

**RASSEGNA**

# MICROBIOTA INTESTINALE: UN NUOVO PROTAGONISTA NELLA EZIOLOGIA E NEL TRATTAMENTO DELL'ATEROSCLEROSI?

## Gut microbiota: a new player in the aetiology and treatment of atherosclerosis?

**ANTONIO PIEMONTESE, FRANCO BERNINI, ILARIA ZANOTTI**

*Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Parma*

**SUMMARY**

Gut microbiota is a very interesting, yet largely unexplored ecosystem inside the human body. Its importance for the pathophysiology of atherosclerosis is being unraveled by recent studies, demonstrating dual effects on the development of atherosclerotic plaque. On one hand, commensal bacteria may exert deleterious activity by increasing risk factors, such as insulin resistance, dyslipidemia, and producing trimethylamine-N-oxide. Conversely, gut microbiota could also play an atheroprotective activity in relation to the metabolism of polyphenols. It is therefore conceivable why gut microbiota has recently been identified as a novel target for cardiovascular disease. Beyond the use of selected probiotics for the management of atherosclerosis-associated risk factors, innovative approaches, such as the fecal microbiota transplantation, has been recently proposed and discussed in the present review.

**Key words:** *Gut Microbiota, Probiotics, Fecal Microbial Transplantation.*

### Aspetti generali del microbiota intestinale

L'organismo umano ospita un significativo numero di microrganismi, tra cui archaea, virus, funghi, protozoi e soprattutto batteri, (*Tabella 1*) che si localizzano

in diversi distretti corporei. Tale complesso ecosistema, che si è co-evoluto con l'ospite, è localizzato nella cavità orale, sulla pelle e, in modo quantitativamente più rilevante, nell'intestino, e prende il nome di microbiota.

Globalmente, si è stimato che il numero di cellule batteriche superi di almeno un fattore 10 il numero di cellule eucariotiche del corpo umano<sup>1</sup>.

La composizione del microbiota intestinale è stata oggetto di intensi studi di metagenomica, che hanno permesso di

*Indirizzo per la corrispondenza*

Ilaria Zanotti  
Dipartimento di Farmacia  
Università degli Studi di Parma  
Parco Area delle Scienze 27/A, 43124 Parma  
E-mail: [ilaria.zanotti@unipr.it](mailto:ilaria.zanotti@unipr.it)

caratterizzare qualitativamente e quantitativamente la popolazione microbica. Tra i progetti più ambiziosi che si sono distinti in queste ricerche, citiamo lo statunitense Human Microbiome Project (2) e l'europeo Metagenomics of the Human Intestinal Tract (3). Questi studi si basano su moderne tecniche di sequenziamento genico ("next generation sequencing"), basate sull'analisi della porzione 16S dell'RNA ribosomiale, abbinate a tecniche di bioinformatica.

Complessivamente è stato stimato un numero di oltre 35000 specie batteriche colonizzanti l'intestino umano (4). Qualitativamente, esiste un ampio "core" di specie microbiche largamente condiviso dalla popolazione «normale». I phyla più rappresentativi sono Firmicutes e Actinobacteria, tra i gram positivi, e Bacteroidetes e Proteobacteria tra i gram negativi. Uno studio recente ha chiarito la relazione tra ricchezza del microbiota e stato di salute/malattia, associando un'alta conta batterica ad una minor prevalenza di pato-

logie metaboliche e, viceversa, una ridotta variabilità di specie ad una maggior incidenza di malattie infiammatorie. Questa osservazione sembra legarsi alla presenza, nel primo caso, di batteri con funzioni protettive (maggior produzione di butirato e idrogeno, ridotta produzione di solfuro d'idrogeno), nel secondo con attività pro infiammatoria (degradazione di aminoacidi aromatici e beta glucuronide) (5).

La composizione del microbiota intestinale è definita da una serie di fattori, quali:

■ *Tipo di parto*: la tipologia di batteri che per primi colonizzano l'intestino è definita dalla nascita per via vaginale o per parto cesareo. Nel primo caso, si ritrovano principalmente batteri del genere *Lactobacillus* e *Prevotella*, che colonizzano la vagina materna. Nel secondo prevalgono i ceppi *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Propionibacterium*, tipici della pelle (6).

■ *Età*: il profilo microbico dato dal parto tende a modificarsi in maniera peculiare durante l'allattamento, a seconda che il bambino riceva latte materno o artificiale.

**Tabella 1: la gerarchia tassonomica dei batteri prevede l'identificazione di 23 Phyla, 31 classi, 70 ordini, 175 famiglie e 872 generi. In tabella sono rappresentati alcuni esempi significativi dei batteri che colonizzano il microbiota intestinale umano.**

Phyla	Classi	Ordini	Famiglie	Generi
Proteobacteria	Gamma Proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Escherichia Edwardsiella Proteus
Actinobacteria	Actinobacteria	Bifidobacteriales	Bifidobacteriaceae	Bifidobacterium Propionibacterium Streptomyces
		Coriobacteriales Actinomycetales	Coriobacteriaceae Corynebacteriaceae	Collinsella Corynebacterium
Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae Lactobacillaceae	Enterococcus Lactobacillus
	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae Peptostreptococcaceae Eubacteriaceae	Clostridium Anaerococcus Eubacterium
	Cocchi	Cocccae	Lachnospiraceae Streptococcaceae	Roseburia Streptococcus
Bacteroidetes	Bacteroidetes	Bacteroidales	Bacteroidaceae Prevotellaceae	Bacteroides Prevotella

Se durante la prima infanzia le variazioni della composizione sono massicce, intorno ai 3 anni di vita il microbiota tende ad assumere una composizione molto simile a quella dell'adulto (7).

È stato stimato che, pur con qualche variazione dovuta a diversi fattori, la composizione del microbiota intestinale si mantiene stabile tra la terza e la settima decade della vita (8).

■ *Dieta*: rappresenta il principale fattore influenzante quantitativamente e qualitativamente la composizione del microbiota in età adulta. È stato documentato che un apporto quotidiano di prodotti vegetali e ad alto contenuto di fibre determina una maggior diversità del microbiota, che, come detto in precedenza, si associa ad una minor insorgenza di malattia (9).

■ *Patrimonio genetico*: nonostante diversi studi abbiano documentato l'influenza dell'etnia sulla composizione del microbiota intestinale, è importante considerare l'effetto delle abitudini alimentari che si associano a determinate popolazioni. Quindi, la differenza che si osserva, ad esempio, nel microbiota dei bambini africani e di quelli europei, riflette non solo la variabilità genetica, ma certamente anche le diverse abitudini alimentari (10).

■ *Terapie farmacologiche*: come noto, la classe di farmaci che mostra un maggiore impatto sul microbiota è quella degli antibiotici. In virtù della loro azione battericida e batteriostatica, sfruttata nella terapia di diverse infezioni, gli antibiotici esercitano un'azione a breve e a lungo termine sulla composizione del microbiota. In particolare, l'azione degli antibiotici potrebbe condurre, attraverso la riduzione di alcuni ceppi intestinali, alla perdita della rete di interazioni che si stabiliscono tra le specie colonizzanti. Da qui, la creazione di un ambiente maggiormente favorevole allo sviluppo di batteri patogeni (11).

■ *Xenobiotici*: l'effetto di sostanze inquinanti ambientali, alle quali l'uomo è esposto, sul microbiota è oggetto di recente interesse. Pur mancando gli studi epidemiologici, diversi lavori sperimentali hanno descritto l'impatto negativo di pesticidi (organo-fosforici, glifosato), inquinanti atmosferici (PM-10), bifenili policlorurati, metalli pesanti (mercurio, cadmio, piombo) sul microbiota animale, con conseguente aumentata comparsa di patologie infiammatorie. Questi studi suggeriscono quindi ulteriori effetti tossici di queste sostanze, oltre a quelli sistemici o locali noti ormai da decenni (12).

Come accennato inizialmente, la popolazione microbica ha sviluppato relazioni di tipo simbiotico con l'organismo umano, fornendo diversi benefici fisiologici in cambio della tolleranza del sistema immunitario. Tra le principali funzioni, annoveriamo:

■ *Difensiva*: i batteri commensali dell'intestino, insieme al muco e alla mucosa intestinale, costituiscono la barriera mucosa, un importante sistema che protegge l'organismo da fattori immunogenici e patogeni presenti nel lume (13). In particolare, il microbiota contribuisce in maniera fondamentale alla prevenzione della colonizzazione da parte di microorganismi patogeni, grazie all'attività di sintesi di proteine antimicrobiche, all'attivazione delle cellule dendritiche intestinali e garantendo le funzioni di barriera dell'intestino tramite effetti strutturali, quali la modulazione della proliferazione delle cellule epiteliali intestinali, il mantenimento dei desmosomi e delle tight junctions. Inoltre il microbiota intestinale esplica un importante ruolo di immunomodulazione, in associazione con i tessuti linfoidei intestinali (1).

■ *Metabolica*: questa importante funzione integra per molti aspetti il metabolismo dell'ospite e permette di identificare il mi-

crobiota come un organo metabolicamente attivo, responsabile della digestione di diversi nutrienti, che altrimenti non sarebbero modificabili e assimilabili dal nostro organismo. Tra questi:

- **Carboidrati.** La fermentazione di queste macromolecole rappresenta la principale fonte di nutrienti per i batteri intestinali e coinvolge quei carboidrati che sfuggono alla digestione prossimale e che sono indigeribili per l'organismo umano. I principali prodotti che originano da questa fermentazione sono acidi grassi a catena corta (SCFA), molecole con una coda alifatica composta da meno di sei atomi di carbonio, che rappresentano una fonte energetica per l'epitelio intestinale e il fegato (14), sono coinvolti nel mantenimento dell'integrità della barriera mucosa, presentano un'azione immunomodulatoria e diminuiscono la permeabilità intestinale. A livello metabolico esplicano un'importante funzione regolatoria, modulando l'uptake lipidico degli enterociti e la sintesi di lipidi e glucosio. In letteratura è stato evidenziato il ruolo benefico degli SCFA negli stati cronici di infiammazione e nei tumori (15). In particolare, Cousin ha dimostrato che gli SCFA prodotti dal probiotico *Propionibacterium freudenreichii* sono co-responsabili dell'apoptosi nel colon umano di cellule cancerogene (16).
- **Lipidi.** Il microbiota intestinale esplica un ruolo rilevante anche nel metabolismo lipidico, influenzando l'omeostasi del colesterolo e regolando la composizione della bile. Ad esempio, alcuni batteri del genere *Bacteroides* sopprimono l'inibizione della lipasi lipoproteica negli adipociti, con conseguente immagazzinamento dei trigliceridi nel tessuto adiposo (17). Il metabolismo degli acidi biliari è invece a carico principal-

mente della bile salt hydrolase (BSH), che promuove la deconiugazione degli acidi biliari con conseguente ridotto riassorbimento e maggior eliminazione del colesterolo (18). Come si vedrà più avanti, questa attività rappresenta un target importante per lo sviluppo di probiotici ad azione ipocolesterolemizzante.

- **Proteine:** il metabolismo di questa classe di macromolecole è garantito da un sostenuto apparato di proteasi e peptidasi microbiche, che agiscono in associazione con gli enzimi dell'ospite (1).
- **Polifenoli:** questi metaboliti secondari si ritrovano in diverse varietà di alimenti di origine vegetale che il nostro organismo assume quotidianamente, ed esplicano documentate funzioni benefiche sulla salute dell'uomo (19). Questi composti, una volta ingeriti, sono sottoposti ad un esteso metabolismo ad opera del microbiota, che porta alla produzione di metaboliti, assorbibili per via portale e come tali in grado di raggiungere i siti distali dell'organismo. Si ritiene che possano essere proprio questi metaboliti ad spiegare, a livello cellulare, le attività che conducono agli effetti preventivi dei polifenoli sullo sviluppo di diverse malattie.

■ **Sintesi delle vitamine B e K:** è una delle principali funzioni del microbiota intestinale

■ **Degradazione di xenobiotici e farmaci:** analogamente a quanto accennato in precedenza per i nutrienti, il microbiota intestinale possiede un'estesa attività metabolizzante verso farmaci e xenobiotici, che deve essere tenuta in considerazione nel corso di una terapia.

Questa relazione di mutuo beneficio tra microbiota ed organismo umano si instaura in un contesto di equilibrio, la cui perturbazione conduce a stati patologici.

Ormai diverse evidenze hanno dimostrato che la variazione della composizione/funzione del microbiota gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo di malattie associate ad alterazioni metaboliche (20).

### Microbiota ed aterosclerosi

La disbiosi è stata dunque collegata all'insorgenza e allo sviluppo di diverse patologie, non solo dell'apparato gastrointestinale. Tra queste: sindrome dell'intestino irritabile (21), IBD (22), diabete ed obesità (23), cancro (24), disturbi neurologici (25) e malattie cardiovascolari.

Il ruolo di microorganismi nell'eziologia dell'aterosclerosi è noto dalla prima metà del XIX secolo, quando si individuò la presenza di agenti patogeni nella placca aterosclerotica. Tra questi: *Helicobacter pylori*, *Chlamydia pneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Hepatitis A virus* e *Herpes virus*. I meccanismi attraverso cui tali microorganismi sarebbero in grado di promuovere lo sviluppo di aterosclerosi sono molteplici e coinvolgono sia aspetti infiammatori (aumentata secrezione di citochine, attivazione degli inflammasomi, riduzione della paraossinasi), sia del metabolismo lipidico (aumento foam cells) (26).

Tuttavia, l'associazione tra batteri del microbiota intestinale e aterosclerosi è molto più recente. Uno studio interessante condotto da Karlsson e colleghi e basato sul sequenziamento del metagenoma intestinale di soggetti con aterosclerosi conclamata, ha dimostrato che l'aterosclerosi sintomatica è associata ad alterazioni geniche e funzionali del metagenoma intestinale. In particolare, questi soggetti presentavano un aumento dei batteri del genere *Collinella*, mentre gli individui sani mostravano una prevalenza dei generi *Eubacterium* e *Roseburia*. In maniera molto interes-

te, è inoltre emerso che questa variazione qualitativa rispecchiava una variazione di tipo funzionale. Infatti nei soggetti con aterosclerosi si assisteva ad un aumento dei batteri che producono sostanze proinfiammatorie (peptidoglicani che potenziano la funzione dei neutrofilii), mentre nei sani si aveva un aumento del gene che promuove la sintesi di beta-carotene (27). Da qui l'idea che una possibile funzione protettiva del microbiota sia legata all'azione antiossidante e che il metagenoma possa contribuire all'aterogenesi attraverso la regolazione di meccanismi infiammatori dell'ospite.

La correlazione tra aterosclerosi e microbiota, non solo intestinale, è stata ulteriormente rafforzata dal lavoro di Koren e colleghi, che hanno messo a confronto la composizione batterica di cavità orale, intestino e placca. In questo studio è emerso che le placche aterosclerotiche sono caratterizzate da un "core" di specie batteriche, comune a diversi individui, e da ceppi specifici dell'individuo. Tuttavia, in ciascun individuo la composizione del microbiota orale, intestinale e della placca è strettamente correlata (28). L'osservazione che il microbiota orale e quello della placca aterosclerotica abbiano la stessa diversità di batteri apre interessanti scenari sull'origine dei batteri della placca, permettendo di ipotizzare che questi derivino dall'apparato gastrointestinale.

I meccanismi attraverso cui il microbiota ha un effetto sull'aterosclerosi potrebbero essere distinti in diretti e indiretti. Tra i primi consideriamo la capacità metabolizzante del microbiota intestinale, attraverso cui si originano sostanze che esercitano effetti pro o antiaterosclerotici. Gli effetti indiretti sono invece quelli che dipendono dalla capacità del microbiota intestinale di modulare dei fattori di rischio per l'aterosclerosi, quali l'obesità, il diabete e la dislipidemia (29).

### *Effetti diretti*

Uno degli esempi meglio caratterizzati di come il microbiota possa, attraverso la sua attività metabolica, esercitare un effetto proaterosclerotico è data dalla produzione di trimetilammina N-ossido (TMAO), una molecola organica la cui concentrazione nel sangue aumenta dopo l'assunzione di L-carnitina e colina (30). Recenti studi clinici hanno dimostrato una correlazione positiva tra elevati livelli plasmatici di TMAO e aumento del rischio di eventi cardiovascolari avversi, come morte, infarto del miocardio o ictus (31).

Per questa ragione TMAO è stato proposto come un potenziale nuovo marker di rischio cardiovascolare, indipendente dai tradizionali fattori di rischio (32).

Cibi ricchi di fosfatidilcolina, la fonte principale di colina, sono la carne rossa, il pesce, il pollame e le uova. Alti livelli di L-carnitina sono riscontrabili in carne rossa e pollame. Sembra che esista una concentrazione soglia di colina che debba essere assunta per poter dare origine a TMAO (33) poiché la colina è assorbita dall'intestino tenue tramite un trasportatore che è saturabile alla concentrazione di colina nell'intestino di 200-300  $\mu\text{M}$  (34). Se questa concentrazione viene superata, l'eccesso di colina raggiunge l'intestino crasso e viene metabolizzata dai batteri intestinali a formare TMA (35). La maggior parte di TMA prodotta dal metabolismo batterico di colina e L-carnitina è assorbita nella circolazione sanguigna ed è in seguito rapidamente ossidata a TMAO ad opera di un enzima epatico, la monoossigenasi contenente flavina (FMO, flavin-containing monooxygenase) (36).

Da questi studi si può capire come la dieta abbia un ruolo non trascurabile nello sviluppo dell'aterosclerosi. È stato osservato che i soggetti onnivori producono più TMAO, attraverso il meccanismo di-

pendente dai batteri intestinali, rispetto ai vegani o ai vegetariani in seguito all'assunzione di L-carnitina. I vegani e i vegetariani a lungo termine (ovvero da almeno un anno) hanno infatti una capacità ridotta di sintetizzare TMAO a partire da L-carnitina; questi soggetti presentano inoltre concentrazioni plasmatiche di L-carnitina significativamente alte rispetto ai soggetti onnivori probabilmente dovuto al diminuito metabolismo intestinale della L-carnitina ad opera della flora batterica (37). Questi risultati indicano che le abitudini alimentari sono associate ad alterazioni significative della composizione della flora batterica intestinale e quindi influenzano l'abilità di sintetizzare TMA e TMAO a partire dall'assunzione di L-carnitina. Sono state infatti definite le tipologie di batteri la cui proporzione è associata a elevate concentrazioni plasmatiche di TMAO. Individui con un enterotipo caratterizzato da elevate proporzioni del genere *Prevotella* hanno concentrazioni plasmatiche di TMAO più elevate. Per quanto riguarda i batteri che processano la colina nell'uomo, i più rappresentativi sono stati identificati tra i generi *Anaerococcus*, *Clostridium*, *Proteus* ed *Edwardsiella* (38).

Questi batteri sono capaci quindi di aumentare le concentrazioni plasmatiche di TMAO per la maggior formazione di TMA a partire da colina.

All'opposto il microbiota può esplicare un'azione ateroprotettiva grazie al metabolismo dei polifenoli, che determina la formazione di composti bioattivi, in grado di svolgere effetti antiaterogeni attraverso diversi meccanismi (39). Un esempio è fornito dal lavoro di Wang, che ha dimostrato come le antocianine, di cui sono ricchi i frutti di bosco, vengano convertite dal microbiota intestinale in acido protocatecuico, la cui concentrazione plasmatica è inversamente associata allo sviluppo di

lesioni aterosclerotiche in topi. Tali effetti protettivi non si osservano però nei topi privi del microbiota a causa di un trattamento d'urto con antibiotici o perché geneticamente manipolati (topi germ free), nei quali, a livello circolante, non si rintraccia il metabolita sopra citato (40).

### *Effetti indiretti*

Le implicazioni del microbiota nell'obesità sono state documentate in diversi studi sull'uomo. Tra i meccanismi proposti vi sono l'aumento delle condizioni di endotossemia metabolica e infiammazione cronica conseguenti ad alterazioni del microbiota che aumentano la permeabilità intestinale. Infatti in soggetti obesi si sono osservati aumentati livelli plasmatici postprandiali di batteri o loro proteine (soprattutto lipopolisaccaride o endotossine) (41).

Nei topi che sviluppano spontaneamente obesità per deficit del gene della leptina, i topi ob/ob, si evidenzia una diminuzione dei Bacteroidetes e un aumento dei Firmicutes, mentre i topi germ free, privi cioè del microbiota, mostrano una resistenza allo sviluppo di obesità, anche in seguito all'assunzione di dieta ad alto contenuto di grassi (42). Ad ulteriore dimostrazione di questi concetti, è stata dimostrata l'azione correttiva della dieta ipocalorica. Nell'uomo, una ridotta variabilità del microbiota intestinale è stata associata ad una maggiore suscettibilità allo sviluppo dell'obesità (5).

Altre evidenze a favore del ruolo del microbiota nell'obesità riguardano l'effetto della chirurgia bariatrica, che induce variazioni del microbiota verso enterotipi associati a marcatori antinfiammatori (43) e l'effetto della variazione della composizione del microbiota in seguito ad ileostomia (44).

I meccanismi che giustificano l'effetto di promozione del microbiota sullo svilup-

po dell'obesità sembrano essere legati alla modulazione dell'attività della proteina Angiopietin-like 4, inibitore della lipoproteina lipasi, con conseguente aumento dell'accumulo di trigliceridi negli adipociti (45).

Analogamente, sono state dimostrate le interrelazioni tra composizione del microbiota e diabete di tipo 2. I soggetti diabetici presentano una diminuzione dei Firmicutes e un aumento dei Bacteroidetes e il rapporto tra questi due phyla è stato visto correlare con la tolleranza al glucosio. Soggetti con ridotta variabilità del microbiota intestinale sono più suscettibili anche allo sviluppo di insulino resistenza (46).

Il rapporto tra microbiota e dislipidemia non è così ben documentato, nonostante l'evidenza, anche per questo fattore di rischio, di una maggior predisposizione nei soggetti con minor diversità microbica intestinale. Uno studio interessante, perché condotto nel modello sperimentale del criceto, maggiormente predittivo per l'uomo rispetto a topi e ratti, ha permesso di correlare le alterazioni del microbiota intestinale indotte dalla dieta ad una profonda modifica del profilo lipidico. In questo lavoro, l'aumento dei livelli intestinali di bifidobatteri correlava positivamente con le HDL plasmatiche, mentre quelli della famiglia delle Coriobacteriaceae correlava positivamente con i valori di colesterolo non HDL (47).

### **Modulazione del microbiota: una nuova frontiera contro l'aterosclerosi**

#### *I probiotici: definizione, scoperta e uso in terapia*

L'ampia diffusione, nel mondo occidentale, di prodotti contenenti microorganismi, trova le sue radici nella ricerca di una terapia non farmacologica priva di effetti collaterali. Tali trattamenti possono sia so-

stituire l'uso del farmaco in disturbi di lieve entità, sia coadiuvare la terapia farmacologica, con lo scopo di diminuire gli effetti collaterali del farmaco, e di conseguenza aumentare la compliance del paziente, un problema questo di notevole importanza per l'efficacia di una terapia (48).

Negli ultimi decenni ha avuto ampia diffusione l'approccio nutraceutico basato sulla somministrazione di ceppi batterici selezionati per la cura di patologie sistemiche e del tratto gastro-intestinale. L'OMS e la FAO definiscono questi ceppi come batteri probiotici, ossia microorganismi che,

**Tabella 2: principali applicazioni terapeutiche di vari ceppi probiotici.**

Patologia	Ceppi Batterici Attivi	Referenze
Malattie allergiche in età pediatrica e adulta	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> LP-33	Giovannini M, et al. 2007 (104) Costa DJ, et al. 2014 (105)
Immunostimolazione	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA68 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB64	Marinkovic D, et al. 2016 (106)
Infezioni respiratorie	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 <i>Lactobacillus</i> GG <i>Lactobacillus helveticus</i> Lafti L10	Rautava S, et al. 2009 (107) Michalickova D, et al. 2016 (108)
Gastroenterite infettiva	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>	Canani R.B, et al. 2007 (109) Szymański H, et al. 2006 (110)
Diarrea associata a terapia antibiotica (AAD)	<i>Lactobacillus</i> GG <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Castagliuolo I, et al. 1999 (111) Evans M, et al. 2016 (112) Hickson M, et al. 2007 (113)
Riduzione sindrome colon irritabile	<i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG <i>Lactobacillus plantarum</i> 299 <i>Bifidobacterium</i> Cure 21 <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Rautava S, et al. 2009 (114) Bengtsson J, et al. 2016 (115) Kruis W, et al. 2004 (116)
Trattamento diarrea acuta	<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( <i>boulardii</i> ) <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 <i>Saccharomyces thermophilus</i> <i>Enterococcus faecium</i> LAB SF68 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Dinleyici EC, et al. 2015 (117) Allen S, et al. 2004 (118)
Attività antiossidante e antimicrobica	<i>Lactobacillus fermentum</i> ME-3	Songisepp E, et al. 2004 (53)
Infezione del tratto urogenitale femminile	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 <i>Lactobacillus fermentum</i> RC-14	Falagas ME, et al. 2006 (55)
Effetti anti ipertensivi	<i>Lactobacillus</i> FTDC 2113 <i>Lactobacillus acidophilus</i> FTDC 8033 <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 <i>Bifidobacterium</i> FTDC 8943 <i>Bifidobacterium longum</i> FTDC 8643	Yeo S, et al. 2010 (56)

quando somministrati in adeguate quantità, conferiscono beneficio all'ospite (49).

Il termine proviene dal greco *pro bios* (a favore della vita) ed è stato coniato nel 1965 dai veterinari Lilly e Stillwell. Tuttavia le prime osservazioni degli effetti benefici dati dalla somministrazioni di batteri erano già avvenute nel 1910, da parte del premio Nobel Eli Metchnikoff, che descrisse le capacità anti-invecchiamento del *Lactobacillus bulgaricus*, un ceppo contenuto nel latte acido assunto regolarmente dagli ultracentenari di alcune comunità del Caucaso e della Bulgaria (50). Nello stesso periodo, il pediatra francese Henry Tisser, aveva osservato nelle feci di pazienti pediatriche affetti da diarrea, la bassa presenza di batteri con la peculiare forma bifida, al contrario ampiamente presenti in bambini sani. La somministrazione di questi "bifido" batteri ha consentito di ristabilire la flora batterica nei soggetti malati. Le osservazioni di Tisser e Metchnikoff furono le prime considerazioni scientifiche sugli effetti benefici di probiotici sul tratto gastrointestinale, seguite successivamente da numerosi studi che hanno evidenziato attività benefiche di batteri sulla salute dell'uomo (51), tra le quali la stimolazione del sistema immunitario (52), la prevenzione di varie tipologie di tumori (53), la riduzione di sintomi allergici (54), delle infezioni del tratto urogenitale femminile (55), gli effetti anti-ipertensivi (56) e ipolipidizzanti (57). Per una esauriente panoramica sulle applicazioni terapeutiche dei probiotici, si veda la *tabella 2*.

#### *Probiotici e modulazione del profilo lipidico*

Nella *tabella 3* sono riassunti i lavori più significativi che hanno dimostrato l'attività ipolipemizzante dei probiotici.

I ricercatori Mann e Shaper nel 1974 furono i primi a descrivere l'attività ipolipide-

mizzante di ceppi batterici assunti tramite la dieta. Essi correlarono l'alto consumo di latte fermentato contenente vari ceppi di lattobacilli, con la riduzione dei livelli sierici di colesterolo riscontrata in alcune tribù Masai (58).

In seguito, numerosi sono stati gli studi che hanno dimostrato in vitro, in vivo e nell'uomo gli effetti ipolipidizzanti di vari ceppi di Lactobacilli e di Bifidobacteria, batteri ampiamente presenti nel microbiota umano. Tra questi, i ricercatori Harrison e Peat, nel 1975, osservarono una diminuzione dei livelli di colesterolo plasmatico in neonati nutriti con latte addizionato di *Lactobacillus acidophilus* (59).

Soprattutto nelle prime ricerche, queste variazioni della lipidemia si apprezzavano solamente dopo ripetuti ed elevati consumi di latte fermentato, o di prodotti caseari. Al contrario, la somministrazione di quantità più basse non confermarono gli effetti positivi sul profilo lipidico dell'ospite (60). Questi risultati contraddittori possono essere, almeno in parte, dovuti a errori nel disegno sperimentale, tra cui il numero limitato dei pazienti trattati o il mancato controllo della dieta per i soggetti in trattamento (61). Studi recenti, invece, basati sull'analisi in doppio cieco di un ampio numero di soggetti, hanno rivelato l'attività ipolipidizzante e di prevenzione di rischio cardiovascolare di vari bifidobatteri e lattobacilli (51, 61-62).

I Lactobacilli sono batteri Gram-positivi, anaerobi e acidofili, con elevate capacità fermentative responsabili della produzione di acido lattico. Una tra le prime osservazioni sulle capacità di modulazione del profilo lipidico dei lattobacilli è quella di Gilliland che, nel 1985, ha evidenziato una diminuzione del colesterolo totale (-11,8%) in maiali trattati con *Lactobacillus acidophilus* P-47 e RP-32 (63). Successivi studi hanno evidenziato l'effetto sulla

**Tabella 3: selezione degli studi più significativi e recenti attestanti l'effetto ipolipidemizzante dei probiotici.**

Studi Clinici	Ceppi Batterici Attivi	Effetti sul profilo Lipidico nell'Uomo	Referenze
114 pazienti adulti dislipidemic; 6 settimane di trattamento giornaliero.	<i>Lactobacillus reuteri</i> NCIMB 30242	LDL-C (- 8.92%) Colesterolo totale (-4.81%) Colesterolo non-HDL (-6.01%) ApoB100 (-0.19 mmol/L)	Jones ML, et al. 2012 (64)
38 pazienti in età pediatrica dislipidemic; 3 mesi di trattamento giornaliero.	<i>Bifidobacterium animalis lactis</i> MB2409 <i>Bifidobacterium bifidum</i> MB109B <i>Bifidobacterium longum longum</i> BL04	Colesterolo Totale (-3.4%) LDL-C (-3.8%)	Guardamagna O, et al. 2014 (62)
Meta-analisi di 13 studi clinici su 485 pazienti adulti ipercolesterolemici	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus sporogenes</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Bifidobacterium longum</i>	Colesterolo totale (-6.4 mg/dL) LDL-C (-4.90 mg/dL) Trigliceridi (-3.95%)	Guo Z, et al. 2011 (66)
29 adulti normolipidemic; 6 settimane di trattamento giornaliero.	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	LDL-C (-10%)	Agerbaek M, et al. 1995 (67)
89 pazienti obesi adulti; 12 settimane di trattamento giornaliero	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5 <i>Bifidobacterium lactis</i> BB12	Colesterolo Totale (-0.36 mmol/L) LDL-C (0.35 mmol/L)	Madjd A, et al. 2016 (119)
60 pazienti ipercolesterolemici adulti; 12 settimane di trattamento giornaliero	<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 7527 <i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 7528 <i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 7529	Colesterolo totale (-17.4%) LDL-C (-17.6%) LDL ossidate (-15.6%)	Fuentes MC, 2013 (120)

lipidemia anche nell'uomo: tra questi, gli studi condotti da Jones, che ha analizzato l'attività di uno yogurt contenente *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 su 114 individui ipercolesterolemici, in doppio cieco. L'LDL-C e il colesterolo totale sono risultati ridotti rispettivamente dell'8,92% e del 4,81%. Inoltre è stata apprezzata una diminuzione significativa dell'ApoB100, maggior componente delle lipoproteine a bassa densità (64).

La famiglia dei bifidobatteri è composta da batteri gram positivi, spesso anaerobi, che si adattano e colonizzano facilmente l'ambiente intestinale (65). Numerosi sono i dati in vivo e sull'uomo che dimostrano le attività ipolipidemizzanti di questa famiglia. Tra i primi, il trial clinico

condotto su 38 pazienti in età pediatrica affetti da dislipidemia, a cui è stato somministrato un mix di *Bifidobacterium animalis lactis* MB2409, *B. bifidum* MB109B e *B. longum longum* BL04 che ha diminuito il colesterolo totale (-3,4%) e le LDL (-3,8%) (62). Un'importante meta-analisi di trials clinici condotta su un totale di 485 pazienti con colesterolemia media o elevata, ha rivelato che la somministrazione di *L.bulgaricus*, *L.sporogenes*, *E.faecium*, *B.lactis*, e *B.longum* abbassa i livelli sierici di colesterolo, LDL e trigliceridi, rispettivamente di 6,40 mg/dL, 4,9 mg/dL e 3,95mg/dL (66).

La ricerca di potenziali probiotici non si è limitata ai ceppi delle famiglie dei bifidobatteri e lattobacilli, ma ha esplorato le

eventuali capacità di altre famiglie batteriche; ad esempio, un trial clinico condotto su 29 individui con valori di lipemia nella norma, a cui è stato somministrato un yogurt contenente *Enterococcus faecium* e due ceppi di *Streptococcus thermophilus*, ha mostrato una riduzione del 10% delle LDL rispetto al gruppo controllo (67).

L'attività ipolipidemizzante dei probiotici può realizzarsi attraverso quattro meccanismi principali: assimilazione del colesterolo all'interno della cellula batterica, degradazione del colesterolo mediante la trasformazione in coprostanolo, metabolizzazione enzimatica degli acidi biliari, modulazione dell'assorbimento intestinale mediata dagli SCFA.

■ *Assimilazione del colesterolo nella cellula batterica*: questo meccanismo consiste nell'incorporazione nel batterio di colesterolo e di lipidi presenti nel lume intestinale, diminuendone il quantitativo disponibile all'assorbimento da parte degli enterociti. Il colesterolo, situato maggiormente nelle membrane batteriche, esercita un ruolo cruciale per la sopravvivenza dei microrganismi, poiché interagisce con i fosfolipidi di membrana, modulandone la fluidità. Questa interazione cambia il rapporto fra acidi grassi di membrana saturi e insaturi, aumentando la resistenza cellulare alla lisi, e quindi la sopravvivenza del batterio (68). Questa capacità è tipica di vari Bifidobatteri come *B. bifidum*, *B. breve*, *B. animalis*, i quali, in presenza di colesterolo, aumentano la trascrizione di geni responsabili della sintesi di trasportatori di membrana ATP dipendenti, che favoriscono l'entrata di molecole a nucleo steroideo all'interno del batterio (69). Il nostro gruppo di ricerca ha evidenziato, nel *Bifidobacterium bifidum* PRL2010, una notevole captazione di colesterolo, mediata da trasportatori ATP dipendenti (70). Inoltre, un aumento di attività di questi geni è stato riscontrato in

probiotici come il *Lactobacillus acidophilus* e il *Lactobacillus plantarum* (71).

■ *Degradazione del colesterolo mediante la trasformazione in coprostanolo*: alcuni batteri del microbiota di grandi mammiferi sono in grado di trasformare il colesterolo, captato dall'ambiente intestinale, in coprostanolo, eliminato dalla cellula batterica e in seguito dall'ospite mediante le feci. Questa metabolizzazione riduce la quantità di colesterolo assorbito dagli enterociti, diminuendone i livelli plasmatici. Chiang e colleghi hanno evidenziato che numerosi *Arthrobacteri*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus* presentano una elevata attività dell'enzima colesterolo deidrogenasi/isomerasi, responsabile della biotrasformazione del colesterolo in coprostanolo (72). Inoltre questa via di degradazione è stata scoperta anche in ceppi facenti parte della famiglia dei bifidobacteria come *B. animal*, *B. longum* (73) e *B. bifidum* PRL2010 (70). Studi in vitro hanno dimostrato l'attività di conversione in lactobacilli come il *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* and *L. casei* ATCC 393 (74).

■ *Attività della BSH*: come accennato in precedenza, la BSH, espressa diffusamente in ceppi di Bifidobacteria e di Lactobacilli, è responsabile della deconiugazione degli acidi biliari tauro- e glico-deossicolico, i maggiori componenti della bile. L'idrolisi riduce la ricaptazione di queste molecole da parte degli enterociti, inibendone quindi il ricircolo enteroepatico e favorendone, al contrario, l'eliminazione. È quindi comprensibile come questo meccanismo possa essere considerato un bersaglio farmacologico, per la riduzione dei livelli sierici di colesterolo (75). Studi clinici recenti hanno mostrato una significativa riduzione di colesterolo totale e LDL-C, dovuta alla somministrazione di *L. gasseri* CHO-220, un probiotico con

elevata attività di BSH, combinata con capsule del prebiotico inulina (76). In un altro trial clinico a doppio cieco, la somministrazione di microcapsule di *L. reuteri* NCIMB30242 ha modulato in modo positivo il profilo lipidico dell'ospite riducendo l'LDL-C dell'11,64%, il colesterolo totale del 9,14%, e l'ApoB-100 dell'8,41%. Al fine di individuare il meccanismo ipolipidemizzante, Jones trovò un significativo aumento di acidi biliari deconiugati, che testimoniano l'elevata attività dell'enzima BSH, espressa nel batterio (77). Inoltre i probiotici con un'elevata attività di BSH possono influenzare l'espressione del farnesoid X receptor (FXR), un recettore nucleare che interagisce con gli acidi biliari. È stato dimostrato che la diminuzione dell'attività di FXR aumenta il catabolismo del colesterolo e la sintesi di acidi biliari; inoltre è responsabile della diminuzione dell'attività del recettore nucleare small heterodimer partner (SHP), coinvolto nell'inattivazione dei recettori nucleari (78). Questa diminuzione aumenta l'espressione del Liver X Receptor (LXR), responsabile della sintesi dei trasportatori ABCG5/8, che promuove l'escrezione biliare di colesterolo. Usman ha dimostrato che la somministrazione di *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 nei topi ha diminuito significativamente LDL-C e trigliceridi ed ha aumentato l'attività del CYP7A1, promuovendo la sintesi e l'escrezione fecale degli acidi biliari (79).

Un altro meccanismo di azione associato alla BSH coinvolge il trasportatore Niemann-Pick C1-Like 1, responsabile dell'assorbimento del colesterolo dal lume intestinale agli enterociti (80). È stato dimostrato che la somministrazione del *L. acidophilus* in ratti riduce l'attività di questo trasportatore, diminuendo l'assorbimento di colesterolo esogeno e determinando un effetto ipocolesterolemizzante (80).

■ *Modulazione dell'assorbimento intestinale di colesterolo da parte degli SCFA*: come accennato in precedenza, gli SCFA sono prodotti di fermentazione derivanti dalla digestione di carboidrati da parte dei batteri della flora intestinale. Alcuni di questi, tra cui l'acido propionico, butirrico e acetico, giocano un importante ruolo nella modulazione dei livelli sierici di colesterolo. Vari studi hanno dimostrato che l'acido acetico aumenta il colesterolo totale, mentre l'acido propionico è associato ad una diminuzione del colesterolo plasmatico (81). Gli SCFA sono responsabili inoltre dell'attivazione dell'angiopoietin-like protein 4, un inibitore della lipoprotein lipasi. L'inibizione della LPL riduce l'immagazzinamento di trigliceridi provenienti dalle VLDL e dai chilomicroni, e controlla l'ossidazione degli acidi grassi nei muscoli e negli adipociti (82). In letteratura sono presenti numerosi studi che dimostrano come la produzione di SCFA da parte di probiotici, possa influenzare il profilo lipidico in pazienti con ipercolesterolemia lieve o moderata e in pazienti con diabete di tipo 2 (83-84).

#### *Sicurezza e dosaggio dei probiotici*

Poche ed eterogenee sono le informazioni riguardanti la dose dei probiotici da somministrare nell'uomo poiché la scelta dipende dai ceppi e dai benefici desiderati<sup>85</sup>. Al fine di individuare una accurata dose-risposta, l'Agence Francaise de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), nel 2005 ha affermato che la dose di probiotico somministrata deve essere tale da determinare il raggiungimento di una concentrazione batterica intestinale di 10<sup>6</sup> Colony Forming Unit (CFU)/ml, se la colonizzazione deve avvenire nell'intestino tenue, o di 10<sup>8</sup> CFU/ grammi di feci se il luogo della colonizzazione è l'intestino crasso. La prima concentrazione proviene dall'osservazione di effetti benefici su

stati diarroici dovuti a infezioni batteriche dell'intestino tenue dell'uomo, mentre la seconda concentrazione è stata proposta perché corrisponde a meno di 1/1000 della flora autoctona (86).

Per quanto riguarda l'uso dei probiotici contro l'aterosclerosi, numerosi studi indicano che il quantitativo ottimale di probiotici somministrati varia da  $10^7$  a  $10^{11}$  CFU/die nell'uomo e da  $10^7$  a  $10^9$  CFU/die nell'animale (87-88), anche se alcuni ceppi sono attivi a concentrazioni più basse, o in molti casi l'effetto non dipende dal quantitativo di probiotico somministrato. Come ha dimostrato Naruszewicz, la somministrazione di una bassa concentrazione di *L. plantarum* 299v ( $5.0 \times 10^7$  CFU/mL) è sufficiente per ridurre l'LDL-C del 12% (87), al contrario il consumo giornaliero di capsule contenenti  $3 \times 10^9$  CFU di *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 e di *Bifidobacterium longum* non influisce in modo significativo sul profilo lipidico dell'ospite (89). Un altro fattore che può influire sull'attività di un batterio è il vettore usato per la somministrazione, poiché alcuni potenziali probiotici, non resistendo all'ambiente acido dello stomaco, o alla secrezioni pancreatiche e della bile presenti nell'ambiente intestinale, sono somministrati con l'ausilio di vettori a bassa viscosità o micro capsule, in modo da favorire il raggiungimento del sito d'azione (90-91). L'attività del sistema immunitario nei confronti di ceppi non autoctoni, è considerato un grande ostacolo alla colonizzazione dell'intestino da parte dei probiotici. Il ritrovamento nelle feci di anticorpi ceppo-specifici contro i probiotici somministrati dimostra come il sistema immunitario tende a ristabilire l'equilibrio microbico, prediligendo i batteri autoctoni ai ceppi non naturalmente presenti nell'intestino, i quali hanno meno capacità adattative all'ambiente intestinale, e quindi possibilità inferiori di sopravvive-

re rispetto al microbiota (92). Per evitare che si sviluppi resistenza verso i probiotici somministrati, in tempi recenti è stata proposta una strategia basata sulla somministrazione alternata di ceppi simili ma con una differente sensibilità immunitaria. Ciò porta alla produzione di anticorpi specifici per i singoli ceppi, che non agiscono sugli altri. La procedura consta di tre parti:

- 1) Somministrazione del ceppo probiotico di interesse terapeutico, che induce una risposta immunitaria;
- 2) somministrazione di una miscela di ceppi batterici simili, che a loro volta indurranno la produzione di numerosi tipologie di anticorpi, specifici per ogni singolo ceppo;
- 3) ulteriore somministrazione del probiotico iniziale. Usando questa procedura, il livelli di anticorpi specifici per il probiotico rimangono bassi, poiché il sistema immunitario umano necessita di tempo per la produzione di essi (93).

La somministrazione di batteri nell'uomo, solleva la questione della loro sicurezza. Storicamente, i lattobacilli e i bifidobatteri, sono considerati sicuri, in quanto batteri commensali della flora intestinale dei mammiferi, anche se teoricamente questi ceppi possono essere responsabili di quattro tipologie di effetti collaterali:

- Infezioni sistemiche;
- Attività metaboliche deleterie;
- Eccessiva risposta immunitari in soggetti suscettibili;
- Trasferimento genetico, responsabile della diffusione di resistenze agli antibiotici.

In letteratura sono descritti pochi casi di eventi avversi dopo somministrazione di probiotici, principalmente infezioni di *Bacillus* dopo somministrazione continuativa di probiotici (94), infezioni nosocomiali dovute ad assunzione di Enterococchi, responsabili inoltre di resistenza all'antibioti-

co Vancomicina, e rari casi di presenza di batteri nel sangue di pazienti dopo somministrazione di alcuni lattobacilli (95). Non sono invece riportati eventi infettivi dovuti alla somministrazione di bifidobatteri (96).

La resistenza agli antibiotici è dovuta al trasferimento da un batterio ad un altro di plasmidi, un doppio filamento di DNA contenente funzioni non essenziali per la sopravvivenza del batterio. Nel 2001, la FAO ha affermato, nelle linee guida per l'uso dei probiotici, che batteri contenenti geni di resistenza agli antibiotici non devono essere usati come nutraceutico, anche se nello stesso report la FAO ammette la presenza di plasmidi nei più comuni batteri probiotici usati in commercio. Per evitare l'effetto avverso citato precedentemente, il Comitato Scientifico sulla Nutrizione animale dell'Unione Europea (SCAN) e il Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) dell'European Food Safety Agency (EFSA) ha suggerito ulteriori studi sulla resistenza agli antibiotici dei batteri probiotici (97). Inoltre l'EFSA ha creato la lista dei batteri Generalmente Considerati Sicuri (GRAS), che raggruppa tutti i potenziali probiotici sicuri, certificati mediante analisi in vitro, in vivo e nell'uomo, mirate a individuare le resistenze agli antibiotici, alle eventuali attività batteriche di metabolismo e di produzione di tossine che possano modificare l'ambiente intestinale e l'assenza di infettività in animali immuno-compromessi.

#### *Il trapianto fecale di microbiota (FMT)*

Un nuovo approccio per modificare il microbiota allo scopo di ottenere benefici per l'ospite è l'FMT. Mentre le prime testimonianze di donatori di feci risalgono addirittura all'antica Cina (IV secolo), il ricercatore Lewin, in un testo di coprologia comparativa, ha affermato che "il consumo di feci di cammello è stato raccomandato dalle popolazioni beduine come

*un utile rimedio contro la dissenteria, ciò confermato dai soldati tedeschi durante la seconda guerra mondiale*" (98). I primi studi scientifici sull'FMT sono stati condotti da Eiseman nel 1954, che ha usato questa terapia contro l'infezione da *Clostridium difficile* (CDI) (99). L'effetto positivo dell'FMT contro il CDI è stato confermato da una recente revisione sistematica della letteratura, che ha incluso 27 studi coinvolgenti 317 pazienti. Complessivamente la risoluzione dell'infezione è stata registrata nel 93% dei casi (100).

Il trapianto fecale di microbiota consiste nella somministrazione di una soluzione di feci provenienti da un donatore sano direttamente nell'intestino del paziente. In accordo con studi condotti dall'Academic Medical Center di Amsterdam, è consigliabile che il donatore sia un familiare del paziente e che il quantitativo di feci somministrate sia di 200-300 grammi dissolti in 500 mL di soluzione salina sterile (101), anche se differenti studi hanno riportato risultati simili somministrando feci congelate (102). In letteratura sono descritte differenti metodiche di somministrazione tra cui la colonscopia, il clistere o il sondino naso-gastrico (100). Gli studi condotti negli ultimi decenni mostrano un altro grado di sicurezza dell'FMT, riscontrando solo pochi casi di diarrea, costipazione, crampi addominali e febbre (100).

Questo approccio innovativo è risultato favorevole anche in soggetti affetti da obesità e diabete che, come indicato precedentemente, sono caratterizzati da condizioni di disbiosi. La procedura di FMT da donatori non obesi aumenta la sensibilità all'insulina, molto probabilmente come conseguenza dell'aumento della concentrazione di batteri intestinali in grado di produrre butirrato, acido grasso a catena corta in grado di ridurre la permeabilità intestinale (103).

Studi di FMT sono attualmente in corso per valutare se questa tecnica può migliorare alcuni aspetti delle malattie da fegato grasso e l'infiammazione vascolare (103).

## Conclusioni

Le recenti scoperte che associano il microbiota intestinale all'aterosclerosi suggeriscono nuove strategie per la cura di questa patologia.

Una di queste prevede la modulazione della composizione microbica, attraverso l'utilizzo di probiotici e prebiotici. In alter-

nativa, poiché molti effetti antiaterogeni del microbiota sono mediati da prodotti derivanti dal metabolismo batterico, gli stessi metaboliti potrebbero essere individuati come target, modulandone la produzione o l'attività. Tuttavia è importante sottolineare che, a causa della complessa composizione e del coinvolgimento in diverse funzioni fisiologiche e in svariate condizioni patologiche, può essere difficile definire un microbiota "sano". Pur essendo quindi un campo di estrema attualità e di grande interesse, molti aspetti restano ancora da esplorare.

## Glossario

**ANGPLT 4:** Angiopietin Like 4. Inibitore della lipoproteina lipasi, e quindi responsabile dell'accumulo di trigliceridi negli adipociti.

**BSH:** Bile Salt Hydrolase. È un enzima espresso da diversi ceppi batterici che, tramite l'attività di idrolisi degli acidi biliari, diminuisce l'idrofilia di questa molecole, impedendone la ricaptazione negli enterociti e favorendone di conseguenza l'eliminazione fecale.

**CFU:** Colony Forming Unit / Unità di Formazione della Colonia Batterica

**CYP7A1:** Cholesterol 7 alpha-hydroxylase. Conosciuto anche come citocromo P450 7A/1, è responsabile della trasformazione del colesterolo in 7-aidrossicolesterolo, tappa limitante della sintesi degli acidi biliari.

**EFSA:** European Food Safety Agency / Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare

**FAO:** Food and Agriculture Organization of the United Nation.

**FMT:** Fecal Microbiota Transplant / Trapianto Fecale di Microbiota

**FXR:** Farnesoid X Receptor / Recettore Nucleare Farnesoide X. Recettore nucleare per gli acidi biliari. Se attivato, determina l'inibizione della produzione di acidi biliari.

**GRAS:** Batteri Generalmente Considerati Sicuri dall'EFSA. È un elenco di batteri probiotici considerati sicuri, dopo analisi in vitro, in vivo e nell'uomo, mirate a individuare le resistenze

agli antibiotici, alle eventuali attività batteriche di metabolismo e di produzione di tossine

**HDL:** High Density Lipoprotein

**LDL:** Low Density Lipoprotein

**LPL:** Lipoprotein Lipase / Lipasi Lipoproteica. Enzima responsabile dell'idrolisi dei trigliceridi provenienti dalle lipoproteine VLDL e della produrre acidi grassi e glicerolo, che potranno successivamente entrare nella cellula ed essere ossidati (muscolo scheletrico e cardiaco) per ricavare energia, oppure essere risintetizzati in trigliceridi nel tessuto adiposo.

**LXR:** Liver X Receptor. Recettore nucleare, attivato agli ossisteroli, coinvolto in diversi processi del metabolismo lipidico, tra cui la sintesi dei trasportatori ABCG5/8, che promuovono l'escrezione biliare di colesterolo.

**OMS:** Organizzazione Mondiale della Sanità

**Phylum (plurale: phyla):** È il gruppo tassonomico gerarchicamente inferiore al regno e superiore alla classe.

**SCFA:** Short Chain Fatty Acid / acidi grassi a catena corta

**TMA:** Trimetilammina. È un prodotto della decomposizione di colina e L-carnitina, presenti in diverse fonti alimentari, precursore di TMAO.

**TMAO:** Trimetilammina-N-Ossido. Molecola organica, derivante dal metabolismo epatico di TMA, di recente individuata come potenziale nuovo biomarker di rischio cardiovascolare.

**RIASSUNTO**

Il microbiota intestinale è il più ampio ecosistema presente nel nostro corpo, composto da numerosi ceppi batterici che possono influenzare in modo opposto lo sviluppo della placca aterosclerotica, come è stato dimostrato in recenti studi. Da un lato, infatti, i batteri commensali possono avere effetti deleteri, aumentando i fattori di rischio, come l'insulino resistenza e la dislipidemia o promuovendo la formazione di trimetilammina-N-ossido (TMAO). Al contrario, altri ceppi del microbiota umano giocano un ruolo ateroprotettivo importante, principalmente legato al metabolismo di polifenoli provenienti dalla dieta. Da ciò si deduce come il microbiota intestinale sia stato identificato come un nuovo e possibile bersaglio per lo sviluppo di terapie contro le malattie cardiovascolari. In questa review sono descritti gli approcci tradizionali ed innovativi che, attraverso la modulazione del microbiota intestinale, possono essere adottati per la riduzione dei fattori di rischio associati all'aterosclerosi.

**Parole chiave:** *Microbiota intestinale, probiotici, trapianto fecale di microbiota.*

**Bibliografia**

- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, et al. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 21(29):8787-8803, 2015
- Huttenhower C, Gevers D, Knight R, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486(7402):207-214, 2012
- Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464(7285):59-65, 2010
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, et al. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(34):13780-13785, 2007
- Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* 500(7464):541-546, 2013
- Munyaka PM, Khafipour E, Ghia J-E. External influence of early childhood establishment of gut microbiota and subsequent health implications. *Front Pediatr* 2:109, 2014
- Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 486(7402):222-227, 2012
- Mariat D, Firmesse O, Levenez F, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 9:123, 2009
- Kashtanova DA, Popenko AS, Tkacheva ON, et al. Association between the gut microbiota and diet: Fetal life, early childhood, and further life. *Nutrition* 32(6):620-627, 2016.
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(33):14691-14696, 2010.
- Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, et al. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 156(Pt 11):3216-3223, 2010.
- Lu K, Mahbub R, Fox JG. Xenobiotics: Interaction with the Intestinal Microflora. *ILAR J* 56(2):218-227, 2015.
- Johansson ME V., Larsson JMH, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl :4659-4665, 2010
- Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 62(1):67-72, 2003
- Greer JB, Keefe SJ. Microbial induction of immunity, inflammation, and cancer. *Front Physiol* :1-8, 2011
- Cousin FJ, Jouan-Lanhouet S, Theret N, et al. The probiotic *Propionibacterium freudenreichii* as a new adjuvant for TRAIL-based therapy in colorectal cancer. *Oncotarget* 7(6):7161-7178, 2016
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(44):15718-15723, 2004.
- Joyce SA, Shanahan F, Hill C, et al. Bacterial bile salt hydrolase in host metabolism: Potential for influencing gastrointestinal microbe-host crosstalk. *Gut Microbes* 5(5):669-674, 2014
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, et al. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 18(14):1818-1892, 2013
- Velagapudi VR, Hezaveh R, Reigstad CS, et al. The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice. *J Lipid Res* 51(5):1101-1112, 2010

21. Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, et al. Irritable bowel syndrome: a microbiome-gut-brain axis disorder? *World J Gastroenterol* 20(39):14105-14125, 2014
22. Ferreira CM, Vieira AT, Vinolo MAR, et al. The central role of the gut microbiota in chronic inflammatory diseases. *J Immunol Res* 2014:689492, 2014
23. Karlsson F, Tremaroli V, Nielsen J, et al. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes* 62(10):3341-3349, 2013.
24. Pevsner-Fischer M, Tuganbaev T, Meijer M, et al. Role of the microbiome in non-gastrointestinal cancers. *World J Clin Oncol* 7(2):200-213, 2016
25. Moos WH, Faller DV, Harpp DN, et al. Microbiota and Neurological Disorders: A Gut Feeling. *Biores Open Access* 5(1):137-145, 2016
26. Sessa R, Pietro M Di, Filardo S, et al. Infectious burden and atherosclerosis: A clinical issue. *World J Clin cases* 2(7):240-249, 2014
27. Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun* 3:1245, 2012.
28. Koren O, Spor A, Felin J, et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 108(Supplement\_1):4592-4598, 2011
29. Drosos I, Tavridou A, Kolios G. New Aspects on the Metabolic role of Intestinal Microbiota in the Development of Atherosclerosis. *Metabolism* 64(4):476-481, 2015
30. Ufnal M, Zadlo A, Ostaszewski R. TMAO: A small molecule of great expectations. *Nutrition* 31(11-12):1317-1323, 2015
31. Mente A, Chalcraff K, Ak H, et al. The Relationship Between Trimethylamine-N-Oxide and Prevalent Cardiovascular Disease in a Multiethnic Population Living in Canada. *Can J Cardiol* 31(9):1189-1194, 2015
32. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 368(17):1575-1584, 2013.
33. Zeisel SH, daCosta K a, Youssef M, et al. Conversion of dietary choline to trimethylamine and dimethylamine in rats: dose-response relationship. *J Nutr* 119(5):800-804, 1989
34. Sheard NF, Zeisel SH. An in vitro study of choline uptake by intestine from neonatal and adult rats. *Pediatr Res* 20(8):768-772, 1986
35. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472(7341):57-63, 2011
36. Warrior M, Shih DM, Burrows AC, et al. The TMAO-Generating Enzyme Flavin Monooxygenase 3 Is a Central Regulator of Cholesterol Balance. *Cell Rep* January 2015
37. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* 19(5):576-585, 2013
38. Romano KA, Vivas EI, Amador-Nogues D, et al. Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide. *MBio* 6(2):e02481, 2015
39. Zanotti I, Dall'Asta M, Mena P, et al. Atheroprotective effects of (poly)phenols: a focus on cell cholesterol metabolism. *Food Funct* 6(1):13-31, 2015
40. Wang D, Xia M, Yan X, et al. Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing miRNA-10b. *Circ Res* 111(8):967-981, 2012
41. Graham C, Mullen A, Whelan K. Obesity and the gastrointestinal microbiota: a review of associations and mechanisms. *Nutr Rev* 73(6):376-385, 2015
42. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(3):979-984, 2007
43. Patrone V, Vajana E, Minuti A, et al. Postoperative Changes in Fecal Bacterial Communities and Fermentation Products in Obese Patients Undergoing Bilio-Intestinal Bypass. *Front Microbiol* 7:200, 2016
44. Young VB, Raffals LH, Huse SM, et al. Multiphasic analysis of the temporal development of the distal gut microbiota in patients following ileal pouch anal anastomosis. *Microbiome* 1(1):9, 2013
45. Chistiakov D a., Bobryshev Y V., Kozarov E, et al. Role of gut microbiota in the modulation of atherosclerosis-associated immune response. *Front Microbiol* 6:1-7, 2015
46. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FWJ, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*.5(2):e9085, 2010
47. Martinez I, Wallace G, Zhang C, et al. Diet-Induced Metabolic Improvements in a Hamster Model of Hypercholesterolemia Are Strongly Linked to Alterations of the Gut Microbiota. *Appl Environ Microbiol* 75(12):4175-4184, 2009
48. Ngoh LN. Health literacy: A barrier to pharmacist-patient communication and medication adherence. *J Am Pharm Assoc* 49(5):132-149, 2009
49. Food and Agriculture Organization (FAO). Probiotics in Food - Health and Nutritional Proper-

- ties and Guidelines for Evaluation. *FAO Food Nutr Pap* 85:1-71, 2001
50. Mackowiak PA. Recycling metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Front public Heal*.1:1-3, 2013
  51. Sharma M, Devi M. Probiotics: A Comprehensive Approach toward Health Foods. *Crit Rev Food Sci Nutr*54(4):537-552, 2014
  52. Frei R, Akdis M, O'Mahony L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system. *Curr Opin Gastroenterol* 31(2):153-158, 2015
  53. Songisepp E, Kullisaar T, Hutt P, et al. A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. *J Dairy Sci* 87(7):2017-2023, 2004
  54. Di Gioia D, Aloisio I, Mazzola G, et al. Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. *Appl Microbiol Biotechnol* 98(2):563-577, 2014
  55. Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother* 58(2):266-272, 2006
  56. Yeo S-K, Liong M-T. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by probiotics in soymilk supplemented with prebiotics. *Int J Food Sci Nutr* 61(2):161-181, 2010
  57. Pereira DI a, Gibson GR. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37(4):259-281, 2002
  58. Mann G V. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Maasai. *Am J Clin Nutr* 27(5):464-469, 1974
  59. Harrison VC, Peat G. Serum cholesterol and bowel flora in the newborn. *Am J Clin Nutr* 28(12):1351-1355, 1975
  60. de Roos NM, Schouten G, Katan MB. Yoghurt enriched with *Lactobacillus acidophilus* does not lower blood lipids in healthy men and women with normal to borderline high serum cholesterol levels. *Eur J Clin Nutr* 53(4):277-280, 1999
  61. Ooi L-G, Liong M-T. Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A Review of in Vivo and in Vitro Findings. *Int J Mol Sci* 11(6):2499-2522, 2010
  62. Guardamagna O, Amaretti A, Puddu PE, et al. Bifidobacteria supplementation: effects on plasma lipid profiles in dyslipidemic children. *Nutrition* 30(7-8):831-836, 2014
  63. Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 49(2):377-381, 1985
  64. Jones ML, Martoni CJ, Prakash S. Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 66(11):1234-1241, 2012
  65. Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(22):14422-14427, 2002
  66. Guo Z, Liu XMM, Zhang QXX, et al. Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: A meta-analysis of randomised controlled trials. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21(11):844-850, 2011
  67. Agerbaek M, Gerdes LU, Richelsen B. Hypocholesterolaemic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. *Eur J Clin Nutr* 49(5):346-352, 1995
  68. Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. Cholesterol Removal from Media by Lactococci. *J Dairy Sci* 85(12):3182-3188, 2015
  69. Bordoni A, Amaretti A, Leonardi A, et al. Cholesterol-lowering probiotics: In vitro selection and in vivo testing of bifidobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(18):8273-8281, 2013
  70. Piemontese A, Zanotti I, Turrone F, et al. Evidence for cholesterol-lowering activity by *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 through gut microbiota modulation. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(16):6813-6829, 2015
  71. Remagni MC, Paladino M, Locci F, et al. Cholesterol removal capability of lactic acid bacteria and related cell membrane fatty acid modifications. *Folia Microbiol* 58(6):443-449, 2013
  72. Chiang Y-R, Ismail W, Heintz D, et al. Study of Anoxic and Oxic Cholesterol Metabolism by *Sterolibacterium denitrificans*. *J Bacteriol* 190(3):905-914, 2008
  73. Noriega L, Cuevas I, Margolles A, et al. Deconjugation and bile salts hydrolase activity by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile. *Int Dairy J* 16(8):850-855, 2006
  74. Lye H-S, Rusul G, Liong M-T. Removal of cholesterol by lactobacilli via incorporation and conversion to coprostanol. *J Dairy Sci* 93(4):1383-1392, 2010
  75. Jones ML, Tomaro-Duchesneau C, Martoni CJ, et al. Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for heart health applications. *Expert Opin Biol Ther* 13(5):631-642, 2013
  76. Ooi L-G, Ahmad R, Yuen K-H, et al. *Lactobacillus gasseri* [corrected] CHO-220 and inulin reduced plasma total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol via alteration of lipid transporters. *J Dairy Sci* 93(11):5048-5058, 2010

77. Jones ML, Martoni CJ, Parent M, et al. Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. *Br J Nutr* 107(10):1505-1513, 2012
78. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, et al. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7(8):678-693, 2008
79. Usman, Hosono A. Effect of administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats. *J Dairy Sci* 83(8):1705-1711, 2000
80. Huang Y, Wang J, Cheng Y, et al. The hypocholesterolaemic effects of *Lactobacillus acidophilus* American type culture collection 4356 in rats are mediated by the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1. *Br J Nutr* 104(6):807-812, 2010
81. St-Onge MP, Farnworth ER, Jones PJ. Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. *Am J Clin Nutr* 71(3):674-681, 2000
82. Korecka A, de Wouters T, Cultrone A, et al. ANGPTL4 expression induced by butyrate and rosiglitazone in human intestinal epithelial cells utilizes independent pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304(11):G1025-G1037, 2013
83. Tonucci LB, Olbrich dos Santos KM, Licursi de Oliveira L, et al. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Nutr* S0261-5614(15)00331-32, 2015.
84. Fukushima M, Han K-H, Taneichi Y, et al. *Amylomyces rouxii* strain CBS 438.76 affects cholesterol metabolism in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 51(6):453-459, 2005
85. Morelli L. In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Curr Issues Intest Microbiol.* (2):59-67, 2000
86. (AFSSA) Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Effects of probiotics and prebiotics on flora and immunity in adults. *Agence Française Sécurité Sanitaire des Aliments.* (February):1-128, 2005
87. Naruszewicz M, Johansson M-L, Zapolska-Downar D, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *Am J Clin Nutr* 76(6):1249-1255, 2002
88. Lubbadah W, Haddadin MS, Al-Tamimi MA, et al. Effect on the cholesterol content of fresh lamb of supplementing the feed of Awassi ewes and lambs with *Lactobacillus acidophilus*. *Meat Sci* 52(4):381-385, 1999
89. Greany KA, Nettleton JA, Wangen KE, et al. Probiotic consumption does not enhance the cholesterol-lowering effect of soy in postmenopausal women. *J Nutr* 134(12):3277-3283, 2004
90. Caramia G. I probiotici : da Metchnikoff alle attuali possibilità preventive e terapeutiche. *Ped Med Chir* (26):19-33, 2004
91. Iravani S, Korbekandi H, Mirmohammadi SV. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *J Food Sci Technol* 52(8):4679-4696, 2015
92. Ventura M, Sozzi T, Turrone F, et al. The impact of bacteriophages on probiotic bacteria and gut microbiota diversity. *Genes Nutr* 6(3):205-207, 2011
93. Sozzi T. Method for preventing the inactivation, due to specific bacteriophages, of probiotic strain mixtures used in cattle-breeding. 2006.
94. Spinosa MR. The trouble in tracing opportunistic pathogens: cholangitis due to *Bacillus* in a French Hospital Caused by a Strain Related to an Italian Probiotic? *Microb Ecol Health Dis* 12:99-101, 2000
95. Saxelin M, Rautelin H, Salminen S, et al. Safety Of Commercial Products With Viable *Lactobacillus* Strains. *Infect Dis Clin Pract* 5(5), 1996
96. Food and Agriculture Organization (FAO). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. *FAO Food Nutr Pap.* 1:1-11, 2002
97. European Food Safety Authority (EFSA). QPS: Qualified Presumption of Safety of Micro-Organisms in Food and Feed.; 2005
98. Lewin RA. *Merde : excursions in scientific, cultural, and sociohistorical coprology.* Random House, 1999
99. Eiseman B, Silen W, Bascom GS, et al. Fecal enema as an adjunct in the treatment of pseudomembranous enterocolitis. *Surgery* 44(5):854-859, 1958
100. Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 53(10):994-1002, 2011
101. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med* 368(5):407-415, 2013
102. Hamilton MJ, Weingarden AR, Sadowsky MJ, et al. Standardized frozen preparation for transplantation of fecal microbiota for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol* 107(5):761-767, 2012
103. Smits LP, Bouter KEC, de Vos WM, et al. The therapeutic Potential of Fecal Microbiota Tran-

- splantation. *Gastroenterology* 145(5):946-953, 2013
104. Giovannini M, Agostoni C, Riva E, et al. A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term consumption of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis. *Pediatr Res.* 62(2):215-220, 2007
  105. Costa DJ, Marteau P, Amouyal M, et al. Efficacy and safety of the probiotic *Lactobacillus paracasei* LP-33 in allergic rhinitis: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial (GA2LEN Study). *Eur J Clin Nutr.* 68(5):602-607, 2014
  106. Marinkovic DM, Kostic-Vucicevic MM, Vukasinovic-Vesic MD, et al. *L. helveticus* Lafti(R) L10 supplementation modulates mucosal and humoral immunity in elite athletes: a randomized double-blinded placebo-controlled trial. *J strength Cond Res / Natl Strength Cond Assoc.* 2016
  107. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy - a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 101(11):1722-1726, 2009
  108. Michalickova D, Minic R, Dikic N, et al. *Lactobacillus helveticus* Lafti L10 supplementation reduces respiratory infection duration in a cohort of elite athletes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Appl Physiol Nutr Metab* 41(7):782-789, 2016
  109. Canani RB, Cirillo P, Terrin G, et al. Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. *BMJ* 335(7615):340, 2007
  110. Szymanski H, Chmielarczyk A, Strus M, et al. Colonisation of the gastrointestinal tract by probiotic *L. rhamnosus* strains in acute diarrhoea in children. *Dig Liver Dis* 38 Suppl 2:S274-S276, 2006
  111. Castagliuolo I, LaMont JT. Pathophysiology, diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection. *Keio J Med* 48(4):169-174, 1999
  112. Evans M, Salewski RP, Christman MC, et al. Effectiveness of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus rhamnosus* for the management of antibiotic-associated diarrhoea in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Br J Nutr* 116(1):94-103, 2016
  113. Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, et al. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* 335(7610):80, 2007
  114. Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy—a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr* 101(11):1722-1726, 2009
  115. Bengtsson J, Adlerberth I, Ostblom A, et al. Effect of probiotics (*Lactobacillus plantarum* 299 plus *Bifidobacterium* Cure21) in patients with poor ileal pouch function: a randomised controlled trial. *Scand J Gastroenterol.* 51(9):1087-1092, 2016
  116. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53(11):1617-1623, 2004
  117. Dinleyici EC, Kara A, Dalgic N, et al. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 reduces the duration of diarrhoea, length of emergency care and hospital stay in children with acute diarrhoea. *Benef Microbes* 6(4):415-421, 2015
  118. Allen SJ, Okoko B, Martinez E, et al. Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane database Syst Rev* (2):CD003048, 2004
  119. Madjd A, Taylor MA, Mousavi N, et al. Comparison of the effect of daily consumption of probiotic compared with low-fat conventional yogurt on weight loss in healthy obese women following an energy-restricted diet: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 103(2):323-329, 2016
  120. Fuentes MC, Lajo T, Carrion JM, et al. Cholesterol-lowering efficacy of *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529 in hypercholesterolaemic adults. *Br J Nutr* 109(10):1866-1872, 2013.