UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

Biljana HACIN

MEHANIZMI PROBIOTIČNEGA DELOVANJA IZBRANIH LAKTOBACILOV ČLOVEŠKEGA IN ŽIVALSKEGA IZVORA

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK: 579.22/.24: 636.087: 616.34-097 (043.3)

Biljana HACIN, dr. vet. med.

MEHANIZMI PROBIOTIČNEGA DELOVANJA IZBRANIH LAKTOBACILOV ČLOVEŠKEGA IN ŽIVALSKEGA IZVORA

Doktorska disertacija

MECHANISMS OF PROBIOTIC ACTION OF SELECTED LACTOBACILLI OF HUMAN AND ANIMAL ORIGIN

Doctoral Thesis

Ljubljana, 2010

Biljana Hacin

MEHANIZMI PROBIOTIČNEGA DELOVANJA IZBRANIH LAKTOBACILOV ČLOVEŠKEGA IN ŽIVALSKEGA IZVORA

Delo je bilo opravljeno na:

Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, predstojnica prof. dr. Irena Rogelj

Forumu za funkcionalno hrano, Univerze v Turku na Finskem,
predstojnik prof. Seppo Salminen, PhD

Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani, predstojnik prof. dr. Srečko Koren

Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani,
predstojnica prof. dr. Nina Gale

Oddelku za toksikologijo na Lek-u pod mentorstvom doc. dr. Manice Černe.

in Oddelku za citopatologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani,
vodja oddelka za citopatologijo doc. dr. Živa Pohar-Marinšek

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne _____

Mentor: prof. dr. Alojz Ihan

Somentorica: znan. sod. dr. Bojana Bogovič Matijašić

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Milka Vrecl

Članica: doc. dr. Irena Zdovc

Članica: prof. dr. Irena Rogelj

IZJAVA O DELU

Izjavljam, da je doktorsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Biljana Hacin

Ljubljana, 8. 3. 2010

VSEBINA

IZVLEČEK 13

ABSTRACT 14

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI 15

1 UVOD 17

1.1 HIPOTEZE 18

2 PODATKI IZ LITERATURE 20

2.1 PROBIOTIKI 20

2.1.1 Mlečnokislinske bakterije kot probiotiki 22

2.1.1.1 Laktobacili 23

2.1.1.2 Laktobacili in črevesje 26

2.1.2 Probiotične lastnosti 28

2.1.2.1 Protibakterijsko delovanje 28

2.1.2.2 Adhezija 29

2.1.2.2.1 Črevesne celične linije človeškega izvora 31

2.1.2.2.2 Črevesna sluz človeškega in živalskega izvora 32

2.1.2.3 Vpliv na imunski odziv 33

2.1.2.3.1 Celična linija THP-1 33

2.1.2.3.2 Citokini 34

2.2 ČREVESJE IN IMUNSKI SISTEM 37

2.2.1 Toll-u podobni receptorji (TLR-ji) 39

2.2.2 receptorji NOD 40

2.2.3 Transkripcijski faktor NF-κB 40

3 MATERIAL IN METODE 42

3.1 REAGENTI IN GOJIŠČA 42

3.2 BAKTERIJSKI SEVI IN GOJENJE BAKTERIJ 44

3.2.1 Sevi rodu *Lactobacillus* človeškega izvora 44

3.2.2 Sevi rodu *Lactobacillus* živalskega izvora 45

3.2.3 Patogeni in potencialno patogeni sevi 46

3.3 UGOTAVLJANJE SPOSOBNOSTI PREŽIVETJA V SIMULIRANEM ŽELODČNEM IN ČREVESNEM SOKU 48

3.4 UGOTAVLJANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI 48

3.4.1 Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti z metodo lise na agarju (MLA) 48

3.4.1.1 Priprava brezceličnih supernatantov 49

3.4.2 Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti z metodo difuzije v agarju (MDA) 49

3.5 UGOTAVLJANJE VARNOSTI PROBIOTIKOV 49

3.5.1 Razgradnja sluzi 49

3.5.1.1 Čiščenje prašičje želodčne sluzi 49

3.5.2 Ugotavljanje odpornosti proti antibiotikom 50

3.6 UGOTAVLJANJE HIDROFOBNOSTI 51

3.7 UGOTAVLJANJE SPOSOBNOSTI ADHEZIJE (PRIPENJANJA MIKROORGANIZMOV) 51

3.7.1 Celice Caco-2 52

3.7.2 Gojišče za celice Caco-2 52

3.7.3 Gojenje celic Caco-2 52

3.7.4 Črevesna sluz človeškega in živalskega izvora 53

3.7.5 Sposobnost adhezije na celice Caco-2 53

3.7.6 Sposobnost adhezije in testi tekmovanja na sluzi človeškega in prašičjega izvora 54

3.8 UGOTAVLJANJE VPLIVA IZBRANIH LAKTOBACILOV NA CITOKINSKI ODZIV CELIČNE LINIJE THP-1 55

3.8.1 Celice THP-1 55

3.8.2 Gojenje celic THP-1 55

3.8.3 Priprava celic THP-1 za poskus 56

3.8.4 Priprava mikroorganizmov za poskus 56

3.8.5 Potek poskusa 56

3.8.5.1 Vrednotenje citokinov z metodo pretočne citometrije 57

3.8.5.2 Postopek za pripravo poskusa 58

3.9 UGOTAVLJANJE VPLIVA PROBIOTIČNE BAKTERIJE *L. GASSERI* K7 (RIF^R) NA MIŠI SEVA C57BL/6J OB SOČASNI APLIKACIJI ENTEROHEMORAGIČNE *E. COLI* O157:H7-POSKUS *IN VIVO* 59

3.9.1 Potek poskusa 61
3.9.2 Gojenje in priprava mikroorganizmov 62
3.9.3 Aplikacija mikroorganizmov 63
3.9.4 Odvzem vzorcev blata 63
3.9.5 Odvzem vzorcev krvi 63
3.9.5.1 Odvzem krvi za krvno sliko in diferencialno belo krvno sliko 64
3.9.5.2 Odvzem krvi za vrednotenje fagocitoze 64
3.9.5.2.1 Test fagocitoze 64
3.9.5.2.2 Postopek za pripravo poskusa 65
3.9.6 Postopek za izvedbo raztelesbe 66
3.9.7 Priprava organov za histološke analize 67
3.9.7.1 Prepajanje organov s paraplastom 67
3.9.7.2 Izdelava parafinskih blokov 67
3.9.7.3 Priprava predmetnih stekelc za nanašanje rezin 68
3.9.7.4 Rezanje parafinskih blokov z drsnim rezalnikom ali mikrotomom 68
3.9.7.5 Barvanje histoloških preparatov 68
3.9.8 Priprava organov za imunohistološke analize 69
3.9.9 Mikrobiološka analiza blata, organov in črevesne vsebine 70
3.9.9.1 Priprava vzorcev 70
3.9.9.2 Ugotavljanje prisotnosti *E. coli* O157: H7 71
3.9.9.3 Ugotavljanje prisotnosti K7 (Rif^r) 72
3.10 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV 73

4 REZULTATI 74

4.1 PREŽIVETJE IZBRANIH SEVOV LAKTOBACILOV V SIMULIRANEM ŽELODČNEM IN ČREVESNEM SOKU 74
4.2 UGOTAVLJANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI 78
4.2.1 Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti z metodo lise na agarju (MLA) 78
4.2.2 Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti z metodo difuzije v agarju (MDA) 79
4.3 UGOTAVLJANJE VARNOSTI PROBIOTIKOV 80
4.3.1 Razgradnja črevesne sluzi 80
4.3.2 Odpornost proti antibiotikom 82
4.4 HIDROFOBNOST 85

4.5 ADHEZIJA 86

4.5.1 Adhezija izbranih izolatov človeškega in prašičjega izvora na sluz človeškega in prašičjega izvora ter celično linijo Caco-2 86

4.5.2 Adhezija izbranih izolatov na sluz iz različnih delov prašičjega črevesja 87

4.5.3 Vpliv izbranih laktobacilov na adhezijo *S. aureus* in *E. coli* na sluz človeškega in prašičjega izvora 88

4.6 UGOTAVLJANJE VPLIVA IZBRANIH LAKTOBACILOV NA CITOKINSKI ODZIV CELIČNE LINIJE THP-1 92

4.7 VPLIV PROBIOTIČNE BAKTERIJE *L. GASSERI* K7 (RIF^R) NA MIŠI SEVA C57BL/6J OB SOČASNI APLIKACIJI ENTEROHEMORAGIČNE *E. COLI* O157:H7 97

4.7.1 Teža živali in prirast 97

4.7.2 Poraba krme 100

4.7.3 Opazovanje poskusnih živali 100

4.7.4 Analize krvi 100

4.7.4.1 Krvna slika 101

4.7.4.2 Diferencialna bela krvna slika 102

4.7.4.3 Test fagocitoze 103

4.7.5 Mikrobiološke analize 104

4.7.5.1 Vrednotenje števila mlečnokislinskih bakterij v blatu 105

4.7.5.2 Vrednotenje števila koliformnih bakterij v blatu 106

4.7.5.3 Vrednotenje števila mlečnokislinskih bakterij v blatu, izraslih na gojišču MRS z dodatkom rifampicina 107

4.7.5.4 Vrednotenje števila *E. coli* O157:H7 v blatu 108

4.7.5.5 Vrednotenje števila mikroorganizmov v želodcu in vsebini črevesja 108

4.7.5.6 Vrednotenje števila mikroorganizmov na črevesni sluznici 109

4.7.5.7 Vrednotenje števila mikroorganizmov v organih 109

4.7.6 Histološke analize 109

4.7.6.1 Morfometrične analize črevesnih resic teščega črevesa 110

4.7.6.2 Morfometrične analize črevesnih resic vitega črevesa 111

4.7.6.3 Morfometrične analize debeline sluznice kolona 112

4.7.6.4 Skupna površina limfatičnega tkiva teščega črevesa 113

4.7.6.5 Skupna površina limfatičnega tkiva vitega črevesa 114

4.7.7 Imunohistološke analize 115

5 RAZPRAVA IN SKLEPI 118

5.1 RAZPRAVA 118

5.1.1 Preživetje izbranih sevov laktobacilov v simuliranem želodčnem in črevesnem soku 119

5.1.2 Varnost probiotikov 120

5.1.2.1 Sposobnost razgradnje sluzi 120

5.1.2.2 Občutljivost za antibiotike 121

5.1.3 Protibakterijsko delovanje 123

5.1.4 Adhezija (sposobnost pripenjanja mikroorganizmov) 125

5.1.4.1 Hidrofobnost 125

5.1.4.2 Adhezija izbranih izolatov človeškega in prašičjega izvora na sluz človeškega in prašičjega izvora ter celično linijo Caco-2 126

5.1.4.3 Adhezija izbranih izolatov na sluz iz različnih delov prašičjega črevesja 128

5.1.4.4 Vpliv izbranih laktobacilov na adhezijo *S. aureus* in *E. coli* na sluz človeškega in prašičjega izvora 129

5.1.5 Probiotiki in njihov vpliv na izločanje citokinov 130

5.1.6 Vpliv probiotične bakterije *L. gasseri K7* (Rif^r) na miši seva C57BL/6J ob sočasni aplikaciji *E. coli* O157:H7-poskus *in vivo* 134

5.1.6.1 Prirast in poraba krme 134

5.1.6.2 Analize krvi 135

5.1.6.2.1 Krvna slika 135

5.1.6.2.2 Fagocitoza 136

5.1.6.3 Mikrobiološke analize 137

5.1.6.4 Histološke analize 140

5.1.6.5 Imunohistološke analize 141

5.2 SKLEPI 143

6 POVZETEK 146

7 SUMMARY 148

8 ZAHVALE 150

9 VIRI 152

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pogoji za kultivacijo bakterijskih sevov. 47

Preglednica 2: Protibakterijska aktivnost izbranih sevov laktobacilov proti petim indikatorskim sevom (Metoda z liso na agarju). 78

Preglednica 3: Protibakterijska aktivnost izbranih sevov laktobacilov proti petim indikatorskim sevom (Metoda z difuzijo v agarju). 80

Preglednica 4: Odpornost seva *L. gasseri* K7 proti desetim antibiotikom, ugotovljena z metodo E-test® (AB Biodisk, Švedska). 82

Preglednica 5: Odpornost prašičjih izolatov proti desetim antibiotikom, ugotovljena z metodo E-test® (A) (AB Biodisk, Švedska). 83

Preglednica 6: Odpornost prašičjih izolatov proti desetim antibiotikom,ugotovljena z metodo E-test® (B) (AB Biodisk, Švedska). 84

Preglednica 7: Hidrofobnost izbranih prašičjih in človeških izolatov. 85

Preglednica 8: Vpliv izbranih laktobacilov *(L.)* na adhezijo *S. aureus (S.a.)* ob aplikaciji suspenzije v kateri so *S. aureus* in izbrani laktobacili v razmerju 1:1 in 1:10 na sluzi človeškega izvora. 89

Preglednica 9: Vpliv izbranih laktobacilov *(L.)* na adhezijo *E. coli (E.c.)* ob aplikaciji suspenzije v kateri so *E. coli* in izbrani laktobacili v razmerju 1:1 in 1:10 na sluzi človeškega izvora. 89

Preglednica 10: Vpliv izbranih laktobacilov *(L.)* na adhezijo *S. aureus (S.a.)* ob aplikaciji suspenzije v kateri so *S. aureus* in izbrani laktobacili v razmerju 1:1 in 1:10 na sluzi prašičjega izvora. 90

Preglednica 11: Vpliv izbranih laktobacilov *(L.)* na adhezijo *E. coli (E.c.)* ob aplikaciji suspenzije v kateri so *E. coli* in izbrani laktobacili v razmerju 1:1 in 1:10 na sluzi prašičjega izvora. 91

Preglednica 12: Krvna slika živali v poskusu. 101

Preglednica 13: Diferencialna bela krvna slika živali v poskusu. 102

Preglednica 14: Število IgM-pozitivnih celic v histoloških rezinah živali v poskusu. 116

KAZALO SLIK

Slika 1: Filogenetsko drevo, ki temelji na analizi genskih zaporedij za 16S rRNA in prikazuje filogenetska razmerja med posameznimi vrstami rodov *Lactobacillus*, *Pediococcus* in *Paralactobacillus* (Dellaglio in Felis). 25

Slika 2: Porazdelitev laktobacilov v ustni votlini in gastrointestinalnem traktu človeka (povzeto po Walter, 2005). 27

Slika 3: Porazdelitev laktobacilov v gastrointestinalnem traktu miši (povzeto po Walter, 2005). 28

Slika 4: Shematski prikaz poskusa. 62

Slika 5: Preživetje *L. gasseri K7* v simuliranem želodčnem (A) in črevesnem soku (B). 75

Slika 6: Preživetje *L. crispatus*/*amylovorus* 4/26 v simuliranem želodčnem (A) in črevesnem soku (B). 76

Slika 7: Preživetje *L. crispatus/amylovorus* 2/25 v simuliranem želodčnem (A) in črevesnem soku (B). 76

Slika 8: Preživetje *L. reuteri* 12/26 v simuliranem želodčnem (A) in črevesnem soku (B). 77

Slika 9: Preživetje *L. reuteri* 14/26 v simuliranem želodčnem (A) in črevesnem soku (B). 77

Slika 10: Test razgradnje sluzi. 81

Slika 11: Adhezija izbranih izolatov človeškega in prašičjega izvora na sluz človeškega in prašičjega izvora ter celično linijo Caco-2. 86

Slika 12: Adhezija izbranih izolatov na sluz iz različnih delov prašičjega črevesja. 87

Slika 13: Koncentracija (c) IL-8 (pg/mL) v supernatantih celične linije THP-1 po stimulaciji z RPMI, L, LPS in L+LPS. 93

Slika 14: Koncentracija (c) IL-1β (pg/mL) v supernatantih celične linije THP-1 po stimulaciji z RPMI, L, LPS in L+LPS. 94

Slika 15: Koncentracija (c) IL-6 (pg/mL) v supernatantih celične linije THP-1 po stimulaciji z RPMI, L, LPS in L+LPS. 95

Slika 16: Koncentracija (c) TNF (pg/mL) v supernatantih celične linije THP-1 po stimulaciji z RPMI, L, LPS in L+LPS. 96

Slika 17: Prirast živali v času 28-dnevnega poskusa. 98

Slika 18: Povprečna teža živali posameznih skupin na dan vhlevitve, 8., 15., 22. in 28. dan poskusa. 99

Slika 19: (A) Delež fagocitirajočih granulocitov, (B) delež fagocitirajočih monocitov živali v poskusu. 103

Slika 20: Število bakterij v gramu blata živali v skupinah A, B, C, D in E, zraslih na gojišču MRS, ob vhlevitvi, 8., 15., 22. in 28. dan poskusa. 105

Slika 21: Število bakterij v gramu blata živali v skupinah A, B, C, D in E, zraslih na gojišču za koliformne bakterije, ob vhlevitvi, 8., 15., 22. in 28. dan poskusa. 106

Slika 22: Število bakterij v gramu blata živali v skupinah A, B, C, D in E, zraslih na gojišču MRS z dodatkom rifampicina, ob vhlevitvi, 8., 15., 22. in 28. dan poskusa. 107

Slika 23: Višina resic teščega črevesa (jejunum) živali v poskusu. 110

Slika 24: Višina resic vitega črevesa (ileum) živali v poskusu. 111

Slika 25: Povprečna debelina sluznice kolona živali v poskusu. 112

Slika 26: Skupna površina limfatičnega tkiva v histoloških rezinah teščega črevesa živali v poskusu. 113

Slika 27: Skupna površina limfatičnega tkiva v histoloških rezinah vitega črevesa živali v poskusu. 114

Slika 28: Število IgA-pozitivnih celic v histoloških rezinah živali v poskusu. 115

MEHANIZMI PROBIOTIČNEGA DELOVANJA IZBRANIH LAKTOBACILOV ČLOVEŠKEGA IN ŽIVALSKEGA IZVORA

IZVLEČEK

Ključne besede: probiotiki-analize; *Lactobacillus*-fiziologija-imunologija; *Escherichia coli*-imunologija; bakterijska adhezija-fiziologija; črevesna sluznica-mikrobiologija; modeli, biološki;

Probiotične kulture imajo dolgo zgodovino varne uporabe v prehrani ljudi, dodajajo pa jih tudi krmnim mešanicam za živali. Raziskave kažejo, da ima vsak probiotični sev specifičen način delovanja. Poleg seva človeškega izvora *L. gasseri* K7, čigar probiotične lastnosti so poznane iz prejšnjih raziskav, smo v testih *in vitro* preskusili še 12 izolatov iz odstavljenih prašičkov, ki so bili izbrani na podlagi dobrega protibakterijskega delovanja proti nekaterim potencialno patogenim bakterijskim vrstam. Pet zanimivejših sevov, ki smo jih izbrali za testiranja preživetja v simuliranih pogojih prebavil (K7, 2/25, 12/26, 14/26, 4/26), je pokazalo zadovoljivo odpornost proti nizkim vrednostim pH in žolču. Sevi so se različno vezali na celice Caco-2 (0,6-13,4-odstotna vezava) in črevesno sluz človeškega (0,4-49-odstotna vezava) ali živalskega izvora (0,3-27-odstotna vezava), pri čemer učinkovitost vezave ni bila pogojena z izvorom seva (človeški/živalski), niti ni bila v povezavi s hidrofobnostjo. Vezava posameznega seva na črevesno sluz, pridobljeno iz različnih delov črevesja prašičev, se ni razlikovala. V testih tekmovanja za adhezijo na sluz človeškega in živalskega izvora sta *L. gasseri* K7 in *L. crispatus/amylovorus* 4/26 odstopala od ostalih testnih sevov po inhibiciji adhezije *E. coli* in *S. aureus.* Rezultati poskusov na makrofagni celični liniji THP-1 so pokazali, da testni sevi laktobacilov (seva K7, 4/26 ter trije referenčni sevi) vplivajo na citokinski odziv. Ob sočasni stimulaciji z lipopolisaharidi so testni sevi zmanjšali koncentracijo provnetnih citokinov IL-8, IL-6 in TNF, kar kaže na njihovo sposobnost protivnetnega delovanja. V študiji *in vivo* na miših seva C57BL/6J smo ugotovili, da *L. gasseri* K7 (Rif^r) preživi prehod skozi prebavila, jih začasno naseli in je varen za uporabo. Poleg tega stimulira prirojeni imunski sistem gostitelja, kar je razvidno iz povečanja površine limfatičnega tkiva vitega in teščega črevesa in dviga tkivne koncentracije IgA-pozitivnih celic v sluznici vitega črevesa. Vpliv *E. coli* O157:H7 se je odrazil v stanjšani sluznici kolona, povečani površini limfatičnega tkiva vitega črevesa in povečanju tkivne koncentracije IgM-pozitivnih celic v sluznici vitega črevesa. Vse to je bilo v kombinaciji z delovanjem K7 (Rif^r) še izrazitejše. Rezultati raziskave kažejo na to, da so pri probiotičnem učinkovanju testnih laktobacilov vpleteni naslednji mehanizmi: kompetitivno izključevanje z inhibitornimi metaboličnimi produkti, oviranje adhezije patogenih bakterij na črevesno sluz ter vpliv na imunski odziv gostitelja. Podatki, ki smo jih pridobili v poskusih *in vitro* in študiji *in vivo*, predstavljajo dobro osnovo za nadaljnje klinične raziskave in so nas pripeljali korak bližje k razvoju probiotičnega proizvoda za ljudi in živali, z dobro poznanimi funkcionalnimi učinki.

MECHANISMS OF PROBIOTIC ACTION OF SELECTED LACTOBACILLI OF HUMAN AND ANIMAL ORIGIN

ABSTRACT

Key words: Probiotics-analysis; *Lactobacillus*-physiology-immunology; *Escherichia coli*-immunology; bacterial adhesion-physiology; intestinal mucosa-microbiology; models, biological;

Probiotic cultures have a long history of safe use in human and animal consumption. Research shows that every probiotic strain exhibits a specific mode of action. Apart from *L. gasseri* K7, with well known probiotic properties, 12 porcine isolates were chosen for further *in vitro* studies on the basis of their antimicrobial activity against certain pathogens. Five strains (K7, 2/25, 12/26, 14/26, 4/26) showed good resistance against low pH and bile. The strains tested showed variable adhesion to Caco-2 cells (0.6-13.4 %) and human (0.4-49 %) and porcine (0.3-27 %) mucus. The origin of the strain (human/porcine) did not affect the level of adhesion and no correlation with hydrophobicity was observed. There were no differences in the adhesion of selected strains to mucus obtained from different parts of porcine intestine. In further adhesion studies *L. gasseri* K7 and *L. crispatus/amylovorus* 4/26 showed superior ability to compete with *E. coli* and *S. aureus*. Tests employing the well established THP-1 cell line revealed the ability of selected strains (K7, 4/24 and three referential strains) to elicit an immune response, which was evident in production of cytokines. Furthermore, down-regulation of inflammatory cytokines (IL-8, IL-6 and TNF) after stimulation of THP-1 cells with LPS speaks for anti-inflammatory properties of the strains tested. Our *in vivo* study on C57BL/6J mice confirmed that *L. gasseri* K7 (Rif^r) survives the passage through the gastrointestinal tract and at least transiently colonizes the intestine. As it showed no detrimental effects, we can conclude that it is safe for consumption. Effect on innate immunity was observed, as application of K7 (Rif^r) resulted in proliferation of ileal and jejunal lymphatic tissue and in increased production of IgA in the ileum. Application of *E. coli* O157:H7 resulted in thinning of the colon mucosa and an increase in lymphatic tissue in the ileum. It also triggered an increase in positive IgM cells in the ileum which was even more pronounced in the presence of K7 (Rif^r). Our research shows that probiotic action of the strains tested is dependent on various mechanisms including competitive inhibition with inhibitory metabolic products, competitive inhibition in adhesion of pathogens to intestinal mucus as well as stimulation of the immune response. Data obtained in our *in vitro* and *in vivo* studies represents a good basis for further clinical studies and has brought us a step further in the development of a probiotic product for human and animal consumption with well known functional effects for the consumer.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATCC	American Type Culture Collection (Ameriška zbirka tipskih kultur)
B	*Bifidobacterium*
BD CBA	Beckton Dickinskon Cytometric Bead Array (sistem za merjenje koncentracije citokinov z metodo pretočne citometrije)
BF	*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*
BHI	Brain Heart Infusion, gojišče za *S. aureus* in *E.coli*
BLIS	Bacteriocin-like substance (bakteriocinom podobna substanca)
BSA	Bovine serum albumin (goveji serumski albumin)
Caco-2	človeške epitelijske celice adenokarcinoma kolona
CFU (KE)	colony forming unit (kolonijska enota)
CnBP	collagen binding protein (protein, ki veže kolagen)
CO_2	ogljikov dioksid
DC	dendritska celica
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium (Eaglov medij modificiran po Dullbeccu)
DNA	deoksirobonukleinska kislina
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
EF-Tu	elongation factor Tu (elongacijski faktor Tu)
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas-ova pot
FACS	fluorescent activated cell sorter (ločevalec fluorescenčno označenih celic)
FAE	follicle-associated epithelium (s folikli povezan epitelij)
FAO	Food and Agriculture organization (Organizacija za kmetijstvo in prehrano)
FBS	fetal bovine serum (plodov serum goveda)
FITC	Fluorescein izotiocianat
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor (faktor, ki spodbuja razvoj granulocitnih kolonij)
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (faktor, ki spodbuja razvoj granulocitnih in makrofagnih kolonij)
GRAS	generally regarded as safe (na splošno priznane kot varne)
HH	HEPES Hanks (Hanksova solna raztopina)
Ig	imunoglobulin (A, D, E, G, M)
IFN	interferon
IKK	IκB serinska kinaza
IL	interlevkin
KE	kolonijska enota
K7	*Lactobacillus gasseri* K7
K7 (rif^r)	proti rifampicinu odporen sev *Lactobacillus gasseri* K7
L	*Lactobacillus*
LF	*Lactobacillus gasseri* LF221
LF bac^-	mutanta seva *Lactobacillus gasseri* LF221, ki ne proizvaja bakteriocinov
LPS	lipopolisaharid
LRR	leucin rich repeat (ponovitve bogate z levcinom)
LTA	lipoteihojska kislina
MapA	mucus adhesion-promoting protein (protein, ki spodbuja adhezijo na sluz)
MIC	minimal inhibitory concentration (minimalna inhibitorna koncentracija)
MKB	mlečnokislinske bakterije
MRS	gojišče De Man, Rogosa, Sharp za laktobacile
Mub	mucus-binding protein (protein, ki omogoči vezavo na sluz)
NCDO	National Collection of Dairy organisms, Reading, England (Nacionalna zbirka mlekarskih organizmov, Reading, Anglija)
NF-κB	nuclear factor kappa B (transkripcijski faktor kappa B)
NK	natural killer cell (naravna celica ubijalka)
NO	dušikov oksid
PAMP	pathogen associated molecular patterns (antigenske determinante patogenih mikroorganizmov)

PCR	verižna polimerazna reakcija
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononuklearne celice periferne krvi)
PBS	phosphate buffered saline (fosfatni pufer z NaCl)
PE	phycoerithrin
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PP	Peyerjeva plošča
PRR	pattern recognition receptors (receptorji za prepoznavanje specifičnih antigenskih determinant)
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA (naključna amplifikacija polimorfne DNA)
rRNA	ribosomska RNA
rpm	rounds per minute (število obratov v minuti)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute growth medium for THP-1 cell line (RPMI rastni medij za celice THP-1)
SCFA	short chain fatty acids (kratko-verižne maščobne kisline)
SCS	spent culture supernatant (supernatant bakterijske kulture)
T_H	oznaka za celico T pomagalko (H od angl. helper)
THP-1	človeška makrofagna celična linija
TIR	Toll/IL-1 receptorska domena
TLR	Toll-like receptor (Toll-u podobni receptor)
TNF	tumor necrosis factor (dejavnik tumorske nekroze)
tRNA	transfer RNA (prenašalna RNA)
TS	oznaka za T supresorsko celico
TTSS	type III secretion system (sekrecijski sistem tipa III)
WHO	World Health Organization (Svetovna zdravstvena organizacija)

1 UVOD

Pod izrazom probiotiki razumemo žive mikroorganizme, ki zaužiti v zadostni količini pozitivno vplivajo na zdravje gostitelja (Guarner in Schaafsma, 1998). Odkritje probiotikov seže v začetek dvajsetega stoletja, ko je Elie Metchnikoff ugotovil, da bolgarski kmetje, ki redno uživajo fermentirane mlečne izdelke, predvsem jogurt, živijo dlje. Seveda pa nikoli ni dovolj le poznavanje dejstva, da je za nas nekaj dobro, zanima nas tudi mehanizem in princip delovanja. Tako so se začele izčrpne in dolgotrajne raziskave, usmerjene k odkrivanju sestave črevesne mikrobiote in njenih večplastnih vplivov na organizem. Ugotovili so, da je v črevesju približno 400 različnih vrst mikroorganizmov, po novejših podatkih pa celo čez 1000, od katerih jih 30 do 40 predstavlja 99 odstotkov populacije. Poleg pozitivnega vpliva na črevesno mikrobioto in na splošno zdravstveno stanje, probiotiki lahko varujejo organizem pred okužbami, pomagajo pri prebavi ljudem z laktozno intoleranco, zmanjšujejo nivo holesterola v krvi in stimulirajo imunski sistem (Agrawal, 2005). Vpliv probiotičnih mikroorganizmov je specifičen za sev, tako imajo nekateri sevi večjo sposobnost tvorbe bakteriocinov in zaviranja rasti drugih bakterij, drugi so pokazali boljše rezultate v testih izpodrivanja patogenih bakterij na črevesni sluznici, tretji vzpodbudijo imunski sistem k protivnetnemu ali pa k provnetnemu citokinskemu odzivu.

Na Katedri za mlekarstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani se že vrsto let ukvarjajo z ugotavljanjem probiotičnih lastnosti mlečnokislinskih bakterij, osamljenih iz različnih okolij, kot so hrana, blato ali črevesje. Med sevi človeškega izvora je najbolj proučen *Lactobacillus gasseri* K7 (K7), izolat iz blata dojenčka, ki tvori bakteriocine s širokim spektrom delovanja in dobro preživi v različnih okoljih, kot so prebavila prašičev in sir. Druga skupina zanimivih izolatov laktobacilov (*L. reuteri*, *L. crispatus/amylovorus in L. vaginalis/reuteri*), z dobro izraženimi protibakterijskimi lastnostmi proti patogenim bakterijam, pa izvira iz odstavljenih prašičev.

V svojem doktorskem delu sem z metodami *in vitro* proučevala probiotične lastnosti izbranih sevov človeškega in živalskega izvora-kandidatov za probiotike, med katerimi so sposobnost preživetja v pogojih, podobnim tistim v prebavilih (odpornost proti nizkim vrednostim pH, encimom in žolčnim solem), sinteza bakteriocinov in drugih

protibakterijskih metabolitov, sposobnost pripenjanja na črevesno sluznico, sposobnost izpodrivanja patogenih bakterij in stimulacija imunskega sistema gostitelja.

Ker je poznavanje vpliva bakterij na imunski sistem pomembno tako z vidika varnosti kot funkcionalnosti probiotika, so rezultati pomembno prispevali k oceni primernosti proučevanega seva K7. Rezultati poskusov *in vitro* in študije *in vivo* na miših predstavljajo dobro podlago za nadaljnje klinične študije, katerih namen je razvoj probiotičnih izdelkov za ljudi in živali, s ciljanimi funkcionalnimi učinki.

1.1 HIPOTEZE

V doktorski disertaciji smo preverjali naslednje hipoteze:

- Izbrani sevi laktobacilov človeškega in živalskega izvora so sposobni preživeti v simuliranih pogojih prebavil, se vezati na celično linijo Caco-2 in sluz človeškega in živalskega izvora ter pri vezavi tekmovati s potencialnimi patogenimi mikroorganizmi (*E. coli*, *S. aureus*). Učinkovitost vezave na sluz humanega oziroma živalskega izvora je lahko pogojena z izvorom seva (humani/živalski), je v neposredni povezavi s hidrofobnostjo, in/ali je sestava sluzi iz različnih delov prašičjega črevesja tako različna, da to lahko vpliva na vezavo laktobacilov.
- Izbrani sevi laktobacilov človeškega in živalskega izvora izražajo protibakterijsko aktivnost proti izbranim patogenim mikroorganizmom.
- Testni sevi ne razgrajujejo mucinov želodčne sluzi in niso bolj odporni proti antibiotikom, kakor je to običajno za rod *Lactobacillus*.
- Izbrani sevi laktobacilov človeškega in živalskega izvora so sposobni izzvati imunski odziv makrofagov celične linije THP-1, kar se odraža v izločanju citokinov (IL-1β, IL-8, IL-6, IL-12p70, TNF in IL-10). Obenem predvidevamo, da vplivajo tudi na odziv celic THP-1 ob sočasni stimulaciji z LPS (iz *E. coli* O111:B4).
- Enterohemoragična *E. coli* O157:H7 po oralni aplikaciji povzroči vnetne spremembe v črevesju miši seva C57BL/6J. Sočasna aplikacija seva K7 omili posledice okužbe z *E. coli* O157:H7.

- Seva K7 in *E. coli* O157:H7 preživita prehod skozi prebavila in vsaj začasno kolonizirata prebavni trakt miši seva C57BL/6J. V črevesju vplivata na avtohtono mikrobioto (število mlečnokislinskih bakterij, koliformnih bakterij).
- Sev K7 je po oralni aplikaciji sposoben stimulirati imunski odziv miši seva C57BL/6J in povzročiti t.i. vzbujeno stanje (primed state), kar ima za posledico povečano fagocitno aktivnost monocitov in granulocitov, kot tudi povečano tkivno koncentracijo Ig-pozitivnih celic (IgA, IgG in IgM) v sluznici črevesja. Sev K7 vpliva na histološko zgradbo tankega in debelega črevesa in na s črevesjem povezano limfatično tkivo.

2 PODATKI IZ LITERATURE

2.1 PROBIOTIKI

Beseda »probiotik« izhaja iz grščine in pomeni »za življenje«. Prva sta besedo probiotik uporabila Lilly in Stillwell za opis substanc, ki jih izločajo mikroorganizmi in z njimi stimulirajo rast drugih mikroorganizmov. Parker je kot probiotike opisoval dodatke živalski krmi, ki vsebujejo organizme in snovi, ki pozitivno vplivajo na zdravje živali tako, da vplivajo na ravnovesje črevesne flore (Huis In't Veld in Havenaar, 1991). Fuller je leta 1989 (cit. po Shortt, 1999) definiral probiotik kot »živ mikrobni dodatek krmi, ki pozitivno vpliva na žival gostiteljico z izboljšanjem njenega mikrobnega ravnotežja«. Havenaar in sod. (1992) pa so definicijo še dopolnili: »mono ali mešana kultura živih organizmov, ki koristno učinkujejo na človeka ali žival z izboljšanjem lastnosti obstoječe mikrobiote.« Na osnovi te definicije se je razvil probiotični koncept v več smeri. Ni omejen le na vpliv probiotikov na črevesje, pač pa dopušča možnost delovanja tudi na respiratorni trakt, urogenitalni trakt in kožo (Klaenhammer in Kullen, 1999; Shortt, 1999). Danes se je najbolj uveljavila definicija, ki pravi, da so probiotiki živi organizmi, ki zaužiti v zadostni količini, pozitivno vplivajo na zdravje gostitelja (Guarner in Schaafsma, 1998). Slednjo sta privzeli tudi Organizacija za kmetijstvo in prehrano (FAO) in Svetovna zdravstvena organizacija (WHO). V gastrointestinalnem traktu človeka se kmalu po rojstvu vzpostavi kompleksna mešanica različnih vrst mikroorganizmov, ki jo poznamo kot normalno črevesno mikrobioto in ima pomemben vpliv na gostitelja. Sprememba te mikrobiote vpliva na mnoge biokemijske, fiziološke in imunske funkcije telesa. Najpogosteje iz črevesja človeka izoliramo predstavnike rodov *Bacteroides, Bifidobacterium, Eubacterium, Clostridium, Lactobacillus, Fusobacterium* in številne anaerobne po Gramu pozitivne koke. Bakterije, prisotne v manjšem številu, so iz rodu *Enterococcus* in družine *Enterobacteriaceae*. Predstavniki črevesne flore fermentirajo tudi za gostitelja neprebavljiva hranila in endogeni mukus. Raznolikost v genski sestavi mikroorganizmov poskrbi tudi za raznolikost in veliko število prebavnih encimov, ki jih gostitelj sam nima. Fermentacija ogljikovih hidratov v kolonu je ogromen vir energije za bakterije in izvor številnih kratko-verižnih maščobnih kislin (SCFA, short chain fatty acids), ki jih gostitelj absorbira in tako prihrani energijo. Poveča se tudi absorpcija ionov Ca, Mg, Fe v slepem črevesu, sinteza nekaterih vitaminov (K, B12, biotin, folna kislina, pantotenska kislina) in

sinteza aminokislin iz amoniaka in uree. Bakterije, ki pozitivno delujejo na ekosistem gastrointestinalnega trakta, imenujemo probiotične bakterije. Dober probiotični sev za uporabo pri ljudeh naj bi bil:

- človeškega izvora,
- odporen proti želodčni kislini in žolčnim solem,
- sposoben vezave na človeške črevesne celice in črevesno sluz,
- sposoben vsaj začasne kolonizacije črevesja,
- varen,
- tehnološko ustrezen

in sposoben izkazovati vsaj enega od naslednjih učinkov (Klaenhammer in Kullen, 1999):

- negativen vpliv na rast in razmnoževanje patogenih bakterij (kompetitivno izrivanje, proizvodnja protibakterijskih snovi) in posledično izboljšanje odpornosti gostitelja proti infekcijam (npr. driske, ki jih povzročajo *Clostridium difficile* in rotavirusi, potovalne driske, driske povzročene z dolgotrajnim jemanjem antibiotikov ter vaginalna vnetja),
- vpliv na imunski sistem tako, da poveča naravno obrambno funkcijo,
- krepitev barierne funkcije črevesne sluznice,
- vpliv na metabolizem gostitelja (npr. blažitev simptomov laktozne intolerance),
- vpliv na črevesno pasažo,
- antimutageno oziroma antikancerogeno delovanje (detoksifikacija karcinogenov in s tem zmanjšanje tveganja za nastanek raka na debelem črevesu).

V zadnjem času je vedno večji poudarek na tem, da mora biti pozitivni vpliv na zdravje dokazan, najbolje v kliničnih študijah (Salminen in sod., 1998). Najobičajnejši probiotični sevi so predstavniki rodov *Lactobacillus* (*L. acidophilus, L. johnsonii, L. casei, L. gasseri, L. plantarum, L. rhamnosus*), *Bifidobacterium* (*B. longum, B. breve, B. infantis*) in *Enterococcus* (*E. faecalis, E. faecium*) (Kaur in sod., 2002).

2.1.1 Mlečnokislinske bakterije kot probiotiki

Mlečnokislinske bakterije (MKB) so začeli opisovati kot samostojno skupino mikroorganizmov v začetku 20. stoletja. Začetki znanstvenega in tehnološkega razvoja na področju mikrobiologije mlečnokislinskih bakterij segajo že v konec 19. stoletja, ko je Pasteur odkrival skrivnosti mlečnokislinske fermentacije, Lister pa izoliral (leta 1873) prvo čisto bakterijsko kulturo, *Bacterium lactis*. Zgodnja definicija mlečnokislinskih bakterij, ki je temeljila na njihovi sposobnosti fermentacije in koagulacije mleka, je uvrstila MKB v isto skupino s koliformnimi bakterijami. Leta 1901 pa je Beijerinck opisal MKB kot po Gramu pozitivne bakterije in jih tako ločil od koliformnih mikroorganizmov (Stiles in Holzapfel, 1997). MKB so skupina po Gramu pozitivnih kokov ali palčk, ki proizvajajo mlečno kislino kot glavni končni produkt fermentacije ogljikovih hidratov. So katalaza negativne, mikroaerofilne, acidotolerantne bakterije brez citokromov (Axelsson, 2004). V gojišču z ogljikovimi hidrati, ki so jih sposobne fermentirati, vrednost pH običajno znižajo do vrednosti okrog 4,0 ali manj, kar pogosto upočasni rast, oziroma povzroči smrt drugih bakterij. Zaradi dolgoletne varne uporabe so MKB pridobile status varnih bakterij, v angleščini GRAS (Generally Regarded As Safe). Posebno aromo, teksturo in obstojnost fermentiranih živil kot so siri, jogurt, salame, kruh iz kvašenega testa in silaže, dosežemo z uporabo različnih predstavnikov sedmih glavnih rodov MKB:

- *Lactobacillus* (mleko, meso, zelenjava),
- *Lactococcus* (mleko),
- *Leuconostoc* (mleko, zelenjava),
- *Pediococcus* (zelenjava, meso),
- *Oenococcus* (vino),
- *Enterococcus* (mleko) in
- *Streptococcus* (mleko).

Začetki uživanja fermentiranih mlečnih izdelkov datirajo v davno preteklost. Fermentirani izdelki so bili bolj obstojni, uporabljali pa so jih tudi v terapevtske namene, in sicer še preden so poznali bakterije. Prvi, ki je menil, da določene bakterije pozitivno delujejo na zdravje, je bil Elie Metchnikoff (1907). Domneval je, da uživanje jogurta, fermentiranega z

bakterijo *Bulgarian bacillus* (staro ime današnje vrste *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*) pozitivno vpliva na zdravje. Svojo domnevo je utemeljeval z dejstvom, da bolgarski kmetje, ki uživajo tak jogurt, dolgo živijo (Naidu in sod., 1999; Shortt, 1999). Zaradi dokazanega potencialnega dobrega vpliva na zdravje, se določeni sevi MKB danes uporabljajo kot probiotiki (Temmerman in sod., 2004). Večina probiotikov je iz vrst MKB in bifidobakterij, saj so le te običajni prebivalci prebavnega trakta (Naidu in sod., 1999).

2.1.1.1 Laktobacili

Rod *Lactobacillus* je daleč največji med MKB, njegovi predstavniki pa so najpogosteje uporabljeni probiotični mikroorganizmi. Kot vse MKB so laktobacili po Gramu pozitivne bakterije, ki ne tvorijo spor. Lahko imajo paličasto obliko ali elipsoidno - kokobacili. So striktno fermentativni, mikroaerofilni in kemoorganotrofni mikroorganizmi, ki za rast potrebujejo bogato gojišče. Najdemo jih v okolju, ki je bogato z ogljikovimi hidrati, kot je hrana (mlečni izdelki, fermentirano meso, testo, zelenjava, sadje, napitki) in v respiratornem, gastrointestinalnem in genitalnem traktu ljudi in živali. Taksonomsko sodi rod *Lactobacillus* med mikroorganizme debla *Firmicutes*, razreda *Bacilli*, reda *Lactobacillales* in družine *Lactobacillaceae*. Glede na tip fermentacije sta Hammes in Vogel (1995) laktobacile razdelila v naslednje tri skupine:

I. obligatni homofermentativni laktobacili,
II. fakultativni heterofermentativni laktobacili,
III. obligatni heterofermentativni laktobacili.

Skupina I zajema obligatno homofermentativne laktobacile, ki fermentirajo heksoze izključno do mlečne kisline preko Embden-Meyerhof-Parnas-ove poti (EMP) in ne fermentirajo pentoz in glukonata, ker nimajo encima fosfoketolaze. Pomembnejši predstavniki so: *L. acidophilus, L. delbrueckii, L. helveticus, L. gasseri, L. johnsonii* in *L. kefiranofaciens.*

Skupina II zajema fakultativno heterofermentativne laktobacile, ki fermentirajo heksoze do mlečne kisline preko EMP poti. Razgrajujejo tudi pentoze in zelo pogosto glukonat, saj vsebujejo aldolaze in fosfoketolaze. Sposobni so fermentacije pentoz s pomočjo

fosfoketolaze do mlečne in ocetne kisline. Pomembnejši predstavniki so: *L. acetotolerans, L. casei, L. curvatus, L. paracasei, L. plantarum, L. rhamnosus* in *L. sakei.*

Skupina III zajema obligatno heterofermentativne laktobacile, ki fermentirajo heksoze preko fosfoglukonatne poti do mlečne kisline, ocetne kisline in/ali etanola in ogljikovega dioksida (CO_2). Nekateri pomembnejši predstavniki so: *L. brevis, L. fermentum, L. kefiri, L. panis, L. reuteri, L. sanfrancisco* in *L. vaginalis.*

Laktobacili se razen po načinu fermentacije ogljikovih hidratov ločijo še na osnovi razlik v konfiguraciji proizvedene mlečne kisline, hidrolizi arginina in pogojih, ki jih potrebujejo za rast. Za natančnejšo klasifikacijo so v uporabi naslednje analitske metode: analiza peptidoglikana, vsebnost G+C v DNA (v mol odstotkih) in DNA-DNA homologija. Na razpolago so tudi številne vrstno-specifične oligonukleotidne hibridizacijske sonde ali začetni oligonukleotidi za verižno polimerazno reakcijo (PCR), sestavljeni na podlagi poznanih zaporedij genov za 16S ribosomsko RNA (rRNA), kar olajšuje identifikacijo (Axelsson, 2004; Dellaglio in Felis, 2005; Stiles in Holzapfel, 1997).

Do začetka 80-ih let prejšnega stoletja je veljalo, da je glavni predstavnik laktobacilov v črevesju *L. acidophilus*. Z razvojem tehnik molekularne biologije pa so na podlagi homologij DNA znotraj skupine *L. acidophilus* določili dve DNA homologni skupini oziroma identificirali šest vrst (Johnson in sod., 1980):

A-1: *Lactobacillus acidophilus*
A-2: *Lactobacillus crispatus*
A-3: *Lactobacillus amylovorus*
A-4: *Lactobacillus gallinarum*
B-1: *Lactobacillus gasseri*
B-2: *Lactobacillus johnsonii*

Slika 1: **Filogenetsko drevo, ki temelji na analizi genskih zaporedij za 16S rRNA in prikazuje filogenetska razmerja med posameznimi vrstami rodov *Lactobacillus*, *Pediococcus* in *Paralactobacillus.*** V tej radialni predstavitvi je filogenetska razdalja podana z vsoto dolžin posameznih vej (Dellaglio in Felis, 2005).

Figure 1: **Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence analysis, depicting the phylogenetic relationships among species of the genera *Lactobacillus, Pediococcus* and *Paralactobacillus*.** In this radial respresentation, the phylogenetic distance is given by the sum of branch lenghts (Dellaglio in Felis, 2005).

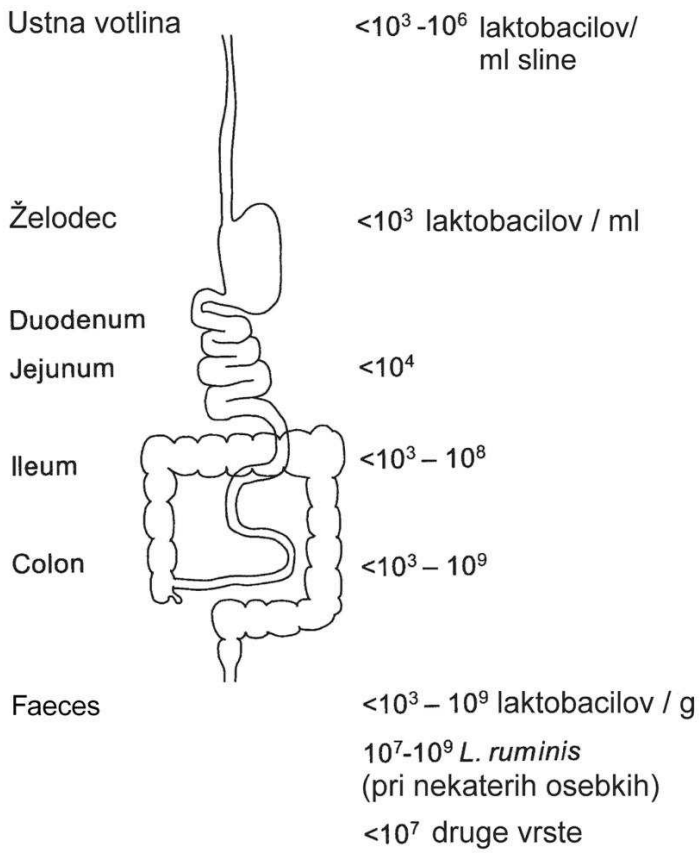
Omenjenih vrst ne moremo ločiti med seboj na podlagi preprostih fenotipskih testov ali morfoloških značilnosti, pač pa po zaporedju nukleotidov v genih za 16S ali 23S rRNA, s pomočjo vrstno specifičnih oligonukleotidnih hibridizacijskih sond ali začetnih oligonukleotidov za PCR. Predstavniki skupine *L. acidophilus* so pokazali sposobnost vezave na črevesne celice zarodka *in vitro*, kar nakazuje na sposobnost njihove vezave na

epitelne celice *in vivo*. Prav tako so pogosto dodani v jogurte z dokazanim pozitivnim vplivom na zdravje. Trenutno razpoložljivi probiotični pripravki najpogosteje vsebujejo vrste *L. delbrueckii ssp. bulgaricus, L. acidophilus, L. casei, L. fermentum, L. plantarum, L. brevis, L. lactis, L. reuteri, L. paracasei, L. gasseri, L. johnsonii* in *L. rhamnosus.*

2.1.1.2 Laktobacili in črevesje

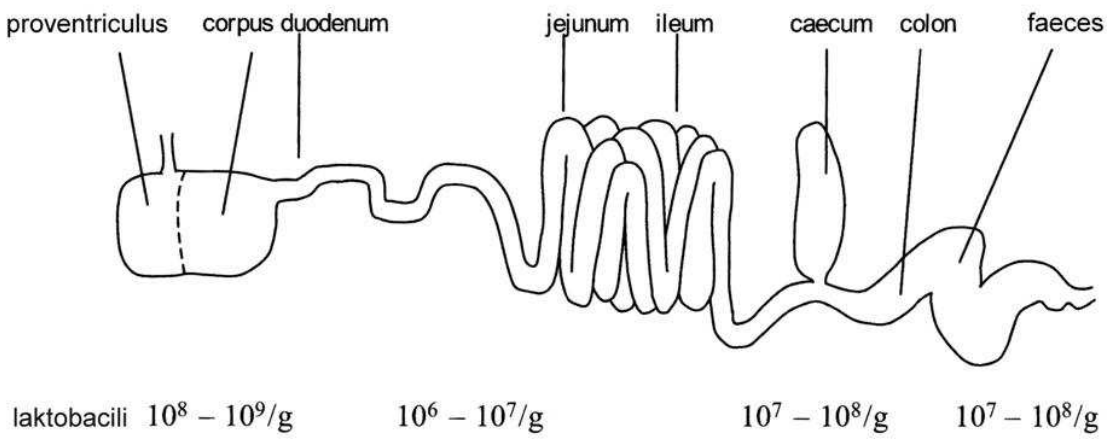
Največje število bakterij monogastričnih živali domuje v distalnem delu črevesja (ileum, kolon), kjer je njihova gostota okrog 10^{11} mikrobov na gram črevesne vsebine. Čeprav je v želodcu in prvih dveh tretjinah tankega črevesja vsebnost hranilnih snovi največja, je zaradi nizke vrednosti pH v želodčni vsebini (pH 2), toksičnosti žolčnih soli in relativno hitrega prehoda črevesne vsebine, v teh delih črevesja pri človeku prisotnih le malo mikroorganizmov. V nasprotju s človekom pa imajo nekatere vrste živali v proksimalnem delu prebavne cevi (prednji del želodca glodalcev, golša kokoši, *pars oesophagea* prašičev) relativno veliko število bakterij, večinoma laktobacilov. Vzrok je najverjetneje pripenjanje laktobacilov na površino nesekretornega epitelija na teh predelih, kar bakterijam omogoči tvorbo biofilmu podobne strukture, ki služi kot bakterijski inokulum za črevesno vsebino (Walter, 2005). Črevesno mikrobioto človeka predstavlja 500-1000 različnih vrst bakterij, ki so večinoma obligatno anaerobne (Zoetendal in sod., 2006). Približno 60 odstotkov bakterijske populacije v črevesju je kljub odličnim bakteriološkim gojitvenim tehnikam zaenkrat še nemogoče gojiti v laboratoriju, najverjetneje zaradi kompleksnih potreb po hranilnih snoveh in striktni anaerobnosti. S pomočjo 16S rRNA genskih sond je bilo ugotovljeno, da večina bakterij prebavnega trakta, ki jih ne moremo gojiti, sodi v rodove *Bacteroides* in *Prevotella* ter vrste *Clostridium coccoides* in *Clostridium leptum* (Tannock, 2002). Evolucijska teorija predpostavlja, da v prostorsko raznolikem okolju organizmi zasedejo prazne niše. Naravna selekcija pa favorizira organizme, ki se dobro prilagodijo in specializirajo za prazne niše, ki so jih zasedli. Vse niše prebavnega trakta zdravega odraslega organizma so tako kmalu zasedene z dobro prilagojenimi endogenimi (avtohtonimi) predstavniki mikrobiote. Vsaka ekološka niša lahko vzdržuje le en tip organizma (teorija izpodrivanja oz. princip tekmovanja in izpodrivanja) zato je verjetnost, da bi se v njej naselil nov mikroorganizem, ki bi slučajno ali namenoma prispel v gastrointestinalni trakt naknadno, zelo majhna. To opisujejo tudi

kot fenomen kolonizacijske odpornosti. Ta ekološki princip obrazloži dejstvo, da sta velikost populacije in njena sestava pri določenem gostiteljskem organizmu sorazmerno stalni. V praksi pa avtohtone laktobacile težko ločimo od alohtonih, ki so prisotni le krajši čas in izvirajo iz hrane ali proksimalnih delov črevesja. Večinski predstavniki avtohtonih laktobacilov pri človeku so *L. gasseri, L. reuteri, L. crispatus, L. salivarius* in *L. ruminis*. *L. acidophilus, L. fermentum. L. casei, L. rhamnosus, L. johnsonii, L. plantarum, L. brevis, L. delbrueckii, L. curvatus* in *L. sakei* pa v gastrointestinalnem traktu nihajo v različnih časovnih obdobjih. Laktobacili predstavljajo le majhen delež mikrobiote odraslega človeka, in sicer od 0,01 do 0,6 odstotkov (Lebeer in sod., 2008; Walter, 2005).



Slika 2: **Porazdelitev laktobacilov v ustni votlini in gastrointestinalnem traktu človeka (povzeto po Walter, 2005).**

Figure 2: **The distribution of lactobacilli in the oral cavity and the gastrointestinal tract of humans (adapted from Walter, 2005).**



Slika 3: **Porazdelitev laktobacilov v gastrointestinalnem traktu miši (povzeto po Walter, 2005).**

Figure 3: **The distribution of lactobacilli in the murine gastrointestinal tract (adapted from Walter, 2005).**

2.1.2 Probiotične lastnosti

2.1.2.1 Protibakterijsko delovanje

Mikroorganizmi morajo izpolnjevati številne zahteve, da ustrezajo definiciji učinkovitih probiotikov. Imeti morajo sposobnost preživeti prehod skozi gastrointenilani trakt, sposobnost pripenjanja na epitelne celice in preprečiti ali zmanjšati vezavo patogenih mikroorganizmov, vsaj začasno naseliti črevesje gostitelja, proizvajati različne metabolite, ki preprečujejo rast in razmnoževanje patogenih mikroorganizmov, poleg tega pa morajo biti varni, neinvazivni, nekancerogeni in nepatogeni. Pomembno vlogo pri delovanju probiotikov imajo organske kisline, predvsem mlečna in ocetna, ki so končni produkt katabolizma ogljikovih hidratov. Mlečna kislina znižuje pH okolja, kar zaviralno vpliva na potencialne patogene bakterije. Nedisociirane kisline vstopajo v mikrobne celice in v citoplazmi disociirajo, kar ima usodne posledice za celico. Tudi drugi metabolni produkti, ki se tvorijo v manjših količinah, pomembno prispevajo k celotnemu protibakterijskemu delovanju. Ti produkti so: ogljikov dioksid, mravljinčna kislina, proste maščobne kisline, amoniak, etanol, vodikov peroksid, diacetil, acetoin, acetaldehid, 2,3-butandiol, benzoat, bakteriolitični encimi, bakteriocini, antibiotiki in neideficirane zaviralne snovi. Pod izrazom bakteriocini danes razumemo proteine ali proteinske komplekse, ki jih izločajo

bakterije in so sposobni baktericidnega delovanja proti drugim bakterijam. Večina metod, ki jih uporabljajo pri iskanju bakteriocinogenih sevov, temelji na difuziji bakteriocinov v trdnem ali poltrdnem gojišču in zaviranju rasti občutljivih indikatorskih mikroorganizmov. Razlikujejo se predvsem po načinu nanosa testirane kulture. Razredčeno kulturo lahko nacepimo po vsej površini, tako da zrastejo posamezne kolonije, ali pa jo naneseno nerazredčeno v obliki lise s premerom okrog 1 cm. Z indikatorskim sevom inokuliramo poltrdo gojišče, ki ga nanesemo na površino. Po inkubaciji ugotavljamo prisotnost inhibicijskih con okrog kolonij testirane probiotične kulture. Drug način je, da preizkusimo brezcelični supernantant bakteriocinogenih bakterij. Po tej metodi plošče z izbrano trdno hranljivo podlogo prelijemo s poltrdim agarjem, inokuliranim z bakterijskim sevom. Izrežemo luknje v agarju in vanje nanesemo supernatant. Inkubiramo in opazujemo, ali se pojavijo cone inhibicije rasti okrog lukenj. Inhibicijska cona okrog kolonij testiranega seva pa seveda ni dokaz tvorbe bakteriocinov. Izključiti je potrebno vpliv drugih inhibitornih metabolitov, predvsem kislin in vodikovega peroksida. Pozorni moramo biti tudi na izgled inhibicijske cone, saj se je v večini primerov pokazalo, da imajo tiste, ki so rezultat tvorbe bakteriocinov, izrazito ostre robove, medtem, ko so meje inhibicijske cone povzročene le zaradi tvorbe in difuzije kislin, zabrisane (Alain, 2004; Bogovič Matijašić, 1997; Fajdiga, 2006; Kaur in sod., 2002; Tagg in sod., 1976).

2.1.2.2 Adhezija

Adhezija, pripenjanje na tkivne površine, je poglavitnega pomena za razvoj rastočih bakterijskih populacij, se pravi kolonizacije. Nevezane bakterije se zaradi peristaltike v črevesju hitro odplavijo. Peristaltika je v tankem črevesu relativno močnejša kot v debelem, zato je sposobnost vezave na črevesne celice veliko bolj pomembna za kolonizacijo tankega črevesa kot debelega. Mehanizmi, ki sodelujejo pri vezavi probiotičnih bakterij na celice črevesne stene, še niso povsem raziskani (Tuomola in sod., 1999a). Adhezija bakterij temelji sprva na nespecifičnih fizikalnih interakcijah med bakterijsko in črevesno površino, ki kasneje omogočijo specifične interakcije med adhezini (ponavadi površinski bakterijski proteini) in komplementarnimi receptorji na črevesnih celicah (Kirjavainen in sod., 1998). Klasična teorija adhezije predvideva dva do pet korakov v procesu pripenjanja bakterij, kjer sodelujejo pasivne van der Waalsove vezi,

elektrostatske interakcije, hidrofobne in sterične sile in lipoteihojska kislina. Pogosto sledi aktivna adhezija, ki jo omogočijo specifične strukture na površini bakterije, lektini in (ali) zunajcelični polimeri (polisaharidi). Lektini so beljakovine, ki imajo specifična vezišča za določene sladkorne molekule. Na površini probiotičnih bakterij so lektini, ki se vežejo s specifičnimi receptorji epitelijskih celic in preprečijo adhezijo patogenih mikroorganizmov s tekmovanjem za vezivna mesta na črevesnih celicah ali s steričnim zadrževanjem, t.j. s spremembo konfiguracije vezivnega mesta. Po Gramu negativne bakterije, npr. patogena *E. coli*, se vežejo na tarčne celice s pomočjo proteinskih struktur (pilov), laktobacili pa se vežejo na celice črevesne stene z zunajceličnimi strukturami, ki vsebujejo polisaharide, proteine, lipide in lipoteihojske kisline. Lipoteihojske kisline sestavljajo ribitol ali glicerolfosfatni polimeri na celični steni veliko vrst po Gramu pozitivnih bakterij. S kovalentnimi vezmi so lipoteihojske kisline vezane na glikolipide, ki vsebujejo tako hidrofilne kot tudi hidrofobne regije. Igrajo pomembno vlogo v procesu adhezije z direktno vezavo ali z vezavo preko divalentnih kationov na substrat (Gusils in sod., 2002). Hidrofobnost celične površine je eden izmed faktorjev, ki vpliva na adhezijo mikroorganizmov. Pri nekaterih sevih laktobacilov so opazili povezavo med adhezijo in hidrofobnostjo, tako da so merili sposobnost adhezije mikroorganizmov na ogljikovodike (*n*-heksadekan) (Del Re in sod., 2000). Van der Mei in sod. (2003) so ugotovili, da so proteini površinskega sloja laktobacilov odgovorni za hidrofobne lastnosti celične površine in izboljšajo sposobnost vezave na heksadekan preko hidrofobnih interakcij. Peptidoglikan ter kompleksi lipoteihojske kisline in proteinov S-plasti bakterijske stene (S-surface layer proteins), lahko stimulirajo imunski sistem in naj bi imeli poleg metabolitov MKB svojo vlogo tudi pri izražanju pozitivnih učinkov probiotikov na zdravje gostitelja. Proteini S-plasti bakterijske stene, ki so jih našli pri večini po Gramu negativnih in tudi pri precej po Gramu pozitivnih organizmih, vključno z laktobacili, so dvodimenzionalne parakristalne strukture, ki popolnoma prekrivajo površino bakterijske celice. So potencialni mediatorji začetnih korakov adhezije (Lorca in sod., 2002) Večinoma jih sestavlja enojna proteinska podenota velikosti 40-200 kDa, ki tvori dvodimenzionalno strukturo S-plasti. Pogosto jih najdemo pri laktobacilih iz skupine *L. acidophilus*. Izražajo jih izolati iz DNA homolognih skupin A1-A4 (*L. acidophilus, L. crispatus, L. amylovorus* in *L. gallinarum*), niso pa prisotni v homolognih skupinah B1 in B2 (*L. gasseri* in *L. johnsonii*) (Sillanpää, 2001).

Druge komponente bakterijske celične stene, ki lahko sodelujejo pri adheziji, so: kisli mukopolisaharidi, ogljikohidratni polimeri kapsule, glikoproteini, ogljikovi hidrati, kompleksi proteinov in teihojske kisline, proteini celične stene in proteini, ki jih celična stena izloča (Zárate in sod., 2002).

Določeni sevi tvorijo specifične adhezijske proteine. Pri *L. reuteri* sta najbolje proučena protein, ki spodbuja adhezijo na sluz (mucus adhesion-promoting protein, MapA) in protein, ki omogoči vezavo na sluz (mucus-binding protein, Mub). Opisanih je bilo pet homologov proteina Mub *L. reuteri*, ki so jih identificirali tudi pri *L. acidophilus* NCFM. Mub homologi so bili ugotovljeni tudi pri *L. gasseri*, *L. johnsonii* in *L. plantarum*. *L. reuteri* proizvaja protein, ki veže kolagen (collagen binding protein (CnBP) in je v interakciji s črevesno sluzjo, vendar ne igra vloge pri adheziji. Pri *L. johnsonii* La1 so izolirali adhezijskemu podoben protein, imenovan elongacijski faktor Tu (elongation factor, EF-Tu), ki omogoča prenos aminoacyl prenašalne RNA (tRNA) na A del ribosoma. EF-Tu protein se veže na sluz in olajša adhezijo seva *L. johnsonii* La1 na črevesne epitelijske celice in črevesno sluz pri človeku. Mehanizem delovanja EF-Tu pa še ni povsem pojasnjen. Predhodne študije so se osredotočile predvsem na metode *in vitro* ugotavljanja adhezije probiotičnih bakterij na celične linije in črevesno sluz. V zadnjem času pa se z uporabo PCR v realnem času raziskuje tudi izražanje genov za proteine Mub, MapA in EF-Tu, za katere so ugotovili, da so pomembni adhezijski faktorji (Ramiah in sod., 2007).

2.1.2.2.1 Črevesne celične linije človeškega izvora

Celične linije tkivnih kultur človeškega črevesnega izvora pogosto uporabljajo za proučevanje adhezije bakterij, ker te celice izražajo veliko podobnost z epitelijskimi celicami črevesja. Celične linije so najpogosteje pridobljene iz tumorjev in jih lahko vzdržujemo v standardnih pogojih za celične linije. So komercialno dostopne, kar omogoča izvajanje poskusov v podobnih pogojih različnim raziskovalnim skupinam. V raziskavah probiotikov se najpogosteje uporabljata celični liniji Caco-2 (American Type Culture Collection; ATCC HTB-37) in HT-29 (ATCC HTB-38). Obe celični liniji sta bili izolirani iz človeškega adenokarcinoma kolona. Čeprav celične linije izvirajo iz kolona, se celice

diferencirajo v enterocite in jih lahko uporabljamo kot model za epitelij človeškega tankega črevesa. Diferenciacija in polarizacija celic Caco-2 je spontana in dodajanje spodbujevalcev ni potrebno. Nasprotno pa dosežemo diferenciacijo celične linije HT-29 s spremembo gojišča npr. z zamenjavo glukoze z galaktozo. Lastnosti omenjenih celičnih linij so, da rastejo v eni plasti in se strukturno in funkcionalno preoblikujejo, ko pride do stikanja celic. V procesu preoblikovanja se celice podaljšajo in polarizirajo, tako da se oblikujeta bazolateralna in apikalna stran, na slednji se izoblikujejo črevesne resice. Obe celični liniji izražata hidrolaze apikalne »ščetkaste« meje, ki so normalno prisotne v tankem črevesu. Prisotnost hidrolaz nam služi kot dokaz, da so se celice preoblikovale (Bianchi in sod., 2004; Ouwehand in sod., 2001; Tuomola in sod., 1999a).

Kadar uporabljamo modele *in vitro* za enterocite, npr. celični liniji kot sta Caco-2 in HT-29, moramo upoštevati, da te celice ne proizvajajo sluzi, ki v normalnih pogojih pokriva črevesno sluznico in je prva, ki pride v stik z zaužitimi bakterijami. Ta problem lahko delno rešimo z uporabo celične linije HT-29-MTX. Ta celična linija proizvaja sluz, ki pa se razlikuje od črevesne sluzi v tem, da vsebuje predvsem mucine z želodčno imunoreaktivnostjo (MUC3 in MUC5C) in malo mucinov z imunoreaktivnostjo kolona (MUC2 in MUC4). Število in lastnosti vezišč tako nastale sluzi se lahko zelo razlikujejo od sluzi, ki je normalno prisotna v črevesju (Vesterlund in sod., 2005). Sluz ima dvojno vlogo, saj lahko prepreči vezavo določenih mikroorganizmov na spodaj ležeči epitelij, istočasno pa predstavlja medij, ki omogoča adhezijo drugim bakterijam (Ouwehand in sod., 1999).

2.1.2.2.2 Črevesna sluz človeškega in živalskega izvora

Površino črevesnega epitela pokriva mukozni gel (sluz), ki leži na glikokaliksu črevesnih resic enterocitov. Sluz proizvajajo specializirane črevesne celice, vrčaste celice, ki se nahajajo med enterociti in izločajo v lumen. Največjo organsko komponento sluzi predstavljajo mucini (mukozni glikoproteini), ki so veliki glikoproteini, odgovorni za viskozno-elastične lastnosti mukoznega gela. Mucine sestavljajo monomeri glikoproteinov, ki se razlikujejo po velikosti in zgradbi oligosaharidnih verig (Tuomola in sod., 1999b). Mukozni sloj, ki pokriva epiteijske celice črevesja, predstavlja površino, ki je prva v kontaktu z zaužitimi mikroorganizmi in ga zato smatramo kot pomembno mesto za

bakterijsko adhezijo in kolonizacijo (Ouwehand in sod., 2001). Sluz za študije *in vitro* najpogosteje pridobimo iz blata različnih živalskih vrst in človeka ali iz črevesja operiranih pacientov.

2.1.2.3 Vpliv na imunski odziv

Vpliv različnih učinkovin in mikroorganizmov na imunski odziv lahko proučujemo v pogojih *in vitro* z uporabo celičnih linij in se tako do določene mere izognemo poskusom na živalih. Pogosto so uporabljane monocitne celične linije človeškega izvora U-937, Mono mac 6 (MM6) in THP-1. Pogosto se uporabljajo tudi mononuklearne celice periferne krvi (PBMC, peripheral blood mononuclear cells), ki so pomembna komponenta imunskega sistema v prepoznavanju patogenih in komenzalnih mikroorganizmov. Celice PBMC z okroglim jedrom so npr. limfociti in monociti. Populacijo limfocitov sestavljajo v 75 odstotkih celice T ($CD4^+$ in $CD8^+$) in v 25 odstotkih celice B ter celice NK. Iz celokupne krvi jih izločimo s pomočjo fikola, hidrofilnega polisaharida, ki loči sloj limfocitov in monocitov (buffy coat) od sloja krvne plazme.

Kot model za mišje makrofage se uporablja mišja makrofagna celična linija RAW 264.7, lahko pa se poslužimo tudi peritonealnih makrofagov, ki jih pridobimo z izpiranjem trebušne votline po žrtvovanju živali.

2.1.2.3.1 Celična linija THP-1

THP-1 je monocitna celična linija, pridobljena iz krvi 1-letnega dečka z akutno monocitno levkemijo. Po stimulaciji s forbolnim estrom (12-tetradekanoilforbol-13-acetat) se monociti preobrazijo v aktivne makrofage s sposobnostjo pripenjanja na podlago in izločanja citokinov (Tsuchiya in sod., 1980). Prav pripenjanje na podlago je poleg sprememb v morfologiji celic in izražanju površinskih markerjev (npr. CD14), indikator preobrazbe monocitov v makrofage. Podobne metabolne in morfološke lastnosti celic THP-1 lahko izzovemo tudi z 1,25-dihidroksi vitaminom D3, retinojsko kislino ali določenimi citokini (dejavnik tumorske nekroze- α (TNF-α) in interferon-γ (IFN-γ)), vendar se lahko z uporabo različnih sredstev stopnja preobrazbe razlikuje. Diferencirane

celice THP-1 so zelo pogost model človeških makrofagov za proučevanje njihovega metabolizma, procesov vnetja in apoptoze *in vitro*.

2.1.2.3.2 Citokini

Citokini so skupina majhnih (molekulska masa manj kot 30 kD) regulacijskih proteinov, ki jih izločajo skoraj vse celice, predvsem pa celice T pomagalke (T_H) in makrofagi. Citokini, ki jih sproščata ta dva celična tipa, aktivirajo celotno mrežje sodelujočih celic. Uravnavajo razmnoževanje, diferenciacijo, efektorske funkcije in preživetje celic. Vendar v nasprotju s hormoni, ki delujejo na velike razdalje, večina citokinov deluje lokalno. Citokini se vežejo s specifičnimi receptorji na membrani tarčne celice in sprožijo signal, ki se prenese v notranjost celice in spremeni izražanje genov v njej. Na splošno se citokini vežejo na receptorje z močno afiniteto, zato lahko posredujejo biološke učinke že v pikomolarnih koncentracijah. Nekateri citokini se lahko vežejo z receptorji na membrani iste celice, ki jih izloča in delujejo avtokrino. Citokini se navadno vežejo na receptorje tarčnih celic, ki so v neposredni bližini celice, ki jih izloča, in delujejo parakrino. Najpomembnejša lastnost citokinov je pleiotropnost, tj. v različnih tarčnih celicah izzovejo različne biološke učinke. Delujejo lahko sinergistično, kar pomeni, da je skupen učinek dveh citokinov večji od aditivnega učinka posameznih citokinov, ali pa delujejo antagonistično. Citokini obsegajo družine molekul, kot so rastni faktorji, interferoni, interlevkini in kemokini. Ponavadi se začnejo izločati po aktivaciji določene celice, njihovo izločanje pa je kratkotrajno, to je od nekaj ur do nekaj dni. Citokini navadno delujejo kot medcelične sporočilne molekule, ki po vezavi na receptorje odzivnih celic tarč vzpodbudijo v njih določeno biološko aktivnost. Med številnimi fiziološkimi odzivi, za katere je potrebna udeležba citokinov, je razvoj humoralnega in celično posredovanega imunskega odziva, sprožitev vnetja, uravnavanje hemopoeze, uravnavanje celičnega razmnoževanja in diferenciacije ter celjenje tkiva. Glede na strukturo delimo citokine v družino hematopoetinskih, interferonskih, citokinov TNF in kemokinov.

Ob vezavi citokina na zanj specifičen receptor se sproži prenos signala. Receptorji se po vezavi citokina aktivirajo in agregirajo, kar povzroči, da se sproži signal, ki ga receptor pošlje v celico, na kateri je bil izražen. Zaradi agregacije pridejo citoplazemski deli

receptorjev v neposredno bližino, postanejo aktivni in se medsebojno fosforilirajo (Abbas in Lichtman, 2005; Vozelj, 2000).

- Interlevkin-1 (IL-1)

IL-1 izločajo predvsem aktivirani makrofagi, lahko pa tudi monociti, limfociti B, dendritske celice in celice endotelija. Tarčne celice so celice T_H in limfociti B. Poznamo dve obliki IL-1 (IL-1α in IL-1β), ki ju kodirata dva različna gena. Sta ključna vnetna citokina in imata osrednji pomen v imunskem odzivu. Sodelujeta pri aktivaciji celic T_H, vplivata na zorenje in klonsko ekspanzijo limfocitov B, povečata aktivnost celic NK (celic naravnih ubijalk), privabljata makrofage in nevtrofilce s pomočjo kemotakse in v jetrih pospešita nastajanje proteinov akutne faze vnetja. Povzročata vročino, kaheksijo, resorbcijo kosti in proteolizo mišic. V nekaterih primerih je učinek neposreden, v drugih pa posreden prek spodbuditve drugih citokinov, npr. IL-6 ali TNF-α.

- Interlevkin-10 (IL-10)

IL-10 ima močan biološki učinek na funkcijo celic T. Izdelujejo ga celične podvrste T_H0 in T_H2, njegovo izdelovanje pa preprečuje IFN-γ. Poglavitini funkciji IL-10 sta preprečevanje z lipopolisaharidi (LPS) spodbujenega izdelovanja citokinov IL-1, TNF-α, faktor, ki spodbuja razvoj granulocitnih in makrofagnih kolonij (GM-CSF) in faktor, ki spodbuja razvoj granulocitnih kolonij (G-CSF). Preprečuje tudi izdelovanje reaktivnih kisikovih presnovkov in dušikovega oksida (NO) v makrofagih. IL-10 imenujemo tudi zaviralni faktor sinteze citokinov, ker preprečuje sintezo citokinov, predvsem v makrofagih, celicah T_H in celicah NK. Končni učinek teh akcij je preprečevanje imunskega vnetja, ki ga posredujejo celice T. IL-10 pa ima situmulativen učinek na celice B in na tkivne bazofilce v sluznici.

- Interlevkin 12 (IL-12)

Izdelujejo ga celice B, monociti, makrofagi in dendritske celice. Je edini citokin, ki ga ne izdelujejo celice T in ga imamo zaradi njegovega delovanja na celice NK za mediatorja naravne imunosti. Zaradi učinkov na celice NK in celice T je IL-12 pomemben regulator

celično posredovanega imunskega odziva. Je najmočnejši znani stimulator celic NK. V celicah NK spodbuja izdelovanje IFN-γ, deluje sinergistično z IL-2 in okrepi citolitično aktivnost celic NK. Poleg tega pa vzpodbuja diferenciacijo celic T CD8 v zrele funkcijsko aktivne citotoksične celice. Oznaka IL-12 se uporablja za poimenovanje skupine z IL-12 povezanih proteinov. Bioaktivna oblika IL-12 je heterodimer z molekulsko težo (IL12p70), ki ga sestavljata neodvisno regulirani, z disulfidno vezjo povezani 40 kDa (p40) in 35 kDa (p35) podenoti. Podenota p40 se nahaja kot izvencelični monomer (IL12p40) ali dimer ($IL12(p40)_2$), ki lahko antagonistično vpliva na delovanje IL12p70. Bioaktivni IL-12 je močan regulator celično posredovane imunosti in ključni mediator celičnega delovanja Th1.

- Interlevkin 6 (IL-6)

IL-6 izdelujejo monociti, makrofagi in T_H2 celice v odgovor na že izločeni IL-1. Je izrazit pleiotropni citokin. Pospeši razmnoževanje in zorenja celic B, ter s tem posredno krepi izločanje imunoglobulinov. V obtoku ga odkrijemo pri okužbah s po Gramu negativnimi bakterijami, kjer se izloča v odgovor na TNF in ne v odgovor na LPS. IL-6 ne povzroča žilne tromboze ali okvare tkiva, ki jo vidimo pri delovanju LPS ali TNF. Je poglavitni mediator reakcije akutne faze in deluje neposredno na hepatocite, da sintetizirajo CRP, komponente komplementa in druge proteine akutne faze.

- Dejavnik tumorske nekroze α (TNF- α)

Izdelujejo ga makrofagi, celice T, celice NK, astrociti in Kupfferjeve celice kot odgovor na bakterije, viruse, različne citokine in imunske komplekse. Je poglavitni mediator imunskega odziva na po Gramu negativne bakterije, pomemben pa je tudi pri odzivu na druge infektivne mikroorganizme. Najpomembnejši celični vir TNF so z LPS-om aktivirani mononuklearni fagociti. Biološke aktivnosti TNF (kot posledica delovanje LPS) najbolje pojasnimo kot funkcijo količine. Pri majnhnih koncentracijah spodbudi žilne endotelijske celice k izražanju površinskih adhezijskih molekul, ki napravijo endotelijske celice lepljive najprej za nevtrofilce in nato za monocite in limfocite. To delovanje prispeva k nakopičenju levkocitov v vnetišču in je verjetno fiziološko najpomembnejši lokalni učinek TNF. Poleg tega TNF aktivira vnetne levkocite, da

ubijejo mikrobe in spodbudi mononuklearne fagocite k izločanju citokinov, predvsem IL-1, IL-6, samega TNF in kemokinov. Vsi ti učinki so kritični za vnetni odziv na mikrobe. Če je dražljaj LPS dovolj močan, se izločajo večje količine TNF. V takih razmerah vstopi TNF v obtok in deluje kot endokrini hormon. TNF je endogeni pirogen, ki deluje v hipotalamusnem termoregulacijskem območju in inducira vročino. Poleg tega deluje na hepatocite, da povečajo izločanje nekaterih proteinov akutne faze. TNF zavira delitev matičnih celic v kostnem mozgu zato kronično izpostavljanje TNF povzroči limfopenijo in imunsko pomanjkljivost.

- Kemokin IL-8

Kemokini (citokini, z močno sposobnostjo kemotakse) so velika družina strukturno homolognih citokinov, ki stimulirajo levkocite in regulirajo njihovo potovanje iz krvi v tkiva. V različne skupine jih delimo na podlagi števila in lokacije N-terminalnih cisteinskih ostankov. Dve glavni skupini predstavljajo kemokini CC, pri katerih so cisteinski ostanki drug poleg drugega in kemokini CXC, pri katerih so cisteinski ostanki ločeni z eno aminokislino. Pri procesih vnetja delujejo kemokini CXC v glavnem na nevtrofilce, kemokini CC pa na monocite, limfocite in eozinofilce. Kemokine, ki so vpleteni v vnetne procese kot odgovor na zunanje dražljaje proizvajajo levkociti. Kemokine, ki regulirajo prehod celic skozi tkiva pa proizvajajo različne celice v teh tkivih (levkociti, bronhalne epitelijske celice, keratinociti). IL-8 je predstavnih družine CXC kemokinov, ki privablja nevtrofilce na mesto vnetja (Abbas in Lichtman, 2005; Vozelj, 2000).

2.2 ČREVESJE IN IMUNSKI SISTEM

Črevesje je organ, v katerem se odvijajo kompleksne interakcije med hrano, mikrobi in gostiteljskimi celicami. Je del prebavnega sistema, ki je odgovoren za absorbcijo hranilnih snovi in vode. Sestavljata ga dve anatomski regiji: tanko črevo, ki se deli na dvanajstnik (*duodenum*), tešče (*jejunum*) in vito črevo (*ileum*) in debelo črevo, ki ga anatomsko razdelimo na kolon (*colon*), slepo črevo (*caecum*) in rektum (*rectum*), ki se nadaljuje v anus in predstavlja končni del prebavnega trakta. Črevesje je cevast organ z značilno histološko zgradbo, ki jo sestavljajo sluznica, podsluznica, mišična plast in seroza.

Sluznico (*tunica mucosa*) sestavlja epitelij (*lamina epithelialis*), propria (*lamina propria*) in mišična plast, sestavljena iz gladkih mišičnih celic (*lamina muscularis mucosae*). Absorbcijsko sposobnost črevesja zelo močno povečajo resice, ki so v dvanajstniku dolge in postajajo vedno krajše proti koncu tankega črevesa. V debelem črevesu resice niso prisotne. Resice se končujejo v t.i. Lieberkühnovih kriptah, na vrhu katerih so germinativne oblike enterocitov, ki se ves čas diferencirajo in pomikajo proti vrhu resic. Življenjska doba enterocitov je od 4-7 dni, odvisno od živalske vrste in pogojev v prebavilih. Proprio sluznice tvorijo rahlo vezivo z limfociti T in B (ki oblikujejo tudi limfatične folikle), fibroblasti, tkivni bazofilci, plazmatke, histiociti, gladka mišičnina, žile in živci. Črevesni epitelij sestavljajo štirje tipi celic, ki vsi izvirajo iz iste populacije zarodnih celic z vrha črevesnih kript. Ti različni tipi celic so: (1) visokoprizmatične absorbcijske celice oz. enterociti, katerih apikalna membrana je opremljena z mikrovili, (2) vrčaste celice, ki izločajo sluz, (3) enteroendokrine celice, ter (4) Panethove celice. Panethove celice predstavljajo populacijo specializiranih epitelnih celic, ki se nahajajo na dnu črevesnih kript in izločajo bakteriocidne proteine kot so lizocim, kriptidini (defenzini) in angiogenini. Kriptidini oz. α-defenzini so bakteriocidni proteini, shranjeni v granulah Panethovih celic. Njihovo sproščanje v lumen črevesja sproži stimulacija s strani mikrobov ali mikrobnih molekul kot so LPS, lipoteihojska kislina in muramil dipeptid. Pomembne celice črevesnega epitelija so tudi celice M (*angl*. microfold cells), ki imajo na apikalni površini mikroplike namesto mikrovilov, ter izločajo manjše količine prebavnih encimov kot absorbcijske celice. Celice M, ki jih uvrščamo med celice mononuklearnega fagocitnega sistema, se v epiteliju tankega črevesa nahajajo nad limfatičnimi folikli kot del s folikli povezanega epitelija (FAE, follicle-associated epithelium). To so nizkoprizmatične celice s številnimi vgrezninami bazalne membrane, ki je na teh mestih prekinjena. Z ostalimi celicami so povezane z dezmosomi. Njihova funkcija je prenos antigenov in lektinov (proteinske molekule na površini bakterij) do makrofagov s pomočjo endocitoze (Crawford, 1999; Greaves, 2000).

Prvo obrambno linijo črevesja predstavlja mukozni sloj, ki pokriva epitelij in vsebuje različne varovalne in protibakterijske substance, ki jih izločajo epitelne celice npr. komponente komplementa, mucine, encime in defenzine. Črevesni epitelij poleg tega, da je udeležen pri absorpcijskih, prebavnih in sekretornih procesih, ne predstavlja le pasivne

bariere, ampak igra pomembno obrambno vlogo prek interakcij z imunskim sistemom. Črevesne dendritske celice iztegujejo svoje podaljške skozi tesne stike med črevesnimi epitelijskimi celicami, kar jim omogoča lovljenje mikroorganizmov v lumnu črevesja. Iztegovanje dendritov v lumen je omogočen s signali, ki jih posredujejo kemokinski receptorji CX3CR1, iztegovanje podaljškov dendritskih celic pa ojača še signaliziranje TLR receptorjev na nekaterih epitelnih celicah črevesja (Pamer, 2007). Peyerjeve plošče (PP) so organizirano limfatično tkivo v steni tankega črevesa, ki vsebujejo limfatične folikle, napolnjenje z limfociti B, in interfolikularne populacije limfocitov T. *Lamina propria* vsebuje veliko število limfoidnih in mieloidnih celic, predvsem imunoglobulin A pozitivnih (IgA^+) plazmatk, razporejenih pod črevesnim epitelijem. Znotraj epitelija se nahajajo večinoma $CD8^+$ T celice. Vse več pa je dokazov, da je kvantiteta in kvaliteta celic odvisna od stimulacije, ki jo zagotovi endogena intestinalna mikrobiota (Ibnou-Zekri in sod., 2003).

2.2.1 Toll-u podobni receptorji (TLR-ji)

Večcelični organizmi so neprestano izpostavljeni mikrobom, ki jih lahko ogrozijo svojega gostitelja. Uspešno se lahko branijo le, če so sposobni pravočasnega prepoznavanja patogenih mikroorganizmov in jim tako preprečijo vstop in posledične poškodbe tkiva. Enterociti izražajo receptorje družine PRR (pattern recognition receptors), ki prepoznavajo specifične komponente mikroorganizmov (PAMP, pathogen-associated molecular patterns). Receptorji, ki igrajo pomembno vlogo pri detekciji PAMP, sodijo v družino TLR-jev in družino receptorjev NOD (nucleotide-binding oligomerization domain receptors). TLR-ji so del družine receptorjev PRR, ki prepoznavajo specifične komponente mikroorganizmov in predstavljajo pomembno povezavo med prirojeno in pridobljeno imunostjo. So glikoproteinski transmembranski receptorji tipa I, sestavljeni iz zunajcelične, transmembranske in znotrajcelične domene. Zunajcelični, N-terminalni del TLR je setavljen iz ponovitev bogatih z levcinom (leucin-rich repeat, LRR) in je odgovoren za vezavo z določenimi strukturnimi komponentami patogenih mikroorganizmov (PAMP). Variacije v LRR sekvencah generirajo receptorje, ki prepoznavajo številne različne PAMP. Znotrajcelična domena vsebuje zelo ohranjeno domeno TIR (Toll/IL-1 receptorska domena), ki je homologna signalni domeni receptorja IL-1 in lahko aktivira NF-κB

signalno pot in poznejšo gensko transkripcijo. Do sedaj je bilo pri sesalcih ugotovljenih 12 različnih TLR-jev. TLR2, 4 in 6 se nahajajo na plazemski membrani imunskih celic in prepoznavajo lipoproteine in lipoglikane na površini mikrobov. TLR2 deluje v povezavi z TLR1 in TLR6. TLR5 se prav tako nahaja na plazemski membrani in je specifičen za flagelin, ki je monomerni protein in sestavni del bakterijskih bičkov. TLR3 prepoznava virusno dvovijačno RNA, enovijačno RNR pa TLR7 in TLR8. TLR9 se nahaja znotraj celice in prepoznava mikrobno DNA. LPS prepoznava LPS receptorski kompleks, ki ga sestavljajo vsaj tri molekule: CD14, TLR4 in protein MD2. Vloga posamezne molekule tega kompleksa še ni povsem pojasnjena, ugotovljeno pa je, da je za stimulacijo odziva na LPS nujno potrebna interakcija med TLR4, MD2 in LPS. Celice gostiteljice proizvajajo protein MD2 v velikih količinah, saj ta deluje kot opsonin in tako izboljša fagocitozo po Gramu negativnih bakterij. V primeru vnetnega odziva, TLR-ji aktivirajo tkivne makrofage, da začnejo izločati provnetne citokine TNF, IL-1β, in IL-6, ki urejajo lokalni in sistemski vnetni odziv. TNF in IL-1β z aktivacijo lokalnega endotelija povzročita vazodilatacijo in posledično povečano prepustnost krvnih žil, kar omogoči prihod serumskih proteinov in levkocitov na mesto infekcije (Brightbill in sod., 1999; Werling in sod., 2009; Winkler in sod., 2007).

2.2.2 receptorji NOD

Receptorja poddružine NOD (NOD1 in NOD2) sta udeležena pri zaznavanju peptidoglikanov bakterij, vsak od njiju prepozna strukturno značilne fragmente peptidoglikana. Zaznavanje s strani NOD1 in NOD2 sproži sintezo provnetnih citokinov in kemokinov in nabor nevtrofilcev na mesto infekcije. NOD2 je nadvse pomemben za sintezo protibakterijskih peptidov, defenzinov, ki jih izločajo Panethove celice tankega črevesa (Medzhitov, 2007).

2.2.3 Transkripcijski faktor NF-κB

NF-κB je glavni transkripcijski faktor za uravnavanje genov, ki sprožijo signale za nastanek vnetja v črevesju. Pot aktivacije NF-κB se začne s signali, ki se prenesejo prek različnih receptorjev (receptorji za citokine in TLR), z bakterijskimi produkti in

efektorskimi proteini preko celične membrane. V citoplazmi celic se nahaja neaktivni NF-κB, na katerega je vezan inhibitor κB (IκB). Po tem, ko IκB serinska kinaza (IKK) fosforilira serinske ostanke na IκB, se nanj lahko veže ubikvitin. IκB z vezanim ubikvitinom je tarča za razgradnjo s 26S proteasomom, kar omogoči sprostitev NF-κB iz kompleksa IκB/ NF-κB. NF-κB se premakne v jedro, kjer aktivira prepisovanje različnih genov, vključno z geni, ki kodirajo citokine in druge mediatorje vnetja (Abbas in Lichtman, 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 REAGENTI IN GOJIŠČA

• BHI, tekoče gojišče Brain Heart Infusion (Merck, 1.10493.0500)
• BHI, agar Brain Heart Infusion (Merck, 1.13825.0510)
• agar Coliform (Merck, 1.10426.0500)
• črevo za dializo (Sigma D-9777)
• DMEM, agar Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Biocrom, AG T 043-01;
• BioWhittaker BE 12-709F)
• agar *E. coli* O157:H7 (Merck, 1.04036.0500)
• FBS, serum govejega zarodka (Gibco, 10106-169)
• Fluorescentni prekrivni medij (Dako, S3023)
• gentamicin (Gibco, 15750-037)
• glicerol (Merck, 4094)
• Hemacolor, komplet reagentov za barvanje histoloških in kliničnih preparatov (Merck, 1.11674)
• HEPES Hanks, Hanksova solna raztopina, N-[2-hidroksietil]piperazin-N'-2-[etan sulfonilna kislina] (10mM HEPES; pH 7,4)
• L-glutamin (Sigma, G-8540)
• Lipopolisaharidi iz *E. coli* O111:B4 (Sigma, L5293)
• MRS, tekoče gojišče De Man, Rogosa, Sharp (Merck, 1.10661; Oxoid, CM359)
• MRS, agar De Man, Rogosa, Sharp (Merck 1.10660; Oxoid, CM361)
• kalijev klorid (Merck, 1.04936)
• 2-merkaptoetanol (Sigma, M-7154)
• metanol (Merck, 1.06009)
• mucin iz prašičjega želodca, Type III (Sigma, M1778)
• barvilo za elektroforezo naphtol blue black (Sigma, N3393)
• natrijev hidrogen karbonat ($NaHCO_3$) (Kemika, 14467)
• natrijev klorid (Merck, 1.06404)
• pankreatin (Sigma, P3292)
• penicilin/streptomicin (Sigma, P4333)
• pepsin (Sigma, P-7000)

- plastične kanile za oralno aplikacijo (Instech Solomon, FTP2038, 20Gx38mm)
- resazurin natrijeva sol (Sigma, R7017)
- PMA (Sigma-Aldrich, P8139)
- rifampicin (Calbiochem, 557303)
- RPMI-1640 (Sigma, 5886)
- metil-1,2,-[3H]-timidin (Sigma, T4688)
- tripansko modrilo (Merck, 1.11732)
- Triton X-100 (Sigma, T-9284)
- za α verigo specifična s FITC konjugirana proti-mišja IgA protitelesa (Sigma, F 9384)
- za μ verigo specifična s FITC konjugirana proti-mišja IgM protitelesa (Sigma, F 9259)
- za γ verigo specifična s FITC konjugirana proti-mišja IgG protitelesa (Sigma, F 8264)
- dehidriran goveji žolč (Sigma, B 3883)
- žolčne soli No.3 (Biolife, 4111302)

3.2 BAKTERIJSKI SEVI IN GOJENJE BAKTERIJ

3.2.1 Sevi rodu *Lactobacillus* človeškega izvora

Lactobacilllus gasseri K7 (K7), je izolat iz blata teden dni starega dojenčka, z dokazanimi probiotičnimi lastnostmi, izoliran na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani. Sev je shranjen v zbirki mikroorganizmov na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za Zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani, pod oznako IM 105 in v Czech Collection of Microorganisms pod oznako CCM 7710.

Lactobacilllus gasseri K7 Rif^r (K7 Rif^r), je derivat seva K7, ki je z zaporednim precepljanjem v gojišča z naraščajočo koncentracijo rifampicina, pridobil odpornost proti rifampicinu. Sev je shranjen v zbirki mikroorganizmov na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za Zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani, pod oznako IM 238.

Lactobacillus gasseri LF221 (LF), (prej *Lactobacillus acidophilus* LF221), je izolat iz blata novorojenčka, izoliran na Instituto di Microbiologia, Facolta di Agraria, Università Cattolica dal Sacro Cuore, Piacenza, Italia. Raziskave so potrdile, da proizvaja dva bakteriocina (Bogovič Matijašić in Rogelj, 1998). Sev je shranjen v Zbirki industrijskih mikroorganizmov (ZIM) v Ljubljani, ki je registrirana kot WDCM810 (WFCC-MIRCEN World Data Centre for Microorganisms (WDCM), pod oznako ZIM BI 50.

Lactobacillus gasseri LF221 bac^- (LF bac^-), je mutant seva LF, ki ne tvori bakteriocinov. Pridobili smo ga na Katedri za mlekarstvo, Oddelku za zootehniko, Biotehniški fakulteti, Univerzi v Ljubljani; s tretiranjem seva LF221 z N,N-nitrozoguanidinom. Sev je shranjen v Zbirki industrijskih mikroorganizmov (ZIM) v Ljubljani, ki je registrirana kot WDCM810 (WFCC-MIRCEN World Data Centre for Microorganisms (WDCM), pod oznako ZIM BI 43.

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG), je izolat s številnimi dokazanimi probiotičnimi lastnostmi. Sev je shranjen v ameriški celični zbirki (American Type Cell Collection;

ATTC) pod oznako ATCC 53103. LGG je tržna znamka v lasti Finske mlekarske korporacije Valio.

Lactobacillus casei imunitass DN114 je naravni izolat iz rodu laktobacilov, pridobljen v raziskovalnem centru DANONE Vitapole iz fermentiranega mleka. Zaradi dokazanih probiotičnih lastnosti ter dobrega preživetja v izdelkih in prebavilih, ga uporabljajo za proizvodnjo probiotičnih izdelkov. Sev, ki smo ga uporabili v naši študiji, je bil izoliran iz izdelka Actimel. Pripadnost vrsti *Lactobacillus casei* smo potrdili z metodo PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za to vrsto.

L. delbrueckii ssp. bulgaricus BF (BF) je izolat iz prehranskega dopolnila Biofank (Kamy Medical, Bolgarija). Sev je izoliran iz tradicionalnega bolgarskega jogurta in je v lasti družbe Selur (Sofia, Bolgarija). Sev je shranjen tudi v zbirki mikroorganizmov na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za Zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani pod oznako IM 376.

Lactobacillus sakei NCDO 2714 smo zaradi občutljivosti za bakteriocine uporabljali kot indikatorski sev. Shranjen je v zbirki mikroorganizmov NCDO (National Collection of Dairy Organisms, National Institute for Dairying, Reading England) pod oznako NCDO 2714.

3.2.2 Sevi rodu *Lactobacillus* živalskega izvora

Lactobacillus reuteri 9/17 (IM 298), 9/26 (IM 278), 2/26 (IM 280), 14/26 (IM 279), 2/18 (IM 303), 12/26 (IM 300) in 10/26 (IM 301), *Lactobacillus crispatus/amylovorus* 4/26 (IM 276) in 2/25 (IM 299) ter *Lactobacillus vaginalis/reuteri* 13/26 (IM 302), 11/26 (IM 277) in 6/17 (IM 297) so izolati iz prebavil 3-5 tednov starih odstavljenih pujskov, izolirani na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za Zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani in shranjeni v zbirki mikroorganizmov na isti ustanovi, pod oznakami, ki so navedene v oklepajih.

3.2.3 Patogeni in potencialno patogeni sevi

S. aureus RN 4220 (Kreiswirth in sod., 1983) smo prejeli od S. Vesterlund, Functional Foods Forum, University of Turku, Finland. Sevi vrste *S. aureus* so potencialno patogene bakterije, prisotne predvsem na nosni sluznici in črevesju človeka in živali. Sev RN 4220 je sposoben dobrega pripenjanja na črevesno sluz (Vesterlund in sod., 2006).

E. coli O157:H7 je klinični izolat Laboratorija za bakteriološko diagnostiko črevesnih infekcij, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete v Ljubljani, ki ga je za poskus podarila dr. Alenka Andlovic, vodja laboratorija.

E. coli O8:K88:H9Ent$^+$ je enterotoksigena *E. coli*, izolirana iz črevesja sesnih pujskov, ki so oboleli za drisko. Specifični pili, ki posedujejo antigen K88 na zunanji membrani bakterijske celice, omogočajo patogenemu sevu dobre lastnosti pripenjanja na črevesno sluznico (Talafantová in sod., 1987). Sev *E. coli* O8:K88:H9Ent$^+$ in netoksigeno mutanto *E. coli* O8:K88:H9Ent$^-$ smo prejeli od prof. A. Bombe, Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovaška (Bomba in sod., 1999).

E. coli K-12 smo prejeli od S. Vesterlund, Functional Foods Forum, University of Turku, Finland. Sev K-12 je sicer zelo razširjeni laboratorijski mikroorganizem, za katerega je poznano tudi nukleotidno zaporedje celotnega genoma.

Laktobacile smo gojili v tekočem gojišču MRS ali v/na trdnem gojišču MRS pri 37 °C v anaerobnih pogojih. *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 smo inkubirali pri 30 °C. Pred poskusi smo laktobacile, ki so bili hranjeni na -20 °C vcepili v tekoče gojišče MRS (1 % v/v) in inkubirali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo kulturo vcepili (1 % v/v) v sveže gojišče MRS in inkubirali 18 ur pri 37 °C. Postopek smo naslednji dan ponovili, tako da smo v poskusih uporabili 18-urno kulturo laktobacilov po dvakratnem precepljanju. Koncentracijo celic laktobacilov smo ugotavljali z metodo štetja kolonij v ali na trdnem gojišču MRS (Singleton, 1992). V 18-urni kulturi je število laktobacilov približno $1x10^8$ do $1x10^9$ ke/mL. Glede na pričakovano koncentracijo bakterij smo izračunali, koliko sveže kulture potrebujemo za posamezen poskus. Dejansko število bakterij smo ugotavljali z

nacepljanjem na plošče. Patogene bakterije smo gojili na enak način vendar z uporabo gojišča BHI.

Preglednica 1: **Pogoji za kultivacijo bakterijskih sevov.**

Table 1: **Conditions for cultivation of bacterial strains**

Bakterijski sev	Gojišče	Atmosferski pogoji[a]	Temperatura (°C)
L. gasseri K7	MRS	anaerobno	37
L. gasseri K7 Rif^r	MRS+rif	anaerobno	37
L.gaserri LF221	MRS	anaerobno	37
L. gasseri LF221 (bac-)	MRS	anaerobno	37
L. rhamnosus GG	MRS	anaerobno	37
L. casei immunitass DN114	MRS	anaerobno	37
L. ssp. bulgaricus BF	MRS	anaerobno	42
L. sakei NCDO 2714	MRS	anaerobno	30
L. reuteri 9/17, 9/26, 2/26, 14/26, 2/18, in 12/26, 10/26	MRS	anaerobno	37
L. crispatus/amylovorus 4/26 in 2/25	MRS	anaerobno	37
L. vaginalis/reuteri 13/26, 11/26 in 6/17	MRS	anaerobno	37
S. aureus RN 4220	BHI	aerobno	37
E. coli O157:H7	BHI	aerobno	37
E. coli O8:K88:H9Ent$^+$ in Ent$^-$	BHI	aerobno	37
E. coli K-12	BHI	aerobno	37

[a] Anaerobne pogoje smo zagotovili s pomočjo sistemov Generbag v neprodušnih vrečkah ali Generbox v anaerobnih škatlah (Biomerieux, Marcy d'Etoile, Francija).

3.3 UGOTAVLJANJE SPOSOBNOSTI PREŽIVETJA V SIMULIRANEM ŽELODČNEM IN ČREVESNEM SOKU

Sposobnost preživetja izbranih probiotičnih sevov smo ugotavljali v simuliranem želodčnem in črevesnem soku pri temperaturi in času inkubacije, ki naj bi čimbolj ponazarjali razmere v prebavnem traktu. Celice iz 18-urne kulture laktobacilov smo prenesli v 50 mL simuliranega želodčnega soka (NaCl 125 mmol/l, KCl 7 mmol/l, $NaHCO_3$ 45 mmol/l in pepsin 3 g/l) z vrednostjo pH 2,3 oziroma 7. Vzorčili smo ob času 0, po 90 in po 180 minutah. Število preživelih mikroorganizmov smo ugotavljali z metodo štetja na ploščah. Laktobacile smo po 3-urni inkubaciji v simuliranem želodčnem soku izločili s centrifugiranjem ter jih prenesli v simuliran črevesni sok (0,1% pankreatina in 0,3% žolčnih soli, pH 8 (No. 3, Biolife)). Vzorčili smo pri času 0, po 90 in po 180 minutah in število preživelih mikroorganizmov ugotavljali z metodo štetja na ploščah (Fernández in sod., 2003).

3.4 UGOTAVLJANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI

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

Sposobnost potencialnih probiotičnih sevov za produkcijo protibakterijskih snovi smo ugotavljali z difuzijsko metodo v agarju (metoda po Tagg-u (1976) z modifikacijami po Bogovič Matijašić in Rogelj (1998). Na osušeno plast modificiranega trdnega gojišča MRS (10 mL) v petrijevih ploščah smo na označena mesta nacepili 5 µl 18-urne kulture testnih sevov laktobacilov, po dvakratnem precepljanju. Plošče smo inkubirali 24 ur pri 37 °C v anaerobnih pogojih. Naslednji dan smo tako pripravljene plošče z izraslimi testnimi sevi prelili s poltrdim gojiščem, ustreznim za posamezni indikatorski sev (BHI, MRS ali RCM), ki je vsebovalo 18-urno kulturo indikatorskih sevov (50 µl kulture indikatorskega seva smo resuspendirali v 5 mL poltrdega gojišča). Plošče smo ponovno inkubirali 24 ur pri 37 °C v anaerobnih pogojih. Prisotnost protibakterijskih snovi v vzorcu smo po inkubaciji potrdili s pojavom cone inhibicije rasti indikatorskih sevov na področju okrog lise z izraslimi kolonijami testnega seva.

3.4.1.1 Priprava brezceličnih supernatantov

Testne seve smo vcepili (1% v/v) v 25 mL svežega gojišča MRS in inkubirali 18 ur pri 37 °C. Kulture smo 15 minut centrifugirali pri 3500 g in 4 °C. Izmerili smo vrednost pH supernatantov, nato smo jih v količini 10 mL odpipetirali v stekleničke za liofiliziranje, zamrznili pri -20 °C in zamrznjene liofilizirali. Supernatante smo po liofilizaciji hranili v hladilniku in pred poskusom resuspendirali v 2 mL sterilne demineralizirane vode, tako da smo pridobili 5-krat koncentriran supernatant posameznega testnega seva.

3.4.2 Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti z metodo difuzije v agarju (MDA)

Osušeno plast trdnega gojišča BHI smo prelili s 5 mL poltrdega gojišča, ustreznega za posamezni indikatorski sev (BHI, MRS ali RCM), ki je vsebovalo 25 µl kulture indikatorskega seva. V trdno gojišče smo izrezali luknje s premerom 5 mm in vanje odpipetirali 100 µl supernatanta testnega seva. Plošče smo pustili v zaščitni mikrobiološki komori, da je pripravek difundiral v trdno gojišče, zatem pa jih inkubirali 24 ur pri 37 °C. Prisotnost protibakterijskih snovi v vzorcu smo po inkubaciji potrdili s pojavom cone inhibicije rasti indikatorskih sevov na področju okrog luknje z nanešenim vzorcem. Vpliv prisotne kisline oziroma nizke vrednosti pH smo preverili tako, da smo namesto supernatantov testnih bakterij v izrezane luknjice odpipetirali tekoče gojišče MRS, ki smo mu dodali toliko mlečne kisline, da smo pridobili raztopine z različnimi vrednostmi pH (3,8, 4,0, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8).

3.5 UGOTAVLJANJE VARNOSTI PROBIOTIKOV

3.5.1 Razgradnja sluzi

3.5.1.1 Čiščenje prašičje želodčne sluzi

V testu razgradnje sluzi smo uporabili delno očiščeno prašičjo želodčno sluz (mucin from porcine stomach type III, Sigma M 1778). Pred uporabo je bilo potrebno sluz dodatno očistiti, zato smo 10 g sluzi v liofilizirani obliki raztopili v 500 mL 0,02 M fosfatnega pufra z 0,1 M NaCl (PBS), dodali 1 mL toluena in mešali eno uro na magnetnem mešalu.

Nato smo z 2 M NaOH umerili vrednost pH raztopine na 7,2. Raztopino smo mešali 24 ur na magnetnem mešalu in nato 1 uro centrifugirali pri 4 °C in 10.000 g. Supernatant smo ohladili na 0±2 °C in dodali ohlajen etanol do 60-odstotne končne koncentracije (v/v) in tako oborili proteine želodčne sluzi. Proteine smo s pomočjo močnega stresanja raztopili v 60 mL destilirane vode in jih prelili v črevo za dializo (dialysis tubing, Sigma D-9777). Dializa v destilirani vodi je potekala 24 ur, destilirano vodo smo menjali na 8 ur. Po 24 urah smo vsebino iz dializnega črevesa odpipetirali v stekleničke in liofilizirali. Z opisanim postopkom smo pridobili 3,8 g prečiščene prašičje želodčne sluzi, ki smo jo uporabili pri pripravi gojišča za test razgradnje sluzi (gojišče B). Za čiščenje prašičje sluzi, pripravo gojišča B in test razgradnje sluzi smo uporabljali metode, ki so jih opisali (Fernández in sod., 2005) in (Zhou in sod., 2001).

Sestavine gojišča B smo raztopili v destilirani vodi. Pripravili smo 760 mL gojišča in ga razdelili v dve steklenički po 380 mL, v eni od stekleničk smo gojišču B dodali še 3 odstotke glukoze (30 g/L). Tako pripravljenemu gojišču B in gojišču B z glukozo smo z 2 M NaOH umerili vrednost pH na 7,2. Z gojiščem B in gojiščem B z dodano glukozo smo prelili 4 petrijeve plošče, jih razdelili na 6 delov in na vsak del nanesli 10 µL kulture testnih sevov. Plošče smo anaerobno inkubirali 3 dni pri 37 °C. Po trodnevni inkubaciji smo plošče prelili z 0,1-odstotnim Amido Black v 3,5 M ocetni kislini, počakali 30 minut, da so se enakomerno obarvale in jih nato sprali z 1,2 M ocetno kislino. Po spiranju smo na ploščah ugotavljali prisotnost cone razgradnje sluzi.

Sposobnost razgradnje sluzi smo preskušali pri vseh izolatih iz odstavljenih pujskov (poglavje material in metode 3.3), pri LGG ter K7. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili *E. coli* O8:K88:H9Ent^{+}, *E. coli* O8:K88:H9Ent^{-} in *S. aureus* RN 4220. Kot negativno kontrolo smo uporabili seva *E. coli* O8:K88:H9Ent^{+} in LGG, ki sta bila 10 minut izpostavljena 100 °C.

3.5.2 Ugotavljanje odpornosti proti antibiotikom

Odpornost proti antibiotikom smo preskušali pri človeškem izolatu K7 in prašičjih izolatih *L. reuteri* 9/17, 9/26, 2/26, 14/26, 2/18, 12/26 in 10/26, *L. crispatus/amylovorus* 4/26 in 2/25 ter *L. vaginalis/reuteri* 13/26, 11/26 in 6/17. Suspenzije bakterijskih celic smo

pripravili tako, da smo celice iz 18-urne kulture sprali in resuspendirali v tolikšni količini fiziološke raztopine, da je motnost ustrezala vrednosti 1 po Mc Farlandovi lestvici. Uporabili smo gojišče, ki smo ga sestavili iz 90-odstotnega Mueler Hinton (Merck, Nemčija) in 10-odstotnega gojišča MRS ter uravnali na vrednost pH=6,7 (Klare in sod., 2005). Petrijevke s po 25 ml gojišča smo osušili, na površino nacepili po 100 µl suspenzije celic in nanesli na površino trakove E-test® z antibiotiki. Plošče smo inkubirali 48 ur pri 37 °C v anaerobnih razmerah. Rezultate minimalnih inhibitornih koncentracij (MIC) smo odčitali po navodilih proizvajalca AB Biodisk (Solna, Švedska).

3.6 UGOTAVLJANJE HIDROFOBNOSTI

Uporabili smo 18-urno kulturo testnih sevov, ki smo jih predhodno dvakrat precepili. Kulturo smo 10 minut centrifugirali pri 4000 g in 5 ºC. Supernatant smo odlili in celice trikrat sprali s PBS. Celice smo resuspendirali v PBS in uravnali optično gostoto na vrednost 1 pri 560 nm. 3 mL celične suspenzije smo dodali 0,6 mL n-heksadekana in 2 minuti mešali na vrtičniku. Vzorce smo inkubirali 1 uro pri 37 ºC. Po inkubaciji smo vodno fazo previdno odpipetirali v 2 mL kiveto in ponovno zmerili optično gostoto pri 560 nm. Odstotek hidrofobnosti smo izračunali po naslednji formuli:

$$\% \text{ hidrofobnosti} = [(A_0-A)/A_0]x100 \qquad ...(1)$$

A_0 - absorbanca vodne faze pred stikom z N-heksadekanom
A - absorbanca vodne faze po stiku z N-heksadekanom
(Vinderola in sod., 2004)

3.7 UGOTAVLJANJE SPOSOBNOSTI ADHEZIJE (PRIPENJANJA MIKROORGANIZMOV)

Sposobnost pripenjanja izbranih sevov mikroorganizmov smo preizkusili z metodami *in vitro* na celični liniji Caco-2 in na sluzi človeškega in prašičjega izvora.

3.7.1 Celice Caco-2

Celično linijo smo dobili iz ameriške zbirke tipskih kultur (American Type Culture Collection; ATCC), v kateri je shranjena pod oznako ATCC HTB 37. Celice Caco-2 so celična linija, ki so jo pridobili iz adenokarcinoma debelega črevesa 72-letnega pacienta (Fogh in sod., 1977; Pinto in sod., 1983). Popolnoma diferencirane celice Caco-2 imajo v pogojih *in vitro* lastnosti celic tankega črevesa (enterocitov) in so najpogosteje uporabljen model za proučevanje sposobnosti adhezije bakterij na črevesno sluznico.

3.7.2 Gojišče za celice Caco-2

Celice Caco-2 smo gojili v gojišču DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) z dodatki. Osnovno gojišče DMEM (BioWhittaker, BE 12-709F ali Biocrom, AG T 043-01) smo pripravili po navodilih proizvajalca. Nato smo dodali sterilno pripravljen plodov serum goveda (FBS) v 16-odstotni končni koncentraciji (v/v) in antibiotik gentamicin v končni koncentraciji 50 μg/mL.

3.7.3 Gojenje celic Caco-2

Delo s celičnimi kulturami je vedno potekalo v sterilnih pogojih, v mikrobiološki komori. Celice smo vzdrževali v gojišču DMEM z dodatki, v inkubatorju pri 37 °C v aerobnih razmerah s 5% CO_2. Gojišče smo menjali 3-krat tedensko. Celice Caco-2 se pritrdijo na površino in se razmnožujejo, dokler ne pride do stikanja celic, ki površino v celoti zapolnijo. Ko jo popolnoma prekrijejo v eni plasti, se nehajo deliti in rečemo, da so dosegle fazo konfluentne rasti. Če jim menjamo gojišče, se začnejo diferencirati. Ko so se celice začele stikati (po približno enem tednu), smo jih gojili še dva tedna v enakih pogojih, da smo dosegli popolno diferenciacijo. Za gojenje celic smo uporabljali polistirenske stekleničke s površino 75 cm^2 (Greiner, 658 170 ali TPP, 90076). Celice v stekleničkah smo prelili s 15 mL gojišča. Pred poskusom smo celice gojili v polistirenskih ploščah s 24 vdolbinicami, s površino posamezne vdolbinice 2 cm^2 (TPP, 92424). V vsako vdolbinico s pritrjenimi celicami v koncentraciji 1 x 10^4, smo odpipetirali 1 mL gojišča. Celice smo presajali 1-krat tedensko (ena pasaža). Da smo celice odlepili od podlage, smo

jih najprej sprali s PBS, nato pa medcelične povezave prekinili z 0,25-odstotnim Tripsin-EDTA (EDTA-etilendiaminotetraocetna kislina). Celice smo prekrili z raztopino Tripsin-EDTA, jo po 1 minuti odstranili in nato počakali še 10 minut, da je Tripsin-EDTA, ki se je zadržal med celicami, razgradil medcelične povezave. Celice smo nato resuspendirali v gojišču DMEM in jih prešteli s hemocitometrom. Tako za razmnoževanje kot za pripravo celic za poskuse smo v gojitvene posodice nasadili po 4 x 10^4 celic. V poskusih smo uporabljali tri tedne stare celice. Vsaj 24 ur pred začetkom poskusa smo dodali gojišče DMEM brez antibiotika. V poskusih smo uporabili celice med 5. in 22. pasažo (Bogovič Matijašić in sod., 2003; Bogovič Matijašić in sod., 2006a; Fajdiga, 2006).

3.7.4 Črevesna sluz človeškega in živalskega izvora

Za pridobivanje sluzi iz črevesja, smo del zdravega, reseciranega črevesja pazljivo sprali s PBS, ki je vseboval 0,01 odstotka želatine in zatem nežno postrgali sluz s sluznice s pomočjo gumijaste spatule. Tako pridobljeno sluz smo centrifugirali 10 minut pri 1300 g, da smo izločili celične ostanke in bakterije. Določili smo vsebnost proteinov v črevesni sluzi (Lowry in sod., 1951) in jo do uporabe hranili pri temperaturi -20 ºC. Pred poskusom smo sluz raztopili v Hanksovi solni raztopini (HH), da smo dosegli koncentracijo proteinov 0,5 mg/mL (Lauková in sod., 2004; Vesterlund, 2006).

3.7.5 Sposobnost adhezije na celice Caco-2

Ugotavljanje adhezivnih sposobnosti testnih probiotičnih sevov je potekalo *in vitro* na črevesnih epitelnih celicah Caco-2. Uporabljali smo tri tedne stare, torej diferencirane celice Caco-2 in proučevali sposobnost vezave izbranih bakterij na celice. Celice Caco-2 smo na dan vsakega poskusa šteli. Število celic je bilo v vseh poskusih približno 2-4 x 10^5 na cm^2. Bakterije smo po 18 urah inkubacije centrifugirali in pelet trikrat sprali s PBS. Po tretjem spiranju smo bakterije resuspendirali v PBS in uravnali optično gostoto na 0,5 pri 600 nm, tako da je koncentracija bakterij znašala približno $5x10^8$ do $5x10^9$ KE/mL odvisno od posameznega seva. Po dvakratnem spiranju celic Caco-2 s PBS, smo v vsako vdolbinico plošče s 24-imi vdolbinicami nanesli 0,5 mL bakterijske raztopine in 30 min inkubirali pri 37 °C v atmosferi s 5% CO_2. Nevezane bakterije smo odstranili s trikratnim

spiranjem s PBS. Po inkubaciji smo celice Caco-2 lizirali s Tritonom X-100 (0,05-odstotni) in število vezanih laktobacilov ovrednotili z metodo štetja na ploščah na gojišču MRS (Bogovič Matijašić in sod., 2003; Bogovič Matijašić in sod., 2006a).

3.7.6 Sposobnost adhezije in testi tekmovanja na sluzi človeškega in prašičjega izvora

Študije adhezije in sposobnost tekmovanja testnih probiotičnih sevov z izbrano patogeno bakterijo (*S. aureus* , *E. coli*) na črevesni sluzi so bile opravljene s pomočjo radioaktivnega označevanja preiskovanih bakterij in odčitavanja deleža vezanih bakterij z merjenjem radioaktivnosti s tekočinsko scintilometrijo (Ouwehand in sod., 1999). V vsako vdolbinico polistirenske mikrotitrske plošče s 96-imi vdolbinicami smo nanesli 100 µl prečiščene suspenzije sluzi in inkubirali 15-20 ur pri 4 ºC. Po inkubaciji smo odstranili nevezane komponente sluzi z dvakratnim spiranjem z 200 µl HH (Kirjavainen in sod., 1998). Vdolbinice mikrotitrske plošče smo po inkubaciji sprali z 250 µl HH. Preiskovane seve bakterij smo 18 ur gojili v bujonu MRS pri 37 ºC. Gojišču smo dodali 5 µl/mL metil-1,2,-[3H]-timidina, da smo bakterije metabolično označili. Bakterije smo po 18 urah inkubacije centrifugirali in pelet trikrat sprali s PBS. Po tretjem spiranju smo bakterije resuspendirali v PBS in uravnali število celic z umerjanjem optične gostote na 0,5 pri 600 nm, tako da smo dobili približno 1-2×10^8 KE/ml. V vsako vdolbinico smo dodali 100 µl bakterijske suspenzije in inkubirali eno uro in pol pri 37 ºC (Tuomola in sod., 2000). V testih tekmovanja smo istočasno dodali 50 µl laktobacilov in 50 µl *E. coli* ali *S. aureus*. Preverili smo tudi vpliv laktobacilov na adhezijo pri dveh koncentracijah *E. coli* ali *S. aureus*, zato smo v testih tekmovanja uporabili razmerja *E. coli* ali *S. aureus* in laktobacili 1:1 in 1:10. Tako kot v predhodnih testih smo bakterije resuspendirali v PBS in uravnali število celic z umerjanjem optične gostote na 0,5 pri 600 nm, nato pa *E. coli* oziroma *S. aureus* ustrezno razredčili v PBS. Pri testih tekmovanja smo radioaktivno označili le *E. coli* ali *S. aureus*, vezavo pa ovrednotili glede na rezultate, kjer je bil v testu uporabljeni sev *E. coli* ali *S. aureus* sam.

3.8 UGOTAVLJANJE VPLIVA IZBRANIH LAKTOBACILOV NA CITOKINSKI ODZIV CELIČNE LINIJE THP-1

3.8.1 Celice THP-1

Celično linijo smo dobili iz ameriške zbirke tipskih kultur (American Type Culture Collection; ATCC), v kateri je shranjena pod številko ATCC TIB-202. THP-1 je monocitna celična linija, pridobljena iz krvi 1-letnega dečka obolelega za akutno monocitno levkemijo. Po stimulaciji s PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) se monociti preobrazijo v aktivne makrofage s sposobnostjo pripenjanja na podlago in izločanja citokinov (Tsuchiya in sod., 1980).

3.8.2 Gojenje celic THP-1

Celično linijo smo gojili s pomočjo standardnih tehnik za celične kulture v gojišču RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Sigma, R5886) z dodatki. Že pripravljenemu gojišču (500 mL) smo dodali 5,5 mL 200 mM L-glutamina, 2 mL mešanice streptomicina in penicilina, ki je vsebovala 5000 U/mL streptomicina in 5000 µg/mL penicilina, 50 mL deaktiviranega telečjega seruma in 1,748 µL 14,3 M 2-merkaptoetanola.

Delo s celično kulturo je vedno potekalo v sterilnih pogojih, v mikrobiološki komori. Celice smo vzdrževali v gojišču RPMI 1640 z dodatki, v CO_2 inkubatorju pri 37 °C v aerobnih razmerah s 5% CO_2. Za gojenje celic smo uporabljali polistirenske stekleničke s površino 75 cm^2 (TPP, 90076), v katerih so bile celice suspendirane v gojišču in se niso pritrdile na podlago. Ko so se monociti pričeli deliti, tvoriti skupke v obliki grozdov, smo jih centrifugirali 5 min pri 1600 g in 4 °C, prešteli in resuspendirali v 20 mL gojišča RPMI 1640, tako da je bila njihova končna koncentracija med $5x10^5$ in $7x10^5$ celic/mL. Celice smo ponovno inkubirali, dokler nismo pridobili zadostnega števila celic za izvedbo poskusa. Gojišče smo menjali v povprečju 3-krat tedensko. Celice smo šteli tako, da smo 100 µL celic, resupendiranih v RPMI, odpipetirali v epruvetko, ki je vsebovala 900 µL tripanskega modrila, 100 µL te suspenzije odpipetirali v Neubauerjevo komoro in celice, ki so se obarvale modro (žive celice z ohranjeno celično membrano) prešteli s pomočjo svetlobnega mikroskopa.

3.8.3 Priprava celic THP-1 za poskus

Vsaj 24 ur pred začetkom poskusa smo celice gojili v gojišču RPMI, ki ni vsebovalo antibiotika. Pred poskusom smo celice prešteli, resuspendirali v gojišču RPMI 1640 in jih v koncentraciji $1x10^6$ celic/mL odpipetirali v polistirenske plošče s 24 vdolbinicami, tako da je vdolbinica vsebovala $1x10^6$ celic. Gojišču RPMI smo dodali PMA v koncentraciji 10 ng/mL in plošče inkubirali 24 ur v inkubatorju pri 37 °C v aerobnih razmerah s 5% CO_2. Pod vplivom PMA so se monociti celične linije THP-1 diferencirali v makrofage in se pritrdili na dno polistirenske plošče. Pritrjene celice smo sprali z gojiščem RPMI brez PMA in antibiotikov in ponovno inkubirali 24 ur v CO_2 inkubatorju pri 37 °C v aerobnih razmerah s 5% CO_2. V poskusih smo uporabili celice med 8. in 12. pasažo.

3.8.4 Priprava mikroorganizmov za poskus

V testu smo uporabili naslednje seve: *L. crispatus/amylovorus* 4/26, LGG, K7, *L. casei imunitass* DN114 in *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* BF. Kulturo laktobacilov, ki je bila predtem 2-krat precepljena, smo centrifugirali in trikrat sprali s PBS. Po tretjem spiranju smo bakterije resuspendirali v PBS in uravnali število celic z umerjanjem optične gostote na 0,5 pri 600 nm, pri čemer smo dobili približno $1\text{-}2\times10^8$ KE/mL. V predhodnem poskusu smo se prepričali, da se število KE laktobacilov ohrani, če jih resuspendiramo v gojišču RPMI. Pred poskusom smo suspenzijo laktobacilov v PBS ponovno centrifugirali in resuspendirali v istem volumnu gojišča RPMI.

3.8.5 Potek poskusa

V tri zaporedne vdolbinice z diferenciranimi celicami THP-1 smo odpipetirali po 1 mL

- gojišča RPMI,
- v RPMI resuspendiranega izbranega seva laktobacilov,
- RPMI z dodanimi lipopolisaharidi (LPS) *E. coli* (O111:B4) v končni koncentraciji 0,4 µg/mL,
- v RPMI resuspendiranega izbranega seva laktobacilov z dodanimi lipopolisaharidi (LPS) *E. coli* (O111:B4) v končni koncentraciji 0,4 µg/mL,

Tako pripravljeno ploščo s 24 vdolbinicami smo inkubirali 24 ur v inkubatorju pri 37 °C v aerobnih razmerah s 5% CO_2. Po 24-urni inkubaciji smo odpipetirali supernatante celične linije THP-1 in jih do opravljanja meritev koncentracije šestih različnih citokinov hranili pri -20 °C.

3.8.5.1 Vrednotenje citokinov z metodo pretočne citometrije

Vpliv izbranih laktobacilov na imunski odziv celične linije THP-1 smo ugotavljali s pomočjo sistema BD™ CBA (Cytometric Bead Array, Becton Dickinson, ZDA). Koncentracije izločenih citokinov v supernatantih celične linije smo merili z metodo pretočne citometrije, na tekočinskem citometru BD FACSCalibur™. Izbrali smo komplet reagentov za vrednotenje vnetja pri človeku (Human inflammation kit, BD), ki omogoča merjenje koncentracij IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF in IL-12p70 v pg/mL.
Šest populacij lovilnih kroglic s specifičnimi intenzivnostmi fluoresciranja je prekritih s specifičnimi protitelesi za proteine IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF in IL-12p70. Lovilne kroglice, PE-konjugirana detekcijska protitelesa in rekombinantne standarde ali testne vzorce skupaj inkubiramo, da pride do tvorbe sendvič kompleksov. BD™ CBA programska oprema za analiziranje nam po opravljenih meritvah na pretočnem citometru rezultate poda grafično in v tabelah. Iz meritev, pridobljenih pri testiranju negativne kontrole in standardov, smo izdelali umeritveno krivuljo, s pomočjo katere smo določili koncentracijo posameznega citokina v preiskovanih vzorcih.

Reagenti:

- Lovilne kroglice (human inflammation capture beads) s specifično intenziteto fluoresciranja so razporejene od najsvetlejše do najtemnejše A1 (IL-8), A2 (IL-1β), A3 (IL-6), A4 (IL-10), A5 (TNF), A6 (IL-12p70)
- Lovilne kroglice za umeritev citometra (cytometer setup beads)
- Reagent B: PE-konjugirana protitelesa proti človeškim citokinom IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF in IL-12p70
- Standardi za meritve vnetja pri človeku (human inflammation standards), ki vsebujejo liofilizirane rekombinatne človeške proteine; vsak standardni vzorec

vsebuje po 50 ng/mL posameznega proteina (IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF in IL-12p70)

- Detektor pozitivne PE kontrole (PE positive control detector): kontrola s PE-konjugiranimi protitelesi, ki jo uporabimo skupaj z lovilnimi kroglicami za umeritev citometra za določitev izhodiščnih kompenzacijskih nastavitev
- Detektor pozitivne FITC kontrole (FITC positive control detector): kontrola s FITC konjugiranimi protitelesi, ki jo uporabimo skupaj z lovilnimi kroglicami za umeritev citometra, za določitev izhodiščnih kompenzacijskih nastavitev
- Izpiralni pufer (wash buffer), ki vsebuje proteine in detergent
- Raztopina za razredčevanje (Assay diluent): raztopina proteinskega pufra.

3.8.5.2 Postopek za pripravo poskusa

BD CBA standarde za vrednotenje vnetja pri človeku smo raztopili v 0,2 mL raztopine za razredčevanje, nežno premešali s pipeto in pustili 15 minut na sobni temperaturi.

100 µl standardov smo nato odpipetirali v 900 µl raztopine za razredčevanje in pripravili ustrezne razredčitve, tako da smo 300 µl izhodiščnega standarda odpipetirali v epruveto s 300 µl raztopine za razredčevanje in postopek nadaljevali, da smo dobili ustrezne razredčitve (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:128 in 1:156). Različne razredčitve standardov so nam omogočile izdelavo umeritvene krivulje.

Lovilne kroglice (capture beads) smo dobro premešali na vrtičniku in odpipetirali 10 µl lovilnih kroglic za posamezen citokin (IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF in IL-12p70) za vsak preiskovani vzorec in tako pripravili skupno mešanico citokinov.

V posamezno ustrezno označeno epruvetko smo odpipetirali 50 µl skupne mešanice citokinov, 50 µl reagenta B in 50 µl preiskovanega vzorca ali 50 µl standarda ustrezne razredčitve oziroma 50 µl razredčevalne raztopine pri negativni kontroli.

Tako pripravljene vzorce smo premešali na vrtičniku in 3 ure inkubirali v temi na sobni temperaturi. Po končani inkubaciji, smo v vsako epruvetko dodali 1 mL izpiralnega pufra, premešali na vrtičniku in centrifugirali (5 min, 200 g, 4 °C). Supernatant smo odpipetirali

in zavrgli in preostalo vsebino v epruvetki resuspendirali v 300 µl izpiralnega pufra. Takoj po pripravi smo vzorce analizirali z metodo pretočne citometrije, s pomočjo modro-zelene ekscitacijske luči (488 nm argon-ion laser). Vrednotili smo 10 000 dogodkov (celic) na vzorec.

3.9 UGOTAVLJANJE VPLIVA PROBIOTIČNE BAKTERIJE *L. gasseri* K7 (Rif^r) NA MIŠI SEVA C57BL/6J OB SOČASNI APLIKACIJI ENTEROHEMORAGIČNE *E. coli* O157:H7-poskus *in vivo*

Poskus *in vivo* je potekal v hlevčku za poskusne živali, Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani. Dovoljenje za izvajanje poskusov na živalih številka 34001-29/2008/7 je bilo izdano s strani Veterinarske uprave Republike Slovenije dne 16.7.2008.

V poskus je bilo vključenih 50 šest do osem tednov starih mišk seva C57BL/6J ženskega spola, ki smo jih prejeli v Medicinskem eksperimentalnem centru Inštituta za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Gojili smo jih v plastičnih kletkah pri temperaturi 21-23 °C, 55-odstotni relativni vlagi in 12-urnem ciklu svetlobe in teme. Živalim v poskusu smo kletke dvakrat tedensko menjali in jih po uporabi oprali in sterilizirali v za to namenjenem prostoru. V času poskusa so imele živali neomejen dostop do sterilizirane vode in krme (Altromin 1324). Na začetku poskusnega obdobja so bile živali naključno razdeljene v poskusne skupine (5 skupin po 10 živali) in nastanjene v skupinah po 5 živali v kletki. Poskus je bil razdeljen na obdobje prilagajanja (7 dni), ko so bile živali vseh petih skupin hranjene ad libitum samo s standardno hrano za miši v obliki peletov, in poskusno obdobje (21 dni), ko so poleg standardne hrane prejemale še testne mikroorganizme. Med poskusom smo živali vsak dan opazovali in ocenili njihovo zdravstveno stanje glede na kriterije, opisane v literaturi (Shu in Gill, 2001):

- (1) normalen izgled: miš je živahna, ima gladko, svetlečo dlako, se odziva na zunanje dražljaje, kaže zanimanje za okolico, nima driske;

- (2) nenormalen izgled: dlaka je nasršena in ni svetleča, manj živahna in aktivna in manj zainteresirana za dogajanje zunaj kletke, znaki hiperventilacije ob rokovanju z živaljo, miš je zgrbljena in letargična, ne reagira na dražljaje, kaže znake driske.

Delo je potekalo v treh prostorih, ki so med seboj povezani s čistim in nečistim hodnikom. Kontrolna skupina in skupina živali, ki smo jim aplicirali sev K7 (Rif^r), so bile v času poskusa nastanjene v prostoru namenjemu karanteni, medtem ko so bile živali, ki smo jim aplicirali le *E. coli* in živali, ki smo jim aplicirali sev K7 (Rif^r) in *E. coli*, nastanjene v prostoru za poskus. Rokovanje z živalmi (aplikacija, tehtanje živali in krme, odvzem blata) smo opravljali v ločenem prostoru, kjer smo imeli na uporabo tudi mikrobiološko varnostno komoro. Kadar smo na isti dan aplicirali različnim skupinam sev K7 (Rif^r) in *E. coli*, smo najprej opravili aplikacijo K7 (Rif^r) in potem *E. coli*, zatem pa prostor temeljito razkužili. Čiščenje in sterilizacijo kletk in vode smo opravili v posebnem, za to namenjenem prostoru, kjer smo imeli na uporabo avtoklav. Ob vhlevitvi smo vsako žival ustrezno označili z ušesno ščipalko, da smo tekom poskusa lahko izvajali monitoring posamezne živali. Živali smo stehtali in jim odvzeli vzorce blata ob vhlevitvi, ter 8., 15., 22. in 28. dan poskusa. Dnevno smo spremljali količino zaužite krme oz. tehtali morebitne ostanke krme pri posamezni skupini petih živali. Zaradi velikega obsega dela, ki je zajemalo 14-dnevno aplikacijo mikroorganizmov in odvzemanje številnih vzorcev, še posebej ob žrtvovanju, smo po 5 živali (v eni kletki) vključevali v poskus z enodnevnim zamikom.

Zadnji dan poskusa (28. dan) smo živali omamili z uporabo CO_2 in izkrvaveli s pomočjo intrakardialne punkcije.

Usmrtitev z omamljanjem in izkrvavitvijo smo izvedli v komori s CO_2 atmosfero. Miš smo položili v komoro in zaprli pokrov, nato smo odprli ventil na jeklenki s CO_2 in pustili dovod plina odprt toliko časa, da je žival prenehala dihati.

Nobena žival ni poginila pred načrtovanim žrtvovanjem. Odstranjevanje trupel poskusnih živali je bilo izvedeno v skladu s predpisi, ki urejajo živalske stranske proizvode, ki niso namenjeni prehrani ljudi.

3.9.1 Potek poskusa

1. skupina A

kontrolna skupina, hranjena samo s standardno hrano za miši v obliki peletov (28 dni)
8.-21. dan vsakodnevna per oralna aplikacija 100 µl fiziološke raztopine

2. skupina B

1-7. dan standardna hrana za miši v obliki peletov
8.-21. dan standardna hrana za miši v obliki peletov in vsakodnevna aplikacija $1,2x10^9$ KE/mL K7 (Rif^r) v 100 µl fiziološke raztopine
21.-28. dan standardna hrana za miši v obliki peletov

3. skupina C

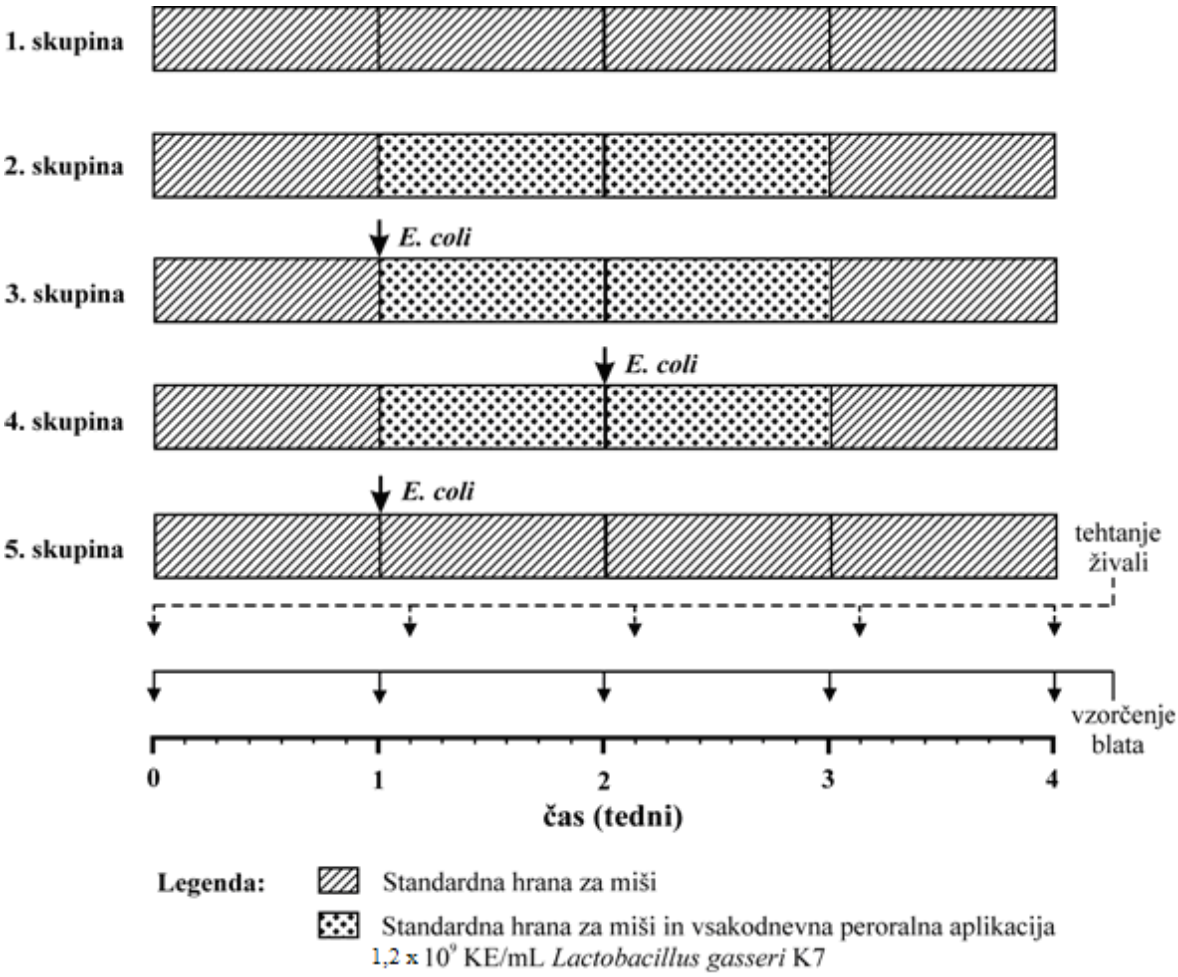
1.-7. dan standardna hrana za miši v obliki peletov
8.-21. dan standardna hrana za miši v obliki peletov in vsakodnevna aplikacija $1,2x10^9$ KE/mL K7 (Rif^r) v 100 µl fiziološke raztopine
8. dan intragastrična okužba s $5x10^8$ KE/mL *E. coli* O157:H7 v 100 µl fiziološke raztopine
21.-28. dan standardna hrana za miši v obliki peletov

4. skupina D

1-7. dan standardna hrana za miši v obliki peletov
8.-21. dan standardna hrana za miši v obliki peletov in vsakodnevna aplikacija $1,2x10^9$ KE/mL K7 (Rif^r) v 100 µl fiziološke raztopine
15. dan poskusa intragastrična okužba s $5x10^8$ KE/mL *E. coli* O157:H7 v 100 µl fiziološke raztopine
21.-28. dan standardna hrana za miši v obliki peletov

5. skupina E

1.-28. dan standardna hrana za miši v obliki peletov
8. dan intragastrična okužba s $5x10^8$ KE/mL *E. coli* O157:H7 v 100 µl fiziološke raztopine



Slika 4: **Shematski prikaz poskusa.**

Figure 4**: Schematic display of the experiment**

3.9.2 Gojenje in priprava mikroorganizmov

Sev K7 (Rif^r) smo gojili v tekočem gojišču MRS z dodatkom rifampicina v končni koncentraciji 250 µg/mL. 5 mL 18-urne kulture, ki je bila predtem dvakrat precepljena (prvič v gojišče z rifampicinom, drugič pa v gojišče brez rifampicina), smo centrifugirali 10 minut pri 3,500 g in sediment trikrat sprali s sterilno fiziološko raztopino. Po zadnjem spiranju smo celice resuspendirali v 100 µl sterilne fiziološke raztopine. Za aplikacijo smo uporabili suspenzije laktobacilov, ki so bile hranjene v hladilniku največ tri dni. Dnevno smo suspenzijo laktobacilov, pripravljeno za aplikacijo živalim, nacepljali na gojišče MRS z dodatkom rifampicina, da smo preverjali število KE/mL. V poskusu smo aplicirali v

povprečju 1,2x10^9 KE K7 (Rif^r)/žival/dan, resuspendiranih v 100 µl fiziološke raztopine. *E. coli* O157:H7 smo gojili v tekočem gojišču BHI. Dnevne doze smo pripravili po enakem postopku kot je opisano za sev K7 (Rif^r), le da je 100 µl pripravljene suspenzije vsebovalo 5 x 10^8 KE *E. coli* O157:H7/žival/dan.

3.9.3 Aplikacija mikroorganizmov

Za oralno aplikacijo smo uporabili plastične intragastrične sonde za enkratno uporabo velikosti 20Gx38 mm (Instech Solomon, FTP2038). Pri aplikaciji probiotičnega mikroorganizma smo žival fiksirali in intragastrično sondo usmerili na koren jezika ter tako izzvali požiralni refleks. Pri intragastrični aplikaciji patogenega mikroorganizma smo živali fiksirali in intragastrično sondo z občutkom usmerili skozi žrelo v smeri požiralnika. Pred samo aplikacijo smo ocenili razdaljo od smrčka do zadnjega rebra, kar nam je služilo kot pokazatelj kako globoko lahko sondo vstavimo. Aplicirali smo enakomerno in počasi ter pazili, da pri aplikaciji nismo čutili nobenega odpora.

3.9.4 Odvzem vzorcev blata

Blato smo vzorčili v sterilne 14-mL centrifugirke (TPP, 91016) ob tehtanju živali, saj je že samo rokovanje z živaljo povzročilo blatenje. Proti koncu poskusa, ko so se živali navadile na rokovanje, smo morali za odvzem blata masirati abdominalno regijo. Sveže blato smo vzorčili pri vsaki miši posebej. Od vsake živali smo pridobili približno 50 mg vzorca.

3.9.5 Odvzem vzorcev krvi

Ko je pri živali nastopila globoka narkoza, smo odprli trebušno votlino za rebernim lokom, pazljivo prerezali diafragmo, ter levo in desno od prsnice še rebra. Prsnico smo dvignili in fiksirali s pomočjo peana in prerezali osrčnikove vezi. Z injekcijsko iglo (BD Microlance™) smo vbodli v desni ventrikel in počasi vsrkali vso kri v brizgo. Na žival smo v povprečju pridobili 500 µl krvi, ki smo jo uporabili za tri različne analize in jo zato razdelili v tri epruvetke z različnimi antikoagulanti oziroma stabilizatorji.

3.9.5.1 Odvzem krvi za krvno sliko in diferencialno belo krvno sliko

Približno 100 µl krvi smo previdno vbrizgali v epruvete z dodatkom EDTA (BD Microtainer tubes, 365973) in nežno premešali. Z uporabo hematološkega analizatorja ABC VET (ABX Diagnostics, Montpelier, Francija) smo preverili naslednje parametre: WBC (št. levkocitov), RBC (št. eritrocitov), HGB (količina hemoglobina v krvi), HCT (hematokrit), PLT (št. trombocitov), MCV (povprečni volumen eritrocitov), MCH (povprečna absolutna količina hemoglobina v eritrocitih) in MCHC (povprečna relativna koncentracija hemoglobina v eritrocitu).

Kapljico krvi iz epruvete z dodatkom EDTA smo kanili na predmetno stekelce in s pomočjo posebnega predmetnega stekelca z zaobljenim robom naredili krvni razmaz. Tako pripravljene krvne razmaze smo pobarvali z barvili za hematološke in klinične vzorce, Hemacolor (Merck, 1.11674), po navodilih proizvajalca. Preparate smo pregledovali s pomočjo svetlobnega mikroskopa (Olympus BX51, Europa Holding Company, Hamburg, Nemčija). Prešteli smo 150 do 200 belih krvnih celic, ki smo jih razdelili v naslednje kategorije: limfociti, monociti, segmentirani nevtrofilni granulociti, paličasti nevtrofilni granulociti, eozinofilni granulociti, bazofilni granulociti in druge celice. Za vsako kategorijo smo izračunali delež celic v preparatu tako, da smo število celic v eni kategoriji delili s številom vseh preštetih belih krvnih celic. Da smo čim bolj eliminirali možnosti napak pri štetju, smo uporabili programsko opremo EasyCell counter (Dogša I., EasyCell counter^{TM}). Krvne celice smo trikrat prešteli v desetih preparatih, da smo preverili točnost metode.

3.9.5.2 Odvzem krvi za vrednotenje fagocitoze

Za vrednotenje fagocitoze smo 100 µl krvi previdno vbrizgali v epruvete z dodatkom heparina (po navodilih proizvajalca je odsvetovana uporaba EDTA ali citrata) in nežno premešali. Epruvetke smo do izvedbe testa hranili na ledu.

3.9.5.2.1 Test fagocitoze

Skupek reagentov (Phagotest, Orpegen Pharma) omogoča kvantitativno določanje levkocitne fagocitoze v heparinizirani celokupni krvi. Vsebuje s fluoresceinom (FITC)-označene *E. coli* in potrebne reagente. Omogoča nam merjenje odstotka fagocitov, ki so

zaužili bakterijo in njihovo aktivnost (število zaužitih bakterij na celico). Fagocitozno raziskavo izvajamo s pretočno citometrijo (FACScalibur, BD).

Reagenti:

Reagent A: Soli izpiralne raztopine, ki jih pred uporabo rekonstituiramo v 1 litru dvakrat destilirane vode in med uporabo hranimo v hladilniku pri -4 °C.

Reagent B: Raztopina stabilizirane in opsonizirane s FITC-označene *E. coli.* 1x raztopina vsebuje približno 2 x 10^9 bakterij na mililiter. 2 mL s FITC-označene raztopine *E. coli* smo razdelili na alikvote po 100 µL in zamrznili pri -20 °C, da smo se izognili večkratnemu odmrzovanju in zamrzovanju reagenta.

Reagent C: dušilna raztopina za nevtraliziranje fluorescence bakterij, ki se vežejo na površino celic; reagent modre barve.

Reagent D: raztopina za obarvanje, razredčimo v razmerju 1:10 z dvakrat destilirano vodo, da dobimo raztopino za liziranje eritrocitov in sočasno fiksacijo levkocitov.

Reagent E: Raztopina za obarvanje DNA za citometrično ločevanje bakterij med analizo levkocitov; reagent rožnate barve.

3.9.5.2.2 Postopek za pripravo poskusa

Heparinizirano celokupno kri smo nežno premešali in jo nanesli na dno 5 mL epruvete, 100 µL na poskus. Pazili smo, da na stranskih stenah epruvete ni bilo ostankov krvi. Pred dodajanjem bakterij smo vzorce krvi položili v ledno kopel za 10 minut, da smo jih ohladili na 0 °C. Ohlajeno raztopino *E. coli* (reagent B) smo dobro premešali in dodali 20 µL na poskus in kontrolni vzorec. Kontrolni vzorec smo pustili v ledni kopeli, poskusne vzorce pa smo inkubirali 10 minut pri 37 °C v vodni kopeli. Točno ob koncu inkubacije smo vse vzorce naenkrat vzeli iz vodne kopeli in jih namestili v ledno kopel, da smo zaustavili fagocitozo. Vsakemu vzorcu smo dodali 100 µL ledeno hladne dušilne raztopine (reagent C). V epruvete smo nato dodali 3 mL izpiralne raztopine (reagent A) in centrifugirali (5 min, 250 x g, 4 °C). Vzorcem smo dodali 2 mL segrete (na sobni temperaturi) raztopine za obarvanje (reagent D) in inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi. Celice smo po inkubaciji centrifugirali (5 min, 250 x g, 4 °C) in supernatant zavrgli. V epruvete smo dodali 3 mL izpiralne raztopine, centrifugirali in supernatant odpipetirali in zavrgli. Nato

smo celicam dodali 200 µL raztopine za obarvanje DNA (reagent E), premešali in inkubirali 10 minut na ledu, zaščitene pred svetlobo. Celice smo analizirali s pretočno citometrijo, s pomočjo modro-zelene ekscitacijske luči (488 nm argon-ion laser). Zbrali smo 10 000 levkocitov na vzorec. Analizirali smo odstotek celic, v katerih je potekala fagocitoza (granulociti in monociti), kot tudi njihovo fluorescentno intenzivnost (število zaužitih bakterij). Razmerje med bakterijami (pribl. 4 x 10^7 na 20 µL) in levkociti (v 100 µL celokupne krvi) je 50:1, če upoštevamo število belih krvničk 8000/µL in 80:1 pri 5000/µL.

3.9.6 Postopek za izvedbo raztelesbe

Raztelešenje smo opravljali v secirnici, v mikrobiološki varnostni komori. Pri delu smo uporabili osebna zaščitna sredstva. Po odvzemu krvi smo nadaljevali z odvzemom organov iz trebušne votline v naslednjem vrstnem redu: jetra, prebavila v celoti, vranica in ledvice. Pri prebavilih smo najprej odvzeli želodec, tako da smo ga na področju pilorusa ločili od začetka tankega črevesa. Dvanajstnik smo od teščega črevesa ločili na dvanajstnikovo-teščečrevnem zavinku (flexura duodenojejunalis). Črevesje smo pazljivo razpletli in tanko črevo ločili od slepega črevesa na področju vitočrevne-slepočrevne gube (plica ileocaecocolica), ki vito črevo povezuje s slepim črevesom. Ko smo črevesje razpletli, smo previdno odvzeli vzorce mezenterialnih bezgavk in jih fiksirali v 10-odstotnem formalinu. Slepo črevo smo od kolona ločili na področju vitočrevnega ustja (ostium ileale), ki nakazuje mejo med slepim črevesom in kolonom. Za histološko analizo smo odvzeli vzorce posameznih delov črevesja (dvanajstnik, tešče črevo, vito črevo, kolon, slepo črevo) v dolžini dveh centimetrov in sicer vzorec dvanajstnika proksimalno (pri pilorusu), vzorec vitega črevesa dva centimetra proksimalno od vitočrevne-slepočrevne gube, preostalo tešče črevo smo izmerili in odvzeli vzorec na sredini razpletenega teščega črevesa. Vzorec velikosti enega centimetra smo nemudoma fiksirali v 10-odstotnem formalinu, preostali vzorec prav tako velikosti enega centimetra smo vzdolžno prerezali, da smo dobili tkivo v obliki pravokotnika, ki smo ga z bucikami pripeli na košček stiroporja. Vsak del črevesja (dvanajstnik, tešče črevo, vito črevo, kolon, slepo črevo) od vsake živali posebej smo shranili v ustrezno označenem lončku in fiksirali v 10-odstotnem formalinu. Vzorce smo ob vsaki raztelesbi odvzeli v enakem zaporednem vrstnem redu in na enakih anatomskih lokacijah, kar nam je omogočilo ponovljivost vzorčenja. Iz preostalih delov črevesja smo v

posebej označene 14 mL centrifugirke pazljivo iztisnili črevesno vsebino tankega črevesa, slepega črevesa in kolona. Izpraznjene dele črevesja smo shranili v 2 mL krioviale, vsak del posebej. Organe (jetra, vranica, želodec, ledvica), dele črevesja (dvanajstnik in tešče črevo, slepo črevo, kolon, vito črevo) smo v 2 mL kriovialah hranili na temperaturi -70 °C do opravljanja analiz. Vsebino črevesja (vsebina tankega črevesa in slepega črevesa ter vsebina kolona) in blato, vzorčeno na dan žrtvovanja, smo suspendirali v sterilni fiziološki raztopini in še isti dan nacepili na plošče s selektivnim trdim gojiščem, za potrditev prisotnosti K7 (Rif^r) oziroma *E. coli* O157:H7.

3.9.7 Priprava organov za histološke analize

3.9.7.1 Prepajanje organov s paraplastom

Fiksirane organe smo oblikovali na primerno velikost in jih zložili v oštevilčene plastične košarice (oznaka živali, organ). Tako pripravljene košarice smo do začetka postopka hranili v fiksativu. Nato smo jih odcedili in zložili v kaseto aparata Hypercenter XP. Kaseto s košaricami smo zaprli in vložili v reakcijsko komoro vključenega aparata Hypercenter XP. Po programu se je tkivo dehidriralo in razmastilo z naraščajočo vrsto alkoholov in z nadomestkom ksilena (Shandon Xylene Substitute, Thermo Scientific, ZDA) ter postopoma prepojilo s paraplastom (Bio-Plast Extra, Bio-Optica, Italija). Po končanem postopku smo reakcijsko komoro odprli ter košarice z organi prenesli v temu namenjeno komoro z ogretim paraplastom v aparaturi za zalivanje organov "Histocentre 2" (Shandon).

3.9.7.2 Izdelava parafinskih blokov

Preverili smo, če je v rezervoarjih, kasetah in kovinskih modelih zadostna količina paraplasta. Aparat "Histocentre 2" smo vključili 24 ur pred pričetkom dela, da se je paraplast raztopil. 30 minut pred pričetkom dela smo vključili še grelno in hladilno ploščo aparata. S segreto pinceto smo prenesli košarico z organi na vročo ploščo aparata ter jo odprli. Kovinski model za organe smo postavili na ogreti del aparata, s segreto pinceto prenesli enega ali več organov v model, pokrili z nosilcem ter zalili s paraplastom. Model

smo prenesli na hladilno ploščo, da se je paraplast strdil ter nato odstranili kovinski model za organe. Tako pripravljeni parafinski bloki so bili pripravljeni za rezanje tkivnih rezin.

3.9.7.3 Priprava predmetnih stekelc za nanašanje rezin

Predmetna stekelca smo zložili v plastične nosilce in jih potopili v 2% kromžvepleno kislino, da so se razmastili. Nato smo jih spirali pod tekočo vodo toliko časa, da smo odstranili razmaščevalec. Temeljito smo jih sprali še z destilirano vodo in potopili v adheziv (kromgalun želatina), jih odcedili, ter brezprašno posušili.

3.9.7.4 Rezanje parafinskih blokov z drsnim rezalnikom ali mikrotomom

Na ustrezno mesto na drsnem mikrotomu (model SM2000 R, Leica, Nemčija) smo vstavili nosilec s parafinskim blokom, nastavili želeno debelino rezanja (4 µm) ter ustrezni kot rezanja. S čopičem smo odrezano rezino prenesli v vodno kopel (T=45 °C), da se je izravnala, ter jo nanesli na ustrezno označeno in z adhezivom premazano predmetno steklo. Predmetna stekla z rezinami organov smo vstavili v nosilec predmetnic aparata za barvanje tkivnih rezin Shandon »Varistan 24-4«, ter jih posušili. Tako pripravljena predmetna stekla z rezinami organov smo obarvali.

3.9.7.5 Barvanje histoloških preparatov

Predmetna stekla z rezinami organov smo pobarvali po metodi H&E (hematoksilin in eozin) s pomočjo aparata Varistan 24-4 (Shandon, ZDA). Program izvede odstranitev paraplasta s ksilenom, razmastitev in rehidracijo tkiva s padajočo koncentracijo alkoholov, obarvanje s hematoksilinom, izpiranje, obarvanje z eozinom, izpiranje ter dehidracijo v rastoči vrsti alkoholov in ksilen nadomestka. Po končanem barvanju smo na preparat kanili nekaj kapljic kanadskega balzama (Shandon Xylene Substitute Mountant, Thermo Scientific, ZDA) in pokrili s čistim pokrovnim stekelcem.

Histološke rezine smo pregledali in opravili morfometrične meritve višine resic teščega in vitega črevesa. Na pregledovanem delu črevesja vsake živali smo izmerili višino stotih

histološko primernih resic v desetih zaporedno odrezanih tkivnih rezinah. Za vrednotenje debeline sluznice kolona smo izmerili od vrha *lamine epithelialis* do *lamine muscularis mucosae* sto histološko ustreznih mest vsake živali. Limfatično tkivo, ki je bilo naključno prisotno v histoloških rezinah teščega in vitega črevesa, smo ovrednotili z meritvami absolutne površine limfatičnega vložka. Pregledali smo deset histoloških rezin na skupino živali. Meritve so bile opravljene s pomočjo mikroskopa Olympus BX-51, kamere Olympus DP-12 in programske opreme Olympus DP-Soft BX-51 (vse Olympus, Nemčija).

3.9.8 Priprava organov za imunohistološke analize

Iz vsake skupine miši smo odvzeli pet vzorcev vitega črevesa in pripravili štiri histološke rezine posameznega vzorca za kvantifikacijo celic z vsebnostjo IgA, IgG in IgM. Vzorce smo narezali s pomočjo drsnega mikrotoma (debelina rezin 5 µm), rezine položili v vodno kopel (T=45 °C) in nanesli na predmetna stekelca. Pred inkubacijo z ustreznimi protitelesi smo stekelca vstavili v kadičke in deparafinizirali in rehidrirali po naslednjem standardnem postopku:

• 3 krat 3 minute ksilen

• 3 krat 2 minuti 100-odstotni etanol

• 1 krat 2 minuti 95-odstotni , 80-odstotni in 70-odstotni etanol

• 5 minut PBS.

• Po končani deparafinizaciji smo stekelca še trikrat sprali s PBS, obrisali s krpico in označili mesto, kjer se nahaja vzorček (mesto nanosa protiteles) z diamantnim svinčnikom.

Uporabili smo protitelesa proizvajalca Sigma in sicer:

• za α verigo specifična s FITC konjugirana proti-mišja IgA protitelesa (F 9384),

• za µ verigo specifična s FITC konjugirana proti-mišja IgM protitelesa (F 9259),

• za γ verigo specifična s FITC konjugirana proti-mišja IgG protitelesa (F 8264).

Konjugat je v obliki raztopine v 0,01 M PBS in vsebuje 1-odstotni BSA z 15 mM natrijevim azidom za podaljšanje obstojnosti. Pripravili smo različne razredčitve konjugata s PBS (1:50, 1:100 in 1:150) in ugotovili, da so pozitivne celice najlažje števne pri

razredčitvi 1:50. Na vsak vzorček, pritrjen na predmetno stekelce, smo s pipeto nanesli 200 µl raztopine protiteles, razredčenih v PBS v razmerju 1:50. Stekelca smo 30 minut inkubirali v vlažni komori pri sobni temperaturi in jih po inkubaciji trikrat sprali s PBS. Tako pripravljene vzorce na predmetnih stekelcih smo prekrili s krovnimi stekelci z uporabo fluorescentnega prekrivnega medija (Dako, S3023). Za vrednotenje števila pozitivnih (fluorescirajočih) celic, ki so vsebovale specifična protitelesa, smo uporabili mikroskop Nikon Eclipse E800. Za vrednotenje priostnosti posameznega protitelesa smo v vsakem od dvajsetih preparatov, ki smo jih pripravili iz ileumov živali ene skupine, prešteli število pozitivnih celic v celotni histološki rezini in rezultate primerjali med skupinami.

3.9.9 Mikrobiološka analiza blata, organov in črevesne vsebine

3.9.9.1 Priprava vzorcev

Živalim smo odvzeli vzorce blata ob vhlevitvi, ter 8., 15., 22. in 28. dan poskusa. Sveže vzorce blata posamezne miši v poskusu smo zbirali v 14 mL centrifugirke, jih stehtali in dodali sterilno fiziološko raztopino v razmerju 1:10. V vzorcih blata smo tekom poskusa ugotavljali število mlečnokislinskih in koliformnih bakterij ter prisotnost K7 (Rif^r) in *E. coli* O157: H7 po aplikaciji. Ustrezne razredčitve tako pripravljenih vzorcev blata smo nanesli na selektivna gojišča: za vrednotenje števila K7 (Rif^r) trdno gojišče MRS z dodanim rifampicinom (120 µg/mL), za vrednotenje števila mlečnokislinskih bakterij trdno gojišče MRS, za vrednotenje števila *E.coli* O157:H7 selektivno trdno gojišče Fluorocult *E. coli* O157:H7 (Merck, 1.04036.0500) in za vrednotenje števila koliformnih mikroorganizmov trdno gojišče Chromocult Coliform (Merck, 1.10426.0500).

Ob žtvovanju smo vsebino tankega črevesa, kolona in slepega črevesa nežno iztisnili v 14 mL centrifugirke in dodali sterilno fiziološko raztopino do končnega volumna 10 mL za ugotavljanje prisotnosti K7 (Rif^r) in *E. coli* O157: H7.
Ob žrtvovanju smo živalim odvzeli vzorce želodca, tankega črevesa, kolona in slepega črevesa za ugotavljanje prisotnosti K7 (Rif^r) in *E. coli* O157: H7 na sluznici črevesja in v želodcu. Prav tako smo vzorčili parenhimske organe in mezenterialne bezgavke za ugotavljanje morebitne translokacije K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7.

Organe smo do preiskav hranili pri temperaturi -70 °C. Zamrznjen organ smo prenesli v 14 mL centrifugirko, ga stehtali in dodali 3 mL sterilne fiziološke raztopine.

Dele črevesja, želodec in bezgavke smo prestavili v posebno stekleno epruveto in nežno homogenizirali z uporabo teflonskega bata, pritrjenega na vrtalnik (Potter S homogenizator, Sartorius, Nemčija), tako da smo epruveto pomikali navzgor in navzdol in je bat drsel ob steni epruvete. Po homogenizaciji vsakega organa smo stekleno epruveto temeljito pomili z navadno vročo vodo, splaknili z destilirano vodo, očistili s papirnato brisačo in 70-odstotnim etanolom in nato še splaknili s sterilno fiziološko raztopino. Teflonski bat smo prav tako očistili s papirnato brisačo in 70-odstotnim etanolom. Vranico, ledvice in jetra smo nežno homogenizirali s paličnim homogenizatorjem (Ultra-turrax T8, Ika). Po homogenizaciji smo kovinski del paličnega homogenizatorja sprali s curkom navadne vroče vode in mehanično očistili in nato splaknili še z destilirano vodo. Kovinski del paličnega homogenizatorja smo potopili v 70-odstotni etanol in homogenizator vključili za nekaj sekund. Postopek smo ponovili še s sterilno fiziološko raztopino.

3.9.9.2 Ugotavljanje prisotnosti *E. coli* O157: H7

Po 0,1 mL homogeniziranih vzorcev organov in črevesne vsebine smo v dveh paralelkah macepili na trdo gojišče Fluorocult za *E.coli* O157:H7. Plošče smo inkubirali 18 ur pri 35 ^{0}C v aerobnih pogojih. Po inkubaciji smo opazovali izrasle kolonije. Ugotovili smo, da bakterijski sev *E. coli* O157:H7 v prisotnosti drugih bakterij vrste *E. coli* ne tvori kolonij tipičnega izgleda, na podlagi česar bi kolonije tega seva lahko razločevali od ostalih kolonij, zato selektivno štetje kolonij *E. coli* O157:H7 ni bilo mogoče. Po navodilih proizvajalca gojišča Fluorocult, so kolonije *E.coli* O157:H7 rumene in ne fluorescirajo, če jih osvetlimo z UV žarki. V predposkusih smo ugotovili, da kolonije kažejo tipičen izgled le v primeru, da smo nacepili čisto kulturo, ne pa v mešanici z drugimi sevi *E. coli*. Zato smo vse zrasle kolonije s fiziološko raztopino sprali s površine plošč z razredčitvijo 10^{-3} ter po 1 mL prenesli v mikroepruvete. Celokupno populacijo *E. coli* smo do nadaljnje analize shranjevali na -20 ^{0}C. Iz tako pripravljenih vzorcev celokupne populacije *E. coli* smo izolirali DNA s pomočjo Wizard Genomic DNA Purification Kit-a (Promega), po navodilih proizvajalca. Za detekcijo serotipa EHEC O157:H7 v blatu, organih in črevesni

vsebini smo uporabili reakcijo multiplex PCR (Fratamico in sod., 1995), s katero smo ugotavljali prisotnost genov z zapisi za toksine SLT, specifične za to serološko skupino. Uporabili smo tri sete začetnih oligonukleotidov, kjer MS1F in MS1R pomnožujeta odsek DNA na 60 MDa velikem plazmidu, MK-1 in MK-2 pomnožujeta gene za virulenčne dejavnike (toksini) ter AE 19 in AE 20 pomnožujeta zapis gena *eaeA* za membranski protein $intimin_{O157:H7}$. Pomnožki PCR, specifični za sev O157:H7 so veliki 166 bp (plazmid), 224 ali/in 227 bp (SLT) ter 1087 bp (membranski protein). PCR produkte smo ločevali na 1,8-odstotnem agaroznem gelu. Obarvali smo jih z barvilom Sybr safe. Za primerjavo velikosti smo uporabili označevalec velikosti 100 bp.

3.9.9.3 Ugotavljanje prisotnosti K7 (Rif^r)

Po 1 mL homogeniziranega vzorca smo odpipetirali na petrijeve plošče v dveh paralelkah in jih prelili z gojiščem MRS z dodanim rifampicinom (120 µg/mL). Plošče smo inkubirali 72 ur pri 37 ºC v anaerobnih pogojih, ki smo jih dosegli z uporabo izdelka GENbox anaer (BioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francija). Po inkubaciji smo opazovali zrasle kolonije. Posamezne zrasle kolonije mlečnokislinskih bakterij smo z gojišča MRS+rif s pomočjo cepilne zanke vcepili v 1 mL bujona MRS v mikroepruvetah ter inkubirali 48 ur pri 37 ^{0}C. Na ta način smo pridobili čisto kulturo. Očiščene izolate mlečnokislinskih bakterij smo do nadaljnje analize shranjevali na -20 ^{0}C. Sev K7 (Rif^r) smo dokazovali z metodo naključne amplifikacije polimorfne DNA (Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)). DNA posameznih izolatov smo predhodno osamili s komercialnim kitom Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, WI 53711-5399 Madison, ZDA). Pelet smo resuspendirali v 600 µL raztopine 50 mM EDTA, ki je vsebovala 0.01 mg μL^{-1} lizocima (Sigma-Aldrich, 89552 Steinheim, Nemčija) in inkubirali pri 37 °C 1 uro. Nadaljnji koraki so bili izvedeni po navodilih proizvajalca.

Za pomnoževanje v reakciji PCR smo uporabili začetni oligonukleotid M-13 in predhodno objavljene pogoje reakcije (Torriani in sod., 1999). Pomnožke smo analizirali z gelsko elektroforezo. S primerjavo vzorcev pomnožkov smo potrdili sev K7 (Rif^r).

3.10 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Zbrane podatke smo obdelali s pomočjo programskega paketa Microsoft Excel (Microsoft corporation, ZDA). Vsi podatki poskusov *in vitro* in poskusa *in vivo* so podani kot povprečne vrednosti s standardnimi odkloni. Statistično značilnost smo ovrednotili s Studentovim t-testom. Razlike med skupinami podatkov smo smatrali za statistično značilne, če je bila vrednost p enaka ali manjša od 0,05.

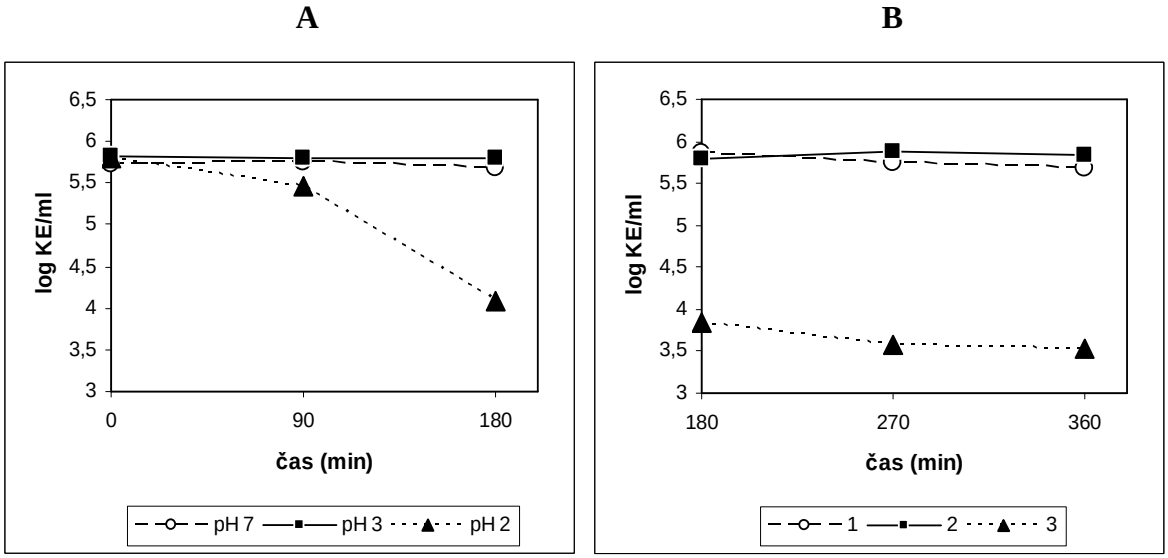
4 REZULTATI

4.1 PREŽIVETJE IZBRANIH SEVOV LAKTOBACILOV V SIMULIRANEM ŽELODČNEM IN ČREVESNEM SOKU

Preverili smo, ali izbrani sevi laktobacilov preživijo v simuliranem želodčnem in črevesnem soku (simulirani pogoji prebavil). V poskusu smo uporabili en sev človeškega izvora, K7, in 4 seve laktobacilov prašičjega izvora: *L. crispatus/amylovorus* 4/26 in 2/25 in *L. reuteri* 12/26 in 14/26. Laktobacile smo za 180 minut izpostavili simuliranem želodčnem soku in nato še za 180 minut simuliranem črevesnem soku. Število preživelih mikroorganizmov smo spremljali ob času 0, 90, 180, 270 in 360 min. Rezultati izbranih poskusov so prikazani na slikah 5, 6, 7, 8 in 9.

Vsi sevi laktobacilov so preživeli v simuliranih pogojih prebavil, saj je bilo število preživelih bakterij po 6 urah v simuliranem želodčnem in črevesnem soku pri vseh sevih v mejah detekcije. Število kolonijskih enot se med 3-urno inkubacijo v simuliranem želodčnem soku z vrednostjo pH 7 in pH 3 in med nadaljnjo 3-urno inkubacijo v simuliranem črevesnem soku ni zmanjšalo. V simuliranem želodčnem soku z vrednostjo pH 2, pa se je število vseh izbranih laktobacilov zmanjšalo, poleg tega pa so preživele bakterijske celice v manjši meri preživele nadaljnjo inkubacijo v črevesnem soku. Po 6-urni inkubaciji v simuliranih pogojih prebavil se je tako pri sevih K7 (slika 5) in *L. crispatus/amylovorus* 2/25 (slika 7) zmanjšalo število kolonijskih enot za red velikosti dveh logaritmov, pri *L. crispatus/amylovorus* 4/26 (slika 6) za red velikosti enega logaritma in pri *L. reuteri* 12/26 (slika 8) za red velikosti pol logaritma. Najslabšo sposobnost preživetja smo ugotovili pri sevu *L. reuteri* 14/26 (slika 9), saj se je število bakterij ob izpostavitvi simuliranem želodčnem soku z vrednostjo pH=2 sicer ohranilo, vendar se je takoj po izpostavitvi simuliranem črevesnem soku število kolonijskih enot zmanjšalo za red velikosti štirih logaritmov. Po 3-urni inkubaciji v simuliranem črevesnem soku pa se je število kolonijskih enot *L. reuteri* 14/26 (slika 9B) zmanjšalo še za red velikosti dveh logaritmov, kar pomeni, da je bilo število bakterij po šesturni inkubaciji v simuliranih pogojih prebavil manjše za red velikosti šestih logaritmov.

Iz rezultatov lahko povzamemo, da sta seva K7 in 4/26 precej občutljiva za nizko vrednost pH, neobčutljiva pa za žolč, prisoten v simuliranem črevesnem soku. Pri sevu 2/25 smo opazili slabšo preživelost pri pH=2, razen tega je izpostavitev nizki vrednosti pH negativno vplivala tudi na odpornost seva proti žolču. Pri sevu 14/26 sicer nismo zaznali zmanjšanja preživetja pod vplivom nizkih vrednosti pH, vendar so celice postale po izpostavitvi pH=2 bolj občutljive za žolč. Sev 12/26 pa se je izkazal za odpornega tako proti nizkim vrednostim pH kakor tudi proti žolču.

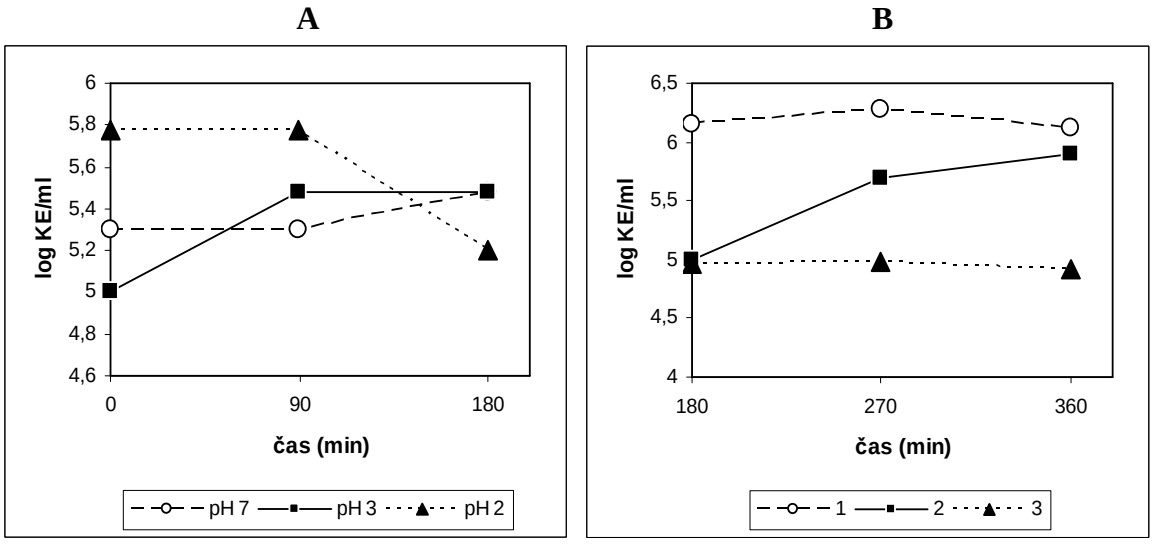


Legenda:

1- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 7
2- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 3
3- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 2

Slika 5: **Preživetje *L. gasseri K7* v simuliranem želodčnem (A) in črevesnem soku (B).**

Figure 5: **Survival of *L. gasseri* K7 in simulated gastric (A) and intestinal juice (B).**

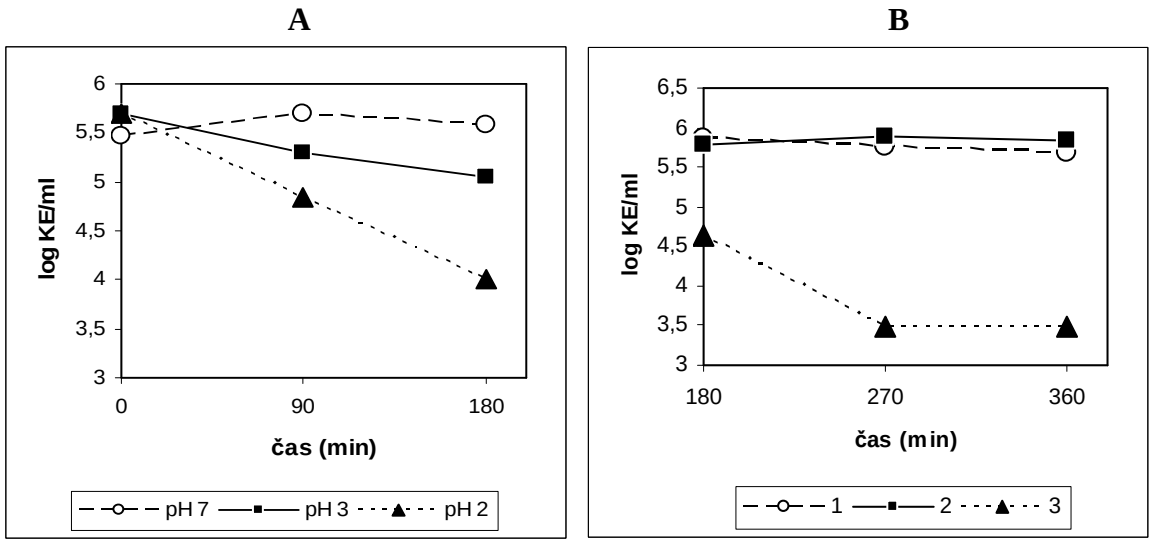


Legenda:

1- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 7
2- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 3
3- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 2

Slika 6: **Preživetje *L. crispatus/amylovorus* 4/26 v simuliranem želodčnem (A) in črevesnem soku (B).**

Figure 6: **Survival of *L. crispatus/amylovorus* 4/26 in simulated gastric (A) and intestinal juice (B).**

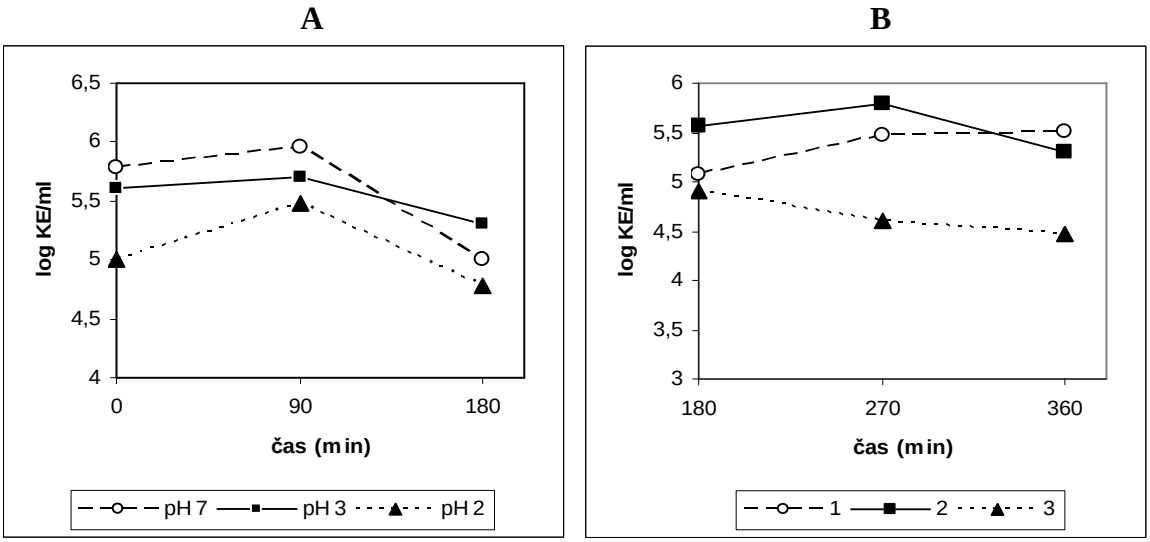


Legenda:

1- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 7
2- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 3
3- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 2

Slika 7: **Preživetje *L. crispatus/amylovorus* 2/25 v simuliranem želodčnem (A) in črevesnem soku (B).**

Figure 7: **Survival of *L. crispatus/amylovorus* 2/25 in simulated gastric (A) and intestinal juice (B).**

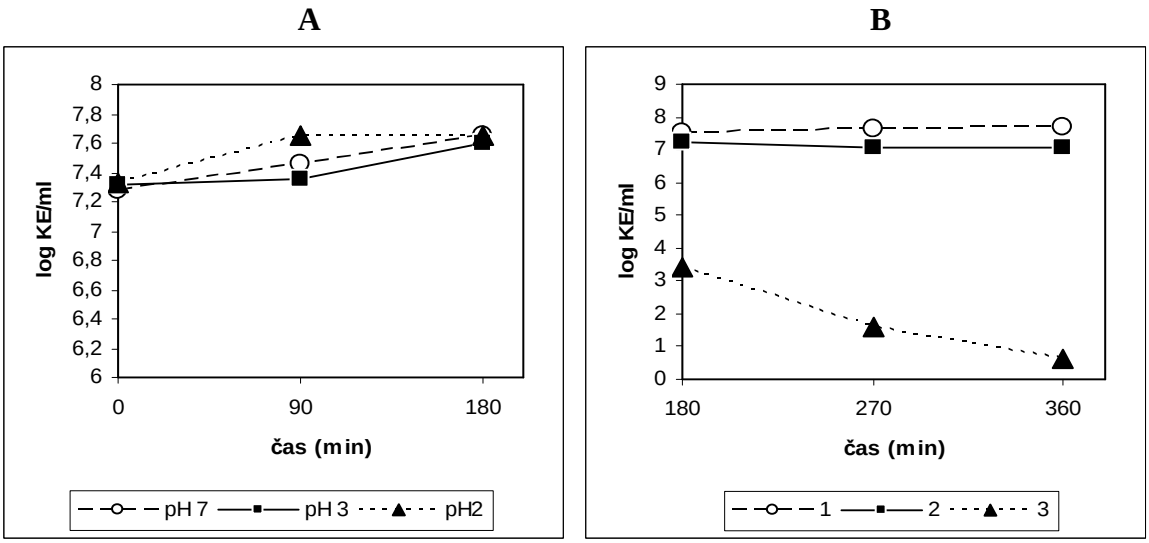


Legenda:

1- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 7
2- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 3
3- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 2

Slika 8: **Preživetje *L. reuteri* 12/26 v simuliranem želodčnem (A) in črevesnem soku (B).**

Figure 8: **Survival of *L. reuteri* 12/26 in simulated gastric (A) and intestinal juice (B).**



Legenda:

1- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 7
2- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 3
3- sev je bil pred izpostavitvijo črevesnemu soku izpostavljen želodčnemu soku z vrednostjo pH 2

Slika 9: **Preživetje *L. reuteri* 14/26 v simuliranem želodčnem (A) in črevesnem soku (B).**

Figure 9: **Survival of *L. reuteri* 14/26 in simulated gastric (A) and intestinal juice (B).**

4.2 UGOTAVLJANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI

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

Protibakterijsko aktivnost z liso na agarju smo ugotavljali pri prašičjih izolatih *L. reuteri* 9/17, 9/26, 2/26, 14/26, 2/18, 12/26 in 10/26, *L. crispatus/amylovorus* 4/26 in 2/25 ter *L. vaginalis/reuteri* 13/26, 11/26 in 6/17 in človeških izolatih LGG in K7. Kot indikatorske seve smo izbrali *E. coli* K12, *E. coli* 11229, *E. coli* O8:K88:H9Ent^{+}, *S. aureus* RN 4220 in *L. sakei* NCDO 2714.

Preglednica 2: **Protibakterijska aktivnost izbranih sevov laktobacilov proti petim indikatorskim sevom (Metoda z liso na agarju).**

Table 2: **Antibacterial activity of selected lactobacilli strains against five indicator strains (Agar spot method).**

sev	*E. coli* (K12)	*E.coli* 11229	*E.coli* K88	*S. a.* RN4220	*L. sakei*
6/17	4 (oster rob)	N	4 (zabrisan rob)	1-3 (zabrisan rob)	N
9/17	3 (zabrisan rob)	N	N	N	N
2/18	3 (zabrisan rob)	4 (oster rob)	3 (zabrisan rob)	1-5 (zabrisan rob)	N
2/25	N	N	6 (zabrisan rob)	3,5 (oster rob)	cona na robu lise
2/26	6 (oster rob)	7 (oster rob)	6 (oster rob)	5 (oster rob)	5 (oster rob)
4/26	9 (zabrisan rob)	N	7 (oster rob)	1-4 (oster rob)	2 (zabrisan rob)
9/26	6 (oster rob)	6 (oster rob)	N	3 (oster rob)	N
10/26	N	N	N	N	N
11/26	N	N	1 (zabrisan rob)	2 (oster rob)	N
12/26	N	N	N	N	N
13/26	1-4 (oster rob)	N	2-3 (zabrisan rob)	N	N
14/26	N	N	4 (zabrisan rob)	5 (oster rob)	N
K7	N	N	N	cona na robu lise	5 (oster rob)
LGG	2 (oster rob)	cona na robu lise	1 (oster rob)	cona na robu lise	N

* velikost con inhibicije je podana v mm
N - ni cone inhibicije

Prisotnost protibakterijskih snovi v okolici lise z izraslimi kolonijami testnega seva smo po inkubaciji opazili v obliki cone inhibicije rasti indikatorskih sevov, ki smo jo v mm izmerili od roba lise do roba cone inhibicije. Edini prašičji izolat, pri katerem smo opazili protibakterijsko aktivnost proti vsem indikatorskim sevom, je bil *L. reuteri* 2/26. Prašičji izolati niso pokazali protibakterijske aktivnosti proti sevu *L. sakei*, z izjemo *L. reuteri* 2/26, pri katerem je bila cona inhibicije rasti *L. sakei* enaka kot pri človeškem izolatu K7. Prašičja izolata *L. reuteri* 10/26 in 12/26 nista delovala protibakterijsko proti nobenemu izmed indikatorskih sevov. Osem od dvanajstih prašičjih izolatov (*L. reuteri* 2/26, 14/26, 2/18, *L. crispatus/amylovorus* 4/26 in 2/25 in *L. vaginalis/reuteri* 13/26, 11/26 in 6/17) je delovalo protibakterijsko proti indikatorskemu sevu *E. coli* O8:K88:H9Ent^{+}, ki je prav tako prašičjega izvora. Osem od dvanajstih prašičjih izolatov (*L. reuteri* 9/26, 2/26, 14/26, 2/18, *L. crispatus/amylovorus* 4/26 in 2/25 ter *L. vaginalis/reuteri* 11/26 in 6/17) je pokazalo protibakterijsko aktivnost proti indikatorskemu sevu *S. aureus* RN 4220 (preglednica 2).

4.2.2 Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti z metodo difuzije v agarju (MDA)

Z metodo difuzije v agarju smo ugotavljali protibakterijsko aktivnost supernatantov kultur prašičjih izolatov *L. reuteri* 9/17, 9/26, 2/26, 14/26, 2/18, 12/26 in 10/26, *L. crispatus/amylovorus* 4/26 in 2/25 ter *L. vaginalis/reuteri* 13/26, 11/26 in 6/17 in človeških izolatov K7 in LF. Kot indikatorske seve smo izbrali *E. coli* K12, *E. coli* O157:H7, *E. c.* O8:K88:H9Ent^{+}, *E. coli* O8:K88:H9Ent^{-} in *S. aureus* RN 4220. Prisotnost protibakterijskih snovi v vzorcih smo po inkubaciji opazili kot pojav cone inhibicije rasti indikatorskih sevov na področju okrog luknje z nanešenim vzorcem.

Protibakterijsko aktivnost proti vsem indikatorskim sevom smo zaznali pri supernatantih kultur človeških izolatov K7 in LF, ter pri supernatantu kulture prašičjega izolata *L. crispatus/amylovorus* 4/26. Pri supernatantih kultur ostalih prašičjih izolatov nismo zaznali protibakterijske aktivnosti proti nobenemu od indikatorskih sevov (preglednica 3). Na ploščah, kjer smo namesto supernatantov MKB nanesli gojišče MRS z dodano mlečno kislino (vrednost pH 3,8, 4,0, 4,2, 4,4, 4,6 in 4,8) ni bilo con inhibicije rasti indikatorskih sevov (podatki niso prikazani).

Preglednica 3: **Protibakterijska aktivnost izbranih sevov laktobacilov proti petim indikatorskim sevom (Metoda z difuzijo v agarju).**

Table 3: **Antibacterial activity of selected lactobacilli strains against five indicator strains (Agar-well diffusion method).**

sev	*E. c.* O8:K88:H9Ent$^-$	*E. c.* O8:K88:H9Ent$^+$	*E.c.* O157:H7	*E.c.* K12	*S.a.* RN 4220
6/17	-	-	-	-	-
9/17	-	-	-	-	-
2/18	-	-	-	-	-
2/25	-	-	-	-	-
2/26	-	-	-	-	-
4/26	+	+	+	+	+
9/26	-	-	-	-	-
10/26	-	-	-	-	-
12/26	-	-	-	-	-
13/26	-	-	-	-	-
14/26	-	-	-	-	-
K7	+	+	+	+	+
LF	+	+	+	+	+

Slikovni prikaz protibakterijske aktivnosti izbranih sevov laktobacilov proti petim indikatorskim sevom je predstavljen v prilogi A.

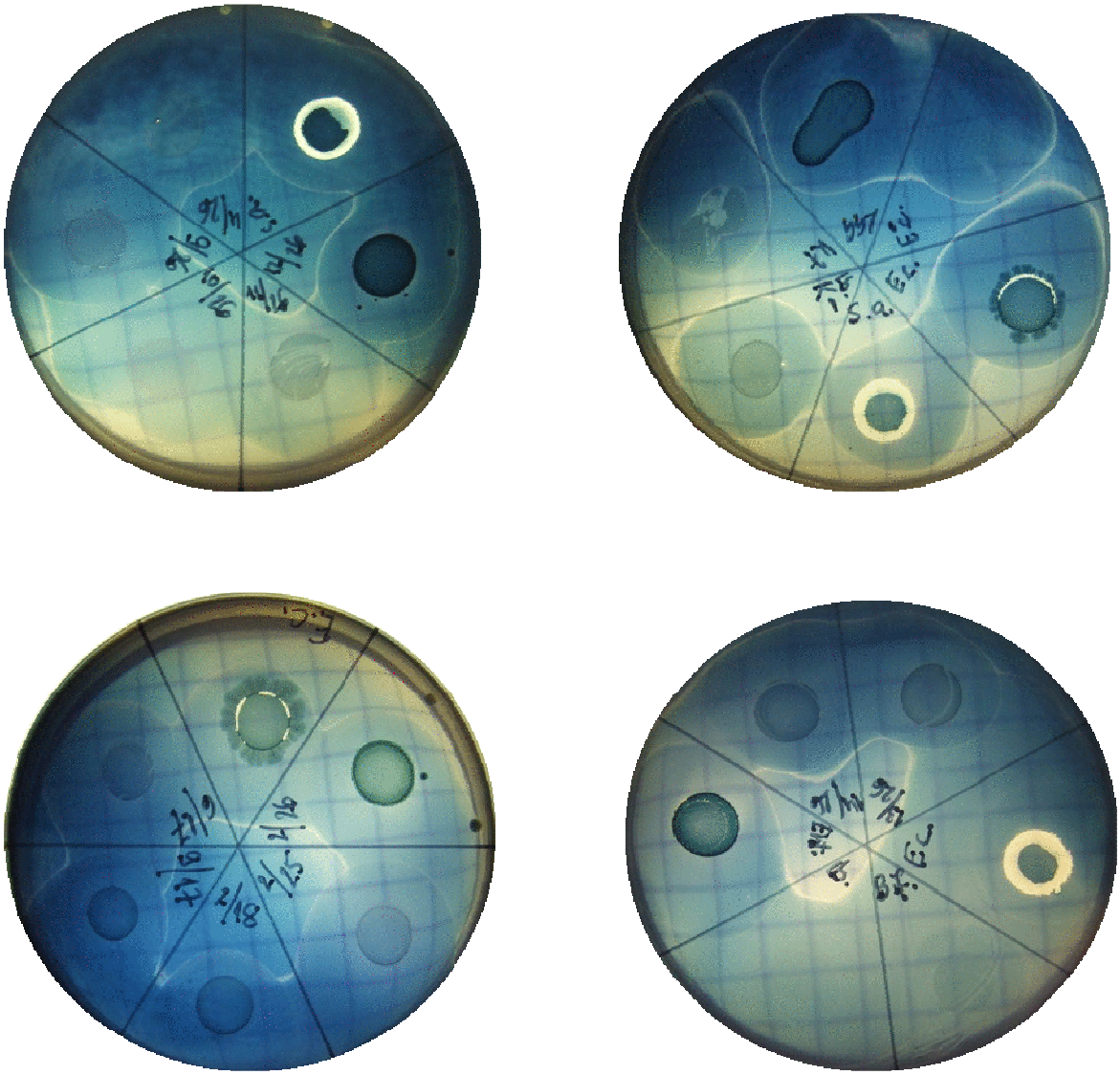
4.3 UGOTAVLJANJE VARNOSTI PROBIOTIKOV

4.3.1 Razgradnja črevesne sluzi

Sposobnost razgradnje črevesne sluzi smo preskušali pri vseh prašičjih izolatih laktobacilov (poglavje 4.2.1) ter človeških izolatih LGG in K7. Kot pozitivne kontrole smo uporabili *E. coli* O8:K88:H9Ent$^+$, *E. coli* O8:K88:H9Ent$^-$ in *S. aureus* RN 4220. Kot negativni kontroli smo uporabili seva *E. coli* O8:K88:H9Ent$^+$ in LGG, ki sta bila 10 minut izpostavljena 100 °C. Preiskovane seve smo nanesli na gojišče B z ali brez 3% glukoze.

Cono razgradnje sluzi smo opazili pri *E. coli* O8:K88:H9Ent$^+$ in *S. aureus* RN 4220, ne glede na prisotnost glukoze v gojišču. Prašičji izolati laktobacilov in človeška izolata

(LGG in K7) niso razgradili sluzi v gojišču B z ali brez 3% glukoze. Prav tako sluzi ni razgradil patogeni prašičji izolat *E. coli* O8:K88:H9Ent^{-} (slika 10).



Slika 10: **Test razgradnje sluzi.** Pri testiranih sevih laktobacilov prašičjega in človeškega izvora ni cone razgradnje sluzi; cona razgradnje sluzi je vidna pri pozitivni kontroli *E. coli* O8:K88:H9Ent+ *E.c.*) in *S. aureus* RN 4220 (*S.a*).

Figure 10: **Mucin degradarion test**. No mucin degradation detected with lactobacilli isolates of porcine and human origin; mucin degradation present with positive control *E. coli* O8:K88:H9Ent+(*E.c.*) and *S. aureus* RN 4220 (*S.a*).

4.3.2 Odpornost proti antibiotikom

Preglednica 4: **Odpornost seva *L. gasseri* K7 proti desetim antibiotikom, ugotovljena z metodo E-test® (AB Biodisk, Švedska).**

Table 4: **Susceptibility of *L. gasseri* K7 to ten antimicrobial agents determined by E-test® method (AB Biodisk, Sweden).**

ANTIBIOTIK (razpon koncentracij v µg/ml)	MIC_{bp}[a]	MIC_{bp}[b]	MIC (µg/ml)	
			1.paral.	2.paral.
STREPTOMYCIN- SM (0,064-1024)	16	> 256	48	48
GENTAMICIN– GM (0,064-1024)	8	256	8	8
TETRACYCLINE– TC (0,016-256)	8	4	4	4
AMPICILLIN- AM (0,016-256)	4	4	2	2
METRONIDAZOLE– MZ (0,016-256)	n.p.	n.p.	> 256	> 256
CLINDAMYCIN– CM (0,016-256)	4	64	4	4
CHLORAMPHENICOL– CL (0,016-256)	4	16	12	16
ERYTROMYCIN- EM (0,016-256)	4	1	0,38	0,38
RIFAMPICIN- RI (0,016-256)	n.p.	2	0,19	0,047
VANCOMYCIN-VA (0,016-256)	4	4	1	1
CEFOTAXIME CTL (0,02-32)			3	3
CEFACLOR CF (0,016-256)			12	12
AMOXICILLIN AC (0,016-256)			1,5	2

MIC_{bp}[a]: mikrobiološke mejne vrednosti rezistence za obligatno homofermentativne vrste rodu *Lactobacillus*, povzete po FEEDAP Panel Report (2005).

MIC_{bp}[b]: mikrobiološke mejne vrednosti za rezistenco (Danielsen in Wind, 2003).

Če upoštevamo mejne minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) iz literature (Danielsen in Wind, 2003) sev K7 ni odporen proti nobenemu preskušanemu antibiotiku, le ugotovljene vrednosti MIC kloramfenikola in tetraciklina so bile na zgornji meji območja občutljivosti. Če pa upoštevamo kriterije, ki so jih postavili na podlagi FEEDAP Panel Report (2005), je bila ugotovljena MIC za gentamicin na zgornji meji območja občutljivosti, MIC kloramfenikola in streptomicina pa nekoliko nad mejo, kar kaže na zmerno odpornost seva K7 proti tema dvema antibiotikoma (preglednica 4).

Preglednica 5: **Odpornost prašičjih izolatov proti desetim antibiotikom, ugotovljena z metodo E-test® (A) (AB Biodisk, Švedska).**

Table 5: **Susceptibility of porcine lactobacilli isolates to ten antimicrobial agents determined by E-test® method (A) (AB Biodisk, Sweden).**

Antibiotik	MIC (µg/ml)		
	L. crispatus		
	4/26	**2/25**	**MIC_{bp}[a]**
Streptomycin- Sm (0,064-1024)	8	>1024	**16**
Gentamicin– Gm (0,064-1024)	4	16	**8**
Tetracycline– Tc (0,016-256)	48	0,48	**8**
Ampicillin- Am (0,016-256)	1,5	0,38	**4**
Metronidazol– Mz (0,016-256)	>256	>256	**n.p.**
Clindamycin– Cm (0,016-256)	0,064	0,75	**4**
Chloramphenicol– Cl (0,016-256)	2	4	**4**
Erythromycin- Em (0,016-256)	0,032	0,5	**4**
Rifampicin- Ri (0,016-256)	1,5	0,38	**2****
Vancomycin-Va (0,016-256)	0,50	>256	**4**

MIC_{bp}[a] : Mikrobiološke mejne vrednosti rezistence za obligatno homofermentativne vrste rodu. *Lactobacillus*, povzete po FEEDAP Panel Report (2005).

**V FEEDAP Panel Report (2005), ni podatkov za rifampicin zato smo mejne vrednosti MIC povzeli po literaturi (Danielsen in Wind, 2003).

Pri vseh prašičjih izolatih smo ugotovili odpornost proti metronidazolu. Pri izolatih *L. reuteri* pa intrinzično odpornost proti vankomicinu. *L. crispatus/amylovorus* 2/25 je pokazal atipično odpornost proti streptomicinu za katerega je bila MIC nad mejo detekcije. MIC za gentamicin pa je bila za eno stopnjo razredčitve višja od mejne vrednosti določene s strani FEEDAP panel Report (2005). Pri *L. crispatus/amylovorus* 4/26 je bila MIC za tetraciklin nad mejno vrednostjo določeno za homofermentativne mlečno kislinske

bakterije. V skupini izolatov, ki so bili identificirani kot *L. reuteri* ali *L. vaginalis/reuteri* smo v štirih primerih opazili zmerno odpornost proti streptomicinu. Pri preiskovanih prašičjih izolatih nismo ugotovili odpornosti proti kloramfenikolu, razen pri izolatu 12/26, kjer je bila MIC rahlo nad mejno vrednostjo. Multipla odpornost ni bila ugotovljena pri nobenem od preiskovanih sevov. Rezultati so prikazani v preglednicah 5 in 6.

Preglednica 6: **Odpornost prašičjih izolatov proti desetim antibiotikom,ugotovljena z metodo E-test® (B) (AB Biodisk, Švedska).**

Table 6: **Susceptibility of porcine lactobacilli isolates to ten antimicrobial agents determined by E-test® method (B) (AB Biodisk, Sweden).**

Antibiotik	**MIC (µg/ml)**										
	skupina L. reuteri										
	9/ 17	**12/ 26**	**2/ 26**	**6/ 17**	**11/ 26**	**9/ 26**	**13/ 26**	**14/ 26**	**2/ 18**	**10/ 26**	**MIC_{bp}[b]**
Streptomycin- Sm (0,064-1024)	8	32	96	24	6	32	12	12	8	8	**16**
Gentamicin– Gm (0,064-1024)	0,19	0,25	4	1,0	0,25	0,38	3	0,25	0,25	3	**8**
Tetracycline– Tc (0,016-256)	1,5	1,5	1,5	3	0,50	1,0	1,5	1,0	1,5	2	**8**
Ampicillin- Am (0,016-256)	0,50	0,25	0,38	0,38	0,19	0,19	0,38	0,38	0,38	0,75	**4**
Metronidazol– Mz (0,016-256)	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	**n.p.**
Clindamycin– Cm (0,016-256)	0,64	0,50	0,5	0,064	0,023	1,0	0,023	0,19	0,50	0,047	**4**
Chloramphenicol– Cl (0,016-256)	2	6	3	4	1,0	3	4	2	4	4	**4**
Erythromycin- Em (0,016-256)	0,047	0,38	0,19	0,032	0,50	0,50	0,047	0,023	0,75	0,032	**4**
Rifampicin- Ri (0,016-256)	0,16	0,16	0,012	0,012	0,032	0,016	0,008	0,012	0,016	0,032	**4****
Vancomycin-Va (0,016-256)	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	**IR***

MIC_{bp}[b]: Mikrobiološke mejne vrednosti za rezistenco (Danielsen in Wind, 2003); sevi pri katerih so vrednosti nad mejnimi se smatrajo za rezistentne (sivo ozadje).

* IR, intrinzična rezistenca

**V FEEDAP Panel Report (2005), ni podatkov za rifampicin zato smo mejne vrednosti MIC povzeli po literaturi (Danielsen in Wind, 2003).

n.p.: ni podatka

4.4 HIDROFOBNOST

Odstotek hidrofobnosti izbranih sevov smo ugotavljali v vsaj treh neodvisnih poskusih z dvema paralelkama. Najnižji odstotek hidrofobnosti smo izmerili pri potencialno patogenih sevih *E. coli K12* (5,2 odstotka) in *S. aureus* RN 4220 (3,4 odstotke), najvišji pa pri prašičjem izolatu *L. reuteri* 9/26 (97 odstotkov). Ostale vrednosti za hidrofobnost so se gibale med 6,2 in 93,2 odstotka. Med človeškimi izolati smo ugotovili nizek odstotek hidrofobnosti pri K7 in LGG in relativno visok pri LF. Izmed prašičjih izolatov smo najnižji odstotek hidrofobnosti izmerili pri *L. reuteri* 2/26 (9 odstotkov) in 10/26 (35,5 odstotkov) ter *L. vaginalis/reuteri* 13/26 (6,2 odstotka) in 11/26 (19,2 odstotka). Pri ostali prašičjih izolatih je bila izmerjena hidrofobnost nad 50 odstotkov. Rezultati so prikazani v preglednici 7.

Preglednica 7: **Hidrofobnost izbranih prašičjih in človeških izolatov.**

Table 7: **Hydrophobicity of selected porcine and human isolates.**

sev	**% hidrofobnosti**						
	M1	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**	**povprečje**	**SD**
6/17	96,0	94,0	71	75,5	n.m.	84,1	11,01
9/17	77,5	n.m.	81	82	n.m.	80,2	1,93
2/18	n.m.	n.m.	52	92,5	86	87,5	18,54
2/25	96	96	87,5	n.m.	n.m.	93,2	4,01
2/26	n.m.	25,5	6	12,5	8,5	9,0	7,73
4/26	81,5	79	72	88	n.m.	80,1	5,73
9/26	99	97,5	n.m	94,5	n.m.	97,0	1,87
10/26	n.m	37,5	26	32	45,5	35,5	7,18
11/26	15	12,6	30	n.m.	n.m.	19,2	7,67
12/26	98,5	n.m.	45	63,5	67	68,2	19,23
13/26	n.m.	n.m.	6	7	5,5	6,2	0,62
14/26	98	97	75,5	84	n.m.	88,8	9,38
K7	15	56,5	42,5	28	27	32,0	14,33
LF	n.m.	n.m.	66,5	77	87,5	77,0	8,57
LGG	n.m.	n.m.	10	13,5	15	12,8	2,10
***E.coli* K12**	6,1	n.m.	2	7,5	n.m.	5,2	2,33
***S.aureus* RN 4220**	4,3	n.m.	1,5	4,5	n.m.	3,4	1,37

n.m. - ni meritve

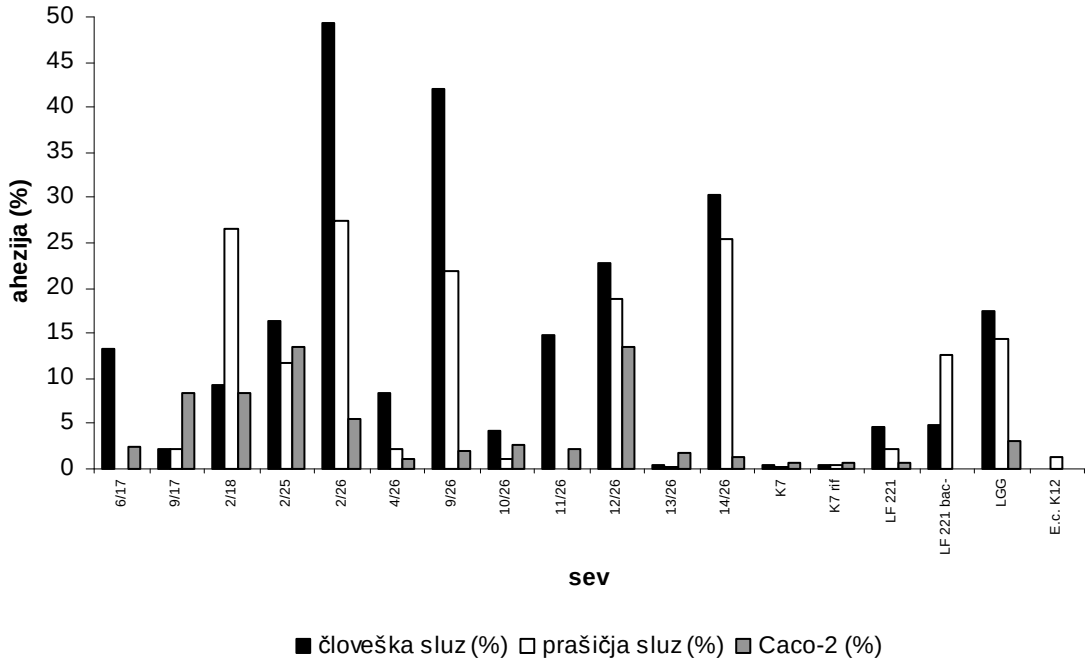
M – meritev

SD – standardni odklon

4.5 ADHEZIJA

4.5.1 Adhezija izbranih izolatov človeškega in prašičjega izvora na sluz človeškega in prašičjega izvora ter celično linijo Caco-2

Sposobnost adhezije izolatov človeškega in prašičjega izvora smo ugotavljali v poskusih *in vitro* na sluzi človeškega in prašičjega izvora ter na celični liniji Caco-2.



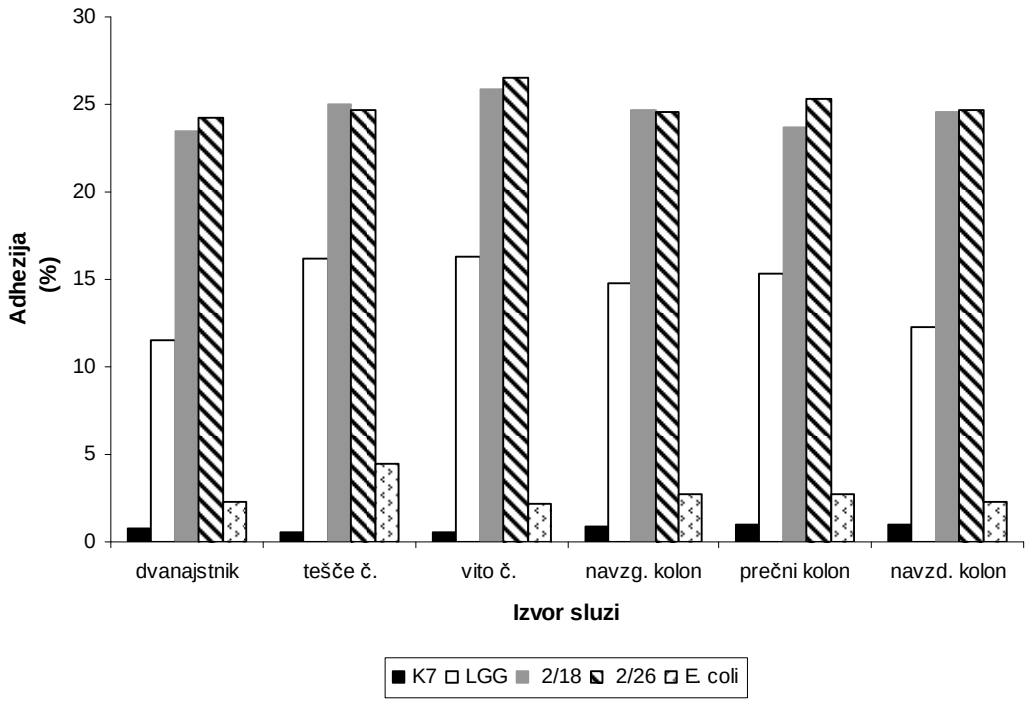
Slika 11: **Adhezija izbranih izolatov človeškega in prašičjega izvora na sluz človeškega in prašičjega izvora ter celično linijo Caco-2.**

Figure 11**: Adhesion of selected human and porcine isolates to human mucus, porcine mucus and Caco-2 cell line.**

Slika 11 prikazuje sposobnost adhezije izolatov človeškega in prašičjega izvora na sluz človeškega in prašičjega izvora ter na celice Caco-2, kot delež vezanih bakterij. Pri prašičjih izolatih *L. reuteri* 2/26, 9/26, 12/26, 14/26 in *L. crispatus/amylovorus* 4/26 ter človeških izolatih LF in LGG smo opazili, da so se najbolje vezali na sluz človeškega izvora (49,4%, 42,0%, 22,7%, 30,2%, 8,4%, 4,6% in 17,5%), slabše na sluz prašičjega

izvora (27,4%, 21,8%, 18,8%, 25,5%, 2,3%, 2,2% in 14,4%) in najslabše na celice Caco-2 (5,5%, 2,1%, 13,4%, 1,4%, 1,2%, 0,6% in 3,1%). Delež vezanih bakterij prašičjih in človeških izolatov na celice Caco-2 je znašal od 0,6 odstotka (K7 in LF) do 13,4 odstotka (*L. crispatus/amylovorus* 2/25 in *L. reuteri* 12/26), na sluz človeškega izvora od 0,4 odstotka (K7) do 49,4 odstotka (*L. reuteri* 2/26) in na sluz prašičjega izvora od 0,3 odstotka (K7 in *L. vaginalis/reuteri* 13/26) do 27,4 odstotka (*L. reuteri* 2/26). Odstotek adhezije izolatov prašičjega in človeškega izvora je bil v poskusih *in vitro* na celični liniji Caco-2 pri večini izolatov nižji v primerjavi s poskusi na sluzi človeškega in prašičjega izvora. Najboljšo sposobnost vezave na sluz človeškega in prašičjega izvora smo ugotovili pri prašičjem izolatu *L. reuteri* 2/26 (49,4 in 27,4 odstotka). Najslabše sta se na sluz človeškega in prašičjega izvora vezala prašičji izolat *L. vaginalis/reuteri* 13/26 (0,5 in 0,3 odstotka) in človeški izolat K7 (0,4 in 0,3 odstotka).

4.5.2 Adhezija izbranih izolatov na sluz iz različnih delov prašičjega črevesja



Slika 12: **Adhezija izbranih izolatov na sluz iz različnih delov prašičjega črevesja.**

Figure 12: **Adhesion od selected strains to mucus from different parts of porcine intestine.**

Zanimalo nas je ali se bodo izbrani izolati človeškega in prašičjega izvora z različno afiniteto vezali na sluz iz različnih delov prašičjega črevesja. V ta namen smo izolirali sluz dvanajstnika, teščega črevesa, vitega črevesa, navzgornjega, prečnega in navzdoljnega kolona. Iz slike 12 je razvidno, da so se posamezni izolati tako človeškega kot tudi prašičjega izvora (K7, LGG, *L. reuteri* 2/26 in 2/18 ter *E. coli* K12) z enako afiniteto vezali na sluz iz različnih delov prašičjega črevesja. Razlike v sposobnosti vezave pa so bile med posameznimi izolati *L. reuteri* 2/26 (25 odstotkov), *L. reuteri* 2/18 (24,5 odstotkov), LGG (14,4 odstotka), *E. coli* K12 (2,8 odstotka) in K7 (0,8 odstotka).

4.5.3 Vpliv izbranih laktobacilov na adhezijo *S. aureus* in *E. coli* na sluz človeškega in prašičjega izvora

Zanimalo nas je ali so izbrani sevi laktobacilov človeškega (LGG, LF, in K7) in prašičjega izvora (*L. reut*eri 2/26, 9/26, 14/26, 12/26, 2/18 in *L. crispatus/amylovorus* 2/25 in 4/26) sposobni tekmovati z izbranimi patogenimi mikroorganizmi (*S. aureus*, *E. coli*) pri vezavi na sluz človeškega ali prašičjega izvora. Želeli smo tudi proučiti, če na sposobnost adhezije vpliva razmerje med mikroorganizmi, zato smo na sluz aplicirali suspenzijo izbranega patogena in laktobacilov v razmerju 1:1 in 1:10. V testih tekmovanja smo radioaktivno označili le *E. coli* ali *S. aureus*, vezavo pa ovrednotili glede na rezultate, kjer je bil v testu uporabljeni sev *E. coli* ali *S. aureus* sam. V preglednicah so predstavljene srednje vrednosti in standardni odklon treh neodvisnih poskusov, kjer smo ugotavljali vpliv izbranih laktobacilov na adhezijo *S. aureus* in *E. coli* na sluz človeškega in živalskega izvora. V testih tekmovanja na sluzi človeškega izvora smo ugotovili, da sta K7 in *L. crispatus/amylovorus* 4/26 zmanjšala adhezijo *S. aureus* (za približno 20 odstotkov), kadar so bili mikroorganizmi aplicirani v razmerju 1:1. V testih, kjer smo *S. aureus* laktobacile aplicirali v razmerju 1:10 je le K7 zmanjšal adhezijo *S. aureus* (za približno 20 odstotkov), ostali testni sevi laktobacilov pa so vezavo *S. aureus* občutno povečali (preglednica 8).

Preglednica 8: **Vpliv izbranih laktobacilov *(L.)* na adhezijo *S. aureus (S.a.)* ob aplikaciji suspenzije v kateri so *S. aureus* in izbrani laktobacili v razmerju 1:1 in 1:10 na sluzi človeškega izvora.**

Table 8: **Effect of selected *lactobacilli (L.)* on adhesion of *S. aureus (S.a.)* when added in a suspension where the ratio of *S. aureus* and *lactobacilli* is 1:1 and 1:10 on human mucus.**

sev	*S.a.* : *L.* (1 : 1)	*S.a.* : *L.* (1 : 10)
LGG	n.p.	232 ± 116
LF	n.p.	127 ± 96
K7	82 ± 19	76 ± 23
2/26	117 ± 13	247 ± 79
9/26	n.p.	353 ± 213
14/26	130 ± 8	311 ± 89
12/26	97 ± 12	218 ± 113
2/25	94 ± 17	304 ± 149
2/18	n.p.	193 ± 70
4/26	82 ± 12	138 ± 66

n.p.: ni podatka

* V testih tekmovanja smo radioaktivno označili le *E. coli* ali *S. aureus*, vezavo pa v odstotkih ovrednotili glede na rezultate, kjer je bil v testu uporabljeni sev *E. coli* ali *S. aureus* sam.

Preglednica 9: **Vpliv izbranih laktobacilov *(L.)* na adhezijo *E. coli (E.c.)* ob aplikaciji suspenzije v kateri so *E. coli* in izbrani laktobacili v razmerju 1:1 in 1:10 na sluzi človeškega izvora.**

Table 9: **Effect of selected *lactobacilli (L.)* on adhesion of *E. coli (E.c.)* when added in a suspension where the ratio of *E. coli* and *lactobacilli* is 1:1 and 1:10 on human mucus.**

sev	*E.c.* : *L.* (1 : 1)	*E.c.* : *L.* (1 : 10)
LGG	86 ± 23	105 ± 31
LF	82 ± 10	100 ± 4
K7	95 ± 17	98 ± 10
2/26	102 ± 7	131 ± 16
9/26	92 ± 5	140 ± 7
14/26	96 ± 11	147 ± 36
12/26	78 ± 6	112 ± 16
2/25	96 ± 17	193 ± 56
2/18	86 ± 13	108 ± 23
4/26	78 ± 8	115 ± 19

* V testih tekmovanja smo radioaktivno označili le *E. coli* ali *S. aureus*, vezavo pa v odstotkih ovrednotili glede na rezultate, kjer je bil v testu uporabljeni sev *E. coli* ali *S. aureus* sam.

V testih tekmovanja laktobacilov z *E. coli* na sluzi človeškega izvora sta človeška izolata LGG, LF in prašičja izolata *L. reuteri* 12/26 in *L. crispatus/amylovorus* 4/26 zmanjšala adhezijo *E. coli*, kadar so bili mikroorganizmi aplicirani v razmerju 1:1. V testih, kjer smo mikroorganizme aplicirali v razmerju 1:10, laktobacili niso zmanjšali adhezije *E. coli* na sluz človeškega izvora. Ugotovili smo, da so v tem primeru nekateri prašičji izolati adhezijo *E. coli* celo povečali (preglednica 9).

Preglednica 10: **Vpliv izbranih laktobacilov *(L.)* na adhezijo *S. aureus (S.a.)* ob aplikaciji suspenzije v kateri so *S. aureus* in izbrani laktobacili v razmerju 1:1 in 1:10 na sluzi prašičjega izvora.**

Table 10: **Effect of selected *lactobacilli (L.)* on adhesion of *S. aureus (S.a.)* when added in a suspension where the ratio of *S. aureus* and *lactobacilli* is 1:1 and 1:10 on porcine mucus.**

sev	*S.a.* : *L.* (1 : 1)	*S.a.* : *L.* (1 : 10)
LGG	164 ± 22	78 ± 10
LF	68 ± 8	82 ± 9
K7	69 ± 34	51 ± 11
2/26	236 ± 3	139 ± 20
9/26	145 ± 31	87 ± 11
14/26	205 ± 47	157 ± 49
12/26	124 ± 71	100 ± 19
2/25	65 ± 14	70 ± 37
2/18	101 ± 14	96 ± 5
4/26	81 ± 8	123 ± 58

* V testih tekmovanja smo radioaktivno označili le *E. coli* ali *S. aureus*, vezavo pa v odstotkih ovrednotili glede na rezultate, kjer je bil v testu uporabljeni sev *E. coli* ali *S. aureus* sam.

V testih tekmovanja na sluzi prašičjega izvora, kjer so bili mikroorganizmi aplicirani v razmerju 1:1, sta človeška izolata LF in K7 ter prašičja izolata *L. crispatus/amylovorus* 2/25 in 4/26 zmanjšala adhezijo *S. aureus* (za 20-30 odstotkov). Ostali preiskovani sevi (človeški izolat LGG in prašičji izolati *L. reuteri* 2/26, 9/26, 14/26, 12/26) pa so adhezijo *S. aureus* povečali. Prašičji izolat *L. reuteri* 2/18 na adhezijo *S. aureus* ni vplival. V testih tekmovanja na prašičji sluzi, kjer so bili mikroorganizmi aplicirani v razmerju 1:10, je človeški izolat K7 zmanjšal adhezijo *S. aureus* za odstotkov, preostala človeška izolata LF

in LGG pa za približno 20 odstotkov. Adhezijo *S. aureus* sta zmanjšala tudi prašičja izolata *L. crispatus/amylovorus* 2/25 (za 30 odstotkov) in *L. reuteri* 9/26 (za 13 odstotkov). Prašičji izolati *L. reuteri* 2/26 in 14/26, ter *L. crispatus/amylovorus* 4/26 so adhezijo *S. aureus* povečali, medtem ko *L. reuteri* 12/26 in 2/18 na adhezijo nista vplivala (preglednica 10).

Preglednica 11: **Vpliv izbranih laktobacilov *(L.)* na adhezijo *E. coli (E.c.)* ob aplikaciji suspenzije v kateri so *E. coli* in izbrani laktobacili v razmerju 1:1 in 1:10 na sluzi prašičjega izvora.**

Table 11: **Effect of selected *lactobacilli (L.)* on adhesion of *E. coli (E.c.)* when added in a suspension where the ratio of *E. coli* and *lactobacilli* is 1:1 and 1:10 on porcine mucus.**

sev	*E.c.* : *L.* (1 : 1)	*E.c.* : *L.* (1 : 10)
LGG	66 ± 8	94 ± 23
LF	71 ± 15	89 ± 7
K7	87 ± 11	110 ± 16
2/26	92 ± 15	136 ± 29
9/26	92 ± 17	118 ± 25
14/26	102 ± 19	131 ± 26
12/26	74 ± 10	107 ± 16
2/25	73 ± 6	102 ± 18
2/18	79 ± 23	99 ± 14
4/26	77 ± 17	113 ± 5

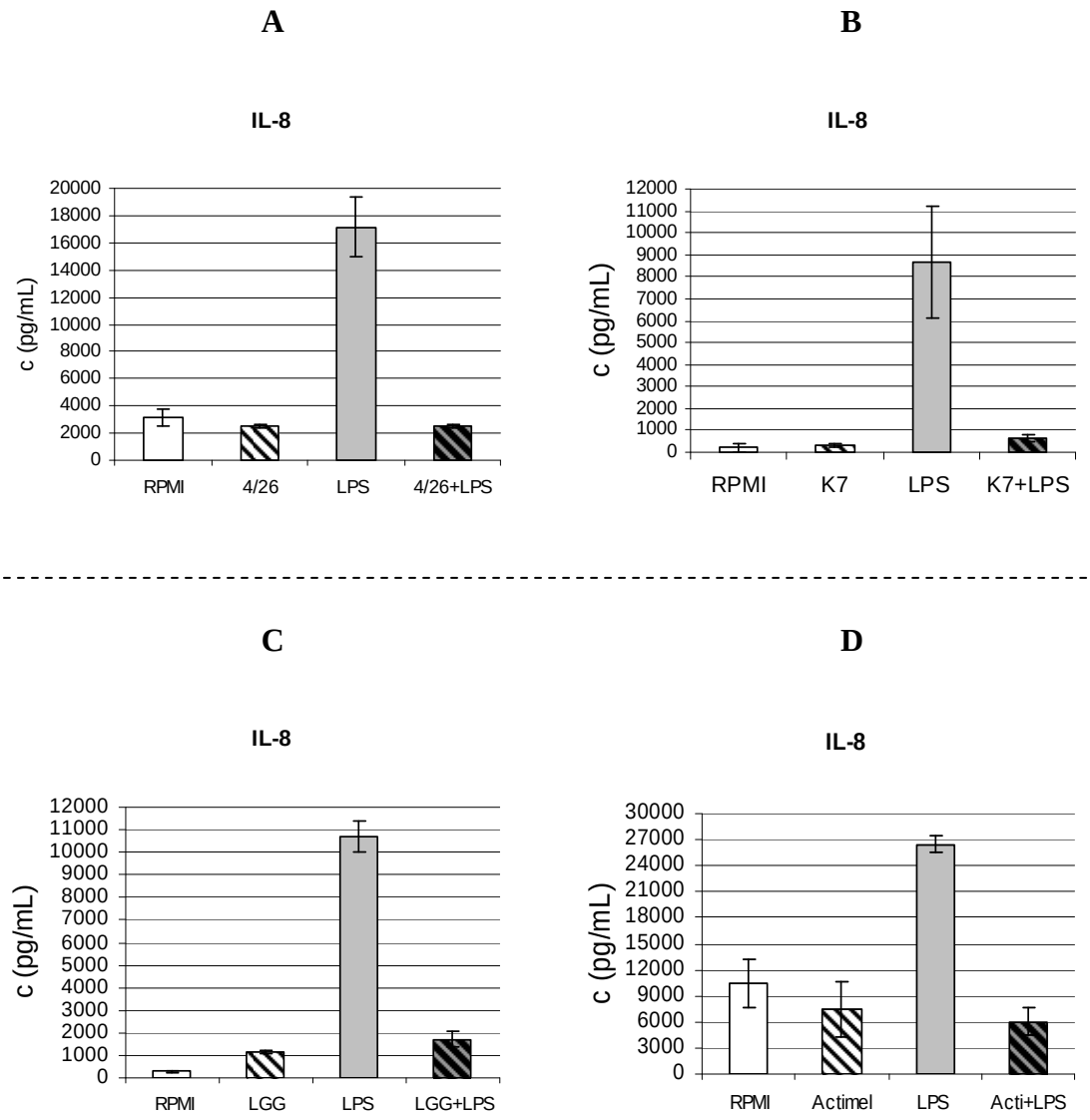
* V testih tekmovanja smo radioaktivno označili le *E. coli* ali *S. aureus*, vezavo pa v odstotkih ovrednotili glede na rezultate, kjer je bil v testu uporabljeni sev *E. coli* ali *S. aureus* sam.

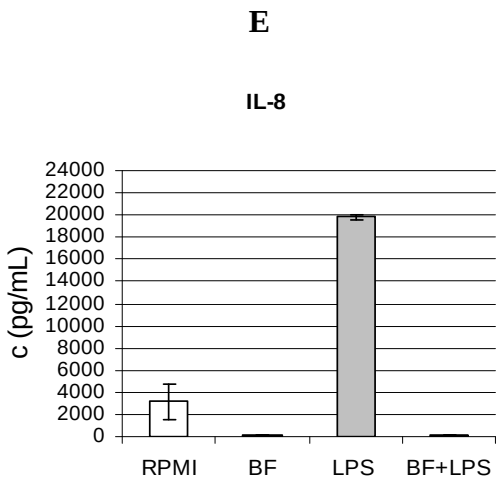
V testih adhezije na sluzi prašičjega izvora so vsi človeški izolati (LGG, K7 in LF) ter prašičji izolati *L. reuteri* 12/26 in 2/18 in *L. crispatus/amylovorus* 2/25 in 4/26 zmanjšali sposobnost adhezije *E. coli* kadar so bili mikroorganizmi aplicirani v razmerju 1:1. V testih, kjer so bili mikroorganizmi aplicirani v razmerju 1:10 je adhezijo *E.coli* zmanjšal le človeški izolat LF. Ostali izolati so adhezijo povečali (*L. reuteri* 2/26, 9/26, 14/26) ali pa niso imeli večjega vpliva (preglednica 11).

4.6 UGOTAVLJANJE VPLIVA IZBRANIH LAKTOBACILOV NA CITOKINSKI ODZIV CELIČNE LINIJE THP-1

Vpliv izbranih laktobacilov na citokinski odziv celične linije THP-1 smo ugotavljali z merjenjem koncentracije izločenih citokinov v supernatantih celične linije po 24-urni inkubaciji v gojišču samem (RPMI), z dodanimi bakterijami testnih sevov laktobacilov (*L. crispatus/amylovorus* 4/26, K7, LGG, *L. casei imunitass* DN114 (Actimel) in BF), z dodanim LPS (iz *E. coli* O111:B4) in ob inkubaciji z izbranim sevom laktobacilov in LPS skupaj. Uporabili smo komplet reagentov za vrednotenje vnetja pri človeku (Human inflammation kit, BD), ki omogoča sočasno merjenje koncentracij IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF in IL-12p70 v pg/mL z metodo pretočne citometrije. Pri stimulaciji celic THP-1 s sevom LGG smo opazili statistično značilno povečanje koncentracije IL-8 glede na kontrolo ($p \leq 0.05$; n=3) (slika 13 C). Pri merjenju koncentracije IL-1β smo pri stimulaciji celic THP-1 z izbranimi laktobacili opazili statistično značilno povečanje. Najbolj izrazito povečanje smo opazili pri sevu *L. casei imunitass* DN114 (Actimel) (slika 14 D) in najmanj izrazito pri sevu LGG (slika 14 C). Pri stimulaciji celic THP-1 samo z LPS so bile koncentracije izmerjenega citokina večje glede na kontrolo (gojišče RPMI), vendar manjše glede na koncentracije izmerjene pri stimulaciji z izbranimi laktobacili. Ob stimulaciji celic THP-1 z izbranimi laktobacili in LPS hkrati pa so bile koncentracije IL-1β večje od vrednosti, kjer smo celice stimulirali samo z LPS, vendar manjše v primerjavi z vrednostmi, kjer smo celice stimulirali le z izbranimi laktobacili (slika 14).

Po 24-urni stimulaciji celične linije THP-1 z RPMI, izbranimi laktobacili, z LPS *E. coli* O111:B4, oziroma z izbranimi laktobacili in LPS skupaj, v supernatantih celične linije nismo ugotovili sprememb v koncentracijah IL-10 in IL-12p70. Dodatek LPS *E. coli* O111:B4 je v vseh poskusih povzročil statistično značilno povečanje koncentracije IL-8 ($p \leq 0{,}01$; n=3), ob dodatku izbranega seva laktobacilov (*L. crispatus/amylovorus* 4/26, K7, LGG, *L. casei imunitass* DN114 (Actimel) in BF pa je prišlo do statistično značilnega zmanjšanja koncentracije IL-8 ($p \leq 0{,}03$; n=3) (slika 13). Podoben trend smo opazili tudi v koncentracijah IL-6 in TNF, kjer se je njuna koncentracija povečala ob stimulaciji z LPS, ob stimulaciji z LPS in izbranimi laktobacili, pa se je koncentracija citokina statistično značilno zmanjšala ($p \leq 0.05$; n=3) (slika15 in 16). Na slikah 13, 14, 15 in 16 so prikazani rezultati enega izmed treh identičnih testov.



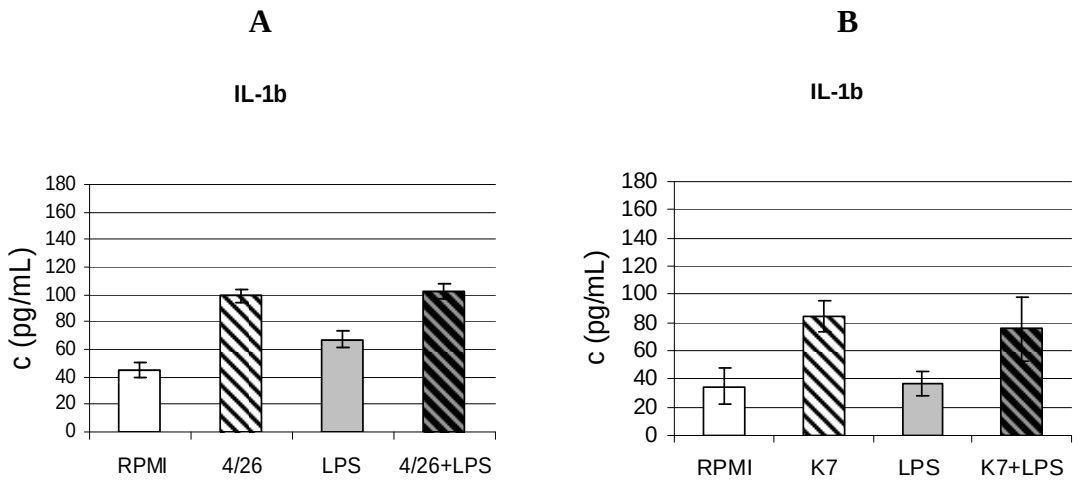


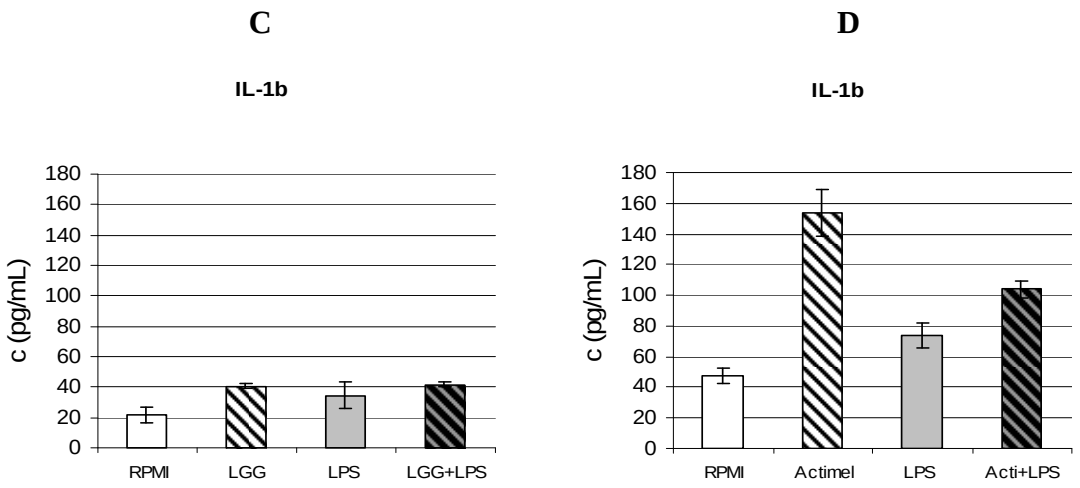
Legenda:

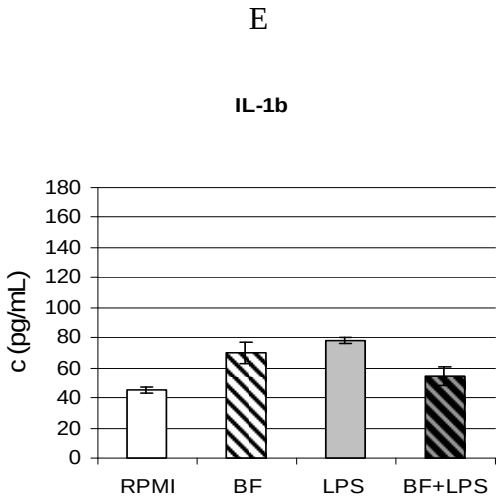
RPMI – gojišče za celično linijo THP-1; L. – izbrani sev laktobacilov; (A) *L. crispatus/amylovorus* 4/26, (B) *L. gasseri* K7, (C) *L. rhamnosus* LGG, (D) *L. casei imunitass* DN114 (Actimel), (E) *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* BF; LPS – lipopolisaharid *E. coli* O111:B4

Slika 13: **Koncentracija (c) IL-8 (pg/mL) v supernatantih celične linije THP-1 po stimulaciji z RPMI, L, LPS in L+LPS.**

Figure 13: **Concentration (c) of IL-8 (pg/mL) in supernatants of THP-1 cell line after stimulation with RPMI, L, LPS, L+LPS.**





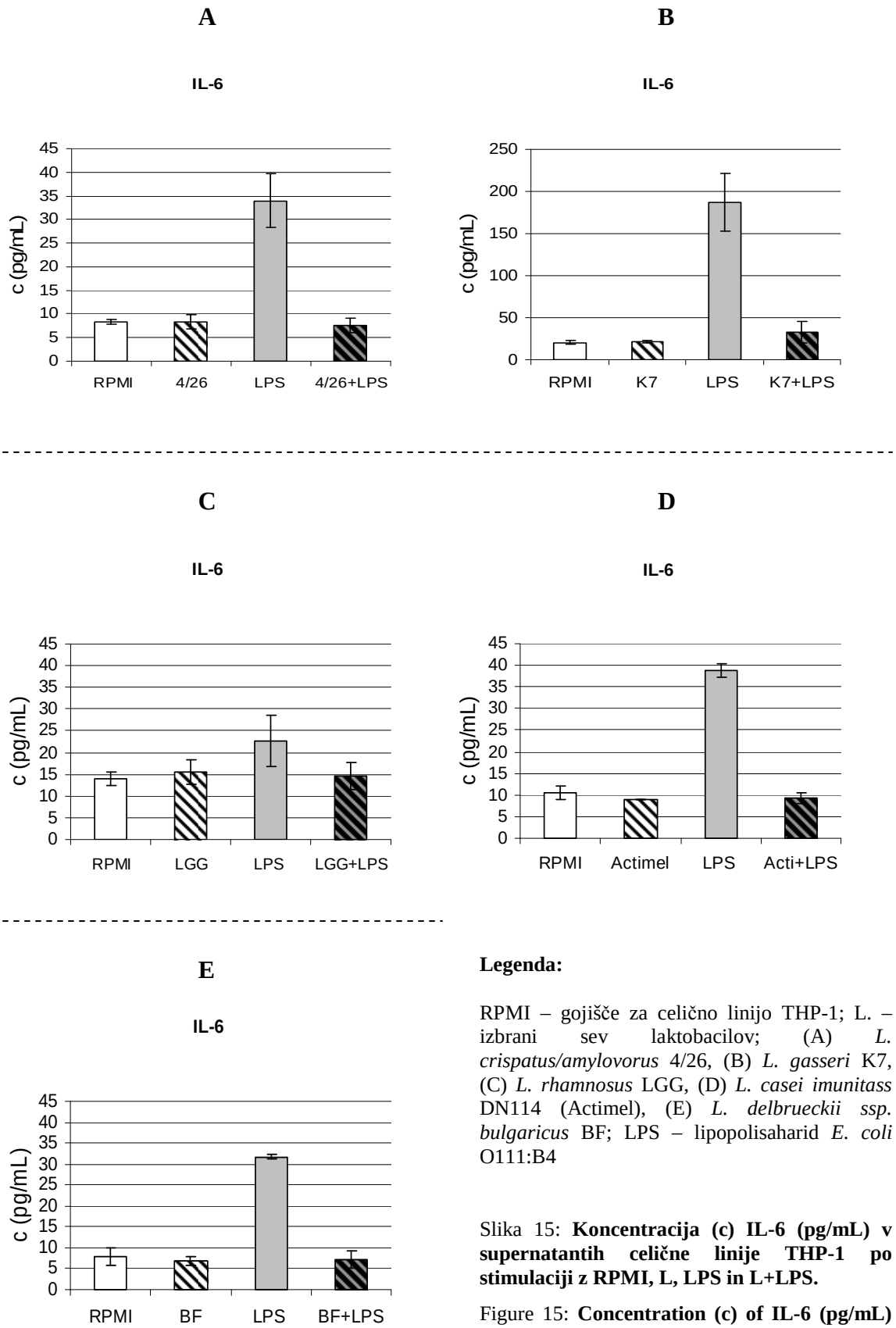


Legenda:

RPMI – gojišče za celično linijo THP-1; L. – izbrani sev laktobacilov; (A) *L. crispatus/amylovorus* 4/26, (B) *L. gasseri* K7, (C) *L. rhamnosus* LGG, (D) *L. casei imunitass* DN114 (Actimel), (E) *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* BF; LPS – lipopolisaharid *E. coli* O111:B4

Slika 14: **Koncentracija (c) IL-1β (pg/mL) v supernatantih celične linije THP-1 po stimulaciji z RPMI, L, LPS in L+LPS.**

Figure 14: **Concentration (c) of IL-1β (pg/mL) in supernatants of THP-1 cell line after stimulation with RPMI, L, LPS, L+LPS.**

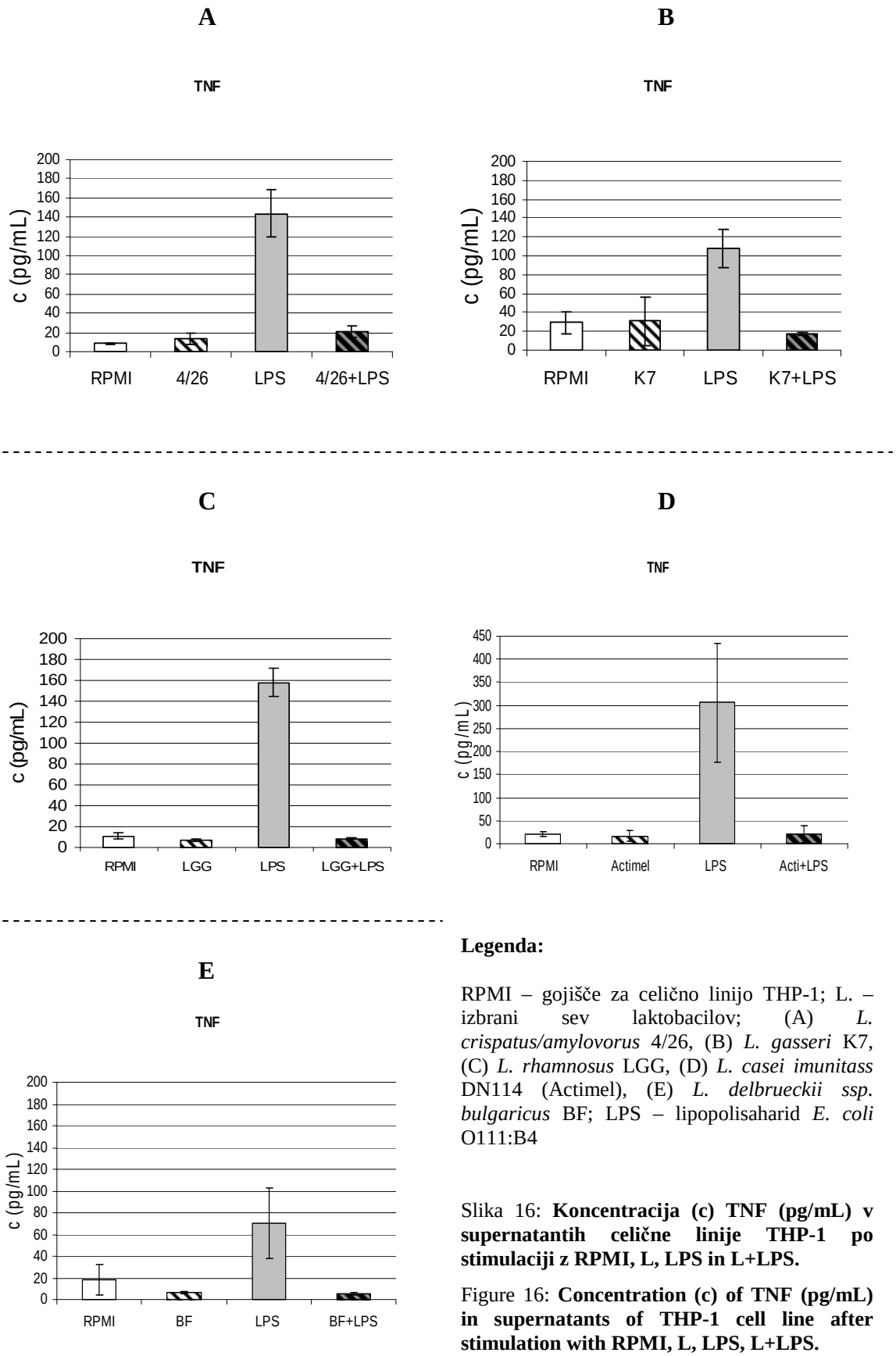


Legenda:

RPMI – gojišče za celično linijo THP-1; L. – izbrani sev laktobacilov; (A) *L. crispatus/amylovorus* 4/26, (B) *L. gasseri* K7, (C) *L. rhamnosus* LGG, (D) *L. casei imunitass* DN114 (Actimel), (E) *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* BF; LPS – lipopolisaharid *E. coli* O111:B4

Slika 15: **Koncentracija (c) IL-6 (pg/mL) v supernatantih celične linije THP-1 po stimulaciji z RPMI, L, LPS in L+LPS.**

Figure 15: **Concentration (c) of IL-6 (pg/mL) in supernatants of THP-1 cell line after stimulation with RPMI, L, LPS, L+LPS.**



Legenda:

RPMI – gojišče za celično linijo THP-1; L. – izbrani sev laktobacilov; (A) *L. crispatus/amylovorus* 4/26, (B) *L. gasseri* K7, (C) *L. rhamnosus* LGG, (D) *L. casei imunitass* DN114 (Actimel), (E) *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* BF; LPS – lipopolisaharid *E. coli* O111:B4

Slika 16: **Koncentracija (c) TNF (pg/mL) v supernatantih celične linije THP-1 po stimulaciji z RPMI, L, LPS in L+LPS.**

Figure 16: **Concentration (c) of TNF (pg/mL) in supernatants of THP-1 cell line after stimulation with RPMI, L, LPS, L+LPS.**

4.7 VPLIV PROBIOTIČNE BAKTERIJE *L. gasseri* K7 (Rif^r) NA MIŠI SEVA C57BL/6J OB SOČASNI APLIKACIJI ENTEROHEMORAGIČNE *E. coli* O157:H7

4.7.1 Teža živali in prirast

V poskus je bilo vključenih 50 mišk seva C57BL/6J ženskega spola starih od šest do osem tednov. Na začetku poskusnega obdobja so bile živali naključno razdeljene v poskusne skupine (5 skupin po 10 živali) in nastanjene po 5 živali v kletki. Poskus je bil razdeljen na obdobje prilagajanja (7 dni), ko so bile živali vseh petih skupin hranjene ad libitum samo s standardno hrano za miši v obliki peletov, in poskusno obdobje (21 dni), ko so poleg standardne hrane prejemale še testne mikroorganizme. Živali smo stehtali ob vhlevitvi, 8., 15., 22. dan poskusa in ob žrtvovanju (28. dan poskusa).

V skupini A (kontrolna skupina) se je povprečna teža živali v prvem tednu poskusa (obdobje prilagajanja) zmanjšala za 0,1 g, v nadaljnih treh tednih pa so živali enakomerno priraščale v povprečju 0,5 g na teden. Povprečna teža živali ob vhlevitvi je bila 18,28 g, ob žrtvovanju 19,72 g, tekom poskusa so živali pridobile 1,44 g.

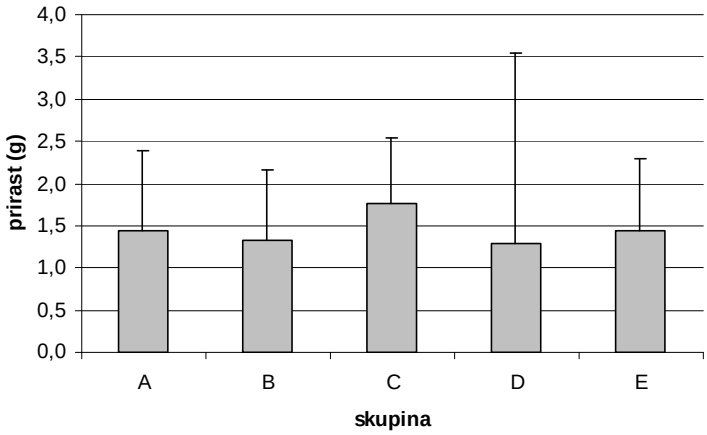
V skupini B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)) se je povprečna teža živali v obdobju prilagajanja povečala za 0,64 g, v času 14-dnevne aplikacije K7 (Rif^r) se je povečala za 0,09 g in v zadnjem tednu za 0,60 g. Povprečna teža živali ob vhlevitvi je bila 18,15 g, ob žrtvovanju 19,48 g, tekom poskusa so živali pridobile 1,33 g.

V skupini C (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* 8. dan poskusa) se je povprečna teža živali v obdobju prilagajanja povečala za 1,09 g, po aplikaciji *E. coli* in tudi v času 14-dnevne aplikacije K7 (Rif^r) je povprečna teža živali padla za 0,93 g, v zadnjem tednu pa so živali v povprečju pridobile 1,60 g. Povprečna teža živali ob vhlevitvi je bila 18,61 g, ob žrtvovanju 20,37 g, tekom poskusa so živali pridobile 1,76 g.

V skupini D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* 15. dan poskusa) je povprečna teža živali od vhlevitve do 15. dneva poskusa narasla za 0,91 g. Od 15. do 22. dne poskusa, teden po aplikaciji *E. coli*, so živali izgubile 0,64 g, od 22. dne do žrtvovanja so pridobile 1,01 g. Povprečna teža živali ob vhlevitvi je bila 18,64 g, ob žrtvovanju 19,92 g, tekom poskusa so živali pridobile 1,28 g.

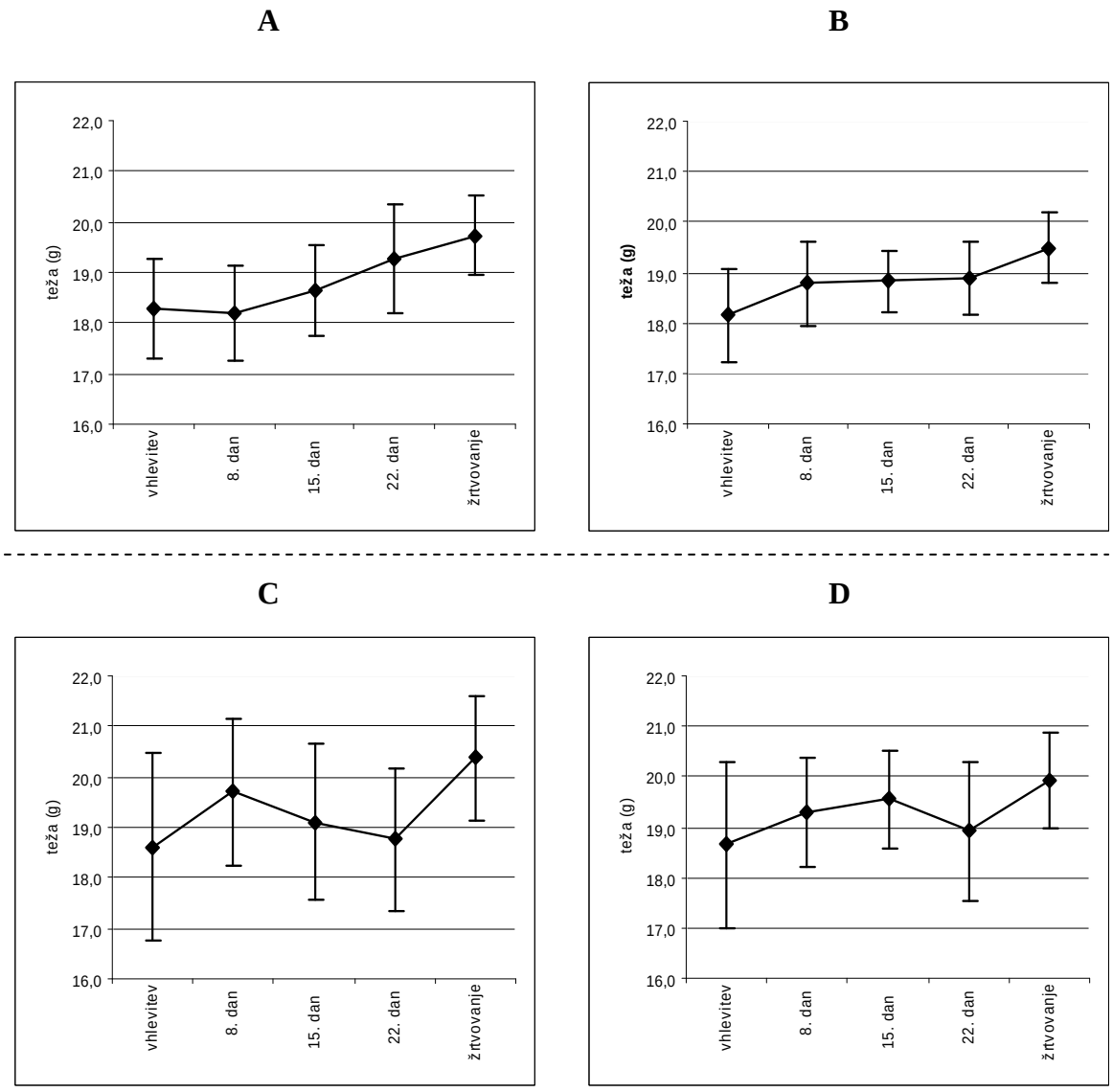
V skupini E (enkratna aplikacija *E. coli* 8. dan poskusa) je povprečna teža živali v prvem tednu poskusa narasla za 0,89 g, v tednu po aplikaciji *E. coli* je padla za 0,08 g, od 15. dne do žrtvovanja pa so živali pridobile 0,64 g. Povprečna teža živali ob vhlevitvi je bila 18,75 g, ob žrtvovanju 20,20 g, tekom poskusa so živali pridobile 1,45 g.

Vse živali v petih različnih poskusnih skupinah so tekom poskusa (28 dni) pridobile na telesni teži. Med poskusnimi skupinami nismo zaznali statistično značilnih razlik v prirastu (slika 17).



Slika 17: **Prirast živali v času 28-dnevnega poskusa.**

Figure 17: **Animal weight gain during 28 day trial.**



Slika 18: **Povprečna teža živali posameznih skupin na dan vhlevitve, 8., 15., 22. in 28. dan poskusa.**

Legenda:

(A) kontrolna skupina, (B) dnevna aplikacija 1,2 x 10^9 KE seva K7 (Rif^r) na žival 8. do 21. dan poskusa, (C) dnevna aplikacija 1,2 x 10^9 KE seva K7 (Rif^r) na žival 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 5 x 10^8 KE seva E. coli O157:H7 na žival 8. dan poskusa, (D) dnevna aplikacija 1,2 x 10^9 KE seva K7 (Rif^r) na žival 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 5 x 10^8 KE na žival seva E. coli O157:H7 15. dan poskusa in (E) enkratna aplikacija 5 x 10^8 KE na žival seva E. coli O157:H7 8. dan poskusa.

Figure 18 (Page 99): **Mean weight of animals from five different test groups on day of housing, 8., 15., 22. and 28. day of trial.**

Legend: (A) control group, (B) daily application of 1,2 x 10^9 CFU of strain K7 (Rif^r) per animal from 8. until 21. day of trial, (C) daily application of 1,2 x 10^9 CFU of strain K7 (Rif^r) per animal from 8. until 21. day of trial and one application of 5 x 10^8 CFU of strain *E. coli* O157:H7 per animal on 8. day of trial, (D) daily application of 1,2 x 10^9 CFU of strain K7 (Rif^r) per animal from 8. until 21. day of trial and one application of 5 x 10^8 CFU per animal of strain *E. coli* O157:H7 on 15. day of trial and (E) one application of 5 x 10^8 CFU per animal of strain *E. coli* O157:H7 on 8. day of trial.

4.7.2 Poraba krme

Količino zaužite krme smo spremljali z vsakodnevnim tehtanjem krme pri posamezni skupini petih živali, ki so bile nastanjene v isti kletki. Povprečna poraba krme na dan je bila za skupino A (kontrolna skupina) 31,06 g (±0,82), za skupino B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) 28,38 g (±0,67), za skupino C (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* 8. dan poskusa) 30,00 g (±0,96), za skupino D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* 15. dan poskusa) 28,41g (±1,01) in za skupino E (enkratna aplikacija *E. coli* 8. dan poskusa) 29,05 g (±0,68). Številke v oklepajih ponazarjajo standardno napako pri meritvah. Povprečna dnevna poraba krme je bila pri skupini, ki smo ji 14 dni aplicirali K7 (Rif^r) (skupina B) signifikantno nižja ($p \leq 0,01$) kot pri kontrolni skupini (skupina A). Poraba krme pri ostalih skupinah se ni statistično značilno razlikovala od porabe pri kontrolni skupini.

4.7.3 Opazovanje poskusnih živali

Med poskusom smo živali vsak dan opazovali in ocenili njihovo zdravstveno stanje. Živali vseh petih poskusnih skupin so bile med poskusom živahne, imele gladko, svetlečo dlako, se odzivale na zunanje dražljaje in kazale zanimanje za okolico. Tudi po aplikaciji mikroorganizmov (*E. coli* O157:H7 in K7 (Rif^r)) živali niso imele driske in niso kazale drugih kliničnih znakov bolezni.

4.7.4 Analize krvi

Živalim smo ob žrtvovanju odvzeli vzorce krvi za analizo krvne slike, diferencialne bele krvne slike in test fagocitoze.

4.7.4.1 Krvna slika

Kri smo analizirali z uporabo hematološkega analizatorja ABC VET (ABX Diagnostics, Montpelier, Francija) in preverili naslednje parametre: WBC (št. levkocitov), RBC (št. eritrocitov), HGB (količina hemoglobina v krvi), HCT (hematokrit), PLT (št. trombocitov), MCV (povprečni volumen eritrocitov), MCH (povprečna absolutna količina hemoglobina v eritrocitih) in MCHC (povprečna relativna koncentracija hemoglobina v eritrocitu). Merjeni krvni parametri so bili pri vseh poskusnih skupinah živali v mejah referenčnih vrednosti (ABC Vet), razen število trombocitov. Število trombocitov je bilo pri skupini B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)) nekoliko povišano, vendar se ni statistično značilno razlikovalo od števila trombocitov pri skupini A (kontrolna skupina). Število trombocitov pri skupinah C, D in E je bilo nad referenčnimi vrednostmi in se je statistično značilno razlikovalo od kontrolne skupine A ($p \leq 0,05$). Vrednosti levkocitov so bile pri vseh skupinah v mejah referenčnih vrednosti, vendar je bilo število levkocitov v skupini D statistično značilno višje ($p=0,02$), kot pri kontrolni skupini A.

Preglednica 12: **Krvna slika živali v poskusu.**

Prikazane so srednje vrednosti in standardni odkloni različno tretiranih živali v poskusu. A (kontrolna skupina), B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)), C (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa), D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa) in E (enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa).

Table 12: **Hematology values for animals in trial.**

Mean ± SD of differently treated animals during trial**.** A (control group), B (14 day application of K7 (Rif^r)), C (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial), D (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 15 of trial) and E (one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial).

	enota	ref.vred.	A	B	C	D	E
WBC	10^9/L	3,0-15,0	5,0 ± 2,4	6,2 ± 2,1	6,1 ± 1,7	7,6 ± 1,9	7,4 ± 2,4
RBC	10^{12}/L	5,0-12,0	9,6 ± 0,4	9,8 ± 0,4	9,8 ± 0,5	9,6 ± 0,4	9,8 ± 4,6
HGB	g/L	111-180	145,8 ± 7,9	147,2 ± 6,6	147,4 ± 7,1	142,6 ± 5,3	144 ± 68,5
HCT	L/L	0,36-0,52	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0, 0	0,4 ± 0,2
PLT	10^9/L	140-600	472,8 ± 329,8	668,9 ± 298,2	851,6 ± 141,9	863,1 ± 81,1	925,8 ± 268
MCV	fl	44-69	46,8 ± 1,0	46,3 ± 0,7	47,1 ± 0,9	46,6 ± 0,8	46 ± 22,9
MCH	pg	12,0-24,5	15,1 ± 0,3	15,1 ± 0,2	15,1 ± 0,6	14 ,9 ± 0,4	14,7 ± 7,4
MCHC	g/L	216-420	322,5 ± 8,8	324,9 ± 8,5	320,2 ± 7,2	320,5 ± 4,9	320,2 ± 157,8

4.7.4.2 Diferencialna bela krvna slika

Za vrednotenje diferencialne bele krvne slike smo pripravili krvne razmaze, v katerih smo prešteli 150 belih krvnih celic, ki smo jih razdelili v naslednje kategorije: limfociti, monociti, segmentirani nevtrofilni granulociti, paličasti nevtrofilni granulociti, eozinofilni granulociti in bazofilni granulociti. Za vsako kategorijo smo izračunali delež celic v preparatu tako, da smo število celic v eni kategoriji delili s številom vseh preštetih belih krvnih celic, ter ga izrazili v odstotkih.

Delež preštetih monocitov, eozinofilnih granulocitov in bazofilnih granulocitov je bil manjši od 1 odstotka. Absolutno število limfocitov v preiskovanih krvnih razmazih je bilo v skupini D statistično značilno večje ($p=0,02$) kot pri kontrolni skupini. Pri skupini E pa smo opazili statistično značilno večji ($p<0,05$) delež segmentiranih in paličastih nevtrofilnih granulocitov kot pri kontrolni skupin.

Preglednica 13: **Diferencialna bela krvna slika živali v poskusu.**
(prikazane so srednje vrednosti in standardni odkloni različno tretiranih živali v poskusu. A (kontrolna skupina), B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)), C (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa), D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa) in E (enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa).

Table 13: **Diferential white blood count of animals in trial.**
(Mean ± SD of differently treated animals during trial**.** A (control group), B (14 day application of K7 (Rif^r)), C (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial), D (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 15 of trial) and E (one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial).

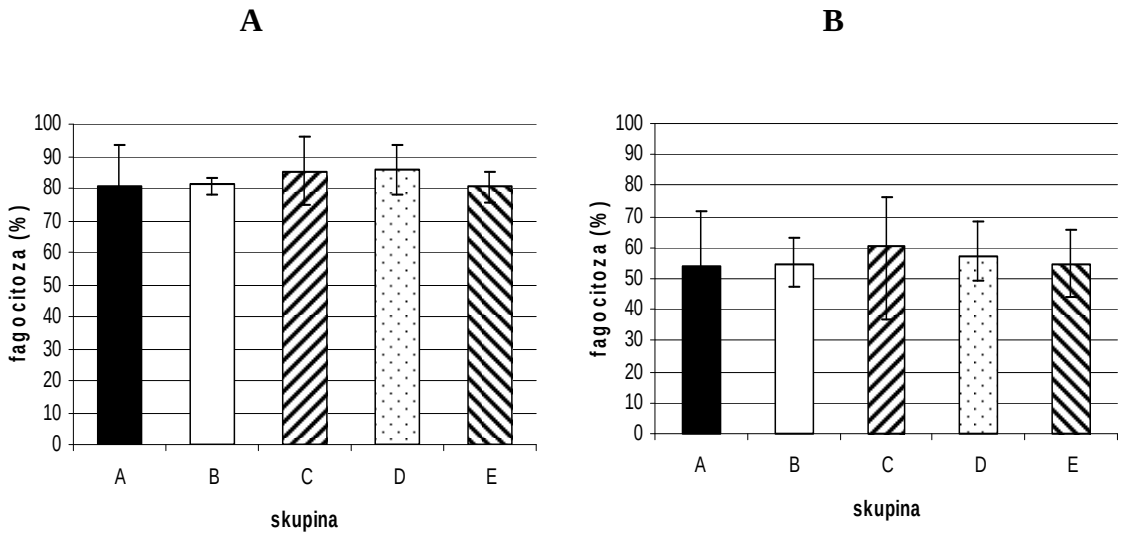
	ref.vred.	A	B	C	D	E
limfociti (%)	90,20 ± 2,97	84,4 ± 8,3	83,1 ± 4,4	83,4 ± 4,7	80,2 ± 5,0	71,4 ± 5,2
segmentirani nevtrofilci (%)	8,30 ± 3,77	14,4 ± 8,2	16,1 ± 4,6	15,7 ± 4,7	18,9 ± 5,3	26,0 ± 5,2
paličasti nevtrofilci (%)	n.p.	0,8 ± 0,4	1,4 ± 1,1	0,8 ± 0,4	0,9 ± 0, 6	2,3 ± 0,4
eozinofilci (%)	0,70 ± 0,82	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
bazofilci (%)	0,20 ± 0,42	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
monociti (%)	0,6 ± 0,84	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,2	0 ,2 ± 0,3

n.p.- ni podatka

4.7.4.3 Test fagocitoze

Ob žrtvovanju živali smo odvzeli vzorce krvi, da bi preverili, če je različno tretiranje živali vplivalo na fagocitno sposobnost granulocitov in monocitov. V ta namen smo uporabili skupek reagentov (Phagotest, Orpegen Pharma), ki omogoča kvantitativno ugotavljanje levkocitne fagocitoze v heparinizirani celokupni krvi. Fagocitozno raziskavo smo izvajali z metodo pretočne citometrije s FACScalibur pretočnim citometrom.

Med različno tretiranimi skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v deležu granulocitov in monocitov, pri katerih smo izmerili aktivnost fagocitoze. Delež granulocitov, ki so fagocitirali, je bil v skupini A (kontrolna skupina) 80,4 odstotka, v skupini B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)) 81,3 odstotka, v skupini C (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8.dan poskusa) 85,1 odstotka, v skupini D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 15.dan poskusa) 85,7 odstotka in v skupini E (enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8.dan poskusa) 80,5 odstotka. Povprečen delež fagocitirajočih monocitov je bil pri skupini A 53,7 odstotka, pri skupini B 54,4 odstotka, pri skupini C 60,2 odstotka, pri skupini D 56,9 odstotka in pri skupini E 54,9 odstotka.



Slika 19: **(A) Delež fagocitirajočih granulocitov, (B) delež fagocitirajočih monocitov živali v poskusu.**
Figure 22: **(A) Percentage of granulocytes positive for phagocytosis, (B) percentage of monocytes positive for phagocytosis from animals in trial.**

4.7.5 Mikrobiološke analize

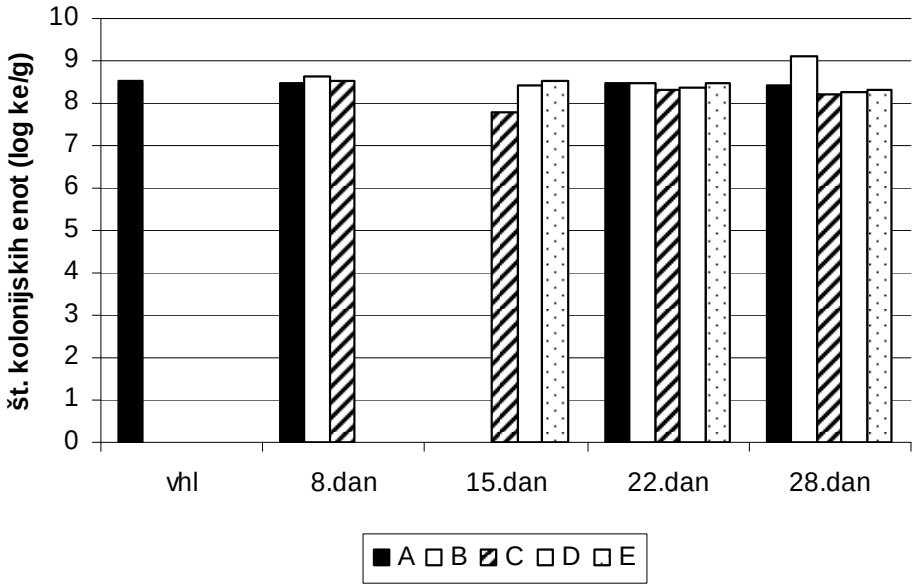
Za mikrobiološke analize smo živalim odvzeli vzorce blata ob vhlevitvi ter 8., 15., 22. in 28. dan poskusa. V vzorcih blata smo na selektivnih gojiščih ugotavljali število mlečnokislinskih in koliformnih bakterij ter prisotnost K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7. Število mlečnokislinskih bakterij smo ugotavljali na gojišču MRS, število seva K7 (Rif^r) na gojišču MRS z dodatkom antibiotika rifampicina, število koliformnih bakterij na gojišču Chromocult in število seva *E. coli* O157:H7 na gojišču Fluorocult.

Ob žrtvovanju smo odvzeli vzorce želodca, tankega črevesa, kolona in slepega črevesa, vzorce vsebine tankega črevesa, kolona in slepega črevesa, mezenterialne bezgavke, vranico, jetra in ledvice ter v odvzetih vzorcih ugotavljali prisotnost bakterij K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7.

Ker se je izkazalo, da bakterijski sev *E. coli* O157:H7 v prisotnosti drugih bakterij na gojišču Fluorocult ne tvori tipičnih kolonij, selektivno štetje kolonij seva *E. coli* O157:H7 ni bilo mogoče. Zato smo zrasle kolonije s pomočjo fiziološke raztopine sprali s površine plošč ter iz izpirkov izolirali celokupno bakterijsko DNA, da bi dokazali prisotnost seva *E. coli* O157:H7 z metodo multiplex PCR. Uporabili smo tri sete začetnih oligonukleotidov, kjer MS1F in MS1R pomnožujeta odsek DNA na 60 MDa velikem plazmidu, MK-1 in MK-2 pomnožujeta gene za virulenčne dejavnike (toksini) ter AE 19 in AE 20 pomnožujeta zapis gena *eaeA* za membranski protein $intimin_{O157:H7}$ (Fratamico in sod., 1995). Pomnožki PCR, specifični za serološko skupino O157:H7, so veliki 166 bp (plazmid), 224 ali/in 227 bp (SLT) ter 1087 bp (membranski protein) (priloga B).

Kolonije, zrasle na gojišču MRS z dodanim rifampicinom, smo precepili v tekoče gojišče MRS, izolirali celokupno DNA izraslih kolonij in potrdili njihovo istovetnost s sevom K7 (Rif^r) z analizo RAPD z uporabo začetnega nukleotida M-13 (Torriani in sod., 1999) (priloga C).

4.7.5.1 Vrednotenje števila mlečnokislinskih bakterij v blatu



Legenda:

Skupina A-kontrolna skupina;
Skupina B-dnevna aplikacija 1,2 x 10^9 KE seva K7 (Rif^r) na žival 8. do 21. dan poskusa;
Skupina C-dnevna aplikacija 1,2 x 10^9 KE seva K7 (Rif^r) na žival 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 5 x 10^8 KE seva *E. coli* O157:H7 na žival 8. dan poskusa;
Skupina D-dnevna aplikacija 1,2 x 10^9 KE seva K7 (Rif^r) na žival 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 5 x 10^8 KE na žival seva *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa;
Skupina E-enkratna aplikacija 5 x 10^8 KE na žival seva *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa.

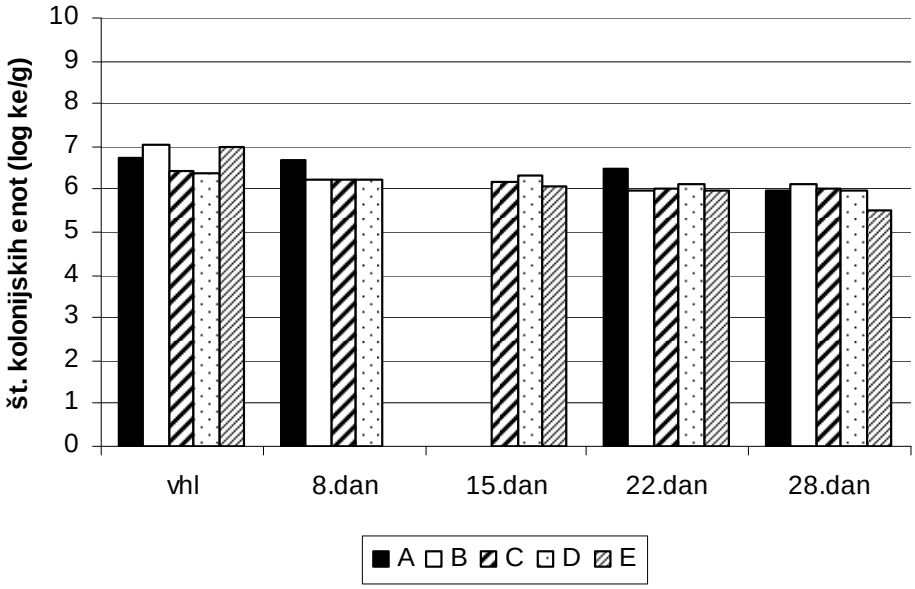
Slika 20: **Število bakterij v gramu blata živali v skupinah A, B, C, D in E, zraslih na gojišču MRS, ob vhlevitvi, 8., 15., 22. in 28. dan poskusa.**

Figure 20: **Number of bacteria in 1 g of faeces from animals in groups A, B, C, D and E, grown on MRS agar on the day of housing, 8., 15., 22. and 28. day of trial.**

Slika 20 prikazuje število kolonijskih enot bakterij na gram blata miši, odvzetega med 28-dnevnim poskusom, na gojišču MRS, ki je selektivno gojišče za mlečnokislinske bakterije (MKB). Povprečno število MKB v blatu skupine A (kontrola) je bilo skozi celotno obdobje okrog 2,5 x 10^8 KE/g. Pri skupini B smo ugotovili največjo vrednost 1,3 x 10^9 KE/g po 4 tednih, ko je bilo število kolonijskih enot glede na predhodna vzorčenja večje za red velikosti 0,5 logaritma. Pri skupini C je bilo število največje po 1 tednu, ko smo ugotovili 3,2 x 10^8 KE/g, najmanjše pa po 2 tednih, ko smo ugotovili 6,3 x 10^7 KE/g. Število zraslih

celic MKB je bilo pri skupinah D in E približno enako in se med poskusom ni bistveno spreminjalo. Za število bakterij v vzorcih blata, ki naj bi izrasle na gojišču MRS, pri skupinah A in B (po 2 tednih) ter D in E (po 1 tednu) nimamo podatkov.

4.7.5.2 Vrednotenje števila koliformnih bakterij v blatu



Legenda:

Skupina A-kontrolna skupina;
Skupina B-dnevna aplikacija 1,2 x 10^9 KE seva K7 (Rif^r) na žival 8. do 21. dan poskusa;
Skupina C-dnevna aplikacija 1,2 x 10^9 KE seva K7 (Rif^r) na žival 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 5 x 10^8 KE seva *E. coli* O157:H7 na žival 8. dan poskusa;
Skupina D-dnevna aplikacija 1,2 x 10^9 KE seva K7 (Rif^r) na žival 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 5 x 10^8 KE na žival seva *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa;
Skupina E-enkratna aplikacija 5 x 10^8 KE na žival seva *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa.

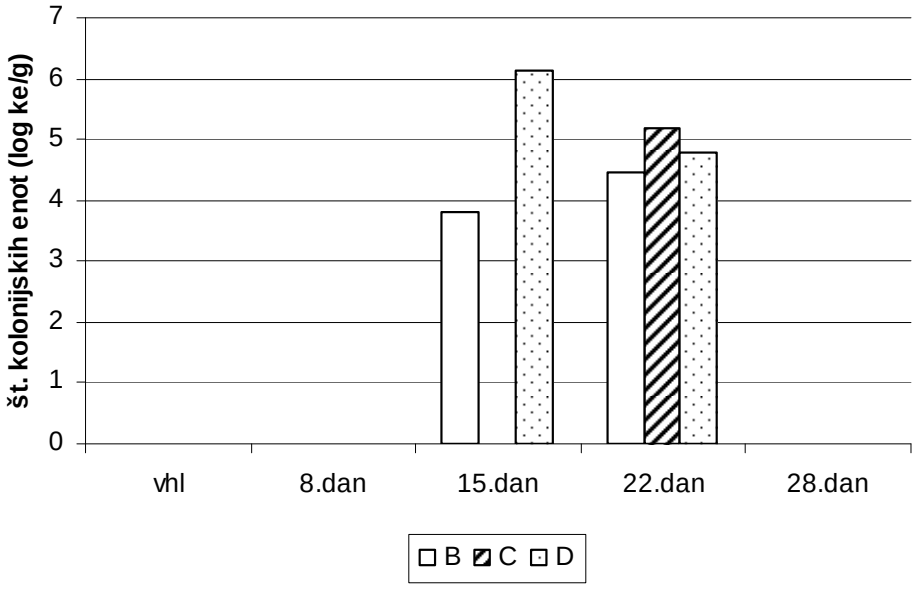
Slika 21: **Število bakterij v gramu blata živali v skupinah A, B, C, D in E, zraslih na gojišču za koliformne bakterije, ob vhlevitvi, 8., 15., 22. in 28. dan poskusa.**

Figure 21: **Number of bacteria in 1 g of faeces from animals in groups A, B, C, D and E, grown on coliform agar on the day of housing, 8., 15., 22. and 28. day of trial.**

Na sliki 21 so prikazana števila koliformnih bakterij na gram blata živali v poskusu, odvzetega v različnih časovnih obdobjih. Število koliformnih bakterij je bilo v povprečju za red velikosti dveh logaritmov nižje od ugotovljenega števila MKB. Število KE koliformnih bakterij na gram blata pri skupini A je znašalo 4 x 10^6 (po 1 tednu), med

testnim obdobjem se je število bakterij zmanjšalo in zadnji teden doseglo vrednost 8,9 x 10^5 KE/g. Trend upadanja smo opazili tudi pri skupini E, ki ni prejemala seva K7 (Rif^r). Povprečno število koliformnih bakterij je pri skupinah B, C in D po 1 tednu znašalo 1,6 x 10^6 KE/g. Pri skupini B in C smo najmanjše število ugotovili po 3 tednih (9,1 x 10^5 KE/g), pri skupini D pa po 4 tednih (9,5 x 10^5 KE/g). Za število bakterij na gojišču Chromocult pri skupinah A in B (po 2 tednih) ter E (po 1 tednu) nimamo podatkov.

4.7.5.3 Vrednotenje števila mlečnokislinskih bakterij v blatu, izraslih na gojišču MRS z dodatkom rifampicina



Legenda:

Skupina A-kontrolna skupina;
Skupina B-dnevna aplikacija 1,2 x 10^9 KE seva K7 (Rif^r) na žival 8. do 21. dan poskusa;
Skupina C-dnevna aplikacija 1,2 x 10^9 KE seva K7 (Rif^r) na žival 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 5 x 10^8 KE seva *E. coli* O157:H7 na žival 8. dan poskusa;
Skupina D-dnevna aplikacija 1,2 x 10^9 KE seva K7 (Rif^r) na žival 8. do 21. dan poskusa in enkratna aplikacija 5 x 10^8 KE na žival seva *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa;
Skupina E-enkratna aplikacija 5 x 10^8 KE na žival seva *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa.

Slika 22: **Število bakterij v gramu blata živali v skupinah A, B, C, D in E, zraslih na gojišču MRS z dodatkom rifampicina, ob vhlevitvi, 8., 15., 22. in 28. dan poskusa**.

Figure 22: **Number of bacteria in 1 gram of faeces from animals in groups A, B, C, D and E, grown on MRS agar with rifampicin on the day of housing, 8., 15., 22. and 28. day of trial.**

Na sliki 22 je prikazano število kolonijskih enot proti rifampicinu odpornih mlečnokislinskih bakterij v blatu miši. Praviloma je na tem gojišču zrasel samo sev K7 (Rif^r), saj je proti rifampicinu odpornih sevov v naravi izredno malo. Da bi potrdili specifičnost gojišča za sev K7 (Rif^r), smo naključne kolonije izrasle na gojišču po nacepitvi obravnavanih vzorcev potrdili z analizo RAPD. Pri skupini D je bilo število zraslih KE po 2 tednih za red velikosti 1,3 logaritma večje kot po 3 tednih. Pri skupini B pa je bilo število zraslih KE po 2 tednih za red velikosti 0,6 logaritma manjše od tistega po 3 tednih. Povprečno število KE pri skupini C, ugotovljeno po 3 tednih, je znašalo 1,5 x 10^5 KE/g. Kjer podatki niso prikazani, je bilo število kolonijskih enot pod mejo detekcije (10^3 KE/g). Rasti na tem selektivnem gojišču nismo opazili po nacepljanju blata živali iz skupin A (kontrola) in E skozi celotno poskusno obdobje, kar je pričakovan rezultat, saj nobena od teh dveh skupin ni prejemala celic seva K7(Rif^r). V 1. in 4. tednu poskusnega obdobja v blatu nobene skupine živali nismo ugotovili prisotnosti proti rifampicinu odpornih mlečnokislinskih bakterij.

4.7.5.4 Vrednotenje števila *E. coli* O157:H7 v blatu

Prisotnost kultivabilnih bakterij seva *E. coli* O157:H7 smo potrdili v blatu mišk skupine D, ki je v poskusnem obdobju 2. tedna prejemala dnevni odmerek seva K7 (Rif^r) ter enkratno dozo *E. coli* O157:H7 (8. dan). *E. coli* O157:H7 smo ugotovili samo v vzorcih blata 5 mišk od 10 analiziranih, odvzetih prvi dan po aplikaciji omenjenega seva, drugi in tretji dan po aplikaciji pa prisotnosti nismo več uspeli detektirati (priloga B).

4.7.5.5 Vrednotenje števila mikroorganizmov v želodcu in vsebini črevesja

Zanimalo nas je ali bodo mikroorganizmi, ki smo jih živalim aplicirali tekom poskusa (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) pri skupini B, C in D in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa pri skupini C in E in 15. dan poskusa pri skupini D) prisotni v vsebini želodca in v vsebini tankega črevesa, kolona in slepega črevesa. Z metodo RAPD (za ugotavljanje K7 (Rif^r)) smo analizirali 22 izolatov iz črevesne vsebine in 6 izolatov iz želodca, ki so zrasli na selektivnem gojišču MRS z dodatkom rifampicina. Prisotnosti K7 (Rif^r) v želodcu poskusnih živali nismo potrdili. Prisoten pa je bil v vsebini slepega črevesa ene izmed mišk

v skupini C (C2/2). Z metodo multiplex PCR (za ugotavljanje *E. coli* O157:H7) v želodcu in črevesni vsebini mišk nismo uspeli potrditi seva *E. coli* O157:H7 pri nobeni od skupin (priloga C).

4.7.5.6 Vrednotenje števila mikroorganizmov na črevesni sluznici

Zanimalo nas je ali sta se mikroorganizma K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7, ki smo ju aplicirali živalim v poskusu, uspela pripeti in kolonizirati črevesno sluznico. Homogenizate tankega črevesa, kolona in slepega črevesa smo nacepili na ustrezna trdna gojišča in iz zraslih kolonij izolirali DNA. Z metodo RAPD in multiplex PCR omenjenih sevov v vzorcih nismo uspeli potrditi pri nobeni od skupin.

4.7.5.7 Vrednotenje števila mikroorganizmov v organih

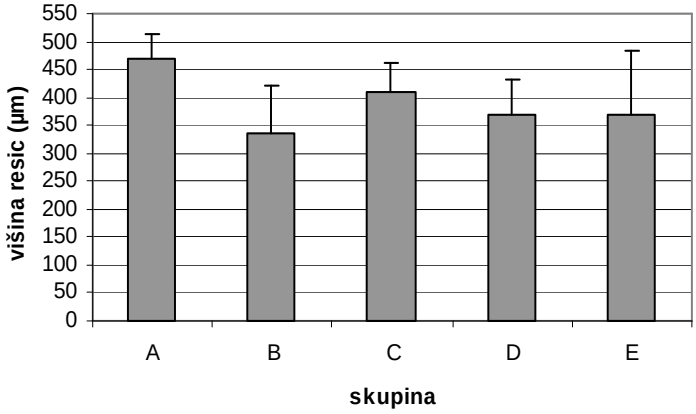
Zanimalo nas je ali sta mikroorganizma K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7, ki smo ju aplicirali živalim v poskusu, prešla v mezenterialne bezgavke in morda celo kolonizirala parenhimske organe. V vzorcih jeter, ledvic, vranice in mezenterialnih bezgavk poskusnih živali, seva K7 (Rif^r) in O157:H7 z metodo RAPD in multiplex PCR nismo uspeli potrditi pri nobeni od skupin.

4.7.6 Histološke analize

Pripravili smo histološke rezine mezenterialnih bezgavk, dvanajstnika, teščega črevesa, vitega črevesa in kolona. Izmerili smo višine resic teščega in vitega črevesa, debelino sluznice kolona in površino limfatičnega tkiva teščega in vitega črevesa. Pregledali smo histološke rezine mezenterialnih bezgavk (slikovna predstavitev v prilogi E). Analize smo opravili s pomočjo mikroskopa Olympus BX-51, kamere Olympus DP-12 in programske opreme Olympus DP-Soft BX-51 (vse Olympus, Nemčija). Meritve smo opravili pri 400-kratni povečavi.

V histoloških rezinah dvanajstnika so bile resice pri vseh skupinah poskusnih živali poškodovane, tako da meritve niso bile mogoče.

4.7.6.1 Morfometrične analize črevesnih resic teščega črevesa

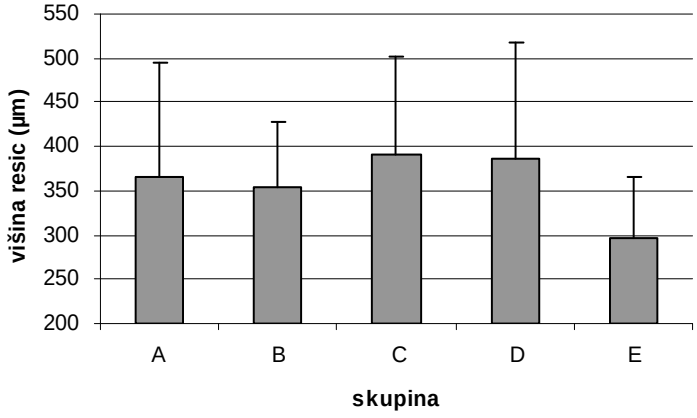


Slika 23: **Višina resic teščega črevesa (jejunum) živali v poskusu.**
A (kontrolna skupina), B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)), C (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa), D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa) in E (enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa).

Figure 23: **Height of jejunal villi of animals in trial.**
A (control group), B (14 day application of K7 (Rif^r)), C (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial), D (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 15 of trial) and E (one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial).

Z meritvami resic teščega črevesa smo opazili, da so bile glede na kontrolno skupino A resice pri živalih v poskusni skupini B nižje za 28 odstotkov, v skupini C za 13 odstotkov in pri živalih v poskusnih skupinah D in E za 21 odstotkov. Razlike v višini resic teščega črevesa so bile statistično značilne med živalmi v poskusnih skupinah A in B (p= 0,02), A in C (p= 0,05) in A in D (p= 0,01).

4.7.6.2 Morfometrične analize črevesnih resic vitega črevesa



Slika 24**: Višina resic vitega črevesa (ileum) živali v poskusu.**

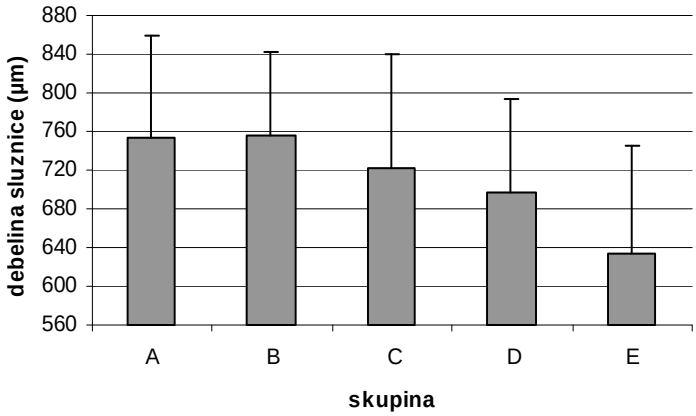
A (kontrolna skupina), B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)), C (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa), D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa) in E (enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa).

Figure 24: **Height of ileal villi of animals in trial.**

A (control group), B (14 day application of K7 (Rif^r)), C (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial), D (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 15 of trial) and E (one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial).

Z meritvami resic vitega črevesa smo opazili, da so bile višine resic živali iz skupin A in B primerljive, pri živalih v skupini C višje za 7 odstotkov, v skupini D višje za 6 odstotkov in pri živalih v poskusni skupini E nižje za 19 odstotkov. V višini resic med posameznimi skupinami v poskusu ni bilo statistično značilnih razlik. Ugotovili smo statistično značilne razlike med višino resic vitega in teščega črevesa (resice teščega črevesa so bile višje od resic vitega črevesa) pri skupini A (p= 0,02), C (p= 0,01) in E (p=0,001). Pri poskusnih skupinah B in D pa v višini resic teščega in vitega črevesa ni bilo statistično značilnih razlik.

4.7.6.3 Morfometrične analize debeline sluznice kolona



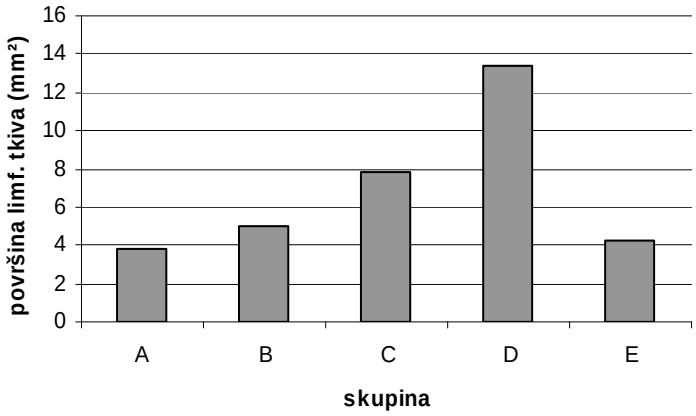
Slika 25: **Povprečna debelina sluznice kolona živali v poskusu.**
A (kontrolna skupina), B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)), C (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa), D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa) in E (enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa).

Figure 25: **Mean width of colon mucosa of animals in trial.**
A (control group), B (14 day application of K7 (Rif^r)), C (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial), D (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 15 of trial) and E (one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial).

Debelina sluznice kolona pri živalih v poskusnih skupina B, C in D se ni statistično značilno razlikovala od debeline sluznice pri kontrolni skupini A. Debelina sluznice živali v skupini E pa je bila statistično značilno (p=0,02) tanjša od kontrolne skupine A.

4.7.6.4 Skupna površina limfatičnega tkiva teščega črevesa

Površina limfatičnega tkiva teščega črevesa je bila za skupino E primerljiva s kontrolno skupino A (4,2 mm^2 pri skupini E in 3,84 mm^2 pri skupini A). Rahlo povečanje površine limfatičnega tkiva glede na kontrolno skupino smo opazili pri skupini B (4,95 mm^2), dvakratno povečanje pri skupini C (7,87 mm^2) in trikratno povečanje pri skupini D (13,44 mm^2).



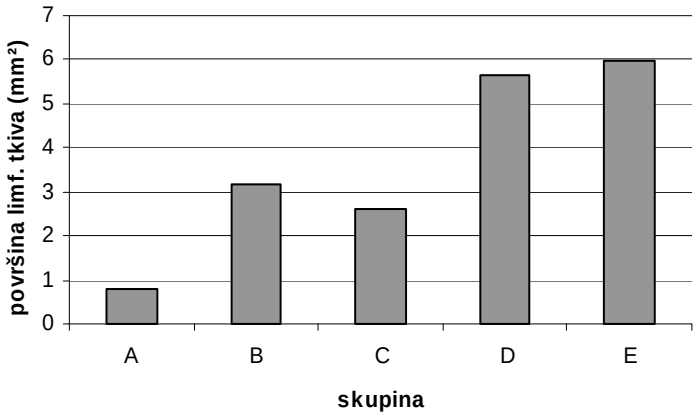
Slika 26: **Skupna površina limfatičnega tkiva v histoloških rezinah teščega črevesa živali v poskusu.**
A, (kontrolna skupina), B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)), C (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa), D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa) in E (enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa).

Figure 26: **Total area of lymphatic tissue in histological slices of jejunum of animals in trial.**
A (control group), B (14 day application of K7 (Rif^r)), C (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial), D (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 15 of trial) and E (one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial).

4.7.6.5 Skupna površina limfatičnega tkiva vitega črevesa

Površina limfatičnega tkiva vitega črevesa je bila v primerjavi s kontrolno skupino A (0,8 mm^2) pri poskusnih živalih skupine B štirikrat povečana (3,2 mm^2), pri skupini C trikrat povečana (2,6 mm^2), pri skupini D sedemkrat povečana (5,6 mm^2) in pri skupini E skoraj osemkrat povečana (6,0 mm^2).

Opazili smo tudi, da je bila površina limfatičnega tkiva teščega črevesa (od 3,84 do 13,44 mm^2) večja od površine limfatičnega tkiva vitega črevesa (od 0,8 do 6,0 mm^2).

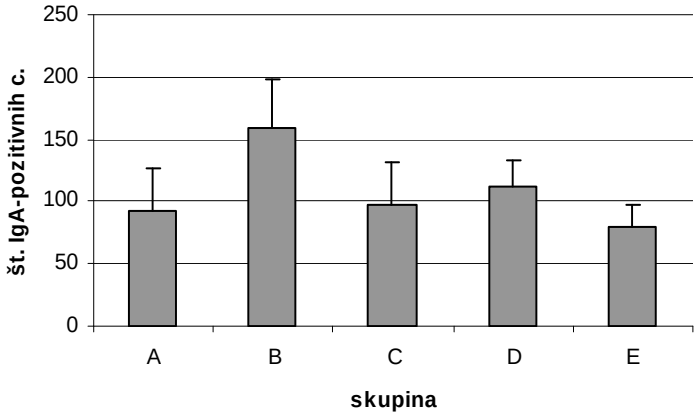


Slika 27: **Skupna površina limfatičnega tkiva v histoloških rezinah vitega črevesa živali v poskusu.**
A, (kontrolna skupina), B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)), C (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa), D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa) in E (enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa).

Figure 27: **Total area of lymphatic tissue in histological slices of ileum of animals in trial.**
A (control group), B (14 day application of K7 (Rif^r)), C (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial), D (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 15 of trial) and E (one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial).

4.7.7 Imunohistološke analize

V histoloških rezinah vitega črevesa smo ugotavljali prisotnost protiteles IgA, IgG in IgM s specifičnimi s FITC konjugiranimi proti-mišjimi protitelesi. Iz vsake skupine miši (A, B, C, D in E) smo vzorčili pet vitih čreves in pripravili štiri histološke rezine posameznega vzorca vitega črevesa za vrednotenje števila protiteles enega razreda. Za vrednotenje prisotnosti posameznega razreda protiteles smo v vsakem od dvajsetih preparatov, ki smo jih pripravili iz ileumov živali ene skupine, prešteli število pozitivnih celic v celotni histološki rezini in rezultate primerjali med skupinami.



Slika 28: **Število IgA-pozitivnih celic v histoloških rezinah živali v poskusu.**
A (kontrolna skupina), B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)), C (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa), D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa) in E (enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa).

Figure 28: **Number of IgA positive cells in histological slices of animals in trial.**
A (control group), B (14 day application of K7 (Rif^r)), C (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial), D (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 15 of trial) and E (one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial).

Slika 28 prikazuje število IgA-pozitivnih celic, ki smo jih prešteli v histoloških rezinah vitega črevesa. Največje število IgA-pozitivnih celic smo prešteli pri skupini B (159,5), ki je bilo statistično značilno višje (p=0,05) kot pri kontrolni skupini A (93). Pri skupini C smo prešteli 97,4 IgA-pozitivnih celic, pri skupini D 112 in najmanj IgA-pozitivnih celic pri skupini E (78,8). Pozitivne IgA celice so bile prisotne v vseh preiskovanih rezinah.

Število pozitivnih IgA celic ponazarja povprečje preštetih IgA-pozitivnih celic, štirih histoloških rezin vitega črevesa, petih miši iste skupine.

Preglednica 14: **Število IgM-pozitivnih celic v histoloških rezinah živali v poskusu.**
Skupina A (kontrolna skupina), B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)), C (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija E. coli O157:H7 8. dan poskusa, D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa in E (enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa.

Table 14: **Number of IgM positive cells in histological slices of animals in trial.**
Group A (control group), B (14 day application of K7 (Rif^r)), C (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial), D (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 15 of trial) and E (one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial).

A	B	C	D	E
2	2	21	28	2
5		16	2	4
		20	2	1
		12	3	4
		22	6	4
		43	71	12
		29		5
		42		6
				9
				16
				4

Preglednica 14 prikazuje število IgM-pozitivnih celic, ki smo jih prešteli v histoloških rezinah vitega črevesa. Največje število IgM-pozitivnih celic smo prešteli pri skupini C (povprečno 25,6) in sicer smo pozitivne celice opazili v 8 izmed 20 preiskovanih rezin. Pri skupini C je bilo število pozitivnih IgM celic statistično značilno večje (p=0,03) kot pri kontrolni skupini A (3,5 pozitivnih celic), kjer smo opazili pozitivne celice le v dveh izmed 20 preiskovanih rezin. Pri skupini B smo prešteli le 2 IgM-pozitivni celici v eni izmed 20 preiskovanih rezin. Pri skupini D smo opazili povprečno 18,7 IgM-pozitivnih celic in sicer v 6 izmed 20 preiskovanih rezin, pri tem je zanimiv podatek, da smo v eni izmed rezin

prešteli kar 71 IgM-pozitivnih celic. Pri skupini E smo prešteli povprečno 6,1 IgM-pozitivnih celic, ki so bile prisotne v 11 rezinah od 20 preiskovanih. Število pozitivnih IgM celic ponazarja povprečje preštetih IgM-pozitivnih celic štirih histoloških rezin vitega črevesa, petih miši iste skupine. Število pozitivnih celic IgM je bilo pri vseh skupinah živali v poskusu (A, B, C, D, E) statistično značilno manjše kot število pozitivnih celic IgA. V histoloških rezinah, ki smo jih inkubirali z za γ specifičnimi s FITC konjugiranimi proti-mišjimi IgG protitelesi, nismo opazili pozitivnih celic. Slikovna predstavitev je v prilogi D.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Mlečnokislinske bakterije so sposobne pozitivno vplivati na zdravje človeka, kar dokazuje dejstvo, da veliko število prehranskih proizvodov prisotnih na svetovnih trgih, vsebuje MKB s probiotičnim delovanjem. Večina probiotičnih sevov, ki se danes uporabljajo v prehrani sodi v rodova *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*. Tako je probiotični pripravek VSL #3, ki vsebuje 9 x 10^{10} KE/g živih liofiliziranih bifidobakterij (*Bifidobacterium longum*, *B. infantis* in *B. breve*), 8 x 10^{10} laktobacilov (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* in *L. plantarum*) in 20 x 10^{10} *Streptococcus thermophilus*, kot del vzdrževalne terapije pokazal dobre rezultate pri zdravljenju bolnikov z ulcerativnim kolitisom in pri preprečevanju ponovnega pojava Crohnove bolezni po operativnem posegu. Pozitivni učinki tega probiotičnega pripravka *in vivo* so najverjetneje rezultat kombinacije sposobnosti vezanja določenih laktobacilov na površino sluznice in inhibicije vezave patogenih bakterij, izločanja snovi, ki izboljšajo epitelijsko bariero in imunomodulatornega vpliva na celice imunskega sistema (Madsen in sod., 2001). *L. plantarum* 299v (ProViva®) je v dvojno slepih, kontroliranih randomiziranih študijah zavrl ponovitev enterokolitisa, ki ga povzroča *Cl. difficile*, in ublažil simptome sindroma razdražljivih prebavil (Niedzielin in sod., 2001; Wullt in sod., 2003). Za *B. lactis* BB12 so dokazali, da zmanjšuje pojav akutnih drisk pri otrocih in blaži simptome alergijskih reakcij na mleko in atopičnega dermatitisa pri otrocih (Chouraqui in sod., 2004; Majamaa in Isolauri, 1997). *L. rhamnosus* GG (Actifit®, Gefilus®, LGG®, Onaka He GG! ®, Vifit®...) je do danes najbolj raziskana probiotična bakterija, s številnimi dokazanimi učinki, med drugim na zmanjšanje pojavnosti akutne driske pri otrocih (Szajewska in sod., 2001), blaženje simptomov alergijskih reakcij na mleko in atopičnega dermatitisa pri otrocih (Charlesworth, 2003; Rosenfeldt in sod., 2004), zmanjšanje tveganja vnetij dihal (Gluck in Gebbers, 2003), zmanjšanje zobnega kariesa (Nase in sod., 2001) in lajšanje simptomov revmatoidnega artritisa (Hatakka in sod., 2003). Številni pozitivni učinki za zdravje človeka so bili dokazani tudi za probiotične bakterije *L. johnsonii* La1 (LC1®), *L. casei* DN114001 (Actimel®) in *L. casei* Shirota (Yakult®) (Saxelin in sod., 2005).

Številni rezultati drugih raziskovalcev, pridobljeni v raziskavah *in vitro* in *in vivo*, ki dokazujejo pozitivne učinke probiotičnih bakterij na gostitelja, so nas vzpodbudili k ugotavljanju morebitnih probiotičnih učinkov lastnih izolatov človeškega in živalskega izvora.

5.1.1 Preživetje izbranih sevov laktobacilov v simuliranem želodčnem in črevesnem soku

Ker številne študije kažejo na to, da je predpogoj za celovito probiotično delovanje (zaviralno delovanje proti patogenim bakterijam, predvsem preko sproščanja protimikrobnih snovi ter pripenjanja na črevesno sluznico in vpliv na prirojeni in pridobljeni imunski odziv gostitelja) potrebna prisotnost živih mikroorganizmov, smo preverili sposobnost preživetja izbranih laktobacilov v simuliranih pogojih prebavil. Vsi testirani sevi laktobacilov (K7, *L. crispatus/amylovorus* 4/26 in 2/25 in *L. reuteri* 12/26 in 14/26) so preživeli v simuliranih pogojih prebavil, pri čemer so bili tri ure izpostavljeni simuliranemu želodčnemu soku in zatem prenešeni v simuliran črevesni sok, v katerem smo jih inkubirali naslednje tri ure (Slika 5, 6, 7, 8 in 9). Opazili pa smo, da je izpostavljenost nizki vrednosti pH (simuliran želodčni sok z vrednostjo pH=2) vplivala na slabše preživetje v simuliranem črevesnem soku (prisotnost žolčnih soli) (Slika 5, 6, 7, 8 in 9). Le sev *L. reuteri* 12/26 se je izkazal za odpornega tako proti nizkim vrednostim pH, kakor tudi proti nadaljnji izpostavitvi žolčnim solem simuliranega črevesnega soka (Slika 8). Metodo za testiranje preživetja izbranih laktobacilov v želodčnem in črevesnem soku smo povzeli po Fernandez in sod. (2003), katerih rezultati testiranja probiotičnih sevov *L. acidophilus* UO 001 in *L. gasseri* UO 002 so primerljivi z našimi. Zanimiva pa je njihova ugotovitev, da je dodatek posnetega mleka (pH=2,5) pozitivno vplival na sposobnost preživetja testiranih sevov ob izpostavitvi črevesnemu soku in žolčnim solem. Mishra in Prasad (2005) sta sedem različnih sevov vrste *L. casei* ločeno izpostavila raztopinam z različnimi vrednostmi pH (pH=1, pH=2 in pH=3) in 1- in 2-odstotni raztopini žolčnih soli. Noben izmed sevov ni preživel v raztopini z vrednostjo pH 1, v raztopini z vrednostjo pH 2 sta enourno izpostavitev preživela dva seva, vsi sevi razen enega pa so preživeli triurno izpostavitev vrednosti pH=3. Testirani sevi so se razlikovali po sposobnosti preživetja v 1- in 2-odstotni raztopini žolčnih soli v različnih časovnih obdobjih. Naši rezultati in rezultati

drugih raziskovalcev (Conway in sod., 1987; Fernández in sod., 2003; Goldin in sod., 1992; Jacobsen in sod., 1999; Mishra in Prasad, 2005; Zárate in sod., 2002) kažejo na to, da je sposobnost preživetja v okolju z nizko vrednostjo pH in prisotnostjo prebavnih encimov in žolčnih soli specifična za posamezen sev in je torej selekcijski dejavnik, ki ga je potrebno pri iskanju novih kandidatov za probiotike preveriti.

Rezultati predhodnih poskusov *in vivo* na prašičkih so potrdili, da je sev človeškega izvora K7 sposoben preživetja in začasne kolonizacije črevesja prašičkov. Po 14-dnevni aplikaciji 5 x 10^{10} KE/dan je bilo v blatu prašičkov ugotovljenih 2.5 x 10^5 do 3.3 x 10^5 KE K7 v gramu blata, pri dveh živalih pa je bil preiskovani sev v blatu prisoten še šest dni po končani aplikaciji. Pri dveh živalih, ki sta bili žrtvovani po petih dneh aplikacije K7 je bil preiskovani sev ugotovljen na sluznici dvanajstnika (140 KE/10 cm^2), teščega črevesa (170 KE/10 cm^2) in vitega črevesa (1600 KE/10 cm^2) (Bogovič Matijašić in sod., 2006b; Bogovič Matijašić in sod., 2004). Sposobnost preživetja K7 in začasne kolonizacije prebavil smo tudi v okviru te doktorske disertacije potrdili s poskusom *in vivo* na miših. Testirani sevi laktobacilov prašičjega izvora so pokazali sposobnost preživetja v simuliranih pogojih prebavil *in vitro*, pred njihovo uporabo v probiotičnih pripravkih pa bi bila potrebna še dodatna testiranja v poskusih *in vivo*.

5.1.2 Varnost probiotikov

5.1.2.1 Sposobnost razgradnje sluzi

Probiotične bakterije morajo zadostiti tudi varnostnim zahtevam Organizacije Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo in Svetovne zdravstvene organizacije, ki določajo, da probiotični proizvod ne sme vsebovati sevov, ki lahko razgradijo sluz ali so odporni proti antibiotikom v večji meri, kot je to značilno za posamezne vrste. Sposobnost razgradnje sluzi smo preskušali pri vseh prašičjih izolatih laktobacilov (poglavje 3.2.2) ter človeških izolatih LGG in K7. Prašičji izolati laktobacilov in človeška izolata (LGG in K7) niso razgradili sluzi tudi v primeru, ko gojišču ni bila dodana glukoza in bi zaradi pomanjkanja hranilnih snovi lahko kot vir hranilnih snovi uporabili glikoproteine in oligosaharide črevesne sluzi (Hacin in sod., 2008). Ne glede na prisotnost glukoze v gojišču pa smo

razgradnjo sluzi (slika 10) opazili pri sevih *S. aureus* RN 4220 in toksigeni *E. coli* O8:K88:H9Ent^{+}, ne pa tudi pri netoksigeni mutanti *E. coli* O8:K88:H9Ent^{-}, kar nakazuje na povezavo med patogenostjo in sposobnostjo razgradnje sluzi. Patogenim mikroorganizmom sposobnost razgradnje sluzi in drugi mehanizmi (npr. sekrecijski sistem tip III pri *S. typhimurium* in patogeni *E. coli*) omogočijo vstop v črevesne celice, kar povzroči patološke spremembe v črevesju gostitelja, medtem ko komenzalna in probiotična mikroflora ostane ujeta v mukoznem sloju in v majhni meri vstopa oziroma prehaja skozi črevesni epitel, v glavnem s pomočjo dendritskih in specializiranih črevesnih celic M. Sposobnost razgradnje sluzi, ki je eden od pokazateljev varnosti probiotikov, so predtem ugotavljali pri različnih sevih, med katerimi so *L. casei* GG, *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *L. rhamnosus* (HN001), *L. acidophilus* (HN017), *B. lactis* (HN019), *L. delbrueckii ssp. lactis* (UO 004) še preden so se lotili ugotavljanja njihovih pozitivnih učinkov *in vivo* na ljudeh (Fernández in sod., 2005; Ruseler-van Embden in sod., 1995; Zhou in sod., 2001). Številni poskusi *in vitro*, kot tudi *in vivo* na podganah so dokazali, da predstavniki vrst, ki nastopajo kot probiotiki, ne razgrajujejo črevesne sluzi (Snydman, 2008).

5.1.2.2 Občutljivost za antibiotike

Za bakterije rodu *Lactobacillus* še ni standardov za izvedbo in interpretacijo testov za občutljivost/rezistenco, zato smo si pri izbiri gojišča in interpretaciji pomagali s podatki iz literature. Na gojišču Mueller-Hinton, ki je konvencionalno gojišče za testiranje odpornosti proti antibiotikom, sev K7, kakor tudi večina ostalih laktobacilov, ne raste. Zato smo uporabili mešanico gojišča Mueller-Hinton (90 odstotkov) in gojišča MRS (10 odstotkov), uravnano na vrednost pH=6,8 (Klare in sod., 2005). Tako gojišče omogoča rast laktobacilov, sestavine MRS pa v uporabljenih koncentracijah ne vplivajo negativno na aktivnost antibiotikov. V večini objavljenih raziskav (Danielsen in Wind, 2003; Delgado in sod., 2005; Kheadr in sod., 2004; Mättö in sod., 2007; Zhou in sod., 2005), so za testiranje laktobacilov in bifidobakterij uporabili kar MRS z dodatkom cisteina, ker omogoča dobro rast teh organizmov, ki na gojiščih, običajnih za testiranje odpornosti proti antibiotikom (Mueller-Hinton agar, Iso-sensotest agar) ne rastejo. Obstajajo pa utemeljeni pomisleki v zvezi z uporabo MRS za testiranje občutljivosti za antibiotike, saj lahko pride do interakcij med sestavinami gojišča in antibiotiki. Na zmanjšanje aktivnosti nekaterih antibiotikov

lahko vpliva tudi vrednost pH, ki je v tem gojišču že na začetku nizka (pH=5,4) ter se med rastjo mlečnokislinskih bakterij še dodatno zniža. Preizkusili so nekaj alternativnih gojišč, kjer je začetna vrednost pH 6,8 in kjer je delež MRS samo tolikšen, da omogoča rast, ne vpliva pa na antibiotike. Takšnega (90 odstotkovMH in 10 odstotkov MRS) smo uporabili tudi v naši raziskavi (Hacin in sod., 2008). Ugotovljene vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracij (MIC) desetih antibiotikov za K7 smo primerjali z mejnimi vrednostmi MIC, ki smo jih povzeli po Danielsen in Wind (2003) ter po FEEDAP Panel Report (2005). Če upoštevamo mejne MIC po Danielsen in Wind (2003), K7 ni odporen proti nobenemu preskušanemu antibiotiku, le ugotovljene vrednosti MIC kloramfenikola in tetraciklina so bile na zgornji meji območja občutljivosti. Če pa upoštevamo kriterije, ki so jih postavili na podlagi FEEDAP Panel Report (2005), je bila ugotovljena MIC za gentamicin na zgornji meji območja občutljivosti, MIC kloramfenikola in streptomicina pa nekoliko nad mejo, kar pomeni zmerno rezistenco seva K7 proti tema dvema antibiotikoma (preglednica 4). Izsledki, ki so jih objavili Mättö in sod. (2007), so rezultat obsežne evropske raziskave 6. okvirnega programa EU, ACE-ART, v katero so bili vključeni laboratoriji iz več evropskih držav, in od katere si obetajo validirane testne metode za ugotavljanje občutljivosti za antibiotike pri mlečnokislinskih bakterijah, ter smernice za standarde ISO in nacionalne zakonodaje. Možnost prenosa genov za odpornost proti antibiotikom med probiotičnimi in patogenimi bakterijami je majhna, vendar kljub temu vredna pozornosti. MKB lahko namreč vsebujejo plazmide z geni za odpornost proti tetraciklinu, eritromicinu, kloramfenikolu in makrolid-linkozamid-streptograminu. Plazmidi z geni za odpornost proti antibiotikom so bili najdeni pri *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* in *L. plantarum*, ki so bili izolirani iz surovega mesa, silaže in blata živali. Odpornost proti streptomicinu, tetraciklinu in kloramfenikolu je bila dokazana pri *L. lactis*, izoliranem iz surovega mleka in mehkega sira. Odpornost proti tetraciklinu je bila ugotovljena pri *L. plantarum* 5057. Genov za odpornost proti vankomicinu pri laktobacilih niso našli (Snydman, 2008). Laktobacili so načeloma občutljivi za penicilinske antibiotike (piperacilin, ampicilin) in inhibitorje ß-laktamaz, odporni pa proti oksacilinu in cefalosporinom (cefoksitin in ceftriakson) (Coppola in sod., 2005; Danielsen in Wind, 2003). Nepropustnost celične stene je glavni vzrok za odpornost, saj sevi tega rodu nimajo s citokromi posredovanega elektronskega transporta. Večina sevov laktobacilov kaže visoko stopnjo odpornosti proti glikopeptidnim antibiotikom (vankomicin, teikoplanin),

občutljivost za bacitracin pa močno variira med sevi (Coppola in sod., 2005; Katla in sod., 2001). Večinoma so občutljivi za antibiotike, ki inhibirajo sintezo celične stene, kot so kloramfenikol, eritromicin, klindamicin in tetraciklin in odporni proti aminoglikozidnim antibiotikom (neomicin, kanamicin, streptomicin in gentamicin) (Zhou in sod., 2005). Odporni so tudi proti večini inhibitorjev sinteze nukleinskih kislin (enoksacin, pefloksacin, norfloksacin, nalidiksinska kislina, sulfonamidi, trimetoprim in metronidazol). Večinoma je odpornost laktobacilov proti antibiotikom intrizična (nespecifična, neprenosljiva), vendar je zaradi vse večje uporabe teh bakterij v prehrani potreben strog nadzor in reden monitoring občutljivosti za antibiotike, ki je specifična za posamezen sev (Ammor in sod., 2007).

5.1.3 Protibakterijsko delovanje

Probiotične bakterije so sposobne proizvajati različne metabolite in druge substance, ki preprečujejo rast in razmnoževanje patogenih mikroorganizmov. Pomembno vlogo imajo organske kisline, predvsem mlečna in ocetna, kot tudi druge snovi, ki se sicer tvorijo v manjših količinah, kot so bakteriocini, antibiotiki in še nepoznane zaviralne snovi. Dokazano je, da sta človeška izolata K7 in LF sposobna tvoriti bakteriocine. Acidocin LF221 A in acidocin LF221 B, ki ju proizvaja LF, sta predstavnika dvo-komponentnih bakteriocinov razreda II. Bakteriocini, ki jih proizvaja K7, pa se po sestavi strukturnih genov (gassericin K7 A - Genbank EF392861; gassericin K7 B - Genbank AY307382) ne razlikujejo od acidocinov LF221 A in B. Dokazano je tudi, da sev K7, tudi zaradi tvorbe bakteriocinov, inhibira rast vegetativnih celic in spor *Cl. tyrobutyricum in vitro* v siru in tako zaviralno vpliva na pozno napihovanje, hkrati pa ne vpliva na viabilnost starterske kulture (Bogovič Matijašić, 1997; Bogovič Matijašić in sod., 2007; Bogovič Matijašić in Rogelj, 1998; Bogovič Matijašić in sod., 1998; Čanžek Majhenič in sod., 2003). Protibakterijsko delovanje probiotičnih sevov je pomembno z vidika dobrih tehnoloških lastnosti, kot tudi z vidika preživetja seva v prebavilih gostitelja, kolonizacije in sposobnosti tekmovanja s patogenimi mikroorganizmi, zato smo to lastnost preverili tudi pri živalskih izolatih.

Z metodo difuzije v agarju smo potrdili protimikrobno aktivnost supernatantov kultur človeških izolatov K7 in LF, ter prašičjega izolata *L. crispatus/amylovorus* 4/26, proti indikatorskim sevom *E. coli* K12, *E. coli* O157:H7, *E. coli* O8:K88:H9Ent^{+}, *E. coli* O8:K88:H9Ent^{-} in *S. aureus* RN 4220 (preglednica 3, priloga A). Na ploščah, kjer smo namesto supernatantov MKB nanesli gojišče MRS z dodano mlečno kislino, (vrednost pH 3,8, 4,0, 4,2, 4,4, 4,6 in 4,8) ni bilo con inhibicije rasti, zato sklepamo, da za inhibicijo rasti indikatorskih sevov ni bila odgovorna mlečna kislina, ampak druge zaviralne snovi, ki so jih v gojišče izločale MKB.

Edini prašičji izolat, pri katerem smo z metodo lise na agarju opazili protibakterijsko aktivnost proti vsem indikatorskim sevom, je bil *L. reuteri* 2/26. Prašičji izolati niso pokazali protibakterijske aktivnosti proti sevu *L. sakei*, z izjemo *L. reuteri* 2/26, pri katerem je bila cona inhibicije rasti *L. sakei* enaka kot pri humanem izolatu K7. Prašičja izolata *L. reuteri* 10/26 in 12/26 nista delovala protimikrobno proti nobenemu izmed indikatorskih sevov. Osem od dvanajstih prašičjih izolatov (*L. reuteri* 2/26, 14/26, 2/18, *L. crispatus/amylovorus* 4/26 in 2/25 in *L. vaginalis/reuteri* 13/26, 11/26 in 6/17) je delovalo protimikrobno proti indikatorskem sevu *E. coli* O8:K88:H9Ent^{+}, ki je prav tako prašičjega izvora. Osem od dvanajstih prašičjih izolatov (*L. reuteri* 9/26, 2/26, 14/26, 2/18, *L. crispatus/amylovorus* 4/26 in 2/25 ter *L. vaginalis/reuteri* 11/26 in 6/17) je pokazalo protimikrobno aktivnost proti indikatorskemu sevu *S. aureus* RN 4220 (preglednica 2). Rezultati kažejo, da je protibakterijska aktivnost pri posameznih sevih različna in ni odvisna od izvora samega seva, saj so nekateri sevi prašičjega izvora (*L. reuteri* 2/26 in 14/26, *L. crispatus/amylovorus* 4/26 in 2/25, *L. vaginalis/reuteri* 11/26 in 6/17) izkazali protibakterijsko aktivnost proti indikatorskim sevom tako prašičjega kot tudi človeškega izvora. Rezultati ugotavljanja protibakterijske aktivnosti z dvema metodama so se pri posameznih sevih razlikovali. Tako so z metodo z liso na agarju protibakterijsko aktivnost proti *E. coli* O8:K88:H9Ent^{+} in *S. aureus* RN 4220 izkazali prašičji izolati *L. reuteri* 2/26, 14/26, 2/18, *L. crispatus/amylovorus* 4/26 in 2/25 in *L. vaginalis/reuteri* 11/26 in 6/17, medtem ko je pri metodi difuzije v agarju protibakterijsko aktivnost proti istima indikatorskima sevoma izkazal le *L. crispatus/amylovorus* 4/26. Morda je za protibakterijsko delovanje potreben živ organizem, saj smo pri metodi lise na agarju na gojišče nanesli živo kulturo in opazovali protibakterijsko aktivnost po 24-urni inkubaciji,

pri metodi difuzije v agarju pa smo na gojišče nanesli supernatante in ne živih celic, ki smo jih predhodno odstranili. Druga razlaga pa je, da so koncentracije protimikrobnih snovi v supernatantih pod mejo detekcije, pri čemer je mogoče, da se je protibakterijska aktivnost zmanjšala tudi med pripravo supernatantov (zamrzovanje, liofilizacija). Metoda ugotavljanja protibakterijske aktivnosti z difuzijo v agarju in z liso na agarju sta primerna presejalna testa *in vitro*, kadar želimo testirati večje število bakterijskih sevov.

5.1.4 Adhezija (sposobnost pripenjanja mikroorganizmov)

5.1.4.1 Hidrofobnost

V procesu vezave mikroorganizmov na črevesne epitelne celice sodeluje veliko dejavnikov in mehanizmov, med katerimi so tudi hidrofobne lastnosti celične površine, ki jih posedujejo nekateri mikroorganizmi, medtem ko je celična površina drugih mikroorganizmov hidrofilne narave. Merjenje hidrofobnosti, kot sposobnosti vezave mikroorganizma na ogljikovodike (najpogosteje heksadekan), je pogosta metoda *in vitro* ugotavljanja sposobnosti mikroorganizma za vezavo na črevesne epitelne celice (Kiely in Olson, 2000; Rosenberg, 1984; Vinderola in Reinheimer, 2003). V naših poskusih smo najmanjšo hidrofobnost izmerili pri potencialno patogenih sevih *E. coli K12* (5,2%) in *S. aureus* RN 4220 (3,4%), najvišjo pa pri prašičjem izolatu *L. reuteri* 9/26 (96%). Tudi pri prašičjih izolatih *L. reuteri* 14/26, 2/18, 9/17 in 12/26, *L. crispatus/amylovorus* 4/26 in 2/25 in *L. vaginalis/reuteri* 6/17 je bila izmerjena hidrofobnost nad 50%. Vendar pa smo pri nekaterih prašičjih izolatih izmerili tudi majhno hidrofobnost *L. reuteri* 2/26 (9%) in 10/26 (35,5%) ter *L. vaginalis/reuteri* 13/26 (6,2%) in 11/26 (19,2%). Hidrofobnost je bila majhna tudi pri človeških izolatih K7 (32%) in LGG (12,8%), ne pa pri LF (77%) (preglednica 7). Ugotovili smo tudi, da hidrofobnost ni bila v neposredni povezavi z učinkovitostjo vezave preiskovanih sevov na celice Caco-2 in sluz človeškega oziroma živalskega izvora (slika 11). Ta ugotovitev je v nasprotju z rezultati Del Re in sod. (2000), ki so ugotovili povezavo med hidrofobnostjo in sposobnostjo adhezije pri 10 od 13 testiranih sevov. Vendar so njihovi testirani sevi pripadali vrsti *Bifidobacterium*, mi pa smo testirali izolate, ki pripadajo vrsti *Lactobacillus*, kar je možen vzrok za razlike v pridobljenih rezultatih. Mishra in Prasad (2005) sta ugotovila, da sevi *L. casei* posedujejo

hidrofobne lastnosti, ki so v nekaterih primerih povezane s sposobnostjo vezave na epitelij. Vrednosti hidrofobnosti, ki sta jih izmerila pa so bile precej nižje (najvišji delež hidrofobnosti 40%), kot smo jih izmerili v naših poskusih. Perez in sod. (1998) so pri bifidobakterijah, pri katerih je bil izmerjen visok delež hidrofobnosti, ugotovili tudi dobro sposobnost vezave na celice Caco-2, vendar pa so sevi s podobnim deležem hidrofobnosti pokazali različno afiniteto do vezave. Iz naših rezultatov in podatkov iz literature lahko povzamemo, da je delež hidrofobnosti ena izmed lastnosti, v katerih se mikroorganizmi med seboj razlikujejo in je v povezavi z adhezijo, vendar pa hidrofobne lastnosti ne zagotavljajo dobre vezave na črevesne celice.

5.1.4.2 Adhezija izbranih izolatov človeškega in prašičjega izvora na sluz človeškega in prašičjega izvora ter celično linijo Caco-2

Ocena adhezije na epitelne celice črevesja in posledična sposobnost kolonizacije prebavil je pomemben dejavnik pri selekciji probiotičnih sevov. Večina probiotičnih sevov je sposobna preživeti prehod skozi prebavila in v pogojih *in vitro* izkazati sposobnost adhezije, vendar pa v pogojih *in vivo* ne naseli črevesja gostitelja. Od probiotičnih sevov, ki so trenutno prisotni na trgu, je LGG eden redkih, ki ostane prisoten v prebavilih še nekaj časa po končani aplikaciji (Dunne in sod., 2001).

Za proučevanje adhezijskih sposobnosti izbranih izolatov smo uporabili model črevesnih celic Caco-2, ki so pridobljene iz tumorja debelega črevesa človeka, vendar v pogojih *in vitro* spontano diferencirajo v absorpcijskim enterocitom podobne celice in izražajo lastnosti epitelnih celic tankega črevesa (Fogh in sod., 1977; Pinto in sod., 1983). Celice Caco-2 so pogosto uporabljen model za proučevanje adhezije, vendar pa niso sposobne izločati mucinov in tako niso pokrite z mukoznim slojem, značilnim za enterocite, ki se *in vivo* nahajajo v črevesju. Da bi preverili še ta vidik, smo v testih adhezije uporabili tudi črevesno sluz človeškega in živalskega izvora, ki smo jo pridobili iz zdravih delov črevesja ljudi in prašičev (opisano v poglavju 3.7.4). Teste adhezije na sluz smo izvedli s pomočjo radioaktivnega označevanja preiskovanih bakterij in odčitavanja deleža vezanih bakterij z merjenjem radioaktivnosti s tekočinsko scintilometrijo, saj so Vesterlund in sod. (2005) ugotovili, da je ta metoda v primerjavi s fluorescentnim označevanjem preiskovanih

bakterij, štetjem na ploščah, barvanjem DAPI in barvanjem bakterij z barvilom kristal vijolično, najprimernejša. Pri testih adhezije na celice Caco-2 smo pripete mikroorganizme vrednotili s pomočjo štetja na ploščah z uporabo selektivnega gojišča (Bogovič Matijašić in sod., 2003; Bogovič Matijašić in sod., 2006a; Fajdiga in sod., 2006). Obetavna metoda za vrednotenje bakterij, ki se vežejo na celice Caco-2 pa je tudi PCR v realnem času (Candela in sod., 2008). Sposobnost adhezije izolatov človeškega in prašičjega izvora na sluz človeškega in prašičjega izvora ter na celice Caco-2, smo izmerili kot delež vezanih bakterij. Pri 7 izmed 14 izolatov laktobacilov smo opazili trend vezave in sicer, da so se prašičji izolati *L. reuteri* 2/26, 9/26, 12/26 in 14/26 in *L. crispatus/amylovorus* 4/26 ter človeška izolata LF in LGG najbolje vezali na sluz človeškega izvora, slabše na sluz prašičjega izvora in najslabše na celice Caco-2 (slika 11). Odstotek adhezije izolatov prašičjega in človeškega izvora je bil nižji v poskusih *in vitro* na celični liniji Caco-2, v primerjavi s poskusi na sluzi človeškega in prašičjega izvora. Najboljšo sposobnost vezave na sluz človeškega in prašičjega izvora smo ugotovili pri prašičjem izolatu *L. reuteri* 2/26 (49,4 in 27,4 odstotkov), ki je bil tudi edini prašičji izolat, pri katerem smo z metodo lise na agarju opazili protibakterijsko aktivnost proti vsem indikatorskim sevom. Najslabše sta se na sluz človeškega in prašičjega izvora vezala prašičji izolat *L. vaginalis/reuteri* 13/26 (0,5 in 0,3 odstotka) in človeški izolat K7 (0,4 in 0,3 odstotka). Zanimiv podatek je, da sta se človeški izolat LF in njegova mutanta, ki ne proizvaja bakteriocinov, LF bac$^-$, na sluz človeškega izvora vezala z enako afiniteto (4,6 in 4,8 odstotka) na sluz prašičjega izvora pa se je LF bac$^-$ vezal z veliko večjo afiniteto (12,6 odstotka) kot LF (2,2 odstotka) (slika 11). Ugotovili smo, da so vsi preiskovani sevi sposobni adhezije na črevesno sluz človeškega in živalskega izvora ter na celice Caco-2, vendar pa so med posameznimi sevi velike razlike v deležu vezanih celic. Razlike v sposobnosti adhezije petih sevov laktobacilov (*L. brevis* PEL1, *L. reuteri* ING1, *L. rhamnosus* E-800, *L. rhamnosus* LC-705 in LGG) na sluz človeškega izvora so opisali tudi Ouwehand in sod. (2001). Ugotovili so tudi, da prisotnost pepsina vpliva na zmanjšanje sposobnosti vezave, prav tako pa je prisotnost mleka z različno vsebnostjo maščobe vplivala na zmanjšano sposobnost adhezije preiskovanih laktobacilov. To pomeni, da četudi mikroorganizmi preživijo prehod skozi prebavila in jih prisotnost mleka v tem primeru ščiti, lahko vsebina prebavil in prisotnost mleka vplivata na njihove adhezivne sposobnosti. Rezultati, ki so jih pridobili glede adhezije seva LGG na sluz človeškega izvora (35%) se razlikujejo od naših (14,4%). Očitno je, da so zaradi

pomanjkanja standardizirane metode za vrednotenje adhezije, rezultati adhezije istih sevov v različnih laboratorijih različni in pogosto se za vrednotenje adhezije uporabljajo različne metode (Blum in sod., 1999).

5.1.4.3 Adhezija izbranih izolatov na sluz iz različnih delov prašičjega črevesja

Zanimalo nas je ali se bodo izbrani izolati človeškega in prašičjega izvora z različno afiniteto vezali na sluz iz različnih anatomskih delov prašičjega črevesja, saj je iz literature znano, da je največja prisotnost laktobacilov v predelu teščega črevesa, v predelu debelega črevesa (navzgornji, prečni in navzdoljni kolon) pa naj bi bili glavni predstavniki probiotičnih bakterij bifidobakterije (McCracken in Lorenz, 2001). V ta namen smo izolirali sluz dvanajstnika, teščega črevesa, vitega črevesa, navzgornjega, prečnega in navzdoljnega kolona. Ugotovili smo, da so se testirani izolati tako človeškega kot tudi prašičjega izvora (K7, LGG, *L. reuteri* 2/26 in 2/18 ter *E. coli* K12) z enako afiniteto vezali na sluz iz različnih delov prašičjega črevesja. Razlike v sposobnosti vezave pa so bile med posameznimi izolati *L. reuteri* 2/26 (25%), *L. reuteri* 2/18 (24,5%), LGG (14,4%), *E. coli* K12 (2,8%) in K7 (0,8%) (slika 12). Rezultati adhezije na sluz iz različnih delov prašičjega črevesa so bili v skladu z rezultati, kjer smo testirali vezavo vseh proučevanih sevov na sluz prašičjega izvora. Zakaj v vezavi na sluz iz anatomsko različnih delov črevesja ni bilo večjih razlik ne vemo. Možna razlaga je, da je v tankem, kot tudi v debelem črevesu, črevesna sluz sestavljena pretežno iz mucinov MUC2 in MUC3 in ima zato verjetno enake receptorje, v razmeroma enaki koncentraciji kar pogojuje podobne pogoje za vezavo mikroorganizmov (Ouwehand in sod., 2001). Podoben poskus so izvedli Ouwehand in sod. (2002b), ki so za teste adhezije izolirali resecirano tkivo slepega črevesa, navzdoljnega, prečnega in navzgornjega kolona. Hkrati so izolirali tudi samo črevesno sluz iz teh delov črevesa in primerjali adhezijo izbranih probiotičnih bakterij (LGG, *L. casei* Shirota, *L. johnsonii* La1, *L. bulgaricus* in *B. lactis* BB12) na črevesno sluz in resecirano tkivo črevesa. Ugotovili so, da so se *L. bulgaricus, L. johnsonii* La1 in *B. lactis* BB 12 statistično značilno slabše vezali na resecirano tkivo navzgornjega kolona v primerjavi z adhezijo na ostale dele kolona. V vezavi probiotičnih sevov na sluz iz različnih delov črevesja pa niso opazili statistično značilnih razlik, kar je v skladu z našimi rezultati. Preiskovani sevi so se slabše vezali na resecirano tkivo črevesa kot na izolirano črevesno sluz, kar lahko

pripisujemo vplivu rezidentne mikroflore na reseciranih delih črevesa, ki v sami sluzi ni prisotna. Na reseciranem tkivu so lahko prisotni tudi delci hrane in encimi, ki prav tako vplivajo na adhezijo. Naši rezultati in podatki iz literature podpirajo dejstvo, da je vezava bakterij na epitelijske celice črevesja kompleksen proces, ki je odvisen od številnih dejavnikov in bi ga bilo za pridobitev bolj realnih podatkov potrebno proučevati tudi v poskusih *in vivo*.

5.1.4.4 Vpliv izbranih laktobacilov na adhezijo *S. aureus* in *E. coli* na sluz človeškega in prašičjega izvora

Znano je, da laktobacili različno vplivajo na adhezijo patogenih mikroorganizmov, bodisi s tekmovanjem za vezivna mesta, ali z izločanjem protimikrobnih snovi (Gopal in sod., 2001; Lee in sod., 2000; Lee in Puong, 2002; Lehto in Salminen, 1997; Tuomola in sod., 1999a). Zato nas je zanimalo ali so izbrani sevi laktobacilov človeškega (LGG, LF, in K7) in prašičjega (*L. reut*eri 2/26, 9/26, 14/26, 12/26, 2/18 in *L. crispatus/amylovorus* 2/25 in 4/26) izvora sposobni tekmovati z izbranim patogenimi mikroorganizmi (*S. aureus, E. coli*) pri vezavi na sluz človeškega ali prašičjega izvora. Ker se v pogojih *in vivo* mikroorganizmi ne nahajajo vedno v enakih razmerjih, smo preizkusili vpliv laktobacilov na patogene mikroorganizme kadar so z njimi v enakem razmerju in kadar je patogenih mikroorganizmov približno desetkrat manj. V testih tekmovanja za vezavo na sluz človeškega izvora, kjer so bili *E. coli* in laktobacili dodani v razmerju 1:10, laktobacili niso vplivali na adhezijo *E. coli*, ali pa so jo celo povečali (preglednica 9). Izmed preskušanih laktobacilov je le K7 zmanjšal adhezijo *S. aureus* na sluz človeškega izvora v testih, kjer smo *S. aureus* in laktobacile dodali v razmerju 1:10. Vsi ostali sevi laktobacilov, aplicirani v razmerju 1:10, so adhezijo *S. aureus* na sluz človeškega izvora povečali (preglednica 8). Povečanje adhezije patogenega mikrooganizma (*E. coli* O157) ob sočasni aplikaciji LGG na celice Caco-2 so ugotovili tudi Lee in Puong (2002) in Ouwehand in. sod. (2000). Rezultate so obrazložili tako, da so se celice *E. coli* O157 vezale na celice *L. rhamnosus*, kar je možno, da se je zgodilo tudi v naših poskusih. Tuomola in sod. (1999a) pa so opazili, da LGG poveča adhezijo *S. typhimurium* na glikoproteine, izolirane iz črevesja človeka. V naših testih adhezije je sev LGG povečal adhezijo *S. aureus* na sluz človeškega izvora v primeru, ko je bilo apliciranih laktobacilov 10-krat več in na sluz prašičjega

izvora, ko so bili aplicirani v razmerju 1:1 (preglednica 8 in 10). V testih, kjer je bilo LGG 10-krat več, pa so laktobacili zmanjšali adhezijo S. *aureus* na sluz prašičjega izvora za 22 odstotkov (preglednica 10). Prav tako se je adhezija *E. coli* na sluz prašičjega in človeškega izvora zmanjšala, kadar sta bila mikroorganizma aplicirana v razmerju 1:1, ter ostala nespremenjena, kadar je bilo apliciranih laktobacilov 10-krat več (preglednica 9 in 11). Človeški izolat K7 je zmanjšal vezavo *S. aureus* na sluz človeškega in prašičjega izvora, kadar sta bila mikroorganizma aplicirana v razmerju 1:1, kot tudi v testih, kjer je bilo apliciranih laktobacilov 10-krat več (preglednica 8 in 10). Tudi vezava *E. coli* na sluz prašičjega izvora se je zmanjšala, kadar sta bila mikroorganizma aplicirana v razmerju 1:1, v ostalih testih pa K7 na vezavo *E. coli* ni imel večjega vpliva (preglednica 9 in 11). Izmed prašičjih izolatov je sev *L. crispatus/amylovorus* 4/26 zmanjšal adhezijo *S. aureus* in *E. coli* kadar sta bila mikroorganizma aplicirana na sluz prašičjega in človeškega izvora v razmerju 1:1 in povečal adhezijo *S. aureus* in *E. coli* kadar je bilo apliciranih laktobacilov 10-krat več (preglednica 8, 9, 10 in 11). Iz pridobljenih rezultatov in podatkov iz literature (Collado in sod., 2007; Gueimonde in sod., 2006; Lee in sod., 2003; Vesterlund in sod., 2006) lahko sklepamo, da je vpliv laktobacilov na adhezijo patogenih mikroorganizmov odvisen v prvi vrsti od seva laktobacilov in njegove interakcije s specifičnim patogenim mikroorganizmom, pomembno pa je tudi razmerje med posameznimi mikroorganizmi.

5.1.5 Probiotiki in njihov vpliv na izločanje citokinov

Dokazano je, da so probiotične bakterije sposobne spremeniti humoralni, celični in nespecifični imunski odziv gostitelja, da lahko vplivajo na lokalno izločanje citokinov, kot tudi na lokalni imunski odziv (Smits in sod., 2005). Za ugotavljanje vpliva testnih mikroorganizmov na izločanje citokinov smo uporabili monocitno celično linijo THP-1, ki je bila prvotno pridobljena iz krvi 1-letnega dečka obolelega za akutno monocitno levkemijo. V primerjavi z drugimi človeškimi mieloidnimi celičnimi linijami, kot so HL-60, U937, KG-1 ali HEL, so diferencirane celice THP-1 po obnašanju bolj podobne nativnim makrofagom, ki nastanejo s preobrazbo monocitov in so neprecenljivi model za proučevanje delovanja makrofagov *in vitro* (Auwerx, 1991). Po stimulaciji s PMA se monociti preobrazijo v aktivne makrofage s sposobnostjo pripenjanja na podlago in izločanja citokinov (Tsuchiya in sod., 1980). Diferenciacijo monocitov THP-1 v

makrofage najpogosteje povzročimo z dodatkom PMA v koncentraciji 10-400 ng/mL, vendar lahko (pre)visoka koncentracija PMA v diferenciiranih makrofagih povzroči nezaželjeno izražanje nekaterih genov. To lahko prekrije izražanje tistih genov, ki naj bi se izražali pod vplivom proučevanega dejavnika, oziroma zahteva uporabo nefizioloških koncentracij proučevane snovi. Tretiranje celic THP-1 s PMA v koncentraciji 5 ng/mL je zadostovalo za sprožitev stabilne diferenciacije, brez nezaželjenega izražanja genov, celice pa so se vseeno dobro odzivale na sekundarne, šibke stimuluse (Park in sod., 2007). Park in sod. (2007) pa so tudi ugotovili, da ob dodatku 5 ng/mL PMA po 48-urni inkubaciji ni prišlo do izražanja genov za TNF-α, RANTES, IL-1β, MCP-1, IL-8, MIP-1β, CCR5 CCR2a in CCR2b, medtem ko so pri koncentraciji 25-100 pg/mL zaznali izražanje genov za TNF-α, MIP-1β, IL-8 in IL-1β. Glede na podatke iz literature smo pred našimi poskusi celicam v gojišču RPMI dodali PMA v koncentraciji 10 ng/mL, kar je povzročilo diferenciacijo monocitov v makrofage, ki so se pritrdili na dno polistirenske plošče. Vpliv izbranih laktobacilov in LPS (pridobljenih iz *E. coli* O111:B4) na imunski odziv smo ugotavljali z merjenjem koncentracije izločenih citokinov v supernatantih celične linije THP-1 (poglavje 3.8). Po 24-urni stimulaciji celične linije THP-1 z RPMI, z izbranimi laktobacili, z LPS *E. coli* O111:B4, oziroma z izbranimi laktobacili in LPS skupaj, v supernatantih celične linije nismo ugotovili sprememb v koncentracijah IL-10 in IL-12p70. Pri zgodnjem prepoznavanju bakterij in posledično pri oblikovanju odziva celic T igrajo ključno vlogo dendritične celice. Študije na številnih bakterijskih vrstah, vključno z znanimi probiotiki VSL#3 in *L. plantarum* 299v, so pokazale, da lahko selektivno regulirajo zorenje *in vitro* in izražanje citokinov mišjih dendritskih celic in tako posledično vplivajo na razvoj celic T, kar se kaže v imunskem odzivu tipov Th1, Th2 ali Th3. Te interakcije z dendritskimi celicami so vsaj deloma posledica vezave laktobacilov na receptor PRR DC-SIGN (DC specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin). Pomembno pa je dejstvo, da so samo tisti laktobacili, ki so bili sposobni interakcije z DC-SIGN, stimulirali razvoj regulatornih populacij celic T, ki so proizvajale IL-10 (Smits in sod., 2005). Tudi Cross in sod. (2004) so potrdili, da nekateri sevi laktobacilov ne stimulirajo izločanja IL-10, najverjetneje zaradi mehanizma prepoznavanja različnih mikroorganizmov s strani prirojenega imunskega sistema. Proučevali so vpliv po Gramu negativnih in po Gramu pozitivnih mikroorganizmov na izločanje citokinov ob stimulaciji mišje monocitne/makrofagne celične linije J774A.1 s probiotičnima

mikroorganizmoma *L. casei* Shirota in *E. coli* Nissle, ter patogeno *E. coli* 2282. Pokazalo se je, da so po Gramu pozitivne probiotične bakterije *L. casei* Shirota povzročile izločanje IL-12 in TNF-α, ne pa tudi IL-10. Po Gramu negativni probiotični sev *E. coli* Nissle in patogena *E. coli* 2282, pa sta povzročila izločanje IL-12, TNF-α, in IL-10, pri čemer so bile koncentracije IL-12 in TNF-α od tri do petkrat višje kot pri stimulaciji z *L. casei* Shirota. V študiji so Maragkoudakis in sod. (2006) proučevali vpliv osmih sevov laktobacilov na izločanje citokinov na modelu mononuklearnih celic periferne krvi (PBMC). Laktobacili so različno vplivali na izločanje citokinov IL-12, IL-10, TNF-α in IFNγ, zanimivo pa je, da so v nasprotju z ugotovitvami Cross-a in sod. (2004) izmerili najvišje koncentracije IL-10 ob stimulaciji PBMC z *L. casei* Shirota. Sevi rodu *Lactobacillus*, ki povzročijo dvig koncentracije proti-vnetnega citokina IL-10 na modelu PBMC, so po navedbah v literaturi redki in najpogosteje pripadajo vrsti *L. casei* (Maassen in sod., 2000; Miettinen in sod., 1996). Na celični liniji THP-1 so bile opravljene tudi študije izražanja citokinov z merjenjem mRNA po stimulaciji z *L. plantarum* in *L. paracasei* F19 in patogeno *E. coli* K4 (Cammarota in sod., 2009). Vse bakterije so povzročile dvig koncentracije mRNA za TNF- α, patogena *E. coli* K4 pa je povzročila tudi povečano izražanje IL-8, IL-1ß in IL-23. Noben izmed bakterijskih sevov ni povzročil izražanja IFNγ, IL-10 ali IL-12p40. Za imunomodulatorno delovanje, vključno z aktivacijo monocitov in makrofagov, naj bi bili v veliki meri odgovorni lipoproteini. Del lipoproteinske molekule, ki je odgovoren za njegovo imunomodulatorno aktivnost, se nahaja na NH_2-terminalnem delu s tremi acilnimi skupinami. Odstranitev lipidnega dela povzroči neaktivnost nativne molekule, medtem ko imajo sintetični lipopeptidi sposobnost aktivacije celic B in makrofagov. Ohranjenost genetskih in strukturnih lastnosti mikrobnih lipoproteinov (maščobna acilna komponenta) je poglavitnega pomena za aktivacijo monocitov preko TLR, saj so ugotovili, da OspA (lipoprotein *B. burgdorferi* OspA) brez acilnih skupin ni sposoben stimulirati celic THP-1 k izločanju IL-12 (Brightbill in sod., 1999).

Dodatek LPS iz *E. coli* O111:B4 je v vseh naših poskusih povzročil statistično značilno povečanje koncentracije IL-8, ob dodatku izbranega seva laktobacilov (*L. crispatus/amylovorus* 4/26, K7, LGG, *L. casei imunitass* DN114 (Actimel) in BF pa smo zaznali statistično značilno zmanjšanje koncentracije IL-8 (slika 13). IL-8 se razlikuje od

drugih citokinov v tem, da ga v glavnem proizvajajo monociti in makrofagi, je izredno selektiven za nevtrofilne granulocite in je daljše obdobje obstojen v aktivni obliki v tkivih, tako da lahko govorimo o podaljšani aktivnosti (Ameho in sod., 1997). Po vsej verjetnosti smo ga zato v naših pokusih zaznali v največjih koncentracijah. Podoben trend smo opazili tudi pri IL-6 in TNF, kjer se je njuna koncentracija povečala ob stimulaciji z LPS, ob stimulaciji z LPS in izbranimi laktobacili pa se je koncentracija citokina statistično značilno zmanjšala, le da so bile koncentracije izločenih citokinov veliko manjše (sliki 15 in 16). Testni laktobacili, razen LGG, niso povzročili povečanja koncentracije provnetnih citokinov (IL-8, IL-6 in TNF), opazili pa smo rahlo povečanje IL-1ß (slika 14), ki je mediator lokalnega vnetja in lahko povzroči proliferacijo celic B in posledično povečano tvorbo protiteles. Razlike med koncentracijami posameznih citokinov v supernatantih, izmerjenimi v ločenih testih, so bile kar velike, vendar so bili trendi (razmerja med koncentracijami posameznih citokinov pri stimulaciji z različnimi dejavniki) podobni. Za vrednotenje izločenih citokinov smo izbrali sistem za merjenje koncentracije citokinov z metodo pretočne citometrije (BD CBA), kjer dodajamo vzorcu mešanico šestih populacij lovilnih kroglic z različnimi intenzivnostmi fluoresciranja fluoresciranja, pri čemer je vsaka od njih prekrita s specifičnimi protitelesi za enega od naslednjih citokinov: IL-8, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF ali IL-12p70. Lovilne kroglice, PE-konjugirana detekcijska protitelesa in rekombinantne standarde ali testne vzorce skupaj inkubiramo, da pride do tvorbe sendvič kompleksov. Dobra lastnost te metode je že omenjeno dejstvo, da lahko hkrati merimo koncentracijo šestih različnih citokinov, rezultate pridobimo v zelo kratkem času, poleg tega pa za meritve potrebujemo zelo majhno količino vzorca (Morgan in sod., 2004). Številne študije so pokazale dobro korelacijo med metodo ELISA in MBAA (multiplex bead array assay) v kombinaciji z metodo pretočne citometrije, vendar pa se same vrednosti koncentracij citokinov lahko zelo razlikujejo. Variabilnost rezultatov, pridobljenih z metodo ELISA in MBAA lahko zmanjšamo, če uporabimo enaka protitelesa in podobne reagente istega proizvajalca (Elshal in McCoy, 2006). Študije o vplivu različnih mikroorganizmov na izločanje citokinov na številnih modelih človeških in živalskih celičnih linij, kot tudi na PBMC, so nam postregle z veliko količino, v nekaterih primerih tudi nasprotujočih si, podatkov. Nasprotujoči si rezultati so lahko posledica uporabe različnih modelov celičnih linij, kot tudi uporaba različnih metod za vrednotenje izločenih citokinov (merjenje koncentracije citokinov z metodo pretočne citometrije ali z

metodo ELISA ali vrednotenje mRNA citokinov z metodo PCR v realnem času). Upoštevati pa je potrebno tudi dejstvo, da ima vsak sev svojstven vpliv na regulatorne mehanizme imunskega sistema in posledično izzove specifičen citokinski odziv (Cross, 2002). Citokini redko, če sploh kdaj, *in vivo* delujejo sami. Celica tarča je izpostavljena okolju, kjer so prisotni različni citokini, in katerih sinergistični in antagonistični učinki imajo zelo različne posledice. Poleg tega pa citokini pogosto spodbudijo sintezo drugih citokinov, kar sproži kaskado citokinskih aktivnosti (Vozelj, 2000). Zato se moramo zavedati dejstva, da se lahko vpliv laktobacilov na imunski odziv v pogojih *in vitro* razlikuje od vpliva v pogojih *in vivo*, kjer so vključeni še številni drugi dejavniki in medsebojni vplivi signalnih poti v živem organizmu.

5.1.6 Vpliv probiotične bakterije *L. gasseri K7* (Rif^r) na miši seva C57BL/6J ob sočasni aplikaciji *E. coli* O157:H7-poskus *in vivo*

5.1.6.1 Prirast in poraba krme

Po predhodnih raziskavah *in vitro*, ki so pokazale, da sev K7 (Rif^r) poseduje probiotične lastnosti, smo želeli ovrednotiti delovanje te mlečnokislinske bakterije v pogojih *in vivo* in proučiti njen vpliv na miši seva C57BL/6J ob sočasni aplikaciji enterohemoragične *E. coli* O157:H7. Sev miši C57BL/6J smo izbrali na podlagi že objavljenih rezultatov (Savkovic in sod., 2005), ki so potrdili, da je ta linija ustrezen model za proučevanje infekcije z *E. coli* O157:H7. V poskus smo vključili 50 miši seva C57BL/6J ženskega spola, starih od 6 do 8 tednov, ki smo jih razdelili v pet skupin po deset živali. Poskus smo razdelili na dva dela, obdobje prilagajanja (1 teden) in testno obdobje, v katerem smo živalim aplicirali testne bakterijske seve. Skupina A (kontrolna skupina) je bila podvržena 14-dnevni aplikaciji fiziološke raztopine, skupina B 14-dnevni aplikaciji seva K7 (Rif^r), skupina C 14-dnevni aplikaciji seva K7 (Rif^r) in enkratni aplikaciji *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa, skupina D 14-dnevni aplikaciji seva K7 (Rif^r) in enkratni aplikaciji *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa in skupina E enkratni aplikaciji *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa. Dnevne odmerke seva K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7, ki smo jih uporabili v poskusu, smo določili glede na podatke iz literature. Miši seva BALB/c, ki so jim aplicirali 5 x 10^4 KE/mL *E. coli* O157:H7, so začele drastično izgubljati na teži, 12 od 14 miši pa je poginilo v roku 10 dni

od aplikacije (Asahara in sod., 2004). V drugi študiji so mišim seva BALB/c aplicirali 10^{10} KE/mL *E. coli* O157:H7. Miši so po aplikaciji začele izgubljati na teži, vendar niso poginile. Glede na različne podatke iz literature smo se odločili, da bomo živalim aplicirali 5 x 10^8 KE *E. coli* O157:H7, da bi izzvali infekcijo, ne pa tudi pogina živali. Za LGG, ki je eden izmed najbolje proučenih laktobacilov s probiotičnimi lastnostmi, pri miših s per oralno aplikacijo akutna toksičnost ni bila ugotovljena niti pri zelo visokih odmerkih. Snydman (2008) zaključuje, da dejansko ni mogoče doseči letalnega odmerka. Odmerek s 1,2 x 10^9 KE seva K7 (Rif^r) se nam je zdel primeren za 14- dnevno aplikacijo.

Ob tehtanju smo ugotovili, da so tekom poskusa živali v skupini A enakomerno priraščale. Živali skupine B so v času aplikacije probiotične bakterije težo vzdrževale, v tednu po končani aplikaciji pa so pridobile na teži. Živali skupine C, so po aplikaciji *E. coli* O157:H7 (8. dan poskusa) začele izgubljati na teži, v zadnjem tednu poskusa pa so si opomogle in začele priraščati. Živali skupine D so enakomerno priraščale, po aplikaciji *E. coli* O157:H7 (15. dan poskusa) so začele izgubljati na teži, vendar so si v zadnjem tednu opomogle in pridobile na teži. Tudi pri skupini E smo opazili rahlo izgubo teže v tednu po aplikaciji *E. coli* O157:H7 (8. dan poskusa), potem pa so živali enakomerno priraščale (slika 18). Kljub velikim standardnim odklonom pri meritvah telesne teže lahko trdimo, da je aplikacija *E. coli* O157:H7 vplivala na živali v poskusu, vendar pa ni povzročila kliničnih znakov, značilnih za toksine enterohemoragične *E. coli* O157:H7. Živali so se tekom poskusa normalno hranile, vendar je bila poraba krme pri skupini B statistično značilno nižja glede na kontrolno skupino, prirast živali v skupini B pa ni odstopal od prirasta ostalih živali v poskusu. Nekateri sevi laktobacilov so z izločanjem mlečne kisline in posledičnim zniževanjem vrednosti pH gojišča sposobni inhibirati rast *E. coli* O157:H7 v pogojih *in vitro* (Ogawa in sod., 2001). Sev K7 je v pogojih *in vitro* izkazal sposobnost inhibicije rasti *E. coli* O157:H7 z izločanjem protimikrobnih snovi (preglednica 3, priloga A). Menimo, da je sev K7 (Rif^r) tudi v pogojih *in vivo* z izločanjem protimikrobnih snovi, predvsem mlečne kisline, vplival na viabilnost *E. coli* O157:H7 v črevesju miši.

5.1.6.2 Analize krvi

5.1.6.2.1 Krvna slika

Merjeni krvni parametri so bili pri vseh poskusnih skupinah živali v mejah referenčnih vrednosti (preglednica 12), opazili smo le povišane vrednosti trombocitov. Število trombocitov pri skupinah C, D in E je bilo nad referenčnimi vrednostmi, podanimi s strani hematološkega analizatorja ABCVet (140-600 x 10^9/L) in se je statistično značilno razlikovalo od kontrolne skupine A. Število trombocitov pri miših je nasploh višje kot pri drugih vrstah (900-1600 x 10^9/L pri miših, 200-600 x 10^9/L pri človeku). Zaradi njihove majhnosti je število mišjih trombocitov včasih podcenjeno, saj so nekateri hematološki analizatorji sposobni meriti le večje trombocite. Mišji trombociti se v pogojih *in vitro* pogosto tudi aktivirajo in tvorijo grude, kar vodi do napak pri štetju (Everds, 2007). Tudi drugi viri (Jacoby in sod., 2002) navajajo veliko višje vrednosti za število trombocitov (100-1000 x 10^9/L), zato povišanim vrednostim v našem poskusu ne gre pripisovati večjega pomena. Vrednosti levkocitov so bile pri vseh skupinah v mejah referenčnih vrednosti, vendar je bilo število levkocitov v skupini D statistično značilno višje ($p=0,02$), kot pri kontrolni skupini A (preglednica 12). Vrednosti diferencialne bele krvne slike sovpadajo s temi rezultati, saj je bilo tudi absolutno število limfocitov v preiskovanih krvnih razmazih v skupini D statistično značilno višje ($p=0,02$), kot pri kontrolni skupini A. Pri skupini E pa smo opazili statistično značilno višji ($p<0,05$) delež segmentiranih in paličastih nevtrofilnih granulocitov kot pri kontrolni skupini (preglednica 13). Rezultati kažejo na to, da je pri skupini D, ki je bila pred aplikacijo *E. coli* O157:H7 en teden tretirana s sevom K7, prišlo do aktivacije celic B, kar se je pokazalo v povečanem številu limfocitov. V skupini E, ki je bila tretirana le z *E. coli* O157:H7, pa je bilo povečano število paličastih kot tudi segmentiranih nevtrofilnih granulocitov, kar je značilno za vnetna stanja.

5.1.6.2.2 Fagocitoza

Fagocitoza s polimorfonuklearnimi nevtrofilci in monociti predstavlja najpomembnejši del zaščite gostitelja proti bakterijskim in glivičnim okužbam. Proces fagocitoze lahko razdelimo na več pomembnejših faz: kemotaksa (migracije fagocitov na prizadeta mesta), združevanje delcev s površino celic fagocitov, zaužitje (fagocitoza) ter znotrajcelično ubijanje z od kisika odvisnimi in neodvisnimi mehanizmi. Različni imunomodulatorji (citokini kot so IL-2 ali IFNγ, mlečnokislinske bakterije in izvlečki rastlin kot je *Echinacea Purpurea*) lahko povečajo fagocitno aktivnost nevtrofilnih granulocitov in monocitov.

Pripravki živih in toplotno inaktiviranih celic *L. rhamnosus* HN001, apliciranih v koncentraciji 10^9 mikroorganizmov na dan, v časovnem obdobju 14 dni, so stimulirali fagocitno aktivnost krvnih in peritonealnih levkocitov miši. Le pripravki živih celic pa so v črevesni sluznici vplivali na izboljšano sintezo protiteles proti vakcini kolera toksina. Največji vpliv na fagocitno sposobnost krvih levkocitov so ugotovili pri dnevnih odmerkih 10^9 in 10^{11} živih celic. Minimalna doza za stimulacijo peritonealnih levkocitov je bila 10^9 živih celic *L. rhamnosus* HN001 na dan, večja koncentracija celic (10^{11} celic) pa ni povzročila večje stimulacije peritonealnih levkocitov. Študija Gilla in Rutherfurda (2001) je pokazala, da je vpliv *L. rhamnosus* HN001 na fagocitni obrambni sistem miši odvisen od koncentracije celic. Čeprav so tudi mrtve celice vplivale na prirojeni imunski sistem (fagocitoza), je bila za specifični imunski odziv (tvorba protiteles) v sluznici črevesja potrebna prisotnost živega mikroorganizma. V naši raziskavi smo mišim kri odvzeli ob žrtvovanju, se pravi 7 dni po zadnji aplikaciji seva K7 (pri živalih skupin B, C in D), ter dva tedna po aplikaciji *E. coli* O157:H7 (živali skupine C in E) in en teden po aplikaciji *E. coli* O157:H7 (živali skupine D). Vpliva apliciranih mikroorganizmov na sposobnost fagocitoze monocitov in granulocitov nismo ugotovili, najverjetneje zaradi razmeroma dolgega časovnega obdobja, ki je preteklo od zadnje aplikacije mikroorganizmov do vrednotenja sposobnosti fagocitoze (slika 19).

5.1.6.3 Mikrobiološke analize

Tekom poskusa smo v vzorcih blata ugotavljali število mlečnokislinskih in koliformnih bakterij ter prisotnost seva K7 (Rif^r) in *E. coli* O157: H7. Želeli smo ugotoviti, ali 14-dnevna aplikacija probiotičnega mikroorganizma vpliva na že obstoječo mikrofloro v črevesju miši. Zanimalo nas je tudi, koliko časa se aplicirana mikroorganizma K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7 zadržita v črevesju živali, zato smo ugotavljali njuno prisotnost še 1 teden po zadnji aplikaciji. Povprečno število MKB skupine A je bilo skozi celotno obdobje okrog 2,5 x 10^8 KE/g blata. Pri skupini B smo ugotovili največjo vrednost 1,3 x 10^9 KE/g blata po 4 tednih, ko je bilo število kolonijskih enot glede na predhodna vzorčenja večje za red velikosti 0,5 logaritma. Število kolonijskih enot MKB je bilo pri skupinah D in E približno enako in se med poskusom ni bistveno spreminjalo (slika 20). Število koliformnih bakterij

na gojišču Chromocult je bilo v primerjavi s številom MKB, zraslih na gojišču MRS, v povprečju nižje za red velikosti dveh logaritmov (slika 21). Čeprav se je količina mikroorganizmov tekom poskusa spreminjala, spremembe niso bile statistično značilne in o vplivu K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7 na velikost že obstoječe mikrobiote živalih v poskusu ne moremo govoriti. K7 (Rif^r) smo v blatu miši ugotovili pri skupinah B, C in D v tretjem in četrtem tednu poskusa, ne pa tudi ob žrtvovanju (slika 22). Preiskovani sev K7 (Rif^r) je torej vsaj začasno naselil črevesje preiskovanih živali, vendar ga 7 dni po končani aplikaciji v blatu nismo več zasledili. Prisotnost kultivabilnih bakterij seva *E. coli* O157:H7 smo potrdili le v blatu mišk skupine D, in sicer v vzorcih blata 5-ih mišk od 10 analiziranih, odvzetih prvi dan po aplikaciji omenjenega seva, drugi in tretji dan po aplikaciji pa prisotnosti nismo uspeli potrditi (priloga B). *E. coli* O157:H7 torej ni naselila črevesja živali v poskusu v takšnem številu, da bi jo lahko detektirali v blatu. Benno in sod. (1996) so odkrili povezavo med uživanjem LGG in povečanjem števila bifidobakterij v blatu, medtem ko so Ouwehand in sod. (2002a) opazili, da je zauživanje *L. salivarius* UCC118 povzročilo povečanje števila enterokokov v blatu. Celokupna koncentracija laktobacilov v blatu je lahko nespremenjena, vendar je mogoče, da je prišlo do spremembe sestave populacije laktobacilov tako, da so del prvotno prisotne mikrobiote zamenjali laktobacili, ki smo jih aplicirali tekom poskusa. V študiji na miših seva CD1, BALB/c in C57BL/6, ki so jim intragastrično aplicirali med 1,0 x 10^{10} in 2,5 x 10^{10} KE *E. coli* O157:H7 so v njihovem blatu zasledili aplicirani mikroorganizem še do 10 dni po aplikaciji. Razen občasnega mehkega blata miši niso kazale vidnih znakov bolezni (Conlan in Perry, 1998). Mišim seva BALB/c, C3H/HeJ, C3H/HeN in C/J so aplicirali 10^{11} KE/kg *E. coli* O157:H7, vendar so ta bakterijski sev zaznali v blatu le pri 1 miši od 6. Pri miših ICR pa so *E. coli* O157:H7 ugotovili v blatu vseh živalih tudi ob uporabi manjšega odmerka (10^9 KE/kg *E. coli* O157:H7) (Nagano in sod., 2003). Conlan in sod. (1998) pa so ob aplikaciji 10^{10} KE *E. coli* O157:H7 mišim seva CD1, BALB/c in C57BL/6 te bakterije v blatu detektirali do 10 dni po aplikaciji, živali pa niso kazale kliničnih znakov. V študiji, kjer so mišim CD1 aplicirali 10^{10} *E. coli* O157:H7, so sev ugotovili v blatu miši vseh 25 dni poskusa, in sicer v koncentraciji 10^7 KE/g blata. Vendar pa živali niso kazale znakov driske in so bile zdrave ves čas poskusa. Ker je sev *E. coli* O157:H7 uspešno naselil celotno debelo črevo miši, so predvidevali, da so epitelijske celice debelega črevesa pri miših neobčutljive za toksine teh bakterij. Navajajo tudi, da so bile lezije, povzročene s

strani enterohemoragične *E. coli*, pri živalih, ki niso kazale znakov driske, omejene na debelo črevo in distalni del tankega črevesa (Wadolkowski in sod., 1990). Sklepamo, da je kolonizacija *E. coli* O157:H7, njeno izločanje v blatu in pojav kliničnih znakov odvisna od linije miši, ki jih uporabimo v poskusu, kot tudi od drugih, očitno še nepoznanih dejavnikov.

Ob žrtvovanju smo živalim odvzeli vzorce želodca, tankega črevesa, kolona in slepega črevesa za ugotavljanje prisotnosti K7 (Rif^r) in *E. coli* O157: H7 na sluznici črevesja in v želodcu. Prisotnost K7 (Rif^r) in *E. coli* O157: H7 smo ugotavljali tudi v vsebini tankega črevesa, kolona in slepega črevesa. Za potrditev selektivnosti gojišča z rifampicinom za sev K7 (Rif^r) smo analizirali 22 naključno izbranih izolatov iz črevesne vsebine in 6 izolatov iz želodca. Prisotnosti K7 (Rif^r) v želodcu poskusnih živali nismo potrdili. Prisoten pa je bil v vsebini slepega črevesa ene izmed mišk v skupini C (C2/2). V želodcu in črevesni vsebini mišk nismo uspeli potrditi seva *E. coli* O157:H7 pri nobeni od skupin. Preiskovanih sevov tudi v črevesni sluznici tankega črevesa, kolona in slepega črevesa nismo ugotovili. Prehod laktobacilov iz črevesnega lumna omogočajo FAE Peyerjevih plošč ali specializirane celice M v črevesnih resicah tankega črevesa. Galdeano in sod. (2006) so dokazali, da cele celice laktobacilov ne morejo v epitelne celice črevesja, temveč lahko vstopajo samo antigenske komponente ali razpadni produkti bakterij, ki tako vzpostavijo stik z imunskimi celicami. Dokazali so tudi, da je živost bakterij pomembna za boljšo stimulacijo imunskega sistema črevesja. Ugotovitve Solis-Pereyra in sod. (1997) pa kažejo na to, da za vpliv MKB na prirojeni imunski odziv ni potrebna živa bakterijska celica, zadostuje že prisotnost nepoškodovane bakterijske celične stene.

Translokacije laktobacilov v vranico in bezgavke še niso dokazali (Snydman, 2008). Znano pa je, da nekateri sevi laktobacilov lahko zmanjšajo oziroma preprečijo translokacijo *E. coli* O157:H7 v parenhimske organe, kar je pomemben korak v preprečevanju infekcije (Shu in Gill, 2001). Zato smo vzorčili tudi parenhimske organe in mezenterialne bezgavke, da bi ugotovili morebitno translokacijo seva K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7. V vzorcih jeter, ledvic, vranice in mezenterialnih bezgavk poskusnih živali, prisotnosti K7 (Rif^r) ali *E. coli* O157: H7 nismo potrdili.

5.1.6.4 Histološke analize

Za vrednotenje vpliva K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7 na črevesje smo pripravili histološke rezine dvanajstnika, teščega črevesa, vitega črevesa, kolona in mezenterialnih bezgavk. Histološke rezine smo pregledali in izmerili višine resic teščega in vitega črevesa, debelino sluznice kolona in površino limfatičnega tkiva teščega in vitega črevesa. Višina resic teščega črevesa se je med posameznimi skupinami v povprečju sicer razlikovala, vendar so bili standardni odkloni pri meritvah zelo veliki (slika 23). V višini resic vitega črevesa med posameznimi skupinami v poskusu ni bilo statistično značilnih razlik (slika 24). Meritve resic pri vseh živalih v poskusu so v skladu z višinami resic, ki jih navajajo v literaturi (Abbas in sod., 1989; Gillon in sod., 1982; Ito in sod., 1996). V pregledanih histoloških rezinah živali tudi nismo opazili večjih histoloških sprememb, zato razlikam, ki smo jih opazili pri višinah resic teščega črevesa, ne moremo pripisovati večjega pomena. Pri meritvah debeline sluznice kolona smo ugotovili, da je bila sluznica živali v skupini E statistično značilno tanjša (p=0,02) od kontrolne skupine A (slika 25). To je v skladu s podatki iz literature, ki navajajo, da ima *E. coli* O157:H7 največji vpliv v debelem črevesu, v primerih, ko klinične spremembe niso zaznavne (Wadolkowski in sod., 1990).

Površina limfatičnega tkiva teščega črevesa je bila za skupino E primerljiva s kontrolno skupino A. Rahlo povečanje površine limfatičnega tkiva glede na kontrolno skupino smo opazili pri skupini B, dvakratno povečanje pri skupini C, in trikratno povečanje pri skupini D (slika 26). Površina limfatičnega tkiva vitega črevesa je bila v primerjavi s kontrolno skupino A pri poskusnih živalih skupine B štirikrat povečana, pri skupini C trikrat povečana, pri skupini D sedemkrat povečana in pri skupini E skoraj osemkrat povečana (slika 27). Rezultati potrjujejo, da ima *E. coli* O157:H7 največji vpliv v distalnem delu tankega črevesa, na proliferacijo limfatičnega tkiva teščega črevesa pa ni imela vpliva. Sev K7 (Rif^r) je povzročil proliferacijo limfatičnega tkiva tako v teščem kot v vitem črevesu, vendar v manjši meri kot v primeru, ko je bila poleg K7 (Rif^r) aplicirana tudi patogena *E. coli* O157:H7.

5.1.6.5 Imunohistološke analize

V histoloških rezinah vitega črevesa smo ugotavljali prisotnost celic z vsebnostjo protiteles IgA, IgG in IgM s specifičnimi s FITC konjugiranimi proti-mišjimi protitelesi. Pozitivne IgA celice so bile prisotne v vseh preiskovanih rezinah, vendar smo največje število glede na kontrolno skupino ugotovili pri skupini B, najmanjše pa pri skupini E (slika 28). Črevesje sesalcev mora zagotavljati zadostno prepustnost, ki omogoča učinkovito absorbcijo hranilnih snovi, hkrati pa se mora izogniti potencialno nevarnemu imunskemu odzivu proti beljakovinam in komensalnim bakterijam v hrani. Prirojeni obrambni mehanizmi črevesnih epitelnih celic npr. proizvodnja α-defenzinov in mucinov, pomagajo preprečevati bakterijam prehod skozi mukozno bariero črevesja. Dodatno obrambo predstavlja sekretorni imunoglobulin A (sIgA). V nasprotju s sIgA, ki nastane kot imunski odziv na epitope patogenih mikroorganizmov in zahteva kostimulacijo z antigen specifičnimi limfociti T, je indukcija sIgA proti komensalnim antigenom pri miših neodvisna od limfocitov T (Hooper in Gordon, 2001). Veliko večino IgA, izločenega v črevesju, sintetizirajo limfociti B220+IgM+ na način, ki je neodvisen od celic T, v organiziranem limfatičnem tkivu z germinativnimi centri in folikularnimi dendritskimi celicami. Ta specifičen, od celic T neodvisni odziv protiteles IgA, je v glavnem usmerjen proti komensalnim predstavnikom črevesne mikrobiote. Intraepitelne dendritske celice, ki vzorčijo intestinalne mikroorganizme na površini črevesnih resic, so znane po tem, da odpotujejo v lamino proprio, kjer lahko predstavijo nativne antigene lokalnim naivnim celicam B. Od celic T neodvisni imunski odziv razumemo kot primitivno evolucijsko obliko specifične obrambe imunskega sistema, ki stremi k temu, da črevesna mikrobiota ne okupira gostitelja. Komensali, ki prečijo mukozno bariero, so obloženi z za njih specifičnimi protitelesi IgA. Nazaj v lumen odpotujejo s pomočjo polimernih Ig receptorsko posredovane transcitoze ali pa jih požrejo in prebavijo lokalni makrofagi, ki izražajo μ/α Fc receptorje (Arnaud in sod., 2002). Avtohtona komensalna mikrobiota igra odločilno vlogo v razvoju celic B Peyerjevih plošč, kar potrjuje dejstvo, da so le-te pri pri GF "germ free" živalih slabo razvite. Živali, ki imajo normalno črevesno mikrobioto, imajo 10 krat več celic, ki sintetizirajo IgA v lamini proprii črevesja kot živali GF, kar dokazuje, da je komensalna mikroflora esencialnega pomena za zorenje imunskega sistema (Dogi in Perdigon, 2006). Pri proučevanju vpliva komensalnih in nekomensalnih laktobacilov na

celice, ki sintetizirajo IgA so opazili, da so vsi proučevani sevi povzročili značilno povečanje števila teh celic 5-7 dni po aplikaciji mikroorganizmov. Znano je, da komensalna mikroflora ne stimulira močnega imunskega odziva, primerljivega z vnetnim odzivom. Komensalna mikrobiota pa lahko v majhnem številu stalno vstopa v črevesje in v dendritskih celicah preživi tudi do 72 ur. S komensalnimi bakterijami napolnjene dendritske celice stimulirajo imunski odziv v sluznici črevesja in s tem vzpostavijo poostren imunski nadzor v črevesju, kar omogoči hitrejši in boljši odziv ob vstopu patogenega mikroorganizma (Macpherson in Uhr, 2004). Pri aplikaciji K7 (Rif^r) je po vsej verjetnosti prišlo do aktivacije prirojenega imunskega sistema in posledične aktivacije celic B v sluznici črevesja, medtem ko delovanje pridobljenega imunskega sistema vključuje celice T. Znano je, da probiotični mikroorganizmi vplivajo na prirojeno imunost preko učinkovanja na klonsko ekspanzijo IgA sintetizirajočih celic B (Galdeano in Perdigon, 2006).

Največji dvig tkivne koncentracije IgM-pozitivnih celic v sluznici smo prešteli pri skupini C (25,6) in nekoliko manjši pri skupini D (18,7). Pri skupini B smo prešteli le 2 IgM-pozitivni celici v eni izmed 20 preiskovanih rezin. Pri skupini E pa smo našli 6,1 IgM-pozitivnih celic, ki so bile prisotne v 11 rezinah od 20 preiskovanih (preglednica 14). V histoloških rezinah, ki smo jih inkubirali z za γ specifičnimi s FITC konjugiranimi proti-mišjimi IgG protitelesi, nismo opazili pozitivnih celic, kar je v skladu s podatki iz literature (Vinderola in sod., 2006). Rezultati kažejo na to, da je sev K7 (Rif^r) aktiviral celice B za izločanje IgM, kar je lahko vplivalo na aktivacijo klasične poti komplementa in posledično odstranitev *E. coli* O157:H7 iz organizma (Vozelj, 2000). Na sintezo IgG pa tako K7 (Rif^r) kot tudi *E. coli* O157:H7 nista imela vpliva.

Sprožitev imunskega odziva, ki se je izrazil v spremembah na mezenterialnih bezgavkah (priloga E), povečanju limfatičnega tkiva teščega in vitega črevesa in v povečani sintezi IgA v sluznici vitega črevesa, kaže na vpliv laktobacilov na imunski sistem črevesja, ki je posledica interakcije med bakterijami in epitelijskimi, oziroma imunskimi celicami. Kljub precej velikim odmerkom in dolgotrajni aplikaciji, sev K7 (Rif^r) ni povzročil nefizioloških sprememb pri živalih v poskusu, zato lahko sklepamo, da je proučevani sev laktobacilov varen za uporabo.

Enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 (5 x 10^8 KE) pri miših seva C57BL/6J ni povzročila kliničnih znakov, vendar se je vpliv patogenega mikroorganizma izrazil v povečanem številu segmentiranih in paličastih nevtrofilnih granulocitov v krvi in IgM-pozitivnih celic v sluznici vitega črevesa, povečani površini limfatičnega tkiva vitega črevesa, ter stanjšanju sluznice kolona. Sočasna aplikacija K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7 (skupina D) pa je povzročila povečano število limfocitov v krvi, povečano površino limfatičnega tkiva teščega in vitega črevesa ter povečano število pozitivnih IgM celic v sluznici vitega črevesa. Rezultati se razlikujejo glede na skupini, kjer je bil sev K7 (Rif^r) ali *E. coli* O157:H7 apliciran sam.

5.2 SKLEPI

- Izbrani sevi laktobacilov človeškega (K7) in prašičjega izvora (*L. crispatus/amylovorus* 4/26 in 2/25 in *L. reuteri* 12/26 in 14/26) so sposobni preživeti v simuliranih pogojih prebavil. Nizke vrednosti pH (pH=2) simuliranega želodčnega soka povečajo občutljivost preiskovanih sevov za žolčne soli in negativno vplivajo na njihovo nadaljnje preživetje v simuliranem črevesnem soku.

- Vsi preiskovani sevi človeškega in prašičjega izvora so sposobni adhezije na celice Caco-2 in sluz človeškega in prašičjega izvora. Različno dobro se vežejo na celično linijo Caco-2 (0,6-13,4%) in črevesno sluz človeškega (0,4-49%) ali živalskega izvora (0,3-27%), pri čemer učinkovitost vezave na sluz človeškega oziroma živalskega izvora ni pogojena z izvorom seva (človeški/živalski), niti ni v neposredni povezavi s hidrofobnostjo. Pri izbranih sevih (K7, LGG, *L. reuteri* 2/26 in 2/18 ter *E. coli* K12) ni razlik v vezavi na sluz iz različnih delov črevesja

- Nekateri izolati človeškega in prašičjega izvora so v pogojih *in vitro* sposobni tekmovati s potencialno patogenimi organizmi (*E. coli, S. aureus*) in zmanjšati njihovo adhezijo na sluz človeškega in prašičjega izvora. *L. crispatus/amylovorus* 4/26 poleg seva K7 odstopa od ostalih testnih sevov po inhibiciji adhezije *E. coli* in *S. aureus.*

- Protibakterijska aktivnost preiskovanih izolatov laktobacilov je specifična za vsak posamezen sev in se razlikuje tudi glede na to ali uporabimo živo kulturo (metoda z liso na agarju) ali koncentriran supernatant kulture (metoda difuzije v agarju).

- Testni sevi ne razgrajujejo mucinov želodčne sluzi in niso bolj odporni proti antibiotikom, kakor je to običajno za rod *Lactobacillus*, kar je pomembno s stališča varnosti.

- Testni sevi laktobacilov (K7, *L. crispatus/amylovorus* 4/26 ter trije referenčni sevi) vplivajo na imunski odziv, ki se kaže v izražanju citokinov s strani makrofagov celične linije THP-1. Ob sočasni stimulaciji z LPS iz *E. coli* O111:B4 so zmanjšali koncentracijo provnetnih citokinov IL-8, IL-6 in TNF, kar kaže na njihovo sposobnost protivnetnega delovanja.

- Sev K7 (Rif^r) preživi prehod skozi prebavila in vsaj začasno naseli prebavila miši seva C57BL/6J. Vsakodnevna aplikacija relativno visokih odmerkov seva K7 (Rif^r) (1,2 x 10^9 KE) v časovnem obdobju 14 dni ni povzročila nefizioloških sprememb pri živalih v poskusu, zato lahko trdimo, da je sev varen za uporabo.

- Sev K7 (Rif^r) vpliva na imunski odziv gostitelja, kar se odraža v povečanem številu IgA-pozitivnih celic v sluznici vitega črevesa.

- Aplikacija K7 (Rif^r) in/ali *E. coli* O157:H7 ni vplivala na velikost populacije mlečnokislinskih in koliformnih bakterij fekalne mikrobiote.

- Enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 (5 x 10^8 KE) ni povzročila kliničnih znakov pri miših seva C57BL76J, vendar se vpliv patogenega mikroorganizma kaže v povečanem številu segmentiranih in paličastih nevtrofilnih granulocitov v krvi, povečanju števila IgM-pozitivnih celic v sluznici vitega črevesa in stanjšanju sluznice kolona.

- Sočasna aplikacija K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7 (skupina D) je povzročila povečanje površine limfatičnega tkiva teščega in vitega črevesa ter povečano število pozitivnih IgM celic v sluznici vitega črevesa.

6 POVZETEK

Mlečnokislinske bakterije imajo dolgo zgodovino varne uporabe v prehrani ljudi. Posebno skupino predstavljajo probiotične bakterije, ki zaradi različnih pozitivnih zdravstvenih učinkov postajajo vse bolj atraktivne tako za znanstvenike kot prehransko in farmacevtsko industrijo. Probiotične bakterije zauživamo predvsem v obliki fermentiranih mlečnih izdelkov, ki imajo poleg hranilne vrednosti še funkcionalne učinke, saj poleg samih probiotičnih bakterij vsebujejo številne bioaktivne snovi, ki nastanejo med fermentacijo. Vse pogosteje jih dodajajo tudi krmnim mešanicam za živali, še posebej v zadnjem času, ko je nadzor nad krmnimi dodatki vse ostrejši, probiotiki pa imajo dokazan učinek na povečanje prirasta zaradi izboljšanega izkoristka krme. Probiotične bakterije so najpogosteje sevi vrst iz rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, ki imajo sposobnost preživetja v pogojih prebavil in pripenjanja na črevesno sluznico, kar v pogojih *in vitro* najpogosteje dokazujejo na modelu celične linije Caco-2 ter na črevesni sluzi. Sposobni so izločanja inhibitornih metaboličnih produktov in tekmovanja s patogenimi mikroorganizmi za vezavna mesta. Raziskave kažejo, da ima vsak probiotični sev specifičen način delovanja, zato smo lastnosti lastnih izolatov človeškega in prašičjega izvora proučili *in vitro* in *in vivo* na miših.

Ugotovili smo, da so preiskovani sevi sposobni preživeti v simuliranih pogojih prebavil in se vezati na celice Caco-2 in na sluz človeškega in prašičjega izvora. Seva K7 in *L. crispatus/amylovorus* 4/26 sta izstopala v testih tekmovanja za vezavo na sluz človeškega in prašičjega izvora. Zanimiva je ugotovitev, da učinkovitost vezave na sluz človeškega oziroma živalskega izvora ni bila pogojena z izvorom seva (človeški/živalski), niti ni bila v neposredni povezavi s hidrofobnostjo. Pri izbranih sevih (K7, LGG, *L. reuteri* 2/26 in 2/18 ter *E. coli* K12) tudi nismo opazili razlik v vezavi na sluz iz različnih delov črevesja

Testni sevi laktobacilov (K7, *L. crispatus/amylovorus* 4/26 ter trije referenčni sevi) vplivajo na imunski odziv, kar smo ugotovili z merjenjem koncentracij citokinov, ki so jih izločili makrofagi THP-1 celične linije. Ob sočasni stimulaciji THP-1 celične linije z LPS iz *E. coli* O111:B4, so laktobacili zmanjšali koncentracijo provnetnih citokinov IL-8, IL-6 in TNF, kar kaže na njihovo sposobnost protivnetnega delovanja.

Tako K7 (Rif^r) kot *E. coli* O157:H7 sta vplivala na miši seva C57BL/6J, nista pa povzročila večjih sprememb v velikosti mikrobnih populacij, saj se število mlečnokislinskih in koliformnih bakterij v blatu v času poskusa ni občutno spremenilo. Aplikacija seva K7 (Rif^r) je vplivala na imunski odziv gostitelja, kar se je odražalo v povečani površini limfatičnega tkiva v teščem in vitem črevesu in povečanem številu IgA-pozitivnih celic v sluznici vitega črevesa. Enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 (5×10^8 KE) pri miših seva C57BL/6J ni povzročila kliničnih znakov, vendar se je vpliv patogenega mikroorganizma izrazil v povečanem številu segmentiranih in paličastih nevtrofilnih granulocitov v krvi in IgM-pozitivnih celic v sluznici vitega črevesa, povečani površini limfatičnega tkiva vitega črevesa ter stanjšanju sluznice kolona. Sočasna aplikacija K7 (Rif^r) in *E. coli* O157:H7 pa je povzročila povečano površino limfatičnega tkiva teščega in vitega črevesa ter povečano število pozitivnih IgM celic v sluznici vitega črevesa. Rezultati se razlikujejo glede na skupini, kjer je bil sev K7 (Rif^r) ali *E. coli* O157:H7 apliciran sam. Sev K7 (Rif^r) je preživel prehod skozi prebavila in jih pri miših seva C57BL/6J vsaj začasno naselil. Vsakodnevna aplikacija relativno visokih odmerkov seva K7 (Rif^r) ($1,2 \times 10^9$ KE) v časovnem obdobju 14 dni ni povzročila nefizioloških sprememb pri živalih v poskusu, zato lahko trdimo, da je sev varen za uporabo.

Rezultati raziskave kažejo na to, da so pri probiotičnem učinkovanju testnih laktobacilov vpleteni naslednji mehanizmi: kompetitivno izključevanje z inhibitornimi metaboličnimi produkti, oviranje adhezije patogenih bakterij na črevesno sluz ter vpliv na imunski odziv gostitelja. Podatki, ki smo jih pridobili v poskusih *in vitro* in študiji *in vivo*, predstavljajo dobro osnovo za nadaljnje klinične raziskave in so nas pripeljale korak bližje k razvoju probiotičnega proizvoda za ljudi in živali, z dobro poznanimi funkcionalnimi učinki.

7 SUMMARY

Probiotic cultures have a long history of safe use in human consumption mainly in the form of fermented milk products which apart from having good nutritional value also serve as functional foods containing various bioactive substances formed during fermentation. Due to their health promoting effects they are attracting the interest of scientists as well as the food and pharmaceutical industry. Probiotics, with their proven effects on nutrient utilization play also an important role as additives in animal feed especially in a time when the legislative for additives in animal feed is more and more stringent. The most common representatives of probiotic bacteria are from the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* as they have the ability to survive the stringent conditions of the gastrointestinal tract and adhere to intestinal mucosa. Adhesion is most often studied on Caco-2 cell line and intestinal mucus. Probiotic strains are also capable of producing antibacterial metabolic products and of competing with pathogenic microorganisms for adhesion sites in the intestine. Research shows that every probiotic strain exhibits a specific mode of action. In the present study we examined the probiotic properties of our own isolates *in vitro* as well as *in vivo* on mice.

Five strains (K7, 2/25, 12/26, 14/26, 4/26) showed good resistance against low pH and bile. The strains tested showed variable adhesion to Caco-2 cells and human and porcine mucus. The origin of the strain (human/porcine) did not affect the level of adhesion and no correlation with hydrophobicity was observed. There were no differences in the adhesion of selected strains (K7, LGG, *L. reuteri* 2/26 and 2/18 and *E. coli* K12) to mucus obtained from different parts of porcine intestine. In further adhesion studies strains K7 and *L. crispatus/amylovorus* 4/26 showed superior ability to compete with *E. coli* and *S. aureus*. Tests employing the well established THP-1 cell line revealed the ability of selected strains (K7, 4/24 and three referential strains) to elicit an immune response, which was evident in production of cytokines. Furthermore, a down-regulation of inflammatory cytokines (IL-8, IL-6 and TNF) after stimulation of THP-1 cells with LPS speaks for anti-inflammatory properties of the strains tested.

Our *in vivo* study on C57BL/6J mice confirmed that strain K7 (Rif^r) survives the passage through the gastrointestinal tract and at least transiently colonizes the intestine. As no

detrimental effects were seen after a 14 day application of a relatively high dose of K7 (Rif^r) (1,2 x 10^9 CFU), we can conclude that the strain is safe for consumption. K7 (Rif^r) and *E. coli* O157:H7 did not have an influence on the microbiota of mice, as no great alterations were seen in the numbers of coliform and lactic acid bacteria. Effect on innate immunity was observed, as application of K7 (Rif^r) resulted in proliferation of ileal and jejunal lymphatic tissue and in increased production of IgA in the ileum.

After a single application of *E. coli* O157:H7 (5 x 10^8 CFU) the animals showed no clinical signs. The impact of the pathogen was seen in a higher number of segmented and band neutrophils in the blood and a higher number of positive IgM cells in the ileum. Proliferation of lymphatic tissue in the ileum and thining of the colon mucosa were also observed.

Application of both K7 (Rif^r) and *E. coli* O157:H7 resulted in the proliferation of ileal and jejunal lymphatic tissue and caused an increase in the number of positive IgM cells in the ileum. These results differ from the ones obtained in groups where K7 (Rif^r) and *E. coli* O157:H7 were given alone.

Our research shows that probiotic action of the strains tested is dependent on various mechanisms including competitive inhibition with inhibitory metabolic products, competitive inhibition in adhesion of pathogens to intestinal mucus as well as stimulation of the immune response.

Results of our *in vitro* experiments and *in vivo* study on mice represent a good foundation for further animal and clinical studies and a stepping stone in the development of a probiotic product for animal and human consumption with well defined functional effects.

8 ZAHVALE

Zahvaljujem se:

Članicam komisije (prof. dr. Milki Vrecl, doc. dr. Ireni Zdovc in prof. dr. Ireni Rogelj) ter dr. Bojani Bogovič Matijašić in prof. dr. Alojzu Ihanu za temeljit pregled doktorske naloge, za vse pripombe in napotke, ki so to delo izboljšali.

Prof. dr. Ireni Rogelj za priložnost, da sem bila del raziskovalne skupine na Katedri za mlekarstvo.

Dr. Bojani Bogovič Matijašić za priložnost, da sem bila njena prva mlada raziskovalka, za mentorstvo, nasvete in potrpežljivost v šestih letih najinega sodelovanja.

Doc. dr. Ireni Zdovc za priložnost, da sem vstopila v svet veterinarske mikrobiologije, kot tudi za vso podporo in razumevanje v zadnjih mesecih nastajanja doktorskega dela.

Prof. dr. Alojzu Ihanu, da je prevzel mentorstvo moje doktorske naloge in mi s tem omogočil delo na makrofagni celični liniji in poskusnih živalih. Vaša vrata so bila vedno odprta in vedno ste mi priskočili na pomoč v kritičnih trenutkih.

Vsem ostalim vodjem laboratorijev Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Medicinske fakultete (prof. dr. Vladimirju Kotniku, dr. Branki Wraber in dr. Saši Simčič), da sem lahko opravljala delo v vseh laboratorijih inštituta in se nikoli nisem počutila kot tujec.

Dr. Andreji Nataši Kopitar za opravljene analize na pretočnem citometru in za vso pomoč, ki si mi jo nudila v času mojega dela na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo. Brez tvojih bogatih, večletnih izkušenj bi se marsikje zataknilo.

Doc. dr. Manici Černe za priložnost, da sem lahko mesece preživela v laboratorijih Oddelka za toksikologijo na Lek-u in se tam počutila kot doma. Iskrena hvala, da ste si kljub svojemu napornemu urniku vedno vzeli čas zame, mi nudili strokovno pomoč in vzpodbudne besede.

Dr. Špeli Škrajnar za neštete ure, ki si mi jih posvetila. Za vse diskusije, takšne in drugačne, predvsem pa zato, ker si do konca verjela vame.

Gorazdu Tompi za nesebično pomoč na vsakem koraku mojega raziskovalnega dela. Za iskreno prijateljstvo, odkrite pogovore in razumevanje. V veliko veselje mi je bilo sodelovati s človekom, ki je raziskovalec po düši.

Dr. Petri Mohar Lorbeg za malo morje vestno opravljenih mikrobioloških analiz.

Vesni Kuhar za opravljene analize PCR in RAPD.

Roku Novaku za izvedbo E-testov.

Sodelavcem na Katedri za mlekarstvo za pomoč pri delu in za vse trenutke, ki smo jih v zadnjih šestih letih preživeli skupaj.

Dr. Matjažu Simončiču, da je delil z mano svoje izčrpno znanje glede dela s poskusnimi živalmi. Hvala za vse konstruktivne debate, izmenjave mnenj in idej.

Zali Prevoršek in Ani Zanjkovič za pomoč med poskusom na miših, najsi je šlo za steljo ali ščipalec za ušesa, vedno sta bili pripravljeni pomagati.

Prof. dr. Mojci Narat za možnost opravljanja poskusov na celični liniji Caco-2.

Dr. Alenki Vizjak za priložnost, da sem lahko opravila imunohistološke analize v laboratorijih Inštituta za patologijo in za vso strokovno pomoč.

Martini Perše za pomoč pri pridobitvi dovoljenja za delo na poskusnih živalih in za miške seva C57BL/6J.

Dr. Jaki Lavrenčaku in doc. dr. Veroniki Kloboves-Prevodnik, da sta v zadnjem hipu priskočila na pomoč pri meritvah fagocitoze.

Elini Sargon za neprecenljivo tehnično pomoč pri delu s poskusnimi živalmi.

Dr. Arthur-ju Ouwehand-u za priložnost, da sem lahko poskuse adhezije na sluzi opravila v laboratorijih Functional Foods Forum-a na Finskem.

Dr. Satu Vesterlund za pomoč in nasvete pri testih adhezije in za vpogled v finsko kulturo.

Dr. Alenki Andlovic za sev enterohemoragične *E. coli* brez katerega poskus na miših ne bi bil mogoč.

Katerini Čeh za nasvete glede jemanja krvi pri miškah.

Mag. Brigiti Grecs Smole za pregled literature in Maji Sevnik za lektoriranje.

Staršem za vse priložnosti, ki sem jih imela v življenju, za podporo in za finančno pomoč v hudih časih.

9 VIRI

Abbas B, Hayes TL, Wilson DJ, Carr KE. Internal structure of the intestinal villus: morphological and morphometric observations at different levels of the mouse villus. J Anat 1989; 162: 263-73.

Abbas A.K., Lichtman A.H. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Elsevier Inc., 2005: 243-274.

Agrawal R. Probiotics: an emerging food supplement with health benefits. Food Biotechnol 2005; 19: 227 - 46.

Alain LS. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiol Rev 2004; 28: 405-40.

Ameho CK, Adjei AA, Harrison EK et al. Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumour necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis. Gut 1997; 41: 487-93.

Ammor MS, Florez AB, Mayo B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiol 2007; 24:559-70.

Arnaud D, Jean-Claude S, Jean-Pierre K, Marian RN. How the gut senses its content. Cell Microbiol 2002; 4: 61-72.

Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A, Takeda Y. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 2004; 72: 2240-7.

Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifacetted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. Cell Mol Life Sci 1991; 47: 22-31.

Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Von Wright A, Ouwehand A, eds. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd ed. New York, Basel: Marcel Dekker, 2004: 1-22.

Benno Y, He F, Hosoda M et al. Effects of *Lactobacillus* GG yogurt on human intestinal microecology in Japanese subjects. Nutr Today 1996; 31: 12S.

Bianchi MA, Rio DD, Pellegrini N, Sansebastiano G, Neviani E, Brighenti F. A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. Lett Appl Microbiol 2004; 39: 301-5.

Blum S, Reniero R, Schiffrin EJ et al. Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. Trends Food Sci Technol 1999; 10: 405-10.

Bogovič Matijašić B. Bakteriocini seva *Lactobacillus acidophilus* LF221: preučevanje tvorbe, protibakterijske aktivnosti, biokemijskih lastnosti in sestave. Doktorska disertacija. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, 1997.

Bogovič Matijašić B, Rogelj I. Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221-production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. Process Biochem 1998; 33: 345-52.

Bogovič Matijašić B, Rogelj I, Nes IF, Holo H. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221.
Appl Microbiol Biotechnol 1998; 49: 606-12.

Bogovič Matijašić B, Narat M, Zorič M. Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. Food Technol Biotechnol 2003; 41: 83-8.

Bogovič Matijašić B, Stojković S, Salobir J, Malovrh Š, Rogelj I. Evaluation of the *Lactobacillus gasseri* K7 and LF221 strains in weaned piglets for their possible probiotic use and their detection in the faeces. Anim Res 2004; 53: 35-44.

Bogovič Matijašić B, Narat M, Zorič Peternel M, Rogelj I. Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion *in vitro* on Caco-2 cells and *ex vivo* on pigs' jejunal tissue. Int J Food Microbiol 2006a; 107: 92-96.

Bogovič Matijašić B, Stojković S, Rogelj I. Survival and in vivo adhesion of human isolates *Lactobacillus gasseri* LF221 and K7 in weaned piglets and their effects on coliforms, clostridia and lactobacilli viable counts in faeces and mucosa.
J Dairy Res 2006b; 73: 417-22.

Bogovič Matijašić B, Koman Rajsp M, Perko B, Rogelj I. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. Int Dairy J 2007; 17: 157-66.

Bomba A, Nemcova R, Gancarikova S, Herich R, Kastel R. Potentiation of the effectiveness of *Lactobacillus casei* in the prevention of *E. coli* induced diarrhea in conventional and gnotobiotic pigs. Adv Exp Med Biol 1999; 473: 185-90.

Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. Science 1999; 285: 732-6.

Cammarota M, De Rosa M, Stellavato A, Lamberti M, Marzaioli I, Giuliano M. *In vitro* evaluation of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 12028 as a probiotic: emphasis on innate immunity. Int J Food Microbiol 2009; 135: 90-8.

Candela M, Perna F, Carnevali P et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production.
Int J Food Microbiol 2008; 125: 286-92.

Charlesworth E. Effect of probiotic lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. Curr Allergy Asthma Rep 2003; 3: 281-2.

Chouraqui JP, Van Egroo LD, Fichot MC. Acidified milk formula supplemented with *Bifidobacterium lactis*: impact on infant diarrhea in residential care settings. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2004; 38: 288-92.

Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. Food Res Int 2007; 40: 629-36.

Conlan JW, Perry MB. Susceptibility of three strains of conventional adult mice to intestinal colonization by an isolate of *Escherichia coli* O157:H7. Can J Microbiol 1998; 44: 800-5.

Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J Dairy Sci 1987; 70: 1-12.

Coppola R, Succi M, Tremonte P, Reale A, Salzano G, Sorrentino E. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. Lait 2005; 85: 193-204.

Crawford J.M. The gatrointestinal tract. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T eds. Pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999: 775-844.

Cross ML. Immunoregulation by probiotic lactobacilli: pro-Th1 signals and their relevance to human health. Clin Appl Immunol Rev 2002; 3: 115-25.

Cross ML, Ganner A, Teilab D, Fray LM. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 42: 173-80.

Čanžek Majhenič A, Bogovič Matijašić B, Rogelj I. Chromosomal location of the genetic determinants for bacteriocins produced by *Lactobacillus gasseri* K7. J Dairy Res 2003; 70: 199-203.

Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus spp.* to antimicrobial agents. Int J Food Microbiol 2003; 82: 1-11.

Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. Lett Appl Microbiol 2000; 31: 438-42.

Delgado S, Flórez AB, Mayo B. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. Curr Microbiol 2005; 50: 202-7.

Dellaglio F, Felis GE. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. In: Tannock GW, eds. Probiotics & prebiotics: scientific aspects. Norfolk: Caister Academic Press, 2005: 25-49.

Dogi CA, Perdigon G. Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria. J Dairy Res 2006; 73: 357-66.

Dunne C, O'Mahony L, Murphy L et al. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. Am J Clin Nutr 2001; 73 (suppl. 2): 386S-92.

Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. Methods 2006; 38: 317-23.

Fajdiga S. Vpliv sevov iz rodov *Salmonella* in *Lactobacillus* na raven izražanja interleukina 8 in proteina toplotnega stresa 70 v celicah Caco-2: doktorska disertacija. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2006..

Fajdiga S, Koninkx J, Tooten P, Marinšek-Logar R. Interference of *Salmonella enteritidis* and *Lactobacillus spp*. with IL-8 levels and transepithelial electrical resistance of enterocyte-like caco-2 cells. Folia Microbiol (Praha) 2006; 51: 268-72.

FEEDAP Panel. Opinion of the scientific panel on additives and products or substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance.
EFSA-Q-2004-079. EFSA 2005; 223: 1-12.

Fernández MF, Boris S, Barbés C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. J Appl Microbiol 2003; 94: 449-55.

Fernández MF, Boris S, Barbés C. Safety evaluation of *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* UO 004, a probiotic bacterium. Res Microbiol 2005; 156: 154-60.

Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. J Natl Cancer Inst 1977; 58: 209-14.

Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M, Deng MY. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 2188-91.

Galdeano CM, Perdigon G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity.
Clin Vaccine Immunol 2006; 13: 219-26.

Gill HS, Rutherfurd KJ. Viability and dose response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* in mice.
Br J Nutr 2001; 86: 285-9.

Gillon J, Al Thamery D, Ferguson A. Features of small intestinal pathology (epithelial cell kinetics, intraepithelial lymphocytes, disaccharidases) in a primary Giardia muris infection. Gut 1982; 23: 498-506.

Gluck U, Gebbers JO. Ingested probiotics reduce nasal colonization with pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae,* and beta-hemolytic streptococci). Am J Clin Nutr 2003; 77: 517-20.

Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract.
Dig Dis Sci 1992; 37: 121-28.

Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. I*n vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. Int J Food Microbiol 2001; 67: 207-16.

Greaves P. Histopathology of preclinical toxicity studies. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2000: 366-371.
Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. Int J Food Microbiol 1998; 39: 237-8.

Gueimonde M, Jalonen L, He F, Hiramatsu M, Salminen S. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli.
Food Res Int 2006; 39: 467-71.

Gusils C, Cuozzo S, Sesma F, Gonzales S. Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. Can J Microbiol 2002; 48: 34-42.

Hacin B, Rogelj I, Bogovič Matijašić B. *Lactobacillus* isolates from weaned piglets' mucosa with inhibitory activity against common porcine pathogens. Folia Microbiol (Praha) 2008; 53: 569-76.

Hammes WP, Vogel RF. The genus *Lactobacillus*. In: Wood BJB, Holzapfel WH, eds. The lactic acid bacteria: the genera of lactic acid bacteria. Vol. 2. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1995: 19-54.

Hatakka K, Martio J, Korpela M et al. Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis: a pilot study. Scand J Rheumatol 2003; 32: 211-5.

Haavenar R, Brink TB, Huis in't Veld JHJ. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R, ed. Probiotics. The scientific basis. London: Chapman & Hall, 1992: 209-224.

Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut.
Science 2001; 292: 1115-8.

Huis in't Veld JHJ, Havenaar R. Probiotics and health in man and animal. J Chem Tech Biotechn 1991; 51: 562-7.

Ibnou-Zekri N, Blum S, Schiffrin EJ, von der Weid T. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties *in vitro*. Infect Immun 2003; 71: 428-36.

Ito E, Ohkusu M, Yasumoto T. Intestinal injuries caused by experimental palytoxicosis in mice. Toxicon 1996; 34: 643-52.

Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp*. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans.
Appl Environ Microbiol 1999; 65: 4949-56.

Johnson JL, Phelps CF, Cummins CS, London J, Gasser F. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 53-68.

Katla AK, Kruse H, Johnsen G, Herikstad H. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. Int J Food Microbiol 2001; 67: 147-52.

Kaur IP, Chopra K, Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical applications.
Eur J Pharm Sci 2002; 15: 1-9.

Kheadr E, Bernoussi N, Lacroix C, Fliss I. Comparison of the sensitivity of commercial strains and infant isolates of bifidobacteria to antibiotics and bacteriocins.
Int Dairy J 2004; 14: 1041-53.

Kiely LJ, Olson NF. The physicochemical surface characteristics of *Lactobacillus casei*. Food Microbiol 2000; 17: 277-91.

Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. FEMS Microbiol Lett 1998; 167: 185-9.

Klaenhammer TR, Kullen MJ. Selection and design of probiotics.
Int J Food Microbiol 1999; 50: 45-57.

Klare I, Konstabel C, Muller-Bertling S et al. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of lactobacilli, pediococci, lactococci, and bifidobacteria. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 8982-6.

Kreiswirth BN, Lofdahl S, Betley MJ et al. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. Nature 1983; 305: 709-12.

Lauková A, Strompfová V, Ouwehand A. Adhesion properties of enterococci to intestinal mucus of different hosts. Vet Res Commun 2004; 28: 647-55.

Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. Microbiol Mol Biol Rev 2008; 72: 728-64.

Lee YK, Puong KY, Ouwehand AC, Salminen S. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. J Med Microbiol 2003; 52: 925-30.

Lee YK, Lim CY, Teng WL, Ouwehand AC, Tuomola EM, Salminen S. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 3692-7.

Lee YK, Puong KY. Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in the presence of carbohydrate.
Br J Nutr 2002; 88 (Suppl. 1): S101-8.

Lehto EM, Salminen SJ. Inhibition of *Salmonella typhimurium* adhesion to Caco-2 cell cultures by *Lactobacillus* strain GG spent culture supernate: only a pH effect?
FEMS Immunol Med Microbiol 1997; 18: 125-32.

Lorca G, Torino MI, Valdez G, Ljungh Å. Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin.
FEMS Microbiol Lett 2002; 206: 31-7.

Lowry OH, Rosebrough NR, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 139: 265-75.

Maassen CBM, van Holten-Neelen C, Balk F et al. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered Lactobacillus strains. Vaccine 2000; 18: 2613-23.

Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. Science 2004; 303: 1662-5.

Madsen K, Cornish A, Soper P et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. Gastroenterology 2001; 121: 580-91.

Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy.
J Allergy Clin Immunol 1997; 99: 179-85.

Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulus G, Pot B, Tsakalidou E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products.
Int Dairy J 2006; 3: 189-99.

Mättö J, van Hoek HAM, Domig KJ et al. Susceptibility of human and probiotic *Bifidobacterium spp*. to selected antibiotics as determined by the Etest method.
Int Dairy J 2007; 17: 1123-31.

McCracken VJ, Lorenz RG. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. Cell Microbiol 2001; 3: 1-11.

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature 2007; 449: 819-26.

Miettinen M, Vuopio-Varkila J, Varkila K. Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria.

Infect Immun 1996; 64: 5403-05.

Mishra V, Prasad DN. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. Int J Food Microbiol 2005; 103: 109-15.

Morgan E, Varro R, Sepulveda H et al. Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology. Clin Immunol 2004; 110: 252-66.

Nagano K, Taguchi K, Hara T, Yokoyama S, Kawada K, Mori H. Adhesion and colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cecum of mice. Microbiol Immunol 2003; 47: 125-32.

Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. Crit Rev Food Sci Nut 1999; 38 (Num. 1): 13-126.

Nase L, Hatakka K, Savilahti E et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. Caries Res 2001; 35: 412-20.

Niedzielin K, Kordecki H, Birkenfeld Be. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. Eur J Gastroenterol Hepatol 2001; 13: 1143-7.

Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K et al. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic Lactobacillus strains due to production of lactic acid. Int J Food Microbiol 2001; 68: 135-40.

Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie van Leeuwenhoek 2002a; 82: 279-89.

Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Grönlund MM, Isolauri E, Salminen SJ. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. Int Dairy J 1999; 9: 623-30.

Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV, lkk, T. S, Salminen SJ. The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus* GG and *Lact. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Lett Appl Microbiol 2000; 30: 10-3.

Ouwehand AC, Tuomola EM, Tölkkö S, Salminen S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. Int J Food Microbiol 2001; 64: 119-26.

Ouwehand AC, Salminen S, Tolkko S, Roberts P, Ovaska J, Salminen E. Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. Clin Diagn Lab Immunol 2002b; 9: 184-6.

Pamer EG. Immune responses to commensal and environmental microbes. Nat Immunol 2007; 8: 1173-8.

Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. Inflamm Res 2007; 56: 45-50.

Perez PF, Minnaard Y, Disalvo EA, De Antoni GL. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 21-6.

Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD et al. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. Biol Cell 1983; 47: 323-30.

Ramiah K, ven Reenen CA, Dicks LMT. Expression of the mucus adhesion genes *mub* and *mapA*, adhesion-like factor *EF-Tu* and bacteriocin gene *plaA* of *Lactobacillus plantarum* 423, monitored with real-time PCR. Int J Food Microbiol 2007; 116: 405-9.

Rosenberg M. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett 1984; 22: 289-95.

Rosenfeldt V, Benfeldt E, Valerius NH, Paerregaard A, Michaelson KF. Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. J Pediatr 2004; 145: 612-6.

Ruseler-van Embden JGH, van Lieshout LMC, Gosselink MJ, Marteau P. Inability of *Lactobacillus casei* Strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. Scand J Gastroenterol 1995; 30: 675-80.

Salminen S, Bouley C, Boutron MC et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. Br J Nutr 1998; 80 (Suppl. 1): S147-71.

Savkovic SD, Villanueva J, Turner JR, Matkowskyj KA, Hecht G. Mouse model of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Infect Immun 2005; 73: 1161-70.

Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos WM. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. Curr Opin Biotechnol 2005; 16: 204-11.

Shortt C. The probiotic century: historical and current perspectives.
Trends Food Sci Technol 1999; 10: 411-7.

Shu Q, Gill HS. A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. Med Microbiol Immunol 2001; 189: 147-52.

Sillanpää J. Tissue-adherence in lactic acid bacteria: identification and characterization of the collagen-binding S-layer protein of *Lactobacillus crispatus*: Doctoral dissertation Helsinki: Department of Biosciences, 2001.

Singleton P. Introduction to bacteria for students of biology, biotechnology and medicine. New York: John Wiley & Sons, 1992: 692.

Smits HH, Engering A, van der Kleij D et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin.
J Allergy Clin Immunol 2005; 115: 1260-7.

Snydman DR. The safety of probiotics. Clin Infect Dis 2008; 46 (Suppl. 2): S104-11.

Solis-Pereyra B, Aattouri N, Lemonnier D. Role of food in the stimulation of cytokine production. Am J Clin Nutr 1997; 66: 521S-5.

Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy.
Int J Food Microbiol 1997; 36: 1-29.

Szajewska H, Kotowska M, Mrakowicz JZ, Armanska M, Mikolajczyk W. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants.
J Pediatr 2001; 138: 361-5.

Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria.
Microbiol Mol Biol Rev 1976; 40: 722-56.

Talafantová M, Mandel L, Trebichavský I. The adherence of *Escherichia coli* to the intestinal epithelium of piglets. Die Nahrung 1987; 31: 477-9.

Tannock GW. Molecular methods for exploring the intestinal ecosystem.
Br J Nutr 2002; 87 (suppl. 2): S199-201.

Temmerman R, Huys G, Swings J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. Trends Food Sci Technol 2004; 15: 348-59.

Torriani S, Zapparoli G, Dellaglio F. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* and *L. delbrueckii ssp. lactis*.
Appl Environ Microbiol 1999; 65: 4351-6.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1).
Int J Cancer 1980; 26: 171-6.

Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus.
FEMS Immunol Med Microbiol 1999a; 26: 137-42.

Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. Human ileostomy glycoproteins as a model for small intestinal mucus to investigate adhesion of probiotics.
Lett Appl Microbiol 1999b; 28: 159-63.

Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen SJ. Chemical, physical and enzymatic pre-treatments of probiotic lactobacilli alter their adhesion to human intestinal mucus glycoproteins. Int J Food Microbiol 2000; 60: 75-81.

van der Mei HC, van de Belt-Gritter B, Pouwels PH, Martinez B, Busscher HJ. Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins: a study in recombinant lactobacilli. Colloid Surface B 2003; 28: 127-34.

Vesterlund S, Paltta J, Karp M, Ouwehand AC. Measurement of bacterial adhesion - *in vitro* evaluation of different methods.
J Microbiol Methods 2005; 60: 225-33.

Vesterlund S, Karp M, Salminen S, Ouwehand AC. *Staphylococcus aureus* adheres to human intestinal mucus but can be displaced by certain lactic acid bacteria. Microbiology 2006; 152: 1819-26.

Vesterlund S. Methods to determine the safety and influence of probiotics on the adherence and viability of pathogens: doctoral thesis. Turku: Department of Biochemistry and Food Chemistry, 2006.

Vinderola CG, Reinheimer JA. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative *in vitro* study of probiotic characteristics and biological barrier resistance.
Food Res Int 2003; 36: 895-904.

Vinderola CG, Medici M, Perdigón G. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. J Appl Microbiol 2004; 96: 230-43.

Vinderola G, Perdigon G, Duarte J, Farnworth E, Matar C. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. J Dairy Res 2006; 73: 472-9.

Vozelj M. Temelji imunologije. Ljubljana: DZS, 2000: 239-59.

Wadolkowski EA, Burris JA, O'Brien AD. Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 1990; 58: 2438-45.

Walter J. The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract. In: Tannock GW, eds. Probiotics & prebiotics: scientific aspects. 1st ed. Norfolk: Caister Academic Press, 2005: 52-82.

Werling D, Jann OC, Offord V, Glass EJ, Coffey TJ. Variation matters: TLR structure and species-specific pathogen recognition. Trends Immunol 2009; 30: 124-30.

Winkler P, Ghadimi D, Schrezenmeir J, Kraehenbuhl JP. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. J Nutr 2007; 137 (3 suppl. 2): 756S-72.

Wullt M, Hagslatt MJ, Odenholt I. *Lactobacillus plantarum* 299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a double-blind, placebo-controlled trial. Scand J Infect Dis 2003; 35: 365-7.

Zárate G, De Ambrosini VM, Perez Chaia A, González S. Some factors affecting the adherence of probiotic *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 to intestinal epithelial cells. Can J Microbiol 2002; 48: 449–57.

Zhou JS, Gopal PK, Gill HS. Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin *in vitro*. Int J Food Microbiol 2001; 63: 81-90.

Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal GK. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. Int J Food Microbiol 2005; 98: 211-7.

Zoetendal EG, Vaughan EE, de Vos WM. A microbial world within us.
Mol Microbiol 2006; 59: 1639-50.

PRILOGE

Priloga A: **Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti z metodo difuzije v agarju (MDA).**

Annex A: **Antibacterial activity as detected with agar-well diffusion method.**

A1: **Protibakterijsko delovanje *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221 in *L. crispatus/amylovorus* 4/26 proti indikatorskemu sevu *E. coli* O8:K88:H9Ent$^-$ ugotovljeno z metodo difuzije v agarju.**

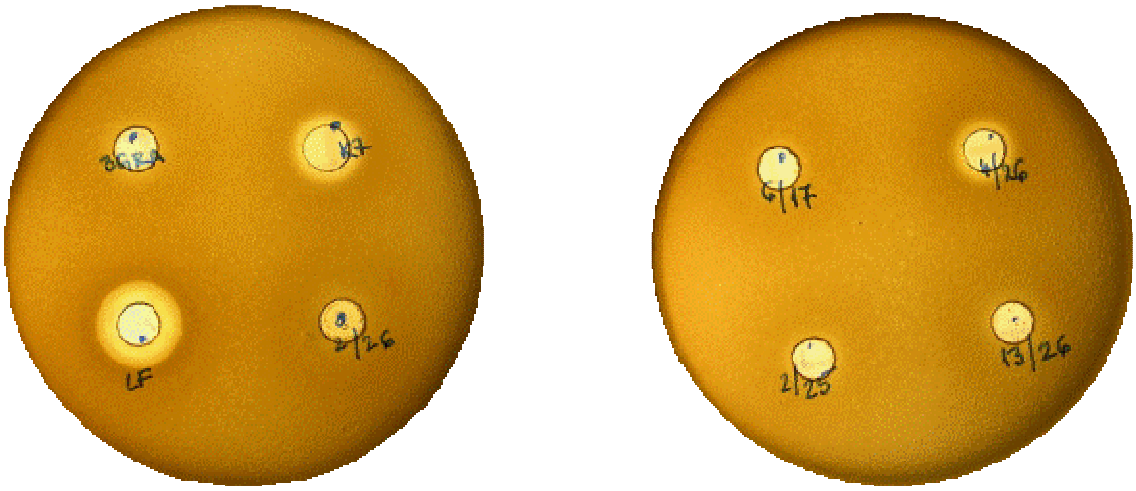
A1: **Antibacterial activity of *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221 and *L. crispatus/amylovorus* 4/26 against indicator strain *E. coli* O8:K88:H9Ent$^-$ as detected with agar-well diffusion method.**

A2: **Protibakterijsko delovanje *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221 in *L. crispatus/amylovorus* 4/26 proti indikatorskemu sevu *E. coli* O8:K88:H9Ent$^+$ ugotovljeno z metodo difuzije v agarju.**

A2: **Antibacterial activity of *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221 and *L. crispatus/amylovorus* 4/26 against indicator strain *E. coli* O8:K88:H9Ent$^+$ as detected with agar-well diffusion method.**

A3: **Protibakterijsko delovanje *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221 in *L. crispatus/amylovorus* 4/26 proti indikatorskemu sevu *E.coli* O157:H7 ugotovljeno z metodo difuzije v agarju.**

A3: **Antibacterial activity of *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221 and *L. crispatus/amylovorus* 4/26 against indicator strain *E. coli* O157:H7 as detected with agar-well diffusion method.**



A4: **Protibakterijsko delovanje *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221 in *L. crispatus/amylovorus* 4/26 proti indikatorskemu sevu *E.coli* K12 ugotovljeno z metodo difuzije v agarju.**

A4: **Antibacterial activity of *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221 and *L. crispatus/amylovorus* 4/26 against indicator strain *E. coli* K12 as detected with agar-well diffusion method.**

A5: **Protibakterijsko delovanje *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221 in *L. crispatus/amylovorus* 4/26 proti indikatorskemu sevu *S. aureus* RN 4220 ugotovljeno z metodo difuzije v agarju.**

A5: **Antibacterial activity of *L. gasseri* K7, *L. gasseri* LF221 and *L. crispatus/amylovorus* 4/26 against indicator strain *S. aureus* RN 4220 as detected using agar-well diffusion method.**

Priloga B: **Potrditev prisotnosti toksinov *E. coli* O157:H7 s pomočjo reakcije multiplex PCR.**

Annex B : **Verification of *E. coli* O157:H7 toxins with multiplex PCR.**

- **PCR mešanica (20 µl):**

  1 µl DNA4 µl GoTaq pufer z $MgCl_2$ (1,5 mM)

  0,2 µl začetni oligonukleotid MFS1F (10 µM)

  0,2 µl začetni oligonukleotid MFS1R (10 µM)

  0,2 µl začetni oligonukleotid MK1 (10 µM)

  0,2 µl začetni oligonukleotid MK2 (10 µM)

  0,2 µl začetni oligonukleotid AE 19 (10 µM)

  0,2 µl začetni oligonukleotid AE20 (10 µM)

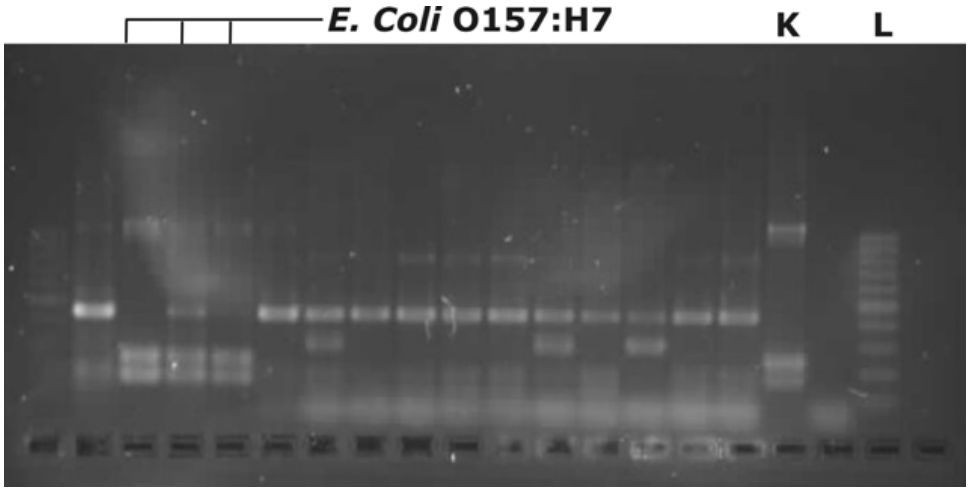
  0,2 µl dNTP-jev (0,1mM)

  0,1 µl GoTaq polimeraze13,5 µl H_2O

- **PCR program:**

Število ciklov	*Faza*	*Temperatura*	*Čas*
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	5 min
35	Denaturacija DNA	95 °C	1 min
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	48 ºC	1 min
	Podaljševanje verige	72 °C	1 min
1	Zaključno podaljševanje verige	72 °C	10 min

PCR produkte smo ločevali na 1,8 % agaroznem gelu. Obarvali smo jih z barvilom Sybr safe. Za primerjavo velikosti smo uporabili označevalec velikosti 100 bp.



B1: **Produkti reakcije multipleks PCR iz DNA vzorcev blata miši, ki smo jim aplicirali *L. gasseri* K7 and *E. coli* O157:H7; K- *E. coli* O157:H7 kontrola; L- označevalec velikosti 100 bp.**

B1: **Products of multiplex PCR reaction from DNA of fecal isolates from mice fed L. gasseri K7 and E. coli O157:H7; K- *E. coli* O157:H7 control; L- 100 bp DNA ladder.**

Priloga C: **Potrditev prisotnosti seva *L. gasseri* K7 (rif^r) s pomočjo analize RAPD.**

Annex C : **Verification of *L. gasseri* K7 (rif^r) with RAPD analysis.**

- **PCR mešanica (20 µl):**

  1 µl DNA

  4 µl GoTaq pufer

  3,2 µl MgCl2 (4mM)

  0,2 µl začetni oligonukleotid M13 (10 µM)

  0,2 µl dNTP-jev (0,1mM)

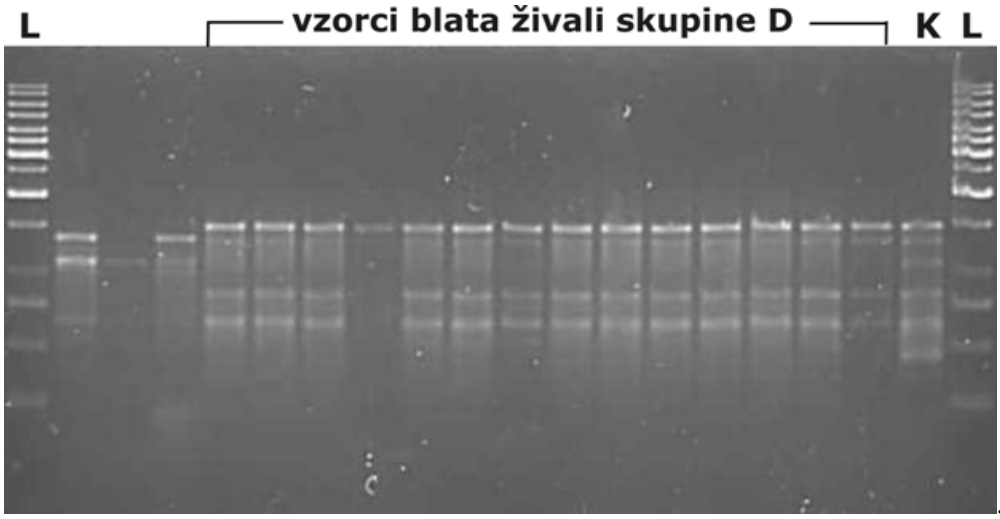
  0,1 µl GoTaq polimeraze

  11,3 µl H2O

- **PCR program:**

Število ciklov	*Faza*	*Temperatura*	*Čas*
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	3 min
40	Denaturacija DNA	95 °C	1 min
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	48 ºC	20 s
	Podaljševanje verige	72 °C	2 min
1	Zaključno podaljševanje verige	72 °C	5 min

PCR produkte smo ločevali na 1,8 % agaroznem gelu. Obarvali smo jih z barvilom Sybr safe. Za primerjavo velikosti smo uporabili označevalec velikosti 1kbp



C1: **RAPD profili izolatov blata miši, ki smo jim aplicirali *L. gasseri* K7; K- *L. gasseri* K7 kontrola; L- označevalec velikosti 1kbp**

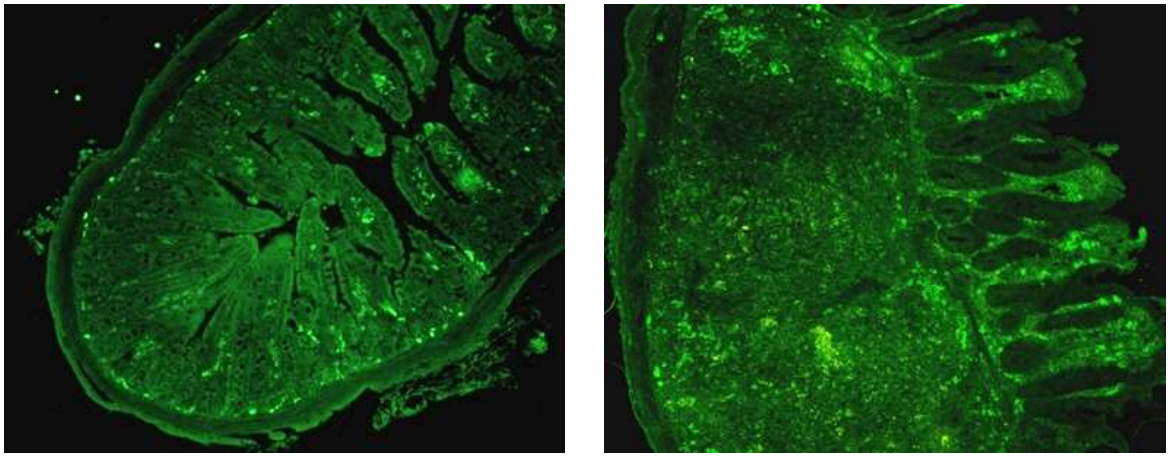
C1: **RAPD profiles generated from DNA of fecal isolates from mice fed *L. gasseri* K7; K- *L. gasseri* K7 control; L- 1kbp DNA ladder**

Priloga D: **Imunohistološke analize.**

Annex D : **Immunohistological analysis.**

V histoloških rezinah vitega črevesa smo ugotavljali prisotnost protiteles IgA, IgG in IgM s specifičnimi s FITC konjugiranimi proti-mišjimi protitelesi.

A **B**

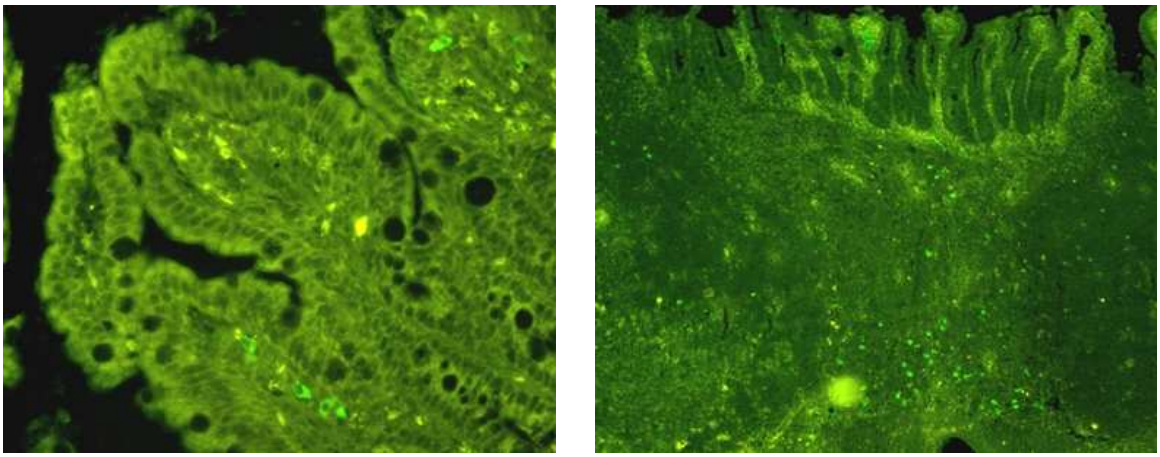


D1: **Histološka rezina vitega črevesa označena z za α-verigo specifičnimi s FITC konjugiranimi proti-mišjimi IgA protitelesi;** A- skupina A (kontrolna skupina), B- skupina B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r); povečava 100x)).

D1: **Histological slice of ileum labelled with α-chain specific FITC labelled anti-mouse IgA antibodies;** A-group A (control group), B- group B (14 day application of K7 (Rif^r); magnification 100x)).

Na sliki D1 je prikazana histološka rezina vitega črevesa, kjer so vidne pozitivne celice IgA, ki fluorescirajo, kot posledica vezave za α-verigo specifičnih s FITC konjugiranih proti-mišjih IgA protiteles.

A **B**



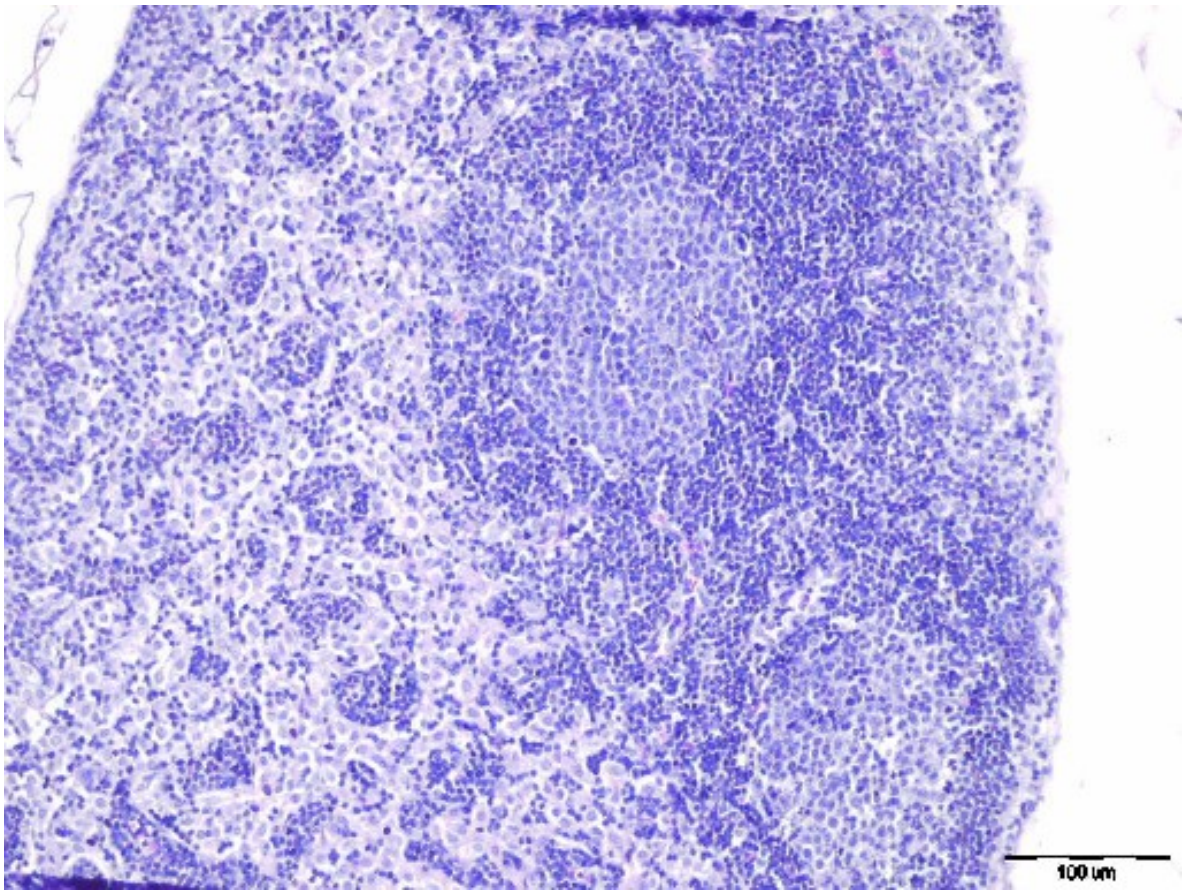
D2: **Histološka rezina vitega črevesa označena z za μ-verigo specifičnimi s FITC konjugiranimi proti-mišjimi IgM protitelesi;** slika A - skupina A (kontrolna skupina (povečava 400x)), slika B - skupina D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacij *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa (povečava 100x)).

D2: **Histological slice of ileum labelled with μ chain specific FITC labelled anti-mouse IgM antibodies;** figure A- group A (control group (magnification 400x)), figure B- group D (14 day application of K7 (Rif^r) and one time application of *E. coli* O157:H7 on day 15 of experiment (magnification 100x)).

Na sliki D2 je prikazana histološka rezina vitega črevesa, kjer so vidne pozitivne celice IgM, ki fluorescirajo, kot posledica vezave za μ-verigo specifičnih s FITC konjugiranih proti-mišjih IgM protiteles.

Priloga E: **Histološke rezine mezenterialnih bezgavk.**

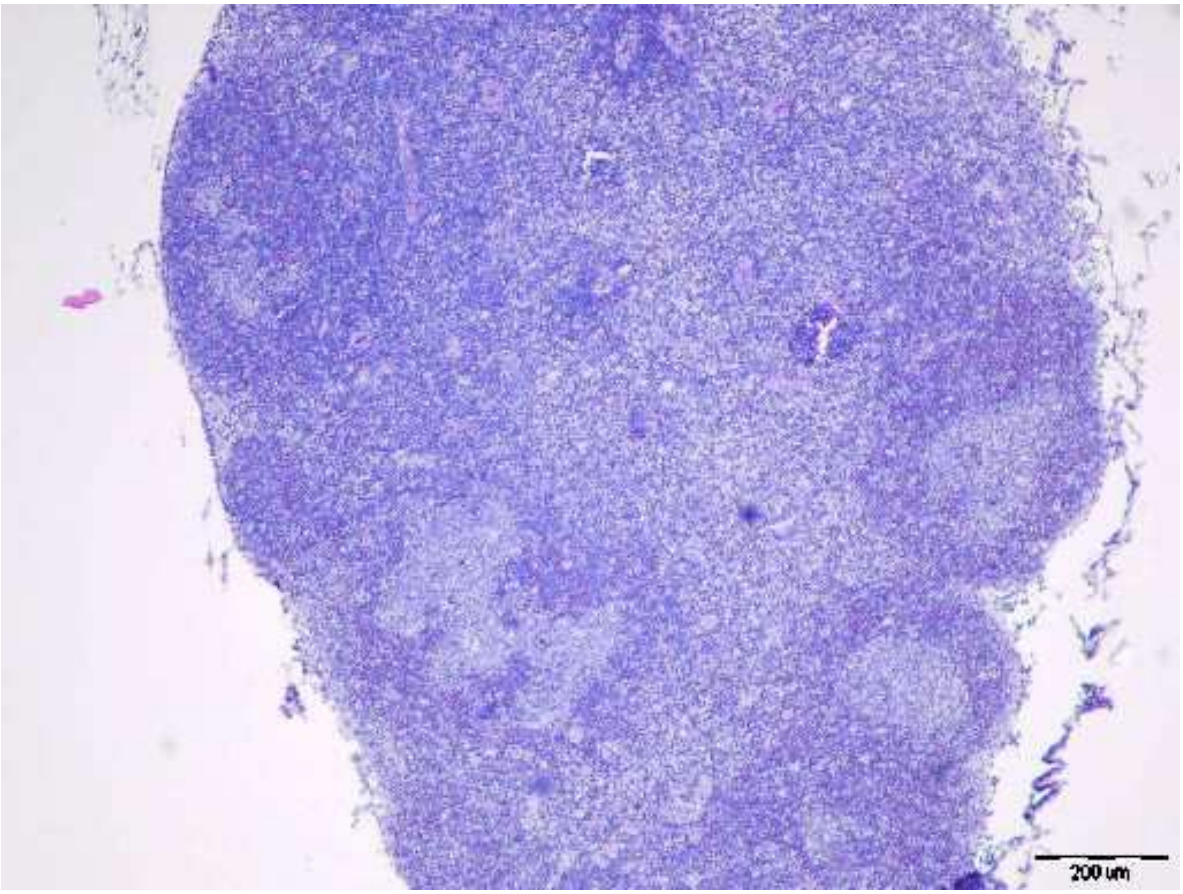
Annex E : **Histological slices of mesenterial lymph nodes.**



E1: **Svetlobno mikroskopski posnetek histološke rezine mezenterialne bezgavke živali skupine A (kontrolna skupina) (Povečava 100x, H&E).**

E1: **Light microscope picture of histological slice from animal in group A (control group) (Magnification 100x, H&E).**

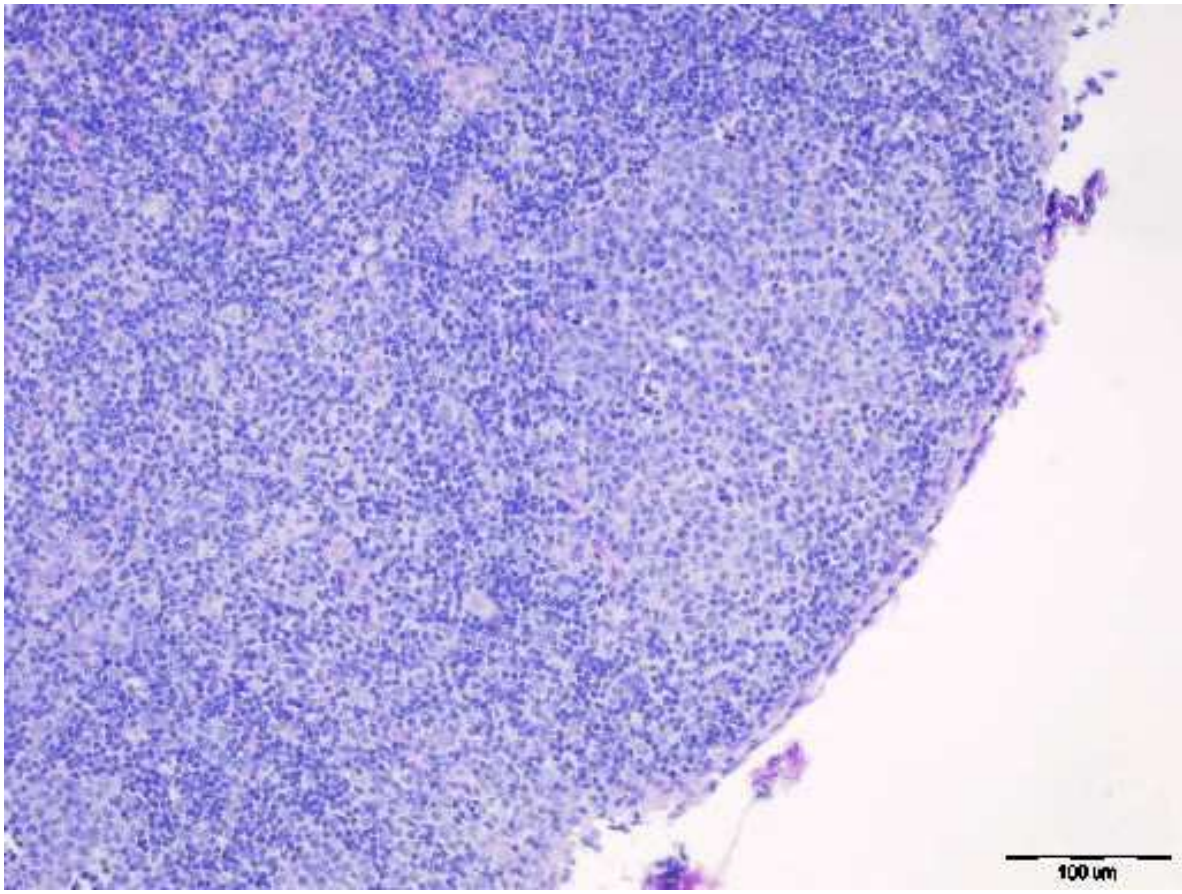
Pri pregledu histoloških rezin kontrolne skupine A (priloga E1) smo ugotovili, da kaže značilnosti fiziološke bezgavke. Ocenili smo, da korteks in parakorteks predstavljata 1/3, medularno tkivo pa 2/3 površine bezgavke. Lepo so vidni posamezni sekundarni folikli, v katerih smo ocenili, da je razmerje zrelih in nezrelih limfocitov 1/1.



E2: **Svetlobno mikroskopski posnetek histološke rezine mezenterialne bezgavke živali skupine B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)) (Povečava 40x, H&E).**

E2: **Light microscope picture of histological slice from animal in group B (14 day application of K7 (Rif^r)) (Magnification 40x, H&E).**

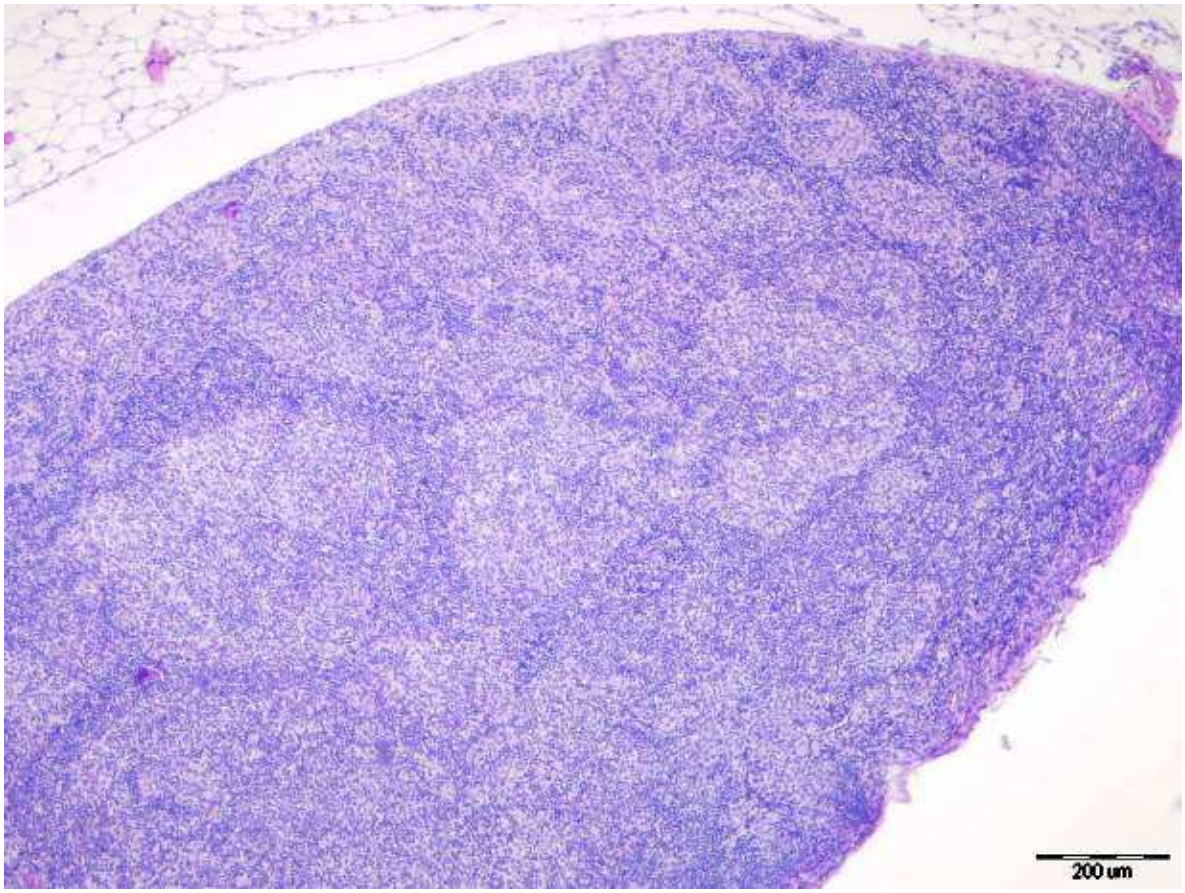
Pri skupini B (priloga E2) smo pri pregledu histoloških rezin ugotovili značilnosti reaktivne bezgavke, s številnimi malimi in velikimi germinativnimi centri. Porušeno je razmerje med temnim (perifernim) in svetlim (centralnim) delom sekundarnih foliklov na račun svetlega dela (nezreli limfociti). Limfni sinusi so napolnjeni z limfociti. Medularnega tkiva v bezgavki skoraj ni, Ocenili smo, da parakorteks predstavlja približno 2/3 površine bezgavke. Opazna je rahla reaktivna hiperplazija (hiperplasia reactiva). Vse opažene spremembe so še v mejah fiziološkega.



E3: **Svetlobno mikroskopski posnetek histološke rezine mezenterialne bezgavke živali skupine B (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r)) (Povečava 100x, H&E).**

E3: **Light microscope picture of histological slice from animal in group B (14 day application of K7 (Rif^r)) (Magnification 100x, H&E).**

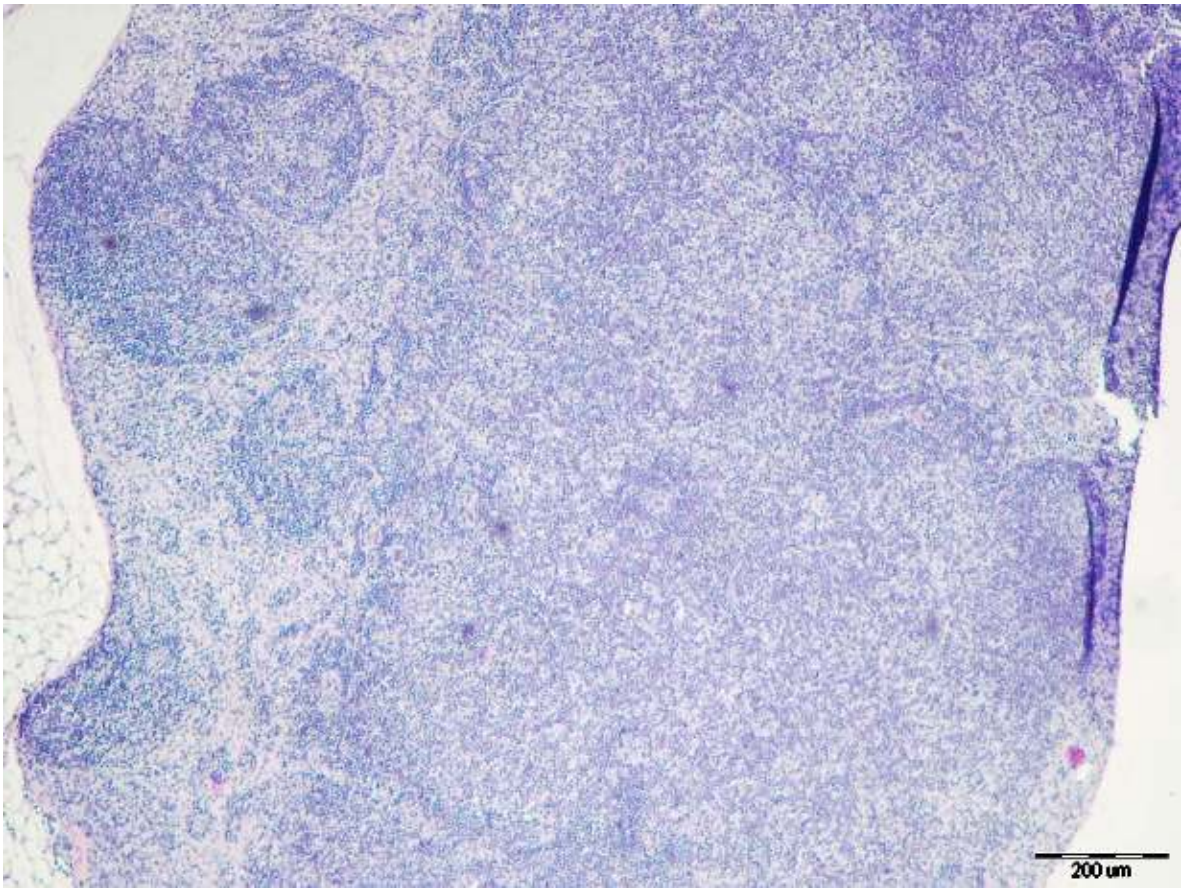
V histoloških rezinah skupine B (priloga E3) je razmerje med limfociti porušeno v prid nezrelih limfocitov.



E4: **Svetlobno mikroskopski posnetek histološke rezine mezenterialne bezgavke živali skupine C (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa) (Povečava 40x, H&E).**

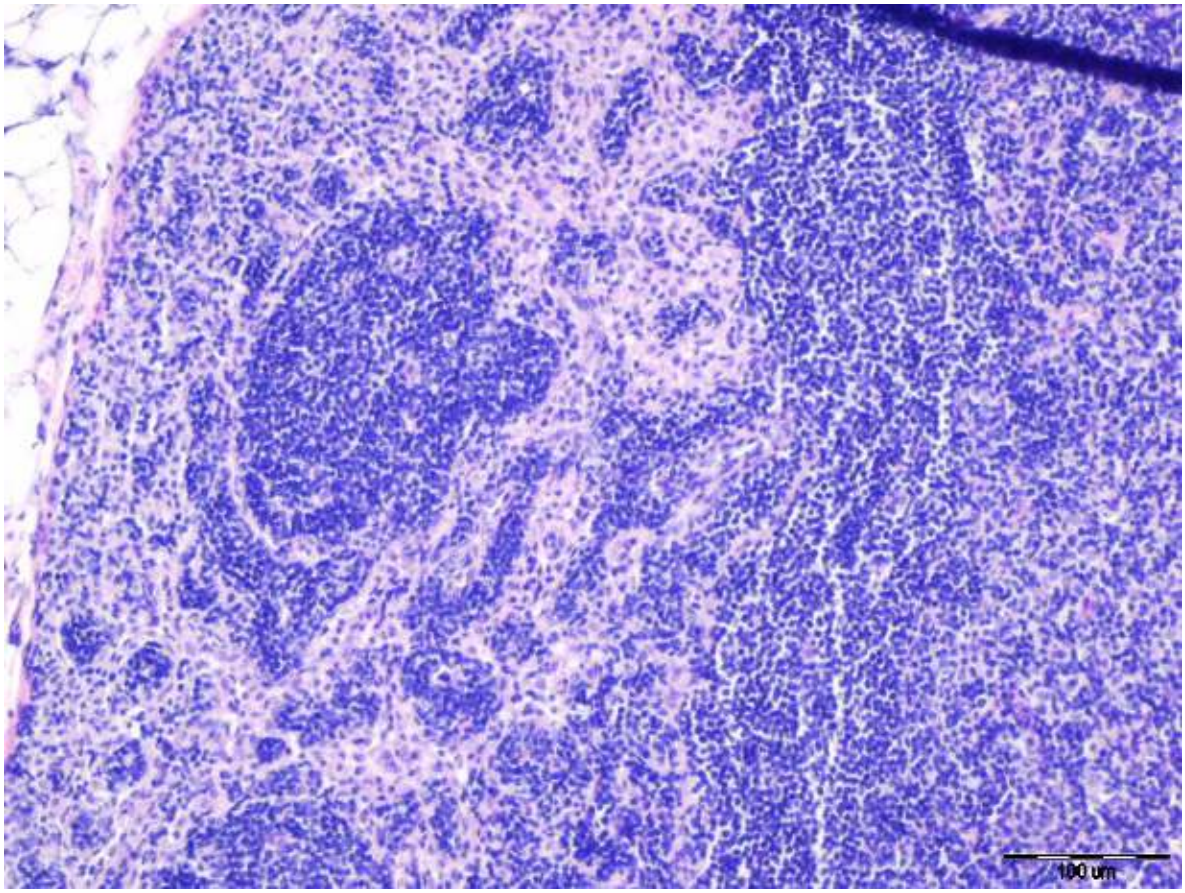
E4: **Light microscope picture of histological slice from animal in group C (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial) (Magnification 40x, H&E).**

V histoloških rezinah živali iz skupine C (priloga E4) so limfni folikli jasno vidni vendar so manjši kot v fiziološki bezgavki, kar govori za reakcijo medularnega tkiva bezgavke.



E5: **Svetlobno mikroskopski posnetek histološke rezine mezenterialne bezgavke živali skupine D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa) (Povečava 40x, H&E).**

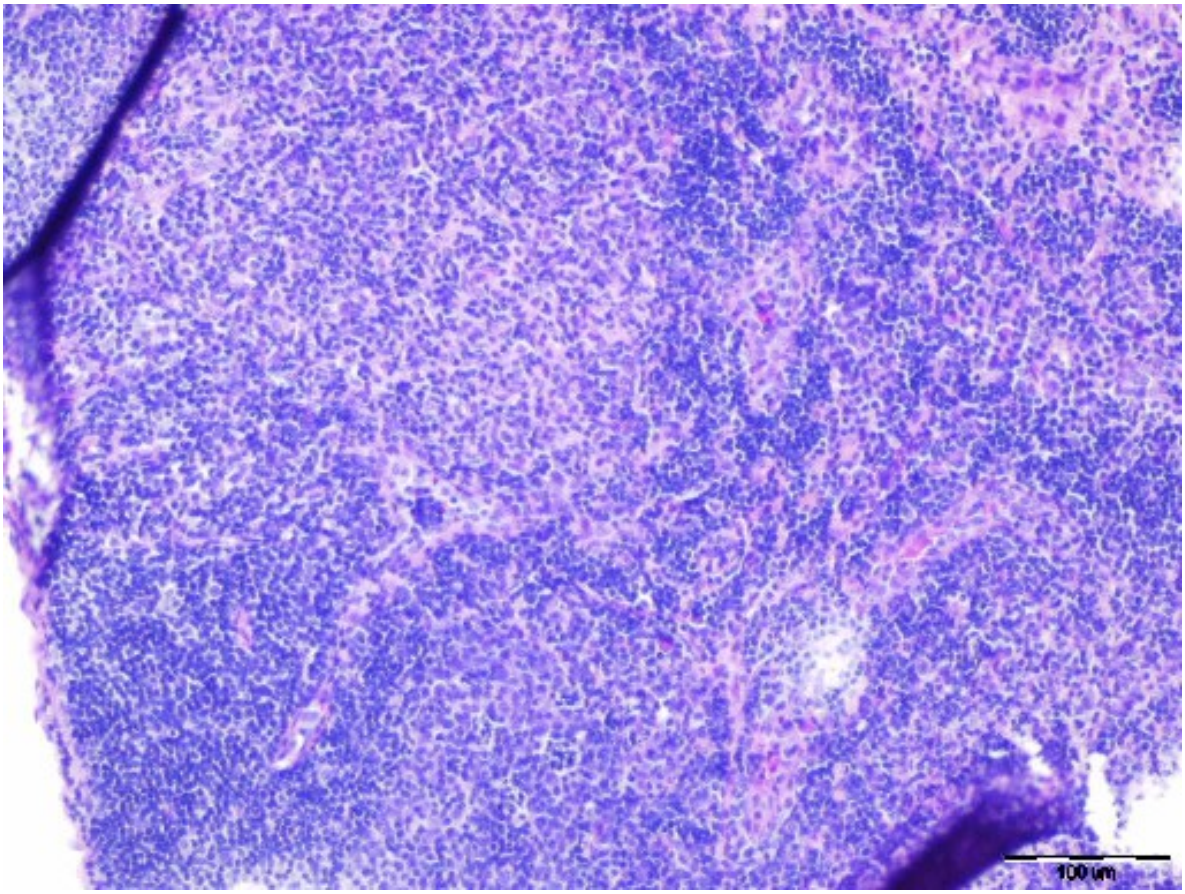
E5: **Light microscope picture of histological slice from animal in group D (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 15 of trial) (Magnification 40x, H&E).**



E6: **Svetlobno mikroskopski posnetek histološke rezine mezenterialne bezgavke živali skupine D (14-dnevna aplikacija K7 (Rif^r) in enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 15. dan poskusa) (Povečava 100x, H&E).**

E6: **Light microscope picture of histological slice from animal in group D (14 day application of K7 (Rif^r) and one application of *E. coli* O157:H7 on day 15 of trial) (Magnification 100x, H&E).**

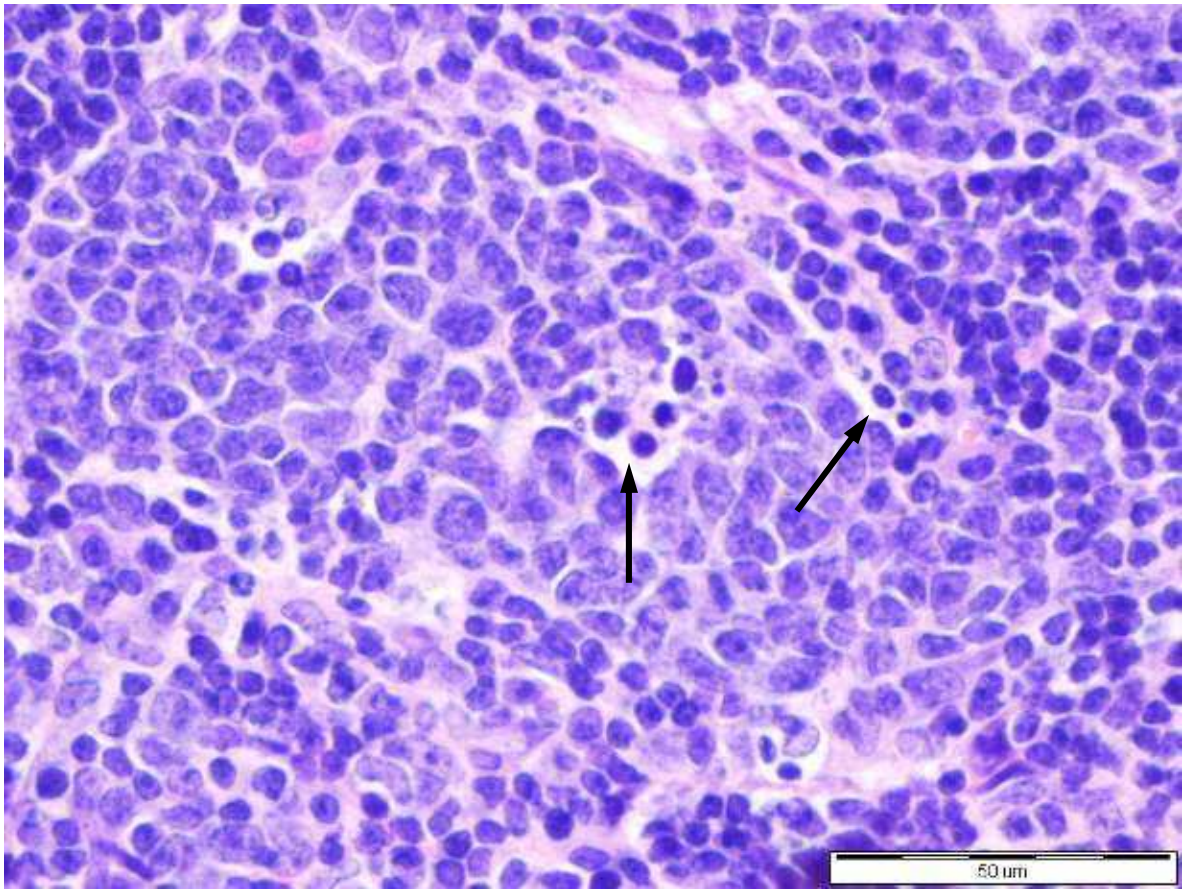
V histoloških rezinah živali skupine D (priloga E5 in E6) je opazna hiperplazija zrelih limfocitov, ki so še vedno na mestu, kjer so bili prej folikli. Tkivo daje izgled izpraznjene bezgavke.



E7: **Svetlobno mikroskopski posnetek histološke rezine mezenterialne bezgavke živali skupine E (enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa) (Povečava 100x, H&E).**

E7: **Light microscope picture of histological slice from animal in group E (application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial) (Magnification 100x, H&E).**

V histoloških rezinah živali skupine E (priloga E7) folikle še opazimo, vendar so precej prazni (meje med centralnim in skorjinim delom so zabrisane, zrelih limfocitov je manj. Opazna je limforetikularna hiperplazija.



E8: **Svetlobno mikroskopski posnetek histološke rezine mezenterialne bezgavke živali skupine E (enkratna aplikacija *E. coli* O157:H7 8. dan poskusa) (Povečava 400x, H&E).**

E8: **Light microscope picture of histological slice from animal in group E (application of *E. coli* O157:H7 on day 8 of trial) (Magnification 400x, H&E).**

V histoloških rezinah skupine E (priloga E8) je prisotno večje število fokalnih nekroz limfocitov (puščica), pri čemer prevladujejo fokusi z apoptotičnimi limfociti.