



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γαλακτοκομίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

*Μεταβολή εντερικού περιεχομένου σε ζωικό μοντέλο μύων έπειτα από χορήγηση του
προβιοτικού στελέχους *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και μελέτη της δυναμικής
αντιφλεγμονώδους δράσης του στη δημιουργία αθηρωματικών πλακών*

Δήμητρα Κ. Λαλή
Κτηνίατρος

Επιβλέπουσα: Καθ. Τσακαλίδου Έφη, ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2019



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Γαλακτοκομίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

*Μεταβολή εντερικού περιεχομένου σε ζωικό μοντέλο μυών έπειτα από χορήγηση του
προβιοτικού στελέχους *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και μελέτη της δυναμικής
αντιφλεγμονώδους δράσης του στη δημιουργία αθηρωματικών πλακών*

Msc Thesis

*Modulation of gut microbiota in Apo-E^{-/-} mice after the administration of *Lactobacillus
fermentum* ACA-DC 179 and study of its potential antiinflammatory action against
atherosclerotic plaque formation*

Δήμητρα Κ. Λαλή
Κτηνίατρος

Τριμελής Επιτροπή
Καθ. Τσακαλίδου Έφη, ΓΠΑ (Επιβλέπουσα)
Ειδικός Λειτουργικός Επιστήμονας Α' Δρ. Κωστομητσόπουλος Νικόλαος, ΙΠΒΕΑΑ (Μέλος)
Αναπλ. Καθ. Πανάγου Ευστάθιος, ΓΠΑ (Μέλος)

ΑΘΗΝΑ 2019

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής. Θα ξεκινήσω από την επιβλέπουσα της παρούσας διατριβής Καθ. Έφη Τσακαλίδου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ξεχωριστή ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ υπό την επίβλεψή της για την εκπόνηση αυτής της μελέτης. Την ευχαριστώ ιδιαίτερος για την έμπνευση, τη συνεχή παρουσία και τη ξεχωριστή παρέμβαση και καθοδήγησή της, ακόμα και στις πιο δύσκολες στιγμές αυτής της διατριβής και το κίνητρο που μου έδινε για να προχωρήσω.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Ειδικό Λειτουργικό Επιστήμονα Α' Δρ. Νικόλαο Κωστομητσόπουλο, προιστάμενο του Τομέα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ) και υπεύθυνο κτηνίατρο του Κέντρο Πειραματικής Χειρουργικής του Ιδρύματος που με εμπιστεύτηκε και μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ μαζί του σε ιδανικές συνθήκες και σε ένα πρότυπο ερευνητικό Ίδρυμα, μέσα στο οποίο είχα τη δυνατότητα να κάνω τα πρώτα μου ερευνητικά βήματα και να δουλέψω δίπλα σε εξαιρετικούς επιστήμονες-ερευνητές. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγησή του και την κύρια παρέμβασή του στις δύσκολες στιγμές εκπόνησης αυτής της διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθ. Ευστάθιο Πανάγου που μου έκανε την τιμή να είναι μέλος της Τριμελούς Επιτροπής και να συμμετέχει με τις καίριες παρατηρήσεις του στην κρίση της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στην κ. Γεωργία Ζουμποπούλου από το Εργαστήριο Γαλακτοκομίας που με την αμέριστη βοήθεια, την καθοδήγηση και την οργανωτικότητά της με βοήθησε τόσο καθοριστικά σε όλες τις φάσεις της πειραματικής διαδικασίας. Με τις γνώσεις, την κατάρτιση και την καθοδήγησή της συνέβαλε ουσιαστικά και καθοριστικά στην έκβαση και την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για τις ώρες που αφιέρωσε δουλεύοντας μαζί μου στο Εργαστήριο και ήταν πάντα δίπλα μου σε κάθε φάση του πειράματος, αφιερώνοντας πολύτιμο χρόνο και κόπο για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω την αμέριστη βοήθεια και συμβολή της κ. Ράνιας Αναστασίου, της κ. Μαρίνας Γεωργαλάκη και της κ. Μαρίας Κάζου του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας στην εξέλιξη της πειραματικής διαδικασίας της διατριβής μου, οι οποίες ήταν πάντα πρόθυμες να συμβάλουν με τις γνώσεις και την κατάρτισή τους είτε στις μοριακές μεθόδους που χρησιμοποιήσαμε είτε στις μικροβιολογικές αναλύσεις που απαιτούνταν.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εξάιρετο καρδιολόγο κ. Νίκο Καδόγλου, ο οποίος συνέβαλε καθοριστικά με τις γνώσεις, την κατάρτιση και τις παρατηρήσεις του στο στήσιμο του ερευνητικού μου πρωτοκόλλου και με βοήθησε να κατανοήσω σημαντικές πτυχές της αθηροσκλήρωσης, της καρδιαγγειακής νόσου που μελέτησα στη μεταπτυχιακή μου διατριβή.

Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω τη συμβολή της κ. Άννας Αγαπάκη, της ιστολόγου από το Τμήμα Ιστοχημείας του ΙΒΕΑΑ, η οποία με βοήθησε με τις ιστολογικές τομές των δειγμάτων αορτικού τόξου και βαλβίδας των ζώων. Την ευχαριστώ θερμά για τις ώρες εργασίας και την υποστήριξή της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μικροβιολόγο του Ναυτικού Νοσοκομείου Αθηνών κ. Εμμανουήλ Κωνσταντάκη, ο οποίος με βοήθησε στην ανάλυση των ορών αίματος. Η συμβολή του ήταν καθοριστική για την έκβαση του πειράματός μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη στήριξη και τη συμπαράστασή τους καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο.

Περίληψη

Σκοπός: Το αντικείμενο της παρούσας εργασίας ήταν η χορήγηση του προβιοτικού στελέχους *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 σε ζωικό μοντέλο μυών με σκοπό τη μελέτη των μεταβολών της εντερικής μικροχλωρίδας, καθώς και την αντιφλεγμονώδη δράση του σε κατάσταση ήπιας αθηρωμάτωσης.

Υλικά και μέθοδοι: Στα αρχικά πειράματα, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση και τυποποίηση του προβιοτικού στελέχους με τη χρήση μιας φαινοτυπικής και δύο μοριακών μεθόδων [ζύμωση υδατανθράκων (API test), species-specific PCR και RAPD-PCR], χρησιμοποιώντας για το σκοπό αυτό και άλλα δύο στελέχη της συλλογής του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (*L. fermentum* ACA-DC 2882, και *L. fermentum* ACA-DC 4010T). Επίσης, μελετήθηκε η επιβίωση και η σταθερότητα ανάπτυξης του *L. fermentum* ACA-DC 179 σε συνθήκες ψύξης (4° C). Για την *in vivo* μελέτη χρησιμοποιήθηκε πληθυσμός Apolipoprotein E knockout μυών, ένα ζωικό μοντέλο που αναπτύσσει ήπια αθηροσκλήρωση. Εξήντα (60) μύες C57B/6 ηλικίας 12 εβδομάδων τυχαιοποιήθηκαν σε έξι (6) ομάδες των 8-10 ατόμων η καθεμία (n= 8-10). Η 1η ομάδα περιελάμβανε αρσενικά ζώα που διατρέφονταν με τυπική διαίτα (normal chow diet) και λάμβαναν παράλληλα χαμηλή δόση του μικροοργανισμού (10⁶ CFU/ημέρα), η 2η αρσενικά ζώα που διατρέφονταν με τυπική διαίτα και τους χορηγούνταν παράλληλα ο μικροοργανισμός σε υψηλή δόση (10⁹ CFU/ημέρα), η 3η θηλυκά ζώα που διατρέφονταν με τυπική διαίτα και λάμβαναν παράλληλα χαμηλή δόση του μικροοργανισμού (10⁶ CFU/ημέρα), η 4η θηλυκά ζώα που διατρέφονταν με τυπική διαίτα και λάμβαναν παράλληλα τον μικροοργανισμό σε υψηλή δόση (10⁹ CFU/ημέρα), η 5η ομάδα αρσενικά ζώα που διατρέφονταν με τυπική διαίτα (control group 1), χωρίς να λαμβάνουν τον μικροοργανισμό και η 6η θηλυκά ζώα που διατρέφονταν με τυπική διαίτα (control group 2) χωρίς να λαμβάνουν τον μικροοργανισμό. Το βάρος και η φυσική κατάσταση των ζώων εξετάζονταν μία φορά εβδομαδιαίως. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου για οκτώ ομάδες μικροοργανισμών (Total aerobes, Total anaerobes, *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Enterococcus* spp Total coliforms, *Staphylococcus* & *Micrococcus* spp, *Clostridium* spp) και συγκεκριμένα αναλύσεις κοπράνων ανά ομάδα ζώων σε 3 χρονικά σημεία (0 days- 30 days- 60 days) και αναλύσεις εντερικών περιεχομένων ανά ζώο στις 60 days σε δείγματα από λεπτό έντερο, τυφλό και κόλον. Πραγματοποιήθηκαν επίσης βιοχημικές αναλύσεις στον ορό του αίματος που λήφθηκε από τα ζώα κατά τη ευθανασία, όπου μελετήθηκαν οι εξής βιοχημικές παράμετροι: γλυκόζη, τριγλυκερίδια, ολική χοληστερόλη, λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας, λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας και το ένζυμο του ήπατος γ-γλουταμυλοτρανσφεράση. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν ιστολογικές αναλύσεις σε δείγματα αορτικού τόξου και αορτικής βαλβίδας που λήφθηκαν από τα ζώα κατά την ευθανασία και τα οποία βιάφτηκαν με τη χρώση αιματοξυλίνης/εωσίνης για τον εντοπισμό και αναγνώριση των αθηρωματικών αλλοιώσεων.

Αποτελέσματα: Οι μεταβολές στη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου δεν ήταν τόσο ευδιάκριτες μετά τη χορήγηση του προβιοτικού στελέχους. Παρατηρήθηκε αύξηση στον πληθυσμό των γαλακτοβακίλλων και των bifidobacteria και μείωση στο πληθυσμό των εντεροκόκκων σε αρσενικά και θηλυκά ζώα που λάμβαναν την υψηλή δόση σε σχέση με τα control.

Όσον αφορά στις ιστολογικές μεταβολές παρατηρήθηκε ελαφρά αισθητή διαφορά στο πάχος της αθηρωματικής πλάκας σε βαλβίδα και αορτή μεταξύ των control ζώων και εκείνων που λάμβαναν τη υψηλή δόση του μ/ο.

Αναφορικά με το βιοχημικό προφίλ των ζώων παρατηρήθηκε ενδεικτική αλλά ικανοποιητική εικόνα της μείωσης των βιοδεικτών που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση μετά τη χορήγηση του προβιοτικού για 60 ημέρες (μείωση ολικής CHOL και TG σε θηλυκά και TG σε αρσενικά ζώα).

Συμπεράσματα: Η μελέτη των προβιοτικών μικροοργανισμών καταδεικνύει τα σημαντικά οφέλη τους στους ξενιστές μέσω των μηχανισμών δράσης τους, μεταξύ των οποίων πολύ σημαντική αποδεικνύεται η τροποποίηση της εντερικής μικροχλωρίδας, όπως κατέδειξε και η χορήγηση του *L. fermentum* ACA-DC 179.

Η χορήγηση του *L. fermentum* ACA-DC 179 προκάλεσε ιστολογικές μεταβολές, ελαφρά αισθητές σε ζώα που λάμβαναν την υψηλή δόση του μ/ο τα οποία δεν παρουσίασαν αθηρωματικές πλάκες σε σχέση με τα ζώα που λάμβαναν τη χαμηλή δόση του μ/ο και τα control ζώα τα οποία εμφάνισαν αθηρωματικές πλάκες σε βαλβίδα και αορτή, η οποία καταδεικνύει μία ενδεικτική αντιαθηρωματική δράση του προβιοτικού στελέχους.

Το βιοχημικό προφίλ των ζώων έδειξε ότι η χορήγηση του μ/ο μειώνει τους βιοχημικούς δείκτες που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση μετά τη χορήγηση του προβιοτικού στελέχους για 60 ημέρες, με χαρακτηριστική τη μείωση της ολικής CHOL και TG σε θηλυκά και TG σε αρσενικά ζώα που λάμβαναν την υψηλή δόση του μ/ο σε σχέση με τα ζώα που λάμβαναν τη χαμηλή δόση του μ/ο και τα control ζώα.

Λέξεις-Κλειδιά: *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, εντερική μικροχλωρίδα, αθηροσκλήρωση, φλεγμονή

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου

Εργαστήριο Γαλακτοκομίας

Κέντρο Κλινικής, Πειραματικής Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας

Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ)

Abstract

Aim: The aim of the present study was to administer the probiotic strain *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 to an animal model of mice in order to study changes in the intestinal microflora and its anti-inflammatory effect in mild atherosclerosis.

Materials and methods: In the initial experiments, the probiotic strain was identified and standardized using a phenotypic and two molecular methods [carbohydrate fermentation (API test), species-specific PCR and RAPD-PCR], using two more strains of the Dairy Collection of Agricultural University of Athens (*L. fermentum* ACA-DC 2882, and *L. fermentum* ACA-DC 4010T). The survival and growth stability of *L. fermentum* ACA-DC 179 under cooling conditions (4° C) were also studied. For the *in vivo* study we used a population of Apolipoprotein E knockout mice, an animal model that develops mild atherosclerosis. Sixty (60) 12-week-old C57B / 6 mice were randomized to six (6) groups of 8-10 individuals each (n = 8-10). The first group consisted of animals fed with normal chow diet and received a low dose of microorganism (10⁶ CFU / day), the second group of male animals fed with normal chow diet and received a high dose of microorganism (10⁹ high-dose CFU / day), the third of female animals fed with normal chow diet and received a low dose of microorganism (10⁶ CFU / day), the fourth of female animals fed with normal chow diet and received the high dose microorganism (10⁹ CFU / day), the fifth group of male animals fed with normal chow diet (control group 1), without taking the microorganism and the sixth of female animals fed with normal chow diet (control group 2) without receiving the microorganism. The weight and physical condition of the animals were examined once a week. Microbial intestinal flora was analyzed for eight groups of microorganisms (Total aerobes, Total anaerobes, *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Enterococcus* spp, Total coliforms, *Staphylococcus* & *Micrococcus* spp., *Clostridium* spp in the feces at three different time points (0 days- 30 days- 60 days) and in the intestinal contents per animal at 60 days in samples of small intestine, cecum and colon. Biochemical analyses of blood serum obtained from all animals during euthanasia were also performed and the following biochemical parameters were studied: glucose, triglycerides, total cholesterol, high density lipoprotein, low density lipoprotein and γ -glutamyltransferase. Histological analyses were also performed on aortic arch and aortic valve specimens obtained from animals at euthanasia stained with hematoxylin/ eosin in order to identify atherosclerotic lesions

Results: Changes in microbial intestinal flora were not as prominent after administration of the probiotic strain. There was an increase in the population of lactobacilli and bifidobacteria and a decrease in the population of enterococci in male and female animals receiving the high dose compared to controls.

Regarding histological changes, a slight difference in the thickness of the atherosclerotic plaque and aorta was observed between the control animals and those receiving the high dose.

Regarding the biochemical profile of the animals, there was a satisfactory reduction in biomarkers associated with atherosclerosis after administration of the probiotic for 60 days (reduction in total CHOL and TG in females and TG in males).

Conclusions: The study of probiotic microorganisms demonstrates their significant benefits to the hosts through their mechanisms of action, including the modification of the intestinal microflora, which has been shown to be very important, something that was shown by the administration of *L. fermentum* ACA-DC 179.

Administration of *L. fermentum* ACA-DC 179 induced histologic changes to animals receiving high-dose. These animals did not have atherosclerotic plaques compared to animals receiving low-dose and controls, which exhibited atherosclerotic plaques on the valve and aorta. This demonstrates an anti-inflammatory effect in mild atherosclerosis of the probiotic strain.

The biochemical profile of the animals showed that the administration of *L. fermentum* ACA-DC 179 reduces the biochemical markers associated with atherosclerosis after the administration of the probiotic strain for 60 days, with a significant decrease in total CHOL and TG in females and TG in male animals. the high dose of the animal compared to the animals receiving the low dose and the control animals.

Key words: *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, gut microbiota, atherosclerosis, inflammation

**Laboratory of Dairy Research, Department of Food Science and Human Nutrition,
Agricultural University of Athens, Greece**

**Center of Clinical, Experimental Surgery and Translational Research, Biomedical
Research Foundation of the Academy of Athens, Greece**

Περιεχόμενα	
Περίληψη	4
Abstract	6
<u>Κεφάλαιο 1ο: Εισαγωγή</u>	9
1.1 Η γαστρεντερική οδός (gastrointestinal tract-GIT) ως οικοσύστημα	9
1.2 Ρόλος της εντερικής μικροχλωρίδας στην υγεία του ξενιστή	10
1.3 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί	11
1.3.1 Ιστορικά στοιχεία για τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς	12
1.3.2 Κριτήρια Επιλογής Προβιοτικών Οργανισμών	12
1.3.3 Είδη μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά	13
1.3.3.1 Οξυγαλακτικά	13
1.3.3.2 Γένος <i>Bifidobacterium</i>	14
1.4 Μηχανισμοί δράσης προβιοτικών	15
1.5 Δράσεις προβιοτικών ευεργετικές για την υγεία	19
1.6 Αθηροσκλήρωση και στάδια εξέλιξης της πάθησης	21
1.6.1 Ζωικό μοντέλο μυών για μελέτη της αθηροσκλήρωσης	22
1.6.2 Αντιαθηρωματική δράση προβιοτικών μικροοργανισμών	23
1.7 Σκοπός της μελέτης	23
<u>Κεφάλαιο 2ο :Υλικά και Μέθοδοι</u>	24
2.1. Ταυτοποίηση και τυποποίηση του <i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179	24
2.1.1 Στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης	24
2.1.2 Συνθήκες συντήρησης	24
2.1.3 Καταμέτρηση αποικιών (cfu)	24
2.2 Ταυτοποίηση στελεχών	25
2.2.1 Χρώση κατά Gram	25
2.2.2 Ζύμωση υδατανθράκων (API test)	25
2.3 Μοριακή ταυτοποίηση	25

2.3.1 Απομόνωση βακτηριακού DNA από τα κύτταρα και έλεγχος της ποιότητας	25
2.3.2 Ταυτοποίηση στελεχών με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA	28
2.3.3 Ταυτοποίηση σε επίπεδο στελέχους με τη μέθοδο RAPD-PCR	29
2.4 Μελέτη επιβίωσης του <i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179 σε συνθήκες ψύξης (4° C)	29
2.5 Σταθερότητα ανάπτυξης του <i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179 υπό συνθήκες ψύξης (4° C)	30
2.6 Ζωικό μοντέλο ApoE knock-out (ApoE ^{-/-}) μών για τη μελέτη της επίδρασης της χορήγησης του προβιοτικού στελέχους <i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179 στην δημιουργία αθηρωματικών πλακών και στην μεταβολή του εντερικού τους περιεχομένου	30
2.6.1 Πειραματόζωα	30
2.6.2 Δόση, μέθοδος και διάρκεια χορήγησης του μικροοργανισμού	31
2.6.3 Αναλύσεις αίματος	31
2.6.4 Συλλογή κοπράνων και εντερικού περιεχομένου-Μικροβιολογικές αναλύσεις	32
2.6.5 Ποσοτικοποίηση αλλοιώσεων που σχετίζονται με την δημιουργία και τη σταθερότητα των αθηρωματικών πλακών-Ιστολογική ανάλυση δειγμάτων	32
<u>Κεφάλαιο 3ο : Αποτελέσματα και συζήτηση</u>	34
3.1 Μελέτη επιβίωσης και σταθερότητας ανάπτυξης του <i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179 υπό συνθήκες ψύξης (4o C)	34
3.2 Ταυτοποίηση στελεχών με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRna	35
3.3 Χορήγηση <i>L. fermentum</i> ACA-DC 179 και εντερική χλωρίδα μών	37
3.4 Χορήγηση <i>L. fermentum</i> ACA-DC 179 και αθηρωμάτωση σε ApoE ^{-/-} μύες	41
3.5 Ιστολογική ανάλυση δειγμάτων μετά από 60 ημέρες χορήγησης του μ/ο	42
<u>Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα</u>	44
4.1 Χορήγηση <i>L. fermentum</i> ACA-DC 179 και μεταβολή της σύνθεσης της εντερικής χλωρίδας μών	44
4.2 Χορήγηση <i>L. fermentum</i> ACA-DC 179 και αθηρωμάτωση σε ApoE ^{-/-} μύες	45
<u>Βιβλιογραφικές αναφορές</u>	47

Κεφάλαιο 1^ο: Εισαγωγή

1.1 Η γαστρεντερική οδός (gastrointestinal tract-GIT) ως οικοσύστημα

Η γαστρεντερική οδός αντιπροσωπεύει το οικοσύστημα με την υψηλότερη πολυπλοκότητα όσον αφορά στο μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών που την αποικίζουν. Η επιφάνεια του βλεννογόνου παρέχει μια μεγάλη περιοχή για την προσκόλληση και τον μικροβιακό αποικισμό του λεπτού και του παχέος εντέρου. Σε σύγκριση με την επιφάνεια του δέρματος μας (2 m²) η επιφάνεια του γαστρεντερικού μας συστήματος είναι τεράστια και υπολογίζεται ότι είναι 150-200 m² (Waldeck, 1990). Η μεγάλη αυτή επιφάνεια οφείλεται στις αναδιπλώσεις που σχηματίζονται από το εντερικό επιθήλιο. Με τον τρόπο αυτό παρέχεται ο αναγκαίος χώρος για τις ποικίλες αλληλεπιδράσεις κατά τη διάρκεια της πεπτικής διαδικασίας και για μικροβιακή προσκόλληση στο τοίχωμα του βλεννογόνου και τον ταυτόχρονο αποικισμό του. Το γαστρεντερικό σύστημα του μέσου ενήλικα αποικίζεται από περίπου 10¹⁴ μικροβιακά κύτταρα (Luckey & Floch, 1972), περίπου 10 φορές περισσότερα από όλα τα κύτταρα του σώματος μας. Πρόσφατες έρευνες που χρησιμοποιούν μοριακές προσεγγίσεις έχουν αποκαλύψει ότι ένα ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα περιλαμβάνει πάνω από 1000 φυλοτύπους (O'Toole & Cooney, 2008). Αυτό το τεράστιο μεταβολικό δυναμικό υποδηλώνει ισχυρές ρυθμιστικές επιδράσεις στις λειτουργίες του σώματος, ιδιαίτερα στο κόλον, όπου βρίσκεται η μεγαλύτερη συγκέντρωση, μέχρι και 5x10¹¹ βακτηριακά κύτταρα ανά g.

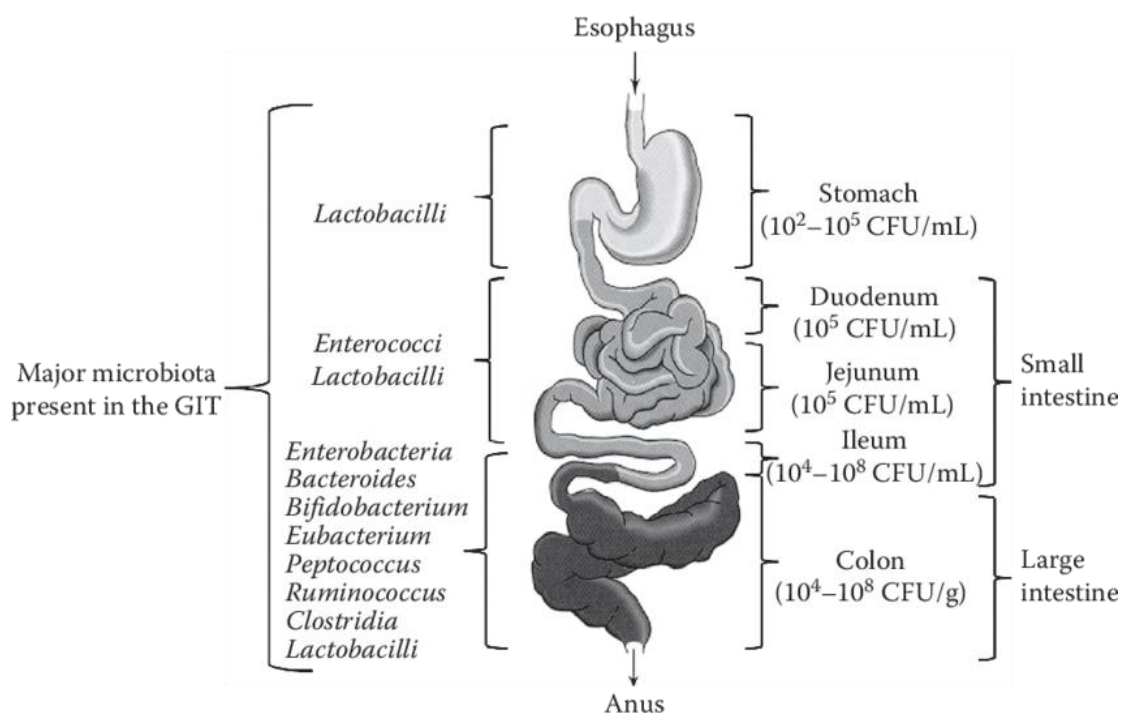
Ο πληθυσμός της αυτόχθονης χλωρίδας του εντέρου ξεπερνά το σύνολο των κυττάρων του ανθρώπινου σώματος. Πρέπει να αναφερθεί ότι το 80-90% των μελών της εντερικής χλωρίδας δεν μπορεί να καλλιεργηθεί. Αντιπροσωπεύοντας περισσότερα από 400 είδη, αυτοί οι «αυτόχθονοι» μικροοργανισμοί περιλαμβάνουν ποικίλα βακτηριακά γένη. Στο παχύ έντερο, όπου παρατηρείται ο μεγαλύτερος πληθυσμός μικροοργανισμών, κυριαρχούν τα θετικά κατά Gram και τα αναερόβια γένη *Bacteroides*, *Eubacterium* και *Bifidobacterium*. Άλλες ομάδες, όπως τα κλωστρίδια, οι στρεπτόκοκκοι και οι λακτοβακίλλοι φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο, π.χ. στη διατήρηση ενός σταθερού βλεννογόνου του εντέρου και στη δημιουργία λιπαρών οξέων βραχείας αλυσίδας (Short Chain Fatty Acids-SCFAs) σε μία σταθερή αναλογία λιπαρών οξέων (Holzapfel & Schillinger, 2002).

Παρόλο που η μικροβιακή χλωρίδα των κοπράνων εμφανίζεται να είναι ένας καλός ποιοτικός δείκτης της περιφερικής μικροχλωρίδας του παχέος εντέρου, δεν αντανακλά όμως το σύνολο της μικροχλωρίδας της γαστρεντερικής οδού και σίγουρα όχι εκείνη του λεπτού εντέρου. Η ποικιλότητα του γαστρεντερικού σωλήνα επομένως ποικίλει από τμήμα σε τμήμα και, επιπλέον, καθορίζεται από παράγοντες, όπως η διατροφή, το γενετικό υπόβαθρο και η φυσιολογική κατάσταση του ξενιστή (Holzapfel & Schillinger, 2002).

Η στόχευση της περιοχής 16S του ριβοσωμικού RNA (rRNA) είναι μια δημοφιλής προσέγγιση (Mizrahi-Man *et al.*, 2013, Poretzky *et al.*, 2014), καθώς αυτό το γονίδιο υπάρχει σε όλα τα βακτήρια και περιέχει εννέα εξαιρετικά μεταβλητές περιοχές (V1-V9), που επιτρέπουν την εύκολη διάκριση των ειδών (Macpherson & McCoy, 2013).

Η πυκνότητα και η σύνθεση της μικροχλωρίδας επηρεάζονται από χημικές, θρεπτικές και ανοσολογικές μεταβολές κατά μήκος του εντέρου. Στο λεπτό έντερο υπάρχουν τυπικά υψηλά επίπεδα οξέων, οξυγόνου και αντιμικροβιακών ουσιών και ένας σύντομος χρόνος διέλευσης και παραμονής των βακτηρίων από το σημείο αυτό (Donaldson *et al.*, 2015). Αυτές οι ιδιότητες περιορίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων, έτσι ώστε μόνο τα ταχέως αναπτυσσόμενα, προαιρετικά αναερόβια βακτήρια έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στον επιθηλιακό βλεννογόνο και να επιβιώνουν (Donaldson *et al.*, 2015). Από την άλλη πλευρά, το παχύ έντερο αποικίζεται από μία πλειάδα βακτηρίων, κυρίως αναερόβιων, τα οποία διαθέτουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν σύνθετους υδατάνθρακες, οι οποίοι δεν έχουν υποστεί ζύμωση στο λεπτό έντερο από τα ενδογενή του ένζυμα. Οι υδατάνθρακες που προέρχονται από τις τροφές διακρίνονται σε γλυκαιμικούς, οι οποίοι απορροφώνται στο

λεπτό έντερο και είναι διαθέσιμοι για μεταβολισμό, και σε μη γλυκαιμικούς, οι οποίοι εισέρχονται στο παχύ έντερο ως υποστρώματα για ζύμωση, από τους μικροοργανισμούς του παχέος εντέρου (Englyst & Englyst, 2005). Στο παχύ έντερο φαίνεται πως επικρατούν γένη των οικογενειών Prevotellaceae, Lachnospiraceae και Rikenellaceae (Gu *et al.*, 2013; Donaldson, *et al.*, 2015). Επίσης, όσον αφορά στο παχύ έντερο, παρατηρούνται διαφορές και στη σύνθεση της μικροχλωρίδας των κοπράνων και του εντερικού αυλού σε σχέση με το βλεννογόνο (Eckburg, 2005; Lavelle *et al.*, 2015). Παραδείγματος χάρη, ο πληθυσμός των Bacteroidetes στο παχύ έντερο φαίνεται να είναι υψηλότερος στα δείγματα κοπράνων και εντερικού αυλού σε σχέση με το βλεννογόνο (Eckburg, 2005; Van den Abbeele *et al.*, 2013). Στο **Σχήμα 1** απεικονίζονται τα κυριότερα είδη μικροοργανισμών που αποικίζουν το ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα.



Σχήμα 1: Οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που αποικίζουν το ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα
 Lactobacilli: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* και *Lactobacillus rhamnosus*.
 Bifidobacteria: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis* και *Bifidobacterium breve*. Επιπλέον Ζύμες: *Saccharomyces boulardii*.
 (Holzapfel *et al.*, 1998).

1.2 Ρόλος της εντερικής μικροχλωρίδας στην υγεία του ξενιστή

Οι μικροοργανισμοί του εντέρου, με πληθυσμό περίπου 10^{13} έως 10^{14} κύτταρα, έχουν ανοσορρυθμιστικές λειτουργίες, επηρεάζουν την κατανάλωση ενέργειας του ξενιστή που αποικίζουν (Cani *et al.*, 2008), τον μεταβολισμό των λιπιδίων (Velagapudi *et al.*, 2010), καθώς επίσης ενισχύουν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού, επηρεάζοντας έτσι άμεσα τη μετατόπιση-μετακίνηση (translocation) βακτηριακών κυττάρων (Sekirov *et al.*, 2010). Όλες αυτές οι λειτουργίες μπορούν έμμεσα να επηρεάσουν την εμφάνιση χρόνιας φλεγμονής (Chan *et al.*, 2016). Επίσης, η μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου παρεμποδίζει την εμφάνιση διαφόρων εκφυλιστικών ασθενειών στον άνθρωπο και τα ζώα μέσω της ανοσορρύθμισης.

Ένα υγιές εντερικό επιθήλιο, σε συνδυασμό με μια άριστη εντερική χλωρίδα, παρέχει ένα ζωτικό φράγμα κατά της εισβολής ή πρόσληψης παθογόνων μικροοργανισμών, αντιγόνων και επιβλαβών ενώσεων από τον αυλό του εντέρου. Επίσης, ο εντερικός βλεννογόνος ουσιαστικά αφομοιώνει τα αντιγόνα, ενώ οι εξειδικευμένες ανοσολογικές αντιδράσεις

προκαλούνται από τους εξειδικευμένους μηχανισμούς μεταφοράς και αντιγονοπαρουσίασης που διαθέτει (Heyman *et al.*, 1982). Ένας σταθερός εντερικός φραγμός, σε υγιή άτομα, εξασφαλίζει την προστασία του ξενιστή και υποστηρίζει τη φυσιολογική λειτουργία του εντέρου και την ανοσολογική απόκριση. Θεωρείται ότι είναι το μεγαλύτερο "ανοσοποιητικό όργανο" στο ανθρώπινο σώμα (Hemrajata & Versalovic, 2013). Στο λεπτό έντερο, βρίσκεται περίπου το 80% (10^{10} κύτταρα) όλων των κυττάρων που παράγουν ανοσοσφαιρίνες (Shanahan, 1994), ενώ το έντερο παίζει σημαντικό ρόλο στην ανοσοδιέγερση και την ενίσχυση των ανοσοκαταστροφικών κυττάρων του βλεννογόνου.

Οι παρακάτω λειτουργίες μπορούν να θεωρηθούν ως οι κυριότερες φυσιολογικές λειτουργίες της μικροχλωρίδας του εντέρου (Holzapfel *et al.*, 1998): Α) λειτουργία εντερικού φραγμού / αποκατάσταση ακεραιότητας του εντερικού βλεννογόνου, Β) διέγερση ανοσοποιητικού συστήματος, Γ) κυκλοφορία και παραγωγή θρεπτικών ουσιών / αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και Δ) διέγερση της κινητικότητας του εντέρου.

Το εντερικό μικροβίωμα παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία και την ακεραιότητα της γαστρεντερικής οδού, τη διατήρηση της ανοσοποιητικής ομοιόστασης και του ενεργειακού μεταβολισμού του ξενιστή (Pflughoeft & Versalovic, 2012). Οι διαταραχές στη σύνθεση των μικροβιακών πληθυσμών, επίσης γνωστές ως dysbiosis, μπορεί να οδηγήσουν σε διαταραγμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροβίων και ξενιστή (Frank *et al.*, 2011). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει τις συσχετίσεις μεταξύ της εντερικής dysbiosis και της ήπιας, χρόνιας φλεγμονής (Cani and Delzenne, 2009) και των μεταβολικών διαταραχών (Jumpertz *et al.*, 2011), με τελικό αποτέλεσμα το μεταβολικό σύνδρομο, την παχυσαρκία και τον διαβήτη (Claus *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2010; Pflughoeft & Versalovic, 2012). Μεταβολές στη σύνθεση του εντερικού μικροβιώματος έχουν συσχετιστεί με λοιμώξεις στο γαστρεντερικό σωλήνα, την ασθένεια του φλεγμονώδους εντέρου (Inflammatory Bowel Disease- IBD) και το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου (Irritable Bowel Syndrom-IBS) (Pflughoeft and Versalovic, 2012; Saulnier *et al.*, 2011).

Τα προβιοτικά μπορεί να εισάγουν ευεργετικές λειτουργίες στο εντερικό σωλήνα ή να ενισχύσουν τη λειτουργικότητα των υφιστάμενων μικροβιακών πληθυσμών. Τα προβιοτικά μπορεί επίσης να επηρεάσουν τη σύνθεση και τη λειτουργία των μικροοργανισμών μέσω του ανταγωνισμού για τις θρεπτικές ουσίες, της παραγωγής θρεπτικών συστατικών που ευνοούν την αύξηση τους και της διαμόρφωσης της εντερικής ανοσίας (O'Toole & Cooney, 2008).

1.3 Προβιοτικοί μικροοργανισμοί

Ο όρος "προβιοτικός" προέρχεται από τα συνθετικά "προ" και "βίος" και σημαίνει "υπέρ της ζωής". Οι πρώιμες προσπάθειες ορισμού των προβιοτικών δεν έγιναν γενικότερα αποδεκτές (Lilley & Stillwell, 1965). Οι Lilly & Stillwell (1965) όρισαν τα προβιοτικά ως "μικροοργανισμούς που παράγονται από πρωτόζωα και προάγουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών". Ο Parker (1974) πρότεινε έναν αρχικό ορισμό για τα προβιοτικά, ως "οργανισμοί και ουσίες που επηρεάζουν την εντερική μικροβιακή ισορροπία". Αυτός ο ορισμός τροποποιήθηκε στη συνέχεια, όταν ο Fuller (1989) τροποποίησε τον ορισμό, αφαιρώντας την αναφορά στη λέξη «ουσίες», όπως τα μικροβιακά διεγερτικά (microbial stimulants), η οποία αργότερα χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει τα πρεβιοτικά (Gibson & Roberfroid, 1995). Ο αναθεωρημένος ορισμός του Fuller ήταν: "Ένα ζωντανό μικροβιακό συμπλήρωμα για ζωοτροφών, το οποίο επηρεάζει ευνοϊκά το ζώο-ξενιστή, βελτιώνοντας την εντερική μικροβιακή ισορροπία του". Αυτή η τροποποιημένη εκδοχή υπογράμμισε την ανάγκη να αποτελείται το συμπλήρωμα από βιώσιμους μικροοργανισμούς. Έγινε γενικότερα αποδεκτό ότι τέτοιοι μικροοργανισμοί μπορεί να μην είναι απαραίτητα σταθεροί κάτοικοι της γαστρεντερικής οδού (GastroIntestinal Tract-GIT), αλλά θα πρέπει να έχουν ευεργετική επίδραση στην γενικότερη κατάσταση της υγείας ανθρώπου και ζώων (Fuller, 1989; Havenaar *et al.*, 1992; Salminen *et al.*, 1998). Αργότερα, ένας επίσημος ορισμός των προβιοτικών συμφωνήθηκε από ομάδα ευρωπαίων επιστημόνων και οριστικοποιήθηκε ως

εξής: “Προβιοτικό είναι ένα ζωντανό μικροβιακό συμπλήρωμα ζωοτροφών που είναι ευεργετικό για την υγεία” (Salminen *et al.*, 1998). Αυτός ο ορισμός υπογράμμισε τη σημασία των θετικών επιδράσεων στην υγεία, που πρέπει να έχουν όσοι μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνταν ως προβιοτικά. Αντίστοιχα, υπήρχε γενικότερη συμφωνία ότι ο όρος «προβιοτικό» αναφέρεται σε βιώσιμους μικροοργανισμούς που προάγουν ή υποστηρίζουν μια ευεργετική ισορροπία της αυτόχθονης μικροβιακής χλωρίδας της GIT) (Holzapfel *et al.*, 1998; Holzapfel, *et al.*, 2001).

Σήμερα, προβιοτικοί μικροοργανισμοί ορίζονται τα μικροβιακά στελέχη που παρουσιάζουν ευεργετικές ιδιότητες για την υγεία του ξενιστή. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization-FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization-WHO), τα προβιοτικά είναι “ζωντανά στελέχη μικροοργανισμών που έχουν ευεργετική επίδραση για την υγεία στον ξενιστή, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες” (F.A.O/ WHO, 2002).

1.3.1 Ιστορικά στοιχεία για τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς

Το 76 π.Χ. ο Ρωμαίος ιστορικός Πλίνιος συνέστησε τη χορήγηση ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων για τη θεραπεία της γαστρεντερίτιδας (Bottazzi, 1983). Στις αρχές της δεκαετίας του 1900, ο Louis Pasteur προσδιόρισε τους μικροοργανισμούς, που ήταν υπεύθυνοι για τη διαδικασία ζύμωσης, ενώ ο Elie Metchnikoff (1907) συνέδεσε τη μακροζωία του βουλγαρικού αγροτικού πληθυσμού με την τακτική κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων, όπως το γιαούρτι. Πρότεινε ότι οι γαλακτοβακίλλοι θα μπορούσαν να εξουδετερώσουν τις επιπτώσεις του μεταβολισμού στον οργανισμό, που συνέβαλαν στην εμφάνιση ασθένειας και τη γήρανση (Gasbarrini, Bonvicini and Gramenzi, 2016). Παρόλο που ο Metchnikoff (1907) θεωρούσε τη μικροβιακή χλωρίδα του εντέρου ως επιζήμια και όχι ωφέλιμη για την ανθρώπινη υγεία, θεώρησε ότι η αντικατάσταση των μικροβίων του εντέρου από τα βακτήρια του γιαουρτιού θα ήταν ευεργετική (Metchnikoff, 1907).

Το 1930, ο Μινόρου Σιρότα, ένας Ιάπωνας γιατρός έθεσε τις βάσεις στον τομέα της προληπτικής ιατρικής, η οποία έχει ως στόχο να βοηθήσει τους ανθρώπους να αποφύγουν την ασθένεια, παρά να θεραπεύσουν τις ασθένειες μετά την εμφάνισή τους, και ξεκίνησε την έρευνά του πάνω στους μικροοργανισμούς. Κατά τη διάρκεια της έρευνάς του, ο Δρ Σιρότα ανακάλυψε ότι οι γαλακτοβακίλλοι ήταν αποτελεσματικοί στην καταστολή των επιβλαβών βακτηρίων στον εντερικό αυλό.

Αργότερα, έγινε ο πρώτος που παρουσίασε ένα στέλεχος γαλακτοβακίλλων, με προβιοτικές ιδιότητες, το οποίο είναι τώρα γνωστό ως *Lactobacillus casei* Shirota. Ο Δρ Σιρότα, μαζί με την ομάδα του, το 1935, ανέπτυξε ένα ρόφημα, που προήγαγε την εντερική υγεία, και το οποίο ήταν ένα ρόφημα γάλακτος, που είχε υποστεί ζύμωση με την ονομασία Yakult.

1.3.2 Κριτήρια επιλογής προβιοτικών μικροοργανισμών

Τις τελευταίες δεκαετίες, πολλές ερευνητικές προσπάθειες έχουν ως στόχο τους την απομόνωση και την αξιοποίηση νέων προβιοτικών στελεχών. Συνήθως, η επιλογή προβιοτικών στελεχών πραγματοποιείται έχοντας ως βάση συγκεκριμένες ιδιότητες των στελεχών, αλλά και μηχανισμούς δράσης τους. Αρχικά, για να χαρακτηριστεί ένα στέλεχος ως προβιοτικό, αποτελεί προϋπόθεση να προσφέρει ευεργετικά αποτελέσματα στον οργανισμό του ξενιστή. Στη συνέχεια, τα προβιοτικά πρέπει να πληρούν ορισμένα περαιτέρω κριτήρια. Υπάρχουν διάφορα χαρακτηριστικά για την επιλογή και αξιολόγηση ενός καλού προβιοτικού προϊόντος, τα οποία συνοψίζονται στα κάτωθι: ανθεκτικά στο γαστρικό οξύ και τα χολικά άλατα (συνθήκες πέψης), ικανότητα πρόσδεσης στο εντερικό επιθήλιο του ξενιστή, απουσία παθογένειας και ικανότητα να μειώνουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς (Dunne *et al.*, 2001; Hawrelak, 2013)

Πιο συγκεκριμένα, τα κριτήρια επιλογής των υπό εξέταση στελεχών που στηρίζονται σε χαρακτηριστικά και ιδιότητές τους, αφορούν πρώτον, στη λειτουργικότητά τους ως προς την υγεία, και συγκεκριμένα να έχουν ευεργετικές επιδράσεις έναντι ασθενειών. Επίσης κριτήριο για την επιλογή τους είναι η επιβίωση των στελεχών στις αντίξοες συνθήκες του ανθρώπινου γαστρεντερικού συστήματος, όπως οι χαμηλές τιμές pH και η παρουσία χολικών αλάτων (Fooks & Gibson, 2002), αλλά και η ικανότητά τους να φτάνουν σε ικανοποιητικούς πληθυσμούς σε σημεία της GI οδού, όπου μπορούν να εκφραστούν οι ευεργετικές τους επιδράσεις στον ξενιστή, όπως το στομάχι, το λεπτό και παχύ έντερο και το κόλον. Επίσης, αφορούν στην ασφάλειά τους για τον άνθρωπο. Τα υπό εξέταση στελέχη θα πρέπει να μην ευθύνονται για αιμόλυση στον άνθρωπο, να μην παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και να μην παράγουν τοξίνες κατά τη μεταβολική τους δραστηριότητα. Επίσης δεν θα πρέπει να προκαλούν μεταφορά παθογόνων γονιδίων, αλλά και υπερδιέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος (Del Piano *et al*, 2006b). Και τα δύο γένη μικροοργανισμών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* που χρησιμοποιούνται ευρέως ως προβιοτικά, όπως θα αναφερθεί και στη συνέχεια, έχουν ένα μακροχρόνιο ιστορικό ασφαλούς χρήσης και γενικώς αναγνωρίζονται ως ασφαλή (Generally Recognised As Safe-GRAS) (Morgensen *et al*, 2002). Επίσης, στελέχη των γενών αυτών απαντώνται στη φυσιολογική χλωρίδα της γαστρεντερικής οδού του ανθρώπου, προσλαμβάνονται ημερησίως μέσω των τροφών, δεν αποτελούν αιτιολογικούς παράγοντες λοιμώξεων και το γεγονός ότι δεν έχουν αναφερθεί παρενέργειες έπειτα από τη χορήγησή τους σε υψηλά επίπεδα σε μελέτες τόσο σε ζωικά μοντέλα, όσο και σε ανθρώπους (Gionchetti & Campieri, 2000) συνιστά βασικό στοιχείο για την ασφάλειά τους. Τέλος, πρέπει να παρουσιάζουν σταθερότητα στους πληθυσμούς τους κατά την ενσωμάτωσή τους σε προβιοτικά προϊόντα, όπως τρόφιμα και σκευάσματα, καθώς και να μην επηρεάζουν αρνητικά τις τεχνολογικές ιδιότητες των προϊόντων, τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά και την ασφάλειά τους.

1.3.3 Είδη μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά

Τα πιο αντιπροσωπευτικά είδη μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά ανήκουν στα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic acid bacteria-LAB), με πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο το γένος *Lactobacillus*. Ως προβιοτικά χρησιμοποιούνται και είδη του γένους *Bifidobacterium* (Holzapfel & Schillinger, 2002). Και τα δύο γένη μικροοργανισμών, όπως προαναφέρθηκε, αναγνωρίζονται ως ασφαλή (GRAS).

1.3.3.1 Οξυγαλακτικά

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μία ομάδα μικροοργανισμών με υψηλή ποικιλομορφία γενών και ειδών, τα οποία απαντώνται σε διάφορα οικοσυστήματα, όπως στα ζυμούμενα τρόφιμα, τη γαστρεντερική, αναπνευστική και γενετική οδό του ανθρώπου και των ζώων. Απαντώνται επίσης και σε νερά υπονόμων και αποσυντιθέμενα φυτικά υλικά.

Η εξέλιξη των μοριακών τεχνικών και η συνεχής ενημέρωση των βάσεων δεδομένων με αλληλουχίες 16S rRNA γονιδίων, έχουν αλλάξει τα δεδομένα στην ταξινόμηση των βακτηρίων, η οποία γινόταν στο παρελθόν με βάση φαινοτυπικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην τάξη *Lactobacillales* της κλάσης *Bacilli*, του γένους *Firmicutes* (Garrity & Holt, 2001). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια περιλαμβάνουν έξι (6) οικογένειες και σαράντα (40) περίπου γένη. Πιο συγκεκριμένα έχουν αναφερθεί και περιγραφεί τρία (3) γένη για την οικογένεια *Lactobacillaceae*, επτά (7) γένη για την οικογένεια *Enterococcaceae*, επτά (7) γένη για την οικογένεια *Aerococcaceae*, έξι (6) γένη για την οικογένεια *Carnobacteriaceae*, τέσσερα (4) γένη για την οικογένεια *Leuconostocaceae*, καθώς και τρία (3) γένη για την οικογένεια *Streptococcaceae*. Τα γένη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που σχετίζονται με τα τρόφιμα είναι τα εξής: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* και *Carnobacterium*. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα είδη

των οξυγαλακτικών βακτηρίων που είναι γενικότερα παρόντα στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα καθώς και μερικά γνωστά στελέχη.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) είναι Gram θετικά βακτήρια που έχουν κοινά μορφολογικά, φυσιολογικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά (Cintas *et al.*, 2001). Είναι κύτταρα με μορφή κόκκου ή βακίλλου, μη σποριογόνα, στερούνται κίνησης και είναι αρνητικά στη δοκιμή της καταλάσης. Αναπτύσσονται σε μικροαερόφιλες έως και αυστηρά αναερόβιες συνθήκες (Klein *et al.*, 1998). Ζυμώνουν τους υδατάνθρακες και τις ανώτερες αλκοόλες κυρίως προς γαλακτικό οξύ. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ανθεκτικά στα οξέα και παρουσιάζουν το βέλτιστο ρυθμό ανάπτυξης σε ελαφρώς όξινη περιοχή (pH 5.0-7.0), ενώ σε υψηλότερες τιμές pH (αλκαλική περιοχή), ο ρυθμός ανάπτυξής τους μειώνεται σημαντικά (Tannock, 1999). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια διακρίνονται σε δύο βιοχημικές υποομάδες, με βάση τα προϊόντα που προκύπτουν από τη ζύμωση των σακχάρων. Έτσι, διακρίνονται σε ομοζυμωτικά, τα οποία παράγουν μόνο ένα προϊόν ζύμωσης, το γαλακτικό οξύ και σε ετεροζυμωτικά, τα οποία παράγουν προϊόντα, όπως κυρίως αιθανόλη ή οξικό οξύ και διοξείδιο του άνθρακα αλλά και γαλακτικό οξύ.

Πίνακας 1 Οξυγαλακτικά βακτήρια γενικά παρόντα στο ανθρώπινο γαστρεντερικό σύστημα

Είδος
<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>

1.3.3.2 Γένος *Bifidobacterium*

Το γένος *Bifidobacterium* ανήκει στην κλάση *Actinobacteria* αλλά μελετάται συνήθως μαζί με τα οξυγαλακτικά βακτήρια, καθώς παρουσιάζει στενή συγγένεια με αυτά, όσον αφορά στις φυσιολογικές και βιοχημικές τους ιδιότητες, αλλά και γιατί απαντάται στα ίδια οικοσυστήματα, όπως στη γαστρεντερική οδό και τον κόλπο (Vandamme *et al.*, 1996). Τα *bifidobacteria* ανήκουν στην τάξη *Bifidobacteriales* της κλάσης *Actinobacteria* του γένους *Bifidobacterium* (Orla-Jensen, 1924) με βάση τη χαρακτηριστική μορφολογία τους, τη βιοχημεία, τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και τη σύνθεση βάσεων του DNA (Scardovi *et al.*, 1971).

Τα *bifidobacteria* διαθέτουν κύτταρα με μορφή ράβδου, είναι θετικά κατά Gram, μη σποριογόνα και πολλές φορές απαντώνται να διαθέτουν μορφή διακλαδώσεων. Δεδομένου ότι τα *bifidobacteria* αποτελούν έως και το 25% της μικροχλωρίδας του εντέρου σε μερικά ενήλικα άτομα, συμβάλλουν σημαντικά στη ζύμωση των υδατανθράκων στο κόλον. Οικολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα *bifidobacteria* μπορούν να απομονωθούν από διάφορα οικοσυστήματα (Modler, 1994). Παραδείγματος χάριν, αποικίζουν το κόλον ανθρώπων και ζώων και μπορούν επίσης να βρεθούν στα σώματα των εντόμων και από τα 24 είδη που μέχρι τώρα έχουν ταυτοποιηθεί, εννέα απομονώθηκαν κυρίως από ανθρώπους (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. dentium* και *B. Pseudocatenulatum*) (Ballongue, 1998). Το γένος *Bifidobacterium* συγκεντρώνει υψηλό ερευνητικό ενδιαφέρον για τη χρήση των ειδών του ως προβιοτικών

βακτηρίων, κυρίως λόγω των ευεργετικών επιδράσεων τους στην υγεία (Fooks & Gibson, 2002). Στον **Πίνακα 2** που ακολουθεί αναφέρονται τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ως προβιοτικά είδη μικροοργανισμών.

Πίνακας 2 Είδη ευρέως χρησιμοποιούμενων προβιοτικών στελεχών (Holzapfel *et al*, 1998; Holzapfel & Schillinger, 2002)

Γένος <i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. amylovorus</i>
	<i>L. brevis</i>
	<i>L. casei subsp. rhamnosus</i>
	<i>L. crispatus</i>
	<i>L. plantarum</i>
	<i>L. delbreuckii subsp. bulgaricus</i>
	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. gasseri</i>
	<i>L. helveticus</i>
	<i>L. johnsonii</i>
	<i>L. lactis</i>
	<i>L. paracasei</i>
	<i>L. gallinarum</i>
<i>L. reuteri</i>	
<i>L. salvarius</i>	
Γένος <i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis</i>
	<i>B. animalis</i>
	<i>B. breve</i>
	<i>B. bifidum</i>
	<i>B. Infantis</i>
	<i>B. lactis</i>
<i>B. longum</i>	
Άλλα είδη μικροοργανισμών	<i>Bacillus cereus (toyoi)</i>
	<i>Escherichia coli Nissle</i>
	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Lactococcus lactis subsp. Cremoriss</i>
	<i>Lactococcus lactis subsp.lactis</i>
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
	<i>Pediococcus acidilactici</i>
	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
	<i>Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae (boulardii)</i>	

1.4 Μηχανισμοί δράσης προβιοτικών

Τα προβιοτικά ασκούν τις ωφέλιμες δράσεις τους στον ξενιστή μέσω συγκεκριμένων μηχανισμών, οι κύριοι από τους οποίους περιλαμβάνουν: Α) τον ανταγωνισμό για τα θρεπτικά συστατικά, Β) τη βιομετατροπή, για παράδειγμα, των σακχάρων σε προϊόντα ζύμωσης με ανασταλτικές ιδιότητες, Γ) την παραγωγή θρεπτικών συστατικών, όπως για παράδειγμα, εξωπολυσακχαριτών (Extracellular Polymeric Substance-EPS) ή βιταμινών, για άλλα βακτήρια, Δ) τον άμεσο ανταγωνισμό μέσω π.χ. της παραγωγής βακτηριοσινών, Ε) τον

αποκλεισμό της βακτηριακής προσκόλλησης παθογόνων μικροοργανισμών στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, ΣΤ) τη βελτίωση της λειτουργίας του εντερικού φραγμού, Ζ) τη μείωση της φλεγμονής και Η) τη διέγερση της ανοσοαπόκρισης, επιδρώντας στα επιθηλιακά κύτταρα, στα δενδριτικά κύτταρα, στα μονοκύτταρα / μακροφάγα και στα λεμφοκύτταρα: Β-λεμφοκύτταρα-Natural Killer (NK) κύτταρα - Τ κύτταρα (Zhang *et al.*, 2007; Neurath, 2007; O'Toole & Cooney, 2008; Ng *et al.*, 2008). Οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους τα δρουν τα προβιοτικά απεικονίζονται στο **Σχήμα 3**. Τα πρόσφατα δεδομένα παρουσιάζουν την επίδραση των προβιοτικών σε συσχέτιση και με τη θεωρία του αισθήματος της απαρτίας (quorum sensing), που αποτελεί έναν τρόπο επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων (Gibson and Roberfroid, 1995; Hooper *et al.*, 2001; Ohland & Macnaughton, 2010; Goudarzi *et al.*, 2014) και οι στόχοι δράσης τους ποικίλλουν από την μόνιμη μικροβιακή χλωρίδα (resident microbiota) του ξενιστή έως και κυτταρικές δομές του άξονα του εντέρου-εγκεφάλου (gut-brain axis).

Όπως προαναφέρθηκε, οι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών περιλαμβάνουν τον ανταγωνισμό για θρεπτικά συστατικά (O'Toole & Cooney, 2008). Η κατανάλωση προβιοτικών καλλιεργειών μπορεί να τροποποιήσει το μικροβίωμα ή να μεταβάλει τις μεταβολικές του ιδιότητες μέσω του ανταγωνισμού για θρεπτικά συστατικά. Πιο συγκεκριμένα, τα προβιοτικά μπορεί να επηρεάσουν τη σύνθεση του μικροβιώματος καθώς τα ανταγωνίζονται για τη διαθεσιμότητα και τη χρήση των υδατανθράκων ως πηγή θρεπτικών συστατικών (Sonnenburg *et al.*, 2006).

Αναφορικά με τον φυσικό, άμεσο ανταγωνισμό μεταξύ των παθογόνων μικροοργανισμών στο έντερο, αυτός μπορεί να προκαλείται από μηχανισμούς, όπως η παραγωγή βακτηριοσινών, κάτι το οποίο μπορεί να αξιοποιηθεί για τη χρήση προβιοτικών για τη ρύθμιση της εντερικής μικροχλωρίδας (O'Toole & Cooney, 2008).

Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης της μικροχλωρίδας είναι ο ανταγωνιστικός αποκλεισμός (Collado *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2008). Τα προβιοτικά βακτήρια είναι ικανά να προσκολλώνται στα επιθηλιακά κύτταρα, και με αυτό τον τρόπο παρεμποδίζουν την προσκόλληση των παθογόνων. Η παρεμπόδιση της προσκόλλησης μπορεί να είναι το αποτέλεσμα ανταγωνισμού μεταξύ προβιοτικών στελεχών και των παθογόνων για τον ίδιο υποδοχέα ή από την επαγωγή παραγωγής βλέννης από τα προβιοτικά (Juntunen *et al.*, 2001, Schiffrin *et al.*, 1997 ; Hirano *et al.*, 2003)

Ένας άλλος μηχανισμός δράσης των προβιοτικών που σχετίζεται με ωφέλιμες επιδράσεις στην υγεία, είναι η παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων. Αυτές οι ενώσεις είναι σχεδόν πάντοτε χαμηλού μοριακού βάρους (LMW) (<1,000 Da), όπως π.χ οργανικά οξέα αλλά και οι βακτηριοσίνες (>1,000 Da) (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Τα οργανικά οξέα, ιδιαίτερα το γαλακτικό οξύ και το οξικό, αναστέλλουν την ανάπτυξη Gram-αρνητικών βακτηρίων και έχουν θεωρηθεί ως οι κύριες αντιμικροβιακές ενώσεις που ευθύνονται για την ανασταλτική δράση των προβιοτικών έναντι των παθογόνων (Alakomi *et al.*, 2000; De Keersmaecker *et al.*, 2006; Makras *et al.*, 2006). Η αδιάστατη μορφή του οργανικού οξέος εισέρχεται στο βακτηριακό κύτταρο και διίσταται μέσα στο κυτταρόπλασμα του, μειώνοντας το ενδοκυτταρικό pH. Η ενδεχόμενη μείωση του ενδοκυτταρικού pH ή η ενδοκυτταρική συσσώρευση της ιονισμένης μορφής του οργανικού οξέος μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο παθογόνων μικροοργανισμών (Ouwehand, 1998; Russell & Diez-Gonzalez, 1998).

Πολλά οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν αντιβακτηριακά πεπτίδια, συμπεριλαμβανομένων των βακτηριοσινών (Corr *et al.* 2009; Spinler *et al.*, 2017). Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από Gram-θετικά βακτήρια, όπως είναι η λακτασίνη Β που παράγεται από τον *L. acidophilus*, η πλανταρισίνη που παράγεται από τον *L. plantarum* και η νισίνη από τον *Lactococcus lactis*, έχουν ένα στενό φάσμα δραστηριότητας και δρουν μόνο έναντι σε πολύ φυλογενετικά στενά συγγενή τους βακτήρια, όπως άλλοι γαλακτοβάκιλλοι ή ταξινομικά συγγενή τους Gram θετικά βακτήρια. Μερικές βακτηριοσίνες είναι όμως, δραστικές έναντι και σε παθογόνα που μεταδίδονται από τρόφιμα (Nielsen *et al.*, 2010). Οι συνήθεις μηχανισμοί δράσης των βακτηριοσινών περιλαμβάνουν το σχηματισμό πόρων στα κύτταρα-στόχο και/ή την αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τους τοιχώματος (Hassan *et al.*, 2012).

Τα εντερικά βακτήρια παράγουν, επίσης, και έναν αριθμό από λιπαρά οξέα ευεργετικά για την υγεία. Είδη των γενών *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, που αποικίζουν τη γαστρεντερική οδό παράγουν λιπαρά οξέα, όπως το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ (Conjugated linoleic acid- CLA), το οποίο είναι ένας ισχυρός αντικαρκινικός παράγοντας. Επίσης στελέχη που παράγουν CLA παρουσιάζουν δράση κατά της παχυσαρκίας, καθώς και την ικανότητα να διαμορφώνουν τη σύνθεση των λιπαρών οξέων του ήπατος και του λιπώδους ιστού του ξενιστή, οι οποίες αποτελούν παρατηρήσεις που έχουν προκύψει από μελέτες σε ζωικά μοντέλα μυών (O'Shea *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2007). Είναι γνωστό ότι πολλά προβιοτικά στελέχη παράγουν μεταβολίτες που αναστέλλουν την αύξηση μυκήτων και άλλων βακτηρίων (Lindgren and Dobrogosz, 1990; Coloretto *et al.*, 2007).-αλλαγή με χρονολογική σειρά Επίσης, οι γαλακτοβάκιλλοι μπορούν να παράγουν αντιμυκητιακές ουσίες, όπως βενζοϊκό οξύ και λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας (Short-Chain Fatty Acids- SCFAs) (Oelschlaeger, 2010; Prema *et al.*, 2008; Sjogren, 2003).

Όσον αφορά στην ενίσχυση του επιθηλιακού εντερικού φραγμού, γνωρίζουμε ότι το εντερικό επιθήλιο βρίσκεται σε συνεχή επαφή με το περιεχόμενο του εντερικού αυλού και την εντερική χλωρίδα, που παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία. Ο εντερικός φραγμός είναι ένας σημαντικός αμυντικός μηχανισμός που χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της ακεραιότητας του επιθηλίου και για την προστασία του οργανισμού από το περιβάλλον. Ο εντερικός φραγμός στα υγιή άτομα αποτελείται από το στρώμα του βλενογόνου, τα αντιμικροβιακά πεπτίδια, το εκκριτικό σύστημα IgA και τα επιθηλιακά κύτταρα που σχηματίζουν μεταξύ τους ισχυρές συνδέσεις (tight junctions) (Ohland & Macnaughton, 2010). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η ενίσχυση της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στη δημιουργία των ισχυρών συνδέσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων, είναι ένας πιθανός μηχανισμός για την ενίσχυση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού (Anderson *et al.*, 2010). Μερικοί γαλακτοβακίλλοι, για παράδειγμα, ρυθμίζουν την έκφραση πολλών γονιδίων, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες προσκόλλησης, όπως η E-καντερίνη (E-cadherin) και η β-κατενίνη (β-catenin) (Hummel *et al.*, 2012).

Η διαταραχή της λειτουργίας του εντερικού φραγμού μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα εντερικές λοιμώξεις, κοιλιοκάκη, μερικές αυτοάνοσες ασθένειες, όπως είναι ο διαβήτης τύπου 1 και η νόσος του φλεγμονώδους εντέρου. Η κατανάλωση προβιοτικών βακτηρίων μπορεί να συμβάλει στην βελτίωση της λειτουργίας του εντερικού φραγμού (Hooper *et al.*, 2001; Sakaguchi *et al.*, 2002; Watts *et al.*, 2005; Sartor, 2006). Τα προβιοτικά είναι ικανά να επηρεάζουν πολλούς από τους μηχανισμούς λειτουργίας του επιθηλιακού φραγμού, είτε μειώνοντας την απόπτωση των εντερικών κυττάρων, είτε αυξάνοντας την παραγωγή βλέννης (Gogineni *et al.*, 2013)

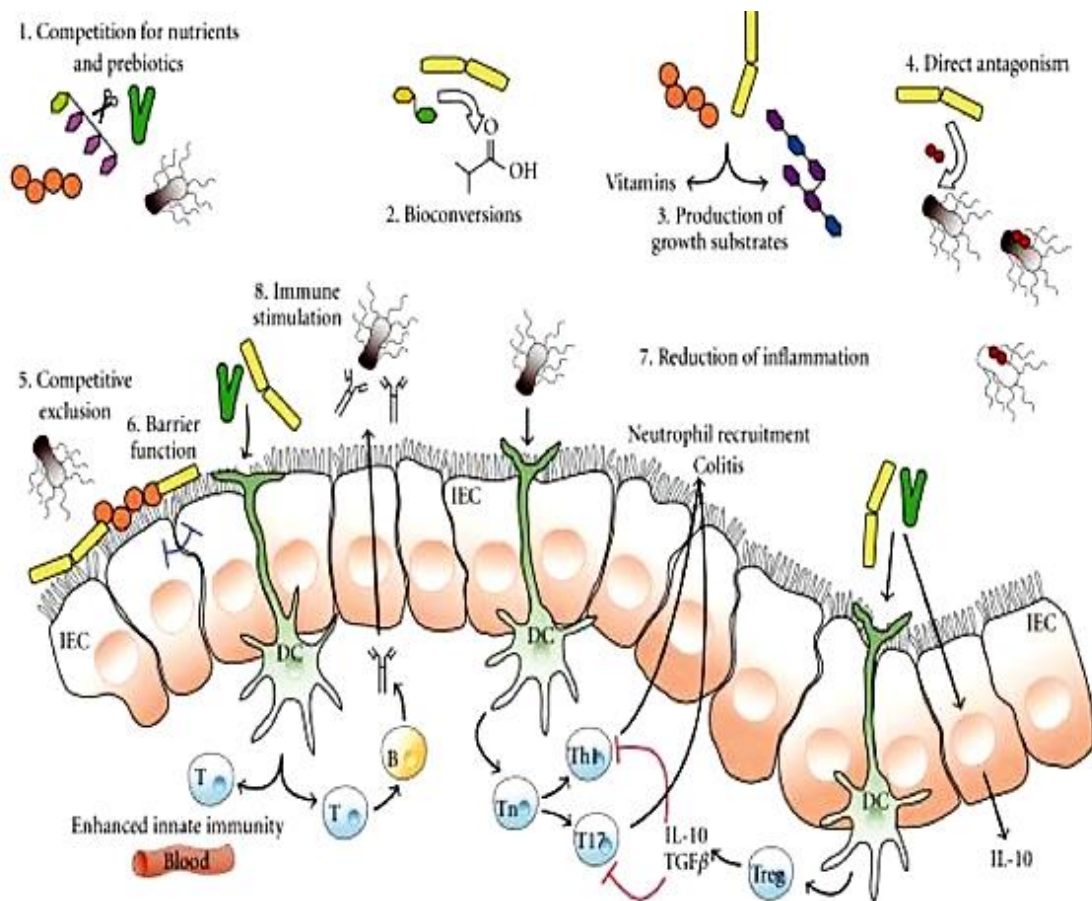
Δεδομένα από πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι τα προβιοτικά μπορούν να αποκαταστήσουν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού μετά από βλάβη. Μπορούν να αποκαστήσουν την ακεραιότητα του βλενογόνου αλλά και να προκαλέσουν την αναδιαμόρφωση του πλέγματος των ισχυρών συνδέσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων (Otte & Podolsky, 2004; Parassol *et al.*, 2005; Zyrek *et al.*, 2007; Stetinova *et al.*, 2010).

Τα προβιοτικά μπορούν να προάγουν την έκφραση των βλεννινών (mucins) ως έναν μηχανισμό ενίσχυσης της λειτουργίας του εντερικού φραγμού και την παρεμπόδιση προσκόλλησης παθογόνων μικροοργανισμών. Οι βλεννίνες είναι πολύ σημαντικές μακρομοριακές γλυκοπρωτεΐνες του επιθηλιακού βλενογόνου και έχουν εδώ και καιρό συνδεθεί με την υγεία του ξενιστή (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

Επίσης, προβιοτικά στελέχη μπορούν να επάγουν την απελευθέρωση ντεφενσινών (defensins) από τα επιθηλιακά κύτταρα. Αυτά τα μικρά πεπτίδια-πρωτεΐνες είναι δραστικά έναντι βακτηρίων, μυκήτων και ιών και είναι ικανά να σταθεροποιούν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού (Furrle *et al.*, 2005).

Όσον αφορά στο ανοσοποιητικό σύστημα, αναφέρθηκε προηγουμένως, ότι τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να επηρεάσουν πολλούς τύπους κυττάρων που εμπλέκονται στις ανοσολογικές αποκρίσεις, όπως τα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού αυλού, τα δενδριτικά κύτταρα, τα μονοκύτταρα-μακροφάγα, τα Β-κύτταρα, τα Τ-κύτταρα, τα ρυθμιστικά Τ-κύτταρα και τα Natural Killer (NK) κύτταρα και συνεπώς να εκφράσουν την ανοσορρυθμιστική τους δράση (Gómez-Llorente *et al.*, 2010).

Πιο συγκεκριμένα, αναφέρονται οι επιδράσεις των προβιοτικών βακτηρίων στα δενδριτικά κύτταρα. Τα δενδριτικά κύτταρα (Dendritic Cells-DCs) είναι κύτταρα αντιγονοπαρουσίασης και δρουν ως αγγελιαφόροι του ανοσοποιητικού συστήματος. Προβιοτικά βακτήρια μπορούν να ρυθμίσουν την απόκριση των T1 βοηθητικών κυττάρων και να αναστείλουν την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως της ιντερλευκίνης 12 (IL-12), του νεκρωτικού παράγοντα TNF-α και της ιντερφερόνης γ (IFN-γ) από τα δενδριτικά κύτταρα (Hart *et al.*, 2004). Έχει διαπιστωθεί ότι τα προβιοτικά μπορούν να καταστέλλουν τη φλεγμονή του εντέρου, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης των υποδοχέων TLR (toll-like receptors), που αποτελούν τους πιο καλά μελετημένους υποδοχείς στο μηχανισμό της αρχικής απόκρισης του οργανισμού στα παθογόνα (Bermudez-Brito *et al.*, 2012). Επίσης, καταστέλλουν τη φλεγμονή του εντερικού βλεννογόνου μέσω της ρύθμισης της έκκρισης μεταβολιτών, οι οποίοι μπορεί να αναστέλλουν την είσοδο του TNF-α στα μονοπύρνα κύτταρα του αίματος και την αναστολή της σηματοδότησης για τον πρωτεϊνικό παράγοντα NF-κB στα εντεροκύτταρα (Gómez-Llorent *et al.*, 2010).



Σχήμα 2. Σχηματική απεικόνιση των πιθανών ή γνωστών μηχανισμών με τους οποίους τα προβιοτικά μπορεί να επηρεάζουν την εντερική χλωρίδα (O'Toole & Cooney, 2008).

1) ανταγωνισμός για τα θρεπτικά συστατικά, 2) βιομετατροπή, 3) παραγωγή θρεπτικών συστατικών, όπως εξωπολυσακχαρίτες ή βιταμίνες για άλλα βακτήρια, 4) άμεσος ανταγωνισμός (παραγωγή βακτηριοσινών), 5) αποκλεισμός της προσκόλλησης παθογόνων στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, 6) βελτίωση της λειτουργίας του εντερικού φραγμού, 7) μείωση της φλεγμονής και 8) διέγερση της ανοσοαπόκρισης (επίδραση στα επιθηλιακά κύτταρα, στα δενδριτικά κύτταρα, στα μονοκύτταρα/μακροφάγα και στα λεμφοκύτταρα: B-λεμφοκύτταρα- NK κύτταρα - T κύτταρα)

Όπως προαναφέρθηκε, η δράση των προβιοτικών επεκτείνεται και στον τρόπο επικοινωνίας μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων. Τα βακτήρια επικοινωνούν μεταξύ τους και με το περιβάλλον τους μέσω χημικών σηματοδοτικών μορίων που ονομάζονται αυτο-επαγωγείς (auto-inducers). Το φαινόμενο αυτό είναι το λεγόμενο quorum sensing, το οποίο μπορεί να εκτιμήσει το μέγεθος του βακτηριακού πληθυσμού, τη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών και άλλα χαρακτηριστικά του εκάστοτε οικοσυστήματος. Επιπλέον, το φαινόμενο αυτό μπορεί να ελέγξει τη γονιδιακή έκφραση ολόκληρης της μικροβιακής κοινότητας, ως απάντηση στις αλλαγές που πραγματοποιούνται στον αριθμό των κυττάρων (Schauder & Bassler, 2001; Vilà *et al.*, 2010).

Τα προβιοτικά, όπως για παράδειγμα, στελέχη που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*, αλλά και στελέχη του είδους *B. cereus*, μπορούν να παράγουν αυτο-επαγωγείς, οι οποίοι ελέγχουν την έκφραση γονιδίων λοιμογονικότητας σε πολυάριθμους μικροοργανισμούς. Το στέλεχος *Lactobacillus acidophilus* La-5, για παράδειγμα, εκκρίνει μία ένωση, η οποία εμποδίζει την παραγωγή ενός συγκεκριμένου αυτο-επαγωγέα από την *E. coli* O157, με αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά η μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται με τον αποικισμό της *E. coli* O157 στα αντίστοιχα περιβάλλοντα και να μειώνεται έτσι η τοξικότητα του βακτηρίου (Medellin-Pena *et al.*, 2007). Συνοπτικά, στον **Πίνακα 3** που ακολουθεί παρουσιάζονται με βάση σύγχρονες βιβλιογραφικές αναφορές οι κυριότεροι και πιο αντιπροσωπευτικοί μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών.

Πίνακας 3. Κυριότεροι μηχανισμοί δράσης των προβιοτικών μικροοργανισμών στον ξενιστή (European Society of Neurogastroenterology and Motility (ESNM)-GUT MICROBIOTA & PROBIOTICS #1, A selection of content from the Gut Microbiota for Health 2017, January 2018)

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
Παραγωγή μεταβολιτών, όπως SCFA	Gao <i>et al.</i> , 2017, Sanders <i>et al.</i> , 2018
Τροποποίηση της σύνθεσης και της λειτουργίας του μικροβιώματος του ξενιστή	Hemrajata & Versalovic 2013, O'Connell Motherway <i>et al.</i> , 2011
Διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού	Rao & Samak 2013
Διαμόρφωση-Τροποποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή	Yan & Polk 2011
Παραγωγή νευροδιαβιβαστών(neurotransmitters)	Wang <i>et al.</i> , 2016
Τροποποίηση της έκφρασης γονιδίων σε όργανα απομακρυσμένα από τη γαστρεντερική οδό , π.χ. συκώτι, λιπώδης ιστός)	Plaza-Diaz <i>et al.</i> , 2014
Επίδραση στα επίπεδα ορμονών	Clarke <i>et al.</i> , 2014
Προσκόλληση στον εντερικό βλεννογόνο και το επιθήλιο, αναστέλλοντας την προσκόλληση/ αύξηση παθογόνων μ/ο,	Bermudez-Brito <i>et al.</i> , 2012
Αναστέλλουν την έκφραση παραγόνων λοιμογονικότητας	Corr <i>et al.</i> , 2009
Παραγωγή ενζύμων (π.χ. λακτάση για τον καταβολισμό της λακτόζης στο λεπτό έντερο)	De Vrese <i>et al.</i> , 2001
Σύνθεση βιταμινών	Gu & Li 2016
Παραγωγή βακτηριοσινών	Corr <i>et al.</i> 2009, Spinler <i>et al.</i> , 2017

1.5 Δράσεις προβιοτικών ευεργετικές για την υγεία

Έχουν αναφερθεί πολλές ευεργετικές δράσεις στην ανθρώπινη υγεία που σχετίζονται με την πρόσληψη προβιοτικών. Αυτές περιλαμβάνουν την αναστολή παθογόνων βακτηρίων, όπως *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* και *Helicobacter* (Servin, 2004; Sgouras *et al.*, 2004), αλλά και τη μείωση των συμπτωμάτων της ατοπικής δερματίτιδας (Lee *et al.*, 2008) και τη διαχείριση των αλλεργικών ασθενειών (Kirjavainen *et al.*, 2003; Weston *et al.*, 2005).

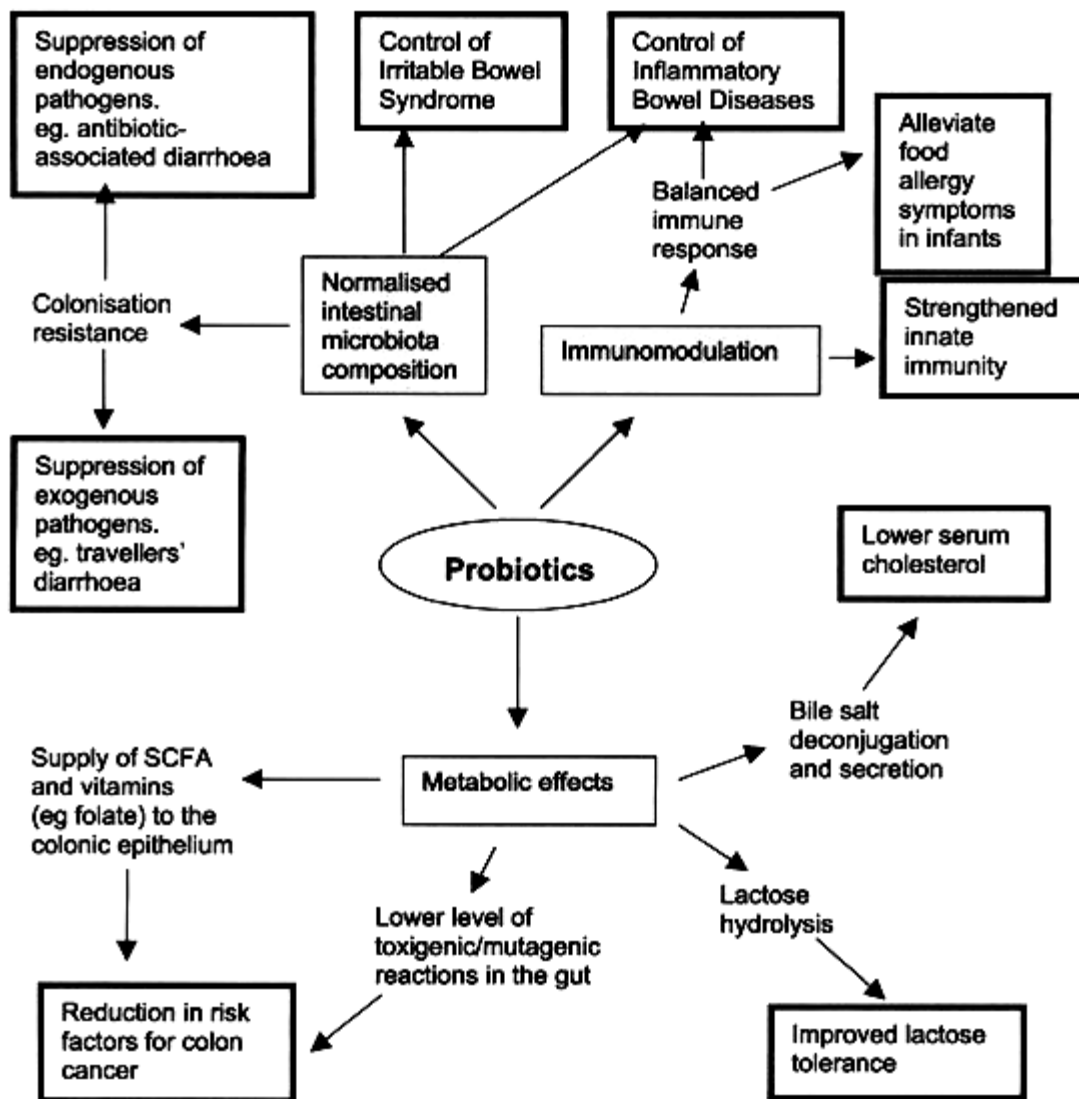
Έχουν, επίσης, αναφερθεί και αντικαρκινογόνες δράσεις (Rafter, 2003; Commane *et al.*, 2005, Capurso *et al.*, 2006), μείωση στη δυσανεξία της λακτόζης (Adolfsson *et al.*, 2004), ρύθμιση των ανοσολογικών αποκρίσεων (Gill *et al.*, 2001; Mercenier *et al.*, 2003; Hart *et al.*, 2004, Mazmanian *et al.*, 2008), πρόληψη φλεγμονωδών νόσων του εντέρου (Sartor, 2004; Kim *et al.*, 2005; Whorwell *et al.*, 2006), καθώς και μείωση των παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο (Klaver & van der Meer, 1993; De Smet *et al.*, 1998; Tuomilehto *et al.*, 2004). Ο Πίνακας 4 παρουσιάζει συνοπτικά τις κυριότερες ευεργετικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στη χρήση των προβιοτικών.

Πίνακας 4. Ευεργετικές δράσεις προβιοτικών (O'Toole & Cooney, 2008)

Οφέλη ξενιστή	Μηχανισμός προβιοτικών
Ανοσορρύθμιση <ul style="list-style-type: none"> • Ενεργοποίηση ανοσίας • Εξουδετέρωση φλεγμονής 	Αύξηση του αριθμού των T-κυττάρων και των επιπέδων δραστηριότητάς τους Προαγωγή της παραγωγής αντιφλεγμονωδών κυτοκινών
Μείωση του μικροβιακού φορτίου (παθογόνα)	<ul style="list-style-type: none"> • Ανταγωνιστικός αποκλεισμός • Άμεσος ανταγωνισμός
Βελτιωμένη λειτουργία του εντερικού φραγμού – Ισορροπία της GIT	Διατήρηση της ακεραιότητας του φραγμού
Μείωση κινδύνου εμφάνισης καρκίνου	Αποτοξίνωση από καρκινογόνους μεταβολίτες
Μειωμένα συμπτώματα δερματικών παθήσεων (ατοπική δερματίτιδα)	Καταστολή της υπερευαισθησίας
Καταπράνιση συμπτωμάτων του συνδρόμου ευερέθιστου εντέρου	Παραγωγή αντιυπερτασικών πεπτιδίων Μείωση χοληστερόλης με αποσυζεύξη (deconjugation) χολικών αλάτων
Καταπράνιση τροφικής δυσανεξίας	Καταβολισμός των διατροφικών συστατικών
Ενισχυμένη θρεπτική αξία	Παραγωγή βιταμινών
Μειωμένος κίνδυνος εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου	Απροσδιόριστο

Πρόσφατα, υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις μεταβολές που μπορούν να προκαλέσουν τα προβιοτικά στην εντερική μικροχλωρίδα (Azad *et al.*, 2018). Η γαστρεντερική οδός, όπως προαναφέρθηκε, είναι ένα περίπλοκο οικοσύστημα, το οποίο φιλοξενεί σωματικά κύτταρα, θρεπτικά συστατικά και μικροοργανισμούς.

Όσον αφορά στην αντιφλεγμονώδη δράση συγκεκριμένων προβιοτικών, η ικανότητά τους να ενισχύουν τις ανοσολογικές και μη ανοσολογικές λειτουργίες του εντερικού φραγμού συμβάλλει στο να μειώνεται η μετατόπιση βακτηριακού και άλλου ανοσογόνου υλικού από το έντερο στην κυκλοφορία του αίματος (Mennigen & Bruewer, 2009). Επιπλέον, υπάρχουν ορισμένα στοιχεία που συνδέουν τη χρήση προβιοτικών με τη μείωση διάφορων βιοδεικτών (biomarkers) της καρδιαγγειακής νόσου, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης της ολικής χοληστερόλης και της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (Low Density Lipoprotein-LDL) στον ορό του αίματος (Guo *et al.*, 2011), την πρόληψη της περιοδοντικής νόσου (Nase *et al.*, 2001) και την εμφάνιση συστηματικής φλεγμονής (Kekkonen *et al.*, 2008). Στο Σχήμα 3 απεικονίζονται οι ευεργετικές δράσεις των προβιοτικών όχι μόνο σε σχέση με το γαστρεντερικό σύστημα αλλά και τις επιδράσεις τους σε ασθένειες που αφορούν και άλλα συστήματα του ξενιστή.



Proposed health benefits stemming from probiotic consumption.

Σχήμα 3. Παρουσίαση των διαφόρων λειτουργιών των προβιοτικών και τα οφέλη τους για την υγεία του ξενιστή, όπως η διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού, η ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος, η σύνθεση βιταμινών, η ανοσοενισχυτική δράση και η βελτίωση της απορρόφησης της λακτόζης. Στα προβιοτικά έχει ακόμα αποδοθεί η ικανότητα να ενθαρρύνουν τη θεραπεία πολλών χρόνιων ασθενειών όπως ο διαβήτης τύπου 1, η υπέρταση και οι ουρογεννητικές παθήσεις. Λειτουργούν, επίσης, ως αντιοξειδωτικοί, αντιφλεγμονώδεις παράγοντες και ευεργετικοί έναντι της παχυσαρκίας (Al-Tawaha & Meng, 2018)

1.6 Αθηροσκλήρωση και στάδια εξέλιξης της πάθησης

Η αθηροσκλήρωση είναι μία εκφυλιστική πάθηση των μεγάλου και μεσαίου μεγέθους αρτηριών και χαρακτηρίζεται ως φλεγμονώδης διαταραχή των αγγείων (Tedgui & Mallat, 2006). Το 1958, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας όρισε την αθηροσκλήρωση ως "το σύνολο των μεταβολών του ενδοθηλίου των αρτηριών, που περιλαμβάνει την τοπική συγκέντρωση λιποειδών, βλεννοπολυσακχαριτών, αίματος και προϊόντων του ινώδους ιστού και ασβεστίου, με συνύπαρξη αλλοιώσεων στο μέσο χιτώνα". Η αθηροσκλήρωση θεωρείται μια μορφή χρόνιας αγγειακής φλεγμονής (Ross & Glomset, 1973), στην οποία η συστηματική αυτή φλεγμονή οδηγεί στη συσσώρευση πλάκας, του λεγόμενου αθηρώματος, στο εσωτερικό τοίχωμα των αγγείων. Οι πλάκες έχουν έναν πλούσιο σε λιπίδια πυρήνα και ένα λεπτό ινώδες εξωτερικό στρώμα που μπορεί να ραγίσει, προκαλώντας θρόμβωση των μικρών σε διάμετρο

αγγείων (Jin *et al.*, 2015). Οι Ross & Glomset (Ross & Glomset, 1973) ισχυρίστηκαν ότι η αθηροσκλήρωση είναι μια σειρά από βιολογικές αποκρίσεις που προκαλούνται από τον τραυματισμό του ενδοθηλιακού ιστού των αγγείων. Η εμφάνιση της αθηροσκλήρωσης χαρακτηρίζεται από διήθηση του εσωτερικού τοιχώματος των αρτηριών από λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL), όπου αυτή, με τη σειρά της, υφίσταται οξείδωση. Ακολούθως, τα λευκοκύτταρα (κυρίως μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα), τα οποία συγκεντρώνονται στην περιοχή από μόρια προσκόλλησης (adhesion molecules) που εκφράζονται από το φλεγμονώδες ενδοθήλιο, διεισδύουν στο εσωτερικό τοίχωμα των αγγείων και παράγουν φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και χημειοκίνες (Williams & Tabes, 1995).

Τα διηθητικά μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα, καταναλώνουν την οξειδωμένη LDL και μετατρέπονται σταδιακά σε μεγάλα αφρώδη κύτταρα (foam cells), τα οποία με τη σειρά τους προάγουν την ανάπτυξη πλακών. Τα μακροφάγα και τα αφρώδη κύτταρα εκκρίνουν μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας (matrix metalloproteinases-MMPs), οι οποίες βοηθούν στην αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας της πλάκας, εξασθενίζοντας έτσι το ινώδες εξωτερικό στρώμα και αποσταθεροποιώντας την αθηρωματική πλάκα (Libby & Ridker, 2011). Η ενδεχόμενη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας θα προκαλέσει σχηματισμό θρόμβου.

Εάν δεν ελέγχονται σε ικανοποιητικό βαθμό, οι αθηρωματικές πλάκες μπορούν να φράξουν τον αρτηριακό αυλό, οδηγώντας σε καρδιαγγειακές παθήσεις (cardiovascular diseases-CVDs), όπως στεφανιαία καρδιακή νόσο (coronary heart disease-CHD), καρδιακή προσβολή, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο ή στηθάγχη.

Η εξέλιξη της αθηρωμάτωσης είναι αργή και μπορεί να επηρεαστεί από μη τροποποιήσιμους γενετικούς παράγοντες, αλλά και από το φύλο και την ηλικία, καθώς και από παράγοντες που μπορούν να τροποποιηθούν, όπως ο καθιστικός τρόπος ζωής και το καπνίσμα (Mercado & Jaimes 2007; Warren *et al.*, 2010). Η αθηροσκλήρωση είναι αποτέλεσμα χρόνιας φλεγμονής, που μπορεί να προκληθεί από μετατόπιση βακτηριακών συστατικών από την στοματο-γαστρεντερική οδό στην κυκλοφορία (Chan *et al.*, 2016). Οι μικροβιακοί ανοσογόνοι παράγοντες που προέρχονται από την γαστρεντερική οδό έχουν αποδειχθεί ως βασικοί για την πρόκληση της φλεγμονής που οδηγεί στην εμφάνιση και καθορίζει την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης (Koren *et al.*, 2010). Ο ρόλος της μικροχλωρίδας του εντέρου στην παραγωγή ουσιών που σχετίζονται με την εμφάνιση αθηροσκλήρωσης, όπως η χολίνη, το N-οξειδιο της τριμεθυλαμίνης και η βεταΐνη είναι καθοριστικός (Wang *et al.*, 2011). Επίσης, η φυλογενετική συγγένεια που υφίσταται μεταξύ βακτηρίων της αθηρωματικής πλάκας και της στοματικής και εντερικής μικροχλωρίδας (Koren *et al.*, 2011) επιβεβαιώνουν τη σημασία των βακτηριδίων του εντέρου στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης.

1.6.1 Ζωικό μοντέλο μυών για μελέτη της αθηροσκλήρωσης

Με σκοπό να αποσαφηνιστούν οι παράγοντες που επηρεάζουν την αθηρογένεση ήταν καθοριστικής σημασίας η ανάπτυξη ζωικών μοντέλων μυών για τη μελέτη της αθηροσκλήρωσης. Μεταξύ των διαθέσιμων μοντέλων, οι μύες που στερούνται την απολιποπρωτεΐνη E (ApoE knock-out mice) είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο, το οποίο εμφανίζει υπερχοληστερολαιμία (Zhang *et al.*, 1992; Véniant *et al.*, 2001) και έχει την τάση να αναπτύσσει αυθόρμητα αθηροσκληρωτικές βλάβες ακόμα και με την κατανάλωση φυσιολογικής, μη υπερλιπιδαιμικής διαίτας (Karen & Leitersdorf, 2004).

Το μοντέλο μυών ApoE knock-out σηματοδότησε μια νέα εποχή για την έρευνα των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Το μοντέλο αναπτύχθηκε το 1992 (Piedrahita *et al.*, 1992; Plump *et al.*, 1992) με ομόλογο ανασυνδυασμό εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων και είναι σήμερα το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο προκλινικό μοντέλο αθηροσκλήρωσης (Zhang *et al.*, 1992; Jawien, 2012).

Η απολιποπρωτεΐνη E (ApoE) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που συντίθεται κυρίως στο ήπαρ και τον εγκέφαλο και αποτελεί συστατικό όλων των λιποπρωτεϊνών εκτός από τις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL). Λειτουργεί ως σημείο σύνδεσης (ligand) για

υποδοχείς που συμβάλλουν στην αναγνώριση και την εκκαθάριση των χυλομικρών και των καταλοίπων των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL). Η ApoE επίσης συντίθεται από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα στα αγγεία και θεωρείται ότι έχει τοπικές επιδράσεις στην ομοίωση της χοληστερόλης και στις φλεγμονώδεις διεργασίες σε αγγεία που παρουσιάζουν αθηρωματικές πλάκες (Curtiss & Boisvert, 2000). Συνεπώς, οι ApoE knock-out μύες παρουσιάζουν καθυστερημένη εκκαθάριση λιποπρωτεϊνών και συνεπώς αναπτύσσουν υπερ- και δυσλιποπρωτεϊναιμία (Von Holt *et al.*, 2009), σοβαρή υπερχοληστερολαιμία και αθηρωματικές αλλοιώσεις, ακόμη και όταν βρίσκονται σε φυσιολογική, μη υπερλιπιδαιμική διαίτα. Οι εναποθέσεις λίπους στις αρτηρίες παρατηρούνται ήδη στους 3 μήνες μετά τη γέννησή τους (Tamminen *et al.*, 1999; De Leon *et al.*, 2014). Επομένως, το ζωικό μοντέλο ApoE knock-out μύων είναι ένα καλά μελετημένο μοντέλο για την ανθρώπινη αθηροσκλήρωση (Sasso *et al.*, 2016).

1.6.2 Αντιαθηρωματική δράση προβιοτικών μικροοργανισμών

Έχει καταδειχθεί η ικανότητα προβιοτικών στελεχών να καταστέλνουν φλεγμονώδεις μηχανισμούς που εμπλέκονται στην αθηρογένεση. Σύμφωνα με τους Chen *et al.* (2013), η χορήγηση του *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 σε ζωικό μοντέλο μύων που στερούνταν την απολιποπρωτεΐνη E (ApoE knock-out mice) επιβράδυνε την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης μέσω της ρύθμισης του οξειδωτικού στρες και συγκεκριμένων φλεγμονωδών διεργασιών που συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου. Επίσης, σύμφωνα με τους Chan *et al.* (2016), η χορήγηση του προβιοτικού μίγματος VSL#3 σε ApoE knock-out μύες μείωσε τη φλεγμονή των αγγείων και την αθηρογένεση που προκλήθηκε σε αυτά από την κατανάλωση υπερλιπιδαιμικής διαίτας. Επιπλέον, σύμφωνα με άλλη έρευνα των Chan *et al.* (2016), η χορήγηση του *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) σε ζωικό μοντέλο μύων ApoE μείωσε σημαντικά το μέγεθος της αθηρωματικής πλάκας και βελτίωσε διάφορους βιοδείκτες, όπως η ενδοτοξίνη, η οποία αποτελεί έναν ισχυρά υποψήφιο βιοδείκτη-εκκινητή της παχυσαρκίας και της αντίστασης στην ινσουλίνη (Cani *et al.*, 2007).

1.7 Σκοπός της μελέτης

Δεδομένων των προαναφερθέντων δράσεων των προβιοτικών στην υγεία, και ιδιαίτερα στις ευεργετικές επιδράσεις τους στην εντερική μικροχλωρίδα, έναντι παθογόνων βακτηρίων, αλλά και στην αντιφλεγμονώδη συμπεριφορά τους, στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η δυναμική μεταβολή του εντερικού περιεχομένου σε ζωικό μοντέλο ApoE knock-out μύων, έπειτα από τη χορήγηση ενός προβιοτικού μικροοργανισμού, *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179. Επιπλέον εξετάστηκε παράλληλα και η δυναμική αντιφλεγμονώδης ικανότητά του ενάντια στη πρόκληση ήπιας αθηροσκλήρωσης.

Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη (Zoumproulou *et al.*, 2008), το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 179 επέδειξε αντιφλεγμονώδη δράση και in vitro και in vivo. Στην έρευνα αυτή ο *L. fermentum* αποδείχθηκε ο ισχυρότερος επαγωγέας της ρυθμιστικής αντιφλεγμονώδους κυτταροκίνης IL-10 (anti-inflammatory regulatory cytokine). Η υψηλή έκκριση IL-10 παρατηρήθηκε κατά τη διέγερση μονοπύρηνων κυττάρων ανθρώπινου περιφερικού αίματος (Human peripheral blood mononuclear cells) από το στέλεχος *L. fermentum* ACA-DC 179. Επίσης, επέδειξε in vitro υψηλό λόγο IL-10/IL-12, υποδηλώνοντας μία δυναμική αντιφλεγμονώδη δράση του. Στελέχη που επιδεικνύουν υψηλό λόγο IL-10/IL-12 έχει αποδειχθεί ότι προστατεύουν τα ποντίκια από την κολίτιδα που προκαλείται από trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS-induced colitis) (Grangette *et al.*, 2005; Foligne *et al.*, 2007).

Κεφάλαιο 2^ο :Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Ταυτοποίηση και τυποποίηση του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179

2.1.1 Στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο προβιοτικός μικροοργανισμός *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179. Το υπό μελέτη στέλεχος είναι ένα οξυγαλακτικό βακτήριο που απομονώθηκε από Κασέρι φυσικής ζύμωσης και διατηρείται στην συλλογή ACA-DC του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης, δύο ακόμα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων της συλλογής:

α) *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 2882, στέλεχος, το οποίο απομονώθηκε από κοπανιστή και

β) *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 4010^T [τυπικό στέλεχος (type strain) από ξένη συλλογή μικροοργανισμών, Culture Collection BCCM- LMG, Belgium], το οποίο απομονώθηκε από ζυμώμενα παντζάρια.

Για την ανάπτυξη των τριών οξυγαλακτικών βακτηρίων που εξετάστηκαν χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (ζωμός-broth) de Man, Rogosa και Sharp (MRS, Biokar Diagnostics, Beauvais, France), με 1% (v/v) εμβόλιο. Πιο συγκεκριμένα, 50μl καλλιέργειας από τα φιαλίδια των μικροοργανισμών που συντηρούνταν στους -80° C ανανεώθηκαν σε 5 ml MRS broth. Όλα τα στελέχη αναπτύχθηκαν υπό μικροαερόφιλες συνθήκες για 18-20 h σε επωαστικό κλίβανο 37° C.

2.1.2 Συνθήκες συντήρησης

Όλα τα προαναφερθέντα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων φυλάσσονταν σε ειδικά φιαλίδια σε MRS broth εμπλουτισμένο με τον κρυσταλλικό παράγοντα γλυκερόλη (Fluka Analytical, St. Gallen, Switzerland) 20% (v/v) στους -80° C.

2.1.3 Καταμέτρηση αποικιών (cfu)

Από την καλλιέργεια των 18-20 h σε MRS broth στους 37° C πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα Ringer (Oxoid, UK). Οι αραιώσεις στρώθηκαν σε τρυβλία MRS άγαρ 1.5% (w/v) και επώαστηκαν για 48 h σε μικροαερόφιλες συνθήκες στους 37° C. Η καμέτρηση των αποικιών έγινε με μετρητή αποικιών (Gallenkamp Colony Counter). Για τον υπολογισμό του τελικού πληθυσμού χρησιμοποιήθηκε ο κάτωθι τύπος:

ΤΥΠΟΣ: $[X1 + X2 + X3 + X4 / (n_1 + 0,1 X n_2)] \times 10$ συντελεστής μικρότερης αραιώσης

Όπου X1 :Ο αριθμός των αποικιών στο 1^ο τρυβλίο της μικρότερης αραιώσης

X2 : Ο αριθμός των αποικιών στο 2^ο τρυβλίο της μικρότερης αραιώσης

X3 : Ο αριθμός των αποικιών στο 1^ο τρυβλίο της μεγαλύτερης αραιώσης

X4 : Ο αριθμός των αποικιών στο 2^ο τρυβλίο της μεγαλύτερης αραιώσης

n₁ : Ο αριθμός των τρυβλίων που καταμετρήθηκαν στη μικρότερη αραιώση

n₂ : Ο αριθμός των τρυβλίων που καταμετρήθηκαν στη μεγαλύτερη αραιώση

2.2 Ταυτοποίηση στελεχών

2.2.1 Χρώση κατά Gram

Για τη χρώση κατά Gram χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από μονές αποικίες 48 h και των τριών στελεχών, για τα οποία ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Μεταφορά και επίστρωση σε αντικειμενοφόρο πλάκα, χρώση με κρυσταλλικό ιώδες (Crystal violet, Sigma) για 1 min, στη συνέχεια, χρώση με ιώδιο (Lugol, Sigma) για 30 sec και έκπλυση με αιθανόλη, και τέλος προσθήκη σαφρανίνης (Safranin, Sigma) για 20 sec. Έπειτα από κάθε στάδιο χρώσης γινόταν έκπλυση των κυττάρων με απιονισμένο νερό. Με το πέρας της παραπάνω διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική εξέταση με τη χρήση ελαιοκαταδυστικού φακού (x100) και ταυτοποίηση των τριών λακτοβακίλλων, *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 2882 και *Lactobacillus fermentum* 4010^T.

2.2.2 Ζύμωση υδατανθράκων (API test)

Για την ταυτοποίηση των στελεχών σε επίπεδο είδους χρησιμοποιήθηκε αρχικά το σύστημα ζύμωσης 50 σακχάρων API 50 CHL (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής: Κύτταρα από μονές αποικίες 48 h και από τα τρία στελέχη ανανεώθηκαν σε MRS broth και τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 37° C για 24 h. Έπειτα, η καλλιέργεια των 24 h και από τα τρία στελέχη εξαπλώθηκε σε τρυβλία με MRS άγαρ και επώασθηκε στη θερμοκρασία των 37° C για 48 h. Μετά τον έλεγχο της καθαρότητας των στελεχών, η βιομάζα από κάθε τρυβλίο συλλέχθηκε με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου και έγινε η ανασύσταση της σε 2 ml αποστειρωμένου απιονισμένου νερού μέχρι να παρατηρηθεί θολερότητα επιπέδου 2 της κλίμακας McFarland. Στη συνέχεια, από το διάλυμα αυτό μεταφέρθηκαν 10-15 σταγονίδια σε ειδικό φιαλίδιο με τροποποιημένο θρεπτικό ζωμό MRS (API 50 CHL medium, Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France), χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα γυάλινα σιφόνια τύπου Pasteur. Στη συνέχεια, πληρώθηκαν οι κυψελίδες στα ειδικά πλαστικά κυψελωτά πλακίδια (strips) του συστήματος API με τον εμβολιασμένο ζωμό. Έπειτα οι κυψελίδες καλύφθηκαν με αποστειρωμένο παραφινέλαιο. Τέλος, τα παραπάνω πλακίδια τοποθετήθηκαν στον πλαστικό δίσκο επώασης και επώασθηκαν αερόβια σε κλίβανο στους 37° C για 48 h.

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης των πλακιδίων, η ζύμωση των σακχάρων κάθε κυψέλης από το βακτήριο κατά την ανάπτυξή του έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος, και κατά συνέπεια την πτώση του pH και την αλλαγή του χρώματος του δείκτη σε κάθε κυψελίδα. Στην περίπτωση μας, η θετική δοκιμή αντιστοιχούσε στην αλλαγή του χρώματος του μωβ δείκτη της βρωμοκρεσόλης που περιέχεται στις κυψελίδες, το οποίο άλλαξε σε κίτρινο. Το βιοχημικό προφίλ και των τριών στελεχών, μετά τη δοκιμή ζύμωσης των σακχάρων, μεταφέρθηκε σε ηλεκτρονικό υπολογιστή και πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίησή τους σε επίπεδο είδους (*Lactobacillus fermentum*) με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού της Biomérieux (API LAB plus v. 3.3.3, Biomérieux), το οποίο παρέχει βάση δεδομένων για την ταυτοποίηση των στελεχών.

2.3 Μοριακή ταυτοποίηση

2.3.1 Απομόνωση βακτηριακού DNA από τα κύτταρα και έλεγχος της ποιότητάς του

Για την απομόνωση του γενωμικού DNA (gDNA) από τα τρία βακτηριακά στελέχη, χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Pitcher *et al.* (1989) μερικώς τροποποιημένο. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε στηρίζεται στη χρήση θειοκυανιούχου γουανιδίνης (guanidinium thiocyanate), ενός ισχυρού αποδιατακτικού παράγοντα, με στόχο την απομόνωση υψηλής ποιότητας και καθαρότητας DNA. Τα στάδια της διαδικασίας απομόνωσης περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

1. Εμβολιασμός υγρού θρεπτικού υποστρώματος, MRS broth, από τα φιαλίδια των στελεχών που διατηρούνται στους -80°C (50 μl από τα vial σε 5 ml MRS broth-εμβόλιο 1% v/v). Επώαση καλλιέργειας για 24-48 h.
2. Συλλογή κυττάρων από την υγρή καλλιέργεια στο τέλος της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης με φυγοκέντρηση (10.000 rpm/ 2 min/ 25°C). Το ίζημα των κυττάρων πρέπει να έχει μέγεθος μεγαλύτερο από ένα κόκκο ρυζιού. Επιλέγεται η λογαριθμική φάση ανάπτυξης για τη συλλογή των κυττάρων, ώστε να αποφευχθεί η αποικοδόμηση του γενωμικού DNA από περιοριστικές ενδονουκλεάσες που απελευθερώνονται μετά τη λύση των κυττάρων.
3. Απόχυση του υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml ρυθμιστικού φωσφορικού διαλύματος PBS (0,8% w/v NaCl, 0,02% w/v KCl, 0,144% w/v Na_2HPO_4 , 0,024% w/v KH_2PO_4), pH 7,4, με σκοπό την απομάκρυνση του θρεπτικού υλικού. Φυγοκέντρηση (10.000 rpm/ 2 min/ 25°C). Απομάκρυνση όλων των σταγονιδίων του υπερκείμενου με τη χρήση πιπέτας.
4. Απόχυση του υπερκείμενου και επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml PBS. Θέρμανση στους 65°C για 10 min με σκοπό την αποδιάταξη μέρους των πρωτεϊνών. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (10.000 rpm/ 2min/ 25°C) και πλήρης απομάκρυνση του υπερκείμενου με τη χρήση πιπέτας.
5. Στο ίζημα των κυττάρων προστίθενται 100 μl λυσοζύμης (50 mg/ml, L6876, Sigma-Aldrich, St. Louis, United States) σε διάλυμα TE:10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8 και σε θερμοκρασία 25°C , 10 μl μουτανολυσίνης (5 U/ μl , Sigma-Aldrich) και 20 μl ριβονουκλεάσης (RNase, Sigma-Aldrich). Τα δύο πρώτα ένζυμα συμβάλλουν στη λύση του κυτταρικού τοιχώματος, ενώ το τρίτο στην υδρόλυση του υπολειμματικού RNA. Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 30 min με περιοδική ανάδευση των erpendorfs ανά 10 min. Μετά τη λύση των κυττάρων και για αποφυγή αποικοδόμησης του DNA, ο χειρισμός των δειγμάτων πρέπει να γίνεται με ήπιες κινήσεις.
6. Μεταφορά των δειγμάτων σε απαγωγό. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 0,5 ml αντιδραστήριου GES (5 M Guanidium thiocyanate, 100 mM EDTA, 0,5% v/v Sarcosyl) και ακολουθεί ήπια ανάδευση και ψύξη σε πάγο για 5 min.
7. Στη συνέχεια προστίθενται 0,25 ml παγωμένου διαλύματος οξικού αμμωνίου (ammonium acetate) 7,5 M και μετά από ήπια ανάδευση τα δείγματα παραμένουν στον πάγο για 10 min.
8. Προσθήκη 0,5 ml χλωροφορμίου και ήπια ανάδευση ώστε να αναμειχθούν οι δύο φάσεις. Φυγοκέντρηση σε παγωμένη φυγόκεντρο (13.000 rpm / 10 min/ 4°C). Προσεκτική μεταφορά υπερκείμενου σε καθαρά erpendorfs και αποφυγή λήψης των πρωτεϊνών της μεσόφασης. Σε περίπτωση που οι φάσεις δεν είναι καλά διαχωρισμένες η φυγοκέντρηση επαναλαμβάνεται.
9. Προσθήκη 0,54 του όγκου παγωμένης ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση. Τα erpendorfs παρέμειναν στους -20°C o/n για να κατακρημνιστεί το DNA.
10. Φυγοκέντρηση (7.000 rpm/ 2 min/ 4°C) και απόχυση του υπερκείμενου.
11. Προσθήκη 0,7 ml παγωμένης αιθανόλης (70%) και ανάδευση για επαναιώρηση του ιζήματος, ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα. Φυγοκέντρηση (11.000 rpm/ 3 min/ 4°C) και απόχυση υπερκείμενου. Πλύσιμο με αιθανόλη συνολικά 3 φορές.
12. Πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης με φυγοκέντρηση (8.500 rpm/ 3 min/ 4°C) και χρήση πιπέτας. Τοποθέτηση των δειγμάτων σε κλίβανο στους 37°C για 8-10 min ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη, χωρίς όμως να στεγνώσει το ίζημα.
13. Ακολουθεί διαλυτοποίηση του DNA σε 30 μl TE buffer (10mmol/l Tris-HCl, 1mmol/l EDTA, pH 8).
14. Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 37°C για 24 h και κατόπιν στους 4°C .

Εν συνεχεία, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση και η καθαρότητα του απομονωμένου DNA. Οι μετρήσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση φασματοφωτομέτρου μικροποσοτήτων (Quawell Q5000 UV-Vis Spectrophotometer, Quawell Technology Inc., San Jose, USA) και του προγράμματος Q5000 V6.0.3, για την προβολή των δεδομένων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Κατά την έναρξη του προγράμματος, επιλέχθηκε το αντίστοιχο

λογισμικό της συσκευής Nucleic Acid - sample type: dsDNA 50. Αρχικά, έγινε καθαρισμός του τριχοειδούς και κατόπιν μηδενισμός της συσκευής με διάλυμα TE. Έπειτα, κατόπιν ήπιας ανάδευσης, τοποθετήθηκαν 2 μl DNA του δείγματος στην ειδική βάση όταν ο βραχίονας ήταν ανοιχτός. Όταν ο βραχίονας έκλεισε το δείγμα σχημάτισε μία στήλη, όπου με χρήση ακτινοβολίας οπτικών ινών, υπολογίστηκε η συγκέντρωση του δείγματος. Στο τέλος κάθε μέτρησης, η βάση καθαριζόταν με απορροφητικό χαρτί. Η φωτομέτρηση για το DNA έγινε σε μήκος κύματος 260nm και από την τιμή της οπτικής απορρόφησης (Optical Density), υπολογίστηκε αυτόματα η συγκέντρωση αυτού. Όσον αφορά στην καθαρότητα, έγινε παράλληλη μέτρηση του δείγματος στα 280 nm, για έλεγχο της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνες, με τον λόγο 260/280. Όταν ο λόγος είναι ανάμεσα στις τιμές 1.8-2, τότε το δείγμα θεωρείται καθαρό. Αντίθετα, όταν ο λόγος είναι μικρότερος από 1.8 τότε πιθανότατα υπάρχουν προσμίξεις πρωτεϊνών στο δείγμα. Ένα δεύτερο μέτρο καθαρότητας νουκλεϊνικών οξέων αποτελεί ο λόγος 260/230. Σε δείγματα υψηλής καθαρότητας από σάκχαρα, ο συγκεκριμένος λόγος κυμαίνεται μεταξύ 1,8 και 2,2. Μετά τη φωτομέτρηση, τα δείγματα αραιώθηκαν έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση όλων των δειγμάτων να είναι ίδια και ίση με 25 ng/μl, σύμφωνα με το πρωτόκολλο της PCR που ακολουθήσαμε στη συνέχεια.

Πριν τη διεξαγωγή της species-specific PCR, το γενωμικό DNA (gDNA) και από τα τρία στελέχη ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αгарόζης. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω υλικά:

- 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος (Running buffer) TAE (Tris-acetate-EDTA): 40 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8,0), 20 mM acetic acid
- Αγαρόζη 0,8% w/v (Sigma-Aldrich)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma-Aldrich): 2μl
- Μάρτυρας μοριακών μαζών 1 kb (DNA Ladder, Invitrogen, California, USA)

Χρησιμοποιήθηκαν 3μl διαλύματος φόρτωσης (Loading Buffer) στα eppendorfs για την προσθήκη χρωστικής καθώς και 6μl ύδατος για την αύξηση του όγκου του δείγματος.

Παρακάτω περιγράφεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή πηκτής αгарόζης και φόρτωσης των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση:

1. Διαλυτοποίηση της σκόνης αгарόζης στο διάλυμα TAE με θέρμανση μέχρι να βράσει.
2. Προσθήκη 2 μl βρωμιούχου αιθιδίου (τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml) πριν την στερεοποίηση της αгарόζης και μεταφορά του μείγματος σε κατάλληλο καλούπι προς στερεοποίηση.
3. Τοποθέτηση πλαστικής "χτένας" σε απόσταση περίπου 2 cm από την άκρη του καλουπιού, κάθετα βυθισμένη στο υγρό, έτσι ώστε μετά την στερεοποίηση της πηκτής να δημιουργηθούν τα κατάλληλα "πηγαδάκια", στα οποία τοποθετήθηκαν τα προς διαχωρισμό δείγματα DNA.
4. Μετά την στερεοποίηση, η αгарόζη τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE 1x, σε τόση ποσότητα, ώστε βρισκόταν πλήρως βυθισμένη σε αυτό.
5. Τα δείγματα προστέθηκαν στα πηγαδάκια με τη χρήση πιπέτας (18μl). Στο αρχικό και στο τελευταίο πηγαδάκι, προστίθενται 5 μl από τον μάρτυρα μοριακών μαζών.
6. Στη συνέχεια, η πηκτή της αгарόζης ηλεκτροφορήθηκε στην δεξαμενή ηλεκτροφόρησης στα 60 V για 120 min.

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης έγιναν ορατά με τη βοήθεια μιας συσκευής που εκπέμπει υπεριώδη ακτινοβολία (High Performance Ultraviolet Transilluminator, Ultra-Violet Products, UK), ώστε να δούμε με ευκρίνεια τις ζώνες δημιουργήθηκαν. Εάν η απομόνωση DNA είναι επιτυχής, τα τμήματα DNA που έχουν ενισχυθεί διακρίνονται ως πορτοκαλί ζώνες, λόγω του φθορισμού που παρουσιάζει το βρωμιούχο αιθίδιο όταν εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Η συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας συνδέεται με ειδική ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και έτσι η πηκτή αгарόζης φωτογραφίζεται άμεσα. Παράλληλα συνδέεται και με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Έτσι, με τη βοήθεια ενός ειδικού λογισμικού

προγράμματος (Doc-IT 2.4.0.2, Syngene, Cambridge, UK) έγινε εφικτή η αποθήκευση και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης του γενωμικού DNA.

2.3.2 Ταυτοποίηση στελεχών με την αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA

Το DNA των τριών βακτηριακών στελεχών ενισχύθηκε με την 16S species- specific PCR, με τους εκκινητές 16S F (5'- GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G -3') και 16S R (5'- AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC -3') (VBC-Biotech, Wien, Austria) (Ntougias *et al.*, 2006). Χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Taq ReadyMix (Kappa Biosystems, Cape Town, South Africa) και οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι ακόλουθες: 2 min στους 94 °C, 30 s στους 56°C, 1 min και 20 s στους 72 °C. Με το πέρας των 30 κύκλων, ακολούθησε παραμονή για 5 min στους 72 °C. Στον **Πίνακα 5** αναφέρονται αναλυτικά τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση.

Πίνακας 5 : Αντιδραστήρια για την ενίσχυση της γονιδιακής περιοχής του 16S rRNA

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανα αντίδραση
Taq ReadyMix	12,5 μl
DNA template	1 μl (200 ng/μl)
Primer F (10 pmol/μl)	1 μl
Primer R (10 pmol/μl)	1 μl
ddH ₂ O	9,5 μl
Τελικός όγκος	25 μl

Πριν σταλούν τα προϊόντα PCR για αλληλούχιση, έγινε καθαρισμός προκειμένου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα των εκκινητών, των δεοξυνουκλεοτιδίων, των μη ειδικών προϊόντων μικρού μοριακού μεγέθους και του ρυθμιστικού διαλύματος. Ο καθαρισμός πραγματοποιήθηκε με το Nucleospin gel and PCR clean-up (Macherey-Nagel, Duren, Germany). Η διαδικασία καθαρισμού στηρίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεϊκά οξέα προσδένονται σε στήλη χαλαζία (PCR Clean-up Column), σε περιβάλλον υψηλής ιοντικής ισχύος και χαμηλού pH που δημιουργείται από την προσθήκη χαστροπικού παράγοντα, ενώ η έκλυση του DNA γίνεται με νερό ή με ρυθμιστικό διάλυμα TE σε pH 8,3. Η διαδικασία έγινε σε θερμοκρασία δωματίου και περιλάμβανε τα εξής στάδια:

1. Προσθήκη διπλάσιου όγκου διαλύματος πρόσδεσης NT1 (Binding Buffer) στο φιαλίδιο με το προϊόν της PCR.
2. Μετάγγιση του διαλύματος στη στήλη χαλαζία για πρόσδεση του DNA σε αυτή και φυγοκέντρηση της στήλης (11.000 rpm/ 1 min/ 25 °C). Απορρίψη του διηθήματος.
3. Προσθήκη στη στήλη 700 μl αλκοολούχου διαλύματος NT3 για καθαρισμό της μεμβράνης χαλαζία και φυγοκέντρηση (11.000 rpm/ 1 min/ 25 °C).
4. Η φυγοκέντρηση της στήλης επαναλαμβάνεται (μέγιστη ταχύτητα σε θερμοκρασία δωματίου) για να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα του NT3.
5. Επώαση σε κλίβανο στους 37 °C για 2 min για εξάτμιση της αιθανόλης.
6. Τοποθέτηση στήλης σε καθαρό φιαλίδιο και προσθήκη 16 μl από το διάλυμα έκλυσης NE (5mM Tris-HCl, pH 8,5) στη στήλη. Το DNA εκλύεται κάτω από της χαμηλής ιοντικής ισχύος συνθήκες και το ελαφρώς αλκαλικό pH του NE. Επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση της στήλης (11.000 rpm/ 2 min/ 25 °C).
7. Το διήθημα περιέχει, πλέον, το καθαρό προϊόν και φυλάσσεται στους -20 °C.

Τέλος, η ταυτοποίηση των αλληλουχιών μετά την αλληλούχισή τους, πραγματοποιήθηκε με σύγκριση αυτών με τις διαθέσιμες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank, χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>).

2.3.3 Ταυτοποίηση σε επίπεδο στελέχους με τη μέθοδο RAPD-PCR

Δείγματα γενωμικού DNA και από τα τρία στελέχη του είδους *Lactobacillus fermentum* που απομονώθηκαν με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω (παράγραφος 2.3) χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση RAPD-PCR, ώστε με τη μέθοδο αυτή να πραγματοποιηθεί ενίσχυση σε πολλά τυχαία τμήματα στο γονιδίωμα του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179. Χρησιμοποιήθηκαν δύο εκκινητές με αυθαίρετες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων (Gardiner *et al.*, 2002) : 5'ACGAGGCAC '3 και 5' ACGCGCCCT '3 σε τελικό όγκο αντίδρασης 25 μl που περιείχε: 12,5 μl 2xMix, 2,5 μl για κάθε εκκινητή (10pmol), 1,1 μl MgCl₂ (4mM) και 50ng DNA. Στο τελικό μίγμα για την RAPD-PCR προστέθηκε DyNAzyme II DNA Polymerase (Thermo Scientific, Germany) και με το Optimized DyNAzyme buffer να περιλαμβάνει 10 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25 °C), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ and 0.1 % Triton® X-100.

Χρησιμοποιήθηκε θερμικός κυκλοποιητής (SimplyAmp, Applied biosystems, ThermoFisher Scientific, Germany). Το DNA ενισχύθηκε για 36 κύκλους χρησιμοποιώντας το ακόλουθο προφίλ θερμοκρασιών: αρχική μετουσίωση (denaturation) στους 94° C για 5 λεπτά, στη συνέχεια, μετουσίωση στους 94° C για 30 δευτερόλεπτα, annealing στους 36° C για 30 δευτερόλεπτα και πολυμερισμό (polymerization) στους 72° C για 2 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιήθηκε και ένα τελικό βήμα επέκτασης (extension) στους 72° C για 10 λεπτά.

2.4 Μελέτη επιβίωσης του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 σε συνθήκες ψύξης(4° C)

Η μελέτη επιβίωσης του στελέχους *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 υπό ψύξη (4° C) πραγματοποιήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές χρονικές στιγμές: ημέρα 0, ημέρα 1, ημέρα 3 και ημέρα 6.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη του στελέχους σε 10 ml MRS (1% v/v εμβόλιο) σε σωληνάρια φυγόκεντρου τύπου falcon. Τα σωληνάρια παρέμειναν σε επωαστικό κλίβανο για 18 h στους 37° C. Με το πέρας των 18 h, τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν (SL 16R Centrifuge, Thermo Scientific, Germany) (5.000 rpm, 25° C, 3 min), πραγματοποιήθηκε απόχυση του υπερκείμενου και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε (πλύσιμο) σε 5 ml απιονισμένου νερού (dd H₂O). Μετά το πλύσιμο των κυττάρων, τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν για δεύτερη φορά (5.000 rpm, 25° C, 3 min), έγινε απόχυση του υπερκείμενου και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε στείρο ελεύθερου ενδοτοξίνης διαλύτη (Water For Injections-WFI, Demo S.A. Pharmaceutical Industry, Greece) έτσι ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση κυττάρων 5-8 x 10⁹ cfu/ml.

Τα επαναιωρημένα σε WFI κύτταρα παρέμειναν στους 4° C για 6 ημέρες και πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των πληθυσμών στις 0, 1, 3 και 6 ημέρες. Για την καταμέτρηση των κυττάρων εφαρμόστηκε η κλασική μέθοδος των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα Ringer (Oxoid, UK) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ενσωμάτωσή τους σε τρυβλία MRS άγαρ 1.5% (w/v). Η επώαση των τρυβλίων έγινε για 48 h σε μικροαερόφιλες συνθήκες στους 37° C και η καταμέτρηση των αποικιών πραγματοποιήθηκε σε μετρητή αποικιών (Gallenkamp Colony Counter). Για τον τελικό υπολογισμό του πληθυσμού, χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένος τύπος (παρ. 2.1.3).

Το πείραμα για τη μελέτη της επιβίωσης του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 υπό συνθήκες ψύξης (4° C) πραγματοποιήθηκε εις διπλούν (πείραμα 1 και 2).

2.5 Σταθερότητα ανάπτυξης του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 υπό συνθήκες ψύξης (4° C)

Η μελέτη της σταθερότητας της ανάπτυξης του στελέχους *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 ύστερα από παραμονή του υπό ψύξη (4° C) πραγματοποιήθηκε για τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές: ημέρα 1, ημέρα 3 και ημέρα 6.

Όπως και στην περίπτωση της μελέτης της επιβίωσης του στελέχους στους 4° C (παρ. 2.4) αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη του στελέχους σε 10 ml MRS (1% v/v εμβόλιο) σε σωληνάρια φυγόκεντρου τύπου falcon. Τα σωληνάρια παρέμειναν σε επωαστικό κλίβανο για 18 h στους 37° C. Με το πέρας των 18 h, τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν (5.000 rpm, 25° C, 3 min) και πραγματοποιήθηκε πλύσιμο των κυττάρων με 5 ml απιονισμένου νερό (dd H₂O). Τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν για δεύτερη φορά (5.000 rpm, 25° C, 3 min), έγινε απόχυση του υπερκείμενου και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε στείρο ελεύθερου ενδοτοξίνης διαλύτη (Water For Injections-WFI, Demo S.A. Pharmaceutical Industry, Greece) έτσι ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση κυττάρων 5-8 x 10⁹ cfu/ml. Τα επαναιωρημένα σε WFI κύτταρα παρέμειναν στους 4° C για 6 ημέρες.

Σε κάθε χρονικό σημείο (1, 3 και 6 ημέρες) 50 μl (1% v/v εμβόλιο), από τα σωληνάρια που διατηρούνταν υπό ψύξη, ενοφθαλμίστηκαν σε 5ml MRS broth. Οι καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37° C για 18 h. Με το πέρας των 18 h, έγινε καταμέτρηση των πληθυσμών του στελέχους με την κλασική μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα Ringer (Oxoid, UK) και στη συνέχεια ενσωμάτωσή τους σε τρυβλία MRS άγαρ 1.5% (w/v). Η επώαση των τρυβλίων έγινε για 48 h σε μικροαερόφιλες συνθήκες στους 37° C και η καταμέτρηση των αποικιών πραγματοποιήθηκε σε μετρητή αποικιών (Gallenkamp Colony Counter). Για τον τελικό υπολογισμό του πληθυσμού, χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένος τύπος (παρ. 2.1.3).

Το πείραμα για τη μελέτη της σταθερότητας ανάπτυξης του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 υπό συνθήκες ψύξης (4° C) πραγματοποιήθηκε εις διπλούν (πείραμα 1 και 2).

2.6 Ζωικό μοντέλο ApoE knock-out (ApoE^{-/-}) μυών για τη μελέτη της επίδρασης της χορήγησης του προβιοτικού στελέχους *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 στην δημιουργία αθηρωματικών πλακών και στην μεταβολή του εντερικού τους περιεχομένου

Στην παρούσα μελέτη χορηγήθηκε το προβιοτικό στέλεχος *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 σε ζωικό μοντέλο ApoE knock-out μυών με σκοπό τη μελέτη των μεταβολών της εντερικής μικροχλωρίδας και της πιθανής αντιφλεγμονώδους δράσης του σε κατάσταση ήπιας αθηρωμάτωσης. Χρησιμοποιήθηκαν μύες και των δύο φύλων που ήταν ομόζυγοι ως προς την έλλειψη της απολιποπρωτεΐνης E (apoE knockout mice – apoE^{-/-}) και εμφανίζουν αλλοιώσεις αθηρωμάτωσης ακόμα και με την κατανάλωση φυσιολογικής, μη υπερλιπιδαιμικής διαίτας (Meir and Leitersdorf, 2004; Paigen *et al.*, 1987; Pense *et al.*, 2009).

2.6.1 Πειραματόζωα

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Ιδρύματος ΙατροΒιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (I.IB.E.A.A), κάτω από συνεχή κτηνιατρική παρακολούθηση.

Εξήντα (60) C57B/6 μύες, ηλικίας 12 εβδομάδων τυχαιοποιήθηκαν σε έξι (6) ομάδες των 8-10 ατόμων η καθεμία (n= 8-10): Η 1^η ομάδα περιελάμβανε αρσενικά ζώα που διατρέφονταν με φυσική, μη υπερλιπιδαιμική διαίτα (normal chow diet) και λάμβαναν παράλληλα χαμηλή δόση του μικροοργανισμού (10⁶ cfu/ ημέρα), η 2^η αρσενικά ζώα που διατρέφονταν με φυσική, μη υπερλιπιδαιμική διαίτα και τους χορηγούνταν παράλληλα ο μικροοργανισμός σε υψηλή δόση (10⁹ cfu/ ημέρα), η 3^η θηλυκά ζώα που διατρέφονταν με φυσική, μη υπερλιπιδαιμική

δίαιτα και λάμβαναν παράλληλα χαμηλή δόση του μικροοργανισμού (10^6 cfu/ημέρα), η 4^η θηλυκά ζώα που διατρέφονταν με φυσική, μη υπερλιπιδαιμική δίαιτα και τους χορηγούνταν παράλληλα και ο μικροοργανισμός σε υψηλή δόση (10^9 cfu/ ημέρα), η 5^η ομάδα αρσενικά ζώα τα οποία διατρέφονταν με φυσική, μη υπερλιπιδαιμική δίαιτα, χωρίς να λαμβάνουν τον μικροοργανισμό (control group 1) και η 6^η θηλυκά ζώα που διατρέφονταν διατρέφονται με φυσική, μη υπερλιπιδαιμική δίαιτα (control group 2), χωρίς να λαμβάνουν τον μικροοργανισμό. Οι ομάδες των ζώων, η δίαιτα καθώς και η δόση χορήγησης του γαλακτοβακίλλου που λάμβαναν αναφέρονται συνοπτικά στον **Πίνακα 6**. Το βάρος και η φυσική κατάσταση των ζώων ελεγχόταν τουλάχιστον μία φορά εβδομαδιαίως.

Πίνακας 6. Ομάδες ApoE knock out μυών, δίαιτα και δόση μ/ο που λάμβαναν ανά ημέρα

Ομάδες ζώων	Γένος	Δίαιτα	Δόση χορήγησης/ ημέρα
1 ^η	♂	Φυσική, μη υπερλιπιδαιμική	10^6 cfu
2 ^η	♂	-//-	10^9 cfu
3 ^η	♀	-//-	10^6 cfu
4 ^η	♀	-//-	10^9 cfu
5 ^η	♂	-//-	WFI
6 ^η	♀	-//-	WFI

2.6.2 Δόση, μέθοδος και διάρκεια χορήγησης του μικροοργανισμού

Στις ομάδες των ζώων που λάμβαναν τον μικροοργανισμό παράλληλα με τη δίαιτα, χορηγούνταν ενδογαστρικά (intragastric gavage) 10^9 cfu/ ημέρα (high dose), και 10^6 cfu/ημέρα (low dose), τα οποία είχαν ανασυσταθεί σε 200 μl Water For Injections (WFI), μία φορά ημερησίως για το χρονικό διάστημα οκτώ (8) εβδομάδων. Στα ζώα που δεν λάμβαναν το προβιοτικό στέλεχος (ομάδες ζώων 5 και 6) χορηγούνταν, αντίστοιχα, 200 μl WFI ενδογαστρικά, μία φορά ημερησίως για το διάστημα των οκτώ (8) εβδομάδων. Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας, όλα τα ποντίκια υπέστησαν ευθανασία με ισοφλουράνιο και στη συνέχεια με καρδιοπαρακέντηση και παράλληλη αφαιμάξη.

2.6.3 Συλλογή κοπράνων και εντερικού περιεχομένου- Μικροβιολογικές αναλύσεις

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της μικροβιακής χλωρίδας (κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους) στα κόπρανα και το εντερικό περιεχόμενο των ζώων. Η συλλογή των κοπράνων πραγματοποιήθηκε από τους χώρους-κελιά διαβίωσης των ζώων τη μέρα 0, πριν την ενδογαστρική χορήγηση του μικροοργανισμού, στο τέλος της 4^{ης} εβδομάδας χορηγήσεων καθώς και στο τέλος της 8^{ης} εβδομάδας, όπου λήφθηκε επίσης εντερικό περιεχόμενο, μετά την ευθανασία. Σε όλα τα δείγματα πραγματοποιήθηκε μικροβιολογική ανάλυση με χρήση επιλεκτικών υποστρωμάτων και συνθηκών ανάπτυξης για οκτώ (8) ομάδες μικροοργανισμών.

Για το γένος *Lactobacillus* spp. χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα de Man, Rogosa και Sharp (MRS, Biokar Diagnostics, Beauvais, France), για το γένος *Bifidobacterium* spp. το θρεπτικό υπόστρωμα Bifidobacterium Agar, Modified (HiMedia Laboratories GmbH, Einhausen, Germany), για το γένος *Enterococcus* spp. το Kanamycin aesculin azide (KAA) agar (Merck, Darmstadt, Germany), για το γένος *Staphylococcus* spp. και *Micrococcus* spp. το υπόστρωμα Mannitol salt agar (MSA, LaBM, Lancashire, UK), για τα κολοβακτηρίδια (coliforms) το θρεπτικό υπόστρωμα Violet red bile agar (VRB, LaBM, Lancashire, UK), για τους ολικούς αερόβιους μικροοργανισμούς (Total aerobes), το Nutrient agar (NA, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, England), για τα ολικά αναερόβια (Total

anaerobes) το θρεπτικό υπόστρωμα Chalgrens-Wilkins agar (Ch-W, Becton Dickinson France S.A., Le Pont de Claix, France) και τέλος για το γένος *Clostridium* spp το υπόστρωμα Sulfite Polymyxin Sulfadiazine άγαρ (SPS agar-Merck, KGaA, Darmstadt, Germany). Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα, οι τεχνικές και οι συνθήκες επώασης για κάθε ομάδα μικροοργανισμών παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6**. Δείγματα κοπράνων και εντερικών περιεχομένων από τις ομάδες μυών που ευθανατώθηκαν έχουν κρατηθεί σε κατάλληλες συνθήκες (-80° C) για μεταγονιδιωματική ανάλυση.

Πίνακας 6 Θρεπτικά υποστρώματα και τεχνικές καταμέτρησης εντερικής μικροχλωρίδας μυών

Ομάδα μ/ο	Θρεπτικό υπόστρωμα	Τεχνική	Θερμοκρασία °C	Ώρες	Συνθήκες
<i>Lactobacillus</i> spp.	MRS agar	Pour	37	48	Αναερόβιος κλίβανος
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Bifidobacterium Agar, Modified	Pour	37	48	Αναερόβια GasPak
<i>Enterococcus</i> spp.	Kanamycin aesculin azide (KAA) agar	Spread	37	24	Αερόβια
<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Micrococcus</i> spp.	Mannitol salt agar (MSA)	Spread	37	24- 48	Αερόβια
Coliforms	Violet red bile agar (VRB agar)	Pour	37	24	Αερόβια
Total aerobes	Nutrient agar (NA)	Pour	37	24	Αερόβια
Total anaerobes	Chalgrens- Wilkins agar (Ch-W)	Pour	37	48	Αναερόβιος κλίβανος
<i>Clostridium</i> spp.	TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine) Agar	Pour	37	48	Αναερόβια GasPak

2.6.4 Αναλύσεις αίματος

Δείγματα αίματος λήφθηκαν από τα ζώα στις 60 ημέρες πριν από την ευθανασία, έπειτα από ολονύκτια νηστεία. Στον ορό του αίματος μετρήθηκαν τα επίπεδα της γλυκόζης (GLU), τα τριγλυκερίδια (TG), η ολική χοληστερόλη (CHOL), η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (HDL), η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL) και το ένζυμο του ήπατος γ-γλουταμυλοτρανσφεράση (γ-GT), χρησιμοποιώντας αυτόματο βιοχημικό αναλυτή στο μικροβιολογικό τμήμα του Ναυτικού Νοσοκομείου Αθηνών.

2.6.5 Ποσοτικοποίηση αλλοιώσεων που σχετίζονται με την δημιουργία και τη σταθερότητα των αθηρωματικών πλακών-Ιστολογική ανάλυση δειγμάτων

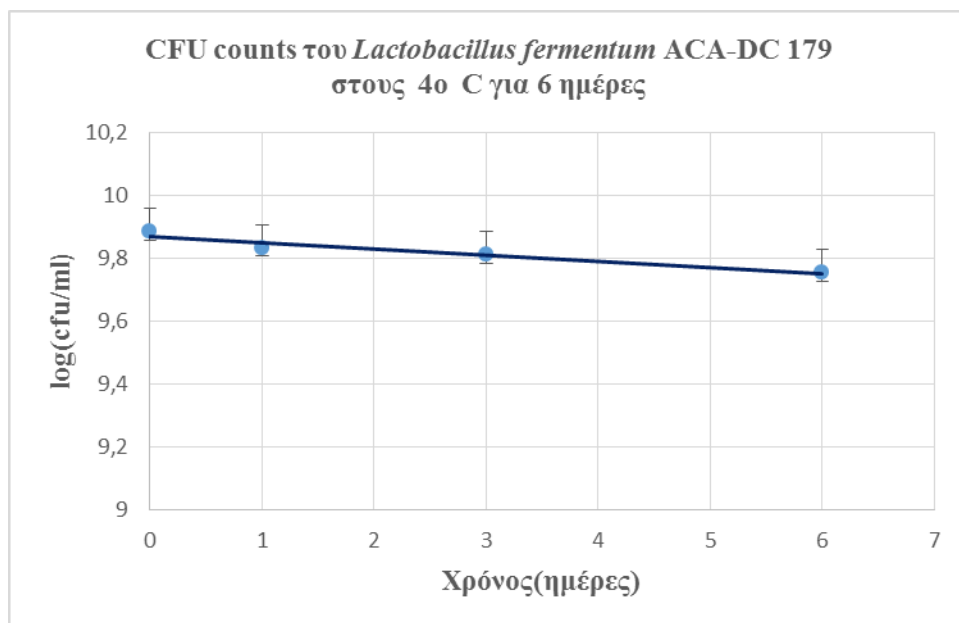
Στο τέλος των 8 εβδομάδων τα ζώα ευθανατώνονταν και λαμβανόταν ολόκληρη η καρδιά και το αορτικό τόξο, τα οποία εκπλένονταν με έγχυση αλατούχου φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (PBS) μέσω της αριστερής κοιλίας της καρδιάς. Ο καρδιακός μυς κοβόταν με χειρουργική λεπίδα σε δύο τμήματα στο ύψος των βαλβίδων. Τα δύο τμήματα τοποθετούνταν ξεχωριστά σε δύο διαφορετικές ιστολογικές κασέτες (Embedding cassettes, Kartell S.p.A.- Labware Division, Italy). Σε ιστολογικές κασέτες τοποθετούνταν επίσης οι καρωτίδες αρτηρίες και τμήμα του ήπατος. Οι ιστοί αυτοί συντηρούνταν για 18-20 h σε 10% φορμαλίνη (formalin 10%, Sigma, USA), στη συνέχεια εκπλένονταν κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης και τοποθετούνταν σε δοχεία με 70% αιθανόλη (Ethanol absolute HPLC grade, Fisher Scientific, USA), όπου παρέμεναν μέχρι την ενσωμάτωσή τους σε μπλόκ παραφίνης. Τα μπλοκ παραφίνης στα οποία είχε ενσωματωθεί το τμήμα της καρδιάς από το ύψος των βαλβίδων μέχρι το αορτικό τόξο υφίσταντο επεξεργασία με ιστολογικό μικροτόμο και λαμβάνονταν σειριακά ιστολογικά δείγματα πάχους 7μm από την αορτική βαλβίδα έως το αορτικό τόξο. Για την ποσοτική μορφομετρική ανάλυση των αλλοιώσεων που σχετίζονται με

την δημιουργία και τη σταθερότητα των αθηρωματικών πλακών, τα ιστολογικά αυτά δείγματα βάφονταν με τη χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης (hematoxylin/eosin stain-H&E) στο Τμήμα Ιστοχημείας του Ι.ΙΒ.ΕΑ.Α. Σε αντικειμενοφόρες πλάκες [Microscope slides polylysine, Menzel-Glaser (Thermo Scientific), Germany] τοποθετούνταν 3 σειριακές ιστολογικές τομές σε διαφορετικά βάθη τομών από το ύψος των βαλβίδων μέχρι και το αορτικό τόξο και μελετήθηκαν με τη χρήση μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου (Brightfield microscope) με φακό 5X στο Τμήμα Απεικόνισης του Ι.ΙΒ.ΕΑ.Α (Kadoglou *et al.*, 2011; Kadoglou *et al.*, 2012; Kadoglou *et al.*, 2013; Moustardas *et al.*, 2014; Katsimpoulas *et al.*, 2016). Επίσης, κατά τη λήψη των ιστών λαμβάνονταν σε ειδικά φιαλίδια (vials) δείγματα από το ήπαρ, τον σπλήνα, το πάγκρεας και τους νεφρούς από τα ζώα που ευθανατώνονταν, τα οποία διατηρούνταν προσωρινά σε δοχείο που περιείχε υγρό άζωτο και στη συνέχεια σε κατάλληλες συνθήκες (-80° C), μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή τους.

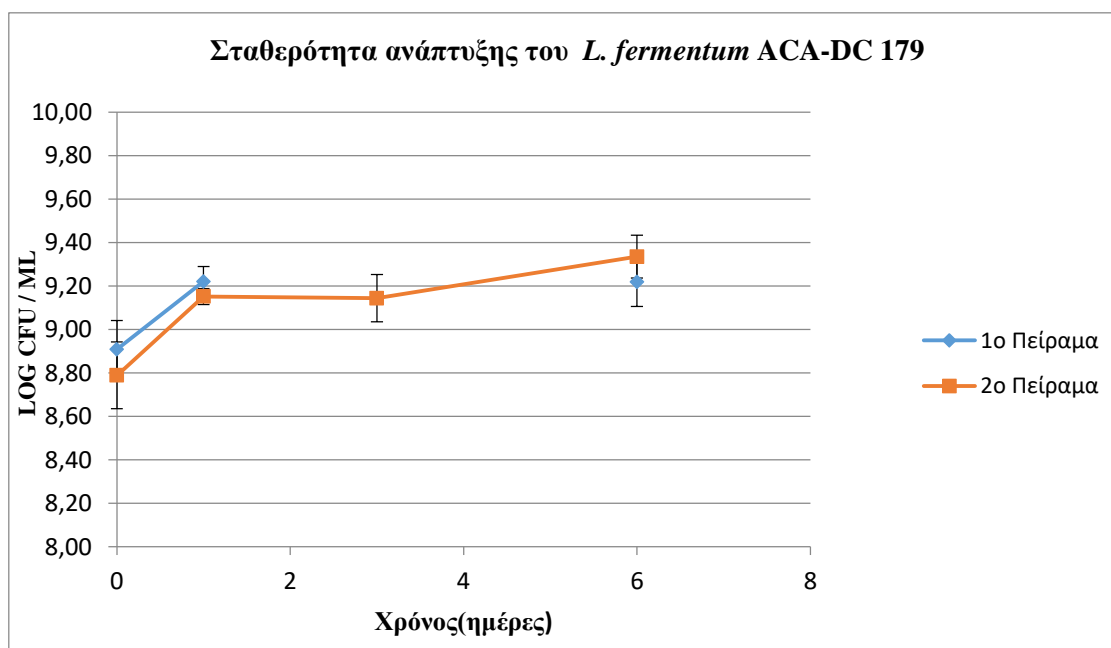
Κεφάλαιο 3^ο : Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Μελέτη επιβίωσης και σταθερότητας ανάπτυξης του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 υπό συνθήκες ψύξης (4^ο C)

Τα αποτελέσματα του πειράματος για τη μελέτη επιβίωσης του στελέχους υπό συνθήκες ψύξης και του πειράματος για τη μελέτη της σταθερότητας ανάπτυξης του στελέχους υπό συνθήκες ψύξης παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα (Σχήμα 5 και Σχήμα 6 αντίστοιχα).



Σχήμα 5 Έλεγχος επιβίωσης του *L. fermentum* ACA-DC 179 σε συνθήκες ψύξης
Έλεγχος της βιωσιμότητας (log cfu/mL) του *L. fermentum* ACA-DC 179 μετά από 0, 1, 3 και 6 ημέρες παραμονής του στους 4^ο C (καλλιέργεια μικροοργανισμού επαναιωρημένη σε Water For Injections-WFI). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή της κάθε ημέρας παρακολούθησης της επιβίωσης ± την τυπική απόκλιση (Average± SD)



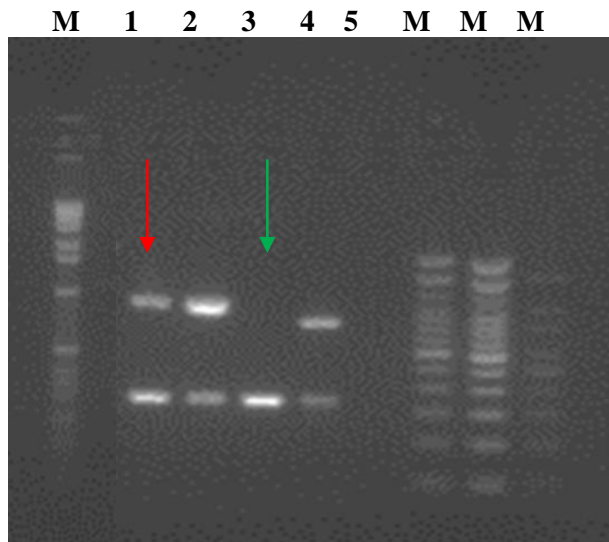
Σχήμα 6 Έλεγχος της σταθερότητας ανάπτυξης του *L. fermentum* ACA-DC 179 σε συνθήκες ψύξης (4° C)
 Ο έλεγχος της σταθερής ανάπτυξης του *L. fermentum* ACA-DC 179 εκφρασμένη σε log cfu/mL σε τέσσερις χρονικές στιγμές(χρονικά σημεία 0,1,3 και 6) πραγματοποιήθηκε έπειτα από την ανανέωση των καλλιιεργειών του στελέχους οι οποίες παρέμειναν για 0, 1, 3 και 6 ημέρες υπό συνθήκες ψύξης(4° C). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή του κάθε χρονικού σημείου παρακολούθησης της σταθερότητας ανάπτυξης ± την τυπική απόκλιση (Average± SD)

Έπειτα από τα πειράματα της βιωσιμότητας (**Σχήμα 5**) και της σταθερότητας ανάπτυξης (**Σχήμα 6**) του *L. fermentum* ACA-DC 179 σε συνθήκες ψύξης (4°C) παρατηρούμε ότι ο μικροοργανισμός επιβιώνει σε αυτές τις συνθήκες και χωρίς να επηρεάζεται ιδιαίτερα ο πληθυσμός του, γεγονός που βοήθησε στην επιλογή του τρόπου συντήρησης του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος, καθώς τα aliquots με τον μικροοργανισμό που ήταν επαναιωρημένος σε Water for Injections (WFI) διατηρούνταν στο ψυγείο (4°C) για έξι μέρες και καθένα από αυτά χορηγούταν καθημερινά στις ομάδες των ζώων.

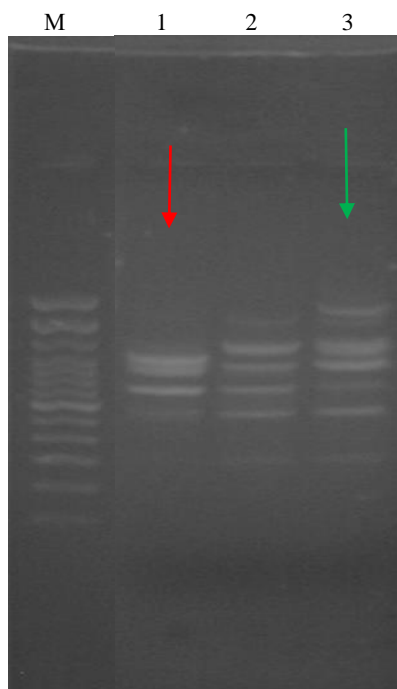
3.2 Ταυτοποίηση και τυποποίηση *L. fermentum* ACA-DC 179

Στην species-specific PCR που πραγματοποιήσαμε το type strain μας έδωσε το αναμενόμενο PCR product και τα υπόλοιπα στελέχη έντονα προφίλ στις 337 bp χαρακτηριστικά του είδους *L. fermentum* όπως σημειώνεται στη φωτογραφία της ηλεκτροφόρησης (**Σχήμα 7**). Στη συνέχεια, η ταυτοποίηση των στελεχών, μετά την αλληλούχησή τους, πραγματοποιήθηκε με σύγκριση αυτών με τις διαθέσιμες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων GenBank, χρησιμοποιώντας τη μηχανή αναζήτησης BLAST (Basic Local Alignment Tool) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>). Και για τα τρία στελέχη του είδους *Lactobacillus fermentum* που στάλθηκαν για ταυτοποίηση *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 2882 και *Lactobacillus fermentum* 4010T, εκείνη έγινε με query cover 100% και ποσοστό ταυτοποίησης (identification) 99%.

Στην RAPD-PCR που πραγματοποιήσαμε, τα τρία στελέχη έδωσαν διαφορετικά προφίλ (**Σχήμα 8**). Έτσι πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση σε επίπεδο στελέχους και συνεπώς, ήμαστε σε θέση να επιβεβαιώσουμε το γεγονός ότι το άνωθι στέλεχος ήταν αυτό που χορηγούνταν ενδογαστρικά στο ζωικό μοντέλο ApoE μών που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη.



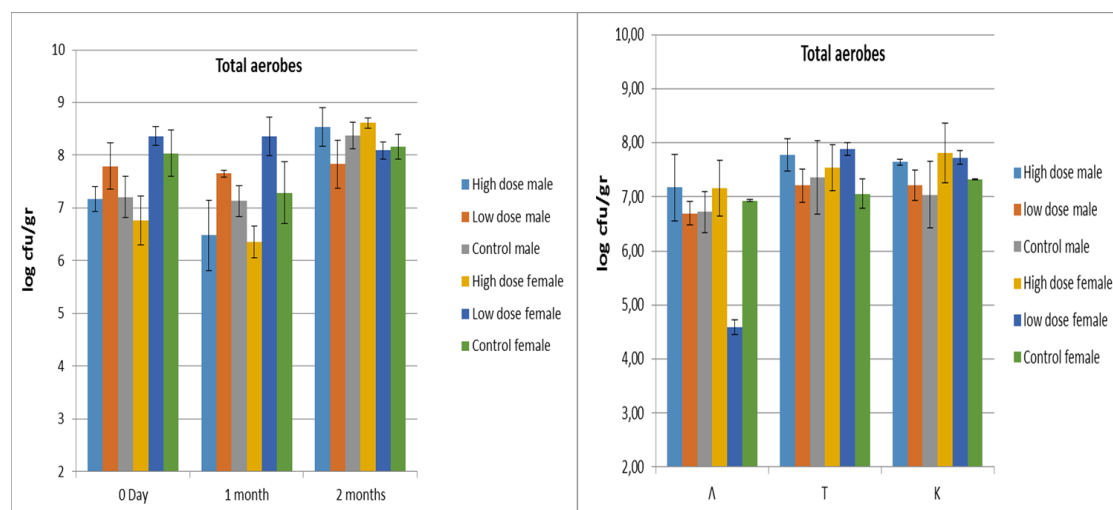
Σχήμα 7 Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης από species- specific PCR για τα ακόλουθα στελέχη 1. *L. fermentum* ACA-DC 179, 2. *L. fermentum* ACA-DC 2882 3. *L. fermentum* ACA-DC 4010T 4. *L. plantarum* ACA-DC 1468. Με βέλη σημειώνονται τα προφίλ του *L. fermentum* ACA-DC 179 και του type strain αντίστοιχα στις 337 bp.



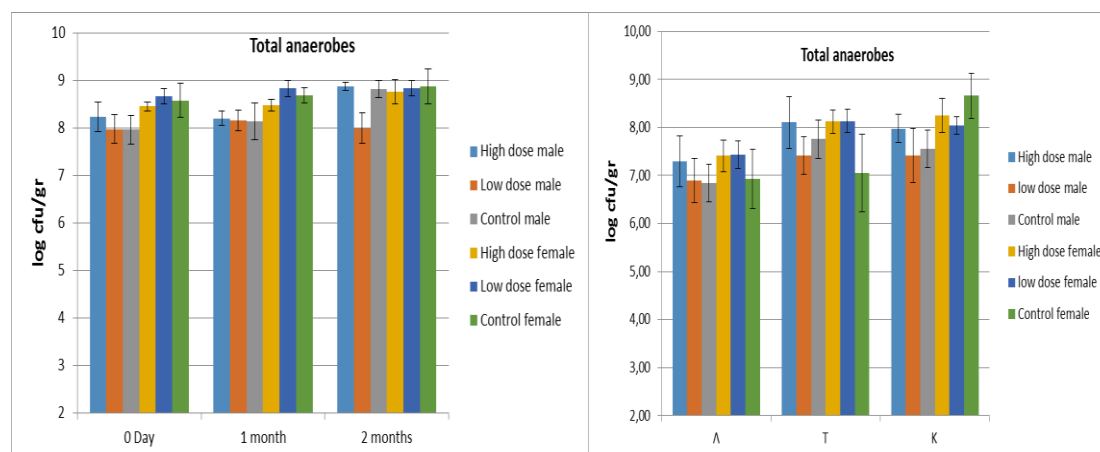
Σχήμα 8 Ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης από RAPD-PCR για τα ακόλουθα στελέχη 1. *L. fermentum* ACA-DC 179, 2. *L. fermentum* ACA-DC 2882, 3. *L. fermentum* ACA-DC 4010T. Με βέλη σημειώνονται τα προφίλ των *L. fermentum* ACA-DC 179 και του type strain αντίστοιχα.

3.3 Χορήγηση *L. fermentum* ACA-DC 179 και εντερική χλωρίδα μύων

Στα παρακάτω διαγράμματα (Σχήματα 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15) παρουσιάζονται τα αποτελέσματα καταμέτρησης των πληθυσμών ανά ομάδα μικροοργανισμών (cfu counts) που πραγματοποιήθηκε στα κόπρανα των ζώων ανά ομάδα ζώων εκφρασμένα σε log cfu/gr σε τρία χρονικά σημεία (0 days- 30 days- 60 days). Παράλληλα παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα από την καταμέτρηση των πληθυσμών ανά ομάδα μικροοργανισμών στα εντερικά περιεχόμενα από λεπτό έντερο, τυφλό και κόλον ανά ζώο στις 60 ημέρες.

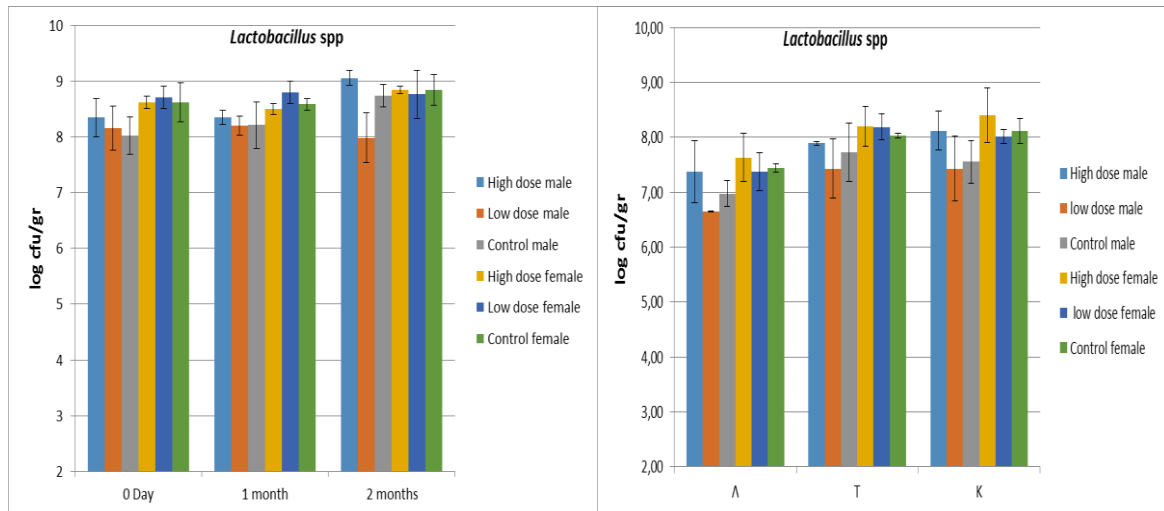


Σχήμα 9 Καταμέτρηση Total aerobes (πληθυσμός εκφρασμένος σε log cfu/gr) σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε υψηλή δόση (high dose male & female) σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε χαμηλή δόση (low dose male & female) καθώς και στα κόπρανα και το εντερικό περιεχόμενο ζώων, αρσενικά και θηλυκά, στα οποία δεν χορηγήθηκε το στέλεχος (control male & female). Η καταμέτρηση έγινε σε τρία (3) χρονικά σημεία : πριν τη χορήγηση του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 (Day 0), μετά από ένα μήνα χορήγησης του στελέχους (30 days) και μετά από δύο μήνες χορήγησης του (60 days) για τα κόπρανα και στις 60 days για τα εντερικά περιεχόμενα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή της καταμέτρησης \pm την τυπική απόκλιση (Average \pm SD).

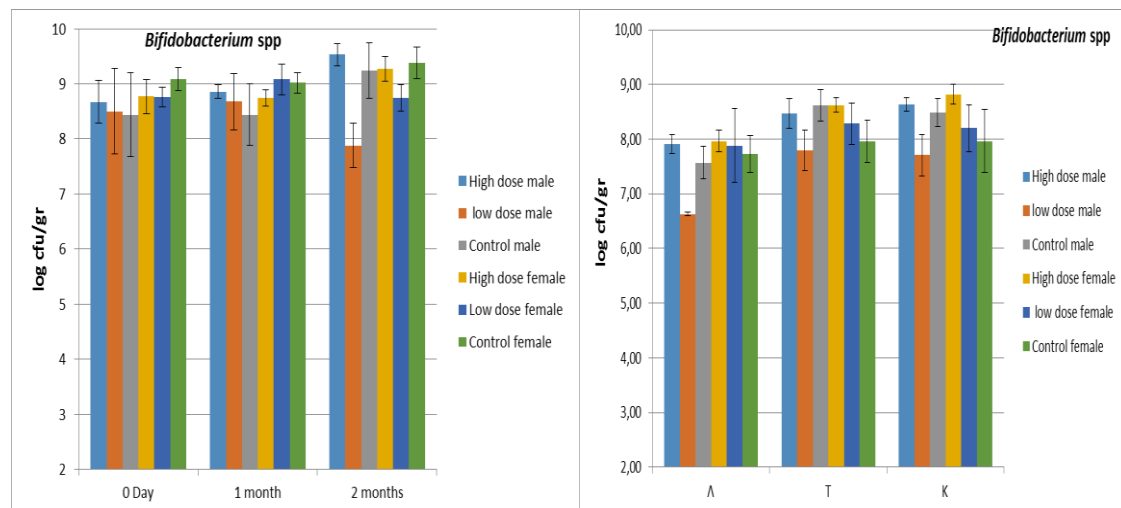


Σχήμα 10 Καταμέτρηση Total anaerobes (πληθυσμός εκφρασμένος σε log cfu/gr) σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε υψηλή δόση (high dose male & female) σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε χαμηλή δόση (low dose male & female) καθώς και στα κόπρανα και το εντερικό περιεχόμενο ζώων, αρσενικά και θηλυκά, στα οποία δεν χορηγήθηκε το στέλεχος (control male & female). Η καταμέτρηση έγινε σε τρία (3) χρονικά σημεία : πριν τη χορήγηση του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 (Day 0), μετά από ένα μήνα χορήγησης του στελέχους (30 days) και μετά από δύο μήνες χορήγησης του (60 days) για τα κόπρανα και στις 60

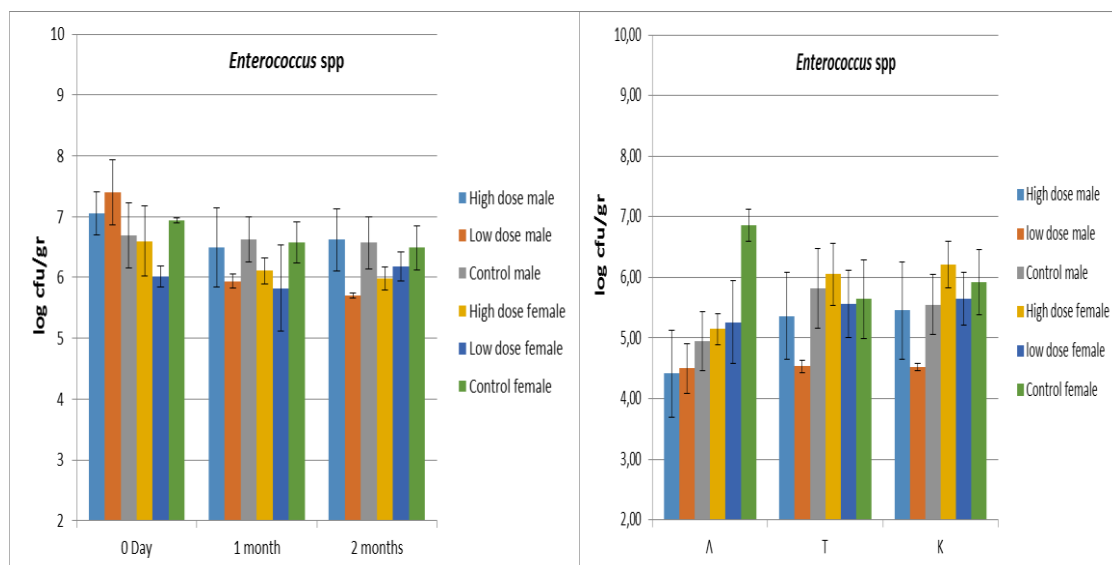
days για τα εντερικά περιεχόμενα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή της καταμέτρησης \pm την τυπική απόκλιση (Average \pm SD).



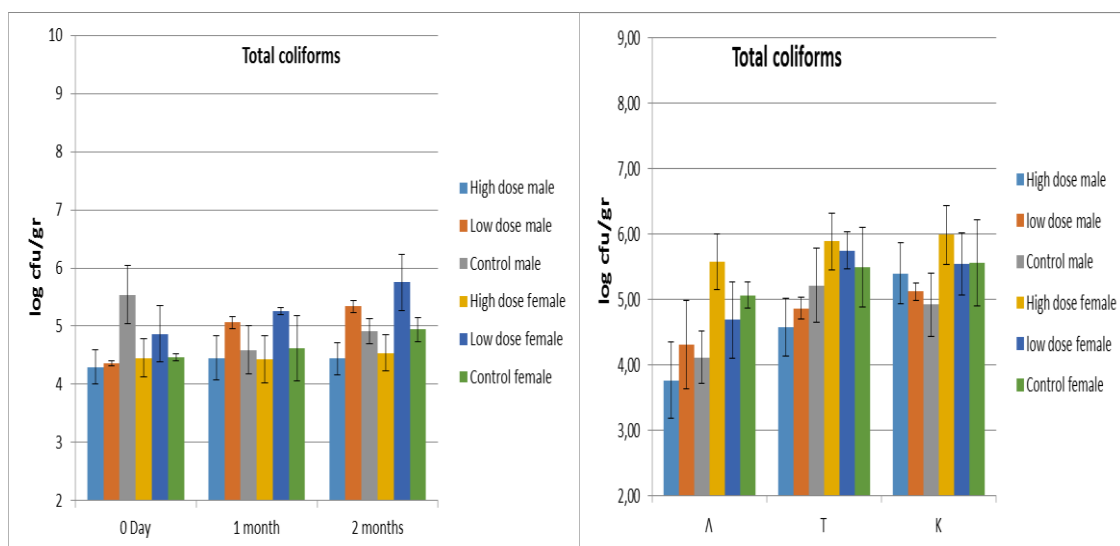
Σχήμα 11 Καταμέτρηση μικροοργανισμών (πληθυσμός εκφρασμένος σε log cfu/gr) του είδους *Lactobacillus* spp σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε υψηλή δόση (high dose male & female) σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε χαμηλή δόση (low dose male & female) καθώς και στα κόπρανα και το εντερικό περιεχόμενο ζώων, αρσενικά και θηλυκά, στα οποία δεν χορηγήθηκε το στέλεχος (control male & female). Η καταμέτρηση έγινε σε τρία (3) χρονικά σημεία : πριν τη χορήγηση του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 (Day 0), μετά από ένα μήνα χορήγησης του στελέχους (30 days) και μετά από δύο μήνες χορήγησης του (60 days) για τα κόπρανα και στις 60 days για τα εντερικά περιεχόμενα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή της καταμέτρησης \pm την τυπική απόκλιση (Average \pm SD).



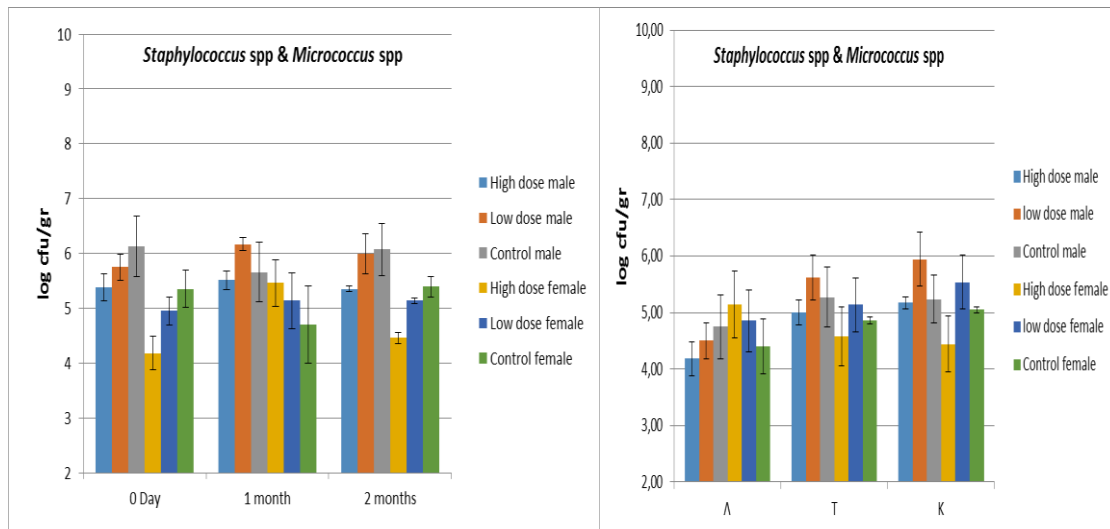
Σχήμα 12 Καταμέτρηση μικροοργανισμών (πληθυσμός εκφρασμένος σε log cfu/gr) του είδους *Bifidobacterium* spp σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε υψηλή δόση (high dose male & female) σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε χαμηλή δόση (low dose male & female) καθώς και στα κόπρανα και το εντερικό περιεχόμενο ζώων, αρσενικά και θηλυκά, στα οποία δεν χορηγήθηκε το στέλεχος (control male & female). Η καταμέτρηση έγινε σε τρία (3) χρονικά σημεία : πριν τη χορήγηση του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 (Day 0), μετά από ένα μήνα χορήγησης του στελέχους (30 days) και μετά από δύο μήνες χορήγησης του (60 days) για τα κόπρανα και στις 60 days για τα εντερικά περιεχόμενα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή της καταμέτρησης \pm την τυπική απόκλιση (Average \pm SD).



Σχήμα 13 Καταμέτρηση μικροοργανισμών (πληθυσμός εκφρασμένος σε log cfu/gr) του είδους *Enterococcus spp* σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε υψηλή δόση (high dose male & female) σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε χαμηλή δόση (low dose male & female) καθώς και στα κόπρανα και το εντερικό περιεχόμενο ζώων, αρσενικά και θηλυκά, στα οποία δεν χορηγήθηκε το στέλεχος (control male & female). Η καταμέτρηση έγινε σε τρία (3) χρονικά σημεία : πριν τη χορήγηση του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 (Day 0), μετά από ένα μήνα χορήγησης του στελέχους (30 days) και μετά από δύο μήνες χορήγησης του (60 days) για τα κόπρανα και στις 60 days για τα εντερικά περιεχόμενα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή της καταμέτρησης \pm την τυπική απόκλιση (Average \pm SD).



Σχήμα 14 Καταμέτρηση των Total coliforms (πληθυσμός εκφρασμένος σε log cfu/gr) σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε υψηλή δόση (high dose male & female) σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε χαμηλή δόση (low dose male & female) καθώς και στα κόπρανα και το εντερικό περιεχόμενο ζώων, αρσενικά και θηλυκά, στα οποία δεν χορηγήθηκε το στέλεχος (control male & female). Η καταμέτρηση έγινε σε τρία (3) χρονικά σημεία : πριν τη χορήγηση του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 (Day 0), μετά από ένα μήνα χορήγησης του στελέχους (30 days) και μετά από δύο μήνες χορήγησης του (60 days) για τα κόπρανα και στις 60 days για τα εντερικά περιεχόμενα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή της καταμέτρησης \pm την τυπική απόκλιση (Average \pm SD).



Σχήμα 15 Καταμέτρηση μικροοργανισμών (πληθυσμός εκφρασμένος σε log cfu/gr) του είδους *Staphylococcus* & *Micrococcus* spp σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε υψηλή δόση (high dose male & female) σε κόπρανα και εντερικό περιεχόμενο αρσενικών και θηλυκών ζώων στα οποία χορηγήθηκε το στέλεχος σε χαμηλή δόση (low dose male & female) καθώς και στα κόπρανα και το εντερικό περιεχόμενο ζώων, αρσενικά και θηλυκά, στα οποία δεν χορηγήθηκε το στέλεχος (control male & female). Η καταμέτρηση έγινε σε τρία (3) χρονικά σημεία : πριν τη χορήγηση του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 (Day 0), μετά από ένα μήνα χορήγησης του στελέχους (30 days) και μετά από δύο μήνες χορήγησής του (60 days) για τα κόπρανα και στις 60 days για τα εντερικά περιεχόμενα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως η μέση τιμή της καταμέτρησης ± την τυπική απόκλιση (Average± SD).

Όσον αφορά στους ολικούς αερόβιους μικροοργανισμούς (**Σχήμα 9**) παρατηρούνται χαμηλότεροι πληθυσμοί κατά έναν λογάριθμο μεταξύ δειγμάτων εντερικών περιεχομένων και κοπράνων στις 60 ημερες σε ζώα αρσενικά και θηλυκά που λάμβαναν την υψηλή δόση του μ/ο. Στο εντερικό περιεχόμενο παρατηρούμε σταδιακή αύξηση στους πληθυσμούς των ολικών αερόβιων μ/ο καθώς περνάμε από το λεπτό στο τυφλό και στο κόλον για όλες τις ομάδες των ζώων. Επίσης, παρατηρείται βαθμιαία μείωση σε θηλυκά ζώα που λάμβαναν τη χαμηλή δόση για δύο μήνες

Για τους ολικούς αναερόβιους μικροοργανισμούς (**Σχήμα 10**) παρατηρούμε χαμηλότερους πληθυσμούς κατά έναν λογάριθμο μεταξύ δειγμάτων εντερικών περιεχομένων και κοπράνων στις 60 ημερες σε όλες τις ομάδες ζώων. Επίσης σημειώνονται χαμηλότεροι πληθυσμοί σε θηλυκά που λάμβαναν την υψηλή δόση του μ/ο σε σχέση με τα control στα δείγματα εντερικού περιεχομένου από το κόλον. Επιπροσθέτως, οι ολικοί αναερόβιοι σημείωσαν αύξηση στα αρσενικά και θηλυκά ζώα που λάμβαναν την υψηλή δόση του γαλακτοβακίλλου και μείωση στα αρσενικά ζώα που λάμβαναν τη χαμηλή δόση. Παρατηρούμε χαμηλότερους πληθυσμούς ολικών αναερόβιων κατά έναν λογάριθμο μεταξύ δειγμάτων εντερικών περιεχομένων και κοπράνων στις 60 ημερες σε ζώα αρσενικά και θηλυκά που λάμβαναν την υψηλή δόση του μ/ο.

Όπως παρατηρούμε από τα διαγράμματα, μετά από τη χορήγηση της υψηλής δόσης του στελέχους (10^9 cfu/ml) για δύο μήνες και στα αρσενικά και στα θηλυκά ζώα σημειώνεται αύξηση στον πληθυσμό των γαλακτοβακίλλων σε σχέση με τη μέρα 0 (**Σχήμα 11**), ενώ στην ομάδα των control ζώων ο αριθμός των γαλακτοβακίλλων παραμένει σταθερός σε όλη τη διάρκεια του πειράματος. Στην ομάδα των αρσενικών και των θηλυκών ζώων που λάμβαναν την χαμηλή δόση (10^6 cfu/ml) δεν παρατηρούνται διαφορές στον πληθυσμό των γαλακτοβακίλλων στα τρία χρονικά σημεία. Σημειώνεται αύξηση στον αριθμό των γαλακτοβακίλλων και στα αρσενικά και στα θηλυκά ζώα καθώς περνάμε από το εντερικό περιεχόμενο του λεπτού εντέρου, στο τυφλό και στο κόλον. Επίσης, είναι χαμηλότεροι οι

πληθυσμοί των γαλακτοβακίλλων κατά έναν λογάριθμο μεταξύ δειγμάτων εντερικών περιεχομένων και κοπράνων στις 60 ημέρες σε ζώα αρσενικά και θηλυκά που λάμβαναν την υψηλή δόση του μ/ο. Τέλος στα εντερικά περιεχόμενα από λεπτό έντερο, τυφλό και κόλον αρσενικών και θηλυκών ζώων που λάμβαναν την υψηλή δόση του μ/ο είναι υψηλότερος ο πληθυσμός των γαλακτοβακίλλων σε σχέση με τα αρσενικά και θηλυκά control.

Όσον αφορά στον πληθυσμό του *Bifidobacterium* spp στα κόπρανα (Σχήμα 12), παρατηρούμε αύξηση και στην ομάδα των αρσενικών και στην ομάδα των θηλυκών ζώων που λάμβαναν την υψηλή δόση του στελέχους για δύο μήνες. Επίσης, παρατηρούμε χαμηλότερους πληθυσμούς bifidobacteria κατά έναν λογάριθμο μεταξύ δειγμάτων εντερικών περιεχομένων και κοπράνων στις 60 ημέρες σε ζώα αρσενικά και θηλυκά που λάμβαναν την υψηλή δόση του μ/ο. Τέλος, στα εντερικά δείγματα από το κόλον σε ζώα αρσενικά και θηλυκά που λάμβαναν την υψηλή δόση του μ/ο παρατηρούμε υψηλότερους πληθυσμούς σε σχέση με τα control ζώα.

Για τον πληθυσμό των εντεροκόκκων στα κόπρανα (Σχήμα 13), παρατηρούμε ότι υπάρχει μείωση στις ομάδες αρσενικών και θηλυκών ζώων που λάμβαναν την υψηλή δόση μετά από 60 ημέρες χορήγησης, σε σχέση με τη Day 0, καθώς και στις ομάδες αρσενικών που λάμβαναν τη χαμηλή δόση. Επιπροσθέτως, στις 60 ημέρες χορήγησης του μ/ο, αρσενικά ζώα που λάμβαναν τη χαμηλή δόση του μ/ο, καθώς και θηλυκά που λάμβαναν την υψηλή και τη χαμηλή δόση του μ/ο παρουσίασαν στα κόπρανά τους χαμηλότερους πληθυσμούς σε εντεροκόκκους σε σχέση με τα control. Όσον αφορά στα εντερικά περιεχόμενα, αρσενικά ζώα που λάμβαναν την υψηλή και τη χαμηλή δόση του μ/ο παρουσίασαν χαμηλότερους πληθυσμούς στα εντερικά περιεχόμενα λεπτού εντέρου, τυφλού και κόλον σε σχέση με τα αρσενικά control.

Στον πληθυσμό των ολικών κολοβακτηριοειδών στα κόπρανα των μυών (Σχήμα 14) παρατηρήθηκαν χαμηλότεροι πληθυσμοί σε αρσενικά και θηλυκά ζώα στα οποία χορηγούνταν η υψηλή δόση του μ/ο για 60 ημέρες σε σχέση με τα control ζώα. Επίσης, μιλώντας για τα εντερικά περιεχόμενα, παρατηρήθηκε αύξηση των πληθυσμών για όλες τις ομάδες των ζώων περνώντας από το λεπτό έντερο στο κόλον.

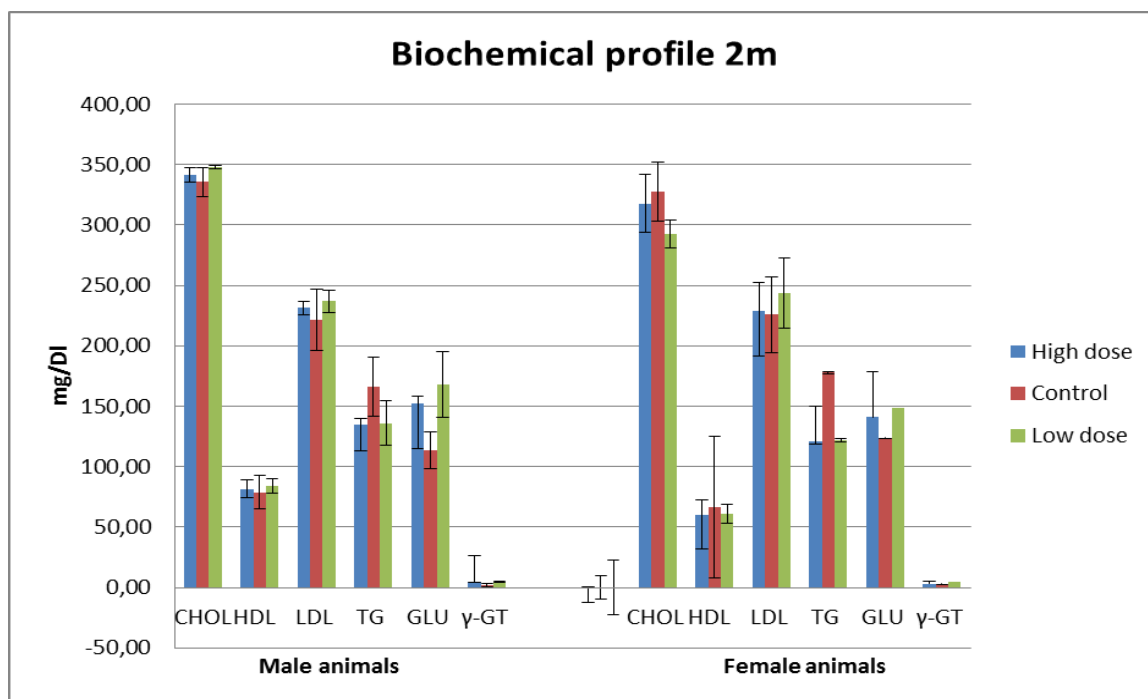
Αναφορικά με τον πληθυσμό των *Staphylococcus* και *Micrococcus* spp (Σχήμα 15), παρατηρείται μείωσή τους στα κόπρανα αρσενικών ζώων μετά από δύο μήνες χορήγησης υψηλής δόσης του γαλακτοβάκιλλου σε σχέση με τη Day 0. Επιπροσθέτως, σε αρσενικά που λάμβαναν τη υψηλή και τη χαμηλή δόση του μ/ο καθώς και στις ίδιες ομάδες των θηλυκών ζώων μετά από 60 ημέρες χορήγησης παρατηρήθηκαν χαμηλότεροι πληθυσμοί σε σχέση με τα αρσενικά και θηλυκά control ζώα. Ακόμα παρατηρούμε ότι οι πληθυσμοί στα δείγματα εντερικών περιεχομένων ήταν κατά έναν λογάριθμο χαμηλότεροι σε σχέση με τα δείγματα κοπράνων στις 60 ημέρες σε αρσενικά και θηλυκά ζώα που λάμβαναν την υψηλή δόση του μ/ο. Τέλος, όσον αφορά στα εντερικά περιεχόμενα, παρατηρήθηκαν χαμηλότεροι πληθυσμοί *Staphylococcus* και *Micrococcus* spp σε high dose θηλυκά ζώα σε σχέση με τα control έπειτα από 60 ημέρες χορήγησης του γαλακτοβάκιλλου.

Τέλος, όσον αφορά στον πληθυσμό των *Clostridium* spp στα κόπρανα αρσενικών και θηλυκών ζώων καταμετρήθηκε πληθυσμός 10^3 cfu/gr τη day 0, ενώ δεν καταμετρήθηκαν στις 30 και 60 days. Αναφορικά με τα εντερικά περιεχόμενα, δεν καταμετρήθηκαν πληθυσμοί κλωστριδίων στις 60 days.

3.4. Βιοχημικό προφίλ ομάδων ζώων μετά από 60 ημέρες χορήγησης του μ/ο

Σύμφωνα με το διάγραμμα που ακολουθεί (Σχήμα 16), παρατηρείται σημαντική μείωση της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων σε θηλυκά ζώα που λάμβαναν την υψηλή δόση του μικροοργανισμού για δύο μήνες καθώς και στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων σε αρσενικά ζώα που λάμβαναν την υψηλή δόση του μικροοργανισμού για δύο μήνες, σε σχέση με τις ομάδες που λάμβαναν τη χαμηλή δόση και την ομάδα των control. Από την άλλη πλευρά, τα επίπεδα της HDL είναι σταθερά σε όλες τις ομάδες των ζώων και με δεδομένο ότι στους μυς υπάρχουν υψηλά επίπεδα HDL, όπως προαναφέρθηκε, παρατηρούμε ότι οι μεταβολές στα επίπεδα των βιοχημικών δεικτών γενικότερα δεν είναι πολύ ευδιάκριτες,

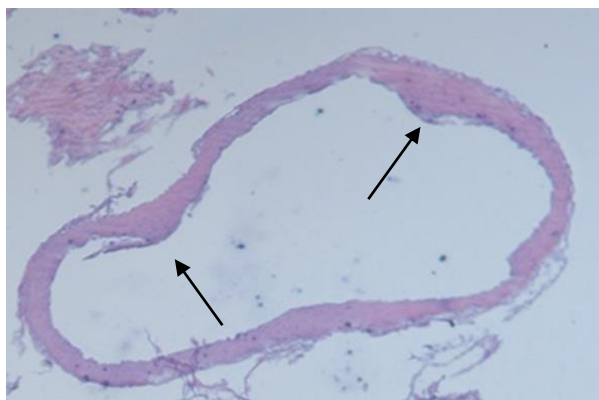
πιθανότατα επειδή η HDL ασκεί μία προστατευτική δράση στην εμφάνιση των φαινομένων της φλεγμονής.



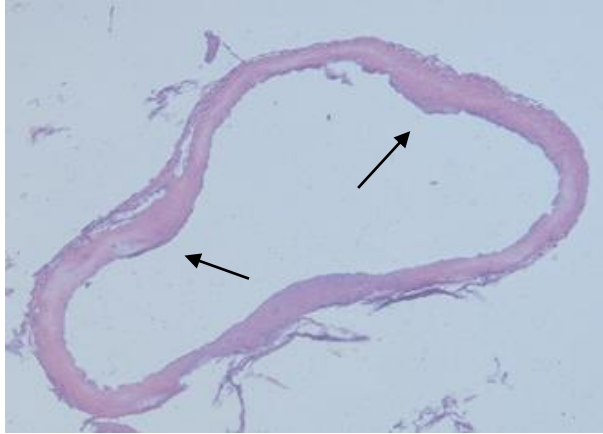
Σχήμα 16 Μέτρηση επιπέδων γλυκόζης (GLU), τριγλυκεριδίων (TG), ολικής χοληστερόλης (CHOL), HDL, LDL και γ-γλουταμιλοτρανσφεράσης (γ- GT) στον ορό του αίματος αρσενικών και θηλυκών μυών που λήφθηκαν την όγδοη εβδομάδα της χορήγησης πριν την ευθανασία, έπειτα από ολονύκτια νηστεία. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε mg/dL με τη μέση τιμή ± την τυπική απόκλιση (Average± SD).

3.5 Ιστολογική ανάλυση δειγμάτων μετά από 60 ημέρες χορήγησης του μ/ο

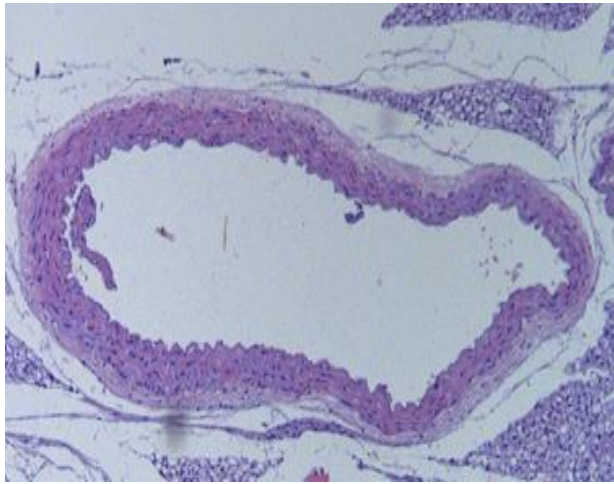
Η μορφομετρική ανάλυση των ιστολογικών δειγμάτων του αορτικού τόξου των ζώων με τη χρήση αιματοξυλίνης /εωσίνης αποκάλυψε την απουσία αθηρωματικών πλακών σε ζώα που λάμβαναν την υψηλή δόση του μ/ο, σε αντίθεση με τις ομάδες που λάμβαναν τη χαμηλή δόση και των ζώων control. Στο **σχήμα 17** παρουσιάζονται τρεις χαρακτηριστικές εικόνες από αορτή αρσενικών high dose, low dose και control ζώων, όπου διακρίνονται (βέλη) οι αθηρωματικές αλλοιώσεις με τη μορφή επαρμάτων στον αυλό των αγγείων σε ζώα low dose και control.



Control male aorta



Low dose male aorta



High dose male aorta

Σχήμα 17 Φωτογραφίες από ιστολογικά δείγματα αορτής που λήφθηκαν από αρσενικά high dose, low dose και control ζώα κατά την ευθανασία έπειτα από 60 ημέρες χορήγησης του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179. Τα βέλη δείχνουν τις αθηρωματικές αλλοιώσεις (επάσματα) στον αυλό των αγγείων low dose και control αρσενικών ζώων.

Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα

4.1 Χορήγηση *L. fermentum* ACA-DC 179 και μεταβολή της σύνθεσης της εντερικής χλωρίδας μυών

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι, παρόλο που η χλωρίδα των κοπράνων φαίνεται να είναι ένας καλός ποιοτικός δείκτης της χλωρίδας του παχέος εντέρου, δεν αντικατοπτρίζει τη χλωρίδα του εντέρου σαν σύνολο και σίγουρα όχι αυτή του λεπτού εντέρου. Η χλωρίδα της εντερικής οδού ποικίλει από τμήμα σε τμήμα και καθορίζεται και από παράγοντες, όπως η διατροφή, το γενετικό υπόβαθρο και η φυσιολογική κατάσταση του ξενιστή.

Όπως είναι γενικότερα αποδεκτό, ο τελικός στόχος μιας διατροφικής παρέμβασης με τη χρήση προβιοτικών μικροοργανισμών είναι να έχει ευεργετική-ωφέλιμη επίδραση στην υγεία του ξενιστή. Αυτό θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω διαφορετικών δράσεων τους, όπως η διαμόρφωση-τροποποίηση των ανοσολογικών αποκρίσεων του ξενιστή και η βελτίωση της θρεπτικής κατάστασής του ή μέσω εκείνων των επιδράσεων που προέρχονται από τη διαμόρφωση-τροποποίηση της μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου.

Βάσει μελετών σε ζωικά μοντέλα είχε αποδειχθεί ότι η χορήγηση στελεχών από τα γένη *Bifidobacterium* ή *Lactobacillus* συνδέονταν με ωφέλιμες μεταβολές στην εντερική χλωρίδα ζωικού μοντέλου μυών (Arthur *et al.*, 2013, Sugahara *et al.*, 2015, Turroni *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2015). Ωστόσο, όπως παρατηρείται και από τα παραπάνω διαγράμματα, οι μεταβολές αυτές μπορεί να μην είναι πολύ μεγάλες και ευδιάκριτες. Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι η μεταβολή στην εντερική μικροβιακή χλωρίδα δεν είναι τόσο χαρακτηριστική στους ανθρώπους. Διαφαίνεται ότι σημαντικότερες αλλαγές συμβαίνουν στο μεταβολισμό των βακτηρίων της εντερικής χλωρίδας, παρά σε αυτή καθ'αυτή τη σύνθεση των μικροβιακών ομάδων που επικρατούν (Sanchez *et al.*, 2017). Κατά συνέπεια, για να γίνουν κατανοητές οι επιδράσεις των προβιοτικών στον άνθρωπο χρησιμοποιήθηκαν άλλοι τρόποι, όπως η μεταγονιδιωματική, μέσω της οποίας μπορούν να αναλυθούν πληθώρα γονιδιωματικών δεδομένων, στα οποία συμπεριλαμβάνονται αλληλουχίες όλων των γονιδίων από το σύνολο μιας σύνθετης μικροβιακής κοινότητας που αποικίζουν ένα οικοσύστημα. Σε σχετική έρευνα των McNulty *et al.*, 2011 μελετήθηκε, με χρήση της μεταγονιδιωματικής, η μικροβιακή χλωρίδα των κοπράνων σε ενήλικα θήλαα άτομα που ήταν μονοζυγωτικά δίδυμα πριν από, κατά τη διάρκεια και μετά την κατανάλωση ενός εμπορικού ζυμούμενου γάλακτος, το οποίο περιείχε, μεταξύ άλλων μικροοργανισμών, και ένα στέλεχος του *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, στο οποίο έχουν αποδοθεί ευεργετικές επιδράσεις για την υγεία. Μέσω αυτής της μελέτης, δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στη σύνθεση των μικροβιακών ομάδων του εντέρου. Σε αντίθεση με αυτή την παρατήρηση, σημαντικές μεταβολές ανιχνεύθηκαν στο μεταγραφικό προφίλ των μικροοργανισμών των κοπράνων των ατόμων που κατανάλωναν το ζυμούμενο γάλα, και ιδιαίτερα μεταβολές που σχετίζονταν με το μεταβολισμό φυτικών πολυσακχαριτών. Σύμφωνα με μία άλλη έρευνα (Lahtinen *et al.*, 2012), η κατανάλωση τυριού που περιείχε δύο γαλακτοβακίλλους από τα είδη *Lactobacillus rhamnosus* και *Lactobacillus acidophilus* δεν μετέβαλαν σημαντικά τη σύνθεση των κύριων μικροβιακών ομάδων των κοπράνων σε ανθρώπους μεγάλης ηλικίας, ενώ σε άτομα μικρότερης ηλικίας παρατηρήθηκαν μερικές σημαντικές αλλαγές στον πληθυσμό του μικροβιώματος. Σε άλλη εργασία, (Nadja *et al.*, 2011) η χορήγηση του *L. acidophilus* NCFM και του *B. animalis* subsp. *lactis* Bi-07 δεν αλλοίωσε τη γενικότερη εικόνα των κυριότερων ομάδων μικροοργανισμών που υπάρχουν στην μικροβική χλωρίδα των κοπράνων παιδιών με ατοπική δερματίτιδα.

Αντίθετα, άλλες μελέτες αναφέρουν ότι τα προβιοτικά μπορούν να προκαλέσουν διαφοροποιήσεις σε συγκεκριμένους βακτηριακούς πληθυσμούς της εντερικής χλωρίδας, με ή χωρίς μεταβολές στη μεταβολική τους δραστηριότητα. Οι Plaza-Diaz *et al.*, 2015, με την αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA, κατέδειξαν ότι προκλήθηκε αλλαγή στη μικροβιακή χλωρίδα των κοπράνων ενηλίκων, έπειτα από την κατάποση των στελεχών *L. rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* ή *Bifidobacterium breve*.

Αυτές οι διαφοροποιήσεις που προκύπτουν ανά μελέτη καθιστούν αναγκαία τη χρήση και την αλληλοσυμπλήρωση πολλών μεθόδων που θα εξηγούσαν τις προβιοτικές ιδιότητες κάποιων μικροοργανισμών και των μηχανισμό δράσης τους σε μοριακό επίπεδο. Βέβαια οι επιδράσεις των προβιοτικών στην εντερική χλωρίδα εξαρτώνται και από τη φυσιολογία του εκάστοτε ατόμου αλλά και τις διατροφικές του συνήθειες (Derrien *et al.*, 2015). Οι αλλαγές στο περιβάλλον του εντέρου δεν συνεπάγονται απαραίτητα μεταβολές στη σύνθεση των ομάδων μικροοργανισμών, αλλά πολλές φορές συνδέονται με αλλαγές στη μεταβολική τους δραστηριότητα, όπως για παράδειγμα αύξηση της παραγωγής των Short Chain Fatty Acids (Sanchez *et al.*, 2017).

Η μελέτη των προβιοτικών μικροοργανισμών καταδεικνύει τα σημαντικά οφέλη τους στους ξενιστές μέσω των μηχανισμών δράσης τους, μεταξύ των οποίων πολύ σημαντική αποδεικνύεται η τροποποίηση της εντερικής μικροχλωρίδας, όπως κατέδειξε και η χορήγηση του *L. fermentum* ACA-DC 179. Βέβαια η εκδήλωση της ευεργετικής τους δράσης δεν συνδέεται απαραίτητα με την τροποποίηση αυτή, όπως προκύπτει από πρόσφατες έρευνες (Kristensen *et al.*, 2016), αλλά θα μπορούσε να εκδηλωθεί και μέσω της αλληλεπίδρασής τους με το ανοσοποιητικό σύστημα. Σχετικά με αυτό, κατά τη διεξαγωγή πρόσφατων ερευνών προκύπτει ότι ευρέως χρησιμοποιούμενα στελέχη μικροοργανισμών που ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidacterium* δεν αποτελούν μέλη της κύριας σύνθεσης της εντερικής μικροχλωρίδας, αλλά απελευθερώνονται από το έντερο μετά από τη χορήγησή τους στον ξενιστή.

4.2 Χορήγηση *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και αθηρωμάτωση σε ApoE^{-/-} μύες

Είναι γνωστό ότι η αθηρωμάτωση, κάτω από κανονικές συνθήκες δεν αναπτύσσεται στα εργαστηριακά ποντίκια. Η στοχευμένη όμως διαγραφή του γονιδίου για την απολιποπρωτεΐνη E (ApoE^{-/-}) προκαλεί την ανάπτυξη βαριάς μορφής υπερχοληστερολαιμίας και κατά συνέπεια στη δημιουργία αθηρωματικής αλλοίωσης. Ο προσδιορισμός στο αίμα των βιοχημικών δεικτών φλεγμονής [γλυκόζη (GLU), τριγλυκερίδια (TG), ολική χοληστερόλη (CHOL), HDL, LDL και γ-γλουταμυλοτρανσφεράση (γ-GT)] σε ζώα με αθηρωματική αλλοίωση είναι ενδεικτικός μόνο του φλεγμονώδους φορτίου του ασθενούς και η αναφορά μεταβολών της συγκέντρωσης των φλεγμονωδών ουσιών ως αποτέλεσμα διάφορων παρεμβάσεων προσφέρει μία σχετική, αλλά όμως ικανοποιητική εικόνα της αποτελεσματικότητας των παρεμβάσεων αυτών (Roberts, Chen & Barnard, 2007).

Υπάρχουν διαφορές μεταξύ των ζωικών αυτών προτύπων και του ανθρώπου στο μεταβολισμό της χοληστερόλης, στο λιπιδαιμικό profile τους, στην καρδιαγγειακή φυσιολογία, στην παθολογοανατομία της πλάκας και στην απουσία επεισοδίων ρήξης της πλάκας, οξείας θρόμβωσης και καρδιαγγειακών συμβάντων. Οι ApoE^{-/-} μύες, όμως, αποτελούν ένα έγκυρο ζωικό πρότυπο μελέτης της ανάπτυξης αθηρωματικής νόσου στον άνθρωπο (Meir & Leitersdorf, 2004).

Είναι γνωστό ότι, στους μύς υπάρχουν υψηλά επίπεδα HDL και χαμηλά επίπεδα LDL, το αντίστροφο από ό,τι συμβαίνει στον άνθρωπο. Επιπλέον, οι μύες στερούνται της πρωτεΐνης μεταφοράς του χοληστερινικού εστέρα, ενός ενζύμου το οποίο μεταφέρει τον χοληστερινικό εστέρα από την HDL στη VLDL και στην LDL. Παρά τις διαφορές αυτές οι ApoE^{-/-} μύες παρουσιάζουν αξιοσημείωτες φαινοτυπικές ομοιότητες με τους ανθρώπους που έχουν έλλειψη της ApoE. Υπό φυσιολογική διαίτα οι ApoE^{-/-} μύες εμφανίζουν τιμές ολικής χοληστερόλης περίπου 500 mg/dl, κυρίως μέσα σε κλάσματα VLDL και χυλομικρών, ενώ η ανάπτυξη αθηρωματικών πλακών είναι ταχεία και εμφανίζει όλα, σχεδόν, τα χαρακτηριστικά της εξελικτικής πορείας της αθηρωματικής αλλοίωσης στους ανθρώπους.

Η χορήγηση του *L. fermentum* ACA-DC 179 προκάλεσε ιστολογικές μεταβολές, ελαφρά αισθητές σε ζώα που λάμβαναν την υψηλή δόση του μ/ο τα οποία δεν παρουσίασαν αθηρωματικές πλάκες σε σχέση με τα ζώα που λάμβαναν τη χαμηλή δόση του μ/ο και τα control ζώα τα οποία εμφάνισαν αθηρωματικές πλάκες σε βαλβίδα και αορτή. Τα

αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν μια ενδεικτική αντιαθηρωματική δράση του προβιοτικού στελέχους.

Το βιοχημικό προφίλ των ζώων έδειξε μείωση των βιοδεικτών που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση μετά τη χορήγηση του προβιοτικού στελέχους για 60 ημέρες, με χαρακτηριστική τη μείωση της ολικής CHOL και TG σε θηλυκά και TG σε αρσενικά ζώα που λάμβαναν την υψηλή δόση του μ/ο σε σχέση με τα ζώα που λάμβαναν τη χαμηλή δόση του μ/ο και τα control ζώα.

Βιβλιογραφικές αναφορές

- Al-Tawaha, R., & Meng, C. (2018). Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. *Advances in Environmental Biology*, 12(1), 16-27.
- Alakomi HL, Skytta E, Saarela M, Mattila- Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2001– 2005
- Alvarez-Olmos, M. I., & Oberhelman, R. A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clinical infectious diseases*, 32(11), 1567-1576.
- Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, Kelly WJ, Roy NC: *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol* 2010; 10: 316. 2
- Arthur,J.C.,Gharaibeh, R.Z., Urines, J.M., Perez- Chanona, E. et al., VSL#3 probiotic modifies mucosal microbial composition but does not reduce colitis-associated colorectal cancer. *Sci. Rep.* 2013, 3, 2868.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorrente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160-174.
- Berni Canani, R., Sangwan, N., Stefka, A. T., Nocerino, R. et al., *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J.* 2015, 10, 1–9.
- Boirivant, M., & Strober, W. (2007). The mechanism of action of probiotics. *Current opinion in gastroenterology*, 23(6), 679-692.
- Bouskra, D., Brézillon, C., Bérard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I. G., & Eberl, G. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature*, 456(7221), 507.
- Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., ... & Brigidi, P. (2008). Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International journal of food microbiology*, 125(3), 286-292.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(7): 1761–72. doi:10.2337/db06-1491.
- Corcionivoschi, N., Drinceanu, D., Stef, L., Luca, I., & Julean, C. (2010). Probiotics-identification and ways of action. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 6, 1.
- Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11:243–251
- De Leon H, Boue S, Schlage WK, Boukharov N, Westra JW, Gebel S, VanHooser A, Talikka M, Fields RB, Veljkovic E, et al. A vascular biology network model focused on inflammatory processes to investigate atherogenesis and plaque instability. *J Transl Med*. 2014;12:185.].
- Del Piano, M., Morelli, L., Strozzi, G. P., Allesina, S., Barba, M., Deidda, F. & Sartori, M. (2006). Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*, 38, S248-S255.
- Derrien, M.,vanHylckama Vlieg,J.E.,Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends Microbiol*. 2015, 23, 354–366.
- Dickson, E. M., Riggio, M. P., & Macpherson, L. (2005). A novel species-specific PCR assay for identifying *Lactobacillus fermentum*. *Journal of Medical Microbiology*, 54(3), 299-303.

- Domingo, J. J. S. (2017). Review of the role of probiotics in gastrointestinal diseases in adults. *Gastroenterología y Hepatología (English Edition)*, 40(6), 417-429.
- dos Reis, S. A., da Conceição, L. L., Siqueira, N. P., Rosa, D. D., da Silva, L. L., & Maria do Carmo, G. P. (2017). Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutrition Research*, 37, 1-19.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., ... & Kiely, B. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 386s-392s.
- Eckburg, P.B. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638 doi:10.1126/science.1110591
- Englyst, K. N., & Englyst, H. N. (2005). Carbohydrate bioavailability. *British Journal of Nutrition*, 94(1), 1-11.
- Espitia, P. J., Batista, R. A., Azeredo, H. M., & Otoni, C. G. (2016). Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International*, 90, 42-52.
- Fernández, M. F., Boris, S., & Barbes, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94(3), 449-455.
- Ferrario, C., Taverniti, V., Milani, C., Fiore, W. et al., Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *J. Nutr.* 2014, 144, 1787–1796.
- Floch, M. H. (2017). The role of prebiotics and probiotics in gastrointestinal disease. *Gastroenterology Clinics of North America*.
- Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88(S1), s39-s49.
- Fuller, R., & Gibson, G. R. (1997). Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 32(sup222), 28-31.
- Gao, C. et al., 2017. Gut Microbe-Mediated Suppression of Inflammation-Associated Colon Carcinogenesis by Luminal Histamine Production. *The American journal of pathology*, 187(10), pp.2323–2336. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28917668> [Accessed January 4, 2018].
- Gardiner, G. E., Heinemann, C., Bruce, A. W., Beuerman, D., & Reid, G. (2002). Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *L. rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 9(1), 92-96.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F., & Gramenzi, A. (2016). Probiotics history. *Journal of clinical gastroenterology*, 50, S116-S119.
- Gionchetti, P. and M. Campieri, 2000. Probiotic therapy. *Res. Clin. Forums* 22:111-116.
- Gogineni, V. K., Morrow, L. E., & Malesker, M. A. (2013). Probiotics: mechanisms of action and clinical applications. *J Prob Health*, 1(101), 2.
- Goldin, B. R. (1998). Health benefits of probiotics. *The British journal of nutrition*, 80(4), S203-7.
- Gómez-Llorente, C., Muñoz, S., & Gil, A. (2010). Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proceedings of the Nutrition Society*, 69(3), 381-389.
- Goudarzi, M., Goudarzi, H., & Rashidan, M. (2014). Probiotics: an update on mechanisms of action and clinical applications. *Novelty in Biomedicine*, 2(1), 22-30.

- Gu, S., Chen, D., Zhang, J.-N., Lv, X., Wang, K., Duan, L.-P. et al. (2013) Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract. *PLoS ONE* 8, e74957 doi:10.1371/journal.pone.0074957
- Guarner, F., & Schaafsma, G. J. (1998). Probiotics. *International journal of food microbiology*, 39(3), 237-238.
- Hart, A. L., Lammers, K., Brigidi, P., Vitali, B., Rizzello, F., Gionchetti, P., ... & Stagg, A. J. (2004). Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, 53(11), 1602-1609.
- Hawrelak J, BNat(Hons). Probiotics. In: Pizzorno JE, Murray MT, editors. *Textbook of Natural Medicine*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Churchill Livingstone Elsevier; 2013. p. 979–94.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R., & Carvalho, I. S. (2013). Mechanism of action of probiotics. *Brazilian archives of Biology and technology*, 56(1), 113-119.
- Hemarajata, P., & Versalovic, J. (2013). Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 6(1), 39-51.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R. et al., Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014, 11, 506–514.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., & in't Veld, J. H. H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International journal of food microbiology*, 41(2), 85-101.
- Holzapfel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition–. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 365s-373s.
- Holzapfel, W. H., & Schillinger, U. (2002). Introduction to pre-and probiotics. *Food Research International*, 35(2-3), 109-116.
- Hossain, M. I., Sadekuzzaman, M., & Ha, S. D. (2017). Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food Research International*, 100, 63-73.
- Jawien J. The role of an experimental model of atherosclerosis: apoE- knockout mice in developing new drugs against atherogenesis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13:2435–9
- Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology and cell biology*, 78(1), 80-88.
- Karen S. Meir, Eran Leitersdorf Atherosclerosis in the Apolipoprotein E–Deficient Mouse A Decade of Progress
- Khalighi, A., Behdani, R., & Kouhestani, S. (2016). Probiotics: A comprehensive review of their classification, mode of action and role in human nutrition. In *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. InTech.
- Kristensen, N. B., Bryrup, T., Allin, K. H., Nielsen, T. et al., Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Med.* 2016, 8, 52.
- Lammers, K. M., Brigidi, P., Vitali, B., Gionchetti, P., Rizzello, F., Caramelli, E., ... & Campieri, M. (2003). Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 38(2), 165-172.
- Lavelle, A. et al. (2015) Spatial variation of the colonic microbiota in patients with ulcerative colitis and control volunteers.
- Lahtinen, S. J., Forssten, S., Aakko, J., Granlund, L. et al., Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM modifies

- subpopulations of fecal lactobacilli and *Clostridium difficile* in the elderly. *Age* 2012, 34, 133–143.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011; 473: 317- 25. (Review)
 - Lilly, D. M., & Stillwell, R. H. (1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147(3659), 747-748.
 - Macfarlane, G. T., & Cummings, J. H. (1999). Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?. *Western journal of medicine*, 171(3), 187.
 - Madsen, K. L. (2001). The use of probiotics in gastrointestinal disease. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15(12), 817-822.
 - Maragkoudakis, P. A., Chingwaru, W., Gradisnik, L., Tsakalidou, E., & Cencic, A. (2010). Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection. *International journal of food microbiology*, 141, S91-S97.
 - McNulty, N. P., Yatsunencko, T., Hsiao, A., Faith, J. J. et al., The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci. Transl. Med.* 2011, 3, 106ra106
 - Morelli, L., 2000. In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 1:59-67.
 - Morgensen, G., S. Salminen, J. O' Brien, A. Ouwehand, W.H. Holzapfel, C. Shortt et al, 2002. Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. *Bull. /Di'377:10-18.*
 - Nadja, L., Vogensen, F. K., Gøbe, R., Michaelsen, K. F. et al., Predominant genera of fecal microbiota in children with atopic dermatitis are not altered by intake of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium animalis* subsp.lactisBi-07. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011, 75, 482–496.
 - Ng, S. C., Hart, A. L., Kamm, M. A., Stagg, A. J., & Knight, S. C. (2008). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory bowel diseases*, 15(2), 300-310.
 - O'Bryan, C. A., Pak, D., Crandall, P. G., Lee, S. O., & Ricke, S. C. (2013). The role of prebiotics and probiotics in human health. *J Prob Health*, 1(108), 2.
 - O'Connell Motherway, M. et al., 2011. Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(27), pp.11217–11222. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21690406> [Accessed January 5, 2018].
 - Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions—a review. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(1), 57-62.
 - Ohashi, Y., & Ushida, K. (2009). Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Animal Science Journal*, 80(4), 361-371.
 - O'Toole, P. W., & Cooney, J. C. (2008). Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2008.
 - Papagianni, M. (2012). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and structural biotechnology journal*, 3(4), e201210003.
 - Piedrahita JA et al, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4471–4475
 - Pitcher, D. G., Saunders, N. A., & Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in applied microbiology*, 8(4), 151-156.
 - Plaza-Díaz, J., Fernández-Caballero, J. A., Chueca, N., García, F. et al., Pyrosequencing analysis reveals changes in intestinal microbiota of healthy adults

- who received a daily dose of immunomodulatory probiotic strains. *Nutrients* 2015, 7, 3999–4015.
- Plump AS et al, *Cell* 1992;71:343–353
 - Rao, R.K. & Samak, G., 2013. Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications. *Current nutrition and food science*, 9(2), pp.99–107. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24353483> [Accessed December 21, 2017].
 - Reddick, R. L., Zhang, S. H., & Maeda, N. (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology*, 14(1), 141-147.
 - Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 17-25.
 - Roberts CK, Chen AK, Barnard RJ. Effect of a short-term diet and exercise intervention in youth on atherosclerotic risk factors. *Atherosclerosis*. 2007; 191: 98-106.
 - Ross, R., & Glomset, J. A. (1973). Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell. *Science*, 180(4093), 1332-1339.
 - Rolfe, R. D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of nutrition*, 130(2), 396S-402S.
 - Saavedra, J. M. (2001). Clinical applications of probiotic agents—. *The American journal of clinical nutrition*, 73(6), 1147S-1151S.
 - Saarela M, Lähteenmäki L, Crittenden R, Salminen S and Mattila-Sandholm T, 2002. Gut bacteria and health foods—the European perspective. *International journal of food microbiology*, 78(1-2):99-117.
 - Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. (2017). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular nutrition & food research*, 61(1), 1600240.
 - Sanders, M.E. et al., 2018. Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, pp.207–216. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29128720> [Accessed December 20, 2017].
 - Sasso, G. L., Schlage, W. K., Boué, S., Veljkovic, E., Peitsch, M. C., & Hoeng, J. (2016). The Apoe^{-/-} mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *Journal of translational medicine*, 14(1), 146.
 - Saxelin, M. (1996). Colonization of the human gastrointestinal tract by probiotic bacteria. *Nutrition Today*, 31(6), 9S.
 - Schrezenmeir, J. and M. de Vrese, 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics—approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73(Suppl.):361-364.
 - Shornikova, A. V., Casas, I. A., Mykkänen, H., Salo, E., & Vesikari, T. (1997). Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *The Pediatric infectious disease journal*, 16(12), 1103-1107.
 - Sobhani, I., Tap, J., Roudot-Thoraval, F., Roperch, J. P., Letulle, S., Langella, P., ... & Furet, J. P. (2011). Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. *PloS one*, 6(1), e16393.
 - Song D, Ibrahim S, Hayek S, (2012). Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural science. *INTECH Chapter 1*.
 - Sugahara, H., Odamaki, T., Fukuda, S., Kato, T. et al., Probiotic *Bifidobacterium longum* alters gut luminal metabolism through modification of the gut microbial community. *Nature* 2015, 5, 1–11
 - Suvarna, V. C., & Bobby, V. U. (2005). Probiotics in human health: A current assessment. *Current science*, 88(11), 1744-1748.

- Tamminen M, Mottino G, Qiao J, Breslow J, Frank J. Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:847–53.
- Tilsala-Timisjärvi, A., & Alatosava, T. (1998). Strain-Specific Identification of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* with Randomly Amplified Polymorphic DNA-Derived PCR Primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(12), 4816–4819.
- Turrone, F., Milani, C., Duranti, S., Mancabelli, L. et al., Deciphering bifidobacterial-mediated metabolic interactions and their impact on gut microbiota by a multiomics approach. *ISME J.* 2016, 10, 1656–1668.
- Van den Abbeele, P., Belzer, C., Goossens, M., Kleerebezem, M., De Vos, W.M., Thas, O. et al. (2013) Butyrate-producing *Clostridium* cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME J.* 7, 949–961 doi:10.1038/ismej.2012.158
- Van Zanten, G. C., Krych, L., Roytio, H., Forssten, S. et al., Synbiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM and cellobiose does not affect human gut bacterial diversity but increases abundance of lactobacilli, bifidobacteria and branched-chain fatty acids: a randomized, double-blinded cross-over trial. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2014, 90, 225–236.
- Véniant MM, Withycombe S, Young SG. Lipoprotein size and atherosclerosis susceptibility in ApoE^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1567–70.
- Von Holt K, Lebrun S, Stinn W, Conroy L, Wallerath T, Schlee R. Progression of atherosclerosis in the Apo E^{-/-} model: 12-Month exposure to cigarette mainstream smoke combined with high-cholesterol/fat diet. *Atherosclerosis.* 2009;205:135–43.]
- Walker, W. A. (2008). Mechanisms of action of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 46(Supplement_2), S87-S91.
- Wang, W.-L., Xu, S.-Y., Ren, Z.-G., Tao, L. et al., Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World J. Gastroenterol.* 2015, 21, 803–814.
- Williams KJ, Tabes I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 551-61. (Review)
- World health organization WHO(2002). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, a joint FAO/WHO expert consultation. Cordoba, Argentina, 1-4 October 2001. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/index.html.
- Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 1992;258:468–71]
- Zoumpoulou, G., Pot, B., Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. (2017). Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. *International Dairy Journal*, 67, 46-60.
- <https://nccih.nih.gov/health/probiotics>
- <http://www.usprobiotics.org/>