

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Manuela ČITAR

**PROUČEVANJE *in vitro* PROBIOTIČNEGA
DELOVANJA IZOLATOV *Lactobacillus* Z VIDIKA
VZDRŽEVANJA ZAŠČITNE FUNKCIJE
ČREVESNE STENE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Manuela ČITAR

**PROUČEVANJE *in vitro* PROBIOTIČNEGA DELOVANJA
IZOLATOV *Lactobacillus* Z VIDIKA VZDRŽEVANJA ZAŠČITNE
FUNKCIJE ČREVESNE STENE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

***In vitro* STUDY OF PROBIOTIC ACTIVITY OF *Lactobacillus*
ISOLATES IN THE ASPECT OF MAINTAINING THE
PROTECTIVE ROLE OF THE INTESTINAL WALL**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani, po sklepu Senata Biotehniške fakultete, sklepa 31. seje komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 19. 9. 2012 ter 36. seje z dne 13. 2. 2013 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20. 1. 2009) in seje senata Biotehniške fakultete, z dne 25. 9. 2013 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje: znanosti o celici. Za mentorja je bila imenovana višja znan. sod. dr. Bojana Bogovič Matijašič.

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, kjer je bila izvedena izolacija novih bakterijskih sevov in njihova karakterizacija. Analize vpliva bakterijskih sevov na celične kulture THP-1 in Caco-2 so bile izvedene na Katedri za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, analize z metodo RT-qPCR pa na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani in na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Alojz IHAN
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora: 30. 1. 2015

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Manuela Čitar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dd
DK	UDK 579.864:579.67(043)
KG	črevesna sluznica/probiotiki/ <i>Lactobacillus</i> /občutljivost za antibiotike/preživetje/protimikrobna aktivnost/celice THP-1/imunomodulacija/tesni stiki/mikrofilamenti/TEER/celice Caco-2
AV	ČITAR, Manuela, univerzitetna diplomirana mikrobiologinja
SA	BOGOVIČ MATIJAŠIČ, Bojana (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, znanstveno področje: znanosti o celici
LI	2015
IN	PROUČEVANJE <i>in vitro</i> PROBIOTIČNEGA DELOVANJA IZOLATOV <i>Lactobacillus</i> Z VIDIKA VZDRŽEVANJA ZAŠČITNE FUNKCIJE ČREVESNE STENE
TD	Doktorska disertacija
OP	XV, 163 str., 15 pregl., 26 sl., 1 pril., 257 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Tesni stiki med sesalskimi epitelnimi celicami predstavljajo v črevesju, poleg sloja mukusa, prvo mehansko obrambo pred vdorom dražljajev iz črevesne svetline do vezivne plasti (lamina propria) in s tem do celic črevesnega limfatičnega tkiva. Zanimanje za stimulacijo boljše funkcionalnosti tesnih stikov med črevesnimi epitelnimi celicami je veliko, saj bi tak pristop lahko uporabili kot podporno zdravljenje pri terapiji bolnikov s KVČB (kronične vnetne črevesne bolezni). Namen dela je bila izolacija novih bakterijskih sevov iz rodu <i>Lactobacillus</i> iz črevesne sluznice otrok, ki bi bili primerni za probiotike, sposobne krepitve barierne funkcije črevesne sluznice. Iz 30-ih črevesnih bioptičnih vzorcev smo izolirali 19 izolatov z različnimi profili RAPD iz rodu <i>Lactobacillus</i> in 1 sev iz rodu <i>Bifidobacterium</i> . Od 20-ih sevov smo na podlagi njihove karakterizacije (izkoriščanje sladkorjev in občutljivost za antibiotike) izbrali 5 sevov za nadaljnje preskuse probiotičnih lastnosti v razmerah <i>in vitro</i> (preživetje, protimikrobna aktivnost, imunomodulacija in vpliv na barierno funkcijo črevesja). Izkazalo se je, da sta 2 seva, <i>L. rhamnosus</i> L344 in <i>L. paracasei</i> L350, sposobna preživeti prehod skozi zgornja prebavila, kolonizirati črevesje, delovati protimikrobno in pozitivno vplivati na imunski sistem gostitelja z modulacijo citokinov, za katere je bila dokazana vpletenost pri bolnikih s KVČB. Seva sta znižala izražanje genov za provnetna citokina IL-6 in IL-12 in hkrati zvišala izražanje gena za protivnetni citokin IL-10 ter vplivala na zvišanje vrednosti transepitelne električne upornosti (TEER), tako pri nepoškodovanih kot pri kemijsko poškodovanih celicah Caco-2. Seva L344 in L350 sta se pokazala za potencialno uporabna v preventivne in terapevtske namene, saj sta tako v primeru sočasne izpostavitve celic Caco-2 sevoma in forbol 12,13-dibutiratu (PDB), kakor tudi v primeru izpostavitve celic Caco-2 sevoma pred tretiranjem s PDB, zadržala padec vrednosti TEER za okrog 20 %. Oba seva vplivata na vrednosti TEER s prerazporeditvijo aktinskih filamentov, sev L344 pa tudi z zviševanjem prepisovanja gena za klavdin-1, ki ima poglobljeno vlogo pri funkciji epitelne bariere. Ugotovili smo še, da beljakovine S-sloja niso odgovorne za zvišanje vrednosti TEER pri stimulaciji celic Caco-2 v pogojih <i>in vitro</i> , saj teh beljakovin pri sevih L344 in L350 nismo odkrili.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Dd
DC UDC 579.864:579.67(043)
CX intestinal mucosa/probiotics/*Lactobacillus*/susceptibility to antibiotics/survival/anti-microbial activity/THP-1 cells/immunomodulation/tight junction/microfilament/TEER/Caco-2 cells
AU ČITAR, Manuela
AA BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, scientific field: cell science
PY 2015
TI *In vitro* STUDY OF PROBIOTIC ACTIVITY OF *Lactobacillus* ISOLATES IN THE ASPECT OF MAINTAINING THE PROTECTIVE ROLE OF THE INTESTINAL WALL
DT Doctoral Dissertation
NO XV, 163 p., 15 tab., 26 fig., 1 ann., 257 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Tight junctions between mammalian epithelial cells in the intestine represent, in addition to the mucosal layer, the first mechanical barrier against the intrusion of stimuli from the intestinal lumen into the layer of loose connective tissue (lamina propria) and thus to the cells of the gut-associated lymphoid tissue. In recent years, there has been an increasing interest for stimulation of tight junctions with higher tensile strength between intestinal epithelial cells in the treatment of patients with IBD (Inflammatory Bowel Disease), as such stimulation can provide an excellent supportive therapy. The aim of the research work was isolation of new bacterial strains of the genus *Lactobacillus* from the children's intestinal mucosa, which would meet the general requirements for the probiotic effectiveness, with the emphasis on their potential to strengthen the barrier function of the intestinal mucosa. Nineteen isolates of the genus *Lactobacillus* with different RAPD profile and 1 strain of the genus *Bifidobacterium* were isolated from 30 intestinal biopsies. Five out of 20 strains have been selected after initial characterization (exploitation of sugars and antibiotic sensitivity) for additional testing of probiotic properties *in vitro* (survival, antimicrobial activity, immunomodulation and effect on intestinal barrier function). Results have shown that 2 bacterial strains, namely *L. rhamnosus* L344 and *L. paracasei* L355, were capable to survive passage through the upper gastrointestinal tract, colonize the gut, exert antimicrobial activity and influence the host's immune system through modulation of specific cytokines, which have been demonstrated to be involved in patients with IBD. It has been established that both strains decrease gene expression of pro-inflammatory cytokines IL-6 and IL-12, and concurrently increase gene expression of anti-inflammatory cytokine IL-10. Both strains have shown a positive influence on the increase of the Trans Epithelial Electrical Resistance (TEER) values of intact as well as chemically damaged Caco-2 cells. L344 and L355 strains have also indicated their potential for preventive and therapeutic use, as they were able to reduce the decrease of TEER values for about 20% when Caco-2 cells were simultaneously exposed to phorbol 12,13-dibutyrate (PDB) and lactobacilli or when exposed to lactobacilli before PDB treatment. Furthermore, it was apparent that both strains affected TEER values with redistribution of actin filaments, wherein the strain L344 affected TEER values also by increasing transcription of the gene for claudin-1, which plays a major role in epithelial barrier function. In addition, it has been found that bacterial S-layer proteins were not responsible for the increase of TEER values during stimulation of Caco-2 cells *in vitro*, since these proteins were not detected in L344 and L350 strains.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 CELICE ČREVESNEGA EPITELIJA	4
2.2 CELIČNI STIKI	7
2.2.1 Tesni stiki	7
2.2.1.1 Transmembranske beljakovine	7
2.2.1.2 Citosolne beljakovine	11
2.2.1.2.1 Citosolne beljakovine z domeno PDZ	11
2.2.1.2.2 Citosolne beljakovine brez domene PDZ	13
2.2.2 Drugi celični stiki	14
2.3 KRONIČNE VNETNE ČREVESNE BOLEZNI (KVČB)	16
2.3.1 Vpliv citokinov na tesne stike	18
2.4 ČREVO KOT EKOSISTEM	21
2.4.1 Probiotiki	21
3 MATERIAL IN METODE	25
3.1 REAGENTI	25
3.1.1 Kompleti reagentov	27
3.2 LABORATORIJSKA OPREMA	28
3.3 BAKTERIJSKI SEVI IN CELIČNE KULTURE	29
3.3.1 Bakterijski sevi - pozitivne kontrole pri različnih poskusih	29
3.3.2 Patogeni in potencialno patogeni sevi	30
3.3.3 Celične kulture	33
3.3.3.1 Celična linija THP-1	33
3.3.3.2 Celična linija Caco-2	33
3.4 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA BLATA IN BIOPSIJSKIH VZORCEV HUMANE ČREVESNE SLUZNICE	34
3.4.1 Pridobitev vzorcev blata in biopsijskih vzorcev humane črevesne sluznice	34
3.4.2 Obdelava pridobljenih vzorcev	34

3.4.2.1	Mikrobiološke analize blata	34
3.4.2.2	Mikrobiološka analiza vzorcev črevesne sluznice	34
3.5	IZOLACIJA BAKTERIJSKIH SEVOV IZ HUMANE ČREVESNE SLUZNICE	36
3.5.1	Izolacija bakterij iz rodov <i>Lactobacillus</i> in <i>Bifidobacterium</i> iz človeške črevesne sluznice	36
3.5.1.1	Denuracijska tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (DHPLC)	36
3.6	IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH BAKTERIJ	37
3.6.1	Genotipizacija izolatov s pomočjo metode RAPD-PCR	37
3.6.2	Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja 16S rDNA	37
3.6.3	Za <i>L. rhamnosus</i> GG[®] - specifična PCR reakcija	38
3.7	KARAKTERIZACIJA SEVOV	39
3.7.1	Fenotipska karakterizacija: izkoriščanje virov ogljika	39
3.7.1.1	Biolog MicroLog TM system: AN MicroPlate TM	39
3.7.1.2	Sistem API 50 CH	39
3.7.2	Občutljivost za antibiotike	39
3.7.2.1	Fenotipsko ugotavljanje občutljivosti	39
3.7.2.2	Ugotavljanje prisotnosti genov, povezanih z rezistenco proti tetraciklinu, eritromicinu in vankomicinu	40
3.8	VREDNOTENJE PROBIOTIČNIH LASTNOSTI	41
3.8.1	Ugotavljanje sposobnosti preživetja sevov v simuliranih gastrointestinalnih razmerah	41
3.8.2	Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti z metodo lise na agarju (MLA)	41
3.8.3	Produkcija mlečne in očetne kisline	41
3.8.4	Imunomodulacija: proučevanje vpliva izbranih sevov na citokinski odziv celične linije THP-1	42
3.8.4.1	Gojenje celic THP-1	42
3.8.4.2	Priprava celic THP-1 za preskuse	42
3.8.4.3	Ugotavljanje vpliva bakterijskih sevov na imunski odziv celic THP-1	44
3.8.4.3.1	Ovrednotenje izražanja genov za citokine z metodo obratne transkripcije in verižnega pomnoževanja s polimerazo v realnem času (RT-qPCR)	44
3.8.4.3.2	Ovrednotenje citokinov z metodo encimskega imunskega testa (ELISA)	44
3.8.5	Proučevanje vpliva izbranih sevov na transepitelno električno upornost (TEER) celic Caco-2	45
3.8.5.1	Gojenje celic Caco-2	47

3.8.5.2	Priprava celic Caco-2 za preskuse	47
3.8.5.2.1	Ugotavljanje sposobnosti adhezije izbranih sevov na celice Caco-2 v razmerah <i>in vitro</i>	48
3.8.5.2.2	Merjenje transepitelne električne upornosti (TEER)	48
3.8.5.2.3	Ugotavljanje vpliva različnih koncentracij bakterij na TEER celic Caco-2	49
3.8.5.2.4	Ugotavljanje vpliva izbranih sevov na nepoškodovane celice Caco-2	50
3.8.5.2.5	Ugotavljanje vpliva izbranih sevov na (bio)kemijsko poškodovane celice Caco-2	51
3.8.5.2.6	Ugotavljanje izražanja genov za beljakovine tesnih stikov z metodo obratne transkripcije in verižnega pomnoževanja s polimerazo v realnem času (RT-qPCR)	52
3.8.5.2.7	Semikvantitativno ugotavljanje beljakovine klavdin-1 z metodo »western blot«	53
3.8.5.2.8	Analiza imunofluorescenčno označenih beljakovin tesnih stikov in aktinskih filamentov s konfokalnim mikroskopiranjem	54
3.8.5.2.9	Ugotavljanje vpliva bakterijske ovojnice in metabolitov na funkcionalnost tesnih stikov celic Caco-2	55
3.9	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI EKSTRACELULARNIH BELJAKOVIN PRI IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVIH (L344 in L350)	57
3.9.1	Izolacija beljakovin S-sloja	57
3.9.2	Izolacija na bakterijsko površino vezanih beljakovin	57
3.9.2.1	Izolacija z uporabo pufra CP	57
3.9.2.2	Izolacija z uporabo 5 M LiCl	58
3.10	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	58
4	REZULTATI	59
4.1	MIKROBIOLOŠKA ANALIZA BLATA IN BIOPSIJSKIH VZORCEV HUMANE ČREVESNE SLUZNICE	59
4.2	IZOLACIJA BAKTERIJ IZ RODU <i>Lactobacillus</i> IN <i>Bifidobacterium</i> IZ HUMANE ČREVESNE SLUZNICE IN NJIHOVA IDENTIFIKACIJA	61
4.3	KARAKTERIZACIJA IZBRANIH SEVOV	66
4.3.1	Fenotipska karakterizacija: izkoriščanje virov ogljika	66
4.3.2	Občutljivost za antibiotike	68
4.4	VREDNOTENJE PROBIOTIČNIH LASTNOSTI	71
4.4.1	Ugotavljanje sposobnosti preživetja sevov v simuliranih gastrointestinalnih razmerah	71
4.4.2	Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti z metodo lise na agarju (MLA) in produkcije mlečne in oetne kisline	72

4.4.3	Imunomodulacija: proučevanje vpliva izbranih sevov na citokinski odziv celične linije THP-1	74
4.4.3.1	Ovrednotenje izražanja genov za citokine z metodo RT-qPCR	74
4.4.3.2	Ovrednotenje produkcije citokinov z metodo encimskega imunskega testa (ELISA)	78
4.5	UGOTAVLJANJE LASTNOSTI IZBRANIH SEVOV, POMEMBNIH Z VIDIKA ZAŠČITNE FUNKCIJE ČREVESNE STENE, V RAZMERAH <i>in vitro</i>	80
4.5.1	Ugotavljanje vpliva različnih koncentracij bakterij na transepitelno električno upornost (TEER) enosloja celic Caco-2	80
4.5.2	Ugotavljanje vpliva sevov <i>L. rhamnosus</i> L344 in <i>L. paracasei</i> L350 na izražanje beljakovin, gradnikov tesnih stikov celic Caco-2	83
4.5.3	Ugotavljanje vpliva izbranih sevov <i>L. rhamnosus</i> L344 in <i>L. paracasei</i> L350 na poškodovane tesne stike celic Caco-2	89
4.5.3.1	Porušenje tesnih stikov med celicami Caco-2 z interleukinom-1 beta (IL-1 β)	88
4.5.3.2	Ugotavljanje vpliva izbranih sevov <i>L. rhamnosus</i> L344 in <i>L. paracasei</i> L350 na celice Caco-2 s porušenimi medceličnimi stiki	89
4.5.4	Ugotavljanje vpliva izbranih sevov <i>L. rhamnosus</i> L344 in <i>L. paracasei</i> L350 na beljakovine tesnih stikov celic Caco-2 pri istočasnem delovanju bakterijskih sevov in PDB	94
4.5.5	Ugotavljanje sposobnosti adhezije seva <i>L. rhamnosus</i> (L344) in seva <i>L. paracasei</i> (L350) na celicah Caco-2 v razmerah <i>in vitro</i>	98
4.6	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI BELJAKOVIN S-SLOJA Z DENATURACIJSKO POLIAKRILAMIDNO GELSKO ELEKTROFOREZO (SDS-PAGE)	100
4.7	UGOTAVLJANJE VPLIVA SESTAVIN CELIC LAKTOBACILOV IN METABOLITOV NA FUNKCIONALNOST TESNIH STIKOV CELIC Caco-2	102
5	RAZPRAVA	105
5.1	IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ IZ RODU <i>Lactobacillus</i> IN <i>Bifidobacterium</i> IZ HUMANE ČREVESNE SLUZNICE	105
5.2	KARAKTERIZACIJA IZBRANIH SEVOV	111
5.2.1	Fenotipska karakterizacija: izkoriščanje virov ogljika	111
5.2.2	Občutljivost za antibiotike	112
5.3	VREDNOTENJE PROBIOTIČNIH LASTNOSTI	116
5.3.1	Ugotavljanje sposobnosti preživetja sevov v simuliranih gastrointestinalnih razmerah	116

5.3.2	Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti z metodo lise na agarju (MLA) in produkcija očetne in mlečne kisline	117
5.3.3	Imunomodulacija: proučevanje vpliva izbranih sevov na citokinski odziv celične linije THP-1	118
5.3.4	Ugotavljanje lastnosti izbranih sevov, pomembnih z vidika zaščitne funkcije črevesne stene, v razmerah <i>in vitro</i>	121
5.3.4.1	Ugotavljanje vpliva različnih koncentracij bakterij na transepitelno električno upornost (TEER) enosloja celic Caco-2	123
5.3.4.2	Ugotavljanje vpliva izbranih sevov <i>L. rhamnosus</i> L344 in <i>L. paracasei</i> L350 na izražanje beljakovin, gradnikov tesnih stikov pri nepoškodovanih celicah Caco-2	125
5.3.4.3	Ugotavljanje vpliva izbranih sevov <i>L. rhamnosus</i> L344 in <i>L. paracasei</i> L350 na izražanje beljakovin, gradnikov tesnih stikov pri (bio)kemijsko poškodovanih celicah Caco-2	127
5.3.4.4	Ugotavljanje sposobnosti adhezije <i>L. rhamnosus</i> L344 in <i>L. paracasei</i> L350 na celice Caco-2	130
5.4	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI EKSTRACELULARNIH BELJAKOVIN PRI IZBRANIH SEVIH <i>L. rhamnosus</i> L344 IN <i>L. paracasei</i> L350	132
5.4.1	Ugotavljanje vpliva celičnih sestavin <i>L. rhamnosus</i> L344 in <i>L. paracasei</i> L350 in njihovih metabolitov na funkcionalnost tesnih stikov celic Caco-2	133
6	SKLEPI	135
7	POVZETEK (SUMMARY)	137
7.1	POVZETEK	137
7.2	SUMMARY	140
8	VIRI	143

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1:	Seznam sevov uporabljenih v študiji in pogoji njihovega gojenja	32
Pregl. 2:	Seznam uporabljenih gojišč za mikrobiološke analize blata in biopsijskih vzorcev	35
Pregl. 3:	Pregled uporabljenih začetnih oligonukleotidov v metodi RAPD-PCR s pripadajočimi programi	37
Pregl. 4:	Seznam uporabljenih kompletov reagentov za analize z metodama RT-qPCR in ELISA	45
Pregl. 5:	Seznam bakterijskih sevov in njihovih koncentracij (KE/mL) uporabljenih pri ugotavljanju vpliva bakterijskih sevov na TEER celic Caco-2	49
Pregl. 6:	Seznam uporabljenih kompletov pri metodi RT-qPCR	53
Pregl. 7:	Seznam uporabljenih protiteles pri metodi »western blot«	54
Pregl. 8:	Seznam uporabljenih protiteles pri mikroskopiranju s konfokalnim mikroskopom	55
Pregl. 9:	Koncentracije antibiotikov, uporabljene za inaktivacijo bakterijskih sevov	56
Pregl. 10:	Število kolonijskih enot bakterij izraslih na selektivnih gojiščih, na katera smo nacepili vzorce blata, ileuma ali kolona	59
Pregl. 11:	Izvor identificiranih sevov iz humane črevesne sluznice	64
Pregl. 12:	Identifikacija sevov na podlagi različnih metod uporabljenih v študiji	67
Pregl. 13:	Odpornost sevov humane črevesne sluznice proti izbranim antibiotikom, določena z uporabo metode E-test (MIK (μg/mL))	69
Pregl. 14:	Protimikrobna aktivnost in proizvodnja organskih kislin s strani testiranih sevov iz humane črevesne sluznice	73
Pregl. 15:	Preživetje <i>L. rhamnosus</i> L344 in <i>L. paracasei</i> L350 po 22 h izpostavitve kombinaciji dveh antibiotikov (streptomicina in gentamicina)	102

KAZALO SLIK

Sl. 1:	Shematski prikaz poteka poskusov s celično linijo THP-1	43
Sl. 2:	Shematski prikaz poteka poskusov s celično linijo Caco-2	46
Sl. 3:	Število laktobacilov in bifidobakterij v biopsijskih vzorcih ileuma (A) in kolona (B)	60
Sl. 4:	Primer mešanih kultur na kromogenem gojišču URISelect	61
Sl. 5:	Primeri DHPLC kromatogramov mešanih in čistih bakterijskih kultur	62
Sl. 6:	Primer rezultatov analize RAPD-PCR z uporabo začetnega oligonukleotida 1254	63
Sl. 7:	Rezultati RAPD-PCR z uporabo začetnih oligonukleotidov 1254 (A) in KGT80 (B) in PCR z uporabo za sev LGG [®] specifičnih začetnih oligonukleotidov (C) za tri seve <i>L. rhamnosus</i> iz črevesne sluznice ter za sev LGG [®]	65
Sl. 8:	Preživetje testiranih sevov v simuliranem želodčnem in črevesnem soku	71
Sl. 9:	Izražanje genov <i>IL10</i> (A), <i>IL6</i> (B), <i>IL12B</i> (C), <i>IL1B</i> (D), <i>IL1RN</i> (E), <i>IL8</i> (F) in <i>TNFA</i> (G) v celicah THP-1, tretiranih z izbranimi sevi (DN-114 001 – <i>L. casei</i> ; IM386 – <i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> ; L350 – <i>L. paracasei</i> ; L930 bb – <i>L. fermentum</i>), z LPS in s kombinacijo bakterijskih sevov in LPS	74
Sl. 10:	Produkcija citokinov IL-6, IL-10, IL-1 β , IL-8 in TNF- α v celicah THP-1, tretiranih z izbranim sevom <i>L. rhamnosus</i> L344, z LPS ali s kombinacijo L344 in LPS	78
Sl. 11:	Vpliv različne koncentracije bakterij na transepitelno električno upornost (TEER) enosloja celic Caco-2	80
Sl. 12:	Vrednosti TEER celic Caco-2 po stimulaciji s sevom L344 (A) in s sevom L350 (B)	84
Sl. 13:	Imunofluorescenčno barvanje proteinov F-aktin (roza), ZO-1 (zeleno) in okcludin (rumeno) v celicah Caco-2	85
Sl. 14:	Izražanje genov za beljakovine tesnih stikov: okcludin (<i>OCLN</i>), klavdin-1 (<i>CLDNI</i>) in ZO-1 (<i>TJPI</i>)	86
Sl. 15:	Prikaz lis beljakovine klavdin-1 na membrani PVDF	87
Sl. 16:	Vpliv IL-1 β na vrednosti TEER celic Caco-2	88
Sl. 17:	Vpliv sevov L344 in L350 na vrednosti TEER pred tretiranjem celic Caco-2 s PDB – preventivno delovanje bakterij	90
Sl. 18:	Vpliv sevov L344 in L350 na vrednosti TEER celic Caco-2 ob sočasnem dodatku PDB – sočasno delovanje bakterij	92

Sl. 19:	Vpliv sevov L344 in L350 na vrednosti TEER celic Caco-2 po tretiranju s PDB – kurativno delovanje bakterij	93
Sl. 20:	Imunofluorescenčno barvanje beljakovin F-aktin (roza), okludin (rumeno) in ZO-1 (zeleno) v vzorcih celic Caco-2	94
Sl. 21:	Izražanje genov za beljakovine tesnih stikov: okludin (<i>OCLN</i>), klavdin-1 (<i>CLDN1</i>) in ZO-1 (<i>TJPI</i>)	96
Sl. 22:	Prikaz lis beljakovine klavdin-1 na membrani PVDF	97
Sl. 23:	Adhezija (%) sevov LGG [®] , <i>L. rhamnosus</i> (L344) in <i>L. paracasei</i> (L350) na celično linijo Caco-2	98
Sl. 24:	Analiza beljakovin S-sloja z metodo SDS-PAGE	100
Sl. 25:	Analiza površinskih beljakovin z metodo SDS-PAGE	101
Sl. 26:	Vpliv živih ali inaktiviranih sevov <i>L. rhamnosus</i> L344 in <i>L. paracasei</i> L350 ter supernatantov brez celic na transepitelno električno upornost (TEER) celic Caco-2 v razmerah <i>in vitro</i>	103

KAZALO PRILOG

- Pril. A: Fermentacijski profili izkoriščanja sladkorjev za seve iz humane črevesne sluznice, pridobljeni s sistemom API CH 50

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATCC	Ameriška zbirka tipskih kultur (<i>angl.</i> American Type Culture Collection)
BHI	<i>angl.</i> brain heart infusion
BSA	goveji serumski albumin (<i>angl.</i> Bovine Serum Albumin)
Caco-2	kultura epitelnih celic črevesja
KE (CFU)	kolonijska enota (<i>angl.</i> colony forming unit)
DMEM	Eaglov medij modificiran po Dulbeccu (<i>angl.</i> Dulbecco's modified Eagle's medium)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DSMZ	Nemška zbirka mikroorganizmov in celičnih kultur (<i>nem.</i> Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH)
DHPLC	visokotlačna kromatografija v denaturizirajočih pogojih (<i>angl.</i> Denaturing High Pressure Liquid Chromatography)
EFSA	Evropska komisija za varnost hrane (<i>angl.</i> European Food Safety Authority)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ELISA	encimsko imunski test (<i>angl.</i> Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
FBS	serum govejega zarodka (<i>angl.</i> fetal bovine serum)
GALT	črevesno limfatično tkivo (<i>angl.</i> gut-associated lymphoid tissue)
KVČB	kronične vnetne črevesne bolezni (<i>angl.</i> IBD – inflammatory bowel disease)
IL	interlevkin
IL1RN	gen za antagonista receptorja IL-1 (<i>angl.</i> interleukin-1 receptor antagonist)
MRS	gojišče za laktobacile (De Man Rogosa Sharp medium)
MKB	mlečno-kislinske bakterije
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija (<i>angl.</i> minimal inhibitory concentration)
NaDS	natrijev dodecil (lauril) sulfat
SDS-PAGE	denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza

NCDO	Nacionalna zbirka mlekarskih mikroorganizmov, Reading, Anglija (<i>angl.</i> National Collection of dairy organisms, Reading, England)
PDB	forbol 12,13-dibutirat (<i>angl.</i> phorbol 12,13-dibutyrate)
PVDF	poliviniliden fluorid
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RAPD	polimorfizem naključno pomnoženih fragmentov (<i>angl.</i> Random Amplification of Polymorphic DNA)
PMA	forbol 12-miristat 13-acetat (<i>angl.</i> phorbol 12-myristate 13-acetate)
PBS	fosfatni pufer z NaCl (<i>angl.</i> phosphate buffered saline)
rRNA	ribosomska RNA
RPMI	RPMI gojišče za celice THP-1 (<i>angl.</i> Roswell Park Memorial Institute growth medium for THP-1 cell line)
TEER	transepitelna električna upornost (<i>angl.</i> transepithelial electrical resistance)
TNF- α	dejavnik tumorske nekroze (<i>angl.</i> tumor necrosis factor)
THP-1	monocitna celična linija
TEMED	N' N' N' N'-tetrametiletildiamin

1 UVOD

Številne raziskave so pokazale, da so komenzalne bakterije, ki naseljujejo naša prebavila, v nenehnih interakcijah z gostiteljevimi celicami in da imajo pomembno vlogo pri ohranjanju zdravja prebavil. Nekatero bakterijske vrste pripomorejo k vzdrževanju ravnotežja lokalnega imunskega sistema, tako da inducirajo in vzdržujejo toleranco za komenzalno mikrobioto pri zdravem gostitelju in inhibirajo nepravilen odziv, induciran s strani komenzalov pri bolnem gostitelju.

Z besedo probiotik označujemo tiste žive mikroorganizme, ki zaužiti v zadostni količini pozitivno vplivajo na prebavni trakt in zdravje gostitelja (FAO/WHO, 2002). Najbolj razširjeni in raziskani probiotiki so sevi bakterij iz rodu *Lactobacillus*. Razen v probiotičnih živilih se probiotiki vse bolj uporabljajo tudi v različnih prehranskih dopolnilih, katerih namen je najpogosteje krepitev splošnega dobrega počutja, lajšanje črevesnih težav pri akutnih driskah, pri potovalnih driskah ali driskah sproženih po zdravljenju z antibiotiki. Pomembno je dejstvo, da je bila večina do sedaj izvedenih raziskav interakcij med probiotiki in obrambnim sistemom gostitelja opravljena z izolati laktobacilov iz človeškega blata, iz fermentiranih živil ali rastlinskega materiala, ne pa z izolati, ki dejansko poseljujejo črevesno sluznico človeka, torej s tistimi, ki so dobro prilagojeni na okolje prebavil in so v neposrednem stiku z epitelnimi celicami in s celicami črevesnega limfatičnega tkiva (*angl.* GALT – gut-associated lymphoid tissue). V zadnjih letih so znanstveniki dokazali, da so izbrani probiotični sevi sposobni tudi imunomodulacije. Vse več je dokazov, da blagodejno vplivajo na človeško zdravje, tako da krepijo pregradno funkcijo črevesne sluznice in izboljšajo naravno obrambo gostitelja.

Evropska agencija za varnost hrane (EFSA) je konec leta 2011 objavila rezultate presoje zdravstvenih trditev za živila in prehranska dopolnila, med njimi tudi tistih o učinkih probiotikov. Številne do takrat razširjene trditve, kot so na primer »izboljšujejo sestavo črevesne mikrobiote«, »pozitivno učinkujejo na imunski sistem« in »imajo ugoden učinek na prebavo«, je označila kot ne dovolj znanstveno utemeljene. Do danes nobena od predlaganih zdravstvenih trditev za probiotike ni prestala presoje organov EFSA, kar

kaže na potrebo po tem, da mehanizme, s katerimi probiotiki vplivajo na gostitelja, temeljiteje raziščemo in pojasnimo. V zadnjih letih se je povečalo predvsem zanimanje za razumevanje delovanja probiotikov na imunski sistem, kar lahko pripišemo tudi naraščajoči pojavnosti različnih kroničnih vnetnih črevesnih bolezni (KVČB). Veliko je že znanega o vplivu posameznih strukturnih molekul celičnega ovoja probiotičnih bakterij, predvsem laktobacilov, na imunski odziv in posredno na homeostazo v črevesu. Manj pa je raziskano katere strukturne molekule vplivajo na tesne stike med črevesnimi epitelnimi celicami in na kakšen način. Ugotovljeno je bilo tudi, da provnetni citokini, ki jih izločajo gostiteljeve celice, delujejo neposredno na tesne stike med celicami črevesne sluznice. Koristne bakterije bi lahko tako uporabljali kot podporo pri konvencionalnemu zdravljenju bolnikov s KVČB. V ta namen bi potrebovali mikroorganizme, ki so sposobni znižati lokalno raven provnetnih citokinov, zvišati raven protivnetnih citokinov in povečati funkcionalnost stikov med epitelnimi črevesnimi celicami.

S tem doktorskim delom smo želeli prispevati več informacij o značilnostih bakterijskih izolatov iz humane črevesne sluznice. Poleg tega je namen dela tudi izboljšati razumevanje načina delovanja probiotičnih sevov z vidika krepitev pregradne funkcije črevesja, zato smo raziskali možnosti modulacije tesnih stikov z namenom okrepitve črevesne mehanske pregrade proti črevesnim vnetnim antigenom. Rezultati bodo tako prispevali k pojasnjevanju mehanizmov delovanja laktobacilov kot pomembnih predstavnikov naravne črevesne mikrobiote na obrambno sposobnost gostitelja.

Nenazadnje pa so novi izolati iz črevesne sluznice zanimivi kandidati za novo generacijo probiotikov, uporabnih kot podpora pri zdravljenju kroničnih vnetnih črevesnih bolezni, pri katerih sta vpletena tako imunski sistem gostitelja, kakor tudi oslABLJENA pregradna funkcija črevesne sluznice.

1.1 HIPOTEZE

V doktorski disertaciji smo preverjali naslednje hipoteze:

- Izolati laktobacilov, ki so sposobni spodbuditi protivnetni odziv ob stiku z makrofagi celične linije THP-1, tudi povečajo funkcionalnost tesnih stikov črevesnih epitelnih celic v razmerah *in vitro*.

- Na funkcionalnost tesnih stikov vpliva sestava celičnega ovoja bakterij.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CELICE ČREVESNEGA EPITELIJA

Črevo je del prebavnega sistema, ki je odgovoren za absorpcijo hranilnih snovi in vode. Črevesni epitelij je visoko organizirana in sofisticirana struktura, ki jo v večji meri sestavlja enosloj celic, imenovanih enterociti. Primarna funkcija epitelnega enosloja je absorpcija hranil. Dejstvo je, da so celice črevesnega epitelija tekom absorpcije hranil izpostavljene številnim antigenskim molekulam, ki so sestavni del v telo vnesenih hranil ali endogenih in vnesenih mikroorganizmov. V ta namen mora biti enosloj enterocitov organiziran kot selektivno-prepustna pregrada, ki ščiti spodnji sloj tkiva oz. notranjost organizma pred zunanjim svetom oz. predstavlja obrambo pred mikrobioto črevesne svetline in njihovimi toksini ter hkrati omogoča absorpcijo hranilnih snovi, elektrolitov in vode (O'Hara in Shanahan, 2006; Snoeck in sod., 2005).

Celice epitelija kažejo izjemno polarizacijo plazemskih membran, ki se kaže kot razlika v strukturi, v sestavi in v funkciji površinskih domen. Pri vzdrževanju celične polarnosti imajo poglavitno vlogo celični stiki, ki omogočajo ločitev med apikalnim in bazalno-lateralnim delom celične membrane. Celične stike sestavljajo transmembranske in citosolne beljakovine, preko katerih se celični stiki pripenjajo na različne strukture citoskeleta kot so aktinski filamenti, intermediarni filamenti in mikrotubuli. Znano je, da med vnetjem aktinski filamenti vodijo v reorganizacijo apikalnih celičnih stikov, kar lahko privede do motenega delovanja epitelne pregrade (Ivanov in sod., 2010). Stiki med celicami so naključno razporejeni in jih razlikujemo po sestavi njihovih gradnikov ter po ultrastrukturnih razlikah, ki so vidne s pomočjo elektronske mikroskopije. Vsi celični stiki so sestavljeni iz transmembranskih beljakovin, ki se lahko vežejo na dva načina (homo- in heterotipičen način vezave): z ekstracelularno domeno druge ekstracelularne domene celičnih stikov sosednje celice ali posredno na celični citoskelet preko citosolnega beljakovinskega posrednika (Giepmans in van Ijzendoorn, 2009).

Gastrointestinalni epitelij je sestavljen iz štirje funkcionalno različnih tipov celic: absorpcijske celice oz. enterociti, katerih apikalna membrana je opremljena z mikrovili in predstavljajo več kot 80 % vseh epitelnih celic tankega črevesja; čašaste celice, ki

izločajo mukus in snovi, potrebne za rast in obnovo epitelija; enteroendokrine celice ter Panethove celice, ki izločajo različne bakteriocidne beljakovine. Pomembne celice črevesnega epitelija so tudi celice M (*angl.* microfold cells). Celice M, ki so specializirane v prenašanju antigenov, imajo na apikalni strani mnogo manj in krajše mikrovile ter izločajo manjše količine prebavnih encimov kot absorpcijske celice.

Mukus fizično loči črevesno svetlino od črevesnega epitelija in predstavlja prvo zaščitno plast obrambe pred mikroorganizmi črevesne svetline. Tako mukozni sloj kot luminalna površinska struktura enterocitov omejitata prehod makromolekul in drugih antigenov skozi nepoškodovan epitelij in predstavljata prvo mehansko pregrado, ki ščiti notranjost gostitelja pred vdorom nevarnih snovi. Transport makromolekul skozi epitelni enosloj lahko poteka po dveh poteh, in sicer po transcelularni ali paracelularni poti. Transcelularna pot je aktivni transport molekul, kot so aminokisliline, elektroliti, kratkoverižne maščobne kisline in sladkorji skozi citosol enterocitov s t.i. receptorsko posredovano endocitozo. Paracelularna pot predstavlja transport molekul skozi medcelični prostor vzdolž lateralnih membran dveh sosednjih celic (Snoeck in sod., 2005).

Stik med sosednjimi epitelnimi celicami gradijo štirje, po strukturi različni, kompleksi: tesni stiki, adherentni stiki, dezmosomi in presledkovni stiki. Za dezmosome in adherentne stike velja, da so zelo pomembni pri mehanskemu pripenjanju sosednjih celic, medtem ko so tesni stiki, ki se nahajajo najbolj apikalno, odgovorni za tesnitev lateralnega medceličnega prostora, s čimer so odgovorni za regulacijo selektivnega paracelularnega transporta. Omrežje transmembranskih beljakovin, ki gradijo tesne stike, mehansko onemogoča velikim molekulam prost prehod med sosednjimi celicami. Tesni stiki so dinamična struktura, na katero lahko negativno vplivajo različni dejavniki v črevesni svetlini, ki povzročajo njihovo destabilizacijo in posledično povečano prepustnost. Poleg tega so tako adherentni kot tesni stiki odgovorni tudi za regulacijo celične proliferacije, polarizacije in diferenciacije. Pri presledkovnih stikih ne gre za povezavo v mehanskem smislu, ampak za komunikacijo med celicami.

Enterociti so, razen tega da sodelujejo v procesu prebavljanja in predstavljajo mehansko pregrado, pomembni tudi zaradi svoje neposredne vpletenosti v imunski odziv gostitelja. Na svoji površini izražajo poglavitni histokompatibilni kompleks razredov I in II, s pomočjo katerih predelajo in predstavijo antigene celicam T (imenovane tudi intraepitelijski limfociti). Vnetno stanje lahko ogrozi lastnosti epitelne pregrade in s tem imunski odziv na antigene iz črevesne svetline. Enterociti privzamejo in procesirajo luminalne antigene po endocitozni poti, ki v večini primerov poteka tako, da encimi v lizosomih razgradijo antigene, redkeje pa pride do vezikularnega transporta, po katerem enterociti prenesejo nerazgrajene antigenske makromolekule v medcelični prostor. Patogeni mikroorganizmi se poslužujejo različnih poti, s skupnim ciljem prekinitve stikov med epitelnimi celicami, s čimer si odprejo pot do bazalnega prostora enterocitov in nižje ležečih tkiv (Snoeck in sod., 2005; Yu in Yang, 2009).

2.2 CELIČNI STIKI

Povezovalni kompleksi med celicami so poglobitni pri vzdrževanju arhitekture epitelnega enosloja. Mrežo transmembranskih beljakovin sestavljajo trije beljakovinski kompleksi, in sicer tesni stiki, adherentni stiki in dezmosomi. Vsi trije kompleksi so konglomerat tako transmembranskih kot citosolnih beljakovin, ki se na zunanji strani evkariontske celice pripenjajo z zunajceličnim delom istega beljakovinskega kompleksa sosednje celice, medtem ko se na notranji strani vežejo na vmesne citosolne beljakovine, ki jim omogočajo pripenjanje na celični citoskelet. Izražanje povezovalnih beljakovin je dobro nadzorovan proces, ki je odvisen od dela črevesja (tanko ali debelo črevo), od položaja črevesnih resic in dela celične membrane (apikalna, lateralna ali bazalna).

2.2.1 Tesni stiki

Tesni stiki (*angl.* tight junctions) med epitelnimi celicami sesalcev so povezovalni kompleks, lociran na najbolj apikalnem delu, kjer oblikujejo neprekinjen obroč okoli celice in tako razmejijo apikalno celično membrano od lateralne. Tesni stiki so zelo dinamičen beljakovinski kompleks, ki omogoča semi-permeabilno paracelularno prepustnost. Tesni stiki omogočajo selektiven pretok ionov in topljencev skozi medcelični prostor in hkrati onemogočajo prehod antigenov, mikroorganizmov in njihovih toksinov iz črevesne svetline v notranjost organizma. Prisotni so pri različnih vrstah celic: epitelnih ter endotelnih celicah, Schwannovih celicah, sertolijevih celicah, oligodendrocitih in mezotelijskih celicah.

2.2.1.1 Transmembranske beljakovine

Tesne stike sestavljajo 4 družine transmembranskih beljakovin: okludin, klavdin, beljakovine JAM (*angl.* junctional adhesion molecules) in tricelulin. Pri tesnih stikih se ekstracelularni del transmembranskih beljakovin lahko združi z identično beljakovino (cis) ali z beljakovino drugih družin (trans) iz sosednje ležeče celice. Znotrajcelična domena beljakovinskega kompleksa tesnih stikov se s pomočjo vmesnega citosolnega beljakovinskega kompleksa pripenja na citoskelet. Poleg preprečevanja vstopa nevarnih

snovi preko medceličnega prostora in povezovalne naloge so tesni stiki vpleteni v usklajevanje številnih celičnih procesov, med katere štejemo celično diferenciacijo, proliferacijo in celično polarnost. Moteno delovanje tesnih stikov lahko privede do številnih bolezenskih stanj, kot so kronične črevesne bolezni (KVČB), med katere štejemo Crohnovo bolezen in ulcerozni kolitis, do raznih okužb, raka in do prenosa metastaz s krvjo (Hartsock in Nelson, 2008).

▪ **Okludin**

Okludin je bila prva identificirana komponenta tesnih stikov. V večji meri je prisotna pri epitelih in endotelih celicah, a jo vsebujejo tudi astrociti, nevroni in dendritične celice. Poznamo dve izomerni obliki okludina, ki nastaneta z alternativnim izrezovanjem mRNA. Različni izo-obliki okludina se ne razlikujeta v funkciji in distribuciji med različnimi tkivi. Okludin je približno od 62 do 82 kDa velika transmembranska beljakovina, ki prečka membrano 4-krat in kaže na ekstracelularni strani 2 večji zanki in na citosolni strani 2 zavoja, kratko N-terminalno in dolgo C-terminalno citosolno domeno. Ena od dveh ekstracelularnih zank je še posebej bogata s tirozinskimi in glicinskimi ostanki (okoli 60 %) in vsebuje le nekaj nabitih aminokislin. Po drugi strani pa je C-terminalna domena zelo bogata s serinskimi, treoninskimi in tirozinskimi ostanki, ki jih fosforilirajo različne proteinske kinaze. C-terminalna domena se veže neposredno na citosolno povezovalno beljakovino ZO-1, preko katere se posredno pripenja na aktinske filamente citoskeleta (Hartsock in Nelson, 2008; Paris in sod., 2008; Schneeberger in Lynch, 2004). Študije *in vitro* nakazujejo na pomembnost fosforiliranega stanja okludina pri njegovem razporejanju v tesne stike. Okludin v fosforiliranem stanju se veže z ZO-1 in omogoča stabilnost tesnih stikov ter nemoteno delovanje paracelularne pregrade. Okludin, ki ni fosforiliran, plava v citosolnih celičnih veziklih ob bazolateralni membrani (Feldman in sod., 2005).

Ugotovili so, da okludin ni poglavitna beljakovina tesnih stikov, temveč ima to vlogo beljakovina klavdin. Novorojene miši, ki so bile okludin γ , niso kazale anomalije v strukturi in pregradni funkciji tesnih stikov črevesnih epitelih celic, ampak so naknadno pokazale zaostalost v poporodnem razvoju, različna vnetja, hiperplazijo gastrične mukoze, odsotnost citoplazemskih granul v celicah žlez slinavk, tanjšanje

kosti, možganske kalcifikacije in atrofijo testisov, kar nakazuje drugačno in nepričakovano vlogo okcludina (Saitou in sod., 2000).

▪ **Klavdin**

Klavdin je od 20 do 27 kDa velika beljakovina, ki ima poglavitno vlogo pri sestavi in strukturi tesnih stikov. Enako kot okcludin prečka celično membrano 4-krat, na ekstracelularni strani ima 2 zanki in na citosolni strani N- in C-terminalno citosolno domeno. C-terminalna domena se tudi preko domen PDZ (*angl.* Zonula occludens-1 protein (PDZ)-binding domains) citosolnih beljakovin (ZO-1, ZO-2, ZO-3, PATJ in MUPP1) veže na citoskelet. C-terminalna domena klavdina se v primerjavi s C-terminalno domeno okcludina lahko veže ne samo na ZO-1 ampak tudi na ZO-2 in ZO-3 citosolni beljakovini.

Pri človeku so odkrili 24 različnih genov, ki kodirajo klavdin. Njihovo izražanje se razlikuje glede na vrsto celic in tkiva. Znano je, da kombinacija in delež različnih klavdinov prispevata k lastnosti pregrade tesnih stikov v različnih celičnih vrstah oz. tkivih. Vsaka vrsta celic načeloma izraža več kot 2 klavdina hkrati. Tudi pri klavdinu ena od dveh ekstracelularnih zank vsebuje le nekaj nabitih aminokislin. Položaj in število omenjenih aminokislin se pri različnih klavdinih spreminja. V primerjavi z okcludinom je beljakovina klavdin pomembna tudi pri tvorbi kanalov v celični membrani, ki omogočajo pretok kationov. Tako pri klavdinu kot pri okcludinu post-translacijska fosforilacija omogoča transmembransko vpenjanje v celično membrano in interakcijo z beljakovinskimi domenami PDZ drugih citosolnih beljakovin (Chiba in sod., 2008).

Pri funkciji epitelne pregrade igrajo ključno vlogo zlasti klavdini. Številne raziskave različnih klavdinov so pokazale, da imajo pomembno vlogo tako pri tesnilni funkciji kot pri tvorbi por v plazmalemi celic prebavnega trakta (Van Itallie in Anderson, 2006). Klavdin-1, -3, -4, -5 in -8 kažejo tesnilne funkcije (Amasheh in sod., 2009b; Amasheh in sod., 2005; Furuse in sod., 2002; Milatz in sod., 2010; Van Itallie in sod., 2001), medtem ko klavdin-2, -10b ali -15 delujejo kot paracelični kanali, ki spodbujajo prehod malih ionov glede na naboj (Amasheh in sod., 2002; Gunzel in sod., 2009; Rosenthal in

sod., 2010; Tamura in sod., 2011). Sestava, struktura in prepustnost tesnih stikov je specifična za tkivo in strogo urejena kot odziv na različne dražljaje, med katerimi so zelo pomembni regulatorji vnetja. Številne raziskave na bolnikih s KVČB so potrdile znižano ekspresijo klavdinov s tesnilnimi funkcijami kot npr. klavdin-3, -5, -8, -1, -4 (opazili so tudi manjše izražanje okcludina pri bolnikih z ulceroznim kolitisom), medtem ko je bilo znatno povešano izražanje klavdinov s funkcijo tvorbe por, kot je npr. klavdin-2 (Heller in sod., 2005; Zeissig in sod., 2007).

▪ **Beljakovine JAM**

Beljakovine skupine JAM so glikozilirane transmembranske beljakovine, ki spadajo v družino »*angl.* Immunoglobulin (Ig) superfamily«. Beljakovine JAM v primerjavi z okcludinom in s klavdinom le enkrat prečkajo celično membrano, imajo dve transmembranski regiji podobni domenam Ig in C-terminalno citosolno domeno. Beljakovine JAM lahko na ekstracelularni strani vzpostavijo homofilno ali heterofilno interakcijo. Celice, ki imajo beljakovine JAM so endotelne, epitelne in krvne celice. Beljakovine JAM so vpletene v pripenjanje sosednjih celic, pri čemer niso omejene le na pripenjanje med seboj enakih celic, ampak so zmožne tudi spenjanja različnih vrst celic, tako preko homofilnih kot heterofilnih interakcij. Beljakovina JAM-A je vpletена v funkcije tesnih stikov tako v endotelnih kot v epitelnih celicah, v vzpostavljanju celične polarnosti pa le v epitelnih celicah. Beljakovina JAM-A ni samo strukturni del tesnih stikov, ampak je tudi receptor za reoviruse.

Družino beljakovin JAM delimo v dve podskupini na osnovi podobnosti v zaporedju aminokislin na C-terminalnem delu. Prva podskupina, v katero spadajo JAM-A, JAM-B in JAM-C, ima na C-terminalnem koncu domeno razreda II PDZ in je sposobna neposredne vezave na beljakovino ZO-1 in PAR-3. V drugo podskupino spadajo receptorji CAR (*angl.* coxsackievirus and adenovirus receptor), ESAM in JAM-4. Epitelne celice imajo beljakovino CAR, ki je strukturni del tesnih stikov (Chiba in sod., 2008).

▪ **Tricelulin**

Tricelulin je transmembranska beljakovina, ki 4-krat prečka celično membrano, pri kateri je C-terminalna domena v 32 % enaka kot C-terminalna domena okcludina, medtem ko je njegova N-terminalna domena v primerjavi z N-terminalno domeno okcludina daljša. Tudi pri tricelulinu imamo različne izo-oblike, ki so posledica alternativnega izrezovanja mRNA. Večina tricelulinov je v epitelnih celicah zgoščenih pri hkratnem stiku treh celic (Mariano in sod., 2011).

2.2.1.2 Citosolne beljakovine

Citosolne beljakovine, ki pripenjajo strukturne transmembranske beljakovine tesnih stikov na celični citoskelet, razvrščamo v dve skupini. V prvo skupino uvrščamo citosolne beljakovine, ki imajo domeno PDZ (*angl.* Zonula occludens-1 protein (PDZ)-binding domains), v drugo skupino pa beljakovine, ki te regije nimajo.

2.2.1.2.1 Citosolne beljakovine z domeno PDZ

Domene PDZ so evolucijsko ohranjene regije. Imajo dve poglavitni vlogi: prva je zasidranje transmembranskih beljakovin in druga je njihova vezava z drugimi beljakovinami, kar vodi v nastanek dimerov in omreženosti. Citosolne beljakovine se preko domene PDZ vežejo na drugo beljakovino z enako domeno PDZ. Večina citoplazemskih beljakovin tesnih stikov ima več kot eno regijo PDZ. Med take beljakovine sodijo naslednje:

▪ **Beljakovine ZO (Zonula occludens: ZO-1, ZO-2 in ZO-3)**

Beljakovine ZO-1, ZO-2 in ZO-3 so del družine MAGUK (*angl.* membrane-associated guanylate kinase), ki omogočajo povezavo tako adherentnih kot tesnih stikov na celični citoskelet.

Beljakovine ZO-1, ZO-2 in ZO-3 imajo podobno strukturno organizacijo: N-terminalni konec vsebuje 3 domene PDZ, domeno SH3 (*angl.* Src homology 3) in domeno GUK (*angl.* guanylate kinase). Beljakovine ZO imajo osrednjo vlogo pri nastanku beljakovinskih mrež. Prva domena PDZ beljakovin ZO-1, ZO-2 in ZO-3 se neposredno

veže z domeno PDZ v C-terminalnem delu klavdina. Sekundarna domena PDZ beljakovin ZO-1 sodeluje pri interakciji z drugimi beljakovinami ZO in pri pripenjanju na beljakovino koneksin, ki je strukturna beljakovina presledkovnih stikov (*angl.* gap junctions). Tretja domena PDZ beljakovine ZO-1 interagira z JAM-1 in z domeno PDZ beljakovine PAR-3, kar vodi v povezavo ZO-1/klavdin/ in PAR-3-PAR-6-aPKC kompleks. Kljub trdni povezavi in interakciji omenjenih domen z različnimi beljakovinami, ki gradijo tesne stike, te niso dovolj za zagotovitev njihovega delovanja. Dodatne regije SH3, GUK in kisl domena so potrebne za vezavo ZO-1 na celične stike. Regija GUK je potrebna za povezavo ZO-1 na okludin. Beljakovina ZO-1 preko svoje s prolinom bogate N-terminalne regije interagira z aktinom in kortaktinom in se preko svoje C-terminalne regije veže na transmembranske beljakovine. Na ta način povezuje beljakovine tesnih stikov na celični citoskelet.

Struktura beljakovine ZO-2 je podobno organizirana kot struktura beljakovine ZO-1, le da je njena C-terminalna regija krajša in le v 25 % podobna C-terminalni regiji beljakovine ZO-1. Enako kot ZO-1 se tudi ZO-2 veže na klavdin preko prve domene PDZ na druge beljakovine PDZ preko druge domene PDZ, s citoskeletom preko C-terminalnega dela in preko regije SH3 in GUK z okludinom in α -kateninom. Tudi organizacija beljakovine ZO-3 je podobna organizaciji beljakovin ZO-1 in ZO-2, z razliko v strukturi v C-terminalni regiji, ki je pri ZO-3 krajša. Tudi ZO-3, podobno kot ZO-1 in ZO-2, reagira s klavdinom, okludinom in aktinom. Beljakovina ZO-3 je sposobna tudi povezave z beljakovino p120-katenin, ki je vezana na E-kadherin (sestavna beljakovina adherentnih stikov). ZO-1 in ZO-2 se vežeta na α -katenin, medtem ko se C-terminalna domena beljakovine ZO-3 veže na p120-katenin. Znano je tudi, da se ZO-1 in ZO-2 vežeta neposredno na okludin (Guillemot in sod., 2008).

▪ **Beljakovine MAGI (*angl.* membrane-associated guanylate kinase inverted proteins)**

Beljakovine MAGI imajo namesto domene SH3 karakteristični dve domeni WW. Domena GUK se v primerjavi z beljakovinami ZO nahaja pred domenama WW (pri beljakovinah ZO pa domena GUK sledi domeni SH3), kateri sledi pet domen PDZ.

Samo beljakovini MAGI-1 in MAGI-3 sta povezani s tesnimi stiki. Domene PDZ beljakovin MAGI reagirajo s tremi skupinami beljakovin:

- a) integralne membranske beljakovine, vključno z različnimi receptorji, in z dvema beljakovinama tesnih stikov: JAM-A in ESAM;
- b) signalne molekule, povezane s celičnimi stiki, vključno s K-RAS, Rho GEF mNet1, Rap1 GEF PDZ-GEF1, β -katenin, receptor tirozinske fosfataze in tumorski supresor PTEN;
- c) adenovirusni onkoprotein E4-ORF1 (Guillemot in sod., 2008).

▪ **Beljakovine z več domenami PDZ (MUPP1)**

Beljakovine MUPP1 imajo domeno MRE v N-terminalnem delu in trinajst domen PDZ. V epitelnih celicah se beljakovine MUPP1 nahajajo ob tesnih stikih, kjer reagirajo s klavdinom, JAM-1, CAR, Crumbs1 preko različnih domen PDZ. Vloga beljakovin MUPP1 pri nastajanju tesnih stikov še ni dokončno znana, čeprav organizacija njihovih domen PDZ in do sedaj znane interakcije, nakazujejo na njihovo možno delovanje kot citosolne beljakovine, natančneje kot beljakovina PATJ (Guillemot in sod., 2008).

▪ **AF-6/afadin, PAR-3, PAR-6, PALS-1 in PATJ**

Obstajajo različne variante beljakovine AF-6/afadin, ki so posledica alternativnega izrezovanja mRNA. Med seboj jih razlikujemo na podlagi domen, ki se povezujejo z aktinom. Beljakovine PAR-3, PAR-6, PALS-1 in PATJ tvorijo multi-beljakovinski kompleks, vpleten pri vzpostavitvi polarnosti celične plazmaleme (Guillemot in sod., 2008).

2.2.1.2.2 Citosolne beljakovine brez domene PDZ

▪ **Cingulin in JACOP/paracingulin**

Cingulin oblikuje homodimer, ki reagira s številnimi beljakovinami tesnih stikov, med katerimi je poglobitnega pomena interakcija in vezava z beljakovino ZO-1. Cingulin ni neposredno vpleten v strukturo in funkcijo tesnih stikov. Beljakovina JAKOP/paracingulin pa se ne izraža v epitelnih celicah tankega črevesja, pač pa je prisotna pri endotelih celicah (Guillemot in sod., 2008).

▪ **Družina beljakovin Angiomotin**

V družino angiomotinov spadajo 3 beljakovine: angiomotin (Amot), JEAP (*angl.* angiomotin-like-protein-1) in MASCOT (*angl.* angiomotin-like-protein-2). Njihova posebnost je v strukturi ene od domen, ki je v obliki navite spirale. Beljakovina Amot je del tesnih stikov v endotelnih celicah, JEAP pa je del tesnih stikov epitelnih celic eksokrinih žlez. Celice črevesnega epitelija imajo le beljakovino MASCOT, ki reagira s prvo domeno WW beljakovine MAGI-1 (Guillemot in sod., 2008).

2.2.2 Drugi celični stiki

▪ **Adherentni stiki** (*angl.* adherent junctions) so beljakovinski kompleks na lateralnih membranah celic, ki omogoča mehansko pripenjanje med transmembranskimi beljakovinami sosednjih celic in citoskeletom. Pri sesalcih adherentni stiki v primerjavi s tesnimi stiki ležijo bližje bazalnemu delu celičnih membran. Adherentne stike sestavljajo integralne beljakovine iz družine kadherinov, pri katerih je v epitelnih celicah najbolj zastopan E-kadherin. Druge beljakovine iz družine kadherinov so N-, P- in R-kadherini. E-kadherin je transmembranska beljakovina, odvisna od kalcijevih ionov (Ca^{2+}), ki prečka celično membrano enkrat. E-kadherin ima na svoji ekstracelularni strani 5 ponavljajočih se domen, ki oblikujejo trans-kadherinske povezave s sosednjimi celicami in tako pripomorejo k vzpostavljanju šibkih medceličnih povezav. Citoplazemska domena kadherinov se veže na citosolne beljakovine, imenovane katenini, ki omogočajo tako regulacijo endocitoze E-kadherinov in posledično njihove razgradnje in reciklaže kot tudi intracelularne signalne poti, transkripcijo genov in lokalno kontrolo aktinskih filamentov. Družina kateninov vključuje p120-katenin, α -katenin in β -katenin. Kadherini se na citosolni strani preko kateninov pripenjajo na aktinski citoskelet, medtem ko se na ekstracelularni strani povežejo z ekstracelularno domeno kadherinov sosednje celice. Adherentni stiki so tako kot tesni stiki vpleteni tudi v druge procese, med katere štejemo vzdrževanje celične polarnosti, uravnavanje celične migracije in proliferacije, omogočajo pa tudi nastanek drugih povezovalnih kompleksov, kot so dezmosomi (Hartsock in Nelson, 2008).

▪ **Dezmosomi** (*angl.* desmosome) omogočajo celicam odpornost na mehanske obremenitve in strižne sile. V znotrajceličnem prostoru se pripenjajo na intermediarne filamente celičnega citoskeleta (*angl.* DIFC – desmosome-intermediate filament complex). DIFC sestavljajo tri komponente, od katerih sta dve intracelularni, ena pa ekstracelularna. Med intracelularne komponente štejemo intermediarne filamente in citosolne povezovalne beljakovine (desmoplakin, plakoglobin in plakofilin), medtem ko med ekstracelularne štejemo dezmosomske adhezivne molekule (dezmokolin in dezmoglein), ki so del družine kadherinov in so odvisne od Ca^{2+} ionov (Garrod in Chidgey, 2008).

▪ **Presledkovni stiki** (*angl.* gap junctions) kot edinstveni kanali povezujejo sosednje celice in omogočajo difuzijo majhnih metabolitov, ionov in drugih molekul. Komunikacija med celicami preko presledkovnih stikov je bistvena za medcelično signalizacijo in celično prehranjevanje. Tako kot pri drugih celičnih stikih so tudi pri presledkovnih stikih dokazali njihovo interakcijo s celičnim citoskeletom in sicer tako z mikrotubuli kot z aktinskimi filamentmi (Giepmans in van Ijzendoorn, 2009).

2.3 KRONIČNE VNETNE ČREVESNE BOLEZNI (KVČB)

Različni dražljaji med vnetnim stanjem, ki izvirajo tako iz apikalne strani (črevesna svetlina) kot iz bazalne strani enterocitov, ogrožajo zaščitno funkcijo črevesnega epitela. Na apikalni strani se enterociti srečajo s številnimi vdirajočimi patogenimi mikroorganizmi, ki sproščajo različne snovi (toksini, ki tvorijo pore; beljakovine, ki modificirajo celični citoskelet in LPS) z namenom povečanja medcelične prepustnosti. Na ta način si patogeni mikroorganizmi omogočajo pot do gostiteljskih tkiv. Na bazalni strani črevesnega epitela pa aktivirane imunske celice (limfociti T_H , makrofagi), ki so del GALT, sproščajo provnetne citokine (INF- γ , TNF- α , IL-1 β), proteaze in reaktivne kisikove zvrsti (*angl.* ROS – reactive oxygen species), ki vodijo v okvaro pregrade z namenom olajšanja lastnega potovanja do mesta invazije patogenov (Ivanov in sod., 2010; Vozelj, 2000).

GALT sestavljajo številne celice, med katere štejemo Peyerjeve ploščice, celice M, mukozne in intraepitelijske limfocite. Ena od poglavitnih vlog GALT je razločevanje med komenzalno mikrobioto in patogenimi mikroorganizmi, ki pelje v primeren imunski odziv. Specializirane epitelne celice, imenovane celice M in dendritične celice, zajemajo antigene v črevesni svetlini in jih dostavijo celicam imunskega sistema sluznice. Z omenjenim delovanjem omogočajo nenehen imunski nadzor, ki zagotavlja tako varovanje pred škodljivimi patogeni, kakor tudi toleranco do črevesne mikrobiote in neškodljivih antigenov, ki jih v telo vnesemo s hrano. Črevesni epitelij ni le pasivna mehanska pregrada, ampak predstavlja aktivni sestavni del imunskega odziva. Neomejen imunski odziv proti antigenom mikroorganizmov v črevesni svetlini predstavlja dejavnik tveganja za razvoj kroničnih vnetnih črevesnih bolezni, kot sta Crohnova bolezen in ulcerozni kolitis. Neravnovesje med komenzalnimi in potencialno patogenimi mikroorganizmi v črevesni mikrobioti lahko vodi do številnih motenj v črevesni pregradi in posledično do KVČB. Številne raziskave *in vivo* na modelnih miših potrjujejo takšen potek dogodkov. Miši z genetskimi pomanjkljivostmi niso spontano razvile vnetja črevesja, dokler so ostale kot »germ-free«. Do vnetja je prišlo, ko so miši kolonizirali z mikroorganizmi, ki so del naravne mikrobiote (Hudcovic in sod., 2001; Sellon in sod., 1998).

Disfunkcija črevesne pregrade je glavna značilnost KVČB. Posledice oslABLJENE črevesne epitelne pregrade sta driska in povečan vnos zdravju škodljivih antigenov. Motnje v črevesni pregradi pri bolnikih s KVČB vključujejo spremembe v tesnih stikih, ki se kažejo kot spremenjeno izražanje strukturnih beljakovin tesnih stikov in posledično zmanjšano število njihovih horizontalnih pasov okoli celice ter njihovo distribucijo. Anomalije v tesnih stikih lahko pripišemo okrepljeni dejavnosti provnetnih citokinov, kot so TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-13, IL-6 in IL-12, ki se močno izražajo v vnetih predelih črevesja bolnikov. Čeprav vzrok nastanka KVČB ni povsem poznan, je videti, da je kronično vnetje posledica tako genske predispozicije kot spremenjenega odziva gostitelja na črevesno mikrobioto. Raziskovalci se osredotočajo na proučevanje različnih genov, ki kodirajo beljakovine, vpletene v imunski odziv organizma, ali pa so del mehanske zaščitne pregrade (črevesnega epitelija in mukusa). Razumevanje poteka KVČB odpira možnosti za razvoj novih terapevtskih sredstev. Že danes so številni znanstveniki opisali uporabo alternativnih oz. podpornih oblik zdravljenja KVČB z uporabo antagonistov citokinov (Zeissig in sod., 2004), različnih rastlinskih sestavin (Li in sod., 2010a) in probiotikov (Mennigen in sod., 2009), ki so sposobni stabilizirati tesne stike med črevesnimi epitelnimi celicami.

Dokazali so povezavo med uničeno in prekinjeno črevesno pregrado epitelija in razvojem avtoimunskih boleznih in KVČB (Kucharzik in sod., 2006; Turner, 2009). Različne KVČB, kot so Crohn-ova bolezen in ulcerozni kolitis, uničujoče vplivajo na pregradno funkcijo epitelnih celic in tako omogočajo lažji prehod oz. infiltracijo provnetnih dražljajev v podsluznico, vse do celic imunskega sistema. Obe omenjeni bolezni sta vnetni bolezni črevesja, ki potekata kronično, navadno v obliki izmenjujočih se zagonov vnetja in različno dolgih obdobjih remisijskega stanja. Dandanes velja, da spremembe v gradbenih beljakovinah tesnih stikov lahko vodijo v razvoj KVČB (Reiff in Kelly, 2010). Provnetni dražljaji sprožijo nadaljnje, s citokini inducirane spremembe tesnih stikov, kar vodi v začaran krog porušjenja funkcije epitelne pregrade do kroničnega vnetja (Barbara, 2006; Bruewer in sod., 2006; Mankertz in Schulzke, 2007; Yu in Turner, 2008).

Dokazano je bilo, da je oslABLJENA funkcija črevesne epitelne pregrade v neposredni povezavi s stopnjo vnetja črevesne sluznice tako pri ulceroznem kolitisu kot pri Crohn-ovih boleznih (Murphy in sod., 1989). Pri poskusih *in vivo* na miših so dokazali, da tudi pri pravilnem imunskem odzivu in normalni mikrobioti napaka v delovanju epitelija privede do spontanega razvoja kolitisa in da pri miših, ki so nagnjene k razvoju kolitisa, farmakološka podpora za krepitev črevesne epitelne pregrade privede do znatne izboljšave vnete sluznice (Arrieta in sod., 2009; Van der Sluis in sod., 2006). Študije nakazujejo, da pri vnetju pride do reorganizacije aktinskih filamentov črevesnega epitelija in posledično do prekinitve apikalnih celičnih stikov.

2.3.1 Vpliv citokinov na tesne stike

Provnetni citokini igrajo pomembno vlogo pri začetku kaskadne reakcije, ki vodi k okvari pregradne funkcije pri bolnikih s KVČB. Citokini lahko na dva načina vplivajo na tesne stike, in sicer z regulacijo ekspresije gradnikov tesnih stikov ali pa s prerazporeditvijo strukturnih beljakovin. Dokazano je bilo, da številni endogeni agenti (kot so citokini in rastni dejavniki) uravnavajo tesne stike tako v epiteliju kot v endoteliju. Vsekakor pa mehanizmi, s katerimi citokini vplivajo na tesne stike, še niso dobro znani.

INF- γ je provnetni citokin, ki so ga v visoki koncentraciji zasledili v vnetih predelih črevesnega tkiva pri bolnikih s KVČB. Poleg že znane vloge med vnetnim odzivom INF- γ spreminja pregradno funkcijo epitelija. Številne študije so dokazale da INF- γ povečuje prepustnost črevesnega epitelija. Mehanizem njegovega delovanja na tesne stike je kompleksen. Številni raziskovalci opisujejo, da INF- γ vpliva na raven gradnikov tesnih stikov in na njihovo celično lokalizacijo; drugi, da skozi makropinocitoze beljakovin okcludin, JAM-A in klavdin-1 prekine tesne stike (Bruewer in sod., 2005; Ivanov in sod., 2005); tretji pa, da povzroča (tako kot TNF- α) povišanje izražanja gena za klavdin-2 in znižanje izražanja gena za klavdine -1, -5 in -7 (Amasheh in sod., 2009a).

Tudi za **TNF- α** so številne študije dokazale, da je odgovoren za povečanje epitelne prepustnosti. Dokazano je, da je povečana prepustnost celičnega epitelija zaradi delovanja TNF- α odvisna tako od časa izpostavitve kot od dodanega odmerka. Nekatere raziskave poročajo, da sta tirozinska kinaza in proteinska kinaza A vpleteni v mehanizem delovanja TNF- α na tesne stike, saj je bil učinek TNF- α na tesne stike bistveno milejši, ko so celicam poleg TNF- α istočasno dodali tudi inhibitorja za tirozinsko kinazo in proteinsko kinazo A (Schmitz in sod., 1999b). Drugi pa poročajo tudi o vpletenosti MLCK (*angl.* myosin light-chain kinase) in NF- κ B (*angl.* nuclear transcription factor NF- κ B) pri delovanju TNF- α na tesne stike (Ma in sod., 2005; Ma in sod., 2004).

V poskusih *in vitro* na celičnih linijah Caco-2 in T84 so tudi dokazali, da sta INF- γ in TNF- α spodbudila reorganizacijo nekaterih strukturnih beljakovin tesnih stikov (ZO-1, JAM-A, okcludin, klavdin-1 in klavdin-4) in tako vplivala na funkcijo epitelne pregrade (Zolotarevsky in sod., 2002).

IL-1 β je provnetni citokin, za katerega so dokazali, da igra pomembno vlogo pri patogenezi KVČB, saj je bila njegova koncentracija znatno višja v črevesnem tkivu bolnikov s KVČB v primerjavi s kontrolno skupino (Gwee in sod., 2003). Znanstveniki so dokazali tudi korelacijo med povišanim nivojem IL-1 β in višjo prepustnostjo črevesnega epitelija. Delovanje IL-1 β na tesne stike naj bi bilo enako delovanju citokina TNF- α . Odvisno naj bi bilo od odmerka in časa izpostavitve, vključevalo pa naj bi tudi delovanje MLCK (Al-Sadi in Ma, 2007).

IL-6 je močan provnetni citokin poti Th1, ki se odzove kot posledica drugih provnetnih dražljajev, še posebej se odzove na prisotnost TNF- α in IL-1 β . Za IL-6 je znano, da je eden od pglavitnih citokinov pri patogenezi KVČB. Tudi za IL-6 je bil dokazan negativen vpliv na tesne stike (Tazuke in sod., 2003). Nedavne študije nakazujejo, da IL-6 deluje tako, da poviša izražanje gena za klavdin-2, ki tvori kanale v celični membrani, kar posledično privede do povišanja epitelne prepustnosti (Al-Sadi in sod., 2014; Suzuki in sod., 2011).

IL-12 je heterodimer, sestavljen iz dveh kovalentno vezanih polipeptidnih verig. Je provnetni citokin, ki ga ne izdelujejo celice T in ga zaradi njegovega delovanja na celice NK (naravne celice ubijalke) obravnavamo kot mediator naravne imunosti (Vozelj, 2000). Tudi IL-12 naj bi, tako kot ostali že opisani provnetni citokini, povečal prepustnost tesnih stikov (Al-Sadi in sod., 2009). Kolikor nam je znano po pregledu literature, do sedaj ni konkretnih študij, ki bi podpirale vlogo IL-12 pri urejevanju tesnih stikov in s tem prepustnosti črevesnega epitelija.

IL-10 je protivnetni citokin, za katerega velja, da ohranja funkcijo črevesne epitelne pregrade. IL-10 je pokazal zaščitno funkcijo pred delovanjem $\text{INF-}\gamma$ pri poskusih *in vitro* na celicah T84 (Madsen in sod., 1997). Podobno so ugotovili na endotelijskih celicah (Oshima in sod., 2001). Miši, ki so imele genetske pomanjkljivosti v genu za IL-10, so nekaj časa pred razvojem črevesnega vnetja kazale povečano prepustnost epitelne membrane (Madsen in sod., 1999). Ti podatki nakazujejo na zaščitno vlogo IL-10 za tesne stike in s tem na celično pregrado, hkrati pa podpirajo hipotezo, da igra uničena črevesna celična pregrada pomembno vlogo pri razvoju črevesnega vnetja.

Potrebno je še omeniti, da v nekaterih drugih študijah *in vitro* znanstveniki niso zaznali enakega delovanja najpomembnejših provnetnih citokinov ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{INF-}\gamma$ in $\text{IL-1}\beta$) na prekinitev tesnih stikov, ali pa delovanja sploh niso zaznali (Van De Walle in sod., 2010). Moramo pa upoštevati, da je bilo največ študij glede vpliva citokinov na tesne stike črevesnih epitelnih celic narejenih za $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ in $\text{IL-1}\beta$. Raziskav, ki vključujejo ostale citokine, je manj, zaradi česar ostaja mehanizem njihovega delovanja nedorečen.

2.4 ČREVO KOT EKOSISTEM

Naravno mikrobioto človeka in drugih živali sestavljajo vsi mikroorganizmi (od bakterij do nekaterih vrst gliv), ki naseljujejo sluznice in kožo zdravih gostiteljev. Predstavniki normalne mikrobiote so s človekom v komenzalnem sožitju. Normalna mikrobiota kolonizira gostitelja že takoj po rojstvu in je pomembna pri presnovi in sintezi nekaterih rastnih dejavnikov (nekaterne bakterije vplivajo na metabolizem holesterola), ga ščiti pred vdorom in kolonizacijo patogenih mikrobov (proizvaja protimikrobne snovi, tekmuje za vezavna mesta in za hrano), spodbuja razvoj imunskega sistema in posledično onemogoča razvoj okužb. Sestava naravne mikrobiote se razlikuje med posameznimi anatomskimi predeli, različna je tudi od gostitelja do gostitelja, saj nanjo vplivajo različni fiziološki dejavniki (kot so npr. temperatura telesne površine, vlaga...), spreminja pa se tudi s časom (Madigan in sod., 2003; Seme, 2002; Stevens in Hume, 1998).

Kolonizacija in interakcija med gostiteljem in mikrobioto je običajno usklajena in odločilnega pomena pri zmernih fizioloških odzivih. Struktura črevesne mikrobiote je pri odraslih izredno stabilna. Kljub temu, da predstavnike številnih vrst najdemo pri vseh posameznikih (t.i. »core« mikrobiom), so med posamezniki še vedno opazne velike razlike v sestavi črevesne mikrobiote (Tap in sod., 2009). Neravnovesje v sestavi črevesne mikrobiote lahko vodi do številnih patofizioloških stanj, kot so kronične vnetne črevesne bolezni, debelost, metabolični sindrom, diabetes tipa 2, atopični dermatitis in kolorektalni rak (Darfeuille-Michaud in sod., 2004; Larsen in sod., 2010; Penders in sod., 2013; Schwartz in sod., 2010; Serban, 2013; Swidsinski in sod., 2002; Tilg in Kaser, 2011).

Porušen odnos med enterociti in mikrobioto lahko vodi do vnetja, do poškodb tkiva in do različnih bolezni ter okužb s patogenimi mikroorganizmi.

2.4.1 Probiotiki

Številne raziskave so pokazale, da so komenzalne bakterije, ki naseljujejo naša prebavila, v nenehni interakciji z gostiteljevimi celicami in da imajo pomembno vlogo

pri ohranjanju zdravja prebavil. Laktobacili se pogosto uporabljajo kot modelni organizmi za proučevanje mehanizmov interakcij, saj običajno poseljujejo prebavila in so tudi najbolj razširjeni probiotični mikroorganizmi.

Laktobacili in bifidobakterije so predstavniki naravne črevesne mikrobiote, ki ugodno vplivajo na zdravje gostitelja, običajno z ohranjanjem stabilnega črevesnega okolja. Laktobacili so heterogena skupina po Gramu pozitivnih, anaerobnih ali fakultativno anaerobnih, nesporulirajočih paličastih bakterij. Sodijo v skupino mlečnokislinskih bakterij. Laktobacile lahko izoliramo iz zelo različnih okolij, kot so rastlinski material, fermentirana živila in črevesje ljudi in živali (Blana in sod., 2014; Lee in sod., 2010; Todorov in sod., 2011). Bifidobakterije so po Gramu pozitivni, negibljivi, nesporulirajoči, katalaza negativni anaerobni mikroorganizmi, ki pripadajo deblu *Actinobacteria* in se pogosto pojavljajo kot razvejane palčke (Sgorbati in sod., 1995). Visoka koncentracija bifidobakterij v črevesju je značilna pri novorojenčkih ter dojenih otrocih, njihovo število pa se med odraščanjem postopoma zmanjša (Gavini in sod., 2001; Reuter, 2001; Tannock, 2010).

V zadnjih letih se kopičijo dokazi, pridobljeni v raziskavah *in vitro* in *in vivo*, o sposobnosti posameznih sevov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, da pozitivno vplivajo na zdravje ljudi. Med opaženimi pozitivnimi učinki velja omeniti regulacijo homeostaze črevesne mikrobiote, zmanjšanje alergij in okužb dihal, preprečevanje in zdravljenje driske, modulacijo lokalnega imunskega odziva in inhibicijo okužb z oviranjem delovanja potencialnih patogenov (Cimperman in sod., 2011; Guglielmetti in sod., 2011; Messaoudi in sod., 2012; Miyauchi in sod., 2009; Palomar in sod., 2014; Sagaya in sod., 2014; Vilela in sod., 2008; Yu in sod., 2012). Te trditve so spodbudile uporabo probiotikov pri preprečevanju in zdravljenju različnih bolezni. Probiotike najdemo v številnih prehranskih dopolnilih, funkcionalnih živilih in zdravilih brez recepta.

Probiotični sevi ne smejo biti patogeni in ne smejo imeti prenosljivih zapisov za odpornost proti antibiotikom v široki rabi tako v medicini kot v veterini. Zaželeno je, da so človeškega izvora, da so odporni proti želodčni kislini in žolčnim solem, da so sposobni kolonizacije črevesne sluznice in da so tehnološko ustrezni, tako da preživijo

razmere med proizvodnjo in skladiščenjem. Poleg osnovnih pogojev, ki zagotavljajo varnost in učinkovitost, morajo izkazati tudi učinke na zdravje človeka, ki jih je potrebno dokazati na ciljni populaciji. Med možnimi učinki so delovanje na črevesne patogene mikroorganizme, pozitivni vplivi na imunski sistem, kar vodi do boljše obrambne funkcije, pozitivni učinki na metabolizem gostitelja ali krepitev pregradne funkcije črevesnega epitelija (EFSA, 2012; Klaenhammer in Kullen, 1999).

Večina do sedaj opisanih probiotičnih sevov iz rodu *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, ki jih najdemo v različnih izdelkih na trgu, je bilo izoliranih iz človeškega blata. Ta izvor bakterij pa ne zagotavlja, da so bakterije tudi uspešno prilagojene na okolje humanih prebavil, saj lahko gre za take, ki so le prehodne, ne pa stalne prebivalke prebavil (Hautefort in sod., 1999). V primerjavi z izolati iz blata, izolati iz črevesne sluznice so najverjetneje predstavniki stalne črevesne mikrobiote, zato obstaja večja verjetnost, da so dejansko sposobni učinkovito naseliti črevo. Znano je, da črevesno mikrobioto sestavljajo tako mikroorganizmi iz črevesne svetline, ki predstavljajo prehodni del, kot mikroorganizmi, ki so pritrjeni na črevesno sluznico in ki so del avtohtone črevesne združbe. Prehodna mikrobiota se razlikuje od avtohtone (Araujo-Perez in sod., 2012; Turrone in sod., 2009; Zoetendal in sod., 2002). Lastnosti, ki so odgovorne za uspešno kolonizacijo, so specifične za sev, ne pa za vrsto in so do sedaj še dokaj nepoznane. Zato menimo, da je raziskovanje lastnosti sevov, ki so sposobni vsaj začasne kolonizacije črevesne sluznice, nadvse pomembno za boljše razumevanje funkcij, ki so bistvenega pomena za uspešno naselitev črevesja.

Adhezija mikroorganizmov na enterocite praviloma vodi do interakcij mikroorganizmov z imunskim sistemom gostitelja. Sposobnost probiotikov, da na specifične načine vplivajo na imunski sistem, je značilna za posamezni sev in posledično vodi do edinstvenih interakcij med sevom in gostiteljem.

Domnevajo, da interakcije probiotikov z gostiteljevimi črevesnimi epitelnimi in imunskimi celicami prispevajo k vzdrževanju mukozne homeostaze in preprečujejo pretiran vnetni odgovor (Blum in Schiffrin, 2003). Znani so številni mehanizmi, s katerimi laktobacili blagodejno vplivajo na gostitelja (Lebeer in sod., 2008). Nekateri

sevi laktobacilov stimulirajo izločanje sluzi pri enterocitih, s čemer krepijo pregradno funkcijo črevesnega epitelija in tako zmanjšajo možnosti novih infekcij (Mack in sod., 2003). Drugi znani mehanizem je izboljšanje delovanja tesnih stikov med celicami črevesnega epitelija (Karczewski in sod., 2010; Seth in sod., 2008). Znano je tudi tekmovalno izključevanje patogenih bakterij s proizvodnjo protimikrobnih snovi (Corr in sod., 2007; De Keersmaecker in sod., 2006; De Vuyst in Leroy, 2007).

Raziskovalci so si enotni, da so nekateri probiotični sevi laktobacilov sposobni modulacije imunskega sistema gostitelja, niso pa še povsem razjasnjeni njihovi mehanizmi delovanja. Rezultati raziskav kažejo, da lahko različni molekularni motivi (*angl.* MAMP – microbe-associated molecular patterns) laktobacilov, ki so strukturni del celičnega ovoja, sprožijo prirojen imunski odziv GALT (Akira in sod., 2006; Dziarski in Gupta, 2005; Hold in sod., 2011; Sanchez Carballo in sod., 2010; Wells in sod., 2011).

V zvezi z zgoraj navedenim smo se v doktorski disertaciji osredotočili na izolacijo in karakterizacijo novih sevov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, ki imajo svojo ekološko nišo v črevesni sluznici, z namenom ugotavljanja njihovega potenciala pri ublažitvi črevesnega vnetja zaradi KVČB.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 REAGENTI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednje kemikalije:

- L-cistein hidroklorid (Merck, Nemčija, 102839)
- Glicerol (Merck, Nemčija, 4094)
- Agaroz (Sigma-aldrich, ZDA, A9539)
- Go Taq Flexi DNA Polymerase (Promega, ZDA, M8301)
- SYBRSafe DNA Gel stain (Life Technologies, ZDA)
- Lizocim (Sigma-aldrich, ZDA, L6876)
- Mutanolizin iz *Streptomyces globisporus* (Sigma-aldrich, ZDA, M9901-5KU)
- Kloroform (Sigma-aldrich, ZDA, SL-C2432)
- Izopropanol (Sigma-aldrich, ZDA, SI-59304)
- Etanol (Sigma-aldrich, ZDA, SL-32225)
- Tripansko modrilo (Merck, Nemčija, 1.11732)
- Pepsin (Sigma-aldrich, ZDA, P-7000)
- Pankreatin (Sigma-aldrich, ZDA, P3292)
- Žolčne soli No.3 (Biolife, Anglija, 4111302)
- Krotanska kislina (Sigma-aldrich, ZDA, 113018)
- Mupirocin (AppliChem, Nemčija, A4718,0001)
- Gentamicin (GE Healthcare, Anglija, P11-004)
- Kanamicin (Merck, Nemčija, 5222)
- Penicilin/streptomycin (Sigma-aldrich, ZDA, P4333)
- PMA (Sigma-aldrich, ZDA, P8139)
- Lipopolisaharidi (LPS) *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, ZDA, L5293)
- Trizol reagent (Applied Biosystems, ZDA, 15596-026)
- RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, ZDA, 5886)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, ZDA, G-8540)
- β -merkaptetanol (Sigma-aldrich, ZDA, M-7154)
- TEMED (Sigma-Aldrich, ZDA, T-9281)
- PDB (Sigma-Aldrich, ZDA, P1269-1MG)
- Tripsin/EDTA (Sigma-Aldrich, ZDA, SI-T4049)

- IL-1 β (Cell signaling technology, ZDA, CY-8900SF; Sigma-Aldrich, ZDA, SI-I9401)
- Transwell[®]-Clear (Corning, ZDA, 3460)
- Pepton (Merck Millipore, Nemčija, 107214)
- Želatina iz prašičje kože (Sigma-aldrich, ZDA, G9136)
- Natrijev klorid (Merck, Nemčija, 1.06404)
- Kalijev klorid (Merck, Nemčija, 1.04936)
- Natrijev hidrogen karbonat (Kemika, Hrvaška, 14467)
- Posode za anaerobno gojenje (BioMérieux, Francija, BM-96127)
- Generatorji atmosfere GENbox anaer (BioMérieux, Francija, BM-96124)
- GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas, SM0243)
- 500 bp DNA standardna lestvica (Thermo Fisher Scientific Fermentas, ZDA)
- 1000 bp DNA standardna lestvica (Thermo Fisher Scientific Fermentas, ZDA)
- HBSS (GE Healthcare, Anglija, H15-010)
- PBS (Sigma-Aldrich, ZDA, SI-D8537)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, ZDA, SL-X100)
- RIPA pufer (Cell signaling technology, ZDA, CY-9806S)
- PMSF (Cell signaling technology, ZDA, CY-8553S)
- Trizma[®] base, tris (hidroksimetil) aminometan (Sigma-aldrich, ZDA, T-6066)
- EDTA (Sigma-Aldrich, ZDA, E-6635)
- Klorovodikova kislina (Merck, Nemčija, 1.00317)
- Tween-20 (Merck, Nemčija, 8.17072)
- HRP hrenova peroksidaza (Promega, ZDA, W4121)
- Paraformaldehid (Sigma-Aldrich, ZDA, SL-P6148)
- Pufer Laemmli
- Coomassie blue reagent
- Metanol (Sigma-Aldrich, ZDA, SL-32213)
- Ocetna kislina (Sigma-Aldrich, ZDA, SL-33209)
- PVDF membrana (Life Technologies, ZDA, LC2002)
- Posneto mleko v prahu (Sigma-Aldrich, ZDA, M7409)
- Agar MRS (Merck, Nemčija, 10660)
- Tekoče gojišče MRS (Merck, Nemčija, 10661)

- BSA (Sigma-aldrich, ZDA, A-4503)
- Tekoče gojišče BHI (Merck, Nemčija, 1.10493.0500)
- Agar BHI (Merck, Nemčija, 1.13825.0510)
- Agar Iso-Sensitest (Thermo scientific, ZDA, CM0471)
- Agar Mueller Hinton (Merck, Nemčija, 5437)
- DMEM (Life Technologies, ZDA, 41965039)
- FBS (Life Technologies, ZDA, 10270098)
- Plastenke T75 (Sarsted, Nemčija, 83.1813.002)
- Novex[®] sharp Pre-stained Protein standard (Life Technologies, ZDA, LC5800)
- Puffer CAPS (Sigma-aldrich, ZDA, C2632)
- RNAlater[®] (Life Technologies, AM7020)

3.1.1 Kompleti reagentov

- Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, ZDA, A1120)
- Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, ZDA, A9281)
- RNeasy plus mini kit (Qiagen, Nizozemska, Q74134)
- Turbo DNA-free kit (Applied Biosystems, ZDA, AM1907)
- Hight capacity cDNA reverse transcription kits (Applied Biosystems, ZDA, 4368814)
- Biolog MicroLog[™] system: AN MicroPlate[™] (Biolog, ZDA, 1007)
- Sistem API 50 CH (BioMérieux, Francija, B-50300)
- E-test (BioMérieux, France, AM: 412253; VA: 412488; GM: 412368; SM: 526800; EM: 412334; CM: 412315; TC: 412471; CL: 507510; CI: 412311; EF: 528900; TP: 412461; MZH: 412404)
- Reagent RT² profiler PCR array control plates (Qiagen, Nemčija, Q330231C-2)

3.2 LABORATORIJSKA OPREMA

- Homogenizator
- Spektrofotometer NanoVue (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Švedska)
- Spektrofotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, ZDA)
- Aparatura za PCR SureCycler 8800 (Agilent Technologies, ZDA)
- UV transilluminator (Syngene, Anglija), ChemiGenius2 (Syngene, Cambridge, Anglija)
- Aparat za elektroforezo (Biorad, ZDA)
- Spektrofotometer
- Sistem za plinsko kromatografijo Hewlett Packard 5890A (HP, ZDA) in kapilarna kolona Nukol (Supelco, ZDA)
- Millicell ERS-2 Volt/Ohm metrom (Merck Millipore, Germany)
- Aparature za qPCR (ABI 7900 HT FAST in ViiA™ 7 Real-Time PCR System; Applied Biosystems, ZDA)
- Konfokalni mikroskop Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Nemčija)
- Sonicator (Soniprep 150 plus, MSE (UK) Limited)
- Biolog MicroStation™ Reader (Biolog, ZDA, 22607D)
- XCell SureLock® Mini-Cell (Life technologies, ZDA)
- XCell II™ Blot Module kit (Life technologies, ZDA)
- Mighty small II SE 260 (GE Healthcare, Anglija)
- NovaBlot Multiphor II (GE Healthcare, Anglija)

3.3 BAKTERIJSKI SEVI IN CELIČNE KULTURE

3.3.1 Bakterijski sevi - pozitivne kontrole pri različnih poskusih

- *Lactobacillus rhamnosus* GG[®] (LGG[®]) je sev, za katerega so dokazali različne pozitivne vplive na človeško zdravje in je zaradi tega razširjen kot probiotik. Deponiran je v ameriški zbirki mikroorganizmov in celičnih kultur (American Type Culture Collection, Rockville, ZDA) pod številko ATCC 53103. V nalogi smo ga uporabili kot pozitivno kontrolo pri ugotavljanju uporabe različnih sladkorjev, DHPLC ter preživetju v simuliranih gastrointestinalnih razmerah.
- *L. casei* (DN-114 001) je sev v lasti družbe Danone Vitapole (Francija), za katerega so dokazali različne probiotične lastnosti in je razširjen v probiotičnih izdelkih. Za naše raziskave smo sev izolirali iz izdelka Actimel. Sev smo v nalogi uporabili kot pozitivno kontrolo pri ugotavljanju uporabe različnih sladkorjev, pri DHPLC, pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti ter izražanja in izločanja citokinov v celicah THP-1.
- *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12[®]) je sev z dobro raziskanimi probiotičnimi lastnostmi. Deponiran je v nemški zbirki mikroorganizmov (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Germany) pod številko DSM 15954. Sev smo v nalogi uporabili kot pozitivno kontrolo pri ugotavljanju uporabe različnih sladkorjev, DHPLC in preživetja v simuliranih gastrointestinalnih razmerah.
- *L. plantarum* WCFS1 je sev, za katerega so dokazali sposobnost ohranjanja transepitelne električne upornosti (TEER) pri celicah Caco-2, kadar so bile te izpostavljene kemijskemu agensu PDB (forbol 12,13-dibutirat). Sev je deponiran v belgijski zbirki mikroorganizmov (Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent), pod številko LMG 9211. Sev smo v nalogi uporabili kot pozitivno kontrolo pri preskusih na celicah Caco-2.
- *L. gasseri* K7 je izolat iz blata dojenčka, z dokazanimi probiotičnimi lastnostmi. Sev je bil izoliran na Inštitutu za mlekarstvo in probiotike, Oddelka za zootehniko,

Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Deponiran je v češki zbirki mikroorganizmov (Czech Collection of Microorganisms) pod oznako CCM 7710. Sev smo v nalogi uporabili kot indikatorski sev pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti drugih testiranih izolatov.

- *L. acidophilus* (La5[®]) je sev z dokazanimi probiotičnimi lastnostmi. Deponiran je v nemški zbirki mikroorganizmov pod številko DSM 13241. Sev smo uporabili kot pozitivno kontrolo pri ugotavljanju prisotnosti beljakovin S-sloja. S-sloj (t.i. površinski sloj, *angl.* surface layer) je plast sestavljena iz ponavljajočega se niza podenot istega proteina ali glikoproteina, ki obdaja celotno površino celic.
- *L. sakei* NCDO 2714 je deponiran v angleški zbirki mikroorganizmov iz mlečnih izdelkov (National Collection of dairy Organisms; NCDO) pod oznako NCDO 2714. Sev smo v nalogi uporabili kot indikatorski sev pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti drugih testiranih izolatov.
- *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (IM348) je sev, izoliran iz bolgarskega jogurta in deponiran v ameriški zbirki ATCC pod številko 11842. V nalogi smo ga uporabili za preverjanje vpliva na TEER celic Caco-2.

Bakterijske seve iz rodu *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* smo gojili v tekočem gojišču MRS z dodatkom 0,05 % cisteina pri 37 °C v anaerobnih razmerah. Pred vsakim preskusom smo bakterijske seve, hranjene pri – 20 °C, odmrznili, jih nacepili (1 %, v/v) v tekoče gojišče MRS z dodanim cisteinom (0,05 %) in inkubirali preko noči. Naslednji dan smo kulturo precepili (1 %, v/v) v sveže gojišče MRS s cisteinom in inkubirali 18 h. Postopek smo še dvakrat ponovili tako, da smo v vseh poskusih uporabili 18-urno bakterijsko kulturo po trikratnem precepljanju.

3.3.2 Patogeni in potencialno patogeni sevi

- *Escherichia coli* 0157:H7 je klinični izolat Laboratorija za bakteriološko diagnostiko črevesnih infekcij, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani.

- *E. coli* 08:K88:H9 je enterotoksigena *E. coli*, izolirana iz črevesja sesnih pujskov, ki so oboleli za drisko. Sev smo prejeli od prof. A. Bombe, Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovaška (Talafantova in sod., 1987).
- *E. coli* IM121 je hemolitični sev, izoliran iz mastičnega mleka na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani.
- *E. coli* IM122 je nehemolitični sev, izoliran iz mastičnega mleka na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani.
- *E. coli* IM429 je patogeni sev, izoliran iz brojlerjev na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani.
- *E. coli* IM430 je patogeni sev, izoliran iz mastičnega mleka na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani.
- *Staphylococcus aureus* 29213 je deponiran v ameriški celični zbirki ATCC pod številko 29213. Kot ostali sevi *S. aureus* je potencialno patogena bakterija, prisotna predvsem na nosni sluznici in v črevesju človeka in živali.
- *S. aureus* RN 4220 je sev, ki smo ga prejeli od S. Vesterlund, Functional Food Forum, University of Turku, Finska.
- *S. aureus* IM132 je sev izoliran iz mastičnega mleka na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarske fakultete, Univerze v Ljubljani.
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 14028 je invazivni sev, ki povzroča salmonelozo pri človeku in drugih toplokrvnih živalih.

Vse seve, opisane v tem poglavju, smo v nalogi uporabili kot indikatorske seve pri ugotavljanju protimikrobne aktivnosti. Bakterijske seve smo gojili v gojišču BHI v aerobnih razmerah. Uporabljeni sevi v raziskavi in pogoji gojenja so prikazani v **preglednici 1**.

Preglednica 1: Seznam sevov uporabljenih v študiji in pogoji njihovega gojenja

Table 1: Bacterial strains used in the study and their growth conditions

Oznaka seva	^a Izvor	Vrsta	Pogoji gojenja	Njihova uporaba v nalogi
DN-114 001	IM	<i>L. casei</i>	MRS, 37 °C, anaerobno	+ kontrola: Biolog, API, citokinski odziv, protimikrobna aktivnost
La5 [®]	DSM	<i>L. acidophilus</i>	MRS, 37 °C, anaerobno	+ kontrola: izolacija beljakovin S-sloja
K7	hišni sev	<i>L. gasseri</i>	MRS, 37 °C, anaerobno	Indikatorski sev: protimikrobna aktivnost
LGG [®]	ATCC	<i>L. rhamnosus</i>	MRS, 37 °C, anaerobno	+ kontrola: Biolog, API, preživetje, adhezija
BB-12 [®]	DSM	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	MRS, 37 °C, anaerobno	+ kontrola: Biolog, preživetje
WCFS1	LMG	<i>L. plantarum</i>	MRS, 37 °C, anaerobno	+ kontrola: merjenje TEER
IM348	ATCC	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	MRS, 30 °C, anaerobno	+ kontrola: merjenje TEER
NCDO 2714	NCDO	<i>L. sakei</i>	MRS, 37 °C, anaerobno	Indikatorski sev: protimikrobna aktivnost
O157:H7	MF	<i>E. coli</i>	BHI, 37 °C, aerobno	Indikatorski sev: protimikrobna aktivnost
O8:K88:H9	(Talafantova in sod., 1987)	<i>E. coli</i>	BHI, 37 °C, aerobno	Indikatorski sev: protimikrobna aktivnost
IM121	VF	<i>E. coli</i>	BHI, 37 °C, aerobno	Indikatorski sev: protimikrobna aktivnost
IM122	VF	<i>E. coli</i>	BHI, 37 °C, aerobno	Indikatorski sev: protimikrobna aktivnost
IM429	VF	<i>E. coli</i>	BHI, 37 °C, aerobno	Indikatorski sev: protimikrobna aktivnost
IM430	VF	<i>E. coli</i>	BHI, 37 °C, aerobno	Indikatorski sev: protimikrobna aktivnost
RN4220	UT	<i>S. aureus</i>	BHI, 37 °C, aerobno	Indikatorski sev: protimikrobna aktivnost
ATCC 29213	ATCC	<i>S. aureus</i>	BHI, 37 °C, aerobno	Indikatorski sev: protimikrobna aktivnost
IM132	VF	<i>S. aureus</i>	BHI, 37 °C, aerobno	Indikatorski sev: protimikrobna aktivnost
ATCC 14028	ATCC	<i>S. Typhimurium</i>	BHI, 37 °C, aerobno	Indikatorski sev: protimikrobna aktivnost

^aATCC – American Type Culture Collection, Rockville, ZDA; DSM – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Nemčija; LMG – Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent Belgija; VF – Inštitut za mikrobiologijo in parazitologijo, Veterinarska Fakulteta, UL; MF- Laboratorij za bakteriološko diagnostiko črevesnih infekcij, Inštitut za Mikrobiologijo in Imunologijo, Medicinska fakulteta, UL; IM – Inštitut za mlekarstvo in probiotike, Biotehniška fakulteta, UL; UT – S. Vesterlund, University of Turku, Finska; NCDO – National Collection of dairy Organisms, National Institute for dairying Reading, Anglija; BHI – brain heart infusion broth; MRS – deMan-Rogosa-Sharp agar.

se nadaljuje

nadaljevanje **preglednice 1: Seznam sevov uporabljenih v študiji in pogoji njihovega gojenja**

^aATCC – American Type Culture Collection, Rockville, USA; DSM - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Germany; LMG - Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium; VF – Institute of microbiology and parasitology, Veterinary Faculty, University of Ljubljana; MF – Laboratory for Bacteriological Diagnostics of Intestinal Infections, Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty, University of Ljubljana; IM – Institute of Dairy science and Probiotics, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana; UT – S. Vesterlund, University of Turku, Finland; NCDO – National Collection of Dairy Organisms, National Institute for Dairying Reading, England; BHI – brain heart infusion broth; MRS – deMan-Rogosa-Sharpe agar.

3.3.3 Celične kulture

3.3.3.1 Celična linija THP-1

Celice THP-1 so linija celic humane akutne monocitne levkemije. Celično linijo (ATCC TIB-202) smo dobili iz ameriške zbirke tipskih kultur (American Type Culture Collection – ATCC). Kadar celice THP-1 stimuliramo s PMA se iz monocitov diferencirajo v makrofage. Pri diferenciaciji monociti izgubijo proliferativne zmožnosti in pridobijo fagocitno aktivnost, se pritrdijo na podlago, izražajo površinske antigene in so sposobni proizvajati in izločati citokine (Schwende in sod., 1996).

3.3.3.2 Celična linija Caco-2

Celična linija Caco-2 je bila pridobljena iz adenokarcinoma debelega črevesa 72-letnega pacienta (Fogh in sod., 1977). Celično linijo smo dobili iz ameriške zbirke tipskih kultur (ATCC HTB 37). Celice Caco-2 v razmerah *in vitro* kažejo enake lastnosti kot enterociti. Celice Caco-2 dosežejo popolno diferenciacijo v 21. dnevu starosti po doseženi konfluenci (Briske-Anderson in sod., 1997; Natoli in sod., 2012).

3.4 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA BLATA IN BIOPSIJSKIH VZORCEV HUMANE ČREVESNE SLUZNICE

3.4.1 Pridobitev vzorcev blata in biopsijskih vzorcev humane črevesne sluznice

Odvzem biopsijskih vzorcev je potekal na Enoti za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano, na Kliniki za pediatrijo, UKC v Mariboru, kjer je bilo poskrbljeno za varnost preiskovancev. Vzorci so bili odvzeti iz črevesa 15-ih otrok, ki so bili zaradi suma na KVČB podvrženi endoskopskim preiskavam črevesa na Enoti za pediatrično gastroenterologijo, hepatologijo in prehrano, Klinike za pediatrijo, UKC v Mariboru. Za namen raziskave sta bila odvzeta po dva dodatna biopsijska vzorca in sicer eden iz terminalnega ileuma in eden iz kolona. Biopsijske vzorce smo takoj premestili v sterilne krioviale, zamrznili v tekočem dušiku in shranili do obdelave pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorce blata so udeleženci raziskave prostovoljno in samostojno shranili dan pred endoskopskim pregledom. Do prihoda na Kliniko za pediatrijo so prostovoljci vzorce hranili v sterilnih posodicah pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po prihodu na Kliniko za pediatrijo so uslužbenci klinike vzorce blata prenesli v zamrzovalnik (na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$). Raziskava je bila odobrena s strani Državne komisije za medicinsko etiko Republike Slovenije (41/12/11).

3.4.2 Obdelava pridobljenih vzorcev

3.4.2.1 Mikrobiološke analize blata

Vzorce blata, ki smo jih do analize hranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, smo najprej odmrznili in zatem 0,1 g blata odtehtali v sterilno centrifugirko. Odtehtanemu vzorcu smo dodali 9,9 g anaerobnega diluenta (1 g peptona/L; 2 g želatine iz prašičje kože/L; 8,5 g NaCl/L in 0,557 g L-cisteina/L). Posamezne vzorce smo zaporedno redčili do redčitve 10^{-6} . Ustrezne redčitve osnovnega vzorca smo razmazali na ustrezno gojišče (**preglednica 2**). Po končani inkubaciji smo prešteli kolonije in rezultate izrazili v KE/g blata.

3.4.2.2 Mikrobiološka analiza vzorcev črevesne sluznice

Biopsijske vzorce smo stehtali, sprali in v predhodno razkuženem homogenizatorju homogenizirali v 1200 μL anaerobnega diluenta. Na različna selektivna gojišča

(preglednica 2) smo razmazali po 100 µL homogenizata. Po končani inkubaciji smo prešteli kolonije in rezultate izrazili v KE/mg biopta.

Preglednica 2: Seznam uporabljenih gojišč za mikrobiološke analize blata in biopsijskih vzorcev

Table 2: The list of culture media used in microbiological analyses of stools and biopsies

Ime gojišča	Proizvajalec	Selektivnost	Inkubacija
ROGOSA	Merck, Germany, 1.105413.0500	<i>Lactobacillus</i> spp.	37°C/48-72 h; anaerobno
TOS+mup ^a	Yakult Honshu, Japan	<i>Bifidobacterium</i>	37°C/48-72 h; anaerobno
KAA	Laboratorios Conda, Španija, 1027	<i>Enterococcus</i>	37°C/48-72 h; aerobno
MANITOL SALT PHENOL-RED	MG Scientific, ZDA, 211116	<i>Staphylococcus</i>	37°C/72 h; aerobno
DHL	Neogen Corporation, ZDA, 7457	<i>Enterobacteriaceae</i>	37°C/24 h; aerobno
CHROMOCULT	Merck, Nemčija, 1.10426.0500	koliformne bakterije	37°C/24 h; aerobno
URiselect	ChroMgar, Francija, RT410	<i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>Pseudomonas</i>	37°C/24 h; aerobno
CATC	Merck, Nemčija, 1.10279.0500	<i>Enterococcus</i>	37°C/24 h; aerobno

^amup- mupirocin, dodan v koncentraciji 50 µg/mL

^amup- mupirocin, added at a concentration of 50 µg/mL

3.5 IZOLACIJA BAKTERIJSKIH SEVOV IZ HUMANE ČREVESNE SLUZNICE

3.5.1 Izolacija bakterij iz rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* iz človeške črevesne sluznice

Iz vsakega selektivnega gojišča (Rogosa in TOS+mup) smo izolirali po 15 kolonij, izraslih po nacepljanju posameznega biopsijskega vzorca. Izbrane kolonije smo 5-krat zaporedno precepili na agar MRS z dodanim cisteinom (0,05 %) za laktobacile in na agar MRS z dodanim cisteinom (0,05 %) in mupirocinom (50 mg/L) za bifidobakterije. Po vsakem precepljanju smo z mikroskopiranjem po Gram-u obarvanih kolonij in vzporednim precepljanjem na kromogeno gojišče UriSelect preverjali čistost kolonij. Pridobljene čiste kulture izolatov, ki so kazale pod mikroskopom tipične morfološke lastnosti laktobacilov in bifidobakterij, smo shranili pri – 80 °C v bujonu MRS z dodanim cisteinom (0,05 %) in glicerolom (30 %).

3.5.1.1 Denuracijska tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (DHPLC)

Genomsko DNA (gDNA) smo iz čistih kultur izolirali s kompletom »Wizard genomic DNA purification kit« po navodilih proizvajalca. Z reakcijo verižnega pomnoževanja s polimerazo smo pomnožili variabilno regijo V6-V8 z začetnimi oligonukleotidi 0933F in 1407R ter pogoji pomnoževanja, ki so jih opisali avtorji Domann in sod. (2003). Analize DHPLC so opravili v Centru za Mikrobiologijo, Zavoda za javno zdravstvo Maribor.

3.6 IDENTIFIKACIJA IZOLIRANIH BAKTERIJ

3.6.1 Genotipizacija izolatov s pomočjo metode RAPD-PCR

Za pridobitev genomske DNA (gDNA) smo posamezno kolonijo čiste kulture zavreli v 15 μ L pufra Flexi (Promega, ZDA, M8301) pri 99 °C za 15 min. Za naključno pomnoževanje polimorfne DNA z verižno reakcijo s polimerazo (RAPD-PCR) smo uporabili tri naključne začetne oligonukleotide, ki so navedeni v **preglednici 3**.

Preglednica 3: Pregled uporabljenih začetnih oligonukleotidov v metodi RAPD-PCR s pripadajočimi programi

Table 3: Nucleotide sequences of oligonucleotide primers used in RAPD-PCR method with corresponding programs

Ime oligonukleotida	Zaporedje nukleotidov (5' to 3')	Program za PCR	Referenca
M13	GAGGGTGGCGTTCT	94 °C 2 min	1×
		94 °C 1 min	
		42 °C 20 sek	40×
		72° C 2 min	
		72 °C 10 min	1×
1254	CCGCAGCCAA	95 °C 5 min	
		36 °C 5 min	4×
		72 °C 5 min	
		95 °C 1 min	
		36° C 1 min	30×
KGT-80	CGCGTGCCCA	72 °C 2 min	
		72 °C 10 min	1×
		95 °C 2 min	1×
		95 °C 1 min	
		37 °C 2 min	30×
		72° C 2 min	
		72 °C 5 min	1×

Elektroforeza je potekala v 2 % agaroznem gelu pri 50 V približno 5 ur. Gele smo obarvali s SYBR Safe ter pregledali pri UV svetlobi s sistemom za dokumentacijo gelov in analizo slik Syngene Chemigenius2.

3.6.2 Ugotavljanje nukleotidnega zaporedja 16S rDNA

Izbrane izolate smo identificirali do vrste na podlagi ugotavljanja nukleotidnega zaporedja 16S rDNA. Iz 1 mL bakterijske kulture, inkubirane 18 h, smo izolirali gDNA

po protokolu proizvajalca kompleta reagentov »Wizard genomic DNA purification kit«. Pred izolacijo gDNA smo bakterijske celice tretirali z mešanico lizocima (5 mg/mL) in mutanolizina (5 U/mL). Variabilno regijo V1-V3 gena za 16S rRNA smo pomnožili po že opisanem postopku po Klijn-u in sod. (Klijn in sod., 1991). Pomnožke DNA smo po navodilih očistili s kompletom »Wizard SV Gel and PCR Clean-up System« in njihovo dolžino preverili z elektroforezo v 1 % agaroznem gelu. Sekvenciranje DNA je izvedlo podjetje Microsynth (Švica). Dobljena nukleotidna zaporedja smo primerjali z zaporedji deponiranimi v podatkovni zbirki GenBank, z algoritmom NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

3.6.3 Za *L. rhamnosus* GG[®] - specifična PCR reakcija

Genomsko DNA smo izolirali po protokolu proizvajalca kompleta reagentov »Wizard Genomic DNA Purification kit«. Genomsko DNA smo pomnožili po že opisanem postopku avtorjev Ahlroos in Tynkkynen (Ahlroos in Tynkkynen, 2009). Dolžino pomnožkov smo preverili z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu.

3.7 KARAKTERIZACIJA SEVOV

3.7.1 Fenotipska karakterizacija: izkoriščanje virov ogljika

3.7.1.1 Biolog MicroLog™ system: AN MicroPlate™

Izbrane seve in referenčne seve *L. casei* DN-114 001, *L. rhamnosus* LGG® in *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12® smo pripravili po navodilih proizvajalca (MicroLog user's guidebook). Bakterije smo na t.i. univerzalnem anaerobnem trdem gojišču (agar BUA, 70007) gojili 48 h pri 37 °C. Kolonije sevov smo s pomočjo sterilne vatenke resuspendirali do predpisane gostote v specifičnem gojišču (AN Inoculation Fluid, 72007). V metabolne mikrotitrne plošče, ogrete na sobno temperaturo, smo v vsako vdolbino z dehidriranim substratom inokulirali po 100 µL bakterijske suspenzije. Mikrotitrne plošče smo inkubirali v anaerobnih razmerah pri 37 °C za 24 h. Po 24-urni inkubaciji smo rezultate odčitali s čitalcem »Biolog MicroStation Reader™«. Za identifikacijo smo dobljene rezultate primerjali s podatkovno zbirko »AN database«.

3.7.1.2 Sistem API 50 CH

Sposobnost izkoriščanja različnih sladkorjev smo ugotavljali tudi s sistemom »API 50 CH«, po navodilih proizvajalca. Tudi pri tej metodi smo vključili referenčna seva DN-114 001 in LGG®.

3.7.2 Občutljivost za antibiotike

3.7.2.1 Fenotipsko ugotavljanje občutljivosti

Ugotavljali smo odpornost proti naslednjim antibiotikom: ampicilin, vankomicin, gentamicin, streptomycin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin, kloramfenikol, ciprofloksacin, enrofloksacin, teikoplanin in metronidazol. Osemnajst-urno bakterijsko kulturo smo sprali in resuspendirali v fiziološki raztopini, da je motnost ustrezala stopnji 1 po Mc Farlandovi lestvici. Resuspendirane seve smo z vateno palčko nanесли na 2 različna gojišča. Prvo gojišče je bilo sestavljeno iz 90 % agarja Mueller Hinton, 10 % agarja MRS in 0,05 % cisteina (Klare in sod., 2005). Drugo gojišče je bilo sestavljeno iz 90 % Iso-Sensitest agarja, 10 % agarja MRS in 0,05 % cisteina. Na površino gojišča,

nacepljenega s testnimi sevi, smo položili trakove E-test[®] z antibiotiki (BioMérieux, Francija). Plošče smo inkubirali pri 37 °C za 48 h v anaerobnih razmerah. Po inkubaciji smo po navodilih proizvajalca odčitali minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Za ovrednotenje odčitanih rezultatov smo upoštevali navodila EFSA (EFSA, 2012).

3.7.2.2 Ugotavljanje prisotnosti genov, povezanih z rezistenco proti tetraciklinu, eritromicinu in vankomicinu

Genomsko DNA smo izolirali s kompletom reagentov »Genomic DNA Purification kit«, po navodilih proizvajalca. Pred izolacijo smo 18-urno bakterijsko kulturo tretirali z mešanico lizocima (5 mg/mL) in mutanolizina (5 U/mL). Z uporabo metode PCR smo preverili prisotnost izbranih genov, povezanih z rezistenco proti eritromicinu (*ermA*, *ermB*), tetraciklinu (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetM*, *tetM/O*) in vankomicinu (*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*). Uporabili smo že opisane pogoje pomnoževanja in začetne oligonukleotide (Klein, 2011; Nawaz in sod., 2011).

3.8 VREDNOTENJE PROBIOTIČNIH LASTNOSTI

3.8.1 Ugotavljanje sposobnosti preživetja sevov v simuliranih gastrointestinalnih razmerah

Poleg izbranih sevov smo za primerjavo testirali še referenčna seva *L. rhamnosus* GG[®] in *B. animalis* spp. *lactis* BB-12[®]. Osemnajst-urno bakterijsko kulturo smo najprej inkubirali 3 h v simuliranem želodčnem soku (pepsin 3 g/L) z vrednostjo pH 3 oz. 7. Po 3-urni inkubaciji smo seve centrifugirali in odlili simulirani želodčni sok. Usedlini z bakterijami smo dodali simuliran črevesni sok (0,1 % pankreatina in 0,3 % žolčnih soli) z vrednostjo pH 8. V obeh primerih smo s stresanjem, pri 200 RPM simulirali peristaltiko. Med obema inkubacijama smo seve vzorčili na začetku inkubacije, po 90 in po 180 minutah. Število preživelih celic bakterij smo ugotavljali z metodo štetja na ploščah, pri kateri je inkubacija potekala 48 h pri 37 °C v anaerobnih razmerah (Hacin in sod., 2008).

3.8.2 Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti z metodo lise na agarju (MLA)

Sposobnost izbranih sevov za proizvodnjo protimikrobnih snovi smo testirali z metodo lise na agarju (MLA). Poleg izbranih sevov iz človeške črevesne sluznice smo testirali še referenčni sev DN-114 001. Na označen del površine trdnega gojišča MRS v petrijevih ploščah smo nacepili 5 µL 18 h kulture testnih sevov. Po 24 urni inkubaciji v anaerobnih razmerah pri 37 °C smo plošče s testnimi sevi prelili s 5 mL poltrdega gojišča, ki je vsebovalo 50 µL 18 h kulture indikatorskega seva (**preglednica 1**). Po 24 urni inkubaciji pri 37 °C v anaerobnih razmerah smo izmerili cone inhibicije rasti indikatorskih sevov (Bogovic-Matijasic in Rogelj, 1998; Tagg in sod., 1976).

3.8.3 Produkcija mlečne in očetne kisline

Osemnajst-urne kulture v modificiranem gojišču MRS smo centrifugirali in odvzeli supernatant. Koncentracijo mlečne kisline smo določali spektrofotometrično po protokolu po Oser-ju (Oser, 1965), medtem ko smo koncentracijo očetne kisline določali s plinsko kromatografijo. Iz supernatantov smo očetno kislino pridobili z 2-kratno ekstrakcijo z dietil etrom (Holdeman in sod., 1977). V ta namen smo uporabili

plinski kromatograf Hewlett Packard 5890A (HP, ZDA) s kapilarno kolono Nuko (Supelco, ZDA). Temperatura injektorja je bila 185 °C, temperatura detektorja pa 290 °C. Začetna temperatura je bila 75 °C, zatem je temperatura naraščala vsako minuto za 14 °C, dokler ni dosegla 160 °C. Volumen injiciranega vzorca je bil 1 µL. Ocetno kislino smo identificirali na osnovi primerjave retencijskega časa v vzorcu, z retencijskim časom standardne raztopine očetne kisline (0,525 g/L) in kvantificirali z uporabo internega standarda (krotonska kislina 1 g/L).

3.8.4 Imunomodulacija: proučevanje vpliva izbranih sevov na citokinski odziv celične linije THP-1

3.8.4.1 Gojenje celic THP-1

Delo s celicami je potekalo v sterilnih pogojih, v mikrobiološki komori. Celice THP-1 smo gojili v gojišču RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, ZDA) z dodanimi L-glutaminom (2 mM), β-merkaptotanolom (0,05 mM), glukozo (4,5 g/L), Na-piruvatom (1 mM), 5 mL/500 mL mešanico antibiotikov streptomicina (100 µg/mL) in penicilina (100 U/mL) in dezaktiviranim FBS (10 %). Za gojenje celic smo uporabili polistirenske platenke s površino 75 cm², v katere smo prenesli celice, resuspendirane v gojišču. Gojišče smo menjavali 3-krat tedensko. Celice THP-1 smo presadili v ploščice s 24 vdolbinami takrat, ko so se te začele deliti tako, da je bila končna koncentracija približno 5×10⁵ celic/mL. Celice smo šteli s pomočjo hemocitometriške ploščice.

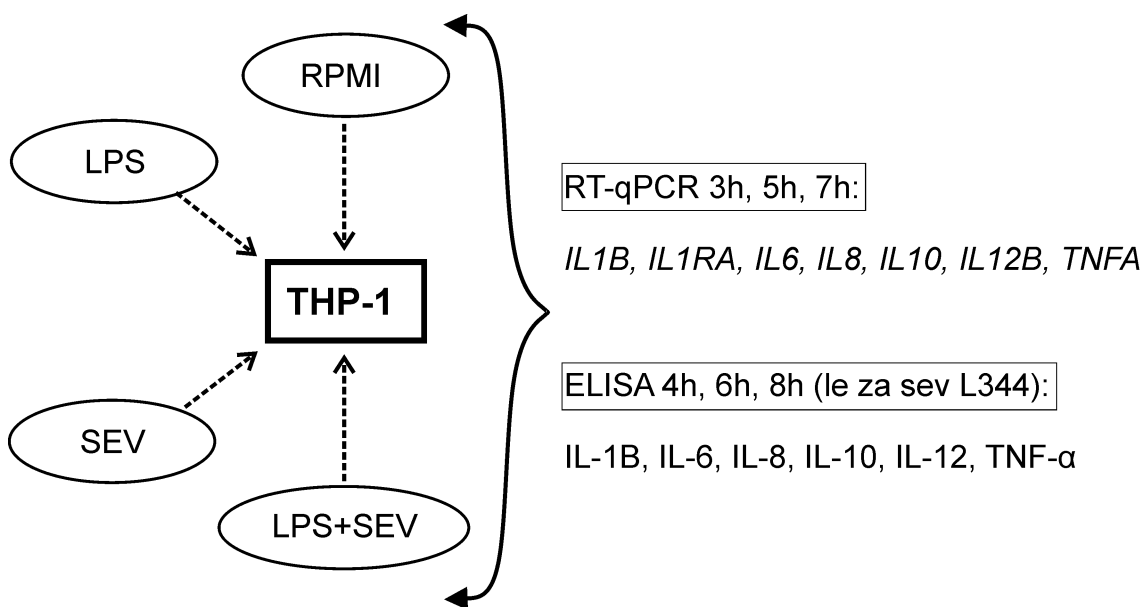
3.8.4.2 Priprava celic THP-1 za preskuse

Celice THP-1, namenjene preskusom, smo nasadili v plošče s 24 vdolbinami. Uporabili smo celice med 8. in 12. pasažo. Vsaka vdolbina je vsebovala približno 1×10⁶ celic. Diferenciacijo celic THP-1 v makrofage smo dosegli z dodajanjem PMA (10 ng/mL) v gojišče RPMI. Plošče smo inkubirali 24 h pri 37 °C v aerobnih razmerah s 5 % CO₂. V diferenciranem stanju so se celice THP-1 pritrdile na dno vdolbine. Pritrjene celice smo sprali in dodatnih 24 ur gojili v gojišču RPMI brez PMA in antibiotikov.

V tri vzporedne vdolbine z diferenciranimi celicami THP-1 smo nanesti po 1 mL:

- gojišča RPMI 1640, ki je predstavljal kontrolo
- v gojišču RPMI 1640 resuspendiranega seva v koncentraciji $\sim 10^8$ KE/mL
- gojišča RPMI 1640 z dodanimi lipopolisaharidi (LPS) *E. coli* O111:B4 v končni koncentraciji 0,4 μ g/mL
- v gojišču RPMI 1640 resuspendiranega seva ($\sim 10^8$ KE/mL) in LPS (v končni koncentraciji 0,4 μ g/mL)

Tako pripravljene plošče smo do vzorčenja inkubirali v aerobnih razmerah pri 37 °C s 5 % CO₂.



Slika 1: Shematski prikaz poteka poskusov s celično linijo THP-1

Figure 1: Schematic representation of the experiments with THP-1 cell line

3.8.4.3 Ugotavljanje vpliva bakterijskih sevov na imunski odziv celic THP-1

3.8.4.3.1 Ovrednotenje izražanja genov za citokine z metodo obratne transkripcije in verižnega pomnoževanja s polimerazo v realnem času (RT-qPCR)

Po 3, 5 in 7-ih urah inkubacije smo iz vdolbin s stimuliranimi in ne-stimuliranimi kulturami celic THP-1, odstranili gojišče in celice sprali s pufrom PBS. Spranim celicam THP-1 smo dodali po 300 μ L reagenta Trizol. Suspenzijo smo prenesli v čiste mikrocentrifugirke in vzorce do analize shranili pri -80 °C. Celokupno RNA smo izolirali po navodilih proizvajalca reagenta Trizol. DNA iz vzorcev smo odstranili z uporabo komercialnega kompleta »Turbo DNA-free kit«. Koncentracijo izolirane RNA smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop. RNA smo prepisali v komplementarno DNA (cDNA) s komercialnim kompletom »High capacity cDNA reverse transcription kits«. Pri vseh naštetih korakih smo upoštevali navodila proizvajalcev. Dobljeno cDNA smo shranili pri -20 °C. Poleg citokinov, ki smo jih analizirali z metodo RT-qPCR (oz. ELISA), smo vključili še antagonist receptorja IL-1 (IL-1 RA). Pri metodi RT-qPCR smo uporabili princip TaqMan proizvajalca Applied Biosystems in delali po navodilih proizvajalca. Izbor citokinov in uporabljeni kompleti reagentov so zbrani v **preglednici 4**. Med 12 vzdrževalnimi geni za evkariontske celice, ki jih v ta namen največkrat uporabijo, smo izbrali gen za receptor za transferin (TFRC; Reagent RT² profiler PCR array control plates). Izražanje genov smo ovrednotili z metodo $\Delta\Delta$ Ct (Pfaffl, 2001). Rezultate smo podali kot razmerje relativnega izražanja v primerjavi z ne-stimuliranimi celicami THP-1. Prikazani rezultati so povprečje treh paralelk. Vse reakcije PCR v realnem času smo izvedli v 2 redčitvah in v 2 tehničnih ponovitvah. Statistično značilne razlike med vzorci smo ovrednotili s Studentovim t-testom. Vrednosti p , ki so bile manjše od 0,05, smo upoštevali kot statistično značilne.

3.8.4.3.2 Ovrednotenje citokinov z metodo encimskega imunskega testa (ELISA)

Po 4, 6 in 8-ih urah smo prenesli vzorce iz mikrotitrskih plošč v čiste mikrocentrifugirke. Supernatante pridobljene z 10 minutnim centrifugiranjem pri 4 °C in 12 000 \times g, smo do opravljanja meritev hranili pri -20 °C. V **preglednici 4** je seznam

citokinov, ki smo jih ovrednotili z metodo ELISA, ter uporabljenih kompletov reagentov. Metodo smo izvedli po navodilih proizvajalca (eBioscience, ZDA).

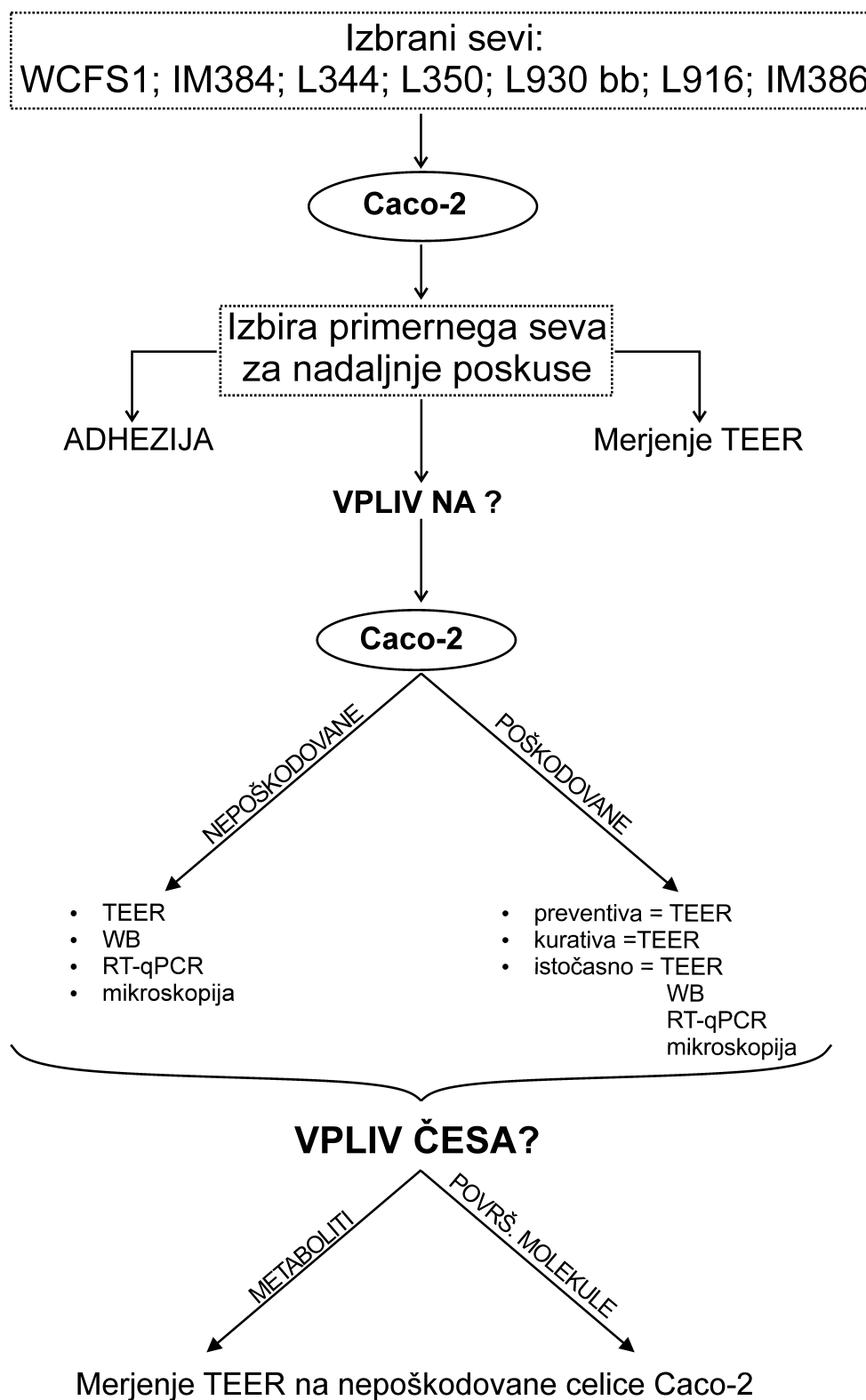
Preglednica 4: Seznam uporabljenih kompletov reagentov za analize z metodama RT-qPCR in ELISA

Table 4: The list of reagent kits used for RT-qPCR and ELISA analyses

Ime	Oznaka	Kat. št. in proizvajalec kompletov reagentov za RT-qPCR	Kat. št. in proizvajalec kompletov reagentov za ELISA
Interleukin-1 β	IL-1 β	Hs01555410_m1; Applied Biosystems (ZDA)	88-7010-88; eBioscience (ZDA)
Antagonist receptorja IL-1	IL-1 RA	Hs00893626_m1; Applied Biosystems (ZDA)	/
Interleukin-6	IL-6	Hs00985639_m1; Applied Biosystems (ZDA)	BMS213/2MST; eBioscience (ZDA)
Interleukin-8	IL-8	Hs00174103_m1; Applied Biosystems (ZDA)	BMS204/3MST; eBioscience (ZDA)
Interleukin-10	IL-10	Hs00961622_m1; Applied Biosystems (ZDA)	88-7106-88; eBioscience (ZDA)
Interleukin-12	IL-12	Hs01011518_m1; Applied Biosystems (ZDA)	BMS2013MST; eBioscience (ZDA)
Dejavnik tumorske nekroze- α	TNF- α	Hs01113624_g1; Applied Biosystems (ZDA)	BMS238MST; eBioscience (ZDA)
Transferin receptor	TFRC	Hs00951083_m1; Applied Biosystems (ZDA)	/
TaqMan Universal Master Mix II	MM II	4440038; Applied Biosystems (ZDA)	/

3.8.5 Proučevanje vpliva izbranih sevov na transepitelno električno upornost (TEER) celic Caco-2

Shema na **sliki 2** prikazuje potek preskusov sklopa proučevanja vplivov bakterijskih sevov iz črevesne sluznice na funkcionalnost tesnih stikov med celicami Caco-2 *in vitro*.



Slika 2: Shematski prikaz poteka poskusov s celično linijo Caco-2

Figure 2: Schematic representation of the experiments with Caco-2 cell line

V prvi fazi smo celice Caco-2 stimulirali z različnimi bakterijskimi sevi v različnih koncentracijah. Na podlagi tega smo za nadaljnje poskuse izbrali seve, ki so povišali TEER celic Caco-2. V drugi fazi smo raziskali, ali so izbrani sevi zmožni zadržati zmanjšanje TEER, izzvanega z biološkim (IL-1 β) ali kemijskim (PDB) poškodovanjem tesnih stikov med celicami Caco-2. V tretji fazi pa smo celice Caco-2 stimulirali z inaktiviranimi bakterijskimi celicami in z njihovimi supernatanti, z namenom ugotavljanja vloge sestavin celičnega ovoja bakterij in/ali bakterijskih metabolitov pri delovanju na funkcionalnost tesnih stikov.

Spremembe v funkcionalnosti tesnih stikov smo ugotavljali na različnih nivojih in sicer z merjenjem transepitelne električne upornosti po času (TEER), z ugotavljanjem izražanja genov za gradnike tesnih stikov (RT-qPCR), z ugotavljanjem prisotnosti beljakovin celičnih stikov z metodo »western blot« in z vizualizacijo fluorescenčno označenih beljakovin, ki lahko pokaže razlike v količini posameznih beljakovin tesnih stikov in njihovo prerazporeditev.

3.8.5.1 Gojenje celic Caco-2

Delo s celicami je potekalo v sterilnih pogojih, zagotovljenih z uporabo mikrobiološke komore. Celice Caco-2 smo gojili v gojišču DMEM z dodanim FBS (10 %) in gentamicinom (50 μ L/mL). Gojišče smo menjavali 2-krat tedensko. V vseh preskusih smo uporabili celice Caco-2 v 33. pasaži, po 21 dneh diferenciacije. Za gojenje celic do potrebne pasaže (33. pasaže) smo uporabljali polistirenske platenke s površino 75 cm². Celice so v 75 cm² platenkah dosegle konfluentno rast v približno 5 dneh. Pred presaditvijo smo celicam odsesali gojišče, jih sprali s pufrom HBSS, dodali 2,5 mL 0,125 % Trypsin/EDTA in inkubirali 5 min pri 37 °C. Celice smo zatem prešteli s pomočjo hemocitometriške ploščice.

3.8.5.2 Priprava celic Caco-2 za preskuse

Celice Caco-2 smo gojili na filtrskih vstavkih s poliestersko membrano, površine 1,12 cm² z 0,4 μ m velikimi porami, vstavljenih v mikrotitrne plošče z 12-imi vdolbinami (Transwell, Corning, ZDA). V zgornji prekat smo nanašali po 0,5 mL gojišča, v spodnji

pa po 1,5 mL. V vsako vdolbino smo nasadili po 7×10^4 celic Caco-2. Pred vsakim preskusom je bilo v posamezni vdolbini približno 2×10^5 celic Caco-2/vdolbino. Štiriindvajset ur pred začetkom preskusa smo celicam zamenjali gojišče in dodali DMEM brez antibiotika. Celice Caco-2, katerim nismo dodali drugih dražljajev (kot so bakterijske celice, PDB ali IL-1 β), so pri vseh preskusih predstavljale negativno kontrolo.

3.8.5.2.1 Ugotavljanje sposobnosti adhezije izbranih sevov na celice Caco-2 v razmerah *in vitro*

Sposobnost adhezije izbranih bakterijski sevov smo ugotavljali v razmerah *in vitro* na celični liniji Caco-2. Poleg izbranih sevov smo testirali tudi referenčni sev *L. rhamnosus* LGG[®]. Za adhezijo smo uporabili celice Caco-2 v 33. pasaži in po 21-ih dneh diferenciacije. Celice Caco-2 smo nasadili na poliesterske membrane v nosilcih »Transwell«. V vsakem preskusu je bilo število celic približno 2×10^5 /vdolbino ($1,8 \times 10^5/\text{cm}^2$). Štiriindvajset ur pred poskusom smo celicam Caco-2 zamenjali izrabljeno gojišče s svežim, brez dodanega antibiotika. Na dan poskusa smo bakterijske kulture centrifugirali, bakterijske celice dvakrat sprali s PBS in jih resuspendirali v gojišču DMEM brez antibiotika. Koncentracijo bakterij smo pred vsakim preskusom uravnali na približno 5×10^8 KE/mL. Po trikratnem spiranju celic Caco-2 s PBS smo v vsako vdolbino dodali po 500 μL bakterijske suspenzije s 5×10^8 KE/mL oz. 5×10^7 KE/mL in inkubirali 90 min pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂. Po inkubaciji smo celice Caco-2 3-krat sprali s sterilnim PBS, da smo odstranili nevezane bakterije. Spranim celicam Caco-2 smo dodali po 1 mL 0,05 % reagenta Triton X-100 in inkubirali 10 min pri sobni temperaturi, da so lizirale. Število vezanih bakterij smo ovrednotili z metodo štetja na ploščah na gojišču MRS z 0,05 % cisteina. Za ugotavljanje sposobnosti adhezije smo naredili 3 biološke poskuse. Pri vsakem biološkem poskusu smo imeli po 5 paralelnih ponovitev.

3.8.5.2.2 Merjenje transepitelne električne upornosti (TEER)

Za merjenje transepitelne električne upornosti smo celice Caco-2 pripravili kot je zapisano v točki 3.8.5.2. Za merjenje upornosti smo uporabljali aparat Millicell ERS-2

Volt-Ohm Meter, po navodilih proizvajalca. Vsaj dva dni pred izvedbo preskusa smo začeli z merjenjem TEER celic Caco-2. Celice smo uporabili takrat, ko so bile vrednosti stabilne ter okrog $1300 \Omega / \text{cm}^2$.

3.8.5.2.3 Ugotavljanje vpliva različnih koncentracij bakterij na TEER celic Caco-2

Za vse bakterijske seve smo preskusili različne koncentracije (**preglednica 5**) in izbrali optimalno, ki smo jo uporabili za nadaljnje testiranje. Poleg novih bakterijskih sevov iz črevesne sluznice smo vključili *L. plantarum* WCFS1, za katerega je bila dokazana sposobnost povečanja funkcionalnosti tesnih stikov, in *L. bulgaricus* IM348, startersko kulturo za izdelavo bolgarskih jogurtov, kot negativno kontrolo.

Preglednica 5: Seznam bakterijskih sevov in njihovih koncentracij (KE/mL) uporabljenih pri ugotavljanju vpliva bakterijskih sevov na TEER celic Caco-2

Table 5: The list of bacterial strains and concentrations (CFU/mL) used for determination of their influence on TEER values of Caco-2 cells

Oznaka bakt. seva	Vrsta	OD650 _{nm}	KE/mL
WCFS1	<i>L. plantarum</i>	0,42	8×10^8
		1,20	3×10^9
IM348	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	0,34	$1,3 \times 10^8$
		0,69	$2,9 \times 10^8$
L350	<i>L. paracasei</i>	0,47	$6,5 \times 10^8$
		1,04	$1,8 \times 10^9$
L930 bb	<i>L. fermentum</i>	0,61	$5,2 \times 10^8$
		1,07	$1,1 \times 10^9$
L916	<i>L. gasseri</i>	0,20	5×10^8
		0,69	$1,8 \times 10^9$
IM386	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	0,29	7×10^7
		0,50	$1,3 \times 10^8$
L344	<i>L. rhamnosus</i>	0,82	$2,4 \times 10^8$
		0,59	$8,8 \times 10^8$
		1,06	$1,9 \times 10^9$

Bakterijske celice smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.3.1, celice Caco-2 pa kot je opisano v poglavju 3.8.5.2. Vrednosti TEER celic Caco-2 smo merili 9 h s pomočjo aparata Millicell ERS-2 Volt/Ohm Meter, ki meri razliko v napetosti med apikalno in bazolateralno površino sloja celic.

TEER praznega filtra smo odšteli od TEER sloja celic kot prikazuje enačba 1:

$$R [\Omega \text{ cm}^2] = (R_v - R_f) [\Omega] \times P [\text{cm}^2] \quad \dots (1)$$

R je upornost sloja celic, R_v je upornost sloja celic in filtra, R_f je upornost filtra brez na njih gojenih celic in P je površina filtra.

Celicam Caco-2 smo odsesali gojišče pod filtrom in ga zamenjali s svežim gojiščem DMEM z dodanim FBS (10 %). Celicam na apikalni strani filtra smo odsesali gojišče DMEM in jim dodali 500 μL gojišča DMEM z 10 % FBS, v katerem smo resuspendirali bakterijske seve. Vsako uro (skupno 9 h) smo merili vrednosti TEER celic Caco-2. Vsak preskus smo opravili v treh paralelkah. Vrednosti TEER, izmerjene na celicah Caco-2, tretiranih z bakterijami, smo primerjali z vrednostmi TEER kontrolne skupine.

3.8.5.2.4 Ugotavljanje vpliva izbranih sevov na nepoškodovane celice Caco-2

Celice Caco-2 smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.8.5.2. Celice smo stimulirali z dvema izbranimi bakterijama (*L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350) v koncentraciji $\sim 8 \times 10^8$ KE/mL oz. $\sim 4 \times 10^8$ KE/vdolbino.

V tri vzporedne vdolbine z diferenciranimi celicami smo nanesti po 500 μL :

- gojišča DMEM brez antibiotika (kontrolne celice Caco-2)
- gojišča DMEM brez antibiotika, z bakterijami posameznega seva ($\sim 4 \times 10^8$ KE/vdolbino)

Tako pripravljene plošče smo inkubirali v aerobnih razmerah pri 37 °C s 5 % CO_2 in vsako uro merili TEER. Izvedli smo 3 biološke poskuse. Pri vsakem biološkem poskusu smo za vsak dražljaj imeli po tri tehnične paralelke (3-krat kontrolne celice Caco-2 in 3-krat z bakterijami stimulirane celice Caco-2). Vzorcili smo takrat, ko je bila izmerjena vrednost TEER najvišja. Vzorce smo naknadno pregledali z različnimi metodami (RT-qPCR, »western blot« in fluorescenčno mikroskopiranje).

3.8.5.2.5 Ugotavljanje vpliva izbranih sevov na (bio)kemijsko poškodovane celice Caco-2

Celice Caco-2 smo pripravili kot je zapisano v poglavju 3.8.5.2. Z namenom porušanja tesnih stikov med epitelnimi celicami Caco-2 smo celicam na bazalni strani dodali IL-1 β (v končni koncentraciji od 10 do 25 ng) ali na apikalni strani PDB (v končni koncentraciji 5 μ M).

Vpliv izbranih sevov laktobacilov (L344 in L350) na s PDB poškodovane tesne stike celic Caco-2 smo raziskali v več preskusih, ki so bili zasnovani tako, da smo ugotavljali morebitno preventivno ali kurativno delovanje bakterij. Preventivne učinke smo preverjali tako, da smo celice Caco-2 najprej stimulirali za 2,5 oz. 6 ur z bakterijami, zatem pa v zgornji prekat dodali PDB (v končni koncentraciji 5 μ M) in merili TEER. Kurativne učinke bakterij smo ugotavljali tako, da smo celice Caco-2 najprej 6 h inkubirali v prisotnosti PDB (v končni koncentraciji 5 μ M). Po 6-ih urah smo celicam Caco-2 v zgornjem prekatu odsesali gojišče s PDB, celice Caco-2 sprali s pufrom PBS in jim dodali sveže gojišče z resuspendiranim bakterijskim sevom in PDB. V tretjem primeru smo celicam Caco-2 istočasno dodali mešanico bakterij in PDB (5 μ M). Izvedli smo 3 biološke poskuse. Pri vsakem biološkem poskusu smo za vsak dražljaj imeli po tri tehnične paralelke. V vseh primerih smo uporabili bakterijske seve v koncentraciji $\sim 2 \times 10^7$ KE/mL oz. v koncentraciji $\sim 1 \times 10^7$ KE/vdolbino.

V tri vzporedne vdolbine z diferenciranimi celicami smo nanесли po 500 μ L:

- gojišča DMEM brez antibiotika
- gojišča DMEM brez antibiotika, z bakterijskim sevom v določeni koncentraciji ($\sim 1 \times 10^7$ KE/vdolbino)
- gojišča DMEM brez antibiotika z dodanim PDB v končni koncentraciji 5 μ M
- gojišča DMEM brez antibiotika, z bakterijskim sevom v določeni koncentraciji ($\sim 1 \times 10^7$ KE/vdolbino) in PDB (5 μ M)

Tako pripravljene plošče smo inkubirali v aerobnih razmerah pri 37 °C s 5 % CO₂ in vsako uro merili TEER.

Pri istočasnem učinkovanju bakterijskih sevov in PDB smo po 8-ih urah odvzeli vzorce in sicer po 3 paralelke vsake kombinacije za nadaljnje analize (RT-qPCR, »western blot« in konfokalno mikroskopiranje).

3.8.5.2.6 Ugotavljanje izražanja genov za beljakovine tesnih stikov z metodo obratne transkripcije in verižnega pomnoževanja s polimerazo v realnem času (RT-qPCR)

Po določenem času stimulacije celic Caco-2 z bakterijami in/ali PDB smo celicam odsesali gojišče in jih sprali s pufrom PBS. Spranim celicam Caco-2 smo dodali po 350 µL pufru RLT. Suspenzijo smo do analiz prenesli v čiste mikrocentrifugirke in vzorce shranili pri – 80 °C. Celokupno RNA smo izolirali po navodilih proizvajalca kompleta reagentov »RNeasy plus mini kit«. Koncentracijo celokupne RNA smo izmerili spektrofotometrično z aparatom NanoDrop. RNA smo prepisali v komplementarno DNA (cDNA) s komercialnim kompletom »High capacity cDNA reverse transcription kits«. Pri vseh naštetih korakih smo upoštevali navodila proizvajalcev. Dobljeno cDNA smo shranili pri – 20 °C.

Pri metodi RT-qPCR smo uporabili princip TaqMan proizvajalca Applied Biosystems in delali po navodilih proizvajalca. Izbor citokinov in uporabljeni kompleti reagentov so zbrani v **preglednici 4**. Med 12 vzdrževalnimi geni za evkariontske celice, ki jih v ta namen največkrat uporabijo, smo izbrali gen za beta aktin (Reagent RT² profiler PCR array control plates). Izražanje genov smo ovrednotili z metodo $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001). Rezultate smo podali kot razmerje relativne ekspresije v primerjavi z ne-stimuliranimi celicami THP-1. Prikazani rezultati so povprečje treh paralelk. Vse reakcije PCR v realnem času smo izvedli v 2 redčitvah in v 2 tehničnih ponovitvah. Statistično značilno razliko smo izračunali s Studentovim t-testom. *P* vrednosti, ki so bile manjše od 0,05, smo upoštevali kot statistično značilne.

Preglednica 6: Seznam uporabljenih kompletov pri metodi RT-qPCR

Table 6: The list of kits used in RT-qPCR method

Ime	Oznaka	Kataloška številka	Proizvajalec
Okludin	OCLN	Hs00170162_m1	Applied Biosystems (ZDA)
Klavdin-1	CLDN1	Hs00221623_m1	Applied Biosystems (ZDA)
Zonula occludens-1	TJP1	Hs01551861_m1	Applied Biosystems (ZDA)
Beta aktin	ACTB	Hs01551861_m1	Applied Biosystems (ZDA)
TaqMan Universal Master Mix II	MM II	4440038	Applied Biosystems (ZDA)

3.8.5.2.7 Semikvantitativno ugotavljanje beljakovine klavdin-1 z metodo »western blot«

Po določenem času stimulacije celic Caco-2 z bakterijami in/ali PDB smo celicam odsesali gojišče in jih sprali s pufrom PBS. Celicam smo dodali po 100 μ L 1-kratnega pufra RIPA z dodatkom PMSF (v končni koncentraciji 1 mM). Vzorčenje smo izvedli po navodilih proizvajalca. Suspenzijo smo prenesli v mikrocentrifugirke in vzorce do analiz shranili pri -80 °C. Vzorce smo pred analizo počasi odmrznili na ledu in jih sonicirali 3×45 sekund pri nizki intenziteti. Po sonikaciji smo koncentracijo beljakovin spektrofotometrično izmerili z aparatom NanoView. Na poliakrilamidni gel smo nanašali po 5 mg skupnih beljakovin. Ločevanje beljakovin z denuracijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo je potekalo na 10 % poliakrilamidnih gelih, ki smo jih pripravili po standardnem postopku tako, da smo zmešali 4,9 mL destilirane vode; 2,5 mL 1,5 mol/L Tris-HCl pH 8,8; 0,1 mL 10 % (m/v) NaDS; 3,3 mL 30 % akrilamida; 0,05 mL 10 % (m/v) APS in 0,005 mL TEMED (Laemmli, 1970). V aparatu za vertikalno elektroforezo Mighty small II SE 260 smo pripravili dvofazne pokončne poliakrilamidne gele dimenzij $80 \times 60 \times 1$ mm. Gel smo nalili do višine 1,5 cm pod zgornjim robom, ga prelili z 0,5 mL n-butanola in pustili, da je polimeriziral. Po polimerizaciji smo butanol sprali z destilirano vodo in osušili. Na 10 % ločevalni gel smo nanесли 1,5 cm 5 % nabijalnega gela v sestavi: 3 mL destilirane vode; 1,26 mL 0,5 mol/L Tris-HCl pH 6,8; 0,1 mL 10 % (m/v) NaDS; 0,833 mL 30 % akrilamida; 0,05 mL 10 % (m/v) APS in 0,005 mL TEMED. Gel smo pustili na sobni temperaturi, da je polimeriziral. Sestava elektroforeznega pufra je bila naslednja: 3 g/L TRIS; 14,4 g/L glicina; 1 g/L NaDS in destilirane vode do 1000 mL. Uporabili smo tudi standardno velikostno lestvico »MagicMark™ XP«. Elektroforeza je potekala pri konstantni moči

100 V približno 3 h. Za polsuhi prenos na membrano PVDF smo uporabili sistem »NovaBlot Multiphor II«, po navodilih proizvajalca. Prenos je potekal 120 min pri 47,144 mA. Membrano PVDF smo med rahlim stresanjem pri sobni temperaturi blokiral 45 min v blokirnem pufu (1-kratni TBS; 0,1 % Tween-20; 5 % (w/v) nemastno mleko v prahu). Membrano smo 3-krat po 5 min spirali s pufrom za spiranje (1-kratni TBS; 0,1 % Tween-20). Sledilo je inkubiranje membrane preko noči pri 4 °C z rahlim stresanjem, v prisotnosti primarnih protiteles v pufu, sestavljenem iz 1-kratnega TBS, 0,1 % Tween-20 in 5 % BSA (**preglednica 7**). Naslednji dan smo membrano sprali s pufrom za spiranje (3-krat po 5 min pri rahlem stresanju). Nato smo membrane 1 uro pri sobni temperaturi in pri rahlem stresanju inkubirali s sekundarnimi protitelesi z vezano hrenovo peroksidazo (HRP), v enakem pufu kot smo inkubirali primarna protitelesa. Sledilo je ponovno spiranje membrane (3-krat po 5 min v pufu za spiranje in 1-krat po 10 min v PBS). Še mokrim membranam smo dodali substrat za peroksidazo in počakali 3 min do pojava pozitivno obarvanih produktov. Reakcijo smo ustavili tako, da smo membrano sprali z destilirano vodo.

Preglednica 7: Seznam uporabljenih protiteles pri metodi »western blot«

Table 7: The list of antibodies used in »western blot« method

Ime beljakovine	Ime protitelesa	Redčitev/ končna konc.	Kat. številka	Proizvajalec
Klavdin-1	Claudin-1 Ab	1:1000	CY-4933P	Cell Signaling Technology (ZDA)
Beta actin	Actin Rabbit mAb	1:1000	CY-4970P	Cell Signaling Technology (ZDA)
/	Anti-rabbit IgG	1:2000	CY-7074S	Cell Signaling Technology (ZDA)

3.8.5.2.8 Analiza imunofluorescenčno označenih beljakovin tesnih stikov in aktinskih filamentov s konfokalnim mikroskopiranjem

Po določenem času stimulacije celic Caco-2 z bakterijami in/ali PDB smo celicam odsesali gojišče z dodatki in jih 3-krat sprali s pufrom PBS. Celice smo fiksirali tako, da smo jih za 15 min inkubirali v 4 % raztopini formaldehida pri sobni temperaturi. Po fiksaciji smo celice 8-krat sprali s pufrom PBS in jih inkubirali 15 min v mešanici PBS in Triton X-100 (0,01 %). V tem koraku smo celice permeabilizirali. Celice smo ponovno sprali 8-krat s PBS-jem in jih preko noči pri 4 °C inkubirali z barvilom za

aktinske filamente (**preglednica 8**). Drugi dan smo fiksirane celice Caco-2 sprali 10-krat s PBS, jim dodali primarna protitelesa proti beljakovini ZO-1 in jih inkubirali 1 h pri sobni temperaturi. Po inkubaciji s primarnimi protitelesi smo celice Caco-2 ponovno 8-krat sprali s PBS in jim dodali mešanico primarnih protiteles proti beljakovini okludin in sekundarnih protiteles proti primarnim za ZO-1. Celice smo inkubirali 1 h pri sobni temperaturi in jih zadnjič sprali 8-krat s PBS. Pri vsem do sedaj opisanem postopku so celice Caco-2 ostale pripete na poliesterske membrane vstavkov »Transwell«. Po fiksaciji, permeabilizaciji in barvanju smo s skalpelom izrezali poliestersko perforirano membrano in jo s pomočjo pritrditvenega medija pritrdili na nosilno objektno stekelce za mikroskopiranje. Tako pripravljene vzorce smo pregledali s konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP5 na Kemijskemu Inštitutu v Ljubljani.

Preglednica 8: Seznam uporabljenih protiteles pri mikroskopiranju s konfokalnim mikroskopom

Table 8: The list of antibodies used in confocal microscopy

Ime	Ime protitelesa/barvila	Končna konc.	Kat. številka	Proizvajalec
Okludin	Occludin monoclonal Ab	3 µg/mL	331588	Molecular Probes (ZDA)
Zonula occludens-1	ZO-1 Polyclonal Ab, rabbit	3 µg/mL	617300	Molecular Probes (ZDA)
/	Alexa Fluor® 594 Goat Anti-rabbit IgG	5 µg/mL	A11037	Molecular Probes (ZDA)
Aktinski filament	Alexa Fluor® 647 Phalloidin	200 enot/mL	A22287	Molecular Probes (ZDA)
Jedro	ProLong® Gold antifade reagent with DAPI	/	P36935	Molecular Probes (ZDA)

3.8.5.2.9 Ugotavljanje vpliva bakterijske ovojnice in metabolitov na funkcionalnost tesnih stikov celic Caco-2

Dan pred preskusom smo 18 h bakterijsko kulturo centrifugirali, odstranili gojišče MRS s cisteinom (0,05 %), sprali s PBS in resuspendirali v gojišču DMEM (brez antibiotika) v želeni koncentraciji. Tako pripravljenim bakterijam smo v gojišče DMEM dodali kombinacijo antibiotikov streptomycin in gentamicin (**preglednica 9**) in bakterije inkubirali pri 37 °C 24 h v anaerobnih razmerah. Istočasno smo bakterije 18 h pred preskusom nacepili v MRS s cisteinom (0,05 %) in jih inkubirali.

Preglednica 9: Koncentracije antibiotikov, uporabljene za inaktivacijo bakterijskih sevov

Table 9: The concentrations of antibiotics used for inactivation of the bacterial strains

Sevi	Koncentracija [KE/mL]	Dodana končna koncentracija gentamicina [$\mu\text{g/mL}$]	Dodana končna koncentracija streptomicina [$\mu\text{g/mL}$]
L344 <i>L. rhamnosus</i>	8×10^8	500	500
L350 <i>L. paracasei</i>	6×10^8	250	250

Na dan preskusa smo bakterijske kulture (tiste, ki niso bile izpostavljene antibiotikom) centrifugirali, sprali s PBS in resuspendirali v gojišču DMEM brez antibiotika, v željeni koncentraciji. Bakterijske seve, ki smo jih 24 h inkubirali v prisotnosti antibiotika, smo na dan preskusa nacepili na plošče in prešteli preživele bakterije. Iste bakterijske kulture smo centrifugirali, sprali s PBS in resuspendirali v isti količini gojišča DMEM brez antibiotika. Tako pripravljene seve smo dodali celicam Caco-2 in merili TEER. Istočasno smo želeno koncentracijo bakterij (tiste, ki niso bile izpostavljene antibiotikom) inkubirali 4 h anaerobno pri 37 °C v gojišču DMEM brez antibiotika. Po 4 h smo bakterije centrifugirali, odvzeli supernatant in ga še dodatno filtrirali (v nadaljevanju govorimo o sterilnem supernatantu DMEM). Tako dobljeni sterilni supernatant smo dodali celicam Caco-2 in tudi v tem primeru merili TEER.

Kombinacije, ki smo jih v tem preskusu dodali celicam Caco-2, so sledeče:

- gojišče DMEM brez dodanega antibiotika
- gojišče DMEM brez dodanega antibiotika z resuspendiranimi živimi bakterijami v koncentraciji $\sim 4 \times 10^8$ KE/vdolbino
- gojišče DMEM brez antibiotika z resuspendiranimi inaktiviranimi bakterijskimi celicami v koncentraciji $\sim 4 \times 10^8$ KE/vdolbino
- sterilni supernatant DMEM

3.9 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI EKSTRACELULARNIH BELJAKOVIN PRI IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVIH (L344 in L350)

3.9.1 Izolacija beljakovin S-sloja

En mL 18-urne bakterijske kulture smo centrifugirali ($10\ 000\times g/5$ min). Pelet smo sprali enkrat s PBS in ponovno centrifugirali pod že opisanimi pogoji. Spranemu peletu (~ 20 mg mokrih celic) smo dodali 200 μ L pufra Laemmli (Laemmli, 1970). Suspenzijo smo prekuhali na $100\ ^\circ\text{C}/90$ sekund in jo ohlajeno ponovno centrifugirali pri $13\ 000\times g/5$ min. Odvzeli smo supernatant in izvedli SDS-PAGE (denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza) po postopku opisanem v poglavju 3.8.5.2.7. Elektroforeza je potekala pri 100 V približno 3 h oz. dokler modra fronta nanašalnega pufra ni izginila iz gela. Po končani elektroforezi smo gel 2 h barvali z barvilom Coomassie (225 mL dH_2O ; 225 mL metanola; 0,5 g Coomassie moder; 50 mL očetne kisline). Po barvanju smo gel čez noč pri rahlem stresanju razbarvali s Coomassie razbarvalnim pufrom (437,5 mL dH_2O ; 25 mL metanola; 37,5 mL očetne kisline).

3.9.2 Izolacija na bakterijsko površino vezanih beljakovin

3.9.2.1 Izolacija z uporabo pufra CP

Dvesto mL 18 h bakterijske kulture smo centrifugirali na $3500\times g/10$ min pri sobni temperaturi. Pelet smo 2-krat sprali s pufrom PBS in ponovno centrifugirali. Po centrifugiranju smo pelet resuspendirali v 100 mL CP pufra (0,1 M citratno-fosfatni – 0,1 M NaCl; pH = 4,5) in inkubirali 10 min na sobni temperaturi. Bakterijske celice smo po inkubaciji centrifugirali ($16\ 000\times g/5$ min/sobna temperatura) in supernatant prefiltrirali skozi 0,22 μm filter (Baccigalupi in sod., 2005). Dobljene vzorce smo liofilizirali. Vzorce smo resuspendirali v 10 mL destilirane vode in izvedli dializo (2 h na sobni temperaturi v 1:1=CP pufer:voda; 2h na sobni temperaturi v vodi in 24 h na $4\ ^\circ\text{C}$ v vodi) skozi membrane za dializo (6-8 kDa). Izmerili smo koncentracijo površinsko izoliranih beljakovin s pomočjo aparature NanoView. Izvedli smo SDS-PAGE elektroforezo (10 % gel) po že opisanem postopku v poglavju 3.8.5.2.7.

3.9.2.2 Izolacija z uporabo 5 M LiCl

Dvesto mL 18 h bakterijske kulture smo centrifugirali na $2300\times g/10$ min pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pelet smo 2-krat sprali z mrzlim pufrom PBS in centrifugirali ponovno na $2300\times g/10$ min pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant smo odlili in stehali mokri pelet. Teža mokrega peleta je bila ~ od 5,5-6,5 g (kar je ~ 600-700 mg suhe biomase). Bakterije smo resuspendirali v mrzlem 5 M LiCl (1 mL LiCl na 10 mg suhe biomase) in inkubirali 15 min na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Med inkubacijo smo celice večkrat vorteksirali. Po inkubaciji smo bakterije centrifugirali ($9000\times g/10\text{min}/4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Supernatant smo filtrirali skozi $0,22\text{ }\mu\text{m}$ filter. Supernatant smo ultracentrifugirali skozi membrane s 3 kDa velikimi porami (Johnson in sod., 2013). Izmerili smo koncentracijo površinsko izoliranih beljakovin s pomočjo aparature NanoView. Izolirane in skoncentrirane beljakovine smo nanесли na 15 % gel in izvedeli SDS-PAGE po že opisanem protokolu v poglavju 3.8.5.2.7.

3.10 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Za statistično analizo podatkov smo uporabili programski paket Sigma Plot[®] (systat Software Inc., ZDA). Podatki so podani kot povprečne vrednosti s pripadajočimi standardnimi napakami. Statistično značilne razlike smo ovrednotili z enosmerno ANOVA in Tukey test mnogoterih primerjav ali z uporabo Studentovega t-testa. Za statistično značilne smo upoštevali tiste rezultate kjer je bila vrednost p manjša od 0,05.

4 REZULTATI

4.1 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA BLATA IN BIOPSIJSKIH VZORCEV HUMANE ČREVESNE SLUZNICE

Analizirali smo 30 biopsijskih vzorcev (terminalni ileum ali kolon) in 15 vzorcev blata. Ugotavljali smo prisotnost laktobacilov, bifidobakterij, *E. coli*, koliformnih bakterij, enterobakterij in enterokokov. Rezultati so zbrani v **preglednici 10**.

Preglednica 10: Število kolonijskih enot bakterij izraslih na selektivnih gojiščih, na katera smo nacepili vzorce blata, ileuma ali kolona

Rezultati predstavljajo vrednosti median KE v g oz. mg vzorca.

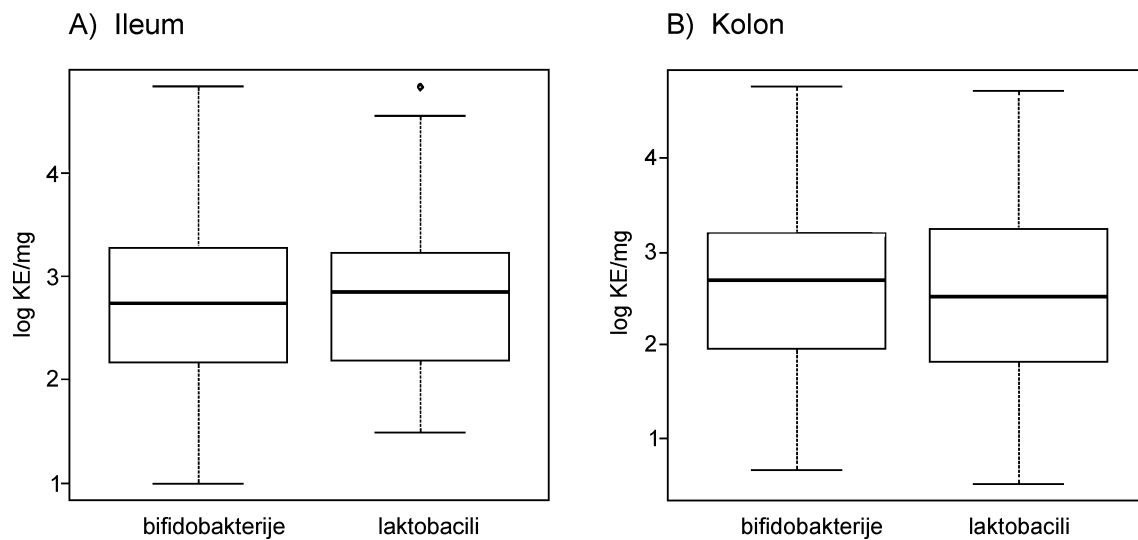
Table 10: Colony forming units of bacteria on selective growth media, used for plating of stool, ileum or colon samples

The results represent the median CFU values per g (stool) or mg (of sample).

	laktobacili	bifidobakterije	<i>E. coli</i>	koliformne bak.	enterobakterije	enterokoki
Blato [g]	3×10^5	5×10^6	1×10^4	2×10^5	2×10^4	5×10^2
Ileum [mg]	5×10^2	3×10^2	2×10^2	8×10^2	2×10^1	2×10^1
Kolon [mg]	2×10^2	3×10^2	7×10^1	3×10^2	2×10^1	2×10^1

Število vzorcev v vsaki skupini = 15; the number of samples in each group = 15

Iz **preglednice 10** je razvidno, da je bilo tako v blatu kakor v črevesni sluznici iz ileuma in kolona laktobacilov in bifidobakterij več kot *E. coli*, enterobakterij in enterokokov. Skupina koliformnih bakterij je bila približno enako zastopana kot laktobacili ali bifidobakterije.



Slika 3: Število laktobacilov in bifidobakterij v biopsijskih vzorcih ileuma (A) in kolona (B)
Rezultati so podani kot \log_{10} KE na mg vzorca. Pregledali smo 15 vzorcev iz ileuma in 15 vzorcev iz kolona.

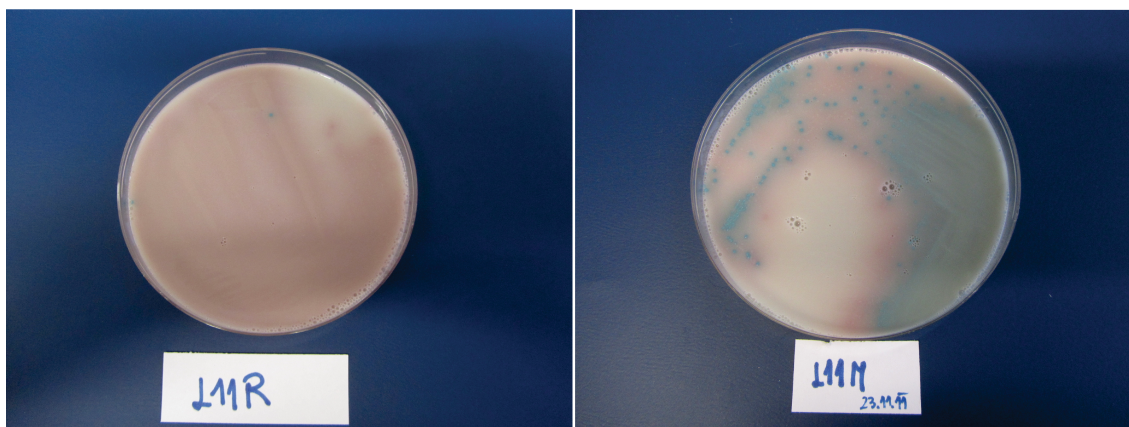
Figure 3: Viable counts of lactobacilli and bifidobacteria in ileum (A) and colon (B)
Results are expressed as \log_{10} CFU per mg of sample. Fifteen samples from ileum and from colon were examined, respectively.

Število laktobacilov in bifidobakterij v vzorcih črevesne sluznice, odvzete iz ileuma in kolona, se je gibalo med 10^1 in 10^4 KE/mg odvzetega tkiva (slika 3), pri čemer ni bilo velike razlike med različnima mestoma odvzema.

4.2 IZOLACIJA BAKTERIJ IZ RODU *Lactobacillus* IN *Bifidobacterium* IZ HUMANE ČREVESNE SLUZNICE IN NJIHOVA IDENTIFIKACIJA

Z namenom ugotavljanja sestave mikrobnih združb laktobacilov in bifidobakterij, ki so vezane na črevesno sluznico in ki niso le del prehodne črevesne mikrobiote ter pridobivanja novih probiotičnih sevov, smo iz biopsijskih vzorcev izolirali predstavnike omenjenih rodov.

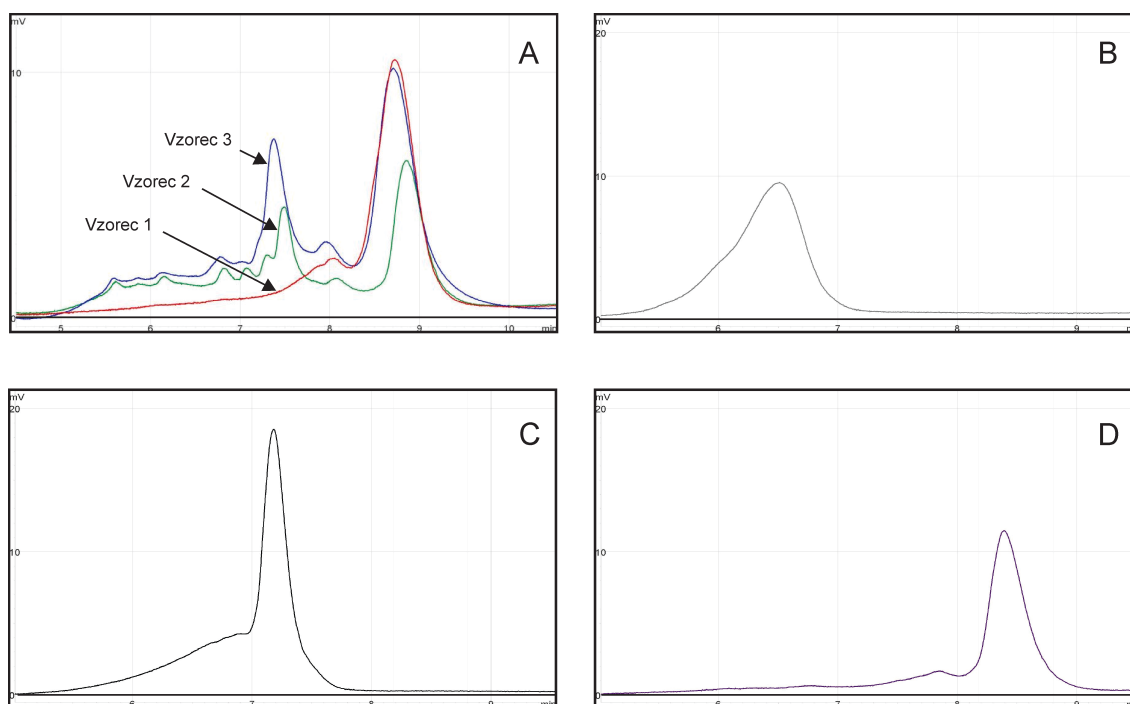
Iz vsakega vzorca tkiva, ki je bil predhodno homogeniziran v ustrezni raztopini in nacepljen na gojišči Rogosa in TOS z mupirocinom, smo naključno izbrali po 15 bakterijskih kolonij z vsakega od obeh gojišč. Bakterije smo na podlagi rasti na selektivnih gojišč in morfoloških lastnostih v prvem koraku identificirali kot potencialne laktobacile (Rogosa agar) in bifidobakterije (TOS agar). Sledilo je prečiščevanje z zaporednim precepljanjem in barvanje po Gramu. Tudi po večkratnem precepljanju so se nekateri izolati izkazali za mešane kulture, sestavljene iz različnih vrst laktobacilov. Ker je bilo na gojiščih Rogosa in TOS z mupirocinom težko razlikovati različne kolonije, smo v postopek prečiščevanja vključili nacepljanje na kromogeno selektivno gojišče URISelect (Rogelj in sod., 2013) (slika 4) in analizo kolonij z metodo DHPLC (slika 5). Slika 4 prikazuje primer mešane kulture, modre kolonije predstavljajo enterokoke medtem ko so prozorne kolonije na roza obarvani podlagi kultura laktobacilov.



Slika 4: Primer mešanih kultur na kromogenem gojišču URISelect

Figure 4: Example of mixed cultures on chromogenic growth medium URISelect

Z metodo DHPLC, ki omogoča ločevanje nukleinskih kislin na podlagi razlik v dolžini ali sestavi, smo analizirali pomnožke variabilne regije V6-V8 gena za 16S rDNA, pridobljene s PCR. Rezultati analize DHPLC so prikazani v obliki kromatogramov. Izolate iste vrste prepoznamo po enaki obliki krivulje in identičnih retencijskih časih. **Slika 5A** kaže primer čiste kulture (vzorec 1), pri kateri se je pokazal en izrazitejši vrh, in primera mešane kulture (vzorca 2 in 3), pri katerih sta se pokazala po dva vrhova.



Slika 5: Primeri DHPLC kromatogramov mešanih in čistih bakterijskih kultur

(A) Vzorec 1, pri katerem je viden le en vrh, predstavlja DHPLC profil čiste kulture. Pri vzorcih 2 in 3 je krivulja sestavljena iz več različnih vrhov, kar kaže na to, da vsebuje DNA več vrst bakterij. Na ostalih slikah (B, C in D) so predstavljeni kromatogrami čistih kultur treh različnih vrst laktobacilov: B – *L. plantarum*, C – *L. paracasei* in D – *L. fermentum*. Različne bakterijske vrste izkazujejo vrhove z različnim retencijskim časom (os x).

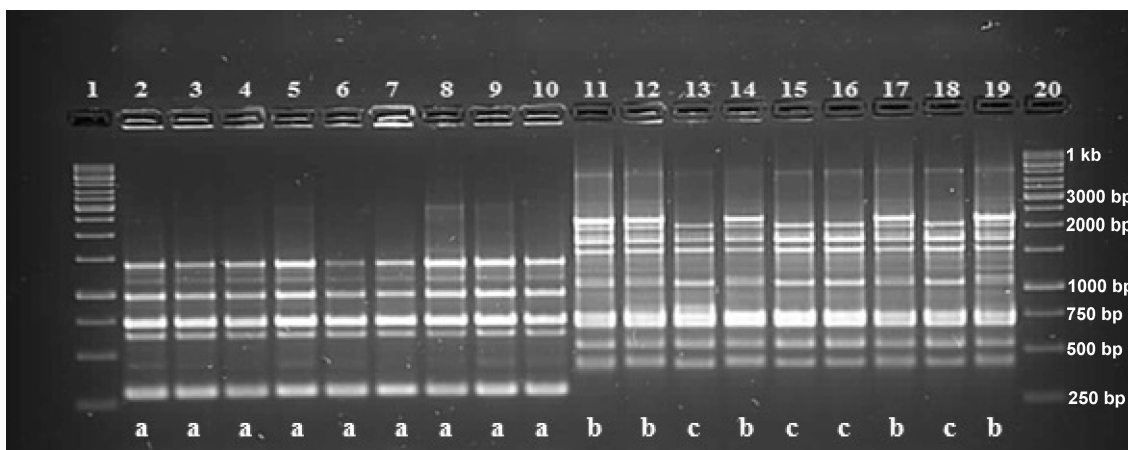
Figure 5: Representative DHPLC chromatograms of mixed and pure bacterial cultures

(A) Sample 1, indicated by single absorbance peak, represents DHPLC profile of pure culture. More than one absorbance peak is represented in Sample 2 and 3 profiles, indicating the presence of DNA of several bacterial species. Additional images (B, C, D) represent chromatograms of pure cultures of different lactobacilli species: B – *L. plantarum*, C – *L. paracasei* and D – *L. fermentum*. Different bacterial species are represented as single peaks with different retention times (x axis).

Slike 5B-D prikazujejo rezultate analiz treh naših čistih kultur laktobacilov iz vrst *L. plantarum*, *L. paracasei* in *L. fermentum*, ki smo jih predhodno identificirali s

sekvenciranjem. Razvidna je specifična oblika krivulj za različne vrste laktobacilov ter različni položaji vrhov, iz katerih odčitamo retencijski čas.

Z metodo RAPD in ob uporabi treh različnih začetnih oligonukleotidov (KGT-80, 1254 in M13) smo preverili raznolikost vseh 469 izolatov, od katerih jih je bilo 227 pridobljenih iz agarja Rogosa, 242 pa iz agarja TOS z mupirocinom (slika 6). Zaznali smo 20 različnih profilov RAPD in upoštevali, da naj bi vsak profil ustrezal posameznemu sevu. Zaradi tega smo v nadaljnje analize vključili 20 novih izolatov z različnimi profili RAPD. Primer rezultatov analize RAPD je podan na sliki 6. V prikazanem primeru smo 18 analiziranih izolatov razporedili v 3 skupine z istim vzorcem RAPD. S pomočjo RAPD-PCR profila smo tudi opazili, da lahko najverjetneje isti sevi kolonizirajo tako ileum kot kolon, kar je razvidno tudi iz slike 6.



Slika 6: Primer rezultatov analize RAPD-PCR z uporabo začetnega oligonukleotida 1254
Stolpec 1 in 20, standardna lestvica DNA, 1 kbp; stolpec 2-6, izolati iz ileuma prvega preiskovanca; 7-10, izolati iz kolona prvega preiskovanca; 11-14, izolati iz ileuma drugega preiskovanca; 15-19, izolati iz kolona drugega preiskovanca; a, b, c, oznake za različne vzorce RAPD.

Figure 6: An example of the results of RAPD-PCR analysis using oligonucleotide primer 1254
Lanes 1 and 20, 1 kbp DNA molecular weight marker; 2-6, profile of isolates from ileal sample of the first donor; 7-10, profile of isolates from colonic sample of the first donor; 11-14, profile of isolates from ileal sample of the second donor; 15-19, profile of isolates from colonic sample of the second donor; a, b, c, designations of different RAPD profiles.

Seve smo identificirali na podlagi sekvenciranja 16S rDNA. Vse domnevne bifidobakterije (izolati izrasli na gojišču TOS z mupirocinom), razen ene (identificirane kot *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*), so se izkazale za laktobacile. Iz

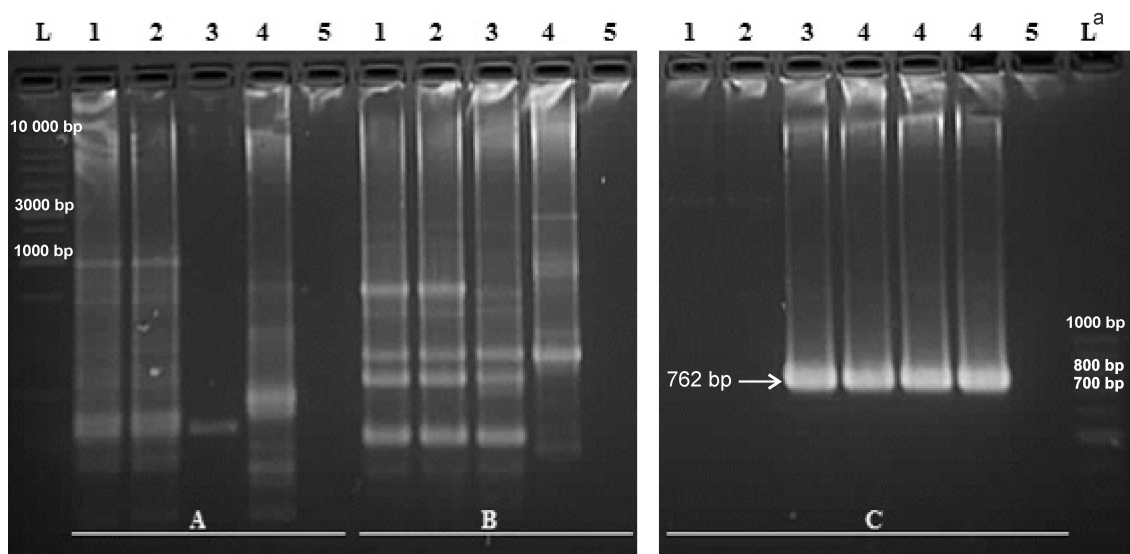
biopsijskih vzorcev smo izolirali in identificirali naslednje vrste laktobacilov: *L. paracasei* (35 %), *L. fermentum* (30 %), *L. plantarum* (15 %), *L. rhamnosus* (15 %) in *L. gasseri* (5 %) (**preglednica 11**).

Preglednica 11: Izvor identificiranih sevov iz humane črevesne sluznice

Table 11: The origin of identified strains from human intestinal mucosa

Izolat	Vrsta	Izvor biopsijskega vzorca				
		Mesto odvzema	Stanje črevesne sluznice	Oznaka preiskovancev	Spol	Starost [leta]
L248	<i>L. paracasei</i>	kolon	zdrava	a	F	7
L271	<i>L. paracasei</i>	kolon	obolela	b	M	15
L567 m	<i>L. paracasei</i>	ileum	zdrava	c	F	12
L350	<i>L. paracasei</i>	kolon	zdrava	d	M	18
L150 m	<i>L. paracasei</i>	ileum	zdrava	e	F	17
L203 s.m.	<i>L. paracasei</i>	ileum	obolela	f	M	18
L344	<i>L. rhamnosus</i>	kolon	zdrava	d	M	18
L930 a	<i>L. rhamnosus</i>	kolon	zdrava	g	M	14
L203 p	<i>L. rhamnosus</i>	ileum	obolela	f	M	18
L916	<i>L. gasseri</i>	ileum	zdrava	g	M	14
L911	<i>L. fermentum</i>	kolon	obolela	h	F	18
L928	<i>L. fermentum</i>	kolon	zdrava	g	M	14
L916 b.r.	<i>L. fermentum</i>	ileum	zdrava	g	M	14
B912	<i>L. fermentum</i>	kolon	obolela	h	F	18
L930 bb	<i>L. fermentum</i>	kolon	zdrava	g	M	14
B189	<i>L. fermentum</i>	ileum	obolela	f	M	18
L567 v	<i>L. plantarum</i>	ileum	zdrava	c	F	13
L150 v	<i>L. plantarum</i>	ileum	zdrava	e	F	17
L371	<i>L. plantarum</i>	ileum	obolela	b	M	15
IM386	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	kolon	zdrava	g	M	14

Zaradi razširjenosti seva *L. rhamnosus* LGG[®] v različnih funkcionalnih živilih in prehranskih dopolnilih smo preverili morebitno identičnost sevov vrste *L. rhamnosus* s sevom LGG[®]. V ta namen smo uporabili PCR in za sev LGG[®] specifične začetne oligonukleotide. Kot je razvidno iz **slike 7** je bil le sev označen z oznako L930a pozitiven na PCR specifičen za sev LGG[®], čeprav je bil RAPD profil različen. Glede na to, da so se profili RAPD preiskanih sevov *L. rhamnosus* razlikovali od tistega, ki je značilen za sev LGG[®] (**slika 7**), lahko sklepamo, da sev L930a ni enak sevu LGG[®]. Na to kaže tudi profil uporabe sladkorjev (**preglednica 12**).



Slika 7: Rezultati RAPD-PCR z uporabo začetnih oligonukleotidov 1254 (A) in KGT80 (B) in PCR z uporabo za sev LGG[®] specifičnih začetnih oligonukleotidov (C) za tri seve *L. rhamnosus* iz črevesne sluznice ter za sev LGG[®]
L: standardna lestvica DNA 1 kbp; L^a: standardna lestvica DNA 100 bp; 1: sev L203p; 2: sev L344; 3: sev L930a; 4: sev LGG[®]; 5: negativna kontrola.

Figure 7: The results of RAPD-PCR using oligonucleotide primers 1254 (A) and KGT80 (B) as well as the results of PCR using LGG[®] – strain specific primers (C) for three *L. rhamnosus* strains from intestinal mucosa and for LGG[®] strain
L: 1 kbp DNA molecular weight marker; L^a: 100 bp DNA molecular weight marker; 1: strain L203p; 2: strain L344; 3: strain L930a; 4: strain LGG[®]; 5: negative control.

4.3 KARAKTERIZACIJA IZBRANIH SEVOV

4.3.1 Fenotipska karakterizacija: izkoriščanje virov ogljika

Ugotavljali smo metabolno aktivnost 20 izbranih sevov laktobacilov in bifidobakterije iz črevesne sluznice in dveh referenčnih sevov (*L. casei* DN-114 001 in *L. rhamnosus* GG[®]) z uporabo sistema API 50 CH (BioMérieux, France). Primerjava rezultatov identifikacije s sistemom API z rezultati sekvenciranja 16S rDNA je pokazala, da fenotipska identifikacija s sistemom API ni zanesljiva, saj je bila vrsta rezultatov nepravilnih. Tako so bili predstavniki *L. paracasei* identificirani kot *L. plantarum* (2/7), predstavniki *L. fermentum* kot *L. salivarius* (1/6) ali *L. cellobiosus* (2/6), *L. rhamnosus* kot *L. paracasei* (1/4), *L. gasseri* kot *Leuconostoc mesenteroides* (1/1) in *B. animalis* subsp. *animalis* kot *L. paracasei* (1/1). V primeru vrste *L. plantarum* so se rezultati fenotipske identifikacije s sistemom API za vse tri preiskane seve ujemali z molekularno identifikacijo.

Vsi testirani sevi so bili sposobni fermentacije D-glukoze, D-galaktoze in eskulin železovega citrata, nobeden pa ni bil zmožen fermentacije glicerola, D- in L-ksiloze, L-ramnoze, glikogena, ksilitola, D-fukoze, D- in L-arabitola in kalijevega 2-ketoglukonata (**priloga A**). Sevi, ki smo jih na podlagi sekvenciranja 16S rDNA razvrstili v skupino S3 (*L. rhamnosus*) in skupino S4 (*L. paracasei*) so pokazali najboljšo sposobnost izkoriščanja različnih sladkorjev. V primerjavi s prej omenjenima skupinama so predstavniki skupine S2 (*L. fermentum*) sposobni izkoriščati pol manj sladkorjev.

Raznolikost v uporabi sladkorjev ni značilna le za bakterijsko vrsto, saj smo opazili velike razlike tudi med sevi znotraj iste vrste. Sevi z oznakami L350 (*L. paracasei*), L203p (*L. rhamnosus*) in L344 (*L. rhamnosus*) so sposobni fermentacije 26-ih ali 27-ih različnih testiranih sladkorjev, kar je veliko več v primerjavi z razširjenimi probiotičnimi sevi *L. casei* DN-114 001 (sposoben izkoriščati le 21 od testiranih sladkorjev) in *L. rhamnosus* GG[®] (sposoben izkoriščati le 18 od testiranih sladkorjev).

Poleg uporabe uveljavljanega sistema API 50 CH (BioMérieux, France) smo preskusili tudi uporabnost sistema za fenotipsko identifikacijo Biolog. V naši raziskavi se je

pokazalo, da je bila ponovljivost rezultatov preskušanja s sistemom Biolog slaba, identifikacija pa nezanesljiva. Identifikacija na nivoju rodu je bila pravilna le za 13 od 23 testiranih sevov (56 %) (20 sevov iz črevesne sluznice in 3 referenčni sevi: DN-114 001, LGG[®] in BB-12[®]), na nivoju vrste pa le za 2 preskušana seva (9 %) (**preglednica 12**).

Preglednica 12: Identifikacija sevov na podlagi različnih metod uporabljenih v študiji

Table 12: Different methods of strain identification used in the study

Oznaka seva	Identifikacija		
	Sekvenciranje 16S rDNA	Sistem API	Sistem Biolog
L150 m	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
L203 s.m.	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
L350	<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>
L215	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
L567 m	<i>L. paracasei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. casei</i>
L271	<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>B. asteroides</i>
DN-114 001	<i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
L930 bb	<i>L. fermentum</i>	<i>L. salivarius</i>	<i>L. fermentum</i>
B912	<i>L. fermentum</i>	<i>L. cellobiosus</i>	<i>Fusobacterium gonidiaformans</i>
B189	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. gasseri</i>
L916 b.r.	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
L911	<i>L. fermentum</i>	<i>L. cellobiosus</i>	n.i.
L928	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
L203 p	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>Leuconostoc</i>
L344	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. paracasei</i>
L930 a	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
LGG [®]	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. casei</i>
L150 v.r.	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
L567 v	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>
L371	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. delbrueckii</i>
L916	<i>L. gasseri</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>L. fermentum</i>
IM386	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>B. gallinarum</i>
BB-12 [®]	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	n.t.	<i>B. dentium</i>

n.t.: ni bilo testirano; n.i.: ni identifikacije

n.t.: not tested; n.i.: not identified

4.3.2 Občutljivost za antibiotike

Dvajset sevov, izoliranih iz črevesnih biopsijskih vzorcev in izbranih na podlagi analize RAPD, smo preskusili glede občutljivosti za antibiotike, ki so pomembni v medicini in veterini (EFSA, 2012). Rezultati so povzeti v **preglednici 13**. Pri interpretaciji rezultatov smo upoštevali mejne minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), podane s strani EFSA (EFSA, 2012). O rezistenci bakterijskega seva proti določenemu antibiotiku govorimo, kadar je izmerjena MIK večja od mejne MIK.

Visoke vrednosti MIK ($\geq 256 \mu\text{g/mL}$) za vankomicin, metronidazol in teikoplanin smo opazili pri vseh sevih (z izjemo seva vrste *L. gasseri*). Eden od šestih sevov *L. paracasei* je pokazal rezistenco proti tetraciklinu, ko smo ga testirali na agarju MH, ne pa tudi na agarju ISO. Trije od šestih sevov *L. fermentum* so pokazali odpornost proti tetraciklinu, od katerih eden tudi proti eritromicinu. Dva od treh sevov *L. plantarum* sta odporna proti tetraciklinu in vsi trije proti eritromicinu. Sevi vrste *L. plantarum* so pokazali tudi visok nivo rezistence proti ciprofloksacinu in enofloksacinu (MIK $> 32 \mu\text{g/mL}$), za katera sicer s strani EFSA ni zahtevano testiranje. Pri vseh 20 testiranih sevih smo opazili občutljivost za ampicilin, gentamicin, klindamicin, kloramfenikol in streptomycin (razen za en sev *L. plantarum*). Edini sev bifidobakterij (IM386) je pokazal občutljivost za 12 testiranih antibiotikov. Naknadno smo, glede na priporočila s strani EFSA, testirali 5 izbranih sevov (L344, L350, L916, L930 bb in IM386) za občutljivost za kanamicin. Eden (L930 bb) od petih testiranih sevov je kazal odpornost proti kanamicinu, ampak le na gojišču MH, medtem ko so rezultati za MIK, pridobljeni na agarju ISO, sovpadali z mejno vrednost MIK, postavljeno s strani EFSA. Opazili smo, da je 7 od 20 (35 %) testiranih sevov odpornih proti eritromicinu in/ali tetraciklinu. Preverili smo, ali imajo sevi, ki kažejo odpornost proti eritromicinu in tetraciklinu, gene z zapisi za odpornost proti omenjenim antibiotikom. S PCR nismo zaznali pri nobenemu od testiranih sevov prisotnost naslednjih genov: *ermA*, *ermB*, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetM*, *tetM/O*, *vanA*, *vanB*, *vanC1* in *vanC2*.

Preglednica 13: Odpornost sevov humane črevesne sluznice proti izbranim antibiotikom, določena z uporabo metode E-test (MIK (µg/mL))

Table 13: The resistance of human intestinal mucosa-associated strains to antibiotics determined by E-test assay (MICs (µg/mL))

Vrsta ali podvrsta	Sev	Minimalna inhibična koncentracija (µg/mL)																										
		AM		VA		TP		GM		SM		EM		CM		TC		CL		EF		CI		MZ		KM		
		(0,016-256)		(0,016-256)		(0,016-256)		(0,064-1024)		(0,064-1024)		(0,016-256)		(0,016-256)		(0,016-256)		(0,016-256)		(0,002-32)		(0,002-32)		(0,016-256)		(0,016-256)		
		MH	ISO	MH	ISO	MH	ISO	MH	ISO	MH	ISO	MH	ISO	MH	ISO	MH	ISO	MH	ISO	MH	ISO	MH	ISO	MH	ISO	MH	ISO	
<i>L. paracasei</i>	L248	0,25	0,19	>256	>256	>256	>256	4	2	32	32	0,125	0,380	0,016	0,016	1,5	1,5	2	4	4	4	4	4	4	6	>256	>256	n.t.
	L271	0,125	0,125	>256	>256	>256	>256	2	1	12	12	0,125	0,047	0,016	0,016	0,25	0,25	0,5	1,5	1	1	0,5	0,5	1	0,5	>256	>256	n.t.
	L567 m	0,25	0,19	>256	>256	>256	>256	3	1,5	12	8	0,047	0,032	0,016	0,016	0,5	0,5	1,5	3	3	1,5	3	1,5	1	1	>256	>256	n.t.
	L350	0,25	0,19	>256	>265	>256	>256	3	1,5	12	8	0,094	0,064	0,064	0,016	0,5	0,5	1	1,5	3	3	1,5	2	0,75	2	>256	>256	16
	L150 m	0,50	0,19	>256	>256	>256	>256	1	2	64	48	3	2	0,250	0,125	5	4	1,5	1,5	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>256	>256	n.t.
	L203 s.m	0,25	0,25	>256	>256	>256	>256	2	1,5	8	8	0,25	0,047	0,016	0,016	0,38	0,25	1	0,75	3	1,5	1	1	1	>256	>256	n.t.	
	MIK _{mv}		4	n.z.	n.z.	n.z.	32	64	8	64	8	1	1	4	4	4	4	4	4	4	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	64
	<i>L. fermentum</i>	L911	0,094	0,064	>256	>256	>256	>256	4	2	24	24	>256	>256	0,016	0,016	>256	>256	1,5	1,5	4	4	4	4	6	8	>256	>256
L928		0,064	0,094	>256	>256	>256	>256	3	1	24	16	0,125	0,025	0,016	0,023	2	2	1	1,5	3	4	4	4	4	4	>256	>256	n.t.
L916 b.r		0,064	0,125	>256	>256	>256	>256	6	3	32	48	0,125	0,025	0,016	0,016	3	3	1,5	1,5	4	4	4	4	>32	>32	>256	>256	n.t.
B912		0,125	0,067	>256	>256	>256	>256	0,75	1	12	24	0,125	0,500	0,016	0,032	>256	>256	2	2	4	4	4	4	6	3	>256	>256	n.t.
L930 bb		0,094	0,125	>256	>256	>256	>256	1	0,5	12	12	0,125	0,125	0,016	0,016	1	1,5	1,5	1,5	1	4	4	4	4	4	4	>256	>256
B189	0,094	0,19	>256	>256	>256	>256	3	2	16	24	0,250	0,380	0,016	0,016	>256	>256	2	2	6	6	6	6	6	12	>256	>256	n.t.	
MIK _{mv}		2	n.z.	n.z.	n.z.	16	64	3	16	24	1	1	8	8	8	8	4	4	4	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	32
<i>L. rhamnosus</i>	L344	0,38	0,38	>256	>256	>256	>256	8	8	16	16	0,750	0,380	0,50	0,125	0,50	0,500	4	2	1,5	1,50	1	1	1	1	>256	>256	64
	L930 a	0,50	0,50	>256	>256	>256	>256	12	8	24	24	1	1	0,75	0,250	0,38	0,250	4	1,5	1	0,75	0,75	0,75	1	1	>256	>256	n.t.
	L203 p	0,25	0,25	>256	>256	>256	>256	12	6	16	16	0,125	0,094	0,25	0,125	0,25	0,125	3	1,5	1,5	0,75	1	1	1	1	>256	>256	n.t.
MIK _{mv}		4	n.z.	n.z.	n.z.	16	32	12	6	16	1	1	8	8	8	8	4	4	4	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	64
<i>L. plantarum</i>	L567 v	0,094	0,094	>256	>256	>256	>256	12	6	0,48	0,48	1	4	0,125	0,125	12	12	1	2	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>256	>256	n.t.
	L150 v	1,5	1,5	>256	>256	>256	>256	1	3	64	32	4	4	0,125	0,500	>256	>256	4	3	>32	>32	>32	>32	>32	>256	>256	n.t.	
	L371	0,125	0,064	>256	>256	>256	>256	6	4	48	48	1,5	1,5	0,250	0,094	>256	>256	4	4	>32	>32	>32	>32	>32	>256	>256	n.t.	
MIK _{mv}		2	n.z.	n.z.	n.z.	16	16	6	6	2	6	0,125	0,250	0,25	0,75	1,5	1,5	1	1	>32	>32	>32	>32	>32	>256	>256	n.t.	
<i>L. gasseri</i>	L916	0,047	0,125	>256	>256	0,125	0,125	6	6	2	6	0,125	0,250	0,25	0,75	1,5	1,5	1	1	>32	>32	>32	>32	>32	>256	>256	32	
MIK _{mv}		1	n.z.	n.z.	n.z.	16	16	6	6	2	6	1	1	4	4	4	4	4	4	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	64
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	IM386	0,016	0,023	0,19	0,19	0,250	0,047	48	16	64	24	0,125	0,094	1	0,5	0,25	0,25	1	0,5	2	2	2	2	2	2	1	>256	>256
	MIK _{mv}		2	n.z.	n.z.	64	64	48	16	64	24	1	1	8	8	8	8	4	4	4	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.

^aMIK: minimalna inhibična koncentracija; vrednosti, ki predstavljajo rezistenco proti testiranim antibiotikom so odebene (> EFSA mejne vrednosti); MIK_{mv}: MIK mejna vrednost (EFSA mejne vrednosti (2012)); n.z.: EFSA testa ne zahteva; n.t.: ni bilo testirano; MH: Mueller Hinton agar; ISO: ISO-sensitest agar; AM: ampicilin; VA: vankomicin; TP: teikoplanin; GM: gentamicin; SM: streptomycin; EM: erythromycin; CM: clindamycin; TC: tetracycline; CL: chloramphenicol; EF: enrofloxacin; CI: ciprofloksacin; MZH: metronidazol; KM: kanamicin.

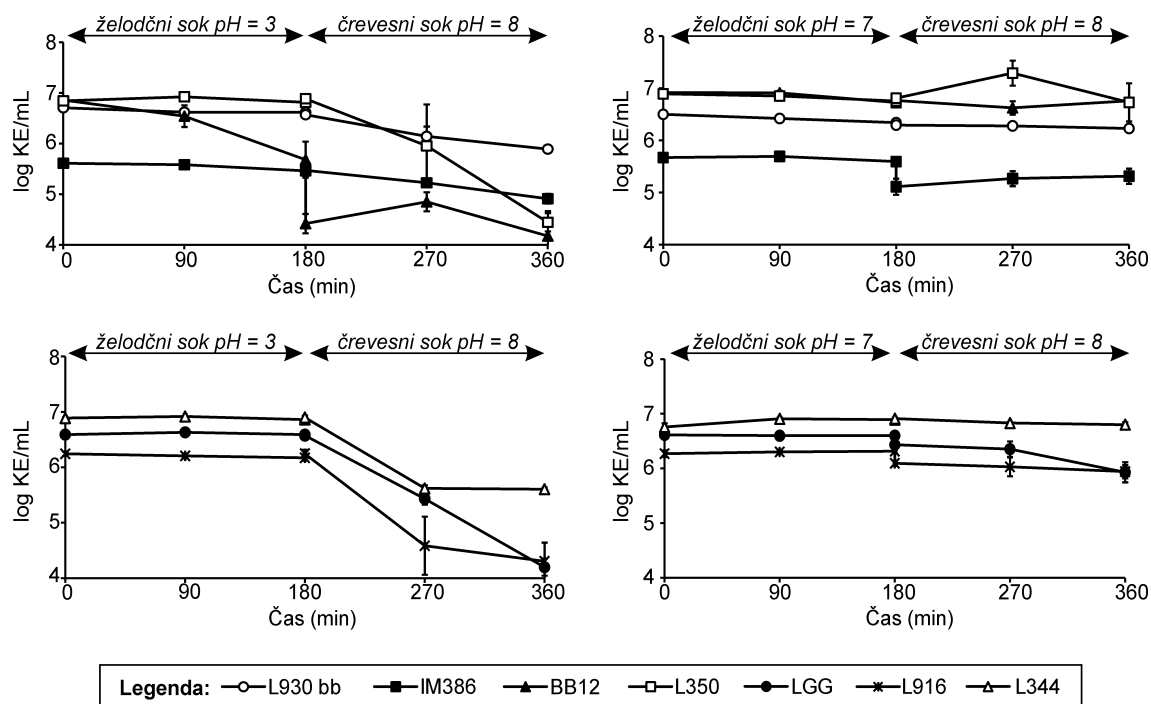
^aMIK: minimum inhibitory concentration; values indicating resistance to antimicrobials are marked bold (> EFSA breakpoint values); MIK_{mv}: breakpoint of MIC (EFSA's breakpoints (2012)); n.z.: test not required by EFSA; n.t.: not tested; MH: 90% Mueller Hinton agar; ISO: Iso-sensitest agar; AM: ampicillin; VA: vancomycin; TP: teicoplanin; GM: gentamicin; SM: streptomycin; EM: erythromycin; CM: clindamycin; TC: tetracycline; CL: chloramphenicol; EF: enrofloxacin; CI: ciprofloxacin; MZ: metronidazole; KM: kanamycin.

Trinajst (65 %) od 20 testiranih sevov, ki ni pokazalo odpornosti proti antibiotikom, pomembnih v medicini in veterini, je po kriterijih EFSA varnih za uporabo v prehranski verigi s stališča tveganja za prenos odpornosti proti antibiotikom na patogene bakterije.

Na podlagi kombinacije rezultatov E-testov in sistema API 50 CH smo izbrali za nadaljnje raziskave seve L344, L350, L916, L930 bb in IM386. Našteti sevi so se izkazali za varne glede tveganja za prenos odpornosti proti antibiotikom in so bili sposobni izkoriščanja, v primerjavi z drugimi sevi iste vrste, največjega števila različnih virov ogljika.

4.4 VREDNOTENJE PROBIOTIČNIH LASTNOSTI

4.4.1 Ugotavljanje sposobnosti preživetja sevov v simuliranih gastrointestinalnih razmerah



Slika 8: Preživetje testiranih sevov v simuliranem želodčnem in črevesnem soku

Bakterije smo najprej inkubirali 3 h v simuliranem želodčnem soku, potem smo jih prenesli v črevesni sok z dodatkom 0,3 % žolčnih soli in inkubirali še 3 h. Rezultati so prikazani kot \log_{10} KE/mL. Vsaka prikazana vrednost je povprečje dveh bioloških ponovitev, izvedenih v dveh paralelkah. Na sliki je za vsako vrednost označena standardna napaka.

Figure 8: The survival of tested isolates in simulated gastric and intestinal juice

The bacteria were exposed to simulated gastric juice for 3 h and subsequently transferred to simulated intestinal juice containing 0,3 % bile acid and further incubated for 3 h. The results are expressed as \log_{10} CFU/mL. Each value represents the mean value from two trials carried out in two parallels. The error bars represent Standard Errors.

Sposobnost preživetja petih izbranih sevov (L344, L350, L916, L930 bb in IM386) in dveh referenčnih sevov (LGG[®] in BB-12[®]) smo preskusili *in vitro*, v simuliranih gastrointestinalnih razmerah. Rezultati so podani na **sliki 8**.

Vsi sevi so do neke mere preživeli izpostavitve razmeram prebavil, saj je bilo število preživelih, po 360 min izpostavitve simuliranim prebavnim razmeram, nad mejo detekcije. Večina sevov, vključno z referenčnim probiotičnim sevom *L. rhamnosus*

GG[®], je dobro prenesla 3-urno izpostavitvev nizki vrednosti pH (pH = 3). Preživetje drugega probiotičnega referenčnega seva, *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12[®] v želodčnem soku pa je bilo slabše, le 15 %. Izkazalo se je, da sevi *L. gasseri* (L916), *L. rhamnosus* (L344) in *L. paracasei* (L350) najboljše preživijo v kislih razmerah. Njihova stopnja preživetje je bila nad 94 %. Čeprav smo najslabše preživetje v kislem okolju opazili pri sevu IM386 (71 %), je bilo še vedno boljše od preživetja referenčnega seva BB-12[®] (15 %). Moramo pa še poudariti, da je stopnja preživetja seva L916 v simuliranem črevesnem soku tako po predhodni inkubaciji pri vrednosti pH 3 kot pri vrednosti pH 7 bila zelo nizka v primerjavi z drugimi testiranimi laktobacili.

Iz **slike 8** je razvidno, da sevi L344 in L350 niso občutljivi za črevesni sok z 0,3 % žolčnih soli (w/v), če predhodno niso bili izpostavljeni nizkim vrednostim pH (želodčni sok pH 7). Potrebno je omeniti tudi, da se je število KE/mL seva L350 med inkubacijo v simuliranem črevesnem soku celo povečalo (za 54 %), medtem ko je bil po 3-urni inkubaciji seva v simuliranem želodčnem soku pri nizki vrednosti pH (pH 3), učinek žolča bolj izrazit. Odstotek preživelih celic IM386 (*B. animalis* subsp. *animalis*) in L350 (*L. fermentum*) v simulirani prebavi je vsaj 12-krat višji v primerjavi z referenčnimi sevi LGG[®] (preživel le 0,4 % bakterij) in BB-12[®] (preživel le 1 % bakterij). Rezultati kažejo, da so vsaj trije sevi iz črevesne sluznice (IM386, L930 bb in L344) sposobni preživeti prehod skozi želodec in tanko črevo, kar predstavlja zelo pomemben pogoj za potencialno probiotične seve.

4.4.2 Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti z metodo lise na agarju (MLA) in produkcije mlečne in oetne kisline

Protimikrobno aktivnost sevov L344, L350, L916, L930 bb, IM386 proti 13-im indikatorskim sevom (**preglednica 14**) smo ugotavljali z metodo lise na agarju.

V preskuse smo vključili tudi referenčni sev *L. casei* DN-114 001. Med testiranimi sevi je L916 (*L. gasseri*) pokazal najmočnejšo inhibicijo proti 5-im od 12-ih indikatorskih sevov in je bil edini s sposobnostjo inhibicije sevov *S. aureus* RN 4220 in ATCC 29213. Sev IM386 ni inhibiral nobenega od 12-ih testiranih indikatorskih sevov. Sev L930 bb

je inhibiral le *L. sakei* NCDO 2714. Sev L350 je imel podoben protimikrobni potencial kot sev L344, le da ni inhibiral *E. coli* IM429.

Preglednica 14: Protimikrobna aktivnost in proizvodnja organskih kislin s strani testiranih sevov iz humane črevesne sluznice

Table 14: Antimicrobial activity and organic acid production by selected strains from intestinal mucosa

		Testirani izolati iz humane črevesne sluznice					
		L344	L350	L916	L930 bb	IM386	DN-114 001
Inhibicijska cona (mm) ^b indikatorskih mikroorganizmov	<i>E. coli</i>						
	O157:H7	++	+	+	-	-	+
	O8:K88:H9	+	+	++	-	-	-
	IM121	+	-	+	-	-	+
	IM122	++	+	++	-	-	++
	IM429	+	-	+	-	-	-
	IM430	-	-	+	-	-	-
	<i>S. aureus</i>						
	RN 4220	-	-	++	-	-	-
	ATCC 29213	-	-	+	-	-	-
	IM132	+	++	+	-	-	-
	<i>S. Typhimurium</i>						
	ATCC 14028	++	++	++	-	-	++
	<i>Lactobacillus spp.</i>						
	NCDO 2714	++	++	+++	+	-	++
K7	-	-	-	-	-	+	
DN-114 001	-	-	-	-	-	-	
Produkcija ^a (mmol/L)	Ocetna kislina	73,5	77,9	65,7	77,2	88,2	n.t.
	Mlečna kislina	17,2	135,2	107,1	146,2	49,3	n.t.

^aKoncentracija v supernatantih 18 h bakterijske kulture; n.t., ni bilo testirano.

^bOznake se nanašajo na opazovano velikost območja inhibicije (merjeno kot razdalja od roba lise z izraslimi kolonijami testnega seva do roba področja z rastjo indikatorskih sevov): +, 1-2 mm inhibicije; ++, 2-4 mm; +++, > 4 mm; -, ni inhibicije.

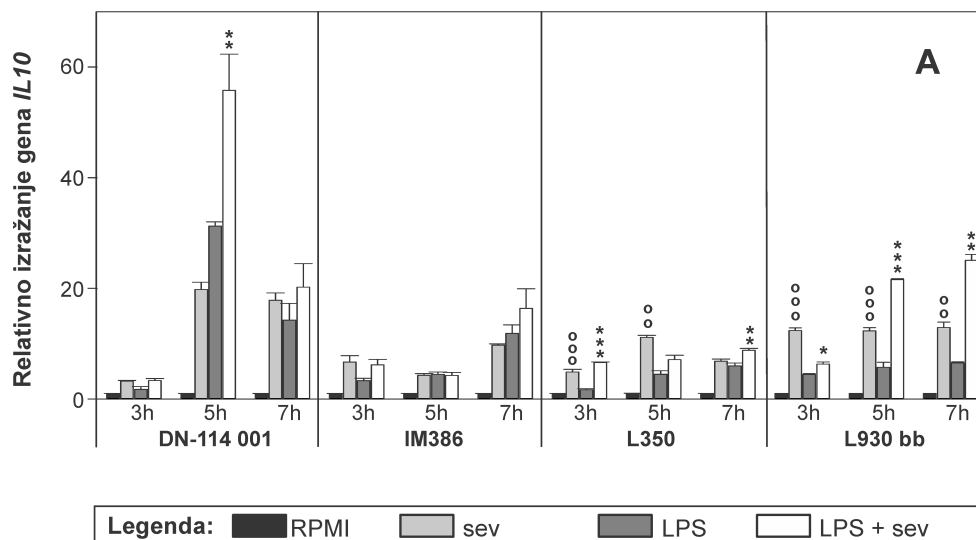
^aConcentration in supernatants of 18 h culture; n.t., not tested.

^bSymbols refer to the observed size of the inhibition zone (measured as the distance from the edge of the spot to the edge of the zone without the growth of indicator strains): +, 1-2 mm; ++, 2-4 mm; +++, > 4 mm; -, no inhibition

Vsi testirani sevi iz humane črevesne sluznice proizvajajo približno enako količino oetne kisline, vendar različno količino mlečne kisline. Rezultati so zbrani in prikazani v **preglednici 14**, iz katere je razvidno, da protimikrobna sposobnost posameznih sevov ni neposredno povezana s produkcijo organskih kislin, kar kaže na to, da pri protimikrobnem delovanju sodelujejo tudi druge učinkovine.

4.4.3 Imunomodulacija: proučevanje vpliva izbranih sevov na citokinski odziv celične linije THP-1

4.4.3.1 Ovrednotenje izražanja genov za citokine z metodo RT-qPCR



Slika 9: Izražanje genov *IL10* (A), *IL6* (B), *IL12B* (C), *IL1B* (D), *IL1RN* (E), *IL8* (F) in *TNFA* (G) v celicah THP-1, tretiranih z izbranimi sevi (DN-114 001 – *L. casei*; IM386 – *B. animalis* subsp. *animalis*; L350 – *L. paracasei*; L930 bb – *L. fermentum*), z LPS in s kombinacijo bakterijskih sevov in LPS

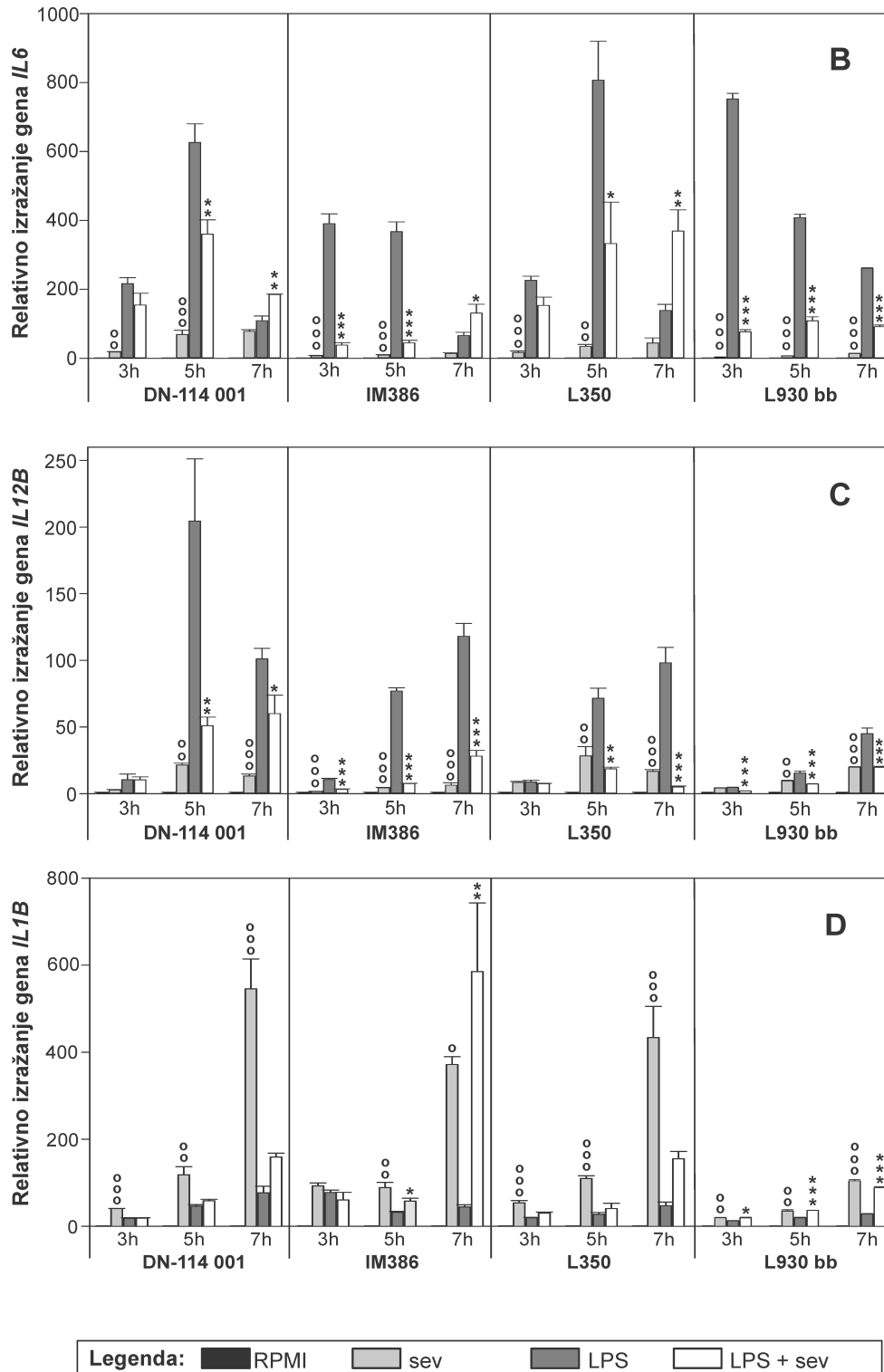
Rezultati so podani kot relativne količine izraženega gena v primerjavi z netretiranimi celicami THP-1. Na grafih so prikazane standardne napake. (°) Krog označuje statistično značilne razlike med z sevi stimuliranimi celicami THP-1 in celicami THP-1, stimuliranimi z LPS. (*) Zvezdica označuje statistično značilne razlike med celicami THP-1, stimuliranimi z LPS, in celicami THP-1, stimuliranimi s kombinacijo LPS in bakterijskih sevov. Za ugotavljanje statističnih razlik smo uporabljali enosmerno ANOVA in Tukey-ev test mnogoterih primerjav. Razlike med skupinami podatkov smo smatrali za statistično značilne, če je bila vrednost $p < 0,05$ (* ali °, $p < 0,05$; ** ali °°, $p < 0,01$; *** ali °°, $p < 0,001$).

Figure 9: The expression of *IL10* (A), *IL6* (B), *IL12B* (C), *IL1B* (D), *IL1RN* (E), *IL8* (F) and *TNFA* (G) genes in THP-1 cells treated with selected isolates (DN-114 001 – *L. casei*; IM386 – *B. animalis* subsp. *animalis*; L350 – *L. paracasei*; L930 bb – *L. fermentum*), LPS and combination of isolates and LPS

Results are shown as the fold change in expression relative to non-treated THP-1 cells. Error bars indicate Standard Errors. (°) Circle indicates statistically significant differences between THP-1 cells stimulated with strains and THP-1 cells stimulated with LPS. (*) Asterisk indicates statistically significant differences between THP-1 cells stimulated with the combination of LPS and isolates and those stimulated only with LPS. Statistical analysis of gene expression data was performed using one-way ANOVA with additional *post hoc* pairwise comparisons by Tukey's test, used to determine differences between tested groups at 5 % significance level (* or °, $p < 0,05$; ** or °°, $p < 0,01$; *** or °°, $p < 0,001$).

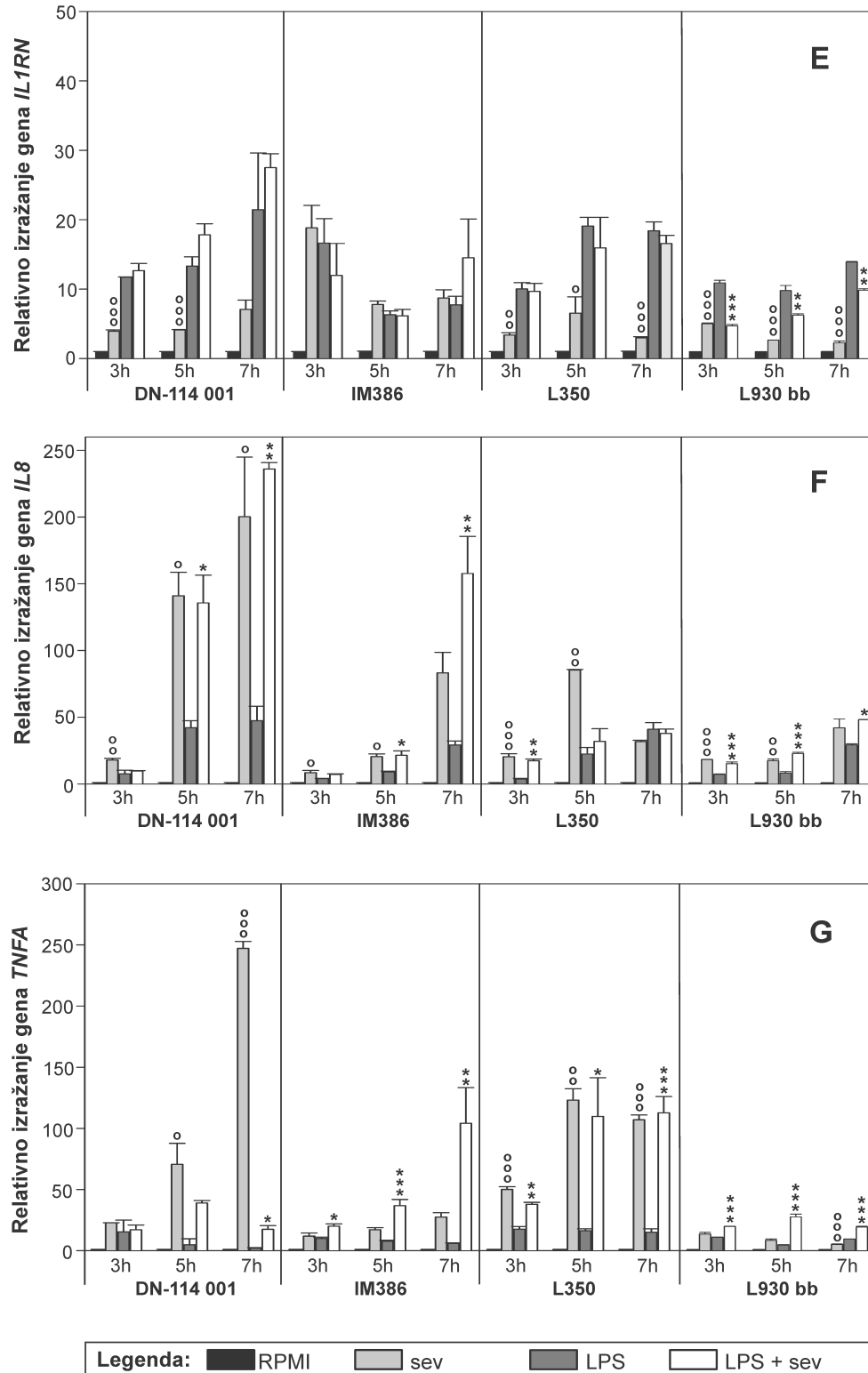
se nadaljuje

nadaljevanje slike 9: Izražanje genov *IL10* (A), *IL6* (B), *IL12B* (C), *IL1B* (D), *IL1RN* (E), *IL8* (F) in *TNFA* (G) v celicah THP-1, tretiranih z izbranimi sevi (DN-114 001 – *L. casei*; IM386 – *B. animalis* subsp. *animalis*; L350 – *L. paracasei*; L930 bb – *L. fermentum*), z LPS in s kombinacijo bakterijskih sevov in LPS



se nadaljuje

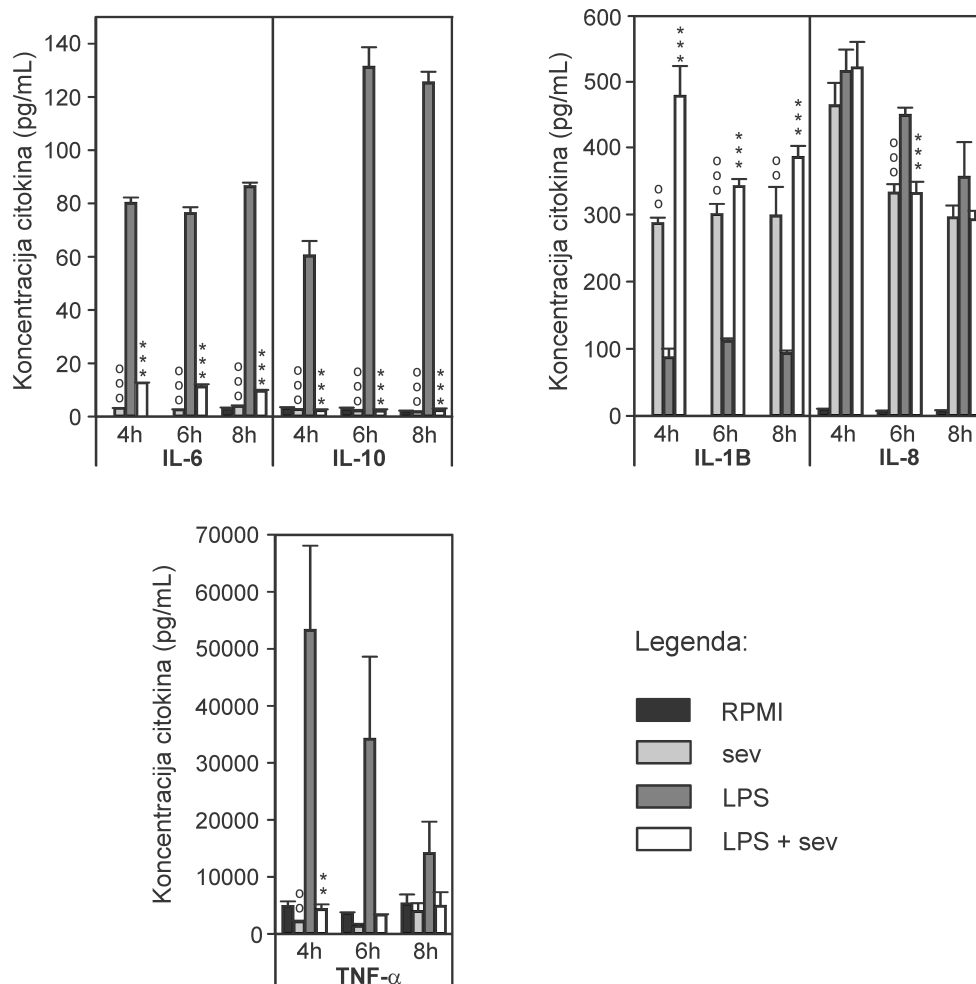
nadaljevanje slike 9: Izražanje genov *IL10* (A), *IL6* (B), *IL12B* (C), *IL1B* (D), *IL1RN* (E), *IL8* (F) in *TNFA* (G) v celicah THP-1, tretiranih z izbranimi sevi (DN-114 001 – *L. casei*; IM386 – *B. animalis* subsp. *animalis*; L350 – *L. paracasei*; L930 bb – *L. fermentum*), z LPS in s kombinacijo bakterijskih sevov in LPS



V tem delu smo testirali seve L350, L930 bb, IM386 in L344, izbrane na podlagi njihove stopnje preživetja v simuliranih gastrointestinalnih razmerah, za sposobnost spodbujanja protivnetnega odziva ob stiku z makrofagi celične linije THP-1 v razmerah *in vitro*. Testirali smo vpliv bakterijskih sevov L350, L930 bb, IM386 in referenčni probiotični sev *L. casei* DN-114 001 na izražanje genov za izbrane citokine v celicah THP-1, medtem ko so celice THP-1 bile izpostavljene neposrednemu stiku z bakterijami oziroma z bakterijami in LPS. Celice THP-1 so bile predhodno diferencirane v makrofage. Rezultati, pridobljeni med 7-urno inkubacijo, so prikazani na **sliki 9**. Za sev L344 pa smo testirali njegov vpliv na izločanje citokinov celic THP-1, pri istih zgoraj naštetih pogojih, z metodo ELISA.

Vsi novi izolirani sevi (L350, IM386 in L930 bb) so pokazali sposobnost povečanja izražanja gena *IL10* za protivnetni citokin IL-10 v primerjavi z ne-stimuliranimi celicami THP-1. Učinek bakterijskih sevov je bil še bolj izrazit, ko smo celice THP-1 istočasno stimulirali z bakterijskimi sevi (L350, L930 bb in IM386) in LPS (**slika 9**). Omeniti pa velja tudi, da noben od testiranih sevov ni bil sposoben povečati izražanja gena *IL1RN* (antagonist receptorja IL-1 (IL-1 α in IL-1 β), za razliko od LPS. Edini, ki je kazal vpliv na izražanje gena *IL1RN*, je bil sev IM386, vendar se razlike niso pokazale za statistično značilne. Raziskali smo tudi, ali je izražanje genov za izbrane protivnetne citokine pod vplivom LPS mogoče zmanjšati, če poleg LPS celicam dodajamo tudi izbrane bakterijske seve. Vsi trije sevi (IM386, L350 in L930 bb) so pokazali sposobnost represije izražanja genov (*IL6* in *IL12B*) za dva protivnetna citokina, IL-6 in IL-12, izzvana z LPS (**slika 9B in 9C**). Sev IM386 je 10-krat zmanjšal raven izražanja genov *IL6* in *IL12B* po 3 h in po 5 h tretiranja. Pri sevu L930 bb smo po 3 h inkubacije ugotovili zmanjšanje ravni izražanja gena *IL6* za 10-krat, gena *IL12B* za 2-krat. Sev L350 je po 7 h zmanjšal izražanje gena *IL12B* za 20-krat in izražanje gena *IL6* po 5 h za 2-krat. Izražanja ostalih protivnetnih citokinov (IL-1 β , IL-8 in TNF- α) bakterijski sevi niso zmanjšali (**slika 9D, 9F in 9G**). Zanimivo je, da so preiskovani sevi učinkoviteje zmanjšali izražanje protivnetnih citokinov pod vplivom LPS, kakor razširjeni probiotični sev DN-114 001 z dokumentiranimi probiotičnimi učinki. Po drugi strani testirani sevi sami niso bili sposobni spodbuditi izražanja protivnetnih citokinov IL-6 in IL-12 pri celicah THP-1 v razmerah *in vitro*.

4.4.3.2 Ovrednotenje produkcije citokinov z metodo encimskega imunskega testa (ELISA)



Slika 10: Produkcija citokinov IL-6, IL-10, IL-1 β , IL-8 in TNF- α v celicah THP-1, tretiranih z izbranim sevom *L. rhamnosus* L344, z LPS ali s kombinacijo L344 in LPS

Na grafih so prikazane standardne napake. (°) Krog označuje statistično značilne razlike med z L344 stimuliranimi celicami THP-1 in celicami THP-1 stimuliranimi s LPS. (*) Zvezdica označuje statistično značilne razlike med celicami THP-1, stimuliranimi z LPS in celicami THP-1, stimuliranimi s kombinacijo LPS in L344. Za ugotavljanje statističnih razlik smo uporabljali enosmerno ANOVA in Tukey-ev test mnogoterih primerjav. Razlike med skupinami podatkov smo smatrali za statistično značilne, če je bila vrednost $p < 0,05$ (* ali °, $p < 0,05$; ** ali °°, $p < 0,01$; *** ali °°°, $p < 0,001$).

Figure 10: The production of cytokines IL-6, IL-10, IL-1 β , IL-8 and TNF- α by THP-1 cells treated with selected isolate *L. rhamnosus* L344, LPS or a combination of strain L344 and LPS

Error bars indicate Standard Errors. (°) Circle indicates statistically significant differences between THP-1 cells stimulated with L344 and THP-1 cells stimulated with LPS. (*) Asterisk indicates statistically significant differences between THP-1 cells stimulated with the combination of LPS and L344 and those stimulated only with LPS. Statistical analysis of gene expression data was performed using one-way ANOVA with additional *post hoc* pairwise comparisons by Tukey's test, used to determine the differences between tested groups at 5 % significance level (* or °, $p < 0,05$; ** or °°, $p < 0,01$; *** or °°°, $p < 0,001$).

Vpliv seva *L. rhamnosus* L344 na citokinski odziv celične linije THP-1 smo sledili z merjenjem koncentracije izločenih citokinov v supernatantih z metodo ELISA ob inkubaciji celic THP-1 z dodanim testnim sevom L344, z dodanim LPS in ob istočasni inkubaciji celic THP-1 s sevom L344 in LPS. Vzorčili smo po 4 h, 6 h in 8 h inkubacije. Rezultati so prikazani na **sliki 10**.

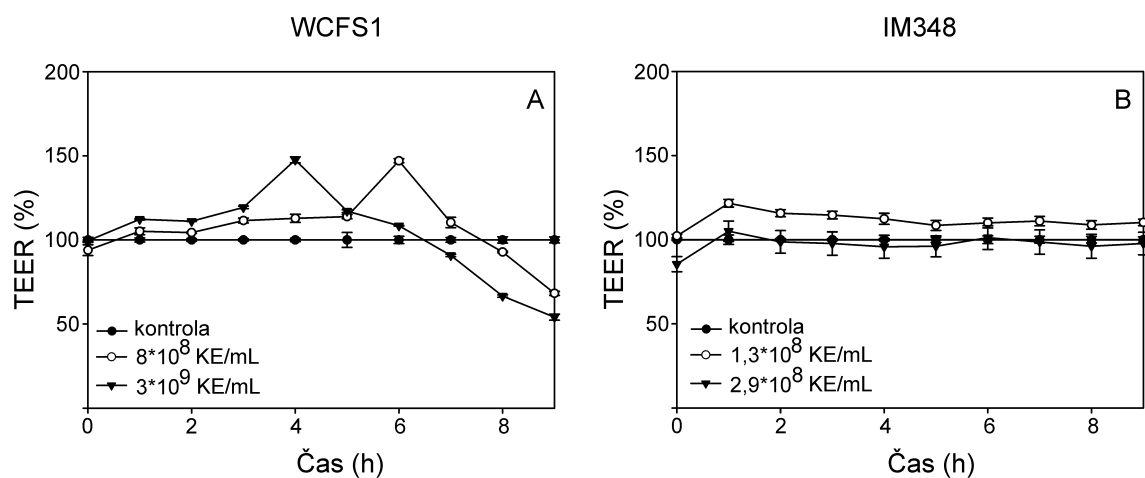
Po stimulaciji celic THP-1 s sevom L344 smo opazili statistično značilno povečanje koncentracije citokinov IL-6, IL-8 in IL-1 β po 4 h, 6 h in 8 h stimulacije, medtem ko smo statistično značilne razlike za IL-8 in TNF- α zaznali le po 6 h oz. 4 h stimulacije. Sev L344 je znatno povečal produkcijo proinflammatoryh citokinov IL-1 β in IL-8, pri čemer je sev L344 bolj povečal produkcijo IL-1 β kot jo je povečal sam LPS. Pri IL-6, IL-8 in TNF- α je v kombinaciji z LPS sev L344 znižal produkcijo v primerjavi s produkcijo, ki je nastala ob stimulaciji le z LPS ($p < 0,001$ oz. $p < 0,01$). Omeniti moramo tudi, da je sev L344 znižal tudi produkcijo protivnetnega citokina IL-10 ($p < 0,001$). Pri stimulaciji celic THP-1 samo z LPS so bile koncentracije izmerjenih citokinov IL-1 β in IL-8 višje glede na kontrolo (celice THP-1 v gojišču RPMI), vendar nižje glede na koncentracije, izmerjene pri stimulaciji celic THP-1 s sevom L344. Moramo še dodati, da IL-12 z metodo ELISA nismo uspeli izmeriti.

4.5 UGOTAVLJANJE LASTNOSTI IZBRANIH SEVOV, POMEMBNIH Z VIDIKA ZAŠČITNE FUNKCIJE ČREVESNE STENE, V RAZMERAH *in vitro*

4.5.1 Ugotavljanje vpliva različnih koncentracij bakterij na transepitelno električno upornost (TEER) enosloja celic Caco-2

S pomočjo merjenja transepitelne električne upornosti (TEER) smo raziskali morebitni vpliv novih bakterijskih sevov, izbranih na podlagi zgoraj opisanih preskusov, na funkcionalnost tesnih stikov evkariontskih celic Caco-2.

Testirali smo bakterijske seve L344 (*L. rhamnosus*), L350 (*L. paracasei*), L916 (*L. gasseri*), L930 bb (*L. fermentum*), IM386 (*B. animalis* subsp. *animalis*), WCFS1 (*L. plantarum*) in IM348 (*L. bulgaricus*) (preglednica 5). Celice Caco-2 smo izpostavili posameznim bakterijskim sevom in merili TEER vsako uro. Pri vsakem preskusu smo vključili negativno kontrolo - celice Caco-2, ki smo jih inkubirali v gojišču DMEM z 10 % FBS in brez antibiotika. Rezultati so prikazani na **sliki 11**.



se nadaljuje

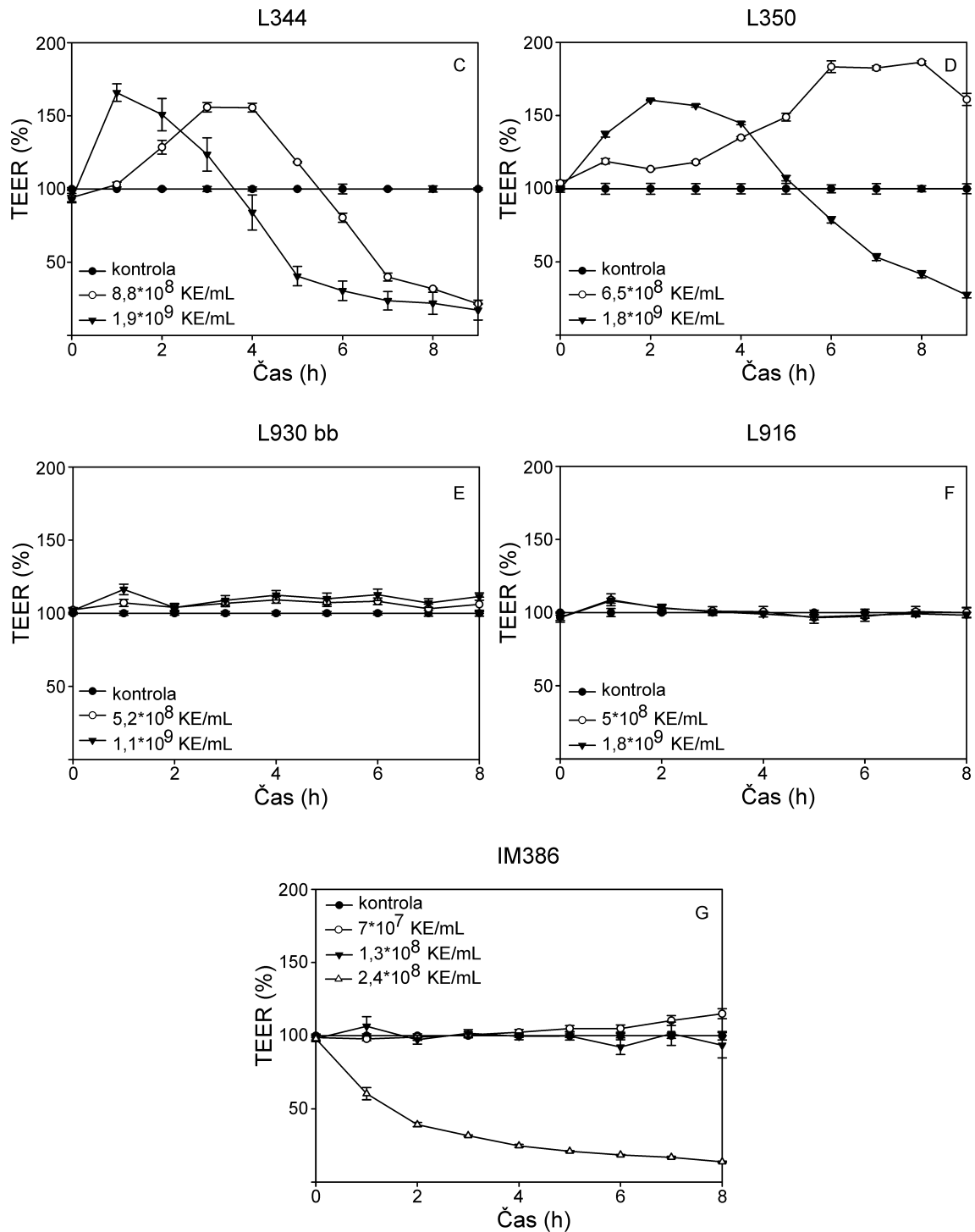
Slika 11: Vpliv različne koncentracije bakterij na transepitelno električno upornost (TEER) enosloja celic Caco-2

Rezultati so podani kot odstotek upornosti v primerjavi s kontrolo. Za vsako vrednost je prikazana standardna napaka.

Figure 11: The influence of different concentrations of bacteria on transepithelial resistance (TEER) of Caco-2 cells monolayer

Results are represented as the percentage of TEER vs. control. Error bars indicate Standard Errors.

nadaljevanje slike 11: Vpliv različne koncentracije bakterij na transepitelno električno upornost (TEER) enosloja celic Caco-2



Rezultati, podani na **sliki 11**, kažejo, da so nekateri sevi (WCFS1, L344, L350) povišali vrednosti TEER, kar nakazuje na njihovo sposobnost, da okrepijo funkcionalnost tesnih

stikov. Iz **slike 11** je razvidno tudi, da po začetnem pozitivnem vplivu naštetih sevov na izmerjene vrednosti TEER se, po 8-ih urah inkubacije, izmerjena vrednost TEER bistveno zniža. Do padca izmerjene vrednosti TEER je najverjetneje privedla močna sprememba v pH-ju gojišča DMEM zaradi laktobacilov, kar smo tudi opazili tekom samih poskusov na podlagi spremembe barve samega gojišča.

Ko smo celice Caco-2 izpostavili višji koncentraciji testiranih sevov, se je odziv v obliki višje vrednosti TEER zgodil nekaj ur prej v primerjavi z odzivom, ki smo ga izmerili, ko smo celice Caco-2 stimulirali z nižjo koncentracijo bakterij. Drugi testirani sevi (L930 bb, L916, IM386, IM348) pa niso povečali TEER niti kadar so bili dodani celicam Caco-2 v višjih koncentracijah. Sevi L930 bb, L916, IM348 niso vplivali na TEER celic Caco-2, ne glede na uporabljeno koncentracijo, medtem ko je stimulacija celic s sevom *B. animalis* subsp. *animalis* IM386 povzročila celo uničenje tesnih stikov med celicami, kar se je pokazalo kot oster padec transepitelne upornosti, vendar samo, kadar so bile bifidobakterije dodane v najvišji koncentraciji ($\sim 2,5 \times 10^8$ KE/mL).

Vpliv različnih koncentracij sevov, sposobnih povišanja vrednosti TEER pri celicah Caco-2, se je kazal predvsem v različnem časovnem okviru, v katerem smo opazili povišanje TEER, ne pa toliko v jakosti/odstotku povišanja.

Med petimi novimi izbranimi sevi iz humane črevesne sluznice sta dva spodbudila povišanje vrednosti TEER pri nepoškodovanih celicah Caco-2 v razmerah *in vitro*: sev L344 (*L. rhamnosus*) in sev L350 (*L. paracasei*). Sev L344 je zvišal vrednosti TEER celic Caco-2 za ~ 60 %, ne glede na to, katero koncentracijo laktobacilov smo uporabili. Sev L350 je izzval odgovor celic Caco-2 kasneje v primerjavi s sevom L344, ampak je že pri nižji koncentraciji bakterij zvišal vrednosti TEER za več kot ~ 80 %.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo za nadaljnje raziskave izbrali seva L344 in L350. Oba seva sta bila edina med novimi sevi sposobna povišanja vrednosti TEER v razmerah *in vitro* pri nepoškodovanih evkariontskih celicah Caco-2.

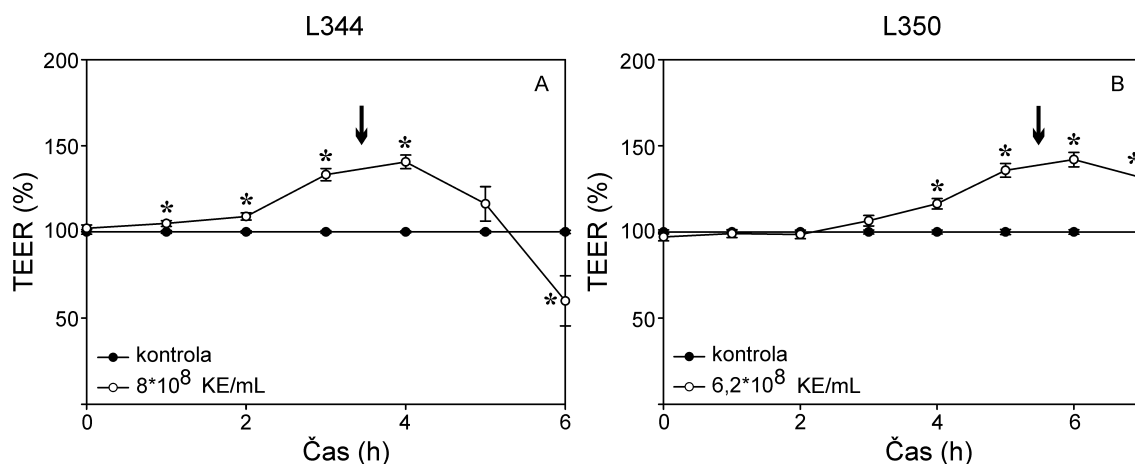
4.5.2 Ugotavljanje vpliva sevov *L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350 na izražanje beljakovin, gradnikov tesnih stikov celic Caco-2

Celice Caco-2 smo za 6 do 7 h izpostavili bakterijskim sevom *L. rhamnosus* (L344) in *L. paracasei* (L350) v koncentraciji približno 8×10^8 KE/mL in vsako uro merili vrednosti TEER. Ob času, ko je bilo pri stimulaciji celic Caco-2 s posameznim sevom izmerjeno največje povečanje TEER v primerjavi z negativno kontrolo (netretirane celice Caco-2), smo odvzeli vzorce za analize beljakovin tesnih stikov celic Caco-2. V ta namen smo uporabili naslednje metode:

- RT-qPCR: preverili smo, ali se je izražanje genov za gradnike tesnih stikov povišalo s povišanjem transepitelne električne upornosti (z RT-qPCR smo analizirali vzorce, odvzete eno uro pred najvišjim vrhom izmerjenih vrednosti TEER: to pomeni tudi 1 uro pred vzorčenjem za metodo »western blot« in za konfokalno mikroskopiranje);
- »western blot«: preverili smo, ali so celice Caco-2 vsebovale višjo količino beljakovin tesnih stikov in ali se je morebitno povečanje količine teh beljakovin odrazilo na tesnih stikih ter posledično večjo transepitelno električno upornost;
- vizualizacija gradnikov tesnih stikov s fluorescenčno mikroskopijo: preverili smo, ali je povečanje transepitelne električne upornosti posledica prerazporeditev gradnikov tesnih stikov in/ali posledica prerazporeditve aktinskih filamentov.

Pri sevu L344 smo vzorčili med 3. in 4. uro, pri sevu L350 pa med 5. in 6. uro po začetni stimulaciji celic Caco-2. Spreminjanje transepitelne električne upornosti je prikazano na **sliki 12**, na kateri je prikazan tudi časovni interval vzorčenja. Podobno kakor v predhodnih preskusih, opisanih v poglavju 4.5.1, sta oba seva statistično značilno povišala vrednosti TEER pri celicah Caco-2, pri čemer sta se seva med seboj razlikovala po dinamiki učinkovanja na TEER celic Caco-2.

Odziv celic Caco-2 je bil pri sevu L344 nekoliko hitrejši, saj smo največje povečanje vrednosti TEER izmerili po štirih urah, medtem ko smo ga pri celicah, stimuliranih s sevom L350, izmerili po šestih urah po izpostavitvi.

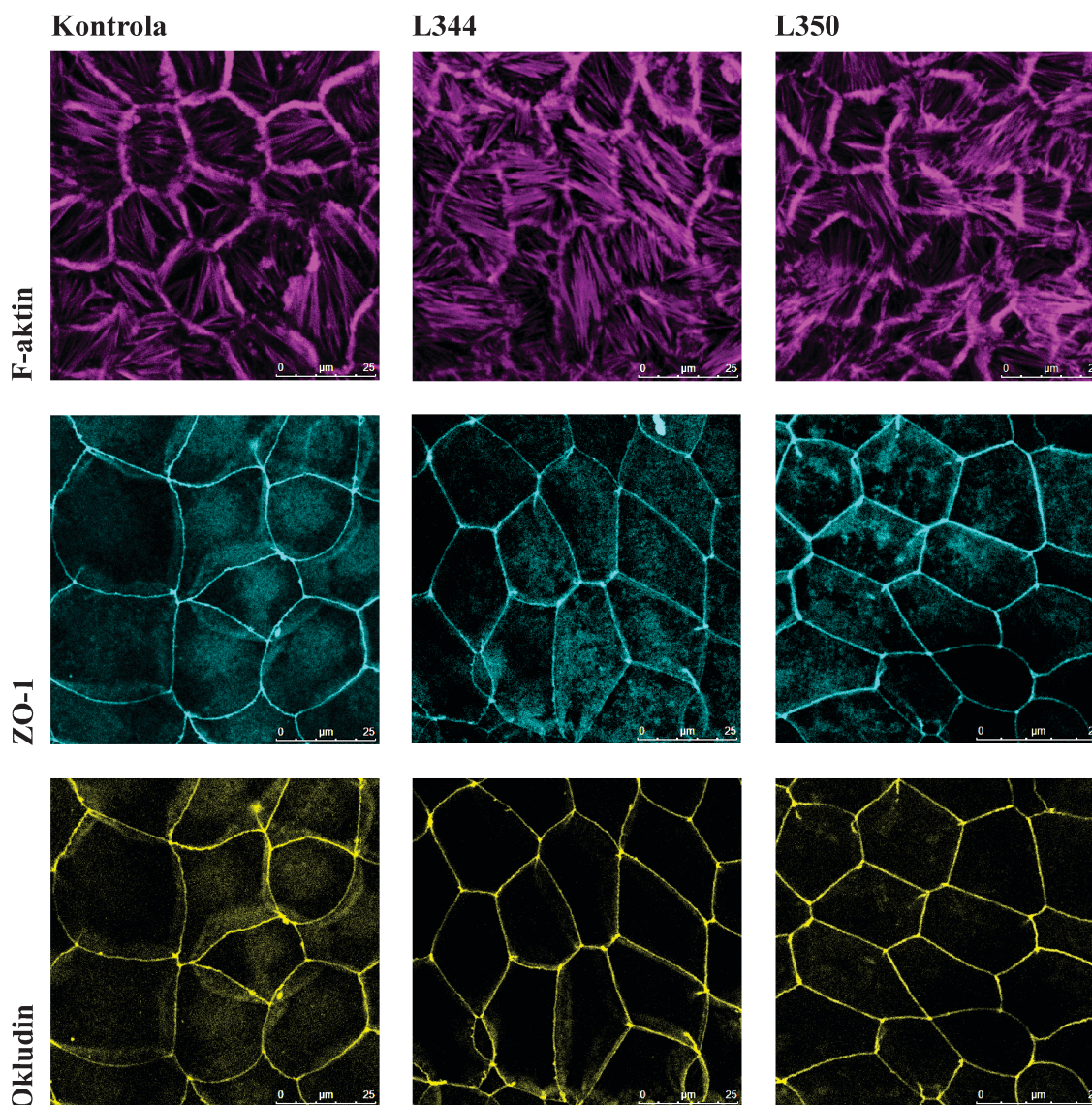


Slika 12: Vrednosti TEER celic Caco-2 po stimulaciji s sevom L344 (A) in s sevom L350 (B)

Uporabili smo bakterijske seve v koncentraciji 8×10^8 KE/mL. Rezultati so podani kot delež upornosti (%) v primerjavi z negativno kontrolo (netretirane celice Caco-2). V vsaki izmerjeni točki je podana vrednost standardne napake. Puščici označujeta čas vzorčenja. Za ugotavljanje statističnih razlik smo uporabili Studentov t-test. Razlike med skupinami podatkov smo smatrali za statistično značilne, če je bila vrednost $p < 0,05$ (*).

Figure 12: TEER values of Caco-2 cells after stimulation with the L344 (A) and L350 (B) strains

The concentration of bacteria was 8×10^8 CFU/mL. Results are represented as the percentage of resistance vs. negative control (non-treated Caco-2 cells). Error bars indicate Standard Errors. Statistical analysis was performed using Student's t-test. The arrows indicate sampling time points. The differences between groups of data were considered statistically significant if $p < 0,05$ (*).



Slika 13: Imunofluorescenčno barvanje proteinov F-aktin (roza), ZO-1 (zeleno) in okludin (rumeno) v celicah Caco-2

Levi stolpec (kontrola) predstavlja netretirane celice Caco-2, srednji in desni stolpec pa celice Caco-2, tretirane s sevoma L344 ali L350.

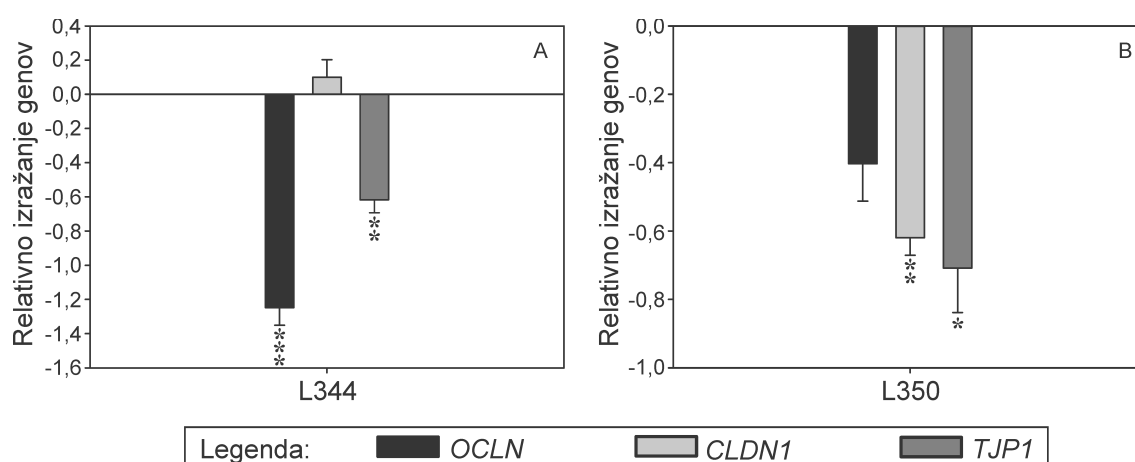
Figure 13: Immuno-fluorescent staining of proteins F-actin (pink), ZO-1 (green) and occludin (yellow) in Caco-2 cells

Left column (control) represents non-treated Caco-2 cells while the other two columns represent Caco-2 cells treated with L344 or L350 strains.

Iz **slike 13** je razvidno, da tako sev L344 kot sev L350 nista povzročila spremembe pri preiskovanih beljakovinah tesnih stikov v primerjavi s kontrolnimi celicami Caco-2, ki niso bile izpostavljene bakterijam. Pri obeh sevih vidimo, da je bila fluorescenca tako beljakovine okludin kot ZO-1 približno enaka fluorescenci istih beljakovin pri kontrolni

skupini. Tudi razporeditev beljakovin okludin in ZO-1 je bila ista pri celicah Caco-2 stimuliranih s bakterijami v primerjavi s kontrolno skupino. Tudi aktinski filamenti so bili po stimulaciji z laktobacili bili razporejeni enako kot pri kontroli, saj so tvorili enakomerno razporejene snope.

Rezultati izražanja genov za beljakovine tesnih stikov, predstavljeni na **sliki 14**, niso skladni s sliko, ki smo jo pridobili s pomočjo imunofluorescenčnega barvanja (**slika 13**).



Slika 14: Izražanje genov za beljakovine tesnih stikov: okludin (*OCLN*), klavdin-1 (*CLDN1*) in ZO-1 (*TJPI*)

Razmerje izražanja genov pri celicah Caco-2 izpostavljenih bakterijskim sevom L344 (A) in L350 (B) pri koncentraciji 8×10^8 KE/mL glede na kontrolo (celice Caco-2, ki jih nismo izpostavili bakterijam). V grafikonu so označene standardne napake. Za ugotavljanje statističnih razlik smo uporabili Studentov t-test. Razlike med skupinami podatkov smo smatrali za statistično značilne, če je bila vrednost $p < 0,05$ (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). (*) Zvezdica označuje statistično značilne razlike med z bakterijami stimuliranimi in ne-stimuliranimi celicami Caco-2.

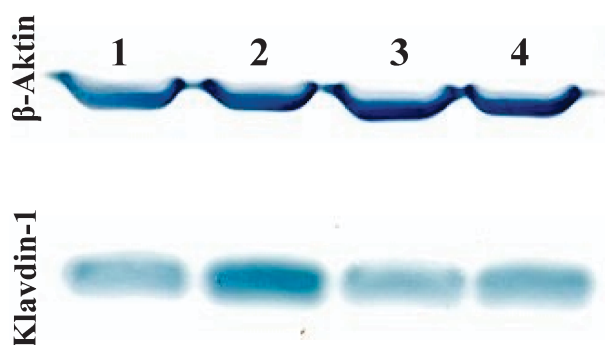
Figure 14: The expression of tight junctions proteins' genes: occludin (*OCLN*), claudin-1 (*CLDN1*) and ZO-1 (*TJPI*)

The ratio of gene expression in Caco-2 cells exposed to L344 (A) and L350 (B) bacterial strains at concentration of 8×10^8 CFU/mL vs. control (Caco-2 cells not exposed to bacteria). Error bars indicate Standard Errors. Statistical analysis was performed using Student's t-test. The differences between groups of data were considered statistically significant if $p < 0,05$ (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). (*) Asterisk indicates statistically significant differences between treated and non-treated Caco-2 cells.

Pri obeh sevih je bilo izražanje genov za okludin nižje kot pri kontrolnih celicah Caco-2. Pričakovali smo, da se bo podobno pokazalo tudi na proteinskem nivoju z imunofluorescenčnim barvanjem, torej da bo intenziteta barvila na stičiščih dveh

evkarionstkih celic nižja pri s sevi stimuliranih celicah Caco-2 v primerjavi s kontrolnimi celicami. Izražanje gena *TJPI* (*ZO-1*) je bilo primerljivo pri obeh sevih in nižje kot pri kontrolnih celicah. Nasprotno pa fluorescenčno barvanje tudi v tem primeru ni pokazalo razlike v intenziteti med tretiranimi in kontrolnimi celicami Caco-2.

Z metodo »western blot« (slika 15) smo potrdili prisotnost beljakovine klavdin-1 v večjih količinah pri celicah Caco-2, izpostavljenih sevu L344 in sevu L350, kakor pri kontroli. Iz slike vidimo, da je količina beljakovine klavdin-1 v celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene sevu L344, višja tudi v primerjavi s celicami Caco-2, ki so bile izpostavljene sevu L350. Takšen rezultat smo opazili tudi z metodo analize izražanja gena *CLDNI* (slika 13).



Slika 15: Prikaz lis beljakovine klavdin-1 na membrani PVDF

1: Caco-2; 2: Caco-2 + L344 (8×10^8 KE/mL); 3: Caco-2; 4: Caco-2 + L350 (8×10^8 KE/mL).

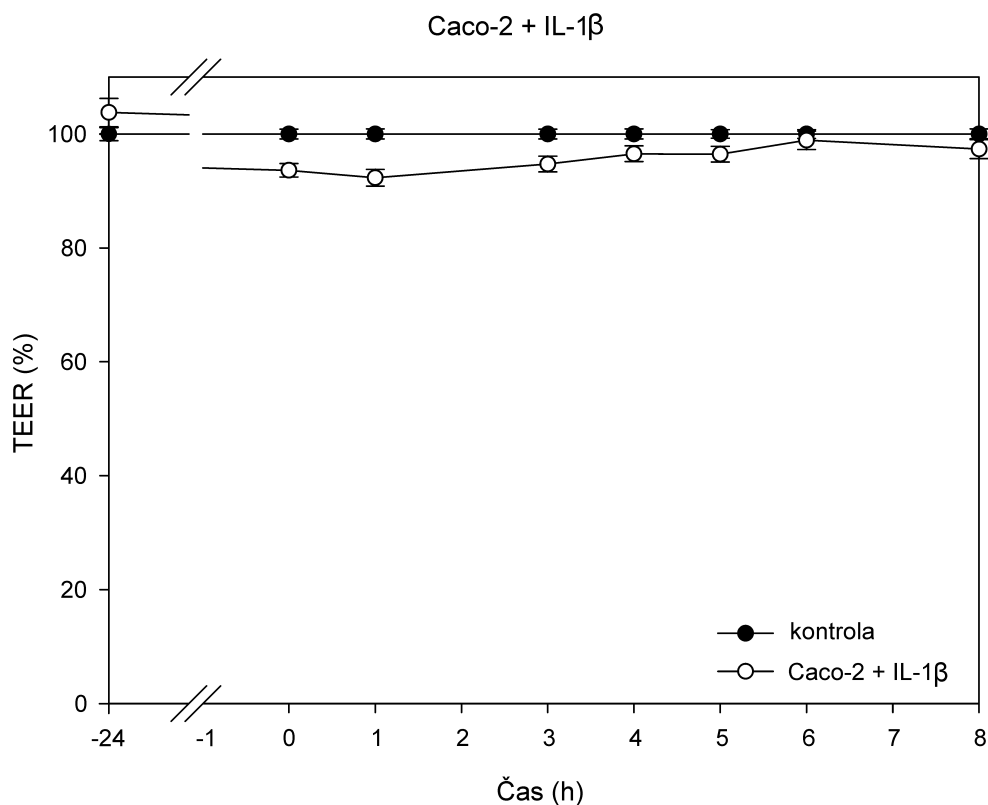
Figure 15: Claudin-1 bands on PVDF membrane

1: Caco-2; 2: Caco-2 + L344 (8×10^8 CFU/mL); 3: Caco-2; 4: Caco-2 + L350 (8×10^8 CFU/mL).

Podatkov o količini beljakovin okcludin in *ZO-1* s pomočjo metode »western blot« žal zaradi neuspešnega delovanja protiteles nismo pridobili.

4.5.3 Ugotavljanje vpliva izbranih sevov *L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350 na poškodovane tesne stike celic Caco-2

4.5.3.1 Porušenje tesnih stikov med celicami Caco-2 z interleukinom-1 beta (IL-1 β)



Slika 16: Vpliv IL-1 β na vrednosti TEER celic Caco-2

Celicam Caco-2 smo 24 h pred poskusom v spodnjem prekatu oz. na bazalni strani dodali IL-1 β v koncentraciji 25 ng/mL. Po 24 h smo začeli meriti vrednosti TEER. Rezultati so podani kot odstotek upornosti v primerjavi z netretiranimi celicami Caco-2. Za vsako vrednost je prikazana standardna napaka.

Figure 16: The effect of IL-1 β on TEER values of Caco-2 cells

The IL-1 β was added to Caco-2 cells on the basal side at concentration of 25 ng/mL. The TEER values were measured after 24 h of incubation. Results are represented as the percentage of resistance vs. non-treated Caco-2 cells. Error bars indicate Standard Errors.

Iz grafa na **sliki 17** je razvidno, da IL-1 β po 24 h inkubacije ni povzročil porušnja oz. poškodb tesnih stikov pri celicah Caco-2, kot je bilo pričakovano. Poskus je bil ponovljen večkrat z različnimi koncentracijami IL-1 β (od 10 ng/mL do največ 25 ng/mL) in z IL-1 β dveh različnih proizvajalcev. Iz rezultatov lahko sklepamo, da v razmerah *in vitro*, ki smo jih uporabili v našem delu, IL-1 β ni bil sposoben porušiti

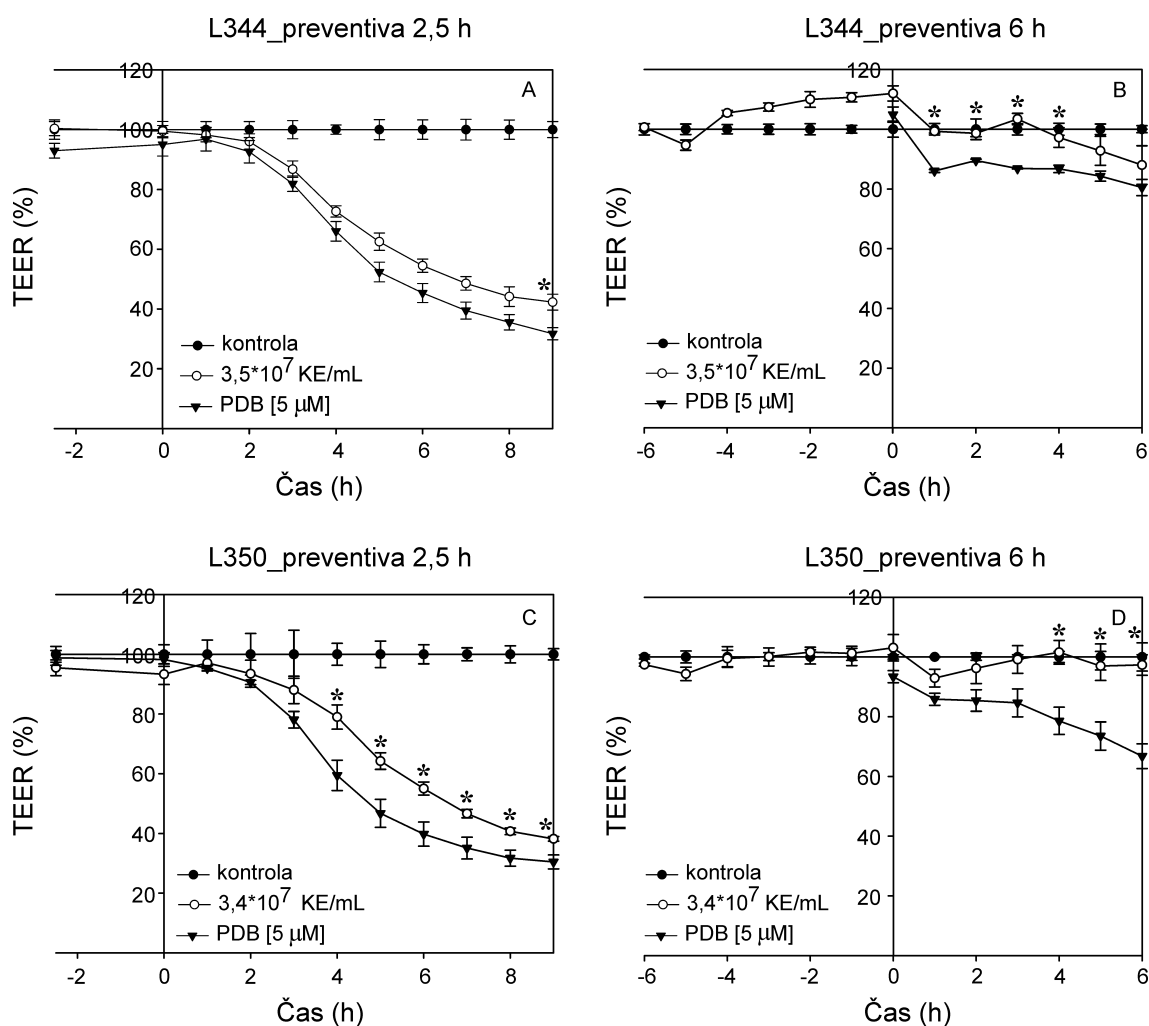
medceličnih stikov pri celicah Caco-2. V nadaljevanju smo za porušenje celičnih stikov uporabili kemikalijo forbol 12,13-dibutirat (PDB) v končni koncentraciji 5 μ M.

4.5.3.2 Ugotavljanje vpliva izbranih sevov *L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350 na celice Caco-2 s porušenimi medceličnimi stiki

Ugotavljali smo vpliv sevov L344 in L350, ki sta predhodno izkazala pozitivni vpliv na TEER celic Caco-2 (zadržati padec vrednosti TEER), še na celice iste vrste, pri katerih smo medcelične stike porušili s PDB. V ta namen smo celicam Caco-2 v zgornjem prekatu vstavkov z membrano (»Transwell«) dodali PDB v končni koncentraciji 5 μ M za katero je že znano, da poruši tesne stike med epiteljskimi celicami. Bakterijska seva smo celicam Caco-2 dodajali bodisi pred tretiranjem s PDB (2,5 h oz. 6 h), istočasno s PDB ali potem, ko so že bile tretirane s PDB. Tako smo raziskali morebitno preventivno ali kurativno delovanje bakterij proti porušenju medceličnih stikov.

V vseh poskusih smo celicam Caco-2 v zgornjem prekatu vstavkov »Transwell« dodali PDB v končni koncentraciji 5 μ M. Preverili smo:

- ali so izbrane bakterije sposobne varovati celice Caco-2, ko so te istočasno izpostavljene kemikaliji PDB (istočasno delovanje);
- ali predhodno dodane bakterije lahko preprečijo znatno porušenje tesnih stikov s kemikalijo PDB (preventivno delovanje) in
- ali so izbrane bakterije sposobne ponovno vzpostaviti prvotno stanje tesnih stikov po njihovem uničenju s kemikalijo PDB (kurativno delovanje).



Slika 17: Vpliv sevov L344 in L350 na vrednosti TEER pred tretiranjem celic Caco-2 s PDB – preventivno delovanje bakterij

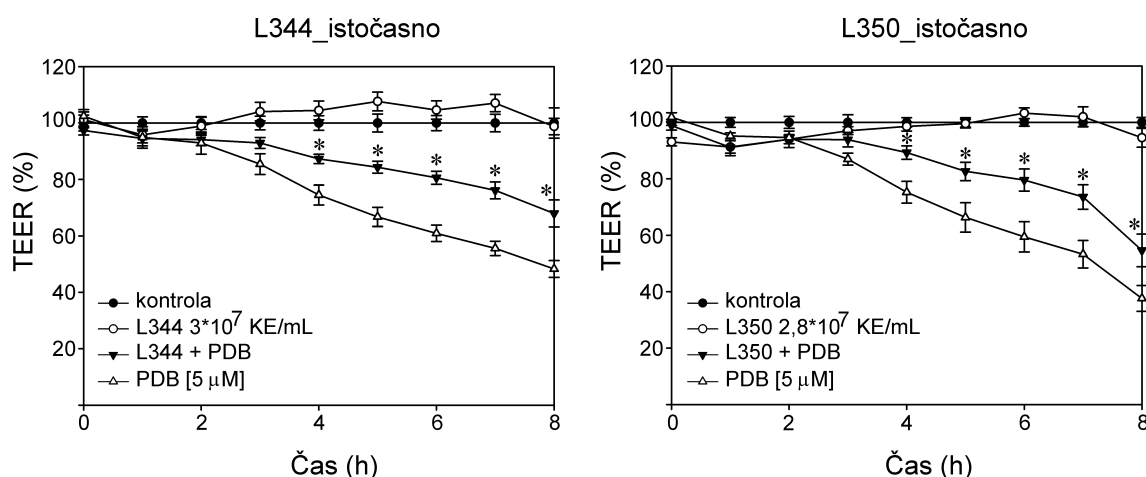
Celicam Caco-2 smo dodali bakterijske celice v koncentraciji približno $3,5 \times 10^7$ KE/mL ter jih inkubirali 2,5 h ali 6 h, preden smo celice tretirali s PDB v končni koncentraciji 5 μ M. Rezultati merjenja TEER so podani kot odstotek upornosti v primerjavi z negativno kontrolo, ki so jo predstavljale netretirane celice Caco-2. Za vsako vrednost je prikazana standardna napaka. Za ugotavljanje statističnih razlik smo uporabili Studentov t-test. Razlike med skupinami podatkov smo smatrali za statistično značilne, če je bila vrednost $p < 0,05$ (*). (*) Zvezdica označuje statistično značilne razlike med rezultati za celice Caco-2, izpostavljene samo PDB in celicami Caco-2, izpostavljene bakterijam in PDB.

Figure 17: The effect of L344 in L350 strains on TEER values of Caco-2 cells before PDB treatment – preventive action of bacteria

$3,5 \times 10^7$ CFU/mL of bacteria were added to Caco-2 cells and incubated for 2,5 h or for 6 h before treatment with PDB (5 μ M). Results of TEER measurements are represented as the percentage of resistance vs. non-treated Caco-2 cells. Error bars indicate Standard Errors. Statistical analysis was performed using Student's t-test. The differences between groups of data were considered statistically significant if $p < 0,05$ (*). (*) Asterisk indicates statistically significant differences between Caco-2 cells stimulated with PDB and Caco-2 cells stimulated with bacteria and PDB.

Iz **slike 17** je razvidno, da sta oba seva sposobna statistično značilno zmanjšati porušenje tesnih stikov med črevesnimi epitelijскими celicami Caco-2 s PDB v razmerah *in vitro* (**slika 17A-B**). Preventivno delovanje seva L344 je bilo bolj izrazito, ko smo celice Caco-2 s sevom L344 inkubirali dalj časa (6 h). Statistično značilne razlike so se pokazale po 1 h, 2 h, 3 h in 4h po naknadni izpostavitvi celic Caco-2 kemikaliji PDB. Preventivna izpostavljenost celic Caco-2 sevu L344 za 6 h ob naknadnem dodatku kemikalije PDB je zvišala vrednosti TEER za do 16 % (**slika 17B**).

Ko smo celice Caco-2 izpostavili bakterijskemu sevu L350 za 2,5 h, je sev zadržal padec vrednosti TEER za 20 % v primerjavi s celicami Caco-2, ki niso bile izpostavljene bakterijam (**slika 17C**). Rezultati so bili statistično značilni od 4 ure do 9 ur po tretiranju s PDB. Statistično značilne razlike smo opazili tudi v primeru, ko smo celice Caco-2 za 6 h preventivno inkubirali s sevom L350 (4 h, 5 h, 6 h). Po dodatku PDB je sev L350 zadržal padec vrednosti TEER do 30 % (**slika 17D**).



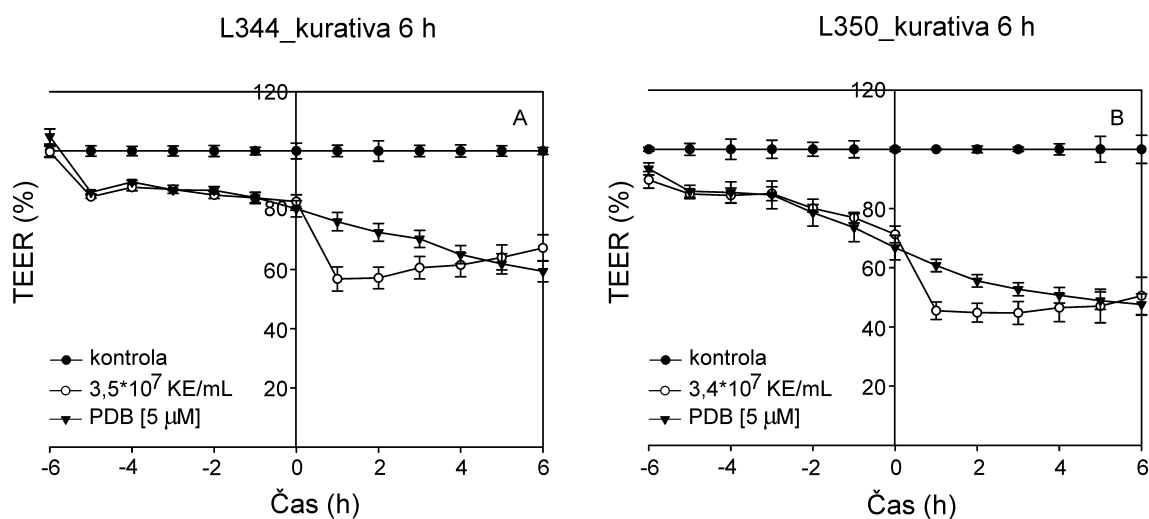
Slika 18: Vpliv sevov L344 in L350 na vrednosti TEER celic Caco-2 ob sočasnem dodatku PDB – sočasno delovanje bakterij

Celicam Caco-2 smo dodali bakterijske celice s koncentraciji približno 3×10^7 KE/mL, kemikalijo PDB v končni koncentraciji $5 \mu\text{M}$ ali kombinacijo bakterij in kemikalije PDB. Po 8-ih urah smo celice Caco-2 vzorčili za analize z RT-qPCR, z WB in s konfokalnim mikroskopiranjem. Rezultati merjenja TEER so podani kot odstotek upornosti v primerjavi z negativno kontrolo, ki so jo predstavljale netretirane celice Caco-2. Za vsako vrednost je prikazana standardna napaka. Za ugotavljanje statističnih razlik smo uporabili Studentov t-test. Razlike med skupinami podatkov smo smatrali za statistično značilne, če je bila vrednost $p < 0,05$ (*). (*) Zvezdica označuje statistično značilne razlike med rezultati za celice Caco-2, izpostavljene samo PDB in celicami Caco-2, istočasno izpostavljene bakterijam in PDB.

Figure 18: The effect of L344 and L350 strains on TEER values of Caco-2 cells together with the addition of PDB – simultaneous action of bacteria

3×10^7 CFU/mL of bacteria, PDB at a concentration of $5 \mu\text{M}$ or combination of bacteria and PDB were added to Caco-2 cells. After 8 h of incubation the Caco-2 cells were sampled for RT-qPCR, WB and confocal microscopy analyses. Results of TEER measurements are represented as the percentage of resistance vs. non-treated cells Caco-2. Error bars indicate Standard Errors. Statistical analysis was performed using Student's t-test. The differences between groups of data were considered statistically significant if $p < 0,05$ (*). (*) Asterisk indicates statistically significant differences between Caco-2 cells stimulated with PDB and Caco-2 cells stimulated simultaneously with PDB and bacteria.

Slika 18 kaže, da je po istočasni izpostavitvi celic Caco-2 kemikaliji PDB in sevu L344 ali L350 prišlo do manjšega padca transepitelne električne upornosti, kot če so bile celice tretirane samo s PDB. Po 7 urah smo izmerili 20 % višje vrednosti TEER pri celicah Caco-2, tretiranih hkrati s PDB in s sevom L344. Podobno se je pokazalo tudi pri sevu L350 (21 % višja TEER). Pri obeh sevih so se statistično značilne razlike v TEER pokazale po 4 h po izpostavitvi bakterijam in PDB ter se kazale vse do konca inkubacije (8 h).



Slika 19: Vpliv sevov L344 in L350 na vrednosti TEER celic Caco-2 po tretiranju s PDB – kurativno delovanje bakterij

Celice Caco-2 smo 6 h stimulirali s kemikalijo PDB v koncentraciji 5 μM in naknadno dodali bakterijske seve v koncentraciji približno 3,5×10⁷ KE/mL. Rezultati merjenja TEER so podani kot odstotek upornosti v primerjavi z negativno kontrolo, ki so jo predstavljale netretirane celice Caco-2. Za vsako vrednost je prikazana standardna napaka. Za ugotavljanje statističnih razlik smo uporabili Studentov t-test. Razlike med skupinami podatkov smo smatrali za statistično značilne, če je bila vrednost $p < 0,05$.

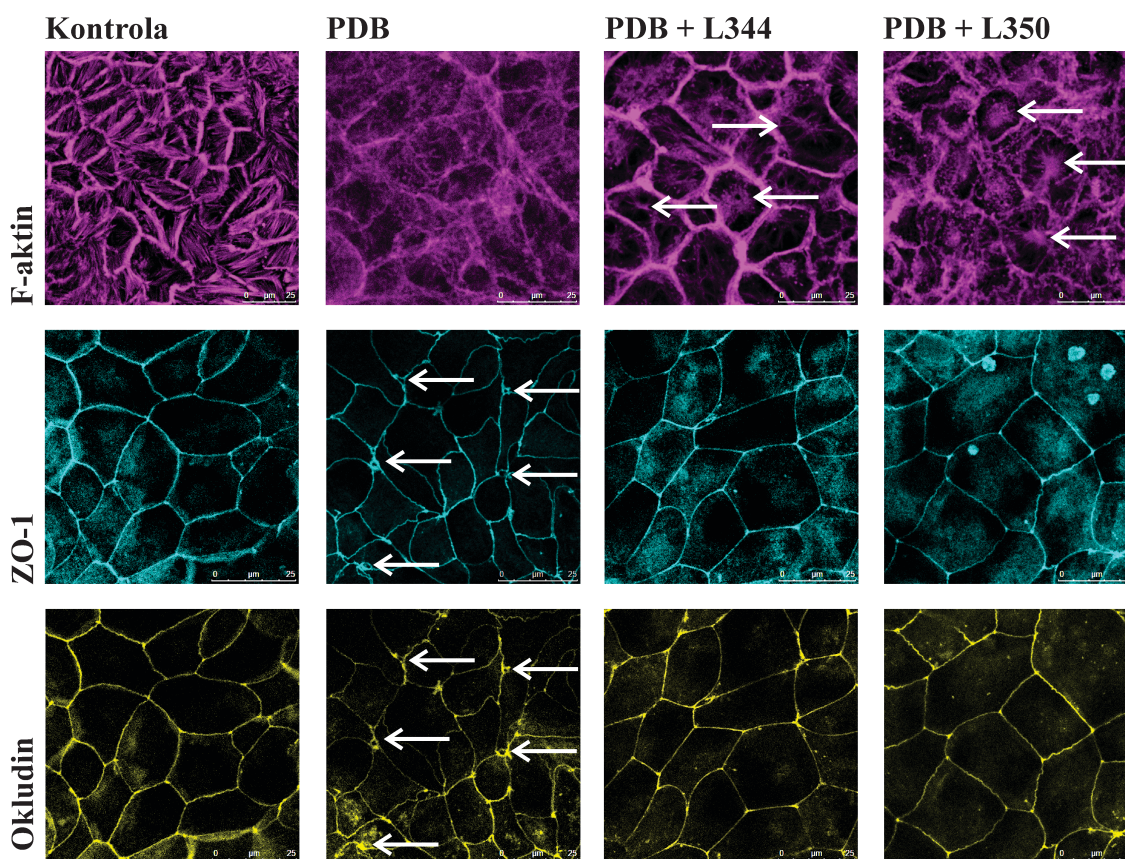
Figure 19: The effect of L344 and L350 strains on TEER values of Caco-2 cells after the addition of PDB – curative action of bacteria

PDB was added to Caco-2 cells at a final concentration of 5 μM and incubated for 6 h before the treatment with bacteria at the concentration of about 3,5×10⁷ CFU/mL. Results of TEER measurements are represented as the percentage of resistance vs. non-treated Caco-2 cells. Error bars indicate Standard Errors. Statistical analysis was performed using Student's t-test. The differences between groups of data were considered statistically significant if $p < 0,05$.

Iz slike 19 je razviden trend pozitivnega vpliva obeh sevov L344 in L350 na ponovno vzpostavitev s PDB porušjenih tesnih stikov, vendar razlike v vrednostih TEER med kontrolno in testno skupino niso bile statistično značilne. Medtem ko je pri celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene le PDB, vrednost TEER konstantno padala med celotno inkubacijo, je transepitelna električna upornost ob dodatku kateregakoli od bakterijskih sevov sicer najprej padla, nato pa se začela zviševati. Znaten padec vrednosti TEER v prvi uri po dodatku bakterij (L344 ali L350) bi bil lahko delno tudi posledica zamenjave gojišča v zgornjem prekatu. Sev L344 je v 6-ih urah zvišal vrednosti TEER za 10 % v primerjavi z vrednosti TEER v prvi uri po dodatku mešanice seva in PDB. Sev L350 je v 6-ih urah zvišal vrednosti TEER za 5 % v primerjavi z vrednosti TEER v prvi uri po dodatku mešanice seva in PDB.

4.5.4 Ugotavljanje vpliva izbranih sevov *L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350 na beljakovine tesnih stikov celic Caco-2 pri istočasnem delovanju bakterijskih sevov in PDB

Vzorci celic Caco-2, ki so bile izpostavljene istočasnemu delovanju izbranih sevov laktobacilov (L344 in L350) in PDB, kakor je opisano v poglavju 3.8.5.2.5, smo po osmih urah inkubacije odvzeli, da bi analizirali izražanje genov za beljakovine tesnih stikov z metodo RT-qPCR ter dokazali njihovo prisotnost z metodo »western blot« in s konfokalnim mikroskopiranjem. Rezultati so prikazani na slikah 20, 21 in 22.



Slika 20: Imunofluorescenčno barvanje beljakovin F-aktin (roza), okcludin (rumeno) in ZO-1 (zeleno) v vzorcih celic Caco-2

Negativno kontrolo predstavljajo netretirane celice Caco-2, v ostalih vzorcih pa so bile Caco-2 sočasno tretirane s PDB in enim od bakterijskih sevov (L344 ali L350), ali pa le s PDB.

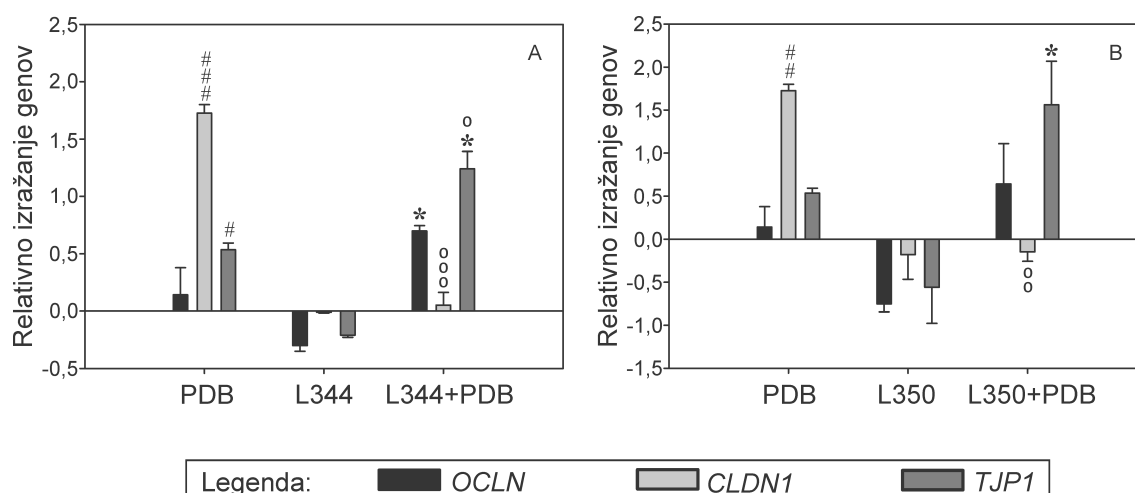
Figure 20: Immuno-fluorescent staining of proteins F-actin (pink), ZO-1 (green) and occludin (yellow) in Caco-2 cells

Non-treated Caco-2 cells represent negative control, while the other samples represent Caco-2 cells that were simultaneously treated with PDB and bacterial strains (L344 or L350) or only with PDB.

Na **sliki 20** so vidne tako razlike v strukturi celične membrane celic Caco-2 kot v razporeditvi aktinskih filamentov. Vidimo, da so pri celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene PDB, na stičiščih membran sosednjih celic vidne okrogle odprtine, ki kažejo na to, da se celice Caco-2 ne držijo več tesno skupaj, torej da je prišlo do poškodb tesnih stikov. V naših poskusih smo najpogosteje opazili odprtine pri hkratnemu stiku treh celic, kjer je v večji meri zgoščena transmembranska beljakovina tricelulin. Jasno je, ker je hkratno povezovanje treh celic težje kot hkratno povezovanje dveh celic, da je prav stičišče treh celic prvo mesto kjer so tesni stiki začeli popuščati, kar je posledično vodilo v nižjo izmerjeno vrednost TEER. Takih poškodb nismo opazili pri celicah Caco-2, ki so bile istočasno inkubirane s PDB in laktobacili. To velja tako za sev L344 kot za sev L350. Ko smo celicam Caco-2 dodali le PDB, je prišlo tudi do prerazporeditve aktinskih filamentov, in sicer smo opazili, da aktinski filament niso več tvorili dobro definiranih snopov, temveč so se kazali kot zamegljena slika. Zanimivo je dejstvo, da je bila razporeditev aktinskih filamentov, ko smo celice Caco-2 istočasno izpostavili PDB in bakterijskim sevom, drugačna tako v primerjavi s kontrolo kot v primerjavi s celicami, tretiranimi s PDB. Aktinski filament niso se namreč zgostili, razporedili v sredini evkariontske celice in se v obliki zvezde podaljšali proti celični membrani.

Na **sliki 21**, kjer so prikazani rezultati analiz celic Caco-2 z metodo RT-qPCR, je razvidno, da je tretiranje celic Caco-2 s PDB spodbudilo izražanje genov za klavdin-1, v manjši meri pa tudi za okludin in ZO-1, medtem ko so bakterijski sevi delovali nasprotno, izražanje treh genov so zavirali.

Prisotnost sevov in PDB je povečala izražanje gena *TJPI* (ZO-1), v primerjavi z izražanjem v celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene le PDB. Pri dodatku seva L350 in PDB smo statistično značilni učinek ugotovili tudi v primeru gena za *OCN* (okludin). Pod vplivom seva L344, dodanega skupaj s PDB, se je izražanje gena *CLDN1* (klavdin-1) zmanjšalo v primerjavi z izražanjem pod vplivom samega PDB, s sevom L350 v kombinaciji s PDB pa celo prevesilo na negativno stran, kar pomeni, da je bilo manjše od izražanja pri netretiranih celicah Caco-2.



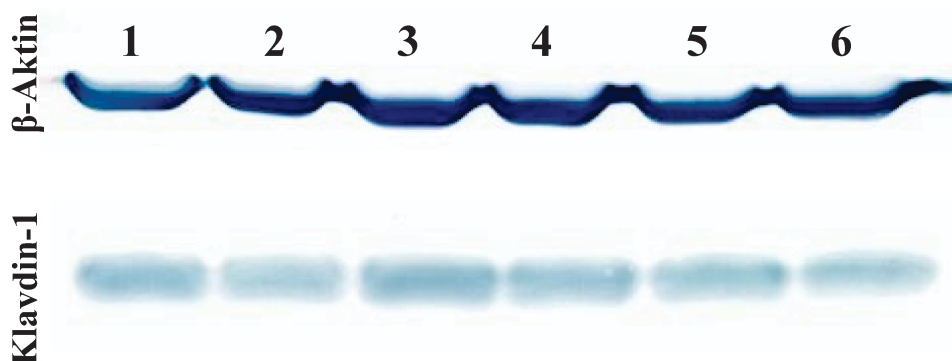
Slika 21: Izražanje genov za beljakovine tesnih stikov: okcludin (*OCLN*), klavdin-1 (*CLDN1*) in ZO-1 (*TJPI*)

Izražanje genov v celicah Caco-2, izpostavljenih PDB (5 μM), bakterijskima sevoma L344 (A) in L350 (B) v koncentraciji $3,5 \times 10^7$ KE/mL, oz. kombinaciji laktobacilov in PDB. Relativne vrednosti so bile izračunane glede na izražanje v netretiranih celicah Caco-2. (*) Zvezdica označuje statistično značilne razlike med rezultati za vzorce, tretirane z laktobacili in PDB, ter vzorce, tretirane samo z laktobacili; (°) krogec označuje statistično značilne razlike med rezultati za vzorce, tretirane z laktobacili in PDB, ter vzorce, tretirane samo s PDB; (#) znak označuje statistično značilne razlike med rezultati za vzorce, tretirane s PDB, ter vzorce netretiranih celic Caco-2. V grafikonu so prikazane standardne napake. Za ugotavljanje statističnih razlik smo uporabljali enosmerno ANOVA in Tukey-ev test mnogoterih primerjav. Razlike med skupinami podatkov smo smatrali za statistično značilne, če je bila vrednost $p < 0,05$. Statistično značilne rezultate smo označili s sledečimi oznakami: * ali ° ali # pomeni $p < 0,05$; ** ali °° ali ## pomeni $p < 0,01$; *** ali °°° ali ### pomeni $p < 0,001$.

Figure 21: The expression of tight junctions proteins' genes: occludin (*OCLN*), claudin-1 (*CLDN1*) and ZO-1 (*TJPI*)

The ratio of gene expression in Caco-2 cells exposed to PDB (5 μM), to L344 (A) and L350 (B) bacterial strains at a concentration of $3,5 \times 10^7$ CFU/mL and to combination of PDB and bacteria. Relative values were calculated in relation to the expression values in non-treated cells Caco-2. (*) Asterisk indicates statistically significant differences between the results obtained with the Caco-2 cells stimulated with bacteria and PDB as well as Caco-2 cells stimulated only with bacteria; (°) circle indicates statistically significant difference between the results obtained with the Caco-2 cells stimulated with bacteria and PDB as well as Caco-2 cells stimulated only with PDB; (#) sign indicates statistically significant difference between the results obtained with the Caco-2 cells stimulated with PDB and non-treated Caco-2 cells. Error bars indicate Standard Errors. Statistical analysis of gene expression data was performed using one-way ANOVA with additional *post hoc* pairwise comparisons by Tukey's test, used to determine differences between the groups at 5 % significance level. Statistically significant results are marked with the following labels: * or ° or # indicate $p < 0,05$; ** or °° or ## indicate $p < 0,01$; *** or °°° or ### indicate $p < 0,001$.

Na **sliki 22**, ki prikazuje rezultate ugotavljanja prisotnosti beljakovine klavdin-1 z metodo »western blot« je vidno, da dobljena lisa pri celicah Caco-2 stimuliranih s bakterijskim sevom L344 (koncentracija 3×10^7 KE/mL) nakazuje na večjo količino beljakovine klavdin-1 tako v primerjavi s kontrolno skupino kot v primerjavi s celicami Caco-2, tretiranimi s PDB. Poleg tega je bila količina klavdina-1 v celicah Caco-2, tretiranih istočasno z bakterijskim sevom L344 in PDB, rahlo višja kot pri celicah Caco-2, izpostavljenih le PDB. Pri celicah Caco-2, stimuliranih s sevom L350, pa nismo opazili podobnih učinkov. Opazili smo tudi, da se spremembe v izražanju gena za *CLDNI*, tako v pozitivnem kot v negativnem smislu, niso pokazale tudi pri produkciji beljakovine klavdin-1, saj je bilo izražanje gena *CLDNI* po stimulaciji celic Caco-2 s kemikalijo PDB višje kot pri netretiranih celicah, medtem ko je bila količina beljakovine klavdin-1 nižja v primerjavi s količino klavdina-1 pri netretiranih celicah Caco-2.



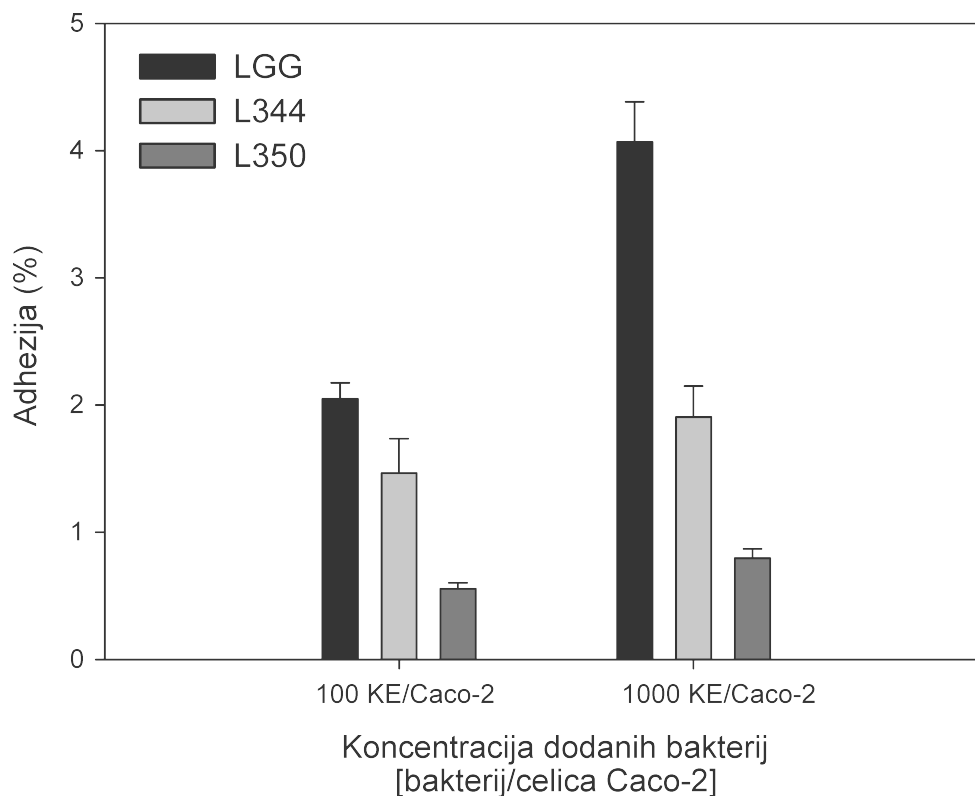
Slika 22: Prikaz lis beljakovine klavdin-1 na membrani PVDF

1: Caco-2; 2: PDB (5 μ M); 3: L344 (3×10^7 KE/mL); 4: L344 + PDB; 5: L350 ($3,5 \times 10^7$ KE/mL); 6: L350 + PDB.

Figure 22: Claudin-1 bands on PVDF membrane

1: Caco-2; 2: PDB (5 μ M); 3: L344 (3×10^7 CFU/mL); 4: L344 + PDB; 5: L350 ($3,5 \times 10^7$ CFU/mL); 6: L350 + PDB.

4.5.5 Ugotavljanje sposobnosti adhezije seva *L. rhamnosus* (L344) in seva *L. paracasei* (L350) na celicah Caco-2 v razmerah *in vitro*



Slika 23: Adhezija (%) sevov LGG[®], *L. rhamnosus* (L344) in *L. paracasei* (L350) na celično linijo Caco-2
V grafu so prikazane standardne napake.

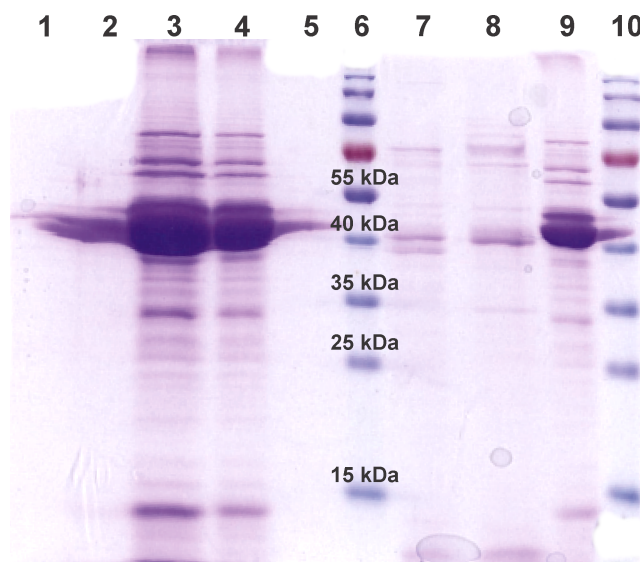
Figure 23: Adhesion (%) of LGG[®], *L. rhamnosus* (L344) and *L. paracasei* (L350) strains to Caco-2 cell line
Error bars indicate Standard Errors.

Sposobnost adhezije izbranih sevov, L344 in L350, smo preverjali v preskusih *in vitro* na celični liniji Caco-2. Diferencirane celice Caco-2 v popolni konfluenci smo izpostavili bakterijam v dveh različnih koncentracijah. Po odstranjevanju nevezanih bakterij s 3-kratnim spiranjem s sterilnim pufrom ter liziranjem celic Caco-2 smo bakterijske celice prešteli z metodo štetja na plošči. Za pozitivno kontrolo smo vključili sev LGG[®]. Rezultati so podani v deležu (%) vezanih bakterij glede na koncentracijo dodanih bakterij (**slika 23**). Iz **slike 23** je razvidno, da je bila vezava obeh izbranih sevov (tako L344 kot L350) na celice Caco-2 v danih razmerah *in vitro* slabša od

vezave referenčnega seva LGG[®]. Opazili smo tudi, da začetna koncentracija pri testiranih sevih (L344 in L350) ni toliko vplivala na adhezijo bakterij na celice Caco-2 kot pri referenčnem sevu LGG[®]. Pri višji koncentraciji dodanih sevov L344 in L350 (1000 KE/Caco-2) je bila adhezija le za 0,4 % višja v primerjavi z nižjo koncentracijo dodanih bakterij (100 KE/Caco-2), pri sevu LGG[®] pa se je ob dodajanju 10-krat večje koncentracije bakterij ta podvojila.

4.6 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI BELJAKOVIN S-SLOJA Z DENATURACIJSKO POLIAKRILAMIDNO GELSKO ELEKTROFOREZO (SDS-PAGE)

Z metodo denaturacijske elektroforeze v poliakrilamidnem gelu smo preverili, ali imata seva *L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350 na svoji površini beljakovine S-sloja. Kakor je razvidno na **sliki 24**, beljakovin S-sloja pri nobenem od preiskanih sevov nismo potrdili.

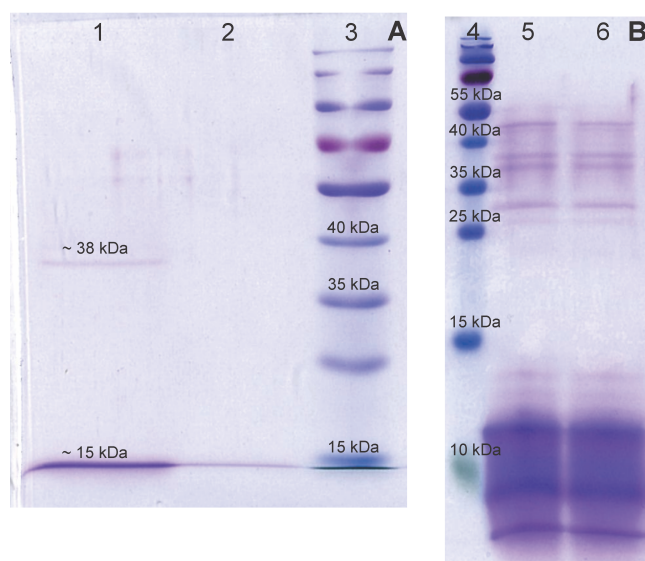


Slika 24: Analiza beljakovin S-sloja z metodo SDS-PAGE

1, 2, 5: negativna kontrola (voda); 6, 10: standardna proteinska velikostna lestvica; 3, 4, 9: pozitivna kontrola, *L. acidophilus* La5[®]; 7: L344; 8: L350.

Figure 24: Analysis of S-layer proteins with SDS-PAGE

1, 2, 5: negative control (water); 6, 10: standard protein molecular weight marker; 3, 4, 9: positive control, *L. acidophilus* La5[®]; 7: L344; 8: L350.



Slika 25: Analiza površinskih beljakovin z metodo SDS-PAGE

A – izolacija s pufrom CP (10 % gel); B – izolacija s 5 M LiCl (15 % gel); 1, 5, 6 – L344; 2 – L350; 3, 4 – standardna proteinska velikostna lestvica.

Figure 25: Analysis of surface-associated proteins with SDS-PAGE

A – isolation with CP buffer (10 % gel); B – isolation with 5 M LiCl (15 % gel); 1, 5, 6 – L344; 2 – L350; 3, 4 – standard protein molecular weight marker.

Slika 25A kaže, da smo s pufrom CP pri sevu L344 ekstrahirali beljakovine, manjše od 15 kDa. Črta, ki jo vidimo pri sevu L350, je črta nalagalnega pufra in ne predstavlja beljakovin. Ločevanje beljakovin v ekstraktu s 5M LiCl je pokazalo prisotnost beljakovin velikosti približno 6 do približno 12 kDa (**slika 25B**).

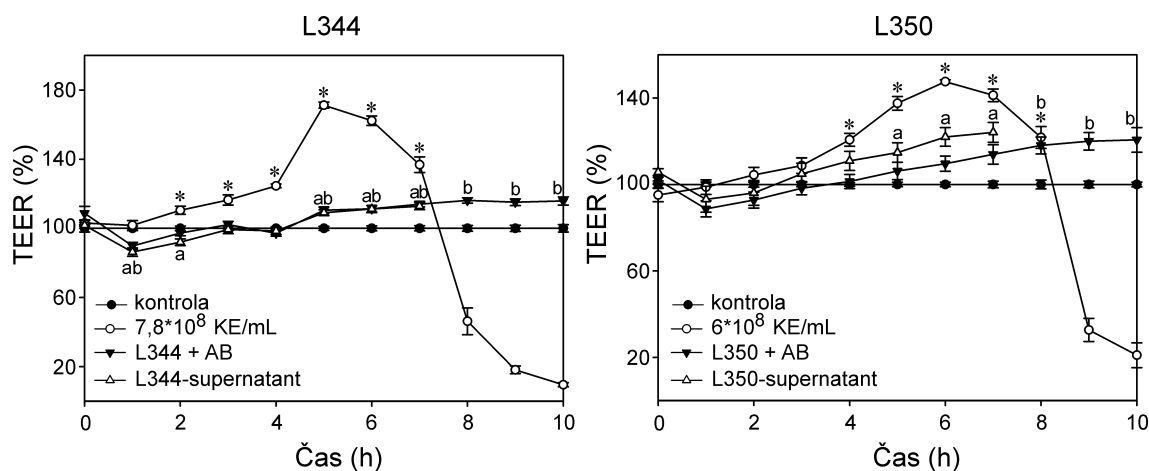
4.7 UGOTAVLJANJE VPLIVA SESTAVIN CELIC LAKTOBACILOV IN METABOLITOV NA FUNKCIONALNOST TESNIH STIKOV CELIC Caco-2

Z merjenjem transepitelne električne upornosti Caco-2 celic, tretiranih z neživimi bakterijskimi celicami obeh sevov ali s supernatantom kulture laktobacilov brez celic, smo raziskali, ali je povečanje transepitelne električne upornosti pri celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene kulturam laktobacilov, posledica interakcije s površino bakterijske celice ali posledica v gojišče sproščenih metabolitov s strani bakterije. V ta namen smo celice Caco-2 stimulirali z aktivnim bakterijskim sevom, s supernatantom aktivnega bakterijskega seva in z bakterijskimi celicami, ki smo jih predhodno inaktivirali s tretiranjem z visoko koncentracijo antibiotikov. Rezultati so grafično prikazani na **sliki 26**.

Preglednica 15: Preživetje *L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350 po 22 h izpostavitve kombinaciji dveh antibiotikov (streptomicina in gentamicina)
(Končna koncentracija antibiotikov: 500 µg/mL za L344 in 250 µg/mL za L350)

Table 15: Viability of *L. rhamnosus* L344 and *L. paracasei* L350 after 22 h treatment with a combination of 2 antibiotics (streptomycin and gentamicin)
(Final concentration of antibiotics: 500 µg/mL for L344 and 250 µg/mL for L350)

Sevi	Začetna koncentracija bakterij [KE/mL]	Preživelost sevov L344 in L350 po 22 h inkubaciji s streptomycinom in gentamicinom	
		[KE/mL]	[%]
L344 <i>L. rhamnosus</i>	8×10^8	66	0,00000825
L350 <i>L. paracasei</i>	6×10^8	412	0,0000687



Slika 26: Vpliv živih ali inaktiviranih sevov *L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350 ter supernatantov brez celic na transepitelno električno upornost (TEER) celic Caco-2 v razmerah *in vitro*

Celice Caco-2 smo izpostavili živim celicam sevov L344 in L350 ($6-7,8 \times 10^8$ KE/mL), neživim celicam istih sevov, inaktiviranih z antibiotikoma streptomycin in gentamicin (AB), in supernatantom istih sevov brez celic, pridobljenih iz 4-urnih (L344) oziroma 6-urnih (L350) kultur laktobacilov v DMEM gojišču. Rezultati so podani kot odstotek upornosti v primerjavi s kontrolo, ki so jo predstavljale netretirane celice Caco-2. Za vsako vrednost je prikazana standardna napaka. Za ugotavljanje statističnih razlik smo uporabili enosmerno ANOVA in Tukey test mnogoterih primerjav. Razlike med skupinami podatkov smo smatrali za statistično značilne, če je bila vrednost $p < 0,05$. (*) Zvezdica označuje statistično značilne razlike med rezultati za celice Caco-2, stimuliranimi s sevoma laktobacilov in rezultati za kontrolno skupino (netretiranimi celicami Caco-2); (a) označuje statistično značilne razlike med rezultati za celice Caco-2, stimulirane s sterilnimi supernatanti, in rezultati za kontrolno skupino; (b) označuje statistično značilne razlike med rezultati za skupino Caco-2, stimuliranih z neživimi bakterijami, in rezultati za kontrolno skupino.

Figure 26: The influence of living or non-living *L. rhamnosus* L344 and *L. paracasei* L350 strains as well as bacteria-free supernatants, on Caco-2 cells TEER values *in vitro*

Caco-2 cells were stimulated with live bacteria at a final concentration of $6-7,8 \times 10^8$ CFU/mL, collapsed bacteria (with the combination of antibiotics – AB) and with a sterile supernatant, obtained after 4 h (L344) or 6 h (L350) of incubation in DMEM growth medium. Results of TEER measurements are represented as the percentage of resistance vs. non-treated Caco-2 cells. Error bars indicate Standard Errors. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with additional *post hoc* pairwise comparisons made by employing Tukey's test. The differences between groups of data were considered statistically significant if $p < 0,05$. (*) Asterisk indicates statistically significant differences between Caco-2 cells stimulated with bacterial cells and control (non-treated Caco-2 cells); (a) indicates statistically significant differences between Caco-2 cells stimulated with bacteria free-supernatant and control; (b) indicates statistically significant differences between Caco-2 cells stimulated with collapsed bacteria and control.

Rezultati na **sliki 26** kažejo, da so žive celice obeh sevov značilno povečale transepitelno električno upornost nepoškodovanih celic Caco-2. Pri sevu L344 smo po petih urah izmerili za 71 % višjo TEER kot pri netretiranih celicah Caco-2, pri sevu L350 pa po šestih urah za 48 % višjo.

V obeh primerih je iz slike razvidno, da sta tako sterilni supernatant kot z antibiotiki inaktivirane bakterijske celice sposobni povišati vrednosti TEER do statistično značilnih razlik. Iz slike je tudi razvidno, da supernatant tako kot inaktivirana bakterijska seva nista sposobna zvišati TEER na vrednost, ki jo dosežeta živa bakterijska seva. Nežive bakterijske celice seva L344 so po 8 h zvišale vrednosti TEER za 16 %, brezcelični supernatant istega seva pa po 7 h za 13 %. Podobno se je pokazalo pri sevu L350, pri katerem je bila po 10 h inkubacije z neživimi celicami TEER višja za 21 % v primerjavi z netretiranimi celicami Caco-2, po 7 h inkubacije s supernatantom kulture istega seva pa za 24 % višja.

Rezultati kažejo, da na tesnost apikalnih celičnih stikov, ki jo ocenjujemo s pomočjo merjenja TEER, ne vplivajo le sestavine celične površine laktobacilov, ampak tudi druge snovi, ki so produkt metabolizma laktobacilov.

5 RAZPRAVA

5.1 IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ IZ RODU *Lactobacillus* IN *Bifidobacterium* IZ HUMANE ČREVESNE SLUZNICE

Za namen raziskave smo od 15-ih otrok pridobili vzorce blata in biopsijske vzorce humane črevesne sluznice (1 iz ileuma in 1 iz kolona). Glede na to, da so bili otroci pred endoskopskim posegom izpostavljeni popolni izpraznitvi črevesne votline in da smo naknadno vzorce črevesne sluznice izpirali, obstaja velika verjetnost, da so bakterije, ki so zrasle na selektivnih gojiščih, resnično del naravne mikrobiote črevesne sluznice, ne pa le predstavniki prehodne mikrobiote.

Število laktobacilov (KE/mg) v biopsijskih vzorcih, odvzetih tako iz ileuma kot iz kolona, je bilo približno enako številu koliformnih bakterij in višje od števila *Enterobacteriaceae*, enterokokov in *E. coli*. Razmerje pregledanih skupin bakterij v črevesni sluznici je dokaj običajno. Tudi Ahrné in sod. (1998) in Reuter (2001), ki so raziskovali mikrobioto sluznice ileuma otrok in odraslih, so prišli do podobnih ugotovitev. V naši raziskavi se je število laktobacilov in bifidobakterij gibalo med 10^1 in 10^4 KE/mg vzorca, pri čemer nismo zasledili večjih razlik med ileumom in kolonom. Mediana števila laktobacilov v ileumu je bila 5×10^2 KE/mg in v kolonu 2×10^2 KE/mg, medtem ko med medianami števila bifidobakterij v ileumu in kolonu ni bilo razlik (3×10^2 KE/mg). Veliko število bifidobakterij, ki smo jih določili v biopsijskih vzorcih, je bilo najverjetneje vsaj delno posledica nezadostne selektivnosti izbranega gojišča TOS.

Ahrne in sod. (2005) so zasledili, da se struktura skupnosti laktobacilov v blatu v obdobju prvih 6 mesecev življenja popolnoma razlikuje od strukture laktobacilov starejših otrok (od 6 do 18 mesecev starosti). V prvih 6-ih mesecih so prevladovalе bakterije iz vrst *L. gasseri* in *L. rhamnosus*, medtem ko so populacijo laktobacilov v kasnejši fazi sestavljale bakterije vrst *L. paracasei*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* in *L. acidophilus*. Opazili so tudi, da je bilo število laktobacilov v blatu najvišje pri 6-mesečnih dojenčkih, in sicer 10^9 KE/g blata, kasneje pa je število padalo vse do 10^5 KE/g blata pri 12 mesečnih otrocih. Naši rezultati števila laktobacilov v blatu

najstnikov, so bili zelo podobni tistim, ki jih Ahrne in sod. (2005) navajajo za blato 12 mesečnih otrok, saj smo določili približno 3×10^5 KE/g blata.

Med bakterijami, zraslimi na selektivnih gojiščih, smo na podlagi morfoloških lastnosti izbrali po 15 kolonij potencialnih laktobacilov in po 15 kolonij potencialnih bifidobakterij za nadaljnje postopke čiščenja in identifikacije. Skupaj smo izbrali 469 kolonij, od katerih smo jih 227 izolirali iz gojišča Rogosa za laktobacile in 242 iz gojišča TOS za bifidobakterije.

Kljub večkratnem zaporednem čiščenju izolatov smo ugotovili, da so bile nekatere izrasle bakterijske kolonije še vedno mešane kulture, zato smo čistosti izolatov posvetili posebno pozornost in jo dodatno preverjali z razmazovanjem na kromogeno gojišče URISelect in z analizo DNA z metodo DHPLC. DHPLC je molekularna metoda, ki je v osnovi namenjena razlikovanju med vrstami, v našem primeru pa se je izkazala za uporabno tudi pri ugotavljanju čistosti bakterijskih kultur. Problem izolacije čistih sevov iz kompleksnih okoljskih vzorcev je sicer pogosto spregledan. Zavedamo se tudi, da smo s pomočjo metode DHPLC zaznali, da kultura ni čista, samo v primeru, da so bili prisotni izolati različnih vrst, različnih sevov iste vrste pa s to metodo ne bi mogli razlikovati. Taki rezultati kažejo na možnost uporabe DHPLC tudi v identifikacijskih postopkih na primer laktobacilov, izoliranih iz specifičnih okolij, kot je črevesna mukoza. Za razlikovanje med sevi iste vrste smo v naši raziskavi uporabili metodo RAPD-PCR, ki temelji na naključnem pomnoževanju delov bakterijskega genoma s PCR. Uporabili smo 3 različne začetne oligonukleotide (1254, KGT-80, M13), s katerimi smo pregledali vseh 469 izolatov. Razlik med zelo podobnimi sevi z RAPD-PCR ne moremo vedno ugotoviti, pri čemer so nekateri začetni oligonukleotidi lahko bolj uspešni kot drugi. Zato je za uspešno razlikovanje med sevi priporočljivo narediti več analiz RAPD, v katerih uporabimo različne začetne oligonukleotide. Izkazalo se je, da je uporaba treh različnih začetnih oligonukleotidov omogočala zaznavanje več med seboj različnih RAPD vzorcev, kot če bi v ta namen uporabili le en začetni oligonukleotid. Glede na dobljeni vzorec smo izolate razvrstili v 20 skupin. Skupnost na črevesno mukozo pripetih laktobacilov, ki smo jih izolirali iz biopsijskih vzorcev ileuma in kolona, ni bila zelo raznolika, saj smo iz vsakega prostovoljca največkrat izolirali le

po en (redko dva) sev iz rodu laktobacilov. Iste seve laktobacilov smo zasledili tako v vzorcih ileuma kot v vzorcih kolona, kar kaže na njihovo sposobnost kolonizacije različnih delov črevesja.

Po enega predstavnika 20-ih različnih skupin RAPD smo identificirali s sekvenciranjem 16S rDNA. Ne glede na to, ali so bili pridobljeni s selektivnega gojišča za laktobacile (Rogosa) ali za bifidobakterije (TOS+mup), so se vsi izolati, razen enega, naknadno identificiranega kot *B. animalis* subsp. *animalis* (IM386), po identifikaciji s sekvenciranjem 16S rDNA, izkazali za laktobacile. Identificirani predstavniki laktobacilov so pripadali naslednjim vrstam: *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* in *L. gasseri*. Rezultati kažejo na to, da selektivno gojišče TOS+mup, namenjeno izolaciji bifidobakterij, ni dovolj selektivno za ta rod. Rezultati prejšnjih študij niso v skladu z našimi. Naši rezultati o nezadostni selektivnosti trdnega gojišča TOS+mup nasprotujejo študiji Simpson-a in sod. (2004), ki navaja, da je gojišče, ki temelji na dodatku antibiotika mupirocina, selektivno za bifidobakterije in ne omogoča rasti MKB, a hkrati podpirajo rezultate iz študije Turrone in sod. (2009), ki poročajo tudi o rasti drugih po Gramu pozitivnih bakterij na tem gojišču.

Menimo, da smo v postopkih zaporednega precepljanja posameznih kolonij, izraslih na gojišču za bifidobakterije (TOS+mup agar), izrasle bifidobakterije izgubili, saj so jih laktobacili prerasli, ker so bolje prenesli izpostavljanje aerobnim razmeram. Znana je občutljivost bifidobakterij za kisik. Postopka izolacije in čiščenja bakterijskih kultur nismo opravljali v popolnoma anaerobnih razmerah, saj je bil naš namen pridobiti bolj »robustne« izolate bifidobakterij, primerne za gojenje in pripravo probiotičnih pripravkov. Manjša občutljivost sevov bifidobakterij za kisik je zaželena, saj omogoča učinkovite industrijske procese pridobivanja probiotičnih kultur, pa tudi boljše stabilnost izdelkov med skladiščenjem. Znano je, da so posamezni predstavniki *Bifidobacterium animalis* zelo odporni proti stresnim dejavnikom, vključno s kisikom (Li in sod., 2010b; Masco in sod., 2005). Nedavno so raziskovalci zasledili predstavnike vrste *B. animalis* subsp. *lactis* tudi v vzorcih sluznice debelega črevesja odraslih osebkov, čeprav v zelo majhnem deležu (1%) (Turrone in sod., 2009). Koncentracijo bifidobakterij v biopsijskih vzorcih črevesja smo ugotavljali tudi z metodo qPCR, ki ja

pokazala relativno visoke koncentracije tega rodu (mediana 2×10^4 kopij 16S rDNA na mg mukoze, neobjavljeni rezultati). Potrebno pa je poudariti, da rezultati, pridobljeni z metodo qPCR, zajemajo tako žive kot propadle in nekultivabilne bakterije (*angl.* viable but non-culturable).

Poleg nezadostne selektivnosti gojišča TOS+mup smo pri delu opazili tudi slabšo selektivnost gojišča Rogosa, kar pa ni presenetljivo ali novo. Selektivnost tega gojišča, namenjenega rasti laktobacilov, temelji na nizkem pH in vsebnosti oetne kisline, ne vsebuje pa nobenih antibiotikov. Tudi Ahrné in sod. (2005) so poročali o slabi selektivnosti gojišča Rogosa za laktobacile, saj so na gojišču Rogosa iz blata dojenčkov večinoma zrasle bakterije iz rodu *Bifidobacterium*. V naši študiji smo izolirali iz gojišča Rogosa poleg laktobacilov tudi enterokoke in *Pediococcus acidilactici*. Razlika med raziskavo Ahrné-ja in sod. (2005) ter našo raziskavo, ki zadeva sestavo bakterijske združbe, zrasle na gojišču Rogosa, izvira lahko tudi iz razlike v starostni strukturi preiskovanih skupin. Medtem ko so bili vzorci blata v omenjeni raziskavi Ahrné-ja in sod. (2005) pridobljeni iz 18 mesecev starih dojenčkov, pri katerih so bifidobakterije običajno zelo dobro zastopane, so bili naši preiskovanci v povprečju stari 15 let. Nielsen in sod. (2003a) pa so poročali, da iz kolona odraslega človeka niso izolirali niti enega predstavnika iz rodu *Pediococcus*. Naši rezultati kažejo na to, da bi lahko bile bakterijske iz rodu *Pediococcus* značilne za črevesno sluznico mladostnikov.

V naši študiji je bila vrsta *L. paracasei* najštevilčnejša v črevesnih biopsijskih vzorcih. Številne raziskave potrjujejo, da so vrste *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* in *L. delbrueckii* običajno del prehodne mikrobiote glede na to, da so pogoste komponente fermentiranih živil in se po zaužitju take hrane izločajo v blatu. Nekateri probiotiki, ki jih zaužijemo s hrano, pa se lahko tudi za dalj časa naselijo v črevesu. Tako so McCartney in sod. (1996) poročali, da je isti sev laktobacilov (eden vrste *L. acidophilus*, drugi vrste *L. fermentum*) pri testiranih posameznikih prevladoval tekom 12-mesečnega obdobja po prenehanju uživanja tega probiotika in da je bilo število omenjenega seva v blatu vedno zelo visoko. Omenjeni rezultati kažejo na dejstvo, da so bile povišane vrednosti posledica razmnoževanja testiranega seva v črevesju in ne samo rezultat zaužite hrane. O podobnih ugotovitvah so poročali tudi Zoetendal in sod. (2002), ki so

opazili, da je bila mikrobna združba laktobacilov pri testiranih posameznikih ista v vzorcih sluznice in vzorcih blata.

Kolikor nam je znano, je bilo le malo raziskav opravljenih na biopsijskih vzorcih črevesne sluznice. Rezultati v naši raziskavi delno podpirajo ugotovitve Nielsen in sod. (2003a), da izolirani sevi laktobacilov sodijo v skupino *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*) in ugotovitve Zoetendal in sod. (2002), ki so zasledili večinoma vrsto *L. gasseri*. Omeniti pa je treba, da sta obe omenjeni študiji potekali le na vzorcih sluznice kolona. Ahrné in sod. (1998) so zasledili, da sta v rektalni sluznici najštevilčnejši vrsti *L. plantarum* (52 %) in *L. rhamnosus* (26 %), medtem ko so Molin in sod. (1993) poročali, da so najpogostejše izolirane vrste laktobacilov iz biopsijskih vzorcev črevesne sluznice *L. rhamnosus*, *L. salivarius* in vrste skupine *L. acidophilus*.

V naši študiji smo opazili, da so imeli številni izolati iz sluznice ileuma enak profil RAPD kot izolati iz sluznice kolona, kar kaže na to, da so se enaki sevi sposobni naseliti tako v ileumu kot v kolonu. V naši raziskavi smo izolirali 3 seve laktobacilov, ki smo jih identificirali kot *L. rhamnosus*. Eden najbolj razširjenih probiotičnih sevov, ki ga najdemo v živilih in prehranskih dopolnilih, je *L. rhamnosus* GG[®]. Glede na to, da bi tudi naši preiskovanci lahko imeli v svoji črevesni mikrobioti sev LGG[®] kot posledico vnosa iz številnih živil in prehranskih dopolnil, smo preverili, ali so naši izolati v resnici sev LGG[®]. V ta namen smo izvedli PCR, ki je specifičen za sev LGG[®] (Ahluoos in Tynkkynen, 2009). Rezultati reakcije PCR so bili za enega od treh testiranih sevov sicer pozitivni (L930a), vendar se je sev po vzorcu RAPD in po rezultatih fermentacijske sposobnosti, ki smo jo ugotavljali s sistemom API razlikoval od seva LGG[®]. Zaključimo lahko, da gre za različna seva ter da reakcija PCR ni bila dovolj specifična za sev LGG[®].

Večina opisanih probiotičnih sevov iz rodu *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* je bila izolirana iz človeškega blata, iz mlečnih izdelkov in iz drugih fermentiranih živil (Blana in sod., 2014; Jimenez in sod., 2010; Messaoudi in sod., 2012). Znano je, da črevesno mikrobioto sestavljajo mikroorganizmi iz črevesne svetline, ki so prehodni in predvsem odvisni od prehranskih navad, in mikroorganizmi, ki so pripeti na črevesno sluznico.

Slednji predstavljajo avtohtono mikrobioto, ki se načeloma razlikuje od mikrobiote črevesne svetline (Araujo-Perez in sod., 2012; Turrone in sod., 2009). Ugodni učinki komezalnih bakterij, vključno z laktobacili in bifidobakterijami, so v veliki meri odvisni od njihove sposobnosti, da vsaj začasno kolonizirajo prebavni trakt. Medtem ko izvor bakterij iz blata ni zagotovilo za njihovo učinkovito kolonizacijo črevesja (Hautefort in sod., 1999), je za izolate, ki so del mikrobiote črevesne sluznice, bolj verjetna uspešna in vztrajna kolonizacija črevesja. Glede na to, da je učinkovita kolonizacija lastnost, specifična za sev, je raziskovanje posameznih sevov, ki so del mikroorganizmov sluznice in ki so obstojni v gastrointestinalnem traktu, izjemno pomembno za boljše razumevanje lastnosti in mehanizmov, odgovornih za uspešno črevesno kolonizacijo.

5.2 KARAKTERIZACIJA IZBRANIH SEVOV

5.2.1 Fenotipska karakterizacija: izkoriščanje virov ogljika

Sistem API 50 CH se velikokrat uporablja v identifikacijske namene, vendar smo v naši študiji z uporabo sistema API 50 CH nepravilno identificirali številne izolate, in sicer: *L. paracasei* kot *L. plantarum* (2/7); *L. fermentum* kot *L. salivarius* (1/6) ali *L. cellobiosus* (2/6), *L. rhamnosus* kot *L. paracasei* (1/4); *L. gasseri* kot *Leuconostoc mesenteroides* (1/1) in *B. animalis* subsp. *animalis* kot *L. paracasei* (1/1). S metodo sistema API smo pravilno uvrstili le vse predstavnike *L. plantarum* (3/3). Raziskovalci so že opozarjali, da fermentacijski profil API ni popolnoma zanesljivo orodje za identifikacijo laktobacilov na ravni vrste in da se rezultati, pridobljeni s sistemom API, močno razlikujejo od rezultatov, pridobljenih z uporabo metode sekvenciranja 16S rDNA. Vsekakor pa je sistem API zelo koristen pri preiskovanju fermentacijske sposobnosti proučevanih sevov (Ahrne in sod., 1998; Pulido in sod., 2007).

Laktobacili in bifidobakterije so kot predstavniki naravne črevesne mikrobiote trajno izpostavljeni številnim prilagoditvam na različne vire ogljika, ki so posledica dnevnega vnosa raznovrstnih živil. Zmogljivost bakterijskih sevov, da presnavljajo širok spekter virov ogljika, poveča njihovo učinkovito kolonizacijo prebavnega trakta. Sevi vrste *L. rhamnosus* in *L. plantarum*, katerim sledijo sevi vrste *L. paracasei*, so pokazali najboljšo fermentacijsko sposobnost različnih virov ogljikovih hidratov. V primerjavi z zgoraj naštetimi skupinami so sevi vrste *L. fermentum* sposobni uspešno izkoriščati le polovico manj sladkorjev. Naša dognanja so pričakovana, saj je znano, da je sposobnost bakterij, da presnavljajo različne ogljikove hidrate, odvisna od velikosti njihovega genoma. Sevi vrste *L. plantarum*, *L. rhamnosus* in *L. paracasei* imajo največje genome v rodu *Lactobacillus* (~ 3 Mb) (O'Donnell in sod., 2013; Smokvina in sod., 2013). Obstajajo pa tudi precejšnje razlike v številu različnih virov ogljika, ki so jih sposobni izrabljati, tudi znotraj sevov iste vrste, ne glede na velikost njihovega genoma. Izolati iz črevesne sluznice, označeni kot L350 (*L. paracasei*), L203p (*L. rhamnosus*) in L344 (*L. rhamnosus*), so bili sposobni izkoriščati 26 ali 27 različnih testiranih sladkorjev, medtem ko so referenčni probiotični sevi *L. casei* DN-114 001 in *L. rhamnosus* GG[®] fermentirali le 21 oz. 18 različnih vrst sladkorjev (**priloga A**).

Poleg uporabe uveljavljenega sistema API 50 CH (BioMérieux, France) smo preskusili tudi uporabnost sistema za fenotipsko identifikacijo Biolog, ki je sicer razširjen v klinični mikrobiologiji, še posebej pri identifikaciji po Gramu negativnih bakterij (Klingler in sod., 1992; Miller in Rhoden, 1991). Identifikacija s sistemom Biolog temelji na ugotavljanju sposobnosti izkoriščanja 95-ih različnih virov ogljika. V naši raziskavi se je pokazalo, da je bila ponovljivost rezultatov preskušanja s sistemom Biolog slaba, identifikacija laktobacilov pa nezanesljiva. Zaključimo lahko, da je omenjeni sistem neuporaben za identifikacijo bakterij iz rodu *Lactobacillus*, izoliranih iz črevesne sluznice. Tudi druge raziskave so pokazale na pomanjkljivosti identifikacije različnih rodov s sistemom Biolog (Di Cagno in sod., 2010; Morgan in sod., 2009; Olsson in sod., 2004; Wünsche in Babel, 1996).

5.2.2 Občutljivost za antibiotike

V novejši medicini predstavlja uporaba antibiotikov osnovo za boj proti bakterijskim okužbam, še posebej za boj proti patogenim mikroorganizmom. Izpostavljenost antibiotikom spodbuja bakterije, da razvijejo nove mehanizme za premagovanje učinkov protimikrobnih snovi. Trenutna razširjenost odpornosti proti antibiotikom je dosegla zaskrbljujočo raven ter trenutno predstavlja eno glavnih skrbi javnega zdravstva in izziv številnim raziskovalcem po celem svetu. Poleg tega, da je pretirana uporaba antibiotičnega zdravljenja bakterijskih infekcij izzvala prilagajanje patogenih mikroorganizmov in s tem njihovo odpornost, predstavlja tudi prisotnost antibiotske odpornosti pri komenzalni mikrobioti (med katerimi spadajo tudi probiotični sevi) določeno tveganje, ki ga ne smemo zanemariti, saj je širjenje zapisov za odpornost mogoče tudi med predstavniki različnih vrst. Zaradi tega je prisotnost genskih determinant antibiotske odpornosti, kar posledično lahko vodi v prenos zapisov na patogene bakterije in komenzalno mikrobioto črevesja, nezaželena lastnost sevov, ki bi se lahko potencialno uporabljali kot probiotiki v komercialne namene. Temeljita raziskava varnosti teh mikroorganizmov je zato bistvenega pomena. Bakterijski sev, ki ga uporabljamo kot probiotik za ljudi, ne sme imeti genskih zapisov za rezistenco proti antibiotikom, ali pa moramo dokazati, da se prisotni zapisi ne morejo prenesti na druge

bakterije, saj bi sicer lahko sami predstavljali temeljni rezervoar za širjenje odpornosti (Ashraf R. in Shah, 2011; Devirgiliis in sod., 2011; EFSA, 2012; Poonam Sharmaa in sod., 2014).

Poznavanje razširjenosti odpornosti laktobacilov proti antibiotikom temelji skoraj v celoti na sevih, izoliranih iz hrane, krme, prehranskih dopolnil ali vzorcev blata. Temu primerno so nove informacije o odpornosti laktobacilov, izoliranih iz humane črevesne sluznice, izrednega pomena. Ocena o vzorcu odpornosti laktobacilov proti antibiotikom je pomembna, saj lahko le na tak način omejimo oz. onemogočimo uporabo probiotičnih sevov s prenosljivimi zapisi za odpornost proti antibiotikom.

V ta namen smo v našem raziskovalnem delu testirali odpornost vseh 20 novih izolatov proti najpogosteje uporabljenim antibiotikom tako v medicini kot v veterini. Pri interpretaciji rezultatov in pri izbiri sevov za nadaljnje testiranje smo upoštevali mejne minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), podane s strani EFSA (EFSA, 2012). O odpornosti bakterijskih sevov proti določenemu antibiotiku govorimo, kadar je izmerjena MIK večja od mejne MIK.

Na splošno bakterije iz rodu *Lactobacillus* kažejo visoko naravno (intrinzično) odpornost proti antibiotikom bacitracinu, cefoksitinu, ciprofloksacinu, fusidni kislini, kanamicinu, gentamicinu, metronidazolu, streptomycinu, sulfadiazinu, nalidksični kislini in vankomicinu (Bernardeau in sod., 2008; Blandino G., 2008; Kastner in sod., 2006; Temmerman in sod., 2003). Blandino in sod. (2008) so dokazali intrinzično odpornost proti vankomicinu za *L. paracasei*, *L. salivarius* in *L. plantarum*. Laktobacili so pogosto bolj občutljivi za antibiotike, ki inhibirajo sintezo celične stene, kot so kloramfenikol, eritromicin, klindamicin, tetraciklin, penicilin in ampicilin, ter bolj odporni proti aminoglikozidnim antibiotikom, kot so neomicin, kanamicin, streptomycin in gentamicin (Coppola in Succi, 2005; Danielsen in Wind, 2003; Zhou in sod., 2005). Neredko zasledimo tudi odpornost laktobacilov proti tetraciklinu in eritromicinu, ki je posledica pridobljene odpornosti, pri kateri so pogosto vpleteni geni *tetM* in *ermB* (Ammor in sod., 2008; Klare in sod., 2007; Ouoba in sod., 2008).

Bifidobakterije so bolj občutljive za ampicilin, cefotaksim in eritromicin ter intrinzično odporne proti streptomycinu, gentamicinu in mupirocinu (Blandino, 2008; Mättö in sod., 2006; Serafini in sod., 2011). Glede odpornosti proti tetraciklinu pri rodu *Bifidobacterium* je potrebna posebna pozornost, saj je odpornost zelo verjetno pridobljena (Aires in sod., 2007).

V naši študiji smo opazili visoko vrednost MIK ($\geq 256 \mu\text{g/mL}$) pri vseh sevih laktobacilov proti vankomicinu, metronidazolu in teikoplaninu (razen občutljivosti skupine *L. acidophilus* za vankomicin). Dobljeni rezultati so v skladu s prejšnjimi študijami o intrinzični odpornosti laktobacilov proti zgoraj naštetim antibiotikom (izjema je občutljivost skupine *L. acidophilus* za vankomicin). Pri intrinzični odpornosti se geni nahajajo na kromosomski DNA in zato niso prenosljivi, sevi z intrinzično odpornostjo pa ne predstavljajo tveganja s stališča varnosti (Klein in sod., 2000; Nelson, 1999). V primeru seva *L. gasseri* L916, ki sodi v skupino *L. acidophilus*, pa lahko odpornost proti vankomicinu predstavlja določeno tveganje za horizontalni prenos na druge bakterije, zato bi morali, če bi sev želeli uporabiti v prehrani, raziskati gensko ozadje opažene odpornosti. Odpornost sevov za metronidazol in teikoplanin ni problematična, ker so možnosti prenosa zanemarljive in zaradi tega s strani EFSA mejne MIK niso določene. Medtem ko je rezistenca laktobacilov proti vankomicinu, metronidazolu in teikoplaninu intrinzična, se odpornost proti eritromicinu in tetraciklinu pojavlja le sporadično (Klare in sod., 2007).

Pomembno je tudi poudariti varnost seva *B. animalis* subsp. *animalis* IM386 glede odpornosti proti antibiotikom, saj je omenjeni sev občutljiv za vse testirane antibiotike. Nasprotno so pri številnih bifidobakterijah, vključno s predstavniki *B. animalis* subsp. *lactis*, celo tistimi v komercialni rabi (BB-12[®]), zaznali odpornost proti tetraciklinu ali eritromicinu (Aires in sod., 2007; van Hoek in sod., 2008). Pri bakterijskih sevih, ki so izkazali fenotipsko odpornost proti antibiotikom tetraciklinu in eritromicinu ter pri sevu *L. gasseri* L916, ki je izkazal odpornost proti vankomicinu, smo testirali še prisotnost določenih genov, za katere so največkrat dokazali, da jih imajo sevi s pridobljeno odpornostjo. Nobeden od testiranih sevov ni pokazal prisotnosti zapisov za testirane gene, kar seveda omejuje možnost horizontalnega prenosa, a možnosti ne izključuje v

celoti. Zaradi tega smo za nadaljnje testiranje funkcionalnosti izbrali seve, ki niso pokazali odpornosti proti nobenemu od testiranih antibiotikov, razen proti tistim, za katere je znana intrinzična odpornost. To so bili sevi L344, L350, L916, L930 bb in IM386. Pri ostalih bi bilo potrebno raziskati, ali gre za kromosomske mutacije, ki ne predstavljajo tveganja za prenos rezistence, ali pa za pridobitev genskih elementov, kar pa pri sevih namenjenih za prehrano ljudi in živali ni sprejemljivo.

Trinajst od vseh testiranih sevov ni pokazalo odpornosti proti antibiotikom po kriterijih EFSA, torej so v pogledu rezistence proti antibiotikom varni za uporabo v prehranski verigi človeka in živali (Čitar in sod., 2015). Nekatere mikroorganizme, za katere vemo, da imajo intrinzično odpornost proti določenemu antibiotiku, bi lahko uporabili tudi pri obnovitvi črevesne mikrobiote med oz. po zdravljenju z istimi antibiotiki.

5.3 VREDNOTENJE PROBIOTIČNIH LASTNOSTI

5.3.1 Ugotavljanje sposobnosti preživetja sevov v simuliranih gastrointestinalnih razmerah

Predpogoj, ki omogoča izbranim probiotičnim sevom, da po zaužitju s svojimi lastnosti pomagajo gostitelju, je njihova sposobnost preživetja prehoda skozi želodec in dvanajstnik v tanko črevo. Predpogoj za probiotično delovanje proti patogenim mikroorganizmom (zaviralno delovanje) in vpliv na imunski sistem gostitelja je odvisen od živosti probiotikov, ker le živi mikroorganizmi lahko naselijo prebavila in izkažejo pozitivne funkcionalne učinke na zdravje gostitelja. Zaradi tega smo preverili sposobnost preživetja izbranih sevov v simuliranih gastrointestinalnih razmerah. Poleg lastnih izolatov iz črevesne sluznice smo med preskuse preživetja vključili tudi dva v praksi najbolj uporabljena probiotična seva, in sicer *L. rhamnosus* GG[®] in *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12[®].

Vsi testirani sevi (L344, L350, L916, L930 bb, IM386) so preživeli inkubacijo v simuliranih gastrointestinalnih razmerah, pri čemer so bili 3 h izpostavljeni simuliranemu želodčnemu soku in zatem izpostavljeni dodatne 3 h simuliranemu črevesnemu soku (**slika 8**). Opazili smo, da je 3-urna izpostavitve nizki vrednosti pH (pH = 3) simuliranega želodčnega soka v veliki meri negativno vplivala na preživetje vseh testiranih sevov v simuliranem črevesnem soku. Postopek testiranja sposobnosti preživetja izbranih sevov v simuliranih pogojih prebavil smo povzeli po Fernández in sod. (2003) katerih rezultati testiranja probiotičnih sevov *L. acidophilus* UO 001 in *L. gasseri* UO 002 so primerljivi z našimi. Naši rezultati glede sposobnosti preživetja v simuliranih pogojih prebavil, v primerjavi z rezultati iz drugih študij, kažejo na to, da je sposobnost preživetja specifična za posamezni sev. Ta lastnost predstavlja pomemben selekcijski dejavnik pri izbiri novih kandidatov za probiotike (Andriantsoanirina in sod., 2013; Fernandez in sod., 2003; Kirtzalidou in sod., 2011; Shokryazdan in sod., 2014; Zheng in sod., 2013).

Iz dobljenih rezultatov so se najboljše izkazali sevi laktobacilov (L344, L35, L930 bb) in sev *B. animalis* subsp. *animalis* (IM386), ki so uspešno preživeli v simuliranih

gastrointestinalnih razmerah v razmerah *in vitro*, kar kaže na visok potencial testiranih sevov za uporabo v različnih probiotičnih izdelkih. Predvidevamo, da bodo najverjetneje uspešno preživeli prehod skozi želodec in dvanajstnik. Velja pa omeniti, da bi bilo v prihodnosti vsekakor potrebno seve preskusiti tudi v kliničnih študijah.

5.3.2 Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti z metodo lise na agarju (MLA) in produkcija očetne in mlečne kisline

Eden izmed najbolj zaželenih učinkov probiotikov je njihova sposobnost inhibicije patogenih mikroorganizmov, kar bi lahko omejilo oz. preprečilo različne okužbe prebavil. Pozitivni učinki probiotičnih sevov so odvisni od njihove sposobnosti preživetja prehoda skozi želodec kot tudi od njihove sposobnosti kolonizacije in tekmovanja s patogenimi mikroorganizmi. Laktobacili in bifidobakterije so sposobni proizvajati različne metabolite in druge substance, ki lahko preprečujejo rast in razmnoževanje patogenih mikroorganizmov. Pomembno vlogo imajo organske kisline, predvsem mlečna in očetna, pa tudi druge snovi, ki se sicer tvorijo v manjših količinah, kot so bakteriocini, antibiotiki in še nepoznane zaviralne snovi (Arqués in sod.; Bogovič Matijašič in sod., 2007). Znano je, da nekateri sevi lahko inhibirajo *Salmonella* spp. in *Clostridium difficile*, ki povzročata tako vnetje ileuma kot debelega črevesa (Pegues in sod., 2005). Poleg tega je znano, da debelo črevo predstavlja glavni rezervoar sevov *Escherichia coli*, ki povzročajo okužbe sečil (Franz in Horl, 1999).

Trije od petih testiranih sevov, med katerimi so bili 4 sevi laktobacilov in 1 sev bifidobakterij, so pokazali antagonistično delovanje proti več različnim indikatorskim sevom (**preglednica 14**). Vsi laktobacili so pokazali protimikrobno delovanje proti vsaj enemu indikatorskemu sevu, medtem ko sev IM386 (bifidobakterija) ni zaviral rasti niti enega od uporabljenih indikatorskih sevov. Izolat *L. gasseri* L916 je pokazal najmočnejšo sposobnost inhibicije testiranih indikatorskih sevov. Rezultati kažejo, da njegova močna protimikrobna sposobnost ni le posledica proizvodnje organskih kislin, ampak da sev L916 tvori tudi druge snovi, ki so vpletene v antagonistično delovanje.

5.3.3 Imunomodulacija: proučevanje vpliva izbranih sevov na citokinski odziv celične linije THP-1

V patogenezo KVČB so lahko vključeni številni dejavniki, npr. okoljski, genetski, mikrobní in dejavniki imunskega odziva (Ardizzone in Porro, 2005). Glavni vzroki za nastanek KVČB še vedno niso dobro poznani, a ima zelo verjetno pomembno vlogo neravnovesje pro- in protivnetnih citokinov, kar so dokazali v številnih študijah (Gologan in sod., 2013; Sanchez-Munoz in sod., 2008). Znanstveniki so ugotovili zmanjšano proizvodnjo protivnetnega citokina IL-10 v črevesni sluznici bolnikov s KVČB. Zaradi omenjenega, obravnavamo IL-10 kot pomemben dejavnik pri razvoju KVČB. Ker je bilo tudi že dokazano, da miši z genotipom *IL10* (-/-) in *IL10Rb* (-/-) spontano razvijejo črevesno vnetje (Kuhn in sod., 1993; Rennick in Fort, 2000), se zdi IL-10 odličen kandidat za terapevtsko uporabo (Lindsay in sod., 2004; Steidler in sod., 2000; Tagore in sod., 1999; Waeytens in sod., 2008). Poleg tega je znano tudi, da IL-10 zavira izločanje protivnetnih citokinov, kot so IL-6 in IL-12, ki so neposredno vključeni pri KVČB z vzdrževanjem akutne faze vnetja. Tako citokin IL-6 kot citokin IL-12 sta vpletena v odpornost celic T v črevesni sluznici proti apoptozi, ki vodi do lokalnega kopičenja celic T in s tem do trajnega vnetnega odziva (Mudter in Neurath, 2007a). Dokazali so, da je pri bolnikih s KVČB izražanje IL-10 nizko (Gasche in sod., 2000), medtem ko je izražanje IL-6 in IL-12 povišano (Mudter in Neurath, 2007b; Nielsen in sod., 2003b). Manipulacija produkcije citokinov je uspešno zmanjšala resnost bolezni in vzdrževala njeno remisijo (Drouault-Holowacz in sod., 2006; O'Mahony in sod., 2005; Steidler in sod., 2000).

Številni poskusi tako *in vitro* kot *in vivo* so potrdili potencial nekaterih sevov laktobacilov in bifidobakterij za pozitivno učinkovanje na zdravje ljudi, zlasti v sposobnosti modulacije lokalnega imunskega odziva (Messaoudi in sod., 2012; Peran in sod., 2005; van Hemert in sod., 2010). Te trditve so spodbudile uporabo probiotikov kot podpora zdravljenja ali preprečevanja različnih patologij (Drouault-Holowacz in sod., 2006; Selinger in sod., 2013). Sposobnost uravnavanja imunskega sistema je značilnost posameznega seva, ki se izrazi v unikatni interakciji bakterijskega seva in gostitelja (Meijerink in sod., 2010; Sood in sod., 2009; van Hemert in sod., 2010). Tako

imenovane koristne bakterije lahko posegajo v imunski odziv z zvišanjem proizvodnje protivnetnih citokinov in z znižanjem proizvodnje provnetnih citokinov. Pri pregledu literature smo opazili, da nobeden od testiranih laktobacilov in bifidobakterij, glede vpliva na imunski sistem, ni bil izolat iz humane črevesne sluznice.

V naši raziskavi smo testirali 4 izbrane seve (L350, L930 bb, IM386 in L344) in referenčni probiotični sev (DN-114 001) v pogojih *in vitro* na celični liniji THP-1. Preverjali smo njihov vpliv na izražanje genov za provnetne citokine (*IL1B*, *IL6*, *IL8*, *IL12B*, *TNFA*), na izražanje gena za protivnetni citokin (*IL10*) in na izražanje gena antagonista receptorja IL-1 (*IL1RN*), tako v prisotnosti kot v odsotnosti LPS. Ker smo v prvih poskusih vzorčene celice THP-1 shranili ob dodatku reagenta *RNAlater*[®], kakor priporoča proizvajalec (pri naslednjih poskusih smo uporabili kemikalijo *Trizol*[®]), smo vzorce celic THP-1, stimulirane s sevom L344, izgubili, saj se je shranjevanje v *RNAlater*[®] izkazalo za popolnoma neprimerno, ker iz takih vzorcev nismo uspeli izolirati celokupne RNA. *RNAlater*[®] naj bi sicer zelo izboljšal stabilnosti molekul RNA med hranjenjem celic (Medeiros in sod., 2003), kar se v naših poskusih ni potrdilo. Zaradi omenjene težave z izolacijo RNA smo v supernatantih istega poskusa namesto tega izmerili količine citokinov (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 in TNF- α) z metodo ELISA.

Vsi testirani sevi (L344, L350, L930 bb in IM386) so znižali izražanje gena *IL6* oz. produkcijo citokina IL-6 (sev L344), medtem ko so sevi L350, L930 bb in IM386 znižali tudi izražanje gena *IL12B* (za L344 podatkov nimamo). Menimo, da je sposobnost izbranih sevov, da zmanjšajo izražanje *IL6* in *IL12B*, izjemnega pomena, saj je proizvodnja IL-6 in IL-12 pogosto močno povišana v vnetih tkivih pri bolnikih s KVČB (Gologan in sod., 2013; Peluso in sod., 2006). Drugi avtorji so tudi že dokazali v poskusih tako *in vitro* kot *in vivo*, da so bakterijski sevi sposobni vplivati v smislu znižanja proizvodnje IL-6 in s tem posredno ublažiti simptome vnetnih bolezni (Fitzpatrick in sod., 2008; Matsumoto in sod., 2005). Znano je tudi, da IL-10 inhibira izločanje različnih vnetnih citokinov, vključno z IL-1, IL-6, TNF- α in IL-12 (Fiorentino in sod., 1991; Koch in sod., 1996). Cammarota in sod. (2009) so testirali vpliv sevov *L. plantarum*, *L. paracasei* F19 in patogene *E. coli* K4 na izražanje genov celične linije

THP-1. Vse testirane bakterije so stimulirale izražanje genov *TNFA*, medtem ko je *E. coli* K4 stimulirala tudi izražanje genov *IL8* in *IL1B*. Nobeden izmed testiranih bakterijskih sevov pa ni vplival na povečanje izražanja genov *IL10* in *IL12B*. Rezultati naše študije nakazujejo, da so trije novi izolati (L350, L930 bb in IM386) sposobni zvišati ravni ekspresije gena *IL10*, kot tudi inhibirati izražanje *IL6* in *IL12B* pri z LPS induciranih celicah THP-1, ob hkratnem ohranjanju visoke ravni izražanja gena *IL10*. Edino sev L344 ni bil sposoben zvišati količine IL-10, niti v primerjavi s kontrolno skupino celic THP-1 niti v primerjavi s celicami THP-1, izpostavljenimi LPS. Tudi Cross in sod. (2004) so potrdili, da nekateri sevi laktobacilov niso sposobni stimulirati proizvodnje IL-10, najverjetneje zaradi mehanizma prepoznavanja različnih mikroorganizmov s strani prirojenega imunskega sistema.

Pri testiranih sevih (DN-114 001, IM386 in L350; razen pri sevih L930 bb in L344 za citokin TNF- α), je bil nivo izraženega gena *TNFA* in gena *IL1B* (količina izmerjenega citokina IL-1 β) pri stimulaciji s sevi in pri stimulaciji s kombinacijo sevov in LPS višji v primerjavi z odzivom celic THP-1, ko so bile stimulirane le z LPS. Takšen rezultat je po eni strani tudi pričakovan, saj smo poskušali izzvati provnetno stanje celic THP-1 z LPS, ki je, kot je znano, del bakterijskih sten po Gramu negativnih bakterij (Madigan in sod., 2003; Murray in sod., 2005). Po Gramu negativne bakterije predstavljajo veliki delež črevesne mikrobiote in zaradi tega močan in neprekinjen odziv lokalnih imunskih celic na ta stimulus, z izločanjem poglavitnih provnetnih citokinov, bi lahko privedel do hudega kroničnega vnetja. IL-1 β , ki je ključni vnetni citokin in ima osrednji pomen v imunskem odzivu, lahko povzroči proliferacijo celic B in posledično povečano tvorbo protiteles (Vozelj, 2000). Nekatero študije so dokazale tudi vpletenost IL-1 β pri povišanju prepustnosti pregrade črevesnega enosloja (Al-Sadi in sod., 2010; Al-Sadi in Ma, 2007). Zaradi tega je večji odziv na laktobacile (novi dražljaj) in kombinacijo laktobacilov in LPS zelo verjeten.

Ne smemo zanemariti dejstva, da sta vpliv na mehanizme imunskega sistema in posledično specifična oblika citokinskega odziva odvisna od posameznega seva (Cross, 2002). Menimo, da pridobljeni rezultati naše raziskave prispevajo k boljšemu razumevanju vpliva bakterij iz črevesne sluznice na imunski sistem gostitelja. Citokini

redko, če sploh kdaj, v razmerah *in vivo* delujejo sami. Celica tarča je izpostavljena okolju, kjer so prisotni različni citokini, katerih sinergistični in antagonistični učinki imajo zelo različne posledice. Poleg tega pa citokini pogosto spodbudijo sintezo drugih citokinov, kar sproži kaskado citokinskih aktivnostih (Vozelj, 2000). Zaradi omenjenega ostaja dejstvo, da je lahko vpliv laktobacilov *in vitro* drugačen kot bi bil imunski odziv v razmerah *in vivo*. Zaradi tega so rezultati *in vitro* preskušanja vpliva laktobacilov na celice THP-1 predvsem koristni pri izbiri sevov, ki imajo potencial za delovanje na imunski sistem. Potrebne pa so nadaljnje raziskave takega delovanja v razmerah *in vivo*, v katerih sodelujejo še številni drugi dejavniki, ki lahko vplivajo na drugačen potek in izid citokinskega imunskega odgovora.

Glede na povedano lahko zaključimo, da novi sevi iz humane črevesne sluznice predstavljajo potencialne kandidate za ciljno uporabo v podpori konvencionalnemu zdravljenju bolezni KVČB, ki pa jih bo potrebno proučiti tudi *in vivo*.

5.3.4 Ugotavljanje lastnosti izbranih sevov, pomembnih z vidika zaščitne funkcije črevesne stene, v razmerah *in vitro*

Črevesni epitelij ima poleg funkcije absorpcije hranil tudi poglavitno mehansko vlogo pri obrambi črevesja in posledično pri obrambi gostitelja pred vdorom patogenih mikroorganizmov. Enterociti predstavljajo prvo obrambno linijo pred različnimi vnetnimi dražljaji (alergene snovi in toksini) in možnimi okužbami s številnimi patogenimi mikroorganizmi, med katere najpogosteje štejemo bakterije iz rodu *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* (EPEC, ETEC, EHEC, EIEC) in *Clostridium* spp (Murray in sod., 2005; Sousa in sod., 2005; Yu in Yang, 2009). Celice GALT se pri prepoznavanju patogenih dražljajev aktivirajo z namenom preprečevanja same okužbe in izločanja patogenega mikroorganizma iz telesa.

Številne črevesne bolezni, predvsem bolezni KVČB, ogrožajo črevesno pregrado. Med bolezni KVČB štejemo Crohnovo bolezen in ulcerozni kolitis, ki potekata kronično in običajno doživljenjsko, s poslabšanji in izboljšanji. Za Crohnovo bolezen je značilno vnetje na različnih mestih prebavnega trakta, zaradi česar se pojavita diareja in bolečine

v trebuhu. Natančen vzrok bolezni ni jasen. Trenutno je znano, da je za nastanek bolezni odločilna genetska predispozicija, medtem ko vzrok pripisujejo nenormalnemu imunskemu odzivu obrambnega sistema proti naravni črevesni mikrobioti. Še bolj zanimiva je ugotovitev, da je bila prav pri bolnikih s KVČB dokazana povečana prepustnost črevesnega epitelija pred kliničnimi ponovitvami bolezni, kar pomeni, da je lahko povečana prepustnost tisti dejavnik, ki vodi v reaktivacijo bolezni (Arnott in sod., 2000; Schmitz in sod., 1999a; Turcotte in sod., 2012; Zeissig in sod., 2007). Znano je tudi, da razrahljanje celičnih stikov, še posebej tesnih stikov med črevesnimi enterociti, olajša prehod vnetnih dražljajev do celic GALT, kar privede do neprestanega izločanja provnetnih citokinov in s tem do lokalnega kroničnega vnetja. Številne študije tako na celičnih linijah kot na živalskih modelih in klinične študije na človeku so raziskovalcem omogočile, da so razvili hipoteze o patogenezi pri bolnikih s KVČB. Kaže, da so pri nastanku in napredovanju bolezni vpleteni trije ključni elementi, in sicer:

- porušenje epitelne črevesne pregrade;
- dostop črevesne vsebine do vezivne plasti (lamina propria) in
- nenormalni imunski odziv (Clayburgh in sod., 2004).

Zaradi sprememb v selektivni prepustnosti črevesnega epitelija, ki je lahko posledica genetske predispozicije, posledica nenormalnega imunskega odziva ali pa posledica okoljskih dejavnikov (kot so številne infekcije, ki vodijo v stimulacijo imunskega sistema), je prehod do vezivne plasti črevesni vsebini olajšan oz. omogočen. Iztekanje črevesne vsebine do vezivne plasti sproži aktivacijo imunskega sistema, ki posledično s svojim delovanjem (izločanje številnih citokinov) neprestano inducira uničevanje črevesne pregrade in povečanje prepustnosti. Na ta način se vzpostavi začaran krog, ki privede ne samo do akutnega vnetnega stanja, ampak tudi do številnih lokalnih in dolgotrajnih (kroničnih) vnetnih obolenj črevesa. Dokazano je bilo tudi, da lahko vsak od teh treh naštetih elementov neodvisno en od drugega sproži začetek opisanega cikla. Bolniki s KVČB lahko kažejo nenormalnosti (anomalije) v vseh treh komponentah. Danes je zdravljenje bolnikov s KVČB usmerjeno v zmanjševanje črevesnega vnetja s prilagojeno prehrano ter predpisovanje kortikosteroidov in antibiotikov. Terapevtski poseg v enega ali več stopenj cikla bi lahko omogočil ponovno vzpostavitev normalnega

delovanja črevesne pregrade (Burger in Travis, 2011; Clayburgh in sod., 2004; Reiff in Kelly, 2010). Neprestani napredek v razumevanju patogeneze bolezni KVČB ponuja številne nove tarče za terapije. Številne študije, tako na živalih kot na ljudeh (Borrueel in sod., 2002; Fedorak in Demeria, 2012; Fujimori in sod., 2007; Herias in sod., 2005; Liu in sod., 2011; Sood in sod., 2009; Wildt in sod., 2011), so dokazale možnost probiotičnega podpornega zdravljenja, ki se je pokazalo v hitrejši remisiji bolezni in vzdrževanju omenjenega stanja.

Zaradi tega menimo, da je pridobitev novih probiotičnih mikroorganizmov, ki so sposobni učinkovito kolonizirati črevo, ciljano delovati na lokalni imunski odziv in zaščititi črevesno steno z zviševanjem funkcionalnosti tesnih stikov med črevesnimi epitelnimi celicami izjemnega pomena, saj bi lahko predstavljali podporo pri hitrejši remisiji KVČB in vzdrževanju remisijskega stanja.

5.3.4.1 Ugotavljanje vpliva različnih koncentracij bakterij na transepitelno električno upornost (TEER) enosloja celic Caco-2

Vpliv mikroorganizmov na zaščitno funkcijo črevesne epitelne pregrade je lahko tako pozitiven (Anderson in sod., 2010a; Anderson in sod., 2010b; Fajdiga in sod., 2006; Karczewski in sod., 2010; Zyrek in sod., 2007) kot negativen (Johnson in sod., 2010; Malago in sod., 2003; Zhang in sod., 2010). V literaturi nismo zasledili nobene raziskave o vplivu izolatov iz črevesne sluznice na epitelno pregrado. Pri preskušanju sposobnosti povišanja vrednosti TEER pri popolnoma diferenciranih celicah Caco-2 smo uporabili izolate, ki so uspešno prestali presejalne teste za probiotike: *L. rhamnosus* L344, *L. paracasei* L350, *L. gasseri* L916, *L. fermentum* L930 bb in *B. animalis* subsp. *animalis* IM386. Za pozitivno kontrolo smo vključili sev *L. plantarum* WCFS1, za katerega so v predhodnih raziskavah že dokazali sposobnost zviševanja vrednosti TEER v pogojih *in vitro* (Karczewski in sod., 2010), za negativno kontrolo pa *L. bulgaricus* IM348, ki ga uporabljajo kot startersko kulturo pri izdelavi bolgarskega jogurta.

Iz primerjave rezultatov naše raziskave in drugih raziskav je razvidno, da je tudi vpliv na transepitelno električno upornost v pogojih *in vitro* po pričakovanju sevno specifična

lastnost. Jensen in sod. (2012) so v svoji raziskavi testirali *L. rhamnosus* LGG[®] in *L. gasseri* ATCC 33323. Nobeden od sevov ni pokazal sposobnosti povišanja vrednosti TEER pri celicah Caco-2. V naši raziskavi je sev *L. rhamnosus* L344, ki je predstavnik iste vrste kot sev LGG[®], spodbudil povišanje vrednosti TEER, medtem ko je bil sev *L. gasseri* L916 neučinkovit. Velja še omeniti, da primerjava našega izolata L916 s sevom *L. gasseri* K7 kaže, da se omenjena seva razlikujeta po delovanju, saj je sev K7 izkazal sposobnost povišanja TEER pri nepoškodovanih celicah Caco-2, sev L916 pa ne (Mavrič in sod., 2013).

Raziskave o vplivu bifidobakterij na vzdrževanje črevesne integritete tako *in vitro* kot *in vivo* je malo. Do sedaj so sicer poročali o vplivih *B. longum* DSM 21062 (Kilsgaard in sod., 2011), *B. bifidum* OLB6378 (Khailova in sod., 2009) in *B. infantis* BB-02 (Bergmann in sod., 2013), vendar se te študije med seboj razlikujejo v vrsti uporabljenih bifidobakterij in v izbiri celičnega modela (HT-29 ali Caco-2), tako da naših rezultatov ne moremo neposredno primerjati z drugimi. Rezultati raziskave so pokazali, da je bilo delovanje našega izolata *B. animalis* odvisno od koncentracije, saj pri nižjih koncentracijah ni vplival na vrednosti TEER pri celicah Caco-2, pri najvišji testirani koncentraciji pa celo povzročil močan padec v transepitelni odpornosti.

V fazi izbire seva za nadaljnje poskuse smo celice Caco-2 izpostavili zelo visoki koncentraciji bakterijskih sevov ($> 1 \times 10^8$ /mL). Kot smo že omenili, je iz **slike 11**, razvidno, da vsi testirani sevi niso bili sposobni zvišati izmerjene vrednosti TEER. Vrednosti izmerjene TEER so bile v prvih urah po izpostavitvi celic Caco-2 sevoma, L344 in L350, višje v primerjavi s kontrolnimi celicami Caco-2, ampak je po določenem času vrednost TEER začela znatno padati. Menimo, da je padec vrednosti TEER povzročila sprememba vrednosti pH gojišča, saj smo pri obeh sevih zasledili spremembo v barvi gojišča DMEM (močna rumena barva). Visoka izmerjena vrednost TEER tretiranih celic Caco-2 s sevi L344 in L350 bi lahko bila tudi posledica uporabe visokih koncentracij izbranih sevov, saj bi lahko bakterijski sevi prekrili sloj celic Caco-2 na dno vdolbinice in tako zamašili apikalno-lateralni prostor med sosednjimi celicami, kar bi opazili z zvišanjem vrednosti TEER. Menimo pa, da bi se to najverjetneje zgodilo pri vseh testiranih sevih, saj smo pri vseh uporabili približno enako koncentracijo. Res

pa je, da zaenkrat ne moremo izključiti možnost da sta oba seva, L344 in L350, sposobna v primerjavi z drugimi testiranimi bakterijskimi sevi, tvoriti biofilm, ki bi lahko prispeval k višji izmerjeni vrednosti TEER. Podobno se je obnašal tudi sev *L. plantarum* WCFS1 (pozitivna kontrola) za katerega je znano, da je sposoben tvoriti biofilm (Bove in sod., 2012). Sposobnost tvorbe biofilma s strani izbranih sevov, bi lahko predstavljala dodatno pozitivno lastnost, saj bi s tem lahko še lažje kolonizirali črevesno nišo (Walter, 2008).

S tem poskusom smo želeli izbrati seve, ki so pri celicah Caco-2 z nepoškodovanimi tesnimi stiki sposobni povišati funkcionalnost le-teh, saj bi bili taki sevi lahko uporabni za preventivo pri bolnikih, ki trpijo za pogostimi gastrointestinalnimi okužbami, poleg tega pa bi bili primerni za proučevanje mehanizmov, s katerimi lahko sevi prispevajo k ohranjanju črevesne pregrade. Glede na pridobljene rezultate smo za nadaljnje testiranje izbrali 2 seva, in sicer sev *L. rhamnosus* L344 in sev *L. paracasei* L350.

5.3.4.2 Ugotavljanje vpliva izbranih sevov *L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350 na izražanje beljakovin, gradnikov tesnih stikov pri nepoškodovanih celicah Caco-2

Le seva L344 in L350, ki sta bila sposobna zvišati izmerjene vrednosti TEER pri nepoškodovanih celicah Caco-2, smo uporabili v nadaljnjih testiranjih. Poleg merjenja vrednosti TEER nas je zanimalo, do katerih sprememb tesnih stikov pride ob zvišanju izmerjene vrednosti TEER. Preverili smo, ali stimulacija z laktobacili privede do večjega izražanja genov za okcludin, klavdin-1 in ZO-1 in posledično do večje količine omenjenih beljakovin tesnih stikov (»western blot«), ki omogočajo celicam epitelija močnejšo medsebojno povezavo, ki se kaže v višjih izmerjenih vrednostih TEER.

Izkazalo se je, da oba seva negativno vplivata na izražanje genov za okcludin in ZO-1, medtem ko le sev L344 stimulira izražanje gena za klavdin-1 (**slika 14**). Podobno sliko o beljakovini klavdin-1 smo dobili tudi s pomočjo metode »western blot«, saj je bila pri celicah, stimuliranih s sevom L344, količina zaznane beljakovine klavdin-1 opazno višja v primerjavi s količino, zaznano pri kontrolnih celicah Caco-2. Omeniti pa je treba,

da je metoda »western blot« nakazala tudi večjo količino beljakovine klavdin-1 pri celicah Caco-2 stimuliranih s sevom L350 v primerjavi s kontrolno skupino (**slika 15**). Razlog zaradi katerega, pri celicah Caco-2 stimuliranih s sevom L350, nismo opazili zvišanje izražanja gena za klavdin-1 je lahko napačen čas vzorčenja za RT-qPCR. Za metodo RT-qPCR smo celice Caco-2 vzorčili 1 uro pred vzorčenjem celic za metodo »western blot«. Če bi za RT-qPCR vzorčili v drugem časovnem obdobju (npr. 1 uro prej) bi morda, glede na dobljene rezultate z metodo »western blot«, opazili višje izražanje gena za klavdin-1 tudi pri tretiranju celic Caco-2 s sevom L350.

Številne študije so do sedaj že pokazale, da so nekateri probiotični sevi sposobni izboljšati barierno integriteto nepoškodovanega enosloja (*in vitro*) z neposrednim vplivom na strukture tesnih stikov. Probiotični sev *L. plantarum* MB452, ki je del probiotičnega produkta VSL#3, je izkazal sposobnost pozitivnega vpliva na nepoškodovane celice Caco-2. Njegov učinek je bil odvisen od uporabljene koncentracije (testirane koncentracije so bile: 7×10^7 KE/mL, $1,8 \times 10^8$ KE/mL in 3×10^8 KE/mL), saj pri nižjih koncentracijah učinka niso zasledili (tudi v naši študiji pri nizkih koncentracijah nismo zasledili nobenega učinka sevov L344 in L350) medtem ko je pri koncentraciji od 3×10^8 KE/mL sev *L. plantarum* MB452 zvišal izmerjene vrednosti TEER za več kot 40 %. Potrdili so tudi, da MB452 vpliva pozitivno na tesne stike tako, da zviša izražanje genov za beljakovino okcludin in cingulin (Anderson in sod., 2010b). Messaoudi in sod. (2012) pa poročajo o sposobnosti seva *L. salivarius* SMXD51 ($\sim 10^8$ KE/mL) na zviševanje izmerjene vrednosti TEER za približno 20 % pri celicah Caco-2/TC7. V študiji, ki jo je opravil Klingberg in sod. (2005), sta se pri pozitivnem vplivu na tesne stike v razmerah *in vitro* (Caco-2) odlikovala druga 2 seva, *Lactobacillus plantarum* MF1298 in *Lactobacillus salivarius* DC5. Seva sta v koncentraciji 10^8 KE/mL zvišala izmerjene vrednosti TEER za 40 %. V primerjavi z našimi rezultati, seva MF1298 in DC5, nista povzročila padca v izmerjeni vrednosti TEER po začetnem zviševanju. Pri zviševanju vrednosti TEER so zaznali višjo količino beljakovine ZO-1 z metodo »western blot«. Podobno kot laktobacili deluje tudi probiotični sev *E. coli* Nissle 1917, ki je v poskusih *in vitro* na celični liniji T84 zvišal izražanje gena za ZO-2 in njegovo prerazporeditev iz citosola proti celični membrani (Zyrek in sod., 2007). Rezultati naših in rezultati prejšnjih raziskav potrjujejo, da se mehanizmi delovanja za

povišanje funkcionalnosti tesnih stikov med sevi razlikujejo, skupno pa je to, da lahko delujejo tako preko uravnavanja ekspresije genov za gradnike tesnih stikov kot tudi preko prerazporeditve gradnikov tesnih stikov in nivoje njihove fosforilacije (Mathias in sod., 2010; Resta-Lenert in Barrett, 2003).

Izbrana seva, L344 in L350, nista vplivala na aktinske filamente, saj je bila njihova razporeditev znotraj celic Caco-2, stimuliranih z laktobacili, enaka kot pri kontrolnih celicah Caco-2. Aktinski filamentni so bili v vseh primerih razporejeni v dobro vidne snope, ki so zapolnjevali celotno prostornino celic Caco-2 (**slika 13**). Žal naših rezultatov ne moremo primerjati z drugimi študijami ker podobnih raziskav, ki bi opazovale vpliv laktobacilov na aktinske filamente nepoškodovanih celic, nismo zasledili.

5.3.4.3 Ugotavljanje vpliva izbranih sevov *L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350 na izražanje beljakovin, gradnikov tesnih stikov pri (bio)kemijsko poškodovanih celicah Caco-2

Na podlagi znanega dejstva, da je beljakovina klavdin-1 poglavitna pri izgradnji tesnih stikov med enterociti in da so v sluznici kolona bolnikov s KVČB s prevladujočo drisko zaznali spremembe v izražanju gena za klavdin-1, smo osredotočili našo pozornost prav na to beljakovino (Bertiaux-Vandaele in sod., 2011; Weber in sod., 2008).

Čeprav smo vse poskuse o vplivu izbranih sevov laktobacilov na tesne stike črevesnih epitelnih celic izvedli *in vitro*, smo razmere želeli čim bolj približati tistim, ki so prisotne pri bolnikih s KVČB. V ta namen smo za poškodovanje tesnih stikov izbrali biološki agens, in sicer IL-1 β . Po dodatku IL-1 β celicam Caco-2 nismo zasledili nobenega padca v vrednosti TEER (**slika 16**). Dobljeni rezultati ne podpirajo podatkov iz literature, ki navajajo močan vpliv IL-1 β pri uničevanju tesnih stikov (Al-Sadi in Ma, 2007; Van De Walle in sod., 2010). Čeprav smo preskuse izvedli z različnimi koncentracijami IL-1 β (od 10 ng/mL do 25 ng/mL) in z interleukini dveh različnih proizvajalcev, nismo opazili negativnega vpliva IL-1 β na tesne stike, ki ga omenjajo v zgoraj navedenih študijah. Do odstopanja v rezultatih je lahko privedla razlika v pogojih

gojenja celic Caco-2. Medtem ko smo v naši raziskavi uporabljali celice Caco-2 v 33. pasaži, po 21-ih dneh diferenciacije, pri čemer smo jih gojili na poliesterski membrani z 0,4 μm porami, so v nekaterih drugih študijah uporabljali celice Caco-2 v bistveno nižji pasaži (od 20. do 25. pasaže (Al-Sadi in Ma, 2007)) in jih gojili na drugih nosilcih (s kolagenom prevlečenih nosilcih (Van De Walle in sod., 2010)). Menimo, da celice Caco-2 v zelo nizki pasaži, ko so nepopolno diferencirane, niso zelo primerljive s črevesnimi enterociti, zato smo, za razliko od nekaterih predhodnih študij, za preskuse izbrali opisane parametre. Nikakor ne smemo zanemariti, da so to biološki eksperimenti, ki so zelo občutljivi že na majhne spremembe v razmerah preskusov. Znano je, da lahko število pasaj celične linije Caco-2 vpliva na stabilnost tesnih stikov. V raziskavi Briske-Andersona in sod. (1997) so ugotovili, da so tesni stiki pri celicah Caco-2 najbolj stabilni med 31. in 36. pasajo in da uporaba takih celic zagotavlja boljšo ponovljivost rezultatov. Znano je tudi, da se celice Caco-2 popolnoma diferencirajo po 21-ih dneh po konfluenci. Predvidevamo, da so raziskovalci sorodnih študijah uporabili celice Caco-2 v zelo nizki pasaži in v nepopolni diferenciaciji. Zaradi tega se lahko postavi vprašanje, ali so bile njihove uporabljene celice dovolj stabilne in resnično podobne črevesnim enterocitom za izvedbo omenjenih poskusov.

Zaradi neuspešnega delovanja IL-1 β na tesne stike celične linije Caco-2 smo za porušenje celičnih stikov uporabili, kakor že raziskovalci pred nami, kemikalijo PDB (Magro in sod., 2004; Vermeulen in sod., 2011). Tudi pri uporabi PDB smo opazili razlike v primerjavi s prejšnjimi študijami. Karczewski in sod. (2010) so za poskuse *in vitro* na celični liniji Caco-2 uporabili kemikalijo PDB v končni koncentraciji 1 μM . Pri naših pogojih končna koncentracija 1 μM ni zadostovala za poškodovanje tesnih stikov in posledično za zaznavanje padca vrednosti TEER. V kolikor smo pri naših pogojih želeli doseči enako učinkovitost kemikalije PDB, smo morali zvišati njeno koncentracijo za petkrat (celicam Caco-2 smo dodajali v zgornjem prekatu kemikalijo PDB v končni koncentraciji 5 μM). Višja koncentracija uporabljenega PDB (več kot 5 μM) ni pripomogla k bistveno višjemu padcu vrednosti TEER (neobjavljeni rezultati).

Naši rezultati o merjenju vrednosti TEER pri celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene tako bakterijskim sevom kot PDB so primerljivi z rezultati pridobljeni v študiji

Karczewski in sod. (2010), saj smo tudi mi opazili sposobnost testiranih sevov, da zadržijo padec v vrednosti TEER (statistično signifikantne razlike).

Ko smo celice Caco-2 stimulirali s PDB, so se celice medsebojno ločile, kar se je pokazalo v nastanku majhnih odprtih stikov med sosednjimi celicami. Odprtine smo opazili na stičišču treh celic, kjer je poglobljena transmembranska beljakovina tricelulin (Ikenouchi in sod., 2005). Naši rezultati nakazujejo na pozitivno delovanje izbranih sevov na beljakovino tricelulin, saj ko smo celice Caco-2 tretirali istočasno tako z bakterijskimi sevi kot s PDB teh odprtih nismo zaznali. Dobljeni rezultati odpirajo možnosti novih poti raziskav o vplivu izbranih sevov na tesne stike črevesnih epitelnih celic, še posebej ker študij o vplivu potencialnih probiotikov na beljakovino tricelulin nismo zasledili. Glede na to, da je bila potrjena pomembnost beljakovine tricelulin pri vzdrževanju barierne funkcije črevesne stene pri bolnikih z ulceroznim kolitisom, rezultati naše raziskave potrjujejo dodatno pozitivno delovanje izbranih sevov za ciljano podporno zdravljenje takih bolnikov (Krug in sod., 2010). Prerazporeditev aktinskih filamentov pri celicah Caco-2, ki so bile stimulirane istočasno z laktobacili in PDB, ni bila podobna ne razporeditvi aktinskih filamentov pri netretiranih celicah Caco-2 (paralelni snopi), ne razporeditvi filamentov pri s PDB tretiranih celicah (nestrukturirana meglica), ampak se je v številnih celicah pojavila dobro vidna zvezdasta struktura, pri kateri je bila večina aktinskih filamentov skoncentrirana v krogu, na sredini citosola, iz katerega so se snopi filamentov razporejali krožno proti celični membrani. Pri pregledu literature nismo zasledili podobnih rezultatov o vplivu laktobacilov na prerazporeditev aktinskih filamentov. Več raziskav laktobacilov je bilo usmerjenih v preučevanje preprečevanja reorganizacije aktinskih filamentov, ki jo povzročijo različne patogene bakterije, kot so *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Messaoudi in sod., 2012), *E. coli* (Lievin-Le Moal in sod., 2002) in sev *S. Typhimurium* SL1344 (Li in sod., 2011), kar povzroči poškodbe integritete enosloja. V naštetih študijah so laktobacili, pri inficiranih epitelnih celicah v razmerah *in vitro*, onemogočali reorganizacijo aktinskih filamentov in s tem zadržali padec v izmerjeni vrednosti TEER, kljub temu v nobenem primeru ni prišlo do podobne reorganizacije aktinskih filamentov kot smo jo opazili v naši študiji (zvezdasta oblika).

Naši rezultati kažejo, da je sev L344 sposoben zadržati padec v TEER pri celicah Caco-2 izpostavljenih kemikaliji PDB, tako da je poleg prerazporeditve aktinskih filamentov povečal tudi količino transmembranske beljakovine klavdin-1 (**slika 22**). Ob primerjavi rezultatov izražanja gena za klavdin-1, pridobljenih z metodo RT-qPCR, z rezultati, pridobljenimi za isto beljakovino z metodo »western blot«, smo opazili, da se le ti ne ujemajo. Razlog za omenjeno diskrepanco je najverjetneje spet v uri vzorčenja, saj smo za metodo RT-qPCR vzorčili le eno uro pred vzorčenjem za »western blot«. Pri varovanju tesnih stikov pred številnimi različnimi dražljaji so se odlikovali tudi drugi sevi, ki so kazali različne mehanizme delovanja tako v študijah *in vitro* kot v študijah *in vivo* (Eun in sod., 2011; Karczewski in sod., 2010; Madsen in sod., 2001; Resta-Lenert in Barrett, 2003; Resta-Lenert in Barrett, 2009). Obstoječe raziskave kažejo na različne mehanizme delovanja testiranih bakterij, ki so odvisne od posameznega seva. Poudariti pa je potrebno, da študije med seboj težko primerjamo, saj se močno razlikujejo ali v vrsti testiranih bakterij, ali v naravi uporabljenega negativnega dražljaja ali celo v uporabljeni celični liniji.

Moramo še izpostaviti, da smo za uporabljene metode (fluorescenčno mikroskopiranje, RT-qPCR in »western blot«) vzorčili celice Caco-2 po ~ 60 % padcu vrednosti TEER, torej po zelo invazivnem vplivu PDB na tesne stike epitelnih celic (**slika 18**). Zanimivo bi bilo z izbranimi metodami spremljati celoten potek vpliva laktobacilov na zadrževanje padca vrednosti TEER, s pogostejšim vzorčenjem (npr. na vsako uro).

5.3.4.4 Ugotavljanje sposobnosti adhezije *L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350 na celice Caco-2

Iz rezultatov je razvidno, da se oba seva (L344 in L350) slabo pripenjata na celice Caco-2. Primerjava z drugimi študijami pa ni najbolj relevantna, saj smo teste adhezije izvedeli na celicah Caco-2, ki smo jih gojili na vstavkih »Transwell« s poliestersko membrano, pri čemer so bile celice v 33. pasaži, v 21. dnevu diferenciacije. Dejstvo je, da celice Caco-2 za poskuse adhezije večinoma uporabljajo v nižjih pasajah (večinoma do 20. pasaže), ki niso popolnoma diferencirane (14. dan po konfluenci) in ki so gojene neposredno v polistirenskih gojitvenih ploščicah za gojenje celičnih linij z zmožnostjo

pripenjanja in tvorbe enosloja (Bogovič Matijašič in sod., 2003). Da bi izključili možnost vpliva naštetih dejavnikov, smo v naših poskusih vključili referenčni sev LGG[®], ki je bil v istem laboratoriju že raziskan, s tem da so bile v testih adhezije uporabljene zgoraj opisane razmere, ki so bile drugačne od naših (Bogovič Matijašič in sod., 2003). Pri primerjavi naših rezultatov za sev LGG[®] z rezultati pridobljenimi v prejšnji študiji (Bogovič Matijašič in sod., 2003), je razvidno, da je metoda v visoki meri ponovljiva, s čimer smo potrdili primernost metode adhezije z gojenjem celic Caco-2 na membranah nastavkov »Transwell«.

Zanimalo nas je predvsem, ali so izbrani sevi sposobni zviševati transepitelijsko rezistenco (vrednosti TEER) enosloja celic Caco-2 zaradi visoke sposobnosti pripenjanja na uporabljeno celično linijo, česar pa nismo potrdili.

Glede na to, da smo seve izolirali iz človeške črevesne sluznice, so dobljeni rezultati nepričakovani, saj smo glede na izvor laktobacilov pričakovali, da bodo izbrani sevi pokazali dobro sposobnost adhezije. Rezultate je mogoče razložiti z dejstvom, da celice Caco-2, čeprav jih najbolj pogosto uporabljajo pri testiranju sposobnosti adhezije, niso dober model, saj ne proizvajajo mukusa (črevesne sluzi) (Gagnon in sod., 2013). Tudi Turpin in sod. (2012) so v njihovi študiji, kjer so testirali sposobnost adhezije 30 sevov mlečno kislinskih bakterij na dveh celičnih linijah, in sicer HT29 (ne proizvaja sluzi) in HT29-MTX (proizvaja sluz), ugotovili, da je sposobnost adhezije posameznih sevov odvisna od uporabljene celične linije. Dejstvo je, da so črevesne bakterije najprej v stiku z mukusom in jim le uspešno pripenjanje na mukus zagotovi možnost stika in pripenjanja na enterocite. Zaradi tega bi bilo vsekakor najbolje preskusiti sposobnosti adhezije izbranih sevov v pogojih *in vivo*. Mesto izvora naših sevov sicer že nakazuje na njihovo sposobnost pripenjanja.

5.4 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI EKSTRACELULARNIH BELJAKOVIN PRI IZBRANIH SEVIH *L. rhamnosus* L344 IN *L. paracasei* L350

Sestava celične ovojnice po Gramu pozitivnih bakterij, še posebej laktobacilov, je zelo kompleksna. Različne beljakovine, ki so lahko kovalentno pripete na osnovne gradbene enote celične stene (peptidoglikan, teihojska kislina ali polisaharidi), sestavljajo najbolj zunanje dele celične ovojnice. Za nekatere bakterije je značilen ponavljajoč se niz podenot proteinov ali glikoproteinov, ki sestavljajo t. i. površinski sloj (*angl.* surface layer, S-layer) (Mobili in sod., 2010). Molekulska masa proteinov S-sloja, ki so značilni za rod *Lactobacillus*, je med 25 in 71 kDa. Sama funkcija beljakovin S-sloja ni popolnoma razjasnjena, vemo pa, da deluje kot zaščitni plašč ter ima pomembno vlogo pri vzdrževanju celične oblike, pri celični adheziji in pri obrambi proti patogenim mikroorganizmom (Beganovic in sod., 2011; Chen in sod., 2007; Rojas in sod., 2002). Glede na to, da do sedaj še ni bilo razjasnjeno, kaj pravzaprav epitelna evkarionska celica prepozna kot signal za povišanje vrednosti TEER, smo predvideli, da so beljakovine S-sloja tiste, ki so odgovorne za zvišanje izmerjenih vrednosti TEER v poskusih *in vitro*.

Izkazalo se je, da seva *L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350 na svoji površini nimata beljakovin S-sloja. Rezultati so bili glede na njihovo vrsto (*L. rhamnosus* in *L. paracasei*) pričakovani, saj je znano, da bakterije iz teh dveh vrst načeloma nimajo teh beljakovin. Domnevali smo, da so molekule, ki jih epitelne celice prepoznajo kot signale za zvišanje funkcionalnosti tesnih stikov, na skrajno zunanjem delu bakterijskega ovoja. Da bi ugotovili, katere molekule bakterijske celice so vpletene v ta mehanizem, bi iz zunanje površine bakterijskega ovoja morali izolirati vsako komponento posebej in jo v čisti obliki dodajati celicam Caco-2 ter meriti spremembe v vrednosti TEER. Ko smo z metodo SDS-PAGE preverjali, ali imata izbrana seva beljakovine S-sloja, smo zasledili, da ima sev *L. rhamnosus* L344 na svoji površini, po koncentraciji sodeč (debelina lise na gelu), številne manjše beljakovine, z molekulsko maso od 6 do 12 kDa. Zaradi tega smo menili, da bi lahko bile te beljakovine vpletene v pozitivno signalizacijo celic Caco-2 pri zviševanju vrednosti TEER, saj se nahajajo na najbolj zunanji strani bakterijskega ovoja. Nekatere prejšnje raziskave že omenjajo

prisotnost različnih beljakovin na površini laktobacilov (Baccigalupi in sod., 2005; Johnson in sod., 2013; Ying in sod., 2007).

Žal zaradi časovne stiske nismo uspeli izolirati omenjenih beljakovin in jih preskusiti na celicah Caco-2 v pogojih *in vitro*, da bi ugotovili, ali so vpletene v mehanizem zviševanja vrednosti TEER pri celicah Caco-2 po stimulaciji s sevom L344. S tega vidika bi bilo ugotavljanje vpliva omenjenih beljakovin na TEER pri celicah Caco-2 in njihova karakterizacija zelo zanimivo za prihodnje raziskave. Smo pa v okviru tega dela preskusili, ali so za vpliv na TEER odgovorne celične sestavine ali metaboliti.

5.4.1 Ugotavljanje vpliva celičnih sestavin *L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350 in njihovih metabolitov na funkcionalnost tesnih stikov celic Caco-2

Raziskali smo, ali na povišanje vrednosti TEER celic Caco-2 vplivajo strukturne komponente na površini preskušanih bakterijskih sevov ali v gojišče sproščeni metaboliti.

V ta namen smo celice Caco-2 izpostavili bakterijskemu supernatantu in s kombinacijo antibiotikov inaktiviranim bakterijskim celicam. Pri tem je bilo pomembno, na kakšen način smo inaktivirali bakterijske celice, saj nismo smeli poškodovati njihove površine. Izbrali smo kombinacijo dveh antibiotikov (streptomycin in gentamicin), ki inhibirata sintezo beljakovin, na katero sta seva občutljiva (antibiotike smo izbrali na podlagi rezultatov E-testov). Pri obeh sevih se je izkazalo, da sta bila edino živa in aktivna seva (L344 in L350) sposobna zvišati vrednosti TEER do pričakovanih vrednosti, ne pa tudi bakterijski supernatanti ali inaktivirane celice L344 in L350. Pri tem so tako bakterijski supernatanti kot inaktivirane bakterije obeh sevov v majhni, skoraj enaki, meri povišale vrednosti TEER. Klingberg in sod. (2005) so tudi izpostavili celice Caco-2 tako živim bakterijam, kot z antibiotikom inaktiviranim bakterijam in bakterijskemu supernatantu. Ugotovili so, da so tako žive kot z antibiotikom inaktivirane bakterije v enaki meri zvišale izmerjene vrednosti TEER, medtem ko bakterijski supernatanti (oz. bakterijski metaboliti) niso učinkovali. V tem primeru je jasno, da so za zviševanje funkcionalnosti tesnih stikov odgovorne molekule na bakterijski površini. Naši rezultati niso dali jasnih

odgovorov, saj so tako inaktivirane bakterijske celice kot metaboliti zvišali izmerjeno vrednost TEER. Opažene rezultate je mogoče razložiti na več načinov, in sicer:

- Med tretiranjem bakterijskih celic z antibiotiki je lahko prišlo do razpada celične površine in s tem do razgradnje temu namenjenih signalnih molekul. Ne smemo zanemariti dejstva, da sta bila kljub občutljivosti sevov za izbrane antibiotike, potrebna visoka koncentracija antibiotikov in dolg čas izpostavitve (22 h). Take pogoje smo uporabili, da bi dosegli čim boljše inaktivacijo bakterij. Kljub temu je nekaj bakterijskih celic preživel.
- Da bi ugotovili, ali so v povišanje vrednosti TEER vpleteni metaboliti bakterijskih kultur, smo celice Caco-2 izpostavili sterilnemu supernatantu, ki smo ga pridobili tako, da smo seve 4 h gojili v gojišču DMEM brez antibiotika. Možno je, da je nekaj bakterij iz kulture razpadlo in je tako manjša količina delov bakterijskega ovoja kljub filtraciji prešla v supernatant.
- Ni izključeno, da celice Caco-2 v manjši meri celo reagirajo na bakterijsko DNA, ki je v obeh primerih lahko prešla v supernatant kultur.

Iz naših rezultatov lahko zaključimo, da v primeru naših sevov beljakovine »S-sloja« niso odgovorne za stimulacijo celic Caco-2 pri poviševanju funkcionalnosti tesnih stikov, ker teh beljakovin pri izbranih sevih nismo zasledili. V nadaljnjih poskusih pa bi bilo zanimivo raziskati ali na površino vezane beljakovine, ki smo jih zasledili pri sevu L344, vplivajo na vrednosti TEER celic Caco-2. Zanimivo je še dejstvo, da so druge študije že pokazale pozitiven vpliv metabolitov nekaterih bakterij na TEER epitelnih celic (Ewaschuk in sod., 2008). Zaradi tega bi bilo v nadaljnjih raziskavah vsekakor smiselno, poleg raziskave vrste in učinka zaznane površinske beljakovine pri sevu L344, dodatno proučiti metabolite supernatantov izbranih sevov, saj so ti v relativno kratkem času (v primerjavi z zgoraj navedeno študijo) statistično značilno zvišali izmerjeno vrednost TEER.

6 SKLEPI

- Hipoteze, da izolati laktobacilov, ki so sposobni spodbuditi protivnetni odziv ob stiku z makrofagi celične linije THP-1, tudi povečajo funkcionalnost tesnih stikov črevesnih epitelnih celic v razmerah *in vitro*, ne moremo potrditi. Testni sevi (L344, L350, L930 bb, IM386) so pokazali protivnetni vpliv na imunski odziv celic THP-1, vendar sta le dva seva (*L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350) tudi povečala funkcionalnost testnih stikov celic Caco-2.
- Hipoteze, da na funkcionalnost tesnih stikov vpliva sestava celičnega ovoja bakterij oz. da je ta pogojena s prisotnostjo beljakovin S-sloja, ne moremo potrditi, saj v primeru naših sevov beljakovine »S-sloja« niso odgovorne za stimulacijo celic Caco-2 pri poviševanju funkcionalnosti tesnih stikov, ker teh beljakovin pri izbranih sevih nismo zasledili, vpliva na površino vezanih beljakovin, ki smo jih zasledili pri sevu L344, pa nismo uspeli proučiti.

Poleg glavnih rezultatov, s katerimi smo preverjali zastavljene hipoteze, navajamo še nekaj dodatnih zanimivih rezultatov, ki smo jih opazili med izvajanjem raziskave:

- Sevi *Lactobacillus*, ki so sposobni zadržati padec vrednosti TEER pri poškodovanih celicah Caco-2, vplivajo na prerazporeditev aktinskih filamentov ali na gradnike tesnih stikov, saj sta oba seva (L344 in L350) vplivala na prerazporeditev aktinskih filamentov, medtem ko je sev L344 tudi povečal izražanje gena *CLDN1* in posledično vplival na višjo količino proteina klavdin-1.
- Izbrana seva laktobacilov (L344 in L350) izpolnjujeta splošne zahteve za učinkovitost probiotikov: sta varna z vidika odpornosti proti antibiotikom, sta sposobna izkoriščati več virov ogljika, kažeta protimikrobno aktivnost in sta sposobna preživeti prehod skozi zgornja prebavila, kar je predpogoj za uspešno kolonizacijo črevesja.

- Seva *L. rhamnosus* L344 (adhezija 1,9 %) in *L. paracasei* L350 (adhezija 0,8 %) nista pokazala dobrih adhezijskih sposobnosti na celicah Caco-2 v pogojih *in vitro*, kar je glede na njihov izvor, ki je črevesna sluznica, v nasprotju s pričakovanji. Sklepamo, da celice Caco-2 niso najboljši model za poskuse adhezije *in vitro*, ker ne proizvajajo mukusa, kakor črevesni enterociti.
- Selektivno kromogeno gojišče URISelect agar se je izkazalo za zelo uporabno pri prečiščevanju izolatov iz črevesne sluznice.
- Metoda DHPLC se je izkazala za učinkovito pri odkrivanju mešanih kultur, ki so vsebovale po dve vrsti laktobacilov.
- Identifikacija s sistemom Biolog, ki temelji na fenotipskem izkoriščanju virov ogljika, se je izkazala za nezanesljivo pri identifikaciji laktobacilov iz črevesne sluznice.
- Interleukin 1 β , v nasprotju s podatki iz literature, ni povzročil zmanjšanja vrednosti TEER pri celični liniji Caco-2.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Kronične vnetne črevesne bolezni (KVČB) še zmeraj predstavljajo uganko za raziskovalce, saj je kljub številnim izvedenim študijam vzrok nastanka bolezni še precej nejasen. Danes prevladuje teorija, da so KVČB posledica pretiranega odgovora celic GALT na komenzalno črevesno mikrobioto pri genetsko dovzetnih posameznikih. Delovanje provnetnih citokinov, kot sta IL-6 in IL-12, katerih izražanje je povečano v vnetih predelih črevesja bolnikov s KVČB, predstavlja pomemben dejavnik pri uničevanju celičnih tesnih stikov. Razumevanje nastanka in poteka KVČB odpira nove možnosti zdravljenja. Do sedaj so znanstveniki že dokazali uspešnost podpornega zdravljenja bolnikov s KVČB z uporabo antagonistov provnetnih citokinov (protitelesa) in uporabo številnih rastlinskih ekstraktov ter probiotikov v namen stabilizacije črevesne pregrade oz. epitelnih tesnih stikov.

V zadnjih letih se je zanimanje za razumevanje delovanja probiotikov na imunski sistem povečalo tudi zaradi naraščajoče pojavnosti KVČB. Mehanizmi delovanja, s pomočjo katerih probiotiki vplivajo na imunski sistem in na črevesno pregrado, tako da izboljšajo naravno obrambno funkcijo, še niso povsem pojasnjeni. Pomembno je dejstvo, da je bila večina preteklih raziskav opravljena z izolati laktobacilov iz blata, fermentiranih živil ali rastlinskega materiala, ne pa tudi z izolati, ki dejansko poseljujejo črevesno sluznico človeka in so v neposrednem stiku z epitelnimi celicami in GALT.

Namen našega raziskovalnega dela je bil pridobiti nove seve iz rodu *Lactobacillus* iz črevesne sluznice ljudi, s potencialnim ciljanim delovanjem na imunski sistem in črevesno epitelno pregrado.

Ugotovili smo, da je raznolikost bakterij iz rodu *Lactobacillus*, ki so bile izolirane iz črevesne sluznice, majhna in da smo identične izolate pridobili tako iz ileuma kot iz kolona, kar kaže na njihovo sposobnost kolonizacije različnih predelov črevesja.

Izkazalo se je, da laktobacili, ki naseljujejo črevesno sluznico, ne kažejo visoke odpornosti proti najbolj pogosto uporabljanim antibiotikom, kar je pomembno s stališča varnosti. Kar 65 % testiranih sevov ni pokazalo odpornosti proti antibiotikom po merilih EFSA. Odpornost proti antibiotikom (tetraciklinu in eritromicinu) smo potrdili le pri nekaterih sevih laktobacilov, vendar pri njih nismo zaznali prisotnih zapisov za najpogostejše gene za odpornost proti antibiotikom.

Izolati L344, L350 in L916 iz črevesnih biopsijskih vzorcev so bili sposobni tekmovati v pogojih *in vitro* s potencialno patogenimi organizmi (*E. coli*, *Sal. Typhimurium* in *Staph. aureus*). Najbolje se je izkazal sev *L. gasseri* L916, ki je inhibiral vse preskušene potencialno patogene indikatorske seve. Protimikrobna sposobnost posameznih sevov ni neposredno povezana s produkcijo organskih kislin, kar kaže na to, da pri protimikrobnem delovanju sodelujejo tudi druge učinkovine.

Ob sočasni stimulaciji celic THP-1 z LPS so sevi L350, L930 bb in IM386 zmanjšali izražanje genov za provnetna citokina IL-6 in IL-12 ter sočasno zvišali izražanje gena za protivnetni citokin IL-10, kar nakazuje na njihovo sposobnost protivnetnega delovanja. Sev L344 je ob sočasni stimulaciji celic THP-1 zmanjšal produkcijo provnetnih citokinov IL-6, IL-8 in TNF- α .

Med izbranimi izolati sta bila le dva sposobna zvišati vrednosti TEER pri nepoškodovanih celicah Caco-2, in sicer *L. rhamnosus* L344 in *L. paracasei* L350. Stopnja povišanja vrednosti TEER je bila različna in odvisna od seva. Različna koncentracija dodanih bakterij ni vplivala na izmerjene vrednosti TEER, ampak na čas odziva celic Caco-2, po katerem smo učinek zvišanja vrednosti TEER zaznali. Izpostavitve nepoškodovanih celic Caco-2 sevom L344 je povzročila večje izražanje gena *CLDNI* (klavdin-1), medtem ko nobeden od bakterijskih sevov ni povzročil prerazporeditve aktinskih filamentov.

Sočasna izpostavitve celic Caco-2 PDB in laktobacilom (L344 in L350) je statistično značilno omejila zmanjšanje vrednosti TEER za približno 20 % pri obeh sevih. Razporeditev aktinskih filamentov v celicah Caco-2, ki so bile sočasno izpostavljene

PDB in laktobacilom (L344 in L350), se je razlikovala od razporeditve v celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene samo PDB. Še posebej se je izkazal sev *L. rhamnosus* L344, ki je zvišal raven izražanja gena za poglobitno strukturno transmembransko beljakovino tesnih stikov klavdin-1 in hkrati vplival tudi na prerazporeditev aktinskih filamentov, v primeru da so bili tesni stiki uničeni s PDB.

Rezultati so tudi pokazali, da povečanje funkcionalnosti tesnih stikov pri stimuliranih celicah Caco-2, tako z bakterijskim sevom L344 kot s sevom L350, ni odvisna od prisotnosti beljakovin »S-sloja«, saj teh beljakovin pri sevih nismo odkrili. Pri sevu L344 pa smo zaznali prisotnost manjših (od 6 do 12 kDa) na površino vezanih beljakovin, ki bi lahko bile vpletene pri stimulaciji celic Caco-2 pri zviševanju vrednosti TEER.

Ugotovili smo, da je sev L344 še posebej zanimiv z vidika zaščite črevesne pregrade pri bolnikih s KVČB, saj kaže probiotične lastnosti (občutljivost za antibiotike, sposobnost izkoriščanja večih virov ogljika, protimikrobna aktivnost, sposobnost preživetja prehoda skozi zgornja prebavila in imunomodulacija) s ciljanim delovanjem na črevesno pregrado, kar bi morda lahko pomagalo pri vzdrževanju remisijskega stanja KVČB ali vsaj olajša njihovo bolezensko stanje. Vsekakor pa bodo za podroben opis mehanizma njegovega delovanja potrebne še dodatne raziskave tako v razmerah *in vitro* kot *in vivo*.

7.2 SUMMARY

Chronic Inflammatory Bowel Disease (IBD) has become an international hot spot for research during recent years, since the cause of the disease is still quite unclear despite of numerous studies already performed. One of the latest theories in scientific community stipulates that IBD is caused by excessive response of the local immune system (GALT) on the commensal intestinal microbiota in genetically susceptible individuals. It has been established, that the mode of action of the pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and IL-12, whose expression is increased in inflamed regions of the intestines of patients with IBD, is an important factor in the destruction of tight junctions between epithelial cells. Understanding the occurrence and clinical course of IBD also opens up new treatment possibilities. Up until now, scientists have already demonstrated the effectiveness of supportive therapy in patients with IBD using antagonists of pro-inflammatory cytokines (antibodies) and a range of herbal extracts and probiotics to bolster stabilization of the intestinal barrier or epithelial tight junctions.

In recent years, the interest for understanding the function of probiotics on the immune system also increased due to the increasing incidence of IBD. The mechanisms of action by which probiotics affect the immune system and the intestinal barrier to improve the natural defensive function have not yet been completely resolved. It should be also taken into consideration that most previous studies were performed with lactobacilli isolates from stool, fermented foods or plant material, and not with isolates that actually colonize the human intestinal mucosa and are in direct contact with epithelial cells and GALT.

The aim of our research was the isolation of new strains of the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* from the human intestinal mucosa with potential targeted action on the host's immune system and the intestinal epithelial barrier.

We have found that a diversity of bacteria of the genus *Lactobacillus* that have been isolated from intestinal mucosa was relatively low and that identical isolates have been

obtained from both the ileum and the colon, which indicates their ability to colonize different parts of the intestine.

It has been found that lactobacilli that inhabit the intestinal mucosa do not show resistance against the most commonly used antibiotics, which is important from a safety standpoint. As much as 65 % of the tested strains did not show antibiotic resistance according to the EFSA criteria. Resistance to antibiotics (tetracycline and erythromycin) was confirmed only for a few strains of lactobacilli, however the transcripts for the most common antibiotic resistance genes have not been detected in those strains.

Isolated strains L344, L350 and L916 from intestinal biopsies have been able to compete *in vitro* with potentially pathogenic organisms (*E. coli*, *S. Typhimurium* and *S. aureus*). The strain *L. gasseri* L916 with the most pronounced antimicrobial activity inhibited all tested potentially pathogenic indicator strains. However, antimicrobial activity of individual strains was not directly associated with the production of organic acids, suggesting that some other substances must be involved in the mechanisms of antimicrobial action of the strains.

Strains L350, L930 bb and IM386 have been able to reduce the gene expression of pro-inflammatory cytokine IL-6 and IL-12 during stimulation of THP-1 cells with LPS, and to simultaneously increase the expression of the gene for the anti-inflammatory cytokine IL-10, indicating their ability of anti-inflammatory mode of action. In addition, strain L344 reduced the production of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-8 and TNF- α during stimulation of THP-1 cells.

Among the selected isolates only two were able to increase TEER values in intact Caco-2 cells, namely *L. rhamnosus* L344 and *L. paracasei* L350. The rate of increase of TEER values varied and was dependent on the strain. Different concentrations of added bacteria did not affect the measured TEER values, but affected the response time of Caco-2 cells by which the effect of an increase in TEER values was detected. Exposure of intact Caco-2 cells to strain L344 resulted in increased expression of the gene *CLDN1*

(claudin-1), while none of the bacterial strains influenced the redistribution of actin filaments.

Simultaneous exposure of Caco-2 cells to PDB and lactobacilli (L344 and L350) significantly limited the decrease of TEER values for approximately 20 % by both strains. Distribution of actin filaments in Caco-2 cells that were simultaneously exposed to PDB and lactobacilli (L344 and L350) differed from distribution of actin filaments in Caco-2 cells that were exposed only to PDB. This has been particularly proven for *L. rhamnosus* L344 strain, which has increased the level of expression of the gene for the major structural transmembrane protein claudin-1 and at the same time also affected the redistribution of actin filaments during destruction of tight junctions caused by PDB.

Results have also shown that increase in the strength of tight junctions in stimulated Caco-2 cells, utilizing either L344 or L350 strain, does not depend on the presence of »S-layer« proteins, since these proteins have not been detected in the strains. However, it should be stressed that the presence of low MW (6 to 12 kDa) surface bound proteins have been detected in L344 strain, which might be involved in the stimulation of Caco-2 cells by increasing TEER values.

It has been found that the strain L344 is particularly interesting in terms of protection of the intestinal barrier in patients with IBD, showing evident probiotic properties (sensitivity to antibiotics, ability to exploit multiple sources of carbon, antimicrobial activity, capability of surviving the passage through the upper gastrointestinal tract and immunomodulation) with targeted mode of action in the intestinal barrier, which may help in maintaining remission of IBD or at least help to facilitate host's defence. However, further research is required for in-depth characterization of the mechanisms of its action, both *in vitro* and *in vivo*.

8 VIRI

- Ahlroos T., Tynkkynen S. 2009. Quantitative strain-specific detection of *Lactobacillus rhamnosus* GG in human faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 2: 506-514
- Ahrne S., Lonnermark E., Wold A. E., Aberg N., Hesselmar B., Saalman R., Strannegard I. L., Molin G., Adlerberth I. 2005. Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbes Infect*, 7, 11-12: 1256-1262
- Ahrne S., Nobaek S., Jeppsson B., Adlerberth I., Wold A. E., Molin G. 1998. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 1: 88-94
- Aires J., Doucet-Populaire F., Butel M. J. 2007. Tetracycline resistance mediated by *tet(W)*, *tet(M)*, and *tet(O)* genes of *Bifidobacterium* isolates from humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 8: 2751-2754
- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 4: 783-801
- Al-Sadi R., Boivin M., Ma T. 2009. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. *Frontiers Bioscience*, 14: 2765-2778
- Al-Sadi R., Ye D., Boivin M., Guo S., Hashimi M., Ereifej L., Ma T. Y. 2014. Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. *PLoS ONE*, 9, 3: e85345, doi:10.1371/journal.pone.0085345: 15 str.
- Al-Sadi R., Ye D., Said H. M., Y. M.T. 2010. IL-1 β -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by MEKK-1 activation of canonical NF- κ B pathway. *The American Journal of Pathology*, 177, 2310–2322
- Al-Sadi R. M., Ma T. Y. 2007. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *Journal of Immunology*, 178, 7: 4641-4649
- Amasheh M., Grotjohann I., Amasheh S., Fromm A., Soderholm J. D., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J.D. 2009a. Regulation of mucosal structure and barrier function in rat colon exposed to tumor necrosis factor alpha and interferon gamma *in vitro*: a novel model for studying the pathomechanisms of inflammatory bowel disease cytokines. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 44, 10: 1226-1235
- Amasheh S., Meiri N., Gitter A. H., Schoneberg T., Mankertz J., Schulzke J. D., Fromm M. 2002. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 115, 24: 4969-4976
- Amasheh S., Milatz S., Krug S. M., Bergs M., Amasheh M., Schulzke J. D., Fromm M. 2009b. Na⁺ absorption defends from paracellular back-leakage by claudin-8 upregulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 378, 1: 45-50

- Amasheh S., Schmidt T., Mahn M., Florian P., Mankertz J., Tavalali S., Gitter A. H., Schulzke J. D., Fromm M. 2005. Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells. *Cell and Tissue Research*, 321, 1: 89-96
- Ammor M. S., Gueimonde M., Danielsen M., Zagorec M., Van Hoek A. H., De Los Reyes-Gavilan C. G., Mayo B., Margolles A. 2008. Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried *tet(L)* and chromosomally located transposon-associated *tet(M)*, coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 5: 1394-1401
- Anderson R. C., Cookson A. L., McNabb W. C., Kelly W. J., Roy N. C. 2010a. *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS Microbiology Letters*, 309, 2: 184-192
- Anderson R. C., Cookson A. L., McNabb W. C., Park Z., McCann M. J., Kelly W. J., Roy N. C. 2010b. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiology*, 10, 316, doi: 10.1186/1471-2180-10-316: 11 str.
- Andriantsoanirina V., Allano S., Butel M. J., Aires J. 2013. Tolerance of *Bifidobacterium* human isolates to bile, acid and oxygen. *Anaerobe*, 21, 39-42
- Andrighetto C., Psomas E., Tzanetakis N., Suzzi G., Lombardi A. 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 1: 5-9
- Araujo-Perez F., McCoy A. N., Okechukwu C., Carroll I. M., Smith K. M., Jeremiah K., Sandler R. S., Asher G. N., Keku T. O. 2012. Differences in microbial signatures between rectal mucosal biopsies and rectal swabs. *Gut Microbes*, 3, 6: 530-535
- Ardizzone S., Porro G. B. 2005. Biologic therapy for inflammatory bowel disease. *Drugs*, 65, 16: 2253-2286
- Arnott I. D., Kingstone K., Ghosh S. 2000. Abnormal intestinal permeability predicts relapse in inactive Crohn disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 35, 11: 1163-1169
- Arqués J. A., Rodríguez E., Nuñez M., Medina M. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. *Food Control*, 22, 3-4: 457-461
- Arrieta M. C., Madsen K., Doyle J., Meddings J. 2009. Reducing small intestinal permeability attenuates colitis in the IL10 gene-deficient mouse. *Gut*, 58, 1: 41-48
- Ashraf R., Shah N. P. 2011. Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products. *International Food Research Journal*, 18, 3: 837-853
- Baccigalupi L., Di Donato A., Parlato M., Luongo D., Carbone V., Rossi M., Ricca E., De Felice M. 2005. Small surface-associated factors mediate adhesion of a food-isolated strain of *Lactobacillus fermentum* to Caco-2 cells. *Research in Microbiology*, 156, 7: 830-836

- Barbara G. 2006. Mucosal barrier defects in irritable bowel syndrome. Who left the door open? *American Journal of Gastroenterology*, 101, 6: 1295-1298
- Beganovic J., Frece J., Kos B., Lebos Pavunc A., Habjanic K., Suskovic J. 2011. Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100, 1: 43-53
- Bergmann K. R., Liu S. X., Tian R., Kushnir A., Turner J. R., Li H. L., Chou P. M., Weber C. R., De Plaen I. G. 2013. Bifidobacteria stabilize claudins at tight junctions and prevent intestinal barrier dysfunction in mouse necrotizing enterocolitis. *American Journal of Pathology*, 182, 5: 1595-1606
- Bernardeau M., Vernoux J. P., Henri-Dubernet S., Gueguen M. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 3: 278-285
- Bertiaux-Vandaele N., Youmba S. B., Belmonte L., Lecleire S., Antonietti M., Gourcerol G., Leroi A. M., Dechelotte P., Menard J. F., Ducrotte P., Coeffier M. 2011. The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *American Journal of Gastroenterology*, 106, 12: 2165-2173
- Blana V. A., Grounta A., Tassou C. C., Nychas G. J. E., Panagou E. Z. 2014. Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. *Food Microbiology*, 38, 208-218
- Blandino G., Milazzo I., Fazio D. 2008. Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products available in Italy. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 20, 4: 199-203
- Blum S., Schiffrin E. J. 2003. Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: implications for probiotic bacteria? *Current Issues Intestinal Microbiology*, 4, 2: 53-60
- Bogovic-Matijasic B., Rogelj I. 1998. Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221 - production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Process Biochemistry*, 33, 3: 345-352
- Bogovič Matijašić B., Koman Rajšp M., Perko B., Rogelj I. 2007. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal*, 17, 2: 157-166
- Bogovič Matijašić B., Narat M., Zorič M. 2003. Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. *Food Technology and Biotechnology*, 41, 1: 83-88
- Borrueal N., Carol M., Casellas F., Antolin M., De Lara F., Espin E., Naval J., Guarner F., Malagelada J.R. 2002. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated *ex vivo* by probiotic bacteria. *Gut*, 51, 5: 659-664

- Bove P., Capozzi V., Garofalo C., Rieu A., Spano G., Fiocco D. 2012. Inactivation of the *ftsH* gene of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: effects on growth, stress tolerance, cell surface properties and biofilm formation. *Microbiological Research*, 167, 4: 187-193
- Briske-Anderson M. J., Finley J. W., Newman S. M. 1997. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 214, 3: 248-257
- Bruewer M., Samarin S., Nusrat A. 2006. Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1072, 242-252
- Bruewer M., Utech M., Ivanov A. I., Hopkins A. M., Parkos C. A., Nusrat A. 2005. Interferon- γ induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19, 8: 923-933
- Burger D., Travis S. 2011. Conventional medical management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 140, 6: 1827-1837.e2, doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.045: 10 str.
- Cammarota M., De Rosa M., Stellavato A., Lamberti M., Marzaioli I., Giuliano M. 2009. *In vitro* evaluation of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 12028 as a probiotic: emphasis on innate immunity. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 2: 90-98
- Chen X., Xu J., Shuai J., Chen J., Zhang Z., Fang W. 2007. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 3: 307-312
- Chiba H., Osanai M., Murata M., Kojima T., Sawada N. 2008. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1778, 3: 588-600
- Cimperman L., Bayless G., Best K., Diligente A., Mordarski B., Oster M., Smith M., Vatakis F., Wiese D., Steiber A., Katz J. 2011. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in hospitalized adults. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 45, 9: 785-789
- Clayburgh D. R., Shen L., Turner J. R. 2004. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Laboratory Investigation*, 84, 3: 282-291
- Coppola R., Succi M., Tremonte P., Reale A., Salzano G., Sorrentino E. 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Lait*, 85, 3: 193-204
- Corr S. C., Li Y., Riedel C. U., O'toole P. W., Hill C., Gahan C. G. 2007. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 18: 7617-7621

- Cross M. L. 2002. Immunoregulation by probiotic lactobacilli: pro-Th1 signals and their relevance to human health. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 3, 115-125
- Cross M. L., Ganner A., Teilab D., Fray L. M. 2004. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 42, 2: 173-180
- Čitar M., Hacin B., Tompa G., Štempelj M., Rogelj I., Dolinšek J., Narat M., Bogovič Matijašić B. 2015. Human intestinal mucosa-associated *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with probiotic properties modulate IL-10, IL-6 and IL-12 gene expression in THP-1 cells. *Beneficial Microbes*, doi: 10.3920/BM2014.0081: 12 str.
- Danielsen M., Wind A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 1: 1-11
- Darfeuille-Michaud A., Boudeau J., Bulois P., Neut C., Glasser A. L., Barnich N., Bringer M. A., Swidsinski A., Beaugerie L., Colombel J. F. 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, 127, 2: 412-421
- De Keersmaecker S. C., Verhoeven T. L., Desair J., Marchal K., Vanderleyden J., Nagy I. 2006. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiology Letters*, 259, 1: 89-96
- De Vuyst L., Leroy F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 4: 194-199
- Devirgiliis C., Barile S., Perozzi G. 2011. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. *Genes & Nutrition*, 6, 3: 275-284
- Di Cagno R., Minervini G., Sgarbi E., Lazzi C., Bernini V., Neviani E., Gobbetti M. 2010. Comparison of phenotypic (Biolog System) and genotypic (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR, and amplified fragment length polymorphism, AFLP) methods for typing *Lactobacillus plantarum* isolates from raw vegetables and fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 3: 246-253
- Domann E., Hong G., Imirzalioglu C., Turschner S., Kuhle J., Watzel C., Hain T., Hossain H., Chakraborty T. 2003. Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 12: 5500-5510
- Drouault-Holowacz S., Foligne B., Dennin V., Goudercourt D., Terpend K., Burckel A., Pot B. 2006. Anti-inflammatory potential of the probiotic dietary supplement Lactibiane Tolerance: *in vitro* and *in vivo* considerations. *Clinical Nutrition*, 25, 6: 994-1003
- Dziarski R., Gupta D. 2005. *Staphylococcus aureus* peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. *Infection and Immunity*, 73, 8: 5212-5216

- European Food Safety Authority (EFSA) - Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. The EFSA Journal 10: 1-10.
- Eun C. S., Kim Y. S., Han D. S., Choi J. H., Lee A. R., Park Y. K. 2011. *Lactobacillus casei* prevents impaired barrier function in intestinal epithelial cells. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 119, 1: 49-56
- Ewaschuk J. B., Diaz H., Meddings L., Diederichs B., Dmytrash A., Backer J., Looijer-Van Langen M., Madsen K. L. 2008. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295, 5: G1025-G1034
- Fajdiga S., Koninkx J. F., Tooten P. C., Marinsek-Logar R. 2006. Interference of *Salmonella enteritidis* and *Lactobacillus* spp. with IL-8 levels and transepithelial electrical resistance of enterocyte-like Caco-2 cells. *Folia Microbiol*, 51, 4: 268-272
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, FAO-Food and Agriculture Organization: 11 str.
- Fedorak R., Demeria D. 2012. Probiotic bacteria in the prevention and the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics of North America*, 41, 4: 821-842
- Feldman G. J., Mullin J. M., Ryan M. P. 2005. Occludin: structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 6: 883-917
- Fernandez M. F., Boris S., Barbes C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 3: 449-455
- Fiorentino D. F., Zlotnik A., Mosmann T. R., Howard M., Ogarra A. 1991. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology*, 147, 11: 3815-3822
- Fitzpatrick L. R., Small J., Hoerr R. A., Bostwick E. F., Maines L., Koltun W. A. 2008. *In vitro* and *in vivo* effects of the probiotic *Escherichia coli* strain M-17: immunomodulation and attenuation of murine colitis. *British Journal of Nutrition*, 100, 3: 530-541
- Fogh J., Wright W. C., Loveless J. D. 1977. Absence of Hela-cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 58, 2: 209-214
- Franz M., Horl W. H. 1999. Common errors in diagnosis and management of urinary tract infection. I: pathophysiology and diagnostic techniques. *Nephrology, Dialysis and Transplantation*, 14, 11: 2746-2753
- Fujimori S., Tatsuguchi A., Gudis K., Kishida T., Mitsui K., Ehara A., Kobayashi T., Sekita Y., Seo T., Sakamoto C. 2007. High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22, 8: 1199-1204

- Furuse M., Hata M., Furuse K., Yoshida Y., Haratake A., Sugitani Y., Noda T., Kubo A., Tsukita S. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, 156, 6: 1099-1111
- Gagnon M., Zihler Berner A., Chervet N., Chassard C., Lacroix C. 2013. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *Journal of Microbiological Methods*, 94, 3: 274-279
- Garrod D., Chidgey M. 2008. Desmosome structure, composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1778, 3: 572-587
- Gasche C., Bakos S., Dejaco C., Tillinger W., Zakeri S., Reinisch W. 2000. IL-10 secretion and sensitivity in normal human intestine and inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Immunology*, 20, 5: 362-370
- Gavini F., Cayuela C., Antoine J-M., Lecoq C., Lefebvre B., Membré J-M., Neut C. 2001. Differences in the distribution of bifidobacterial and enterobacterial species in human faecal microflora of three different (children, adults, elderly) age groups. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 13, 1: 40-45
- Giepmans B. N., Van Ijzendoorn S. C. 2009. Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1788, 4: 820-831
- Gologan S., Iacob R., Iancu D., Iacob S., Cotruta B., Vadan R., Catuneanu A. M., Constantinescu I., Barbarii L., Gheorghe C., Diculescu M. 2013. Inflammatory gene expression profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis: a comparative analysis using a reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification protocol. *Journal of Crohns & Colitis*, 7, 8: 622-630
- Guglielmetti S., Mora D., Gschwender M., Popp K. 2011. Randomised clinical trial: *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome and improves quality of life - a double-blind, placebo-controlled study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 33, 10: 1123-1132
- Guillemot L., Paschoud S., Pulimeno P., Foglia A., Citi S. 2008. The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1778, 3: 601-613
- Gunzel D., Stuver M., Kausalya P. J., Haisch L., Krug S. M., Rosenthal R., Meij I. C., Hunziker W., Fromm M., Muller D. 2009. Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function. *Journal of Cell Science*, 122, 10: 1507-1517
- Gwee K. A., Collins S. M., Read N. W., Rajnakova A., Deng Y., Graham J. C., Mckendrick M. W., Moolchala S. M. 2003. Increased rectal mucosal expression of interleukin 1 β in recently acquired post-infectious irritable bowel syndrome. *Gut*, 52, 4: 523-526

- Hacin B., Rogelj I., Matijasic B. B. 2008. *Lactobacillus* isolates from weaned piglets' mucosa with inhibitory activity against common porcine pathogens. *Folia Microbiologica*, 53, 6: 569-576
- Hartsock A., Nelson W. J. 2008. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1778, 3: 660-669
- Hautefort I., Roels A., Tailliez P., Ladire M., Raibaud P., Ducluzeau R., Fons M. 1999. Selection of *Lactobacillus fermentum* strains able to durably colonize the digestive tract of mice harboring a complex human flora. *FEMS Microbiology Ecology*, 29, 1: 23-31
- Heller F., Florian P., Bojarski C., Richter J., Christ M., Hillenbrand B., Mankertz J., Gitter A. H., Burgel N., Fromm M., Zeitz M., Fuss I., Strober W., Schulzke J. D. 2005. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, 129, 2: 550-564
- Herias M. V., Koninkx J. F., Vos J. G., Huis In't Veld J. H., Van Dijk J. E. 2005. Probiotic effects of *Lactobacillus casei* on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 2: 143-155
- Hold G. L., Mukhopadhyaya I., Monie T. P. 2011. Innate immune sensors and gastrointestinal bacterial infections. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 579650, doi: 10.1155/2011/579650: 11 str.
- Holdeman L. V., Cato E. P., Moore W. E. C. 1977. *Anaerobe laboratory manual*. 4th ed. Blacksburg, Virginia, Virginia Polytechnic Institute and State University: 132 str.
- Hudcovic T., Stepankova R., Cebra J., Tlaskalova-Hogenova H. 2001. The role of microflora in the development of intestinal inflammation: acute and chronic colitis induced by dextran sulfate in germ-free and conventionally reared immunocompetent and immunodeficient mice. *Folia Microbiologica*, 46, 6: 565-572
- Ikenouchi J., Furuse M., Furuse K., Sasaki H., Tsukita S., Tsukita S. 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, 171, 6: 939-945
- Ivanov A. I., Nusrat A., Parkos C. A. 2005. Endocytosis of the apical junctional complex: mechanisms and possible roles in regulation of epithelial barriers. *Bioessays*, 27, 4: 356-365
- Ivanov A. I., Parkos C. A., Nusrat A. 2010. Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation. *American Journal of Pathology*, 177, 2: 512-524
- Jensen H., Grimmer S., Naterstad K., Axelsson L. 2012. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 1-2: 216-222
- Jimenez E., Martin R., Maldonado A., Martin V., Gomez De Segura A., Fernandez L., Rodriguez J. M. 2010. Complete genome sequence of *Lactobacillus salivarius*

- CECT 5713, a probiotic strain isolated from human milk and infant feces. *Journal of Bacteriology*, 192, 19: 5266-5267
- Johnson A. M., Kaushik R. S., Hardwidge P. R. 2010. Disruption of transepithelial resistance by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology*, 141, 1-2: 115-119
- Johnson B., Selle K., O'flaherty S., Goh Y. J., Klaenhammer T. 2013. Identification of extracellular surface-layer associated proteins in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Microbiology*, 159, 11: 2269-2282
- Karczewski J., Troost F. J., Konings I., Dekker J., Kleerebezem M., Brummer R. J., Wells J. M. 2010. Regulation of human epithelial tight junction proteins by *Lactobacillus plantarum* *in vivo* and protective effects on the epithelial barrier. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 298, 6: G851-G859
- Kastner S., Perreten V., Bleuler H., Hugenschmidt G., Lacroix C., Meile L. 2006. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 2: 145-155
- Khailova L., Dvorak K., Arganbright K. M., Halpern M. D., Kinouchi T., Yajima M., Dvorak B. 2009. *Bifidobacterium bifidum* improves intestinal integrity in a rat model of necrotizing enterocolitis. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 297, 5: G940-G949
- Kilsgaard J., Leser T. D., Gunnarsson T., Weise M., Folkenberg D. M., Janzen T., Flambard B. 2011. New probiotic *Bifidobacterium longum*. European Patent Office EP20090780180: 26 str.
<http://www.google.com/patents/EP2318513A1?cl=en> (9. sept. 2014)
- Kirtzalidou E., Pramateftaki P., Kotsou M., Kyriacou A. 2011. Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. *Anaerobe*, 17, 6: 440-443
- Klaenhammer T. R., Kullen M. J. 1999. Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1-2: 45-57
- Klare I., Konstabel C., Muller-Bertling S., Reissbrodt R., Huys G., Vancanneyt M., Swings J., Goossens H., Witte W. 2005. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of lactobacilli, pediococci, lactococci, and bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 12: 8982-8986
- Klare I., Konstabel C., Werner G., Huys G., Vankerckhoven V., Kahlmeter G., Hildebrandt B., Muller-Bertling S., Witte W., Goossens H. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 5: 900-912
- Klein G. 2011. Antibiotic resistance and molecular characterization of probiotic and clinical *Lactobacillus* strains in relation to safety aspects of probiotics. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8, 2: 267-281

- Klein G., Hallmann C., Casas I. A., Abad J., Louwers J., Reuter G. 2000. Exclusion of *vanA*, *vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 5: 815-824
- Klijn N., Weerkamp A. H., Devos W. M. 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 11: 3390-3393
- Klingberg T. D., Pedersen M. H., Cencic A., Budde B. B. 2005. Application of measurements of transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial cell monolayers to evaluate probiotic activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 11: 7528-7530
- Klingler J. M., Stowe R. P., Obenhuber D. C., Groves T. O., Mishra S. K., Pierson D. L. 1992. Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 6: 2089-2092
- Koch F., Stanzl U., Jennewein P., Janke K., Heufler C., Kampgen E., Romani N., Schuler G. 1996. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *Journal of Experimental Medicine*, 184, 4: 1591-1591
- Krug S. M., Bojarski C., Fromm A., Schulzke J. D., Fromm M. 2010. Tricellulin in Crohn's disease and ulcerative colitis. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
http://www.fasebj.org/cgi/content/meeting_abstract/24/1_MeetingAbstracts/998.1 (31. avg. 2014)
- Kucharzik T., Maaser C., Luger A., Kagnoff M., Mayer L., Targan S., Domschke W. 2006. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflammatory Bowel Diseases*, 12, 11: 1068-1083
- Kuhn R., Lohler J., Rennick D., Rajewsky K., Muller W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75, 2: 263-274
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 5259: 680-685
- Larsen N., Vogensen F. K., van den Berg F. W. J., Nielsen D. S., Andreasen A. S., Pedersen B. K., Abu Al-Soud W., Sorensen S. J., Hansen L. H., Jakobsen M. 2010. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS ONE*, 5, 2: e9085, doi:10.1371/journal.pone.0009085: 10 str.
- Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S. C. J. 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72, 4: 728-764

- Lee H. I., Kim M. H., Kim K. Y., So J. S. 2010. Screening and selection of stress resistant *Lactobacillus* spp. isolated from the marine oyster (*Crassostrea gigas*). *Anaerobe*, 16, 5: 522-526
- Li N., Gu L., Qu L., Gong J., Li Q., Zhu W., Li J. 2010a. Berberine attenuates pro-inflammatory cytokine-induced tight junction disruption in an *in vitro* model of intestinal epithelial cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40, 1: 1-8
- Li P., Yu Q., Ye X., Wang Z., Yang Q. 2011. *Lactobacillus* S-layer protein inhibition of *Salmonella*-induced reorganization of the cytoskeleton and activation of MAPK signalling pathways in Caco-2 cells. *Microbiology*, 157, 9: 2639-2646
- Li Q. Q., Chen Q. H., Hui R., Zhu D. S., He G. Q. 2010b. Isolation and characterisation of an oxygen, acid and bile resistant *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* Qq08. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 8: 1340-1346
- Lievin-Le Moal V., Amsellem R., Servin A. L., Coconnier M-H. 2002. *Lactobacillus acidophilus* (strain LB) from the resident adult human gastrointestinal microflora exerts activity against brush border damage promoted by a diarrhoeagenic *Escherichia coli* in human enterocyte-like cells. *Gut*, 50, 6: 803-811
- Lindsay J. O., Sandison A., Cohen P., Brennan F. M., Hodgson H. J. F. 2004. IL-10 gene therapy is therapeutic for dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, 49, 7-8: 1327-1334
- Liu Y. W., Su Y. W., Ong W. K., Cheng T. H., Tsai Y. C. 2011. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* K68 ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in BALB/c mice via the anti-inflammatory and immunomodulatory activities. *International Immunopharmacology*, 11, 12: 2159-2166
- Ma T. Y., Boivin M. A., Ye D., Pedram A., Said H. M. 2005. Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288, 3: G422-G430
- Ma T. Y., Iwamoto G. K., Hoa N. T., Akotia V., Pedram A., Boivin M. A., Said H. M. 2004. TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 286, 3: G367-G376
- Mack D. R., Ahrne S., Hyde L., Wei S., Hollingsworth M. A. 2003. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut*, 52, 6: 827-833
- Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. Upper Saddle River, Prentice-Hall international: 1019 str.
- Madsen K., Cornish A., Soper P., Mckaigney C., Jijon H., Yachimec C., Doyle J., Jewell L., De Simone C. 2001. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*, 121, 3: 580-591

- Madsen K. L., Lewis S. A., Tavernini M. M., Hibbard J., Fedorak R. N. 1997. Interleukin 10 prevents cytokine-induced disruption of T84 monolayer barrier integrity and limits chloride secretion. *Gastroenterology*, 113, 1: 151-159
- Madsen K. L., Malfair D., Gray D., Doyle J. S., Jewell L. D., Fedorak R. N. 1999. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflammatory Bowel Diseases*, 5, 4: 262-270
- Magro F., Fraga S., Ribeiro T., Soares-Da-Silva P. 2004. Intestinal Na⁺-K⁺-ATPase activity and molecular events downstream of interferon- γ receptor stimulation. *British Journal of Pharmacology*, 142, 8: 1281-1292
- Malago J. J., Koninkx J. F., Ovelgonne H. H., Van Asten F. J., Swennenhuis J. F., Van Dijk J. E. 2003. Expression levels of heat shock proteins in enterocyte-like Caco-2 cells after exposure to *Salmonella enteritidis*. *Cell Stress & Chaperones*, 8, 2: 194-203
- Mankertz J., Schulzke J. D. 2007. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Current Opinion Gastroenterology*, 23, 4: 379-383
- Mariano C., Sasaki H., Brites D., Brito M. A. 2011. A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *European Journal of Cell Biology*, 90, 10: 787-796
- Masco L., Huys G., De Brandt E., Temmerman R., Swings J. 2005. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 102, 2: 221-230
- Mathias A., Duc M., Favre L., Benyacoub J., Blum S., Corthesy B. 2010. Potentiation of polarized intestinal Caco-2 cell responsiveness to probiotics complexed with secretory IgA. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 44: 33906-33913
- Matsumoto S., Hara T., Hori T., Mitsuyama K., Nagaoka M., Tomiyasu N., Suzuki A., Sata M. 2005. Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 140, 3: 417-426
- Mättö J., Alakomi H-L., Vaari A., Virkajärvi I., Saarela M. 2006. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *International Dairy Journal*, 16, 9: 1029-1037
- Mavrič A., Tompa G., Narat M., Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 2013. Effect of *Lactobacillus gasseri* K7 and its bacteriocins on transepithelial electrical resistance of Caco-2 cells. V: 5th Congress of European Microbiologists, Leipzig, July 21-25, 2013. Geneva, Kenes International: 312
- Mccartney A. L., Wang W. Z., Tannock G. W. 1996. Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and *Lactobacillus* microflora of humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 12: 4608-4613

- Medeiros M., Sharma V. K., Ding R., Yamaji K., Li B., Muthukumar T., Valderde-Rosas S., Hernandez A. M., Munoz R., Suthanthiran M. 2003. Optimization of RNA yield, purity and mRNA copy number by treatment of urine cell pellets with RNAlater. *Journal of Immunological Methods*, 279, 1-2: 135-142
- Meijerink M., Van Hemert S., Taverne N., Wels M., De Vos P., Bron P. A., Savelkoul H. F., Van Bilsen J., Kleerebezem M., Wells J. M. 2010. Identification of genetic loci in *Lactobacillus plantarum* that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization. *PLoS ONE*, 5, 5: e10632, doi:10.1371/journal.pone.0010632: 12 str.
- Mennigen R., Nolte K., Rijcken E., Utech M., Loeffler B., Senninger N., Bruewer M. 2009. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296, 5: G1140-G1149
- Messaoudi S., Madi A., Prevost H., Feuilleley M., Manai M., Dousset X., Connil N. 2012. *In vitro* evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Anaerobe*, 18, 6: 584-589
- Milatz S., Krug S. M., Rosenthal R., Gunzel D., Muller D., Schulzke J. D., Amasheh S., Fromm M. 2010. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1798, 11: 2048-2057
- Miller J. M., Rhoden D. L. 1991. Preliminary evaluation of Biolog, a carbon source utilization method for bacterial identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 6: 1143-1147
- Miyauchi E., Morita H., Tanabe S. 2009. *Lactobacillus rhamnosus* alleviates intestinal barrier dysfunction in part by increasing expression of zonula occludens-1 and myosin light-chain kinase in vivo. *Journal of Dairy Science*, 92, 6: 2400-2408
- Mobili P., Gerbino E., Tymczynsyn E. E., Gómez-Zavaglia A. 2010. S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria. V: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Mendez-Vilas A. (ed.). Badajoz, Spain, Formatex Research Center: 1224-1234
- Molin G., Jeppsson B., Johansson M. L., Ahrne S., Nobaek S., Stahl M., Bengmark S. 1993. Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 3: 314-323
- Morgan M. C., Boyette M., Goforth C., Sperry K. V., Greene S. R. 2009. Comparison of the Biolog OmniLog Identification System and 16S ribosomal RNA gene sequencing for accuracy in identification of atypical bacteria of clinical origin. *Journal of Microbiological Methods*, 79, 3: 336-343

- Mudter J., Neurath M. F. 2007a. Apoptosis of T cells and the control of inflammatory bowel disease: therapeutic implications. *Gut*, 56, 2: 293-303
- Mudter J., Neurath M. F. 2007b. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflammatory Bowel Diseases*, 13, 8: 1016-1023
- Murphy M. S., Eastham E. J., Nelson R., Pearson A. D. J., Laker M. F. 1989. Intestinal permeability in Crohns-disease. *Archives of Disease in Childhood*, 64, 3: 321-325
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. 2005. *Medical microbiology*. 5th ed. Philadelphia, Elsevier Mosby: 963 str.
- Natoli M., Leoni B. D., D'agnano I., Zucco F., Felsani A. 2012. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicology In Vitro*, 26, 8: 1243-1246
- Nawaz M., Wang J. A., Zhou A. P., Ma C. F., Wu X. K., Moore J. E., Millar B. C., Xu J. R. 2011. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Current Microbiology*, 62, 3: 1081-1089
- Nelson R. R. S. 1999. Intrinsically vancomycin-resistant Gram-positive organisms: clinical relevance and implications for infection control. *Journal of Hospital Infection*, 42, 4: 275-282
- Nielsen D. S., Moller P. L., Rosenfeldt V., Paerregaard A., Michaelsen K. F., Jakobsen M. 2003a. Case study of the distribution of mucosa-associated *Bifidobacterium* species, *Lactobacillus* species, and other lactic acid bacteria in the human colon. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 12: 7545-7548
- Nielsen O. H., Kirman I., Rudiger N., Hendel J., Vainer B. 2003b. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 38, 2: 180-185
- O'Donnell M. M., O'toole P. W., Ross R. P. 2013. Catabolic flexibility of mammalian-associated lactobacilli. *Microbial Cell Factories*, 12:48, doi: 10.1186/1475-2859-12-48: 11 str.
- O'Hara A. M., Shanahan F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7, 7: 688-693
- O'Mahony L., Mccarthy J., Kelly P., Hurley G., Luo F. Y., Chen K. S., O'sullivan G. C., Kiely B., Collins J. K., Shanahan F., Quigley E. M. M. 2005. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology*, 128, 3: 541-551
- Olsson C., Ahrne S., Pettersson B., Molin G. 2004. DNA based classification of food associated *Enterobacteriaceae* previously identified by Biolog GN Microplates. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 2: 219-228
- Oser B. L. 1965. *Hawk's physiological chemistry*. 14th ed. New York, USA, McGraw-Hill: 1102 str.
- Oshima T., Laroux F. S., Coe L. L., Morise Z., Kawachi S., Bauer P., Grisham M. B., Specian R. D., Carter P., Jennings S., Granger D. N., Joh T., Alexander J. S. 2001.

- Interferon-gamma and interleukin-10 reciprocally regulate endothelial junction integrity and barrier function. *Microvascular Research*, 61, 1: 130-143
- Ouoba L. I., Lei V., Jensen L. B. 2008. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 2: 217-224
- Palomar M. M., Galdeano C. M., Perdigon G. 2014. Influence of a probiotic *Lactobacillus* strain on the intestinal ecosystem in a stress model mouse. *Brain Behavior and Immunity*, 35, 77-85
- Paris L., Tonutti L., Vannini C., Bazzoni G. 2008. Structural organization of the tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1778, 3: 646-659
- Pegues D. A., Miller S. I. 2005. *Salmonella* species: including *Salmonella* Typhi. V: Principles and practice of infectious disease. Mandell G. L., Bennett J. E., Doun R. (eds.). Philadelphia, Elsevier Inc.: 2636-2654
- Peluso I., Pallone F., Monteleone G. 2006. Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn's disease: pathogenetic relevance and therapeutic implication. *World Journal of Gastroenterology*, 12, 35: 5606-5610
- Penders J., Gerhold K., Stobberingh E. E., Thijs C., Zimmermann K., Lau S., Hamelmann E. 2013. Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 132, 3: 601-607
- Peran L., Camuesco D., Comalada M., Nieto A., Concha A., Diaz-Ropero M. P., Olivares M., Xaus J., Zarzuelo A., Galvez J. 2005. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 33: 5185-5192
- Pfaffl M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, 9: e45, doi: 10.1093/nar/29.9.e45: 6 str.
- Pulido R. P., Ben Omar N., Abriouel H., Lopez R. L., Canamero M. M., Guyot J. P., Galvez A. 2007. Characterization of lactobacilli isolated from caper berry fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 2: 583-590
- Reiff C., Kelly D. 2010. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 1: 25-33
- Rennick D. M., Fort M. M. 2000. Lessons from genetically engineered animal models - XII. IL-10-deficient (IL-10^{-/-}) mice and intestinal inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 278, 6: G829-G833
- Resta-Lenert S., Barrett K. E. 2003. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*, 52, 7: 988-997
- Resta-Lenert S. C., Barrett K. E. 2009. Modulation of intestinal barrier properties by probiotics: role in reversing colitis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1165, 175-182

- Reuter G. 2001. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2, 2: 43-53
- Rogelj I., Bogovič Matijašič B., Hacin B., Čitar M., Štempelj M., Švigelj K. 2013. Metoda za izolacijo in selekcijo bakterijskih sevov, bakterijski sevi in način njihove uporabe. Urad Republike Slovenije za intelektualno lastnino P 20300372: 32 str.
- Rojas M., Ascencio F., Conway P.L. 2002. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5: 2330-2336
- Rosenthal R., Milatz S., Krug S. M., Oelrich B., Schulzke J. D., Amasheh S., Gunzel D., Fromm M. 2010. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *Journal of Cell Science*, 123, 11: 1913-1921
- Sagaya F. M., Hacin B., Tompa G., Ihan A., Špela Š., Černe M., Hurrell R. F., Matijašič B. B., Rogelj I., Vergères G. 2014. *Lactobacillus gasseri* K7 modulates the blood cell transcriptome of conventional mice infected with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 5: 1282-1296
- Saitou M., Furuse M., Sasaki H., Schulzke J. D., Fromm M., Takano H., Noda T., Tsukita S. 2000. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Molecular Biology of the Cell*, 11, 12: 4131-4142
- Sanchez-Munoz F., Dominguez-Lopez A., Yamamoto-Furusho J. K. 2008. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 14, 27: 4280-4288
- Sanchez Carballo P. M., Vilen H., Palva A., Holst O. 2010. Structural characterization of teichoic acids from *Lactobacillus brevis*. *Carbohydrate Research*, 345, 4: 538-542
- Schmitz H., Barmeyer C., Fromm M., Runkel N., Foss H. D., Bentzel C. J., Riecken E. O., Schulzke J. D. 1999a. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 116, 2: 301-309
- Schmitz H., Fromm M., Bentzel C. J., Scholz P., Detjen K., Mankertz J., Bode H., Epple H. J., Riecken E. O., Schulzke J. D. 1999b. Tumor necrosis factor-alpha (TNF α) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *Journal of Cell Science*, 112, 1: 137-146
- Schneeberger E. E., Lynch R. D. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 286, 6: C1213-1228
- Schwende H., Fitzke E., Ambs P., Dieter P. 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Journal of Leukocyte Biology*, 59, 4: 555-561

- Schwartz A., Jacobi M., Frick J-S., Richter M., Rusch K., Köhler H. 2010. Microbiota in pediatric inflammatory bowel disease. *The Journal of Pediatrics*, 157, 2: 240-244.e1, doi: 10.1016/j.jpeds.2010.02.046: 4 str.
- Selinger C. P., Bell A., Cairns A., Lockett M., Sebastian S., Haslam N. 2013. Probiotic VSL#3 prevents antibiotic-associated diarrhoea in a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Hospital Infection*, 84, 2: 159-165
- Sellon R. K., Tonkonogy S., Schultz M., Dieleman L. A., Grenther W., Balish E., Rennick D. M., Sartor R. B. 1998. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and Immunity*, 66, 11: 5224-5231
- Seme K. 2002. Normalna mikrobna flora. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologij. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 59 - 64
- Serafini F., Bottacini F., Viappiani A., Baruffini E., Turrone F., Foroni E., Lodi T., Van Sinderen D., Ventura M. 2011. Insights into physiological and genetic mupirocin susceptibility in bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 9: 3141-3146
- Serban D. E. 2013. Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Letters*, 345, 2: 258-270
- Seth A., Yan F., Polk D. B., Rao R. K. 2008. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294, 4: G1060-G1069
- Sgorbati B., Biavati B., Palenzona D. 1995. The genus *Bifidobacterium*. V: The Lactic Acid Bacteria. Wood B. J. B., Holzapfel W. H. (eds.). London, Blackie Academic: 279-306
- Sharma P., Tomar S. K., Goswami P., Sangwan V., Singh R. 2014. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57, 176-195
- Shokryazdan P., Sieo C. C., Kalavathy R., Liang J. B., Alitheen N. B., Jahromi M. F., Yin W. H. 2014. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Research International*, 2014, 927268, doi: 10.1155/2014/927268:16 str.
- Simpson P. J., Fitzgerald G. F., Stanton C., Ross R. P. 2004. The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of bifidobacteria from probiotic animal feed. *Journal of Microbiological Methods*, 57, 1: 9-16
- Smokvina T., Wels M., Polka J., Chervaux C., Brisse S., Boekhorst J., van Hylckama Vlieg J. E. T., Siezen R. J. 2013. *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. *PLoS ONE*, 8, 7: e68731, doi: 10.1371/journal.pone.0068731: 18 str.
- Snoeck V., Goddeeris B., Cox E. 2005. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes and Infection*, 7, 7-8: 997-1004

- Sood A., Midha V., Makharia G. K., Ahuja V., Singal D., Goswami P., Tandon R. K. 2009. The probiotic preparation, VSL#3 induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7, 11: 1202-1209
- Sousa S., Lecuit M., Cossart P. 2005. Microbial strategies to target, cross or disrupt epithelia. *Current Opinion in Cell Biology*, 17, 5: 489-498
- Steidler L., Hans W., Schotte L., Neiryneck S., Obermeier F., Falk W., Fiers W., Remaut E. 2000. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, 289, 5483: 1352-1355
- Stevens C. E., Hume I. D. 1998. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiological Reviews*, 78, 2: 393-427
- Suzuki T., Yoshinaga N., Tanabe S. 2011. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 36: 31263-31271
- Swidsinski A., Ladhoff A., Pernthaler A., Swidsinski S., Loening-Baucke V., Ortner M., Weber J., Hoffmann U., Schreiber S., Dietel M., Lochs H. 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122, 1: 44-54
- Tagg J. R., Dajani A. S., Wannamaker L. W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40, 3: 722-756
- Tagore A., Gonsalkorale W. M., Pravica V., Hajeer A. H., McMahon R., Whorwell P. J., Sinnott P. J., Hutchinson I. V. 1999. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens*, 54, 4: 386-390
- Talafantova M., Mandel L., Trebichavsky I. 1987. The adherence of *Escherichia coli* to the intestinal epithelium of piglets. *Nahrung*, 31, 5-6: 477-479
- Tamura A., Hayashi H., Imasato M., Yamazaki Y., Hagiwara A., Wada M., Noda T., Watanabe M., Suzuki Y., Tsukita S. 2011. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology*, 140, 3: 913-923
- Tannock G. W. 2010. Analysis of bifidobacterial population in bowel ecology studies. V: Bifidobacteria: genomics and molecular aspects. Mayo B., van Sinderen D. (eds.). Norfolk, Caister Academic Press: 1-15
- Tap J., Mondot S., Levenez F., Pelletier E., Caron C., Furet J. P., Ugarte E., Munoz-Tamayo R., Paslier D. L., Nalin R., Dore J., Leclerc M. 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*, 11, 10: 2574-2584
- Tazuke Y., Drongowski R. A., Teitelbaum D. H., Coran A. G. 2003. Interleukin-6 changes tight junction permeability and intracellular phospholipid content in a human enterocyte cell culture model. *Pediatric Surgery International*, 19, 5: 321-325

- Temmerman R., Pot B., Huys G., Swings J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 1: 1-10
- Tilg H., Kaser A. 2011. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *Journal of Clinical Investigation*, 121, 6: 2126-2132
- Todorov S. D., Rachman C., Fourrier A., Dicks L. M. T., van Reenen C. A., Prévost H., Dousset X. 2011. Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe*, 17, 1: 23-31
- Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. 1999. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 10: 4351-4356
- Turcotte J. F., Wong K., Mah S. J., Dieleman L. A., Kao D., Kroeker K., Claggett B., Saltzman J. R., Wine E., Fedorak R. N., Liu J. J. 2012. Increased epithelial gaps in the small intestine are predictive of hospitalization and surgery in patients with inflammatory bowel disease. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 3, e19, doi: 10.1038/ctg.2012.13: 6 str.
- Turner J. R. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9, 11: 799-809
- Turpin W., Humblot C., Noordine M-L., Thomas M., Guyot J-P. 2012. *Lactobacillaceae* and cell adhesion: genomic and functional screening. *PLoS ONE*, 7, 5: e38034, doi:10.1371/journal.pone.0038034: 14 str.
- Turrone F., Foroni E., Pizzetti P., Giubellini V., Ribbera A., Merusi P., Cagnasso P., Bizzarri B., De'angelis G. L., Shanahan F., Van Sinderen D., Ventura M. 2009. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 6: 1534-1545
- Van De Walle J., Hendrickx A., Romier B., Larondelle Y., Schneider Y. J. 2010. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. *Toxicology In Vitro*, 24, 5: 1441-1449
- Van Der Sluis M., De Koning B. A., De Bruijn A. C., Velcich A., Meijerink J. P., Van Goudoever J. B., Buller H. A., Dekker J., Van Seuningen I., Renes I. B., Einerhand A. W. 2006. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 131, 1: 117-129
- Van Hemert S., Meijerink M., Molenaar D., Bron P. A., De Vos P., Kleerebezem M., Wells J. M., Marco M. L. 2010. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes modulating the cytokine response of human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Microbiology*, 10, 293, doi:10.1186/1471-2180-10-293: 13 str.
- Van Hoek A. H. A. M., Mayrhofer S., Domig K. J., Aarts H. J. M. 2008. Resistance determinant *erm(X)* is borne by transposon Tn5432 in *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, 6: 544-548

- Van Itallie C., Rahner C., Anderson J. M. 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *Journal of Clinical Investigation*, 107, 10: 1319-1327
- Van Itallie C. M., Anderson J. M. 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annual Review of Physiology*, 68, 403-429
- Vermeulen M. A., De Jong J., Vaessen M. J., Van Leeuwen P. A., Houdijk A. P. 2011. Glutamate reduces experimental intestinal hyperpermeability and facilitates glutamine support of gut integrity. *World Journal of Gastroenterology*, 17, 12: 1569-1573
- Vilela E. G., Ferrari M. L. A., Torres H. O. G., Pinto A. G., Aguirre A. C. C., Martins F. P., Goulart E. M. A., Cunha A. S. 2008. Influence of *Saccharomyces boulardii* on the intestinal permeability of patients with Crohn's disease in remission. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 43, 7: 842-848
- Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1. izd. Ljubljana, DZS: 552 str.
- Waeytens A., Ferdinande L., Neiryck S., Rottiers P., De Vos M., Steidler L., Cuvelier C.A. 2008. Paracellular entry of interleukin-10 producing *Lactococcus lactis* in inflamed intestinal mucosa in mice. *Inflammatory Bowel Diseases*, 14, 4: 471-479
- Walter J. 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 16: 4985-4996
- Weber C. R., Nalle S. C., Tretiakova M., Rubin D. T., Turner J.R. 2008. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Laboratory Investigation*, 88, 10: 1110-1120
- Wells J. M., Rossi O., Meijerink M., Van Baarlen P. 2011. Epithelial crosstalk at the microbiota-mucosal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, Suppl 1, 4607-4614
- Wildt S., Nordgaard I., Hansen U., Brockmann E., Rumessen J. J. 2011. A randomised double-blind placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 for maintenance of remission in ulcerative colitis. *Journal of Crohns & Colitis*, 5, 2: 115-121
- Wünsche L., Babel W. 1996. The suitability of the Biolog Automated Microbial Identification System for assessing the taxonomical composition of terrestrial bacterial communities. *Microbiological Research*, 151, 2: 133-143
- Ying C., Lei W., Jiazhong L., Zhantao S., Ligu A. 2007. Identification and purification of a novel adhesion-associated protein in a new strain of *Lactobacillus*, L15, from flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Veterinary Microbiology*, 122, 1-2: 116-122
- Yu D., Turner J. R. 2008. Stimulus-induced reorganization of tight junction structure: the role of membrane traffic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1778, 3: 709-716

- Yu Q., Wang Z., Yang Q. 2012. *Lactobacillus amylophilus* D14 protects tight junction from enteropathogenic bacteria damage in Caco-2 cells. *Journal of Dairy Science*, 95, 10: 5580-5587
- Yu Q. H., Yang Q. 2009. Diversity of tight junctions (TJs) between gastrointestinal epithelial cells and their function in maintaining the mucosal barrier. *Cell Biology International*, 33, 1: 78-82
- Zeissig S., Bojarski C., Buergele N., Mankertz J., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J. D. 2004. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut*, 53, 9: 1295-1302
- Zeissig S., Buergele N., Gunzel D., Richter J., Mankertz J., Wahnschaffe U., Kroesen A.J., Zeitz M., Fromm M., Schulzke J. D. 2007. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*, 56, 1: 61-72
- Zhang Q., Li Q., Wang C., Liu X., Li N., Li J. 2010. Enteropathogenic *Escherichia coli* changes distribution of occludin and ZO-1 in tight junction membrane microdomains *in vivo*. *Microbial Pathogenesis*, 48, 1: 28-34
- Zheng Y., Lu Y., Wang J., Yang L., Pan C., Huang Y. 2013. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan kefir grains. *PLoS ONE*, 8, 7: e69868, doi:10.1371/journal.pone.0069868: 8 str.
- Zhou J. S., Pillidge C. J., Gopal P. K., Gill H. S. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 2: 211-217
- Zoetendal E. G., von Wright A., Vilpponen-Salmela T., Ben-Amor K., Akkermans A. D. L., de Vos W. M. 2002. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 7: 3401-3407
- Zolotarevsky Y., Hecht G., Koutsouris A., Gonzalez D. E., Quan C., Tom J., Mrsny R. J., Turner J. R. 2002. A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in *in vitro* models of intestinal disease. *Gastroenterology*, 123, 1: 163-172
- Zyrek A. A., Cichon C., Helms S., Enders C., Sonnenborn U., Schmidt M. A. 2007. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC ζ redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cellular Microbiology*, 9, 3: 804-816

ZAHVALA

Zahvaljujem se:

- Vsem članom komisije, prof. dr. Ireni Rogelj, prof. dr. Roku Kostanjšku, prof. dr. Alojzu Ihanu, za hitro in podrobno recenzijo doktorske disertacije ter za vse konstruktivne pripombe, ki so to delo izboljšale.
- Mentorici, dr. Bojani Bogovič Matijašić, za pregled disertacije in uporabne napotke pri raziskovalnem delu.
- dr. Biljani Hacin za iskrenost, uvajanje v raziskovalno delo in vsestransko pomoč ter podporo tekom raziskovalnega dela in nastajanju prvega znanstvenega članka.
- dr. Gorazdu Tompa za vso pomoč pri statistični obdelavi podatkov ter pri nastanku tega dela, še posebej pa zaradi svoje človečnosti. Hvala, ker si verjel v moj uspeh v raziskovalni dejavnosti.
- prof. dr. Mojci Narat, ker mi je omogočila delo s celičnimi linijami in mi s tem odprla vrata za sodelovanje s svojo skupino raziskovalcev (dr. Ivanka Cizelj, dr. Irena Oven in Luka Bolha).

Prav posebna zahvala gre dr. Ivanki Cizelj za vso potrpljenje, strokovno pomoč in nasvete, ki mi jih je namenila v vsem tem času sodelovanja, saj sem vedno dobila odgovor na kakršnokoli vprašanje. Brez tebe bi bilo delo bistveno težje in manj zabavno.

- prof. dr. Kristini Gruden in mag. Neži Turnšek iz Nacionalnega inštituta za biologijo za pomoč pri načrtovanju analiz RT-qPCR in uporabi instrumenta ABI 7900 HT FAST.

- prof. dr. Darji Žgur Bertok in vsem zaposlenim na Katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov (UL, BF) za uporabo delovnih prostorov tekom izvedbe RT-qPCR analiz, saj ste mi s tem moje delo veliko olajšali.
- dr. Mojci Benčina s Kemijskega Inštituta za uporabo, uvajanje in podporo pri delu s konfokalnim mikroskopom.
- prof. dr. Maji Rupnik in dr. Jure Škrabanu za analize DHPLC.
- Ireni Jereb in Marti Berlec za pomoč v laboratoriju in vse lepe trenutke, ki sem jih lahko preživela z vama.
- Podjetju Medis d.o.o, ki mi je omogočil postati mlada raziskovalka iz gospodarstva.
- Svoji družini in najbližjim za vso moralno podporo. Hvala za pomoč, motivacijo in še posebej za potrpljenje (vem, da ste ga veliko potrebovali).

Operacijo je delno financirala Evropska unija, in sicer iz Evropskega socialnega sklada. Doktorska naloga je bila financirana s strani Javne agencije TIA (kasneje SPIRIT Slovenija) - projekt Mladi raziskovalci iz gospodarstva generacija 2010. Sredstva so bila dodeljena podjetju Medis d.o.o. in vodena pod številko pogodbe: P-MR-10/23.

PRILOGE

Priloga A: Fermentacijski profili izkoriščanja sladkorjev za seve iz humane črevesne sluznice, pridobljeni s sistemom API CH 50

Annex A: Sugar fermentation profiles of strains from human intestinal mucosa obtained by API CH 50 system

Substrat	Vrsta (16S rDNA identifikacija) / sevi																						
	S1					S2					S3					S4					S5	S6	
	L 150 m	L 203 s.m.	L 350	L 215	L 567 m	L 271	DN-114 001	L 930 bb	B 912	B 189	L 916 b.r.	L 911	L 928	L 203 p	L 344	L 930 a	LGG®	L150 v.r.	L 567 v	L 371	L916	IM 386	
kontrola	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-riboza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-ksiloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ksiloza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-adonitol	+	?	+	+	-	+	?	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
metil-β-D-ksilopiranozid	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galaktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+
D-glukoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fruktoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-manoza	+	+	+	+	+	+	+	?	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
L-sorboza	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-ramnoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galaktitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
inozitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?
D-sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	?	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
metil-α-D-manopiranozid	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Fermentacijski profili izkoriščanja sladkorjev za seve iz humane črevesne sluznice, pridobljeni s sistemom API CH 50

Substrat	S1					S2					S3			S4		S5	S6					
	L 150 m	L 203 s.m.	L 350	L 215	L 567 m	L 271	DN-144 001	L 930 bb	B 912	B 189	L 916 b.r.	L 911	L 928	L 203 p	L 344	L 930 a	L 150 v.r.	L 567 v	L 371	L 916	IM 386	
metil- α -glukopiranozid	?	-	-	?	-	-	?	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
N-acetilglukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
amigdalin	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
arbutin	+	+	+	+	+	+	+	?	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
eskulin železov citrat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
D-celobioza	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
D-maltoza	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
D-laktoza (goveji izvor)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
D-melibioza	-	-	+	?	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-saharaza	?	-	+	+	?	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-trehaloza	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	?	-	+
inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-melezitoza	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
D-rafinoza	-	-	?	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
škrob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
glikogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ksilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gentiobioza	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	?	-	+
D-turanoza	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
D-liksoza	-	?	-	?	-	?	?	-	-	-	-	-	-	?	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatoza	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
D-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fukoza	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
kalijev glukonat	?	+	+	+	+	+	?	?	?	?	?	?	?	+	+	+	?	?	+	-	-	?

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Fermentacijski profili izkoriščanja sladkorjev za seve iz humane črevesne sluznice, pridobljeni s sistemom API CH 50

Substrat	S1			S2			S3			S4		S5	S6										
	L 150 m	L 203 s.m.	L 350	L 215	L 567 m	L 271	DN-144 001	L 930 bb	B 912	B 189	L 916 b.r.	L 911	L 928	L 203 p	L 344	L 930 a	LGG®	L 150 v.r.	L 567 v	L 371	L 916	IM 386	
kalijev-2-keto-glukonat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
kalijev-5-keto-glukonat	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Identifikacija API	Lp	Lp	Lpl	Lp	Lp	Lp	Lp	Ls	Lc	Lf	Lf	Lc	Lf	Lr	Lr	Lr	Lp	Lp	Lpl	Lpl	Lpl	Lm	Lp

Legenda:

(+), pozitivna reakcija; (-), negativna reakcija; (?), dvomljiva reakcija

Identifikacija na osnovi sekvenciranja 16S rDNA: S1 – *L. paracasei*; S2 – *L. fermentum*; S3 – *L. rhamnosus*; S4 – *L. plantarum*; S5 – *L. gasseri*; S6 – *B. animalis* subsp. *animalis*.

Identifikacija na osnovi sistema API 50 CH: Lp – *L. paracasei*; Lpl – *L. plantarum*; Ls – *L. salivarius*; Lc – *L. cellobiosus*; Lf – *L. fermentum*; Lr – *L. rhamnosus*; Lm – *Leuconostoc mesenteroides*

Legendi:

(+), positive reaction; (-), negative reaction; (?), doubtful

Identification based on 16S rDNA sequence analysis: S1 – *L. paracasei*; S2 – *L. fermentum*; S3 – *L. rhamnosus*; S4 – *L. plantarum*; S5 – *L. gasseri*; S6 – *B. animalis* subsp. *animalis*.

Identification based on API 50 CH test kit: Lp – *L. paracasei*; Lpl – *L. plantarum*; Ls – *L. salivarius*; Lc – *L. cellobiosus*; Lf – *L. fermentum*; Lr – *L. acidophilus*; Lr – *L. rhamnosus*; Lm – *Leuconostoc mesenteroides*