

Ricerca scientifica e nuove applicazioni dei probiotici

Report sul simposio internazionale
“The Gut, Immune modulation and Probiotics”
(Verona, 22-23 novembre 2007)

I continui avanzamenti della ricerca scientifica e l'aumentata sensibilità delle tecniche di indagine disponibili hanno permesso di compiere notevoli passi avanti nella comprensione della funzione della microflora intestinale e del ruolo della dieta nella sua modulazione (in termini di composizione e di attività). Nell'ambito dell'alimentazione, la ricerca dedica sempre più attenzione ai probiotici e al loro ruolo nel mantenimento di un ecosistema intestinale sano. Negli ultimi anni, infatti, l'applicazione dei probiotici in ambito alimentare e clinico ha rapidamente conquistato notevole interesse nella comunità scientifica, ma anche tra le persone che si rivolgono al medico di famiglia, al quale richiedono sempre più spesso consigli per correggere e migliorare le proprie abitudini alimentari.

Con questa premessa, lo scorso 22 novembre si è aperto il quarto simposio internazionale sui probiotici dal titolo “The Gut, Immune modulation and Probiotics”, organizzato da Yakult con il patrocinio dell'Università di Verona. I due giorni di congresso hanno richiamato più di 200 esperti e ricercatori provenienti da tutto il mondo, che si sono incontrati con l'obiettivo di fare un bilancio delle conoscenze acquisite finora sulle proprietà dei probiotici e per discutere di future applicazioni.

Durante il simposio gli interventi e le sessioni di discussione hanno cercato di chiarire il ruolo cruciale della microflora per la funzionalità intestinale e per la modulazione del sistema immunitario. Inoltre, i relatori intervenuti al simposio hanno riportato i risultati di alcune recenti ricerche che evidenziano le numerose azioni positive esercitate dai probiotici nell'intestino, grazie all'interazione con la microflora intestinale e con le cellule dell'intestino e all'interferenza con le sostanze che si formano durante la digestione. Particolare attenzione è stata dedicata alla modulazione del sistema immunitario e al possibile ruolo dei probiotici nell'interferire con i processi di formazione del cancro.

Funzionalità dell'intestino e microflora intestinale

Il dott. *Sander Gusssekloo* (Università di Utrecht, Olanda) ha confrontato la struttura dell'apparato digerente di diversi animali in base alle relazioni filogenetiche che tra loro intercorrono, le abitudini alimentari, l'ambiente in cui si sono adattati.

In tutti gli animali sono presenti, lungo l'apparato digerente, delle parti distinte responsabili di diverse funzioni fondamentali per l'organismo:

- ricezione del cibo;
- prima digestione;
- fine digestione e assorbimento dei nutrienti;
- assorbimento di acqua, concentrazione dei solidi e delle sostanze di scarto.

È certo che le basi genetiche di un organismo determinano la struttura morfologica del suo apparato digerente e la suddivisione nelle diverse parti/funzioni. Tuttavia, è evidente che nel corso del tempo la struttura e le dimensioni di questo organo hanno subito modificazioni e permesso agli animali di adattarsi ai diversi habitat. L'apparato digerente, e l'intestino in particolare, è un organo così esteso che il suo mantenimento richiede un'elevata quantità di energia. La sua superficie può cambiare anche considerevolmente nel mondo animale in risposta a numerosi fattori esterni quali la dieta (ricca o povera di fibre, a base di carne o completamente vegetariana) e all'ambiente dove l'animale vive (densità di competitori, scarsità di cibo, alimentazione discontinua).

Nell'uomo, come negli animali, la funzionalità dell'ambiente intestinale è fortemente influenzata dalla microflora intestinale che in esso risiede. La relazione del prof. *Kevin Collins* (Università di Cork, Irlanda) ha focalizzato l'attenzione proprio su questo aspetto anche in relazione ad alcune gravi patologie quali il cancro. Il tumore al colon rappresenta la seconda causa di morte nel mondo ed è più frequente nei paesi sviluppati. Questo dato rafforza la convinzione che sulla sua formazione incidano maggiormente i fattori ambientali rispetto a quelli genetici. A supporto di questa osservazione, lo scorso ottobre la *World Cancer Research Fund* (WCRF) ha confrontato i risultati ottenuti da 9 università in 5 anni di lavoro. Queste ricerche hanno permesso di individuare diversi fattori che sembrano incrementare il rischio di sviluppo di tumore in diversi organi; tra queste l'abuso di alcol, il frequente consumo di carne rossa e l'obesità.

È convinzione diffusa tra i ricercatori che mantenere un ambiente intestinale sano sia fondamentale per sfavorire la formazione del cancro al colon. È proprio nell'intestino che l'accumulo di sostanze mutageniche, genotossiche e citotossiche può contribuire, più che i fattori genetici, a favorire l'insorgenza di questa patologia. Questa osservazione conferma quanto sia importante migliorare l'ambiente intestinale anche attraverso l'alimentazione durante l'arco della vita e non solamente nel caso di disordini

specifici. Al momento, i maggiori ostacoli che il medico deve affrontare sono dovuti al fatto che queste patologie si sviluppano in tempi lunghi e i sintomi spesso si manifestano quando il tumore è già sviluppato. Pertanto si rende necessario trovare dei marcatori non invasivi e predittivi che permettano di monitorare la situazione nel colon prima che il tumore si formi o durante la sua fase iniziale.

La microflora intestinale svolge sicuramente un ruolo cruciale nella carcinogenesi. Esperimenti recenti hanno evidenziato che sostanze chimiche carcinogeniche causano meno tumori nei topi *germ-free* (sterili) rispetto quelli con una microflora intestinale normale. Inoltre, nelle persone anziane affette da cancro al colon

è stata osservata spesso la presenza di una microflora alterata, caratterizzata da meno bifidobatteri e una presenza più consistente di clostridi rispetto agli anziani sani.

Queste osservazioni sottolineano il ruolo protettivo che possono avere probiotici e prebiotici rispetto all'intestino, contribuendo a migliorare l'ambiente intestinale attraverso molteplici meccanismi: la riduzione del pH nel lume intestinale, l'influenza sulla risposta immunitaria dell'ospite, l'inattivazione di sostanze potenzialmente carcinogeniche, l'alterazione della microflora intestinale, la riduzione di alcune attività enzimatiche coinvolte nello sviluppo del tumore.

Questi aspetti dovranno essere sicuramente chiariti attraverso ulteriori ricerche cliniche, anche se esperimenti *in vitro* hanno

Il IV simposio internazionale organizzato da Yakult, in collaborazione con l'Università di Verona, si è posto l'obiettivo di focalizzare l'attenzione della comunità scientifica sulle conseguenze generate dalle alterazioni dell'ecosistema intestinale. Grazie al crescente numero di lavori clinici e sperimentali realizzati negli ultimi anni, è stato possibile inoltre il confronto e la riflessione sulle numerose condizioni cliniche di utilizzo dei probiotici. Nel simposio è stata data particolare enfasi ai possibili effetti benefici dei probiotici in relazione all'immunomodulazione a livello intestinale.

L'interesse verso i probiotici da parte delle aziende produttrici e della comunità scientifica deriva dal fatto che la microflora intestinale viene oggi universalmente riconosciuta come un vero e proprio organo, con funzioni e attività molto importanti per l'omeostasi e la salute del nostro organismo. A tutto questo si è giunti con l'introduzione dei metodi di studio molecolari che hanno permesso di comprendere meglio le interazioni tra microflora e ospite, sia in condizioni normali che in condizioni patologiche, e di valutare il possibile ruolo benefico sulla salute e l'impiego terapeutico di specifici ceppi batterici.

In articoli apparsi sui precedenti numeri di questa rivista, sono state riportate le caratteristiche necessarie affinché un batterio possa essere definito probiotico. In questa sede si vuole ribadire che le proprietà probiotiche sono ceppo-specifiche, cioè del singolo batterio, e non si possono quindi estendere ad altri componenti della stessa specie non ancora adeguatamente studiati. Diventa pertanto strategico per il clinico e il medico pratico conoscere questi principi in modo da poter valutare la relativa letteratura scientifica e poter orientare l'attività terapeutica.

Dal generico utilizzo dei "fermenti lattici" del passato siamo arrivati all'impiego dei probiotici, e il futuro si caratterizzerà per indicazioni sempre più specifiche per il singolo ceppo probiotico, sulla base degli studi clinici effettuati e le evidenze scientificamente dimostrate.

Dal simposio è emersa la necessità di realizzare ulteriori studi per provare l'utilità di specifici probiotici sia nel campo dell'immunomodulazione sia nella prevenzione di alcune forme di cancro del tratto gastrointestinale. Mentre è ampiamente dimostrato il ruolo protettivo dei probiotici nei confronti dell'immunomodulazione, risultano contrastanti e insufficienti gli studi clinici finora condotti sulla carcinogenesi, come sottolineato nell'articolo di Capurso et al. pubblicato su *Digestive and Liver Disease* (suppl. 2, dicembre 2006). Tale *review* evidenzia come numerosi studi *in vitro* e *in vivo* abbiano dimostrato una potenziale azione anticarcinogenica dei probiotici, mentre i pochi studi epidemiologici disponibili non hanno confermato queste iniziali osservazioni nei confronti del cancro colon-rettale. In realtà andrebbero valutati anche i fattori genetici e ambientali che nel lungo periodo possono aumentare il rischio di cancro colon-rettale. Un campo interessante di ricerca è quello dell'individuazione di marcatori facilmente rilevabili con metodi di analisi non invasivi che possano permettere il monitoraggio nel lungo termine del processo di formazione del cancro colon-rettale e la valutazione dell'influenza esercitata da fattori ambientali, terapie farmacologiche e abitudini alimentari.

Un altro campo di ricerca nel quale i probiotici (grazie alle loro proprietà immunostimolanti) sembrano avere promettenti possibilità di impiego è quello della prevenzione e della terapia di molte patologie croniche, in particolar modo quelle legate ad alterazioni del sistema immunitario dovute ad esempio al processo d'invecchiamento.

Se da un lato i probiotici sono oramai di provata efficacia nella pratica clinica, non dobbiamo dimenticare il beneficio che gli stessi possono apportare in termini preventivi anche nelle persone sane, grazie al loro utilizzo regolare a integrazione di una corretta alimentazione.

Enzo Ubaldi

Responsabile Area Gastroenterologica SIMG

già evidenziato come alcuni simbiotici (combinazione di probiotici e prebiotici) sembrano ridurre l'attività di proliferazione della mucosa anche se non influenzano la capacità dell'acqua fecale di indurre la formazione di tumori.

I probiotici e il sistema immunitario

L'intestino e la microflora intestinale sono strettamente correlati al sistema immunitario dell'organismo. Diversi fattori incidono sulle difese immunitarie dell'organismo come l'alimentazione, l'età, le terapie antibiotiche, ecc. Già da tempo si sa che il consumo regolare di alimenti o preparati probiotici può aiutare a mantenere un ambiente intestinale sano e supportare il sistema immunitario. I meccanismi coinvolti possono essere molteplici, mantenendo in equilibrio la microflora, modulando alcune attività enzimatiche (diminuendo la formazione di composti cancerogeni), stimolando alcune attività immunitarie, contrastando lo sviluppo di patogeni e mantenendo l'integrità della barriera intestinale. Tuttavia queste proprietà variano da ceppo a ceppo e dipendono dalla quantità di probiotico ingerita. Per questo è importante che ogni ceppo probiotico abbia a supporto delle valide ricerche scientifiche che attestino le sue proprietà probiotiche e la minima quantità efficace.

Durante il simposio, è stato affrontato da diversi punti di vista, il legame tra l'intestino e le difese immunitarie dell'organismo, nonché il potenziale utilizzo dei probiotici in diversi casi.

Il dott. *Dietmar Herndler-Brandstetter* (Austrian Academy of Science, Austria) ha descritto quali modificazioni subisce il sistema immunitario umano con l'aumentare dell'età, rendendo l'organismo più fragile (Fig. 1). È noto, infatti, che con l'avanzare dell'età aumentano le infezioni, diminuisce l'efficacia delle vaccinazioni e aumentano le malattie infiammatorie e croniche. Questo aspetto è di notevole interesse, visto che la popolazione mondiale sta invecchiando e si prevede che tra meno di 50 anni il 30% delle persone avrà più di 65 anni.

Con l'avanzare dell'età diminuiscono le capacità dei precursori (mieloidi e linfoidi) di differenziarsi e di reagire efficacemente a diversi antigeni esterni con cui vengono in contatto, diminuisce l'attività citotossica e la velocità di proliferazione di tali componenti. Il progressivo declino della funzione del timo contribuisce a diminuire il numero delle cellule *naive* in circolo; questo fenomeno si correla con l'incapacità degli anziani di rispondere efficacemente a nuovi antigeni. È stato osservato inoltre che, rispetto un individuo giovane, con l'età si riduce progressivamente la diversità dei linfociti in circolo rendendo l'organismo capace di rispondere a una ristretta gamma di antigeni. La maggiore frequenza di malattie croniche o infiammatorie può essere determinata dall'accumulo di effettori pro-infiammatori che si verifica nell'anziano. Per questo il consumo regolare di probiotici può contribuire, nelle persone anziane, a migliorare l'ambiente intestinale e a supportare le difese immunitarie che decrescono con l'età.

Il prof. *Jerry Wells* (Università di Wageningen, Olanda) ha sottolineato l'importanza di mantenere l'integrità dell'epitelio intestinale, spesso compromessa nei pazienti affetti da malattie infiammatorie. Infatti, modificazioni nella permeabilità del tessuto intestinale sono spesso evidenziate in concomitanza con la sindrome dell'intestino irritabile (IBS), coliti, diabete e cancro al colon. Recenti studi hanno evidenziato come citochine pro-infiammatorie (ad es. interferone gamma [IFN- γ]) possono causare modificazioni nella permeabilità dell'epitelio intestinale rendendo più facile la diffusione di batteri patogeni e l'insorgenza di infiammazioni.

In questo caso, i probiotici possono avere un ruolo protettivo nei confronti del tessuto intestinale, favorendo la riparazione della barriera epiteliale, ricostituendo la permeabilità normale e ostacolando l'invasione di agenti patogeni nei tessuti. Alcuni preliminari studi *in vitro*, condotti con tessuti modello, sembrano confermare questa proprietà protettiva per alcuni ceppi probiotici che al momento sono stati testati (*Lactobacillus plantarum* WCFS1 e *Escherichia coli* Nissle). Ulteriori studi saranno necessari per

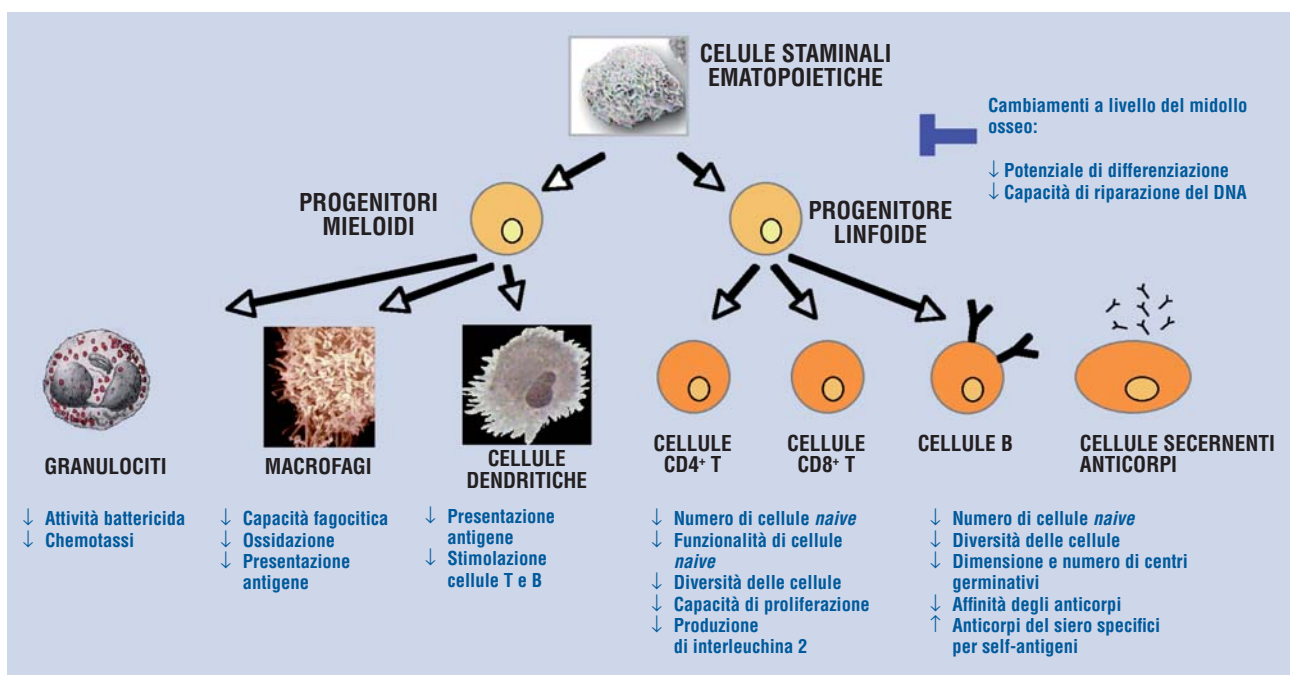


Figura 1
Cambiamenti del sistema immunitario dell'organismo umano con l'avanzare dell'età.

confermare queste prime osservazioni e per estendere l'indagine anche a ulteriori ceppi probiotici.

Il prof. *Carsten Waltz* (Università di Heidelberg, Germania) ha contribuito a spiegare come le cellule *Natural Killer* (NK) possono essere coinvolte nella formazione dei tumori. Le cellule NK sono componenti del sistema immunitario (fanno parte dell'immunità naturale) e sono coinvolte nel riconoscimento e nell'eliminazione di antigeni estranei (patogeni e cellule tumorali). Il riconoscimento degli antigeni dannosi, che devono essere eliminati, avviene grazie alla presenza di specifici recettori che si trovano sulla superficie delle cellule NK. Solo una volta avvenuto il riconoscimento tra le cellule NK e l'antigene, quest'ultimo può essere eliminato completamente. L'eliminazione dell'antigene dipende da due recettori di superficie (quello di attivazione e quello di inibizione). Il recettore di attivazione, riconosciuto l'antigene corrispondente sulla superficie del corpo estraneo, determina l'attivazione delle cellule NK, mentre il recettore di inibizione ne blocca al contrario l'attività citotossica.

Le cellule NK svolgono un ruolo di protezione dell'organismo anche nei confronti delle cellule tumorali. In questo ambito l'attività citotossica dipende da alcuni fattori quali l'espressione di recettori di attivazione e/o inibizione sulla superficie, l'accessibilità del tumore e le sue dimensioni, il numero e l'attività delle cellule NK nel sangue.

Per rendere più efficace l'azione di questi componenti del sistema immunitario si possono seguire due strade:

1. aumentare il numero delle cellule NK;
2. aumentare la loro attività citotossica.

Al momento sono disponibili delle evidenze *in vitro* che dimostrano come alcuni probiotici sembrano contribuire ad aumentare l'attività delle cellule NK attraverso la produzione di interleuchina (IL)-12. Tuttavia, non sono ancora chiariti i meccanismi cellulari che stanno alla base di questa proprietà. Pertanto, ulteriori studi saranno necessari per far luce su questi aspetti e per sottolineare le differenze tra diversi ceppi probiotici. Inoltre, sarà necessario dimostrare se anche nell'uomo l'aumento di attività delle cellule NK possa ostacolare la formazione di patologie gravi come il cancro.

Il dott. *Satoshi Matsumoto* (Yakult Central Institute for Microbiological Research, Giappone) ha presentato i risultati di alcune recenti ricerche condotte su topi modello per comprendere quale può essere il ruolo dei probiotici nell'ostacolare la formazione di cancro o di malattie infiammatorie nel colon. I risultati finora ottenuti sembrano dimostrare che i probiotici possono inibire alcuni componenti del sistema immunitario (*Nuclear Factor κB* [NFκB] e IL-6) coinvolti nei processi infiammatori e abbassare la produzione di IL-6 nell'intestino ad opera delle cellule LPS (*Stimulated Lamina Propria*).

Questi dati potrebbero aprire nuove prospettive nell'impiego dei

probiotici nel mantenimento di un ambiente intestinale sano e nell'inibizione dello sviluppo di anomalie/patologie (come ad esempio tumori e infiammazioni). Tuttavia, la formazione del cancro è un processo lungo in cui molti fattori possono essere coinvolti. Per questo è difficile condurre degli studi di lunga durata che valutino i processi che si innescano durante la formazione del tumore e i fattori che possono contribuire maggiormente ad ostacolarne lo sviluppo.

I probiotici e l'ambiente intestinale: focus sui processi che interferiscono sulla formazione del cancro

La prof.ssa *Kristin Verbeke* (Università Cattolica di Leuven, Belgio) è intervenuta al congresso riportando lo stato dell'arte del ruolo dei probiotici nella formazione di tumori al colon. Ci sono numerose evidenze in letteratura che dimostrano come i probiotici possano migliorare l'ambiente intestinale (Tab. I).

È importante ricordare che queste attività sono ceppo-specifiche. Ogni ceppo quindi agirà con più o meno efficacia sui diversi fattori. I probiotici possono ridurre attività enzimatiche batteriche (come β-glucuronidasi, β-glucosidasi, nitrato redattasi, nitroreduccasi, glutatone S-transferasi) coinvolte nella liberazione di sostanze tossiche o carcinogeniche nell'intestino. Inoltre, alcuni probiotici possono legare tossine o sostanze mutagene rendendole inattive o possono inibirne l'accumulo favorendo la riduzione del tempo di transito. Queste evidenze sottolineano il potenziale ruolo dei probiotici nel mantenere l'ambiente intestinale in salute attraverso molteplici meccanismi d'azione e influenzando diversi fattori (microflora, tessuto intestinale, sistema immunitario). Recenti esperimenti *in vitro*, *in vivo* su animali modello e studi clinici sull'uomo suggeriscono un effetto protettivo dei probiotici anche sulla cancerogenesi. In realtà, ci sono delle discrepanze tra gli studi epidemiologici che comparano la diffusione del consumo di probiotici con l'incidenza di tumori al colon. Perciò si renderà necessario individuare specifici ceppi probiotici con un potenziale antitumorale, sui quali concentrare gli studi clinici, per approfondire queste tematiche.

Il prof. *Seiji Naito* (Università di Kyusyu, Giappone) ha riportato il risultato di alcuni studi (*in vitro* e *in vivo* su animali e sull'uomo) che sottolineano il potenziale ruolo protettivo dei probiotici nella ricomparsa di cellule tumorali a seguito di rimozione chirurgica. In particolare, queste recenti ricerche si sono soffermate su una tipologia di cancro che non invade i tessuti.

Si ipotizza che l'effetto protettivo dei probiotici può essere determinato da diverse azioni:

1. inibizione di attività carcinogeniche;

TABELLA I
Principali benefici dei probiotici.

Fattori generalmente influenzati dai probiotici	
Composizione della microflora intestinale	↑ Lattobacilli, bifidobatteri ↓ Clostridi o altri patogeni
Attività metabolica intestinale	↓ Attività proteolitica intestinale ↓ Ammonio e p-cresolo nelle feci
Produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA)	↑ Butirrato che inibisce la proliferazione delle cellule tumorali e promuove l'apoptosi

2. soppressione di composti mutageni derivanti dal cibo;
3. attività immuno-stimolante (attività citotossica) che inibisce la proliferazione delle cellule tumorali.

Ulteriori studi sono fondamentali per comprendere meglio i risultati finora ottenuti con alcuni ceppi probiotici (come il ceppo *Lactobacillus casei* Shirota).

La difficoltà di approfondire questi aspetti consiste nel fatto che il tumore si sviluppa durante un lungo periodo e molti fattori, sia genetici sia ambientali, incidono sui processi di carcinogenesi. Come sottolineato dal prof. Ian Rowland (Università di Reading, Gran Bretagna) e dal prof. Paolo Boscolo (Università "G. D'Annunzio" di Chieti e Pescara, Italia) durante la loro relazione, è fondamentale trovare dei marcatori molecolari che permettano di monitorare il processo di formazione del cancro e di valutare quindi l'azione protettiva dell'alimentazione e dello stile di vita (attività fisica, fumo, alcol, stress).

Conclusioni

I progressi della ricerca scientifica hanno evidenziato come stili di vita inadeguati (alimentazione e abitudini scorrette) possano incidere sullo stato di salute delle persone sane. Le aziende alimentari possono svolgere un ruolo importante nel promuovere uno stile di vita corretto e fornire delle risposte adeguate per contribuire alla salute e al benessere delle persone, attraverso l'alimentazione. In particolare, i risultati presentati al simposio confermano le numerose potenzialità dei probiotici sia nella pratica clinica sia per le persone sane, in un'ottica di prevenzione.

In futuro diventerà fondamentale chiarire i seguenti aspetti:

1. come i probiotici interagiscono con le cellule dell'intestino;
2. come e attraverso quali meccanismi riescono a modulare il sistema immunitario;
3. come possono modificare l'ambiente intestinale;
4. come possono interferire con il processo di formazione dei tumori;
5. quali molecole possono essere utili come biomarcatori.

Il simposio ha infine sottolineato come distinti ceppi probiotici possiedono diverse capacità benefiche. Quindi, la prossima sfida dei ricercatori sarà comprendere quali siano i probiotici più adatti da impiegare nelle diverse condizioni patologiche e nella pratica di prevenzione.

Gli atti del simposio saranno pubblicati sulla rivista:
International Journal of Probiotics and Prebiotics.
 Potete richiederne una copia a Yakult Italia (www.yakult.it)
 E-mail: science@yakult.it – Tel. 02 831281

Fonte: Dipartimento Scientifico, Yakult Italia

Bibliografia di riferimento

- Burns AJ, Rowland IR. *Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells*. *Mutat Res* 2004;551:233-43.
- De Preter V, Vanhoutte T, Huys G, Swings J, De Vuyst L, Rutgeerts P, et al. *Effects of Lactobacillus casei Shirota, Bifidobacterium breve, and oligofructose-enriched inulin on colonic nitrogen-protein metabolism in healthy humans*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007;292:G358-68.
- Duncan SH, Belongue A, Holtrop G, Johnstone AM, Flint HJ, Lobley GE. *Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in faeces*. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:1073-8.
- Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*. *Ann Oncol* 2007;18:581-92.
- Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. *Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health*. *Environ Microbiol* 2007;9:1101-11.
- Fujihashi K, McGhee JR. *Mucosal immunity and tolerance in the elderly*. *Mech Ageing Dev* 2004;125:889-98.
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. *Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome*. *Science* 2006;312:1355-9.
- Goossens D, Jonkers D, Russel M, Stobberingh E, Van Den Bogaard A, Stockbrgger R. *The effect of Lactobacillus plantarum 299v on the bacterial composition and metabolic activity in faeces of healthy volunteers: a placebo-controlled study on the onset and duration of effects*. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:495-505.
- Johnson SA, Cambier JC. *Ageing, autoimmunity and arthritis: senescence of the B cell compartment - implications for humoral immunity*. *Arthritis Res Ther* 2004;6:131-9.
- Larsen CN, Nielsen S, Kaestel P, Brockmann E, Bennedsen M, Christensen HR, et al. *Dose-response study of probiotic bacteria Bifidobacterium animalis subsp lactis BB-12 and Lactobacillus paracasei subsp paracasei CRL-341 in healthy young adults*. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:1284-93.
- Louis P, Scott KP, Duncan SH, Flint HJ. *Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine*. *J Appl Microbiol* 2007;102:1197-208.
- O'Hara AM, Shanahan F. *The gut flora as a forgotten organ*. *EMBO Reports* 2007;7:688-93.
- Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, et al. *Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients*. *Am J Clin Nutr* 2007;85:488-96.
- Rochet V, Rigottier-Gois L, Sutren M, Kremetscki MN, Andrieux C, Furet JP, et al. *Effects of orally administered Lactobacillus casei DN-114 001 on the composition or activities of the dominant faecal microbiota in healthy humans*. *Br J Nutr* 2006;95:421-9.
- Schwaiger S, Wolf AM, Robatscher P, Jenewein B, Grubeck-Loebenstein B. *IL-4-producing CD8+ T cells with a CD62L++(bright) phenotype accumulate in a subgroup of older adults and are associated with the maintenance of intact humoral immunity in old age*. *J Immunol* 2003;170:613-9.
- Tuohy KM, Pinart-Gilberga M, Jones M, Hoyles L, McCartney AL, Gibson GR. *Survivability of a probiotic Lactobacillus casei in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora*. *J Appl Microbiol* 2007;102:1026-32.