

Kolonizacijski potencijal i učinak na intestinalnu mikrobiotu *Lactobacillus plantarum* SF9C i *Lactobacillus brevis* SF9B in vivo

Vurnek, Teo

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:433507>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2019.

Teo Vurnek

998/MB

**Kolonizacijski potencijal i učinak na
intestinalnu mikrobiotu *Lactobacillus
plantarum* SF9C i *Lactobacillus brevis*
SF9B *in vivo***

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pročelnice prof. dr.sc. Jagode Šušković, a pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Jasne Novak, te uz pomoć doktorantice Katarine Butorac, mag. ing. mol. biotech i doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc u okviru HRZZ projekta "Probiotici i starter kulture- površinski proteini i bakteriocini", IP-2014-09-7009 (voditeljica projekta: prof. dr. sc. Blaženka Kos).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Kolonizacijski potencijal i učinak na intestinalnu mikrobiotu *Lactobacillus plantarum* SF9C i *Lactobacillus brevis* SF9B *in vivo*

Teo Vurnek, 998/MB

Sažetak: Cilj ovog diplomskog rada je istražiti kolonizacijski potencijal i učinak na sastav intestinalne mikrobiote sojeva *Lactobacillus brevis* SF9B koji sintetizira S-protein i *Lactobacillus plantarum* SF9C producenta plantaricina, koji se istražuju kao probiotički sojevi, *in vivo* na modelu eksperimentalnih štakora. Za analizu sastava intestinalne mikrobiote korišteni su različiti pristupi, PCR-DGGE metoda za detekciju prisutnosti odabranih *Lactobacillus* sojeva, nakon prolaska kroz gastrointestinalni trakt (GIT) *in vivo*, dok je najnovija generacija sekvencioniranja primjenjena za određivanje redoslijeda nukleotida V3 i V4 varijabilnih regija 16S rRNA gena mikrobioma pomoću Illumina MiSeq platforme s ciljem analize sastava i učinka odabranih sojeva na intestinalnu mikrobiotu. PCR-DGGE metodom potvrđeno je da oba ispitivana soja laktobacila preživljavaju u visokom broju kolonija nakon prolaska kroz GIT, 3 i 10 dana nakon prestanka primjene, a ustanovljena je i prisutnost drugih *Lactobacillus* vrsta, koje su dio autohtone populacije: *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus intestinalis* i *Lactobacillus reuteri*. Metagenomskom analizom potvrđena je bioraznolikost *Lactobacillus* spp. u mikrobioti štakora u kojima su aplicirani SF9C i SF9B u usporedbi s kontrolnom skupinom i 10 dana nakon završetka tretmana. Rezultati ovog istraživanja doprinose hipotezi o funkcionalnosti sojeva SF9C i SF9B. Združena primjena dva soja, doprinosi adhezijskim svojstvima *Lb. plantarum* SF9C uslijed kompetitivne ekskluzije patogena djelovanjem *Lb. brevis* SF9B, a soj SF9B ima pojačan kolonizacijski potencijal kojem doprinosi antimikrobna aktivnost plantaricina *Lb. plantarum* SF9C, koji iskazuje širi spektar antimikrobnog djelovanja uključujući *Listeria monocytogenes* ATCC 19111.

Ključne riječi: intestinalna mikrobiota, kolonizacija *in vivo*, sekvencioniranje, *Lactobacillus*

Rad sadrži: 52 stranice, 18 slika, 8 tablica, 46 literature, 1 prilog

Jezik izvornika : hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jasna Novak

Pomoć pri izradi : Katarina Butorac, mag. ing. mol. biotech., doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Jagoda Šušković
2. izv. prof. dr. sc. Jasna Novak
3. izv. prof. dr.sc. Jurica Žučko
4. doc. dr. sc. Janko Diminić (zamjena)

Datum obrane: 17. lipanj 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of biochemical engineering
Laboratory for antibiotic technology, enzymes, probiotics and starter cultures

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Colonization potential and effect on intestinal microbiota of *Lactobacillus plantarum* SF9C and *Lactobacillus brevis* SF9C *in vivo*

Teo Vurnek, 998/MB

Abstract: The aim of this work is to investigate the colonization potential and effect on the composition of the intestinal microbiota of S-layer carrying *Lactobacillus brevis* SF9B and plantaricin producing *Lactobacillus plantarum* SF9C *in vivo* on the model of experimental rats. Two different approaches were applied for the analysis of the intestinal microbiota composition. PCR-DGGE method was employed for assessing the presence of selected *Lactobacillus* strains, after their transit through the gastrointestinal tract (GIT) of the rat, while next-generation sequencing via Illumina MiSeq platform was applied for determination intestinal microbiota composition and effect of the selected strains in the, by amplifying V3 and V4 16S rRNA gene regions. PCR-DGGE analysis revealed the presence of both examined strains as well as detection of other *Lactobacillus* species representatives, the identified as *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus intestinalis* and *Lactobacillus reuteri*, which are autochthonous bacteria in the rat intestine, even 3rd and 10th day after the end of application. The metagenomic analysis confirmed an abundant prevalence of *Lactobacillus* spp. was in the gut microbiota of rats inoculated with SF9C and SF9B strains compared with the control group, even 10 days after the end of treatment. The results of this research supported enhanced functionality potential of jointed application of SF9C and SF9B strains, where both strains can benefit, *Lb. plantarum* SF9C by facilitated adhesion due to the competitive pathogen exclusion by coexisting *Lb. brevis* SF9B, while in same SF9B benefits in improved colonization due to the plantaricin production by *Lb. plantarum* SF9C, resulting altogether in a broader spectrum of antimicrobial activity against pathogens of the coculture.

Keywords: intestinal microbiota, *in vivo* colonization, next-generation sequencing, *Lactobacillus*

Thesis contains: 52 pages, 18 figures, 8 tables, 46 references, 1 supplement

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: PhD, Jasna Novak, associate professor

Technical support and assistance: Katarina Butorac, mag. ing. biotech., assistant professor Andreja Leboš Pavunc

Reviewers:

1. PhD, Jagoda Šušković, full professor
2. PhD, Jasna Novak, associate professor
3. PhD, Jurica Žučko, associate professor
4. PhD, Janko Diminić, assistant professor

Thesis defended: 17 June 2019

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. PROBIOTICI	3
2.1.1. Probiotičke bakterije sa S-slojem proteina.....	6
2.1.2. Probiotici s bakteriocinskom aktivnošću.....	9
2.2. CRIJEVNA MIKROBIOTA I POVEZANOST S MOZGOM	10
2.3. MIKROBIOM I ALZHEIMEROVA BOLEST	13
2.3.1. Istraživanja na Germ-free životinjama	15
2.3.2. Modulacija sastava intestinalne mikrobiote utjecajem različitih čimbenika	16
2.3.3. Transplantacija fekalne mikrobiote	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. MATERIJALI	21
3.1.1. Radni mikroorganizmi.....	21
3.1.2. Hranjive podloge	21
3.1.3. Kemikalije	22
3.1.4. Aparatura i pribor	23
3.2. METODE RADA	24
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama	24
3.2.2. Priprema bakterijske suspenzije i intragastrično kaniliranje štakora	24
3.2.3. Provjera broja bakterija u fecesu štakora na selektivnim hranjivim podlogama..	26
3.2.4. Izolacija i analiza ukupne DNA iz fecesa štakora	26
3.2.5. PCR-DGGE -gel elektroforeza u gradijentu denaturirajućeg agensa.....	26
3.2.6. Izolacija DNA iz DGGE gela i amplifikacija V2-V3 regije 16S rDNA	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. ANALIZA SASTAVA MIKROBNE POPULACIJE PRIMJENOM KLASIČNIH MIKROBIOLOŠKIH METODA	29
4.2. PRIMJENA DGGE METODE ZA EVALUACIJU KOLONIZACIJSKIH POTENCIJALA <i>Lactobacillus</i> SOJEVA <i>in vivo</i>	33
4.3. ANALIZA SASTAVA INTESTINALNE MIKROBIOTE PRIMJENOM Illumina MiSeq SEKVENCIRANJA	37
5. ZAKLJUČCI	47
6. LITERATURA	48
7. PRILOZI	

1. UVOD

Intestinalna mikrobiota je kompleksna mikrobna zajednica unutar gastrointestinalnog trakta sisavaca. Sastav intestinalne mikrobiote je specifičan za svakog domaćina ovisno o životnoj dobi, te izloženosti različitim egzogenim i endogenim čimbenicima. Uključena je u brojne aspekte fiziologije domaćina, od načina prehrane do ponašanja, odgovora na stres, a posljednjih godina znanstvena zajednica usmjerena na definiranje poveznice sastava intestinalne mikrobiote i razvoja različitih intestinalnih poremećaja i bolesti. Unutar gastrointestinalnog trakta mikrobima su dostupni brojni spojevi koji mogu biti hranjive tvari sudionicima intestinalne mikrobiote što je značajno za kolonizaciju. U intestinalnoj mikrobioti čovjeka prevladavaju dva koljena: *Bacteroidetes* i *Firmicutes*. Najnovija istraživanja su usmjerena na razjašnjavanje uloge crijevne mikrobiote u etiologiji bolesti koje se pojavljuju u organima fizički udaljenim od crijeva (Sekirov i sur, 2010). Kronične bolesti poput pretilosti, upalnih bolesti crijeva, dijabetesa, metaboličkog sindroma, ateroskleroze, bolesti jetre, Chronove bolesti, Parkinsonove bolesti, Alzheimerove bolesti te različitih karcinoma mogu biti povezane sa sastavom intestinalne mikrobiote čovjeka (Wang i sur, 2017). Analiza povezanosti sastava intestinalne mikrobiote s Alzheimerovom bolesti pokazuje izraziti potencijal u pronalasku lijeka za terapiju ove neizlječive progresivne demencije. Primjena probiotičkih bakterija u prehrani može preventivno utjecati na mogućnost smanjena pojave različitih bolesti poput Alzheimerove bolesti, Chronove bolesti, ulceroznog kolitisa te drugih bolesti za koje se u novijim istraživanjima pretpostavlja povezanost s crijevnom mikrobiotom čovjeka. Novija istraživanja doprinose hipotezi da poremećaji po osi mozak-mikrobiota-crijeva (engl. brain-gut-microbiota axis) značajno utječu na patogenezu neurodegenerativnih bolesti. Primjerice povećana permeabilnosti crijeva i krvno-moždane barijere, kao posljedica narušavanja ravnoteže intestinalne mikrobiote, može posredovati Alzheimerovoj bolesti i drugim neurodegenerativnim poremećajima povezanim sa starenjem. Narušenu ravnotežu intestinalne mikrobiote moguće je ponovo uspostaviti primjenom mikroorganizama koji iskazuju pozitivan učinak na domaćina, probioticima. Rodovi *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* najčešće se primjenjuju kao probiotici (Kechagia i sur., 2013).

U ovom diplomskom radu na modelu eksperimentalnih životinja ispitan je utjecaj *Lactobacillus brevis* SF9B, koji eksprimira S-sloj proteina na površini stanice, i *Lactobacillus plantarum* SF9C, koji proizvodi plantaricin, na sastav intestinalne mikrobiote. Skupina zdravih i skupina štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest kanilirani su bakterijskom

suspenzijom *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C jednom dnevno tijekom 5 dana. Za analizu sastava intestinalne mikrobiote korišteni su različiti pristupi, PCR-DGGE metoda za procjenu kolonizacijskog potencijala i detekciju prisutnosti odabranih *Lactobacillus* sojeva, nakon prolaska kroz gastrointestinalni trakt (GIT) *in vivo*, dok je najnovija generacija sekvencioniranja primjenjena za određivanje redoslijeda nukleotida V3 i V4 varijabilnih regija 16S rRNA gena mikrobioma pomoću Illumina MiSeq platforme s ciljem analize sastava i učinka odabranih sojeva na intestinalnu mikrobiotu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PROBIOTICI

Znanstveni interes za probiotičke sojeve osobito je značajan u zadnja dva desetljeća kao rezultat konstantnog istraživanja njihovog pozitivnog utjecaja na ljudsko zdravlje. Sveopća definicija probiotika kaže da su to živi mikrobiološki dodaci prehrani koji imaju pozitivan utjecaj na domaćina tako što održavaju mikrobiološki balans domaćina (Kechagia i sur., 2013). Probiotici se s obzirom na ciljanu primjenu mogu definirati kao funkcionalni dodaci hrani, no u novije vrijeme sve se više istražuje njihov potencijalni terapijski učinak, odnosno primjena kao bioterapeutika. Probiotici kao funkcionalni dodaci hrani pozitivno utječu na ravnotežu crijevne mikrobiote, što u konačnici može doprinjeti poželjnim učincima na zdravlje. Bioterapeutcima se smatraju probiotički sojevi koji su namijenjeni za terapiju ili prevenciju bolesti što ih svrstava u kategoriju živih lijekova. Da bi neki mikroorganizam mogao imati probiotičku funkciju treba zadovoljiti tri glavna aspekta: opći, tehnološki i funkcionalni (Šušković i sur., 2009). Probiotički mikroorganizmi taksonomski većinom pripadaju bakterijama mliječne kiseline (BMK), ali mogu pripadati i bakterijama iz drugih skupina. BMK koje su često okarakterizirani kao probiotički sojevi pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Tablica 1.) (Kechagia i sur., 2013). Funkcionalnost potencijalnih probiotičkih sojeva potrebno je definirati, primjenom *in vitro* testova, na sljedeća specifična svojstva:

- otpornost na visoke koncentracije kiselina i žuči
- svojstvo adhezije na sluznice i epitelne površine, što može imati učinak na imunomodulaciju, kompetitivnu ekskluziju patogena
- antimikrobna aktivnost protiv patogenih bakterija
- ispitati aktivnost enzima hidrolaze žučnih soli (Kechagia i sur., 2013)

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO) probiotici koji iskažu navedena svojstva, ako se koriste u odgovarajućim količinama, imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Primjene probiotičkih sojeva osim na zdravlje intestinalnog trakta, šire se i na učinak na mikrobiotu kože, učinka na rezistenciju na alergene, jačanje imunološkog sustava, suzbijanje patogenih mikroorganizama te zaštiti tjelesnih makromolekula (DNA, proteine, lipide) od oksidativnog oštećenja (Mohajeri i sur., 2018). U literaturi su najčešće okarakterizirani učinci probiotika prilikom poremećaja funkcije crijeva kao što su intolerancija na laktozu, dijareju uslijed terapije antibioticima, alergije (Kechagia i sur., 2013). Evolucija crijevne mikrobiote i

opravdanost probiotičke terapije vidljiva je na slici 1. gdje je prikazan utjecaj probiotika na primarno izlaganje i genetičke faktore, dijetu i antimikrobne tretmane, imunosni odgovor, stres i starenje, gastrointestinalne bolesti. Isto tako je vidljivo kako se povećava rizik pojave kroničnih upalnih i alergijskih bolesti kao i stupanj promjena u sastavu crijevne mikrobiote (Slika 1.) (Isolauri i sur., 2002).

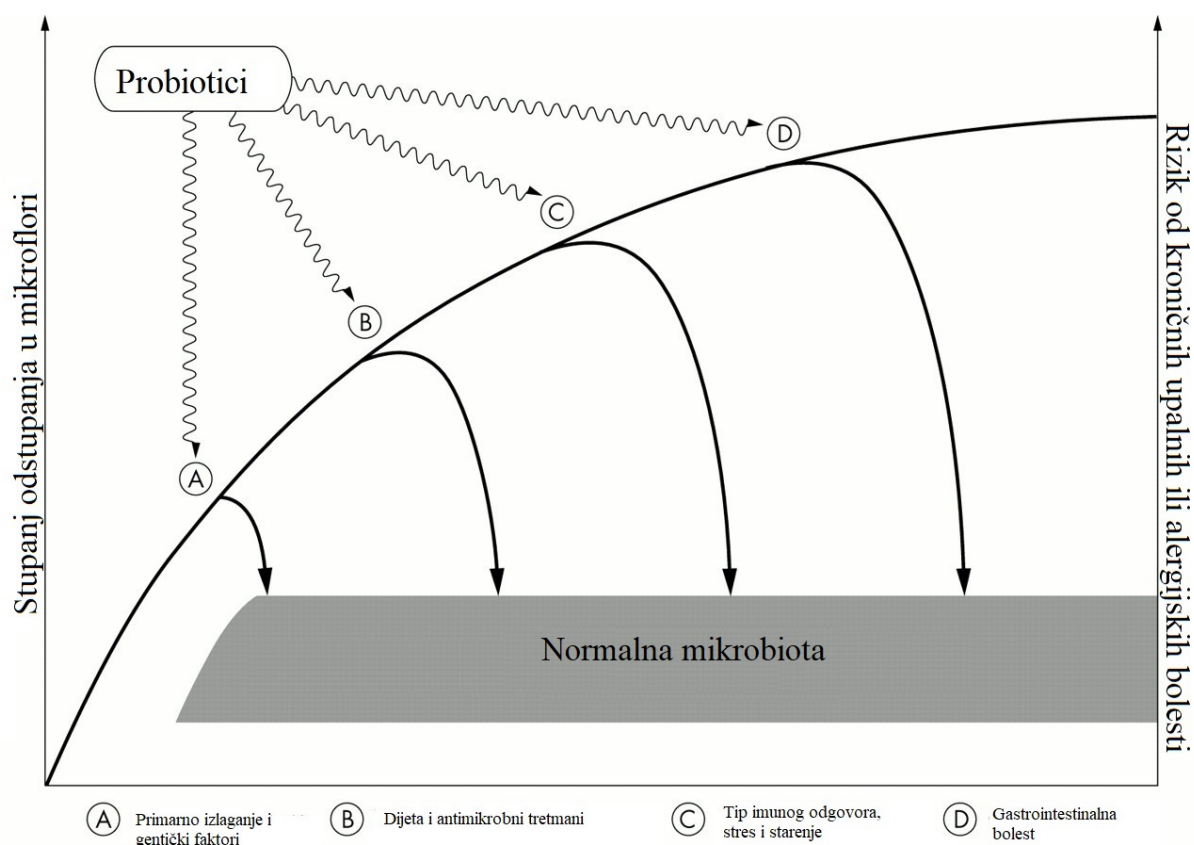
Tablica 1. Pojedini probiotički mikroorganizmi (Kechagia i sur., 2013)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Ostale BMK	Ostale bakterije
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ¹	<i>Bacillus cereus</i> var. Toyoi ¹
<i>Lb. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain nissle
<i>Lb. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ³	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Lb. gallinarum</i> ¹	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lb. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pedicoccus acidilactici</i> ³	<i>S. boulardii</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i> ²	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ¹	
<i>Lb. paracasei</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> ³	
<i>Lb. plantarum</i>			
<i>Lb. reuteri</i>			
<i>Lb. rhamnosus</i>			

¹Najviše se primjenjuju u veterini

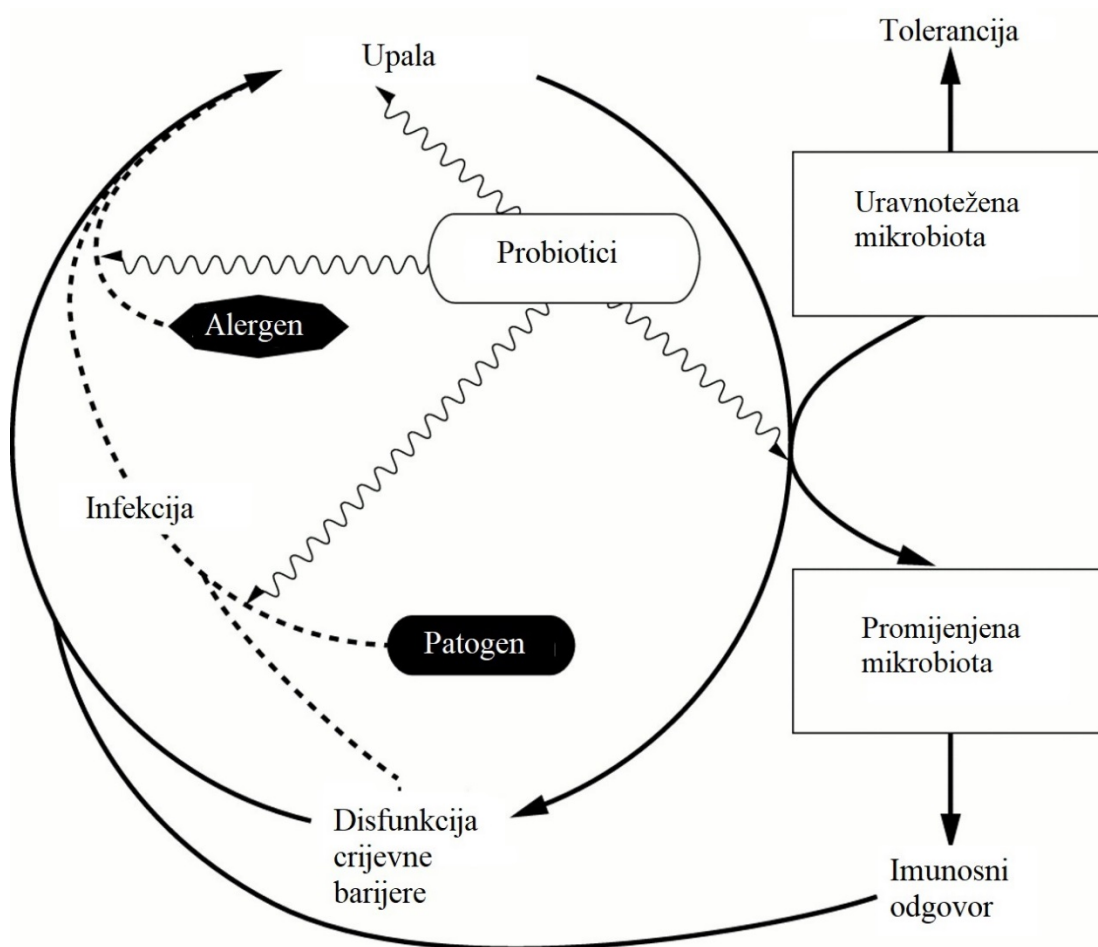
²Zadnje reklasificirana kao *B. animalis* subsp. *lactis*

³Malo je poznato o probiotičkim svojstvima



Slika 1. Evolucija crijevne mikrobiote i opravdanost probiotičke terapije (Isolauri i sur., 2002)

Fermentirani mliječni proizvodi, osobito jogurt, su značajni proizvodi za unos probiotičkih bakterija kod potrošača, uz sektor koji se neprekidno razvija, kao rezultat napredovanja tehnologije hrane i porasta potražnje. Osim jogurta, probiotičke bakterije se mogu primijeniti u drugim fermentiranim proizvodima, ali i u obliku različitih pripravaka. Jedan od mehanizama djelovanja probiotičkih bakterija ostvaruje se antimikrobnim djelovanjem prilikom prolaska antigena, odnosno patogenih mikroorganizama kroz gastrointestinalnu barijeru. Kada dospiju do sluznice crijeva, probiotički sojevi kompetitivnom ekskluzijom ograničavaju kolonizaciju patogena te mogu ukloniti antigene i regulirati specifičan imunski odgovor na prisutne antigene koji uzrokuju upalni proces ili infekcije. Antigeni, koji su već bili prisutni, prepoznati su od strane površine sluznice i uklanjanju pomoću crijevnih proteaza, dok preostali antigen prepoznaju drugi mehanizmi obrambenog ustava domaćina, te mogu uzrokovati dugoročen upale. Cilj primjene probiotičkih bakterija je održati homeostazu, gdje je osim njihovog djelovanja, potrebna učinkovita funkcija crijevne barijere i epitelni integritet (Slika 2.)(Isolauri i sur., 2002).



Slika 2. Intestinalna mikrobiota tijekom upalnog procesa u domaćinu (Isolauri i sur., 2002)

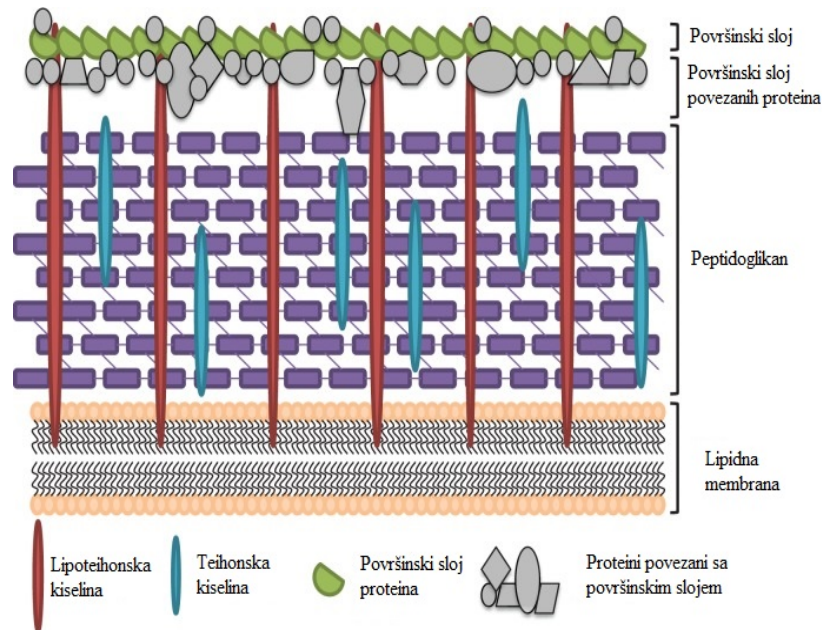
Upalni proces može utjecati na promjene u sastavu i funkciji uravnotežene intestinalne mikrobiote te uzrokovati poremećaje koji utječu na imuno odgovor domaćina i disfunkciju intestinalne barijere. Probiotičke bakterije mogu utjecati na upalni proces razgradnjom antigena, čime se neposredno utječe na smanjenje razine različitih čimbenika obrambenog imuno odgovora i na uspostavljanje ponovne ravnoteže intestinalne mikrobiote te ekskluzije patogenih sojeva (Isolauri i sur., 2002).

2.1.1. Probiotičke bakterije sa S-slojem proteina

Vrste roda *Lactobacillus*, koje eksprimiraju površinski S-sloj sastavljen od ponavljajućih podjedinica S-proteina s vanjske strane stanične stijenke, su prepoznate kao probiotički sojevi s povećanom otpornošću na stresne okolišne čimbenike te boljim adhezijskim i imunomodulacijskim svojstvima (Beganović i sur., 2014; Uroić i sur., 2016; Kant, i sur., 2016; Banić i sur., 2018). S-slojevi odnosno površinski slojevi proteina su monomolekularna

parakristalna struktura sastavljena od proteinskih ili glikoproteinskih podjedinica čiji je raspon masa od 40 do 200 kDa. S-slojevi proteina predstavljaju 10-15% ukupnog proteinskog sastava bakterijske stanice koja ukazuje na učinkovitu ekspresiju gena za sintezu proteina S-sloja i njihovo izlučivanje na površinu stanice. Do danas su identificirane dvije vrste posttranslacijskih modifikacija podjedinica S-sloja. Glikozilirani S-slojevi proteina okarakterizirani su kod Gram-pozitivnim bakterijama i Archaea. Pored glikozilacije, objavljena je posttranslacijska modifikacija S-slojeva koja uključuje fosforilaciju tirozinskih ostataka. Unatoč visokoj sličnosti aminokiselinskog sastava samih S-slojeva proteina, oni se međusobno jako razlikuju čak i unutar roda *Lactobacillus*. Nekoliko laktobacila sadrži više S- proteina koji mogu biti različito ili simultano ekspresirani. Laktobacili pripadaju bakterijama mliječne kiseline koje su Gram-pozitivne bakterije, a glavni proizvod metabolizma je mliječna kiselina nastala fermentacijom šećera, te imaju GRAS status koji im je dodijelila FDA (Mobili i sur., 2010). Unutar roda postoji izrazita bioraznolikost. Pojedini sojevi su prisutni kao dio autohtone mikrobiote gastrointestinalnih i genitourinarnih sustava čovjeka i životinja. Mnoge vrste roda *Lactobacillus* posjeduju S-sloj proteina, ali su geni za kodiranje proteina S-sloja klonirani i sekvencionirani iz dva *Lactobacillus brevis* soja, jednog *Lactobacillus acidophilus*, jednog *Lactobacillus helveticus* soja i jednog soja *Lactobacillus crispatus*. Funkcionalne uloge *Lactobacillus* S-slojeva još su slabo karakterizirane, jedna od funkcija koja je opisana do sada odnosi se na posredovanje adhezije na različite površine domaćina. Neke vrste roda *Lactobacillus brevis* sadrže adhezine, koji posreduju u adheziji bakterijskih stanica na crijevne epitelne stanične linije i fibronektinom, komponentom izvanstaničnog matriksa. Za nekoliko *Lactobacillus* S-slojeva, poput *Lb. helveticus*, *Lb. gasseri* i *Lb. kefir*, još nisu opisane specifične funkcije. Buduće perspektive istraživanja *Lactobacillus* S-slojeva uključuju njihovo korištenje u različitim biotehnološkim, nanotehnološkim i biomedicinskim primjenama. Prednosti u primjeni laktobacila kao vektora uključuje svojstva za promicanje zdravlja koje posjeduje nekoliko sojeva, GRAS status laktobacila i nedostatak lipopolisaharida u staničnoj stijenci što smanjuje rizik endotoksičnog šoka. Nekoliko je hipoteza za biotehnološku primjenu S-slojeva proteina laktobacila primjerice kao vektora za antigene (Åvall-Jääskeläinen & Palva, 2005). Provođenjem različitih istraživanja utvrđeno je da S-slojevi nekih sojeva laktobacila imaju ulogu u održavanju staničnih funkcija pa je pročišćavanjem S-slojeva proteina ustanovljena njihova stabilnost pri fiziološkom pH, zračenju, temperaturi, određenoj vrsti proteolize, visokim tlakovima i tretmanima deterdženata te je predložena njihova zaštitna uloga. Različite studije su pokazale da S-sloj proteina laktobacila posreduje u svojstvima poput bakterijske agregacije kao i adheziju na epitelne stanice i na crijevne komponente poput sluzi ili ECM

proteina. Zbog tih uloga potpuno je razumljiv mogućnost primjene tih sojeva kao probiotika. (Mobili i sur., 2010)



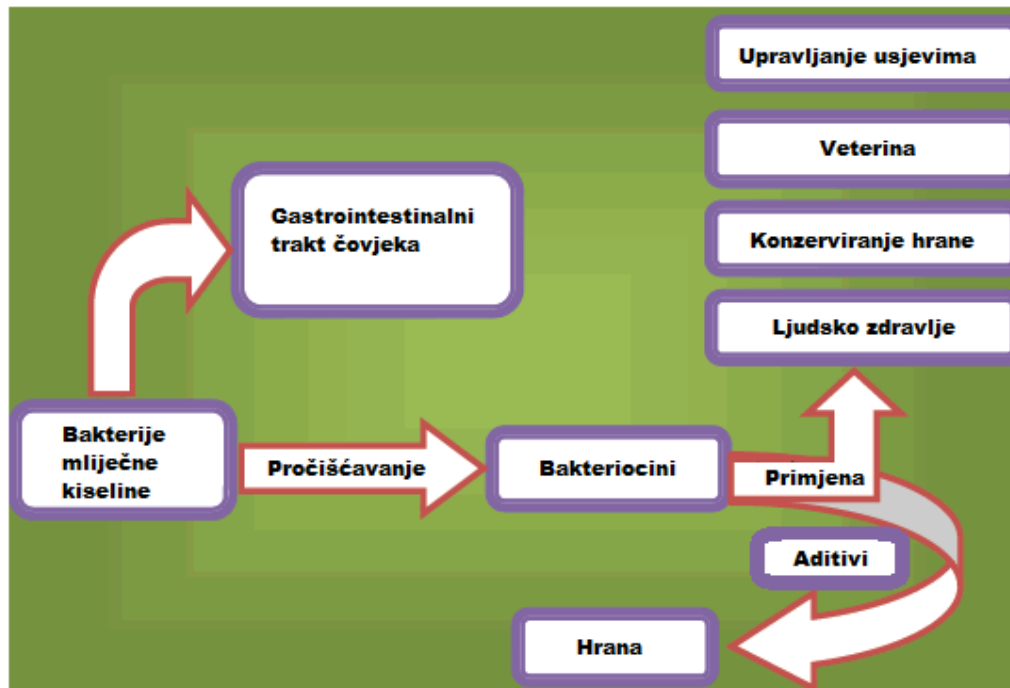
Slika 3. Shematski prikaz S-sloja proteina kod *Lb. acidophilus* NCFM te lokalizacija proteina vezanih na S-sloj (Johnson i sur., 2013)

Na slici 3. je prikazana struktura stanične stijenke bakterije *Lb. acidophilus* NCFM koja se sastoji od debelog sloja peptidoglikana kojeg čine teihonska kiselina i lipoteihonska kiselina koja omogućuje povezanost peptidoglikana i stanične membrane. Na vrhu se nalazi S-sloj proteina i proteini koji su vezani za S-sloj proteina (engl. surface layer associated proteins SLAP). (Johnson i sur., 2013)

2.1.2. Probiotici s bakteriocinskom aktivnošću

U fermentiranoj hrani BMK iskazuju antimikrobne aktivnosti kao rezultat sinteze različitih metabolita. To se posebice odnosi na sintezu organskih kiselina, ali i drugih specifičnijih biomolekula poput bakteriocina i antifungalnih peptida. Industrijski potencijal velikog broja pročišćenih i okarakteriziranih bakteriocina je istražuje. Bakteriocini probiotičkih BMK mogu imati ulogu prilikom interakcija *in vivo* u gastrointestinalnom traktu i time doprinosti zdravlju odnosno homeostazi crijeva (De Vuyst i Leroy, 2007). Bakteriocini su ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi koje proizvode bakterije, a mogu inhibirati srodne, ali i taksonomski udaljene bakterijske sojeve, a nemaju inhibitorni učinak prema soju producentu. Često se klasificiraju kao antibiotici, što nisu. Proizvodnja bakteriocina smatra se uspješnom strategijom održavanja ravnoteže mikrobne populacije i smanjenja kompeticije kako bi producenti bakteriocina imali kompetitivnu prednost pred patogenim bakterijama ili kontaminantima, putem natjecanja za dostupne hranjive tvari i mjesta vezanja. Kako su proteinske prirode, osjetljivi su na djelovanje proteaza, ali nisu štetni za domaćina i mikrookoliš. Nisin s GRAS statusom, je primjer bakteriocina koji se uspješno koristi u prehrambenoj industriji. Klasifikacija bakteriocina može se temeljiti s obzirom na razlike u mikroorganizmu producentu, odnosno da li ih sintetiziraju Gram-negativne ili Gram-pozitivne bakterije. Primjeri bakteriocina koje proizvode Gram-negativne bakterije su kolicini i mikrocin. Pri tome su najčešći producenti definirani iz rodova BMK koji se međusobno razlikuju prema molekularnoj masi, strukturi, fizikalno-kemijskim svojstvima i inhibicijskom spektru. Bakteriocini Gram-pozitivnih bakterija generalno su podijeljeni u razred I (modificirani peptidi, lantibiotici), razred II (nemodificirani peptidi, ne lantionini) i razred III (veliki proteini, toplinski nestabilni). Pročišćeni bakteriocini ili bakteriocini koje proizvode probiotici mogu smanjiti broj patogena ili promijeniti sastav crijevne mikrobiote u životinjskim modelima poput miševa, pilića i svinja. Berbon i suradnici (2006) izvjestili su o sposobnosti soja *Lactococcus lactis* CHCC5826 koji proizvodi nisin i *Lactococcus lactis* soja CHCH2826 koji ne proizvodi nisin, da utječu na sastav crijevne mikrobiote u štakorima koloniziranim s mikrobiotom čovjeka. Saznali su da se broj *Bifidobacterium* u fecesu štakora hranjenih sa sojevima *Lactococcus lactis* koji proizvode i ne proizvode nisin kroz 8 dana značajno povećao te se ujedno broj bakterija *Enterococcus/Streptococcus* u duodenumu, ileumu, cekumu i debelom crijevu smanjio. Međutim takav učinak nije nađen nakon hranjenja čistim nisinom. *Lactococcus lactis* može utjecati na intestinalnu mikrobiotu kompeticijom za hranjive tvari ili adhezijsko mjesto (Bernbon i sur., 2006). Neki istraživači tvrde da bakteriocini pokazuju aktivnost protiv

tumorskih stanica (Yang i sur., 2014). Spomenuti nisin je aktivan protiv Gram-pozitivnih bakterija uključujući patogene i one koje uzrokuju kvarenje hrane uključujući vrste *S. aureus* i *L. monocytogenes* (Zacharof & Lovitt, 2012). Sojevi bakterija roda *Lactobacillus* koji se koriste u terapijske svrhe su: *Lb. sporogenes*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Lb. delbruckii*, *Lb. lactis*. BMK mogu utjecati na sastav mikrobiote gastrointestinalnog trakta, a ako proizvode bakteriocine imaju primjenu kao aditivi u hrani, kao biokonzervansi te u veterini ili kod upravljanja usjevima (Slika 4.) (Toomula i sur., 2011).



Slika 4. Primjene bakteriocina bakterija iz roda *Lactobacillus* (Toomula i sur., 2011)

2.2. CRIJEVNA MIKROBIOTA I POVEZANOST S MOZGOM

Alzheimerova bolest (AB) je najpoznatiji oblik demencije kod starijih ljudi i predstavlja društveni zdravstveni problem koji je trenutno neizlječiv (Tablica 2.) (Korolev, 2014). Svjetska populacija izrazito brzo stari, a ujedno i broj ljudi sa spomenutom demencijom ubrzano raste te se pretpostavlja da će broj oboljelih od ove bolesti drastično porasti sa 35 milijuna na 65 milijuna do 2030. godine. Bolest najčešće zahvaća populaciju stariju od 65 godina te nastupa postepeno i pogoršava se. Početni simptom je gubitak pamćenja. "Zlatna" metoda dijagnosticiranja Alzheimerove bolesti je autopsija bazirana na patološkoj procjeni. Laboratorijska i neuroimagingna istraživanja se koriste samo u svrhu istraživanja ili kao

dodatak kliničkim kriterijama za AB, posebno za isključivanje strukturnih oštećenja mozga i identificiranje "reverzibilnih" uzroka demencije (Tablica 2.) (Korolev, 2014).

Tablica 2. Klinički pokazatelji za moguću prisutnost Alzheimerovu bolest (Korolev, 2014)

a) Prisutnost demencije

b) Postepena pojava simptoma mjesecima do godinama

c) Povijest progresivnog kognitivnog pada

d) Početna prezentacija može biti amnezična (tipična) ili ne amnezična (ne tipična)

e) Ne postojanje dokaza za druge uzroke kognitivnog oštećenja: cerebrovaskularne bolesti, drugi demencijski sindromi ili neurološko/medicinske bolesti

Lijek za samu bolest još uvijek nije otkriven, primjenjuju se različiti medicinski pripravci koji ublažuju simptome AB, no ne usporavaju patogenezu bolesti već omogućuju kvalitetniji život (Korolev, 2014). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) proglasila je 2012. godine AB svjetskim javnozdravstvenim prioritetom te usmjerila države članice, među kojima je i Hrvatska, da izrade akcijske planove i nacionalne strategije za borbu protiv AB. U Hrvatskoj je osnovana Hrvatska udruga za Alzheimerovu bolest koja upozorava na rastući problem demencije te zagovara za sva potrebna prava oboljelih osoba (Tablica 3.) (HZJZ, 2017).

Tablica 3. Broj hospitalizacija zbog Alzheimerove bolesti u stacioniranim ustanovama od 2012. – 2016. godine po dobnim skupinama (HZJZ, 2017)

	Ukupno	0-64	65-74	75-84	85-130
2012.	225	29	68	104	24
2013.	260	39	67	129	25
2014.	302	48	84	127	43
2015.	489	82	142	208	57
2016.	612	93	205	227	87

AB je posljedica promjena u "radu" mozga koje se mogu objasniti kao djelomičan ili progresivan gubitak funkcije neurona i sinaptičke povezanosti te smrti živčanih stanica u različitim regijama mozga. Iako je kronična progresivna neurodegenerativna bolest, ona varira od pacijenta do pacijenta podijeljena u 3 faze: blaga, umjerena i teška. Neurodegeneracija je važna karakteristika bolesti, ali nije i jedinstvena karakteristika. Bitna razlika koja AB čini

drugačijom od ostalih neurodegenerativnih bolesti je prisutnost nepoznate patologije u mozgu pacijenata: amiloidnih plakova i neurofibrilarnih čvorova (NFT) (Lau & Brodney, 2007). Najčešća teorija o patološkim promjenama na kojima se temelji proces bolesti je amiloidna kaskadna hipoteza, navodeći da je primarni događaj koji pokreće pretjerana akumulacija i sakupljanje beta-amiloida ($A\beta$) što dovodi do formiranja i taloženje amiloidnih plakova kroz medijalni temporalni režanj i moždani korteks. Kao rezultat "kaskade događaja" pojavljuje se neuronska šteta (eventualnu smrt), poremećaj neuronske komunikacije, upale i inicijacija drugog abnormalnog proteinskog procesa odnosno nakupljanje neurofibrilnih čvorova (NFT). Postoje dokazi koji govore da je prisutnost amiloidnih plakova i neurofibrilnih čvorova (NFT) potrebna za razvijanje Alzheimerove bolesti (DeFina i sur., 2013). Ranim otkrivanjem AB dozvoljen je tretman primjene klase lijekove poznatih kao AChE inhibitori (AChEI) odobren od strane FDA. Pretpostavljeni mehanizam je inhibicija enzima AChE koji privremeno povećava razinu acetilkolina u sinapsi. Smatra se da AChEI može poboljšati spoznaju i/ili funkcioniranje te pacijentu obično bude bolje kada uzima lijek nego kada ne uzima (Neugroschl & Wang, 2011).

Danas se provode mnoga istraživanja u kojima je naglasak na povezanost crijevne mikrobiote odnosno perifernih intestinalnih funkcija sa centralnim i enteričkim živčanim sustavom te povezanost sa emocionalnim i kognitivnim centrom u mozgu. Takav dvosmjerni način komunikacije se naziva os crijevo-mozak (engl. gut-brain axis). Interakcija između mikrobiote i osi crijevo-mozak omogućena je pomoću neuralnih, endokrinih, imunih i staničnih poveznica (Carabotti i sur., 2015). Mikrobiom čovjeka predstavlja kompleksnu mikrobnu zajednicu u kojoj su autohtono prisutne brojne vrste mikroorganizama, dakle bakterija, arhea, virusa i eukariotiskih mikroba koji su dio mikrobiote prisutne i na drugim djelovima našeg tijela. Prisutni mikrobi mogu uvelike pridonijeti zdravlju i bolesti organizma kroz svoje različite metaboličke funkcije, zaštite protiv patogenih, direktnog ili indirektnog utjecaja na psihološke funkcije te "edukaciji" samog imunološkog sustava. Sastav same mikrobne populacije se identificira najčešće skevencioniranjem 16S rRNA gena te usporedbom sa taksonomskim odrednicama u bazi podataka. Porast prikupljenih informacija o sastavu mikrobioma čovjeka posljednjih godina je proizašao iz rezultata istraživanja dvaju međunarodnih znanstvenih projekata MetaHIT i NIH HMP. Zdrava odrasla osoba (iako ta vrijednost može varirati) sadrži u svom mikrobiomu 1000 bakterijskih vrsta koje pripadaju relativno slabo poznatom koljenu bakterija zajedno sa dominantnim koljenom bakterija *Bacteroides* i *Firmicutes*. Sastav crijevne mikrobiote uvelike utječe na fiziologiju čovjeka, a narušene promjene mikrobiote nazivamo

disbiozom. Osim potencijalnog utjecaja crijevne mikrobiote na kardiovaskularne bolesti i infekcije poseban naglasak je stavljen na upalnu bolest crijeva odnosno na bolest koja je posljedica djelovanja okoliša i genetskih čimbenika. Kao primjer takvih bolesti se može navesti Crohnova bolest te ulcerozni kolitis (Shreiner i sur., 2015). Pretpostavka je o ulozi probiotičkih sojeva u suzbijanju neurodegenerativnih poremećaja koji se nude kao obećavajući pristup. Zahtjev ovlaštenih institucija da se buduća istraživanja koja su usmjerena na mehanizam djelovanja i moguće nuspojave postave kao temelj za terapiju probiotičkim mikroorganizmima (Mohajeri i sur., 2018).

2.3. MIKROBIOM I ALZHEIMEROVA BOLEST

Na temelju znanstvenih zapažanja može se zaključiti da je sastav intestinalne mikrobiote povezan s velikim brojem različitih bolesti i sindroma čija brojka raste preko 25. Rezultati takvih istraživanja uvelike mogu biti korisni za razumijevanje uzročno posljedične bolesti poput AB te za njihovo praćenje i razvitak. Prema rezultatima istraživanja sve je više dokaza u prilog da se intestinalna mikrobiota može istraživati kao personalizirani ljudskim organ sa metaboličkim aktivnostima te genomom koji kada se zbroji sadrži više od 3 milijuna jedinstvenih gena. Veliki broj intestinalnih mikroorganizama izoliran je na selektivnim hranjivim medijima u obliku poraslih kolonija te se studije samog mikrobioma provode iz uzoraka fecesa. Mikrobiom čovjeka se razvija od samog rođenja te je on u životu odraslih vrlo individualiziran, vremenski stabilan te sličan u monozigotnim blizancima i genetski srodnim subjektima. Na temelju tehnologija nove generacije provedena je kvantitativna analiza koja je prikazala da ljudski mikrobiom sadrži više od 1000 različitih prokariotskih vrsta koje pripadaju ograničenom kompletu unutar desetak odjeljaka gdje dominiraju Gram-pozitivni anaerobi. Unatoč brzom razvoju NGT sekvencijskih sustava, analize utemeljene na dubokom metagenomskom sekvencioniranju i dalje je skupo, dugotrajno i prilično zahtjevno bioinformatički glede skladištenja podataka. Danas se većina studija usredotočila na 1,5-kb bakterijske 16S rRNA sekvence gena koje su dobri filogenetski uspostavljeni markeri. Detaljna analiza crijevne mikrobiote zdravog subjekta pokazala je da zajedničku jezgru čini preko 450 različitih mikroba unutar koje su dobro poznate vrste rodova *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Colinsella*, *Dorea*, *Eubacterium*, *Parabacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus* i *Streptococcus* spp. Bakterija *Bifidobacterium adolescentis* je dio intestinalne mikrobiote čovjeka. Zdravlje je prema WHO definirano kao stanje potpunog fizičkog, mentalog i socijalnog blagostanja koje nije samo prisutno tijekom odsutnosti bolesti ili slabosti. U nekim slučajevima opsežni i

validirani upitnici koriste pojam kvaliteta života koji na neki način uključuje fizički, socijalni i mentalni aspekt. To je korisno upotrijebiti kod diferencijacije zdravih subjekata koji pate od IBD-a jer kod njih se učestalo pojavljuju promjene koje uključuju os mozak-crijeva. Specifična povezanost samog funkcioniranja i bolesti sa intestinalnim mikrobima dovela je do izrazito velikog broja istraživanja koja su početno rađena na životinjama, ali su prvenstveno fokusirana na čovjeka (Tablica 4.) (de Vos & de Vos, 2012).

Tablica 4. Povezanost sastava intestinalne mikrobiota s različitim poremećajima (de Vos & de Vos, 2012)

Poremećaj	Najrelevantnija zapažanja i potencijalne poveznice
Crohnova bolest	Smanjenje raznolikosti- smanjen <i>F. prausnitzii</i>
Ulcerozni kolitis	Smanjenje raznolikosti- smanjen <i>A.muciniphila</i>
Sindrom iritabilnog crijeva	Globalni znakovi- povećanje <i>Dorea</i> i <i>Ruminococcus</i>
<i>Clostridium difficile</i> infekcija	Izrazito smanjenje raznolikosti- prisutnost <i>C.difficile</i>
Karcinom debelog crijeva	Varijacije <i>Bacteroides</i> spp.- povećanje fusobakterija
Alergija/atopija	Izmijenjena raznolikost- posebni znakovi
Celijakija	Izmijenjenog sastava, značajno u malim intezitetima
Dijabetes tipa 1	Različiti znakovi
Dijabetes tipa 2	Različiti znakovi
Pretilost	Posebni omjeri bakterija (<i>Bacteroides/Firmicutes</i>)

Crohnova bolest te ulcerozni kolitis su bolesti koje su povezane sa genetičkim predispozicijama pojedinca te su obe povezane sa smanjenjem raznolikosti crijevne mikrobiote. Kada je pristuna Crohnova bolest promatrana bakterija kao biomarker je bila *Faecalibacterium prausnitzii* te je zabilježen smanjen broj tih bakterija kao i protuupalno svojstvo toga anaerobnog proizvođača anaerobnih butirata u modelu miša. Razina mukozne bakterije *Akkermansia muciniphila* je 10 puta smanjena kod pacijenta s Crohnovom bolesti dok je kod pacijenta s ulceroznim kolitisom smanjena 100 puta. Smatra se da ta bakterija pridonosi

imunološkom sustavu te funkciji same crijevne barijere u modelu miša. Karcinom debelog crijeva je u nekim slučajevima povezan s kolitisom. Smatra se da dijetna komponenta poput nitrata koji je prekursor za kancerogene nitrosamine, može prevesti u kancerogeni sastojak djelovanjem enzima intestinalne mikrobiote, te stoga može uzrokovati početak karcinoma debelog crijeva. Današnja istraživanja svakodnevno pridonose razvoju novih metoda i principa koji trenutno nisu primjenjivi na ljudima jer se mikrobiota čovjeka i miša razlikuju ovisno o regiji GIT, biološkom okolišu, fizikalno-kemijskom okolišu. AB, Parkinsonova bolest te multipla skleroza su također neizlječive bolesti. Istraživanja koja se provode na životinjama provode se često na mutantima istih, životinjama tretiranim antibioticima, divljeg tipa te na laboratorijskim životinjama koje nemaju prisutne mikroorganizme na svom tijelu (germ-free) (de Vos & de Vos, 2012). Povećanje permeabilnosti crijeva i krvno-moždane barijere inducirane mikrobiotskom disbiozom može posredovati AB i drugim neurodegenerativnim poremećajima, posebno onima povezanim sa starenjem. Bakterijska populacija crijevne mikrobiote može izlučivati velike količine amiloida i lipopolisaharida koji mogu pridonjeti modulaciji signalnih puteva i proizvodnji protuupalnih citokina povezanih sa patogenezom AB. Neuravnotežena crijevna mikrobiota može izazvati upalu povezanu s patogenezom pretilosti, dijabetes melitusom tipa 2 te AB. Studije koje su provedene kako bi objasnile koja je uloga crijevne mikrobiote na kognitivna svojstva ili AB uključuju korištenje germ-free životinja, antibiotika, probiotika, mikrobnih infekcija i fekalne transplantacije mikrobiote.

2.3.1. Istraživanja na Germ-free životinjama

Germ-free (GF) životinje su uzgojene u sterilnom okolišu u gnotobiotičkim uvjetima koji uklanjaju mogućnost poslije porođajne kolonizacije mikrobioma. GF miševi koji su tako uzgojeni su pokazali deficit na prostornoj i radnoj memoriji i smanjenu ekspresiju BDNF-a u hipokampusu. BDNF je neutrofin koji je važan za sinaptičku plastičnost i kognitivne funkcije te je utvrđeno da je prisutan u nižim koncentracijama u mozgu i serumu pacijenata s AB te je povezan sa A β teretom. Neufeld i suradnici su na temelju istraživanja razlike u ekspresiji mRNA BDNFa kod muških i ženskih GF miševa došli do zaključka da je ekspresija BDNFa kod ženskih GF miševa veća u odnosu na muške GF miševe. Rezultati ukazuju na to da je ekspresija BDNFa povezana sa spolom GF miševa. Sudo i suradnici su ustanovili smanjene ekspresije N-metil-D-aspartat (NMDA) receptor 2A (NR2A) mRNA u korteksu i hipokampusu GF miševa u usporedbi s specifičnim miševima bez patogena. Spomenuti receptor igra ključnu

ulogu u sinaptičkoj plastičnosti i kognitivnim funkcijama. Na temelju zajedničkih istraživanja GF miševi pokazuju korisnost u objašnjenju temeljnog mehanizma osi mikrobiota-mozak.

2.3.2. Modulacija sastava intestinalne mikrobiote utjecajem različitih čimbenika

Antibiotička terapija primjer je jednog od najčešće uočenih uzroka intestinalne disbioze koja se očituje smanjenjem zastupljenosti i bioraznolikost crijevne mikrobiote u eksperimentalnim životinjama. Dugotrajni tretmani antibioticima širokog spektra induciraju perturbacije u mikrobnoj zajednici, smanjuju taloženje A β plakova, atenuiraju plak lokalnu glia reaktivnost i značajno mijenjaju morfologiju mikrogena u mišjem modelu AB. Buduća istraživanja s antibioticima kod ljudi opravdano trebaju istražiti ulogu crijevne mikrobiote na funkcioniranje mozga (Jiang i sur., 2017). Nasuprot gore navedenom, probiotičke bakterije se intenzivno istražuju s ciljem definiranja njihove primjene u manipulaciji sastava narušene intestinalne mikrobiote. *Lactobacillus* i *Bifidobacteria* su dva važna probiotička roda bakterija koji se koriste kod istraživanja utjecaja probiotika na zdravlje domaćina. *Lactobacillus brevis* i *Bifidobacterium dentium* su bakterije koje preko metabolizma glutamata proizvode γ -aminobutiričnu kiselinu (GABA) koja je glavni inhibitor neurotransmitera u ljudskom središnjem živčanom sustavu (CNS). Obdukcijom kortikalnog područja kod pacijenta s AB vidljiva je smanjena frontalna, temporalna i parientalna/tjemena koncentracija GABA. Osim pozitivnog utjecaja probiotika neki od njih imaju i negativan utjecaj poput *Citrobacter rodentium* koja svojom prisutnošću mijenja mikrobiotu i uzrokuje, kod miševa, oštećenje pamćenja uzrokovano stresom. Navedena infekcija se može izliječiti primjenom dnevnog tertmana probiotika (*L.rhamnosus* (R0011) + *L.helveticus* (R0052)).

2.3.3. Transplantacija fekalne mikrobiote

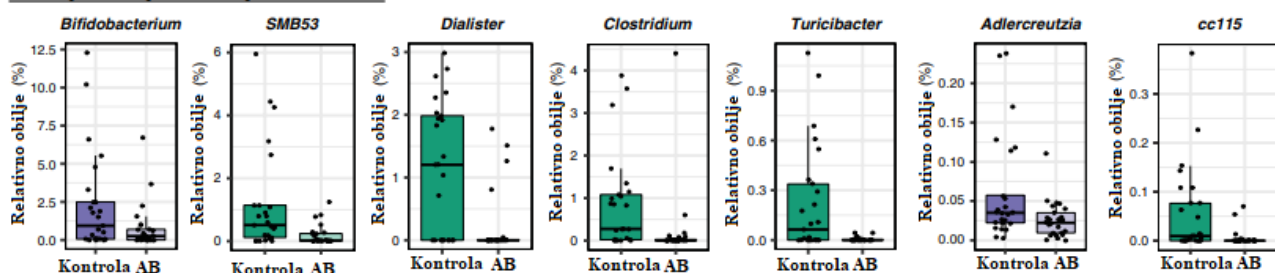
TFM je ekstremni postupak zamjene ili nadopunjavanja crijevne mikrobiote kod bolesnih pojedinaca sa mikrobiotom zdravih pojedinaca. Izrazito efektivna terapija za tretiranje pacijenata zaraženih *Clostridium difficile*. Keller i suradnici su otkrili da fekalna transplatacija iz pretilih miševa čija je mikrobiota narušena primjenom antibiotika inducira značajnu i selektivnu disrupciju u istraživačkom, kognitivnom i stereotipnom ponašanju. Istraživanje je provedeno u konvencionalnom smještaju kontrolnih miševa na dijeti, neovisno o tjelesnoj težini. Iako se transplantacija fekalne mikrobiote čini drastičnim tretmanom, promjena

kompozicije crijevne mikrobiote može pozitivno utjecati na spoznaju ili patologiju AB. Nedavna studija je pokazala da crijevna mikrobiota iz pacijenata koji imaju Parkinsonovu bolest potiče povećanje motorne disfunkcije u usporedbi sa mikrobiotom zdravih kontrola.

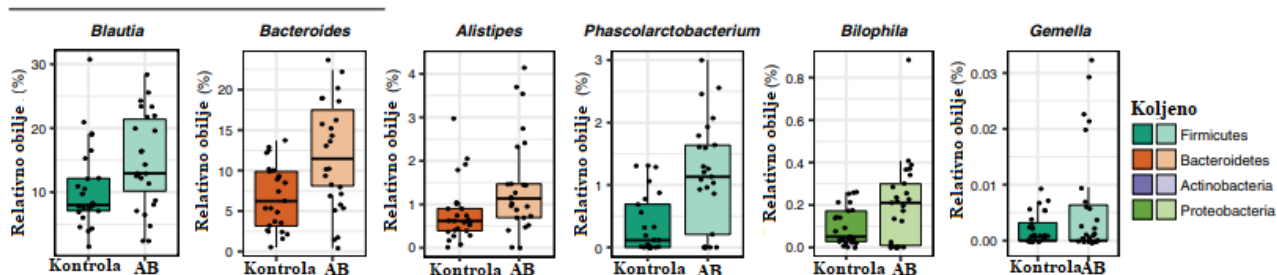
Povezanosti starosne dobi i pojave AB ima ulogu prilikom incidencije ove bolesti. Kako se crijevna mikrobiota mijenja sa starenjem tako se mijenja i broj bakterija koje imaju poželjan učinak poput *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroidetes*. Srž same mikrobiote sadrži vrste iz tri obitelji: *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*. Osim toga postoje i bakterije koje su nepoželjne te se njihova prisutnost u mikrobioti povezuje s učestalijom pojavom određenih bolesti (Jiang i sur., 2017). Najnovija istraživanja na glodavcima upućuju da promjene u sastavu crijevne mikrobiote mogu pridonositi taloženju amiloida no nije poznato da li je takva promjena prisutna i kod ljudi. Kod sudionika oboljelih od AB smanjila se mikrobiološka raznolikost te je uočena smanjena zastupljenost reda *Firmicutes*, povećana reda *Bacteroides* i smanjenja reda *Bifidobacterium* u mikrobiomu oboljelih. Da bi ustanovili povezanost između intestinalne mikrobiote i AB patologije kao mjera se koriste biomarkeri cerebrospinalne tekućine. Istraživanja su provedena na 25 zdravih (kontrolna skupina) i 25 sudionika koji su oboljeli od AB (Vogt i sur., 2017).

U istraživanjima su korišteni fekalni uzorci svakog pojedinog sudionika koji su dobiveni i sakupljeni u prostoru u kojem žive odnosno iz njihovog doma. Provedeno je sekvencioniranje 16S rRNA bakterija izoliranih iz fecesa oboljelih od AB i zdrave kontrole. Sastav mikrobiote svih sudionika se ne razlikuje značajno štoviše prevladava koljeno *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (74% kod kontrole te 15% kod oboljelih u odnosu na ukupnu vrijednost) te s nižim doprinosom *Actinobacteria* (2,6%), *Verrucomicrobia* (2,6%) i *Proteobacteria* (1,1%). Najzastupljenije bakterijske obitelji za sve sudionike su bile *Lachnospiraceae* (39,1%), *Ruminococcaceae* (29,6%), *Bacteroidaceae* (9,8%), *Verrucomicrobiaceae* (2,6%), *Clostridiales* (1,9%) i *Bifidobacteriaceae* (1,5%). Sastav crijevne mikrobiote bila je karakterizirana korištenjem tradicionalnih ekoloških mjera uključujući bogatstvo (broj jedinstvenih OTUs prezentiranih u sudionicima), alfa raznolikost (bogatstvo i obilje OTUs svakog sudionika) i beta raznolikost (sličnosti i razlike u kompoziciji između samih sudionika). Spomenuta analiza primarno je identificirala 13 rodova čije je obilje između oboljelih od AB i zdrave kontrole različito (Slika 5.) (Vogt i sur., 2017).

U manjem izobilju kod oboljelih od AB



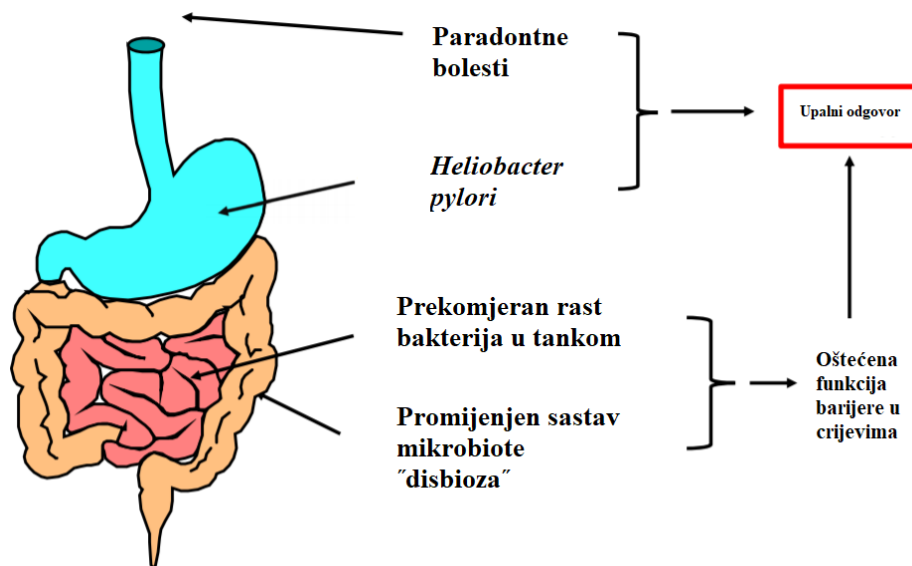
U većem izobilju kod oboljelih od AB



Slika 5. Različita zastupjenost 13 različitih rodova između oboljelih od AB i zdrave kontrole (Vogt i sur., 2017)

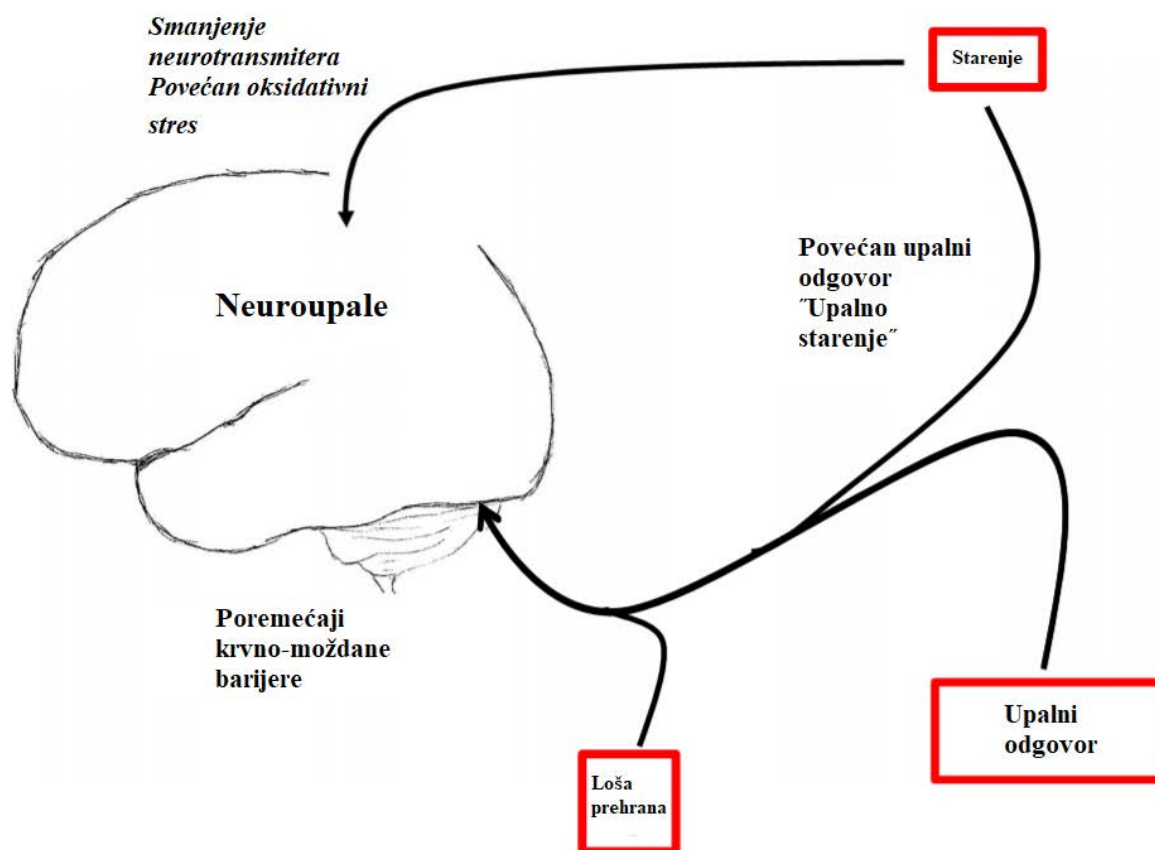
Smanjena raznolikost u ovom istraživanju su rezultati koji su uglavnom usporedivi s rezultatima analize mikrobioma kod oboljelih od drugih bolesti koje su isto tako povezane s crijevnom mikrobiotom poput pretilosti, dijabetesa, Parkinsonove bolesti te upalne crijevne bolesti. Osim kod oboljelih od AB povećanje broja bakterija iz roda *Bacteroidetes* vidljivo je i kod pojedinaca oboljelih od dijabetesa tipa 2 te kod pacijenata oboljelih od Parkinsonove bolesti (Vogt i sur., 2017). Na Sveučilištu Lund u Švedskoj provedena su nova istraživanja koja su ukazala da određeni sastav intestinalne mikrobiote utječe na progresivan razvoj AB. Istraživanja Švicarskih znanstvenika u suradnji s timovima u Njemačkoj i Belgiji dobiveni su zanimljivi rezultati. U istraživanjima su korišteni zdravi i skupina miševa oboljela od Alzheimerove bolesti gdje su znanstvenici otkrili da oboljeli miševi imaju i drugačiji sastav crijevne mikrobiote. GF miševi imali su značajno manju pojavu amiloidnih plakova u mozgu u odnosu na zdrave miševe. Bakterije kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhimurium*, *Bavillus subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Staphylococcus aureus* samo su neke od bakterija koje proizvode funkcionalna ekstracelularna vlakna. One mogu stupati u interakciju s okolišom na mnogo različitih načina. Primjerice endotoksin *Escherichie coli* omogućuje formiranje A β fibrila u *in vitro* uvjetima te zbog toga može biti uključena u patogenezu AB (Harach i sur., 2017). Utjecaj na smanjenje amiloidne proizvodnje mogu imati i određene hranjive tvari odnosno pravilna prehrana. Provedeno je istraživanje u kojem su klinički i kognitivno zdravi pojedinci sa i bez čimbenika povezanih s rizikom

nastajanja AB slijedili prehrambeni plan koji je bio obilježen visokim unosom integralnih žitarica, svježeg voća, povrća, mahunarki, ribe, mliječnih proizvoda s niskim udjelom masti i niskim unosima rafiniranih šećera, masnih mliječnih i drugih proizvoda i prerađenog mesa. Pojedinci su pokazivali nižu akumulaciju A β u mozgu i ubrzani metabolizam glukoze. Isto tako nekoliko studija je objasnilo pozitivan učinak prirodnih fenola iz biljne hrane poput zelenog čaja, crvenih bobica, začina, ekstra djevičanskog maslinovog ulja, crvenog vina i aromatičnog bilja u smanjenju amiloidne agregacije i učestalosti amiloidnih bolesti (Pistollato i sur., 2016). Pokazano je da Mediteranska dijeta reducira rizik AB tako što djeluje pozitivno na crijevnu mikrobiotu. Biljna prehrana bogata voćem i povrćem i visokim udjelom vlakana mijenja sastav naše mikrobiote što utječe na smanjenje *Bacteroides* bakterija i potiče rast vrsta *Prevotella*. Iste nepoželjne vrste *Bacteroides* se inhibiraju konzumacijom polifenola iz spomenutog zelenog i crnog čaja (Ellison, 2018). Primjena ranije spomenutih probiotika isto tako može pridonjeti prevenciji nastanka raznih bolesti povezanih s crijevnom mikrobiotom. Upalni odgovor javlja se kao posljedica djelovanja crijevnih bakterija prilikom čega dolazi do aktivacije imuniteta kroz defektne barijere crijeva. On narušava krvno-moždanu barijeru i potiče neuro-upalu odnosno neuralnu ozljedu i degeneraciju (Slika 6.) (Quigley, 2017).



Slika 6. Hipoteze o mogućim izvorima upala kod neurodegenerativnih poremećaja (Quigley, 2017)

Starenje, upalni odgovor te loša prehrana su čimbenici koji na različite načine mogu utjecati na neuroupale što posljednično uzrokuje poremećaj krvno-moždane barijere i smanjenje neurotransmitera kao i povećan oksidativni stres (Slika 7.) (Quigley, 2017).



Slika 7. Konvergencija crijevnog upalnog odgovora, starenja i loše prehrane u razvoju neuroupale (Quigley, 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom diplomskom radu korištni su autohtoni sojevi *Lactobacillus brevis* SF9B i *Lactobacillus plantarum* SF9C koji su izolirani iz kiselog kupusa te su detaljno istraženi i okarakterizirani kao probiotički sojevi u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Tablica 5.).

Navedeni sojevi su pohranjeni u Zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Sojevi se čuvaju pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola.

Tablica 5. Bakterijski sojevi korišteni u ovom diplomskom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus brevis</i>	SF9B	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	SF9C	MRS, 37 °C, anaerobno

3.1.2. Hranjive podloge

Za održavanje, čuvanje, uzgoj i selekciju korištene su optimalne hranjive podloge za bakterije mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus*:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) kruta hranjiva podloga sastava: pepton 15,0 g/L; mesni ekstrakt 3,0 g/L; kvašćev ekstrakt 5,0 g/L; glukoza 20,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L; MgSO₄·7 H₂O 0,05 g/L; MnSO₄·7 H₂O 0,05 g/L; natrijev-acetat 5,0 g/L; agar 20,0 g/L, u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge je 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.

- MRS bujon je jednakog sastava kao MRS agar, samo bez dodatka agara.

Za određivanje ukupnog broja živih bakterija korišten je hranjivi agar:

- HA (hranjivi agar), sastava (g/l destilirane vode): pepton 15 g/L; mesni ekstrakt 3,0 g/L; NaCl 5 g/L; K-fosfat 0,3 g/L; agar 18,0 g/L. pH podloge je 7,3, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta
- HB (hranjivi bujon) je istog sastava kao hranjivi agar, ali bez dodatka agara.

Za selekciju broja koliformnih bakterija korištena je selektivna podloga za koliformne bakterije:

- VRBG (Violet Red Bile Glucose) agar sastava: pepton 7,0 g/L; kvašćev ekstrakt 3,0 g/L; natrijev-klorid 5 g/L; žučne soli 1,5 g/L; glukoza 10,0 g/L; neutralno crvenilo 0,03 g/L; kristal violet 0,002 g/L; agar 15,0 g/L, u destiliranoj vodi. Zagrijati do kuhanja i ohladiti do 45-50 °C.

3.1.3. Kemikalije

U ovom eksperimentalnom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- 100 bp DNA Ladder, „Invitrogen“, SAD
- ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit
- agaroz, „Appligane“, Strasbourg, Francuska
- akrilamid/bisakrilamid (40%), „BioRad“, SAD
- aluminijev klorid
- APS, „Kemika“, Hrvatska
- Dcode dye solution, „BioRad“, SAD
- destilirana voda
- D-galaktoza
- EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix - (2x Premix), „Takara“, Japan
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim, Njemačka
- fiziološka otopina
- Formamid, „BioRad“, SAD
- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska
- HDA1 i HDA2 specifične početnice
- Lizozim, „Eurobio“, Francuska

- Maxwell Cell DNA eluacijski pufer, „Promega“, SAD
- Maxwell[®] DNA Cell kit, „Promega“, SAD
- Maxwell[®] DNA Tissue kit, „Promega“, SAD
- TAE, „BioRad“, SAD
- TE pufer
- TEMED, „Sigma“, SAD
- Urea, „BioRad“, SAD
- Voda, „Takara“, Japan
- λ HindIII DNA standard, „Fermentas“, Kanada

3.1.4. Aparatura i pribor

U ovom eksperimentalnom radu korištena je sljedeća aparatura i pribor:

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- automatski četverokapilarni uređaj ABI PRISM 3100 Avant DNA Genetic Analyser (Applied Biosystems, SAD)
- BioSpec Nano, „Shimatzu“, Japan
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- DGGE system, „BioRad“, SAD
- Eppendorf kivete
- epruvete
- Kadica za DNA elektroforezu, „BioRad“, SAD
- kivete od 15 i 50 ml
- magnetska miješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- Maxwell[®] 16 Research System instrumentu „Promega“, SAD
- Nastavci za automatske pipete
- PCR uređaj, „Applied Biosystems“, SAD
- Petrijeve zdjelice
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- pinceta
- Power supply „BioRad“, SAD

- Sonopuls mini20 „Bandelin“, Njemačka
- Stalci za eppendorf kivete
- Stalci za epruvete
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- Transiluminator Mini BIS Pro, „DNT“, Izrael
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- vibro-mješač EV-100, „bioSan“, Latvija
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Probiotički sojevi su čuvani pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije ekperimenta probiotički sojevi su inokulirani u svježu optimalnu hranjivu podogu te inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u Tablici 5.

3.2.2. Priprema bakterijske suspenzije i intragastrično kaniliranje štakora

Potencijalni probiotički sojevi *Lactobacillus brevis* SF9B i *Lactobacillus plantarum* SF9C uzgojeni su preko noći u anaerobnim uvjetima pri 37 °C u de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Biolife, Italija) bujonu, nakon čega je slijedilo centrifugiranje („Eppendorf 5804R“, SAD) i suspendiranje taloga stanica u 0,5 mL fiziološke otopine. Broj živih mikroorganizama u priređenoj bakterijskoj suspenziji određen je indirektnom metodom. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri 37 °C izbrojane su porasle kolonije te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU/ml).

Ekperiment probiotičke intervencije na modelu štakora te prikupljanje uzoraka fecesa se provodilo na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. U trbušnu šupljinu 3 štakora je svaki dan tijekom 28 dana injektirano 0,5 mL otopine AlCl₃ (10 mg/kg) i D-galaktoze (60 mg/kg) u svrhu izazivanja

Alzheimerove bolesti. Skupina zdravih štakora je, svaki dan tijekom istog vremenskog perioda, primala 0,5 mL fiziološke otopine.

U cilju ispitivanja utjecaja probiotika na intestinalnu mikrobiotu skupine štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest i zdravi štakori su kanilirani probiotičkom suspenzijom sojeva *Lactobacillus brevis* SF9B i *Lactobacillus plantarum* SF9C tijekom 5 dana, te su u obje skupine prikupljeni fecesi prije početka tretmana (0. dan) te treći i deseti dan nakon završetka kaniliranja s čiste stelje unutar 2 h nakon premještanja štakora u čisti kavez. Provedena je mikrobiološka analiza uzoraka fecesa na selektivnim hranjivim podlogama, te je izolirana ukupna DNA u svrhu analize sastava ukupne intestinalne mikrobiote i za provođenje DGGE analize s ciljem provjere prisutnosti probiotičkih sojeva u fecesima zdravih i fecesima štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest nakon provedenog probiotičkog tretmana (Tablica 6.).

Tablica 6. Skupine štakora, plan tretmana u probiotičkom eksperimentu i prikupljanje uzoraka fecesa. Uzorci fecesa zdravih štakora koji su tijekom 5 dana primali probiotik su označeni početnim slovom K, a štakora kojima je izazvana Alzheimerova bolest koji su tijekom 5 dana primali probiotik slovom A.

skupina (kavez)	$AlCl_3$ + D-galaktoza/ fiziološka otopina	kaniliranje probiotikom	Prikupljanje fecesa
$AlCl_3$ 10 mg/kg+ D-galaktoza 60 mg/kg	Tijekom 28 dana	jednom dnevno tijekom 5 dana	Prije kaniliranja
			3 dana nakon kaniliranja
			10 dana nakon kaniliranja
Kontrola (fiziološka otopina)	Tijekom 28 dana	jednom dnevno tijekom 5 dana	Prije kaniliranja
			3 dana nakon kaniliranja
			10 dana nakon kaniliranja

3.2.3. Provjera broja bakterija u fecesu štakora na selektivnim hranjivim podlogama

100 mg fecesa štakora suspendirano je u 900 μ L fosfatnog pufera (pH=7,4). Pripremljena su razrijeđenja suspenzije do 10^{-10} , a ukupan broj živih bakterija određen je indirektnom metodom na hranjivom agaru (Biolife, Italija), broj BMK na MRS agaru, a broj koliformnih bakterija na selektivnoj podlozi za koliformne bakterije (VRBG agar).

3.2.4. Izolacija i analiza ukupne DNA iz fecesa štakora

Fecesi (100 mg) su suspendirani u 1 mL fiziološke otopine te je nakon uklanjanja taloga, netopljivih ostataka fecesa i stelje, supernatant centrifugiran 10 min pri 13000 o/min. Talog stanica resuspendiran je u 400 μ L otopine lizozima (5 mg/mL) u TE puferu. Tako pripremljen uzorak je uronjen u led kako bi se spriječilo zagrijavanje uzorka tijekom sonikacije na uređaju Sonopuls mini20 (Bandelin, Njemačka) u 3 ciklusa po 30 sa po 15 s pauze između ciklusa. DNA je izolirana iz ukupnog volumena pripremljenog uzorka u Maxwell[®] 16 Research System instrumentu (Promega, SAD) primjenom odgovarajućeg Maxwell[®] DNA Tissue kita. Koncentracija DNA je izmjerena uređajem Biospec-nano (Shimadzu, Japan). Uzorci izolirane DNA su poslani na Illumina MiSeq sekvencioniranje, a ostatak je pohranjen na -20°C za daljnje analize. Dobiveni rezultati sekvencioniranja mješovite DNA u fasta formatu su analizirani pomoću bioinformatičkog QIIME (eng. Quantitative Insights Into Microbial Ecology) programa u suradnji s Kabinetom za bioinformatiku Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2.5. PCR-DGGE -gel elektroforeza u gradijentu denaturirajućeg agensa

Uzorkovani fecesi štakora (100 mg) suspendirani su u 900 μ L fosfatnog pufera (pH=7,4) a zatim je 100 μ L tako priređene suspenzije nacijepljeno na MRS hranjivi agar. Nakon 48 h inkubacije, porasle bakterijske kolonije su resuspendirane u 400 μ L otopine lizozima (5 mg/mL) u TE puferu. Tako pripremljeni uzorci su uronjeni u led tijekom sonikacije koja se provodi pomoću uređaja Sonopuls mini20 (Bandelin, Njemačka) u 3 ciklusa po 30 sa po 15 s pauze između ciklusa. Izolacija DNA u tako pripremljenom uzorku provedana je automatski u

u Maxwell® 16 Research System uređaju (Promega, SAD) primjenom Maxwell® DNA Cell kita. Koncentracije DNA u uzorcima su izmjerene uređajem Biospec-nano (Shimadzu, Japan)

Izolacija kromosomske DNA odabranih *Lactobacillus* sojeva je provedena prema prethodno opisanoj metodi primjenom Maxwell® DNA Cell kita, nakon čega je izmjerena koncentracija DNA pomoću BioSpec Nano uređaja, pri čemu je kao slijepa proba korišten TE pufer. Nakon toga je provedena PCR reakcija za DGGE (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) s univerzalnim bakterijskim početnicama HDA1 (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') i HDA2 (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3') prema uvjetima prikazanim u Tablici 7. Kao negativna kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica korišten je uzorak bez DNA. Kao DNA standard korišten je λ DNA HindIII (Fermentas, Canada) i 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD). Dobiveni PCR produkti su razdvojeni u 1%-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 200 V. Gel je obojan u etidijevom bromidu i vizualiziran na transiluminatoru pri valnoj duljini s Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012) (Tablica 7.).

Tablica 7. Uvjeti provođenja PCR reakcije s univerzalnim HDA1 i HDA2 početnicama za DGGE

Broj ponavljanja	T (°C)	Vrijeme	Korak
1	95	3 min	inicijalna denaturacija
35	95	30 s	denaturacija
	58	30 s	sparivanje
	72	40 s	polimerizacija
1	72	5 min	završna elongacija

Nakon utvrđivanja prisutnosti PCR produkata DNA elektroforezom provedena je DGGE elektroforeza na poliakrilamidnom gelu gradijenta denaturirajućeg agensa 30-70%. Neposredno prije nanošenja gela u suspenziju je dodano 130 μ L amonijev-persulfata (0,1 g/mL) i 5,8 μ L TEMED-a (BioRad, SAD). U suspenziju gela višeg postotka dodana je plava boja Dcode dye solution (BioRad, SAD). Kao uzorci su korišteni PCR produkti svakog soja, a kao standard združeni sojevi *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C. Nanošenje uzoraka je započelo pri 58 °C, a sama elektroforeza je započela pri 60 °C. DGGE elektroforeza se prvih 10 minuta provodila pri 30 V kako bi se uzorci spustili na dno jažica, a nakon toga 1 sat pri 220 V. Nakon

završene elektroforeze gel je obojan u etidijevom bromidu (0,5 µg/mL) i vizualiziran na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

3.2.6. Izolacija DNA iz DGGE gela i amplifikacija V2-V3 regije 16S rDNA

DNA je izolirana iz vrpce čija migracija na gelu ne odgovara vrpčama standarda kako bi se ustanovilo koji još bakterijski sojevi su prisutni u mikrobioti GIT-a štakora osim primjenjenih sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C. Gel je vizualiziran UV lampom, ciljane vrpce su izrezane i dodane u 30 µL Maxwell Cell DNA elucijskog pufera. Nakon vorteksiranja, uzorci su inkubirani na 4 °C preko noći. Zatim su smrznuti na -80 °C i otopljeni na sobnoj temperaturi tri puta kako bi se olakšala izolacija DNA iz poliakrilamidnog DGGE gela. Gel je centrifugiranjem spušten na dno epice, a supernatant koji sadrži DNA izoliranu iz gela, je korišten kao kalup u PCR reakciji s HDA1 i HDA2 početnicama u cilju umnažanja V2-V3 regije 16S rRNA gena i dobivanja PCR produkta koji su zatim poslani na 16S rDNA sekvenciranje na Institut Ruđer Bošković. Provedena je PCR reakcija prema uvjetima upisanim u 3.2.5. u kojoj je kao kalup korištena DNA izolirana iz DGGE gela. Zatim je provedena DNA elektroforeza PCR produkata kako bi se dokazala uspješnost provedene izolacije DNA iz DGGE gela. Sekvenciranje umnožene V2-V3 regije 16S rDNA je provedeno u DNA servisu Instituta Ruđer Bošković. Korišten je DNA-sekvenator ABI PRISM 3100 Avant DNA Genetic Analyser (Applied Biosystems, SAD), te ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit. ABI PRISM 3100 uređaj se temelji na Sangerovoj dideoksi metodi zaustavljanja sinteze DNA ugradnjom 2', 3'-dideoksinukleotida (ddNTP).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ANALIZA SASTAVA MIKROBNE POPULACIJE PRIMJENOM KLASIČNIH MIKROBIOLOŠKIH METODA

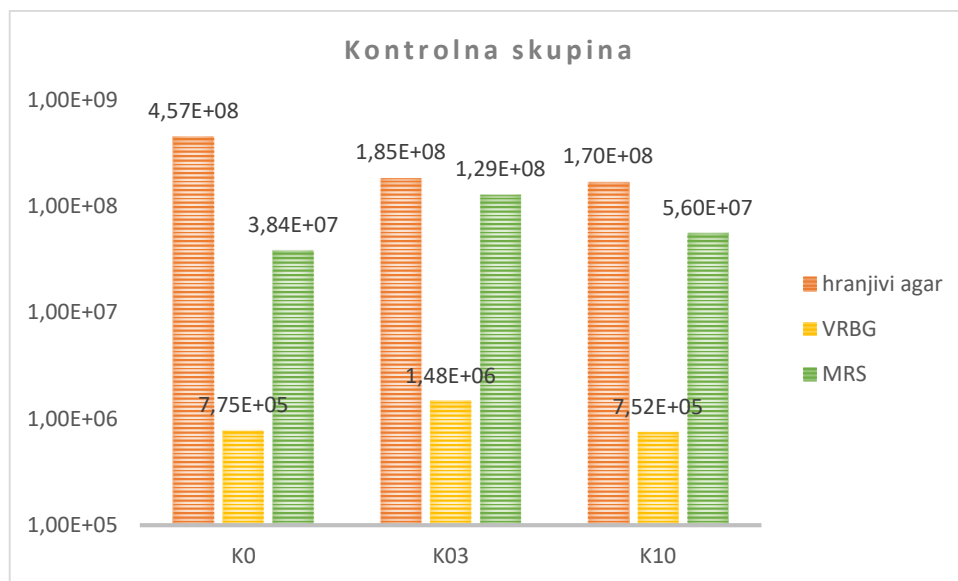
Prema literaturi, pojedina predklinička i klinička istraživanja upućuju na dvosmjernu interakciju duž osi kolon-mozak-mikrobiota (engl. gut-brain-microbiome axis) odnosno na povezanost sastava mikrobioma intestinalnog trakta i razvoja neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove bolesti. Karakterizacija ovih interakcija doprinosi kontinuiranim nastojanjima da se pronađe terapija ili mogućnosti ublažavanja simptoma neizlječive Alzheimerove bolesti (Martin i sur., 2018). Stoga je u ovom radu na modelu eksperimentalnih životinja ispitan utjecaj oralne primjene *Lactobacillus brevis* SF9B, koji eksprimira S-sloj proteina na površini stanice, i *Lactobacillus plantarum* SF9C, koji proizvodi plantaricin, na sastav intestinalne mikrobiote, ali također i na modelu u skupini životinja kojima je inducirana Alzheimerova bolest. Kako se odabrani sojevi intezivno istražuju kao probiotičke bakterije, a funkcionalno svojstvo probiotičkih sojeva je modulacija sastava narušene intestinalne mikrobiote, u ovom istraživanju je skupina eksperimentalnih štakora s izazvanom Alzheimerova bolesti, ujedno i eksperimentalni model narušene ravnoteže intestinalne mikrobiote. U prijašnjim istraživanjima ustanovljeno je da *Lb. brevis* SF9B eksprimira S-proteine lokalizirane s vanjske strane površine bakterijskih stanica, koji su identificirani nakon SDS-PAGE analizom i masenom spektrometrijom pomoću LC/MS (Banić i sur., 2018). Prema istraživanjima S-proteini laktobacila iskazuju zaštitnu ulogu prilikom prolaska bakterijskih stanica kroz simulirane uvjete GIT, sudjeluju u autoagregaciji i koagregaciji, te u adheziji na proteine ekstracelularnog matriksa i glikoprotein mucin, te na humane intestinalne epitelne Caco-2 stanice, no smatra se da ima i imunomodulacijsko djelovanje (Banić i sur., 2018; Uroić i sur., 2016). Ova svojstva mogu doprinosti kolonizacijskom potencijalu probiotičkih sojeva *in vivo*. Primjenom PCR metode sa specifičnim početnicama za plantaricine ustanovljeno je da soj *Lb. plantarum* SF9C sadrži gene odgovorne za biosintezu plantaricina. Nakon sekvencioniranja cijelog genoma, u cilju identifikacije soja, provedena je analiza, te je definiran genomski klaster, odnosno nakupina gena koja sudjeluje u biosintezi plantaricina, primjenom bioinformatičkog alata za detekciju bakteriocina, programskog paketa BAGEL4. Soj SF9C iskazuje bakteriocinska djelovanje prema Gram-pozitivnim test-mikroorganizmima, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048, što je potvrđeno nakon združene kultivacije s navedenim

osjetljivim test-mikroorganizmima. Zbog dokazanih probiotičkih učinaka *in vitro*, dva odabrana soja laktobacila su združena u kokulturu, nakon čega je provedeno *in vivo* ispitivanje preživljavanja u GIT-u, kao važan selekcijski kriterij za iskazivanje funkcionalnosti i mogućnosti kolonizacije na modelu uravnotežene mikrobiote, zdravih štakora i modelu koji predstavlja narušen sastav intestinalne mikrobiote, štakorima kojima je izazvana Alzheimerova bolest, te je ispitan utjecaj na sastav intestinalne mikrobiote štakora. Naime, kako bi mogli iskazati funkcionalnost *in situ* probiotički sojevi, osim nepovoljnih uvjeta tijekom prolaska kroz GIT domaćina, moraju se suočiti s kolonizacijskom otpornošću (engl. colonisation resistance) autohtone intestinalne mikrobiote.

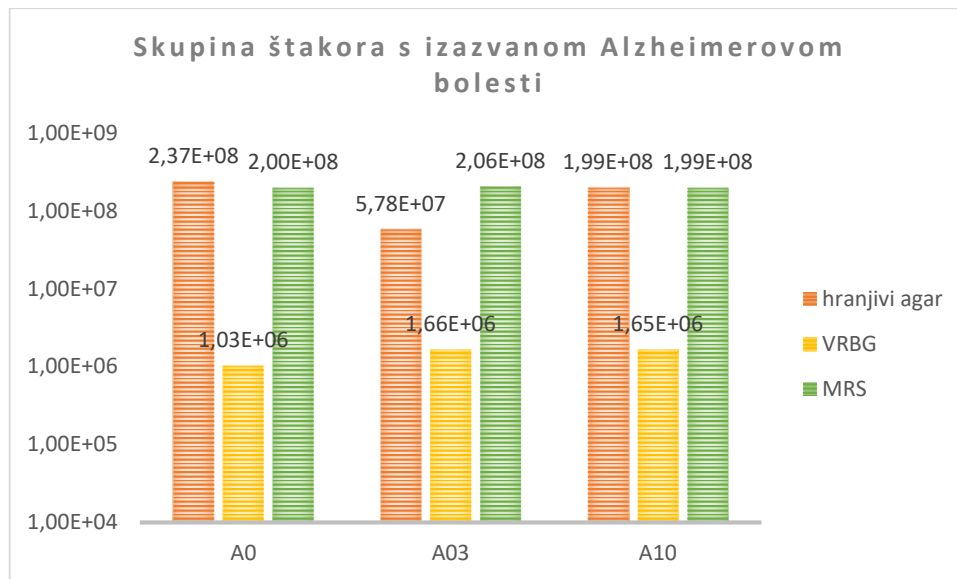
U skupini zdravih i skupini štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest primjenjena je bakterijska suspenzija *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C intragastričnim kaniliranjem jednom dnevno tijekom 5 dana, a zatim su iz uzoraka fecesa klasičnim mikrobiološkim metodama određeni brojevi poraslih kolonija na selektivnim hranjivim podlogama za rast. Rezultati analize broja poraslih kolonija bakterija mliječne kiseline na selektivnoj MRS hranjivoj podlozi, pokazali su da primjena *Lb. plantarum* SF9C i *Lb. brevis* SF9B u skupini zdravih štakora, utječe na povećanje broja poraslih kolonija (CFU/ml), odnosno zastupljenosti BMK u mikrobnoj populaciji fecesa (Slika 8 i Slika 9). Ujedno je određen broj poraslih bakterijskih kolonija inokuliranih iz uzoraka fecesa, na hranjivom agaru za određivanja ukupnog broja poraslih bakterija, ali i na VRBG (Violet Red Bile Glucose) agar koja je selektivna hranjiva podloga za koliformne bakterije odnosno za detekciju Gram-negativnih bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* čiji su predstavnici dio prirodno prisutne populacije intestinalne mikrobiote. Naime, u nedavno objavljenom znanstvenom radu Sorivan i suradnici (2018) su pokazali da prirodno prisutna bakterijska populacija porodice *Enterobacteriaceae* može utjecati na kolonizaciju fungi u debelom crijevu na modelu kolitisa izazvanog kod miševa, a time i pretpostavili da prisutna bakterijska populacija posreduje u manipulaciji sastava intestinalnog mikrobioma domaćina, čime su doprinjeli novim spoznajama o važnosti i funkcionalnim interakcijama taksonomski vrlo udaljenih vrsta u bolestima gastrointestinalnog trakta primjerice u upalnim bolestima crijeva. Ovakvi rezultati mogu upućivati na hipotezu da sastav mikrobiote u skupini štakora kojima je izazvana Alzheimerova bolest, koji je u odnosu na mikrobiotu zdravih životinja narušen, eventualno utječe na različitu zastupljenost BMK u usporedbi sa sastavom mikrobiote u skupini zdravih životinja. Takva hipoteza je u skladu s istraživanjima Haracha i suradnika (2017) koji su ustanovili da je sastav crijevne mikrobiote

transgeničkih APPPS1 miševa drugačiji u odnosu na sastav mikrobiote iz skupine zdravih miševa.

Međutim, kod skupine štakora kojima je izazvana Alzheimerova bolest, u uzorcima fecesa nakon administracije dva *Lactobacillus* soja, određivanjem broja poraslih bakterijskih kolonija na selektivnim podlogama nije uočena značajna promjena u poraslih BMK. Kako se radi o rezultatima mikrobioloških analiza, čijom primjenom se može odrediti broj poraslih bakterijskih kolonija, koje se mogu uzgojiti, slijedeći eksperimenti su provedeni primjenom molekularno-genetičkih metoda. No, klasične mikrobiološke analize ne treba izostaviti, jer je ustanovljeno da analize mikrobiote pomoću metodologija koje zaobilaze korak kultivacije na optimalnim hranjivim medijima za rast, ipak može doći do podcjenjivanja, odnosno do pogreške u broju mikrobnih vrsta koje su manje zastupljene u sastavu mikrobiote domaćina (Hiergiest i sur., 2015).



Slika 8. Broj bakterija (CFU/mL) poraslih na selektivnim hranjivim podlogama iz uzoraka fecesa zdravog štakora prikupljenih neposredno prije kaniliranja probiotikom (K0), 3 dana nakon završetka kaniliranja probiotikom (K03) te 10 dana nakon završetka kaniliranja probiotikom (K10).

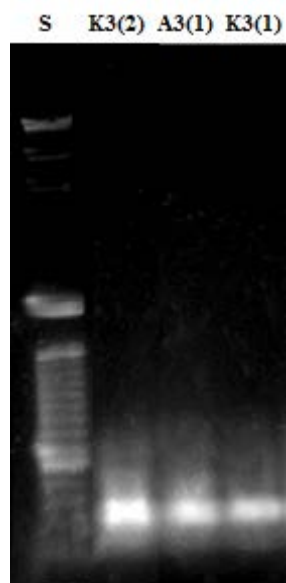


Slika 9. Broj bakterija (CFU/mL) poraslih na selektivnim hranjivim podlogama iz uzoraka fecesa skupine štakora kojima je izazvana Alzheimerova bolest prikupljenih neposredno prije kaniliranja probiotikom (A0), 3 dana nakon završetka kaniliranja probiotikom (A03) te 10 dana nakon završetka kaniliranja probiotikom (A10).

Raspon vrijednosti poraslih kolonija (CFU/mL) koliformnih bakterija određen naciepljivanjem na VRBG hranjiva podloga određen u uzorcima iz skupine zdravog štakora, nije statistički značajno promijenjen u usporedbi s početnom vrijednošću, tri dana i desetog dana od završetka kaniliranja, te je gotovo jednak početnoj vrijednost (7.75×10^5 CFU/mL). Broj poraslih bakterija određen na hranjivom agaru, za određivanje ukupnog broja kolonija, prema očekivanjima, je neposredno prije kaniliranja najveći. Tri dana nakon završetka kaniliranja suspenzijom laktobacila vrijednost ukupnog broja kolonija je i dalje visoka, ali je niža u usporedbi s vrijednošću određenom iz uzoraka na dan intragastričnog kaniliranja. Deset dana nakon kaniliranja suspenzijom laktobacila određen broj poraslih bakterija na hranjivom agaru koji nije značajno promijenjen. Broj koliformnih bakterija određen mikrobiološkom metodom u skupini štakora kojima je izazvan Alzheimer je vrlo sličnih vrijednosti. Vrijednost ukupnog broja bakterija značajno se ne mijenja kao i vrijednost broja koliformnih bakterija (Slika 8 i Slika 9). Isti uzorci su analizirani primjenom molekularno-genetičke metode PCR – DGGE.

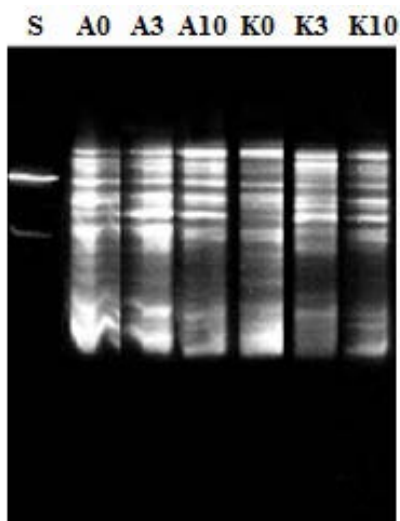
4.2. PRIMJENA DGGE METODE ZA EVALUACIJU KOLONIZACIJSKIH POTENCIJALA *Lactobacillus* SOJEVA *in vivo*

Kako bi se ustanovilo da li oralno primjenjeni, potencijalni probiotički sojevi *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C mogu preživjeti tranzit kroz GIT eksperimentalnih životinja, odnosno štakora, a time i da li imaju mogućnost kolonizacije GIT štakora, primjenjena je PCR-DGGE za analizu prisutne populacije *Lactobacillus* sojeva u uzorcima fecesa štakora kaniliranih suspenzijom kokulture navedenih sojeva. S ciljem amplifikacije ciljane DNA sekvence za primjenom DGGE analizu, V2-V3 regija 16S rDNA gena (na poziciji 339 do 539 kod istog gena bakterije *Escherichia coli*) je umožena korištenjem početnica HDA1-GC (CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGCGGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T-39) i HDA2 (59-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C-39), i to u uzorcima ekstrahirane ukupne DNA iz mikrobioma fecesa eksperimentalnih štakora, ali i uzorcima DNA izolirane iz pojedinačnih bakterijskih kolonija poraslih na selektivnim MRS hranjivim podlogama. Razlog je što je sastav mikrobiote GIT vrlo kompleksan jer sadrži velik broj različitih mikrobnih, a prvenstveno bakterijskih vrsta, stoga su primjenjena dva različita pristupa. U prvom pristupu, koji zaobilazi korak kultivacije prisutne mikrobne populacije na selektivnim hranjivim podlogama za rast, kako je gore već spomenuto, kao uzorak za analizu PCR-DGGE metodom je korištena DNA izolirana iz mikrobioma mikrobne populacije prisutne u fecesu tretiranih štakora kako bi se definirao mogući učinak primjene *Lactobacillus* sojeva na sastav intestinalne mikrobiote, te procijenila mogućnost manipulacije njenog sastava primjenom odabranih *Lactobacillus* sojeva. U drugom pristupu, u prvoj fazi je iz uzorka fecesa provedena kultivacija prisutnih bakterijskih vrsta na MRS hranjivoj podlozi za izolaciju BMK, a zatim je iz poraslih bakterijskih kolonija izolirana DNA za analizu pomoću PCR-DGGE s ciljem evaluacije mogućnosti primjenjenih *Lactobacillus* sojeva da prežive prolazak kroz GIT *in vivo*, a eventualno koloniziraju GIT domaćina, ali da se uspoređi i sastav bakterijske populacije *Lactobacillus* sojeva između tretirane i netretirane skupine štakora. Kako bi se ustanovila uspješnost amplifikacije ciljane sekvence, nakon PCR reakcije, prisutnost PCR produkata, provjerena je DNA elektroforezom (Slika 10).

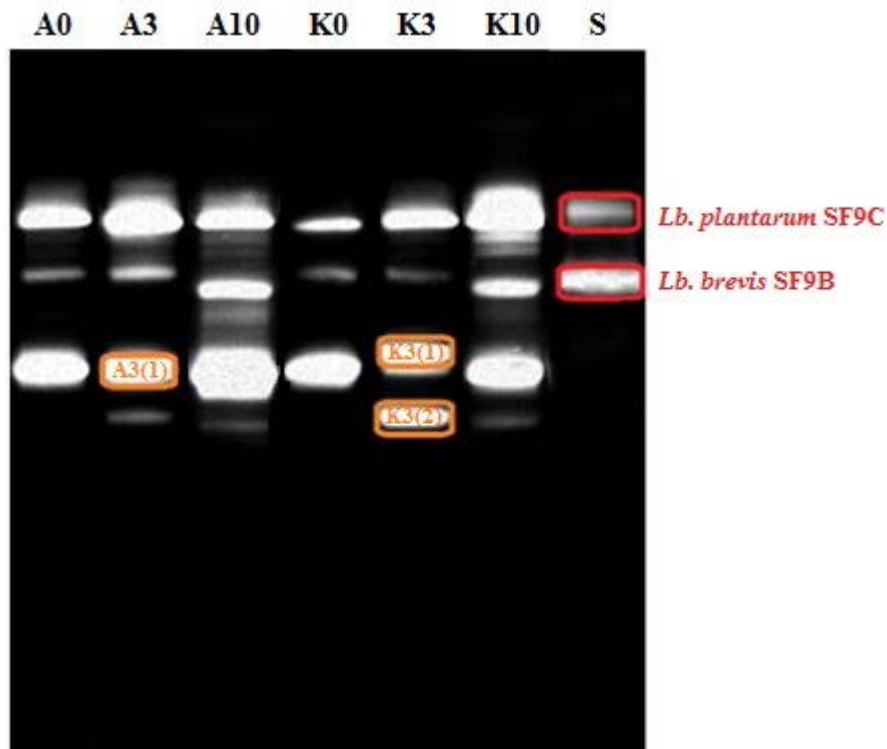


Slika 10. Agarozna DNA elektroforeza PCR produkata umnoženih PCR reakcijom s HDA1/HDA2 početnicama iz DNA pojedinačnih bakterijskih kolonija poraslih na MRS selektivnoj hranjivoj podlozi.

PCR-DGGE profili iz uzoraka DNA ukupne mikrobne populacije prisutne u fecesima štakora, prikazani su na Slici 11., te upućuju na bioraznolikost bakterijske populacije.



Slika 11. Detekcija prisutnosti *Lactobacillus* sojeva u uzorcima fecesa primjenom PCR- DGGE. Oznake uzoraka: Uzorci fecesa iz skupine zdravih štakora koji su primali suspenziju laktobacila (K); uzorci fecesa skupine štakora kojima je izazvan Alzheimer, a koji su primali suspenziju laktobacila (A); brojevi; 0 - uzorak prije hranjenja suspenzijom laktobacila; 3 – 3 dana nakon prestanka hranjenja probiotikom i 10 – 10 dana nakon prestanka hranjenja suspenzijom laktobacila.



Slika 12. PCR-DGGE elektroforeza iz uzoraka DNA kolonija bakterija mliječne kiseline poraslih na MRS hranjivoj podlozi, nakon kultivacije iz uzoraka fecesa eksperimentalnih životinja. Uzorci fecesa iz skupine zdravih štakora koji su primali suspenziju laktobacila su označeni početnim slovom K; skupina štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest koji su primali suspenziju laktobacila slovom A; dok oznake brojeva znače sljedeće; 0 - uzorak prije hranjenja probiotikom; 3 – 3 dana nakon prestanka hranjenja probiotikom i 10 – 10 dana nakon prestanka hranjenja suspenzijom laktobacila.

Nakon PCR-DGGE analize iz odabranih DNA vrpce ekstrahirani su dobiveni PCR produkti, koji su sekvencionirani, a temeljem dobivene sekvence provedena je identifikacija. Slijedovi nukleotidnih sekvenci PCR produkata uspoređeni su s javno dostupnim nukleotidnim sekvencama pomoću BLASTa (engl. Basic Local Alignment Search Tool). Prema PCR-DGGE, DNA vrpce iz svih uzoraka podudaraju se s DNA vrpčama priređenih iz čistih bakterijskih kultura sojeva *Lb. plantarum* SF9C i *Lb. brevis* SF9B, odnosno 16S V2-V3 DNA fragmenti migriraju u DGGE gelu do iste pozicije kao DNA fragmenti u kontroli, pa se može zaključiti, da odabrani sojevi nakon oralne primjene preživljavaju nepovoljne uvjete prisutne GIT eksperimentalnih životinja, a kako su detektirani i u uzorcima uzorkovanim 10 dana nakon prestanka hranjenja štakora suspenzijom laktobacila, može se pretpostaviti da pokazuju i kolonizacijski potencijal. Iz preostalih DNA vrpce koje nisu pokazale podudaranje sa priređenim standardom ekstrahirani su PCR amplikoni i sekvencionirani (Slika 12). Umnažanje

V2-V3 regije 16S rDNA provedeno je PCR reakcijom s HDA1/HDA2 početnicama, a uspješnost umnažanja je provjerena agaroznom DNA elektroforezom. DNA svih uzoraka je uspješno izolirana iz DGGE gela (Slika 12.). PCR amplikoni su sekvencionirani u DNA servisu Instituta Ruđer Bošković, a dobivene sekvence su uspoređene sa sekvencama prisutnim u NCBI (eng. National Center for Biotechnology Information) bazi nukleotidnih sekvenci (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sekvenca K3(2) je pokazala najveću sličnost u NCBI bazi sa vrstom *Lactobacillus reuteri* M7 (95%), sekvenca K3(1) sa sojem *Lactobacillus intestinalis* TH4, a sekvenca A3(1) sa sojem *Lactobacillus animalis* FR12 (Tablica 8). Budući da DGGE elektroforeza omogućuje razlikovanje bakterija na razini vrste razdvajanjem fragmenata DNA u denaturirajućem gradijentu, potpuno je očekivan rezultat identifikacije sva tri uzorka jer su uzorci DNA migrirali uslijed različitog udjela AT i GC parova baza.

Tablica 8. Rezultati BLAST usporedbe sekvenci dobivenih sekvenciranjem PCR produkata DNA izolirane iz DGGE gela sa sekvencama pohranjenim u NCBI bazi podataka.

Uzorak	Identifikacija	Pokrivenost slijeda	E vrijednost	Postotak identifikacije
A3(1)	<i>Lactobacillus animalis</i> FR12	46 %	1e-49	90%
K3(1)	<i>Lactobacillus intestinalis</i> TH4	43%	5e-49	93%
K3(2)	<i>Lactobacillus reuteri</i> M7	43%	3e-55	95%

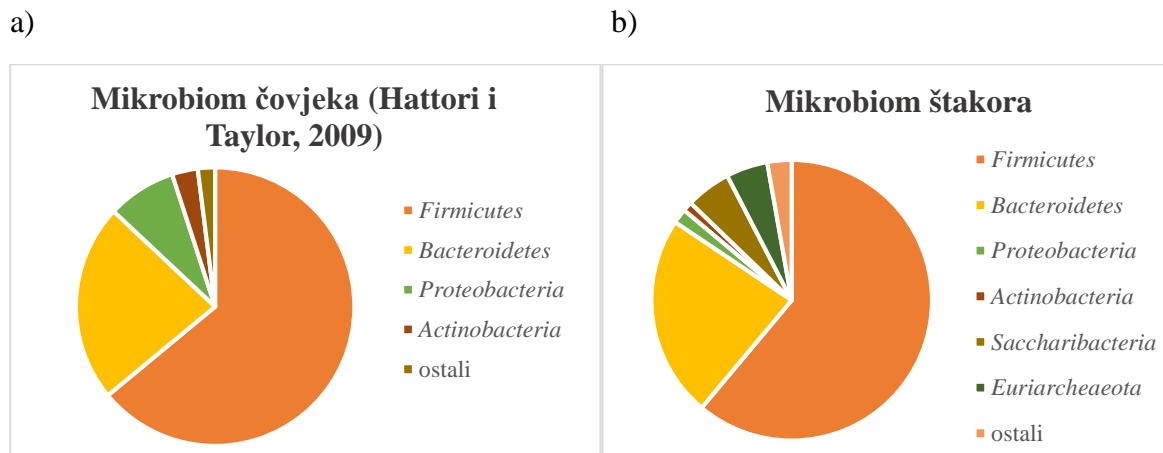
Prisutnost potencijalnih probiotičkih sojeva u intestinalnoj mikrobioti zdravog i štakora s izazvanim Alzheimerom, nakon primjene *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C, ispitana je PCR- DGGE metodom. DGGE metoda je tehnika koja se koristi za razdvajanje kratkih i srednje dugih fragmenata DNA bazirana na njihovom svojstvu taljenja (Strathdee i Free, 2013). Prema rezultatima DGGE analize potvrđena je prisutnost oba potencijalna probiotička soja tijekom tri različita dana uzorkovanja fecesa (0, 3, 10 dana) kod zdravih i u skupini štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest (Slika 12.). DGGE analiza kolonija BMK poraslih na selektivnoj podlozi MRS-u ukazuje na prisutnost *Lactobacillus plantarum* SF9C i *Lactobacillus brevis* SF9B i tijekom tri dana nakon kaniliranja (uzorci A3 i K3). Prisutnost primjenjenih sojeva laktobacila u uzorcima fecesa dokazana je i desetog dana nakon završetka kaniliranja (uzorci A10 i K10) u skupini zdravih i u skupini štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest,

što ukazuje da su se odbarani sojevi pokazuju potencijal kolonizacije GIT-a , jer su detektirani u uzorcima desetog dana nakon prestanka hranjenja. Osim unešenih alohtonih sojeva DGGE analizom je ustanovljena prisutnost i drugih vrsta BMK koji su vjerojatno dio autohtodne populacije (Slika 12.). Primjenom BLAST usporedbe sekvenci dobivenih sekvencioniranjem DNA fragmenata iz DGGE gela sa sekvencama pohranjenim u NCBI bazi podataka provedena je identifikacija, gdje je postotak podudaranja iznosio minimalno 90%. Nepoznate BMK identificirane su *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus intestinalis* te *Lactobacillus animalis*. *Lactobacillus reuteri* je u velikom broju zastupljena u mikrobioti sisavaca te može proizvoditi antimikrobne molekule, mliječnu kiselinu, etanol i specifičnu molekulu reuterin (3-hidroksipropionaldehid) (Mu i sur., 2018). Homofermentativna *Lactobacillus intestinalis* proizvodi D- i L- oblik mliječne kiseline što je fenotipsko svojstvo koja ju razlikuje od ostalih homofermentativnih *Lactobacillus* vrsta te ima niski udio G-C parova baza i ne raste pri 15 °C (Fujisawa i sur., 1990). Soj *Lactobacillus intestinalis* TH4, je pohranjen je u Američkoj Zbirci mikroorganizama pod oznakom ATCC® 49335™ , te je u prijašnjim istraživanjima izoliran iz gastrointestinalnog trakta štakora. *Lactobacillus animalis* je bakterija koja homofermentativnim putem pretežno proizvodi L(+) mliječnu kiselinu.

4.3. ANALIZA SASTAVA INTESTINALNE MIKROBIOTE PRIMJENOM Illumina MiSeq SEKVENCIRANJA

Prema rezultatima Illumina MiSeq sekvenciranja ukupne DNA izolirane iz fecesa sastav mikrobioma fecesa štakora vrlo sličan mikrobiomu fecesa čovjeka (Slika 13.) što ide u prilog provođenju istraživanja u kojima se kao eksperimentalna životinja koristi štakor kao modelni organizam, jer predstavlja ekonomičniji izbor, te omogućuje preliminarna istraživanja, ali i lakši nadzor provedenih eksperimenata s ciljem definiranja utjecaja različitih faktora na mikrobiotu čovjeka. Naime, štakor je prva vrsta sisavaca koja je pripitomljena u znanstvene svrhe. Oni su nedavno korišteni u brojnim istraživanjima koja istražuju povezanost sastava bakterijske populacije mikrobiote i različitih poremećaja, poput raka debelog crijeva, ulceroznog kolitisa, mukozitisa i drugih bolesti. Iako u sastavu mikrobiote čovjeka, prevladavaju bakterije iz koljena *Firmicutes* (64 %), *Bacteroidetes* (23 %), *Proteobacteria* (8 %) i *Actinobacteria* (3 %) (Hattori i Taylor, 2009), ipak prema analizi mikrobioma iz uzoraka fecesa štakora udio navedenih koljena u ukupnom sastavu mikrobiote sličnih vrijednosti. Razlika je u zastupljenosti *Proteobacteria* (1,7 %) u fecesu štakora, dok je udio preostalih koljena bakterija manji od 2 %.

U mikrobioti oba organizma prevladavaju dva koljena *Firmicutes* i *Bacteroidetes* (Franklin i Ericsson, 2018). Baza koljena bakterija prisutnih u mikrobiomu ljudi bogatija je *Proteobacteriama* te ostalim udjelom koljena bakterija koji je u odnosu na štakore veći za 2% (Hattori i Taylor, 2009).

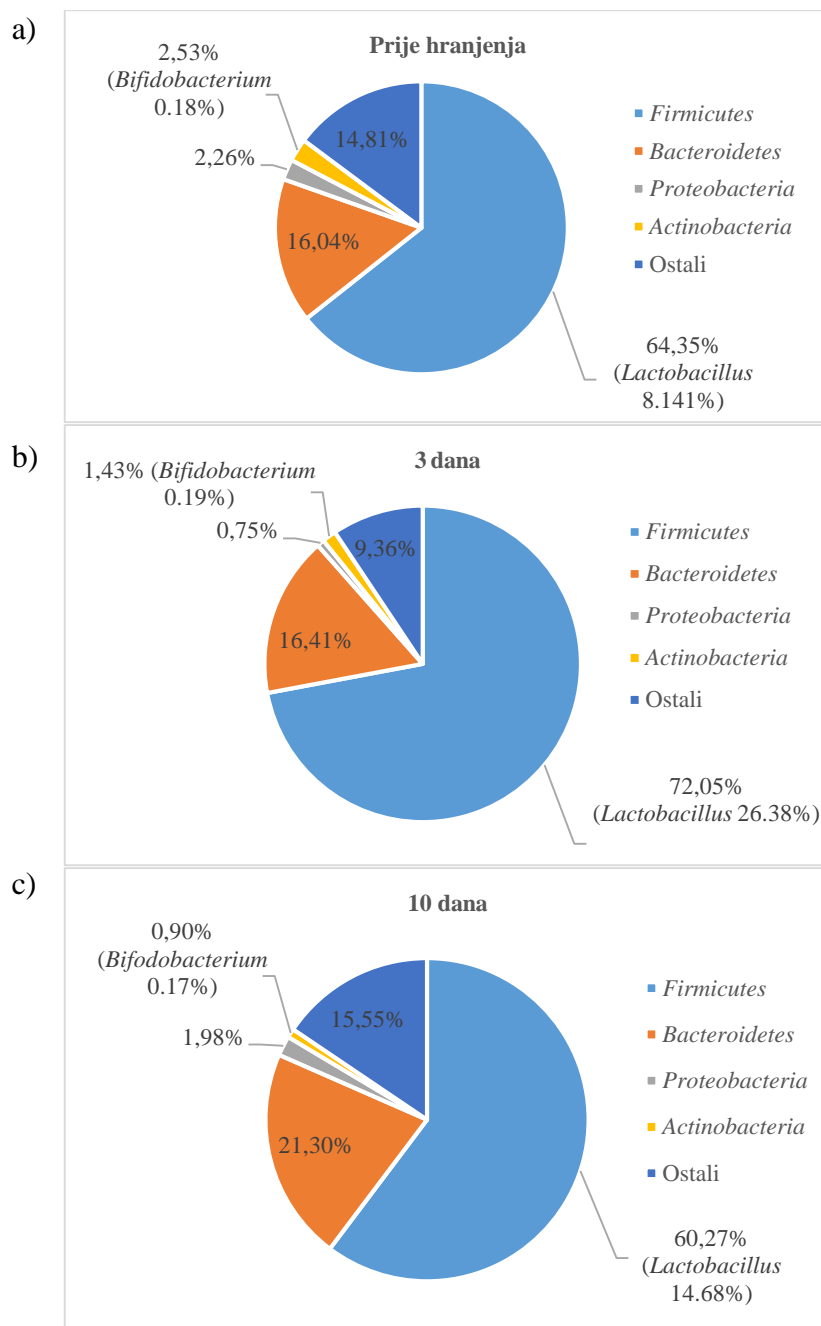


Slika 13. Usporedba udjela prevladavajućih bakterijskih koljena u: a) mikrobiomu fecesa čovjeka (Hattori i Taylor, 2009) i b) mikrobiomu fecesa štakora.

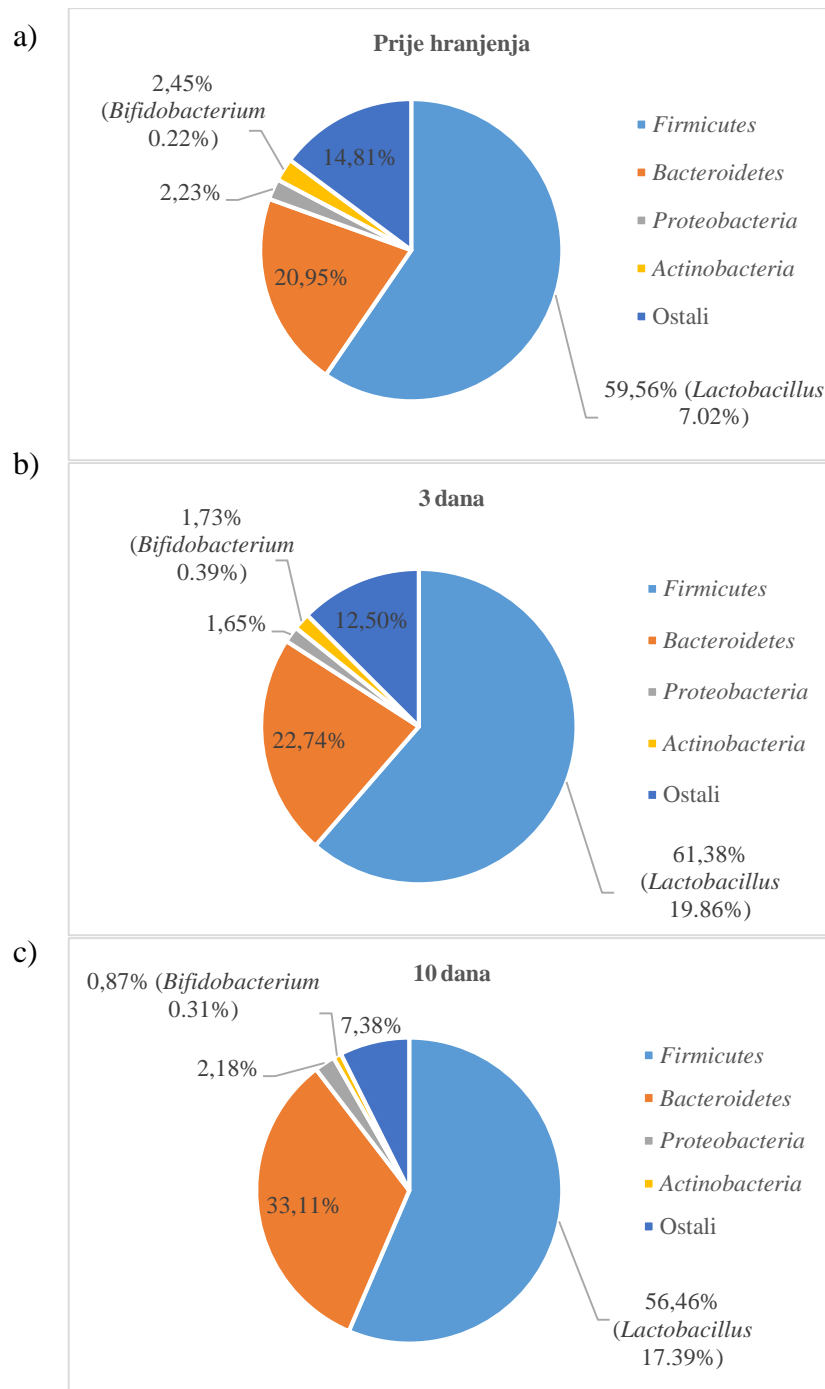
Udio bakterija iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* u ukupnoj mikrobioti kod skupine zdravih životinja i kod skupine životinja kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest je povećan nakon primjene dva *Lactobacillus* soja (Slike 14 i 15). U uzorcima fecesa zdravog (Slika 14b) i (Slika 15b) štakora s izazvanom Alzheimerovom bolesti, koji su prikupljeni 3 dana nakon prestanka kaniliranja štakora suspenzijom laktobacila, udio vrsta iz roda *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* je bio znatno viši u usporedbi s uzorcima istih štakora prikupljenima neposredno prije početka primjene suspenzije laktobacila, što može upućivati na adhezijska svojstva primijenjenih *Lactobacillus* sojeva u GIT-u štakora, te time na njihov kolonizacijski potencijal. Smatra se da je neki probiotički soj kolonizirao GIT kada se može izolirati iz fecesa tjedan dana nakon prestanka probiotičke administracije. U uzorcima fecesa zdravog (Slika 14c) i bolesnog (Slika 15c) štakora, prikupljenima 10 dana nakon završetka primjene laktobacila, vidljivo je smanjenje udjela *Lactobacillus* vrsta, no taj je udio još uvijek bio mnogo viši nego u uzorcima prikupljenima prije početka probiotičke administracije što ukazuje da primijenjeni sojevi laktobacila imaju potencijal kolonizacije GIT *in vivo*.

Sveobuhvatna karakterizacija mikrobiote zdravog štakora, koja je okarakterizirana uravnoteženim sastavom intestinalne mikrobiote, primjenom novih tehnologija sekvencioniranja poput Illumina MiSeq, kritični je preduvjet za razumijevanje i predviđanje

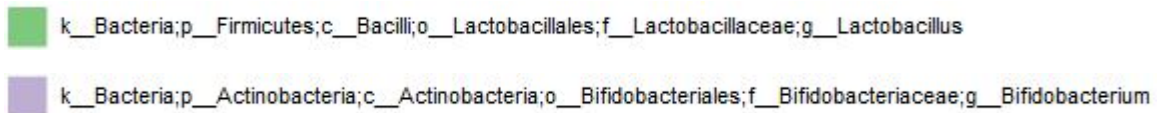
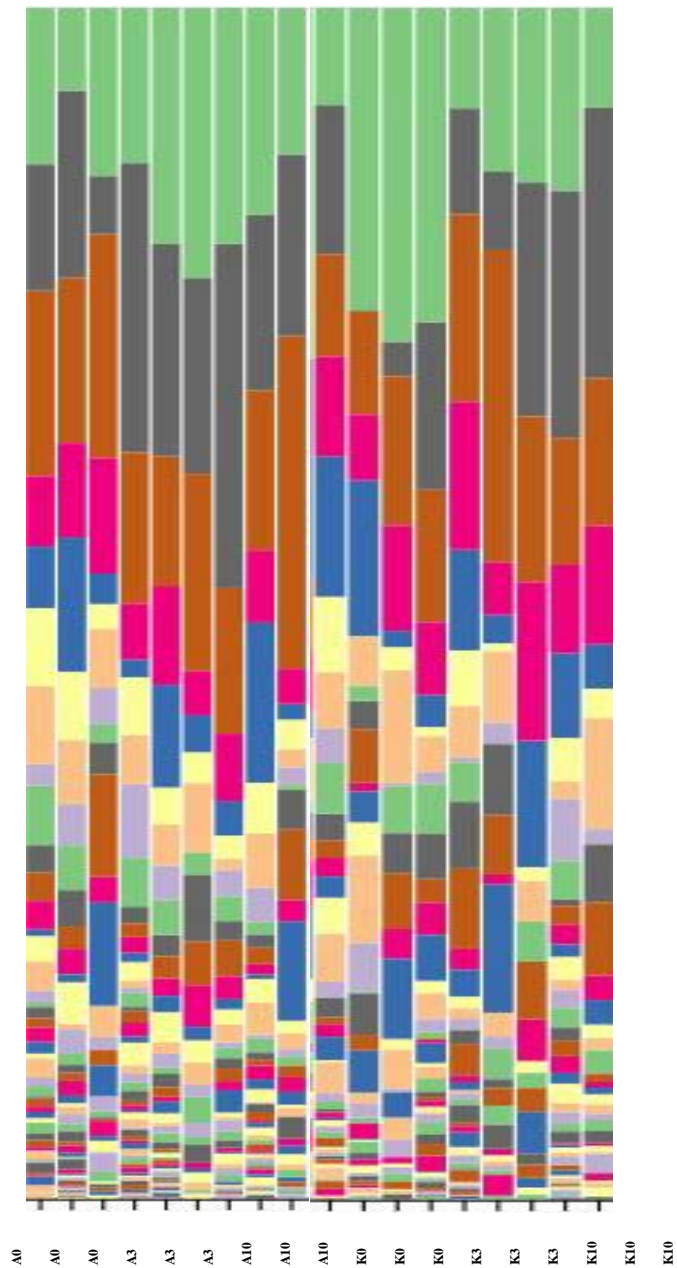
promjena u mikrobnim zajednicama koje su povezane s bolešću (Li i sur., 2017). Fox i sur. (2014) u preglednom radu navode primjenu Illumina MiSeq sekvencioniranja V3-V4 16S rRNA regije za određivanje sastava mikrobioma štakora, te su ustanovili da je sama metoda izrazito precizna, te je optimiranjem postupka moguće postići smanjene pogreške na manje od jedan na tisuću sekvencioniranih nukleotida. Rezultatima analize mikrobioma skupine zdravih i skupine štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest nakon kaniliranja suspenzijom laktobacila su u skladu s podacima iz literature. Naime prema Vogt i sur., (2017) kod pacijenata oboljelih od Alzheimerera, na razini koljena (lat. phylum), uočena je smanjena zastupljenost *Firmicutes* i *Actinobacteria*, a povećana zastupljenost *Bacteroidetes* u usporedbi s kontrolnom skupinom, odnosno zdravim osobama, što su pokazali i rezultati ovoga rada, gdje je zastupljenost bakterija iz koljena *Firmicutes* značajno smanjena, slično iako manje izražen efekt je uočen i u zastupljenosti bakterija iz koljena *Actinobacteria*, a zastupljenost bakterija iz koljena *Bacteroidetes* značajno povećana kod životinja s izazvanim Alzheimerom u usporedbi s vrijednostima u skupini zdravih životinja. U ukupnoj mikrobioti primjena suspenzije laktobacila utjecala je na povećanje zastupljenosti bakterijskih rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* (Slika 14. i Slika 15). Prije samog hranjenja postotak laktobacila i bifidobakterija unutar mikrobiote zdravih i u skupini štakora s izazvanim Alzheimerom, je manji u usporedbi s rezultatima iz uzoraka preostalih dana, nakon kaniliranja, što je i očekivano. Kod štakora je prije hranjenja postotak *Lactobacillus* vrsta iznosi 8.141 % u mikrobiomu zdravih miševa dok je kod skupine štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest iznosi 7.02 %. Postotak *Bifidobacterium* u skupini zdravih miševa je 0.18 %, a kod skupine štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest 0.22 %. Tri dana nakon hranjenja udio bakterija i iz roda *Lactobacillus* značajno je veći u odnosu na kontrolnu skupinu, a desetog dana je, iako niži, još uvijek značajno veći nego u odnosu na vrijednosti kontrolne skupine (Slika 14. i Slika 15), što ukazuje na potencijal odabranih sojeva *Lb. plantarum* SF9C i *Lb. brevis* SF9B da prežive prilikom prolaska kroz GIT *in vivo*.



Slika 14. Usporedba zastupljenosti bakterija iz četiri najzastupljenija taksonomska koljena u mikrobioti iz skupine zdravih štakora; a) prije b) 3 dana i c) 10 dana nakon hranjenja bakterijskom suspenzijom sojeva *Lb. plantarum* SF9C and *Lb. brevis* SF9B.



Slika 15. Usporedba zastupljenosti bakterija iz četiri najzastupljenija taksonomska koljena u mikrobioti skupine štakora kojima je izazvana Alzheimerova bolest; a) prije b) 3 dana i c) 10 dana nakon hranjenja bakterijskom suspenzijom sojeva *Lb. plantarum* SF9C and *Lb. brevis* SF9B.

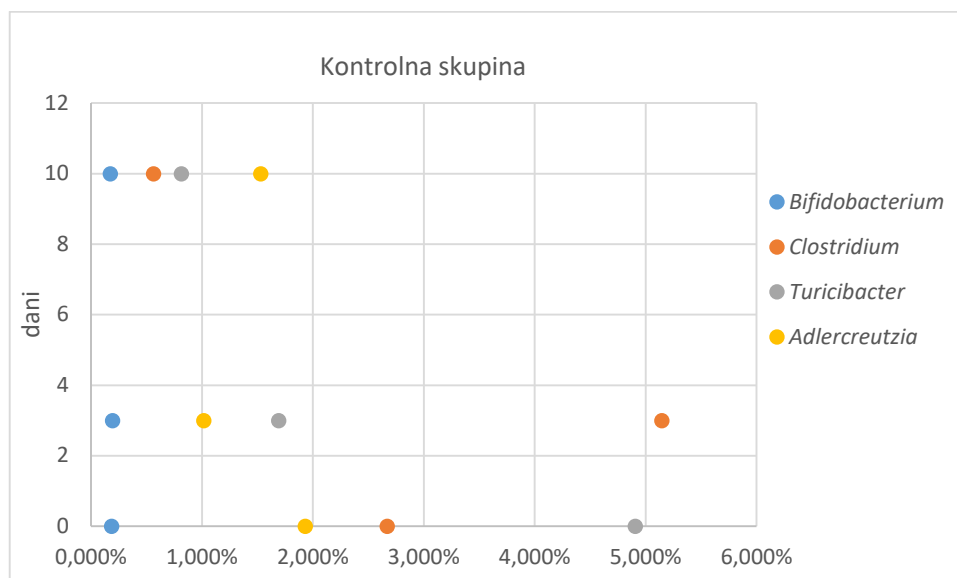


Slika 16. Zastupljenost rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* i preostalih bakterijskih rodova u fecesima skupine zdravih štakora (K) i u skupini štakora s izazvanom Alzheimerovom bolesti (A). Oznake brojeva označavaju vrijeme uzimanja uzoraka; 0 – prije ; 3 - 3 dana i 10 – 10 dana nakon primanja probiotičke suspenzije sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C.

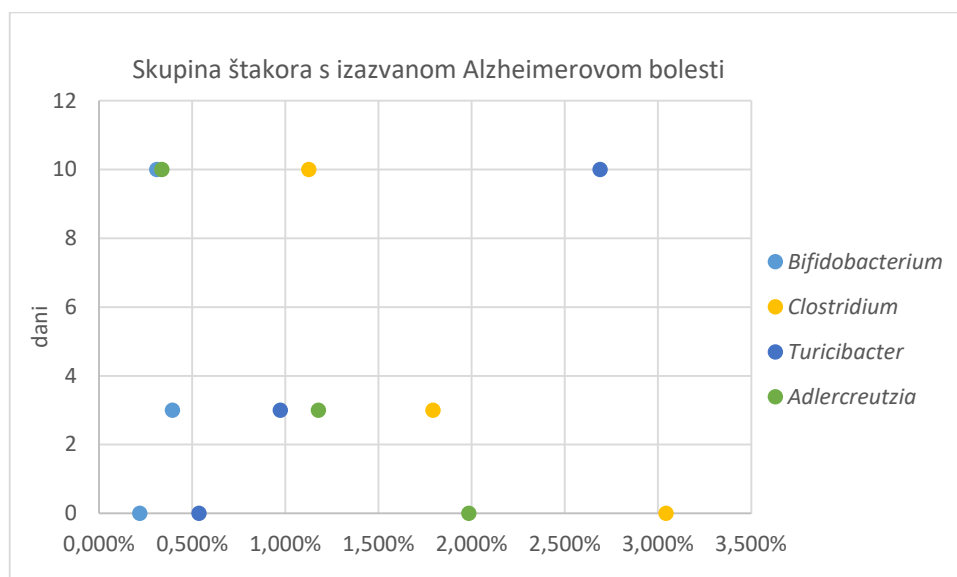
Na slici 17. prikazani udio (%) pojedinih manje zastupljenih bakterijskih rodova prije, 3 dana nakon i 10 dana nakon kaniliranja suspenzijom laktobacila, kod zdravih i kod skupina štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest. U skupini zdravih štakora, prema rezultatima, udio bakterija iz roda *Bifidobacterium* značajno se ne mijenja 3. i 10. dana nakon prestanka hranjenja, dok u skupini štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest udio je povećan. Prema Vogt i sur. (2017) udio bakterija iz roda *Bifidobacterium* je kod pacijenata oboljelih od Alzheimerova smanjen u usporedbi s vrijednostima u skupini zdravih osoba, što može upućivati na hipotezu da primjena *Lactobacillus* sojeva može utjecati na zastupljenost *Bifidobacterium*. *Actinobacteria*, osobito pripadnici roda *Bifidobacterium*, važan su dio bakterijske populacije intestinalne mikrobiote, s dokazanim korisnim učincima na zdravlje. Pojedini sojevi bifidobakterija dovode se u vezu s protuupalnim svojstvima i održavajnju funkcije intestinalne barijere. Vrijednosti za rod *Clostridium* određene u skupini zdravih štakora osciliraju, tako je trećeg dana postotka značajno povećan, da bi se desetog dana nakon kaniliranja taj postotak značajno smanjio. Može se pretpostaviti da ovakav rezultat proizlazi iz moguće interakcije primjenjenih *Lactobacillus* sojeva prema bakterijama iz roda *Clostridium*, manipulacijom sastava intestinalne mikrobiote. Primjerice bakterije iz roda *Bifidobacterium* iskazuju antimikrobno djelovanje prema vrsti *Clostridium difficile* koja je sastavni dio crijevne mikrobiote, no ako dođe do narušavanja sastava intestinalne mikrobiote (disbioza), može doći do nekontroliranog umnažanja ove bakterije, što uzrokuje upalni proces i oštećenja intestinalne sluznice (Valdés-Varela i sur., 2016). Rod *Turicibacter* je u zdravih štakora u padu samog postotka dok je u skupini štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest postotak u povećanju. Udio roda *Adlercreutzia* poprima padajuće vrijednosti u odnosu prije kaniliranja dok se deset dana nakon hranjenja kod zdravih stabilizira u nižoj vrijednosti od početne, a većoj od tri dana nakon hranjenja. Kod skupine štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest vrijednost deset dana nakon hranjenja je najniža u usporedbi sa prethodne dvije vrijednosti (Slika 17.). Neki od rodova koji su više zastupljeni kod zdravih i kod skupine štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest su: *Blautia*, *Bacteroides*, *Phascolarctobacterium*. Postotak roda *Blautia* je prisutan u nepromijenjenom postotku kod zdravih i kod skupine štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest. Udio *Bacteroides* kod zdravih štakora se povećava, dok u skupini štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest tri dana nakon hranjenja postotak je smanjen, a deset dana nakon hranjenja povećana je postotna vrijednost. Rod *Phascolarctobacterium* kod zdravih miševa tri dana nakon hranjenja je povećan, dok deset dana nakon hranjenja nije detektiran. Kod skupine štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest

dolazi do snižavanja udjela tri dana nakon hranjenja, a deset dana nakon prestanka hranjenja vrijednost je veća.

a)

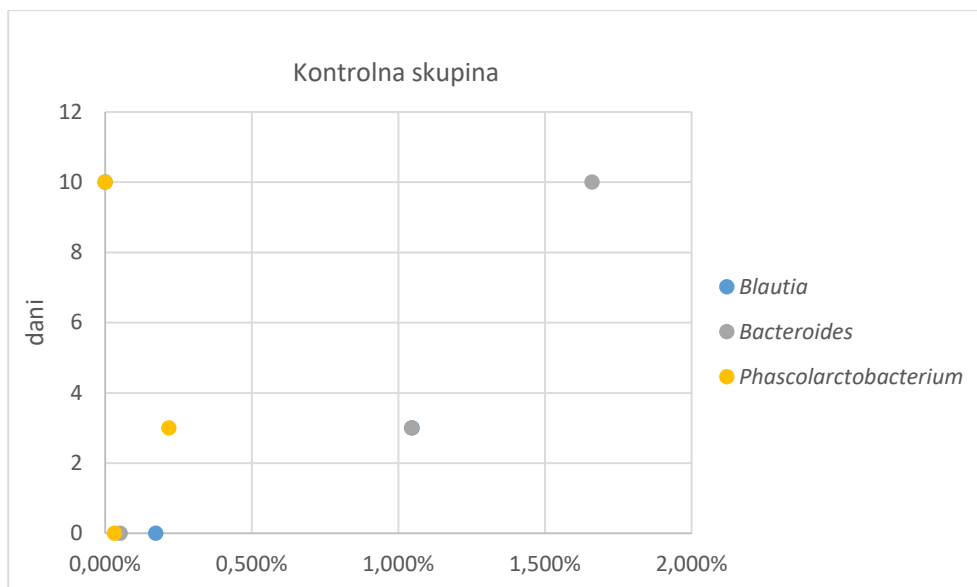


b)

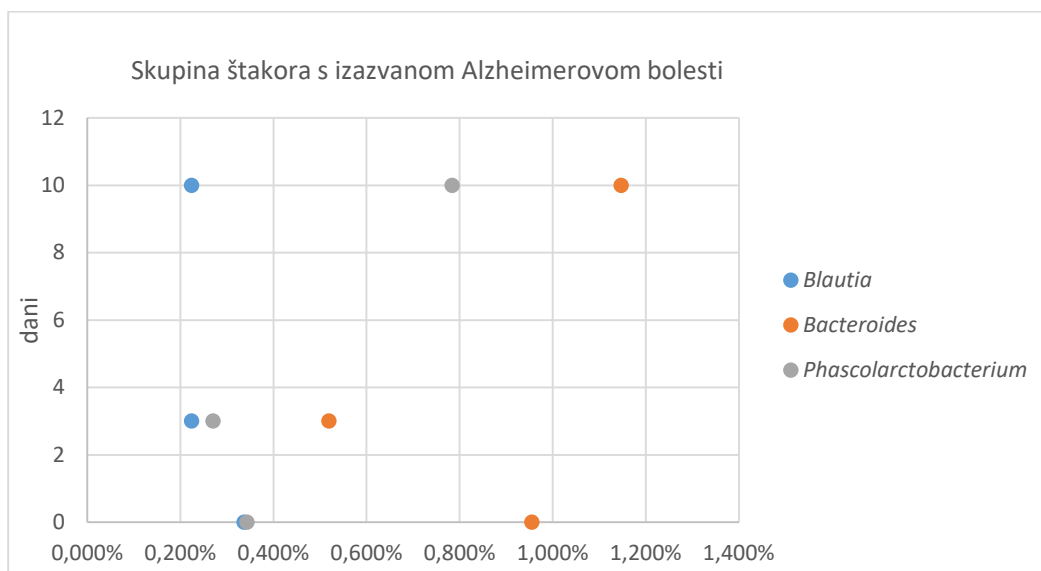


Slika 17. Zastupljenost prevladavajućih bakterijskih rodova u intestinalnoj mikrobioti štakora. Prikazani su rezultati za odabrane bakterijske rodove koji su prema rezultatima Vogt i sur. (2017) manje zastupljeni u intestinalnoj mikrobioti oboljelih od Alzheimerova u usporedbi na zdrave osobe: a) zdravih i b) skupina štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest prije (0. dan) i nakon (3. i 10. dan) kaniliranja probiotičkom suspenzijom sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C.

a)



b)



Slika 18. Zastupljenosti odabranih bakterijskih rodova koji su prema Vogt i sur. (2017) više zastupljenih u intestinalnoj mikrobioti oboljelih od Alzheimerera u usporedbi na zdrave osobe: više zastupljenih kod Alzheimerove bolesti prema Vogt i sur. (2017) u skupini: a) zdravih i b) štakora kod kojih je izazvana Alzheimerova bolest prije (0. dan) i nakon 3. i 10. dana kaniliranja suspenzijom sojeva *Lb. brevis* SF9B i *Lb. plantarum* SF9C.

Potrebno je napomenuti da su rezultati ovih istraživanja preliminarni i da je zastupljenost navedenih rodova određena u intestinalnoj mikrobioti štakora. Osim toga, rezultati su uspoređeni s istraživanjima Vogt i sur. (2017). Na temelju provedenog eksperimenta i usporedbe može se zaključiti da skupina štakora u kojima je izazvana Alzheimerova bolest predstavljaju učinkovit eksperimentalan model za istraživanja analize sastava narušene intestinalne mikrobiote. Istraživanja povezanosti patogeneze Alzheimerove bolesti i intestinalne mikrobiote tek su u začetku, a uključuju pokuse na životinjama i opsežne kliničke studije koje su neophodne kako bi se odredila uzročno-posljedična veza između intestinalne mikrobiote i patogeneze AB. Utvrđivanje uloge intestinalnih bakterija u razvoju Alzheimerove bolesti može doprinjeti novim terapijskim pristupima kojima će se modulirati i zatim ponovo uspostaviti sastav narušene intestinalne mikrobiote te definirati mikrobnih metaboliti koji mogu imati zaštitnu ulogu u liječenju AB.

5. ZAKLJUČCI

1. Povećana zastupljenost bakterija iz roda *Lactobacillus* u intestinalnoj mikrobioti eksperimentalnih životinja upućuje na uspješnu adaptaciju alohtonih sojeva *Lb. plantarum* SF9C i *Lb. brevis* SF9B u gastrointestinalnom traktu štakora, a time mogućnost njihovog kolonizacijskog potencijala *in vivo*.

2. Može se pretpostaviti da primjena združene kulture potencijalnih probiotičkih sojeva, doprinosi adhezijskim svojstvima *Lb. plantarum* SF9C uslijed kompetitivne ekskluzije patogena djelovanjem *Lb. brevis* SF9B, a soj SF9B ima pojačan kolonizacijski potencijal kojem doprinosi bakteriocinska aktivnost plantaricina *Lb. plantarum* SF9C, koji ima širok spektar antimikrobnog djelovanja uključujući *Listeria monocytogenes* ATCC 19111.

6. LITERATURA

- Åvall-Jääskeläinen, S., & Palva, A. (2005). Lactobacillus surface layers and their applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 511-529. doi:10.1016/j.fmrre.2005.04.003
- Banić, M., Uroić, K., Leboš Pavunc, A., Novak, J., Zorić, K., Durgo, K., . . . Kos, B. (2018). Characterization of S-layer proteins of potential probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* SF9B isolated from sauerkraut. *LWT-Food Sci. Technol.*(93), 257-267.
- Beganović, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Uroić, K., Jokić, M., & Šušković, J. (2014). Traditionally produced sauerkraut as source of autochthonous functional starter cultures. *Microbiol Res.*(169), 623-632.
- Bernbom, N., Licht, T., Brogren, C., Jelle, B., Johansen, A., Badiola, I., . . . Nørrung, B. (2006). Effects of *Lactococcus lactis* on composition of intestinal microbiota: role of nisin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(1), 239-244. doi:10.1128/AEM.72.1.239-244.2006
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M., & Severi, C. (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous system. *Ann Gastroenterol*, 28(2), 203-209.
- de Vos, W., & de Vos, E. (2012). Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutrition Reviews*, 70(1), 45-56. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00505.x.
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol.*, 13(4), 194-199. doi:10.1159/000104752
- DeFina, P., Rosemarie, S., Glenn, M., Lichtenstein, J., & Fellus, J. (2013). Alzheimer's Disease Clinical and Research Update for Health Care Practitioners. *Hindawi*, 9. doi:10.1155/2013/207178
- Dent, V., & Williams, R. (1982). *Lactobacillus animalis* sp.nov., a New Species of *Lactobacillus* from the Alimentary Canal of Animals. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C* 3, 377-389.

- Ellison, J. (2018, May 23). *www.brightfocus.org*. Retrieved December Friday, 2018, from <https://www.brightfocus.org/alzheimers/article/gut-bacteria-and-brains-how-microbiome-affects-alzheimers-disease>
- Fox, E., Reid-Bayliss, K., Emond J, M., & Loeb A, L. (2014). Accuracy of Next Generation Sequencing Platforms. *Next Gener Seq Appl*.
- Franklin L, C., & Ericsson C, A. (2018). Microbiota and reproducibility of rodent models. *Lab Anim (NY)*(4), 114-122.
- Fujisawa, T., Itoh, K., Benno, Y., & Mitsuoka, T. (1990). *Lactobacillus intestinalis* (ex Hemme 1974) sp. nov., nom. rev., Isolated from the Intestines of Mice and Rats. *International Journal of Systematic Bacteriology*(40), 302-304.
- Harach, T., Marungruang, N., Duthilleul, N., Cheatham, V., Mc Coy, K., Frisoni, G., Bolmont, T. (2017). Reduction of Abeta amyloid pathology in APPPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiot. *Scientific Reports*(7).
- Hattori, M., & Taylor, T. (2009). The Human Intestinal Microbiome: A New Frontier of Human Biology. *DNA Research*(1), 1-12.
- Hiergeist, A., Gläsner, J., Reischl, U., & Gessner, A. (2015). Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing. *ILAR Journal*, 56(2), pp. 228-240.
- HZJZ. (2017). *www.hzjz.hr*. Retrieved December Thursday, 2018, from <https://www.hzjz.hr/aktualnosti/alzheimerova-bolest/>
- Isolauri, E., Kirjavainen, P., & Salminen, S. (2002). Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut*, 3(50), 54-59. doi:10.1136/gut.50.suppl_3.iii54
- Jiang, C., Li, G., Huang, P., Liu, Z., & Zhao, B. (2017). The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 58(1), 1-15. doi:10.3233/JAD-161141
- Johnson, B., Selle, K., O'Flaherty, S., Jun Goh, Y., & Klaenhammer, T. (2013). Identification of extracellular surface-layer associated proteins in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Microbiology*, 159(11), 2269-2282. doi:10.1099/mic.0.070755-0
- Kant, R., Uroić, K., Hynonen, U., Kos, B., Šušković, J., & Palva, A. (2016). The genomes of *Lactobacillus brevis* D6 strain isolated from smoked fresh cheese. *GenomeA*, 4(2).

- Kechagia, M., Basoulis , D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. (2013). Health Benefits of Probiotics. *ISRN Nutrition*, 7. doi:10.5402/2013/481651
- Korolev, I. (2014). Alzheimer's Disease: A Clinical and Basic Science Review. *Medical Student Research Journal* , 4, 24-33. doi:10.3402/msrj.v3i0.201333
- Leboš Pavunac, A., Beganović, J., Kos, B., Uroić, K., Blažić, M., & Šušković, J. (2012). Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production. *Food Technol. Biotechnol.*(2), 141-151.
- Li, D., Chen, H., Mao , B., Yang, Q., Zhao, J., Gu, Z., . . . Chen, W. (2017). Microbial Biogeography and Core Microbiota of the Rat Digestive Tract. *Sci Rep*.
- Martin, C., Osadchiy, V., Kalani, A., & Mayer, E. (2018). The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 6(2), pp. 133-148.
- Mobili, P., Gerbino, E., E E, T., & Gómez-Zavaglia, A. (2010). S-layer in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria. *ResearchGate*, 1224-1234.
- Mohajeri, M., La Fata, G., E Steiner, R., & Weber, P. (2018). Relationship between the gut microbiome and brain function. *Nutrition Reviews* , 76(7), 481-496.
- Mu., Q., Vincent J., T., & Xin M., L. (2018). Role of Lactobacillus reuteri in Human Health and Diseases. *Front Microbiol*, 757.
- Neugroschl, J., & Wang, S. (2011). Alzheimer's Disease: Diagnosis and Treatment Across the Spectrum of Disease Severity. *Mount Sinai Journal of Medicine*, 78(4), 596-612.
- Pistollato, F., Sumalla Cano, S., Elio, I., Masias Vergara, M., Giampieri, F., & Battino, M. (2016). Role of gut microbiota and nutrients in amyloid formation and pathogenesis of Alzheimer disease. *Nutrition Reviews*, 74(10), 624-634. doi:10.1093/nutrit/nuw023
- Poredoš, D. (2003). *Alzheimerova bolest i obitelji*. Hrvatska udruga za Alzheimerovu bolest.
- Quigley, E. (2017). Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 17(12).
- Sekirov, I., Russell, S., Antunes, C., & Brett Finaly, B. (2010). Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 859-904.

- Shreiner, A., Kao, J., & Young, V. (2015). The gut microbiome in health and in disease . *Curr Opin Gastroenterol.*, 31(1), 69-75.
- Sovran, B., Planchais, J., Jegou, S., Straube, M., Lamas, B., Natividad, J.M., Agus, A., Dupraz, L., Glodt, J., Da Costa, G., Michel, M.L., Langella, P., Richard, M.L., Sokol, H. (2018). *Enterobacteriaceae* are essential for the modulation of colitis severity by fungi. *Microbiome*, 6(1): 152.
- Strathdee F., & Free, A. (2013). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Methods Mol Biol.*, 145-157.
- Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., & Leboš Pavunc, A. (2009). Probiotički koncept - probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 4(3-4), 77-84.
- Toomula, N., Kumar D, S., Kumar R, A., Bindu K, H., & Raviteja Y. (2011). Bacteriocin Producing Probiotic Lactic acid Bacteria. *Microbial & Biochemical Technology*, 3(5), 121-124. doi:10.4172/1948-5948.1000062
- Uroić, K., Beganović, J., Hynönen, J., Pietilä, T., Leboš Pavunc, A., Kant, R., . . . Šušković, J. (2016). The role of S-layer in adhesive and immunological properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. *LWT- Food Sci. Technol.*(69), 623-632.
- Valdés-Varela, L., Hernández-Barranco, A., Ruas-Madiedo, P., & Gueimonde, M. (2016). Effect of Bifidobacterium upon Clostridium difficile Growth and Toxicity When Co-cultured in Different Prebiotic Substrates. *Front Microbiol*, 738.
- Vlasova, A., Kandasamy, S., Chattha, K., Rajashekara, G., & Saif, L. (2016). Comparison of probiotic lactobacili and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Vet Immunol Immunopathol*, 72-84.
- Vogt, N., Kerby, R., Dill-McFarland, K., Harding, S., Merluzzi, A., Johnson, S., . . . Rey, F. (2017). Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 7(1), 1-11. doi:10.1038/s41598-017-13601-y
- Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z., & Li, L. (2017). The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering*, 3(1), 71-82.

Yang, S.-C., Lin, C.-H., Sung, C., & Fang, J.-Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: applications in foods and pharmaceuticals. *Front Microbiol.*, 5(241). doi:10.3389/fmicb.2014.00241

Zacharof, M., & Lovitt, R. (2012). Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56. doi:10.1016/j.apcbee.2012.06.0

7. PRILOZI

Kratice:

AB - Alzheimerova bolešt

NFT - Neurofibrilarni čvorovi

MetaHIT - The European Metagenomics of the Human Intestinal Tract

NIH HMP - NIH Human Microbiome Project

NGT - Next Generation Technology

WHO - The World Health Organization

IBD - Inflammatory bowel disease (Upalna bolešt crijeva)

BDNF - Brain-derived neurotrophic factora

GF - Germ-free

TFM - Transplantacija fekalne mikrobiote

ADRC - Aging and Disability Resource Center, Wisconsin

WRAP - The Wisconsin Registry for Alzheimer's Prevention

OTU - Operational taxonomic unit

A β - Amiloid β

ECM - Ekstracelularni matriks

GIT - gastrointestinalni trakt

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Leo Kunek

Ime i prezime studenta