

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Nevena Đ. Ivanović

**UTICAJ ORALNE PRIMENE
LACTOBACILLUS RHAMNOSUS LA68 I
LACTOBACILLUS PLANTARUM WCFS1
NA IMUNOLOŠKE I METABOLIČKE
PARAMETRE MIŠEVA U USLOVIMA
EKSPERIMENTALNO INDUKOVANE
NEALKOHOLNE MASNE JETRE**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Nevena Đ. Ivanović

**THE EFFECT OF ORAL ADMINISTRATION
OF *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* LA68
AND *LACTOBACILLUS PLANTARUM*
WCFS1 ON IMMUNOLOGICAL AND
METABOLIC PARAMETRES OF MICE IN
EXPERIMENTAL CONDITIONS INDUCED
NON-ALCOHOLIC FATTY LIVER DISEASE**

Doctoral Dissertation

Beograd, 2016

MENTOR:

Dr sc. Brižita Đorđević, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr sc. Rajna Minić, viši naučni saradnik

Institut za virusologiju, vakcine i serume,
Torlak,

Odsek za naučno-istraživački rad

Dr sc. Ivan Stanković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Nataša Golić, naučni savetnik

Univerzitet u Beogradu-Institut za molekularnu genetiku
i genetičko inženjerstvo

U Beogradu, _____

Svom mentor, prof. dr Brižiti, izražavam duboko poštovanje i dugujem najveću zahvalnost za stalnu podršku tokom izrade ovog rada, na prenesenom znanju u oblasti nauke o hrani i ishrani. Prof. dr Brižiti se zahvaljujem i za nesebično zalaganje i podršku koju mi je pružila u trenucima kada mi je bila najpotrebnija, za poverenje i poštovanje, za ogromno razumevanja i pokazano strpljenje, i to ne samo za obaveze oko doktorata, već i za privatne obaveze, za to što je bila pre svega čovek, a tek onda profesor i mentor.

Veliku zahvalnost dugujem dr sc. Rajni, mom učitelju i prijatelju, koja je sa mnom danonoćno razrađivala ideje sa velikim entuzijazmom, imala uvek strpljenja da me sasluša i da pročita sve moje pisanije, da mi nesebično ukaže na sve pravilnosti i nepravilnosti u mom istraživačkom radu. Rajni se zahvaljujem i za prenesenu ljubav prema nauci, kao i za pokazanu neverovatnu snalažljivost i dovitljivost koja je bila neophodna u okolnostima u kojima je ova doktorska disertacija izrađena.

Prof. dr Ivanu Stankoviću se zahvaljujem na punoj podršci koja mi je pružena tokom izrade rada i sveukupne profesionalne saradnje.

Dr Nataši Golić najiskrenije se zahvaljujem za preneto znanje u oblasti mikrobiologije, na korisnim savetima i smernicama u pisanju ove doktorske disertacije.

Dr Ljli Dimitrijević se iskreno i od srca zahvaljujem na nesebičnom prenošenju znanju u oblasti imunologije, za veliku pomoć u izvođenju dela eksperimentalnog rada i saveta u tumačenju i prezentovanju dobijenih rezultata.

Mojoj kumi Miličići se zahvaljujem na svakodnevnoj duhovnoj i moralnoj podršci, na pozitivnom stavu i stalnoj inspiraciji da stvari gledam u vedrijim nijansama.

Mojoj kumi Ivy se zahvaljujem što me je uvela u svet lipidologije i pokazala sve čari gasne hromatografije.

Zahvaljujem se i svim kolegama sa Katedre za bromatologiju na podršci.

Posebno se zahvaljujem mojoj porodici, mom suprugu Nikoli, mojim dečacima Ogiju i Vukiju, bakama, dekama, tečkama i "čiči" na nesebičnoj podršci i strpljenju, na svom teretu koji su podneli tokom izrade ove doktorske disertacije i na beskrajnom strpljenju.

I na kraju, svoju doktorsku disertaciju posvećujem mojoj mami čije me reči i saveti svakodnevno prate i opominju, bez koje ne bi bila ovo što jesam i ovde gde sam sada...Mamiška, volim te najviše na svetu celom....

Uticaj oralne primene *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na imunološke i metaboličke parametre miševa u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre

Rezime

Prema definiciji Svetske Zdravstvene Organizacije, probiotici su živi mikroorganizmi koji kada su konzumirani u adekvatnoj količini imaju povoljne efekte na zdravlje domaćina. Pod pojmom probiotskih bakterija misli se većinom na bakterije mlečne kiseline (BMK) koje obuhvataju uglavnom vrste iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Rastući je broj dokaza koji ukazuju da primena BMK može ispoljiti povoljne efekte u tretmanu komponenata metaboličkog sindroma, kao što su gojaznost, dijabetes tip 2, dislipidemije, nealkoholna masna bolest jetre (engl. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*, NAFLD). NAFLD obuhvata čitav spektar oboljenja, počev od hepatične steatoze preko nealkoholnog steatohepatitisa do hepatične fibroze. Predstavlja najčešći uzrok ozbiljnih i hroničnih oboljenja jetre kod odraslih i kod dece u zapadnim zemljama, sa prevalencom od 20-30% u opštoj odrasloj populaciji, pri čemu prevalenca korelira sa povećanom incidencom gojaznosti i metaboličkog sindroma. Nedavno objavljena istraživanja ukazuju na ulogu crevne mikrobiote u razvoju steatoze i progresiji NAFLD-a, a s obzirom da probiotici mogu delovati na više nivoa na patogenezu oboljenja, a uz to su još i bezbedni i pristupačni, nije iznenađujuće što LAB postaju sve privlačniji kao potencijalna dugoročna terapija NAFLD-a. Kliničke i eksperimentalne studije sugerišu da se probiotici značajno razlikuju u efektima i mehanizmima dejstva a razlike postoje, ne samo između različitih vrsta, već i između različitih soje iste vrste. Zbog toga je najvažniji cilj ove studije bio da se razvije model NAFLD (stadijum steatoze) ishranom visokog sadržaja masti (VSM), a zatim da se ispita i izvrši poređenje dejstva oralne primene dva različita soja BMK, *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1, na imunološke i metaboličke parametre, na razvoj steatoze, kao i na sastav masnih kiselina organa kod miševa soja C57BL/6 u uslovima VSM ishrane.

Nakon 16 nedelja VSM ishrane, u kojoj je 41% energije poticao od masti, kod miševa soja C57BL/6 došlo je do značajnog porasta telesne mase, i razvoja steatoze koju je pratio

poremećaj lipidnih parametara i porast nivoa leptina, što odgovara početnoj fazi NAFLD (stadijum steatoze). Uočene su i značajne promene u sastavu masnih kiselina organa, a naročito jetre gde je deponovanje masti, odnosno nastanak steatoze bio povezan sa povećanjem sadržaja mononezasićenih masnih kiselina i smanjenjem u ukupnom sadržaju zasićenih i polinezasićenih masnih kiselina. Aplikacija soja WCFS1 u uslovima VSM ishrane sprečila je porast telesne mase, smanjila nivo serumskih triglicerida i LDL holesterola. Takođe, aplikacija WCFS1 soja pokazala je značajan imunomodulatorni efekat, odnosno dovela je do povećanja u broju CD3+CD4+ i CD3+CD8+ populacija ćelija i do smanjenja u broju CD19+ and CD25+ ćelija, kao i do smanjenja ćelijske vijabilnosti nakon stimulacije. Aplikacija soja LA68 je u uslovima VSM ishrane takođe sprečila porast telesne mase, dovela do smanjenja serumskih nivoa ukupnog i HDL holesterola, a za razliku od soja WCFS1, nije dovela do značajnih imunomodulatornih efekata kod miševa na VSM ishrani. Sa aspekta sastava masnih kiselina organa, zapaženo je da je aplikacija oba soja u uslovima VSM ishrane dovela do promena u masnokiselinskom sastavu jetre, ali nije imala značajan uticaj na sastav masnih kiselina lipida mozga. Nisu zapažene značajne razlike između dve *Lactobacillus* vrste/soja u efektu na masnokiselinski sastav jetre u toku VSM ishrane, ali je aplikacija *L. plantarum* WCFS1 imala izraženiji efekat u odnosu na kontrolnu grupu. U zaključku, aktivna primena odabranih probiotskih vrsta/sojeva je imala povoljne efekte na metaboličke parametre kod laboratorijskih miševa na VSM ishrani, ali su ovi pozitivni efekti bili kratkoročni nakon prestanka aplikacije. Odnosno, za održavanje povoljnih efekata probiotske suplementacije u tretmanu NAFLD neophodna je promena režima ishrane.

Ključne reči: probiotici, laktobacili, ishrana visokog sadržaja masti, NAFLD, steatoza

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Hemija hrane i dijetetskih proizvoda

UDK broj: 613.2:579.864:616.36(043.3)

The effect of oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* LA68 and *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on immunological and metabolic parameters of mice in experimental conditions induced non-alcoholic fatty liver

Abstract

According to the World Health Organisation's definition, probiotics are alive microorganisms which, when consumed in adequate quantities, have beneficial effects on host's health. The term probiotics bacteria mostly refers to lactic acid bacteria (LAB) which include species from the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacteria*. The increasing amount of evidence indicates that the usage of LAB can have positive effects on the treatment of metabolic syndrome components, such as: obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). NAFLD includes a whole specter of diseases, starting from hepatic steatosis through nonalcoholic steatohepatitis to hepatic fibrosis which may further progress into irreversible cirrhosis and hepatocellular carcinoma. NAFLD represents the most common cause of severe and chronic liver diseases in adults and children in Western countries, with the prevalence correlating with increased incidence of obesity and metabolic syndrome. Recently published research points to the role of intestinal microbiota in the development of steatosis and progression of NAFLD. Probiotics, especially LAB, can have an influence on disease pathogenesis at multiple levels and besides that they are safe and affordable. Taking into account all above-mentioned reasons, it is not surprising that LAB are becoming more and more attractive as potential long-term NAFLD therapy. Clinical and experimental studies suggest that LAB differ significantly in the effects and mechanisms of action. Those differences are not only among different species but also among different strains within the same species. Because of that, the most important goal of this study was to develop a model of NAFLD (steatosis stadium) with use of high fat diet (HFD) and then to examine and to compare the effects of oral administration of two different LAB species/strains, *Lactobacillus rhamnosus* LA68 and *Lactobacillus plantarum* WCFS1, on immunological and metabolic parameters, on steatosis development status, as well as on fatty acid composition of liver and brain in

C57BL/6 mice under high fat diet regime. After 16 weeks of HFD regime, in which 41% energy was derived from fat, in experimental group on HFD regime alone there was a significant increase in weight and liver steatosis developed. This was accompanied by increased levels of blood lipids and increased leptin levels which represents the first phase of NAFLD (steatosis stadium). Significant changes in fatty acid composition were observed, especially in the liver where fat deposition, or steatosis, was accompanied by the increase in the level of monounsaturated fatty acids and decrease in total content of polyunsaturated and saturated fatty acids. Administration of WCFS1 strain in HFD regime prevented the increase in mice body weight and led to a significant decrease in serum triglycerides and LDL cholesterol. Also, the administration of WCFS1 had a significant immunomodulatory effect, which led to an increase in both CD3+CD4+ and CD3+CD8+ cell populations and a decrease in CD19+ and CD25+ cells, as well as a decrease in cell viability/proliferation upon stimulation. The administration of LA68 also resulted in significantly lower body weight of the animals, led to a significant decrease in serum total and HDL cholesterol, but unlike the WCFS1 strain, it did not have a prominent immunomodulatory effect in mice on HFD regime. Administration of both strains led to significant changes in fatty acid composition of liver tissue but had no significant influence on fatty acid composition of brain tissue. There were no significant differences between the two *Lactobacillus* species/strains effects on liver fatty acid composition during HFD regime but the administration of *L. plantarum* WCFS1 had a more pronounced effect when compared to the HFD group. In conclusion, active probiotic administration of two *Lactobacillus* species/strains had positive influence mostly on metabolic parameters in C57BL/6 mice on HFD regime, but these positive outcomes were short term after ending probiotic administration. Namely, the change in dietary regime is necessary for maintenance of probiotic supplementation positive effects in NAFLD treatment

Key words: probiotics, *Lactobacillus*, high fat diet, NAFLD, steatosis

Scientific field: Pharmacy

Scientific topic: Chemistry of food and dietary products

UDC number: 613.2:579.864:616.36(043.3)

Sadržaj

1	UVOD.....	1
1.1	Intestinalna mikrobiota i bakterije mlečne kiseline	2
1.1.1	Intestinalna mikrobiota	2
1.1.1.1	Osnovne uloge GI mikrobiote	6
1.1.1.2	Mehanizmi održavanja imunološke tolerancije na prisustvo simbiotskih intestinalnih bakterija	8
1.1.1.3	Ograničavanje imunske aktivacije na prisustvo simbiota	11
1.1.2	Bakterije mlečne kiseline kao probiotici	12
1.1.3	Bakterije mlečne kiseline i imunski sistem	20
1.1.3.1	BMK i urođeni imunski odgovor	22
1.1.3.2	BMK i stečeni imunski odgovor	23
1.1.4	Dejstva bakterija mlečne kiseline na metaboličke parametre.....	26
1.2	Nealkoholna masna bolest jetre	29
1.2.1	Definicija	29
1.2.2	Epidemiologija	30
1.2.3	Tok bolesti i prognoza	30
1.2.4	Patogeneza	31
1.2.5	Dijagnoza.....	33
1.2.5.1	Histopatološka potvrda prisustva steatoze (nealkoholne masne jetre)....	34
1.2.6	Strategija za tretman NAFLD.....	35
1.3	Gojaznost i nealkoholna masna jetra	36

1.3.1	Uloga gojaznosti u razvoju nealkoholne masne jetre	36
1.3.2	Veza između crevne mikrobiote, gojaznosti i nealkoholne masne jetre.....	39
1.3.2.1	Promene propustljivosti crevne mukoze i prekomernog rasta bakterija u tankom crevu kao uzrok NAFLD	40
1.3.2.2	Prisustvo bakterijske endotoksemije kao uzrok NAFLD	40
1.3.3	Sprega metabolizma i imunskog sistema	41
1.4	Bakterije mlečne kiseline (probiotici) u tretmanu nealkoholne masne jetre (steatoze).....	44
1.4.1	Efikasnost probiotika u tretmanu nealkoholne masne jetre.....	44
1.4.2	Mehanizmi delovanja probiotika u NAFLD.....	45
1.4.2.1	Modulacija sastava crevne mikrobiote i produkcija antibakterijskih faktora	45
1.4.2.2	Modulacija intestinalne epitelne propustljivosti i funkcije	46
1.4.2.3	Modifikacija endotoksemije.....	47
1.4.2.4	Supresija inflamacije	48
2	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	50
3	MATERIJAL I METODE	52
3.1	Materijal.....	53
3.1.1	Hemikalije, podloge, ELISA testovi, antitela i rastvori	53
3.1.2	Hrana	56
3.1.3	Bakterijski sojevi	57
3.1.3.1	Propagacija bakterijskih sojeva i priprema oralnog rastvora	58
3.1.4	Eksperimentalne životinje	58
3.1.4.1	Eksperimentalne procedure na životinjama 1 – testiranje efekta Lactobacillus rhamnosus LA68 u u uslovima standardne ishrane	59

3.1.4.2	Eksperimentalne procedure na životinjama 2 – Poređenje efekta <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA68 i <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre	60
3.1.4.3	Eksperimentalne procedure na životinjama 3 – Ispitivanje dužine trajanje uticaja oralne primene <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA68 i <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1 u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre.....	61
3.2	Metode	62
3.2.1	Određivanje biohemijskih parametara.....	62
3.2.2	Izolacija splenocita	62
3.2.3	Stimulacija splenocita i određivanje metaboličke aktivnosti splenocita - MTT test	63
3.2.4	Protočna citometrija.....	64
3.2.5	Estrakcija lipida iz jetre i mozga	64
3.2.6	Određivanje sastava masnih kiselina metodom gasne hromatografije.....	65
3.2.7	ELISA – merenje koncentracije citokina u serumu i ćelijskim supernatantima	66
3.2.8	ELISA – određivanje koncentracije leptina, adiponektina i insulina u serumu	66
	Proračun:.....	67
3.2.9	Određivanje koncentracije glukoze u krvi i test opterećenja glukozom.....	68
3.2.10	Histološka analiza tkiva jetre.....	69
3.2.11	Statistička obrada podataka	69
4	REZULTATI I DISKUSIJA.....	70
4.1	Ispitivanje efekata primene <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA68 pri standardnoj ishrani u nepatološkim uslovima	71
4.1.1	Biohemijski parametri nakon primene LA68 u uslovima standardne ishrane	72

4.1.2	Sastav masnih kiselina jetre i mozga prilikom primene LA68 u uslovima standardne ishrane	73
4.1.3	Citokinski profil nakon primene LA68 u uslovima standardne ishrane dobijen iz seruma.....	78
4.1.4	Procenti leukocitnih populacija nakon primene LA68 u uslovima standardne ishrane	79
4.1.5	Reaktivnost leukocita slezine na nespecifičnu stimulaciju nakon primene LA68 u uslovima standardne ishrane	80
4.2	Ispitivanje efekata <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LA68 i <i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1, na metaboličke i imunološke parametre laboratorijskih miševa soja C57BL/6 u modelu eksperimentalno izazvane nealkoholne masne jetre (steatoze)	85
4.2.1	Promene u telesnoj masi i unosu hrane prilikom aplikacije bakterija mlečne kiseline	86
4.2.2	Biohemijski parametri u modelu nealkoholne masne jetre (steatoze) i promena prilikom aplikacije bakterija mlečne kiseline.....	87
4.2.3	Histološka analiza uzoraka jetre	89
4.2.4	Leptin i adiponektin.....	90
4.2.5	Određivanje profila citokina u modelu nealkoholne masne jetre i promena prilikom aplikacije bakterija mlečne kiseline.....	92
4.2.6	Reaktivnost leukocita slezine na nespecifičnu stimulaciju u modelu nealkoholne masne jetre i promena prilikom aplikacije bakterija mlečne kiseline – sekrecija citokina i MTT test.....	93
4.2.7	Procenti leukocitnih populacija u modelu nealkoholne masne jetre i promena prilikom aplikacije bakterija mlečne kiseline.....	96
4.2.8	Uticaj ishrane visokog sadržaja masti na sastav masnih kiselina jetre i mozga	98

4.2.9	Uticaj aplikacije bakterija mlečne kiseline na sastav masnih kiselina jetre i mozga u režimu ishrane visokog sadržaja masti	101
4.3	Ispitivanje dužine trajanja efekata <i>L. rhamnosus</i> LA68 i <i>L. plantarum</i> WCFS1 posle 8 nedelja <i>wash out</i> perioda.....	106
4.3.1	Promene u telesnoj masi i biohemijskim parametrima.....	106
4.3.2	Histološki nalaz jetre	108
4.3.3	Promene u sastavu masnih kiselina organa nakon 8 nedelja <i>wash out</i> perioda	109
5	ZAKLJUČCI	113
6	LITERATURA.....	118

LISTA SKRAĆENICA KORIŠĆENIH U TEKSTU

ALA – (engl. *alpha - linolenic acid*) - alfa-linolenska kiselina

ALT – alanin-aminotransferaza

APĆ – antigen prezentujuće ćelije

AST – aspartat-aminotransferaza

BMK – bakterije mlečne kiseline

BSA – (engl. *Bovine Serum Albumin*) – albumin seruma govečeta

CFU – (engl. *Colony Forming Units*)

DĆ – dendritske ćelije

DHA – (*docosahexaenoic acid*) – dokozaheksaenska kiselina

EFSA – (engl. *European Food Safety Agency*)

ELISA – (engl. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) - enzimski imunosorbent test

EPA – (engl. *eicosapentaenoic acid*) – eikozapentaenska kiselina

FCS – (engl. *Fetal Calf Serum*) – fetalni serum govečeta

FITC – (engl. *Fluorescein Isothiocyanate*)

GALT – (engl. *Gastrointestinal Associated Lymphoid Tissue*)

GI – gastrointestinalni

GIT – gastrointestinalni trakt

GRAS – (engl. *Generally Recognise As Safe*)

HDL – (engl. *High Density Lipoprotein*) - lipoprotein velike gustine

IEĆ – intestinalne epitelne ćelije

IgA – imunoglobulin A

IL-12 – interleukin 12

IL-6 – interleukin 6

IL-8 – interleukin 8

INF- γ – interferon γ

IR – insulinska rezistencija

LA – (engl. *linoleic acid*) - linolenska kiselina

LDL – (engl. *Low Density Lipoprotein*) - lipoprotein male gustine

LPS – lipopolisaharid

MAMPs – (engl. *Microorganism-Associated Molecular Patterns*)

MMK – mononezasićene masne kiseline

MRS – (engl. *deMan, Rogosa and Sharpe*)

NAFL – (engl. *Nonalcoholic Fatty Liver*) – nealkoholna masna jetra

NAFLD – (engl. *Nonalcoholic Fatty Liver Disease*) – nealkoholna masna bolest jetre

NASH – (engl. *Nonalcoholic Steatohepatitis*) – nealkoholni steatohepatitis

NF- κ B – (engl. *Nuclear Factor kappa B*)

NK – (engl. *Natural Killer*)

PBS – (engl. *Phosphate Buffer Saline*)

PE – (engl. *Phycoerythrin*)

PGN – peptidoglikan

PMK – polinezasićene masne kiseline

PRRs – (engl. *Pattern Recognition Receptors*)

QPS – (engl. *Qualified Presumption of Safety*)

SCFA – (engl. *Short Chain Fatty Acid*) – kratkolančane masne kiseline

SH – standardna hrana

SMK – slobodne masne kiseline

TG – trigliceridi

Th – (engl. *T helper*) – pomoćnički T limfocit

TLRs – (engl. *Toll-like Receptors*)

TNF- α – (engl. *Tumor Necrosis Factor- α*) - faktor tumorske nekroze alfa

Treg – regulatorne T ćelije

UH – ukupni holesterol

VSM – visok sadržaj masti

VSM – visok sadržaj masti

ZMK – zasićene masne kiseline

1 UVOD

1.1 Intestinalna mikrobiota i bakterije mlečne kiseline

1.1.1 Intestinalna mikrobiota

Gastrointestinalna (GI) mikrobiota kičmenjaka je veoma kompleksan sistem koji se sastoji uglavnom od bakterija, ali su prisutni i virusi, gljivice, kvasci i protozoe [1]. Pod pojmom mikrobiota, mikroflora ili normalna flora podrazumeva se ukupna masa živih mikroorganizama u crevima koja koegzistira sa svojim domaćinom u nepatološkim uslovima [1]. Bakterijska zajednica u intestinumu sastoji se od najmanje 500-1000 vrsta, sa oko 10^{14} bakterijskih ćelija [2]. Ono što doprinosi sagledavanju veličine ovog ekosistema je činjenica da je mikrobiom, genom GI mikrobiote, oko 150 puta veći od genoma domaćina, a broj ćelija 10 puta veći u odnosu na broj ćelija domaćina [2]. GI mikrobiotu kičmenjaka u homeostazi čine uglavnom predstavnici sledećih tipova: *Firmicutes* (vrste *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*), *Bacteroidetes* (*Bacteroides* vrste), *Actinobacteria* (vrste *Bifidobacteria*) i *Proteobacteria* (uglavnom *Escherichia coli*) [3, 4]. Svaka od prisutnih bakterijskih vrsta u okviru GI mikrobiote ima svoj individualni metabolizam, različite kvalitete i funkciju, pri čemu različite bakterijske grupe u homeostazi funkcionišu kao jedna zajednica [5].

Mikrobiota čoveka je filogenetski slična mikrobioti drugih sisara, iako su kod čoveka prisutne drugačije bakterijske vrste [6]. Primena molekularnih tehnika je pokazala visoki nivo varijabilnosti između individua na nivou bakterijskih vrsta, ali kada se mikrobiota poredi na višem nivou, na nivou tipova, može se uočiti zajednički obrazac. Taj obrazac čine tipovi *Firmicutes* i *Bacteroidetes* koji su dominantni bakterijski tipovi u gastrointestinalnom traktu (GIT) kod svih kičmenjaka [7]. Tip *Firmicutes* čine Gram+ bakterije koje uglavnom pripadaju klasi *Clostridia*, ali obuhvataju i familije *Enterococcaceae* i *Lactobacillaceae* i vrste *Lactococcus* spp. Tip *Bacteroidetes* su Gram-bakterije sačinjene od nekoliko *Bacteroides* vrsta [8]. Istraživanja su pokazala da relativni odnos ova dva glavna tipa, pre nego prisustvo ili odsustvo pojedinih bakterijskih vrsta, korelira sa zdravljem ili bolešću kod čoveka [9].

Intestinalna mikrobiota nije homogena; njen sastav se menja duž GIT-a, pri čemu su dominantna mikrobiota u tankom crevu vrste *Proteobacteria* i predstavnici reda *Lactobacillales*, dok je debelo crevo kolonizovano uglavnom predstavnicima rodova *Bacteroides* i *Clostridia* [10]. Uočljiva su dva gradijenta raspodele bakterija u GIT-u. Prisustvo bakterijskih ćelija u intestinumu sisara pokazuje kontinuitet pri čemu bakterijska gustina raste počev od želuca i duodenuma gde je prisutno oko $10^1 - 10^3$ bakterija/g sadržaja, zatim progresivno raste do $10^4 - 10^7$ bakterija/g sadržaja u jejunumu i ileumu i dostiže svoj maksimum od $10^{11} - 10^{12}$ bakterija/g u kolonu [1]. Sa porastom gustine, u istom maniru raste i bakterijska raznovrsnost [1]. Drugi gradijent raspodele bakterija je uočljiv duž veze tkivo-lumen, pri čemu mali broj bakterija se nalazi u mukusu, dok je veliki broj bakterija prisutan u lumenu [1]. Mnoge bakterijske vrste su prisutne u lumenu, dok samo mali broj, dobro prilagođenih vrsta, uključujući nekoliko proteobakterija, adherira i živi unutar mukusnog sloja, u blizini mukoze [11]. Mikrobiota je dinamičko stanište koje podleže konstantnim i brzim promenama pod dejstvom promena brojnih faktora, uključujući faktore domaćina (pH vrednost sredine, prisustvo žučnih soli i digestivnih enzima, mukus, vreme tranzita), faktore sredine (način ishrane, primena antibiotika) i faktore koji potiču od samih bakterija (sposobnost adhezije za mukoze epitela, produkcija enzima, produkcija bakteriocina, metabolički kapacitet) [12]. Važno je naglasiti da intestinalne bakterije mogu biti tranzitne i stalne. Tranzitne bakterije ne mogu trajno da kolonizuju GIT i mogu imati pozitivni (probiotski) ili negativni (patogeni) efekat na domaćina [13].

GIT čoveka je sterilan prilikom rođenja, ali biva jako brzo kolonizovan od strane bakterija koje potiču od vaginalne i intestinalne mikrobiote majke ili iz spoljašnje sredine [14]. Sastav GI mikrobiote novorođenčadi zavisi od brojnih faktora, kao što su način rođenja, način ishrane (dojenje ili ishrana formula), okruženja i primena antibiotika [15]. Tako, na primer, dominantnu mikrobiotu novorođenčadi rođenih vaginalnim putem čine laktobacili, u poređenju sa mikrobiotom novorođenčadi rođenih carskim rezom, što se objašnjava činjenicom da su laktobacili dominantni stanovnici urogenitalne mikroflore zdravih žena [16]. Pored prisustva laktobacila, intestinalnom mikrobiotom novorođenčadi koja su na majčinom mleku uglavnom dominiraju bifidobakterije. Ono što ima ključnu ulogu za

uspostavljanje ovakvog sastava mikrobiote je prisustvo oligosaharida (bifidogenih faktora rasta) u majčinom mleku [17, 18]. Nakon inicijalnog uspostavljanja mikrobiote i u toku prve godine života, sastav GI mikrobiote sisara se karakteriše malim brojem bakterijskih vrsta i varira između individua i tokom vremena [1]. Pretpostavlja se da ova inicijalna kolonizacija ima važnu ulogu u oblikovanju mikrobiote tokom odrastanja. Prelaskom na čvrstu hranu, mikrobiota dobija na kompleksnosti i stabilnosti koja karakteriše mikrobiotu odraslih, a do tada prisutne vrste bivaju potisnute sa *E. coli* i predstavnicima rodova *Bacteroides* i *Clostridia* [19].

Pored faktora okruženja, kao što je uticaj majke na sastav mikrobiote novorođenčadi, i drugi faktori mogu imati uticaja na njeno oblikovanje. Smatra se da je način ishrane, pre svega količina i vrsta prisutnih nedigestibilnih ugljenih hidrata, najvažniji faktor koji utiče na oblikovanje GI mikrobiote. Naime, pretpostavlja se da je prisustvo ovih polisaharida u ishrani imalo ključnu ulogu u evoluciji GI mikrobiote sisara [7, 20]. Naime, genom kičmenjaka ima ograničen repertoar glikozil-hidrolaza i samim tim nije u mogućnosti da u potpunosti iskoristi energiju iz određene hrane. Kičmenjacima je to omogućila intestinalna bakterijska zajednica, sa lako prilagodljivim genomom, koji poseduje široki spektar saharolitičkih enzima. Ovi enzimi omogućavaju sisarima i drugim kičmenjacima da hidrolizuju, inače nedigestibilne polisaharide, i na taj način se lako adaptiraju na dijetarne promene [21]. Studije na animalnim modelima su uspele da kvantifikuju doprinos mikrobiote digestivnoj efikasnosti domaćina, pa je tako studija rađena na glodarima pokazala da životinje koje poseduju mikrobiotu, zahtevaju 30% manje kalorijskog unosa za održavanje telesne mase u poređenju sa akseničnim životinja (životinje koje rastu u sterilnim uslovima, sa sterilnim GIT-om) [22]. Noviji dokazi ukazuju da količina i vrsta nedigestibilnih ugljenih hidrata u ishrani utiče na sastav mikrobiote, i to u pogledu broja bakterija i u pogledu bakterijskih vrsta u kolonu [23, 24]. Pretpostavlja se da određeni nedigestibilni ugljeni hidrati stimulišu određenu grupu mikroorganizama koji imaju visok afinitet i visok stepen degradativne aktivnosti za taj supstrat [24].

Rezultati istraživanja rađenih poslednjih godina sugerišu da se sastav GI mikrobiote domaćina adaptira na dijetarne promene i promene u telesnoj masi [25]. Pokazano je da dijetarne promene, pre svega promene ishrane od one bogate polisaharidima i siromašne

mastima do ishrane bogate šećerima i mastima, dovode do promena u sastavu GI mikrobiote domaćina u toku samo jednog dana [26].

Visok sadržaj masti (VSM) u ishrani, što je najčešći uzrok gojaznosti, dovodi do narušavanja sastava mikrobiote, i to smanjivanjem broja bifidobakterija, koje imaju važnu ulogu u održavanju GIT barijere i promovisanjem rasta bakterija koje proizvode endotoksine [27]. Istraživanjem mikrobiote gojaznih osoba ustanovljena je veza između gojaznosti i promene u sastavu mikrobiote [12]. Rezultati relevantnih studija ukazuju na to da VSM ishrana dovodi do izmene u mikrobioti nezavisno od prisustva gojaznosti [28]. Analize su pokazale da *ob/ob* miševi, sojevi genetski predisponirani da razviju gojaznost jer nemaju gen za leptin, imaju više predstavnika tipa *Firmicutes* u odnosu na predstavnike tipa *Bacteroidetes* [29]. Dijetarne manipulacije koje su imale za cilj da ograniče porast u telesnoj masi, imale su reverzibilni efekat na izmenjeni sastav mikrobiote koja je bila posledica ishrane koja je dovela do gojaznosti [1]. Takođe, još jednu potvrdu da GI mikrobiota može biti uzrok metaboličkih promena i gojaznosti, je studija u kojoj je izvršena transplantacija GI mikrobiote iz *ob/ob* miševa na normalnoj ishrani i iz divljeg tipa miša na ishrani VSM u GIT akseničnog miša. Ova transplantacija je dovela do razvoja većeg stepena gojaznosti kod akseničnog miša nego što je izazvala transplantacija GI mikrobiote uzeta od miša na standardnoj ishrani [25].

Promena u sastavu GI mikrobiote, njenoj metaboličkoj aktivnosti i izmeni u distribuciji bakterija, označeno kao disbioza, se dovodi u vezu kako sa različitim oboljenjima GIT-a (inflamatorna bolest creva, sindrom iritabilnog kolona), tako i sa oboljenjima van GIT-a (dijabetes tipa 1 i 2, metabolički sindrom, nealkoholna masna bolest jetre). Disbioza može nastati paralelno sa intestinalnom patogenezom, a može biti, kako uzrok, tako i posledica oboljenja [30].

1.1.1.1 Osnovne uloge GI mikrobiote

Primarna funkcija GI mikrobiote je da poveća efikasnost domaćina prilikom digestije dijetarnih polisaharida koji se inače ne digestuju dejstvom enzima domaćina. Ova funkcija se smatra pokretačkom snagom koja stoji iza evolucije odnosa sisara kao domaćina i mikroorganizama [31]. Mikrobiom pruža domaćinu biohemijske puteve neophodne za fermentaciju nedigestibilnih ugljenih hidrata i endogenog mukusa, pri čemu dolazi do stimulacije bakterijskog rasta, ali i do produkcije kratkolančanih masnih kiselina (engl. *Short Chain Fatty Acids*, SCFA) i gasova [32]. Najvažnije SCFA su acetati, butirati i propionati, a ostali bakterijski krajnji produkti uključuju laktate, etanol, sukcinat, valerate, kaproate, izovalerate i dr. [33]. Bakterijska fermentacija se odvija u kolonu i cekumu gde se SCFA apsorbuju stimulišući apsorpciju soli i vode. Jedan od najznačajnijih efekata ovih metabolita je njihov stimulišući (trofični) efekat na rast intestinalnog epitela [32]. Butirat je posebno poželjan izvor energije za epitelne ćelije i biva skoro u potpunosti uklonjen od strane epitelnih ćelija kolona [34]. Acetati su osnovne masne kiseline kratkog lanca u kolonu i predstavljaju primarni supstrat za sintezu holesterola [12]. Ostale metaboličke funkcije GI mikrobiote uključuju produkciju vitamina (vitamin K i većina vitamina B kompleksa), sintezu aminokiselina i biotransformaciju žučnih kiselina [35, 36]. Biotransformacija žučnih kiselina od strane enzima mikrobiote od značaja je za metabolizam holesterola i glukoze [37].

Druga važna uloga GI mikrobiote je protektivna. Naime, komensalni mikroorganizmi sprečavaju kolonizaciju patogena kompeticijom za vezivna mesta i nutrijente, produkcijom i sekrecijom antimikrobnih agenasa, kao i smanjenja pH sredine produkovanjem organskih kiselina [12]. GI mikrobiota je od esencijalnog značaja za pravilan razvoj, sazrevanje i regulaciju lokalnog i sistemskog imunskog sistema domaćina [38, 39]. Aksenični miševi ispoljavaju nerazvijeni imunski sistem u crevima, koji se karakteriše slabije razvijenim Pejerovim pločama i izolovanim limfoidnim folikulima [40]. Postoje dokazi koji ukazuju da mikrobiota ima ključnu ulogu u indukovanju IgA produkcije, razvoju B ćelija, kao i u razvoju T ćelijskih populacija, uključujući regulatorne T ćelije, Th1, Th2 i Th17 ćelije [16]. Skorija istraživanja ukazuju da komensalne bakterije proizvode molekule koje posreduju u

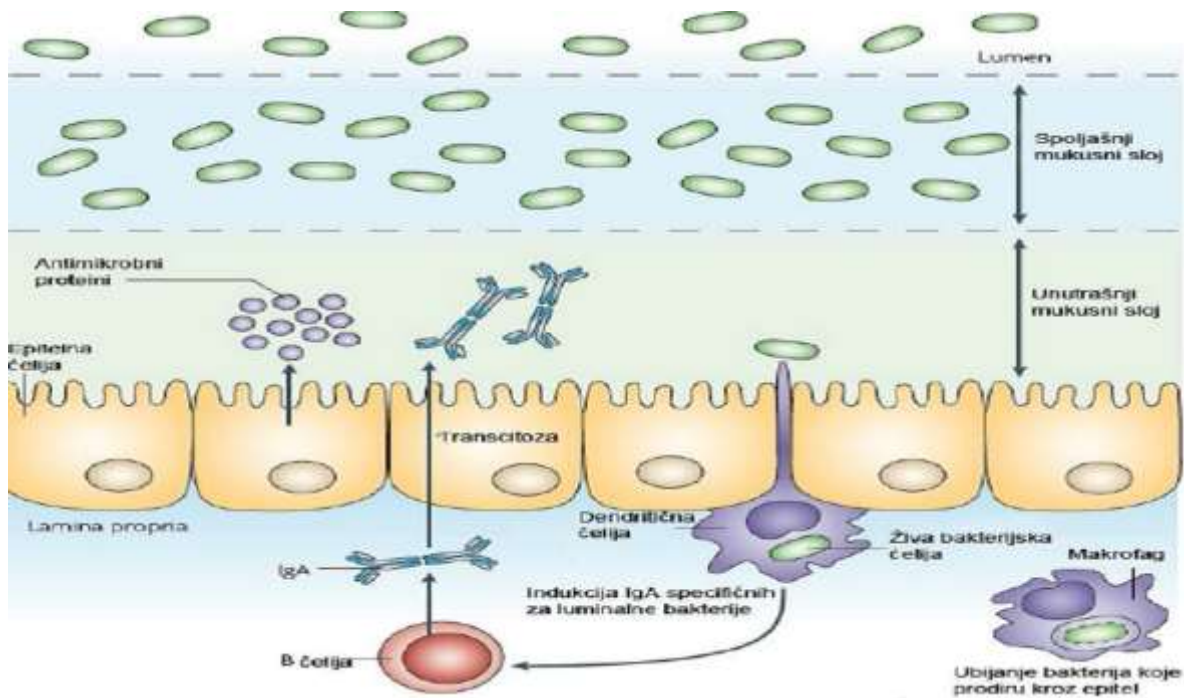
zdravom imunskom odgovoru i štite domaćina od inflamatornih oboljenja (kao što je polisaharid A koji proizvodi *Bacteroides fragilis*) [41]. SCFA, kao što je butirat, može da ispolji potentni imunomodulatorni efekat suprimirajući aktivaciju NF- κ B odgovornog za transkripciju gena koji kodiraju proinflamatorne citokine [42]. Ovaj koncept ilustruje aktivnu ulogu mikrobiote u razvoju i homeostazi imunskog sistema domaćina.

Mikrobiota igra važnu ulogu u održavanju intestinalne strukture i funkcije. Naime, mikrobiota je uključena i u razvoj ćelija i tkiva u GIT-u, na šta ukazuje istraživanje rađeno na akseničnim miševima kod kojih su ustanovljene anatomske promene u GIT-u (duže i šire mikrovile enterocita cekuma i kraće kripte kolona sa manjim brojem ćelija u odnosu na konvencionalnu životinju) uslovljenih redukcijom u broju bakterija [43]. Takođe, kod akseničnih miševa je nađen manji broj epitelnih peharastih ćelija i tanji mukusni sloj u odnosu na konvencionalne miševе, a ovaj fenomen je bio reverzibilan nakon transplantacije mikrobiote uzete od konvencionalnog miša [44, 45]. Mukusni sloj koji prekriva epitel predstavlja prepreku za prodor antigena i proinflamatornih molekula [46]. Istraživanja ukazuju i da SCFA regulišu rast i diferencijaciju epitelnih ćelija kolona [47], a postoje dokazi da butirat pojačava odbrambenu barijeru kolona indukovanjem sekrecije mucina i antimikrobnih peptida [48]. Pored uloge u promovisanju ćelijske diferencijacije, butirati igraju važnu ulogu u prevenciji kancera kolona ograničavajući progresiju ćelijskog ciklusa i promovisanjem apoptoze izmenjenih kolonocita [47]. Sve ovo ukazuje da je strukturalni i morfološki razvoj GIT-a uslovljen u značajnoj meri prisustvom mikrobiote.

1.1.1.2 Mehanizmi održavanja imunološke tolerancije na prisustvo simbiotskih intestinalnih bakterija

Uspostavljanje i održavanje korisnih interakcija između domaćina i njegove mikrobiota su od ključne važnosti za zdravlje domaćina. U održavanju ove korisne veze glavnu ulogu ima GIT u kome funkcioniše mukozni imunski sistem. GIT mora da ispuni dva, na izgled kontradiktorna zadatka. Prvi je da olakša apsorpciju nutrijenata, zbog čega ukupna površina GIT-a kod čoveka iznosi oko 200 m². Drugo, mora da bude rezistentan na infekciju i da inhibira translokaciju bakterija kroz tkivnu barijeru [11, 49]. Uzimajući u obzir veliki broj i raznovrsnost bakterija u GIT-u, kao i činjenicu da je ovakva mikrobna zajednica odvojena od površine intestinalnih epitelnih ćelija (IEĆ) samo mukusom debljine od par do nekoliko stotina mikrometara (u zavisnosti od lokacije), jasno je da se mukozni imunski sistem suočava sa velikim izazovom u poređenju sa drugim organima. Zbog toga mora da ispuni nekoliko specifičnih zahteva; da ne reaguje ili da bude tolerantan na veliki broj prisutnih simbiotskih bakterija koje borave u lumenu GIT-a, da obezbedi povoljan sastav mikrobiote držeći bakterije sa potencijalno štetnim dejstvom pod kontrolom i da mehanizmom negativne povratne sprege ograničava prekomerni rast bakterija pravovremenom reakcijom na prodor bakterija kroz intestinalnu barijeru (produkcovanjem sekretornog IgA i antimikrobnih peptida, prisustvom mukusnog sloja i čvrsto povezanih IEĆ) [11]. Za uzvrat, intestinalna mikrobiota igra ključnu ulogu u razvoju i regulaciji imunskog tkiva domaćina, populacije imunskih ćelija i imunskih medijatora [11].

Efikasnost ove strategije se ogleda u činjenici da čovek, ali i drugi kičmenjaci, koegzistiraju sa više od 100 triliona bakterija bez prisustva značajne inflamacije [50]. Prvi odbrambeni sistem sa kojim se susreću bakterije, i čija je uloga da prevenira mikrobnu invaziju u ekstraintestinalna tkiva, je intestinalna mukozna barijera. Mukozna barijera je sačinjena od tri komponente, fizičke koju čine čvrsto vezane epitelne ćelije i tanak sloj mukusa, hemijske koju čine sekretovani antimikrobni peptidi i imunske koju čine dendritične ćelije i makrofagi koji zatim aktiviraju B ćelije da sekretuju IgA [47] (Slika 1).



Slika 1. Barijere GI trakta. Fizičku barijeru čini mukusni sloj i čvrsto povezane epitelne ćelije. Hemijsku barijeru čine antimikrobni peptidi. Imunološku barijeru na prvom mestu čine dendritične ćelije i makrofagi [51]

IEĆ koje su povezane čvrstim vezama, ne samo da fizički odvajaju mikrobiotu od lamine proprije, nego u odgovoru na bakterijsku invaziju i metabolički stres, sekretuju proinflamatorne citokine i reaktivne kiseonične vrste. Na taj način služe kao sistem uzbune za imunske ćelija u lamini propriji u borbi protiv mikroorganizama, zbog toga se i smatraju aktivnim učesnikom u urođenom imunitetu [47].

Čitava površina intestinalnog epitela pokrivena je slojem mukusa kog sekretuju peharaste ćelije. Osnovni gradivni element mukusa čine glikoproteini, koji mukusu daju konzistenciju gela, otežavajući prodor bakterija ka epitelnim ćelijama [11, 21]. Za mukus je karakteristično da se sastoji od dva različita sloja. Dok gornji sloj sadrži veliki broj bakterija, donji sloj mukusa formira zaštićenu zonu na apikalnoj površini epitelnih ćelija koji je rezistentan na bakterijsku penetraciju [52]. Miševi kojima nedostaje esencijalni mucin MUC2 nemaju ovu zonu oslobođenu od bakterija i spontano razvijaju kolitis [52].

Drugi mehanizam koji promovise održavanje bakterija u lumenu GIT-a je produkcija antimikrobnih peptida od strane različitih IEC, uključujući enterocite i Panetove ćelije. Ovi prirodni antibiotici pokazuju širok spektar antimikrobne aktivnosti usmerene protiv Gram+ i Gram- bakterija, gljivica, kvasaca i virusa [53]. Pripadaju različitim klasama proteina i direktno ubijaju bakterije preko mehanizama koji kompromituju integritet ćelijskog zida [21]. Dok se neki antimikrobni peptidi sekretuju konstitutivno, drugi se sekretuju kao odgovor na bakterijske signale, preko aktivacije receptora za prepoznavanje obrazaca (engl. *Pattern Recognition Receptors*, PRRs), uključujući TLR (engl. *Toll-like Receptors*, TLRs), koji prepoznaju molekulske obrasce vezane za mikroorganizme (engl. *Microorganism-Associated Molecular Patterns*, MAMPs) koji su jedinstveni za mikroorganizme [21]. Bakterijski MAMP molekuli obuhvataju lipopolisaharide (Gram- bakterije), teihojnu kiselinu (Gram+ bakterije), flageline (bakterijski flagelin), peptidoglikane i lipoproteine (većina bakterija). MAMP molekuli služe kao ligandi za različite klase TLR receptora, koji tada specifično prepoznaju mikrobnog antigena. Aktivacijom TLR receptora Panetovih ćelija dolazi do ekspresije kompleksne smeše antimikrobnih proteina, što ima ključnu ulogu u sprečavanju prodora komensalnih bakterija u tkivo domaćina [54]. Ovo ukazuje na postojanje negativne povratne sprege u kojoj uzorkovanje površinski vezanih bakterija preko TLR receptora na Panetovim ćelijama, dovodi do sekretovanja antimikrobnih peptida koji limitiraju bakterijski pristup i penetraciju kroz epitel GIT-a.

Treći mehanizam uključuje sekreciju IgA koji proizvode B ćelije unutar lamine proprie, a zatim dolazi do njegove transcitoze kroz IEC i sekrecije IgA na apikalnoj površini IEC [55]. IgA je esencijalan faktor u homeostatskoj kontroli simbiotskih bakterija, s obzirom da deficijencija IgA dovodi do prodora komensalnih bakterija u tkiva domaćina [56]. Mogući mehanizmi kojim IgA sprečava prodor bakterija uključuje zadržavanje bakterija u sloju mukusa, aktiviranje sistema komplementa koji ubija bakteriju ili iniciranjem fagocitoze bakterija koje su narušile barijeru [21]. Kao i sekrecija antimikrobnih peptida, i sekrecija IgA je regulisana negativnom povratnom spregom. Dendritske ćelije svojim dendritskim nastavcima uzorkuju bakterije koje se nalaze na apikalnoj površini IEC ili bakterije prodiru kroz epitel, što dovodi do indukcije sekrecije IgA specifičnih za tu bakteriju i sprečavanje daljeg prodora bakterija [21]. Na taj način, i urođeni i stečeni imunski sistem imaju svoje

mehanizme za otkrivanje bakterija na apikalnoj strani IEC i aktivno sarađuju u cilju zaustavljanja prodora bakterija kroz epitel.

Naime, komensalne bakterije pri pokušaju prolaska kroz intestinalnu barijeru bivaju uhvaćene u tanak mukusni sloj koji sadrži antimikrobne peptide i IgA specifične za ove bakterije, čime se isključuju iz unutrašnjeg tkiva. Dok komensalne bakterije imaju tendenciju da ostanu na luminalnoj strani epitela, patogene bakterije imaju mehanizme kojim zaobilaze zaštitne mehanizme intestinalne mukoze. PRR receptori i koreceptori igraju ključnu ulogu u razlikovanju komensalnih i patogenih bakterija koje se zasniva na različitom ponašanju ove dve grupe bakterija [57].

U slučaju da ovi mehanizmi nisu dovoljni da zaustave prodor bakterija u tkivo, odnosno ako komensalne bakterije prođu epitelnu barijeru, dolazi do aktiviranja makrofaga infiltriranih u laminu propriu i njihove brze eliminacije [56].

Možemo reći da simbiotski mikroorganizmi podstiču antimikrobne sisteme domaćina i uspostavljajući mehanizme negativne povratne sprege, dovode do kontrole sopstvene brojnosti, ujedno povećavaju efikasnost GI barijere domaćina.

1.1.1.3 Ograničavanje imunske aktivacije na prisustvo simbiota

IEC na svojoj površini ekspimiraju PRR, uključujući i TLR receptore. TLR receptori prepoznaju široki spektar bakterijskih elemenata (MAMP molekula) i prepoznaju antigene koji potiču i od patogenih i od simbiotskih bakterija. Prisutni su na velikom broju ćelija urođenog imuniteta, uključujući i IEC.

Vezivanje MAMP molekula za TLR receptore dovodi do iniciranja signalne kaskade koja aktivira NF- κ B, koji predstavlja transkripcioni faktor odgovoran za ekspresiju proinflamatornih i antimikrobnih gena [58]. S obzirom da su receptori na IEC u bliskom kontaktu sa velikim brojem bakterija koje sadrže strukture koje prepoznaju ovi receptori, postavlja se pitanja na koji način se sprečava pokretanje inflamatornog odgovora na prisustvo simbiotskih bakterija.

Jedno od objašnjenja je da PRR receptori, kao što su TLR-ovi, imaju ograničenu ekspresiju i/ili lokalizaciju na IEC. Tako je predloženo da IEC minimalno reaguju na LPS zbog

zanemarljive ekspresije TLR4 i kostimulatora CD14 [59]. Rezultati drugih studija sugeriraju da je TLR4 eksprimiran jedino na IEC koji se nalaze u intestinalnim kriptama [60]. Isto tako, prisustvo TLR5 koji prepoznaje bakterijski flagelin je ograničen samo na bazolateralnu stranu IEC, što omogućava da do aktivacije dođe samo ukoliko bakterija prođe u epitel [61]. Ovo sugerira da receptori na IEC neće reagovati na strukture komensalnih bakterija, ali da su pozicionirani tako da pokrenu odgovor u slučaju prodora bakterija.

Drugi predloženi mehanizam koji se smatra odgovornim za sprečavanje aktiviranja imunskog sistema u prisustvu simbiotskih bakterija uključuje supresiju epitelnih proinflammatoryh signalnih puteva od strane simbiotskih bakterija [62]

Uprkos ovim *in vitro* otkrićima, podaci dobijeni *in vivo* ukazuju da i pod normalnim, fiziološkim uslovima, simbiotske bakterije preko eksprimiranih TLR receptora na apikalnoj strani IEC aktiviraju urođene mehanizme zaštite, što ima značaj u održavanju homeostaze signalnih puteva urođenog imuniteta [21].

1.1.2 Bakterije mlečne kiseline kao probiotici

Metagenomske studije su omogućile profilisanje GI mikrobiote i otkrivanje veze između niskog diverziteta GI mikrobiote i različitih oboljenja, uključujući inflamatornu bolest creva, metabolička oboljenja i sindrom iritabilnog kolona [63]. Iako još uvek nije ustanovljena jasna uzročno-posledična veza između smanjenog diverziteta mikrobiote i bolesti, ono što se zna je da primena antibiotika u ranom uzrastu predstavlja značajan faktor rizika za razvoj inflamatornog oboljenja creva i gojaznosti, što navodi na zaključak da izostanak određenih komensalnih bakterija u GIT-u može imati posledice po zdravlje u kasnijem periodu života [63]. Ova opažanja podržavaju hipotezu da sve više ranjiva humana mikrobiota i naročito poremećena kolonizacija, igraju važnu ulogu u etiologiji velikog broja oboljenja savremenog društva [63]. Hipotetički, zamena komensalnih bakterija koje nedostaju sa pojedinačnim sojevima ili definisanom kombinacijom sojeva, u cilju vraćanja i održavanja ravnoteže u mikrobioti, može imati značaj u prevenciji i

tretmanu poremećaja koja su posledica poremećene homeostaze u GIT-u [63]. Zbog toga je poslednjih godina veoma aktuelna oblast istraživanja u kojima se sastav GI mikrobiote reguliše primenom korisnih bakterija, odnosno probiotskih mikroorganizama.

Prema definiciji Svetske Zdravstvene Organizacije, probiotici su živi mikroorganizmi koji primenjeni u adekvatnoj količini imaju povoljne efekte na zdravlje domaćina [64], iako i mrtve bakterije i molekulske komponente bakterija takođe mogu da ispolje određene probiotske efekte [65]. Pod pojmom probiotskih bakterija koje su označene kao bezbedne za humanu upotrebu misli se većinom na BMK. BMK se koriste hiljadama godina u proizvodnji fermentisanih proizvoda u kojima vrše fermentaciju šećera do mlečne kiseline, po čemu su i dobile naziv, a prvi put su i izolovane iz mleka. S obzirom na to da se procenjuje da fermentisani mlečni proizvodi čine skoro trećinu humane ishrane, predstavljaju glavni izvor ovih bakterija u ishrani ljudi [20]. Pored nutritivnog značaja, smatra se da konzumiranje BMK i njihovih fermentisanih proizvoda ima povoljne efekte na zdravlje, što je i uticalo na to da BMK budu najčešće korišćeni probiotski mikroorganizmi [66]

Generalno je prihvaćeno da su BMK Gram+ bakterije, uglavnom katalaza-negativne bakterije, koje rastu u mikroaerofilnim ili strogo anaerobnim uslovima. BMK obuhvataju širok opseg rodova sa velikim brojem vrsta, a najznačajnije su: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Weissella* [67]. U stvari, bifidobakterije ne pripadaju BMK jer se filogenetski razlikuju od ostalih nabrojanih rodova, a poseduju i jedinstvene puteve za fermentaciju šećera koji su specifični samo za rod *Bifidobacterium*. Međutim, neki ih autori zbog sličnosti u fiziološkim i biohemijskim osobinama, kao i zbog toga što dele ista staništa sa drugim BMK, ubrajaju u BMK. Vrste koje pripadaju nabrojanim rodovima se mogu naći u namirnicama dobijenim postupkom fermentacije, ali su i sastavni deo mikrobiote na mukoznim membrana GIT-a, usta, kože i urogenitalnog trakta ljudi i životinja [67, 68].

Sama ideja o pozitivnim efektima BMK na zdravlje ljudi nije nova, s obzirom da je još *Metchnikoff* početkom 20. veka predložio da laktobacili mogu biti korisni u borbi protiv infekcija GIT-a i doprineti dugovečnosti. Takvi organizmi ne moraju biti obavezno sastavni deo mikrobiote domaćina ali bi trebalo da imaju povoljne efekte na opšte i zdravstveno

stanje ljudi i životinja [69]. Spektar probiotskih efekata je dosta širok, a neki od fizioloških efekata ne zahtevaju prisustvo živih, vijabilnih ćelija. Međutim, uzimajući u obzir funkcionalnost, mrtvi mikroorganizmi se ne smatraju probioticima, pa je svakako jedan od najvažnijih zahteva za primenu probiotskih mikroorganizama zahtev da budu u vijabilnom stanju u trenutku ingestije, kako bi ispoljili povoljni efekat na zdravlje domaćina [68]. Takođe, prema definiciji, pod probioticima se smatraju živi mikroorganizmi uzeti u dovoljnom broju. Drugim rečima, da bi ostvarili povoljne efekte potrebno ih je konzumirati u adekvatnoj količini, (minimum 10^9 CFU (*Colony-Forming Unit*)), u toku dužeg vremenskog perioda [63]. Količina probiotskih mikroorganizama u preparatima bi svakako trebalo da se zasniva na onim količinama koje su pokazale efikasnost u sprovedenim studijama.

BMK sa probiotskom aktivnošću su uglavnom, ali ne i obavezno, sastavni deo intestinalne mikrobiote, a najčešće korišćeni sojevi pripadaju vrstama iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* [70]. U Tabeli 1 su prikazane najčešće korišćene BMK kao probiotici.

Tabela 1. Najčešće korišćene BMK kao probiotici

<i>Lactobacillus</i> vrste	<i>Bifidobacterium</i> vrste	Ostale BMK
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L.rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L.plantarum</i>	<i>B. breve</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>infantis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	
<i>L. bulgaricus</i>		
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. salivarius</i>		
<i>L. lactis</i>		

Laktobacili se mogu naći u svim sredinama u kojima su dostupni ugljeni hidrati, kao što su različiti fermentisani proizvodi, a naseljavaju i respiratorni, urogenitalni i gastrointestinalni trakt. Što se tiče zastupljenosti u mikrobioti GIT-a, laktobacili su najdominantniji članovi mikrobiote ileuma, a zajedno sa predstavnicima roda *Enterococcus* čine oko 1% fekalne bakterijske populacije [71, 72]. Takođe, među *Lactobacillus* vrstama razlikujemo one vrste koje su deo stalne (rezidentne) GI mikrobiote, kao što su *L. gasseri* i *L. reuteri* i vrste koje predstavljaju tranzitnu mikrobiotu, kao što su *L. plantarum*, *L. rhamnosus* i *L. paracasei* [20]. Rod *Lactobacillus* pripada domenu *Bacteria*, tipu *Firmicutes*, klasi *Bacilli*, redu *Lactobacillales*, familiji *Lactobacillaceae*, i sastoji od velikog broja vrsta i sojeva koji imaju različite karakteristike, kako metaboličke, tako i strukturalne [73, 74].

Razlog za široku primenu laktobacila kao probiotika jeste saznanje da su laktobacili poželjni članovi intestinalne mikrobiote i pokazuju povoljne zdravstvene efekte. To je rezultiralo poslednjih decenija u njihovoj povećanoj upotrebi u proizvodnji jogurta i drugih fermentisanih mlečnih proizvoda, što je ove proizvode svrstalo u kategoriju funkcionalne hrane [75]. S obzirom da su sastavni deo GI mikrobiote i imaju mali rizik za izazivanje infekcija, označeni su kao bezbedni za upotrebu (engl. *Generally Regarded As Safe*, GRAS) [76].

Kako bi neki soj bio okarakterisan kao probiotski, mora da ispuni veliki broj kriterijuma, i da bude ispitan kako *in vitro*, tako i *in vivo*. Kriterijumi za selekciju probiotskih mikroorganizama dati su u Tabeli 2.

Jedan od najvažnijih kriterijuma za selekciju probiotskih mikroorganizama je adhezija za intestinalnu mukozu, s obzirom da je ova osobina od ključne važnosti za ispoljavanje imunodulatorne aktivnosti primenjenog soja [77, 78]. Važan zahtev u pogledu ispoljavanja ove aktivnosti je i privremena kolonizacija GIT-a od strane primenjenog soja. Razlog tome je činjenica da ukoliko soj postane deo rezidentne GI mikrobiote neće i njegov potencijal za stimulaciju imunskog sistema domaćina jer prema rezidentnoj mikrobioti domaćin ima razvijenu imunsku toleranciju [78].

Tabela 2. Kriterijumi za selekciju probiotika za komercijalnu primenu [79]

Generalni zahtevi	Karakteristike
Bezbednosni kriterijumi	<i>Poreklo Patogenost i infektivnost vrste/soja Faktori virulencije – toksičnost, metabolička aktivnost, senzitivnost na antibiotike</i>
Tehnološki kriterijumi	<i>Genetički stabilni sojevi Visoka vijabilnost tokom tehnoloških procesa i čuvanja Dobre senzorne karakteristike Rezistencija na bakteriofage</i>
Funkcionalni kriterijumi	<i>Tolerancija na želudačnu kiselinu Tolerancija na žučne soli Adhezija na mukoznu površinu Validirani i dokumentovani zdravstveni efekti</i>
Poželjni fiziološki kriterijumi	<i>Imunomodulacija Antagonistička aktivnost u odnosu na GI patogene Aktivnost u metabolizmu holesterola (prisustvo holesterol-esteraze) Aktivnost u metabolizmu laktoze (prisustvo laktaze) Antimutagene i antikancerogene aktivnosti</i>

Mehanizmi delovanja probiotskih mikroorganizama mogu varirati od soja do soja i u većini slučajeva predstavlja kombinaciju aktivnosti, što otežava otkrivanje konkretnog mehanizma odgovornog za dejstvo. Generalno, mogu se razlikovati tri nivoa aktivnosti probiotskih mikroorganizama [80] :

- 1) probiotici mogu ispoljiti povoljan efekat na zdravlje ljudi interagujući sa mikroorganizmima na mestu delovanja (antagonističko dejstvo na patogene bakterije redukovanjem luminalnog pH, inhibiranjem adhezije bakterija za IEC i translokacije, produkovanjem antimikrobnih supstanci, kompeticijom za nutrijente)
- 2) ojačavanjem intestinalne mukozne barijere (promocijom sekrecije mukusa, ojačavanjem intercelularnih veza)
- 3) uticajem na imunski sistem domaćina (imunostimulacijom i imunosupresijom imunskog sistema)

Širok spektar potencijalno korisnih efekata dovodi se u vezu sa probioticima što je i prikazano u Tabeli 3.

Tabela 3. Potencijalni i potvrđeni zdravstveni efekti povezani sa primenom probiotika [68]

Povoljni zdravstveni efekti	Predloženi mehanizam
Ublažavanje simptoma kod sindroma iritabilnih creva	<i>Modulacija GI mikrobiote, inhibicija produkcije gasova u GIT-u</i>
Kontrola inflamatornih oboljenja creva (Kronova bolest, ulcerativni kolitis)	<i>Modulacija GI mikrobiote, modulacija imunskog odgovora</i>
Kontrola i prevencija atopijskog dermatitisa	<i>Modulacija imunskog odgovora</i>
Prevencija KVO/uticaj na nivo holesterola u krvi	<i>Asimilacija holesterola od strane bakterijskih ćelija; dekonjugacija žučnih kiselina produkovanjem hidrolaza od strane bakterija, vezivanje holesterola za bakterijski zid, redukcija hepatične sinteze holesterola i/ili redistribucija holesterola iz plazme u jetru preko produkcije SCFA</i>
Prevencija i smanjenje trajanje dijareja izazvanih bakterijama/virusima	<i>Modulacija GI mikrobiote, produkcija antimikrobnih supstanci, kompeticija sa patogenima za ista adhezivna mesta, stimulacija sekrecije mukusa, modulacija imunskog odgovora</i>
Prevencija/tretman infekcije izazvane <i>H. pylori</i>	<i>Produkcija antimikrobnih supstanci, kompeticija sa patogenima za ista adhezivna mesta, stimulacija sekrecije mukusa, stimulacija specifičnog i nespecifičnog imunskog odgovora</i>
Smanjenje simptoma intolerancije na laktozu	<i>Efekat bakterijske β-galaktozidaze na laktozu</i>
Skraćenje vremena tranzita kroz kolon	<i>Uticaj na peristaltiku bakterijskom produkcijom metabolita</i>
Prevencija urogenitalnih infekcija	<i>Produkcija antimikrobnih supstanci, kompeticija sa patogenima za ista adhezivna mesta</i>
Antikancerogena aktivnost	<i>Inhibicija transformacije pro-kancerogena u aktivne kancerogene, vezivanje/inaktivacija mutagenih jedinjenja, supresija rasta bakterija sa pro-kancerogenom aktivnošću, povećanje imunske funkcije, aktivacija NK ćelija, redukcija apsorpcije karcinogena</i>

Do sada je sproveden značajan broj istraživanja o efektima primene BMK u različitim patološkim stanjima i oboljenjima kao što su dijareja, gastroenteritis, inflamatorna

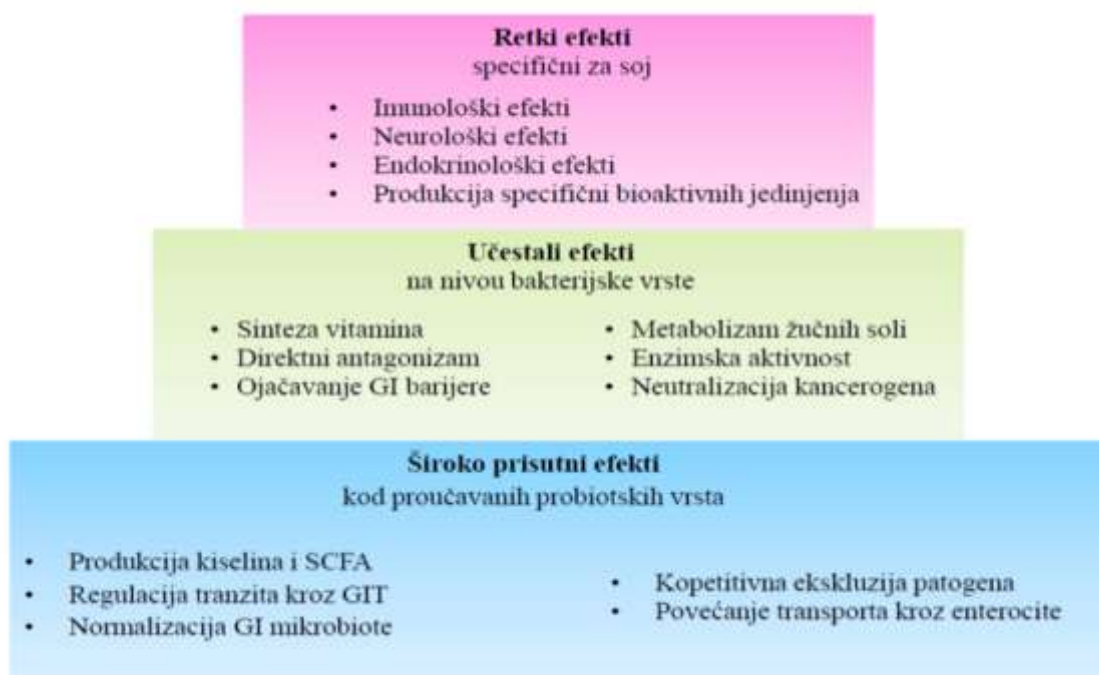
oboljenja creva, alergije odojčadi, hiperlipidemije, hronična oboljenja jetre i dr. [80, 81]. Neke od ovih efekata, kao što je skraćenje vremena tranzita kroz GIT, prevencija i tretman dijareje, smanjenje intolerancije na laktozu, našli su i svoju kliničku primenu, dok ostali efekti zahtevaju dodatna istraživanja. Ono što je svakako najvažnije da rezultati brojnih studija ukazuju na veliki potencijal probiotika, kako u prevenciji, tako i u tretmanu različitih oboljenja.

Međutim, ono što se ne sme zanemariti to je da su ovi efekti ne samo specifični za bakterijsku vrstu, već i za različite sojeve u okviru iste vrste. Naime, različiti sojevi u okviru iste vrste su najčešće jedinstveni, i mogu se razlikovati po specifičnom mestu za vezivanje u GIT-u, ali i u načinu na koji interaguju sa imunskim sistemom sisara [82, 83], što je od ključne važnosti kada se određuje oblast primene izabranog probiotskog soja. Međutim, Internacionalna Naučna Asocijacija za Probiotike i Prebiotike (engl. *The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics*) u svom izveštaju objavljenom 2014. godine navodi da postoji dovoljan broj dokaza da se ustanovi koncept „suštinske“ korist od primene određenih probiotika [63]. Ovaj koncept se zasniva na velikom broju dokaza proizašlih iz humanih studija i meta-analiza koje podržavaju postojanje zajedničkih korisnih efekata od konzumiranja adekvatne doze bilo kog soja. Sojevi bi trebalo da pripadaju vrstama probiotika koje su se pokazale kao efikasne i koje se već decenijama koriste u ishrani ljudi. U svom izveštaju Asocijacija daje potencijalnu distribuciju povoljnih efekata koji su široko rasprostranjeni među većinom probiotika, zatim onih koji su učestale i najverovatnije specifični na nivou vrste i efekte koji su retki, odnosno karakteristični za soj, što je i prikazano na Slici 2.

S obzirom da se probiotski mikroorganizmi uzimaju u vijabilnom obliku i to u visokim dozama, najmanje 10^9 CFU po jednoj dozi, u dužem vremenskom periodu, pitanje bezbednosti je od ključnog značaja. Generalno, sojevi BMK koji se koriste kao probiotici su generalno označeni kao bezbedni (GRAS status). Takođe, pitanjem bezbednosti probiotskih mikroorganizama se bavi i Evropska Agencija za bezbednost hrane (engl. *European Agency of Food Safety, EFSA*) koja je na osnovu procene rizika najčešće korišćenih bakterijskih sojeva, ali i drugih mikroorganizama koji se koriste u proizvodnji hrane, dala svoju listu pod nazivom „Kvalifikovana Pretpostavka Bezbednosti“ (engl.

Qualified Presumption Safety, QPS) [84]. QPS lista služi kao smernica za bezbedni odabir probiotskih mikroorganizama pri proizvodnji hrane i dijetetskih suplemenata.

Neželjeni efekti primene probiotika su retki i uglavnom uključuju flatulenciju i promene u peristaltici creva. Takođe, jako su retki slučajevi infekcije uzorkovani laktobacilima i bifidobakterijama i procenjeno je da su bili uzročnici u oko 0,05-0,4% slučajeva infektivnog endokarditisa i bakterijemije [85]. I pored navedenog, smatra se da primena probiotika može biti rizična samo za imunokompromitovane osobe. Još jedan važan bezbednosti aspekt primene laktobacila kao probiotika je prisustvo mobilnih gena za restistenciju na antibiotike [80]. Odsustvo antimikrobne rezistencije je jedan od najvažnijih kriterijuma za evaluaciju bezbednosti primene laktobacila kao starter kulture i kao probiotika [86]. Međutim, još uvek nema dovoljno podataka koji mogu da ukažu pod kojim uslovima će doći do mobilizacije gena za rezistenciju na antibiotike ka drugim mikroorganizmima i da li ovo može da postane klinički problem [80].



Slika 2. Mehanizmi dejstva karakteristični za proučavane probiotike i specifičnosti efekata na nivou vrsta i sojeva [63]

1.1.3 Bakterije mlečne kiseline i imunski sistem

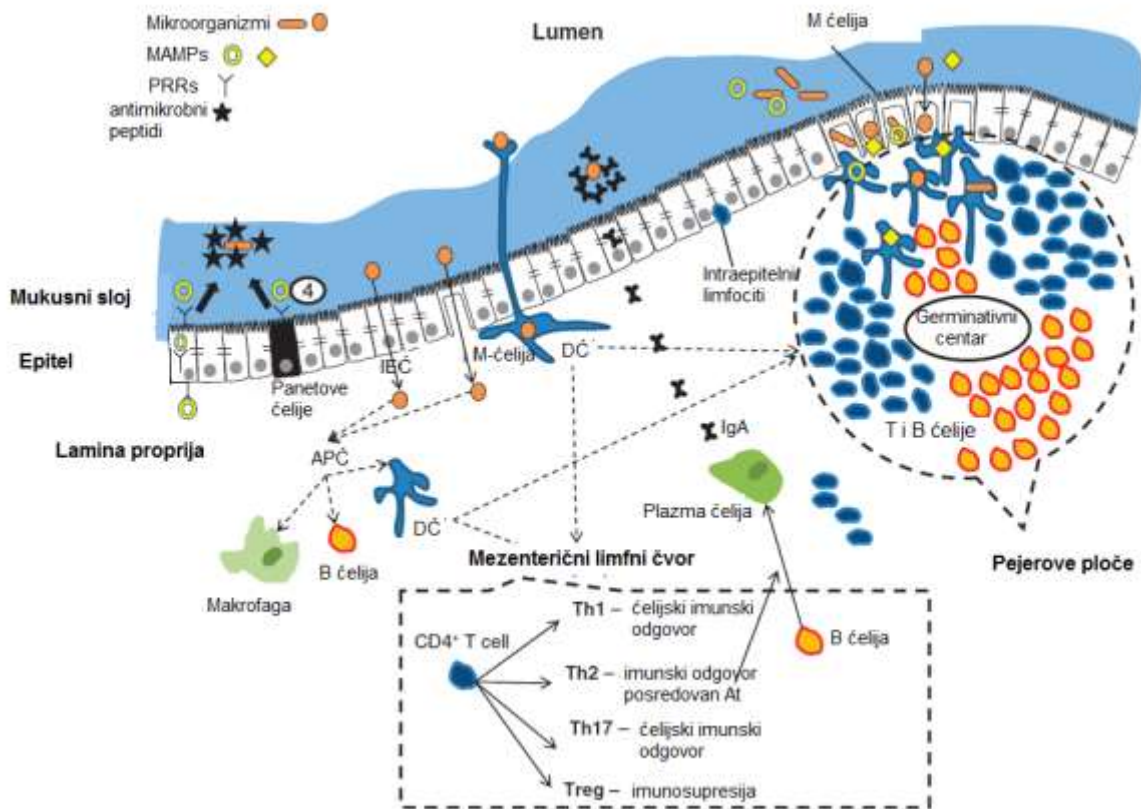
Veliki broj povoljnih efekata se dovodi u vezu sa primenom BMK kao probiotika, uključujući prevenciju inflamatornih oboljenja (creva), prevenciju i tretman atopijskih bolesti i dr. Ovi povoljni efekti su jednim delom posredovani sposobnošću probiotskih mikroorganizama da moduliraju urođene ili stečene imunske odgovore, što poslednjih decenija zaokuplja veliku pažnju naučne javnosti [87]. S obzirom da se probiotici unose oralnim putem, njihov prvi kontakt sa imunskim sistemom domaćina se dešava u kontaktu sa mukozom GI trakta koja sadrži čak 70% svih imunskih ćelija organizma. Iako imunski odgovor intestinalne mukoze pokazuje nekoliko zajedničkih karakteristika sa imunskim odgovorom drugih organa, on ima i svoje specifičnosti, uzimajući u obzir veliki površinu GI mukoze i veliki broj antigena kojim je izložen. Takođe, imunski sistem GI mukoze je regulisan kompleksnim procesima koji mu omogućavaju eliminaciju patogenih mikroorganizama, dok sa druge strane omogućavaju održavanje tolerancija na simbiotske bakterije i antigene hrane [88]. Važno je naglasiti da ključnu ulogu u razvoju kompletno funkcionalnog i balansirano mukoznog imunskog sistema ima mikrobiota [88].

Imunski sistem intestinalne mukoze je obezbeđen od strane limfoidnog tkiva povezanog sa crevnim traktom (engl. *Gut-Associated Lymphoid Tissue*, GALT), koji je najveće limfoidno tkivo u organizmu. GALT se sastoji od organizovanog limfoidnog tkiva kao što su Pajerove ploče (locirane uglavnom u ileumu), mezenteričnih limfnih čvorova i izolovanih limfoidnih folikula, ali i od neorganizovanih efektorskih mesta koje čine intraepitelijalni limfociti i imunokompetentne ćelije raspoređeni duž lamine proprije [89]. Dodatni nivo zaštite od prodora mikroorganizama je prisustvo tankog sloja gustog mukusa koji sprečava direktan kontakt mukoze sa mikroorganizmima. Komponente imunskog sistema intestinalne mukoze su date na Slici 3.

Nekoliko studija na ljudima i životinjama je pokazalo da određene probiotske vrste koje pripadaju BMK (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* subsp. *paracasei* i *Bifidobacterium longum*), imaju sposobnost da stimulišu i regulišu nekoliko aspekata urođenog i stečenog imunskog odgovora [90]. Mehanizmi kojim probiotici moduliraju imunske funkcije nisu u potpunosti razjašnjeni, ali svakako iniciranje imunskog odgovora počinje interakcijom ovih

bakterija sa IEC. Ova interakcija je važna za kontrolisanu produkciju citokina i hemokina sekretovanih od strane IEC koji dovode do modulacije imunskog sistema mukoze [88]. Naime, pokazano je da neke BMK mogu *in vitro* modulirati ekspresiju pro- i antiinflamatornih molekula, a ovaj efekat je bio specifičan u zavisnosti od primenjenog soja. Razlog specifičnosti u ispoljenim efektima različitih sojeva leži u činjenici da je sposobnost različitog bakterijskog soja da indukuje različite citokine, posredovano velikim delom komponentama ćelijskog zida tog soja [91]. Interakcija između probiotskih bakterija i imunskih ćelija, kao što su IEC, makrofage i dendritske ćelije, dešava se između regiona prisutnih na bakterijskom ćelijskom zidu, odnosno MAMP molekula i PRR receptora, uglavnom TLR receptora, prisutnim na površini ovih ćelija [92]. Iako je prisustvo MAMP molekula odlika mnogobrojnih bakterija, njihova hemijska struktura može varirati od soja do soja, i to u pogledu polimerne strukture, dužine i vrste supstituenata, čime se delimično može objasniti specifičnost između sojeva u pogledu indukovanja imunskog odgovora [93]. Tako je pokazano da je peptidoglikan (MAMP molekul) uključen u indukciju IL-12 u splenocitima, dok je teihojna kiselina uključena u stimulaciju produkcije TNF- α u makrofagima i splenocitima [91].

Sem interakcije probiotskih bakterija sa TLR receptorima, postoje dokazi koji govore da probiotici mogu dospeti do imunskog sistema mukoze, odnosno do imunskih ćelija u limfoidnim folikulama, gde dovode do aktiviranja stečenog imunskog odgovora [94]. Naime, probiotici bivaju internalizovani od strane M ćelija mukoze, koje su specijalizovane da apsorbuju i transportuju antigene kroz epitel ka limfoidnim folikulima. Takođe, veliki broj patogena koristi M ćelije kako bi prošao kroz intestinalnu mukozu i na taj način zaobišao odbrambene mehanizme mukozne barijere [95]. Studija u kojoj je korišćen fluorescentno obeležen lactobacil (*L. casei*), pokazala je da se nakon 10 minuta od oralno primenjenog probiotika, fluorescencija se detektuje u imunskim ćelijama u Pajerovim pločama i u lamini propriji u tankom crevu, kao i u imunskim ćelijama u kriptama i limfnim čvorovima kolona [96]. Ova studija je potvrdila da probiotici ili njihovi produkti, mogu dospeti u imunski sistem mukoze i inicirati specifični imunski odgovor.



Slika 3. Komponente urođenog i stečenog imunskog odgovora intestinalne mukoze [57]

1.1.3.1 BMK i urođeni imunski odgovor

Urođeni imunitet formira prvu liniju odbrane domaćina protiv patogena. Najvažnije ćelije uključene u reakcije urođene imunosti su mononuklearne fagocitne ćelije (monociti i makrofage), NK ćelije (engl. *Natural Killer Cells*, NK) i dendritske ćelije, ali i IEC, kao i sekretovani citokini [97]. Naime, poznato je da nekoliko sojeva BMK može *in vitro* da indukuju oslobađanje proinflamatornih citokina, kao što su TNF- α i IL-6, a *in vivo* aktiviraju produkciju makrofaga, što reflektuje stimulaciju nespecifičnog imunskog odgovora od strane ovih bakterija [98]. Takođe, mnoge BMK (uglavnom lactobacili i bifidobakterije) mogu da utiču na mehanizme urođene imunosti kao što je fagocitoza, povećavajući fagocitnu sposobnost mononuklearnih i polimorfonuklearnih ćelija periferne krvi [88].

Dalje, postoje dokazi koji sugerišu da BMK mogu da regulišu aktivnost NK ćelija. Pokazano je da konzumiranje *B. lactis* HN109 i *L. rhamnosus* HN001 značajno povećava citotoksični potencijal NK ćelija, pri čemu, nakon prestanka uzimanja probiotika, dolazi do smanjenja ovog efekta [99, 100]. Takođe, primena *L. casei* Shirota dovodi do povećanja aktivnosti NK ćelija i ova aktivnost je povezana sa produkcijom IL-12, citokina uključenog u aktivnost NK ćelija [101]. Naime, IL-12 je imunomodulatorni citokin koji posreduje u produkciji INF- γ (*Interferon- γ*) od strane T i NK ćelija i povećava njihovu citotoksičnu aktivnost protiv intracelularnih patogena i tumorskih ćelija [102].

Primena BMK može uticati na produkciju citokina od strane IEC, što je i pokazano u studiji u kojoj je primena vijabilnih ćelija *L. plantarum* 299v *in vitro* dovela do produkcije IL-8 od strane enterocita stimulisanih TNF- α [103]. IL-8 je glavni citokin produkovan od strane IEC nakon kontakta sa probiotskim mikroorganizmima, a ima ulogu neutrofilnog hemoatraktanta [88]. Probiotski sojevi se razlikuju i u sposobnosti da povećaju ekspresiju IL-8, mada neki sojevi dovode i do smanjenja produkcije IL-8 od strane IEC. U prisustvu probiotskih bakterija, IEC mogu produkovati i proinflamatorni citokin IL-6 [104, 105]. Rezultati ovih studija ukazuju da interakcija probiotskih bakterija, pre svega BMK, sa intestinalnom mukozom, dovodi do produkcije citokina od strane IEC, što najverovatnije predstavlja inicirajući događaj u probiotskoj imunomodulatornoj aktivnosti.

1.1.3.2 BMK i stečeni imunski odgovor

Stečeni imunski odgovor podrazumeva prisustvo B i T limfocita. Njegove glavne odlike su specifičnost i memorija, a prepoznavanjem i pamćenjem velikog broja antigena, a pruža efektivniju zaštitu u poređenju sa urođenim imunitetom. B ćelije učestvuju u imunskoj reakciji produkovanjem antitela i obezbeđuju odbranu od ekstracelularnih mikroorganizama (humoralna imunost), dok T ćelije učestvuju u odbrani od intracelularnih mikroorganizama (celularna imunost). U zavisnosti od mehanizma dejstva, T ćelije se mogu podeliti u pomoćničke T-limfocite (CD4+) (*Thelper*, Th) i u citotoksične (CD8+) T-limfocite. Važno je napomenuti da su ćelije urođene imunosti od ključnog značaja za iniciranje reakcije stečene imunosti. Tako dendritske ćelije (DC), zajedno sa makrofagama i monocitima,

predstavljaju važnu vezu između urođene i stečene imunosti, s obzirom na njihovu ulogu kao antigen prezentujućih ćelija (APĆ). Naime, aktivacija APĆ predstavlja prvi korak u pokretanju odgovora stečene imunosti [106].

Studije su pokazale da određene vrste BMK (*B. bifidum*, *L. acidophilus* La1) imaju sposobnost da stimuliraju produkciju IgA od strane B ćelija, pomažući održavanje intestinalne humoralne imunosti vezivanjem antigena i na taj način limitiraju njihov pristup epitelu [88]. Uticaj probiotika na humoralni imunitet je delimično određen sposobnošću primenjenog soja da kolonizuje GIT. Prilikom testiranja dve vrste BMK (*L. johnsonii* i *L. paracasei*) koja *in vitro* pokazuju slične karakteristike, *L. johnsonii* je pokazao bolju sposobnost kolonizacije GIT-a miša i doveo do jače indukcije sekrecije intestinalnog IgA [107]. Pored indukcije mukoznog IgA odgovora, određeni sojevi BMK mogu dovesti do povećanja ukupnog serumskog nivoa IgA i samim tim pokazati sistemski imunski efekat (kao npr. *B. bifidum* Bb-11) [108].

APĆ, pre svega DĆ, imaju ključnu ulogu u determinisanju Th1/Th2 balansa i razvoju imunske tolerancije [57]. S obzirom na važnu ulogu dendritskih ćelija u kontroli imunskog odgovora, pretpostavlja se da probiotici moduliraju imunski odgovor kroz uticaj na sazrevanje DĆ. DĆ mogu uticati da CD4⁺ T ćelije diferenciraju u različite Th ćelije (Th1, Th2 i Th17) ili u regulatorne T-ćelije (Treg) (Slika 2.) [57].

Prilikom izlaganja DĆ iz koštane srži različitim vrstama laktobacila, pokazano je da različiti laktobacili pokazuju veoma različite, čak i suprotne efekte na aktivaciju DĆ [109]. Ovo je ukazalo na činjenicu da od primene određene vrste probiotskih bakterija može zavisiti i krajnji ishod imunskog odgovora, uzimajući u obzir da DĆ imaju ključnu ulogu u indukciji antigen-specifičnog imunskog odgovora kao tolerancija ili kao Th1/Th2/Th17 odgovor. Th1 i Th2 ćelije se razlikuju po vrsti citokina koji se proizvode, kao i u odgovoru i u imunskim reakcijama u kojima su uključeni. Th1 ćelije proizvode proinflamatorne citokine kao što su INF- γ , TNF α i IL-12, dok Th2 ćelije proizvode citokine kao što su IL-4, IL-5, IL-6 i IL-13. Citokini proizvedeni od strane Th1 ćelija stimuliraju fagocitozu i destrukciju intracelularnih patogena, dok Th2 citokini, kao što je IL-4, stimuliraju produkciju antitela usmerenih protiv ekstracelularnih patogena, dok IL-5 stimulira odgovor eozinofila na ekstracelularne parazite [106]. Balans između produkcije citokina između Th1 i Th2

ćelija određuje pravac i krajnji ishod imunskog odgovora. Prekomeran Th1 imunski odgovor je povezan sa hroničnim inflamatornim oboljenjima, a prekomerni Th2 odgovor se nalazi u osnovi alergijskih reakcija [88].

Rezultati određenih studija ukazuju da određeni probiotici mogu uticati na DĆ u smeru razvoja regulatornih T ćelija [110]. Postoji više vrsta regulatornih ćelija koje se razlikuju po fenotipu i mehanizmu dejstva kao što su antigenom indukovani tip 1 Treg ćelije koje sekretuju visok nivo citokina IL-10 i nizak ili umeren nivo citokina TGFβ (*Transforming Growth Factor*) i prirodno prisutne regulatorne T ćelije CD4+CD25+ (Treg), poreklom iz timusa, koje inhibiraju imunске reakcije u direktnom kontaktu sa ćelijama [57, 88]. Važno je reći da regulatorne T ćelije imaju imunosupresivnu funkciju i ključnu ulogu u indukciji periferne tolerancije na sopstvene i strane antigene [57]. Rezultati studija ukazuju da mnogi sojevi BMK, *in vitro*, ali i *in vivo*, pokazuju antiinflamatorno dejstvo, stimulišući DĆ da indukuju diferencijaciju CD4+ ćelija u T ćelije sa imunoregulatornim karakteristikama [88]. Međutim, određeni sojevi laktobacila aktiviraju DĆ da produkuju visoke nivoe citokina IL-12 i IL-18, što vodi nastanku proinflamatornog (Th1) imunskog odgovora [87]. Takođe, skoro svi sojevi vrste *L. casei* dovode do produkcije visokih nivoe proinflamatornih citokina IL-12 i to stimulacijom makrofaga [111].

Mnoge studije ukazuju da probiotici favorizuju produkciju citokina IL-10, koji je proizvod sekrecije mnogih imunskih ćelija, uključujući Th2 ćelije, DĆ, monocite, B ćelije i regulatorne T ćelije. IL-10 je antiinflamatorni citokin i primarno deluje kao inhibitor Th1 odgovora [112]. IL-10 je i kritični citokin za održavanje tolerancije na komensalne bakterije. U njegovom odsustvu, dolazi do razvoja ozbiljne intestinalne inflamacije, a primena sojeva BMK koji su indukovali produkciju IL-10, dovodi do smanjenja inflamacije [113, 114].

Iz svega navedenog se zaključuje da svaki probiotik utiče na imunski sistem na specifičan način, odnosno imunomodulatorni efekat je specifičan za svaki soj, pa se povoljni efekat koji ispolji jedan soj ili vrsta, ne mogu generalizovati za svaki probiotik. Zbog toga bi efikasnost svakog probiotskog soja trebalo prvo ispitati u dobro dizajniranoj studiji. Još jedan važan aspekt primene probiotika u cilju ispoljavanja poželjnog efekta je činjenica da će ovaj efekat u značajnog meri zavisiti od zatečenog imunskog stanja. Drugi, ali ne manje

važan aspekt primene probiotika od koga će zavisti konačan efekat primene, je i sastav GI mikrobiote domaćina, pa bi individualni pristup svako bilo nešto što je poželjno i na čemu će se u bliskoj budućnosti insistirati.

1.1.4 Dejstva bakterija mlečne kiseline na metaboličke parametre

Brojni dokazi ukazuju da je konzumiranje fermentisanih mlečnih proizvoda, najvažnijeg izvora BMK u ishrani, povezano sa smanjenim rizikom za dijabetes tipa 2, boljom regulacijom homeostaze glukoze, manjom telesnom masom i smanjenim opštim rizikom za smrtnost [63]. U opservacionoj studiji koja je uključila više od 6500 ljudi utvrđeno je da osobe koje svakodnevno konzumiraju jogurt imaju niže nivoe serumskih triglicerida i glukoze, niže vrednosti sistolnog krvnog pritiska i niži stepen insulinske rezistencije, u poređenju sa osobama koje ne konzumiraju jogurt [115]. Za sve ove korisne efekte primene fermentisanih mlečnih proizvoda uglavnom se smatraju odgovornim BMK. Što se tiče efekata primene BMK kao probiotika, rastući je broj dokaza koji ukazuju da primena BMK može ispoljiti povoljne efekte u tretmanu komponenata metaboličkog sindroma, kao što su gojaznost, dijabetes tip 2, dislipidemije, nealkoholna masna bolest jetre [116-119]. Razlog tome su dokazi koji sve više ukazuju na direktnu vezu između mikrobiote i metaboličkih poremećaja, odnosno da je GI mikrobiota ključni faktor u nastanku gojaznosti i pridruženih komorbiditeta. Kako se probiotici definišu kao živi mikroorganizmi koji ispoljavaju povoljan zdravstveni efekat modulacijom GI mikrobiote, povoljan efekat probiotika u ovim stanjima se ne može objasniti bez poznavanja osnovnih metaboličkih funkcija i karakteristika mikrobiote [120].

GI mikrobiota se smatra punopravnim organom koji je uključen u regulaciju velikog broja fizioloških puteva i ima uticaja na različite funkcije domaćina [121]. Uticaj mikrobiote na metaboličke funkcije se ogleda u produkciji vitamina, biotransformaciji žučnih soli, esencijalnoj ulozi u fermentaciji nedigestibilnih polisaharida, apsorpciji nutrijenata [12]. Kroz biotransformaciju žučnih soli, aktivnošću enzima koje poseduju određeni članovi mikrobiote, mikrobiota se uključuje i u metabolizam holesterola, glukoze ali i u regulaciju

energetske potrošnje [37, 122]. GI mikrobiota se smatra i jednim od najvažnijih faktora koji utiču na iskorišćenje energije iz hrane (učestvovanjem u digestiji polisaharidi i povećanoj resorpciji monosaharida) i deponovanje masti, zbog čega se i smatra pokretačkom snagom u patogenezi gojaznosti i metaboličkih poremećaja koji su u vezi sa gojaznošću [123]. Rezultati brojnih studija su ukazali na razliku u sastavu GI mikrobiote između zdravih osoba i osoba sa prekomernom telesnom masom, gojaznih osoba i osoba koje boluju od dijabetesa tipa 2 [123]. Kao što je već rečeno, sastav GI mikrobiote je posledica interakcije između genetike domaćina i sredine, a način ishrane je najvažniji uticaj u oblikovanju intestinalne bakterijske zajednice [124]. Prvi predloženi obrazac sastava GI mikrobiote koji je povezan sa gojaznošću se odnosio na povećanje odnosa predstavnika tipa *Firmicutes* u odnosu na predstavnike tipa *Bacteroidetes* (F/B odnos), uz smanjenje bakterijskog diverziteta [125]. Nakon smanjenja u telesnoj masi, uočeno je smanjenje u F/B odnosu koji je korelirao sa procentom redukcije u telesnoj masi [125]. Umesto povezivanja celokupnog tipa *Firmicutes* sa gojaznošću, novija istraživanja ukazuju da je prisustvo konkretne vrste, koja pripada dominantnoj klasi iz ovog tipa, zajedno sa redukcijom drugih bakterijskih grupa (uključujući i bakterije koje pripadaju tipu *Bacteroidetes*), specifično povezano sa gojaznošću [126]. Ono što je svako karakteristika izmenjene mikrobiote je povećan kapacitet za iskorišćenje energije iz hrane, zajedno sa smanjenom sposobnošću da produkuje faktore u crevima koji inhibiraju deponovanje masti [25].

Dosadašnja saznanja sugerišu da profil GI mikrobiote može predstavljati novi prediktor metaboličkog oboljenja i da manipulacija mikrobiote može biti obećavajući pristup za prevenciju i tretman ovih oboljenja [127]. Ova saznanja su otvorila novu oblast primene probiotika, koja konstantno raste još od ere *Metchnikoff*-a, zahvaljujući velikom broju dokaza koji ukazuju na veliki potencijal različitih sojeva u modifikaciji metaboličkih i imunoloških parametara domaćina. Svoje pozitivno dejstvo u metaboličkim oboljenjima probiotici ispoljavaju ne samo moduliranjem GI mikrobiote, već i produkcijom bioaktivnih i regulatornih metabolita, ojačavanjem GI barijere i modulacijom imunskog sistema [128, 129]. Rezultati brojnih istraživanja ukazuju da su pozitivni efekti probiotika specifični u zavisnosti od primenjenog soja, pa je samim tim ideja o „univerzalnom soju“ koji bi pružio

sve benefite koji se vezuju za primenu probiotika, nedostižna, čak i za sojeve istih vrsta [63].

U kontekstu metaboličkih poremećaja i gojaznosti, različiti *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* sojevi su pokazali povoljne efekte na kontrolu unosa hrane, regulaciju homeostaze glukoze, smanjenje telesne mase i redukciji telesnih masti [123]. Ovi pozitivni efekti su bili ispoljeni čak i bez modifikacije kalorijskog unosa, što je i demonstrirano u sprovedenim studijama [123]. Studija u kojoj je korišćen soj *L. plantarum* LP14 pokazala je da primene ovog soja kod miševa na VSM ishrani dovodi do smanjenja veličine adipocita, smanjenja ukupnog masnog tkiva i serumskih nivoa holesterola i leptina [130]. Studija u kojoj je soj *B. breve* B-3 primenjen kod miševa na VSM ishrani, uspela je da delimično rasvetli mehanizam njegov pozitivnog dejstva. Naime, primena soja *B. breve* B-3 je dovela do dozno-zavisne supresije akumulacije masnog tkiva i ushodne regulacije gena povezanih sa metabolizmom masti i osetljivosti na dejstvo insulina u GIT-u i adipoznom tkivu [131]. Pored primene pojedinačnih sojeva, u studijama su korišćene i kombinacije više sojeva BMK, kao što je probiotik VSL#3, koji se, u poređenju sa pojedinačnim sojevima, pokazao efikasnijim u tretmanu poremećaja povezanih sa gojaznošću. Yadav i saradnici su pokazali da je ispoljeni pozitivan efekat probiotika VSL#3 na unos hrane i regulaciju tolerancije na glukoze, posledica oslobađanja hormona glukagonu-sličan protein 1 (GLP-1) koji je doveo do modulacije nekoliko gena uključenih u regulaciju unosa hrane. Oslobađanje ovog hormona iz L-ćelija intestinuma je bilo povezano sa povećanom sintezom butirata u GIT-u [132].

Potencijalni mehanizam kojim probiotici mogu smanjiti negativne efekte ishrane koja vodi ka gojaznosti je interakcija sa komensalnim bakterijama i izmena ekspresije određenih enzima, naročito onih uključenih u metabolizam polisaharida ili puteve sinteze butirata [133]. Butirati, SCFA koje nastaju bakterijskom fermentacijom nedigestibilnih polisaharida, predstavljaju izvor energije za kolonocite, a smatraju se odgovornim i za postizanje osećaja sitosti nakon unošenja hrane [125]. Takođe, jedan od pretpostavljenih mehanizama koji BMK dovode do smanjenja telesne mase, smanjenja nivoa serumskog holesterola i triglicerida, je posledica njihove sposobnosti da produkuju enzim koji hidrolizuje žučne soli [123]. Naime, brojne studije su pokazale da se žučne kiseline ponašaju kao signalni molekuli koji učestvuju u energetskej regulaciji, kao i u regulaciji

glukoze i metabolizma lipida [122, 134]. Iako je uticaj mikrobiote na energetski metabolizam kompleksan, ovi rezultati ukazuju na značaj racionalne selekcije probiotika baziranoj na specifičnim svojstvima bakterijskih sojeva, kao što je njihova sposobnost da hidrolizuju žučne soli ili povećaju sintezu butirata u kolonu.

Još jedan aspekt metaboličkih efekata primene BMK, je i njihov uticaj na sastav masnih kiselina organa kao posledica modulacije sastava masnih kiselina ćelijskih membrana [135]. U literaturi postoje podaci koji ukazuju na to da primena BMK utiče na masnokiselinski sastav organa kao što su jetra, mozak, adipozno tkivo, a primećena je i razlika u ispoljenom efektu u odnosu na primenjeni soj [135, 136]. Mehanizmi kojim primena probiotika utiče na sastav masnih kiselina organa još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Potencijalni mehanizam se odnosi na sposobnost sojeva da moduliraju resopciju određenih masnih kiselina u tankom crevu, indukuju njihovu sintezu, naročito u jetri ili da utiču na određene metaboličke puteve u biotransformaciji masnih kiselina [135, 137].

1.2 Nealkoholna masna bolest jetre

1.2.1 Definicija

Nealkoholna masna bolest jetre se definiše kao prekomerna akumulacija masti u hepatocitima (> 5%) u odsustvu prekomernog unosa alkohola ili drugih uzroka hepatične steatoze (medikamentozna terapija, nasledni poremećaji) [138, 139]. NAFLD se histološki dalje kategoriše kao nealkoholna masna jetra (engl. *Nonalcoholic Fatty Liver*, NAFL) i nealkoholni steatohepatitis (engl. *Nonalcoholic Steatohepatitis*, NASH), u zavisnosti od prisustva ili odsustva hepatocelularnog inflamatornog oštećenja, sa ili bez fibroze [139]. Obuhvata čitav spektar oboljenja, počev od hepatične steatoze preko nealkoholnog steatohepatitisa do hepatične fibroze, koja dalje može da progredira u ireverzibilnu cirozu i hepatocelularni karcinom [140-142]. Naime, dok se steatoza u odsustvu fibroze smatra relativno benignim stanjem, prisustvo fibroze predviđa, kako progresiju bolesti, tako i komplikacije vezane za jetru tokom perioda od narednih 10 godina [143, 144].

1.2.2 Epidemiologija

NAFLD je najčešći uzrok ozbiljnih i hroničnih oboljenja jetre kod odraslih i kod dece u zapadnim zemljama, sa prevalencom od 20-30% u opštoj odrasloj populaciji [145]. Prevalenca značajno raste kod osoba koje boluju od dijabetesa tipa 2 (60-76%) i kod gojaznih osoba (60-80%) i korelira sa povećanom incidencom gojaznosti i metaboličkog sindroma u zapadnim zemljama [146-149]. Neadekvatne životne i dijetarne navike dovode do konstantnog porasta ovog oboljenja, pa masna jetra poprima epidemijski karakter u zapadnim zemljama [150].

Izveštaji o proceni prevalence NAFLD se razlikuju u zavisnosti od populacije koja je analizirana, kao i od metodologije koja je korištena. Generalno, prevalenca NAFLD u Evropi iznosi 15%, u Sjedinjenim Američkim Državama 30%, a u Aziji se kreće oko 10% u opštoj populaciji, dok prevalenca raste i do 27,2% kod stanovnika koji žive u industrijskim oblastima [151, 152].

1.2.3 Tok bolesti i prognoza

Mnoge studije koje su istraživale proces progresije steatoze su otkrile da sama steatoza jako sporo histološki progredira, ali prisustvo inflamacije dovodi do progresije u steatohepatitis koji dalje vodi u cirozu [153]. Pacijenti sa blagom steatozom imaju mali rizik za razvoj uznapredovalih bolesti jetre, što je i pokazano u nekoliko longitudinalnih studija [144, 154, 155]. Međutim, prospektivna longitudinalna studija koja je uključila 52 pacijenata sa NAFLD je pokazala da će u toku tri godine čak 23% pacijenata sa blagom steatozom razviti nealkoholni steatohepatitis, a da su najvažniji faktori koji su povezani sa progresijom bolesti porast telesne mase i obim struka [156]. Ovo nam govori da prisustvo steatoze, odnosno nealkoholne masne jetre, može dovesti do ozbiljnih oboljenja jetre, naročito kod pacijenata sa visokim indeksom telesne mase (ITM) i abdominalnom gojaznošću. Naročito visok rizik za razvoj nealkoholnog steatohepatitisa imaju pacijenti koji boluju od dijabetesa tipa 2 [148]. Takođe, praćenje dugoročnih ishoda u populaciji pacijenata sa NAFLD ukazalo je na povećanu stopu smrtnosti u poređenju sa kontrolnom populacijom, kako zbog

kardiovaskularnih komplikacija (pacijenti sa NAFLD, NAFL i NASH), tako i zbog komplikacija vezanih za jetru (uglavnom pacijenti sa NASH), pri čemu je stopa smrtnosti veća kod pacijenata sa steatohepatitisom nego kod pacijenata koji imaju samo steatozu (nealkoholnu masnu jetru) [139, 144, 157, 158]. Oko 30% pacijenata sa nealkoholnom masnom jetrom razvija nealkoholni steatohepatitis, a kod 30-40% ovih pacijenata bolest će napredovati do stanja fibroze i ciroze. Kod četvrtine pacijenta sa fibrozom i cirozom jetre doći će do smrtnog ishoda u narednih deset godina, a kod oko 5% doći će do razvoja hepatocelularnog karcinoma [159]. Zbog toga je, u toku progresije bolesti, najkritičniji korak progresija od benigne steatoze do steatohepatitisa i predstavlja najveći izazov za uspešnu terapiju i dobru prognozu.

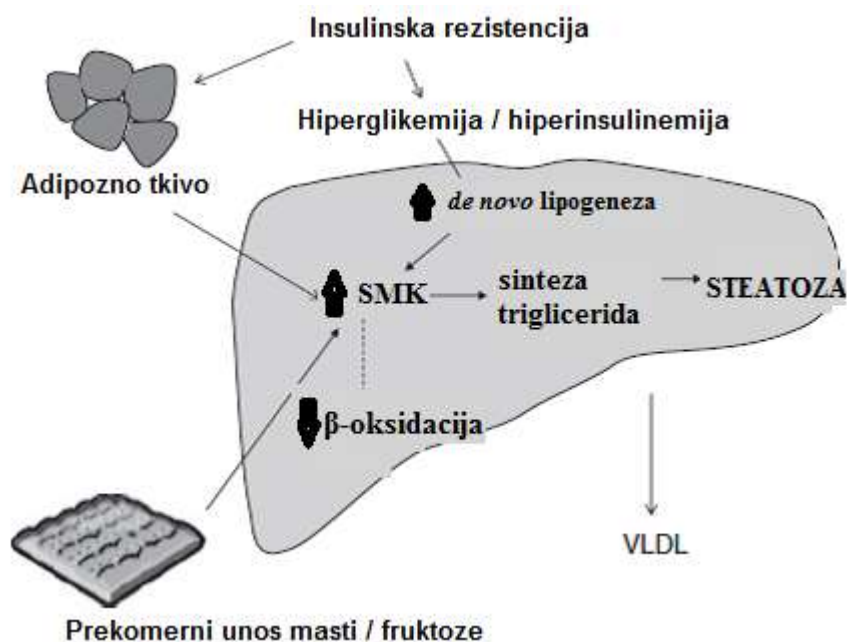
1.2.4 Patogeneza

Patogeneza NAFLD još uvek nije u potpunosti razjašnjena, ali poslednjih godina je napravljen značajan progres u razjašnjavanju mehanizma progresije oboljenja od benigne hepatične steatoze do inflamacije i fibroze jetre. Jedna od najzastupljenijih teorija koja objašnjava mehanizam nastanka NAFLD je hipoteza „dva udarca“.

Kako je jetra centralni organ metabolizma lipida i glukoze, prekomerno deponovanje energije, a samim tim i lipida, ima negativne efekte na jetru, ali i druge organe. Do razvoja steatoze, kao početne faze razvoja NAFLD, dolazi usled nakupljana triglicerida kao posledice povećanog priliva slobodnih masnih kiselina u jetru iz insulinski rezistentnog masnog tkiva, usled izmenjenog metabolizma lipida poreklom iz hrane koji se dopremaju u jetru putem lipoproteina, povećane *de novo* sinteze lipida i usled poremećenog transporta lipida iz jetre [160]. Shema mehanizma nastanka steatoze je data na Slici 40.

Smatra se da su patogenetski mehanizmi koji vode nastanku NAFLD usko povezani sa perifernom insulinskom rezistencijom i oksidativnim stresom u hepatocitima [161]. Prvi predloženi model o progresiji NAFLD dao je Day i saradnici kao hipotezu „dva udarca“ [162]. „Prvi udarac“ je akumulacija triglicerida u vidu lipidnih kapi u više od 5% hepatocita kao posledica disbalansa između ulaska i sinteze lipida sa jedne strane i β -oksidacije i izlaska sa druge [163, 164]. Naime, insulinska rezistencija dovodi do hiperaktivnosti

hormon-senzitivne lipaze u adipocitima i posledičnog povećanja nivoa slobodnih masnih kiselina (SMK) u krvi, dok u jetri stimuliše glukoneogenezu i smanjenje sinteze glikogena što izaziva povećanu proizvodnju SMK i smanjenje beta-oksidacije [161]. Kao posledice ovog procesa dolazi do akumulacije lipida, pre svega triglicerida, i nastanka steatoze. Ovo je faza benigne hepatične steatoze koja je reverzibilna, ali čini jetru podložnu „drugom udarcu“ koji uvodi jetru u inflamatorno stanje, tj. u steatohepatitis. Odnosno, posledice „prvog udara“ mogu biti kompenzovane antioksidativnim hepatičnim mehanizmima u ćelijama sve dok velika količina SMK ne dovede do prekomernog stvaranja reaktivnih kiseoničnih radikala. Radikali će u krajnjoj meri dovesti do lipidne peroksidacije što se može smatrati „drugim udarcem“ [161]. Takođe, dodatni faktor koji može pokrenuti progresiju steatoze je i prisustvo bakterijskog lipopolisaharida (LPS) i etanola, koje proizvode bakterije GI mikrobiote. Ova jedinjenja su odgovorna za indukovanje oksidativnog stresa i produkciju citokina, naročito TNF- α koji vodi oštećenju jetre [165]. U stvari, „drugi udarac“ predstavlja višestruke interakcije koje rezultuju inflamacijom i fibrozom kao posledice disbalansa pro- i antiinflamatornih faktora usled: oksidativnog stresa, mitohondrijalne disfunkcije, lipidne peroksidacije, formiranja proinflamatornih citokina, apoptoze i bakterijske endotoksemije u digestivnom traktu [162, 166]. Teorija „dva udara“ je bio važan model za razumevanje patogeneze NAFLD ali je kasnije ustanovljeno da su patofiziološke promene mnogo komplikovanije i da nisu rezultat samo dva definisana uticaja, zbog čega je kasnije predložen model „višestrukog udara“. Faktori za koje je utvrđeno da igraju važnu ulogu u progresiji bolesti, zajedno sa metaboličkim faktorima, su genetski faktor odgovorni za smanjenu sposobnost regeneracije hepatocita. Ovo se objašnjava činjenicom da određen broj pacijenata sa NAFLD imaju normalni ITM [164]. U cilju otkrivanja genetske predispozicije za ovo oboljenje sprovedeno je i više studija [167, 168].



Slika 4. Shema uprošćenog mehanizma nastanka steatoze [142]

1.2.5 Dijagnoza

Većina pacijenata sa NAFLD nema nikakvih simptoma koji su u vezi sa oboljenjem jetre. Oboljenje se otkriva najčešće slučajno tokom posete lekaru iz nekog drugog razloga kada se utvrde ili povišene vrednosti jetrenih enzima ili se ultrazvučnim nalazom utvrdi postojanje masne („svetle“) jetre [169]. Ovo je najčešći ultrazvučni nalaz kod osoba koje imaju metabolički sindrom zbog čega se ovo oboljenje i smatra hepaticnom manifestacijom metaboličkog sindroma. Odnosno, NAFLD je najčešći uzročnik abnormalnog testa funkcije jetre u zapadnim zemljama [170]. Na postojanje nealkoholnog steatohepatitisa mogu da ukažu i blago do umereno povišene (1,5-4 puta) vrednosti za enzime alanin-aminotransferaza (ALT) i aspartat-aminotransferata (AST) pri čemu su vrednosti za ALT više povišene nego za AST. Međutim, povišene vrednosti ovih enzima nisu pouzdani marker nealkoholnog steatohepatitisa, s obzirom da njihova vrednost može biti i u normalnim granica kod uznapredovalih oblika NAFLD-a [171].

Ultrasonografija je prvi dijagnostički metod za utvrđivanje prisustva „svetle“ jetre, pre svega zbog svoje visoke specifičnosti i osetljivosti, ali i zbog neinvazivnosti i široke dostupnosti [172, 173]. Ono što predstavlja ograničenje ultrasonografije je da ne može detektovati blagu steatozu (sadržaj masti u parenhimu jetre manji od 30%) i utvrditi da li se radi o steatozi, nealkoholnom steatohepatitisu ili fibrozi [174]. Zbog toga je histološka analiza tkiva jetre dobijenog biopsijom „zlatni standard“ u postavljanju dijagnoze NAFLD [175].

1.2.5.1 Histopatološka potvrda prisustva steatoze (nealkoholne masne jetre)

Kao što je već rečeno, histološka analiza tkiva jetre dobijenog biopsijom je „zlatni standard“ u dijagnostifikovanju NAFLD, a omogućava i jasno razlikovanje obične steatoze, NAFL (nealkoholne masne jetre) od steatohepatitisa, NASH, kao dva oblika sa značajno različitim tokom, kao i procenu stadijuma inflamacije i fibroze jetre [175].

Stepen steatoze se može kvantifikovati na osnovu broja hepatocita zahvaćenih steatozom, a dijagnoza NAFLD se postavlja kada je akumulacija masti u obliku triglicerida zastupljena u više od 5% hepatocita [176].

U NAFLD, steatoza je obično makrovezikularna kada je nukleus hepatocita pomeren na periferiju sa jednom velikom intracitoplazmatskom kapljicom masti ili sa više malih kapljica. Mogući histološki nalaz je i kombinovana makro- i mikrovezikularna steatoza. Mikrovezikularnu steatozu karakterišu hepatociti sa centralno smeštenim nukleusima i brojnim sitnim kapljicama masti u citoplazmi [177]. Steatoza je najizraženija u perivenularnim regionima hepatocita.

Kod oblika NAFLD-a okarakterisanog kao obična steatoza moguće je, osim masnih promena hepatocita, videti i područja lobularne i portalne inflamacije, ali nisu prisutni znakovi hepatocelularnog oštećenja, kao ni fibroza [177].

Ocena stepena steatoze se vrši vizualizacijom i ocenom hepatocita koji sadrže masnu kapljicu [164]:

Stepen 0 (normalno): < 5% parenhima je zahvaćeno steatozom

Stepen 1 (blaga steatoza): 5-33% zahvaćenog parenhima

Stepen 2 (umerena steatoza): 34-66% zahvaćenog parenhima

Stepen 3 (izražena steatoza): > 66% zahvaćenog parenhima

Iako je biopsija jetre široko dostupna i predstavlja, ne samo najsigurniju potvrdu NAFLD, već može dati precizan podatak o stadijumu oboljenja, to je invazivna procedura, nosi rizik od komplikacija i predstavlja trošak za zdravstveni sistem zbog hospitalizacije pacijenata [160]. Takođe, zbog invazivnosti procedure i visoke prevalencije metaboličkog sindroma u opštoj populaciji, sa kojim je NAFLD u uskoj vezi, nije opravdano izvoditi biopsiju jetre kod svih osoba sa metaboličkim sindromom i visokim enzimima jetre, već samo kod osoba kod kojih odgovarajući prognostički faktori ukazuju na rizik za razvoj steatohepatitisa i napredovale fibroze [139]. Zbog toga postoji velika potreba za razvoj neinvazivnih tehnika koje će imati sve prednosti histološke analize u dijagnostici NAFLD.

1.2.6 Strategija za tretman NAFLD

Glavni cilj u terapiji pacijenata sa NAFLD-om je, uzimajući u obzir progresivni karakter oboljenja, da se uspori ili zaustavi progresija oboljenja, da se smanji stepen steatoze, prevenira inflamacija i fibroza i, ako je već došlo do razvoja, da se tretira fibroza i ciroza jetre [160]. Zato je prvi korak u tretmanu ovog oboljenja, bez obzira na stadijum NAFLD, odgovarajući higijensko-dijetetski režim čiji je cilj smanjivanje telesne mase, s obzirom da većina pacijenata sa NAFLD imaju prekomernu telesnu masu, ili su gojazni i imaju metabolički sindrom [178]. Istraživanja su pokazala da je stepen redukcije masti u jetri direktno povezan sa intenzitetom promene životnih navika, što odražava dominantnu ulogu visceralnog adipoznog tkiva u patogenezi NAFLD-a [139, 179]. Takođe, gubitak od 5-10% u telesnoj masi dovešće do značajnog poboljšanja u steatozi i inflamaciji, ali ne i u fibrozi [180]. Postoji sve veća potreba za specifičnim i ciljanim tretmanom, osim gubitka telesne mase, jer sam gubitak telesne mase ima slab dugoročan efekat kod većine pacijenata [181]. Takođe, u početnoj fazi oboljenja, kada je prisutna samo steatoza, odgovarajuća farmakološka terapija je indikovana samo u prisustvu komorbiditeta, komponenta metaboličkog sindroma (dijabetes tipa 2, dislipidemije) [139, 182, 183].

Poslednjih godina istraživanja ukazuju na veliki značaj GI mikrobiote u razvoju gojaznosti i patogeneze NAFLD-a. Stoga bi cilj terapije NAFLD-a mogao biti usmeren ka modifikaciji sastava mikrobiote, odnosno korekciji disbioze, pa bi i upotreba probiotika mogla da predstavlja racionalni izbor kao, pre svega bezbedan, ali i dugoročan tretman NAFLD-a.

1.3 Gojaznost i nealkoholna masna jetra

1.3.1 Uloga gojaznosti u razvoju nealkoholne masne jetre

Incidenca gojaznosti i stanja koja su sa gojaznošću u direktnoj vezi, uključujući i NAFLD, dramatično je porasla u svi starosnim grupama širom sveta. Gojaznost nastaje kao posledica promene u energetske balansu, odnosno promena u regulisanju energetske unosa, energetske potrošnje i deponovanja energije [137]. Gojaznost dovodi do razvoja IR i metaboličkog sindroma, a predstavlja i važan faktora rizika za razvoj NAFLD-a. Kod najvećeg broja pacijenata NAFLD se razvija u asocijaciji sa metaboličkim sindromom koji se definiše na osnovu prisustva sledećih faktora rizika: hipertrigliceridemije, niskog nivoa HDL holesterola, hipertenzije, abdominalne gojaznosti i insulinske rezistencije [184]. Zbog uske veze sa metaboličkim sindromom, NAFLD se još smatra i hepatičnom manifestacijom metaboličkog sindroma [185, 186]. Faktor rizika za razvoj NAFLD predstavlja, kako visok ITM, tako i abdominalna gojaznost, na šta upućuje činjenica da kod blizu dve trećine gojaznih osoba i osoba koje boluju od dijabetesa melitusa tipa 2, dolazi do razvoja hepatične steatoze [148, 187]. Primenom ultrasonografije je pokazano da se masna infiltracija jetre javlja kod čak 50% pacijenata sa hiperlipidemijom [188]. Takođe, insulinska rezistencija (IR) može biti odgovorna za razvoj NAFLD čak i kod osoba koje nisu gojazne [164].

Prekomerna telesna masa i sadržaj lipida u jetri su u skoro linearnoj korelaciji i povezani su sa smanjenom insulinskom aktivnošću [189]. IR se ispoljavanja na više organa: u mišićima gde je smanjeno preuzimanje glukoze i sinteza glikogena; u jetri u kojoj dolazi do prekomerne sinteze glukoze uprkos hiperinsulinemiji koja se javlja u gladovanju; u

adipoznom tkivu gde lipoliza nije adekvatno suprimirana insulinom zbog čega dolazi do oslobađanja glicerola i SMK u cirkulaciju.

Kod gojaznih osoba adipozno tkivo promovise insulinsku rezistenciju i dijabetes tipa 2, oslobađajući hormone (adipokine), neesterifikovane masne kiseline i proinflamatorne citokine (TNF- α , IL-1). Poremećen metabolizam lipida u jetri je, usled smanjene insulinske osetljivosti, u direktnoj korelaciji sa povišenim nivoom SMK u krvi i u krajnjoj meri dovodi do inhibicije hepatične β -oksidacije [190]. Naime, IR se smatra ključnim momentom koji dovodi do steatoze, a kasnije doprinosi i progresiji oboljenja. Ovo objašnjava činjenicu da značajan broj osoba koje nisu gojazne, a imaju IR, imaju i nealkoholnu masnu jetru [164]. Mehanizam kojim IR dovodi do nastanka steatoze se zasniva na: povećanju nivoa SMK u serumu kontinuiranom lipolizom u adipoznom tkivu i povećanom ulasku SMK u jetru, povećanju *de novo* sinteze lipida i inhibiciji β -oksidacije u hepatocitima [191]. Kapacitet jetre da eksportuje trigliceride putem VLDL čestica je ograničen zbog neadekvatne sinteze apolipoproteina B100 koji učestvuje u sintezi VLDL čestica [192]. Na ovaj način količina lipida koji uđe u hepatocite i koji se sintetiše, prevazilazi količinu koja se metaboliše i transportuje iz jetre putem VLDL čestica, što na kraju rezultuje steatozom [193]. Takođe, nekoliko studija je sugerisalo da je steatoza najvećim delom posledica povećane lipogeneze i smanjenog transporta lipida iz jetre [194, 195], a glavni izvor triglicerida u jetri su SMK [163]. Istraživanja su pokazala da je kod gojaznih osoba koje nemaju dijabetes, VSM ishrana može dovesti u toku 10 dana do povećanja od 35% u sadržaju lipida u jetri [196]. Kod osoba sa NAFLD 26% triglicerida u jetri potiče od *de novo* sinteze lipida, dok je kod zdravih osoba taj udeo < 5% [142, 163].

Nastanku steatoze i progresiji oboljenja ka inflamaciji i fibrozi doprinosi oksidativni stres i produkcija proinflamatornih citokina [197]. Što se tiče fibroze, smatra se da je insulinska rezistencija najodgovornija, s obzirom da ovo stanje vodi hiperinsulinemiji i hiperglikemiji koje mogu dovesti do aktiviranja stelatnih ćelija jetre što rezultuje u stimulaciji fibroze [198].

Takođe, važno je naglasiti značaj visceralnog adipoznog tkiva u patogenezi hepatične IR i steatoze što je i potvrđeno u brojnim studijama [199]. Kod ljudi, postoji jasna veza između hepatične IR i adipoznog tkiva koja vodi izmenjenoj produkciji adipokina i povećanom

oslobađanju SMK [200, 201]. Povećanje adipoznog tkiva, a naročito visceralnih masti, povezano je sa inflamacijom tkiva koja se karakteriše smanjenim oslobađanjem anti-inflamatornih citokina i povećanom ekspresijom proinflamatornih molekula koji modifikuju oslobađanje adipokina [201].

Adipokini predstavljaju peptide koje uglavnom produkuju adipociti (leptin, adiponektin). Igraju značajnu ulogu u patogenezi NAFLD. Adipokini se mogu podeliti, na osnovu njihovog potencijalnog uticaja na NAFLD, na one koje imaju pozitivan ili negativan uticaj. Adiponektin je adipokin sa pozitivnim uticajem na NAFLD za koji je u eksperimentalnim studijama pokazano da negativno korelira sa IR, trigliceridima (TG) u plazmi, LDL-cholesterolom, sadržajem lipida u jetri i progresiji steatoze u steatohepatitis [202, 203]. Takođe, sekrecija i cirkulišući nivo adiponektina je obrnuto srazmeran sadržaju telesnih masti i njegova koncentracija je snižena kod pacijenata sa NAFLD [142]. Adipokin sa negativnim efektom na NAFLD je TNF- α koji pokazuje proinflamatorni efekat i povećava IR, a ima antagonističko dejstvo sa adiponektinom. Adiponektin antagonizuje efekte TNF- α , tako što inhibira njegovu ekspresiju, sekreciju i aktivnost i na taj način poboljšava insulinsku osetljivost. S druge strane TNF- α suprimira transkripciju, sekreciju i aktivnost adiponektina i na taj način povećava IR [204, 205]. U fiziološkim uslovima postoji balans između ova dva adipokina, a balans se narušava kako se masno tkivo povećava što dovodi do hronične inflamacije, insulinske rezistencije i NAFLD [205]. Značajan adipokin u patogenezi NAFLD je i leptin. Leptin produkuju zreli adipociti i uključen je u regulaciju energetskeg metabolizma, regulaciju imunskog sistema, promociju inflamacije i fibrogeneze [142]. Leptin se sekretuje proporcionalno količini adipoznog tkiva, odnosno cirkulišući nivo leptina primarno odražava energetske depoe organizma, dok sekundarno odražava promene u energetskeg unosu [206]. Viši nivoi leptina su nađeni kod gojaznih osoba i osoba sa NAFLD, i ovo stanje je označeno kao stanje leptinske rezistencije [207]. U animalnim modelima, leptin pokazuje dvostruku ulogu na patogenezu NAFLD: u inicijalnoj fazi može sprečiti nastanak hepatične steatoze, ali kako bolest napreduje ili se održava, leptin se ponaša kao inflamatorni i fibrinogeni faktor [208]. Mehanizam kojim leptin povećava insulinsku osetljivost i pokazuje antisteatotičnu aktivnost su: supresija produkcije glukoze u jetri, inhibicija hepatične *de novo* sinteze lipida i stimulacija

oksidacije masnih kiselina [208]. Povišeni nivoi citokina IL-6 su u korelaciji sa inflamacijom i IR, a cirkulišući nivoi IL-6 su povišeni kod gojaznih osoba i osoba sa dijabetesom tipa 2 [209]. Drugi adipokini koji se u većoj meri sekretuju kod NAFLD uključuju angiotenzinogen i rezistin. Zajednički efekat ovih adipokina je antagonističko dejstvo na lipogeni efekat insulina, a njihova precizna ulogu u patogenezi NAFLD još uvek nije jasno determinisana.

1.3.2 Veza između crevne mikrobiote, gojaznosti i nealkoholne masne jetre

Rastući broj dokaza ukazuju da promena sastava mikrobiote utiče na akumulaciju lipida u jetri i progresiju NAFLD [210]. Takođe, sama gojaznost je povezana sa specifičnim sastavom mikrobiote, koja je najverovatnije uslovljena ishranom bogatom mastima [210]. Postoje nekoliko nivoa dokaza koji potvrđuju snažnu interakciju GI mikrobiote i jetre. Ukoliko se pogleda anatomska pozicija, 70% krvi koju jetra dobija potiče od portalne vene koja krv nosi iz digestivnog trakta, što čini jetru organom koji je najizloženiji toksičnim materijama iz digestivnog trakta, kao što su bakterija i njihovi toksini [211]. Veza između intestinalne mikrobiote i razvoja NAFLD je pokazana i u animalnim i humanim studijama. Backhed i saradnici su prvi uočili da transplantacija normalne mišje cecalne mikrobiote akseničnim miševima indukuje porast od čak 60% u telesnim mastima i dvostruko povećanje u hepatičnim trigliceridima [212]. Još pre više od 80 godina je otkriveno da je crevna mikrobiota izmenjena kod pacijenata sa hroničnim oboljenjima jetre. Ovaj poremećaj crevne mikrobiote, uz prekomeran porast bakterija u tankom crevu, je zastupljen kod velikog broja (20-75%) pacijenata sa hroničnim oboljenjem jetre [211]. Ranih 80-tih zapaženo je da se nakon intestinalnog *bypass*-a, koji se obavljao kod morbidno gojaznih ljudi, dolazi do istovremenog nastanka nealkoholne steatoze i steatohepatitisa, zajedno sa prekomernim rastom bakterija u tankom crevu. Ono što je bilo interesantno i što je podržalo ulogu mikrobiote u patogenezi NAFLD, je činjenica da nakon primene antibiotika dolazi do značajnog smanjenja stepena steatoze [213].

Mehanizmi kojim GI mikrobiota može stimulisati deponovanje lipida u jetri i promovisati nastanak inflamatornog stanja (nealkoholnog steatohepatitisa) su sledeći [141, 211]:

- Promocija gojaznosti povećavanjem iskoristljivosti energije iz hrane
- Povećanje permeabilnosti creva, inflamacije niskog stepena i aktivacije imunskog sistema
- Modulacija metabolizma dijetarnog holina neophodnog za sintezu VLDL lipoproteina i transport lipida iz jetre
- Povećavanje endogene sinteze etanola od strane bakterija
- Povećanje nivoa LPS-a u krvi

1.3.2.1 Promene propustljivosti crevne mukoze i prekomernog rasta bakterija u tankom crevu kao uzrok NAFLD

Ćelije intestinalnog epitela su povezane međusobno čvrstim vezama koje imaju ključnu ulogu u održavanju integriteta intestinalne barijere [214]. Razvoj NAFL i NASH je povezano sa prekomernim rastom bakterija u tankom crevu i povećanom intestinalnom propustljivošću (engl. *leaky gut*) [215]. Prvi dokaz o povećanoj intestinalnoj propustljivosti i izmenjenim vezama između enterocita kod pacijenata sa NAFLD-om u poređenju sa zdravim osobama dao je Miele sa saradnicima. Autori su pokazali da je i povećana propustljivost crevne mukoze i prisustvo prekomernog rasta bakterija u direktnoj korelaciji sa stepenom hepatične steatoze [216]. Kasnije su i drugi autori došli do sličnih rezultata što vodi zaključku da poremećaj u homeostazi između bakterija prisutnih u crevima i domaćina, dovodi do promena u propustljivosti intestinalne barijere i promociji bakterijske translokacije iz creva u portalnu cirkulaciju, rezultujući oštećenjem jetre [217].

1.3.2.2 Prisustvo bakterijske endotoksemije kao uzrok NAFLD

U zavisnosti od specifičnih dijetarnih uslova može doći do povećanja intestinalne permeabilnosti i posledičnoj endotoksemiji, koja dalje može biti okidač za inflamaciju i metaboličke poremećaje [211]. Sama intestinalna mikrobiota produkuje etanol, fenole,

amonijum i acetaldehid koji se metabolišu u jetri i mogu uticati na produkciju TNF- α u Kupferovim ćelijama i indukovati inflamaciju jetre [218, 219]. U animalnim modelima je pokazano da VSM ishrana utiče na promenu bakterijske populacije, favorizujuću Gram-bakterije u odnosu na Gram+, dovodeći do endotoksemije [211]. Povišeni nivoi bakterijskih LPS, komponenta ćelijskog zida Gram- bakterija, nađeni su u portalnoj i/ili sistemske cirkulaciji kod nekoliko tipova hroničnih oboljenja jetre. Izlaganje jetre LPS-u, koji se ponaša kao hepatotoksin, povezano je sa morfološkim i funkcionalnim promenama koje indukuju akutni inflamatorni odgovor, prvo aktivacijom Kupferovih ćelija koji vodi oslobađanju proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-6, IL-12) i drugo, ranom aktivacijom polimorfonuklearnih ćelija [220, 221]. Neutrofili oslobađaju reaktivne kiseonične vrste, proteaze i druge enzime koji dodatno oštećuju tkivo jetre [222].

1.3.3 Sprega metabolizma i imunskog sistema

Jedan od osnovnih zahteva za preživljavanje jeste sposobnost vrste da preživi gladovanje i obezbedi efikasnu zaštitu protiv infekcije [223]. Pružanje efikasnog imunskog odgovora je energetski zahtevan proces, pa je sa stanovišta metabolizma, potreba za zaštitom organizma od patogena u koliziji sa potrebom da se održi metabolička homeostaza [223, 224]. Ovo predstavlja fundamentalni fiziološki izazov koji se sreće u evoluciji kroz blisku integraciju i koordinaciju imunskog i inflamatornog odgovora sa regulacijom metabolizma [223].

Bliska veza između metabolizma i inflamacije se može uočiti u organizaciji metaboličkih organa, kao što su jetra i adipozno tkivo. Ovde su makrofage i druge ćelije imunskog sistema u neposrednoj blizini sa metaboličkim ćelijama, hepatocitima i adipocitima [223]. Adipociti i makrofage dele i mnoge signalne puteve, uključujući i TLR receptore, preko kojih, u prisustvu različitih signala, dolazi do indukcije imunskog odgovora i inflamacije [223, 225, 226]. Familija TLR receptora, kao što su TLR2 i TLR4, koji prepoznaju lipoproteine i lipopolisaharide ćelijskog zida bakterija, mogu prepoznati i nutritivne signale kao što su masne kiseline [223, 224, 227]. Takođe, signalni putevi koji su povezani sa metabolizmom mogu uticati i na imunski odgovor, odnosno određeni citokini, hormoni

(leptin, adiponektin), neuropeptidi i transkripcioni faktori koji igraju važnu ulogu u metaboličkim, imaju ulogu i u imunološkim funkcijama [228].

Delikatna ravnoteža između metabolizma i imunskog odgovora može biti narušena dugotrajnim prisustvom hronične inflamacije ili poremećenog nutritivnog balansa. Dugotrajna izloženost patogenu dovodi do promena u sistemskom metabolizmu, dok gladovanje i malnutricija dovodi do kompromitovanja imunske funkcije [223]. S druge strane, višak deponovane energije u obliku masnog tkiva dovodi do inflamacije koji dalje vodi poremećaju imunskih funkcija [229]. Naime, veliki broj dokaza ukazuje da je inflamacija ključni etiopatogenetski faktor u razvoju metaboličkih oboljenja, uključujući gojaznost, insulinsku rezistenciju, dijabetes tipa 2, aterosklerozu i NAFLD [230, 231].

Gojaznost je povezana sa značajnim promenama u urođenom i stečenom imunskom odgovoru [232]. U prilog tome govore rezultati nekoliko epidemioloških studija koje su pokazale da su gojazne osobe podložnije sistemskim infekcijama [232]. Takođe, gojazna deca, adolescenti i odrasle osobe pokazuju različiti stepen poremećaja ćelijski posredovanog imunskog odgovora *in vivo* i *in vitro*, kao i smanjenu sposobnost eliminacije intracelularnih bakterija od strane polimorfonuklearnih leukocita [233]. Značajan poremećaj imunskog sistema je nađen i u animalnom modelu gojaznosti. Kod leptin deficitarnih *ob/ob* miševa i kod leptin rezistentnih *db/db* miševa utvrđen je poremećaj imunskog odgovora posredovan B i T limfocitima [232]. Gojaznost se takođe karakteriše poremećajem u sekreciji citokina koji dovodi do indukcije sistemske inflamacije niskog stepena. Kod gojaznih osoba prisutne su izuzetno visoke vrednosti inflamatornih citokina, koji najvećim delom potiču od aktiviranih makrofaga koji su infiltrirani u adipoznom tkivu [232].

Poslednjih godina je otkriveno da adipozno tkivo nije inertno tkivo već funkcioniše kao endokrini organ. Odnosno, pored uloge kao depoa energije, adipozno tkivo produkuje hormone i citokine koji utiču i na energetske status, ali i na reaktivnost imunskog sistema [234]. Adipokini, hormoni i citokini produkovani od strane adipocita, povezuju metabolizam i imunološku homeostazu [228].

Leptin ima imunomodulatorni efekat i u urođenom i u stečenom imunitetu [235]. Povećava sekreciju proinflamatornih citokina kao što su IL-1, IL-6 i TNF- α od strane makrofaga i

samim tim leptin učestvuje u akutnoj fazi inflamacije [236, 237]. U urođenoj imunosti, leptin je neophodan za fagocitozu bakterija posredovanu polimorfonuklearnim leukocitima, stimuliše hemotaksu monocita/makrofaga, razvoj i aktivaciju NK ćelija [232]. U stečenoj imunosti, leptin različito moduliše funkciju naivnih i memorijskih T ćelija, stimulišući proliferaciju naivnih T ćelija i sekreciju proinflamatornih citokina koji usmeravaju Th1/Th2 ravnotežu ka Th1 imunskom odgovoru, ali dovodi i do inhibicije proliferacije memorijskih ćelija [236].

Insulin je drugi hormon koji značajno može uticati na energetske balans i ćelijsku imunost. S obzirom da insulin povećava ćelijski metabolizam i sintezu proteina, što je neophodno za normalno funkcionisanje T ćelija, poremećaj u insulinskoj aktivnosti vodi smanjenoj sposobnosti T limfocita da odgovore na antigensku stimulaciju [228].

Važan citokin uključen u regulaciju energetske statusa i urođene i stečene imunosti je IL-6 [238]. Uključen je u regulaciju razvoja B-ćelija, produkciju antitela, hematopoezu, funkciju adipocita i metaboličku funkciju. U fiziološkim uslovima biva produkovan od strane adipocita i njegove vrednosti u cirkulaciji korelišu sa indeksom telesne mase, osetljivošću ćelija na insulin i toleranciju na glukozu [228].

TNF- α je citokin koji važnu ulogu u odbrani domaćina od infekcija i u razvoju Th1 imunskog odgovora. Sekretuju ga aktivirane makrofage i adipociti i deluje kao inhibitor insulina dovodeći do inhibicije sinteze masti, stimulacije lipolize i apoptoze adipocita [239, 240]. Uloga TNF- α u IR povezanoj sa gojaznosti se ogleda u činjenici da pacijenti sa IR imaju povišene nivoe ovog citokina, a TNF- α deficitarni miševi su zaštićeni od IR kada su na VSM ishrani [239].

1.4 Bakterije mlečne kiseline (probiotici) u tretmanu nealkoholne masne jetre (steatoze)

1.4.1 Efikasnost probiotika u tretmanu nealkoholne masne jetre

Kao što je već rečeno, cilj terapije nealkoholne masne jetre je da se uspori progresija bolesti ili čak dovede do reverzibilnih promena, što je ključno za postizanje dugoročnih zdravstvenih efekata kod osoba koje imaju NAFLD. S obzirom na progresivni karakter bolesti, fokus bi trebalo da bude na prevenciji i tretmanu benigne steatoze, koja je i prvi stadijum u ovom oboljenju jetre. Idealni tretman bi trebalo da deluje na više nivoa na patogenezu NAFLD-a i da bude bezbedan, pristupačan, jeftin, da se dobro podnosi i samim tim bude prihvatljiv za dugoročnu upotrebu [241]. Trenutno, ne postoji dovoljno efikasan tretman za NAFLD. Određenu efikasnost u tretmanu NAFLD-a su uglavnom pokazivali tretmani koji su se zasnivali na antioksidativnoj aktivnosti primenjenih farmakoloških i nefarmakoloških agenasa, a samim tim i na antiinflamatornoj i insulin-senzibilisućoj aktivnosti [219]. Kako je poznata uloga crevne mikrobiote u razvoju steatoze i progresiji NAFLD-a, i s obzirom da probiotici mogu delovati na više nivoa na patogenezu oboljenja i uticati na nishodnu regulaciju inflamatornih medijatora, a uz to su još i bezbedni i pristupačni, sve više postaju atraktivni kao potencijalna dugoročna terapija NAFLD-a [219].

Iako postoje opsežni literaturni podaci na ovu temu, teško je sa sigurnošću reći koji je pravi efekat probiotika na patogenezu NAFLD. Razlog tome je korišćenje različitih bakterijskih sojeva i animalnih modela u studijama koje su pratile uticaj probiotika na NAFLD. Takođe, efekat primenjenih probiotika zavisi i od sastava crevne mikrobiote domaćina, načina ishrane i genetike [242]. Postoji značajan broj studija u kojima je ispitivan efekat laktobacila, pojedinačno ili u kombinaciji sa drugim rodovima, u animalnim modelima nealkoholne masne jetre. Upotreba kombinacije više sojeva se objašnjava činjenicom da se na ovaj način kombinuju i različiti mehanizmi delovanja različitih sojeva.

Lactobacili su doveli do smanjenog deponovanja masti u jetri, snižavanja ukupnog holesterola i triglicerida u serumu, smanjenja IR i porasta telesne mase, odnosno pokazali

protektivni efekat na razvoj steatoze i progresiju NAFLD [243-246]. Primena laktobacila je dovela i do prevencije steatoze koja je indukovana fruktozom, smanjenjem aktivacije TLR4 signalnog puta [247].

U cilju utvrđivanja potentnijeg probiotika, često se u studijama poredi efekti dva različita probiotika. U jednoj studiji koja je poredila efekte *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium longum* kod pacova sa nealkoholnom masnom jetrom indukovanom VSM ishranom, primena *Bifidobacterium longum* je bila efikasnija u smanjenju akumulacije lipida u jetri [248]. Takođe, ono što može da doprinosi povoljnom efektu u patogenezi NAFLD su antiinflamatorni efekti koje pokazuju pojedini probiotski sojevi [249].

1.4.2 Mehanizmi delovanja probiotika u NAFLD

Kliničke i eksperimentalne studije sugerišu da se probiotici značajno razlikuju u efektima i mehanizmima dejstva. Značajne razlike postoje, ne samo između različitih vrsta, već i u okviru iste vrste. U cilju selekcionisanja određenih sojeva ili kombinacija sojeva za specifičnu namenu, od ključne važnosti je razumevanje različitih mehanizama aktivnosti probiotika [116]. Iako molekularni mehanizmi probiotskih bakterija nisu u potpunosti rasvetljeni, efekti koji mogu biti od koristi u tretmanu i prevenciji steatoze i NAFLD-a su: modulacija intestinalne mikrobiote, produkcija antibakterijskih supstanci, ojačavanje funkcije epitelne barijere i smanjenje propustljivosti epitela creva, prevencija bakterijske translokacije, smanjenje inflamacije i stimulacija imunskog sistema domaćina [141].

1.4.2.1 Modulacija sastava crevne mikrobiote i produkcija antibakterijskih faktora

Probiotici mogu smanjiti negativan uticaj crevne mikrobiote u patogenezi NAFLD kroz najmanje dva mehanizma: inhibicija bakterijske translokacije i produkcija antimikrobnih faktora. Pod nespecifičnim antimikrobnim supstancama se smatraju SCFA, hidrogen peroksid, bakteriocini, bakteriocinima slični faktori i bakteriofagi [116]. SCFA, pored toga

što predstavljaju dodatni izvor energije u organizmu, jer mogu poslužiti za *de novo* sintezu lipida i glukoze [250], imaju i važnu ulogu u smanjivanju pH vrednosti i inhibiranju rasta velikog broja Gram- patogenih bakterija [116]. Naime, modifikacija pH vrednosti može dovesti do izmene u sastavu crevne mikrobiote, limitirajući rast određenih patogenih bakterija [251, 252].

Bakteriocini su mali antimikrobni peptidi produkovani od strane bakterija koji mogu delovati baktericidno ili bakteriostatski [253]. Takođe, mnoge BMK produkuj veliki broj različitih bakteriocina čija je aktivnost usmerena uglavnom na Gram+ bakterije, uključujući rodove *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria* i mikobakterije. Glavni mehanizam ovih bakteriocina se zasniva na formiranju pora na membrani senzitivnih bakterija i ometanju aktivnosti ključnih enzima bakterija. Takođe, nekoliko sojeva bifidobakterija produkuj bakterocinima slične komponente koje su toksične za neke Gram+ i Gram- bakterije [254]. Za razliku od bakteriocina, bakteriofagi su produkti su visoko specifični i mogu biti aktivni samo protiv jednog soja bakterija [116]. Probiotici mogu produkovati i određene faktore koje mogu inhibirati vezivanje nekih patogenih bakterija za specifične receptore eksprimirane na površini IEC [255]. Određeni sojevi laktobacila i bifidobakterija su sposobni da se takmiče sa patogenim bakterijama za mesta za vezivanje na intestinalnim epitelnim ćelijama i na taj način spreči njihovo vezivanje [256, 257]. Kompetitivna inhibicija i izmeštanje patogenih bakterija od strane probiotika je efikasno čak i kada su patogene bakterije vezane za epitel pre primene probiotika [257].

Svi pomenuti mehanizmi kojim probiotici pozitivno utiču na sastav crevne mikrobiote, najverovatnije dovode do prevencije prekomernog rasta bakterija u tankom crevu što se smatra jednim od važnih uzroka nastanka steatoze i NAFLD-a.

1.4.2.2 Modulacija intestinalne epitelne propustljivosti i funkcije

Intestinalna mukoza ima važnu ulogu u apsorpciji nutrijenata i u održavanju barijere prema spoljašnjoj sredini, sprečavajući na taj način bakterijsku translokaciju. Integritet intestinalne mukoze je osiguran kroz intercelularne čvrste veze (engl. *Tight junction*, TJ), sekreciju

mukusa, oslobađanje antimikrobnih peptida iz Panetovih ćelija i sekrecijom IgA antitela [258].

Probiotici imaju sposobnost da poboljšaju nespecifični mehanizam odbrane intestinalne barijere, da modulišu proteine koji grade „čvrste veze“ između enterocita i stimulišu njihovu sintezu. Ovi mehanizmi, koji su primećeni u animalnim i humanim modelima, dovode do sprečavanja preteranog rasta bakterija u tankom crevu i njihove translokacije, i samim tim su odgovorni za sprečavanje bakterijske endotoksemije [259].

Mukusni sloj koji pokriva intestinalnu mukozu se smatra prvom linijom odbrane od mehaničkih, hemijskih i mikrobioloških agenasa iz luminalnog sadržaja. Oštećenje mukusne barijere dovodi do adhezije bakterija za epitel, a uklanjanje mukusnog sloja favorizuje ulazak bakterija i antigena u mukozno tkivo [260, 261]. Pokazano je da probiotska smeša laktobacila i bifidobakterija povećava sekreciju mucina tako što stimuliše ekspresiju gena za sintezu mucina (MUC2) u kolonu pacova, a *in vitro* je pokazano da laktobacili inhibiraju vezivanje *E. coli* tako što vrše ushodnu regulaciju gena koji kodiraju sintezu mucina (MUC2 i MUC3 geni) [262].

Povećana intestinalna permeabilnost može biti posledica redukovane ekspresije proteina koji grade intracelularne veze uzrokovane ishranom bogatom mastima [263]. Ovo „curenje“ kroz paracelularne prostore enterocita omogućava prolazak velikog broja antigena iz intestinuma, dovodeći do pokretanja imunskog odgovora posledične inflamacije i oksidativnog stresa [264]. Probiotici mogu uticati na intestinalnu permeabilnost i preko produkcije kratkolančanih masnih kiselina, što je pokazano u određenim stanjima kao što su: kolitis izazvan antibiotskom terapijom, inflamatorna oboljenja creva, hepatična encefalopatija, kao i redukovanjem bakterijskih metabolita (hidrogen sulfid i ekstracelularni superoksid) koja mogu povećati intestinalnu permeabilnost [116, 265].

1.4.2.3 Modifikacija endotoksemije

Kao što je već rečeno, kao posledica povećanja intestinalne permeabilnosti dolazi do endotoksemije koja može biti okidač za inflamaciju u jetri i metaboličke poremećaje.

Povećanje endotoksemije i indukcija TLR-4, kao i kostimulatornih molekula TLR4 (CD14) nađeni su kod miševa kod kojih je indukovana NAFLD, što dovodi do zaključka da je signalizacija preko TLR4 receptora važna za patogenezu ovog oboljenja [266]. TLR receptori prepoznaju različite molekulske obrasce povezane sa patogenima inicirajući imunski odgovor i signalnu kaskadu koja vodi do aktivacije proinflammatoryh gena, kao što su TNF- α , IL-6, IL-8, IL-12 [220]. Najbolje proučen molekularni obrazac povezan sa patogenima je LPS, komponenta ćelijskog zida Gram- bakterija. LPS se vezuje za liposaharid-vezujući protein koji se zatim vezuje za CD14. Ovaj kompleks aktivira TLR4 u Kupferovim ćelijama što dovodi do produkcije proinflammatoryh citokina (TNF- α) i inflamacije jetre [141]. Mnoge studije, većina njih izvedene na animalnim modelima, pokazale su da je aktivacija LPS-TLR4 signalnog puta povezana sa razvojem IR i nealkoholnog steatohepatitisa. Studija u kojoj je kod pacova ishranom VSM izazvana IR i steatohepatitis je pokazala da dugotrajna primena *Lactobacillus paracasei* dovodi do smanjene ekspresije ovog receptora, a sami tim i redukcija inflamacije što može sprečiti dalju progresiju NAFLD-a [267].

1.4.2.4 Supresija inflamacije

Za nekoliko citokina (TNF- α , IFN- γ , IL-4) je pokazano da povećavaju *in vitro* permeabilnost mukoze, menjajući morfologiju čvrstih veza, što može dovesti do bakterijske translokacije koja je uzrok ekstraintestinalne inflamacije i oštećenja [268, 269].

Glavni koordinator imunskog i inflamatornog odgovora unutar IEC, pri odgovoru na patogene bakterije i druge stresne signale, je transkripcioni faktor NF- κ B. Međutim, mnoge komensalne bakterije ne aktiviraju NF- κ B, dok neke imaju sposobnost da ga antagonizuju unutar enterocita [270]. Za nekoliko sojeva probiotskih bakterija je pokazano da mogu da suprimiraju sekreciju IL-8 koji proizvode IEC u odgovoru na nekoliko patogenih bakterija [269]. Antiinflamatorni efekti značajnog broja sojeva lactobacila i bifidobakterija su posredovani, jednim delom, supresijom aktivacije NF- κ B [271]. Pored NF- κ B signal transdukcionog puta, protektivni efekti probiotika mogu biti posredovani i

preko drugih intracelularnih signal transdukcionih puteva (protein kinaza B, aktivator protein-1, PPAR- γ signalni put) [116].

Pored intestinalne inflamacije, prekomerni rast bakterija u tankom crevu i bakterijska translokacija dovode do endotoksemije koja direktno stimuliše Kupferove ćelije u jetri da produkuju TNF- α i slobodne kiseonične radikale [272]. Uloga TNF- α u patogenezi NAFLD-a je dobro dokumentovana i potvrđena kada je primena antitela usmerenih protiv TNF- α dovela do poboljšanja funkcije jetre [273]. Oslobođanje TNF- α stimuliše fibrozu i povećava lipidnu peroksidaciju što doprinosi progresiji NAFLD [274]. Studija, u kojoj je praćen efekat primene probiotika (VSL#3) u eksperimentalnom modelu nealkoholnog steatohepatitisa izazvanog hranom VSM, pokazala je da je antiinflamatorni efekat ovog probiotika posledica, sa jedne strane, smanjenja aktivacije NF- κ B u hepatocitima, a sa druge strane posledica smanjenja nivoa TNF- α u jetri [275].

Rezultati navedenih studija jasno ukazuju na veliku potencijalnu korist od primene probiotika u tretmanu NAFLD-a, kako u prevenciji i reverziji steatoze, tako i u sprečavanju dalje progresije ovog oboljenja. Još uvek nije jasno na koji način probiotici moduliraju inflamatorne, metaboličke i oksidativne procese odgovorne za nastajanje i progresiju NAFLD-a. Rezultati prethodnih istraživanja nedvosmisleno ukazuju da primena probiotika može korigovati disbiozu koja se javlja kod gojaznih osoba i da mogu povoljno uticati na integritet intestinalne barijere. Rezultati studija takođe ukazuju da jedino određeni probiotski sojevi pokazuju poželjne efekte u prevenciji i patogenezi nealkoholne masne jetre, što vodi zaključku da se dobijeni rezultati ne mogu ekstrapolirati na sve postojeće komercijalne sojeve. Zbog toga se, u cilju definisanja najpotentnijeg soja za primenu kod nealkoholne masne jetre, poslednjih godina u animalnim modelima nealkoholne masne jetre ispituje efikasnost pojedinačnih sojeva.

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

- Ispitati dejstvo oralne primene specifičnog BMK soja, *Lactobacillus rhamnosus* LA68, vlasništvo Instituta za virusologiju, vakcine i serume Torlak, na imunski sistem i sastav masnih kiselina jetre i mozga kod mladih ženki miševa soja C57BL/6 u nepatološkim uslovima, pri standardnoj ishrani.
- Razviti model nealkoholne masne bolesti jetre (stadijum steatoze) izazvane VSM ishranom.
- Ispitati i izvršiti poređenje dejstva oralne primene dva različita soja BMK, *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1, na imunološke i metaboličke parametre, kao i na sastav masnih kiselina organa (jetra i drugi organi) kod mladih mužjaka miševa soja C57BL/6, koji će biti na režimu VSM ishrane.
- Ispitati uticaj *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na razvoj steatoze u modelu nealkoholne masne jetre.
- Ispitati dužinu trajanja efekata *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na metaboličke parametre i sastav masnih kiselina organa nakon 8 nedelja *wash out* perioda pri uslovima VSM ishrane

3 MATERIЈAL I METODE

3.1 Materijal

3.1.1 Hemikalije, podloge, ELISA testovi, antitela i rastvori

Podaci o hemikalijama, antitelima i rastvorima korišćenim u eksperimentalnom radu prikazani su u Tabelama 4, 5 i 6.

Tabela 4. Hemikalije i podloge korišćene u eksperimentalnom radu

Naziv hemikalije	Proizvođač
Natrijum-hlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Hlorovodonična kiselina (HCl)	Sigma-Aldrich
β -merkaptoetanol	Sigma-Aldrich
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromidom (MTT)	Sigma-Aldrich
Natrijum-dodecilsulfat	Sigma-Aldrich
Natrijum-azid	Sigma-Aldrich
Formaldehid	Sigma-Aldrich
Trihlormetan CHROMASOLV [®]	Sigma-Aldrich
n-Heksan CHROMASOLV [®]	Sigma-Aldrich
Metanol CHROMASOLV [®]	Sigma-Aldrich
Toluen	Sigma-Aldrich
Tripan plava	Sigma-Aldrich
Orto-feniladiamin	Sigma-Aldrich
Lipopolisaharid (LPS)	Sigma-Aldrich

(lipopolisaharid iz <i>Salmonella minnesota</i>)	
Peptidoglikan (PGN) (peptidoglikan iz <i>Staphylococcus aureus</i>)	Fluka BioChemika
streptavidin sa <i>horseradish</i> peroksidazom (skr. streptavidin-HRP)	Biolegend
Fetalni serum govečeta (engl. <i>fetal calf serum</i> , FCS)	Sigma-Aldrich
Albumin seruma govečeta (engl. <i>bovine serum albumin</i> , BSA)	Sigma-Aldrich
Naziv podloge	Proizvođač
Agar	Torlak, Srbija
de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medijum	Torlak, Srbija
RPMI-1640	Sigma-Aldrich

Tabela 5. Antitela korišćena u eksperimentalnom radu

Antitela korišćena za detekciju citokina	Kataloški broj	Proizvođač
Prečišćeno antimišji IL-6 antitelo	504502	Biolegend
Prečišćeno antimišji IL-10 antitelo	505001	Biolegend
Prečišćeno antimišji IL-17A antitelo	506902	Biolegend
Prečišćeno antimišji IFN- γ antitelo	505701	Biolegend
Prečišćeno antimišji TNF- α antitelo	510801	Biolegend
Biotin konjugovano antimišji IL-6 antitelo	504602	Biolegend

Biotin konjugovano antimišji IL-10	504905	Biolegend
Biotin konjugovano antimišji IL-17A	507002	Biolegend
Biotin konjugovano antimišji IFN- γ	505803	Biolegend
Biotin konjugovano antimišji TNF- α	506311	Biolegend
Antitela korišćena za protočnu citometriju	Poreklo/izotip	Proizvođač
Fluoresceinom konjugovano antimišji CD3e antitelo (skr. CD3-FITC)	hrčkovo/IgG	Immunotools
Fikoeritriinom konjugovano antimišji CD4 antitelo (skr. CD4-PE)	pacovsko/IgG2b	Immunotools
Fikoeritriinom konjugovano antimišji CD8 antitelo (skr. CD8-PE)	pacovsko/IgG2b	Immunotools
Fluoresceinom konjugovano antimišji NK antitelo (skr. NK cells -FITC)	mišje/IgG2a	Immunotools
Fikoeritriinom konjugovano antimišji CD19 antitelo (skr. CD19 -PE)	pacovsko/IgG2a	Immunotools
Fluoresceinom konjugovano antimišji CD25 antitelo (skr. CD25-FITC)	pacovsko/IgG1	Immunotools
Fluoresceinom konjugovano antimišji CD11b antitelo (skr. CD11b-FITC)	pacovsko/IgG2b	Immunotools
Fikoeritriinom konjugovano antimišji CD32/16 antitelo (skr. CD32/16-PE)	pacovsko/IgG2b	Immunotools

Standardi za određivanje citokina	Kataloški broj	Proizvođač
Rekombinantni mišji IL-6 (ELISA standard)	575709	Biolegend
Rekombinantni mišji IL-10 (ELISA standard)	575809	Biolegend
Rekombinantni mišji IL-17A (ELISA standard)	576009	Biolegend
Rekombinantni mišji IFN- γ (ELISA standard)	575309	Biolegend
Rekombinantni mišji TNF- α (ELISA standard)	575209	Biolegend

Tabela 6. Rastvori korišćeni u eksperimentalnom radu

Naziv rastvora	Sastav
Fiziološki rastvor puferovan fosfatom (engl. <i>phosphate buffered saline, PBS</i>)	komercijalan; proizvođač Sigma Aldrich, Nemačka
Pufer sa natrijum-karbonatom	Torlak

3.1.2 Hrana

VSM hrana je nabavljena od proizvođača *Research diets (RD Western diet, D12079B, New Brunswick, USA)* i u hrani je 41% energetskog sadržaja poticao od masti, 17% od proteina i 43% od ugljenih hidrata. Sastav standardne hrane (LM2, Veterinarski Zavod Subotica, Subotica, Srbija) je varirao, ali u proseku oko 18% energetskog sadržaja poticao od masti, 24% od proteina, and 59% od ugljenih hidrata. Sastav ove dve hrane, uključujući i masnokiselinski sastav je dat u Tabeli 7.

Tabela 7. Sastav VSM i standardne hrane

	SH	VSM hrana
Energetska vrednost (kcal/g)	3,2	4,7
Proteini (%)	19	20
Ugljeni hidrati (%)	48	50
Masti (%)	6	21
Sastav masnih kiselina (%)		
ZMK	44,0	62,4
MMK	50,0	30,7
PMK	6,0	6,9

3.1.3 Bakterijski sojevi

U ovoj studiji korišćena su dve različite vrste BMK, oba iz roda *Lactobacillus*.

Lactobacillus rhamnosus soj LA68 korišćen u ovoj studiji je sa Instituta za virusologiju, vakcine i serume Torlak i okarakterisan je kao *L. rhamnosus* sekvenciranjem 16s RNK. Institut Torlak proizvodio je preparat ovog soja kao pomoćno sredstvo za regulisanje vaginalne mikroflore koji je bio na tržištu od 1968 do 2011. Preparat je trenutno u postupku promene tehnoloških uslova proizvodnje, nakon čega treba da se opet pojavi na tržištu.

Lactobacillus plantarum WCFS1 predstavlja izolat jedne kolonije soja *Lactobacillus plantarum* (Orla-Jensen) Bergey et al. (ATCC® BAA-793™) i dobijen je od dr Geira Mathiesena sa Univerziteta Prirodnih nauka iz As-a, Norveška.

3.1.3.1 Propagacija bakterijskih sojeva i priprema oralnog rastvora

Obe bakterijske vrste gajene su na isti način. Prekonoćna kultura zasejavana je u MRS medijum sa dodatkom 0,1% Tween 80 (Institut za virusologiju, vakcine i serume Torlak, Beograd, Srbija) i inkubirana na 37°C bez aeracije.

Radi određivanja broja vijabilnih bakterija u preparatu pravljena su razblaženja u MRS medijumu, a 100 µl krajnjeg razblaženja razmazivano je na MRS medijum sa 1,5% agara. Nakon inkubacije tokom noći na 37°C brojane su kolonije.

Priprema oralnog rastvora je vršena svakodnevno, neposredno pre administracije, tako što je prekonoćna kultura centrifugirana 20 min na 3000 g na +4 °C. Dobijeni bakterijski talog je rastvoren u 50x manjoj zapremini PBS-a i ispran jedanput. Broj vijabilnih bakterija u jednoj dozi oralnog preparata je bio 2×10^9 CFU. U cilju održavanja konstantnog broja bakterija, preparat je uvek razblaživan tako da se dobije optička gustina od 0,25 merena na 610 nm u ELISA čitaču (Ascent 6-384 [Suomi], MTX Lab Systems Inc., Vienna, VA 22182, USA).

3.1.4 Eksperimentalne životinje

Ispitivanje uticaja oralne primene *Lactobacillus rhamnosus* LA68 na imunološke i metaboličke parametre u uslovima standardne ishrane i ispitivanje uticaja oralne primene *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre se obavljalo na ženka i mužjacima, redom, miševa soja C57BL/6 koji su kupljeni od Odeljenja za uzgoj laboratorijskih i eksperimentalnih životinja Vojno Medicinske Akademije (VMA, Beograd, Srbija). Tokom trajanja studije, životinje su bile smeštene u vivarijumu Instituta za virusologiju, vakcine i serume Torlak, u standardnim plastičnim kavezima (po 2 životinje u kavezu) u kojima su imale slobodan pristup hrani i vodi. U prostoriju su održavani konstantni uslovi: vlažnost $55 \pm 5\%$; temperatura 23 ± 1 °C i ciklus svetlost/tama 12/12h. Eksperiment je odobren od strane Etičkog komiteta za dobrobit eksperimentalnih životinja Instituta za viruse, vakcine i serume Torlak (br. dozvole 323-07-01577/2016-05/2).

3.1.4.1 Eksperimentalne procedure na životinjama 1 – testiranje efekta *Lactobacillus rhamnosus* LA68 u u uslovima standardne ishrane

Ispitivanje uticaja oralne primene *Lactobacillus rhamnosus* LA68 na imunološke i metaboličke parametre u uslovima standardne ishrane se obavljalo na ženkama miševa soja C57BL/6. U eksperimentu su korišćeni prvi mladunci životinja koje su nabavljeni iz vivarijuma Vojno Medicinske Akademije (VMA). Ženke miševa starosti 4-5 nedelja su podeljene u 2 grupe po 6 životinja. Obe grupe životinja su bile na standardnoj, komercijalnoj dijeti (LM2, Veterinarski Zavod Subotica, Subotica, Srbija). Prva grupa životinja je dobijala preko oralne sonde 2×10^9 CFU *L. rhamnosus* LA68 u 200 μ l izotoničnog fosfatnog pufera (engl. phosphate buffer saline, PBS), dok je druga grupa, koja je služila kao kontrola, dobijala samo 200 μ l PBS-a. Prekonoćna kultura *L. rhamnosus* LA68 je pripremana ponedeljkom, a zatim je oralno davana u toku četiri naredna dana, ukupno četiri puta nedeljno, četiri nedelje tokom mesec dana. Prosečan unos hrane u obe grupe je bio $3,4 \pm 0,1$ g. Tridesetog dana od početka eksperimenta sakupljena je periferna krv. Uzorci krvi za odvajanje seruma ostavljeni su da koagulišu u toku 2 h na 24°C, a zatim je serum odvojen centrifugiranjem 10 min na 3000 rpm. Uzorci seruma su čuvani na -80°C do analize. Životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Jetra i mozak su uzeti od miševa i nakon ispiranja fiziološkim rastvorom, zamrznuti su u tečnom azotu, nakon čega su čuvani na -80°C do analiziranja masnih kiselina.

3.1.4.2 Eksperimentalne procedure na životinjama 2 – Poređenje efekta *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre

Ispitivanje uticaja oralne primene *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na imunološke i metaboličke parametre u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre se obavljalo na mužjacima miševa soja C57BL/6 koji su u trenutku početka eksperimenta bili starosti od 6-8 nedelja, podeljeni u 4 grupe po 12 životinja. Prva grupa miševa je bila na standardnoj, komercijalnoj dijeti (SD) (LM2, Veterinarski Zavod Subotica, Subotica, Srbija), a druga, treća i četvrta grupa su prve 4 nedelje bile samo na ishrani VSM (RD Western diet, D12079B, Research diets, New Brunswick, USA). Nakon 4 nedelje, druga i treća grupa su dobijale preko oralne sonde ili 2×10^9 CFU *L. rhamnosus* LA68 (VSM LA68) ili 2×10^9 CFU *L. plantarum* WCFS1 (VSM WCFS1) u 200 μ l PBS. Četvrta grupa životinja, koja je služila kao kontrola, dobijala je samo 200 μ l PBS (VSM). Prekonoćna kulture *L. rhamnosus* LA68 i *L. plantarum* WCFS1 su pripremane ponedeljkom, a zatim su oralno davane u toku četiri naredna dana, ukupno četiri puta nedeljno u toku 12 nedelja. Masa životinja i potrošnja hrane je merena jednom nedeljno. Nakon 16 nedelja od početka eksperimenta, uzeti su uzorci periferne krvi iz koje je izdvojen serum koji je čuvan na -80°C do trenutka analiziranja. U svakoj grupi je cervikalnom dislokacijom žrtvovano polovina od ukupnog broja životinja. Slezina, jetra i mozak su uzeti od miševa. Iz slezine su odmah izolovani splenociti. Jedan manji deo jetre je stavljen u formaldehid i poslat na histopatološku analizu na Institut za patologiju Medicinskog fakulteta. Drugi, veći deo jetre i mozga je, nakon ispiranja fiziološkim rastvorom, trenutno zamrznuti u tečnom azotu, nakon čega su čuvani na -80°C do analiziranje masnih kiselina.

3.1.4.3 *Eksperimentalne procedure na životinjama 3 – Ispitivanje dužine trajanje uticaja oralne primene Lactobacillus rhamnosus LA68 i Lactobacillus plantarum WCFS1 u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre*

Ispitivanje dužine trajanja uticaja oralne primene *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1 na metaboličke parametre i masnokiselinski sastav organa u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre je praćeno nakon 8 nedelja od prestanka oralnog davanja *L. rhamnosus* LA68 i *L. plantarum* WCFS1 u 3 grupe miševa (po 6 životinja) koji su bili na ishrani VSM. Nakon 24 nedelje od početka eksperimenta uzeti su uzorci periferne krvi iz koje je izdvojen serum koji je čuvan na -80°C do trenutka analiziranja. Nakon toga su životinje žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Jetra i mozak su uzeti od miševa. Jedan manji deo jetre je stavljen u formaldehid i poslat na histopatološku analizu na Institut za patologiju Medicinskog fakulteta. Drugi, veći deo jetre i mozga je, nakon ispiranja fiziološkim rastvorom, trenutno zamrznuti u tečnom azotu, nakon čega su čuvani na -80°C do analiziranja masnih kiselina.

3.2 Metode

3.2.1 Određivanje vrednosti osnovnih biohemijskih parametara

Koncentracije osnovnih biohemijskih parametara: glukoze, triglicerida, ukupnog holesterola, HDL-holesterola i LDL-holesterola su određivane rutinskim automatizovanim enzimskim metodama uz upotrebu Roche-ovih reagenasa (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) na biohemijskom analizatoru COBAS c-311 ROCHE HITACHI. Koncentracije alanin-aminotransferaze (ALT) i aspartat-aminotransferaze (AST) su određivane kinetičkom UV metodom bez piridoksin-fosfata na istom biohemijskom analizatoru.

3.2.2 Izolacija splenocita

U prethodno određenim vremenskim tačkama životinje su žrtvovane i slezine su sakupljene pod aseptičnim uslovima. Nakon uklanjanja drugih tkiva, slezine su stavljene u 5 ml sterilnog rastvora RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (engl. *fetal calf serum*, FCS) u podlozi RPMI 1640. Slezina je usitnjena sa pincetom kako bi se oslobodile ćelije, a zatim je suspenzija ćelija i ostatak tkiva propuštena kroz sterilnu metalnu rešetku (*wire mesh* No. 100). Suspenzija je centrifugirana 10 min na 400 x g (SIGMA 3K18, Sigma Laboratory Centrifuges GmbH), nakon čega su iz suspenzije uklonjeni eritrociti inkubiranjem u toku 15s u 4 ml sterilne redestilisane vode. Suspenziji je zatim dodato 4 ml smeše 0,3M NaCl/5% FCS/RPMI 1640 i opet centrifugirano 10 min na 400 x g a izdvojeni talog je resuspendovan u 2 ml 10% FCS/RPMI 1640.

Vijabilnost ovog ćelijskog preparata je određena Tripan blue exclusion testom (pomešano je 50 µl suspenzije limfocita sa 50 µl Trypan blue boje) i ćelije su izbrojane u A kvadratima Neuber-ove komore. Broj ukupnih i vijabilnih ćelija je izvršeno prema sledećoj formuli:

Broj ćelija/ml = srednja vrednost broja ćelija u A-kvadratima x Razblaženje x 10 000

% vijabilnosti = broj živih ćelija / ukupan broj ćelija x 100

Određena vijabilnost ćelija je bila veća od 95%. Nakon provere vijabilnosti, ćelije su razblažene u smeši 10% FCS/50 μ M β -merkaptotanol/RPMI 1640 do koncentracije od 1×10^6 ćelija/ml.

Ovako dobijena suspenzija ćelija je podeljena na dva dela. Jedan deo ćelija je na odgovarajući način stimulisan, nakon čega je praćena metabolička aktivnost ćelija, a supernatanti su izdvojeni i korišćeni za određivanje citokina. Drugi deo ćelijske suspenzije je korišćen za kvantifikaciju subpopulacije leukocita protočnom citometrijom.

3.2.3 Stimulacija splenocita i određivanje metaboličke aktivnosti splenocita - MTT test

Aseptično izolovani splenociti (1×10^6 ćelija/ml) su stimulisani *in vitro* u toku inkubacije (37 °C, 5% CO₂: 48 h) ili sa 10 μ g/ml lipopolisaharida (LPS) (lipopolisaharid iz *Salmonella minnesota*, Sigma-Aldrich) ili sa 10 μ g/ml peptidoglikana (PGN) (peptidoglikan iz *Staphylococcus aureus*, BioChemika, Fluka). Nakon 24h ćelije su odvojene od supernatanta koji su sakupljeni i zamrznuti na -80 °C i korišćeni su za analizu citokina. Ćelije korišćene za merenje proliferacije sa 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromidom (MTT) inkubirane su 48h sa stimulatorima [276]. Ploče sa ćelijskom kulturom su centrifugirane na 400 x g u toku 10 min nakon čega su supernatanti odbačeni. U svaki bunar je dodato po 100 μ l RPMI podloge (bez fenol crvenog) sa dodatkom 500 μ g MTT/ml (Sigma-Aldrich) i ćelije su inkubirane na (37 °C, 5% CO₂: 4 h). Nakon toga, u cilju rastvaranja zaostalih kristala, u svaki bunar je dodato po 100 μ l 10% natrijum-dodecil-sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) u 10mM HCl. Nakon inkubacije na 37 °C u toku 24h, na spektrofotometru (Ascent 6-384 [Suomi], MTX Lab Systems Inc., Vienna, VA 22182, USA) je merena apsorbancija na 580 nm.

3.2.4 Protočna citometrija

Suspenzija ćelija koja je pripremljena na već opisan način, razblažena je u 2% goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u PBS-u sa 0,1% natrijum-azidom do koncentracije od 1×10^6 ćelija/ml. U cilju smanjivanja nespecifičnog vezivanja antitela, suspenzija je inkubirana u toku 10 min sa 10 μ l normalnog mišjeg seruma. Suspenzije ćelija su nakon toga obeležene monoklonskim antitelima konjugovanim fluorohromom i analizirana protočnim citometrom FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). U eksperimentalnom radu su korišćena monoklonska fluorescein isotiocijanatom (engl. *fluorescein-isothiocyanate*, FITC) i fikoeritriinom (engl. *phycoerythrin*, PE) obeležena antitela: CD3 ϵ (145-2C11 hamster IgG FITC), NK-cells (PK136 mouse IgG2a PE), CD19 (PeCa1 rat IgG2a PE), CD25 (PC61.5.3 Rat IgG1 FITC), CD11b(M1/70.15 Rat IgG2b FITC) i CD32/16 (DaBe4 RatIgG2b PE). Sva antitela su kupljena od Immunotools (Immunotools, Friesoythe, Germany) i korišćena su u količini od 4 μ l na milion ćelija. Nakon dodavanja antitela uzorci su inkubirani na 4 °C u mraku u toku 20 min. Po završenoj inkubaciji, uzorcima je dodato 2 ml 2% BSA u PBS-u sa 0,1% natrijum-azidom. Uzorci su vorteksovani i centrifugirani 10 min na 400 x g. Ovaj postupak je ponovljen dva puta nakon čega su uzorci analizirani na protočnom citometru.

3.2.5 Estrakcija lipida iz jetre i mozga

Ukupni lipidi su ekstrahovani iz jetre, mozga i srca smešom organskih rastvarača hloroform/metanol prema metodi po Bligh-Dyer-u [277].

Ekstrakcija je izvedena tako što se u 1 g homogenizovanog uzorka doda 1 ml vode i 10 ml smeše metanol-hloroforma (2:1, v/v) i smeša se obrađuje u Lourdes-ovom homogenizatoru ili Sorvall omnimikseru 2 minuta na sobnoj temperature. Homogena smeša se centrifugira i odvoji se supernatanta, a ostatak se recentrifugira sa oko 12 ml smeše metanol:hloroform:voda u odnosu 2:1:0,8. Nakon centrifugiranja, supernatanti se spoje i u njih se doda po 7 ml hloroforma i vode. U levku za odvajanje se izdvoji hloroformski sloj

koji se zatim uparava na rotacionom evaporatoru na 30-35°C do suva. Izdvojeni lipidi se čuvaju na -20°C do analize masnih kiselina

3.2.6 Određivanje sastava masnih kiselina metodom gasne hromatografije

Sastav masnih kiselina u ekstrahovanim lipidima određen je metodom gasne hromatografije nakon derivaizacije masnih kiselina u ispraljive metil-estre.

Prevođenje masnih kiselina u metil-estre vršeno je postupkom transesterifikacije korišćenjem rastvora HCl u metanolu, kako je opisano u metodi po Ichihara-u i Fukubayashi-u [278]. Ekstrahovani lipidi se prebace u staklene epruvete i rastvore u 0,2 ml toluena. U rastvor lipida se doda po 1,5 ml metanola i 0,3 ml 8% rastvora HCl. Sadržaj u epruvetama se izmeša na vorteksu a zatim se stavljaju u vodeno kupatilo na 100°C tokom 1h. Kada se sadržaj ohladi na sobnoj temperaturi, doda se 1 ml heksana i 1 ml vode za ekstrakciju metil-estara masnih kiselina. Sadržaj se opet vorteksira i centrifugira na 3000 obrtaja 15 min, a nakon toga se gornji heksanski sloj koristi za analizi masnih kiselina.

Metil-estri masnih kiselina su ispitivani metodom gasne hromatografije na aparatu Agilent Technologies 7890A sa plameno jonizacionim detektorom. Korišćena je kapilarna kolona CP-Sil 88 (100 m x 0,25 mm x 0,2 µm), pri čemu je helijum bio noseći gas konstantnog protoka od 1 ml/min. Uzorci su injektovani na temperaturi kolone od 80°C, temperature injektora je bila 250°C a temperature detektora 270°C. Temperatura kolone se povećavala za 4°C/min od 80°C do 220°C, zatim je ova temperatura zadržana 5 min, a onda se temperatura kolone povećavala za 4°C/min do 240°C. Ova krajnja temperatura je bila zadržana 10 minuta. Masne kiseline su identifikovane na osnovu retencionih vremena standardne smeše masnih kiselina (Supelco FAME Mix, Bellefonte, PA).

Rezultati su prikazivani kao procentualni sadržaj pojedinačnih masnih kiselina u odnosu na ukupne masne kiseline.

3.2.7 ELISA – merenje koncentracije citokina u serumu i ćelijskim supernatantima

Određivanje citokina je rađeno iz supernatanta stimulisanih splenocita i iz mišjeg seruma. Za određivanje su korišćene MaxiSorp ploče (Nunc A/S, Denmark), a standardi i antitela su kupljena od Biolegend-a (San Diego, CA). Procedura određivanja citokina je sprovedena prema uputstvima proizvođača.

Ukratko, glavno antitelo je aplikovano u 50 µl 0,1M natrijum-karbonatnog pufera (pH 9,6) i ostavljeno preko noći na 4 °C. Blokiranje je izvršeno sa 2% BSA/PBS u toku 1 h na 37°C. Ispiranje je vršeno tri puta sa po 200 µl PBS-a sa 0.05% Tween-a 20, i jednom sa 200 µl PBS-a. Analiza citokina je rađena u nerazblaženom supernatantu, dok je serum razblažen 2-5x u PBS-u koji je sadržao 1% BSA i inkubiran je u toku 1h na 37 °C. Za detekciju su korišćena antitela konjugovana sa biotinom zajedno sa streptavidin-peroksidazom (Biolegend, San Diego, CA) i orto-fenilendiaminom kao supstratom, a apsorbancija razvijene boje je merena na ELISA čitaču (Ascent 6-384 [Suomi], MTX Lab Systems Inc., Vienna, VA 22182, USA).

3.2.8 ELISA – određivanje koncentracije leptina, adiponektina i insulina u serumu

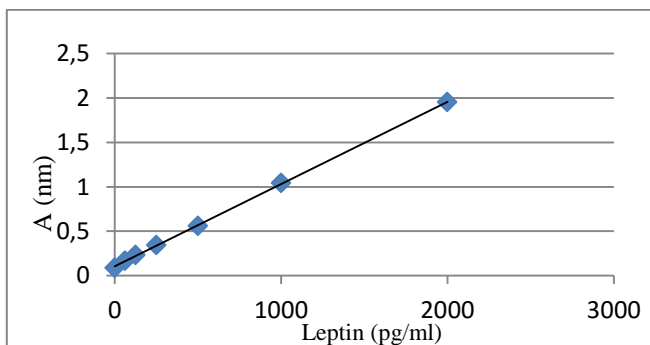
Leptin, adiponektin i insulin su određivani u serumu korišćenjem komercijalnih ELISA testova prema uputstvu proizvođača. Uzorci seruma za određivanje leptina su razblaženi 20x, dok je za određivanje insulina korišćen nerazblažen serum. Serum je razblažen u rastvoru koji je bio deo komercijalnog testa.

ELISA testovi su u osnovi sendvič enzim imunoesej za kvantitativnu analizu insulina/leptina/adiponektina iz mišjeg seruma. U osnovi testa je antigen-antitelo interakcija. Mikrotitarska ploča ima 96 bazena koji su obeleženi specifičnim antitelom protiv insulina/leptina/adiponektina. Po dodatku standarda ili rastvora uzorka u bazene, prisutan leptin/insulin/adiponektin vezaće se za specifična antitela, i kao rezultat toga

nastaje antitelo-antigen-kompleks. Komponente koje se nisu vezale za antitela se u narednom koraku uklanjaju ispiranjem puferom. Sledi dodavanje antitela konjugovanog peroksidazom koji se vezuje za At-Ag-kompleks pri čemu se formira antitelo-antigen antitelo (sendvič) kompleks. Svaki enzimski konjugat koji je ostao nevezan se uklanja ispiranjem puferom. Enzimski supstrat (urea peroksid) i hromogen (tetrametilbenzidin) se dodaju u bazene i inkubiraju. Vezani konjugat prevodi bezbojni hromogen u plavi produkt, a po dodatku stop-reagensa se boja menja iz plave u žutu. Merenje se obavlja fotometrijski na 450 nm, a korekcija talasne užine na 540 nm ili 570 nm. Dobijena apsorbancija je proporcionalna koncentraciji insulin/adiponektina u uzorku i izračunava se iz dobijene jednačine prave.

Proračun:

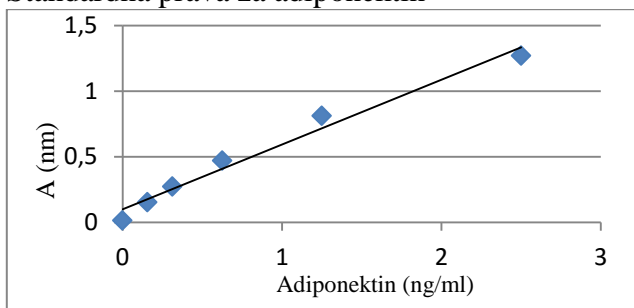
Standardna prava za leptin



Za proračun korišćena je jednačina prave: $y = 0,0009x + 1,1062$, sa korelacionim koeficijentom: 0,9997.

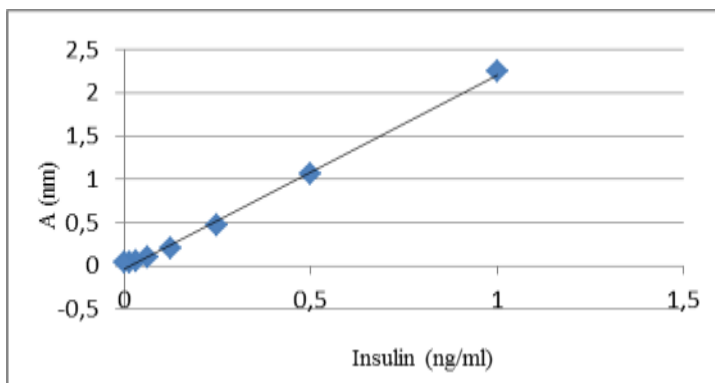
Proračun:

Standardna prava za adiponektin



Za proračun korišćena je jednačina prave: $y = 0,4936x + 0,0991$, sa korelacionim koeficijentom: 0,9952.

Standardna prava za insulin



Za proračun korišćena je jednačina prave: $y = 2,2355x - 0,0278$, sa korelacionim koeficijentom: 0,9966.

3.2.9 Određivanje koncentracije glukoze u krvi i test opterećenja glukozom

U cilju izvođenja testa opterećenja glukozom, životinjama je ukinuta hrana 3h pre uzimanja uzoraka krvi. Test je izveden 20 dana pre kraja eksperimenta. Životinjama je putem oralne sonde dat rastvor glukoze koncentracije 2 g/l, nakon čega su, u tačno određenim vremenskim intervalima, sakupljeni uzorci krvi iz repne vene. Promene u sadržaju glukoze u krvi je meren test trakama (Roche LTD).na Accu-Chek Go aparatu.

3.2.10 Histološka analiza tkiva jetre

Uzorci jetre za histološku analizu su fiksirani sa 10% formalinom, zatim su dehidratirani u alkohol-ksilen seriji i uklopljeni u parafin. Tanki isečci tkiva (5 μm) su obojeni rutinskom metodom bojenja, hematoksilin-eozin (HE). Uzorci su analizirani pomoću svetlosnog mikroskopa (Olympus BX41) i izvršeno je bodovanje stepena steatoze prema kriterijuma navedenim u literaturi [279]. Histološka analiza je urađena od strane iskusnog histopatologa. Stepen steatoze je određen procenom proporcije masnih kapi u hepatocitima: 0 = nema promene; $<1/3$ = blaga; $1/3-2/3$ = umerena, $>2/3$ = ozbiljna.

3.2.11 Statistička obrada podataka

Varijable su testirane na normalnost distribucije upotrebom *Kolmogorov-Smirnov* testa. Varijable koje su imale normalnu distribuciju su prikazivane kao srednje vrednosti i standardne devijacije (SD) ili standardna greška merenja (SEM). Kontinuirane varijable koje slede normalnu raspodelu, kao i kontinuirane varijable koje posle logaritmovanja slede normalnu raspodelu, poređene su ili Studentovim t-testom ili jednofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) uz primenu *post-hoc Tuckey* testa za utvrđivanje statistički značajne razlike između grupa. Varijable koje ne prate normalnu raspodelu poređene su neparametarskim testovima (*Mann-Whitney U test*, *Kruskal-Wallis test*). Statistička značajnost je uzeta u obzir kada je nivo značajnosti P bio manji ili jednak 0,05 ($P \leq 0,05$). Statistička obrada podataka je urađena u programu SPSS ver. 20.0 (SPSS, Chicago, IL, USA), i OriginPro 8 software (OriginLab Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA).

4 REZULTATI I DISKUSIJA

4.1 Ispitivanje efekata primene *Lactobacillus rhamnosus* LA68 pri standardnoj ishrani u nepatološkim uslovima

Lactobacillus rhamnosus soj LA68 dobijen je za ovu studiju sa Instituta za virusologiju, vakcine i serume Torlak. Kako do ove studije nije bilo dovoljno podataka o efektima njegove oralne primene, a uzimajući u obzir specifičnost različitih *Lactobacillus* vrsta i sojeva, jedan od ciljeva ove studije je bila karakterizacija soja *Lactobacillus rhamnosus* LA68 kroz efekte na imunološke i metaboličke parametre kod laboratorijskih miševa soja C57BL/6 u nepatološkim uslovima, pri standardnoj ishrani.

Sve je veći broj dokaza koji ukazuju na direktnu vezu između sastava GI mikrobiote, metabolizma domaćina i iskorišćenja energije. Modifikacijom GI mikrobiote se može uticati na metabolizam masti domaćina preko sinteze kratkolančanih masnih kiselina koje mogu poslužiti za *de novo* sintezu lipida i preko uticaja na ekspresiju gena uključenih u preuzimanje masnih kiselina, oksidaciju i deponovanje (FIAF geni) [280]. Takođe, različite vrste mikroorganizama u GIT-u mogu modulirati sastav masnih kiselina, ne samo u intestinumu (produkcijom SCFA), već i u tkivima od ključne važnosti za metabolizam domaćina [280]. Zbog toga je bilo značajno da se ispita da li primena specifičnog *Lactobacillus* soja u uslovima standardne ishrane može uticati na lipidni profil, kao i na sastav masnih kiselina organa koje reflektuju profil masnih kiselina unetih hranom.

Takođe, s obzirom da se rod *Lactobacillus* sastoji od velikog broja vrsta i sojeva koji imaju različite metaboličke i strukturalne karakteristike koje se ispoljavaju i u načinu na koji intereaguju sa imunskim sistemom sisara [73, 82, 83], jedan od ciljeva u ovoj studiji je bio da se ispita efekat *L. rhamnosus* LA68 na imunski sistem zdravih miševa u uslovima standardne ishrane. Životinje su u periodu od mesec dana, 4 x nedeljno, gavažom dobijale LA68 u dozi od 2×10^9 CFU, a zatim su praćeni osnovni imunološki parametri kao što je procentualna zastupljenost leukocitnih populacija u splenocitima, serumski nivoi citokina, kao i reaktivnost ćelija na nespecifičnu stimulaciju, a rezultati su zatim poređeni sa kontrolnom grupom.

4.1.1 Biohemijski parametri nakon primene LA68 u uslovima standardne ishrane

Osnovni biohemijski parametri su određeni u cilju utvrđivanja da li oralna primena *L. rhamnosus* LA68, u trajanju od 4 nedelje u uslovima standardne ishrane, utiče na neke od osnovnih biohemijskim parametara, telesnu masu i maseni udeo jetre i mozga u ukupnoj telesnoj masi. Analizom dobijenih vrednosti, utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u izmerenim biohemijskim parametrima između grupe koja je oralno dobijala *L. rhamnosus* LA68 (LA68 grupa) i kontrolne grupe (Tabela 8). Sve dobijene vrednosti su bile u normalnom opsegu za C57BL/6 miševe (prema podacima o hematologiji za C57BL/6, *Charls River*). Rezultati merenja mase jetre nisu pokazali statistički značajnu razliku između kontrolne i LA68 grupe. Međutim, rezultati ukazuju na statistički značajno povećanje u masi mozga u LA68 grupi. Ovo je najverovatnije posledica korišćenja mladih miševa, u periodu intenzivnog rasta, i kratkog eksperimentalnog perioda koji je bio ograničavajući za detektovanje promena u telesnoj masi ili masi jetre, za koje se takođe zapaža trend porasta u LA68 grupi.

U Tabeli 8 su prikazane vrednosti za telesnu masu, maseni udeo organa i osnovne biohemijske parametre.

Tabela 8. Telesna masa, procentualna masa organa i biohemijski parametri na kraju eksperimentalnog perioda

	Kontrola	LA 68	
	Xs±Sd	Xs±Sd	P
Telesna masa (g)	21,03±1,25	20,35±0,75	0,322
Jetra masa (%)	5,08±0,22	5,15±0,14	0,554
Mozak masa (%)	1,41±0,10	1,56±0,05	0,028
ALT (IU/l)	120,7±49,9	62,5±24,4	0,066
AST (IU/l)	180,5±32,5	210,5±55,9	0,310
AP (IU/l)	198,5±28,6	184,0±17,6	0,396
Glukoza (mmol/l)	12,18±3,43	10,40±1,71	0,372
Ukupni holesterol (mmol/l)	1,13±0,34	0,69±0,52	0,148
TG (mmol/l)	0,82±0,21	0,74±0,15	0,551

4.1.2 Sastav masnih kiselina jetre i mozga prilikom primene LA68 u uslovima standardne ishrane

Rezultati određivanja sastava masnih kiselina u ukupnim lipidima jetre ukazuju da ne postoji statistički značajna razlika u zasićenim masnim kiselinama nakon 4 nedelje oralne primene soja LA68 u odnosu na kontrolnu grupu. Što se tiče nezasićenih masnih kiselina, u LA68 grupi su uočene značajno veće vrednosti za palmitoleinsku kiselinu ($0,92\pm 0,28$ vs $1,36\pm 0,24$, $p=0,038$), dok su omega-3 masne kiseline, alfa-linoleinska (ALA) i eikozapentaenska kiselina (EPA), bile takođe povećane, ali ovo povećanje nije bilo statistički značajno ($p>0,05$). Nisu uočene promene u sadržaju dokozaheksaenske kiseline (DHA) u ovom organu između dve grupe. U Tabeli 9 prikazan je sastav masnih kiselina lipida jetre.

Tabela 9. Sastav masnih kiselina lipida jetre u kontrolnoj grupi i LA68 grupi (% u odnosu na ukupne masne kiseline)

	Kontrola	LA 68	
MK	Xs±Sd	Xs±Sd	P
16:0	22,32±0,43	21,59±0,48	0,067
16:1	0,92±0,28	1,36±0,24	0,038
18:0	16,29±1,79	16,92±0,97	0,476
18:1n-9	12,15±2,93	11,71±1,03	0,914
18:2n-6	18,06±1,64	18,92±1,20	0,476
18:3n-3	0,31±0,09	0,45±0,15	0,171
20:4n-6	13,49±1,28	14,84±0,49	0,067
20:5n-3	0,64±0,13	0,72±0,04	0,476
22:6n-3	12,84±0,69	12,31±0,51	0,257

Rezultati određivanja sastava masnih kiselina u ukupnim lipidima mozga pokazuju povećan sadržaj palmitinske kiseline (18,28±2,78% vs 21,49±1,27%, p=0,042), stearinske kiseline (15,33±2,86% vs 21,04±2,17%, p=0,017), arahidonske kiseline (10,24±0,61 vs 12,03±0,66%, p=0,009) i DHA (16,30±0,88% vs 19,08±0,87%, p=0,004) u LA68 grupi u odnosu na kontrolnu grupu. Sadržaj linolne kiseline je nešto manji u LA68 grupi, ali ova razlika nije statistički značajna. Sastav masnih kiselina lipida mozga prikazan je u Tabeli 10.

Tabela 10. Sastav masnih kiselina lipida mozga u kontrolnoj grupi i LA68 grupi (% u odnosu na ukupne masne kiseline)

	Kontrola	LA 68	
MK	Xs±Sd	Xs±Sd	P
16:0	18,28±2,78	21,49±1,27	0,042
18:0	15,33±2,86	21,04±2,17	0,017
18:1c9	22,59±5,71	18,87±0,97	0,329
18:2n-6	0,92±0,32	0,65±0,05	0,247
20:4n-6	10,24±0,61	12,03±0,66	0,009
22:6n-3	16,30±0,88	19,08±0,87	0,004

S obzirom na metaboličke efekte primene BMK, jedan od ciljeva ovog rada je bio da se ispita da li oralna primena soja LA68 u uslovima standardne ishrane može uticati na sastav masnih kiselina organa, pre svega jetre i mozga, organa sa veoma intenzivnom metaboličkom aktivnošću [281]. Rezultati prikazani u Tabelama 9 i 10 ukazuju da prilikom oralne primene soja LA68 dolazi do promena u sastavu masnih kiselina ispitivanih organa. Naime, uočeno je i od strane drugih autora da modifikacija GI mikrobiote miševa primenom probiotskih bakterija (*B. breve* NCIMB 702258, *L. paracasei* NFBC 338) dovodi do promene u sastavu masnih kiselina jetre i adipoznog tkiva [136, 282]. Isto tako, oralna primena probiotskih bakterija kod miševa dovodi do promena u sastavu masnih kiselina mozga, a uočene su i razlike u efektima između različitih bakterijskih sojeva (*B. breve* NCIMB 702258 i *B. breve* DPC6330) [135]. Takođe, Barrett i sar. su objavili da primena soja *B. breve* DPC6330 kod mladih pacova, koji su rano odvojeni od majke dovodi do značajnog povećanja palmitoleinske, arahidonske kiseline i DHA u lipidima jetre, eikozenske kiseline u adipoznom tkivu i palmitoleinske u prefrontalnom korteksu, dok davanje istog soja pacovima koji nisu bili odvojeni prerano od majke, dovodi do povećanja u EPA i dokozapentaenske kiseline u serumu [283]. U studiji u kojoj su trudnice tokom

cele trudnoće suplementirane sa dva soja BMK, *L. rhamnosus* GG i *Bifidobacterium lactis* Bb12, a zatim praćen sastav mleka nakon porođaja, nađeno je da primena ovih sojeva dovodi do povećanja u sadržaju gama-linoleinske kiseline u majčinom mleku [284]. Međutim, u literaturi ne postoje podaci o metaboličkim efektima *L. rhamnosus*, a posebno efektima soja LA68 na sastav masnih kiselina organa domaćina.

U našem radu, primena soja LA68 u toku 4 nedelje, dovela je do značajnog povećanja sadržaja palmitoleinske kiseline u lipidima jetre, ali nije imala uticaja na sadržaj omega-3 masnih kiselina u poređenju sa kontrolnom grupom, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenim primenom drugog probiotskog soja (*B. breve* DPC6330) [283]. Palmitoleinska kiselina je jedinstvena masna kiselina koja služi kao marker *de novo* sinteze lipida i njena koncentracija u tkivu se može povećati kao posledica aktivacije *de novo* lipogeneze [285]. *Dimopoulos* i sar. su objavili da *in vitro* izlaganje mišićnih ćelija palmitoleinskoj kiselini dovodi do povećanog preuzimanja glukoze, kao posledica povećane oksidacije glukoze i sinteze glikogena u ćelijama [286]. Rezultati ukazuju da oralna primena soja LA68 dovodi do povećanja u sadržaju palmitoleinske kiseline u lipidima jetre, ali su dalja istraživanja neophodna kako bi pružila detaljnija objašnjenja za metaboličke puteve i potencijalne efekte povećanja palmitoleinske kiseline u organizmu.

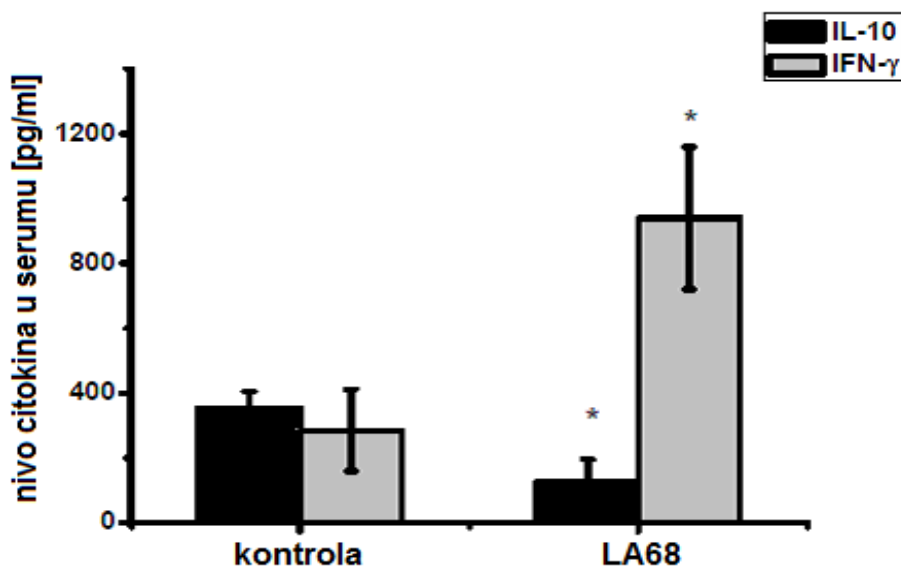
Što se tiče uticaja na sastav masnih kiselina mozga, utvrđeno je da primena ovog soja dovodi do statistički značajnih promena u sastavu pojedinih masnih kiselina u poređenju sa kontrolnom grupom (Tabela 10). Uočeno je povećanje sadržaja arahidonske kiseline i DHA nakon oralne primene soja LA68. Ovo može biti od značaja s obzirom da obe masne kiseline (arahidonska i DHA) igraju važnu ulogu u neurogenezi i neurotransmisiji [287, 288]. Takođe, zbog njihovog pozitivnog uticaja na kognitivne procese kao što su učenje i pamćenje [289, 290], kao i njihovog značaja u razvoju nervnog sistema, arahidonska kiselina i DHA su postale važni sastojci mlečnih formula [291]. Povećanje u sadržaju palmitinske i stearinske kiseline u odnosu na kontrolnu grupu može da ima negativne posledice, s obzirom da promena odnosa zasićenih i nezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima ćelijskih membrana može uticati na fluidnost membrane koja zatim može dovesti do promena kod integralnih proteina koji determinišu funkcionalne karakteristike ćelijskih membrana [292].

Prikazani rezultati jasno ukazuju da manipulacija mikrobiote dovodi do promena u sastavu lipida kod domaćina. Ova interakcija između masnih kiselina i članova mikrobiote može uticati na biološke uloge i jednih i drugih, a takve interakcije se na kraju ispoljavaju na fiziološkim funkcijama domaćina [135].

Mehanizam kojim oralna primena BMK dovodi do promena u sastavu masnih kiselina mozga i jetre nije u potpunosti razjašnjen. Jedno od objašnjenja bi bilo da primena BMK dovodi do modulacije procesa apsorpcije masti u intestinumu. S' obzirom da je hrana kojom su miševi hranjeni sadržala većinu masnih kiselina detektovanih u tkivima, ovim mehanizmom bi moglo da se objasni povećanje palmitinske, stearinske kiseline i DHA. Povećanje sadržaja DHA u mozgu u odnosu na kontrolnu grupu se može objasniti uticajem soja LA68 na metabolizam masnih kiselina, pre svega asimiliranjem određenih polinezasićenih masnih kiselina kao što je alfa-linolenska kiselina, prisutna, mada u maloj količini, u hrani kojom su životinje hranjene. Ovaj efekat je primećen u studiji u kojoj je praćen efekat istovremene administracija jednog probiotskog soja (*B. breve* 702258) i ALA (prekusora EPA i DHA) na sastav masnih kiselina jetre i mozga kod miševa, pri čemu je nađeno da je prisustvo ove bakterije dovelo do značajnog povećanja u koncentraciji EPA u jetri i DHA u mozgu, u poređenju sa životinjama koje su samo dobijale ALA [293]. Sadržaj arahidonske kiseline je takođe bio povećan u mozgu tretiranih životinja, što se može objasniti uticajem ovog soja na aktivnosti enzima desaturaza, uključenih u biotransformaciju masnih kiselina u više polinezasićene masne kiseline. *Fukushima* i sar. su otkrili da mešavina probiotskih bakterija koja je, pored ostalih, sadržala i laktobacile povećava aktivnost enzima Δ^6 -desaturaze u jetri pacova, što je dovelo do povećane sinteze arahidonske kiseline iz linolne [294]. U hrani koju su životinje dobijale, linolna kiselina je bila zastupljena u značajnom procentu i ovo bi moglo da bude objašnjenje za značajno povećanje arahidonske kiseline nakon 4 nedelje primene soja LA68.

4.1.3 Citokinski profil nakon primene LA68 u uslovima standardne ishrane dobijen iz seruma

U cilju praćenja sistemskog efekta primene soja LA68 kod zdravih miševa, određen je nivo citokina (IL-10, IFN γ , IL-6 i IL-17A) u uzorcima seruma životinja koje su oralno dobijale LA68, kao i u kontrolnoj grupi, s obzirom da se promene u profilu citokina u GIT-u indukovane od strane različitih sojeva BMK reflektuju u krvi [295]. Statistički značajna razlika između LA68 i kontrolne grupe je nađena u nivoima citokina IL-10 i INF- γ . Nivo IL-10 je smanjen, dok je nivo IFN- γ povećan u serumu miševa koji su dobijali LA68 u odnosu na kontrolnu grupu što je prikazano na Slici 5.

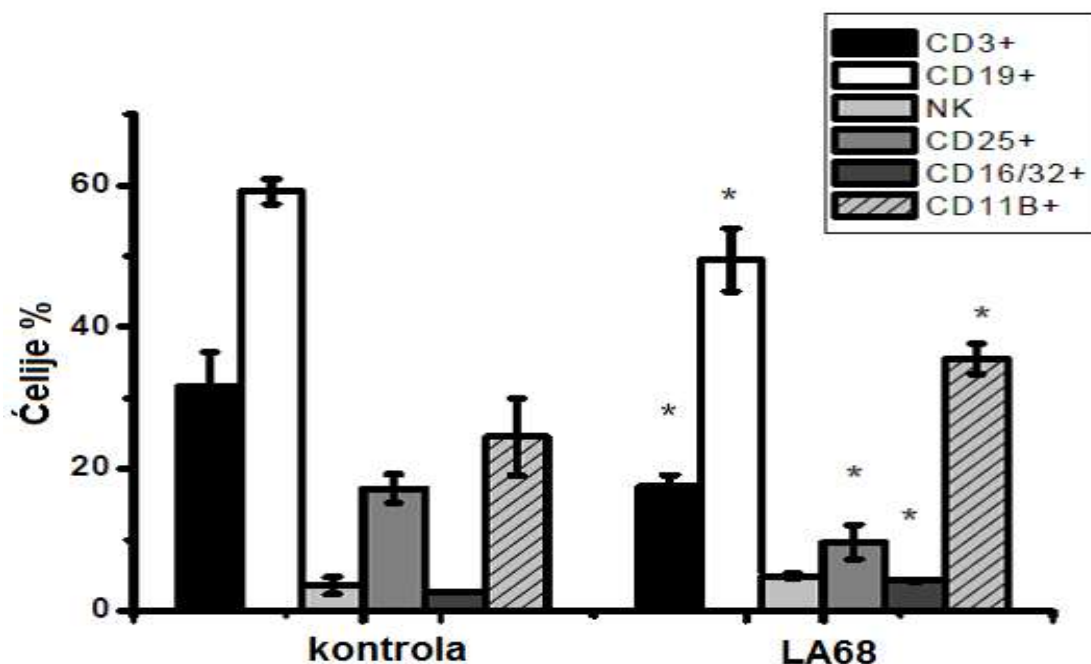


Slika 5. Nivo citokina u serumu C57BL6 miševa. LA68-eksperimentalna grupa koja je dobijala gavažom *L. rhamnosus* LA68. Prikazane su srednje vrednosti u pg/ml \pm SD. Statistička značajnost je dobijena primenom Studentovog t-testa za neuparene uzorke, $P < 0,05$ je označena zvezdicom (*).

Što se tiče vrednosti za IL-6 i IL-17A, nisu nađene statistički značajne razlike između grupa najverovatnije zbog visoke varijacije između individualnih uzoraka zbog čega podaci nisu ni prikazani.

4.1.4 Procenti leukocitnih populacija nakon primene LA68 u uslovima standardne ishrane

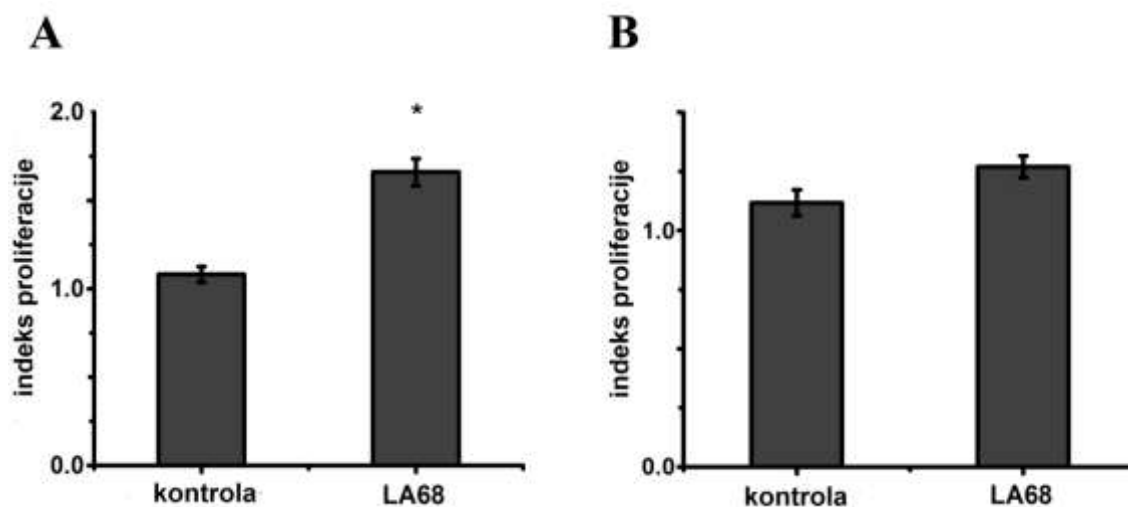
Procedura izolacije leukocita je dala sličan broj ćelija u obe grupe životinja, a slezine nisu bile uvećane. Populacije ćelija koje su analizirane su obuhvatile CD3+ ćelije ili ukupne T ćelije, CD19+ ćelije ili B ćelije (izuzev plazma ćelija), NK ćelije, CD25+ ćelije ili aktivirane T i B ćelije, CD16/32 ili FcγRIII/FcγRII pozitivne ćelije i Cd11b+ ili CR3+ ćelije. Oralna primena soja LA68 dovela je do statistički značajnog smanjenja broja CD3+, CD25+ i CD19+ ćelija i povećanja broja CD11b+ i CD16/32+ ćelija u odnosu na kontrolnu grupu. Nije nađena statistički značajna razlika za NK ćelije između dve grupe (Slika 6).



Slika 6. Razlike u zastupljenosti određenih populacija leukocita u slezini nakon primene *L. rhamnosus* LA68. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost \pm SD od tri biološka replikata, svaki dobijen spajanjem uzorka od dve životinje. Statistička značajnost je dobijena korišćenjem nezavisnog T-testa. * označava statističku značajnost, $P < 0,05$.

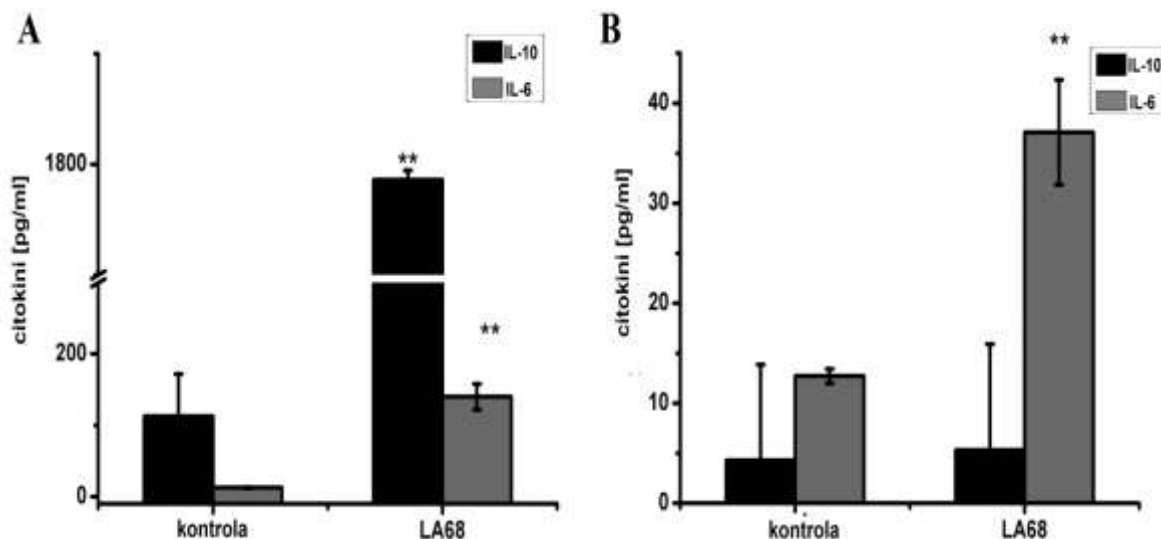
4.1.5 Reaktivnost leukocita slezine na nespecifičnu stimulaciju nakon primene LA68 u uslovima standardne ishrane

Splenciti su stimulisani *in vitro* tokom 48 h inkubacije LPS-om ili PGN-om nakon čega je metabolička aktivnost splencita merena MTT testom. MTT test je pokazao da je LPS potentniji stimulator ćelijske proliferacije od PGN-a. Stimulisani splenciti životinja koje su dobijale soj LA68 su pokazali značajno veći indeks proliferacije nakon stimulacije sa LPS-om nego stimulacijom sa PGN-om koji nije dao statistički značajnu promenu u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 7).



Slika 7. Metabolička aktivnost splencita određena MTT testom nakon stimulacije (A) LPS; (B) PGN. Prikazane su srednje vrednosti indeksa proliferacije (dobijene kada se signal dobijen od stimulisanih ćelija podeli sa signalom dobijenih od nestimulisanih) \pm SD. Statistička značajnost je određivana T-testom za nezavisne uzorke, i * označava statističku značajnost, $P < 0,05$.

Produkcija citokina je određivana, pored seruma, i u supernatantu splencita stimulisanih LPS-om ili PGN-om. U supernatantu stimulisanih splencita nađena je značajno veća produkcija IL-6 u LA68 grupi u poređenju sa kontrolnom grupom (Slika 8A, B). Produkcija IL-10 je značajno porasla u LA68 grupi, ali samo nakon stimulacije splencita sa PGN-om (Slika 8A). Nije bilo statistički značajne razlike između grupa u produkciji IL-17 i INF- γ nakon stimulacije splencita.



Slika 8. Nivo citokina meren u supernatantu stimulisane kulture splenocita (A) PNG; (B) LPS. Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti u pg/ml \pm SD. Statistička značajnost je dobijena korišćenjem T-testa za nezavisne uzorke. Zvezdica (*) označava statističku značajnost, $P < 0,05$, dok ** odgovara $P < 0,005$.

Jedan od ciljeva ove studije bio je i ispitati efekat oralne primene *Lactobacillus rhamnosus* soja LA68 na imunološke parametre kod miševa u uslovima standardne ishrane.

Kako su bakterije date oralno, kontakt bakterija sa imunskim sistemom životinje se dogodio na nivou GI mukoze. Podaci iz literature pokazuju da različite vrste/sojevi BMK mogu indukovati različit imunski odgovor, lokalni (mukozni) imunski odgovor, sistemski imunski odgovor ili toleranciju na prisutne antigene, kao posledica različite vrste kontakta BMK sa imunskim sistemom u GIT-u (GALT) [91, 296]. Naši rezultati ukazuju da je aktivacija imunskog sistema u GIT-u, oralnom primenom soja LA68, dovela do sistemskih promena, s obzirom na promene u populaciji splenocita i razlike u nivou serumskih citokina u poređenju sa kontrolnom grupom.

Kod miševa koji su oralno dobijali soj LA68 nađeno je povećanje procenta CD11b⁺ ćelija u poređenju sa kontrolnom grupom. Ovaj molekul, takođe označen još kao CR3 ili Mac-1, eksprimiran je na površini mnogih leukocita, uključujući monocite, neutrofile, NK ćelije, granulocite, makrofage, i uključen je u celularnu adheziju, fagocitozu i migraciju leukocita [297]. Neutrofilni granulociti su prva linija odbrane od bakterija, pa povećanje u CD11b⁺

ćelijama je najverovatnije povezano sa ekspanzijom ove ćelijske populacije, mada to ostaje da se potvrdi s obzirom da ovaj molekul može biti eksprimiran i na monocitima koji su prekusori makrofaga i dendritskih ćelija. Makrofage i dendritske ćelije su komponente urođenog imunskog odgovora, takođe uključene u odbranu od bakterija. Interesantno je da mišji, isto kao i humani neutrofili, eksprimiraju na svojoj površini TL9 receptor. To čini neutrofile još senzitivnijim na ligande za TL9 receptor, poreklom iz bakterija koji ne mogu dospeti u endosome, što u stvari predstavlja dodatni mehanizam aktivacije neutrofila [298]. Pored ćelija mijeloidne loze, CD11b molekuli mogu biti eksprimirani i na malo zastupljenoj populaciji limfocita, pre svega B limfocitima [299, 300], ali je verovatnoća da je došlo do ekspanzije ove populacije leukocita mala s obzirom na to da je detektovana manja zastupljenost i B i T limfocita u slezini. Funkcionalni značaj CD11b+ ćelija i značaj njihovog povećanja je ranije rasvetljen u sličnom kontekstu od strane *Chiba* i sar. [301]. Ovi autori su identifikovali CD11b+ ćelije u slezini miševa koji su dobijali *L. casei* kao glavne ćelije koje proizvode citokine IL-12 i TNF- α . Iako pomenuti citokini nisu mereni u ovoj studiji, oba citokina su direktno povezana sa produkcijom INF- γ , za koji je izmerena povećana koncentracija u serumu životinja koje su dobijale soj LA68 u odnosu na kontrolnu grupu (Slika 5).

Paralelno sa povećanjem zastupljenosti CD11b+ ćelija, nađeno je i povećanje CD16/32+ ćelija u LA68 grupi. CD16/CD32 molekuli predstavljaju Fc γ receptore, Fc γ RII i Fc γ RIII receptore, respektivno. Ovi receptori prepoznaju Fc region imunoglobulina IgG i predstavljaju važnu vezu između humoralnog i celularnog imunskog odgovora [302]. Ovi nisko afinitetni receptori se nalaze i na mijeloidnoj i na limfoidnoj lozi ćelija i preko njih dolazi do aktiviranja različitih bioloških odgovora kao što su fagocitoza, endocitoza, celularna citotoksičnost zavisna od antitela, oslobađanje inflamatornih medijatora i povećanje prezentacije antigena [302]. Smatra se da imaju i uticaj na razvoj leukocita, s obzirom da su na B i T ćelijama eksprimirani u stadijumu razvoja pre klonske distribucije receptora za antigen [303]. Kooperacija sa drugim površinskim molekulima može biti esencijalna za pravilno funkcionisanje ovih receptora. Naime, utvrđeno je da aktivacija CD11b/CD18 (CR3 ili Mac-1) receptora važna za adheziju Fc γ R za imunski kompleks, kao i za pojačavanje bioloških aktivnosti posredovanih preko Fc γ R receptora: fagocitoza (od

strane monocita i polimorfonuklearnih leukocita), antitelima posredovana ćelijska citotoksičnost i produkcija određenih inflamatornih medijatora [302, 304]. Povećanje broja CD11b+ i CD16/32+ ćelija sugerise da prisustvo soja LA68 podiže nivo odbrane protiv potencijalnog patogena.

Smanjenje zastupljenosti B i T ćelijskih populacija, naročito CD25+ ćelija, može ukazivati da ovaj soj indukuje specifičnu toleranciju, mada smanjenje broja CD25+ ćelija može takođe značiti i smanjenje regulatornih (Treg) ćelija. Smanjenje u procentima ćelija koji ekspimiraju CD25 molekule (CD4+CD25+ i CD8+CD25+ ćelije) je detektovano u perifernoj krvi kod osoba nakon uzimanja *L. rhamnosus* 271 [305], što su autori povezali sa povećanom *in vivo* produkcijom IL-10, inhibitora aktivacije T limfocita. U serumu životinja koje su dobijale soj LA68 nađeno je smanjenje koncentracije IL-10 u odnosu na kontrolnu grupu. Međutim, činjenica da su sojevi koji su podjednako efikasni u smanjenju broja CD25+ ćelija istovremeno i induktori produkcije citokina IL-12 (induktor T ćelijske aktivacije, a samim tim i ekspresije CD25 molekula), ukazuje na to da i drugi mehanizmi ovde igraju značajnu ulogu [305].

Uočene promene u zastupljenosti populacija leukocita slezine izazvane oralnom primenom *L. rhamnosus* soja LA68 nisu detektovane do sada. S obzirom da postoje razlike u efektima različitih *Lactobacillus* vrsta, koje mogu biti manje između različitih sojeva, svaki soj može ispoljiti jedinstvenu aktivnost. Tako primena *L. rhamnosus* HN001 kod Balb/c miševa nije dovela do promene u zastupljenosti populacije limfocita, ali je rezultirala povećanjem kapaciteta za fagocitozu od strane leukocita i makrofaga u krvi [306]. Razlog drugačijeg efekta ova dva soja na zastupljenost limfocitne populacije u slezini može biti zato što su u pomenutoj studiji korišćeni Balb/c miševi, dok su u našoj studiji korišćeni C57BL/6 miševi. Inbredni sojevi miševa imaju različitu genetičku osnovu što je važno za Th1/Th2 balans [307, 308]. Postoji veliki broj razlika između ova dva soja miševa, ali je generalno prihvaćeno da je C57BL/6 mišji imunski sistem sličniji humanom imunskom sistemu jer se smatraju Th1 miševima za razliku od Balb/c koji se smatraju Th2 miševima [309].

Kompletna populacija splenocita je stimulisana sa PGN-om ili LPS-om. Najveći stepen proliferacije ćelija, odnosno metaboličke aktivnosti nađen je u LA68 grupi nakon stimulacije LPS-om (Slika 7). *Gill* i sar. su takođe našli povećani proliferativni odgovor

nakon stimulacije LPS-om i konkavalinom A [306], što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Kako BMK, kao Gram+ bakterije, ne sadrže LPS, ovaj rezultat ne može biti objašnjen povećanom osetljivošću splenocita kao posledicom ponovnog izlaganja. Šta više, za mnoge sojeve BMK uočeno je da smanjuju intestinalnu propustljivost [310] i samim tim bi trebalo da smanjuju koncentraciju LPS-a u serumu. Povećana reaktivnost je najverovatnije povezana sa promenama u prisustvu/odsustvu ili aktivacijom specifičnih receptora za ove molekule (TLR4 za LPS i TLR2 za PGN).

Kako je pokazano da oralna primena različitih sojeva BMK indukuje različiti profil citokina u GIT-u i poseduje različitu sposobnost da modifikuje imunski odgovor, praćenje citokinskog profila indukovanog od strane specifičnog soja predstavlja adekvatan metod za analiziranje njegovog probiotskog potencijala [295]. Takođe, s obzirom da se promene u citokinskom profilu u GIT-u, indukovane od strane BMK, reflektuju u krvi, posebno je interesantna promena u serumskim nivoima citokina između dve grupe jer odražava indukciju *in vivo*. U serumu životinja koje su oralno dobijale LA68 je nađen snižen nivo IL-10 i povećan nivo INF- γ u odnosu na kontrolnu grupu. U studiji u kojoj je praćen uticaj oralne primene dva soja *L. rhamnosus* na serumski profil citokina, pokazano je da oba soja, u različitom stepenu, dovode do povećanja i IL-10 i INF- γ u odnosu na kontrolnu grupu [311]. Ovo neslaganje u efektu na produkciju IL-10 može biti posledica jedinstvene aktivnosti našeg soja koji, prema citokinskom profilu, najverovatnije dovodi do indukcije Th1 imunskog odgovora.

Mnoge prethodne studije su detektovale *in vitro* promene u produkciji citokina [109, 306, 312], pa je u ovoj studiji praćena i produkcija citokina nakon *in vitro* stimulacije splenocita LPS-om i PGN-om. Analizom citokina u supernatantu stimuliranih splenocita nađeno je značajno povećanje u produkciji IL-10 u LA68 grupi nakon stimulacije PGN-om, dok je povećana produkcija IL-6 detektovana kako nakon stimulacije PGN-om, tako i LPS-om. Povećanje u produkciji IL-10 nakon stimulacije splenocita sa PGN-om se može objasniti činjenicom da *L. rhamnosus*, kao i druge BMK, poseduje PGN, pa kontakt sa istim tipom bakterija indukuje toleranciju za ovaj tip bakterija.

Rezultati dobijeni oralnom primenom soja LA68 kod zdravih C57BL/6 miševa podržavaju prethodno objavljene podatke o uticaju BMK na pojačavanje urođenog imunskog

odgovora. Detektovana imunska aktivacija je najverovatnije posledica aktivacije uzrokovana usled povećanog bakterijskog opterećenja. Naime, patogeni i komensalni mikroorganizmi dele zajedničke ligande za PRR receptore, što otežava diferenciranje između različitih mikroorganizama, rezultujući nespecifičnom aktivacijom imunskog sistema.

4.2 Ispitivanje efekata *Lactobacillus rhamnosus* LA68 i *Lactobacillus plantarum* WCFS1, na metaboličke i imunološke parametre laboratorijskih miševa soja C57BL/6 u modelu eksperimentalno izazvane nealkoholne masne jetre (steatoze)

Drugi deo studije je dizajniran kako bi se ispitali efekti rane intervencije oralnom aplikacijom dva soja BMK na metaboličke i imunološke parametre u mišjem modelu NAFLD-a, uzrokovanog VSM ishranom. S' obzirom na progresivni karakter ovog oboljenja, fokus studije je bio na prevenciji nealkoholne masne jetre, odnosno steatoze, koja je prva faza NAFLD-a. Nekoliko autora je predložilo primenu BMK kao mogući specifični tretman za bezbedan, jeftin i dugoročan tretman NAFLD-a, ali i pridruženih komorbiditeta (gojaznosti, hiperlipidemije) uslovljenih VSM ishranom [219, 313]. Zbog toga je jedan od ciljeva studije bio da se ispita da li postoji protektivan efekat dva specifična soja BMK na porast telesne mase, lipidni status i razvoj steatoze. Takođe, s obzirom da postoji jasna veza između telesne mase, adipoznog tkiva i imuniteta, i kako je gojaznost povezana sa promenama u aktivnosti imunskog sistema, u studiji je od interesa bilo ispitati neke od osnovnih imunoloških parametara, kao što su serumski nivo citokina, zastupljenost leukocitnih populacija u slezini, kao i njihov odgovor na stimulaciju. Ovi parametri su odabrani jer je nađeno da miševi sa razvijenim NAFLD-om imaju povećanu

proliferaciju B i T limfocita i povećanu produkciju inflamatornih citokina kao odgovor na poliklonsku stimulaciju [314, 315].

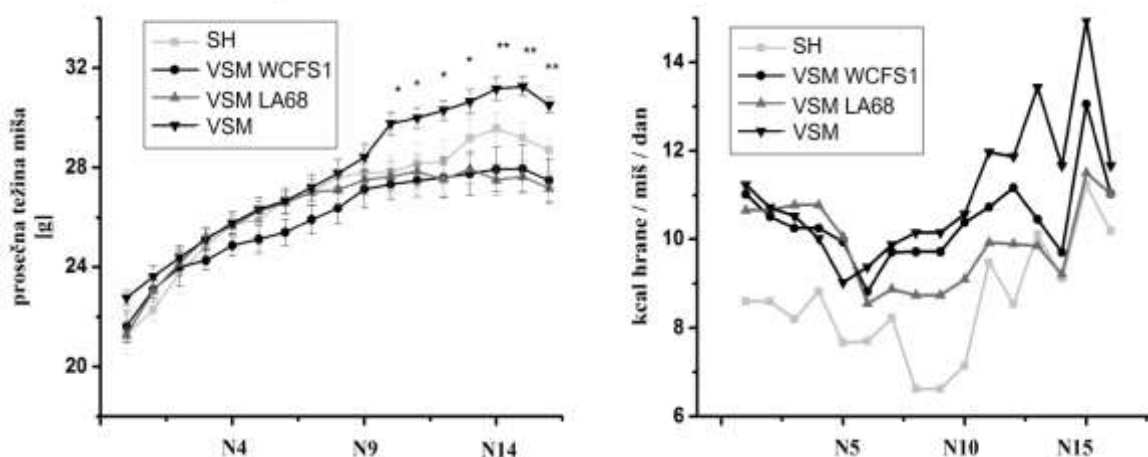
U studiji su ispitivani efekti dva soja BMK, *L. rhamnosus* LA68 i *L. plantarum* WCFS1. *L. plantarum* WCFS1 je izabran zbog dokazane bezbednosti, sposobnosti da preživi u GIT-u, kao i zbog pozitivnih fizioloških efekata, koji su opisani u mnogim animalnim i humanim studijama. Cilj je bio ispitati efekte nakon oralne primene *L. plantarum* WCFS1 u modelu steatoze, izazvane VSM ishranom i uporediti sa efektima izazvanim primenom *L. rhamnosus* LA68. Što se tiče njihovih imunoloških efekata, u prvom delu studije smo pokazali da oralna aplikacija soja LA68 ima imunostimulatorno dejstvo kod zdravih miševa soja C57BL/6. Za soj WCFS1 je u literaturi nađeno da ima sposobnost da redukuje alergijsku reakciju i to aktivacijom Th1 tipa imunskog odgovora [316].

4.2.1 Promene u telesnoj masi i unosu hrane prilikom aplikacije bakterija mlečne kiseline

Rezultati merenja su pokazali značajno povećanje u telesnoj masi kod životinja koje su bile na ishrani VSM (VSM grupa), u poređenju sa ostalim eksperimentalnim grupama. Značajna promena u masi između eksperimentalnih grupa se uočava od 9 nedelje od početka eksperimenta. Zapaženo je i da životinje koje su uz masnu hranu dobijale i probiotske sojeve, VSM WCFS1 i VSM LA68 grupa, imaju nešto manju masu od životinja koje su bile na standardnoj hrani (SH grupa), što je i prikazano na Slici 9A.

Aplikacija dva soja BMK je dovela do značajnog smanjenja u telesnoj masi životinja u obe grupe. Životinje koje su bile na standardnoj hrani su imale manji energetske unos (u kcal), iako je unos hrane u gramima bio veći u odnosu na druge grupe. Zapaženo je i da je energetske unos u VSM WCFS1 i VSM LA68 grupama bio nešto manji u odnosu na VSM grupu, ali ova razlika nije bila statistički značajna (Slika 9B). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa zapažanjima od strane drugih autora koji su takođe našli da aplikacija BMK dovodi do smanjenja u masi, što je naročito bilo izraženo kod gojaznih životinja [130, 243, 317-320]. Efekat je bio zavistan od primenjene bakterijske vrste, ali i soja. Redukcioni efekat BMK na telesnu masu sugerise da je metabolizam domaćina pogođen prisustvom

ova dva soja laktobacila tokom visoko kalorične ishrane. Ovo je najverovatnije posledica promene u sastavu mikrobiote pod dejstvom aplikovanih BMK koja se na kraju održava i na digestiju nutrijenata, u koju je uključena i mikrobiota [212, 321]. Takođe, smanjenje telesne mase može biti i posledica manjeg unosa hrane zapaženog kod tretiranih grupa. Naime, studije su pokazale da primena BMK može uticati na brže postizanje osećaja sitosti kako preko uticaja na produkciju hormona sitosti, tako i preko sinteze butirata koji se smatraju odgovornim za postizanje osećaja sitosti nakon unošenja hrane [123, 125, 322].

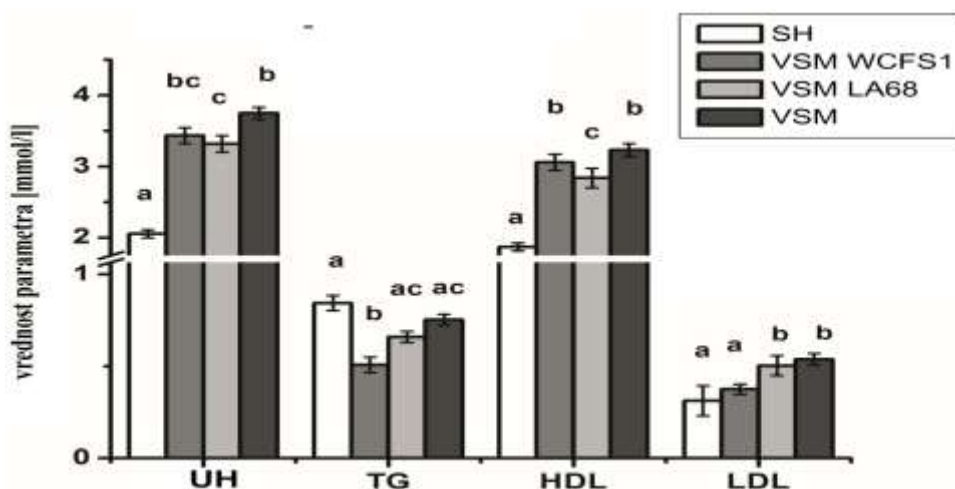


Slika 9. (A) Promene u masi tokom eksperimentalnog perioda. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SEM. Statistička značajnost je dobijena korišćenjem ANOVA testa. MH grupa se statistički značajno razlikovala od ostalih eksperimentalnih grupa. *odgovara $P < 0,05$; ** $P < 0,005$. $n = 10$ životinja po grupi. (B) Unos hrane tokom eksperimentalnog perioda predstavljen u kcal po mišu po danu.

4.2.2 Biohemijski parametri u modelu nealkoholne masne jetre (steatoze) i promena prilikom aplikacije bakterija mlečne kiseline

U cilju procene metaboličkih efekata aplikacije BMK u uslovima VSM ishrane, mereni su različiti biohemijski parametri (ukupni holesterol, trigliceridi, HDL, LDL, AST, ALT, glukoza). Ishrana visokog sadržaja masti je, kao što se i očekivalo, dovela do značajnog povećanja u ukupnom holesterolu, HDL i LDL holesterolu u svim grupama koje su bile na

ovoj hrani, u poređenju sa standardnom ishranom. Interesantno je da je nivo triglicerida (TG) u svim VSM grupama bio niži nego u SH grupi, što se može i videti na Slici 10. Administracija WCFS1 soja je dovela do značajnog sniženja TG i LDL holesterola, dok je administracija soja LA68 dovela do značajnog sniženja u ukupnom holesterolu (UH) i HDL holesterolu, u poređenju sa VSM grupom.



Slika 10. Biohemijski parametri mereni iz seruma miševa u 16. nedelji od početka eksperimenta. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SEM (n=10). Statistička značajnost je dobijena korišćenjem Studentovog t-testa za nezavisne uzorke. Različito slovo označava statističku značajnost između grupa ($P < 0,05$). [mmol/l]

Nisu nađene statistički značajne razlike u vrednosti ALT, AST i glukoze između grupa. Ni test tolerancije glukoze nije pokazao razlike između grupa (podaci nisu prikazani).

U literaturi postoje podaci o hipoholesterolemijskom efektu *L. plantarum*-a [317, 323]. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima objavljenim od strane grupe autora koji su pokazali sniženje u LDL holesterolu primenom soja *L. plantarum* 299v kod pacijenata sa umereno povišenim vrednostima holesterola [324]. Jeun i sar. su takođe našli da soj *L. plantarum* KCTC 3928 snižava nivo LDL holesterola i TG kod miševa koji su bili na VSM ishrani [325]. Oralna aplikacija soja LA68 je pokazala jači efekat na snižavanje UH i HDL holesterola. Drugi sojevi *L. rhamnosus*-a nisu ispoljili efekat na parametre lipidnog statusa [243, 326, 327].

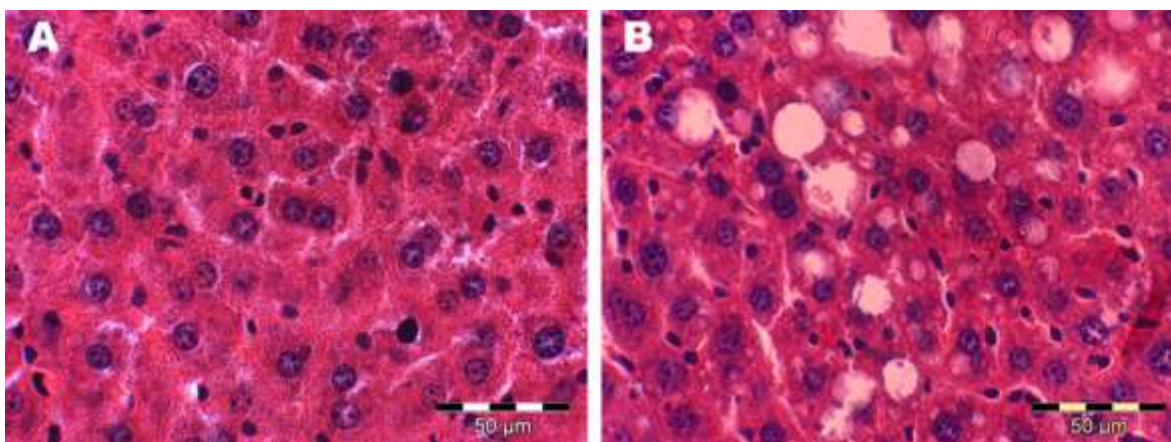
Hipoholesterolemijski efekat BMK može biti objašnjen pomoću više mehanizama [328, 329]: (1) produkti fermentacije BMK inhibiraju aktivnost enzima uključenih u sintezu holesterola i na taj način smanjuju produkciju holesterola; (2) BMK olakšavaju eliminaciju holesterola u feces; (3) bakterije inhibiraju ponovnu apsorpciju holesterola vezujući ga za sebe; (4) bakterije interferiraju sa recirkulacijom žučnih soli i olakšavaju njihovu eliminaciju što povećava sintezu žučnih soli iz holesterola, a samim tim i njegovo snižavanje; (5) BMK mogu da inkorporiraju holesterol u svoje ćelijske membrane ili ćelijski zid u cilju povećanja rezistencije na uslove sredine; (6) BMK poseduju enzim hidrolazu koja vrši dekonjugaciju žučnih soli do slobodnih žučnih kiselina u intestinalnom lumenu, što takođe vodi snižavanju holesterola.

U studiji je nivo serumskih TG snižen u odgovoru na VSM ishranu u poređenju sa standardnom ishranom. To može biti posledica povećane akumulacije TG u jetri. Aplikacija soja WCFS1 je dovela do značajnog snižavanja u nivou serumskih TG u poređenju sa VSM grupom, što je u saglasnosti sa objavljenim hipoholesterolemijskim efektom *L. plantarum*-a.

4.2.3 Histološka analiza uzoraka jetre

Histološkom analizom jetre je utvrđeno prisustvo mikro- i makrovezukularne steatoze kod životinja koje su bile na VSM ishrani (Slika 11). Stepem steatoze je procenjen od strane histopatologa koji je procenu vršio na osnovu dugogodišnjeg iskustva ocenom izgleda preseka jetre, prema utvrđenoj klasifikaciji: 0 - bez patoloških promena; 1 – fokalna akumulacija lipidnih micela, promenom zahvaćeno 33% tkiva; 2 – umerena akumulacija lipidnih micela, prisutna u 33-66% tkiva; 3 – difuzna akumulacija lipidnih micela prisutna u više od 66% tkiva. Ocene za individualne grupe su bile sledeće: SH grupa 0; VSM WCFS1 grupa $0,4 \pm 0,24$; VSM LA68 grupa $0,6 \pm 0,24$ i VSM grupa $0,8 \pm 0,37$. Iz rezultata se vidi da su promene bile relativno blage zbog kratkog trajanja eksperimentalnog perioda. Ovaj stepen steatoze je u saglasnosti sa inicijalnim stadijumom oboljenja, a promene na nivou jetre su bile očigledne u poređenju sa grupom koja je bila na standardnoj ishrani. Nakon 12 nedelja tretmana sa *L. plantarum* WCFS1 i *L. rhamnosus* LA68, ocena stepena steatoze je u

obe grupe bila niža, a administracija ova dva soja je pokazala različite, ali ne i statistički značajne rezultate u smanjenju akumulacije lipida u jetri kod miševa koji su bili na VSM ishrani. Međutim, intervencija sojem WCFS1 je pokazala nešto bolje rezultate, koji uzeti zajedno sa efektima ovog soja na snižavanje serumskih nivoa TG i LDL holesterola, doprinose sagledavanju povoljnog efekta ovog soja u prevenciji steatoze izazvane VSM ishranom.

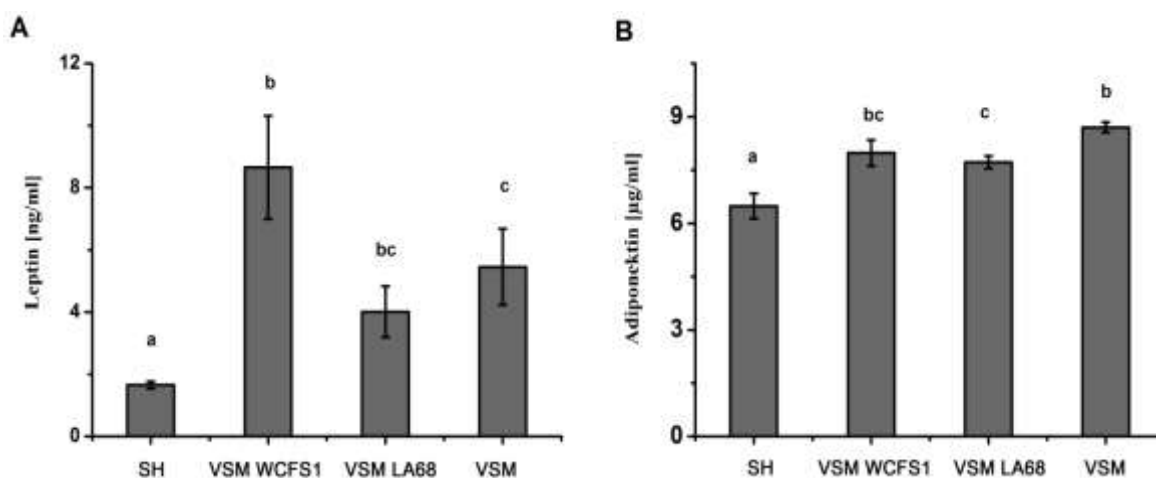


Slika 11. Reprezentativne slike uzoraka tkiva jetre obojenih HE metodom. (A) Normalno tkivo jetre iz grupe na standardnoj hrani; (B) tkivo jetre iz VSM grupe

4.2.4 Leptin i adiponektin

Kod svih grupa koje su bile na VSM ishrani su nađeni povišeni nivoi leptina, u poređenju sa grupom koja je bila na standardnoj ishrani. Leptin, hormon sekretovan od strane adipocita, ima ulogu u kontroli telesne mase, kontrolišući energetske unos i energetske potrebe, a serumske koncentracije leptina uglavnom korelišu sa procentima telesnih masti, pa su tako viši nivoi leptina nađeni kod gojaznih osoba [330, 331]. Koncentracija leptina raste sa povećanjem adipoznog tkiva, kao kompenzatorni mehanizam u cilju očuvanja osetljivosti na insulin, sprečavajući razvoj steatoze u jetri [332]. Međutim, ukoliko adipozno tkivo nastavi da se povećava, leptin gubi kompenzatornu sposobnost, a ujedno dolazi do aktiviranja negativnih efekata povišenih nivoa leptina, jer tada ispoljava i inflamatornu i fibrinogenu aktivnost [332]. Međutim, nivoi leptina izmereni u VSM WCFS1 i VSM LA68 grupi nisu pratili smanjenje u telesnoj masi, kao što se očekivalo.

Naime, VSM ishrana je dovela do povećanja nivoa leptina, a administracija soja WCFS1 nije dovela do smanjenja nivoa leptina, kao što je bilo očekivano (s obzirom na prethodno pokazane povoljne efekte na telesnu masu i lipidne parametre), već naprotiv, dovela je do statistički značajnog povećanja u odnosu na VSM grupu. Moguće objašnjenje za povećanje nivoa leptina, uprkos smanjenju u telesnoj masi, može da bude aktivacija kompenzatorne aktivnosti leptina kojom se sprečava razvoj steatoze, s obzirom da je nađeni stepen steatoze bio manji u odnosu na grupu koja je bila samo na masnoj hrani. Suprotno VSM WCFS1 grupi, u VSM LA68 grupi je nađeno skromno smanjenje u nivou leptina u odnosu na VSM grupu, koje nije bilo statistički značajno (Slika 11A).



Slika 12. Adipocitokini mereni u serumu u 16. nedelji od početka eksperimenta. (A) Leptin i (B) Adiponektin. Vrednosti su predstavljene kao srednje vrednosti \pm SEM (n=5). Statistička značajnost je dobijena korišćenjem Studentovog t-testa za nezavisne uzorke. Vrednosti označene različitim slovom su statistički različite (P<0,05).

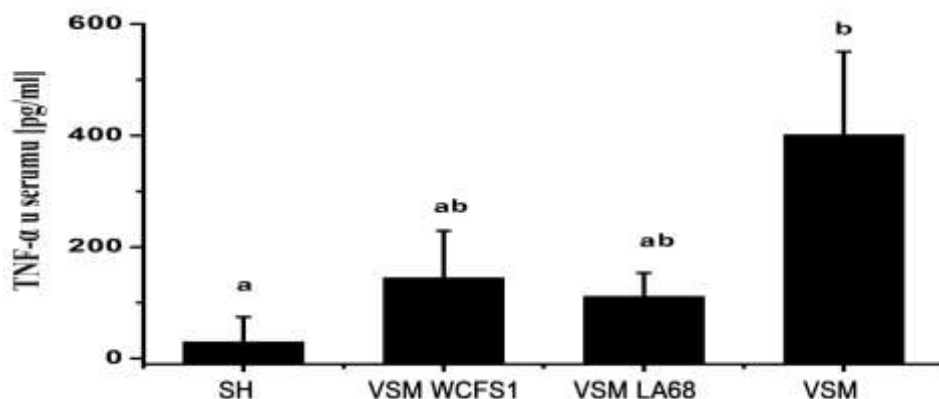
Interesantan rezultat je bio povećanje nivoa adiponektina u svim grupama koje su bile na VSM ishrani, a najviši nivo je nađen u VSM grupi, Slika 11B. Naš rezultat nije u saglasnosti sa literaturnim podacima, s' obzirom da se nivo adiponektina, za razliku od drugih adipokina, smanjuje sa povećanjem procenta masnog tkiva, a sniženi nivoi adiponektina su nađeni kod poremećaja povezanih sa gojaznošću [333, 334]. Adiponektin igra važnu ulogu u metabolizmu i održavanju osetljivosti na insulin, sprečava nastanak steatoze u jetri, pokazuje antiinflamatornu i antifibrinogenu ulogu [204, 335].

Antiinflamatorna aktivnost adiponektina se uglavnom zasniva na suprimiranju proinflamatornih citokina (IL-6 i TNF- α) i indukciji antiinflamatornih citokina (IL-10) [204]. U VSM LA68 grupi je nivo adiponektina bio značajno niži u odnosu na VSM grupu, Slika 11B. Ovaj rezultat možda nije povoljna aktivnost soja LA68 jer sniženi nivoi adiponektina indukuju progresiju hepatične steatoze [336], ali histološka analiza ovo nije potvrdila, s obzirom da je stepen steatoze u ovoj grupi bio nešto manji u odnosu na VSM grupu. Oksaharju i sar. su takođe objavili da VSM ishrana dovodi do povećanja nivoa adiponektina, a da je aplikacija probiotskih bakterija kod miševa prevenirala povećanje adiponektina u serumu [327]. Objašnjenje koje su autori ponudili za povećanje adiponektina jeste da period od 4 nedelje, koliko su životinje provele na VSM ishrani, nije imao negativan uticaj na serumski nivo adiponektina. Međutim, u našoj studiji životinje su provele 16 nedelja na masnoj hrani, a pored povišenih vrednosti leptina i poremećaja lipidnog statusa, u svim VSM grupama histološki je utvrđeno prisustvo hepatične steatoze, tako da, s obzirom na protektivno dejstvo adiponektina na nastanak steatoze, značaj povišenih vrednosti adiponektina ostaje predmet diskusije.

4.2.5 Određivanje profila citokina u modelu nealkoholne masne jetre i promena prilikom aplikacije bakterija mlečne kiseline

Gojaznost je stanje koje se karakteriše konstantno prisutnom inflamacijom niskog stepena, a povećanje nivoa inflamatornih citokina je jedan od ranih događaja i u mnogim oboljenjima jetre, uključujući i NAFLD. Dva najčešća citokina uključena u inflamatorne i metaboličke promene u ranoj fazi oštećenja jetre su TNF- α i IL-6. Nivo TNF- α korelira sa stepenom fibroze kod osoba sa NAFLD-om i NASH-om [337, 338]. U cilju detektovanja prisutne inflamacije, u serumu životinja su merene vrednosti TNF- α . Povišene vrednosti su detektovane u svim grupama koje su bile na VSM ishrani, ali je značajno povećanje detektovano samo u VSM grupi u poređenju sa SH grupom. Iako su vrednosti za TNF- α bile niže u grupama koje su dobijale BMK, nismo uspeli da detektujemo statističku značajnost zbog velikih individualnih razlika u merenim vrednostima (Slika 12). Ovaj

rezultat je bio u saglasnosti sa literaturnim podacima u kojima je pokazano da aplikacija određenih sojeva BMK može da redukuje nivo ovog inflamatornog citokina u modelu nealkoholne masne jetre dobijenog VSM ishranom [267, 339].

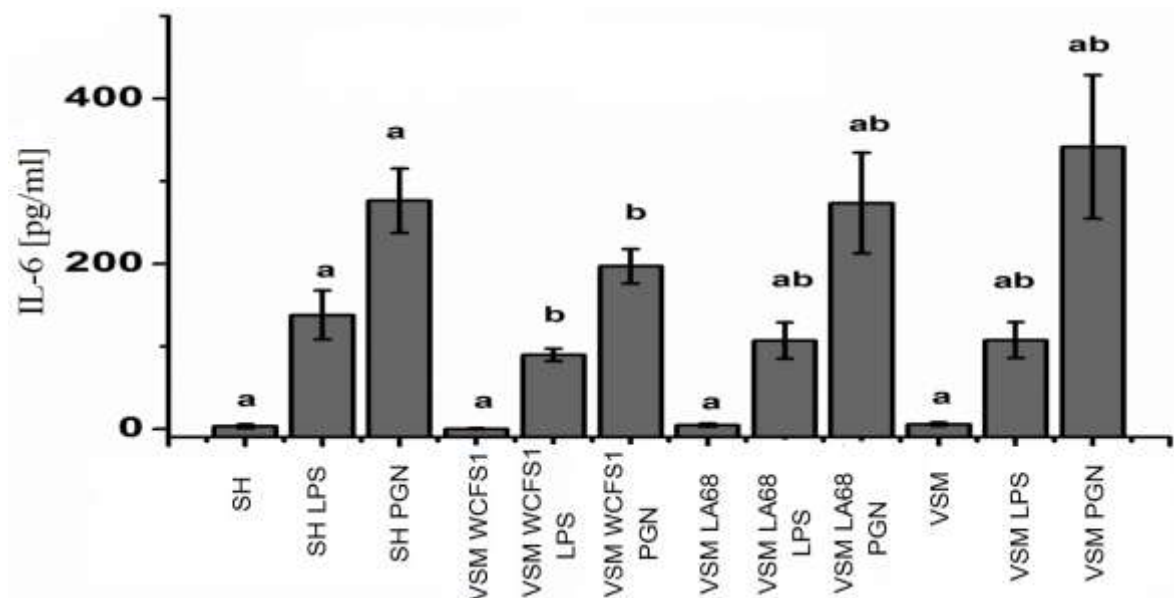


Slika 13. Koncentracije TNF- α merenih u serumu životinja u 16. nedelji od početka eksperimenta. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM (n=5). Statistička značajnost je dobijena korišćenjem Studentovog t-testa. Različiti slova za isti parametar ukazuju na statističku značajnost ($P < 0,05$).

4.2.6 Reaktivnost leukocita slezine na nespecifičnu stimulaciju u modelu nealkoholne masne jetre i promena prilikom aplikacije bakterija mlečne kiseline – sekrecija citokina i MTT test

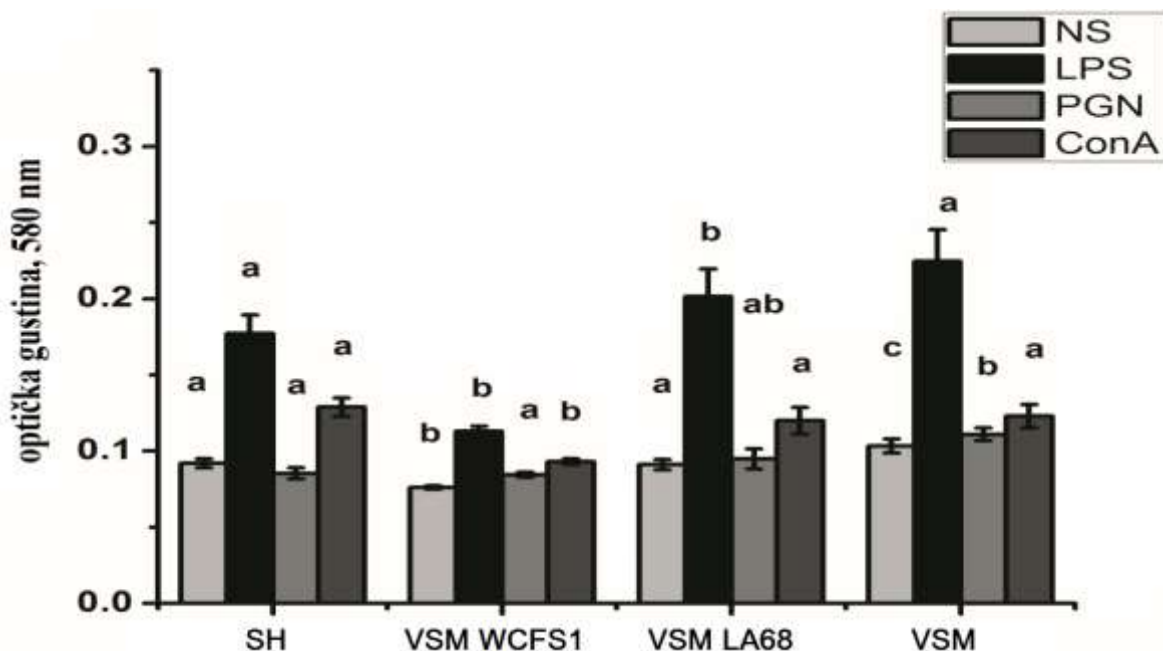
Kako nismo uspeali da detektujemo IL-6 direktno iz seruma, u studiji je određivan IL-6 u supernatantu nestimuliranih splenocita i splenocita stimuliranih LPS-om ili PGN-om. Kao što je prikazano na Slici 13, nestimulirane ćelije ni u jednoj grupi nisu proizvele IL-6, dok je stimulacija, kako LPS-om, tako i PGN-om, dovela do produkcije IL-6. Iako nivo IL-6, zajedno sa nivoom TNF- α , raste sa gojaznošću i predstavlja dobar prediktor insulinske rezistencije, nismo uspeali ni u *in vitro* uslovima da detektujemo značajno povećanje u uslovima VSM ishrane [340]. Interesantan rezultat je da su vrednosti za IL-6 bile niže u

VSM WCFS1 grupi u odnosu na ostale grupe nakon stimulacije LPS-om i PGN-om (Slika 13)



Slika 14. Nivo IL-6 mereni u supernatantu nestimuliranih i kultura splenocita stimuliranih PGN-om i LPS-om. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM (n=5). Statistička značajnost je dobijena korišćenjem Studentovog t-testa. Različita slova za isti parametar ukazuju na statističku značajnost ($P < 0,05$).

Sličan rezultat je dobijen i merenjem metaboličke aktivnosti splenocita MTT testom (Slika 14), gde je niža metabolička aktivnost nađena u VSM WCFS1 grupi nakon 48 h. LPS je bio najpotentniji stimulator ćelija, sa najizraženijim efektom u VSM grupi, dok je konkalin A (Con A) najjači efekat imao u grupi na standardnoj ishrani (Slika 14).

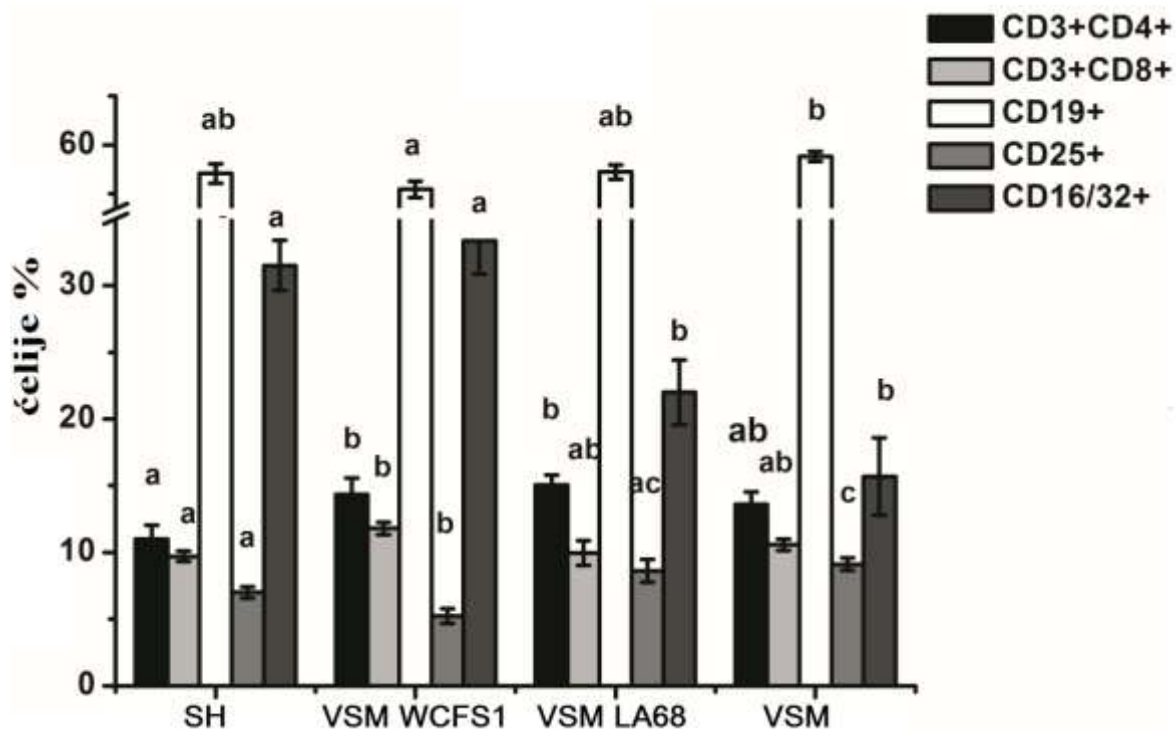


Slika 15. MTT test pokazuje metaboličku aktivnost kulture splenocita nakon stimulacije poliklonским stimulatorima (LPS, PNG ili ConA). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM (n=5). Statistička značajnost je testirana korišćenjem jednofaktorskog ANOVA testa, i Tukey testa za merenje razlike između pojedinačnih grupa. Različita slova za isti parametar ukazuju na statističku značajnost ($P < 0,05$).

Smanjena produkcija IL-6 je najverovatnije posledica smanjene vijabilnosti/proliferacije ćelija splenocita koja se zapaža nakon aplikacije soja WCFS1. IL-6 je važan citokin uključen u regulaciju energetskeg statusa, ali i u regulaciju urođenog i stečenog imuniteta [238]. U uslovima kada ne postoji inflamacija, IL-6 biva produkovan od strane adipocita i njegove koncentracije u serumu koreliraju sa ITM, osetljivošću na insulin i tolerancijom na glukozu, a IL-6 deficijenti miševi razvijaju gojaznost i imaju smanjenu toleranciju na glukozu [228]. U serumu životinja nismo uspeli da izmerimo koncentraciju IL-6, ali vrednosti dobijene iz supernatanata splenocita ukazuju na supresivnu aktivnost soja WCFS1 na produkciju IL-6 i nakon stimulacije PGN-om i LPS-om, a ova produkcija je bila niža čak i u odnosu na grupu koja je bila na standardnoj ishrani.

4.2.7 Procenti leukocitnih populacija u modelu nealkoholne masne jetre i promena prilikom aplikacije bakterija mlečne kiseline

U cilju dobijanje slike o *in vivo* stanju imunskog sistema i boljeg razumevanja rezultata dobijenih u eksperimentu poliklonske stimulacije splenocita, u studiji je analizirana zastupljenost pojedinih populacija leukocita. Za procenu stanja inflamacije od posebnog značaja je bilo analiziranje CD25+ ćelija, među kojima se nalaze Treg ćelije, i CD11b+ ćelije koje pripadaju monocitnoj/granulocitnoj lozi. Analizom zastupljenosti pojedinih populacija leukocita nisu nađene razlike u zastupljenosti CD11b+ ćelija između pojedinih grupa, kao što je to bio slučaj sa prethodnom primenom LA68 kod miševa na standardnoj ishrani, ali u svim grupama na ishrani VSM nađeno je povećanje u CD3+CD4+ ćelijama (Th ćelije). Intervencija sa *L. plantarum* WCFS1 je dovela do statistički značajnog smanjenja u CD19+ i CD25+ ćelijama i značajnog povećanja u CD16/32+ ćelijama, u odnosu na grupu koja je bila samo na ishrani visokog sadržaja masti. Takođe, u VSM WCFS1 grupi se zapaža i porast CD3+CD8+ ćelija (citotoksične T ćelije) u odnosu na ostale VSM grupe. Za razliku od soja WCFS1, aplikacija soja LA68 nije dovela do značajnih promena u zastupljenosti pojedinih populacija leukocita u odnosu na VSM grupu.



Slika 16. Razlike u zastupljenosti splenocitne populacije leukocita između eksperimentalnih grupa. Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm SEM (n=5). Statistička značajnost je dobijena korišćenjem Studentovog t-testa. Različita slova za isti parametar ukazuju na statističku značajnost između grupa ($P < 0,05$).

Povišeni nivoi leptina koji su nađeni u VSM grupama mogu da dovedu do povećane proliferacije CD4+ ćelija i na funkcionalnom nivou dovedu do polarizacije produkcije citokina od strane Th ćelija ka proinflamatornom Th1 odgovoru [341, 342]. Kako su u serumu VSM grupa nađeni i povišeni nivoi serumskog TNF- α (Slika 12), ovo može biti indikator aktivacije Th1 imunskog odgovora i posledične inflamacije koja je karakteristična za stanje gojaznosti.

Uzimajući u obzir zajedno analizirane imunološke i metaboličke parametre, uočavamo jedinstvenu aktivnost kod VSM WCFS1 grupe koja nije zapažena kod ostalih grupa na VSM ishrani. Naime, aplikacija soja WCFS1 dovela je do povećanja citotoksične T ćelijske populacije (CD3+CD8+), značajnog smanjenja aktiviranih B i T ćelija i regulatornih ćelija (CD25+) i B ćelija (CD19+), a dovela je i do smanjenja u produkciji IL-6 i ćelijske proliferacije/vijabilnosti nakon nespecifične stimulacije. Ovo je bilo praćeno i značajno povišenim serumskim nivoom leptina u odnosu na ostale VSM grupe. Naime, povišeni

nivoi leptina negativno utiču na generaciju i proliferaciju Treg ćelija koje su CD25+ ćelije [343], čija je zastupljenost smanjena intervencijom sa WCFS1. Ovo možda nije povoljan efekat soja WCFS1 u prevenciji nealkoholne masne jetre ili metaboličkog sindroma, s obzirom da povišeni nivoi leptina dovode do redukcije broja CD4+CD25+ regulatornih T ćelija i povećanog preživljavanja autoreaktivnih CD4+ T ćelija *in vivo* [344, 345], čime se objašnjava povezanost povećane incidence autoimunih oboljenja u razvijenim zemljama sa povišenim ITM i leptinom [346-348]. Leptin-deficitarni (*ob/ob*) miševi su rezistentni na eksperimentalno indukovana autoimuna oboljenja, kao i na oštećenje jetre indukovano aktivacijom T ćelija i produkcijom inflamatornih citokina (TNF- α) [349, 350]. Egzogeni leptin čini životinje ponovo podložnim razvoju inflamatornih oboljenja, usled indukovanja sekrecije Th1 citokina [351].

Iako primena *L. plantarum* WCFS1 nije bila povezana sa većom telesnom masom, za ovaj soj je poznato da indukuje promenu imunskog odgovora ka IgG2a i proinflamatornom Th1 imunskom odgovoru [352].

Aplikacija soja LA68 je kod mladih ženki miševa na standardnoj hrani dovela do indukcije Th1 imunskog odgovora i pomeranje splenocitne populacije od limfocitne ka monocitnoj/granulocitnoj lozi. Ovakva aktivnost nije bila ispoljena u uslovima VSM ishrane, sa starijim mužjacima. Iako su oba soja imala pozitivan efekat na telesnu masu i razvoj steatoze, prednost LA68 soja u odnosu na WCFS1 u uslovima VSM ishrane, mogla bi da bude blaža imunomodulatorna aktivnost.

4.2.8 Uticaj ishrane visokog sadržaja masti na sastav masnih kiselina jetre i mozga

Poznato je da masti poreklom iz hrane utiču na sastav masnih kiselina različitih organa i da se dijetarni sastav masnih kiselina reflektuje u fosfolipidima cerebralnih ćelijskih membrana [353-355]. Stoga, cilj ove studije je bio da se utvrdi na koji način dugotrajna VSM ishrana menja sastav masnih kiselina jetre i mozga miševa soja C57BL/6. Takođe, aplikacija BMK dovodi do promena u masnokiselinskom sastavu organa, a uočene su i razlike između različitih vrsta/sojeva [136, 280, 282]. Kako u literaturi ne postoje podaci o

uticaju aplikacije BMK na masnokiselinski sastav na režimu VSM ishrane, cilj ove studije je bio i da se ispita ovaj aspekt primene *L. rhamnosus* LA68 i *L. plantarum* WCFS1.

Sastav masnih kiselina jetre i mozga nakon 16 nedelja na ishrani visokog sadržaja masti (u toku 4 nedelje adaptacije i 12 nedelja eksperimenta) prikazan je u Tabeli 11 i Tabeli 12. Kada je određen sastav masnih kiselina ukupnih lipida jetre, uočeno je značajno smanjenje u zasićenim masnim kiselina (ZMK) ($P < 0,001$) u grupi koja je bila na VSM ishrani, u odnosu na grupu koja je bila na standardnoj ishrani. Ova razlika je bila posledica značajnog smanjenja u palmitinskoj (C16:0; 27%), stearinskoj (C18:0, 44%), arahinskoj (C20:0; 55%) i tetrakozanskoj kiselini (C24:0, 61%). Smanjenje je zapaženo i kod ukupnih polinezasićenih masnih kiselina (Σ PMK; 33%), pri čemu je došlo do smanjenja sadržaja masnih kiselina n-3 i n-6 serije. VSM ishrana je dovela do povećanja n-6/n-3 odnosa ($20:4/[20:5+22:6]$) i to za 33% u odnosu na SH grupu. Što se tiče mononezasićenih masnih kiselina (MMK), ishrana visokog sadržaja masti je dovela do njihovog statistički značajnog povećanja ($P < 0,01$) u ukupnim lipidima jetre, usled povećanja u palmitoleinskoj (C16:1n-7, 290%) i oleinskoj masnoj kiselini (C18:1n-9, 164%). Kada se pogleda odnos proizvod/prekursor za različite serije masnih kiselina, uočava se da je ovaj odnos kod n-9 serije (C18:1/C18:0) veći, a kod n-6 (C18:3/C18:2 and 20:4/20:3) i n-3 serije ($[C20:5 + C22:6]/C18:3$) manji u VSM grupi u odnosu na SH grupu.

Suprotno u odnosu na jetru, VSM ishrana je tokom 16 nedelja dovela do značajnog povećanja u sadržaju ZMK ($\approx 27\%$) i MMK ($\approx 20\%$) u ukupnim lipidima mozga dok je sadržaj PMK ostao nepromenjen. Takođe, visok unos masti je doveo do značajnog smanjenja ($P < 0,05$) sadržaja PMK n-6 serije, uključujući smanjenje linolenske kiseline (C18:2; $\approx 48\%$), kao i do smanjenja u n-6/n-3 odnosu ($\approx 12\%$) u lipidima mozga. Zapaženo je i značajno smanjenje vrednosti EPA ($20:5n-3$, $\approx 52\%$) u odnosu na standardni režim ishrane.

Dobijeni rezultati ukazuju da je sastav masnih kiselina organa, a naročito jetre, izmenjen na režimu VSM ishrane. Takođe, u VSM grupi je u toku ovog perioda došlo do značajnih metaboličkih promena, uključujući i razvoj steatoze, koja predstavlja glavnu karakteristiku povezanu sa NAFLD-om. S obzirom da je ovo oboljenje povezano sa promenama u metabolizmu masnih kiselina [356], bilo je od interesa ispitati promene u sastavu masnih

kiselina, ne samo jetre, već i mozga, organa sa veoma intenzivnom metaboličkom aktivnošću i sa velikim udelom lipida u ukupnoj masi. Rezultati određivanja sastava masnih kiselina jetre ukazuju da je deponovanje masnih kiselina u jetri povezano sa povećanjem sadržaja MMK i smanjenjem u ukupnom sadržaju ZMK i PMK. Takođe, značajno smanjenje u PMK je bilo povezano sa smanjenjem odnosa proizvod/prekursor masnih kiselina n-6 (C18:3/C18:2 and 20:4/20:3) i n-3 serije ([C20:5 + C22:6]/C18:3), kao i sa povećanjem odnosa n-6/n-3 masnih kiselina (20:4/[20:5+22:6]).

Značajno povećanje u MMK u jetri je nađeno kod alkoholne i nealkoholne masne bolesti jetre [357, 358] i ovo povećanje je najverovatnije povezano sa povećanjem aktivnosti enzima $\Delta 9$ desaturaza, što je u saglasnosti sa povećanjem u odnosu C18:1/C18:0, nađenim u VSM grupi. Takođe, podaci u literaturi pokazuju da je povećanje aktivnosti $\Delta 9$ desaturaze, kao i posledično povećanje u sadržaju MMK, povezano sa povećanjem stepena gojaznosti i progresiji hepatičnih lezija [359, 360]. Značajno smanjenje u ukupnim PMK, uključujući i n-3 i n-6 PMK, koje je nađeno u jetri miševa koji su bili na VSM ishrani, u saglasnosti je sa rezultatima drugih autora koji su takođe objavili smanjenje u sadržaju PMK u lipidima jetre kod NAFLD-a [358, 361, 362]. Jedan od razloga za smanjenje ukupnih PMK je poremećaj metaboličkih puteva, odnosno puteva za desaturaciju i elongaciju esencijalnih prekursora, linolne kiseline (18:2, n-6) i α -linoleinske kiseline (18:3, n-3) koji uključuju aktivnost enzima $\Delta 5$ i $\Delta 6$ desaturaze [358]. Smanjenje odnosa proizvod/prekursor masnih kiselina n-3 i n-6 serija koji smo našli u VSM grupi u odnosu na SH grupu, ukazuje na nižu aktivnost $\Delta 5$ i $\Delta 6$ desaturaze u jetri. Naime, poremećaj u aktivnosti ovih enzima je nađen kod gojaznih osoba sa NAFLD-om gde je inhibicija aktivnosti ovih enzima bila posledica visokog unosa zasićenih masti i holesterola [361, 363, 364]. Drugo objašnjenje je da je do smanjenja PMK u lipidima jetre došlo usled peroksidacije PMK kao posledice oksidativnog stresa koji se javlja u jetri usled velikog priliva SMK u jetri i smanjenog transporta iz jetre i smanjene β -oksidacije MK u jetri [358].

Mozak je organ sa visokim sadržajem lipida pa je bilo interesantno ispitati uticaj ishrane visokog sadržaja masti na masnokiselinski sastav ukupnih lipida mozga. Dugolančane PMK su najzastupljenije masne kiseline lipida mozga, pre svega fosfolipida, koji su veoma

važni u nervnom sistemu [365]. Isto tako, aktivnost enzima povezanih sa membranom i neurotransmitera, kao i kognitivne funkcije mogu biti pod uticajem promena u sastavu masnih kiselina ćelijskih membrana [366-368]. Naši rezultati ukazuju da je masnokiselinski sastav i ovog organa promenjen pod uticajem dijetarnih masti. Nisu uočene promene u sadržaju ukupnih PMK, a efekat masne hrane je bio najizraženiji u smanjivanju sadržaja linolne kiseline (48%) i smanjivanju sadržaja EPA (52%), ali ove dve masne kiseline su inače zastupljene u malom procentu u ukupnim lipidima mozga. Nisu uočene promene u sadržaju DHA čija je zastupljenost direktno povezana sa boljim kognitivnim sposobnostima [368]. Sadržaj ukupnih ZMK u VSM grupi je bio povećan, uključujući sadržaj palmitinske i stearinske masne kiseline. Naši rezultati su u saglasnosti sa zapažanjima od strane Yu i sar. koji su objavili da dugotrajna ishrana bogata zasićenim mastima povećava sadržaj ZMK u ukupnim lipidima mozga, nema uticaja na sadržaj MMK, ali, za razliku od naših rezultata, dovodi do smanjenja u sadržaju DHA [369]. Granholm i sar. su objavili da su pacovi hranjeni VSM ishranom imali veći broju grešaka u radnoj memoriji [370]. Kako u našoj studiji nismo sproveli bihevioralne, ni kognitivne testove, ne možemo predvideti posledice detektovanih promena u sastavu masnih kiselina mozga.

4.2.9 Uticaj aplikacije bakterija mlečne kiseline na sastav masnih kiselina jetre i mozga u režimu ishrane visokog sadržaja masti

Analizom sastava masnih kiselina jetre zapažene su značajne promene u grupama kojima su aplikovane BMK u odnosu na VSM grupu. U VSM WCFS1 grupi je zapaženo povećanje od 14% u sadržaju ZMK, povećanje od 13% u sadržaju PMK n-6 i povećanje u odnosu proizvod/prekursor masnih kiselina n-3 serije za 57%. U VSM LA68 grupi su nađene značajne promene u sadržaju određenih ZMK, ali nije bilo razlike u ukupnim ZMK u odnosu na VSM grupu (Tabela 11). I u VSM LA68 grupi, kao i u VSM WCFS1 grupi, uočeno je značajno povećanje u odnosu proizvod/prekursor masnih kiselina n-3 serije. Zapažen je i trend smanjenja odnosa 18:1/18:0 u obe grupe koje su dobijale probiotske

sojeve. Nije bilo statistički značajne razlike u sastavu masnih kiselina jetre između grupa kojima su aplikovane BMK, sem u sadržaju masne kiseline C18:1n-7.

Nismo našli statistički značajnu razliku u sastavu masnih kiselina mozga između VSM, VSM WCFS1 i VSM LA68 grupa (Tabela 12).

Literaturni podaci su u saglasnosti da postoji uticaj aplikacije probiotskih bakterija na sastav masnih kiselina organa miševa, a uočene su i razlike u efektu između različitih bakterijskih vrsta/sojeva [135, 136, 282, 371]. Isto tako, pokazali smo da je aplikacija soja *L. rhamnosus* LA68 u toku 4 nedelje dovela do značajnih promena u sastavu masnih kiselina jetre i mozga kod miševa koji su bili na standardnoj ishrani, ali u literaturi nisu nađeni podaci o uticaju aplikacije BMK na masnokiselinski sastav organa domaćina u toku ishrane visokog sadržaja masti.

Naši rezultati ukazuju da je sastav masnih kiselina jetre značajno izmenjen nakon aplikacije BMK, ali nisu zapažene statistički značajne promene u sastavu masnih kiselina mozga. Takođe, nisu zapažene značajne razlike između dve korišćene vrste/soja laktobacila u efektu na masnokiselinski sastav jetre u toku režima VSM ishrane, ali je administracija *L. plantarum* WCFS1 imala izraženiji efekat. Najkarakterističnija promena u sastavu masnih kiselina jetre izazvana aplikacijom bakterija bilo je povećanje u odnosu proizvod/prekursor n-3 serije masnih kiselina ($([C20:5 + C22:6]/C18:3)$) kod obe tretirane grupe u poređenju sa VSM grupom i ovaj odnos je bio isti kao i kod grupe koja je bila na standardnoj ishrani. Uzimajući u obzir da ovaj odnos uključuje aktivnost enzima Δ -5 i Δ -6 desaturaze i da je aktivnost ovih enzima poremećena kod gojaznih osoba sa NAFLD-om [358, 361], postoji mogućnost da korišćeni sojevi mogu reverzibilno da utiču na aktivnost pomenutih enzima. Naime, *Fukushima* i sar. su našli da mešavina probiotskih bakterija koja je, pored ostalih, sadržala i *Lactobacillus* vrste povećava aktivnost enzima Δ^6 -desaturaze u jetri pacova [294].

Takođe, kod obe tretirane grupe zapaža se trend smanjenja odnosa proizvod/prekursor n-9 serije u kome se ogleda aktivnost enzima Δ^9 -desaturaze, pa postoji mogućnost da je administracija ova dva soja dovela do regulacije aktivnosti ovog enzima. Naime, i pored trenda porasta u sadržaju C18:0 kod VSM WCFS1 i VSM LA68 grupa u odnosu na VSM

grupu, nije došlo do povećanja u sadržaju C18:1 u tretiranim grupama, već naprotiv, zapaža se opadanje vrednosti za ovu masnu kiselinu u odnosu na VSM grupu.

Tabela 11. Sastav masnih kiselina (%) jetre C57BL/6 miševa na ishrani visokog sadržaja masti u toku 12 nedelja eksperimentalnog perioda

MK	SH	VSM	VSM WCFS1	VSM LA68
12:0	0.034 ± 0.016	0.137± 0.007 ^{***a}	0.114± 0.028 ^{ab}	0.091 ± 0.036 ^b
14:0	0.302 ± 0.720	1.734 ± 0.351 ^{***}	1.341± 0.228	1.316 ± 0.386
16:0	24.508 ± 2.180	17.870 ± 1.153 ^{**}	18.905 ± 0.750	18.422 ± 0.522
18:0	13.455 ± 1.092	7.520 ± 1.569 ^{***a}	10.604 ± 0.822 ^b	9.738 ± 1.627 ^{ab}
20:0	0.276± 0.076	0.125 ± 0.041 ^{***a}	0.213 ± 0.063 ^b	0.162 ± 0.019 ^{ab}
22:0	0.541 ± 0.103	0.740 ± 0.188 ^a	1.041± 0.134 ^b	1.003 ± 0.097 ^b
24:0	0.451 ± 0.052	0.175 ± 0.056 ^{***a}	0.287 ± 0.034 ^b	0.266 ± 0.060 ^b
16:1n-7	1.660 ± 0.361	6.468 ± 1.538 ^{**}	4.464 ± 0.946	5.299 ± 1.429
18:1n-9	9.490± 0.752	25.477 ± 7.988 ^{**}	21.729 ± 0.945	23.337 ± 2.033
18:1n-7	1.753 ± 0.482	3.959± 0.759 ^{**a}	2.975 ± 0.514 ^b	4.245 ± 0.297 ^a
24:1n-9	0.540 ± 0.034	0.246 ± 0.094 ^{**}	0.332 ± 0.043	0.317 ± 0.074
18:2n-6	17.903 ± 1.119	10.027 ± 0.577 ^{***}	10.075 ± 0.636	10.101± 0.265
18:3n-6	0.449 ± 0.061	0.137 ± 0.011 ^{**a}	0.104± 0.011 ^b	0.106 ± 0.018 ^b
20:3n-6	1.563± 0.150	1.737± 0.299 ^a	2.079 ± 0.109 ^b	2.025± 0.121 ^{ab}
20:4n-6	12.200 ± 1.746	9.843 ± 2.162 ^a	12.332 ± 0.447 ^b	11.837 ± 0.805 ^{ab}
18:3n-3	0.304 ± 0.033	0.319 ± 0.131	0.230 ± 0.047	0.198 ± 0.032
20:5n-3	0.699± 0.020	0.281 ± 0.075 ^{***}	0.340± 0.053	0.340± 0.024
22:5n-3	0.525 ± 0.098	0.273 ± 0.075 ^{**}	0.321 ± 0.073	0.272 ± 0.023
22:6n-3	8.184± 1.147	5.267 ± 1.498 [*]	6.239± 0.517	5.490 ± 0.416
Σ ZMK	39.570 ± 1.603	28.306 ± 2.074 ^{***a}	32.510 ± 1.119 ^b	31.004 ± 1.915 ^{ab}
Σ MMK	13.443±1.517	36.148 ± 9.218 ^{**}	29.498±1.754	33.196±3.423
Σ PMK	41.833±2.451	27.884±3.836 ^{***}	31.720±0.846	30.372±1.349
DLPMK	21.087±2.818	15.390±3.523 [*]	18.910±0.725	17.668±1.230
PMK n-3serije	9.715±1.218	6.140±1.691 ^{**}	7.130±0.552	6.300±0.432
PMK n-6 serije	32.117±1.350	21.744±2.459 ^{***a}	24.590±0.564 ^b	24.072±0.935 ^{ab}
n6/n3 ΣPMK	3.335 ± 0.318	3.741±0.962	3.465±0.262	3.828±0.139
20:4/18:2 n6	0.686 ± 0.121	0.985 ± 0.219 [*]	1.229 ± 0.106	1.172 ± 0.065
(20:5+22:6)/18:3 n3	29.816 ± 6,200	18.812 ± 6,771 ^{*a}	29.458 ± 7,756 ^b	30.032 ± 7.377 ^b
18:1/18:0 n-9	0.710±0.100	3.683±1.859 [*]	2.060±0,206	2,476±0,597
20:4/(20:5+22:6) n6/n3	1.373 ± 0.105	1.832 ± 0.322 [*]	1.883 ± 0.149	2.032 ± 0.029

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (g/100 g metil estara masnih kiselina); n=6 miševa po grupi. Statistička značajnost između SH i MH grupa je dobijena korišćenjem Studentovog t- test za nezavisne uzorke sa *P<0,05; ** P<0,01; ***P < 0,001. Vrednosti u istom redu sa različitim superskriptom se značajno razlikuju P < 0.05 (ANOVA praćene post hoc Tukey' s testom). MKME, metil-estri masnih kiselina;

Tabela 12. Sastav masnih kiselina (%) mozga C57BL/6 miševa na ishrani visokog sadržaja masti nakon završenog eksperimentalnog perioda

MKME	SH	VSM	VSM WCFS1	VSM LA68
16:0	12.894 ± 1.457	15.762 ± 1.472*	16.514 ± 2.730	13.801 ± 2.774
18:0	10.866 ± 2.583	14.397 ± 1.417*	15.420 ± 3.267	12.586 ± 2.795
20:0	0.201 ± 0.606	0.260 ± 0.012	0.296 ± 0.046	0.241 ± 0.061
22:0	0.358 ± 0.108	0.482 ± 0.023*	0.527 ± 0.062	0.421 ± 0.105
24:0	0.388 ± 0.269	0.560 ± 0.456	0.655 ± 0.121	0.426 ± 0.197
16:1n-7	0.351 ± 0.061	0.418 ± 0.046	0.437 ± 0.062	0.395 ± 0.099
18:1n-9	11.726 ± 1.421	13.872 ± 1.130*	15.554 ± 2.001	12.301 ± 2.813
18:1n-7	2.447 ± 0.365	3.021 ± 0.270*	3.411 ± 0.439	2.626 ± 0.631
20:1n-9	1.603 ± 0.050	1.769 ± 0.097*	2.079 ± 0.385	1.824 ± 0.392
24:1n-9	1.164 ± 0.444	1.727 ± 0.199	1.846 ± 0.248	1.489 ± 0.416
18:2n-6	0.629 ± 0.055	0.327 ± 0.042***	0.366 ± 0.028	0.314 ± 0.053
20:2n-6	0.536 ± 0.105	0.267 ± 0.063**	0.260 ± 0.027	0.403 ± 0.187
20:3n-6	0.423 ± 0.031	0.357 ± 0.023**	0.359 ± 0.032	0.375 ± 0.088
20:4n-6	9.743 ± 1.152	8.830 ± 0.451	7.882 ± 1.931	8.451 ± 1.635
20:5n-3	1.309 ± 0.579	0.627 ± 0.244*	0.621 ± 0.134	1.268 ± 0.808
22:6n-3	12.422 ± 0.902	12.956 ± 1.082	10.733 ± 3.783	11.638 ± 2.500
Σ ZMK	24.705 ± 4.408	31.460 ± 2.949*	33.418 ± 6.211	27.480 ± 5.702
Σ MMK	17.293 ± 2.258	20.808 ± 1.688*	23.328 ± 3.000	18.642 ± 4.015
Σ PMK	25.070 ± 1.960	23.366 ± 1.331	20.225 ± 5.692	22.454 ± 3.604
PMK n-3	13.735 ± 0.719	13.584 ± 0.892	11.355 ± 3.787	12.906 ± 2.062
PMK n-6	11.335 ± 1.253	9.782 ± 0.463*	8.870 ± 1.905	9.548 ± 1.646
n6/n3 PMK	0.823 ± 0.046	0.722 ± 0.023**	0.823 ± 0.158	0.740 ± 0.058

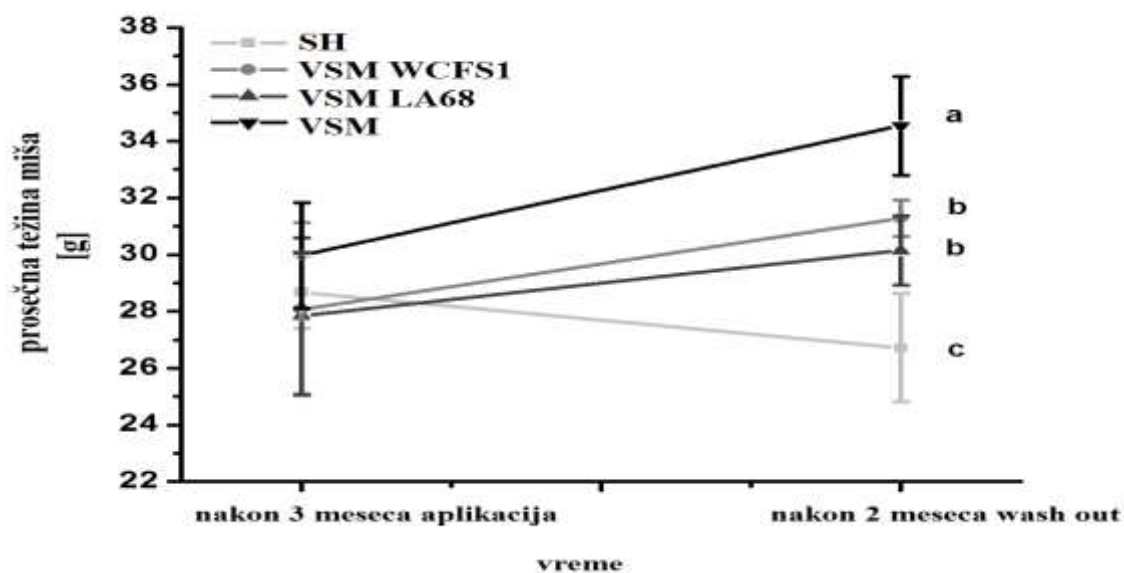
Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (g/100 g metil estara masnih kiselina); n=6 miševa po grupi. Statistička značajnost između SH i MH grupa je dobijena korišćenjem Studentovog t- test za nezavisne uzorke sa *P<0,05; ** P< 0,01; ***P < 0,001. Vrednosti u istom redu sa različitim superskriptom se značajno razlikuju P < 0.05 (ANOVA praćene post hoc Tukey' s testom). MKME, metil-estri masnih kiselina;

4.3 Ispitivanje dužine trajanja efekata *L. rhamnosus* LA68 i *L. plantarum* WCFS1 posle 8 nedelja *wash out* perioda

U cilju procene dužine trajanja efekata aplikacije BMK na metaboličke parametre, telesnu masu i sastav masnih kiselina organa pri istom režimu ishrane, izvršene su analize na preostalim životinjama nakon 8 nedelja nakon prestanka aplikacije BMK.

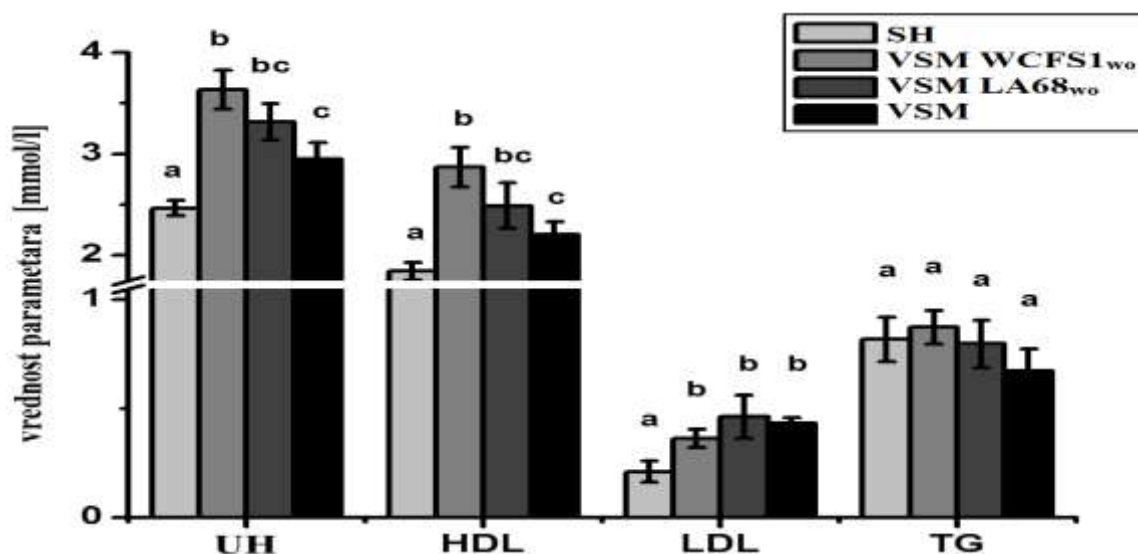
4.3.1 Promene u telesnoj masi i biohemijским parametrima

Kako bismo procenili dužinu trajanja pozitivnih efekata oralne aplikacije dva *Lactobacillus* soja na telesnu masu, mase preostalih životinja u svakoj grupi su merene i nakon 2 meseca od prestanka aplikacije BMK. Rezultati merenja su pokazali da je masa miševa u grupama kojima su oralno davane bakterije, VSM WCFS1 i VSM LA68, porasla u odnosu na grupu koja je bila na standardnoj ishrani, ali su i dalje bile značajno niže u odnosu na VSM grupu (Slika 16).

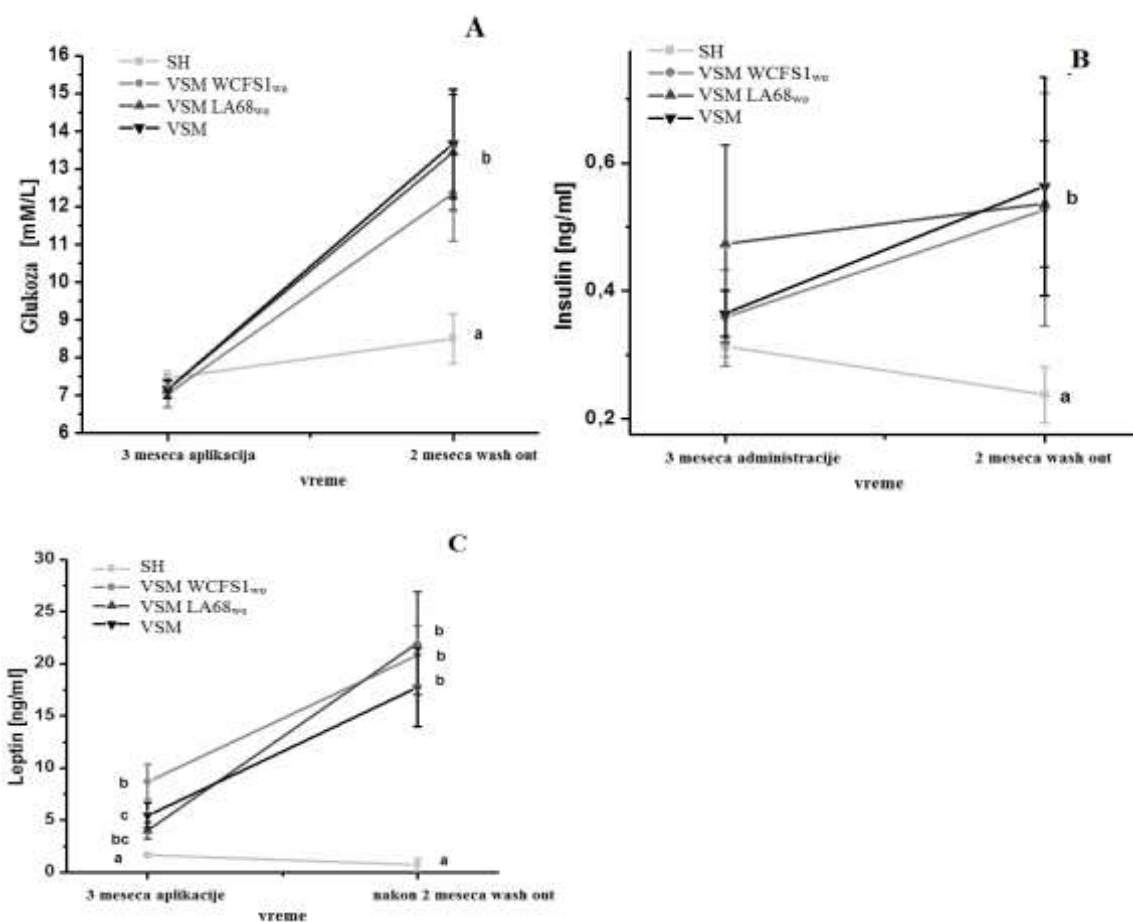


Slika 17. Telesna masa miševa merena u dve tačke: nakon 3 meseca aplikacije BMK i nakon 2 meseca *wash out* perioda. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SEM. Statistička značajnost je dobijena korišćenjem ANOVA testa (n=6).

U serumu životinja nakon 8 nedelja *wash out* perioda su mereni i parametri lipidnog statusa (TG, UH, LDL, HDL). Poređenjem rezultata između grupa uočava se statistički značajno veća vrednost za UH i HDL holesterol kod VSM WCFS1 grupe u odnosu na VSM grupu (Slika 17). Takođe, dodatnih 8 nedelja VSM ishrane je dovelo do povećanja serumskih koncentracija leptina, insulina i glukoze u svim VSM grupama u odnosu na SH grupu, ali nisu nađene statistički značajne razlike u vrednostima ovih parametara između VSM grupa (Slika 18 A, B, C). Ovi rezultati ukazuju da je nakon 8 nedelja *wash out* perioda većina protektivnih efekata koji su zapaženi nakon administracije dva *Lactobacillus* soja, naročito soja WCFS1 na nivo TG, LDL i leptina, je izgubljeno.



Slika 18. Parametri lipidnog statusa mereni nakon završenog *wash out* perioda. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SEM. Statistička značajnost je testirana korišćenjem ANOVA testa (n=6).



Slika 19. Serumski nivoi hormona i glukoze merenih u dve tačke: nakon 3 meseca aplikacije BMK i nakon 2 meseca *wash out* perioda. A) Glukoza; B) Insulin; C) Leptin. Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SEM. Statistička značajnost je dobijena korišćenjem ANOVA testa (n=6). Različita slova označavaju statističku značajnost

4.3.2 Histološki nalaz jetre

Histološka analiza uzorka jetre je utvrdila progresiju steatoze u toku 8 nedelja *wash out* perioda kod svih VSM grupa. U uzorcima jetre miševa na standardnoj ishrani nisu uočene patološke promene. Ocene za individualne grupe su bile sledeće: SH grupa 0; VSM WCFS1_{wo} grupa $2 \pm 0,7$; VSM LA68 grupa $1,4 \pm 1,5$ i VSM grupa $1,6 \pm 1,1$. Ocene histološke analize su predstavljene kao srednje vrednosti \pm SD. Razlike između VSM grupa nisu bile statistički značajne. Rezultati histološke analize jetre su pokazali da je nakon 8

nedelja *wash out* perioda u VSM WCFS1_{wo} i VSM LA68_{wo} grupama došlo do napredovanja steatoze tako da se histološka slika više nije razlikovala u odnosu na grupu koja je tokom čitavog eksperimentalnog perioda bila samo na VSM ishrani.

4.3.3 Promene u sastavu masnih kiselina organa nakon 8 nedelja *wash out* perioda

Nakon 8 nedelja od prestanka aplikacije BMK, pri čemu su životinje ostale na VSM režimu, analiziran je sastav masnih kiselina jetre i mozga. Rezultati analize sastava masnih kiselina jetre su pokazali da dodatnih 8 nedelja na ishrani sa povećanim sadržajem masti, u VSM grupi nisu doveli do značajnih promena u sadržaju ukupnih ZMK, MMK i PMK, ali je prestanak aplikacije probiotskim bakterijama doveo do značajnih promena u sadržaju pojedinih masnih kiselina. Prestanak tretmana je na kraju rezultirao gubitkom razlika između VSM grupa u sadržaju određenih masnih kiselina uočenih nakon 12 nedelja administracije sojeva LA68 i WCFS1 (Tabela 13). Jedina uočena razlika u sastavu masnih kiselina jetre nakon 8 nedelja od prestanka aplikacije bakterija je bila značajna razlika u sadržaju γ -linoleinske kiseline i EPA u VSM WCFS1_{wo} grupi u poređenju sa VSM i VSM LA68_{wo} grupama. (Tabela 13).

Prolongirana VSM ishrana u toku *wash out* perioda uticala je na sastav masnih kiselina mozga na sličan način kod sve tri VSM grupe. Naime, uočeno je značajno smanjenje u sadržaju PMK n-3 serije i povećanje u odnosu n-6/n-3 serija masnih kiselina kod sve tri VSM grupe. Jedina uočena razlika u sastavu masnih kiselina mozga nakon ovog perioda bila je u sadržaju arahidonske kiseline (C20:4n-6) u VSM WCFS1_{wo} grupi u odnosu na VSM i VSM LA68_{wo} grupu, ali je kod sve tri grupe tokom ovog perioda zapažen trend smanjivanja sadržaja arahidonske kiseline (Tabela 14).

Zapaženo je da je nakon prestanka aplikacije soja WCFS1 stepen smanjenja u sadržaju EPA u režimu ishrane visokog sadržaja masti bio manji nego kod ostale dve VSM grupe. Ovo je interesantan rezultat s obzirom da smanjenje sadržaja dugolančanih PMK u jetri može biti odgovorno za razvoj masne jetre [358]. Takođe, veličina masnih kapljica u jetri je u negativnoj korelaciji sa sadržajem EPA u lipidima jetre [372], pa ovo može da bude

povoljan efekat nakon prestanka aplikacije soja *L. plantarum* WCFS1 u VSM režimu. Međutim, kako grupa koja je dobijala ovaj soj nije imala bolju histološku sliku od ostale dve grupe, sam rezultat bi mogao da bude bez suštinskog značaja. Analizom sastava masnih kiselina mozga nakon 8 nedelja *wash out* perioda, nisu nađene značajne razlike između grupa koje su bila na VSM ishrani. Uočeno je samo da je prolongiran režim VSM ishrane uticao na sastav masnih kiselina ovih organa na sličan način u sve tri grupe, tj. doveo je do progresivnog smanjenja u sadržaju PMK n-3 serije i do povećanja u odnosu n-6/n-3 serija masnih kiselina u okviru svih VSM grupa.

Tabla 13. Sastav masnih kiselina jetre (%) kod C57BL/6 miševa na ishrani visokog sadržaja masti nakon 8 nedelja wash out perioda

MK	VSM	VSM WCFS1wo	VSM LA68wo
12:0	0.160 ± 0.112	0.131 ± 0.013	0.246 ± 0.135
14:0	1.714 ± 1.086	1.537 ± 0.052	2.506 ± 1.295
16:0	20.596 ± 1.062 ^{a†}	18.775 ± 0.649 ^b	19.747 ± 0.775 ^{ab†}
18:0	7.382 ± 2.205	7.306 ± 0.379 [†]	5.777 ± 2.014 [†]
20:0	0.139 ± 0.041	0.094 ± 0.006 [†]	0.088 ± 0.030 [†]
22:0	0.742 ± 0.316	0.794 ± 0.039 [†]	0.564 ± 0.230 [†]
24:0	0.187 ± 0.097	0.167 ± 0.014 [†]	0.127 ± 0.080 [†]
16:1n-7	7.836 ± 4.804	7.578 ± 0.343 [†]	10.624 ± 4.590
18:1n-9	27.479 ± 5.343	27.382 ± 1.749 [†]	30.206 ± 3.372 [†]
18:1n-7	3.444 ± 0.850	3.487 ± 0.575	3.514 ± 0.567 [†]
24:1n-9	0.271 ± 0.111	0.267 ± 0.024 [†]	0.218 ± 0.094
18:2n-6	8.787 ± 0.934 [†]	8.415 ± 0.796 [†]	8.029 ± 0.922 [†]
18:3n-6	0.150 ± 0.034 ^a	0.287 ± 0.071 ^{b†}	0.138 ± 0.034 ^a
20:3n-6	1.429 ± 0.233	1.209 ± 0.080 [†]	2.127 ± 0.1061
20:4n-6	9.174 ± 4.904	11.507 ± 0.466 [†]	6.777 ± 4.741
18:3n-3	0.241 ± 0.070	0.286 ± 0.058	0.290 ± 0.077 [†]
20:5n-3	0.158 ± 0.059 ^{a†}	0.263 ± 0.051 ^{b†}	0.156 ± 0.096 ^{a†}
22:5n-3	0.216 ± 0.118	0.399 ± 0.075	0.228 ± 0.139
22:6n-3	4.663 ± 3.220	6.717 ± 0.067	3.626 ± 3.523
Σ ZMK	30.918 ± 2.102	28.812 ± 0.733 [†]	29.032 ± 0.878
Σ MMK	39.030±10.609	38.718 ± 2.517 [†]	44.562±7.951 [†]
Σ PMK	24.788 ± 8.987	29.090 ± 1.443 [†]	21.374 ± 8.540
DLPMK	13.964±8.138	18.488±0.515	10.560±8.348
PMK n-3	5.248 ± 3.337	7.668 ± 0.202	4.302 ± 3.740
PMK n-6	19.540 ± 5.772	21.422 ± 1.302 [†]	17.072 ± 4.844 [†]
PMK n6/n3	5.203 ± 2.984	2.793 ± 0.135 [†]	6.502 ± 3.934
20:4/18:2 n6	1.020 ± 0.502	1.374 ± 0.084	0.806 ± 0.498
(20:5+22:6)/18:3 n3	23.377 ± 18.111	25.062 ± 5.509	13.739 ± 12.782 [†]
18:1/18:0 n-9	4.236 ± 2.192	3.764 ± 0,437	5.978 ± 2,692
20:4/(20:5+22:6) n6/n3	2.326 ± 0.760	1.648 ± 0.058 [†]	2.442 ± 0.914

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (g/100 g metil estara masnih kiselina); n=6 miševa po grupi. Vrednosti u istom redu sa različitim superskriptom se značajno razlikuju P < 0.05 (ANOVA praćene post hoc Tukey' s testom). MKME, metil-estri masnih kiselina; Vrednosti u istom redu i koloni u Tabeli X i Tabli X označenih sa † su značajno različite (Student T-test za nezavisne uzorke).

Tabla 14. Sastav masnih kiselina jetre (%) kod C57BL/6 miševa na ishrani visokog sadržaja masti nakon 8 nedelja wash out perioda

MK	VSM	VSM WCFS1wo	VSM LA68wo
16:0	17.131 ± 1.181	17.433 ± 0.996	17.557 ± 1.157 [†]
18:0	15.305 ± 0.950	15.480 ± 0.971	15.957 ± 0.663
20:0	0.327 ± 0.025 [†]	0.345 ± 0.036	0.347 ± 0.033 [†]
22:0	0.608 ± 0.054 [†]	0.650 ± 0.065 [†]	0.652 ± 0.044 [†]
24:0	0.637 ± 0.089	0.796 ± 0.112	0.767 ± 0.139 [†]
16:1n-7	0.543 ± 0.067 [†]	0.510 ± 0.030	0.557 ± 0.022 [†]
18:1n-9	16.288 ± 0.937 [†]	15.673 ± 0.823	16.221 ± 0.933 [†]
18:1n-7	3.454 ± 0.173 [†]	3.384 ± 0.192	3.468 ± 0.206 [†]
20:1n-9	2.425 ± 0.146 [†]	2.282 ± 0.147	2.319 ± 0.054 [†]
24:1n-9	2.276 ± 0.219 [†]	2.546 ± 0.285 [†]	2.574 ± 0.232 [†]
18:2n-6	0.349 ± 0.021	0.342 ± 0.064	0.356 ± 0.024
20:2n-6	0.206 ± 0.036	0.214 ± 0.045	0.200 ± 0.031
20:3n-6	0.359 ± 0.010	0.351 ± 0.020	0.356 ± 0.016
20:4n-6	9.427 ± 0.130 ^a	8.876 ± 0.322 ^b	9.382 ± 0.129 ^a
20:5n-3	0.360 ± 0.080 [†]	0.449 ± 0.129	0.394 ± 0.104
22:6n-3	2.815 ± 0.118 [†]	2.616 ± 1.222 [†]	2.617 ± 0.016 [†]
Σ ZMK	34.012 ± 2.219	34.708 ± 2.058	35.280 ± 1.772 [†]
Σ MMK	24.992 ± 1.472 [†]	24.398 ± 1.419	25.138 ± 1.356 [†]
Σ PMK	13.518 ± 0.287 [†]	12.848 ± 0.543	13.305 ± 0.151 [†]
n-3 PMK	3.176 ± 0.195 [†]	3.066 ± 0.192 [†]	3.015 ± 0.117 [†]
n-6 PMK	10.342 ± 0.137 ^{a†}	9.782 ± 0.374 ^b	10.290 ± 0.129 ^a
n6/n3 PMK	3.266 ± 0.184 [†]	3.194 ± 0.118 [†]	3.418 ± 0.145 [†]

Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost ± SD (g/100 g metil estara masnih kiselina); n=6 miševa po grupi. Vrednosti u istom redu sa različitim superskriptom se značajno razlikuju P < 0.05 (ANOVA praćene post hoc Tukey' s testom). MKME, metil-estri masnih kiselina; Vrednosti u istom redu i koloni u Tabeli X i Tabli X označenih sa † su značajno različite (Student T-test za nezavisne uzorke).

5 ZAKLJUČCI

U ovom radu ispitivan je uticaj dva soja bakterija mlečne kiseline, *L. rhamnosus* LA68 i *L. plantarum* WCFS1, na metaboličke i imunološke parametre u uslovima eksperimentalno indukovanoj nealkoholnoj masnoj jetri. Iz dobijenih rezultata zaključili smo sledeće:

a) Karakterizacija *L. rhamnosus* soja LA68 kroz metaboličke i imunološke efekte nakon oralne aplikacije u trajanju od 4 nedelje kod zdravih mladih miševa soja C57BL/6 u uslovima standardne ishrane:

- Oralna aplikacija *L. rhamnosus* soja LA68 u uslovima standardne ishrane nije pokazala efekte na telesnu masu i biohemijske parametre kod mladih ženki miševa soja C57BL/6
- Sastav masnih kiselina organa (jetre i mozga) miševa je bio promenjen nakon aplikacije soja LA68 u uslovima standardne ishrane
- Aspekt modulacije sastava masnih kiselina organa usled primene BMK bi trebalo da bude intenzivnije testiran s obzirom na sve širu upotrebu BMK kroz fermentisane mlečne proizvode i dodatke ishrani
- Oralna aplikacija *L. rhamnosus* soja LA68 u uslovima standardne ishrane je pokazala imunomodulatornu aktivnost kod miševa soja C57BL/6, odnosno dovela je do povećanog odgovora splenocita na nespecifičnu stimulaciju, do aktivacije Th1 imunskog odgovora i do pomeranja populacije splenocita ka granulocitnoj/monocitnoj lozi koja je važna komponenta urođenog imunskog odgovora i predstavlja prvu liniju odbrane od infekcije

b) Imunološki i metabolički efekti primene *L. rhamnosus* LA68 i *L. plantarum* WCFS1 u uslovima eksperimentalno indukovane nealkoholne masne jetre-steatoze kod miševa soja C57BL/6

- 16 nedelja ishrane u kojoj je 41% energije poticao od masti je bio dovoljan da kod miševa soja C57BL/6 dovede do značajnog porasta telesne mase i razvoja steatoze koju je pratio poremećaj lipidnih parametara i porast nivoa leptina, što odgovara početnoj fazi NAFLD (stadijum steatoze).

- U toku 16 nedelja VSM ishrane uočene su značajne promene u sastavu masnih kiselina organa, a naročito jetre gde je deponovanje masti, odnosno nastanak steatoze bio povezan sa povećanjem sadržaja MMK i smanjenjem u ukupnom sadržaju ZMK i PMK.
- Histološka analiza uzoraka jetre je pokazala da je oralna aplikacija u toku 12 nedelja oba *Lactobacillus* sp. soja, usporila razvoj steatoze u jetri u uslovima VSM ishrane
- U uslovima eksperimentalno izazvane nealkoholne masne jetre, odnosno steatoze, aplikacija soja LA68 i soja WCFS1 je pokazala različite efekte na metaboličke i imunološke parametre, pri čemu je izraženiji efekat zapažen kod soja WCFS1
- Aplikacija soja WCFS1 je u uslovima VSM ishrane sprečila porast telesne mase, smanjila nivo serumskih triglicerida i LDL holesterola, a zapažen je i značaj porast u nivou leptina.
- Aplikacija soja LA68 je uslovima VSM ishrane takođe sprečila porast telesne mase, ali je dovela do smanjenja serumskih nivoa UH i HDL holesterola
- Sa aspekta sastava masnih kiselina organa, zapaženo je da je aplikacija oba soja u uslovima VSM ishrane dovela do promena u masnokiselinskom sastavu jetre, ali nije imala značajan uticaj na sastav masnih kiselina lipida mozga.
- Nisu zapažene značajne razlike između dva *Lactobacillus* vrste/soja u efektu na masnokiselinski sastav jetre u toku režima VSM ishrane, ali je aplikacija *L. plantarum* WCFS1 imala izraženiji efekat u odnosu na VSM grupu
- Najznačajnija promena u sastavu masnih kiselina jetre izazvana aplikacijom oba soja je bilo povećanje u odnosu proizvod/prekursor n-3 serije masnih kiselina ($[C20:5 + C22:6]/C18:3$) kod obe tretirane grupe i ovaj odnos je bio isti kao i kod grupe koja je bila na standardnoj ishrani. Uzimajući u obzir da ovaj odnos uključuje aktivnost enzima Δ -5 i Δ -6 desaturaze i da je aktivnost ovih enzima poremećena kod gojaznih osoba sa NAFLD, postoji mogućnost da primena testiranih sojeva može reverzibilno da deluje na aktivnost navedenih enzima
- Aplikacija soja WCFS1 u uslovima VSM ishrane je imala tendenciju povećanja citotoksične T ćelijske populacije (CD3+CD8+), značajnog smanjenja aktiviranih B i T ćelija i regulatornih ćelija (CD25+) i B ćelija (CD19+), a dovela je i do

smanjenja u produkciji IL-6 i ćelijskoj proliferaciji/vijabilnosti nakon nespecifične stimulacije.

- Zbog ispoljenih imunomodulatornih efekata u vidu povišenog nivoa leptina, smanjene reaktivnosti na poliklonsku stimulaciju, smanjenje u procentualnoj zastupljenosti CD25+ ćelija, ali i povećanje procenta T limfocita, primena soja WCFS1, sa aspekta imunoloških efekata, ne bi bila prvi izbor u prevenciji nealkoholne masne jetre ili metaboličkog sindroma.
- Za razliku od soja WCFS1, aplikacija soja LA68 nije dovela do značajnih imunomodulatornih efekata kod miševa na VSM ishrani, za razliku od primene u uslovima standardne ishrane, pa bi prednost LA68 soja u odnosu na WCFS1 u uslovima ishrane visokog sadržaja masti, mogla da bude upravo blaža imunomodulatorna aktivnost

c) Ispitivanje trajanja efekata oralne aplikacije *L. rhamnosus* i *L. plantarum* na telesnu masu, biohemijske parametre i sastav masnih kiselina organa posle 8 nedelja *wash out* perioda:

- Posle 8 nedelja od prestanka aplikacije BMK mase miševa su u i dalje bile manje u odnosu na grupu koja je bila samo na VSM ishrani, ali je izgubljen protektivni efekat na razvoj steatoze, s obzirom da je došlo do značajnog napredovanja steatoze u grupama kojima su prethodno aplikovane BMK, a histološka slika je bila ista kao kod grupe koja je samo bila samo na VSM ishrani
- Posle 8 nedelja *wash out* perioda izgubljeni su specifični efekti primenjenih sojeva na parametre lipidnog statusa, a došlo je i do porasta u serumskim nivoima leptina i insulina.
- Sa aspekta sastava masnih kiselina jetre, posle 8 nedelja od prestanka intervencije izgubljene su razlike u sadržaju pojedinih masnih kiselina uslovljene aplikacijom korišćenih sojeva
- U grupi koja je dobijala *L. plantarum* WCFS1, nakon 8 nedelja od prestanka aplikacije u uslovima VSM ishrane, detektovana je najveća koncentracije HDL holesterola u serumu, kao i najmanje smanjenje u sadržaja dugolančane PMK

(eikozapentaenske kiseline) u jetri u odnosu na ostale grupe koje su bile na istom režimu ishrane, što može biti povoljan efekat ovog soja nakon prestanka administracije

U zaključku, aktivna primena odabranih probiotskih vrsta/sojeva je imala povoljne efekte pre svega na metaboličke parametre kod laboratorijskih miševa na VSM ishrani, ali su ovi pozitivni efekti bili kratkoročni nakon prestanka aplikacije. Odnosno, za održavanje povoljnih efekata probiotske suplementacije u tretmanu NAFLD neophodna je i promena režima ishrane.

6 LITERATURA

1. Sekirov, I., et al., *Gut microbiota in health and disease*. *Physiol Rev*, 2010. **90**(3): p. 859-904.
2. Human Microbiome Project, C., *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. *Nature*, 2012. **486**(7402): p. 207-14.
3. Hill, D.A. and D. Artis, *Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis*. *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 623-67.
4. Backhed, F., et al., *Host-bacterial mutualism in the human intestine*. *Science*, 2005. **307**(5717): p. 1915-20.
5. Louis, P., et al., *Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine*. *J Appl Microbiol*, 2007. **102**(5): p. 1197-208.
6. Ley, R.E., et al., *Evolution of mammals and their gut microbes*. *Science*, 2008. **320**(5883): p. 1647-51.
7. Ley, R.E., et al., *Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota*. *Nat Rev Microbiol*, 2008. **6**(10): p. 776-88.
8. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora*. *Science*, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
9. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. *Nature*, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
10. Kamada, N., et al., *Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota*. *Nat Immunol*, 2013. **14**(7): p. 685-90.
11. Sommer, F. and F. Backhed, *The gut microbiota--masters of host development and physiology*. *Nat Rev Microbiol*, 2013. **11**(4): p. 227-38.
12. Prakash, S., et al., *Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics*. *Biologics*, 2011. **5**: p. 71-86.
13. Ivanov, II and K. Honda, *Intestinal commensal microbes as immune modulators*. *Cell Host Microbe*, 2012. **12**(4): p. 496-508.
14. Vaishampayan, P.A., et al., *Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant*. *Genome Biol Evol*, 2010. **2**: p. 53-66.
15. Penders, J., et al., *Molecular fingerprinting of the intestinal microbiota of infants in whom atopic eczema was or was not developing*. *Clin Exp Allergy*, 2006. **36**(12): p. 1602-8.
16. Turrone, F., et al., *Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a Lactobacillus and Bifidobacterium perspective*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(2): p. 183-203.
17. Yoshioka, H., K. Iseki, and K. Fujita, *Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants*. *Pediatrics*, 1983. **72**(3): p. 317-21.
18. Gueimonde, M., et al., *Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation?* *Neonatology*, 2007. **92**(1): p. 64-6.
19. Langhendries, J.P., *[Early bacterial colonisation of the intestine: why it matters?]*. *Arch Pediatr*, 2006. **13**(12): p. 1526-34.
20. Derrien, M. and J.E. van Hylckama Vlieg, *Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota*. *Trends Microbiol*, 2015. **23**(6): p. 354-66.

21. Hooper, L.V., *Do symbiotic bacteria subvert host immunity?* Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(5): p. 367-74.
22. Wostmann, B.S., et al., *Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats.* Lab Anim Sci, 1983. **33**(1): p. 46-50.
23. Stephen, A.M., H.S. Wiggins, and J.H. Cummings, *Effect of changing transit time on colonic microbial metabolism in man.* Gut, 1987. **28**(5): p. 601-9.
24. Flint, H.J., *The impact of nutrition on the human microbiome.* Nutr Rev, 2012. **70 Suppl 1**: p. S10-3.
25. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest.* Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
26. Turnbaugh, P.J., et al., *The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice.* Sci Transl Med, 2009. **1**(6): p. 6ra14.
27. Cani, P.D., et al., *Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia.* Diabetologia, 2007. **50**(11): p. 2374-83.
28. Hildebrandt, M.A., et al., *High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity.* Gastroenterology, 2009. **137**(5): p. 1716-24 e1-2.
29. Ley, R.E., et al., *Obesity alters gut microbial ecology.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(31): p. 11070-5.
30. Salzman, N.H. and C.L. Bevins, *Dysbiosis--a consequence of Paneth cell dysfunction.* Semin Immunol, 2013. **25**(5): p. 334-41.
31. Hooper, L.V. and A.J. Macpherson, *Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 159-69.
32. Wong, J.M., et al., *Colonic health: fermentation and short chain fatty acids.* J Clin Gastroenterol, 2006. **40**(3): p. 235-43.
33. Claesson, M.J., et al., *Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly.* Nature, 2012. **488**(7410): p. 178-84.
34. Bergman, E.N., *Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species.* Physiol Rev, 1990. **70**(2): p. 567-90.
35. LeBlanc, J.G., et al., *Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective.* Curr Opin Biotechnol, 2013. **24**(2): p. 160-8.
36. Yatsunenko, T., et al., *Human gut microbiome viewed across age and geography.* Nature, 2012. **486**(7402): p. 222-7.
37. Lefebvre, P., et al., *Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation.* Physiol Rev, 2009. **89**(1): p. 147-91.
38. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 313-23.
39. Kabat, A.M., N. Srinivasan, and K.J. Maloy, *Modulation of immune development and function by intestinal microbiota.* Trends Immunol, 2014. **35**(11): p. 507-17.
40. Cebra, J.J., et al., *Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses.* Dev Immunol, 1998. **6**(1-2): p. 13-8.

41. Mazmanian, S.K., J.L. Round, and D.L. Kasper, *A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease*. *Nature*, 2008. **453**(7195): p. 620-5.
42. Luhrs, H., et al., *Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis*. *Scand J Gastroenterol*, 2002. **37**(4): p. 458-66.
43. Stappenbeck, T.S., L.V. Hooper, and J.I. Gordon, *Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(24): p. 15451-5.
44. Kandori, H., et al., *Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice*. *Exp Anim*, 1996. **45**(2): p. 155-60.
45. Enss, M.L., et al., *Changes in colonic mucins of germfree rats in response to the introduction of a "normal" rat microbial flora*. *Rat colonic mucin*. *J Exp Anim Sci*, 1992. **35**(3): p. 110-9.
46. Kleessen, B. and M. Blaut, *Modulation of gut mucosal biofilms*. *Br J Nutr*, 2005. **93 Suppl 1**: p. S35-40.
47. Yu, L.C., et al., *Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology*. *World J Gastrointest Pathophysiol*, 2012. **3**(1): p. 27-43.
48. Hamer, H.M., et al., *Review article: the role of butyrate on colonic function*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008. **27**(2): p. 104-19.
49. McFall-Ngai, M., *Adaptive immunity: care for the community*. *Nature*, 2007. **445**(7124): p. 153.
50. Neish, A.S., *Molecular aspects of intestinal epithelial cell-bacterial interactions that determine the development of intestinal inflammation*. *Inflamm Bowel Dis*, 2004. **10**(2): p. 159-68.
51. Lukić, J., *Analiza interakcija laktobacila sa crevnom mukozom pacova*, in *Biološki fakultet*. 2013, Univerzitet u Beogradu: Beograd. p. 145.
52. Johansson, M.E., et al., *The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(39): p. 15064-9.
53. De Smet, K. and R. Contreras, *Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins*. *Biotechnol Lett*, 2005. **27**(18): p. 1337-47.
54. Vaishnava, S., et al., *Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(52): p. 20858-63.
55. Macpherson, A.J., M.B. Geuking, and K.D. McCoy, *Immune responses that adapt the intestinal mucosa to commensal intestinal bacteria*. *Immunology*, 2005. **115**(2): p. 153-62.
56. Macpherson, A.J. and T. Uhr, *Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria*. *Science*, 2004. **303**(5664): p. 1662-5.
57. Van den Abbeele, P., et al., *The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept*. *FEMS Microbiol Rev*, 2011. **35**(4): p. 681-704.
58. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.

59. Abreu, M.T., et al., *Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1609-16.
60. Ortega-Cava, C.F., et al., *Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 3977-85.
61. Gewirtz, A.T., et al., *Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1882-5.
62. Neish, A.S., et al., *Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1560-3.
63. Hill, C., et al., *Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2014. **11**(8): p. 506-14.
64. FAO and WHO, *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. 2001: Cordoba, Argentina. p. 19-20.
65. Giahhi, L., et al., *Regulation of TLR4, p38 MAPkinase, IkappaB and miRNAs by inactivated strains of lactobacilli in human dendritic cells*. Benef Microbes, 2012. **3**(2): p. 91-8.
66. Soccol, C.R., de Souza Vandenberghe, L. P., Spier, M. R., Pedroni Medeiros, A. B., Yamagishi, C. T., De Dea Lindner, J., Pandey, A. and Thomaz-Soccol, V., *The Potential of Probiotics: A Review*. Food Technol. Biotechnol, 2010. **48**(4): p. 413.
67. Klein, G., et al., *Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria*. Int J Food Microbiol, 1998. **41**(2): p. 103-25.
68. Harzallah, D.a.B., 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*. 2013, Kongo M. InTech: Rijeka, Croatia.
69. Holzapfel, W.H., et al., *Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2 Suppl): p. 365S-373S.
70. Isolauri, E., et al., *Probiotics: effects on immunity*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2 Suppl): p. 444S-450S.
71. Hayashi, H., et al., *Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism*. J Med Microbiol, 2005. **54**(Pt 11): p. 1093-101.
72. Matsuda, K., et al., *Establishment of an analytical system for the human fecal microbiota, based on reverse transcription-quantitative PCR targeting of multicopy rRNA molecules*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(7): p. 1961-9.
73. Lebeer, S., J. Vanderleyden, and S.C. De Keersmaecker, *Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(4): p. 728-64, Table of Contents.

74. Felis, G.E. and F. Dellaglio, *Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria*. Curr Issues Intest Microbiol, 2007. **8**(2): p. 44-61.
75. Saarela, M., et al., *Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties*. J Biotechnol, 2000. **84**(3): p. 197-215.
76. Farnworth, E.R., *The evidence to support health claims for probiotics*. J Nutr, 2008. **138**(6): p. 1250S-4S.
77. Tuomola, E., et al., *Quality assurance criteria for probiotic bacteria*. Am J Clin Nutr, 2001. **73**(2 Suppl): p. 393S-398S.
78. Isolauri, E., S. Salminen, and A.C. Ouwehand, *Microbial-gut interactions in health and disease*. Probiotics. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2004. **18**(2): p. 299-313.
79. Vasiljevic, T. and N.P. Shah, *Probiotics—From Metchnikoff to bioactives*. International Dairy Journal, 2008. **18**(7): p. 714-728.
80. Leroy, F.F., G., and de Vuyst, L., *Latest Developments in Probiotics*, in *Meat Biotechnology*, F. Toldra, Editor. 2008, Springer Science+Business Media: LLC. p. 217-229.
81. Brown, A.C. and A. Valiere, *Probiotics and medical nutrition therapy*. Nutr Clin Care, 2004. **7**(2): p. 56-68.
82. Takeda, S., et al., *Effects of oral administration of probiotics from Mongolian dairy products on the Th1 immune response in mice*. Biosci Biotechnol Biochem, 2013. **77**(7): p. 1372-8.
83. Dong, H., I. Rowland, and P. Yaqoob, *Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro*. Br J Nutr, 2012. **108**(3): p. 459-70.
84. EFSA, *Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed*. EFSA Journal, 2013. **11**(11): p. 3449.
85. Borriello, S.P., et al., *Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria*. Clin Infect Dis, 2003. **36**(6): p. 775-80.
86. Mayrhofer, S., et al., *Comparison of broth microdilution, Etest, and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of Lactobacillus acidophilus group members*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(12): p. 3745-8.
87. Mohamadzadeh, M., et al., *Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 2880-5.
88. Delcenserie, V., et al., *Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract*. Curr Issues Mol Biol, 2008. **10**(1-2): p. 37-54.
89. Mowat, A.M., *Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(4): p. 331-41.
90. Gill, H. and J. Prasad, *Probiotics, immunomodulation, and health benefits*. Adv Exp Med Biol, 2008. **606**: p. 423-54.
91. Borchers, A.T., et al., *Probiotics and immunity*. J Gastroenterol, 2009. **44**(1): p. 26-46.
92. Neish, A.S., *The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue*. Microbes Infect, 2002. **4**(3): p. 309-17.
93. van Baarlen, P., J.M. Wells, and M. Kleerebezem, *Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli*. Trends Immunol, 2013. **34**(5): p. 208-15.

94. Santiago-López, L., Hernández-Mendoza, A., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., Vallejo-Cordoba, B., & González-Córdova, A. F. , *The effects of consuming probiotic-fermented milk on the immune system: A review of scientific evidence*. International Journal of Dairy Technology, 2015. **68**(2): p. 153-165.
95. Erickson, K.L. and N.E. Hubbard, *Probiotic immunomodulation in health and disease*. J Nutr, 2000. **130**(2S Suppl): p. 403S-409S.
96. Galdeano, C.M. and G. Perdigon, *Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation*. J Appl Microbiol, 2004. **97**(4): p. 673-81.
97. Mandal, V., & Mandal, N. C, *New health potentials of orally consumed probiotic microorganisms*, in *Probiotics Biology, Genetics and Health Aspects*. 2011, Springer Berlin, Heidelberg. p. 167-189.
98. Miettinen, M., J. Vuopio-Varkila, and K. Varkila, *Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria*. Infect Immun, 1996. **64**(12): p. 5403-5.
99. Gill, H.S., K.J. Rutherford, and M.L. Cross, *Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes*. J Clin Immunol, 2001. **21**(4): p. 264-71.
100. Sheih, Y.H., et al., *Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium Lactobacillus rhamnosus HN001*. J Am Coll Nutr, 2001. **20**(2 Suppl): p. 149-56.
101. Takeda, K., et al., *Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by Lactobacillus casei Shirota*. Clin Exp Immunol, 2006. **146**(1): p. 109-15.
102. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes*. Blood, 1994. **84**(12): p. 4008-27.
103. McCracken, V.J., et al., *TNF-alpha sensitizes HT-29 colonic epithelial cells to intestinal lactobacilli*. Exp Biol Med (Maywood), 2002. **227**(8): p. 665-70.
104. Ruiz, P.A., et al., *Innate mechanisms for Bifidobacterium lactis to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats*. Immunology, 2005. **115**(4): p. 441-50.
105. Vinderola, G., C. Matar, and G. Perdigon, *Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: involvement of toll-like receptors*. Clin Diagn Lab Immunol, 2005. **12**(9): p. 1075-84.
106. Abbas, A.K.L., A.H., *Osnovna imunologija: funkcije i poremećaji imunskog sistema*. 2008, Beograd: DATA STATUS.
107. Ibnou-Zekri, N., et al., *Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal Lactobacillus strains that display similar properties in vitro*. Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 428-36.
108. Park, J.H., et al., *Encapsulated Bifidobacterium bifidum potentiates intestinal IgA production*. Cell Immunol, 2002. **219**(1): p. 22-7.
109. Christensen, H.R., H. Frokiaer, and J.J. Pestka, *Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 171-8.

110. Smits, H.H., et al., *Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **115**(6): p. 1260-7.
111. Shida, K., et al., *Lactobacillus casei strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model*. Clin Exp Allergy, 2002. **32**(4): p. 563-70.
112. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
113. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. **75**(2): p. 263-74.
114. Madsen, K.L., et al., *Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice*. Gastroenterology, 1999. **116**(5): p. 1107-14.
115. Wang, H., et al., *Yogurt consumption is associated with better diet quality and metabolic profile in American men and women*. Nutr Res, 2013. **33**(1): p. 18-26.
116. Iacono, A., et al., *Probiotics as an emerging therapeutic strategy to treat NAFLD: focus on molecular and biochemical mechanisms*. J Nutr Biochem, 2011. **22**(8): p. 699-711.
117. Firouzi, S., et al., *Role of probiotics in modulating glucose homeostasis: evidence from animal and human studies*. Int J Food Sci Nutr, 2013. **64**(6): p. 780-6.
118. Ben Salah, R., et al., *Lactobacillus plantarum TN8 exhibits protective effects on lipid, hepatic and renal profiles in obese rat*. Anaerobe, 2013. **23**: p. 55-61.
119. Jung, S.P., et al., *Effect of Lactobacillus gasseri BNR17 on Overweight and Obese Adults: A Randomized, Double-Blind Clinical Trial*. Korean J Fam Med, 2013. **34**(2): p. 80-9.
120. Fooks, L.J. and G.R. Gibson, *Probiotics as modulators of the gut flora*. Br J Nutr, 2002. **88 Suppl 1**: p. S39-49.
121. Cox, L.M. and M.J. Blaser, *Pathways in microbe-induced obesity*. Cell Metab, 2013. **17**(6): p. 883-94.
122. Watanabe, M., et al., *Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation*. Nature, 2006. **439**(7075): p. 484-9.
123. Cani, P.D. and M. Van Hul, *Novel opportunities for next-generation probiotics targeting metabolic syndrome*. Curr Opin Biotechnol, 2015. **32**: p. 21-7.
124. David, L.A., et al., *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome*. Nature, 2014. **505**(7484): p. 559-63.
125. Zhao, L., *The gut microbiota and obesity: from correlation to causality*. Nat Rev Microbiol, 2013. **11**(9): p. 639-47.
126. Turnbaugh, P.J., et al., *Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(4): p. 213-23.
127. Hur, K.Y. and M.S. Lee, *Gut Microbiota and Metabolic Disorders*. Diabetes Metab J, 2015. **39**(3): p. 198-203.
128. de Vrese, M. and J. Schrezenmeir, *Probiotics, prebiotics, and synbiotics*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2008. **111**: p. 1-66.

129. Gerritsen, J., et al., *Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics*. Genes Nutr, 2011. **6**(3): p. 209-40.
130. Takemura, N., T. Okubo, and K. Sonoyama, *Lactobacillus plantarum strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet*. Exp Biol Med (Maywood), 2010. **235**(7): p. 849-56.
131. Kondo, S., et al., *Antiobesity effects of Bifidobacterium breve strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity*. Biosci Biotechnol Biochem, 2010. **74**(8): p. 1656-61.
132. Yadav, H., et al., *Beneficial metabolic effects of a probiotic via butyrate-induced GLP-1 hormone secretion*. J Biol Chem, 2013. **288**(35): p. 25088-97.
133. Le Barz, M., et al., *Probiotics as Complementary Treatment for Metabolic Disorders*. Diabetes Metab J, 2015. **39**(4): p. 291-303.
134. Thomas, C., et al., *TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis*. Cell Metab, 2009. **10**(3): p. 167-77.
135. Wall, R., et al., *Contrasting effects of Bifidobacterium breve NCIMB 702258 and Bifidobacterium breve DPC 6330 on the composition of murine brain fatty acids and gut microbiota*. Am J Clin Nutr, 2012. **95**(5): p. 1278-87.
136. Wall, R., et al., *Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues*. Am J Clin Nutr, 2009. **89**(5): p. 1393-401.
137. DiBaise, J.K., et al., *Gut microbiota and its possible relationship with obesity*. Mayo Clin Proc, 2008. **83**(4): p. 460-9.
138. McClain, C.J., S. Barve, and I. Deaciuc, *Good fat/bad fat*. Hepatology, 2007. **45**(6): p. 1343-6.
139. Chalasani, N., et al., *The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(6): p. 811-26.
140. Ludwig, J., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease*. Mayo Clin Proc, 1980. **55**(7): p. 434-8.
141. Aron-Wisnewsky, J., et al., *Gut microbiota and non-alcoholic fatty liver disease: new insights*. Clin Microbiol Infect, 2013. **19**(4): p. 338-48.
142. Dowman, J.K., J.W. Tomlinson, and P.N. Newsome, *Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease*. QJM, 2010. **103**(2): p. 71-83.
143. Day, C.P., *Natural history of NAFLD: remarkably benign in the absence of cirrhosis*. Gastroenterology, 2005. **129**(1): p. 375-8.
144. Ekstedt, M., et al., *Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes*. Hepatology, 2006. **44**(4): p. 865-73.
145. Lazo, M., et al., *Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the United States: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994*. Am J Epidemiol, 2013. **178**(1): p. 38-45.
146. Beymer, C., et al., *Prevalence and predictors of asymptomatic liver disease in patients undergoing gastric bypass surgery*. Arch Surg, 2003. **138**(11): p. 1240-4.
147. Gholam, P.M., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease in severely obese subjects*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(2): p. 399-408.

148. Targher, G., et al., *Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and its association with cardiovascular disease among type 2 diabetic patients*. Diabetes Care, 2007. **30**(5): p. 1212-8.
149. Williams, C.D., et al., *Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study*. Gastroenterology, 2011. **140**(1): p. 124-31.
150. Bellentani, S. and M. Marino, *Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Ann Hepatol, 2009. **8 Suppl 1**: p. S4-8.
151. Ratzliff, V., et al., *A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference*. J Hepatol, 2010. **53**(2): p. 372-84.
152. Chitturi, S., V.W. Wong, and G. Farrell, *Nonalcoholic fatty liver in Asia: Firmly entrenched and rapidly gaining ground*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26 Suppl 1**: p. 163-72.
153. Caldwell, S. and C. Argo, *The natural history of non-alcoholic fatty liver disease*. Dig Dis, 2010. **28**(1): p. 162-8.
154. Teli, M.R., et al., *The natural history of nonalcoholic fatty liver: a follow-up study*. Hepatology, 1995. **22**(6): p. 1714-9.
155. Dam-Larsen, S., et al., *Long term prognosis of fatty liver: risk of chronic liver disease and death*. Gut, 2004. **53**(5): p. 750-5.
156. Wong, V.W., et al., *Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years*. Gut, 2010. **59**(7): p. 969-74.
157. Ong, J.P., A. Pitts, and Z.M. Younossi, *Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease*. J Hepatol, 2008. **49**(4): p. 608-12.
158. Ong, J.P. and Z.M. Younossi, *Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH*. Clin Liver Dis, 2007. **11**(1): p. 1-16, vii.
159. Rafiq, N., et al., *Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2009. **7**(2): p. 234-8.
160. Dietrich, P. and C. Hellerbrand, *Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2014. **28**(4): p. 637-53.
161. Paoletta, G., et al., *Gut-liver axis and probiotics: their role in non-alcoholic fatty liver disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(42): p. 15518-31.
162. Day, C.P. and O.F. James, *Steatohepatitis: a tale of two "hits"?* Gastroenterology, 1998. **114**(4): p. 842-5.
163. Donnelly, K.L., et al., *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. J Clin Invest, 2005. **115**(5): p. 1343-51.
164. Ahmed, M., *Non-alcoholic fatty liver disease in 2015*. World J Hepatol, 2015. **7**(11): p. 1450-9.
165. Law, K. and E.M. Brunt, *Nonalcoholic fatty liver disease*. Clin Liver Dis, 2010. **14**(4): p. 591-604.
166. Cave, M., et al., *Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition*. J Nutr Biochem, 2007. **18**(3): p. 184-95.

167. Chalasani, N., et al., *Genome-wide association study identifies variants associated with histologic features of nonalcoholic Fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 2010. **139**(5): p. 1567-76, 1576 e1-6.
168. Kitamoto, T., et al., *Genome-wide scan revealed that polymorphisms in the PNPLA3, SAMM50, and PARVB genes are associated with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in Japan*. *Hum Genet*, 2013. **132**(7): p. 783-92.
169. Choudhury, J. and A.J. Sanyal, *Clinical aspects of fatty liver disease*. *Semin Liver Dis*, 2004. **24**(4): p. 349-62.
170. Armstrong, M.J., et al., *Presence and severity of non-alcoholic fatty liver disease in a large prospective primary care cohort*. *J Hepatol*, 2012. **56**(1): p. 234-40.
171. Adams, L.A., P. Angulo, and K.D. Lindor, *Nonalcoholic fatty liver disease*. *CMAJ*, 2005. **172**(7): p. 899-905.
172. Palmentieri, B., et al., *The role of bright liver echo pattern on ultrasound B-mode examination in the diagnosis of liver steatosis*. *Dig Liver Dis*, 2006. **38**(7): p. 485-9.
173. Marovic, D., *[Ultrasonography findings of liver in textile workers for diagnosing nonalcoholic fatty liver disease]*. *Srp Arh Celok Lek*, 2007. **135**(9-10): p. 532-5.
174. Saadeh, S., et al., *The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 2002. **123**(3): p. 745-50.
175. Adams, L.A. and A.E. Feldstein, *Non-invasive diagnosis of nonalcoholic fatty liver and nonalcoholic steatohepatitis*. *J Dig Dis*, 2011. **12**(1): p. 10-6.
176. Neuschwander-Tetri, B.A. and S.H. Caldwell, *Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference*. *Hepatology*, 2003. **37**(5): p. 1202-19.
177. Brunt, E.M. and D.G. Tiniakos, *Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease*. *World J Gastroenterol*, 2010. **16**(42): p. 5286-96.
178. Harrison, S.A. and C.P. Day, *Benefits of lifestyle modification in NAFLD*. *Gut*, 2007. **56**(12): p. 1760-9.
179. Finelli, C. and G. Tarantino, *Is visceral fat reduction necessary to favour metabolic changes in the liver?* *J Gastrointestin Liver Dis*, 2012. **21**(2): p. 205-8.
180. Promrat, K., et al., *Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis*. *Hepatology*, 2010. **51**(1): p. 121-9.
181. Durazzo, M., et al., *Focus on therapeutic strategies of nonalcoholic Fatty liver disease*. *Int J Hepatol*, 2012. **2012**: p. 464706.
182. Musso, G., et al., *Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity*. *Ann Med*, 2011. **43**(8): p. 617-49.
183. Musso, G., et al., *Impact of current treatments on liver disease, glucose metabolism and cardiovascular risk in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a systematic review and meta-analysis of randomised trials*. *Diabetologia*, 2012. **55**(4): p. 885-904.
184. Alberti, K.G., et al., *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and*

- International Association for the Study of Obesity*. *Circulation*, 2009. **120**(16): p. 1640-5.
185. Grundy, S.M., et al., *Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement*. *Circulation*, 2005. **112**(17): p. 2735-52.
186. Loomba, R., et al., *Association between diabetes, family history of diabetes, and risk of nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis*. *Hepatology*, 2012. **56**(3): p. 943-51.
187. Leite, N.C., et al., *Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus*. *Liver Int*, 2009. **29**(1): p. 113-9.
188. Assy, N., et al., *Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients*. *Dig Dis Sci*, 2000. **45**(10): p. 1929-34.
189. Korenblat, K.M., et al., *Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(5): p. 1369-75.
190. Mehta, S.R., et al., *Intrahepatic insulin exposure, intrahepatocellular lipid and regional body fat in nonalcoholic fatty liver disease*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. **97**(6): p. 2151-9.
191. Postic, C. and J. Girard, *Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice*. *J Clin Invest*, 2008. **118**(3): p. 829-38.
192. Fabbrini, E., et al., *Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease*. *Gastroenterology*, 2008. **134**(2): p. 424-31.
193. Malhi, H. and G.J. Gores, *Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease*. *Semin Liver Dis*, 2008. **28**(4): p. 360-9.
194. Miele, L., et al., *Hepatic mitochondrial beta-oxidation in patients with nonalcoholic steatohepatitis assessed by 13C-octanoate breath test*. *Am J Gastroenterol*, 2003. **98**(10): p. 2335-6.
195. Charlton, M., et al., *Apolipoprotein synthesis in nonalcoholic steatohepatitis*. *Hepatology*, 2002. **35**(4): p. 898-904.
196. Westerbacka, J., et al., *Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. **90**(5): p. 2804-9.
197. Johnson, A.M. and J.M. Olefsky, *The origins and drivers of insulin resistance*. *Cell*, 2013. **152**(4): p. 673-84.
198. Paradis, V., et al., *High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis*. *Hepatology*, 2001. **34**(4 Pt 1): p. 738-44.
199. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease*. *Trends Endocrinol Metab*, 2008. **19**(10): p. 371-9.
200. Gastaldelli, A., et al., *Relationship between hepatic/visceral fat and hepatic insulin resistance in nondiabetic and type 2 diabetic subjects*. *Gastroenterology*, 2007. **133**(2): p. 496-506.
201. Marra, F. and C. Bertolani, *Adipokines in liver diseases*. *Hepatology*, 2009. **50**(3): p. 957-69.

202. Cnop, M., et al., *Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex.* Diabetologia, 2003. **46**(4): p. 459-69.
203. Bugianesi, E., et al., *Plasma adiponectin in nonalcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity.* J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3498-504.
204. Polyzos, S.A., J. Kountouras, and C. Zavos, *The multi-hit process and the antagonistic roles of tumor necrosis factor-alpha and adiponectin in non alcoholic fatty liver disease.* Hippokratia, 2009. **13**(2): p. 127; author reply 128.
205. Tilg, H. and G.S. Hotamisligil, *Nonalcoholic fatty liver disease: Cytokine-adipokine interplay and regulation of insulin resistance.* Gastroenterology, 2006. **131**(3): p. 934-45.
206. Kelesidis, T., et al., *Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications.* Ann Intern Med, 2010. **152**(2): p. 93-100.
207. Huang, X.D., et al., *Serum leptin and soluble leptin receptor in non-alcoholic fatty liver disease.* World J Gastroenterol, 2008. **14**(18): p. 2888-93.
208. Polyzos, S.A., J. Kountouras, and C.S. Mantzoros, *Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review.* Metabolism, 2015. **64**(1): p. 60-78.
209. Naik, A., R. Kosir, and D. Rozman, *Genomic aspects of NAFLD pathogenesis.* Genomics, 2013. **102**(2): p. 84-95.
210. Machado, M.V. and H. Cortez-Pinto, *Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease.* Ann Hepatol, 2012. **11**(4): p. 440-9.
211. Compare, D., et al., *Gut--liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease.* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2012. **22**(6): p. 471-6.
212. Backhed, F., et al., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(44): p. 15718-23.
213. Drenick, E.J., J. Fisler, and D. Johnson, *Hepatic steatosis after intestinal bypass--prevention and reversal by metronidazole, irrespective of protein-calorie malnutrition.* Gastroenterology, 1982. **82**(3): p. 535-48.
214. Artis, D., *Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 411-20.
215. Lichtman, S.N., et al., *Hepatic injury associated with small bowel bacterial overgrowth in rats is prevented by metronidazole and tetracycline.* Gastroenterology, 1991. **100**(2): p. 513-9.
216. Miele, L., et al., *Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease.* Hepatology, 2009. **49**(6): p. 1877-87.
217. De Gottardi, A. and K.D. McCoy, *Evaluation of the gut barrier to intestinal bacteria in non-alcoholic fatty liver disease.* J Hepatol, 2011. **55**(6): p. 1181-3.
218. Nagata, K., H. Suzuki, and S. Sakaguchi, *Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis.* J Toxicol Sci, 2007. **32**(5): p. 453-68.
219. Solga, S.F. and A.M. Diehl, *Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics.* J Hepatol, 2003. **38**(5): p. 681-7.
220. Alisi, A., et al., *Causative role of gut microbiota in non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis.* Front Cell Infect Microbiol, 2012. **2**: p. 132.

221. Bilzer, M., F. Roggel, and A.L. Gerbes, *Role of Kupffer cells in host defense and liver disease*. Liver Int, 2006. **26**(10): p. 1175-86.
222. Jirillo, E., et al., *The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings*. J Endotoxin Res, 2002. **8**(5): p. 319-27.
223. Hotamisligil, G.S. and E. Erbay, *Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 923-34.
224. Baker, R.G., M.S. Hayden, and S. Ghosh, *NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease*. Cell Metab, 2011. **13**(1): p. 11-22.
225. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
226. Barton, G.M., *A calculated response: control of inflammation by the innate immune system*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 413-20.
227. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Semin Immunol, 2007. **19**(1): p. 24-32.
228. Matarese, G. and A. La Cava, *The intricate interface between immune system and metabolism*. Trends Immunol, 2004. **25**(4): p. 193-200.
229. Karagiannides, I. and C. Pothoulakis, *Obesity, innate immunity and gut inflammation*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. **23**(6): p. 661-6.
230. Al Rifai, M., et al., *The association of nonalcoholic fatty liver disease, obesity, and metabolic syndrome, with systemic inflammation and subclinical atherosclerosis: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)*. Atherosclerosis, 2015. **239**(2): p. 629-33.
231. Rocha, V.Z. and P. Libby, *Obesity, inflammation, and atherosclerosis*. Nat Rev Cardiol, 2009. **6**(6): p. 399-409.
232. Wolowczuk, I., et al., *Feeding our immune system: impact on metabolism*. Clin Dev Immunol, 2008. **2008**: p. 639803.
233. Chandra, R.K., *Immune response in overnutrition*. Cancer Res, 1981. **41**(9 Pt 2): p. 3795-6.
234. Ahima, R.S. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. Trends Endocrinol Metab, 2000. **11**(8): p. 327-32.
235. La Cava, A., et al., *Leptin-based immune intervention: current status and future directions*. Curr Opin Investig Drugs, 2003. **4**(11): p. 1327-32.
236. Matarese, G., et al., *Regulatory T cells in obesity: the leptin connection*. Trends Mol Med, 2010. **16**(6): p. 247-56.
237. Fantuzzi, G. and R. Faggioni, *Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(4): p. 437-46.
238. Haddad, J.J., N.E. Saade, and B. Safieh-Garabedian, *Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis*. J Neuroimmunol, 2002. **133**(1-2): p. 1-19.
239. Warne, J.P., *Tumour necrosis factor alpha: a key regulator of adipose tissue mass*. J Endocrinol, 2003. **177**(3): p. 351-5.
240. Uysal, K.T., et al., *Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function*. Nature, 1997. **389**(6651): p. 610-4.
241. Angulo, P. and K.D. Lindor, *Treatment of nonalcoholic fatty liver: present and emerging therapies*. Semin Liver Dis, 2001. **21**(1): p. 81-8.

242. Gratz, S.W., H. Mykkanen, and H.S. El-Nezami, *Probiotics and gut health: a special focus on liver diseases*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(4): p. 403-10.
243. Lee, H.Y., et al., *Human originated bacteria, Lactobacillus rhamnosus PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(7): p. 736-44.
244. Yadav, H., S. Jain, and P.R. Sinha, *Antidiabetic effect of probiotic dahi containing Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei in high fructose fed rats*. Nutrition, 2007. **23**(1): p. 62-8.
245. Wang, Y., et al., *Effects of Lactobacillus plantarum MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet*. Appl Microbiol Biotechnol, 2009. **84**(2): p. 341-7.
246. Bhathena, J., et al., *Oral probiotic microcapsule formulation ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in Bio F1B Golden Syrian hamsters*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58394.
247. Wagnerberger, S., et al., *Lactobacillus casei Shirota protects from fructose-induced liver steatosis: a mouse model*. J Nutr Biochem, 2013. **24**(3): p. 531-8.
248. Xu, R.Y., et al., *Supplementation with probiotics modifies gut flora and attenuates liver fat accumulation in rat nonalcoholic fatty liver disease model*. J Clin Biochem Nutr, 2012. **50**(1): p. 72-7.
249. Abu-Shanab, A. and E.M. Quigley, *The role of the gut microbiota in nonalcoholic fatty liver disease*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2010. **7**(12): p. 691-701.
250. Wolever, T.M., et al., *Effect of rectal infusion of short chain fatty acids in human subjects*. Am J Gastroenterol, 1989. **84**(9): p. 1027-33.
251. Walker, A.W., et al., *pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon*. Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(7): p. 3692-700.
252. Diez-Gonzalez, F., et al., *Modeling the growth of Listeria monocytogenes based on a time to detect model in culture media and frankfurters*. Int J Food Microbiol, 2007. **113**(3): p. 277-83.
253. Cleveland, J., et al., *Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation*. Int J Food Microbiol, 2001. **71**(1): p. 1-20.
254. Collado, M.C., M. Hernandez, and Y. Sanz, *Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal Bifidobacterium strains*. J Food Prot, 2005. **68**(5): p. 1034-40.
255. Bernet, M.F., et al., *Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions*. Appl Environ Microbiol, 1993. **59**(12): p. 4121-8.
256. Candela, M., et al., *Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: competition between bifidobacteria and enteropathogens*. Res Microbiol, 2005. **156**(8): p. 887-95.
257. Collado, M.C., J. Meriluoto, and S. Salminen, *Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus*. Lett Appl Microbiol, 2007. **45**(4): p. 454-60.
258. Lau, E., et al., *Beyond gut microbiota: understanding obesity and type 2 diabetes*. Hormones (Athens), 2015. **14**(3): p. 358-69.

259. Ramakrishna, B.S., *Probiotic-induced changes in the intestinal epithelium: implications in gastrointestinal disease*. Trop Gastroenterol, 2009. **30**(2): p. 76-85.
260. Swidsinski, A., et al., *Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon*. Gut, 2007. **56**(3): p. 343-50.
261. Khan, J., et al., *Role of intestinal mucus on the uptake of latex beads by Peyer's patches and on their transport to mesenteric lymph nodes in rats*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1999. **23**(1): p. 19-23.
262. Kim, Y., et al., *Inhibition of Escherichia coli O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells*. J Microbiol Biotechnol, 2008. **18**(7): p. 1278-85.
263. Cani, P.D., et al., *Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1470-81.
264. Groschwitz, K.R. and S.P. Hogan, *Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(1): p. 3-20; quiz 21-2.
265. Attene-Ramos, M.S., et al., *Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(5): p. 455-9.
266. Rivera, C.A., et al., *Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis*. J Hepatol, 2007. **47**(4): p. 571-9.
267. Raso, G.M., et al., *Effects of a Lactobacillus paracasei B21060 based synbiotic on steatosis, insulin signaling and toll-like receptor expression in rats fed a high-fat diet*. J Nutr Biochem, 2014. **25**(1): p. 81-90.
268. Ceponis, P.J., et al., *Interleukins 4 and 13 increase intestinal epithelial permeability by a phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Lack of evidence for STAT 6 involvement*. J Biol Chem, 2000. **275**(37): p. 29132-7.
269. Ma, D., P. Forsythe, and J. Bienenstock, *Live Lactobacillus rhamnosus [corrected] is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression*. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5308-14.
270. Kelly, D., et al., *Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA*. Nat Immunol, 2004. **5**(1): p. 104-12.
271. O'Hara, A.M., et al., *Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by Bifidobacterium infantis and Lactobacillus salivarius*. Immunology, 2006. **118**(2): p. 202-15.
272. Thurman, R.G., et al., *Role of Kupffer cells, endotoxin and free radicals in hepatotoxicity due to prolonged alcohol consumption: studies in female and male rats*. J Nutr, 1997. **127**(5 Suppl): p. 903S-906S.
273. Pappo, I., et al., *Antitumor necrosis factor antibodies reduce hepatic steatosis during total parenteral nutrition and bowel rest in the rat*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 1995. **19**(1): p. 80-2.
274. Diehl, A.M., *Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis IV. Nonalcoholic fatty liver disease abnormalities in macrophage function and cytokines*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **282**(1): p. G1-5.

275. Esposito, E., et al., *Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats*. J Nutr, 2009. **139**(5): p. 905-11.
276. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
277. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 1959. **37**(8): p. 911-7.
278. Ichihara, K. and Y. Fukubayashi, *Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography*. J Lipid Res, 2010. **51**(3): p. 635-40.
279. Kleiner, D.E., et al., *Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease*. Hepatology, 2005. **41**(6): p. 1313-21.
280. Wall, R., Ross, P. R., Shanahan, F., Quigley, E. M., Dinan, T. G., Cryan, J. F., Fitzgerald G. F., and Stanton, C., *Influence of gut microbiota and manipulation by probiotics and prebiotics on host tissue fat: potential clinical implications*. Lipid Technology, 2012. **24**(10): p. 227-229.
281. Wang, Z., et al., *Specific metabolic rates of major organs and tissues across adulthood: evaluation by mechanistic model of resting energy expenditure*. Am J Clin Nutr, 2010. **92**(6): p. 1369-77.
282. Rosberg-Cody, E., et al., *Recombinant lactobacilli expressing linoleic acid isomerase can modulate the fatty acid composition of host adipose tissue in mice*. Microbiology, 2011. **157**(Pt 2): p. 609-15.
283. Barrett, E., et al., *Bifidobacterium breve with alpha-linolenic acid and linoleic acid alters fatty acid metabolism in the maternal separation model of irritable bowel syndrome*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e48159.
284. Hoppu, U., et al., *Probiotics and dietary counselling targeting maternal dietary fat intake modifies breast milk fatty acids and cytokines*. Eur J Nutr, 2012. **51**(2): p. 211-9.
285. Cao, H., et al., *Identification of a lipokine, a lipid hormone linking adipose tissue to systemic metabolism*. Cell, 2008. **134**(6): p. 933-44.
286. Dimopoulos, N., et al., *Differential effects of palmitate and palmitoleate on insulin action and glucose utilization in rat L6 skeletal muscle cells*. Biochem J, 2006. **399**(3): p. 473-81.
287. Katakura, M., et al., *Omega-3 polyunsaturated Fatty acids enhance neuronal differentiation in cultured rat neural stem cells*. Stem Cells Int, 2013. **2013**: p. 490476.
288. Maekawa, M., et al., *Arachidonic acid drives postnatal neurogenesis and elicits a beneficial effect on prepulse inhibition, a biological trait of psychiatric illnesses*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5085.
289. Henriksen, C., et al., *Improved cognitive development among preterm infants attributable to early supplementation of human milk with docosahexaenoic acid and arachidonic acid*. Pediatrics, 2008. **121**(6): p. 1137-45.
290. Yurko-Mauro, K., et al., *Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline*. Alzheimers Dement, 2010. **6**(6): p. 456-64.

291. EFSA, *Scientific Opinion of the panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from Mead Johnson & Company on DHA and ARA and visual development*. 2009. **7(3)**: p. 1-13.
292. Murphy, M.G., *Dietary fatty acids and membrane protein function*. J Nutr Biochem, 1990. **1(2)**: p. 68-79.
293. Wall, R., et al., *Impact of administered bifidobacterium on murine host fatty acid composition*. Lipids, 2010. **45(5)**: p. 429-36.
294. Fukushima, M., et al., *Effects of a mixture of organisms, Lactobacillus acidophilus or Streptococcus faecalis on delta6-desaturase activity in the livers of rats fed a fat- and cholesterol-enriched diet*. Nutrition, 1999. **15(5)**: p. 373-8.
295. Salva, S., J. Villena, and S. Alvarez, *Immunomodulatory activity of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from goat milk: impact on intestinal and respiratory infections*. Int J Food Microbiol, 2010. **141(1-2)**: p. 82-9.
296. Perdigon, G., et al., *Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system*. Eur J Clin Nutr, 2002. **56 Suppl 4**: p. S21-6.
297. Ehlers, M.R., *CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity*. Microbes Infect, 2000. **2(3)**: p. 289-94.
298. Lindau, D., et al., *Primary blood neutrophils express a functional cell surface Toll-like receptor 9*. Eur J Immunol, 2013. **43(8)**: p. 2101-13.
299. Kawai, K., et al., *CD11b-mediated migratory property of peripheral blood B cells*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116(1)**: p. 192-7.
300. Ross, G.D. and V. Vetvicka, *CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions*. Clin Exp Immunol, 1993. **92(2)**: p. 181-4.
301. Chiba, Y., et al., *Well-controlled proinflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic Lactobacillus casei*. Immunology, 2010. **130(3)**: p. 352-62.
302. van de Winkel, J.G. and P.J. Capel, *Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications*. Immunol Today, 1993. **14(5)**: p. 215-21.
303. Lynch, R.G., *Regulatory roles for Fc gamma RIII (CD16) and Fc gamma RII (CD32) in the development of T- and B-lineage lymphoid cells*. J Leukoc Biol, 2000. **67(3)**: p. 279-84.
304. Ortiz-Stern, A. and C. Rosales, *Fc gamma RIIB stimulation promotes beta1 integrin activation in human neutrophils*. J Leukoc Biol, 2005. **77(5)**: p. 787-99.
305. Rask, C., et al., *Differential effect on cell-mediated immunity in human volunteers after intake of different lactobacilli*. Clin Exp Immunol, 2013. **172(2)**: p. 321-32.
306. Gill, H.S., et al., *Enhancement of natural and acquired immunity by Lactobacillus rhamnosus (HN001), Lactobacillus acidophilus (HN017) and Bifidobacterium lactis (HN019)*. Br J Nutr, 2000. **83(2)**: p. 167-76.
307. Hsieh, C.S., et al., *T cell genetic background determines default T helper phenotype development in vitro*. J Exp Med, 1995. **181(2)**: p. 713-21.
308. Stewart, D., et al., *Genetic contribution to the septic response in a mouse model*. Shock, 2002. **18(4)**: p. 342-7.
309. Watanabe, H., et al., *Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains*. Shock, 2004. **22(5)**: p. 460-6.

310. Salminen, S., E. Isolauri, and E. Salminen, *Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1996. **70**(2-4): p. 347-58.
311. Villena, J., et al., *Orally administered Lactobacillus rhamnosus modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C)*. *BMC Immunol*, 2012. **13**: p. 53.
312. Miettinen, M., et al., *Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells*. *Infect Immun*, 1998. **66**(12): p. 6058-62.
313. Zheng, M.-H., et al., *Probiotics: A possible specific liver drug for non-alcoholic fatty liver disease*. *Bioscience Hypotheses*, 2009. **2**(1): p. 54-55.
314. Miyake, T., et al., *Impaired dendritic cell functions disrupt antigen-specific adaptive immune responses in mice with nonalcoholic fatty liver disease*. *J Gastroenterol*, 2010. **45**(8): p. 859-67.
315. De Vries, M.C., et al., *Lactobacillus plantarum—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract*. *International Dairy Journal*, 2006. **16**(9): p. 1018-1028.
316. Molin, G., et al., *Numerical taxonomy of Lactobacillus spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines*. *J Appl Bacteriol*, 1993. **74**(3): p. 314-23.
317. Xie, N., et al., *Effects of two Lactobacillus strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet*. *BMC Complement Altern Med*, 2011. **11**: p. 53.
318. Park, J.E., S.H. Oh, and Y.S. Cha, *Lactobacillus plantarum LG42 isolated from gajami sik-hae decreases body and fat pad weights in diet-induced obese mice*. *J Appl Microbiol*, 2014. **116**(1): p. 145-56.
319. Sanchez, M., et al., *Effect of Lactobacillus rhamnosus CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women*. *Br J Nutr*, 2014. **111**(8): p. 1507-19.
320. Karlsson, C.L., et al., *Effects on weight gain and gut microbiota in rats given bacterial supplements and a high-energy-dense diet from fetal life through to 6 months of age*. *Br J Nutr*, 2011. **106**(6): p. 887-95.
321. Ding, S., et al., *High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse*. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12191.
322. Forssten, S.D., et al., *Changes in satiety hormone concentrations and feed intake in rats in response to lactic acid bacteria*. *Appetite*, 2013. **71**: p. 16-21.
323. Nguyen, T.D., J.H. Kang, and M.S. Lee, *Characterization of Lactobacillus plantarum PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects*. *Int J Food Microbiol*, 2007. **113**(3): p. 358-61.
324. Naruszewicz, M., et al., *Effect of Lactobacillus plantarum 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers*. *Am J Clin Nutr*, 2002. **76**(6): p. 1249-55.
325. Jeun, J., et al., *Hypocholesterolemic effects of Lactobacillus plantarum KCTC3928 by increased bile acid excretion in C57BL/6 mice*. *Nutrition*, 2010. **26**(3): p. 321-30.

326. Hatakka, K., et al., *Lactobacillus rhamnosus LC705 together with Propionibacterium freudenreichii ssp shermanii JS administered in capsules is ineffective in lowering serum lipids*. J Am Coll Nutr, 2008. **27**(4): p. 441-7.
327. Oksaharju, A., et al., *Effects of probiotic Lactobacillus rhamnosus GG and Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii JS supplementation on intestinal and systemic markers of inflammation in ApoE*3Leiden mice consuming a high-fat diet*. Br J Nutr, 2013. **110**(1): p. 77-85.
328. Chiu, C.H., et al., *The effects of Lactobacillus-fermented milk on lipid metabolism in hamsters fed on high-cholesterol diet*. Appl Microbiol Biotechnol, 2006. **71**(2): p. 238-45.
329. Park, Y.H., et al., *Effect of dietary inclusion of Lactobacillus acidophilus ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats*. J Microbiol Biotechnol, 2007. **17**(4): p. 655-62.
330. Jequier, E., *Leptin signaling, adiposity, and energy balance*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **967**: p. 379-88.
331. Considine, R.V., et al., *Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. N Engl J Med, 1996. **334**(5): p. 292-5.
332. Polyzos, S.A., J. Kountouras, and C.S. Mantzoros, *Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease*. Metabolism, 2015.
333. Berg, A.H. and P.E. Scherer, *Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease*. Circ Res, 2005. **96**(9): p. 939-49.
334. Polyzos, S.A., et al., *The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease*. Diabetes Obes Metab, 2010. **12**(5): p. 365-83.
335. Heiker, J.T., D. Kosel, and A.G. Beck-Sickinger, *Molecular mechanisms of signal transduction via adiponectin and adiponectin receptors*. Biol Chem, 2010. **391**(9): p. 1005-18.
336. Gatselis, N.K., et al., *Adiponectin: a key playmaker adipocytokine in non-alcoholic fatty liver disease*. Clin Exp Med, 2014. **14**(2): p. 121-31.
337. Manco, M., et al., *Correlation of serum TNF-alpha levels and histologic liver injury scores in pediatric nonalcoholic fatty liver disease*. Am J Clin Pathol, 2007. **127**(6): p. 954-60.
338. Jarrar, M.H., et al., *Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2008. **27**(5): p. 412-21.
339. Li, C., et al., *Lactobacillus plantarum NCU116 improves liver function, oxidative stress and lipid metabolism in rats with high fat diet induced non-alcoholic fatty liver disease*. Food Funct, 2014. **5**(12): p. 3216-23.
340. Klover, P.J., A.H. Clementi, and R.A. Mooney, *Interleukin-6 depletion selectively improves hepatic insulin action in obesity*. Endocrinology, 2005. **146**(8): p. 3417-27.
341. Lord, G.M., et al., *Leptin inhibits the anti-CD3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(2): p. 330-8.
342. Lord, G.M., et al., *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 897-901.

343. De Rosa, V., et al., *A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation*. *Immunity*, 2007. **26**(2): p. 241-55.
344. Matarese, G., et al., *Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(14): p. 5150-5.
345. Galgani, M., et al., *Leptin modulates the survival of autoreactive CD4+ T cells through the nutrient/energy-sensing mammalian target of rapamycin signaling pathway*. *J Immunol*, 2010. **185**(12): p. 7474-9.
346. Fraser, D.A., et al., *Decreased CD4+ lymphocyte activation and increased interleukin-4 production in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients after acute starvation*. *Clin Rheumatol*, 1999. **18**(5): p. 394-401.
347. Garcia-Gonzalez, A., et al., *Serum leptin levels in women with systemic lupus erythematosus*. *Rheumatol Int*, 2002. **22**(4): p. 138-41.
348. La Cava, A. and G. Matarese, *The weight of leptin in immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(5): p. 371-9.
349. Matarese, G., C. Procaccini, and V. De Rosa, *At the crossroad of T cells, adipose tissue, and diabetes*. *Immunol Rev*, 2012. **249**(1): p. 116-34.
350. Faggioni, R., et al., *Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(5): p. 2367-72.
351. Matarese, G., et al., *Requirement for leptin in the induction and progression of autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol*, 2001. **166**(10): p. 5909-16.
352. Repa, A., et al., *Mucosal co-application of lactic acid bacteria and allergen induces counter-regulatory immune responses in a murine model of birch pollen allergy*. *Vaccine*, 2003. **22**(1): p. 87-95.
353. Lin, Y.H., S. Shah, and N. Salem, Jr., *Altered essential fatty acid metabolism and composition in rat liver, plasma, heart and brain after microalgal DHA addition to the diet*. *J Nutr Biochem*, 2011. **22**(8): p. 758-65.
354. Marteinsdottir, I., et al., *Changes in dietary fatty acids alter phospholipid fatty acid composition in selected regions of rat brain*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 1998. **22**(6): p. 1007-21.
355. Clandinin, M.T., M. Foot, and L. Robson, *Plasma membrane: can its structure and function be modulated by dietary fat?* *Comp Biochem Physiol B*, 1983. **76**(2): p. 335-9.
356. de Almeida, I.T., et al., *Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis*. *Clin Nutr*, 2002. **21**(3): p. 219-23.
357. de la Maza, M.P., et al., *Fatty acid composition of liver total lipids in alcoholic patients with and without liver damage*. *Alcohol Clin Exp Res*, 1996. **20**(8): p. 1418-22.
358. Araya, J., et al., *Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n - 6/n - 3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. *Clin Sci (Lond)*, 2004. **106**(6): p. 635-43.
359. Pan, D.A., A.J. Hulbert, and L.H. Storlien, *Dietary fats, membrane phospholipids and obesity*. *J Nutr*, 1994. **124**(9): p. 1555-65.

360. Mavrelis, P.G., et al., *Hepatic free fatty acids in alcoholic liver disease and morbid obesity*. Hepatology, 1983. **3**(2): p. 226-31.
361. Araya, J., et al., *Decreased liver fatty acid delta-6 and delta-5 desaturase activity in obese patients*. Obesity (Silver Spring), 2010. **18**(7): p. 1460-3.
362. Wang, X., et al., *Liver fatty acid composition in mice with or without nonalcoholic fatty liver disease*. Lipids Health Dis, 2011. **10**: p. 234.
363. Elizondo, A., et al., *Polyunsaturated fatty acid pattern in liver and erythrocyte phospholipids from obese patients*. Obesity (Silver Spring), 2007. **15**(1): p. 24-31.
364. Borkman, M., et al., *The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids*. N Engl J Med, 1993. **328**(4): p. 238-44.
365. Neuringer, M. and W.E. Connor, *n-3 fatty acids in the brain and retina: evidence for their essentiality*. Nutr Rev, 1986. **44**(9): p. 285-94.
366. Foot, M., T.F. Cruz, and M.T. Clandinin, *Effect of dietary lipid on synaptosomal acetylcholinesterase activity*. Biochem J, 1983. **211**(2): p. 507-9.
367. Sun, G.Y. and A.Y. Sun, *Synaptosomal plasma membranes: acyl group composition of phosphoglycerides and (Na⁺ plus K⁺)-ATPase activity during fatty acid deficiency*. J Neurochem, 1974. **22**(1): p. 15-8.
368. Jacobson, J.L., et al., *Beneficial effects of a polyunsaturated fatty acid on infant development: evidence from the inuit of arctic Quebec*. J Pediatr, 2008. **152**(3): p. 356-64.
369. Yu, H., et al., *Long-term effects of high lipid and high energy diet on serum lipid, brain fatty acid composition, and memory and learning ability in mice*. Int J Dev Neurosci, 2010. **28**(3): p. 271-6.
370. Granholm, A.C., et al., *Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat*. J Alzheimers Dis, 2008. **14**(2): p. 133-45.
371. Ivanovic, N., et al., *Brain and liver fatty acid composition changes upon consumption of Lactobacillus rhamnosus LA68*. Int J Food Sci Nutr, 2015. **66**(1): p. 93-7.
372. Singer, P. and E. Richter-Heinrich, *Stress and fatty liver--possible indications for dietary long-chain n-3 fatty acids*. Med Hypotheses, 1991. **36**(1): p. 90-4.

BIOGRAFIJA

Nevena Ivanović (rođena Medaković) je rođena 16. decembra 1983. godine u Kraljevu gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Diplomirala je na Farmaceutskom fakultet - Univerziteta u Beogradu 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,42. Tokom studija bila je stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka. Po završetku fakulteta, obavila je pripravnički staž u Apotekarskoj ustanovi Beograd i položila stručni ispit za farmaceute. Doktorske akademske studije – modul bromatologija upisala je školske 2008/09. god.

Pri Katedri za bromatologiju Farmaceutskog fakulteta u Beogradu počela je da radi oktobra 2008. godine kao saradnik u nastavi, a potom kao asistent od 2010. godine. Od 2011. godine Nevena Ivanović je angažovana kao saradnik na dva projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Autor je i koautor 5 radova štampanih u časopisima nacionalnog i međunarodnog značaja, od kojih četiri čine deo doktorske disertacije, kao i 19 saopštenja na međunarodnim i nacionalnim skupovima. Na VI kongresu farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 15-19 oktobar 2014. godine, osvojila je I nagradu za prezentaciju rada pod nazivom „Imunološki i metabolički efekti konzumacije *Lactobacillus rhamnosus* LA68”.

Član je Sekcije za sanitarnu hemiju Saveza farmaceutskih udruženja Srbije i Društva za ishranu Srbije.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Невена Ђ. Ивановић

Број индекса 6/08

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Утицај оралне примене *Lactobacillus rhamnosus* LA68 и *Lactobacillus plantarum* WCFS1 на имунолошке и метаболичке параметре мишева у условима експериментално индуковане неалкохолне масне јетре“

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

Потпис аутора

У Београду, 06.07.2016. год.

Невена Ивановић

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора Невена Ђ. Ивановић

Број индекса 6/08

Студијски програм Докторске академске студије – модул броматологија

Наслов рада „Утицај оралне примене *Lactobacillus rhamnosus* LA68 и *Lactobacillus plantarum* WCFS1 на имунолошке и метаболичке параметре мишева у условима експериментално индуковане неалкохолне масне јетре“

Ментор Др сц. Брижита Ђорђевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива 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 аутора

У Београду, 06.07.2016. год.

Невена Ивановић

Изјава о коришћењу

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

„Утицај оралне примене *Lactobacillus rhamnosus* LA68 и *Lactobacillus plantarum* WCFS1 на имунолошке и метаболичке параметре мишева у условима експериментално индуковане неалкохолне масне јетре“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 06.07.2016. год.

Невена Ивановић

1. Ауторство. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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 прерада. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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 прерада. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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.