

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Daša KAVKA

**UČINEK PROBIOTIČNIH BAKTERIJ NA
ADHEZIVNOST IN INVAZIVNOST BAKTERIJ
Campylobacter jejuni V CELIČNEM MODELU
PIŠČANČJIH IN PRAŠIČJIH ČREVESNIH
EPITELIJSKIH CELIC**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

KAVKA Daša

**UČINEK PROBIOTIČNIH BAKTERIJ NA ADHEZIVNOST IN INVAZIVNOST
BAKTERIJ *Campylobacter jejuni* V CELIČNEM MODELU PIŠČANČJIH IN
PRAŠIČJIH ČREVESNIH EPITELIJSKIH CELIC**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF PROBIOTICS ON ADHESION AND INVASION OF BACTERIA
Campylobacter jejuni IN CHICKEN AND PIG INTESTINAL EPITHELIAL CELL
LINE MODEL**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za mikrobiologijo, molekularno biologijo, biokemijo in biotehnologijo, Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede/Katedre za biokemijo in nutricistiko, Medicinska fakulteta, Univerze v Mariboru.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr Sonjo Smole Možina, za somentorico dr. Avrelijo Cencič in za recenzentko prof. dr. Romano Marinšek Logar.

Mentorica: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA

Somentorica: dr. Avrelija CENCIČ

Recenzentka: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter RASPOR
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Sonja SMOLE MOŽINA
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: dr. Avrelija CENCIČ
 Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede
 Medicinska fakulteta

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Daša Kavka

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.22+579.24:636.4/.5.09:616.98(043)=163.6
KG probiotične bakterije / *Lactobacillus* sp. / učinkovitost probiotičnih bakterij / adhezivnost / invazivnost / *Campylobacter jejuni* / celične kulture / črevesne epitelijske celice / B1OXI / PSI cl.1 / celični inserti
AV KAVKA, Daša
SA SMOLE MOŽINA, Sonja (mentorica) / CENCIČ, Avrelija (somentorica) / MARINŠEK LOGAR, Romana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2011
IN UČINEK PROBIOTIČNIH BAKTERIJ NA ADHEZIVNOST IN INVAZIVNOST BAKTERIJ *Campylobacter jejuni* V CELIČNEM MODELU PIŠČANČJIH IN PRAŠIČJIH ČREVESNIH EPITELIJSKIH CELIC
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 59 str., 24 pregl., 7 sl., 12 pril., 66 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen diplomske naloge je bil preveriti učinek probiotičnih bakterij na adhezivnost in invazivnost bakterije *Campylobacter jejuni* v celičnem modelu piščančjih (B1OXI) in prašičjih (PSI cl.1) črevesnih epitelijskih celic. Z rezultati eksperimentalnega dela diplomske naloge smo prišli do treh sklepov. Glede vezave na in prehajanja bakterij *C. jejuni* oziroma v piščanje (B1OXI) in prašičje (PSI cl.1) črevesne epitelijske celice skozi smo dokazali, da se bakterije *C. jejuni* vežejo na obe preučevani vrsti črevesnih celic vežejo in vanje tudi uspešno prehajajo. Opazovali smo vpliv sočasne inkubacije živih probiotičnih bakterij rodu *Lactobacillus* sp. (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG) z bakterijami *C. jejuni* na zmanjšanje ali preprečevanje adhezije in/ali invazije, v piščanje črevesne epitelijske celice (B1OXI) in prašičje črevesne epitelijske celice (PSI cl.1). Zanimalo nas je torej, ali lahko s probiotičnimi bakterijami zaščitimo piščanje in prašičje črevesne epitelijske celice pred bakterijami *C. jejuni*. Ugotovili smo, da sočasna inkubacija bakterije *C. jejuni* in probiotika PCK 9 učinkovito zmanjša adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* v celičnem modelu piščančjih (B1OXI) črevesnih epitelijskih celic. Pri ostalih opazovanih probiotičnih bakterijah (PCS 20, PCS 22, PCS 25 in LGG) smo opazili le rahlo sposobnost zmanjšanja adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni*, pri obeh celičnih modelih črevesnih epitelijskih celic. Na podlagi dobljenih rezultatov smo naredili primerjavo učinkovitosti probiotikov na piščančjih in prašičjih črevesnih epitelijskih celicah. Ugotovili smo primerljivo učinkovitost probiotikov pri piščančjih (B1OXI) in prašičjih (PSI cl.1) črevesnih epitelijskih celicah. Opazne razlike so bile le pri probiotiku PCK 9, ki je zmanjšal adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* v celičnem modelu piščančjih (B1OXI) črevesnih epitelijskih celic.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.22+579.24:636.4/.5.09:616.98(043)=163.6
CX probiotic bacteria / *Lactobacillus sp.* / effect of probiotic bacteria / adhesion / invasion / *Campylobacter jejuni* / cell line models / intestinal epithelial cells / B1OXI / PSI cl.1 / cell inserts
AU KAVKA, Daša
AA SMOLE MOŽINA, Sonja (supervisor) / CENCIČ, Avrelija (co-advisor) / MARINŠEK LOGAR, Romana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2011
TY EFFECT OF PROBIOTICS ON ADHESION AND INVASION OF BACTERIA *Campylobacter jejuni* IN CHICKEN AND PIG INTESTINAL EPITHELIAL CELL MODEL
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 59 p., 24 tab., 7 fig., 12 ann., 66 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of our research was to see how effective probiotic bacteria are on preventing the adhesion and invasion of bacteria *Campylobacter jejuni* in chicken (B1OXI) and pig (PSI cl.1) intestinal epithelial cell line model. Results of our research gave us three important conclusions. Firstly, we have proved that bacteria *C. jejuni* adhered on chicken (B1OXI) and pig (PSI cl.1) intestinal epithelial cell line model and they also successfully passed through the monolayer of chicken (B1OXI) and pig (PSI cl.1) intestinal epithelial cells. Secondly, we observed the effect of co-incubated live probiotic bacteria from genus *Lactobacillus* (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 and LGG), with bacteria *C. jejuni*, on prevention and reduction of the adhesion or/and invasion in chicken (B1OXI) and pig (PSI cl.1) intestinal epithelial cell line model. We were interested on protective effect of probiotic bacteria on chicken and pig intestinal epithelial cells against bacteria *C. jejuni*. We observed that co-incubation of probiotic bacteria PCK 9 and bacteria *C. jejuni* successfully reduced adhesion and invasion of bacteria *C. jejuni* in chicken (B1OXI) intestinal epithelial cell line model. With other probiotic bacterial strains (PCS 20, PCS 22, PCS 25 and LGG), we could detect small reduction of adhesion and invasion of bacteria *C. jejuni* in chicken (B1OXI) and pig (PSI cl.1) intestinal epithelial cell line model. Finally, we compared both cell line models for bacterial interactions. We concluded that effectiveness of probiotic bacteria was comparable in chicken (B1OXI) and pig (PSI cl.1) intestinal epithelial cell line model. However, the biggest difference was noticed with probiotic bacteria PCK 9, which successfully reduced the adhesion and invasion of bacteria *C. jejuni* in chicken (B1OXI) intestinal epithelial cell line model.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IVV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII

1 UVOD	1
1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA IN KLASIFIKACIJA BAKTERIJE <i>Campylobacter jejuni</i>	3
2.2 FIZIOLOGIJA BAKTERIJE <i>Campylobacter jejuni</i>	4
2.3 EPIDEMIOLOGIJA IN PATOGENEZA BAKTERIJE <i>Campylobacter jejuni</i>	5
2.3.1 Gibljivost in kemotaksa.....	7
2.3.2 Adhezivnost in invazivnost.....	8
2.3.3 Translokacija	10
2.3.4 Toksini	10
2.4 MIKROBNA ČREVESNA ZDRUŽBA PROBIOTIČNIH BAKTERIJ	11
2.5 CELIČNE KULTURE	14
3 MATERIAL IN METODE	15
3.1 POTEK DELA	15
3.2 MATERIAL	16
3.2.1 Mikroorganizmi	16
3.2.2 Celični model.....	16
3.2.3 Mikrobiološka gojišča	17
3.2.4 Laboratorijska oprema in material	19
3.2.5 Raztopine in dodatki	20
3.3 METODE	21
3.3.1 Bakterije <i>C. jejuni</i> K49/4.....	21
3.3.1.1 Barvanje po Gramu.....	21
3.3.1.2 Ugotavljanje koncentracije bakterij <i>C. jejuni</i> in nanos na celično kulturo	21

3.3.1.3 Ugotavljanje koncentracije bakterij <i>C. jejuni</i> K49/4 s štetjem kolonijskih enot na trdnem gojišču Karmali	22
3.3.2 Probiotiki.....	23
3.3.2.1 Revitalizacija in gojenje	23
3.3.2.2 Ugotavljanje koncentracije probiotičnih bakterij in nanos na celično kulturo.	23
3.3.3 Celične kulture.....	24
3.3.3.1 Gojenje in tripsinizacija celične kulture	25
3.3.3.2 Ugotavljanje koncentracije celic s hemocitometrom	25
3.3.3.3 Nanos celične kulture na inserte.....	26
3.3.3.4 Merjenje transepiteljske električne rezistence (TER) in transepiteljskega električnega potenciala (TEP)	26
3.3.4 Vpliv probiotičnih bakterij (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG) na adhezivnost in invazivnost bakterij <i>C. jejuni</i>	27
3.3.4.1 Vpliv probiotičnih bakterij na adhezivnost in invazivnost bakterij <i>C. jejuni</i> ...	28
3.3.4.2 Vpliv probiotičnih bakterij na vstopanje bakterij <i>C. jejuni</i> v celice PSI cl.1 in B1OXI.....	28
3.3.5 Določanje toksičnosti.....	28
3.3.6 Statistična analiza podatkov	30
3.3.6.1 Povprečna vrednost	30
3.3.6.2 Standardni odklon	30
4 REZULTATI	31
4.1 TRANSMEMBRANSKA REZISTENCA IN POTENCIAL (TER IN TEP)	31
4.2 TOKSIČNOST BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> , PROBIOTIKOV TER NJIHOVE SOČASNE INKUBACIJE NA MONOSLOJIH B1OXI IN PSI CL.1	34
4.3 KONCENTRACIJA PROBIOTIKOV IN BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> V ODVISNOSTI OD ČASA INKUBACIJE	37
4.3.1 Koncentracija probiotikov v odvisnosti od časa inkubacije	37
4.3.2 Koncentracija bakterij <i>C. jejuni</i> v odvisnosti od časa inkubacije	38
4.4 PREHAJANJE BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> SKOZI MONOSLOJ CELIC B1OXI IN PSI CL. 1, OB HKRATNI INKUBACIJI S PROBIOTIKI, V ODVISNOSTI OD ČASA INKUBACIJE	38
4.5 VEZAVA BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> NA CELICE B1OXI IN PSI CL.1, OB HKRATNI INKUBACIJI S PROBIOTIKI	40
4.6 PREHAJANJE BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> V CELICE B1OXI IN PSI CL.1, OB HKRATNI INKUBACIJI S PROBIOTIKI	42

5 RAZPRAVA	45
5.1 TRANSEPITELIJSKA REZISTENCA IN POTENCIAL (TER IN TEP)	45
5.2 TOKSIČNOST BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> , PROBIOTIKOV TER NJIHOVE SOČASNE INKUBACIJE MONOSLOJEV B1OXI IN PSI CL.1	45
5.3 KONCENTRACIJA PROBIOTIKOV IN BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> V ODVISNOSTI OD ČASA INKUBACIJE	46
5.4 PREHAJANJE IN VEZAVA BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> SKOZI/NA MONOSLOJ CELIC B1OXI IN PSI CL. 1, OB HKRATNI INKUBACIJI S PROBIOTIKI, V ODVISNOSTI OD ČASA INKUBACIJE	46
5.5 PREHAJANJE BAKTERIJ <i>C. jejuni</i> V CELICE B1OXI IN PSI CL.1, OB HKRATNI INKUBACIJI S PROBIOTIKI	48
6 SKLEPI	49
6.1 PREDLOGI NADALJNJIH RAZISKAV.....	51
7 VIRI.....	52

ZAHVALA**PRILOGE**

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Prikaz vrste in podvrste znotraj rodu <i>Campylobacter</i> , kje le te najdemo ter kaj povzročajo pri ljudeh in živalih (Humphrey in sod., 2007; 237).....	3
Preglednica 2: Mikroorganizmi, ki se uporablajo kot probiotiki (Gupta in sod., 2009).	13
Preglednica 3: Probiotične bakterije, uporabljene pri eksperimentalni delu.....	16
Preglednica 4: Trdno gojišče Karmali.....	17
Preglednica 5: Tekoče gojišče BHI	17
Preglednica 6: Trdno gojišče MRS.	18
Preglednica 7: Tekoče gojišče MRS.	18
Preglednica 8: Tekoče gojišče DMEM.	19
Preglednica 9: Laboratorijska oprema, uporabljena pri eksperimentalnem delu.	19
Preglednica 10: Raztopine in dodatki, uporabljeni pri eksperimentalnem delu.....	20
Preglednica 11: Nanos bakterij <i>C. jejuni</i> in probiotičnih bakterij (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG) na celične inserte.	27
Preglednica 12: Nanos bakterij <i>C. jejuni</i> in probiotičnih bakterij (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG) na mikrotitrsko ploščico.	29
Preglednica 13: Transepiteljska rezistenca in potencial piščančjih celic B1OXI v odvisnosti od časa inkubacije.....	31
Preglednica 14: Transepiteljska rezistenca in potencial prašičjih celicam PSI cl.1 v odvisnosti od časa inkubacije.....	33
Preglednica 15: Preverjanje toksičnosti <i>C. jejuni</i> in probiotikov za piščančje celice B1OXI. 34	
Preglednica 16: Preverjanje toksičnosti <i>C. jejuni</i> in probiotikov za prašičje celice PSI cl.1... 35	
Preglednica 17: Koncentracija probiotikov v odvisnosti od časa inkubacije za celice B1OXI in PSI cl.1.....	37
Preglednica 18: Koncentracija bakterij <i>C. jejuni</i> v odvisnosti od časa inkubacije za celice B1OXI in PSI cl.1.....	38
Preglednica 19: Prehajanje bakterij <i>C. jejuni</i> skozi monosloj piščančjih celic B1OXI ob hkratni inkubaciji s probiotiki v odvisnosti od časa inkubacije.....	39
Preglednica 20: Prehajanje bakterij <i>C. jejuni</i> skozi monosloj prašičjih celic PSI cl.1 ob hkratni inkubaciji s probiotiki.	40
Preglednica 21: Vezava bakterij <i>C. jejuni</i> na piščančje celice B1OXI ob hkratni inkubaciji s probiotiki.....	41

Preglednica 22: Vezava bakterij <i>C. jejuni</i> na prašičje celice PSI cl.1 ob hkratni inkubaciji s probiotiki.....	42
Preglednica 23: Prehajanje bakterij <i>C. jejuni</i> v piščanče celice B1OXI ob hkratni inkubaciji s probiotiki.....	43
Preglednica 24: Prehajanje bakterij <i>C. jejuni</i> v prašičje celice PSI cl.1 ob hkratni inkubaciji s probiotiki.....	43

KAZALO SLIK

Slika 1: Bakterije <i>C. jejuni</i> med delitvijo (Humphrey in sod., 2007).	4
Slika 2: Najpogostešji načini okužbe s <i>C. jejuni</i> pri ljudeh (Dasti in sod., 2009).....	6
Slika 3: Predlagani mehanizmi adhezije in invazije bakterij <i>C. jejuni</i> v gostiteljsko celico (Ketley, 1997).	9
Slika 4: Celični insert, kjer črka A prikazuje apikalni del in črka B bazolateralni del celice (Langerholc in sod., 2011).	14
Slika 5: Shema poteka eksperimentalnega dela.	15
Slika 6: Celični model piščančjih celic B1OXI, pod invertnim mikroskopom pri 100-kratni povečavi.	16
Slika 7: Celični model prašičjih celic PSI cl.1, pod invertnim mikroskopom pri 100-kratni povečavi.	17

KAZALO PRILOG

Priloga A1: Transepiteljska rezistenca piščančjih celic B1OXI v odvisnosti od časa inkubacije.

Priloga A2: Transepiteljski potencial piščančjih celic B1OXI v odvisnosti od časa inkubacije.

Priloga A3: Transepiteljska rezistenca prašičjih celic PSI cl.1 v odvisnosti od časa inkubacije.

Priloga A4: Transepiteljski potencial prašičjih celic PSI cl.1 v odvisnosti od časa inkubacije.

Priloga B1: Preverjanje toksičnosti *C. jejuni* in probiotikov za piščančje celice B1OXI z merjenjem absorbance po različnih časih inkubacije.

Priloga B2: Preverjanje toksičnosti *C. jejuni* in probiotikov za prašičje celice PSI cl.1 z merjenjem absorbance po različnih časih inkubacije.

Priloga C1: Prehajanje bakterij *C. jejuni* skozi piščančje celice B1OXI ob hkratni inkubaciji s probiotiki.

Priloga C2: Prehajanje bakterij *C. jejuni* skozi prašičje celice PSI cl.1 ob hkratni inkubaciji s probiotiki.

Priloga D1: Vezava bakterij *C. jejuni* na piščančje celice B1OXI ob hkratni inkubaciji s probiotiki.

Priloga D2: Vezava bakterij *C. jejuni* na prašičje celice PSI cl.1 ob hkratni inkubaciji s probiotiki.

Priloga E1: Prehajanje bakterij *C. jejuni* v piščančje celice B1OXI ob hkratni inkubaciji s probiotiki v odvisnosti od časa inkubacije.

Priloga E2: Prehajanje bakterij *C. jejuni* v prašičje celice PSI cl.1 ob hkratni inkubaciji s probiotiki v odvisnosti od časa inkubacije.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca [nm]
B1OXI	celična kultura črevesnih epitelijskih celic, izoliranih iz tankega črevesa piščancev
BHI	tekoče gojišče iz ekstraktov telečjih možganov in govejega srca (angl. Brain Heart Infusion)
<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter coli</i>
CDT	citotoksični toksin (angl. Cytolethal Distending Toxin)
<i>C. fetus</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
CFU	število kolonijskih enot (angl. Colony Forming Unit)
<i>Cia</i>	angl. <i>Campylobacter</i> invasion proteins
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
DMEM	tekoče gojišče za gojenje celičnih kultur (angl. Dulbecco's modified Eagle's medium)
FBS	serum govejega zarodka
IgA	imunoglobulin razreda A
MRS	tekoče in trdno gojišče za namnoževanje mlečnokislinskih bakterij (angl. de Man, Rogosa in Sharpe)
LGG	sev bakterije <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (komercialno dostopen)
OD	optična gostota (angl. Optical Density) [nm]
PBS	fosfatni pufer (angl. Phosphate Buffered Saline)
PCK 9	sev bakterije iz rodu <i>Lactobacillus sp.</i>
PSC 20	sev bakterije <i>Lactobacillus plantarum</i> , izoliran iz sira
PSC 22	sev bakterije <i>Lactobacillus plantarum</i> , izoliran iz sira
PSC 25	sev bakterije <i>Lactobacillus plantarum</i> , izoliran iz sira
PSI cl.1	celična kultura črevesnih epitelijskih celic, izoliranih iz tankega črevesa prašičev
RPM	obrati na minuto (angl. rounds per minute)
SD	standardni odklon
TEP	transepiteljski električni potencial [mV]
TER	transepiteljska električna rezistenca [Ω]

1 UVOD

Campylobacter jejuni je po Gramu negativna bakterija, ki ima obliko črke S, in so jo odkrili že leta 1886 (Snelling in sod., 2005). Je glavni bakterijski vzrok za gastrointestinalne bolezni, ki so odraz okužb s hrano in vodo. Epidemiološke študije so pokazale, da so glavni rezervoar *C. jejuni* ptice, natančneje perutnina (Byrne in sod., 2007). Infekcijska doza je med 500 in 10000 bakterijami *C. jejuni*, inkubacijska doba pa med 1-7 dni. Rezultat je razvoj kampilobakterioze pri ljudeh, gastrointestinalne bolezni, ki lahko traja do 7 dni. Kampilobaktri se za razliko od bakterij rodu *Salmonella* niso sposobni razmnoževati v hrani, zato do velikih izbruhov kampilobakterioze ne prihaja. So pa infekcije s kampilobaktri povezane s postinfekcijskimi komplikacijami, ki vključujejo artritis, Reiterjev sindrom in Guillain-Barrejev sindrom (Snelling in sod., 2005).

Razumevanje odnosa med patogenom in komenzalom v prebavilih je ključno, saj lahko pripomore k boljšemu razumevanju tega, kako kampilobaktri kolonizirajo gostitelja in povzročajo enterične bolezni (Byrne in sod., 2007). Adhezivnost in invazivnost sta odvisni tako od gibljivosti, kot tudi od same ekspresije bička. Vendar pa natančnega mehanizma s katerim *C. jejuni* inducira bolezen, ne poznamo. Simptomi bi lahko bili rezultat toksina CDT in vnetnega odgovora (Snelling in sod., 2005).

Odpornost na protimikrobnia zdravila lahko podaljša bolezen in oteži zdravljenje pacientov z bakteriemijo. Veliko študij je pokazalo, da narašča število protimikrobnih snovi, na katere so kampilobaktri odporni. Razlog je predvsem v neodgovorni in slabo nadzorovani uporabi protimikrobnih sredstev pri ljudeh in živalih (Snelling in sod., 2005).

V mnogih študijah se je izkazalo tudi, da imajo mikrobeni probiotiki veliko dobrih učinkov, ko jih uporabijo v živalski krmi. Vplivajo predvsem na izboljšavo prebave in absorpcije nutrientov, prav tako pa tekmujejo s patogeni za vezavna mesta (Netherwood in sod., 1999).

Odkritje novih snovi in mehanizmov zaščite pred kampilobaktri, ki bi bile uporabljene odgovorno in učinkovito v smeri zmanjševanja bolezni, bi tako zmanjšalo tudi ekonomsko izgubo, ki nastaja kot posledica izgube delovnih ur in dragih kliničnih testov (Snelling in sod., 2005).

1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE

Bakterijski sev *C. jejuni* K49/4, ki smo ga uporabili v eksperimentalnem delu te naloge, je sposoben adhezije in invazije na/v celični kulturi Caco-2 in makrofagih J477 (Mihaljević in sod., 2007; Šikić Pogačar in sod., 2009), zato smo z diplomsko nalogo želeli ugotoviti:

- v kolikšni meri se *C. jejuni* K49/4 veže na celični model piščančjih črevesnih epitelijskih celic (B1OXI) in prašičjih črevesnih epitelijskih celic (PSI cl.1) in ali v njih prehaja;
- ali lahko piščanče (B1OXI) in prašičje (PSIcl.1) črevesne epitelijske celice zaščitimo pred bakterijo *C. jejuni* K49/4 s sočasno inkubacijo živih probiotičnih bakterij rodu *Lactobacillus* oziroma zmanjšamo ali preprečimo adhezijo in/ali invazijo v piščanče črevesne epitelijske celice (B1OXI) in prašičje črevesne epitelijske celice (PSI cl.1);
- ali je učinkovitost probiotikov na piščančjih in prašičjih črevesnih epitelijskih celicah primerljiva.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Bakterije *C. jejuni* se vežejo na piščanče in prašičje epitelijske celice in vanje uspešno prehajajo.
- Sočasna inkubacija bakterije *C. jejuni* in probiotikov (bakterij rodu *Lactobacillus*) zmanjša adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* v celičnem modelu piščančjih in prašičjih črevesnih epitelijskih celic.
- Učinkovitost probiotikov (bakterij iz rodu *Lactobacillus*) je primerljiva pri piščančjih in prašičjih črevesnih epitelijskih celicah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA IN KLASIFIKACIJA BAKTERIJE *Campylobacter jejuni*

Že leta 1886 je Theodor Escherich opazoval mikroorganizme, podobne kampilobaktrom v vzorcih blata otrok z diarejo. McFaydean in Stockman sta leta 1913 identificirala kampilobakte kot vibrijem sorodne, na podlagi posmrtnih ostankov tkiva splavljeni ovce (Altekrose in sod., 1999). Po vsej verjetnosti je šlo za kampilobakte, ki so danes poznani pod imenom *Campylobacter fetus*, in povzročajo infekcije reproduktivnih organov in splav pri živalih (Ketley, 1997).

Družino Campylobacteriaceae, ki spada v deblo proteobakterij, sestavljajo rodovi *Arcobacter*, *Sulfurospirillum*, *Thiovulum* in *Campylobacter* (Snelling in sod., 2005).

Preglednica 1: Prikaz vrste in podvrste znotraj rodu *Campylobacter*, kje le te najdemo ter kaj povzročajo pri ljudeh in živalih (Humphrey in sod., 2007; 237).

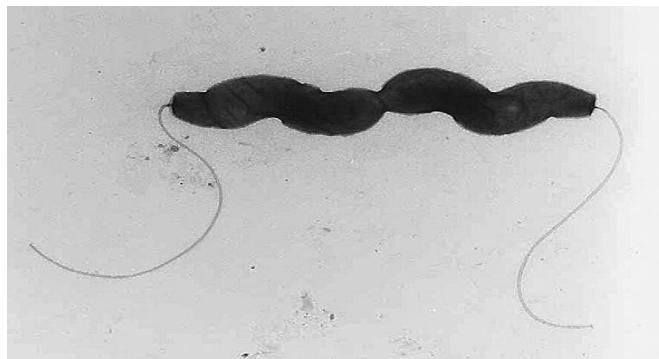
Vrste in podvrste rodu <i>Campylobacter</i>	Znani viri	Bolezen	
		Ljudje	Živali
<i>C. coli</i>	Prašiči, perutnina, govedo, ovce in ptice	Gastroenteritis, septikemija	Gastroenteritis
<i>C. concisus</i>	Človek	Gastroenteritis, parodontalna bolezen	Trenutno ni znano
<i>C. curvus</i>	Človek	Gastroenteritis, parodontalna bolezen	Trenutno ni znano
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	Govedo, ovce	Gastroenteritis, septikemija, splav, meningitis	Splav pri govedu in ovcah
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	Govedo	Septikemija	Neplodnost
<i>C. gracialis</i>	Človek	Parodontalna bolezen, abscesi	Trenutno ni znano
<i>C. helveticus</i>	Mačke, psi	Trenutno ni znano	Gastroenteritis
<i>C. hyoilei</i>	Prašiči, govedo, hrčki in svinjad	Gastroenteritis	Prašičji in goveji enteritis
<i>C. hyoilei</i>	Prašiči	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	Človek	Trenutno ni znano	Prašičji enteritis
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	Perutnina, prašiči, govedo, ovce, psi, mačke, voda, ptice, insekti, zajci	Gastroenteritis, septikemija, gastritis, meningitis, splav, Guillain-Barre sindrom	Trenutno ni znano
<i>C. lari</i>	Perutnina in ptice, voda, psi, opice, konji	Gastroenteritis, septikemija	Ptičji gastroenteritis
<i>C. mucosalis</i>	Prašiči	Trenutno ni znano	Prašičji enteritis
<i>C. rectus</i>	Človek	parodontalna bolezen	Trenutno ni znano
<i>C. showae</i>	Človek	parodontalna bolezen	Trenutno ni znano
<i>C. sputorum</i> bv. <i>Sputorum</i>	Človek, govedo, prašiči	Gastroenteritis, abscesi	Trenutno ni znano
<i>C. sputorum</i> bv. <i>Faecalis</i>	Ovce, biki	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano
<i>C. upsaliensis</i>	Psi, mačke	Gastroenteritis, septikemija, abscesi	Gastroenteritis
<i>C. insulaenigrae</i>	Tjulni	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano
<i>C. lanienae</i>	Govedo, prašiči in človek	Trenutno ni znano	Trenutno ni znano

Klinični mikrobiologi iz Belgije so leta 1972 prvi izolirali kampilobakte iz vzorcev blata bolnikov z diarejo. Z razvojem selektivnih medijev, ki so omogočili lažjo in boljšo izolacijo kampilobaktrov, so se ti tako uveljavili kot pogosti humani patogeni. Danes so kampilobaktri vodilni povzročitelji gastrointestinalnih bolezni (Altekruše in sod., 1999).

2.2 FIZIOLOGIJA BAKTERIJE *Campylobacter jejuni*

Bakterije *C. jejuni* so po Gramu negativne, ne tvorijo spor in so nesaharolitične. Katalazni in oksidazni test sta pozitivna, prav tako hidrolizirajo hipurat (Snelling in sod., 2005). So gibljive, na enem ali obeh koncih se nahaja polarni biček. Ta veliko pripomore k zelo dobrni gibljivosti bakterije (Ketley, 1997).

Bakterije *C. jejuni* so pri normalnih pogojih spiralne oblike. Značilna je oblika črke S (Snelling in sod., 2005). Opazili so, da so celice bakterij *C. jejuni* lahko tudi kokoidne oblike. Kljub temu, da imajo biček, so kokoidne celice negibljive. Z opazovanjem preobrazbe celic pod elektronskim mikroskopom so opazili, da pride do izgube integritete celične stene kokoidnih celic (Boucher in sod., 1994).



Slika 1: Bakterije *C. jejuni* med delitvijo (Humphrey in sod., 2007).

Kampilobaktri preidejo v kokoidno obliko, ko so v stacionarni fazi ali pod stresom (Ketley, 1997). Dobro se odzivajo na stres v okolju, saj dlje preživijo pri nižjih koncentracijah kisika, pri nižjih temperaturah ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) ter pri višjih koncentracijah kisika (Alter in sod., 2006).

Od drugih patogenov, ki povzročajo okužbe preko živil, se *C. jejuni* razlikuje po tem, da je mikraerofil. Najbolje raste v atmosferi, ki vsebuje približno 10 % CO_2 in 5 % O_2 (Humphrey in sod., 2007). Gre za termofilen mikroorganizem, ki najbolje raste pri temperaturi $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, ne raste pa pri temperaturah, nižjih od $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ketley, 1997).

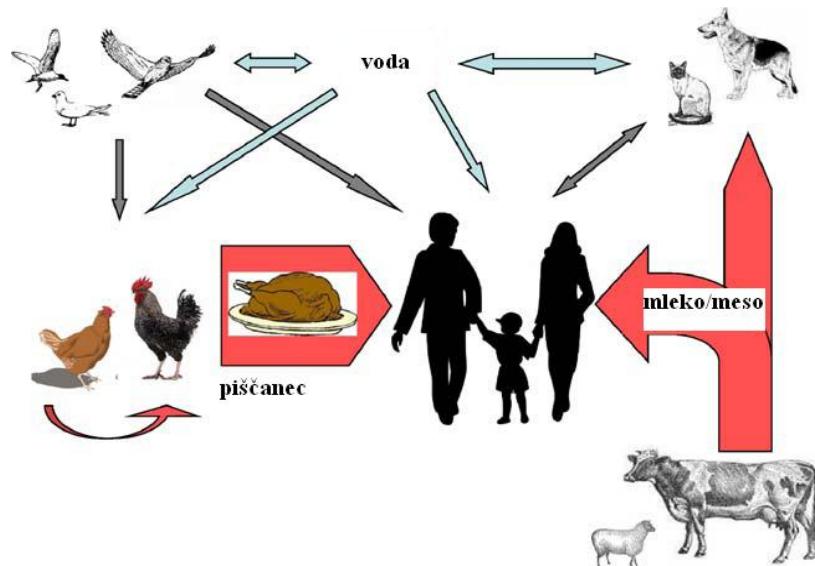
V okolju najdemo *C. jejuni* pri divjih ptičih in sesalcih. Najpogosteje kolonizira črevesje piščancev, manj pogosto črevesje puranov in rac. Pri perutnini mu zelo ustreza mikraerofilni pogoj in temperatura okoli 41 °C v črevesju, saj omogočata kontinuirano razmnoževanje (Dasti in sod., 2010).

Genom bakterije *C. jejuni* je relativno majhen, velik je med 1,6-1,7 Mbp. Bogat je z adeninom in timinom, razmerje med citozinom in gvaninom pa se lahko spreminja med 29-47 %. Majhen genom je verjetno posledica zahtevnih pogojev za rast, prav tako ne oksidirajo in ne razgrajujejo ogljikovih hidratov, ni lipazne in lecitinazne aktivnosti. Ne raste pri pH nižjem od 4,9 (Snelling in sod., 2005). Pri *C. jejuni* so opazili tako konjugativne plazmide, kot tudi bakteriofage (Ketley, 1997).

2.3 EPIDEMIOLOGIJA IN PATOGENEZA BAKTERIJE *Campylobacter jejuni*

Več kot 90 % vseh okužb s kampilobaktri povzročata *C. jejuni* in *C. fetus*. V zadnjih petih letih je *Campylobacter* spp. postal glavni bakterijski povzročitelj gastrointestinalnih okužb v večini držav Evropske unije in ZDA. Podoben trend so prvič opazili v letu 2009 tudi v Sloveniji. *Campylobacter* je tako v prevalenci v zadnjih letih prekobil salmonelo (EFSA, 2009; IVZ, 2010; CDC, 2010). Kljub temu, da je rod *Campylobacter* odgovoren le za približno 5 % smrti povezanih z okužbo preko živil, je hospitalizacija potrebna kar pri 17 % vseh obolelih. To pomeni milijardno izgubo, saj so stroški hospitalizacije visoki zaradi dragih kliničnih testov. K tej izgubi doprinesejo tudi izgube delovnih ur (Mead in sod., 1999).

Ljudje se s kampilobaktri najpogosteje okužijo s slabo toplotno obdelanim piščančjim mesom, navzkrižno kontaminacijo, z uživanjem kontaminirane pitne vode ali neposredno s stikom z živalmi. Prenos s človeka na človeka je možen, a epidemiološko manj pomemben (Dasti in sod., 2010).



Slika 2: Najpogosteji načini okužbe s *C. jejuni* pri ljudeh (Dasti in sod., 2009).

Bakterija *C. jejuni* naseljuje spodnji del črevesja in navadno ne povzroča simptomov. Infektivna doza znaša med 500 do 10000 kampilobaktri, ki povzročijo kampilobakteriozo (Altekrose, 1998). Ta je v večini simptomatičnih bolezni samo-omejujoča bolezen, ki traja do deset dni (Dasti in sod., 2010). Simptomi pri bolnikih s potrjeno diagnozo okužbe s kampilobaktri so diareja, vročina, trebušni krči, slabost in omotičnost (Altekrose, 1999). Približno polovica bolnikov z laboratorijsko potrjeno okužbo s kampilobaktri ima krvavo diarejo (Blaser in sod., 1983). Okužbe s kampilobaktri lahko privedejo do bakteriemije, septičnega artritisa in drugih simptomov (Altekrose, 1999). Kampilobakteriozo v zadnjem času povezujejo tudi z vnetjem debelega črevesa (Dasti in sod., 2010).

Guillain-Barrejev sindrom in Reiterjev sindrom naj bi bila avtoimunski odziv na okužbo s kampilobaktri. Na vsakih 1000 okužb s kampilobaktri se pojavi en primer z Guillain Barrejevim sindromom (Peterson, 1994).

Kampilobakteriozo, ki ne povzroči zapletov, redko zdravijo z antibiotiki. Pogosta pa so poročila o vedno večji odpornosti kampilobaktrov na klinično pomembne antibiotike, tudi v našem okolju (Smole Možina in sod., 2011a, 2011b).

2.3.1 Gibljivost in kemotaksi

Celična oblika in polarni biček kampilobaktrom omogočata visoko zmožnost gibljivosti, tudi v viskoznih medijih (Konkel in Cieplak, 1992). Biček kampilobaktrov je polaren in sestavljen iz O-glikoziliranega flagelina. Polarni biček ima zelo pomembno vlogo pri približevanju vezavnim mestom intestinalnih celic. Za regulacijo bička je odgovoren dvokomponentni sistem, ki ga sestavlja senzor FlgS in odzivni regulator FlgR. Pri izražanju genov, ki sodelujejo pri gibljivosti, izločanju proteinov in invaziji, sodelujejo še regulatorji *fliA*, *rpoN* in vzdrževalni geni *rpoD* (Hendrixson, 2006). Znani kemoatraktanti so na primer L-serin, L-fukoza, L-cistein, piruvat, sukcinat, fumarat, citrat in malat (Hugdahl in sod., 1988).

Na podlagi genomske sekvence *C. jejuni* NTC11168 so odkrili več kot 40 različnih genov, ki naj bi bili povezani s funkcijo bička (Fernando in sod., 2007). Poleg biosinteze teh 40 strukturnih in regulatornih proteinov je pomemben sekrecijski sistem tipa III. Za izražanje in delovanje večine genov, povezanih z delovanjem bička sta odgovorna sigma dejavnika *fliA* in *rpoN* (Carrillo in sod., 2004).

Morfološki izgled bička temelji na bazalnem telescu, ki mu sledi kljuka in na koncu še filament. Vloga filimenta na koncu kljuke je pod nadzorom gena *flgK* in še ni poznana. So pa ugotovili, da so mutante *flgK* slabo gibljive (Muramoto in sod., 1999). Geni *fliA*, *rpoN* in *flgK* so potencialno dobre tarče pri proizvodnji cepiv in terapevtikov (Fernando in sod. 2007).

Biček omogoča gibanje in sodeluje pri kemotaksi, ki je pomembna za učinkovito kolonizacijo (Hendrixson, 2006). Kampilobaktri imajo mehanizme, ki jim omogočajo zaznavo kemijskega gradiента ter premikanje v smeri le tega (Takata in sod., 1992). Pri genomski sekvenci so odkrili, da so tudi ortologni geni *cheA*, *cheW*, *cheV*, *cheY*, *cheR* in *cheB* odgovorni za kemotakso. Odzivni regulator *cheY* ima glavno vlogo pri rotaciji bička (Hendrixson in DiRita, 2004).

2.3.2 Adhezivnost in invazivnost

Bakterije *C. jejuni* in *C. coli* so sposobne adhezije na tkiva celic brez nadaljne invazije, lahko pa tudi prehajajo v celice (Everest in sod., 1992). Z adhezijo sta povezana dva zunaj membranska proteina, CadF in PEB1. CadF se veže na fibronektin in je eden od pomembnejših vezavnih faktorjev. Gen *cadF* se izraža pri vseh sevih *C. jejuni* in *C. coli*, vendar se med vrstama nekoliko razlikuje. Prav tako je CadF pomemben virulentni dejavnik, saj se mutante *cadF* slabo vežejo na celice. CadF igra dvojno vlogo - sproži adhezijo na gostiteljske celice s specifično vezavo na fibronektin epitelijskih celic, sproži pa tudi signalne procese, ki aktivirajo male GTPaze Rac1 in Cdc24 (Krause-Gruszczynska in sod., 2007). Tudi protein PEB1, ki je kodiran na lokusu *peb1A*, se veže na fibronektin. Opazili so tudi, da omogoči invazijo v HeLa celice (Konkel in sod., 1997).

Invazivnost ima pomembno vlogo pri boleznih, ki jih povzročajo kampilobaktri. Vnetje in bakterimija nakazujeta, da je invazivnost pomembna pri patogenezi. Študija, kjer so kot eksperimentalni model uporabili opice makaki (*Macaca mulatta*), je dokazala, da je bila diarejogena bolezen povezana z invazivnostjo *C. jejuni* (Russell in sod., 1993). Tudi druge študije so pokazale, da je zgodnja poškodba mukoznega sloja rezultat invazije *C. jejuni* v črevesne epitelijske celice. Invazivnost *C. jejuni* je torej pomemben, s patogenostjo povezan dejavnik (Babakhani in sod., 1993).

Sposobnost vstopanja in stopnja zmožnosti vstopa kampilobaktrov v celice je specifična za sev. Bolj invazivni so ponavadi klinični izolati. Vsem invazivnim sevom pa je skupno, da v črevesne epitelijske celice vstopajo z mikrotubuli-odvisnim in z aktinskim filament-nejodvisnim invazivnim mehanizmom (Ketley, 1997).

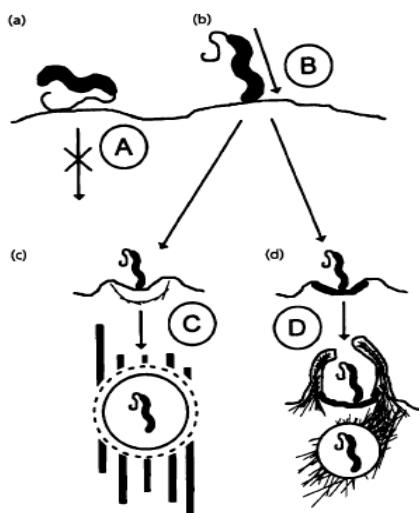
Konkel in Cieplak (1992) sta ugotovila, da se mrtvi kampilobaktri lahko vseeno pritrdijo na gostiteljske celice, *de novo* sinteza proteinov ni potrebna. Pri invaziji pa je bakterijska sinteza proteinov potrebna, sinteza proteinov s strani gostitelja pa ne.

Invazivnost *C. jejuni* je poseben proces, saj *C. jejuni* vstopi v celice s kljuko, ki ji sledi zadnji del z bičkom. Pomembno vlogo pri invazivnosti bi naj imeli naslednji faktorji: polisaharid kaspule (CPS), sialilacija zunaj jedrnih lipooligosaharidov (LOS) ali *Campylobacter* invazivni antigeni (Cia) (Krause-Gruszczynska in sod., 2007).

Bacon in sod. (2002) so odkrili homologijo z izločevalnim aparatom tipa IV, na 37 Kbp velikem plazmidu pVir bakterij *C. jejuni*. Pokazali so namreč, da mutacije nekaterih genov na plazmidu otežujejo invazijo. Z nadaljnimi študijami so odkrili, da prenos plazmida na seve, ki plazmida nimajo, ne poveča invazivnosti, kar nakazuje na dejstvo, da so z invazivnostjo povezani tudi geni na kromosomu (Dasti in sod., 2010).

Natančnega procesa vezave in vstopanja *C. jejuni* v gostiteljsko celico še niso razvoplali, kljub številnim študijam na tem področju. Slika 3 prikazuje, kako naj bi proces potekal. Adhezija s sekundarnim adhezinom na bičku ne stimulira poteka procesa (a). Pritrjevanje s primarnimi adhezini (b) vodita do invazije, ki lahko poteče na dva načina ozziroma na oba načina hkrati:

- z endocitozo preko specifičnih regij v membrani, ki so obdane s ščetinami in sodelujejo pri transportu makromolekul ter v povezavi z mikrotubuli (c);
- interakcije z molekulami, ki so v povezavi s kaveolami, vodijo do transdukcije, sledi endocitoza, ki vključuje aktinske filamente (d) (Ketley, 1997).



Slika 3: Predlagani mehanizmi adhezije in invazije bakterij *C. jejuni* v gostiteljsko celico (Ketley, 1997).

Raziskovanje se tako nadaljuje, saj je pomembno spoznati in razjasniti patogenezo *C. jejuni* z namenom omejevanja in preprečevanja bolezni (Dasti in sod., 2010).

2.3.3 Translokacija

Številne enteropatogene bakterije sprožijo obrambni mehanizem gostitelja z rastjo v ali translokacijo skozi epitelijske celice in zato povzročijo bolezni. Tudi kampilobaktri sposobni translokacije. Prehajanje kampilobaktrov skozi črevesne epitelijske celice je možno s translokacijo ali epitelijsko celično invazijo, ki ji sledi liza celice (Everest in sod., 1992).

Translokacija *C. jejuni* skozi monosloj celic Caco-2 povzroči prekinitev stičišč tesnih stikov v membranah celic (MacCallum in sod., 2005). Translocirane bakterije so opazili pod monoslojem v manj kot 1 uri po inokulaciji nad monoslojem celic (Konkel in sod., 1992).

Prehajanje skozi celični monosloj je mogoče s transcitozo, t.i. translokacijo preko citoplazme. Lahko pa kampilobaktri prehajajo monosloj tudi paracelularno, za kar ni potrebna invazija, vendar tak način ni pogost in ne vpliva na spremembo transmembranske rezistence monosloja (Konkel in sod., 1992).

2.3.4 Toksini

Črevesni enteritis, ki se lahko iz vodene diareje razvije v krvavo, nakazuje na možnost, da pri bolezni sodelujejo bakterijski toksini. Pri kampilobaktrih so skozi različne raziskave opazili več različnih toksičnih aktivnosti, koleri-podoben toksin (CLT) in več citotoksinov. Mehanizem delovanja in vpletenost v bolezen ni dobro poznana (Wassenaar in sod., 1997). Citotoksični toksin (CDT) sestavlja Cdt ABC kompleks. CdtA in CdtC sta pomembna pri vezavi na gostiteljsko celico, CdtB je aktivna molekula kompleksa (Pickett in Whitehouse, 1999). Za citotoksično aktivnost je pomemben vstop CdtB v jedro gostiteljske celice. Povzroči prekinitev celičnega cikla v fazi G2/M tako, da blokira CDC2 kinazo, ki je vpletena v začetek mitoze (Pickett in Whitehouse, 1999). Povzroči smrt celice in skupaj z bakterijsko adhezijo in invazijo vpliva na nastajanje in sproščanje interlevkina-8 (Kopecko, 2001).

2.4 MIKROBNA ČREVESNA ZDRUŽBA PROBIOTIČNIH BAKTERIJ

V zadnjih 50-ih letih se je zelo povečala uporaba antibiotikov pri reji perutnine, predvsem za namen rastnih promotorjev, kot tudi za terapevtske namene ter pri zdravljenju bakterijskih infekcij. Veliko teh antibiotikov se uporablja tudi pri zdravljenju bolezni ljudi. Iz tega razloga se je povečala odpornost mikroorganizmov na določene antibiotike (Donnelly, 1999; Edens, 2003; Smole Možina in sod., 2011a).

Dokazano je bilo tudi, da obstaja povezava med tveganostjo obolenosti za zoonotično boleznijo in uporabo antibiotikov kot rastnih promotorjev (Coldbere-Garapin in sod., 2007). Leta 1999 je Evropska unija prepovedala uporabo določenih antibiotikov kot rastnih promotorjev. Leta 2006 pa so sprejeli zakon, ki prepoveduje uporabo vseh antibiotikov za namene rastnih promotorjev pri reji perutnine. Dovoljena je le uporaba antibiotikov za zdravljenje bakterijskih infekcij, ki pa so lahko predpisani le s strani veterinarja. Kot alternativno možnost so pričeli uporabljati probiotike (Edens, 2003).

Nobelov nagrajenec Eli Metchnikoff je leta 1908 opazoval vpliv fermentiranih mlečnih izdelkov na življenjsko dobo kmetov iz Bolgarije ter razvil koncept probiotikov (Metchnikoff, 1908). Prvič sta besedo probiotik, ki sicer izvira iz grške besede in pomeni »za življenje«, uporabila Lilly in Stillwell, leta 1965. Besedo probiotik sta uporabila za opis snovi, ki jih izločajo organizmi in stimulirajo rast drugih organizmov (Lilly in Stillwell, 1965).

Probiotiki so definirani kot mono ali multikultura živih mikroorganizmov, ki ob zaužitju v zadostnih količinah pripomorejo k izboljšanju črevesne mikroflore gostitelja (Havenaar in Huis in't Veld, 1992). Probiotiki pripomorejo tudi k izboljšanju imunskega sistema, ki lahko tako lažje in učinkoviteje zaznava in odstranjuje škodljive patogene iz prebavnega trakta. Stabilizirajo črevesno sluznico, zato jo patogeni težje kolonizirajo ali prehajajo skoznjo (Edens, 2003; Coldbere-Garapin in sod., 2007; Gupta in Garg, 2009).

Večina teh bakterij je obligatnih anaerobov in so gram pozitivni ter spadajo med mlečno kislinske bakterije. So tolerantne na kisline in fermentativne, glavni produkt je mlečna kislina. Glede na metabolizem ogljikovih hidratov jih lahko razdelimo na dve skupini. Homofermentativno skupino sestavljajo rodovi *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*,

Streptococcus in nekateri laktobacili, ki lahko uporabijo Embden-Meyerhof-Parnasovo pot za pretvorbo vira ogljika v mlečno kislino. Heterofermentativna skupina proizvaja laktat, CO₂, etanol ali acetat iz glukoze po ketolazni poti. Sem spadajo rodovi *Leuconostoc*, *Weissella* ter nekateri laktobacili (Holzapfel in sod., 1998). Simbioza z gostiteljem tvori še vsaj 10¹⁴ mikroorganizmov črevesne mikrobiote, ki je pri posameznikih stabilna, vendar so med ljudmi razlike v starosti, prehrani, rasi itd. (Colbere-Garapin in sod., 2007; Maragkoudakis in sod., 2010).

Črevesne epitelijske celice prebavnega trakta predstavljajo primarno oviro, ki ločuje organizem od zunanjega okolja. Tolerirajo in sodelujejo z biofilmom komenzalnih bakterij, ki jih na podlagi molekularnih vzorcev prepozna kot »svoje«. Rod *Lactobacillus* je na primer del normalne črevesne mikroflore tudi pri piščancih ter ostalih živalih od prvega dne njihovega življenja (Colbere-Garapin in sod., 2007).

Sluznica prebavnega trakta je osnovna ločnica ali pa povezava med zunanjim okoljem in imunskim sistemom organizma. Probiotične bakterije stimulirajo imunske celice, da prično izločati imunske signale. IgA igra pomembno vlogo pri odpornosti sluznice, saj prispeva k zaščiti proti patogenim bakterijam in virusom (Gupta in Garg, 2009). Ugotovili so, da probiotiki povečajo koncentracijo IgA ter celic, ki izločajo imunoglobuline v črevesju, pospešujejo lokalno sproščanje interferonov in olajšajo transport antigenov (Reid in sod., 2003). Izločajo se tudi citokini, ki regulirajo imunski odziv in vzdržujejo črevesno homeostazo. Mehanizem, s katerim probiotiki modulirajo imunski odziv in protivnetne ukrepe, še ni natančno raziskan (Gupta in Garg, 2009; Maragkoudakis in sod., 2010).

Kriteriji, ki opredeljujejo idealen mikroorganizem kot probiotik (Harmsen in sod., 2000):

- visoka celična viabilnost in odpornost na kisline ter nizke vrednosti pH;
- zadržanje v črevesju, kljub nesposobnosti kolonizacije črevesja;
- adhezija na epitelij črevesja;
- stimulacija imunskega celic, povezanih s črevesjem;
- humani izvor;
- nepatogenost;
- čim boljša odpornost na pogoje v in izven črevesja;
- sposobnost vplivanja na lokalno metabolno aktivnost celic.

Preglednica 2: Mikroorganizmi, ki se uporabljajo kot probiotiki (Gupta in sod., 2009).

Mikroorganizmi, ki se uporabljajo kot probiotiki				
<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Saccharomyces</i>	Ostali
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>S. boulardii</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. casei (rhamnosus)</i>	<i>B. breve</i>	<i>S. salivarius subsp. <i>thermophilus</i></i>		<i>Escherichia coli</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. lactis</i>			<i>Enterococcus</i> sp.
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>			<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. infantis</i>			
<i>L. lactis</i>	<i>B. adolescentis</i>			
<i>L. paracasei</i>				
<i>L. plantarum</i>				
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. salivarius</i>				
<i>L. bulgaricus</i>				

Komercialne kulture, uporabljene v fermentiranih izdelkih, vključujejo predvsem seve probiotičnih bakterij iz rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) je bil prvi probiotik, s katerim so izvajali klinične študije. Probiotične bakterije rodu *Lactobacillus* so uporabljene v industriji fermentiranih mlečnih izdelkov. Proizvajajo številne metabolite, kot na primer proste maščobne kisline, vodikov peroksid in bakteriocine, ki preprečujejo rast patogenov v mlečnih izdelkih (Holzapfel in sod., 1998; Fooks in Gibson, 2002).

Uporaba probiotikov se je izkazala za učinkovito pri lajšanju zdravljenja različnih kliničnih boleznih, kot so na primer nekrotični enterokolitis, diareja kot posledica antibiotičnega zdravljenja, kolitis, ki ga povzroča *Clostridium difficile*, okužba s *Helicobacter pylori*, urogenitalna vnetja pri ženskah ter vnetja želodca, ki so posledica raka (Reid in sod, 2003).

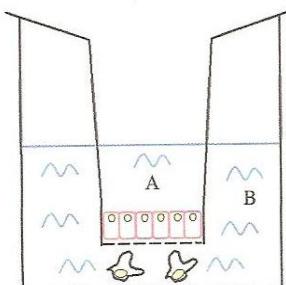
Študije so pokazale, da imajo probiotiki tudi ugoden vpliv pri uporabi v živalski krmi. Izboljšajo prebavo in absorpcijo hrani in tekmujejo za vezavna mesta s patogeni, ki jim na ta način preprečujejo vstop v črevesne epitelijske celice (Haschke in sod., 1998). Netherwood in sodelavci (1999) so v raziskavi ugotovili, da je za doseganje ugodnega vpliva potrebno probiotike v krmo dodajati postopno. Opazili so zmanjšanje števila patogenov pri piščancih, ki so jim dodajali probiotike v krmo (Vasiljevic in Shah, 2008; Gupta in Garg, 2009).

2.5 CELIČNE KULTURE

Študij mehanizma patogeneze bakterij rodu *Campylobacter* je zapleten predvsem zaradi pomanjkanja preprostega živalskega modela, s katerim bi lahko prikazali potek razvoja bolezni pri ljudeh. Dobra in uporabna alternativa, s katerimi lahko preučujemo interakcije med bakterijo in gostiteljsko epitelijsko celico, so celične kulture (Friis in sod., 2005; Langerholc in sod., 2011). Najprimernejše celične linije za študij invazije kampilobaktrov so humane črevesne epitelijske celice, vendar se najbolj uporablajo celice HEp-2, Int 407, HeLa in Caco-2. Dobro je, če celične linije niso rakavega izvora, da imamo realnejši *in vitro* model za preučevanje mehanizmov odnosa med patogenom in gostiteljem (Friis in sod., 2005; de Melo in sod., 1989; Everest in sod., 1992; Langerholc in sod., 2011).

Konfluentnost monosloja je pomemben dejavnik, ki vpliva na invazijo in adhezijo bakterije. Dokazali so, da se invazivnost bakterij poveča pri semi-konfluentnem monosloju, ker je površina celic večja in dostop do bazolateralnega dela celice lažji. Pri tem je potrebno upoštevati, da je tvorba monosloja pri različnih celičnih kulturah različna (Friis in sod., 2005).

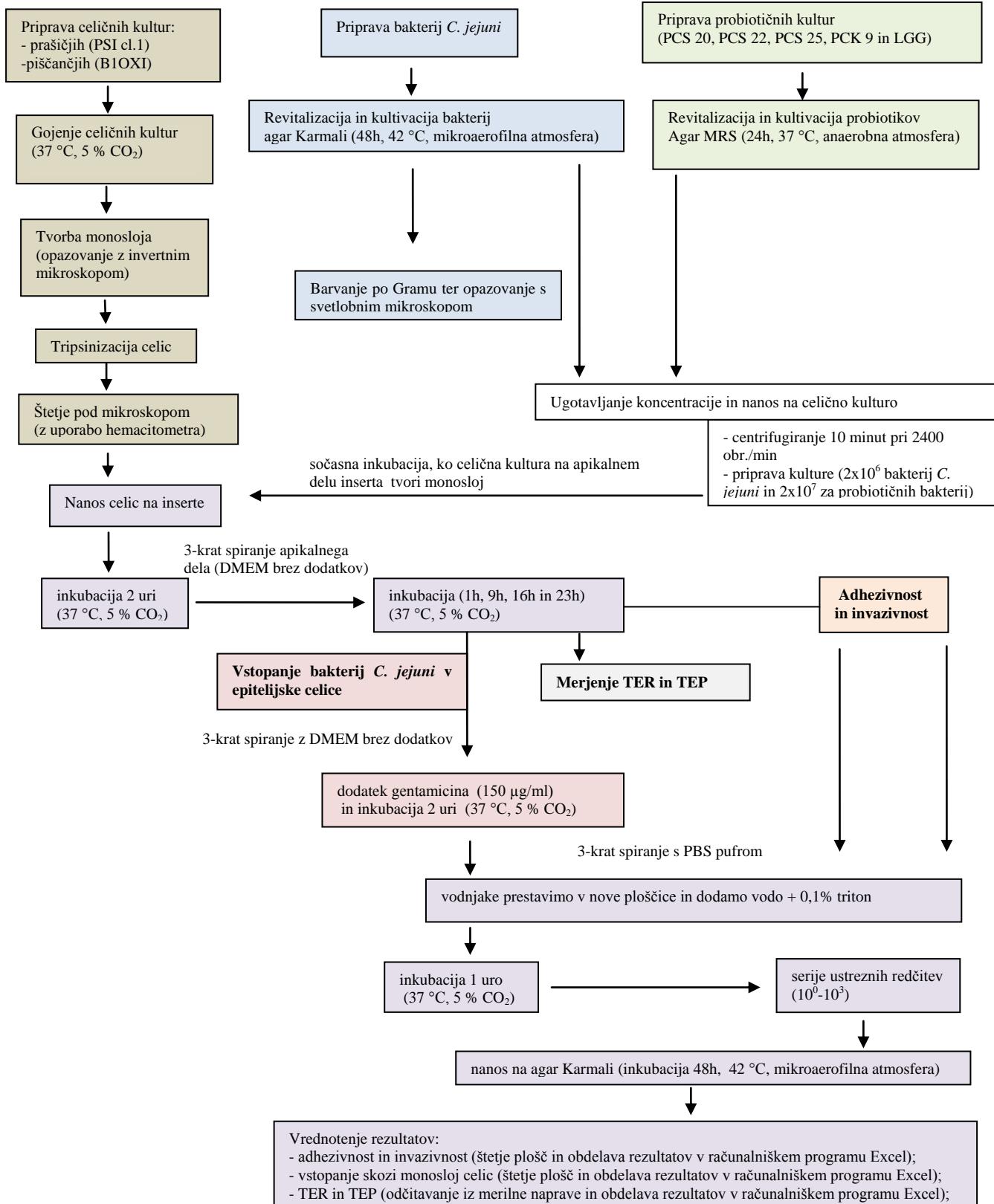
Tesni stiki med gostiteljskimi celicami ovirajo prehajanje tekočine in ločijo apikalni del od bazolateralnega. Apikalni in bazolateralni del sta si biokemijsko različna, glede na funkcije transporta in lokacije receptorskih komponent na celični površini. Pri tako polariziranih epitelijskih celicah lahko merimo transepitelijsko električno rezistenco (TER) in transepitelijski električni potencial (TEP) med bazolateralnim in apikalnim delom membrane. Merjenje transepitelijske rezistence polariziranih epitelijskih celic tako služi kot indikator integritete celičnega monosloja ter translokacije *C. jejuni* skozi monosloj polariziranih črevesnih epitelijskih celic (Klingberg in sod., 2005; Šikić Pogačar in sod., 2010; Langerholc in sod., 2011).



Slika 4: Celični insert, kjer črka A prikazuje apikalni del in črka B bazolateralni del celice (Langerholc in sod., 2011).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POTEK DELA



Slika 5: Shema poteka eksperimentalnega dela.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mikroorganizmi

Pri poskusu smo uporabili sev bakterije *Campylobacter jejuni* K49/4, ki je bil izoliran iz perutnine v Laboratoriju za živilsko mikrobiologijo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Biotehniške fakultete, Univerza v Ljubljani (Zorman in sod., 2006).

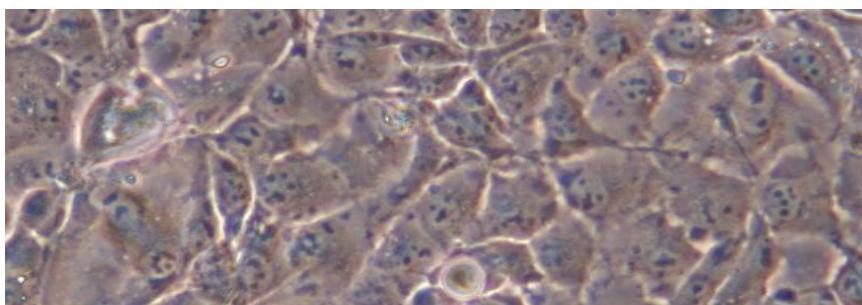
Probiotične bakterije, uporabljeni pri poskusu, so last laboratorijske Katedre za mikrobiologijo, biokemijo, molekularno biologijo in biotehnologijo, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerza v Mariboru/Katedra za biokemijo in nutricistiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru.

Preglednica 3: Probiotične bakterije, uporabljeni pri eksperimentalni delu.

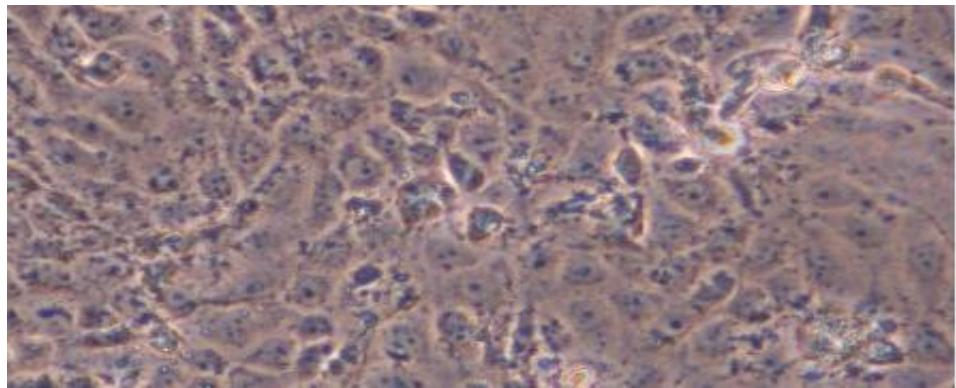
Sev probiotičnih bakterij	Izvor	Oznaka
<i>Lactobacillus plantarum</i>	sir	PCS 20
<i>Lactobacillus plantarum</i>	sir	PCS 22
<i>Lactobacillus plantarum</i>	sir	PCS 25
rod <i>Lactobacillus</i> sp.		PCK 9
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		LGG

3.2.2 Celični model

Uporabljena celična modela B1OXI in PSI cl.1 sta bila izolirana v laboratoriju Katedre za mikrobiologijo, biokemijo, molekularno biologijo in biotehnologijo, Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru. Celični model B1OXI je bil pridobljen iz epitelijskih celic tankega črevesja piščancev. Celični model PSI cl.1 pa je bil pridobljen iz epitelijskih celic tankega črevesja prašičev.



Slika 6: Celični model piščančjih celic B1OXI, pod invertnim mikroskopom pri 100-kratni povečavi.



Slika 7: Celični model prašičjih celic PSI cl.1, pod invertnim mikroskopom pri 100-kratni povečavi.

3.2.3 Mikrobiološka gojišča

Preglednica 4: Trdno gojišče Karmali.

Sestavine	21,5 g osnovnega gojišča 500 ml destilirane H ₂ O
Sestava osnovnega medija Karmali (17152; Fluka BioChemika)	agar (12 g/l) oglje (4 g/l) koruzni škrob (1 g/l) pepton (23 g/l) NaCl (5 g/l)
Priprava	21,5 g osnovnega gojišča MRS smo raztopili v 500 ml dH ₂ O in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 15 minut pri tlaku 1,1 bar). Ohlajenega smo razlili v petrijevke in do uporabe hranili v hladilniku (4 °C).

Preglednica 5: Tekoče gojišče BHI.

Sestavine	37,0 g osnovnega gojišča 1000 ml destilirane H ₂ O
Sestava osnovnega medija BHI (CM0375; Oxoid)	Ekstrakt telečjih možganov (12,5 g/l) Ekstrakt govejega srca (5 g/l) Proteazni pepton (10 g/l) Glukoza (2 g/l) NaCl (5 g/l) Na ₂ PO ₄ (2,5 g/l)
Priprava	37 g osnovnega gojišča BHI smo raztopili v 1000 ml dH ₂ O in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 15 minut pri tlaku 1,1 bar). Ohlajenega smo do uporabe hranili v hladilniku (4 °C).

Preglednica 6: Trdno gojišče MRS.

Sestavine	61,0 g osnovnega gojišča 1000 ml destilirane H ₂ O
Sestava osnovnega medija MRS (69964; Fluka BioChemika)	agar (12 g/l) diamonijev hidrogen citrat (2 g/l) dikalijev hidrogen fosfat (2 g/l) D(+)-glukoza (20 g/l) MgSO ₄ (0.1 g/l) MnSO ₄ (0.05 g/l) mesni ekstrakt (5 g/l) natrijev acetat (5 g/l) pepton (10 g/l) kvasni ekstrakt (5 g/l)
Priprava	61,0 g osnovnega gojišča MRS smo raztopili v 1000 ml dH ₂ O in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 15 minut pri tlaku 1,1 bar). Ohlajenega smo razlili v petrijevke in do uporabe hranili v hladilniku (4 °C).

Preglednica 7: Tekoče gojišče MRS.

Sestavine	51,0 g osnovnega gojišča MRS 1000 ml destilirane H ₂ O
Sestava osnovnega medija MRS (69966; Fluka BioChemika)	K ₂ HPO ₄ (2 g/l) Glukoza (20 g/l) MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.2 g/l) MnSO ₄ ·4H ₂ O (0.05 g/l) mesni ekstrakt (8 g/l) pepton (10 g/l) C ₂ H ₃ NaO ₂ ·3(H ₂ O) (5 g/l) triamonijev citrat (2 g/l) kvasni ekstrakt (4 g/l)
Priprava	51 g osnovnega gojišča MRS smo raztopili v 1000 ml dH ₂ O in sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 15 minut pri tlaku 1,1 bar). Ohlajenega smo do uporabe hranili v hladilniku (4 °C).

Preglednica 8: Tekoče gojišče DMEM.

Sestavine	
Sestava osnovnega medija DMEM Adv. (12491-015; Gibco)	D-glukoza (4,5 g/l) Natrijev piruvat (0,11 g/L) Dodane neesencialne aminokisline, vitamini in pH indikator
Priprava	Osnovnemu gojišču dodamo 1 mM glutamin, penicilin in streptomycin ter tako dobimo kompletni medij DMEM Adv.

3.2.4 Laboratorijska oprema in material

Preglednica 9: Laboratorijska oprema, uporabljena pri eksperimentalnem delu.

Aparatura	Proizvajalec
Avtoklav	Kambič, Slovenija Sutjeska, Beograd
Avtomatska pipeta	Finnpipete, Thermo scientific
Centrifuga Centric 3000	Tehtnica
CO ₂ inkubator	Binder GmbH
Digitalni fotoaparat	Coolpix 995, Nikon
Hematocitometer	Malassez, Assistant
Hladilnik	Gorenje
Inkubator	Binder
Invertni mikroskop	Nikon
Laboratorijska tehtnica	Sartorius AG, Gotheningen
Laminarij M12	Iskra PIO
Multikanalna pipeta	Thermo
Naprava za merjenje TER in TEP (53845-02B)	Millipore, USA
Plinski gorilnik	
Spektrofotometer	Labysystems 391, Multiscan MS
Vodna kopel WB-30	Kambič
Vrtično mešalo	Tehtnica
Zamrzovalnik (-18°C)	Candy

Pri izvedbi eksperimentalnega dela smo uporabili še sledeč laboratorijski material:

- anaerobni lonec (AnaeroJar Base, Ag0026A, Oxoid);
- anaerobne vrečke (AnaeroGen™, Oxoid);
- cepilne zanke;
- gojitvene posodice za gojenje celičnih kultur (Corning in Costar);

- laboratorijske steklenice;
- mikrotitrskie ploščice (96-luknjičaste in 12-luknjičaste);
- merilni valji (100 ml, 500 ml in 1000 ml);
- nastavki za pipete;
- mikrocentrifugirke;
- parafilm;
- petrijevke;
- plastične centrifugirke (15 ml in 50 ml).

3.2.5 Raztopine in dodatki

Preglednica 10: Raztopine in dodatki, uporabljeni pri eksperimentalnem delu.

fiziološka raztopina	Sestavine: 8,5 g NaCl (Fluka) Priprava: 8,5 g NaCl smo raztopili v 500 ml destilirane H ₂ O. Izmerili smo pH in ga uravnali s 3 M NaOH do pH 7,2. Raztopino smo sterilizirali v avtoklavu (121°C, 15 minut pri tlaku 1,1 bar). Ohlajeno smo do uporabe hranili v hladilniku (4°C).
FBS (serum govejega zarodka)	Proizvajalec: Biowhittaker
tripsin	0,25% raztopina z dodatkom 0,5 mM EDTA Proizvajalec: Sigma
gentamicin	40 µg/ ml Proizvajalec: Lek
70 % etanol	Proizvajalec: Fluka
0,1 % kristal vijolično barvilo	
10 % ocetna kislina	
0,1 % tripansko modrilo	
safranin	
mešanica 90 % etanol + 10 % aceton	
lugol	

3.3 METODE

3.3.1 Bakterije *C. jejuni* K49/4

Revitalizacija in gojenje

Zamrznjena kultura *C. jejuni* K49/4 je bila shranjena v krionepruvetkah v tekočem gojišču BHI z dodatkom 10 % glicerola pri -80 °C. S cepilno zanko smo sev prenesli na trdno gojišče Karmali in ga inkubirali 48 ur pri 42°C v mikraerofilnih pogojih (3 % O₂, 10 % CO₂ in do 85 % N₂). Zrasle kolonije smo nato prenesli v tekoče gojišče BHI ter jih inkubirali 9 ur pri enakih pogojih, do eksponentne faze rasti.

3.3.1.1 Barvanje po Gramu

Z barvanjem po Gramu smo preverili čistost kulture in fazo rasti bakterij. Barvanje je potekalo po sledečem postopku:

- razmaz smo fiksirali nad plamenom
- preparat smo barvali s kristalno vijoličnim barvilm 1 minuto
- sprali smo z rahlim curkom pod vodovodno vodo
- preparat smo prelili z lugolom, odlili lugol ter ga znova prelili z lugolom in barvali 1 minuto
- sprali smo z vodovodno vodo
- preparat razbarvamo z mešanico 90 % etanola + 10 % acetona
- sprali smo z vodovodno vodo
- preparat smo obarvali s safraninom 1 minuto
- sprali smo z vodovodno vodo in posušili

Preparat smo nato opazovali s svetlobnim mikroskopom pri 400-kratni povečavi. Bakterije so bile po Gramu negativne in z značilno S obliko (Brucker, 1986).

3.3.1.2 Ugotavljanje koncentracije bakterij *C. jejuni* in nanos na celično kulturo

S spektrofotometrom smo izmerili optično gostoto (OD) bakterij pri 600 nm, kot kontrolo smo uporabili samo tekoče gojišče BHI. Za vsak vzorec in kontrolo smo izvedli dve meritvi in izračunali povprečje. Od izmerjene OD vzorca smo odšteli OD kontrole ter rezultat množili z

že vnaprej ugotovljenim standardom (3×10^8 celic/ml), po enačbi (1). Iz dobljene koncentracije znanega končnega volumna (22 ml) in znane končne koncentracije (2×10^6 bakterij/ml) smo izračunali začetni volumen za nanos celične kulture, po enačbi (2).

$$C_{začetna} = (\overline{OD}_{vzorca} - \overline{OD}_{kontrole}) \times 3 \times 10^8 \text{ celic/ml} \quad \dots(1)$$

C_z ...začetna koncentracija (CFU/ml)

\overline{OD}_{vzorca} ...povprečna izmerjena optična gostota vzorca

$\overline{OD}_{kontrole}$...povprečna izmerjena optična gostota kontrole

Izračun začetnega volumna za nanos na inserte:

$$V_{začetni} = \frac{V_{končni} \times C_{končna}}{C_{začetna}} \quad \dots(2)$$

$V_{začetni}$...začetni volumen (ml)

$V_{končni}$...končni volumen (ml)

$C_{začetna}$...začetna koncentracija (CFU/ml)

$C_{končni}$...končna koncentracija (CFU/ml)

Pred nanosom smo bakterijsko kulturo centrifugirali 10 minut pri 2400 rpm, odlili supernatant ter bakterije resuspendirali v prej izračunanem začetnem volumnu gojišča DMEM. Bakterijska suspenzija je bila tako pripravljena za nanos na celično kulturo.

3.3.1.3 Ugotavljanje koncentracije bakterij *C. jejuni* K49/4 s štetjem kolonijskih enot na trdnem gojišču Karmali

S štetjem kolonijskih enot bakterij *C. jejuni* K49/4 na trdnem agarnem gojišču Karmali, smo izračunali začetno koncentracijo bakterij ter koncentracije pri vseh ostalih časih inkubacije (3 h, 17 h in 24 h). To smo izvedli tako, da smo z 0,1 ml vzorca pripravili razredčitve po Kochu v fiziološki raztopini. 0,1 ml ustrezne razredčine (za določitev začetne koncentracije smo nanašali razredčine 10^{-3} - 10^{-6} , za ostale čase inkubacije pa razredčine 10^0 - 10^{-3}) smo nanesli na trdno gojišče Karmali v treh ponovitvah in inkubirali 48 ur pri 42 °C v mikraerofilnih

pogojih. Število zraslih kolonijskih enot pri posamezni razredčini smo pomnožili s faktorjem razredčitve in dobili povprečno koncentracijo bakterij v izhodnem vzorcu.

Povprečno koncentracijo bakterij v izhodnem vzorcu (CFU/ml) smo izračunali po enačbi 3:

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 \times n_2)R} \quad \dots(3)$$

N...CFU/ml

$\sum c$... vsota kolonij na vseh ploščah

n_1 ...število plošč prve števne razredčitve

n_2 ...število plošč druge števne razredčitve

R...razredčitveni faktor (prve števne razredčitve)

3.3.2 Probiotiki

Probiotične bakterije PCS 20, PCS 22 in PCS 25 so sevi vrste *Lactobacillus plantarum*. Izolirane so bile iz sira in so last laboratorija Katedre za mikrobiologijo, molekularno biologijo, biokemijo in biotehnologijo, Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru/Katedre za biokemijo in nutricistiko, Medicinske fakultete, Univerze v Mariboru. Probiotične bakterije LGG (*Lactobacillus rhamnosus*) so komercialno dostopne. Probiotične bakterije PCK 9 so iz rodu *Lactobacillus* sp. Laboratorij Katedre za mikrobiologijo, molekularno biologijo, biokemijo in biotehnologijo, Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru/Katedre za biokemijo in nutricistiko, Medicinske fakultete, Univerze v Mariboru je kulturo probiotičnih bakterij PCK 9 dobil iz Danske, pri sodelovanju v projektu FP6-PathogenCombat.

3.3.2.1 Revitalizacija in gojenje

Zamrznjene kulture probiotičnih bakterij (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG) so bile shranjene v krioepruvetkah v tekočem gojišču MRS z dodatkom 10 % glicerola pri -80 °C. S cepilno zanko smo sev prenesli v tekoče gojišče MRS ter inkubirali v anaerobnih loncih, 24 ur pri 37 °C, z uporabo anaerobne vrečke.

3.3.2.2 Ugotavljanje koncentracije probiotičnih bakterij in nanos na celično kulturo

S spektrofotometrom smo izmerili optično gostoto (OD) probiotičnih bakterij (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG) pri 620 nm, za kontrolo smo uporabili samo tekoče gojišče MRS. Za vsak vzorec in kontrolo smo izvedli dve meritvi in izračunali povprečje. Od izmerjene OD vzorca smo odšteli OD kontrole ter rezultat množili z že vnaprej določenim standardom (3×10^8 celic/ml). Iz dobljene koncentracije, znanega končnega volumna (9 ml) in znane končne koncentracije (1×10^7 probiotičnih bakterij/ml) smo izračunali začetni volumen za nanos na celično kulturo (enačbi 1 in 2).

Pred nanosom smo probiotično bakterijsko kulturo centrifugirali pri 2400 rpm 10 minut, odlili supernatant ter probiotične bakterije resuspendirali v prej izračunanem začetnem volumnu gojišča DMEM brez dodatkov. Probiotična bakterijska suspenzija je bila tako pripravljena za nanos na celično kulturo.

3.3.2.3 Ugotavljanje koncentracije probiotičnih bakterij

S štetjem kolonijskih enot probiotičnih bakterij (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG) na trdnem gojišču MRS smo izračunali začetno koncentracijo probiotičnih bakterij ter koncentracije pri vseh ostalih časih inkubacije (3 h, 17 h in 24 h). To smo izvedli tako, da smo z 0,1 ml vzorca pripravili razredčitve po Kochu v fiziološki raztopini. 0,1 ml ustrezne razredčine (za določitev začetne koncentracije smo nanašali razredčine 10^{-3} - 10^{-6} , za ostale čase inkubacije pa razredčine 10^0 - 10^{-3}) smo nanesli na trdno gojišče MRS v treh ponovitvah in inkubirali 24 ur pri 37 °C v anaerobnih loncih, z uporabo anaerobne vrečke. Povprečno koncentracijo bakterij v izhodnem vzorcu (CFU/ml) smo po inkubaciji izračunali po enačbi 3.

3.3.3 Celične kulture

Celična kultura B1OXI je bila izolirana iz tankega črevesa piščancev, celična kultura črevesnih epitelijskih celic PSI cl.1 pa iz tankega črevesa prašičev, v laboratoriju Katedre za mikrobiologijo, molekularno biologijo, biokemijo in biotehnologijo, Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru/Katedre za biokemijo in nutricistiko, Medicinske fakultete, Univerze v Mariboru.

3.3.3.1 Gojenje in tripsinizacija celične kulture

Celični kulturi PSI cl.1 in B1OXI smo gojili v gojitvenih posodicah v gojišču DMEM Adv, ki smo mu dodali 5 % serum telečjega zarodka (FBS) ter inkubirali pri 37 °C in atmosferi, ki je vsebovala 5 % CO₂ in 95% O₂. Razraščenost in živost celičnih kultur smo opazovali vsak dan z invertnim mikroskopom. Gojišče smo zamenjali, ko je le to spremenilo barvo (iz rdeče v rumeno rjavo). Sprememba barve je nakazovala znižanje vrednosti pH zaradi kopčenja presnovnih produktov. Prav tako smo gojišče zamenjali, če smo z invertnim mikroskopom opazili, da se celice v posodici ne pritrjajo, ampak plavajo, kar je nakazovalo na odmiranje celic. Če smo opazili, da celice v posodici odmirajo, smo namesto 5 % FBS dodali 10 % FBS v medij.

Pri tvorbi monosloja (celice prerastejo celotno dno gojitvene posodice) smo celice presadili oziroma tripsinizirali. Najprej smo odlili izrabljeno gojišče in celice sprali z 2 ml tripsina + EDTA. V gojitvene posodice smo dodali 2 ml tripsina + EDTA, rahlo pretresli in inkubirali 5-15 minut v inkubatorju (5 % CO₂ in nasičena vlažnost) pri 37 °C oziroma tako dolgo, dokler nismo opazili, da so se vse celice odlepile od dna posodice. To smo preverili še pod mikroskopom. Celicam smo dodali 8 ml DMEM Adv., resuspendirali in celotno vsebino prenesli v centrifugirke ter centrifugirali 5 minut pri 22 °C in pri 800 rpm. Supernatant smo odlili, pelet pa resuspendirali v 10 ml DMEM Adv. 2 ml suspenzije (petino celic) smo vrnili v gojitveno posodico, dodali 7,5 ml DMEM Adv in 0,5 ml FBS (5 %).

Pri delu s celičnimi kulturami moramo biti pozorni na aseptično delo, saj so celične kulture zelo občutljive. Vsi postopki s celičnimi kulturami so zato potekali v laminariju.

3.3.3.2 Določanje koncentracije celic s hemocitometrom

Štetje celic smo opravili med postopkom tripsinizacije s hemocitometrom. 100 µl celične suspenzije, ki je že bila centrifugirana in resuspendirana z DMEM Adv., smo dodali k 900 µl barvila tripan modro. 100 µl te suspenzije smo nanesli na hemocitometer. Prešteli smo celice v 25 kvadratkih. Pri tem smo upoštevali pravilo, da poleg celic znotraj kvadratka štejemo tudi celice na dveh vedno istih robovih (levi in zgornji rob).

Izračun število celic v ml celične suspenzije (N):

$$N = \frac{\text{število preštetih celic} \times 10^6}{25 \text{ kvadratkov}} \quad \dots(4)$$

3.3.3.3 Nanos celične kulture na inserte

Postopek je potekal v laminariju. Najprej smo pripravili celično kulturo v gojitveni posodici. Tripsinizirali smo celice, jih prešteli ter pripravili ustrezne celične suspenzije za nanos na inserte. V zgornjem vodnjaku, ki predstavlja apikalni del membrane, je bila v 500 µl končna koncentracija celic 2×10^5 celic/ml. Uporabljeni medij je DMEM Adv s 5 % FBS. Spodnji del vodnjaka predstavlja bazolateralni del membrane. Vanj smo dodali samo gojišče DMEM Adv s 5 % FBS. Pri tem je potrebno paziti, da se ne dotikamo zgornjega dela vodnjaka, saj bi tako prenesli celice v spodnji del.

Celičnim kulturam na insertih smo vsak dan izmerili TER in TEP. Ko so kulture dosegle pričakovane vrednosti (za PSI cl.1 približno 1800Ω in za B1OXI približno 240Ω), so bile primerne za nadaljevanje eksperimenta, sočasno inkubacijo z bakterijami *C. jejuni* K49/4 in probiotičnimi bakterijami (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG). Celice na insertih smo gojili v inkubatorju pri 37°C in atmosferi, ki vsebuje 5 % CO_2 in nasičeno vlažnost.

3.3.3.4 Merjenje transepiteljske električne rezistence (TER) in transepiteljskega električnega potenciala (TEP)

Merjenje TER in TEP je potekalo v laminariju. Elektrode so bile shranjene v pufru PBS. Krajšo elektrodo smo povezali z apikalnim delom daljša pa z bazolateralnim delom ter izmerili TER in TEP. Med merjenjem smo elektrode razkužili v 70 % etanolu, jih nato ponovno namočili v pufru PBS, otresli ter tako nadaljevali z merjenjem.

3.3.4 Vpliv probiotičnih bakterij (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG) na adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni*

Pred nanosom bakterij *C. jejuni* in probiotičnih bakterij (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG) na inserte smo izmerili TER in TEP. Apikalni in bazolateralni del smo dvakrat sprali s pufrom PBS. V spodnji preglednici je prikazano, kako smo nato sočasno nanesli *C. jejuni* in probiotične bakterije na apikalni del insertov. Poskus smo izvedli v dveh ponovitvah. Bazolateralnemu delu smo le zamenjali medij, DMEM s samo dodanim glutaminom (brez antibiotikov in FBS).

Preglednica 11: Nanos bakterij *C. jejuni* in probiotičnih bakterij (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG) na celične inserte.

Vzorec	Volumen nanosa bakterij <i>C. jejuni</i> in probiotičnih bakterij ter gojišča na izbrano celično kulturo
Kontrola izbrane celične kulture (PSI cl.1 ali B1OXI)	samo menjava medija, DMEM brez dodatkov (500 µl)
Kontrola, ki vsebuje izbrano celično kulturo in bakterije <i>C. jejuni</i>	250 µl <i>C. jejuni</i> iz založne raztopine
Kontrola, ki vsebuje izbrano celično kulturo in probiotik PCS 20	250 µl probiotika PCS 20 iz založne raztopine
Kontrola, ki vsebuje izbrano celično kulturo in probiotik PCS 22	250 µl probiotika PCS 22 iz založne raztopine
Kontrola, ki vsebuje izbrano celično kulturo in probiotik PCS 25	250 µl probiotika PCS 25 iz založne raztopine
Kontrola, ki vsebuje izbrano celično kulturo in probiotik PCK 9	250 µl probiotika PCK 9 iz založne raztopine
Kontrola, ki vsebuje izbrano celično kulturo in probiotik LGG	250 µl probiotika LGG iz založne raztopine
Izbrana celična kultura, na kateri sočasno inkubiramo probiotik PCS 20 in bakterije <i>C. jejuni</i>	250 µl probiotika PCS 20 iz založne raztopine
Izbrana celična kultura, na kateri sočasno inkubiramo probiotik PCS 22 in bakterije <i>C. jejuni</i>	250 µl probiotika PCS 22 iz založne raztopine
Izbrana celična kultura, na kateri sočasno inkubiramo probiotik PCS 25 in bakterije <i>C. jejuni</i>	250 µl probiotika PCS 25 iz založne raztopine
Izbrana celična kultura, na kateri sočasno inkubiramo probiotik PCK 9 in bakterije <i>C. jejuni</i>	250 µl probiotika PCK 9 iz založne raztopine
Izbrana celična kultura, na kateri sočasno inkubiramo probiotik LGG in bakterije <i>C. jejuni</i>	250 µl probiotika LGG iz založne raztopine

3.3.4.1 Vpliv probiotičnih bakterij na adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni*

Po inkubaciji smo odpipetirali 100 µl iz apikalnega dela in v ustreznih redčinah (10^0 - 10^3), nacepili trdno gojišče Karmali in plošče inkubirali, kot je opisano v točki 3.3.3.1. Omenjeni postopek smo ponovili še za bazolateralni del ter tako preverili koliko bakterij preide skozi monosloj celične kulture.

Za določitev adheriranih in invadiranih bakterij smo epitelijski monosloj sprali 3x s pufrom PBS, dodali 100 µl vode + 0,1 % triton in inkubirali 1 uro. Po inkubaciji smo odpipetirali 100 µl iz apikalnega dela in ustrezne redčine (10^0 - 10^3) prenesli na agar Karmali ter jih inkubirali kot je opisano v točki 3.3.3.1.

3.3.4.2 Vpliv probiotičnih bakterij na vstopanje bakterij *C. jejuni* v celice PSI cl.1 in B1OXI

Apikalni in bazolateralni del insertov smo sprali z DMEM brez dodatkov, dodali antibiotik gentamicin (150 µg/ml) in inkubirali 2 uri pri 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂ in nasičeno vlažnostjo. Nato smo na enak način kot v 3.3.4.1 določili koncentracijo *C. jejuni* v epitelijskih celicah.

3.3.5 Preverjanje toksičnosti

Z nanosom celičnih kultur na 96-luknjičasto mikrotitrsko ploščico smo želeli preveriti toksičnost bakterij *C. jejuni* in probiotičnih bakterij (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG) oziroma celično preživetje pri različnih časih inkubacije (3 h, 17 h, 24 h in 48 h).

Celične kulture (PSI cl.1 in B1OXI) smo nanesli na mikrotitrsko ploščico v končni koncentraciji 6×10^5 celic/ml in inkubirali pri 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂ in nasičeno vlažnostjo do tvorbe monosloja. Celice smo dvakrat sprali s pufrom PBS, nanje smo nato sočasno nanesli bakterije *C. jejuni* in probiotične bakterije, kot je opisano v spodnji preglednici. Delali smo v treh ponovitvah.

Preglednica 12: Nanos bakterij *C. jejuni* in probiotičnih bakterij (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG) na mikrotitrsko ploščico.

Vzorec	Volumen nanosa bakterij <i>C. jejuni</i> in probiotičnih bakterij ter gojišča na izbrano celično kulturo
Kontrola izbrane celične kulture (PSI cl.1 ali B1OXI)	samo menjava medija, DMEM brez dodatkov (100 µl)
Kontrola, ki vsebuje izbrano celično kulturo in bakterije <i>C. jejuni</i>	50 µl <i>C. jejuni</i> iz založne raztopine
Kontrola, ki vsebuje izbrano celično kulturo in probiotik PCS 20	50 µl probiotika PCS 20 iz založne raztopine
Kontrola, ki vsebuje izbrano celično kulturo in probiotik PCS 22	50 µl probiotika PCS 22 iz založne raztopine
Kontrola, ki vsebuje izbrano celično kulturo in probiotik PCS 25	50 µl probiotika PCS 25 iz založne raztopine
Kontrola, ki vsebuje izbrano celično kulturo in probiotik PCK 9	50 µl probiotika PCK 9 iz založne raztopine
Kontrola, ki vsebuje izbrano celično kulturo in probiotik LGG	50 µl probiotika LGG iz založne raztopine
Izbrana celična kultura, na kateri sočasno inkubiramo probiotik PCS 20 in bakterij <i>C. jejuni</i>	50 µl probiotika PCS 20 iz založne raztopine
Izbrana celična kultura, na kateri sočasno inkubiramo probiotik PCS 22 in bakterij <i>C. jejuni</i>	50 µl probiotika PCS 22 iz založne raztopine
Izbrana celična kultura na kateri sočasno inkubiramo probiotik PCS 25 in bakterijo <i>C. jejuni</i>	50 µl probiotika PCS 25 iz založne raztopine
Izbrana celična kultura, na kateri sočasno inkubiramo probiotik PCK 9 in bakterij <i>C. jejuni</i>	50 µl probiotika PCK 9 iz založne raztopine
Izbrana celična kultura, na kateri sočasno inkubiramo probiotik LGG in bakterij <i>C. jejuni</i>	50 µl probiotika LGG iz založne raztopine

Sledila je inkubacija 2 uri pri 37 °C in atmosferi s 5 % CO₂ in nasičeno vlažnostjo. Po inkubaciji smo trikrat spirali s pufrom PBS, dodali 100 µl gojišča DMEM brez dodatkov ter inkubirali še 1 uro, 15 ur, 22 ur in 46 ur. Po vsaki inkubacijo smo gojišče odstranili in barvali celice z 0,1 % kristal vijoličnim barvilm ter inkubirali 5 minut. Barvilo smo sprali z vodovodno vodo, mikrotitrsko ploščico pa posušili čez noč na sobni temperaturi. Naslednji dan smo dodali 100 µl 10 % ocetne kisline in mikrotitrsko ploščico pol ure inkubirali z mešanjem. S spektrofotometrom smo izmerili absorbanco pri 595 nm. Manjša vrednost absorbance pomeni večji razpad monosloja in govorimo lahko o večji toksičnosti.

3.3.6 Statistična analiza podatkov

3.3.6.1 Povprečna vrednost

Vse poskuse smo izvedli v dveh ponovitvah, le merjenje toksičnosti smo izvedli v treh ponovitvah. Rezultate meritev smo podali kot povprečno vrednost, ki smo jo izračunali po enačbi 5 (Košmelj, 2001).

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \dots(5)$$

\bar{X} ...povprečna vrednost

X_i ...vrednosti i-te meritve

n...število vzorcev

3.3.6.2 Standardni odklon

Oceno variabilnosti rezultatov smo podali s standardnim odklonom (SD), ki smo ga izračunali po enačbi 6 (Košmelj, 2001).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad \dots(6)$$

SD...standardni odklon

\bar{X} ...povprečna vrednost

X_i ...vrednosti i-te meritve

n...število vzorcev

4 REZULTATI

Eksperimentalni del diplomskega dela je bil opravljen v laboratoriju Katedre za mikrobiologijo, molekularno biologijo, biokemijo in biotehnologijo, Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru, v obdobju od oktobra 2009 do julija 2010.

4.1 TRANSMEMBRANSKA REZISTENCA IN POTENCIAL (TER IN TEP)

Črevesnim epitelijskim celicam, B1OXI in PSI cl.1, smo merili vrednosti TER in TEP, v odvisnosti od časa (0 h, 3 h, 17 h in 24 h) in sočasni inkubaciji s *C. jejuni* in probiotiki (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG). Za kontrolo smo merili spremenjanje TER in TEP samo pri celicah, spremenjanje TER in TEP pri inkubaciji samo s *C. jejuni* ter spremembe, ko smo dodali samo probiotike. Rezultate prikazujeta Preglednica 13 in 14 ter slike v Prilogi A1, A2, A3 in A4.

Preglednica 13: Transepiteljska rezistence in potencial piščančjih celic B1OXI v odvisnosti od časa

Čas inkubacije 0 h	TER (Ω)	Povprečje (Ω)	SD	TER (mV)	Povprečje (mV)	SD
celice B1OXI	240	242	241	1,41	0,1	0,2
B1OXI + <i>C. jejuni</i>	288	279	284	6,36	0,1	0,1
B1OXI + PCS 20	235	238	237	2,12	0,6	0,5
B1OXI + PCS 22	234	236	235	1,41	0,6	0,6
B1OXI + PCS 25	256	258	257	1,41	0,7	0,8
B1OXI + PCK 9	278	282	280	2,83	0,6	0,7
B1OXI + LGG	214	212	213	1,41	0,7	0,5
B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	256	258	260	261	2,22	0,3
B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	246	244	237	232	6,45	0,4
B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	276	272	269	277	3,70	0,3
B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	285	280	292	282	5,25	0,5
B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	292	312	295	302	8,88	0,5
Čas inkubacije 3 h	TER (Ω)	Povprečje (Ω)	SD	TER (mV)	Povprečje (mV)	SD
celice B1OXI	254	244	249	7,07	0,5	0,6
B1OXI + <i>C. jejuni</i>	298	312	305	9,90	0,3	0,3
B1OXI + PCS 20	278	276	277	1,41	1,8	1,6
B1OXI + PCS 22	254	256	255	1,41	1,5	1,9
B1OXI + PCS 25	380	423	402	30,41	1,7	1,4
B1OXI + PCK 9	307	312	310	3,54	1,8	1,9
B1OXI + LGG	224	328	276	73,54	1,6	1,6
B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	107	117	111	106	4,99	1,1
B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	158	172	166	164	5,77	1
B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	172	174	173	177	2,16	0,8
B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	93	121	110	101	12,04	1,1
B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	87	92	88	86	2,63	1,1
Čas inkubacije 17 h	TER (Ω)	Povprečje (Ω)	SD	TER (mV)	Povprečje (mV)	SD
celice B1OXI	194	221	208	19,09	1	1,1
B1OXI + <i>C. jejuni</i>	233	200	217	23,33	0,9	0,8
B1OXI + PCS 20	100	119	110	13,44	2	2,1
B1OXI + PCS 22	124	107	116	12,02	2,5	2,4
B1OXI + PCS 25	100	109	105	6,36	2,7	2,4
B1OXI + PCK 9	298	197	248	71,42	2,3	2,2

inkubacije.

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 13: Transepiteljska rezistence in potencial piščančjih celic B1OXI v odvisnosti od časa inkubacije.«

Čas inkubacije 17 h	TER (Ω)	Povprečje (Ω)	SD	TEP (mV)	Povprečje (mV)	SD
B1OXI + LGG	312	296	304	11,31	2,1	2,1
B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	96	100	98	102	2,58	0,4
B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	166	194	174	177	11,79	0,3
B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	214	218	221	225	4,65	0,3
B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	305	377	348	364	31,33	0,8
B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	275	200	221	231	31,60	0,8
Čas inkubacije 24 h	TER (Ω)	Povprečje (Ω)	SD	TEP (mV)	Povprečje (mV)	SD
celice B1OXI	114	117	116	2,12	0,4	0,3
B1OXI + <i>C. jejuni</i>	254	202	228	36,77	0,1	0,1
B1OXI + PCS 20	98	100	99	1,41	0,5	0,4
B1OXI + PCS 22	102	92	97	7,07	0,4	0,4
B1OXI + PCS 25	100	101	101	0,71	0,3	0,4
B1OXI + PCK 9	97	103	100	4,24	0,1	0,2
B1OXI + LGG	337	308	323	20,51	0,5	0,6
B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	87	84	88	82	2,75	0,1
B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	87	76	83	75	5,74	0,2
B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	84	88	86	90	2,58	0,3
B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	320	390	367	373	29,96	0,5
B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	296	337	288	302	21,61	0,7

Pri merjenju TER in TEP celicam B1OXI smo ugotovili, da vrednost TER rahlo narašča, po 17 urni inkubaciji pa prične padati. Tudi vrednost TEP je rahlo naraščala in pričela padati šele po 24 urni inkubaciji. Pri inkubaciji s *C. jejuni* smo opazili, da vrednost TER rahlo naraste in že po 3 urni inkubaciji prične padati, vrednost TEP pa je naraščala in pričela padati po 24 urni inkubaciji. Vrednosti TER za probiotike PCS 20, PCS 22 in PCS 25 so po 3 urah inkubacije nerasle in po 17 urah inkubacije močno padle, kar se je nadaljevalo tudi po 24 urah. Vrednost TER pri probiotiku PCK 9 je rahlo naraščala in po 17 urni inkubaciji pričela padati. Pri probiotiku LGG so vrednosti TER vseskozi naraščale. Vrednosti TEP so pri vseh probiotikih naraščale in pričele padati po 24 urah inkubacije. Pri sočasni inkubaciji probiotikov in *C. jejuni* po 3 urah inkubacije smo opazili, da vrednost TER pri vseh zelo pade. Po triurni inkubaciji je vrednost TER narasla pri vseh, razen pri sočasni inkubaciji s probiotikom PCS 20 in *C. jejuni*. Po 24 urni inkubaciji smo opazili padec vrednosti TER pri PCS 22+*C. jejuni* in PCS 25+*C. jejuni*. Po triurni inkubaciji PCK 9+*C. jejuni* in LGG+*C. jejuni* so vrednosti TER naraščale. Vrednosti TEP pa so začele pri vseh padati po 17 urni inkubaciji, pri PCK 9+*C. jejuni* in LGG+*C. jejuni* je bilo to padanje zelo počasno.

Preglednica14: Transepiteljska rezistenza in potencial prašičjih celicam PSI cl.1 v odvisnosti od časa inkubacije.

Čas inkubacije 0 h	TER (Ω)		Povprečje (Ω)	SD	TEP (mV)		Povprečje (mV)	SD
celice PSI cl.1	1890	1894	1892	2,83	0,7	0,7	0,7	0,00
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	1900	1905	1903	3,54	0,8	0,6	0,7	0,14
celice PSI cl.1 + PCS 20	1993	1994	1994	0,71	0,7	0,6	0,7	0,07
celice PSI cl. 1 + PCS 22	1860	1868	1864	5,66	0,8	0,6	0,7	0,14
celice PSI cl.1 + PCS 25	1874	1877	1876	2,12	0,7	0,7	0,7	0,00
celice PSI cl.1 + PCK 9	1861	1863	1862	1,41	0,8	0,6	0,7	0,14
celice PSI cl.1 + LGG	1814	1813	1814	0,71	0,6	0,6	0,6	0,00
celice PSI cl.1 + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	1920	1923	1925	1922	2,08	0,8	0,8	0,8
celice PSI cl. 1 + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	1888	1886	1884	1889	2,22	0,6	0,7	0,7
celice PSI cl.1 + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	1860	1866	1864	1868	3,42	0,8	0,7	0,7
celice PSI cl.1 + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	1870	1868	1873	1867	2,65	0,6	0,6	0,6
celice PSI cl.1 + LGG + <i>C. jejuni</i>	1892	1899	1888	1890	4,79	0,7	0,6	0,6
Čas inkubacije 3 h	TER (Ω)		Povprečje (Ω)	SD	TEP (mV)		Povprečje (mV)	SD
celice PSI cl.1	1900	1904	1902	2,83	1,2	1,3	1,3	0,07
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	1970	1977	1974	4,95	1,3	1,3	1,3	0,00
celice PSI cl.1 + PCS 20	2021	2015	2018	4,24	1,8	1,9	1,9	0,07
celice PSI cl. 1 + PCS 22	1955	1953	1954	1,41	1,7	1,7	1,7	0,00
celice PSI cl.1 + PCS 25	1977	1976	1977	0,71	1,6	1,7	1,7	0,07
celice PSI cl.1 + PCK 9	1994	1998	1996	2,83	1,8	1,9	1,9	0,07
celice PSI cl.1 + LGG	1893	1896	1895	2,12	2	1,8	1,9	0,14
celice PSI cl.1 + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	2001	2010	2008	2000	4,99	1,7	1,7	1,7
celice PSI cl. 1 + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	1943	1945	1946	1950	2,94	1,8	1,8	1,8
celice PSI cl.1 + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	1933	1937	1931	1942	4,86	1,6	1,6	1,6
celice PSI cl.1 + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	1949	1952	1947	1953	2,75	1,7	1,8	1,8
celice PSI cl.1 + LGG + <i>C. jejuni</i>	2000	2002	2008	2010	4,76	1,9	1,9	0,05
Čas inkubacije 17 h	TER (Ω)		Povprečje (Ω)	SD	TEP (mV)		Povprečje (mV)	SD
celice PSI cl.1	1810	1805	1808	3,54	0,8	0,8	0,8	0,00
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	1800	1802	1801	1,41	0,7	0,8	0,8	0,07
celice PSI cl.1 + PCS 20	1942	1948	1945	4,24	0,7	0,8	0,8	0,07
celice PSI cl. 1 + PCS 22	1852	1854	1853	1,41	0,9	0,8	0,9	0,07
celice PSI cl.1 + PCS 25	1735	1736	1736	0,71	0,6	0,7	0,7	0,07
celice PSI cl.1 + PCK 9	1842	1848	1845	4,24	0,6	0,8	0,7	0,14
celice PSI cl.1 + LGG	1783	1781	1782	1,41	0,7	0,7	0,7	0,00
celice PSI cl.1 + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	1890	1897	1894	1896	3,10	0,7	0,5	0,6
celice PSI cl. 1 + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	1820	1825	1828	1822	3,50	0,7	0,6	0,6
celice PSI cl.1 + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	1854	1858	1854	1862	3,83	0,8	0,7	0,8
celice PSI cl.1 + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	1811	1825	1820	1819	5,80	0,7	0,7	0,7
celice PSI cl.1 + LGG + <i>C. jejuni</i>	1873	1877	1872	1870	2,94	0,6	0,8	0,7
Čas inkubacije 24 h	TER (Ω)		Povprečje (Ω)	SD	TEP (mV)		Povprečje (mV)	SD
celice PSI cl.1	1700	1705	1703	3,54	0,5	0,5	0,5	0,00
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	1680	1683	1682	2,12	0,1	0,3	0,2	0,14
celice PSI cl.1 + PCS 20	1880	1882	1881	1,41	0,5	0,4	0,5	0,07
celice PSI cl. 1 + PCS 22	1810	1814	1812	2,83	0,5	0,5	0,5	0,00
celice PSI cl.1 + PCS 25	1693	1697	1695	2,83	0,3	0,4	0,4	0,07
celice PSI cl.1 + PCK 9	1797	1794	1796	2,12	0,3	0,3	0,3	0,00
celice PSI cl.1 + LGG	1732	1735	1734	2,12	0,2	0,3	0,3	0,07
celice PSI cl.1 + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	1824	1822	1826	1829	2,99	0,3	0,2	0,3
celice PSI cl. 1 + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	1776	1770	1779	1782	5,12	0,2	0,3	0,2
celice PSI cl.1 + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	1793	1792	1780	1782	6,70	0,2	0,1	0,2
celice PSI cl.1 + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	1720	1723	1721	1719	1,71	0	0,1	-0
celice PSI cl.1 + LGG + <i>C. jejuni</i>	1754	1752	1756	1760	3,42	0,1	0,2	0

Pri merjenju TER in TEP celicam PSI cl.1 smo ugotovili, da vrednosti TER in TEP sprva naraščajo, po treh urah inkubacije pa prično padati. Padanje vrednosti TER in TEP je bilo počasno, tam kjer so bili na celicah inkubirani probiotiki in pri sočasni inkubaciji probiotikov ter *C. jejuni*.

4.2 TOKSIČNOST BAKTERIJ *C. jejuni*, PROBIOTIKOV TER NJIHOVE SOČASNE INKUBACIJE NA MONOSLOJIH B1OXI IN PSI cl.1

Namen poskusa je bil preveriti toksičnost bakterij *C. jejuni*, probiotikov ter njihove kombinacije ob sočasni inkubaciji za monosloj celic B1OXI in PSI cl.1. Rezultate prikazujeta Preglednici 15 in 16 ter slike v Prilogi B1 in B2.

Preglednica 15: Preverjanje toksičnosti *C. jejuni* in probiotikov za piščanče celice B1OXI.

Čas inkubacije 3 h	A (595 nm)	Povprečje	SD
celice B1OXI	3,164	3,273	3,72
celice B1OXI + PCS 20	3,34	3,305	3,574
celice B1OXI + PCS 22	3,34	3,419	3,641
celice B1OXI + PCS 25	3,273	3,215	2,914
celice B1OXI + PCK 9	3,17	3,401	3,799
celice B1OXI + LGG	3,287	3,401	3,556
celice B1OXI + <i>C. jejuni</i>	3,556	3,446	3,556
celice B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	3,321	3,222	2,986
celice B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	3,168	3,194	3,319
celice B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	3,119	3,553	3,319
celice B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	3,143	3,284	3,252
celice B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	3,699	3,222	2,818
Čas inkubacije 17 h	A (595 nm)	Povprečje	SD
celice B1OXI	3,299	3,843	3,6
celice B1OXI + PCS 20	3,746	4,109	3,366
celice B1OXI + PCS 22	3,299	3,445	3,331
celice B1OXI + PCS 25	3,403	3,299	2,901
celice B1OXI + PCK 9	3,335	3,569	3,372
celice B1OXI + LGG	3,092	3,599	3,511
celice B1OXI + <i>C. jejuni</i>	3,3	3,46	3,46
celice B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	3,414	3,46	2,895
celice B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	3,374	3,374	3,269
celice B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	3,269	3,512	3,304
celice B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	3,136	3,211	3,211
celice B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	3,336	3,185	3,035

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 15: Preverjanje toksičnosti *C. jejuni* in probiotikov za piščančje celice B1OXI.«

Čas inkubacije	A (595 nm)	Povprečje	SD
24 h			
celice B1OXI	3,109	3,331	3,179
celice B1OXI + PCS 20	3,179	3,206	3,456
celice B1OXI + PCS 22	3,109	3,206	3,368
celice B1OXI + PCS 25	3,234	3,234	2,933
celice B1OXI + PCK 9	3,029	3,049	3,187
celice B1OXI + LGG	3,161	3,488	3,055
celice B1OXI + <i>C. jejuni</i>	1,721	1,772	1,51
celice B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	1,87	1,963	2,011
celice B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	3,088	3,243	3,088
celice B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	3,066	3,544	3,787
celice B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	2,974	2,502	3,213
celice B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	3,544	3,11	2,87
Čas inkubacije			
48 h			
celice B1OXI	3,532	3,532	3,59
celice B1OXI + PCS 20	3,657	3,736	0,966
celice B1OXI + PCS 22	3,134	3,532	1,608
celice B1OXI + PCS 25	3,231	3,94	2,914
celice B1OXI + PCK 9	3,652	1,237	3,501
celice B1OXI + LGG	3,404	3,625	3,449
celice B1OXI + <i>C. jejuni</i>	0,721	0,556	0,668
celice B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	0,325	0,582	0,4
celice B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	0,649	0,714	0,447
celice B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	0,487	0,408	0,458
celice B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	0,466	0,368	0,646
celice B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	0,719	0,894	0,64

Preglednica 16: Preverjanje toksičnosti *C. jejuni* in probiotikov za prašičje celice PSI cl.1.

Čas inkubacije	A (595 nm)	Povprečje	SD
3 h			
celice PSI cl.1	2,161	2,112	1,795
celice PSI cl.1 + PCS 20	3,373	3,283	3,337
celice PSI cl.1 + PCS 22	2,642	2,874	3,408
celice PSI cl.1 + PCS 25	3,642	3,788	3,208
celice PSI cl.1 + PCK 9	1,372	1,959	1,286
celice PSI cl.1 + LGG	1,931	2,797	2,892
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	3,029	2,661	2,443
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCS 20	2,774	3,320	2,634
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCS 22	2,867	2,835	2,981
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCS 25	3,096	3,060	3,197
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCK 9	2,702	2,835	2,476
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + LGG	2,935	2,140	2,675
Čas inkubacije			
17 h			
celice PSI cl.1	-	-	1,725
celice PSI cl.1 + PCS 20	1,426	1,147	1,593
celice PSI cl.1 + PCS 22	1,745	1,778	1,593
celice PSI cl.1 + PCS 25	1,424	1,735	1,158
celice PSI cl.1 + PCK 9	1,202	0,671	1,536
celice PSI cl.1 + LGG	1,622	1,624	1,668
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	1,995	1,525	2,112
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCS 20	1,259	1,421	1,493
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCS 22	0,865	1,191	1,348
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCS 25	0,871	1,317	1,122
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCK 9	1,515	1,289	1,526
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + LGG	0,695	1,035	0,935

»se nadaljuje«

»nadaljevanje preglednice 16: Preverjanje toksičnosti *C. jejuni* in probiotikov za prasičje celice PSI cl.1.«

Čas inkubacije		A (595 nm)		Povprečje	SD
24 h					
celice PSI cl.1	2,496	2,037	-	2,267	0,325
celice PSI cl.1 + PCS 20	0,949	1,070	1,055	1,025	0,066
celice PSI cl.1 + PCS 22	1,179	0,985	1,028	1,064	0,102
celice PSI cl.1 + PCS 25	1,048	0,968	1,028	1,015	0,042
celice PSI cl.1 + PCK 9	1,049	0,968	2,829	1,615	1,052
celice PSI cl.1 + LGG	2,547	0,849	0,841	1,412	0,983
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	1,986	1,269	1,117	1,457	0,464
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCS 20	2,373	1,397	1,566	1,779	0,522
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCS 22	0,662	1,245	0,744	0,884	0,316
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCS 25	2,596	1,091	1,431	1,706	0,789
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCK 9	0,922	0,977	1,098	0,999	0,090
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + LGG	1,154	0,793	1,002	0,983	0,181
Čas inkubacije		A (595 nm)		Povprečje	SD
48 h					
celice PSI cl.1	0,654	0,810	0,743	0,736	0,078
celice PSI cl.1 + PCS 20	0,700	0,821	0,562	0,694	0,130
celice PSI cl.1 + PCS 22	0,972	1,030	0,690	0,897	0,182
celice PSI cl.1 + PCS 25	0,621	0,688	0,436	0,582	0,131
celice PSI cl.1 + PCK 9	1,050	1,020	0,601	0,890	0,251
celice PSI cl.1 + LGG	0,811	0,983	0,889	0,894	0,086
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	1,091	1,341	1,314	1,249	0,137
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCS 20	0,931	0,847	0,783	0,854	0,074
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCS 22	1,039	0,853	0,734	0,875	0,154
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCS 25	0,377	0,729	0,726	0,611	0,202
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + PCK 9	0,460	0,511	0,561	0,511	0,051
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i> + LGG	0,569	0,665	0,677	0,637	0,059

***Legenda: Oznaka – predstavlja napako pri meritvi, zato rezultata nismo upoštevali.

Opazili smo, da so celice B1OXI normalno preživele 48 h inkubacije, razen če so bile dodane bakterije *C. jejuni* – v tem primeru je monosloj razpadel. PSI cl.1 celice po 48 h niso bile več žive, niti pri inkubaciji s *C. jejuni*, niti brez teh bakterij. Iz tega sklepamo, da celice PSI cl.1 propadejo same po sebi in ne zaradi *C. jejuni*.

4.3 KONCENTRACIJA PROBIOTIKOV IN BAKTERIJ *C. jejuni* V ODVISNOSTI OD ČASA INKUBACIJE

4.3.1 Koncentracija probiotikov v odvisnosti od časa inkubacije

Preverili smo, kaj se dogaja s koncentracijo probiotikov v odvisnosti od časa inkubacije. Probiotiki so bili inkubirani na monosloj celic B1OXI in PSI cl.1. Rezultati so prikazani v Preglednici 17.

Preglednica 17: Koncentracija probiotikov v odvisnosti od časa inkubacije za celice B1OXI in PSI cl.1.

Čas inkubacije	Celice B1OXI	Celice PSI cl.1
	Povprečni CFU/ml	Povprečni CFU/ml
0h		
PCS 20	$6,5 \pm 0,4 \times 10^7$	$6,2 \pm 0,2 \times 10^7$
PCS 22	$5,3 \pm 0,4 \times 10^7$	$6,9 \pm 0,2 \times 10^7$
PCS 25	$5,1 \pm 0,4 \times 10^7$	$7,1 \pm 0,2 \times 10^7$
PCK 9	$4,7 \pm 0,3 \times 10^7$	$6,2 \pm 0,2 \times 10^7$
LGG	$5,0 \pm 0,2 \times 10^7$	$5,6 \pm 0,2 \times 10^7$
Čas inkubacije	Povprečni CFU/ml	Povprečni CFU/ml
3h		
PCS 20	n.p.	$2,4 \times 10^4$
PCS 22	$2,7 \pm 0,1 \times 10^3$	$2,1 \times 10^4$
PCS 25	$2,0 \pm 0,1 \times 10^3$	$2,9 \times 10^4$
PCK 9	$1,0 \times 10^3$	$2,8 \times 10^4$
LGG	$1,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$
Čas inkubacije	Povprečni CFU/ml	Povprečni CFU/ml
17h		
PCS 20	$9,7 \pm 0,2 \times 10^3$	$2,8 \pm 0,7 \times 10^4$
PCS 22	$7,3 \pm 0,2 \times 10^3$	$2,8 \pm 0,9 \times 10^4$
PCS 25	$1,5 \pm 0,2 \times 10^3$	$3,9 \pm 0,7 \times 10^4$
PCK 9	$1,6 \pm 0,2 \times 10^3$	$4,0 \pm 0,6 \times 10^4$
LGG	$9,3 \pm 0,2 \times 10^3$	$2,6 \pm 0,6 \times 10^4$
Čas inkubacije	Povprečni CFU/ml	Povprečni CFU/ml
24h		
PCS 20	$1,0 \pm 0,5 \times 10^3$	$1,5 \pm 0,8 \times 10^4$
PCS 22	$2,7 \pm 0,3 \times 10^4$	$1,6 \pm 0,7 \times 10^4$
PCS 25	$1,3 \pm 0,2 \times 10^4$	$2,9 \pm 1,0 \times 10^4$
PCK 9	$1,5 \pm 0,4 \times 10^4$	$2,2 \pm 0,9 \times 10^4$
LGG	$9,7 \pm 0,5 \times 10^2$	$1,5 \pm 0,8 \times 10^4$

***Legenda: Oznaka n.p. pomeni ni podatka.

Ugotovili smo, da je koncentracija probiotikov v odvisnosti od časa zmanjšuje. Razlika med inkubacijo probiotikov na monosloj celic B1OXI in PSI cl.1 je bila le v tem, da je pri celicah B1OXI koncentracija probiotikov po 3 urni inkubaciji rahlo zmanjšala, nato pa ponovno pričela naraščati.

4.3.2 Koncentracija bakterij *C. jejuni* v odvisnosti od časa inkubacije

Preverili smo, kaj se dogaja s koncentracijo *C. jejuni* v odvisnosti od časa inkubacije. Bakterije *C. jejuni* so bile inkubirane na monosloj celic B1OXI in PSI cl.1. Rezultati so prikazani v preglednici 18.

Preglednica 18: Koncentracija bakterij *C. jejuni* v odvisnosti od časa inkubacije za celice B1OXI in PSI cl.1.

Čas inkubacije	Celice B1OXI	Celice PSI cl.1
	Povprečni CFU/ml	Povprečni CFU/ml
0h	$1,3 \pm 0,3 \times 10^6$	$2,8 \pm 0,6 \times 10^7$
3h	$9,0 \pm 0,0 \times 10^1$	$2,0 \pm 0,1 \times 10^3$
17h	$1,0 \pm 0,0 \times 10^3$	$> 10^3$
24h	$8,7 \pm 0,3 \times 10^3$	$> 10^3$

Koncentracija *C. jejuni* se je pri celicah B1OXI in PSI cl.1 po treh urah inkubacije zmanjšala, nato pa ponovno narasla. Pri celicah PSI cl.1 je bilo naraščanje bolj izrazito.

4.4 PREHAJANJE BAKTERIJ *C. jejuni* SKOZI MONOSLOJ CELIC B1OXI IN PSI CL. 1, OB HKRATNI INKUBACIJI S PROBIOTIKI, V ODVISNOSTI OD ČASA INKUBACIJE

Namen poskusa je bil preveriti ali probiotiki lahko preprečijo prehajanje bakterij *C. jejuni* skozi monosloj celic B1OXI in PSI cl.1 v odvisnosti od časa inkubacije. Rezultati so prikazani v Preglednici 19 in 20 ter na slikah v Prilogi C1 in C2.

Preglednica 19: Prehajanje bakterij *C. jejuni* skozi monosloj piščančjih celic B1OXI ob hkratni inkubaciji s probiotiki v odvisnosti od časa inkubacije.

Čas inkubacije 3 h	Povprečni CFU/ml
celice B1OXI + <i>C. jejuni</i>	$2,8 \pm 0,8 \times 10^4$
celice B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	$7,9 \pm 0,4 \times 10^3$
celice B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	$1,3 \pm 0,4 \times 10^4$
celice B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	$1,0 \pm 0,5 \times 10^4$
celice B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	$1,5 \pm 0,6 \times 10^4$
celice B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	$1,4 \pm 0,4 \times 10^4$
Čas inkubacije 17 h	Povprečni CFU/ml
celice B1OXI + <i>C. jejuni</i>	$2,7 \pm 0,9 \times 10^4$
celice B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	$1,7 \pm 0,1 \times 10^3$
celice B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	$1,7 \pm 0,1 \times 10^3$
celice B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	$2,7 \pm 0,1 \times 10^3$
celice B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	$3,0 \pm 0,1 \times 10^3$
celice B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	$1,0 \pm 0,0 \times 10^3$
Čas inkubacije 24 h	Povprečni CFU/ml
celice B1OXI + <i>C. jejuni</i>	$3,1 \pm 0,4 \times 10^4$
celice B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	$4,3^* \pm 0,3 \times 10^3$
celice B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	$1,6 \pm 0,2 \times 10^4$
celice B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	$3,7 \pm 0,1 \times 10^3$
celice B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	$9,7 \pm 0,2 \times 10^3$

Ob sočasni inkubaciji *C. jejuni* s probiotiki se je prehajanje bakterij *C. jejuni* skozi monosloj celic B1OXI glede na inkubacijo brez probiotikov nekoliko zmanjšalo. Najbolj očiten je bil učinek ob sočasni inkubaciji *C. jejuni* in probiotika PCK 9, kjer po 24 urni inkubaciji nismo več zaznali celic *C. jejuni*.

Preglednica 20: Prehajanje bakterij *C. jejuni* skozi monosloj prasičjih celic PSI cl.1 ob hkratni inkubaciji s probiotiki.

Čas inkubacije 3 h	Povprečni CFU/ml
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	$3,6 \pm 0,9 \times 10^4$
celice PSI cl.1 + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	$2,2 \pm 0,9 \times 10^4$
celice PSI cl. 1 + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	$1,9 \pm 0,9 \times 10^4$
celice PSI cl.1 + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	$2,0 \pm 0,9 \times 10^4$
celice PSI cl.1 + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	$1,7 \pm 0,9 \times 10^4$
celice PSI cl.1 + LGG + <i>C. jejuni</i>	$2,4 \pm 1,1 \times 10^4$
Čas inkubacije 17 h	Povprečni CFU/ml
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	$2,7 \pm 0,9 \times 10^3$
celice PSI cl.1 + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	$1,7 \pm 0,1 \times 10^3$
celice PSI cl. 1 + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	$1,7 \pm 0,1 \times 10^3$
celice PSI cl.1 + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	$2,7 \pm 0,1 \times 10^3$
celice PSI cl.1 + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	$3,0 \pm 0,1 \times 10^3$
celice PSI cl.1 + LGG + <i>C. jejuni</i>	$1,0 \pm 0,0 \times 10^3$
Čas inkubacije 24 h	Povprečni CFU/ml
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	$2,0 \pm 0,1 \times 10^3$
celice PSI cl.1 + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl. 1 + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl.1 + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl.1 + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl.1 + LGG + <i>C. jejuni</i>	ni rasti

Ob sočasni inkubaciji *C. jejuni* s probiotiki se je prehajanje bakterij *C. jejuni* skozi monosloj celic PSI glede na inkubacijo brez probiotikov zmanjšalo, po 24 urah inkubacije nismo v nobenem primeru sočasne inkubacije zaznali celic *C. jejuni* na bazolateralni strani kar pomeni, da bakterije niso več prehajale skozi monosloj celic PSI cl.1.

4.5 VEZAVA BAKTERIJ *C. jejuni* NA CELICE B1OXI IN PSI CL.1, OB HKRATNI INKUBACIJI S PROBIOTIKI

Namen poskusa je bil preveriti, ali se bakterije *C. jejuni* ob sočasni inkubaciji s probiotiki vežejo na monosloj celic B1OXI in PSI cl.1. Rezultati so prikazani v preglednici 21 in 22 ter na slikah v Prilogi D1 in D2.

Preglednica 21: Vezava bakterij *C. jejuni* na piščanče celice B1OXI ob hkratni inkubaciji s probiotiki.

Čas inkubacije	Povprečni CFU/ml
3 h	
celice B1OXI + <i>C. jejuni</i>	$2,5 \pm 0,7 \times 10^3$
celice B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	$9,7 \pm 0,5 \times 10^1$
celice B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	$8,8 \pm 0,4 \times 10^1$
celice B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	$1,0 \pm 0,0 \times 10^0$
celice B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	$2,0 \pm 0,1 \times 10^0$
celice B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	$1,0 \pm 0,0 \times 10^0$
Čas inkubacije	Povprečni CFU/ml
17 h	
celice B1OXI + <i>C. jejuni</i>	$1,6 \pm 0,9 \times 10^4$
celice B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	$1,2 \pm 0,5 \times 10^4$
celice B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	$1,0 \pm 0,4 \times 10^4$
celice B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	$1,3 \pm 0,4 \times 10^4$
celice B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	$1,3 \pm 0,6 \times 10^4$
celice B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	$1,0 \pm 0,5 \times 10^4$
Čas inkubacije	Povprečni CFU/ml
24 h	
celice B1OXI + <i>C. jejuni</i>	$2,8 \pm 0,6 \times 10^4$
celice B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	$3,3 \pm 0,5 \times 10^4$
celice B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	$2,0 \pm 0,6 \times 10^4$
celice B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	$2,8 \pm 1,3 \times 10^4$
celice B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	$1,4 \pm 0,5 \times 10^4$
celice B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	$9,7 \pm 0,5 \times 10^4$

Koncentracija bakterij *C. jejuni* na monosloju celic B1OXI je naraščala s časom inkubacije. To je veljalo tudi za poskuse s sočasno inkubacijo *C. jejuni* in probiotikov. Koncentracija vezanih bakterij je bila po treh urah inkubacije zelo majhna, po 17 urah inkubacije pa se je povečala in še naprej počasi naraščala. Naraščanje je bilo najbolj izrazito pri probiotiku PCS 20 (pregl. 21).

Preglednica 22: Vezava bakterij *C. jejuni* na prašičje celice PSI cl.1 ob hkratni inkubaciji s probiotiki.

Čas inkubacije 3 h	Povprečni CFU/ml
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	1,4±0,6 x 10 ²
celice PSI cl.1 + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	1,0±0,4 x 10 ²
celice PSI cl. 1 + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	8,8±0,4 x 10 ¹
celice PSI cl.1 + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	1,6±0,6 x 10 ²
celice PSI cl.1 + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	1,4±0,6 x 10 ²
celice PSI cl.1 + LGG + <i>C. jejuni</i>	1,0±0,5 x 10 ²
Čas inkubacije 17 h	Povprečni CFU/ml
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	5,3±0,9 x 10 ⁴
celice PSI cl.1 + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	3,1±0,8 x 10 ⁴
celice PSI cl. 1 + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	2,6±0,7 x 10 ⁴
celice PSI cl.1 + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	3,8±0,9 x 10 ⁴
celice PSI cl.1 + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	3,1±0,8 x 10 ⁴
celice PSI cl.1 + LGG + <i>C. jejuni</i>	2,8±0,8 x 10 ⁴
Čas inkubacije 24 h	Povprečni CFU/ml
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	1,2±0,5 x 10 ⁴
celice PSI cl.1 + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	1,4±0,6 x 10 ⁴
celice PSI cl. 1 + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	1,2±0,6 x 10 ⁴
celice PSI cl.1 + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	1,6±0,6 x 10 ⁴
celice PSI cl.1 + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	1,6±0,7 x 10 ⁴
celice PSI cl.1 + LGG + <i>C. jejuni</i>	1,1±0,5 x 10 ⁴

Koncentracija bakterij *C. jejuni* na monosloju celic PSI cl.1 po 17 urni inkubaciji je narasla, po 24 urni inkubaciji je bila še vedno relativno visoka. Probiotiki niso zmanjšali vezave bakterij *C. jejuni* na celice PSI cl.1.

4.6 PREHAJANJE BAKTERIJ *C. jejuni* V CELICE B1OXI IN PSI CL.1, OB HKRATNI INKUBACIJI S PROBIOTIKI

Želeli smo preveriti ali bakterije *C. jejuni* prehajajo skozi monosloj celic B1OXI in PSI cl.1, ob sočasni inkubaciji *C. jejuni* s probiotiki ter v odvisnosti od časa inkubacije. Antibiotik gentamicin smo dodali zato, da smo ločili adherirane *C. jejuni* (gentamicin jih uniči) od znotrajceličnih (gentamicin v celice ne prehaja). Rezultati so prikazujeta Preglednici 23 in 24 ter slike v Prilogi E1 in E2.

Preglednica 23: Prehajanje bakterij *C. jejuni* v piščanče celice B1OXI ob hkratni inkubaciji s probiotiki.

Čas inkubacije	Povprečni CFU/ml
3 h	
celice B1OXI + <i>C. jejuni</i>	$9,4 \pm 0,4 \times 10^1$
celice B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	$1,1 \pm 0,6 \times 10^2$
celice B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	$1,0 \pm 0,5 \times 10^2$
celice B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	$3,0 \pm 0,8 \times 10^3$
Čas inkubacije	Povprečni CFU/ml
17 h	
celice B1OXI + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
Čas inkubacije	Povprečni CFU/ml
24 h	
celice B1OXI + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice B1OXI + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice B1OXI + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice B1OXI + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice B1OXI + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice B1OXI + LGG + <i>C. jejuni</i>	ni rasti

Preglednica 24: Prehajanje bakterij *C. jejuni* v prašičje celice PSI cl.1 ob hkratni inkubaciji s probiotiki.

Čas inkubacije	Povprečni CFU/ml
3 h	
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	$2,0 \pm 0,1 \times 10^3$
celice PSI cl.1 + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl. 1 + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl.1 + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl.1 + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl.1 + LGG + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
Čas inkubacije	Povprečni CFU/ml
17 h	
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	$1,0 \pm 0,0 \times 10^3$
celice PSI cl.1 + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl. 1 + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl.1 + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl.1 + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl.1 + LGG + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
Čas inkubacije	Povprečni CFU/ml
24 h	
celice PSI cl.1 + <i>C. jejuni</i>	$1,0 \pm 0,0 \times 10^3$
celice PSI cl.1 + PCS 20 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl. 1 + PCS 22 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl.1 + PCS 25 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl.1 + PCK 9 + <i>C. jejuni</i>	ni rasti
celice PSI cl.1 + LGG + <i>C. jejuni</i>	ni rasti

Pri celicah B1OXI smo opazili, da je bilo prehajanje *C. jejuni* v celice zelo šibko. Po triurni inkubaciji so v celice prehajale bakterije *C. jejuni* tam, kjer so bile na monosloj inkubirane same ter pri sočasni inkubaciji s probiotiki PCS 20, PCS 22 in LGG. Po 17 in 24 urni inkubaciji pa v nobenem poskusu nismo potrdili znotrajceličnih kampilobaktrov, iz česar smo sklepali, da bakterije niso prehajale v celice.

Pri celicah PSI cl.1 smo opazili, da so bakterije prehajale v celice, kjer so bile na monosloj inkubirane same, brez probiotikov, ob sočasni inkubaciji s probiotiki pa bakterije v celice niso prehajale.

5 RAZPRAVA

5.1 TRANSEPITELIJSKA REZISTENCA IN POTENCIAL (TER IN TEP)

Merjenje transepiteljske električne rezistence (TER) in transepiteljskega električnega potenciala (TEP) je prikazano v preglednicah 13 in 14 ter z grafikoni na slikah v prilogi A1, A2, A3 in A4.

Pričakovali smo, da se bosta TER in TEP zmanjšala tako pri celicah B1OXI, kot tudi pri celicah PSI cl.1, v odvisnosti od časa inkubacije. Predvidevali smo tudi, da bo zmanjševanje TER in TEP manjše pri sočasni inkubaciji *C. jejuni* in probiotikov ter pri inkubaciji samo s probiotiki. Večjih razlik med celicami B1OXI in PSI cl.1 nismo pričakovali.

Translokacija *C. jejuni* povzroči povečano prepustnost monosloja in zmanjša vrednosti TER. Sposobnost enteričnih patogenov, da prehajajo skozi celične bariere, je izjemnega pomena za povzročitev infekcije (Klingberg in sod., 2005). To smo opazili tudi pri našem poskusu. Pri probiotikih na celicah B1OXI, kjer smo kasneje opazili, da *C. jejuni* skoznje prehaja, sta se vrednosti TER in TEP precej zmanjšali. Vrednosti TER in TEP sta se pri probiotikih PCK 9 in LGG, kjer je bilo prehajanje *C. jejuni* slabo ali ga sploh ni bilo, zmanjševali zelo počasi. Pri celicah PSI cl. 1 sta se pri vseh probiotikih vrednosti TER in TEP zelo zmanjšali.

Spremembe TER in TEP v prvih 24 urah inkubacije naj bi bile posledica prehajanja transcelularno in ne paracelularno (Bras in Ketley, 1999). To smo opazili tudi pri poskusu, saj smo v prvih 24 urah opazili *C. jejuni* znotraj celic.

5.2 TOKSIČNOST BAKTERIJ *C. jejuni*, PROBIOTIKOV TER NJIHOVE SOČASNE INKUBACIJE MONOSLOJEV B1OXI IN PSI CL.1

Spremljanje toksičnosti bakterij *C. jejuni*, probiotikov ter njihove kombinacije ob sočasni inkubaciji, za monosloj celic B1OXI in PSI cl.1 je prikazano v preglednicah 15 in 16 ter z grafi na slikah v prilogi B1 in B2. Preverjali smo jo na mikrotitrski ploščici z merjenjem absorbance kristal vijoličnega pri 595 nm. Pričakovali smo, da bo prisotnost bakterij *C. jejuni* za celice B1OXI in PSI cl.1 toksična, kar se pokaže z razpadom monosloja celic. Predvidevali smo, da bo monosloj razpadal počasneje v primeru, ko smo na celice nanesli samo probiotike.

Prav tako smo pričakovali, da bo razpad manjši tam, kjer bodo na celice sočasno inkubirani *C. jejuni* in probiotiki.

Opazili smo, da so celice B1OXI po 48 h še normalno preživele, če smo na njih inkubirali *C. jejuni*, je monosloj razpadel.

PSI cl.1 celice po 48 h niso bile več žive, prav tako ne pri inkubaciji s *C. jejuni*. Iz tega sklepamo, da celice PSI cl.1 propadejo same po sebi in ne zaradi *C. jejuni*. Na podlagi tega smo izbrali tudi ustrezne čase inkubacije. Nesmiselno bi bilo izvajati poskus z 48 urno inkubacijo, saj monosloja sploh ne bi več imeli.

5.3 KONCENTRACIJA PROBIOTIKOV IN BAKTERIJ *C. jejuni* V ODVISNOSTI OD ČASA INKUBACIJE

Koncentracija probiotikov v odvisnosti od časa inkubacije je prikazana v preglednici 17. Spreminjanje koncentracije *C. jejuni* v odvisnosti od časa inkubacije je prikazano v preglednici 18.

Pričakovali smo, da bosta koncentraciji bakterij *C. jejuni* in probiotikov v odvisnosti od časa inkubacije padali. Ugotovili smo, da je koncentracija probiotikov v odvisnosti od časa padala. Razlika med inkubacijo probiotikov na monosloj celic B1OXI in PSI cl.1 je bila le v tem, da je pri celicah B1OXI koncentracija probiotikov po 3 urni inkubaciji rahlo padla, nato pa ponovno rahlo narasla.

Koncentracija *C. jejuni* je pri celicah B1OXI in PSI cl.1 po treh urah inkubacije padla, nato pa ponovno narasla. Pri celicah PSI cl.1 je bilo naraščanje bolj izrazito.

5.4 PREHAJANJE IN VEZAVA BAKTERIJ *C. jejuni* SKOZI/NA MONOSLOJ CELIC B1OXI IN PSI CL. 1, OB HKRATNI INKUBACIJI S PROBIOTIKI, V ODVISNOSTI OD ČASA INKUBACIJE

Prehajanje bakterij *C. jejuni* skozi monosloj celic B1OXI in PSI cl.1, v odvisnosti od časa inkubacije in ob hkratni inkubaciji s probiotiki, prikazujejo preglednice 19 in 20 ter grafi na slikah v prilogi C1 in C2. Vezava bakterij *C. jejuni* skozi monosloj celic B1OXI in PSI cl.1, v

odvisnosti od časa inkubacije in ob hkratni inkubaciji s probiotiki, je prikazana v preglednicah 21 in 22 ter z grafi na slikah v prilogi D1 in D2.

Zgodnja poškodba gostiteljske celice je posledica invazije *C. jejuni*, to pa lahko privede do z diarejo povezanih bolezni (Babakhani in sod., 1993). Po nekaterih podatkih naj bi probiotiki zmanjšali možnost za nastanek z antibiotiki povezane diareje, za kar 52 % (Vasiljevic in Shah, 2008).

Namen poskusa je bil preveriti ali probiotiki preprečijo prehajanje bakterij *C. jejuni* skozi monosloj celic B1OXI in PSI cl.1, v odvisnosti od časa inkubacije. Pričakovali smo, da bodo bakterije *C. jejuni* tam, kjer so bile s celicami B1OXI in PSI cl.1 inkubirane same, dobro prehajale skozi monosloj, in da bo prehajanje bakterij manjše tam, kjer bodo poleg *C. jejuni* na monosloj celic inkubirani še probiotiki. Pri prehajanju bakterij *C. jejuni* skozi monosloj celic B1OXI in PSI cl.1 nismo pričakovali večjih razlik. Podobno smo pričakovali tudi pri vezavi bakterij *C. jejuni* na monosloj celic B1OXI in PSI cl.1, kjer smo sklepali, da ne bo večjih razlik.

Sposobnost probiotikov, da se vežejo na prašičje ali piščanče črevesne celice, je vrstno specifična (Van Deun in sod., 2008a). Učinkovitost probiotikov pa je odvisna tudi od količine, ki jo dodamo (Klingberg in sod., 2005). *Lactobacillus acidophilus* je vpletен v tekmovanje za vezavo s patogeni za receptorska mesta na gostiteljski celici (Schneitz in sod., 1993). Probiotiki tekmujejo za vezavna mesta in tako zaščitijo celice pred vezavo in vstopom bakterij (Langerholc in sod., 2011).

To se je pokazalo tudi pri našem poskusu. Kljub temu, da se je vezava sicer povečevala, je bilo s prehajanjem *C. jejuni* skozi monosloj drugače. Bakterije *C. jejuni*, inkubirane same brez probiotikov, so prehajale skozi monosloj celic B1OXI skozi celoten čas inkubacije. Po 24 urni inkubaciji se je prehajanje še nekoliko povečalo. Ob sočasni inkubaciji *C. jejuni* s probiotiki se je prehajanje bakterij *C. jejuni* skozi monosloj celic B1OXI po 17 urni inkubaciji zmanjšalo, po 24 urni inkubaciji pa se je prehajanje spet nekoliko povečalo. Vsi probiotiki so zmanjšali prehod *C. jejuni*, probiotik PCK 9 pa se je izkazal kot najbolj učinkovit.

Bakterije *C. jejuni*, inkubirane same brez probiotikov, so prehajale skozi monosloj celic PSI cl.1 Ob sočasni inkubaciji *C. jejuni* in probiotikov pa bakterij *C. jejuni* v epitelnih celicah nismo zaznali. Vsi probiotiki so se izkazali kot učinkoviti.

Za učinkovito kolonizacijo so pomembni gibljivi bički (Van Deun, 2008a). Nekateri avtorji ugotavlajo, da je prisotnost flagelina A bolj pomembna od gibljivosti (Wassenar in sod., 1993). Pomembno vlogo pri kolonizaciji črevesja piščancev igra tudi invazivni antigen (Cia), protein, ki se izloči ob prisotnosti piščančjega seruma in črevesne sluznice (Biswas in sod. 2007). Mehanizem vstopa bakterij *C. jejuni* v celico je odvisen od tipa celice in seva. Probiotiki pa lahko odstranijo že vezane patogene na membrano (Nomoto, 2005).

V našem poskusu nismo opazili večjih razlik pri vezavi bakterij na celice B1OXI in PSI cl. Vezava bakterij *C. jejuni* na monosloj celic B1OXI in PSI cl.1 je naraščala s časom inkubacije tudi ob hkratni inkubaciji *C. jejuni* in probiotikov. Po 17 in 24 urni inkubaciji vpliva na zmanjšanje vezave bakterij *C. jejuni* na celice B1OXI in PSI cl.1 ni bilo opaziti.

5.5 PREHAJANJE BAKTERIJ *C. jejuni* V CELICE B1OXI IN PSI CL.1, OB HKRATNI INKUBACIJI S PROBIOTIKI

Prehajanje bakterij *C. jejuni* v celice B1OXI in PSI cl.1, ob sočasni inkubaciji *C. jejuni* s probiotiki ter v odvisnosti od časa inkubacije, je prikazano v preglednicah 23 in 24 ter na slikah v prilogi E1 in E2.

Za kritično oceno prehajanja *C. jejuni* v celice se uporablja test z gentamicinom. Gentamicin je aminoglikozidni antibiotik in ima omejeno sposobnost prehajanja skozi evkariontske celice. Tako pobije tiste bakterije na površini membrane, ne pa tudi tistih, ki prehajajo v celico (Friis in sod., 2005).

Pričakovali smo, da bodo probiotiki preprečili prehajanje bakterij *C. jejuni* v celice ali pa le-tega upočasnili. Privzeli smo tudi, da gentamicin pobije samo zunajcelične bakterije *C. jejuni*, v celice pa ne more vstopiti.

Pri celicah B1OXI je bilo opaziti, da je prehajanje bakterij *C. jejuni* v celice zelo majhno. Ugotovili smo, da po triurni inkubaciji bakterije *C. jejuni* prehajajo v celice tam, kjer so bile na monosloj inkubirane same, kot tudi pri sočasni inkubaciji s probiotiki PCS 20, PCS 22 in LGG. Pri uporabi probiotika PCK 9 nismo oprazili vstopa bakterij *C. jejuni* v celice. Po 17 in 24 urni inkubaciji pa nikjer ni bilo opazne rasti, kar pomeni, da bakterije po daljši inkubaciji niso bile več prisotne v v celicah.

Pri celicah PSI cl.1 ob sočasni inkubaciji s probiotiki rasti *C. jejuni* ni bilo zaznati, kar pomeni, da bakterije v celice niso prehajale. Nasprotno pa smo pri vseh časovnih meritvah v celicah našli prisotne *C. jejuni*, inkubirane na celicah same brez probiotikov.

6 SKLEPI

Iz rezultatov eksperimentalnega dela diplomske naloge lahko podamo naslednje sklepe:

- Bakterije *C. jejuni* se vežejo na piščanče (B1OXI) in prašičje (PSI cl.1) črevesne epitelijske celice in vanje uspešno prehajajo.
- S sočasno inkubacijo živih probiotičnih bakterij rodu *Lactobacillus* smo žeeli preveriti ali lahko piščanče in prašičje črevesne epitelijske celice zaščitimo pred adhezijo in/ali invazijo bakterij *C. jejuni*: Sočasna inkubacija bakterije *C. jejuni* in probiotika PCK 9 (bakterij rodu *Lactobacillus*) je zmanjšala adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* v celičnem modelu piščančjih (B1OXI) črevesnih epitelijskih celic. Pri ostalih opazovanih probiotičnih bakterijah (PCS 20, PCS 22, PCS 25 in LGG) smo opazili le rahlo sposobnost zmanjšanja adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni*, pri obeh celičnih modelih (piščanjčjih in prašičjih) črevesnih epitelijskih celic.
- Učinkovitost probiotikov je bila pri piščančjih (B1OXI) in prašičjih (PSI cl.1) črevesnih epitelijskih celicah primerljiva, razlike so bile opazne le pri probiotiku PCK 9, ki je učinkoviteje zmanjšal adhezivnost in invazivnost bakterij *C. jejuni* v celičnem modelu piščančjih (B1OXI) črevesnih epitelijskih celic.

6.1 PREDLOGI NADALJNJIH RAZISKAV

Pri eksperimentalnem delu diplomske naloge smo imeli tri spremenljivke, bakterije *C. jejuni*, probiotične bakterije (PCS 20, PCS 22, PCS 25, PCK 9 in LGG) in celične kulture črevesnih epitelijskih celic (B1OXI in PSI cl.1), zato lahko tudi pri predlogih nadaljnjih raziskav govorimo o treh smernicah.

Celične kulture črevesnih epitelijskih celic so uporaben model za preučevanje membranskega transporta hrani in zdravil, toksikoloških študij, študij metabolizma in študij odnosa patogen-gostitelj. Pri diplomski nalogi smo preučevali odnos bakterij *C. jejuni* in piščančjih (B1OXI) ter prašičjih (PSI cl.1) črevesnih epitelijskih celic ter vpliv probiotičnih bakterij na adhezijo in invazijo le teh. V zadnjih letih postajajo celične kulture pomembno orodje za študij *in vivo* okolja (Langerholc in sod., 2011). Zanimivo bo videti, kaj bodo prinesle raziskave z njihovo uporabo, saj so tudi odlično nadomestilo za testiranje na živalih.

Sposobnost probiotikov, da se vežejo na prašičje ali piščanče črevesne celice, je vrstno specifična (Van Deun in sod., 2008a). Mi smo ugotovili, da so se predvsem probiotične bakterije PCK 9 izkazale kot učinkovite pri preprečevanju adhezije in invazije bakterij *C. jejuni*, pri piščančjem modelu črevesnih epitelijskih celic (B1OXI). Leta 2006 so sprejeli zakon, ki prepoveduje uporabo vseh antibiotikov za namene rastnih promotorjev pri reji perutnine. Dovoljuje se le uporaba antibiotikov za zdravljenje bakterijskih infekcij, ki pa so lahko predpisani le s strani veterinarja (Edens, 2003). Razvoj in študije uporabe probiotikov so tako še kako smiselne.

V Evropski uniji naj bi bilo v zadnjem času več primerov kampilobakterioze kot salmoneloze (Dasti, 2009). Veljalo bi poiskati tudi druge vire za preprečevanje adhezivnosti in invazivnosti bakterij *C. jejuni*. Eden takšnih je na primer butirat. Butirat je eden izmed pomembnejših produktov bakterijske fermentacije v črevesnem lumnu - zaradi svojih protivnetnih lastnosti in sposobnosti zmanjšanja paracelularne prepustnosti skozi tesne spoje proteinov, omogoči hitrejšo obnovo črevesja po poškodbi (Van Deun in sod., 2008b).

7 VIRI

Altekruze S.F., Stern N.J., Fields P.I., Swerdlow D.L. 1999. *Campylobacter jejuni* – An emerging foodborne pathogen. Emerging Infectious Diseases, 5, 1: 28-35

Alter T., Bori A., Hamed A., Ellerbroek L., Fehlhaber K. 2006. Influence of inoculation levels and processing parameters on the survival of *Campylobacter jejuni* in German style fermented turkey sausages. Food Microbiology, 23: 701-707

Babakhani F.K., Bradley G.A., Joens L.A. 1993. Newborn piglet model for campylobacteriosis. Infection and Immunity, 61: 3466-3475

Bacon D.J., Alm R.A., Hu L., Hickey T.E., Ewing C.P., Batchelor R.A., Trust T.J., Guerry P. 2002. DNA sequence and mutational analyses of the pVir plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176. Infection and Immunity, 70: 6242-6250

Biswas D., Fernando U.M., Reiman C.D., Willson P.J., Townsend H.G.G., Potter A.A., Allan B.J. 2007. Correlation between *in vitro* secretion of virulence-associated proteins of *Campylobacter jejuni* and colonization of chickens. Current Microbiology, 54: 207-212

Blaser M.J., Wells J.G., Feldman R.A., Pollard R.A., Allen J.R. 1983. *Campylobacter* enteritis in the United States: multicenter study. Annals of Internal Medicine, 98: 360-365

Boucher S.N., Slater E.R., Chamberlain A.H.L., Adams M.R. 1994. Production and viability of coccoid forms of *Campylobacter jejuni*. Journal of Applied Microbiology, 77: 303-307

Bras A.M., Ketley M.J. 1999. Transcellular translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarised epithelial monolayers. FEMS Microbiology Letters, 179: 209-215

Brucker M.C. 1986. Gram staining a useful laboratory technique. Journal of Nurse-Midwifery, 31, 3: 156-158

Byrne C.M., Clyne M., Bourke B. 2007. *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells *in vitro*. Microbiology, 153: 561-569

Carrillo C.D., Taboada E., Nash J.H. 2004. Genome-wide expression analyses of *Campylobacter jejuni* NTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *fliA*. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 20327-20338

CDC. 2010. Morbidity and mortality weekly report. 16. april 2010. Atlanta, CDC - Centers for Diseases Control and Prevention: 418-421

<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm5914.pdf> (februar, 2011)

Coldbere-Garapin F., Martin-Latil S., Blondel B., Mousson L., Pelletier I., Autret A., Francois A., Niborski V., Grompone G., Catonnet G., van de Moer A. 2007. Prevention and treatment of enteric viral infections: possible benefits of probiotic bacteria. *Microbes and Infection*, 9: 1623-1631

Dasti J.I., Malik Tareen A., Lugert R., Zautner A.E., Groß U. 2010. *Campylobacter jejuni*: A brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 4: 205-211

Donnelly J. P. 1999. Commentary on the MAFF technical report: a review of antimicrobial resistance in the food chain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 12: 63 -65

De Melo M.A., Gabbiani G., Pchere J.C. 1989. Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of HEp-2 cells. *Infection and Immunity*, 57: 2214-2222

Edens F.W. 2003. An alternative for antibiotic use in poultry: Probiotics. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 5, 2: 75-97

EFSA. 2009. The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union 2007. Parma, EFSA - European Food Safety Authority: 109-133

<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/223r.pdf> (maj, 2011)

Everest P.H., Goossens H., Buztler J.P., Lloyd D., Knutton S., Ketley J.M., Williams P.H. 1992. Differentiated Caco-2 cells as a model for enteric invasion by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 37: 319-325

Fernando U., Biswas D., Allan B., Willson P., Potter A.A. 2007. Influence of *Campylobacter jejuni* *fliA*, *rpoN* and *flgK* genes on colonization of the chicken gut. *International Journal of Food Microbiology*, 118: 194-200

Fooks L.J, Gibson G.R. 2002. *In vitro* investigations of effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 39: 67-75

Friedman C. R., Hoekstra R.M., Samuel M., Marcus R., Bender J., Shiferaw B., Reddy S., Ahuja S.D., Helfrick D.L., Hardnett F., Carter M., Anderson B., Tauxe R.V. 2004. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infection in the United States: A case-control study in FoodNet sites. *Clinical Infectious Diseases*, 38: 285-296

Friis L.M., Pearson B.M., Pin C., Weells J.M. 2005. *In vitro* cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *Journal of Microbiological Methods*, 61: 145-160

Gupta V., Garg R. 2009. Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27, 3: 202-209

Haschke F., Wang W., Ping G.Z., Varavithya W., Pdhipak A. Rochat F., LinkAmster H., Pfeifer A., DialloGinstl E., Steenhout P. 1998. Clinical trials prove the safety and efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium* Bb12 in folow-up formula and growing-up milks. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 146: 26-30

Havenaar R., Huis in't Veld J.H.J. 1992. Probiotics: a general view. V: The lactic acid bacteria in health and disease. Vol. 1. Wood B.J.B. (ed.). London, Elsevier Applied Science: 151-170

Hendrixson D.R., DiRita V.J. 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. Molecular Microbiology, 52: 471-484

Hendrixson D.R. 2006. A phase-variable mechanism controlling the *Campylobacter jejuni* FlgR response regulator influences commensalism. Molecular Microbiology, 61: 1646-1659

Holzapfel W.H., Haberer P., Snel J., Schillinger U., Huisin't Veld J.H.J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. International Journal of Food Microbiology, 41: 85–101

Hugdahl M.B., Beery J.T., Doyle M.P. 1988. Chemotactic behaviour of *Campylobacter jejuni*. Infection and Immunity, 56: 1560-1566

Humphrey T., O'Brien S., Madsen M. 2007. Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. International Journal of Food Microbiology, 117: 237-257

IVZ. 2010. Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni 2009. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja: 47-48

http://www.ivz.si/nalezljive_bolezni_aktualno?pi=5&_5_Filename=2491.pdf&_5_MdiaId=2491&_5_AutoResize=false&pl=29-5.3. (maj, 2011)

Ketley J.M. 1997. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. Microbiology, 143: 5-21

Klingberg T.D., Pedersen M.H., Cencic A., Budde B.B. 2005. Application of measurements of transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial cell monolayers to evaluate probiotic activity. Applied and Environmental Microbiology, 71, 11: 7528-7530

Konkel M.E., Cieplak W.Jr. 1992. Altered synthetic response of *Campylobacter jejuni* to cocultivation with human epithelial cells is associated with enhanced internalization. Infection and Immunity, 60: 4945-4949

Konkel M.E., Mead D.J., Hayes S.F., Cieplak W., Jr. 1992. Translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarized epithelial cell monolayer cultures. *Journal of Infectious Diseases*, 166: 308-315

Konkel M.E., Garvis S.G., Tipton S.L., Anderson D.E., Cieplak W., Jr. 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, 24: 953-963

Kopecko D.J., Hu L., Zaal K.J.M. 2001. *Campylobacter jejuni* – microtubule-dependent invasion. *Trends in Microbiology*, 9: 389-396

Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.

Krause-Gruszczynska M., Van Alphen L.B., Oyarzabal O.A., Alter T., Hänel I., Schliephake A., König W., Van Putten J.P.M., Konkel M.E., Backert S. 2007. Expression patterns and role of the CadF protein in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 274, 1: 9-16

Langerholc T., Maragkoudakis P.A., Wollgast J., Gradišnik L., Cencič A. 2011. Novel and established intestinal cell line models – An indispensable tool in food science and nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 1: 11-20

Lilly D.M., Stillwell R.H. 1965. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147: 747-748

MacCallum A., Hardy S.P., Everest P.H. 2005. *Campylobacter jejuni* inhibits the absorptive transport functions of Caco-2 cells and disrupts cellular tight junctions. *Microbiology*, 151: 2451–2458

Maragkoudakis P.A., Chingwaru W., Gradišnik L., Tsakalidou E., Cencič A. 2010. Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection. *International Journal of Food Microbiology*, 141: 91-97

Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M. in Tauxe R.V. 1999. Food related illness and death in United States. Emerging Infectious Diseases, 5: 607-625

Metchnikoff E. 1908. The prolongation of life. Optimistic studies. New York, The Knickerbocker Press: 343 str.

Mihaljević R.R., Šikić M., Klančnik A., Brumini G., Možina S.S., Abram M. 2007. Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. Microbial Pathogenesis, 43: 120–125

Muramoto K., Makishima S., Aizawa S., MacNab R. 1999. Effect of hook subunit concentration on assembly and control of length of the flagellar hook of *Salmonella*. Journal of Bacteriology, 181: 5508-5813

Netherwood T., Gilbert H.J., Parker S.D., O'Donnell A.G. 1999. Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology, 65, 11: 5134-5138

Nomoto K. 2005. Prevention of infections by probiotics. Journal of Bioscience and Bioengineering, 100, 6: 583-592

Peterson M.C. 1994. Rheumatic manifestations of *Campylobacter jejuni* and *C. fetus* infections in adults. Scandinavian Journal of Rheumatology, 23: 167-170

Pickett C.L., Whitehouse C.A. 1999. The cytolethal distending toxin family. Trends in Microbiology, 7: 292–297

Reid G., Jass J., Sebulsky M.T., McCormick J.K. 2003. Potential use of probiotics in clinical practice. Clinical Microbiology Reviews, 16: 658-672

Russell R.G., O'Donnoghue M., Blake Jr. D.C., Zulty J., DeTolla L.J. 1993. Early colonic damage and invasion of *Campylobacter jejuni* in experimentally challenged infant *Macaca mulatta*. *Journal of Infectious Diseases*, 168, 1: 210-215

Schneitz C., Nuotlo L., Lounatma K. 1993. Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *Journal of Applied Bacteriology*, 74: 290-294

Smole Možina S., Kurinčič M., Klančnik A., Mavri A. 2011a. *Campylobacter* and its multiresistance in the food chain. *Trends in Food Science & Technology*, 22: 91 – 98

Smole Možina S., Kovač J., Lušicky M. 2011b. Prevalence and antibiotic resistance of thermotolerant *Campylobacter* spp. in retail chicken meat - trends in Slovenia and EU. V: Animal hygiene and sustainable livestock production: innovations in hygiene, nutrition and housing for healthy food from healthy animals. Proceedings of the 15th International Congress of the International Society for Animal Hygiene, July 3 - 7, Vienna, Austria. Köfer J., Schobesberger H. (eds.). Brno, International Society for Animal Hygiene: 169-171

Snelling W.J., Matsuda M, Moore J.E., Dooley J.S.G. 2005. Under the mycroscope - *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 297-302

Šikić Pogačar M., Rubeša-Mihaljević R., Klančnik A., Brumini G., Abram M., Smole Možina S. 2009. Survival of stress exposed *Campylobacter jejuni* in the murine macrophage J774 cell line. *International Journal of Food Microbiology*, 129: 68-73

Šikić Pogačar M., Klančnik A., Smole Možina S., Cencič A. 2010. Attachment, invasion, and translocation of *Campylobacter jejuni* in pig small-intestinal epithelial cells. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5: 589-595

Takata T., Fujimoto S., Amako K. 1992. Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter jejuni* and their colonization of the mouse intestinal tract. *Infection and Immunity*, 60: 3596-3600

Van Deun K., Pasmans F., Ducatelle R., Flahou B., Vissenberg K., Martel A., Van den Broeck W., Van Immerseel F., Haesebrouck F. 2008a. Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. Veterinary Microbiology, 130: 285-297

Van Deun K., Pasmans F., Van Immerseel F., Ducatelle R., Haesebrouck F. 2008b. Butyrate protects Caco-2 cells from *Campylobacter jejuni* invasion and translocation. British Journal of Nutrition, 100: 480-484

Vasiljevic T., Shah N.P. 2008. Probiotics: From Metchnikoff to bioactives. International Diary Journal, 18: 714-728

Wasenar T., Van Der Zeijst B.A.M., Ayling R., Newell D.G. 1993. Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. Journal of General Microbiology, 139: 1171-1175

Zorman T., Heyndrickx M., Uzunović-Kamberović S., Smole Možina S. 2006. Genotyping of *Campylobacter coli* and *C. jejuni* from retail chicken meat and humans with campylobacteriosis in Slovenia and Bosnia and Herzegovina. International Journal of Food Microbiology, 110: 24-33

ZAHVALA

Mentorici dr. Sonji Smole Možina in somentorici dr. Avreliji Cencič se zahvaljujem, da sta me sprejeli pod svoje mentorstvo. Predvsem bi se rada zahvalila dr. Sonji Smole Možina za vso pomoč, strokovne nasvete ter hiter in kritičen pregled diplomskega dela.

Iskrena hvala delovnemu mentorju dr. Tomažu Langerholcu za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela diplomske naloge. Hvala za vse opombe, pripombe in vzpodbudo pri pisanju diplomskega dela ter za strokoven in kritičen pregled le te.

Zahvalila bi se tudi vsem zaposlenim Katedre za mikrobiologijo, molekularno biologijo, biokemijo in biotehnologijo, Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerze v Mariboru, še posebej Lidiji Gradišnik in Walterju Chingwaruju.

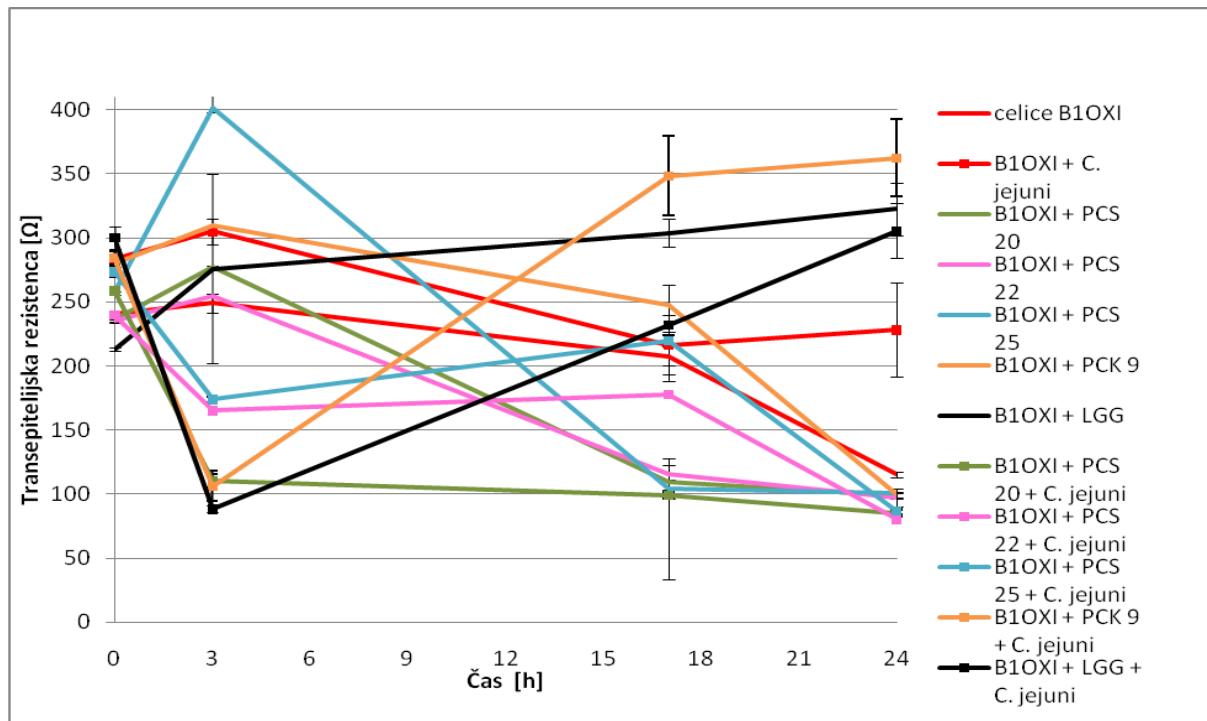
Za strokoven, kritičen in hiter pregled diplomske naloge ter za razumevanje se zahvaljujem recenzentki dr. Romani Marinšek Logar.

Posebna zahvala gre mamici in atiju. Brez vajine stalne podpore, spodbujanja, finančne pomoči, pa tudi »štrabciranja« danes ne bi bila kjer sem. Žejo tudi ti si del tega, hvala!

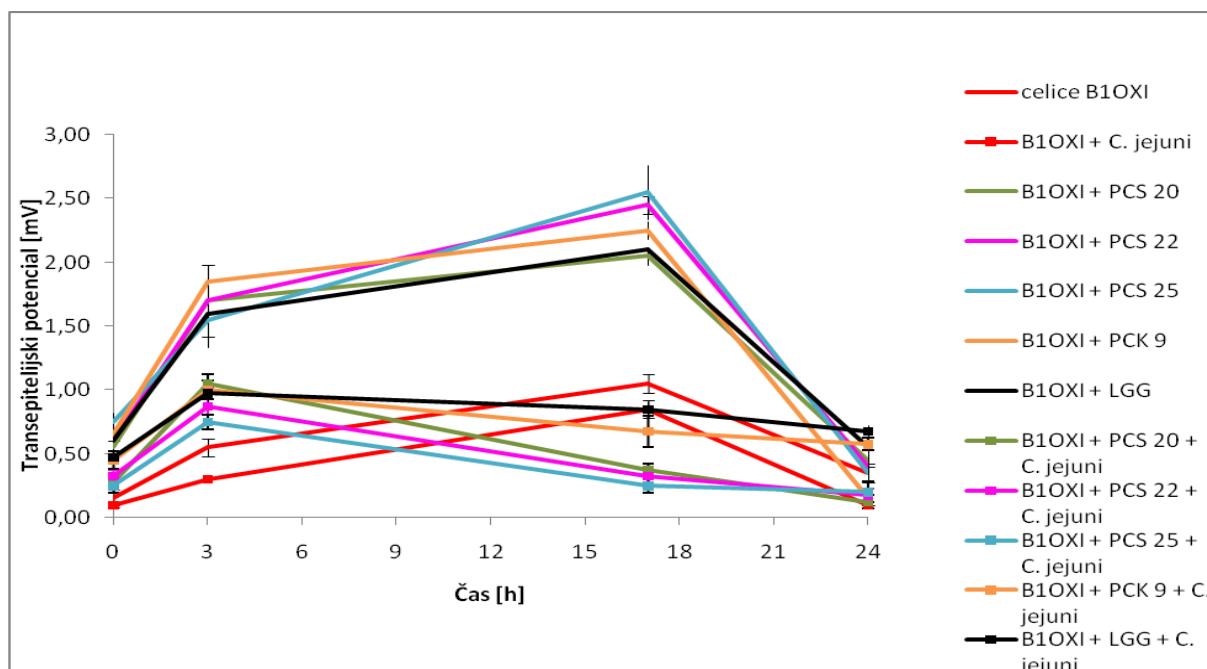
Štruč in Piko, hvala za vso pomoč in piko na i pripravi diplomske naloge, predvsem pa za vse lepe spomine, ki smo jih ustvarili skozi študijska leta. Za vzpodbudo, pomoč in prijateljske nasvete hvala tudi vama, Barbi in Gaja.

Bogi, hvala za prečudovitih pet let!

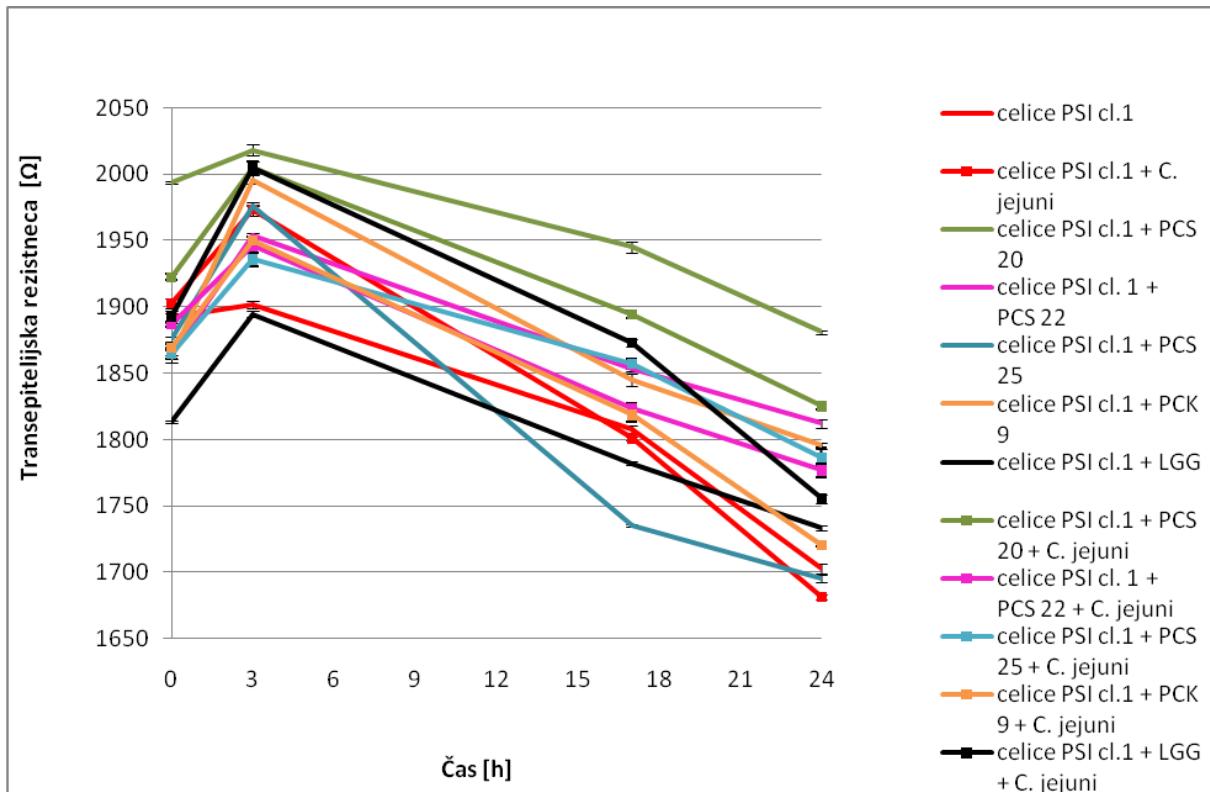
PRILOGE



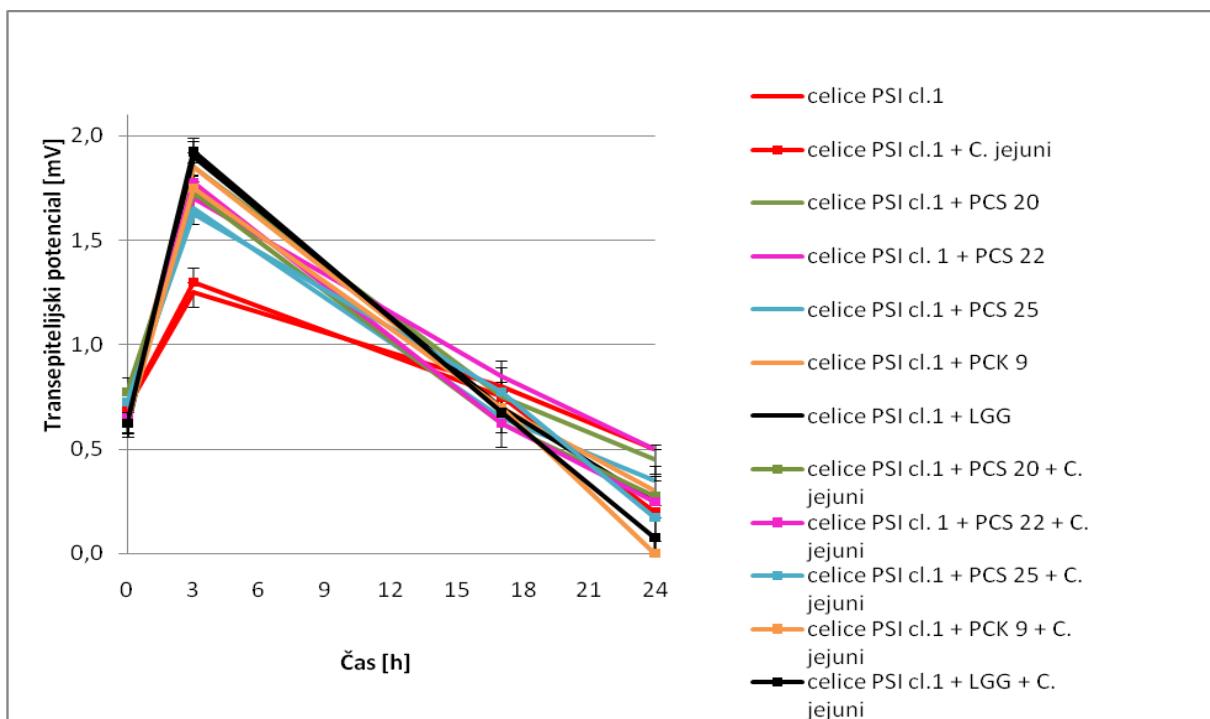
Priloga A1: Transepiteljska rezistenca piščančjih celic B1OXI v odvisnosti od časa inkubacije.



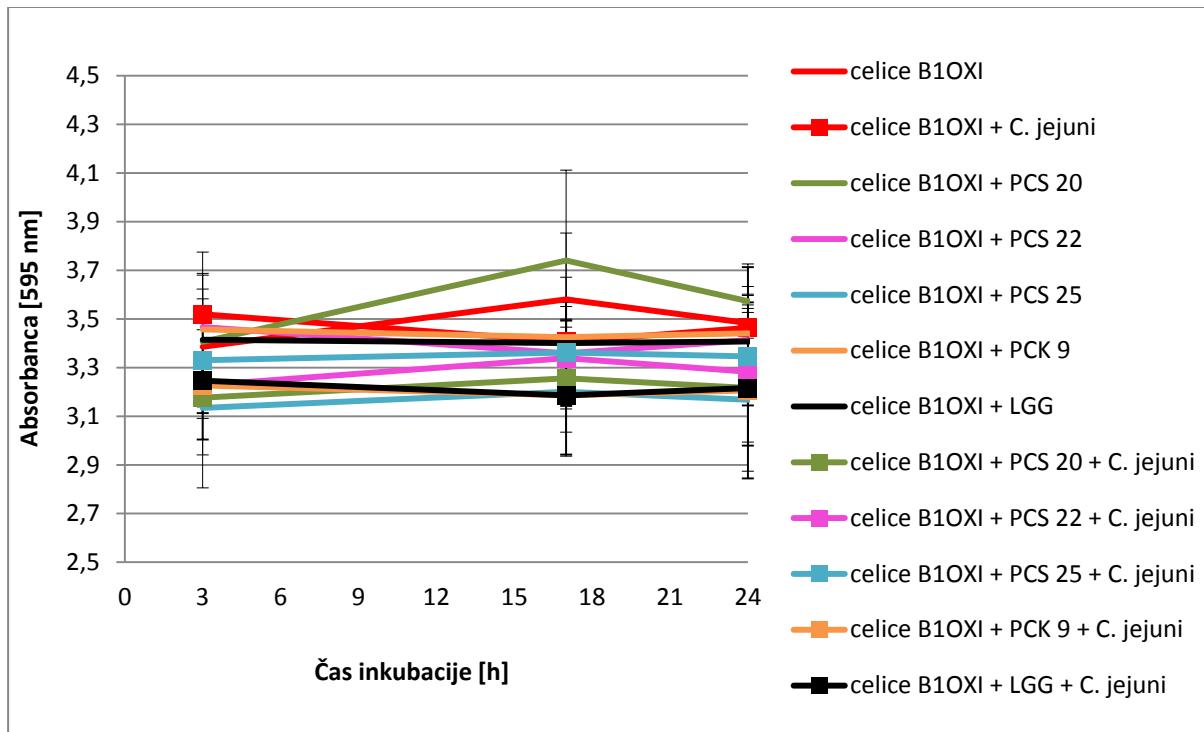
Priloga A2: Transepiteljski potencial piščančjih celic B1OXI v odvisnosti od časa inkubacije.



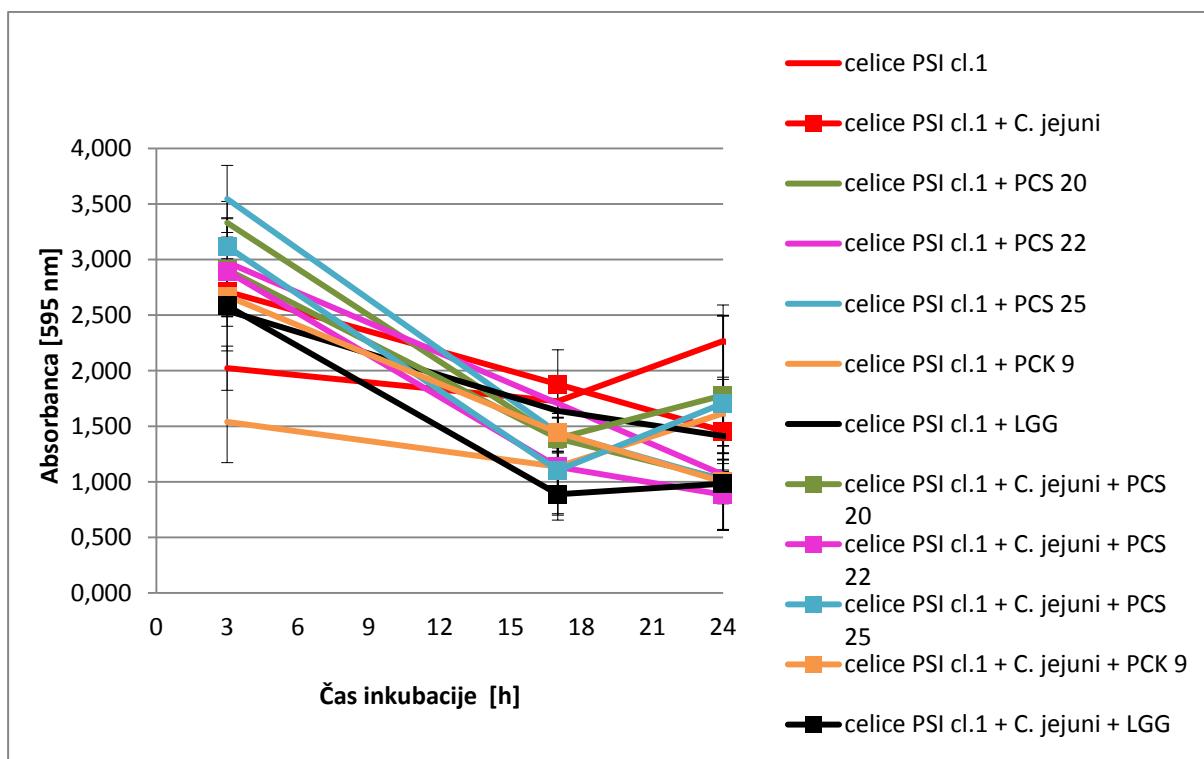
Priloga A3: Transepiteljska rezistenca prašičjih celic PSI cl.1 v odvisnosti od časa inkubacije.



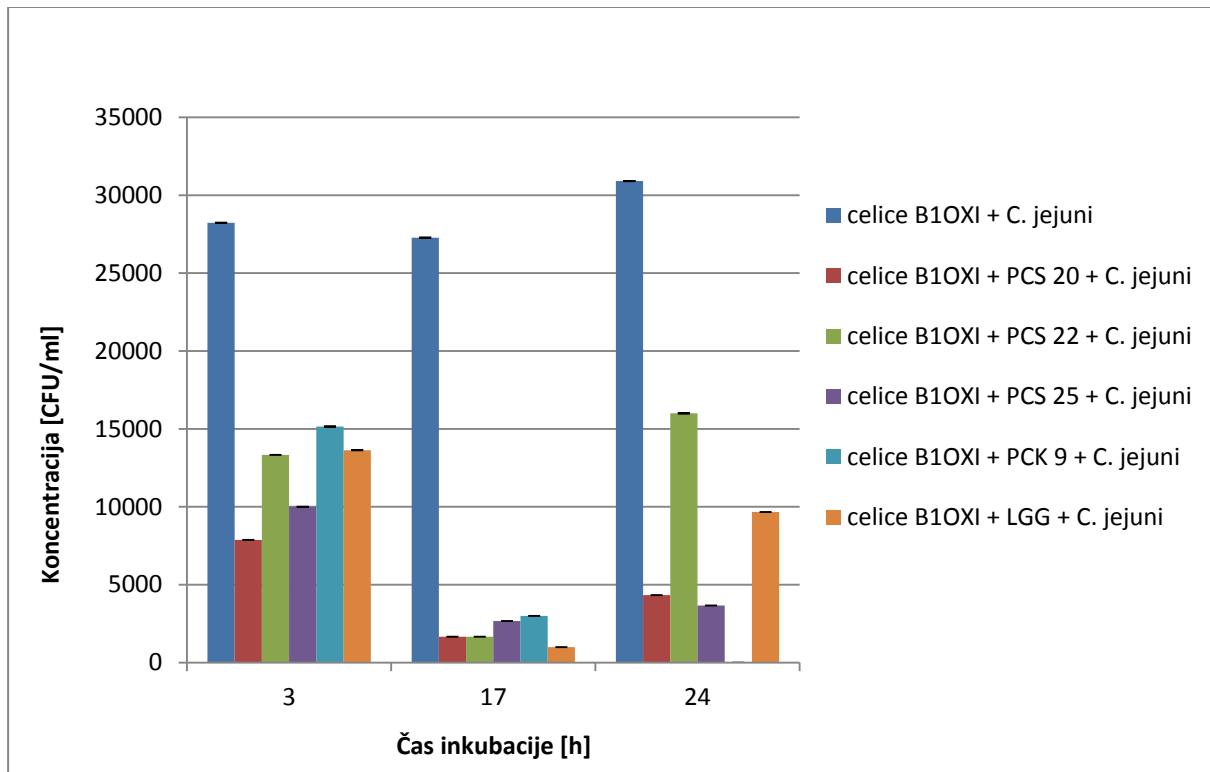
Priloga A4: Transepiteljski potencial prašičjih celic PSI cl.1 v odvisnosti od časa inkubacije.



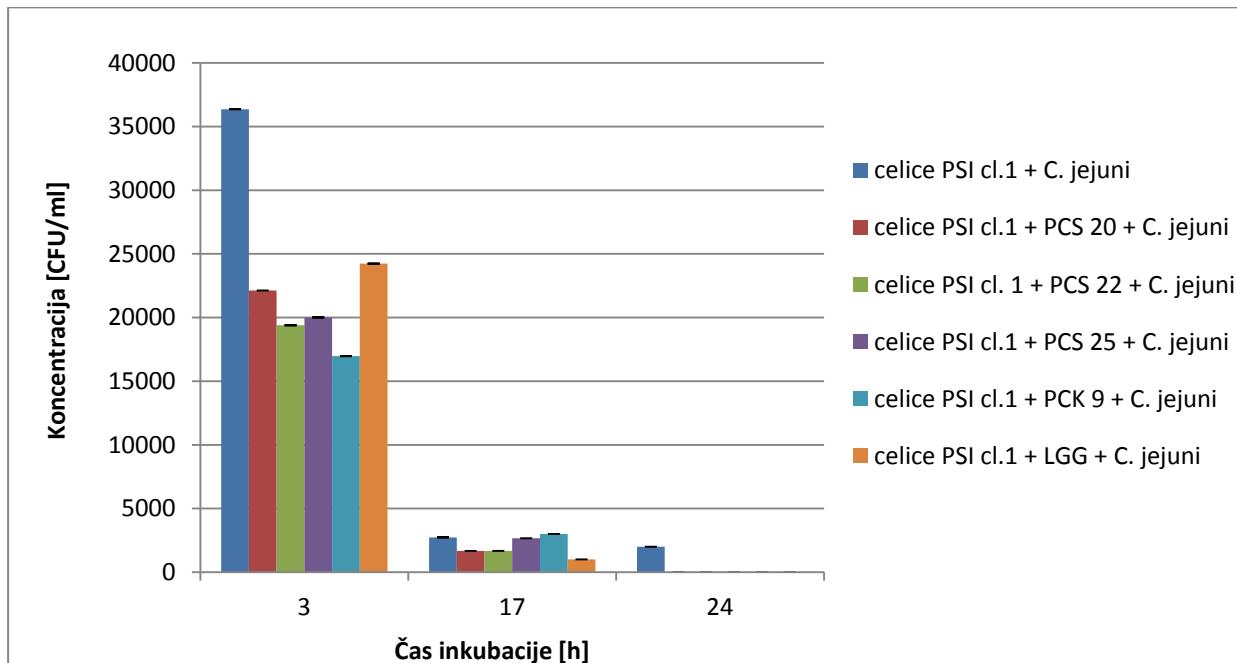
Priloga B1: Preverjanje toksičnosti *C. jejuni* in probiotikov za piščančje celice B1OXI z merjenjem absorbance po različnih časih inkubacije.



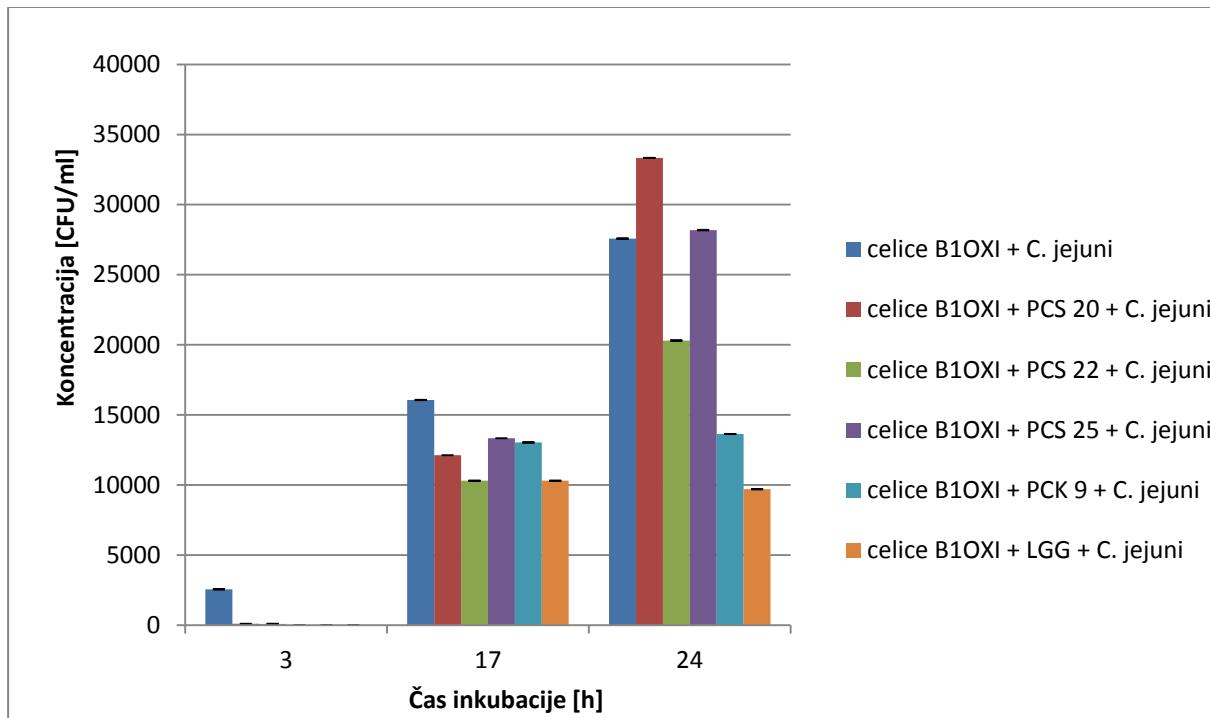
Priloga B2: Preverjanje toksičnosti *C. jejuni* in probiotikov za prašičje celice PSI cl.1 z merjenjem absorbance po različnih časih inkubacije.



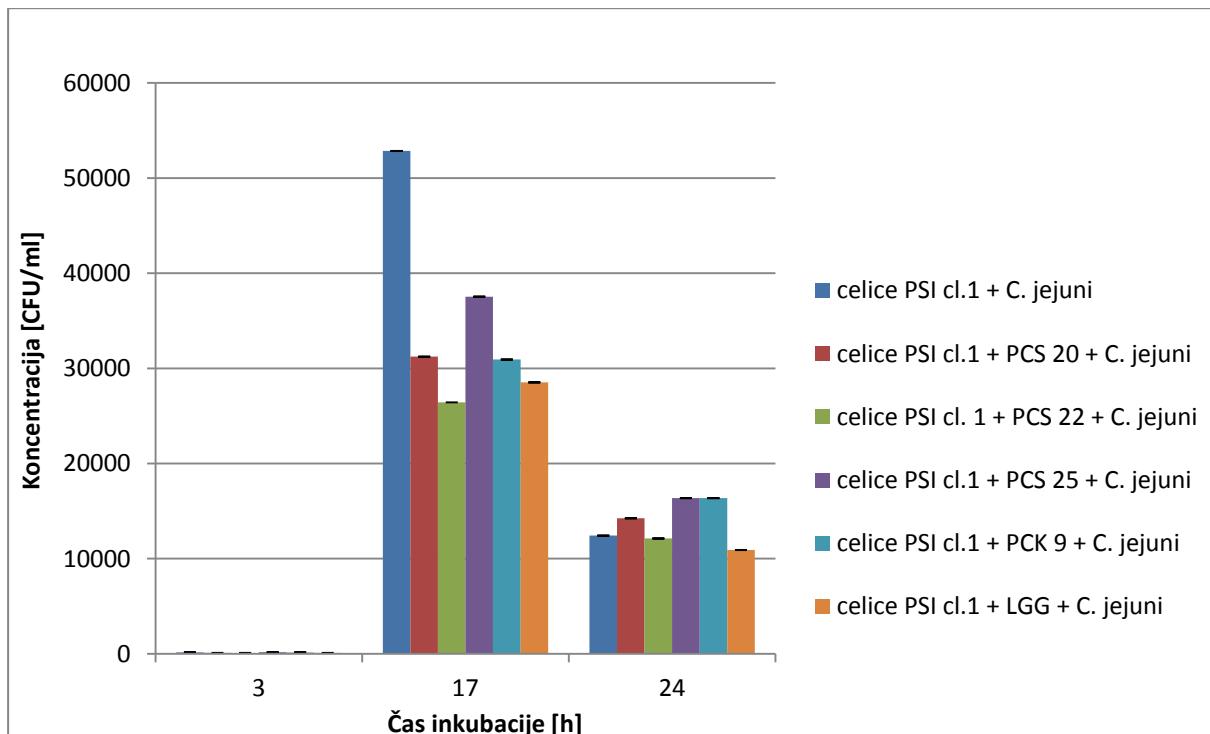
Priloga C1: Prehajanje bakterij *C. jejuni* skozi piščančje celice B1OXI ob hkratni inkubaciji s probiotiki.



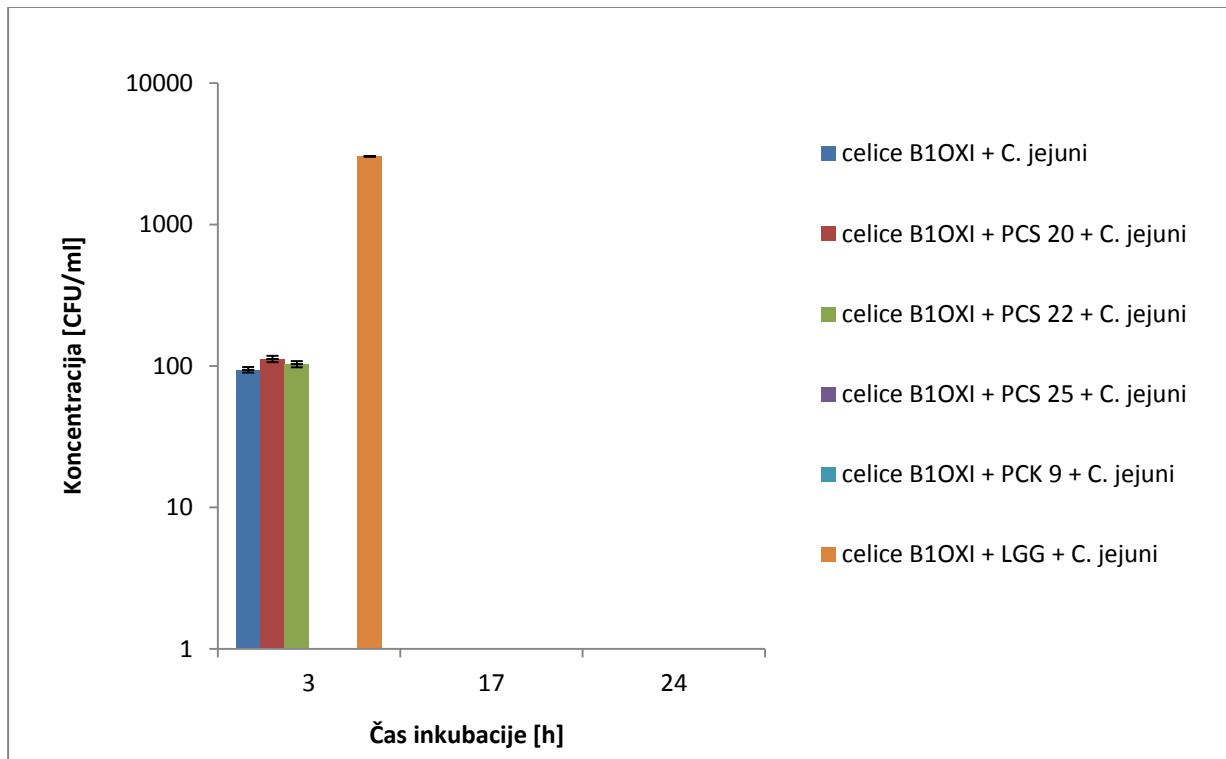
Priloga C2: Prehajanje bakterij *C. jejuni* skozi prašičje celice PSI cl.1 ob hkratni inkubaciji s probiotiki.



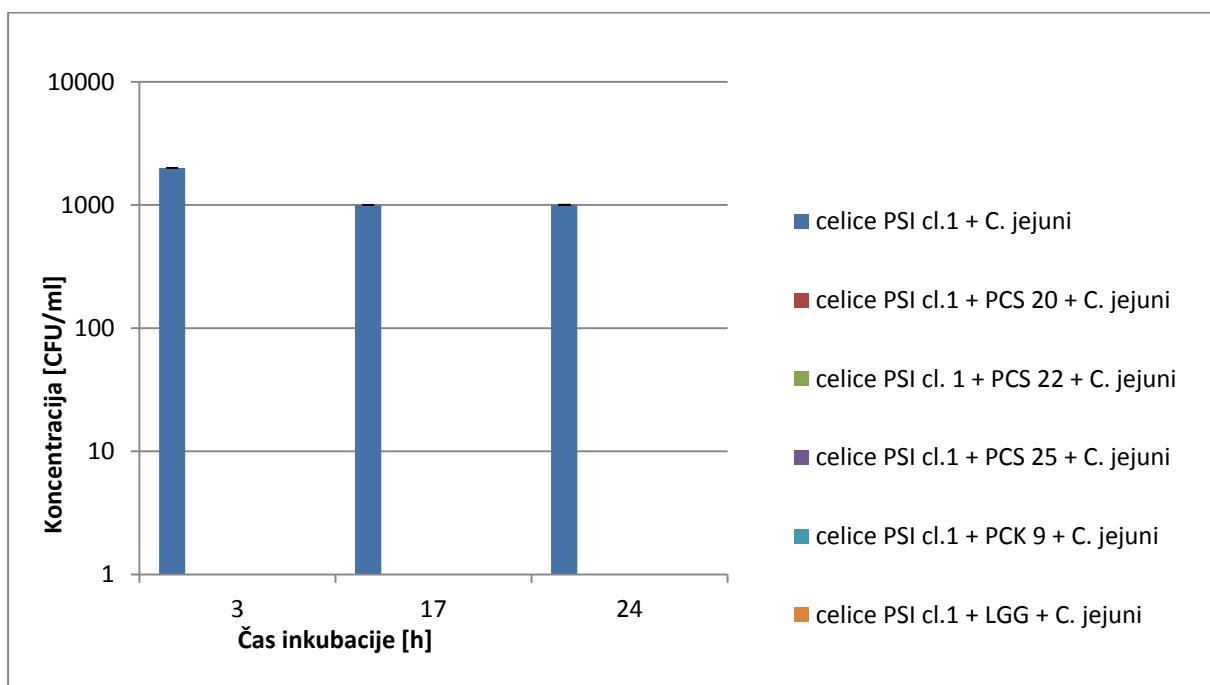
Priloga D1: Vezava bakterij *C. jejuni* na piščančje celice B1OXI ob hkratni inkubaciji s probiotiki.



Priloga D2: Vezava bakterij *C. jejuni* na prašičje celice PSI cl.1 ob hkratni inkubaciji s probiotiki.



Priloga E1: Prehajanje bakterij *C. jejuni* v piščanče celice B1OXI ob hkratni inkubaciji s probiotiki v odvisnosti od časa inkubacije.



Priloga E2: Prehajanje bakterij *C. jejuni* v prašičje celice PSI cl.1 ob hkratni inkubaciji s probiotiki v odvisnosti od časa inkubacije.