

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jovanka M. Lukić

**ANALIZA INTERAKCIJA LAKTOBACILA
SA CREVNOM MUKOZOM PACOVA**

doktorska disertacija

BEOGRAD, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jovanka M. Lukić

**ANALYSIS OF INTERACTIONS OF
LACTOBACILLI WITH RAT GUT MUCOSA**

doctoral dissertation

BELGRADE, 2013

MENTORI:

Dr Branko Jovčić, docent
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, mentor

Dr Jelena Begović, viši naučni saradnik,
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu
genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), mentor

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Ivana Strahinić, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu
genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI)

Dr Marina Milenković, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr Milan Kojić, viši naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za molekularnu
genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI)

Datum odbrane: _____

Kao deo istraživačkog tima Laboratorije za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama, IMGGI, zahvaljujem se članovima naše laboratorije koji su me prihvatili i podelili sa mnom uspehe i neuspehe svakodnevnog rada.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj mentorki Jeleni, koja mi je pomogla da se osamostalim u istraživačkom radu, imala puno poverenje u mene i povrh svega imala razumevanja za moje dileme i trenutke neizvesnosti koji su bili sastavni deo zajedničkih eksperimenata.

Podjednaku zahvalnost dugujem Ivani koja je sa mnom neumorno razrađivala ideje, imala strpljenja da me sasluša i nesebično mi ukazivala na sve pravilnosti i nepravilnosti u mom istraživačkom radu.

Zahvaljujem profesorki Marini koja je idejno doprinela u planiranju istraživanja, izlazila u susret svim novim predlozima i bez koje realizacija eksperimenata iz teze ne bi bila moguća.

Hvala Branku koji je za mene neformalno rešavao sve formalnosti i od početka održao profesionalan stav u zajedničkom istraživanju.

Zahvaljujem se Milanu koji me je ispratio na putu od diplomca entuzijaste do samostalnog istraživača i na koga se oslanjam kad god eksperimenti krenu neplaniranim tokom.

Hvala profesoru Ljubiši koji mi je omogućio da postanem član ovog tima, Nataši na istrajnosti u borbi za primenu naših istraživanja, Maji i Mici koje su me uvele u eksperimentalni svet IMGGI, Mariji na hrabroj odbrani mojih stavova i teritorije, Goranu na saosećajnosti u eksperimentalnim neuspesima koji ga razbesne više nego mene, Brankici koja ne prestaje da me inspiriše poslovno i više od toga, Jelki, Goci i Ewelini na neizmernoj iskrenosti, Katarini, Amareli i Nemanji na nesubjektivnom prihvatanju mojih subjektivnih stavova, profesoru Đorđu koji veruje u moje intelektualne sposobnosti, Sanji na korisnim sugestijama u poslovnoj organizaciji i maloj Katarini na eksperimentalnoj i moralnoj podršci u zajedničkim istraživanjima.

Beskrajno hvala Sneži koja me je upoznala sa naukom u IMGGI i Aleks 03 koja je uvek umela pozitivno da me iskritikuje. Hvala Mladenu koji se brinuo o mojoj bezbednosti i svim kolegama sa IMGGI koji su, deleći sa mnom hladne centrifuge, eksperimente činili još interesantnijim.

Celokupan uspeh i razvoj naučne karijere dugujem roditeljima, sestri i baki koji me bez izuzetka podržavaju u svakom segmentu privatnog i profesionalnog života.

Analiza interakcija laktobacila sa crevnom mukozom pacova

REZIME

Probiotici predstavljaju žive mikroorganizme koji, nakon unošenja u gastrointestinalni (GI) trakt, ostvaruju pozitivne efekte na zdravlje domaćina. Reakcija domaćina na unos probiotika u velikoj meri zavisi od sposobnosti bliske interakcije bakterija sa epitelnim ćelijama GI mukoze. S druge strane, s obzirom na nepoznatu antigenu prirodu unetih bakterija, kod imunokompromitovanog domaćina je prisutan rizik od imunske reakcije crevnog tkiva što može da dovede do narušavanja integriteta mukozne barijere i hronične inflamacije u GI traktu.

Cilj istraživanja bio je ispitivanje efekta soja *Lactobacillus fermentum* BGHI14, alohtonog za GI trakt pacova, nakon peroralnog unosa u zdrave pacove i u pacove sa kolitisom indukovanim TNBS-om (trinitrobenzensulfonat). Metodološki, u eksperimentima su praćeni: telesna masa pacova i ekspresija iRNK za parametre inflamacije (IL-1 β , TNF α , IL-17F), pokazatelje ćelijskog stresa (HSP70) i parametre uključene u održavanje integriteta mukoze (TJP1); zatim su rađene histološke i biohemijske analize i analiza sastava crevne mikroflore. Rezultati istraživanja su pokazali imunostimulišuće delovanje soja BGHI14 na nivou tkiva kolona nakon unosa u GI trakt zdravih pacova u prvih 16 dana peroralnog tretmana pacova. Iako se, histološki, sa produžetkom tretmana pacova sojem BGHI14 tokom narednih 12 dana, imunska reakcija u tkivu kolona povukla, nivoi iRNK za proinflamatorne IL-1 β i TNF α citokine ostali su povišeni što ukazuje na rizik od nekontrolisane inflamacije u slučaju naknadnog oštećenja epitelne barijere kolona.

U istraživanju je pokazano da je nakon imunostimulacije tkiva kolona sojem BGHI14, u slučaju indukcije kolitisa, ali uz nastavak tretmana sojem BGHI14 došlo do indukcije transkripcije iRNK za HSP70 protein, kako u ranoj (48 h) tako i u kasnoj (7 dana) akutnoj fazi kolitisa. Povećanje transkripcije *Hsp70* gena, sudeći po histološkim i inflamatornim pokazateljima, kao i promenama telesnih masa pacova tokom eksperimenta, nije bilo praćeno pozitivnim delovanjem soja. S druge strane, prestanak tretmana sojem BGHI14 nakon indukcije kolitisa doveo je do manje izraženog pada telesnih masa životinja u

poređenju sa kontrolnim pacovima sa kolitisom, iako bez pratećeg smanjenja inflamatorne reakcije u tkivu kolona, bar u kasnoj akutnoj fazi bolesti (sedam dana od indukcije). Na osnovu opisanog može se zaključiti da su se u interakciji soja BGHI14 sa zdravim tkivom kolona aktivirali mehanizmi adaptivne imunosti u vidu memorijskih T-limfocita koji su indukovani nakon povrede u slučaju kontinuiranog prisustva istog bakterijskog antigena. Nasuprot, terapijski tretman pacova sojem BGHI14 doveo je do pozitivnog efekta u kasnoj akutnoj fazi kolitisa ocenjujući po promenama telesnih masa životinja kao i na osnovu parametara oštećenja mukozne barijere kolona. Dobijeni rezultati ukazuju da bi primena imunostimulišućih probiotika neposredno po nastanku oštećenja crevnog tkiva predstavljala efikasan pristup u lečenju inflamatornih oboljenja crevnog trakta, iako su na ovu temu potrebna dodatna istraživanja.

S obzirom na značaj koji interakcija bakterija sa crevnom mukozom ima u ostvarivanju njihovog probiotičkog potencijala, u istraživanju su testirani mehanizmi kojima se može poboljšati vezivanje laktobacila kao potencijalnih probiotika za GI mukožu pacova. U tom smislu praćeni su efekti proteina sa mucin-vezujućim domenom (MbpL) poreklom iz soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20 na sposobnost vezivanja bakterijskog domaćina za mukožu ileuma i kolona u uslovima *ex vivo* i *in vivo*, kao i u *in vitro* esejima sa izolovanim želudačnim mucinom i mucin-produkujućim HT29-MTX ćelijama kolona. Osim homolognog domaćina, za funkcionalna ispitivanja korišćen je potencijalni probiotički soj *Lactobacillus salivarius* BGHO1. Rezultati su pokazali da eksprimirani MbpL protein nije bio dovoljan za vezivanje soja BGHO1 za crevnu mukožu, iako je pozitivno uticao na vezivanje BGKP1-20 soja za svinjski želudačni mucin i HT20-MTX ćelije u kulturi. Moguće je da je fenotipski efekat ekspresije MucBP proteina kod laktokokalnog BGKP1-20 soja veći u odnosu na BGHO1 soj, s obzirom na prisustvo drugih potencijalnih adhezivnih faktora koji se sintetišu u laktobacilima.

Koristeći istu metodologiju testirana je uloga koju u vezivanju za mukozne površine GI trakta ostvaruje agregacioni faktor AggL poreklom iz soja BGKP1-20. Agregacioni faktor eksprimiran na površini bakterijskih ćelija često se dovodi u vezu sa povećanim afinitetom bakterijskog domaćina za GI mukožu. Naši rezultati su pokazali da, iako bi, povećanjem površinske hidrofobnosti mogao doprineti vezivanju za površinu kolona kod laktokokalnih

sojeva sa niskom ukupnom hidrofobnošću površine, eksprimirani agregacioni faktor generalno otežava vezivanje bakterija za površine izložene dinamičkim peristaltičkim kontrakcijama kakva je u najvećoj meri površina ileuma. Na taj način bi sojevi koji sintetišu faktor agregacije mogli olakšati uklanjanje patogena ali bez sposobnosti ostvarivanja direktnog efekta na imunski sistem domaćina.

Ključne reči: mikroflora, laktobacili, mukoza, imuni odgovor, zapaljenje, adhezija, mucini, agregacija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija

UDK broj:

Analysis of interactions of lactobacilli with rat gut mucosa

SUMMARY

Probiotics are life microorganisms that, after administration in gastrointestinal (GI) tract, exert positive effects on host's health. Host reaction to probiotic administration largely depends on ability of bacteria to closely interact with epithelial cells of GI mucosa. On the other hand, considering the unknown antigenic nature of administered bacteria, in immune-compromised host there is a risk of immune reaction of gut tissue which could lead to disturbance of mucosal barrier integrity and chronic inflammation in GI tract.

The aim of the study was to examine the effects of the strain *Lactobacillus fermentum* BGHI14, which is autochthonous to GI tract of rats, after peroral administration in healthy rats and in rats with TNBS (trinitrobenzenesulfonate)-induced colitis. Methodologically, following parameters were examined in experiments: body masses of rats and expression of mRNA of inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α , IL-17F), as well as markers of cellular stress (HSP70) and barrier integrity maintenance (TJP1); next histological and biochemical analyses and microflora profiling were performed. Results of the study indicated immune-stimulating effects of BGHI14 in colon tissue after administration in GI tract of healthy rats in first 16 days of peroral treatment of rats. Although, histologically, with prolongation of BGHI14 treatment of rats for next 12 days, immune reaction in colon tissue had retreated, mRNA levels of proinflammatory IL-1 β and TNF α cytokines remained elevated which points to the risk of uncontrolled inflammation in the case of subsequent colon epithelial barrier damage.

In research it was shown that after immunostimulation of colon tissue with BGHI14, in the case of colitis induction, but with sequel of treatment with bacteria, transcription of *Hsp70* gene was induced, in early (48 h) as well as late (7 days) acute phase of colitis. The increase of *Hsp70* gene transcription, according to histological and inflammatory markers, as well as body mass changes during the experiment, was not followed by positive action of the strain. On the other hand, the cessation of treatment with BGHI14 after colitis induction had led to less pronounced body mass decrease compared to control colitic rats, but without

concomitant reduction in inflammatory scores in colon tissue, at least in late acute phase of disease (seven days from induction). Based on the above, it could be concluded that mechanisms of adaptive immunity including memory T-cells might have been activated during interaction of BGHI14 with healthy colon tissue and those systems were induced after the injury in the case of continuous presence of same bacterial antigen. Contrary, therapeutic treatment with BGHI14 had brought about the protection in late acute colitis phase according to body mass changes as well as indicators of mucosal barrier disruption. Obtained results implicate that use of immune-stimulating probiotics immediately after colon tissue damage would represent effective approach in treatment of bowel inflammatory diseases, though more detailed research is needed in this area.

Considering the importance of interaction of bacteria with gut mucosa in achieving its probiotic potential, in current research mechanisms for improvement of potential probiotic lactobacilli binding to rat's GI mucosa were tested. In this respect the effects of mucin-binding domain containing protein (MbpL) from strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20 in ability of bacterial host to bind to ileal and colonic mucosa *in vivo* and *ex vivo*, as well as in assays *in vitro* with isolated mucin and mucin-producing HT29-MTX colonic cells were tested. Aside from using the homologous host, for functional tests we have used potential probiotic strain *Lactobacillus salivarius* BGHO1. Results have demonstrated that the expression of MbpL protein was not sufficient for binding of BGHO1 to gut mucosa, although it influenced positively the binding of BGKP1-20 to pig gastric mucin and HT29-MTX cells in culture. It is possible that in lactococcal strain BGKP1-20, phenotypic effects of MucBP protein expression are more pronounced compared to BGHO1 strain, because of presence of other potential adhesion factors synthesized in lactobacilli strains.

Simultaneously, utilizing the same methodology, the role of aggregation factor AggL from BGKP1-20 in binding to GI tract mucosal surfaces was tested. Expression of aggregation factor is commonly correlated to enhanced affinity of bacterial host to GI mucosa. Our results have demonstrated that, although, by increasing surface hydrophobicity, in lactococcal strains it could contribute to binding to colonic surface, the expression of aggregation factor generally aggravates binding of bacteria to surfaces

exposed to dynamic peristaltic contractions such as those present in ileum. That way strains expressing aggregation factor could facilitate removal of pathogens but without directly affecting the host's immune system.

Keywords: microflora, lactobacilli, mucosa, immune response, inflammation, adhesion, mucins, aggregation

Scientific area: Biology

Narrow scientific area: Molecular biology

UDK number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1. 1. Mikroflora GI trakta sisara	1
1. 2. Simbionti i njihovi „susedi“	5
1. 3. Vezivanje simbionata za GI mukozu sisara	9
1. 4. Laktobacili kao probiotici	11
1. 5. Reakcija tkiva domaćina na prisustvo simbionata	12
1. 6. Zapaljenske bolesti creva	17
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	22
3. MATERIJALI I METODE	24
3. 1. Bakterijski sojevi, životinje i prajmeri korišćeni u istraživanju	24
3. 1. 1. Bakterijski sojevi.....	24
3. 1. 2. Eksperimentalne životinje.....	25
3. 1. 3. Prajmeri.....	25
3. 1. 4. Statistička obrada i predstavljanje rezultata.....	26
3. 2. Reakcija tkiva kolona pacova na unos soja <i>Lactobacillus fermentum</i> BGHI14	28
3. 2. 1. Dizajn istraživanja.....	28
3. 2. 2. DGGE (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> , elektroforeza u gradijentu denaturišućeg agensa) analiza.....	31
3. 2. 3. Sekvenciranje DGGE traka.....	32
3. 2. 4. Histološka obrada tkiva.....	33
3. 2. 5. Esej lipidne peroksidacije.....	34
3. 2. 6. Izolacija RNK iz tkiva.....	35
3. 2. 7. Kvantitativni PCR (qPCR).....	36
3. 3. Uloga MbpL i AggL proteina u vezivanju laktobacila za GI mukozu pacova	37
3. 3. 1. Transfomacija bakterijskih ćelija.....	37
3. 3. 2. Izolacija RNK iz bakterijskih ćelija i RT-PCR.....	40

3. 3. 3. Određivanje afiniteta bakterijskih ćelija za organske rastvarače.....	41
3. 3. 4. Test vezivanja bakterijskih ćelija za svinjski želudačni mucin <i>in vitro</i>	42
3. 3. 5. Test vezivanja bakterijskih ćelija za HT29-MTX ćelije <i>in vitro</i>	43
3. 3. 6. Test vezivanja bakterijskih ćelija za isečke creva <i>ex vivo</i>	44
3. 3. 7. Test vezivanja bakterijskih ćelija za crevnu mukozu <i>in vivo</i>	45
4. REZULTATI	47
4. 1. Reakcija tkiva kolona pacova na unos soja	
<i>Lactobacillus fermentum</i> BGHI14	47
4. 1. 1. Odgovor tkiva kolona zdravih pacova na tretman sojem BGHI14 i optimizacija uslova za indukciju kolitisa.....	47
4. 1. 1. 1. Promena telesnih masa pacova tokom eksperimenta.....	47
4. 1. 1. 2. Detekcija soja BGHI14 u sadržaju ileuma pacova.....	47
4. 1. 1. 3. Histološka analiza tkiva kolona pacova.....	48
4. 1. 1. 4. Transkripcija gena u tkivu kolona pacova.....	49
4. 1. 2. Uticaj različitih vremenskih režima tretmana sojem BGHI14 na intenzitet oštećenja tkiva kolona pacova nakon indukcije kolitisa.....	54
4. 1. 2. 1. Promena telesnih masa pacova tokom eksperimenta.....	54
4. 1. 2. 2. DGGE profili mikroflore sadržaja kolona pacova.....	54
4. 1. 2. 3. Makroskopska analiza kolona pacova.....	55
4. 1. 2. 4. Histološka analiza tkiva kolona pacova.....	55
4. 1. 2. 5. Step en lipidne peroksidacije u tkivu kolona pacova.....	56
4. 1. 2. 6. Transkripcija gena u tkivu kolona pacova.....	56
4. 2. Uloga MbpL i AggL proteina u vezivanju laktobacila za GI mukozu pacova	64
4. 2. 1. Funkcionalna analiza u soju <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGKP1-20.....	64
4. 2. 1. 1. Afinitet BGKP1-20 derivata za heksadekan	64
4. 2. 1. 2. Vezivanje BGKP1-20 derivata za svinjski želudačni mucin <i>in vitro</i>	64
4. 2. 1. 3. Vezivanje BGKP1-20 derivata za HT29-MTX ćelije <i>in vitro</i>	64

4. 2. 1. 4. Vezivanje BGKP1-20 derivata za isečke tkiva ileuma i kolona pacova <i>ex vivo</i>	65
4. 2. 1. 5. Vezivanje BGKP1-20 derivata za tkivo ileuma i kolona pacova <i>in vivo</i>	65
4. 2. 2. Funkcionalna analiza u soju <i>Lactobacillus salivarius</i> BGHO1.....	69
4. 2. 2. 1. Transformacija soja BGHO1.....	69
4. 2. 2. 2. RT-PCR analiza ekspresije iRNK za MbpL i AggL proteine u derivatima BGHO1.....	69
4. 2. 2. 3. Afinitet BGHO1 derivata za organske rastvarače.....	70
4. 2. 2. 4. Vezivanje BGHO1 derivata za svinjski želudačni mucin <i>in vitro</i>	70
4. 2. 2. 5. Vezivanje BGHO1 derivata za HT29-MTX ćelije <i>in vitro</i>	70
4. 2. 2. 6. Vezivanje BGHO1 derivata za isečke tkiva ileuma i kolona pacova <i>ex vivo</i>	71
4. 2. 2. 7. Promena telesnih masa pacova tokom tretmana derivatima BGHO1.....	71
4. 2. 2. 8. Vezivanje BGHO1 derivata za tkivo ileuma i kolona pacova <i>in vivo</i>	71
5. DISKUSIJA	77
5. 1. Reakcija tkiva pacova na unošenje soja BGHI14	77
5. 1. 1. Implikacija dobijenih rezultata u primeni laktobacila kao probiotika.....	89
5. 2. Uloga MbpL i AggL proteina u vezivanju laktobacila za GI mukozu pacova	93
6. ZAKLJUČCI	102
6. 1. Reakcija tkiva kolona pacova na peroralni unos soja <i>Lactobacillus fermentum</i> BGHI14	102
6. 2. Uloga MbpL i AggL proteina u vezivanju bakterija za crevnu mukozu pacova	103
7. LITERATURA	105
8. PRILOZI	128
9. BIOGRAFIJA AUTORA	132

1. UVOD

Od trenutka evolutivnog postanka, sisari su bili okruženi mikroorganizmima kao filogenetski starijim i brojnijim stanovnicima planete, koji su, kako bi osigurali opstanak, razvili niz mehanizama da bi se, s jedne strane zaštitili i, s druge strane, iskoristili novonastale eukariotske susede (Hooper, 2009). Tako su pojedini mikroorganizmi, sa izuzetkom patogena, formirali mikrobne zajednice na koži i mukoznim površinama sisara, stupajući u simbiotski odnos sa domaćinom. Zajednica bakterija na određenoj anatomske lokalizaciji sačinjava mikrofloru, a mikroorganizmi koji su stalno prisutni u takvoj mikroflori čine „urođenu“ ili domaću mikrofloru. Mikrofloru čoveka čine mikroorganizmi prisutni na površini kože i mukoznim površinama uključujući gastrointestinalni (GI), respiratorni i urogenitalni (UG) trakt. S obzirom na veličinu i raznovrsnost, uticaj koji GI mikroflora ostvaruje na domaćina daleko prevazilazi uticaj svih ostalih mikrobnih zajednica organizma. Glavni regioni GI trakta uključuju usnu duplju, ždrelo, jednjak, želudac, tanko (duodenum, jejunum i ileum) i debelo crevo (cekum, kolon i rektum). Sa izuzetkom usne duplje, ostali delovi GI trakta imaju specifičan oblik tube što rezultira postojanjem lumena koji može biti ispunjen hranljivim materijama, što pogoduje rastu mikroorganizama (Wilson, 2005).

1. 1. Mikroflora GI trakta sisara

“We are all of us walking communities of bacteria” - Lynn Margulis

Filogenetski, predstavnici tipova *Firmicutes* i *Bacteroidetes* čine dominantnu mikrofloru GI trakta kičmenjaka. Intestinalne *Firmicutes* su Gram-pozitivne bakterije, najčešće iz klase *Clostridia* i familija *Enterococcaceae* i *Lactobacillaceae*. Intestinalne *Bacteroidetes* su Gram-negativne bakterije uglavnom sačinjene od vrsta *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides fragilis* i *Bacteroides ovatus*. Preostali intestinalni mikroorganizmi čine manje od 10% ukupne mikrobne zajednice i pripadaju tipovima *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* i *Spirochaetes* (Hooper i Macpherson, 2010).

Populacija mikroorganizama najveća je u distalnom delu GI trakta s obzirom na odsustvo antimikrobnih mehanizama domaćina među kojima su najvažniji digestivni enzimi, žučne soli i crevna peristaltika (Walter, 2008). Tako je prvo mesto fiziološki relevantne kolonizacije bakterija ileum (Kosin i Rakshit, 2006). Gustina mikroflore povećava se od želuca i proksimalnog dela tankog creva sa manje od 10^5 bakterijskih ćelija koje formiraju kolonije (CFU, Colony-Forming Units)/ml sadržaja, do distalnog ileuma i debelog creva gde dostiže gustinu od oko $10^{11} - 10^{12}$ CFU/g sadržaja (Isolauri i saradnici, 2001). Broj mikroorganizama u debelom crevu deset puta je veći u odnosu na ukupan broj svih somatskih i germinativnih ćelija domaćina (Van den Abbeele i saradnici, 2011).

Crevna mikroflora odraslog čoveka razlikuje se od mikroflore novorođenčeta u kojoj dominiraju bifidobakterije (koje pripadaju tipu *Actinobacteria*) i laktobacili poreklom iz mleka i/ili vaginalnog trakta majke. Prelaskom na normalnu ishranu i unosom čvrste hrane, do tada prisutne vrste bivaju potisnute predstavnicima rodova *Bacteroides* i *Clostridia* (Langhendries, 2005). Tokom postepene kolonizacije GI trakta novorođenčeta, ekološke niše bivaju naseljene dobro prilagođenim bakterijama poreklom iz spoljne sredine. S obzirom na to, svaki novouneti mikroorganizam teško može istisnuti već postojeće bakterije iz njihovih ekoloških niša. Opisani fenomen označava se kao kompetitivno isključenje i odnosi se na pojavu da je kvalitativni i kvantitativni sastav GI mikroflore relativno stabilan u normalnim okolnostima (Walter, 2008).

Pokazano je da među mikroorganizmima blisko povezanim sa epitelom (MAMC, Mucosa-Associated Microbial Community), kod čoveka najznačajnije mesto zauzimaju laktobacili i predstavnici roda *Bacteroides*, kako u tankom tako i u debelom crevu (Ahmed i saradnici, 2007). Laktobacili pripadaju grupi bakterija mlečne kiseline (BMK). BMK predstavljaju Gram-pozitivne, nesporulišuće mikroorganizme, i mogu se javiti u obliku koka (loptaste) ili bacila (štapićaste). Gram-pozitivne bakterije se, u odnosu na procenat GC-parova u genomu, dele na dve grupe: tip *Actinobacteria* (koji, između ostalih, uključuje rod *Bifidobacterium*) (preko 50% sadržaja GC-parova) i tip *Firmicutes* (uključuje rodove *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Clostridium*, itd.) (ispod 50% sadržaja GC-parova) (Forsythe, 2010; Von Wright i Axelsson, 2012). BMK spadaju u katalaza-negativne, hemo-organotrofne mikroorganizme koji koriste ugljene hidrate kao

izvore energije. Metabolički se dele na homo- i heterofermentativne BMK. Homofermentativni metabolički put baziran je na glikolizi gde se kao krajnji produkt dobija samo mlečna kiselina. Alternativno, heterofermentativne bakterije koriste pentozo-fosfoketolazni put kojim se kao krajnji produkti dobijaju mlečna kiselina, ugljen-dioksid i etanol ili sirćetna kiselina. Rodovi *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Weissella* kao i pripadnici roda *Lactobacillus* grupe III (*Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*, *Lb. buchneri*) spadaju u obligatne heterofermentativne BMK. U obligatno homofermentativne BMK spadaju laktobacili iz grupe I (*Lb. salivarius*, *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii*). Fakultativno heterofermentativni laktobacili iz grupe II (*Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*) i sve ostale BMK, heksoze fermentišu glikolitičkim putem, a pentoze pentozo-fosfoketolazni putem.

S obzirom na ograničen kapacitet sinteze amino-kiselina, većina BMK poseduje dobro razvijen proteolitički sistem. Proteolitički sistem im omogućava hidrolizu proteina i peptida iz medijuma u cilju dobijanja esencijalnih amino-kiselina (*Von Wright i Axelsson, 2012*).

Laktobacili predstavljaju aerotolerantne BMK koje su pronađene u svim sredinama gde postoje dostupni ugljeni hidrati, kao što su fermentisani proizvodi od mleka, mesa, voća i povrća, alkoholna pića, biljni materijal, GI, respiratorni i UG trakt sisara. Rod *Lactobacillus* broji preko 100 različitih vrsta i pripada domenu *Bacteria*, tipu *Firmicutes*, klasi *Bacilli*, redu *Lactobacillales*, familiji *Lactobacillaceae* (*Dellaglio i Felis, 2005*).

Iako se BMK opisuju kao katalaza negativne, u nekim laktobacilima je pokazano prisustvo katalaza, što, uz druge sisteme antioksidativne zaštite, ove mikroorganizme svrstava u aerotolerantne anaerobe (*Peacock, 2008; Kang i saradnici, 2013*). Opisane su i aerobne BMK sa elektron-transportnim lancem koje koriste hem kao kofaktor citohromskih kompleksa; primer takve BMK često korišćene u kloniranju i ekspresiji heterolognih proteina je vrsta *Lactococcus lactis* (*Lechardeur i saradnici, 2011*).

Potvrđeno je da su laktobacili najdominantniji mikroorganizmi u ileumu čoveka (*Hayashi i saradnici, 2005*). Istraživanja iz druge polovine prošlog veka ukazala su na vrste laktobacila koje su dominantne u GI traktu čoveka. Pri tom, vrste koje u GI traktu opstaju duži vremenski period označene su kao autohtone dok vrste koje su privremeni kolonizatori crevnog trakta i unose se iz spoljne sredine putem hrane predstavljaju alohtone laktobacile.

Tako je primećeno da među laktobacilima koji duži vremenski period opstaju u GI traktu čoveka spadaju: *Lb. crispatus*, *Lb. gasseri*, *Lb. ruminis*, *Lb. salivarius* i *Lb. reuteri*. Sa izuzetkom *Lb. reuteri*, ostale nabrojane vrste su široko rasprostranjene u hrani i/ili su prisutne u oralnoj duplji tako da je teško utvrditi da li su alohtone ili autohtone za intestinalni trakt. Kao jedini eventualni kandidat za autohtonog laktobacila iz navedene studije proizilazi *Lb. reuteri* s obzirom da njegovo prisustvo nije pokazano u usnoj duplji i da je prisutan samo u specifičnim vrstama hrane (Walter, 2008). Slično, Zoetendal i saradnici (2002) su pokazali da među laktobacilusnom mikroflorom kod čoveka dominira vrsta *Lb. reuteri*, kako među mikroorganizmima blisko vezanim za mukoza tako i u sadržaju kolona. Kod pacova je pokazano da među laktobacilusnom mikroflorom sadržaja creva dominira vrsta *Lb. gasseri* (Walter, 2008).

Predstavnici roda *Bacteroides* imaju visoko razvijen glikobiom sa funkcijom razgradnje luminalnih biljnih polisaharida koji dospevaju nerazgrađeni do debelog creva. U ovim najdominantnijim humanim simbiotima identifikovani su kompletni katabolički putevi za sintezu amino-kiselina, nukleotida i određenih vitamina. S druge strane, laktobacili za rast zahtevaju amino-kiseline, peptide, derivate nukleinskih kiselina, vitamine, soli, estre masnih kiselina i imaju veoma ograničene sposobnosti korišćenja složenih polisaharida. S obzirom na opisani stepen „izbirljivosti“ nameće se pitanje na koji način laktobacili uspevaju da opstanu kao autohtone vrste GI trakta sisara. Postoje pretpostavke da laktobacili imaju sposobnost korišćenja prebiotskih oligosaharida čime obezbeđuju energiju za razmnožavanje i rast. Dodatni faktori koji pogoduju opstanku laktobacila bili bi faktori adhezije za epitelne ćelije i komponente mukusa, zatim metabolizam azotovih oksida poreklom iz fagocita, proteolitička degradacija sekretovanih imunoglobulina, reparacija oksidativno oštećenih proteina ili sinteza vanćelijskih polisaharida. Pokazano je da isti ti faktori mogu da budu važan element invazivnosti patogena (Walter, 2008). U prilog tome, opisani su slučajevi sepse izazvani primenom laktobacila kod imunodeficientnih pacijenata (Boyle i saradnici, 2006; Land i saradnici, 2005).

Savremeni način života podrazumeva sve manju izloženost mikroorganizmima od ranog detinjstva što dovodi do predispozicije za pojavu alergija, veću podložnost infekcijama i

nastanak inflamatornih oboljenja (*Björkstén* i saradnici, 2001; *Molodecky* i *Kaplan*, 2010). Ovakav koncept čini osnovu tzv. higijenske hipoteze, a ukazuje na značaj koji crevna mikroflora ima u razvoju odbrambenih mehanizama domaćina (*Molodecky* i *Kaplan*, 2010). Veliki broj istraživanja potvrdio je uticaj koji mikroflora ima u održavanju homeostaze GI mukoze, a disbalans u sastavu GI mikroflore povezuje se sa poremećajima u funkcionisanju GI trakta (*Wlodarska* i saradnici, 2011; *Hoffmann* i saradnici, 2010). Stoga pristupi kojima bi se regulisao sastav mikroflore postaju od rastućeg značaja u savremenoj medicini. Tako se dolazi do koncepta probiotika koji predstavljaju žive mikroorganizme čijim se unošenjem u određenoj količini ostvaruju pozitivni efekti na zdravlje domaćina (*Kechagia* i saradnici, 2013). Tretman probioticima ima za cilj da povrati ili održi ravnotežu u sastavu GI mikroflore, i time očuva homeostazu na nivou GI mukoze. Probiotici često predstavljaju izolate iz GI trakta čoveka (*Walter*, 2008). Stoga je delovanje probiotika u velikoj meri slično delovanju postojećih simbionata na tkivo GI mukoze. Za objašnjenje efekta probiotika potrebno je temeljno razumevanje ponašanja i interakcije simbionata sa GI traktom domaćina.

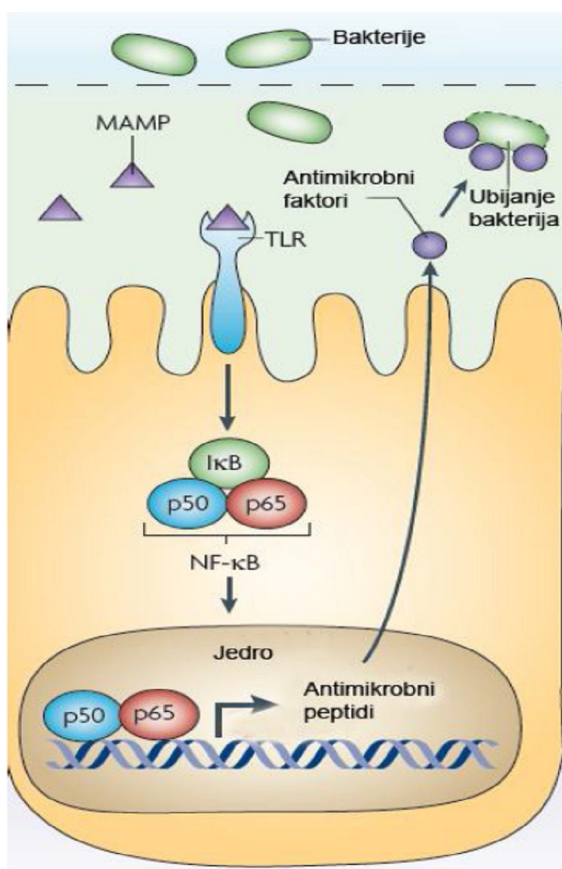
1. 2. Simbionti i njihovi „susedi“

„Good fences make good neighbors“ - Robert Frost

Ogromna apsorptivna površina GI trakta (kod čoveka oko 200 m²) čini ovaj organ naročito izloženim negativnim faktorima spoljne sredine kao što su toksini i potencijalni patogeni. Dodatno, obilje hranljivih materija prisutnih u GI traktu omogućava rast i umnožavanje širokog dijapazona bakterijskih vrsta uključujući i patogene (*Hooper* i *Macpherson*, 2010).

Simbiontske bakterije su se, kako bi osigurale opstanak u GI traktu, prilagodile antimikrobnim mehanizmima domaćina. Šta više, sve veći broj podataka govori u prilog činjenici da simbiontski mikroorganizmi podstiču antimikrobne sisteme domaćina čime regulišu sopstveni rast i brojnost (Slika 1). Na taj način ove bakterije štite domaćina, jer bi njihovo nekontrolisano umnožavanje, bez obzira što ne poseduju faktore virulencije, moglo dovesti do prodiranja bakterija u intestinalno tkivo, do nekontrolisane imunske reakcije

intestinalnog tkiva, do sistemske bakteremije i sepse. Krajnji ishod bila bi smrt domaćina, čime bi ekološka niša ovih bakterija bila narušena. Uspostavljanjem negativne povratne sprege u kojoj simbiotski mikroorganizmi kontrolišu sopstvenu brojnost povećavajući efikasnost GI barijere, domaćinu pruža dodatne prednosti, u smislu otpornosti na eventualno unošenje patogena ili toksina. Nasuprot nepatogenim simbiotima, patogeni mikroorganizmi poseduju faktore virulencije kojima mogu prevazići zaštitne sisteme crevnog tkiva domaćina, i narušiti integritet i homeostazu GI barijere (Hooper, 2009).



Slika 1. Jedan od mogućih mehanizama kojim simbionti aktivacijom receptora na epitelnim ćelijama tkiva creva indukuju dozno-zavisnu sintezu antimikrobnih molekula.

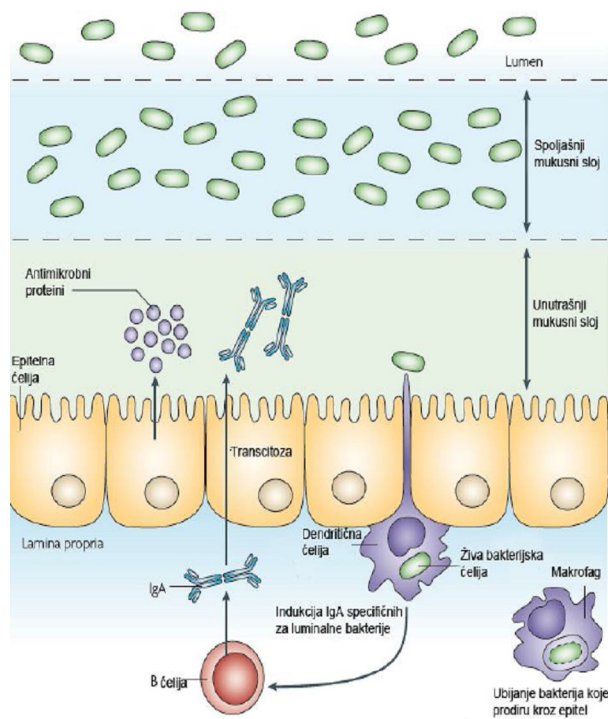
(Hooper, 2009)

Prisustvo simbionata neophodno je za pravilan razvoj i funkcionisanje GI barijere domaćina. Tako je postnatalni razvoj limfoidnih struktura crevnog trakta zavisan od

prisustva simbionata. Crevna mikroflora stimuliše imunski sistem domaćina, kako lokalno, na nivou intestinalnog tkiva, tako i sistemski, u cirkulaciji (*Kamada i saradnici, 2013*). Istovremeno, u odraslom organizmu, prisustvo mikroflore je značajno sa aspekta održavanja fizičkog integriteta s obzirom da odsustvo mikroflore čini eksperimentalne životinje podložnijim hemijskom oštećenju intestinalne barijere i crevnim infekcijama (*Sommer i Bäckhed, 2013*).

Od ulaska u GI trakt, mikroorganizmi se suočavaju sa nizom antimikrobnih sistema domaćina. U usnoj duplji, najvažniji antimikrobni mehanizmi su sekrecija antimikrobnih peptida (AMP), laktoferina, sekretornih imunoglobulina A (sIgA) kao i brz protok tečnosti, čime se ograničava adhezija bakterija za oralnu mukozu. Nakon napuštanja usne duplje, mikroorganizmi se suočavaju sa niskom pH vrednošću želudačnog soka i hidrolitičkom aktivnošću pepsina, dok su u proksimalnom delu tankog creva izloženi, kako digestivnim enzimima, tako i saponificirajućem dejstvu žučnih soli, koji predstavljaju luminalne antimikrobne mehanizme domaćina. Još jedan važan antimikrobni mehanizam je peristaltika creva koja je intenzivna u tankom crevu, gde je vreme zadržavanja hrane 2-6 h kod čoveka, a smanjuje se u debelom crevu gde je vreme zadržavanja sadržaja 48-70 h (*Van den Abbeele i saradnici, 2011*).

Zaštita koju mukozna barijera GI trakta obezbeđuje domaćinu opisuje se kao fizička, hemijska i imunološka (Slika 2). Pored sloja epitelnih ćelija, fizičkoj zaštiti doprinosi i sloj mukusa, koga luče peharaste ćelije i koji prekriva površinu epitela. Hemijsku barijeru čine AMP molekuli koji se sintetišu od strane epitelnih i Panetovih ćelija (*Sommer i Bäckhed, 2013*). Imunološku barijeru GI trakta prvenstveno čini sIgA koji oblaže i neutrališe luminalne bakterijske antigene. U slučaju da nabrojani sistemi odbrane nisu dovoljno efikasni, dodatnu imunološku barijeru čine subepitelni limfociti i fagociti, uključujući dendritične ćelije i makrofage (*Yu i saradnici, 2012*). Dendritične ćelije uzorkuju bakterijske antigene indukujući proizvodnju specifičnih imunoglobulina. Makrofagi reaguju u slučaju probijanja epitelnog sloja dovodeći do uklanjanja potencijalno opasnih bakterija i eventualne indukcije adaptivnog imunskog odgovora (*Hooper, 2009; Yu i saradnici, 2012*).



Slika 2. Barijere GI trakta. Fizičku barijeru čini mukusni sloj i čvrsto povezane epitelne ćelije. Hemijsku barijeru čine AMP molekuli. Imunološku barijeru na prvom mestu čine dendritične ćelije i makrofagi. Modifikovano iz publikacije *Hooper* (2009)

Sloj mukusa koji pokriva entero/kolonocite je među prvim odbrambenim sistemima sa kojim se suočavaju intestinalni mikroorganizmi. Osnovni gradivni element mukusa su mucinski glikoproteini koji mukusu daju želatinoznu konzistenciju što otežava „difundovanje“ čestičnih antigena iz lumena ka sloju epitelnih ćelija i tako, u sadejstvu sa peristaltikom creva, učestvuje u ljuštenju „zalepljenih“ mikroorganizama sa površine epitela (*Van Tassell i Miller, 2011; Sommer i Bäckhed, 2013*). Kod čoveka je opisan 21 gen koji kodira za mucinske proteine, koji mogu biti bilo sekretorni ili membranski a, u zavisnosti od tipa glikozilacije, prisutni su kao neutralni ili kiseli mucini. Razlike u tipu glikozilacije odgovorne su za regionalne različitosti mucina; tako se mucini GI trakta razlikuju od respiratornih kao i od mucina prisutnih u UG traktu ili pljuvačnim žlezdama (*Van Tassell i Miller, 2011*). Mukus, pored uloge u sprečavanju prodora mikroorganizama ka epitelnom sloju, omogućava delovanje drugih antimikrobnih faktora, uključujući AMP

molekule i sIgA. Sloj mukusa koncentriše AMP molekule i sIgA u neposrednoj blizini epitela gde formiraju hemijsku i imunološku barijeru koja sprečava umnožavanje mikroorganizama. Na taj način se, zahvaljujući mukusu, u neposrednoj blizini epitela formira sloj koji obuhvata višestruke zaštitne mehanizme i koji, kao takav, omogućava rigoroznu selekciju mikroorganizama koji stupaju u kontakt sa tkivom domaćina. Tako nastaje populacija MAMC mikroorganizama. U uslovima homeostaze broj mikroorganizama u neposrednoj blizini epitela više od deset puta je manji od broja luminalnih mikroorganizama (*Van den Abbeele, 2011*).

Pretpostavlja se da je jedan od razloga za strogu selekciju MAMC mikroorganizama njihova bliska interakcija sa epitelnim i imunskim sistemom koja ostvaruje neposredan uticaj na funkcionisanje i fiziologiju GI trakta domaćina a, prema mnogim podacima, i drugih organa van GI sistema (*Sommer i Bäckhed, 2013*). Nameće se da je poznavanje odgovora GI mukoze na prisustvo simbionata elementarno u interpretaciji fizioloških i patoloških efekata crevne mikroflore na domaćina.

1. 3. Vezivanje simbionata za GI mukožu sisara

“When goods don’t cross borders, soldiers will” - Frederic Bastiat

Prilazak simbiotskih mikroorganizama sloju epitelnih ćelija ključan je za ostvarivanje interakcije sa domaćinom i održavanje homeostaze GI trakta. Pored toga, bliskom asocijacijom sa epitelnim ćelijama, simbiotski mikroorganizmi otežavaju vezivanje i dalji prodor patogena. Stoga se kao jedan od glavnih kriterijuma za selekciju probiotika navodi sposobnost adhezije za crevnu mukožu, koja može uključivati vezivanje za epitelne ćelije, za mukus ili za komponente vanćelijskog matriksa (ECM, *Extra Cellular Matrix*). Laktobacili poseduju niz adhezina koji se u odnosu na strukturu i poziciju na bakterijskoj ćeliji, ciljne elemente GI mukoze i mehanizam ukotvljavanja na površini bakterija dele na: mucin/mukus vezujuće proteine, površinske (S-layer, *Surface layer*) proteine, sortaza-zavisne proteine, proteine uključene u vezivanje za ECM i neproteinske adhezine (lipoteihoična kiselina i egzopolisaharidi) (*Sengupta i saradnici, 2013*).

Najčešće ispitivani adhezini laktobacila sa ulogom u vezivanju za mukus su proteini koji sadrže ponovljene funkcionalne domene označene kao mukus-vezujući (MUB, *MUCUS-Binding*) domeni, dužine 100-200 amino-kiselina. MUB domen je svrstan u familiju mucin-vezujućih proteinskih (MucBP, *Mucin-Binding Protein*) domena, koji imaju oko 50 amino-kiselina i njihova je uključenost u vezivanje za mucin predviđena samo bioinformatički (Punta i saradnici, 2012). Prisustvo sekvenci koje kodiraju za MucBP domen pokazano je u genomima velikog broja laktobacila uključujući *Lb. acidophilus*, *Lb. reuteri*, *Lb. fermentum*, *Lb. salivarius*, *Lb. gasseri*, *Lb. plantarum*, i drugi (Van Tassell i Miller, 2011). Osim u laktobacilima, MucBP domen prisutan je i kod predstavnika rodova *Listeria*, *Streptococcus* i *Lactococcus* (Punta i saradnici, 2012). Uloga MucBP domena je pokazana kod patogenog soja *Streptococcus pneumoniae* u *in vitro* esejima sa prečišćenim želudačnim mucinom i epitelnim ćelijama respiratornog trakta (Du i saradnici, 2011). Proteini sa MUB domenom do sada su pronađeni samo kod laktobacila i njihova uloga u vezivanju za mukus pokazana je u nekoliko nezavisnih istraživanja, npr. kod *Lb. rhamnosus*, kod *Lb. reuteri*, ili, bar potencijalno, kod *Lb. plantarum* (Boekhorst i saradnici, 2006; MacKenzie i saradnici, 2010; Von Ossowski i saradnici, 2011). Neki od opisanih proteina sa okarakterisanim MUB domenom su Mub protein iz *Lb. reuteri*, Msa protein iz *Lb. plantarum* i 32-Mmubp iz *Lb. fermentum* (Sengupta i saradnici, 2013).

Još jedan od faktora koji se dovodi u vezu sa adhezijom BMK za crevnu mukoza je faktor uključen u agregaciju, fenomen koji pojedinim bakterijama omogućava da se međusobno udružuju u aggregate (Kojic i saradnici, 2011). U kontekstu adhezije, agregacija deluje kao poželjno svojstvo s obzirom da bi agregirajući sojevi mogli formirati fizičku barijeru koja bi sa visokom efikasnošću sprečavala kolonizaciju patogena (Goh i Klaenhammer, 2010). Iako domen odgovoran za agregaciju nije poznat, uloga autoagregacionog fenotipa testirana je u *in vitro* sistemima na epitelnim ćelijskim linijama, a pokazano je i da doprinosi pojačanoj kolonizaciji GI trakta eksperimentalnih životinja (Voltan i saradnici, 2007; Malik i saradnici, 2013, Tuo i saradnici, 2013). Šta više, proteini odgovorni za vezivanje za mucin/mukus često se povezuju sa autoagregacijom (transaldolaza, glukoziltransferaza, inulolsukraza) (Walter i saradnici, 2008; González-Rodríguez i saradnici, 2012).

Imajući u vidu kompleksnost sastava bakterijske površine kao i veliku raznovrsnost mikroorganizama, spisak navedenih adhezivnih faktora nije potpun. Dodatna ispitivanja su neophodna u cilju potpunijeg definisanja interakcije laktobacila sa GI mukozom domaćina.

1. 4. Laktobacili kao probiotici

„Let food be thy medicine and medicine be thy food“ - Hippocrates

Najčešće korišćeni probiotički sojevi mikroorganizama pripadaju vrstama iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacteria* (Isolauri i saradnici, 2001). Jedan od razloga za široku primenu laktobacila kao probiotika jesu poželjne karakteristike koje omogućavaju njihovo korišćenje u proizvodnji fermentisanih proizvoda. S obzirom na niz podataka o efektima laktobacila, mnogi proizvođači fermentisane hrane, pre svega mlečnih proizvoda, koriste laktobacile čime nastaje pojam tzv. funkcionalne hrane - hrane kojom se ostvaruju pozitivni zdravstveni efekti. Kako su laktobacili prirodni kolonizatori GI trakta i relativno retko su uzročnici infekcija, spadaju u grupu organizama koji se smatraju bezbednim (GRAS, *Generally Regarded As Safe*) (Farnworth, 2008).

Unos laktobacila pojačava neimunološke odbrambene barijere domaćina, uključujući lučenje defenzina od strane enterocita što je pokazano u sistemu *in vitro*, kao i produkciju mucina nakon administracije u životinje *in vivo* (Caallero-Franco i saradnici, 2007; Schlee i saradnici, 2008). Imunološki efekti laktobacila povezuju se sa indukcijom sinteze citokina: IL-10 (*InterLeukin-10*), IL-1 β , IFN γ (*InterFeroN γ*), IL-6, IL-8, sa povećanjem fagocitne sposobnosti perifernih polimorfonukleara i mononukleara, sa povećanjem aktivnosti ćelija prirodnih ubica (NK, *Natural Killer*) i sa povećanjem lučenja sIgA. Opisani mehanizmi dovode do jačanja nespecifičnih sistema odbrane bez posledične aktivacije adaptivnog imunskog odgovora (Gill, 2003).

U literaturi se navodi da bi probiotici trebalo da budu konzumirani u velikim količinama (po nekim preporukama u opsegu od 10^8 – 10^{12} CFU dnevno, zavisno od soja), u dužem periodu vremena, kako bi ostvarili pozitivne efekte na domaćina (Douglas i Sanders, 2008; Harzallah i Belhajd, 2013). S obzirom da su probiotici po definiciji živi organizmi, vijabilnost ćelija je imperativ u njihovoj primeni. Međutim, pitanje bezbednosti

je najznačajniji faktor u kliničkoj primeni probiotika (*Harzallah i Belhajd, 2013*). Stoga bi, po novijim kriterijumima, probiotici trebalo da budu privremeni kolonizatori GI trakta, odnosno nakon prestanka tretmana, ne bi trebalo da se zadržavaju u domaćinu (*Meieregger i saradnici, 2011*). Većina laktobacila u probiotičkim preparatima je alohtona za GI trakt sisara, što sprečava njihovo duže zadržavanje u GI traktu nakon prestanka administracije (*Gourbeyre i saradnici, 2011*). Time se postiže kontrola njihove brojnosti i sprečava eventualno invazivno delovanje kod imunokompromitovanih osoba.

Do sada su veoma retki podaci o štetnom delovanju primene probiotika. Međutim, mnoge vrste iz rodova koji se koriste kao probiotici, uključujući i laktobacile, prisutni su među kliničkim izolatima iz inficiranih rana, krvi kod sistemskih infekcija i tkiva srca kod endokarditisa (*Cannon i saradnici, 2005*). Bez obzira na navedeno, pretpostavlja se da laktobacili mogu delovati invazivno samo kod imunokompromitovanih osoba; iako je ovo problematika koja zahteva dodatna ispitivanja. Trenutno postoji niz životinjskih modela na kojima se ispituje bezbednost probiotika kod imunokompromitovanih subjekata, kao što su modeli endokarditisa, kolitisa, povrede jetre i imunodeficijencije. Dodatno se nalaže da se testira osetljivost na antibiotike, prisustvo mobilnih genetičkih elemenata koji nose rezistenciju na antibiotike, eventualno toksično delovanje kao i osetljivost na antimikrobne mehanizme domaćina (*Harzallah i Belhajd, 2013*).

1. 5. Reakcija tkiva domaćina na prisustvo simbionata

„The only good microbe is a dead microbe“ - popular belief. True or...

S obzirom na ogromnu površinu i izloženost velikoj količini antigena, imunski sistem creva označen kao limfoidno tkivo povezano sa crevnim traktom (GALT, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) predstavlja najveće limfoidno tkivo u organizmu (*Shacklett i saradnici, 2003*). Čine ga neorganizovana efektorska mesta koja uključuju imunske ćelije subepitelne *lamina propria* i intraepitelne limfocite i organizovane strukture kao što su mezenterični limfni čvorovi (MLČ), Pejerove ploče tankog creva (PP) i izolovani limfoidni folikuli (ILF) koji su prisutni u tankom i debelom crevu (*Werner, 2011*). Pored MLČ, smatra se da i PP i ILF igraju ulogu sekundarnih limfoidnih organa sa ulogom indukcije mukoznog imunskog

odgovora. MLČ dreniraju limfu iz GI mukoze prihvatajući dendritične ćelije koje nose mukozne antigene i prezentuju ih naivnim T-limfocitima dovodeći do njihove diferencijacije (Hooper i Macpherson, 2010). PP i ILF takođe imaju sposobnost indukcije diferencijacije naivnih T-limfocita ali u manjoj meri u odnosu na MLČ. Predominantna uloga PP i ILF je diferencijacija IgA-sekretujućih B-limfocita (Newberry i Lorenz, 2005).

Aktivnu ulogu u odgovoru na luminalne antigene stimulanse imaju epitelne i imune ćelije crevne mukoze. Intestinalne epitelne ćelije (IEĆ), pored fizičke barijere, imaju ulogu u održavanju homeostaze i aktivaciji mehanizama urođenog imunskog odgovora. Nakon prepoznavanja simbionata oslobađaju TNF α (*Tumour Necrosis Factor α*) i IL-6 koji mogu doprineti boljoj „komunikaciji“ između subepitelnih mijeloidnih ćelija vodeći pojačanoj reparaciji epitela (Galdeano i saradnici, 2007; Rescigno, 2011).

TNF α se ubraja u glavne citokine uključene u akutnu fazu inflamacije (Feghali i Wright, 1997). Pored epitelnih ćelija, glavni izvor TNF α u crevnoj mukozu su makrofagi iz *lamina propria*, i u manjoj meri Panetove i Th1-ćelije (*T-Helper*, T-pomoćničke). TNF α receptori su prisutni na velikom broju kako stromalnih tako i hematopoetskih i epitelnih ćelija (Harrison i Maloy, 2011). TNF α učestvuje u regrutovanju neutrofila povećanjem ekspresije adhezina na površini ćelija endotela i potpomaže biocidnu aktivnost makrofaga (Feghali i Wright, 1997).

Ključnu ulogu u interakciji domaćina sa mikroorganizmima imaju receptori slični *Toll* molekulu (TLR, *Toll-Like Receptors*), koji predstavljaju receptore za prepoznavanje struktura (PRR, *Pattern-Recognition Receptors*) i molekulskih struktura povezanih sa mikroorganizmima (MAMP, *Microorganism-Associated Molecular Patterns*) (Rakoff-Nahoum i saradnici, 2004). TLR receptori ostvaruju važnu ulogu u indukciji sinteze antimikrobnih proteina. Simbiotski mikroorganizmi su zahvaljujući debelom mukusnom pokrivaču kao i prisustvu sIgA i AMP molekula uglavnom sprečeni da prodru u unutrašnja tkiva domaćina. Nasuprot njima, patogene bakterije poseduju mehanizme kojima prevazilaze hemijske i fizičke barijere GI trakta. U skladu sa tim, PRR su lokalizovani tako da omoguće razlikovanje simbionata i patogena. Intestinalne epitelne ćelije su strukturno i funkcionalno polarizovane, pri čemu je apikalna površina u kontaktu sa intestinalnim lumenom a bazolateralna sa subepitelnom bazalnom membranom i sa *lamina propria*.

Takva polarizovanost epitelnih ćelija održava se pomoću pukotinastih međućelijskih spojeva. Dodatno, ekspresija TLR receptora je regulisana u odnosu na lokalizaciju na epitelnim ćelijama. TLR2 receptor, čiji je ligand peptidoglikan poreklom pretežno od Gram-pozitivnih bakterija i TLR4 receptor, čiji je ligand lipopolisaharid (LPS) Gram-negativnih bakterija eksprimiraju se na bazolateralnoj površini. Slična je distribucija i flagelinskog TLR5 receptora. S druge strane, TLR9 receptor, koji detektuje oligonukleotide, eksprimiran je na površini epitelnih ćelija creva, dok je u ćelijama imunskog sistema detektovan na endozomima (Abreu, 2010).

Uopšte uzev, ekspresija TLR receptora na epitelnim ćelijama creva relativno je niska (Abreu, 2010). Međutim, predložen je model po kome ekspresija TLR receptora na apikalnim delovima epitelnih ćelija, iako niska, ima značaj u održavanju homeostaze, reagujući na simbiozite i aktivirajući urođene mehanizme imunološke zaštite čime bi se kontrolisao broj simbiozita (Hooper, 2009). Alternativno objašnjenje bilo bi da tokom stalne obnove epitela, dolazi do kontakta simbiozita sa bazolateralno pozicioniranim receptorima omogućavajući aktivaciju epitelnih ćelija dovoljnu za održavanje integriteta GI barijere.

Subepitelno, u nivou rastresitog veziva strome crevnog tkiva pozicionirane su ćelije imunskog sistema koje reaguju na eventualnu invaziju mikroorganizama sprečavajući njihov dalji prodor u sterilna visceralna tkiva. Subepitelne imunske ćelije creva uključuju ćelije limfoidne i ćelije mijeloidne loze (Rescigno, 2011). Urođene limfoidne ćelije intestinalnog tkiva su proizvođači IL-17 i IL-22, koji su uključeni u regrutovanje neutrofila odnosno indukciju antimikrobne aktivnosti epitela (Ishigame i saradnici, 2009; Maynard i saradnici, 2012).

Mijeloidne ćelije crevnog tkiva uključuju intestinalne makrofage i dendritične ćelije, koji imaju nisku reaktivost na TLR signalizaciju (Bain i saradnici, 2013). Dendritične ćelije imaju sposobnost „provlačenja“ između intestinalnih epitelih ćelija i uzorkovanja luminalnih antigena (Harrison i Maloy, 2011). Mijeloidne imunske ćelije intestinalne mukoze kontrolisane su signalima oslobođenim od strane epitela i učestvuju u održavanju ravnoteže između nastanka regulatornih IL-10 produkujućih Treg i proinflamatornih Th1 i

Th17-limfocita, koji predominantno oslobađaju IFN γ i IL-17 citokine (Abreu, 2010; Ueda i saradnici, 2010; Laffont i saradnici, 2010; Harrison i Maloy, 2011).

IL-17 je proinflamatorni citokin koji se često povezuje sa nastankom autoimunskih bolesti. Do sada je opisano šest članova IL-17 familije citokina pri čemu IL-17A i IL-17F dele najveći stepen sličnosti na proteinskom nivou i u odnosu na biološku aktivnost (Cua i Tato, 2010). Istraživanje Ishigame i saradnika (2009) pokazalo je da se u kolonu IL-17F predominantno proizvodi od strane epitelnih ćelija i ćelija urođene imunosti dok IL-17A proizvode uglavnom Th17-ćelije. Receptor koji vezuje IL-17F, označen kao IL-17AC, prisutan je predominantno na epitelnim ćelijama. Receptor IL-17RA koji, iako prepoznaje obe forme IL-17, vezuje IL-17A sa većim afinitetom, eksprimiran je na površini T-limfocita i makrofaga. Navedeno ukazuje da IL-17F u najvećoj meri stimuliše epitelne ćelije kolona na sintezu AMP molekula i hemoatraktanata dok IL-17A ima ulogu u stimulaciji makrofaga i T-limfocita (Ishigame i saradnici, 2009).

Autori rada objavljenog 2012. godine (Malvin i saradnici) značajnu ulogu u saniranju povreda mukoze pridaju mijeloidnim ćelijama. Iako su životinje sa nedostatkom TLR signalizacije podložnije eksperimentalno indukovanom akutnom kolitisu, TLR signalizacija ograničena na mijeloidne ćelije, kod takvih životinja dovodi do ublažavanja simptoma. Takvi podaci ukazuju na značaj simbiotskih mikroorganizama u reparaciji epitela.

Stromalne ćelije su, pored limfoidnih i mijeloidnih ćelija, neophodne za adekvatan odgovor tkiva creva na povredu epitela. Istraživanje je pokazalo da najvažniju ulogu u reparaciji crevnog epitela imaju stromalne ćelije označene kao miofibroblasti koje produkcijom prostaglandina E2 (PGE2) omogućavaju proliferaciju epitelnih ćelija (Pull i saradnici, 2005; Pai i saradnici, 2002). Pokazano je da je za aktivaciju stromalnih ćelija neophodna TLR-zavisna signalizacija u mijeloidnim ćelijama i aktivacija makrofaga (Malvin i saradnici, 2012).

Pored polarizovane ekspresije TLR receptora u okviru intestinalnog epitela, drugi aspekt strateške lokalizacije PRR receptora uključuje citosolnu detekciju MAMP obrazaca, zasnovano na činjenici da patogene bakterije poseduju mehanizme kojima svoje faktore virulencije ubacuju unutar ćelija domaćina. Citosolni PRR receptori označeni kao NLR (Nucleotide oligomerization domain - Like Receptor, receptor sličan nukleotidnom

oligomerizacionom domenu) prisutni su kako u ćelijama epitela tako i u mijeloidnim ćelijama i imaju potencijal da detektuju patogene bakterije i tzv. signale opasnosti (*Van den Abbeele* i saradnici, 2011). Invazija bakterija u subepitelni prostor često rezultira ćelijskim oštećenjem i time obezbeđuje signal za pokretanje odbrambenog imunskog odgovora. Signali oslobođeni od strane stresiranih ili oštećenih ćelija predstavljaju unutrašnje signale opasnosti ili tzv. molekulske strukture povezane sa opasnošću (DAMP, *Danger-Associated Molecular Patterns*) (*Van den Abbeele* i saradnici, 2011). Većina DAMP struktura biva detektovana posredstvom unutarćelijskih receptora ćelija domaćina. S druge strane, spoljašnji signali opasnosti kao što su LPS, peptidoglikan, nemetilovani CpG ponovci, itd. signaliziraju uglavnom preko TLR receptora (*Blum* i *Schiffirin*, 2003).

Puni efekat NLR receptori ostvaruju tek u sprezi sa indukcijom TLR kompleksa. TLR signalizacija je potrebna za sintezu neaktivnih formi a zatim se aktivacijom NLR receptora unutarćelijskim faktorima virulencije sintetišu zrele forme potentnih inflamatornih citokina (*Van den Abbeele* i saradnici, 2011). NLR receptori dovode do aktivacije kaspaze-1-aktivirajućeg kompleksa označenog kao inflamazom. Aktivacija inflamazoma dovodi do oslobađanja aktivnih formi IL-1 familije inflamatornih citokina: IL-1 β , IL-18 i IL-33 (*Biswas* i *Kobayashi*, 2013).

Za razliku od TNF α koji u određenim situacijama može delovati zaštitno, IL-1 β je potentan citokin sa snažnim proinflamatornim delovanjem. IL-1 β se pretežno oslobađa od strane aktiviranih makrofaga *lamina propria* i dovodi do aktivacije mijeloidnih ćelija i regrutovanja neutrofila. Dodatno potpomaže diferencijaciju Th17-limfocita i aktivaciju efektorskih T-limfocita (*Harrison* i *Maloy*, 2011). IL-1 β se sintetiše kao prekursor (pro-IL-1 β) veličine 31 kDa. Nakon aktivacije kaspaze-1, pro-IL-1 β se iseca u aktivnu formu od 17 kDa. Aktivacija kaspaze-1 zavisna je od formiranja inflamazoma do koje dolazi aktivacijom unutarćelijskog NLR receptora delovanjem endogenih ili egzogenih stresogenih faktora. Nakon sekrecije, IL-1 β se vezuje za IL-1 β receptore, koji su eksprimirani na površini velikog broja ćelija uključujući epitelne i endotelne ćelije, kao i ćelije mijeloidne i limfoidne linije (*Franchi* i saradnici, 2012).

Sumarno, epitelne i mijeloidne ćelije crevne mukoze „programirane“ su tako da u uslovima homeostaze minimalno reaguju na stimulaciju luminalnim mikroorganizmima, što

se postiže bazolateralnom lokalizacijom PRR receptora na epitelnim ćelijama i minimalnom reaktivnošću mijeloidnih ćelija na PRR ligande. Nakon povrede ili infekcije, prve reaguju epitelne ćelije aktivacijom bazolateralnih receptora kao i intraepitelni limfociti koji detektuju molekule oslobođene iz oštećenih ćelija (*Kunisawa i saradnici, 2007*). Aktivnost mijeloidnih ćelija se povećava aktivacijom membranskih receptora što vodi pojačanoj reparaciji epitela i eventualnom regrutovanju neutrofila. U slučaju intenzivnije povrede ili teže infekcije, mijeloidne ćelije reaguju na molekule oslobođene iz oštećenih ćelija i na patogene i to putem unutarćelijskih receptora, dovodeći do indukcije adaptivnog imunskog odgovora. Opšti zaključak je da u bazalnim uslovima, detekcija spoljašnjih signala opasnosti dovodi do indukcije tolerancije i smanjenja patološkog adaptivnog inflamatornog odgovora. Istovremeno, prisustvo unutrašnjih signala opasnosti ima potencijal da pokrene snažan inflamatorni odgovor (*Blum i Schiffrin, 2003*).

1. 6. Zapaljenske bolesti creva

“Bacteria keeps us from heaven and puts us there” - Martin H. Fischer

Intestinalni mikrobni ekosistem može biti veoma dinamičan u zavisnosti od faktora sredine ili zdravstvenog statusa domaćina. Tako ishrana bogata biljnim polisaharidima pogoduje rastu predstavnika roda *Bacteroides* i *Firmicutes*, koji predstavljaju klasične sisarske simbionte, a snižava broj patobionata i enteropatogena (*Candela i saradnici, 2011*). S druge strane, ishrana bogata proteinima pogoduje rastu koliformnih bakterija (kao što je *Escherichia coli*) čiji se proizvodi metabolizma, između ostalog, dovode u vezu i sa nastankom raka debelog creva (*Hentges, 1980; Rafter, 2002*). Najznačajnija promena sastava intestinalne mikroflore primećena je u patološkim stanjima kao što su inflamatorne bolesti creva (IBD, *Inflammatory Bowel Diseases*). Inflamacija narušava homeostatsku ravnotežu u okviru intestinalne mikroflore, pomerajući je sa dobroćudnih i zaštitnih simbionata ka patobiontima (*Candela i saradnici, 2011*). Patobionti kolonizuju GI trakt i u uslovima homeostaze, ali oksidativni stres tokom inflamacije pogoduje njihovom rastu, kao i obilje lako dostupnih hranljivih materija koje nastaju degradacijom tkivnih makromolekula. Patobionti predstavljaju manje zastupljene, ali stalno prisutne članove

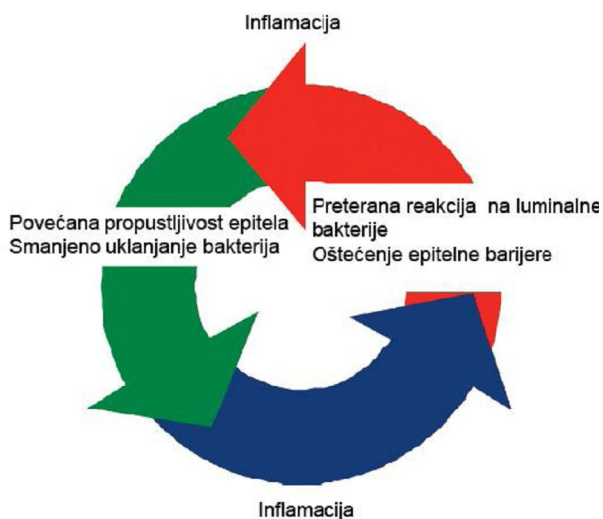
intestinalne mikroflore zdravog domaćina. S obzirom na visoku otpornost na antimikrobne mehanizme domaćina, postaju dominantni u upaljenom tkivu, i dodatno doprinose pojačanju imunskog odgovora domaćina (*Morgan* i saradnici, 2012). Inflamatorne bolesti creva okarakterisane su redukcijom raznovrsnosti klostridija iz klastera IV i XIVa i tipa *Firmicutes*, a povećanja predstavnika tipa *Bacteroidetes*, barem u aktivnoj fazi bolesti (*Sokol* i saradnici, 2009; *Khor* i saradnici, 2011). Takođe je pokazano izraženo povećanje broja enterobakterija (*Candela* i saradnici, 2011).

Nepravilno funkcionisanje GI barijere dovodi do inflamatornih procesa koje se u odnosu na kliničko-patološka svojstva i lokalizaciju dele na Kronovu bolest i ulcerozni kolitis. Kod Kronove bolesti je prisutna hipertrofija peharastih ćelija i povećana je debljina mukusnog sloja, što ukazuje da deficijencija u sekreciji mukusa nije u osnovi patogeneze ove bolesti. Pored spomenutog, pokazano je i povećanje intestinalne propustljivosti za koje se pretpostavlja da je, kod aktivne bolesti, izazvano povećanim lučenjem TNF α i IFN γ koji dovode predominantno do smrti epitelnih ćelija (*McGuckin* i saradnici, 2009). U zdravom tkivu integritet epitela održavaju adhezivne međućelijske veze koje formiraju proteini katenini i β -kaderini (*Kucharzik* i saradnici, 2001).

Istovremeno, pukotinaste međućelijske veze koje formiraju kladini i okludini, kojima pripada i TJP1 (*Tight Junction Protein 1*) protein, označen i kao ZO1 (*Zonula Occludens 1*) (*Kiener* i saradnici, 2007), imaju ulogu u održavanju polarizovanosti IEC i sprečavanju prodora luminalnih materija u dublje slojeve crevnog tkiva (*Abreu*, 2010). U uslovima inflamacije proinflamatorni citokini TNF α i IFN γ dovode do internalizacije proteina pukotinastih veza, bez smanjenja nivoa njihove ekspresije (*Bruewer* i saradnici, 2003). Kod pacijenata sa Kronovom bolešću i ulceroznim kolitisom uočeno je smanjenje ekspresije proteina pukotinastih veza, kako na nivou translacije tako i na nivou transkripcije (*Kucharzik* i saradnici, 2001). Epitelna propustljivost je pokazana i kod srodnika obolelih od Kronove bolesti što ovaj faktor dovodi u vezu sa ranom fazom oboljenja. Translokacija bakterija je takođe pokazana u ovoj bolesti što se može povezati sa povećanom propustljivošću barijere, ali se može pripisati i defektu u obradi i prezentaciji bakterijskih antigena odnosno smanjenom funkcionalnošću mijeloidnih ćelija koje učestvuju u njihovom uklanjanju (*McGuckin* i saradnici, 2009).

Za razliku od Kronove bolesti, ulcerozni kolitis se karakteriše redukcijom u broju peharastih ćelija i smanjenom produkcijom mucina 2 (MUC2) i posledičnim smanjenjem debljine zaštitnog mukusnog sloja. U ulceroznom kolitisu nije uočeno povećanje propustljivosti intestinalne barijere niti translokacija luminalnih mikroorganizama, što je jedna od značajnih razlika u odnosu na Kronovu bolest (*McGuckin i saradnici, 2009*). Istovremeno, kod pacijenata obolelih od Kronove bolesti primena antibiotika pokazala se delotvornom, dok takav rezultat nije primećen kod pacijenata sa ulceroznim kolitisom (*Sartor, 2006*). Nasuprot Kronovoj bolesti, gde inflamacija zahvata sve zidove creva, od mukoze do submukoznog mišićnog sloja (tzv. transmuralna inflamacija), kod ulceroznog kolitisa inflamacija ne prodire dublje od submukoze (*McGuckin i saradnici, 2009*).

Polimorfizmi identifikovani ispitivanjem genoma obolelih od Kronove bolesti ukazuju na deficijenciju urođenog imunskog odgovora, što je u skladu sa funkcionalnim studijama koje su potvrdile narušenu funkciju barijere i defekt u uklanjanju luminalnih bakterija kod obolelih od Kronove bolesti. Činjenica koja u najvećoj meri ide u prilog hipotezi imunodeficijencije u nastanku Kronove bolesti jeste da pacijenti koji imaju druge vrste naslednih deficijencija urođene imunosti i funkcionalnosti fagocita razvijaju neinfektivne upale creva koje histološki podsećaju na Kronovu bolest (*Hayee i saradnici, 2010*).



Slika 3. Predloženi model razvoja Kronove bolesti kao posledice imunodeficijencije;
(*Cobrin i Abreu, 2005*)

Slika 3 ilustruje začarani krug u kome smanjena sposobnost uklanjanja luminalnih mikroorganizama usled oslabljenog akutnog imunskog odgovora dovodi do inflamatorne reakcije tkiva na nekontrolisano umnožene mikroorganizme. Nastala inflamacija dodatno doprinosi oštećenju barijere i sve većem prodiranju mikroorganizama u dublje slojeve tkiva (Cobrin i Abreu, 2005).

S obzirom na značaj mehanizama urođene imunosti u patogenezi Kronove bolesti, podsticanje imunskih funkcija epitelnih ćelija i subepitelnih fagocita kao i aktivnosti neutrofila od strane luminalnih mikroorganizama bi u teoriji moglo preduprediti nastanak lezija kao i eventualnu hroničnu fazu bolesti. Stoga su razvijeni brojni eksperimentalni *in vivo* modeli kako bi se simulirali patološki procesi u Kronovoj bolesti i ujedno ispratili mehanizmi koji su aktivni pre razvoja bolesti. Među tim modelima su genetički i hemijski indukovani modeli. Jedan od najjednostavnijih, ali dovoljno reproducibilnih i minimalno invazivnih modela je TNBS (trinitrobenzensulfonat) model kolitisa koji nastaje nakon unosa TNBS-a u lumen kolona. Ovaj model se karakteriše pojavom ulceracija mukoze i prisustvom ćelijskih infiltrata (Llopis i saradnici, 2005). Iako lokalizovan u nivou kolona (otuda naziv kolitis), odgovara Kronovoj bolesti kod čoveka (Dothel i saradnici, 2013).

Jedan od značajnih pokazatelja stepena zaštite ćelije i tkiva od oštećenja je sinteza proteina toplotnog stresa (HSP, *Heat Shock Proteins*) koji su uključeni u održavanje konformacije i funkcije ćelijskih proteina. Njihova se sinteza indukuje u odgovoru na stresne stimuluse uključujući toplotni stres, teške metale, radijaciju, bakterije, viruse, oksidanse ili citokine. Najinducibilniji HSP protein je forma označena kao HSP70i (Barbatis i Tsopanomichalou, 2009). Iako je funkcija HSP povezana sa povećanjem mehanizama odbrane ćelije od oštećenja, u eksperimentalno indukovanom akutnom kolitisu kao i u inflamacijama GI trakta kod ljudi pokazano je smanjenje nivoa HSP70 proteina koje je regulisano na nivou translacije (Hu i saradnici, 2009). Pored citoprotekcije, HSP70 deluje i kao signal opasnosti dovodeći do aktivacije urođenog imunskog odgovora delujući kao ligand za TLR receptore i dodatno, aktivirajući citotoksične NK ćelije (Vabulas i saradnici, 2002; Elsner i saradnici, 2010). Pokazano je da miševi deficijentni u sintezi HSP70 imaju manje intenzivnu akutnu inflamaciju nakon povrede mišića ali da je u kasnijoj fazi inflamacija kod ovih miševa izraženija dok je oštećenje tkiva smanjeno.

Navedeno govori u prilog ulozi mehanizama urođene imunosti indukovanih HSP70 proteinom u inicijaciji reparacije oštećenja (*Senf i saradnici, 2013*).

Imajući u vidu spomenutu teoriju o Kronovoj bolesti koja nastaje usled slabljenja mehanizama akutnog imunskog odgovora usmerenog ka luminalnim mikroorganizmima, od interesa je proveriti da li sličan mehanizam učestvuje u patogenezi kolitisa indukovanog TNBS-om, trenutno najpribližnijeg *in vivo* modela Kronove bolesti kod čoveka. Paralelno bi se mogao povezati efekat laktobacilnog soja kod životinja sa kolitisom sa efektom istog soja kod zdravih životinja - takvim bi se pristupom stekao potpuniji uvid u mehanizam delovanja laktobacila i, ujedno, olakšala selekcija efikasnih probiotičkih sojeva za tretman inflamatornih oboljenja GI trakta.

Kod pacijenata sa inflamatornim bolestima creva laktobacili su do sada testirani u kontekstu produžavanja remisije i sprečavanja relapsa nakon hirurške intervencije. Iako se u ulceroznom kolitisu pokazao pozitivan učinak VSL#3 probiotičkog preparata, kod Kronove bolesti ne postoje ubedljivi dokazi o pozitivnom delovanju probiotika (*Sanders i saradnici, 2013*). U nekim slučajevima postojao je pozitivan efekat laktobacila u odnosu na placebo kontrolu, ali mali broj pacijenata, odsustvo statističke značajnosti kao i istovremena primena drugih lekova otežava donošenje zaključka vezanog za delovanje laktobacila (*Prantera i saradnici, 2002*). Dodatno, u nekim studijama je incidenca relapsa bila veća kod pacijenata tretiranih laktobacilima (*Shen i saradnici, 2009*). Pojedini autori predlažu da bi, alternativno, trebalo razmotriti primenu probiotika preventivno kod dece sa genetskom predispozicijom za razvoj bolesti. Veruje se da bi, s obzirom na aktuelnu teoriju o nastanku Kronove bolesti usled translokacije luminalnih mikroorganizama, laktobacili mogli ojačati GI barijeru i/ili smanjiti broj patobionata koji bi dodatno doprineli inflamaciji u „imunodeficientnom“ domaćinu (*Prantera, 2006*).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Primeni laktobacila kao probiotika u kliničkoj praksi prethode eksperimentalna istraživanja na modelima bolesti koja imaju za cilj da potvrde potencijalno pozitivno delovanje kao i rizike povezane sa primenom soja od interesa. Dosadašnja istraživanja u ovoj oblasti dala su dvosmislene rezultate vezane kako za krajnji efekat u lečenju tako i za mehanizam delovanja laktobacila. Imajući u vidu da laktobacili mogu dovesti i do imunske reakcije tkiva domaćina na nepoznati antigen, ciljevi ovog istraživanja bili su:

- praćenje vremenskog profila odgovora tkiva kolona na unos soja *Lactobacillus fermentum* BGHI14 kod zdravih pacova;

- praćenje efekata BGHI14 soja u slučaju narušavanja funkcije GI barijere TNBS-om koji indukuje transmuralnu inflamaciju creva - model Kronove bolesti kod čoveka; u te svrhe testiran je efekat različitih vremenskih režima tretmana BGHI14 sojem u odnosu na momenat indukcije bolesti.

Parametri kojima je planirano praćenje delovanja soja BGHI14 uključivali su: promene telesnih masa pacova tokom tretmana, histološke promene u tkivu kolona, indeks lipidne peroksidacije kao pokazatelj oksidativnog oštećenja u tkivu kolona, sastav crevne mikroflore pacova i nivoi iRNK za proteine uključene u aktivaciju imunskog sistema i održavanje GI barijere (TNF α , IL-1 β , IL-17F, HSP70, TJP1).

S obzirom da efekat laktobacila nakon peroralnog unosa u domaćina na prvom mestu zavisi od ostvarivanja bliske interakcije sa ćelijama crevne mukoze, u istraživanju je testiran uticaj različitih proteinskih molekula prisutnih na površini bakterija koji mogu delovati na vezivanje za GI mukožu pacova Wistar soja. U te svrhe analiziran je efekat koji u vezivanju ostvaruju dva potencijalna adhezivna proteina označena kao AggL (*Aggregation factor from Lactococcus*, agregacioni faktor iz roda *Lactococcus*) i MbpL (*Mucin Binding Protein from Lactococcus*, mucin vezujući protein iz roda *Lactococcus*) čiji su geni locirani na plazmidu soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1. Navedeni adhezivni faktori su već ekspimirani u homolognom domaćinu a ciljevi ove studije bili su analiza njihove funkcije u vezivanju za crevnu mukožu:

- u homolognom domaćinu BGKP1-20;
- u potencijalnom probiotičkom soju *Lb. salivarius* BGHO1.

Za testiranje funkcije navedenih proteina u adheziji za crevnu mukozu bili su predviđeni testovi vezivanja za izolovani mucin i mucin-produkujuće ćelije *in vitro*, zatim *ex vivo* esej vezivanja za tkivo creva kao i testiranje doprinosa vezivanju u uslovima *in vivo*.

3. MATERIJALI I METODE

3. 1. Bakterijski sojevi, životinje i prajmeri korišćeni u istraživanju

3 .1. 1. Bakterijski sojevi

Bakterijski sojevi i derivati korišćeni u istraživanju prikazani su u Tabeli 1.

Soj *Lactobacillus fermentum* BGHI14 izolovan je iz fecesa novorođenčeta hranjenog majčinim mlekom starim dve nedelje. Bakterije su kultivisane u *De Man-Rogosa-Sharpe* (MRS) medijumu (*Merck GmbH*, Darmstadt, Nemačka) na 37°C anaerobno u posudama za održavanje anaerobije (*Merck*) u koje je radi formiranja anaerobnih uslova dodat Anaerocult A (*Merck*). U svrhu tretmana životinja sveža prekonoćna bakterijska kultura (10 ml) koja je prethodno rasla 16 h u MRS medijumu (približno 10^{10} CFU) centrifugirana je na $2\ 500 \times g$ (5804, *Eppendorf centrifuge*, Hamburg, Nemačka), isprana u fiziološkom rastvoru i resuspendovana u 1 ml 11% sterilnog mleka (*AD Mlekara Subotica*, Subotica, Srbija). Tako je napravljena bakterijska suspenzija kojom su tretirani pacovi. Kontrolni pacovi su hranjeni mlekom.

Derivati *L. lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20 su u eksperimentu kultivisani aerobno na 30°C u M17 medijumu (*Oxoid Limited*, Hampshire, Ujedinjeno Kraljevstvo) sa 0,5% glukozom (GM17) i eritromicinom (*Serva Electrophoresis GmbH*, Heidelberg, Nemačka) u koncentraciji od 15 µg/ml. Za tretman životinja 10 ml sveže prekonoćne kulture bakterija (približno 10^9 CFU) gajene 16 h u selektivnom GM17 medijumu centrifugirano je na $2\ 500 \times g$ (5804, *Eppendorf centrifuge*) oprano u fiziološkom rastvoru i resuspendovano u 1 ml 11% obranog mleka (*AD Mlekara Subotica*). Pripremljenom bakterijskom suspenzijom su hranjeni pacovi, uz kontrolne pacove koji su hranjeni mlekom.

Soj *Lb. salivarius* BGHO1 predstavlja humani oralni izolat iz laboratorijske kolekcije. Kultivisan je anaerobno na 37°C u MRS medijumu (*Oxoid Limited*) u posudama za održavanje anaerobije (*Merck*), a anaerobija je postizana ubacivanjem Anaerocult-a A (*Merck*). Bakterijske ćelije za tretman životinja pripremljene su nakon prekonoćne kultivacije bakterija u selektivnom MRS medijumu (10 ml), isprane su u fiziološkom rastvoru centrifugiranjem na $2\ 500 \times g$ (5804, *Eppendorf centrifuge*) i resuspendovane u 1

ml 11% sterilnog obranog mleka (*AD Mlekara Subotica*). Dobijena bakterijska suspenzija je korišćena za hranjenje pacova. Kontrolni pacovi su dobijali mleko.

Ćelije soja *Escherichia coli* DH5 α korišćene su za propagaciju pGEM-T Easy vektora i u eksperimentu su gajene aerobno na 37°C uz mešanje u LB (*Luria Broth*, Luria bujon) medijumu koji sadrži: tripton (10 g/l), ekstrakt kvasca (5 g/l) i NaCl (5 g/l) (*Kojic i Ventura*, 2001).

3. 1. 2. Eksperimentalne životinje

Ženke Wistar pacova iz istog legla, starosti 5-6 nedelja, preuzete su sa Farme Vojno-medicinske Akademije u Beogradu i za potrebe eksperimenta smeštene u Vivarijumu Farmaceutskog Fakulteta Univerziteta u Beogradu. Životinje su tokom eksperimenta boravile u polipropilenskim kavezima (najviše četiri pacova po kavezu), u aklimatizovanim prostorijama ($t^{\circ} = 22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, vlažnost vazduha 50%) sa kontrolisanim ciklusima svetla (12 h) i mraka (12 h) uz neograničen pristup hrani za pacove u vidu standardnih briketa (*Vetprom*, Beograd, Srbija) i vodi za piće. Higijena kaveza je održavana i šuška je menjana svakog dana. Oralni tretman životinja vršen je pomoću sonde od nerđajućeg čelika otvora veličine 18 G za peroralni tretman eksperimentalnih životinja (*Instech Solomon*, Plymouth Meeting, Pensilvanija, SAD). Sve eksperimentalne procedure sa životinjama vršene su u skladu sa pravilnikom ustanove za brigu o eksperimentalnim životinjama No 2/09 (Etički Komitet Farmaceutskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu). Rad sa životinjama u opisanom istraživanju odobren je od strane Etičkog Komiteta Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3. 1. 3. Prajmeri

Spisak prajmera korišćenih u istraživanju prikazan je u Tabeli 2.

Prajmeri (*Invitrogen*, Paisley, Ujedinjeno Kraljevstvo i *Metabion International*, Martinsried, Nemačka) dizajnirani su pomoću softvera Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu>) na osnovu sekvenci uskladištenih u NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) bazi podataka ili su preuzeti iz drugih radova kao što je naznačeno u tabeli.

3. 1. 4. Statistička obrada i predstavljanje rezultata

Rezultati su predstavljeni grafički pomoću *box-and-whisker* grafikona, a razlike su smatrane statistički značajnim ukoliko je verovatnoća (P) < 0,05. Vrednosti statističke verovatnoće dobijene za razlike između grupa naznačene su iznad grafikona. Kružići na grafikonima označavaju ekstremne, a zvezdice označavaju odstupajuće vrednosti. Distribucija podataka je proverena Kolmogorno-Smirnov i Shapiro-Wilk testom i normalno raspoređeni podaci analizirani su Studentovim t-testom podrazumevajući nejednake varijanse. Podaci koji nisu normalno raspoređeni logaritamski su transformisani i, ukoliko su transformisani podaci postajali normalni, primenjivan je t-test. U suprotnom, primenjivan je neparametarski Mann-Whitney U-test. Statistička obrada i crtanje grafikona vršeni su pomoću SPSS 12,0 softvera prilagođenom Windows operativnom sistemu.

Tabela 1. Bakterijski sojevi korišćeni u istraživanju

Soj	Relevantne karakteristike	Literatura
<i>Lactobacillus fermentum</i>		
BGHI14	Prirodni izolat	Ovaj rad
<i>Lactobacillus salivarius</i>		
BGHO1	Prirodni izolat	<i>Strahinic</i> i saradnici, 2008
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>		
Derivati soja BGKP1-20 koji nose konstrukte:		
BGKP1-20/pAZIL	pAZIL	
BGKP1-20/pAZIL- <i>mbpL</i>	pAZIL-KPE6	
BGKP1-20/pAZIL- <i>aggL</i>	pAZIL-KPPvSci	<i>Kojic</i> i saradnici, 2011
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	Soj sa visokom sposobnošću transformacije; supE44, Δ lacU169 (Δ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, andA1, gyrA96, thi-1, relA1	<i>Woodcock</i> i saradnici, 1989

Tabela 2. Nazivi i sekvence prajmera korišćenih u istraživanju

Nazivi prajmera	Sekvence prajmera 5'-3'	Literatura
Lab-0159f	GGA AAC AG (A/G) TGC TAA TAC CG	<i>Heilig</i> i saradnici, 2002
Uni-0515r	ATC GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA	<i>Heilig</i> i saradnici, 2002
Uni-0515-GCr	ATC GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA CGC CGG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G	<i>Heilig</i> i saradnici, 2002
β -actin_fw	AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC	<i>Mousavi</i> i saradnici, 2009
β -actin_rev	CTC TCA GCT GTG GTG GTG AA	<i>Mousavi</i> i saradnici, 2009
IL-1 β _fw	GGA AGG CAG TGT CAC TCA TTG TG	<i>Tilleux</i> i saradnici, 2007
IL-1 β _rev	GGT CCT CAT CCT GGA AGC TCC	<i>Tilleux</i> i saradnici, 2007
TNF α _fw	AAA TGG GCT CCC TCT CAT CAG TTC	<i>Peinnequin</i> i saradnici, 2004
TNF α _rev	TCT GCT TGG TGG TTT GCT ACG AC	<i>Peinnequin</i> i saradnici, 2004
IL-17F_fw	GGA AAA GCC TCC TTT GAT CC	Ovaj rad
IL-17F_rev	ACG GAG CTT CAA GGA TGT TG	Ovaj rad
Hsp 70_fw	CGC TCC AGG TGT GAT CTA GG	Ovaj rad
Hsp 70_rev	TAC TGG GAA TGC AAA GCA CA	Ovaj rad
Tjp1_fw	GCA GTG TGA ACA TGG ATT GAA	Ovaj rad
Tjp1_rev	AGC CAA TGC CTG ACA GTT CT	Ovaj rad
Uni-16S_fw	GAG AAG TTT GAT CCT GGC	<i>Jovicic</i> i saradnici, 2009
Uni-16S_rev	AGG AGG TGA TCC AGC CG	<i>Jovicic</i> i saradnici, 2009
mbpLcod_fw	GGG CAA AAG ATG ACA GTG GT	Ovaj rad
mbpLcod_rev	ACC AAG TGT TCC TTC GCT TG	Ovaj rad
aggLcod_fw	CAA ACG AGG GTG GAG ATG TT	Ovaj rad
aggLcod_rev	CTT ATC GCC CGCA TTG TAG T	Ovaj rad
rpoBcod_fw	GGT GGT AAG GCA CAA TTT GG	Ovaj rad
rpoBcod_rev	TGG TTC GCC CTT AAC GAT AG	Ovaj rad

3. 2. Reakcija tkiva kolona pacova na unos soja *Lactobacillus fermentum* BGHI14

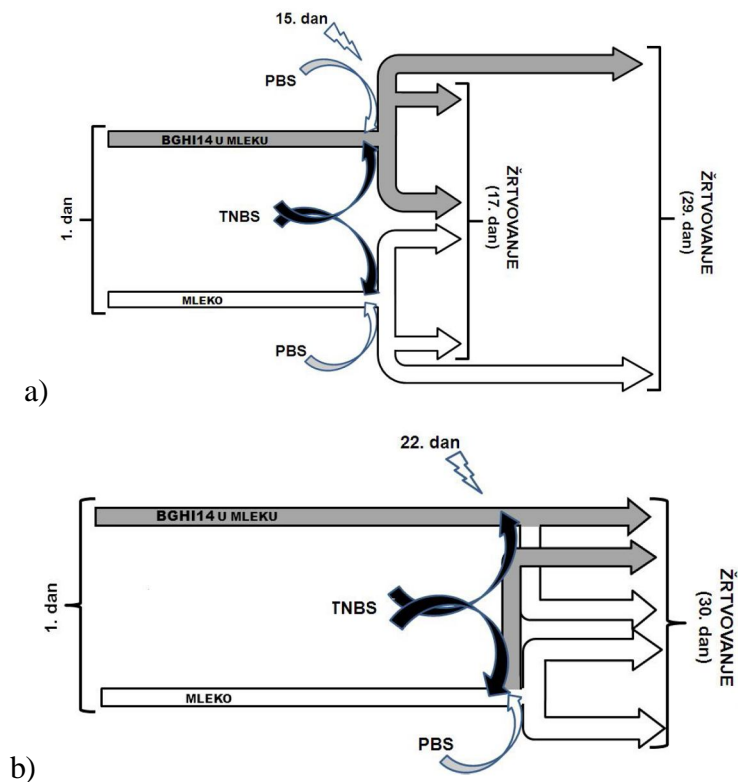
3. 2. 1. Dizajn istraživanja

Istraživanje je osmišljeno u vidu dva eksperimenta pri čemu je prvi uključivao testiranje odgovora zdravog tkiva kolona pacova na tretman bakterijskim sojem BGHI14 i optimizaciju momenta indukcije bolesti u odnosu na početak tretmana bakterijama. Drugi eksperiment uključivao je praćenje efekta različitih vremenskih režima tretmana sojem BGHI14 na razvoj oštećenja u slučaju indukcije bolesti u momentu koji je definisan u prvom delu istraživanja.

Dizajn prvog dela istraživanja ilustriran je Slikom 4a. Životinje (ukupno 48) su podeljene u šest grupa (po osam životinja) (Tabela 3). Na početku eksperimenta životinje su imale prosečno 140 ± 10 grama. Od prvog dana do kraja eksperimenta merene su telesne mase životinja. Tokom prvih 14 dana pacovi iz prve tri grupe peroralno su hranjeni suspenzijom bakterija (1 ml), pripremljenom kao što je opisano u 3. 1. 1., dok su pacovi iz preostale tri grupe dobijali po 1 ml mleka. Petnaestog dana od početka peroralnog hranjenja a nakon 36 h gladovanja, životinjama iz grupe tretirane bakterijskom suspenzijom (I) i iz kontrolne grupe (II) izazvan je kolitis pomoću 34% rastvora 1 M TNBS-a (trinitrobenzensulfonat) (*Fluka*, Buchs, Switzerland) resuspendovanog u 50% etanolu. Životinje su dobile po 100 ± 10 μ l pripremljenog rastvora TNBS-a na 100 g telesne težine (*Kiyoshi* i saradnici, 2006). TNBS je unesen kroz rektum pomoću gumenog katetera (Ch6, *Romed Holland*, Wilnis, Holandija) ubačenog 6 cm proksimalno u odnosu na anus (*Zheng* i saradnici, 2000). Pacovima iz preostale četiri grupe označenim kao zdrave grupe tretirane bakterijskom suspenzijom (III i V) i kao zdrave kontrolne grupe (IV i VI), u zavisnosti od prethodnog načina hranjenja, kroz rektum je na prethodno opisani način uneta ista količina fosfatnog pufera (PBS, *Phosphate Buffered Saline*). Kako bi se sprečilo curenje TNBS-a odnosno PBS-a, nakon unosa rastvora, životinje su 30 s držane u vertikalnom položaju glavama okrenutim ka dole. Narednog dana (dan 16) pacovi su peroralno hranjeni kao i prethodnih dana. Sedamnaestog dana, dva dana nakon unosa TNBS-a/PBS-a, životinje iz

dve grupe sa kolitisom (I i II) i iz dve zdrave grupe (III i IV), nakon prekonoćnog gladovanja su žrtvovane rastućom koncentracijom ugljen-dioksida.

Tkivo kolona svakog pacova 3 cm proksimalno u odnosu na anus gde se očekuju najintenzivnija oštećenja je izdvojeno, uzdužno otvoreno sterilnim hirurškim instrumentima i isprano fiziološkim rastvorom. Za histološku analizu, tkiva su fiksirana u 10% formalinu puferisanom na pH 7 (Marjit, 2009). Za izolaciju RNK, tkiva su smrzavana na -70°C neposredno po uklanjanju iz životinje. Sadržaj lumena ileuma uzorkovan je iz četiri kontrolna i četiri tretirana zdrava pacova i smrznut na -70°C radi detekcije preživljavanja soja BGHI14 u GI traktu pacova. Pacovi iz preostale dve grupe životinja (V i VI) kod kojih je peroralno hranjenje nastavljeno bez promena, žrtvovani su 29. dana od početka eksperimenta nakon prekonoćnog gladovanja. Uzorkovanje tkiva kolona vršeno je kao kod ranije žrtvovanih životinja.



Slika 4. Dizajn a) prvog i b) drugog dela istraživanja

Tabela 3. Raspored životinja po grupama u prvom delu istraživanja

Grupa	Vrsta peroralnog hranjenja	Indukcija kolitisa	Trajanje peroralnog hranjenja
I	Bakterijska suspenzija (tretirani)	Da (TNBS)	16 dana
II	Mleko (kontrola)	Da (TNBS)	16 dana
III	Bakterijska suspenzija (tretirani)	Ne (PBS)	16 dana
IV	Mleko (kontrola)	Ne (PBS)	16 dana
V	Bakterijska suspenzija (tretirani)	Ne (PBS)	28 dana
VI	Mleko (kontrola)	Ne (PBS)	28 dana

Dizajn drugog dela istraživanja prikazan je shematski na Slici 4b. Životinje (ukupno 45) su podeljene u pet grupa (po devet životinja) (Tabela 4). Prosečna masa životinja na početku eksperimenta iznosila je 140 ± 10 g. Telesne mase pacova tokom eksperimenta su beležene kao i tokom prethodnog dela istraživanja. Dve grupe životinja (I i III) su u trajanju od 21 dan tretirane suspenzijom bakterija, dok su preostale tri grupe dobijale mleko. Dvadeset drugog dana od početka peroralnog hranjenja, pacovima iz dve grupe tretirane bakterijskom suspenzijom (I i III) i iz dve grupe hranjene mlekom (II i IV) indukovan je kolitis unosom TNBS-a dok je preostaloj grupi hranjenoj mlekom (V) unesen PBS (zdrave kontrole). Dvema grupama životinja sa kolitisom, po jednoj tretiranoj bakterijama (I) i jednoj hranjenoj mlekom (II), na dan indukcije bolesti promenjena je vrsta peroralnog hranjenja, tako da je kod tretiranih pacova prekinut tretman bakterijama i nastavljeno hranjenje mlekom (preventivno tretirani pacovi sa kolitisom, I) dok je kod pacova hranjenih mlekom započet tretman bakterijama (terapijski tretirani pacovi sa kolitisom, II). Pacovi iz preostalih grupa peroralno su hranjeni na isti način kao od početka eksperimenta (kontinuirano tretirani sa kolitisom - III, kontrole sa kolitisom - IV, i zdrave kontrole - V). Životinje su hranjene odgovarajućim suspenzijama tokom narednih sedam dana i žrtvovane su 30. dana od početka eksperimenta.

Tkivo kolona kao i sadržaj kolona uzorkovani su kao što je prethodno objašnjeno. Dodatno su tkiva uzorkovana i smrznuta na -20°C radi biohemijske analize. Kolon svakog

pacova je fotografisan *in situ* pre uklanjanja iz životinja kao i nakon uzorkovanja, radi procene efikasnosti indukcije bolesti.

Tabela 4. Raspored životinja po grupama u drugom delu istraživanja

Grupa	Vrsta peroralnog tretmana	Indukcija kolitisa
I	Bakterijska suspenzija preventivni tretman	Da (TNBS)
II	Bakterijska suspenzija terapijski tretman	Da (TNBS)
III	Bakterijska suspenzija kontinuirani tretman	Da (TNBS)
IV	Mleko (kontrola)	Da (TNBS)
V	Mleko (kontrola)	Ne (PBS)

3. 2. 2. DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, elektroforeza u gradijentu denaturišućeg agensa) analiza

Bakterijska DNK iz smrznutih uzoraka fecesa izolovana je pomoću QIAamp DNA Stool Mini sistema (*Qiagen*, Hilden, Nemačka) uz dodavanje lizozima u puferu za lizu (30 mg/ml) i inkubaciju na 37°C tokom 40 min pre koraka zagrevanja 5 min na 95°C (*Castillo i saradnici*, 2006). Koncentracija izolovane DNK merena je spektrofotometrijski pomoću aparata Nanovue Plus Spectrophotometer (*GE Healthcare*, Little Chalfont, Ujedinjeno Kraljevstvo). Prinos DNK varirao je između 10 i 30 ng/μl. Lančana reakcija polimeraze (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) sa izolovanom DNK kao matricom postavljena je u skladu sa procedurom iz rada *Heilig* i saradnika (2002), sa izuzetkom broja ciklusa koji je smanjen na 25 u slučaju sadržaja ileuma i na 28 ciklusa u slučaju sadržaja kolona kako bi se sprečilo umnožavanje nespecifičnih fragmenata DNK (*Park i Crowley*, 2010):

početna denaturacija DNK - 94°C, 5 min
denaturacija DNK - 94°C, 30 s
vezivanje prajmera - 56°C, 20 s
sinteza produkata - 68°C, 40 s } 25/28 ciklusa
sinteza nedovršenih produkata - 68°C, 7 min

U eksperimentu je korišćen par prajmera Lab-0159f i Uni-0515-GCr od kojih je Lab-0159f specifičan za 16S rDNK laktobacila: Umnožavanje je vršeno dodavanjem 10 pmola

svakog od prajmera, 1 U (jedinica aktivnosti) Kapa Taq DNK Polimeraze (*Kapa Biosystems*, Cape Town, Južna Afrika), 1 × TaqA pufera sa magnezijumom, 0,2 mM dNTP (*Thermo Scientific*, Vilnius, Litvanija) i 1 µl izolovane DNK. U pozitivnu kontrolu PCR reakcije stavljeno je 2 - 3 ng genomske DNK izolovane iz čiste kulture soja BGHI14. PCR reakcija je postavljena u mašini Gene AmpR PCR System 2700 (*Applied Biosystems*, Foster City, Kalifornija, SAD). Neposredno nakon završetka reakcije, PCR produkti su pomešani sa bojom za nanošenje 6 × Loading Dye Solution (*Thermo Scientific*) u odnosu 3:1 i 10 µl smeše naneto je na gel sa gradijentom denaturišućeg agensa koji je pripremljen uz pomoć aparata DGGE-2001 (*C.B.S. SCIENTIFIC*, San Diego, Kalifornija, SAD). Gelovi su sadržali 16,25% rastvor akrilamid:bisakrilamid 19:1 (40%) i 30 - 60% gradijent uree i formamida pri čemu se 80% odnosi na 5,6 M ureu i 32% formamid. Uzorci na gelu su razdvajani tokom 16 h na 85 V u slučaju sadržaja ileuma i tokom 6 h na 220 V u slučaju sadržaja kolona u 1 × TAE puferu (40 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8, 20 mM sirćetna kiselina) (*Novinscak i saradnici*, 2008). Temperatura razdvajanja podešena je na 60°C. Obrada gela nakon elektroforeze vršena je u skladu sa uputstvima *Radojkovic i Kusic*, 2000. Gelovi su fiksirani 20 min u 10% etanolu i 0,5% glacijalnoj sirćetnoj kiselini. Zatim su 10 min bojani u 0,1% srebro-nitratu. Razvijanje je vršeno sve do pojave vidljivih traka u 1,5% rastvoru natrijum hidroksida (NaOH), 0,1% natrijum-borhidridu (NaBH₄) i 0,048% formaldehidu. Svi opisani koraci izvođeni su na sobnoj temperaturi u zamračenoj posudi uz blago mešanje. Razvijeni gelovi su fotografisani.

3. 2. 3. Sekvenciranje DGGE traka

Trake od interesa su isečene iz gela sterilnim hirurškim skalpelom. Isečeno parče gela postavljeno je u tubu od 1,5 ml gde je dodato 60 µl sterilne bidestilovane vode. Gel je izdrobljen teflonskim tučkom nakon čega je suspenzija inkubirana 10 min na 98°C (*Choa i saradnici*, 2011). Nakon koraka inkubacije suspenzija je vorteksovana i centrifugirana 2 min na 15 500 × g (5415D, *Eppendorf centrifuge*). Supernatanti (30 µl) su korišćeni za dalju analizu. Sa 5 µl supernatanta urađena je PCR reakcija sa prajmerima Lab-0159f/Uni-0515r (*Heilig i saradnici*, 2002) uz gore navedene uslove i povećanje temperature za

vezivanje prajmera na 68°C kako bi se sprečilo umnožavanje pozadinskih signala sa DGGE gela. Ukupna zapremina PCR smeše bila je 30 µl, a umnožavanje je vršeno uz 1 U Kapa polimeraze, 1 × TaqA pufer, 10 pmola svakog od prajmera i 0,2 mM koncentraciju dNTP smeše. Dobijeni PCR produkti prečišćeni su QIAquick sistemom za prečišćavanje PCR produkata (*Qiagen*) i ligirani su u pGEM-T Easy vektor pomoću pGEM-T Easy Vektor sistema (*Promega*, Fitchburg, Viskonsin, SAD) po uputstvima proizvođača. Ligirani konstrukti su transformisani u Ca²⁺ kompetentne *Escherichia coli* DH5α ćelije (*Hanahan*, 1983). Ukratko, ukupna zapremina ligacione smeše (10 µl) dodata je pripremljenim kompetentnim DH5α ćelijama (200 µl), nakon čega su ćelije inkubirane na ledu 40 min uz povremeno blago mešanje. U sledećem koraku ćelije su izložene toplotnom šoku na 42°C u trajanju od 90 s i neposredno posle smeštene na led. Posle 5 min inkubacije na ledu, ćelijama je dodat LB medijum za regeneraciju nakon čega su ćelije regenerisane 1 h na 37°C uz kontinuirano mešanje. Bakterijska suspenzija je utrljana na čvrste selektivne LA (*Luria Agar*) podloge sa 100 µg/ml ampicilina i 20 µg/ml X-Gal (5-bromo-4-hloro-3-indolil-β-D-galaktozid). Transformanti sa insertom su selektovani nakon 24 h aerobne inkubacije na 37°C kao bele kolonije u skladu sa uputstvima proizvođača pGEM-T Easy vektora (*Promega*). Bele kolonije su zasejane u tečni LB medijum sa 100 µg/ml ampicilina i iz prekonocne kulture su izolovani plazmidi pomoću QIAprep Spin Miniprep sistema (*Qiagen*). Sekvenciranje izolovanih pGEM-T Easy vektora sa ligiranim PCR produktima urađeno je M13F/R parom prajmera u *Macrogen Europe* servisu u Amsterdamu, Holandija (http://dna.macrogen.com/eng/support/seq/seq_uniprimer.jsp).

3. 2. 4. Histološka obrada tkiva

Tkivo kolona fiksirano u formalinu obrađeno je za histopatološku analizu po protokolu prilagođenom iz različitih literaturnih izvora (*Marjit*, 2009; *Dietrich* i *Kruger*, 2009; *Roberts* i saradnici, 2012). Nakon dehidracije tkiva provlačenjem kroz rastuće koncentracije etanola (30%, 50%, 70%, 96%, 100%) i ksilena, tkivo je infiltrirano u parafinu (tačka topljenja 56 - 58°C) otopljenom na 60°C. Očvršli blokovi parafina isečeni su na rotirajućem mikrotomu (RM2125RT, *Leica Microsystems*, Wetzlar, Nemačka).

Preseci debljine 5 μm zepljeni su na mikroskopske pločice u vodenom kupatilu podešenom na 50°C. Tkivo je fiksirano za pločice sušenjem na 37°C preko noći. Tkiva su obojena ručno pripremljenim Majerovim hematoksilinom (*Applichem GmbH*, Darmstadt, Nemačka) sa sirćetnom kiselinom i 0,25% alkoholnim rastvorom eozina G (*Carl Roth*, Karlsruhe, Nemačka). Preseci su deparafinizovani provlačenjem kroz ksilen i opadajuće koncentracije etanola (100%, 96%, 70%) do rehidratacije i bojani u hematoksilinu tokom 15 min. Pločice su zatim ispirane pod mlazom vode iz česme u trajanju od 5 min i bojene u eozinu tokom 2 min. Nakon ponovnog ispiranja od nekoliko minuta preseci su dehidratirani provlačenjem kroz rastuće koncentracije etanola (70%, 96%, 100%) do ksilena i pokrovna stakalca su fiksirana pomoću DPX medijuma (*BDH Prolabo*, Lutterworth, Ujedinjeno Kraljevstvo). Nakon sušenja u toku noći na sobnoj temperaturi, preseci su analizirani pod mikroskopom (*Nikon Instruments Inc.*, Tokyo, Japan).

Oštećenja tkiva procenjena su od strane patologa koji nije bio upoznat sa vrstama tretmana u eksperimentalnim grupama. Stepem oštećenja kod pacova iz prvog dela istraživanja ocenjen je semikvantitativno na skali od 0 do 9 (*Farooq* i saradnici, 2009) uzimajući u obzir sledeće promene: intenzitet inflamacije (0 - 5), promene arhitekture kriпти (0 - 3) i prisustvo edema (0 ili 1). S obzirom na veću raznovrsnost uočenih promena u kasnoj akutnoj fazi inflamacije kod pacova iz drugog dela istraživanja, sistem za procenu ukupnog stepena oštećenja uključivao je sledeće kriterijume: zadebljanje kriпти (1 - 3), zadebljanje submukoznog mišićnog tkiva (1 - 3), prisustvo imunskih ćelija u masnom tkivu (1 - 2), zastupljenost organizovanog limfoidnog tkiva (1 - 3), zastupljenost i vrsta infiltrata imunskih ćelija (1 - 8), prisustvo infiltrata u submukoznom mišićnom tkivu (1 - 10), oštećenje kriпти (1 - 3), proširenje submukoze (1 - 2), smanjene apsorptivne površine (1 - 3) i prisustvo nekrotičnog tkiva (1 - 3). Histološki preseci su vizuelizovani i fotografisani pomoću softvera NIS-Elements Microscope Imaging Software 2,3 (*Nikon Instruments Inc.*).

3. 2. 5. Esej lipidne peroksidacije

Stepem oksidativnog stresa u tkivu kolona pacova određen je kao nivo malondialdehida (MDA) u homogenatima tkiva. MDA predstavlja krajnji proizvod lipidne peroksidacije do

koje dolazi usled oksidativnog oštećenja lipida, a u reakciji sa tiobarbituratnom kiselinom (TBA) dovodi do formiranja obojenog produkta (*Garcia i saradnici, 2005*). Test je urađen po protokolu iz rada *McCluskey i saradnika (2011)*, uz manje izmene. Tkivo kolona izdrobljeno je u tečnom azotu i zatim homogenizovano u rastvoru 1,15% KCl do 10% homogenata u staklenim homogenizerima (*Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, SAD*). Odmah nakon homogenizacije, 200 µl suspenzije tkiva pomešano je sa 600 µl rastvora koji sadrži 0,375% TBA (*Sigma-Aldrich*), 0,25 M HCl i 15% rastvor trihlorsirćetne kiseline (TCA). U slepu probu je umesto uzorka dodat 0,05 M Tris-HCl pufer, pH 7,4. Smeša je vorteksovana i inkubirana na 95°C tokom 15 min. Nakon hlađenja na ledu uzorci su centrifugirani 5 min na $1\ 000 \times g$ (5417R, *Eppendorf centrifuge*), +4°C. Apsorbanca supernatanta na 532 nm merena je u polistirenskim semi-mikro kivetama (*Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka*) na spektrofotometru Ultrospec 3 300 pro (*Amersham Bioscience, Piscataway, Novi Džersi, SAD*). Kao standard za određivanje količine MDA korišćen je 1,1,3,3 - tetrametoksiopropan (*Sigma-Aldrich*) u opsegu koncentracija 0,1 - 1 µM.

3. 2. 6. Izolacija RNK iz tkiva

Izolacija iRNK urađena je po izmenjenom protokolu koji su opisali *Chomczynski i Sacchi, 2006*. Smrznuto tkivo (~100 mg) izdrobljeno je u tečnom azotu i rastvoreno u 1 ml denaturišućeg rastvora (4 M guanidin tiocijanat, 25 mM natrijum-citrat, 0,1 M β-merkaptotanol, 0,5% natrijumova so N-lauroilsarkozina). Nakon topljenja, suspenzija je blago dodatno homogenizovana nastavkom od 1 ml. Dodata je jedna zapremina kiselog fenola, pH 4, 1/10 zapremine 2 M natrijum acetata, pH 4, i 1/5 zapremine hloroforma i smeša je držana na ledu tokom narednih 10 - 15 min uz povremeno blago mešanje. Smeša je centrifugirana 20 min na $15\ 000 \times g$, +4°C (5417R, *Eppendorf centrifuge*) i gornja faza je prebačena u drugu tubu. Korak fenolske ekstrakcije ponovljen je kako bi se dodatno eliminisali proteini i genomska DNK. Zatim je dodata jedna zapremina izopropanola i tube su držane na -20°C tokom narednih 30 min. Smeša je centrifugirana 20 min na $15\ 000 \times g$ (5417R, *Eppendorf centrifuge*) na +4°C i talog je rastvoren u 300 µl denaturišućeg rastvora i ponovo homogenizovan nastavkom. U narednom koraku je ponovljena fenolska

ekstrakcija i precipitacija izopropanolom na gore opisani način i talog je rastvoren u 75% etanolu. Smeša je inkubirana 5 min na sobnoj temperaturi uz mešanje rukom i potom centrifugirana 20 min na $15\ 000 \times g$ (5417R, *Eppendorf centrifuge*), $+4^{\circ}\text{C}$. Ponovljena je precipitacija etanolom i talog je sušen 10 - 15 min na sobnoj temperaturi i rastvoren u 25 μl sterilne bidestilovane vode. Koncentracija i čistoća RNK određena je spektrofotometrijski aparatom Nanovue Plus Spectrophotometer (*GE Healthcare*). Prinosi RNK dobijeni opisanim protokolom bili su u opsegu 400 - 1 000 ng/ μl . Svi koraci izolacije vršeni su uz odgovarajuće predostrožnosti kako bi se smanjila kontaminacija uzoraka spoljnim ribonukleazama. Izolovana RNK je čuvana na -70°C do daljih analiza.

3. 2. 7. Kvantitativni PCR (qPCR)

Reverzna Transkripcija (RT) postavljena je u skladu sa uputstvima proizvođača enzima (*Thermo Scientific*). U izolovanu RNK (2 μg) dodato je 100 pmola nasumičnih heksamera (*Applied Biosystems* i *Thermo Scientific*), sterilna bidestilovana voda do 12,5 μl , i smeša je inkubirana 5 min na 65°C . Nakon toga smeša je ohlađena na ledu i dodate su sledeće komponente: 20 U RiboLock ribonukleaznog inhibitora (*Thermo Scientific*), 1 mM dNTP smeše (*Thermo Scientific*), 200 U reverzne transkriptaze i 1 \times reakcioni pufer, do konačne zapremine od 20 μl . Reakcija je nastavljena po sledećem programu: 10 min na 25°C , 60 min na 42°C i 10 min na 70°C . Kontrole bez reverzne transkriptaze uključene su radi provere odsustva kontaminacije genomskom DNK. Svi koraci reakcije izvođeni su u mašini Gene AmpR System 2 700 (*Applied Biosystems*).

Sintetisana cDNK (Complementary, komplementarna DNK) umnožena je u qPCR (Quantitative PCR, količinski PCR) reakciji mašinom 7500 Real Time System (*Applied Biosystems*) koristeći parove prajmera: β -actin_fw/ β -actin_rev, IL-1 β _fw/IL-1 β _rev, TNF α _fw/TNF α _rev, IL-17F_fw/IL-17F_rev, Hsp70_fw/Hsp70_rev i Tp1_fw/Tp1_rev. Prajmeri su specifični za kodirajuće regione sekvenci β -aktin, *IL-1 β* , *TNF α* , *IL-17F*, *Hsp70* i *Tjp1* gena vrste *Rattus norvegicus*. Program qPCR reakcije postavljen je u skladu sa uputstvima proizvođača polimeraze (*Kapa Biosystems*): aktivacija enzima 3 min na 95°C , 40 ciklusa od po 15 s na 95°C i od po 60 s na 60°C . Konačna zapremina iznosila je 20 μl i

sadržala je 4 pmola prajmera, 1 x KAPA SYBR FAST Universal Master Mix (*Kapa Biosystems*), 0,4 µl ROX Reference boje i 2 µl cDNK matrice. Efikasnost prajmera i optimalna koncentracija cDNK matrice određena je esejem apsolutne kvantifikacije koristeći desetostruka razblaženja sintetisane cDNK od 1 do 1/100 000. U eseju relativne kvantifikacije upotrebljeno je 1/10 razblaženje cDNK pri čemu je, u slučaju prvog dela istraživanja, kao kalibrator postavljen uzorak iz grupe zdravih kontrolnih pacova sa trajanjem tretmana od 16 dana, dok je u u drugom delu istraživanja kao kalibrator postavljen uzorak iz zdrave kontrolne grupe životinja. Relativna ekspresija izračunata je po formuli $2^{-\Delta\Delta C_T}$ gde se ΔC_T odnosi na razliku između prazne vrednosti ciklusa (C_T) dobijene za ciljani gen i C_T dobijene za konstitutivno eksprimirani gen za β -aktin (unutrašnja kontrola). Vrednost $\Delta\Delta C_T$ za svaki uzorak meri razliku između sopstvene ΔC_T i ΔC_T vrednosti kalibratora (*Livak i Schnittgen, 2001*). Kontrole cDNK bez reverzne transkriptaze umnožene su u qPCR reakciji kako bi se potvrdilo da je kontaminacija genomskom DNK u uzorcima izolovanih iRNK u prihvatljivom opsegu (*Cheeseman i saradnici, 2012*).

3. 3. Uloga MbpL i AggL proteina u vezivanju laktobacila za GI mukozu pacova

3. 3. 1. Transformacija bakterijskih ćelija

Soj BGHO1 transformisan je plazmidima pAZIL, pAZIL-mbpL i pAZIL-aggL koje su prethodno konstruisali i izolovali *Kojic i saradnici (2011)*, po protokolu za transformaciju *Walker i saradnika (1996)*, uz optimizaciju protokola za transformaciju soja od interesa. Iz prekonoćne kulture BGHO1 zasejan je 2% inokulum u MRS medijum sa 2% glicinom koji ima ulogu da omekša zid bakterijske ćelije i olakša ulazak plazmida. Bakterije su kultivisane do optičke gustine $OD_{600} = 0,6$. Kultura je zatim centrifugirana 15 min na $1\ 600 \times g$ (5804R, *Eppendorf centrifuge*), $+4^\circ C$, i dva puta isprana u ohlađenom HEB puferu (272 mM saharoza, 8 mM HEPES, puferisano pomoću kalijum-hidroksida do pH 7,4) uz blago mešanje na ledu između koraka centrifugiranja. Talog je na kraju resuspendovan u hladnom HEB puferu u 50 puta manjoj zapremini u odnosu na početnu zapreminu bakterijske kulture, dodati su izolovani plazmidi (približno 1 µg) i smeša je inkubirana na ledu 10 min. Uzorci (200 µl) su premešteni u ohlađene kivete za elektroporaciju sa širinom otvora 2 mm

(*Eppendorf*) i suspenzija je podvrgnuta električnom pulsnu jačine 12,5 kV/cm u elektroporatoru tipa 2510 (*Eppendorf*). Neposredno nakon elektroporacije ćelijama je dodato 600 µl hladnog MRS medijuma i smeša je inkubirana 5 min na ledu kako bi se sprečilo brzo zatvaranje pora i olakšao ulazak plazmida u ćeliju. Bakterije su regenerisane 2 - 3 h aerobno na 37°C. Smeša je nakon regeneracije utrljana na čvrste MRS podloge kojima je dodat eritromicin u koncentraciji 15 µg/ml. Transformanti su selektovani nakon 48 h anaerobnog rasta na 37°C.

Radi provere dobijenih transformanata izolovana je ukupna plazmidna DNK po metodi alkalne lize (*Sambrook i Russell, 2006*). Bakterije u logaritamskoj fazi rasta (5 - 10 ml tečne kulture) centrifugirane su 5 min na $3\ 500 \times g$ (5804, *Eppendorf centrifuge*), oprane u TEN puferu (50 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM NaCl, pH 8), i resuspendovane u 200 µl pufera E1 (60 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8) u koji je dodato 8 mg/ml lizozima (*Serva Electrophoresis*). Ćelije su vorteksovane i nakon inkubacije od 30 min na 37°C, dodato je najpre 200 µl E2 pufera (200 mM NaOH, 1% SDS), blago promešano, a zatim još 200 µl pufera E3 (3,1 M kalijum acetat, puferisano glacialnom sirćetnom kislinom do pH 5,5). Nakon blagog mešanja, lizirane ćelije su centrifugirane 12 min na $15\ 500 \times g$ (5415D, *Eppendorf centrifuge*). Supernatant je prebačen u drugu tubu gde je dodato 200 µl fenol-hloroforma, pH 8. Faze su razdvojene centrifugiranjem 5 min na $15\ 500 \times g$ (5415, *Eppendorf centrifuge*). Iz gornje faze, očišćene od proteina, plazmidi su precipitirani dodavanjem 1/10 zapremine 3 M natrijum-acetata, pH 4,8 i jedne zapremine izopropanola i centrifugiranjem 20 min na $15\ 500 \times g$ (5415, *Eppendorf centrifuge*). Talog je opran u ohlađenom 75% etanolu, osušen na 37°C i rastvoren u 30 - 50 µl bidestilovane vode sa 0,2 mg/ml ribonukleaze A (*Sigma-Aldrich*).

Plazmidi su provereni na horizontalnom 1% agaroznom gelu (*Lee i saradnici, 2012*). Ukratko, agarozna (*Applichem*) je otopljena u $1 \times$ TAE puferu (40 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8, 20 mM glacialna sirćetna kiselina), ohlađena do 60°C, i dodat je etidijum bromid (*Serva Electrophoresis*) u koncentraciji od 0,5 µg/ml. Nakon razlivanja i hlađenja gela uzorci, pomešani sa Arancio G bojom za nanošenje uzoraka (*Carlo Erba, Val de Reuil, Francuska*), naneti su na gel i trake su razdvajane pod voltažom od 80 V (PS9009, *Gibco*

BRL, Grand Island, Njujork, SAD). Marker molekulskih masa (1 kb) kupljen je od *Thermo Scientific*. Gel je vizuelizovan pod UV-lampom pomoću sistema BioDocAnalyze live (*Biometra*, Goettingen, Nemačka), a vizuelizacija i fotografija gela urađene su pomoću softvera BioDocAnalyze (*Biometra*). Kako bi se proverila veličina konstrukata u transformantima, plazmidi su isečeni *EcoRI* restrikcionim enzimom čije mesto prepoznavanja je prisutno u pAZIL, pAZIL-mbpL i pAZIL-aggL vektorima (Kojic i saradnici, 2011). U 20 µl izolovanih plazmida dodato je 2 U *EcoRI* enzima i 3 µl *EcoRI Unique* pufera (*Thermo Scientific*), i bidestilovane vode do 30 µl. Plazmidi su sečeni u toku noći na 37°C i sutradan su provereni na 1% agaroznom gelu kao što je prethodno objašnjeno.

Transformanti su dodatno provereni sekvenciranjem gena za 16S rRNK. Hromozomalna DNK izolovana je po standardnom protokolu (*De los Reyes-Gavilán* i saradnici, 1992) uz modifikacije. Bakterije u logaritamskoj fazi rasta ($OD_{600}=0,6 - 0,8$) iz 5 - 10 ml kulture istaložene su na 3 500 g (5804, *Eppendorf centrifuge*), oprane u TEN puferu i resuspendovane u 500 µl PP pufera (40 mM amonijum-acetat, 1,5 mM magnezijum-acetat, 500 mM saharoza, pH 8) sa lizozimom (*Serva Electrophoresis*) u koncentraciji od 8 mg/ml. Posle inkubacije od 30 min na 37°C u smešu je dodato 250 µl 2% SDS-a, ćelije su vorteksovane i dodato je 200 µl fenol-hloroforma, pH 8. Posle vorteksovanja i centrifugiranja 5 min na $15\ 500 \times g$ (5415D, *Eppendorf centrifuge*) iz gornje faze je precipitirana hromozomalna DNK dodavanjem iste zapremine izopropanola i 1/10 zapremine 3 M natrijum-acetata i centrifugiranjem 20 min na $15\ 500 \times g$ (5415D, *Eppendorf centrifuge*). Talog je opran u 75% etanolu, osušen na 37°C i rastvoren u 50 µl bidestilovane vode. Koncentracija dobijene DNK određena je spektrofotometrijski (Nanovue Plus Spectrophotometer, *GE Healthcare*). PCR reakcija sa izolovanom DNK kao matricom (približno 1 µg) postavljena je sa po 10 pmola prajmera Uni-16S_fw/Uni-16S_rev (Jovic i saradnici, 2009), 1 U Kapa Taq DNK polimeraze (*Kapa Biosystems*), 1 × TaqA puferom sa magnezijumom (koji je u pakovanju sa polimerazom) i 0,2 mM koncentracijom dNTP mešavine (*Thermo Scientific*). Sekvence korišćenih prajmera date su

u Tabeli 1. Reakcija je postavljena u mašini Gene AmpR PCR System 2700 (*Applied Biosystems*) po programu *Jovcic* i saradnika (2009):

početna denaturacija DNK - 94°C, 5 min	} 30 ciklusa
denaturacija DNK - 94°C, 30 s	
vezivanje prajmera - 50°C, 30 s	
sinteza produkata - 72°C, 30 s	
sinteza nedovršenih produkata - 72°C, 7 min	

PCR proizvodi su prečišćeni QIAquick sistemom za prečišćavanje PCR proizvoda (*Qiagen*), nakon čega su sekvencirani istim parom prajmera kojim su umnoženi, u Macrogen Europe servisu u Amsterdamu, Holandija (http://dna.macrogen.com/eng/support/seq/seq_uniprimer.jsp).

Kultivisanje dobijenih BGHO1/pAZIL, BGHO1/pAZIL-mbpL i BGHO1/pAZIL-aggL derivata u daljim testovima vršeno je u medijumima sa eritromicinom (*Serva Electrophoresis*) u koncentraciji od 15 µg/ml.

3. 3. 2. Izolacija RNK iz bakterijskih ćelija i RT-PCR

Za izolaciju ukupne RNK (*Chomczynski i Sacchi*, 2006), 20 ml bakterijske kulture u logaritamskoj fazi rasta centrifugirano je 10 min na $2\ 000 \times g$, +4°C (5804R, *Eppendorf centrifuge*), nakon čega je talog usitnjen u tečnom azotu i resuspendovan u 500 µl denaturišućeg rastvora (4 M guanidin tiocijanat, 25 mM natrijum-citrat, 0,1 M β-merkaptoetanol, 0,5% natrijumova so N-lauroilsarkozina). Suspenzija je blago homogenizovana nastavkom od 1 ml i dodata je jedna zapremina fenola, pH 4, 1/10 zapremine 2 M natrijum acetata, pH 4, i 1/5 zapremine hloroforma. Suspenzija je inkubirana na ledu 10 - 15 min uz blago mešanje, bez vorteksovanja, nakon čega je centrifugirana 20 min na $15\ 000 \times g$ (5417R, *Eppendorf centrifuge*), +4°C. Gornja faza je precipitirana jednom zapreminom izopropanola 30 min na -20°C. Talog je resuspendovan u 300 µl denaturišućeg rastvora i ponovljeni su koraci fenolske ekstrakcije i precipitacije izopropanolom. Talog je opran u 75% etanolu, osušen na sobnoj temperaturi i rastvoren u 20 µl sterilne bidestilovane vode. Koncentracija RNK određena je spektrofotometrijski

(Nanovue Plus Spectrophotometer, *GE Healthcare*). Reverzna transkripcija (RT) postavljena je po protokolu koji je gore opisan za iRNK izolovanu iz tkiva pacova.

Sintetisana cDNK korišćena je kao matrica u PCR reakcijama sa parovima prajmera prikazanim u Tabeli 2. Par prajmera mbpLcod_fw/mbpLcod_rev specifičan je za kodirajući region *mbpL* gena (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=mbpL>) dok su aggLcod_fw/aggLcod_rev prajmeri specifični za kodirajući region *aggL* gena (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=aggL>). Prajmeri rpoBcod_fw/rpoBcod_rev dizajnirani su na osnovu kodirajućeg dela sekvence za konstitutivno eksprimiranu RpoB subjedinicu RNK polimeraze iz vrste *Lb. salivarius*. Ukupna zapremina PCR smeše iznosila je 30 µl, a u reakciju je stavljen 1 µl 1/10 puta razblažene cDNK, 10 pmola svakog od prajmera, 1 U Kapa polimeraze (*Kapa Biosystems*), 1 × TaqA pufer, i 0,2 mM koncentracija dNTP smeše (*Thermo Scientific*). PCR program postavljen je u mašini Gene AmpR PCR System 2700 (*Applied Biosystems*):

početna denaturacija DNK - 94°C, 5 min	} 30 ciklusa
denaturacija DNK - 94°C, 30 s	
vezivanje prajmera - 58°C, 30 s	
sinteza produkata - 72°C, 30 s	
sinteza nedovršenih produkata - 72°C, 7 min	

PCR produkti su provereni na 2% agaroznom gelu i fotografisani na gore opisani način.

3. 3. 3. Određivanje afiniteta bakterijskih ćelija za organske rastvarače

Afinitet derivata BGKP1-20 i BGHO1 za organske rastvarače uključujući heksadekan, etil-acetat i hloroform testiran je u skladu sa protokolom iz publikacije *Jacquet* i saradnika (2012), uz manje izmene. Prekonoćne kulture bakterija istaložene su centrifugiranjem na $3\ 600 \times g$ (5804, *Eppendorf centrifuge*), ćelije su oprane u 10 mM kalijum-fosfatnom puferu (pH 7) i resuspendovane u istom puferu do OD₆₀₀ vrednosti od $1 \pm 0,05$ u slučaju derivata BGHO1 i $0,5 \pm 0,05$ u slučaju derivata BGKP1-20. Izražena agregacija BGKP1-20/pAZIL-aggL derivata otežavala je merenje apsorbance u slučaju povećane gustine bakterija.

Optička gustina kultura određivana je u staklenim epruvetama pomoću spektrofotometra Ultrospec 500 pro (*Amersham Bioscience*). U sledećem koraku u 3 ml bakterijske suspenzije dodato je po 150 µl odgovarajućeg rastvarača. Smeša je vorteksovana dva puta sa pauzama od po 30 s između vorteksovanja. Kod BGKP1-20 derivata testiran je afinitet za heksadekan, i vodena faza je uzorkovana brzo nakon vorteksovanja smeše. U slučaju BGHO1 derivata, određen je afinitet za sva tri organska rastvarača, i vodena faza je uzorkovana nakon 30 min. Optička gustina vodene faze kao i bakterijske suspenzije pre mešanja sa organskim rastvaračem na $\lambda = 600$ nm određena je u polipropilenskim semi-mikro kivetama (*Sarstedt*) pomoću spektrofotometra Ultrospec 3 300 pro (*Amersham Bioscience*). Afinitet (A) derivata za heksadekan izračunat je prema sledećoj formuli:

$$A = [(ODa - ODb) / ODa]$$

ODa – optička gustina na 600 nm suspenzije bakterija u puferu

ODb – optička gustina na 600 nm puferske faze nakon mešanja bakterijske suspenzije u puferu i organskog rastvarača.

Vrednosti afiniteta za heksadekan u opsegu između 0 - 35% predstavljaju niske, između 36 - 70% srednje i između 71 - 100% visoke vrednosti hidrofobnosti (*Ocaña i saradnici, 1999*).

Test afiniteta ponovljen je u triplikatu za svaki od testiranih derivata.

3. 3. 4. Test vezivanja bakterijskih ćelija za svinjski želudačni mucin *in vitro*

Vezivanje derivata BGKP1-20 i BGHO1 za mucin urađeno je po protokolu primenjenom od strane *Muñoz-Provencio* i koautora (2009), uz određene izmene. Bunarići Maxisorb ploče (*Nunc, Roskilde, Danska*) obloženi su dodavanjem 200 µl svinjskog želudačnog mucina tipa II (*Sigma-Aldrich*) rastvorenog u 50 mM karbonatnom puferu, pH 9,6, u koncentraciji od 30 mg/ml i inkubacijom na +4°C tokom 24 h. Ista zapremina karbonatnog pufera dodata je u kontrolne bunariće. Obloženi i neobloženi bunarići oprani su tri puta u PBS-u nakon čega je dodato 200 µl PBS pufera sa 1% Tween-20 deterdžentom u cilju vezivanja nepopunjenih mesta na površini plastike. Nakon inkubacije u trajanju od 1 h na sobnoj temperaturi, bunarići su oprani PBS puferom i dodato je 200 µl

bakterijske suspenzije resuspendovane u PBS puferu sa apsorbancom A_{550} podešenom na 1 pomoću spektrofotometra Ultrospec 500 pro (Amersham Bioscience). Bakterijske suspenzije su pripremljene direktnom inokulacijom prekonoćne kulture u PBS-u do željene optičke gustine, kako bi se izbeglo vorteksovanje iz gore navedenog razloga. Svaki derivat je testiran u četvoroplikatu uključujući i obložene i kontrolne, neobložene bunariće. Nakon prekonoćne inkubacije na $+4^{\circ}\text{C}$, bunarići su oprani tri puta PBS puferom u koji je dodat 0,05% Tween-20 kako bi se uklonile nevezane ćelije. Fiksiranje vezanih bakterija vršeno je sušenjem ploče 45 min na 65°C . U sledećem koraku u bunariće je dodato po 200 μl kristal violeta (Serva Electrophoresis) u koncentraciji od 1 mg/ml. Nevezana boja je posle 45 min uklonjena pranjima u PBS puferu, nakon čega je dodat 50 mM citratni pufer, pH 4, kako bi se rastvorila boja vezana za bakterije. Apsorbanca na 620 nm određena je nakon 1 h inkubacije na sobnoj temperaturi korišćenjem čitača Labsystems Multiscan RC plate reader (MTX Lab Systems, Vienna, Austrija). Nivo apsorbance u bunarićima uzet je kao pokazatelj vezivanja derivata za površinu bunarića.

U slučaju BGHO1 derivata, uvedene su izmene u protokolu koje su se odnosile na upotrebenu plastiku (standardne ploče sa ravnim dnom za kulturu tkiva, Sarstedt, umesto Maxisorb ploča) i eliminisanje koraka oblaganja površine bunarića 1% Tween-20-PBS puferom, s obzirom da su uključene odgovarajuće kontrole vezivanja za neobloženu površinu plastike.

3. 3. 5. Test vezivanja bakterijskih ćelija za HT29-MTX ćelije *in vitro*

Test adhezije vršen je u skladu sa metodologijom opisanom u radu Sánchez i koautora (2010). Za esej je korišćen konfluentan sloj intestinalnih HT29-MTX ćelija zasejanih u ploče sa ravnim dnom za kulturu tkiva od 24 bunarića (Sarstedt). Pre dodavanja bakterija, iz bunarića sa ćelijama izvučen je medijum za propagaciju ćelija koji je pripremljen kao 10% fetalni goveđi serum, FBS (*Foetal Bovine Serum*) (PAA, Pasching, Austrija) u DMEM medijumu (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (PAA) i ćelije su oprane tri puta u PBS puferu. Prekonoćne kulture bakterija razblažene su na sledeći način: prva razblaženja (1/10) pripremljena su u PBS-u dok su naredna dva razblaženja (1/10) bila u DMEM

medijumu u koji je dodat 10% FBS. U slučaju BGKP1-20/pAZIL-aggL derivata, bakterije nisu vorteksovane kako bi se izbeglo formiranje agregata. Poslednje razblaženje bakterija (500 µl) naneto je u bunariće sa HT29-MTX ćelijama i u prazne bunariće (kontrola) i dodatnih 100 µl istog razblaženja iskorišćeno je za pripremu desetostrukih razblaženja u fiziološkom rastvoru radi brojanja bakterijskih ćelija. Time je određen broj bakterija nanetih na HT29-MTX ćelije. Nakon 1 h inkubacije bakterija sa HT29-MTX ćelijama ili u praznim bunarićima u atmosferi sa 5% CO₂ na 37°C u HERACell 150 inkubatoru (*Thermo Electron*, Waltham, Massachusetts, SAD), medijum sa nevezanim bakterijama je uklonjen i bunarići su oprani tri puta u PBS-u. Nakon toga, dodato je 500 µl 0,25 % tripsina (PAA) u PBS-u kako bi se bakterije odvojile od HT29-MTX ćelija ili površine plastike i ploča je inkubirana 15 min na 37°C, 5% CO₂. Iz tripsinizovanog sadržaja bunarića pripremljena su razblaženja u odnosu 1:10 u fiziološkom rastvoru za brojanje bakterijskih ćelija koje su se vezale za HT29-MTX ćelije odnosno za površinu plastike. Alikvoti (10 µl) razblaženja pripremljeni pre i nakon interakcije bakterija sa HT29-MTX ćelijama inokulisani su na čvrste selektivne podloge sa eritromicinom. Adhezija derivata za HT29-MTX ćelije izračunata je iz formule:

Adhezija = Broj bakterijskih ćelija u tripsinizovim suspenzijama (HT29-MTX i bakterijskih ćelija) / broj bakterijskih ćelija resuspendovanih u DMEM medijumu pre nanošenja na HT29-MTX ćelije

Broj bakterija je određen kao broj kolonija na selektivnim čvrstim podlogama nakon 48 h rasta na optimalnoj temperaturi. Test adhezije urađen je u četvoroplikatu kod svih testiranih derivata.

3. 3. 6. Test vezivanja bakterijskih ćelija za isečke creva *ex vivo*

Test je urađen po protokolu *Muñoz-Provencio* i koautora (2009). Ženke pacova Wistar soja telesnih masa oko 200 ± 10 g žrtvovane su rastućim koncentracijama ugljen-dioksida. Delovi ileuma i kolona su isečeni, uzdužno otvoreni i luminalni sadržaj je pažljivo uklonjen bez oštećivanja površine mukoze. Zatim su tkiva oprana u PBS puferu i isečki težine oko 100 mg pozicionirani su luminalnom stranom ka gore na umetke sa mrežicama (veličine

otvora 500 µm) smeštene u bunariće prečnika 15 mm ploče za kulturu tkiva (*Corning Inc.*, Corning, Nju Jork, SAD). Prekonočne kulture bakterija razblažene su 1/100 u RPMI 1640 medijumu sa HEPES puferom i L-Glutaminom (PAA). Vorteksovanje bakterija je izbegavano u slučaju BGKP1-20 derivata kao što je prethodno objašnjeno. U bunariće sa isečcima tkiva dodato je 3 ml pripremljenih bakterijskih suspenzija u RPMI medijumu. Za svaki derivat BGKP1-20 i BGHO1 sojeva test vezivanja rađen je u triplikatu. Nakon 4 h inkubacije isečaka sa bakterijama u uslovima sa 5% CO₂ na 37°C u HERACell 150 inkubatoru (*Thermo Electron*), tkiva su prebačena u Falkon-tubu (*Sarstedt*) sa 10 ml PBS-a za korak ispiranja. Tuba je lagano mešana tokom 90 s i nakon toga su tkiva prebačena u stakleni homogenizer u koji je dodat 1 ml fiziološkog rastvora. Iz medijuma za inkubaciju (RPMI), pufera za pranje i rastvora za homogenizaciju pripremljena su razblaženja u fiziološkom rastvoru radi određivanja CFU. Alikvoti (10 µl) razblaženja inokulisani su na čvrste selektivne podloge sa eritromicinom koje su inkubirane u odgovarajućim uslovima narednih 48 h. Broj izraslih kolonija uzet je kao merilo broja živih ćelija u testiranim frakcijama: homogenatima tkiva, medijumu za inkubaciju (RPMI) i medijumu za ispiranje (fiziološki rastvor). Stepenn adhezije za isečke tkiva izračunat je po sledećoj formuli:

Adhezija = Broj bakterijskih ćelija u homogenatu tkiva/ broj bakterijskih ćelija u (homogenatu tkiva + medijumu za inkubaciju + medijumu za ispiranje).

3. 3. 7. Test vezivanja bakterijskih ćelija za crevnu mukozu *in vivo*

U istraživanju su korišćene ženke Wistar pacova, telesne mase od približno 190 ± 20 g na početku tretmana. Životinje su bile podeljene u po četiri eksperimentalne grupe za svaku grupu derivata sa po tri životinje po grupi u slučaju derivata BGKP1-20 soja i po sedam životinja po grupi u eksperimentu sa derivatima BGHO1 soja. U slučaju BGKP1-20 derivata tretman je trajao 14 dana, dok je tretman BGHO1 derivatima trajao nedelju dana duže. U eksperimentu sa BGHO1 derivatima praćena je i telesna masa pacova tokom hranjenja. Tri grupe životinja hranjene su odgovarajućim derivatima BGKP1-20 odnosno BGHO1 soja i jedna kontrolna grupa hranjena je mlekom (kontrola). Životinje su na kraju eksperimenta žrtvovane rastućim koncentracijama ugljen-dioksida. Isecci ileuma i kolona

su izvađeni, isečeni uzdužno, sadržaj lumena je pažljivo uklonjen i tkivo je isprano u fiziološkom rastvoru. Približno 100 mg luminalnog sadržaja ileuma i kolona i tkivo ileuma i kolona iste težine uzorkovano je i resuspendovano u 1 ml fiziološkog rastvora. Sadržaj je homogenizovan snažnim vorteksovanjem, a tkivo je homogenizovano u staklenim ručno napravljenim homogenizerima. Alikvoti homogenata sadržaja i tkiva direktno su inokulisani (10 µl) na čvrste podloge sa eritromicinom i dodatno su iskorišćeni (100 µl) za pripremu desetstrukih razblaženja u fiziološkom rastvoru. Razblaženja su zatim na isti način inokulisana na selektivne podloge. Broj kolonija na čvrstim selektivnim podlogama nakon 48 h rasta na optimalnoj temperaturi uzet je kao pokazatelj broja bakterija u luminalnom sadržaju i u tkivnim homogenatima. Na podlogama sa inokulisanim sadržajem i tkivom kontrolnih netretiranih pacova nisu uočene kolonije. Adhezija za mukozu ileuma i kolona izračunata je po sledećoj formuli:

Adhezija = Broj bakterija u tkivnom homogenatu / broj bakterija u (tkivnom homogenatu + sadržaju lumena)

4. REZULTATI

4. 1. Reakcija tkiva kolona pacova na unos soja *Lactobacillus fermentum* BGHI14

4. 1. 1. Odgovor tkiva kolona zdravih pacova na tretman sojem BGHI14 i optimizacija uslova za indukciju kolitisa

U prvom delu istraživanja praćen je odgovor tkiva zdravih pacova i pacova sa kolitisom nakon 16 dana tretmana pacova sojem BGHI14. U cilju razumevanja mehanizama delovanja soja BGHI14 odgovor tkiva kolona zdravih pacova na unos soja BGHI14 praćen je i nakon produženog tretmana bakterijama u trajanju od 28 dana. Dobijeni rezultati su u narednoj fazi istraživanja korišćeni za planiranje optimalnog momenta indukcije kolitisa u odnosu na početak tretmana bakterijama.

4. 1. 1. 1. Promena telesnih masa pacova tokom eksperimenta

Tokom tretmana sojem BGHI14, praćena je telesna masa pacova kao pokazatelj zdravstvenog statusa eksperimentalnih životinja. Zdravi kontrolni pacovi pokazali su obrazac promene telesnih masa tokom prvih 16 dana peroralnog hranjenja koji se razlikovao u odnosu na pacove tretirane sojem BGHI14 (Slika 5). U zdravim grupama hranjenim 16 i 28 dana (Slike 5b, 5c) tretman sojem BGHI14 je doveo do statistički značajnog pada u telesnim masama 11. i 13. dana od početka tretmana. Nisu uočene razlike u telesnim masama između pacova tretiranih sojem BGHI14 i kontrolnih pacova u ostatku tretmana. Slično, nije primećena ni statistički značajna razlika između pacova tretiranih sojem BGHI14 i kontrolnih pacova sa kolitisom (Slika 5a).

4. 1. 1. 2. Detekcija soja BGHI14 u sadržaju ileuma pacova

U cilju praćenja preživljavanja BGHI14 soja u GI traktu pacova iz sadržaja ileuma pacova tretiranih sojem BGHI14 izolovana je ukupna DNK, 16S rDNK gen laktobacila umnožen je specifičnim prajmerima i PCR produkti su analizirani na DGGE gelu. DGGE profil proizvoda umnožavanja gena za bakterijsku 16S rRNK dobijen iz čiste kulture soja BGHI14 ukazao je na prisustvo većeg broja gena za 16S rRNK u genomu soja, pri čemu jedna kopija dominira kao najjači signal na gelu. DGGE analiza proizvoda umnožavanja

bakterijskog 16S rDNK gena iz sadržaja ileuma dva od ukupno četiri analizirana zdrava pacova tretirana sojem BGHI14 u trajanju od 16 dana pokazala je prisustvo signala koji po poziciji na gelu odgovara najjačem signalu dobijenom iz čiste kulture soja BGHI14 (Slika 6). Pretpostavljena traka poreklom iz sadržaja ileuma zdravih pacova tretiranih sojem BGHI14 kao i najzastupljenija traka dobijena iz čiste BGHI14 kulture, su sekvencirane i sekvence su upoređene sa NCBI bazom podataka. Rezultati su potvrdili da sve pretpostavljene trake pripadaju vrsti *Lb. fermentum*. U sadržaju ileuma kontrolnih pacova nije uočena traka koja odgovara dominantnom signalu čiste kulture soja BGHI14.

4. 1. 1. 3. Histološka analiza tkiva kolona pacova

Morfološke promene u tkivu kolona pacova praćene su histološki H&E bojenjem i mikroskopskom analizom pripremljenih preparata. Histološka procena koja je uključivala procenu intenziteta inflamacije, oštećenja kriпти i formiranja edema u tkivu kolona ukazala je na statistički značajno povećanje patohistoloških promena kod zdravih pacova tretiranih sojem BGHI14 u trajanju od 16 dana u odnosu na zdrave kontrolne životinje bez obzira na trajanje tretmana (Slika 7). Uočene promene nisu bile praćene formiranjem edema ni promenom arhitekture kriпти (Slika 8). Kod pacova sa kolitisom uočen je statistički značajno veći stepen patohistoloških promena u odnosu na zdrave kontrolne pacove, dok takva razlika nije uočena između pacova sa kolitisom i zdravih pacova tretiranih sojem BGHI14. Takođe, histološki nije primećena razlika između pacova tretiranih sojem BGHI14 i kontrolnih pacova sa kolitisom. Na Slici 8 mogu se videti veliki submukozni infiltrati sastavljeni od polimorfonukleara kod pacova sa kolitisom tretiranog sojem BGHI14 (8A) i oštećenje kriпти i masivna infiltracija neutrofila kod kontrolnog pacova sa kolitisom (8B). Kod zdravog pacova tretiranog sojem BGHI14 u trajanju od 16 dana prisutna je difuzna submukozna akumulacija mononukleara, eozinofila i sporadično neutrofila u slučaju tretmana bakterijama (8C) nasuprot normalnoj morfologiji kod zdravog kontrolnog pacova (8D). Prisustvo sporadičnih mukoznih i submukoznih agregata limfocita uočeno je kod zdravog pacova tretiranog sojem BGHI14 tokom 28 dana (8E); iste promene se ne uočavaju u kolonu zdravog kontrolnog pacova iz grupe sa produženim tretmanom (28 dana) (8F).

4. 1. 1. 4. Transkripcija gena u tkivu kolona pacova

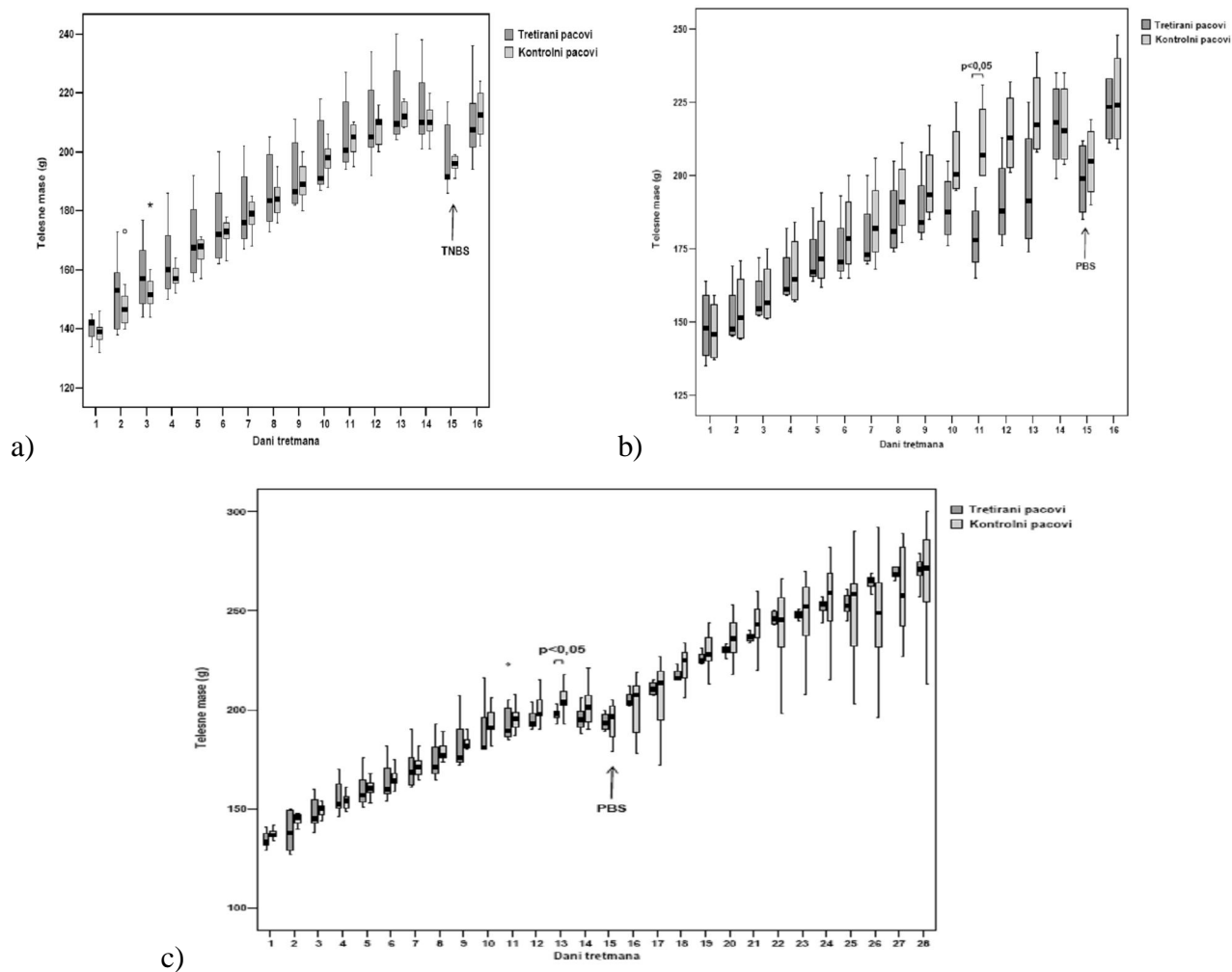
Parametri imunskog odgovora i integriteta GI barijere praćeni su qPCR analizom ukupne RNK izolovane iz kolona zdravih i pacova sa kolitisom tretiranih sojem BGHI14 i kontrolnih pacova. Analiza nivoa *IL-1 β* transkripata ukazala je da unos TNBS-a indukuje značajno veću ekspresiju *IL-1 β* iRNK u odnosu na zdrave pacove. Nije uočena razlika u indukciji *IL-1 β* iRNK između pacova sa kolitisom tretiranih sojem BGHI14 i kontrolnih pacova sa kolitisom. Zdravi pacovi tretirani sojem BGHI14 pokazali su statistički značajno povećanje nivoa iRNK za IL-1 β nakon 28 dana tretmana, nasuprot kraćem tretmanu (16 dana) koji nije ostvario takav uticaj na transkripciju gena za IL-1 β (Slika 9a).

Zdravi pacovi tretirani sojem BGHI14 16 i 28 dana pokazali su statistički značajno povećanje ekspresije iRNK za TNF α u odnosu na odgovarajuće kontrolne pacove. Indukcija kolitisa dovela je do povećanja ekspresije TNF α iRNK u odnosu na kontrolne zdrave pacove. Tretman sojem BGHI14 nije delovao na transkripciju TNF α u akutnoj fazi kolitisa (Slika 9b).

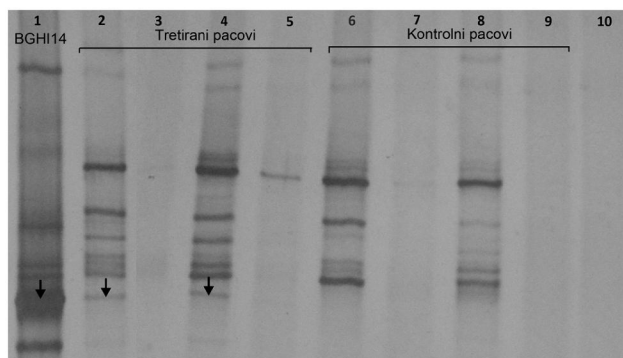
Unos TNBS-a statistički je značajno snizio ekspresiju iRNK za IL-17F u odnosu na zdrave kontrole. Nije primećena razlika u nivou iRNK za IL-17F između pacova tretiranih sojem BGHI14 i kontrolnih pacova sa kolitisom. Slično, BGHI14 nije uticao na transkripciju iRNK za IL-17F kod zdravih pacova (Slika 9c).

Tretman sojem BGHI14 doveo je do statistički značajnog povećanja transkripcije *Hsp70* gena 48 h nakon indukcije kolitisa u odnosu na kontrolne pacove sa kolitisom kao i u odnosu na zdrave BGHI14 tretirane pacove u trajanju od 16 dana. Takva razlika nije primećena u odnosu na zdrave kontrolne pacove sa istim trajanjem tretmana. Takođe, zdravi pacovi tretirani sojem BGHI14 tokom 28 dana kao i odgovarajući kontrolni pacovi pokazali su statistički značajno povećanje nivoa transkripata za HSP70 u odnosu na pacove tretirane sojem BGHI14 i kontrolne pacove hranjene 16 dana. Tretman sojem BGHI14 nije ostvario uticaj na ekspresiju *Hsp70* gena kod zdravih pacova (Slika 9d).

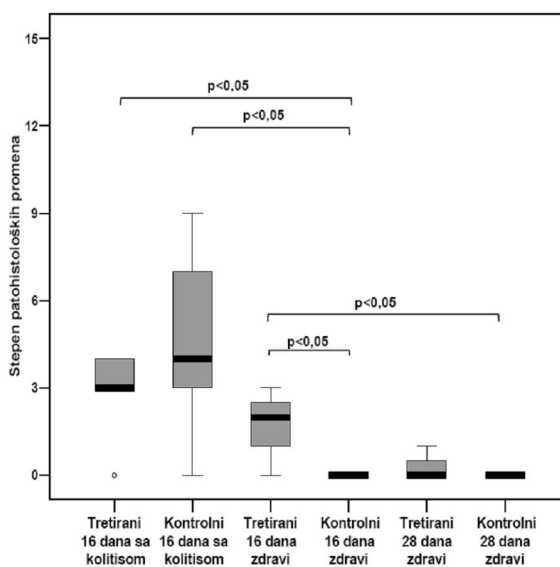
Indukcija kolitisa kao ni tretman sojem BGHI14 nisu ostvarili uticaj na nivo *Tjp1* transkripata. Kontrolni pacovi iz grupe hranjene 28 dana pokazali su statistički značajno povećanje ekspresije iRNK za TJP1 u odnosu na zdrave pacove iz kontrolne grupe hranjene 16 dana (Slika 9e).



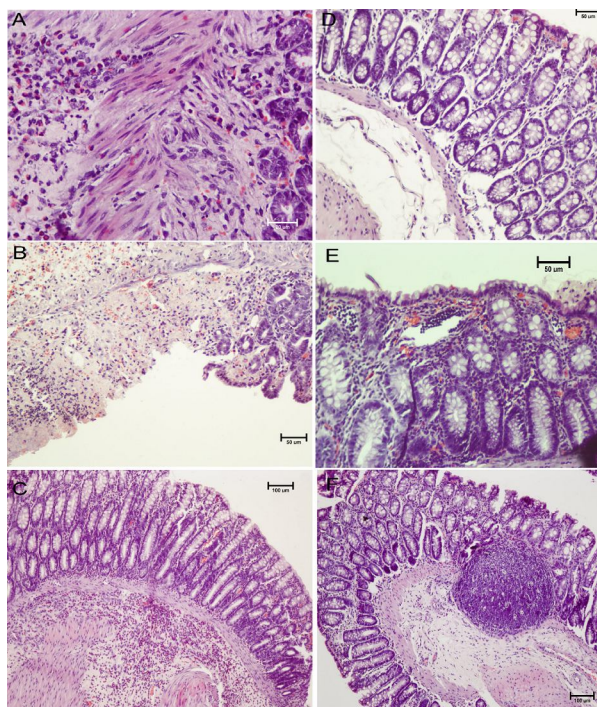
Slika 5. Telesne mase pacova tretiranih bakterijskim sojem *Lb. fermentum* BGHI14 i odgovarajućih kontrolnih pacova: a) pacovi sa kolitisom; b) zdravi pacovi hranjeni 16 dana; c) zdravi pacovi hranjeni 28 dana



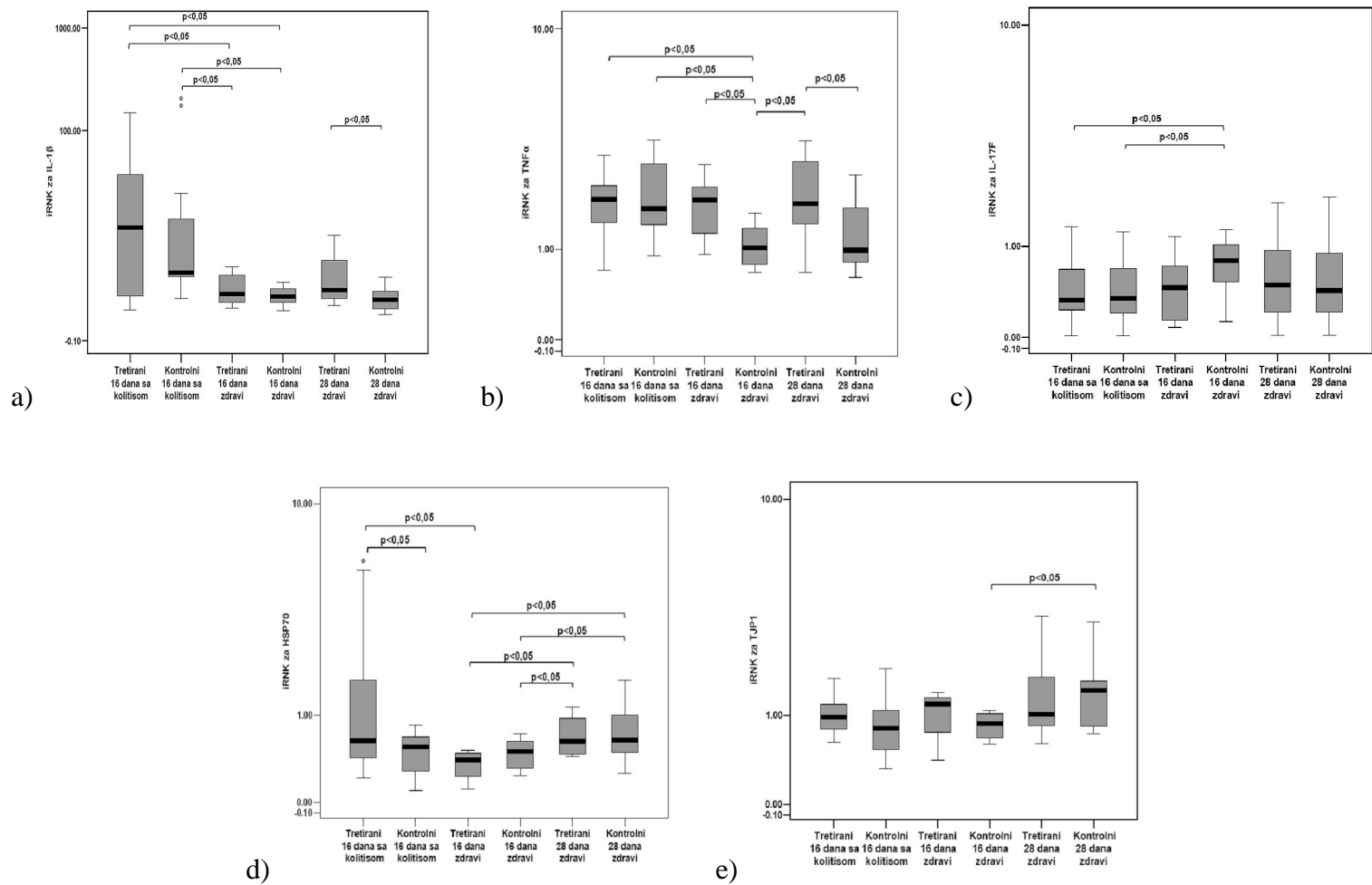
Slika 6. DGGE profili umnožaka gena za 16S rRNK specifičnih za laktobacile dobijenih u PCR reakcijama sa parom prajmera Lab-0159f/Uni-0515r. Strelice ukazuju na trake koje su odabrane za sekvenciranje. Linija 1: BGHI14; linije 2-5: ilealni sadržaj četiri tretirana pacova; linije 6-9: ilealni sadržaj četiri kontrolna pacova



Slika 7. Patohistološka procena efekta tretmana sojem BGHI14 na morfologiju tkiva kolona pacova nakon indukcije kolitisa (16 dana tretmana) i kod zdravih pacova nakon dva perioda tretmana (16 i 28 dana tretmana)



Slika 8. Histopatološki prikaz preseka tkiva kolona pacova: (A) pacova sa kolitisom tretiranog sojem BGHI14, (B) kontrolnog pacova sa kolitisom, (C) zdravog pacova tretiranog sojem BGHI14 u trajanju od 16 i (E) 28 dana, (D) zdravog kontrolnog pacova tretiranog mlekom 16 i (F) 28 dana; uveličanja mikroskopa: A) $\times 600$, B) $\times 200$, C) $\times 100$, D) $\times 200$, E) $\times 200$, F) $\times 100$



- Slika 9. Efekat soja BGHI14 na ekspresiju iRNK za: a) IL-1 β ; b) TNF α ; c) IL-17F; d) HSP70; e) TJP1 u tkivu kolona pacova; na ordinati su prikazane logaritamske vrednosti relativne ekspresije

4. 1. 2. Uticaj različitih vremenskih režima tretmana sojem BGHI14 na intenzitet oštećenja tkiva kolona pacova nakon indukcije kolitisa

U cilju ispitivanja načina primene BGHI14 soja koji potencijalno može ostvariti pozitivan učinak kod pacova sa kolitisom, testirani su različiti režimi tretmana pacova sojem BGHI14 u odnosu na momenat indukcije kolitisa, i to preventivni, terapijski i kontinuirani tretman. S obzirom na imunostimulišuće delovanje BGHI14 soja, što je potvrđeno u prethodnom delu istraživanja, momenat indukcije kolitisa pomeren je sa dve na tri nedelje od početka tretmana BGHI14 sojem.

4. 1. 2. 1. Promena telesnih masa pacova tokom eksperimenta

Radi usklađivanja u telesnim masama, na grafikonima su prikazani procenti promena telesnih masa pacova u odnosu na početak tretmana pre indukcije bolesti (Slika 10a) i u odnosu na momenat indukcije kolitisa nakon indukcije bolesti (Slika 10b). Pre indukcije bolesti uočen je statistički značajno niži procenat promene telesnih masa pacova tretiranih sojem BGHI14 u odnosu na kontrolne pacove i to drugog, četvrtog, petog, šestog, sedmog, osmog i devetog dana od početka tretmana (Slika 10a). Nakon indukcije bolesti uočeno je statistički značajno sniženje procenata promena telesnih masa pacova sa kolitisom u odnosu na zdrave pacove i to preventivno tretiranih trećeg i četvrtog, terapijski tretiranih drugog, trećeg, četvrtog i šestog, kao i kontinuirano tretiranih i kontrolnih životinja sve vreme od momenta indukcije bolesti (Slika 10b). Dodatno, kontinuirano tretirani pacovi su pokazali statistički značajno niži procenat promene telesnih masa i u odnosu na preventivno tretirane pacove i to sedmog dana od unosa TNBS-a.

4. 1. 2. 2. DGGE profili mikroflore sadržaja kolona pacova

Kako bi se odredile promene mikroflore kolona pacova nakon indukcije kolitisa, sadržaj kolona analiziran je DGGE metodom. DGGE analiza PCR fragmenata dobijenih umnožavanjem gena za bakterijsku 16S rRNK iz ukupne DNK izolovane iz sadržaja kolona ukazala je na četiri trake koje su sa pojačanim intenzitetom prisutne kod pacova sa kolitisom u odnosu na zdrave kontrole. Tretman sojem BGHI14 nije ostvario uticaj na sadržaj mikroflore kolona kod pacova sa kolitisom ni u jednom od primenjenih režima

tretmana (Slika 11). Navedene trake su isečene, sekvencirane i utvrđena je njihova pripadnost vrstama: *Ethanoligenens harbinense*, *Bacteroides capilosus* i *Clostridium jejense*. Ni u jednom od tretiranih pacova nije uočena traka koja odgovara soju BGHI14 (Slika 11).

4. 1. 2. 3. Makroskopska analiza kolona pacova

Nakon žrtvovanja životinja kvalitativno je procenjeno oštećenje kolona. Kod pacova sa kolitisom, nezavisno da li su tretirani bakterijama ili pripadaju kontrolnim grupama uočena je dilatacija kolona, zadebljanje i proširenje zida kolona sa gubitkom nabora, uz prisustvo pseudomembrana praćeno povećanim zapadanjem luminalnog sadržaja (Slika 12a). Zdravi pacovi su pokazali normalnu morfologiju i elastičnost zida creva (Slika 12b). Slika 12c prikazuje dilataciju creva (meteorizam kod pacova sa kolitisom).

4. 1. 2. 4. Histološka analiza tkiva kolona pacova

Morfološke promene izazvane indukcijom kolitisa praćene su mikroskopskom analizom histoloških preseka tkiva kolona. Indukcija kolitisa je u kasnoj akutnoj fazi dovela do statistički značajnog povećanja patohistoloških promena u odnosu na zdrave pacove, bez uticaja tretmana sojem BGHI14 na intenzitet oštećenja (Slika 13). Kod pacova sa kolitisom uočeni su ostaci nekrotičnog tkiva, smanjenje apsorptivne površine, hipertrofija kripti i submukoznih mišićnih slojeva, kao i transmuralni infiltrati polimorfonukleara, mononukleara i eozinofila (Slike 14 i 15). Slika 14 prikazuje preseke tkiva kolona na malom uvećanju mikroskopa (40×). Kod pacova sa kolitisom preventivno i terapijski tretiranih sojem BGHI14 (14A i B) kao i kod kontrolnih pacova sa kolitisom (14D) vidljivo je uvećanje kripti i mišićnih slojeva kao i gubitak arhitekture slojeva kod pojedinih pacova. Hipertrofija kripti i mišićnih slojeva praćeni smanjenjem apsorptivne površine naročito su naglašeni kod kontinuirano tretiranih pacova sa kolitisom (14C). Slika 14E prikazuje morfologiju tkiva kontrolnih zdravih pacova. Tkivo kolona preventivno tretiranog pacova sa kolitisom odlikuje prisustvo ćelijskih infiltrata, u mišićnom sloju mukoze, sastavljenih od mononuklearnih ćelija i neutrofila (15A). Kod terapijski tretiranog pacova sa kolitisom, u submukozi kolona, prisutni su ćelijski infiltrati sastavljeni od neutrofila, mononuklearnih

ćelija i eozinofila (15B). U ovoj grupi životinja se dodatno uočavaju makrofagi kod kojih je prisutan hemosiderin što je pokazatelj obilnog krvarenja u zahvaćenoj oblasti. Histološki nalaz kod kontinuirano tretiranih pacova sa kolitisom karakteriše inflamacija, koja zahvata i submukozni mišićni sloj, sa brojnim mononuklearnim ćelijama i ponekim neutrofilom i eozinofilom (15C i D). U tkivu kontrolnog pacova sa kolitisom uočavaju se mononukleari, neutrofili i eozinofili u infiltratu koji zahvata mukozni mišićni sloj i submukozu (15E). Slika 15F prikazuje tkivo zdravog kontrolnog pacova.

4. 1. 2. 5. Stepenn lipidne peroksidacije u tkivu kolona pacova

Kao pokazatelj oksidativnog oštećenja tkiva kolona određen je stepenn lipidne peroksidacije u homogenatima tkiva kolona. Nivo lipidne peroksidacije predstavljen je kao količina malondialdehida (MDA) u molovima po gramu tkiva kolona (Slika 16). Indukcija kolitisa nije dovela do povećanja nivoa MDA u tkivu kolona u kasnoj akutnoj fazi bolesti u odnosu na zdrave pacove. BGHI14 je ostvario uticaj na nivo lipidne peroksidacije u tkivu kolona samo u režimu kontinuiranog tretmana pacova sa kolitisom gde je došlo do statistički značajnog sniženja nivoa MDA u odnosu na kontrolne pacove sa kolitisom.

4. 1. 2. 6. Transkripcija gena u tkivu kolona pacova

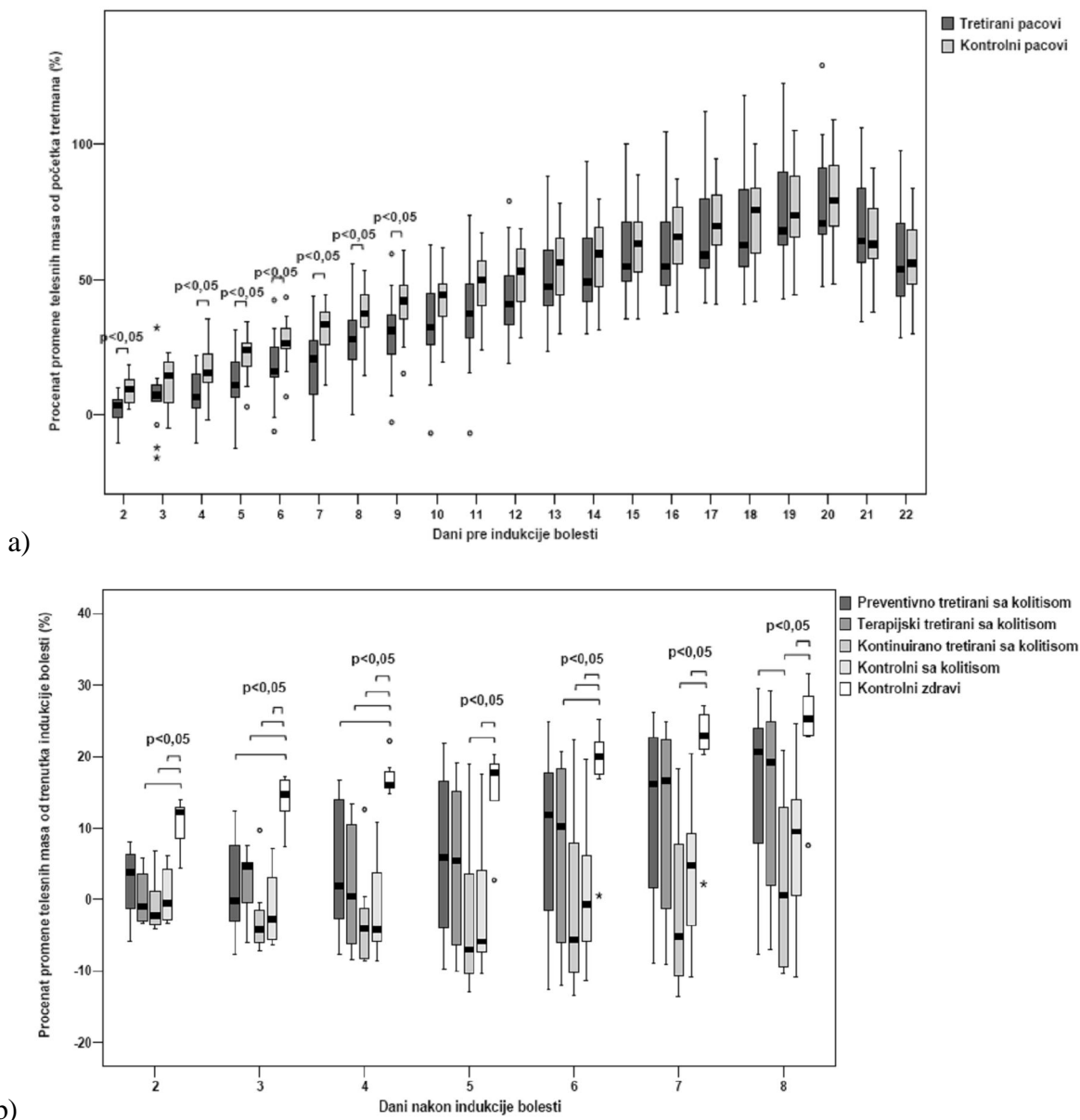
Transkripcija gena uključenih u imunološki odgovor i održavanje GI barijere praćena je qPCR analizom. Indukcija kolitisa dovela je do statistički značajnog povećanja nivoa iRNK za IL-1 β u odnosu na zdrave životinje. Među pacovima tretiranim sojem BGHI14, terapijski tretirana grupa je pokazala statistički značajno nižu ekspresiju iRNK za IL-1 β u odnosu na kontinuirano tretirane životinje. Slična razlika nije uočena u odnosu na preventivno tretirane pacove sa kolitisom (Slika 17a).

Transkripcija *TNF α* gena nije bila statistički značajno promenjena u kasnoj akutnoj fazi kolitisa u odnosu na zdrave kontrole, bez obzira na režim tretmana (Slika 17b).

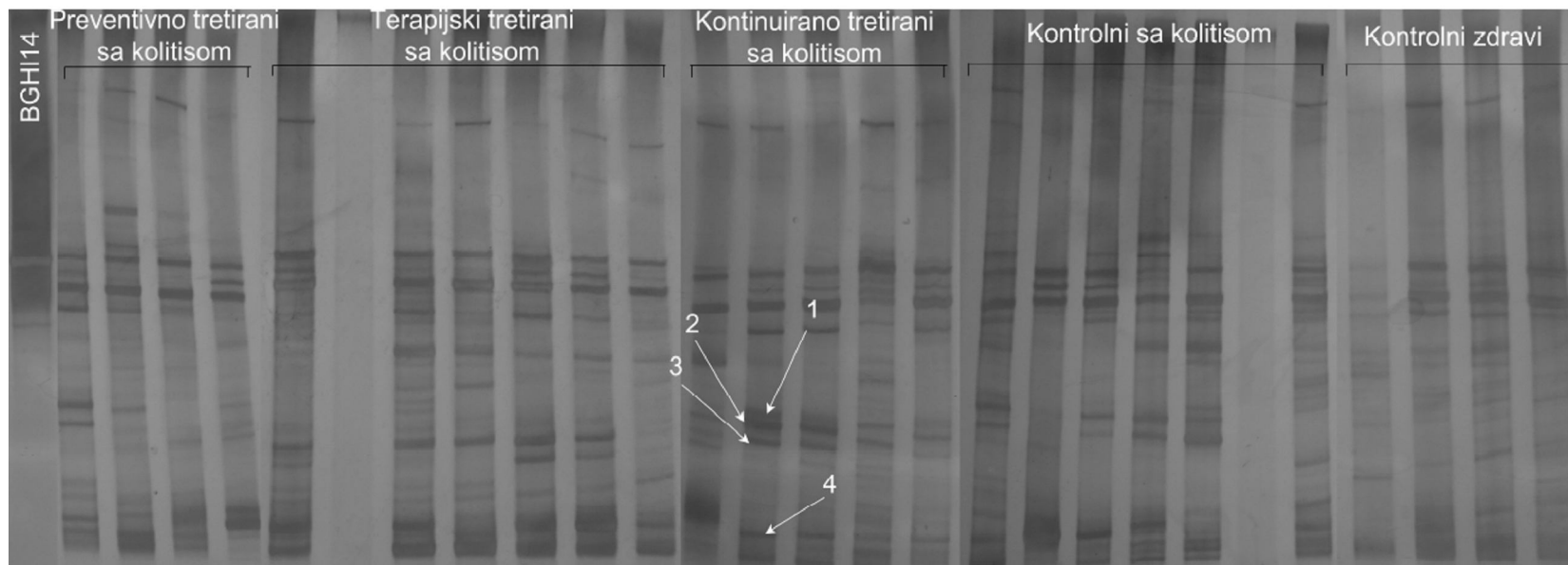
Unos TNBS-a izazvao je sniženje transkripcije gena za IL-17F sa izuzetkom kontinuirano tretiranih životinja gde nije uoćen takav smer promena. Međutim, nije uočena razlika u nivou iRNK za IL-17F između razlićitih režima tretmana kod pacova sa kolitisom (Slika 17c).

Transkripcija gena za HSP70 nije bila promenjena kod pacova sa kolitisom u odnosu na zdrave pacove, izuzev kod kontinuiranog tretmana sojem BGHI14 gde je bilo prisutno statistički značajno povećanje nivoa iRNK za HSP70 u odnosu na zdrave kontrolne životinje, ali ne i u odnosu na ostale grupe pacova sa kolitisom (Slika 17d).

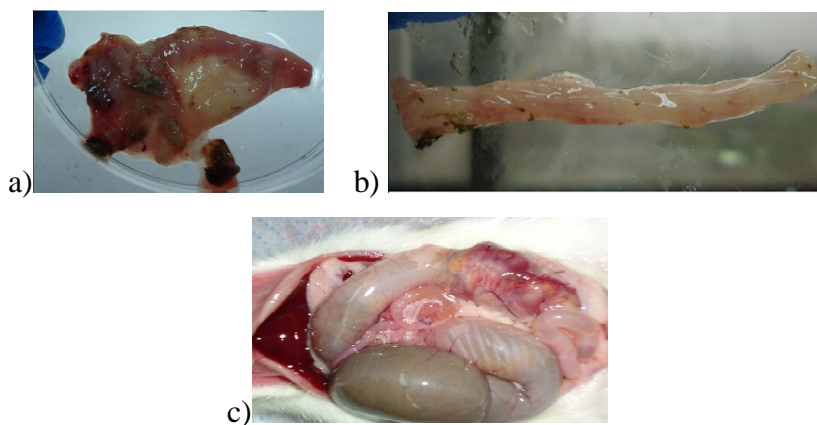
Statistički značajno sniženje nivoa iRNK za TJP1 primećeno je kod pacova sa kolitisom u odnosu na zdrave kontrolne pacove, osim u grupi terapijski tretiranih životinja sa kolitisom. Međutim, terapijski tretman sojem BGHI14 doveo je do statistički značajnog povećanja nivoa transkripata za TJP1 u odnosu na kontinuirano tretirane i kontrolne pacove sa kolitisom (Slika 17e).



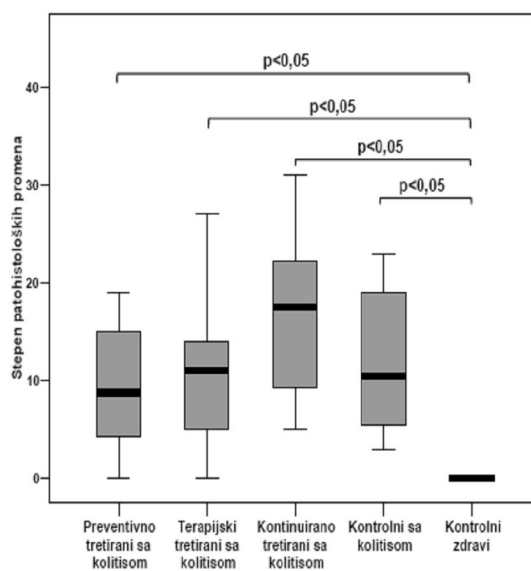
Slika 10. Procenti promena telesnih masa pacova tretiranih sojem BGHI14 i kontrolnih pacova a) pre indukcije bolesti u odnosu na početak tretmana; b) nakon indukcije bolesti u odnosu na momenat unošenja TNBS-a



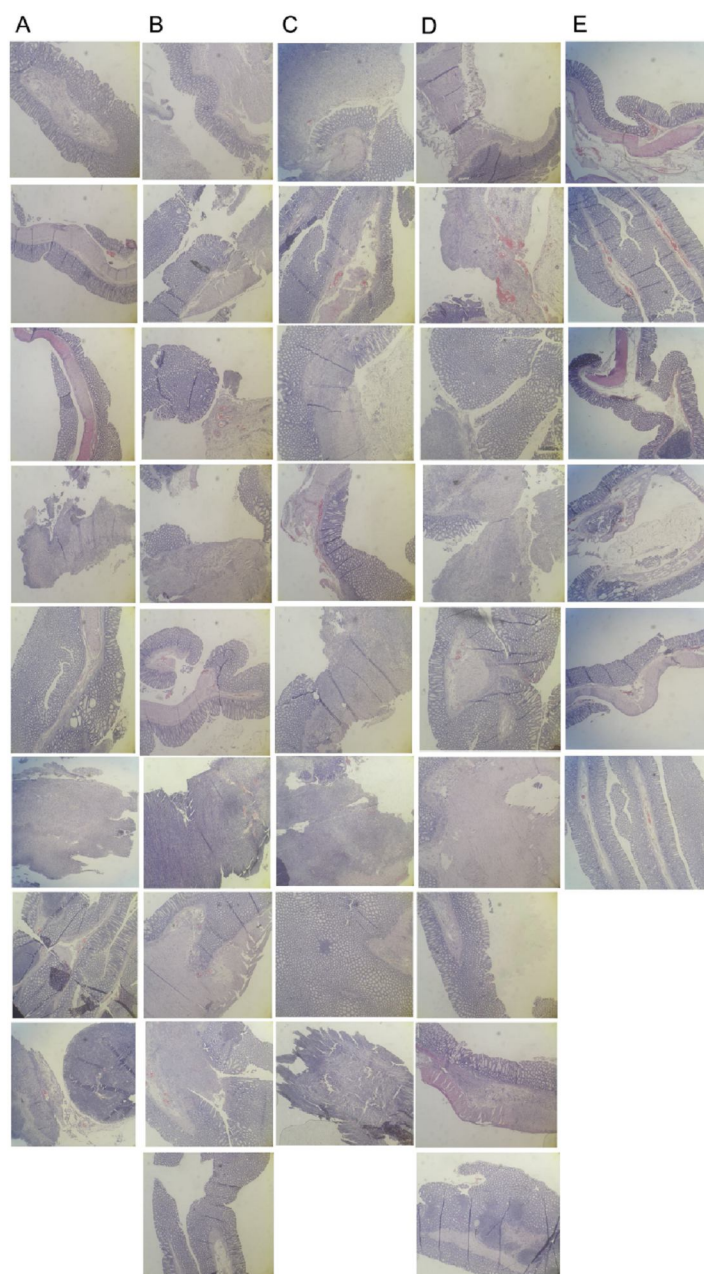
Slika 11. DGGE profili mikroflora pacova sa kolitisom dobijeni umnožavanjem gena za bakterijsku 16S rRNK prajmerima Lab-0159f/Uni-0515r. Na fotografiji su obeležene grupe korišćene u eksperimentu. Strelicama su označeni fragmenti koji su sekvencirani. Rezultati sekvenciranja utvrdili su pripadnost sledećim vrstama: 1) i 2) *Ethanoligenens harbinense*, 3) *Bacteroides capilosus*, 4) *Clostridium jejuense*



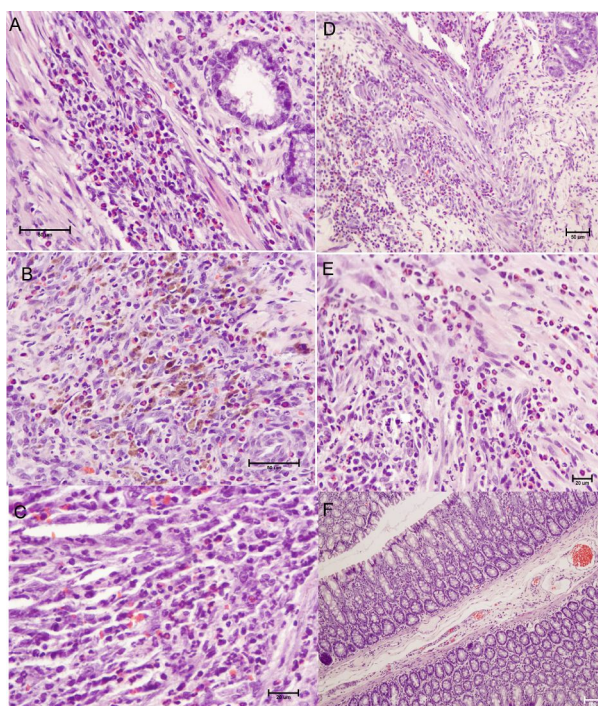
Slika 12. Fotografije kolona a) pacova sa kolitisom i b) zdravog pacova;
c) dilatirani kolon kod pacova sa kolitisom



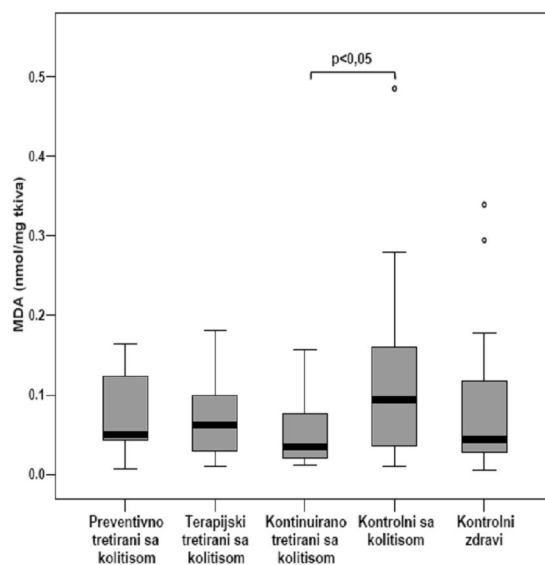
Slika 13. Patohistološka procena efekta tretmana sojem BGHI14 na morfologiju tkiva kolona pacova sa kolitisom



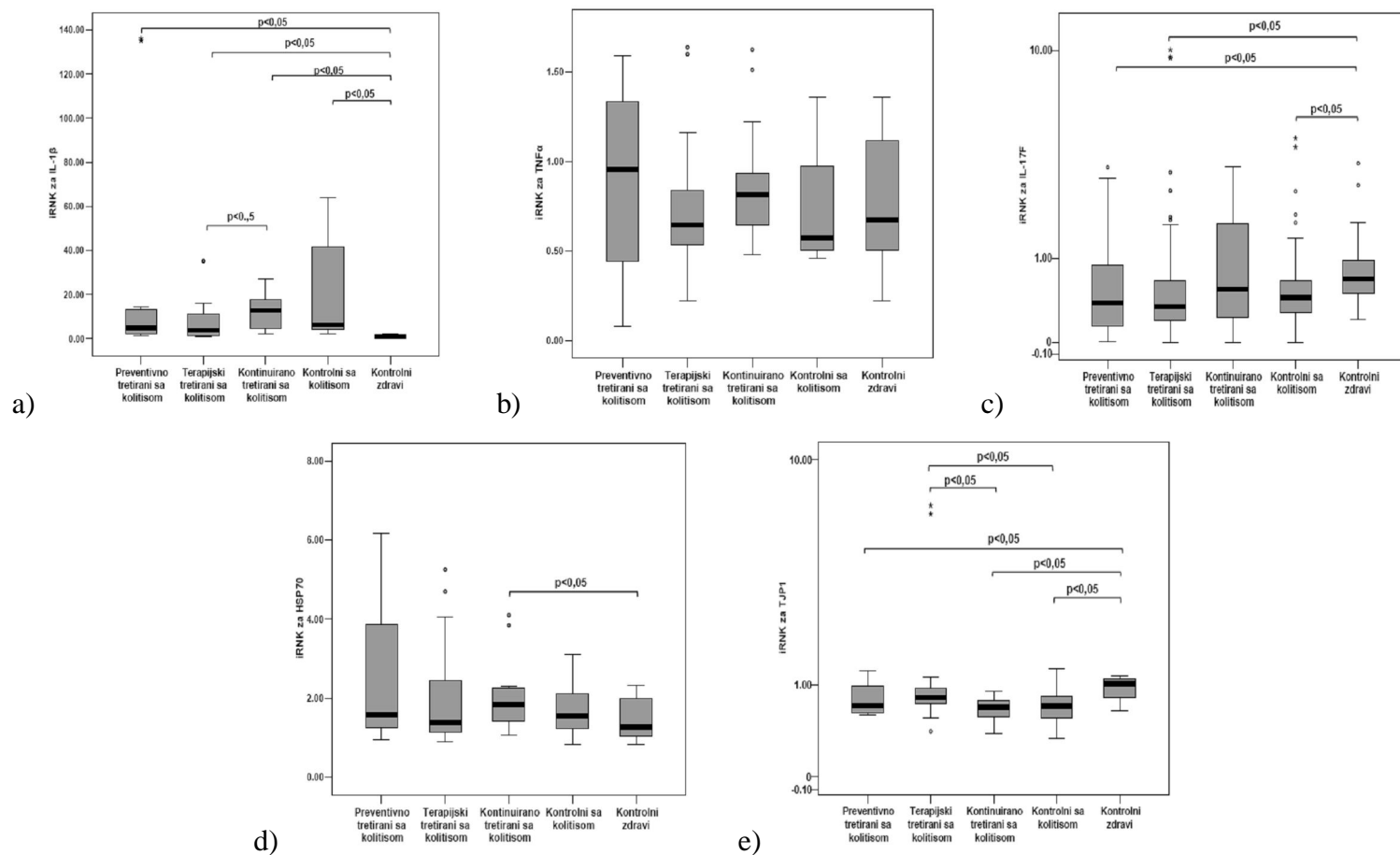
Slika 14. Preseci tkiva kolona na malom uveličanju mikroskopa (40×) kod pacova sa kolitisom (A) preventivno, (B) terapijski i (C) kontinuirano tretiranih sojem BGHI14; (D) morfologija tkiva kolona kontrolnih pacova sa kolitisom i (E) zdravih pacova



Slika 15. Histološki preseki tkiva kolona bojeni H & E metodom: pacova sa kolitisom (A) preventivno, (B) terapijski, (C i D) kontinuirano tretiranih sojem BGHI14, i (E) kontrolnog pacova sa kolitisom; (F) presek tkiva kolona zdravog kontrolnog pacova; uveličanja mikroskopa: (A) $\times 400$, (B) $\times 400$, (C) $\times 600$, (D) $\times 200$; (E) $\times 400$, (F) $\times 100$



Slika 16. Nivoi MDA u tkivu kolona nakon različitih režima tretmana pacova sa kolitisom sojem BGHI14



Slika 17. Uticaj različitih režima tretmana pacova sojem BGHI14 na ekspresiju iRNK u tkivu kolona pacova za: a) IL-1 β ; b) TNF α ; c) IL-17F; d) HSP70; e) TJP1; vrednosti ekspresije na ordinati prikazane su na logaritamskoj skali u slučaju *TNF α* i *Tjp1* gena

4. 2. Uloga MbpL i AggL proteina u vezivanju laktobacila za GI mukozu pacova

4. 2. 1. Funkcionalna analiza u soju *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20

Derivati soja BGKP1-20 koji ekspimiraju laktokokalni mucin-vezujući protein (MbpL) i agregacioni faktor (AggL) testirani su u *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* esejima vezivanja za mukozu GI trakta. Derivat sa pAZIL vektorom služio je kao kontrola.

4. 2. 1. 1. Afinitet BGKP1-20 derivata za heksadekan

Kao pokazatelj hidrofobnosti površine derivata KP1-20 korišćen je test afiniteta za hidrofobni organski rastvarač heksadekan. Afinitet bakterijskih derivata za heksadekan prikazan je u procentima na Slici 18. Derivat BGKP1-20/pAZIL pokazao je statistički značajno niže vrednosti afiniteta za heksadekan u odnosu na BGKP1-20/pAZIL-mbpL i pAZIL-aggL derivate. Pri tom, agregirajući fenotip je statistički značajno povećao afinitet derivata za heksadekan (srednja hidrofobnost) u odnosu na preostala dva derivata (niska hidrofobnost). Jedini ponovljivi rezultati kod spomenutih derivata dobijeni su u eseju sa heksadekanom, nasuprot afinitetima za etil-acetat i hloroform koji nisu mogli biti određeni.

4. 2. 1. 2. Vezivanje BGKP1-20 derivata za svinjski želudačni mucin *in vitro*

Vezivanje derivata za prečišćeni mucin predstavlja merilo afiniteta derivata za komponente mukusnog pokrivača GI mukoze. Rezultati vezivanja za svinjski želudačni mucin predstavljeni su kao apsorbancija na talasnoj dužini 620 nm (Slika 19). Iako je derivat sa agregirajućim fenotipom pokazao najveći stepen vezivanja za površinu plastike *Maxisorb* ploče, njegov afinitet za površinu bunarića obloženih mucinom bio je sličan kao i kod BGKP1-20/pAZIL derivata. BGKP1-20/pAZIL-mbpL derivat je pokazao statistički značajno veći afinitet za mucin u odnosu na BGKP1-20/pAZIL i BGKP1-20/pAZIL-aggL derivate, što je suprotno situaciji u kontrolnim neobloženim bunarićima gde isti derivat nije pokazao razliku u vezivanju u odnosu na kontrolni BGKP1-20/pAZIL derivat.

4. 2. 1. 3. Vezivanje BGKP1-20 derivata za HT29-MTX ćelije *in vitro*

U eseju adhezije derivata za mucin-sekretujuće humane HT29-MTX ćelije u kulturi simulirano je vezivanje derivata za peharaste ćelije GI epitela. Rezultati vezivanja za

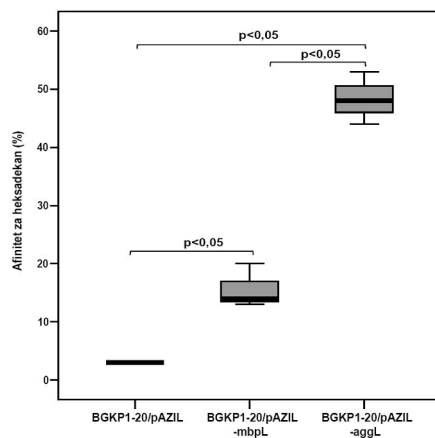
HT29-MTX ćelije predstavljeni su kao procenti vezanih u odnosu na ukupan broj nanetih bakterija (Slika 20). Među testiranim derivatima, BGKP1-20/pAZIL-aggL derivat je pokazao statistički značajno niži stepen vezivanja za HT29-MTX ćelije u odnosu na preostale derivate. Istovremeno, derivat BGKP1-20/pAZIL-mbpL je pokazao statistički značajno veći afinitet za HT29-MTX ćelije u odnosu na kontrolni derivat sa pAZIL vektorom. S druge strane, BGKP1-20/pAZIL-mbpL i BGKP1-20/pAZIL-aggL derivati su pokazali statistički značajno veći stepen adhezije za površinu praznih bunarića ploče za ćelijsku kulturu u odnosu na BGKP1-20/pAZIL derivat.

4. 2. 1. 4. Vezivanje BGKP1-20 derivata za isečke tkiva ileuma i kolona pacova *ex vivo*

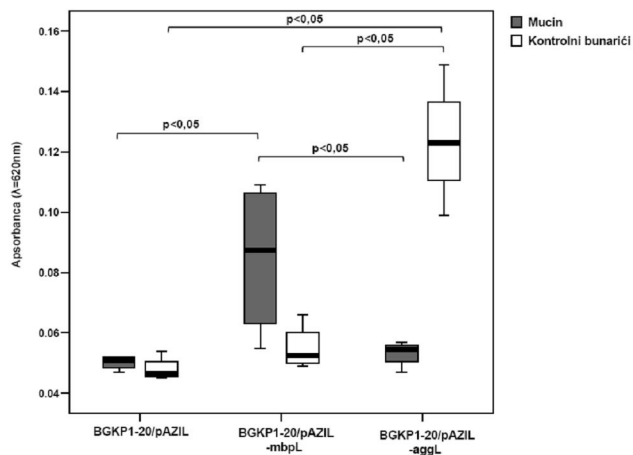
Kako bi se simulirala sredina prisutna u GI traktu praćeno je vezivanje derivata BGKP1-20 za segmente ileuma i kolona pacova u uslovima *ex vivo*. Rezultati su predstavljeni procentualno na Slici 21. Uočene su statistički značajno niže vrednosti adhezije agregirajućeg derivata za isečke tkiva ileuma u odnosu na preostala dva derivata. Isti derivat je pokazao statistički značajno više vrednosti vezivanja za isečke tkiva kolona u odnosu na BGKP1-20/pAZIL i pAZIL/mbpL derivate. Prisustvo gena za MbpL protein dovelo je do statistički značajno nižeg vezivanja derivata za isečke tkiva ileuma i kolona u odnosu na kontrolni BGKP1-20/pAZIL derivat.

4. 2. 1. 5. Vezivanje BGKP1-20 derivata za tkivo ileuma i kolona pacova *in vivo*

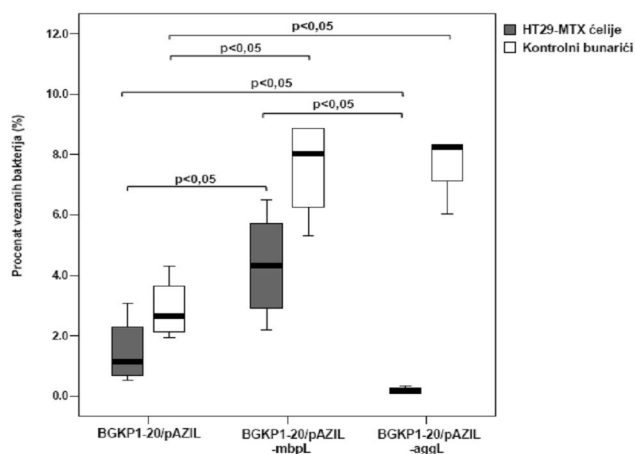
Procena stepena vezivanja derivata u uslovima *in vivo* vršena je određivanjem brojnosti bakterijskih ćelija u sadržaju creva i na zidu creva nakon hranjenja pacova derivatima BGKP1-20. Rezultati vezivanja derivata za tkivo ileuma i kolona pacova *in vivo* prikazani su procentualno na Slici 22. Agregirajući fenotip statistički je značajno doprineo vezivanju derivata za mukozu kolona u odnosu na BGKP1-20/pAZIL i BGKP1-20/pAZIL-mbpL derivate. Suprotno je uočeno u ileumu gde su se derivati BGKP1-20/pAZIL i BGKP1-20/pAZIL-mbpL statistički značajno bolje vezali u odnosu na agregirajući derivat. Nisu uočene statistički značajne razlike u vezivanju za mukozu ileuma i kolona između BGKP1-20/pAZIL i BGKP1-20/pAZIL-mbpL derivata.



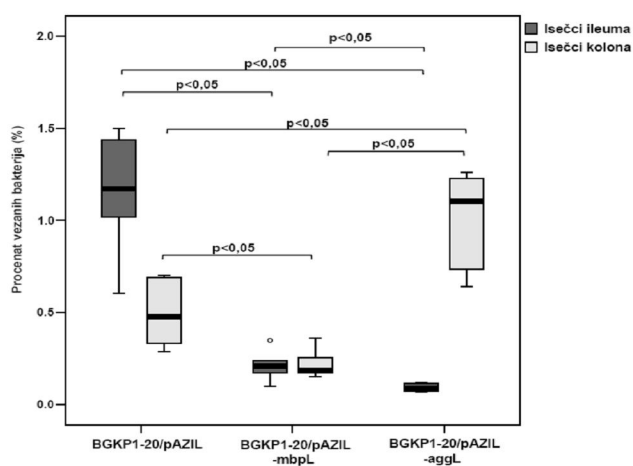
Slika 18. Afinitet derivata BGKP1-20/pAZIL, BGKP1-20/pAZIL-mbpL i BGKP1-20/pAZIL-aggL za heksadekan



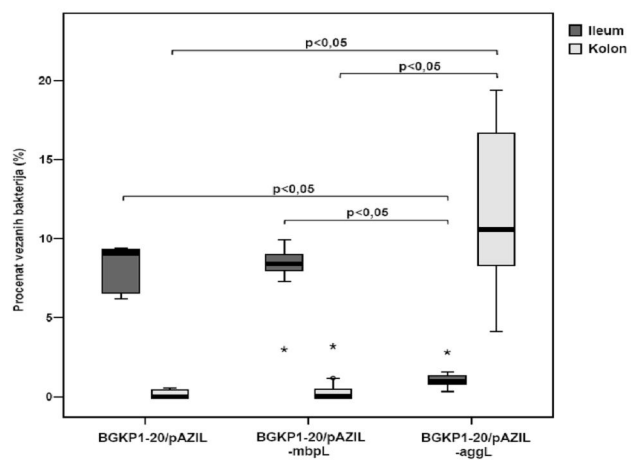
Slika 19. Vezivanje derivata BGKP1-20/pAZIL, BGKP1-20/pAZIL-mbpL i BGKP1-20/pAZIL-aggL za svinjski želudačni mucin (sivi grafikoni) i neobloženu površinu plastike (beli grafikoni)



Slika 20. Vezivanje derivata BGKP1-20/pAZIL, BGKP1-20/pAZIL-mbpL i BGKP1-20/pAZIL-aggL za HT29-MTX ćelije u kulturi (sivi grafikoni) i za površinu praznih bunarića ploče za ćelijsku kulturu (beli grafikoni)



Slika 21. Vezivanje BGKP1-20/pAZIL, BGKP1-20/pAZIL-mbpL i BGKP1-20/pAZIL-aggL derivata za isečke tkiva ileuma i kolona *ex vivo*; rezultati vezivanja za ileum na ordinati prikazani su kao deset puta manje vrednosti



Slika 22. Vezivanje derivata BGKP1-20/pAZIL, BGKP1-20/pAZIL-mbpL i BGKP1-20/pAZIL-aggL za mukožu ileuma i kolona *in vivo*

4. 2. 2. Funkcionalna analiza u soju *Lactobacillus salivarius* BGHO1

Kako bi se testirala uloga MbpL i AggL proteina u laktobacilima, konstrukti sa *mbpL* i *aggL* genima, kao i pAZIL vektor (kontrola), prebačeni su u BGHO1 soj. Eseji vezivanja za GI mukoza ponovljeni su kao i u slučaju BGKP1-20 derivata.

4. 2. 2. 1. Transformacija soja BGHO1

Nakon transformacije soja BGHO1 plazmidima pAZIL, pAZIL-*mbpL* i pAZIL-*aggL* transformanti su provereni restrikcionom analizom izolovanih plazmida i sekvenciranjem gena za 16S rRNK. Proverom plazmida izolovanih iz potencijalnih transformanata BGHO1/pAZIL, BGHO1/pAZIL-*mbpL* i BGHO1/pAZIL-*aggL* potvrđeno je prisustvo različitih plazmida. Dodatno, sečenjem izolovanih plazmida restrikcionim enzimom *EcoRI*, elektroforezom je potvrđeno da veličina konstrukata odgovara veličini istih izolovanih iz *E. coli* soja DH5 α (Slika 23). Sekvenciranjem PCR produkata iz gena za 16S rRNK potvrđena je sličnost sa sekvencama gena za 16S rRNK iz vrste *Lb. salivarius* iz NCBI baze podataka.

4. 2. 2. 2. RT-PCR analiza ekspresije iRNK za MbpL i AggL proteine u derivatima BGHO1

Kako bi se potvrdila aktivnost laktokokalnih promotora *mbpL* i *aggL* gena u heterolognom domaćinu, izolovana je ukupna RNK iz BGHO1 transformanata i cDNK je proverena u PCR reakcijama sa *mbpL* i *aggL*-specifičnim prajmerima. U cilju potvrđivanja prisustva *mbpL* transkripata urađen je RT-PCR sa prajmerima *mbpLcod_fw* i *mbpLcod_rev* i utvrđeno je da je dobijen pozitivan signal u derivatu BGHO1/pAZIL-*mbpL*. Korišćenjem para prajmera *aggLcod_fw* i *aggLcod_rev* dobijeni su pozitivni signali u derivatima BGHO1/pAZIL-*mbpL* i BGHO1/pAZIL-*aggL*. Ovakav rezultat je bio očekivan s obzirom da pAZIL-*mbpL* konstrukt sadrži prvih 1823 bp sekvence iz *aggL* gena (*Kojic* i saradnici). Sva tri derivata dala su pozitivne signale sa prajmerima *rpoBcod_fw* i *rpoBcod_rev* za konstitutivno eksprimiranu RpoB subjedinicu RNK polimeraze (Slika 24).

4. 2. 2. 3. Afinitet BGHO1 derivata za organske rastvarače

U cilju potvrde fenotipskih efekata ekspresije MbpL i AggL proteina u BGHO1 soju, određivan je afinitet BGHO1 soja za organske rastvarače i to heksadekan, etil-acetat i hloroform. Kao što su objasnili *Ocaña* i saradnici, 1999, afinitet za heksadekan odražava hidrofobna, dok etil-acetat i hloroform odražavaju elektron-akceptorska odnosno elektron-donorska svojstva bakterijske površine. Procentualni prikaz afiniteta derivata za organske rastvarače dat je na Slici 25. Derivati BGHO1/pAZIL-mbpL i BGHO1/pAZIL-aggL pokazali su statistički značajno povećan afinitet za heksadekan u odnosu na BGHO1/pAZIL derivat, bez međusobne razlike u afinitetu (Slika 25a). U poređenju sa BGKP1-20 derivatima (poglavlje 4. 2. 1. 1.) uočavaju se veće ukupne hidrofobnosti BGHO1 derivata. Afinitet za etil-acetat najviši je kod derivata BGHO1/pAZIL-mbpL sa statistički značajnom razlikom u odnosu na preostala dva derivata čiji se afinitet za etil-acetat međusobno ne razlikuje (Slika 25b). Derivati nisu pokazali međusobnu razliku u afinitetu za hloroform (Slika 25c).

4. 2. 2. 4. Vezivanje BGHO1 derivata za svinjski želudačni mucin *in vitro*

Ispitivanje uloge MbpL i AggL proteina u soju BGHO1 u vezivanju za mucin praćeno je u testu afiniteta za prečišćeni želudačni mucin *in vitro*. Rezultati vezivanja BGHO1 derivata predstavljeni su kao apsorbance na talasnoj dužini 620 nm (Slika 26). BGHO1/pAZIL-aggL derivat je pokazao statistički značajno niže vrednosti vezivanja za svinjski želudačni mucin u odnosu na kontrolni derivat BGHO1/pAZIL. Statistička značajnost nije uočena u odnosu na derivat BGHO1/pAZIL-mbpL, kao ni između BGHO1/pAZIL i BGHO1/pAZIL-mbpL derivata. Derivati nisu pokazali međusobnu razliku u vezivanju za površinu neobložene plastične ploče.

4. 2. 2. 5. Vezivanje BGHO1 derivata za HT29-MTX ćelije *in vitro*

U ovom eksperimentu je testirana interakcija BGHO1 derivata sa epitelnim mucin-sekretujućim ćelijama u kulturi. Rezultati vezivanja za HT29-MTX ćelije predstavljeni su kao procenat vezanih u odnosu na ukupan broj nanetih bakterija (Slika 27). Prisustvo agregacionog faktora doprinelo je statistički značajnom smanjenju vezivanja

BGHO1/pAZIL-aggL derivata za HT29-MTX ćelije u odnosu na derivate sa pAZIL i pAZIL-mbpL konstruktima, koji nisu pokazali međusobnu razliku u vezivanju. Istovremeno, BGHO1/pAZIL-aggL derivat je pokazao statistički značajno veći afinitet za površinu plastike ploče za kulturu tkiva u odnosu na BGHO1/pAZIL i BGHO1/pAZIL-mbpL derivate.

4. 2. 2. 6. Vezivanje BGHO1 derivata za isečke tkiva ileuma i kolona pacova *ex vivo*

Izolovani eksplantati tkiva creva korišćeni su u eseju vezivanja BGHO1 derivata za GI mukozu *ex vivo*. Rezultati vezivanja za isečke tkiva ileuma i kolona predstavljeni su procentualno na Slici 28. Stepen vezivanja za isečke ileuma i za tkivo kolona nije se razlikovao između različitih BGHO1 derivata.

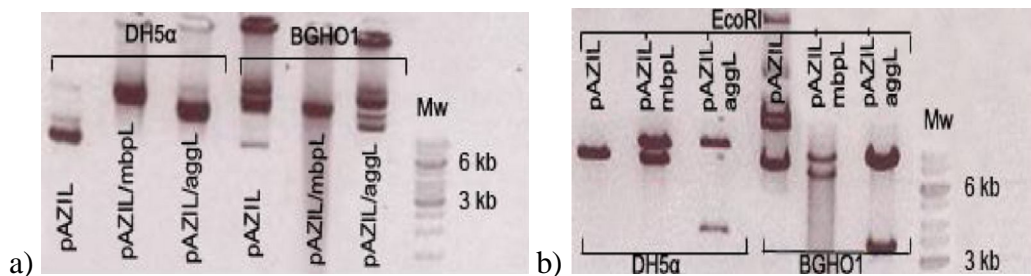
4. 2. 2. 7. Promena telesnih masa pacova tokom tretmana derivatima BGHO1

S obzirom na potencijalnu primenu laktobacila kao probiotika tretman BGHO1 derivatima trajao je nedelju dana duže u odnosu na eksperiment sa BGKP1-20 derivatima, kako bi se ispratila reakcija pacova na unos bakterija. Radi usklađivanja razlika u težini životinja na početku eksperimenta, promene telesnih masa pacova prikazane su kao procenat promene u odnosu na telesne mase pacova na početku tretmana (Slika 29). Pacovi tretirani BGHO1/pAZIL i BGHO1/pAZIL-mbpL derivatima pokazali su brži porast telesnih masa u odnosu na kontrolne životinje koje su dobijale mleko. Taj porast je dostigao statističku značajnost osmog dana od početka tretmana. Uočen je statistički značajno manji porast težine pacova tretiranih BGHO1/pAZIL-aggL derivatom u odnosu na pacove tretirane kontrolnim BGHO1/pAZIL derivatom 17. i 18. dana od početka tretmana.

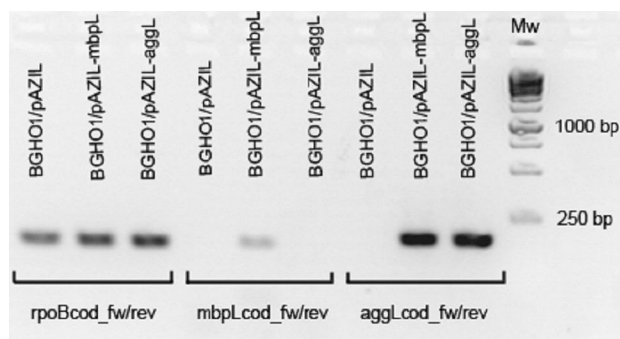
4. 2. 2. 8. Vezivanje BGHO1 derivata za tkivo ileuma i kolona pacova *in vivo*

Hranjenje pacova BGHO1 derivatima i određivanje broja vezanih bakterijskih ćelija služilo je za procenu adhezije derivata za mukozu ileuma i kolona u dinamičnim uslovima GI trakta. Rezultati vezivanja predstavljeni su kao procenat bakterija vezanih za tkivo u odnosu na ukupan broj bakterija u sadržaju lumena i u tkivu (Slika 30). Na podlogama sa inokulisanim sadržajem i homogenatima tkiva kontrolnih pacova nisu uočene kolonije.

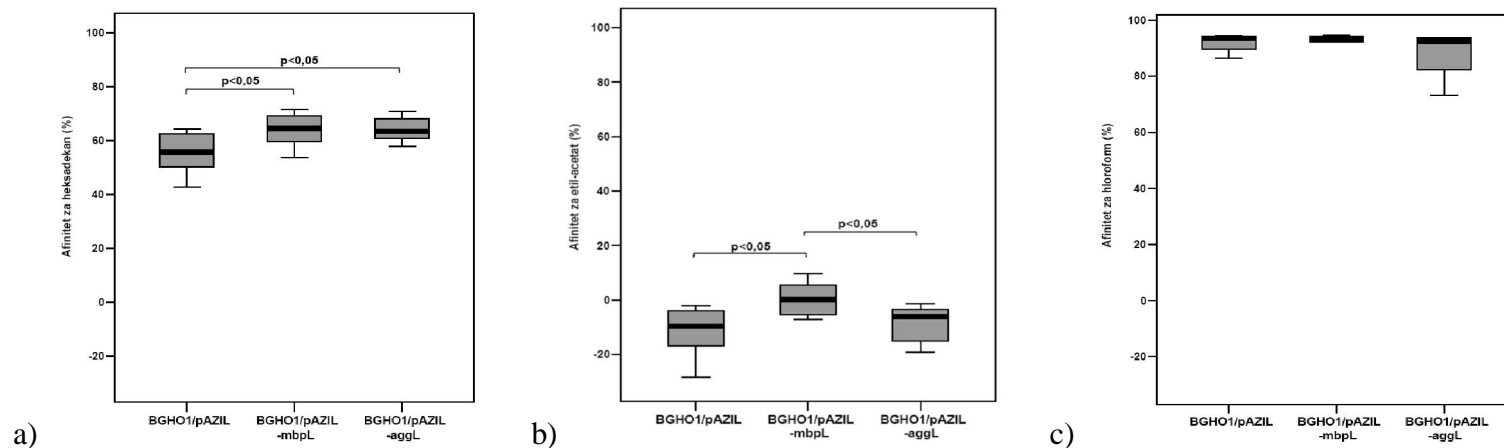
Derivat BGHO1/pAZIL-aggL pokazao je statistički značajno niži procenat vezivanja za mukožu kolona u odnosu na BGHO1/pAZIL derivat, dok je u ileumu to sniženje statistički značajno u odnosu na BGHO1/pAZIL i BGHO1/pAZIL-mbpL derivate. Derivati BGHO1/pAZIL i BGHO1/pAZIL-mbpL nisu pokazali međusobnu razliku u vezivanju za mukožu ileuma i kolona.



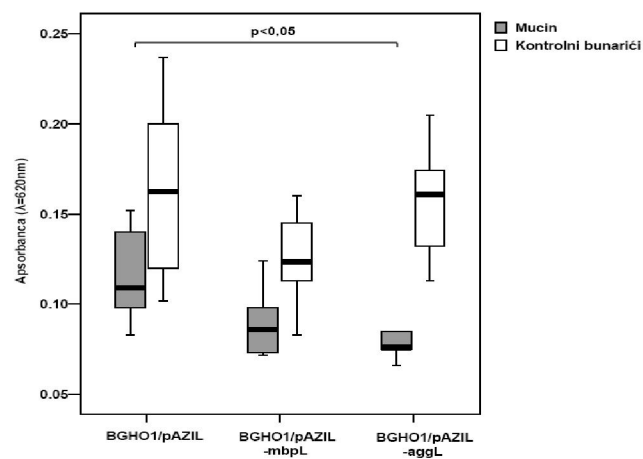
Slika 23. Horizontalna gel-elektroforeza: a) plazmida iz BGHO1 transformanata (linije 1, 2, 3 – plazmidi pAZIL, pAZIL-*mbpL* i pAZIL-*aggL* izolovani iz transformisanih *E. coli* DH5α; linije 4, 5, 6 - plazmidi pAZIL, pAZIL-*mbpL* i pAZIL-*aggL* izolovani iz potencijalnih BGHO1 transformanata; linija 7 – Mw, marker molekulskih težina, 1 kb); b) *EcoRI* isečenih plazmida (redosled u linijama isti kao pod a)



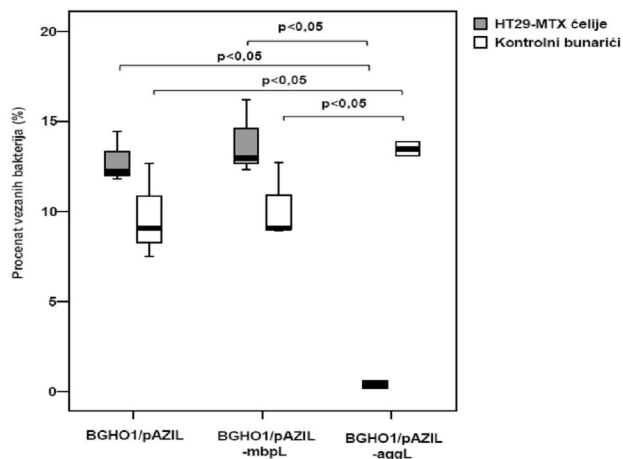
Slika 24. Horizontalna gel-elektroforeza fragmenata dobijenih nakon RT-PCR-a sa ukupnom RNK izolovanom iz BGHO1 derivata BGHO1/pAZIL, BGHO1/pAZIL-*mbpL*, BGHO1/pAZIL-*aggL* (linije 1, 2, 3 – produkti dobijeni parom prajmera *rpoBcod_fw/rev*; linije 4, 5, 6 - produkti dobijeni parom prajmera *mbpLcod_fw/rev*; linije 7, 8, 9 - produkti dobijeni parom prajmera *aggLcod_fw/rev*; linija 10 – Mw, marker molekulskih težina, 1 kb)



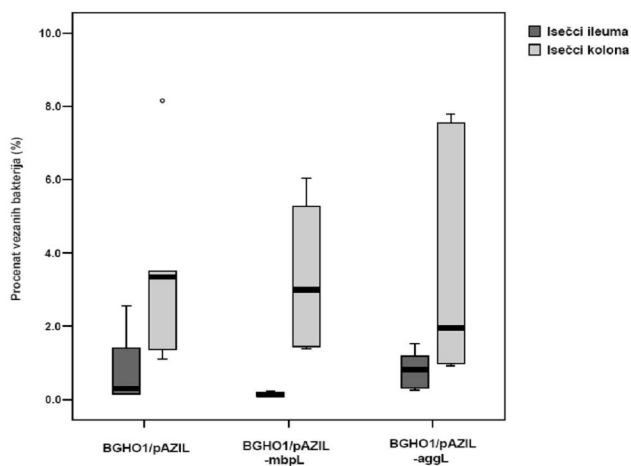
Slika 25. Afinitet derivata BGHO1/pAZIL, BGHO1/pAZIL-mbpL i BGHO1/pAZIL-aggL za organske rastvarače: a) heksadekan; b) etil-acetat; c) hloroform



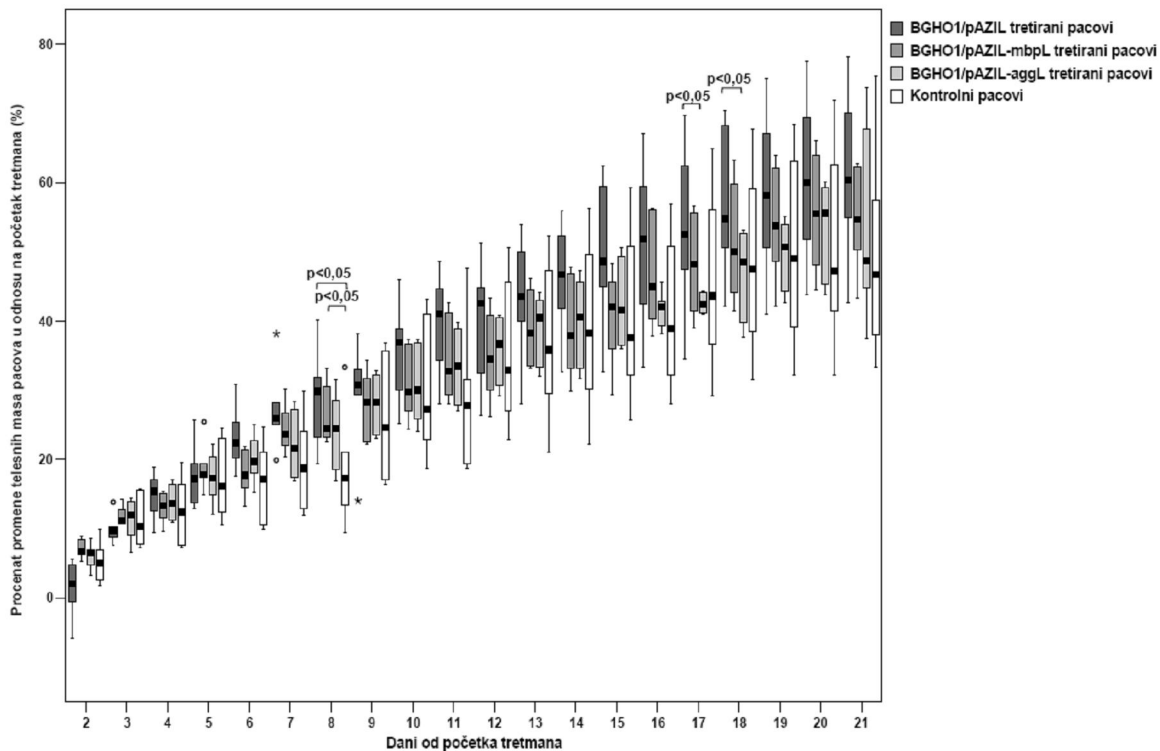
Slika 26. Vezivanje derivata BGHO1/pAZIL, BGHO1/pAZIL-mbpL i BGHO1/pAZIL-aggL za svinjski želudačni mucin (sivi grafikoni) i neobloženu površinu plastike (beli grafikoni)



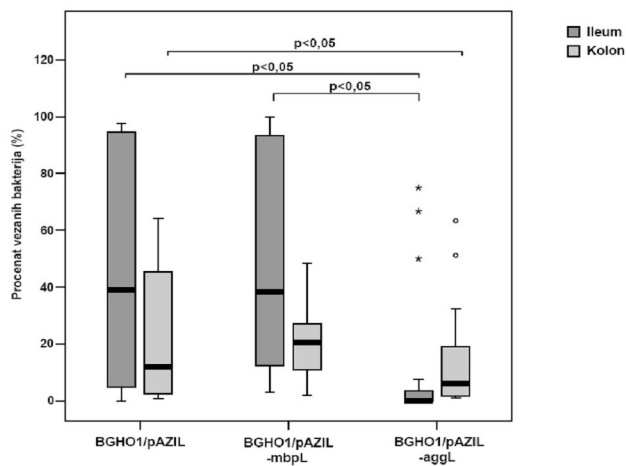
Slika 27. Vezivanje derivata BGHO1/pAZIL, BGHO1/pAZIL-mbpL i BGHO1/pAZIL-aggL za HT29-MTX ćelije u kulturi (sivi grafikoni) i za površinu praznih bunarića ploče za ćelijsku kulturu (beli grafikoni)



Slika 28. Vezivanje BGHO1/pAZIL, BGHO1/pAZIL-mbpL i BGHO1/pAZIL-aggL derivata za isečke tkiva ileuma i kolona *ex vivo*



Slika 29. Procenti promena telesnih masa pacova tretiranih derivatima BGHO1/pAZIL, BGHO1/pAZIL-mbpL i BGHO1/pAZIL-aggL u odnosu na telesne mase na početku tretmana; kontrolni pacovi su označeni belim grafikonima



Slika 30. Vezivanje derivata BGHO1/pAZIL, BGHO1/pAZIL-mbpL i BGHO1/pAZIL-aggL za mukožu ileuma i kolona *in vivo*

5. DISKUSIJA

5. 1. Reakcija tkiva pacova na unošenje soja BGHI14

„That which does not kill us makes us stronger“ - Friedrich Nietzsche

Lactobacillus fermentum je heterofermentativni laktobacil prisutan u hrani, mleku sisara, na vaginalnoj sluzokoži ili GI traktu novorođenčeta i dece (Fazeli i saradnici, 2009; Jiménez i saradnici, 2010; Kaewnopparat i saradnici, 2013; Park i saradnici, 2005; Mikelsaar i Zilmer, 2009). *Lb. fermentum* je asociran sa humanim GI traktom s obzirom da se unosi putem fermentisane hrane (Walter, 2008). S obzirom na visoku otpornost na simulirane uslove GI trakta, interakcija *Lb. fermentum* sa tkivom sisara ispitivana je u velikom broju studija (Lin i saradnici, 2007). Kod miševa je pokazano povećanje sinteze sIgA u tkivu tankog creva kao i broja CD4+ T-limfocita u perifernoj cirkulaciji nakon oralnog unosa *Lb. fermentum* (Park i saradnici, 2005). Kod sportista je primena *Lb. fermentum* izazvala povećanje nivoa IFN γ u perifernoj cirkulaciji što se povezuje sa smanjenim rizikom od nastanka respiratornih oboljenja u navedenom istraživanju (Cox i saradnici, 2010). U prilog tome, klinička studija urađena kod novorođenčadi pokazala je da primena *Lb. fermentum* dovodi do smanjenja učestalosti respiratornih i GI infekcija (Maldonado i saradnici, 2012). Takođe je potvrđeno da *Lb. fermentum* deluje na mikrofloru domaćina, dovodeći do povećanja broja intestinalnih laktobacila (Omar i saradnici, 2013).

Sve veća primena laktobacila u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, sporadični slučajevi infekcije primećeni nakon konzumiranja laktobacila kao i dvosmisleni rezultati o delovanju laktobacila kod inflamatornih oboljenja nameću potrebu za detaljnijim razjašnjenjem mehanizama koji su u osnovi odgovora domaćina na unos laktobacila (Borriello i saradnici, 2003; Prantera i saradnici, 2002). Iz tog razloga je neophodno uporediti odgovor zdravog sa odgovorom povređenog tkiva na prisustvo istog soja laktobacila. Na taj način se može steći uvid u mehanizme delovanja i predvideti ishod konzumiranja laktobacila bilo kao dodatka ishrani ili u određenim patološkim stanjima. U izloženom istraživanju testirana je reakcija tkiva kolona pacova na peroralni unos soja *Lb. fermentum* BGHI14. Ispraćen je efekat peroralne primene soja na zdrave pacove i pacove

kod kojih je indukovano hemijsko oštećenje tkiva kolona TNBS-om čime nastaje inflamacija slična Kronovoj bolesti kod čoveka.

Usled brojnih antimikrobnih mehanizama u proksimalnom delu GI trakta sisara, prvo mesto značajne kolonizacije bakterija u smislu ostvarivanja efekata na domaćina je ileum, gde laktobacili predstavljaju najdominantniju populaciju mikroorganizama. Pretpostavlja se da je molekularna detekcija bakterijske DNK u ovom delu GI trakta indikator dobrog preživljavanja bakterija, s obzirom da bi bakterijska DNK bila razgrađena delovanjem nukleaza u duodenumu (*Bertazzoni-Minelli* i saradnici, 2004). Rezultati DGGE analize sadržaja ileuma zdravih pacova tretiranih sojem BGHI14 u trajanju od 16 dana pokazali su sposobnost ovih bakterija da prežive u GI traktu pacova. Dodatno, profil mikroflore kod pacova tretiranih sojem BGHI14 sličan je profilu kontrolnih pacova. Na ovaj način je potvrđeno da peroralni unos BGHI14 u trajanju od 16 dana nije doveo do poremećaja sastava mikroflore u ileumu pacova. Svaki disbalans u sastavu mikroflore mogao bi da bude indikator invazivnosti unetih bakterija (*Schultz* i *Haas*, 2011).

U našem istraživanju, tretman pacova laktobacilusnim sojem BGHI14 doveo je do inflamacije u tkivu kolona praćene infiltracijom neutrofila i mononukleara kod zdravih pacova nakon svakodnevne peroralne primene od približno 10^{10} bakterijskih ćelija po životinji u trajanju od 16 dana. Produženi tretman životinja sojem BGHI14 (28 dana) doveo je do smanjenja imunske reakcije u tkivu kolona bez hronične inflamacije. U saglasnosti sa histološkim rezultatima, tretman laktobacilima je kod zdravih životinja doveo do pada telesnih masa između 11. i 13. dana od početka primene, iako ovaj trend nije nastavljen sa produžetkom tretmana sojem BGHI14 do 28. dana. Moguće je pretpostaviti da se trenutak pada telesnih masa poklopio sa najvećim intenzitetom inflamatornog odgovora u tkivu kolona pacova. Navedeni podaci ukazuju na imunostimulišuće delovanje soja BGHI14 na tkivo kolona pacova. U prilog dobijenim rezultatima govore istraživanja u kojima je tretman miševa sojem *Lb. reuteri* 100-23 doveo do indukcije prolaznog imuskog odgovora tkiva tankog creva kako histološki, tako i na molekularnom nivou nekoliko dana nakon inokulacije bakterijama, pri čemu se imunska reakcija povukla nakon tri nedelje od momenta administracije (*Hoffmann* i saradnici, 2008).

Veliki broj primenjenih bakterija soja BGHI14 ($\sim 10^{10}$ bakterija po životinji dnevno) koje su alohtone za GI trakt pacova mogao bi indukovati odgovor komponenata urođene imunosti u tkivu kolona koji podižu odbrambene mehanizme i time regulišu broj unetih laktobacila u GI traktu. Ovakva reakcija može se smatrati normalnim odgovorom tkiva imunokompetentnog domaćina, uz ogradu da indukcija imunskog odgovora može predstavljati potencijalni rizik kod imunodeficientnih pacijenata. Kako se inflamatorna reakcija u zdravom tkivu kolona povukla bez obzira na produženje tretmana sojem BGHI14, moguće je pretpostaviti da su unete bakterije došle u kontakt sa subepitelnim imunskim ćelijama u tkivu kolona.

Imunska reakcija u tkivu kolona zdravih pacova uočena histološki bila je praćena povećanom transkripcijom gena za proinflamatorne citokine TNF α i IL-1 β . Indukcija sinteze TNF α u ćelijama imunskog sistema od strane laktobacila potvrđena je u ranijim istraživanjima (Kim i saradnici, 2006). Slično, naše istraživanje je pokazalo povećanje transkripcije TNF α gena u tkivu kolona pacova nakon 16 dana i nakon 28 dana tretmana sojem BGHI14. U eksperimentalnim *in vivo* modelima je pokazan kako pozitivan tako i negativan efekat TNF α , zavisno od primenjene doze (Bekker i saradnici, 2000). Istraživači su pokazali da kad se unosi niska doza TNF α dolazi do suprimiranja infekcije pluća, dok je visoka doza TNF α , iako dovodi do ublažavanja infekcije, praćena snažnom imunskom reakcijom u tkivu pluća. Bez obzira na zaštitno delovanje niskih doza TNF α , hronična primena TNF α može delovati kancerogeno (Onizawa i saradnici, 2009). Verovatno je da je povećanje nivoa TNF α izazvano primenom soja BGHI14 u našem istraživanju mehanizam kojim domaćin omogućava kontrolisanje rasta unetih mikroorganizama kako bi bila sprečena dalja translokacija bakterija i indukcija sistemskog imunskog odgovora (Macpherson, 2006). Time domaćin održava aktivnom intestinalnu barijeru i spreman je da u svakom momentu pokrene proinflamatornu kaskadu događaja ukoliko to uslovi sredine budu zahtevali. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da, nakon peroralne primene, soj BGHI14 ostvaruje imunostimulišuće delovanje na nivou tkiva kolona.

Peroralna primena soja BGHI14 u trajanju od 28 dana dovela je do indukcije transkripcije IL-1 β gena u tkivu kolona pacova. Povećanje nivoa iRNK za IL-1 β ne mora obavezno odražavati nivo aktivne forme citokina. Šta više, u ranijim istraživanjima je

potvrđeno da prisustvo simbiotskih mikroorganizama povećava nivo neaktivne pro-IL-1 β forme u mononuklearnim fagocitima *lamina propria*, i to pretežno u makrofagima (*Franchi* i saradnici, 2012). Međutim, postojanje rezervi pro-IL-1 β predstavlja potencijalnu opasnost u slučaju povrede tkiva i može dovesti do indukcije patološkog Th-ćelijama posredovanog imunskog odgovora (*Sahoo* i saradnici, 2011). Iz tog razloga su potrebne mere opreza pri dugotrajnoj primeni imunostimulišućih laktobacila.

Nakon što je pokazano imunostimulišuće delovanje soja BGHI14 na nivou tkiva kolona zdravih pacova, naredni cilj u istraživanju bio je testiranje uticaja delovanja BGHI14 u eksperimentalnom modelu kolitisa kod pacova. Bez obzira na široku upotrebu TNBS-a za izazivanje kolitisa u laboratorijskim uslovima, mehanizam koji je u osnovi kolitisa izazvanog TNBS-om nije razjašnjen. TNBS deluje kao haptent, vezujući se za tkivne i luminalne antigene i dovodi do indukcije Th1 posredovanog ćelijskog odgovora. Kako bi došlo do indukcije reakcije preosetljivosti na haptentizovane antigene, potrebna je višestruka aplikacija TNBS-a. Model kolitisa izazvanog TNBS-om kod pacova koji se najčešće primenjuje u laboratorijskoj praksi podrazumeva jednokratnu administraciju TNBS-a u lumen kolona čime nastaje inflamacija posredovana Th1-ćelijama u trajanju od nekoliko nedelja (*Dothel* i saradnici, 2013). U prisustvu etanola koji ima funkciju „omekšavanja“ hidrofobnog sloja mukusa, TNBS deluje citotoksično na epitelne ćelije dovodeći do produkcije slobodnih radikala i do nekroze u zidu creva (*Wirtz* i saradnici, 2007; *Wang* i saradnici, 2002). Tako nastaju „džepovi“ u tkivu creva u koje zapadaju luminalni mikroorganizmi. Stimuliše se akutni imunski odgovor, koji, ukoliko je nedovoljno efikasan, ne dovodi do uklanjanja zaostalih bakterija čime se inflamacija i oštećenje crevnog tkiva progresivno uvećavaju. U prilog navedenom je podatak da je za razvoj hronične faze bolesti potrebno prisustvo crevne mikroflore (*Llopis* i saradnici, 2005; *Guarner* i *Malagelada*, 2003). Citokini koji su predominantni u ranim fazama kolitisa indukovaniog TNBS-om (prvih 48 h) kod pacova su TNF α , IL-1 β i IL-6, dok se u kasnoj akutnoj fazi i hroničnoj fazi (1 - 3 nedelje), pored nivoa IL-1 β čija se visoka ekspresija zadržava, povećavaju nivoi Th1 citokina IFN γ i IL-12 (*Sun* i saradnici, 2001).

Najčešće korišćen momenat indukcije kolitisa izazvanog TNBS-om po literaturi je dve nedelje od početka tretmana laktobacilima. Stoga je u prvoj fazi eksperimenta bio cilj da se,

pored testiranja vremenskog profila reakcije zdravog tkiva kolona pacova, testira i efekat koji će primena soja BGHI14 dati u slučaju indukcije bolesti dve nedelje od početka tretmana BGHI14 sojem. Kako bi se dobio neposredan uvid u jačinu tkivne barijere i urođenog imunskog odgovora pacova na oštećenje tkiva kolona, životinje su žrtvovane 48 h nakon indukcije bolesti. Time je testirano u kojoj meri unos BGHI14 soja utiče na imunski sistem i integritet epitela kolona. Rezultati su pokazali da unos soja BGHI14 ne dovodi do pogoršanja u akutnoj fazi bolesti, iako je oštećenje indukovano u momentu postojanja imunске reakcije u tkivu kolona na BGHI14.

Stepen oštećenja kao i transkripcija gena za proinflamatorne citokine TNF α i IL- β u tkivu kolona bili su povećani u istoj meri kod svih pacova sa kolitisom uključujući pacove tretirane BGHI14 sojem i kontrolne pacove. Intenzitet imunološke reakcije uočen histološki i na osnovu nivoa iRNK za IL-1 β bio je veći u tkivu kolona pacova sa kolitisom u odnosu na zdrave životinje tretirane sojem BGHI14 pri istoj dužini tretmana, što ukazuje na postojanje različitih mehanizama koji su u osnovi reakcije tkiva kolona na BGHI14 i na oštećujući hemijski stimulus.

Iako je stepen inflamacije u akutnoj fazi dobar pokazatelj stanja urođenih imunoloških barijera u momentu indukcije oštećenja, ne predstavlja indikator zaštitnog delovanja određenog agensa. Stoga su u narednoj fazi eksperimenta životinje žrtvovane u kasnoj akutnoj fazi kolitisa, odnosno sedam dana od momenta indukcije bolesti. S obzirom na uočenu imunsku reakciju u zdravom tkivu kolona dve nedelje nakon početka tretmana, u drugoj fazi eksperimenta indukcija bolesti je pomerena na tri nedelje od početka tretmana. U daljem tekstu će biti diskutovani rezultati koji se odnose na grupe pacova kod kojih je kolitis indukovao tri nedelje od početka tretmana sojem BGHI14 (odnosno mlekom u slučaju kontrola) i koji su žrtvovani u kasnoj akutnoj fazi (7 dana) inflamacije.

U našem eksperimentu, unos TNBS-a doveo je u kasnoj akutnoj fazi bolesti do transmuralne inflamacije u tkivu kolona sa nekrotičnim poljima, hipertrofijom kripi i mišićnog tkiva i infiltracijom polimorfonukleara i mononukleara. Delovanje laktobacila na modelu kolitisa izazvanog TNBS-om testirano je u nekoliko nezavisnih studija, bilo preventivno ili terapijski. Pokazalo se da je pozitivan efekat zavisao od primenjenog soja laktobacila i objašnjen je antiinflamatornim delovanjem laktobacila (*Peran* i saradnici,

2007). Primena *Lb. fermentum* kod eksperimentalnih životinja ostvarivala je pozitivno delovanje na modelima kolitisa indukovanih DSS-om (*Dextrane Sodium Sulfate*, dekstran natrijum sulfat) i TNBS-om (*Geier* i saradnici, 2007; *Peran* i saradnici, 2006). Sudeći po histološkoj analizi tkiva kolona, tretman sojem BGHI14 nije delovao pozitivno ni u jednom režimu tretmana. S druge strane, na osnovu promene telesnih masa pacova tokom eksperimenta, uočeno je da su pacovi sa kolitisom izloženi preventivnom i terapijskom tretmanu sojem BGHI14 imali manje izražen pad telesnih masa nakon indukcije kolitisa u odnosu na pacove kontinuirano tretirane sojem BGHI14 i u odnosu na kontrolne životinje sa kolitisom. Dodatno, kod terapijski tretiranih pacova, transkripcija gena za proinflamatorni IL-1 β u tkivu kolona bila je snižena u odnosu na kontinuirano tretirane pacove. Rezultati pokazuju da je terapijski tretman pacova sojem BGHI14 bio najefikasniji u snižavanju inflamacije u tkivu kolona pacova sa kolitisom. Opisano neslaganje rezultata histologije sa promenama telesnih masa i molekulskim pokazateljima inflamacije može biti posledica prevelike doze TNBS-a primenjene pri indukciji bolesti, što donekle usporava oporavak životinja, naročito u ranijoj fazi kolitisa. *Dothel* i saradnici (2013) su zaključili da bi, u laboratorijskoj praksi, nivo oštećujućeg agensa trebalo podesiti tako da šanse za oporavak farmakološkim intervencijama budu realne. Pored toga, ne može se isključiti mogućnost da bi se eventualni pozitivni učinak mogao uočiti tek u kasnijoj fazi bolesti (*Mañé* i saradnici, 2009).

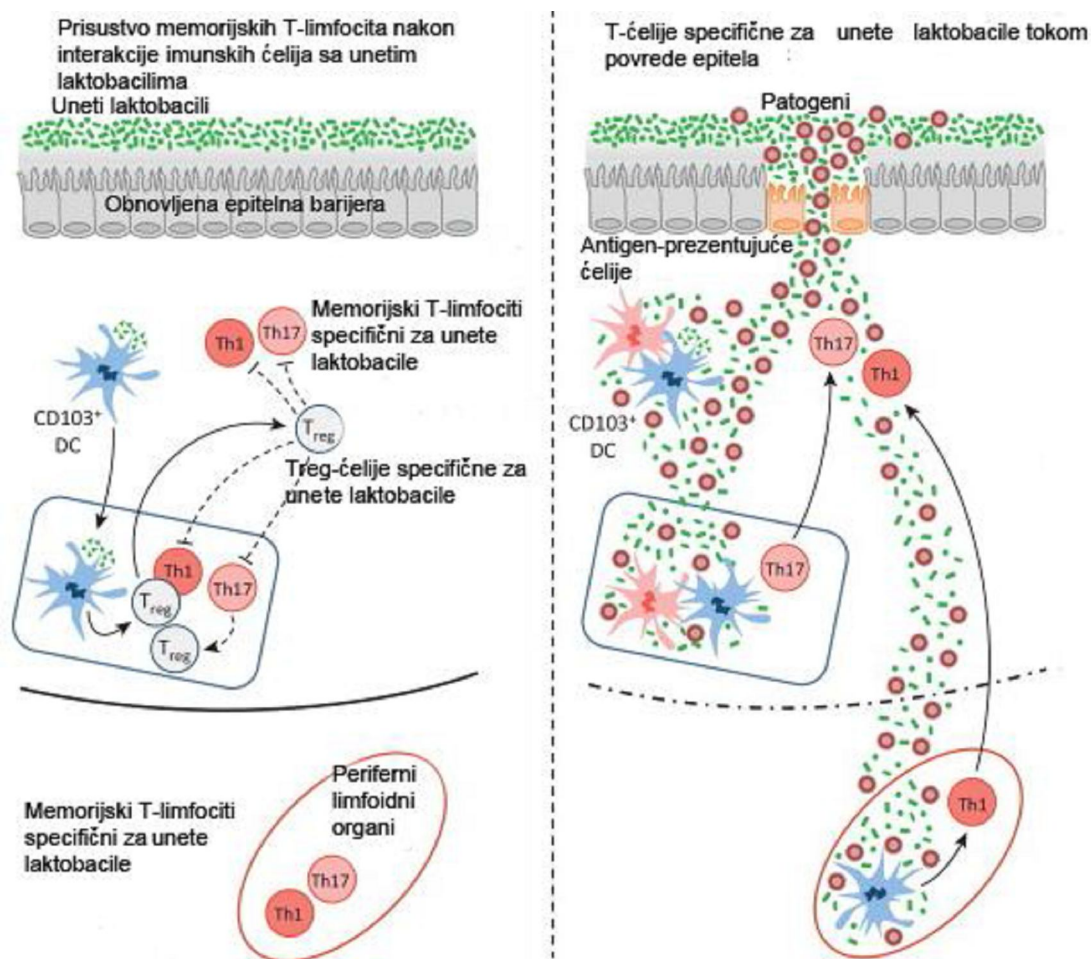
Nivo iRNK za TNF α u kasnoj akutnoj fazi kolitisa indukovanog TNBS-om nije pokazao razlike u odnosu na zdrave životinje, nevezano za režim tretmana sojem BGHI14. Jedno od mogućih objašnjenja je posttranslaciona regulacija sinteze TNF α koja je regulisana 3'-netranslirajućim regionima (*Clark*, 2000). Alternativno, pored direktnog delovanja na ćelije crevnog tkiva, TNF α dodatno stimuliše sintezu IL-6 preko koga ostvaruje niz sekundarnih efekata na imunski sistem (*Feghali* i *Wright*, 1997). IL-6 se predominantno produkuje od strane mijeloidnih ćelija *lamina propria* i deluje na niz ciljnih ćelija, kao što su epitelne ćelije u kojima indukuje aktivaciju citoprotektivnih faktora. U isto vreme, IL-6 je bitan za diferencijaciju Th1- i Th17-limfocita, što čini osnovu njegovog proinflamatornog delovanja (*Harrison* i *Maloy*, 2011). Poznato je da IL-6 može delovati regulatorno u smeru snižavanja ekspresije TNF α čime obezbeđuje negativnu povratnu

spregu kojom kontroliše intenzitet akutnog inflamatornog odgovora (*Feghali i Wright, 1997*). U našim uslovima nije bilo moguće testiranje nivoa iRNK za IL-6 s obzirom na nizak nivo ekspresije ovog citokina u homogenatima tkiva kolona pacova. U budućim istraživanjima, izolacija imunskih ćelija iz MLČ bi eventualno mogla pomoći u detekciji citokina čije su vrednosti u homogenatima celog tkiva ispod granica detekcije korišćenog metoda izolacije RNK.

Rezultati dobijeni u našoj studiji podržavaju sve veći broj podataka iz literature koji ukazuju na činjenicu da laktobacili stimulišu urođeni imunski odgovor (*Gill, 2003*). To ukazuje da bi se pozitivno delovanje u kolitisu indukovanom TNBS-om moglo postići jačanjem nespecifičnog imunskog odgovora, barem kod određenih sojeva laktobacila. U prilog navedenom stoji nekoliko činjenica. Kao što je gore spomenuto, razvoj kolitisa indukovanog TNBS-om omogućavaju luminalni mikroorganizmi a tretman antibioticima ublažava simptome bolesti. Istraživanje *Mañé* i saradnika iz 2009. godine pokazalo je da terapijski tretman laktobacilima u prvih nekoliko dana od indukcije bolesti dovodi do pogoršanja inflamacije, iako u kasnijoj fazi bolesti, sa nastavkom tretmana, laktobacili ostvaruju zaštitni efekat. Novije istraživanje na modelu spontanog ileitisa kod miševa pokazalo je da preventivna administracija probiotika dovodi do ublažavanja simptoma dok se terapijski tretman pokazao neefikasnim. Potvrđeno je da su opisani efekti rezultat stimulacije produkcije TNF α i posledičnog smanjenja propustljivosti epitelne barijere tkiva ileuma (*Corridoni i saradnici, 2012*). Spomenuto istraživanje je značajno i utoliko što je među prvima koji opisuju TNF α kao citokin čije delovanje dovodi do modulacije međućelijskih veza u smeru jačanja integriteta epitela, nasuprot više puta potvrđenim efektima o destruktivnom delovanju TNF α u ovom procesu. Način na koji TNF α deluje u cilju zaštite epitelne barijere nije razjašnjen, ali verovatno da u uslovima homeostaze ili u ranim fazama inflamacije može dovoditi do obnavljanja epitela antiapoptotskim ili proliferativnim delovanjem ili direktnim delovanjem na proteine međućelijskih veza epitelnih ćelija. Dodatno, TNF α bi mogao povećati komunikaciju među mijeloidnim i stromalnim ćelijama *lamina propria*, indukujući restituciju epitela u slučaju oštećenja (*Galdeano i saradnici, 2007*).

Pokazano je da prisustvo simbionata indukuje transkripciju *Hsp70* gena u GI traktu (*Hu* i saradnici, 2010). Slično, u *in vitro* sistemu je pokazana indukcija HSP proteina pod uticajem laktobacila, kako u intaktnim ćelijama tako i u *in vitro* modelu infekcije i oksidativne povrede epitela (*Tao* i saradnici, 2006; *Paszi-Gere* i saradnici, 2012; *Nemeth* i saradnici, 2006). Iako podaci iz literature ukazuju na indukciju iRNK za HSP70 nakon indukcije kolitisa TNBS-om (*Guzman* i saradnici, 2006), naše istraživanje nije pokazalo promenu transkripcije *Hsp70* gena u tkivu kolona kod pacova sa kolitisom. Grupa životinja kontinuirano tretirana BGHI14 sojem je u kasnoj akutnoj fazi inflamacije pokazala povećanje nivoa iRNK za HSP70 u tkivu kolona u odnosu na zdrave pacove. Takvo povećanje nije bilo praćeno pozitivnim delovanjem soja sudeći po drugim pokazateljima ispraćenim u eksperimentu. S obzirom da deluje kao signal opasnosti, HSP70 bi mogao doprineti pojačanju intenziteta inflamacije tkiva. Kako nivo *Hsp70* iRNK u tkivu kolona nije bio povećan kod zdravih pacova tretiranih sojem BGHI14, malo je verovatno da bakterije deluju kao stresogeni stimulus koji indukuje transkripciju *Hsp70* gena. S druge strane, sinteza HSP70 bi mogla biti pojačana usled pojačanog stresa u tkivu kolona u uslovima inflamacije. Međutim, kako kod kontrolnih životinja sa kolitisom isti nivo oštećenja tkiva i iRNK za proinflamatorni IL-1 β citokin nisu bili praćeni porastom nivoa *Hsp70* iRNK u tkivu kolona, verovatno je da postoje drugi faktori koji su indukovani kod kontinuirano tretiranih pacova sa kolitisom. Poznato je da IFN γ može dovesti do transkripcije *Hsp70* gena preko STAT1 signalnog puta (*Stephanou* i *Letchman*, 2011). Memorijski T-limfociti koji su potencijalno mogli biti aktivirani kod pacova sa kolitisom kontinuirano tretiranih sojem BGHI14 bi mogli doprineti lučenju IFN γ i eventualnoj indukciji transkripcije *Hsp70* gena u tkivu kolona. Interesantno je da je ekspresija *Hsp70* gena pod delovanjem BGHI14 bila uvećana već nakon 48 h od indukcije bolesti kod grupa gde je kolitis indukovao dve nedelje od početka BGHI14 tretmana. S obzirom da je u tom momentu, kao što je prethodno objašnjeno, postojala imunska reakcija tkiva na BGHI14, rana sinteza *Hsp70* iRNK bi se eventualno mogla objasniti prisustvom Th-limfocita u tkivu kolona u trenutku kada je naneta povreda. Iako naši rezultati ne sadrže podatke o stepenu translacije *Hsp70* iRNK, koja bi mogla biti inibirana u uslovima inflamacije, moglo bi se zaključiti da indukcija transkripcije *Hsp70* gena nije povezana sa pozitivnim delovanjem

soja BGHI14. Nasuprot, indukcija *Hsp70* iRNK mogla bi biti posredovana aktivacijom komponenti adaptivne imunosti.



Slika 31. Predloženi model koji objašnjava reakciju tkiva kolona pacova preventivno tretiranih određenim sojem laktobacila na oštećenje barijere u prisustvu istog soja.

Modifikovano iz publikacije *Belkaid* i saradnika (2013)

Slika 31 shematski predstavlja koncept izložen u našem istraživanju o mehanizmima koji bi mogli delovati nakon oštećenja epitelne barijere crevnog tkiva u slučaju prethodnog unosa imunostimulišućih laktobacila. Prvobitna imunostimulirajuća reakcija crevnog tkiva na unete bakterije mogla je rezultirati nastankom memorijskih Th1- i Th17-limfocita u MLC. Epitel creva je nakon takve reakcije mogao biti obnovljen sprečavajući indukciju memorijskih T-

ćelija u uslovima homeostaze. U slučaju oštećenja crevnog epitela usled unutrašnjih ili spoljnih faktora, prisustvo istog soja laktobacila moglo bi dovesti do aktivacije memorijskih T-limfocita i eventualnog pojačanja inflamacije tkiva creva.

Aktivacija TLR receptora dovodi do smanjenja paraćelijske propustljivosti, što se objašnjava povećanjem fosforilacije proteinskih kinaza $C\alpha$ i $C\delta$ (PKC α i δ) i posledičnom reorganizacijom okcludina ZO1 u smeru njihovog održavanja u apikalnom regionu pukotinastih veza. Iako je signalizacija preko TLR receptora potrebna za jačanje integriteta epitelne barijere tkiva creva tokom povrede, nije neophodna za održavanje barijere u bazalnim uslovima (Abreu, 2010). Pokazano je da probiotici povećavaju transkripciju iRNK za proteine pukotinastih veza na eksperimentalnom modelu inflamacije creva kod miševa (Corridoni i saradnici, 2012). Naše istraživanje je pokazalo smanjenje transkripcije gena za okcludin 1 (TJP1) u tkivu kolona, nakon indukcije kolitisa, u kasnoj akutnoj fazi bolesti, u odnosu na zdrave kontrole, što je u skladu sa podacima iz literature (Xia i saradnici, 2011). Međutim, pacovi terapijski tretirani sojem BGHI14 nisu pokazali smanjenje nivoa *Tjp1* iRNK u tkivu kolona u odnosu na zdrave pacove. Šta više, u istoj grupi je primećeno povećanje nivoa *Tjp1* iRNK u odnosu na kontrolne i kontinuirano BGHI14 tretirane životinje sa kolitisom. Mada bi se moglo zaključiti da postoji različit stepen indukcije transkripcije *Tjp1* gena kod terapijski BGHI14 tretiranih pacova koji bi jačanjem barijere mogao doprineti sveukupnom ublažavanju inflamacije, dodatni eksperimenti su neophodni za donošenje takvog zaključka. Pre svega trebalo bi ispitati nivo vilina koji je specifično eksprimiran u epitelnim ćelijama, a koji bi omogućio kalibraciju u odnosu na stepen živih epitelnih ćelija u uzorku tkiva. Sličnu pretpostavku o analizi ekspresije gena u oštećenom tkivu izneli su McGuckin i saradnici (2009). Na osnovu podataka kojima raspolažemo, može se pretpostaviti da dobijeni rezultat odražava stepen oštećenja tkiva kolona i posledično smanjenje broja epitelnih ćelija koji su u najmanjoj meri izraženi kod pacova koji su dobijali BGHI14 nakon indukcije kolitisa. Takvom tumačenju ide u prilog i činjenica da kod zdravih životinja BGHI14 nije doveo do povećane transkripcije *Tjp1* gena u tkivu kolona.

Interesantno, kod zdravih pacova je primećen porast nivoa iRNK za HSP70 i TJP1 proteine sa produženjem peroralnog hranjenja mlekom i tretmana sojem BGHI14. S

obzirom da simbionti indukuju transkripciju proteina toplotnog stresa, prebiotičko delovanje mleka na rast ukupne populacije simbionata bi moglo biti odgovorno za povećanu transkripciju *Hsp70* gena (*Bertazzoni-Minelli* i saradnici, 2004). Dodatno, s obzirom na starost pacova na početku tretmana, promene u tkivu creva povezane sa sazrevanjem organizma mogle bi dovesti do promene nivoa ekspresije faktora uključenih u citoprotektivno dejstvo i fizičko održavanje integriteta GI epitela.

Za razliku od IL17A, citokina koji ima značajnu ulogu u patogenezi artritisa i encefalomijelitisa, IL17F ne igra značajnu ulogu u razvoju opisanih autoimunskih bolesti. IL-17F bi mogao delovati zaštitno u ranim fazama infekcije ili povrede crevnog epitela sprečavajući invaziju luminalnih mikroorganizama (*Ishigame* i saradnici, 2009). Naše istraživanje je pokazalo da se nivo iRNK za IL-17F u tkivu kolona pacova snizio nakon indukcije kolitisa. Takav rezultat nije u skladu sa podacima iz literature koji ukazuju na povećanje nivoa IL-17 u tkivu kolona nakon indukcije kolitisa TNBS-om (*Zhang* i saradnici, 2006). Međutim, istraživanje koje su sproveli *von Vietinghoff* i *Ley* (2009) pokazalo je da IL-17A suprimira sintezu iRNK za IL-17F. U prilog tome, *Wedebye Schmidt* i saradnici (2013) su pokazali da nivo IL-17F obrnuto korelira sa stepenom oštećenja u modelu hroničnog kolitisa kod miša. Stoga je moguće da je sniženje nivoa iRNK za IL-17F u tkivu kolona nakon indukcije kolitisa u našem eksperimentu eventualna posledica povećanja nivoa IL-17A.

Pored oksidativnog stresa koji je direktno indukovano TNBS-om, tokom inflamacije fagociti proizvode reaktivne vrste delovanjem NADPH (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide PHosphate*, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) - oksidaze, NO (*Nitric Oxide*, azotov oksid) - sintaze i mijeloperoksidaze. Prevelika količina oslobođenih kiseoničnih i azotovih reaktivnih vrsta vodi oksidativnom oštećenju epitela (*Rochat* i saradnici, 2007). Antioksidativna svojstva *Lb. fermentum* testirana su u *in vitro* esejima gde je testirani soj pokazao sposobnost preživljavanja u prisustvu reaktivnih kiseoničnih vrsta što se pripisuje postojanju kompletnog enzimskog puta za sintezu glutaciona (*Mikelsaar* i *Zilmer*, 2009; *Kullisaar* i saradnici, 2010). Od posebnog je značaja istraživanje *Peran* i saradnika (2006) gde je pretpostavljeno da bi produkcija γ -glutamil-cistein dipeptida od strane *Lb. fermentum* mogla doprineti zaštitnom delovanju testiranog soja na modelu

kolitisa indukovanog TNBS-om. Primarni mehanizam odbrane eukariotskih sistema od oksidativnog stresa je redukovani glutation koji deluje direktno na hidroperoksidne grupe fosfolipida i drugih lipidnih peroksida (Marí i saradnici, 2009). Iako je prisustvo glutationa u nekim BMK kao što su *Lb. fermentum* i *Lb. salivarius* potvrđeno eksperimentalno, sinteza glutationa od strane BMK je otvoreno polje istraživanja (Pophaly i saradnici, 2012). Generalno se smatra da BMK nemaju sposobnost sinteze glutationa, ali se pretpostavlja da sintetišu γ -glutamyl-cistein, prekursor glutationa, za koga je pokazano da se lakše apsorbuje u crevnoj mukozi domaćina u odnosu na glutation (Serrano i saradnici, 2007; Peran i saradnici, 2006). U eukariotskim ćelijama γ -glutamyl-cistein se prevodi u glutation, što bakterije koje ga proizvode čini vrlo poželjnim u svrhe regulisanja poremećene oksidativne ravnoteže domaćina (Peran i saradnici, 2006).

Najčešće korišćeni biomarkeri oksidativnog stresa su lipidni peroksidi koji nastaju oksidacijom membranskih lipida ćelije (Niki, 2008). Kontinuirani tretman pacova sojem BGHI14 doveo je do snižavanja stepena lipidne peroksidacije u tkivu kolona pacova sa kolitisom u odnosu na kontrolne pacove sa kolitisom. Interesantno, kod bolesnih pacova u svim režimima tretmana sojem BGHI14 nije uočeno povećanje stepena lipidne peroksidacije u tkivu kolona u odnosu na zdrave životinje. Jedan od razloga zbog koga tkivno oštećenje nije praćeno stepenom oksidativnog oštećenja je da su drugi mehanizmi u osnovi oštećenja, kao što je aktivacija matriksnih metaloproteinaza (Schepens i saradnici, 2011). Matriksne metaloproteinaze se oslobađaju iz ćelija prisutnih u vezivnom tkivu uključujući mezenhimske ćelije, makrofage i neutrofile. Ovi proteini vrše remodelovanje tkiva ali njihova nekontrolisana aktivacija pod delovanjem IL-1 i TNF α citokina dovodi do oštećenja tkiva (Medina i Radomski, 2006). U prilog aktivaciji drugih patoloških mehanizama ide i rezultat dobijen kod kontinuirano BGHI14 tretiranih pacova sa kolitisom gde, sudeći po drugim pokazateljima, intenzitet inflamacije ne korelira sa nivoom oksidativnog stresa u tkivu kolona. Soj BGHI14 verovatno poseduje antioksidativna svojstva koja nakon dužeg tretmana snižavaju nivo reaktivnih vrsta u tkivu ali drugi mehanizmi, pre svega pretpostavljena aktivacija memorijskih Th-limfocita dovode do napredovanja bolesti.

Promena crevne mikroflore može biti pokazatelj stepena oštećenja, naročito u akutnoj fazi inflamacije tkiva creva. Na modelu kolitisa indukovanog TNBS-om uočeno je ukupno smanjenje predstavnika tipa *Firmicutes* i ukupno povećanje predstavnika tipa *Bacteroidetes* u sadržaju cekuma miševa i pacova (*Ettreiki* i saradnici, 2012). U našem istraživanju, DGGE analiza profila mikroflore sadržaja kolona pacova sa kolitisom indukovanim TNBS-om pokazala je povećanje predstavnika reda *Clostridiales* i to pripadnika klastera IV (*Ethanoligenens harbinense*) i klastera XIVa (*Clostridium jejuense*). Dodatno, uočeno je i povećanje populacije *Bacteroides capillosus*. Na osnovu karakteristika na nivou genoma i po fiziološkim svojstvima, vrsta *Bacteroides capillosus* pripada redu *Clostridiales* (preimenovana u vrstu *Pseudoflavonifractor capillosus*) i to klasteru IV (*Carlier* i saradnici, 2010). Predstavnicu vrste *Clostridium jejuense* izolovani su iz zemljišta (*Jeong* i saradnici, 2004) dok *Bacteroides capillosus* i *Ethanoligenens harbinense* predstavljaju normalne stanovnike GI trakta sisara (*Carlier* i saradnici, 2010; *Hakansson* i *Molin*, 2011; *Wang* i saradnici, 2013). DGGE analiza sadržaja kolona pacova nije pokazala prisustvo laktobacilne mikroflore ni kod zdravih ni kod bolesnih pacova. S obzirom da laktobacili ne čine dominantnu grupu mikroorganizama u ovom delu GI trakta, broj laktobacila je mogao biti ispod granica detekcije DGGE metode (*Hayashi* i saradnici, 2005). Trebalo bi napomenuti da su prajmeri korišćeni u našem eksperimentu dizajnirani tako da budu specifični za 16S rDNK gene laktobacila i nisu dovoljno reprezentativni za sve predstavnike crevne mikroflore. Efikasnost korišćenih prajmera u umnožavanju sekvenci 16S rDNK gena iz bakterija reda *Clodtridiales* nije određena (*Heilig* i saradnici, 2002).

5. 1. 1. Implikacija dobijenih rezultata u primeni laktobacila kao probiotika

“Science never solves a problem without creating ten more” - George Bernard Shaw

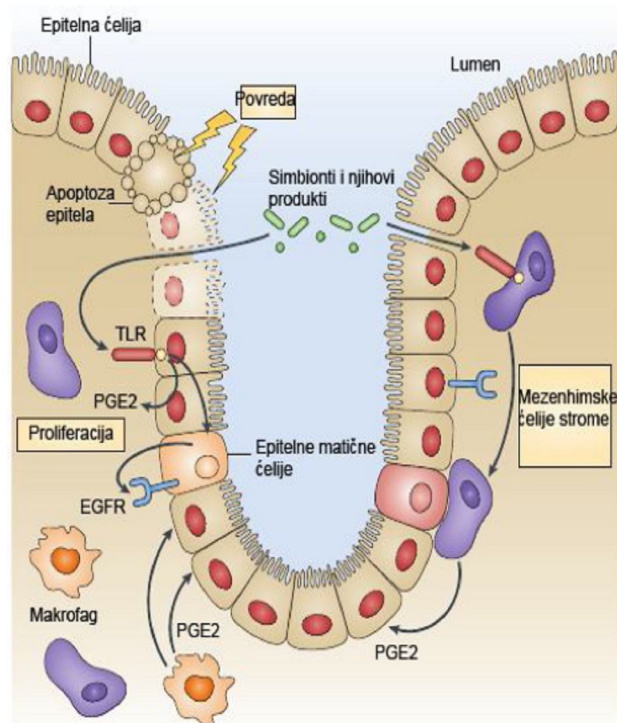
Rezultati o delovanju laktobacila dobijeni u predstavljenom istraživanju kao i dvosmisleni rezultati kliničkih studija i pojedinih istraživanja na eksperimentalnim modelima bolesti mogu se bolje razumeti ako se u razmatranje uzme publikacija *Eckmann* i saradnika (2008). U publikaciji je sumirana uloga ključnog regulatora inflamatornog odgovora - NF- κ B (*Nuclear Factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells*, jedarni

faktor pojačavač kapa lakog lanca aktiviranih B-ćelija), koji je i centralni molekul u interakciji intestinalnih ćelija sa simbiotima i patogenima. NF-κB signalni put se nalazi nizvodno od aktivacije TLR receptora. NF-κB ima sveukupno zaštitno delovanje u akutnom oštećenju epitelne barijere što odgovara eksperimentalnim modelima akutnog kolitisa. Pozitivno delovanje se ostvaruje direktnim delovanjem na preživljavanje u samim epitelnim ćelijama, najverovatnije aktivacijom antiapoptotskog *bcl-xl* gena. Dodatno, povećana ekspresija hemokina izazvana stimulacijom IEĊ dovodi do regrutovanja makrofaga i T-ćelija koji dalje proizvode IL-22 i IL-11 sa antiapoptotskim dejstvom i indukuju ekspresiju citoprotektivnih faktora kao što je HSP70 (*Eckmann i saradnici, 2008*). Aktivacija mijeloidnih ćelija u takvim uslovima u sprezi sa miofibroblastima ima ulogu u reparaciji epitela (*Malvin i saradnici, 2012; Pai i saradnici, 2002; Pull i saradnici, 2005*). S druge strane, kod hroničnog kolitisa uzrokovanog poremećenom regulacijom adaptivnog imunskog odgovora, aktivacija NF-κB signalnog puta pojačava inflamaciju. Nasuprot akutnom, hronični kolitis nastaje usled neravnoteže između regulatornih T-limfocita i proinflamatornih limfocita. Epitelne ćelije sada igraju sekundarnu ulogu u patogenezi. Aktivacija NF-κB signalnog puta u takvim uslovima ne deluje zaštitno već, nasuprot, dovodi do agravacije oštećenja, zbog prekomerne aktivacije mijeloidnih i limfoidnih ćelija i povećavanja nivoa proinflamatornih citokina.

U zavisnosti od ćelija čija je uloga važna za progresiju oboljenja zavisi i set gena koji će delovati zaštitno. Geni koji kodiraju za antiapoptotske proteine i hemokine su od značaja u akutnom hemijskom oštećenju epitela, dok su geni uključeni u proizvodnju citokina ključni u patogenezi hroničnih imunski posredovanih bolesti (*Eckmann i saradnici, 2008*). U skladu sa opisanim, stimulacija intestinalnog tkiva antigenima mikroorganizama može proizvesti različite efekte u zavisnosti od ćelija koje ostvaruju ključnu ulogu u nastanku oštećenja.

U svetlu gore navedenih rezultata i pretpostavki mogu se tumačiti i rezultati dobijeni u našem istraživanju. Bakterije soja BGHI14 čija je primena počela tek od momenta indukcije lezije TNBS-om doveli su do ublažavanja patologije jer su intenzivno stimulisali epitelne i mijeloidne ćelije uključene u reparaciju tkiva kolona. Opisani model omogućava i razjašnjavanje rezultata dobijenih kod pacova kontinuirano tretiranih sojem BGHI14. Kao

što je prethodno spomenuto, imunska reakcija zdravog tkiva kolona na alohoni laktobacilusni soj BGHI14 mogla je dovesti do nastanka memorijskih T-limfocita u MLČ. Odbrambeni sistemi nakon te prve reakcije mogli bi biti podignuti na nivo koji sprečava dalji prodor alohtonih mikroorganizama i njihov kontakt sa imunskim ćelijama. Prisustvo istog soja u momentu oštećenja sluznice bi moglo regrutovati memorijske T-limfocite (*Belkaid i saradnici, 2013*). Time bi pozitivni efekti prvobitne NF- κ B signalizacije u epitelnim i mijeloidnim ćelijama bili poništeni aktivacijom NF- κ B u limfoidnim ćelijama. Elegantan način da se ispita da li je kod kontinuirano tretiranih pacova prisutno regrutovanje i aktivacija T-limfocita bilo bi određivanje glavnog markera aktivacije Th1-limfocita IFN γ (*Whitmire i saradnici, 2008*). Međutim, slično IL-6, u našim uslovima nije detektovana dovoljna količina iRNK za IFN γ koja je potrebna za ekspresionu analizu.



Slika 32. Model kojim se objašnjava uloga simbionata pri akutnoj povredi epitela.

Modifikovano iz publikacije *Abreu (2010)*

Opisani koncept je shematizovan Slikom 32. Aktivacija bazolateralnih receptora na epitelnim ćelijama kao i receptora na stromalnim ćelijama crevnog tkiva dovodi do sinteze

faktora koji učestvuju u proliferaciji epitela (PGE_2) kao i receptora faktora rasta epitela (EGFR, *Epithelial Growth Factor Receptor*) i pozicioniranja stromalnih ćelija u blizini oštećenja epitela čime se indukuje proliferacija epitelnih matičnih ćelija (Abreu, 2010).

S obzirom da je preventivna primena soja BGHI14 dovela do ublažavanja inflamacije kolona kod pacova sa kolitisom, verovatno je da uočeno povećanje nivoa $TNF\alpha$ kod zdravih pacova tretiranih bakterijama nije bilo praćeno hroničnom inflamacijom posredovanom leukocitima, bez obzira na imunsku reakciju u zdravom tkivu kolona na BGHI14 nakon dve nedelje tretmana pacova. U suprotnom bi intenzivna aktivacija NF- κ B signalne kaskade do koje dolazi u razorenom tkivu, zbog velike izloženosti PRR receptora u tkivu kolona pacova luminalnim antigenima, dovela do stimulacije već aktiviranih leukocita i pogoršanja bolesti.

Čak i ukoliko se prvobitna reakcija u tkivu kolona na BGHI14 povukla u momentu nastanka lezije nakon prestanka tretmana, određeni broj unetih laktobacila teoretski može zaostati u GI traktu i doći u kontakt sa memorijskim T-limfocitima vodeći aktivaciji NF- κ B signalnog puta. To dovodi u pitanje primenu imunostimulišućih laktobacila u režimu preventivnog tretmana, bez obzira na rezultat dobijen u našem istraživanju. Predložene hipoteze kojima se objašnjavaju naši rezultati govore u prilog kratkotrajnoj terapijskoj primeni imunostimulišućih laktobacila u kliničkoj praksi. Praćenje osoba sa genetskom predispozicijom kako bi se na vreme uočili prvi simptomi bolesti i reagovalo kratkotrajnom terapijskom primenom laktobacila predstavlja najbezbedniju strategiju u tretiranju inflamatornih oboljenja GI trakta.

Konačno, važan moment u primeni laktobacila, bilo preventivno ili terapijski, uključuje bezbednost kod imunokompromitovanih pacijenata. S obzirom da naši rezultati pokazuju da primena BGHI14 dovodi do imunske reakcije u tkivu kolona kod potpuno zdravih životinja i imajući u vidu da Kronova bolest predstavlja bolest imunodeficijencije, nameće se pitanje da li će kod takvih osoba doći do inflamacije tkiva i eventualne sepse. Međutim, *in vivo* eksperimenti kao ni istraživanja na imunokompromitovanim pacijentima ne potvrđuju takvu pretpostavku. Tako je oralni tretman imunosuprimiranih miševa doveo do jačanja oslabljenog imunskog odgovora životinja, bez negativnih posledica izazvanih eventualnom invazijom unetih laktobacila (De Arellano i saradnici, 2012). Imajući u vidu

rezultate našeg istraživanja, predlažemo primenu testa rezistencije na mehanizme urođene imunosti domaćina kakav su primenili *Asahara* i saradnici (2003), koji su izveli koinkubaciju testiranih laktobacila sa mišjim makrofagima. Ovakav test je relevantan za potvrdu bezbednosti probiotika pre daljih *in vivo* analiza ili kliničke primene, naročito kod imunodeficijentnih osoba.

5. 2. Uloga MbpL i AggL proteina u vezivanju laktobacila za GI mukozu pacova

“If the facts don't fit the theory, change the facts” - Albert Einstein

Kako bi delovali na domaćina, mikroorganizmi u GI traktu bi trebalo da imaju sposobnost prolaska kroz mukus i pozicioniranja u neposrednoj blizini crevnog epitela (*Van den Abbeele* i saradnici, 2011). Iako predstavlja strategiju patogenih mikroorganizama, ovo je svojstvo poželjno u selekciji sojeva sa probiotičkim potencijalom. Stoga su adhezivni molekuli na površini mikroorganizama koji učestvuju u vezivanju za mukus predmet brojnih istraživanja kako kod patogena tako i kod potencijalnih probiotika.

U našem istraživanju je korišćen protein sa MucBP domenom kao i agregacioni faktor, koji su izolovani iz plazmida pKP1 soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1. Geni (sa promotorskim sekvencama) koji kodiraju za oba proteina klonirani su u vektor za kloniranje pAZIL, čime su dobijeni konstrukti pAZIL-mbpL i pAZIL-aggL (*Kojic* i saradnici, 2011). Dobijeni konstrukti, kao i kontrolni pAZIL vektor su radi daljih analiza prebačeni u derivat soja BGKP1 koji je očišćen od plazmida a označen je kao BGKP1-20, čime su dobijeni sledeći derivati: BGKP1-20/pAZIL, BGKP1-20/pAZIL-mbpL i BGKP1-20/pAZIL-aggL (*Kojic* i saradnici, 2011).

Laktokoke predstavljaju homofermentativne Gram-pozitivne mikroorganizme (*Teuber*, 2000). Predstavnici ovog roda nisu trajni kolonizatori GI trakta s obzirom na nemogućnost umnožavanja *in vivo* i samim tim kratko vreme zadržavanja u crevnom traktu sisara (*Xin* i saradnici, 2003). Adhezivne sposobnosti laktokoka za mucin i ćelije u kulturi do sada su ispitivane od strane nekolicine istraživačkih timova (*Dharmawan* i saradnici, 2006; *Kimoto* i saradnici, 1999). Iako se nisu pokazale inferiornijim u odnosu na laktobacile, eventualni adhezivni molekuli na površini laktokoka nisu detaljnije proučavani. Značajno je

istraživanje *Kojic* i saradnika, koje je pokazalo prisustvo MucBP domena u površinskom proteinu kod laktokoka. Međutim, funkcionalna karakterizacija ovog proteina u navedenoj studiji nije rađena (*Kojic* i saradnici, 2011). *L. lactis* je mikroaerofilna BMK koja predstavlja često korišćenog domaćina za proizvodnju rekombinantnih proteina s obzirom da, između ostalog, sekretuje mali broj proteina i sintetiše neznatan broj površinskih proteaza i proteaza koje se luče u spoljašnju sredinu (*Brooijmans* i saradnici, 2007; *Loir* i saradnici, 2005; *Miyoshu* i saradnici, 2002; *Sriraman* i *Jayaraman*, 2008).

Rezultati našeg istraživanja na derivatima BGKP1-20 ukazuju na pozitivnu korelaciju između autoagregacije bakterija i vezivanja za mukožu kolona u uslovima *in vivo* i *ex vivo*. Debljina mukusnog sloja u kolonu veća je u odnosu na tanko crevo. Šta više, na resama tankog creva usled intenzivne peristaltike mukus koji se sintetiše u kriptama od strane peharastih ćelija biva sljušten, čime je olakšana apsorpcija materija u ovom delu GI trakta (*Johansson* i saradnici, 2011). Interesantno, pokazano je da je hidrofobnost površine kolona veća u odnosu na tanko crevo, usled prisustva fosfolipidnog surfaktantnog sloja koji pokriva luminalnu površinu mukusa (*Lugea* i saradnici, 2000; *Branu* i saradnici, 2009). Iako bi se na osnovu navedenog moglo pretpostaviti da je agregirajući fenotip odgovoran za adheziju za mucinske glikoproteine koji čine mukus, rezultati vezivanja *in vitro* sa HT20-MTX ćelijama i komercijalnim svinjskim želudačnim mucinom ne govore u prilog takvoj pretpostavci.

S obzirom da agregirajući derivat ima pojačan afinitet za heksadekan, i da se odlikuje srednjim vrednostima hidrofobnosti površine u odnosu na niske vrednosti pokazane kod kontrolnog BGKP1-20/pAZIL derivata može se zaključiti da je pojačan stepen adhezije BGKP1-20/pAZIL-aggL derivata za mukožu kolona rezultat nespecifičnih interakcija sa površinskim surfaktantnim slojem fosfolipida. To ukazuje da je agregacioni protein indirektno, kroz povećanje hidrofobnosti površine doprineo nespecifičnom vezivanju BGKP1-20 soja za mukožu kolona pacova. Površinska hidrofobnost je i ranije testirana u kontekstu vezivanja za crevnu mukožu. S obzirom na prirodu nespecifičnih hidrofobnih interakcija, njihovim bi se uspostavljanjem omogućio blizak kontakt ćelija i/ili vanćelijskih elemenata i time olakšalo uspostavljanje specifičnih interakcija (*Sethman*, 2003). Međutim, pozitivna korelacija nije potvrđena u svim studijama što ukazuje na uključenost dodatnih

adhezivnih faktora ili na specifičnost eukariotskog ciljnog sistema (*Fel Re* i saradnici, 2000; *Tuo* i saradnici, 2013).

Međutim, navedenim činjenicama ne može se objasniti manji stepen adhezije agregirajućeg BGKP1-20/pAZIL-aggL derivata u ileumu u odnosu na ostale derivate u uslovima *in vivo*. Može se pretpostaviti da, s obzirom na odsustvo kontinuiranog mukusnog sloja i niže hidrofobnosti površine ileuma, BGKP1-20/pAZIL-aggL derivat nije u prednosti u odnosu na preostale derivate. Dodatno, moguće da peristaltika creva, koja je intenzivnija u ileumu u odnosu na kolon (*Van den Abbeele* i saradnici, 2011), dovodi do efikasnijeg i bržeg uklanjanja formiranih agregata u odnosu na neagregirajuće bakterijske derivate. U prilog tome idu i rezultati u kojima je pokazan niži stepen vezivanja BGKP1-20/pAZIL-aggL derivata u *in vitro* testovima sa HT29-MTX ćelijama u odnosu na kontrolni BGKP1-20/pAZIL derivat. U standardnim adhezionim esejima nakon statičkih uslova inkubacije slede koraci usisavanja medijuma i ispiranja. Ovim koracima uklanjaju se ne samo nevezane, nego i slabo vezane bakterije (*John* i saradnici, 1994; *Haier* i *Nicolson*, 2001). Intenzivna ispiranja nakon inkubacije mogla bi imitirati protok kakav postoji u GI traktu - dovodeći do mehaničkog uklanjanja agregata bakterija. Nasuprot, *ex vivo* test koji je korišćen u našem istraživanju nije zasnovan na primeni snažnih sila kakvo je usisavanje medijuma nakon perioda inkubacije bakterija sa tkivom creva. Slabije vezivanje BGKP1-20/pAZIL-aggL derivata se u eseju adhezije za mucin delimično potire pojačanim afinitetom istog derivata za zaostala neobložena mesta plastike koja je korišćena u testu. Izraženija sposobnost vezivanja agregirajućeg derivata za hidrofobnu površinu plastike u kontrolnim bunarićima u *in vitro* esejima mogla bi se objasniti afinitetom za hidrofobne površine koji može nadjačati sile usisavanja, slično situaciji primećenoj u testovima vezivanja za mukoza kolona pacova.

Derivat BGKP1-20/pAZIL-mbpL pokazao je pojačano vezivanje za komercijalno dostupni mucin iz svinje i za HT29-MTX ćelije u kulturi. Pokazano je da komercijalni svinjski želudačni mucin poseduje homologiju na nivou cDNK sa humanim Muc5AC koji je predominantno eksprimiran u respiratornim traktu i u mukozi želuca (*Holmen-Larsson* i saradnici, 2013; *Van Tassell* i *Miller*, 2011). HT29-MTX ćelije predstavljaju besmrtnu ćelijske linije raka debelog creva koje predominantno sekretuju MUC5AC i 5AB, umesto

MUC2 koji dominira u tankom i debelom crevu (*Van Tassell i Miller, 2011*). Razlike između tipova mucina u GI traktu potiču uglavnom od drugačijih tipova glikozilacije - tako MUC2 nosi veće naelektrisanje u odnosu na želudačne mucine (*Holmen-Larsson i saradnici, 2013*). Istraživanja koja bi odgovorila na pitanje da li, i u kojoj meri razlike u glikozilaciji doprinose različitom vezivanju bakterija nisu rađena. Eksperimenti koji su poredili sposobnost mukus-vezujućih proteina *Lb. fermentum* pokazala su podjednak stepen vezivanja istih proteina kako za intestinalni mukus tako i za želudačni mucin (*Rojas i saradnici, 2002; Macías-Rodríguez i saradnici, 2009*). Na osnovu toga može se zaključiti da MbpL doprinosi vezivanju bakterija za mucine, i to za tipove mucina koji su prisutni u želucu i respiratornom traktu. S druge strane, ne može se isključiti mogućnost da je adhezija agregirajućeg BGKP1-20/pAZIL-aggL derivata za mukoza kolona posledica veće sposobnosti adhezije za mucin tipa dva.

Na osnovu dobijenih rezultata teško je objasniti povećanu adheziju derivata sa kontrolnim pAZIL vektorom u uslovima *ex vivo* u odnosu na derivate sa pAZIL-mbpL konstruktom. Primećeno je da BGKP1-20/pAZIL derivat ima bolji rast u uslovima *in vitro* u odnosu na derivate koji ekspimiraju MbpL i AggL proteine (neobjavljeni rezultati). Ukoliko se to ima u vidu, logično je pretpostaviti da u uslovima kada je otežano ispiranje nevezanih bakterija sa testirane površine kao što je slučaj u *ex vivo* eseju adhezije, takav soj stiče prividnu prednost u adheziji ukoliko nisu prisutni drugi faktori uključeni u vezivanje. Slično, i derivat BGKP1-20/pAZIL-mbpL je pokazivao bolji rast *in vitro* u odnosu na agregirajući derivat, čime bi se mogla objasniti blaga prednost ovog derivata u odnosu na agregirajući derivat u statičnom sistemu kakav je esej *ex vivo*.

Korišćenjem očišćenog soja *L. lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20 kao domaćina za ekspresiju MbpL i AggL proteina pokazano je da agregirajući fenotip doprinosi nespecifičnom vezivanju za hidrofobnu mukoza kolona. Isti taj fenotip otežava vezivanje za mukoza ileuma gde je peristaltika intenzivnija u odnosu na kolon i gde, s druge strane ne postoji izražena hidrofobnost koja bi ovom derivatu dala prednost u odnosu na derivate sa manjom površinskom hidrofobnošću. U isto vreme, naše istraživanje je pokazalo da MbpL protein ekspimiran u soju *L. lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20 pozitivno korelira sa vezivanjem za želudačne mucine. Takođe, rezultati ukazuju da bi želudačna mukoza mogla

predstavljati ciljno tkivo u eventualnoj medicinskoj primeni sojeva koji ekspimiraju mucin-vezujuće domene.

U svrhe testiranja uloge MbpL i AggL proteina u sistemu koji je relevantniji za humanu upotrebu, konstrukti pAZIL-mbpL i pAZIL-aggL ubačeni su u neagregirajući humani oralni izolat *Lb. salivarius* BGHO1. Ovaj soj se na osnovu *in vitro* testova pokazao kao dobar kandidat za dalju primenu u *in vivo* istraživanjima (Strahinic i saradnici, 2007). *Lb. salivarius* je homofermentativni laktobacil koji pripada oralnoj autohtonj mikroflori sisara (Jiménez i saradnici, 2010). S obzirom na veliku svakodnevnu produkciju pljuvačke (1-1.5 l dnevno kod odraslog čoveka), često se detektuje u nižim delovima GI trakta što može izazvati konfuziju u vezi sa stvarnim poreklom ove vrste (Walter, 2008). Testiran je na modelima kolitisa i artritisa kod eksperimentalnih životinja gde je pokazao bilo zaštitno delovanje ili odsustvo efekta (Neville i O'Toole, 2010). Slična situacija je i sa kliničkim ispitivanjima kod sindroma iritabilnog kolona. U *in vitro* istraživanjima *Lb. salivarius* se pokazao efikasnim u indukciji proinflammatoryh citokina od strane mononukleara i IL-10 od strane dendritičnih ćelija poreklom iz MLC. S druge strane, isti soj doveo je do sniženja nivoa IL-8 u enterocitima u uslovima *in vitro* (Neville i O'Toole, 2010). Analizom potencijalnih adhezivnih faktora pokazano je prisustvo sortaza-zavisnih proteina na površini među kojima su homolozi mukus- i kolagen-vezujućih proteina (Van Pijkeren i saradnici, 2006). Navedeni faktori su analizirani funkcionalno u interakciji sa epitelim ćelijama *in vitro* i potvrđena je njihova uloga u adheziji (Neville i O'Toole, 2010). Dodatno, prisustvo sekvenci koje kodiraju za MucBP domen je takođe potvrđeno u genomu *Lb. salivarius* (Van Pijkeren i saradnici, 2006). Jedno od svojstava koje ovaj soj čini naročito pogodnim za eksperimentalnu upotrebu je sposobnost zadržavanja u GI traktu nakon oralnog unošenja u životinje (Neville i O'Toole, 2010). Time se, s obzirom na brojnost, olakšava praćenje ponašanja unesenog soja u GI traktu. Kako ne predstavlja deo autohtone mikroflora distalnog dela GI trakta sisara, olakšano je mikrobiološko i molekularno-biološko razlikovanje u odnosu na već prisutne stalne kolonizatore crevnog trakta eksperimentalnih životinja.

Ekspresija *mbpL* i *aggL* gena u derivatima BGHO1/pAZIL, BGHO1/pAZIL-mbpL i BGHO1/pAZIL-aggL potvrđena je na nivou iRNK korišćenjem RT-PCR-a. Iako derivat

BGHO-1/pAZIL-aggL ne pokazuje izražena agregaciona svojstva u tečnom medijumu za rast, nakon ispiranja derivata u PBS-u uočava se nepotpuna agregacija. Pored toga, kolonije BGHO1/pAZIL-aggL derivata su manje i kompaktnije u odnosu na ostale derivate, iako ta razlika nije izražena kao u slučaju analognog laktokokalnog BGKP1-20/pAZIL-aggL derivata (Kojic i saradnici, 2011). Ujedno, fenotipski efekat ekspresije MppL i AggL proteina potvrđen je testiranjem afiniteta derivata za organske rastvarače, gde je uočen veći afinitet BGHO1/pAZIL-mbpL i pAZIL-aggL derivata za heksadekan, što odražava hidrofobnost bakterijske površine. Pokazan je i veći afinitet BGHO1/pAZIL-mbpL derivata za etil-acetat što je merilo porasta elektron-akceptorskih svojstva bakterijske površine.

Ekspresija AggL proteina u slučaju BGKP1-20/pAZIL-aggL derivata rezultirala je snažnim auto-agregacionim fenotipom. S obzirom na različita svojstva koja pokazuju različiti sojevi koji ekspimiraju isti AggL protein, pretpostavljeno je da je ostvarivanje agregacionog fenotipa, pored faktora agregacije, zavisno i od fizičko-hemijskih svojstava površine ciljne ćelije koja deluje kao akceptor za agregacioni faktor. Sličnu su pretpostavku izneli Ventura i saradnici (2002) i podržano je istraživanjima u kojima je agregacioni faktor dodat u bakterijsku suspenziju dovodio do agregacije neagregirajućih sojeva mikroorganizama (Reniero i saradnici, 1992). Ekspresija agregacionog faktora bi takođe mogla biti odgovorna za izmenjena svojstva površine ćelije koja pojačavaju agregaciju, s obzirom da je pokazano da je AggL protein dodat u bakterijsku suspenziju doveo do agregacije samo prethodno agregirajućih bakterija koje su izgubile sposobnost agregacije nakon ponavljajućih ispiranja u vodi, ali ne i do agregacije bakterija koje ne ekspimiraju agregacioni faktor (Kojic i saradnici 2011). Različita fizičko-hemijska svojstva laktokokalnog soja BGKP1-20 mogla su uticati na različitu sposobnost agregacije. Tako su se afiniteti kontrolnog BGKP1-20/pAZIL derivata za etil-acetat i hloroform razlikovali u odnosu na vrednosti dobijene sa sojem BGHO1 (rezultati nisu prikazani). Slična je situacija sa afinitetom za heksadekan.

Test *in vivo* pokazao je niži stepen adhezije BGHO1/pAZIL-aggL derivata za mukoza ileuma u odnosu na preostala dva derivata, dok je u kolonu takav trend uočen samo u odnosu na derivat sa kontrolnim pAZIL vektorom. Promena telesnih masa pacova tokom eksperimenta ukazuje na blago povećanje telesnih masa pacova tretiranih derivatima

BGHO1/pAZIL i BGHO1/pAZIL-mbpL u odnosu na kontrolne životinje hranjene mlekom. Takođe, isti smer promena važi i za pacove tretirane kontrolnim derivatom BGHO1/pAZIL u odnosu na pacove tretirane BGHO1/pAZIL-aggL derivatom. Takav rezultat nedvosmisleno ukazuje na AggL protein kao otežavajući faktor u vezivanju bakterija za GI mukozu. Nasuprot, u laktokokalnom domaćinu je AggL protein pomogao u vezivanju za mukozu kolona. S obzirom da derivat BGHO1 sa kontrolnim pAZIL vektorom poseduje znatno veću hidrofobnost (u proseku 50%) u odnosu na analogni derivat BGKP1-20 (manje od 5%), doprinos agregacionog faktora nespecifičnim interakcijama ovog derivata daleko je manji u odnosu na BGKP1-20/pAZIL derivat. U skladu sa tim, kontrolni BGHO1/pAZIL derivat je imao relativno visok stepen adhezije za hidrofobnu površinu kolona (prema testovima *in vivo* otprilike 40% u odnosu na manje od 2% u soju BGKP1-20).

S druge strane, peristaltika koja je prisutna duž GI trakta i više izražena u ileumu u odnosu na kolon mogla je da olakša uklanjanje derivata sa agregacionim faktorom iz GI trakta (*Van den Abbeele* i saradnici, 2011). Nepravilnosti u pokretljivosti creva povezuju se sa nekontrolisanim porastom broja crevnih mikroorganizama (*Dukowicz* i saradnici, 2007). U skladu sa tim, u *ex vivo* testu u kome nije simulirana peristaltika creva derivati BGHO1 nisu pokazali međusobne razlike u vezivanju za mukozu ileuma i kolona. Razvijeni su *in vitro* sistemi sa simulacijom peristaltičkih pokreta na izolovanom intestinalnom tkivu. Takav dinamičan sistem predstavlja fiziološki relevantniji pristup ispitivanju adhezije bakterija za crevnu mukozu (*Pozzoli* i *Poli*, 2012). Može se pretpostaviti da kod bakterijskih sojeva koji ekspimiraju faktor agregacije postoji ravnoteža između peristaltičkog uklanjanja i vezivanja za hidrofobne substrate, što zavisi od svojstava soja i hidrofobnosti vezujuće površine, iako se ne može isključiti uloga drugih specifičnih i nespecifičnih interakcija. Predložena petpostavka bi takođe mogla objasniti rezultat sa sojem BGKP1-20 koji je pokazao negativnu korelaciju između vezivanja za mukozu ileuma i ekspresije agregacionog faktora.

Interesantno u našem istraživanju je povećanje telesnih masa pacova u toku tretmana BGHO1 sojem u odnosu na kontrolne pacove hranjene mlekom. Vrsta *Lb. salivarius* često se susreće u nižim delovima GI trakta čoveka (*Walter*, 2008). Filogenetski bliska vrsta *Lb. murinus*, koja je ranije bila identifikovana kao fenotipska varijanta vrste *Lb. salivarius*, iako

predominantno zastupljena u gornjim delovima GI trakta, često je detektovana i u distalnim delovima GI trakta glodara (*Dewhirst* i saradnici, 1999; *Sarma-Rupavtarm* i saradnici, 2004). S obzirom na navedeno, moguće je da unos BGHO1 soja nije bio praćen imunskom reakcijom kakva je uočena u istraživanju sa sojem *Lb. fermentum* BGHI14 koji je „nepoznat“ za GI trakt pacova. U tom smislu otvara se mogućnost za bezbednu upotrebu soja BGHO1 kao probiotika.

BGHO1/pAZIL-aggL derivat pokazao je niže sposobnosti vezivanja za HT29-MTX ćelije i želudačni mucin u odnosu na kontrolni BGHO1/pAZIL derivat. Kao što je prethodno obrazloženo, intenzivna ispiranja nakon perioda inkubacije mogla bi olakšati uklanjanje bakterija koje eksprimiraju AggL protein. Agregacioni faktor je doprineo vezivanju za hidrofobne površine praznih bunarića ploče za ćelijsku kulturu što podržava spomenutu pretpostavku o postojanju balansa između sila ispiranja i vezivanju za visoko hidrofobne substrate.

Istraživanje *Jankovic* i saradnika (2003) ima važne implikacije vezane za ulogu agregacionog faktora u bakterijskim ćelijama. Autori su pokazali da agregacioni faktor nije obavezno povezan sa ćelijskom agregacijom i da povećana ili snižena ekspresija ovog faktora ne utiče na autoagregacione sposobnosti bakterija koje ga sintetišu. Međutim, viši nivo ekspresije faktora agregacije bio je povezan sa nepravilno savijenim oblikom ćelije nasuprot izduženom filamentoznom fenotipu ćelija koje sniženo eksprimiraju agregacioni faktor. Može se pretpostaviti da bi zbog specifičnog pozicioniranja u prostoru eventualni uvijeni oblik BGHO1/pAZIL-aggL derivata mogao biti podložniji delovanju fizičkih sila u odnosu na ostale derivate. Takav fenotip ne mora biti inferiorniji u vezivanju u statičnim uslovima, kao što je uočeno u *ex vivo* testu.

Sumarno, rezultati našeg istraživanja pokazali su negativnu korelaciju između ekspresije laktokokalnog agregacionog faktora, AggL, i adhezije bakterija za površine izložene dinamičnim peristaltičkim kontaktijama kao što je GI trakt, naročito tanko crevo. Navedeno bi moglo ukazivati na peristaltiku kao ključni antimikrobni mehanizam koji otežava adheziju mikroorganizama koji eksprimiraju agregacioni faktor, najverovatnije usled fizičkih karakteristika nastalih izmenjenim oblikom ćelije. Iako se inhibitorna aktivnost ne može pripisati agregacionom fenotipu, može se pretpostaviti da je isti

mehanizam prisutan i kod agregirajućih bakterija, jer bi formiranje ćelijskih agregata moglo dodatno pojačati mehaničko uklanjanje bakterija sa mukoznih površina. Međutim, agregacioni faktor bi mogao omogućiti formiranje agregata sa drugim bakterijama u GI traktu koje poseduju odgovarajuća površinska svojstva. Time bi, iako bez mogućnosti da utiču na imunski sistem domaćina, sojevi koji eksprimiraju agregacioni faktor mogli, putem koagregacije, olakšati uklanjanje patogena iz GI trakta.

S druge strane, naša studija je pokazala da MbpL, laktokokalni protein sa MucBP domenom, heterologo eksprimiran u laktobacilusnom soju BGHO1 ne doprinosi adheziji za GI mucine. S obzirom da je kod laktokokalnog domaćina BGKP1-20 isti protein doprineo vezivanju za mucine, može se zaključiti da je njegov efekat u vezivanju zanemarljiv u prisustvu drugih mukus-vezujućih proteina ili ostalih adhezivnih molekula koji su široko rasprostranjeni kod predstavnika laktobacila, uključujući i vrstu *Lb. salivarius* korišćenu u našem istraživanju.

6. ZAKLJUČCI

6. 1. Reakcija tkiva kolona pacova na peroralni unos soja *Lactobacillus fermentum* BGHI14

1. Peroralni unos soja *Lactobacillus fermentum* BGHI14 alohtonog za crevni trakt pacova doveo je do imunske reakcije praćene infiltracijom neutrofila i mononuklearnih ćelija u tkivu kolona pacova nekoliko dana nakon početka tretmana; imunska reakcija se povukla uprkos produžetku tretmana. Nivoi iRNK za citokine IL-1 β i TNF α bili su povećani nakon dužeg tretmana pacova sojem BGHI14, što ukazuje na imunostimulišuće delovanje soja BGHI14, bez narušavanja sastava mikroflore u sadržaju crevnog trakta pacova.

2. Indukcija kolitisa TNBS-om u momentu nakon imunske reakcije u tkivu kolona na BGHI14 uz nastavak tretmana bakterijama nije dovela do smanjenja oštećenja u kasnoj akutnoj fazi bolesti u odnosu na kontrolne pacove sa kolitisom. Profili promena telesnih masa pacova iz iste grupe značajno su se razlikovali od kontrolnih zdravih pacova i bili su slični profilima promena telesnih masa kontrolnih pacova sa kolitisom. Hronični tretman pacova sojem BGHI14 doveo je do povećanja nivoa iRNK za protein toplotnog stresa HSP70 kod pacova sa kolitisom što ukazuje na dodatne patološke mehanizme izazvane prisustvom bakterija u periodima pre i nakon indukcije kolitisa.

3. Profili promena telesnih masa pacova sa kolitisom indukovanim TNBS-om nakon imunske reakcije u tkivu kolona na BGHI14 ali bez nastavka tretmana bakterijama pokazali su manje izražene razlike u odnosu na zdrave kontrole od kontinuirano tretiranih i kontrolnih pacova sa kolitisom kao i značajno veći porast masa u odnosu na kontinuirano tretirane pacove. Oštećenje tkiva nije se razlikovalo u odnosu na kontrolne pacove sa kolitisom.

4. Tretman pacova sojem BGHI14 nakon indukcije kolitisa TNBS-om doveo je do manje izraženih razlika u promenama telesnih masa pacova u odnosu na zdrave kontrole u poređenju sa kontinuirano tretiranim i kontrolnim pacovima sa kolitisom. Nivoi iRNK za okcludin 1 (TJP1) nisu pokazali sniženje u odnosu na kontrolne pacove i dodatno, bili su

značajno povećani kod pacova sa terapijskim tretmanom u odnosu na kontinuirano tretirane i kontrolne pacove sa kolitisom. S druge strane, transkripcija gena za proinflamatorni IL1 β citokin u kasnoj akutnoj fazi kolitisa u ovoj grupi bila je značajno snižena u odnosu na kontinuirano tretirane pacove, što govori u prilog inflamatornom oštećenju barijere koje je najmanje izraženo nakon terapijskog tretmana sojem BGHI14.

5. Primena imunostimulišućih sojeva laktobacila predstavlja potencijalni rizik u slučaju imunokompromitovanog domaćina kao i slučaju narušavanja integriteta barijere kod zdravog domaćina. Terapijsko unošenje imunostimulišućih laktobacila neposredno nakon uočavanja prvih simptoma moglo bi predstavljati deo tretmana pacijenata sa sa genetičkim predispozicijama za nastanak Kronove bolesti.

6. 2. Uloga MbpL i AggL proteina u vezivanju bakterija za crevnu mukozu pacova

1. Laktokokalni agregacioni faktor (AggL) eksprimiran na površini ćelija soja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1-20 doveo je do povećanja hidrofobnosti površine bakterijskih ćelija i doprineo vezivanju soja BGKP1-20 za hidrofobnu mukoznu površinu kolona.

2. AggL eksprimiran na već hidrofobnoj površini bakterija soja *Lactobacillus salivarius* BGHO1 nije doprineo vezivanju bakterija za mukozu kolona, što pokazuje da su nespecifične interakcije glavni mehanizam kojim protein odgovoran za agregaciju pomaže vezivanju za crevnu mukozu. Šta više, uočeno je otežano vezivanje soja BGHO1 koji sintetiše agregacioni protein za mukozu kolona.

3. Vezivanje za manje hidrofobnu mukoznu površinu ileuma bilo je otežano i kod BGKP1-20 i kod BGHO1 soja u slučaju ekspresije agregacionog faktora. Proizilazi da bi izražena peristaltika mogla biti ključni antimikrobni mehanizam kojim bi se uklanjale bakterije koje sintetišu faktor agregacije. U tom smislu bi isti faktor mogao putem koagregacije doprineti efikasnijem uklanjanju patogenih mikroorganizama.

4. Laktokokalni protein sa mucin-vezujućim domenom (MbpL) eksprimiran na površini ćelija sojeva BGKP1-20 i BGHO1 nije doprineo vezivanju bakterijskih ćelija za

mukozne površine ileuma i kolona. Iako je MbpL protein doprineo vezivanju ćelija BGKP1-20 soja za želudačne mucine i mucine sekretovane od strane HT20-MTX ćelija, MbpL prisutan na površini ćelija soja BGHO1, koje poseduju niz drugih mukus-vezujućih proteina, nije doprineo vezivanju bakterija za iste supstrate. Proizilazi da je doprinos MbpL proteina u vezivanju za mukozne površine zanemarljiv i od značaja samo u odsustvu drugih proteina sa većim afinitetom vezivanja za mucinske glikoproteine.

7. LITERATURA

1) Abreu M. T. Toll-like receptor signaling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology* (2010) 10 (2): 131-144.

2) Ahmed S., Macfarlane G. T., Fite A., McBain A. J., Gilbert P., Macfarlane S. Mucosa-associated bacterial diversity in relation to human terminal ileum and colonic biopsy samples. *Applied and Environmental Microbiology* (2007) 73 (22): 7435-7442.

3) Asahara T., Takahashi M., Nomoto K., Takayama H., Onoue M., Morotomi M., Tanaka R., Yokokura T., Yamashita N. Assessment of safety of *Lactobacillus* strains based on resistance to host innate defense mechanisms. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* (2003) 10 (1): 169-173.

4) Bain C. C., Scott C. L., Uronen-Hansson H., Gudjonsson S., Jansson O., Grip O., Williams M., Malissen B., Agace W. W., Mowat A. M. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunology* (2013) 6 (3): 498-510.

5) Barbatis C. and Tsopanomichalou M. Heat shock proteins in inflammatory bowel disease. *Annals of Gastroenterology* (2009) 22 (4): 244-247.

6) Bekker L. G., Moreira A. L., Bergtold A., Freeman S., Ryffel B., Kaplan G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. *Infection and Immunity* (2000) 68 (12): 6954-6961.

7) Belkaid Y., Bouladoux N., Hand T. W. Effector and memory T cell responses to commensal bacteria. *Trends in Immunology* (2013) 34 (6): 299-306.

8) Bertazzoni-Minelli E., Benini A., Marzotto M., Sbarbati A., Ruzzenente O., Ferrario R., Hendriks H., Dellaglio F. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. *International Dairy Journal* (2004) 14 (8): 723-736.

9) Biswas A. and Kobayashi K. S. Regulation of intestinal microbiota by the NLR protein family. *International Immunology* (2013) 25 (4): 207-214.

10) Björkstén B., Sepp E., Julge K., Voor T., Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2001) 108 (4): 516-520.

11) Blum S. and Schiffrin E. J. Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: implications for probiotic bacteria? *Current Issues in Intestinal Microbiology* (2003) 4 (2): 53-60.

12) Boekhorst J., Helmer Q., Kleerebezem M., Siezen R. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology* (2006) 152 (19): 273-280.

13) Borriello S. P., Hammes W. P., Holzapfel W., Marteau P., Schrezenmeir J., Vaara M., Valtonen V. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clinical Infectious Diseases* (2003) 36 (6): 775-780.

14) Boyle R. J., Robins-Browne R. M., Tang M. L K. Probiotics use in clinical practice: what are the risks? *The American Journal of Clinical Nutrition* (2006) 83 (6): 1256-1264.

15) Branu A., Treede I., Gotthardt D., Tietje A., Zahn A., Ruhwald R., Schoenfeld U., Welsch T., Kienle P., Erben G., Lehmann W. D. Fuellekrug J., Stremmel W., Ehehalt R. Alterations of phospholipid concentration and species composition of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: a clue to pathogenesis. *Inflammatory Bowel Diseases* (2009) 15: 1705-1720.

16) Brooijmans R. J., Poolman B., Schuurman-Wolters G. K., de Vos W. M., Hugenholtz J. Generation of a membrane potential by *Lactococcus lactis* through aerobic electron transport. *Journal of Bacteriology* (2007) 189 (14): 5203-5209.

17) Bruewer M., Luegering A., Kucharzik T., Parkos C. A., Madara J. L., Hopkins A. M., Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *The Journal of Immunology* (2003) 171 (11): 6164-6172.

18) Caallero-Franco C., Keller K., De Simone C., Chadee K. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* (2007) 292 (1): G315-322.

19) Candela M., Guidotti M., Fabbri A., Brigidi P., Franceschi C., Fiorentini C. Human intestinal microbiota: cross-talk with the host and its potential role in colorectal cancer. *Critical Reviews in Microbiology* (2011) 37 (1): 1-14.

20) Cannon J. P., Lee T. A., Bolanos J. T., Danziger L. H. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infective Diseases* (2005) 24 (1): 31-40.

21) Carlier J. P., Bedora-Faure M, K'ouas G., Alauzet C., Mory F. Proposal to unify *Clostridium orbiscindens* Winter et al. 1991 and *Eubacterium plautii* (Séguin 1928) Hofstad and Aasjord 1982, with description of *Flavonifractor plautii* gen. nov., comb. nov., and reassignment of *Bacteroides capillosus* to *Pseudoflavonifractor capillosus* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2010) 60 (Pt 3): 585-590.

22) Castillo M., Martín-Orúe S. M., Manzanilla E. G., Badiola I., Martín M., Gasa J. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary Microbiology* (2006) 114 (1-2): 165-170.

23) Cheeseman J. F., Winnebeck E. C., Millar C. D., Kirkland L. S., Sleigh J., Goodwin M., Pawley M. D. M., Bloch G., Lehmann K., Menzel R., Warman G. R. General anesthesia alters time perception by phase shifting the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2012) 109 (18): 7061-7066 (Supporting information).

24) Choa A., Takahashi H., Kimura B., Kuda T. Comparison of PCR-DGGE and PCR-SSCP analysis for microflora of kaburazushi and daikonzushi, traditional fermented foods made from fish and vegetables. *Journal of Food Technology* (2011) 9 (1): 1-8.

25) Chomczynski P. and Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* (2006) 1 (2): 581-585.

26) Clark A. Post-transcriptional regulation of pro-inflammatory gene expression. *Arthritis Research & Therapy* (2000) 2: 172-174.

27) Cobrin G. M. and Abreu M. T. Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease. *Immunological Reviews* (2005) 206: 277-295.

28) Corridoni D., Pastorelli L., Mattioli B., Locovei S., Ishikawa D., Arseneau K., Chieppa M., Cominelli F., Pizzaro T. T. Probiotic bacteria regulate intestinal epithelial permeability in experimental ileitis by a TNF-dependent mechanism. *PLoS One* (2012) 7 (7): 1.

29) Cox A. J., Pyne D. B., Saunders P. U., Fricker P. A. Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. *British Journal of Sports Medicine* (2010) 44 (4): 222-226.

30) Cua D. J., and Tato C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews Immunology* (2010) 10: 479-489.

31) De Arellano A .R., Sánchez M., Vera R., Jara S., González M., Castro E. Effect of orally-administered *Lactobacillus plantarum* LPLM-01 strain in an immunosuppressed mouse model of urinary tract infection. *Beneficial Microbes* (2012) 3 (1): 51-59.

32) De los Reyes-Gavilán C. G., Limsowtin G. K. Y., Tailliez P., Séchaud L., Accolas J. P. A *Lactobacillus helveticus*-specific DNA probe detects restriction fragment length polymorphisms in this species. *Applied and Environmental Microbiology* (1992) 58 (10): 3429-3432.

33) Dellaglio F. and Felis G. E. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. In: *Probiotics and Prebiotics: Scientific Aspect*. Ed. Tannock G. W. Caister Academic Press, Norfolk, UK (2005).

34) Dewhirst F. E., Chien C. C., Paster B. J., Ericson R. L., Orcutt R. P., Schauer D. B., Fox J. G. Phylogeny of the defined murine microbiota: altered Schaedler flora. *Applied and Environmental Microbiology* (1999) 65 (8): 3287-3292.

35) Dharmawan J., Surono I. S., Kun L. Y. Adhesion properties of indigenous dadih lactic acid bacteria on human intestinal mucosal surface. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* (2006) 19 (5): 751-755.

36) Dietrich D. and Kriger H. O. *Histological analysis of endocrine disruptive effects in small laboratory fish*. John Wiley Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, NJ (2009).

37) Dothel G., Vasina V., Barbara G., de Ponti F. Animal models of chemically induced intestinal inflammation: predictivity and ethical issues. *Pharmacology & Therapeutics* (2013) 139 (1): 71-86.

38) Douglas L. C. and Sanders M. E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *Journal of the American Dietetic Association* (2008) 108 (3): 510-521.

39) Du Y., He Y. X., Zhang Z. Y., Yang Y. H., Shi W. W., Frolet C., Di Guilmi A. M., Vernet T., Zhou C. Z., Chen Y. Crystal structure of the mucin-binding domain of Spr1345 from *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Structural Biology* (2011) 174 (1): 252-257.

40) Dukowicz A. C., Lacy B. E., Levine G. M. Small intestinal bacterial overgrowth: a comprehensive review. *Journal of Gastroenterology & Hepatology* (2007) 3 (2): 112-122.

41) Eckmann L., Nebelsiek T., Fingerle A. A., Dann S. M., Mages J., Lang R., Robine S., Kagnoff M. F., Schmid R. M., Karin M., Arkan M. C., Greten F. R. Opposing functions of IKK β during acute and chronic intestinal inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2008) 105 (39): 15058-15063.

42) Elsner L., Flügge P. F., Lozano J., Muppala V., Eiz-Vesper B., Demiroglu S. Y., Malzahn D., Herrmann T., Brunner E., Bickeböller H., Multhoff G., Walter L., Dressel R. The endogenous danger signals HSP70 and MICA cooperate in the activation of cytotoxic effector functions of NK cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (2010) 14 (4): 992-1002.

43) Ettoreiki C., Gadonna-Wiehem P., Mangin I., Coëffier M., Delayre-Orthez C., Anton P. M. Juvenile ferric iron prevents microbiota dysbiosis and colitis in adult rodents. *World Journal of Gastroenterology* (2012) 18 (21): 2619-2629.

44) Farnworth E. R. The evidence to support health claims for probiotics. *The Journal of Nutrition* (2008) 138 (6): 1250S-1254S.

45) Farooq S. M., Stillie R., Svensson M., Svanborg C., Strieter R. M., Stadnyk A. W. Therapeutic effect of blocking CXCR2 on neutrophil recruitment and dextran sodium sulfate-induced colitis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2009) 329 (1): 123-129.

46) Fazeli M. R., Hajimohammadali M., Moshkani A., Samadi N., Jamalifar H., Khoshayand M. R., Vaghari E., Pouragahi S. Aflatoxin B1 binding capacity of autochthonous strains of lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* (2009) 72 (1): 189-192.

47) Feghali C. A. and Wright T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience* (1997) 2: d12-26.

48) Fel Re B., Sgorbati B., Miglioli M., Palenzona D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* (2000) 31 (6): 438-442.

49) Forsythe S. J. *The microbiology of safe food*. 2nd edition. pp. 95. Black Willey & Sons Ltd, West Sussex, UK (2010).

50) Franchi L., Kamada N., Nakamura Y., Burberry A., Kuffa P., Shaw M. H., Kim Y. G., Núñez G. NLRC4-driven production of IL-1 β discriminates between pathogenic and commensal bacteria and promotes host intestinal defense. *Nature Immunology* (2012) 13 (5): 449-456.

51) Galdeano C. M., de Moreno de LeBlanc a., Vinderola G., Bonet M. E. B., Perdigón G. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology* (2007) 14 (5): 485-492.

52) Garcia Y. J., Rodríguez-Malayer A. J., Peñaloza N. Lipid peroxidation measurement by thiobarbituric acid assay in rat cerebellar slices. *Journal of Neuroscience Methods* (2005) 144 (1): 127-135.

53) Geier M. S., Butler R. N., Giffard P. M., Howarth G. S. *Lactobacillus fermentum* BR11, a potential new probiotic, alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS) in rats. *International Journal of Food Microbiology* (2007) 114 (3): 267-274.

54) Gill H. S. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* (2003) 17 (5): 755-773.

55) Goh Y. J. and Klaenhammer T. R. Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology* (2010) 76 (15): 5005-5012.

56) González-Rodríguez I., Sánchez B., Ruiz L., Turrón F., Venturi M., Ruas-Madeiro P., Gueimonde M., Margolles A. Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Applied and Environmental Microbiology* (2012) 78 (11): 3992-3998.

57) Gourbeyre P., Denery S., Bodinier M. Probiotics, prebiotics and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leucocyte Biology* (2011) 89 (5): 685-695.

58) Guarner F. and Malagelada J. R: Role of bacteria in experimental colitis. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* (2003) 17 (5): 793-804.

59) Guzman J., Yu J. G., Suntres Z., Bozarov A., Cooke H., Javed N., Auer H., Palatini J., Hassanain H. H., Cardounel A. J., Javed A., Grants I., Wunderlich J. E., Christofi F. L. ADOA3R as a therapeutic target in experimental colitis: proof by validated high-density oligonucleotide microarray analysis. *Inflammatory Bowel Diseases* (2006) 12 (8): 766-789.

60) Haier J. and Nicolson G. L. Tumor cell adhesion under hydrodynamic conditions of fluid flow. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* (2001) 109 (4): 241-262.

61) Hakansson A. and Molin G. Gut microbiota and inflammation. *Nutrients* (2011) 3 (6): 637-682.

62) Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* (1983) 166 (4): 557-580.

63) Harrison O. J. and Maloy K. J. Innate immune activation in intestinal homeostasis. *Journal of Innate Immunity* (2011) 3 (6): 585-593.

64) Harzallah D. and Belhadj H. Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics, selection criteria and role in immunomodulation of human GI mucosal barrier. In: *Lactic acid bacteria - R & D for food, health and livestock purposes*. Edited by Kongo M. InTech, Rijeka, Croatia (2013).

65) Hayashi H., Takahashi R., Nishi T., Sakamoto M., Benno Y. Molecular analysis of jejuna, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene

libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Medical Microbiology* (2005) 54 (Pt 11): 1093-1101.

66) Hayee B., Rahman F. Z., Sewell G., Smith A. M., Segal A. W. Crohn's disease as an immunodeficiency. *Expert Review of Clinical Immunology* (2010) 6 (4): 585-596.

67) Heilig H. G. H. J., Zoetendal E. G., Vaughan E. E., Marteau P., Akkermans A. D. L., de Vos W. M. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology* (2002) 68 (1): 114-123.

68) Hentges D. J. Does diet influence human fecal microflora composition? *Nutrition Reviews* (1980) 38 (10): 329-336.

69) Hoffmann K. M., Deutschmann A., Weitzer C., Joainig M., Zehner E., Högenauer C., Hauer A. C. Antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by cytotoxin-producing *Klebsiella oxytoca*. *Pediatrics* (2010) 125 (4): e960-963.

70) Hoffmann M., Rath E., Hölzlwimmer G., Quintanilla-Martinez L., Loach D., Tannock G., Haller D. *Lactobacillus reuteri* 100-23 transiently activates intestinal epithelial cells of mice that have a complex microbiota during early stages of colonization. *Journal of Nutrition* (2008) 138 (9): 1684-1691.

71) Holmen-Larsson J. M., Thomsson K. a., Rodríguez-Piñeiro A. M., Kralsson H., Hansson G. C. Gastrointestinal Muc5ac and Muc2 mucin O-glycan pattern reveal a region-specific distribution - 3. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* (2013)

72) Hooper L. V. and Macpherson A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology* (2010) 10 (3): 159-169.

73) Hooper L. V. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nature Reviews Microbiology* (2009) 7: 367-374.

74) Hu S., Wang Y., Lichtnstein L., Tao Y., Musch M.W., Jabri B., Antonopoulos D., Calud E. C., Chang E. B. Regional differences in colonic mucosa-associated microbiota determine the physiological expression of host heat shock proteins. *The American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* (2010) 299 (6): G1266-1275.

75) Hu S., Zhu X., Triggs J. R., Tao Y., Wang Y., Lichtenstein L., Bissonnette M., Musch M. W., Chang E. B. Inflammation-induced, 3'UTR-dependent translational inhibition of Hsp70 mRNA impairs intestinal homeostasis. *The American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* (2009) 296 (5): G1003-1011.

76) Ishigame H., Kakuta S., Nagai T., Kadoki M., Nambu A., Komiyama Y., Fujikado N., Tanahashi Y., Akitsu A., Kotaki H., Nakae S., Sasakawa C., Iwakura Y. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. *Immunity* (2009) 30 (1): 108-119.

77) Isolauri E., Sütas Y., Kankanpää P., Heikki A., Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition* (2001) 73 (suppl): 444S-450S.

78) Jacquet T., Cailliez-Grimal C., Borges F., Gaiani C., Francius G., Duval J. F., Waldvogel Y., Revol-Junelles A. M. Surface properties of bacteria sensitive and resistant to the class IIa carnobacteriocin Cbn BM1. *Journal of Applied Microbiology* (2012) 112 (2): 372-382.

79) Jankovic I., Ventura M., Meylan V., Rouvet M., Elli M., Zink R. Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *Journal of Bacteriology* (2003) 185 (11): 3288-3296.

80) Jeong H., Yi H., Sekiguchi Y., Muramatsu M., Kamagata Y., Chun J. *Clostridium jejuense* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (2004) 54 (Pt 5): 1465-1468.

81) Jiménez E., Langa S., Martín V., Arroyo R., Martín R., Fernández L., Rodríguez J. M. Complete genome sequence of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk. *Journal of Bacteriology* (2010) 192 (18): 4800.

82) Jiménez E., Martín R., Maldonado A., Martín V., De Segura A. G., Fernández L., Rodríguez J. M. Complete genome sequence of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a probiotic strain isolated from human milk and infant feces. *Journal of Bacteriology* (2010) 192 (19): 5266-5267.

83) Johansson M. E. V., Larsson J. M. H., Hansson G. C. The two mucus layers of colon are organized by the Muc2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-

microbial interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2011) 108 (Suppl 1): 4659-4665.

84) John J. J. S., Schroen D. J., Cheung H. T. An adhesion assay using minimal shear force to remove nonadherent cells. Journal of Immunological Methods (1994) 170 (2): 159-166.

85) Jovicic B., Begovic J., Lozo J., Topisirovic L., Kojic M. Dynamic of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. Archives of Biological Science (2009) 61: 159-165.

86) Kaewnopparat S., Dangmanee N., Kaewnopparat N., Srichana T., Chulasiri M., Settharaksa S. *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. Anaerobe (2013) 22: 6-13.

87) Kamada N., Seo S. U., Chen G. Y., Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. Nature Reviews Immunology (2013) 13: 321-335.

88) Kang T. S., Korber D. R., Tanaka T. Influence of oxygen on NADH recycling and oxidative stress resistance systems in *Lactobacillus panis* PM1. AMB Express (2013) 3: 10.

89) Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopolou K., Skarmoutsou N., Fakiri E. M. Health benefits of probiotics: a review. ISRN Nutrition (2013) doi: 10.5402/2013/481651

90) Khor B., Gardet A., Xavier R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel diseases. Nature (2011) 474: 307-317.

91) Kiener T. K., Sleptsova-Friedrich I., Hunziker W. Identification, tissue distribution and developmental expression of *tjp1/zo-1*, *tjp2/zo-2* and *tjp3/zo-3* in the zebrafish, *Danio rerio*. Gene Expression PAtterns (2007) 7 (7): 767-776.

92) Kim Y. G., Ohta T., Takahashi T., Kushiro A., Nomoto K., Yokokura T., Okada N., Danbara H. Probiotic *Lactobacillus casei* activates innate immunity via NF- κ B and p38 MAP kinase signaling pathway. Microbes and Infection (2006) 8: 994-1005.

93) Kimoto H., Kurisaki J., Tsuji N. M., Ohmomo S., Okamoto T. Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. Letters in Applied Microbiology (1999) 29 (5): 313-316.

94) Kiyoshi Y., Noriko N., Yoko I., Ariyoshi I., Yasuyuki A. Histoimmunological evaluation for the efficacy of entero nutrient containing n-3 fatty acids in TNBS rat colitis model. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* (2006) 39 (2): 88-97.

95) Kojic M. i Venture V. Regulation of rpoS gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator. *Journal of Bacteriology* (2001) 183 (12): 3712-3720.

96) Kojic M., Jovic B., Strahinic I., Begovic J., Lozo J., Veljovic K., Topisirovic L. Cloning and expression of a novel lactococcal aggregation factor from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGKP1. *BMC Microbiology* (2011) 11: 265.

97) Kosin B. and Rakshit S. K. Microbial and processing criteria for production of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology* (2006) 44 (3): 371-379.

98) Kucharzik T., Walsh S. V., Chen J., Parkos C. A., Nusrat A. Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *The American Journal of Pathology* (2001) 159 (6): 2001-2009.

99) Kullisaar T., Songisepp E., Aunapuu M., Kilk K., Arend A., Mikelsaar M., Rehema A., Zilmer M. Complete glutathione system in probiotic *Lactobacillus fermentum* ME-3. *Priklafnaia biokhimiia i mikrobiologiiia* (2010) 46 (5): 527-531.

100) Kunisawa J., Takahashi I., Kiyono H. Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviours in the small and large intestine. *Immunological Reviews* (2007) 215: 136-153.

101) Laffont S., Siddiqui K. R., Powrie F. Intestinal inflammation abrogates the tolerogenic properties of MLN CD103+ dendritic cells. *European Journal of Immunology* (2010) 40 (7): 1877-1883.

102) Land M. H., Rouster-Stevens K., Woods C. R., Cannon M. L., Cnota J., Shetty A. K. *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics* (2005) 115 (1): 178-181.

103) Langhendries J. P. Early bacterial colonization of the intestine: why it matters. *Italian Journal of Pediatrics* (2005) 31: 360-369.

104) Lechardeur D., Cesselin B., Fernandez A., Lamberet G., Garrigues C., Pedersen M., Gaudu P., Gruss A. Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* (2011) 22 (2): 143-149.

105) Lee P. Y., Costumbrado J., Hsu C. Y., Kim Y. H. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualised Experiments* (2012) (62): e3923.

106) Lin W. H., Yu B., Jang S. H., Tsen H. Y. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe* (2007) 13 (3-4): 107-113.

107) Livak K. J. and Schnittgen T. D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* (2001) 25 (4): 402-408.

108) Llopis M., Antolín M., Guarner F., Salas A., Malagelada J. R. Mucosal colonisation with *Lactobacillus casei* mitigates barrier injury induced by exposure to trinitrobenzene sulphonic acid. *Gut* (2005) 54 (7): 955-959.

109) Loir Y. L., Azevedo V., Oliveira S. C., Freitas D. A., Miyoshi A., Bermúdez-Humarán L. G., Nouaille S., Ribeiro L. A., Leclercq S., Gabriel J. E., Guimares V. D., Oliveira M. N., Charlier C., Gautier M., Langella P. Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microbial Cell Factories* (2005) 4: 2.

110) Lugea A., Salas A., Casalot J., Guarner F., Malagelada J. R. Surface hydrophobicity of the rat colonic mucosa is a defensive barrier against macromolecules and toxins. *Gut* (2000) 46: 515-521.

111) Macías-Rodríguez M. E., Zagorec M., Ascenci F., Vázquez-Juárez R., Rojas M. *Lactobacillus fermentum* BCS87 expresses mucus- and mucin-binding proteins in the cell surface. *Journal of Applied Microbiology* (2009) 107 (6): 1866-1874.

112) MacKenzie D. A., Jeffers F., Parker M. L., Vibet-Vallet A., Bongaerts R. J., Roos S., Walter J., Juge N. Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology* (2010) 156 (11): 3368-3378.

113) Macpherson A. J. IgA adaptation to the presence of commensal bacteria in the intestine. *Current Topics in Microbiology and Immunology* (2006) 308: 117-136.

114) Maldonado J., Cañabate F., Sempere L., Vela F., Sánchez A. R., Narbona E., López-Huertas E., Geerlings A., Valero A. D., Olivares M., Lara-Villoslada F. Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (2012) 54 (1): 55-61.

115) Malik S., Petrova M. I., Claes I. J. J., Verhoeven T. L. A., Busschaert P., Vaneechoutte M., Lievens B., Lambrichts I., Siezen R. J., Balzarini J., Vanderleyden J., Lebeer S. The high auto-aggregative and adhesive phenotype of the vaginal *Lactobacillus plantarum* strain CMPG5300 is sortase-dependent. *Applied and Environmental Microbiology* (2013) doi: 10.1128/AEM.00926-13.

116) Malvin N. P., Seno H., Stappenbeck T. S. Colonic epithelial response to injury requires Myd88 signaling in myeloid cells. *Mucosal Immunology* (2012) 5 (2): 194-206.

117) Mañé J., Lorén V., Pedrosa E., Ojanguren I., Xaus J., Cabré E., Domènech E., Gassull M. A. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 prevents and reverts intestinal damage on TNBS-induced colitis in mice. *Inflammatory Bowel Diseases* (2009) 15 (8): 1155-1163.

118) Marí M., Morales A., Colell A., García-Ruiz C., Fernández-Checa J. C. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & Redox Signaling* (2009) 11 (11): 2685-2700.

119) Marjit B. *General Anatomy, Genetics, Histology and Embriology*, 5th ed. Bimar Kumal Dhur of Academic Publishers, Kolkata (2009).

120) Maynard C. L., Elson C. O., Hatton R. D., Weaver C. T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* (2012) 489: 231-241.

121) McCluskey J. D., Sava D., Harbison S. C., Muro.Cacho C. a., Giffe J .T., Ping X., Harbison R. D. Hepatoprotective effects of select water-soluble PARP inhibitors in a carbon tetrachloride model. *International Journal of Critical Illness and Injury Science* (2011) 1 (2): 97-103.

122) McGuckin M. A., Eri R., Simms L. A., Florin T. H., Radford-Amith G. Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* (2009) 15 (1): 100-113.

123) Medina C. and Radomski M. W. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2006) 318 (3): 933-938.

124) Meierregger A., Mayrhuber E., Lettner H. P. Probiotics and health claims: the perspective of the feed industry. In: *Probiotics and health claims*. Edited by Kneifel W. and Salminen S. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, UK (2011).

125) Mikelsaar M. and Zilmer M. *Lactobacillus fermentum* ME-3 - an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease* (2009) 21 (1): 1-27.

126) Miyoshu A., Poquet I., Azevedo V., Commissaire J., Bermudez-Humaran L., Domakova E., Le Loir Y., Oliveira S. C., Gruss A., Langella P. Controlled production of stable heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* (2002) 68 (6): 3141-3146.

127) Molodecky N. A. and Kaplan G. G. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology & Hepatology* (2010) 6 (5): 339-346.

128) Morgan X. C., Tickle T. L., Sokol H., Gevers D., Devaney K. L., Reyes J. a., Shah S. A., LeLeiko N., Snapper S. B., Bousvaros A., Korzenik J., Sands B. E., Xavier R. J., Huttenhower C. Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biology* (2012) 13 (9): R79.

129) Mousavi S. A., Fønhus M. S., Berg T. Up-regulation of uPARAP/Endo180 during culture activation of rat hepatic stellate cells and its presence in hepatic stellate cell lines from different species. *BMC Cell Biology* (2009) 10: 39.

130) Muñoz-Provencio D., Llopis M., Antolin M., Torres I., Guarner F., Pérez-Martinez G., Monedero V. Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Archives of Microbiology* (2009) 191 (2): 153-161.

131) Nemeth E., Fajdiga S., Malago J., Koninkx J., Tooten P., van Dijk J. Inhibition of *Salmonella*-induced IL-8 synthesis and expression of Hsp70 in enterocyte-like Caco-2 cells after exposure to non-starter lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology* (2006) 112 (3): 266-274.

132) Neville B. A. and O'Toole P. W. Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* and closely related *Lactobacillus* species. *Future Microbiology* (2010) 5 (5): 759-774.

133) Newberry R. D. and Lorenz R. G. Organizing a mucosal defense. *Immunological Reviews* (2005) 206: 6-21.

134) Niki E. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *BioFactors* (2008) 34 (2): 171-180.

135) Novinscak A., Surete C., Allain C., Filion M. Application of molecular technologies to monitor the microbial content of biosolids and composted biosolids. *Water Science and Technology* (2008) 57 (4): 471-477.

136) Ocaña V. S., Bru E., de Ruiz Holgado A. A. P., Nader-Macias M. E. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *The Journal of General and Applied Microbiology* (1999) 45 (5): 203-212.

137) Omar J. M., Chan Y. M., Jones M. L., Prakash S., Jones P. J. H: *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus amylovorus* as probiotics alter body adiposity and gut microflora in healthy persons. *Journal of Functional Foods* (2013) 5 (1): 116-123.

138) Onizawa M., Nagaishi T., Kanai T., Nagano K., Oshima S., Nemoto Y., Yoshioka A., Totsuka T., Okamoto R., Nakamura T., Sakamoto N., Tsuchiya K., Aoki K., Ohya K., Yagita H., Watanabe M. Signaling pathway via TNF-alpha/NF-kappaB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* (2009) 296 (4): G850-859.

139) Pai R., Soreghan B., Szabo I. L., Pavelka M., Baatar D., Tarnawski A. S. Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nature Medicine* (2002) 8 (3): 289-293.

140) Park J. H., Lee Y., Moon E., Seok S. H., Cho S. A., Baek M. W., Lee H., Kim D. J., Park J. H. Immunoenhancing effects of a new probiotic strain, *Lactobacillus fermentum* PL9005. *Journal of Food Protection* (2005) 68 (3): 571-576.

141) Park J. W. and Crowley D. E. Nested PCR bias: a case study of *Pseudomonas* spp. in soil microcosms. *Journal of Environmental Monitoring* (2010) 12 (4): 985-988.

142) Paszti-Gere E., Szeker K., Csibrik-Nemeth E., Csizinszky R., Marosi A., Palocz O., Farkas O., Galfi P. Metabolites of *Lactobacillus plantarum* 2142 prevent oxidative stress-induced overexpression of proinflammatory cytokines in IPEC-J2 cell line. *Inflammation* (2012) 35 (4): 1487-1499.

143) Peacock T. J. Biological role of manganese-catalase in selected lactobacilli. 2008. ProQuest LLC, Ann Arbor, Michigan, USA.

144) Peinnequin A., Mouret C., Birot O., Alonso A., Mathieu J., Clarençon D., Agay D., Chancerelle Y., Multon E. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction SYBR green. *BMC Immunology* (2004) 5:3.

145) Peran L., Camuesco D., Comalada M., Bailon E., Henriksson A., Xaus J., Zarzuelo A., Galvez J. A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. *Journal of Applied Microbiology* (2007) 103 (4): 836-844.

146) Peran L., Camuesco D., Comalada M., Nieto A., Concha A., Adrio J. L., Olivares M., Xaus J., Zarzuelo A., Galvez J. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *International Journal of Colorectal Disease* (2006) 21 (8): 737-746.

147) Pophaly S. D., Singh R., Pophaly S. D., Kaushik J. K., Tomar S. K. Current status and emerging role of glutathione in food grade lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories* (2012) 11: 114.

148) Pozzoli C. and Poli E. Assesment of intestinal peristalsis *in vitro*. *Current Protocols in Toxicology* (2012) doi. 10.1002/0471140856.tx2111s54.

149) Prantera C. Probiotics for Crohn's disease: what have we learned? *Gut* (2006) 55 (6): 757-759.

150) Prantera C., Scribano M. L., Andreoli A., Luyi C. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn-s disease - a randomized controlled trial with *Lactobacillus* GG. *Gut* (2002) 51 (3): 405-409.

151) Pull S. L., Doherty J. M., Mills J. C., Gordon J. I., Stappenbeck T. S: Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2005) 102 (1): 99-104.

152) Punta M., Coggill P. C., Eberhardt R. Y., Mistry J., Tate J., Boursnell C., Pang N., Forslund K., Ceric G., Clements J., Heger A., Holm L., Sonnhammer E. L. L., Eddy S. R., Bateman A., Finn R. D. The Pfam protein families database. *Nucleic Acid Research* (2012) Database Issue 40: D290-D30.

153) Radojkovic D. and Kusic J. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clinical Chemistry* (2008) 46 (6): 883-884.

154) Rafter J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *British Journal of Nutrition* (2002) 88 (Suppl. 1): S89-S94.

155) Rakoff-Nahoum S., Paglino J., Eslami-Varzaneh F., Edberg S., Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* (2004) 118 (2): 229-241.

156) Reniero R., Cocconcelli P., Bottazzi V., Morelli L. High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *Journal of General Microbiology* (1992) 138: 763-768.

157) Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends in Immunology* (2011) 32 (6): 256-264.

158) Roberts RJ, Smail DA, Munro ES. Laboratory Methods p.439-481. *In*: Roberts RJ (ed), *Fish pathology*. Wiley-Blackwell, New Jersey, NJ (2012).

159) Rochat T., Bermúdez-Humarán L., Gratadoux J. J., Fourage C., Hoebler C., Corthier G., Langella P. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microbial Cell Factories* (2007) 6: 22.

160) Rojas M., Ascencio F., Conway P. L. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Applied and Environmental Microbiology* (2002) 68 (5): 2330-2336.

161) Sahoo M., Ceballos-Olvera I., del Barrio L., Re F. Role of the inflammasome, IL-1 β , and IL-18 in bacterial infections. *ScientificWorldJournal* (2011) 11: 2037-2050.

162) Sambrook J. and Russell D. Preparation of plasmid DNA by alkaline lysis with SDS: miniprep. *Cold Spring Harbor Protocols* (2006) doi: 10.1101/pdb.prot4084.

163) Sánchez B., Fernández-García M., Margolles A., De los Reyes-Gavilán C. G., Ruas-Madiedo P. Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain. *International Dairy Journal* (2010) 20 (11): 800-805.

164) Sanders M. E., Guarner F., Guerrant R., Holt P. R., Quigley E- M., Sartor R. b., Sherman P. M., Mayer E. A. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut* (2013) 62 (5): 787-796.

165) Sarma-Rupavtarm R. B., Ge Z., Schauer D. B., Fox J. G., Polz M. F. Spatial distribution and stability of the eight microbial species of the altered Schaedler flora in the mouse gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* (2004) 70 (59): 2791-2800.

166) Sartor R. B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* (2006) 3 (7): 390-407.

167) Schepens M. A., Vink C., Schonewille A. J. Roelofs H. M., Brummer R. J., van der Meer R., Bovee-Oudenhoven I. M. Supplemental antioxidants do not ameliorate colitis development in HLA-B27 transgenic rats despite extremely low glutathione levels in colonic mucosa. *Inflammatory Bowel Diseases* (2011) 17 (10): 2065-2075.

168) Schlee M., Harder J., Köten B., Stange E. F., Wehkamp J., Fellermann K. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clinical and Experimental Immunology* (2008) 151 (3): 528-535.

169) Schultz M. J. and Haas L. E. Antibiotics or probiotics as preventive measure against ventilator-associated pneumonia: a literature review. *Critical Care* (2011) 15 (1): R18.

170) Senf S. M., Howard T. M., Ahn B., Ferreira L. F., Judge A. R. Loss of the inducible Hsp70 delays the inflammatory response to skeletal muscle injury and severely impairs muscle regeneration. *PLoS One* (2013) 8 (4): e62687.

171) Sengupta R., Altermann E., Anderson R. C., McNabb W. C., Moughan P. J., Roy N. C. The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators of Inflammation* (2013) doi: 10.1155/2013/237921.

172) Serrano L. M., Molenaar D., Wels M., Teusing B., Bron P. A., de Vos W. M., Smid E. J. Thioredoxin reductase is a key factor in the oxidative stress response of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Microbial Cell Factories* (2007) 6: 29.

173) Sethman C. Attachment of *Streptococcus pyogenes* to host epithelial cells. Thesis (Ph. D.), Miami University - the Graduate School (2003).

174) Shacklett B. L., Cox C. A., Sandberg J. K., Stollman N. H., Jacobson M. A., Nixon D. F. Trafficking of human immunodeficiency virus type 1-specific CD8⁺ T cells to gut-associated lymphoid tissue during chronic infection. *Journal of Virology* (2003) 77 (10): 5621-5631.

175) Shen J., Ran H. Z., Yin M. H., Zhou T. X., Xiao D. S. Meta-analysis: the effect and adverse events of Lactobacilli versus placebo in maintenance therapy for Crohn disease. *International Medicine Journal* (2009) 39 (2): 103-109.

176) Sokol H., Seksik P., Furet J. P., Firmesse O., Nion-Larmurier I., Beaugerie L., Cosnes J., Cothier G., Marteau P., Doré J. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases* (2009) 15 (8): 1183-1189.

177) Sommer F. and Bäckhed F. The gut microbiota - masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology* (2013) 11 (4): 227-238.

178) Sriraman K. and Jayaraman G. HtrA is essential for efficient secretion of recombinant proteins by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* (2008) 74 (23): 7442-7446.

179) Stephanou A. and Letchman D. S. Transcriptional modulation of heat-shock protein gene expression. *Biochemistry Research International* (2011) 2011: 238601.

180) Strahinic I., Busarcevic M., Pavlica D., Milasin J., Golic N., Topisirovic L. Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral Microbiology and Immunology* (2007) 22 (2): 111-117.

181) Sun F. F., Lai P. S., Yue G., Yin K., Nagele R. g., Tong D. M., Krzesicki R. F., Chin J. E., Wong P. Y. K. Pattern of cytokine and adhesion molecule mRNA in haptent-induced relapsing colon inflammation in the rat. *Inflammation* (2001) 25 (1): 33-45.

182) Tao Y., Drabik K. A., Waypa T. S., Musch M. W., Alverdy J. C., Schneewind O., Chang E. B., Petrof E. O. Soluble factors from *Lactobacillus* GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *The American Journal of Physiology, Cell Physiology* (2006) 290 (4): C1018-1030.

183) Teuber M. Fermented milk products. In: *Microbiological Safety and Quality of Food, Volume I*. Editors: Lund B. M., Baird-Parker T. C., Gould G. W. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland, USA (2000).

184) Tilleux S., Berger J., Hermans E. Induction of astrogliosis by activated microglia is associated with a down-regulation of metabotropic glutamate receptor 5. *Journal of Neuroimmunology* (2007) 189 (1-2): 23-30.

185) Tuo Y., Yu H., Yi L., Wu Z., Guo B., Chen W. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science* (2013) 96 (7): 4252-4257.

186) Ueda Y., Kayama H., Jeon S. G., Kusu T., Isaka Y., Rakugi H., Yamamoto M., Takeda K. Commensal microbiota induce LPS hyporesponsiveness in colonic macrophages via the production of IL-10. *International Immunology* (2010) 22 (12): 953-962.

187) Vabulas R. M., Ahmad-Nejad P., Ghose S., Kirschning C. J., Issels R. D., Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *The Journal of Biological Chemistry* (2002) 277 (17): 15107-15112.

188) Van den Abbeele P., Van de Wiele T., Verstraete W., Possemiers S. The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept. *FEMS Microbiology Reviews* (2011) 35 (4): 681-704.

189) Van Pijkeren J. P., Canchaya C., Ryan K. R., Li Y., Claesson M. J., Sheil B., Steidler L., O'Mahony L., Fitzgerald G. F., Van Sinderen D., O'Toole P. W. Comparative

and functional analysis of sortase-dependent proteins in the predicted secretome of *Lactobacillus salivarius* UCC118. Applied and Environmental Microbiology (2006) 72 (6): 4143-4153.

190) Van Tassell M. L. and Miller M. J. *Lactobacillus* adhesion to mucus. Nutrients (2011) 3 (5): 613-636.

191) Ventura M., Jankovic I., Walker D.C., Pridmore R. D., Zink R. Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. Applied and Environmental Microbiology (2002) 68 (12): 6172-6181.

192) Voltan S., Castagliuolo I., Elli M., Longo S., Brun P., D'Inca R., Porzionato A., Macchi V., Palù G., Sturniolo G. C., Morelli L., Martines D. Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. Clinical and Vaccine Immunology (2007) 14 (9): 1138-1148.

193) Von Ossowski I., Satokari E., Reunanen J., Lebeer S., De Keersmaecker A. C. J., Vanderleyden J., de Vos W. M., Palva A. Functional characterization of a mucus specific LPXTG surface adhesion from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. Applied and Environmental Microbiology (2011) 77 (13): 4465-4472.

194) Von Vietinghoff S. and Ley K. Interleukin 17A controls interleukin 17F production and maintains blood neutrophil counts in mice. The Journal of Immunology (2009) 183 (2): 865-873.

195) Von Wright A. and Axelsson L. Lactic acid bacteria: an introduction. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 4th ed. Editors: Lahtinen S., Ouwehand A. C., Salminen S., von Wright A. Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, Florida, USA (2012).

196) Walker D. C., Aoyama K., Klaenhammer T. R. Electrotransformation of *lactobacillus acidophilus* group A1. FEMS Microbiology Letters (1996) 138 (2-3): 233-237.

197) Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. Applied and Environmental Microbiology (2008) 74 (16): 4985-4996.

198) Walter J., Schwab C., Loach D. M., Gänzle M. G., Tannock G. W. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cells aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology* (2008) 154 (Pt 1): 72-80.

199) Wang C., Li S., Chen L., Peng X., Wu X. The responses of colonic *Clostridium* cluster IV to essential oil and aqueous extract of *Cinnamon cassia* in rats. *Journal of Food and Nutrition Research* (2013) 1 (3): 24-29.

200) Wang H., Ouyang Q., Hu R. W. Establishment of a trinitrobenzene sulfonic acid-induced rat colitis model. *Chinese Journal of Digestive Diseases* (2002) 3 (19): 13-17.

201) Wedebye Schmidt E. G., Larsen H. L., Kristensen N. N., Poulsen S. S., Lyng Pedersen A. M., Claesson M. H., Pedersen A. E. TH17 cell induction and effects of IL-17A and IL-17F blockade in experimental colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* (2013) 19 (8): 1567-1576.

202) Werner T. Iron as environmental factor in the pathogenesis of Crohn's disease-like ileitis. Logos Verlag Berlin GmbH, Berlin, Germany (2011) pp.14-15.

203) Whitmire J. K., Eam B., Whitton J. L. Tentative T cells: memory cells are quick to respond, but slow to divide. *PLoS Pathogens* (2008) 4 (4): e1000041.

204) Wilson M. Microbial inhabitants of humans: their role in health and disease. Cambridge University Press, New York, NY, USA (2005) pp. 3 and 251-257.

205) Wirtz S., Neufert C., Weigmann B., Neurath M. F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. *Nature Protocols* (2007) 2 (3): 541-546.

206) Wlodarska M., Willing B., Keeney K. M., Menendez A., Bergstrom K. S., Gill N., Russell S. L., Vallance B. A., Finlay B. B: Antibiotic treatment alters the colonic mucus layer and predisposes the host to exacerbated *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Infection and Immunity* (2011) 79 (4): 1536-1545.

207) Woodcock D. M., Crowther P. J., Doherty J., Jefferson S., Decruz E., Noyer-Weidner M., Smith S. S., Michael M. Z., Graham M. W. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acid Research* (1989) 17 (9): 3469-3478.

208) Xia C. M., Zhao Y., Jiang L., Jiang J., Zhang S. C. *Schistosoma japonicum* ova maintains epithelial barrier function during experimental colitis. *World Journal of Gastroenterology* (2011) 17 (43): 4810-4816.

209) Xin K. Q., Hoshino Y., Toda Y., Igimi S., Kojima Y., Jounai N., Ohba K., Kushiro A., Kiwaki M., Hamajima K., Klinman D., Okuda K. Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env. *Blood* (2003) 102 (1): 223-228.

210) Yu L. C., Wyng J .T., Wei S. C., Ni Y .H. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: from physiology to pathology. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology* (2012) 3 (1): 27-43.

211) Zaki M. H., Boyd K. L., Kastan M. B., Lamkanfi M., Kanneganti T. D. The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* (2010) 32 (3): 379-391.

212) Zhang Z., Zheng M., Bindas J., Schwarzenberger P., Kolls J. K. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* (2006) 12 (5): 382-388.

213) Zheng L., Gao Z. Q., Wang S. X. A chronic ulcerative colitis model in rats. *World Journal of Gastroenterology* (2000) 6 (1): 150-152.

214) Zoetendal E. G., von Wright A., Vilpponen-Salmela T., Ben-Amor K., Akkermans A., D. L., de Vos W. M. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology* (2002) 68 (7): 3401-3407.

8. PRILOZI

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Јованка М. Лукић

број уписа М3008/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Анализа интеракција лактобацила са цревном мукозом пацова“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Јованка Лукић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Јованка Лукић

Број уписа _____ М3008/2009

Студијски програм _____ Молекуларна биологија прокариота

Наслов рада _____ „Анализа интеракција лактобацила са цревном мукозом пацова“

Ментор _____ Др Јелена Беговић

Потписани _____ Јованка Лукић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Јованка Лукић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

“Анализа интеракција лактобацила са цревном мукозом пацова”

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

Јосипка Сивог

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

9. BIOGRAFIJA AUTORA

Jovanka M. Lukić je rođena 23. 08. 1983. Godine u Tuzli, Bosna i Hercegovina. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, upisala je 2002. godine. Diplomirala je 2008. godine na izornoj oblasti Genetičko inženjerstvo i biotehnologija sa prosečnom ocenom 9, 74. Godine 2009. upisala je doktorske studije Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u grupi Molekularna biologija prokariota, kada je i započela izradu doktorske disertacije u Laboratoriji za molekularnu genetiku industrijskih mikroorganizama (LMGIM) u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI). U periodu od 2010. - 2011. bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije a 2011. godine zaposlena je kao istraživač pripravnik u LMGIM. Godine 2013. izabrana je u zvanje istraživača saradnika.

Jovanka Lukić iz teze ima objavljena dva rada u M21 kategoriji časopisa:

Lukic J., Strahinic I., Jovcic B., Filipic B., Topisirovic L., Kojic M., Begovic J. Different roles of lactococcal aggregation factor and mucin binding protein in adhesion to gastrointestinal mucosa. *Applied and Environmental Microbiology* (2012) 78: 12: 7993-8000.

Lukic J., Strahinic I., Milenkovic M., Golic N., Kojic M., Topisirovic L., Begovic J. Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with rat colonic mucosa: implications for colitis induction. *Applied and Environmental Microbiology* (2013) 79 (18): 5735-5744.

Rezultati iz teze predstavljeni su na međunarodnim kongresima:

Lukic J., Strahinic I., Milenkovic M., Golic N., Kojic M., Topisirovic L., Begovic J. Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with rat colonic mucosa: implications for colitis induction. Abstract, “7th Probiotics, Prebiotics & New Foods”, Rome, Italy (2013).

Begović, J., Lukić, J., Strahinić, I., Jovčić, B., Golić, N., Kojić, M. Adherence of probiotic bacteria to intestinal mucus - new perspectives. Plenary lecture, 8th Balkan Congress of Microbiology, Book of Abstracts, p29, Veliko Tarnovo, Bulgaria (2013).