. 3-B</b>	53,5
								<b>MEAN</b>	61
								<b>STDEV</b>	28,7663

<sup>a</sup>Οι αρνητικές τιμές που προκύπτουν λόγω πειραματικού σφάλματος είναι πρακτικά αδύνατες.

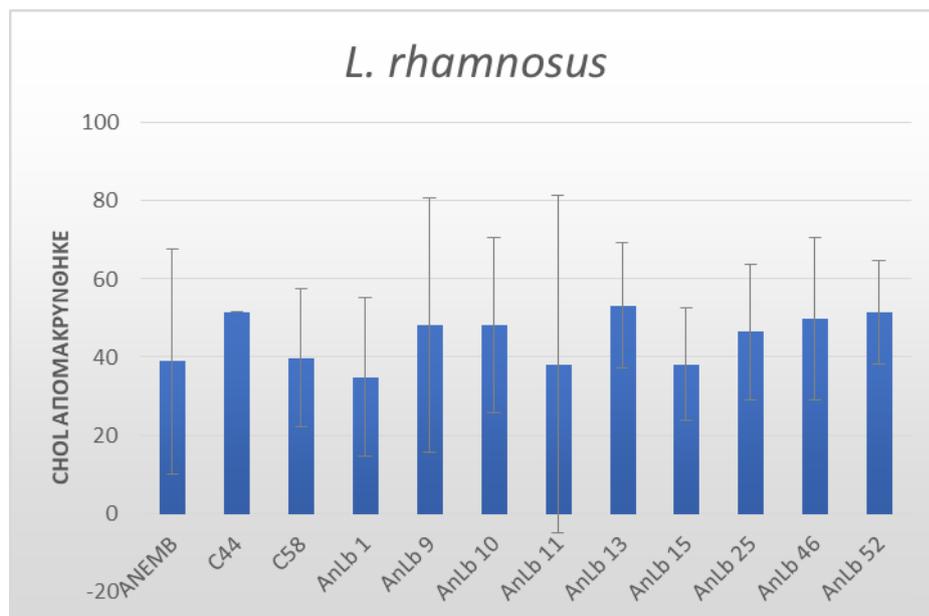
Κατόπιν, με τη χρήση της Εξίσωσης 2 ( $C$  απομακρύνθηκε =  $C$  αρχικό –  $C$  απέμεινε) υπολογίστηκε η συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό κάθε δείγματος (και για τα ανεμβολίαστα δείγματα). Τα δεδομένα αναλύθηκαν ανά είδος *Lactobacillus* και παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακες 10,11,12,13 , Σχήματα 3,4,5,6).

Πίνακας 10: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό για τα στελέχη *L. rhamnosus*.

Συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε (μg/mL) από τα στελέχη <i>L. rhamnosus</i>									
	C44	C58	AnLb 1	AnLb 9	AnLb 10	AnLb 11	AnLb 13		ANEMB
<b>No. 1</b>	51,5	41,5	11,5	16,5	71,5	76,5	41,5	<b>No. 1-A</b>	61,5
<b>No. 2</b>	51,5	21,5	46,5	81,5	26,5	-8,5 <sup>a</sup>	46,5	<b>No. 2-A</b>	-13,5 <sup>a</sup>
<b>No. 3</b>	51,5	56,5	46,5	46,5	46,5	46,5	71,5	<b>No. 3-A</b>	31,5
<b>MEAN</b>	51,5	39,8333	34,8333	48,1667	48,1667	38,1667	53,1667	<b>No. 1-B</b>	41,5
<b>STDEV</b>	0	17,5594	20,2073	32,532	22,5462	43,1084	16,0728	<b>No. 2-B</b>	66,5
	<b>AnLb 15</b>	<b>AnLb 25</b>	<b>AnLb 46</b>	<b>AnLb 52</b>				<b>No. 3-B</b>	46,5
<b>No. 1</b>	21,5	36,5	26,5	36,5				<b>MEAN</b>	39
<b>No. 2</b>	46,5	36,5	56,5	56,5				<b>STDEV</b>	28,7663
<b>No. 3</b>	46,5	66,5	66,5	61,5					
<b>MEAN</b>	38,1667	46,5	49,8333	51,5					
<b>STDEV</b>	14,4338	17,3205	20,8167	13,2288					

<sup>a</sup>Οι αρνητικές τιμές που προκύπτουν λόγω πειραματικού σφάλματος είναι πρακτικά αδύνατες.

Σχήμα 3: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομάκρυναν από το μέσο καλλιέργειας τα στελέχη *L. rhamnosus*.



Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης ANOVA, η οποία δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων χοληστερόλης που απομάκρυναν τα στελέχη *L. rhamnosus* ( $P = 0,992$ ).

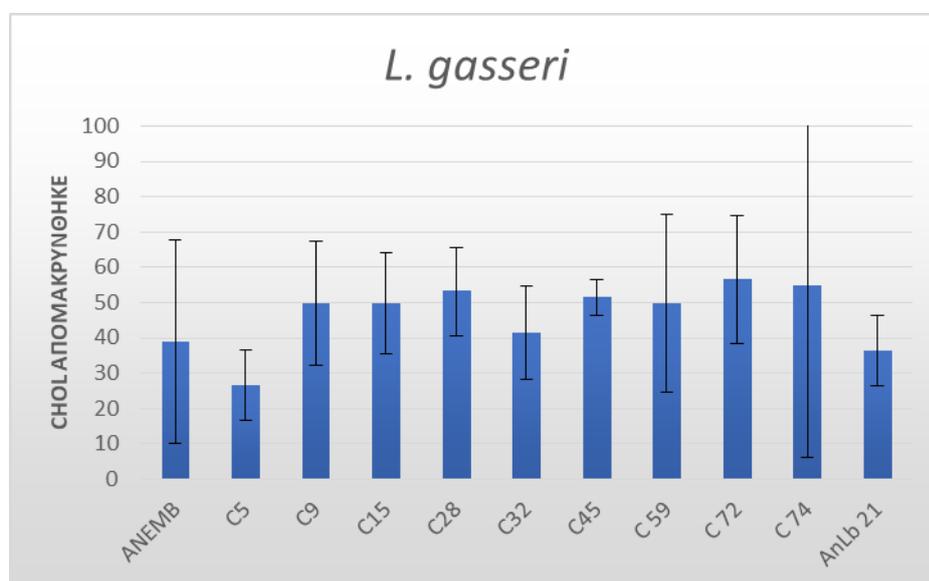
Πίνακας 11: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό για τα στελέχη *L. gasseri*.

Συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε (μg/mL) από τα στελέχη <i>L. gasseri</i>									
	C5	C9	C15	C28	C32	C45	C 59		ANEMB
<b>No. 1</b>	26,5	31,5	41,5	51,5	26,5	51,5	46,5	<b>No. 1-A</b>	61,5
<b>No. 2</b>	16,5	51,5	66,5	66,5	46,5	46,5	76,5	<b>No. 2-A</b>	-13,5 <sup>a</sup>
<b>No. 3</b>	36,5	66,5	41,5	41,5	51,5	56,5	26,5	<b>No. 3-A</b>	31,5
<b>MEAN</b>	26,5	49,8333	49,8333	53,1667	41,5	51,5	49,8333	<b>No. 1-B</b>	41,5
<b>STDEV</b>	10	17,5594	14,4338	12,5831	13,2288	5	25,1661	<b>No. 2-B</b>	66,5
	<b>C 72</b>	<b>C 74</b>	<b>AnLb 21</b>					<b>No. 3-B</b>	46,5
<b>No. 1</b>	51,5	96,5	36,5					<b>MEAN</b>	39
<b>No. 2</b>	76,5	66,5	26,5					<b>STDEV</b>	28,7663
<b>No. 3</b>	41,5	1,5	46,5						

<b>MEAN</b>	56,5	54,8333	36,5		
<b>STDEV</b>	18,0278	48,5627	10		

<sup>α</sup>Η αρνητική τιμή που προκύπτει λόγω πειραματικού σφάλματος είναι πρακτικά αδύνατη.

Σχήμα 4: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομάκρυναν από το μέσο καλλιέργειας τα στελέχη *L. gasseri*.



Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης ANOVA, η οποία δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων χοληστερόλης που απομάκρυναν τα στελέχη *L. gasseri* ( $P = 0,780$ ).

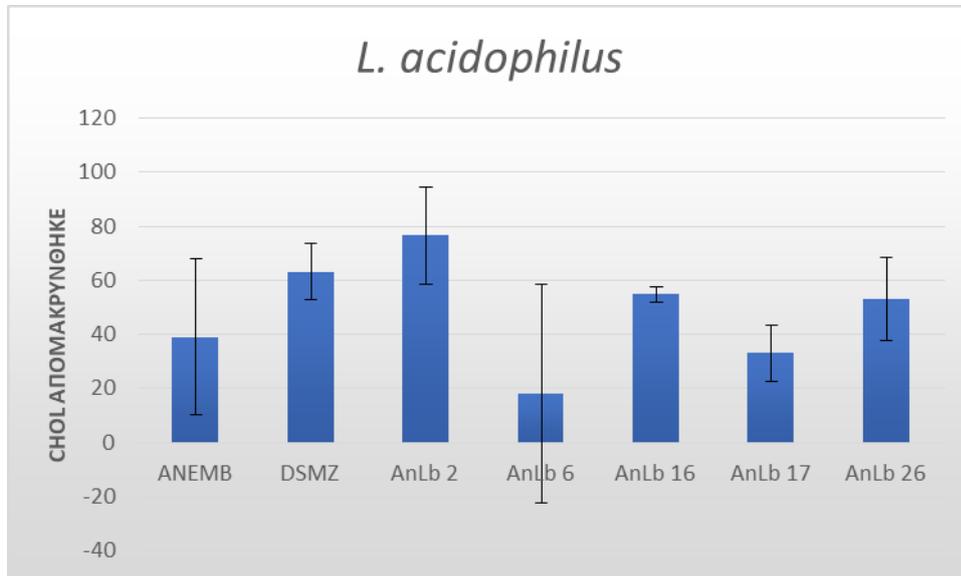
Πίνακας 12: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό για τα στελέχη *L. acidophilus*.

Συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε (μg/mL) από τα στελέχη <i>L. acidophilus</i>								
	DSMZ	AnLb 2	AnLb 6	AnLb 16	AnLb 17	AnLb 26		ANEMB
<b>No. 1</b>	51,5	81,5	61,5	56,5	41,5	36,5	<b>No. 1-A</b>	61,5
<b>No. 2</b>	71,5	56,5	11,5	51,5	21,5	56,5	<b>No. 2-A</b>	-13,5 <sup>a</sup>
<b>No. 3</b>	66,5	91,5	-18,5 <sup>a</sup>	56,5	36,5	66,5	<b>No. 3-A</b>	31,5
<b>MEAN</b>	63,1667	76,5	18,1667	54,8333	33,1667	53,1667	<b>No. 1-B</b>	41,5
<b>STDEV</b>	10,4083	18,0278	40,4145	2,88675	10,4083	15,2753	<b>No. 2-B</b>	66,5
							<b>No. 3-B</b>	46,5

	<b>MEAN</b>	39
	<b>STDEV</b>	28,766

<sup>α</sup>Οι αρνητικές τιμές που προκύπτουν λόγω πειραματικού σφάλματος είναι πρακτικά αδύνατες.

Σχήμα 5: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομάκρυναν από το μέσο καλλιέργειας τα στελέχη *L. acidophilus*.



Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης ANOVA, η οποία δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων χοληστερόλης που απομάκρυναν τα στελέχη *L. acidophilus* ( $P = 0,087$ ).

Τα υπόλοιπα στελέχη αναλύθηκαν μαζί, όπως φαίνεται στον Πίνακα 13.

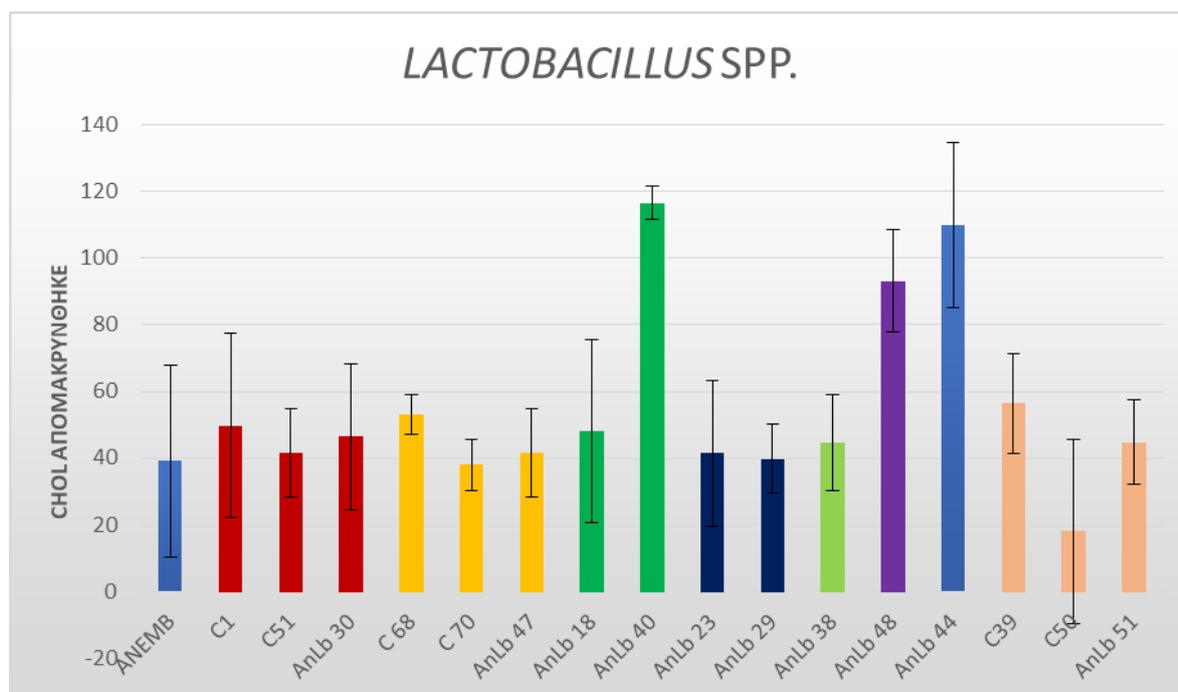
Πίνακας 13: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο για τα υπόλοιπα στελέχη (*Lactobacillus* spp.).

Συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε (μg/mL) από τα υπόλοιπα στελέχη								
	C1	C51	AnLb 30	C 68	C 70	AnLb 47		ANEMB
<b>No. 1</b>	81,5	36,5	61,5	46,5	46,5	56,5	<b>No. 1-A</b>	61,5
<b>No. 2</b>	31,5	56,5	21,5	56,5	36,5	36,5	<b>No. 2-A</b>	-13,5 <sup>a</sup>
<b>No. 3</b>	36,5	31,5	56,5	56,5	31,5	31,5	<b>No. 3-A</b>	31,5
<b>MEAN</b>	49,8333	41,5	46,5	53,1667	38,1667	41,5	<b>No. 1-B</b>	41,5

<b>STDEV</b>	27,5379	13,2288	21,7945	5,7735	7,63763	13,2288	<b>No. 2-B</b>	66,5
	<b>AnLb 18</b>	<b>AnLb 40</b>	<b>AnLb 23</b>	<b>AnLb 29</b>	<b>AnLb 38</b>	<b>AnLb 48</b>	<b>No. 3-B</b>	46,5
<b>No. 1</b>	21,5	121,5	31,5	31,5	36,5	106,5	<b>MEAN</b>	39
<b>No. 2</b>	46,5	116,5	26,5	51,5	36,5	76,5	<b>STDEV</b>	28,7663
<b>No. 3</b>	76,5	111,5	66,5	36,5	61,5	96,5		
<b>MEAN</b>	48,1667	116,5	41,5	39,8333	44,8333	93,1667		
<b>STDEV</b>	27,5379	5	21,7945	10,4083	14,4338	15,2753		
	<b>AnLb 44</b>	<b>C39</b>	<b>C50</b>	<b>AnLb 51</b>				
<b>No. 1</b>	121,5	56,5	-8,5 <sup>a</sup>	31,5				
<b>No. 2</b>	126,5	71,5	46,5	56,5				
<b>No. 3</b>	81,5	41,5	16,5	46,5				
<b>MEAN</b>	109,833	56,5	18,1667	44,8333				
<b>STDEV</b>	24,6644	15	27,5379	12,5831				

<sup>a</sup>Οι αρνητικές τιμές που προκύπτουν λόγω πειραματικού σφάλματος είναι πρακτικά αδύνατες.

Σχήμα 6: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομάκρυναν από το μέσο καλλιέργειας τα υπόλοιπα στελέχη (*Lactobacillus spp.*).



Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης ANOVA, η οποία ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων χοληστερόλης που απομακρύναν τα υπόλοιπα στελέχη ( $P < 0,001$ ).

Στη συνέχεια, για τα ανωτέρω στελέχη, πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις με τη μέθοδο Dunnett (σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0,05$ ) για τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το θρεπτικό υλικό κάθε δείγματος σε σχέση με το ανεμβολίαστο θρεπτικό υλικό (control). Οι στατιστικές αναλύσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.

Πίνακας 14: Σύγκριση των *Lactobacillus spp.* με το ανεμβολίαστο-control ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό ( $\mu\text{g/mL}$ ), με χρήση της μεθόδου πολλαπλών συγκρίσεων Dunnett.

<b>Σύγκριση των στελεχών <i>Lactobacillus spp.</i> με το ανεμβολίαστο θρεπτικό υπόστρωμα, ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε (Dunnett's method)</b>								
Αποτελέσματα Dunnett's test (διάστημα εμπιστοσύνης $p < 0,05$ )								
στελέχη	C1	C51	AnLb 30	C 68	C 70	AnLb 47	AnLb 18	AnLb 40
<b>P&lt;0,050</b>	όχι	όχι	όχι	όχι	όχι	όχι	όχι	<b>ναι</b>
στελέχη	AnLb 23	AnLb 29	AnLb 38	AnLb 48	AnLb 44	C39	C50	AnLb 51
<b>P&lt;0,050</b>	όχι	όχι	όχι	<b>ναι</b>	<b>ναι</b>	όχι	όχι	όχι

Από τα αποτελέσματα του Dunnett's test, παρατηρούμε ότι μόνο τα στελέχη AnLb 40, AnLb 44 και AnLb 48 εμφανίζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ( $p < 0,05$ ) όταν συγκρίνονται με το ανεμβολίαστο-control ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό. Αυτό σημαίνει ότι τα συγκεκριμένα στελέχη μπορούν να θεωρηθούν ικανά να προσλάβουν ένα σημαντικό μέρος της χοληστερόλης που προστέθηκε στο καλλιεργητικό μέσο. Όλα τα υπόλοιπα στελέχη φαίνεται να μην έχουν μειώσει στατιστικά σημαντικά τη συγκέντρωση χοληστερόλης στο μέσο καλλιέργειας σε σχέση με το ανεμβολίαστο ( $p > 0,05$ ).

Στη συνέχεια υπολογίστηκε η συγκέντρωση χοληστερόλης ( $\mu\text{g/mL}$ ) που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηρίων σύμφωνα με την Εξίσωση 3. Τα κανονικοποιημένα

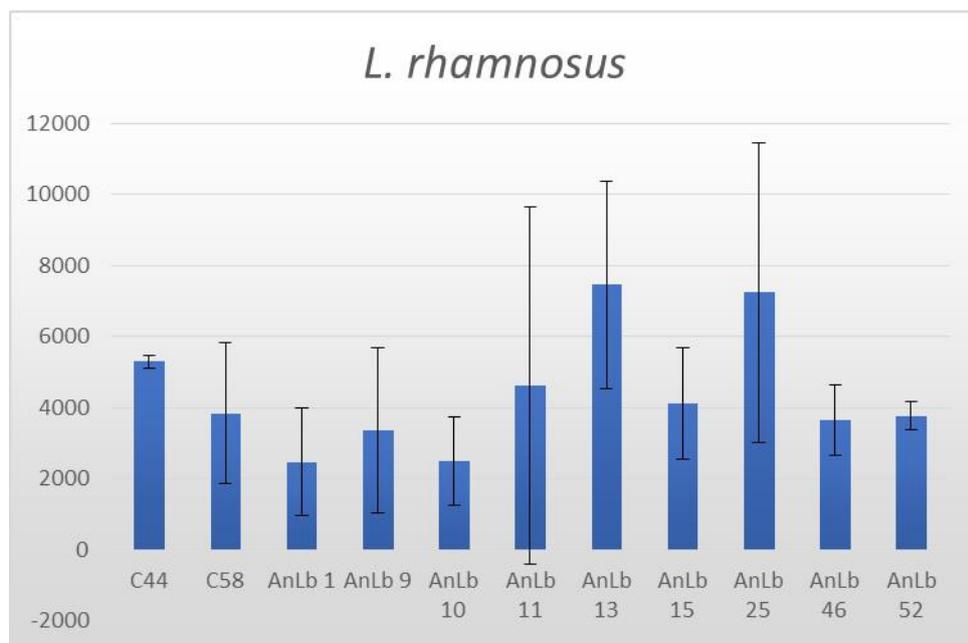
αποτελέσματα της συγκέντρωσης της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε ως προς την ξηρή βιομάζα των βακτηρίων, εμφανίζονται παρακάτω (Πίνακες 15,16,17, Σχήματα 7,8,9). Από τις κανονικοποιημένες μετρήσεις αφαιρέθηκαν εκείνες που αντιστοιχούσαν σε αρνητική τιμή ξηρής βιομάζας (συγκεκριμένα η τρίτη μέτρηση για τα στελέχη C32 και AnLb 40), που είναι πρακτικά αδύνατη και αποτελεί πειραματικό σφάλμα.

Πίνακας 15: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών *L. rhamnosus*.

Συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε (μg/mL) / g ξηρής βιομάζας στελεχών <i>L. rhamnosus</i>							
	<b>C44</b>	<b>C58</b>	<b>AnLb 1</b>	<b>AnLb 9</b>	<b>AnLb 10</b>	<b>AnLb 11</b>	<b>AnLb 13</b>
<b>No. 1</b>	5099,01	3705,36	751,63	1064,52	3803,19	9000,00	5608,11
<b>No. 2</b>	5364,58	1936,94	3632,81	5699,30	1305,42	-858,59 <sup>a</sup>	5961,54
<b>No. 3</b>	5421,05	5885,42	3059,21	3345,32	2396,91	5740,74	10833,3
<b>MEAN</b>	5294,88	3842,57	2481,22	3369,71	2501,84	4627,38	7467,66
<b>STDEV</b>	171,96	1977,81	1525,07	2317,49	1252,19	5022,71	2920,11
	<b>AnLb 15</b>	<b>AnLb 25</b>	<b>AnLb 46</b>	<b>AnLb 52</b>			
<b>No. 1</b>	2311,83	5069,44	2598,04	3411,21			
<b>No. 2</b>	5166,67	4562,50	3741,72	3741,72			
<b>No. 3</b>	4894,74	12090,9	4586,21	4183,67			
<b>MEAN</b>	4124,4105	7240,95	3641,99	3778,87			
<b>STDEV</b>	1575,6199	4207,83	997,83	387,57			

<sup>a</sup>Η αρνητική τιμή που προκύπτει λόγω πειραματικού σφάλματος είναι πρακτικά αδύνατη.

Σχήμα 7: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών *L. rhamnosus*.



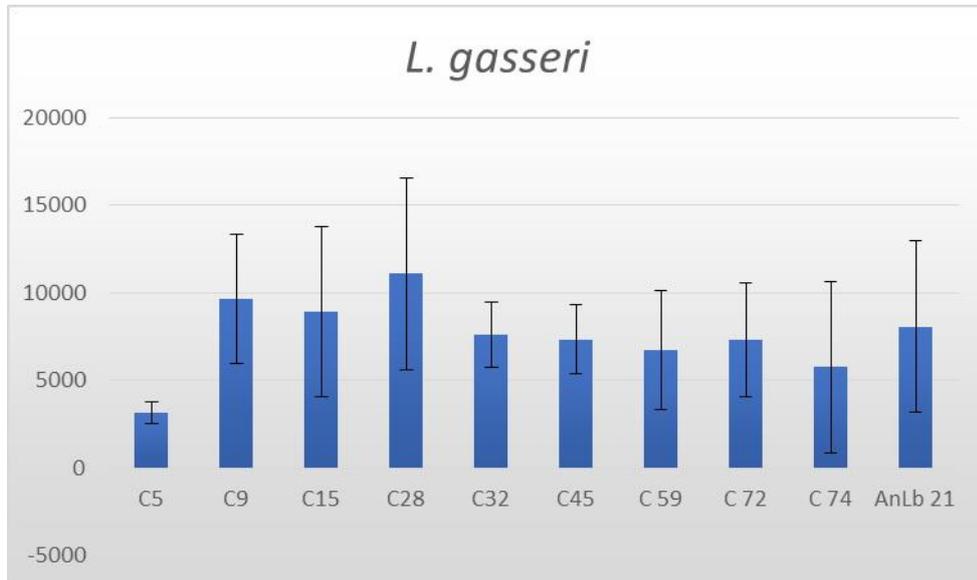
Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης ANOVA, η οποία δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών *L. rhamnosus* ( $P = 0,264$ ).

Πίνακας 16: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών *L. gasseri*.

Συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε (μg/mL) / g ξηρής βιομάζας στελεχών <i>L. gasseri</i>							
	C5	C9	C15	C28	C32	C45	C 59
<b>No. 1</b>	3581,08	5526,32	6803,28	12875,00	6309,52	6602,56	6369,86
<b>No. 2</b>	2462,69	10957,4	14456,5	15465,1	8942,31	5812,50	10337,8
<b>No. 3</b>	3509,62	12547,2	5460,53	4940,48		9576,27	3581,08
<b>MEAN</b>	3184,46	9676,98	8906,78	11093,53	7625,92	7330,45	6762,93
<b>STDEV</b>	626,10	3681,41	4852,89	5483,82	1861,66	1984,65	3395,48
	<b>C 72</b>	<b>C 74</b>	<b>AnLb 21</b>				
<b>No. 1</b>	5659,34	9368,93	4451,22				

<b>No. 2</b>	11086,957	7732,56	6105,99
<b>No. 3</b>	5253,16	153,06	13676,5
<b>MEAN</b>	7333,15	5751,52	8077,89
<b>STDEV</b>	3257,23	4916,96	4918,60

Σχήμα 8: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών *L. gasseri*.



Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης ANOVA, η οποία δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών *L. gasseri* ( $P = 0,522$ ).

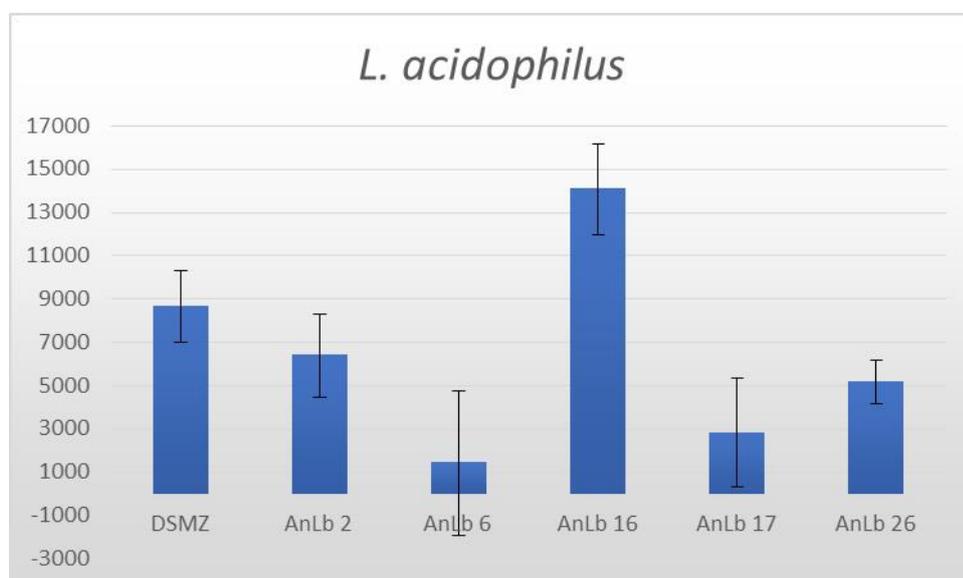
Πίνακας 17: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών *L. acidophilus*.

Συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε (μg/mL) / g ξηρής βιομάζας στελεχών <i>L. acidophilus</i>						
	DSMZ	AnLb 2	AnLb 6	AnLb 16	AnLb 17	AnLb 26
<b>No. 1</b>	7923,08	6680,33	4959,68	14125,00	387,13	4620,25
<b>No. 2</b>	7526,32	4312,98	982,91	11976,74	2756,41	4593,50
<b>No. 3</b>	10555,56	8169,64	-	16142,86	5367,65	6333,33

<b>MEAN</b>	8668,32	6387,65	1425,31	14081,53	2837,06	5182,36
<b>STDEV</b>	1646,39	1944,92	3335,25	2083,40	2491,24	996,86

<sup>α</sup>Η αρνητική τιμή που προκύπτει λόγω πειραματικού σφάλματος είναι πρακτικά αδύνατη.

Σχήμα 9: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών *L. acidophilus*.



Τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης ANOVA, η οποία ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές για τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας βακτηριακών στελεχών *L. acidophilus* ( $P < 0,001$ ).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των κανονικοποιημένων μετρήσεων των στελεχών *L. acidophilus* με τη χρήση του Tukey test (σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0,05$ ). Δεν χρησιμοποιήθηκε ο έλεγχος Dunnett διότι δεν χρησιμοποιούνται πλέον οι ανεμβολίαστοι σωλήνες για σύγκριση ανά δύο (δεν υπάρχει βιομάζα). Οι συγκρίσεις για τις οποίες βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται στον Πίνακα 18.

Πίνακας 18: Σύγκριση μεταξύ των κανονικοποιημένων μετρήσεων των στελεχών *L. acidophilus* με τη χρήση του Tukey test ( $p < 0.05$ ).

Σύγκριση μεταξύ των κανονικοποιημένων μετρήσεων των στελεχών <i>L. acidophilus</i> (Tukey test)					
Αποτελέσματα Tukey test (διάστημα εμπιστοσύνης $p < 0,05$ )					
στελέχη	ANLB16 vs. ANLB6	ANLB16 vs. ANLB17	ANLB16 vs. ANLB26	ANLB16 vs. ANLB2	DSMZ vs. ANLB6
P	<0,001	<0,001	0,004	0,011	0,016

Παρατηρώ ότι όταν λαμβάνεται υπόψιν η ξηρή βιομάζα των βακτηρίων, το στέλεχος AnLb16 παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απομάκρυνε από το υπερκείμενο ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη *L. acidophilus*, εκτός από το στέλεχος DSMZ. Αυτό μας δείχνει ότι το AnLb16 πιθανότατα απομακρύνει χοληστερόλη από το καλλιεργητικό μέσο στα ίδια επίπεδα με το στέλεχος DSMZ. Αντίστοιχα, ο DSMZ παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο με το στέλεχος AnLb6. Ωστόσο, όταν τα στελέχη *L. acidophilus* είχαν συγκριθεί με το ανεμβολίαστο-control σε προηγούμενες συγκρίσεις, ως προς τη συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομάκρυναν από το μέσο καλλιέργειας, δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, όπως είχα παρατηρήσει στο Σχήμα 5.

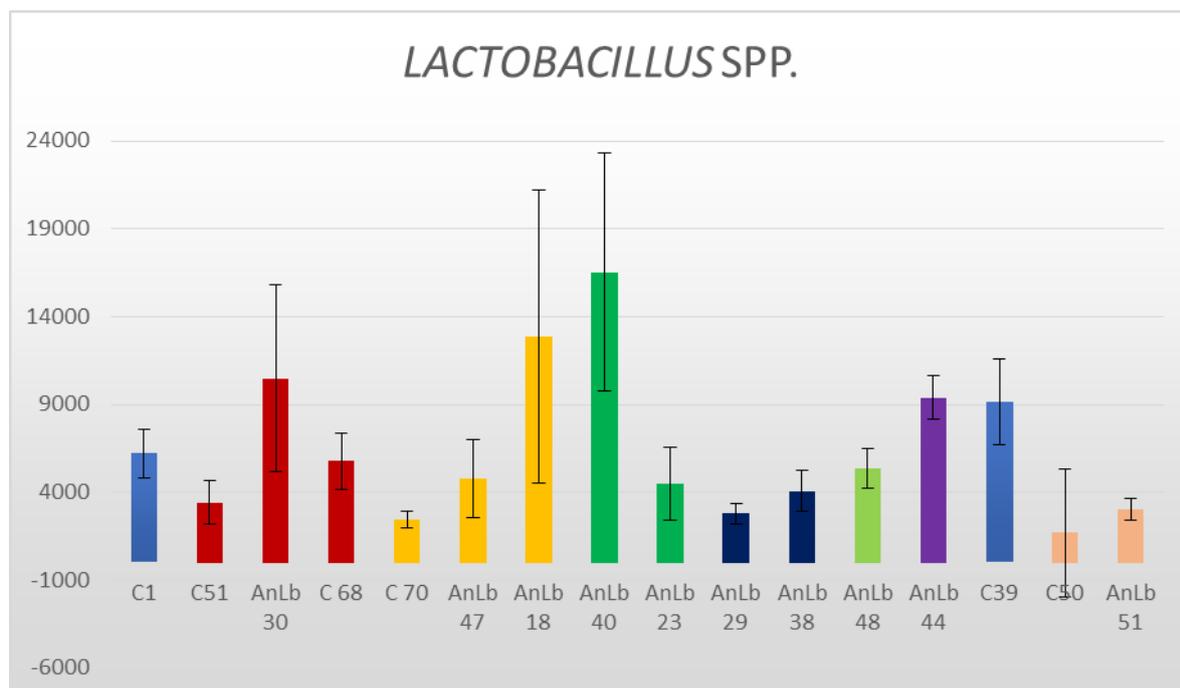
Τα υπόλοιπα στελέχη αναλύθηκαν μαζί, όπως φαίνεται στον Πίνακα 19 και στο Σχήμα 10.

Πίνακας 19: Συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας των υπόλοιπων βακτηριακών στελεχών (*Lactobacillus spp.*).

Συγκέντρωση χοληστερόλης που απομακρύνθηκε ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) / g ξηρής βιομάζας των υπόλοιπων στελεχών <i>Lactobacillus spp.</i>						
	C1	C51	AnLb 30	C 68	C 70	AnLb 47
No. 1	7761,90	2744,36	12551,02	4266,06	2988,43	7337,66
No. 2	5080,65	4870,69	4479,17	5650,00	2417,22	3842,11

<b>No. 3</b>	5887,10	2715,52	14487,18	7434,21	2032,26	3181,82
<b>MEAN</b>	6243,22	3443,52	10505,79	5783,42	2479,30	4787,20
<b>STDEV</b>	1375,65	1236,05	5308,23	1588,29	481,10	2233,31
	<b>AnLb 18</b>	<b>AnLb 40</b>	<b>AnLb 23</b>	<b>AnLb 29</b>	<b>AnLb 38</b>	<b>AnLb 48</b>
<b>No. 1</b>	7413,79	21315,79	3181,82	2350,75	4010,99	6574,07
<b>No. 2</b>	8773,58	11767,68	3486,84	3433,33	2943,55	4297,75
<b>No. 3</b>	22500,00		6927,08	2625,90	5301,72	5244,57
<b>MEAN</b>	12895,79	16541,73	4531,91	2803,33	4085,42	5372,13
<b>STDEV</b>	8345,23	6751,54	2079,88	562,68	1180,85	1143,51
	<b>AnLb 44</b>	<b>C39</b>	<b>C50</b>	<b>AnLb 51</b>		
<b>No. 1</b>	8804,35	8828,13	-1062,50	2386,36		
<b>No. 2</b>	10858,37	11721,31	5812,50	3553,46		
<b>No. 3</b>	8578,95	6916,67	394,74	3274,65		
<b>MEAN</b>	9413,89	9155,37	1714,91	3071,49		
<b>STDEV</b>	1256,02	2418,98	3622,64	609,49		

Σχήμα 10: Συγκέντρωση χοληστερόλης (μg/mL) που απομακρύνθηκε ανά γραμμάριο ξηράς βιομάζας των υπόλοιπων βακτηριακών στελεχών (*Lactobacillus spp.*).



Κατά την στατιστική ανάλυση των δεδομένων για τη συγκεκριμένη ομάδα δειγμάτων, το Normality test απέτυχε. Παρ'όλα αυτά, τα δεδομένα υποβλήθηκαν σε ανάλυση διακύμανσης ANOVA (αντί για κάποιο μη παραμετρικό έλεγχο), η οποία ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων χοληστερόλης που απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο υγρό ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας των συγκεκριμένων στελεχών ( $P < 0,001$ ).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις μεταξύ των κανονικοποιημένων μετρήσεων των στελεχών αυτών με τη χρήση του Tukey test (σε επίπεδο σημαντικότητας  $p < 0,05$ ). Οι συγκρίσεις για τις οποίες βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται στον Πίνακα 20.

Πίνακας 20: Συγκρίσεις μεταξύ των κανονικοποιημένων μετρήσεων των υπόλοιπων στελεχών οι οποίες εμφάνισαν σημαντικές διαφορές ( $p < 0,05$ ), με τη χρήση του Tukey test.

<b>Σύγκριση μεταξύ των κανονικοποιημένων μετρήσεων των υπόλοιπων στελεχών <i>Lactobacillus spp.</i> που παρουσίασαν σημαντικές διαφορές (Tukey test)</b>					
Αποτελέσματα Tukey test (διάστημα εμπιστοσύνης $p < 0,05$ )					
στελέχη	<b>ANLB40</b> vs. <b>C50</b>	<b>ANLB40</b> vs. <b>C70</b>	<b>ANLB40</b> vs. <b>ANLB29</b>	<b>ANLB40</b> vs. <b>ANLB51</b>	<b>ANLB40</b> vs. <b>C51</b>
<b>P</b>	0,002	0,003	0,004	0,006	0,008
στελέχη	<b>ANLB40</b> vs. <b>ANLB38</b>	<b>ANLB40</b> vs. <b>ANLB23</b>	<b>ANLB40</b> vs. <b>ANLB47</b>	<b>ANLB40</b> vs. <b>ANLB48</b>	<b>ANLB18</b> vs. <b>C50</b>
<b>P</b>	0,014	0,020	0,025	0,040	0,013
στελέχη	<b>ANLB18</b> vs. <b>C70</b>	<b>ANLB18</b> vs. <b>ANLB29</b>	<b>ANLB18</b> vs. <b>ANLB51</b>		
<b>P</b>	0,027	0,037	0,047		

Παρατηρώ ότι, όταν λαμβάνεται υπόψιν η ξηρή βιομάζα των βακτηρίων, το στέλεχος AnLB40 παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές, ως προς την συγκέντρωση χοληστερόλης που

απομάκρυνε από το υπερκείμενο ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας, σε σχέση με τα στελέχη C1, C50, C70, AnLB23, AnLB29, AnLB38, AnLB47, AnLB48 και AnLB51. Το AnLB18 παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απομάκρυνε από το υπερκείμενο ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας σε σχέση με τα στελέχη C50, C70, AnLb 29 και AnLb 51. Ωστόσο, όταν το AnLB18 είχε συγκριθεί με το ανεμβολίαστο-control ως προς τη συγκέντρωση της χοληστερόλης που απομάκρυνε από το μέσο καλλιέργειας, δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά, όπως είχα παρατηρήσει στον πίνακα 14.

Επίσης, παρατηρώ ότι ενώ τα στελέχη AnLb 40, AnLb 44 και AnLb 48 εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απομάκρυναν από το μέσο καλλιέργειας σε σύγκριση με το ανεμβολίαστο-control (πίνακας 14), όταν λήφθηκε υπόψη η ξηρή βιομάζα των βακτηρίων, τα αποτελέσματα διέφεραν. Μόνο το στέλεχος AnLb 40 εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση χοληστερόλης που απομάκρυνε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας σε σύγκριση με τα υπόλοιπα στελέχη (πίνακας 20). Αυτό σημαίνει ότι το στέλεχος AnLb 40 έχει προσλάβει χοληστερόλη σε σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα από τα στελέχη C50, C70, AnLb 29, AnLb 51, C51, AnLb 38, AnLb 23 και AnLb 47. Μάλιστα, φαίνεται να διαφέρει σημαντικά και ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης που αφομοίωσε σε σύγκριση με το στέλεχος AnLb 48, το οποίο αφομοίωσε επίσης σημαντικό μέρος της χοληστερόλης του καλλιεργητικού μέσου, όταν συγκρίθηκε με το ανεμβολίαστο (Πίνακας 14).

Αντίστοιχα, το στέλεχος AnLb18 φαίνεται να αφομοιώνει σημαντική ποσότητα χοληστερόλης όταν συγκρίνεται με τα στελέχη C50, C70, AnLb 29 και AnLb 51 (πίνακας 20). Αυτό πιθανώς να υποδεικνύει ότι αφομοιώνει χοληστερόλη κοντά στα επίπεδα του AnLb40.

Αν συγκρίνω τις κανονικοποιημένες μετρήσεις όλων των υπό μελέτη στελεχών μεταξύ τους με την χρήση της δοκιμής ANOVA (παρότι το Normality test απέτυχε), προκύπτουν κάποιες στατιστικά σημαντικές διαφορές ( $p < 0,005$ ). Ακολούθως, γίνονται όλες οι συγκρίσεις ανά δύο με τη χρήση του Tukey test, όπου παρατηρούμε πως τα στελέχη AnLB40, AnLB16 και AnLB18, διαφέρουν σημαντικά από κάποια άλλα στελέχη. Συγκεκριμένα, το στέλεχος AnLb 40 εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές και με κάποια στελέχη *L. rhamnosus*, *L. gasseri* και *L. acidophilus* (Πίνακας 21), ενώ δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με το στέλεχος

AnLb 48. Ακόμη, φαίνεται ότι και τα στελέχη AnLb 16 και AnLb 18 απομακρύνουν στατιστικά σημαντική ποσότητα χοληστερόλης.

Πίνακας 21: Σύγκριση των κανονικοποιημένων μετρήσεων μεταξύ του AnLb 40 και όλων των υπό μελέτη στελεχών με τα οποία παρουσίασαν σημαντικές διαφορές, με τη χρήση του Tukey test ( $p < 0.05$ ).

<b>Σύγκριση μεταξύ των κανονικοποιημένων μετρήσεων μεταξύ AnLb 40 και όλων των υπό μελέτη στελεχών που παρουσίασαν σημαντικές διαφορές</b>					
Αποτελέσματα Tukey test (διάστημα εμπιστοσύνης $p < 0,05$ )					
<b>στελέχη</b>	<b>ANLB40 vs. C50</b>	<b>ANLB40 vs. C70</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB29</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB51</b>	<b>ANLB40 vs. C51</b>
<b>P</b>	< 0,001	0,002	0,004	0,005	0,008
<b>στελέχη</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB38</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB23</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB47</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB48</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB6</b>
<b>P</b>	0,017	0,028	0,038	όχι	< 0,001
<b>στελέχη</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB1</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB10</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB17</b>	<b>ANLB40 vs. C5</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB9</b>
<b>P</b>	0,002	0,002	0,004	0,006	0,007
<b>στελέχη</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB46</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB52</b>	<b>ANLB40 vs. C58</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB15</b>	<b>ANLB40 vs. ANLB11</b>
<b>P</b>	0,010	0,012	0,013	0,018	0,032

Το στέλεχος AnLb 40 εμφανίζει στατιστικά σημαντικές διαφορές ως προς τη χοληστερόλη που απομάκρυνε ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας με τα στελέχη C50, C70, AnLb 29, AnLb 51, C51, AnLb 38, AnLb 23, AnLb 47, AnLb 6, AnLb1, AnLb 10, AnLb 17, AnLb9, AnLb 46, AnLb 52, AnLb

15, AnLb 11, C5 και C58, απομακρύνει δηλαδή μεγαλύτερη ποσότητα χοληστερόλης από το καλλιεργητικό μέσο σε σύγκριση με αυτά.

Πίνακας 22: Σύγκριση των κανονικοποιημένων μετρήσεων μεταξύ του AnLb 16 και AnLb 18 και όλων των υπό μελέτη στελεχών με τα οποία παρουσίασαν σημαντικές διαφορές, με τη χρήση του Tukey test ( $p < 0.05$ ).

<b>Σύγκριση μεταξύ των κανονικοποιημένων μετρήσεων των AnLb 16 και AnLb 18 και όλων των υπό μελέτη στελεχών που παρουσίασαν σημαντικές διαφορές</b>					
Αποτελέσματα Tukey test (διάστημα εμπιστοσύνης $p < 0,05$ )					
<b>στελέχη</b>	<b>ANLB16</b> <b>vs.</b> <b>C50</b>	<b>ANLB16</b> <b>vs.</b> <b>C70</b>	<b>ANLB16</b> <b>vs.</b> <b>ANLB29</b>	<b>ANLB16</b> <b>vs.</b> <b>ANLB51</b>	<b>ANLB16</b> <b>vs.</b> <b>C51</b>
<b>P &lt; 0,005</b>	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι
<b>στελέχη</b>	<b>ANLB16</b> <b>vs.</b> <b>ANLB6</b>	<b>ANLB16</b> <b>vs.</b> <b>ANLB1</b>	<b>ANLB16</b> <b>vs.</b> <b>ANLB10</b>	<b>ANLB16</b> <b>vs.</b> <b>ANLB17</b>	<b>ANLB16</b> <b>vs.</b> <b>C5</b>
<b>P &lt; 0,005</b>	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι
<b>στελέχη</b>	<b>ANLB16</b> <b>vs.</b> <b>ANLB9</b>	<b>ANLB16</b> <b>vs.</b> <b>ANLB46</b>	<b>ANLB16</b> <b>vs.</b> <b>ANLB52</b>		
<b>P &lt; 0,005</b>	ναι	ναι	ναι		
<b>στελέχη</b>	<b>ANLB18</b> <b>vs.</b> <b>C50</b>	<b>ANLB18</b> <b>vs.</b> <b>C70</b>	<b>ANLB18</b> <b>vs.</b> <b>ANLB6</b>	<b>ANLB18</b> <b>vs.</b> <b>ANLB1</b>	<b>ANLB18</b> <b>vs.</b> <b>ANLB10</b>
	ναι	ναι	ναι	ναι	ναι

Όταν πραγματοποιείται σύγκριση στο σύνολο των υπό μελέτη στελεχών, το στέλεχος AnLb 16 απομακρύνει στατιστικά σημαντική ποσότητα χοληστερόλης σε σχέση με τα στελέχη C50, C70, AnLb29, AnLb51, C51, AnLb6, AnLb1, AnLb10, AnLb17, C5, AnLb9, AnLb46 και AnLb52. Αντίστοιχα, το στέλεχος AnLb 18 απομακρύνει στατιστικά σημαντική ποσότητα χοληστερόλης σε σχέση με τα στελέχη C50, C70, AnLb6, AnLb1 και AnLb10.

## ΚΕΦ 4: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα υψηλά ποσοστά νοσηρότητας και θνησιμότητας των καρδιαγγειακών παθήσεων (CVD) έχουν καταστήσει επιτακτική την ανάγκη αναζήτησης εναλλακτικών επιλογών θεραπείας, όπως αυτή των συμπληρωμάτων διατροφής, στην στρατηγική πρόληψης και θεραπείας της υπερχοληστερολαιμίας (Bendali, Kerdouche, Hamma-Faradji, & Drider, 2017). Τα λειτουργικά τρόφιμα που περιέχουν προβιοτικά στελέχη θα μπορούσαν να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου μέσω των μηχανισμών με τους οποίους κάποια προβιοτικά στελέχη μπορούν να απομακρύνουν την χοληστερόλη (Miremadi, Ayyash, Sherkat, & Stojanovska, 2014).

Ένας από τους μηχανισμούς αυτούς αφορά τη μείωση της απορρόφησης της χοληστερόλης από τον εντερικό αυλό με τη δράση προβιοτικών στελεχών που αποτελούν μέρος του εντερικού μικροβιόκοσμου του ανθρώπου (Miremadi, Ayyash, Sherkat, & Stojanovska, 2014). Αρκετές *in vitro* μελέτες έχουν διεξαχθεί προκειμένου να αξιολογήσουν την ικανότητα των βακτηριακών στελεχών του γένους *Lactobacillus* να απομακρύνουν χοληστερόλη από το μέσο στο οποίο αναπτύσσονται (Tomago-Duchesneau, Jones, Shah, Jain, Saha, & Prakash, 2014; Lim, Lim, & Ramasamy, 2017; Syakila, Lim, Agatonovic-Kustrin, Lim, & Ramasamy, 2019). Έχει λοιπόν προταθεί ότι η *in vitro* απομάκρυνση της χοληστερόλης μπορεί να οφείλεται:

- σε αφομοίωση της χοληστερόλης από τα αναπτυσσόμενα βακτηριακά κύτταρα (βλ. Πίνακα 3),
- σε σύνδεση της χοληστερόλης με τις κυτταρικές μεμβράνες των κυττάρων (Kimoto, Ohmoto, & Okamoto, Cholesterol removal from media by lactococci, 2002) και
- σε συγκαταβύθιση της χοληστερόλης με αποσυζευγμένα χολικά άλατα, εφόσον το βακτηριακό στέλεχος καλλιεργείται παρουσία χολικών αλάτων και διαθέτει δραστικότητα ενζύμου υδρολάσης χολικών αλάτων (BSH) (Klaver & Meer, 1993).

Στο πείραμα αφομοίωσης της χοληστερόλης, τα στελέχη που εμφάνισαν τη μεγαλύτερη στατιστικά σημαντική απομάκρυνση χοληστερόλης από το καλλιεργητικό μέσο σε σύγκριση με το ανεμβολίαστο-control θρεπτικό μέσο ήταν τα AnLb 40 (*Lactobacillus delbrueckii delbrueckii*), AnLb 44 (*Lactobacillus salivarius*) και AnLb 48 (*Lactobacillus plantarum*). Αυτό σημαίνει ότι τα συγκεκριμένα στελέχη μπορούν να θεωρηθούν ικανά να προσλαμβάνουν ένα σημαντικό μέρος

της χοληστερόλης από το καλλιεργητικό μέσο όταν καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό MRS παρουσία χολικών αλάτων.

Πράγματι, το στέλεχος *Lactobacillus plantarum* έχει προταθεί ως ένα από τα πλέον υποσχόμενα στελέχη λακτοβακίλλων με ικανότητα *in vitro* απομάκρυνσης χοληστερόλης, διαθέτοντας δραστικότητα ενζύμου υδρολάσης (Jones, Chen, Ouyang, Metz, & Prakash, 2004). Η παρουσία αποσυζευγμένων χολικών αλάτων έχει βρεθεί ότι αυξάνει τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, ενισχύοντας την αφομοίωση της χοληστερόλης από τα βακτηριακά κύτταρα (Lye, Rahmat-Ali, & Liang, Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract, 2010). Το στέλεχος *Lactobacillus plantarum* έχει βρεθεί αποτελεσματικό στην *in vitro* αφομοίωση της χοληστερόλης ακόμη κι όταν καλλιεργήθηκε απουσία χολικών αλάτων. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι η αφομοίωση της χοληστερόλης δεν εξαρτάται απόλυτα από τη δραστικότητα του ενζύμου BSH (Ramasamy, Abdullah, Wong, Karuthan, & Ho, 2010; Lim, Lim, & Ramasamy, 2017) και επομένως βακτηριακά στελέχη *Lactobacillus delbrueckii delbrueckii* και *Lactobacillus salivarius* μπορούν να θεωρηθούν ικανά να αφομοιώσουν χοληστερόλη ακόμη κι αν δε διαθέτουν το συγκεκριμένο ένζυμο.

Κανένα άλλο στέλεχος δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές όταν συγκρίθηκε με το ανεμβολίαστο δείγμα ως προς τη συγκέντρωση χοληστερόλης που απομάκρυνε από το καλλιεργητικό μέσο. Η διαφορά στην απομάκρυνση μεταξύ των στελεχών έχει συσχετιστεί με χημικές και δομικές διαφορές στη σύνθεση των πεπτιδογλυκανών του κυτταρικού τοιχώματος του κάθε στελέχους. Συνεπώς, η αφομοίωση της χοληστερόλης είναι ειδική για κάθε στέλεχος (Miremadi, Ayyash, Sherkat, & Stojanovska, 2014; Lim, Lim, & Ramasamy, 2017; Syakila, Lim, Agatonovic-Kustrin, Lim, & Ramasamy, 2019). Η αδυναμία αφομοίωσης της χοληστερόλης από τα στελέχη μπορεί να σχετίζεται ακόμη με διαφορετική ανοχή των στελεχών στην παρουσία των χολικών αλάτων (Syakila, Lim, Agatonovic-Kustrin, Lim, & Ramasamy, 2019).

Πρέπει οπωσδήποτε να σημειωθεί η μεγάλη διακύμανση μεταξύ των αποτελεσμάτων των επαναλήψεων του ίδιου δείγματος, τόσο για τα εμβολιασμένα όσο και για τα ανεμβολίαστα

δείγματα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από τη διενέργεια πειραματικών σφαλμάτων καθώς η κάθε επαναλήψη προέκυψε από ανεξάρτητο χειρισμό. Ακόμη, μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι παρουσία αιθανόλης, το διαλύμα *o*-rhtaldaldehyde solution αντιδρά με πρωτογενείς αμίνες σχηματίζοντας προϊόντα με υψηλό φθορισμό. Αυτό μπορεί να επηρεάσει τις μετρήσεις της φωτομέτρησης, παρέχοντας μη αξιόπιστα αποτελέσματα τόσο για τα εμβολιασμένα όσο και για τα ανεμβολίαστα δείγματα (Benson & Hare, 1975). Η ύπαρξη πειραματικού σφάλματος αντανακλάται και από τις αρνητικές τιμές κάποιων αποτελεσμάτων οι οποίες είναι πρακτικά αδύνατες. Η μεγάλη διακύμανση των επαναλήψεων μπορεί να οφείλεται τέλος σε συγκαταβύθιση της χοληστερόλης μαζί με αποσυζευγμένα χολικά άλατα, η οποία λαμβάνει χώρα όταν το pH του μέσου καλλιέργειας γίνεται μικρότερο από 5,5 (Begley, Hill, & Gahan, 2006). Δεδομένου ότι το πείραμα πραγματοποιήθηκε χωρίς έλεγχο του pH, είναι πιθανό μέρος της χοληστερόλης που υπήρχε στο καλλιεργητικό μέσο να συγκαταβυθίστηκε όταν το pH έπεσε κάτω από την τιμή του 5,5, λόγω βακτηριακής ζύμωσης και παραγωγής γαλακτικού οξέος και λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (Preter, Coormans, Rutgeerts, & Verbeke, 2006). Λόγω διακυμάνσεων στην ανάπτυξη των βακτηρίων μεταξύ των τριών επαναλήψεων, η ποσότητα της χοληστερόλης που συγκαταβυθίστηκε με τα χολικά οξέα σε κάθε βακτηριακή καλλιέργεια μπορεί να είναι διαφορετική.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης εμφανίζονται διαφορετικά, όταν λαμβάνεται υπόψιν η ξηρή βιομάζα των βακτηριακών κυττάρων. Το ίδιο συνέβη και στη μελέτη των Tomaro et al. το 2014 (Tomaro-Duchesneau, Jones, Shah, Jain, Saha, & Prakash, 2014). Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος AnLb16 (*L. acidophilus*) παρουσιάζει απομάκρυνση χοληστερόλης στατιστικά διαφορετική από τα υπόλοιπα στελέχη *L. acidophilus*, με εξαίρεση το στέλεχος DSMZ. Αυτό μας δείχνει ότι το AnLb16 πιθανότατα απομακρύνει χοληστερόλη στα ίδια επίπεδα με το στέλεχος DSMZ. Ωστόσο κανένα από τα δύο στελέχη δε φάνηκε να απομακρύνει σημαντικά επίπεδα χοληστερόλης όταν συγκρίθηκε με το ανεμβολίαστο.

Όσον αφορά τα στελέχη AnLb40, AnLb44 και AnLb48, μόνο το AnLb40 βρέθηκε να αφομοιώνει σημαντικά περισσότερη χοληστερόλη από κάποια βακτηριακά στελέχη, όταν λήφθηκε υπόψιν η ξηρή βιομάζα. Συγκεκριμένα, το AnLb40 αφομοίωσε στατιστικά σημαντικά περισσότερη χοληστερόλη από τα στελέχη C50, C70, AnLb 29, AnLb 51, C51, AnLb 38, AnLb 23, AnLb 47,

AnLb 6, AnLb1, AnLb 10, AnLb 17, AnLb9, AnLb 46, AnLb 52, AnLb 15, AnLb 11, C5 και C58 (Tukey test για το σύνολο των υπό μελέτη στελεχών), τα οποία αφομοίωσαν πολύ μικρότερη ποσότητα. Αντίστοιχα, τα στελέχη AnLb16 και AnLb18 φαίνεται να αφομοιώνουν σημαντική ποσότητα χοληστερόλης όταν γίνεται σύγκριση μεταξύ του συνόλου των υπό μελέτη στελεχών. Αυτό πιθανώς να υποδεικνύει ότι αφομοιώνουν χοληστερόλη κοντά στα επίπεδα του AnLb40. Ενδιαφέρον προκαλούν τα στελέχη AnLb44 και AnLb48 για τα οποία όταν λαμβάνεται υπόψιν η ξηρή βιομάζα, δεν εμφανίζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην αφομοιωμένη χοληστερόλη σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στη μεγάλη διακύμανση των μετρήσεων για τα AnLb44 και AnLb48.

Συμπερασματικά, όταν τα στελέχη συγκρίνονται με το ανεμβολίαστο-control, τα στελέχη AnLb40, AnLb44 και AnLb48 εμφανίζονται ως τα περισσότερο ικανά να αφομοιώσουν σημαντικό μέρος της χοληστερόλης του καλλιεργητικού μέσου. Ειδικά για το στέλεχος AnLb40, η ικανότητα αφομοίωσης φαίνεται να διατηρείται όταν λαμβάνεται υπόψιν η ξηρή βιομάζα των βακτηριακών κυττάρων, κάτι που δε συμβαίνει για τα AnLb44 και AnLb48. Η απομάκρυνση της χοληστερόλης ανά γραμμάριο ξηρής βιομάζας παρουσιάζει στατιστικά σημαντικές διαφορές, με το AnLb40 να αφομοιώνει το μεγαλύτερο ποσό χοληστερόλης και το AnLb18 να αφομοιώνει χοληστερόλη σε σημαντικά επίπεδα. Ωστόσο, οι μεγάλες διακυμάνσεις που υπάρχουν μεταξύ των τριών επαναλήψεων, μας κάνει λίγο διστακτικούς απέναντι στην ασφαλή ιεράρχηση των στελεχών ως προς την απομάκρυνση χοληστερόλης. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την ανάγκη διεξαγωγής περισσότερων επαναλήψεων για κάθε στέλεχος προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί το πειραματικό σφάλμα και να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα και η αξιοπιστία της μεθόδου.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θα μπορούσαν να παρέχουν μια πρώτη προσέγγιση για την ανίχνευση υποψήφιων προβιοτικών στελεχών με ιδιότητες απομάκρυνσης χοληστερόλης από το μέσο καλλιέργειας. Περισσότερες *in vitro* μελέτες απαιτούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ικανότητας αφομοίωσης της χοληστερόλης από στελέχη λακτοβακίλλων και την ανίχνευση των πιθανών μηχανισμών αφομοίωσης, με τη χρήση καλλιεργητικών μέσων που προσομοιάζουν τις εντερικές συνθήκες, τον αυστηρό έλεγχο των συνθηκών ανάπτυξης και του pH και τη διενέργεια πολλών επαναλήψεων για το κάθε υπό

μελέτη στέλεχος με σκοπό τη διεξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων. Η αξιολόγηση των ιδιοτήτων μείωσης της χοληστερόλης *in vitro* αποτελεί σημαντικό κριτήριο στην επιλογή βακτηριακών στελεχών για περαιτέρω *in vivo* προβιοτικές δοκιμές (Tomago-Duchesneau, Jones, Shah, Jain, Saha, & Prakash, 2014).

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahn, Y., Kim, G., Lim, K., Baekc, Y., & Kim, H. (2003). Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *International Dairy Journal*, 13(4), 303–311.
- Albano, C., Morandi, S., Silvetti, T., Casiraghi, M., Manini, F., & Brasca, M. (2018). Lactic acid bacteria with cholesterol-lowering properties for dairy applications: In vitro and in situ activity. *Journal of Dairy Science*, 101(12), 10807-10818.
- Al-Saleh, A., Metwalli, A., & Abu-Tarboush, H. (2006). Bile Salts and Acid Tolerance and Cholesterol Removal from Media by some Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Journal of the Saudi Society for Food & Nutrition*, 1(1).
- Anandharaj, M., & Sivasankari, B. (2014). Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(2), 153-159.
- Antharam, V., McEwen, D., Garrett, T., Dossey, A., Li, E., Kozlov, A., et al. (2016). An Integrated Metabolomic and Microbiome Analysis Identified Specific Gut Microbiota Associated with Fecal Cholesterol and Coprostanol in *Clostridium difficile* Infection. *PLoS One*, 11(2).
- Asan-Ozusaglam, M., & Gunyakti, A. (2018). *Lactobacillus fermentum* strains from human breast milk with probiotic properties and cholesterol-lowering effects. *Food Science and Biotechnology*, 28(2), 501-509.
- Azad, M., Sarker, M., Li, T., & Yin, J. (2018). Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *BioMed research international*, 2018(9478630).
- Bana, B., & Cabreiro, F. (2019). The Microbiome and Aging. *Annual Review of Genetics*, 53, 239-261.
- Begley, M., Hill, C., & Gahan, C. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729-1738.
- Bendali, F., Kerdouche, K., Hamma-Faradji, S., & Drider, D. (2017). In vitro and in vivo cholesterol lowering ability of *Lactobacillus pentosus* KF923750. *Beneficial Microbes*, 8(2), 271-280.
- Benson, J., & Hare, P. (1975). O-phthalaldehyde: fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 619–622.

- Bosch, M., Fuentes, M., Audivert, S., Bonachera, M., Peiró, S., & Cuñé, J. (2014). *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529: probiotic candidates to reduce cholesterol levels. *Journal of the science of food and agriculture*, *94*(4), 803-809.
- Cadieux, P., Wind, A., Sommer, P., Schaefer, L., Crowley, K., Britton, R., et al. (2008). Evaluation of reuterin production in urogenital probiotic *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(15), 4645-4649.
- Chiang, Y.-R., Ismail, W., Heintz, D., Schaeffer, C., Dorsselaer, A., & Fuchs, G. (2008). Study of anoxic and oxic cholesterol metabolism by *Sterolibacterium denitrificans*. *Journal of Bacteriology*, *190*(3), 905-914.
- Cho, Y., & Kim, J. (2015). Effect of Probiotics on Blood Lipid Concentrations: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Medicine*, *94*(43), e1714.
- Corzo, G., & Gilliland, S. (1999). Measurement of bile salt hydrolase activity from *Lactobacillus acidophilus* based on disappearance of conjugated bile salts. *Journal of Dairy Science*, *82*(3), 466-471.
- Crovesy, L., Ostrowski, M., Ferreira, D., Rosado, E., & Soares-Mota, M. (2017). Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials. *International Journal of Obesity*, *41*(11), 1607-1614.
- Culpepper, T., Rowe, C., Rusch, C., Burns, A., Federico, A., Girard, S.-A., et al. (2019). Three probiotic strains exert different effects on plasma bile acid profiles in healthy obese adults: randomised, double-blind placebo-controlled crossover study. *Beneficial Microbes*, *10*(5), 497-509.
- Devi, S., & Halami, P. (2019). Genetic Variation of pln Loci Among Probiotic *Lactobacillus plantarum* Group Strains with Antioxidant and Cholesterol-Lowering Ability. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *11*(1), 11-22.
- Dominguez-Bello, M., Godoy-Vitorino, F., Knight, R., & Blaser, M. J. (2019). Role of the microbiome in human development. *Gut*, *68*(6), 1108-1114.
- Doron, S., & Snyderman, D. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, *60*(2), 129-134.
- Dudek-Wicher, R., Junka, A., Paleczny, J., & Bartoszewicz, M. (2020). Clinical Trials of Probiotic Strains in Selected Disease Entities. *International Journal of Microbiology*, *2020*, 1-8.

- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., et al. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 386-392.
- Efrati, H., Rottem, S., & Razin, S. (1981). Lipid and protein membrane components associated with cholesterol uptake by Mycoplasmas. *Biochimica et Biophysica Acta*, 641(2), 386-394.
- Fuentes, M., Lajo, T., Carrión, J., & Cuñé, J. (2013). Cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolaemic adults. *The British Journal of Nutrition*, 109(10), 1866-1872.
- Fukushima, M., & Nakano, M. (1996). Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat- and cholesterol-enriched diet. *The British Journal of Nutrition*, 76(6), 857-867.
- Gilliland, F., Mahler, R., Hunt, W., & Davis, S. (1999). Preventive health care among rural American Indians in New Mexico. *Preventive Medicine*, vol. 28, no. 2, pp. , 28(2), 194-202.
- Gilliland, S., Nelson, C., & Maxwell, C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(2), 377-381.
- Gopalakrishnan, V., Helmink, B., Spencer, C., Reuben, A., & Wargo, J. A. (2018). The Influence of the Gut Microbiome on Cancer, Immunity, and Cancer Immunotherapy. *Cancer Cell*, 33(4), 570-580.
- Górska, A., Przystupski, D., Niemczura, M., & Kulbacka, J. (2019). Probiotic Bacteria: A Promising Tool in Cancer Prevention and Therapy. *Current Microbiology*, 76(8), 939-949.
- Grill, J., Cayuela, C., Antoine, J., & Schneider, F. (2000). Isolation and characterization of a *Lactobacillus amylovorus* mutant depleted in conjugated bile salt hydrolase activity: relation between activity and bile salt resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 89(4), 553-563.
- Grunewald, K. (1982). Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Food Science*, 47, 2078-2079.
- Guo, C., Zhang, L., Han, X., Li, J., Du, M., Yi, H., et al. (2011). A sensitive method for qualitative screening of bile salt hydrolase-active lactobacilli based on thin-layer chromatography. *Journal of Dairy Science*, 94(4), 1732-1737.

- Guo, C.-F., Zhang, S., Yuan, Y.-H., Li, J.-Y., & Yue, T.-L. (2018). Bile Salt Hydrolase and S-Layer Protein are the Key Factors Affecting the Hypocholesterolemic Activity of Lactobacillus casei-Fermented Milk in Hamsters. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(24).
- Horáčková, Š., Plocková, M., & Demnerová, K. (2018). Importance of microbial defence systems to bile salts and mechanisms of serum cholesterol reduction. *Biotechnology Advances*, 36(3), 682-690.
- Howles, P. (2016). Cholesterol Absorption and Metabolism. *Methods in Molecular Biology*, 1438, 177-197.
- Hu, P.-L., Yuan, Y.-H., Yue, T.-L., & Guo, C.-F. (2018). A new method for the in vitro determination of the bile tolerance of potentially probiotic lactobacilli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(4), 1903-1910.
- Huang, Y., & Zheng, Y. (2010). The probiotic Lactobacillus acidophilus reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells. *The British Journal of Nutrition*, 103(4), 473-478.
- Huang, Y., Wang, J., Cheng, Y., & Zheng, Y. (2010). The hypocholesterolaemic effects of Lactobacillus acidophilus American type culture collection 4356 in rats are mediated by the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1. *The British Journal of Nutrition*, 104(6), 807-812.
- Islam, S. U. (2016). Clinical Uses of Probiotics. *Medicine*, 95(5), 2658.
- Jain, S., Yadav, H., & Sinha, P. (2009). Antioxidant and cholesterol assimilation activities of selected lactobacilli and lactococci cultures. *The Journal of Dairy Research*, 76(4), 385-391.
- Jandhyala, S., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, 21(29), 8787-8803.
- Javanmard, A., Ashtari, S., Sabet, B., Davoodi, S., Rostami-Nejad, M., Akbari, M., et al. (2018). Probiotics and their role in gastrointestinal cancers prevention and treatment; an overview. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 11(4), 284-295.
- Jones, M., Chen, H., Ouyang, W., Metz, T., & Prakash, S. (2004). Microencapsulated Genetically Engineered Lactobacillus plantarum 80 (pCBH1) for Bile Acid Deconjugation and Its Implication in Lowering Cholesterol. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2004(1), 61-69.

- Jones, M., Martoni, C., & Prakash, S. (2012). Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 66(11), 1234-1241.
- Jones, M., Martoni, C., Parent, M., & Prakash, S. (2011). Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *British Journal of Nutrition*, 9, 1-9.
- Karr, S. (2017). Epidemiology and management of hyperlipidemia. *The American Journal of Managed Care*, 23(9), 139-148.
- Khare, A., & Gaur, S. (2020). Cholesterol-Lowering Effects of *Lactobacillus* Species. *Current Microbiology*, 77(4), 638-644.
- Kimoto, H., Ohmomo, S., & Okamoto, T. (2002). Cholesterol removal from media by lactococci. *Journal of Dairy Science*, 85(12), 3182-3188.
- Klaver, F., & Meer, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 1120-1124.
- Kotsou, M., Mitsou, E., Oikonomou, I., & Kyriacou, A. (2008). In Vitro Assessment of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains from Infant Gut Microflora. *Food Biotechnology*, 22(1), 1-17.
- Kozakova, H., Schwarzer, M., Tuckova, L., Srutkova, D., Czarnowska, E., Rosiak, I., et al. (2016). Colonization of germ-free mice with a mixture of three *Lactobacillus* strains enhances the integrity of gut mucosa and ameliorates allergic sensitization. *Cellular and Molecular Immunology*, 13(2), 251-262.
- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., et al. (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Experimental Diabetes Research*, 2012, 1-14.
- Kumar, R., Rajkumar, H., Kumar, M., Varikuti, S., Athimamula, R., Shujaiddin, M., et al. (2013). Molecular cloning, characterization and heterologous expression of bile salt hydrolase (Bsh) from *Lactobacillus fermentum* NCDO394. *Molecular Biology Reports*, 40(8), 5057-5066.
- Lim, F., Lim, S., & Ramasamy, K. (2017). *Pediococcus acidilactici* LAB4 and *Lactobacillus plantarum* LAB12 assimilate cholesterol and modulate ABCA1, CD36, NPC1L1 and SCARB1 in vitro. *Beneficial Microbes*, 8(1), 97-109.

- Lim, P., Loke, C., Ho, Y., & Tan, H. (2020). Cholesterol homeostasis associated with probiotic supplementation in vivo. *Journal of Applied Microbiology*, *129*(5), 1374-1388.
- Lin, S., Ayres, J., Winkler, W., & Sandine, W. (1989). Lactobacillus effects on cholesterol: in vitro and in vivo results. *Journal of Dairy Science*, *72*(11), 2885–2899.
- Liong, M., & Shah, N. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*, *88*(1), 55-66.
- Liong, M.-T., Dunshea, F., & Shah, N. (2007). Effects of a synbiotic containing Lactobacillus acidophilus ATCC 4962 on plasma lipid profiles and morphology of erythrocytes in hypercholesterolaemic pigs on high- and low-fat diets. *The British Journal of Nutrition*, *98*(4), 736-744.
- Ljungh, A., & Wadström, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, *7*(2), 73-89.
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., & Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, *8*(1), 51.
- Lopez-Santamarina, A., Lamas, A., Mondragón, A., Cardelle-Cobas, A., Regal, P., Rodriguez-Avila, J., et al. (2021). Probiotic Effects against Virus Infections: New Weapons for an Old War. *Foods*, *10*(1), 130.
- Lye, H.-S., Alias, K., Rusul, G., & Liong, M.-T. (2012). Ultrasound treatment enhances cholesterol removal ability of lactobacilli. *Ultrasonics Sonochemistry*, *19*(3), 632-641.
- Lye, H.-S., Rahmat-Ali, G., & Liong, M.-T. (2010). Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. *International Dairy Journal*, *20*(3), 0-175.
- Lye, H.-S., Rusul, G., & Liong, M.-T. (2010). Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *Journal of Dairy Science*, *93*(4), 1383-1392.
- Ma, C., Zhang, S., Lu, J., Zhang, C., Pang, X., & Lv, J. (2019). Screening for Cholesterol-Lowering Probiotics from Lactic Acid Bacteria Isolated from Corn Silage Based on Three Hypothesized Pathways. *International Journal of Molecular Science*, *20*(9), 2073.
- Malik, M., Suboc, T., Tyagi, S., Salzman, N., Wang, J., Ying, R., et al. (2018). Lactobacillus plantarum 299v Supplementation Improves Vascular Endothelial Function and Reduces Inflammatory Biomarkers in Men With Stable Coronary Artery Disease. *Circulation Research*, *123*(9), 1091-1102.
- Mann, G. (1977). A factor in yoghurt which lowers cholesterolemia in man . *Arthrosclerosis*, *26*, 335–340.

- Mann, G., & Spoerry, A. (1974). Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *American Journal of Clinical Nutrition*, 27(5), 464–469.
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9), 1021.
- McAuliffe, O., Cano, R., & Klaenhammer, T. (2005). Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environment Microbiology*, 71(8):4925-9.
- Michael, D., Moss, J., Calvente, D., Garaiova, I., Plummer, S., & Ramji, D. (2016). *Lactobacillus plantarum* CUL66 can impact cholesterol homeostasis in Caco-2 enterocytes. *Beneficial microbes*, 7(3), 443-451.
- Milani, C., Duranti, S., Bottacini, F., Casey, E., Turrone, F., Mahony, J., et al. (2017). The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(4).
- Miremedi, F., Ayyash, M., Sherkat, F., & Stojanovska, L. (2014). Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Journal of functional foods*, 9, 295-305.
- Mirlohi, M., Madany, G., Hassanzadeh, A., & Yahay, M. (2012). On the Colorimetric Method for Cholesterol Determination in the Laboratory Media. *International Journal of Biological Chemistry*, 6(1), 37-41.
- Mohan, J., Arora, R., & Khalilullah, M. (1990). Preliminary observations on effect of *Lactobacillus sporogenes* on serum lipid levels in hypercholesterolemic patients. *Indian Journal of Medical Research Section B*, 92, 431–432.
- Moser, S., & Savage, D. (2001). Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in *Lactobacilli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3476-3480.
- Moyes, R., Reynolds, J., & Breakwell, D. (2009). Differential staining of bacteria: gram stain. *Current Protocols in Microbiology*.
- Nakamura, F., Ishida, Y., Aihara, K., Sawada, D., Ashida, N., Sugawara, T., et al. (2016). Effect of fragmented *Lactobacillus amylovorus* CP1563 on lipid metabolism in overweight and mildly obese individuals: a randomized controlled trial. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 27, 30312.

- Nazir, Y., Hussain, S., Hamid, A., & Song, Y. (2018). Probiotics and Their Potential Preventive and Therapeutic Role for Cancer, High Serum Cholesterol, and Allergic and HIV Diseases. *Biomed Research International*.
- Noh, D., Kim, S., & Gilliland, S. (1997). Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Journal of Dairy Science*, *80*(12), 3107-3113.
- Ooi, L.-G., & Liong, M.-T. (2010). Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International journal of molecular sciences*, *11*(6), 2499-2522.
- Ouwehand, A., Nermes, M., Collado, M., Rautonen, N., Salminen, S., & Isolauri, E. (2009). Specific probiotics alleviate allergic rhinitis during the birch pollen season. *World Journal of Gastroenterology*, *15*(26), 3261-3268.
- Palaniyandi, S., Damodharan, K., Suh, J.-W., & Yang, S. (2020). Probiotic Characterization of Cholesterol-Lowering *Lactobacillus fermentum* MJM60397. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *12*(3), 1161-1172.
- Park, Y., Kim, M., Shim, K., Kim, Y.-I., Chu, J., Kim, B.-K., et al. (2020). Effects of *Lactobacillus plantarum* Q180 on Postprandial Lipid Levels and Intestinal Environment: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Parallel Trial. *Nutrients*, *12*(1), 255.
- Parvez, S., Kim, H.-Y., Lee, H.-C., & Kim, D.-S. (2006). Bile salt hydrolase and cholesterol removal effect by *Bifidobacterium bifidum* NRRL 1976. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *22*(5), 455–459.
- Pereira, D., & Gibson, G. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, *68*(9), 4689-4693.
- Pereira, G. V., Coelho, B., Magalhães Júnior, A., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. (2018). How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. *Biotechnology advances*, *36*(8), 2060-2076.
- Preter, V., Coopmans, T., Rutgeerts, P., & Verbeke, K. (2006). Influence of long-term administration of lactulose and *Saccharomyces boulardii* on the colonic generation of phenolic compounds in healthy human subjects. *Journal of the American College of Nutrition*, *25*(6), 541-549.
- Qian, Y., Li, M., Wang, W., Wang, H., Zhang, Y., Hu, Q., et al. (2019). Effects of *Lactobacillus Casei* YBJ02 on Lipid Metabolism in Hyperlipidemic Mice. *Journal of Food Science*, *84*(12), 3793-3803.

- Quigley, E. M. (2019). Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17(2), 333-344.
- Ramasamy, K., Abdullah, N., Wong, M., Karuthan, C., & Ho, Y. (2010). Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by Lactobacillus strains used as probiotics in chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(1), 65-69.
- Rani, R., Anandharaj, M., & Ravindran, A. (2017). Characterization of Bile Salt Hydrolase from Lactobacillus gasseri FR4 and Demonstration of Its Substrate Specificity and Inhibitory Mechanism Using Molecular Docking Analysis. *Frontiers of Microbiology*, 8, 1004.
- Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 30(1), 17-25.
- Ren, J., Sun, K., Wu, Z., Yao, J., & Guo, B. (2011). All 4 bile salt hydrolase proteins are responsible for the hydrolysis activity in Lactobacillus plantarum ST-III. *Journal of Food Science*, 76(9), 622-628.
- Rudel, L., & Morris, M. (1973). Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *Journal of Lipid Research*, 14(3), 364-366.
- Schröder, O., Rathner, W., Caspary, W., & Stein, J. (1996). Bile acid-induced increase of rat colonic apical membrane fluidity and proton permeability. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 34(6), 365-370.
- Seddik, H., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). Lactobacillus plantarum and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9, 111-122.
- Shafquat, A., Joice, R., Simmons, S., & Huttenhower, C. (2014). Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. *Trends in Microbiology*, 22(5), 261-266.
- Shahrokhi, M., & Nagalli, S. (2020, July 5). *Probiotics*. Retrieved January 2020, from StatPearls: <https://www.statpearls.com>
- Shokryazdan, P., Jahromi, M., Liang, J., & Ho, Y. (2017). Probiotics: From Isolation to Application. *Journal of the American College of Nutrition*, 36(8), 666-676.
- Singhal, N., Maurya, A., Mohanty, S., Kumar, M., & Viridi, J. (2019). Evaluation of Bile Salt Hydrolases, Cholesterol-Lowering Capabilities, and Probiotic Potential of Enterococcus faecium Isolated From Rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1567.
- SJOVALL, J. (1959). On the concentration of bile acids in the human intestine during absorption. Bile acids and steroids 74. *Acta Physiologica Scandinavica*, 46, 339-345.

- Smet, I., Hoorde, L., Woestyne, M., Christiaens, H., & Verstraete, W. (1995). Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *The Journal of Applied Bacteriology*, 79(3), 292-301.
- Su, D., Liang, L., Li, Z., Lin, Q., Peng, C., Lei, X., et al. (2020). Genome analysis of two *Lactobacillus plantarum* strains, LLY-606 and pc-26, for evaluating their potential as probiotics. *Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Sun, J., & Buys, N. (2015). Effects of probiotics consumption on lowering lipids and CVD risk factors: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of Medicine*, 47(6), 430-440.
- Syakila, R., Lim, S., Agatonovic-Kustrin, S., Lim, F., & Ramasamy, K. (2019). In vitro assessment of pediococci- and lactobacilli-induced cholesterol-lowering effect using digitally enhanced high-performance thin-layer chromatography and confocal microscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(6), 1181-1192.
- Taherian, M., Samadi, P., Rastegar, H., Faramarzi, M., Rostami-Nejad, M., Yazdi, M. H., et al. (2019). An Overview on Probiotics as an Alternative Strategy for Prevention and Treatment of Human Diseases. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 18(1), 31-50.
- Tahri, K., Grill, J., & Schneider, F. (1996). Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. *Current Microbiology*, 33(3), 187-193.
- Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T., & Mierau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *Journal of Dairy Science*, 82(12), 2530-2535.
- Taranto, M., Medici, M., Perdigon, G., Holgado, A., & Valdez, G. (1998). Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *Journal of Dairy Science*, 81(9), 2336–2340.
- Taylor, G., & Williams, C. (1998). Effects of probiotics and prebiotics on blood lipids. *British Journal of Nutrition*, 80(2), 225-230.
- Thumu, S., & Halami, P. (2020). In vivo safety assessment of *Lactobacillus fermentum* strains, evaluation of their cholesterol-lowering ability and intestinal microbial modulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10(2), 705-713.
- Thushara, R., Gangadaran, S., Solati, Z., & Moghadasian, M. (2016). Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies. *Food & Function*, 7(2), 632-642.
- Ticho, A., Malhotra, P., Dudeja, P., Gill, R., & Alrefai, W. (2019). Intestinal Absorption of Bile Acids in Health and Disease. *Comprehensive Physiology*, 10(1), 21-56.

- Tomaro-Duchesneau, C., Jones, M., Shah, D., Jain, P., Saha, S., & Prakash, S. (2014). Cholesterol assimilation by *Lactobacillus* probiotic bacteria: an in vitro investigation. *BioMed Research International*, 1-9.
- Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Malhotra, M., Jones, M., Rodes, L., & Prakash, S. (2015). *Lactobacillus fermentum* NCIMB 5221 and NCIMB 2797 as cholesterol-lowering probiotic biotherapeutics: in vitro analysis. *Beneficial Microbes*, 6(6), 861-869.
- Ursell, L., Metcalf, J., Wegener Parfrey, L., & Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*, 70(1), 38-44.
- Usman, & Hosono, A. (1999). Bile tolerance, taurocholate deconjugation, and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *Journal of dairy science*, 82(2), 243-8.
- Vinderola, C., & Reinheimer, J. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36, 895–904.
- Wang, G., Huang, W., Xia, Y., Xiong, h., & Ai, L. (2019). Cholesterol-lowering potentials of *Lactobacillus* strain overexpression of bile salt hydrolase on high cholesterol diet-induced hypercholesterolemic mice. *Food & Function*, 10(3), 1684-1695.
- Wang, J., Chu, B.-B., Ge, L., Li, B.-L., Yan, Y., & Song, B.-L. (2009). Membrane topology of human NPC1L1, a key protein in enterohepatic cholesterol absorption. *Journal of Lipid Research*, 50(8), 1653-1662.
- Wang, L., Guo, M.-J., Gao, Q., Yang, J.-F., Yang, L., Pang, X.-L., et al. (2018). The effects of probiotics on total cholesterol: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine*, 97(5).
- WGO. (2017). *Probiotics and Prebiotics*. World Gastroenterology Organisation.
- Wieërs, G., Belkhir, L., Enaud, R., Leclercq, S., Philippart de Foy, J.-M., Dequenne, I., et al. (2020). How Probiotics Affect the Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 454.
- Wilkins, T., & Sequoia, J. (2017). Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *American Family Physician*, 96(3), 170-178.
- Wu, Y., Zhang, Q., Ren, Y., & Ruan, Z. (2017). Effect of probiotic *Lactobacillus* on lipid profile: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *PloS One*, 12(6).
- Yamasaki, M., Minesaki, M., Iwakiri, A., Miyamoto, Y., Ogawa, K., Nishiyama, K., et al. (2020). *Lactobacillus plantarum* 06CC2 reduces hepatic cholesterol levels and modulates bile

- acid deconjugation in Balb/c mice fed a high-cholesterol diet. *Food Science & Nutrition*, 8(11), 6164-6173.
- Young, V. B. (2017). The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. *The BMJ*, 356, 831.
- Zhang, Z., Lv, J., Pan, L., & Zhang, Y. (2018). Roles and applications of probiotic Lactobacillus strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 8135–8143.
- Zuccotti, G., Meneghin, F., Raimondi, C., Dilillo, D., Agostoni, C., Riva, E., et al. (2008). Probiotics in clinical practice: an overview. *Journal of International Medical Research*, 36(1), 1-53.