

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Svetlana S. Soković Bajić

Karakterizacija mlečnokiselinskih bakterija
proizvođača γ -aminobuterne kiseline i njihova
uloga u prevenciji i tretmanu eksperimentalnog
autoimunskog encefalomijelitisa

Doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Svetlana S. Soković Bajić

Characterization of the lactic acid bacteria
producers of γ -aminobutyric acid and their role
in the prevention and treatment of experimental
autoimmune encephalomyelitis

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

Mentori:

dr Maja Tolinački, viši naučni saradnik,

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Branko Jovčić, vanredni profesor,

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Maja Tolinački, viši naučni saradnik,

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Branko Jovčić, vanredni profesor,

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Jelena Đokić, naučni saradnik,

Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Lozo, vanredni profesor,

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Ova doktorska disertacija urađena je u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Deo eksperimenata urađen je u saradnji sa Odeljenjem za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”.

Ovom prilikom bih se zahvalila:

dr Maji Tolinački, na ukazanom poverenju, mnogobrojnim korisnim savetima, nesebičnoj pomoći, bezgraničnom optimizmu. Hvala na vremenu i trudu uloženom u tumačenje dobijenih rezultata, strpljenju i sugestijama koje su bile neophodne za finalno oblikovanje teze, kao i za kritičku ocenu same teze. Iznad svega hvala na iskrenom prijateljstvu.

dr Branku Jovčiću na savetima, diskusijama, korisnim sugestijama koje su unapredile ovu tezu, kao i na kritičkoj oceni teze.

dr Jeleni Đokić na ogromnoj pomoći prilikom realizacije ove teze, na osmišljavanju eksperimenata, uloženom trudu i bodrenju kada nije sve teklo kako smo planirale i velikoj podršci u ključnim trenucima. Hvala na sugestijama koje su doprinele pisanju ove teze, kao i na kritičkoj oceni teze.

dr Jeleni Lozo na savetima i korisnim sugestijama koje su unapredile ovu tezu, kao i na kritičkoj oceni same teze.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Sanji Mihajlović, koja me je uvela u svet istraživanja, na uloženom vremenu, strpljenju i energiji. Hvala na savetima i podršci koji su omogućili da savladam prve prepreke u eksperimentalnom radu.

Zahvaljujem se svim članovima Odeljenju za imunologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, pre svega dr Đorđu Miljkoviću i dr Suzani Stanisavljević, uz čiju sam pomoć naučila da radim sa eksperimentalnim životinjama, na planiranju i sprovođenju eksperimenata i tumačenju dobijenih rezultata.

Dragim kolegama iz lab 06: Amarelici, Milanu, Ivani, Jeleni, Nati, Đorđu, Mici, Kaći, Nikoli, Jovanki, Dušanki, Brankci, Goksiju, Nemanjii M., Nemanji S., Mini, Danki i Malom Nikoli sa kojima je rad bio mnogo lakši i lepši.

Hvala Emici na prijateljstvu, optimizmu i smehu, hvala Mikiju na nesebičnoj pomoći, hvala Kaćici, Milkici i Duletu na svim divnim momentim, najdraži moji „Abrovići“, najbolji ste!

Hvala Ivi, Tanji, Jovani, Jovani, Miri i Ani na podršci, strpljenju, šalama, smehu i iskrenom prijateljstvu.

Hvala mami i tati na bezuslovnoj podršci, razumevanju i strpljenju.

Posebno mom Jovanu, hvala na svemu!

Karakterizacija mlečnokiselinskih bakterija proizvođača γ -aminobuterne kiseline i njihova uloga u prevenciji i tretmanu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa

REZIME

γ -aminobuterna kiselina (GABA) je biogeni amin prisutan kod biljaka, životinja i mikroorganizama i ostvaruje brojne fiziološke funkcije: inhibitor je neurotransmisije u sinapsama, ima umirujući efekat i ublažava hipertenziju i važan je imunosupresivni molekul. γ -aminobuterna kiselina nastaje ireverzibilnom dekarboksilacijom L-glutamata aktivnošću glutamat dekarboksilaze (GAD).

Ovo istraživanje imalo je za cilj ispitivanje potencijala sojeva mlečnokiselinskih bakterija (MKB) izolovanih iz mlečnih proizvoda Zapadnog Balkana kao i iz proizvoda sa Kavkaza i iz Azerbejdžana za produkciju γ -aminobuterne kiseline, selekciju sojeva sa navedenih područja koji produkuju najviše ovog metabolita i njihovu detaljnu probiotičku karakterizaciju. Nakon selekcije soja, koji produkuje najveću koncentraciju γ -aminobuterne kiseline ispitivan je efekat živog soja i supernatanata kultura ovog soja na modelu inflamacije *in vitro* i na poboljšanje kliničke slike na modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa, životinjskog modela multiple skleroze. Korišćenjem standardnih prajmera (CoreR/CoreF) prisustvo *gadB* gena, gena koji kodira glutamat dekarboksilazu, detektovano je kod 124 soja i to: 83 (27,4 %) laktobacila, 15 (4,9 %) laktokoka, 11 (3,6 %) leukonostoka, 8 (2,64 %) streptokoka, 6 (1,98 %) enterokoka i 1 (0,33 %) pediokoka od testirana 303 soja. TLC metodom je produkcija ovog metabolita detektovana je kod 4,6 % sojeva, odnosno 14 sojeva, od 124 testirana soja, a koji pripadaju vrstama *Lactobacillus brevis* i *Lb. plantarum*, dok je HPLC metodom izmerena koncentracija produkovane γ -aminobuterne kiseline. Simulirane uslove gastrointestinalnog trakta od 7 testiranih sojeva uspešno su preživela 4 soja vrste *Lb. brevis* BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 i BGZLS30-2. Ispitivanje bezbednosnog statusa sojeva pokazalo je da je soj BGZLS10-17 je bio osetljiv na sve testirane antibiotike, BGLMM11 je bio rezistentan na kanamicin, BGLMM10 je bio rezistentan na kanamicin i tetraciklin, dok je soj BGZLS30-2 bio rezistentan na ampicilin, kanamicin i tetraciklin, dok ni jedan od 4 ispitivana soja nije ispoljio ni hemolitičku ni želatinoznu aktivnost. Soj BGLMM10 ispoljio je najpotentniju antimikrobnu

aktivnost, na 11 od 18 testiranih patogena, dok soj BGZLS10-17 nije ispoljio antimikrobnu aktivnost. Ova studija pokazala je dobru sposobnost adhezije 4 testirana soja *Lb. brevis* za Caco-2 ćelijsku liniju, kao i visok procenat sprečavanja adhezije *Escherichia coli* ATCC25922 i *Salmonella enterica* C29039 za istu ćelijsku liniju. Tretman diferenciranih Caco-2 ćelija supernatantima kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom statistički značajno je smanjio inflamaciju izazvanu sa IL-1 β preko smanjenja ekspresije iRNK *IL-8*, stimulacije ekspresije iRNK *TGF- β* , kao i stimulacije ekspresije iRNK proteina čvrstih veza, što dovodi do zaključka da supresija inflamacije i jačanje proteina čvrstih veza imaju značajnu ulogu u jačanju intestinalne epitelne barijere.

Supernatanti kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom kao i supernatant kulture istog soja bez γ -aminobuterne kiseline ostvarili su značajan imunosupresivni efekat na ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova. Tretman supernatantima kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom statistički značajno su smanjili metaboličku aktivnost, proliferaciju, produkciju proinflamatornih citokina IL-17 i IFN- γ i ekspresiju MHCII i CD80 molekula ćelija mezenteričnih limfnih čvorova u odnosu na netretirane ćelije ili ćelije tretirane supernatantom kulture istog soja bez γ -aminobuterne kiseline. Supernatanti kulture soja BGZLS10-17 indukovali su tolerogena svojstva ćelija mezenteričnih limfnih čvorova, odnosno značajno su stimulisali ekspresiju iRNK *Foxp3* i *TGF- β* i produkciju IL-10, kao i ekspresiju CTLA-4 i SIRP α molekula na antigen prezentujućim ćelijama, s tim da su supernatanti sa γ -aminobuternom kiselinom izazvali snažniju ekspresiju svih navedenih molekula. Analizom povezanosti inflamacije i autofagije pokazano je da je supresija inflamacije supernatantima kulture soja BGZLS10-17 posredovana autofagijom. Supernatanti culture soja BGZLS10-17 indukuju autofagiju u različitim tipovima ćelija mezenteričnih limfnih čvorova kao što su: CD4+T, CD8+T, NK i NKT ćelije, dendritske ćelije, makrofagi i B ćelije. Stimulacija ekspresije iRNK *Foxp3* i *TGF- β* i stimulacija produkcije IL-10 supernatantima kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom posredovana je indukcijom ATG5 zavisne autofagije, dok neki drugi metaboliti, sadržani u supernatantu bez γ -aminobuterne kiseline indukuju imunosupresiju nezavisnu od: γ -aminobuterne kiseline, ATG5, *Foxp3*, *TGF- β* i IL-10. Oralna primena živog soja BGZLS10-17 ublažila simptome eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa kod Dark agouti pacova, odložila početak bolesti i skratila period trajanja bolesti, a životinje su se potpuno oporavile nakon 40 dana što kod kontrolnih životinja nije bio slučaj. Značajno poboljšanje

simptoma uočeno je nakon tretmana životinja supernatantom kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom što ukazuje na ulogu ovog metabolita u ublažavanju EAE simptoma. Blago poboljšanje uočeno je i kada su životinje tretirane supernatantom kulture soja BGZLS10-17 bez γ -aminobuterne kiseline što sugerira da i drugi metaboliti produkovani u supernatantu mogu biti potencijalni postbiotici.

Navedeni rezultati ukazuju da identifikacija i selekcija sojeva MKB, koji proizvode γ -aminobuternu kiselinu, može da doprinese razvoju novih, funkcionalnih prehrambenih proizvoda, obogaćenih γ -aminobuternom kiselinom, probiotičkih sojeva, kao i postbiotskih preparata, koji se potencijalno mogu koristiti u terapiji bolesti povezanih sa pojačanim imunskim odgovorom, ali tek nakon detaljne karakterizacije mehanizama kojima ostvaruju svoj efekat kako bi dobijeni preparati mogli biti primenjeni bez straha od neželjenih reakcija.

Ključne reči: γ -aminobuterna kiselina, glutamat dekarboksilaza, mlečnokiselinske bakterije, integritet epitelne barijere, čvrste veze, inflamacija, autofagija, autoimunost, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biologija prokariota

Characterization of the lactic acid bacteria producers of γ -aminobutyric acid and their role in the prevention and treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis

SUMMARY

γ -Aminobutyric acid (GABA) is biogenic amine which is distributed in plants, animals, and microorganisms. GABA functions as an inhibitory neurotransmitter, has a calming effect alleviates hypertension, and is an effective immunosuppressive molecule. GABA is synthesized by irreversible decarboxylation of L-glutamate by glutamate decarboxylase (GAD) activity.

The research goal of this study was to examine the potential of lactic acid bacteria (LAB), isolated from dairy products from the Western Balkans and from the products from the Caucasus and Azerbaijan, for the production of GABA, selection of the best GABA-producing strains, and their detailed probiotic characterization. After selecting the best GABA-producing strain next objective was to examine the effects of live strain, as well as, its culture supernatants on an *in vitro* inflammation models and on the clinical picture on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal multiple sclerosis (MS) model. Using standard (CoreR/CoreF) primers, the presence of the *gadB* gene, which encodes glutamate decarboxylase, was detected at 83 (27,4 %) *Lactobacillus* spp., 15 (4,9 %) *Lactococcus* spp., 11 (3,6 %) *Leuconostoc* spp., 8 (2,64 %) *Streptococcus* spp., 6 (1,98 %) *Enterococcus* spp., and 1 (0,33 %) *Pediococcus* spp out of 303 tested strains. By TLC method, the production of GABA was detected in 4.6% of the strains, ie 14 strains, out of 124 tested strains, belonging to the species *Lactobacillus brevis* and *Lb. plantarum*, while the concentration of produced GABA was measured by HPLC. The simulated gastrointestinal conditions successfully survived 4 out of 7 tested *Lb. brevis* strains: BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 and BGZLS30-2. Examination of the four *Lb. brevis* strains safety status showed that strain BGZLS10-17 was sensitive to all tested antibiotics, BGLMM11 was resistant to kanamycin, BGLMM10 was resistant to kanamycin and tetracycline, strain BGZLS30-2 was resistant to ampicillin, kanamycin and tetracycline, while none of the 4 tested strains showed hemolytic or gelatinous activity. The BGLMM10 strain exhibited the most potent antimicrobial activity, on 11 out of 18 pathogens, while BGZLS10-17 strain did not exhibit antimicrobial activity. This study demonstrated high adhesion of four *Lb. brevis* strains to Caco-2 cells and the ability to decrease the adhesion of

Escherichia coli ATCC25922 and *Salmonella enterica* C29039. Treatment of differentiated Caco-2 cells monolayer with BGZLS10-17 culture supernatant containing GABA alleviated inflammation (expression of mRNA *IL-8*) caused by IL-1 β and significantly stimulated the expression of tight junction proteins (zonulin, occludin, and claudin 4), as well as the expression of mRNA *TGF- β* cytokine leading to the conclusion that immunosuppression and strengthening the tight junctions could have significant role in the maintenance of intestinal epithelial barrier integrity. GABA-containing and GABA-free culture supernatants of BGZLS10-17 had strong immunosuppressive effect on mesenteric lymph node cells. Further, GABA produced by this strain exposed an additional suppressive effect on proliferation, IFN- γ and IL-17 production by mesenteric lymph node cells, and the expression of MHCII and CD80 on antigen presenting cells, compared to untreated cells or cells treated with the BGZLS10-17 culture supernatant without γ -aminobutyric acid. At the other hand, GABA-containing culture supernatant exposed the strong stimulatory effect on the expression of immunosuppressive molecules such as Foxp3+, IL-10, TGF- β , CTLA4 and SIRP- α . BGZLS10-17 culture supernatants induced autophagy in different type of MLNC, such as CD4+ and CD8+ T lymphocytes, NK and NKT cells, as well as dendritic cells, macrophages and B cells. Stimulation of Foxp3+, IL-10 and TGF- β expression by BGZLS10-17 produced GABA is completely mediated by induction of ATG5 dependent autophagy, but some other molecules in BGZLS10-17 culture supernatant have GABA, ATG5, Foxp3+, IL-10 and TGF- β independent immunosuppressive effects. Oral administration of BGZLS10-17 alleviated the symptoms of EAE in DA rats. Namely, treatment with BGZLS10-17 delayed the onset, shortened the duration, and reduced the intensity of the disease in the period when the EAE symptoms in controls were most pronounced. The probiotic treated animals were completely recovered after 40 days, unlike the control animals. Significant improvement on EAE symptoms was observed after the treatment of the animals with BGZLS10-17 GABA-containing culture supernatant, suggesting the role of GABA in relieving EAE symptoms. A slight improvement was also observed when animals were treated with BGZLS10-17 GABA-free culture supernatant suggesting that other metabolites produced in the supernatant may also be potential postbiotics.

These results indicated that the identification and selection of GABA producing strains could contribute to the development of new, GABA enriched, functional foods, probiotics, as well as postbiotics, which could be used in the treatment of diseases associated with an disturbed

immune response, but only after detailed characterization of the mechanisms by which they exert their effect so that they could be applied without any fear of adverse reactions.

Keywords: γ -aminobutyric acid, glutamate decarboxylase, lactic acid bacteria, epithelial barrier integrity, tight junctions, inflammation, autophagy, autoimmunity, experimental autoimmune encephalomyelitis

Scientific field: Biology

Narrow scientific field: Molecular biology of prokaryotes

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. γ -aminobuterna kiselina	1
1.2. Fiziološke uloge γ -aminobuterne kiseline.....	2
1.2.1. Imunomodulatorni efekat γ -aminobuterne kiseline	5
1.3. γ -aminobuterna kiselina bakterija	7
1.4. Mlečnokiselinske bakterije.....	10
1.4.1. Bakterije proizvođači γ -aminobuterne kiseline	14
1.5. Mehanizmi delovanja probiotika.....	16
1.5.1. Inhibicija štetnog delovanja patogena.....	17
1.5.2. Jačanje intestinalne epitelne barijere	18
1.5.3. Imunomodulatorna aktivnost probiotika.....	21
1.6. Autofagija.....	23
1.7. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, životinjski model multiple skleroze...	26
2. CILJEVI RADA	29
3. MATERIJAL I METODE.....	31
3.1. Bakterijski sojevi.....	31
3.2. Podloge za rast bakterija	34
3.3. Metoda za izolovanje ukupne dezoksiribonukleinske kiseline iz mlečnokiselinskih bakterija.....	35
3.4. Umnožavanje fragmenata DNK lančanom reakcijom polimeraze.....	35
3.5. Elektroforeza DNK	36
3.6. Analiza produkcije γ -aminobuterne kiseline.....	37
3.6.1. Tankoslojna hromatografija	37
3.6.2. Tečna hromatografija visokih performansi.....	38
3.7. Probiotička karakterizacija odabranih sojeva.....	39
3.7.1. Preživljavanje u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta	39
3.7.1.1. Tolerancija kiselih uslova želudačnog soka pH 2 u prisustvu obranog mleka, proteina mleka i mucina.....	39
3.7.2. Test mikrodilucije	40
3.7.3. Test hemolitičke aktivnosti	40
3.7.4. Test želatinozne aktivnosti.....	41

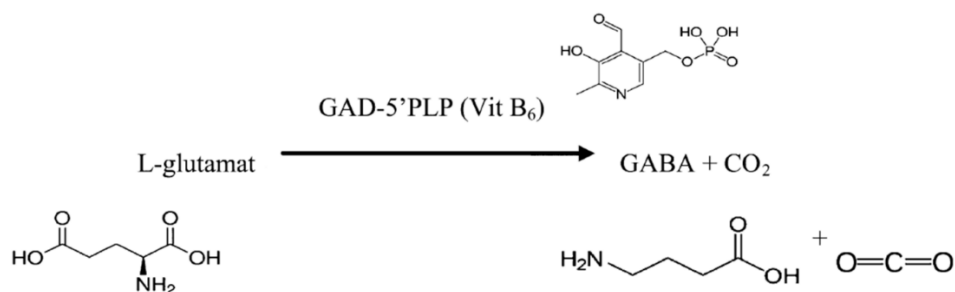
3.7.5.	Antimikrobna aktivnost	41
3.8.	Ćelije korišćene u <i>in vitro</i> eksperimentima.....	42
3.9.	Adhezija odabranih sojeva, proizvođača γ -aminobuterne kiseline, za Caco-2 ćelije	42
3.10.	Test kompetitivne ekskluzije	43
3.11.	Analiza integriteta epitela, indukcija inflamacije sa IL-1 β u Caco-2 ćelijama i tretmani supernatantima 48 sati stare kulture soja <i>Lb. brevis</i> BGZLS10-17	43
3.12.	Eksperimentalne životinje	44
3.13.	Izolacija i tretman ćelija mezenteričnih limfnih čvorova	45
3.14.	RNK interferencija	45
3.15.	LDH esej.....	46
3.16.	MTT esej.....	46
3.17.	Određivanje proliferacije ćelija izolovanih iz mezenteričnih limfnih čvorova	47
3.18.	Kvantifikacija citokina	47
3.19.	Izolacija RNK iz ćelija	47
3.20.	Reverzna transkripcija	48
3.21.	Kvantitativni PCR.....	49
3.22.	SDS-PAGE elektroforeza	51
3.23.	Western blot.....	51
3.24.	Protočna citofluorimetrija.....	52
3.25.	Imunomodulatorni efekat odabranog soja proizvođača γ -aminobuterne kiseline na modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa <i>in vivo</i>	53
3.26.	Statistička analiza	54
4.	REZULTATI	55
4.1.	Određivanje prisustva <i>gadB</i> gena u prirodnim izolatima mlečnokiselinskih bakterija..	55
4.2.	Analiza produkcije γ -aminobuterne kiseline.....	58
4.3.	Ispitivanje preživljavanja odabranih sojeva, proizvođača γ -aminobuterne kiseline, u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta	60
4.4.	Ispitivanje bezbednosnog statusa odabranih sojeva, proizvođača γ -aminobuterne kiseline	61
4.5.	Antimikrobna aktivnost odabranih sojeva proizvođača γ -aminobuterne kiseline	62
4.6.	Ispitivanje vezivanja odabranih sojeva proizvođača γ -aminobuterne kiseline za intestinalnu epitelnu ćelijsku liniju Caco-2.....	63
4.7.	Ekskluzija <i>E. coli</i> ATCC25922 i <i>S. enterica</i> C29039 u prisustvu odabranih sojeva proizvođača γ -aminobuterne kiseline na modelu Caco-2 ćelija.....	64

4.8.	Efekat supernatanta 48 sati stare kulture soja <i>Lb. brevis</i> BGZLS10-17 na ekspresiju proteina čvrstih veza i ekspresiju <i>TGF-β</i> i <i>IL-8</i>	65
4.9.	Imunomodulatorni potencijal supernatanta 48 sati stare kulture soja <i>Lb. brevis</i> BGZLS10-17 <i>in vitro</i>	71
4.9.1.	Uticaj supernatanta 48 sati stare kulture soja <i>Lb. brevis</i> BGZLS10-17 na proliferaciju, metaboličku aktivnost i produkciju citokina ćelija izolovanih iz mezenteričnih limfnih čvorova <i>in vitro</i>	71
4.9.2.	Supernatanti 48 sati stare kulture soja <i>Lb. brevis</i> BGZLS10-17 indukuju autofagiju u MLNC75	
4.9.3.	Uticaj supernatanta 48 sati stare kulture soja <i>Lb. brevis</i> BGZLS10-17 na indukciju različitih tipove autofagije u zavisnosti od γ -aminobuterne kiseline	81
4.9.4.	Imunosupresivni efekti γ -aminobuterne kiseline sadržane u supernatantu 48 sati stare kulture soja <i>Lb. brevis</i> BGZLS10-17 zavisni su od ATG5 posredovane indukcije autofagije	82
4.10.	Ispitivanje imunomodulatornog potencijala soja <i>Lb. brevis</i> BGZLS10-17 na modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa	85
4.10.1.	Efekat soja <i>Lb. brevis</i> BGZLS10-17 na klinički tok eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa	85
4.10.2.	Efekat supernatanta soja <i>Lb. brevis</i> BGZLS10-17 na klinički tok eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa.....	86
5.	DISKUSIJA.....	89
5.1.	Karakterizacija prirodnih izolata mlečnokiselinskih bakterija proizvođača γ -aminobuterne kiseline	90
5.2.	Probiotička karakterizacija sojeva proizvođača γ -aminobuterne kiseline.....	93
5.3.	Imunomodulatorni potencijal soja <i>Lb. brevis</i> BGZLS10-17.....	101
5.4.	Efekat soja <i>Lb. brevis</i> BGZLS10-17 na klinički tok eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa	107
6.	ZAKLJUČCI	110
7.	LITERATURA	114

1. UVOD

1.1. γ -aminobuterna kiselina

γ -aminobuterna kiselina (GABA) je biogeni amin biljaka, životinja i mikroorganizama (Ueno, 2000). L-glutamat i γ -aminobuterna kiselina najpoznatiji su po svojim ulogama glavnog ekscitatornog odnosno inhibitornog neurotransmitera u centralnom nervnom sistemu (CNS) sisara (Hyland i Cryan, 2010). Biosinteza γ -aminobuterne kiseline odvija se u samo jednom koraku. Glutamat dekarboksilaza, zavisna od kofaktora piridoksal-5'-fosfata, katalizuje ireverzibilnu dekarboksilaciju L-glutamata do γ -aminobuterne kiseline. Eukarioti i prokarioti sintetišu γ -aminobuternu kiselinu koristeći isti biosintetski put (Slika 1) (Mazzoli i Pessione, 2016). Glutaminska kiselina i njene soli glutamati (E 620 – 625) su aditivi koji se dodaju u hranu i čija je upotreba dozvoljena u Evropskoj Uniji (EFSA, 2017). Natrijum (Na)-glutamat je natrijumova so glutaminske kiseline (E 621), koja se koristi kao aditiv u hrani, a koja se dodaje u medijum za rast bakterija kao prekursor za sintezu γ -aminobuterne kiseline (EFSA, 2017; Dhakal et al., 2012). γ -aminobuterna kiselina se metaboliše do sukcinat semialdehida dejstvom enzima GABA-transaminaze (GABA-T) (Jin et al., 2013). GAD je pronađena kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija gde učestvuje u sistemima za održavanje pH homeostaze i proizvodnji metaboličke energije (proton-motorna sila) (Pessione, 2012). Među gljivama GAD je pronađena kod rodova *Aspergillus* i *Neurospora*, a do sada je prisustvo GAD pokazano kod biljaka: čajevca, paradajza, soje, u listovima maline i u klijavom braon pirinču (Diana et al., 2014). γ -aminobuterna kiselina se u biljkama akumulira kad su pod biotičkim ili abiotičkim stresom koji dovode do povećanja koncentracije sukcinat semialdehida, inhibitora GABA-transaminaze (Chua et al., 2019). Pokazano je i da γ -aminobuterna kiselina u biljkama promovše sintezu DNK i proliferaciju ćelija tokom kortikalnog razvoja (Bouché et al., 2003). γ -aminobuterna kiselina je pronađena i kod insekata: bubašvaba, skakavaca, moljaca, pčela i muva (Diana et al., 2014).



Slika 1. Biosinteza γ -aminobuterne kiseline. Dekarboksilacija L-glutamata do γ -aminobuterne kiseline, koju katalizuje glutamat dekarboksilaza (GAD) zavisna od kofaktora piridoksal-5'-fosfata. Preuzeto i modifikovano iz Diana i koautori (2014).

Poslednjih godina sve više pažnje se posvećuje proizvodnji fermentisane hrane obogaćene γ -aminobuternom kiselinom pa je i fokus istraživanja na izolaciji mikroorganizama proizvođača γ -aminobuterne kiseline, pre svega mlečnokiselinskih bakterija (MKB) koje se mogu koristiti kao starter kulture u procesima fermentacije. Prednosti proizvodnje γ -aminobuterne kiseline kroz biosintezu u mlečnokiselinskim bakterijama su: jednostavna reakcija, visoko efikasna enzimska sinteza, blagi uslovi reakcije i kompatibilnost sa životnom sredinom, bez potrebe za izolacijom i prečišćavanjem enzima i prečišćavanjem krajnjih proizvoda (Chua et al., 2019). Međutim, da bi bila moguća primena kod osoba sa poremećajima u imunskom odgovoru potrebno je detaljno ispitati mehanizme delovanja na specifičnim *in vitro* i *in vivo* sistemima kako bi se omogućila primena bez straha od neželjenih reakcija.

1.2. Fiziološke uloge γ -aminobuterne kiseline

Kod sisara γ -aminobuterna kiselina je glavni medijator inhibitorne transmisije u CNS, ali i u perifernim tkivima (Hyland i Cryan, 2010). Disfunkcija GABAergičkog sistema povezana je sa Huntingtonovom, Alchajmerovom, Parkinsonovom bolešću, sindromom ukočene osobe (engl. *Stiff-person syndrome*), depresijom i šizofrenijom (Ting Wong et al., 2003). Mnogi lekovi i prirodni proizvodi, koji sadrže bioaktivne molekule koji se vezuju za GABA receptore, se koriste u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Međutim, smatra se da γ -aminobuterna kiselina sintetisana van mozga, osim preko hipofize, ne može da prođe krvno-moždanu barijeru (KMB) (Boonstra et al., 2015; Powers et al., 2008), iako su rezultati studija koji se bave ovim ispitivanjima nedosledni. Naime, pojedini autori su pokazali da γ -aminobuterna kiselina može da prođe krvno-moždanu barijeru. Löscher i Frey (1982) su pokazali, na studiji sprovedenoj na psima, da γ -aminobuterna kiselina može da uđe u cerebrospinalnu tečnost, ali i da izađe iz nje preko KMB. γ -aminobuterna kiselina je primenjena intravenozno, a koncentraciju stabilnog stanja u cerebrospinalnoj tečnosti dostizala je 10 do 60 min od primene. Na studiji sprovedenoj na pacovima Shyamaladevi i koautori (2002) su pokazali da je intraperitonealna administracija γ -aminobuterne kiseline statistički značajno povećala koncentraciju γ -aminobuterne kiseline u mozgu. Al-Sarraf (2002) je pratio prolazak ^{14}C - γ -aminobuterne kiseline kroz KMB neonatalnih i odraslih pacova. Iako je pokazano da može proći KMB, dvostruko više γ -aminobuterne kiseline detektovano je u cerebrospinalnoj tečnosti neonatalnih pacova u odnosu na adultne pacove. γ -aminobuterna kiselina učestvuje u komunikaciji između gastrointestinalnog trakta (GIT) i mozga vezujući se za receptore na neuronima enteričkog nervnog sistema, enteroendokrinim ćelijama i imunskim ćelijama (Mazzoli et al., 2017), a na različitim animalnim modelima i u humanim studijama pokazan je pozitivan efekat γ -aminobuterne kiseline na više funkcija u organizmu. Okada i koautori (2000) su pokazali da je svakodnevna ishrana pirinčem sa prirodno produkovanom γ -aminobuternom kiselinom efikasna u tretmanu depresije, nesаницe, razdražljivosti i tegoba koje se primećuju u ranim fazama demencije. Boonstra i koautori (2015) su pokazali da upotreba suplemenata na bazi γ -aminobuterne kiseline ublažava jačinu epileptičnih napada. Fermentacijom sojinog mleka kulturom *Lactobacillus brevis* FPA3709 dobijen je proizvod obogaćen γ -aminobuternom kiselinom. Ishrana Sprague-Dawley (SD) pacova ovim fermentisanim proizvodom ublažila je simptome depresije kod pacova, slično kao i lek fluoksetin, ali bez neželjenih efekata koji su karakteristični za navedeni lek pa je predloženo da unos γ -aminobuterne kiseline putem hrane bude alternativna terapija u lečenju depresije (Ko et al., 2013). Abdou i koautori (2006) su pokazali da primena γ -aminobuterne kiseline kod ljudi izaziva opuštanje i ublažava anksioznost. Nedavna transkriptomaska analiza uzoraka humanih fecesa iz zdravih pojedinaca pokazala je da je GAD enzim eksprimiran u vrstama rodova

Bacteroides, *Parabacteroides* i *Escherichia*. Korelisanjem sekvenci gena za 16S rRNK sa funkcionalnom magnetnom rezonancom pacijenata sa depresivnim poremećajem, bolešću povezanom sa izmenjenim GABA-posredovanim odgovorom, otkriveno je da je relativni nivo bakterija iz roda *Bacteroides* u fecesu negativno korelisan sa nervnim aktivnostima povezanim sa depresijom (Strandwitz et al., 2019).

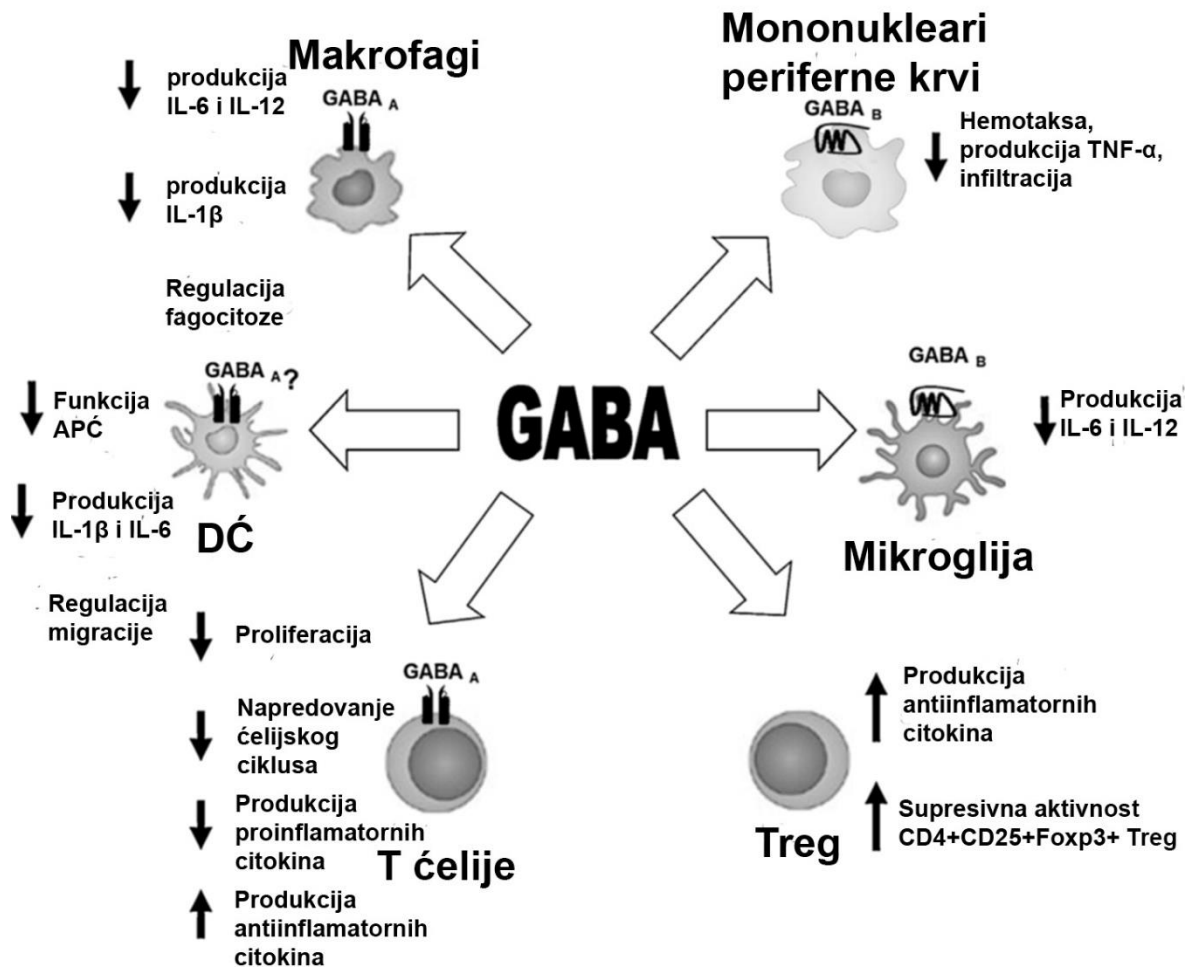
Pored navedenih psiholoških efekata, γ -aminobuterna kiselina ostvaruje i brojne druge fiziološke funkcije. Receptori za γ -aminobuternu kiselinu nalaze se na β -ćelijama pankreasa. Antitela na GAD uključena su u patogenezu dijabetesa tip I. Nedavno istraživanje je pokazalo da γ -aminobuterna kiselina stimuliše lučenje insulina iz pankreasa zdravih pacova, dok kod pacova kojima je izazvan dijabetes doprinosi višem, ali ne značajnom povećanju lučenja insulina, odnosno da γ -aminobuterna kiselina može da se koristi za prevenciju nastanka dijabetesa (Adeghate i Ponery, 2002). Dodatno, pokazano je da primena čaja obogaćenog γ -aminobuternom kiselinom ublažava dijabetesom indukovanu apoptozu u cerebralnom korteksu posredstvom supresije Fas i mitohondrijskih puteva i da zbog toga može imati potencijal za terapiju dijabetične encefalopatije. Ekspresija komponenti Fas-zavisnog apoptotskog puta: Fas liganda, FADD (engl. *fas-associated protein with death domain*), kaspaze 8, Bid proteina i kaspazom 8 isečenog Bid proteina (engl. *truncated Bid, tBid*) značajno je povećana u korteksu pacova obolelih od dijabetesa u poređenju sa zdravim jedinkama, dok je primena čaja obogaćenog γ -aminobuternom kiselinom značajno smanjila ekspresiju navedenih proteina u korteksu dijabetičnih pacova. Uzvodne proteinske komponente [Bax (engl. *Bcl-2-associated X protein*) i citohrom c], kao i nizvodne komponente mitohondrijskog apoptotskog puta (kaspaza 3 i kaspaza 9) takođe su značajno eksprimirane u korteksu dijabetičnih pacova, dok primena čaja obogaćenog γ -aminobuternom kiselinom značajno smanjuje ekspresiju navedenih proteina u korteksu dijabetičnih pacova (Huang et al., 2014). Tian i koautori (2011) su pokazali da oralni unos γ -aminobuterne kiseline sprečava povećanje telesne mase C57BL/6 miševa indukovano ishranom bogatom mastima (engl. *high fat diet, HFD*), značajno smanjuje povećanje glukoze u krvi i poboljšava toleranciju na glukozu i osetljivost na insulin, odnosno da aktiviranje perifernih GABA receptora sprečava insulinsku rezistenciju i gojaznost povezane sa HFD ishranom preko smanjenja inflamacije. Primena γ -aminobuterne kiseline

indukovala je značajno povećanje Foxp3+ Treg kod HFD – miševa. Regulacija krvnog pritiska jedan je od najizučavanijih efekata γ -aminobuterne kiseline. Antihipertenzivni efekat γ -aminobuterne kiseline pokazan je na životinjskim modelima i humanim studijama. Do smanjenja krvnog pritiska kod spontano hipertenzivnih pacova dolazi usled primene γ -aminobuterne kiseline ili fermentisanog mlečnog proizvoda obogaćenog γ -aminobuternom kiselinom (Hayakawa et al., 2004), sojinog mleka obogaćenog γ -aminobuternom kiselinom (Liu et al., 2011), soja sosa obogaćenog γ -aminobuternom kiselinom (Yamakoshi et al., 2007), zelenog čaja obogaćenog γ -aminobuternom kiselinom (Abe et al., 1995) i ekstrakta lista maline koji sadrži γ -aminobuternu kiselinu (Yang et al., 2012). Direktno injektiranje γ -aminobuterne kiseline u srce Wistar pacova snižava aterijski pritisak i puls (Sasaki et al., 1986). Dnevni unos fermentisanog mlečnog proizvoda sa γ -aminobuternom kiselinom tokom 12 nedelja snizio je krvni pritisak kod hipertenzivnih ljudi, ali nije ostvario efekat na puls ispitanika (Inoue et al., 2003), dok je primena sira obogaćenog γ -aminobuternom kiselinom smanjila sistolni krvni pritisak hipertenzivnih osoba muškog pola (Pouliot-Mathieu et al., 2013).

1.2.1. Imunomodulatorni efekat γ -aminobuterne kiseline

γ -aminobuterna kiselina ostavlja niz efekata na imunske ćelije, kao što su: aktivacija ili supresija produkcije citokina, modifikacija ćelijske proliferacije, a utiče i na migraciju ćelija (Slika 2) (Jin et al., 2013). Limfociti i antigen-prezentujuće ćelije (APC) ekspimiraju komponente GABAergičkog sistema uključujući GABA receptore, GABA transportere (GAT) i GABA-T. GABAergičke komponente negativno regulišu imunski odgovor, naročito posredovan T ćelijama, posredstvom uticaja na proizvodnju antiinflamatornih citokina (IL-10 i TGF- β) i inhibiciju aktivacije signalnih puteva: mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAP kinaza) i nuklearnog faktora kappa B (NF- κ B) (Wu et al., 2017). Enzimi odgovorni za sintezu γ -aminobuterne kiseline su detektovani u T ćelijama, makrofagima (Mf) i dendritskim ćelijama (DC) (Bhat et al., 2010), dok su GABA-T detektovane u Mf, CD4+ T ćelijama i perifernim humanim monocitima (Bhat et

al., 2010; Dionisio et al., 2011). Do sada je u neuronima identifikovano 4 GABA transporetera (GAT1-4), ali su samo GAT1 i GAT2 identifikovani na imunskim ćelijama (Jin et al., 2013). Aktivacija GABA_A receptora dovodi do smanjene proliferacije T ćelija (Bjurstöm et al., 2008) i smanjene produkcije proinflamatornih citokina (Tian et al., 2004; Bhat et al., 2010). Aktivacija ovog tipa receptora inhibira proliferaciju antigen-specifičnih T ćelija i proizvodnju interleukina (IL)-6, IL-12, inducibilne azot oksid sintaze (iNOS), IL-1 β i TNF- α iz CD4⁺ T ćelija i M ϕ , dok honokiol (HNK), agonist GABA_A receptora, ublažava inflamatorni artritis i alergijsku astmu posredstvom smanjenja ekspresije proinflamatornih citokina (Munroe et al., 2010). GABA_B receptor eksprimira se na neutrofilima i deluje kao hemoatraktantski receptor, koji takođe ima značajnu ulogu u odgovoru na inflamaciju i neutrofil-zavisne ishemijske povrede kao što je šlog (Rane et al., 2005). Za GAT je takođe pokazano da modulišu proliferaciju T ćelija i produkciju citokina. Proliferacija T limfocita i produkcija IFN- γ , IL-17, IL-23, IL-6, TNF- α značajno je povećana je kod miševa kojima je uklonjen gen za *GAT1* u odnosu na kontrolne životinje (Wang et al., 2008).

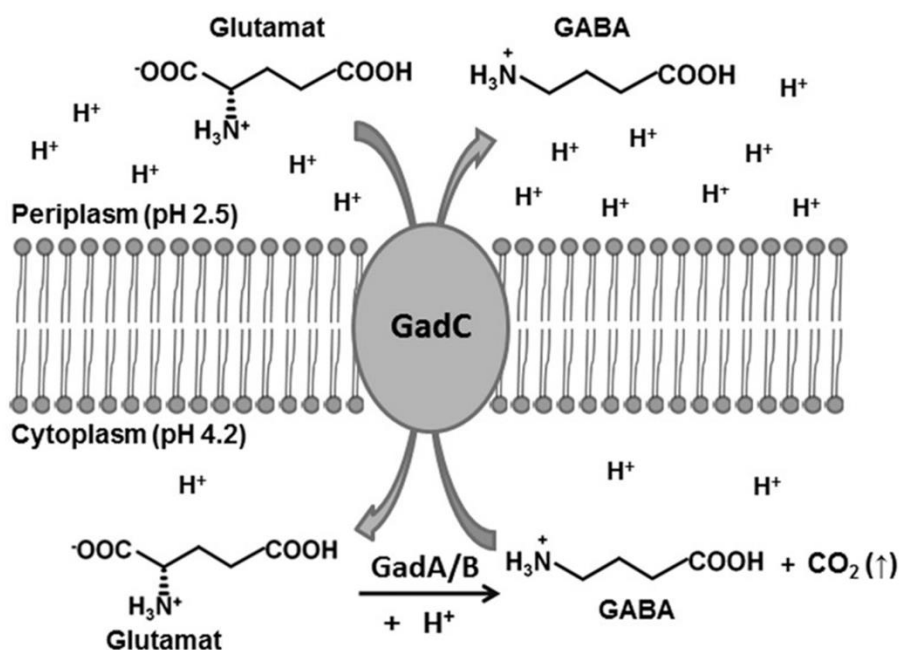


Slika 2. Šematski prikaz glavnih efekata koje γ -aminobuterna kiselina ostvaruje na imunskim ćelijama. APC - antigen-prezentujuće ćelije, DC - dendritske ćelije, Treg - regulatorne T ćelije. Preuzeto i modifikovano iz Auteri i koautori (2015).

1.3. γ -aminobuterna kiselina bakterija

Da bi kolonizovale domaćina, oralno unete bakterije moraju da prežive tranzit kroz izuzetno kisele uslove u želucu, budu otporne na aktivnosti žučnih soli sličnih deterdžentima, da prežive u uslovima sniženog nivoa kiseonika i da se nadmeću sa postojećom mikrobiotom kako bi kolonizovale creva (De Biase i Pennacchietti, 2012). Sposobnost da izdrže kiselinski stres, odnosno kombinovani efekat HCl u želudačnom soku

i masnih kiselina kratkog lanca (engl. *Short-chain fatty acid, SCFA*), koje proizvode intestinalna mikrobiota, presudna je za uspešnu kolonizaciju GIT (De Biase i Pennacchietti, 2012). GAD sistem je u više bakterijskih rodova uključen u toleranciju na kisele uslove sredine. Ovaj sistem održava unutrašnju homeostazu pH korišćenjem protona u reakciji dekarboksilacije u kojoj se od glutamata formira γ -aminobuterna kiselina. Glutamat-zavisni sistem otpornosti na kisele uslove (engl. *Glutamate-dependent acid resistance system, GDAR*) *E. coli* sastoji se od jedne ili dve izoforme PLP-zavisnog GAD proteina (GAD A i GAD B), a u ceo proces uključen je i antiporter GadC preko koga se unosi glutamat, a izbacuje γ -aminobuterna kiselina (Slika 3) (Feehily i Karatzas, 2013). Model sistem za izučavanje GAD bakterija je *E. coli*, ali je pokazano da je ovaj sistem prisutan i kod drugih bakterija uključujući vrste rodova *Shigella*, *Listeria*, kao i kod MKB (De Biase i Pennacchietti, 2012). Kada koncentracija protona (H^+) van ćelije iznenada poraste do štetnog nivoa ($pH \leq 2,5$), kao tokom prolaska kroz želudac domaćina, membrana postaje propustljiva za protone, unutarćelijska pH vrednost opada do 4,2 pa se pokreće unos glutamata (neto naelektrisanje 0) preko GadC antiportera (Richard i Foster, 2004). Unutar ćelije glutamat ostaje protonovan na γ -karboksilatu da bi omogućio vezivanje i dekarboksilaciju od strane GAD A/B, čija je maksimalna aktivnost na opsegu pH između 4 i 5. Dekarboksilacijom, α -karboksilna grupa, koja odlazi kao CO_2 , biva zamenjena citoplazmatskim protonom i nastaje γ -aminobuterna kiselina (neto naelektrisanje +1), koju GadC izmenjuje za novi molekul glutamata (De Biase i Pennacchietti, 2012). GAD enzim *E. coli* lokalizovan je u citoplazmi kada je intracelularna $pH > 5,6$, ali kada pH padne ispod 5,6 lokalizovan je na ćelijskoj membrani pa se smatra da na taj način efikasnije kontroliše unutarćelijsku pH vrednost (Capitani, 2003).



Slika 3. Šematski prikaz uloge koju imaju glavne strukturne komponente GDAR sistema. Glutamat (neto naelektrisanje 0) preuzima elektrogeni L-glutamat / GABA antiporter GadC, membranski protein. Dekarboksilacija glutamata putem GAD A / B troši unutarćelijski H⁺ u svakom ciklusu i doprinosi stvaranju protonske motorne sile izbacivanjem GABA (neto naelektrisanje +1). Preuzeto i modificirano iz De Biase i Pennacchietti (2012).

U MKB sposobnost proizvodnje γ -aminobuterne kiseline, pored toga što je potrebna za prolazak bakterija kroz GIT, povezana je i sa dodatnim fiziološkim funkcijama. Higuchi i koautori (1997) i Sanders i koautori (1998) su predložili hipotezu prema kojoj korišćenje protona od strane GAD u kombinaciji sa elektrogenim antiportom koji vrši GadC (Glutamat⁰_{unutar}/GABA⁺¹_{van} na kiseloj pH) generiše motornu silu zavisnu od protona, koja se može povezati sa proizvodnjom energije. Tri sukcesivna ciklusa dekarboksilacije i antiporta dovoljna su da se uspostavi električni gradijent koji se koristi za pokretanje sinteze jednog adenzin-trifosfat (ATP) molekula.

Tradicionalno fermentisane namirnice, obogaćene glutamatom, važan su izvor za izolaciju MKB koje mogu da produkuju γ -aminobuternu kiselinu (Li i Cao, 2010), a

dekarboksilacija glutamata ima važnu ulogu u fermentaciji hrane bogate proteinima, koja sadrži visoke koncentracije glutamata (Su et al., 2011).

1.4. Mlečnokiselinske bakterije

Mlečnokiselinske bakterije predstavljaju heterogenu grupu Gram-pozitivnih aerobnih ili fakultativno anaerobnih mikroorganizama loptastog (koke) ili štapićastog oblika (bacili). Glavna karakteristika MKB je sinteza mlečne kiseline tokom procesa fermentacije šećera. Mlečnokiselinske bakterije uključuju veliki broj rodova: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* (Axelsson, 2004). Navedeni rodovi razlikuju se po morfologiji, toleranciji na soli i pH, temperaturnom optimumu za rast, staništu i patogenosti. Na osnovu optimalne temperature rasta mogu se podeliti na: mezofilne, čija je optimalna temperatura rasta ispod 30°C i termofilne, koje rastu na temperaturama iznad 37°C (Pessione, 2012). Mlečnokiselinske bakterije se, između ostalog, primenjuju u prehrambenoj industriji kao starter kulture za dobijanje širokog spektra fermentisanih proizvoda kao što su: mlečni proizvodi, fermentisani proizvodi od mesa, ribe, voća, povrća i žitarica (Bintsis, 2018). Dobra sposobnost adaptacije omogućila je MKB prilagođavanje različitim okruženjima od različitih prehrambenih proizvoda do mukoznih površina kao što su usna duplja, gastrointestinalni i urogenitalni trakt (Bintsis, 2018). Metabolička aktivnost MKB povezana je sa proizvodnjom mnogih korisnih jedinjenja kao što su organske kiseline, poliol, egzopolisaharidi i antimikrobna jedinjenja (Pessione, 2012). Tri glavna puta kojima MKB učestvuju u proizvodnji fermentisane hrane i razvoju ukusa su: fermentacija ugljenih hidrata, lipoliza (razgradnja masti) i proteoliza (razgradnja proteina) (Leroy i De Vuyst, 2004). Mlečnokiselinske bakterije ne poseduju enzime katalazu i oksidazu, a kao glavni izvor energije koriste ugljene hidrate. Homofermentativne vrste (laktokoke, streptokoke, pediokoke i neki laktobacili) proizvode samo mlečnu kiselinu tokom fermentacije ugljenih hidrata, dok heterofermentativne (leukonostoci, *Oenococcus* i neke vrste laktobacila), pored

mlečne kiseline, proizvode i acetat, etanol, CO₂, mravlju kiselinu i sukcinat (Khalid, 2011). Pošto MKB nisu u stanju da sintetišu sve potrebne vitamine i aminokiseline za rast zahtevaju bogate podloge. Tokom evolucije MKB su, usled dobitka malo energije fermentacijom i prilagođavanja na različite ekološke niše, svoj metabolizam specijalizovale za razvoj mehanizama odbrane od stresa, a ne za razvoj biosintetskih mehanizama. S tim u vezi razvile su simbiotske odnose sa biljkama i životinjama koje mogu da ih snabdeju neophodnim vitaminima, proteinima i amino kiselinama (Pessione, 2012). Jedan od mehanizama adaptacije na stres jeste dekarboksilacija aminokiselina, koja pored toga omogućava bakterijama i neke druge funkcije kao što je komunikacija između bakterija ili između bakterija i simbionta. Glutamat se dekarboksiluje do γ -aminobuterne kiseline, histidin do histamina, fenilalanin do β -feniletilamina, tirozin do tiramina, triptofan do tritamina, ornitin do putrescina, lizin do kadaverina (Konings, 2006). Neki od navedenih biogenih amina su bioaktivni molekuli (histamin, tiramin, tritamin, β -feniletilamin i γ -aminobuterna kiselina) i deluju na vaskularni, CNS ili ENS, dok su putrescin i kadaverin medijatori međubakterijske komunikacije (Pessione, 2012; Shah i Swlatlo, 2008).

Svetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization, WHO*) proglasila je MKB bezbednim za humanu upotrebu i dodelila im status GRAS (engl. *generally regarded as safe*) (WHO-FAO, 2002). Naučni odbor Evropske uprave za sigurnost hrane (engl. *European food safety authority, EFSA*) uveo je QPS pristup (engl. *qualified presumption of safety*) radi smanjenja rizika prilikom unošenja mikroorganizama u lanac ishrane. Da bi dobio QPS status mikroorganizam mora da ispunjava sledeće kriterijume: njegova taksonomija mora biti dobro definisana, mora da se utvrdi njegova sigurnost, mora da se ustanovi i potkrepi nedostatak patogenih karakteristika, a namena mu mora biti jasno definisana (EFSA, 2016).

Bakterije roda *Lactococcus* su mezofilne, loptastog oblika, grupisane u parove ili kratke lance nesporogene su i nepokretne, homofermentativne i fakultativno anaerobne. Značajne su za fermentaciju mlečnih proizvoda. Sojevi *Lc. lactis* subsp. *lactis* koriste se kao starter kulture za proizvodnju polutvrđih sireva tipa gauda, edamer i čedar (Lynch et al., 1996). Biovarijetet *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* po fenotipskim karakteristikama sličan je *Lc. lactis* subsp. *lactis*, ali se razlikuje po sposobnosti korišćenja citrata i sintezi

aromatičnih jedinjenja (Boumerdassi et al., 1997). Sojevi *Lc. lactis* subsp. *cremoris* se koriste kao starter kulture za proizvodnju sireva gauda, feta i edamer (Ayad, 2001). Laktokoke imaju GRAS status, a pored upotrebe kao standardnih starter kultura, svoju primenu našle su i kao probiotici, ekspresioni i sekrecioni sistemi za proizvodnju industrijskih enzima, terapeutika i kao sistemi za proizvodnju antigena, a mogu da se koriste i kao živi adjuvansi koji će da podstaknu imunski odgovor (Song et al., 2017).

Vrste roda *Leuconostoc* koriste se u mlečnoj industriji zbog proizvodnje specifičnih aromatičnih jedinjenja kao što su citrat i diacetil čime doprinose ukusu fermentisanih mlečnih proizvoda. U okviru roda izdvajaju se dve vrste, *Leuconostoc mesenteroides* i *Ln. lactis*, zbog njihovog značaja u prehrambenoj industriji gde se koriste kao starter kulture. Sferičnog su ili sočivastog oblika, javljaju se pojedinačno, u parovima ili lancima i rastu na temperaturama između 20°C i 30°C. Heterofermentativni su organizmi pa, pored mlečne kiseline, tokom fermentacije proizvode i etanol i CO₂. Proizvodnja CO₂ poželjna je u nekim sirevima kao što je ementaler (Mullan, 2001). Ostali metabolički putevi uključuju konverziju citrata u diacetil i acetoin i proizvodnju dekstrana i levana iz saharoze (Cogan et al., 1981).

Streptococcus thermophilus jedna je od najcenjenijih homofermentativnih MKB, koja se već dugo upotrebljava kao starter kultura za proizvodnju fermentisanih mlečnih proizvoda. Ključne proizvodne karakteristike *S. thermophilus*, kao što su proizvodnja egzopolisaharida, proteolitičkih enzima i aromatičnih supstanci, kao i sposobnost zakišeljavanja imaju važan uticaj na kvalitet mlečnih proizvoda (Cui et al., 2016). *S. thermophilus* je termofilni organizam koji raste raste na temperaturama višim od 45°C. Tradicionalno se koristi u proizvodnji jogurta i mocarela sira, a od sredine devedesetih godina XX veka i u proizvodnji čedar sira. *S. thermophilus* je okruglog oblika i javlja se u paru ili u lancima. Neki sojevi poseduju ureazu pa imaju sposobnost da produkuju CO₂ iz uree i takvi sojevi imaju potencijal da stvaraju šupljine u siru (Mullan, 2001).

Vrste roda *Pediococcus* su homofermentativne i acidofilne MKB. Koriste se u fermentaciji povrća i mesa. Izolovane su iz različitih biljnih materijala, ali i iz zrelih sireva (Beresford et al., 2001). Mogu biti deo sekundarne mikrobiote sira i smatra se da pomažu u zrenju sira. Pediokoke su okruglog oblika i nesporulišuce su, formiraju tetrade i fakultativni

su anaerobi. Soj *Pediococcus acidilactici* MA18/5M okarakterisan je i kao probiotik (Mikulski et al., 2012).

Vrste roda *Enterococcus* rastu na temperaturama od 10°C do 45°C, na pH 9,6, tolerantne su na visoke koncentracije soli, manje acidofilne i manje su acidogene u odnosu na druge MKB. Otporne su na mnoga antimikrobna jedinjenja, a često su rezistentne na antibiotike. Većina virulentnih karakteristika, kao što su: želatinozna i hemolitička aktivnost, endokarditis antigen, enterokoka je specifična za sojeve (Pessione, 2012). Enterokoke su okrugle i javljaju se ili u parovima ili u lancima. Uobičajeni su stanovnici gastrointestinalnog trakta ljudi i životinja, a vrste *Enterococcus faecium* i *E. faecalis* mogu se naći i u hrani različitog porekla, naročito u mlečnim proizvodima. Dok se vrste *E. faecium* smatraju sigurnim i koriste u prehrambenoj industriji kao starter kulture ili kao probiotici, vrste *E. faecalis* mogu da izazovu infekcije urinarnog, gastrointestinalnog trakta i centralnog nervnog sistema i često se ubrajaju u oportunističke patogene (Holzapfel et al., 2001; Franz et al., 1999).

Laktobacili su najbrojniji rod MKB, koji obuhvata preko sto do sada opisanih vrsta različitih fenotipskih, fizioloških i biohemijskih karakteristika (Salveti et al., 2012). Štapićastog su oblika i nesporulišuce, anaerobne bakterije. Na osnovu ključnih enzima u metabolizmu šećera mogu se podeliti u tri grupe. Obligatni homofermentativni laktobacili fermentišu heksoze do mlečne kiseline, a ne fermentišu pentoze i glukonat. U ovu grupu spadaju: *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* i *Lb. helveticus*. Fakultativno heterofermentativni laktobacili fermentišu heksoze do mlečne kiseline i mogu da produkuju gas iz glukonata, ali ne i iz glukoze. Predstavnici grupe su: *Lb. casei* i *Lb. plantarum*. Obligatni heterofermentativni laktobacili fermentišu heksoze do mlečne kiseline i sirćetne kiseline, etanola i CO₂. U ovoj grupi su *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri* i *Lb. reuteri* (Sharpe, 1979). Za rast laktobacila neophodne su im potrebne različite aminokiseline, vitamini, nukleinske kiseline i mineralne materije (Siezen et al., 2002). Optimalna temperatura za većinu vrsta roda *Lactobacillus* je od 30°C do 40°C. Laktobacili se dugo koriste u proizvodnji fermentisanih prehrambenih proizvoda, a ovom rodu pripada i veliki broj sojeva koji su okarakterisani kao probiotici. Pored uloge u fermentaciji hrane, laktobacili se nalaze i u gastrointestinalnom traktu ljudi i životinja, ali

zastupljenost i brojnost variraju u zavisnosti od životinjske vrste, starosti domaćina i lokalizacije unutar creva (Lebeer et al., 2008). Neke vrste laktobacila su alohtoni stanovnici GIT (*Lb. gasseri*, *Lb. reuteri*, *Lb. crispatus*, *Lb. salivarius* i *Lb. ruminis*) (Heilig et al., 2002), dok su *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. curvatus* i *Lb. sakei* tranzijentni stanovnici GIT (Walter, 2005). Različiti sojevi laktobacila ostvaruju probiotičke efekte zahvaljujući eksprimiranju površinskih molekula i produkciji metabolita i proteina koji direktno komuniciraju sa ćelijama domaćina (Lebeer et al., 2008). Pozitivni efekti laktobacila na zdravlje ljudi naročito su dobro istraženi na polju lečenja i prevencije crevnih infekcija i postantibiotskog sindroma (Lebeer et al., 2008). Delotvornost nekih laktobacila pokazana je kod akutnih dijareja i u prevenciji dijareje uzrokovane uzimanjem antibiotika (Sazawal et al., 2006). Obećavajući rezultati dobijeni su ispitivanjem uticaja laktobacila na prevenciju i lečenje inflamatorne bolesti creva (engl. *inflammatory bowel disease*, *IBD*) (Hedin et al., 2007) i lečenje sindroma iritabilnog kolona (engl. *irritable bowel syndrome*, *IBS*) (Sadrin et al., 2017).

1.4.1. Bakterije proizvođači γ -aminobuterne kiseline

Laktobacili, poznati po svom probiotičkom efektu na zdravlje domaćina, predstavljaju najvažniju grupu MKB koje proizvode γ -aminobuternu kiselinu (Cho et al., 2007; Lebeer et al., 2008). U ove danas ubrajamo sojeve vrsta *Lb. brevis*, *Lb. paracasei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. buchneri*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus* i *Lb. rhamnosus* (Cho et al., 2007; Siragusa et al., 2007; Komatsuzaki et al., 2005; Kim et al., 2009; Sun et al., 2009). Među ostalim rodovima, kao dobri proizvođači γ -aminobuterne kiseline, izdvojeni su: *Lc. lactis* (Nomura et al., 1999; Siragusa et al., 2007), *St. salivarius* subsp. *thermophilus* (Yang et al., 2008), *St. thermophilus* (Seok et al., 2008), *E. durans*, *E. faecium* (Seok et al., 2008; Irlinger et al., 2017), *Pd. acidilactici*, *Pd. pentosaceus* (Irlinger et al., 2017) i *Ln. mesenteroides* (Seok et al., 2008). Skoro svi sojevi su izolovani iz tradicionalnih fermentisanih namirnica kao što su kimči, sir, kiselo testo čija je zajednička

osobina niska pH vrednost (kisela sredina). Pored toga svi prethodno navedeni fermentisani proizvodi sadrže i glutamat. Do sada su razvijene dve tehnike za efikasnu proizvodnju γ -aminobuterne kiseline korišćenjem mikroorganizama: tehnologija imobilizacije ćelija i diskontinualna fermentacija. Ove tehnologije koriste se za proizvodnju γ -aminobuterne kiseline u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, kao i u drugim industrijama (Dhakal et al., 2012). Barrett i koautori (2012) su izolovali jedan *Lactobacillus* spp. soj i četiri *Bifidobacterium* spp. soja iz GIT koji proizvode γ -aminobuternu kiselinu. Među navedenim sojevima, soj *Lb. brevis* DPC6108 bio je najefikasniji u konvertujući 100 % glutamata do γ -aminobuterne kiseline. U literaturi je opisana i studija o modulaciji glutamat/GABAergičkog sistema u CNS od strane soja *Lb. rhamnosus* JB-1, proizvođača γ -aminobuterne kiseline, izolovanog iz GIT. Primena *Lb. rhamnosus* JB-1 smanjila je koncentracije kortikosterona izazvanih stresom, anksioznost i ponašanje slično depresiji kod BALB/c miševa. Međutim, navedeni neurohemijski i bihevioralni efekti primene *Lb. rhamnosus* JB-1 nisu uočeni kod vagotomisanih miševa, što ukazuje da je komunikacija preko nerva vagusa glavni put komunikacije između bakterija iz gastrointestinalnog trakta i centralnog nervnog sistema (Bravo et al., 2011). Oralni unos soja *Bifidobacterium denium*, proizvođača γ -aminobuterne kiseline, putem gavaže (CFU / ml $\sim 4 \times 10^8$) doveo je do smanjenja osetljivost ganglija dorzalnih korenova u modelu visceralnog bola pacova (Pokusaeva i saradnici, 2016). Nedavna metagenomska analiza Projekta humanog mikrobioma (engl. *Human Microbiome Project*) ukazala je da su geni koji kodiraju proteine GAD sistema prisutni u značajnom udelu među članicama mikrobiote čoveka (Pokusaeva et al., 2017). Osim toga, istraživanje na ljudima pokazalo je da je transplantacija fekalne mikrobiote iz vitkih u gojazne osobe rezultirala povećanim nivoom γ -aminobuterne kiseline u plazmi, što je ukazalo da manipulisanje mikrobiotom može izmeniti nivo γ -aminobuterne kiseline (Kootte et al., 2017). Strandwitz i koautori (2019) su *in silico* analizom mikrobioma čoveka pokazali prisustvo vrsta koje imaju sposobnost produkcije γ -aminobuterne kiseline, ali i prisustvo vrsta koje koriste egzogeno produkovanu γ -aminobuternu kiselinu, kao i vrsta koje i proizvode i konzumiraju γ -aminobuternu kiselinu. Rodove *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Eubacterium* i *Bifidobacterium* identifikovali su kao

proizvođače γ -aminobuterne kiseline, dok je za *Bacteroides* spp.i, u manjoj meri za *Parabacteroides* spp., pokazano da je proizvode unutar pH opsega debelog creva čoveka.

1.5. Mehanizmi delovanja probiotika

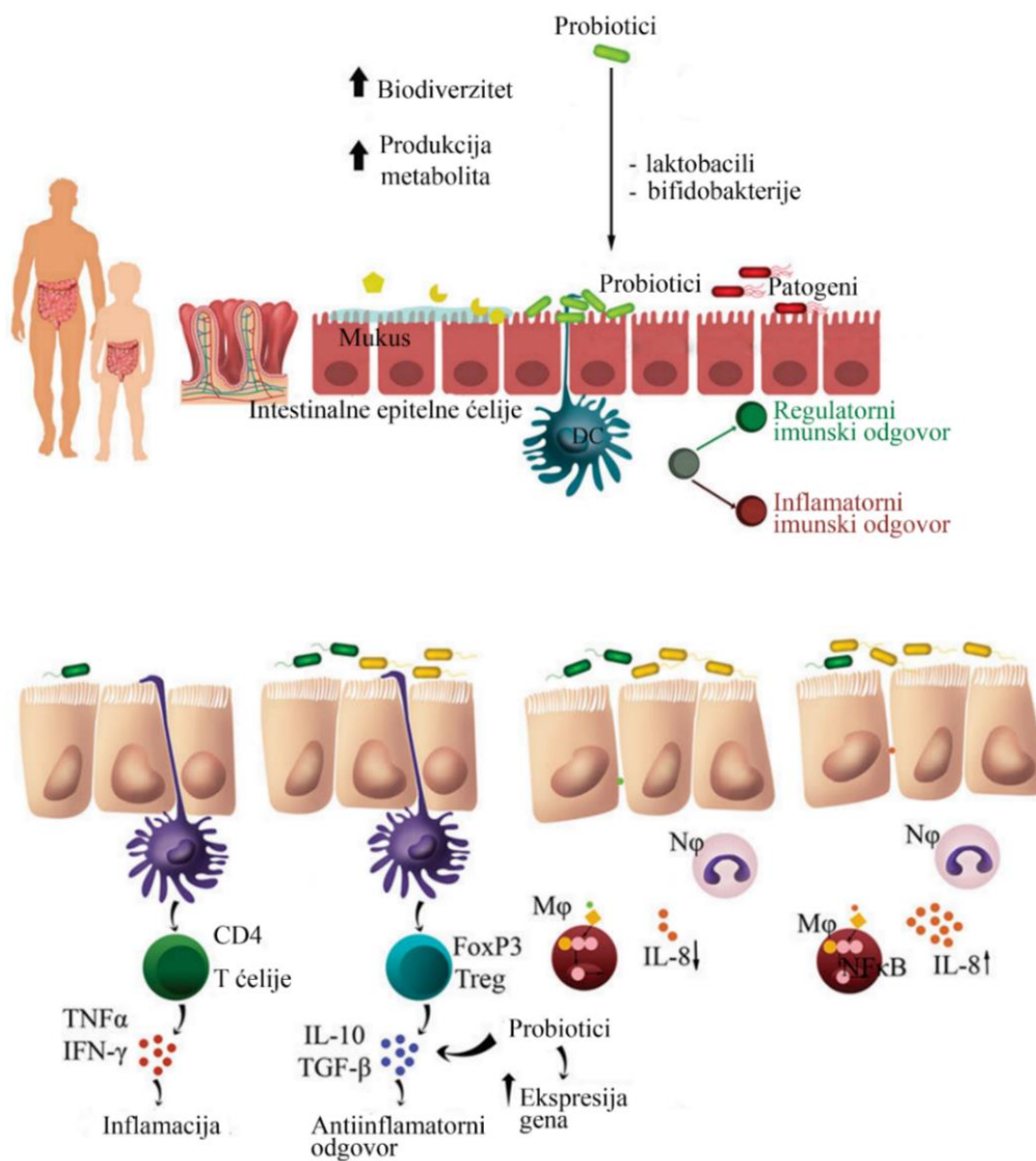
Svetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation, WHO*) i Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (engl. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO*) definisale su probiotike kao žive mikroorganizme koji imaju blagotvoran efekat na zdravlje domaćina ukoliko se primene u adekvatnim količinama (WHO-FAO, 2002). Organizacije i agencije kao što su Kodeks, Zdravstvena organizacija Kanade, Svetska organizacija za gastroenterologiju i Evropska agencija za bezbednost hrane (EFSA) koriste navedenu, tradicionalnu, definiciju probiotika (Hill et al., 2014). U skladu sa specifikacijama koje je iznela radna grupa WHO-FAO (2002) ključni aspekti ove definicije podrazumevaju da: probiotici moraju biti živi prilikom primene, da moraju proći kontrolisanu procenu kojom će se dokazati koristan efekat na zdravlje domaćina, da su taksonomski definisani i da su bezbedni za upotrebu. Poslednjih godina dolazi do promene shvatanja pojma probiotik pa, pored toga što su probiotičke bakterije definisane kao korisne za zdravlje, da bi se neki soj definisao kao probiotički i bio primenjen u tretmanu bolesti neophodno je ispitati i definisati tačne mehanizme njegovog delovanja u odgovarajućim *in vitro* i *in vivo* modelima bolesti.

Sojevi bifidobakterija i laktobacila, koji predstavljaju dominantnu odnosno subdominantnu grupu intestinalne mikrobiote, najčešće su korišćene probiotske bakterije (Bermudez-Brito et al., 2012). Mehanizmi kojima probiotici ostvaruju svoje funkcije u GIT su: inhibicija štetnog delovanja patogena, jačanje intestinalne epitelne barijere i imunomodulatorna aktivnost (Lebeer et al., 2008).

1.5.1. Inhibicija štetnog delovanja patogena

Inhibicija štetnog delovanja patogena ostvaruje se kompeticijom za hranljive materije, produkcijom antimikrobnih supstanci i/ili konkurentnim isključivanjem patogenih bakterija (Oelschlaeger, 2010). Probiotici koriste hranljive materije u gastrointestinalnom traktu, prisutne u ograničenim količinama, čineći ih tako nedostupnim za patogene. Pored kompeticije za dostupne nutrijente probiotici produkuju jedinjenja koja imaju direktno antimikrobno delovanje prema konkurentskim bakterijama (Bermudez-Brito et al., 2012). Organske kiseline (mlečna kiselina, sirćetna kiselina i mravlja kiselina) ostvaruju snažan inhibitorni efekat na Gram-negativne bakterije i smatraju se glavnim antimikrobnim jedinjenjima odgovornim za inhibitornu aktivnost probiotika protiv patogena (Makras et al., 2006). Mnoge MKB proizvode bakteriocine, antimikrobne peptide koji obično imaju uzak spektar aktivnosti i deluju samo protiv srodnih bakterija, međutim pokazano je da mogu da budu aktivni i protiv patogena koji se smatraju kontaminantima hrane (Nielsen et al., 2010). Pored organskih kiselina i bakteriocina pokazano je da produkcija H₂O₂ (laktobacili) predstavlja važan antimikrobni mehanizam (Servin, 2004).

Probiotičke bakterije eksprimiraju različite površinske determinante, uključene u interakciju sa intestinalnim epitelnim ćelijama (IEĆ) i mucinom (Bermudez-Brito et al., 2012). Kompetitivno isključivanje zasniva se na interakcijama između bakterija i kompeticijom za vezujuća mesta na IEĆ, a probiotičke i komensalne bakterije mogu da menjaju okruženje i da ga na taj način ga učine manje pogodnim za kompetitore (Makras et al., 2006). Probiotici koriste ista mesta za vezivanje za IEĆ kao i patogeni, tako da su u kompeticiji za vezivanje za intestinalnu mukozu čime sprečavaju kolonizaciju patogenim bakterijama. Mehanizmi adhezije za IEĆ u *in vitro* esejima najčešće su izučavani na Caco-2 i HT-29 ćelijama, imobilisanom mukusu ili molekulima vanćelijskog matriksa kao što su kolagen i fibronektin (Perea-Velez et al., 2007). Molekuli koje bakterije koriste za vezivanje za IEĆ jesu sortaza-zavisni proteini, proteini površinskog sloja (engl. *S-layer proteins*), adhezini, mucin vezujući proteini, lipoteihoična kiselina i egzopolisaharidi (Lebeer et al., 2008).

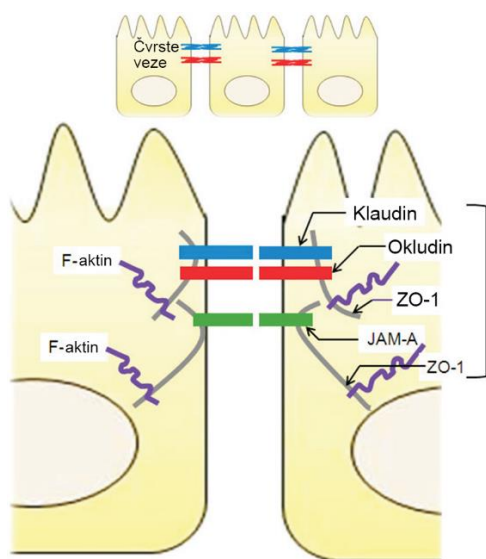


Slika 4. Mehanizmi interakcije probiotika sa intestinalnim epitelnim ćelijama i dendritskim ćelijama (DC) u gastrointestinalnom traktu. Preuzeto i modifikovano iz Plaza-Diaz i koautori (2019).

1.5.2. Jačanje intestinalne epitelne barijere

Odbrambene mehanizme, koji učestvuju u očuvanju integriteta epitela, čine sloj mukusa, antimikrobni peptidi, sekretorni IgA i proteini čvrstih veza (Ohland i

MacNaughton, 2010). Ukoliko dođe do narušavanja ove barijere antigeni bakterija i hrane mogu da dospeju do submukoze i izazovu inflamatorne reakcije, koje mogu biti okidač za razvoj intestinalnih inflamatornih bolesti kao što su inflamatorna bolest creva, celijačna bolest i sindrom iritabilnog kolona ili sistemskih inflamatornih bolesti, kao što su dijabetes tipa I, multipla skleroza i reumatoidni artritis (Lee, 2015). Poboljšanje ekspresije proteina čvrstih veza jedan je od načina za jačanje integriteta intestinalne epitelne barijere (Bermudez-Brito et al., 2012). Čvrste veze predstavljaju multiproteinski kompleks, koji formira selektivno propustljivi prolaz između susednih epitelnih ćelija i definiše granicu između apikalnog i bazolateralnog domena ćelija. Proteini čvrstih veza locirani su na apikalnim krajevima lateralne membrane IEĆ. Tri integralna transmembranska proteina grade čvrste veze: kladin, okludin i molekul spojne veze (engl. *junctional adhesion molecule, JAM*). Unutarćelijski domeni navedenih transmembranskih proteina interaguju sa citosolnim proteinom *zonula occludens 1* (ZO-1), koji usidrava transmembranske proteine u aktinski citoskelet (Slika 5) (Lee, 2015).



Slika 5. Molekularna struktura unutarćelijskih veza intestinalnih epitelnih ćelija. Preuzeto i modifikovano iz Lee (2015).

Vanćelijske petlje kladina prave homofilne i heterofilne interakcije sa proteinima susednih ćelija, a navedene interakcije stvaraju ili prepreke ili grade pore za prolazak selektivnih molekula prilikom paracelularnog transporta (Van Itallie i Anderson, 2006).

Istraživanja na miševima kojima su inaktivirani geni za kladine su pokazala da kladine imaju ključnu ulogu u formiranju barijera i u kontroli paracelularnog transporta. Miševi kojima je uklonjen gen za kladin-15 umiru u roku od 24 sata od rođenja usled gubitka tečnosti i elektrolita kroz narušenu intestinalnu barijeru (Tamura et al., 2011).

Okludini takođe imaju ulogu u formiranju strukture čvrstih veza i regulaciji paracelularnog transporta. Inaktivacija okludina indukuje povećanje paracelularne propustljivosti za makromolekule. Pokazano je da fosforilacija tirozinskih rezidua okludina tokom oksidativnog stresa narušava čvrste veze. *In vitro* fosforilacija tirozina onemogućava vezivanje okludina i ZO-1 i na taj način destabilizuje povezanost proteina čvrstih veza (Elias et al., 2009).

Proteini JAM familija pripadaju superfamiliji imunoglobulina (Ig) i sastoje se od 2 vanćelijska Ig domena, transmembranskog domena i jednog unutarćelijskog C-terminalnog domena (Cunningham et al., 2000). Proteini JAM familije su eksprimirani u različitim tipovima ćelija: epitelnim, endotelnim i imunskim ćelijama. U IEC su eksprimirani JAM-A i JAM-4 i uključeni su u regulaciju čvrstih veza i održavanje intestinalne epitelne barijere (Lee, 2015).

ZO proteini su prvi identifikovani proteini čvrstih veza, a do sada su okarakterisana tri ZO proteina (ZO-1, ZO-2, ZO-3). Transmembranski proteini čvrstih veza vezuju se za N-terminalni domen ZO-1 proteina, dok je C-terminalni domen ZO-1 uključen u interakciju sa aktinskim citoskeletom. ZO proteini najverovatnije učestvuju u ranoj organizaciji proteina čvrstih veza radi formiranja međućelijskog kontakta (Lee, 2015). Ćelije koje nemaju ZO-1 protein su i dalje u stanju da formiraju proteine čvrstih veza, međutim dolazi do kašnjenja u povezivanju sa ostalim proteinima čvrstih veza, što ukazuje na ulogu ZO-1 u regulaciji sklapanja kompleksa čvrstih veza (Umeda et al., 2004).

Do danas u dostupnoj literaturi postoje samo oskudni podaci o uticaju γ -aminobuterne kiseline na funkcije enterocita i na održavanje integriteta crevne barijere u homeostazi i inflamatornim stanjima. Samo dve grupe su istraživale uticaj γ -aminobuterne kiseline na enterocite i crevni integritet u različitim stanjima. Braun i koautori (2015) su predložili

hipotezu po kojoj se protektivni efekti glutamina na crevni integritet delom mogu pripisati efektima njegovog metabolita γ -aminobuterne kiseline na ekspresiju zaštitnog mucina u enterocitima. Abd El-Hady i koautori (2017) su pokazali da primena γ -aminobuterne kiseline ima ulogu u poboljšanju histopatoloških i biohemijskih poremećaja u tankom crevu pacova uzrokovanih γ -zračenjem.

1.5.3. Imunomodulatorna aktivnost probiotika

Oko 70 % imunskog sistema lokalizovano je u GIT u okviru limfoidnog tkiva povezanog sa gastrointestinalnim traktom (engl. *gut-associated lymphoid tissue, GALT*) (Pessione, 2012) (Slika 4). Efekat probiotika na imunski sistem ogleda se u postizanju ravnoteže u produkciji antiinflamatornih i proinflamatornih citokina i selekciji populacija T limfocita sa proinflamatornom i imunoregulatornom ulogom (Pessi et al., 2000; Karimi et al., 2009). Probiotici mogu da interaguju sa DC, monocitima/makrofagima i limfocitima (Lebeer et al., 2008). Imunski sistem čine urođeni i adaptivni imunski sistem. Adaptivni imunski sistem se zasniva na aktivnosti T i B limfocita, koji su specifični za određene antigene. Urođeni imunski sistem reaguje na zajedničke strukture, koje se nazivaju molekularnim obrascima povezanim sa mikroorganizmima (engl. *microorganisms-associated molecular patterns, MAMPs*), a među njima su i obrasci povezani sa patogenima (engl. *pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*) (Bermudez-Brito et al., 2012). Primarni odgovor na mikroorganizme pokreće se receptorima za prepoznavanje obrazaca (engl. *pattern recognition receptors, PRR*), a najpoznatiji PRR jesu receptori slični Toll-u (engl. *toll-like receptors, TLR*). TLR su ispoljeni na različitim imunskim i neimunskim ćelijama: B limfocitima, urođenoubilačkim ćelijama (engl. *natural killer cell, NK*), DC, Mf, fibroblastima, epitelnim i endotelnim ćelijama. Sisari poseduju 11 TLR proteina. TLR 1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 i TLR10, membranski su eksprimirani i reaguju na PAMP-ove sa površine bakterija, dok su TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 eksprimirani na površini endozoma i vezuju nukleinske kiseline bakterija i virusa (Gómez-Llorente et al., 2010). Pored navedenih receptora u prepoznavanju molekula poreklom od mikroorganizama

učestvuju i vanćelijski lektinski receptori C tipa (engl. *extracellular C type lectin receptors, CLR*) i unutarćelijski receptori slični oligomerizujućim nukleotid-vezujućim proteinima (engl. *nucleotide binding oligomerization domain-containing protein (NOD)-like receptors, NLR*) (Lebeer et al., 2010). Aktivacija PRR ispoljenih na epitelnim ćelijama koje čine epitelne barijere organizma (creva, pluća, itd.) pokreće razvoj urođenog imunskog odgovora uključuje proizvodnju antimikrobnih jedinjenja (defenzina i H₂O₂) i produkciju hemokina kao što je IL-8. IL-8 regrutuje neutrofile, ćelije koje fagocituju mikroorganizme ili njihove delove, dok je adaptivni imunski odgovor na mikroorganizme posredovan T i B limfocitima organizovanim u lokalna limfna tkiva. Kada mikroorganizmi ili druga strana tela iz creva aktiviraju lokalne antigen prezentujuće ćelije (APĆ) kao što su DC, vezujući se za određene PRR, DC ih preuzimaju, obrađuju i prezentuju njihove antigene naivnim T i B limfocitima lokalizovanim u limfoidnom tkivu organizovanom u crevima. Osim prezentacije antigena, u zavisnosti od toga koji su PRR aktivirani na DC dolazi do indukcije ekspresije određenih molekula na površini DC kao što su kostimulatorni molekuli CD80 i CD86 kao i do produkcije određenih citokina što je sve neophodno da bi došlo do usmeravanja diferencijacije naivnih antigen-specifičnih limfocita u određeni tip efektorskih ćelija. Tako stimulacija PRR, koji prepoznaju unutarćelijske bakterije ili viruse, dovodi do indukcije produkcije IL-12 kod DC što vodi diferencijaciji Th1 ćelija čiji je najvažniji citokin IFN- γ , dok aktivacija receptora koji prepoznaju vanćelijske bakterije i gljive dovodi do indukcije produkcije IL-23 kod DC i diferencijacije Th17 ćelija koje proizvode IL-17, IL-21 i IL-22. Paraziti dovode do razvoja Th2 ćelija koji proizvode IL-4, IL-5, IL-13. Takođe određeni molekuli ispoljeni na mikroorganizmima mogu da dovedu do razvoja tolerogenih osobina kod DC, kao što je ekspresija inhibitornih molekula na površini, kao što su indolamin-2,3-dioksigenaza-1 (IDO-1) i dr., i produkcija citokina IL-10, TGF- β , koje onda indukuju razvoj regulatornih T ćelija i dovode do supresije odgovora na određeni antigen. (Artis, 2008; Maldonado i von Andrian, 2010). Modulacija funkcije DC između inflamacijskog i tolerogenog fenotipa i indukcija regulatornih T limfocita (Treg) važni su mehanizmi kojima probiotici ostvaruju svoje funkcije. Prema „Higijenskoj hipotezi“ nedostatak izloženosti određenim mikroorganizmima, nazvanim „dobrim, starim prijateljima“ može biti odgovoran za povećanu stopu nekih hroničnih bolesti kao što su

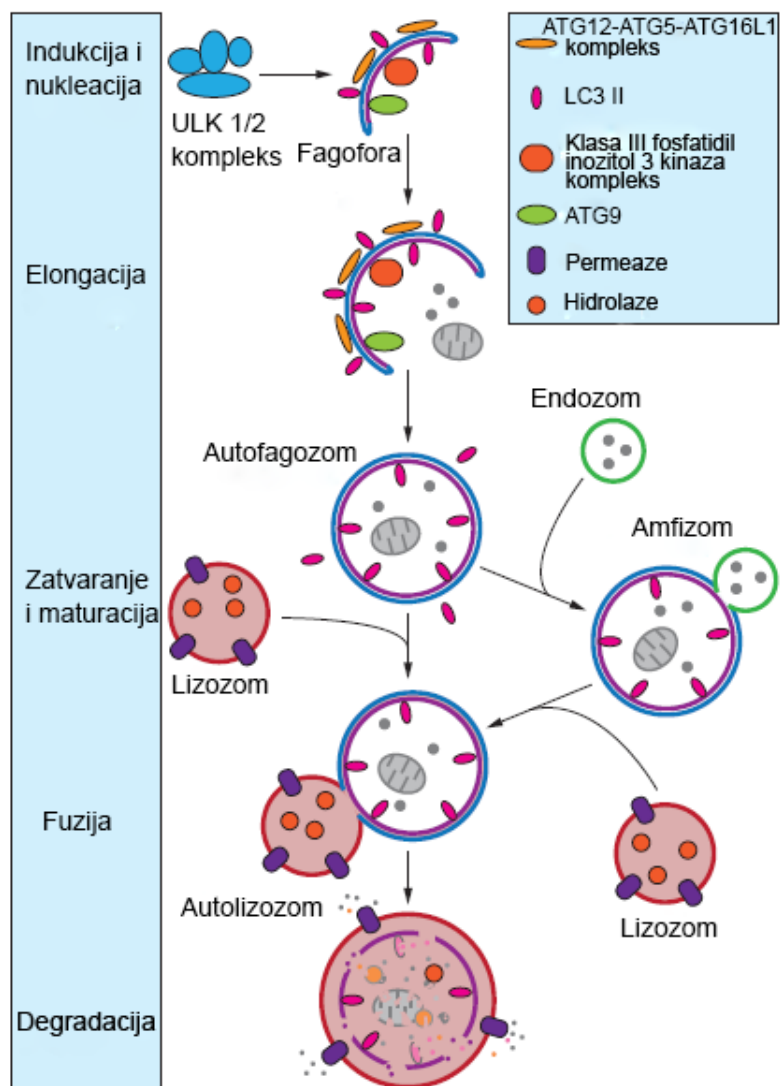
alergije i inflamatorna bolest creva. Smatra se da su laktobacili ti „dobri stari prijatelji“ sposobni da indukuju regulatorne DC i Treg (Lebeer et al., 2008).

Laktobacili preko TLR posredovane signalizacije kontrolišu sazrevanje DC, indukujući pojačanje ekspresije različitih markera maturacije, kao što su CD80, CD83 i CD86, ekspresiju molekula glavnog histokompatibilnog kompleksa II (MHC II), kostimulatora, adhezina, kao i CCR7 hemokinskog receptora, indukujući prezentaciju antigena T ćelijama ili produkciju regulatornog citokina IL-10 (Bermudez-Brito et al., 2012). Komensalne i probiotičke bakterije mogu indukovati stanje tolerancije posredovane aktivnošću TLR na DC. Signalizacija preko TLR9 je najvažnija za ostvarivanje antiinflamatornih efekata probiotika. Međutim, različite studije ukazale su i na ulogu drugih TLR, kao što su TLR3 i TLR7, u indukciji tolerancije komensalnim i probiotičkim bakterijama (Bermudez-Brito et al., 2012). Osim uloge Th1 i Th17 ćelija u borbi protiv intracelularnih/ekstracelularnih patogena aktivacija i diferencijacija ćelija koje prepoznaju sopstvene antigene u smeru Th1 i Th17 ćelija povezana je sa razvojem autoimunskih bolesti. Sa druge strane, kao imunosupresivne ćelije Treg su ključne za modulaciju imunskog odgovora, sprečavanje prejakog imunskog odgovora i ključna su meta delovanja probiotika. Treg proizvode antiinflamatorne citokine IL-10 i TGF- β i ispoljavaju površinske imunosupresivne molekule kao što je CTLA-4 i dr. (Lebeer et al., 2008; Ouyang et al., 2008).

1.6. Autofagija

Autofagija je katabolički proces kojim se citoplazmatske komponente, uključujući makromolekule i organele, razgrađuju u lizozomima (Harris, 2011). Zajedno sa ubikvitinskim proteaznim sistemom autofagija je ključni mehanizam uključen u homeostazu proteina i kontrolu njihovog kvaliteta (Kaur i Debnath, 2015) u ćelijama eukariota. Do sada su okarakterisane tri osnovna tipa autofagije: mikroautofagija, šaperonima posredovana autofagija (engl. *chaperone-mediated autophagy*, CMA) i makroautofagija (Mizushima, 2007). Tokom mikroautofagije dolazi do invaginacije

membrana lizozoma ili endozoma što rezultira direktnim zahvatanjem supstrata, koji se nakon toga razgrađuje lizozomalnim proteazama (Li et al., 2012). U procesu šaperonima posredovane autofagije, šaperoni (HSC70) identifikuju i targetuju ciljne proteine koji sadže pentapeptidni motiv KFERQ. HSC70 protein omogućava translokaciju targetovanih proteina do lizozoma interakcijom sa membranskim receptorom 2A asociiranim sa membranom lizozoma (Cuervo i Wong, 2014). Termin autofagija se najčešće odnosi na makroautofagiju (Harris, 2011). Makroautofagija podrazumeva formiranje dvoslojne membranske vezikule autofagozoma, koja zahvata citoplazmatske proteine i organele i transportuje ih do lizozoma u kojima će se izvršiti njihova degradacija (Mizushima i Komatsu, 2011). Formiranje autofagozoma dešava se u tri koraka: inicijacija, nukleacija i elongacija, odnosno zatvaranje autofagozoma (Kaur i Debnath, 2015) (Slika 6). Faza inicijacije počinje na mestu za formiranje fagofore (engl. *phagophore assembly site, PAS*) gde dolazi do sklapanja UNC51-sličnog kinaznog (ULK) kompleksa, koji se sastoji od ULK1 ili ULK2 serin/treonin kinaza, ATG13 (engl. *autophagy related protein 13*), i FIP200 proteina (engl. *200 kDa focal adhesion kinase family-interacting protein*) (Lamb et al., 2013). U narednoj fazi, fazi nukleacije, ULK fosforiliše Beclin1, koji zajedno sa VPS15 (engl. *vacuolar protein sorting 15*), VPS34, ATG14 i fosfatidil-inozitol-3-kinazom (PKI3) III klase gradi PI3K kompleks III klase. Aktivacijom navedenog kompleksa dolazi do produkcije fosfatidil-inozitol-3-fosfata (Diao et al., 2015). Tokom faze elongacije regrutuje se 2 kompleksa: ATG12-ATG5-ATG16 i LC3 (engl. *microtubule-associated protein light chain 3*) konjugacioni sistem. ATG4 proteaza iseca LC3 i oslobađa C terminalni glicin (LC3 I). ATG7 aktivira LC3 I i prenosi ga do ATG3, koji olakšava vezivanje LC3 I i fosfatidiletanolamina, čime nastaje liposolubilna forma proteina LC3 II (Parzych i Klionsky, 2014). Kompleks ATG12-ATG5-ATG16 omogućava ugradnju LC3 II u rastuću fagoforu. U narednom koraku dolazi do sazrevanja fagofore i formiranja autofagozoma. Fuzijom autofagozoma i lizozoma nastaje autolizozom. Ponekad, pre nego što se fuzioniše sa lizozomom, može doći do fuzije autofagozoma i endozoma, čime nastaje amfizom. Sadržaj autolizozoma se degraduje i eksportuje nazad u citoplazmu, radi ponovnog korišćenja od strane ćelije (Parzych i Klionsky, 2014).



Slika 6. Morfologija makroautofagije. Preuzeto i modificirano iz Parzych i Klionsky (2014).

Jedan od glavnih regulatora procesa autofagije je mTOR kompleks (engl. *Mammalian Target Of Rapamycin*). Asocijacija mTOR sa inicijacionim kompleksom pod uticajem je nutritivnog statusa. U prisustvu hranljivih materija, mTOR je vezan sa kompleksom, ali dislocira sa inicijacionog kompleksa u uslovima gladovanja. Kada je mTOR povezan sa inicijacionim kompleksom fosforiliše ULK1/2 i ATG13 i na taj način ih inaktivira. Međutim u uslovima gladovanja ćelija ili nakon tretmana rapamicinom mTOR

se odvaja od inicijacionog kompleksa što dovodi do defosforilacije ULK1/2 i ATG13 i indukcije makroautofagije (Hosokawa et al., 2009).

Proteini autofagije učestvuju u indukciji ili supresiji imunskog odgovora i, obrnuto, produkti imunskih ćelija mogu biti stimulatori i/ili inhibitori za proces autofagije (Zhou i Zhang, 2012). U literaturi je pokazano da je disfunkcija autofagije povezana sa različitim stanjima, koja se karakterišu pojačanom inflamacijom kao što su: Kronova bolet, dijabetes tipa 1 i sistemski eritemski lupus (Ye et al., 2018). Aktiviranje GABAergičkog signalnog puta pozitivno utiče na lečenje navedenih stanja (Lv et al., 2018; Tian et al., 2011; Mathieu et al., 2010), međutim do sada nije istraživani potencijani odnos autofagije i GABAergičke signalizacije u autoimunskim bolestima. Kim i koautori (2018) su pokazali da GABAergička aktivacija pojačava odgovor domaćina na infekciju unutarćelijskim patogenima. Tretman makrofaga γ -aminobuternom kiselinom ili GABAergičkim lekovima stimulisao je aktivaciju autofagije, sazrevanje fagozoma i antimikrobnu reakciju protiv mikobakterijske infekcije. Pored uloge γ -aminobuterne kiseline u indukciji antimikrobne autofagije pokazana je uloga nekih vrsta laktobacila u stimulisanju ili suprimiranju autofagije. Wu i koautori (2013) su pokazali da tretman probiotikom *Lb. rhamnosus* GG tokom virusnog gastroenteritisa suprimira nekontrolisanu virusom izazvanu autofagiju i štiti ćelije creva od oštećenja. Postbiotik soja *Lb. fermentum* BGHV110 stimuliše aktivaciju PINK-1 zavisne autofagije u HepG2 ćelijama i na taj način neutrališe hepatotoksičnost izazvanu paracetamolom u HepG2 ćelijama (Dinić et al., 2017).

1.7. Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, životinjski model multiple skleroze

Multipla skleroza (MS) je hronična autoimunska, inflamatorna, neurološka bolest centralnog nervnog sistema (CNS) koja često dovodi do teškog fizičkog ili kognitivnog invaliditeta i neuroloških oštećenja (Ghasemi et al., 2017). MS karakterišu multifokalna demijelinizacija i oštećenja aksona što rezultira disfunkcijom i smrću neurona i većinom pogađa mlade odrasle osobe (Terry et al., 2014). Definisane su tri osnovne forme MS: relapsno remitentna, sekundarno progresivna i primarno progresivna (Stepanović-Petrović i

Micov, 2015). Uzrok bolesti još uvek nije poznat, ali mnogobrojna istraživanja ukazuju da važnu ulogu ima upravo kombinacija genetičkih i sredinskih faktora (Goldenberg, 2012). Nedavna istraživanja o povezanosti MS sa disbiozom crevne mikrobiote (Chen et al., 2016; Stanisavljević et al., 2019) kao i značajan porast u učestalosti autoimunskih bolesti u periodu povećanog korišćenja higijenskih sredstava i antibiotika ukazuju na veoma veliku ulogu sredinskih uticaja na razvoj ove i drugih autoimunskih bolesti.

Brojne kliničke studije ispitivale su nivo glutamata i γ -aminobuterne kiseline kod pacijenata sa multiplom sklerozom. Etiologija multiple skleroze povezana je sa redukovanom koncentracijom γ -aminobuterne kiseline i smanjenom aktivnošću GAD kod ovih pacijenata (Demakova et al., 2003). Niži nivo γ -aminobuterne kiseline detektovan je u hipokampusu i senzomotornom korteksu pacijenata sa sekundarno progresivnom multiplom sklerozom, a niža koncentracija γ -aminobuterne kiseline korelira sa smanjenom mogućnošću kontralateralnog pokretanja ekstremiteta (Cawley et al., 2015). Značajno niži nivo γ -aminobuterne kiseline i glutamata, povezan je sa verbalnim i vizuospacijalnim deficitom pamćenja kod pacijenata sa relapsno remitentnim oblikom bolesti u poređenju sa zdravim kontrolnim grupama (Gao et al., 2018). Studije su pokazale da modulacija neurotransmisije posredovane γ -aminobuternom kiselinom može biti nova terapijska strategija za lečenje ranih faza MS (Gao et al., 2018).

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) je najčešće korišćeni eksperimentalni model MS. EAE je kompleksno stanje u kome interakcija između različitih imunopatoloških i neuropatoloških stanja dovodi do razvoja ključnih patoloških karakteristika MS: inflamacije, demijelinizacije, gubitka aksona i glioze (Constantinescu et al., 2011). EAE se indukuje imunizacijom homogenatima CNS (antigen nespecifični EAE), proteolipidnim proteinom (PLP), ili specifičnim antigenima CNS-a encefalitogenim epitopima PLP (PLP₁₃₉₋₁₅₁, PLP₁₇₈₋₁₉₁), mijelin oligodendrocitnog proteina (MOG₉₂₋₁₀₆) ili mijelin baznim proteinom MBP (MBP₈₄₋₁₀₄) u emulziji sa kompletnim Frojdovim adjuvansom (Robinson et al., 2014). Primarni korak u autoimunskom procesu je aktivacija reaktivnih autoimunskih CD4⁺ T ćelija koje se diferenciraju u Th1, INF- γ produkujuće, i u Th17, IL-17 produkujuće, T ćelije (Stanisavljević et al., 2018). Aktivirane T ćelije

ekspimiraju integrine kao što je VLA-4 i mogu da prođu krvno-moždanu barijeru. Kroz permeabilizovanu krvno-moždanu barijeru, privučene oslobađanjem hemokina, i druge imunske ćelije, uključujući B ćelije, monocite i makrofage, migriraju u CNS. U CNS-u se susreću sa istim (ili veoma sličnim) antigenom, prikazanim na rezidentnim APC ili APC koje su migrirale u CNS. Kada u CNS-u sretnu antigen prikazan na APC, autoreaktivne T ćelije se dalje reaktiviraju i diferenciraju produkujući citokine, koji aktiviraju susedne imunske ćelije i privlače dodatne inflamatorne ćelije u CNS (Constantinescu et al., 2011). Ovaj animalni model bolesti ima predvidiv klinički tok koji se karakteriše razvojem bolesti tokom 10-15 dana od imunizacije, a zatim uzlaznom paralizom, koja počinje u repu i zadnjim udovima i napreduje do prednjih udova (Robinson et al., 2014).

2. CILJEVI RADA

Mlečnokiselinske bakterije se tradicionalno koriste za proizvodnju fermentisane hrane ili se koriste kao probiotici stoga se njihova upotreba smatra bezbednom. Poslednjih godina opisani su različiti korisni efekti probiotika na zdravlje domaćina, međutim identifikacija i karakterizacija produkata metabolizma bakterija potrebna je radi dodatnog rasvetljavanja mehanizama koji leže u osnovi probiotičke aktivnosti bakterija. Uzevši u obzir da je γ -aminobuterna kiselina važan imunomodulatorni molekul, a da je poznato da neke mlečnokiselinske bakterije proizvode γ -aminobuternu kiselinu glavni cilj ovog rada bio je testiranje primene probiotika koji proizvode γ -aminobuternu kiselinu u terapiji inflamacije i eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa i mehanizama koji leže u osnovi navedenog terapijskog dejstva. Imajući navedeno u vidu postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. selekcija sojeva koji proizvode γ -aminobuternu kiselinu i kvantifikacija produkcije γ -aminobuterne kiseline:
 - određivanje prisustva *gadB* gena PCR metodom,
 - kvalitativna analiza produkcije γ -aminobuterne kiseline tankoslojnom hromatografijom,
 - kvantifikacija produkovane γ -aminobuterne kiseline u medijumu 48 sati starih kultura odabranih sojeva tečnom hromatografijom visokih performansi.
2. Detaljna probiotička karakterizacija sojeva proizvođača γ -aminobuterne kiseline:
 - preživljavanje u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta,
 - rezistencija na antibiotike,
 - hemolitička i želatinozna aktivnost,
 - antimikrobna aktivnost,
 - adhezija za Caco-2 ćelijsku liniju,
 - ekskluzija patogena,

- analiza integriteta epitela.
3. Utvrđivanje uloge γ -aminobuterne kiseline, koju proizvode mlečnokiselinske bakterije, u tretmanu inflamacije i mehanizama koji leže u osnovi terapijskog procesa *in vitro*:
 - ispitivanje metaboličke aktivnosti i proliferacije ćelija izolovanih iz mezenteričnih limfnih čvorova;
 - ispitivanje produkcije citokina;
 - ispitivanje uloge autofagije u inflamaciji.
 4. Ispitivanje terapijskog potencijala odabranog soja proizvođača γ -aminobuterne kiseline i medijuma kulture datog soja nakon 48 sati gajenja, kao postbiotskog preparata, na smanjenje inflamacije *in vivo* na modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Bakterijski sojevi

Bakterijski sojevi korišćeni u ovom radu prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Sojevi korišćeni u ovom radu

<u>Vrsta</u>	<u>Bakterijski sojevi</u>	<u>Referenca</u>
<i>Lactobacillus sp.</i>	<u>BGAZES2-89a, BGAZES2-89b, BGZLS10-2, BGZLS30-23</u>	<u>BG LMM kolekcija</u>
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	<u>BGNJ1-16</u>	<u>BG LMM kolekcija</u>
<i>Lactobacillus arizonensis</i>	<u>BGKAVS3-31, BGKAVS4-58, BGNJ1-16</u>	<u>BG LMM kolekcija</u>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<u>BGHi3, BGLMM10, BGLMM11, BG KAVS2-41, BGKAVS2-50, BGZLS10-17, BGZLS30-2, BGZLS45-36, BGPT9-53, BGAZES1-52, BGAZES1-70</u>	<u>BG LMM kolekcija</u>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<u>BGMK3-43</u>	<u>BG LMM kolekcija</u>
<i>Lactobacillus casei</i>	<u>BGTRS4-7, BGG05-7, BGG07-7, BGDP1-84, BGG08-49, BGG03-41, BGG03-42</u>	<u>BG LMM kolekcija</u>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<u>BGPT10-48, BGG02-2</u>	<u>BG LMM kolekcija</u>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<u>BGAZEJ2-89, BGAZES2-96, BGVLJ1-7, BGDU4-71, BGPT3-71, BGPT9-43</u>	<u>BG LMM kolekcija</u>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	<u>BGAZEJ 1-49, BGVLJ1-54</u>	<u>BG LMM kolekcija</u>
<i>Lactobacillus divergens</i>	742	<u>BG LMM kolekcija</u>
<i>Lactobacillus farciminis</i>	<u>BGKAVS2-48</u>	<u>BG LMM kolekcija</u>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<u>BGHO36, BGHO64, BGG08-47, BGG09-38</u>	<u>BG LMM kolekcija</u>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<u>BGH089, BGHi7</u>	<u>BG LMM kolekcija</u>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<u>BGTRM7-58</u>	<u>BG LMM kolekcija</u>

<i>Lactobacillus plantarum</i>	BGZLS20-20, BGZLS30-41, ZLS60-43, BGZLS60-58, BGA _n 8, BGP _{IR} 13, LMM1, BGPV2-45a, BGZB19, BGSJ1-10, BGSJ3-18, BGCH2P, BGFD50, BGGA8, BGAZES2-8, BGAZES2-87, BGAZES2-67, BGAZEJ3-32, BGMI1, BGHO10, BGHN40, A112, BGKAVS2-46, BGKAVS4-9, BGGO5-3, BGGO5-28, BGGO7-25, BGGO7-29, BGGO7-30, BGGO11-3, BGGO11-22, BGGO11-47, BGV _L 1-24, ZGPR2-25, ZGPR2-42, ZGPR3-17, ZGPR3-18, ZGPR3-19, ZGZA7-7, ZGZA7-44, BGV _L 2a-5, BGV _L 2a-18, BGV _L 2a-21, BGV _L 2a-30, BGV _L 2a-41, BGV _L 2a-89, BGNV1-73, BGKAVS2-13, BGKAVS3-67, BGKAVS3-38, BGKAVS4-12	BG LMM kolekcija
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	BGCG11, BGZLS60-58, BGKP15, BGZLS60-58, BGKAVS2-20, BGGR1-25	BG LMM kolekcija
<i>Lactobacillus paracasei</i>	BGZLM1-2, BGAZEJ1-52a, BGAZES1-89, BGAZES2-77, BGLI15, BGLI18, BGAR88-2, BGAR89-2, BGAR98-2, BGAR99-1, BGGR2-20, BGGR2-59, BGGR2-66, BGGR2-94, BGNK1-31, BGNK1-70, BGNK1-80, BGNK1-99, BGNJ1-3, BGNJ1-61, BGNJ1-70, BGGO8-18, BGDP9-85, BGKO1-44	BG LMM kolekcija
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	BGAR75, BGAR76, BGUB9, BGKP20, BGBUK2-16, BGHN14, BGZLS45-25, BGZLS45-49, BGZLS45-50, BGZLS10-1, BGZLS10-6, BGZLS20-1, BGZLS60-32, BGZLS60-50, BGZLM1-1, BGZLM1-4, BGSJ2-8	BG LMM kolekcija
<i>Lactobacillus parabruchneri</i>	BGNV1-24	BG LMM kolekcija
<i>Lactobacillus pentosus</i>	BGKAVS2-70	BG LMM kolekcija
<i>Lactobacillus reuteri</i>	BGGO6-55	BG LMM kolekcija
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BGT 10, BGGO3-41a, BGGO5-47, BGZL18	BG LMM kolekcija
<i>Lactobacillus salivarius</i>	BGH01	BG LMM kolekcija
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	BGJK1-36	BG LMM kolekcija
<i>Lactobacillus sucicola</i>	BGGO6-41, BGGO9-18, BGGO7-28	BG LMM kolekcija
<i>Lactococcus garlicum</i>	BGPT9-44, BGPT9-45	BG LMM kolekcija
<i>Lactococcus garvieae</i>	BGDK2-25, BGTRM7-59, BGRE2-21, BGGO2-13, BGGO2-14, BGGO1-19	BG LMM kolekcija
<i>Lactococcus lactis</i>	BGAR8, BGTRK1-19, BGZLS10-33	BG LMM kolekcija
<i>Lactococcus lactis</i> subsp.	Wg2, NS1	BG LMM

<i>cremoris</i>		kolekcija
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	BGZLS10-33, BGZLS10-35, BGSM19, NP45, BGKF26, BGMN1-5, BGMN1-596, BGIS29, BGKP1, BGVL2a-1, BGVL2a-2, BGVL2-8, BGVL2a-88, BGZLM1-24, BGZLS1-11, BGLE1-6, BGLE1-12, BGAL2-10, BGAL3-40, BGVL1-1, BGRE2-53, ZGPR1-51, ZGPR2-4, ZGPR2-11, ZGBP4-1, ZGBP4-2, ZGBP5-9, ZGBP5-32, ZGBP5-51, ZGBP6-51, ZGZA7-6, ZGZA7-10, ZGZA8-39, ZGZA8-40, ZGZA9-2, BGG08-2, BGG010-17, BGZLS10-34	BG LMM kolekcija
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>	S50, BGTRS7-20, BGAL1-1, BGAL1-4, BGBU1-4, BGBU1-26, ZGZA9-11	BG LMM kolekcija
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis/cremoris</i>	BGTRS1-57	BG LMM kolekcija
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis/hordniae</i>	BGTRS7-36	BG LMM kolekcija
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	BGTRK10-1	BG LMM kolekcija
<i>Leuconostoc citreum</i>	BGVL2-25	BG LMM kolekcija
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BGMK1-13a, BGTRK10-19, BGTRS7-21, BGTRS1-2, BGG011-17, BGVL1-13, BGNJ1-45	BG LMM kolekcija
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	BGTRM1-61	BG LMM kolekcija
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	BGVL2a-11, BGKAVS4-8	BG LMM kolekcija
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	BGKAVS3-23, BGTRK4-3, BGLE1-36, BGAL3-43, ZGPR1-27, ZGBP4-14, BGVL2-29	BG LMM kolekcija
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	BGVL2a-51, BGBK1-8	BG LMM kolekcija
<i>Enterococcus</i> sp.	BGAZES1-50, BGAZES1-12	BG LMM kolekcija
<i>Enterococcus durans</i>	BGG05-13, GO11-33, BGAL1-39, BGAL3-19, BGBU1-41, ZGPR1-19, ZGBP4-24,	BG LMM kolekcija
<i>Enterococcus faecalis</i>	BGLE1-13, BGVL1-61, BGBU1-16, BGRE2-24, ZGPR2-9, ZGPR3-6, ZGPR3-16, ZGBP6-53, ZGBP6-55, ZGZA7-1, ZGZA7-2, ZGZA7-15, ZGZA9-15, ZGZA9-25, ZGBP6-22	BG LMM kolekcija
<i>Enterococcus faecium</i>	BGAZES1-44, BGAZEJ1-48, BGG05-36, BGAL2-53, BGAL3-54, BGBU1-42, BGRE2-43, BGRE2-57, ZGPR1-54, ZGPR1-55, ZGBP5-20,	BG LMM kolekcija
<i>Enterococcus sulphureus</i>	BGJB9-29	BG LMM kolekcija

<i>Streptococcus</i> sp.	BGS36	BG LMM kolekcija
<i>Streptococcus bovis</i>	BGLE1-14, BGLE1-16, BGAL1-5, BGAL1-14,	BG LMM kolekcija
<i>Streptococcus macedonicus</i>	BGBK1-46a	BG LMM kolekcija
<i>Streptococcus mitis</i>	BGTRK7-38	BG LMM kolekcija
<i>Streptococcus thermophilus</i>	BGAZEJ2-2, BGAZEJ3-7, BGAZEJ3-27, BGAZEJ3-30, BGVLJ1-44, KO1-22, KO1-26/2, S39, S389, BGTRM4-55, ZGBP4-17, BGGR3-12, BGGO10-7	BG LMM kolekcija
<i>Streptococcus suis/bovis</i>	BGDK1-17	BG LMM kolekcija
<i>Weissella confusa</i>	BGBK1-40	BG LMM kolekcija

3.2. Podloge za rast bakterija

Za kultivisanje sojeva rodova *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, i *Weissella* korišćen je MRS tečni medijum, pH 5,7 (Mersk GmbH Darmštat, Nemačka). Za kultivisanje sojeva rodova *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* i *Listeria* s korišćen je M-17 tečni medijum (Merck) u koji je dodavana glukoza (5 g/l) (GM-17). Za kultivaciju sojeva rodova *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia*, *Citrobacter* i *Bacillus* korišćen je Luria-Bertani (LB) tečni medijum (0,5% natrijum hlorid, 1% tripton i 0,5% ekstrakt kvasca). Za kultivaciju sojeva *Staphylococcus* korišćen je Brain heart infusion (BHI) tečni medijum (Oxoid, Hampshire, Velika Britanija). Bakterije su gajene na 30°C ili na 37°C, u zavisnosti od toga da li su sojevi mezofilni ili termofilni, u aerobnim ili mikroaerofilnim uslovima.

Čvrste podloge dobijane su dodavanjem 1,5 % agara u odgovarajući tečni medijum. Svi medijumi su sterilisani u autoklavu 15 minuta na 121°C. Sojevi mlečnokiselinskih bakterija čuvani su u odgovarajućem medijumu za rast sa 15 % glicerolom na -80°C.

3.3. Metoda za izolovanje ukupne dezoksiribonukleinske kiseline iz mlečnokiselinskih bakterija

Izolacija ukupne dezoksiribonukleinske kiseline (DNK) vršena je po već opisanoj metodi (Hopwood, 1985). Talog dobijen centrifugiranjem (Eppendorf 5424, Hamburg, Nemačka, 15871 x g, 10 minuta) 10 ml kulture u logaritamskoj fazi rasta (OD 0,6-0,8) opran je u 500 µl TEN pufera (50 mM TRIS-HCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8), pa resuspendovan u 500 µl PP pufera (40 mM NH₄-acetat, 10 mM Mg-acetat, 0,5 M saharoza, pH 7) sa lizozimom 7 mg/ml i inkubiran 30 minuta na 37°C. Nakon inkubacije dodato je 250 µl 2 % SDS-a i intenzivno vorteksovano 1 minut. Dodavanjem 250 µl smeše fenol-hloroforma i centrifugiranjem (Eppendorf 5424, 4500 x g, 15 minuta) vršeno je odstranjivanje proteina. Ovaj korak je ponavljan sve do potpunog gubitka interfaze. Supernatant je pažljivo prebačen u nove mikrotube i dodata je 1/10 volumena nepuferisanog 3M Na-acetata i 1 volumen izopropanola. Precipitacija DNK je vršena centrifugiranjem 15 minuta (Eppendorf 5424, 15 871 x g). Ispiranje viška soli vršeno je dodavanjem 700 µl hladnog 70 % etanola i centrifugiranjem 5 minuta (Eppendorf 5424, 15 871 x g). Istaložena DNK je sušena na 42°C 20 - 30 minuta. Nakon sušenja DNK je resuspendovana u 50 µl bidestilovne vode sa 1 µl RNaze (10 mg/ml), i inkubirana 30 minuta na 37°C. Dobijene DNK čuvane su na -20°C do upotrebe.

3.4. Umnožavanje fragmenata DNK lančanom reakcijom polimeraze

Lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polimerase Chain Reaction, PCR*) vršeno je umnožavanje fragmenata DNK tako što je pripremana reakciona smeša koja sadrži: 1 X reakcioni pufer A (KAPA Taq Buffer A) sa 1,5 mM MgCl₂, dNTP smešu (svaki dNTP po 200 µM), prajmere (svaki po 0,4 µM), 1 U KAPA Taq DNK polimeraze (Kapa Biosystems, Boston, Masačusets, USA) i 100-500 ng DNK matrice. Korišćeni prajmeri prikazani su u Tabeli 2.

- Za amplifikaciju CoreF/CoreR prajmerima PCR ciklus se sastojao od: inicijalne denaturacije na 95°C 5 min, umnožavanja DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacije (95°C 30 s), hibridizacije prajmera (68°C 30 s) i elongacije prajmera (72°C 40 s). Finalna elongacija trajala je 5 min na 72°C.
- Prajmerima za umnožavanje dela gena za 16S rRNK rađena je amplifikacija, koja se sastojala od: inicijalne denaturacije na 95°C 5 min, umnožavanja DNK fragmenata u 30 ciklusa: denaturacije (95°C 30 s), hibridizacije prajmera (55°C 1 min) i elongacije prajmera (72°C 30 s). Finalna elongacija rađena je 7 min na 72°C.
- Prajmerima za umnožavanje gena za β -aktin pacova i čoveka rađena je amplifikacija korišćenjem istog programa kao i za gen za 16S rRNK.

Tabela 2. Prajmeri korišćeni u ovom radu

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera 5' - 3'	Referenca
Core R	TCATATTGACCGGTATAAGTGATGCCC	(Siragusa et al., 2007)
Core F	CCTCGAGAAGCCGATCGCTTAGTTCG	(Siragusa et al., 2007)
Uni16S Rev	AGGAGGTGATCCAGCCG	(Jovčić et al., 2009)
Uni16S Fw	GAGAGTTTGATCCTGGC	(Jovčić et al., 2009)
h β -actin Rev	TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAGCA	(Li et al., 2015)
h β -actin Fw	TTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGA	(Li et al., 2015)
pacovski β -actin Rev	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	(Mousavi et al., 2009)
pacovski β -actin Fw	AGCCATGTACGTAGCCATCC	(Mousavi et al., 2009)

3.5. Elektroforeza DNK

Elektroforeza totalne DNK i PCR-om umnoženih fragmenata i fragmenata DNK dobijenih rađena je na horizontalnom 1 % agaroznom gelu. Gelovi su pravljени

rastvaranjem agaroze u 1 X TAE puferu (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8) uz dodavanje etidijum bromida (0,5 µg/ml). Elektroforeza je tekla u 1 X TAE puferu pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela. Veličine PCR-om umnoženih fragmenata određivane su na agaroznim gelovima upoređivanjem dužine pređenog puta ispitivanih fragmenata sa dužinom puta koju su prešli DNK fragmenti poznate veličine. Kao DNK standard korišćen je GeneRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, Masačusets, Sjedinjene Američke Države).

3.6. Analiza produkcije γ -aminobuterne kiseline

Radi kvantifikacije γ -aminobuterne kiseline u supernatantima kultura odabranih sojeva mlečnokiselinskih bakterija, isti su gajeni 48 sati u MRS ili GM-17 medijumu sa dodatkom 0,6 % i 1 % Na-glutamata (engl. *monosodium glutamate MSG*) (Acros organics, Morris Plains, Nju Džerzi, Sjedinjene Američke Države). Čelije su istaložene centrifugiranjem (Eppendorf, 5424, 4500 x g, 15 minuta) i 1 ml supernatanta je uparen do 200 µl (Eppendorf, Vacufuge Concentrator), a zatim 2 puta razblažen sa 7 % sirćetnom kiselinom (J. T. Backer, Phillipsburg, Nju Džerzi, Sjedinjene Američke Države), da ne bi došlo do degradacije γ -aminobuterne kiseline. Uzorci su zatim ponovo centrifugirani (Eppendorf 5424, 8100 x g, 15 minuta), a potom korišćeni za analizu tankoslojnom hromatografijom (TLC) (Park et al., 2014) i tačnom hromatografijom visokih performansi (HPLC) (Holdiness, 1983).

3.6.1. Tankoslojna hromatografija

Na silika gel 60F₂₅₄ TLC ploču (Macherey-Nagel, Düren, Nemačka) nanet je 1 µl preparata dobijenog tretmanom supernatanta 48 sati starih kultura sojeva ili kontrola 7 % sirćetnom kiselinom. Kao kontrole korišćeni su odgovarajući medijumi za rast bakterija (MRS ili GM-17), medijumi sa Na-glutamatom, medijumi sa γ -aminobuternom kiselinom i medijumi u kojima su istovremeno bili Na-glutamat i γ -aminobuterna kiselina. Razvijanje

hromatograma urađeno je u smeši rastvarača koja se sastojala od n – butanola (J. T. Backer), sirćetne kiseline (J. T. Backer) i vode u odnosu 4:1:1. Nakon što je razvijanje hromatograma završeno ploča je osušena i urađena je vizuelizacija 0,2 % ninhidrinom (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, Sjedinjene Američke Države). Konverzija Na-glutamata u γ -aminobuternu kiselinu analizirana je ImageJ softverom.

3.6.2. Tečna hromatografija visokih performansi

Za HPLC analizu 100 μ l uzorka, preparata dobijenog tretmanom supernatanata kultura sojeva i GABA standarda (Sigma-Aldrich) 7 % sirćetnom kiselinom, profiltrirano je kroz filter 0,22 μ m (IC Millex-LG, Millipore, Sigma-Aldrich) i pomešano sa derivatizujućom supstancom feniltiokarbamidom (Rossetti i Lombard, 1996). Derivatizovani uzorci su rastvoreni u 200 μ l inicijalne mobilne faze, linije A (138 mM natrijum acetat, pH 6,3, 6 % acetonitril, 0,05 % trietil amin). HPLC razdvajanje vršeno je višestrukim gradijentom upotrebom linije A, linije B (acetonitril) i linije C (MiliQ voda) prema programu datom u Tabeli 3 na instrumentu Thermo Scientific 3000, korišćenjem Hypersil gold column (Thermo Fisher Scientific, 150 x 4,6, 5 mm). Koncentracija γ -aminobuterne kiseline u uzorcima izračunata je na osnovu standardne krive.

Tabla 3. Elucioni program za detekciju γ -aminobuterne kiseline

Vreme (min)	Linija A	Linija B	Linija C	Protok (ml/min)
0	60 %	12 %	28 %	0,6
6	60 %	12 %	28 %	0,6
6,1	20 %	13,5 %	66,5 %	0,4
22	20 %	13,5 %	66,5 %	0,4
25	60 %	12 %	28 %	0,6
40	60 %	12 %	28 %	0,6

3.7. Probiotička karakterizacija odabranih sojeva

3.7.1. Preživljavanje u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta

Preživljavanje bakterija u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta rađeno je po već opisanoj metodi (Sánchez et al., 2010). Deset mililitara prekonoćne kulture testiranih bakterija oboreno je (Eppendorf 5804, 4500 x g, 10 minuta) i talog je opran 2 puta u po 10 ml 0,85 % NaCl (fiziološki rastvor) (Eppendorf 5804, 4500 x g 10 minuta). Zatim su suspenzije bakterija razblažene u 8 ml želudačnog soka (125 mM NaCl, 7mM KCl, 45mM NaHCO₃, 0,3 % pepsin (engl. *pepsine from porcine gastric mucosa* Sigma-Aldrich), puferisan korišćenjem HCl do pH 2) sa 2 ml 10 % rekonstituisanog sterilisanog obranog mleka (BD, Difco®, Becton Dickinson, NJ, SAD) i inkubirane 90 minuta na 37°C u mikroaerofilnim uslovima uz mešanje na 180 rpm. Nakon inkubacije suspenzije su centrifugirane (Eppendorf 5804, 4500 x g, 10 minuta) i resuspendovane u 10 ml dvanaestopalačnog soka (1 % goveđa žuč, puferisan sa 10 N NaOH do pH 8) i inkubirane dodatnih 10 minuta na 37°C u mikroaerofilnim uslovima. Čelije su potom oborene (Eppendorf 5804, 4500 x g, 10 minuta) i resuspendovane u 10 ml crevnog soka (0,3 % goveđa žuč, 0,1 % pankreatin (engl. *pancreatin from porcine pancreas*, Sigma-Aldrich) i inkubirane 120 minuta na 37°C u mikroaerofilnim uslovima. Određivanje broja preživelih bakterija je rađeno pre tretmana, kao i nakon svake faze prolaska kroz simulirane slove gastrointestinalnog trakta. Serijska razblaženja (od -1 do -7) su pravljena u fiziološkom rastvoru.

3.7.1.1. Tolerancija kiselih uslova želudačnog soka pH 2 u prisustvu obranog mleka, proteina mleka i mucina

Mleko u prahu (Mlekara d. o. o., Pančevo, Srbija), β laktoglobulin (Sigma-Aldrich) i mucin (Sigma-Aldrich) resuspendovani su u želudačnom soku pH 2 u koncentraciji 1 mg/ml. Obrano mleko je pripremljeno u skladu sa uputstvom proizvođača u količini od 110 mg/ml. Deset mililitara prekonoćnih kultura je oboreno (Eppendorf 5804, 4500 x g, 10

min), oprano 2 puta u fiziološkom rastvoru i resuspendovano u 10 ml odgovarajućeg želučanog soka koji je sadržao protein mleka, β -laktoglobulin, obrano mleko ili mucin. Mešavine su inkubirane mikroaerofilno 2 h na 37°C. Tolerancija testiranih sojeva izračunata je kako je opisano u prethodnom odeljku.

3.7.2. Test mikrodilucije

Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije antibiotika (MIK) urađeno je testom mikrodilucije u ISO medijumu (Iso-Sensitest Broth, Oxoid). MIK vrednosti osam antibiotika (ampicilin, gentamicin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, klindamicin, tetraciklin, i hloramfenikol) su određene u skladu sa preporukama EFSA (2012). Odgovarajuće kulture bakterijskih ćelija (20 μ l) dodate su u bunare mikrotitarske ploče (Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) u kojima su se nalazile rastuće koncentracije rastvorenih antibiotika u 180 μ l ISO medijuma. Gustina ćelija je praćena pomoću merenja optičke gustine na 600 nm (OD 600), posle 24 h inkubacije na 37°C, u čitaču mikrotitarskih ploča (engl. *microtiter plate reader*) (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austrija). Rezultati su tumačeni prema preporuci EFSA (2012), a najniža koncentracija antibiotika na kojoj nije detektovan rast bakterija uzeta je kao MIC vrednost. Eksperimenti su urađeni u triplikatu.

3.7.3. Test hemolitičke aktivnosti

U cilju određivanja hemolitičke aktivnosti odabrani sojevi bakterija su striklovani na Kolumbija agaru sa 5 % ovčje krvi (Oxoid) i inkubirani 48 sati na 37°C prema prethodno opisanom protokolu (Argyri et al., 2013). Petri šolje sa krvnim agarom su ispitivane na prisustvo β -hemolize (jasne, providne zone oko kolonija), koje ukazuju na produkciju β -hemolizina i lizu eritrocita, i α -hemolize (zone zelene boje oko kolonija), koja ukazuje na oksidisanje hemoglobina u methemoglobin.

3.7.4. Test želatinozne aktivnosti

Test želatinozne aktivnosti izveden je kako je opisano u radu Su i koautora (1991). Odabrani sojevi su rasli na čvrstoj podlozi sa 3 % želatina (Oxoid) 48 sati na 37°C, a zatim su preliveni zasićenim rastvorom amonijuma sulfata (550 mg/ml) (Centrohem, Stara Pazova, Srbija). Prozirni oreol oko ćelija i želatinozni talog bili su indikator sinteze želatinaze. Soj *E. faecalis* V583 (Paulsen, 2003) korišćen je kao pozitivna kontrola navedenom testu.

3.7.5. Antimikrobna aktivnost

Odabrani sojevi kao i supernatanti kultura tih sojeva su testirani u triplikatu na prisustvo antimikrobne aktivnosti protiv klinički relevantnih patogena: *Bacillus cereus* ATCC11778, *Bacillus spizizeni* ATCC6633, *Citrobacter freundii* ATCC43864, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Escherichia coli* ATCC25922, *Listeria innocua* ATCC 3090, *Listeria ivanovii* ATCC19119, *Listeria monocytogenes* ATCC19111, *Proteus hauseri* ATCC13315, *Proteus mirabilis* ATCC12453, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Rhodococcus equi* ATCC6936, *Salmonella enterica* C29039, *Salmonella typhimurium* ATCC14028, *Shigella sonnei* ATCC 29930, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 i *Yersinia enterocolitica* ATCC27729. Prisustvo antimikrobnih jedinjenja testirano je u prekonocnim kulturama odabranih sojeva i njihovim supernatantima, dobijenim posle centrifugiranja (Eppendorf 5804, 4500 x g, 10 min). Testiranje antimikrobne aktivnosti na patogene sojeve urađeno je difuzionim testom u bunarićima. Meki LB i BHI meki agar (0,7% agara) sa patogenim sojevima je preliven preko LB i BHI Petri šolja i bunarići su napravljeni u očvrslom mekom agaru. Alikvoti (50 µl) prekonocnih kultura i supernatanta naliveni su u bunariće, a na ivicu bunarića je sterilnim čačkalicama nanošen kristal pronaze E. Jasne zone inhibicije oko bunarića uzimane su kao znak antimikrobne aktivnosti. Odsustvo zone inhibicije oko kristala pronaze E ukazuje na proteinsku prirodu antimikrobnog jedinjenja.

3.8. Čelije korišćene u *in vitro* eksperimentima

Efekti sojeva i njihovih ekstrakata su ispitivani na Caco-2 ćelijama (Evropska kolekcija ćelijskih kultura, ECACC, br. 86010202) i ćelijama izolovanim iz mezenteričnih limfnih čvorova (MLNC) ženki Dark Agouti (DA) pacova. Caco-2 ćelije su gajene u CO₂ inkubatoru u vlažnoj atmosferi sa 5 % CO₂ na 37°C u DMEM medijumu (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*), dok su MLNC gajene pod istim uslovima, ali u RPMI 1640 medijumu. DMEM i RPMI medijumi obogaćivani su dodavanjem 10 % fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*), 2 mM L-glutamina, 100 µg/ml sterptomocina i 100 U/ml penicilina. Sve navedene hemikalije za obogaćivanje medijuma nabavljene su od Gibco, Life Technologies, Waltham, Masačusets, Sjedinjene Američke Države. Do postavljanja u ploče i izvođenja eksperimenata Caco-2 ćelije su gajene u flaskovima T-75 (Sarstedt) i pasažirane svakih 5 dana, a za odlepljivanje ćelija sa površine flaskova korišćen je 0,25 % tripsin sa dodatkom 1 mM EDTA (Torlak, Beograd, Srbija).

3.9. Adhezija odabranih sojeva, proizvođača γ -aminobuterne kiseline, za Caco-2 ćelije

Caco-2 ćelijska linija korišćena je za određivanje adhezivne sposobnosti odabranih sojeva bakterija. Caco-2 ćelije (2×10^5 ćelija po bazenu) su postavljene u ploče sa 24 bunara (Sarstedt) i gajene do formiranja konfluentnog sloja. Prekonoćne kulture (16 h) odabranih sojeva bakterija oprane su 2 puta u PBS-u (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ i 2 mM KH₂PO₄) (Eppendorf 5424, 15871 x g, 5 min) i pelet je resuspendovan u DMEM medijumu bez antibiotika. Ćelijski sloj je takođe pažljivo opran PBS-om pa su bakterijske suspenzije dodate u odnosu 10:1 (bakterijske ćelije : eukariotske ćelije). Nakon inkubacije u CO₂ inkubatoru na 37°C 1 h ćelije su pažljivo oprane, kako bi se isprale nevezane bakterijske ćelije, a zatim su adherirane ćelije odlepljene korišćenjem 0,25 % tripsin-EDTA rastvora (Torlak). Serijska razblaženja su pravljena u PBS-u i nakapavana na odgovarajuće čvrste podloge. Adhezija, izražena u procentima, računata je kao CFU (engl.

colony-forming unit) adheriranih bakterija podjeljeno sa CFU dodatih bakterija. Eksperimenti su ponovljeni tri puta u triplikatu.

3.10. Test kompetitivne ekskluzije

Ekskluzija patogena *E. coli* ATCC25922 i *S. enterica* C29039 odabranim sojevima urađena je na Caco-2 ćelijama (2×10^5 ćelija po bunaru) po prethodno opisanoj metodi (Živković et al., 2016). Bakterijske kulture oprane su 2 puta u PBS-u (Eppendorf 5424, 15871 x g, 5 min) i resuspendovane u DMEM medijumu bez antibiotika. Bakterijske suspenzije sa patogenim vrstama ili sa kombinacijom patogenih vrsta i odabranih MKB sojeva u odnosu 1:1 dodate su na Caco-2 sloj u odnosu 10:1 (bakterijske ćelije:eukariotske ćelije) i inkubirane u CO₂ inkubatoru tokom 1 h. Nakon inkubacije sloj Caco-2 ćelija pažljivo je pran PBS-om, a adherirane ćelije odlepljene korišćenjem 0,25% tripsin-EDTA rastvora (Torlak). Adhezija *E. coli* i *Salmonella* izračunata je pravljjenjem serijskih razblaženja u PBS-u i nakapavanjem na LA čvrste podloge: (CFU adheriranih bakterija/CFU dodatih bakterija) x 100. Da bi se odredila sposobnost odabranih sojeva da spreče vezivanje *E. coli* i *Salmonella* za Caco-2 ćelije dobijeni podaci su normalizovani podacima dobijenim za vezivanje samih *E. coli* i *Salmonella*. Eksperiment je ponovljen tri puta u triplikatu.

3.11. Analiza integriteta epitela, indukcija inflamacije sa IL-1 β u Caco-2 ćelijama i tretmani supernatantima 48 sati stare kulture soja *Lb. brevis* BGZLS10-17

Diferencirane Caco-2 ćelije korišćene su za analizu efekata supernatanta kulture soja BGZLS10-17 gajene 48 sati na ekspresiju proteina čvrstih veza (zonulina, okcludina i klaudina) i ekspresiju iRNK citokina IL-8 i TGF- β . Caco-2 ćelije (2×10^5 ćelija po bunaru) su postavljene u ploče sa 24 bunara (Sarstedt) i gajene do formiranja konfluentnog sloja nakon čega su diferencirane tokom 21 dana. Medijum za kultivaciju ćelija menjan je svaki

drugi dan tokom 21 dana diferencijacije ćelija. Odabrani bakterijski soj gajen je u odgovarajućem medijumu i prema HPLC analizi nije bilo proizvodnje γ -aminobuterne kiseline. Da bi se stimulisala proizvodnja γ -aminobuterne kiseline, u odgovarajući medijum za rast bakterija dodato je 0,6 % Na-glutamata. Diferencirane Caco-2 ćelije tretirane su supernatantom 48 sati sate kulture odabranog soja koncentracije 0,625, 1,25 i 2,5 %, u kojima se na osnovu HPLC analize nalazilo 1 mM, 2 mM odnosno 4 mM γ -aminobuterne kiseline. Supernatant kulture odabranog soja, gajen u odgovarajućem medijumu bez dodatka Na-glutamata, (finalne koncentracije 2,5 %) korišćen je kao kontrola. Supernatant kulture istog soja, gajen u medijumu bez Na-glutamata, ali sa dodatkom sintetičke γ -aminobuterne kiseline u istoj koncentraciji koju je produkovao i sam soj, korišćen je kao dodatna kontrola u cilju korelacije efekata supernatanta sa γ -aminobuternom kiselinom proizvedenom od strane bakterija. Supernatanti su dobijeni iz 48 sati stare bakterijske kulture, neutralisani do pH oko 7 i filtrirani kroz 0,22 μ m filtere (Sarstedt). Diferencirane Caco-2 ćelije su tretirane rekombinantnim, humanim IL-1 β koncentracije 10 ng/ml (R&D sistemi, Minneapolis, Minesota, Sjedinjene Američke Države) i različitim BGZLS10-17 supernatantima. Svi tretmani su trajali 24 sata, a eksperiment je ponovljen u tri puta u triplikatu.

3.12. Eksperimentalne životinje

Za *in vitro* i *in vivo* eksperimente korišćene su ženke Dark agouti (DA) pacova (stare od 8 do 10 nedelja, mase 200-250 g). Životinje su uzgajane na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u standardnim uslovima: u sobi sa kontrolisanom temperaturom (22 \pm 1 °C) uz neograničen pristup vodi i hrani i uz smenjivanje ciklusa svetlo/tama na 12 h. Svi eksperimenti su odobreni od strane Etičkog komiteta Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu (broj dozvole 03-1/15) i izvedeni u skladu sa relevantnim međunarodnim smernicama i propisima ([Directive 2010/63/EU](#)).

3.13. Izolacija i tretman ćelija mezenteričnih limfnih čvorova

Mezenterični limfni čvorovi (engl. *mesenteric lymph nodes*, *MLN*) su izolovani iz DA pacova, a iz njih su izolovane ćelije (engl. *mesenteric lymph node cells*, *MLNC*). MLN su homogenizovani u PBS-u sa dodatkom 100 µg/ml streptomocina i 100 U/ml penicilina potiskivanjem i filtriranjem kroz mrežice dijametra 70 µm. Vijabilnost ćelija kao i broj ćelija praćen je bojenjem ćelija Tripan plavom bojom i broj živih (neobojenih) ćelija analiziran je na svetlosnom mikroskopu (Olympus, Shinjuku, Tokio, Japan). Suspenzija MLNC ($2,5 \times 10^6$ / ml) resuspendovana je u RPMI-1640 medijumu i čuvana do 72 h u CO₂ inkubatoru. MLNC su bile tretirane supernatantima kulture soja BGZLS10-17 sledećih koncentracija: 0,625 %, 1,25 %, 2,5 %, 5 % i 10 % i stimulisane konkanavalinom A (Kon-A) (Sigma-Aldrich) 24 ili 72 h. Za analizu autofagnog fluksa MLNC su bile tretirane sa 25 µM hlorokina (engl. *chloroquine*, *CQ*) istovremeno kad i supernatantima. Supernatanti korišćeni za tretmane, kao i kontrolni supernatanti, pripremani su kao što je već opisano u odeljku 3.11. Nakon 24 ili 72 sata inkubacije MLNC i njihovi supernatanti su sakupljeni i čuvani na -80 °C odnosno na -20 °C do dalje analize.

3.14. RNK interferencija

U cilju ispitivanja uloge autofagije u imunosupresiji posredovanoj supernatantima kulture soja BGZLS10-17 *ATG5* (engl. *autophagy-related gene*) gen u MLNC je inaktiviran korišćenjem RNK interferencije. MLNC su oprane dva puta u OptiMEM medijumu (ThermoFisher Scientific) i postavljene u ploče (1×10^6 ćelija / bunaru) sa 24 bunara u OptiMEM medijumu. MLNC su transfekovane malim interferirajućim RNK (engl. *small interfering RNA*, *siRNA*) radi utišavanja *ATG5* gena (si+ *ATG5*) ili siRNK sa nasumično rearanžiranom nukleotidnom sekvencom (si-) prema preporuci proizvođača Ambion, Applied Biosystems, Waltham, Masačusets, Sjedinjene Američke Države, korišćenjem reagensa za transfekciju Lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific). Nakon 8 sati transfekcije OptiMEM medijum zamenjen je RPMI-1640 medijumom za

narednih 16 sati, a zatim su transfektovani MLNC tretirani supernatantima kulture soja BGZLS10-17 koncentracije 2,5 %, prethodno opisanim u poglavlju 3.11., naredna 24 sata. Nakon tretmana MLNC i njihovi supernatanti su sakupljeni i čuvani do dalje analize.

3.15. LDH esej

LDH (engl. *lactate dehydrogenase*) esej je korišćen merenje citotoksičnosti različitih tretmana na Caco-2 ćelijama i ćelijama izolovanim iz mezenteričnih limfnih čvorova. Citotoksičnost se određuje merenjem aktivnosti oslobođene laktat dehidogenaze u supernatantima kultura ćelija prema uputstvima proizvođača korišćenjem komercijalnog kita (ThermoFisher Scientific).

3.16. MTT esej

Metabolička aktivnost ćelija izolovanih iz mezenteričnih limfnih čvorova nakon tretmana praćena je MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromid] (Serva, Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka) esejem po protokolu koji je prethodno opisao Mosmann (1983). Nakon tretmana, MTT rastvoren u RPMI medijumu, bez fenol crvenog, finalne koncentracije 0,5 mg/ml dodat je na ćelije. Nakon 4 h inkubacije u CO₂ inkubatoru 10 % SDS sa 0,01 N HCL je dodat da rastvori formazan. Apsorbanca je merena na čitaču mikrotitarskih ploča (Tecan) na talasnoj dužini 570 nm sa referentnom talasnom dužinom na 640 nm. Rezultat je predstavljen kao procenat metaboličke aktivnosti tretiranih ćelija upređenih sa kontrolnim ćelijama (100 %).

3.17. Određivanje proliferacije ćelija izolovanih iz mezenteričnih limfnih čvorova

Da bi bio analiziran efekat tretmana na poliklonalnu proliferaciju MLNC stimulisane sa Kon-A, ćelije su bile obeležene karboksifluorescein sukcinimidil estrom (engl. *carboxyfluorescein succinimidyl ester*, *CFSE*) koncentracije 1 μ M prema preporuci proizvođača (ThermoFisher Scientific), a zatim tretirane sa Kon-A koncentracije 2,5 μ g/ml (Sigma-Aldrich) u prisustvu tretmana supernatantima ili bez njih (kontrola). Proliferacija CFSE obeleženih MLNC analizirana je u populaciji živih ćelija, koje su određene istovremenim bojenjem ćelija propidijum jodidom (PI), 10 μ g/ml (Sigma-Aldrich), protočnom citofluorimetrijom. Procenat proliferacije određen je korišćenjem FCS Eskpres 4 softvera (De Novo Software, Glendale, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države). Relativna proliferacija u testovima supresije izračunata je kao procenat proliferacije u odnosu na kontrolu (100%).

3.18. Kvantifikacija citokina

Koncentracija citokina u supernatantima ćelijskih kultura MLNC nakon tretmana 24 i 72 h određena je enzimski vezanim imunosorbentnim testom (engl. *enzyme linked immunosorbent assay*, *ELISA*). Za detekciju IL-10 i IFN- γ , specifični DuoSet ELISA testovi su korišćeni u skladu sa uputstvima proizvođača (R&D Systems). Za detekciju IL-17A, korišćen je ELISA Read-SET-Go pacovski IL-17A (homodimer) prema uputstvima proizvođača (eBioscience, San Diego, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države). Uzorci su analizirani u duplikatima i rezultati su izračunati korišćenjem standardnih kriva.

3.19. Izolacija RNK iz ćelija

Izolacija totalne RNK iz Caco-2 ćelija i MLNC urađena je po prethodno opisanoj metodi (Lukic et al., 2013). Ćelije su resuspendovane u denaturišućem rastvoru (4M

guanidin tiocijanat, 25 mM natrijum-citrat, 0,1 M 2-merkaptetoetanol i 0,5% natrijumova so N-lauroilsarkozin), zatim je dodata jednak volumen kiselog fenola, pH 4, 1/10 volumena 2M natrijum-acetata, pH 4 i 1/5 volumena hloroforma. Homogenati ćelija su zatim pažljivo izmućkani i ostavljeni da stoje na ledu 15 min pa potom centrifugirani (Eppendorf 5417R, 17949 x g, 20 min, 4°C) i gornja faza prebačena u nove tube. RNK je precipitirana dodatkom izopropanola i inkubacijom na -20°C 30 min i potonjim centrifugiranjem (Eppendorf 5417R, 17949 x g, 20 min, 4 °C). Talog je zatim resuspendovan u denaturišućem puferu, a postupak precipitacije je ponovljen. Nakon druge precipitacije dodat je 75 % etanol i smeša je centrifugirana (Eppendorf 5417R, 17949 x g, 20 min, 4 °C). Sušenje taloga trajalo je 15 min na sobnoj temperaturi, a nakon toga usledilo je resuspendovanje taloga u bidestilovanoj vodi bez RNaza. Koncentracije RNK merene su na Nanovue Plus spektrofotometru (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Sjedinjene Američke Države). RNK su čuvane na -80 ° C do dalje upotrebe.

3.20. Reverzna transkripcija

Sinteza komplementarne DNK (engl. *complementary DNA*, *cDNK*) urađena je po preporuci proizvođača (ThermoFisher Scientific). Kao matrica za sintezu cDNK korišćeno je 200 ng RNK izolovane iz Caco-2 ćelija i 500 ng RNK izolovane iz MLNC. Smeša određene koncentracije RNK, 100 pmol nasumičnih heksamera i bidestilovane vode, do finalne zapremine od 13 µl, inkubirana je na 65 °C radi denaturisanja sekundarnih struktura RNK. Nakon toga u reakciju je dodato: 20 U RiboLock ribonukleaznog inhibitora, 1 mM dNTP smeše, 200 U RevertAid H Minus reverzne transkriptaze i 1 × reakcionog pufera, do finalne zapremine od 20 µl. Paralelno je za svaki uzorak postavljena i reakcija bez reverzne transkriptaze da bi se proverila potencijalna kontaminacija genomskom DNK. Uslovi reverzne transkripcije bili su: 10 min na 25°C, 60 min na 42°C i 10 min na 70°C. Provera sintetisane cDNK i odsustvo kontaminacije urađeno je PCR metodom korišćenjem prajmera za β aktin čoveka za Caco-2 ćelije i β-aktin pacova za MLNC. Sekvence prajmera predstavljene su u Tabeli 2.

3.21. Kvantitativni PCR

Za kvantifikaciju ekspresije gena metodom kvantitativni PCR (engl. *quantitative, qPCR*) korišćena je cDNK kao matrica, razblažena 10 puta. Reakciona smeša je sadržala: 4 pmol prajmera, 1 x KAPA SYBR FAST Universal Master Mix (Kapa Biosystems), 0,2 µl Rox low referentne boje i 1 µl cDNK. Kvantitativni PCR urađen je aparatom 7500 Real Time System (Applied Biosystems) korišćenjem sledećeg programa: aktivacija enzima 3 min na 95°C i 40 ciklusa od po 15 s na 95°C i od po 60 s na 60°C. Korišćeni prajmeri prikazani su u Tabeli 4 i 5. Efikasnost prajmera i procena količine cDNK potrebne reakciju određeni su esejem apsolutne kvantifikacije. U esejju relativne kvantifikacije ekspresija gena izračunata je po formuli $2^{-\Delta\Delta Ct}$ iz rada Livak i Schmittgen (2001). Vrednost $\Delta\Delta Ct$ (Ct , pražna vrednost ciklusa) jeste razlika između ΔCt željenog uzorka i ΔCt uzorka koji je definisan kao kalibrator, dok je vrednost ΔCt razlika između Ct vrednosti dobijene za ciljani gen i Ct vrednosti dobijene za konstitutivno eksprimirani gen (β -aktin, unutrašnja kontrola). Kao kalibratori postavljene su netretirane ćelije Caco-2 ćelije ili MLNC.

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za qPCR, za umnožavanje cDNK sekvenci čoveka

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera 5' - 3'	Referenca
β -aktin Rev	TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAGCA	(Li et al., 2015)
β -aktin Fw	TTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGA	(Li et al., 2015)
CLDN 4 Rev	GGAAGAACAAAGCAGAG	(Elamin et al., 2012)
CLDN 4 Fw	ACAGACAAGCCTTACTCC	(Elamin et al., 2012)
OCLN Rev	CATCAGCAGCAGCCATGTACTCTTCAC	(Elamin et al., 2012)
OCLN Fw	TCAGGGAATATCCACCTATCACTTCAG	(Elamin et al., 2012)
ZO-1 Rev	GCAGAGGTCAAAGTTCAAGGCTCAAGAGG	(Elamin et al., 2012)
ZO-1 Fw	AGGGGCAGTGGTGGTTTTCTGTTCTTTC	(Elamin et al., 2012)
cIL-8 Rev	ACACAGAGCTGCAGAAATCAGG	(Angrisano et al., 2010)
cIL-8 Fw	GGCACAAACTTTCAGAGACAG	(Angrisano et al., 2010)
TGF- β Rev	CCGGTTATGCTGGTTGTACAG	(Dragicevic et al., 2017)
TGF- β Fw	AAGGACCTCGGCTGGAAGTGG	(Dragicevic et al., 2017)

Tabela 5. Prajmeri korišćeni za qPCR, za umnožavanje cDNK sekvenci pacova

Naziv prajmera	Sekvenca prajmera 5' - 3'	Referenca
β -actin Rev	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	(Mousavi et al., 2009)
β -actin Fw	AGCCATGTACGTAGCCATCC	(Mousavi et al., 2009)
TGF- β Rev	ACCTCGACGTTTGGGACTGA	Ovaj rad
TGF- β Fw	GCTGAACCAAGGAGACGGAATA	Ovaj rad
FoxP3 Rev	CTGCTTGGCAGTGCTTGAGAA	(Mailleux et al., 2017)
FoxP3 Fw	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT	(Mailleux et al., 2017)
ULK1 Rev	GGGACGAACGACATGGAAGT	Ovaj rad
ULK 1 Fw	CTCCCAAGTGGGAACCATC	Ovaj rad
UVRAG Rev	GGGGCTCTCCTGTTACAAGT	Ovaj rad
UVRAG Fw	CTGTACACCTGACTCCCACG	Ovaj rad
Becl 1 Rev	AGGGAAGAGGGAAAGGACAG	Lična komunikacija
Becl1 Fw	CAATACCAGAATCCACAAAAGC	Lična komunikacija
ATG 5 Rev	TTCTGCAGTCCCATCCAGAG	Ovaj rad
ATG 5 Fw	CGGTGCAAGGATGCAGTTGAG	Ovaj rad
LC3 Rev	ACCAGCATCGTAGAGGGTCT	(Chen et al., 2014)
LC3 Fw	GACTTCCGGAAAGCTCTGCT	(Chen et al., 2014)
GABARAP Rev	CACTGGTGGGTCGAATGACA	Ovaj rad
GABARAP Fw	AAAGCTCGGATAGGGGACCT	Ovaj rad
p62 Rev	TCCTCCTTGGCTTTGTCTC	(Chen et al., 2014)
p62 Fw	TCCCTGTCAAGCAGTATCC	(Chen et al., 2014)

3.22. SDS-PAGE elektroforeza

Proteini su izolovani iz Caco-2 ćelija i MLNC korišćenjem RIPA pufera (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM, NaCl, 1% NP-40, 0,25% natrijum-dezoksiholat) u koji su dodati proteinazni inhibitor (Roche, Basel, Švajcarska) i 1 mM PMSF (Sigma_Aldrich). Koncentracija proteina određena je korišćenjem kita Pierce BCA Protein Assay Kit po preporuci proizvođača (ThermoFisher Scientific). Za razdvajanje proteina korišćena je SDS-poliakrilamidna gel (SDS-PAGE) elektroforeza. Proteini, ista koncentracija, iz svakog uzorka, resuspendovani su u 2 x Laemmli puferu (4% SDS, 20% glicerol, 10% β -merkaptoetanol, 0,004% bromfenol plavo i 125 mM Tris HCl, pH 6,8) i inkubirani 5 min na 95°C. Sistem gelova koji je korišćen za SDS-PAGE razdvajanje je diskontinuiran i sastojao se od gela za koncentrisanje i gelova za razdvajanje. Gel za koncentrisanje sastojao se od: 7% akrilamid/bisakrilamida, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,07% amonijum persulfata i 0,1% TEMED (Serva), dok se gel za razdvajanje sastojao od: 12% akrilamid/bisakrilamida, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,07% amonijum persulfata i 0,1% TEMED (Serva). Komponente pufera za elektroforezu bile su: 25 mM Tris, pH 8,3, 186 mM glicin i 0,1% SDS. Elektroforeza je tekla pri konstantnoj struji od 20 mA.

3.23. Western blot

Zastupljenost određenog proteina u ukupnim proteinima merena je Western blot metodom kao što je prethodno opisano (Dinić et al., 2017). Ukratko, ekstrahovani proteini (10 mg) razdvojeni su na 12% SDS-PAGE elektroforezi i prebačeni na 0,2 mm nitroceluloznu membranu (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Sjedinjene Američke Države) koristeći Bio-Rad Mini trans-blot sistem (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države). Nakon transfera proteina membrane su inkubirane u 10 % rastvoru obranog mleka (Merck) u TBST puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM, NaCl i 0,05% Tween-20) 1 h na sobnoj temperaturi kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela za membranu. Membrane su zatim inkubirane preko noći na 4°C sa anti-klaudin (CLDN-4)

antitelom (1: 1000; Novus Biologicals, Centennial, Kolorado, Sjedinjene Američke Države), anti-LC3B antitelom (1:2000, ThermoFisher Scientific) i anti- β -aktin antitelom (1: 1000; Thermo Fisher Scientific). Membrane su zatim bile isprane 3 puta po 15 min u TBST puferu i inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim kozijim anti-zečijim IgG antitelom obeleženim peroksidazom rena (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) (1: 10000, ThermoFisher Scientific). Nakon inkubacije i ispiranja 3 puta u TBST puferu na membrane je nanet ECL reagens (Immobilon Western, Merck Milipore) 5 min, a proteini su bili detektovani pojačanom hemiluminiscencijom, ovekovečenom na rendgenskom filmu. Intenzitet hemiluminiscencije je direktno proporcionalan količini proteina na membrani. ImageJ softver korišćen je za denzitometrijsku analizu ekspresije proteina i indukcija autofagije predstavljena je odnosom LC3 II i LC3 I forme proteina.

3.24. Protočna citofluorimetrija

Efekti supernatanta odabranog soja proizvođača γ -aminobuterne kiseline na fluks LC3 unutar MLNC analizirani su u MLNC, koje su prethodno tretirane sa 25 μ M CQ, sakupljenim nakon 24h protočnom citometrijom. Ekspresija funkcionalnih molekula na odabranim imunskim ćelijama izvršena je na MLNC koje nisu tretirane sa CQ. Sakupljene MLNC su isprane dva puta u PBS puferu koji je sadržao 0,1% NaN_3 i 2% FCS i površinski obojene sledećim, direktno konjugovanim mišjim anti-pacovskim monoklonskim antitelima (mAT): CD3 Aleksa Fluor 647 (klon: 1F4), CD11b Aleksa Fluor 647 (OKS-42), CD4 fikoeritrin (PE) (W3 / 25), MHC klasa II RT1B (OX-6) PE, CD68 (ED1) Aleksa 647, izotipska kontrola pacovskog IgG biotina, izotipska kontrola IgG Aleksa 647 (Bio-Rad), CD161 biotin (10/78), alfa E2 integrin (OX-62) biotin (R&D systems), CD80 PE (3H5), CD45R B220 FITC (HIS 24), izotipska kontrola pacovskog IgG (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nju Džerzi, Sjedinjene Američke Države), CD152 CTLA-4 (14D3) biotin, CD172a SIRP-a (P84) biotin, izotipska kontrola pacovskog IgG FITC (ThermoFisher Scientific). Nakon bojenja biotinom obeleženim mAT, ćelije su isprane i inkubirane 15 minuta sa streptavidinom PEci7 (Biolegend, San Diego, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države) i

zatim isprane sa PBS / NaN₃. Inkubacija ćelija sa antitelima za molekule ispoljene na površini ćelija usledila je nakon permeabilizacije i fiksacije pomoću BD fiksacionog / permeabilizacionog kita, prema protokolu proizvođača (BD Bioscience). Unutarćelijsko bojenje LC3 je izvedeno u puferu za permeabilizaciju korišćenjem zečijeg anti-pacovskog LC3 AT, praćeno kozjim anti-zečijim IgG Aleksa 647 ili kozjim anti-zečijim IgG Aleksa 488 (ThermoFisher Scientific). Zbog permeabilizacije, ovaj metod preferencijalno detektuje membransku formu proteina LC3II, u odnosu na citosolnu formu proteina LC3 I, a intenzitet boje se povećava obeležavanjem sa sekundarnim AT. Ćelije su analizirane u zavisnosti od njihove veličine i granularnosti nakon isključivanja dubleta, a kompenzacija je određena korišćenjem uzoraka obojenih jednom bojom. Nespecifična fluorescencija je detektovana na osnovu izotipskih kontrola, po principu fluorescencija minus jedan (engl. *fluorescence minus one, FMO*) kontrola ili, u slučaju detekcije LC3, izostavljanjem primarnog AT.

3.25. Imunomodulatorni efekat odabranog soja proizvođača γ -aminobuterne kiseline na modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa *in vivo*

Ženke DA pacova (starosti od 8 do 10 nedelja) uzgajane su u Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković. Po 5 pacova je držano u istom kavezu. Aktivni EAE je indukovao homogenatom kičmene moždine pacova (HKM) u PBS (50% v / v) emulgovanim u jednakoj zapremini kompletnog Frojovog adjuvansa (engl. *Complete Freund's Adjuvant, CFA*) (Difco, Detroit, Mičigen, Sjedinjene Američke Države). EAE je indukovao subkutanom imunizacijom u skočni zglob jednog zadnjeg ekstemiteta. Klinički tok razvoja bolesti (k.s.) praćen je na osnovu tipičnih simptoma EAE i bodovan prema sledećoj skali: 0 - nema k.s; 1 – atonija repa; 2 - pareza zadnjih udova; 3 - paraliza zadnjih udova; 4 - umiruće stanje ili smrt. Ukoliko su pojedini simptomi bili slabije izraženi korišćene su intermedijerne vrednosti (Stanisavljević et al., 2018).

Nakon imunizacije, životinje su razdvojene u 4 grupe (5 životinja po grupi): grupa 1 tretirana sa 50 ml / dan bujona odgovarajućeg medijuma - kontrolna grupa; grupa 2 tretirana odabranim sojem proizvođačem γ -aminobuterne kiseline koji je rastao 16 h u odgovarajućem medijumu (CFU / ml $\sim 1 \times 10^9$); grupa 3 tretirana sa 50 ml / dan supernatanta kultivisanog 48 sati u odgovarajućem medijumu bez Na-glutamata (bez proizvodnje γ -aminobuterne kiseline); grupa 4 tretirana sa 50 ml / dan supernatanta kultivisanog 48 sati u odgovarajućem medijumu sa Na-glutamatom (stimulacija proizvodnje γ -aminobuterne kiseline). Svaki tretman je trajao 30 dana.

3.26. Statistička analiza

Svi podaci, osim na graficima koji predstavljaju analizu protočne citofluorimetrije, prikazani su kao srednje vrednosti \pm standardna greška iz minimum tri eksperimenta. Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa Tukey post hoc testom korišćena je za poređenje više grupa, dok su razlike između kontrolne i eksperimentalne grupe upoređene pomoću Studentovog t-testa. Vrednosti $p < 0,05$ ili manje smatrane su statistički značajnim. Grafikoni koji prikazuju analizu protočne citofluorimetrije su prikazani kao rezultati dva eksperimenta. Statistička analiza i dizajn grafika urađeni su uz pomoć softvera GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države).

4. REZULTATI

4.1. Određivanje prisustva *gadB* gena u prirodnim izolatima mlečnokiselinskih bakterija

Ova studija je obuhvatila analizu prisustva *gadB* gena i proizvodnju γ -aminobuterne kiseline (GABA) mlečnokiselinskih bakterija (MKB) izolovanih iz autohtonih sireva sa područja Zapadnog Balkana kao i mlečnih proizvoda sa Kavkaza i iz Azerbejdžana, kolekcije Laboratorije za molekularnu mikrobiologiju (BGLMM).

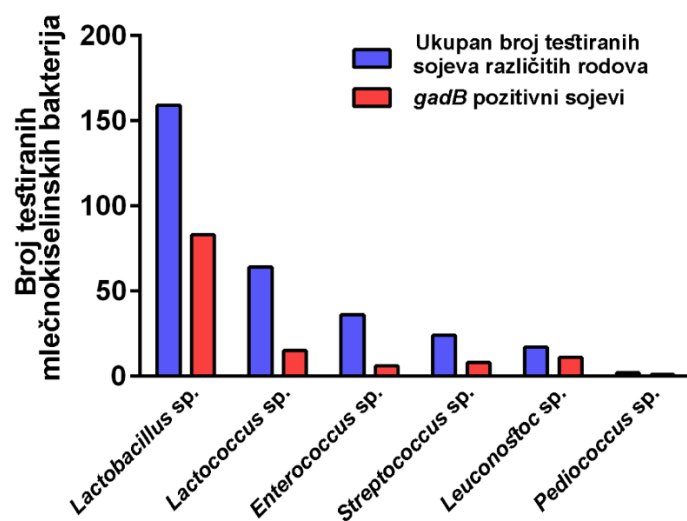
Sojevi MKB testirani su na prisustvo *gadB* gena PCR metodom korišćenjem CoreR/CoreF prajmera (Siragusa et al., 2007). CoreF/CoreR prajmeri umnožavaju konzervirani region *gadB* gena dužine 540 bp. Testirana su 303 soja i proverom dobijenih PCR produkata putem DNK elektroforeze, na osnovu očekivane dužine fragmenata i njihovog sekvenciranja, ustanovljen je pozitivan signal kod 124 soja. Sojevi kod kojih je ustanovljeno prisustvo *gadB* gena predstavljeni su u Tabeli 6. Od 303 testirana soja 27,4 % laktobacila (83 soja), 4,9 % laktokoka (15 sojeva), 3,6 % leukonostoka (11 sojeva), 2,64 % streptokoka (8 sojeva), 1,98 % enterokoka (6 sojeva) i 0,33 % pediokoka (1 soj) BGLMM kolekcije ima *gadB* gen (Slika 7), s tim da je grupa laktobacila bila i najbrojnija čineći 52,48 % ukupnog broja testiranih sojeva, slede laktokoke sa 21,12 %, enrerokoke sa 11,88 %, streptokoke sa 7,92 %, leukonostoci sa 5,61 %, pediokoke sa 0,66 % i veisela sa 0,33 % u odnosu na ukupan broj testiranih sojeva (Slika 7).

Tabela 6. Sojevi kod kojih je PCR metodom ustanovljeno prisustvo *gadB* gena

Laktobacili	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	BGZLS20-20, BGAN8, BGP13, BGPV2-45a, BGZB19, BGSJ3-18, BGF50, BGA8, BGAZES2-87, BGAZES2-67, BGMI1, BGZLS20-20, BGZLS30-41, BGAZEJ3-32, BGKAVS4-9, ZLS60-43, BGG07-25, BGG07-29, BGG07-30, BGG011-3, BGG011-22, BGG011-47, BGV11-

	24, ZGPR2-25, ZGPR2-42, ZGPR3-17, ZGPR3-18, ZGPR3-19, ZGZA7-7, ZGZA7-44, BGVL2a-30, BGVL2a-21, BGVL2a-41, BGVL2a-89, LMM1, BGHO10, A112, BGHN40, BGAZES2-8, BGKAVS3-67, BGKAVS2-13, BGKAVS3-38, BGKAVS4-12
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	BGBUK2-16, BGSJ2-8, BGAR76, BGZLS10-1, BGZLS60-50, BGZLM1-1, BGZLS45-25, BGZLS45-49, BGZLS20-1
<i>Lactobacillus paracasei</i>	BGAZES1-89, BGAZES2-77, BGLI15, BGKO1-44, BGNK1-31, BGNK1-70, BGNK1-80, BGNK1-99, BGNJ1-3
<i>Lactobacillus divergens</i>	742
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BGZL18, BGT 10
<i>Lactobacillus fermentum</i>	BGHO36
<i>Lactobacillus brevis</i>	BGLMM10, BGLMM11, BGKAVS2-50, BGZLS10-1, BGZLS45-36, BGZLS30-2, KAVS2-41, BGAZES1-70, BGAZES1-52
<i>Lactobacillus pentosus</i>	BGKAVS2-70
<i>Lactobacillus arizonensis</i>	BGKAVS4-58
<i>Lactobacillus farciminis</i>	BGKAVS2-48
<i>Lactobacillus sucicola</i>	BGGO7-28
<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	BGNJ1-16
<i>Lactobacillus curvatus</i>	BGGO2-2, BGAJEJ1-52, BGAZES2-89, BGAZES2-8
Laktokoke	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	MG1827, BGVL2a-1, BGVL2a-2, BGVL2-8, BGVL2a-88, BGLE1-6, ZGBP4-1, ZGBP5-9, ZGBP6-51, ZGZA7-10, ZGZA8-40, BGZLS10-34
<i>Lactococcus lactis</i> .	BGZLS10-33
<i>Lactococcus garvieae</i>	BGTRM7-59

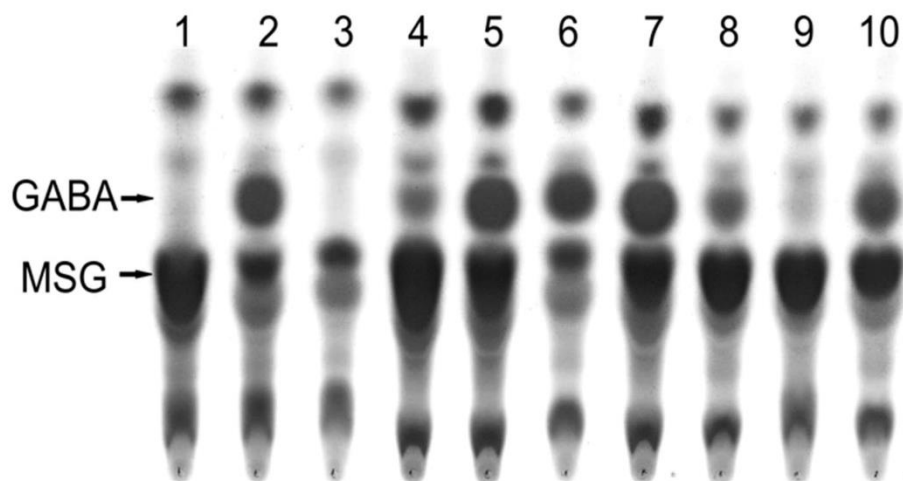
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i>	BGBU1-4
Leukonostoci	
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	BGKAVS3-23, BGTRK4-3, BGLE1-36, AL3-43, ZGPR1-27, ZGBP4-14, BGVL2-29
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	BGVL2a-11
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	BGVL1-13, BGVL1-13
<i>Leuconostoc citreum</i>	BGVL2-25
Streptokoke	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	BGAZEJ3-27, KO1-22, KO1-26/2, S39, ZGBP4-17, BGG010-7
<i>Streptococcus mitis</i>	BGTRK7-38
<i>Streptococcus bovis</i>	BGLE1-14
Pediokoke	
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	BGBK1-8
Enterokoke	
<i>Enterococcus faecium</i>	BGAZES1-44, ZGPR1-54, ZGBP5-20
<i>Enterococcus faecalis</i>	BGLE1-13, BGRE2-24, ZGPR3-6



Slika 7. Određivanje prisustva *gadB* gena kod mlečnokiselinskih bakterija standardnim CoreF/CoreR prajmerima. Plavim stubićima prikazan je broj testiranih sojeva, a crvenim broj sojeva kod kojih je pokazano prisustvo *gadB* gena.

4.2. Analiza produkcije γ -aminobuterne kiseline

Sposobnost MKB sojeva, koji poseduju *gadB* gen, da produkuju γ -aminobuternu kiselinu kvalitativno je analizirana tankoslojnom hromatografijom (engl. *Thin Layer Chromatography, TLC*). Od 124 soja kod kojih je pokazano prisustvo *gadB* gena, produkcija γ -aminobuterne kiseline je TLC metodom detektovana kod 14 sojeva roda *Lactobacillus*. Reprezentativni hromatogram konverzije Na-glutamata do γ -aminobuterne kiseline prikazan je na Slici 8. Sojevi koji produkuju γ -aminobuternu kiselinu prikazani su u Tabeli 7.



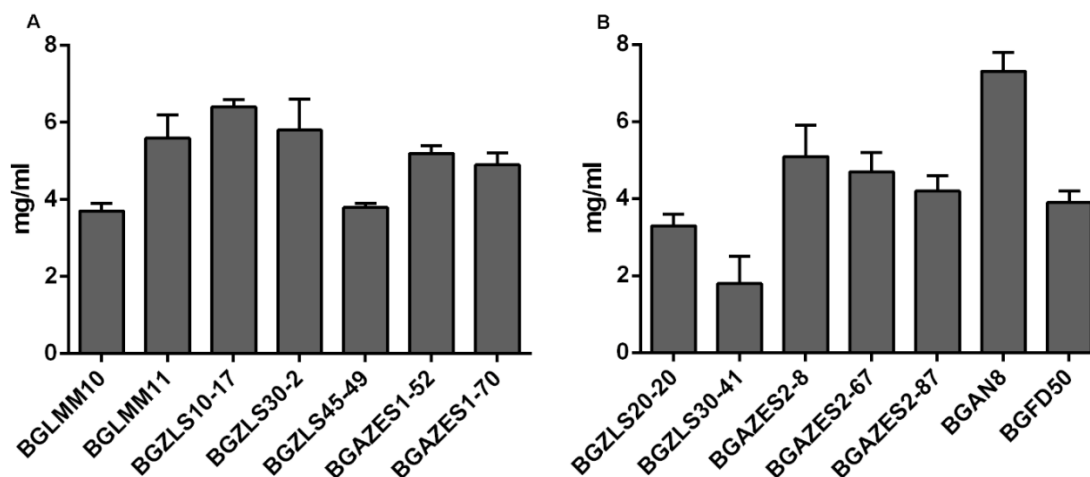
Slika 8. Reprezentativni TLC hromatogram produkcije γ -aminobuterne kiseline. 1. MSG u MRS; 2. GABA u MRS; 3. MRS; 4. BGLMM10; 5. BGLMM11; 6. BGZLS10-17; 7. BGZLS30-2; 8. BGZLS20-20; 9. BGZLS30-41; 10. BGZLS45-49. Strelicama su označeni MSG i GABA. MSG – Na-glutamat; GABA - γ -aminobuterna kiselina.

Tabela 7. Sojevi kod kojih je TLC metodom detektovana produkcija γ -aminobuterne kiseline.

Vrsta	Sojevi koji proizvode γ -aminobuternu kiselinu
<i>Lactobacillus brevis</i>	BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17, BGZLS30-2, BGZLS45-49, BGAZES1-52, BGAZES1-70
<i>Lactobacillus plantarum</i>	BGZLS20-20, BGZLS30-41, BGAZES2-8, BGAZES2-67, BGAZES2-87, BGAN8, BGFD50

Kvantifikacija produkcije γ -aminobuterne kiseline, prethodno selektovanih 14 sojeva, urađena je tečnom hromatografijom visokih performansi (engl. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*). Kao najbolji proizvođači istakli su se *Lb. plantarum* BGAN8 ($7,3 \pm 0,5$ mg/ml) i *Lb. brevis* BGZLS10-17 ($6,4 \pm 0,2$ mg/ml). Sojevi *Lb. brevis* BGZLS30-2, BGLMM11, BGAZES1-52, BGAZES1-70 i BGLMM10 proizveli su: $5,8 \pm 0,8$, $5,6 \pm 0,6$, $5,2 \pm 0,2$, $4,9 \pm 0,3$ odnosno $3,7 \pm 0,2$ mg/ml γ -aminobuterne kiseline. Sojevi *Lb. plantarum* BGAZES2-8, BGAZES2-67, BGAZES2-87, BGFD50, BGZLS20-20 i

BGZLS30-41 produkovali su: $5,1 \pm 0,8$, $4,7 \pm 0,5$, $4,2 \pm 0,4$, $3,9 \pm 0,3$, $3,3 \pm 0,3$, odnosno $1,8 \pm 0,7$ mg/ml γ -aminobuterne kiseline u supernatantima kultura 48 sati starih sojeva. Koncentracije γ -aminobuterne kiseline svih sojeva prikazane su na Slici 9.



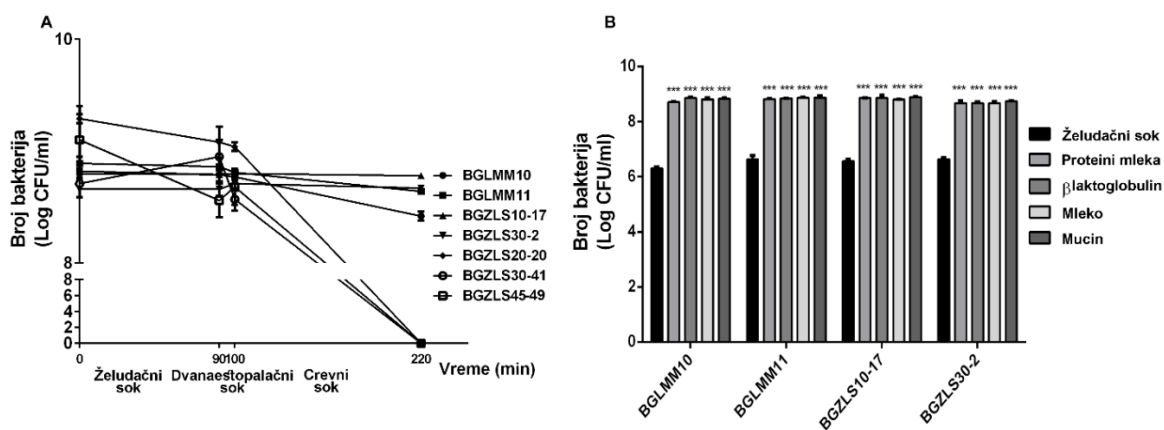
Slika 9. Koncentracija γ -aminobuterne kiseline u mg/ml izmerena u supernatantima 48 sati starih kultura sojeva (A) *Lb. brevis* i (B) *Lb. plantarum*. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ($n=3$) \pm standardne devijacije.

Analizom sojeva koji proizvode γ -aminobuternu kiselinu pokazano da je najveći broj sojeva proizvođača γ -aminobuterne kiseline poreklom iz Zlatarskog sira. S obzirom da je Zlatarski sir autohtoni sir sa područja Srbije za dalji rad odabrano je, na osnovu porekla, 7 izolata iz navedenog sira: BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17, BGZLS20-20, BGZLS30-2, BGZLS30-41 i BGZLS45-49.

4.3. Ispitivanje preživljavanja odabranih sojeva, proizvođača γ -aminobuterne kiseline, u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta

Preživljavanje sedam sojeva, koji proizvode γ -aminobuterne kiseline, a potiču iz Zlatarskog sira, je testirano u simuliranim uslovima GIT - a. Rezultati su pokazali da od sedam sojeva samo četiri soja *Lb. brevis* BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 i

BGZLS30-2 uspešno preživljavaju nakon 220 minuta inkubacije u hemijski simuliranom prolasku kroz GIT (8,7 - 8,9 log CFU/ml) (Slika 10 A i B) ukoliko se primene neki od zaštitnih nosača (mleko, proteini mleka, β -laktoglobulin ili mucin) (Slika 10 B). Soj *Lb. brevis* BGZLS45-49 i sojevi *Lb. plantarum* BGZLS20-20 i BGZLS30-41 nakon preživljavanja u simuliranim uslovima želučalnog i dvanaestopalačnog soka (0-100 min) (9,3 - 8,7 log CFU/ml), ne preživljavaju nakon nastavka inkubacije u crevnom soku (100-220 min) (Slika 10A).



Slika 10. Preživljavanje u simuliranim uslovima gastrointestinalnog trakta. (A) Preživljavanje odabranih *Lactobacillus* sp. sojeva u želučanom soku (0-90 min), dvanaestopalačnom soku (90-100 min) i crevnom soku (100-220 min). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti (n=3) \pm standardne devijacije. (B) Preživljavanje odabranih sojeva u uslovima želučalnog soka (pH 2) u prisustvu proteina mleka, β laktoglobulina, mleka i mucina. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti (n=3) \pm standardne devijacije. Za poređenje tretmana korišćeni su jednofaktorska ANOVA i Tukey post hoc test (***) p<0,001).

4.4. Ispitivanje bezbednosnog statusa odabranih sojeva, proizvođača γ -aminobuterne kiseline

Ispitivanje bezbednosnog statusa sojeva *Lb. brevis* BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 i BGZLS30-2, koji su uspešno preživeli simulirane uslove GIT, i stoga odabrani za dalje analize, uključivalo je testove na prisustvo hemolitičke i želatinozne aktivnosti i test rezistencije na antibiotike. Nakon inkubacije na krvnom agaru 48 sati na 37°C ni jedan od ispitivanih *Lb. brevis* sojeva, koji je odabran za dalji rad, jer uspešno preživljava simulirane uslove GIT - a, ne formira zone hemolize, niti ispoljava ni

želatinoznu aktivnost, nakon inkubacije na želatinskom agaru 48 sati na 37°C i preliivanja zasićenim rastvorom amonijum sulfata.

U skladu sa preporukama Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA, 2012) ispitivana je osetljivost četiri izolata *Lb. brevis* na različite grupe antibiotika. Testirani su sledeći antibiotici: ampicilin, gentamicin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, hloramfenikol, klindamicin i tetraciklin. Rezultati su tumačeni na osnovu preporuke EFSA (2012) za obligatne heterofermentativne laktobacile, kojima vrsta *Lb. brevis* pripada. Pokazano je da je samo soj BGZLS10-17 osetljiv na sve testirane antibiotike, dok je soj BGLMM11 rezistentan na kanamicin (64 µg/ml), BGLMM10 na kanamicin (64 µg/ml) i tetraciklin (16 µg/ml), a soj BGZLS30-2 na ampicilin (4 µg/ml), kanamicin (64 µg/ml) i tetraciklin (16 µg/ml) (Tabela 8).

Tabela 8. Lista testiranih antibiotika i minimalne inhibitorne koncentracije (µg/ml) za četiri odabrana soja vrste *Lb. brevis*.

	Ampicilin	Gentamicin	Kanamicin	Streptomycin	Eritromicin	Klindamicin	Tetraciklin	Hloramfenikol
BGLMM10	1 ^O	8 ^O	64 ^R	64 ^O	0,5 ^O	0,5 ^O	16 ^R	2 ^O
BGLMM11	1 ^O	8 ^O	64 ^R	64 ^O	0,5 ^O	0,5 ^O	8 ^O	2 ^O
BGZLS10-17	1 ^O	8 ^O	32 ^O	64 ^O	0,5 ^O	0,5 ^O	4 ^O	2 ^O
BGZLS30-2	4 ^R	8 ^O	64 ^R	64 ^O	0,5 ^O	0,5 ^O	16 ^R	4 ^O

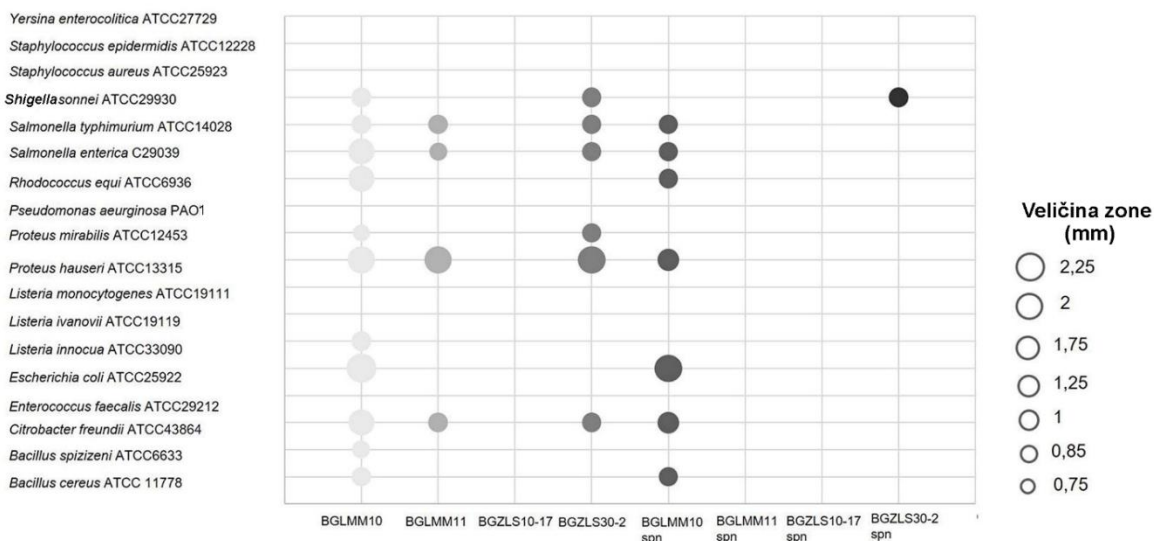
O - osetljiv

R - rezistentan

4.5. Antimikrobna aktivnost odabranih sojeva proizvođača γ-aminobuterne kiseline

Određena je antimikrobna aktivnost četiri soja *Lb. brevis* na 18 patogenih sojeva (Slika 11). Sojevi *Lb. brevis* BGLMM10, BGLMM11 i BGZLS30-2 ostvarili su različit stepen antagonističkog delovanja na klinički relevantne patogene (Slika 11). Veličina zone nije značajno varirala među eksperimentima. Zanimljivo je da je supernatant 16 sati stare kulture soja BGLMM10 pokazao antimikrobnu aktivnost na sedam od 18 sojeva (*Salmonella typhimurium* ATCC14028, *S. enterica* C29039, *Rhodococcus equi* ATCC6936, *Proteus hauseri* ATCC13315, *Escherichia coli* ATCC25922, *Citrobacter freundii* ATCC43864, *Bacillus cereus* ATCC11778), dok je supernatant 16 sati stare kulture soja

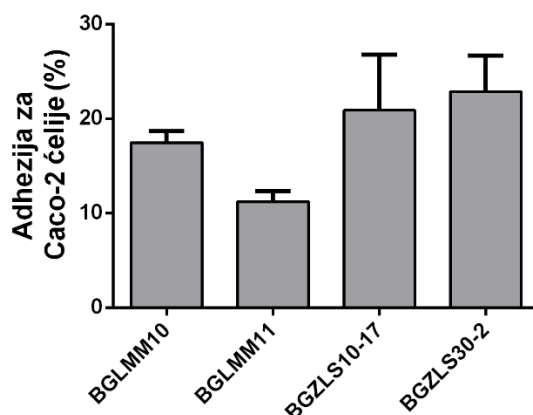
BGZLS30-2 pokazao antimikrobno dejstvo na *Shigella sonnei* ATCC29930. Negativan rezultat dobijen nakon upotrebe pronaze E otkrio je da antimikrobna aktivnost nije posledica produkcije i delovanja molekula proteinske prirode. Soj BGZLS10-17 nije pokazao antimikrobnu aktivnost ni na jedan od korišćenih sojeva.



Slika 11. Antimikrobna aktivnost četiri odabrana soja *Lb. brevis* na klinički relevantne patogene. Zona inhibicije predstavljena je krugovima, dok prečnik kruga predstavlja veličinu zone inhibicije u mm. spn - supernatant.

4.6. Ispitivanje vezivanja odabranih sojeva proizvođača γ -aminobuterne kiseline za intestinalnu epitelnu ćelijsku liniju Caco-2

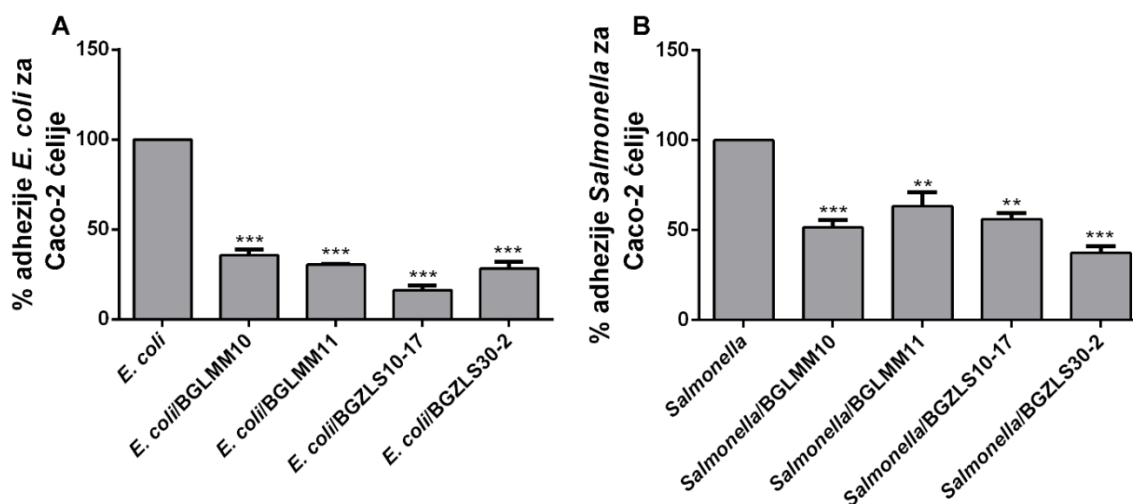
Sposobnost probiotičkih sojeva da se vežu za intestinalne epitelne ćelijske linije (IEĆ) takođe je važan kriterijum koji predlaže WHO/FAO prilikom selekcije probiotika (WHO-FAO, 2006). Sva četiri soja *Lb. brevis* ispoljila su sposobnost vezivanja za Caco-2 ćelije, iako je stepen adhezije varirao među sojevima (Slika 12). Soj BGZLS30-2 pokazao je najveći stepen adhezije (22%), dok je soj BGLMM11 pokazao najnižu adheziju za Caco-2 ćelije (11%) (Slika 12).



Slika 12. Adhezija sojeva *Lb. brevis* BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 i BGZLS30-2 za Caco-2 ćelije. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti (n=3) ±standardne devijacije.

4.7. Ekskluzija *E. coli* ATCC25922 i *S. enterica* C29039 u prisustvu odabranih sojeva proizvođača γ -aminobuterne kiseline na modelu Caco-2 ćelija

Analiziranjem sposobnosti četiri soja *Lb. brevis* da smanje adheziju *E. coli* ATCC25922 i *S. enterica* C29039 za Caco-2 ćelije pokazana je značajna redukcija vezivanja *E. coli* ATCC25922 i *S. enterica* C29039 za Caco-2 ćelije u prisustvu svakog od četiri soja *Lb. brevis* (Slika 13 A i B). Redukcija vezivanja *E. coli* ATCC25922 za Caco-2 ćelije iznosila je 64, 70, 80 i 72%, dok je redukcija vezivanja *S. enterica* C29039 iznosila 50, 37, 44, i 63% u prisustvu sojeva BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 odnosno BGZLS30-2 (adhezija *E. coli* ATCC25922 i *S. enterica* C29039 u odsustvu laktobacila predstavljena je sa 100%).

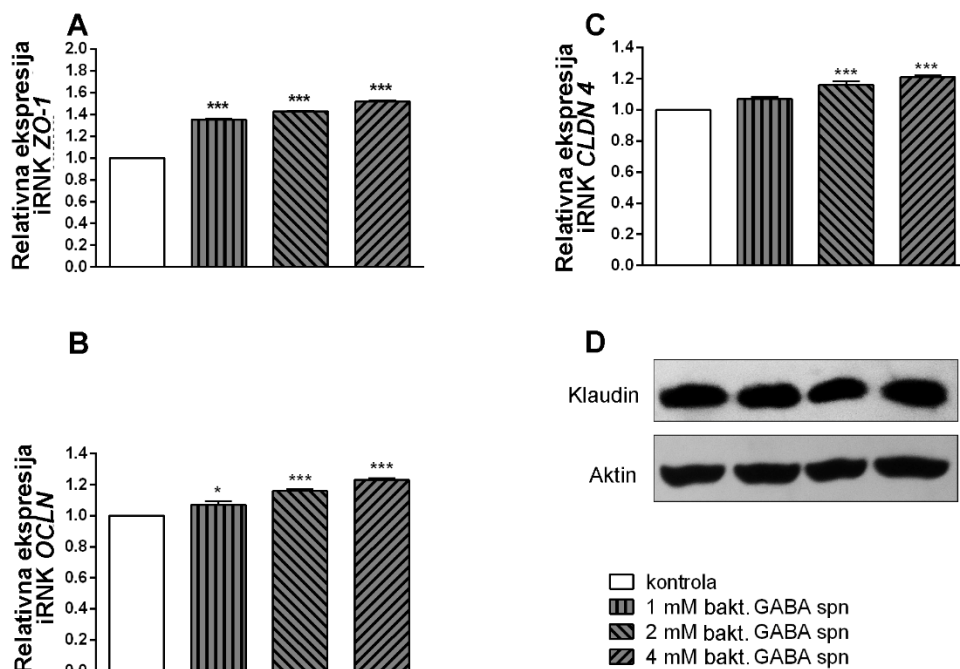


Slika 13. Adhezija (A) *E. coli* ATCC25922 i (B) *S. enterica* C29039 u prisustvu sojeva *Lb. brevis* BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 i BGZLS30-2. Adhezija *E. coli* ATCC25922 i *S. enterica* C29039 u odsustvu laktobacila predstavljena je sa 100 %. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti (n=3) ±standardne devijacije. Za poređenje su korišćeni jednofaktorska ANOVA i Tukey post hoc test (p<0,01, *** p<0,001).**

4.8. Efekat supernatanta 48 sati stare kulture soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 na ekspresiju proteina čvrstih veza i ekspresiju *TGF-β* i *IL-8*

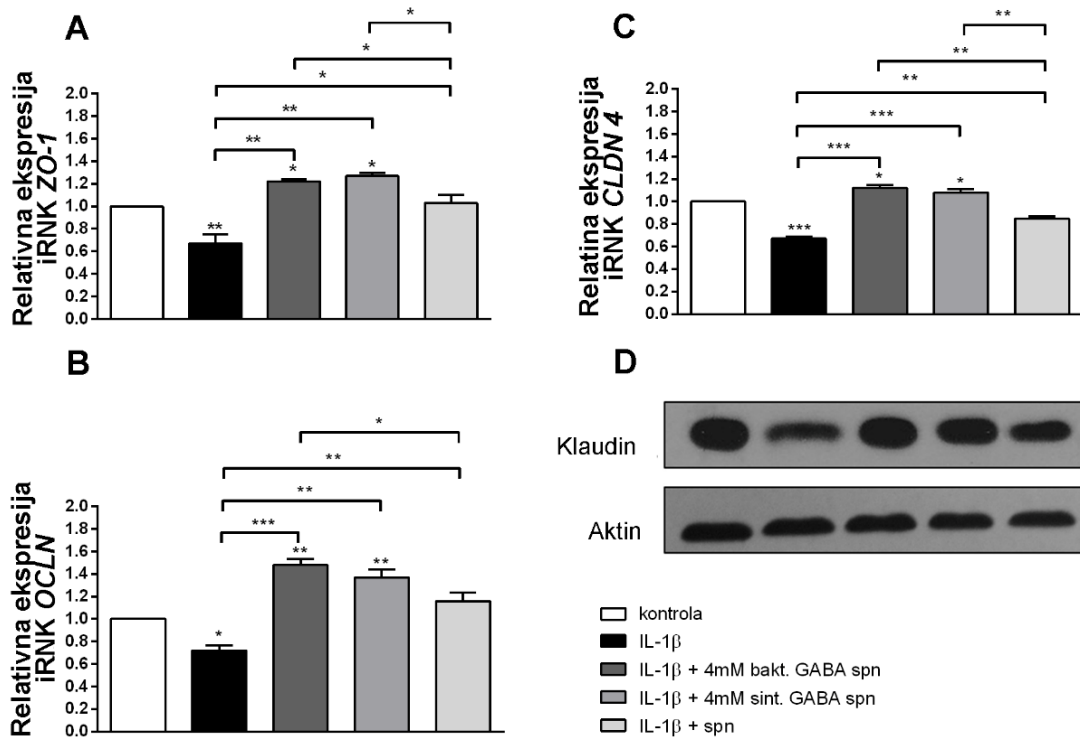
Dobra sposobnost adhezije poželjna je karakteristika probiotičkih bakterija jer, pored omogućavanja dužeg zadržavanja u crevima i isključivanja patogenih bakterija, omogućava interakciju sa ćelijama domaćina radi zaštite epitelnih ćelija, odnosno održavanje integriteta crevne barijere, kao i ispoljavanje lokalnog imunomodulatornog efekta (Bron et al., 2017; Živković et al., 2016). S obzirom da je GABA - signalni sistem uključen je u održavanje homeostaze imunskog sistema (Jin et al., 2013), ispitivan je efekat supernatanta 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17, na ekspresiju proteina čvrstih veza diferenciranih Caco-2 ćelija. Ovaj soj je odabran na osnovu prethodnih rezultata gde je pokazana najviša produkcija γ -aminobuterne kiseline u odnosu na druge sojeve. Prvo je ispitivan efekat tri koncentracije supernatanta sa γ -aminobuternom kiselinom koju je produkovao soj BGZLS10-17 (0,625 %, 1,25 % i 2,5 %), a koje sadrže 1 mM, 2 mM odnosno 4 mM γ -aminobuterne kiseline na ekspresiju proteina čvrstih veza. Rezultati su predstavljeni u odnosu na kontrone ćelije koje su gajene samo u DMEM medijumu

(netretirane ćelije). Supernatanti sa sve tri koncentracije γ -aminobuterne kiseline statistički značajno su stimulisali ekspresiju zonulina i okcludina (Slika 14 A i B) u odnosu na netretirane ćelije, dok su samo supernatanti sa višim koncentracijama γ -aminobuterne kiseline (2 mM i 4 mM) stimulisali ekspresiju kladina u odnosu na netretirane ćelije na nivou transkripcije (Slika 14 C i D).



Slika 14. Efekat supernatanta soja BGZLS10-17 koji sadrže tri koncentracije γ -aminobuterne kiseline (1 mM, 2 mM i 4 mM) na ekspresiju iRNK (A) zonulina, (B) okcludina i (C) kladina i (D) reprezentativni Western blot koji prikazuje ekspresiju proteina kladina u diferenciranim Caco-2 ćelijama. Vrednosti su normalizovane u odnosu na kontrolu i predstavljene kao relativna ekspresija iRNK. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti (n=3) \pm standardne devijacije. Za poređenje su korišćeni jednofaktorska ANOVA i Tukey post hoc test (*p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001); bakt.- bakterijska, spn. – supernatant; GABA- γ -aminobuterna kiselina.

S obzirom da je povećanje propustljivosti creva mehanizam koji doprinosi razvoju različitih inflamatornih stanja, ispitivano je da li tretmani sa supernatantom 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 bez γ -aminobuterne kiseline, supernatantom 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 sa produkovanom γ -aminobuternom kiselinom (4mM) i supernatantom 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 u koji je dodato 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline (Sigma) mogu ublažiti štetne efekte IL-1 β indukovane inflamacije na ekspresiju proteina čvrstih veza. Tretman diferenciranih Caco-2 ćelija sa IL-1 β značajno smanjuje ekspresiju zonulina, okludina i kladina na nivou iRNK u odnosu na netretirane ćelije (Slika 15 A – C), kao i ekspresiju proteina kladina (Slika 15 D). Dodatak bilo kog od navedenih tretmana značajno neutrališe štetne efekte IL-1 β na proteine čvrstih veza. Zanimljivo je da tretmani koji sadrže γ -aminobuternu kiselinu ostvaruju statistički značajnije zaštitne efekte na proteine čvrstih veza u poređenju sa tretmanima bez γ -aminobuterne kiseline ($p < 0,05$ za zonulin, $p < 0,05$ za okludin i $p < 0,01$ za kladin).

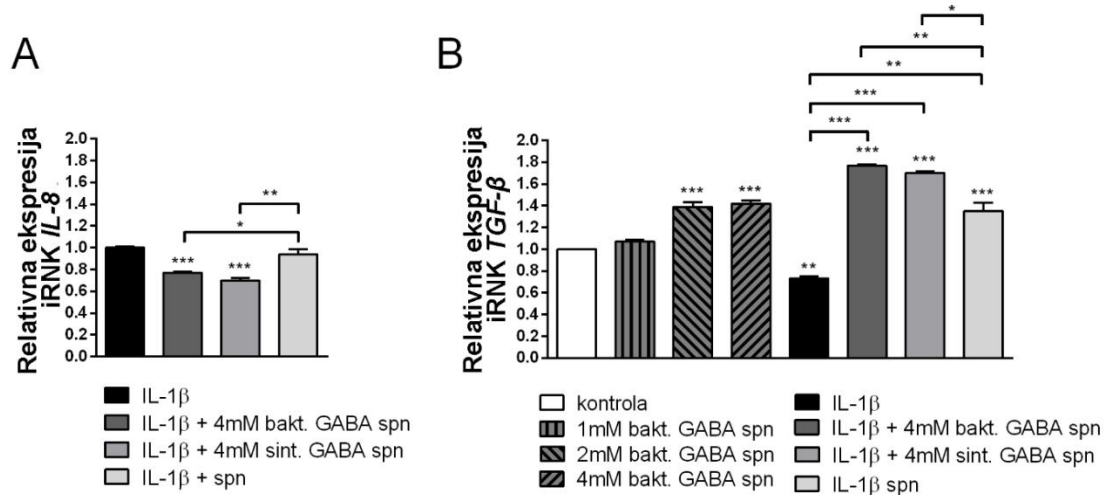


Slika 15. Korelacija između efekta IL-1 β i zaštitnog efekta supernatanta 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 bez γ -aminobuterne kiseline, supernatanta koji sadrži 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline i supernatanta koji sadrži 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline na ekspresiju iRNK (A) zonulina, (B) okcludina i (C) kladina i (D) reprezentivni Western blot koji prikazuje ekspresiju proteina kladina u diferenciranim Caco-2 ćelijama. Vrednosti su normalizovane u odnosu na kontrolu i predstavljene kao relativna ekspresija iRNK. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti (n=3) \pm standardne devijacije. Za poređenje su korišćeni jednofaktorska ANOVA i Tukey post hoc test (*p<0,05, **p<0,01, *** p<0,001); bakt. - bakterijska; sint. - sintetička, spn. – supernatant; GABA - γ -aminobuterna kiselina.

Zatim, ispitivano je da li uzorak sa 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline, uzorak sa 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline i uzorak bez γ -aminobuterne kiseline utiču na IL-1 β indukovanu ekspresiju *IL-8* u diferenciranim Caco-2 ćelijama. Pokazano je da tretman uzorkom koji sadrži γ -aminobuternu kiselinu produkovanu od strane BGZLS10-17, kao i tretman supernatantom u koji je dodata sintetička γ -aminobuterna kiselina, statistički značajno smanjuju ekspresiju iRNK *IL-8* indukovanu sa IL-1 β (p<0,001).

Tretman sa supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline nije imao modulatorne efekte na ekspresiju iRNK *IL-8* Caco-2 ćelija (Slika 16 A).

Dodatno, ispitivano je i kakav je efekat uzoraka sa 4 mM γ -aminobuterne kiseline (bakterijske ili sintetičke) i supernatanta bez γ -aminobuterne kiseline na ekspresiju iRNK *TGF- β* od strane diferenciranih Caco-2 ćelija u odsustvu inflamacije kao i tretiranih sa IL-1 β . Prvo, tretmani supernatantima koji sadrže 2 mM i 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline značajno su stimulisali ekspresiju iRNK *TGF- β* u Caco-2 ćelijama u odnosu na netretirane ćelije (Slika 16 B). Tretman sa IL-1 β doveo je do statistički značajnog sniženja ($p < 0,01$) ekspresije iRNK *TGF- β* u Caco-2 ćelijama u odnosu na netretirane ćelije, a istovremeni tretman sa nekim od supernatanta, sa 4mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline ili sa 4mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline, kao i supernatant bez γ -aminobuterne kiseline sprečili su smanjenje ekspresije iRNK *TGF- β* u Caco-2 ćelijama indukovano sa IL-1 β ($p < 0,001$ za tretmane uzorcima sa γ -aminobuternom kiselinom i $p < 0,01$ za tretman supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline) (Slika 16 B). Supernatanti koji sadrže γ -aminobuternu kiselinu (bakterijsku ili sintetičku) ostvarili su statistički značajnije efekte na prevenciju IL-1 β indukovanog smanjenja ekspresije iRNK *TGF- β* u Caco-2 ćelijama u odnosu na tretman supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline ($p < 0,01$ za supernatant sa bakterijskom γ -aminobuternom kiselinom i $p < 0,05$ za supernatant sa dodatkom sintetičke γ -aminobuterne kiseline) (Slika 16 B).



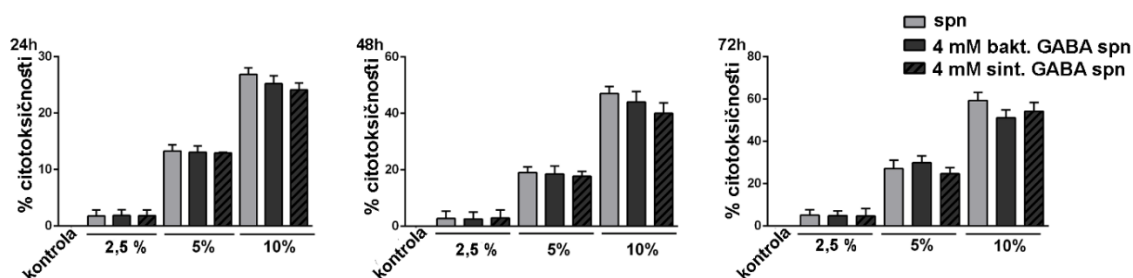
Slika 16. Efekat supernatanta 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 na nivo iRNK odabranih citokina. (A) Nivo ekspresije iRNK *IL-8* u diferenciranim Caco-2 ćelijama tretiranim sa IL-1 β , kao i sa IL-1 β u kombinaciji sa: supernatantom sa 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline i supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline. (B) Nivo ekspresije iRNK *TGF- β* u diferenciranim Caco-2 ćelijama u prisustvu BGZLS10-17 supernatanta sa 1 mM, 2 mM i 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline i nivo ekspresije iRNK *TGF- β* u diferenciranim Caco-2 ćelijama tretiranim sa IL-1 β , kao i sa IL-1 β u kombinaciji sa: supernatantom sa 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline i supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline. Vrednosti su normalizovane u odnosu na kontrolu i predstavljene kao relativna ekspresija iRNK. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ($n=3$) \pm standardne devijacije. Za poređenje su korišćeni jednofaktorska ANOVA i Tukey post hoc test (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$); bakt. - bakterijska; sint. - sintetička, spn. – supernatant; GABA - γ -aminobuterna kiselina.

4.9. Imunomodulatorni potencijal supernatanata 48 sati stare kulture soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 *in vitro*

4.9.1. Uticaj supernatanata 48 sati stare kulture soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 na proliferaciju, metaboličku aktivnost i produkciju citokina ćelija izolovanih iz mezenteričnih limfnih čvorova *in vitro*

Korišćenje probiotika koji proizvode γ -aminobuternu kiselinu može biti dobra strategija za modulaciju imunskog odgovora u različitim inflamatornim bolestima. S tim u vezi ispitan je imunomodulatorni efekat supernatanta soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 na ćelije izolovane iz mezenteričnih limfnih čvorova (MLNC) stimulirane Kon-A i mehanizmi koji su u osnovi navedenog efekta.

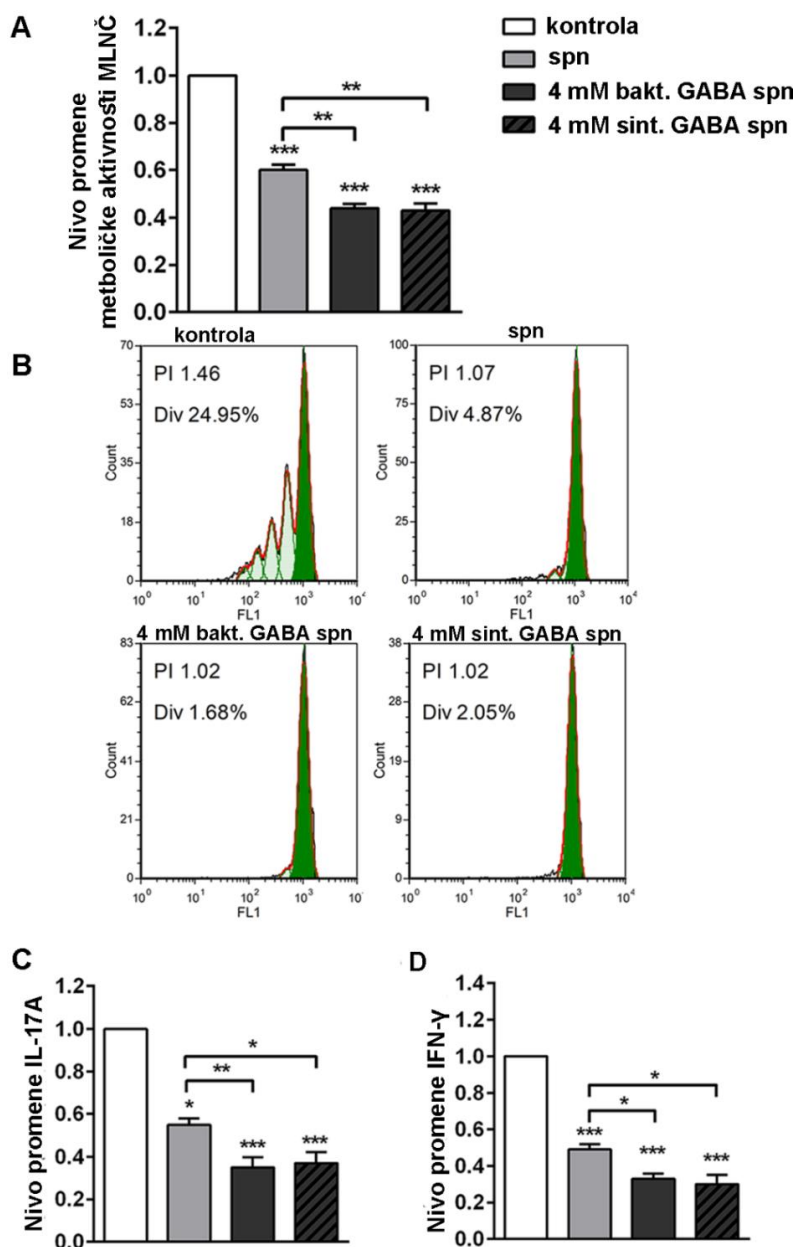
Na početku istraživanja ispitali smo da li postoji citotoksičan efekat supernatanata sa ciljem određivanja netoksične doze čiji će imunomodulatorni efekat na stimuliranim MLNC pratiti posle 24, 48 i 72 sata (Slika 17). Toksičnost tretmana praćena je određivanjem nivoa enzima LDH oslobođenog iz MLNC. Rezultati su pokazali da su doze supernatanata od 5 % i 10 % toksične za MLNC nakon 72 sata, na osnovu čega smo odabrali da ispitujemo efekte netoksične doze od 2,5 %.



Slika 17. Dozno zavisna toksičnost supernatanata 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 u kulturi MLNC. Dozno (2,5 %, 5 % i 10 %) zavisni efekat supernatanata soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 na MLNC nakon 24 sata, 48 sati i 72 sata, tretirane supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline i supernatantom sa dodatkom 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline, procenjen LDH testom. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ($n=3$) \pm standardne devijacije); bakt. - bakterijska; sint. - sintetička, spn. – supernatant; GABA - γ -aminobuterna kiselina.

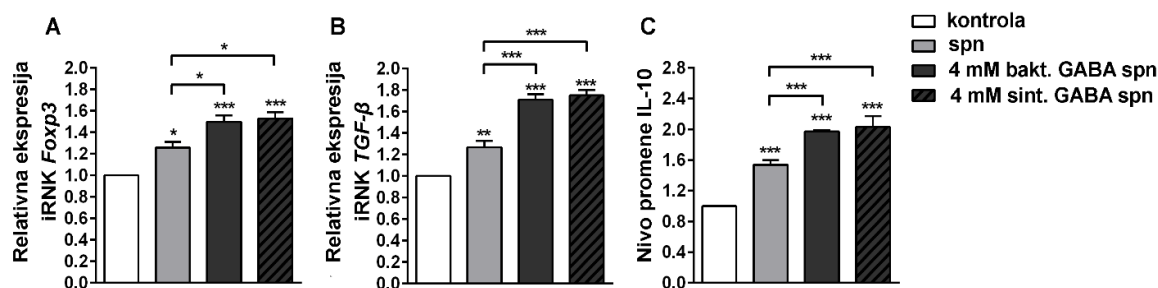
Tretmani netoksičnom dozom supernatanta (2,5 %) statistički značajno su redukovali metaboličku aktivnost MLNC u poređenju sa netretiranim ćelijama ($p < 0,001$) (Slika 18A). Značajno, kulture stimulisanih MLNC tretirane supernatantom sa γ -aminobuternom kiselinom produkovanom od strane soja BGZLS10-17, ili supernatantom sa dodatkom sintetičke γ -aminobuterne kiseline imale su statistički značajno nižu metaboličku aktivnost ($p < 0,01$) u odnosu na kulturu MLNC tretiranu supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline.

Zatim je merena proliferacija MLNC i produkcija proinflamatornih citokina IL-17A i IFN- γ u kulturi stimulisanih MLNC i tretiranih supernatantima soja BGZLS10-17. Rezultati su pokazali da svi supernatanti soja BGZLS10-17 ostvaruju snažan antiproliferativni efekat na Kon-A stimulisane MLNC (Slika 18 B), kao i inhibitorni efekat na produkciju IL-17A i IFN- γ (Slika 18 C i D). Ponovo je pokazano da supernatanti sa γ -aminobuternom kiselinom ostvaruju statistički značajan dodatni inhibitorni efekat na produkciju IL-17A ($p < 0,01$ za supernatant sa bakterijskom, odnosno $p < 0,05$ za supernatant sa sintetičkom γ -aminobuternom kiselinom) i IFN- γ ($p < 0,05$), u poređenju sa efektom koji ostvaruje supernatant bez γ -aminobuterne kiseline na MLNC.



Slika 18. Imunosupresivni efekat supernatanta 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 na Kon-A stimulisane MLNC. (A) Efekat na metaboličku aktivnost, (B) proliferaciju, (C) produkciju IL-17A, (D) produkciju IFN- γ MLNC, tretiranih supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline i supernatantom sa 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline. Vrednosti su normalizovane u odnosu na kontrolu i predstavljene kao nivo promene metaboličke aktivnosti i produkovanih citokina. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ($n=3$) \pm standardne devijacije. Za poređenje su korišćeni jednofaktorska ANOVA i Tukey post hoc test (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$); bakt. - bakterijska; sint. - sintetička, spn. – supernatant; GABA - γ -aminobuterna kiselina.

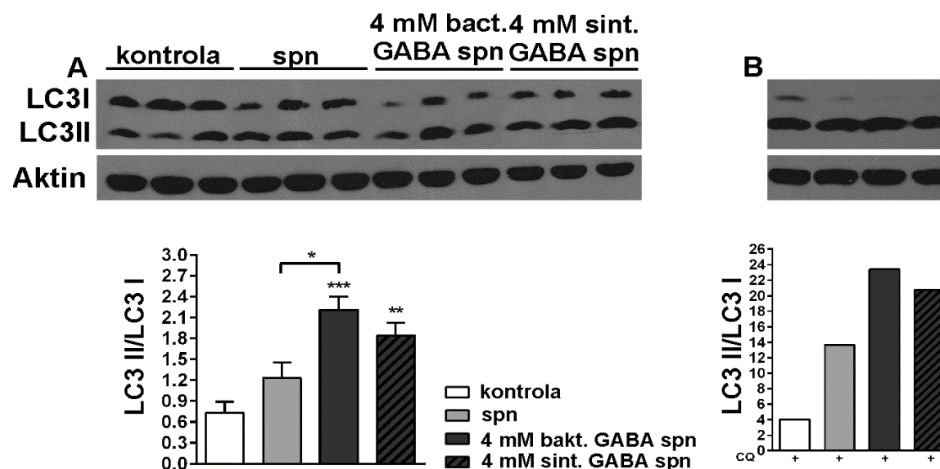
Ispitivanjem efekata supernatanta sa γ -aminobuternom kiselinom (bakterijskom ili sintetičkom), kao i supernatanta bez γ -aminobuterne kiseline pokazano je da svi supernatanti statistički značajno stimulišu ekspresiju iRNK *Foxp3* i *TGF- β* i produkciju IL-10 u poređenju sa netretiranim ćelijama. Viši nivoi iRNK *Foxp3* ($p < 0,05$) i *TGF- β* ($p < 0,001$) izmereni su u MLNC tretiranim supernatantima sa γ -aminobuternom kiselinom u poređenju sa tretmanom supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline (Slika 19 A i B). Takođe tretmani supernatantima sa γ -aminobuternom kiselinom stimulisali su i snažniju produkciju IL-10 ($p < 0,001$) u odnosu na tretman supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline (Slika 19 C).



Slika 19. Supernatanti 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 indukuju tolerogena svostva MLNC. Efekat na (A) ekspresiju iRNK *Foxp3*, (B) ekspresiju iRNK *TGF- β* i (C) produkciju IL-10 MLNC tretiranih supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline i supernatantom 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline. Vrednosti su normalizovane u odnosu na kontrolu i predstavljene kao relativna ekspresija iRNK i nivo promene produkovanog citokina. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ($n=3$) \pm standardne devijacije. Za poređenje su korišćeni jednofaktorska ANOVA i Tukey post hoc test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$); bakt. - bakterijska; sint. - sintetička, spn. – supernatant; GABA - γ -aminobuterna kiselina.

4.9.2. Supernatanti 48 sati stare kulture soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 indukuju autofagiju u MLNC

Western blot analizom praćena je sposobnost supernatanta soja BGZLS10-17 da indukuju autofagiju. Ekspresija LC3 I i LC3 II proteina u Kon-A stimulisanim MLNC tretiranim supernatantima soja praćena je nakon 24 h (Slika 20 A). Pokazano je da samo supernatanti koji sadrže γ -aminobuternu kiselinu značajno povećavaju odnos LC3 II/LC3 I ($p < 0,001$) za tretman supernatantom sa bakterijskom γ -aminobuternom kiselinom, odnosno ($p < 0,01$) za tretman supernatantom sa dodatkom sintetičke γ -aminobuterne kiseline, za razliku od supernatanta bez γ -aminobuterne kiseline, koji povećava odnos LC3 II/LC3 I, ali efekat nije statistički značajan.



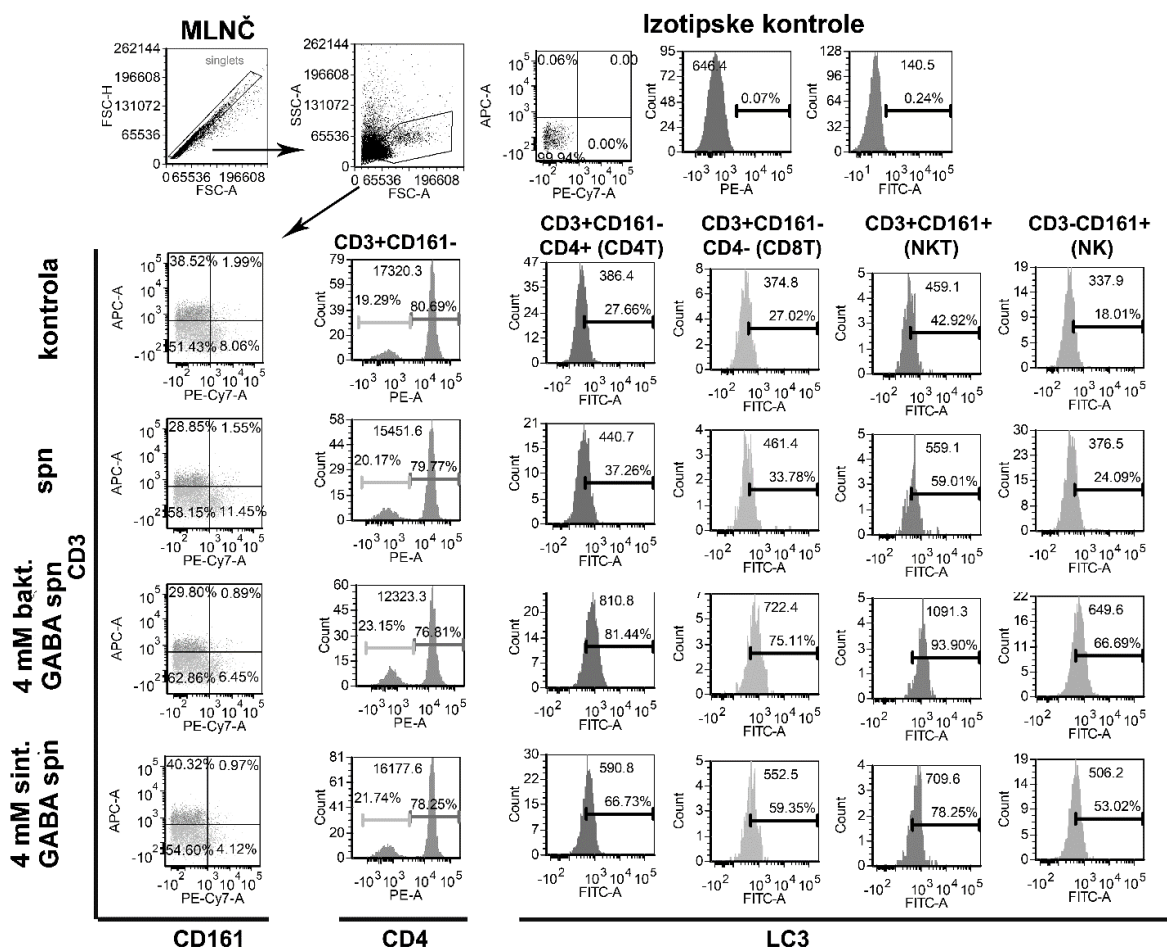
Slika 20. Uticaj supernatanta 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 na autofagiju Kon-A stimulisanih MLNC. (A) Western blot i denzitometrijska analiza ($n=3$) konverzije LC3 II u LC3 I u MLNC tretiranim supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline i supernatantom sa 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ($n=3$) \pm standardne devijacije. Za poređenje su korišćeni jednofaktorska ANOVA i Tukey post hoc test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (B) Autofagni fluks u Kon-A stimulisanim MLNC, reprezentativni Western blot i denzitometrijska analiza konverzije LC3 II u LC3 I u MLNC tretiranim 24 h sa 25 μ M CQ i supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline i supernatantom sa 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline; bakt. - bakterijska; sint. - sintetička, spn. – supernatant; GABA - γ -aminobuterna kiselina; CQ – hlorokin.

Pošto odnos LC3 II/LC3 I može biti pod uticajem istovremene lizozomske degradacije LC3II, provereno je da li se sličan fenomen može primetiti i blokiranjem lizozomske acidifikacije hlorokinom (CQ) (Slika 20 B). I u ovom eksperimentu svi supernatanti su doveli do povećanja odnosa LC3 II/LC3 I (13,66, 23,41 i 20,76 za tretman supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline odnosno supernatantom sa dodatkom 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline), a i u ovom eksperimentu su supernatanti koji sadrže γ -aminobuternu kiselinu doveli do značajnijeg povećanja navedenog odnosa.

MLNC su heterogena populacija ćelija koja se sastoji od različitih leukocitnih ćelija uključujući T ćelije, B ćelije, NK, NKT ćelije, DC i Mf. S obzirom da je povećanje konverzije LC3 I u LC3 II detektovano u celokupnoj populaciji MLNC sledeći cilj je bio utvrditi u kojoj specifičnoj grupi navedenih ćelija je ovaj efekat najizraženiji. Stoga je praćena ekspresija LC3 II u MLNC tretiranim sa 25 μ M CQ, 24 sata nakon tretmana supernatantima.

Diskriminacija između T, NK i NKT ćelija praćena je na osnovu ekspresije molekula CD3 i CD161.

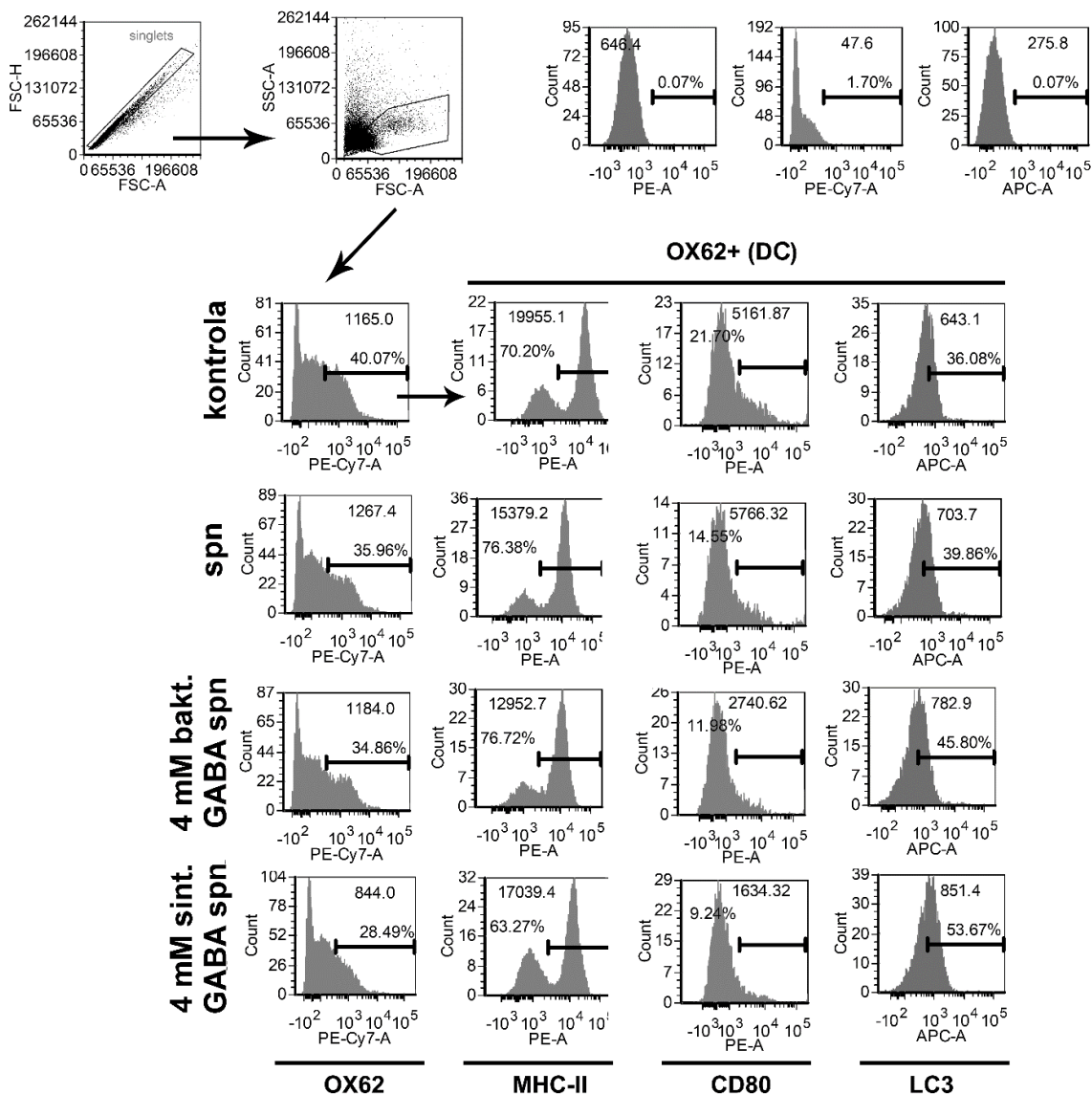
Rezultati su pokazali da je najveća ekspresija LC3 II proteina u CD4+T, CD8+T, NK (CD161+CD3-) i NKT ćelijama (CD161+CD3+) (Slika 21). Supernatanti koji sadrže γ -aminobuternu kiselinu ostvarili su snažniji stimulatorni efekat na ekspresiju LC3 II.



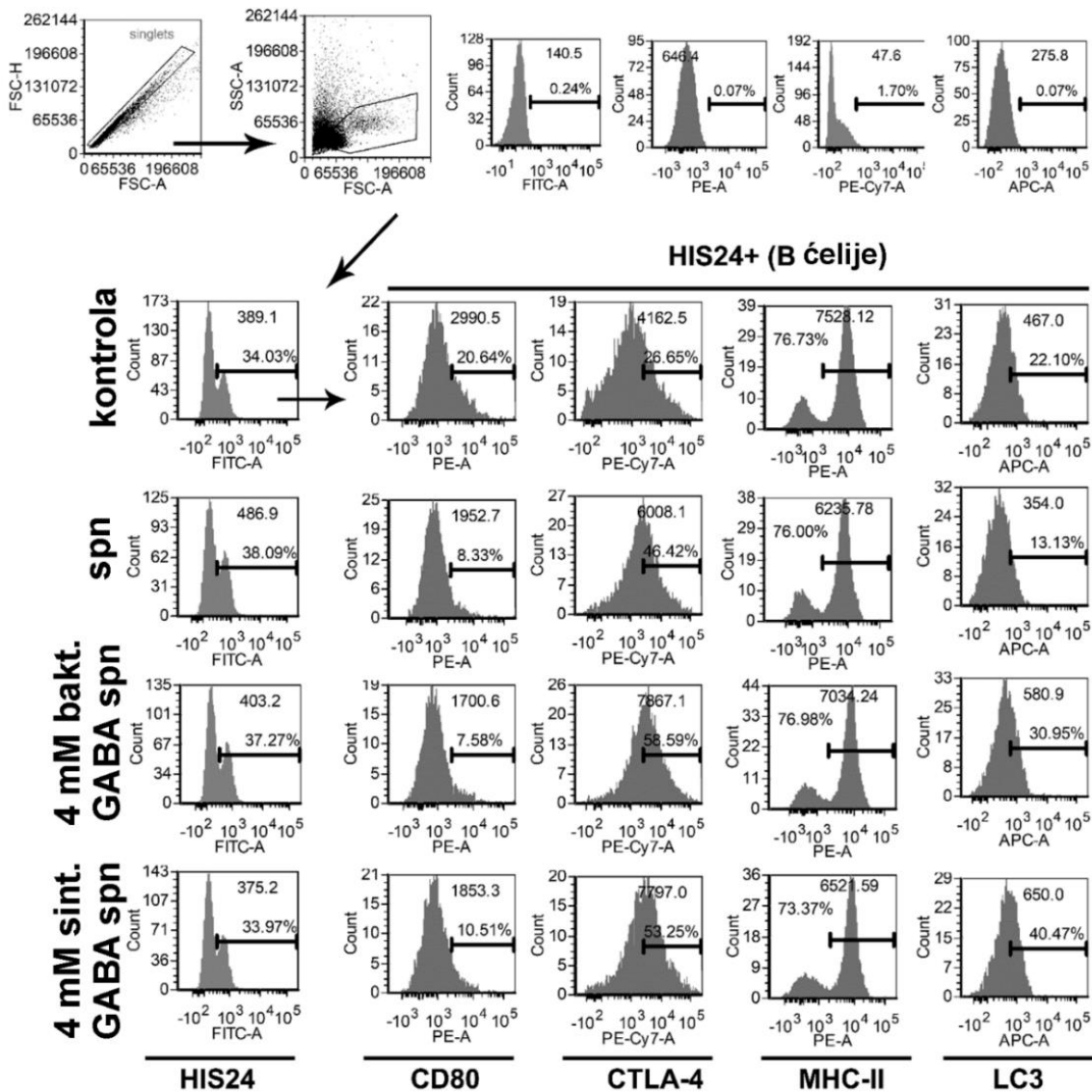
Slika 21. Uticaj supernatanta 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 na autofagiju Kon-A i CQ stimulisanih T ćelija (CD4T, CD8T), NKT i NK ćelija. Procenat CD3⁺CD161⁻CD4⁺LC3⁺, CD3⁺CD161⁻CD4⁻LC3⁺, CD3⁺CD161⁺LC3⁺, CD3⁻CD161⁺LC3⁺ određeni su protočnom citofluorimetrijom. MLNC su tetirani supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline i supernatantom sa 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline u toku 24 h. Predstavljani su reprezentativni histogrami iz dva sprovedena eksperimenta; GABA - γ -aminobuterna kiselina.

Ekspresija LC3 II praćena je i u DC (OX62⁺) (Slika 22), B ćelijama (HIS24⁺) (Slika 23) i Mf (CD68⁺) (Slika 24). Analiza je pokazala da je ekspresija LC3 II stimulirana u svim navedenim tipovima ćelija nakon tretmana supernatantima, ali je povećanje ekspresije LC3 II bilo manje izraženo nego u T ćelijama, NKT i NK ćelijama. Supernatanti koji sadrže γ -aminobuternu kiselinu povećali su ekspresiju LC3 II u OX62⁺ DC, B ćelijama

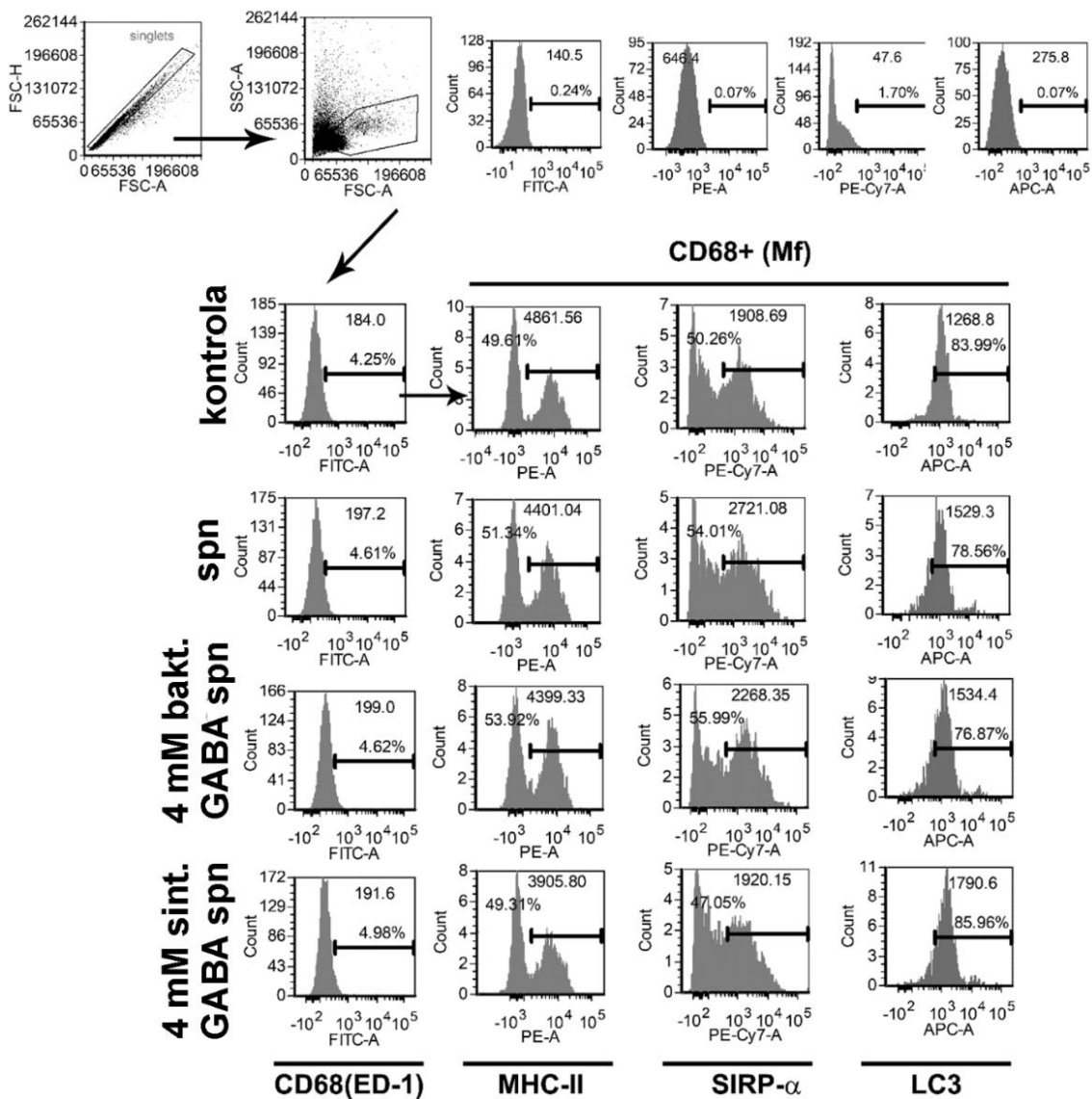
i Mf, dok je supernatant bez γ -aminobuterne kiseline ispoljio stimulatívni efekat na ekspresiju LC3 II u DC i Mf, ali ne i u B ćelijama.



Slika 22. Uticaj supernatanta 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 na ekspresiju proinflamatornih molekula MHC-II i CD80 i autofagiju u dendritskim ćelijama (DC). Procenat OX62+MHC-II+, OX62+CD80+ i OX62+LC3+ određeni su protočnom citofluorimetrijom. MLNC su tetirani supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline i supernatantom sa 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline u toku 24 h. Predstavljani su reprezentativni histogrami iz dva sprovedena eksperimenta; GABA - γ -aminobuterna kiselina.



Slika 23. Uticaj supernatanta 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 na ekspresiju proinflamatornih molekula CD80 i MHC-II, imunosupresivnog molekula CTLA-4 i autofagiju u B ćelijama. Procenat HIS24⁺CD80⁺, HIS24⁺CTLA-4⁺, HIS24⁺MHC-II⁺, HIS24⁺LC3⁺ određeni su protočnom citofluorimetrijom. MLNC su tetirani supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline i supernatantom sa 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline u toku 24h. Predstavljani su reprezentativni histogrami iz dva sprovedena eksperimenta; GABA - γ -aminobuterna kiselina.



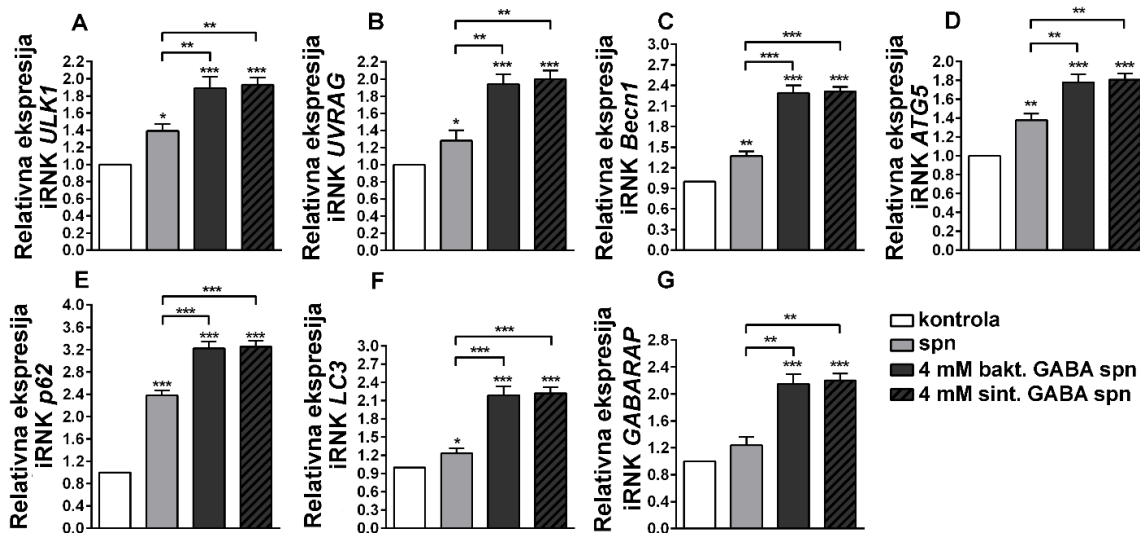
Slika 24. Uticaj supernatanta 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 na ekspresiju proinflamatornog molekula MHC-II, antiinflamatornog molekula SIRP- α i autofagiju u makrofagima. Procenat CD68⁺MHC-II⁺, CD80⁺SIRP α ⁺, and CD80⁺LC3⁺ određeni su protočnom citofluorimetrijom. MLNC su tetirani supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline i supernatantom sa 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline u toku 24h. Predstavljani su reprezentativni histogrami iz dva sprovedena eksperimenta; GABA - γ -aminobuterna kiselina.

Analiza ekspresije MHC-II molekula pokazala je tretman supernatantima culture soja BGZLS10-17 ne utiče značajno na % ekspresije MHC-II molekula u DC, B ćelijama i

Mf, ali da je relativna ekspresija po ćeliji (MFI) redukovana nakon tretmana supernatantima. Nakon tretmana supernatantima kulture soja BGZLS10-17 snižena je i ekspresija CD80, naročito nakon tretmana supernatantima koji sadrže γ -aminobuternu kiselinu. Ekspresija inhibitornog molekula CTLA-4 na B ćelijama stimulisana je nakon tretmana supernatantima, a dodatno i u Mf je stimulisana ekspresija inhibitornog molekula SIRP- α nakon tretmana supernatantima culture soja BGZLS10-17.

4.9.3. Uticaj supernatanata 48 sati stare kulture soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 na indukciju različitih tipove autofagije u zavisnosti od γ -aminobuterne kiseline

Supernatanti kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom (bakterijskom ili sintetičkom) značajno su stimulisali ekspresiju iRNK *ULK1*, *UVRAG*, *Becn-1*, *ATG5*, *p62*, *LC3* i *GABARAP* ($p < 0,001$) (Slika 25). Supernatant kulture soja BGZLS10-17 bez γ -aminobuterne kiseline značajno je stimulisao ekspresiju iRNK *ULK1*, *UVRAG*, *LC3* ($p < 0,05$), *Becn-1* i *ATG5* ($p < 0,01$) i *p62* ($p < 0,001$) (Slika 25 A – F). Supernatanti kulture soja BGZLS10-17 koji sadrže γ -aminobuternu kiselinu ostvarili su statistički značajniji efekat na ekspresiju svih navedenih gena uključenih u proces autofagije u odnosu na supernatant kulture soja BGZLS10-17 bez γ -aminobuterne kiseline. Iako tretmani svim supernatantima indukuju autofagiju, samo tretman supernatantima sa γ -aminobuternom kiselinom (bakterijskom ili sintetičkom) statistički značajno stimulišu ekspresiju *GABARAP* u poređenju sa netretiranim ćelijama ($p < 0,001$) ili ćelijama tretiranim supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline ($p < 0,01$) (Slika 25 G).

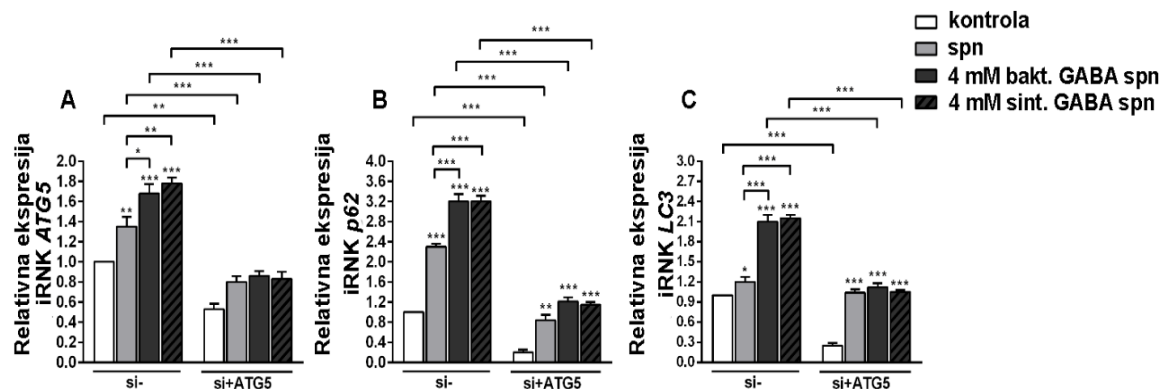


Slika 25. Sposobnost supernatanata soja BGZLS10-17 da indukuju autofagiju u MLNC. Efekat supernatanata na relativnu ekspresiju iRNK (A) *ULK1*, (B) *UVRAG*, (C) *Becn-1*, (D) *ATG5*, (E) *p62*, (F) *LC3* i (G) *GABARAP* u MLNC tretiranim supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline i supernatantom 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline. Vrednosti su normalizovane u odnosu na kontrolu i predstavljene kao relativna ekspresija iRNK. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ($n=3$) \pm standardne devijacije. Za poređenje su korišćeni jednofaktorska ANOVA i Tukey post hoc test (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$); bakt. - bakterijska; sint. - sintetička, spn. – supernatant; GABA- γ -aminobuterna kiselina.

4.9.4. Imunosupresivni efekti γ -aminobuterne kiseline sadržane u supernatantu 48 sati stare kulture soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 zavisi su od ATG5 posredovane indukcije autofagije

Da bi se detaljno ispitala uloga supernatanata soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 u autofagijom posredovanoj imunosupresiji autofagija je inhibirana u MLNC utišavanjem gena za ATG5 korišćenjem siRNK. MLNC su tretirane si⁺ ATG5 ili si⁻ kao kontrolom i praćen je efekat na metaboličku aktivnost i imunske funkcije Kon-A stimulisanih MLNC nakon 24 h. Sposobnost supernatanata da indukuju ekspresiju *ATG5*, *p62* i *LC3* statistički

značajno je smanjena ($p < 0,001$) nakon tretmana siRNK specifičnom za ATG5 u poređenju sa kontrolom (Slika 26 A, B i C).

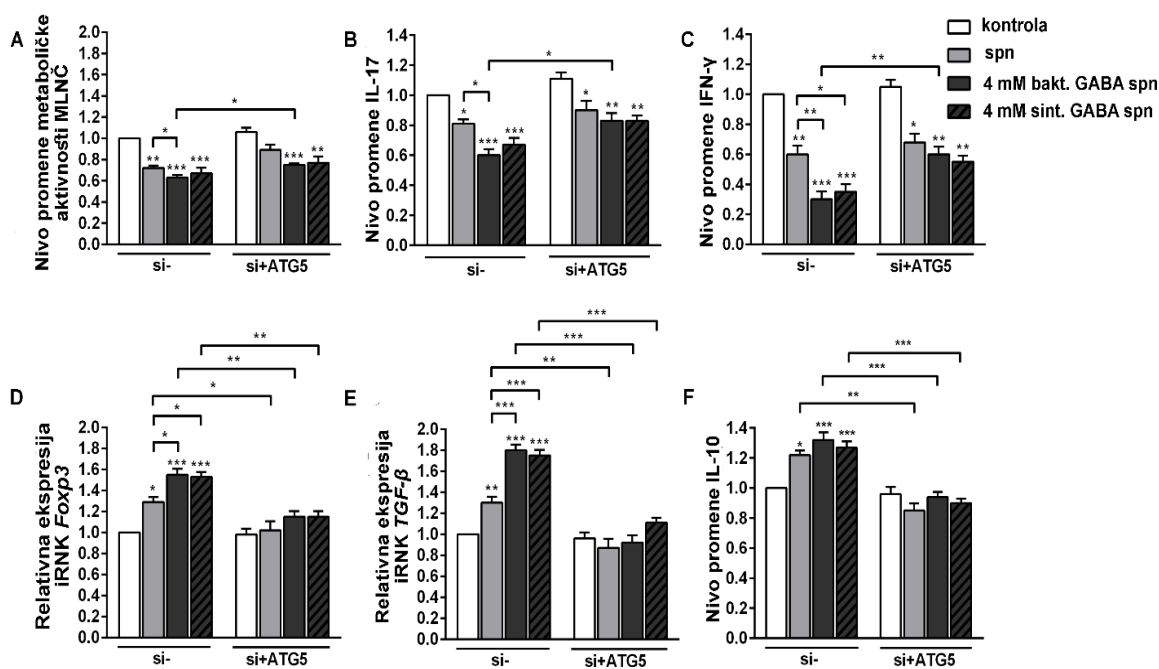


Slika 26. Efekat supernatanata 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 na indukciju autofagije nakon njenog utišavanja sa si+ATG. Efekat supernatanata BGZLS10-17 na relativnu ekspresiju iRNK (A) *ATG5*, (B) *p62* i (C) *LC3* Kon-A stimulisanih MLNC transfekovanih sa si+ ATG5 ili kontrolnom siRNK nakon 24 h tretmana. MLNC su tretirane supernatantom bez γ -aminobuternekiseline, supernatantom sa 4 mM bakterijske γ -aminobuternekiseline i supernatantom 4 mM sintetičke γ -aminobuternekiseline. Vrednosti su normalizovane u odnosu na kontrolu i predstavljene kao relativna ekspresija iRNK. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ($n=3$) \pm standardne devijacije. Za poređenje su korišćeni jednofaktorska ANOVA i Tukey post hoc test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$); bakt. - bakterijska; sint. - sintetička, spn. – supernatant; GABA - γ -aminobuterna kiselina.

Tretman MLNC sa si + ATG5 potpuno je utišao supernatantima stimulisanu ekspresiju *ATG5* u MLNC posle 24 h, tako da je nivo ekspresije *ATG5* bio jednak u kontrolnim siRNK + ATG5 i si+ATG5 MLNC tretiranim supernatantima kulture soja BGZLS10-17. S druge strane, ekspresija *p62* i *LC3* bila je skoro potpuno inhibirana u kontrolnim MLNC tretiranim sa ATG5 siRNK, ali je značajno i nepotpuno smanjenje supernatantima indukovane ekspresije *p62* i *LC3* uočeno u si+ ATG5 MLNC u poređenju sa si- MLNC.

Kada se blokira autofagija u MLNC si+ATG5 (Slika 27) inhibitorni efekat supernatanata kulture soja BGZLS10-17 na metaboličku aktivnost i Kon-A indukovanu produkciju IL-17 i IFN- γ se značajno smanjuje (Slika 27 A, B i C). Dodatno, ne uočava se ni značajna razlika između efekata supernatanata sa γ -aminobuternom kiselinom i

supernatanata bez γ -aminobuterne kiseline na produkciju IL-17 i IFN- γ . Ipak, si+ ATG5 MLNC tretirane supernatantima produkovale su značajno manje navedenih proinflamatornih citokina ($p < 0,05$ za supernatant bez γ -aminobuternekiseline i $p < 0,01$ za supernatante sa γ -aminobuternom kiselinom) u poređenju sa si+ATG5 kontrolnim MLNC (Slika 27 B i C). Blokada autofagije sa si+ ATG5 potpuno je poništila stimulatorne efekte supernatanata na ekspresiju iRNK *Foxp3* i *TGF- β* i produkciju IL-10 (Slika 27 D, E i F).



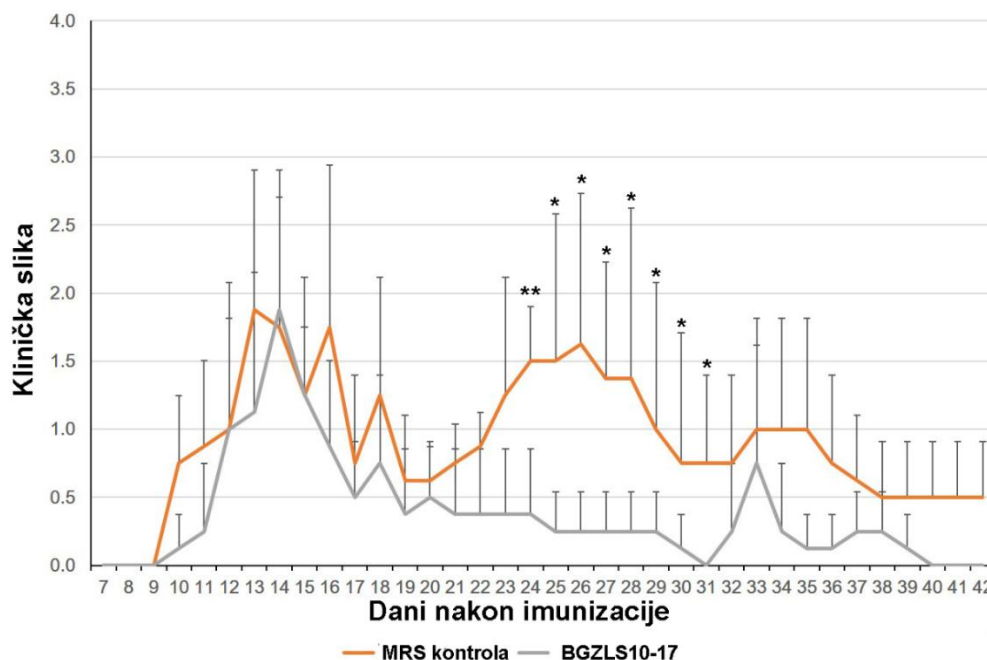
Slika 27. Autofagija indukovana γ -aminobuternom kiselinom je uključena u imunosupresiju. Efekat supernatanata na (A) metaboličku aktivnost, (B) produkciju IL-17, (C) produkciju IFN- γ , (D) relativnu ekspresiju iRNK *Foxp3*, (E) relativnu ekspresiju iRNK *TGF- β* , (F) produkciju IL-10 Kon-A stimuliranih MLNC transfekovanih sa si+ ATG5 ili kontrolnom siRNK nakon 24 h tretmana. MLNC su tretirane supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline, supernatantom sa 4 mM bakterijske γ -aminobuterne kiseline i supernatantom 4 mM sintetičke γ -aminobuterne kiseline. Vrednosti su normalizovane u odnosu na kontrolu i predstavljene kao relativna ekspresija iRNK i nivo promene metaboličke aktivnosti i produkovanih citokina. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ($n=3$) \pm standardne devijacije. Za poređenje su korišćeni jednofaktorska ANOVA i Tukey post hoc test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$); bakt. - bakterijska; sint. - sintetička, spn. – supernatant; GABA - γ -aminobuterna kiselina.

4.10. Ispitivanje imunomodulatornog potencijala soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 na modelu eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa

Kako bi se procenio potencijalni povoljni efekat γ -aminobuterne kiseline na autoimunske bolesti *in vivo*, DA pacovi kod kojih je izazvan EAE su tretirani sojem *Lb. brevis* BGZLS10-17, koji produkuje γ -aminobuternu kiselinu, kao i supernatantom 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17 koji je sadržao bakterijsku γ -aminobuternu kiselinu i supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline.

4.10.1. Efekat soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 na klinički tok eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa

Efekti soja BGZLS10-17 na klinički tok EAE praćeni su na ženkama DA pacova. Rezultati ove *in vivo* studije su pokazali da primena soja BGZLS10-17 ublažava težinu bolesti kod DA pacova. Tretman sa BGZLS10-17 odložio je početak bolesti i skratio period trajanja bolesti, dok su simptomi na vrhuncu bolesti statistički značajno ublaženi, a životinje su se potpuno oporavile posle četrdeset dana dok se kod kontrolnih životinja u ovom periodu još uvek uočavaju simptomi bolesti (Slika 28).

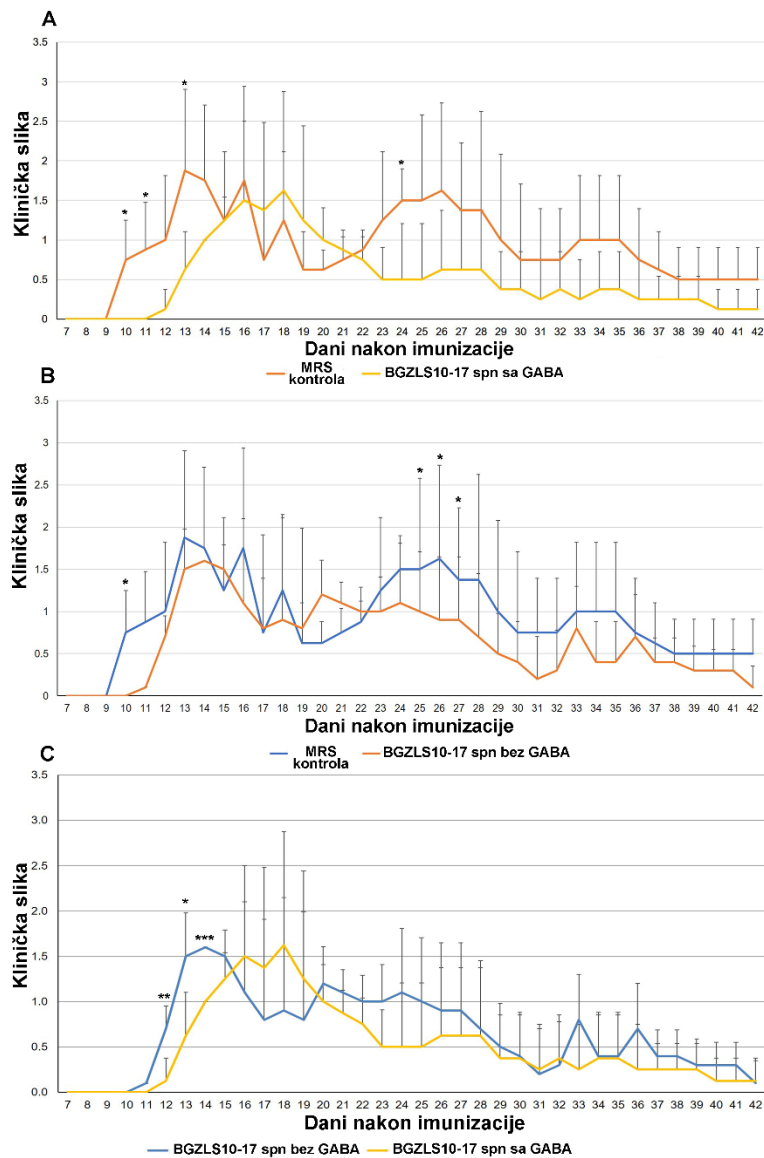


Slika 28. Efekat soja BGZLS10-17 na kliničku sliku EAE ženki DA pacova. Ženke DA pacova su imunizovane HKM pomešanim sa CFA, što dovodi do manifestacije simptoma bolesti sličnih multiploj sklerozi. Kontrolna grupa je pila MRS medijum, a eksperimentalna grupa 16 h kulturu soja BGZLS10-17 u MRS-u (10^9 ćelija po pacovu dnevno). Klinička slika je praćena od 7 do 42 dana. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ($n=5$) \pm standardne devijacije. Za poređenje je korišćen Studentov t-test (* $p<0,05$, ** $p<0,01$). GABA - γ -aminobuterna kiselina.

4.10.2. Efekat supernatanata soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 na klinički tok eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa

Da bismo ispitali ulogu γ -aminobuterne kiseline i drugih solubilnih molekula produkovanih od strane soja BGZLS10-17, životinje su tretirane sa supernatantima dobijenim kultivacijom ovog soja u uslovima koji omogućavaju produkciju γ -aminobuterne kiseline (BGZLS10-17 spn sa GABA) kao i u uslovima bez dodatka Na-glutamata, u kojima ovaj soj ne produkuje γ -aminobuternu kiselinu (BGZLS10-17 spn bez GABA). Iz ovih supernatanata bakterijske ćelije uklonjene su filtriranjem. Značajno poboljšanje EAE simptoma je uočeno kada je kao tretman korišćen supernatant kulture soja BGZLS10-17 sa

γ -aminobuternom kiselinom, što jasno ukazuje na ulogu γ -aminobuterne kiseline i drugih solubilnih molekula koje proizvodi BGZLS10-17 u poboljšanju EAE prognoze. Blago poboljšanje EAE simptoma uočeno je i kada je kao tretman korišćen supernatant BGZLS10-17 bez γ -aminobuterne kiseline, što sugerira da osim γ -aminobuterne kiseline i drugi metaboliti ove bakterije u supernatantu mogu biti mogući postbiotici (Slika 29 A i B). Značajno je pomenuti da prisustvo γ -aminobuterne kiseline u supernatantu dovodi do statistički značajnog odlaganja dostizanja pika bolesti u odnosu na supernatant bez γ -aminobuterne kiseline (Slika 29 C).



Slika 29. Efekat supernatanta soja BGZLS10-17 (A) sa γ -aminobuternom kiselinom, (B) bez γ -aminobuterne kiseline i (C) poređenje efekata supernatanta sa γ -aminobuternom kiselinom i supernatanta bez ovog metabolita na kliničku sliku EAE ženki DA pacova. Ženke DA pacova su imunizovane HKM pomešanim sa CFA, što dovodi do manifestacije simptoma bolesti sličnih multiploj sklerozi. Kontrolna grupa je pila MRS medijum, a eksperimentalne grupe supernatant soja BGZLS10-17 gajen 48 sati u MRS-u sa Na-glutamatom (BGZLS10-17 spn sa γ -aminobuternom kiselinom) i supernatant soja gajen 48 sati u MRS – u bez Na-glutamata (BGZLS10-17 spn bez γ -aminobuterne kiseline). Klinička slika je praćena od 7 do 42 dana. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti ($n=5$) \pm standardne devijacije. Za poređenje je korišćen Studentov t-test (* $p<0,05$). GABA - γ -aminobuterna kiselina.

5. DISKUSIJA

Mlečnokiselinske bakterije (MKB) su heterogena grupa mikroorganizama. Mogu se naći u fermentisanim proizvodima od mesa, povrća, i u mlečnim proizvodima, a deo su i mikrobiote biljaka i mukoznih površina životinja i čoveka kao što su gastrointestinalni trakt, urogenitalni trakt, koža i mogu imati blagotvoran uticaj na ove ekosisteme (Harzallah i Belhadj, 2013). MKB imaju GRAS status, odnosno iskustveno se smatraju bezbednim za upotrebu u ishrani čoveka. Koncept korišćenja hrane koja ima medicinsku vrednost sve je aktuelniji i ovakav tip hrane naziva se funkcionalnom hranom. Pokazano je da doprinosi zdravlju usled upotrebe MKB i fermentisanih proizvoda nastalih njihovom metaboličkom aktivnošću uključuje modulaciju imunskog sistema, povećanu otpornost na malignitete i infekcije (Soccol et al., 2010). Razvoj funkcionalne hrane se zasniva na upotrebi probiotika i postbiotika za koje je pokazano terapijsko dejstvo. Nekoliko mehanizama se nalazi u osnovi probiotičke aktivnosti uključujući antimikrobnu aktivnost, pozitivan uticaj na sastav crevne mikrobiote, kompetitivnu adheziju za mukozu creva i intestinalne epitelne ćelije, modulaciju imunskog odgovora, jačanje epitelne barijere creva i produkciju različitih bioaktivnih molekula među kojima je i γ -aminobuterna kiselina (Bermudez-Brito et al., 2012). Sa druge strane termin postbiotici, ili metaboliti, supernatanti bez ćelija (engl. *Cell-free supernatants, CFS*), odnosi se na solubilne faktore, produkte metabolizma bakterija koje proizvode žive bakterije ili se oslobađaju nakon lize bakterijskih ćelija, a doprinose zdravlju korisnika (Aguilar-Toalá et al., 2018). Uprkos činjenici da mehanizmi koji su uključeni u korisne efekte postbiotika na zdravlje nisu u potpunosti razjašnjeni, naučni podaci pružaju dokaze da postbiotici imaju različite funkcionalne osobine koje uključuju, ali se ne ograničavaju na, antimikrobno, antioksidativno i imunomodulatorno dejstvo (Aguilar-Toalá et al., 2018). Japanska vlada je hranu obogaćenu γ -aminobuternom kiselinom definisala kao „hranu za posebnu zdravstvenu upotrebu“ (engl. *foods for specified health use*). Zbog povećane svesti javnosti o upotrebi hrane prirodnog porekla, sve više pažnje posvećuje se i upotrebi metabolita koje proizvode izolati MKB iz autohtonih proizvoda. S obzirom na pokazane efekte γ -aminobuterne kiseline na zdravlje, identifikacija i karakterizacija MKB koje proizvode γ -aminobuternu kiselinu važna je za

proizvodnju funkcionalne hrane obogaćene ovim metabolitom ili probiotika koji će ga *in situ* proizvoditi. Stoga je cilj ove studije bio karakterizacija prirodnih izolata MKB koji proizvode γ -aminobuternu kiselinu kako bi se na kraju koristili u formulaciji funkcionalne hrane obogaćene ovim metabolitom.

5.1. Karakterizacija prirodnih izolata mlečnokiselinskih bakterija proizvođača γ -aminobuterne kiseline

Da bi se seletovali prirodni izolati MKB sa najvišom aktivnošću enzima glutamat dekarboksilaze (GAD), sojevi MKB laboratorijske kolekcije testirani su na prisustvo *gadB* gena, gena koji kodira GAD enzim, PCR analizom. U ovom radu nakon PCR analize je pokazano da 40,92 % testiranih izolata MKB poseduje *gadB* gen, a da su najbrojniji nosioci *gadB* gena bili laktobacili (83 od testiranih 159), dok za njima slede laktokoke (15 od testiranih 64). Poravnanjem aminokiselinskih sekvenci GAD enzima Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija De Biase i Pennacchietti (2012) su pokazali da je 84 % aminokiselina konzervirano. Prilikom konstrukcije prajmera Siragusa i koautori (2007) su koristili visoko konzervisanu sekvencu GAD proteina mlečnokiselinskih bakterija tako da je uzrok negativne reakcije u PCR analizi najverovatnije posledica odsustva samog gena, a ne posledica varijabilnosti sekvenci. Prilikom Produkcija γ -aminobuterne kiseline, TLC metodom, detektovana je samo kod 14 sojeva (4.6%) roda *Lactobacillus* koji pripadaju vrstama *Lb. brevis* i *Lb. plantarum*. Ovo je relativno mali procenat sojeva u poređenju sa podacima drugih grupa, među kojima su Siragusa i koautori (2007), koji su identifikovali 61 soj koji proizvode γ -aminobuternu kiselinu od 440 (13,86 %) nasumično odabranih Gram-pozitivnih, katalaza negativnih, nepokretnih acidifikujućih izolata iz različitih italijanskih sireva. Među laktobacilima produkcija γ -aminobuterne kiseline detektovana je kod vrsta *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. rhamnosus* i *Lb. casei* i *Lb. brevis*, dok je među ostalim rodovima produkcija ovog metabolita detektovana kod *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Ln. pseudomesenteroides*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus durans* i *Weisela cibaria*, s tim da su se kao najbolji proizvođači izdvojili *Lb. paracasei* PF6, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* PR1, *Lc.*

lactis PU1, *Lb. plantarum* C48 i *Lb. brevis* PM17, produkujući 99,9, 63,0, 36,0, 16,0 odnosno 15,0 mg/kg γ -aminobuterne kiseline tokom fermentacije u rekonstituisanom obranom mleku (Siragusa et al., 2007). Franciosi i koautori (2015) detektovali su 68 izolata koji produkuju γ -aminobuternu kiselinu od ukupno 97 (70,10 %) iz „Nostrano“ sira napravljenog od alpskog sirovog mleka, a najbrojniji proizvođači su bili laktobacili i to vrste *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* i *Lb. casei*. Među ostalim rodovima kao proizvođači γ -aminobuterne kiseline istakli su se *St. thermophilus*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* i *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Ln. mesenteroides* i *Pediococcus pentosaceus*. Međutim od 68 sojeva proizvođača γ -aminobuterne kiseline samo 13 je produkovalo više od 4 mg/kg, a pripadali su vecinom vrsti *Lb. paracasei*, jedan soj je bio *Lb. rhamnosus*, a jedan *St. thermophilus* (Franciosi et al., 2015). Valenzuela i koautori (2019) su od 262 izolata MKB, izolovanih iz tradicionalnih mlečnih proizvoda, napravljenih od sirovog mleka bez dodataka komercijalnih starter kultura, kod 123 detektovali produkciju γ -aminobuterne kiseline (46,94 %). Od 123 izolata kao samo 24 je produkovalo više od 1 mM γ -aminobuterne kiseline, s tim da je 16 sojeva pripadalo vrsti *Lc. lactis* subsp. *lactis*, 3 vrsti *St. thermophilus*, a 5 vrsti *Lb. brevis*. Na osnovu literaturnih podataka može se zaključiti da su najbrojniji i najbolji proizvođači γ -aminobuterne kiseline među MKB laktobacili i to pripadnici vrsta *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* i *Lb. brevis*, dok se među ostalim rodovima kao dobri proizvođači ističu *St. thermophilus* i *Lc. lactis*. Iako je u našoj studiji nakon inicijalne analize PCR metodom izdvojeno 124 potencijalna proizvođača γ -aminobuterne kiseline koji su pripadali rodovima *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Pediococcus*, pri čemu su najbrojniji predstavnici roda *Lactobacillus* pripadali vrstama *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* i *Lb. brevis*, dok najbrojniji predstavnici roda *Lactococcus* bili *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, što je u korelaciji sa literaturnim podacima, nakon TLC i HPLC analize produkcija γ -aminobuterne kiseline pokazana je samo kod sojeva vrsta *Lb. plantarum* i *Lb. brevis*.

Kvantifikacija produkovane γ -aminobuterne kiseline urađena je HPLC metodom, a najbolji proizvođači bili su sojevi *Lb. brevis* BGZLS10-17 (62 mM) i *Lb. plantarum* BGAN8 (82 mM) nakon 48 sati rasta u MRS medijumu sa dodatkom 1% natrijum-glutamata. Zanimljivo, soj *Lb. paracasei* NFRI7415, izolovan iz tradicionalnog

fermentisanog japanskog jela kimči, produkovao je sličnu količinu γ -aminobuterne kiseline (60 mM) pri dodatku 1% Na-glutamata, ali tek nakon 144 sata (6 dana) kultivacije (Komatsuzaki et al., 2005). *Lb. brevis* 340G, takođe izolat iz kimčija, u medijumu sa 1 % Na-glutamata produkovao je 15,5 mM γ -aminobuterne kiseline nakon 48 sati kultivacije (Seo et al., 2013), a soj *Lb. brevis* HYE1 nakon kultivacije od 48 sati u medijumu sa 1 % Na-glutamata produkovao je 14,64 mM γ -aminobuterne kiseline (Lim et al., 2017). Dodatno, različiti autori su pokazali da se proizvodnja γ -aminobuterne kiseline može poboljšati optimizacijom uslova za kultivisanje. Na primer, soj *Lb. buchneri* MS, izolovan iz kimčija, nakon optimizacije uslova produkovao je 251 mM γ -aminobuterne kiseline nakon 48 sati, odnosno za 18 % više u odnosu na standardnu kultivaciju (Cho et al., 2007), dok je *Lb. brevis* NCL912 nakon optimizacije uslova kultivisanja produkovao 345,83 mM, odnosno za 130 % više γ -aminobuterne kiseline u odnosu na standardnu kultivaciju (Li et al., 2010). Iako testiranjem naše kolekcije nije pronađen veliki broj izolata koji proizvode γ -aminobuternu kiselinu, na osnovu poređenja sa literaturnim podacima, može se zaključiti da izolati kod kojih je detektovana produkcija γ -aminobuterne kiseline spadaju u dobre proizvođače ovog biogenog amina. Zanimljivo, iako je soj *Lc. lactis* NCDO218 proizvodio više γ -aminobuterne kiseline sa dodatkom Na-glutamata u medijum, Laroute i koautori (2016) su pokazali da dodatak arginina u medijum dodatno poboljšava produkciju γ -aminobuterne kiseline. Arginin stimuliše dekarboksilaciju glutamata pa je najveća količina γ -aminobuterne kiseline proizvedena od strane ovog soja (8,6 mM) uočena kad su u medijum za rast bakterija dodati i Na-glutamat i arginin. Na-glutamat je prekursor za produkciju γ -aminobuterne kiseline pa je stoga neophodno njegovo dodavanje u medijum kako bi produkcija γ -aminobuterne kiseline bila indukovana što je pokazano u ovoj studiji, ali i brojnim drugim studijama opisanim u literaturi (Zhang et al., 2012; Barret et al., 2012; Kook i Cho, 2013; Lee et al., 2013; Gomma, 2015; Shan et al., 2015; Zhuang et al., 2018). U slučaju fermentacije mleka dolazi do proteolize koja oslobađa L-glutamat koji će biti prekursor za sintezu γ -aminobuterne kiseline (Carafa et al., 2019). Inoue i koauori (2003) su za proizvodnju fermentisanog mlečnog napitka obogaćenog γ -aminobuternom kiselinom koristili dve vrste *Lb. casei* za hidrolizu proteina mleka do L-glutamata i *Lc. lactis* subsp. *lactis* koji je koristio hidrolizovani L-glutamat za sintezu γ -aminobuterne kiseline. Slično su

radili i Wu i koautori (2015) prilikom proizvodnje fermentisanog mlečnog napitka obogaćenog γ -aminobuternom kiselinom, s tim što su za kokultivaciju koristili *Lb. brevis*, soj proizvođač γ -aminobuterne kiseline, i *St. thermophilus* koji je svojom proteolitičkom aktivnošću i oslobađanjem L-glutamata doprineo sintezi γ -aminobuterne kiseline, iako je Na-glutamat i u ovom slučaju u dodat u mleko radi povećanja koncentracije dobijene γ -aminobuterne kiseline. Na-glutamat je jedan od najčešće korišćenih aditiva u prehrambenoj industriji (Niaz et al., 2018). Na-glutamat se apsorbuje iz lumena creva i metaboliše u enterocitama i uključen je u proizvodnju energije potrebne za pokretljivost creva. Prekursor je molekula koji se proizvode unutar crevne mukoze uljučujući: 2-oksoglutarat, L-alanin, ornitin, arginin, prolin, glutation i γ -aminobuternu kiselinu (Tomé, 2018). Iako se koristi kao aditiv u prehrambenoj industriji (E621) njegova upotreba je kontroverzna s obzirom da je pokazano da može da dovede do različitih poremećaja: gojaznosti, neurotoksičnosti i reproduktivnih poremećaja (Niaz et al., 2018). S obzirom na kontroverze oko primene, prilikom obogaćivanja medijuma Na-glutamatom za produkciju γ -aminobuterne kiseline, trebalo bi koristiti koncentracije Na-glutamata koje će odabrani soj moći 100 % da konvertuje do γ -aminobuterne kiseline. S obzirom na imunomodulatorni efekti Na-glutamata (Niaz et al., 2018) u ovoj tezi je za *in vitro* i *in vivo* eksperimente odabrana koncentracija Na-glutamata 0,6 % koju soj *Lb. brevis* BGZLS10-17 kompletno prevodi do γ -aminobuterne kiseline.

5.2. Probiotička karakterizacija sojeva proizvođača γ -aminobuterne kiseline

Analizom sojeva u okviru ove studije, koji proizvode γ -aminobuternu kiselinu, uočeno je da je većina sojeva poreklom iz Zlatarskog ili azerbejdžanskog sira. Zlatarski sir je domaći sir proizveden u udaljenim domaćinstvima na visoravnima prirodnog rezervata planine Zlatar u Srbiji. Pokazano je da izolati MKB iz Zlatarskog sira proizvode antimikrobna jedinjenja sa širokim inhibitornim spektrom, egzopolisaharide (EPS) sa specifičnom imunomodulatornom aktivnošću i razna druga bioaktivna jedinjenja sa

sposobnošću hidrolize žučnih soli i asimilacije holesterola (Veljovic et al., 2007) pa je za dalji rad odabrano samo 7 izolata poreklom iz Zlatarskog sira.

Jedan od glavnih kriterijuma za selekciju probiotičkih sojeva, jeste njihova sposobnost preživljavanja u gastrointestinalnom traktu (WHO - FAO, 2006). To je posebno važno za sojeve koji proizvode bioaktivna jedinjenja, poput γ -aminobuterne kiseline jer moraju da ostanu metabolički aktivni da bi vršili proizvodnju tih jedinjenja na ciljnom mestu. Različite osobine su relevantne za preživljavanje GIT-a, a najvažnije su tolerancija na kisele uslove prisutne u želucu i tolerancija visokih koncentracija žučnih soli prisutnih u tankom crevu (Dowarah et al., 2018). Siragusa i koautori (2007) su izdvojili tri vrste roda *Lactobacillus* koji uspešno preživljavaju uslove GIT-a i mogu da sintetišu γ -aminobuternu kiselinu pri simuliranim uslovima GIT-a, a to su: *Lb. paracasei* PF6, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* PR1 i *Lb. plantarum* C48. U ovom radu od 7 testiranih sojeva samo 4 soja *Lb. brevis* BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 i BGZLS30-2 uspešno preživljavaju nakon prolaska kroz simulirane uslove GIT-a kada su zaštićeni jednim od zaštitnih nosača: mlekom, ukupnim proteinima mleka, pojedinačnim frakcijama proteina mleka ili mucinom, sto je pokazano i u literaturi (Monteagudo-Mera et al., 2012). U ovom smislu je značajno to da unos bakterija posredstvom hrane poboljšava njihovo preživljavanje usled zaštitnih efekata komponenti iz hrane (Ranadheera et al., 2010). Svi prethodno navedeni zaštitni nosači značajno su poboljšali preživljavanje testiranih sojeva u poređenju sa preživljavanjem sojeva u želudačnom soku bez nosača, čija je pH izuzetno niska (pH 2), a slično ponašanje pokazano je i za *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* 193 (Burns et al., 2011), kao i za laktokoke i enterokoke izolovane iz fermentisanih mlečnih proizvoda (Faye et al., 2012) kada je kao zaštitni nosač primenjeno mleko. Primena komercijalnih probiotičkih sojeva takođe je uspešnija kada se kao zaštitni nosač koristi mleko. Lo Curto i koautori (2011) su pokazali da je preživljavanje tri komercijalna probiotička soja: *Lb. casei* subsp. *shirota*, *Lb. casei* subsp. *immunitas*, *Lb. acidophilus* subsp. *johnsonii* mnogo bolje prilikom prolaska kroz GIT ukoliko je kao zaštitni nosač primenjeno mleko nego kada je za iste svrhe korišćena voda. Koncentracija žučnih soli u gastrointestinalnom traktu je dinamična, menja se tokom vremena i u različitim delovima tankog creva. U našim istraživanjima je pokazano da uslove dvanaestopalačnog (1 % žučnih soli) i crevnog soka (0,3 % žučnih soli

i 0,1 % pankreatina) preživljavaju samo sojevi BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 i BGZLS30-2. Relativno visok stepen preživljavanja u prisustvu žučnih soli u simuliranom soku tankog creva ukazuje na otpornost sojeva na žučne soli, koja se može pripisati aktivnosti hidrolaze žučnih soli (engl. *bile salts hydrolase*, *BSH*). BSH katalizuje dekonjugaciju žučnih soli. Slobodne, dekonjugovane žučne soli imaju manju rastvorljivost pri niskom pH, jer dekonjugacija povećava njihovu pKa vrednosti i one precipitiraju kao rezultat fermentativnog metabolizma MKB (Begley et al., 2006). Pretpostavlja se da je *in vivo* jači uzastopni antimikrobni uticaj želudačne kiseline i žučnih soli, nego uticaj svakog od ovih parametara posebno (Marteau et al., 1997).

Odsustvo faktora virulencije, kao što su želatinozna i hemolitička aktivnost, kao i odsustvo stečenih mehanizama rezistencije na antibiotike je preduslov za izbor potencijalnih probiotičkih sojeva (WHO - FAO, 2006). Hemoliza dovodi do oštećenja epitelnih ćelija GIT, a želatinazna aktivnost narušava strukturu sluzokože usled razgradnje kolagena, utičući na taj način na funkcije ove veoma važne strukture GIT kroz koju se razmenjuju mnoge supstance i otvarajući na taj način put patogenim bakterijama. Među sojevima ispitivanim u okviru ove teze nisu detektovani sojevi sa želatinoznom niti sa hemolitičkom aktivnošću. Odsustvo hemolitičke aktivnosti kod laktobacila uočili su i drugi autori (Pisano et al., 2014; Halder et al., 2017; Nallala i Jeevaratnam, 2018), kao i odsustvo želatinozne aktivnosti (Kaktcham, 2012; Amina et al., 2014; Oh et al., 2018).

U skladu sa preporukama Evropske agencije za bezbednost hrane (EFSA, 2012) procenjena je osetljivost sojeva na različite grupe antibiotika. Korišćeni su antibiotici inhibitori sinteze ćelijskog zida (ampicilin) i inhibitori sinteze proteina (gentamicin, kanamicin, streptomycin, eritromicin, hloramfenikol, klindamicin i tetraciklin). Rezistencija je definisana na osnovu preporuke EFSA (2012) za obligatne heterofermentativne laktobacile, kojima vrsta *Lb. brevis* pripada. Rezultati su pokazali da je samo jedan soj BGZLS10-17 osetljiv na sve testirane antibiotike, dok su ostala 3 soja bila rezistentna na 1 do 3 testirana antibiotika (ampicilin, kanamicin i tetraciklin). Ipak, prema prethodnim studijama, važno je razlikovati stečene vidove rezistencije, podložne horizontalnom transferu gena, od urođene rezistencije specifične za određene bakterijske vrste, rodove ili

više taksonomske kategorije (Danielsen i Wind, 2003; Argyri et al., 2013). Rezistencija na kanamicin je potvrđena kod većine vrsta *Lactobacillus* i smatra se karakterističnom za laktobacile zbog odsustva citohromom posredovanog elektron transportnog lanca koji posreduje u unosu leka (Temmerman et al., 2003; Argyri et al., 2013). Rezistencija na kanamicin i tetraciklin pokazana je kod *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Argyri et al., 2013). S druge strane, rezultati Zhou i koautora (2005) su pokazali da su sojevi roda *Lactobacillus* rezistentni na β -laktamske antibiotike (penicilin, ampicilin i cefalotin), ali da se čini da je učestalost transmisije među MKB niska, jer je statistički samo nizak procenat MKB otporno na β -laktamske antibiotike. Prema tome, možemo da smatramo da otpornost na antibiotike sojeva roda *Lactobacillus*, koji su analizirani u ovoj studiji, nije prepreka za bezbednu upotrebu navedenih sojeva.

Antimikrobna aktivnost je veoma cenjeno svojstvo MKB, koje omogućava korišćenje probiotičkih MKB kao alternative za upotrebu antibiotika u borbi protiv patogenih bakterija (O'Shea et al., 2012). Sojevi *Lb. brevis* pokazali su različite stepene antagonističkog delovanja na relevantne patogene bakterije. Najpotentnije antimikrobno dejstvo ostvario je soj BGLMM10 (11 od 18 testiranih patogena), dok je supernatant kulture ovog soja ostvario antagonističko dejstvo na 7 testiranih patogena. Interesantno je da soj BGZLS10-17 nije ispoljio antimikrobnu aktivnost ni prema jednom testiranom patogenu. Drugi autori su pokazali antimikrobnu aktivnost laktobacila na različite patogene uključujući *Clostridium difficile* (McFarland, 2015), *E.coli* (Kumar et al., 2016), *Shigella* spp. (Mirnejad et al., 2013), *Streptococcus mutans* (Ahn et al., 2018), *Staphylococcus aureus* (Kang et al., 2017). Laktobacili proizvode mlečnu kiselinu, sirćetnu kiselinu, mravlju kiselinu kako bi smanjile pH vrednost u mikrosredinama u intestinumu što može da bude jedan od ključnih mehanizama antimikrobne aktivnosti. Produkuju i antimikrobne molekule kao što su: etanol, masne kiseline, vodonik peroksid i bakteriocini kako bi pospešili antimikrobnu aktivnost (Chen et al., 2019; Georgieva et al., 2015; Inglin et al., 2015). S obzirom na negativni rezultat dobijen korišćenjem pronaze E ustanovljena antimikrobna aktivnost sojeva u ovom radu nije proteinske prirode, već verovatno poreklom od mlečne kiseline ili nekih drugih molekula koje testirani sojevi produkuju ili od njihovog sinergističkog efekta.

Sposobnost adhezije omogućava bakterijama da kolonizuju GIT i zadrže se u crevima. Ovo je posebno važno za proizvođače γ -aminobuterne kiseline s obzirom da je maksimalna produkcija ovog metabolita dobijena nakon 48 sati gajenja. Stoga ova karakteristika može biti delimično zavisna od opstanka soja u crevima i adhezije za mukozne površine. Mehanizmi adhezije laktobacila za površinu intestinalnih epitelnih ćelija uključuju vezivanje pomoću specifičnih receptora i nespecifično fizičko vezivanje kao što su hidrofobne interakcije (Ljungh i Wadström, 2006). Pan i koautori (2006) su pokazali vezu između hidrofobnosti i adhezije za intestinalne epitelne ćelije (IEĆ). S tim u vezi pokazano je i da prisustvo nekih površinskih proteina, kao što su proteinaze usidrene u ćelijski zid, povećava hidrofobnost i adheziju MKB (Muñoz-Provencio et al., 2012). Prisustvo adhezina na površini bakterijskih ćelija dodatno doprinosi vezivanju bakterija (Ljungh i Wadström, 2006). Neke vrste laktobacila na svojoj površini ekspimiraju proteine S-sloja koji pokrivaju površinu bakterije tokom rasta i sadrže supstance koje utiču na adheziju za intestinalne ćelije (Ventura et al., 2002). Sposobnost autoagregacije povezana je sa adhezivnom sposobnošću MKB (Del Re et al., 2012). Miljkovic i koautori (2015) su okarakterisali agregacioni faktor soja *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64 velike molekulske mase uključen u formiranje ćelijskih agregata, koji su direktno odgovorni za adheziju za kolagen i fibronektin, dok su Veljović i koautori (2017) okarakterisali agregacioni faktor enterokoka koji doprinosi adheziji za kolagen i fibronektin, kao i za Caco-2 ćelije. Analiza adhezije sojeva u ovom radu pokazala je da se sva 4 ispitivana soja vezuju za Caco-2 ćelijsku liniju, iako je procenat adhezije varirao između sojeva, od 11 do 22 %. U istraživanju Hynönen i koautora (2002) pokazano je da vezivanju soja *Lb. brevis* za fibronektin i epitelne intestinalne ćelije zavisi od prisustva proteina S-sloja. Različit stepen vezivanja pokazan je za različite sojeve laktobacila. Tuomola i Salminen (1998) su pokazali da se sojevi *Lb. rhamnosus* iz različitih probiotičkih proizvoda vezuju od 7 do 14 %, a *Lb. casei* sojevi od 2 do 4 %. Adhezija sojeva *Lb. plantarum* se veoma razlikuje i može biti od 6 % (Tuomola i Salminen, 1998) sve do 83 % (Moussavi i Adams, 2010). Sojevi *Lb. brevis* takođe su ispoljili različit stepen vezivanja za Caco-2 ćelije. Lim i Ahn (2012) su pokazali da *Lb. brevis* MLK27 adherira 30 %, Xu i koautori (2009) su pokazali da se *Lb. brevis* vezuje < 6 % za Caco-2 ćelije, dok su

Ramos i koautori (2013) pokazali izuzetno nizak procenat adhezije za 2 soja *Lb. brevis* (SAU105 0,3 % i FFC119 1,1 %) Navedeni podaci pokazuju da je sposobnost vezivanja laktobacila za intestinalne ćelije raznolika i specifična za svaki soj. Komercijalni probiotički soj *Lb. rhamnosus* GG vezuje se oko 3 % za Caco-2 ćelije (Nikolic et al., 2012), a prethodno je ovaj soj opisan kao soj koji dobro adherira za Caco-2 ćelije (Elo et al., 1991) pa se može zaključiti da testirani sojevi iz ove teze, pripadaju sojevima koji dobro adheriraju sa potencijalom da se i *in vivo* vežu za intestinalne ćelije creva i tu ostvare svoje probiotičke funkcije.

Dodatno, sposobnost probiotičkih sojeva da kompetitivnom ekskluzijom spreče vezivanje patogena u crevima važno je svojstvo probiotika kojim doprinose zdravlju domaćina. Sposobnost bakterija da kompetitivno isključe druge bakterije se takođe zasniva na ekspresiji različitih površinskih komponenti kao što su proteini vezani za površinu ćelija (Varma et al., 2010), proteina S-sloja (Zhang et al., 2010), agregacionog faktora (Miljkovic et al., 2015) i egzopolisaharida (Zivkovic et al., 2015; Živković et al., 2016). U ovom radu je testirana sposobnost *Lb. brevis* sojeva da smanje adheziju *E. coli* ATCC25922 i *S. enterica* C29039 za Caco-2 ćelije. Rezultati su pokazali visoku redukciju adhezije oba navedena patogena soja u prisustvu 4 testirana izolata *Lb. brevis*, a što je u korelaciji sa do sada opisanim stepenom adhezije samih *Lb. brevis* sojeva na Caco-2. Izuzev soja BGLMM10, ostali sojevi pokazali su slabu antimikrobnu aktivnost sto ukazuje da je ekskluzija *E. coli* i *Salmonella* najverovatnije posledica kompeticije za vezivna mesta na Caco-2, a ne baktericidne prirode. Soj BGZLS10-17 ne pokazuje antimikrobnu aktivnost, kako sam soj, tako ni njegov supernatant, ni prema jednom testiranom patogenu, ali pokazuje izuzetno visok procenat sprečavanja vezivanja bakterija *E. coli* i *Salmonella* za Caco -2 ćelije, pri čemu u slučaju *E. coli* za čak 80 %. Slične rezultate dobili su Son i koautori (2017) koji su pokazali da *Lb. brevis* KU15006 smanjuje adheziju *E. coli* i *S. typhimurium* za Caco-2 ćelije za 82 % odnosno 44 %, dok su Lim i Ahn (2012) pokazali da *Lb. brevis* MLK27 ne smanjuje statistički značajno vezivanje *S. typhimurium* za Caco-2 ćelije, iako sam u visokom procentu adherira za Caco-2. Slične rezultate dobili su Candela i koautori (2008) sa drugim vrstama laktobacila koji su pokazali da sojevi *Lb. acidophilus* Bar13, *Lb. plantarum* Bar10, *Bifidobacterium longum* Bar33 i *B. lactis* Bar30 redukuju

vezivanje enteropatogenih *S. typhimurium* i *E. coli* H10407 za Caco-2 ćelije, dok su Gopal i koautori (2001) pokazali da predtretman *E. coli* O157:H7 koncentrovanim supernatantima sojeva *Lb. acidophilus* HN017, *Lb. rhamnosus* DR20 i *B. lactis* DR10 smanjuje broj vijabilnih *E.coli*, ali i redukuje i adhezivne i invazivne sposobnosti O157:H7.

Jedan od glavnih mehanizama kojima probiotici ostvaruju svoju funkciju jeste jačanje epitelne barijere u crevima. Crevni epitel je u stalnom kontaktu sa luminalnim sadržajem i promenljivom, dinamičnom mikrobiotom. Transport različitih molekula iz lumena GIT vrši se paracelularnim transportom. Kontrolori paracelularnog transpota jesu čvrste veze, apikalno locirane veze između epitelnih ćelija. Čvrste veze omogućavaju prolaz malim molekulima kao što su joni, ali ograničavaju prolaz velikih molekula kao što su antigeni i mikroorganizmi koji mogu biti uzrok inflamacije. Integralni proteini membrane: kludin, okludin i zonulin uključeni su u formiranje paracelularnih kanala (Berkes et al., 2003). Protein IL-1 β ima centralnu ulogu u promovisanju intestinalne inflamacije, delimično stimulišući IEC da produkuju IL-8, potentan hemoatraktant neutrofila i T limfocita (Schuerer-Maly et al., 1994). Navedena proinflamatorna kaskada uključena je u patogenezu različitih inflamatornih bolesti. Epitel u delovima creva zahvaćenih inflamacijom karakteriše se slabljenjem čvrstih veza (Schulzke et al., 2009). Pored toga što promovise inflamatornu kaskadu, Al-Sadi i koautori (2008) su pokazali da IL-1 β uzrokuje povećanje propustljivosti creva i da je upravo ovo oštećenje rani događaj u razvoju različitih inflamatornih stanja. Kod pacijenata obolelih od inflamatorne bolesti creva narušena je funkcija čvrstih veza, povećana je produkcija proinflamatornih citokina i narušena je homeostaza imunskog sistema (Edelblum i Turner, 2009). S obzirom na sposobnost γ -aminobuterne kiseline da smanji inflamaciju, u daljem radu je ispitan efekat supernatanta kulture soja *Lb. brevis* BGZLS10-17, izolata iz Zlatarskog sira koji produkuje najveće količine γ -aminobuterne kiseline, na ekspresiju proteina čvrstih veza u diferenciranim Caco-2 ćelijama i pokazano je da su supernatanti kulture navedenog soja, koji su sadržali 1, 2 i 4 mM γ -aminobuterne kiseline, pozitivno uticali na ekspresiju iRNK proteina čvrstih veza. U vezi sa tim, u okviru ove teze je testirano da li tretman supernatantom kulture soja BGZLS10-17 sa 4 mM bakterijske ili sintetičke γ -aminobuterne kiseline, može da neutrališe štetne efekte IL-1 β na proteine čvrstih veza. Kao kontrolni

tretman korišćen je supernatant kulture navedenog soja, ali bez γ -aminobuterne kiseline. Ono što je interesantno je da su svi supernatanti kulture ovog soja uspeli da neutrališu štetne efekte IL-1 β s tim da su supernatanti sa γ -aminobuternom kiselinom dodatno stimulisali ekspresiju iRNK za ove proteine. Potencijal γ -aminobuterne kiseline sadržane u supernatantu kulture soja BGZLS10-17 da zaštiti proteine čvrstih veza od štetnog dejstva inflamacije, u skladu je sa rezultatima koji se odnose na potencijal γ -aminobuterne kiseline da poboljša funkciju epitelne barijere creva, delujući preko selektivne regulacije Mucin-1 proteina u izolovanom jejunumu svinje (Braun et al., 2015), dok su Abd El-Hady i koautori (2017) pokazali da primena γ -aminobuterne kiseline redukuje degenerativne promene u epitelnim ćelijama jejunuma i značajno povećava preživljavanje crevnih resica i kripti kod pacova izloženih γ -zracima. S obzirom na dobijene rezultate u daljem radu je ispitivano da li supernatanti kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom (bakterijskom ili sintetičkom) i supernatant bez γ -aminobuterne kiseline mogu da utiču na ekspresiju iRNK *IL-8* indukovanu sa IL-1 β . Supernatanti sa γ -aminobuternom kiselinom značajno smanjuju ekspresiju iRNK *IL-8*, dok tretman supernatantom bez ovog metabolita nije imao efekta na ekspresiju iRNK *IL-8*. Citokin TGF- β ima značajnu ulogu u održavanju integriteta epitelne barijere kao i u smanjenju neumerene inflamacije (Planchon et al., 1994). U skladu sa ovakvim protektivnim efektima TGF- β i obzirom da smo pokazali da IL-1 β dovodi do smanjenja produkcije ovog citokina od strane Caco-2 analizirali smo uticaj tretmana supernatantima kulture soja BGZLS10-17 na ekspresiju iRNK za TGF- β . Svi korišćeni tretmani delovali su do ublažavanja smanjenja ekspresije iRNK TGF- β indukovanog sa IL-1 β , a supernatanti sa γ -aminobuternom kiselinom ponovo su ostvarili statistički značajniji efekat ($p < 0,01$) u prevenciji IL-1 β indukovanog smanjenja ekspresije TGF- β , što svakako može biti jedan od značajnih protektivnih mehanizama supernatanta kulture soja BGZLS10-17 u uslovima inflamacije. Svi navedeni rezultati ukazuju na potencijal supernatanta kulture soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 da neutrališu štetne efekte IL-1 β na Caco-2 ćelije. Potrebno je istaći da prisustvo γ -aminobuterne kiseline (bakterijske ili sintetičke) doprinosi značajnijem protektivnom efektu. Gotovo identičan efekat supernatanta kulture soja BGZLS10-17 sa bakterijskom i sintetičkom γ -aminobuternom kiselinom dodatno osnažuje hipotezu da je u pitanju važan molekul koji doprinosi

protektivnom efektu supernatanta kulture soja BGZLS10-17 na IL-1 β indukovano oštećenje intestinalne barijere. Dodatno, imunomodulatorni potencijal zajedno sa adhezivnim osobinama soja BGZLS10-17 i njegovom sposobnošću za ekskluziju crevnih patogena ukazuje na mogućnost korišćenja BGZLS10-17 u lečenju infekcija creva koje karakteriše intenzivna inflamacija i narušena epitelna barijera.

5.3. Imunomodulatorni potencijal soja *Lb. brevis* BGZLS10-17

Učestalost bolesti koje se karakterišu pojačanim imunskim odgovorom, posebno autoimunskih bolesti, stalno raste (Wang et al., 2015), a do sada razvijene terapije su nedovoljno efikasne te je potrebno razvijanje novih terapijskih pristupa. Otkriće uloge mikrobiote creva u održavanju homeostaze imunskog sistema (Belkaid i Hand, 2014) pokrenulo je istraživanja usmerena ka ispitivanju uloge sastava mikrobiote u patogenezi i razviću bolesti povezanih sa funkcijama imunskog sistema i iskorišćavanju imunomodulatornog potencijala mikroorganizama u terapiji ovih bolesti. Osim što su probiotičke bakterije definisane kao korisne za zdravlje, da bi bile primenjene u tretmanu bolesti neophodno je ispitati efekte i mehanizme delovanja u odgovarajućim *in vitro* i *in vivo* modelima bolesti. Neke od aktivnih molekula, kao što je npr. γ -aminobuterna kiselina, proizvode i eukariotske ćelije i bakterije, tako da je suplementacija domaćina sa takvim probiotičkim bakterijama, ili odgovarajućim postbiotskim preparatima bakterija koje proizvode γ -aminobuternu kiselinu, prirodan način za modulaciju imunskih funkcija domaćina. Receptori za γ -aminobuternu kiselinu pronađeni su u različitim imunskim ćelijama i uključeni su u supresiju produkcije proinflamatornih citokina, što čini γ -aminobuternu kiselinu važnim imunomodulatorom (Bhat et al., 2010). Sposobnost probiotičkih bakterija da proizvode ovaj metabolit čini se dobrom strategijom za modulaciju imunskog odgovora u različitim inflamatornim bolestima. U ovoj tezi je ispitivan imunomodulatorni efekat supernatanta kulture soja BGZLS10-17, sa bakterijskom i sintetičkom γ -aminobuternom kiselinom, kao i bez nje, na Kon-A stimulisanim MLNC i pokazano je da netoksična doza supernatanta značajno smanjuje

metaboličku aktivnost MLNC, ukazujući na potencijalni imunomodulatorni efekat. Supernatanti kulture soja BGZLS10-17 sa bakterijskom ili sintetičkom γ -aminobuternom kiselinom ostvarili su još snažniji uticaj, u poredjenju sa supernatantom bez γ -aminobuterne kiseline, što ukazuje na dodatni imunosupresivni efekat ovog metabolita sadržanog u supernatantu kulture soja BGZLS10-17. Da bi se ova hipoteza detaljnije ispitala merena je proliferacija i produkcija proinflamatornih citokina, a rezultati su pokazali snažan antiproliferativni efekat supernatanata kulture soja BGZLS10-17 na Kon-A stimulisane MLNC, i smanjenu produkciju proinflamatornih citokina IL-17 i IFN- γ . Supernatanti sa γ -aminobuternom kiselinom ponovo su ostvarili statistički značajniji efekat na navedene funkcije ($p < 0,05$). Citokini IL-17 i IFN- γ su markeri Th-17 odnosno Th-1 ćelija i ključni su za proinflamatorni odgovor i patogenezu autoimunskih bolesti (Kuwabara et al., 2017). Glavni imunosupresivni mehanizam uključen u regulaciju Th17 i Th1 ćelijskog odgovora je produkcija antiinflamatornih citokina IL-10 i TGF- β od strane Foxp3 regulatornih T ćelija (Treg) pa je analiziran efekat sva tri tipa supernatanta kulture soja BGZLS10-17 na ekspresiju *Foxp3* i *TGF- β* iRNK i produkciju IL-10. Dobijeni rezultati ukazali su da supernatanti kulture soja BGZLS10-17 ostvaruju antiinflamatorne efekte i indukuju ekspresiju *Foxp3* i *TGF- β* , kao i produkciju IL-10, a takodje su ukazali da γ -aminobuterna kiselina ima dodatni stimulatorni efekat na ekspresiju ovih imunosupresivnih molekula.

Prethodno je pokazano da autofagija ima važnu ulogu u homeostazi imunskog sistema (Zhou i Zhang, 2012), kao i u indukciji i funkciji Foxp3 regulatornih T ćelija (Wei et al., 2016) pa je stoga analiziran i efekat supernatanata kulture soja BGZLS10-17 na autofagiju MLNC. Proces autofagije prati se analizom ekspresije različitih proteina uključenih u inicijaciju, nukleaciju, elingaciju i regulaciju autofagozoma (Jiang i Mizushima, 2014). Najindikativniji marker autofagije je konjugacija citosolne forme proteina LC3 (LC3 I) sa fosfatidiletanolaminom (PE) pri čemu nastaje liposolubilna forma proteina LC3 II (Arbogast i Gros, 2018). LC3 II se ugrađuje u rastuću fagoforu i ostaje vezan tokom celog procesa autofagije. Praćenjem konverzije LC3 I u LC3 II formu proteina ispitivan je efekat supernatanata kulture soja BGZLS10-17 na autofagiju i pokazano je da su samo supernatanti sa γ -aminobuternom kiselinom značajno stimulisali proces autofagije. Sa druge strane FACS analizom pokazano da svi supernatanti snažno indukuju ekspresiju

LC3 II u CD4⁺T, CD8⁺ T, NK i NKT ćelijama, a da su značajniji efekat na ekspresiju LC3 II u navedenim ćelijama ostvarili supernatanti sa γ -aminobuternom kiselinom. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih grupa koje su pokazale da indukcija autofagije u CD4⁺ T limfocitima može biti uključena u indukciju Treg i stimulaciju njihove funkcije, uključujući produkciju IL-10 i TGF- β (Liu et al., 2013). Produkcija imunosupresivnih citokina IL-10 i TGF- β , nije isključiva karakteristika Treg, već ih mogu proizvoditi i druge tolerogene imunske ćelije, kao što su regulatorne B ćelije, DC i Mf (Sanjabi et al., 2009). Takođe, pokazano je da navedeni antiinflamatorni citokini, sprečavaju aktivaciju DC i stimulišu nastanak tolerogenih DC (Gregori, 2011; Akbari et al., 2001; Esebanmen i Langridge, 2017). Stoga je LC3 II ekspresija analizirana u B ćelijama, DC i Mf, a rezultati su pokazali da je ekspresija stimulirana u B ćelijama, DC i Mf, ali značajno manje nego u CD4⁺T, CD8⁺ T, NK i NKT ćelijama i da su supernatanti kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom ponovo ostvarili značajniji efekat kod DC i Mf u poređenju sa supernatantom bez ovog metabolita. Do stimulacije ekspresije LC3 II u B ćelijama doveo je samo supernatant kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom. Svi ovi rezultati ukazuju na dodatni stimulatívni efekat γ -aminobuterne kiseline na autofagiju kod imunskih ćelija što korelira sa dodatnim imunosupresivnim efektom supernatanta sa γ -aminobuternom kiselinom. Relativna ekspresija MHC II molekula po ćeliji bila je smanjena u B ćelijama, DC i Mf. Smanjena ekspresija MHC II molekula kod antigen prezentujućih ćelija ukazuje na smanjenu sposobnost ovih ćelija da prezentuju antigen naivnim antigen specifičnim limfocitima što rezultuje smanjenom aktivacijom ovih ćelija, slabijom diferencijacijom u efektorske Th ćelije i proliferacijom. Zbog ovoga se snižen nivo ekspresije MHC II smatra osobinom tolerogenih antigen prezentujućih ćelija. U skladu sa ovim ranije je pokazano da je autofagija jedan od mogućih mehanizama indukcije tolerogenih DC (Tomić et al., 2017). Pored prezentacije antigena, za aktivaciju naivnih antigen specifičnih limfocita potreban je i drugi signal koji dolazi od kostimulatornih molekula od kojih je CD80 jedan od najznačajnijih. U skladu sa supresivnim efektom supernatanta kulture soja BGZLS10-17, u ovoj tezi je pokazano i da je ekspresija CD80 smanjena u B ćelijama i DC nakon tretmana supernatantima, naročito supernatantima sa γ -aminobuternom kiselinom. Pored sniženog nivoa najvažnijih molekula za aktivaciju i

diferencijaciju antigen specifičnih limfocita dodatno je pokazano i da je ekspresija CTLA-4 na B ćelijama stimulirana nakon tretmana supernatantima kulture soja BGZLS10-17. CD80 prenosi stimulatorne signale T limfocitima preko CD28 (Hubo et al., 2013), ali može da interaguje sa CTLA-4 što dovodi do aktivacije imunoregulatornih signala i indukcije regulatornih T i B ćelija (Sage et al., 2014). Dodatno, pokazano je da je ekspresija CTLA-4, slično kao i Foxp3, regulirana autofagijom (Kato i Perl, 2018). Stoga inhibicija ekspresije CD80 i stimulacija ekspresije CTLA-4 može dovesti do imunoregulatornih efekata koji se primećuju nakon tretmana MLNC supernatantima kulture soja BGZLS10-17. Pored CTLA-4, u ovom radu je pokazano da je ekspresija još jednog inhibitornog molekula SIRP- α na Mf povećana nakon tretmana supernatantima kulture soja BGZLS10-17. Prethodno je pokazano da ligacija CD47 i SIRP- α inhibira fagocitnu aktivnost Mf i indukciju antitumorskog proinflamatornog odgovora, zbog čega je ovaj molekul predložen kao osnova za novi sistem blokade kontrolnih tačaka u imunoterapiji kancera (Weiskopf, 2017). Osim toga pokazano je da ova blokada može biti indukovana spontanom blokiranjem autofagije (Zhang et al., 2018) ukazujući da su ekspresija i funkcija SIRP- α u Mf pozitivno regulirani autofagijom.

Pored LC3, proteini povezani sa autofagijom (engl. *autophagy related gene (ATG) proteins*) čine osnovnu mašineriju procesa autofagije. ULK1 kompleks inicira formiranje fagofora. U narednom koraku ULK1 aktivira Beklin-1 koji je uključen u formiranje fagofora iz endoplazmatičnog retikuluma. Beklin-1 interakcijom sa proteinom povezanim sa otpornošću na UV (engl. *UV radiation resistance-associated gene protein - UVRAG*) promovira formiranje autofagozoma. Kada je fagofora formirana, ATG5 protein, u fazi elongacije autofagije, utiče na rast fagofore i formiranje autofagozoma što dovodi do konverzije solubilne citosolne forme proteina LC3 (LC3 I) u liposolubilnu membransku formu proteina LC3 II. LC3 i GABARAP (engl. *Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*) su konzervirani, ubikvitinu - slični proteini koji se tokom formiranja autofagozoma konjuguju sa glavnom grupom membranskih fosfolipida fosfatidiletanolaminima, a navedena konjugacija je neophodna za biogenezu autofagozoma. Dodatno LC3/GABARAP kompleks regrutuje adaptorne proteine u potpuno formirane autofagozome da bi olakšali fuziju autofagozoma i lizozoma, što ukazuje na njihovu važnu

ulogu i nizvodno od formiranja autofagozoma. Analiza transkripcije gena koji su uključeni u proces autofagije, kao i prethodno navedena konverzija proteina LC3 I u LC3 II, potvrdila je sposobnost supernatanata kulture soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 da stimuliraju proces autofagije. Uzimajući u obzir imunosupresivne efekte supernatanata kulture soja BGZLS10-17, indukcija autofagije je u skladu sa mnogim rezultatima koji ukazuju na snažnu vezu navedenih gena sa imunosupresijom/homeostazom imunskog sistema. S tim u vezi, uloga ULK1-zavisne autofagije pokazana je u kod infektivnih i neinfektivnih inflamacija (Fan et al., 2018; Kemp et al., 2015). Slično, pokazana je povezanost razvoja patoloških inflamatornih stanja sa supresijom autofagije (Luo et al., 2018). Luo i koautori (2017) su pokazali da je nivo mRNA *Becn1* smanjen kod pacijenata obolelih od sistemskog eritemskog lupusa, a da smanjenje ekspresije ovog molekula značajno povećava učestalost nefritisa. Globularni adiponektin, potentni antiinflamatorni protein, inhibira LPS-om stimulisanu ekspresiju proinflamatornih citokina, delimično preko indukcije autofagije u RAW2547 Mf i mišijim peritonealnim Mf (Kim et al., 2017). Proces autofagije uključen je u održavanje stabilnosti i preživljavanje Treg (Wei et al., 2016). Uklanjanje *ATG5* gena u Treg dovodi do gubitka Treg i razvoja inflamacije (Ye et al., 2018). Miševi sa uklonjenim genom za *ATG5* imaju narušenu imunološku homeostazu CD4⁺ i CD8⁺ ćelija što je povezano sa povećanom ekspresijom IFN- γ . Iako je u ovoj tezi pokazano da sva tri tipa supernatanata kulture soja BGZLS10-17, sa bakterijskom, sintetičkom γ -aminobuternom kiselinom, ili bez nje, stimuliraju ekspresiju gena uključenih u proces autofagije, samo supernatanti sa γ -aminobuternom kiselinom, značajno su stimulisali ekspresiju *GABARAP*. Ekskluzivni stimulatorni efekat na ekspresiju *GABARAP* i snažniji stimulatorni efekat supernatanata kulture soja BGZLS10-17 koji sadrže γ -aminobuternu kiselinu na sve druge gene autofagije korelira sa jačim imunosupresivnim efektima koji ostvaruju ovi supernatanti. Navedeni rezultati ukazuju na to da aktiviranje signalizacije preko *GABARAP* ima važnu ulogu u imunosupresivnim efektima BGZLS10-17 supernatanata koji su povezani sa autofagijom. Ovi rezultati su u skladu sa otkrićem Salah i koautora (2016) koji su pokazali ulogu *GABARAP* u tumorogenezi. Oni su pokazali da je supresija imunskog odgovora u tumoru (sekrecija IL-1 β , IL-6, IL-2 i IFN- γ) od strane Mf i limfocita

zavisna od aktivnosti GABARAP, a dodatno su pokazali i da je nivo TGF- β značajno smanjen u serumu miševa kojima je *GABARAP* gen uklonjen.

Utišavanje *ATG5* gena pomoglo je da se rasvetli uloga supernatanata kulture soja BGZLS10-17 u autofagijom posredovanoj imunosupresiji. Tretman si+ATG5 MLNC potpuno je utišao supernatantima stimulisanu ekspresiju *ATG5*, dok ekspresija *p62* i *LC3* nije bila potpuno inhibirana. Takođe nakon utišavanja *ATG5* u MLNC, izgubila se značajna razlika između efekata supernatanata sa γ -aminobuternom kiselinom i supernatanta bez ovog metabolita na MLNC. Ovi rezultati ukazuju da γ -aminobuterna kiselina sadržana u supernatantu kulture soja BGZLS10-17 dodatno indukuje autofagiju preko *ATG5*. Međutim, nepotpuna inhibicija ekspresije *p62* i *LC3* nakon tretmana supernatantima kulture soja BGZLS10-17, uprkos utišavanju *ATG5* gena, ukazuje da smeša molekula koje proizvodi soja BGZLS10-17 u MRS-u u odsustvu Na-glutamata indukuje *ATG5* nezavisnu autofagiju u MLNC. Nakon utišavanja *ATG5* gena efekti supernatanata kulture soja BGZLS10-17 na metaboličku aktivnost i produkciju proinflammatoryh citokina bili su značajno niži, a razlike među efektima supernatanata sa γ -aminobuternom kiselinom i bez nje na produkciju IL-17 i IFN- γ nije bilo. Ipak si+ATG5 MLNC tretirani supernatantima kulture soja BGZLS10-17 proizveli su manje navedenih citokina u odnosu na netretirane si+ATG5 MLNC, ukazujući da je inhibicija produkcije proinflammatoryh citokina od strane γ -aminobuterne kiseline, koju proizvodi soja BGZLS10-17, kompletno *ATG5* zavisna, a da je inhibicija do koje dovodi tretman supernatantom kulture soja BGZLS10-17 bez γ -aminobuterne kiseline samo delimično zavisna od *ATG5*. Sa druge strane utišavanje *ATG5* gena poništilo je stimulatorne efekte supernatanata kulture soja BGZLS10-17 na ekspresiju *Foxp3* i *TGF- β* i produkciju IL-10. Antiinflammatory efekat supernatanata bez γ -aminobuterne kiseline na MLNC najverovatnije je nezavisan od ovog metabolita, *ATG5*, *Foxp3*, IL-10 i *TGF- β* . Inhibitorni potencijal supernatanata kulture soja BGZLS10-17 bez γ -aminobuterne kiseline može biti posredovan direktnim delovanjem tolerogenih APĆ pošto je pokazano da supernatanti kulture soja BGZLS10-17 snižavaju nivo ekspresije proinflammatoryh molekula (MHC-II i CD80) i stimulišu ekspresiju imunosupresivnih molekula (CTLA-4 i SIRP- α) na DC, B ćelijama i Mf. Ovi efekti mogu biti posredovani autofagijom s obzirom da je u ovim APĆ uočena stimulacija autofagije nakon tretmana

supernatantom kulture soja bez γ -aminobuterne kiseline, ali takođe ovi efekti mogu biti i nezavisni od autofagije.

Rezultati ove *in vitro* studije pokazali su da supernatanti kulture soja BGZLS10-17 imaju snažan supresivni efekat na Kon-A stimulisanu MLNC, a da γ -aminobuterna kiselina sadržana u supernatantu kulture soja BGZLS10-17 ima dodatni imunosupresivni potencijal. Dodatno, efekti zavisni od γ -aminobuterne kiseline kompletno su posredovani ATG5 zavisnom autofagijom, a drugi aktivni, solubilni molekuli koje BGZLS10-17 proizvodi su odgovorni za imunosupresiju, pre svega, na ATG5 nezavisan način.

5.4. Efekat soja *Lb. brevis* BGZLS10-17 na klinički tok eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa

Veza između mozga i GIT (engl. *gut brain axis*, *GBA*) predstavlja dvosmernu komunikaciju između centralnog i enteričnog nervnog sistema, povezujući emocionalne i kognitivne centre mozga sa perifernim intestinalnim funkcijama. Veza između mikrobiote GIT-a i GBA takođe je dvosmerna i ostvaruje se preko neuralnih, endokrinih, imunskih i humoralnih faktora (Carabotti et al., 2015). Ravnoteža između mikrobiote i intestinalne barijere narušava se tokom hronične inflamacije i autoimunskih bolesti, a jedno od veoma atraktivnih polja istraživanja je primena određenih mikroorganizama u cilju ponovnog uspostavljanja ravnoteže. Multipla skleroza (MS) je hronična inflamatorna bolest centralnog nervnog sistema u čijoj patogenezi presudnu ulogu imaju populacije pomoćničkih T limfocita, Th1 i Th17 koji proizvode IFN- γ odnosno IL-17. Uloga γ -aminobuterne kiseline kao važnog imunomodulatornog molekula već je pokazana u autoimunskim bolestima kao što su multipla skleroza, reumatoidni artritis i dijabetes tipa 1 (Jin et al., 2013). Pokazano je da je koncentracija γ -aminobuterne kiseline smanjena u serumu pacijenata obolelih od MS (Demakova et al., 2003), a da tretman γ -aminobuternom kiselinom na modelu eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE) ima antiinflamatorni efekat (Prud'homme et al., 2015). Uzimajući u obzir dobijene rezultate na *in vitro* modelima inflamacije, ispitan je efekat soja *Lb. brevis* BGZLS10-17, kao i

njegovih supernatanata, sa γ -aminobuternom kiselinom i bez nje, na modelu EAE, životinjskom modelu MS. Bolest je praćena kod ženki Dark agouti pacova, osetljivih na indukciju EAE, a pokazano je da oralna primena soja BGZLS10-17 ublažava simptome EAE. Poboljšanje EAE simptoma je zabeleženo i nakon primene supernatanata kulture soja BGZLS10-17 gajenih 48 sati u medijumu za rast bakterija, sa dodatkom prekursora γ -aminobuterne kiseline Na-glutamata, ali i sa supernatantom kulture soja BGZLS10-17 koji nije sadržao γ -aminobuternu kiselinu. Da upotreba bakterija sa imunosupresivnom aktivnošću može doprineti terapiji EAE pokazali su i rezultati drugih grupa. Secher i koautori (2017) su pokazali da tretman probiotičkom *E. coli* Nissle 1917 (ECN) moduliše ishod EAE na mišijem modelu MS. Dnevni tretman miševa ECN redukovao je ozbiljnost simptoma EAE, a u osnovi poboljšanja bilo je smanjenje produkcije proinflamatornih citokina i povećanje produkcije IL-10. Lavasani i koautori (2010) su pokazali da je terapijski efekat probiotičkog preparata, koji sadrži mešavinu laktobacila, povezan sa indukcijom tolerogenih T limfocita u mezenteričnim limfnim čvorovima, ali i u centralnom nervnom sistemu i produkcijom IL-10, dok su Consonni i koautori (2018) pokazali da tretman probioticima na modelu EAE kod Lewis pacova dovodi do ublažavanja simptoma bolesti i očuvanja mijelina u kičmenoj moždini.

S obzirom da su rezultati drugih istraživačkih grupa ukazali na sposobnost Treg da suzbiju inflamaciju u crevima, pa čak i u CNS, kao i značaj održavanja homeostaze mikrobiote, imunskog sistema creva i funkcije epitelne barijere creva, smanjenje simptoma EAE kod životinja koje su tretirane sojem *Lb. brevis* BGZLS10-17 ili supernatantima njegove kulture može se objasniti poboljšanjem funkcije crevne barijere i prevencijom patološke stimulacije imunološkog sistema domaćina preko regulacije Th1 i Th17 ćelijskog odgovora indukcijom produkcije antiinflamatornih citokina IL-10 i TGF- β od strane Foxp3 Treg i indukcijom tolerogenih osobina kod antigen prezentujućih ćelija.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da su izolati iz tradicionalnih fermentisanih proizvoda značajan izvor aktivnih jedinjenja. Takvi izolati mogu se koristiti u formulaciji funkcionalne hrane obogaćene aktivnim jedinjenjima, koja može imati ciljani efekat za tretmanu autoimunskih bolesti. Snažni supresivni efekti supernatanata kulture soja

BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom na stimulisanim ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova, kao i efekti živog soja BGZLS10-17 i supernatanata kulture ovog soja na ublažavanje simptoma eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa doprinose ideji da upotreba sojeva koji produkuju γ -aminobuternu kiselinu može biti dobra strategija za modulaciju imunskog odgovora u različitim autoimunskim bolestima.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata predstavljenih u ovoj tezi mogu se izvući sledeći zaključci:

- PCR analizom utvrđeno je prisustvo *gadB* gena u MKB sojevima BGLMM kolekcije kod 124 od 303 testirana soja i to kod: 83 laktobacila, 15 laktokoka, 11 leukonostoka, 8 steptokoka, 6 enterokoka i 1 pediokoke;
- TLC analizom pokazana je, u primenjenim uslovima, produkcija γ -aminobuterne kiseline kod 14 od 124 testirana soja, a svi sojevi, proizvođači γ -aminobuterne kiseline, pripadali su rodu *Lactobacillus*. Koncentracija produkovane γ -aminobuterne kiseline u supernatantima kultura ovih sojeva korelisala je sa literaturnim podacima;
- Od 7 odabranih sojeva, poreklom iz autohtonog Zlatarskog sira, 4 soja preživljavaju simulirane uslove gastrointestinalnog trakta i to sojevi *Lb. brevis* BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 i BGZLS30-2 i time se kandiduju za oralnu primenu;
- Uzevši u obzir da ni jedan od testirana 4 soja *Lb. brevis* ne ispoljava hemolitičku, ni želatinoznu aktivnost; a da su detektovani nivoi rezistencije na antibiotike ovih sojeva niski, možemo da smatramo njihovu potencijalnu primenu bezbednom;
- Sojevi *Lb. brevis* BGLMM10, BGLMM11 i BGZLS30-2 ostvarili su različit stepen antagonističkog delovanja na klinički relevantne patogene: soj BGLMM10 na 11 od 18 patogena, a njegov supernatant na 7, soj BGLMM11 na 4 patogena, soj BGZLS30-2 na 6 patogena, a njegov supernatant na 1, dok soj BGZLS10-17 nije pokazao antimikrobnu aktivnost;
- Testirani sojevi *Lb. brevis* BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 i BGZLS30-2 vezuju se za Caco-2 ćelije 17, 11, 21 odnosno 22 %, dok redukuju vezivanje *E. coli* za 64, 70, 80 odnosno 72 %, a *Salmonella* sp. za 50, 34, 44 odnosno 63 %;
- Supernatanti kulture soja BGZLS10-17 sa koji su sadržali γ -aminobuternu kiselinu statistički značajno su stimulisali ekspresiju zonulina, okludina i kludina i time iskazali potencijal u očuvanju integriteta crevnog epitela;

- Tretmani supernatantima 48 sati stare kulture soja BGZLS10-17, ublažavaju štetne efekte IL-1 β indukovane inflamacije na proteine čvrstih veza u diferenciranim Caco-2 ćelijama, i pri tome supernatanti sa γ -aminobuternom kiselinom ostvaruju statistički značajnije zaštitne efekte u poređenju sa supernatantom bez ovog metabolita;
- Tretmani supernatantima sa γ -aminobuternom kiselinom značajno smanjuju ekspresiju iRNK *IL-8*, stimulisanu tretmanom Caco-2 sa IL-1 β , dok tretman supernatantom bez ovog metabolita nije imao modulatorne efekte na ekspresiju ovog citokina, što ukazuje na ulogu γ -aminobuterne kiseline sadržane u supernatantu soja BGZLS10-17 u smanjenju inflamacije;
- Tretmani supernatantom kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom značajno su stimulisali ekspresiju iRNK *TGF- β* u diferenciranim Caco-2 ćelijama, dok su supernatanti kulture soja BGZLS10-17 sa 4 mM γ -aminobuterne kiseline, bakterijske ili sintetičke, kao i supernatant bez ovog metabolita, sprečili smanjenje ekspresije iRNK *TGF- β* u diferenciranim Caco-2 ćelijama indukovano sa IL-1 β . Supernatanti sa γ -aminobuternom kiselinom, bakterijskom ili sintetičkom, ostvarili su statistički značajnije efekte na prevenciju IL-1 β indukovanog smanjenja ekspresije iRNK *TGF- β* u Caco-2 ćelijama u odnosu na supernatant kulture soja BGZLS10-17 bez ovog metabolita;
- Tretmani supernatantima kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom i bez ovog metabolita statistički značajno su smanjili metaboličku aktivnost, proliferaciju i produkciju proinflamatornih citokina IL-17 i IFN- γ Kon-A stimulisanih ćelija mezenteričnih limfnih čvorova, pri čemu su supernatanti sa γ -aminobuternom kiselinom ostvarili statistički značajniji efekat na smanjenje inflamacije *in vitro*, čime su pokazali svoju ulogu u regulaciji intenziteta inflamacije;
- Tretmani supernatantima kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom i supernatantom bez ovog metabolita statistički značajno su stimulisali ekspresiju *Foxp3* i *TGF- β* iRNK i produkciju IL10 u Kon-A stimulisanim ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova, a statistički viši nivoi iRNK *Foxp3* i *TGF- β* kao i

statistički snažnija produkcija IL-10 izmereni su u MLNC tretiranim supernatantima sa γ -aminobuternom kiselinom, što ukazuje na ulogu γ -aminobuterne kiseline sadržane u supernatantima kulture soja BGZLS10-17 u rezoluciji inflamacije i uspostavljanju homeostaze imunskog sistema;

- Analizom povezanosti autofagije i inflamacije pokazano je da je antiinflamatorni efekat supernatanta kulture soja BGZLS10-17 posredovan autofagijom;
- FACS analizom ekspresije LC3 II pokazano je da je među različitim analiziranim tipovima ćelija u MLNC autofagija najviše stimulirana u CD4+T, CD8+T, NK i NKT ćelijama, dok je nešto niži nivo stimulacije izmeren u DC, i zatim u Mf i B ćelijama. Supernatanti kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom imali su snažniji efekat na indukciju autofagije u poređenju sa supernatantom bez ovog metabolita;
- Aktiviranje signalizacije preko GABARAP ukazuje na ulogu γ -aminobuterne kiseline sadržane u supernatantu kulture soja BGZLS10-17 u imunosupresiji posredovanoj autofagijom;
- γ -aminobuterna kiselina sadržana u supernatantu kulture soja BGZLS10-17 indukuje autofagiju u ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova preko ATG5;
- Smeša molekula koje proizvodi soja BGZLS10-17 u MRS-u u odsustvu Na-glutamata (supernatant kulture soja BGZLS10-17 bez γ -aminobuterne kiseline) dominantno indukuje ATG5 nezavisnu autofagiju u ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova;
- Antiinflamatorni efekat supernatanta kulture soja BGZLS10-17 bez γ -aminobuterne kiseline na ćelijama mezenteričnih limfnih čvorova najverovatnije je nezavisan od ATG5, Foxp3, IL-10 i TGF- β i može biti posredovan direktnim delovanjem tolerogenih antigen-predstavljajućih ćelija;
- Oralna primena soja BGZLS10-17 ublažava simptome eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa, odlaže početak bolesti, skraćuje trajanje bolesti, smanjuje intenzitet bolesti u periodu kada su simptomi bolesti kod kontrola najjače izraženi, a životinje tretirane ovim sojem se nakon 40 dana potpuno oporavljaju, što

kod kontrolnih životinja nije slučaj, čime se ovaj soj kandiduje kao potencijalni terapeutik za tretman autoimunskih bolesti;

- Poboljšanje simptoma eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa je zabeleženo i nakon primene supernatanta kulture soja BGZLS10-17 sa γ -aminobuternom kiselinom, ali i bez γ -aminobuterne kiseline, što ukazuje na ulogu ovog metabolita, ali i drugih solubilnih molekula koje proizvodi BGZLS10-17 u poboljšanju EAE prognoze i ističe potencijalnu primenu supernatanta kulture soja BGZLS10-17 kao postbiotskog preparata za tretman autoimunskih bolesti.

7. LITERATURA

Abd El-Hady, A.M., Gewefel, H.S., Badawi, M.A., and Eltahawy, N.A. (2017). Gamma-aminobutyric acid ameliorates gamma rays-induced oxidative stress in the small intestine of rats. *J. Basic Appl. Zool.* 78.

Abdou, A.M., Higashiguchi, S., Horie, K., Kim, M., Hatta, H., and Yokogoshi, H. (2006). Relaxation and immunity enhancement effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) administration in humans. *BioFactors Oxf. Engl.* 26, 201–208.

Abe, Y., Umemura, S., Sugimoto, K., Hirawa, N., Kato, Y., Yokoyama, N., Yokoyama, T., Iwai, J., and Ishii, M. (1995). Effect of green tea rich in γ -aminobutyric acid on blood pressure of Dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Hypertens.* 8, 74–79.

Adeghate, E., and Ponery, A.S. (2002). GABA in the endocrine pancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats. *Tissue Cell* 34, 1–6.

Aguilar-Toalá, J.E., Garcia-Varela, R., Garcia, H.S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B., and Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends Food Sci. Technol.* 75, 105–114.

Ahn, K.B., Baik, J.E., Park, O.-J., Yun, C.-H., and Han, S.H. (2018). *Lactobacillus plantarum* lipoteichoic acid inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLOS ONE* 13, e0192694.

Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* 2, 725–731.

Al-Sadi, R., Ye, D., Dokladny, K., and Ma, T.Y. (2008). Mechanism of IL-1 β -Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. *J. Immunol.* 180, 5653–5661.

Al-Sarraf, H. (2002). Transport of ¹⁴C-gamma-aminobutyric acid into brain, cerebrospinal fluid and choroid plexus in neonatal and adult rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 139, 121–129.

Amina, Z., Nouredine, S., Venkatesan, A., Perumal, V., Hichem, B., Asma, Z., Yamina, M., Miloud, H., and Mebrouk, K. (2014). Characterization and Potential Probiotic Attributes of *Lactobacillus plantarum* DU10 Isolated from Algerian Raw Camel Milk. *Biotechnology (Faisalabad)* 13, 282–288.

Angrisano, T., Pero, R., Peluso, S., Keller, S., Sacchetti, S., Bruni, C.B., Chiariotti, L., and Lembo, F. (2010). LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is

accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. *BMC Microbiol.* 10, 172.

Arbogast, F., and Gros, F. (2018). Lymphocyte Autophagy in Homeostasis, Activation, and Inflammatory Diseases. *Front. Immunol.* 9.

Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.-A.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J.E., Panagou, E.Z., and Tassou, C.C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiol.* 33, 282–291.

Artis, D. (2008). Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 411–420.

Auteri, M., Zizzo, M.G., and Serio, R. (2015). GABA and GABA receptors in the gastrointestinal tract: from motility to inflammation. *Pharmacol. Res.* 93, 11–21.

Axelsson, L. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In *Lactic Acid Bacteria*, S. Salminen, A. von Wright, and A. Ouwehand, eds. (CRC Press), p.

Ayad, E.H.E.-S. (2001). Characterisation of lactococci isolated from natural niches and their role in flavour formation of cheese. s.n.].

Barrett, E., Ross, R.P., O'Toole, P.W., Fitzgerald, G.F., and Stanton, C. (2012). γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J. Appl. Microbiol.* 113, 411–417.

Begley, M., Hill, C., and Gahan, C.G.M. (2006). Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1729–1738.

Belkaid, Y., and Hand, T.W. (2014). Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation. *Cell* 157, 121–141.

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., and Cogan, T.M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11, 259–274.

Berkes, J., Viswanathan, V.K., Savkovic, S.D., and Hecht, G. (2003). Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut* 52, 439–451.

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., and Gil, A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 160–174.

Bhat, R., Axtell, R., Mitra, A., Miranda, M., Lock, C., Tsien, R.W., and Steinman, L. (2010). Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2580–2585.

- Bintsis, T., and Department of Agricultural Technology, TEI of West Macedonia, 53100 Florina, Greece (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol.* *4*, 665–684.
- Bjurstöm, H., Wang, J., Ericsson, I., Bengtsson, M., Liu, Y., Kumar-Mendu, S., Issazadeh-Navikas, S., and Birnir, B. (2008). GABA, a natural immunomodulator of T lymphocytes. *J. Neuroimmunol.* *205*, 44–50.
- Boonstra, E., de Kleijn, R., Colzato, L.S., Alkemade, A., Forstmann, B.U., and Nieuwenhuis, S. (2015). Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain and behavior. *Front. Psychol.* *6*.
- Bouché, N., Lacombe, B., and Fromm, H. (2003). GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism. *Trends Cell Biol.* *13*, 607–610.
- Boumerdassi, H., Monnet, C., Desmazeaud, M., and Corrieu, G. (1997). Isolation and properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CNRZ 483 mutants producing diacetyl and acetoin from glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 2293–2299.
- Braun, H.-S., Sponder, G., Pieper, R., Aschenbach, J.R., and Deiner, C. (2015). GABA selectively increases mucin-1 expression in isolated pig jejunum. *Genes Nutr.* *10*.
- Bravo, J.A., Forsythe, P., Chew, M.V., Escaravage, E., Savignac, H.M., Dinan, T.G., Bienenstock, J., and Cryan, J.F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 16050–16055.
- Bron, P.A., Kleerebezem, M., Brummer, R.-J., Cani, P.D., Mercenier, A., MacDonald, T.T., García-Ródenas, C.L., and Wells, J.M. (2017). Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *Br. J. Nutr.* *117*, 93–107.
- Burns, P., Vinderola, G., Reinheimer, J., Cuesta, I., de los Reyes-Gavilán, C.G., and Ruas-Madiedo, P. (2011). Technological characterization and survival of the exopolysaccharide-producing strain *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 193 and its bile-resistant derivative 193+ in simulated gastric and intestinal juices. *J. Dairy Res.* *78*, 357–364.
- Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., Rizzello, F., Campieri, M., and Brigidi, P. (2008). Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int. J. Food Microbiol.* *125*, 286–292.
- Capitani, G. (2003). Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase. *EMBO J.* *22*, 4027–4037.

- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M.A., and Severi, C. (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann. Gastroenterol.* 28, 203–209.
- Carafa, I., Stocco, G., Nardin, T., Larcher, R., Bittante, G., Tuohy, K., and Franciosi, E. (2019). Production of Naturally γ -Aminobutyric Acid-Enriched Cheese Using the Dairy Strains *Streptococcus thermophilus* 84C and *Lactobacillus brevis* DSM 32386. *Front.Microbiol.* 10.
- Cawley, N., Solanky, B.S., Muhlert, N., Tur, C., Edden, R.A.E., Wheeler-Kingshott, C.A.M., Miller, D.H., Thompson, A.J., and Ciccarelli, O. (2015). Reduced gamma-aminobutyric acid concentration is associated with physical disability in progressive multiple sclerosis. *Brain* 138, 2584–2595.
- Chen, C.-C., Lai, C.-C., Huang, H.-L., Huang, W.-Y., Toh, H.-S., Weng, T.-C., Chuang, Y.-C., Lu, Y.-C., and Tang, H.-J. (2019). Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* Species Against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Front. Microbiol.* 10.
- Chen, J., Chia, N., Kalari, K.R., Yao, J.Z., Novotna, M., Paz Soldan, M.M., Luckey, D.H., Marietta, E.V., Jeraldo, P.R., Chen, X., et al. (2016). Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep.* 6.
- Chen, Z., Fu, Q., Shen, B., Huang, X., Wang, K., He, P., Li, F., Zhang, F., and Shen, H. (2014). Enhanced p62 expression triggers concomitant autophagy and apoptosis in a rat chronic spinal cord compression model. *Mol. Med. Rep.* 9, 2091–2096.
- Cho, Y.R., Chang, J.Y., and Chang, H.C. (2007). Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 104–109.
- Chua, J.-Y., Koh, M.K.P., and Liu, S.-Q. (2019). Gamma-aminobutyric acid. In *Sprouted Grains*, (Elsevier), pp. 25–54.
- Cogan, T.M., O’ Dowd, M., and Mellerick, D. (1981). Effects of pH and Sugar on Acetoin Production from Citrate by *Leuconostoc lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 1–8.
- Consonni, A., Cordiglieri, C., Rinaldi, E., Marolda, R., Ravanelli, I., Guidesi, E., Elli, M., Mantegazza, R., and Baggi, F. (2018). Administration of bifidobacterium and lactobacillus strains modulates experimental myasthenia gravis and experimental encephalomyelitis in Lewis rats. *Oncotarget* 9.
- Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O’Brien, K., and Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS): EAE as model for MS. *Br. J. Pharmacol.* 164, 1079–1106.

- Cuervo, A.M., and Wong, E. (2014). Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 24, 92–104.
- Cui, Y., Xu, T., Qu, X., Hu, T., Jiang, X., and Zhao, C. (2016). New Insights into Various Production Characteristics of *Streptococcus thermophilus* Strains. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1701.
- Cunningham, S.A., Arrate, M.P., Rodriguez, J.M., Bjercke, R.J., Vanderslice, P., Morris, A.P., and Brock, T.A. (2000). A Novel Protein with Homology to the Junctional Adhesion Molecule: CHARACTERIZATION OF LEUKOCYTE INTERACTIONS. *J. Biol. Chem.* 275, 34750–34756.
- Danielsen, M., and Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 1–11.
- De Biase, D., and Pennacchietti, E. (2012). Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in orally acquired bacteria: function, distribution and biomedical implications of the *gadBC* operon: Role of *gadBC* operon in orally acquired bacteria. *Mol. Microbiol.* 86, 770–786.
- Demakova, E.V., Korobov, V.P., and Lemkina, L.M. (2003). [Determination of gamma-aminobutyric acid concentration and activity of glutamate decarboxylase in blood serum of patients with multiple sclerosis]. *Klin. Lab. Diagn.* 15–17.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., and Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 438–442.
- Dhakal, R., Bajpai, V.K., and Baek, K.-H. (2012). Production of gaba (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Braz. J. Microbiol.* 43, 1230–1241.
- Diana, M., Quílez, J., and Rafecas, M. (2014). Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *J. Funct. Foods* 10, 407–420.
- Diao, J., Liu, R., Rong, Y., Zhao, M., Zhang, J., Lai, Y., Zhou, Q., Wilz, L.M., Li, J., Vivona, S., et al. (2015). ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature* 520, 563–566.
- Dinić, M., Lukić, J., Djokić, J., Milenković, M., Strahinić, I., Golić, N., and Begović, J. (2017). *Lactobacillus fermentum* Postbiotic-induced Autophagy as Potential Approach for Treatment of Acetaminophen Hepatotoxicity. *Front. Microbiol.* 8.
- Dionisio, L., De Rosa, M.J., Bouzat, C., and Esandi, M. del C. (2011). An intrinsic GABAergic system in human lymphocytes. *Neuropharmacology* 60, 513–519.

Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., Singh, P., and Singh, B. R. (2018). Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PLOS ONE*. 13, e0192978.

Dragicevic, S., Milosevic, K., Nestorovic, B., and Nikolic, A. (2017). Influence of the Polymorphism C-509T in the *TGFBI* Gene Promoter on the Response to Montelukast. *Pediatr. Allergy Immunol. Pulmonol.* 30, 239–245.

Edelblum, K.L., and Turner, J.R. (2009). The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 715–720.

EFSA (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* 10, 2740.

EFSA (2016). Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA J.* 15, 4664.

EFSA (2017). Re-evaluation of glutamic acid (E 620), sodium glutamate (E 621), potassium glutamate (E 622), calcium glutamate (E 623), ammonium glutamate (E 624) and magnesium glutamate (E 625) as food additives. *EFSA J.* 15, 4910.

Elamin, E., Jonkers, D., Juuti-Uusitalo, K., van IJzendoorn, S., Troost, F., Duimel, H., Broers, J., Verheyen, F., Dekker, J., and Masclee, A. (2012). Effects of Ethanol and Acetaldehyde on Tight Junction Integrity: In Vitro Study in a Three Dimensional Intestinal Epithelial Cell Culture Model. *PLoS ONE* 7, e35008.

Elias, B.C., Suzuki, T., Seth, A., Giorgianni, F., Kale, G., Shen, L., Turner, J.R., Naren, A., Desiderio, D.M., and Rao, R. (2009). Phosphorylation of Tyr-398 and Tyr-402 in Occludin Prevents Its Interaction with ZO-1 and Destabilizes Its Assembly at the Tight Junctions. *J. Biol. Chem.* 284, 1559–1569.

Elo, S., Saxelin, M., and Salminen, S. (1991). Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: comparison with other dairy strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 13, 154–156.

Esebanmen, G.E., and Langridge, W.H.R. (2017). The role of TGF-beta signaling in dendritic cell tolerance. *Immunol. Res.* 65, 987–994.

Fan, K., Lin, L., Ai, Q., Wan, J., Dai, J., Liu, G., Tang, L., Yang, Y., Ge, P., Jiang, R., et al. (2018). Lipopolysaccharide-Induced Dephosphorylation of AMPK-Activated Protein Kinase Potentiates Inflammatory Injury via Repression of ULK1-Dependent Autophagy. *Front. Immunol.* 9.

Faye, T., Tamburello, A., Vegarud, G.E., and Skeie, S. (2012). Survival of lactic acid bacteria from fermented milks in an in vitro digestion model exploiting sequential incubation in human gastric and duodenum juice. *J. Dairy Sci.* 95, 558–566.

- Feehily, C., and Karatzas, K.A.G. (2013). Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *J. Appl. Microbiol.* *114*, 11–24.
- Franciosi, E., Carafa, I., Nardin, T., Schiavon, S., Poznanski, E., Cavazza, A., Larcher, R., and Tuohy, K.M. (2015). Biodiversity and γ -Aminobutyric Acid Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Alpine Raw Cow's Milk Cheeses. *BioMed Res. Int.* *2015*, 1–11.
- Franz, C.M., Holzapfel, W.H., and Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* *47*, 1–24.
- Gao, F., Yin, X., Edden, R.A.E., Evans, A.C., Xu, J., Cao, G., Li, H., Li, M., Zhao, B., Wang, J., et al. (2018). Altered hippocampal GABA and glutamate levels and uncoupling from functional connectivity in multiple sclerosis. *Hippocampus* *28*, 813–823.
- Georgieva, R., Yocheva, L., Tserovska, L., Zhelezova, G., Stefanova, N., Atanasova, A., Danguleva, A., Ivanova, G., Karapetkov, N., Rumyan, N., et al. (2015). Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* *29*, 84–91.
- Ghasemi, N., Razavi, S., and Nikzad, E. (2017). Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell J Yakhteh* *19*.
- Goldenberg, M.M. (2012). Multiple sclerosis review. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* *37*, 175–184.
- Gomaa, E. Z. (2015). Enhancement of γ -Aminobutyric Acid Production by Co-Culturing of Two Lactobacilli Strains. *Asian Journal of Biotechnology.* *7*, 108-118.
- Gómez-Llorente, C., Muñoz, S., and Gil, A. (2010). Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proc. Nutr. Soc.* *69*, 381–389.
- Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., and Gill, H.S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* *67*, 207–216.
- Gregori, S. (2011). Dendritic cells in networks of immunological tolerance. *Tissue Antigens* *77*, 89–99.
- Halder, D., Mandal, M., Chatterjee, S., Pal, N., and Mandal, S. (2017). Indigenous Probiotic *Lactobacillus* Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicines* *5*, 31.
- Harris, J. (2011). Autophagy and cytokines. *Cytokine* *56*, 140–144.

Harzallah, D., and Belhadj, H. (2013). Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier. In *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*, J.M. Kongo, ed. (InTech), p.

Hayakawa, K., Kimura, M., Kasaha, K., Matsumoto, K., Sansawa, H., and Yamori, Y. (2004). Effect of a γ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar–Kyoto rats. *Br. J. Nutr.* 92, 411–417.

Hedin, C., Whelan, K., and Lindsay, J.O. (2007). Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proc. Nutr. Soc.* 66, 307–315.

Heilig, H.G.H.J., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D.L., and de Vos, W.M. (2002). Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. and Other Lactic Acid Bacteria in the Human Intestine as Determined by Specific Amplification of 16S Ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 114–123.

Higuchi, T., Hayashi, H., and Abe, K. (1997). Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus* strain. *J. Bacteriol.* 179, 3362–3364.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder P. C., and Sanders M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11, 506–514.

Holdiness, M.R. (1983). Chromatographic analysis of glutamic acid decarboxylase in biological samples. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 277, 1–24.

Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., and Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 365s–373s.

Hopwood (1985). *Genetic manipulation of streptomyces: a laboratory manual* (Norwich: John Innes Foundation).

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., et al. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 1981–1991.

Huang, C.-Y., Kuo, W.-W., Wang, H.-F., Lin, C.-J., Lin, Y.-M., Chen, J.-L., Kuo, C.-H., Chen, P.-K., and Lin, J.-Y. (2014). GABA tea ameliorates cerebral cortex apoptosis and autophagy in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Funct. Foods* 6, 534–544.

Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K., and Jonuleit, H. (2013). Costimulatory Molecules on Immunogenic Versus Tolerogenic Human Dendritic Cells. *Front. Immunol.* 4.

Hyland, N.P., and Cryan, J.F. (2010). A Gut Feeling about GABA: Focus on GABAB Receptors. *Front. Pharmacol.* 01.

Hynönen, U., Westerlund-Wikström, B., Palva, A., and Korhonen, T.K. (2002). Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J. Bacteriol.* 184, 3360–3367.

Inglin, R.C., Stevens, M.J.A., Meile, L., Lacroix, C., and Meile, L. (2015). High-throughput screening assays for antibacterial and antifungal activities of *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Methods* 114, 26–29.

Inoue, K., Shirai, T., Ochiai, H., Kasao, M., Hayakawa, K., Kimura, M., and Sansawa, H. (2003). Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57, 490–495.

International Probiotics Association Europe-IPA Europe. Available from:
<http://www.ipaeurope.org/probiotics.php?ID=4>

Irlinger, F., Helinck, S., and Jany, J.L. (2017). Secondary and Adjunct Cultures. In *Cheese*, (Elsevier), pp. 273–300.

Jiang, P., and Mizushima, N. (2014). Autophagy and human diseases. *Cell Res.* 24, 69–79.

Jin, Z., Mendu, S.K., and Birnir, B. (2013). GABA is an effective immunomodulatory molecule. *Amino Acids* 45, 87–94.

Jovčić, B., Begović, J., Lozo, J., Topisirović, Lj., Kojić, M. (2009). Dynamics of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Arch Biol Sci* 61, 159-164.

Kaktcham, P.M. (2012). Antimicrobial and Safety Properties of Lactobacilli Isolated from Two Cameroonian Traditional Fermented Foods. *Sci. Pharm.* 80, 189–203.

Kang, M.-S., Lim, H.-S., Oh, J.-S., Lim, Y., Wuertz-Kozak, K., Harro, J.M., Shirtliff, M.E., and Achermann, Y. (2017). Antimicrobial activity of *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus fermentum* against *Staphylococcus aureus*. *Pathog. Dis.* 75.

Karimi, K., Inman, M.D., Bienenstock, J., and Forsythe, P. (2009). *Lactobacillus reuteri* – induced Regulatory T cells Protect against an Allergic Airway Response in Mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 179, 186–193.

Kato, H., and Perl, A. (2018). Blockade of Treg Cell Differentiation and Function by the Interleukin-21-Mechanistic Target of Rapamycin Axis Via Suppression of Autophagy in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 70, 427–438.

Kaur, J., and Debnath, J. (2015). Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 461–472.

Kemp, M.G., Lindsey-Boltz, L.A., and Sancar, A. (2015). UV Light Potentiates STING (Stimulator of Interferon Genes)-dependent Innate Immune Signaling through Deregulation of ULK1 (Unc51-like Kinase 1). *J. Biol. Chem.* 290, 12184–12194.

Khalid K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *IJB.* 1, 1-13.

Kim, J.K., Kim, Y.S., Lee, H.-M., Jin, H.S., Neupane, C., Kim, S., Lee, S.-H., Min, J.-J., Sasai, M., Jeong, J.-H., et al. (2018). GABAergic signaling linked to autophagy enhances host protection against intracellular bacterial infections. *Nat. Commun.* 9.

Kim, J.Y., Lee, M.Y., Ji, G.E., Lee, Y.S., and Hwang, K.T. (2009). Production of γ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 12–16.

Kim, M.J., Kim, E.H., Pun, N.T., Chang, J.-H., Kim, J.-A., Jeong, J.-H., Choi, D.Y., Kim, S.-H., and Park, P.-H. (2017). Globular Adiponectin Inhibits Lipopolysaccharide-Primed Inflammasomes Activation in Macrophages via Autophagy Induction: The Critical Role of AMPK Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1275.

Ko, C.Y., Lin, H.-T.V., and Tsai, G.J. (2013). Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus brevis* FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model. *Process Biochem.* 48, 559–568.

Komatsuzaki, N., Shima, J., Kawamoto, S., Momose, H., and Kimura, T. (2005). Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol.* 22, 497–504.

Konings, W.N. (2006). Microbial transport: Adaptations to natural environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 90, 325–342.

Kook, M. C. and Cho, S. C. (2019). Production of GABA (gamma amino butyric acid) by Lactic Acid Bacteria. *Korean J. Food Sci. An.* 33, 377-389.

Kootte, R.S., Levin, E., Salojärvi, J., Smits, L.P., Hartstra, A.V., Udayappan, S.D., Hermes, G., Bouter, K.E., Koopen, A.M., Holst, J.J., et al. (2017). Improvement of Insulin Sensitivity after Lean Donor Feces in Metabolic Syndrome Is Driven by Baseline Intestinal Microbiota Composition. *Cell Metab.* 26, 611-619.e6.

- Kumar, M., Dhaka, P., Vijay, D., Vergis, J., Mohan, V., Kumar, A., Kurkure, N.V., Barbuddhe, S.B., Malik, S.V.S., and Rawool, D.B. (2016). Antimicrobial effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* against multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 265–270.
- Kuwabara, T., Ishikawa, F., Kondo, M., and Kakiuchi, T. (2017). The Role of IL-17 and Related Cytokines in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Mediators Inflamm.* 2017, 1–11.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T., and Tooze, S.A. (2013). The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 759–774.
- Laroute, V., Yasaro, C., Narin, W., Mazzoli, R., Pessione, E., Cocaign-Bousquet, M., and Loubière, P. (2016). GABA Production in *Lactococcus lactis* Is Enhanced by Arginine and Co-addition of Malate. *Front. Microbiol.* 7.
- Lavasani, S., Dzhambazov, B., Nouri, M., Fåk, F., Buske, S., Molin, G., Thorlacius, H., Alenfall, J., Jeppsson, B., and Weström, B. (2010). A Novel Probiotic Mixture Exerts a Therapeutic Effect on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mediated by IL-10 Producing Regulatory T Cells. *PLoS ONE* 5, e9009.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S.C.J. (2008). Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 728–764.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S.C.J. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 171–184.
- Lee, S.H. (2015). Intestinal Permeability Regulation by Tight Junction: Implication on Inflammatory Bowel Diseases. *Intest. Res.* 13, 11.
- Lee, Y. S., Song, T. Y., Kong, W. S., and Yoon, M. H. (2013). Characterization of γ -Aminobutyric acid (GABA) produced by a lactic acid bacterium from button mushroom bed. *J. Mushroom Sci. Prod.* 11, 181-186.
- Leroy, F., and De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 67–78.
- Li, H., and Cao, Y. (2010). Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids* 39, 1107–1116.
- Li, H., Qiu, T., Huang, G., and Cao, Y. (2010). Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microb. Cell Factories* 9, 85.
- Li, W., Li, J., and Bao, J. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1125–1136.

- Li, X., Xu, M., Liu, M., Ji, Y., and Li, Z. (2015). TNF-alpha and IL-6 inhibit apolipoprotein A-IV production induced by linoleic acid in human intestinal Caco2 cells. *J. Inflamm.* 12.
- Lim, S.-M., and Ahn, D.-H. (2012). Factors affecting adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells and inhibitory effect on infection of *Salmonella typhimurium*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 1731–1739.
- Lim, H.S., Cha, I.-T., Roh, S.W., Shin, H.-H., and Seo, M.-J. (2017). Enhanced Production of Gamma-Aminobutyric Acid by Optimizing Culture Conditions of *Lactobacillus brevis* HYE1 Isolated from Kimchi, a Korean Fermented Food. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 450–459.
- Liu, G., Bi, Y., Wang, R., and Wang, X. (2013). Self-eating and self-defense: autophagy controls innate immunity and adaptive immunity. *J. Leukoc. Biol.* 93, 511–519.
- Liu, C.F., Tung, Y.T., Wu, C.L., Lee, B.-H., Hsu, W.-H., and Pan, T.M. (2011). Antihypertensive Effects of *Lactobacillus*-Fermented Milk Orally Administered to Spontaneously Hypertensive Rats. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4537–4543.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25, 402–408.
- Ljungh, A., Wadström, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr Issues Intest Microbiol.* 7, 73-89.
- Lo Curto, A., Pitino, I., Mandalari, G., Dainty, J.R., Faulks, R.M., and John Wickham, M.S. (2011). Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion. *Food Microbiol.* 28, 1359–1366.
- Löscher, W., and Frey, H.-H. (1982). Transport of GABA at the Blood-CSF Interface. *J. Neurochem.* 38, 1072–1079.
- Lukic, J., Strahinic, I., Milenkovic, M., Golic, N., Kojic, M., Topisirovic, L., and Begovic, J. (2013). Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with Rat Colonic Mucosa: Implications for Colitis Induction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5735–5744.
- Luo, X.-Y., Yuan, J.-L., Liu, J., Luo, C.-N., Yang, M.-H., Wei, Q., Yang, M., Chen, Y., Liu, Y., and Yuan, G.-H. (2018). Increased Macroautophagy in Interferon-Gamma-Producing T Cells from Patients with Newly Diagnosed Systemic Lupus Erythematosus. *Chin. Med. J. (Engl.)* 131, 1527–1532.
- Luo, X. Y., Yang, M. H., Wei, K., Li, K., Liu, Y., Yuan, G. H. (2017). Decreased expression of BECN1 mRNA is associated with lupus nephritis. *Biomedical Research-India.* 28, 2952-2956.

- Lv, K., Song, W., Tang, R., Pan, Z., Zhang, Y., Xu, Y., Lv, B., Fan, Y., and Xu, M. (2018). Neurotransmitter alterations in the anterior cingulate cortex in Crohn's disease patients with abdominal pain: A preliminary MR spectroscopy study. *NeuroImage Clin.* 20, 793–799.
- Lynch, C.M., McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cogan, T.M., and Drinan, F.D. (1996). Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *Int. Dairy J.* 6, 851–867.
- Mailleux, J., Timmermans, S., Nelissen, K., Vanmol, J., Vanmierlo, T., van Horssen, J., Bogie, J.F.J., and Hendriks, J.J.A. (2017). Low-Density Lipoprotein Receptor Deficiency Attenuates Neuroinflammation through the Induction of Apolipoprotein E. *Front. Immunol.* 8, 1701.
- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Servin, A., and De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res. Microbiol.* 157, 241–247.
- Maldonado, R.A., and von Andrian, U.H. (2010). How Tolerogenic Dendritic Cells Induce Regulatory T Cells. In *Advances in Immunology*, (Elsevier), pp. 111–165.
- Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R., and Huis In't Veld, J.H.J. (1997). Survival of Lactic Acid Bacteria in a Dynamic Model of the Stomach and Small Intestine: Validation and the Effects of Bile. *J. Dairy Sci.* 80, 1031–1037.
- Mathieu, A., Vacca, A., Serra, A., Cauli, A., Piga, M., Porru, G., Marrosu, F., Sanna, G., and Piga, M. (2010). Defective cerebral gamma-aminobutyric acid-A receptor density in patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system involvement. An observational study. *Lupus* 19, 918–926.
- Mazzoli, R., and Pessione, E. (2016). The Neuro-endocrinological Role of Microbial Glutamate and GABA Signaling. *Front. Microbiol.* 7.
- Mazzoli, R., Riedel, K., and Pessione, E. (2017). Editorial: Bioactive Compounds from Microbes. *Front. Microbiol.* 8.
- McFarland, L. (2015). Probiotics for the Primary and Secondary Prevention of *C. difficile* Infections: A Meta-analysis and Systematic Review. *Antibiotics* 4, 160–178.
- Mikulski, D., Jankowski, J., Naczmanski, J., Mikulska, M., and Demey, V. (2012). Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens. *Poult. Sci.* 91, 2691–2700.
- Miljkovic, M., Strahinic, I., Tolinacki, M., Zivkovic, M., Kojic, S., Golic, N., and Kojic, M. (2015). AggLb Is the Largest Cell-Aggregation Factor from *Lactobacillus paracasei* Subsp.

paracasei BGNJ1-64, Functions in Collagen Adhesion, and Pathogen Exclusion In Vitro. PLOS ONE 10, e0126387.

Mirnejad, R., Vahdati, A.R., Rashidiani, J., Erfani, M., and Piranfar, V. (2013). The Antimicrobial Effect of *Lactobacillus Casei* Culture Supernatant Against Multiple Drug Resistant Clinical Isolates of Shigella Sonnei and Shigella Flexneri in Vitro. Iran. Red Crescent Med. J. 15.

Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. Genes Dev. 21, 2861–2873.

Mizushima, N., and Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. Cell 147, 728–741.

Monteagudo-Mera, A., Rodriguez-Aparicio, L., Rua, J., Martinez-Blanco, H., Navasa, N., Garcia-Armesto, m. R., and Ferrero, M. A. (2012). In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. J. Funct. Foods. 4, 531-541.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 65, 55–63.

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

Moussavi, M., and Adams, M.C. (2010). An In Vitro Study on Bacterial Growth Interactions and Intestinal Epithelial Cell Adhesion Characteristics of Probiotic Combinations. Curr. Microbiol. 60, 327–335.

Mullan, W.M.A. (2001). Microbiology of starter cultures. [On-line]. Available from: <https://www.dairyscience.info/index.php/cheese-starters/49-cheese-starters.html>. Accessed: 15 August, 2019. Revised 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2011, 2013, 2015. Last revision October 2017

Muñoz-Provencio, D., Rodríguez-Díaz, J., Collado, M.C., Langella, P., Bermúdez-Humarán, L.G., and Monedero, V. (2012). Functional Analysis of the *Lactobacillus casei* BL23 Sortases. Appl. Environ. Microbiol. 78, 8684–8693.

Munroe, M.E., Businga, T.R., Kline, J.N., and Bishop, G.A. (2010). Anti-Inflammatory Effects of the Neurotransmitter Agonist Honokiol in a Mouse Model of Allergic Asthma. J. Immunol. 185, 5586–5597.

Nallala, V., and Jeevaratnam, K. (2018). Probiotic Evaluation of Antimicrobial *Lactobacillus plantarum* VJC38 Isolated from the Crop of Broiler Chicken. Microbiology 87, 350–362.

- Niaz, K., Zaplatic, E., and Spoor, J. (2018). Extensive use of monosodium glutamate: A threat to public health? *EXCLI J.* *17*, 273-278.
- Nielsen, D.S., Cho, G.-S., Hanak, A., Huch, M., Franz, C.M.A.P., and Arneborg, N. (2010). The effect of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strains on the intracellular pH of sessile and planktonic *Listeria monocytogenes* single cells. *Int. J. Food Microbiol.* *141*, S53–S59.
- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suárez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., Topisirovic, L., Golic, N., and Ruas-Madiedo, P. (2012). Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* *158*, 155–162.
- Nomura, M., Nakajima, I., Fujita, Y., Kobayashi, M., Kimoto, H., Suzuki, I., and Aso, H. (1999). *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiology* *145*, 1375–1380.
- Oelschlaeger, T.A. (2010). Mechanisms of probiotic actions – A review. *Int. J. Med. Microbiol.* *300*, 57–62.
- Oh, N.S., Joung, J.Y., Lee, J.Y., and Kim, Y. (2018). Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. *PLOS ONE* *13*, e0192021.
- Ohland, C.L., and MacNaughton, W.K. (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* *298*, G807–G819.
- Okada T., Sugishita T., Murakami T., Murai H., Saikusa T., Horino T., Onoda A., Kajimoto O., Takahashi R., and Takahashi T. (2000). Effect of the Defatted Rice Germ Enriched with GABA for Sleeplessness, Depression, Autonomic Disorder by Oral Administration. *NIPPON SHOKUHIN KAGAKU KOGAKU KAISHI* *47*, 596–603.
- O’Shea, E.F., Cotter, P.D., Stanton, C., Ross, R.P., and Hill, C. (2012). Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int. J. Food Microbiol.* *152*, 189–205.
- Ouyang, W., Kolls, J.K., and Zheng, Y. (2008). The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity* *28*, 454–467.
- Pan, W.-H., Li, P.-L., and Liu, Z. (2006). The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians’ faeces. *Anaerobe* *12*, 148–152.
- Park, J.Y., Jeong, S.-J., and Kim, J.H. (2014). Characterization of a glutamate decarboxylase (GAD) gene from *Lactobacillus zymae*. *Biotechnol. Lett.* *36*, 1791–1799.

Parzych, K.R., and Klionsky, D.J. (2014). An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 460–473.

Paulsen, I.T. (2003). Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* *299*, 2071–2074.

Pessi, T., Sütas, Y., Hurme, M., and Isolauri, E. (2000). Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* *30*, 1804–1808.

Pessione, E. (2012). Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *2*.

Pisano, M.B., Viale, S., Conti, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Melis, M.P., Deiana, M., and Cosentino, S. (2014). Preliminary Evaluation of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains Isolated from Sardinian Dairy Products. *BioMed Res. Int.* *2014*, 1–9.

Planchon, S.M., Martins, C.A., Guerrant, R.L., and Roche, J.K. (1994). Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *153*, 5730–5739.

Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F.J., Gil-Campos, M., and Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv. Nutr.* *10*, S49–S66.

Pokusaeva, K., Johnson, C., Luk, B., Uribe, G., Fu, Y., Oezguen, N., Matsunami, R.K., Lugo, M., Major, A., Mori-Akiyama, Y., et al. (2017). GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterol. Motil.* *29*, e12904.

Pouliot-Mathieu, K., Gardner-Fortier, C., Lemieux, S., St-Gelais, D., Champagne, C.P., and Vuilleumard, J.-C. (2013). Effect of cheese containing gamma-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria on blood pressure in men. *PharmaNutrition* *1*, 141–148.

Powers, M.E., Yarrow, J.F., McCoy, S.C., and Borst, S.E. (2008). Growth Hormone Isoform Responses to GABA Ingestion at Rest and after Exercise: *Med. Sci. Sports Exerc.* *40*, 104–110.

Prud'homme, G.J., Glinka, Y., and Wang, Q. (2015). Immunological GABAergic interactions and therapeutic applications in autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* *14*, 1048–1056.

Ramos, C.L., Thorsen, L., Schwan, R.F., and Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiol.* *36*, 22–29.

Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K., and Adams, M.C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.* *43*, 1–7.

Rane, M.J., Gozal, D., Butt, W., Gozal, E., Pierce, W.M., Guo, S.Z., Wu, R., Goldbart, A.D., Thongboonkerd, V., McLeish, K.R., et al. (2005). γ -Amino Butyric Acid Type B Receptors Stimulate Neutrophil Chemotaxis during Ischemia-Reperfusion. *J. Immunol.* *174*, 7242–7249.

Richard, H., and Foster, J.W. (2004). *Escherichia coli* Glutamate- and Arginine-Dependent Acid Resistance Systems Increase Internal pH and Reverse Transmembrane Potential. *J. Bacteriol.* *186*, 6032–6041.

Robinson, A.P., Harp, C.T., Noronha, A., and Miller, S.D. (2014). The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS. In *Handbook of Clinical Neurology*, (Elsevier), pp. 173–189.

Rossetti, V., and Lombard, A. (1996). Determination of glutamate decarboxylase by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* *681*, 63–67.

Sadrin, S., Sennoune, S.R., Gout, B., Marque, S., Moreau, J., Grillasca, J., Pons, O., and Maixent, J.M. (2017). *Lactobacillus acidophilus* versus placebo in the symptomatic treatment of irritable bowel syndrome: the LAPIBSS randomized trial. *Cell. Mol. Biol.* *63*, 122.

Sage, P.T., Paterson, A.M., Lovitch, S.B., and Sharpe, A.H. (2014). The Coinhibitory Receptor CTLA-4 Controls B Cell Responses by Modulating T Follicular Helper, T Follicular Regulatory, and T Regulatory Cells. *Immunity* *41*, 1026–1039.

Salah, F.S., Ebbinghaus, M., Muley, V.Y., Zhou, Z., Al-Saadi, K.R.D., Pacyna-Gengelbach, M., O’Sullivan, G.A., Betz, H., König, R., Wang, Z.-Q., et al. (2016). Tumor suppression in mice lacking GABARAP, an Atg8/LC3 family member implicated in autophagy, is associated with alterations in cytokine secretion and cell death. *Cell Death Dis.* *7*, e2205–e2205.

Salveti, E., Torriani, S., and Felis, G.E. (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob. Proteins* *4*, 217–226.

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

Sanders, J.W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J.R., Venema, G., and Kok, J. (1998). A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Mol. Microbiol.* *27*, 299–310.

Sanjabi, S., Zenewicz, L.A., Kamanaka, M., and Flavell, R.A. (2009). Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 447–453.

Sasaki, S., Lee, L.C., Nakamura, Y., Iyota, I., Fukuyama, M., Inoue, A., Takeda, K., Yoshimura, M., Nakagawa, M., and Ijichi, H. (1986). Hypotension and hypothalamic depression produced by intracerebroventricular injections of GABA in spontaneously hypertensive rats. *Jpn. Circ. J.* 50, 1140–1148.

Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., and Black, R.E. (2006). Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect. Dis.* 6, 374–382.

Schuerer-Maly, C.C., Eckmann, L., Kagnoff, M.F., Falco, M.T., and Maly, F.E. (1994). Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology* 81, 85–91.

Schulzke, J.D., Ploeger, S., Amasheh, M., Fromm, A., Zeissig, S., Troeger, H., Richter, J., Bojarski, C., Schumann, M., and Fromm, M. (2009). Epithelial Tight Junctions in Intestinal Inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165, 294–300.

Secher, T., Kassem, S., Benamar, M., Bernard, I., Boury, M., Barreau, F., Oswald, E., and Saoudi, A. (2017). Oral Administration of the Probiotic Strain *Escherichia coli* Nissle 1917 Reduces Susceptibility to Neuroinflammation and Repairs Experimental Autoimmune Encephalomyelitis-Induced Intestinal Barrier Dysfunction. *Front. Immunol.* 8.

Seo, M.-J., Lee, J.-Y., Nam, Y.-D., Lee, S.-Y., Park, S.-L., Yi, S.-H., Lee, M.-H., Roh, S.W., Choi, H.-J., and Lim, S.-I. (2013). Production of γ -Aminobutyric Acid by *Lactobacillus brevis* 340G Isolated from Kimchi and Its Application to Skim Milk. *Food Eng. Prog.* 17, 418–423.

Seok, J. H., Park, K. B., Kim, Y. H., Bae, M.O., Lee, M.K., Oh, S. H., (2008). Production and characterization of kimchi with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid. *Food Sci Biotechnol.* 17, 940–946.

Servin, A.L. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 405–440.

Shah, P., and Swatlo E. (2008). A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. *Mol Microbiol.* 68, 4-16.

Shan, Y., Man, C. X., Han, X., Li, L., Guo, Y., Deng, Y., Li, T., Zhang, L. W., Jiang, Y. J. (2015). Evaluation of improved γ -aminobutyric acid production in yogurt using *Lactobacillus plantarum* NDC75017. *J Dairy Sci.* 98, 2138-2149.

Sharpe E. (1979). editor. Identification of Lactic Acid Bacteria. Second edition. Waltham: Academic Press.

Shyamaladevi, N., Jayakumar, A.R., Sujatha, R., Paul, V., and Subramanian, E.H. (2002). Evidence that nitric oxide production increases γ -aminobutyric acid permeability of blood-brain barrier. *Brain Res. Bull.* 57, 231–236.

Siezen, R.J., Kok, J., Abee, T., and Schaafsma, G. (2002). Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 1.

Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C.G., Coda, R., and Gobbetti, M. (2007). Synthesis of γ -Aminobutyric Acid by Lactic Acid Bacteria Isolated from a Variety of Italian Cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7283–7290.

Socol, C. R., Porto de Souza Vandenberghe, L., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamagishi, C. T., De Dea Lindner, J., Pandey, A., and Thomaz-Socol, V. (2010). The Potential of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.* 48, 413–434

Son, S.-H., Jeon, H.-L., Yang, S.-J., Lee, N.-K., and Paik, H.-D. (2017). In vitro characterization of *Lactobacillus brevis* KU15006, an isolate from kimchi, reveals anti-adhesion activity against foodborne pathogens and antidiabetic properties. *Microb. Pathog.* 112, 135–141.

Song, A.A.-L., In, L.L.A., Lim, S.H.E., and Rahim, R.A. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microb. Cell Factories* 16.

Stanisavljević, S., Dinić, M., Jevtić, B., Đedović, N., Momčilović, M., Đokić, J., Golić, N., Mostarica Stojković, M., and Miljković, Đ. (2018). Gut Microbiota Confers Resistance of Albino Oxford Rats to the Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Front. Immunol.* 9.

Stanisavljević, S., Čepić, A., Bojić, S., Veljović, K., Mihajlović, S., Đedović, N., Jevtić, B., Momčilović, M., Lazarević, M., Mostarica Stojković, M., et al. (2019). Oral neonatal antibiotic treatment perturbs gut microbiota and aggravates central nervous system autoimmunity in Dark Agouti rats. *Sci. Rep.* 9.

Stepanović-Petrović, R., and Micov, A. (2015). Novine u terapiji multiple skleroze. *Arh. Farm.* 65, 223-236.

Strandwitz, P., Kim, K.H., Terekhova, D., Liu, J.K., Sharma, A., Levering, J., McDonald, D., Dietrich, D., Ramadhar, T.R., Lekbua, A., et al. (2019). GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nat. Microbiol.* 4, 396–403.

Su, M.S., Schlicht, S., and Gänzle, M.G. (2011). Contribution of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus reuteri* to acid resistance and persistence in sourdough fermentation. *Microb. Cell Factories* 10, S8.

Su, Y.A., Sulavik, M.C., He, P., Makinen, K.K., Makinen, P.L., Fiedler, S., Wirth, R., and Clewell, D.B. (1991). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect. Immun.* *59*, 415–420.

Sun, T., Zhao, S., Wang, H., Cai, C., Chen, Y., and Zhang, H. (2009). ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from Xinjiang koumiss in China. *Eur. Food Res. Technol.* *228*, 607–612.

Tamura, A., Hayashi, H., Imasato, M., Yamazaki, Y., Hagiwara, A., Wada, M., Noda, T., Watanabe, M., Suzuki, Y., and Tsukita, S. (2011). Loss of Claudin-15, but Not Claudin-2, Causes Na⁺ Deficiency and Glucose Malabsorption in Mouse Small Intestine. *Gastroenterology* *140*, 913–923.

Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., and Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* *81*, 1–10.

Terry, R.L., Ifergan, I., and Miller, S.D. (2014). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. In *Multiple Sclerosis*, R. Weissert, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 145–160.

Tian, J., Lu, Y., Zhang, H., Chau, C.H., Dang, H.N., and Kaufman, D.L. (2004). γ -Aminobutyric Acid Inhibits T Cell Autoimmunity and the Development of Inflammatory Responses in a Mouse Type 1 Diabetes Model. *J. Immunol.* *173*, 5298–5304.

Tian, J., Dang, H.N., Yong, J., Chui, W.-S., Dizon, M.P.G., Yaw, C.K.Y., and Kaufman, D.L. (2011). Oral Treatment with γ -Aminobutyric Acid Improves Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity by Inhibiting Inflammation in High Fat Diet-Fed Mice. *PLoS ONE* *6*, e25338.

Ting Wong, C.G., Bottiglieri, T., and Snead, O.C. (2003). GABA, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann. Neurol.* *54*, S3–S12.

Tomé, D. (2018). The Roles of Dietary Glutamate in the Intestine. *Ann Nutr Metab.* *73*, 15–20.

Tomić, S., Janjetović, K., Mihajlović, D., Milenković, M., Kravić-Stevović, T., Marković, Z., Todorović-Marković, B., Spitalsky, Z., Micusik, M., Vučević, D. (2017). Graphene quantum dots suppress proinflammatory T cell responses via autophagy-dependent induction of tolerogenic dendritic cells. *Biomaterials* *146*, 13–28.

Tuomola, E.M., and Salminen, S.J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int. J. Food Microbiol.* *41*, 45–51.

Ueno, H. (2000). Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* *10*, 67–79.

- Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (2004). Establishment and Characterization of Cultured Epithelial Cells Lacking Expression of ZO-1. *J. Biol. Chem.* *279*, 44785–44794.
- Valenzuela, J.A., Flórez, A.B., Vázquez, L., Vasek, O.M., and Mayo, B. (2019). Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by lactic acid bacteria strains isolated from traditional, starter-free dairy products made of raw milk. *Benef. Microbes* *10*, 579–587.
- Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (2006). CLAUDINS AND EPITHELIAL PARACELLULAR TRANSPORT. *Annu. Rev. Physiol.* *68*, 403–429.
- Varma, P., Dinesh, K.R., Menon, K.K., and Biswas, R. (2010). *Lactobacillus Fermentum* Isolated from Human Colonic Mucosal Biopsy Inhibits the Growth and Adhesion of Enteric and Foodborne Pathogens. *J. Food Sci.* *75*, M546–M551.
- Veljović, K., Popović, N., Miljković, M., Tolinački, M., Terzić-Vidojević, A., and Kojić, M. (2017). Novel Aggregation Promoting Factor AggE Contributes to the Probiotic Properties of *Enterococcus faecium* BGG09-28. *Front. Microbiol.* *8*, 1843.
- Veljovic, K., Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., Ostojic, M., and Topisirovic, L. (2007). Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese: Lactic acid bacteria in Zlatar cheese. *J. Appl. Microbiol.* *103*, 2142–2152.
- Ventura, M., Jankovic, I., Walker, D.C., Pridmore, R.D., and Zink, R. (2002). Identification and Characterization of Novel Surface Proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 6172–6181.
- Walter, J. (2005) The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract, p. 51–82. In G. W. Tannock (ed.), *Probiotics & prebiotics: scientific aspects*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
- Wang, L., Wang, F.-S., and Gershwin, M.E. (2015). Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J. Intern. Med.* *278*, 369–395.
- Wang, Y., Feng, D., Liu, G., Luo, Q., Xu, Y., Lin, S., Fei, J., and Xu, L. (2008). γ -Aminobutyric Acid Transporter 1 Negatively Regulates T Cell-Mediated Immune Responses and Ameliorates Autoimmune Inflammation in the CNS. *J. Immunol.* *181*, 8226–8236.
- Wei, J., Long, L., Yang, K., Guy, C., Shrestha, S., Chen, Z., Wu, C., Vogel, P., Neale, G., Green, D.R., et al. (2016). Autophagy enforces functional integrity of regulatory T cells by coupling environmental cues and metabolic homeostasis. *Nat. Immunol.* *17*, 277–285.
- Weiskopf, K. (2017). Cancer immunotherapy targeting the CD47/SIRP α axis. *Eur. J. Cancer* *76*, 100–109.

WHO-FAO (2006). Probiotics in foods. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition Paper No. 8592-5-105513.

WHO-FAO (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London: WHO.

Wu, C., Qin, X., Du, H., Li, N., Ren, W., and Peng, Y. (2017). The immunological function of GABAergic system. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 22, 1162–1172.

Wu, Q., Law, Y. S., Shah, N. P. (2015). Dairy *Streptococcus thermophilus* improves cell viability of *Lactobacillus brevis* NPS-QW-145 and its γ -aminobutyric acid biosynthesis ability in milk. *Sci Rep.* 5, 12885.

Wu, S., Yuan, L., Zhang, Y., Liu, F., Li, G., Wen, K., Kocher, J., Yang, X., and Sun, J. (2013). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG mono-association suppresses human rotavirus-induced autophagy in the gnotobiotic piglet intestine. *Gut Pathog.* 5, 22.

Xu, H., Jeong, H.S., Lee, H.Y., and Ahn, J. (2009). Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Lett. Appl. Microbiol.* 49, 434–442.

Yamakoshi, J., Fukuda, S., Satoh, T., Tsuji, R., Saito, M., Obata, A., Matsuyama, A., Kikuchi, M., and Kawasaki, T. (2007). Antihypertensive and Natriuretic Effects of Less-Sodium Soy Sauce Containing γ -Aminobutyric Acid in Spontaneously Hypertensive Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 165–173.

Yang, N.-C., Jhou, K.-Y., and Tseng, C.-Y. (2012). Antihypertensive effect of mulberry leaf aqueous extract containing γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem.* 132, 1796–1801.

Yang, S.-Y., Lü, F.-X., Lu, Z.-X., Bie, X.-M., Jiao, Y., Sun, L.-J., and Yu, B. (2008). Production of γ -aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y2 under submerged fermentation. *Amino Acids* 34, 473–478.

Ye, X., Zhou, X.-J., and Zhang, H. (2018). Exploring the Role of Autophagy-Related Gene 5 (ATG5) Yields Important Insights Into Autophagy in Autoimmune/Autoinflammatory Diseases. *Front. Immunol.* 9.

Zhang, X., Wang, S., Nan, Y., Fan, J., Chen, W., Luan, J., Wang, Y., Liang, Y., Li, S., Tian, W., et al. (2018). Inhibition of autophagy potentiated the anti-tumor effects of VEGF and CD47 bispecific therapy in glioblastoma. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 6503–6513.

Zhang, Y., Song, L., Gao, Q., Yu, S. M., Gao, N. F. (2012). The two-step biotransformation of monosodium glutamate to GABA by *Lactobacillus brevis* growing and resting cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 94, 1619-1627.

Zhang, Y.-C., Zhang, L.-W., Tuo, Y.-F., Guo, C.-F., Yi, H.-X., Li, J.-Y., Han, X., and Du, M. (2010). Inhibition of *Shigella sonnei* adherence to HT-29 cells by lactobacilli from Chinese fermented food and preliminary characterization of S-layer protein involvement. *Res. Microbiol.* *161*, 667–672.

Zhou, X.-J., and Zhang, H. (2012). Autophagy in immunity: Implications in etiology of autoimmune/autoinflammatory diseases. *Autophagy* *8*, 1286–1299.

Zhou, J.S., Pillidge, C.J., Gopal, P.K., and Gill, H.S. (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int. J. Food Microbiol.* *98*, 211–217.

Zhuang, K., Jiang, Y., Feng, X., Li, L., Dang, F., Zhang, W., and Man, C. (2018). Transcriptomic response to GABA-producing *Lactobacillus plantarum* CGMCC 1.2437T induced by L-MSG. *PLOS ONE.* *13*, e0199021.

Zivkovic, M., Hidalgo-Cantabrana, C., Kojic, M., Gueimonde, M., Golic, N., and Ruas-Madiedo, P. (2015). Capability of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-producing isogenic strain NB1, to counteract the effect of enteropathogens upon the epithelial cell line HT29-MTX. *Food Res. Int.* *74*, 199–207.

Živković, M., Miljković, M.S., Ruas-Madiedo, P., Markelić, M.B., Veljović, K., Tolinački, M., Soković, S., Korać, A., and Golić, N. (2016). EPS-SJ Exopolisaccharide Produced by the Strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 Is Involved in Adhesion to Epithelial Intestinal Cells and Decrease on *E. coli* Association to Caco-2 Cells. *Front. Microbiol.* *7*.

Biografija autora

Svetlana S. Soković Bajić je rođena 25. juna 1988. godine u Beogradu, Republika Srbija. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija) upisala je 2007. godine, a osnove akademske studije završila je 2013. godine. Master akademske studije upisala je iste godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, modul Genetičko inženjerstvo i biotehnologija). Master studije završila je 2014. godine odbranom master rada „Analiza prisustva *gadB* gena u mlečno kiselinskim bakterijama izolovanim iz autohtonih sireva sa područja Balkana“ koji je uradila u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu. Godine 2014. upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijski program Molekularna biologija, modul Molekularna biologija prokariota). Od decembra 2014. zaposlena je kao istraživač pripravnik u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu na projektu Osnovnih istraživanja-Biologije OI 173019 „Izučavanje gena i molekularnih mehanizama u osnovi probiotičke aktivnosti bakterija mlečne kiseline izolovanih sa područja Zapadnog Balkana“. Od decembra 2014. do aprila 2016. bila je angažovana i na projektu Osnovnih istraživanja-Biologije OI 173026 „Molekularna karakterizacija bakterija iz rodova *Bacillus* i *Pseudomonas* kao potencijalnih agenasa za biološku kontrolu“. Godine 2017. Izabrana je u zvanje istraživača saradnika. U toku dosadašnjeg naučnog rada Svetlana S. Soković Bajić objavila je sedam (7) naučnih radova: pet (5) radova u vrhunskim međunarodnim časopisima M21 kategorije, jedan (1) rad u međunarodnom časopisu M23 kategorije i jedan (1) rad u domaćem časopisu M52 kategorije. Na domaćim i međunarodnim kongresima ima dvanaest (12) saopštenja. Dobitnik je nagrade Fondacije „Goran Ljubijankić“ za najbolji master rad iz oblasti molekularne biologije odbranjen 2014. godine, kao i stipendije „FEMS“ za mlade naučnike u 2016. godini i stipendije „Wood-Whelan Research Fellowships“ za mlade naučnike u 2018. godini. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije i Srpskog društva za molekularnu biologiju.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Светлана С. Соковић Бајић _____

број индекса _____ M3001/2014 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација млечнокиселинских бактерија произвођача γ -аминобутерне киселине и њихова улога у превенцији и третману експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

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

Потпис докторанда

У Београду, 09. 09. 2019.

Светлана Соковић Бајић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Светлана С. Соковић Бајић

Број индекса M3001/2014

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Карактеризација млечнокиселинских бактерија произвођача γ -аминобутерне киселине и њихова улога у превенцији и третману експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

Ментор др Маја Толиначки, виши научни сарадник, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 09.09.2019.

Светлана Соковић Бајић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Карактеризација млечнокиселинских бактерија произвођача γ-аминобутерне киселине и њихова улога у превенцији и третману експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 09.09.2019.

Светлана Соколовић Бегун

1. Ауторство - Дозвољавате 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. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате 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 прераде. 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.



GABA-Producing Natural Dairy Isolate From Artisanal Zlatar Cheese Attenuates Gut Inflammation and Strengthens Gut Epithelial Barrier *in vitro*

Svetlana Sokovic Bajic, Jelena Djokic, Miroslav Dinic, Katarina Veljovic, Natasa Golic, Sanja Mihajlovic and Maja Tolinacki*

Laboratory for Molecular Microbiology, The Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

OPEN ACCESS

Edited by:

Rubén Salcedo-Hernández,
Universidad de Guanajuato, Mexico

Reviewed by:

Suleyman Yildirim,
Istanbul Medipol University, Turkey
Enrica Pessione,
University of Turin, Italy

*Correspondence:

Maja Tolinacki
maja_tolinacki@imgge.bg.ac.rs

Specialty section:

This article was submitted to
Microbiotechnology, Ecotoxicology
and Bioremediation,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 23 July 2018

Accepted: 01 March 2019

Published: 18 March 2019

Citation:

Sokovic Bajic S, Djokic J, Dinic M,
Veljovic K, Golic N, Mihajlovic S and
Tolinacki M (2019) GABA-Producing
Natural Dairy Isolate From Artisanal
Zlatar Cheese Attenuates Gut
Inflammation and Strengthens Gut
Epithelial Barrier *in vitro*.
Front. Microbiol. 10:527.
doi: 10.3389/fmicb.2019.00527

Probiotic bacteria are recognized for their health-promoting properties, including maintenance of gut epithelial integrity and host immune system homeostasis. Taking into account the beneficial health-promoting effects of GABA, the presence of the *gadB* gene, encoding glutamate decarboxylase that converts L-glutamate to GABA, was analyzed in Lactic Acid Bacteria (LAB) natural isolates from Zlatar cheese. The results revealed that 52% of tested *Lactobacillus* spp. and 8% of *Lactococcus* spp. isolates harbor the *gadB* gene. Qualitative and quantitative analysis of GABA production performed by thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC) revealed the highest GABA production by *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17. Since high GABA-producing LAB natural isolates are the most valuable source of naturally produced GABA, the probiotic properties of BGZLS10-17 were characterized. This study demonstrated high adhesion of BGZLS10-17 strain to Caco-2 cells and the ability to decrease the adhesion of *Escherichia coli* ATCC25922 and *Salmonella enterica* C29039. Treatment of differentiated Caco-2 cells monolayer with BGZLS10-17 supernatant containing GABA alleviated inflammation (production of IL-8) caused by IL-1 β and significantly stimulated the expression of tight junction proteins (zonulin, occludin, and claudin 4), as well as the expression of TGF- β cytokine leading to the conclusion that immunosuppression and strengthening the tight junctions can have significant role in the maintenance of intestinal epithelial barrier integrity. Taken together the results obtained in this study support the idea that using of GABA producing BGZLS10-17 probiotic strain could be a good strategy to modulate immunological response in various inflammatory diseases, and at the same time, it could be a good candidate for adjunct starter culture for production of GABA-enriched dairy foods and beverages offering new perspectives in designing the novel functional foods.

Keywords: GABA, lactobacilli, artisanal food, antimicrobial, anti-inflammatory activity

INTRODUCTION

γ -amino butyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system, directly affecting the personality and the stress management, and has hypotensive, tranquilizing, diuretic and antidiabetic effects (Li and Cao, 2010; Dhakal et al., 2012). The protective role of GABA is demonstrated in many autoimmune diseases such as type 1 diabetes (Tian et al., 2004), experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an animal model of multiple sclerosis (Bhat et al., 2010), collagen-induced arthritis (Kelley et al., 2008; Tian et al., 2011), and contact dermatitis (Nigam et al., 2010). This GABA effect is usually interpreted through the inhibitory effect of this molecule on the immune system. On the other hands, different human and experimental autoimmune models have been characterized by intestinal tight junction dysfunction (Visser et al., 2009). Disruption of intestinal homeostasis and increased intestinal permeability have been shown as an early and immune-mediated event in EAE (Nouri et al., 2014), inflammatory bowel disease (Suenaert et al., 2002), and celiac disease (Vogelsang et al., 1998). In addition, different infectious agents affect intestinal permeability in order to penetrate into deeper tissues (Wang et al., 2018), while entry of unwanted antigens, due to the leaky intestinal barrier, can lead to systemic inflammatory response syndrome, characterized by a whole body inflammatory state, and multiple organ failure (Liu et al., 2005). Thus, intestinal permeability represents a potential therapeutic target in treatment/prevention of MS and other autoimmune and inflammatory diseases.

Many drugs and bioactive components targeting GABA receptors are widely used in pharmaceutical and food industry. It is believed that GABA of extra brain origin, except through the pituitary gland, cannot pass the blood-brain barrier, although the results of studies dealing with this issue are inconsistent (Kakee et al., 2001; Powers et al., 2008; Boonstra et al., 2015). GABA contributes to gut-brain signaling through different pathways including enteric neurons, entero-endocrine cells and immune cells (Mazzoli et al., 2017). The microbial biosynthesis of GABA occurs in simple, highly efficient, and environmentally friendly reaction (Dhakal et al., 2012). The biosynthesis of GABA occurs in a single step. Glutamate decarboxylase (GAD) (EC 4.1.1.15), a pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzyme, catalyzes the irreversible α -decarboxylation of L-glutamate to GABA (Ueno, 2000).

Lactobacilli known for their beneficial effects on human and animal health, represent the most important group of GABA producers (Cho et al., 2007; Lebeer et al., 2008). GABA production was detected in *Lactobacillus brevis*, *Lb. paracasei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. buchneri*, *Lb. plantarum*, *Lb. helveticus*, and *Lb. rhamnosus*, mostly isolated from traditional fermented foods such as cheese, kimchi and sour dough (Cho et al., 2007; Siragusa et al., 2007; Komatsuzaki et al., 2008; Seok et al., 2008; Kim et al., 2009; Sun et al., 2009). Our previous results showed considerable diversity among LAB natural isolates from artisanal dairy products in Western Balkan with great technological and probiotic potential (Golić et al., 2013; Uroić et al., 2014). Due to increased public awareness of the use

of natural food compounds, higher attention has been made on the use of metabolites produced by LAB isolates from artisanal products. In this study, natural isolates originating from Zlatar cheese were used. Zlatar cheese is an artisanal cheese manufactured in the remote households on the highlands of the nature reserve, mountain Zlatar, Serbia. Natural dairy LAB isolates from Zlatar cheese produce antimicrobial compounds with broad inhibitory spectrum, exopolysaccharides (EPS) with specific immunomodulatory activity and various other bioactive compounds with bile salt hydrolase activity and ability of cholesterol assimilation (Veljovic et al., 2007).

Although the immunomodulatory activity of GABA on different immune cells have been repeatedly proven, there is no references about the effects of GABA on enterocytes and intestinal integrity in inflammatory condition. Just a few references investigated the effect of GABA on enterocytes and intestinal integrity in different condition. Braun et al. (2015) proposed that the positive effects of glutamine on intestinal integrity are partly attributable to the promoting effects of its metabolite GABA on the expression of protective mucin in enterocytes. El-Hady et al. (2017) showed that administrated GABA have a role in improving histopathological and biochemical disturbances in the rat's small intestine following gamma radiation. Considering protective effects of GABA on stressed enterocytes showed in these studies as well as repeatedly proven positive effect of different *Lactobacillus* strains, we aimed to investigate the effects of GABA-producing *Lactobacillus* strain on enterocytes exposed to inflammatory condition *in vitro*. Additionally, the other health-promoting effects of GABA-producing LAB natural isolates from Zlatar cheese was investigated in different *in vitro* settings.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains, Media and Growth Conditions

Bacterial strains used in this study are presented in **Table 1**. The *Lactobacillus* strains were grown in De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) medium (Merck GmbH, Darmstadt, Germany), while *Lactococcus* strains were grown in M17 medium (pH 7.2) (Merck GmbH) supplemented with 0.5% (w/v) glucose (GM17). Bacteria were grown at 30 or 37°C, under aerobic or anaerobic conditions, depending on the strain. Anaerobic conditions were achieved by using the Anaerocult A (Merck GmbH) in anaerobic jars. Solid medium was prepared by adding agar (1.5%, w/v) (Torlak, Belgrade, Serbia) to the broth medium. The strains were maintained at -80°C in an appropriate medium (GM17 or MRS) supplemented with 15% (v/v) glycerol.

DNA Manipulation and Identification of GABA-Producing Strains

The total DNA of lactobacilli strains was extracted using the QIA DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The PCR amplification of 16S rDNA, with UNI16SF (5'-GAGAGTTTGATCCTGGC-3') and UNI16SR (5'-AGG

TABLE 1 | The list of strains used in this study.

Species	<i>gadB</i> -negative strains	<i>gadB</i> -positive strains	GABA producing strains
<i>Lactobacillus brevis</i>	BGZLS30-23	BGZLS45-36	BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17, BGZLS30-2
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	BGZLS10-6, BGZLS45-50, BGZLS60-32	BGZLS10-1, BGZLS20-1, BGZLS45-25, BGZLS60-50	BGZLS45-49
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	BGZLS60-58		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	BGZLS60-59	BGZLS60-43	BGZLS20-20, BGZLS30-41
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	BGZLS10-2		
<i>Lactococcus lactis</i>		BGZLS10-33	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	BGZLS11-11, BGZLS10-35	BGZLS10-34	

AGGTGATCCAGCCG-3') primers was performed as described by Jovčić et al. (2009). To amplify highly conserved region of *gad* gene, CoreF (5'-CCTCGAGAAGCCGATCGCTTAGTTCG-3') and CoreR (5'-TCATATTGACCGGTATAAGTGATGCC-3') primers were used as described by Siragusa et al. (2007). Briefly, 25 μ l reaction contained 500 ng/ μ l of DNA, 0.5 U of Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Inc., Ipswich, MA, United States), 200 μ M of each deoxynucleoside triphosphate, 0.5 μ M of both primers and 1x Q5 Reaction Buffer. The obtained PCR amplicons were purified (Qiagen) and sequenced (Macrogen, Amsterdam, the Netherlands). Sequence annotation and the database searches for sequence similarities were performed with the BLAST tool available online¹.

Analysis of GABA Production

The strains were incubated in MRS or GM17 medium supplemented with various concentrations of monosodium glutamate-MSG (Acros organics, Morris Plains, NJ, United States) (0.5–4%) for 48 h. The cells were harvested by centrifugation (4500 \times g for 15 min at 4°C) and 1 ml of the supernatant was evaporated up to 200 μ l and diluted 2-fold by 7% acetic acid. The samples were centrifuged at 8100 \times g for 15 min at room temperature. Obtained supernatants were used for thin-layer chromatography (TLC) analysis (Park et al., 2014.) and high-performance liquid chromatography (HPLC) (Holdiness, 1983). Briefly, 1 μ l of supernatant was spotted on a silica gel 60F₂₅₄ TLC plate (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and developed with *n*-butanol, acetic acid, and water (4:1:1 v/v/v). Upon development was complete the plate was dried and visualized with 0.2% ninhydrin reagent (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO, United States). The conversion rate of MSG to GABA was analyzed using ImageJ software. The aliquots of 100 μ l [bacterial supernatants and GABA standard (Sigma)] were filtrated through 0.22 μ m filters and derivatized

¹<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

to phenylthiocarbonyl-GABA (Rossetti and Lombard, 1996). The derivatized samples were dissolved in 200 μ l of initial mobile phase, solution A (138 mM sodium acetate, pH 6.3, 6% acetonitrile, 0.05% triethylamine). HPLC separation was performed on the instrument of Thermo scientific 3000 equipped with a Hypersil gold column (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States 150 \times 4.6, 5 μ m). The elution solvent system comprised of solution A, solution B (acetonitrile) and solution C (water). The elution program is shown in Table 2. The amount of GABA production was calculated from GABA standard curve.

The Cumulative Effect of Simulated Gastrointestinal Transit on Survival of Selected Strains

The survival of LAB strains during the passage through gastrointestinal tract (GIT) was monitored in an *in vitro* model that simulates the physiological conditions as described by Sánchez et al. (2010). *Lactobacillus* isolates from 10 ml of overnight cultures in MRS medium were harvested by centrifugation (4500 \times g, 10 min), washed in 0.85% NaCl and resuspended in gastric, duodenal and intestinal juice(s) (Sánchez et al., 2010) at pH 2.0 and pH 8.0 supplemented with 10% reconstituted skimmed milk. The aliquots were taken at 0, 90, and 180 min and serial 10 \times dilutions in 0.85% NaCl were plated on MRS agar plates. The plates were incubated anaerobically at 37°C for 48 h. The results were expressed as Log colony forming units (cfu) ml⁻¹ and the survival rate was calculated from the viable cell count with respect to initial cell counts. The experiments were performed in triplicates.

Gastric Tolerance at pH 2.0 in the Presence of Skim Milk, Milk Proteins, and Mucin

One mg ml⁻¹ of milk powder (Mlekara d.o.o., Pancevo, Serbia), β -lactoglobulin, and mucin (Sigma) were resuspended in gastric juice at pH 2.0 (125 mM NaCl, 7 mM KCl, 45 mM NaHCO₃ and 0.3% pepsin). Skim milk was prepared according to the manufacturer's instructions at 110 mg ml⁻¹. *Lactobacilli* strains from an MRS overnight culture were harvested by centrifugation (4500 \times g, 10 min), washed twice in 0.85% NaCl (Merck) and resuspended in 10 ml of an appropriate gastric juice containing milk proteins, β -lactoglobulin, skim milk or mucin. The mixtures were incubated anaerobically for 2 h at 37°C. The tolerance of the tested strains was calculated as described in previous section.

TABLE 2 | Elution program of HPLC.

Time (min)	Solution A (%)	Solution B (%)	Solution C (%)	Flow (ml/min)
0	60	12	28	0.6
6	60	12	28	0.6
6.1	20	13.5	66.5	0.4
22	20	13.5	66.5	0.4
25	60	12	28	0.6
40	60	12	28	0.6

Antibiotic Susceptibility Testing

Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) was performed by microdilution tests in Iso-Sensitest Broth (Oxoid, Hampshire, United Kingdom). The MIC breakpoints of eight antibiotics (ampicillin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, and chloramphenicol) were determined in accordance to European Food Safety Authority recommendations (EFSA, 2008). Appropriate cell culture was added in wells of the microtiter plate containing increasing concentrations of antibiotics dissolved in 180 μ L ISO medium. Cell density was monitored by OD₆₀₀ measurements after 24 h of incubation at 37°C in a microtiter plate reader (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). The lowest concentration of antibiotic at which no growth of bacteria was detected was taken as MIC. Experiments were done in triplicate.

Hemolytic Activity

Lactobacillus brevis strains were cultured in MRS broth and were streaked on Columbia agar plates containing 5% of sheep blood (Oxoid). The plates were incubated for 48 h at 30°C. According to Argyri et al. (2013), blood agar plates were examined for signs of β -haemolysis (clear zones around colonies), α -haemolysis (green-hued zones around colonies) or γ -haemolysis (no zones around colonies).

Gelatinase Activity

The phenotypic assay was performed as described by Su et al. (1991). Briefly, the lactobacilli strains were grown on agar plates containing 3% gelatine (Oxoid) at 37°C for 48 h and flooded with a saturated solution of ammonium sulfate (Centohem, Stara Pazova, Serbia). A transparent halo around cells and gelatine precipitates indicated gelatinase producers. As a positive control *E. faecalis* V583 (Paulsen et al., 2003) was used.

Antimicrobial Activity

All *Lb. brevis* strains and their supernatants were tested in triplicates for their antimicrobial activity against following pathogen strains: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus spizizeni* ATCC 6633, *Citrobacter freundii* ATCC 43864, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria ivanovii* ATCC 19119, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Proteus hauseri* ATCC 13315, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Pseudomonas aeruginosa* PAOI, *Rhodococcus equi* ATCC 6936, *Salmonella enterica* C2 9039, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Shigella sonnei* ATCC 29930, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, and *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729. For production of antimicrobial compounds, *Lb. brevis* strains were inoculated (1%, v/v) in MRS broth and incubated for 16 h. Both, the overnight cultures and the supernatants obtained after centrifugation (12,000 \times g, 5 min) were tested for antimicrobial activity by the agar-well diffusion assay against indicator pathogen strains. Soft LB and BHI soft agar (0.7% w/v) containing pathogenic strains, was overlaid onto LB and

BHI agar plates, respectively. Wells were made in the lawn of hardened soft agars. Aliquots (50 μ l) of supernatants and overnight cultures were poured into the wells. A clear zone of inhibition around the well was taken as a positive signal for antimicrobial activity.

Adherence to Caco-2 Cells

The colonocyte-like cell lines Caco-2, was used to determine the adhesion ability of bacterial strains. Caco-2 was purchased from the European Collection of Cell Cultures (ECACC No. 86010202). The culture and maintenance of the cell line was carried out following standard procedures (Sánchez et al., 2010) using Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U ml⁻¹ penicillin and 100 mg ml⁻¹ streptomycin and 2 mM l-glutamine. Media and reagents were purchased from Thermo Fisher Scientific. Caco-2 cells were seeded in 24-well plates and cultivated until monolayers formed with no further visible differentiation. For adhesion experiments, 13 \pm 1 day-old cellular monolayers were used. Overnight bacterial cultures (24 h) were washed twice with PBS solution. The pellets were resuspended in the corresponding cell-line media without antibiotics at a concentration of about 10⁸ cfu ml⁻¹. Cellular monolayers were also carefully washed and bacterial suspensions were added at a ratio of 10:1 (bacteria : eukaryotic cell). Following co-incubation for 1 h at 37°C and 5% CO₂ the cells were gently washed and lysed with 0.25% Trypsin-EDTA solution (Sigma). Serial dilutions of samples, before and after adhesion, were diluted in PBS and plated on MRS-agar plates. The adherence (expressed as a percentage) was calculated as: cfu adhered bacteria/cfu added bacteria. Experiments were performed in two replicated plates and in each plate three wells were used per sample.

Competitive Exclusion Assay

Exclusion of pathogen strains *Escherichia coli* ATCC25922 and *Salmonella enterica* C29039 was done to Caco-2 cell line by *Lactobacillus brevis* strains as described previously (Živkovic et al., 2016). Briefly, bacterial cultures were washed twice with PBS and resuspended in DMEM without antibiotics at a concentration of $\sim 1 \times 10^7$ CFU ml⁻¹. The bacterial suspensions containing pathogen or a combination of pathogen strain and lactobacilli (ratio 1:1) were independently added to the Caco-2 monolayers at a ratio of 10:1 (bacteria : eukaryotic cells) and incubated at 37°C, with 5% CO₂ for 1 h. Afterward, the monolayers were gently washed twice with PBS and lysed with 0.25% Trypsin-EDTA solution (Sigma). Associated *E. coli* and *S. enterica* strains were counted by plating the serial 10-fold dilutions of the suspension on LA plates. The percentage of *E. coli* and *S. enterica* strains association was calculated as follows: 100 \times CFU ml⁻¹ bacteria associated/CFU ml⁻¹ bacteria added. Each combination was tested in triplicate. To determine the capability of the lactobacilli to decrease the association of pathogen strains to Caco-2 monolayers, data were referred to that obtained with the *E. coli* and *S. enterica* strains alone, respectively (i.e., 100% association).

Epithelial Integrity Analysis, Inflammation Induction and Treatments

Lactobacillus brevis BGZLS10-17, the best GABA producing strain, was used to determine the expression of tight junction proteins (zonulin, occludin, and claudin 4) and cytokine production (IL-8 and TGF- β) in differentiated Caco-2 cells. Caco-2 cells were seeded in 24 well plate and cultivated until monolayers formed with further differentiation for 21 days. Cell culture medium was changed every second day during the 21-day differentiation period.

Bacterial culture was grown in MRS medium and according to HPLC analysis there was no GABA production. To stimulate GABA production by BGZLS10-17, MRS medium was supplemented with 0.6% of MSG (Acros organics). Differentiated Caco-2 cells were treated with BGZLS10-17 supernatants in concentrations of 0.625 %, 1.25 % and 2.5 %, with 1 mM, 2 mM and 4 mM GABA respectively, determined by HPLC. Supernatant from the bacterial culture grown in MRS (the final concentration of 2.5%) was used as control. This supernatant with addition of artificial GABA (Sigma) in final concentration of 4 mM was used as an additional control in order to correlate the effect of supernatant with GABA produced by bacteria. Supernatant was obtained from 48 h bacterial culture and neutralized to pH about 7. Additionally, cells were treated with recombinant human IL-1 β beta (R&D systems, Minneapolis, MN, United States), as a trigger of inflammation, and it was monitored whether a supernatant containing 4 mM GABA can alleviate the induced inflammation. All treatment lasted 24 h.

Cytotoxicity Assay

The level of cytotoxicity in the cell cultures was measured by lactate dehydrogenase (LDH) Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) which detects LDH released from dead cells. After treatments, supernatants were collected and LDH activity was determined by following the manufacturer's instructions. The absorbance was measured at 450 nm on a microplate reader (Tecan).

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was extracted from Caco-2 as previously described by Lukic et al. (2013) with slight modifications. Cells were lysed in denaturing solution (4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.1 M *b*-mercaptoethanol, 0.5% [wt/vol] *N*-lauroylsarcosinate sodium salt) followed by acid phenol (pH 4) extractions and isopropanol precipitation. cDNA was generated from 0.5 μ g total RNA according to the reverse transcriptase manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR was carried out on 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, MA, United States) using KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, United States) under the following conditions: 3 min at 95°C activation, 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C. For β -actin cDNA amplification were used β -actin forward (5'TTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGA3'), and reverse (5'TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAGCA3') (Li et al., 2015). Following primers were used for the claudin cDNA

amplification CLDN 4 forward (5'ACAGACAAGCCTTA CTCC3') and reverse (5'GGAAGAACAAAGCAGAG3'), occludin cDNA amplification OCLN forward (5'TCAG GGAATATCCACCTATCACTTCAG3') and reverse (5'CAT CAGCAGCAGCCATGTACTCTTCAC3') and for zonulin cDNA amplification ZO-1 forward (5'AGGGGCAGTGGTG GTTTTCTGTCTTTC3') and reverse (5'GCAGAGGTCAAA GTTCAAGGCTCAAGAGG3') (Elamin et al., 2012). For expression of IL-8 were used cIL-8 forward (5'GGCA CAAACTTTCAGAGACAG3') and reverse (5'ACA CAGAGCTGCAGAAATCAGG3') primers (Angrisano et al., 2010). For the TGF- β cDNA expression were used TGF- β _F forward (5'AAGGACCTCGGCTGGAAGTGG3') and reverse (5'CCGGGTATGCTGGTTGTACAG3') (Dragicevic et al., 2017). Expression of the tight junction proteins and cytokines mRNAs was normalized against β -actin mRNA expression. All used primers were purchased from Thermo Fisher Scientific.

Western Blot

Proteins were isolated from Caco-2 cells using RIPA buffer and subsequently subjected to Western blot analysis as described by Dinić et al. (2017). Briefly, the extracted proteins (10 μ g) were separated on 12% SDS-PAGE and transferred to 0.2 mm nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Chicago, IL, United States) using Bio-Rad Mini trans-blot system (Bio-Rad, Hercules, CA, United States). The membranes were incubated for 2 h with anti-claudin (CLDN-4) antibody (1:1000; Novus Biologicals, United States) and anti- β -actin (1:1000; Thermo Fisher Scientific). The membranes were washed and incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (goat anti-rabbit; 1:10000; Thermo Fisher Scientific) for 1 h at room temperature. Proteins were detected by enhanced chemiluminescence (Immobilon Western, Merck Millipore).

Statistical Analysis

All data are presented as mean values \pm standard error (SD). One-way ANOVA with the Tukey's *post hoc* test was used to compare multiple groups. Values at $p < 0.05$ or less were considered statistically significant. All experiments were repeated at least three times. Statistical analysis was carried out using SPSS 20.0 for Windows.

RESULTS AND DISCUSSION

"Probiotics are live microorganisms that confer health benefits to the host when ingested in adequate amounts" (WHO-FAO, 2006). Various mechanisms staying behind the health-promoting activity of probiotic bacteria have been proposed, including antimicrobial activity, positive influence on gut microbiota composition, competitive adhesion to gut mucosa and intestinal epithelial cells (IEC), modulation of the immune response, strengthening the gut epithelial barrier and producing of various important bioactive molecules, including vitamins, amino acids and GABA, among others (Bermudez-Brito et al., 2012). The aim of this study was the characterization of GABA-producing natural

LAB isolates in order to be eventually used in formulation of added-value fermented foods with GABA.

Evaluation of GABA Producing LAB Strains

In order to select natural LAB isolates with the highest GAD activity, LAB strains previously isolated from Zlatar cheese (Veljovic et al., 2007) were screened for presence of the *gadB* gene by PCR amplification. Out of 25 LAB isolates from Zlatar cheese 15 strains (60%), including 13 lactobacilli (52%) and two lactococci (8%) were positive for presence of the *gadB* gene (Table 1). The production of GABA was determined by TLC analysis in seven out of 15 analyzed lactobacilli strains (28% in total from 25 LAB strains) (Figure 1A). In comparison, Siragusa et al. (2007) revealed 61 GABA-producing isolates out of 440 randomly taken gram-positive, catalase-negative, non-motile, and acidifying isolates (13.86%) from various Italian cheeses, while Franciosi et al. (2015) determined 68 out of

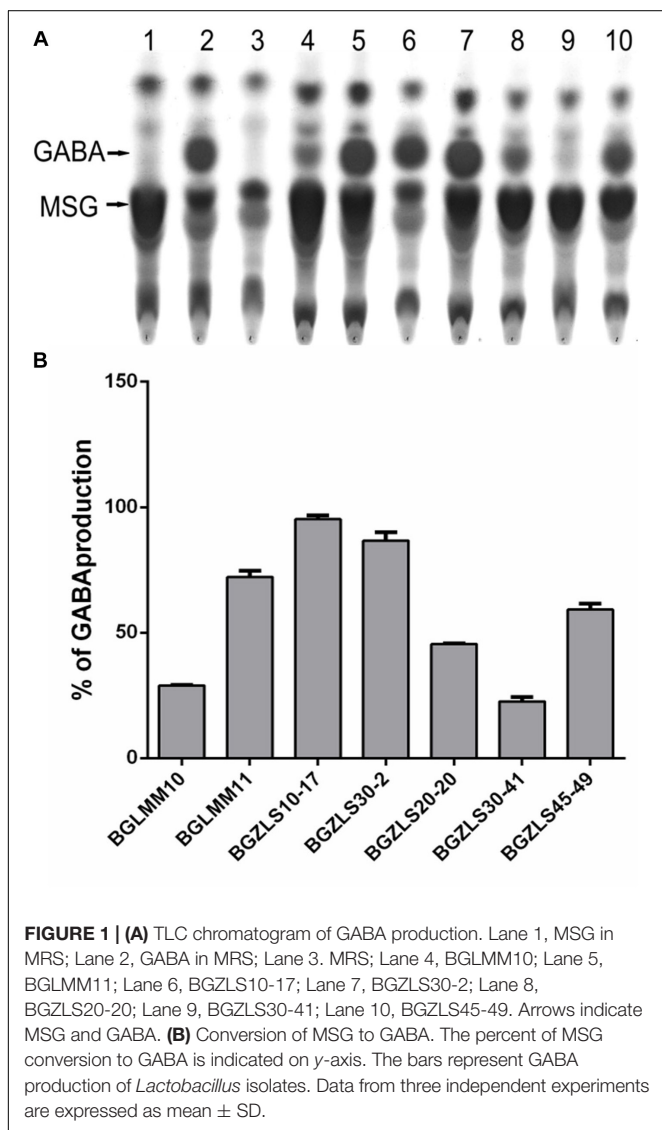
the 97 GABA-producing isolates (70.10%) from alpine raw milk “Nostrano-cheeses.”

Survival of GABA Producers in Simulated Gastrointestinal Conditions

According to WHO-FAO (2006) the survival in simulated gastrointestinal (GI) conditions is an important criterion for selection of probiotic strains. It is particularly important for GABA-producing strains since they could synthesize GABA only if remain viable through GI passage. Survival of seven strains that effectively produce GABA was tested in simulated conditions of the gastrointestinal tract. Our results revealed that among seven GABA-producers only *Lb. brevis* strains BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 and BGZLS30-2 successfully survived after 220 min of incubation in chemically simulated GI transit (8.7–8.9 log CFU ml⁻¹), when applied in one of the protecting carriers such as milk, skim milk, β -lactoglobulin, or mucin (Figures 2A,B). All tested carriers showed significant ($p < 0.001$; about two log cycles) improvement of survival, compared to survival of the strains applied in gastric juice (Figure 2B). The relatively high survival degree in the presence of bile salts in simulated small intestinal juice indicate resistance of some chosen strains to bile salts which could be ascribed to bile salts hydrolase (BSH) activity. BSH catalyzes the deconjugation of bile salts. Free, deconjugated bile salts have lower solubility at low pH because deconjugation increases their pKa values and precipitate as result of the fermentative metabolism of LAB (Begley et al., 2006).

The Safety Status of the *Lb. brevis* GABA-Producing Strains

The absence of virulence factors (e.g., hemolytic and/or gelatinase activity) as well as acquired or transmissible antibiotic resistance is a safety prerequisite for selection of potential probiotic strains (WHO-FAO, 2002). The results revealed that none of the strains exhibited hemolytic and/or gelatinase activity (data not shown). Besides, in line with EFSA recommendations (EFSA, 2008) the susceptibility of the isolates to different antibiotics groups was evaluated. Cell wall inhibitors (ampicillin) and protein synthesis inhibitors (gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, chloramphenicol, clindamycin, and tetracycline) were tested in order to confirm that the strains do not contain transferable resistance genes. The results showed that only the strain *Lb. brevis* BGZLS10-17 was susceptible to all tested antibiotics, while the strain *Lb. brevis* BGLMM11 was resistant to kanamycin (64 μ gml⁻¹), BGLMM10 to kanamycin (64 μ gml⁻¹) and tetracycline (16 μ gml⁻¹), and the strain and BGZLS30-2 to ampicillin (4 μ gml⁻¹), kanamycin (64 μ gml⁻¹) and tetracycline (16 μ gml⁻¹) (Table 3). Nevertheless, according to previous studies it is also important to differentiate the transferable resistance from natural intrinsic non-transmissible resistance (Danielsen and Wind, 2003; Argyri et al., 2013). The resistance to kanamycin has been confirmed for most *Lactobacillus* species and is considered intrinsic among lactobacilli due to the absence of cytochrome-mediated electron transport that mediates drug uptake (Temmerman et al., 2003; Argyri et al., 2013). The resistance to kanamycin and tetracycline was shown



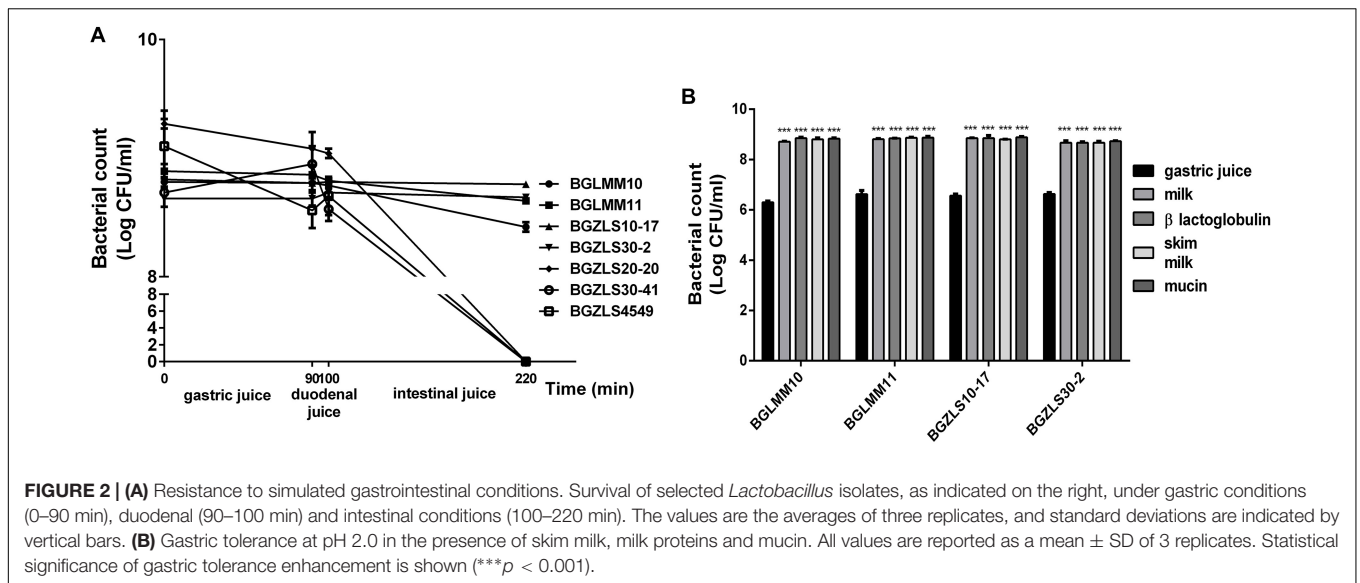
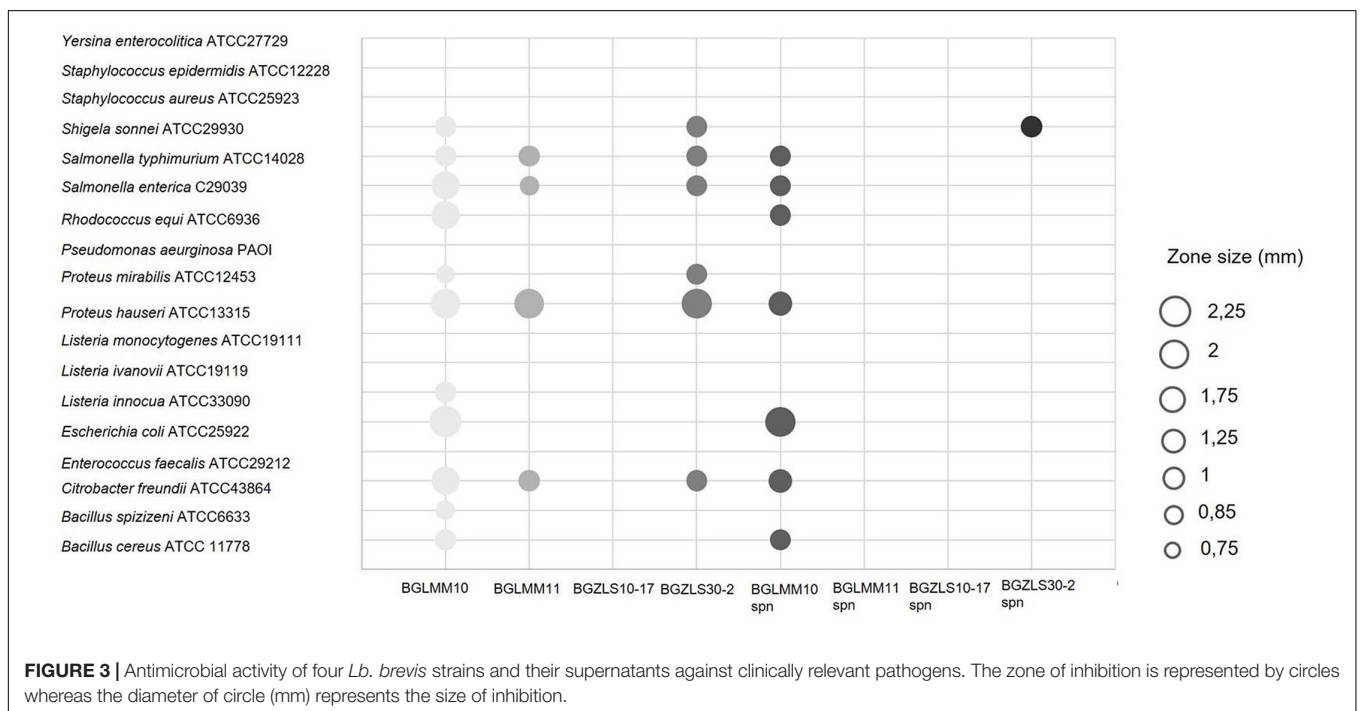


TABLE 3 | List of the tested antibiotics and MICs of four selected *L. brevis* isolates.

	Ampicillin	Vancomycin	Gentamicin	Kanamycin	Streptomycin	Erythromycin	Clindamycin	Tetracycline	Chloramphenicol
BGLMM10	1 ^S	n. r.	8 ^S	64 ^R	64 ^S	0.5 ^S	0.5 ^S	16 ^R	2 ^S
BGLMM11	1 ^S	n. r.	8 ^S	64 ^R	64 ^S	0.5 ^S	0.5 ^S	8 ^S	2 ^S
BGZLS10-17	1 ^S	n. r.	8 ^S	32 ^S	64 ^S	0.5 ^S	0.5 ^S	4 ^S	2 ^S
BGZLS30-2	4 ^R	n. r.	8 ^S	64 ^R	64 ^S	0.5 ^S	0.5 ^S	16 ^R	4 ^S

^S, susceptible; ^R, resistant; n. r., not required.



in *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (Argyri et al., 2013). On the other hand, the results of Zhou et al. (2005) showed that *Lactobacillus* strains were susceptible to β-lactam antibiotics

(penicillin, ampicillin, and cephalothin), but the frequency of transmission among LAB seems to be low because statistically only few LAB are beta lactam resistant. Therefore, the antibiotic

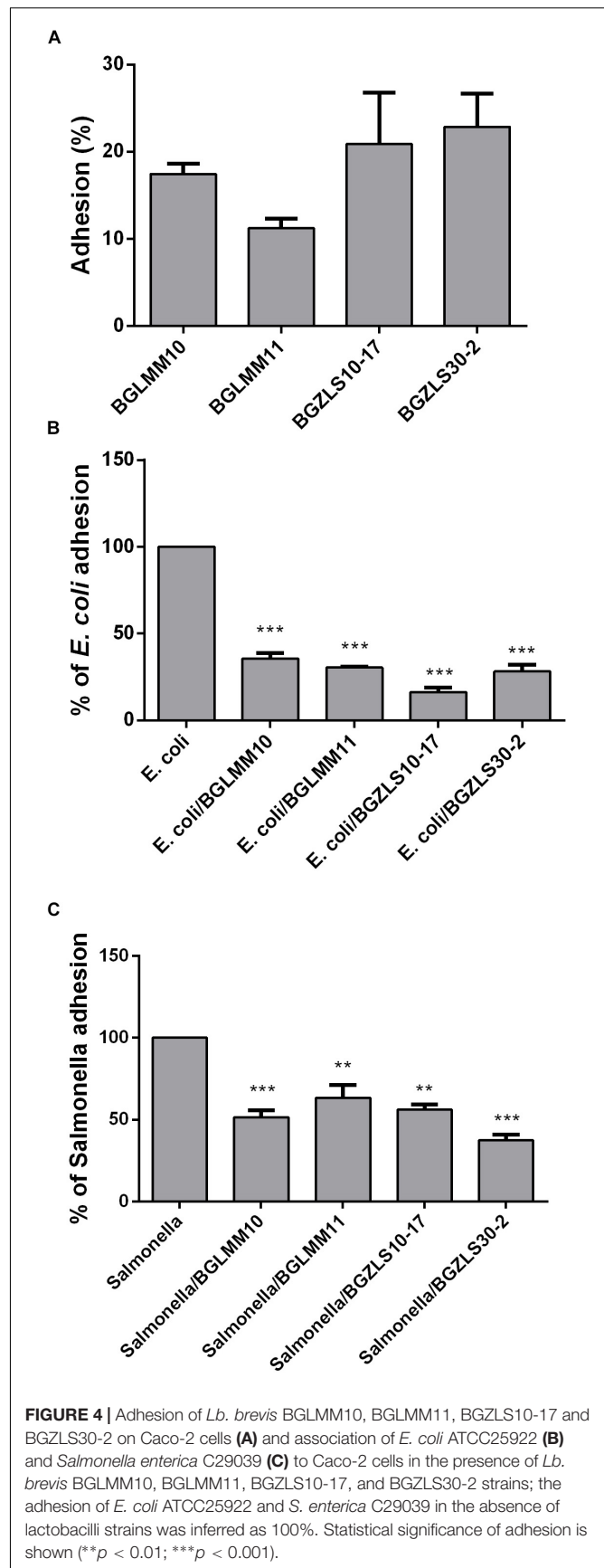
resistances detected in *Lactobacillus* strains, could be considered intrinsic or natural resistances and, hence, non-transmissible.

Quantification of GABA Production

The GABA produced by the strains *Lb. brevis* BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 and BGZLS30-20 was quantified by HPLC analysis. It appeared that the isolate *Lb. brevis* BGZLS10-17 produces the highest amount of GABA among all tested strains ($6.4 \pm 0.2 \text{ mgml}^{-1}$ [$62 \pm 1.94 \text{ mM}$] at 1% MSG; the conversion rate of MSG to GABA was 95%) (Figure 1B). Interestingly, the strain *Lb. paracasei* NFRI 7415, isolated from traditional fermented crucians (tuna-sushi) in Japan, produced similar amount (60 mM) but after 144 h (6 days) cultivation (Komatsuzaki et al., 2005). The isolates *Lb. brevis* BGZLS30-2, BGLMM11 and BGLMM10 produced $5.8 \pm 0.8 \text{ mgml}^{-1}$ [$56.2 \pm 7.76 \text{ mM}$], $5.6 \pm 0.6 \text{ mgml}^{-1}$ [$54.3 \pm 5.82 \text{ mM}$], and $3.7 \pm 0.2 \text{ mgml}^{-1}$ [$35.88 \pm 1.94 \text{ mM}$] in MRS containing 1% MSG, respectively. The conversion rate of MSG to GABA was the lowest (30%) by the isolate *Lb. brevis* BGLMM10 while *Lb. brevis* BGZLS30-2 and BGLMM11 converted 86 and 72% of MSG to GABA, respectively (Figure 1B). On the other hand, various authors revealed that the GABA production could be enhanced by optimizing the culture conditions. For example, the strain *Lb. buchneri* MS, isolated from kimchi, produced GABA at a concentration of 251 mM with a 94% GABA conversion rate, under optimized conditions (Cho et al., 2007), while *Lactobacillus brevis* NCL912 in the optimized fermentation medium produced GABA in concentration of 345.83 mM (Li et al., 2010). Interestingly, although *Lc. lactis* NCDO218 produces more GABA with the higher glutamate supplementation, addition of arginine to the cell culture medium even more improves GABA production. Arginin stimulates glutamate decarboxylation, and the highest GABA production (8.6 mM) was observed when cell culture medium was supplemented together with glutamate and arginin (Laroute et al., 2016). Hence, the aim of our future work will be to optimize the cultivation conditions in order to further increase the GABA yield by the tested isolates.

Antimicrobial Activity

Antimicrobial activity has been highly appreciated as a key property for selection of probiotic LAB as an alternative to antibiotics to fight against clinical pathogens (O'Shea et al., 2012). The antimicrobial activity of *Lb. brevis* strains against 18 pathogenic strains was determined (Figure 3). The *Lb. brevis* BGLM10, BGLM11, and BGZLS30-2 strains showed various degrees of antagonistic effects against number of clinically relevant pathogens (Figure 3). Interestingly, supernatant of the strain *Lb. brevis* BGLMM10 showed antagonistic effect against seven of 18 bacterial strains (*Salmonella typhimurium* ATCC14028, *S. enterica* C29039, *Rhodococcus equi* ATCC6936, *Proteus hauseri* ATCC13315, *Escherichia coli* ATCC25922, *Citrobacter freundii* ATCC43864, *Bacillus cereus* ATCC11778), while supernatant of the strain BGZLS30-2 showed antimicrobial activity against *Shigella sonnei* ATCC 29930. The negative results obtained by using pronase E revealed that antimicrobial activity is not of proteinaceous nature. The strain *Lb. brevis* BGZLS10-17 did not exhibit antimicrobial activity.



Adhesion to Caco-2 Intestinal Epithelial Cells

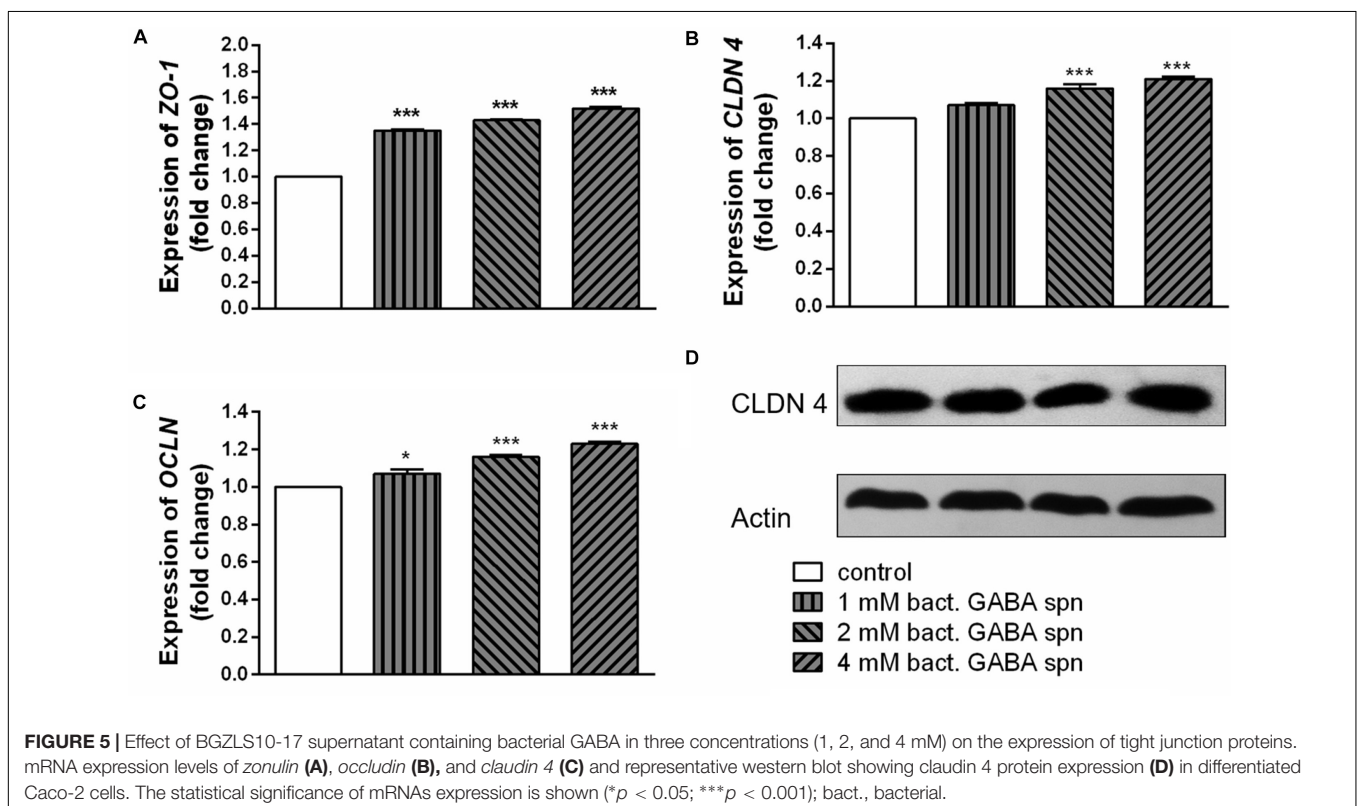
The ability of probiotic strains to adhere to IEC is an important criterion proposed by FAO/WHO guidelines for the selection of probiotic strains (WHO-FAO, 2006). Adhesion ability allows the strain to colonize intestinal mucosa and to persist in the intestine (Muñoz-Provencio et al., 2009). This is particularly important for the GABA-producers, since the maximal GABA production in these strains occurs after 48 h, hence this feature might be partly dependent on the persistence of the strain in the intestine and adhesion to mucosal surfaces. All four *Lb. brevis* strains were able to adhere to Caco-2 cells, although the adhesion varied among the strains (Figure 4A). The strain BGZLS30-2 exhibited the highest adhesion (22%), while the strain BGLMM11 showed the lowest adhesion to Caco-2 (11%) (Figure 4A).

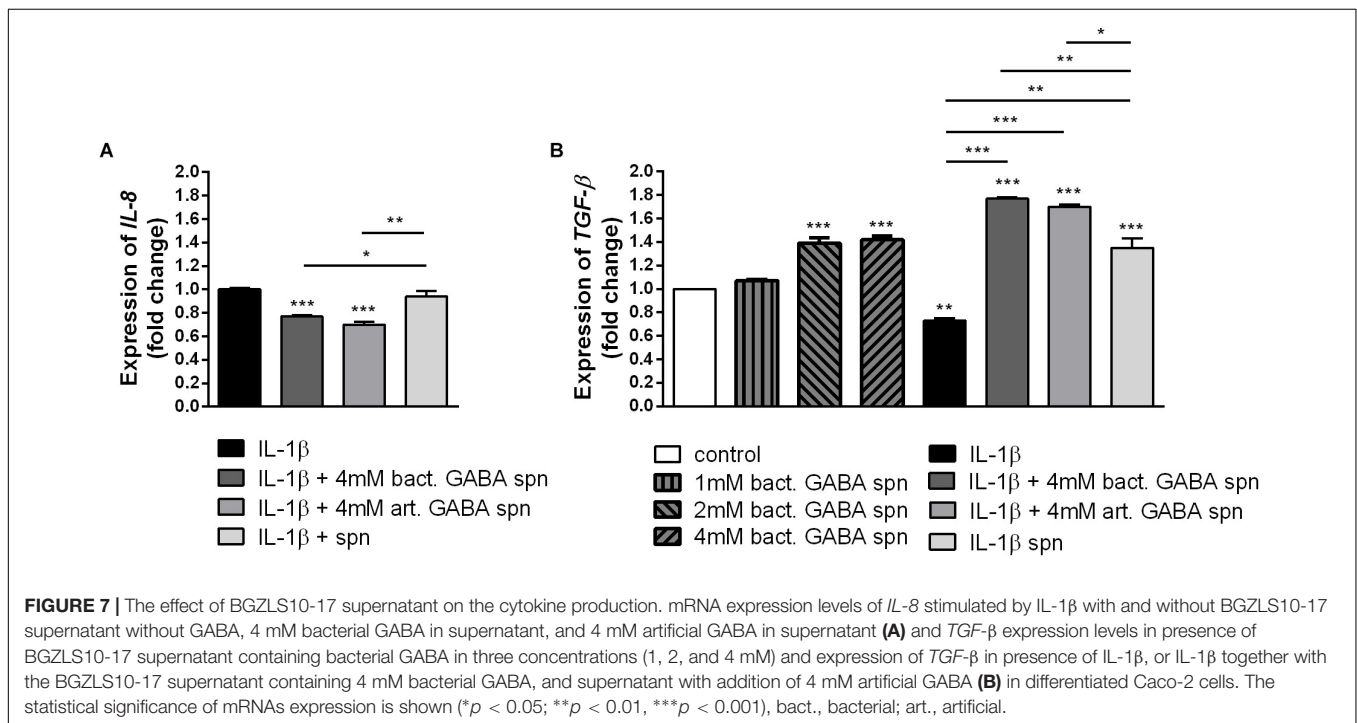
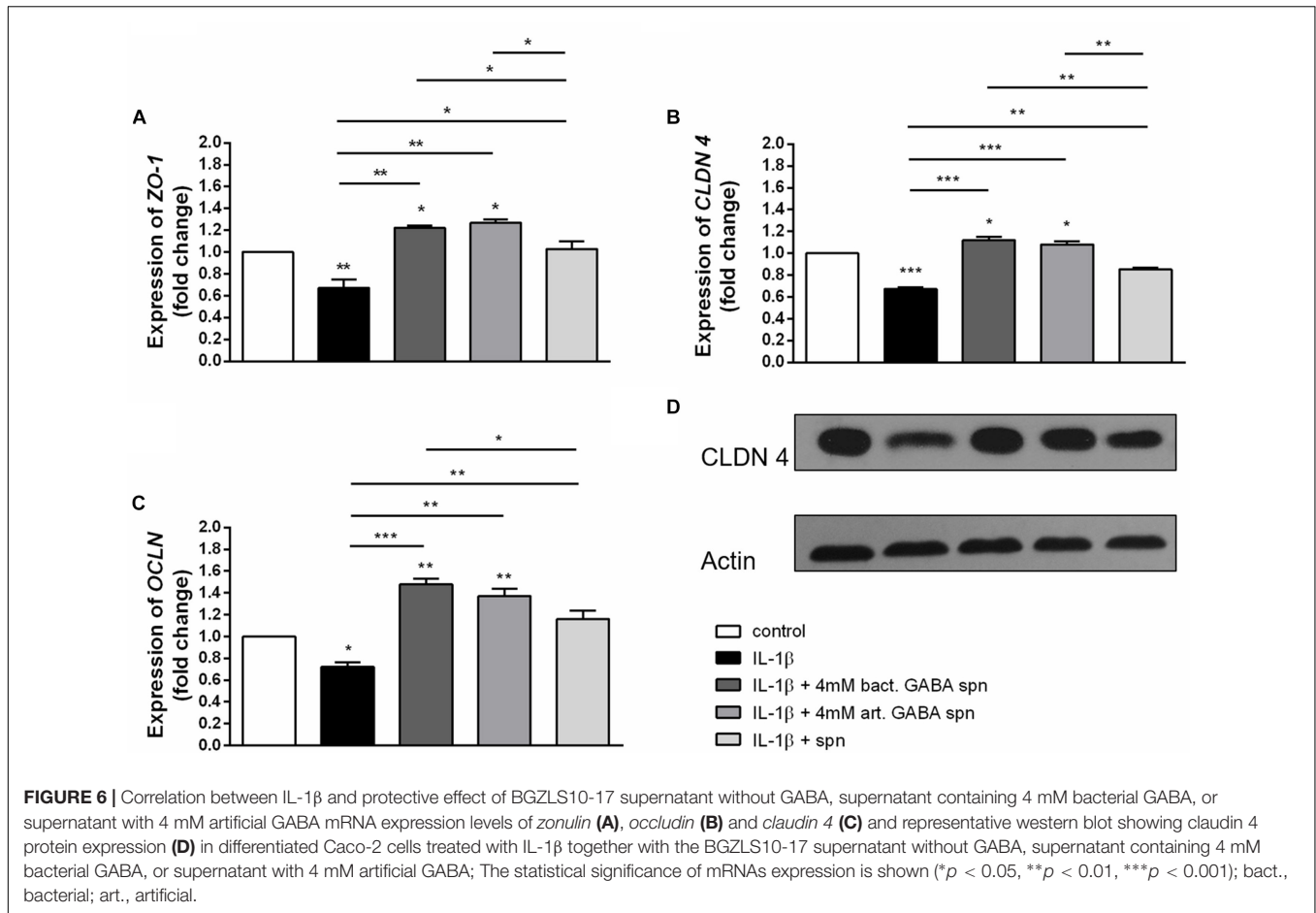
In addition, the adhesive properties of probiotic strains are important health promoting property in term of their capability to competitively counteract the negative effects of pathogenic bacteria (WHO-FAO, 2006). This characteristic is shown to be strain dependent and attributed to the various cell surface components such as cell surface associated proteins (Varma et al., 2010), proteinaceous S-layer macromolecules (Zhang et al., 2010) aggregation factors (Miljkovic et al., 2015), as well as EPS (Živkovic et al., 2015; Živkovic et al., 2016). The capability of the *Lb. brevis* strains to decrease the adhesion of *E. coli* ATCC25922 and *S. enterica* C29039 to the intestinal epithelium in the presence and absence of lactobacilli was tested. The results demonstrated high reduction of *E. coli* ATCC25922 and *S. enterica* C29039 adhesion in

the presence of four tested *Lb. brevis* isolates (Figures 4B,C). The reduction of *E. coli* ATCC25922 adhesion to Caco-2 was 64, 70, 80 and 72%, while the reduction of *S. enterica* C29039 adhesion was 50, 37, 44, and 63% in the presence of BGLMM10, BGLMM11, BGZLS10-17 and BGZLS30-2 strains, respectively (the adhesion of *E. coli* ATCC25922 and *S. enterica* C29039 in the absence of lactobacilli strains was inferred as 100%) (Figures 4B,C).

Effect of *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 on the Expression of Tight Junction Proteins and Cytokine Production

Finally, the important probiotic feature is the maintenance of gut barrier integrity (Bron et al., 2017) and immunomodulatory ability (Živkovic et al., 2016). There are evidences that reveal the GABA signaling system is involved in maintenance of immune system homeostasis (Jin et al., 2013). IL-1 β has a central role in promoting intestinal inflammation, partially by stimulating IECs to produce IL-8, the potent neutrophil and T-lymphocyte chemoattractant (Schuerer-Maly et al., 1994). This proinflammatory cascade is implicated in different intestinal inflammatory diseases. The epithelium in inflamed intestinal segments is characterized by a reduction of tight junction strands (Schulzke et al., 2009). Inflammatory bowel disease (IBD) patients demonstrate a loss of tight junction barrier function, increased proinflammatory cytokine production, and immune dysregulation (Edelblum and Turner, 2009). Regarding this,





we investigated the effects of BGZLS10-17, the best GABA-producing strain supernatant containing different (1 mM, 2 mM and 4 mM) non-toxic (data not shown) concentrations of GABA on the expression of tight junction proteins in differentiated Caco-2 cells monolayer. Interestingly, supernatants containing all three GABA concentrations significantly stimulated the expression of *ZO-1* and *OCN* mRNA (Figures 5A,B), while supernatants containing 2 and 4 mM GABA significantly stimulated the expression of *CLDN 4* (Figures 5C,D). Ct values are presented in the **Supplementary Table 1**. In addition to promoting inflammatory cascade, IL-1 β has been shown to induce increase in intestinal epithelial tight junction permeability, the mechanism shown to be an early event in the development of different inflammatory conditions (Al-Sadi et al., 2008). In that sense, we investigated whether these treatments can alleviate deleterious effects of IL-1 β on tight junction proteins. The treatment of differentiated Caco-2 cells monolayer with IL-1 β significantly reduced the expression of all tight junction mRNAs (Figures 6A–C), as well as claudin protein (Figure 6D), while addition of either of these treatments reverted significantly all these effects of IL-1 β on tight junction. It is interesting that the supernatants containing GABA have more significant protective effect on tight junction proteins in comparison to supernatant without GABA. Such pronounced potential of the supernatant to protect tight junction proteins from deleterious effect of inflammation is in accordance with the recent results related to GABA potential to improve the gut barrier function, acting through selective up-regulation of Mucin-1 protein in isolated pig jejunum (Braun et al., 2015). Additionally, El-Hady et al. (2017) demonstrated that GABA administration reduced the degenerative changes in the jejunal epithelial cells and significantly improved the survival of villi and crypts in gamma-irradiated rats. Considering this we further investigated whether BGZLS10-17 supernatant with highest GABA concentration (4 mM), supernatant with addition of 4mM artificial GABA, and supernatant without GABA, may have affect on IL-1 β induced IL-8 production by differentiated Caco-2 cells monolayer. The results are very promising, disclosing that treatment of Caco-2 by supernatant containing GABA produced by BGZLS10-17, as well as supernatant containing artificial GABA, significantly decreased *IL-8* production by Caco-2 induced by IL-1 β in this experimental setting. Interestingly, treatment with supernatant without GABA had no modulatory effects on *IL-8* mRNA expression by Caco-2 cells (Figure 7A). TGF- β has significant role in the maintenance of epithelial barrier integrity as well as restriction of unrestrained inflammation (Planchon et al., 1994). In that sense, looking for a possible mechanism on preventing the disruption of tight junction proteins expression in IL-1 β treated Caco-2 cells, we analyzed the modulatory effects of the treatments on TGF- β production by Caco-2 cells. The treatments with supernatants containing 2 and 4 mM bacterial GABA significantly stimulated the expression of TGF- β (Figure 7B). Importantly, all supernatants prevented the decrease of TGF- β expression by Caco-2 cells induced by IL-1 β (Figure 7B). Interestingly, the supernatants containing

GABA (bacterial or artificial) have more significant effect on prevention of IL-1 β induced decrease in TGF- β expression by Caco-2 cells. All these results point to the potential of supernatants obtained from BGZLS10-17 culture in different media to prevent the deleterious effects of IL-1 β on Caco-2 cells. Interestingly, the presence of GABA (bacterial or artificial) in supernatant have shown significant additional protective effect on IL-1 β treated Caco-2 cells. Almost identical modulatory effect of supernatant containing bacterial GABA and artificial GABA in same concentration additionally supports the hypothesis that GABA is an important molecule that contributes to the protective effect of BGZLS10-17 supernatant on IL-1 β induced disruption of the intestinal barrier. Additionally, these results together with the adhesive properties of BGZLS10-17 and its capability to decrease the adhesion of important gut pathogens point to the promising role of BGZLS10-17 in the treatment of chronic gut infections characterized by aggravated inflammation and disrupted epithelial integrity.

CONCLUSION

The results of this study support the idea that using GABA producing BGZLS10-17 probiotic strain could be a good strategy to modulate immunological response in various inflammatory diseases, and at the same time, BGZLS10-17 stands out as a promising candidate for adjunct starter culture for production of innovative added-value GABA-enriched dairy products and offers new perspectives in designing the novel functional foods.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SSB performed main work, analyzed and interpreted the data, and drafted the work. JD conceived and designed the experiments, performed part of the experiments, analyzed and interpreted the data, and critically revised the manuscript. MD performed part of the experiments and analyzed and interpreted the data. KV performed part of the experiments and analyzed and interpreted the data. NG supervised the work, analyzed and interpreted the data, and drafted the work. SM conceived and designed the work, performed part of the experiments, and analyzed and interpreted the data. MT conceived and designed the experiments, supervised the work, analyzed and interpreted the data, and critically revised the manuscript. All authors finally approved the version to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

FUNDING

This work was funded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, grant OI 173019.

ACKNOWLEDGMENTS

Ian Paulsen, Macquarie University, Sidney, NSW, Australia is acknowledged for the kind supply of *E. faecalis* V583.

REFERENCES

- Al-Sadi, R., Ye, D., Dokladny, K., and Ma, T. Y. (2008). Mechanism of IL-1 β -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J. Immunol.* 180, 5653–5661. doi: 10.4049/jimmunol.180.8.5653
- Angrisan, T., Pero, R., Peluso, S., Keller, S., Sacchetti, S., Bruni, C. B., et al. (2010). LPS-induced IL-8 activation in human intestinal epithelial cells is accompanied by specific histone H3 acetylation and methylation changes. *BMC Microbiol.* 10:172. doi: 10.1186/1471-2180-10-172
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A., Tsakalidou, E., Nychas, G. J., Panagou, E. Z., et al. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol.* 33, 282–291. doi: 10.1016/j.fm.2012.10.005
- Begley, M., Hill, C., and Gahan, C. G. M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1729–1738. doi: 10.1128/AEM.72.3.1729-1738.2006
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., and Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Ann. Nutr. Metab.* 61, 160–174. doi: 10.1159/000342079
- Bhat, R., Axtell, R., Mitra, A., Miranda, M., Lock, C., Tsien, R. W., et al. (2010). Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 2580–2585. doi: 10.1073/pnas.0915139107
- Boonstra, E., de Kleijn, R., Colzato, L. S., Alkemade, A., Forstmann, B. U., and Nieuwenhuis, S. (2015). Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain and behavior. *Front. Psychol.* 6:1520. doi: 10.3389/fpsyg.2015.01520
- Braun, H. S., Sponder, G., Pieper, R., Aschenbach, J. R., and Deiner, C. (2015). GABA selectively increases mucin-1 expression in isolated pig jejunum. *Genes Nutr.* 10:47. doi: 10.1007/s12263-015-0497-8
- Bron, P. A., Kleerebezem, M., Brummer, R. J., Cani, P. D., Mercenier, A., MacDonald, T. T., et al. (2017). Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *Br. J. Nutr.* 117, 93–107. doi: 10.1017/S0007114516004037
- Cho, Y. R., Chang, J. Y., and Chang, H. C. (2007). Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 104–109.
- Danielsen, M., and Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 1–11. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00254-4
- Dhakal, R., Bajpai, V. K., and Baek, K. (2012). Production of GABA (γ -Aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Braz. J. Microbiol.* 43, 1230–1241. doi: 10.1590/S1517-83822012000400001
- Dinić, M., Lukić, J., Djokić, J., Milenković, M., Strahinić, I., Golić, N., et al. (2017). *Lactobacillus fermentum* postbiotic-induced autophagy as potential approach for treatment of acetaminophen hepatotoxicity. *Front. Microbiol.* 8:594. doi: 10.3389/fmicb.2017.00594
- Dragicevic, S., Milosevic, K., Nestorovic, B., and Nikolic, A. (2017). Influence of the polymorphism C-509T in the TGFB1 gene promoter on the response to montelukast. *Pediatr. Allergy Immunol. Pulmonol.* 30, 239–245. doi: 10.1089/ped.2017.0770
- Edelblum, K. L., and Turner, J. R. (2009). The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 715–720. doi: 10.1016/j.coph.2009.06.022
- EFSA (2008). Technical guidance prepared by the panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA J.* 732, 1–15.
- Elamin, E., Jonkers, D., Jutti-Uusitalo, K., Van Uzendoorn, S., Troost, F., Duimel, H., et al. (2012). Effects of ethanol and acetaldehyde on tight junction integrity: *in vitro* study in a three-dimensional intestinal epithelial cell culture model. *PLoS One* 7:e35008. doi: 10.1371/journal.pone.0035008
- El-Hady, A. M. A., Gewefel, H. S., Badawi, M. A., and Eltahawy, N. A. (2017). Gamma-aminobutyric acid ameliorates gamma rays-induced oxidative stress in the small intestine of rats. *J. Basic Appl. Zool.* 78:2. doi: 10.1186/s41936-017-0005-3
- Franciosi, E., Carafa, I., Nardin, T., Schiavon, S., Poznanski, E., Cavazza, A., et al. (2015). Biodiversity and γ -aminobutyric acid production by lactic acid bacteria isolated from traditional alpine raw cow's milk cheeses. *Biomed Res. Int.* 2015:625740. doi: 10.1155/2015/625740
- Golić, N., Čadež, N., Terzić-Vidojević, A., Šuranská, H., Beganović, J., Lozo, J., et al. (2013). Evaluation of microbial diversity in traditional white-pickled and fresh soft cheeses from mountain regions in Serbia and low laying regions in Croatia. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 294–300. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.032
- Holdiness, M. R. (1983). Chromatographic analysis of glutamic acid decarboxylase in biological samples. *J. Chromatogr.* 14, 1–24. doi: 10.1016/S0378-4347(00)84819-7
- Jin, Z., Mendu, S. K., and Birnir, B. (2013). GABA is an effective immunomodulatory molecule. *Amino Acids* 45, 87–94. doi: 10.1007/s00726-011-1193-7
- Jovčić, B., Begović, J., Lozo, J., Topisirović, L. J., and Kojić, M. (2009). Dynamics of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Arch. Biol. Sci.* 61, 159–164. doi: 10.2298/ABS0902159J
- Kakee, A., Takanage, H., Terasaki, T., Naito, M., Tsuruo, T., and Sugiyama, Y. (2001). Efflux of a suppressive neurotransmitter, GABA, across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 79, 110–118. doi: 10.1046/j.1471-4159.2001.00540.x
- Kelley, J. M., Hughes, L. B., and Bridges, S. L. Jr. (2008). Does gamma-aminobutyric acid (GABA) influence the development of chronic inflammation in rheumatoid arthritis? *J. Neuroinflammation* 5:1. doi: 10.1186/1742-2094-5-1
- Kim, J. Y., Lee, M. Y., Ji, G. E., Lee, Y. S., and Hwang, K. T. (2009). Production of gamma-aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *Int. J. Food Microbiol.* 130, 12–16. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.028
- Komatsuzaki, N., Nakamura, T., Kimura, T., and Shima, J. (2008). Characterization of glutamate decarboxylase from a high gamma-aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 278–285. doi: 10.1271/bbb.70163
- Komatsuzaki, N., Shimaa, J., Kawamoto, S., Momosed, H., and Kimurab, T. (2005). Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol.* 22, 497–504. doi: 10.1016/j.fm.2005.01.002
- Laroute, V., Yasaro, C., Narin, W., Mazzoli, R., Pessione, E., Coccagn-Bousquet, M., et al. (2016). GABA production in *Lactococcus lactis* is enhanced by arginine and co-addition of malate. *Front. Microbiol.* 7:1050. doi: 10.3389/fmicb.2016.01050
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. (2008). Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 728–764. doi: 10.1128/MMBR.00017-08
- Li, H., and Cao, Y. (2010). Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. *Amino Acids* 39, 1107–1116. doi: 10.1007/s00726-010-0582-7
- Li, H., Qiu, T., Hang, G., and Cao, Y. (2010). Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation. *Microb. Cell Fact.* 9:85. doi: 10.1186/1475-2859-9-85
- Li, X., Xu, M., Liu, M., Ji, Y., and Li, Z. (2015). TNF-alpha and IL-6 inhibit apolipoprotein A-IV production induced by linoleic acid in human intestinal Caco2 cells. *J. Inflamm.* 12:22. doi: 10.1186/s12950-015-0069-0
- Liu, Z., Li, N., and Neu, J. (2005). Tight junctions, leaky intestines, and pediatric diseases. *Acta Paediatr.* 94, 386–393. doi: 10.1111/j.1651-2227.2005.tb01904.x

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00527/full#supplementary-material>

- Lukic, J., Strahinic, I., Milenkovic, M., Golic, N., Kojic, M., Topisirovic, L., et al. (2013). Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGH114 with rat colonic mucosa: implications for colitis induction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5735–5744. doi: 10.1128/AEM.01807-13
- Mazzoli, R., Riedel, K., and Pessione, E. (2017). Editorial: bioactive compounds from microbes. *Front. Microbiol.* 8:392. doi: 10.3389/fmicb.2017.00392
- Miljkovic, M., Strahinic, I., Tolinacki, M., Zivkovic, M., Kojic, S., Golic, N., et al. (2015). AggLb is the largest cell aggregation factor from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64, functions in collagen adhesion, and pathogen exclusion *in vitro*. *PLoS One* 10:e0126387. doi: 10.1371/journal.pone.0126387
- Muñoz-Provencio, D., Llopis, M., Antolin, M., de Torres, I., Guarner, F., Pérez-Martínez, G., et al. (2009). Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Arch. Microbiol.* 191, 153–161. doi: 10.1007/s00203-008-0436-9
- Nigam, R., El-Nour, H., Amatya, B., and Nordlind, K. (2010). GABA and GABA(A) receptor expression on immune cells in psoriasis: a pathophysiological role. *Arch. Dermatol. Res.* 302, 507–515. doi: 10.1007/s00403-010-1052-5
- Nouri, M., Bredberg, A., Weström, B., and Lavasani, S. (2014). Intestinal barrier dysfunction develops at the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis and can be induced by adoptive transfer of auto-reactive T cells. *PLoS One* 9:e106335. doi: 10.1371/journal.pone.0106335
- O'Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P., and Hill, C. (2012). Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 152, 189–205. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.025
- Park, J. Y., Jeong, S. J., and Kim, J. H. (2014). Characterization of a glutamate decarboxylase (GAD) gene from *Lactobacillus zymae*. *Biotechnol. Lett.* 36, 1791–1799. doi: 10.1007/s10529-014-1539-9
- Paulsen, I. T., Banerjee, L., Myers, G. S., Nelson, K. E., Seshadri, R., Read, T. D., et al. (2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299, 2071–2074. doi: 10.1126/science.1080613
- Planchon, S. M., Martins, C. A., Guerrant, R. L., and Roche, J. K. (1994). Regulation of intestinal epithelial barrier function by TGF-beta 1. Evidence for its role in abrogating the effect of a T cell cytokine. *J. Immunol.* 153, 5730–5739.
- Powers, M. E., Yarrow, J. F., McCoy, S. C., and Borst, S. E. (2008). Growth hormone isoform responses to GABA ingestion at rest and after exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* 40, 104–110. doi: 10.1249/mss.0b013e318158b518
- Rossetti, V., and Lombard, A. (1996). Determination of glutamate decarboxylase by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 681, 63–67. doi: 10.1016/0378-4347(96)88202-8
- Sánchez, B., Fernandez-García, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilan, C. G., and Ruas-Madiedo, P. (2010). Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* strain. *Int. Dairy J.* 20, 7078–7085. doi: 10.1016/j.idairyj.2010.06.004
- Schuerer-Maly, C. C., Eckmann, L., Kagnoff, M. F., Falco, M. T., and Maly, F. E. (1994). Colonic epithelial cell lines as a source of interleukin-8: stimulation by inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Immunology* 81, 85–91.
- Schulzke, J. D., Ploeger, S., Amasheh, M., Fromm, A., Zeissig, S., Troeger, H., et al. (2009). Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165, 294–300. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04062.x
- Seok, J. H., Park, K. B., Kim, Y. H., Bae, M. O., Lee, M. K., and Oh, S. H. (2008). Production and characterization of kimchi with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid. *Food Sci. Biotechnol.* 17, 940–946.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C. G., Coda, R., and Gobetti, M. (2007). Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7283–7290. doi: 10.1128/AEM.01064-07
- Su, Y. A., Sulavik, M. C., He, P., Makinen, K. K., Makinen, P. L., Fiedler, S., et al. (1991). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (*gelE*) from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. *Infect. Immun.* 59, 415–420.
- Suenaert, P., Bulteel, V., Lemmens, L., Noman, M., Geypens, B., Van Assche, G., et al. (2002). Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am. J. Gastroenterol.* 97, 2000–2004. doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.05914.x
- Sun, T. S., Zhao, S. P., Wang, H. K., Cai, C. K., Chen, Y. F., and Zhang, H. P. (2009). ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from Xinjiang koumiss in China. *Eur. Food Res. Technol.* 228, 607–612. doi: 10.1007/s00217-008-0969-9
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., and Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 1–10. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00162-9
- Tian, J., Lu, Y., Zhang, H., Chau, C. H., Dang, H. N., and Kaufman, D. L. (2004). Gamma-aminobutyric acid inhibits T cell autoimmunity and the development of inflammatory responses in a mouse type 1 diabetes model. *J. Immunol.* 173, 5298–5304. doi: 10.4049/jimmunol.173.8.5298
- Tian, J., Yong, J., Dang, H., and Kaufman, D. L. (2011). Oral GABA treatment downregulates inflammatory responses in a mouse model of rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* 44, 465–470. doi: 10.3109/08916934.2011.571223
- Ueno, H. (2000). Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 10, 67–79. doi: 10.1016/S1381-1177(00)00114-4
- Uroić, K., Nikolić, M., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Beganović, J., Lukić, J., et al. (2014). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Croatian fresh soft cheese and Serbian white pickled cheese. *Food Technol. Biotechnol.* 52, 232–241.
- Varma, P., Dinesh, K. R., Menon, K. K., and Biswas, R. (2010). *Lactobacillus fermentum* isolated from human colonic mucosal biopsy inhibits the growth and adhesion of enteric and foodborne pathogens. *J. Food Sci.* 75, 546–551. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01818.x
- Veljovic, K., Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., et al. (2007). Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. *J. Appl. Microbiol.* 103, 2142–2152. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03450.x
- Visser, J., Rozing, J., Sapone, A., Lammers, K., and Fasano, A. (2009). Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: celiac disease and type 1 diabetes paradigms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165, 195–205. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04037.x
- Vogelsang, H., Schwarzenhofer, M., and Oberhuber, G. (1998). Changes in gastrointestinal permeability in celiac disease. *Dig. Dis.* 16, 333–336. doi: 10.1159/000016886
- Wang, L., Li, L., Lv, Y., Chen, Q., Feng, J., and Zhao, X. (2018). *Lactobacillus plantarum* restores intestinal permeability disrupted by *Salmonella* infection in newly-hatched chicks. *Sci. Rep.* 8:2229. doi: 10.1038/s41598-018-20752-z
- WHO-FAO (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London: WHO.
- WHO-FAO (2006). *Probiotics in foods. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. FAO Food and Nutritional Paper No. 8592-5-105513.
- Zhang, Y., Zhang, L., Tuo, Y., Guo, C., Yi, H., Li, J., et al. (2010). Inhibition of *Shigella sonnei* adherence to HT-29 cells by lactobacilli from Chinese fermented food and preliminary characterization of S-layer protein involvement. *Res. Microbiol.* 161, 667–672. doi: 10.1016/j.resmic.2010.06.005
- Zhou, J. S., Pillidge, C. J., Gopal, P. K., and Gill, H. S. (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 211–217. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.011
- Zivkovic, M., Hidalgo-Cantabrana, C., Kojic, M., Gueimonde, M., Golic, N., and Ruas-Madiedo, P. (2015). Capability of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-producing isogenic strain NB1, to counteract the effect of enteropathogens upon the epithelial cell line HT29-MTX. *Food Res. Int.* 74, 199–207. doi: 10.1016/j.foodres.2015.05.012
- Živkovic, M., Miljkovic, M. S., Ruas-Madiedo, P., Markelic, M. B., Veljovic, K., Tolinacki, M., et al. (2016). EPS-SJ exopolysaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on *E. coli* association to Caco-2 cells. *Front. Microbiol.* 7:286. doi: 10.3389/fmicb.2016.00286

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Sokovic Bajic, Djokic, Dinic, Veljovic, Golic, Mihajlovic and Tolinacki. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



ACCEPTED MANUSCRIPT

This is an early electronic version of an as-received manuscript that has been accepted for publication in the Journal of the Serbian Chemical Society but has not yet been subjected to the editing process and publishing procedure applied by the JSCS Editorial Office.

Please cite this article as S. Sokovic Bajic, S. Mihajlovic, D. Radojevic, D. Popovic, J. Djokic, S. Stanisavljevic, M. Lazarevic, Dj. Miljkovic, P. Ruas-Madiedo, N. Golic, M. Tolinacki, *J. Serb. Chem. Soc.* (2019)

<https://doi.org/10.2298/JSC190716094S>

This “raw” version of the manuscript is being provided to the authors and readers for their technical service. It must be stressed that the manuscript still has to be subjected to copyediting, typesetting, English grammar and syntax corrections, professional editing and authors’ review of the galley proof before it is published in its final form. Please note that during these publishing processes, many errors may emerge which could affect the final content of the manuscript and all legal disclaimers applied according to the policies of the Journal.

Characterization of pH resistance and the proteolytic activity of GABA producing *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 in preparation of fermented milk beverage and the effects on the symptoms of the experimental autoimmune encephalomyelitis

SVETLANA S. SOKOVIC BAJIC^{1,3}, SANJA B. MIHAJLOVIC¹, DUSAN D. RADOJEVIC¹, DUSANKA D. POPOVIC¹, JELENA M. DJOKIC¹, SUZANA M. STANISAVLJEVIC², MILICA N. LAZAREVIC², DJORDJE M. MILJKOVIC², PATRICIA RUAS-MADIEDO³ and NATASA E. GOLIC¹, MAJA S. TOLINACKI^{1,*}

¹Laboratory for Molecular Microbiology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering (IMGGE), University of Belgrade, Serbia; ²Department of Immunology, Institute for Biological Research "Siniša Stanković", University of Belgrade, Serbia; ³Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias, Spain

(Received 16 July; revised 22 August; accepted 3 September 2019)

Abstract: Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system. The aim of this work was to study the probiotic effect of γ -aminobutyric acid (GABA)-producer *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), an experimental animal MS model. Clinical EAE symptoms were monitored in Dark Agouti (DA) rats treated with *L. brevis* BGZLS10-17 strain, or supernatant obtained from 48 h culture of *L. brevis* BGZLS10-17 cultivated in growth medium with or without GABA precursor monosodium glutamate (MSG). The results revealed that oral administration of *L. brevis* BGZLS10-17 alleviates the symptoms of EAE in DA rats. Namely, treatment with BGZLS10-17 and the supernatant of the strain cultivated in medium with MSG delayed the onset, shortened the duration, and reduced the intensity of the disease in the period when the EAE symptoms in controls were most pronounced. The probiotic treated animals were completely recovered after forty days, unlike the control animals. The results indicate that supplementation with live strain or with supernatant containing GABA produced by *L. brevis* BGZLS10-17 could alleviate the EAE symptoms. However, the use of *L. brevis* BGZLS10-17 in functional food as probiotic for autoimmune diseases should be tested in clinical trials.

Keywords: probiotics; γ -aminobutyric acid (GABA); EAE; multiple sclerosis.

*Corresponding author: maja_tolinacki@imgge.bg.ac.rs; Tel: +381 11 3975960, Fax: +381 11 3975808
<https://doi.org/10.2298/JSC190716094S>

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune, inflammatory neurological disease of central nervous system (CNS) often leading to severe physical or cognitive disability and neurological defects¹. MS is characterized by multifocal demyelination and axons damage resulting in dysfunction and death of neurons, mostly targeting the young adults². The cause of the disease is still unknown, although it seems to be a combination of genetic susceptibility and non-genetic and environmental factors³. MS was recently linked to gut microbiota dysbiosis^{4,5}. The connection between the brain and gastrointestinal tract-GIT (gut brain axis, GBA) is a two-way communication between the central and enteric nervous systems. The link between the GIT microbiota and GBA is also bidirectional and occurs via neural, endocrine, immune, and humoral factors⁶. The balance between the microbiota and the intestinal barrier is disturbed during chronic inflammation and autoimmune diseases, and one of the very attractive fields of research is the use of certain microorganisms to restore the balance.

The etiology of MS is related to reduced level of plasma GABA and activities of enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD)⁷. A number of clinical studies investigated glutamate and γ -aminobutyric acid (GABA) levels in MS patients. The lower glutamate levels in sensorimotor and parietal regions of the left cerebral hemisphere of the brain, as well as higher GABA levels in sensorimotor region were detected in MS patients compared to healthy controls⁸. On the other hands, significantly lower GABA and glutamate levels, associated with verbal and visuospatial memory deficits, were reported in relapsing remitting MS patients compared to healthy controls⁹. The studies indicated that modulation of glutamate and GABA levels could be a novel therapeutic strategy for treatment of early stages of MS⁹.

GABA is a major inhibitory neurotransmitter with antidepressant, antihypertensive, anti-diabetic effects. It regulates pain sensations, anxiety, and serum lipid levels in humans¹⁰. Apparently, GABA has an immunomodulatory effect and a specific role in autoimmune diseases like multiple sclerosis, type 1 diabetes, and rheumatoid arthritis. It is a non-protein amino acid synthesized by glutamic acid decarboxylase (GAD) in the irreversible reaction of α -decarboxylation of L-glutamic acid¹¹. The GAD pathway is encoded by the **gadB** and **gadC** genes regulated by the GadR activator; it is induced by presence of glutamate and/or environmental stresses such as acidity, osmotic stress, or starvation and has a role in a stress-resistance¹². GABA is produced by various microorganisms including lactic acid bacteria (LAB)^{13,14}.

In our previous work the probiotic properties of GABA-producing *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 natural isolate from artisanal cheese from Zlata Mountain was evaluated¹³. The high adhesion of BGZLS10-17 strain to Caco-2 cells and the exclusion ability of *Escherichia coli* ATCC25922 and *Salmonella*

enterica C29039 was revealed. Interestingly, we have shown in an *in vitro* model of inflammation-induced disruption of the intestinal barrier that GABA-containing supernatant of BGZLS10-17 culture decreased the production of IL-8 and increased the expression of *TGF- β* cytokines and had protective effect on the intestinal epithelial barrier through stimulation of expression of tight junction proteins¹⁵. As the restraint of exacerbated inflammation and the stabilisation of intestinal barrier was suggested to be very important for MS treatment, in this work we investigated the effect of GABA-producing BGZLS10-17 as well as GABA-enriched supernatant of this probiotic strain on clinical symptoms of EAE in DA rats. Our aim was to test if BGZLS10-17 could be used as adjunct starter culture for production of GABA-enriched dairy functional food for maintenance of various inflammatory diseases, including multiple sclerosis.

EXPERIMENTAL

Bacterial strains

Lactobacillus brevis BGZLS10-17, GABA-producing natural dairy isolate from artisanal Zlata cheese (bacterial collection of Laboratory for Molecular Microbiology, IMGGE) was used in this study. BGZLS10-17 was cultured in MRS broth (Merck, Darmstadt, Germany) at 37 °C under anaerobic conditions using Anaerocult A (Merck). In order to stimulate GABA production, the strain was cultivated in MRS broth with addition of 0.6 % monosodium glutamate (MSG - Acros organics, Morris Plains, NJ, United States) for 48 h at 37 °C under anaerobic conditions. Supernatants were neutralised to pH 7 and then filtrated through 0.22 μ M filters (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). For fermentation purposes strain *Streptococcus thermophilus* BGKMJ1-36 was used. BGKMJ1-36 was grown in M17 medium (pH 7.2) (Merck) supplemented with 0.5 % (w/v) glucose (GM17) at 37 °C, under anaerobic conditions.

Molecular characterisation of the gad gene

The total DNA of lactobacilli strain was extracted using the QIA DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). The PCR amplification of complete *gad* gene was performed by *gad*BBF (5'-GACCGGTCATGAGGCG-3') and *gad*BBR (5'-CATTACTCGCCGTTCCGGC-3') primers (this work). Briefly, 25 μ l reaction contained 500 ng/ μ l of DNA, 0.5 U of Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs, Inc.), 200 μ M of each deoxynucleoside triphosphate, 0.5 μ M of both primers and 1 \times Q5 Reaction Buffer. Conditions for DNA amplification were: denaturation at 98 °C for 30 s; 30 cycles of polymerization at 98 °C for 10 s, 38 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min 30 s; and elongation at 72 °C for 5 min. The obtained PCR amplicons were purified (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) and sequenced (Macrogen, Amsterdam, the Netherlands). Sequence annotation and the database searches for sequence similarities were performed with the BLAST tool available online (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Data base search and in silico phylogenetic analysis

Database search for protein sequence similarities was done using the BLAST tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). To build the GAD protein profile the PSI-BLAST¹⁵ homology searches were restricted to *Lactobacillaceae* and e-value cut-off of 1e-4. All hits that exhibited at least 40 % identity and over 70 % of the query fragment length were maintained for further analysis. GAD protein from *L. brevis* BGZLS10-17 was used as a GAD prototype.

The phylogenetic interpretations were obtained by MEGA version 7.0¹⁶. Multiple protein sequence alignments were performed using Clustal W with default parameters. The construction of a GAD phylogenetic tree was conducted by the maximum-likelihood (ML) method using a Jones-Taylor-Thornton (JTT) model. Bootstrapping of 1000 replicates was used to infer confidence levels of ML trees. An online tool (iTOL) v3 was used for the tree display¹⁷.

pH evolution in MRS with and without MSG

L. brevis BGZLS10-17 was inoculated (2 %) in MRS medium (Merck) and MRS medium with addition of 1 % MSG (Acros organics) and the pH was measured with Thermo scientific Orion Versa Star Advanced Electrochemistry Meter using Orion™ Versa Star Pro™ Meter Software every 15 min for 48 h. Growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) (Eppendorf Bio Photometer Plus, Hamburg, Germany) and bacterial cells were counted by plating serial dilutions on MRS agar plates.

Experimental animals, induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), treatment and evaluation

Female DA rats (8–10 weeks of age) were maintained in the animal facility of the Institute for Biological Research “Sinisa Stankovic”. Animal experiments were approved by the local ethics committee (Institute for Biological Research “Sinisa Stankovic”, No. 03-1/15). Housing of the rats was performed under conventional conditions. Five rats were kept in the same cage. EAE was induced with rat spinal cord homogenate (SCH) in PBS (50 % w/v) mixed with equal volume of CFA (Difco, Detroit, MI, USA). The animals were injected subcutaneously into the hock of one hind limb. The rats were monitored daily for clinical symptoms (c.s.) of EAE and scored according to the following scale: 0 - no c.s.; 1 - flaccid tail; 2 - hind limb paresis; 3 - hind limb paralysis; 4 - moribund state or death. DA rats had EAE onset on 9–11 d.p.i. (c.s. 1), peak on 12–16 d.p.i. (c.s. 2–4) and recovery on 18–22 d.p.i. (c.s. 1 or less).

Animals, 5 per group, were separated in four groups: group 1 was treated with 50 ml/day MRS broth - control group; group 2 treated with BGZLS10-17 strain grown for 16 h in MRS. (colony forming units [CFU]/ml ~ 10⁹); group 3 treated with 50 ml/day of cell free supernatant obtained from BGZLS10-17 cultivated for 48 h in MRS without MSG (no GABA production); group 4 treated with 50 ml/day of cell free supernatant from BGZLS10-17 cultivated for 48 h in MRS with MSG (stimulation of GABA production). Each treatment lasted 30 days. Differences between the control and experimental groups were compared using Student's t-test. Values of p < 0.05 or less were considered statistically significant.

Proteolytic activity

Proteolytic activities of the BGZLS10-17 strain were essentially assayed as described previously¹⁸. For this purpose, BGZLS10-17 was grown on MCA plates for 48 h, at optimal growth conditions prior to cell collection. Collected fresh cells (10 mg) were resuspended in 50 µl of 0.1 M sodium-phosphate buffer pH 6.8, to approximate density of 10¹⁰ cells/ml. The cell suspension was mixed with substrate dissolved in the same buffer at a 1:1 volume ratio and incubated for 3 h and 24 h at 37 °C. The substrates used for proteolytic assay were either α-, β-, κ-casein fractions or total casein (5 mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO, USA). After that, cells were pelleted by centrifugation (5 min at 12.000 g), and the supernatant was then used for preparation of samples for sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Samples were prepared by heating of obtained supernatant (100 °C for 2 min) with an equal volume of 0.125 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) containing 4 % (w/v) SDS, 20 % (w/v) glycerol, 10 % (v/v) β-mercaptoethanol, and 0.07 % (w/v) bromophenol blue. Analysis of casein hydrolysis was carried out on SDS-PAGE by loading 12.5 % polyacrylamide gel with prepared

samples. Gels were run on vertical electrophoresis cells for 20 h at 10 mA constant current. Gels were stained with Coomassie brilliant blue R250 (SERVA, Heidelberg, Germany) and destained in a mixture of methanol (20 %) and acetic acid (7 %) in distilled water.

Fermented milk beverage preparation

To produce fermented milk beverage strains *L. brevis* BGZLS10-17 and *Streptococcus thermophilus* BGKMJ1-36 were used. BGZLS10-17 was cultivated for 16 h in 100 ml of MRS broth at 37 °C anaerobically while BGKMJ1-36 was grown in 100 ml of GM17 broth for 16 h at 37 °C anaerobically.

The acidification ability of the strain BGZLS10-17 in skim milk was tested in following way: i) 4 % of BGZLS10-17 of 16 h old culture was inoculated in 100 ml of pasteurized milk (Imlek, Belgrade, Serbia) with or without yeast extract (YE) 4 g/l (Torlak, Belgrade, Serbia) or MRS broth 20 % (Merck). Fermentation process was monitored for 24 h; ii) 1 % of BGKMJ1-36 of 16 h old culture was inoculated in 100 ml of pasteurized milk (Imlek) and the fermentation process was monitored for 6 h or until the pH reached 4.9; iii) Mixed culture: 4 % of BGZLS10-17 and 1 % of BGKMJ1-36 were inoculated in 100 ml of pasteurized milk (Imlek) and the fermentation process was monitored for 6 h or until the pH reached 4.9. All fermentation processes were performed at 42 °C. Then the cultures were cooled to 5 °C for 2 h. After this cooling time, the storage time was considered equal to 0 day (d). During storage (at 5 °C) every 7 d cultures were taken to determine pH and viability of bacteria (CFU/ml) until 21 d. All experiments were done in triplicates.

RESULTS AND DISCUSSION

*Molecular characterization and phylogenetic analysis of the *L. brevis* gadB gene*

L. brevis BGZLS10-17, the high GABA-producing strain¹³ was screened for the presence of the *gad* gene. The PCR amplification with primers complementary to the complete *gad* genes gave a PCR product of 1440 bp. The predicted amino acid sequences of *L. brevis* BGZLS10-17 showed 98 % identity to the *gadB* of *L. brevis* (WP_011666890.1).

The maximum likelihood (ML) phylogenetic analysis of GAD proteins from the entire *Lactobacillaceae* family separated GAD proteins into three groups (Figure 1). Group I consists of the GAD proteins from *L. aviarius*, *L. antri*, *L. oris* and *L. reuteri*. Group II includes BGZLS10-17 isolate (Figure 1). Although the group II mainly consists of the *gadB* gene from *Lb. brevis* (55 %) there were also *L. aviaries*, *L. coleohominis*, *L. curvatus*, *L. farraginis*, *L. parakefiri*, *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici*, *L. paracasei*, *L. buchneri*, *L. rennini*, *L. rossiae*, *L. senmaizukei*, *L. spicheri* and *L. sakei*. Dominant GAD protein of the group III belongs to *L. plantarum* (60.4 %). The second abundant species is *L. brevis* (20.8 %), while the rest of the group consists of the GAD protein from *L. gastricus*, *L. fermentum*, *L. suebicus*, *L. collinoides*, *L. paracollinoides*, *L. herbarum*, *L. paraplanatrum*, *L. reuteri* and *L. delbruecki*. Multiple sequence alignment comparisons revealed that 60 % of the *gadB* alleles are polymorphic. There are 13 % polymorphic *gadB* alleles in group I (60 out of 459 amino acids positions), 61 % polymorphic alleles in group II (297 out of 490 amino acids positions) and group III has 68 % polymorphic alleles (310 out of 457 amino acids positions).

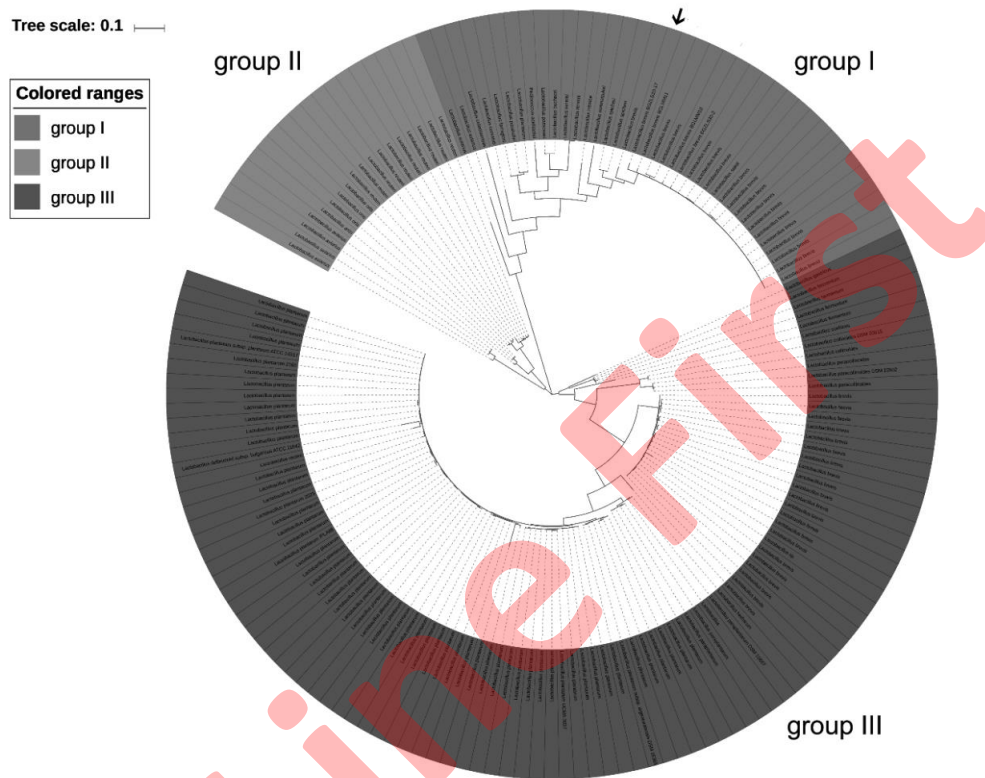


Figure 1. Phylogenetic inferences of GAD protein among *Lactobacillaceae*. A phylogenetic tree of GAD proteins was constructed with the maximum likelihood (ML) method using a Jones-Taylor-Thornton (JTT) model distance matrix. The confidence levels were computed from 1000 bootstrap resamples of alignment used for phylogenetic inferences by ML method. The gray shades represent the three different groups (I-III) consisting of *Lactobacillus* spp. from the database and the BGZLS10-17 isolate (black arrow).

Treatment of EAE

In order to evaluate the possible beneficial effect of GABA on autoimmune diseases, in this study we treated DA rats, prone to EAE induction, with the GABA-producing strain BGZLS10-17, as well as with GABA-enriched cell-free supernatant of BGZLS17-10 grown for 48 h. The results of this *in vivo* study showed that the strain *L. brevis* BGZLS10-17 was able to decrease the disease severity in DA rats. Treatment with BGZLS10-17 delayed disease manifestation and shortened the duration of the disease, while the peak of the disease was entirely reduced, and the animals were completely recovered after forty days that was not observed in control animals (Figure 2).

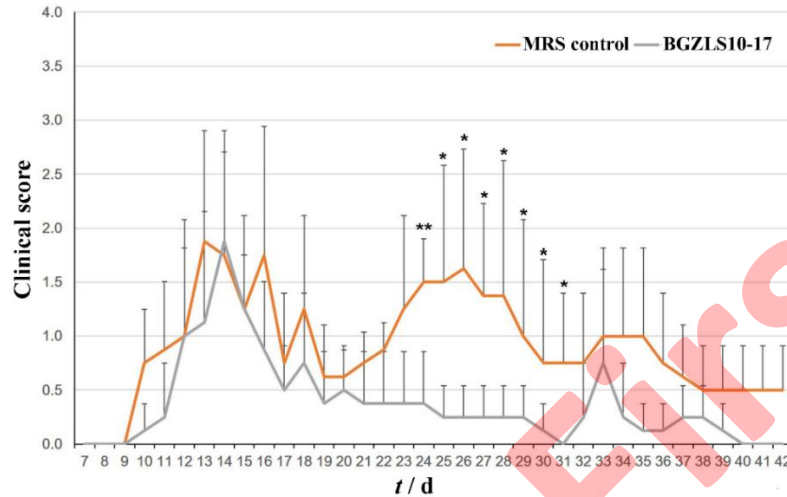


Figure 2. The effect of the BGZLS10-17 on the clinical score of EAE in female DA rats. Females DA rats were immunized with SCH mixed with CFA, which led to the manifestation of symptoms similar to multiple sclerosis. The animal control group consumed MRS medium, while the experimental group consumed BGZLS10-17 grown in MRS medium for 16 h (10^9 cells/rat daily). x-axis represents clinical score of EAE symptoms, while y-axis represents days after immunization. Clinical picture of the disease was monitored from 7 up to 42 days. The results are presented as mean values ($n = 5$ rats per group) \pm standard deviation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; d - days.

The amelioration of the EAE symptoms also occurred when GABA-enriched cell-free supernatant of the *L. brevis* BGZLS10-17 grown for 48 h was used, clearly indicating the role of GABA produced by BGZLS10-17 in improvement of EAE prognosis. However, slight improvement of the EAE symptoms was scored when the cell-free supernatant of the BGZLS10-17 grown for 48 h in MRS without MSG was used suggesting that other beneficial metabolites (molecules) in cell-free supernatant of the BGZLS10-17 could act as a possible postbiotic (Figure 3 a and b). Comparing the effects of live strain and its supernatants, it can be observed that treatment with both live BGZLS10-17 and its GABA-containing supernatant alleviate the development of the second peak of EAE (relapse), while application of the live strain shows more significant effect in alleviating EAE symptoms in this phase of the disease. At the same time only the treatments with supernatants statistically delay the onset of the disease and that could be the result of the time needed for the live strain to colonize the GIT, while bioactive molecules contained in the supernatants can achieve its effect immediately after implementation.

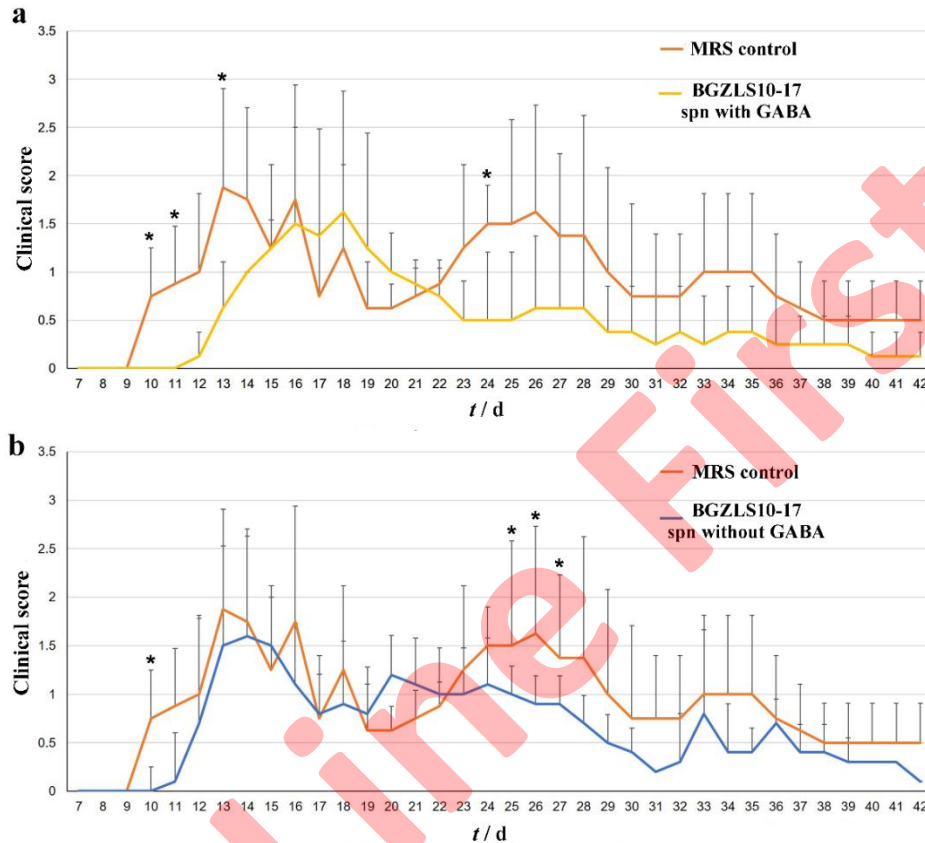


Figure 3. The effect of the BGZLS10-17 cell-free supernatant with GABA (a) and without GABA (b) on the clinical score of EAE in female DA rats. Female DA rats were immunized with SCH mixed with CFA, which led to the manifestation of symptoms similar to multiple sclerosis. The animal control group consumed MRS medium, while the experimental groups consumed BGZLS10-17 cell free supernatant from 48 h grown culture in MRS medium or MRS medium with the addition of MSG. x-axis represents clinical score of EAE symptoms, while y-axis represents days after immunization. Clinical picture of the disease was monitored from 7 up to 42 days. The results are presented as mean values ($n = 5$ rats per group) \pm standard deviation. * $p < 0.05$; d - days.

GABA-mediated pH resistance of BGZLS10-17

Hence, in order to use the strain *L. brevis* BGZLS10-17 as probiotic for prevention and/or treatment of autoimmune diseases, successful colonization of the host is needed. In that order, orally acquired bacteria must survive the extreme acidic stress in the host stomach. Given that GABA production from glutamate (MSG) is by far the most potent acid resistance system in bacteria^{12, 19} our aim was to investigate the pH changes in GABA-producing strain *L. brevis* BGZLS10-17 culture during 24 h and 48 h of incubation (Figure 4).

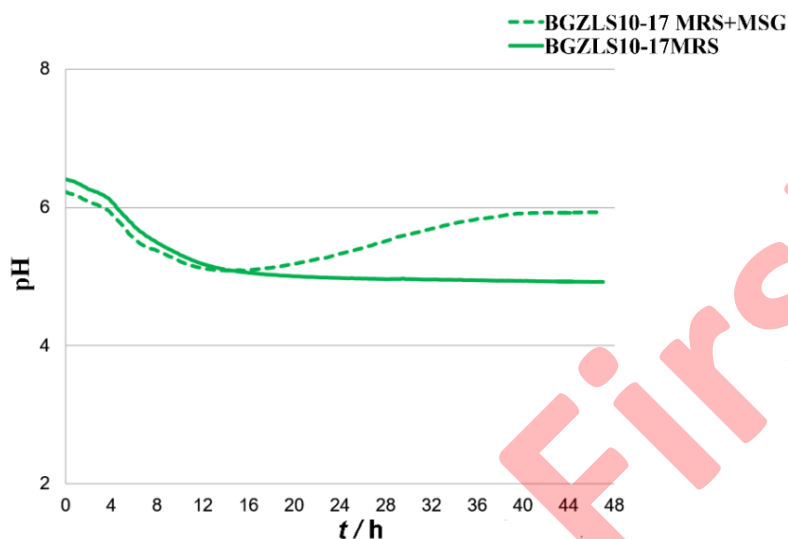


Figure 4. pH evolution in MRS and MRS with MSG. BGZLS10-17 was grown in MRS medium and MRS medium with the addition of MSG. The change of the pH was monitored every 15 min for 48 h.

The pH evolution was dependent on cultivation conditions. Monitoring of the pH of BGZLS10-17 culture grown in MRS with and without MSG revealed that after 48 h of incubation significantly higher pH was observed in the BGZLS10-17 culture grown in medium supplemented with MSG (Figure 4). These results were consistent with our previous HPLC analysis that showed the high GABA concentration in supernatant of BGZLS10-17 grown in MRS with MSG for 48 h¹³. Although the OD₆₀₀ was similar for both BGZLS10-17 cultures grown in MRS and MRS with MSG for 24 and 48 h (Figure 5a) the number of viable bacteria was remarkably higher if they were grown in medium with MSG after 48 h (Figure 5b). Our results obtained for the pH evolution in *L. brevis* BGZLS10-17 culture confirm that GABA might be involved in the pH regulation.

According to Papadimitriou *et al.*¹², the extracellular pH increases during the conversion of glutamate to the more alkaline GABA. The presence of glutamate and/or environmental stress, in this case stationary phase, characterized by depletion of the essential nutrients and acidification of the growth medium caused by formation of lactic acid, induced the GAD pathway in the strain *L. brevis* BGZLS10-17 after the growth in MRS with MSG for 48 h, enabling the pH resistance and higher viability comparing to the strain BGZLS10-17 grown in MRS without MSG.

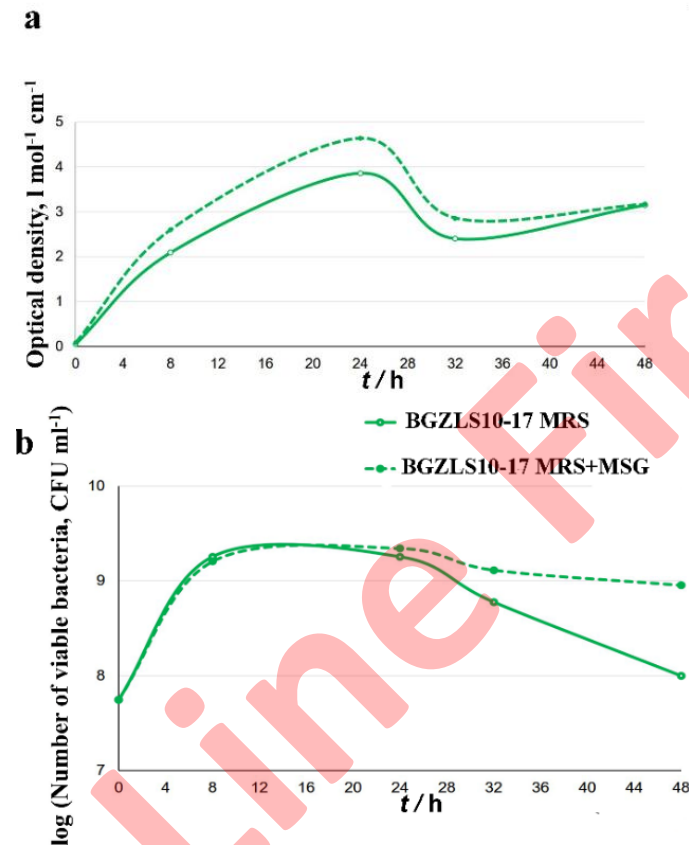


Figure 5. Monitoring of the growth of BGZLS10-17 for 48 h in MRS medium and MRS medium with MSG. Optical density (OD) measured at 600 nm (a) and logarithmic value of CFU ml^{-1} for BGZLS10-17.

Proteolytic activity

Another important characteristic of probiotic strains used in functional dairy food is their ability to degrade casein, the major milk protein. Lactic acid bacteria are multiple amino acid auxotrophs, hence to grow in milk they depend on the expression of a complex proteolytic system encompassing a cell-wall bound extracellular serine proteinase breaking down casein, oligopeptide transport systems and the intracellular peptidases that hydrolyse oligopeptides to free amino acids²⁰. Moreover, during milk fermentation biologically active peptides could be released as a result of proteolytic activity giving the additional health-promoting feature to the functional dairy food^{21, 22}.

Hence, the proteolytic activity of the strain *L. brevis* BGZLS10-17 was analysed and the results revealed that after 3 h only partial degradation of α -

casein was observed (Figure 6), while the complete casein degradation (α -, β - and κ -casein) was achieved after 24 h (Figure 6), pointing to the weak proteolytic activity.

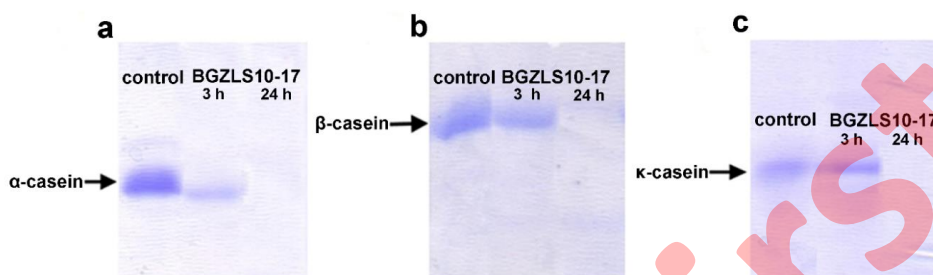


Figure 6. Proteolytic activity of BGZLS10-17 after 3 and 24 h. BGZLS10-17 was grown on MCA plates for 48 h, at optimal growth conditions. Degradation of α -casein (a), β -casein (b), and κ -casein (c).

The fermented milk beverage preparation

Additionally, the fermentation time during the preparation of fermented milk beverage with strain *L. brevis* BGZLS10-17 was followed. The results of fermentation time of BGZLS10-17 for the prepared fermented milk beverage (pH measurement during 24 h) are presented in Table I

TABLE I. pH values (means \pm SD) of fermented milk beverage manufactured with BGZLS10-17

Name	pH					
	Initial	After 3 h	After 4 h	After 5 h	After 6 h	After 24 h
BGZLA10-17 in milk	6.57 \pm 0.01	6.3 \pm 0.01	6.3 \pm 0.03	6.20 \pm 0.016	6.18 \pm 0.025	5.39 \pm 0.01
BGZLS10-17 in milk with YE	6.58 \pm 0.016	6.21 \pm 0.036	6.20 \pm 0.036	6.20 \pm 0.026	6.13 \pm 0.024	4.44 \pm 0.03
BGZLS10-17 in milk with MRS	6.41 \pm 0.026	6.13 \pm 0.036	6.10 \pm 0.016	6.05 \pm 0.01	6.0 \pm 0.03	4.28 \pm 0.03

The results indicated very slow process of fermentation of milk, as well as milk with YE or milk with MRS, inoculated with BGZLS10-17 after 24 h. Moreover, the rheological properties of the fermented beverage were also unsatisfactory, with lot of lumps, indicating that due to weak proteolytic activity strain BGZLS10-17 has poor technological characteristics. Hence, in order to be used in functional dairy food, the strain *L. brevis* BGZAL10-17 should be combined with dairy starter culture bacteria. Therefore, in order to prepare fermented beverage with desirable attributes the strain BGZLS10-17 together with the strain *S. thermophilus* BGKMJ1-36 in pasteurized milk. The fermentation process was monitored and the number of viable bacteria was observed during 7 h. Results are presented in Table II.

TABLE II. pH (means \pm SD) during seven hours of milk fermentation achieved by mixed culture containing BGZLS10-17 and BGKMJ1-36, as well as by single culture containing only BGKMJ1-36

Name	pH after				
	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h
BGZLS10-17 + BGKMJ1-36	5.84 \pm 0.01	5.46 \pm 0.04	5.43 \pm 0.03	5.09 \pm 0.02	4.9 \pm 0.02
BGKMJ1-36	6.07 \pm 0.02	5.59 \pm 0.05	5.57 \pm 0.03	5.15 \pm 0.04	5.0 \pm 0.03

The number of bacteria for both strains was determined at the end of the fermentation process and it was 8×10^8 for BGZLS10-17 and 5.5×10^8 for BGKMJ1-36. The results clearly indicated that the mixed culture of BGZLS10-17 and BGKMJ1-36 had much better technological properties and that could be suitable for preparing of fermented milk beverage.

Moreover, fermented beverage prepared by mixed culture containing BGZLS10-17 and BGKMJ1-36 was stored at 5°C and the stability of pH and bacterial viability were monitored each 7 d until 21 d. The results are presented in Table III.

TABLE III. Stability of fermented beverage during 21 days of storage at 5 °C

Day	pH	Number of viable bacteria, CFU/ml	
		BGZLS10-17	BGKMJ1-36
1	4.9 \pm 0.02	8×10^8	5.5×10^8
7	4.84 \pm 0.02	7.8×10^8	5.4×10^8
14	4.82 \pm 0.01	7.7×10^8	5.5×10^8
21	4.82 \pm 0.04	1.5×10^8	8.5×10^7

The obtained results indicate that the manufactured fermented beverage was stable during 21 days, since the pH and the bacterial viability were not significantly changed over time.

CONCLUSION

The results obtained in this study highly indicate the positive role of GABA-producing strain BGZLS10-17 in amelioration of the EAE symptoms in DA rats that could be accredited to GABA present in the cell-free supernatant. Besides, technological characterization suggests promising use of the strain *L. brevis* BGZLS10-17 in combination with the autochthonous strain *S. thermophilus* BGKMJ1-36 as functional starter culture for production of GABA-enriched fermented beverage under controlled conditions, although the beneficial effects of the strain BGZLS10-17 on autoimmune diseases should be confirmed in clinical trials, according to EFSA regulations²³.

Acknowledgment. This work was financially supported by The Ministry of Education, Science and Technological Development of The Republic of Serbia (project No. 173019, No. 173035).

ИЗВОД

КАРАКТЕРИЗАЦИЈА РЕЗИСТЕНЦИЈЕ НА pH И ПРОТЕОЛИТИЧКЕ АКТИВНОСТИ ГАБА-ПРОДУКУЈУЋЕГ СОЈА *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17 У ПРИПРЕМИ ФЕРМЕНТИСАНОГ МЛЕЧНОГ НАПИТКА И ЕФЕКТИ НА УБЛАЖАВАЊЕ СИМПТОМА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ АУТОИМУНСКОГ ЕНЦЕФАЛОМИЈЕЛИТИСА

СВЕТЛАНА С. СОКОВИЋ БАЈИЋ^{1,3}, САЊА Б. МИХАЈЛОВИЋ¹, ДУШАН Д. РАДОЈЕВИЋ¹, ДУШАНКА Д. ПОПОВИЋ¹, ЈЕЛЕНА М. БОКИЋ¹, СУЗАНА М. СТАНИСАВЉЕВИЋ², МИЛИЦА Н. ЛАЗАРЕВИЋ², ЂОРЂЕ М. МИЉКОВИЋ², PATRICIA RUAS-MADIEDO³, НАТАША Е. ГОЛИЋ¹, МАЈА С. ТОЛИНАЧКИ¹

¹Лабораторија за молекуларну микробиологију, Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство (ИМГИ), Универзитет у Београду, Србија; ²Одељење за имунологију, Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ (ИБИСС), Универзитет у Београду, Србија; ³Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias, Spain

Мултипла склероза (МС) је хронично аутоимунско обољење централног нервног система. Циљ овог рада је био изучавање пробиотичког ефекта произвођача γ -аминобутерне киселине (ГАБА), соја *Lactobacillus brevis* BGZLS10-17, на Dark Agouti (ДА) пацовима осетљивим на индукцију експерименталног аутоимунског енцефаломијелитиса (ЕАЕ), експерименталног модела МС. Пацовима су свакодневно праћени клинички симптоми ЕАЕ. Резултати студије су показали да орална примена *L. brevis* BGZLS10-17 ублажава симптоме ЕАЕ код ДА пацова, одложен је почетак болести, скраћено трајање болести, смањен интензитет болести у периоду када су симптоми код контрола најјаче изражени, а занимљиво је и да се животиње након четрдесет дана потпуно опорављају, што код контролних животиња које нису биле третиране пробиотиком *L. brevis* BGZLS10-17 није био случај. Побољшање ЕАЕ симптома је забележено и након примене супернатанта соја *L. brevis* BGZLS10-17 гајеног 48 сати у медијуму за раст бактерија са и без додатка прекурсора ГАБА, мононатријум глутамата (МСГ). Добијени резултати указују да би ГАБА коју производи сој *L. brevis* BGZLS10-17 могла бити одговорна за ублажавање симптома ЕАЕ. Пробиотички ефекат соја *L. brevis* BGZLS10-17 ће бити даље тестиран у клиничким студијама на људима, како би сој могао да се користи као пробиотик у функционалној храни за пацијенте оболеле од аутоимунских болести.

(Примљено 16. јула; ревидирано 22. августа; прихваћено 3. септембра 2019)

REFERENCES

1. N. Ghasemi, S. Razavi, E. Nikzad, *Cell J.* **19** (2017) 1 (<https://doi.org/10.22074/cellj.2016.4867>)
2. R. L. Terry, I. Ifergan, S. D. Miller, *Methods Mol. Biol.* **1304** (2016) 144 (https://doi.org/10.1007/7651_2014_88)
3. M. M. Goldenberg, *P. T.* **37** (2012) 175 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3351877/>)
4. J. Chen, N. Chia, K. R. Kalari, J.Z. Yao, M. Novotna, M. M. Paz Soldan, D. H. Luckey, E. V. Marietta, P. R. Jeraldo, X. Chen, B.G. Weinschenker, M. Rodriguez, O. H., Kantarci, H. Nelson, J. A. Murray, A. K. Mangalam, *Sci. Rep.* (2016) (<https://doi.org/10.1038/srep28484>)
5. S. Stanisavljević, A. Čepić, S. Bojić, K. Veljović, S. Mihajlović, N. Đedović, B. Jevtić, M. Momčilović, M. Lazarević, M. Mostarica Stojković, Đ. Miljković, N. Golić, *Sci. Rep.* (2019) (<https://doi.org/10.1038/s41598-018-37505-7>)
6. E. V. Demarkova, V. P. Korobov, L. M. Lemkina. *Klin. Lab. Diagn.* **4** (2003) 15 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12774663>)

7. M. Carabotti, A. Scirocco, A. A. Maselli, C. Severi. *Ann. Gastroenterol.* **28** (2015) 203 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4367209/>)
8. J. C. Nantes, S. Proulx, J. Zhong, S. A. Holmes, S. Narayanan, R. A. Brown, R. D. Hoge, L. Koski, *NeuroImage* **157** (2017) 705 (<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.01.033>)
9. F. Gao, X. Yin, R. A. E. Edden, A. C. Evans, J. Xu, G. Cao, H. Li, M. Li, B. Zhao, J. Wang, G. Wang, *Hippocampus* **28** (2018) 813 (<https://doi:10.1002/hipo.23001>)
10. R. Dhakal, V. K. Bajpai, K. H. Baek, *Braz. J. Microbiol.* **43** (2012) 1230 (<https://doi:10.1590/S1517-83822012000400001>)
11. C. H. Wu, Y. H. Hsueh, J. M. Kuo, S. J. Liu, *Int. J. Mol. Sci.* **19** (2018) 143 (<https://doi:10.3390/ijms19010143>)
12. K. Papadimitriou, Á. Alegría, P. A. Bron, M. de Angelis, M. Gobbetti, M. Kleerebezem, J. A. Lemos, D. M. Linares, P. Ross, C. Stanton, F. Turroni, D. van Sinderen, P. Varmanen, M. Ventura, M. Zúñiga, E. Tsakalidou, J. Kok, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80** (2016) 837 (<https://doi:10.1128/MMBR.00076-15>)
13. S. Sokovic Bajic, J. Djokic, M. Dinic, K. Veljovic, N. Golic, S. Mihajlovic, M. Tolinacki, *Front. Microbiol.* **10** (2019) 527 (<https://doi:10.3389/fmicb.2019.00527>)
14. J.A. Valenzuela, A.B. Flórez, L. Vázquez, O.M. Vasek, B. Mayo, *Beneficial Microbes.* **10** (2019) 579 (<https://doi:10.3920/BM2018.0176>)
15. S. F. Altschul, T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. J. Lipman, *Nucleic Acids Res.* **25** (1997) 3389 (<https://doi:10.1093/nar/25.17.3389>)
16. S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura, *Mol. Biol. Evol.* **33** (2016) 1870 (<https://doi:10.1093/molbev/msw054>)
17. I. Letunic, P. Bork, *Nucleic Acids Res.* **44** (2016) 242 (<https://doi:10.1093/nar/gkw290>)
18. M. Kojic, D. Fira, B. Bojovic, A. Banina, L. Topisirovic, *Appl. Environ. Microbiol.* **57** (1991) 1753 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC183463/>)
19. D. De Biase, E. Pennacchietti, *Mol Microbiol.* **86** (2012) 770 (<https://doi:10.1111/mmi.12020>)
20. E. R. S. Kunji, I. Mierau, A. Hagting, B. Poolman, W. N. Konings, *Ant. van Leeuwenhoek.* **70** (1996) 187 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8879407>)
21. M. Gobbetti, L. Stepaniak, M. De Angelis, A. Corsetti, R. Di Cagno, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **42** (2002) 223 (<https://doi:10.1080/10408690290825538>)
22. Y. Nakamura, N. Yamamoto, K. Sakai, A. Okubo, S. Yamazaki, T. Takano, *J. Dairy Sci.* **78** (1995) 777 ([https://doi:10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76689-9](https://doi:10.3168/jds.S0022-0302(95)76689-9))
23. European Food Safety Authority (EFSA), *EFSA Journal* **10** (2012) 2740 (<https://doi:10.2903/j.efsa.2012.2740>)

SUPPLEMENTARY MATERIAL TO

On Line First