

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

SANA FAJDIGA

**VPLIV SEVOV IZ RODOV *SALMONELLA* in
LACTOBACILLUS NA RAVEN IZRAŽANJA
INTERLEUKINA 8 IN PROTEINA TOPLOTNEGA
STRESA 70 V CELICAH CACO-2**

DOKTORSKA DISERTACIJA

LJUBLJANA, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
PODIPLOMSKI ŠTUDIJ BIOLOŠKIH IN BIOTEHNIŠKIH ZNANOSTI

Sana FAJDIGA

**VPLIV SEVOV IZ RODOV *Salmonella* IN *Lactobacillus* NA
RAVEN IZRAŽANJA INTERLEUKINA 8 IN PROTEINA
TOPLOTNEGA STRESA 70 V CELICAH CACO-2**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**INFLUENCE OF STRAINS FROM GENERA *Salmonella* AND
Lactobacillus ON INTERLEUKIN 8 AND HEAT SHOCK
PROTEIN 70 EXPRESSION LEVEL IN CACO-2 CELLS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2006

Moji Mami

Doktorska disertacija je zaključek Podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti, s področja biotehnologije. Delo je bilo opravljeno na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Oddelku za veterinarsko patobiologijo, Fakultete za veterino Univerze v Utrechtu na Nizozemskem (Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands).

Senat Biotehniške fakultete je na seji 13. julija 2005 za mentorico imenoval prof. dr. Romano Marinšek Logar in za somentorico prof dr. Mojco Narat.

Mentorica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Somentorica: prof. dr. Mojca NARAT

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIČ MULEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Članica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Datum zagovora: 19. junij 2006

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

doktorand
Sana Fajdiga

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd

DK UDK 579.61: 616.34-097 (043) = 863

KG črevesni epitel / celice Caco-2 / *Salmonella* / vnetje / probiotiki / *Lactobacillus* / interleukin-8 / protein topotnega stresa 70 / Hsp70 / adhezija / invazija / transepitelna električna upornost

AV FAJDIGA, Sana, univ. dipl. mikrobiol.

SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/NARAT, Mojca (somentorica)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje: biotehnologija

LI 2006

IN VPLIV SEVOV IZ RODOV *Salmonella* IN *Lactobacillus* NA RAVEN IZRAŽANJA INTERLEUKINA 8 IN PROTEINA TOPOTNEGA STRESA 70 V CELICAH Caco-2

TD Doktorska disertacija

OP XI, 123 str., 3 pregl., 31 sl., 14 pril., 152 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Ob okužbi črevesnega epitela s salmonelo *S. enteritidis* pride do izločanja interleukina 8 (IL-8) na mestu vnetja. Dolgotrajno izločanje IL-8 lahko vodi v kronično vnetje črevesja in druge bolezni prebavil. Nekateri laktobacili ovirajo indukcijo sinteze IL-8 in adhezijo ter invazijo salmonele v epitelne celice. Podoben vpliv imajo gostiteljski proteini topotnega stresa (Hsp). Namens dela je bil preveriti, če laktobacili *L. gasseri* LF221 (LF) in *L. rhamnosus* BGT10 (T10) lahko zaščitijo modelne epitelne črevesne celice Caco-2 pred škodljivimi vplivi *S. enteritidis* 857 (Se857). Izpostavitev celic LF ali T10 in naknadno Se857 ne kaže zaščitnega vpliva. Pri sočasni inkubaciji celic Caco-2 z laktobacili (LF ali T10) in salmonelo, pa LF in T10 ovirata invazijo in sintezo IL-8, ki jo v celicah spodbudi Se857. Hsp70, ki jih v celicah Caco-2 inducirajo LF oz. T10, niso vzrok inibicije IL-8. LF in T10 ne ovirata adhezije Se857, zato z Se857 verjetno ne tekmujeta za ista vezavna mesta na celicah. Za indukcijo IL-8 v celicah Caco-2 je vsaj delno odgovorna invazija salmonele. Produkti, ki jih LF in T10 izločata v okolje, zmanjšajo sposobnost Se857 za indukcijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2. Ti produkti imajo vpliv le pri nizki pH vrednosti in le do določene koncentracije Se857. Se857 zniža transepitelno električno upornost (TEER) celic Caco-2. LF in T10 ne znižata TEER. Pri izpostavitvi celic Caco-2 laktobacilom LF ali T10 pred izpostavitvijo Se857, se zmanjša sposobnost Se857 za znižanje TEER, kar kaže na zaščitno vlogo laktobacilov. Tega vpliva ni pri izpostavitvi celic Se857 in laktobacilom sočasno. Pridobljeni rezultati opravičujejo nadaljnja proučevanja probioticske uporabe *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* v prehrani človeka.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd

DC UDC 579.61: 616.34-097 (043) = 863

CX intestinal epithelium / Caco-2 cells / *Salmonella* / inflammation / probiotics / *Lactobacillus* / interleukin 8 / heat shock protein 70 / Hsp70 / adhesion / invasion / transepithelial electrical resistance

AU FAJDIGA, Sana

AA MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/NARAT, Mojca (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical sciences: Biotechnology

PY 2006

TI INFLUENCE OF STRAINS FROM GENERA *Salmonella* AND *Lactobacillus* ON INTERLEUKIN 8 AND HEAT SHOCK PROTEIN 70 EXPRESSION LEVEL IN Caco-2 CELLS

DT Doctoral dissertation

NO XI, 123 p., 3 tab., 31 fig., 14 app., 152 ref.

LA sl

AL sl/en

AB *Salmonella enteritidis* induces expression of interleukin 8 (IL-8) on inflammation sites in intestinal epithelium. Long-term secretion of IL-8 may lead to chronic inflammation and other gastrointestinal diseases. Certain lactobacilli suppress IL-8 induction, adhesion and invasion of salmonella in epithelial cells. Host heat shock proteins (Hsps) have similar effects. The aim of this study was to find out if lactobacilli *L. gasseri* LF221 (LF) and *L. rhamnosus* BGT10 (T10) could protect intestinal epithelial model cells Caco-2, against the negative effects of *S. enteritidis* 857 (Se857). Preincubation of Caco-2 cells with LF or T10 prior to Se857 exposure doesn't have any protective effect. Simultaneous exposure of Caco-2 cells to Se857 and lactobacilli (LF or T10) inhibits invasion and IL-8 synthesis induced by Se857. Hsp70 induced by LF or T10 are not responsible for this inhibition. LF and T10 do not interfere with adhesion of Se857 to Caco-2 cells. Therefore LF and T10 probably don't compete with Se857 for the same adhesion receptors on Caco-2 cells. Invasion of Se857 at least partially accounts for IL-8 induction. Pretreatment of Se857 by LF or T10 products (SCS) inhibits IL-8 secretion in Caco-2 cells. SCS effect develops in acidic conditions and only to limited concentration of Se857. Se857, but not LF and T10, decreases transepithelial electrical resistance (TEER) of Caco-2 cell monolayer. Preincubation of cells with LF or T10 prior to Se857 exposure, reduces ability of Se857 to decrease TEER. This shows the protective role of lactobacilli. Simultaneous exposure of Caco-2 cells to Se857 and lactobacilli doesn't give such effect. Our results suggest further investigations of *L. gasseri* LF221 and *L. rhamnosus* for probiotic use in human nutrition.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	II
Key words documentation	III
Kazalo vsebine	IV
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
1.1 UVOD	1
1.2 HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 EPITELNE CELICE ČREVESJA	4
2.1.1 Toll-like receptorji	5
2.2 CELEČNA KULTURA CACO-2	6
2.2.1 Celične kulture	6
2.2.1.1 Celične linije humanih črevesnih epitelnih celic	6
2.2.2 Celice Caco-2	6
2.2.3 Uporaba celic Caco-2	7
2.3 VPLIV SALMONELE NA EPITELNE CELICE ČREVESJA	8
2.3.1 Rod <i>Salmonella</i>	8
2.3.1.1 Patogeneza rodu <i>Salmonella</i>	8
2.3.1.2 <i>Salmonella</i> , serotip Enteritidis	9
2.3.2 <i>Salmonela</i> kot intracelularni parazit	9
2.3.2.1 Invazija salmonele v epitelne celice	9
2.3.2.1.1 Uporaba poroznih filterov za gojenje celic	12
2.3.2.2 Sekrecijski sistem tipa III	13
2.3.3 Vnetje črevesja	14
2.3.3.1 IL-8	16
2.4 VPLIV ČREVESNE MIKROFLORE NA EPITELNE CELICE ČREVESJA	17
2.4.1 Mlečnokislinske bakterije	19
2.4.1.1 Probiotiki	19
2.4.2 Protibakterijska aktivnost laktobacilov pri okužbi epitelnih celic črevesja s salmonelo	21
2.4.2.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	21
2.4.2.2 Adezivne sposobnosti laktobacilov	21
2.4.2.3 Izločanje protimikrobnih snovi	22

2.5 PROTEINI TOPLONEGA STRESA	24
2.5.1 Vloga proteinov toplotnega stresa pri oblikovanju in delovanju celičnega citoskeleta	25
2.5.2 Zaščita celic s proteini toplotnega stresa pri vnetju	26
3 MATERIAL IN METODE	27
3.1 KEMIKALIJE IN GOJIŠČA	27
3.2 CELIČNA LINIJA CACO-2 IN GOJENJE CELIC	28
3.2.1 Celice Caco-2	28
3.2.2 Gojišče za celice Caco-2	29
3.2.3 Gojenje celic Caco-2	29
3.3 BAKTERIJSKI SEVI IN GOJENJE BAKTERIJ	30
3.3.1 <i>Salmonella enteritidis</i> 857	30
3.3.2 Sevi rodu <i>Lactobacillus</i>	31
3.4 POTEK POSKUSOV	32
3.4.1 Vpliv visoke temperature na izražanje proteinov toplotnega stresa v celicah Caco-2	33
3.4.1.1 Izpostavitev celic Caco-2 temperaturi 42°C	33
3.4.1.2 Priprava celic Caco-2 za merjenje koncentracije Hsps	33
3.4.1.3 Merjenje celokupne koncentracije proteinov v vzorcih celic Caco-2 z metodo BCA	34
3.4.1.4 Ločevanje proteinov z denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo (NaDS-PAGE)	35
3.4.1.4.1 Priprava vzorcev in denaturacija proteinov	35
3.4.1.4.2 Priprava poliakrilamidnih gelov	35
3.4.1.4.3 Pogoji in potek elektroforeze	36
3.4.1.5 Prenos proteinov iz gela na membrano PVDF (Western blotting)	36
3.4.1.6 Imunodetekcija proteinov toplotnega stresa	37
3.4.2 Vpliv različnih temperatur na izražanje Hsp70 v celicah Caco-2	39
3.4.3 Vpliv različnega števila posameznih bakterij na izražanje Hsp70 in IL-8 v celicah Caco-2	39
3.4.3.1 Priprava celic Caco-2	39
3.4.3.2 Priprava bakterijskih sevov	39
3.4.3.3 Izpostavitev celic Caco-2 bakterijam	40
3.4.3.4 Vpliv različnega števila posameznih bakterij na izražanje Hsp70 v celicah Caco-2	41
3.4.3.5 Vpliv različnega števila posameznih bakterij na izražanje IL-8 v celicah Caco-2	41
3.4.3.5.1 Postopek ELISA	42
3.4.3.5.2 Izračun koncentracije IL-8 v vzorcih	43
3.4.4 Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom in naknadno salmoneli oz. njuni mešanici	43
3.4.4.1 Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi <i>L. gasseri</i> LF221 ali <i>L. sakei</i> NCDO 2714 in naknadno <i>S. enteritidis</i> 857	43
3.4.4.2 Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi <i>L. gasseri</i> LF221 ali <i>L. rhamnosus</i> BGT10 in naknadno <i>S. enteritidis</i> 857 oz. mešanici posameznih laktobacilov in salmoneli	45
3.4.5 Vpliv supernatantov laktobacilov (SCS) na sposobnost salmonele za indukcijo IL-8 v celicah Caco-2	46
3.4.5.1 Priprava koncentriranih supernatantov laktobacilov (SCS)	46

3.4.5.2	Vpliv nizkih vrednosti pH in SCS na preživetje <i>S. enteritidis</i> 857	47
3.4.5.2.1	Vpliv gojišča MRS z znižanim pH na preživetje <i>S. enteritidis</i> 857	47
3.4.5.2.2	Vpliv SCS z različnimi vrednostmi pH na preživetje Se857	47
3.4.5.3	Vpliv <i>S. enteritidis</i> 857, predhodno tretirane z SCS, na izražanje IL-8 v celicah Caco-2	47
3.4.6	Vpliv bakterij na transepitelno električno upornost (TEER) celic Caco-2	48
3.4.6.1	Merjenje TEER	49
3.4.6.2	Vpliv starosti celic Caco-2 na TEER	49
3.4.6.3	Vpliv različnega števila posameznih bakterij na TEER celic Caco-2	50
3.4.6.4	Vpliv laktobacilov na TEER celic Caco-2 po izpostavitvi laktobacigom in naknadno salmoneli	51
3.4.6.5	Vpliv laktobacilov na TEER celic Caco-2 po izpostavitvi mešanici laktobacilov in salmonele	52
3.4.7	Vpliv laktobacilov na adhezijo in invazijo salmonele na oz. v celice Caco-2	52
3.4.8	Statistična analiza rezultatov	54
4	REZULTATI	55
4.1	VPLIV VISOKE TEMPERATURE NA IZRAŽANJE PROTEINOV TOPLOTNEGA STRESA V CELICAH CACO-2	55
4.1.1	Stopnja sinteze proteinov topotnega stresa 60 (Hsp60), 70 (Hsp70) in 90 (Hsp90) v celicah Caco-2 po izpostavitvi temperaturi 42°C	55
4.1.2	Časovni potek sinteze proteinov topotnega stresa 70 (Hsp70) v celicah Caco-2 po izpostavitvi temperaturi 42°C	57
4.2	VPLIV RAZLIČNIH TEMPERATUR NA IZRAŽANJE HSP70 V CELICAH CACO-2	58
4.3	VPLIV RAZLIČNEGA ŠTEVILA BAKTERIJ NA IZRAŽANJE HSP70 IN IL-8 V CELICAH CACO-2	59
4.3.1	Vpliv različnega števila bakterij na izražanje Hsp70 v celicah Caco-2	59
4.3.2	Vpliv različnega števila bakterij na izražanje IL-8 v celicah Caco-2	62
4.4	VPLIV LAKTOBACILOV NA IZRAŽANJE IL-8 V CELICAH CACO-2 PO IZPOSTAVITVI LAKTOBACILOM in NAKNADNO SALMONELI oz. NJUNI MEŠANICI	65
4.4.1	Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi <i>L. gasseri</i> LF221 ali <i>L. sakei</i> NCDO 2714 in naknadno <i>S. enteritidis</i> 857	65
4.4.2	Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi <i>L. gasseri</i> LF221 in naknadno <i>S. enteritidis</i> 857 oz. njuni mešanici	68
4.4.3	Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi <i>L. ramnosus</i> BGT10 in naknadno <i>S. enteritidis</i> 857 oz. njuni mešanici	71
4.5	VPLIV SUPERNATANTOV LAKTOBACILOV (SCS) NA SPOSOBNOST SALMONELE ZA INDUKCIJO IL-8 V CELICAH CACO-2	74
4.5.1	Vpliv nizkih vrednosti pH in SCS na preživetje <i>S. enteritidis</i> 857	74
4.5.2	Vpliv <i>S. enteritidis</i> 857, predhodno tretirane z SCS, na izražanje IL-8 v celicah Caco-2	78

4.6	VPLIV BAKTERIJ NA TRANSEPITELNO ELEKTRIČNO UPORNOST (TEER) CELIC CACO-2	80
4.6.1	Vpliv starosti celic Caco-2 na TEER	80
4.6.2	Vpliv različnega števila posameznih bakterij na TEER celic Caco-2	80
4.6.3	Vpliv laktobacilov na TEER celic Caco-2 po izpostavitvi laktobacirom in naknadno salmoneli	82
4.6.4	Vpliv laktobacilov na TEER celic Caco-2 po izpostavitvi mešanici laktobacilov in salmonele	84
4.7	VPLIV LAKTOBACILOV NA ADHEZIJO IN INVAZIJO SALMONELE NA OZ. V CELICE CACO-2	86
4.7.1	Adhezija <i>Lactobacillus rhamnosus</i> BGT10	86
4.7.2	Adhezija in invazija <i>Salmonella enteritidis</i> 857	86
4.7.3	Vpliv <i>L. gasseri</i> LF221 na adhezijo in invazijo <i>S. enteritidis</i> 857 na oz. v celice Caco-2	88
4.7.4	Vpliv <i>L. rhamnosus</i> BGT10 na adhezijo in invazijo <i>S. enteritidis</i> 857 na oz. v celice Caco-2	90
5	RAZPRAVA	92
5.1	RAZPRAVA	92
5.1.1	Vpliv povečane temperature na izražanje Hsp v celicah Caco-2	94
5.1.2	Vpliv salmonele in laktobacilov na izražanje Hsp70 in IL-8 v celicah Caco-2	95
5.1.2.1	Vpliv salmonele in laktobacilov na izražanje Hsp70 v celicah Caco-2	96
5.1.2.2	Vpliv salmonele in laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2	96
5.1.3	Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8, ki ga v celicah Caco-2 spodbudi salmonela	98
5.1.4	Vpliv produktov laktobacilov na sposobnost salmonele za indukcijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2	101
5.1.5	Vpliv laktobacilov na adhezijo in invazijo salmonele na oz. v celice Caco-2	103
5.1.6	Vpliv laktobacilov in salmonele na transepitelno električno upornost (TEER) celic Caco-2	105
5.2	SKLEPI	107
6	POVZETEK (SUMMARY)	109
6.1	POVZETEK	109
6.2	SUMMARY	111
7	VIRI	113

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Preživetje <i>S. enteritidis</i> 857 (Se857) v gojišču LB in v gojišču MRS z različnimi pH vrednostmi	74
Preglednica 2: Preživetje <i>S. enteritidis</i> 857 (Se857) v gojišču LB in v SCS laktobacilov z različnimi pH vrednostmi	75
Preglednica 3: Inhibicija rasti <i>S. enteritidis</i> 857 (Se857), povzročena z SCS z različnimi pH vrednostmi	76

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Diferencirane, enterocitam podobne celice Caco-2	7
Slika 2: Adhezija bakterij <i>Salmonella enteritidis</i> 857 na celice Caco-2	10
Slika 3: Invazija bakterij <i>Salmonella enteritidis</i> 857 v celice Caco-2	11
Slika 4: Adhezija laktobacilov na celice Caco-2	22
Slika 5: Fotografije površine celic Caco-2 z vrstičnim elektronskim mikroskopom	28
Slika 6: Shema poskusov v doktorski disertaciji	32
Slika 7: Merjenje transepitelne električne upornosti (TEER) celic Caco-2	49
Slika 8: Izražanje Hsp60, Hsp70 in Hsp90 v celicah Caco-2, po izpostavitvi temperaturi 42°C	55
Slika 9: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2, po izpostavitvi temperaturi 42°C	57
Slika 10: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2, po izpostavitvi naraščajočim temperaturam	58
Slika 11: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2 v odvisnosti od števila bakterij <i>Salmonella enteritidis</i> 857	59
Slika 12: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2 v odvisnosti od števila laktobacilov	60
Slika 13: Primer membran z lisami Hsp70, 6h po inkubaciji celic Caco-2 z različnim številom laktobacilov	61
Slika 14: Izražanje IL-8 v celicah Caco-2 v odvisnosti od števila bakterij <i>Salmonella enteritidis</i> 857	62
Slika 15: Izražanje IL-8 v celicah Caco-2 v odvisnosti od števila laktobacilov	63
Slika 16: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom (LF ali NCDO) in naknadno salmoneli	66
Slika 17: Izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom (LF ali NCDO) in naknadno salmoneli	67
Slika 18: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom LF in naknadno salmoneli oz. njuni mešanici	69
Slika 19: Izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom LF in naknadno salmoneli oz. njuni mešanici	70
Slika 20: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom T10 in naknadno salmoneli oz. njuni mešanici	72
Slika 21: Izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom T10 in naknadno salmoneli oz. njuni mešanici	73
Slika 22: Območja inhibicije rasti <i>S. enteritidis</i> 857 v agarju	77
Slika 23: Izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi <i>S. enteritidis</i> 857, ki je bila predhodno tretirana z SCS	79
Slika 24: Vpliv starosti celic Caco-2 na TEER	80
Slika 25: Vpliv različnega števila bakterij na TEER celic Caco-2	81

Slika 26: Vpliv laktobacilov na TEER celic Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom in naknadno salmoneli	83
Slika 27: Vpliv laktobacilov na TEER celic Caco-2 po izpostavitvi mešanici laktobacilov in salmonele	85
Slika 28: Adhezija <i>L. rhamnosus</i> BGT10 na celice Caco-2	86
Slika 29: Adhezija in invazija <i>S. enteritidis</i> 857 na oz. v celice Caco-2	87
Slika 30: Vpliv <i>L. gasseri</i> LF221 na adhezijo in invazijo <i>S. enteritidis</i> 857 na oz. v celice Caco-2	89
Slika 31: Vpliv <i>L. rhamnosus</i> BGT10 na adhezijo in invazijo <i>S. enteritidis</i> 857 na oz. v celice Caco-2	91

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APS	amonijev persulfat
ATCC	American Type Culture Collection (Ameriška zbirka tipskih kultur)
BCA	Standardna metoda določanja koncentracije proteinov
BSA	Bovine Serum Albumin (goveji serumski albumin)
CFU	colony forming unit (enota iz katere se razvije posamezna kolonija)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium (rastni medij za celice Caco-2)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Nemška zbirka mikroorganizmov in celičnih kultur)
EDTA	etilendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (encimsko imunski test)
FBS	fetal bovine serum (serum govejega zarodka)
HSP	heat shock protein (protein topotnega stresa)
IL	interleukin
LB	Luria-Bertani gojišče za salmonelo
LF	<i>Lactobacillus gasseri</i> LF221
MAP kinaza	mitogen activated protein kinase (z mitogenom aktivirana proteinska kinaza)
MKB	mlečno-kislinske bakterije
MRS	De Man, Rogosa, Sharp gojišče za laktobacile
NBT/BCIP	nitroblue tetrazolium chloride / 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate
NCDO	National Collection of Dairy organisms, Reading, England (Nacionalna zbirka oranizmov iz mlečnih izdelkov, Reading, Anglija)
NCDO	<i>Lactobacillus sakei</i> NCDO2714
NF-κB	nuclear factor kappa B (transkripcijski faktor kappa B)
PBS	phosphate buffer saline (fosfatni pufer)
PVDF	poliviniliden fluorid
rpm	rounds per minute (število obratov v minutih)
SCS	spent culture supernatant (supernatant oz. izločki laktobacilov)
Se857	<i>Salmonella enteritidis</i> 857
SPI-1	Salmonella pathogenicity island 1 (skupek genov za patogenost SPI-1)
SPI-2	Salmonella pathogenicity island 2 (skupek genov za patogenost SPI-2)
NaDS	natrijev dodecil (lauril) sulfat
NaDS-PAGE	denaturacijska poliakrilamidna gelska elektroforeza
T10	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BGT10
TEER	transepithelial electrical resistance (transepitelna električna upornost)
TEMED	N'N'N'N'-tetrametiletilendiamin
TLR	Toll-like receptor
TMB	tetrametil benzidin
TRIS	tris[hidroksimetil] amino metan
TTSS	type III secretion sistem (sekrecijski sistem tip III)

1 UVOD

1.1 UVOD

Prebavila človeka so zapleten ekosistem, kjer prihaja do pomembnega sodelovanja med mikrofloro in epitelnimi celicami. Črevesni epitel je dnevno izpostavljen množici nevarnih snovi od potencialno škodljivih mikrobov do njihovih produktov, kemikalij, imunskega molekul in raznih oblik stresa. Epitelne celice in rezidenčna mikroflora sodelujejo in vzdržujejo učinkovit sistem obrambe. Epitelne celice delujejo predvsem kot fizična prepreka, ki ščiti gostitelja pred vstopom nevarnih mikrobov v sterilno notranjost gostitelja. Po drugi strani pa laktobacili, bifidobakterije in druge za zdravje ugodne bakterije, ki naseljujejo prebavni trakt, izdelujejo kisline (npr.: mlečna kislina, ocetna kislina) in protimikrobne snovi (vodikov peroksid, diacetil, bakteriocini), s katerimi sodelujejo pri obrambi. Pomembna lastnost mikroflore je tudi, da s patogeni tekmuje pri vezavi na adhezijska mesta epitela (Neish, 2002; Servin, 2004).

Za *in vitro* študije interakcij med črevesnimi epitelnimi celicami in bakterijami uporabljamo različne celične linije epitelnih celic črevesja, kot so Caco-2, T-84 in HT-29. Celice Caco-2 in T-84 v fazi popolne diferenciacije izražajo lastnosti absorpcijskih celic tankega črevesja (enterocit), medtem ko se celice HT-29 razvijejo v enterocite in sluz-producirajoče celice. Celice lahko gojimo na poroznih filtrskih vstavkih in proučujemo apikalno in bazolateralno stran epitela, kar nam koristi pri študijah pripenjanja, invazije in translokacije bakterij (Fantini, 1992; Pinto in sod., 1983).

Salmonella enteritidis, serotip Enteritidis, je pogost povzročitelj črevesnih okužb pri človeku. Povzroča zastrupitve s hrano in lahko tudi smrtno septikemijo pri majhnih otrocih in starejših ljudeh. Do okužbe pride največkrat zaradi neustrezno obdelanega piščančjega mesa in jajc (Oldfield III, 2001; Roderigue in sod., 1990). Večina črevesnih patogenov, vključno s *S. enteritidis*, izzove določene reakcije imunskega odziva v epitelnih celicah. Za odziv je potrebna vsaj interakcija efektorskih proteinov salmonele z receptorji epitelnih celic, pride pa tudi do vstopa salmonele v črevesne celice. Salmonela oz. efektorske molekule spodbudijo izražanje in regulacijo mreže vnetnih citokinov, predvsem IL-8. IL-8 je kemotaktičen citokin, ki privablja in usmerja neutrofilce in druge granulocite na mesto vnetja, kar vodi do lokalnih razjed na črevesju in do diareje (Gewirtz in sod., 1999; Lee in sod., 2000; Wallis in Galyov, 2000). Čeprav se imunski odziv sproži zato, da bi se organizem znebil patogena, pa dolgotrajno izločanje IL-8 pogosto povzroči kronična vnetja in poškodbe tkiva, kar je opaziti pri črevesnih razjedah, Cronovi bolezni in drugih prebavnih motnjah (Feghali in Wright, 1997; Hecht in Savkovic, 1997; Neish, 2002).

Epitelne celice producirajo neko stalno količino proteinov topotnega stresa (Hsp), ki sodelujejo pri zvijanju proteinov, pri sestavljanju multiproteinskih kompleksov in pri prenosu proteinov preko membrane. Do povečanega izražanja pride ob različnih oblikah stresa, med drugim ob vdoru potencialno škodljivih mikrobov (Deitch in sod., 1995). Mehanizem delovanja Hsp v smeri znižanja nivoja IL-8 ni popolnoma raziskan, vendar pa je znano, da Hsp zavirajo delovanje aktivatorjev nekaterih genov. Takšna aktivatorja sta nuklearni faktor kapa B (NF- κ B) in z mitogenom aktivirana proteinska kinaza (MAPK), ki sodelujeta pri nastanku vnetnih citokinov in rastnih faktorjev ter pri izražanju nekaterih adhezijskih molekul (Malago in sod., 2002; Yoo in sod., 2000). Ob vstopu salmonele v celice pride do nagubanja membrane in do pinocitoze bakterijskih celic. To povzroči prerazporeditve aktinskih filamentov citoskeleta (Finlay in Falkow, 1997; Francis in sod., 1993; Wilson in sod., 2002). Hsp imajo verjetno vlogo tudi pri preprečevanju invazije patogenov v celice, ker stabilizirajo navzkrižne povezave aktinskih filamentov in tako omejijo nadaljni vdor (Koyashu in sod., 1986; Liang in MacRae, 1997).

Raziskave kažejo, da zaužitje različnih sevov iz rodu *Lactobacillus* pozitivno vpliva na mikrobeno ravnotežje v črevesju, nudi zaščito pred invazijo enterobakterij in ščiti telo pred različnimi črevesnimi boleznimi. Ti učinki so posledica samih bakterij in/ali njihovih produktov (Holzapfel in sod., 1998). Laktobacilli stimulirajo imunski sistem gostitelja in uravnavaajo produkcijo citokinov. Nekateri direktno ali s svojimi produkti omejujejo izločanje IL-8 (Coconnier in sod., 2000) in inducirajo izražanje Hsp70 pri okužbi s salmonelo (Malago in sod., 2002; Nemeth in sod., 2006).

S tem doktorskim delom smo želeli preveriti, če lahko epitelne črevesne celice zaščitimo pred škodljivimi učinkti *S. enteritidis* 857 tako, da uporabimo laktobacile *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10. Sev *L. gasseri* LF221 ima probiotične učinke, uspešno naseli prebavni trakt poskusnih živali in se zelo dobro veže na celice Caco-2 (Bogovič Matijašić in sod., 2003; Rogelj in sod., 2002). Humani izolat *L. rhamnosus* BGT10 pa je proučen bolj iz genetskega vidika in še ne v smislu probiotske uporabe (Pastar in sod., 2003). *S. enteritidis* 857 v celicah Caco-2 inducira sintezo IL-8 (Jonge in sod., 2001; Malago in sod., 2005), ki neugodno vpliva na celice (Neish, 2002). Želeli smo ugotoviti, če laktobacili *L. gasseri* LF221 in/ali *L. rhamnosus* BGT10 vplivajo na izražanje IL-8 in Hsp70 v celicah Caco-2. Ker nekateri sevi laktobacilov inducirajo sintezo Hsp70 (Nemeth in sod., 2006) in ker Hsp70 ovirajo sintezo IL-8 (Malago in sod., 2005) nas je zanimalo, če *L. gasseri* LF221 in/ali *L. rhamnosus* BGT10 preko indukcije sinteze Hsp70 ovirajo *S. enteritidis* 857 pri indukciji sinteze IL-8. Zanimalo nas je tudi, če produkti, ki jih laktobacili izločajo v okolje, vplivajo na sposobnost *S. enteritidis* 857 za indukcijo IL-8 v celicah Caco-2. Poleg tega smo preverili, če laktobacili preko pripenjanja na celice Caco-2, ovirajo adhezijo in invazijo salmonele na/v celice Caco-2. Ugotovitve, da laktobacili olajšajo težave pri okužbi s salmonelo, bi dale sevu *L. gasseri* LF221 še več možnosti za uporabo v prehrani.

človeka in morda celo kot dodatek pri zdravljenju nekaterih črevesnih obolenj, sevu *L. rhamnosus* BGT10 pa priporočila za poglobljene raziskave v smislu zaščite epitelnih celic pred patogeni. V tem delu smo po eni strani odkrivali način komunikacije med bakterijami in črevesnimi celicami gostitelja na imunskega nivoju, po drugi strani pa so pomembne same metode proučevanja delovanja probiotikov in patogenov *in vitro*. *In vivo* metode so namreč zelo drage in jih je težko izvajati v kontroliranih pogojih.

1.2 HIPOTEZE

V doktorski disertaciji smo preverjali naslednje hipoteze:

- Predvidevamo, da potencialni probiotik *Lactobacillus gasseri* LF221 in humani izolat *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 le minimalno spodbudita ali pa sploh ne spodbudita produkcije IL-8 v celicah Caco-2.
- Prisotnost patogenih bakterij v črevesju ponavadi sproži nastajanje Hsp. Predvidevamo, da *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 kljub temu, da sta humana izolata in nepatogena, sprožita vsaj minimalno povečanje količine Hsp70 v celicah Caco-2.
- Ob izpostavitvi celic Caco-2 salmoneli *S. enteritidis* 857 se običajno poveča raven IL-8. Predvidevamo, da se poveča tudi količina Hsp70, vendar je to verjetno prepozno za učinkovito zaščito celic. Če predhodna hipoteza drži, sklepamo, da predhodna izpostavitev celic Caco-2 laktobacilom (*L. gasseri* LF221 ali *L. rhamnosus* BGT10), spodbudi celice k produkciji Hsp70 in zniža raven IL-8 po naknadni izpostavitvi celic *S. enteritidis* 857.
- Morda na salmonelo direktno vplivajo nekateri produkti laktobacilov, ki jih le ti sproščajo v okolje. Če bi *S. enteritidis* 857 za nekaj časa izpostavili izločkom *L. gasseri* LF221 ali *L. rhamnosus* BGT10 in nato tako salmonelo nanesli na celice Caco-2, bi morda pripomoglo k manjši produkciji IL-8 in s tem k zaščiti celic pred poškodbami, ki so posledica izločanja IL-8.
- Sklepamo, da *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 s salmonelo tekmujeta za vezavna mesta na celicah Caco-2 in tako omejujeta ali preprečita pripenjanje in invazijo *S. enteritidis* 857 na/v celice Caco-2. Na ta način morda znižata tudi produkcijo IL-8, ki jo v celicah Caco-2 spodbudi salmonela in tako zaščitita celice pred poškodbami, ki nastanejo zaradi izločanja IL-8.
- Ob izpostavitvi celic Caco-2 različnim sevom salmonele se zniža transepitelna električna upornost (TEER) celic. Predvidevamo, da tudi *S. enteritidis* 857 zniža TEER celic Caco-2. Poleg tega predvidevamo, da *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 ne povzročita takšnega učinka in da morda *S. enteritidis* 857 ovirata pri znižanju TEER celic Caco-2.

2 PREGLED OBJAV

2.1 EPITELNE CELICE ČREVESJA

Epitelne celice črevesja (epitel) predstavljajo veliko in aktivno tkivo, ki je v stalnem kontaktu z rezidentno mikrofloro, drugimi mikrobi in hrano. Epitel služi predvsem kot fizična prepreka, ki ščiti gostitelja pred vdorom potencialno nevarnih mikroorganizmov, njihovih produktov in drugih nevarnih snovi v črevesni lumen (Holzapfel in sod., 1998; Neish, 2002; Servin, 2004). Zrele epithelne celice tankega črevesja so diferencirane in polarizirane. Polariziranost pomeni, da imajo dva različna pola: apikalni, ki je obrnjen v lumen črevesja in nasprotni bazolateralni pol. Med seboj se celice povezujejo s tesnimi stiki, ki ločujejo tudi apikalno in bazolateralno področje celic. Diferenciranost prepoznamo po prisotnosti mikrovilov na apikalni strani celic (Fantini, 1992; Koninkx, 1995). Epitel je sestavljen iz funkcionalno različnih tipov celic. Vsi tipi celic pa izvirajo iz iste populacije zarodnih celic, ki se nahajajo na dnu črevesnih kript. Štiri glavne funkcionalne skupine polariziranih epithelialnih celic so: (1) podolgovate absorpcijske celice oz. enterocite, katerih apikalna membrana je oblikovana v mikrovile, (2) čaštaste, sluz-producirajoče celice, (3) Panethove celice, ki izločajo proti-mikrobne snovi ter (4) različne endokrine celice (Fantini, 1992; Wilson in sod., 2002). Poleg teh, so pomembne še M-celice (microfold cells), katerih nastanek ni popolnoma poznan. Predvidevajo, da nastanejo s fenotipsko spremembro absorpcijskih enterocit (Wilson in sod., 2002). M-celice imajo na apikalni površini mnogo manj in krajše mikrovile ter izražajo manjše količine prebavnih encimov kot absorpcijske celice (invertaza-izomaltaza, alkalna fosfataza). Absorpcijske celice so pomembne za prebavo in absorpcijo hranil, elektrolitov in vode, medtem, ko imajo M-celice vlogo pri imunskemu odzivu in so sposobne invaginacije (Acheson in Luccioli, 2004; Van Asten in sod., 2005; Wilson in sod., 2002).

Epitelne celice izločajo sluz in prebavne encime, ki sodelujejo v procesu prebave, uravnavajo prehajanje ionov in nutrientov, omejujejo dehidracijo in pomagajo pri premikanju črevesne vsebine skozi prebavila (Neish, 2002; Servin, 2004). Sluz, ki jo izločajo specializirane čaštaste celice, pogosto vsebuje sekretorne imunoglobuline, ki skupaj s peristaltiko iz črevesja izločijo bakterije, ujete v sluz. Črevesne celice služijo tudi kot kemična obrambna linija. Panethove celice v črevesni lumen izločajo protimikrobne snovi (defenzini, fosfolipaze, laktoperin, lizocim), ki sodelujejo z imunskim sistemom črevesnega mikrookolja. M-celice so del epithelialnih foliklov, ki so povezani s spodaj ležečim sluzničnim limfoidnim tkivom. V limfoidnem tkivu so limfociti B in T, ter druge imunske celice. M-celice so pomembne za prevzem antigenov ali mikrobov iz lumna črevesja in prenos le-teh do limfoidnega tkiva. Aktivacija imunskega sistema temelji na prepoznavi določenih predelov nekaterih bakterijskih molekul (lipopolisaharid, tejhojska kislina, flagelin, idr.) s specifičnimi receptorji (npr. Toll-like receptorji, TLR in drugi), kar privede

do imunskega odziva s protitelesi (IgA, fagocitne celice, limfociti T, citokini) in izločanja patogenih mikroorganizmov iz črevesja. Imunska toleranca preprečuje škodljive reakcije s črevesno mikrofloro in antigeni hrane (Acheson in Luccioli, 2004; Didierlaurent in sod., 2002; Servin, 2004, Wilson in sod., 2002).

2.1.1 Toll-like receptorji

V zadnjih letih je bilo precej raziskav narejenih na sesalčjih Toll-like receptorjih (TLR), ki so ključnega pomena pri prepoznavanju patogenov. Gre za družino celičnih transmembranskih receptorjev, ki sodelujejo pri aktivaciji transkripcijskega faktorja NF- κ B. NF- κ B ima ključno vlogo pri indukciji vnetnih citokinov (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 idr.), ki so pomembni za nastanek vnetnega odziva. Vsak TLR je specifičen za določene strukturne determinante (pathogen associated molecular patterns, PAMP) patogenih bakterij, gliv, virusov ali protozojev, ki so različne med različnimi vrstami (Neish, 2002; Takeda in Akira, 2003). PAMP so sestavljeni iz več ponovitev in so različni od molekul, ki so sicer prisotne v gostitelju. PAMP so pomembni za preživetje in patogenost organizma in nimajo pogostih antigenskih variacij (Janeway in Medzhitov, 2002).

N-terminalni del TLR je sestavljen iz ponovitev bogatih z leucinom (leucine-rich repeats, LLR) in je odgovoren za prepoznavo PAMP. C-terminalni del oz. TIR domena (homologen Toll receptorju za IL-1) pa je pomembna za začetek prenosa signala v evkariontsko celico (Kawai in Akira, 2005).

Do sedaj je bilo pri sesalcih identificiranih 11 TLR (Kawai in Akira, 2005). TLR-2 je receptor za lipotejhojsko kislino, nekatere lipoproteine gram pozitivnih bakterij in lipopeptid mikoplazem. Ponavadi se v membrani nahaja skupaj s TLR-1 ali s TLR-6 in od tega je odvisna prepoznavava diacil- (s TLR-1 / TLR-2) ali triacil-lipopeptidov (s TLR-6 / TLR-2). TLR-3 prepoznavava dvostrično RNA, ki nastaja med podvojevanjem virusov (Kawai in Akira, 2005; Takeda in Akira, 2003). TLR-4 je receptor za lipopolisaharid (LPS) gram-negativnih bakterij. Njegovo odzivnost poveča protein MD-2, ki je na TLR-4 vezan na ekstracelularni strani. TLR-5 se nahaja v bazolateralni membrani črevesnih epitelnih celic in je specifičen za flagelin, ki je monomerni protein in sestavni del bakterijskih bičkov. Za indukcijo vnetnega odziva s flagelinom, mora priti do prenosa flagelina iz apikalne membrane, skozi celico do njene bazolateralne strani, kjer se nahaja TLR-5. TLR-7 in TLR-8 sta receptorja za sintetične snovi, kot so nekatera antivirusna zdravila, TLR-9 pa za nemetilirane CpG (citidin-fosfat-gvanozin) motive bakterijske in virusne DNA (Brightbill in Modlin, 2000; Janeway in Medzhitov, 2002; Kawai in Akira, 2005; Takeda in Akira, 2003). Našli so tudi TLR-11, ki je pri človeku neaktivен, mišji TLR-11 pa je podoben TLR-5 in se nahaja v celicah ledvic in mehurja. TLR-3, TLR-7, TLR-8 in TLR-9,

ki prepoznavajo nukleinske kisline, se nahajajo v membrani fagosomov (Kawai in Akira, 2005).

Epitelne celične linije humanih celic, vključno s celicami Caco-2 in T-84, ki jih uporabljamo kot *in vitro* model črevesnega epitela, izražajo TLR-2, TLR-3, TLR-4 in TLR-5 (Didierlaurent in sod., 2002).

2.2 CELIČNA KULTURA CACO-2

2.2.1 Celične kulture

Z uporabo celičnih kultur v raziskovalnem delu se lahko do določene mere izognemo poskusom na živalih. Ti so namreč zelo dragi, težko jih je izvajati v kontroliranih pogojih, poleg tega pa so pogosto etično sporni (Freshney, 2000).

2.2.1.1 Celične linije humanih črevesnih epitelnih celic

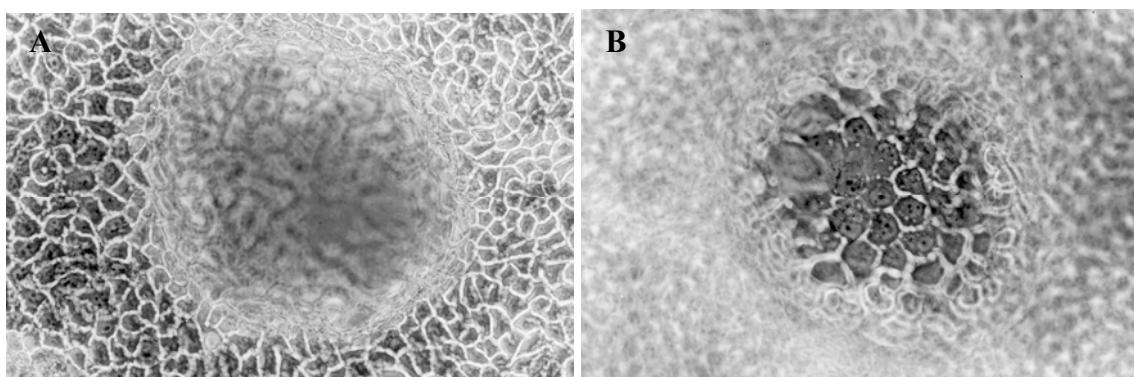
Tri celične linije humanih črevesnih celic so obdržale strukturne in funkcionalne lastnosti posameznih tipov črevesnih epitelnih celic. Celični liniji Caco-2 in T-84 se v fazi konfluentne rasti spontano diferencirata v absorpcijskim celicam podobne celice, medtem ko celice HT-29 v tej fazi izražajo lastnosti absorpcijskih in sluz-producirajočih celic, ki jih lahko gojimo tudi ločeno. Slabost celične linije HT-29 je, da ponavadi absorpcijske in sluz producirajoče celice predstavlja le okoli 5% vseh celic, ostalo pa so nediferencirane celice. Za celice Caco-2 in T-84 je značilna diferenciacija in polariziran fenotip (Fantini, 1992; Fogh in sod., 1977; Madara in sod., 1987).

2.2.2 Celice Caco-2

Celična linija Caco-2 je celična kultura epitelnih celic črevesja. Pridobili so jih iz tumorja debelega črevesa 72-letnega pacienta (Fogh in sod., 1977). Ko celice Caco-2 gojimo v *in vitro* pogojih, se spontano diferencirajo v celice, podobne absorpcijskim enterocitam in izražajo lastnosti epitelnih celic tankega črevesa (enterocit) tako strukturno kot funkcionalno (Pinto in sod, 1983).

Celice Caco-2 se pritrđijo na podlago in rastejo kot enosloj. Diferenciacija celic Caco-2 se začne po tem, ko celice dosežejo konfluentno rast, kar pomeni, da preraščajo celotno površino, ki jo imajo na razpolago in se med seboj tesno stikajo (Freshney, 2000). Znak diferenciacije je vzpostavitev polarnosti celic, ki jo opazimo po prisotnosti mikrovilov na apikalni strani celic in po dobro vidnih tesnih stikih med celicami (slika 1A). Zelo značilno je tudi, da tvorijo strukture za transport snovi iz apikalne strani na bazolateralno stran (slika 1) in izgledajo kot »kupole celic« zrasle na enosloju. Funkcionalno prepoznamo diferenciacijo po aktivnosti različnih encimov na apikalni strani: alkalna fosfataza,

invertaza-izomaltaza, ornitin dekarboksilaza, diamin oksidaza in aminopeptidaza (d'Agostino in sod., 1989; Fantini, 1992; Pinto in sod., 1983). Diferenciacijo preverjamo tudi z merjenjem integritete celic oz. transepitelne električne upornosti enosloja celic (TEER). Za merjenje TEER gojimo celice Caco-2 na poroznih filtrihi, ki omogočajo dostop do apikalnega in bazolateralnega področja celic. Enosloj celic postane električno aktivен šele po nastanku tesnih stikov med celicami (Fantini, 1992). Razlog, zakaj se celice izolirane iz debelega črevesja diferencirajo v celice, podobne enterocitam, ni znan (Pinto in sod., 1983).



Slika 1: **Diferencirane, enterocitam podobne celice Caco-2.** Celice Caco-2 se v kulturi spontano diferencirajo v celice, podobne enterocitam, tako strukturno kot funkcionalno. Slika prikazuje enosloj 21 dni starih celic Caco-2. Diferenciacijo prepoznamo po prisotnosti (A): tesnih stikov med celicami in (A in B): po nastanku t.i. »kupol celic«. Uporaba slik z dovoljenjem avtorjev: dr. Jos Koninkx in Ton Ultee (Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands).

Figure 1: **Differentiated enterocyte-like Caco-2 cells.** Caco-2 cells in culture spontaneously differentiate in enterocyte-like phenotype. Image is showing 21 days old Caco-2 cell monolayer. Differentiation is recognized (A): by the presence of tight junctions and (A and B): formation of domes. Use of photographs with the permission of authors: dr. Jos Koninkx and Ton Ultee (Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands).

2.2.3 Uporaba celic Caco-2

Celice Caco-2 so dober model za študij strukturnih ter funkcionalnih lastnosti diferenciranih enterocit. Primerne so za študije transporta ter absorpcije zdravil in antibiotikov (Bailey in sod., 1996; Biganzoli in sod., 1999), spremljanje ekspresije citokinov (Jung in sod., 1995; Malago in sod., 2005; Morita in sod., 2002), proteinov toplotnega stresa (Deitch in sod., 1995; Ovelgonne in sod., 2000; Malago in sod., 2003) ter drugih celičnih produktov, intracelularnega transporta proteinov, metabolizma poliaminov, adhezije različnih lektinov (Koninkx, 1995) ter adhezije, invazije in translokacije bakterij (Bernet in sod., 1994; Bogovič Matijašić in sod., 2003; Gork in sod., 1999; Greene in Klaenhammer, 1994; Finlay and Falkow, 1990; Solano in sod., 2001).

2.3 VPLIV SALMONELE NA EPITELNE CELICE ČREVESJA

2.3.1 Rod *Salmonella*

Salmonele so gram-negativne paličaste bakterije, široke približno 0,7 - 1,5 µm in dolge 2 - 5 µm. Pripadajo družini *Enterobacteriaceae*. So fakultativni anaerobi, optimalna temperatura za rast je 35 - 37°C, optimalni pH pa med 6,5 in 7,5. Večinoma so gibljive, kar jim omogočajo bički (flageli), ki jih imajo v povprečju okoli 8 (0-15). Bički so enakomerno razporejeni po celični površini (Holt in sod., 1994). Rod *Salmonella* ima 2 vrsti: *Salmonella bongori* in *Salmonella enterica*. Glede na genetsko sorodnost in biokemijske razlike se *S. enterica* deli na šest podvrst. Te se naprej delijo v serotipe na osnovi antigenskih razlik v lipopolisaharidu (O-antigen), flagelinu (H-antigen) in kapsuli (Vi-antigen). Obe vrsti imata skupaj več kot 2.400 serotipov, od tega jih 59% pripada vrsti *Salmonella enterica* subspecies *enterica* (Bäumler in sod., 1997; Jay, 1996; Van Asten, 2005).

2.3.1.1 Patogeneza rodu *Salmonella*

Salmonele lahko okužijo živali in ljudi, odvisno od serotipa. Bolezni, ki jih povzroča *Salmonella* spp. so zelo različne, od asimptomatskih do življenjsko nevarnih. Prenašajo se preko kontakta žival-človek ali preko okužene hrane. Najpogosteje bolezni pri ljudeh so različni gastroenteritisi. Simptomi vključujejo bolečine in krče v trebuhi, drisko, izčrpanost, vročino, glavobol in bruhanje (Holt in sod., 1994; Singleton in Sainsbury, 1996; Van Asten, 2005). Mehanizem nastanka diareje ni popolnoma razjasnjen. Obstajajo tri razlage. Lahko da invazija salmonele v epitelne celice spodbudi izločanje tekočin, možno da je diareja posledica vnetnih citokinov, katerih sinteza se poveča ob okužbi s salmonelo ali pa poškodovan epitel ni zmožen učinkovite absorpcije. Najverjetnejše gre za kombinacijo več mehanizmov (Jepson in sod., 1996).

Virulentnost različnih sevov salmonele določajo virulenčni faktorji: virulenčni plazmidi, toksini (eksotoksini in endotoksini), fimbrije (pili), bički (flageli) in sekrecijski sistem tip III (TTSS). Bolezen, ki jo povzroči salmonela, je odvisna predvsem od virulenčnosti seva, vendar pa na razvoj bolezni vpliva tudi zdravstveno stanje gostitelja (Finlay in Falkow, 1997; Van Asten in Van Dijk, 2005).

Največ raziskav o patogenih učinkih salmonele je narejenih s *Salmonella enterica*, subspecies *enterica*, serotip Typhimurium (*S. typhimurium*) (Finlay in Falkow, 1997; Francis in sod., 1993, Gewirtz in sod., 1999; Jepson in sod., 1996; Lee in sod., 2000; Zeng in sod., 2003), poleg tega pa vse več raziskav poteka na sevih *Salmonella enterica*, subspecies *enterica*, serotip Enteritidis (Fajdiga in sod., 2006; Jonge in sod., 2001; Malago in sod., 2003; McCormick in sod., 1995; Solano in sod., 2001; Suresh in sod., 2006; Van

Asten in sod., 2005). Oba serotipa se pri ljudeh najpogosteje prenašata z okuženo hrano in povzročata različne okužbe prebavil.

2.3.1.2 *Salmonella*, serotip Enteritidis

V zadnjem desetletju se je pogostost izbruhov okužb s *Salmonella* serotip Enteritidis (*Salmonella enteritidis*, *S. enteritidis*) v severni in južni Ameriki, po večini Evrope, ter Indiji in nekaterih afriških državah tako povečala, da je ta serotip danes najpogosteje izoliranih serotipov iz človeka. Najpogosteje se salmonela prenaša preko neustrezno obdelanih jajc, piščančjega in svinjskega mesa, ter mesnih in mlečnih izdelkov. *S. enteritidis* povzroča okužbe prebavnega trakta s krči in slabostjo ter hudo drisko. Večje težave nastanejo pri majhnih otrocih in starejših ljudeh, ki pogosto potrebujejo bolnišnično oskrbo, bolezen pa se lahko konča tudi s smrtjo (Oldfield III, 2001; Rodrigue in sod., 1990; Suresh in sod., 2006).

2.3.2 *Salmonela* kot intracelularni parazit

Sevi rodu *Salmonella* so fakultativni paraziti, ki so sposobni vstopiti v različne tipe evkarionskih celic, vključno z epitelnimi in fagocitnimi celicami, znotraj njih preživeti in se razmnoževati. Za te procese so potrebni tako bakterijski, kot gostiteljski celični produkti (Finlay in Falkow, 1989).

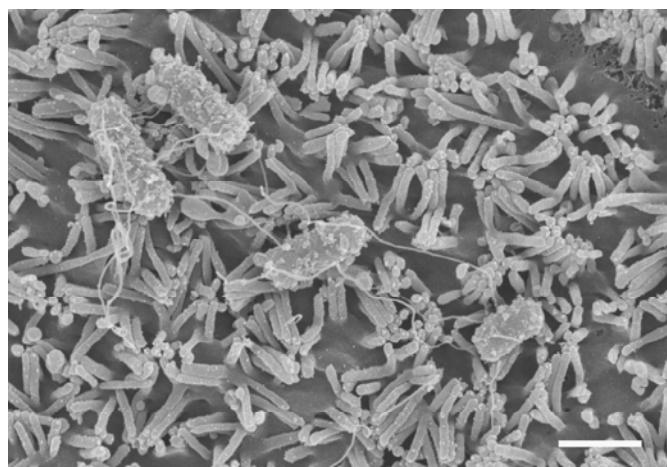
Salmonele za premikanje uporabljajo bičke. Prispevek gibljivosti pri invaziji je odvisen od vrste oz. serotipa salmonele. *S. typhi* za invazijo v epitelne celice nujno potrebuje bičke, saj mutacije, ki vplivajo na premikanje bičkov preprečijo invazijo (Finlay in Falkow, 1989). Premikanje *S. typhimurium* (Finlay in Falkow, 1989) in *S. enteritidis* (Van Asten in sod., 2004) z bički sicer pospeši invazijo v celice Caco-2, vendar pa bički za vstop salmonele niso nujno potrebni.

Glavna pot vstopa salmonel v črevesne celice pogojih *in vivo* je najverjetneje preko M-celic. Ker M-celice predstavljajo le okoli 0,01% vseh epitelnih celic, so za vstop vrst rodu *Salmonella* verjetno ustrezne tudi absorpcijske enterocite. V pogojih *in vitro* je dokazan vstop salmonel preko absorpcijskih enterocit (Lee in Schneewind, 1999; Finlay in Falkow, 1989; Sansonetti, 2002; Van Asten in sod., 2005; Wilson in sod., 2002).

2.3.2.1 Invazija salmonele v epitelne celice

Za vstop *S. typhi*, *S. typhimurium* in *S. choleraesuis* v epitelne celice tako v pogojih *in vitro* kot v pogojih *in vivo*, je najprej potrebna adhezija bakterijskih celic na mikrovile epitelnih celic. Kontakt sproži aktivacijo in izmenjavo različnih kemijskih signalov med bakterijo in gostiteljem. To povzroči spremembe na površini gostiteljske celice in je signal za bakterijsko celico, da izdela ustrezne površinske adhezine in poveča sintezo določenih

proteinov, pomembnih za invazijo (Galan, 1994; Finlay in Falkow, 1989; Finlay in Falkow, 1997). Wilson in sod. (2002) predvidevajo, da se salmonela približa gostiteljski celici s fimbrijami, tesnejši kontakt pa vzpostavi z izrastki, invasomi, ki so nujni za invazijo salmonele v celice, čeprav jih tik pred vstopom izgubi. Mutante, ki niso sposobne izdelati invasomov, imajo sposobnost adhezije, ne pa tudi invazije v evkariotske celice. Finlay in Falkow (1989) domnevata, da je adhezija sestavljena iz dveh faz, reverzibilne adhezije, ko bakterije lahko enostavno odstranimo s spiranjem in ireverzibilne adhezije, ko so bakterije odporne na spiranje. Iz tega sklepata, da je potrebna *de novo* sinteza RNA in proteinov za adhezijo in invazijo.

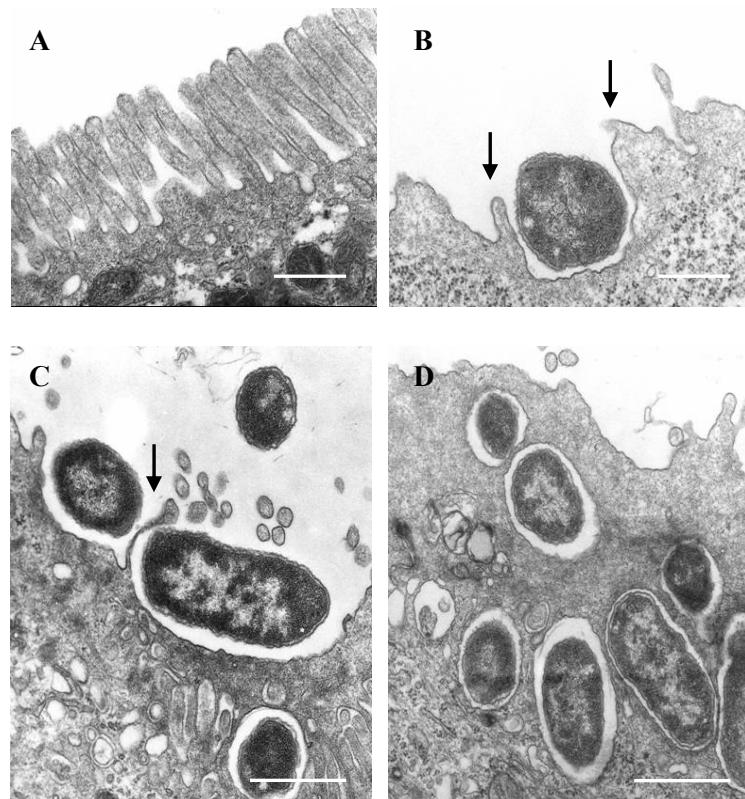


Slika 2: **Adhezija bakterij *Salmonella enteritidis* 857 na celice Caco-2.** Merilo je 1 μm . Avtorji slik: Ton Ultee, dr. Jos Koninkx (Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands) in Sana Fajdiga (Oddelek za Zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija).

Figure 2: **Adhesion of *Salmonella enteritidis* 857 on Caco-2 cells.** Bar represents 1 μm . Authors of the photograph: Ton Ultee, dr. Jos Koninkx (Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands) and Sana Fajdiga (Zootechnical department, Biotechnical faculty, University of Ljubljana, Slovenia).

Salmonella vstopa le v žive celice, saj je za vstop potrebno sodelovanje celičnega citoskeleta. Po adheziji (slika 2) se aktinski mikrofilamenti citoskeleta reorganizirajo in membrane epitelnih celic se nagubajo (Finlay in Falkow, 1989; Jepson in sod., 1996; Wilson in sod., 2002). Istočasno se mikrovili skrajšajo in njihovo število se zmanjša. To je verjetno posledica polimerizacije intracelularnega aktina iz mikrovilov v nagubano membrano (slika 3). Inhibitorji polimerizacije mikrofilamentov (npr. citohalasina B in D) namreč preprečijo invazijo *S. typhi*, *S. typhimurium* in *S. choleraesuis* (Finlay in Falkow, 1989; Francis in sod., 1993). Sledi pinocitoza oz. invaginacija posameznih bakterijskih celic v epitelne celice (Finlay in Falkow, 1989; Wilson in sod., 2002). Francis in sod. (1993) so ugotovili, da istočasno lahko pride tudi do vstopa ne-invazivnih salmonel, ki

same ne spodbudijo nagubanja membrane. To imenujejo pasivni vstop. Vstop salmonel je zelo hiter, saj so bakterije v vakuolah (fagosomih) znotraj celic vidne že nekaj minut po začetnem kontaktu bakterij z epitelnimi celicami. Gostiteljski aktin in celična površina se povrneta v normalno stanje, ko so bakterije znotraj celic (Finlay in Falkow, 1997). Salmonela v vakuolah preživi in se razmnožuje. Generacijski čas podvojevanja *S. typhi*, *S. typhimurium* in *S. choleraesuis* je približno 40-50 minut (Finlay in Falkow, 1989; 1990).



Slika 3: Invazija bakterij *Salmonella enteritidis* 857 v celice Caco-2. (A): Nepoškodovani mikrovili na celicah Caco-2. (B in C): Prerazporeditve citoskeleta in nagubanje membrane ob invaziji *S. enteritidis* 857. (D): *S. enteritidis* 857 v vakuolah znotraj celic Caco-2. Merilo na slikah (A) in (B) je 0,5 µm ter na slikah (C) in (D) 1µm. Uporaba slik z dovoljenjem avtorjev: Ton Ultee, dr. Henno Hendriks in dr. Fons van Asten (Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands).

Figure 3: Invasion of *Salmonella enteritidis* 857 on Caco-2 cells. (A): Undamaged microvilli of Caco-2 cells. (B and C): Rearrangements of cytoskeleton with membrane ruffle formation as a cause of *S. enteritidis* 857 invasion. (D): *S. enteritidis* 857 in vacuoles inside of Caco-2 cell. Bars on figures (A) and (B) represent 0,5 µm and on figures (C) and (D) 1µm. Use of photographs with the permission of authors: Ton Ultee, dr. Henno Hendriks and dr. Fons van Asten (Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands).

Salmonella spp. se obrani pred aktivnostjo imunskega sistema epitelnih celic verjetno z več različnimi mehanizmi, npr. tako, da ovira delovanje fagosomalnega membranskega

proteina, odgovornega za znižanje pH v vakuolah in delovanje NADP oksidaze (Acheson in Luccioli, 2004) ter ovira nastajanje gostiteljskih antibakterijskih encimov (Finlay in Falkow, 1997).

Če salmonela naseli prebavni trakt in lokalna limfatična tkiva za dlje časa, povzroči kronično vnetje črevesja, lahko tudi maligno obolenje črevesja. Možno je tudi, da se preko krvi razširi tudi do drugih organov in povzroči sistemsko obolenje organizma (Acheson in Luccioli, 2004; Finlay in Falkow, 1989), kot je tifoidna vročica v primeru okužbe s *S. typhi* ali *S. paratyphi* (Lee in Schneewind, 1999; Wallis in Galyov, 2000). Pri povzročitvi sistemsko bolezni je za invazijo *S. choleraesuis* in *S. typhimurium* v evkariotske celice potreben kontakt lipopolisaharida (LPS) bakterijske celične stene z epitelnimi celicami. LPS sicer za sam vstop ni potreben (Finlay in Falkow, 1989).

2.3.2.1.1 Uporaba poroznih filterov za gojenje celic

Prehod bakterij iz apikalne na bazolateralno stran celic lahko spremljamo tako, da celice Caco-2 gojimo na poroznih filtrih, kjer imamo dostop tako do apikalne kot do bazolateralne membrane (Solano in sod., 2000). Finlay in Falkow (1989) sta pokazala, da po izpostavitvi celic Caco-2 salmoneli, večina bakterij (90%) ostane znotraj celic, približno 8,7% jih izstopi iz celic na apikalno stran (torej tja, kjer so vstopile), le okoli 1,3% pa jih izstopi na bazolateralni strani (v gojišče pod filtrom). *S. typhimurium* in *S. choleraesuis* preideta preko enosloja celic v gojišče pod filtrom že 2 uri po izpostavitvi (Finlay in Falkow, 1990).

Gojenje celičnih kultur na poroznih filtrih uporabljamo tudi za spremljanje integritete celic z merjenjem transepitelne električne upornosti (TEER) enosloja. TEER je stabilna, ko so med celicami vzpostavljeni tesni stiki. Ob izpostavitvi celic Caco-2 *S. typhimurium*, *S. choleraesuis* (Finlay in Falkow, 1990), *S. typhi* (Solano in sod., 2000) in *S. enteritidis* (Fajdiga in sod., 2006; Malago in sod., 2003; Solano in sod., 2000) na apikalni strani, pride do padca TEER že eno do dve uri po izpostavitvi in se do šestih ur po izpostavitvi še znižuje (odvisno od seva in od uporabljeni koncentracije salmonele). Znižanje TEER je verjetno posledica reorganizacije aktinskih filamentov in porušenja tesnih celičnih stikov (Finlay in Falkow, 1990; Jepson in sod., 1995). Tega učinka ni, če so celice izpostavljeni bakterijam iz bazolateralne strani (Finlay in Falkow, 1989) in prav tako ne, če so celice izpostavljeni neinvazivnim mutantam *S. choleraesuis* ali neinvazivni *E. coli* (Finlay in Falkow, 1990). Solano in sod. (2000) predvidevajo, da pri znižanju TEER z nekaterimi virulentnimi sevi *S. enteritidis* sodeluje tudi ekstracelularni produkt, ki ga najdemo v supernatantu kultur.

2.3.2.2 Sekrecijski sistem tipa III

Veliko gram-negativnih patogenih bakterij (*Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., enteropatogena in enterohemoragična *E. coli*, idr.) ima v celični steni sekrecijski sistem tipa III (TTSS), ki sodeluje pri virulentnosti seva (Lee, 1997; Neish, 2002; Mota in sod., 2005; Wilson in sod. 2002).

Za invazijo salmonele v M-celice v pogojih *in vivo* in v absorpcijske celice ter makrofage v pogojih *in vitro* je odgovoren TTSS, ki posreduje prenos bakterijskih efektorskih proteinov iz bakterijske celice v zunanje okolje oz. v gostiteljsko celico. Geni za komponente sekrecijskega aparata TTSS kot tudi za efektorske in regulatorne proteine so zapisani v skupku genov za patogenost SPI-1 (Acheson in Luccioli, 2004; Finlay in Falkow, 1997; Sansonetti, 2002; Wilson in sod., 2002). Izražanje genov SPI-1 naj bi bilo največje pri temperaturi okoli 37°C, nizki koncentraciji kisika, nevtralnem pH, visoki osmolarnosti in, ko so bakterije v pozni logaritemski fazi rasti (Wilson in sod., 2002). Tudi salmonele, ki nimajo SPI-1 oz. imajo mutacijo za SPI-1, lahko vstopajo v epitelne celice, vendar po drugi poti in sicer tako, da se vežejo in vstopajo v celice, ki na svoji površini izražajo molekulo CD-18. Možno je, da se salmonele na ta način tudi sistemsko razširijo po gostitelju (Acheson in Luccioli, 2004, Sansonetti, 2002). Proteini, pomembni za preživetje in razmnoževanje salmonele v fagocitnih celicah oz. makrofagih, pa so zapisani v skupku genov SPI-2. (Lee in Schneewind, 1999, Sansonetti, 2002). *Salmonela* uporablja TTSS za invazijo v epitelne črevesne celice, indukcijo vnetnega odziva, apoptozo makrofagov in nastanek diareje (Wallis in Galyov, 2000).

Sekrecijski aparat TTSS je sestavljen iz strukturnih proteinov Inv, Spa, Prg in Org. Struktura aparata je podobna brizgalki, ki je usidrana v bakterijsko celično steno, navzven pa izteza podaljšek, podoben igli. Skozi ta aparat poteka prenos bakterijskih efektorskih in regulatornih molekul, ki povzročijo prerazporeditev citoskeleta v gostiteljski celici in vstop bakterije v gostiteljsko celico. Nekatere od efektorskih molekul, ki vstopajo v gostiteljsko celico, niso zapisane na SPI-1, ampak na SPI-2 (Lee, 1997; Mota in sod., 2005; Sansonetti, 2002; Wilson in sod, 2002). Do sedaj je bila natančno raziskana in opisana vloga samo za nekatere efektorske proteine. Bakterijski proteini SipB, SipC in SipD (*Salmonella Invasion Proteins*) so pomembni za translokacijo nekaterih efektorskih proteinov iz bakterijske v gostiteljsko celico. Sip C in verjetno SipD sodelujeta tudi pri nastanku por v gostiteljski celici (Lee in Scheewind, 1999; Mota in sod., 2005; Rottner in sod., 2005). SopE in SopE2 inducirata prerazporeditev citoskeleta v gostiteljski celici tako, da aktivirata celični GTPazi Cdc42 in RacI. Bakterijski protein SptP pa inaktivira GTPazi Cdc42 in RacI ter povzroči vzpostavitev normalnega citoskeleta po tem, ko salmonela že vstopi v gostiteljsko celico. Proteini SipA se akumulirajo na nagubani membrani in tvorijo kompleks s T-plastinom in F-aktinom, kar povzroči polimerizacijo aktina in povečanje membranskih zavirkov, ki

obdajo in »pogoltnejo« bakterijsko celico. SipA lahko sodeluje tudi SipC, SigD (*S. typhimurium*) in analog SopB (*S. dublin*), ki sta zapisana na SPI-2 in prenesena v gostiteljsko celico preko TTSS, ovirata različne gostiteljske signalne poti (Rottner in sod, 2005; Wilson in sod, 2002).

Različni bakterijski efektorski proteini (SigD, SopB, idr.) vplivajo na povečano nastajanje prostaglandinov (predvsem prostaglandina E₂) v gostiteljski celici in s tem izločanje velikih količin tekočine (diareja) ter aktivacijo transkripcijskega faktorja NF-κB. NF-κB med drugim aktivira tudi nastajanje vnetnih citokinov (vključno z IL-8) in vnetja (Sansonetti, 2002; Wallis in Galyov, 2000; Wilson in sod., 2002). Nekateri bakterijski efektorski proteini in verjetno tudi SptP (Murli in sod., 2001) imajo vlogo pri aktivaciji z mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAP kinaza), ki tudi inducira vnetne citokine (Galan, 1994). SipB in SipC, ki sta pri *S. typhimurium* zapisana na SPI-1 sta pomembna za invazijo bakterije v epitelne celice in verjetno tudi za apoptozo makrofagov (Acheson in Luccioli, 2004; Lee, 1997; Sansonetti, 2002).

Izpostavitev gostiteljskih celic izoliranim proteinom TTSS bakterije *Yersinia* spp., nima učinka na gostitelja, kar kaže na to, da je potreben kontakt ali vsaj bližina gostiteljske celice z bakterijo in ne le TTSS. Vzrok je verjetno to, da morajo biti efektorski proteini nujno prisotni na bakterijski celici ali pa imajo zelo kratko življenjsko dobo, kar zahteva bližino bakterijske in gostiteljske celice za učinkovit prenos. Pri vrstah rodu *Salmonella* pa aktivne efektorske proteine lahko najdemo tudi v supernatantu kulture (Lee, 1997), npr. protein SigD (Lee in Schneewind, 1999).

2.3.3 Vnetje črevesja

Vnetje je poškodba tkiva, ki nastane kot lokaliziran odziv gostiteljskih celic na potencialno nevarne endogene ali eksogene signale. Različni signali spodbudijo lokalno sproščanje vnetnih mediatorjev in kemotaktičnih snovi, ki privlačijo in aktivirajo najprej neutrofilce, kasneje pa še druge granulocitne celice, monocite ter limfocite. Ta proces je pomemben za izločitev patogena oz. preprečevanje širjenja lokalne okužbe v sistemsko in popravljanje poškodb tkiva. Akutno vnetje črevesja ob dolgotrajni izpostavitvi neutrofilcem, ostalim granulocitam in levkocitom ter njihovim produktom, lahko vodi do hude diareje ali do kroničnega vnetja (Baggiolini in Clark-Lewis, 1992; Gewirtz in sod., 1999; Neish, 2002; Singleton, 1996).

Ključni mediator akutnega vnetja črevesja je kemotaktični citokin, interleukin 8 (IL-8). Ob okužbi epitelnih celic črevesja s salmonelo (*S. typhimurium*, *S. dublin*), pride do izločanja IL-8 na bazolateralni strani celic. IL-8 usmerja neutrofilce in druge granulocitne celice proti bazolateralni strani celic. Istočasno pa se sproži še izločanje kemotaktičnega faktorja PEEC (pathogen-elicited epithelial chemoattractant) na apikalni strani epitelnih celic, ki

privablja neutrofilce in druge celice iz bazolateralne strani proti lumnu črevesja in tako sodeluje pri nastanku vnetja (Gewirtz in sod., 1999; McCormick in sod., 1998).

Eckmann in sod. (1995) ter Jung in sod. (1995) so ugotovili, da v *in vitro* pogojih ob izpostavitevi sveže izoliranih črevesnih celic ali celičnih kultur epitelnih celic (Caco-2, T-84 in HT-29) z invazivnimi bakterijskimi patogeni (*S. dublin*, *S. typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, enteroinvazivna *E.coli*, *Listeria monocytogenes*), pride do sproščanja vnetnih citokinov: IL-8, TNF- α (tumor necrosis factor α), MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1) in GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). IL-8 privablja in aktivira granulocitne celice. TNF- α poveča baktericidno aktivnost granulocitnih celic in makrofagov in spodbudi izločanje nekaterih vnetnih citokinov, vključno z IL-8. MPC-1 privablja makrofage, GM-CSF pa jih aktivira. Ti citokini se ne sproščajo ob okužbi celic z nekaterimi neinvazivnimi sevi bakterij (nepatogena *E. coli* DH5 α , enterohemoragična *E. coli* O157), z neinvazivnim protozojem *G. lamblia* in z neinvazivnimi mutantami *S. dublin* in *S. dublin* v prisotnosti citohalasina D (preprečuje invazijo, ne pa adhezije). Iz tega sklepajo, da je za indukcijo nastanka vnetnih citokinov potrebna invazija in da sama adhezija ali molekule LPSa niso dovolj.

McCormick in sod. (1995) so ugotovili ravno nasprotno, da sama invazija salmonele v epitelne celice, tako v pogojih *in vitro* kot v pogojih *in vivo*, ni potrebna za indukcijo IL-8 in s tem pogojenega premika granulocitnih celic in vnetja, je pa potreben TTSS, ki je sicer odgovoren za invazijo salmonele. Wallis in Galyov (2000) sta ugotovila, da efektorski protein SopB, ki je del TTSS pri *S. dublin* (oz. SigD pri *S. typhimurium*), lahko povzroči indukcijo IL-8 ter premik granulocitov in vnetje, ne da bi pri tem prišlo do invazije salmonele. Huang in sod. (2004) so ugotovili, da je za indukcijo IL-8 pomembno sodelovanje med SopE2 in flagelinom. Lee in sod. (2000) so dokazali, da tudi kontakt SipA (*S. typhimurium*) z apikalno membrano epitelnih celic lahko spodbudi vnetni odziv in da pri tem ni potrebna niti prisotnost TTSS.

Drugi avtorji opisujejo, da je flagelin glavni faktor, ki izzove izločanje IL-8 oz. vnetni odziv epitelnih celic ob okužbi s *S. typhimurium* ter z drugimi invazivnimi sevi salmonele in ne invazija bakterije v evkarionsko celico (Berkes in sod., 2003; Gewirtz in sod., 2001; Hayashi in sod. 2003). Pri *Salmonella* spp. je flagelin, ki je glavni sestavni del bička, 55 kDa velik monomerni protein, ki ga kodirajo geni *fliC* ter *fliD* (Zeng in sod., 2003). Njegova struktura je zelo podobna aparatu TTSS (Finlay in Falkow, 1997; Lee, 1997; Mota in sod., 2005). Zeng in sod. (2003) so ugotovili, da sevi *S. typhimurium* z manjkajočim genskim zapisom za TTSS ali z neaktivnim TTSS izzovejo v celicah T-84 vnetni odziv, ki je enak odzivu, ki ga inducira sevi z aktivnim TTSS. Pri okužbi celic s sevi, ki jim manjkajo geni za flagelin pa nastane minimalni vnetni odziv. Ta se je povečal, ko so celice okužili z izoliranim flagelinom iz bazolateralne strani. Celice so izpostavili

tudi komercialno pripravljenemu LPS, vendar tudi ta ni spodbudil vnetnega odziva. Sklepajo, da je TLR-4, ki je pomemben za prepoznavo LPS v T-84 celicah prisoten intracelularno za prepoznavo invaginiranih mikrobov in da je flagelin glavni povod za vnetje. Podobno je ugotovil Van Asten (2005), ki je pri izpostavitvi celic Caco-2 izoliranemu flagelinu (apikalno ali bazolateralno) iz seva *S. enteritidis* dokazal podobne koncentracije IL-8 kot pri izpostavitvi celic *S. enteritidis*. Berin in sod. (2002) so ugotovili, da je za aktivacijo MAP kinaz p38 in ERK ter transkripcijskega faktorja NF- κ B in s tem pogojenega izločanja IL-8 in vnetja, odgovoren flagelin neinvazivne enterohemoragične *E. coli* O157:H7 in ne adhezija, toksini ali intimin, ki so sicer glavni virulenčni faktorji te bakterije.

Predvidevajo, da v poskusnih pogojih *in vitro*, salmonelam po določenem času, ko jih nanesemo na epitelne celice, bički odpadejo (Gewirtz in sod., 2001; Van Asten, 2005). Verjetno se flagelin prenese iz apikalne strani, skozi celice ali preko porušenih medceličnih stikov do receptorja TLR-5, ki je na bazolateralni membrani epitelnih celic. To povzoči aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- κ B in bazolateralno izločanje IL-8 (Berkes in sod., 2003; Gewirtz in sod., 2001; Hayashi in sod. 2003; Zeng in sod., 2003). Ni točno znano, kako pride do razpada bička oz. sprostitev posameznih flagelinov (Gewirtz in sod., 2001).

2.3.3.1 IL-8

IL-8 izloča več različnih celic: fibroblasti, keratinocite, epitelne celice, tkivni makrofagi, monocite, neutrofilci in limfociti T. IL-8 spada v družino kemotaktičnih citokinov, ki so majhni proteini (70-130 aminokislin) z zelo pomembno vlogo v imunosti in vnetnih reakcijah. Kemokini povzročijo kemotaktično premikanje neutrofilcev in drugih granulocitnih celic ter limfocitov na mesto okužbe ter njihovo aktivacijo. Aktivacija poteka preko prepoznavne IL-8 s specifičnimi receptorji na granulocitnih celicah in limfocitih. Sledi sprostitev vsebine granul, torej proteaz iz neutrofilcev in monocit, histamina iz bazofilcev, citotoksičnih proteinov iz euzinofilcev, produkcijo bioaktivnih lipidov in reaktivnih oblik kisika itd. IL-8 je povezan z nekaterimi boleznimi, kot so luskavica, vnetje sklepov (revmatoidni artritis), razjede v debelem črevesju (ulcerativni kolitis), kronično vnetje črevesja in Cronova bolezen (Bagnoli, 2001; Bagnoli in Clark-Lewis, 1992; Feghali in Wright, 1997; Murano in sod., 2000; Segain in sod., 2000; Uguccioni in sod., 1999; Wilson in sod., 2002).

Transkripcija genov za IL-8 je posledica aktivnosti transkripcijskih faktorjev, ki se specifično vežejo na promotorje tarčnih genov za uravnavanje vnetja (geni za IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF α , MCP-1, GM-CSF, ...). Signal za aktivacijo transkripcijskih faktorjev sprožijo različni signali, kot so virusi, bakterije, vnetni citokinii, ionizacijsko sevanje in nekatere kemikalije. NF- κ B je glavni transkripcijski faktor za večino teh genov in ima

ključno vlogo pri nastanku vnetja v črevesju. Pot aktivacije NF-κB se začne s signali, ki se prenesejo preko različnih receptorjev (npr. receptorjev za citokine in TLR) ali z bakterijskimi produkti in efektorskimi proteini preko celične membrane. V citoplazmi celic se nahaja neaktivni NF-κB, na katerega je vezan inhibitor κB (IκB). Po tem ko IκB-serinska kinaza (IKK) fosforilira serinske ostanke na IκB, se na IκB lahko veže ubikvitin. IκB z vezanim ubikvitinom je tarča za razgradnjo s 26S proteasomom, kar omogoči sprostitev NF-κB iz kompleksa IκB/NF-κB. NF-κB se premakne v jedro, kjer aktivira prepisovanje različnih genov, vključno z geni, ki kodirajo proteine vnetja (Berkes in sod., 2003; Elewaut in sod., 1999; Malago in sod., 2002).

Pri vnetnem odzivu v črevesnih epitelnih celicah sodeluje tudi družina MAP kinaz (MAPK). MAP kinaze ERK, JNK in p38 so vključene v regulacijo NF-κB in nastanek IL-8 tako, da aktivirajo IKK. Obstajajo pa tudi druge poti aktivacije vnetnih citokinov, predvsem IL-8, preko MAP kinaz. Aktivacija MAP kinaz je posledica kaskadnih reakcij, ki jih sprožijo različni zunanji stimulusi, npr. nekateri vnetni citokini (IL-1 β , IL-17, TNF α , IFN γ), patogene bakterije (*S. typhimurium*, *E. coli*), LPS, topotoni in oksidativni stres idr. Aktivacija MAP kinaz ERK, JNK in p38 pri okužbi celic s *S. typhimurium* je verjetno posledica z invazijo povezanega TTSS ali nekaterih elementov TTSS (Berkes in sod., 2003; Huang in sod., 2004; Malago in sod., 2002; Neish in sod., 2000), pri okužbi z neinvazivno *E. coli* O157:H7 pa naj bi aktivacijo MAP kinaz p38 in ERK sprožil flagelin (Berin in sod., 2002).

Producijo vnetnih citokinov lahko zmanjšajo nekateri proti-vnetni citokini, ki zaviralno vplivajo na določeno stopnjo aktivacije NF-κB in s tem blokirajo aktivnost NF-κB. Najbolj pogost takšen proti-vnetni citokin je IL-10, poleg tega pa še IL-4, IL-11 in IL-13 (Brennan in Feldmann, 2000; Haller in sod., 2002; Mantovani in Sozzani, 2000; Schottelius in sod., 1999). Na aktivacijo NF-κB negativno vplivajo tudi nekateri bakterijski fermentacijski produkti, predvsem butirat ter evkariontski proteini topotnega stresa (Malago in sod., 2005; Segain in sod., 2000; Wong in sod., 1997; Yoo in sod., 2000). Na modelu epitelnih črevesnih celic so pokazali, da je možna pot prekinitev vnetja pri okužbi s salmonelo lahko tudi preko lipida lipoxina A₄, ki prepreči migracijo neutrofilcev (Wilson in sod., 2002). Za zdravljenje kroničnih vnetij so raziskave usmerjene predvsem na antagoniste receptorjev za kemokine. Nekateri antagonisti so se pokazali kot učinkoviti na izbranih živalskih modelih (Baggiolini, 2001).

2.4 VPLIV ČREVESNE MIKROFLORE NA EPITELNE CELICE ČREVESJA

Mikroorganizmi rezidenčne mikroflore so izoblikovali mehanizme, s katerimi kljub imunskemu sistemu gostitelja, uspešno naseljujejo prebavila in sodelujejo pri obrambi

epitela pred škodljivimi mikroorganizmi ter drugimi snovmi in tako prispevajo k zdravju (Holzapfel in sod., 1998; Neish, 2002; Servin, 2004).

Mikroorganizmi različnih vrst: *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., in *Bifidobacterium* spp. idr. naselijo prebavni trakt človeka kmalu po rojstvu in imajo pomembno vlogo pri delovanju in vzdrževanju zdravega črevesja. Značilen je simbiotski odnos med mikroorganizmi, ki naseljujejo prebavila in epitelnimi celicami. Nizek pH v želodcu in hiter prehod hrane skozi tanko črevo zavirata preživetje večine mikroorganizmov v teh delih prebavil. V želodcu in začetnem delu tankega črevesa (duodenum, jejunum) prevladujejo predvsem aerobni in mikroaerofilni mikroorganizmi, npr. vrste rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Candida albicans* in *Helicobacter pylori* (Holzapfel in sod., 1998; Isolauri, 2004; Servin, 2004; Stevens in Hume, 1998; Wilson in sod., 2002). Prebava tu poteka pretežno z endogenimi izločki prebavil, delno pa tudi s fermentacijo, katere glavni produkt je mlečna kislina (Bach-Knudsen in sod., 1991). Proti koncu tankega črevesa (ileum) se število mikroorganizmov poveča, prevladovati začnejo fakultativni anaerobni in anaerobni mikroorganizmi: *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides* spp., *Veillonella* spp. in *Clostridium* spp. Največ mikroorganizmov, tako številčno kot po raznolikosti vrst, naseljuje debelo črevo, kjer se prebavna vsebina zadržuje dlje časa in je pH relativno nevtralen. Ti mikroorganizmi so večinoma anaerobni (*Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Ruminococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Peptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., idr.), večina med njimi so striktni anaerobi (Holzapfel in sod., 1998; Isolauri, 2004; Servin, 2004; Stevens in Hume, 1998; Wilson in sod., 2002).

Mikroorganizmi črevesne mikroflore nudijo gostitelju veliko ugodnih učinkov: razgrajujejo hrano, spodbujajo imunski sistem, zmanjšujejo gostoto potencialno patogenih mikrobov (kompeticija za vezavna mesta in za hrano), proizvajajo protimikrobne snovi (kisline, bakteriocine, vodikov peroksid), nekatere bakterije so vključene v sintezo vitamina B in nekatere vplivajo na metabolizem holesterola. Nekatere bakterije so vključene v metabolizem potencialnih kancerogenih snovi in pozitivno vplivajo na učinek določenih zdravil (Ewing in Cole, 1994; Holzapfel in sod., 1998; Stevens in Hume, 1998, Neish, 2002). Predvsem v debelem črevesju mikroorganizmi črevesne mikroflore fermentirajo ogljikove hidrate v kratkoverižne maščobne kisline, ki so pomemben vir energije za epitelne celice črevesja in olajšajo absorpcijo tekočine ter natrijevih ionov. Mikrobnna razgradnja dušikovih snovi v amoniak je pomembna za sintezo nekaterih aminokislin in za sproščanje prebavnih encimov v lumen prebavil (Servin, 2004; Stevens in Hume, 1998; Wilson in sod., 2002). Porušen odnos med epitelnimi celicami črevesja in

rezidenčno mikrofloro lahko vodi v vnetje, do poškodb tkiva in do različnih bolezni ter okužb s patogenimi mikroorganizmi (Neish, 2002).

2.4.1 Mlečnokislinske bakterije

Mlečnokislinske bakterije (MKB) so Gram-pozitivne, nesporulirajoče, fakultativno anaerobne ali mikroaerofilne bakterije, katerih glavni produkt metabolizma ogljikovih hidratov je mlečna kislina. Ta skupina bakterij zajema tako koke kot paličaste bakterije in kokobacile, ki spadajo v pododdelek *Clostridium* in pripadajo naslednjim rodovom: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* in *Vagococcus*. Zaradi produkcije kislin, podobnih fenotipskih značilnosti in drugih lastnosti MKB, se ponavadi tudi bakterije rodu *Bifidobacterium* obravnavajo v sklopu MKB, čeprav filogenetsko sodijo v pododdelek *Actinomycetes*. Najpogosteje MKB v črevesju človeka so vrste iz rodov *Lactobacillus* in *Leuconostoc* ter bifidobakterije (Holzapfel in sod., 2001; Singleton in Sainsbury, 1996; Vaughan in sod., 2002).

MKB naseljujejo prebavila, genitalije ter dihala ljudi in živali, medtem, ko bifidobakterije najdemo le v prebavilih človeka, toplokrvnih živali in čebel. MKB lahko izoliramo tudi iz hrane, kot je mleko in mlečni izdelki, fermentirana zelenjava, sadje in meso ter iz rastlinskega materiala (silaža, žita) (Holt in sod., 1994; Singleton in Sainsbury, 1996). Pogosto jih uporabljam pri proizvodnji hrane in krmil, ker zavirajo rast patogenih bakterij in bakterij, ki kvarijo hrano, poleg tega pa prispevajo k oblikovanju značilnih organoleptičnih lastnosti fermentirane hrane. MKB, ki so se sposobne vsaj začasno naseliti v prebavilih človeka, vplivajo na ravnotežje črevesne mikroflore in tako posredno prispevajo k zdravju (Bogovič Matijašić, 1997; Holzapfel in sod., 2001; Vaughan in sod., 2002).

2.4.1.1 Probiotiki

V zadnjih letih je zelo veliko zanimanje za uporabo živih organizmov oz. probiotikov za dobro počutje, preventivo in v terapevtske namene. Po Fuller-ju (1989) so probiotiki "živi mikrobeni dodatek krmi, ki koristno deluje na organizem živali tako, da izboljša ravnotežje njegove črevesne mikroflore". Delovna skupina, ki deluje v okviru organizacije ILSI (International Life Science Institute) Europe je leta 1998 definirala probiotike kot "prehranski dodatki z živimi mikroorganizmi, ki ugodno vplivajo na zdravje gostitelja" (Salminen in sod. 1998). Iz istega leta izhaja definicija, ki pravi da so probiotiki živi mikroorganizmi, ki dokazano ugodno učinkujejo na zdravje, če jih zaužijemo v zadostni količini (Guarner in Schaafsma, 1998).

Probiotiki, ki se uporabljajo v prehrani človeka, so navadno izolati predvsem iz rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacteria*, ki so izolirani iz človeka in so sposobni vplivati na ravnotežje mikroflore ter s tem posredno na zdravstveno stanje gostitelja. Učinkovit probiotični pripravek mora po zaužitju preživeti prehod skozi prebavila, poleg tega pa se morajo mikroorganizmi vsaj začasno naseliti v črevesju. Pomembno je tudi, da je sev bakterij izoliran iz človeka, da izloča protimikrobne snovi in antagonistično deluje proti patogenim bakterijam, ter da je varen za uporabo tako v dnevni prehrani, kot za zdravljenje črevesnih obolenj (Holzapfel in sod., 1998; Isolauri, 2004; Neish, 2002; Ouwehand in sod., 2002; Saarela in sod., 2000). Različne klinične študije so pokazale koristen učinek probiotikov pri zdravljenju akutnih in kroničnih vnetij črevesja, črevesnih razjed, Cronove bolezni, kužnih drisk (povzročenih predvsem s *S. typhimurium*, rotavirusom), zaprtja, laktozne intolerance in raka na debelem črevesju (Herías in sod., 2005; Hirayama in Rafter, 2000; Isolauri in sod., 2002; Ouwehand in sod., 2002). Nekateri probiotični sevi laktobacilov so na celicah Caco-2 pokazali antigenotoksične in antimutagene lastnosti (Caldini G., 2005; Saarela in sod., 2000). Vse več je dokazov, da nekatere probiotične bakterije sodelujejo pri inhibiciji transkripcijskega faktorja NF-κB. Aktivacijo NF-κB verjetno ovirajo na več različnih načinov. Znano je, da nekateri laktobacili inducirajo sintezo proti-vnetnega citokina IL-10, ki zaviralno vpliva na aktivacijo NF-κB (Hessle in sod., 1999; 2004; Ma in sod., 2004; Menard in sod., 2004; Neish in sod., 2000; von der Weid in sod., 2001), nekateri pa dokazano inhibirajo aktivacijo nekaterih MAP kinaz (Yan in Polk, 2002), kako natančno, pa še ni pojasnjeno.

Pomembno vlogo pri delovanju probiotikov imajo organske kisline, predvsem mlečna in ocetna, ki so končni produkti katabolizma ogljikovih hidratov. Mlečna kislina znižuje pH okolja, kar zaviralno vpliva na potencialne patogene bakterije. Nedisocirane kisline vstopajo v mikrobne celice in v citoplazmi disocirajo, kar ima usodne posledice za celico. Tudi drugi metabolni produkti, ki se sicer tvorijo v manjših količinah, pomembno prispevajo k celotnemu protimikrobnemu delovanju. Ti produkti so: ogljikov dioksid, mravljinčna kislina, proste maščobne kisline, amoniak, etanol, vodikov peroksid, diacetil, acetoin, acetaldeid, 2,3-butandiol, benzoat, bakteriolitični encimi, bakteriocini, antibiotiki in neidentificirane zaviralne snovi (Bogovič Matijašić, 1997; Holzapfel in sod., 1995; Servin, 2004). Pomembna lastnost probiotikov so njihove adhezivne sposobnosti in kolonizacija prebavnega trakta, saj tako lahko dalj časa učinkujejo s svojimi metabolnimi produkti, spodbujajo imunski sistem gostitelja in preprečijo vezavo nekaterih patogenov (Bernet in sod., 1997; Cocconier in sod., 1993; Reid in Burton, 2002; Saarela in sod., 2000).

2.4.2 Protibakterijska aktivnost laktobacilov pri okužbi epitelnih celic črevesja s salmonelo

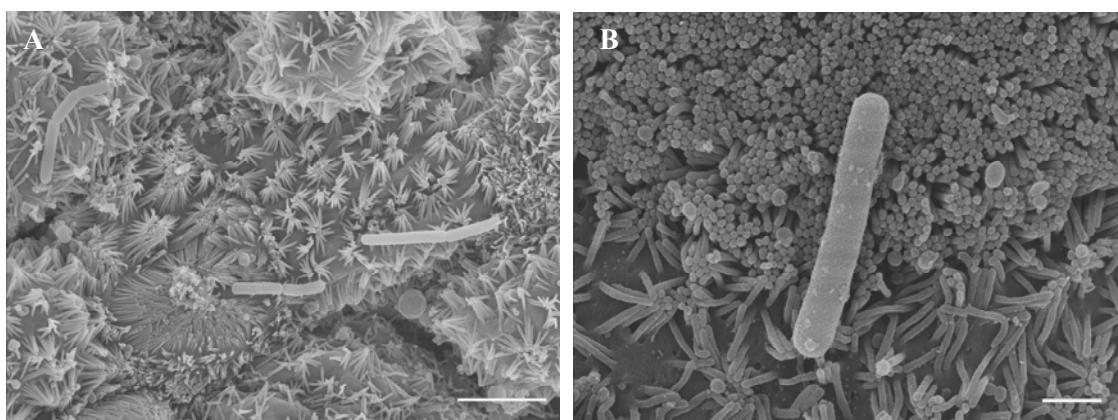
2.4.2.1 Rod *Lactobacillus*

Laktobacili so gram-pozitivne nesporulirajoče palčke, široke približno 0,5 - 1,2 µm in dolge 1 - 10 µm. Najdemo jih posamezno ali v obliki kratkih verižic. So fakultativni anaerobi ali mikroaerofili, včasih tudi anaerobi. Optimalna temperatura za rast je 30 - 40°C. Gibljivi so zelo redko, če so, jim to omogočajo bički. Za rast potrebujejo bogata in kompleksna gojišča. Metabolizem je fermentativen in saharolitičen. Lahko so homofermentativni, kjer je produkt razgradnje ogljika mlečna kislina ali pa heterofermentativni, kjer je produkt razgradnje ogljika mešanica mlečne kisline in drugih produktov. Preživijo tudi pri pH vrednostih, ki so nižje od 4 (Holt in sod., 1994; Singleton in Sainsbury, 1996).

2.4.2.2 Adhezivne sposobnosti laktobacilov

Adhezija (pripenjanje) laktobacilov na celice Caco-2 je vrstno specifična, poleg tega so nekateri laktobacili bolj adhezivni od drugih (Bernet in sod., 1994; Servin, 2004; Tuomola in Salminen, 1998). Tudi nekateri s toploto inaktivirani laktobacili imajo ohranjene adhezivne lastnosti (Chauvière in sod., 1992; Cocconier in sod., 1993). Laktobacili se na epitelne celice vežejo z elektrostatskimi interakcijami, hidrofobnimi silami, lipotejhojsko kislino, glikoproteini, s površinskimi izrastki, podobnimi lektinom (Servin, 2004), s kombinacijo ogljikovih hidratov in proteinskih faktorjev na površini celic (Greene in Klaenhammer, 1994) ali pa s proteinskimi snovmi, ki jih izločajo v okolje (Bernet in sod., 1994). Adhezija laktobacilov in drugih bakterij, ugodnih za črevesje, je pomembna predvsem za omejevanje okužb s potencialnimi patogeni, ki vstopajo v prebavni trakt človeka in živali (Holzapfel in sod., 1998; Neish, 2002; Ouwehand in sod., 2002; Reid in Burton, 2002; Servin, 2004).

Laktobacili, ki imajo adhezivne sposobnosti, tekmujejo s patogeni za vezavna mesta na epitelnih celicah črevesja. Boljše adhezivne sposobnosti laktobacilov nudijo epitelnim celicam večjo zaščito pred vdorom patogenov. Za študije adhezije pogosto uporabljamo *in vitro* tehnike s celičnimi linijami. Sluz (mukus) je prvi kontakt med bakterijo in sluznico črevesja in je zato pomemben za študije adhezije bakterij, čeprav veliko takih študij poteka tudi na celicah, ki ne izločajo sluzi: Caco-2 in T-84 (Holzapfel in sod., 1998; Saarela in sod., 2000; Servin, 2004).



Slika 4: Adhezija laktobacilov na celice Caco-2. (A) Adhezija *Lactobacillus gasseri* LF221. Merilo je 5 μm . (B) Adhezija *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. Merilo je 1 μm . Avtorji slik: Ton Ultee, dr. Jos Koninkx (Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands) in Sana Fajdiga (Oddelek za Zootehniko, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija).

Figure 4: Adhesion of lactobacilli to Caco-2 cells. (A) Adhesion of *Lactobacillus gasseri* LF221. Bar represents 5 μm . (B) Adhesion of *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. Bar represents 1 μm . Authors of the photograph: Ton Ultee, dr. Jos Koninkx (Department of Veterinary Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, The Netherlands) and Sana Fajdiga (Zootechnical department, Biotechnical faculty, University of Ljubljana, Slovenia).

Bernet in sod. (1994) so ugotovili, da *L. acidophilus* LA1 ovira adhezijo in invazijo *S. typhimurium*, enteropatogene in enterotoksigene *E. coli* na oz. v celice Caco-2 ter invazijo *Y. pseudotuberculosis*. Živi in s toploto inaktivirani *L. acidophilus* LB ovirajo tako adhezijo, kot invazijo *S. typhimurium*, enteropatogene *E. coli*, *Y. pseudotuberculosis* in *L. monocytogenes* na oz. v celice Caco-2 (Cocconier in sod., 1993). *Lactobacillus casei* Shirota ovira adhezijo in invazijo *S. enteritidis* 857 na oz. v celice Caco-2 (Hendriks in sod., 2001). V vseh primerih raziskovalci predvidevajo, da je bolj verjetno, da gre za prostorsko oviranje patogenov z laktobacili in ne za blokado specifičnih receptorjev. Nekateri laktobacili ovirajo le invazijo patogenov v celice, ne da bi pri tem vplivali na njihovo preživetje in adhezijo. *L. rhamnosus* ovira invazijo enterohemoragične *E. coli*, ne pa adhezije. Do oviranja invazije pride le v primeru uporabe živih laktobacilov, pri inaktiviranih, pa ne ter ob uporabi gojišča z izločki laktobacilov, prav tako ne (Hirano in sod., 2003).

2.4.2.3 Izločanje protimikrobnih snovi

Laktobacili izločajo veliko protimikrobnih snovi. Mnogo raziskav je bilo narejenih na bakteriocinih, čeprav imajo le-ti omejeno vlogo pri inhibiciji patogenov. Ponavadi inhibitorno delujejo le na zelo sorodne vrste, kot so ostali laktobacili, lahko pa tudi na nekatere gram-pozitivne patogene in kvarljivce hrane: *Bacillus* spp., *Clostridium* spp.,

Listeria monocytogenes in *Staphylococcus aureus* (Bogovič Matijašić in Rogelj, 1999; Holzapfel in sod., 1995). Protimikrobne učinke na patogene bakterije, kot so *Salmonella*, *E. coli*, *Clostridium* in *Helicobacter* so pokazali tudi nizkomolekularni in sekundarni metaboliti laktobacilov, predvsem mlečna in ocetna kislina ter vodikov peroksid (Holzapfel in sod., 1995; Saarela in sod., 2000). Hudault in sod. (1997) so ugotovili antagonistično aktivnost *L. casei* GG proti *S. typhimurium* C5 pri okuženih miših *in vivo* in oviranje invazije *S. typhimurium* C5 *in vitro* v celice Caco-2, ko so bile celice okužene hkrati s salmonelo in laktobacili ali pa s salmonelo in izločki laktobacilov (spent culture supernatant, SCS). Pri tem se preživetje salmonele ni zmanjšalo. Tsai in sod. (2005) so ugotovili, da SCS laktobacilov *L. acidophilus* LAP5 in *L. fermentum* LF33 ovira rast *S. typhimurium*, *E. coli*, *S. aureus* in *B. cereus*. In poleg tega, da je ob izpostavitvi celic INT-407 salmoneli hkrati s kulturami sevov LAP5 ali LF33 oz. salmoneli hkrati z SCS teh sevov, invazija salmonele mnogo manjša kot ob izpostavitvi celic le salmoneli. SCS *L. acidophilus* LB zmanjša preživetje nekaterih sevov *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Enterobacter* spp. *in vitro* ter *S. typhimurium* *in vivo* pri okuženih miših. Preživetje testiranih sevov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* ni bilo omejeno. Protimikrobne snovi sicer niso uspeli definirati, so pa dokazali, da ne gre za mlečno kislino (Cocconier in sod., 1997). Cocconier in sod. (2000) so kasneje ugotovili da SCS *L. acidophilus* LB zmanjša tudi poškodbe citoskeleta in preživetje salmonele v celicah Caco-2, če so celice po izpostavitvi salmoneli izpostavljene še pripravku SCS. Tretiranje salmonele z SCS pred izpostavitvijo celic Caco-2 salmoneli pa omeji adhezijo in ob tem zavira nastanek IL-8. Predvidevajo, da protimikrobna snov iz SCS direktno vpliva na salmonelo. Ker je adhezija salmonele inhibirana (Cocconier in sod., 1997) predvidevajo, da ta snov ovira indukcijo IL-8 tako, da blokira od adhezije *S. typhimurium* odvisen nastanek IL-8 (Cocconier in sod., 2000). Bernet in sod., (1994) so ugotovili da *L. acidophilus* LA1 ovira adhezijo in invazijo *S. typhimurium* na oz. v celice Caco-2. Kasneje so ugotovili, da je za inhibicijo odgovorna protimikrobna snov (ali več snovi) iz SCS laktobacilov. SCS seva *L. acidophilus* LA1 negativno vpliva na preživetje različnih gram-negativnih in gram-počitivnih patogenov: *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* in *Enterobacter cloacae* ter *in vivo* aktivnost *S. typhimurium*, medtem ko ne vpliva na laktobacile in bifidobakterije. Ugotovili so, da protimikrobna snov ni niti bakteriocin, niti mlečna kislina (Bernet-Camard in sod., 1997). Tudi Nemeth in sod. (2006) so *S. enteritidis* 857 tretirali z SCS različnih laktobacilov (*L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*) in nato izpostavili celice Caco-2 tretirani salmoneli. Ugotovili so, da je sinteza IL-8 manjša pri izpostavitvi tretirani, v primerjavi z netretirano salmonelo. Ma in sod. (2004) so ugotovili, da *L. reuteri* ovira *S. typhimurium* pri indukciji sinteze IL-8 v celicah T-84. Inhibicija se je pojavila le v primeru inkubacije celic T-84 z živimi in adhezivno sposobnimi bakterijami *L. reuteri* pred izpostavitvijo salmoneli. Če pa

so celice pred izpostavitvijo salmoneli inkubirali z SCS ali bakterijskim lizatom tega seva oz. jih izpostavili laktobacilom, inaktiviranim s toploto ali gama sevanjem, inhibicije ni bilo.

2.5 PROTEINI TOPLOTNEGA STRESA

Celice in organizmi reagirajo na topotni stres, težke kovine, bakterije ter njihove toksine, virus, pomanjkanje nekaterih hrani, sevanje, proste radikale, citokine, vnetje in ostale oblike stresa tako, da povečajo sintezo proteinov topotnega stresa (heat shock proteins, Hsp). Hsp pomagajo celicam, da se prilagodijo spremembam v okolju in preživijo med stresom, poleg tega pa jim pomagajo, da se po stresu povrnejo v normalno stanje (Kiang in Tsokos, 1998; Morimoto, 1998). Nekateri Hsp dokazano zaščitijo celice pred apoptozo in nekrozo *in vitro*. *In vivo* ščitijo srce in možgane pred srčnim infarktom in možgansko kapjo, pljuča in jetra pa pred sepso. Hsp imajo zaščitno vlogo tudi pri transplantacijah, kjer zmanjšujejo vnetni odziv. Zaradi zaščitnih učinkov so Hsp tarče intenzivnih raziskav za terapevtsko uporabo pri mnogih boleznih (Jäättelä, 1999; Mosser in sod., 2000; Wong in sod., 1997).

Hsp so evolucijsko zelo ohranjeni proteini velikosti od 8 do 150 kDa, ki so bili prvič odkriti pri vinski mušici *Drosophila melanogaster*. Glede na njihovo molekulsko maso so razdeljeni v različne družine: Hsp150, Hsp110, Hsp90, Hsp70, Hsp60, Hsp40, Hsp20 in Hsp8.5 (Malago in sod, 2002; Parsell in Lindquist, 1993). Proteini iz družine Hsp70 so pri človeku najbolj ohranjeni in najbolj raziskani. V to družino spadajo: Hsp70, ki je s stresom izrazito inducirana (poznan tudi kot Hsp72 ali Hsp70i), konstitutivno izražen Hsc70 (heat shock cognate protein 70) oz. Hsp73, mitohondrijski Hsp75 (mtHsp75) in Grp78 (BiP), ki se nahaja v endoplazmatskem retikulumu (Kiang in Tsokos, 1998; Tavaria in sod., 1996).

V normalnih pogojih celice sintetizirajo konstitutivni nivo Hsp, ki so vključeni pri zvijanju novo nastalih proteinov v celici, pri sestavljanju multiproteinskih kompleksov in pri prenosu proteinov preko membrane. Preprečujejo tudi nepravilno zvijanje in sestavljanje proteinov. Ob stresu se poveča sinteza inducibilnih Hsp, ki sodelujejo pri popravljanju odvitih in agregiranih polipeptidov, pri razgradnji proteinov, ki so preveč poškodovani, da bi se ponovno zvili v ustrezno konformacijo in z interakcijami protein – protein ščitijo na novo sintetizirane proteine pred potencialnimi poškodbami. Zaradi takšnega delovanja Hsp proteine imenujemo molekularni šaperoni, ki so pomembni za preživetje in ohranjanje normalnih funkcij celice (Jäättelä, 1999; Morimoto, 1998; Parsell in Lindquist, 1993).

Ob stresu se geni *hsp* aktivirajo s faktorji topotnega stresa (heat shock factor, Hsf). V celicah, ki niso v stresu, je Hsf v citoplazmi, v monomerni obliki, vezan skupaj s citoplazmatskimi Hsp40, Hsp70 in Hsp90. Ob stresu se Hsf sprosti iz kompleksa in potuje v jedro, kjer se sestavi v trimer in se v tej obliki veže na ohranjeno zaporedje (heat shock

regulatory element, HSE) v promotorju za Hsp gene in s tem aktivira transkripcijo genov za Hsp in Hsf. Hsp potujejo v citoplazmo, Hsf pa ostane v jedru in omogoča nadaljnjo transkripcijo genov. Visoka raven Hsp v citoplazmi povzroči premik Hsp v jedro, kjer se vežejo na Hsf in ustavijo transkripcijo. V celicah je vedno prisoten nek konstitutivni nivo Hsp, ki ob stresu sodelujejo z induciranimi Hsp (Malago in sod., 2002; Morimoto, 1998).

Okužba epitelnih celic z bakterijami predstavlja za celice stres. Deitch in sod. (1995) so pokazali, da ob izpostavitvi celic Caco-2 *E. coli* ali endotoksinom *E. coli*, pride do indukcije Hsp70, kar kaže na naravni mehanizem zaščite celic pred bakterijami. Podobno so ugotovili Malago in sod. (2003), da ob izpostavitvi celic Caco-2 z naraščajočo koncentracijo *S. enteritidis*, narašča sinteza Hsp70 in Hsp90, medtem ko ob izpostavitvi celic endotoksinu salmonele, Hsp odziva niso zaznali.

2.5.1 Vloga proteinov toplotnega stresa pri oblikovanju in delovanju celičnega citoskeleta

Citoskelet evkarionskih celic je sestavljen iz mikrotubulov, mikrofilamentov in intermediarnih filamentov. Mikrotubuli so kot votle cevke, sestavljeni iz polipeptitnih verig globularnega α - in β -tubulina. Mikrofilamenti (aktinski filamenti, F-aktin) so sestavljeni iz podenot aktina in so med seboj navzkrižno in vzporedno povezani z različnimi dodatnimi proteini. Intermediarni filamenti pa so sestavljeni iz tankih proteinskih niti, ki so med seboj tesno zvite v strukturo, podobno vrvi. Citoskelet daje celicam oporo in obliko, ločuje organele in sodeluje pri delitvi celice. Porušen celični citoskelet je za celice lahko usoden (Lodish in sod., 2001).

Različne oblike stresa, med drugim okužba celic z nekaterimi patogenimi bakterijami lahko poškoduje celični citoskelet (Malago in sod., 2003). Vse več je dokazov, da Hsp proteini stabilizirajo celični citoskelet. Liang in MacRae (1997) sta ugotovila, da imajo Hsp60, Hsp70, Hsp90 in Hsp100 sicer različno vlogo, vendar vsi sodelujejo pri oblikovanju in delovanju citoskeleta evkarionskih celic. Vplivali naj bi predvsem na razporeditev filamentoznih in tubularnih polimerov. Hsp70, Hsp90 in Hsp100 se vežejo na aktin in stabilizirajo aktinske filamente tako, da omogočijo navzkrižne povezave. Nekateri Hsp preprečujejo depolimerizacijo aktinskih filamentov (Koyashu in sod., 1986; Malago in sod., 2003). Pri stabilizaciji aktinskih filamentov je verjetno vključen tudi Hsp27 (Jäättelä, 1999).

Povečan nivo Hsp70 in Hsp90 v celicah Caco-2 verjetno zavira adhezijo in invazijo bakterij v celice tako, da stabilizira citoskelet celic Caco-2. Bakterije ga zato ne morejo uporabiti v svoje namene (Malago in sod., 2003).

2.5.2 Zaščita celic s proteini toplotnega stresa pri vnetju

Hsp lahko uravnavajo vnetje povzročeno z vnetnimi citokini tako da inhibirajo transkripcijo genov za vnetne citokine. Inhibirajo delovanje IKK, zaradi česar se NF- κ B ne sprosti iz kompleksa I κ B/NF- κ B oz. povečajo količino I κ B in s tem stabilizirajo I κ B/NF- κ B ali pa direktno inhibirajo aktivnost NF- κ B (Malago in sod., 2002; Wong in sod., 1997; Yoo in sod., 2000). Poleg tega nekateri Hsp zavirajo nastanek vnetnih citokinov preko MAP kinaz JNK in p38. Hsp70 zavira delovanje MAP kinaze JNK (Mosser in sod., 2000), Hsp90 pa zavira delovanje kinaze PKR, ki je pomembna za aktivacijo NF- κ B in MAP kinaze p38 (Donze in sod., 2001). Ugotovili so, da prostaglandini A in J aktivirajo Hsf in s tem povečajo sintezo Hsp v celicah po toplotnem stresu in po okužbi z virusi. Herbimicin-A je zaščitil živali z ishemijo pred vnetjem, kar naj bi tudi bila posledica povečanja sinteze Hsp v celicah (Malago in sod., 2002). Glutamin inducira nastanek Hsp70 in s tem zmanjša vnetje, ki se pogosto pojavi pri srčno-pljučnem obvodu. Oviranje delovanja NF- κ B in MAP kinaz s Hsp je pomembno za zmanjšanje vnetnega odziva. Hsp v celicah tako ne delujejo le kot šaperoni, ampak sodelujejo tudi pri uravnavanju vnetja, kar je lahko terapevtskega pomena. Tudi nekatera zdravila za zdravljenje vnetij črevesja preprečujejo vnetje tako, da inhibirajo aktivacijo NF- κ B in/ali MAP kinaz (Jacquier-Sarlin in sod., 1994; Kaiser in sod., 1999; Lee in sod., 1994; Murano in sod., 2000).

Malago in sod. (2003) so ugotovili, da se ob izpostavitvi celic Caco-2 patogeni *S. enteritidis*, poveča sinteza celičnih Hsp70 in Hsp90, vendar ta količina Hsp ni dovolj velika, da bi zaščitala celice pred invazijo salmonele. Če so celice Caco-2 pred izpostavitvijo salmoneli izpostavili visoki temperaturi (42°C) ali nizkim koncentracijam butirata, je bil IL-8 inhibiran v primerjavi s celicami, ki so bile izpostavljene samo salmoneli. Iz tega sklepajo, da imajo Hsp70 vsaj delno vlogo pri omejevanju vnetja (Malago in sod., 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 KEMIKALIJE IN GOJIŠČA

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje kemikalije:

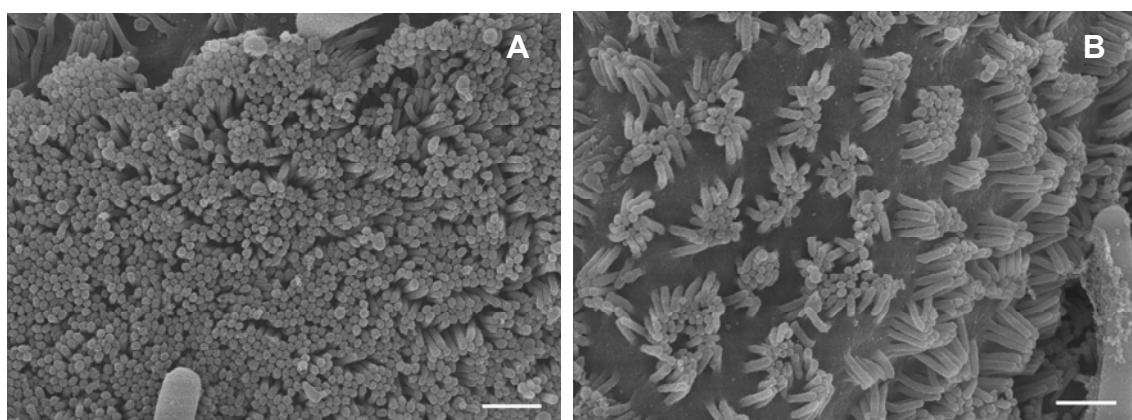
- 30 % akrilamid/bis-akrilamid (Sigma, A-3574)
- 40 % akrilamid/bis-akrilamid (Bio-Rad, 161-0148)
- APS, amonijev persulfat (Bio-Rad, 161-0700; Gibco, 15523-012)
- ECL blocking agent, sredstvo za blokiranje prostih vezavnih mest na membrani (Amersham Biosciences, RPN2125)
- BSA, goveji serumski albumin za umeritveno krivuljo pri določanju koncentracije proteinov (Pierce, 23209)
- BSA (frakcija V), goveji serumski albumin za ELISO (Sigma, A-4503)
- bromfenol modro (Merck 609; Serva, 15375)
- DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biocrom, AG T 043-01; BioWhittaker BE 12-709F); DMEM: osnovno gojišče za celice Caco-2; DMEM^{genta}: DMEM + gentamicin; kompletni DMEM: DMEM + gentamicin + FBS
- EDTA-dinatrijev dihidrat, etilendiamin-tetraacetat-dinatrijev dihidrat (Sigma, E-6635)
- FBS, serum govejega zarodka (BioWhittaker DE 14-801F; HyClone, SH 30066.03)
- gentamicin (Gibco, 15750-037)
- glicerol (Merck 4094)
- glicin (Sigma, G-8898)
- L-glutamin (Sigma, G-8540)
- kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, 11123; Merck, 1.04873)
- kalijev klorid (Merck, 1.04936)
- klorovodikova kislina (Merck, 1.00317)
- LB, Luria-Bertani tekoče gojišče (Invitrogen, 12780-052; Difco, 0446-07-5)
- LB, Luria-Bertani agar (Invitrogen, 22700-025; Difco, 0445-07-6)
- MRS, De Man, Rogosa, Sharp tekoče gojišče (Merck 1.10661; Oxoid, CM359)
- MRS, De Man, Rogosa, Sharp agar (Merck 1.10660; Oxoid, CM361)
- magnezijev klorid heksahidrat (Merck, 1.05833)
- 2-merkaptoetanol (Sigma, M-7154)
- metanol (Merck, 1.06009)
- DL-mlečna kislina (Sigma, L-6661)
- posneto mleko v prahu (Merck, 1.15363)
- natrijev bikarbonat (Merck, 1.06329; Sigma, S-5761)
- NaDS, natrijev dodecil (lauril) sulfat (Merck, 1.13760)
- natrijev klorid (Merck, 1.06404)

- dinatrijev hidrogenfosfat (Merck, 1.06580)
- natrijev dihidrogenfosfat (Merck, 1.06346)
- NBT/BCIP, nitroblue tetrazolium chloride / 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate (Roche, 1681451)
- TEMED, N'N'N'N'-tetrametiletilendiamin (Bio-Rad, 161-0800; Sigma, T-9281)
- 0,25% tripsin-EDTA (Sigma, T-4049)
- TRIS, Trizma baza (Sigma, T-6066)
- Triton X-100 (Sigma, T-9284)
- Tween-20 (Merck, 8.17072)
- žveplova (VI) kislina (Kemika, 18165, Merck, 1.09286)

3.2 CELIČNA LINIJA CACO-2 IN GOJENJE CELIC

3.2.1 Celice Caco-2

Celice Caco-2 so celična linija, ki so jo pridobili iz adenokarcinoma debelega črevesa 72-letnega pacienta (Fogh in sod., 1977; Pinto in sod., 1983). Popolnoma diferencirane celice Caco-2 imajo v *in vitro* pogojih lastnosti celic tankega črevesa (enterocit). Glede na razporeditev mikrovilov ločimo dva tipa celic: celice prekrite s t.i. preprogo mikrovilov (slika 5A) in celice prekrite z mikrovili, ki se med seboj dotikajo z apikalnimi konci in tako tvorijo rožam podobne vzorce (slika 5B).



Slika 5: **Fotografije površine celic Caco-2 z vrstičnim elektronским mikroskopom.** Mikrovili tvorijo 2 različna vzorca, (A): t.i. preprogo mikrovilov in (B): rožam podobne vzorce. Merilo je 1 μm .

Figure 5: **Scanning Electron Microscope Image of the Caco-2 surface.** Distribution of microvilli form 2 different patterns, (A) :carpet- like and (B): flower-like patterns. Bars represent 1 μm .

V raziskavi smo uporabljali 19 dni stare, torej diferencirane celice Caco-2 (Koninkx, 1995) in proučevali vpliv izbranih bakterij na celice. Celično linijo Caco-2 smo dobili iz ameriške

zbirke tipskih kultur (American Type Culture Collection; ATCC), v kateri je deponirana s številko ATCC HTB 37.

Celice Caco-2 smo na dan vsakega poskusa šteli. Število celic je bilo v vseh poskusih približno $2\text{-}4 \times 10^5$ na cm^2 .

3.2.2 Gojišče za celice Caco-2

Celice Caco-2 smo gojili v gojišču DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) z dodatki. Osnovno gojišče DMEM (BioWhittaker, BE 12-709F ali Biocrom, AG T 043-01) z dodatki smo pripravili po navodilih proizvajalca. Nato smo dodali sterilno pripravljen serum govejega zarodka (FBS) v končni koncentraciji 16% (v/v) in antibiotik gentamicin v končni koncentraciji 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Osnovno gojišče DMEM smo poimenovali »DMEM«, osnovno gojišče DMEM z dodanim gentamicinom »DMEM^{genta}« in osnovno gojišče DMEM z dodanim serumom in gentamicinom »kompletnejši DMEM«.

3.2.3 Gojenje celic Caco-2

Delo s celičnimi kulturami je vedno potekalo v sterilnih pogojih, v brezprašni komori (laminar). Celice smo vzdrževali v »kompletnejšem DMEM« gojišču, v CO_2 inkubatorju pri 37°C v aerobnih razmerah s 5% CO_2 in zračno vlogo. Gojišče smo menjali 3-krat tedensko.

Celice Caco-2 se pritrdijo na površino in se po njej razmnožujejo, dokler je ne zapolnijo. Ko jo popolnoma prekrijejo v eni plasti (enosloj), se nehajo deliti in rečemo, da so dosegle fazo konfluentne rasti. Če jim menjamo gojišče se začnejo diferencirati. Za gojenje smo uporabljali različne posodice za gojenje celičnih kultur: polistirenske stekleničke s površino 75 cm^2 (Greiner, 658 170 ali TPP, 90076), polistirenske stekleničke s površino 25 cm^2 (Greiner, 690 160 ali Lifesciences, 3055), 24-luknjičaste polistirenske plošče, s površino luknje 2 cm^2 (TPP, 92424) ali 12-luknjičaste polistirenske plošče z vstavljenimi polikarbonatnimi filtri (velikost por 0,4 μm) s površino 1 cm^2 (Costar, 3460-clear).

Stekleničke s površino 75 cm^2 smo zaradi velike površine uporabljali za namnoževanje celic. V teh stekleničkah je bilo 15 ml gojišča. Za poskuse smo uporabljali manjše gojitvene posodice. V stekleničkah s površino 25 cm^2 so bile celice prelite s 5 ml gojišča, v 24-luknjičastih ploščah z 1 ml gojišča na luknjo, v 12-luknjičastih ploščah s filtrskimi vstavki pa je bilo nad filtrom 0,6 ml gojišča in pod filtrom 1,5 ml gojišča.

Celice smo presajali 1-krat tedensko (ena pasaža). Da smo celice odlepili od podlage, smo jih najprej sprali z 0,01 mol/l fosfatnim pufrom (PBS), nato pa medcelične povezave prekinili z 0,25% Tripsin-EDTA. Celice smo prekrili z raztopino Tripsin-EDTA, jo po 1

minuti odstranili in nato počakali še 10 minut, da je Tripsin-EDTA, ki se je zadržal med celicami, razgradil medcelične povezave. Celice smo nato resuspendirali v gojišču DMEM in jih prešteli s hemocitometrom. Tako za namnoževanje kot za pripravo celic za poskuse, smo v gojitvene posodice nasadili po 4×10^4 celic na cm^2 , razen na filtrske vstavke v 12-luknjičastih ploščah, kamor smo nasadili po 6×10^4 celic na cm^2 . V poskusih smo uporabljali 19 dni stare celice. Vsi poskusi so bili narejeni med 5. in 22. pasažo.

Fosfatni pufer (PBS) smo pripravili iz pufrov 0,01 mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,9 % NaCl in 0,01 mol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,9 % NaCl. Oba pufra smo zmešali v takšnem razmerju, da smo v končnem volumnu dosegli $\text{pH} = 7,3$. Pufer smo filtrirali preko 0,22 μm filtra (LifeSciences PN 4480).

3.3 BAKTERIJSKI SEVI IN GOJENJE BAKTERIJ

3.3.1 *Salmonella enteritidis* 857

Nizozemski izolat *Salmonella enteritidis* 857 (Se857) (Van Asten in sod., 1995) je invazivni sev salmonele in je neugoden za humani črevesni epitel. Izolirali so ga iz piščančjih iztrebkov.

Se857 smo gojili v tekočem gojišču LB pri 37°C ob stresanju pri 200 rpm ali na trdnem gojišču LB pri 37°C. Za poskuse smo Se857 inokulirali v tekoče gojišče LB v deležu 1/10 (v/v) in inkubirali preko noči pri 37°C in 200 rpm. Naslednji dan smo kulturo inokulirali v deležu 1/100 (v/v) v sveže tekoče gojišče LB ter inkubirali 2 uri pri 37°C in 200 rpm. Nato smo centrifugirali 10 minut ($3500 \times g$, 20°C) in usedlino resuspendirali v gojišču DMEM v želeni koncentraciji (odvisno od poskusa).

Za poskuse smo uporabljali salmonelo Se857 v logaritmski fazi rasti, po 2 urah gojenja v tekočem gojišču LB pri 37°C in stresanju 200 rpm. Koncentracijo celic Se857 smo ugotavljal z indirektno metodo štetja kolonij (colony forming units, CFU) na trdnem gojišču LB (Singleton, 1992).

V tem času je bilo število bakterij Se857 približno $4-5 \times 10^8$ CFU/ml.

To število smo uporabljali za izračun volumnov, ki so bili potrebni za pripravo ustreznih koncentracij bakterij za poskus. Dejansko število Se857 pa smo ugotavljal med vsakim poskusom posebej.

3.3.2 Sevi rodu *Lactobacillus*

Laktobacili imajo ponavadi ugoden učinek na prebavila. Za poskuse smo izbrali 3 različne seve:

- *Lactobacillus gasseri* LF221 (LF) (prej *Lactobacillus acidophilus* LF221) je izolat iz blata dojenčka in je producent dveh bakteriocinov (Bogovič Matijašić in sod., 1998; Bogovič Matijašić in sod, 1999). Sev je deponiran v Zbirki industrijskih mikroorganizmov (ZIM), Ljubljana, Slovenija s številko ZIM BI50. Pri enem od poskusov smo uporabili tudi mutanto seva LF, ki ne producira bakteriocinov: *Lactobacillus gasseri* LF221 bac- (LFbac-).
- *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 (T10) je humani vaginalni izolat (Pastar in sod., 2003). Sev je darilo prof. dr. L. Topisiroviča (Inštitut za molekularno genetiko in genetski inžiniring, Beograd, Srbija in Črna gora).
- *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 (NCDO). Sev je deponiran v angleški zbirki organizmov iz mlečnih izdelkov (National Collection of Dairy Organisms; NCDO) s številko NCDO 2714.

Seve LF, T10 in NCDO smo gojili v tekočem gojišču MRS ali v/na trdnem gojišču MRS pri 37°C (LF in T10) oz. pri 30°C (NCDO). Za poskuse smo laktobacile inokulirali v tekoče gojišče MRS v deležu 1/10 (v/v) in inkubirali preko noči pri 37°C oz. pri 30°C. Naslednji dan smo kulturo inokulirali v deležu 1/100 (v/v) v sveže tekoče gojišče MRS in inkubirali 18 ur pri 37°C oz. pri 30°C. Nato smo centrifugirali 10 minut (3500 x g, 20°C) in usedline resuspendirali v gojišču DMEM v želeni koncentraciji (odvisno od poskusa).

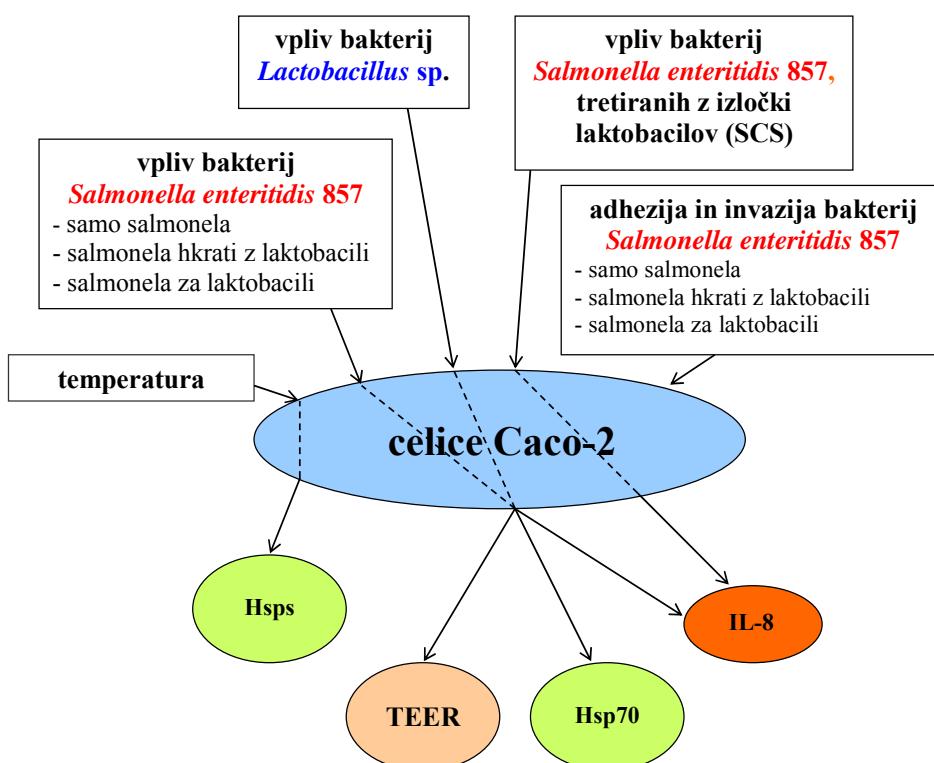
Laktobacile smo v poskusih uporabljali v stacionarni fazi rasti, po 18 urah gojenja v tekočem gojišču MRS pri 37°C (LF, T10) oz. 30°C (NCDO). Koncentracijo celic laktobacilov smo ugotavljal z indirektno metodo štetja kolonij (colony forming units, CFU) v ali na trdnem gojišču MRS (Singleton, 1992).

V tem času je število laktobacilov LF približno: $4\text{-}5 \times 10^8$ CFU/ml, laktobacilov T10 približno $2\text{-}3 \times 10^9$ CFU/ml in laktobacilov NCDO približno $1\text{-}2 \times 10^9$ CFU/ml.

Ta števila smo uporabljali za izračun volumnov, ki so bili potrebni za pripravo ustrezne koncentracije bakterij za poskus. Dejansko število bakterij pa smo ugotavljal med vsakim poskusom posebej.

3.4 POTEK POSKUSOV

V doktorskem delu smo naredili več poskusov, ki so bili med seboj povezani. Ugotavljalci smo vpliv: temperature, bakterij *Lactobacillus* sp., *Salmonella enteritidis* 857 (Se857) ali Se857, ki smo jo predhodno tretirali z izločki laktobacilov (SCS) ter adhezije in invazije Se857 na/v celice Caco-2. Vpliv smo ugotavljalci s spremeljanjem količine proteinov toplotnega stresa (Hsp) in interleukina-8 (IL-8) ali z merjenjem transepitelne električne upornosti (TEER) celic Caco-2.



Slika 6: **Shema poskusov v doktorski disertaciji.** Ugotavljalci smo vpliv: temperature, bakterij *Lactobacillus* sp., *Salmonella enteritidis* 857 (Se857) ter Se857, ki smo jo predhodno tretirali z izločki laktobacilov (SCS), ter adhezije in invazije Se857 na celice Caco-2 kot modela za humane črevesne celice. Vse poskuse smo ponovili 2-krat, razen poskusov, kjer smo ugotavljalci vpliv mešanice laktobacilov in Se857 oz. izpostavitev celic najprej laktobacilom in nato Se857, na izražanje Hsp70, IL-8 in na transepitelno električno upornost (TEER).

Figure 6: **Overview of experiments in PhD thesis.** We tested the influence of temperature, *Lactobacillus* sp., *Salmonella enteritidis* 857 (Se857), Se857 pretreated with spent culture supernatant of lactobacilli (SCS), adhesion and invasion of Se857 on Caco-2 cells, a model for human gut epithelium. All the experiments were done twice, except of experiments where we measured the expression of Hsp70, IL-8 and transepithelial electrical resistance (TEER) after exposure of Caco-2 cells to the mixture od lactobacilli and Se857 or lactobacilli first and then Se857.

3.4.1 Vpliv visoke temperature na izražanje proteinov toplotnega stresa v celicah Caco-2

3.4.1.1 Izpostavitev celic Caco-2 temperaturi 42°C

Preverili smo, če celice Caco-2 proizvedejo proteine toplotnega stresa ob toplotnem stresu. Toplotni stres smo povzročili z izpostavitvijo celic temperaturi 42°C za 1 uro. Nato smo jih inkubirali v CO₂ inkubatorju pri 37°C različno dolgo.

Celice smo v tesno zaprtih stekleničkah (25 cm²) izpostavili temperaturi 42°C tako, da smo stekleničke potopili v vodno kopel s cirkulirajočim termostatom DC10 (Haake, Karlsruhe, Germany), pri 42°C. Temperatura je bila stabilna znotraj intervala 42°C ±0,02°C. Po 1 uri smo stekleničke vzeli iz kopeli, popustili pokrovčke in jih premestili v CO₂ inkubator pri 37°C za ½ ure, 1 uro, 2 uri, 4 ure in 6 ur oz. do 48 ur. Proteine toplotnega stresa smo testirali v dveh paralelkah. Negativno kontrolo so predstavljale celice Caco-2, ki smo jih inkubirali v vodni kopeli pri temperaturi 37°C in nato 6 ur v CO₂ inkubatorju pri 37°C.

3.4.1.2 Priprava celic Caco-2 za merjenje koncentracije Hsps

Iz stekleničk smo z vakumsko črpalko odsesali gojišče. Da smo celice odlepili od podlage, smo jih dvakrat sprali s 5 ml PBS, nato pa medcelične povezave prekinili s pufrom EDTA.

Sestava pufra EDTA:

- 8 g/l NaCl
- 0,2 g/l KCl
- 1,45 g/l Na₂HPO₄
- 0,2 g/l KH₂PO₄
- 0,2 g/l Na₂EDTA x 2H₂O

Vse sestavine smo dobro raztopili v destilirani vodi in pufer filtrirali preko 0,22 µm filtra (Schleicher & Schuell, FP 30/0,2 CAS). pH pufra je približno 7,3.

Celice smo prekrili s 5 ml pufra EDTA (37°C) in inkubirali 30 minut v CO₂ inkubatorju pri 37°C. Po 30 minutah smo dodali 5 ml hladnega (4°C) PBS in s tem ustavili delovanje pufra EDTA. Celice smo resuspendirali s sterilno 10 ml brizgalko in sterilno jekleno iglo s topim koncem (Unimed, Lausanne, Switzerland, 2 x 160 mm), prenesli v centrifugirke in centrifugirali 10 minut (300 x g, 4°C). Usedline celic smo še enkrat sprali s PBS. Po zadnjem centrifugiranju (10 minut, 600 x g, 4°C) smo supernatante zavrgli, usedline celic pa shranili pri -20°C, do nadaljnih analiz.

3.4.1.3 Merjenje celokupne koncentracije proteinov v vzorcih celic Caco-2 z metodo BCA

Koncentracijo proteinov v celicah smo merili z metodo BCA. Uporabili smo BCA Protein Assay Reagent Kit in metodo izvajali po navodilih proizvajalca kita (Pierce, 23227). Kit vsebuje BCA reagent A in BCA reagent B. Kot standard smo uporabili goveji serumski albumin (BSA). Umeritveno premico smo pripravili z 12 koncentracijami standarda BSA.

Vsakemu vzorcu celic (iz ene stekleničke s površino 25 cm^2), ki so bili shranjeni pri -20°C smo dodali 1 ml hladne (4°C) destilirane vode in dobro premešali. Celične proteine smo sprostili iz celic z ultrasonikacijo, 30 s pri amplitudi $20 \mu\text{m}$ in temperaturi 0°C . Uporabili smo ultrasonikator MSE Soniprep 150. Vzorce proteinov smo 4-krat redčili z destilirano vodo, da so bile koncentracije proteinov znotraj merilnega območja.

Za meritve smo uporabili 96-luknjičaste mikrotitrskie plošče z ravnim dnom (Greiner BV., Is655092). $20 \mu\text{l}$ vsake razredčine standarda smo nanesli v dve luknji in $20 \mu\text{l}$ vsake razredčine vzorca v tri luknje 96-luknjičaste plošče. V vsako luknjo smo nato dodali $200 \mu\text{l}$ mešanice reagentov A in B (v razmerju 50:1), ploščo pokrili s pokrovčkom in inkubirali 30 minut pri temperaturi 37°C . Po inkubaciji smo s čitalcem za mikrotitrskie plošče (Bio-Rad Model 3550 ali Bio-Tek ELx808) izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 595 nm.

Iz povprečnih vrednosti optične gostote in znanih koncentracij BSA, smo izrisali umeritveno krivuljo in izračunali enačbo regresijske premice:

$$Y = a * X + b \quad \dots(1)$$

Y je optična gostota izmerjena pri 595 nm, X je koncentracija proteinov v $\mu\text{g}/\text{ml}$, a in b pa sta faktorja, ki ju na osnovi umeritvenih podatkov izračunamo s programom Excel.

Iz izmerjenih vrednosti optične gostote vzorcev in iz enačbe regresijske premice, smo izračunali koncentracijo proteinov v 4-krat razredčenih vzorcih. Dobljeno vrednost smo pomnožili s 4 in tako dobili celokupno koncentracijo proteinov v vzorcih. Uporabili smo enačbo:

$$X = ((Y-b)/a)*4 [\mu\text{g}/\text{ml}] \quad \dots(2)$$

3.4.1.4 Ločevanje proteinov z denaturacijsko poliakrilamidno gelsko elektroforezo (NaDS-PAGE)

3.4.1.4.1 Priprava vzorcev in denaturacija proteinov

Proteine v vzorcih smo denaturirali 5 minut pri 95°C v 3-krat koncentriranem nalagalnem pufru v volumskem razmerju 1 : 2 (pufer : vzorec).

Sestava nalagalnega pufra za vzorce je bila naslednja:

- 188 mmol/l Tris-HCl, pH 6,8
- 6 % (v/v) NaDS
- 30 % (v/v) glicerol
- 15 % (v/v) 2-merkaptoetanol
- 0,003 % (v/v) bromfenol modro

3.4.1.4.2 Priprava poliakrilamidnih gelov

Poliakrilamidne gele smo pripravili po standardnem postopku (Laemmli, 1970). Pripravili smo dvofazne pokončne poliakrilamidne gele dimenzij 80 x 60 x 1 mm v aparatu za vertikalno elektroforezo (Hoefer-Pharmacia Mighty small SE250/SE260 ali Invitrogen Xcell SureLock mini-Cell).

Postopek priprave spodnjega, ločevalnega 10 % gela::

- 4,9 ml destilirane vode
- 2,5 ml 1,5 mol/l Tris-HCl pH 8,8
- 0,1 ml 10 % (m/v) NaDS
- 2,5 ml 40 % akrilamida ali 3,3 ml 30 % akrilamida

Polimerizacijo smo sprožili z dodatkom:

- 0,05 ml sveže pripravljenega 10 % (m/v) APS
- 0,005 ml TEMED

Gel smo nalili do višine 1,5 cm pod zgornjim robom plošč, ga prekrili z 0,5 ml n-butanola nasičenega z vodo in pustili vsaj 1 uro pri sobni temperaturi da je polimeriziral. Butanol smo sprali z destilirano vodo in s filter papirjem dobro osušili notranjo stran plošč.

Na ločevalni gel smo nalili 5 % koncentracijski gel 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
- 0,625 ml 40 % akrilamida ali 0,833 ml 30 % akrilamida

Polimerizacijo smo sprožili z dodatkom:

- 0,05 ml sveže pripravljenega 10 % (m/v) APS
- 0,005 ml TEMED

Koncentracijski gel smo nalili in takoj vstavili glavnik z 10 ali 15 žepki. Gel smo pustili na sobni temperaturi vsaj 30 min, da je polimeriziral.

3.4.1.4.3 Pogoji in potek elektroforeze

V eni elektroforetski celici smo hkrati ločevali proteine na dveh gelih. Pred nanosom vzorcev smo nalagalne žepke 3-krat sprali z destilirano vodo, da smo odstranili nepolimerizirani akrilamid in jih potem napolnili z elektroforetskim pufrom.

Sestava elektroforetskega pufra:

- 3 g/l TRIS
- 14,4 g/l glicina
- 1g/l NaDS

Vse sestavine smo raztopili v destilirani vodi. pH elektroforetskega pufra je bil približno 8,3.

Anodni in katodni elektroforetski pufer sta bila po sestavi enaka. Za vsako elektroforezo smo pripravili svež elektroforetski pufer. V žepke smo s pipeto nanesli enake količine (10 µg) denaturiranih proteinskih vzorcev. Na vsak gel smo v en žepek nanesli tudi 4 µl predhodno obarvane standardne mešanice proteinov v velikostih od 6 kDa do 250 kDa (Bio-Rad, 161-0318) ali od 4 kDa do 250 kDa (Invitrogen, LC5925). Elektroforeza je potekala pri konstantni moči 5 W, približno 2 uri. Gelov med elektroforezo nismo hladili, smo pa uporabili na ohlajen elektroforetski pufer (+4°C). Elektroforetska celica se med potekom elektroforeze ni občutno segrela. Vse elektroforeze so potekale pri podobnem električnem toku in napetosti, kar zagotavlja primerljivost poskusov.

3.4.1.5 Prenos proteinov iz gela na membrano PVDF (Western blotting)

Po končani elektroforezi smo proteine prenesli iz gela na membrano PVDF (Immobilon-P, Millipore). Gele smo ločili od podlage in jih prenesli v pufer za prenos proteinov za 5 minut. Metanol v pufru za prenos povzroči delno krčenje gela. Pred sestavljanjem skladovnice za prenos proteinov iz gela na membrano je zato potrebna ekvilibracija gela v pufru, saj bi krčenje gela ob hkratnem stiku z membrano lahko privedlo do razmazanih lis.

Sestava Tris-glicin pufra (10-krat koncentriran):

- 30,3 g/l TRIS
- 144 g/l glicina

Pufer za prenos proteinov:

- 100 ml 10-krat koncentriranega Tris glicin pufra
- 200 ml metanola
- 700 ml destilirane vode

Uporabljali smo pol-suhi prenos proteinov iz gela na membrano z uporabo sistema Multiphor II (Amersham Pharmacia) s pripadajočima grafitnima elektrodama NovaBlot in električnim usmernikom. Z destilirano vodo smo dobro navlažili elektrodní plošči. Na sredini anodne plošče (+) smo sestavili skladovnico: devet lističev filter papirja, membrana PVDF, gel, devet lističev filter papirja. Filter papir in membrana so se po velikosti natanko prilegali gelu. Izmed vseh plasti smo iztisnili morebitne zračne mehurčke. Skladovnico smo pokrili s katodno ploščo (-). Prenos je potekal pri konstantnem toku 0,8 mA na cm² 90 minut.

Po končanem prenosu proteinov iz gela na membrano smo skladovnico razstavili in na membrani dokazali prisotnost proteinov toplotnega stresa z imunodetekcijo.

3.4.1.6 Imunodetekcija proteinov toplotnega stresa

Imunodetekcija je potekala pri sobni temperaturi in ob rahlem stresanju. Membrano, na katero smo prenesli proteine, smo najprej namočili v 100% metanol za 15 sekund, nato pa sprali z destilirano vodo (po navodilih za membrano PVDF, Immobilon-P, Millipore). Nespecifična vezavna mesta na membrani, kamor se ni vezal noben protein, smo blokirali 1 uro pri sobni temperaturi ali preko noči pri 4°C s pufrom, ki je vseboval proteine posnetega mleka.

Sestava pufra za blokiranje prostih vezavnih mest na membrani:

- 0,01 mol/l PBS, pH 7,3
- 0,1 % (v/v) Tween-20
- 5 % (w/v) sredstva za blokiranje prostih vezavnih mest (ECL blocking agent, Amersham) ali 5 % (w/v) posnetega mleka v prahu

Nato smo membrano spirali s pufrom za spiranje. Spiranje je bilo sestavljeni iz 2-kratnega hitrega splakovanja membrane, nato 1-kratnega spiranja 15 minut in še 2-kratnega spiranja po 5 minut.

Sestava pufra za spiranje membrane:

- 0,01 mol/l PBS, pH 7,3
- 0,1 % (v/v) Tween-20

Sledilo je 1 urno inkubiranje membrane s primarnimi monoklonskimi protitelesi. Uporabili smo mešanico treh primarnih monoklonskih protiteles (raztopina A) ali pa eno vrsto primarnih monoklonskih protiteles (raztopina B).

Sestava raztopine A, s tremi vrstami primarnih monoklonskih protiteles:

- 0,01 mol/l PBS, pH 7,3
- 0,1 % (v/v) Tween-20
- 5 % (w/v) sredstva za blokiranje prostih vezavnih mest (ECL blocking agent, Amersham) ali 5 % (w/v) posnetega mleka v prahu
- 0,1 µg/ml monoklonskih mišjih IgG₁ anti-Hsp60 (Stressgen, SPA-806)
- 0,5 µg/ml monoklonskih mišjih IgG₁ anti-Hsp70 (Stressgen, SPA-810)
- 1 µg/ml monoklonskih mišjih IgG₁ anti-Hsp90 (Stressgen, SPA-806)

Sestava raztopine B z eno vrsto primarnih monoklonskih protiteles je bila enaka kot sestava raztopine A, vsebovala pa je le monoklonskih protitelesa anti-Hsp70.

Membrano smo ponovno spirali po prej opisanem postopku. Nato smo jo 1 uro inkubirali s sekundarnimi protitelesi (specifičnimi za primarna monoklonska protitelesa) z vezano alkalno fosfatazo.

Sestava raztopine sekundarnih protiteles:

- 0,01 mol/l PBS, pH 7,3
- 0,1 % (v/v) Tween-20
- 0,5 % (w/v) sredstva za blokiranje prostih vezavnih mest (ECL blocking agent, Amersham) ali 0,5 % (w/v) posnetega mleka v prahu
- 0,05 % (v/v) poliklonskih kozjih anti-mišjih IgG z vezano alkalno fosfatazo (Stressgen, SAB-101)

Sledilo je ponovno spiranje po že opisanem postopku. Nato smo membrane potopili v detekcijski pufer, ki smo mu tik pred uporabo dodali 2% (v/v) substrata NBT/BCIP.

Sestava pufra za detekcijo:

- 0,1 mol/l TrisHCl
- 0,1 mol/l NaCl
- 5 mmol/l MgCl₂

pH pufra za detekcijo smo uravnali na pH = 9,5 s HCl. Tik pred uporabo smo dodali 2 % (v/v) substrata NBT/BCIP.

Po približno 30 sekundah so se na membrani začeli kazati obarvani produkti. Reakcijo smo ustavili po 1-3 minutah, tako da smo membrano dobro sprali z destilirano vodo. Membrano smo posušili na filter papirju in shranili v suhem in temnem prostoru. Gostoto obarvanih produktov (lis) na membrani smo ugotavljali z denzitometrom (Bio-Rad Model GS-700) in računalniškim programom Molecular Analyst ali pa smo membrano fotodokumentirali z aparatom Chemigenius² (Syngene), ter kvantitativno ovrednotili z računalniškima programoma GeneSnap in GeneTools. Intenzitete lis, ki so predstavljale Hsp smo relativno primerjali z intenzitetu lise, ki je predstavljala negativno kontrolo za Hsp (opisano v poglavju 3.4.1.1 oz. v opisu ustreznega poskusa).

3.4.2 Vpliv različnih temperatur na izražanje Hsp70 v celicah Caco-2

Ugotavljali smo, s kakšno količino Hsp70, se odzovejo celice Caco-2 po izpostavitvi različnim temperaturam. Celice smo izpostavili temperaturam 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C in 43°C za 1 uro in jih nato inkubirali v CO₂ inkubatorju pri 37°C, 6 ur.

Poskus je bil izveden tako, kot je opisano v poglavju 3.4.4.1, le da smo celice izpostavili različnim temperaturam in po izpostavitvi inkubirali v CO₂ inkubatorju 6 ur. Negativno kontrolo je predstavljala inkubacija celic Caco-2 pri 37°C.

Po 6 urah smo ugotavljali količino Hsp70 po postopku, ki je opisan v poglavljih od 3.4.2 do 3.4.6.

3.4.3 Vpliv različnega števila posameznih bakterij na izražanje Hsp70 in IL-8 v celicah Caco-2

Da bi ugotovili, če izpostavitev celic Caco-2 različnim bakterijam povzroči različno izražanje Hsp70 in interleukina 8 (IL-8), smo celice izpostavili različnim številom bakterij sledečih sevov: *Salmonella enteritidis* 857 (Se857), *Lactobacillus gasseri* LF221 (LF), *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 (T10) in *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 (NCDO). Negativna kontrola so bile celice Caco-2, ki jih nismo izpostavili bakterijam.

3.4.3.1 Priprava celic Caco-2

Celice smo gojili v stekleničkah s površino 25 cm² ali v 24-luknjičastih ploščah. Na dan poskusa smo celice prešteli.

Dva dni pred poskusom smo kompletni DMEM zamenjali z gojiščem DMEM z dodatkom seruma in brez gentamicina. Tako smo odstranili gentamicin, ki bi kasneje lahko oviral poskus z bakterijami. Na dan poskusa, vsaj 1 uro pred izpostavitvijo celic Caco-2 bakterijam, smo celice 2-krat sprali z gojiščem DMEM, da smo odstranili morebitne ostanke seruma, ki bi lahko ovirali poskus.

3.4.3.2 Priprava bakterijskih sevov

Bakterijske kulture smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.3. V ustrezнем volumnu gojišča DMEM in pripravili več različnih redčitev posameznih bakterij v DMEM. Želeli smo imeti Se857 v koncentraciji: 5, 10, 50, 500 in 800 CFU/Caco-2. Laktobacile LF, T10 in NCDO pa smo želeli imeti v koncentraciji: 10, 100, 200, 400, 800 CFU/Caco-2.

Potrebni volumen 2 uri stare kulture Se857 in 18 ur starih kultur lahktobacilov smo izračunali po sledečih enačbah:

$$E [bakt.] = A [ml] * B [bakt./Caco-2] * D [Caco-2/ml] \quad \dots(3)$$

$$G [ml] = E [bakt.] / F [bakt./ml] \quad \dots(4)$$

Z enačbo (3) izračunamo število bakterij E , ki ga potrebujemo za poskus. Spremenljivka A je volumen bakterijske kulture, pripravljene v gojišču DMEM, ki ga potrebujemo za poskus (volumen je določen glede na število vzorcev v poskusu). Spremenljivka B je želeno število bakterij na celico Caco-2. Spremenljivka D je prešteto število celic Caco-2 v enem ml gojišča. Z enačbo (4) nato izračunamo volumen, podan s spremenljivko G , 2 uri stare kulture Se 857 oz. 18 ur starih kultur laktobacilov, ki jih moramo pripraviti za poskus. Število bakterij, ki smo ga dobili iz enačbe (3) delimo s spremenljivko F , ki je število bakterij v ml izhodiščne kulture (po 2 urah oz. po 18 urah, kot je opisano v poglavju 3.3).

Dejansko število bakterij, uporabljenih v poskusu smo ugotovili tako, da smo bakterijske suspenzije, uporabljene v poskusu ustrezno razredčili v 0,9% NaCl in jih razmazali na trdno gojišče (Se857 na LB agar) oz. prelivali z agarjem (LF, T10 in NCDO z MRS agarjem) kot je opisano v poglavju 3.3, in kasnje prešteli kolonije (CFU). Rezultate smo podali kot število bakterij na eno celico Caco-2, kar smo izračunali po enačbi:

$$I [bakt / Caco-2] = H [bakt / ml] / D [Caco-2 / ml] \quad \dots(5)$$

H predstavlja število preštetih bakterij na ml in D število preštetih celic Caco-2 na ml.

Dejansko število Se857 je bilo: 4, 16, 43, 404 in 704 CFU/Caco-2, dejansko število LF: 10, 91, 164, 432 in 998 CFU/Caco-2, dejansko število T10: 9, 86, 153, 435 in 882 CFU/Caco-2 in dejansko število NCDO: 5, 81, 243, 449 in 821 CFU/Caco-2.

3.4.3.3 Izpostavitev celic Caco-2 bakterijam

Iz celic Caco-2 smo odsesali gojišče DMEM in jim dodali po 5 ml (v stekleničke) ali po 1 ml (v luknje) pripravljenih redčitev posameznih bakterij v gojišču DMEM. Celice Caco-2 z bakterijami smo 1 uro inkubirali v CO₂ inkubatorju pri 37°C. Negativno kontrolo so predstavljale celice, ki jih nismo izpostavili bakterijam. Poskus smo opravili v štirih paralelkah.

Po 1 uri inkubacije celic Caco-2 z bakterijami, smo bakterije odstranili z odsesanjem in celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} (3.2.2) in nato v DMEM^{genta} celice inkubirali v CO₂ inkubatorju 3 ure, 6 ur in 24 ur. Po inkubaciji smo supernatante celic (DMEM^{genta} s

celičnimi produkti) prenesli v centrifugirke in centrifugirali 10 minut (600 x g, 4°C). Morebitne usedline smo ločili od supernatantov in supernatante shranili pri -20°C za kasnejše meritve koncentracij IL-8. Celice smo tretirali, kot je opisano v postopku 3.4.1.2 (le da smo pri uporabi 24-luknjičastih plošč uporabljali volumen 1 ml na luknjo namesto 5 ml na stekleničko). Usedline celic smo shranili pri -20°C za nadaljne analize Hsp70.

3.4.3.4 Vpliv različnega števila posameznih bakterij na izražanje Hsp70 v celicah Caco-2

V usedlinah celic, shranjenih pri -20°C smo ugotavljali količino Hsp70 po postopku, ki je opisan v poglavljih od 3.4.1.3 do 3.4.1.6.

3.4.3.5 Vpliv različnega števila posameznih bakterij na izražanje IL-8 v celicah Caco-2

Koncentracijo IL-8, ki ga celice izločajo v gojišče po izpostavitvi bakterijam, smo merili v vzorcih supernatantov celic shranjenih pri -20°C (poglavlje 3.4.3.3). Uporabili smo metodo »sendvič« ELISA. Za izvedbo metode ELISA smo uporabili komercialno dostopen kit Hu IL-8 Cytoset (CHC1304, Biosource Europe S.A.), ki vsebuje: lovilna protitelesa (58.130.08), detekcijska protitelesa z vezanim biotinom (58.130.02), rekombinantni humani IL-8 kot standard (58.130.10) in streptavidin s konjugirano hrenovo peroksidazo (streptavidin-HRP, 41.000.04). Poleg kita smo uporabili še substrat TMB (Biosource, SB01). Uporabljali smo 96-luknjičaste plošče (Nunc Maxisorp, 439454). Pri metodi ELISA smo uporabili spodaj opisane pufre:

Pufer 1: pufer za pripravo lovilnih protiteles:

- 8 g/l NaCl
- 1,42 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O
- 0,2 g/l KH₂PO₄
- 0,2 g/l KCl

Sestavine smo raztopili v destilirani vodi. pH je bil približno 7,3.

Pufer 2: pufer za blokiranje:

- 8 g/l NaCl
- 1,42 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O
- 0,2 g/l KH₂PO₄
- 0,2 g/l KCl
- 5 g/l BSA (frakcija V)

Sestavine smo raztopili v destilirani vodi. pH je bil približno 7,3.

Pufer 3: pufer za razredčevanje standarda, protiteles in streptavidina:

- 8 g/l NaCl
- 1,42 g/l Na₂HPO₄ x 2H₂O
- 0,2 g/l KH₂PO₄
- 0,2 g/l KCl
- 5 g/l BSA (frakcija V)
- 0,1 % (v/v) Tween 20

Sestavine smo raztopili v destilirani vodi. pH je bil približno 7,3.

Pufer 4: pufer za spiranje:

- 9 g/l NaCl
- 0,1 % (v/v) Tween 20

Sestavine smo raztopili v destilirani vodi. pH je bil približno 7,3.

Raztopina za ustavitev barvne reakcije:

- 3,6 mol/l H₂SO₄

Po navodilih proizvajalca smo lovilna protitelesa redčili v razmerju 1:1000 v pufru 1, detekcijska protitelesa 1:1250 v pufru 3, streptavidin-HRP 1:5000 v pufru 3 ter standard v pufru 3 najprej do koncentracije 800 pg/ml, sledile so še zaporedne redčitve v razmerju 1:2.

3.4.3.5.1 Postopek ELISA

Plošče smo prekrili lovilnimi protitelesi (100 µl/luknjo, 1 µg/ml) in inkubirali preko noči pri 4°C. Nato je postopek potekal pri 20-23°C. Plošče smo spirali 4-krat po 300 µl/luknjo s pufrom 4. Za spiranje smo uporabili spiralec mikrotitrskih plošč (Bio-Rad Model 1550 ali Bio-Tek ELx50). Neprekrita mesta v luknjah smo 2 uri blokirali s pufrom 2 (300 µl/luknjo), ob konstantnem stresanju pri 300 rpm. Ponovno smo spirali 4-krat po 300 µl/luknjo s pufrom 4 nato smo v luknje prenesli redčine standarda, vzorce in kontrole (vse v dveh ponovitvah, po 100 µl/luknjo) in dodali zraven detekcijska protitelesa (50 µl/luknjo, 0,1 µg/ml) ter inkubirali 2 uri pri konstantnem stresanju 300 rpm. Sledilo je spiranje kot je že opisano. Nato smo v luknje dodali streptavidin-HRP (100 µl/luknjo, redčen 1:5000), inkubirali 30 minut pri stresanju 300 rpm in ponovno spirali. Sledil je dodatek substrata TMB (100 µl/luknjo) in 30 minutna inkubacija v temi. Nastajanje barve smo ustavili z dodatkom raztopine za ustavitev barvne reakcije (50 µl/luknjo) in v 10 minutah izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 450 nm. Optično gostoto smo izmerili s čitalcem mikrotitrskih plošč (Bio-Rad Model 3550 ali Bio-Tek ELx808).

3.4.3.5.2 Izračun koncentracije IL-8 v vzorcih

Na rezultate ELISA lahko vplivajo tudi pufer 3, v katerem so bile pripravljene razredčine standarda in gojišče DMEM^{genta}, v katerem so bili vzorci. Vrednosti optične gostote, izmerjene pri pufru 3, smo odšteli od vrednosti, dobljenih pri razredčinah standarda. Vrednosti optične gostote, dobljene pri DMEM^{genta}, pa smo odšteli od vrednosti dobljenih pri vzorcih.

Iz povprečnih vrednosti optične gostote, izmerjene pri standardih IL-8 znanih koncentracij, smo izrisali umeritveno premico in izračunali enačbo regresijske premice:

$$Y = a * X + b \quad \dots(6)$$

Y je optična gostota, izmerjena pri 450 nm, X je koncentracija IL-8 v pg/ml, a in b pa sta faktorja, ki ju na osnovi umeritvenih podatkov izračunamo s programom Excel.

Iz izmerjenih vrednosti optične gostote vzorcev in iz enačbe regresijske premice, smo izračunali koncentracijo IL-8 v vzorcih. Uporabili smo enačbo:

$$X = (Y - b) / a \text{ [pg IL-8 / ml]} \quad \dots(7)$$

Koncentracijo IL-8 smo podali v pg IL-8 na 10^6 celic Caco-2, izračunano po enačbi:

$$J \text{ [pg IL-8 / } 10^6 \text{ Caco-2]} = (X \text{ [pg IL-8 / ml]} / D \text{ [Caco-2 / ml]}) * 10^6 \quad \dots(8)$$

X je koncentracija IL-8 v vzorcu, izračunana z enačbo (7), D je prešteto število celic Caco-2 v 1 ml.

3.4.4 Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom in naknadno salmoneli oz. njuni mešanici

3.4.4.1 Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi *L. gasseri* LF221 ali *L. sakei* NCDO 2714 in naknadno *S. enteritidis* 857

Ugotavljali smo, če izpostavitev celic laktobacilom LF in NCDO pred izpostavitvijo salmoneli Se857 inhibira izražanje IL-8, ki ga v celicah spodbudi Se857. Z ustreznimi kontrolami smo želeli preveriti, če so za potencialno inhibicijo vzrok Hsp70.

Celice Caco-2 smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.4.3.1. Bakterijske kulture Se857, LF in NCDO smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.4.3.2. Potrebni volumen 2 uri stare kulture Se857 in 18 ur starih kultur LF in NCDO smo izračunali po enačbah (3) in (4) iz poglavja 3.4.3.2. Dejansko število Se857, ki smo jih imeli v poskusu je bilo 20 in 200 CFU/Caco-2. Dejansko število LF in NCDO v poskusu pa je bilo 200 CFU/Caco-2.

Celice Caco-2 smo izpostavili bakterijam in kontrolam po naslednji shemi:

1. izpostavitev celic Caco-2 (1h v CO ₂ inkubatorju)	3x spiranje ↓ inkubacija v CO ₂ inkubatorju		2. izpostavitev celic Caco-2 (1h v CO ₂ inkubatorju)	3x spiranje ↓ inkubacija v CO ₂ inkubatorju
20 LF oz. NCDO (CFU/Caco-2)	DMEM ^{genta} (22h)	DMEM (2h)	0 oz. 20 oz. 200 Se857 (CFU/Caco-2)	DMEM ^{genta} (24h)
200 LF oz. NCDO (CFU/Caco-2)	DMEM ^{genta} (22h)	DMEM (2h)	0 oz. 20 oz. 200 Se857 (CFU/Caco-2)	DMEM ^{genta} (24h)
DMEM, 37°C (neg. kontrola)	DMEM ^{genta} (22h)	DMEM (2h)	0 oz. 20 oz. 200 Se857 (CFU/Caco-2)	DMEM ^{genta} (24h)
DMEM, 42°C (poz. kontrola)	DMEM ^{genta} (22h)	DMEM (2h)	0 oz 20 oz 200 Se857 (CFU/Caco-2)	DMEM ^{genta} (24h)

Iz celic Caco-2 smo odsesali gojišče DMEM in dodali po 5 ml suspenzij LF oz. NCDO. Celice smo z laktobacili inkubirali 1 uro v CO₂ inkubatorju pri 37°C. Nato smo bakterijske suspenzije odsesali in celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in jih v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju pri 37°C 22 ur. Po 22 urah smo DMEM^{genta} sprali in ga zamenjali z gojiščem DMEM za 2 uri, nato pa zamenjali s 5 ml pripravljenih suspenzij Se857 oz. s svežim gojiščem DMEM za 1 uro. Po 1 uri smo celice 3-krat sprali z DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju pri 37°C 24 ur.

Kontrolne celice smo 1 uro inkubirali pri 37°C (negativna kontrola za Hsp70) oz. pri 42°C (pozitivna kontrola za Hsp70), kot je opisano v poglavju 3.4.1.1. Nato smo celice sprali z gojiščem DMEM^{genta} in jih prenesli v CO₂ inkubator za 4 ure. Po 4 urah smo DMEM^{genta} sprali in ga zamenjali z DMEM za 2 uri, nato pa zamenjali s 5 ml pripravljenih suspenzij Se857 oz. svežim gojiščem DMEM in nadaljevali postopek, kot je opisano zgoraj.

Po končani zadnji inkubaciji smo supernatante celic (DMEM^{genta} s celičnimi produkti) prenesli v centrifugirke in centrifugirali 10 minut (600 x g, 4°C). Morebitne usedline smo ločili od supernatantov in supernatante shranili pri -20°C za nadaljno merjenje koncentracij IL-8 (poglavlji 3.4.3.5.1 in 3.4.3.5.2). Celice smo tretirali, kot je opisano v postopku 3.4.1.2. Usedline celic smo shranili pri -20°C za nadaljne merjenje Hsp70 (poglavlja 3.4.1.3 do 3.4.1.6).

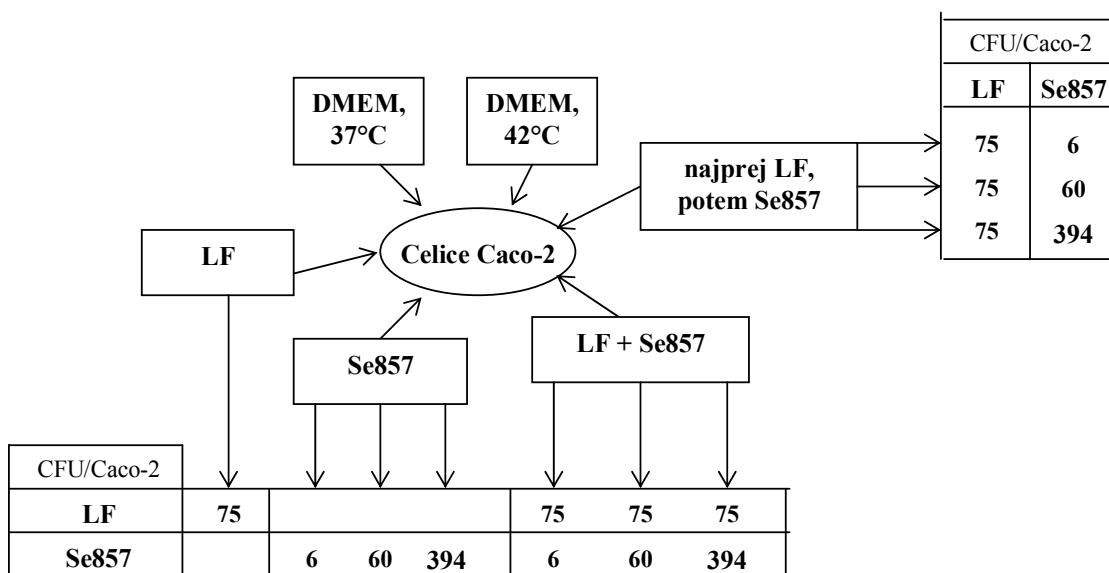
3.4.4.2 Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi *L. gasseri* LF221 ali *L. rhamnosus* BGT10 in naknadno *S. enteritidis* 857 oz. mešanici posameznih laktobacilov in salmonele

Ugotavljalci smo, če izpostavitev celic laktobacilom LF in T10 pred pred izpostavitvijo salmoneli Se857 oz. mešanici posameznih laktobacilov z Se857, inhibira izražanje IL-8, ki ga v celicah spodbudi Se857. Z ustreznimi kontrolami smo želeli preverili, če so za potencialno inhibicijo vzrok Hsp70.

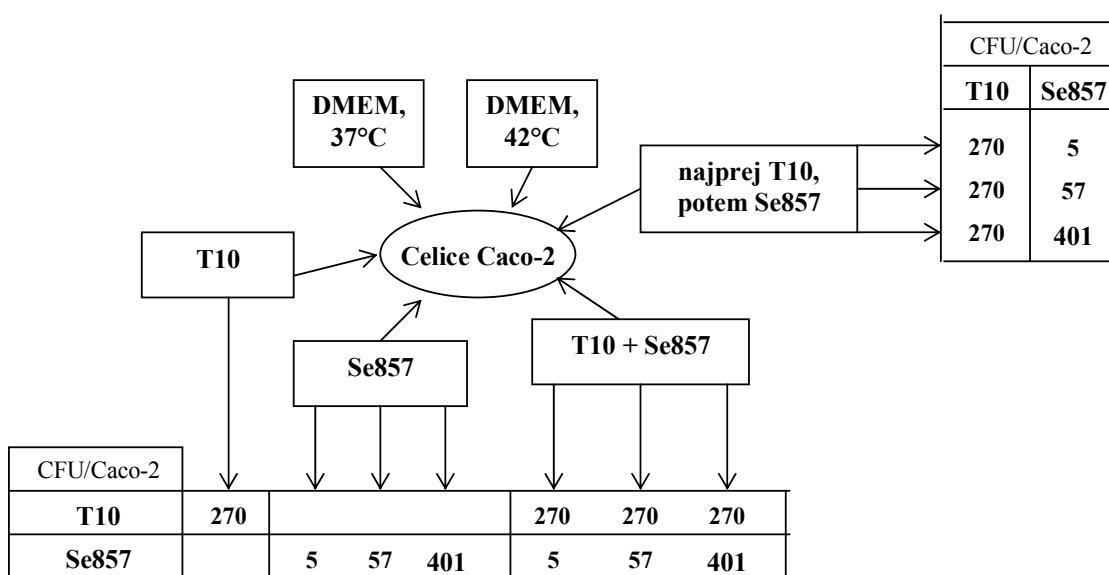
Celice Caco-2 smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.4.3.1. Bakterijske kulture Se857, LF in T10 smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.4.3.2. Potrebeni volumen 2 ur stare kulture Se857 in 18 ur starih kultur LF in T10 smo izračunali po enačbah (3) in (4) iz poglavja 3.4.3.2.

Dejansko število bakterij uporabljenih v poskusu je napisano v sledečih shemah. Negativno kontrolo za Hsp70 in IL-8 so predstavljale celice, ki smo jih inkubirali v gojišču DMEM pri 37°C, pozitivno kontrolo za Hsp70 pa celice, ki smo jih inkubirali v gojišču DMEM pri 42°C (kot je opisano v poglavju 3.4.1.1). Dodatno kontrolo za Hsp70 in IL-8 so predstavljale celice, ki so bile izpostavljene le laktobacilom LF oz. T10 in ne salmoneli.

Iz celic Caco-2 smo odsesali gojišče DMEM in celice izpostavili bakterijam oz. kontrolam, po naslednjih shemah:



in:



Celice, izpostavljene bakterijami oz. kontrolne celice, smo 1 uro inkubirali v CO₂ inkubatorju, razen celic, ki smo jih za 1 uro izpostavili temperaturi 42°C (inkubacija v vodni kopeli pri 42°C, poglavje 3.4.1.1). Nato smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in inkubirali v DMEM^{genta} v CO₂ inkubatorju pri 37°C 3 ure, 6 ur in 24 ur. Poskus smo izvedli v dveh paralelkah.

Pri izpostavitvi celic laktobacilom LF oz. T10 pred izpostavitvijo salmoneli Se857, smo celice najprej izpostavili laktobacilom za 1 uro, celice 3-krat sprali z DMEM, da smo odstranili nepripete laktobacile in nato za 1 uro nanesli Se857 ter sledili zgoraj opisanemu postopku.

Po končani inkubaciji smo supernatante celic (DMEM^{genta} s celičnimi produkti) prenesli v centrifugirke in centrifugirali 10 minut (600 x g, 4°C). Morebitne usedline smo ločili od supernatantov in supernatante shranili pri -20°C za kasnejše merjenje koncentracij IL-8 (poglavlji 3.4.3.5.1 in 3.4.3.5.2). Celice smo tretirali, kot je opisano v postopku 3.4.1.2. Usedline celic smo shranili pri -20°C za nadaljne merjenje Hsp70 poglavja (3.4.1.3 do 3.4.1.6).

3.4.5 Vpliv supernatantov laktobacilov (SCS) na sposobnost salmonele za indukcijo IL-8 v celicah Caco-2

3.4.5.1 Priprava koncentriranih supernatantov laktobacilov (SCS)

Laktobacile smo gojili kot je opisano v poglavju 3.3.2, le da smo po 18 urah rasti kulture centrifugirali 30 minut pri 10.000 x g (4°C), usedline zavrgli, supernatante (spent culture supernatant, SCS) pa filtrirali preko 0,22 µm filtra, da smo popolnoma odstranili bakterijske celice. SCS smo 2-krat koncentrirali z liofilizacijo (liofilizator Salm & Kipp).

3.4.5.2 Vpliv nizkih vrednosti pH in SCS na preživetje *S. enteritidis* 857

3.4.5.2.1 Vpliv gojišča MRS z znižanim pH na preživetje *S. enteritidis* 857

SCS vseh sevov laktobacilov so imeli zelo nizek pH in ker so bili pripravljeni v gojišču MRS, smo preverili preživetje Se857 v MRS z znižanim pH. Se857 smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.3.1. 2 uri staro kulturo Se857 smo alikvotirali in alikvote centrifugirali 10 minut ($3500 \times g$, $20^{\circ}C$) ter usedline resuspendirali v gojišču MRS, kateremu smo predhodno znižali pH s 37% HCl do vrednosti 4,6. Za kontrolo smo usedlino resuspendirali v gojišču LB (originalni pH = 7). Se857 smo v pripravkih MRS inkubirali 1 uro pri $37^{\circ}C$ in 200 rpm, nato pa centrifugirali 10 minut ($3500 \times g$, $20^{\circ}C$). Supernatante smo zavrgli, usedline pa resuspendirali v enakem volumnu PBS in ponovno centrifugirali. Usedline smo resuspendirali v enakem volumnu PBS ter pripravili primerne redčitve za štetje celic Se857.

3.4.5.2.2 Vpliv SCS z različnimi vrednostmi pH na preživetje Se857

Preverili smo preživetje Se857 v SCS laktobacilov. Uporabili smo SCS z nespremenjenim pH, pH = 5,8 in pH = 7,0. pH smo uravnivali s HCl oz. z NaOH. Za kontrolo smo uporabili gojišče LB (nespremenjeni pH = 7). Se857 smo pripravili in gojili enako, kot je opisano v poglavju 3.4.5.2.1, le da smo namesto MRS z znižanim pH uporabili omenjene SCS.

Morebitno inhibicijo, ki bi jo povzročili pripravki SCS smo preverili tudi z difuzijskim testom. Uporabili smo SCS z nespremenjenim pH, pH = 4,8 in pH = 7,0. pH smo uravnali z NaOH. Za kontrole smo uporabili gojišče LB (nespremenjeni pH = 7), 2-krat koncentrirano gojišče MRS (ker so tudi pripravki SCS 2-krat koncentrirani, kot je opisano v poglavju 3.4.5.1) z nespremenjenim pH = 6, ter s pH znižanim na 4,8 s HCl oz. z mlečno kislino. V LB agarske plošče smo naredili vdolbine s premerom 14 mm. V vdolbine smo dodali po 450 μ l (3 x 150 μ l) SCS pripravkov in pustili, da se vpijejo v agar. Med difundiranjem pripravkov v agar smo plošče inkubirali pri $50^{\circ}C$ in tako pospešili difuzijo. Po 500 μ l 2 uri stare kulture Se857 (približno 4-5 v 10^5 CFU/ml) smo vmešali v 4,5 ml gojišče LB, z dodanim 0,7% agarjem pri $45^{\circ}C$ in s tem prelili agarske plošče z vdolbinami. Tako pripravljene plošče smo inkubirali preko noči pri $37^{\circ}C$ in nato izmerili območje inhibicije.

3.4.5.3 Vpliv *S. enteritidis* 857, predhodno tretirane z SCS, na izražanje IL-8 v celicah Caco-2

Celice Caco-2 smo okužili z Se857, ki smo jo predhodno tretirali z SCS laktobacilov in ustreznimi kontrolami. Pripravili smo SCS sledečih bakterij: *L. gasseri* LF221 (SCS LF),

L. gasseri LF221 bac- (SCS LFbac-), *L. rhamnosus* BGT10 (SCS T10) in *L. sakei* NCDO 2714 (NCDO). Uporabili smo SCS pripravke z nespremenjenim pH, pH = 4,8 in pH = 7,0. pH smo uravnali z NaOH. Za kontrole smo uporabili gojišče LB (nespremenjeni pH = 7), 2-krat koncentrirano gojišče MRS z nespremenjenim pH, ter MRS z znižanim pH na 4,8 s HCl oz. z mlečno kislino.

V poskusu smo želeli imeti približno enako število Se857 (150 CFU/Caco-2) po vseh tretiranjih Se857 v različnih SCS in kontrolah. Zato smo 2 uri staro kulturo Se857 (3.3.1) razdelili na različne volumne in centrifugirali 10 minut (3500 x g, 20°C). Za velikost volumna smo se odločili glede na rezultate predhodnih testov preživetja Se857 v gojišču MRS z znižanim pH in v SCS. Volumni kulture Se857 za tretiranje v pripravkih s pH = 4,8 so bili ustrezno večji od volumnov kulture Se857 za tretiranje v pripravkih s pH = 7. Usedline smo resuspendirali v enakih volumnih SCS in kontrol ter inkubirali 1 uro pri 37°C in 200 rpm. Nato smo tretirane celice Se857 centrifugirali 10 minut (3500 x g, 20°C). Supernatante smo zavrgli, usedline pa resuspendirali v enakem volumnu PBS in ponovno centrifugirali. Usedline pa resuspendirali v enakih volumnih DMEM in pripravili različne redčitve Se857 v DMEM. V poskusu smo želeli imeti Se857 v koncentraciji 1-2, 15 in 150 CFU/Caco-2. Dejansko število Se857 v poskusu je bilo: 2, 15 in 146 CFU/Caco-2.

Celice Caco-2 smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.4.3.1. Iz celic Caco-2 smo odsesali gojišče DMEM, dodali pripravljene suspenzije predhodno tretiranih bakterij Se857 in celice inkubirali 1 uro v CO₂ inkubatorju pri 37°C. Negativno kontrolo so predstavljale celice, ki niso bile izpostavljene salmoneli. Poskus smo opravili v dveh paralelkah.

Po 1 uri inkubacije celic Caco-2 z bakterijami, smo bakterije odstranili z odsesavanjem in celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in nato v DMEM^{genta} celice inkubirali v CO₂ inkubatorju pri 37°C 6 ur in 24 ur. Po inkubaciji smo supernatante celic (DMEM^{genta} s celičnimi produkti) prenesli v centrifugirke in centrifugirali 10 minut (600 x g, 4°C). Morebitne usedline smo ločili od supernatantov in supernatante shranili pri -20°C za kasnejše meritve koncentracij IL-8. Celotni postopek je podrobneje opisan v poglavju 3.4.3.3.

3.4.6 Vpliv bakterij na transepitelno električno upornost (TEER) celic Caco-2

Da bi ugotovili učinek bakterij na integriteto celic Caco-2, smo celice gojili v 12-luknjičastih ploščah na filterskih vstavkih (poglavji 3.2.3 in 3.4.3.1).

3.4.6.1 Merjenje TEER

Integriteto oz. transepitelno električno upornost (TEER) celic, ki so rasle na poroznem filtru smo merili z Millicell-ERS Volt/Ohm metrom (Millipore), in pripadajočim parom elektrod (slika 7). Eno elektrodo smo pomagali v gojišče nad filtrom s plastjo celic, drugo pa v gojišče v predel pod filtrom, ter merili upornost celične plasti oz. razliko v napetosti med apikalno (zgornjo) in bazolateralno (spodnjo) površino celic. TEER praznega filtra smo odsteli od TEER plasti celic kot prikazuje enačba (9):

$$R [\Omega \text{ cm}^2] = (R_v - R_f) [\Omega] * P [\text{cm}^2] \quad \dots(9)$$

R je upornost plasti celic, R_v je upornost plasti celic in filtra, R_f je upornost praznega filtra (brez celic) in P je površina filtra.



Slika 7: **Merjenje transepitelne električne upornosti (TEER) celic Caco-2.** (A): TEER celic smo merili z Volt/Ohm metrom in pripradajočim parom elektrod. (B): Eno elektrodo smo pomagali v gojišče nad filtrom (1) s plastjo celic, drugo pa v gojišče v predel pod filtrom (2).

Figure 7: **Measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) of Caco-2 cell monolayer.** (A): We measured the TEER of cell monolayer using Volt/Ohm meter and belonging pair of electrodes. (B): One electrode we immersed into the medium in the compartment above filter (1) covered with cell monolayer and the other electrode in the compartment below filter (2).

3.4.6.2 Vpliv starosti celic Caco-2 na TEER

Celice smo gojili v 12-luknjičastih ploščah na filtrskih vstavkih (opisano v poglavju 3.2.3). TEER smo merili od nasaditve celic do 19. dne starosti celic Caco-2. 6 ur pred merjenjem TEER, smo celicam zamenjali gojišče pod in nad filtrom. 30 minut pred vsakim merjenjem smo plošče postavili iz CO₂ inkubatorja (37°C), da se je temperatura ustalila na sobno temperaturo. Poskus smo izvedli v treh ponovitvah s po 12 paralelkami.

3.4.6.3 Vpliv različnega števila posameznih bakterij na TEER celic Caco-2

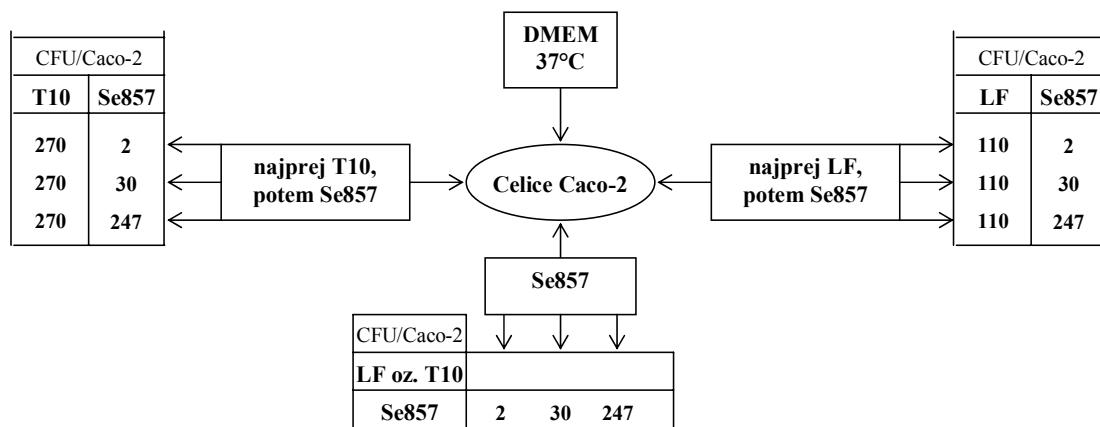
Celice smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.4.3.1, le da smo jih gojili v 12-luknjičastih ploščah na filtrskih vstavkih. Bakterijske kulture Se857, LF in T10 smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.4.3.2. Celice smo želeli izpostaviti posameznim bakterijam v koncentraciji: 2, 20 in 200 CFU/Caco-2. Dejanske koncentracije bakterij pa so bile: Se857: 4, 39 in 325 CFU/Caco-2, LF: 1, 7 in 129 CFU/Caco-2 in T10: 2, 24 in 197 CFU/Caco-2.

Gojišče DMEM smo odsesali iz predela pod filtrom in iz celic na filtru. Celice smo izpostavili bakterijskim suspenzijam tako, da smo bakterije nanesli nad filter, pod filter pa smo dodali gojišče DMEM. Celice, izpostavljene bakterijam, smo inkubirali 1 uro v CO₂ inkubatorju. Po inkubaciji smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} (pod in nad filtrom) in jih inkubirali v CO₂ inkubatorju pri 37°C. TEER smo merili 2, 4, 6, 8, 12, 24 in 48 ur po izpostavitvi celic posameznim bakterijam. 30 minut pred vsakim merjenjem smo plošče postavili iz inkubatorja, da se je temperatura ustalila na sobno temperaturo. Negativno kontrolo so predstavljale celice Caco-2, ki niso bile izpostavljene bakterijam. Poskus smo opravili v dveh paralelkah. TEER vrednosti plasti celic, ki so bile izpostavljene bakterijam, smo relativno primerjali s TEER vrednostjo negativne kontrole.

3.4.6.4 Vpliv laktobacilov na TEER celic Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom in naknadno salmoneli

Ugotavljalci smo vpliv laktobacilov LF in T10 na sposobnost Se857 za znižanje TEER celic Caco-2 tako, da smo celice najprej izpostavili laktobacilom in jih po spiranju nepripetih laktobacilov izpostavili še Se857. Dejansko število bakterij uporabljenih v poskusu je napisano v sledečih shemah.

Poskus smo izvedli enako, kot je opisano v poglavju 3.4.6.3, le da smo celice izpostavili bakterijam in kontroli po naslednji shemi:



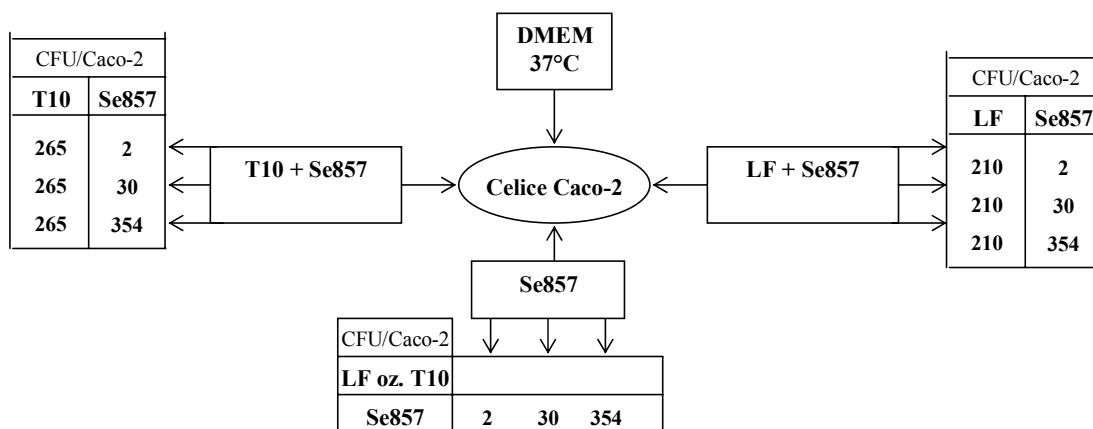
Celice smo najprej izpostavili laktobacilom za 1 uro, celice 3-krat sprali z DMEM, da smo odstranili nepripete laktobacile in nato za 1 uro nanesli še Se857 ter sledili postopku opisanemu v poglavju 3.4.6.3.

Negativno kontrolo so predstavljale celice, ki niso bile izpostavljene bakterijam (gojišče DMEM). Poskus smo opravili v dveh paralelkah. TEER vrednosti celic, ki so bile izpostavljene bakterijam, smo relativno primerjali s TEER vrednostjo negativne kontrole.

3.4.6.5 Vpliv laktobacilov na TEER celic Caco-2 po izpostavitvi mešanici laktobacilov in salmonele

Ugotavljalci smo vpliv laktobacilov na sposobnost Se857 za znižanje TEER celic Caco-2 tako, da smo celice izpostavili laktobacilom LF ali T10 hkrati s salmonelo Se857. Dejansko število bakterij uporabljenih v poskusu je napisano v sledečih shemah.

Poskus smo izvedli enako, kot je opisano v poglavju 3.4.6.3, le da smo celice izpostavili bakterijam in kontroli po naslednji shemi:



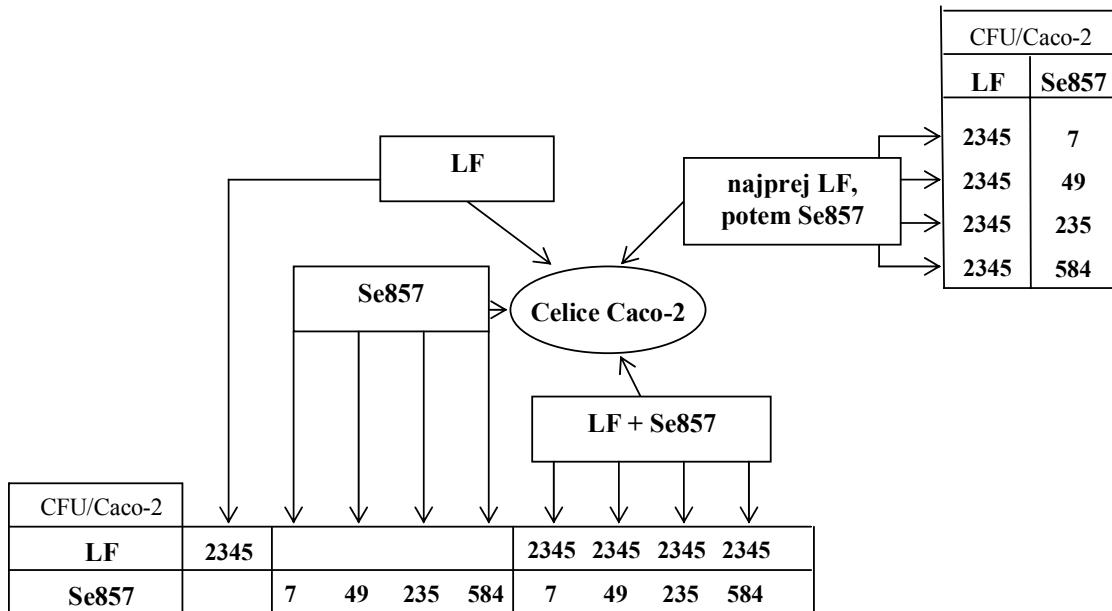
Negativno kontrolo so predstavljale celice, ki niso bile izpostavljene bakterijam (gojišče DMEM). Poskus smo opravili v dveh paralelkah. TEER vrednosti celic, ki so bile izpostavljene bakterijam, smo relativno primerjali s TEER vrednostjo negativne kontrole.

3.4.7 Vpliv laktobacilov na adhezijo in invazijo salmonele na oz. v celice Caco-2

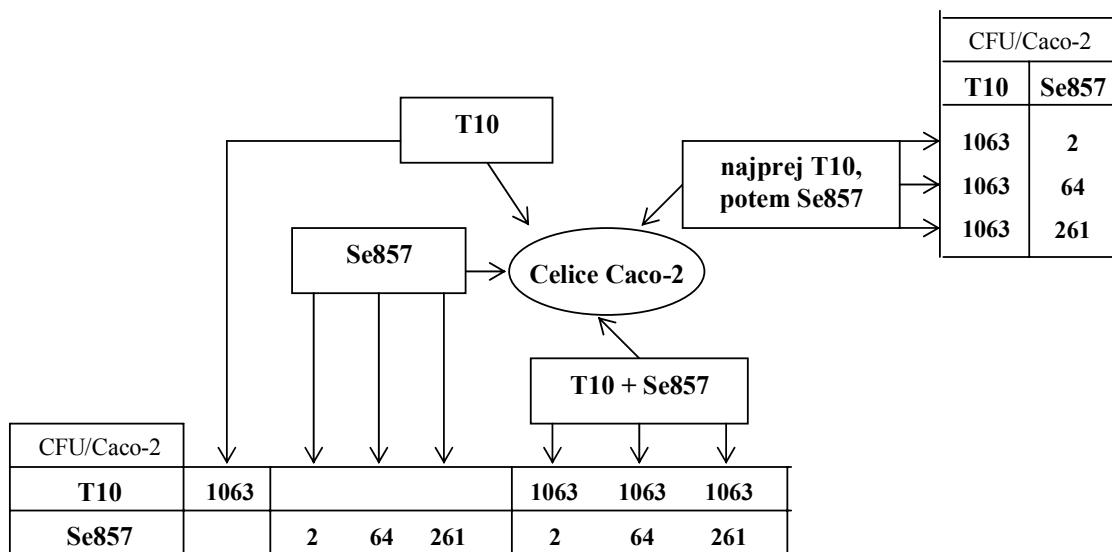
Spremljali smo adhezijo (pripenjanje) in invazijo (vstopanje) salmonele Se857 na oz. v celice Caco-2. Preverili smo, če laktobacili LF in T10 ovirajo salmonelo pri adheziji oz. invaziji. Koncentracijo laktobacilov smo izbrali takšno, da so laktobacili lahko zasedli vsa ustrezna adhezijska mesta na celicah Caco-2. Koncentracijo LF smo izbrali glede na podatke, ki so jih predstavili Bogovič Matijašič in sod. (2003), za T10 pa smo najprej preverili adhezijo pri različnih koncentracijah T10 (CFU/Caco-2) in nato pripravili ustrezno število T10 za poskuse z Se857.

Celice smo gojili v 24-luknjičastih ploščah, pripravili smo jih kot je opisano v poglavju 3.4.3.1. Bakterije smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.4.3.2.

Iz celic Caco-2 smo odsesali gojišče DMEM in celice za 1 uro (v CO₂ inkubatorju) izpostavili bakterijam po naslednjih shemah:



in:



Pri izpostavitvi celic laktobacilom LF oz. T10 pred izpostavitvijo Se857, smo celice najprej izpostavili laktobacilom za 1 uro, celice 3-krat sprali z DMEM, da smo odstranili nepripete laktobacile in nato za 1 uro nanesli Se857.

Za ugotavljanje adhezije, smo celice na katerih smo šteli pripete bakterije Se857 3-krat sprali z 0,01 mol/l PBS, nato pa za 10 minut izpostavili 0,05 % Tritonu X-100. Ta je povzročil lizo celic Caco-2, ne pa lize bakterij. Mešanico liziranih celic in bakterij smo razmazali na trdno gojišče LB (za štetje kolonij Se857) in prelili z agarjem MRS (za štetje kolonij laktobacilov), kot je opisano v poglavjih 3.3.1 in 3.3.2 ter inkubirali pri 37°C.

Za ugotavljanje invazije, smo celice v katerih smo šteli bakterije Se857 ki so vstopile v Caco-2 3-krat sprali z 0,01 mol/l PBS, 3 ure inkubirali v prisotnosti DMEM^{genta} (koncentracija gentamicina 200 µg/ml) v CO₂ inkubatorju in nato 3-krat sprali z 0,01 mol/l PBS, ter za 10 minut izpostavili 0,05 % Tritonu X-100.

Za vsak vzorec smo pripravili 5-8 paralelk. Različne koncentracije Se857 smo testirali v ločenih poskusih, koncentracijo laktobacilov smo vsakič pripravili enako.

3.4.8 Statistična analiza rezultatov

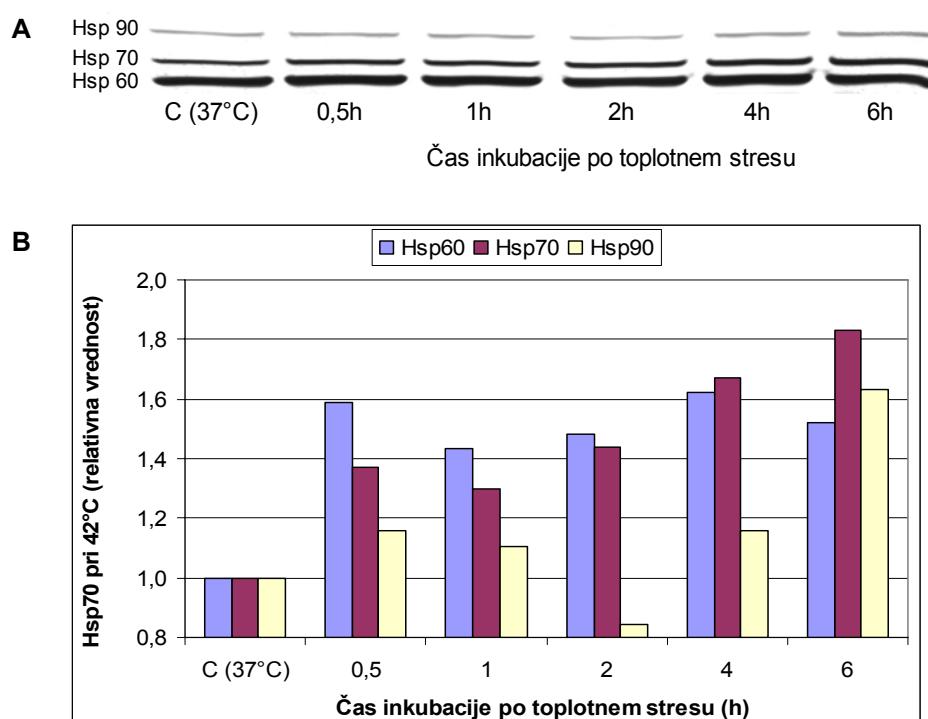
Za statistično analizo podatkov smo uporabili programski paket SPSS 13.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA). Podatke smo primerjali z enosmernim testom za analizo varianc (ANOVA), kateremu je sledil post hoc test Tukey HSD test multiplih primerjav. Meja statistične značilnosti je bila pri $p < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 VPLIV VISOKE TEMPERATURE NA IZRAŽANJE PROTEINOV TOPLOTNEGA STRESA V CELICAH CACO-2

4.1.1 Stopnja sinteze proteinov topotnega stresa 60 (Hsp60), 70 (Hsp70) in 90 (Hsp90) v celicah Caco-2 po izpostavitvi temperaturi 42°C

Preverili smo, če v celicah Caco-2 lahko spodbudimo in zaznamo proteine topotnega stresa Hsp60, Hsp70 in Hsp90. Celice smo za 1 uro izpostavili topotnemu stresu pri 42°C in ob različnih časih po stresu spremljali količino Hsp.



Slika 8: Izražanje Hsp60, Hsp70 in Hsp90 v celicah Caco-2, po izpostavitvi temperaturi 42°C. (A): Prikaz lis Hps na membrani PVDF. (B): Kvantitativne vrednosti Hps na grafikonu. Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili temperaturi 42°C in nato inkubirali v CO₂ inkubatorju: 0,5h, 1h, 2h, 4h in 6h. Kontrolne celice (C) smo izpostavili temperaturi 37°C in jih inkubirali v CO₂ inkubatorju 6h. V celicah smo merili koncentracijo proteinov, ločili proteine z NaDS-PAGE, jih prenesli iz gela na membrano in z imunodetekcijo dokazovali Hsp60, Hsp70 in Hsp90. Kvantitativne vrednosti smo ugotovljali z denzitometrom.

Figure 8: Expression of Hsp60, Hsp70 and Hsp90 in Caco-2 cells after exposure to heat shock at 42°C. (A): Hps bands on PVDF membrane. (B): Quantitative values of Hps on the diagram. Caco-2 cells were exposed to 42°C for 1h and then incubated in CO₂ incubator for: 0,5h, 1h, 2h, 4h and 6h. Control cells (C) were exposed to 37°C and incubated in CO₂ incubator for 6h. Subsequently cell proteins were determined, separated by SDS-PAGE and transferred from gel to membrane. Hsp60, Hsp70 and Hsp90 were determined by immunodetection. Quantitative values were determined using densitometer.

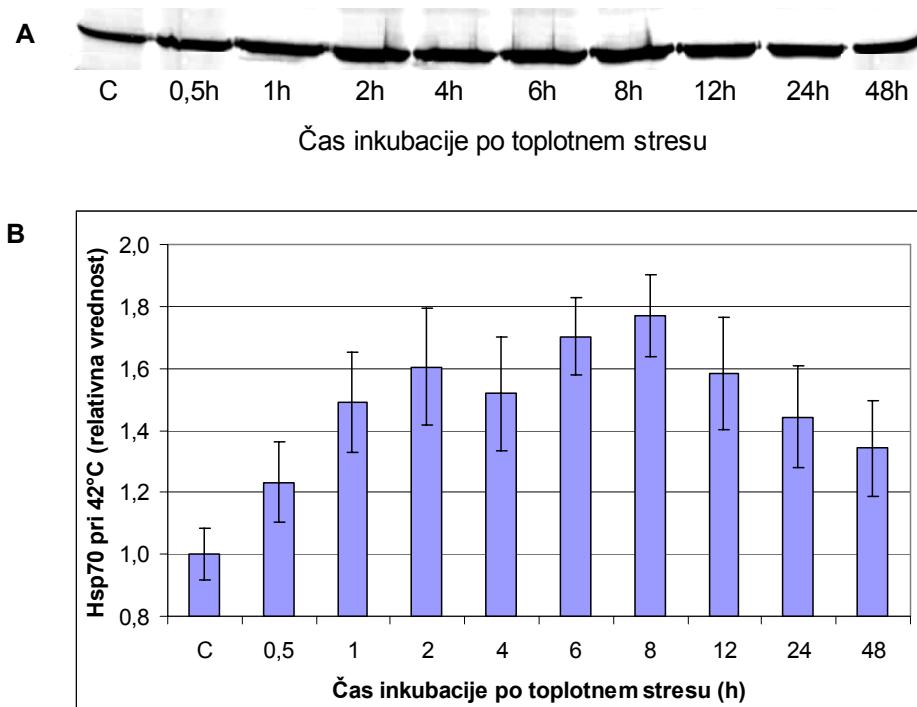
Slika 8 kaže, da je izpostavitev celic Caco-2 temperaturi 42°C v splošnem vplivala na povečanje količine proteinov toplotnega stresa Hsp60, Hsp70 in Hsp90 v primerjavi s konstitutivnim nivojem v kontrolnih celicah. Razen 2 uri po stresu, kjer ni bilo videti povečane koncentracije Hsp90. Glede na preliminarne poskuse predvidevamo, da je bila temu vzrok eksperimentalna napaka.

Že pol ure po stresu so celice Caco-2 sintetizirale povečano količino vseh Hsp, sicer pa je bil časovni trend nastajanja različnih Hsp različen (Slika 8B). Med vsemi Hsp je bila količina Hsp60 največja (slika 8A). Največ Hsp60 smo detektirali 4 ure po toplotnem stresu. Naslednji po intenzivnosti lis je bil Hsp70. Količina Hsp70 je od 0,5 do 1 ure po stresu padla, potem pa se je s časom do 6 ur povečevala. Hsp90 je bil količinsko najmanj zastopan. Količina Hsp90 je od 0,5 do 2 ur po stresu padala, potem pa se je s časom do 6 ur povečevala.

Ker je naraščanje koncentracije proteinov najlepše vidno pri Hsp70 in ker je ta protein v celicah Caco-2 vedno inducibilen, smo v nadaljnjih poskusih spremljali le izražanje Hsp70.

4.1.2 Časovni potek sinteze proteinov topotnega stresa 70 (Hsp70) v celicah Caco-2 po izpostavitvi temperaturi 42°C

Spremljali smo časovni potek sinteze Hsp70 v celicah Caco-2 po izpostavitvi temperaturi 42°C za 1 uro.



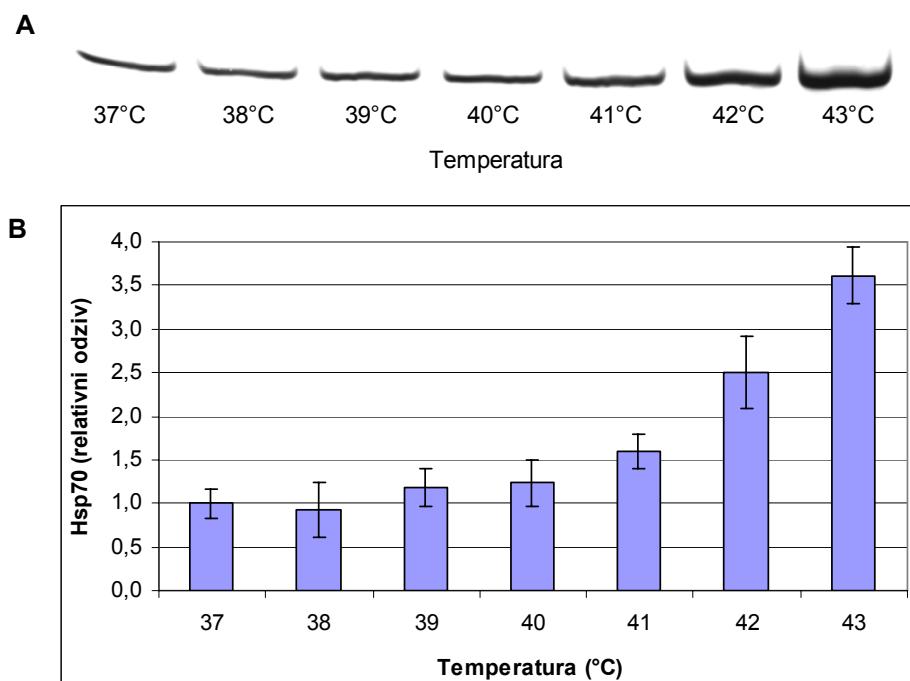
Slika 9: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2, po izpostavitvi temperaturi 42°C. (A): Prikaz lis Hsp70 na membrani PVDF. (B): Kvantitativne vrednosti Hsp70 na grafikonu. Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili temperaturi 42°C in nato inkubirali v CO₂ inkubatorju: 0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h in 48h. Kontrolne celice (C) smo izpostavili temperaturi 37°C in jih inkubirali v CO₂ inkubatorju 6h. V celicah smo merili koncentracijo proteinov, ločili proteine z NaDS-PAGE, jih prenesli iz gela na membrano in z imunodetekcijo dokazovali Hsp70. Kvantitativne vrednosti smo ugotavljali z denzitometrom.

Figure 9: Expression of Hsp70 in Caco-2 cells after exposure to heat shock (42°C). (A): Hsp70 bands on PVDF membrane. (B): Quantitative values of Hsp70 on the diagram. Caco-2 cells were exposed to 42°C for 1h and then incubated in CO₂ incubator for: 0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h and 48h. Control cells (C) were exposed to 37°C and incubated in CO₂ incubator for 6h. Subsequently cell proteins were determined, separated by SDS-PAGE and transferred from gel to membrane. Hsp70 were determined by immunodetection. Quantitative values were determined using densitometer.

Slika 9 kaže, da se je v primerjavi s konstututivno koncentracijo v kontrolnih celicah, koncentracija Hsp70 do 8 ur po topotnem stresu povečevala, z izjemo pri 4 urah. Od 8 do 48 ur po stresu pa je koncentracija Hsp70 padala, vendar je bila tudi 48 ur po stresu še vedno višja kot konstututivni nivo. Predvidevamo, da je bila za padec koncentracije Hsp70 pri 4 urah vzrok eksperimentalna napaka.

4.2 VPLIV RAZLIČNIH TEMPERATUR NA IZRAŽANJE HSP70 V CELICAH CACO-2

Vpliv različnih temperatur na izražanje Hsp70 v celicah Caco-2 smo ugotavljali tako, da smo celice za 1 uro izpostavili temperaturam od 37°C do 43°C, nato pa smo celice inkubirali v CO₂ inkubatorju pri 37°C. Količino Hsp70 smo merili 6 ur po izpostavitvi celic različnim temperaturam.



Slika 10: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2, po izpostavitvi naraščajočim temperaturam. (A): Prikaz lis Hsp70 na membrani PVDF. (B): Kvantitativne vrednosti Hsp70 na grafikonu. Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili različnim temperaturam in nato inkubirali v CO₂ inkubatorju 6h. Kontrolne celice smo izpostavili temperaturi 37°C pri enakih pogojih. V celicah smo merili koncentracijo proteinov, ločili proteine z NaDS-PAGE, jih prenesli iz gela na membrano in z imunodetekcijo dokazovali Hsp70. Kvantitativne vrednosti smo ugotavljali z denzitometrom.

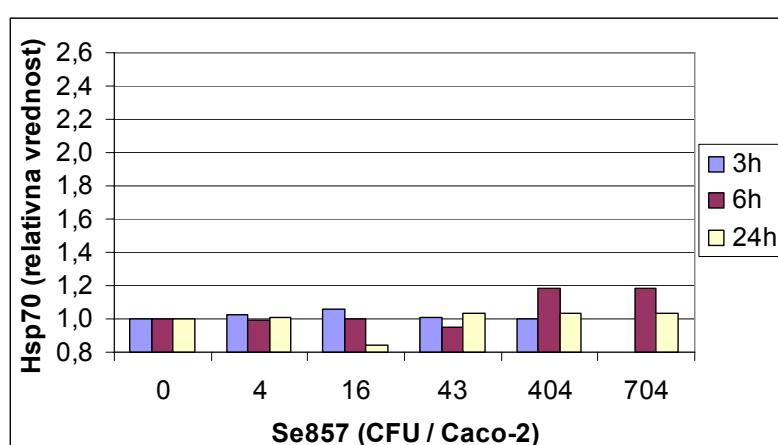
Figure 10: Expression of Hsp70 in Caco-2 cells after exposure to increasing temperatures. (A): Hsp70 bands on PVDF membrane. (B) Quantitative values of hsp70 on the diagram. Caco-2 cells were exposed to different temperatures for 1h and then incubated in CO₂ incubator for 6h. Control cells were exposed to 37°C in the same conditions. Subsequently cell proteins were determined, separated by SDS-PAGE and transferred from gel to membrane. Hsp70 were determined by immunodetection. Quantitative values were determined using densitometer.

Z višanjem temperature, se je povečevala tudi koncentracija Hsp70 v celicah Caco-2 (slika 10). Trend naraščanja koncentracije Hsp70 je bil podoben eksponencialni funkciji. Glede na rezultate smo se odločili, da pri nadalnjih poskusih za pozitivno kontrolo Hsp70 upoštevamo indukcijo Hsp70 6 ur po 1-urni izpostavitvi celic Caco-2 temperaturi 42°C.

4.3 VPLIV RAZLIČNEGA ŠTEVILA BAKTERIJ NA IZRAŽANJE HSP70 IN IL-8 V CELICAH CACO-2

Zanimal nas je vpliv določenih sevov bakterij na izražanje Hsp70 in IL-8 v celicah Caco-2 ter če pri tem prihaja do razlik med sevi. Uporabili smo sev invazivne salmonele *S. enteritidis* 857 (Se857) in tri vrste laktobacilov: *L. gasseri* LF221 (LF), *L. rhamnosus* BGT10 (T10) in *L. sakei* NCDO 2714 (NCDO). Celice Caco-2 smo izpostavili različnim številom posameznih bakterij za 1 uro. Koncentracijo Hsp70 in IL-8, ki so jih izdelale celice Caco-2 smo spremljali po različnih časih od izpostavitve celic bakterijam.

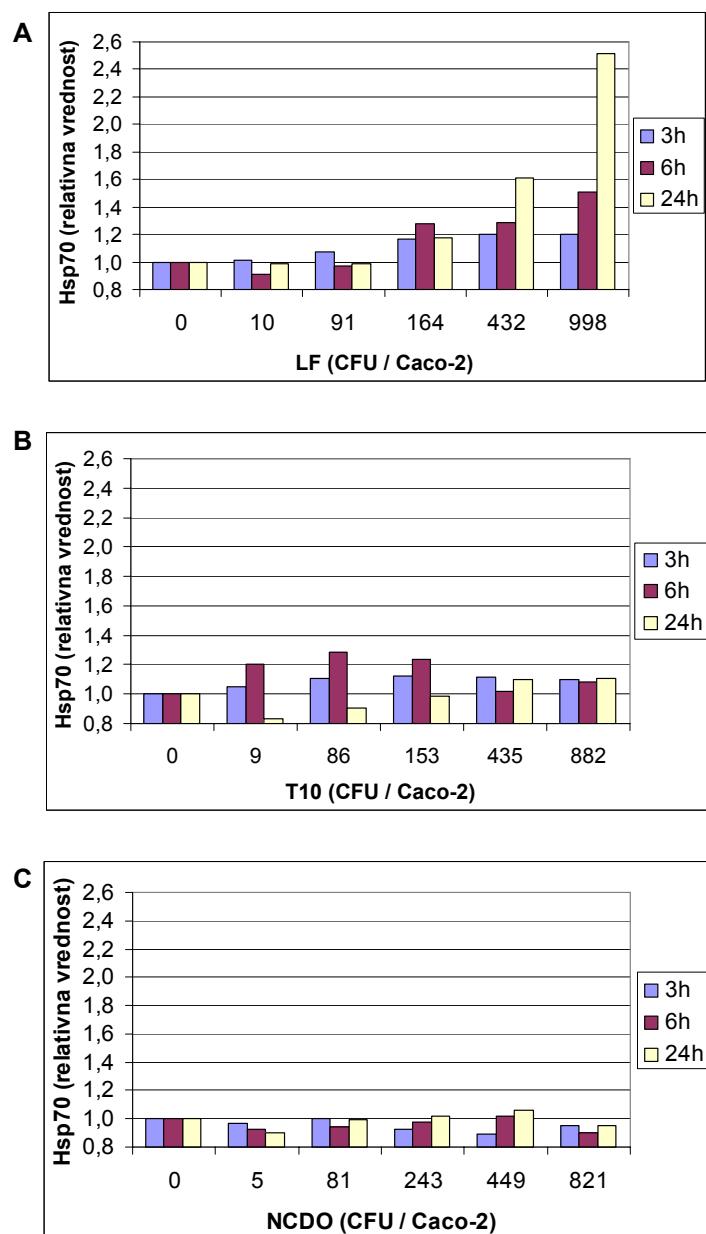
4.3.1 Vpliv različnega števila bakterij na izražanje Hsp70 v celicah Caco-2



Slika 11: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2 v odvisnosti od števila bakterij *Salmonella enteritidis* 857. Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili različnim številom *S. enteritidis* 857 (Se857), jih nato 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju 3h, 6h in 24h. Kontrolne celice niso bile izpostavljene Se857. V celicah smo merili koncentracijo proteinov, ločili proteine z NaDS-PAGE, jih prenesli iz gela na membrano in z imunodetekcijo dokazovali Hsp70. Kvantitativne vrednosti smo ugotovljali z denzitometrom.

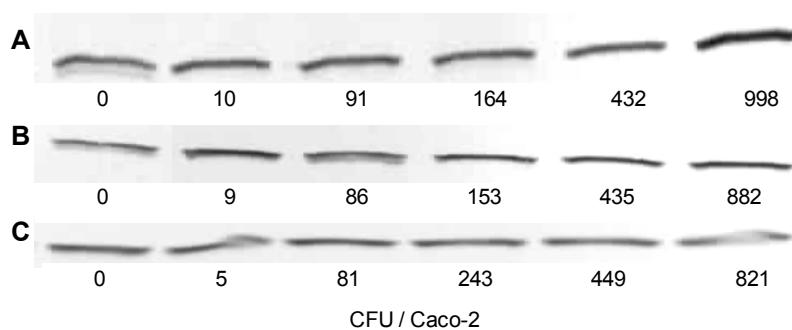
Figure 11: Expression of Hsp70 in Caco-2 cells dependent on number of *Salmonella enteritidis* 857. Caco-2 cells were exposed to different numbers of *S. enteritidis* 857 (Se857) for 1h then washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator for 3h, 6h and 24h. Control cells were not exposed to Se857. Subsequently cell proteins were determined, separated by SDS-PAGE and transferred from gel to membrane. Hsp70 were determined by immunodetection. Quantitative values were determined using densitometer.

6 ur po 1-urni inkubaciji celic Caco-2 v prisotnosti Se857, se je koncentracija Hsp70 v primerjavi s konstitutivno koncentracijo v kontrolnih celicah (0 CFU/Caco-2), povečala le pri izpostavitvi celic Se857 v koncentraciji 404 in 704 CFU/Caco-2. 3 ure in 24 ur po izpostavitvi celic Se857, se koncentracija Hsp70 v primerjavi s konstitutivno koncentracijo skoraj ni povečala (slika 11, priloga A).



Slika 12: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2 v odvisnosti od števila laktobacilov. (A): *Lactobacillus gasseri* LF221 (LF), (B): *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 (T10) in (C): *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 (NCDO). Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili različnemu številu laktobacilov, jih nato 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju 3h, 6h in 24h. Kontrolne celice niso bile izpostavljene laktobacigom. V celicah smo merili koncentracijo proteinov, ločili proteine z NaDS-PAGE, jih prenesli iz gela na membrano in z imunodetekcijo dokazovali Hsp70. Kvantitativne vrednosti smo ugotovljali z denzitometrom.

Figure 12: Expression of Hsp70 in Caco-2 cells dependent on number of lactobacilli. (A): *Lactobacillus gasseri* LF221 (LF), (B): *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 (T10) and (C): *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 (NCDO). Caco-2 cells were exposed to different numbers of lactobacilli for 1h then washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator for 3h, 6h and 24h. Control cells were not exposed to lactobacilli. Subsequently cell proteins were determined, separated by SDS-PAGE and transferred from gel to membrane. Hsp70 were determined by immunodetection. Quantitative values were determined using densitometer.

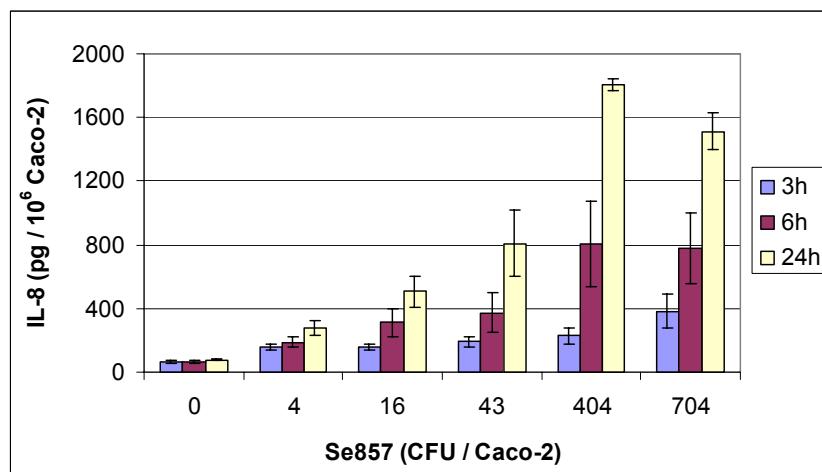


Slika 13: Primer membran z lisami Hsp70, 6h po inkubaciji celic Caco-2 z različnim številom laktobacilov. (A): *Lactobacillus gasseri* LF221 (LF), (B): *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 (T10) in (C): *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 (NCDO). V celicah Caco-2 smo merili koncentracijo proteinov, ločili proteine z NaDS-PAGE in jih prenesli iz gela na membrano, kjer smo z imunodetekcijo dokazovali Hsp70.

Figure 13: Example of Hsp70 bands on membrane, 6h after exposure of Caco-2 cells to different numbers of lactobacilli. (A): *Lactobacillus gasseri* LF221 (LF), (B): *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 (T10) and (C): *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 (NCDO). Proteines from Caco-2 cells were determined, then separated by SDS-PAGE and transferred from gel to membrane, where Hsp70 were determined by immunodetection.

Laktobacili *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 so v določenih koncentracijah v celicah Caco-2 inducirali Hsp70 v primerjavi s konstitutivnim nivojem, medtem ko laktobacili *L. sakei* NCDO 2714 niso imeli takšnega vpliva (sliki 12 in 13, priloga A). Le pri izpostavitvi celic Caco-2 laktobacilom *L. gasseri* LF221, se je koncentracija Hsp70 povečevala z večanjem števila laktobacilov in raven Hsp70 je bila povečana ob vseh časih po izpostavitvi celic temu sevu laktobacilov (sliki 12A in 13A, priloga A). 3 ure po 1-urni inkubaciji celic z *L. rhamnosus* BGT10 je bila indukcija Hsp70 približno enaka pri vseh koncentracijah T10, po 6 urah je bila indukcija Hsp70 povečana predvsem pri izpostavitvi celic Caco-2 *L. rhamnosus* BGT10 v koncentracijah 9, 86 in 153 CFU/Caco-2, po 24 urah pa je bila raven Hsp70 minimalno povečana le pri izpostavitvi celic temu sevu v koncentracijah 435 in 882 CFU/Caco-2 (slika 12B, priloga A).

4.3.2 Vpliv različnega števila bakterij na izražanje IL-8 v celicah Caco-2

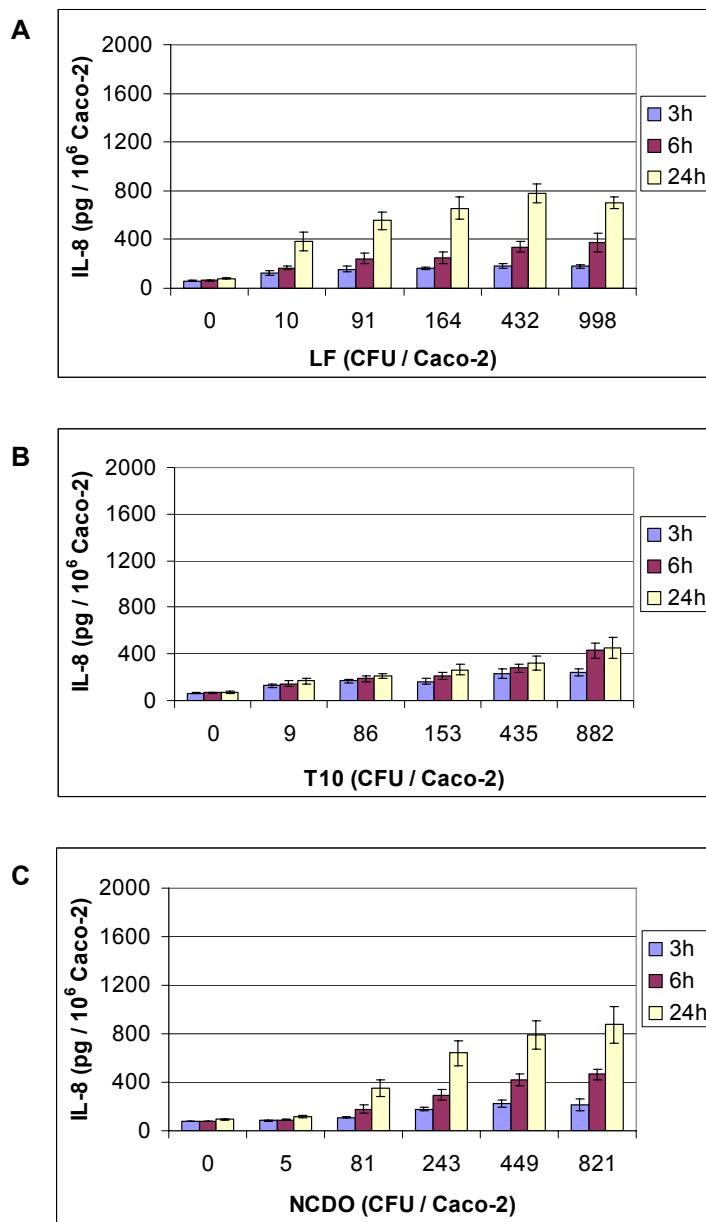


Slika 14: Izražanje IL-8 v celicah Caco-2 v odvisnosti od števila bakterij *Salmonella enteritidis* 857. Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili različnim štrvilom *S. enteritidis* 857 (Se857), jih nato 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju 3h, 6h in 24h. Kontrolne celice niso bile izpostavljene Se857. Koncentracijo IL-8 v celicah smo merili z metodo ELISA.

Figure 14: Expression of IL-8 in Caco-2 cells dependent on different number of *Salmonella enteritidis* 857. Caco-2 cells were exposed to different numbers of *S. enteritidis* 857 (Se857) for 1h then washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator for 3h, 6h and 24h. Control cells were not exposed to Se857. IL-8 levels were determined using ELISA.

6 in 24 ur po 1-urni inkubaciji celic Caco-2 z Se857, se je z večanjem števila Se857 do 404 CFU/Caco-2 tudi koncentracija IL-8 povečevala v primerjavi s konstitutivno koncentracijo v kontrolnih celicah (0 CFU/Caco-2). Pri izpostavitvi celic Se857 v koncentraciji 704 CFU/Caco-2 je koncentracija IL-8 padla v primerjavi s 404 CFU/Caco-2. 3 ure po inkubaciji celic z Se857, pa se je koncentracija IL-8 povečevala do največje uporabljene koncentracije salmonele, 704 CFU/Caco-2. Koncentracija IL-8 se je povečevala s časom po inkubaciji celic Caco-2 z Se857 pri vseh uporabljenih koncentracijah salmonele (slika 14, priloga B).

3 ure in 6 ur po izpostavitvi celic Se857, se je v primerjavi s konstitutivno koncentracijo v kontrolnih celicah, koncentracija IL-8 statistično značilno povečala ($p<0,05$) pri izpostavitvi celic Se857 v koncentracijah 404 in 704 CFU/Caco-2. Med različnimi koncentracijami Se857 večinoma ni bilo statistično značilnih razlik v indukciji IL-8 v celicah Caco-2. 24 ur po izpostavitvi celic Se857, pa se je v primerjavi s konstitutivno koncentracijo v kontrolnih celicah, koncentracija IL-8 statistično značilno povečala ($p<0,05$) pri vseh koncentracijah Se857, razen pri 4 CFU/Caco-2. Se857 je v različnih koncentracijah statistično značilno različno inducirala IL-8 v celicah Caco-2 ($p<0,05$) (priloga C).



Slika 15: Izražanje IL-8 v celicah Caco-2 v odvisnosti od števila laktobacilov. (A): *Lactobacillus gasseri* LF221 (LF), (B): *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 (T10) in (C): *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 (NCDO). Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili različnim številom laktobacilov, jih nato 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju 3h, 6h in 24h. Kontrolne celice niso bile izpostavljeni laktobacilom. Koncentracijo IL-8 v celicah smo merili z metodo ELISA.

Figure 15: Expression of IL-8 in Caco-2 cells dependent on number of lactobacilli. (A): *Lactobacillus gasseri* LF221 (LF), (B): *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 (T10) and (C): *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 (NCDO). Caco-2 cells were exposed to different number of lactobacilli for 1h then washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator for 3h, 6h and 24h. Control cells were not exposed to lactobacilli. IL-8 levels were determined using ELISA.

Pri vseh časih po izpostavitvi celic Caco-2 posameznim laktobacilom, se je v primerjavi s konstitutivno koncentracijo v kontrolnih celicah, koncentracija IL-8 v večini primerov statistično značilno ($p<0,05$) povečevala s številom laktobacilov (slika 15, priloge B, D, E in F).

Indukcija IL-8 v celicah Caco-2 je bila statistično značilno različna ($p<0,05$) večinoma le med nižjimi uporabljenimi koncentracijami LF, ob vseh časih po 1-urni inkubaciji celic z LF (priloga D). Pri izpostavitvi celic laktobacilom T10 so bile razlike v indukciji IL-8 statistično značilne predvsem med višjimi uporabljenimi koncentracijami T10, ob vseh časih po 1-urni inkubaciji celic s T10 (priloga E). Po 6 in 24 urah je bila indukcija IL-8 v celicah Caco-2 statistično značilno različna ($p<0,05$) med večino uporabljenih koncentracij NCDO, razen med 449 in 821 CFU/Caco-2, medtem ko je bilo po 3 urah manj statistično značilnih razlik (priloga F).

Koncentracija IL-8 se je povečevala tudi s časom po izpostavitvi celic posameznim sevom laktobacilov. Laktobacili *L. rhamnosus* BGT10 so med vsemi laktobacili inducirali najmanj IL-8 v celicah Caco-2 (slika 15, priloga B).

Raven izražanja IL-8 je bila po izpostavitvi celic laktobacilom nižja kot po izpostavitvi celic *S. enteritidis* 857 (sliki 14 in 15). *L. gasseri* LF221 in *L. sakei* NCDO 2714 so v povprečju spodbudili približno 2-krat manj IL-8, medtem ko *L. rhamnosus* BGT10 približno 3- do 5-krat manj IL-8 kot *S. enteritidis* 857 v podobni koncentraciji (400-1000 bakterij/Caco-2), odvisno od števila bakterij in od časa, ki je minil od izpostavitve celic Caco-2 bakterijam (priloga B).

Po 6 in 24 urah inkubacije, so *L. rhamnosus* BGT10 s koncentracijo 882 CFU/Caco-2 inducirali podobne koncentracije IL-8 kot *S. enteritidis* 857 v koncentraciji 16 CFU/Caco-2 (sliki 14 in 15B, priloga B). *L. gasseri* LF221 s koncentracijama 432 in 998 CFU/Caco-2 ter *L. sakei* NCDO 2714 s koncentracijo 821 CFU/Caco-2 so inducirali podobne koncentracije IL-8 kot *S. enteritidis* 857 s koncentracijo 43 CFU/Caco-2, pri vseh časih inkubacije (slike 14, 15A in 15C, priloga B).

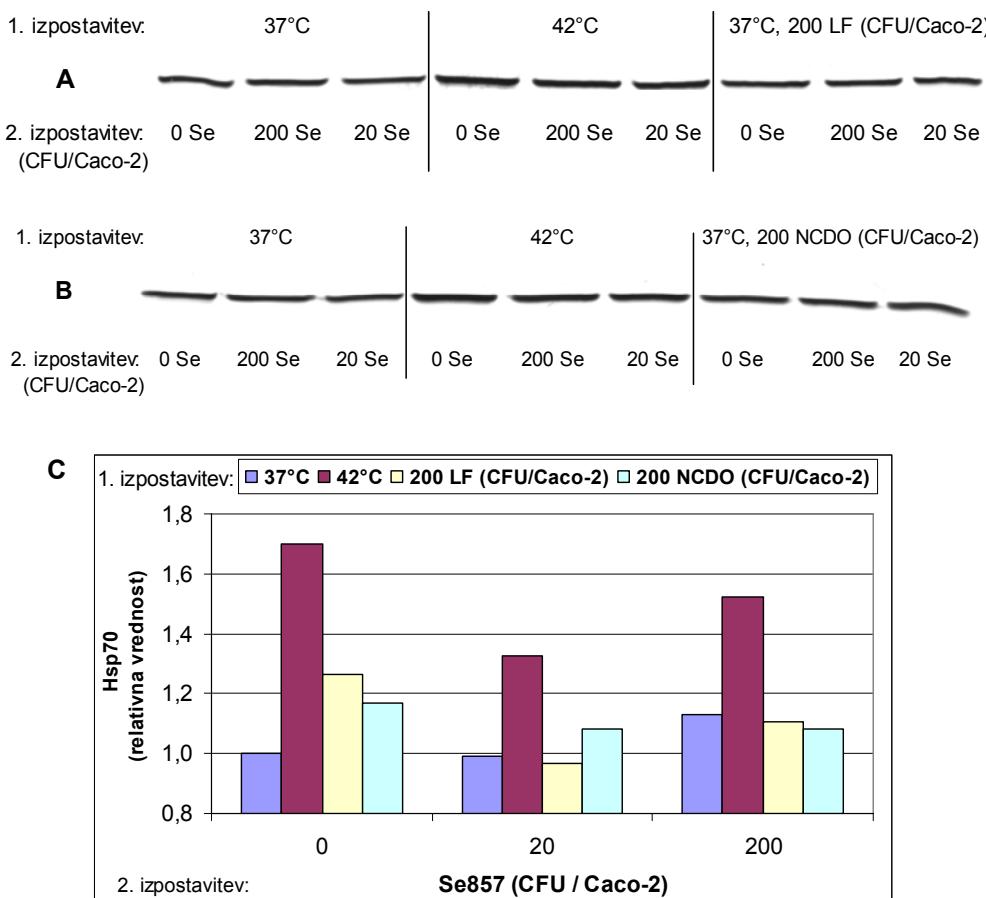
4.4 VPLIV LAKTOBACILOV NA IZRAŽANJE IL-8 V CELICAH CACO-2 PO IZPOSTAVITVI LAKTOBACILOM IN NAKNADNO SALMONELI OZ. NJUNI MEŠANICI

4.4.1 Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi *L. gasseri* *LF221* ali *L. sakei* NCDO 2714 in naknadno *S. enteritidis* 857

Zanimalo nas je, če laktobacili preko indukcije Hsp70 v celicah Caco-2 inibirajo sintezo IL-8, ki jo v celicah spodbudi salmonela. Zato smo celice Caco-2 za 1 uro izpostavili laktobacigom (LF ali NCDO), jih sprali z gojiščem DMEM^{gentam} in jih nato po 24 urah izpostavili še salmoneli Se857 za 1 uro. Koncentracijo Hsp70 in IL-8 smo merili 24 ur po izpostavitvi celic salmoneli.

Slika 16 prikazuje izražanje Hsp70 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacigom (LF oz. NCDO) v koncentraciji 200 CFU/Caco-2 in naknadno salmoneli Se857 ter izražanje Hsp70 v celicah, ki pred izpostavitvijo Se857 niso bile izpostavljene laktobacigom, ampak temperaturi 37°C (negativna kontrola za Hsp70) in 42°C (pozitivna kontrola za Hsp70).

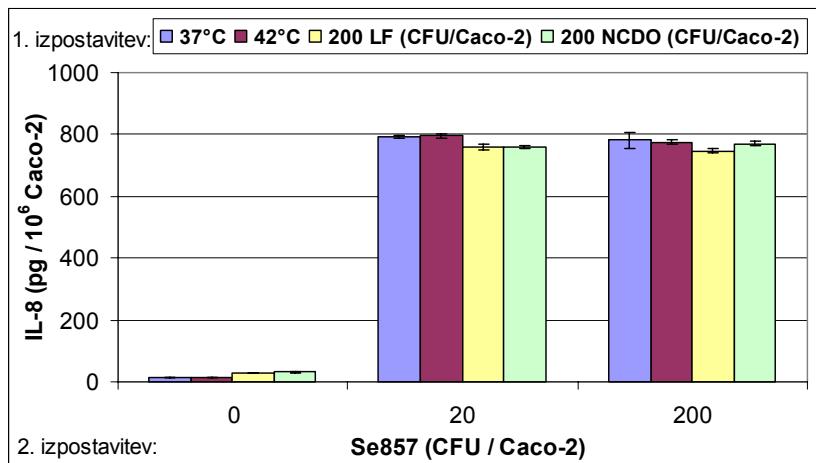
Izražanje Hsp70 je največje po izpostavitvi celic topotnemu stresu 42°C, brez naknadne izpostavitve salmoneli Se857. Laktobacili LF in NCDO so v celicah Caco-2 inducirali Hsp70, vendar manj intenzivno kot topotni stres. Če so bile celice po topotnem stresu oz. po izpostavitvi laktobacigom naknadno izpostavljene še Se857, se je količina Hsp70 znižala. Količina Hsp70 je bila po naknadni izpostavitvi Se857 v koncentraciji 20 CFU/Caco-2 nižja kot po izpostavitvi 200 CFU/Caco-2. Celice, ki so predstavljale negativno kontrolo za Hsp70, so povečano sintetizirale Hsp70 le po naknadni izpostavitvi Se857 v koncentraciji 200 CFU/Caco-2 (slika 16, priloga G).



Slika 16: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom (LF ali NCDO) in naknadno salmoneli. (A in B): Prikaz lis Hsp70 na membrani PVDF. (C): Kvantitativne vrednosti Hsp70 na grafikonu. Celice Caco-2 smo za 1h v DMEM izpostavili (1.izpostavitev): 37°C, 42°C (topljeni stres), 200 LF (CFU/Caco-2) ali 200 NCDO (CFU/Caco-2). Nato smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju 6h (po 37°C oz. 42°C) ali 24h (po 200 LF oz. 200 NCDO). Potem smo celice sprali z DMEM in izpostavili še Se857 za 1h (2. izpostavitev): 0, 20 in 200 Se857 (CFU/Caco-2). Nato smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju 24h. V celicah smo merili koncentracijo proteinov, ločili proteine z NaDS-PAGE, jih prenesli iz gela na membrano in z imunodetekcijo dokazovali Hsp70. Kvantitativne vrednosti smo ugotavljalni z denzitometrom.

Figure 16: Expression of IL-8 in Caco-2 cells after exposure to lactobacilli (LF or. NCDO) and subsequently to salmonella. (A and B): Hsps bands on PVDF membrane. (C): Quantitative values of Hsp70 on the diagram Caco-2 cells were first exposed for 1h in DMEM to (1. izpostavitev): 37°C, 42°C (heat shock), 200 LF (CFU/Caco-2) or 200 NCDO (CFU/Caco-2). Then the cells were washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator for 6h (after 37°C and 42°C) or 24h (after 200 LF and 200 NCDO). Then cells were washed with DMEM and subsequently exposed for 1h in DMEM to Se857 (2. izpostavitev): 0, 20 and 200 Se857 (CFU/Caco-2). Then cells were washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator for 24h. Subsequently cell proteins were determined, separated by SDS-PAGE and transferred from gel to membrane. Hsp70 were determined by immunodetection. Quantitative values were determined using densitometer.

Slika 17 prikazuje vpliv laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom (LF ali NCDO) in naknadno salmoneli Se857 oz. izražanje IL-8 v kontrolnih celicah, ki pred izpostavitvijo salmoneli niso bile izpostavljene laktobacilom, ampak temperaturam 37°C in 42°C.



Slika 17: Izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom (LF ali NCDO) in naknadno salmoneli. Celice Caco-2 smo za 1h v DMEM izpostavili (1.izpostavitev): 37°C, 42°C (topltni stres), 200 LF (CFU/Caco-2) ali 200 NCDO (CFU/Caco-2). Nato smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju 6h (po 37°C oz. 42°C) ali 24h (po 200 LF oz. 200 NCDO). Potem smo celice sprali z DMEM in izpostavili še Se857 za 1h (2. izpostavitev): 0, 20 in 200 Se857 (CFU/Caco-2). Nato smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju 24h. Koncentracijo IL-8 v celicah smo merili z metodo ELISA.

Figure 17: Expression of IL-8 in Caco-2 cells after exposure to lactobacilli (LF or. NCDO) and subsequently to salmonella. Caco-2 cells were first exposed for 1h in DMEM to (1. izpostavitev): 37°C, 42°C (heat shock), 200 LF (CFU/Caco-2) or 200 NCDO (CFU/Caco-2). Then the cells were washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator for 6h (after 37°C and 42°C) or 24h (after 200 LF and 200 NCDO). Then cells were washed with DMEM and subsequently exposed for 1h in DMEM to Se857 (2. izpostavitev): 0, 20 and 200 Se857 (CFU/Caco-2). Then cells were washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator for 24h. IL-8 levels were determined using ELISA.

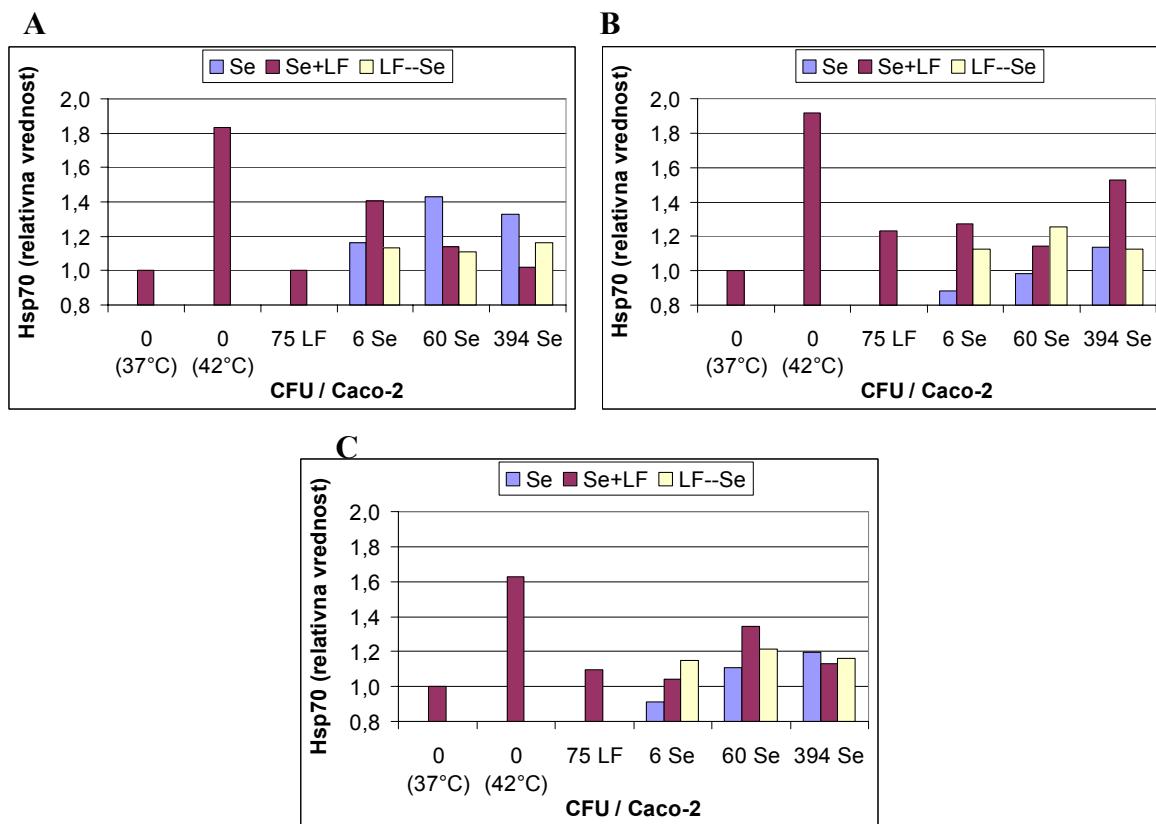
Koncentracije IL-8 so bile minimalne v vseh primerih, ko celice niso bile izpostavljene salmoneli Se857. Če so bile celice najprej izpostavljene temperaturi 37°C, toplotnemu stresu pri 42°C ali laktobacilom in naknadno Se857, so bile koncentracije IL-8 med različnimi pred-izpostavitvami podobne, tako po izpostavitvi Se857 v koncentraciji 20 kot 200 CFU/Caco-2 (slika 17). To kaže, da predhodna izpostavitev celic laktobacilom ali toplotnemu stresu ne vpliva na delovanje Se857 v smislu indukcije sinteze IL-8.

4.4.2 Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi *L. gasseri* LF221 in naknadno *S. enteritidis* 857 oz. njuni mešanici

Zanimalo nas je, če laktobaciili preko indukcije Hsp70 v celicah Caco-2 inibirajo sintezo IL-8, ki jo v celicah spodbudi salmonela, če poskus izvedemo malo drugače, kot v prejšnjem primeru (poglavlje 3.4.4.1, rezultati 4.4.1). Zato smo celice Caco-2 za 1 uro izpostavili laktobacigom LF, jih sprali z gojiščem DMEM in nato takoj izpostavili še salmoneli za 1 uro. Poleg tega smo celice za 1 uro izpostavili mešanici LF in salmonele. Koncentracijo Hsp70 in IL-8 smo merili 3 ure, 6 ur in 24 ur po končani zadnji izpostavitvi celic bakterijam.

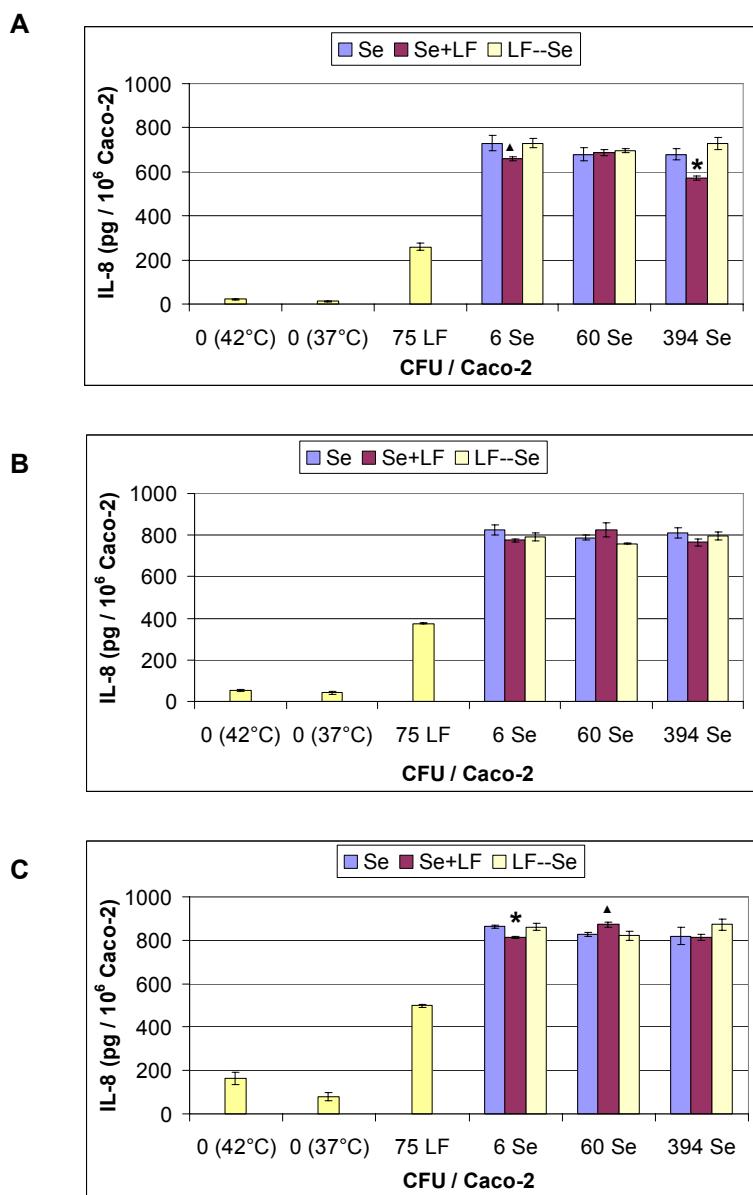
Slika 18 kaže, da so se celice Caco-2 s Hsp70 najbolj intenzivno odzvale po topotnem stresu pri 42°C. Po izpostavitvi celic LF v koncentraciji 75 CFU/Caco-2, se je izražanje Hsp70 povečalo 6 ur in 24 ur po končani inkubaciji celic z LF. Količina Hsp70 je bila po 6 ur po končani inkubaciji z LF večja kot po 24 urah. 3 ure po končani izpostavitvi celic Caco-2 različnemu številu Se857, se je izražanje Hsp70 povečalo pri vseh koncentracijah Se857. 6 ur in 24 ur po končani izpostavitvi celic Se857 pa se je raven Hsp70 povečala le pri višjih uporabljenih koncentracijah Se857 in se je povečevala višanjem koncentracije Se857. Ko so bile celice Caco-2 izpostavljene laktobacigom LF pred izpostavitvijo Se857 ali mešanici Se857 in LF, je bila koncentracija Hsp70 v vseh primerih povečana v primerjavi s konstitutivno koncentracijo, vendar nismo zaznali splošnega trenda povečevanja ali padanja količine Hsp70. V nekaterih primerih je bila količina Hsp70 večja pri izpostavitvi celic mešanici LF in Se857, v drugih pa pri izpostavitvi LF pred izpostavitvijo Se857 (slika 18, priloga H).

Če primerjamo količino IL-8 v celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene laktobacigom LF in naknadno salmoneli Se857 s količino IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi samo Se857 ugotovimo, da med količinami IL-8 ni statistično značilnih razlik pri nobeni koncentraciji Se857 in po nobenem času od končane inkubacije celic z bakterijami (slika 19, priloga I). Če pa primerjamo količino IL-8 v celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene mešanici LF in Se857 s količino IL-8 v celicah po izpostavitvi samo Se857 ugotovimo, da so količine IL-8 po izpostavitvi mešanicam LF in Se857 v nekaterih primerih statistično značilno nižje kot pri izpostavitvi samo Se857 v enakih koncentracijah ($p<0,05$) oz. so te razlike na meji statistične značilnosti ($p\leq 0,1$) (sliki 19A in 19C, priloga I). Ti rezultati kažejo, da predhodna izpostavitev celic laktobacigom LF ne vpliva na delovanje Se857 v smislu indukcije sinteze IL-8, medtem ko LF v mešanici s salmonelo v nekaterih primerih lahko vpliva na zmanjšanje sinteze IL-8, ki jo v celicah Caco-2 spodbudi Se857.



Slika 18: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacirom LF in naknadno salmoneli oz. njuni mešanici. Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili: Se857 (Se), mešanici Se857 in LF (Se+LF) ali LF ter naknadno Se857 (LF—Se). Kontrolne celice smo izpostavili 75 LF (CFU/Caco-2) ter 37°C in 42°C, brez prisotnih bakterij. Nato smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju (A): 3h, (B): 6h in (C): 24h. Pri Se+LF in LF—Se je bilo prisotnih 75 LF (CFU/Caco-2), pri LF—Se so bile celice izpostavljene za 1h LF, sprane z DMEM in naknadno izpostavljene za 1h Se857. V celicah smo merili koncentracijo proteinov, ločili proteine z NaDS-PAGE, jih prenesli iz gela na membrano in z imundetekcijo dokazovali Hsp70. Kvantitativne vrednosti smo ugotavljali z denzitometrom.

Figure 18: Expression of Hsp70 in Caco-2 cells after exposure to lactobacilli LF and subsequently to salmonella or to their mixture. Caco-2 cells were exposed for 1h to: Se857 (Se), mixture of Se857 and LF (Se+LF) or LF preceded by Se857 (LF—Se). Control cells were exposed to 75 LF (CFU/Caco-2), 37°C or 42°C without bacteria present. Cells were then washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator for (A): 3h, (B): 6h and (C): 24h. In Se+LF or LF—Se, 75 LF (CFU/Caco-2) was used, in LF—Se cells were exposed for 1h to LF, washed with DMEM and then exposed for 1h to Se857. Subsequently cell proteins were determined, separated by SDS-PAGE and transferred from gel to membrane. Hsp70 were determined by immunodetection. Quantitative values were determined using densitometer.



Slika 19: Izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom LF in naknadno salmoneli oz. njuni mešanici. Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili: Se857 (Se), mešanici Se857 in LF (Se+LF) ali LF ter naknadno Se857 (LF—Se). Kontrolne celice smo izpostavili 75 LF (CFU/Caco-2) ter 37°C in 42°C, brez prisotnih bakterij. Nato smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju (A): 3h, (B): 6h in (C): 24h. Pri Se+LF in LF—Se je bilo prisotnih 75 LF (CFU/Caco-2), pri LF—Se so bile celice izpostavljene za 1h LF, sprane z DMEM in naknadno izpostavljene za 1h Se857. Koncentracijo IL-8 v celicah smo merili z metodo ELISA.

*...statistično značilne razlike med Se+LF oz. LF—Se in Se ($p<0,05$); ▲...razlike na meji statistične značilnosti ($p\leq0,1$)

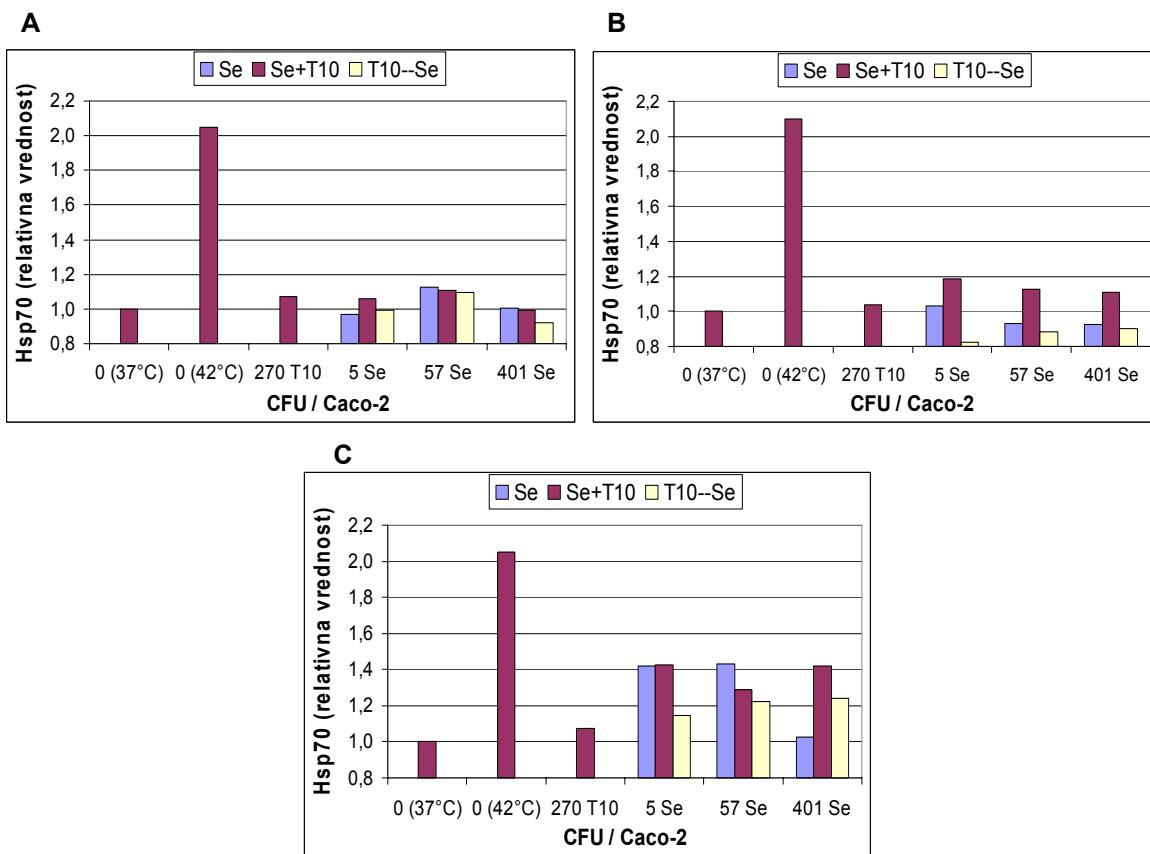
Figure 19: Expression of IL-8 in Caco-2 cells after exposure to lactobacilli LF and subsequently to salmonella or to their mixture. Caco-2 cells were exposed for 1h to: Se857 (Se), mixture of Se857 and LF (Se+LF) or LF preceded by Se857 (LF—Se). Control cells were exposed to 75 LF (CFU/Caco-2), 37°C or 42°C without bacteria present. Cells were then washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator for (A): 3h, (B): 6h and (C): 24h. In Se+LF or LF—Se, 75 LF (CFU/Caco-2) was used, in LF—Se cells were exposed for 1h to LF, washed with DMEM and then exposed for 1h to Se857. IL-8 levels were determined using ELISA. *... statistically significant differences between Se+LF or LF—Se and Se ($p<0,05$); ▲...limit of statistical significance ($p\leq0,1$).

4.4.3 Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi *L. ramnosus* BGT10 in naknadno *S. enteritidis* 857 oz. njuni mešanici

Zanimalo nas je, če laktobaciili T10 preko indukcije Hsp70 v celicah Caco-2 inibirajo sintezo IL-8, ki jo v celicah spodbudi salmonela, če poskus izvedemo enako kot z LF (poglavje 3.4.4.2, rezultati 4.4.2). Zato smo celice Caco-2 za 1 uro izpostavili laktobaciilom T10, jih sprali z gojiščem DMEM in nato takoj izpostavili še salmoneli za 1 uro. Poleg tega smo celice za 1 uro izpostavili mešanici T10 in salmonele. Koncentracijo Hsp70 in IL-8 smo merili 3 ure, 6 ur in 24 ur po končani zadnji izpostavitvi celic bakterijam.

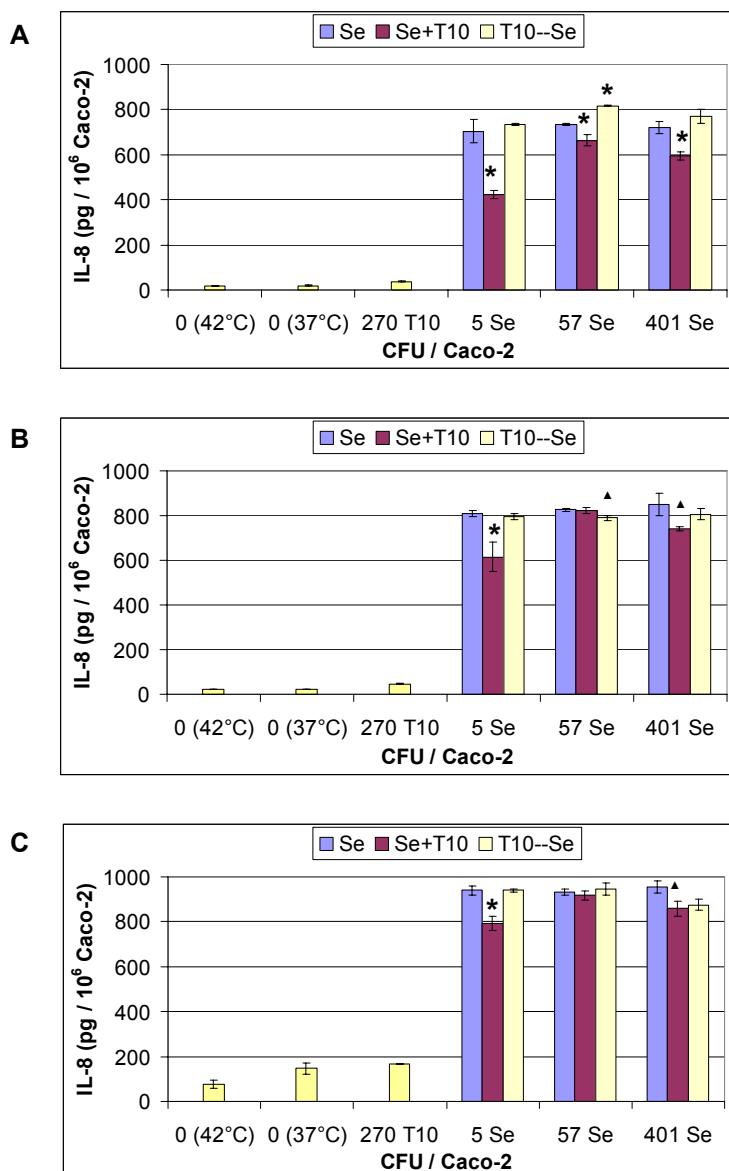
Slika 20 kaže, da so se celice Caco-2 s Hsp70 najbolj intenzivno odzvale po topotnem stresu pri 42°C. Po izpostavitvi celic T10 v koncentraciji 270 CFU/Caco-2, se je izražanje Hsp70 povečalo v primerjavi s konstitutivno koncentracijo in količina Hsp70 je bila v vseh časih po končani inkubaciji celic s T10 podobna. 24 ur po končani izpostavitvi celic Caco-2 različnemu številu Se857, se je izražanje Hsp70 povečalo pri vseh koncentracijah Se857 oz. pri izpostavitvi najvišji koncentraciji Se857 je bilo povečanje količine Hsp70 minimalno. 3 ur in 6 ur po končani izpostavitvi celic Se857 pa se je raven Hsp70 povečala le pri nekaterih koncentracijah Se857. Ko so bile celice Caco-2 izpostavljene laktobaciilom T10 pred izpostavitvijo Se857, se je količina Hsp70 povečala predvsem 24 ur po končani izpostavitvi celic Se857. Po izpostavitvi celic Caco-2 mešanici Se857 in T10 pa je bila koncentracija Hsp70 v primerjavi s konstitutivno koncentracijo povečana skoraj pri vseh koncentracijah Se857 in ob vseh časih po inkubaciji celic z mešanicami, vendar nismo zaznali splošnega trenda povečevanja ali padanja količine Hsp70 (slika 20, priloga H).

Če primerjamo količino IL-8 v celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene laktobaciilom T10 in naknadno salmoneli Se857 s količino IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi samo Se857 ugotovimo, da med količinami IL-8 večinoma ni statistično značilnih razlik (slika 21, priloga I). Če pa primerjamo količino IL-8 v celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene mešanici T10 in Se857 s količino IL-8 v celicah po izpostavitvi samo Se857 ugotovimo, da so količine IL-8 po izpostavitvi mešanicam T10 in Se857 v nekaterih primerih statistično značilno nižje kot pri izpostavitvi samo Se857 v enakih koncentracijah ($p<0,05$) oz. so te razlike na meji statistične značilnosti ($p\leq 0,1$) (slika 21, priloga I). Ti rezultati kažejo, da predhodna izpostavitev celic laktobaciilom T10 ne vpliva na delovanje Se857 v smislu indukcije sinteze IL-8, medtem ko T10 v mešanici s salmonelo lahko vpliva na zmanjšanje sinteze IL-8, ki jo v celicah Caco-2 sposudi Se857.



Slika 20: Izražanje Hsp70 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom T10 in naknadno salmoneli oz. njuni mešanici. Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili: Se857 (Se), mešanici Se857 in T10 (Se+T10) ali T10 ter naknadno Se857 (T10—Se). Kontrolne celice smo izpostavili 270 T10 (CFU/Caco-2) ter 37°C in 42°C, brez prisotnih bakterij. Nato smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju (A): 3h, (B): 6h in (C): 24h. Pri Se+T10 in T10—Se je bilo prisotnih 270 T10 (CFU/Caco-2), pri T10—Se so bile celice izpostavljene za 1h T10, sprane z DMEM in naknadno izpostavljene za 1h Se857. V celicah smo merili koncentracijo proteinov, ločili proteine z NaDS-PAGE, jih prenesli iz gela na membrano in z imunodetekcijo dokazovali Hsp70. Kvantitativne vrednosti smo ugotovljali z denzitometrom.

Figure 20: Expression of Hsp70 in Caco-2 cells after exposure to lactobacilli T10 and subsequently to salmonella or to their mixture. Caco-2 cells were exposed for 1h to: Se857 (Se), mixture of Se857 and T10 (Se+T10) or T10 preceded by Se857 (T10—Se). Control cells were exposed to 270 T10 (CFU/Caco-2), 37°C or 42°C without bacteria present. Cells were then washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator for (A): 3h, (B): 6h and (C): 24h. In Se+T10 or T10—Se, 270 T10 (CFU/Caco-2) was used, in T10—Se cells were exposed for 1h to T10, washed with DMEM and then exposed for 1h to Se857. Subsequently cell proteins were determined, separated by SDS-PAGE and transferred from gel to membrane. Hsp70 were determined by immunodetection. Quantitative values were determined using densitometer.



Slika 21: Izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi laktobacirom T10 in naknadno salmoneli oz. njuni mešanici. Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili: Se857 (Se), mešanici Se857 in T10 (Se+T10) ali T10 ter naknadno Se857 (T10—Se). Kontrolne celice smo izpostavili 270 T10 (CFU/Caco-2) ter 37°C in 42°C, brez prisotnih bakterij. Nato smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju (A): 3h, (B): 6h in (C): 24h. Pri Se+T10 in T10—Se je bilo prisotnih 270 T10 (CFU/Caco-2), pri T10—Se so bile celice izpostavljene za 1h T10, sprane z DMEM in naknadno izpostavljene za 1h Se857. Koncentracijo IL-8 v celicah smo merili z metodo ELISA.

*...statistično značilne razlike med Se+T10 oz. T10—Se in Se ($p<0,05$); ▲...razlike na meji statistične značilnosti ($p\leq0,1$)

Figure 21: Expression of IL-8 in Caco-2 cells after exposure to lactobacilli T10 and subsequently to salmonella or to their mixture. Caco-2 cells were exposed for 1h to: Se857 (Se), mixture of Se857 and T10 (Se+T10) or T10 preceded by Se857 (T10—Se). Control cells were exposed to 270 T10 (CFU/Caco-2), 37°C or 42°C without bacteria present. Cells were then washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator for (A): 3h, (B): 6h and (C): 24h. In Se+T10 or T10—Se, 270 T10 (CFU/Caco-2) was used, in T10—Se cells were exposed for 1h to T10, washed with DMEM and then exposed for 1h to Se857. IL-8 levels were determined using ELISA. *... statistically significant differences between Se+T10 or T10—Se and Se ($p<0,05$); ▲...limit of statistical significance ($p\leq0,1$).

4.5 VPLIV SUPERNATANTOV LAKTOBACILOV (SCS) NA SPOSOBNOST SALMONELE ZA INDUKCIJO IL-8 V CELICAH CACO-2

4.5.1 Vpliv nizkih vrednosti pH in SCS na preživetje *S. enteritidis* 857

Salmonelo Se857 običajno gojimo v gojišču LB, ki ima vrednost pH približno 7. Zanimal nas je vpliv gojišča MRS z različnimi vrednostmi pH na preživetje Se857. Zato smo 2 uri stare bakterijske celice Se857 gojili 1 uro v gojišču MRS. Uporabili smo MRS z originalnim pH (pH=5,8) oz smo mu pH zniževali do vrednosti 4,6 v korakih po 0,2. Za kontrolo smo Se857 gojili v gojišču LB. Število Se857 (CFU/ml), ki smo jih prešteli po 1-urni inkubaciji Se857 v gojišču LB je predstavljalo 100% preživetje Se857. Števila Se857, ki smo jih prešteli po 1-urni inkubaciji Se857 v gojišču MRS pa smo primerjali s številom Se857 v LB.

Preglednica 1: Preživetje *S. enteritidis* 857 (Se857) v gojišču LB in v gojišču MRS z različnimi pH vrednostmi

Table 1: Survival of *S. enteritidis* 857 (Se857) in LB medium and MRS medium at different pH

Gojišče	pH	Se857 (CFU/ml)	Preživetje Se857 (%)
LB	7,0	$1,30 \times 10^9 \pm 0,03$	$100 \pm 2,2$
MRS	5,8	$4,23 \times 10^8 \pm 0,18$	$33 \pm 1,4$
MRS	5,6	$2,45 \times 10^8 \pm 0,64$	$19 \pm 4,9$
MRS	5,4	$2,25 \times 10^8 \pm 0,21$	$17 \pm 1,6$
MRS	5,2	$2,34 \times 10^8 \pm 0,33$	$18 \pm 2,6$
MRS	5,0	$2,25 \times 10^8 \pm 0,35$	$17 \pm 2,7$
MRS	4,8	$1,86 \times 10^8 \pm 0,00$	$14 \pm 0,0$
MRS	4,6	$1,86 \times 10^8 \pm 0,42$	$14 \pm 0,3$

Preglednica 1 kaže, da je bilo preživetje Se857 v gojišču MRS z originalnim pH (pH=5,8) 33%. Ob postopnem zniževanju pH vrednosti do 4,6, se preživetje Se857 znižalo do 14%. Ker imamo ponavadi v 2 uri stari kulturi Se857 približno $4-5 \times 10^8$ CFU/ml (poglavlje 3.3.1) ti rezultati kažejo, da samo gojišče MRS verjetno ne vpliva na preživetje Se857, vendar bolj verjetno na razmnoževanje Se857, medtem ko nizke vrednosti pH (4,6-5,6) kažejo vpliv preživetje Se857.

Preverili smo tudi preživetje Se857 v SCS pripravkih laktobacilov (priprava SCS je opisana v poglavju 3.4.5.1). Zanimalo nas je, če ima pH vrednost v SCS vpliv na preživetje Se857. Uporabili smo SCS z nespremenjenim pH, pH 5,8 in pH 7,0. Za kontrolo smo Se857 gojili v gojišču LB. Število Se857 (CFU/ml), ki smo jih prešteli po 1-urni inkubaciji Se857 v gojišču LB je predstavljalo 100% preživetje Se857. Števila Se857, ki smo jih prešteli po 1-urni inkubaciji Se857 v SCS pa smo primerjali s številom Se857 v LB.

Preglednica 2: **Preživetje *S. enteritidis* 857 (Se857) v gojišču LB in v SCS laktobacilov z različnimi pH vrednostmi**

Table 2: **Survival of *S. enteritidis* 857 (Se857) in LB medium and SCS of lactobacilli at different pH.**

Gojišče	pH	Se857 (CFU/ml)	Preživetje Se857 (%)
LB	7,00	$6,15 \times 10^9 \pm 0,78$	100 ± 12
SCS LF	7,00	$4,15 \times 10^9 \pm 0,28$	$67 \pm 0,5$
	5,80	$2,49 \times 10^9 \pm 0,18$	$40 \pm 2,9$
	4,15	$7,90 \times 10^4 \pm 1,41$	$0,0013 \pm 0,00023$
SCS LFbac-	7,00	$5,01 \times 10^9 \pm 0,05$	$81 \pm 0,8$
	5,80	-	-
	4,15	$1,58 \times 10^8 \pm 0,01$	$2,6 \pm 0,02$
SCS T10	7,00	$4,34 \times 10^9 \pm 0,13$	$71 \pm 2,1$
	5,80	$2,88 \times 10^9 \pm 0,85$	$47 \pm 1,4$
	4,20	0	0
SCS NCDO	7,00	$5,00 \times 10^9 \pm 1,41$	$81 \pm 2,3$
	5,80	$3,01 \times 10^9 \pm 0,16$	$49 \pm 2,5$
	4,50	$6,01 \times 10^8 \pm 0,16$	$10 \pm 0,3$

-...neustrezne redčitve za štetje

Preglednica 2 kaže, da je bilo preživetje Se857 v SCS s pH vrednostjo 7 v primerjavi s kontrolo LB, zmanjšano za približno 20 % pri SCS LFbac- in SCS NCDO ter približno 30% pri SCS LF in SCS T10, kar kaže, da imajo produkti laktobacilov LF in T10 večji vpliv kot produkti laktobacilov LFbac- in NCDO. SCS s pH 5,8 vseh laktobacilov so zmanjšali preživetje Se857 za 50-60% v primerjavi s kontrolo LB. V SCS z nespremenjenimi pH pa je bilo preživetje Se857 popolnoma zavirano ali pa največ 10%, odvisno od katerega seva je bil SCS. Največji učinek so imeli produkti laktobacilov T10 in LF. Rezultati kažejo, da sam SCS vpliva na preživetje Se857, predvsem pa ima vpliv nizka pH vrednost.

Inhibicijo rasti Se857 z SCS smo preverili tudi z difuzijskim testom. Uporabili smo SCS z nespremenjenim pH, pH 4,8 in pH 7,0. Za kontrole smo uporabili 2-krat koncentrirano gojišče MRS (ker so SCS 2-krat koncentrirani) z nespremenjenim pH = 6, ter s pH znižanim na vrednost 4,8 s HCl oz. z mlečno kislino.

Preglednica 3: **Inhibicija rasti *S. enteritidis* 857 (Se857), povzročena z SCS z različnimi pH vrednostmi**

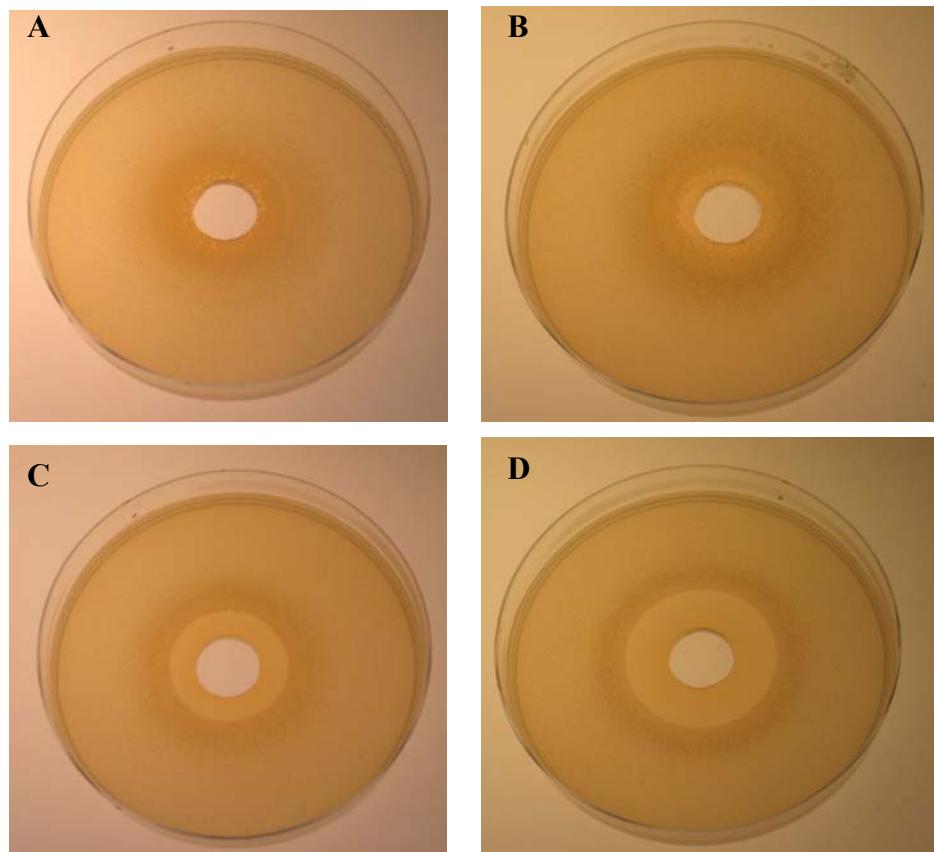
Table 3: **Inhibition of *S. enteritidis* 857 (Se857) growth by SCS at different pH**

Tretiranje Se857 v:	pH	Območje inhibicije (mm)
gojišče MRS	6,0	0
gojišče MRS z dodano HCl	4,8	0
gojišče MRS z dodano mlečno kislino	4,8	3,8 ± 0,35
SCS <i>Lactobacillus gasseri</i> LF221	3,9 4,8 7,0	9,9 ± 0,25 6,7 ± 0,29 0
SCS <i>Lactobacillus gasseri</i> LF221 bac-	4,0 4,8 7,0	9,5 ± 0,41 5,8 ± 0,29 0
SCS <i>Lactobacillus rhamnosus</i> BGT10	4,0 4,8 7,0	8,6 ± 0,25 3,7 ± 0,29 0
SCS <i>Lactobacillus sakei</i> NCDO 2174	4,5 4,8 7,0	6,3 ± 0,29 5,7 ± 0,76 0

Preglednica 3 kaže, da gojišče MRS pH = 6 in MRS z dodano HCl (pH = 4,8), ne ovirata rasti Se857, medtem ko mlečna kislina dodana v MRS (pH = 4,8) povzroči nastanek 3,8 mm velikega območja inhibicije (sliki 22A in 22B) in se statistično značilno razlikuje od vpliva MRS pH = 6 in od MRS z dodano HCl (priloga J). Podobno stopnjo inhibicije rasti Se857 kot MRS z mlečno kislino je povzročil SCS T10 pH = 4,8, medtem ko so ostali SCS pH = 4,8 bolj zavirali rast Se857 (preglednica 3, slika 22C). Ker je mlečna kislina kot glavni produkt fermentacije laktobacilov verjetno prisotna v vseh SCS, ti rezultati kažejo, da na inhibicijo rasti Se857 delno vpliva mlečna kislina, ni pa to glavni produkt, ki je v SCS odgovoren za inhibicijo rasti Se857.

Stopnja inhibicije je bila največja pri SCS z nespremenjenim pH (preglednica 3, slika 22D). Območja inhibicije, povzročena z SCS z nespremenjenim pH in s pH = 4,8 so bila statistično značilno večja ($p<0,05$) kot območja inhibicije povzročena z gojiščem MRS z dodano HCl (pH = 4,8) in večina je bila večja tudi od območja inhibicije MRS z dodano mlečno kislino (pH = 4,8) (priloga J). SCS vsakega laktobacila z nespremenjenim pH, razen SCS NCDO, so povzročili statistično značilno večja območja inhibicije kot SCS istega laktobacila s pH = 4,8 ($p<0,05$). SCS s pH 7 niso povzročili inhibicije rasti Se857.

Ti rezultati nakazujejo, da produkti iz SCS, ki so odgovorni za inhibicijo rasti Se857, učinkujejo le v pH, ki so nižje od nevtralnega pH.



Slika 22: **Območja inhibicije rasti *S. enteritidis* 857 v agarju.** Območja inhibicije rasti *S. enteritidis* 857 po uporabi (A): MRS s pH = 6,0, (B): MRS s pH vrednostjo znižano na 4,8 z mlečno kislino, (C): SCS LF s pH = 4,8 in (D): SCS LF s pH = 3,9.

Figure 22: **Inhibition zones of *S. enteritidis* 857 growth.** Inhibition zones of *S. enteritidis* 857 growth with (A): MRS pH = 6,0, (B): MRS with pH lowered with lactic acid to 4,8, (C): SCS LF pH = 4,8 and (D): SCS LF pH = 3,9.

4.5.2 Vpliv *S. enteritidis* 857, predhodno tretirane z SCS, na izražanje IL-8 v celicah Caco-2

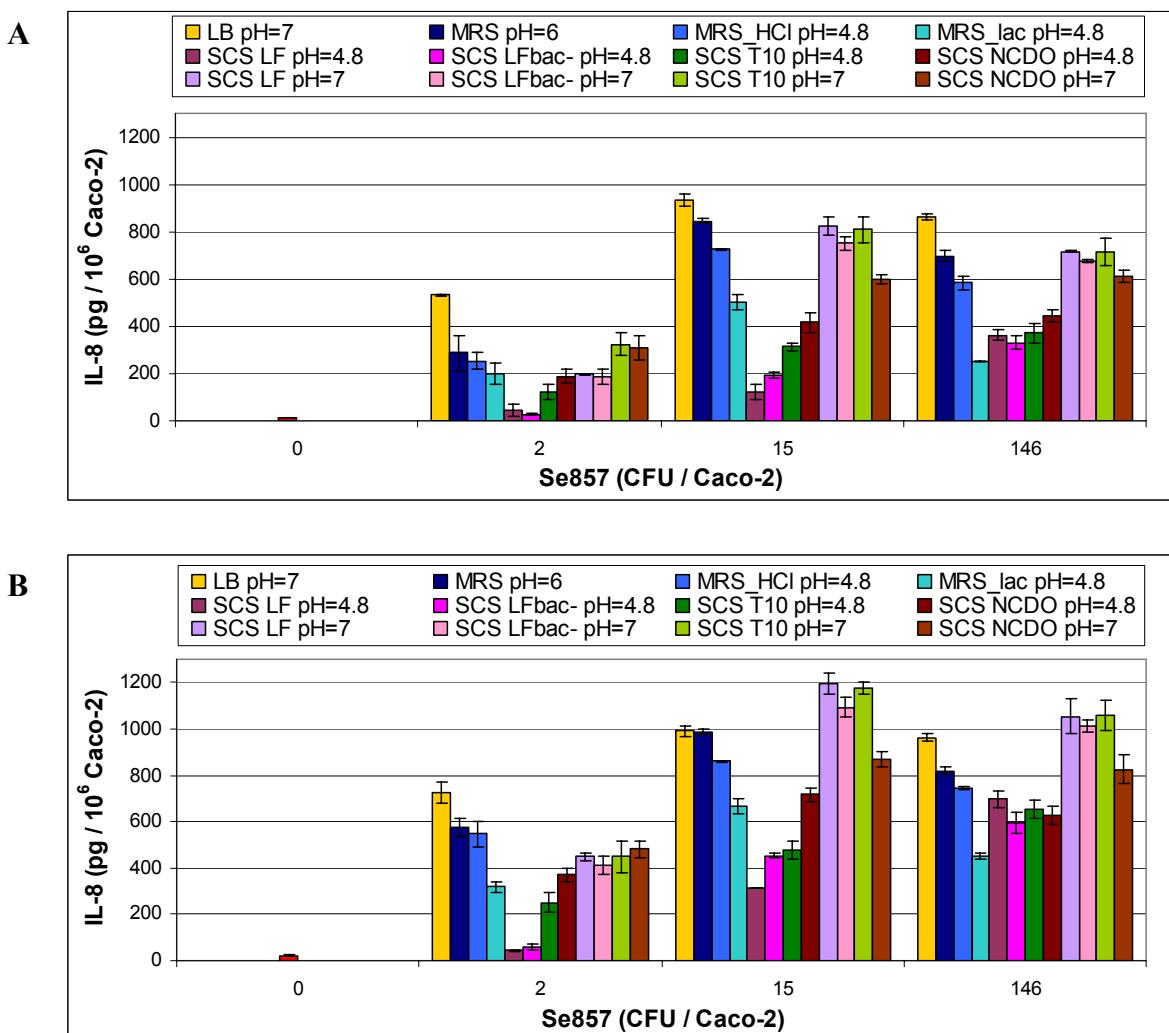
Preverjali smo vpliv izločkov različnih sevov laktobacilov na sposobnost salmonelle Se857 za indukcijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2. V ta namen smo pripravili SCS vsakega laktobacila (LF, LFBAC-, T10 in NCDO) s pH vrednostjo 4,8 in 7. 2 uri stare bakterijske celice Se857 smo 1 uro inkubirali v SCS, nato pa sprali in celice Caco-2 za 1 uro izpostavili predhodno tretirani Se857. Se857 smo v enakih pogojih tretirali tudi v gojiščih LB in MRS. Ker je gojišče LB (pH=7) običajno gojišče za Se857, nam je to predstavljalo pozitivno kontrolo za IL-8, ki ga v celicah Caco-2 spodbudi Se857. Gojišče MRS (pH=6) smo izbrali zato, ker so SCS pripravljeni v MRS. Uporabili smo tudi gojišče MRS, kateremu smo vrednost pH znižali na pH = 4,8 s HCl ali z mlečno kislino. To nam je služilo za preverjanje vpliva nizkega pH ter vpliva mlečne kisline, ki je glavni produkt fermentacije laktobacilov in je prisotna v SCS (priloga N).

6 ur in 24 ur po izpostavitvi celic Caco-2 salmoneli Se857, predhodno inkubirani v gojišču LB, je bila koncentracija IL-8 večinoma statistično značilno višja ($p<0,05$) v primerjavi z Se857, ki je bila tretirana z SCS in gojišči MRS, razen po 24 urah po tretiranju Se857 v koncentracijah 15 in 146 CFU/Caco-2 z MRS pH = 6 ter z vsemi SCS pH = 7 (slika 23, priloge K, L in M).

6 ur in 24 ur po izpostavitvi celic Caco-2 salmoneli Se857, je inkubiranje Se857 v vseh SCS s pH vrednostjo 4,8 statistično značilno znižalo ($p<0,05$) sitezo IL-8 v celicah Caco-2, v primerjavi z SCS istega laktobacila s pH vrednostjo 7 in v primerjavi z MRS pH = 6, pri vseh koncentracijah Se857 (slika 23, priloge K, L, M). Ti rezultati kažejo, da SCS zavirajo sposobnost Se857 za indukcijo sinteze IL-8 predvsem ko imajo pH vrednost 4,8.

6 ur in 24 ur po izpostavitvi celic Caco-2 salmoneli Se857 v koncentracijah 2 in 15 CFU/Caco-2 je tretiranje Se857 z večino SCS pH = 4,8 povzročilo statistično značilno manjšo sintezo IL-8 v celicah Caco-2 v primerjavi z inkubacijo Se857 v obeh MRS pH = 4,8 (slika 23, prilogi K in L). Med vsemi SCS sta imela največji vpliv SCS LF in SCS LFBAC-. Po 6 urah od izpostavitve celic Caco-2 Se857 v koncentraciji 146 CFU/Caco-2 je bila sinteza IL-8 statistično značilno nižja ($p<0,05$), ko je bila Se857 tretirana s katerimkoli SCS pH = 4,8 v primerjavi z MRS_HCl pH=4,8, medtem ko po 24 urah te razlike niso bile statistično značilne. V primerjavi z MRS_lac pH = 4,8, pa je bila sinteza IL-8 v celicah Caco-2 po tretiranju Se857 z večino SCS pH = 4,8 statistično značilno višja (slika 23, priloga M), po obeh časih od izpostavitve celic Caco-2 salmoneli. Ti rezultati kažejo, da ima SCS pH = 4,8 inhibitoren vpliv na sposobnost Se857 za indukcijo sinteze IL-8 v

celicah Caco-2 verjetno le do neke omejene koncentracije Se857 in da k temu vplivu prispeva mlečna kislina, ni pa mlečna kislina glavni vzrok inhibicije.



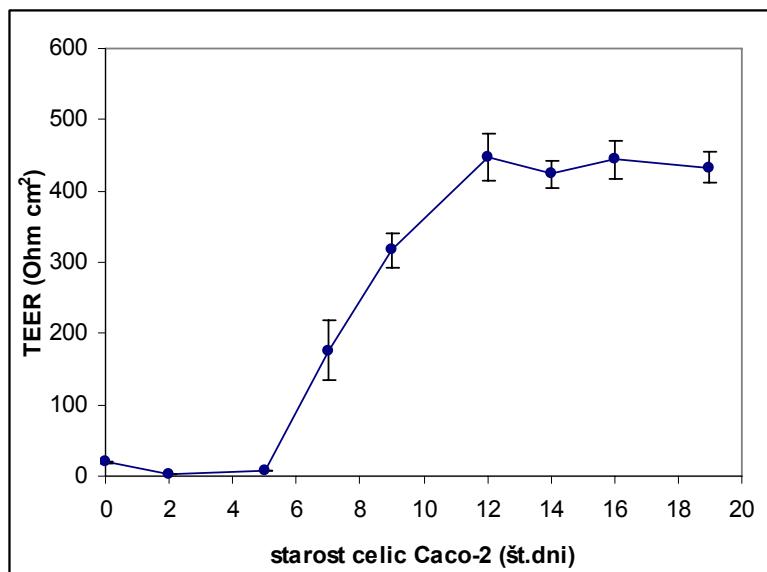
Slika 23: Izražanje IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi *S. enteritidis* 857, ki je bila predhodno tretirana z SCS. Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili *S. enteritidis* 857 (Se857), ki smo jo predhodno 1h tretirali z SCS laktobacilov: SCS LF, SCS LFbac-, SCS T10, SCS NCDO. pH vrednost v SCS je bila 4.8 oz. 7. Se857 smo na enak način tretirali tudi z gojišči: LB (pH=7), MRS (pH=6) in MRS z dodano HCl (MRS_HCl pH=4,8) ali mlečno kislino (MRS_lac pH=4,8). Nato smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju (A): 6h in (B): 24h. Kontrolne celice niso bile izpostavljeni Se857 (0 CFU/Caco-2). Koncentracijo IL-8 v celicah smo merili z metodo ELISA.

Figure 23: Expression of IL-8 in Caco-2 cells after exposure to *S. enteritidis* 857, pretreated with spent culture supernatant (SCS) of lactobacilli. Caco-2 cells were exposed for 1h to *S. enteritidis* 857 (Se857) pre-treated for 1h with SCS of lactobacilli: SCS LF, SCS LFbac-, SCS T10, SCS NCDO. pH of SCS was 4.8 or 7. Se857 was pre-treated also with mediums: LB (pH=7), MRS (pH=6) and MRS with added HCl (MRS_HCl pH=4,8) or lactic acid (MRS_lac pH=4,8). Cells were then washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator for (A): 6h and (B): 24h. Control cells were not exposed to Se857 (0 CFU/Caco-2). IL-8 levels were determined using ELISA.

4.6 VPLIV BAKTERIJ NA TRANSEPITELNO ELEKTRIČNO UPORNOST (TEER) CELIC CACO-2

4.6.1 Vpliv starosti celic Caco-2 na TEER

Zanimalo nas je, kako starost celic Caco-2 vpliva na tranepitelno električno upornost (TEER) enosloja celic. Zato smo TEER merili od nasaditve celic do 19 dne starosti celic.



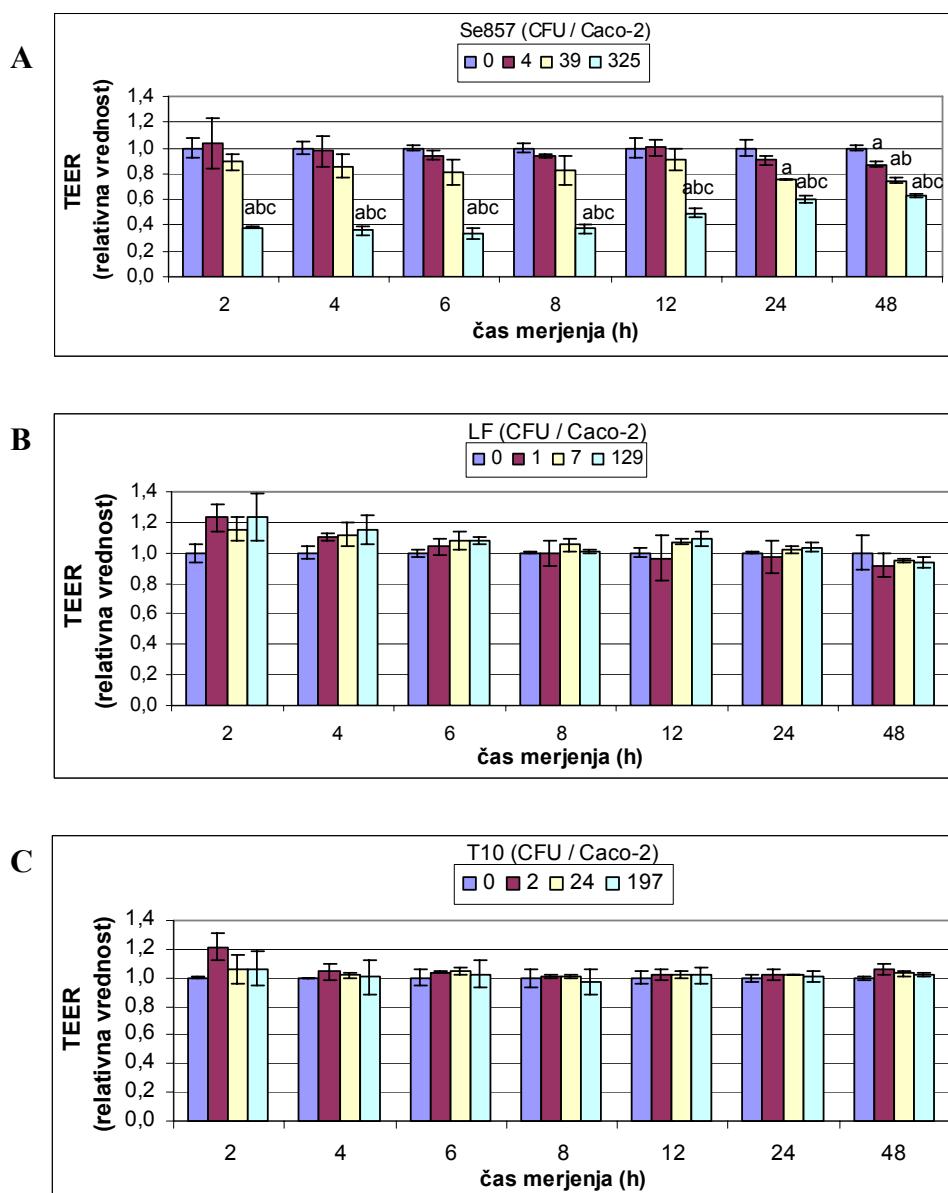
Slika 24: **Vpliv starosti celic Caco-2 na TEER.** Celice smo gojili na filterskih vstavkih in merili TEER od nasaditve celic na vsaka 2-3 dni do 19 dne starosti celic. 6h pred vsakim merjenjem smo gojišče zamenjali s svežim gojiščem.

Figure 24: **The influence of the age of Caco-2 cells to TEER.** Cells were grown on tissue culture inserts. TEER was measured every 2-3 days from the day of seeding till the cells were 19 days old. Medium was refreshed 6h before measuring.

Slika 24 kaže, da je bila TEER v začetnih dneh gojenja celic nizka. Ko so bile celice stare 5 dni se je TEER začela zviševati in je na 12 dan dosegla največjo vrednost ($447 \pm 33,1$ Ohm cm^2), ki je do 19 dne ostala približno konstantna.

4.6.2 Vpliv različnega števila posameznih bakterij na TEER celic Caco-2

Preverili smo vpliv različnih koncentracij salmonele Se857 ter laktobacilov LF in T10 na TEER celic Caco-2. Celice smo izpostavili različnim koncentracijam posameznih bakterij za 1 uro. TEER celic Caco-2 smo merili v različnih časovnih presledkih do 48 ur po izpostavitvi celic Caco-2 bakterijam.



Slika 25: **Vpliv različnega števila bakterij na TEER celic Caco-2.** Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili različnemu številu bakterij: (A) *Salmonella enteritidis* 857 (Se857), (B) *Lactobacillus gasseri* LF221 (LF) in (C) *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 (T10). Kontrolne celice niso bile izpostavljene bakterijam. Nato smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju. TEER smo merili 2, 4, 6, 8, 12, 24 in 48h po končani inkubaciji celic Caco-2 z bakterijami.

^a označuje statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo (0 Se857), ^b v primerjavi s 4 Se857 in ^c v primerjavi s 39 Se857 ($p<0,05$).

Figure 25: **Influence of different number of bacteria upon the TEER of Caco-2 cells.** Caco-2 cells were exposed for 1h to different numbers of bacteria: (A) *Salmonella enteritidis* 857 (Se857), (B) *Lactobacillus gasseri* LF221 (LF) and (C) *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 (T10). Control cells were exposed to bacteria. Cells were then washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator. TEER was measured after a recovery time of 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 48h.

^a indicates statistically significant differences comparing to control (0 Se857), ^b comparing to 4 Se857 and ^c comparing to 39 Se857 ($p<0,05$).

Ko so bile celice Caco-2 izpostavljene različnim številom salmonele Se857, je v primerjavi z vrednostjo TEER kontrolnih celic, TEER padala do 6 ur po končani inkubaciji celic z Se857, nato pa se je povečevala do 12 ur po končani inkubaciji oz. pri največjem številu Se857 do konca merjenja (48 ur). Tudi na koncu merjenja, torej 48 ur po končani 1-urni inkubaciji celic Caco-2 z Se857 je bila vrednost TEER manjša od vrednosti TEER kontrolnih celic. Vrednosti TEER so bile po izpostavitvi celic največji koncentraciji Se857 (325 CFU/Caco-2) statistično značilno nižje od vrednosti TEER kontrolnih celic (0 Se857) in od vrednosti TEER po izpostavitvi celic Caco-2 Se857 v koncentracijah 4 in 39 CFU/Caco-2, ob vseh časih merjenja (slika 25A). Rezultati kažejo, da Se857 v določeni koncentraciji zniža TEER celic Caco-2.

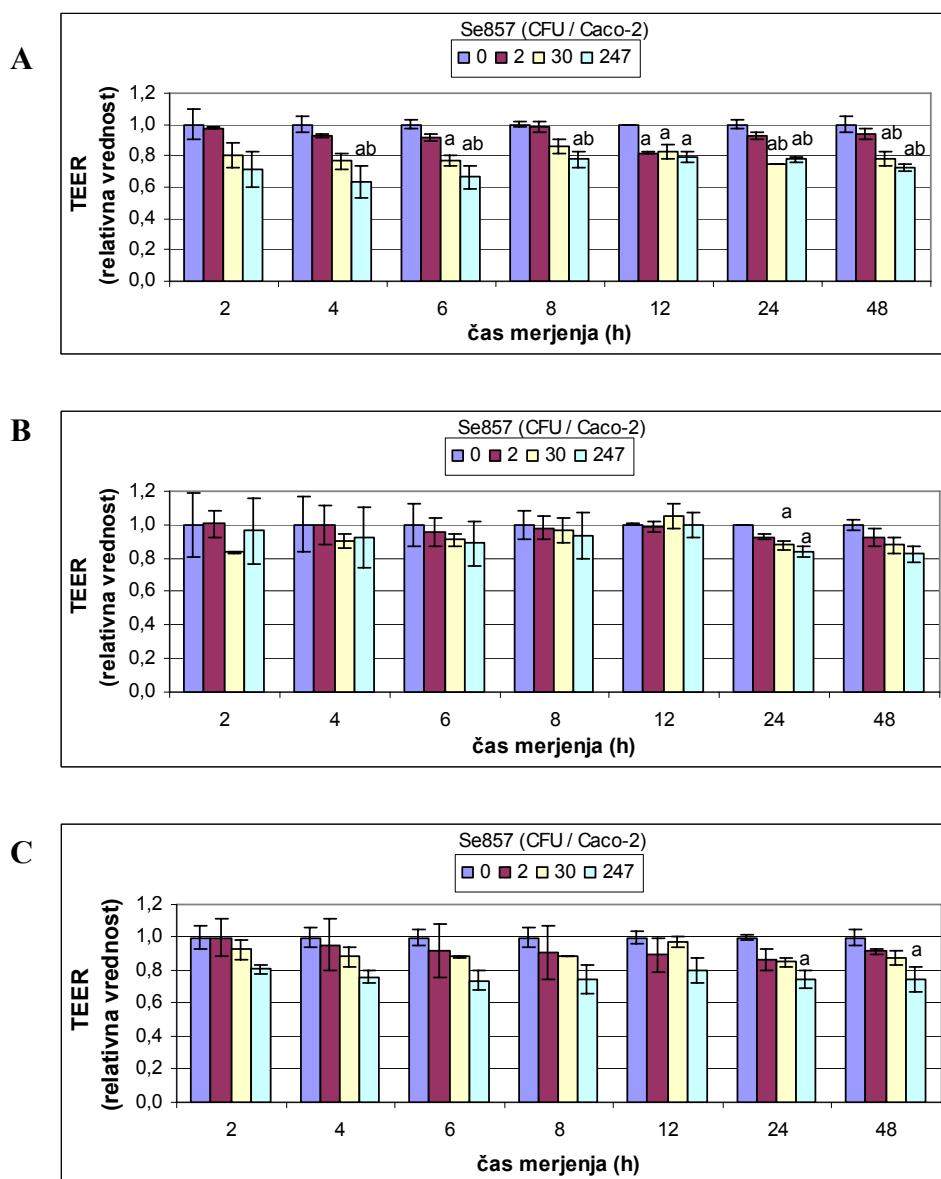
Po izpostavitvi celic Caco-2 laktobacilom LF ali T10, se vrednosti TEER niso bistveno spremajale niti v primerjavi s kontrolnimi celicami niti med različnimi koncentracijami laktobacilov (sliki 25B in 25C).

4.6.3 Vpliv laktobacilov na TEER celic Caco-2 po izpostavitvi laktobacilom in naknadno salmoneli

Preverili smo vpliv laktobacilov LF in T10 na sposobnost Se857 za znižanje TEER celic Caco-2 tako, da smo celice Caco-2 izpostavili najprej posameznim laktobacilom za 1 uro in po spiranju nevezanih laktobacilov še salmoneli Se857 za 1 uro. TEER celic caco-2 smo merili v različnih časovnih presledkih do 48 ur po izpostavitvi celic salmoneli.

Ko so bile celice Caco-2 izpostavljene različnim številom Se857, je v primerjavi z vrednostjo TEER kontrolnih celic, TEER padala do 4 ure, nato pa se je povečevala do 12 ur po končani inkubaciji celic z Se857. Vrednosti TEER so bile po izpostavitvi celic največji koncentraciji Se857 statistično značilno nižje od vrednosti TEER kontrolnih celic (0 Se857) in od vrednosti TEER po izpostavitvi celic Caco-2 salmoneli v koncentraciji 2 CFU/Caco-2 v večini primerov (slika 26A).

Če so bile celice pred izpostavitvijo salmoneli Se857 izpostavljene laktobacilom LF v koncentraciji 110 CFU/Caco-2, ni prišlo do takšnega znižanja TEER kot pri izpostavitvi celic samo Se857 (slika 26B). Če so bile celice pred izpostavitvijo salmoneli Se857 izpostavljene laktobacilom T10 v koncentraciji 270 CFU/Caco-2, se je vrednost TEER v primerjavi s TEER kontrolnih celic sicer znižala, vendar manj kot pri izpostavitvi celic samo Se857 (slika 26C). Rezultati kažejo, da laktobacili LF in T10 lahko ovirajo znižanje TEER, ki ga v celicah Caco-2 povzroči Se857.



Slika 26: **Vpliv laktobacilov na TEER celic Caco-2 po izpostavitvi laktobaciilom in naknadno salmoneli.** Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili: (A) različnemu številu Se857, (B) LF (110 CFU/Caco-2) in naknadno Se857 in, (C) T10 (270 CFU/Caco-2) in naknadno Se857. Kontrolne celice niso bile izpostavljene bakterijam. Nato smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju. TEER smo merili 2, 4, 6, 8, 12, 24 in 48h po končani inkubaciji celic Caco-2 z bakterijami.

^a označuje statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo (0 Se857) in ^b v primerjavi s 2 Se857 ($p<0,05$).

Figure 26: **Influence of pre-incubation of Caco-2 cells with lactobacilli, to the ability of Se857 to decrease TEER**
Caco-2 cells were exposed for 1h to: (A) different numbers of Se857, (B) LF (110 CFU/Caco-2) and subsequently to Se857 or (C) to T10 (270 CFU/Caco-2) and subsequently to Se857. Control cells were not exposed to bacteria. Cells were then washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator. TEER was measured after a recovery time of 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 48h.

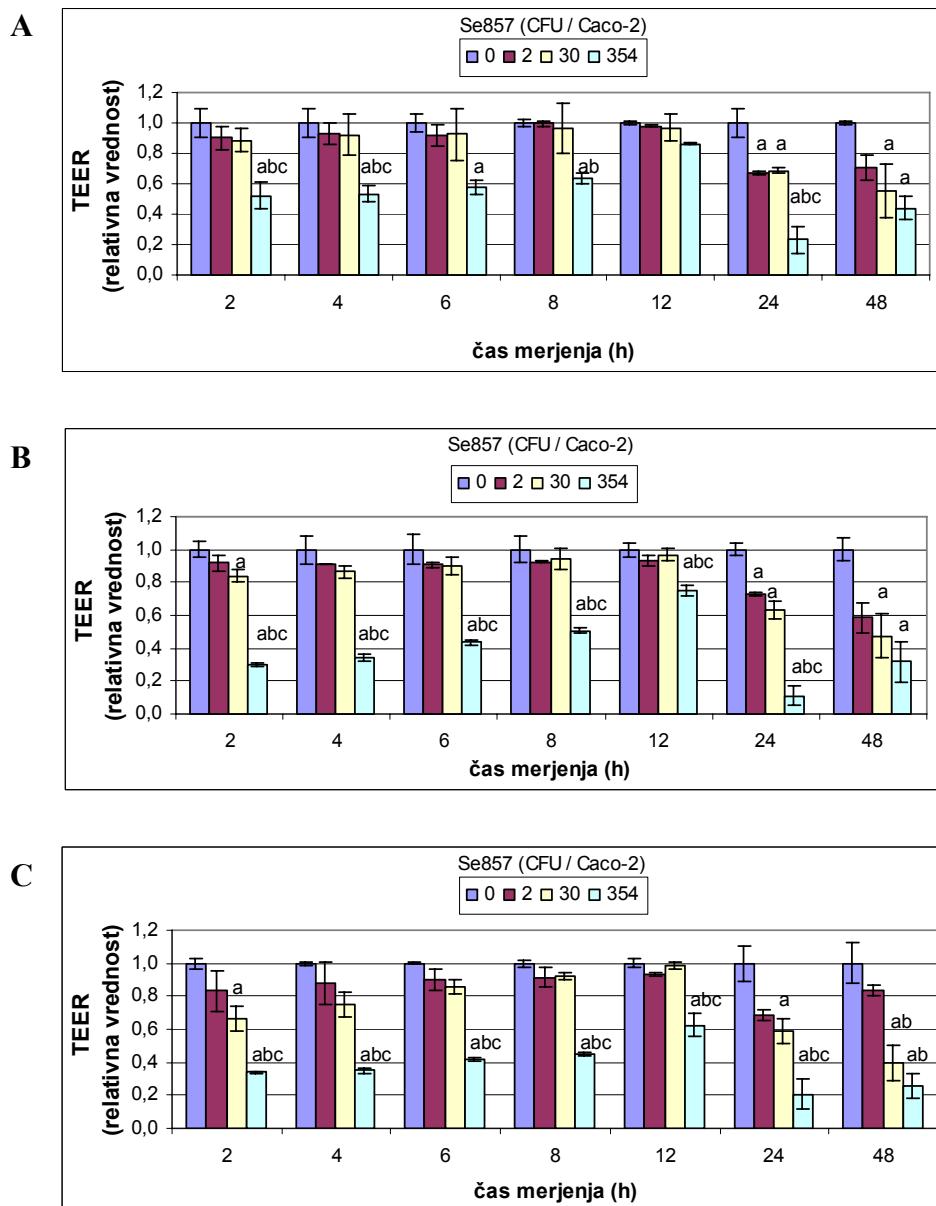
^a indicates statistically signif. differences comparing to control (0 Se857) and ^b to 2 Se857 ($p<0,05$).

4.6.4 Vpliv laktobacilov na TEER celic Caco-2 po izpostavitvi mešanici laktobacilov in salmonele

Preverili smo vpliv laktobacilov LF in T10 na sposobnost Se857 za znižanje TEER celic Caco-2 tako, da smo celice Caco-2 za 1 uro izpostavili posameznim laktobacigom in salmoneli sočasno. TEER celic Caco-2 smo merili v različnih časovnih presledkih do 48 ur po izpostavitvi celic salmoneli.

V primerjavi z vrednostjo TEER kontrolnih celic Caco-2, je TEER 2 uri po izpostavitvi celic najvišji koncentraciji Se857 (354 CFU/Caco-2) padla za približno 50 %. Nato se je nadaljnih 10 ur povečevala, potem pa zopet padla (slika 27A). Vrednosti TEER so bile po izpostavitvi celic največji koncentraciji Se857 statistično značilno nižje ($p<0,05$) od vrednosti TEER kontrolnih celic (0 Se857) pri vseh časih merjenja in od TEER po izpostavitvi celic salmoneli v koncentracijah 2 in 30 CFU/Caco-2, po 2, 4 in 24 urah merjena.

Če so bile celice izpostavljene mešanici Se857 in LF ali z mešanicami Se857 in T10, so bile vrednosti TEER v večini primerov nižje kot po izpostavitvi celic samo Se857 pri vseh koncentracijah Se857 (slike 27B in 27C). Ti rezultati kažejo, da laktobacili v mešanici z Se857 ne ovirajo znižanja TEER celic Caco-2, ki ga povzroči Se857.



Slika 27: Vpliv laktobacilov na TEER celic Caco-2 po izpostavitevi mešanici laktobacilov in salmonele. Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili: (A) različnemu številu Se857, (B) mešanici LF (210 CFU/Caco-2) in Se857 ali (C) mešanici T10 (265 CFU/Caco-2) in Se857. Kontrolne celice niso izpostavljene bakterijam. Nato smo celice 3-krat sprali z gojiščem DMEM^{genta} in v DMEM^{genta} inkubirali v CO₂ inkubatorju. TEER smo merili 2, 4, 6, 8, 12, 24 in 48h po končani inkubaciji celic Caco-2 z bakterijami.

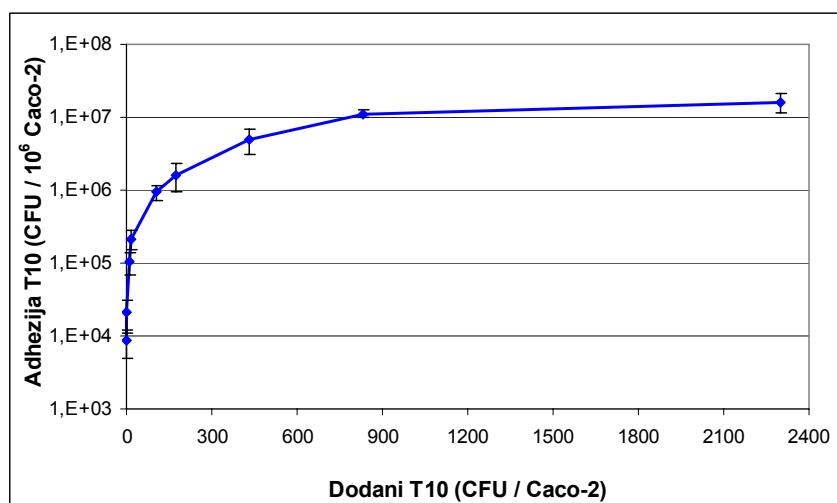
^a označuje statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo (0 Se857), ^b v primerjavi z 2 Se857 in ^c v primerjavi s 30 Se857 ($p<0,05$).

Figure 27: Influence of lactobacilli co-incubated with Se857, to the ability of Se857 to decrease TEER. Caco-2 cells were exposed for 1 hour to: (A) different numbers of Se857, (B) mixture of LF (210 CFU/Caco-2) and Se857 or (C) mixture T10 (265 CFU/Caco-2) and Se857. Control cells were not exposed to bacteria. Cells were then washed 3-times with DMEM^{genta} and incubated in DMEM^{genta} in CO₂ incubator. We measured TEER was measured after a recovery time of 2, 4, 6, 8, 12, 24 and 48h. ^a indicates statistically significant differences comparing to control (0 Se857), ^b comparing to 2 Se857 and ^c comparing to 30 Se857 ($p<0,05$).

4.7 VPLIV LAKTOBACILOV NA ADHEZIJO IN INVAZIJO SALMONELE NA OZ. V CELICE CACO-2

4.7.1 Adhezija *Lactobacillus rhamnosus* BGT10

Preverili smo, če se laktobacili T10 pripenjajo na celice Caco-2. Celice smo za 1 uro izpostavili različnim koncentracijam T10 in po spiranju nevezanih T10 prešteli število T10, ki so se vezali na celice Caco-2.



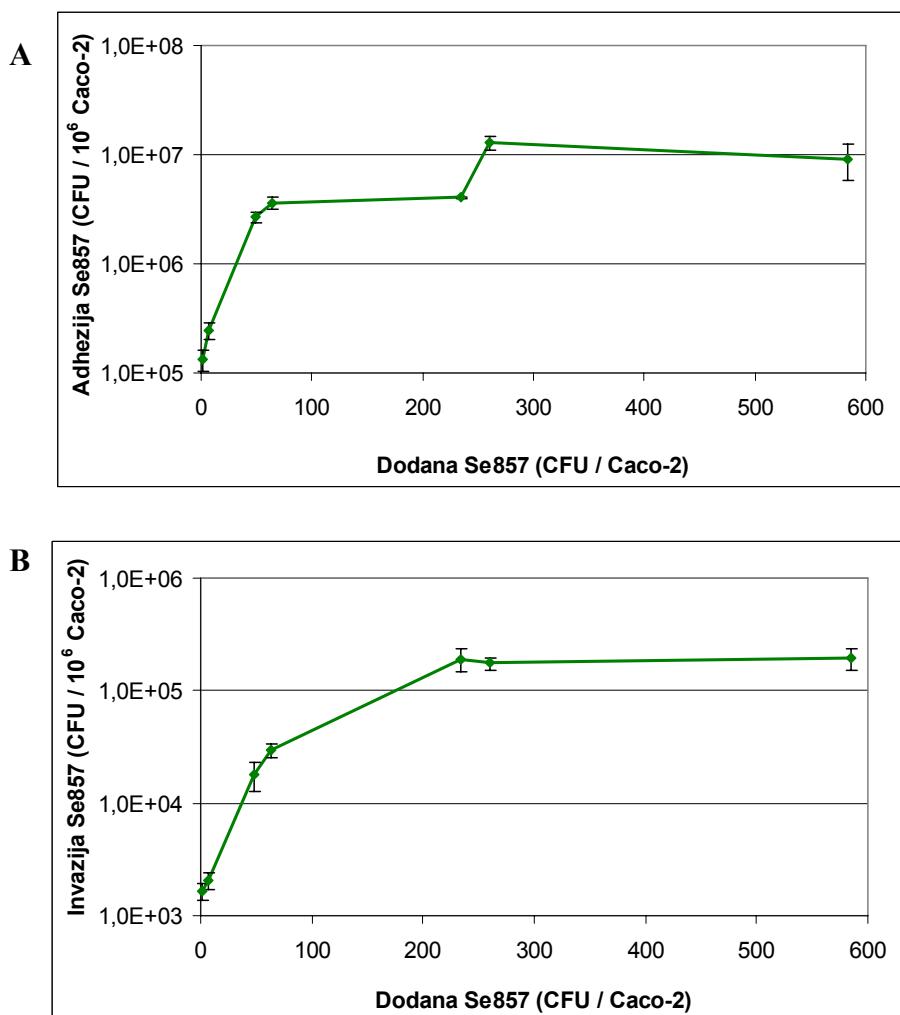
Slika 28: **Adhezija *L. rhamnosus* BGT10 na celice Caco-2.** Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili različnemu številu *L. rhamnosus* BGT10 (T10) in jih nato 3-krat sprali s PBS ter dodali 0,05 % Triton X-100, da smo celice Caco-2 lizirali ter prešteli število laktobacilov T10, ki se je pripelo na celice Caco-2.

Figure 28: **Adhesion of *L. rhamnosus* BGT10 to Caco-2 cells.** Caco-2 cells were exposed to different numbers of *L. rhamnosus* BGT10 (T10) for 1h, then washed 3-times with PBS and exposed to 0,05 % Triton X-100, which lysed the cells, so the number of T10 adhered to Caco-2 cells could counted.

Slika 28 kaže, da se je z večanjem števila laktobacilov T10, dodanih na celice Caco-2, povečevalo tudi število T10 pripetih na celice. Naraščanje adezije je bilo vidno predvsem do nanosa T10 v koncentraciji približno 900 CFU/Caco-2, nato pa se je adhezija do nanosa T10 v koncentraciji 2300 CFU/Caco-2 minimalno povečevala oz. je bila skoraj konstantna.

4.7.2 Adhezija in invazija *Salmonella enteritidis* 857

Spremljali smo adhezijo in invazijo salmonele Se857 na/v celice Caco-2. Celice smo za 1 uro izpostavili različnim koncentracijam Se857 in po spiranju nevezanih Se857 prešteli število Se857, ki so se vezale na celice Caco-2, ter po 3 urah število Se857, ki so vstopile v celice Caco-2.



Slika 29: **Adhezija in invazija *S. enteritidis* 857 na oz. v celice Caco-2.** Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili različnemu številu *S. enteritidis* 857 (Se857) in jih nato (A): 3-krat sprali s PBS in dodali 0,05 % Triton X-100 oz. (B): 3-krat sprali s PBS, 3h inkubirali v DMEM^{genta} (200µg gentamicina/ml), nato 3-krat sprali s PBS in dodali 0,05 % Triton X-100, da smo celice Caco-2 lizirali ter prešteli število Se857, ki se je pripeelo na (adhezija) oz vstopilo (invazija) v celice Caco-2.

Figure 29: ***S. enteritidis* 857 adhesion to and invasion in Caco-2 cells.** Caco-2 cells were exposed for 1h to different numbers of *S. enteritidis* 857 (Se857) and then washed (A): 3-times with PBS and exposed to 0,05 % Triton X-100 or (B): 3-times with PBS, exposed for 3h to DMEM^{genta} (200µg gentamicin/ml), then washed 3-times with PBS and exposed to 0,05 % Triton X-100 which lysed the cells, so the number of Se857 adhered to and the number of Se857 invaded in Caco-2 cells could be counted.

Slika 29 kaže, da sta adhezija in invazija Se857 na/v celice Caco-2 naraščali z večanjem števila Se857, dodanih na celice Caco-2, do nanosa Se857 v koncentraciji med 200 in 300 CFU/Caco-2. Adhezija je nato z večanjem števila dodanih Se857 do 600 CFU/Caco-2 minimalno upadla, medtem, ko se je invazija minimalno povečala. Na celice Caco-2 se je

pripelo približno 100-krat več Se857, kot jih je vstopilo v celice, pri vseh koncentracijah Se857, ki smo jih nanesli na celice.

4.7.3 Vpliv *L. gasseri* LF221 na adhezijo in invazijo *S. enteritidis* 857 na oz. v celice Caco-2

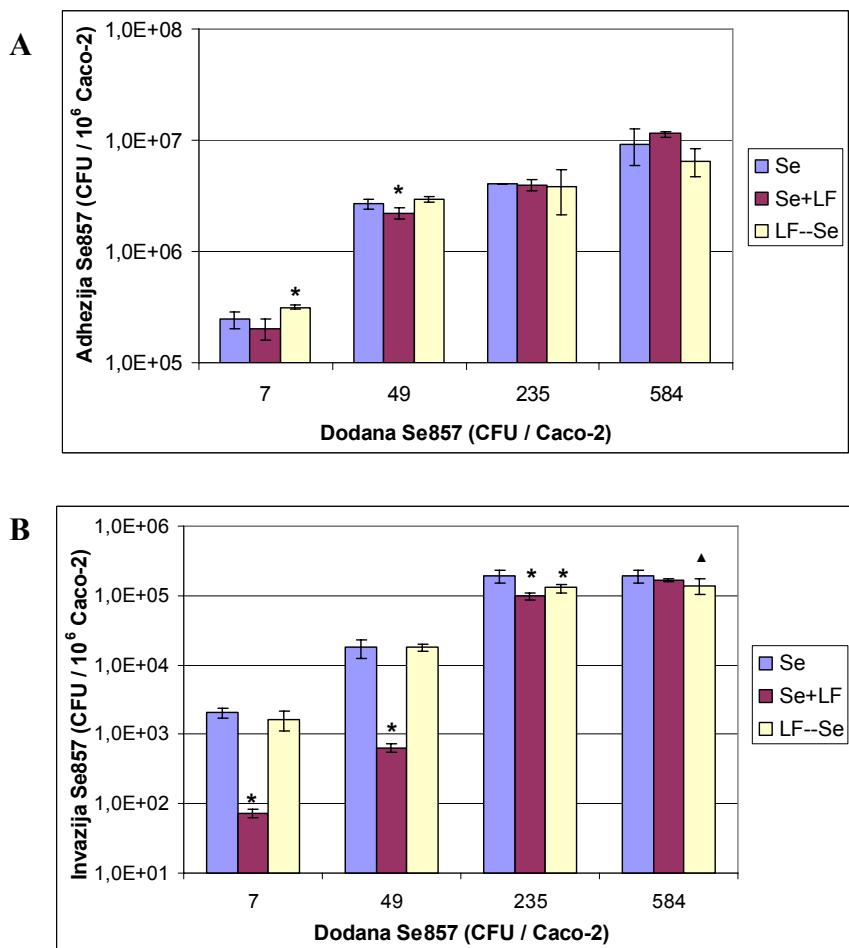
Preverili smo vpliv laktobacilov LF na adhezijo in invazijo salmonele Se857 na/v celice Caco-2 in sicer na dva različna načina. Celice Caco-2 izpostavili ali LF za 1 uro in po spiranju nevezanih LF še Se857 za 1 uro ali pa mešanici LF in Se857 za 1 uro.

Število LF dodanih na Caco-2 je bilo pri vse koncentracijah Se857 približno 2345 ± 156 CFU/Caco-2. V primeru, ko so bile celice Caco-2 najprej izpostavljene LF in nato Se857, smo celice po 1-urni inkubaciji z LF, 3-krat sprali s PBS. Po spiranju nepriperetih LF je bilo na celicah vezanih LF približno $9 \pm 0,7$ CFU/Caco-2.

Slika 30A kaže, da laktobacili LF v nobenem od načinov niso ovirali salmonele Se857 pri adheziji na celice Caco-2, razen v primeru Se857 v koncentraciji 49 CFU/Caco-2, kjer je bila adhezija Se857 statistično značilno manjša ($p<0,5$) pri mešanici LF in Se857 v primerjavi s samo Se857. Pri izpostavitvi celic Caco-2 najprej LF in naknadno Se857 v koncentraciji 7 CFU/Caco-2 pa je bila adhezija Se857 statistično značilno večja ($p<0,5$) v primerjavi z adhezijo same Se857 v enaki koncentraciji.

Slika 30B kaže, da so laktobacili LF v mešani kulturi z Se857 v koncentracijah 7, 49 in 235 CFU/Caco-2 statistično značilno zmanjšali invazijo Se857 v celice Caco-2 ($p<0,05$) v primerjavi z invazijo same Se857 v enakih koncentracijah. Statistično značilno manjša je bila tudi invazija Se857 po izpostavitvi celic Caco-2 najprej LF in naknadno Se857 v koncentraciji 235 CFU/Caco-2 v primerjavi s samo Se857 v enaki koncentraciji, medtem ko je bila pri Se857 v koncentraciji 584 CFU/Caco-2 ta razlika na meji statistične značilnosti ($p\leq0,1$).

Rezultati kažejo, da laktobacili LF ovirajo invazijo Se857 v celice Caco-2, medtem ko ne ovirajo adhezije Se857.



Slika 30: **Vpliv *L. gasseri* LF221 na adhezijo in invazijo *S. enteritidis* 857 na oz. v celice Caco-2.** Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili: različnemu številu *S. enteritidis* 857 (Se), mešanici Se in *L. gasseri* LF221 (Se+LF) ali najprej LF in naknadno Se (LF—Se). LF so imeli v vseh primerih v koncentraciji 2345 ± 156 CFU/Caco-2. V primeru LF—Se smo celice najprej za 1h izpostavili LF, nato s PBS sprali nevezane LF in za 1h celice izpostavili Se. Nato smo celice (A): 3-krat sprali s PBS in dodali 0,05 % Triton X-100 oz. (B): 3-krat sprali s PBS, 3h inkubirali v DMEM^{genta} (200µg gentamicina/ml), nato 3-krat sprali s PBS in dodali 0,05 % Triton X-100, da smo celice Caco-2 lizirali ter prešteli število Se, ki se je (A): pripelo oz. (B): je vstopilo v celice Caco-2.

* statistično značilne razlike v primerjavi z Se ($p < 0,05$); ▲ ...meja statistične značilnosti ($p \leq 0,1$).

Figure 30: Influence of *L. gasseri* LF221 to *S. enteritidis* 857 adhesion to and invasion in Caco-2 cells.
Caco-2 cells were exposed for 1h to different numbers of *S. enteritidis* 857 (Se), mixture of Se and *L. gasseri* LF221 (Se+LF) or first to LF and subsequently to Se (LF—Se). LF was in concentration 2345 ± 156 CFU/Caco-2 in all samples. In the case of LF—Se, cells were first exposed for 1h to LF, then unadhered LF were washed away by PBS, then cells were exposed for 1h to Se. Subsequently cells were washed (A) 3-times with PBS and exposed to 0,05 % Triton X-100 or (B) washed 3-times with PBS, exposed for 3h to DMEM^{genta} (200µg gentamicin/ml), then washed 3-times with PBS and exposed to 0,05 % Triton X-100 which lysed the cells so (A):the number of Se adhered to and (B): the number of Se invaded in Caco-2 cells could be counted. *... statistically significant differences comparing to Se ($p < 0,05$); ▲...limit of statistical significance ($p \leq 0,1$).

4.7.4 Vpliv *L. rhamnosus* BGT10 na adhezijo in invazijo *S. enteritidis* 857 na oz. v celice Caco-2

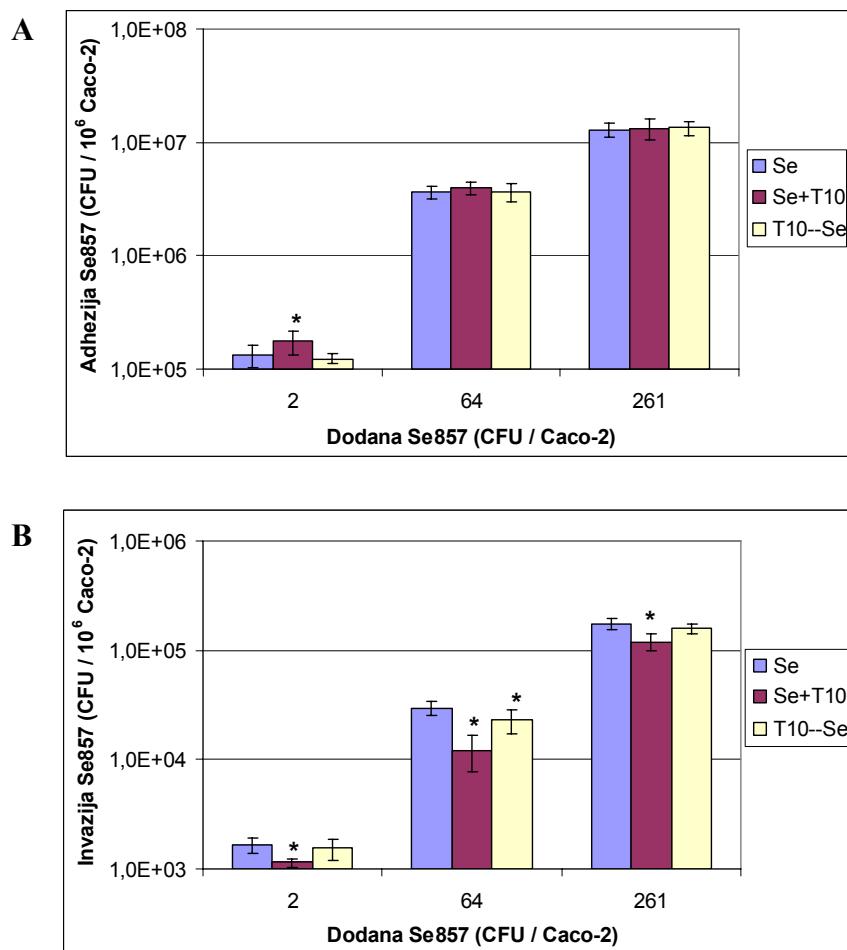
Preverili smo vpliv laktobacilov T10 na adhezijo in invazijo salmonele Se857 na/v celice Caco-2 in sicer na dva različna načina. Celice Caco-2 izpostavili ali T10 za 1 uro in po spiranju nevezanih T10 še Se857 za 1 uro ali pa mešanici T10 in Se857 za 1 uro.

Število T10 dodanih na Caco-2 je bilo pri vse koncentracijah Se857 približno 1063 ± 110 CFU/Caco-2. V primeru, ko so bile celice Caco-2 najprej izpostavljene T10 in nato Se857, smo celice po 1-urni inkubaciji s T10, 3-krat sprali s PBS. Po spiranju nepripetih T10 je bilo na celicah pripetih T10 približno $10 \pm 0,3$ CFU/Caco-2.

Slika 31A kaže, da laktobacili T10 v nobenem od načinov niso ovirali Se857 pri adheziji na celice Caco-2. T10 so v mešani kulturi z Se857 v koncentraciji 2 CFU/Caco-2 celo povečali adhezijo Se857 ($p<0,05$), v primerjavi z adhezijo same Se857 v enaki koncentraciji.

Slika 31B kaže, da so laktobacili T10 v mešani kulturi z Se857 statistično značilno zmanjšali invazijo Se857 ($p<0,05$) v primerjavi z invazijo same Se857 pri vseh uporabljenih koncentracijah Se857. Statistično značilno manjša je bila tudi invazija Se857 ($p<0,05$) v primeru, ko so bile celice Caco-2 najprej izpostavljene T10 in naknadno Se857 v koncentraciji 64 CFU/Caco-2 v primerjavi z invazijo same Se857 v enaki koncentraciji.

Rezultati kažejo, da laktobacili T10 ovirajo invazijo Se857 v celice Caco-2, medtem ko ne ovirajo adhezije Se857.



Slika 31: **Vpliv *L. rhamnosus* BGT10 na adhezijo in invazijo *S. enteritidis* 857 na oz. v celice Caco-2.**
Celice Caco-2 smo za 1h izpostavili: različnemu številu *S. enteritidis* 857 (Se), mešanici Se in *L. rhamnosus* BGT10 (Se+T10) ali najprej T10 in naknadno Se (T10—Se). T10 so imeli v vseh primerih v koncentraciji 1063 ± 110 CFU/Caco-2. V primeru T10—Se smo celice najprej za 1h izpostavili T10, nato s PBS sprali nevezane T10 in za 1h celice izpostavili Se. Nato smo celice (A): 3-krat sprali s PBS in dodali 0,05 % Triton X-100 oz. (B): 3-krat sprali s PBS, 3h inkubirali v DMEM^{genta} (200µg gentamicina/ml), nato 3-krat sprali s PBS in dodali 0,05 % Triton X-100, da smo celice Caco-2 lizirali ter prešteli število Se, ki se je (A): pripelo oz. (B): je vstopilo v celice Caco-2.

* statistično značilne razlike v primerjavi z Se ($p<0,05$).

Figure 31: **Influence of *L. rhamnosus* BGT10 to *S. enteritidis* 857 adhesion to and invasion in Caco-2 cells.** Caco-2 cells were exposed for 1h to different numbers of *S. enteritidis* 857 (Se), mixture of Se and *L. rhamnosus* BGT10 (Se+T10) or first to T10 and subsequently to Se (T10—Se). T10 was in concentration 1063 ± 110 CFU/Caco-2 in all samples. In the case of T10—Se, cells were first exposed for 1h to T10, then unadhered T10 were washed away by PBS, then cells were exposed for 1h to Se. Subsequently cells were washed (A) 3-times with PBS and exposed to 0,05 % Triton X-100 or (B) washed 3-times with PBS, exposed for 3h to DMEM^{genta} (200µg gentamicin/ml), then washed 3-times with PBS and exposed to 0,05 % Triton X-100 which lysed the cells so (A):the number of Se adhered to and (B): the number of Se invaded in Caco-2 cells could be counted.

*... statistically significant differences comparing to Se ($p<0,05$).

5 RAZPRAVA

5.1 RAZPRAVA

Črevesni epitel ima pomembno vlogo pri obrambi črevesja pred vdorom patogenih mikroorganizmov. Med okužbo z enteropatogenimi bakterijami, kot so tudi nekateri serotipi rodu *Salmonella*, epitelne celice delujejo kot prva obrambna linija, kjer se sproži lokalni imunski odziv. Ta odziv vključuje tudi povečano sintezo vnetnih citokinov, predvsem interleukina-8 (IL-8), ki privlači neutrofilce in ostale granulocitne celice na mesto vnetja. Namen tega je preprečevanje okužbe in izločitev patogena iz črevesja. Dolgotrajno izločanje IL-8 in granulocitnih celic na mestu vnetja pa pogosto vodi v akutno ali kronično vnetje in lahko tudi do drugih bolezni. Do tega pogosto pride tudi pri okužbi s patogenimi vrstami salmonele (Finlay in Falkow, 1997; Holzapfel, 1998; McCormick in sod., 1995; Neish, 2002). Pri zaščiti črevesnega epitela sodelujejo tudi nekateri predstavniki rezidentne mikroflore. Veliko študij kaže, da nekatere vrste laktobacilov vplivajo na izboljšanje lokalnega akutnega ali kroničnega vnetja črevesja, Cronove bolezni, bolezni povezanih z diarejo in pri raku debelega črevesja (Herías in sod., 2005; Hirayama in Rafter, 2000; Isolauri in sod., 2002; Ouwehand in sod., 2002; Reid in Burton, 2002). Večina teh bolezni oz. motenj je povezana s povišano koncentracijo IL-8 v črevesni sluznici (Feghali in Wright, 1997; Hecht in Savkovic 1997; Neish, 2002; Uggioni in sod., 1999; Walis in Galyov, 2000). Laktobacili lahko znižajo IL-8 ob okužbi epitelnih celic s salmonelo tako, da zavirajo aktivacijo gostiteljskega transkripcijskega faktorja NF- κ B, ki je odgovoren za nastanek IL-8 (Isolauri, 2004; Ma in sod., 2004; Menard in sod., 2004) ali ovirajo adhezijo ter invazijo salmonele (Bernet in sod., 1994; Cocconier in sod., 1993; Hendriks in sod., 2001), lahko pa izločajo protimikrobne snovi, ki ovirajo salmonelo pri indukciji sinteze IL-8 (Cocconier in sod., 2000; Nemeth in sod., 2006). Pomembno vlogo pri znižanju IL-8 imajo tudi gostiteljski proteini toplotnega stresa (Hsp) (Malago in sod., 2002 in 2005; Ovelgöne in sod., 2000; Yoo in sod., 2000). Oxman in sod. (2000) so ugotovili, da produkti laktobacilov povečajo sintezo Hsp70, ki nudijo dolgotrajno zaščito proti ischemiji srca pri podganah, sicer pa ni dosti podatkov o vlogi laktobacilov pri spodbujanju Hsp70 v epitelnih celicah človeka in živali.

Glavni cilj, ki smo si ga postavili v tej doktorski nalogi, je bil preveriti, če določene vrste laktobacilov lahko zaščitijo epitelne črevesne celice pred škodljivimi vplivi salmonele. Da smo to preverili, smo si za model epitelnih črevesnih celic izbrali celično linijo Caco-2, laktobacile *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 ter invazivno salmonelo *S. enteritidis* 857. Vpliv salmonele na celice Caco-2 smo ugotavljali s spremeljanjem količine IL-8, transepitelne električne upornosti celic (TEER) ter adhezije in invazije salmonele v celice Caco-2. Ugotavljali smo, če *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 preko indukcije sinteze Hsp70 v celicah Caco-2 in/ali preko produktov, ki jih izločajo v okolje,

ovirajo sintezo IL-8, ki jo v celicah Caco-2 spodbudi *S. enteritidis* 857. Preverili smo tudi, če *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 ovirata *S. enteritidis* 857 pri znižanju TEER ter pri adheziji in invaziji na/v celice Caco-2.

Za model epitelnih celic črevesja smo uporabili celice Caco-2. Te celice so pridobljene iz tumorja debelega črevesja človeka (Fogh in sod. 1977), vendar v pogojih *in vitro* spontano diferencirajo v absorpcijskim enterocitam podobne celice in izražajo lastnosti epitelnih celic tankega črevesja (enterocit) tako strukturno kot funkcionalno (Pinto in sod., 1983). Pri vseh poskusih smo uporabljali diferencirane celice Caco-2 in proučevali vpliv izbranih bakterij na celice.

Kot primer za črevesje neugodne bakterije smo uporabili nizozemski izolat salmonele *S. enteritidis* 857 (Van Asten in sod., 1995). *Salmonella* serotip Enteritidis je danes eden najpogosteje izoliranih serotipov salmonele iz človeka, predvsem v Evropi in Ameriki. Povzroča okužbe prebavnega trakta ter hudo diarejo. Večje težave lahko nastanejo pri majhnih otrocih in starejših ljudeh, pri katerih se bolezen lahko konča tudi s smrto (Oldfield III, 2001; Rodrigue in sod., 1990). Dosedanja odkritja kažejo, da se *S. enteritidis* 857 pripenja na in vstopa v celice Caco-2 (Hendriks in sod., 1996 in 2001), zniža TEER celic Caco-2 (Malago in sod., 2003; Fajdiga in sod., 2006) in spodbudi celice Caco-2 k povečanem izločanju vnetnega citokina IL-8 (Jonge in sod., 2001; Malago in sod., 2005; Nemeth in sod., 2006).

Velika večina laktobacilov se dobro pripenja na modelne epitelne celice črevesja (Bogovič Matijašič in sod., 2003; Greene in Klaenhammer, 1994; Holzapfel in sod., 1998; Reid in Burton, 2002; Servin, 2004; Tuomola in Salminen, 1998). Pri tem laktobacili minimalno izzovejo ali pa ne izzovejo sinteze IL-8 (Haller in sod., 2000; Lammers in sod., 2002; Morita in sod., 2002; Nemeth in sod., 2006). V doktorski disertaciji smo uporabili laktobacile *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10. *L. gasseri* LF221 je humani izolat iz blata dojenčka z dokazanim probiotičnim delovanjem in je varen za uporabo (Bogovič Matijašič, 1997; Rogelj in sod., 2002). Poleg tega ima dobre adhezivne sposobnosti (Bogovič Matijašič in sod., 2003). Humani vaginalni izolat *L. rhamnosus* BGT10 je delno proučen le iz genetskega vidika (Pastar in sod., 2003) in še ne v smislu probioticske uporabe v prehrani človeka. Izbrali smo ga zato, ker ima v svoji celični steni domeno (wall spacer; W-domena), v kateri je 100 od 133 aminokislin homolognih z ohranjenim zaporedjem genov za fragment humanega črevesnega proteina mucina (Pastar in sod., 2003). Mucin je glavni sestavni del sluzi, ki prekriva sluznico prebavil in ima pomembno vlogo pri preprečevanju naselitve patogenov (Acheson in Luccioli, 2004; Servin, 2004; Usui in sod., 1999). Glavna vloga W-domene je sicer povezava proteinaze PrtR s celično steno bakterije (proteinaza PrtR je pomembna za razgradnjo kazeina v oligopeptide), vendar pa predvidevajo, da ima vlogo tudi pri adheziji *L. rhamnosus* BGT10 na vaginalno sluznico.

Zaporedje 100 aminokislin, ki ima homologijo s humanim mucinom je namreč v 35% identično tudi s C-terminalnim delom površinskih adhezinov *Streptococcus gordonii*, ki so pomembni za adhezijo na humane receptorje v ustni votlini. Poleg tega, W-domene nekaterih sevov *Lactobacillus lactis* olajšajo adhezijo teh laktobacilov na humane rakaste červesne celice (Pastar in sod., 2003). Pastar in sod. (2003) predpostavljajo, da bi *L. rhamnosus* BGT10 z W-domeno lahko tekmoval s patogeni za vezavna mesta in zaščitil vaginalno ali červesno sluznico pred adhezijo in kolonizacijo patogenov.

5.1.1 Vpliv povečane temperature na izražanje Hsp v celicah Caco-2

Najprej smo preverili, če v celicah Caco-2 lahko spodbudimo in zaznamo Hsp. Običajna temperatura, pri kateri gojimo celice, je 37°C. Toplotni stres smo povzročili tako, da smo celice za 1 uro izpostavili temperaturi 42°C. Po topotnem stresu smo celice inkubirali pri 37°C in ob različnih časih po stresu spremljali nastanek Hsp60, Hsp70 in Hsp90. Že pol ure po stresu so celice sintetizirale povečano količino vseh Hsp v primerjavi s konstitutivnimi količinami v kontrolnih celicah (slika 8). Med vsemi Hsp je bila količina Hsp60 največja. Sinteza Hsp60 je nihala s časom Količino Hsp smo merili do 6 ur po prenehanju stresa, največ Hsp60 smo dokazali po 4 urah. Naslednji po intenzivnosti lis je bil Hsp70, Hsp90 pa je bil količinsko najmanj zastopan. Količina Hsp70 se je od 0,5 do 1 ure po prenehanju stresa znižala, potem pa se je s časom povečevala do konca meritev (6 ur). Količina Hsp90 se je od 0,5 do 2 ur po prenehanju stresa zmanjševala, potem pa se je s časom povečevala do konca meritev (6 ur). S temi poskusi smo uspešno dokazali, da se celice Caco-2 odzivajo na topotni stres s povečano sintezo Hsp. Ovelgönne in sod. (2000) so v podobnem poskusu izmerili povečanje Hsp70 in Hsp90, ki je primerljivo z našimi rezultati. Istočasno pa niso izmerili povišane koncentracije Hsp60, kar je v nasprotju z našimi rezultati, saj smo mi med vsemi Hsp zaznali največ ravno Hsp60. Kaj je vzrok temu, ne vemo.

Ker je Hsp70 v celicah Caco-2 ponavadi zelo inducibilen, ker je največ raziskav narejenih s Hsp70 (Jäättelä, 1999; Kiang in sod., 1998; Morimoto, 1998; Ovelgönne in sod., 2000) in ker se je v našem poskusu koncentracija Hsp70 s časom povečevala (slika 8), smo v nadaljnjih poskusih spremljali le izražanje Hsp70. Natančneje smo preverili časovni potek sinteze Hsp70 do 48 ur po končanem topotnem stresu pri 42°C. V primerjavi s konstitutivno koncentracijo Hsp70 v kontrolnih celicah, se je koncentracija Hsp70 do 8 ur po topotnem stresu povečevala, z izjemo pri 4 urah, kjer se je znižala. To znižanje pripisujemo eksperimentalni napaki. Od 8 do 48 ur po stresu pa je količina Hsp70 padala, vendar je bila tudi po 48 urah še vedno višja kot konstitutivni nivo (slika 9). Razpolovna doba Hsp70 je v humanih epidermalnih celicah okoli 48 ur (Kiang in Tsokos, 1998), zato predvidevamo, da je v našem poskusu pri 48 urah po prenehanju stresa, verjetno količina Hsp70 že delno razpadla in sinteza novih Hsp70 ni več potekala. Da pa bi to ugotovitev

potrdili, bi mogli spremljati količino Hsp70 tudi po več kot 48 urah. Spremljali smo tudi vpliv različnih temperatur ($37 - 43^{\circ}\text{C}$) na izražanje Hsp70, katerih količino smo merili 6 ur po izpostavitvi celic različnim temperaturam (slika 10). Koncentracija Hsp70 se je povečevala z višanjem temperature. Trend naraščanja Hsp70 je bil podoben eksponencialni funkciji. Podobno kot mi, so tudi Malago in sod. (2003) ter Ovelgönne in sod. (2000) v podobnih poskusih dokazali, da Hsp70 v celicah narašča z višanjem temperature.

Opazili smo, da so bile med različnimi poskusi, pri enakem stresu ob istem času (npr. 6 ur po stresu pri 42°C), dejanske količine Hsp70 različne (slike 8, 9 in 10). Za te razlike je možnih več vzrokov, kljub temu da smo poskuse vedno izvajali na enak način in pri enakih pogojih. Namreč, biokemijsko stanje celic se morda v posameznih pasažah malo razlikuje, do napak lahko pride pri nanosu vzorcev v žepke gela za elektroforezo, pri prenosu proteinov iz gela na membrano ali med imunodetekcijo. Med paralelkami vzorcev so bili trendi sinteze Hsp70 podobni, vendar pa so bila odstopanja med dejanskimi koncentracijami vseeno kar velika. Zato smo se odločili, da bomo prikazovali le po en set vzorcev (eno paralelko).

5.1.2 Vpliv salmonele in laktobacilov na izražanje Hsp70 in IL-8 v celicah Caco-2

Z nadaljnjiimi poskusi smo ugotavljali, če izpostavitev celic Caco-2 različnim bakterijam povzroči različno izražanje Hsp70 in IL-8. Celice smo izpostavili različnim številom posameznih bakterij: *S. enteritidis* 857, *L. gasseri* LF221, *L. rhamnosus* BGT10 in *L. sakei* NCDO 2714. Celice smo izpostavili bakterijam za 1 uro, nato pa jih sprali z gojiščem, ki je vsebovalo antibiotik gentamicin (DMEM^{genta}; koncentracija gentamicina $50\mu\text{g}/\text{ml}$). Bakterijske suspenzije smo pripravili v gojišču DMEM, ki je primerno za celice Caco-2. Čeprav so bili postopki podobni tistim, ki so jih uporabili tudi drugi raziskovalci (Bernet-Camard in sod., 1997; Bogovič Matijašič in sod., 2006; Cocconier in sod., 2000; Hendriks in sod., 2001; Jepson in sod., 1996; Solano in sod., 2001; Tuomola in Salminen, 1998; Van Asten, 2005; idr.), smo vseeno preverili preživetje uporabljenih sevov v gojišču DMEM. Ugotovili smo, da DMEM ne ovira preživetja teh sevov (neprikazani rezultati). Preverili smo tudi morebitno preživetje bakterij v DMEM^{genta} po 30 minutah in po 1 uri inkubiranja. Ugotovili smo, da bakterije ne preživijo niti 30 minut (neprikazani rezultati). Gentamicin je aminoglikozidni antibiotik s širokim spektrom delovanja in je baktericiden za večino gram-pozitivnih in gram-negativnih bakterijskih vrst že v nizkih koncentracijah (Singleton in Sainsbury, 1996). Gentamicin pogosto uporablja pri delu s celičnimi kulturami, ker je eden redkih antibiotikov, ki imajo širok spekter delovanja na bakterije, hkrati pa v koncentracijah $25-400 \mu\text{g}/\text{ml}$ tudi po 2 urah ne penetrira v celice Caco-2 (Ranaldi in sod., 1992).

5.1.2.1 Vpliv salmonele in laktobacilov na izražanje Hsp70 v celicah Caco-2

Ugotovili smo, da je *S. enteritidis* 857 inducirala 1,2-krat več Hsp70 kot je bil konstitutivni nivo. Povečanje smo opazili le v primeru najvišjih uporabljenih koncentracij salmonele (404 in 704 CFU/Caco-2) in le 6 ur po končani izpostavitvi celic salmoneli (slika 11, priloga A). Pri izpostavitvi celic Caco-2 *S. enteritidis* 857 v koncentraciji 500 CFU/Caco-2, so Malago in sod. (2003) dokazali 2,0-krat več Hsp70 v primerjavi s konstitutivnim nivojem. Zakaj je med njihovimi in našimi rezultati takšna razlika, ne vemo. Laktobacili *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 so inducirali sintezo Hsp70 v primerjavi s konstitutivnim nivojem Hsp70 v celicah Caco-2, medtem ko laktobacili *L. sakei* NCDO 2714 niso imeli takšnega učinka (sliki 12 in 13, priloga A). 3 ure po končani izpostavitvi celic *L. rhamnosus* BGT10 smo dokazali povečan nivo Hsp70 pri vseh koncentracijah *L. rhamnosus* BGT10 in 6 ur po izpostavitvi celic le pri nižjih uporabljenih koncentracijah (9, 86 in 153 CFU/Caco-2). 1,3-krat več Hsp70 kot konstitutivni nivo, je bilo največje povečanje, ki smo ga dokazali (sliki 12B in 13B). Ob izpostavitvi celic Caco-2 *L. gasseri* LF221, pa se je koncentracija Hsp70 povečevala z večanjem števila teh laktobacilov. Povečan nivo Hsp70 je bil prisoten v celicah tudi še 24 ur po izpostavitvi celic tem laktobacilom. 3 ure po izpostavitvi celic najvišji uporabljeni koncentraciji *L. gasseri* LF221 (998 CFU/Caco-2) smo zaznali 1,2-krat več, po 6 urah 1,5-krat več in po 24 urah 2,5-krat več Hsp70 od konstitutivnega nivoja (sliki 12A in 13A). Nemeth in sod. (2006) so celice Caco-2 izpostavili laktobacilom *L. casei*, *L. curvatus* in *L. plantarum*. Vsi sevi so inducirali sintezo Hsp70. Količine Hsp70 so bile po izpostavitvi celic različnim sevom različne, pri vseh pa so se s časom povečevale. Predvidevamo, da različni sevi laktobacilov spodbudijo v celicah Caco-2 različno količino Hsp70 in da je sposobnost za indukcijo sinteze Hsp70 odvisna od seva. Katera lastnost seva je pri tem pomembna, ne vemo. Morda so vzrok površinske molekule, ki jih laktobacili izražajo, morda sposobnost adhezije laktobacilov na celice Caco-2 ali pa produkti, ki jih ti laktobacili izločajo.

5.1.2.2 Vpliv salmonele in laktobacilov na izražanje IL-8 v celicah Caco-2

S. enteritidis 857 je inducirala sintezo IL-8 v celicah Caco-2 v primerjavi s konstitutivnim nivojem (slika 14). Količina IL-8 se je povečevala s časom in z večanjem koncentracije salmonele do 404 CFU/Caco-2, nato pa se je pri koncentraciji 704 CFU/Caco-2 znižala glede na 404 CFU/Caco-2. Razen po 3 urah, ko se je koncentracija IL-8 povečevala do koncentracije salmonele 704 CFU/Caco-2 (slika 14, priloga B). Malago in sod. (2005) ter Nemeth in sod. (2006) so ugotovili, da se količina IL-8 povečuje s časom po končani izpostavitvi celic *S. enteritidis* 857. Nemeth in sod. (2006) so uporabili le eno koncentracijo *S. enteritidis* 857 in rezultati, ki so jih dobili pri tej koncentraciji salmonele, so primerljivi z našimi rezultati. Malago in sod. (2005) so v enem od poskusov celice Caco-2 izpostavili različnim koncentracijam *S. enteritidis* 857 in koncentracijo IL-8 merili

24 ur po inkubaciji celic Caco-2 s salmonelo. Ugotovili so, da se je koncentracija IL-8 povečevala do izpostavitve celic salmoneli v koncentraciji 10 CFU/Caco-2, nato pa je bila približno konstantna, ko so celice izpostavili salmoneli v koncentracijah 20 – 200 CFU/Caco-2. Koncentracija IL-8, ki so jo izmerili po izpostavitvi celic Caco-2 *S. enteritidis* 857 v koncentracijah 10 – 200 CFU/Caco-2, je bila primerljiva s koncentracijo IL-8, ki smo jo 24 ur po izpostavitvi celic *S. enteritidis* 857 v našem poskusu, izmerili pri salmoneli v koncentraciji 404 CFU/Caco-2. Jonge in sod. (2001) so ugotovili, da po izpostavitvi celic Caco-2 dvema različnima sevoma *S. enteritidis*, koncentracija IL-8 s časom narašča. Prav tako druge raziskave kažejo, da različni serotipi salmonele (*S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. enteritidis*) v epitelnih celicah Caco-2, T-84 in HT-29 spodbudijo večkratno povečanje IL-8 v primerjavi s kontrolnimi celicami (Cocconier in sod., 2000; Gewirtz in sod., 2001; Jonge in sod., 2001; Jung in sod., 1995; Ma in sod., 2004; Van Asten, 2005). Povišane koncentracije IL-8 ob okužbi s patogenimi vrstami salmonele so ponavadi povezane z vnetjem, diarejo in z nekaterimi drugimi boleznimi črevesja (Baggiolini, 2001; Finlay in Falkow, 1997; Gewirtz in sod., 1999; McCormick in sod., 1995; Uggioni in sod., 1999; Wallis in Galyov, 2000), zato je za omejevanje vnetja pomembno znižati količino IL-8.

Mnogo raziskovalcev je ugotovilo, da različni sevi laktobacilov minimalno spodbudijo ali pa sploh ne spodbudijo nastanka IL-8 (Haller in sod., 2000; Lammers in sod., 2002; McCracken in sod., 2002; Morita in sod., 2002, Wallace in sod., 2003). Jonge in sod. (2001) pa so ugotovili, da so bile koncentracije IL-8 v celicah Caco-2, 4 ure po izpostavitvi *L. casei* večje kot pri izpostavitvi enakim koncentracijam *S. enteritidis* 97-198 in *S. enteritidis* 857, ter po 24 urah večje kot pri izpostavitvi *S. enteritidis* 97-198 in manjše kot pri izpostavitvi *S. enteritidis* 857. Naši rezultati kažejo, da so laktobacili *L. gasseri* LF221, *L. rhamnosus* BGT10 in *L. sakei* NCDO 2714 spodbudili nastanek IL-8 v celicah Caco-2. Koncentracija IL-8 je naraščala z večanjem koncentracije laktobacilov in tudi s časom po končani izpostavitvi celic laktobacilom (slika 15, priloga B), vendar so bile te količine manjše, kot pri izpostavitvi celic salmoneli (slika 14, priloga B). *L. rhamnosus* BGT10 so v celicah Caco-2 spodbudili najmanj IL-8 med vsemi laktobacili. *L. gasseri* LF221 in *L. sakei* NCDO 2714 so v povprečju spodbudili približno 2-krat manj IL-8 kot *S. enteritidis* 857 v podobni koncentraciji (400-1000 bakterij/Caco-2), medtem ko *L. rhamnosus* BGT10 približno 3- do 5-krat manj. V vseh primerih pa je bila raven IL-8 odvisna od števila bakterij in od časa, ki je minil po končani inkubaciji celic z bakterijami. Nemeth in sod. (2006) so celice Caco-2 izpostavili laktobacilom *L. casei*, *L. curvatus*, *L. plantarum* in salmoneli *S. enteritidis* 857. 6 ur po končani izpostavitvi celic vsem laktobacilom so izmerili približno 6,5-krat manj IL-8 in po 24 urah približno 5,5-krat manj IL-8 kot pri *S. enteritidis* 857.

Zasledili smo različne razlage o vzroku indukcije sinteze IL-8 v epitelnih celicah pri okužbi s salmonelami. Eckmann in sod. (1995) ter Jung in sod. (1995) so ugotovili, da je vzrok invazija salmonele v celice. McCormick in sod. (1995), Walis in Galyov (2000) ter Lee in sod. (2000) pa predvidevajo, da za indukcijo sinteze IL-8 ni potrebna invazija salmonele, ampak sistem TTSS oz. vsaj nekateri efektorski proteini TTSS. V zadnjem času pa veliko raziskovalcev (Berkes in sod., 2003; Gewirtz in sod., 2001; Hayashi in sod., 2003; Van Asten, 2005; Zeng in sod., 2003) ugotavlja, da je glavni vzrok indukcije sinteze IL-8 pri okužbi s salmonelami, protein flagelin. Flagelin je glavni sestavni del bička salmonele. V epitelnih celicah ga prepoznavata TLR-5, ki se nahaja na bazolateralni strani epitelnih celic (Gewirtz in sod., 2001; Takeda in Akira, 2003) oz. nekatere raziskave kažejo, da je verjetno prisoten tudi na apikalni strani (Berin in sod., 2002; Van Asten, 2005). TLR receptorji vplivajo na aktivacijo NF-κB, ki je glavni transkripcijski faktor za gene, ki kodirajo vnetne citokine, vključno z IL-8 (Janeway in Medzhitov, 2002; Neish in sod., 2002). Tudi *S. enteritidis* 857 dokazano inducira sintezo IL-8 v celicah Caco-2 predvsem s flagelinom (Van Asten, 2005). Ni veliko raziskav, v katerih bi ugotavljali, kako laktobacili spodbujajo nastanek IL-8 v epitelnih celicah. TLR-2 prepoznavata lipotejhojsko kislino in druge komponente celične stene gram-pozitivnih bakterij, kar vodi v aktivacijo NF-κB (Didierlaurent in sod., 2002; Kawai in Akira, 2005; Neish, 2002; Takeda in Akira, 2003). Ker je lipotejhojska kislina sestavni del celične stene laktobacilov je možno, da indukcija sinteze IL-8 z laktobacili poteka preko TLR-2. Vinderola in sod. (2005) predvidevajo, da probiotske bakterije preko TLR-2 inducirajo nastajanje IL-6, ki je vnetni citokin. Transkripcijo IL-6, tako kot transkripcijo IL-8 pa aktivira NF-κB. Koncentracija vnetnih citokinov, ki nastajajo s signalom, prenesenim preko TLR-2, je ponavadi nizka (Hayashi in sod., 2003; Vinderola in sod., 2005). Ker probiotske bakterije nespecifično spodbujajo imunski sistem gostitelja (Ewing in Cole, 1994; Holzapfel in sod., 1998; Stevens in Hume, 1998; Neish, 2002) in ker je tudi IL-8 del prirojenega imunskega sistema ter pomemben za preprečevanje okužb s patogeni (Hecht in Savkovic, 1997; Janeway in Medzhitov, 2002; Neish, 2002), morda laktobacili z indukcijo sinteze IL-8 le spodbujajo imunski sistem gostitelja (Cross in sod., 2004; Haller in sod., 2000; Wallace in sod., 2003).

5.1.3 Vpliv laktobacilov na izražanje IL-8, ki ga v celicah Caco-2 spodbudi salmonela

Hsp v evkariontskih celicah stabilizirajo citoskelet (Jäättelä, 1999; Koyashu in sod., 1986; Liang in McRae, 1997) in na ta način omejujejo invazijo salmonele v celice (Malago in sod., 2003). Poleg tega Hsp inhibirajo aktivacijo NF-κB (Malago in sod., 2002; Yoo in sod., 2000) ter aktivacijo MAP kinaz (Donze in sod., 2001; Galan, 1994; Mosser in sod., 2000) in na ta način zavirajo povečan nastanek IL-8. Ko smo celice Caco-2 izpostavili *S. enteritidis* 857, se je koncentracija Hsp70 minimalno povečala v primerjavi s

konstitutivnim nivojem (slika 11) in to očitno ni oviralo nastanka IL-8. Malago in sod. (2005) so celice Caco-2 za 1 uro izpostavili topotnemu stresu (42°C) in 6 ur po stresu še različnim koncentracijam *S. enteritidis* 857. Ugotovili so, da Hsp70, ki jih inducira topotni stres, zavirajo nastajanje IL-8, ki ga spodbudi kasneje dodana salmonela. Ugotovili so, da tudi butirat, ki so ga dodali v gojišče, v celicah Caco-2 inducira sintezo Hsp70, ki nato ovira indukcijo sinteze IL-8 pri kasnejši izpostavitvi celic salmoneli. Tudi prostaglandini, herbimicin-A in glutamin lahko vplivajo na povečanje sinteze Hsp in zmanjšanje vnetja (Hayashi in sod., 2002; Malago in sod., 2002). V doktorski disertaciji smo eksperimentalno preverili, če laktobacili spodbudijo nastanek Hsp70 in tako zaščitijo celice Caco-2.

Celice Caco-2 smo najprej izpostavili laktobacilom *L. gasseri* LF221 oz. *L. sakei* NCDO 2714 in nato salmoneli *S. enteritidis* 857. Po izpostavitvi laktobacilom, smo celice sprali z DMEM^{genta}, da smo popolnoma odstranili laktobacile. Celicam smo za sintezo Hsp70 dali na voljo 24 ur, preden smo jih izpostavili *S. enteritidis* 857. Ker *L. sakei* NCDO 2714 v predhodnih poskusih niso vplivali na povečanje Hsp70 v celicah Caco-2 (slika 12), smo ta sev uporabili le za primerjavo z *L. gasseri* LF221. Kot pozitivno kontrolo za Hsp70, smo celice izpostavili topotnemu stresu (42°C) in nato salmoneli. Ugotovili smo, da so *L. gasseri* LF221 in tudi *L. sakei* NCDO 2714 v primerjavi s konstitutivno koncentracijo Hsp70, inducirali sintezo Hsp70 v celicah Caco-2 (slika 16), vendar to očitno ni bilo dovolj za zmanjšanje sinteze IL-8 (slika 17). Pri pozitivni kontroli (topotni stres) je nastalo največ Hsp70 (slika 16), vendar tudi to ni zmanjšalo koncentracije IL-8 (slika 17), kar je v nasprotju z ugotovitvami Malaga in sod. (2005). Opazili smo, da so celice izdelale manj Hsp70 v primeru, ko so bile izpostavljene laktobacilom oz. topotnemu stresu in naknadno salmoneli, v primerjavi s celicami, ki naknadno niso bile izpostavljene salmoneli (slika 16). Za ta vpliv nimamo ustrezne razlage. Predvidevamo, da morda poskus ni bil ustrezno izveden in da je od izpostavitve celic laktobacilom oz. topotnemu stresu do izpostavitve salmoneli, preteklo preveč časa. Koncentracijo Hsp70 in IL-8 smo namreč merili šele 30 oz. 48 ur po začetku poskusa (shema v poglavju 3.4.4.1), s predhodnimi poskusi pa smo ugotovili, da v tem času koncentracija Hsp70 že pade (slika 9).

Poskus smo izvedli še enkrat, vendar tako, da smo celice Caco-2 izpostavili *L. gasseri* LF221 ali *L. rhamnosus* BGT10 in takoj po spiranju z gojiščem DMEM (traja približno 30 minut) izpostavili *S. enteritidis* 857. Predvidevamo, da je po spiranju celic z DMEM, nekaj laktobacilov ostalo pripetih na celicah Caco-2. Za *L. gasseri* LF221 smo izbrali nižjo koncentracijo kot za *L. rhamnosus* BGT10, ker smo iz predhodnih poskusov ugotovili, da *L. gasseri* LF221 bolj spodbudi sintezo IL-8 kot *L. rhamnosus* BGT10 (slika 15) in nismo želeli, da bi to vplivalo na rezultate. Ugotovili smo, da so bile koncentracije IL-8 pri izpostavitvi celic laktobacilom in naknadno salmoneli približno enake koncentracijam, ki jih je spodbudila sama *S. enteritidis* 857, pri vseh uporabljenih koncentracijah (sliki 19 in 21). Laktobacili, predvsem *L. gasseri* LF221 so sicer inducirali sintezo Hsp70 v celicah

Caco-2 (sliki 18 in 20), vendar to očitno ni zaviralno vplivalo na sintezo IL-8. Iz teh in rezultatov prejšnjega poskusa sklepamo, da Hsp70 ne zavirajo nastanka IL-8, ki ga v celicah Caco-2 spodbudi *S. enteritidis* 857. Poleg tega, izpostavitev celic Caco-2 *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 pred izpostavitvijo salmoneli, ne ovira salmonele pri indukciji sinteze IL-8.

Preverili smo tudi, če laktobacili inhibirajo sintezo IL-8, ki jo v celicah Caco-2 spodbudi *S. enteritidis* 857, ko se na celicah pojavijo sočasno s salmonelo. Celice Caco-2 smo izpostavili mešanici *S. enteritidis* 857 in *L. gasseri* LF221 oz. mešanici *S. enteritidis* 857 in *L. rhamnosus* BGT10. Ugotovili smo, da je bila v primerjavi s koncentracijo IL-8, ki jo je spodbudila sama *S. enteritidis* 857, koncentracija IL-8 po izpostavitvi mešanicam bakterij, v nekaterih primerih nižja (sliki 19 in 21). Pri obeh mešanicah je bila inhibicija s *S. enteritidis* 857 povzročene sinteze IL-8 največja 3 ure po inkubaciji celic z bakterijami in pri najnižji koncentraciji salmonele oz. pri mešanici salmonele in *L. rhamnosus* BGT10 tudi pri najvišji koncentraciji salmonele. Na zmanjšanje koncentracije IL-8 je imel *L. rhamnosus* BGT10 večji vpliv kot *L. gasseri* LF221. Sklepamo, da če so laktobacili primešani salmoneli, lahko znižajo sintezo IL-8, ki jo v celicah Caco-2 spodbudi salmonela, vendar je inhibicija vidna le do omejenega časa po izpostavitvi celic mešanici laktobacilov in salmonele. Morda je za inhibicijo IL-8 v celicah Caco-2 potrebna prisotnost laktobacilov, mi pa smo jih tako kot salmonelo, po 1-urni inkubaciji s celicami odstranili. Vendar glede na to, da je *S. enteritidis* 857 invazivna (Hendriks in sod., 2001), je verjetno določeno število salmonel po spiranju ostalo prisotnih v celicah Caco-2 in so morda še vedno vplivale na povečano sintezo IL-8. Mešanice bakterij so inducirale sintezo Hsp70 v celicah Caco-2 (sliki 18 in 20), vendar glede na ugotovitve prej omenjenih poskusov menimo, da za inhibicijo sinteze IL-8 niso vzrok Hsp70. Verjetno gre za nek drug vpliv laktobacilov na salmonelo ali vpliv laktobacilov na celice Caco-2, ki pa ga z našimi poskusi nismo uspeli ugotoviti.

Nekateri laktobacili v epitelnih celicah spodbujajo nastajanje proti-vnetnih citokinov, predvsem IL-10 (Haller in sod., 2002; Hessle in sod., 1999; Von der Weid in sod., 2001). IL-10 zaviralno vpliva na aktivacijo NF-κB in s tem na sintezo IL-8 (Brennan in Feldmann, 2000; Mantovani in Sozzani, 2000; Schottelius in sod., 1999). Yan in Polk (2002) sta ugotovila, da *L. rhamnosus* GG prepreči apoptozo celic HT-29, ki je posledica izločanja vnetnih citokinov tako, da inhibira aktivacijo MAP kinaze p38. *L. reuteri* inhibira prenos NF-κB v jedro in s tem prepreči sintezo IL-8, vendar le v primeru, če so laktobacili živi (Ma in sod., 2004). Segain in sod. (2000) so ugotovili, da pri bolnikih s Cronovo boleznijo butirat zmanjša nastajanje vnetnih citokinov tako, da inhibira prehod NF-κB iz citoplazme v jedro in preprečuje razgradnjo inhibitorja NF-κB (IkB). Laktobacili butirata ponavadi ne proizvajajo, vendar morda kateri drugi produkti laktobacilov učinkujejo podobno. S plinsko kromatografijo smo dokazali, da *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus*

BGT10 izločata mlečno kislino in ne ocetne, propionske ter maslene (butirat) kisline (priloga N). Morda na nastanek IL-8 vpliva mlečna kislina ali drugi produkti (H_2O_2 , etanol, bakteriocini, CO_2 , različni encimi) *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 oz. njihove mešanice. Morda pa tudi laktobacili direktno oz. s svojimi produkti vplivajo na povečanje proti-vnetnih citokinov v celicah Caco-2 in zmanjšajo raven IL-8, ki ga v celicah Caco-2 spodbudi *S. enteritidis* 857.

5.1.4 Vpliv produktov laktobacilov na sposobnost salmonele za indukcijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2

Preverili smo, če produkti, ki jih laktobacili izločajo v gojišče, vplivajo na sposobnost *S. enteritidis* 857 za indukcijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2. Produkte laktobacilov (SCS) smo pripravili tako, da smo kulture laktobacilov (v gojišču MRS) centrifugirali in supernatante filtrirali preko 0,22 μm filtra. Produkti laktobacilov so ostali v supernatantu. Vsi pripravljeni supernatanti so imeli vrednost pH med 3,9 in 4,5. Ker za gojenje salmonele uporabljamo popolnoma druga gojišča z nevtralnim pH, smo najprej preverili vpliv gojišča MRS in vpliv nizkega pH na salmonelo. Glede na rezultate (preglednica 1) predvidevamo, da gojišče MRS bistveno ne ovira preživetja salmonele, medtem ko pH ima vpliv. Ugotovili smo tudi, da vsi SCS z originalnim pH ovirajo preživetje salmonele, medtem ko v vseh SCS z nevtralnim pH salmonela normalno raste (preglednici 2 in 3, slika 22).

Vpliv različnih SCS na sposobnost *S. enteritidis* 857 za indukcijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2 smo ugotavljali tako, da smo salmonelo 1 uro inkubirali v SCS laktobacilov, nato usedlino bakterijskih celic sprali in tako pripravljeno salmonelo nanesli za 1 uro na celice Caco-2. Zaradi vpliva SCS na preživetje salmonele, smo vse originalne pH supernatantov povišali na vrednost 4,8. Ugotovili smo, da SCS vseh uporabljenih laktobacilov ovirajo sposobnost *S. enteritidis* 857 za indukcijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2 (slika 23, priloge D, E in F). Vpliv je bil večji predvsem pri nižjih koncentracijah salmonele (2 in 15 CFU/Caco-2) in manjši pri višji koncentraciji salmonele (146 CFU/Caco-2). SCS *L. sakei* NCDO 2714 je imel najmanjši vpliv med vsemi SCS. Če smo salmonelo tretirali z gojiščem MRS, ki smo mu znižali pH z mlečno kislino, se je znižala raven IL-8 v celicah Caco-2. Tega učinka ni bilo, če smo salmonelo tretirali z gojiščem MRS z nespremenjenim pH (pH = 6) in MRS s pH znižanim s HCl, kar kaže da mlečna kislina zaviralno vpliva na salmonelo pri indukciji sinteze IL-8. Pri nizkih koncentracijah salmonele je imel SCS večji inhibitorni učinek na izražanje IL-8 kot mlečna kislina, kar kaže, da je v SCS še nek drug faktor. Vendar pa je pri najvišji koncentraciji salmonele imela mlečna kislina večji učinek kot SCS. Predvidevamo, da so produkti laktobacilov, ki zavirajo sposobnost salmonele za indukcijo sinteze IL-8 aktivni le pri nizkem pH. Predvidevamo, da na salmonelo poleg teh produktov vpliva tudi mlečna kislina, vendar pa, da samo mlečna kislina ni vzrok inhibicije

sinteze IL-8. Predvidevamo tudi, da ima aktivni produkt (ali več produktov) iz SCS laktobacilov vpliv le do neke omejene koncentracije salmonele. Bakteriocini, ki jih izloča *L. gasseri* LF221 verjetno ne sodelujejo pri inhibiciji sinteze IL-8, saj med vplivom SCS *L. gasseri* LF221 (izloča bakteriocine) in vplivom SCS *L. gasseri* LF221bac- (mutanta, ki ne izloča bakteriocinov) ni bistvenih razlik.

Coconnier in sod. (1997) so ugotovili, da protimikrobnna snov iz SCS *L. acidophilus* LB (LB-SCS), ki ovira preživetje *S. typhimurium* ni mlečna kislina in je aktivna le pri kislem pH. Bernet-Camard in sod. (1997) so dokazali, da protimikrobnna snov iz SCS *L. acidophilus* LA1 (SCS-LA1), ki vpliva na preživetje *S. typhimurium* ni niti mlečna kislina niti bakteriocin. Protimikrobnna snov iz SCS *L. casei* GG (SCS-GG), ki pa sicer ne ovira preživetja *S. typhimurium*, ampak le invazijo salmonele v celice Caco-2, je prav tako aktivna le pri nizkih vrednostih pH (pH = 3-5). Vendar sam pH ni vzrok tega vpliva (Hudault in sod., 1997). SCS-LB je vplival tudi na preživetje salmonele v celicah Caco-2, če je bil dodan na celice po tem ko so bile izpostavljene salmoneli. Iz tega predpostavlja, da ta protimikrobnna snov lahko preide membrano celic in deluje na intracelularno prisotno salmonelo (Coconnier in sod., 1997) tako, da spremeni njeno morfologijo in aktivnost (Coconier in sod., 2000). Tudi Ménard in sod. (2004) so ugotovili, da nekateri metaboliti probiotiskih bakterij preidejo preko membrane epitelnih celic in zavirajo vnetje. Bernet in sod. (1994) so ugotovili, da je izpostavitev celic Caco-2 *S. typhimurium* hkrati z *L. acidophilus* LA1 in SCS-LA1 omejila adhezijo in invazijo salmonele na/v celice. Inhibicija se je povečala z večanjem koncentracije laktobacilov. Kasneje so ugotovili, da sami laktobacili (brez SCS-LA1) ne preprečijo adhezije in invazije. Zato predpostavlja, da ima zaviralni vpliv protimikrobnna snov iz SCS-LA1 (Bernet-Camard, 1997). Tsai in sod. (2005) pa so ugotovili, da izpostavitev celic Caco-2 salmoneli *S. typhimurium* hkrati z nekaterimi sevi laktobacilov in SCS teh laktobacilov enako učinkovito zavira invazijo salmonele, kot inkubacija celic s salmonelo in laktobacili brez SCS. Bernet-Camard in sod. (1997) so salmonelo tretirali z SCS-LA1. Salmonele, ki so preživele, so bile sposobne adhezije na celice Caco-2, niso pa bile sposobne vstopiti v celice. Tudi inkubacija salmonele v SCS-GG je zmanjšala sposobnost salmonele za invazijo, medtem ko ni vplivala na adhezijo (Hudault in sod., 1997). Tretiranje salmonele z SCS-LB pa je zaviralo adhezijo in invazijo salmonele na/v celice Caco-2 (Coconnier in sod., 1997). Oviranje invazije bi lahko vplivalo na zmanjšano sintezo IL-8, saj invazija salmonele (Eckmann in sod., 1995; Jung in sod., 1995) ali pa elementi sistema TTSS, ki so pomembni za invazijo (Lee in sod., 2000; McCormick in sod., 1995; Walis in Galyow, 2000) verjetno prispevajo k povečani koncentraciji IL-8 ob okužbi s salmonelami. Coconnier in sod. (2000) so kasneje ugotovili, da tretiranje salmonele z SCS-LB res zmanjša indukcijo sinteze IL-8. Tudi Nemeth in sod. (2006) so ugotovili, da je tretiranje salmonele z SCS *L. casei*, SCS *L. curvatus* in SCS *L. plantarum* zmanjšalo sintezo IL-8 ob izpostavitvi celic Caco-2 tretirani salmoneli. Tretiranje celic Caco-2 z SCS-LB naknadno po izpostavitvi salmoneli pa ni

zmanjšalo ravni IL-8, je pa omejilo prerazporeditve aktinskih filamentov, ki so se pojavile pri izpostavitvi celic salmoneli (Coconnier in sod., 2000).

Nismo zasledili raziskav o vplivu SCS laktobacilov na bičke salmonele. Glede na to, da veliko raziskovalcev trdi, da je protein flagelin, ki je glavni sestavni del bičkov, povzročitelj indukcije sinteze IL-8 ob okužbi s salmonelami (Berkes in sod., 2003; Gewirtz in sod., 2001; Hayashi in sod., 2003; Van Asten, 2005) predpostavljamo, da morda SCS učinkuje prav na flagelin ali pa na bičke. V eni od metod za izolacijo flagelina, salmonelo inkubirajo v fosfatnem pufru s pH = 2, ker pri tem pH, biček razpade na flagelin (Takahashi in sod., 2001; Van Asten, 2005). Znano je tudi, da salmonela prizadete bičke v normalnih razmerah nadomesti s sintezo novih v nekaj minutah (Van Asten, 2005). V naši raziskavi nismo uporabljali pH vrednosti 2, zato predvidevamo, da bički salmonel ob tretiranju z SCS niso razpadli. Če pa je, po tretiranju z SCS (pH = 4,8), salmonela vseeno izgubila nekaj bičkov, jih je morda z novimi nadomestila počasneje ali pa jih sploh ni mogla nadomestiti. V tem primeru, ob izpostavitvi celic Caco-2 tretirani salmoneli, ni bilo prisotnega flagelina oz. je bil prisoten v manjši količini in je bila morda indukcija sinteze IL-8 zato manjša. Lahko pa, da je salmonela ob tretiranju z SCS bičke obdržala, vendar pa nato ob nanosu salmonele na celice Caco-2 bički niso razpadli na flagelin, ki je potreben za indukcijo sinteze IL-8 (Gewirtz in sod., 2001; van Asten in sod., 2005) in je bila morda indukcija sinteze IL-8 zato manjša. Možno je tudi, da se je ob inkubaciji salmonele v SCS, konformacija flagelina spremenila v obliko, ki je TLR-5 ne prepozna in zato ni prišlo do povečane sinteze IL-8. Menimo, da bi bilo v prihodnje smiselno preveriti vpliv SCS laktobacilov na izoliran flagelin salmonele in nato izpostaviti celice Caco-2 takemu flagelinu.

5.1.5 Vpliv laktobacilov na adhezijo in invazijo salmonele na oz. v celice Caco-2

Predstavniki črevesne mikroflore lahko ovirajo adhezijo in/ali invazijo nekaterih enterobakterij na/v črevesne celice (Bernet in sod., 1994; Bogovič Matijašič in sod., 1996; Coconnier in sod., 1993; Hendriks in sod., 2001; Hirano in sod., 2003). Za sev *L. gasseri* LF221 so že Bogovič Matijašič in sod. (2003) ugotovili, da ima na celicah Caco-2 dobre adhezijske sposobnosti. V doktorski disertaciji smo prvič preverili sposobnost vezave *L. rhamnosus* BGT10 na celice Caco-2 (slika 28) in ugotovili, da je tudi ta sev adheziven, ter da ob določeni koncentraciji zasiti vezavna mesta na celicah. Slika 29 prikazuje adhezijo in invazijo *S. enteritidis* 857 na oz. v celice Caco-2. Rezultati so primerljivi z rezultati, ki so jih s *S. enteritidis* 857 dobili Hendriks in sod. (1996). To potrjuje, da je bila naša metoda ugotavljanja adhezije in invazije bakterij primerna. Pri ugotavljanju adhezije in invazije je za štetje bakterij potrebno bakterije ločiti od celic. Evkariotske celice lahko liziramo z detergentom Triton X-100, pri tem pa moramo paziti, da ne poškodujemo bakterij. Bogovič Matijašič in sod. (2003) so ugotovili, da je najustreznejše, če za lizo celic Caco-2

uporabijo Triton X-100 v koncentraciji 0,05 % (v/v) za 10 minut. Preverili smo preživetje *L. rhamnosus* BGT10 in *S. enteritidis* 857 v 0,05 % Tritonu X-100 za 5, 10, 20, 30, 40 in 60 minut in ugotovili, da bakterije preživijo tudi do 60 minut v 0,05 % Tritonu X-100 (neprikazani rezultati). V poskusih smo nato uporabljali Triton X-100 v koncentraciji 0,05 % (v/v) za 10 minut.

V nadalnjih poskusih smo ugotavljali, če *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 ovirata adhezijo in invazijo *S. enteritidis* 857 na/v celice Caco-2. Celice Caco-2 smo izpostavili laktobacilom in naknadno še salmoneli. Vmes smo nevezane laktobacile sprali. Celice smo izpostavili tudi sočasno laktobacilom in salmoneli. Laktobacile smo vedno uporabljali le v eni koncentraciji in sicer tako visoki, da so laktobacili lahko zasedli vsa razpoložljiva vezavna mesta. Salmonelo smo uporabili v različnih koncentracijah, vendar je bila ta koncentracija v vseh primerih manjša od koncentracije laktobacilov.

Ugotovili smo, da so *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 ovirali invazijo salmonele *S. enteritidis* 857 v celice Caco-2, ko smo celice izpostavili laktobacilom in salmoneli sočasno (sliki 30B in 31B). Inhibicija invazije je bila z večanjem koncentracije salmonele manj učinkovita. *L. gasseri* LF221 je bolj oviral invazijo salmonele kot *L. rhamnosus* BGT10 (sliki 30B in 31B). Morda je bil vzrok to, da smo imeli v mešanici s salmonelo skoraj enkrat več *L. gasseri* LF221 kot *L. rhamnosus* BGT10. Pri mešanicah laktobacilov s salmonelo nismo dokazali oviranja adhezije salmonele (sliki 30A in 31A). Tudi Hirano in sod. (2003) so ugotovili, da je *L. rhamnosus* oviral invazijo in ne adhezije enterohemoragične *E. coli*, če ga je bilo v mešanici bakterij vsaj 10-krat več kot *E. coli*. Hirano in sod. (2005) predvidevajo, da je za inhibicijo invazije vzrok komunikacija med laktobacili in celicami Caco-2. Veliko drugih raziskav kaže, da je inhibicija invazije pogojena s predhodno ovirano adhezijo patogenov (Bernet in sod., 1994; Coconnier in sod., 2003; Hendriks in sod., 2001; Hudault in sod., 1997). V vseh teh raziskavah predvidevajo, da se laktobacili ne vežejo na iste receptorje celic Caco-2 kot salmonela oz. *E. coli*, ampak verjetno prostorsko ovirajo salmonelo ali *E. coli* pri dostopu do receptorjev.

Če smo celice najprej izpostavili laktobacilom in po spiranju nevezanih laktobacilov dodali še salmonelo, nista bili ovirani niti adhezija niti invazija salmonele (sliki 30 in 31). Tudi Hendriks in sod. (2001) so ugotovili da *L. casei* Shirota niso ovirali adhezije in invazije *S. enteritidis* 857, ko *L. casei* Shirota uporabili pred izpostavitvijo celic Caco-2 salmoneli, medtem ko so v mešani kulturi s salmonelo ovirali tako adhezijo kot invazijo salmonele. Predvidevajo, da je vzrok inhibicije obeh procesov, sprememba v lastnostih, morfologiji ali biokemiji celic Caco-2 in/ali salmonele. Iz naših rezultatov in ugotovitev drugih sklepamo, da *L. gasseri* LF221 oz. *L. rhamnosus* BGT10 s salmonelo *S. enteritidis* 857 ne tekmujejo za ista vezavna mesta na celicah Caco-2, saj laktobacili niso ovirali salmonele pri adheziji (sliki 30A in 31A). Vzrok za oviranje invazije salmonele v primeru mešane kulture

salmonele in laktobacilov je verjetno nekaj drugega. Morda laktobacili prostorsko ovirajo vstop salmonele, čeprav je že pripeta na ustrezne receptorje celic Caco-2. Morda laktobacili direktno ali s svojimi produkti vplivajo na salmonelo ali na celice Caco-2. Butirat ovira invazijo *S. enteritidis* in *S. typhimurium* tako, da inhibira izražanje mnogih genov zapisanih na SPI-1, ki so nujni za nastanek TTSS in za invazijo salmonele (Gantois in sod., 2006). Laktobacili, ki smo jih uporabili sicer ne izločajo butirata (priloga N), morda pa drugi produkti (npr. mlečna kislina) delujejo podobno. Potrebne bi bile tudi dodatne raziskave, da bi ugotovili, če imajo površinske molekule v celični steni *L. rhamnosus* BGT10, ki so homologne s humanim mucinom, kakšno vlogo pri oviranju invazije *S. enteritidis* 857.

Če primerjamo vpliv *L. gasseri* LF221 oz. *L. rhamnosus* BGT10 na indukcijo sinteze IL-8, ki jo v celicah Caco-2 spodbudi *S. enteritidis* 857 (sliki 19 in 21) in vpliv *L. gasseri* LF221 oz. *L. rhamnosus* BGT10 na invazijo salmonele v celice Caco-2 (sliki 30 in 31) lahko ugotovimo, da *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 v mešanici s salmonelo *S. enteritidis* 857 ovirajo invazijo salmonele v celice Caco-2 in pri nekaterih koncentracijah salmonele, prav tako zmanjšajo raven IL-8, ki jo spodbudi salmonela. Zato predvidevamo, da bi lahko bila za indukcijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2 pri izpostavitvi *S. enteritidis* 857 vsaj delno odgovorna invazija salmonele v celice.

5.1.6 Vpliv laktobacilov in salmonele na transepitelno električno upornost (TEER) celic Caco-2

Pogost način spremljanja vpliva invazivnih bakterij na epitelne celice v pogojih *in vitro* je merjenje TEER celic. Ob izpostavitvi celic invazivni *S. typhimurium* pride do zmanjšanja TEER oz. integritete celic, kar je posledica prerazporeditev aktinskih filamentov in porušenja tesnih stikov med celicami (Cocconier in sod., 2000; Finlay in Falkow, 1990; Jepson in sod., 1995). Salmonela vstopa v celice in po določenem času razmnoževanja iz njih izstopi in poruši membrano, kar zaznamo kot padec TEER (Finlay in Falkow, 1990; Jepson in sod., 1995).

Najprej smo preverili, kako se pri celicah Caco-2 vzpostavlja TEER. TEER smo merili od nasaditve celic, pa do 19-ega dne starosti celic. Slika 24 prikazuje, da je TEER celic Caco-2 s časom naraščala. Ugotovili smo, da je *S. enteritidis* 857 znižala TEER celic Caco-2 (slike 25A, 26A in 27A). Predvsem pri najvišjih dveh uporabljenih koncentracijah salmonele vidimo, da je TEER do 6 ur po izpostavitvi celic salmoneli padala, nato pa postopoma naraščala, vendar niti po 48 urah ni dosegla vrednosti TEER kontrolnih celic.

Ker nismo zasledili podatkov o vplivu laktobacilov na TEER celic Caco-2, smo to preverili z različnim številom *L. gasseri* LF221 oz. *L. rhamnosus* BGT10. Ugotovili smo, da ti sevi laktobacilov ne znižujejo TEER ampak lahko TEER celic Caco-2 celo povišajo (sliki 25B,

25C), torej še bolj stabilizirajo enosloj. Preverili smo tudi, če *L. gasseri* LF221 oz. *L. rhamnosus* BGT10 ovirajo sposobnost *S. enteritidis* 857 za znižanje TEER. Celice smo izpostavili najprej laktobacilom in po spiranju nevezanih laktobacilov še salmoneli. Ali pa smo celice izpostavili mešanici laktobacilov in salmonele. Rezultati kažejo, da so laktobacili, predvsem *L. gasseri* LF221, ovirali sposobnost *S. enteritidis* 857 za znižanje TEER, če smo celice Caco-2 pred izpostavitvijo salmoneli, izpostavili laktobacilom (slika 26). To kaže, da laktobacili lahko zaščitijo celice Caco-2 pred negativnim vplivom salmonele. Če pa smo celice izpostavili mešanici *S. enteritidis* 857 in *L. gasseri* LF221 ali *S. enteritidis* 857 in *L. rhamnosus* BGT10, je bil padec TEER še večji kot pri izpostavitvi celic sami salmoneli (slika 27), kar predvidevamo, da je za celice Caco-2 neugodno.

Vpliv *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 na sposobnost salmonele za znižanje TEER se v primeru mešanice posameznih laktobacilov in *S. enteritidis* 857 (slika 27) ni izkazal kot ugoden, kar se ne ujema s predhodnimi testi, kjer smo ugotavliali, vpliv laktobacilov na invazijo *S. enteritidis* 857 v celice Caco-2 in na izražanje IL-8, ki ga v celicah Caco-2 spodbudi *S. enteritidis* 857. Namreč ugotovili smo, da *L. gasseri* LF221 oz. *L. rhamnosus* BGT10 v mešanici s salmonelo ovirajo invazijo (sliki 30B in 31B) in v nekaterih primerih tudi sposobnost salmonele za indukcijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2 (sliki 19 in 21), kar je za celice Caco-2 ugodno. Kaj je vzrok neujemanja teh rezultatov ne vemo, so pa bili poskusi merjenja TEER po izpostavitvi celic Caco-2 laktobacilom v kombinaciji s salmonelo, izvedeni le enkrat, zato bi jih morali za potrditev rezultatov ponoviti.

Naši rezultati kažejo, da imata tako *L. gasseri* LF221 kot *L. rhamnosus* BGT10 potencialne sposobnosti za delno zaščito celic Caco-2 pred negativnimi učinki *S. enteritidis*, zato sklepamo, da bi imela ta dva seva laktobacilov podobne učinke lahko tudi na epitelne celice črevesja človeka. *L. gasseri* LF221 ima dokazane probiotske lastnosti, zato menimo, da bi ob okužbi s salmonelo lahko vsaj delno olajšal težave, ki jih le-ta povzroča, če bi ga uporabili kot prehranski dodatek ali pa kot dodatek za zdravljenje nekaterih črevesnih obolenj. *L. rhamnosus* BGT10 še ni raziskan v smislu uporabe v prehrani ljudi. Naši rezultati kažejo, da bi bilo ta sev smiselno bolj intenzivno raziskati in preučiti v smislu učinkovitega sredstva pri omejevanja okužb in vnetij, ki jih povzročajo enteropatogene bakterije.

5.2 SKLEPI

- *Salmonella enteritidis* 857 inducira sintezo IL-8 v celicah Caco-2. Količina IL-8 se povečuje z večanjem koncentracije salmonele in prav tako s časom po končani izpostavitvi celic Caco-2 salmoneli.
- *Lactobacillus gasseri* LF221, *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 in *Lactobacillus sakei* NCDO2714 izzovejo nastanek IL-8 v celicah Caco-2, najmanj *L. rhamnosus* BGT10. Količina IL-8 se povečuje z večanjem koncentracije laktobacilov in s časom po končani izpostavitvi celic. Laktobacili inducirajo manjšo količino IL-8 v celicah Caco-2 kot enako število salmonel.
- Laktobacili *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 inducirajo povečano sintezo Hsp70 v celicah Caco-2. Stopnja indukcije je različna in odvisna od seva. Laktobacili *L. sakei* NCDO 2714 ne vplivajo na raven Hsp70 v celicah Caco-2. Koncentracija Hsp70 se v celicah Caco-2 po izpostavitvi *L. gasseri* LF221 povečuje z večanjem koncentracije bakterij, pri *L. rhamnosus* te zakonitosti nismo zasledili.
- Izpostavitev celic Caco-2 laktobacilom (*L. gasseri* LF221, *L. sakei* NCDO2714 ali *L. rhamnosus* BGT10) pred izpostavitvijo *S. enteritidis* 857 ne vpliva na zmanjšanje sinteze IL-8, ki jo v celicah Caco-2 spodbudi salmonela.
- Sklepamo, da Hsp70 ne zavirajo izražanja IL-8, ki ga v celicah Caco-2 spodbudi *S. enteritidis* 857. Laktobacili, predvsem *L. gasseri* LF221, sicer spodbudijo nastanek Hsp70 v celicah Caco-2, vendar to očitno ne zavira sinteze IL-8. Tudi povišana raven Hsp70, ki jo induciramo s toplotnim stresom (42°C) pred izpostavitvijo celic Caco-2 *S. enteritidis* 857, ne zniža ravni IL-8.
- Sočasna izpostavitev celic Caco-2 salmoneli *S. enteritidis* 857 in laktobacilom (*L. gasseri* LF221 ali *L. rhamnosus* BGT10) zmanjša koncentracijo IL-8 v celicah Caco-2 v primerjavi s tisto, ki jo spodbudi sama salmonela. Oviranje s salmonelo povzročene indukcije sinteze IL-8 je najbolj opazno, kadar je v mešanici mnogo več laktobacilov kot salmonele. Za ta učinek laktobacilov verjetno ni vzrok večja sinteza Hsp70, ki jo sicer laktobacili skupaj s salmonelo inducirajo, ampak gre verjetno za nek drug vpliv laktobacilov na salmonelo ali pa vpliv laktobacilov na celice Caco-2.

- Izločki laktobacilov *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 zmanjšajo sposobnost *S. enteritidis* 857 za indukcijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2. Učinek je viden le do neke omejene koncentracije salmonele. Izločki *L. gasseri* LF221 imajo večji zaviralni učinek na produkcijo IL-8 kot izločki *L. rhamnosus* BGT10. Izločki laktobacilov učinkujejo le pri nizki pH vrednosti. Zaviralni učinek ima tudi mlečna kislina, vendar sama mlečna kislina verjetno ni vzrok za inhibicijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2 s tretirano salmonelo.
- *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 ovirata invazijo *S. enteritidis* 857 v celice Caco-2 pri sočasni izpostavitvi s salmonelo, če laktobacili številčno prevladujejo. Pri tem adhezija salmonele ni ovirana. Predhodna izpostavitev celic Caco-2 laktobacilom ne ovira niti adhezije niti invazije salmonele. Sklepamo, da *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 s salmonelo *S. enteritidis* 857 ne tekmujeta za ista vezavna mesta na celicah Caco-2. Oviranje invazije salmonele v primeru mešane kulture salmonele in laktobacilov ima drug vzrok.
- *L. gasseri* LF221 ali *L. rhamnosus* BGT10 v mešani kulturi s salmonelo *S. enteritidis* 857 ovirata invazijo salmonele v celice Caco-2 in indukcijo sinteze IL-8. Predvidevamo, da je za indukcijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2 vsaj delno odgovorna invazija salmonele v celice.
- *S. enteritidis* 857 zniža transepitelno električno upornost (TEER) celic Caco-2, medtem ko *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 ne znižuje TEER, ampak jo lahko celo povečata.
- Predhodno delovanje *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 na celice Caco-2 zmanjša sposobnost, naknadno naneštene *S. enteritidis* 857, za znižanje TEER, medtem ko sočasno delovanje posameznih laktobacilov in salmonele še bolj zniža TEER celic Caco-2 oz. poveča učinek salmonele same.
- Menimo, da bi *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 lahko imela sposobnosti za delno zaščito epitelnih celic črevesja pred negativnimi učinki *S. enteritidis*. *L. gasseri* LF221 ima probiotske lastnosti, zato bi kot prehranski dodatek lahko vsaj delno olajšal težave, ki jih povzroča salmonela. *L. rhamnosus* BGT10 bi bilo smiselno bolj intenzivno preučiti, predvsem v smislu omejevanja infekcij in vnetij črevesja z enteropatogenimi bakterijami.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Okužba črevesnih epitelnih celic z nekaterimi sevi rodu *Salmonella* spodbudi lokalno sproščanje vnetnega citokina IL-8. IL-8 privlači in aktivira neutrofilce in druge granulocitne celice na mestu vnetja. Ta proces je pomemben za izločitev patogena iz črevesja. Ob dolgotrajni izpostavitvi epitelnih celic granulocitam in njihovim produktom, pa akutno vnetje lahko preide v kronično vnetje črevesja. V zadnjem času je *Salmonella* serotip Enteritidis eden najpogosteje izoliranih patogenih serotipov salmonele iz človeka. *S. enteritidis* se pripenja na in vstopa v modelne epitelne celice črevesja, zniža transepitelno električno upornost (TEER) celic in spodbudi celice k povečanemu izločanju vnetnega citokina IL-8.

Probiotiki vplivajo na ravnotežje črevesne mikroflore in posredno na zdravstveno stanje gostitelja. Laktobacili lahko vplivajo na izboljšanje akutnega ali kroničnega vnetja črevesja, Cronove bolezni, bolezni povezanih z diarejo in pri raku debelega črevesja. Indukcijo sinteze IL-8 ob okužbi celic s salmonelo lahko omejijo preko inhibicije transkripcijskega faktorja NF-κB ali pa s svojimi protimikrobnimi snovmi. Poleg tega tekmujejo s patogeni za vezavna mesta na epitelnih celicah in ovirajo adhezijo ter invazijo salmonele.

Pomembno vlogo pri okužbi s patogeni imajo tudi gostiteljski proteini topotnega stresa (Hsp). Hsp inhibirajo transkripcijo genov za vnetne citokine ter stabilizirajo celični citoskelet in tako omejujejo invazijo patogenov.

Namen doktorskega dela je bil preveriti, če laktobacili *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 lahko zaščitijo epitelne črevesne celice pred škodljivimi vplivi *S. enteritidis* 857. Vpliv salmonele smo ugotavljali s spremeljanjem količine IL-8 in Hsp70 v celicah Caco-2, z merjenjem TEER celic ter preko adhezije in invazije salmonele na/v celice Caco-2.

Ugotovili smo, da *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 inducirata sintezo IL-8 in sintezo Hsp70. Količina IL-8, ki so jo inducirali laktobacili je bila manjša od količine ki jo je inducirala *S. enteritidis* 857 v podobni koncentraciji. Ker Hsp70 ščitijo celice pred povečano sintezo IL-8, smo preverili, če laktobacili preko indukcije sinteze Hsp70 in/ali preko produktov, ki jih izločajo v okolje, ovirajo sintezo IL-8, ki jo v celicah spodbudi *S. enteritidis* 857. Preverili smo tudi, če *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 ovirata *S. enteritidis* 857 pri znižanju TEER ter pri adheziji in invaziji na/v celice Caco-2.

Ugotovili smo, da sta *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 zmanjšala invazijo in izločanje IL-8, ki ga v celicah Caco-2 spodbudi *S. enteritidis* 857 le v primeru, ko smo

celice inkubirali sočasno z laktobacili in salmonelo. V primeru izpostavitve celic laktobacilom in naknadno salmoneli, takšnega vpliva ni bilo. Tudi povisana raven Hsp70, ki smo jo inducirali s toplotnim stresom (42°C) pred izpostavitvijo celic Caco-2 *S. enteritidis* 857, ni znižala ravni IL-8. Sklepamo, da Hsp70 ne zavirajo izražanja IL-8, ki ga v celicah Caco-2 spodbudi *S. enteritidis* 857, ampak da gre za nek drug vpliv laktobacilov na salmonelo oz. vpliv laktobacilov na celice Caco-2. Ker laktobacila nista ovirala adhezije salmonele sklepamo, da s salmonelo *S. enteritidis* 857 ne tekmujeta za ista vezavna mesta na celicah Caco-2. Pri oviranju invazije salmonele gre za nek drug vzrok. Predvidevamo, da je za indukcijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2 vsaj delno odgovorna invazija salmonele.

Izločki laktobacilov *L. gasseri* LF221 oz. *L. rhamnosus* BGT10 so zmanjšali sposobnost *S. enteritidis* 857 za indukcijo sinteze IL-8 v celicah Caco-2. Vpliv so imeli le pri nizki pH vrednosti in le do neke omejene koncentracije salmonele. Zaviralni učinek je imela tudi mlečna kislina, vendar sama mlečna kislina ni bila glavni vzrok inhibicije sinteze IL-8.

L. gasseri LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 nista znižala TEER celic Caco-2 tako kot smo to dokazali za *S. enteritidis* 857, ampak sta ga celo povečala. Ko smo celice pred izpostavitvijo salmoneli izpostavili laktobacilom je to oviralo salmonelo pri znižanju TEER celic Caco-2. Takšne zaščite nismo dokazali pri sočasnji izpostavitvi celic Caco-2 salmoneli in laktobacilom.

Menimo, da sta *L. gasseri* LF221 in *L. rhamnosus* BGT10 sposobna vsaj delno zaščititi epitelne črevesne celice pred negativnimi vplivi *S. enteritidis*. *L. gasseri* LF221, ki ima dokazane probiotske lastnosti, bi bil lahko primeren kot prehranski dodatek ali pa kot koristen dodatek za lajšanje težav pri okužbah s salmonelo. *L. rhamnosus* BGT10 bi bilo smiselno bolj intenzivno preučiti v smislu probiotske uporabe.

6.2 SUMMARY

Colonization of intestinal epithelium by certain strains of *Salmonella* spp. induces local expression of proinflammatory cytokine IL-8. IL-8 attracts and activates neutrophils and other granulocytes to the site of inflammation. This process is important for the host to eliminate the pathogen from the intestine. Long-term secretion of IL-8 and neutrophil infiltration may subsequently culminate into epithelial cell damage, which can lead to chronic inflammation. Nowadays *Salmonella* serotype Enteritidis is one of the most frequently isolated serotypes of salmonella from humans. *S. enteritidis* adheres to and invades model intestinal epithelial cells, decreases transepithelial electrical resistance (TEER) and induces high levels of IL-8 secretion in epithelial cells.

Probiotics improve intestinal microbial balance and indirectly exert a positive influence on host health. Some lactobacilli strains palliate acute or chronic intestinal inflammation, ulcerative colitis, Crohn's disease, diarrheagenic illnesses and colorectal cancer. Certain strains of *Lactobacillus* spp are capable of suppressing the IL-8 production in intestinal epithelial cells by inhibition of nuclear factor NF-κB activation or by their antimicrobial compounds. Lactobacilli compete with pathogens for adhesion receptors on intestinal cells and can hinder adhesion and invasion of salmonella.

Intestinal epithelial cells produce heat shock proteins (Hsps) which confer cytoprotection against intestinal inflammation by suppressing the IL-8 production. Hsps also stabilize the cell cytoskeleton and inhibit the invasion of pathogenic microbes.

The aim of this study was to find out if lactobacilli *L. gasseri* LF221 and *L. rhamnosus* BGT10 could protect intestinal epithelial cells against the negative effects of *S. enteritidis* 857. To establish the influence of salmonella we exposed Caco-2 cells to *S. enteritidis* 857 and measured: IL-8 and Hsp70 production in Caco-2 cells, interference of salmonella with TEER of cell monolayer and salmonella adhesion and invasion to Caco-2 cells.

We found out that *L. gasseri* LF221 and *L. rhamnosus* BGT10 induce IL-8 and Hsp70. The expression of IL-8 induced by lactobacilli was far lower than the amount of IL-8 induced by *S. enteritidis* 857. Since Hsp70 reduces IL-8 expression in epithelial cells, we investigated whether these bacteria reduce the expression of IL-8 in Caco-2 cells induced by *S. enteritidis* 857 through Hsp70 induction and/or by their antimicrobial products. We also investigated if *L. gasseri* LF221 and *L. rhamnosus* BGT10 are capable to reduce the capability of *S. enteritidis* 857 to decrease TEER of cell monolayer and if lactobacilli interfere with adhesion and invasion of salmonella.

Simultaneous exposure of Caco-2 cells to *S. enteritidis* 857 and *L. gasseri* LF221 or *L. rhamnosus* BGT10 inhibited the invasion of salmonella and IL-8 induced by salmonella. Preincubation of Caco-2 cells to lactobacilli prior to salmonella exposure, didn't show such effect. Moreover, Hsp70 induced by heat shock (42°C) in Caco-2 cells before exposure to *S. enteritidis* 857 didn't inhibit the IL-8 synthesis. Therefore we conclude that Hsp70 was not the reason for inhibition of IL-8 induced by *S. enteritidis* 857 in Caco-2 cells. The decrease of invasion and IL-8 of salmonella by simultaneous incubation must therefore be caused by another mechanism of lactobacilli influencing salmonella or Caco-2 cells. Lactobacilli didn't interfere with adhesion of salmonella. This suggests that lactobacilli and salmonella do not compete for the same adhesion receptors on Caco-2 cells. We suppose that IL-8 induction is at least partially dependent on salmonella invasion.

Pretreatment of *S. enteritidis* 857 by lactobacilli products (SCS) inhibited IL-8 expression in Caco-2 cells. SCS effect developed just in acidic condition and just to limited concentration of salmonella. Lactic acid had an influence, but was not the main reason for antimicrobial activity of SCS.

S. enteritidis 857 decreased TEER of Caco-2 cell monolayer. On the contrary, *L. gasseri* LF221 and *L. rhamnosus* BGT10 didn't decrease TEER, but could even strengthen it. Preincubation of cells by lactobacilli prior to salmonella exposure, reduced the capability of salmonella to decrease TEER of Caco-2 cells. Simultaneous exposure of Caco-2 cells to *S. enteritidis* 857 and lactobacilli (*L. gasseri* LF221 or *L. rhamnosus* BGT10) didn't show such effect.

Our results suggest that *L. gasseri* LF221 and *L. rhamnosus* BGT10 could at least partially protect intestinal epithelial cells against negative effects of *S. enteritidis*. *L. gasseri* LF221, which has been proven to have probiotic characteristics, could be suitable as food additive or as useful additive to alleviate consequences of salmonella infections. We propose *L. rhamnosus* BGT10 for further investigations for probiotics characteristics.

7 VIRI

- Acheson D.W.K., Luccioli S. 2004. Mucosal immune responses. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, 18, 2: 387-404.
- Bach-Knudsen K.E., Jensen B.B., Anderson J.O., Hansen I. 1991. Gastrointestinal implications in pigs of wheat and oat fractions 2: Microbial activity in the gastrointestinal tract. British Journal of Nutrition, 65: 233-248.
- Baggiolini M. 2001. Chemokines in pathology and medicine. Journal of International Medicine, 250: 91-104.
- Baggiolini M., Clark-Lewis I. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. FEBS Letters, 307, 1: 97-101.
- Bailey C.A., Bryla P., Malick A.W. 1996. The use of the intestinal epithelial cell culture model, Caco-2 in pharmaceutical development. Advanced Drug Delivery Reviews, 22: 85-103.
- Bäumler A.J., Heffron F., Reissbrodt R. 1997. Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for iroB. Journal of Clinical Microbiology, 35, 5: 1224-1230.
- Berin M.C., Darfeuille-Michaud A., Egan L.J., Miyamoto Y., Kagnoff M.F. 2002. Role of EEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF- κ B and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. Cellular Microbiology, 4, 10: 635-647.
- Berkes J., Viswanathan V.K., Savkovic S.D., Hecht G. 2003. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effect on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. Gut, 52: 439-451.
- Bernet M.F., Brassart D., Nesser J.R., Servin A.L. 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment by enterovirulent bacteria. Gut, 35: 483-489.
- Bernet-Camard M.F., Lievin V., Brassart D., Nesser J.R., Servin A.L. Hudault S. 1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. Applied and Environmental Microbiology, 63, 7: 2747-2753.
- Biganzoli E., Cavenaghi L.A., Rossi R., Brunati M.C., Nolli M.L. 1999. Use of Caco-2 cell culture model for the characterisation of intestinal absorption of antibiotics. Il Farmaco, 54: 594-599.
- Bogovič Matijašić B. 1997. Bakteriocini seva *Lactobacillus acidophilus* LF221: preučevanje tvorbe, protibakterijske aktivnosti, biokemijskih lastnosti in sestave. Doktorska disertacija. Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 102 str.
- Bogovič Matijašić B., Rogelj I., Nes I.F., Holo H. 1998. Isolation and characterisation of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. Applied Microbiology and Biotechnology, 49: 606-612.
- Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 1999. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli isolated from cheese and baby feces. Food Technology and Biotechnology, 37, 2: 93-100.

- 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.
- Bogovič Matijašić B., Narat M., Zorič Petrel M., Rogelj I. 2006. Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *E. coli* adhesion in vitro on Caco-2 cells and ex vivo on pigs jejunal tissue. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 92-96.
- Brennan F.M., Feldmann M. 2000. Chemokines. V: The cytokine network. Balkwin F. (ed.). Oxford, University Press: 49-70.
- Brightbill H.D., Modlin R.L. 2000. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. *Immunology*, 101: 1-10.
- Caldini G., Trotta F., Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Scassellati-Sforzolini G., Cenci G. 2005. Screening of potential lactobacilli antigenotoxicity in microbial and mammalian cell-based tests. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 37-47.
- Chauvière G., Cocconier M.H., Kerneis S., Darfeuille-Michaud A., Joly B., Servin A.L. 1992. Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from humane enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Letters*, 91: 213-218.
- Cocconier M.H., Bernet M.F., Kerneis S., Chauviere J.F., Servin A.L. 1993. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens in human intestinal Caco-2 by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiology Letters*, 110: 299-306.
- Cocconier M.H., Lievin V., Bernet-Camard M.F., Hudault S., Servin A.L. 1997. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* LB. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 41, 5: 1046-1052.
- Cocconier M.H., Lievin V., Lorrot M., Servin A.L. 2000. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 3: 1152-1157.
- Cross M.L., Ganner A., Teilab D., Fray L.M. 2004. Patterns of cytokine induction by gram-positive probiotic bacteria. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 42: 173-180.
- D'Agostino L., Daniele B., Pignata S., Gentile R., Tagliaferri P., Contegiacomo A., Silvestro G., Polistina C., Bianco A.R., Mazzacca G. 1989. Ornithine decarboxylase and diamine oxidase in human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Gastroenterology*, 97: 888-894.
- Deitch E.A., Beck S.C., Cruz N.C., De Maio A. 1995. Induction of heat shock gene expression in colonic epithelial cells after incubation with *Escherichia coli* or endotoxin. *Critical Care Medicine*, 23, 8: 1371-1376.
- Didierlaurent A., Sirard J.C., Kraehenbuhl J.P., Neutra M.R. 2002. How the gut senses its content. *Cellular Microbiology*, 4, 2: 61-72.
- Donze O., Abbas-Terki T., Picard D. 2001. The hsp90 chaperone complex is both a facilitator and a repressor of the dsRNA dependant kinase PKR. *EMBO Journal*, 20: 3771-3780.

- Eckmann L., Kagnoff M.F., Fierer J. 1995. Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune systems. *Trends in Microbiology*, 3, 3: 118-120.
- Elewaut D., DiDonato J.A., Kim J.M., Truong F., Eckmann L., Kagnoff M.F. 1999. NF- κ B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *Journal of Immunology*, 163: 1457-1466.
- Ewing W.N., Cole D.J.A. 1994. The living gut. An introduction to micro-organisms in nutrition. 1st ed. Trowbridge, Redwoods Books: 220 str.
- Fajdiga S., Koninkx J.F.J.G., Tooten P.C.J., Marinšek Logar R. 2006. Interference of *Salmonella enteritidis* 857 and *Lactobacillus* spp. with the IL-8 levels and the transepithelial electrical resistance of enterocyte-like Caco-2 cells. *Folia Microbiologica*, (sprejeto v tisk).
- Fantini J. 1992. Differentiation in human colon tumor cells. Importance of autocrine growth factors. *Cancer Journal*, 5, 2: 78-83.
- Feghali C.A., Wright T.M. 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience*, 2: 12-26.
- Finlay B.B., Falkow S. 1989. *Salmonella* as an intracellular parasite. *Molecular Microbiology*, 3, 12: 1833-1841.
- Finlay B.B., Falkow S. 1990. *Salmonella* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. *Journal of Infectious Diseases*, 162: 1096-1106.
- Finlay B.B., Falkow S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 2: 136-169.
- Fogh J., Wright W.C., Loveless J.D. 1977. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of National Cancer Institute*, 58: 209-214.
- Francis C.L., Ryan T.A., Jones B.D., Smith S.J., Falkow S. 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. *Nature*, 364: 639-642.
- Freshney R.I. 2000. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 4th ed. New York, Wiley-Liss: 577 str.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.
- Galan J.E. 1994. *Salmonella* entry into mammalian cells: different yet converging signal transduction pathways? *Trends in Cell Biology*, 4: 196-199.
- Gantois I., Ducatelle R., Pasman F., Haesebrouck F., Hautefort I., Thompson A., Hinton J.C., Van Immerseel F. 2006. Butyrate specifically down-regulates salmonella pathogenicity island 1 gene expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1: 946-949.

- Gewirtz A.T., Siber A.M., Madara J.L., McCormic B.A. 1999. Orchestration of neutrophil movement by intestinal epithelial cells in response to *Salmonella typhimurium* can be uncoupled from bacterial internalization. *Infection and Immunity*, 67, 2:608-617.
- Gewirtz A.T., Simon P.O. Jr., Schmitt C.K., Taylor L.J., Hagedorn C.H., O'Brien A.D., Neish A.S., Madara J.L. 2001. *Salmonella typhimurium* translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *Journal of Clinical Investigations*, 107, 1: 99-109.
- Gork A.S., Usui N., Ceriati E., Drongowski R.A., Epstein M.D., Coran A.G., Harmon C.M. 1999. The effect of mucin on bacterial translocation in I-407 fetal and Caco-2 adult enterocyte cultured cell lines. *Pediatric Surgery International*, 15: 155-159.
- Greene J.D., Klaenhammer T.R. 1994. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 12: 4487-4494.
- Guarner F., Schaafsma G.J. 1998. Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 237-238.
- Haller D., Bode C., Hammers W.P., Pfeifer A.M.A., Schiffrin E., Blum S. 2000. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell / leucocyte co-cultures. *Gut*, 47: 79-87.
- Haller D., Serrant P., Peruisseau G., Bode C., Hammers W.P., Schiffrin E., Blum S. 2002. IL-10 producing CD14^{low} monocytes inhibit Lymphocyte-dependant activation of intestinal epithelial cells by commensal bacteria. *Microbiology and Immunology*, 46, 3: 195-205.
- Hayashi F., Means T.K., Luster A.D. 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood*, 102, 7: 2660-2669.
- Hayashi Y., Sawa Y., Fukuyama N., Nakazawa H., Matsuda H. 2002. Preoperative glutamine administration induces heat-shock protein 70 expression and attenuates cardiopulmonary bypass – induced inflammatory response by regulating nitric oxide syntase activity. *Circulation*, 106: 2601-2607.
- Hecht G., Savkovic S.D. 1997. Effector role of epithelia in inflammation: interaction with bacteria. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 3: 64-69.
- Hendriks H., Van Asten A., Koninkx J., Van der Zeijst B., Van Dijk J. 1996. Interactions between *Salmonella enteritidis* 857 and the enterocyte-like human colon carcinoma cell line Caco-2. V: Cost 98. Effect of antinutrients on the nutritional value of legume diets. Vol 3. Bardocz S., Nekrep F., Pusztai A. (eds.). Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities: 46-47.
- Hendriks H., de Jonge R., Van Asten F., Koninkx J., Swennenhuis J., Van Dijk J. 2001. Adherence and invasion of *Salmonella enteritidis* 857 to Caco-2 cells decreases after simultaneous incubation with *Lactobacillus casei* Shirota. V: Typhoid fever and other salmonellosis. Ou J.T., CIU C.. Cu C. (eds.) Taipei, Jeou-Chou Book Co, Ltd: 135-141.
- Herías M.V., Koninkx J.F.J.G., Vos J.G., Huis in't Veld J.H.J., van Dijk J.E. 2005. Probiotic effect of *Lactobacillus casei* on DSS-induced ulcerative colitis in mice. *International Journal of Food Microbiology*, 103: 143-155.

- Hessle C., Hanson L Å, Wold A.E. 1999. Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clinical and Experimental Immunology*, 116: 276-282.
- Hirano J., Yoshida T., Sugiyama T., Koide N., Mori I., Yokochi T. 2003. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorragic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells *in vitro*. *Microbial Immunology*, 47, 6: 405-409.
- Hirayama K., Rafter J. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection*, 2: 681-686.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore, Williams & Wilkins: 787 str.
- Holzapfel W.H., Geisen R., Schillinger U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 343-362.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huis in't Veld J.H.J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 85-101.
- Holzapfel W.H., Haberer P., Geisen R., Björkroth, Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 2, Suppl.: 365S-373S.
- Huang F.C., Werne A., Li Q., Galyov E., Walker W.A., Cherayil B.J. 2004. Cooperative interactions between flagellin and SopE2 in the epithelial interleukin-8 response to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium infection. *Infection and Immunity*, 72, 9: 5052-5062.
- Hudault S., Lievin V., Bernet-Camard M.F., Servin A.L. 1997. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2: 513-518.
- Isolauri E., Kirjavainen P.V., Salminen S. 2002. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut*, 50, Suppl. 3: 54-59.
- Isolauri E. 2004. Probiotics. *Best Practice & Clinical Gastroenterology*, 18, 2: 299-313.
- Jäättelä M. 1999. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of Medicine*, 31: 261-271.
- Jacquier-Sarlin M.R., Fuller K., Xuan-Din A.T., Richard M.J., Polla B.S. 1994. Protective effect of Hsp70 in inflammation. *Experientia*, 50: 1031-1038.
- Jay J.M. 1996. Foodborne gastroenteritis caused by *Salmonella* and *Shigella*. V: Modern food microbiology. Heldman D.R. (ed.) 5th ed. New York, Chapman and Hall: 507-526.
- Janeway C.A. Jr., Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annual Reviews in Immunology*, 20; 197-216.

- Jepson M.A., Collares-Buzato C.B., Clark M.A., Hirst B.H., Simmons N.L. 1995. Rapid disruption of Epithelial barrier function by *Salmonella typhimurium* is associated with structural modification of intracellular junctions. *Infection and Immunity*, 63, 1: 356-359.
- Jepson M.A., Lang T.F., Reed K.A., Simmons N.L. 1996. Evidence for rapid, direct effect on epithelial monolayer integrity and transepithelial transport in response to *Salmonella* invasion. *European Journal of Physiology*, 432: 225-233.
- Jonge R. de, Swennenhuus J., Garssen J., Hendriks H. 2001. Cell lines and *Salmonella*, an *in vitro* model for studying dose-response relations. V: Typhoid fever and other salmonellosis. Ou J.T., CIU C., Cu C. (eds.) Taipei, Jeou-Chou Book Co, Ltd: 157-164.
- Jung H.C., Eckmann L., Yang S.K., Panja A., Fierer J., Morzycka-Wroblewska E. 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *Cytokine Expression in Colon Epithelial Cells*, 95: 55-65.
- Kaiser G.C., Yan F., Polk D.B. 1999. Mesalamine blocks tumor necrosis factor growth inhibition and a nuclear factor κB activation in mouse colonocytes. *Gastroenterology*, 116: 602-609.
- Kawai T., Akira S. 2005. Pathogen recognition with toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, 17: 338-344.
- Kiang J.G.. Tsokos G.C. 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology & Therapeutic*, 80: 183-201.
- Koninkx J.F.J.G. 1995. Enterocyte-like Caco-2 cells as a tool to study lectin interaction. V:Lectins: Biomedical perspectives. Puszta A., Bardocz S. (eds.). London, Taylor and Francis: 81-101.
- Koyasu S., Nishida E., Kadowaki T., Matsuzaki F., Iida K., Harada F., Kasuga M., Sakai H., Yahara I. 1986. Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100, are actin binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 83: 8054-8058.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lammers K.M., Helwig U., Swennen E., Rizzello F., Venturi A., Caramelli E., Kamm M.A., Brigi P., Gionchetti P., Campieri M. 2002. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *American Journal of Gastroenterology*, 97, 5: 1182-1186.
- Lee J.C., Laydon J.T., McDonnell P.C., Gallagher T.F., Kumar S., Green D., McNulty D., Blumenthal M.J., Heys J.R., Landwatter S.V. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 372: 739-746.
- Lee C.A. 1997. Type III secretion systems: machines to deliver bacterial proteins into eucaryotic cells? *Trends in Microbiology*, 5, 4: 148-156.
- Lee C.A., Silva M., Siber A.M., Kelly A.J., Galyov E., McCormick B.A. 2000. A secreted *Salmonella* protein induces a proinflammatory response in epithelial cells, which promotes neutrophil migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 22:12283-12288.

- Lee V.T., Schneewind O. 1999. Type III secretion machines and the pathogenesis of enteic infections caused by *Yersinia* and *Salmonella* spp. *Imunological Reviews*, 168: 241-255.
- Liang P., MacRae T.H. 1997. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 110: 1431-1440.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. 2001. *Molecular cell biology*. 4th.ed. New York, W.H.Freeman and Company: 1084 str.
- Ma D., Forsythe P., Bienstock J. 2004. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for thhe inhibitory effect on tumor necrosis factor alpa-induced interleukin-8 expression. *Infection and Immunity*, 72, 9: 5308-5314.
- Madara J.L., Stafford J., Dharmsthaphorn K., Carlson S. 1987. Structural analysis of a human intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology*, 92: 1133-1145.
- Malago J.J., Koninkx J.F.J.G., Van Dijk J.E. 2002. The heat shock response and cytoprotection of the intestinal epithelium. *Cell Stress & Chaperones*, 7: 191-199.
- Malago J.J., Koninkx J.F.J.G., Ovelgonne H.H., Van Asten F.A.A.M., Swennenhus 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.
- Malago J.J., Koninkx J.F.J.G., Tooten P.C.J., Liere E.A., van Dijk J.E. 2005. Anti-inflammatory properties of heat shock protein 70 and butyrate on *Salmonella*-induced interleukin-8 in enterocyte-like Caco-2 cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 141: 62-71.
- Mantovani A., Sozzani S. 2000. Chemokines. V: The cytokine network. Balkwin F. (ed.).Oxford, University Press: 103-125.
- McCormick, B.A., Miller S.I., Carnes D., Madara J.L. 1995. Transepithelial signaling to neutrophils by *Salmonellae*: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infection and Immunity*, 63, 6: 2302-2309.
- McCormick, B.A., Parkos C.A., Colgan S.P., Carnes D. K, Madara J.L. 1998. Apical secretion of a pathogen-elicited epithelial chemoattractant activity in response to surface colonization of intestinal epithelia by *Salmonella typhimurium*. *Journal of Immunology*, 160:455-466.
- McCracken V.J., Chun T., Baldeón M., Ahrné S., Molin G., Mackie R.I., Gaskins H.R. 2002. TNF- α sensitizes HT-29 colonic epithelial cells to intestinal lactobacilli. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 8: 665-670.
- Ménard S., Candall C., Bambou J.C., Terpend K., Cerf-Bensussan N., Heyman M. 2004. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut*, 53: 821-828.
- Morimoto R.I. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Genes & Development* 12: 3788-3796.
- Morita H., He F., Fuse T., Ouwehand A.C., Hashimoto H., Hosoda M., Mizumachi K., Kurisaki J.I. 2002. Adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and their effect on cytokine secretion. *Journal of Microbiology and Immunology*, 46, 4: 293-297.

- Mosser D.D., Caron A.W., Bourget L., Meriin A.B., Sherman M.Y., Morimoto R.I., Massie B. 2000. The chaperone function of Hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Molecular Cell Biology*, 20: 7146-7159.
- Mota L.J., Sorg I., Cornelis G.R. 2005. Type III secretion: The bacteria-eucaryotic cell express. *FEMS Microbiology Letters*, 252: 1-10.
- Murano M., Maemura K., Hirata I., Toshina K., Nishikawa T., Hamamoto N., Sasaki S. 2000. Therapeutic effect of intracolonically administered nuclear factor κB (p65) antisense oligonucleotide on mouse dextran sulphate sodium (DSS)-induced colitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 120: 51-58.
- Murli S., Watson O., Galan J.E. 2001. Role of tyrosine kinase and the tyrosine phosphatase in the interaction of *Salmonella* host cell. *Cellular Microbiology*, 3, 12:795-810.
- Neish A.S., Gewirtz A.T., Zeng H., Young A.N., Hobert M.E., Karmali V., Rao A.S., Madara J.L. 2000. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IκB-α ubiquitination. *Science*, 289: 1560-1563.
- Neish A.S. 2002. The gut microflora and intestinal cells: a continuing dialogue. *Microbes and Infection*, 4: 309-317.
- Nemeth E., Fajdiga S., Malago J.J., Koninkx J.F.J.G., Tooten P.C.J., Van Dijk J. 2006. Inhibition of *Salmonella*-induced IL-8 synthesis and expression of Hsp70 in enterocyte-like Caco-2 cells after exposure to non-starter lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology*, (sprejeto v tisk).
- Oldfield III, E.C. 2001. Emerging foodborne pathogens. Keeping your patients and your family safe. *Reviews in Gastroenterological Disorders*, 1: 177-186.
- Ouwehand A.C., Salminen S., Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82: 279-289.
- Ovelgonne J.H., Koninkx J.F.J.G., Pusztai A., Bardocz S., Kok W., Ewen S.W.B., Hendriks H.G.C.J.M., van Dijk J.E. 2000. Decreased levels of heat shock proteins in gut epithelial cells after exposure to plant lectins. *Gut*, 46: 679-687.
- Oxman T., Shapira M., Diver A., Klein R., Avazov N., Rabinowitz B. 2000. A new method of long-term preventive cardioprotection using *Lactobacillus*. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, 278: 1717-1724.
- Parsell D.A., Lindquist S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Reviews of Genetics*, 27: 437-496.
- Pastar I., Tonic I., Golic N., Kojic M., van Kranenburg R., Kleerebezem M., Topisirovic L., Jovanovic G. 2003. Identification and genetic characterisation of a novel proteinase, PrtR, from the human isolate *Lactobacillus rhamnosus* BGT10. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 10: 5802-5811.
- Pinto M., Robine-Leon S., Appay M.D., Kedinger M., Triadou N., Dussault E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A. 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47: 323-330.

- Ranaldi G., Islam K., Sambuy Y. 1992. Epithelial cells in culture as a model for the intestinal transport of antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36, 7: 1374-1381.
- Reid G., Burton J. 2002. Use of lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*, 4: 319-324.
- Rodrigue D.C., Tauxe R.V. Rowe B. 1990. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic. *Epidemiology and Infections*, 105: 21-27.
- Rogelj I., Bogovič Matijašič B., Čanžek Majhenič A., Stojkovič S. 2002. The survival and persistance of *Lactobacillus acidophilus* LF221 in different ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 76: 83-91.
- Rottner K., Stradal T.E.B., Wehland J. 2005. Bacteria-host-cell interactions at plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. *Developmental Cell*, 9: 3-17.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84: 197-215.
- Salminen S., Bouley M.C., Boutron-Ruault M.C., Cummings J., Franck A., Gibson G., Isolauri E., Moreau M.C., Roberfroid M., Rowland I. 1998. Functional food science and gasrtointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition*, 80, Suppl. 1: 147-171.
- Sansonetti P. 2002. Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut*, 50, Suppl 3: 2-8.
- Schottelius A.J.G., Mayo M.W., Sartor R.B., Baldwin A.S.Jr. 1999. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of κB kinase activity and nuclear factor κB DNA binding. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 45: 31868-31874.
- Segain J.P., Raingeard de la Blétière D., Bourreille A., Leray V., Gervois N., Rosales C., Ferrier L., Bonnet C., Blottièvre H.M., Galmiche J.P. 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Chron's disease. *Gut*, 47: 397-403.
- Servin A.L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28: 405-440.
- Singleton P. 1992. Introduction to bacteria for students of biology, biotechnology and medicine. 2nd ed. Guilford, John Willey & Sons: 692 str.
- Singleton P., Sainsbury D. 1996. Dictionary of microbiology and molecular biology. 2nd ed. New York, John Wiley & sons: 1019 str.
- Solano C., Sesma B., Alvarez E.U., Garcia-Ros D., Calvo A., Gamazo C. 2001. Virulent strains of *Salmonella enteritidis* disrupt the epithelial barrier of Caco-2 and HEp-2 cells. *Archives of Microbiology*, 175: 46-51.
- Stevens C.E., Hume I.D. 1998. Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiological Reviews*, 87, 2: 393-427.

- Suresh T., Hatha A.A.M., Sreenivasan D., Sangeetha N., Lashmanaperumalsamy P. 2006. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* enteritidis and other salmonellas in the eggs and egg-storing trays from retails markets of Coimbatore, South India. *Food Microbiology*, 23: 294-299.
- Takahashi A., Wada A., Ogushi K., Maeda K., Kawahara T., Mawatari K., Kurazono H., Moss J., Hirayama T., Nakaya Y. 2001. Production of β .defensin-2 by human colonic epithelial cells induced by *Salmonella enteritidis* flagella filament structural protein. *FEBS Letters*, 508: 484-488.
- Takeda K., Akira S. 2003. Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular Microbiology*, 5, 3: 143-153.
- Tavaria M., Gabriele T., Kola I., Anderson R.L. 1996. A hitchhiker's guide to human Hsp70 family. *Cell Stress & Chaperones*, 1: 23-28.
- Tsai C.C., Hsieh H.Y., Chhiau H.H., Ali Y.Y., Liu J.H.Yu B., Tsen H.Y. 2005. Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 185-194.
- Tuomola E.M., Salminen S.J. 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 45-51.
- Uguzzoni M., Gionchetti P., Robbiani D.F., Rizzello F., Peruzzo S., Campieri M., Baggio M. 1999. Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis. *American Journal of Pathology*, 155, 2: 331-336.
- Usui N., Ray C.J., Drongowski R.A., Coran A.G., Harmon C.M. 1999. The effect of phospholipids and mucin on bacterial internalization in an enterocyte-cell culture model. *Pediatric Surgery International*, 15: 150-154.
- Van Asten. 2005. A moving story on the flagella of *Salmonella* serotype Enteritidis. Doctoral dissertation. Utrecht, Utrecht University: 122 str.
- Van Asten A.J.A.M., Van Dijk J.E. 2005. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 44: 251-259
- Van Asten A.J.A.M., Hendriks H.G.C.J.M., Koninkx J.F.J.G., Van Dijk J.E. 2004. Flagella-mediated bacterial motility accelerates but is not required for *Salmonella* serotype Enteritidis invasion of differentiated Caco-2 cells. *International Journal of Medical Microbiology*, 294: 395-399.
- Van Asten A.J.A.M., Koninkx J.F.J.G., Van Dijk J.E. 2005. Salmonella entry: M cells versus absorptive enterocytes. *Veterinary Microbiology*, 108: 149-152.
- Van Asten A.J.A.M., Zwaagstra K.A., Baay M.F., Kusters J.G., Huis in t'Veld J.H.J., van der Zeijst B.A.M. 1995. Identification of the domain which determines the g,m serotype of the flagellin of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Bacteriology*, 177: 1610-1613.
- Vaughan E.E., De Vries M.C., Zoetendal E.G., Ben-Amor K., Akkermans A.D.L., De Vos W.M. 2002. The Intestinal LABs. *Antoine Van Leeuwenhoek*, 82: 341-352.

- Vinderola G., Matar C., Perdigon G. 2005. Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement of toll-like receptors. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 12, 9: 1075-1084.
- Von de Weid T., Bulliard C., Schiffri E.J. 2001. Induction by lactic acid bacterium of a population of CD4⁺ T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor β and interleukin-10. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 8, 4: 695-701.
- Wallace T.D., Bradley S., Buckley N.D., Green-Johnson J.M. 2003. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. Journal of Food Protection, 66, 3: 466-472.
- Wallis T.S., Galyov E.E. 2000. Molecular basis of *Salmonella* induced enteritis. Molecular Microbiology, 36, 5: 997-1005.
- Wilson M., McNab R., Henderson B. 2002. Bacterial disease mechanisms. An introductory to cellular microbiology. 1st ed. Cambridge, University Press: 656 str.
- Wong H.R., Ryan M.R., Wispe J.R. 1997. Stress response decreases NF- κ B nuclear translocation and increases I- κ B α expression in A549 cells. Journal of Clinical Investigation, 99, 10: 2423-2428.
- Yan F., Polk B. 2002. Probiotic bacterium prevents cytokine – induced apoptosis in intestinal epithelial cells. Journal of Biological Chemistry, 277, 52: 50959-50965.
- Yoo C.G., Lee S., Lee C.T., Kim Y.W., Han S.K., Shim Y.S. 2000. Anti-inflammatory effect of heat shock protein induction is related to stabilisation of I κ B α through preventing I κ B kinase activation in respiratory epithelial cells. Journal of Immunology, 164: 5416-5423.
- Zeng H., Carlson Q., Guo Y., Yu Y., Collier-Hyams L.S., Madara J.L., Gewirtz A.T., Neish A.S. 2003. Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic *Salmonella*. Journal of Immunology, 171: 3668-3674.

ZAHVALA

Moje doktorsko delo je nastajalo tri leta. V tem času sem se veliko naučila, raziskovala, razmišljala in na koncu zapisala, ... To je rezultat. Ob tem mi je pomagalo in me podpiralo veliko ljudi. Vsem bi se rada resnično zahvalila, čeprav tu sigurno ne bom uspela zajeti vseh:

Najprej se iskreno zahvaljujem svoji mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za vso pomoč, nasvete in spodbudo ter vodenje skozi vsa tri leta.

Hvala tudi somentorici prof. dr. Mojci Narat za nasvete in pomoč, predvsem v celičnem laboratoriju, pa tudi sicer.

Predstojniku Katedre za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo, prof. dr. Francu Viktorju Nekrepnu, se zahvaljujem, ker mi je omogočil delo v raziskovalni skupini.

Hvala članoma komisije prof. dr. Ines Mandič Mulec in prof. dr. Alojzu Ihanu za pregled naloge.

V laboratoriju mi je veliko časa prihranila Marta Majdič. Ne vem kako bi sicer sama izvedla obsežne poskuse. Prav tako sta mi veliko pomagala in svetovala dr. Tadej Čepeljnik in dr. Maša Zorec. Hvala vam in vsem ostalim iz katedre za pomoč in sproščeno vzdušje.

Hvala dr. Bojanji Bogovič-Matijašič za sev LF ter za vse nasvete in pomoč pri delu z laktobacili. Hvala tudi prof dr. Ireni Rogelj, Metodi in Biljani iz katedre za mlekarstvo.

Za pomoč pri statistiki se iskreno zahvaljujem prijateljici Darji Herman. Hvala za ves tvoj čas, nasvete in prijateljsko podporo. Za pomoč pri statistiki hvala tudi dr. Špeli Malovrh.

Za sev T10 se zahvaljujem prof. dr. Ljubiši Topisiroviču in Inštitutu za molekularno genetiko in genetski inžiniring iz Beograda.

Prijateljicama Špeli in Romani najlepša hvala za vse nasvete, klepete, debate, zabavo ter podporo.

I deeply thank to dr. Jos Koninkx first for the opportunity to work in Department of Veterinary pathobiology (Faculty of veterinary medicine, Utrecht University, The Netherlands) and second for guidance, all debates, ideas and a lot of help.

I thank to Peter Tooten for all ELISA analyses, which spared me a lot of time. I thank also to dr. Fons Van Asten for giving me many informations about »his pet« Salmonella and to Ton Ultee for Scanning electron microscope images. Thanks to Joshua, Edina and Linaida for technical help with experiments. Thanks to everyone from lab for making me feel comfortable during my stay in Utrecht.

I thank to my friends, "my Utrecht family": April, Elsa, Elena, Vicky, Lorenzo, Timo, Fernando, Jeroen, Duart, Marteen, Meindert, Eyk, Gianluca and others for all the friendship, fun and support.

Na koncu bi se rada zahvalila svojemu očetu in mami, ki sta me spodbujala in vodila na poti skozi vsa moja leta. Brez vaju ne bi nikoli prišla do tu, kjer sem. Hvala sestri Nini za energijo in povezanost, ki jo čutiva. Hvala tudi mojemu Mateju, ki me že precej časa spremlja na moji poti, spodbuja, vodi po svetu in pospešuje ritem srca. Hvala vam!

Priloga A

Indukcija Hsp70 (relativne vrednosti) v celicah Caco-2 po izpostavitev različnim številom posameznih bakterij: *Salmonella enteritidis* 857 (Se 857), *Lactobacillus gasseri* LF221 (LF), *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 (T10) in *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 (NCDO).

Se857 (CFU / Caco-2)	Hsp70 (relativna vrednost)		
	Čas po inkubaciji celic Caco-2 z Se857		
	3h	6h	24h
0	1,00	1,00	1,00
4	1,02	1,00	1,01
16	1,06	1,00	0,84
43	1,01	0,95	1,03
404	1,00	1,18	1,03
704	0,69	1,19	1,03

LF (CFU / Caco-2)	Hsp70 (relativna vrednost)		
	Čas po inkubaciji celic Caco-2 z LF		
	3h	6h	24h
0	1,00	1,00	1,00
10	1,01	0,91	0,99
91	1,07	0,97	0,99
164	1,16	1,28	1,17
432	1,20	1,29	1,61
998	1,20	1,50	2,51

T10 (CFU / Caco-2)	Hsp70 (relativna vrednost)		
	Čas po inkubaciji celic Caco-2 s T10		
	3h	6h	24h
0	1,00	1,00	1,00
9	1,05	1,20	0,83
86	1,11	1,29	0,90
153	1,12	1,24	0,99
435	1,11	1,02	1,10
882	1,10	1,08	1,11

NCDO (CFU / Caco-2)	Hsp70 (relativna vrednost)		
	Čas po inkubaciji celic Caco-2 z NCDO		
	3h	6h	24h
0	1,00	1,00	1,00
5	0,97	0,92	0,90
81	1,01	0,95	0,99
243	0,93	0,97	1,02
449	0,89	1,02	1,06
821	0,95	0,90	0,95

Priloga B

Povprečne koncentracije IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi različnim številom posameznih bakterij: *Salmonella enteritidis* 857 (Se 857), *Lactobacillus gasseri* LF221 (LF), *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 (T10) in *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 (NCDO). Koncentracijo IL-8 smo merili 3 ure, 6 ur in 24 ur po izpostavitvi celic posameznim bakterijam.

Se857 (CFU / Caco-2)	IL-8 (pg / 10^6 Caco-2)					
	3h		6h		24h	
	povpr.	st.dev.	povpr.	st.dev.	povpr.	st.dev.
0	63	7,6	64	6,9	77	7,7
4	155	18,9	186	31,5	276	44,7
16	157	17,7	314	87,8	506	99,3
43	192	31,4	374	124,2	806	208,2
404	230	50,8	808	269,3	1806	41,0
704	382	107,4	780	222,3	1514	117,3

LF (CFU / Caco-2)	IL-8 (pg / 10^6 Caco-2)					
	3h		6h		24h	
	povpr.	st.dev.	povpr.	st.dev.	povpr.	st.dev.
0	62	1,2	64	1,9	80	2,2
10	123	17,6	167	11,5	385	74,7
91	156	21,9	245	39,9	553	68,3
164	163	12,4	249	45,1	657	90,1
432	185	20,7	340	45,2	777	79,4
998	179	15,0	373	79,2	700	47,3

T10 (CFU / Caco-2)	IL-8 (pg / 10^6 Caco-2)					
	3h		6h		24h	
	povpr.	st.dev.	povpr.	st.dev.	povpr.	st.dev.
0	62	6,9	65	7,4	71	6,1
9	127	12,8	144	21,8	167	24,9
86	168	14,8	188	23,5	208	20,4
153	164	23,4	211	33,0	265	46,0
435	231	42,4	277	35,9	324	57,3
882	237	29,6	428	67,7	450	92,1

NCDO (CFU / Caco-2)	IL-8 (pg / 10^6 Caco-2)					
	3h		6h		24h	
	povpr.	st.dev.	povpr.	st.dev.	povpr.	st.dev.
0	76	1,0	78	1,6	95	2,6
5	83	1,2	91	6,2	117	12,4
81	111	4,9	179	34,2	349	67,1
243	178	14,6	297	43,4	641	101,6
449	221	29,0	420	50,3	789	116,0
821	211	47,3	465	41,2	876	150,3

povpr: povprečna vrednost izračunana iz 4 paralelk

st.dev.:standardna deviacija

Priloga C

Prikaz p-vrednosti za koncentracije IL-8 v celicah Caco-2 po inkubaciji z različnim številom bakterij *Salmonella enteritidis* 857 (Se857). Prikazane so vse primerjave med različnimi števili Se857 in vsaka tabela prikazuje vrednosti v določenem času od izpostavitve celic Caco-2 salmoneli (3h, 6h in 24h).

p<0,05.....statistično značilno različno

p≤0,1.....meja statistične značilnosti

3h po inkubaciji celic Caco-2 z Se857		Se857 (CFU/Caco-2)					
		0	4	16	43	404	704
Se857 (CFU/Caco-2)	0		0,167	0,152	0,023	0,003	0,000
	4	0,167		1,000	0,900	0,339	0,000
	16	0,152	1,000		0,918	0,366	0,000
	43	0,023	0,900	0,918		0,896	0,001
	404	0,003	0,339	0,366	0,896		0,007
	704	0,000	0,000	0,000	0,001	0,007	

6h po inkubaciji celic Caco-2 z Se857		Se857 (CFU/Caco-2)					
		0	4	16	43	404	704
Se857 (CFU/Caco-2)	0		0,872	0,259	0,102	0,000	0,000
	4	0,872		0,852	0,548	0,000	0,000
	16	0,259	0,852		0,993	0,003	0,006
	43	0,102	0,548	0,993		0,011	0,018
	404	0,000	0,000	0,003	0,011		1,000
	704	0,000	0,000	0,006	0,018	1,000	

24h po inkubaciji celic Caco-2 z Se857		Se857 (CFU/Caco-2)					
		0	4	16	43	404	704
Se857 (CFU/Caco-2)	0		0,171	0,001	0,000	0,000	0,000
	4	0,171		0,083	0,000	0,000	0,000
	16	0,001	0,083		0,015	0,000	0,000
	43	0,000	0,000	0,015		0,000	0,000
	404	0,000	0,000	0,000	0,000		0,031
	704	0,000	0,000	0,000	0,000	0,031	

Priloga D

Prikaz p-vrednosti za koncentracije IL-8 v celicah Caco-2 po inkubaciji z različnim številom bakterij *Lactobacillus gasseri* LF221 (LF). Prikazane so vse primerjave med različnimi števili LF in vsaka tabela prikazuje vrednosti v določenem času od izpostavitve celic Caco-2 laktobacilom LF (3h, 6h in 24h).

p<0,05.....statistično značilno različno

p≤0,1.....meja statistične značilnosti

3h po inkubaciji celic Caco-2 z LF		LF (CFU/Caco-2)					
		0	10	91	164	432	998
LF (CFU/Caco-2)	0		0,001	0,000	0,000	0,000	0,000
	10	0,001		0,089	0,028	0,000	0,001
	91	0,000	0,089		0,990	0,172	0,360
	164	0,000	0,028	0,990		0,442	0,707
	432	0,000	0,000	0,172	0,442		0,996
	998	0,000	0,001	0,360	0,707	0,996	

6h po inkubaciji celic Caco-2 z LF		LF (CFU/Caco-2)					
		0	10	91	164	432	998
LF (CFU/Caco-2)	0		0,043	0,000	0,000	0,000	0,000
	10	0,043		0,194	0,160	0,000	0,000
	91	0,000	0,194		1,000	0,073	0,009
	164	0,000	0,160	1,000		0,090	0,011
	432	0,000	0,000	0,073	0,090		0,899
	998	0,000	0,000	0,009	0,011	0,899	

24h po inkubaciji celic Caco-2 z LF		LF (CFU/Caco-2)					
		0	10	91	164	432	998
LF (CFU/Caco-2)	0		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	10	0,000		0,024	0,000	0,000	0,000
	91	0,000	0,024		0,288	0,002	0,059
	164	0,000	0,000	0,288		0,165	0,941
	432	0,000	0,000	0,002	0,165		0,589
	998	0,000	0,000	0,059	0,941	0,589	

Priloga E

Prikaz p-vrednosti za koncentracije IL-8 v celicah Caco-2 po inkubaciji z različnim številom bakterij *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 (T10). Prikazane so vse primerjave med različnimi števili T10 in vsaka tabela prikazuje vrednosti v določenem času od izpostavitve celic Caco-2 laktobacilom T10 (3h, 6h in 24h).

p<0,05.....statistično značilno različno

p≤0,1.....meja statistične značilnosti

3h po inkubaciji celic Caco-2 s T10		T10 (CFU/Caco-2)					
		0	9	86	153	435	882
T10 (CFU/Caco-2)	0		0,016	0,000	0,000	0,000	0,000
	9	0,016		0,238	0,320	0,000	0,000
	86	0,000	0,238		1,000	0,021	0,010
	153	0,000	0,320	1,000		0,014	0,006
	435	0,000	0,000	0,021	0,014		0,999
	882	0,000	0,000	0,010	0,006		0,999

6h po inkubaciji celic Caco-2 s T10		T10 (CFU/Caco-2)					
		0	9	86	153	435	882
T10 (CFU/Caco-2)	0		<i>0,064</i>	0,002	0,000	0,000	0,000
	9	<i>0,064</i>		0,567	0,158	0,001	0,000
	86	0,002	0,567		0,994	0,029	0,000
	153	0,000	0,158	0,994		0,159	0,000
	435	0,000	0,001	0,029	0,159		0,000
	882	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000

24h po inkubaciji celic Caco-2 s T10		T10 (CFU/Caco-2)					
		0	9	86	153	435	882
T10 (CFU/Caco-2)	0		<i>0,118</i>	0,012	0,000	0,000	0,000
	9	<i>0,118</i>		0,857	0,109	0,001	0,000
	86	0,012	0,857		0,593	0,041	0,000
	153	0,000	0,109	0,593		0,575	0,001
	435	0,000	0,001	0,041	0,575		0,022
	882	0,000	0,000	0,000	0,001		0,022

Priloga F

Prikaz p-vrednosti za koncentracije IL-8 v celicah Caco-2 po inkubaciji z različnim številom bakterij *Lactobacillus sakei* NCDO (NCDO). Prikazane so vse primerjave med različnimi števili NCDO in vsaka tabela prikazuje vrednosti v določenem času od izpostavitve celic Caco-2 laktobacilom NCDO (3h, 6h in 24h).

$p < 0,05$statistično značilno različno

$p \leq 0,1$meja statistične značilnosti

3h po inkubaciji celic Caco-2 z NCDO		NCDO (CFU/Caco-2)					
		0	5	81	243	449	821
NCDO (CFU/Caco-2)	0		0,998	0,337	0,000	0,000	0,000
	5	0,998		0,582	0,000	0,000	0,000
	81	0,337	0,582		0,008	0,000	0,000
	243	0,000	0,000	0,008		0,143	0,374
	449	0,000	0,000	0,000	0,143		0,989
	821	0,000	0,000	0,000	0,374		0,989

6h po inkubaciji celic Caco-2 z NCDO		NCDO (CFU/Caco-2)					
		0	5	81	243	449	821
NCDO (CFU/Caco-2)	0		0,994	0,008	0,000	0,000	0,000
	5	0,994		0,024	0,000	0,000	0,000
	81	0,008	0,024		0,002	0,000	0,000
	243	0,000	0,000	0,002		0,001	0,000
	449	0,000	0,000	0,000	0,001		0,467
	821	0,000	0,000	0,000	0,000		0,467

24h po inkubaciji celic Caco-2 z NCDO		NCDO (CFU/Caco-2)					
		0	5	81	243	449	821
NCDO (CFU/Caco-2)	0		0,999	0,012	0,000	0,000	0,000
	5	0,999		0,023	0,000	0,000	0,000
	81	0,012	0,023		0,003	0,000	0,000
	243	0,000	0,000	0,003		0,257	0,021
	449	0,000	0,000	0,000	0,257		0,758
	821	0,000	0,000	0,000	0,021		0,758

Priloga G

Relativne vrednosti Hsp70 po izpostavitvi celic Caco-2 laktobacilom *L. gasseri* LF221 (LF) ali *L. sakei* NCDO 2714 (NCDO) oz. temperaturam 37°C ali 42°C in naknadno salmoneli *S. enteritidis* 857 (Se 857). Uporabljene so različne kombinacije izpostavitve celic.

Izpostavitev celic Caco-2				Hsp70 (relativna vrednost)
1. izpostavitev (1h)	1. inkubacija v DMEM ^{genta} → (h)	2. izpostavitev (1h)	2. inkubacija v DMEM ^{genta} → (h)	
DMEM , 37°C	6	0 Se (CFU/Caco-2)	24	1,00
DMEM , 37°C	6	20 Se (CFU/Caco-2)	24	0,99
DMEM , 37°C	6	200 Se (CFU/Caco-2)	24	1,13
DMEM, 42°C	6	0 Se (CFU/Caco-2)	24	1,70
DMEM, 42°C	6	20 Se (CFU/Caco-2)	24	1,32
DMEM, 42°C	6	200 Se (CFU/Caco-2)	24	1,52
200 LF (CFU/Caco-2)	24	0 Se (CFU/Caco-2)	24	1,26
200 LF (CFU/Caco-2)	24	20 Se (CFU/Caco-2)	24	0,97
200 LF (CFU/Caco-2)	24	200 Se (CFU/Caco-2)	24	1,11
200 NCDO (CFU/Caco-2)	24	0 Se (CFU/Caco-2)	24	1,17
200 NCDO (CFU/Caco-2)	24	20 Se (CFU/Caco-2)	24	1,08
200 NCDO (CFU/Caco-2)	24	200 Se (CFU/Caco-2)	24	1,08

Priloga H

Relativne vrednosti Hsp70 v celicah Caco-2 po izpostavitvi kontrolam brez prisotnih bakterij (37°C in 42°C), 75 LF (CFU/Caco-2), trem različnim koncentracijam Se857 (Se): 6, 60 in 394 CFU/Caco-2, mešanici Se857 in LF (Se+LF): 75 LF + 6 Se, 75 LF + 60 Se, 75 LF + 394 Se (CFU/Caco-2) ter 75 LF in naknadno trem različnim koncentracijam Se857 (LF—Se): 75 LF -- 6 Se, 75 LF -- 60 Se, 75 LF -- 394 Se (CFU/Caco-2). Količino Hsp70 smo merili 3 ure, 6 ur in 24 ur po izpostavitvi celic bakterijam.

Izpostavitev celic bakterijam (CFU/Caco-2)	Hsp70 (relativna vrednost) v različnem času (h) po izpostavitvi celic bakterijam		
	3h	6h	24h
0 (37°C)	1,00	1,00	1,00
0 (42°C)	1,84	1,92	1,63
75 LF	1,00	1,23	1,09
6 Se	1,17	0,88	0,91
60 Se	1,43	0,98	1,11
394 Se	1,33	1,14	1,20
75 LF + 6 Se	1,41	1,27	1,04
75 LF + 60 Se	1,14	1,14	1,35
75 LF + 394 Se	1,02	1,53	1,13
75 LF -- 6 Se	1,13	1,12	1,15
75 LF -- 60 Se	1,11	1,25	1,21
75 LF -- 394 Se	1,16	1,12	1,16

Relativne vrednosti Hsp70 v celicah Caco-2 po izpostavitvi kontrolam brez prisotnih bakterij (37°C in 42°C), 270 T10 (CFU/Caco-2), trem različnim koncentracijam Se857 (Se): 5, 57 in 401 CFU/Caco-2, mešanici Se857 in T10 (Se+T10): 270 T10 + 5 Se, 270 T10 + 57 Se, 270 T10 + 401 Se (CFU/Caco-2) ter 270 T10 in naknadno trem različnim koncentracijam Se857 (T10—Se): 270 T10 -- 5 Se, 270 T10 -- 57 Se, 270 T10 -- 401 Se (CFU/Caco-2). Količino Hsp70 smo merili 3 ure, 6 ur in 24 ur po izpostavitvi celic z bakterijam.

Izpostavitev celic bakterijam (CFU/Caco-2)	Hsp70 (relativna vrednost) v različnem času (h) po izpostavitvi celic bakterijam		
	3h	6h	24h
0 (37°C)	1,00	1,00	1,00
0 (42°C)	2,05	2,32	2,10
270 T10	1,07	1,09	1,04
5 Se	0,97	1,03	1,42
57 Se	1,12	0,93	1,43
401 Se	1,01	0,93	1,03
270 T10 + 5 Se	1,06	1,18	1,42
270 T10 + 57 Se	1,11	1,13	1,29
270 T10 + 401 Se	0,99	1,11	1,42
270 T10 -- 5 Se	1,00	0,83	1,15
270 T10 -- 57 Se	1,10	0,88	1,23
270 T10 -- 401 Se	0,92	0,90	1,24

Priloga I

Koncentracija IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi kontrolam brez prisotnih bakterij (37°C in 42°C), 75 LF (CFU/Caco-2), trem različnim koncentracijam Se857 (Se): 6, 60 in 394 CFU/Caco-2, mešanici Se857 in LF (Se+LF): 75 LF + 6 Se, 75 LF + 60 Se, 75 LF + 394 Se (CFU/Caco-2) ter 75 LF in naknadno trem različnim koncentracijam Se857 (LF—Se): 75 LF -- 6 Se, 75 LF -- 60 Se, 75 LF -- 394 Se (CFU/Caco-2). Koncentracijo IL-8 smo merili 3 ure, 6 ur in 24 ur po izpostavitvi celic bakterijam.

Izpostavitev celic bakterijam (CFU/Caco-2)	IL-8 (pg / 10^6 Caco-2)					
	3 h		6 h		24 h	
	povprečje	st. dev.	povprečje	st. dev.	povprečje	st. dev.
0 (37°C)	12	0,1	42	8,8	81	17,6
0 (42°C)	21	0,5	52	5,8	163	29,2
75 LF	260	16,0	376	0,9	498	6,7
6 Se	729	34,7	824	25,0	862	5,1
60 Se	679	29,0	788	12,3	825	9,0
394 Se	679	26,2	812	24,0	820	39,3
75 LF + 6 Se	660 [▲]	8,7	775	7,6	813*	4,1
75 LF + 60 Se	687	12,4	827 [▲]	34,6	872	13,9
75 LF + 394 Se	572*	8,9	766	16,9	813	15,0
75 LF -- 6 Se	730	22,2	791	21,4	861	15,2
75 LF -- 60 Se	696	9,7	759	2,5	820	20,0
75 LF -- 394 Se	728	26,9	796	20,9	872	27,1

povpr.: povprečna vrednost izračunana iz 2 paralelk

st.dev.:standardna deviacija

*: statistično značilne razlike v primerjavi z enako koncentracijo Se ($p<0,05$)

[▲]: meja statistične značilnosti ($p\leq 0,1$)

Koncentracija IL-8 v celicah Caco-2 po izpostavitvi kontrolam brez prisotnih bakterij (37°C in 42°C), 270 T10 (CFU/Caco-2), trem različnim koncentracijam Se857 (Se): 5, 57 in 404 CFU/Caco-2, mešanici Se857 in T10 (Se+T10): 270 T10 + 5 Se, 270 T10 + 57 Se, 270 T10 + 401 Se (CFU/Caco-2) ter 270 T10 in naknadno trem različnim koncentracijam Se857 (T10—Se): 270 T10 -- 5 Se, 270 T10 -- 57 Se, 270 T10 -- 401 Se (CFU/Caco-2). Koncentracijo IL-8 smo merili 3 ure, 6 ur in 24 ur po izpostavitvi celic bakterijam.

Izpostavitev celic bakterijam (CFU/Caco-2)	IL-8 (pg / 10^6 Caco-2)					
	3 h		6 h		24 h	
	povprečje	st. dev.	povprečje	st. dev.	povprečje	st. dev.
0 (37°C)	19	2,7	22	0,9	76	17,5
0 (42°C)	19	0,4	23	0,9	147	24,1
270 T10	38	3,2	46	1,6	167	1,5
5 Se	704	51,5	809	13,5	939	18,5
57 Se	733	3,3	826	7,7	933	12,9
401 Se	721	26,1	851	49,9	955	28,3
270 T10 + 5 Se	422*	18,7	615*	65,6	792*	32,0
270 T10 + 57 Se	663*	24,0	822	14,5	918	20,8
270 T10 + 401 Se	594*	17,2	741 [▲]	10,3	859 [▲]	34,7
270 T10 -- 5 Se	736	5,3	796	12,6	941	7,4
270 T10 -- 57 Se	816*	2,2	790 [▲]	11,8	947	26,2
270 T10 -- 401 Se	771	32,0	807	24,0	876	25,1

povpr.: povprečna vrednost izračunana iz 2 paralelk

st.dev.:standardna deviacija

*: statistično značilne razlike v primerjavi z enako koncentracijo Se ($p<0,05$)

[▲]: meja statistične značilnosti ($p\leq 0,1$)

Priloga J

Prikaz p-vrednosti za območja inhibicije rasti salmonelle *S. enteritidis* 857 (Se857). Naredili smo test difuzije v agarju LB. Testirali smo vpliv izločkov laktobacilov ter gojišča MRS z različnimi pH vrednostmi.

p<0,05.....statistično značilno različno

p≤0,1.....meja statistične značilnosti

območja inhibicije rasti Se857		MRS	MRS	MRS	SCS LF													
		HCl	lac		pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH	pH			
		pH	pH	pH	3,9	4,8	7,0	4,0	4,8	7,0	4,0	4,8	7,0	4,5	4,8	7,0		
MRS	pH 6,0			1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	
MRS_HCl	pH 4,8	1,000			0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000		
MRS_lac	pH 4,8	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
SCS LF	pH 3,9	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,888	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
	pH 4,8	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,086	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,984	0,017	0,000	0,000	
	pH 7,0	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	
SCS LFbac-	pH 4,0	0,000	0,000	0,000	0,888	0,000	0,000		0,000	0,000	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	pH 4,8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,086	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,751	1,000	0,000	0,000	0,000
	pH 7,0	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000		0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000
SCS T10	pH 4,5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	pH 4,8	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	pH 7,0	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000
SCS NCDO	pH 4,5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,984	0,000	0,000	0,751	0,000		0,000	0,000	0,000	0,325	0,000	0,000	0,000
	pH 4,8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,017	0,000	0,000	1,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,325	0,000	0,000	0,000
	pH 7,0	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000

MRS... tekoče gojišče MRS

MRS_HCl...tekoče gojišče MRS z dodano HCl

MRS_lacl...tekoče gojišče MRS z dodano mlečno kislino

SCS LF...izločki oz supernatant od *Lactobacillus gasseri* LF221

SCS LFbac-...izločki oz supernatant od *Lactobacillus gasseri* LF221 bac-

SCS T10...izločki oz supernatant od *Lactobacillus rhamnosus* BGT10

SCS NCDO...izločki oz supernatant od *Lactobacillus sakei* NCDO 2714

Priloga K

Prikaz p-vrednosti za koncentracije IL-8 v celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene salmoneli *S. enteritidis* 857 (Se857), predhodno tretirani z izločki laktobacilov (SCS pH = 7 ali SCS pH = 4,8) in ustreznimi kontrolami. V tabeli so prikazane vse primerjave med vzorci (predobdelava Se857 z različnimi gojiščo oz. SCS), v primeru, ko so bile celice izpostavljene Se857 v koncentraciji **2 CFU/Caco-2** in sicer v prvi tabeli **6 ur** po izpostavitvi celic Se857 in v drugi tabeli **24 ur** po izpostavitvi celic Se857.

p<0,05.....statistično značilno različno

p≤0,1.....meja statistične značilnosti

2 Se857 (CFU/Caco-2), 6h inkubacije	LB	MRS	MRS	MRS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS
		HCl	lac	LF	LFbac-	T10 pH 4,8	NCDO	LF	LFbac-	T10	NCDO	
	pH 7	pH 6	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	pH 7				
LB	pH 7		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000
MRS	pH 6	0,000		0,997	0,514	0,000	0,000	0,009	0,259	0,474	0,314	0,997
MRS_HCI	pH 4,8	0,000	0,997		0,956	0,002	0,001	0,064	0,803	0,940	0,824	0,703
MRS_lac	pH 4,8	0,000	0,514	0,956		0,031	0,014	0,594	1,000	1,000	1,000	0,089
SCS LF	pH 4,8	0,000	0,000	0,002	0,031		1,000	0,527	0,026	0,035	0,062	0,000
SCS LFbac-	pH 4,8	0,000	0,000	0,001	0,014	1,000		0,302	0,011	0,017	0,030	0,000
SCS T10	pH 4,8	0,000	0,009	0,064	0,594	0,527	0,302		0,641	0,639	0,827	0,000
SCS NCDO	pH 4,8	0,000	0,259	0,803	1,000	0,026	0,011	0,641		1,000	1,000	0,023
SCS LF	pH 7	0,000	0,474	0,940	1,000	0,035	0,017	0,639	1,000		1,000	0,078
SCS LFbac-	pH 7	0,000	0,314	0,824	1,000	0,062	0,030	0,827	1,000	1,000		0,041
SCS T10	pH 7	0,001	0,997	0,703	0,089	0,000	0,000	0,000	0,023	0,078	0,041	
SCS NCDO	pH 7	0,000	1,000	0,893	0,174	0,000	0,000	0,001	0,520	0,153	0,085	1,000

2 Se857 (CFU/Caco-2), 24h inkubacije	LB	MRS	MRS	MRS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS
		HCl	lac	LF	LFbac-	T10 pH 4,8	NCDO	LF	LFbac-	T10	NCDO	
	pH 7	pH 6	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	pH 7				
LB	pH 7		0,065	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
MRS	pH 6	0,065		1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,180	0,037	0,103
MRS_HCI	pH 4,8	0,019	1,000		0,002	0,000	0,000	0,000	0,008	0,465	0,123	0,330
MRS_lac	pH 4,8	0,000	0,000	0,002		0,000	0,000	0,798	0,950	0,137	0,501	0,086
SCS LF	pH 4,8	0,000	0,000	0,000	0,000		1,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000
SCS LFbac-	pH 4,8	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000		0,004	0,000	0,000	0,000	0,000
SCS T10	pH 4,8	0,000	0,000	0,000	0,798	0,002	0,004		0,075	0,003	0,018	0,001
SCS NCDO	pH 4,8	0,000	0,002	0,008	0,950	0,000	0,000	0,075		0,610	0,986	0,488
SCS LF	pH 7	0,000	0,180	0,465	0,137	0,000	0,000	0,003	0,610		0,998	1,000
SCS LFbac-	pH 7	0,000	0,037	0,123	0,501	0,000	0,000	0,018	0,986	0,998		0,997
SCS T10	pH 7	0,000	0,103	0,330	0,086	0,000	0,000	0,001	0,488	1,000	0,997	
SCS NCDO	pH 7	0,000	0,399	0,810	0,017	0,000	0,000	0,000	0,115	0,999	0,789	0,996

LB.tekoče gojišče LB

MRS... tekoče gojišče MRS

MRS_HCI...tekoče gojišče MRS z dodano HCl

MRS_lacl...tekoče gojišče MRS z dodano mlečno kislino

SCS LF...izločki oz supernatant od *Lactobacillus gasseri* LF221

SCS LFbac-...izločki oz supernatant od *Lactobacillus gasseri* LF221 bac-

SCS T10...izločki oz supernatant od *Lactobacillus rhamnosus* BGT10

SCS NCDO...izločki oz supernatant od *Lactobacillus sakei* NCDO 2714

Priloga L

Prikaz p-vrednosti za koncentracije IL-8 v celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene salmoneli *S. enteritidis* 857 (Se857), predhodno tretirani z izločki laktobacilov (SCS pH = 7 ali SCS pH = 4,8) in ustreznimi kontrolami. V tabeli so prikazane vse primerjave med vzorci (predobdelava Se857 z različnimi gojiščo oz. SCS), v primeru, ko so bile celice izpostavljene Se857 v koncentraciji **15 CFU/Caco-2** in sicer v prvi tabeli **6 ur** po izpostavitvi celic Se857 in v drugi tabeli **24 ur** po izpostavitvi celic Se857.

p<0,05.....statistično značilno različno

p≤0,1.....meja statistične značilnosti

15 Se857 (CFU/Caco-2), 6h inkubacije	LB	MRS	MRS	MRS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS
	pH 7	pH 6	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	T10 pH 4,8	NCDO	LF	LFbac-	T10	NCDO
LB pH 7		0,301	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,090	0,001	0,021	0,000
MRS pH 6	0,301		0,048	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,196	0,969	0,000
MRS_HCl pH 4,8	0,000	0,048		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,175	0,999	0,234	0,018
MRS_lac pH 4,8	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,219	0,000	0,000	0,000	0,118
SCS LF pH 4,8	0,000	0,000	0,000	0,000		0,643	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
SCS LFbac- pH 4,8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,643		0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
SCS T10 pH 4,8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025		0,033	0,000	0,000	0,000	0,000
SCS NCDO pH 4,8	0,000	0,000	0,000	0,219	0,000	0,000	0,033		0,000	0,000	0,000	0,000
SCS LF pH 7	0,090	1,000	0,175	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,541	1,000	0,000
SCS LFbac- pH 7	0,001	0,196	0,999	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,541		0,693	0,003
SCS T10 pH 7	0,021	0,969	0,234	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,693		0,000
SCS NCDO pH 7	0,000	0,000	0,018	0,118	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,000	

15 Se857 (CFU/Caco-2), 24h inkubacije	LB	MRS	MRS	MRS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS
	pH 7	pH 6	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	T10 pH 4,8	NCDO	LF	LFbac-	T10	NCDO
LB pH 7		1,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,078	0,000
MRS pH 6	1,000		0,021	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,062	0,000
MRS_HCl pH 4,8	0,017	0,021		0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	1,000
MRS_lac pH 4,8	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,767	0,000	0,000	0,000	0,000
SCS LF pH 4,8	0,000	0,000	0,000	0,000		0,009	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
SCS LFbac- pH 4,8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009		0,998	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
SCS T10 pH 4,8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,998		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
SCS NCDO pH 4,8	0,000	0,000	0,002	0,767	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000
SCS LF pH 7	0,000	0,000		0,082	1,000	0,000						
SCS LFbac- pH 7	0,078	0,062	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,082		0,153	0,000
SCS T10 pH 7	0,000	0,000	1,000	0,153		0,000						
SCS NCDO pH 7	0,014	0,018	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

LB.tekoče gojišče LB

MRS... tekoče gojišče MRS

MRS_HCl...tekoče gojišče MRS z dodano HCl

MRS_lacl...tekoče gojišče MRS z dodano mlečno kislino

SCS LF...izločki oz supernatant od *Lactobacillus gasseri* LF221

SCS LFbac-...izločki oz supernatant od *Lactobacillus gasseri* LF221 bac-

SCS T10...izločki oz supernatant od *Lactobacillus rhamnosus* BGT10

SCS NCDO...izločki oz supernatant od *Lactobacillus sakei* NCDO 2714

Priloga M

Prikaz p-vrednosti za koncentracije IL-8 v celicah Caco-2, ki so bile izpostavljene salmoneli *S. enteritidis* 857 (Se857), predhodno tretirani z izločki laktobacilov (SCS pH = 7 ali SCS pH = 4,8) in ustreznimi kontrolami. V tabeli so prikazane vse primerjave med vzorci (predobdelava Se857 z različnimi gojiščo oz. SCS), v primeru, ko so bile celice izpostavljene Se857 v koncentraciji **146 CFU/Caco-2** in sicer v prvi tabeli **6 ur** po izpostavitvi celic Se857 in v drugi tabeli **24 ur** po izpostavitvi celic Se857.

p<0,05.....statistično značilno različno

p≤0,1.....meja statistične značilnosti

146 Se857 (CFU/Caco-2), 6h inkubacije	LB	MRS	MRS	MRS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS
	pH 7	pH 6	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	T10 pH 4,8	NCDO	LF	LFbac-	T10	NCDO
LB pH 7		0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,001	0,004	0,000
MRS pH 6		0,004		0,065	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	1,000	0,208
MRS_HCl pH 4,8		0,000	0,065		0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,021	0,216	0,011
MRS_lac pH 4,8		0,000	0,000	0,000		0,071	0,357	0,023	0,000	0,000	0,000	0,000
SCS LF pH 4,8		0,000	0,000	0,000	0,071		0,995	1,000	0,245	0,000	0,000	0,000
SCS LFbac- pH 4,8		0,000	0,000	0,000	0,357	0,995		0,956	0,037	0,000	0,000	0,000
SCS T10 pH 4,8		0,000	0,000	0,000	0,023	1,000	0,956		0,230	0,000	0,000	0,000
SCS NCDO pH 4,8		0,000	0,000	0,007	0,000	0,245	0,037	0,230		0,000	0,000	0,000
SCS LF pH 7		0,011	1,000	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000			0,964	1,000
SCS LFbac- pH 7		0,001	1,000	0,216	0,000	0,000	0,000	0,000			0,956	0,579
SCS T10 pH 7		0,004	1,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000			0,956	0,036
SCS NCDO pH 7		0,000	0,208	0,994	0,000	0,000	0,000	0,000			0,579	0,036

146 Se857 (CFU/Caco-2), 24h inkubacije	LB	MRS	MRS	MRS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	SCS	
	pH 7	pH 6	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	pH 4,8	T10 pH 4,8	NCDO	LF	LFbac-	T10	NCDO	
LB pH 7			0,145	0,008	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,683	0,993	0,491	0,114
MRS pH 6		0,145		0,885	0,000	0,303	0,005	0,034	0,009	0,004	0,021	0,001	1,000
MRS_HCl pH 4,8		0,008	0,885		0,000	0,990	0,105	0,554	0,216	0,000	0,001	0,000	0,734
MRS_lac pH 4,8		0,000	0,000	0,000		0,002	0,143	0,005	0,021	0,000	0,000	0,000	0,000
SCS LF pH 4,8		0,001	0,303	0,990	0,002		0,531	0,995	0,834	0,000	0,000	0,000	0,158
SCS LFbac- pH 4,8		0,000	0,005	0,105	0,143	0,531		0,931	1,000	0,000	0,000	0,000	0,002
SCS T10 pH 4,8		0,000	0,034	0,554	0,005	0,995	0,931		0,999	0,000	0,000	0,000	0,010
SCS NCDO pH 4,8		0,000	0,009	0,216	0,021	0,834	1,000	0,999		0,000	0,000	0,000	0,002
SCS LF pH 7		0,683	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			0,997	1,000	0,002
SCS LFbac- pH 7		0,993	0,021	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000			0,984	0,013	
SCS T10 pH 7		0,491	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			0,984	0,000	
SCS NCDO pH 7		0,114	1,000	0,734	0,000	0,158	0,002	0,010	0,002	0,002	0,013	0,000	

LB.tekoče gojišče LB

MRS... tekoče gojišče MRS

MRS_HCl...tekoče gojišče MRS z dodano HCl

MRS_lacl...tekoče gojišče MRS z dodano mlečno kislino

SCS LF...izločki oz supernatant od *Lactobacillus gasseri* LF221

SCS LFbac-...izločki oz supernatant od *Lactobacillus gasseri* LF221 bac-

SCS T10...izločki oz supernatant od *Lactobacillus rhamnosus* BGT10

SCS NCDO...izločki oz supernatant od *Lactobacillus sakei* NCDO 2714

Priloga N

Koncentracije ocetne, propionske, maslene in mlečne kisline v gojišču MRS po 18h inkubacije pri 37°C ter v supernatantih 18h starih kultur laktobacilov: *L. gasseri* LF221, *L. rhamnosus* BGT10 in *L. sakei* NCDO 2714.

gojišče ali supernatant	kislina (mg/ml)			
	ocetna	propionska	maslena	mlečna
gojišče MRS	6,7	0,0	0,0	0,2
supernatant od <i>L. gasseri</i> LF221	5,8	0,0	0,0	9,6
supernatant od <i>L. rhamnosus</i> BGT10	6,6	0,0	0,0	10,3
supernatant od <i>L. sakei</i> NCDO 2714	6,7	0,0	0,0	4,1