

Utjecaj glutena na adheziju probiotičkih sojeva na CACO-2 crijevne epitelne stanice

Radišić, Veronika

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:159:909818>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-05**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Veronika Radišić

6646/BT

**UTJECAJ GLUTENA NA ADHEZIJU PROBIOTIČKIH
SOJEVA NA CACO-2 CRIJEVNE EPITELNE STANICE**

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 4

Mentor: Prof. dr. sc. *Blaženka Kos*

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

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

UTJECAJ GLUTENA NA ADHEZIJU PROBIOTIČKIH SOJEVA NA CACO-2 CRIJEVNE EPITELNE STANICE

Veronika Radišić, 6646/BT

Sažetak: Adhezija bakterijskih stanica na epitelne stanice gastrointestinalnog trakta je neophodan uvjet za kolonizaciju i jedan je od najvažnijih izbornih kriterija pri odabiru probiotičkih sojeva. Stoga je cilj ovoga rada bio ispitati utjecaj glutena ($\gamma=1$ mg/mL) na *in vitro* adheziju *Lactobacillus* sojeva na Caco-2 crijevne epitelne stanice čovjeka. Prema dobivenim rezultatima, primjenjena koncentracija glutena nije utjecala na adheziju probiotičkih sojeva na Caco-2 crijevne epitelne stanice. Svi ispitani *Lactobacillus* sojevi (*L. helveticus* M92, *L. brevis* D6 i *L. paraplantarum* SF9B) su se adhezirali na Caco-2 crijevne epitelne stanice, bez obzira na dodatak glutena. Također, nije ustanovljen utjecaj glutena na preživljavanje ispitanih bakterija mliječne kiseline tijekom 2h inkubacije u fiziološkoj otopini.

Ključne riječi: probiotici, gluten, GIT, adhezija, Caco-2 stanična linija

Rad sadrži: 26 stranica, 4 slike, 3 tablice, 61 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica

Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Prof. dr. sc. Blaženka Kos

Pomoć pri izradi: Martina Banić, mag. ing. biotechn.

Rad predan: 8. rujna 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for Antibiotics, Enzymes, Probiotics and Starter Cultures Technology

THE IMPACT OF GLUTEN ON ADHESION OF PROBIOTIC STRAINS AT CACO-2 EPITHELIAL INTESTINAL CELLS

Veronika Radišić, 6646/BT

Abstract: The adhesion of bacterial cells to epithelial cells of the gastrointestinal tract (GIT) is an indispensable requirement for colonization and one of the most important criteria in the selection of probiotic strains. Therefore, the aim of this study was to examine the impact of gluten ($\gamma=1$ mg/mL) on *in vitro* adhesion of *Lactobacillus strains* to Caco-2 human epithelial cells. According to the results, applied concentration of gluten did not affect on adhesion of probiotic strains at Caco-2 epithelial intestinal cells. All of the *Lactobacillus* strains (*L. helveticus* M92, *L. brevis* D6 and *L. paraplantarum* SF9B) have shown the adhesion at Caco-2 epithelial intestinal cells, regardless of the addition of gluten. Also, it has not been established the impact of gluten on the survival of tested lactic acid bacteria during 2h incubation in saline solution.

Keywords: probiotics, gluten, GIT, adhesion, Caco-2 cell line

Thesis contains: 26 pages, 4 figures, 3 tables, 61 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Blaženka Kos, Full professor*

Technical support and assistance: *Martina Banić, mag. ing. biotechn.*

Thesis delivered: September, 8th 2016

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Utjecaj crijevne mikrobiote na zdravlje domaćina	2
2.2. Složene interakcije mikrobiote u tijelu domaćina	5
2.3. Antimikrobno djelovanje probiotičkih sojeva	6
2.4. Dinamičke promjene ljudskog mikrobioma	7
2.5. Poremećaj ravnoteže mikrobiote i bolesti GIT-a	8
2.6. Klinički dokazani učinci probiotika na bolesti crijeva	10
3. MATERIJALI I METODE RADA	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Mikroorganizmi	12
3.1.2. Hranjive podloge.....	12
3.1.3. Kemikalije.....	12
3.1.4. Aparature i pribor.....	13
3.2. Metode rada	14
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija.....	14
3.2.2. Adhezija stanica bakterija mliječne kiseline na Caco-2 staničnu liniju.....	14
3.2.2.1. <i>Kultivacija Caco-2 stanične linije</i>	14
3.2.2.2. <i>Priprema stanica bakterija mliječne kiseline za adheziju na Caco-2 staničnu liniju</i>	15
3.2.2.3. <i>Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom</i>	15
3.2.2.4. <i>Adhezija stanica bakterija mliječne kiseline na Caco-2 staničnu liniju</i>	16
3.2.3. Preživljavanje bakterija mliječne kiseline u fiziološkoj otopini sa i bez prisutnosti glutena.....	16
4. REZULTATI	17
4.1. Adhezija stanica bakterija mliječne kiseline na Caco-2 staničnu liniju u prisutnosti glutena	19
4.2. Preživljavanje bakterija mliječne kiseline u fiziološkoj otopini sa i bez prisutnosti glutena	20
5. RASPRAVA	21
6. ZAKLJUČCI	20
7. LITERATURA	21

1. UVOD

Ljudsko tijelo sadrži oko 10^{14} mikrobnih stanica (Clemente i sur., 2012). Velik dio tih mikroorganizama čine bakterije u gastrointestinalnom traktu (GIT-u), čija je brojnost najveća u debelom crijevu (Eckburg i sur., 2005; Ley i sur., 2006). Kompleksnim međudjelovanjem eukariotskih i prokariotskih stanica unutar ekosustava ljudskog tijela, dolazi do biosinteze esencijalnih vitamina (Yatsunenکو i sur., 2012), metaboličkih produkata koji stimuliraju zdravlje (Schroeter i Klaenhammer, 2009), esencijalnih organskih tvari (Hattori i Taylor, 2009) te dolazi do stimulacije imunostava domaćina bez kojeg on ne bi mogao normalno živjeti (Erturk-Hasdemir i Kasper, 2013). Ljudski mikrobiom čini složeni sustav raznovrsnih mikroorganizama, njihovih interakcija s domaćinom i jedinstvenih gena koje ti mikroorganizmi ekspimiraju.

Iako postoje zajednička obilježja humane intestinalne mikroflore, svaki čovjek ima vlastitu, unikatnu intestinalnu mikrofloru, koja je u zdravih pojedinaca stabilna. Njen sastav ovisi o genotipu domaćina, stilu života i prehrani te zdravstvenom i fiziološkom stanju domaćina, uključujući urođena i stečena svojstva imunološkog sustava. Postoji nebrojeno mnogo komensalnih, mutualističkih i drugih interakcija između korisnih, štetnih i oportunističkih mikroorganizama u ljudskoj mikrobioti. Veliki broj patogenih mikroorganizama pronađenih u hrani, može narušiti ravnotežu komensalizma te dovesti do disbioze (Brown i sur., 2012). Uvriježeno je mišljenje da poremećaji u raznovrsnosti crijevne mikroflore dovode do razvoja različitih poremećaja kao što su Chronova bolest, upalne bolesti crijeva, pretilost, alergije, dijabetes pa čak i karcinom (Packey i Sartor, 2009; David i sur., 2014).

Kad alohtone probiotičke bakterije dospiju u debelo crijevo, moraju se vezati za crijevne resice ili adhezirati na mukozni sloj kako ne bi bile uklonjene iz crijeva uslijed peristaltike (Fernandez i sur., 2003). Adhezija bakterijskih stanica na epitelne stanice GIT-a je neophodan preduvjet za kolonizaciju i jedan je od najvažnijih izbornih kriterija pri odabiru probiotičkih sojeva, stoga je cilj ovog završnog rada ispitati utjecaj glutena na adheziju probiotičkih sojeva na Caco-2 crijevne epitelne stanice. Brojne složen efizikalno-kemijske interakcije, čiji mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, sudjeluju u adheziji stanica mikroorganizama putem adhezina (najčešće proteina) na receptore crijevnog epitela. Na učinkovitost procesa adhezije utječe mnogo faktora poput pH vrijednosti, početnog broja dodanih bakterijskih stanica i uvjeta reakcije. Budući da je gluten važan dio svakodnevne ljudske prehrane jer je prisutan u raži, pšenici, piru i ječmu, potrebno je ispitati kako utječe na mikrobiotu GIT-a i njezina svojstva, između ostalog i sposobnost adhezije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Utjecaj crijevne mikrobiote na zdravlje domaćina

Crijevna mikrobiota predstavlja skup živih mikroorganizama u probavnom sustavu domaćina (Falk i sur., 1998), koji je prirodno stanište za brojne vrste mikroorganizama, većinom bakterije, koje su se prilagodile životu na površini ili u lumenu crijeva (Guarner i Malagelada, 2003). Crijevna mikrobiota ima važnu ulogu u održavanju funkcije mukozne barijere i uključena je u sustav obrane od alergena te održavanje imunoodgovora.

Ljudska mikrobiota se oblikuje od rođenja utjecajem raznih faktora. Razlikuje se ovisno o načinu poroda (Robinson i sur., 2010), sanitarnom stanju bolnice u kojoj je dijete rođeno (Leahy i sur., 2005) te o tome je li novorođenče hranjeno majčinim mlijekom ili dojenačkom formulom (Hattori i Taylor, 2009). Djeca rođena carskim rezom imaju manje “korisnih” anaeroba iz rodova *Bacteroides* i *Bifidobacterium*, a više *Clostridium* spp. u odnosu na djecu rođenu vaginalnim putem. Razlike su vidljive i ovisno o načinu prehrane jer dojena djeca primaju različite oligosaharide, imunoregulatorne tvari i esencijalne masne kiseline iz majčinog mlijeka. Djeca hranjena dojenačkom formulom imaju ukupno veći broj široko rasprostranjenih komensalnih bakterija, uključujući koliformne bakterije, vrste iz roda *Streptococcus*, *Clostridium difficile* i ostale vrste klostridija (Kligler i sur., 2007). Prve bakterije koje nastanjuju crijevo su najvažnije jer mogu mijenjati ekspresiju gena u epitelnim stanicama domaćina i na taj način sebi stvoriti odgovarajući okoliš. Isto tako, mogu spriječiti rast ostalih bakterija koje kasnije ulaze u ekosustav (Guarner i Malagelada, 2003).

Najčešće prisutni sojevi bakterija u ljudskoj prehrani pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, kao i sojevi roda *Propionibacterium* i probiotičkog kvasca *Saccharomyces boulardii* (Sánchez i sur., 2009). Tijekom niza godina, proveden je velik broj istraživanja na životinjama, kako bi se proučili potencijalni korisni učinci bakterija mliječne kiseline (BMK) u liječenju i prevenciji raznih bolesti (Tojo i sur., 2014). Probiotici iskazuju pozitivne učinke različitim mehanizmima djelovanja: interferencijom s patogenim bakterijama (kompeticija za nutrijente i vezna mjesta na crijevnom epitelu, poboljšavanjem funkcije barijere epitelnog sloja, imunomodulacijom te djelovanjem na druge organe u ljudskom tijelu stimulacijom imunoodgovora i proizvodnjom neurotransmitera (GABA, serotonin) (Hill i sur., 2014).

Uloga crijevne flore može se podijeliti u tri kategorije:

a) Metabolička uloga

Metabolička uloga crijevne flore se očituje kroz fermentaciju neprobavljenih ugljikohidrata i endogene sluzi. Genska raznovrsnost unutar bakterijskog ekosustava osigurava mnoštvo enzima i biokemijskih puteva koji su različiti od onih domaćina, ali istovremeno i za njega korisni. Za domaćina, spomenuta složena metabolička aktivnost rezultira obnovom energije i apsorpcijom tvari koje se ne bi mogle apsorbirati bez djelovanja bakterija. Također, na taj način se osigurava energija i hranjive tvari potrebne za rast i razmnožavanje bakterija. Razgradnja ugljikohidrata je glavni izvor ugljika i energije za rast bakterija u crijevima, a osim toga, razgradnjom ugljikohidrata nastaju i kratkolančane masne kiseline (octena, propionska i maslačna kiselina) koje se apsorbiraju u crijevima domaćina i imaju koristan učinak na njegovo zdravlje (Guarner, 2006). Isto tako, metabolička aktivnost crijevne mikrobiote pomaže pri apsorpciji kalcija, magnezija i željeza u cekumu te doprinosi sintezi nekih vitamina (vitamin K, B12, biotin i folna kiselina) i aminokiselina iz amonijaka ili uree (Hooper i sur., 2002).

b) Trofička uloga

Crijevne bakterije imaju ulogu u proliferaciji i diferencijaciji epitelnih stanica crijeva, što potvrđuje i činjenica da je u kriptama crijeva životinja, koje su uzgojene u sterilnim uvjetima, oslabljeno obnavljanje epitelnih stanica (Falk i sur., 1998). Trofička uloga podrazumijeva homeostatsku regulaciju imunološkog sustava, povećanje broja mukoznih limfocita i serumskih imunoglobulina. Također, uključuje utjecaj na aktivnost limfatičnog tkiva probavnog sustava, tj. na regulacijske T-stanice koje sudjeluju u esencijalnim homeostatskim mehanizmima, pomoću kojih domaćin može tolerirati stalnu prisutnost neškodljivih antigena u intestinalnom traktu a da oni ne izazovu upalne procese u organizmu. Važnu ulogu u razvoju crijevne imunosti imaju bakterije. Primjerice, životinje koje su uzgojene u sterilnim uvjetima imaju manju gustoću limfocita u crijevnoj sluznici, limfni folikuli su mali, a cirkulirajuće razine imunoglobulina su niske. Odmah nakon izlaganja životinja mikrobima, broj limfocita u sluznici se povećava, stvaraju se germinativni centri u limfatičnim folikulima i dolazi do povećanja razine imunoglobulina u serumu (Fagarasan i sur., 2002).

c) Zaštitna uloga

Crijevna mikrobiota djeluje kao glavna linija obrane kojom se sprječava kolonizacija patogenih bakterija i oportunističkih mikroorganizama koji su povremeno prisutni u intestinalnom traktu. Nekoliko je mehanizama upleteno u djelovanje zaštitne barijere;

uključuju kompetitivnu ekskluziju, tj. natjecanje za nutrijente i prostor, stimulaciju sekrecije imunoglobulina A, stvaranje mukoznog sloja i antimikrobnih supstanci (bakteriocina), čime se aktivno djeluje na zaustavljanje upale crijeva (Lievin-Le Moal i Servin, 2006).

U posljednje vrijeme se intenzivno proučava moguća upotreba probiotika za različite terapijske svrhe. Zdravstveni učinci probiotika specifični su o soju. Niti jedan probiotički soj nema sve poželjne i iste karakteristike, već one variraju čak i unutar sojeva iste vrste (Figuroa-Gonzalez i sur., 2011), pa se odabir probiotika vrši s obzirom na stanje koje zahtjeva probiotički tretman. Unutar skupine BMK, probiotički sojevi *L. rhamnosus* GG i *L. casei* Shirota su pokazali najbolji utjecaj na zdravlje ljudi koji boluju od intolerancije na laktozu, dijareje i dijareje uzrokovane korištenjem antibiotika (Shah, 2007).

Dokazano je da učinak probiotika ne ovisi samo o vrsti korištenih probiotičkih bakterija već i o upotrebljenoj dozi. Probiotički pripravak treba sadržavati određeni minimum kolonija po dozi, tj. CFU (eng. colony-forming units), kako bi se postigao pozitivan učinak na zdravlje čovjeka (Coeuret i sur., 2004), koji nije moguć bez dnevnog unosa od 10^6 do 10^{10} CFU. Za terapijski učinak potrebne su veće doze probiotika, od 10^9 do 10^{10} CFU, dok se u preventivne svrhe upotrebljavaju doze od 10^6 do 10^9 CFU (Bernardeau i sur., 2006).

Probiotici se sve češće koriste i u životinjskoj prehrani jer pozitivno utječu na zdravlje životinja i pomažu suzbiti patogene bakterije iz hrane poput *Salmonella* i *Campylobacter*, što je nužno za proizvodnju sigurnog mesa i mesnih proizvoda (Vila i sur., 2010). Probiotičke bakterije mogu kolonizirati GIT tovljenih pilića od prvog dana njihovog života, što omogućuje brže postizanje stabilnosti mikroflore. Također, dodatak probiotika u mlijeko za prehranu teladi, može poboljšati njihov rast i razvitak (Frizzo i sur., 2011).

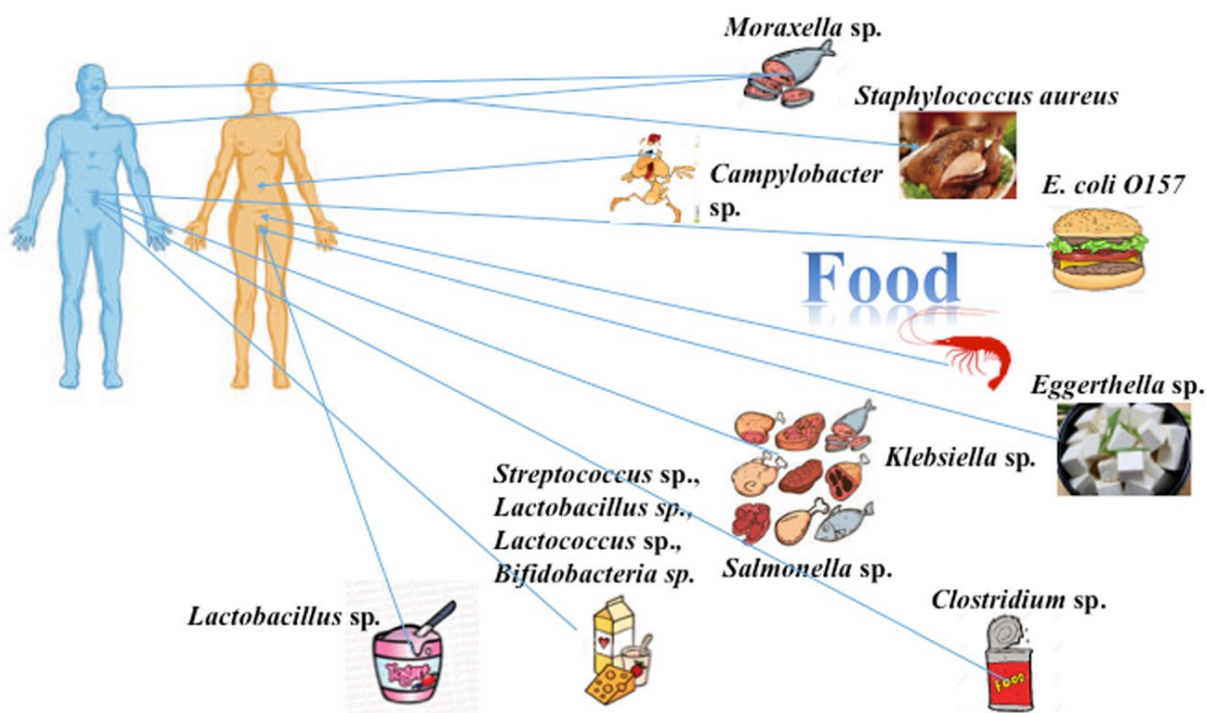
Tablica 1. Pozitivni učinci probiotika na zdravlje čovjeka (preuzeto od Florou-Paneri i sur., 2013).

Bakterija mliječne kiseline	Utjecaj na zdravlje
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Ublažava simptome ulceroznog kolitisa i dermatitisa te skraćuje ciklus rotavirusa koji uzrokuje proljev
<i>Lactobacillus casei</i>	Smanjuje vrijeme trajanja proljeva, stimulira imunosustav crijeva te ublažava simptome Chronove bolesti
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Luči mliječnu kiselinu koja snižava pH crijeva te tako inhibira razvoj patogena (<i>Salmonella</i> spp, <i>E. coli</i>). Smanjuje

	razinu kolesterola prisutnog u krvi.
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Učinkovit kod inhibicije patogena <i>H. pylori</i> te djeluje protuupalno.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Proizvodi kratkolančane masne kiseline koje blokiraju stvaranje karcinogenih spojeva smanjenjem aktivnosti enzima koji sudjeluju u njihovoj sintezi.
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Učinkovit pri obnovi normalne mikroflore i suzbijanju patogene vaginalne mikroflore.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Smanjuje vrijeme trajanja proljeva.
<i>Enterococcus faecium</i>	Smanjuje razinu kolesterola u krvi i time pomaže pri smanjenju krvnog tlaka.

2.2. Složene interakcije mikrobiote u tijelu domaćina

Kompetitivne interakcije između autohtonih mikroorganizama koji prirodno nastanjuju ljudsko tijelo te onih alohtonih koji se svakodnevno unose, veoma su dinamične. Kompeticija između autohtonih i alohtonih organizama, uzrokuje da visoko specijalizirani organizmi s vremenom formiraju svoje vlastite niše. Komensalni organizmi, kao primjerice bakterije iz roda *Bifidobacterium* (Packey and Sartor, 2009), dokazano sprječavaju kolonizaciju stranih patogena poput *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* i *Bacteroides vulgatis* (Leahy i sur., 2005) raznim kompetitivnim interakcijama koje uključuju faktore stanične adhezije, stimulaciju antitijela domaćina i otpuštanje tvari koje poboljšavaju cjelokupni zdravstveni sustav čovjeka (Schroeter i Klaenhammer, 2009; Erturk-Hasdemir i Kasper, 2013). S vremenom, ekološki sustav prisutan u tijelu čovjeka u obliku mikrobiote postaje sekundarni imunosustav. Ravnotežu unutar crijevne mikrobiote može lako narušiti neadekvatan način prehrane te razni faktori iz okoline (Slika 1). Kako su ljudi dinamični domaćini s različitim primjerima stila života, mikroorganizmi moraju stvoriti interakcije sa svojim domaćinom i velikim brojem mikroorganizama, kako bi se bolje i lakše prilagodili na okolinu u kojoj se nalaze. Na mikroorganizme utječe genetika te metabolizam njihovog domaćina, što je istodobno i prednost i nedostatak takve zajednice (Ley i sur., 2006; Backhed, 2011; Le Chatelier i sur., 2013). Prehrambeni izbori domaćina mogu ograničiti i diktirati funkciju komensalne mikrobiote te utjecati na ravnotežu i stabilnost mikrobne zajednice, što je nužno za funkcioniranje zdrave mikrobiote.



Slika 1. Promjene u sastavu ljudske mikrobiote povezane s prehranom, načinom života te bolestima (Josephs-Spaulding i sur., 2016).

2.3. Antimikrobno djelovanje probiotičkih sojeva

Primarni antimikrobni učinak probiotičkih BMK je snižavanje pH vrijednosti uslijed nakupljanja organskih kiselina. BMK proizvode i različite visokomolekularne (bakteriocini) i niskomolekularne supstance s antimikrobnim djelovanjem poput vodikovog peroksida (H_2O_2), ugljičnog dioksida (CO_2), diacetila (2,3-butandion) i drugih sastojaka niske molekularne mase s antimikrobnom aktivnošću (npr. reuterina i reutericiklina). Svi oni mogu djelovati antagonistički na rast patogena u GIT-u (Ammor i sur., 2006.). Bakterije mliječne kiseline tijekom rasta i fermentacije proizvode organske kiseline, među kojima su najznačajnije octena i mliječna kiselina, koje inhibicijski djeluju na rast i razmnožavanje mikroorganizama. Inhibicijsko djelovanje organskih kiselina potječe od njihovog nedisociranog oblika, koji difundira kroz staničnu membranu mikroorganizma te interferira s esencijalnim metabolizmom. Toksični učinak octene i mliječne kiseline ostvaruje se kroz smanjenje intracelularnog pH te promjenu membranskog potencijala (Lorca, 2009). U usporedbi s mliječnom kiselinom, octena kiselina ima jači inhibicijski utjecaj na rast kvasaca, plijesni i bakterija.

Nadalje, bakterije mliječne kiseline u prisutnosti kisika mogu proizvesti vodikov peroksid (H_2O_2) pomoću enzima NADH peroksidaze ili flavoprotein oksidaze. Antimikrobna aktivnost H_2O_2 može se pripisati njegovom snažnom oksidacijskom djelovanju na bakterijsku stanicu te narušavanju molekularne strukture staničnih proteina (Lindgren, 1990). Naime, H_2O_2 uzrokuje oksidaciju sulfhidrilnih skupina, a posljedično i denaturaciju vitalnih enzima metabolizma kao primjerice; heksokinaza, aldolaza i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (Bjorck, 1985). H_2O_2 , što ga proizvode bakterije mliječne kiseline, pomaže u zaštiti od urogenitalnih infekcija, posebice kod bakterijske vaginoze (Reid, 2008).

Heterofermentativne BMK proizvode CO_2 koji djelovanjem na staničnu membranu može direktno stvoriti anaerobne uvjete toksične za neke aerobne mikroorganizme iz hrane. Antimikrobno djelovanje je rezultat inhibicije enzimske dekarboksilacije i nakupljanja ugljičnog dioksida u membranskom lipidnom dvosloju, što uzrokuje disfunkciju membranske propusnosti.

Diacetil (2,3-butandion) je metabolit kojeg proizvode mnogi rodovi BMK metaboliziranjem citrata. Za vrijeme katabolizma, nastajanje diacetila je reprimirano. Smatra se da su na diacetil osjetljivije Gram-negativne bakterije, kvasci i plijesni. Proizvodnja specifičnih inhibicijskih supstancija, kao što su bakteriocini, također je osobina bakterija mliječne kiseline. Bakteriocini su ekstracelularne proteinske supstancije s antimikrobnim djelovanjem prema srodnim bakterijskim vrstama soja producenta. Nisin je najpoznatiji bakteriocin BMK kojeg proizvodi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Šušković i sur., 2010).

2.4. Dinamičke promjene ljudskog mikrobioma

Ljudski mikrobiom je skup genoma svih mikroorganizama prisutnih u ljudskom tijelu. Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da humani mikrobiom sadrži 100 puta veći broj gena nego humani genom, a broj bakterijskih stanica u ljudskom organizmu je 10 puta veći od broja stanica ljudskog tijela pa bi se moglo reći da humani mikrobiom čini čovjeka „više prokariotskim nego eukariotskim bićem“ (Šušković, 2014).

Ovisno o uvjetima u okolini, ljudski mikrobiom se mijenja velikom brzinom, posebice mikrobiom crijeva, koji se može promijeniti čak i kroz jedan dan ako je prehrana promijenjena (David i sur., 2014). Ljudski mikrobiom oblikuje hrana koju čovjek konzumira te organizmi koji koloniziraju ljudsko tijelo i pritom mogu uzrokovati različita stanja. Ukoliko unesena hrana sadrži probiotike, pomaže oblikovati ljudski mikrobiom poboljšanjem

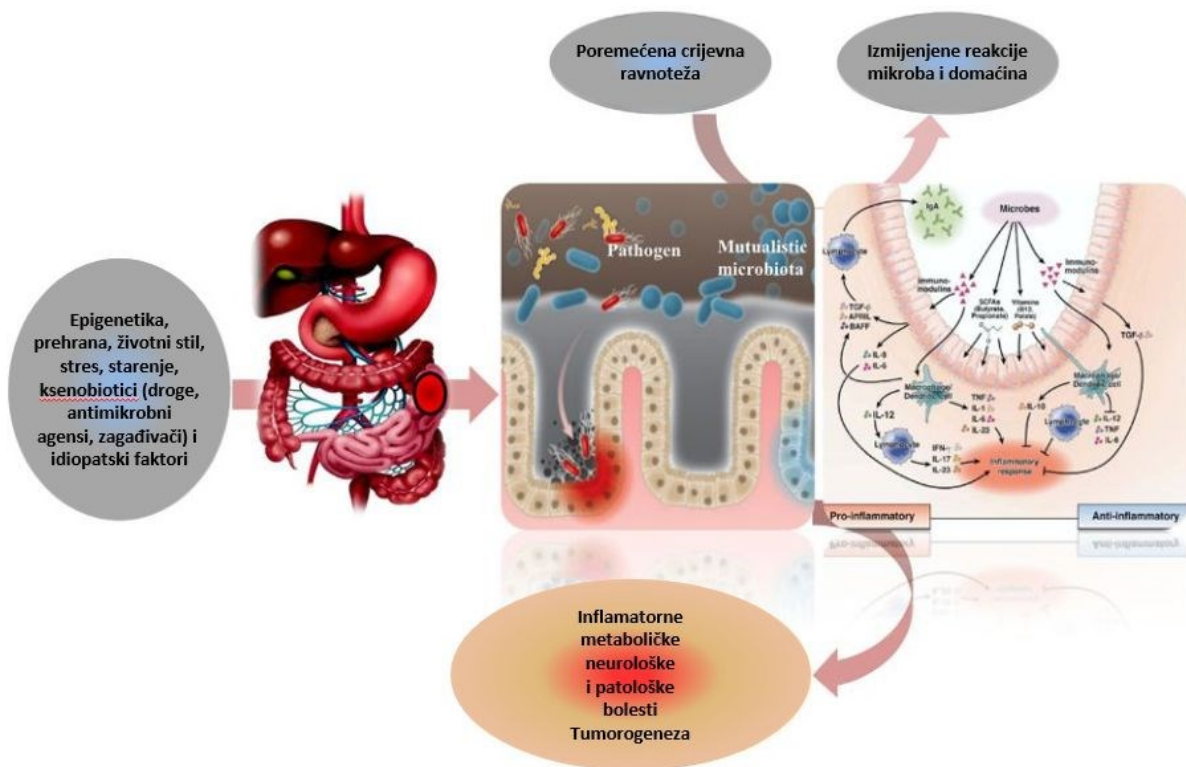
raznolikosti mikrobiote čime se posljedično poboljšava njezina metabolička produktivnost (Rosendale i sur., 2008), a samim time i zdravlje domaćina (Kim i sur., 2007). Probavljena hrana može uzrokovati promjene u ravnoteži mikrobne zajednice GIT-a čovjeka, a ukoliko su te promjene minimalne, pogođena zajednica može brzo vratiti ravnotežu u stabilno stanje. Stabilnost je sposobnost zajednice velike mikrobne raznolikosti da se vrati u normalno stanje nakon poremećaja te sposobnost da se odupre promjeni i kolonizaciji stranih patogena ili invazivnih mikrobnih vrsta (Robinson i sur., 2010). Nadalje, hrana koja se konzumira može sadržavati patogene organizme koji mogu dovesti do disbioze unutar mikrobne zajednice. Ako patogeni mikroorganizmi nisu suprimirani ili izbačeni iz kompeticije pomoću mikrobiote domaćina, može doći do smanjenja raznolikosti mikrobiote domaćina te do pojave raznih bolesti (Carriere i sur., 2015).

2.5. Poremećaj ravnoteže mikrobiote i bolesti GIT-a

Ljudi imaju oko 150 puta više bakterijskih gena svoje mikrobiote nego vlastitih gena (Backhed, 2011). Smanjenjem raznolikosti mikroorganizama unutar mikrobne zajednice, narušava se stabilnost i ravnoteža takvog sustava te on postaje osjetljiviji na invaziju potencijalno patogenih mikroorganizama za ljudski organizam (Robinson i sur., 2010). Raznolikost mikroorganizama unutar ljudskog mikrobioma može se smanjiti korištenjem antibiotika ili konzumacijom hrane s visokim udjelom šećera ili masti, koja smanjuje raznovrsnost komensalnih mikroba, dok povećava osjetljivost domaćina na patogene organizme poput *Bacteroidales* i *Clostridium* spp. (Jakobsson i sur., 2010). Oportunističke bakterije, poput *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, pokazuju sposobnost kompeticije među vrstama i mogu prerasti autohtonu mikrobiotu u crijevima čovjeka te dovesti do narušavanja ravnoteže i bolesti (Stecher i Hardt, 2011). Ako oportunistički organizmi kompeticijom nadvladaju autohtone mikroorganizme domaćina, preuzimaju njihovu nišu, apsorbiraju nutrijente na mjestu kolonizacije i štetno utječu na domaćina i njegovu mikrobiotu (Ley i sur., 2006). Ljudski organizam raznovrsnim interakcijama održava ravnotežu između sebe kao domaćina i svoje specifične mikrobiote. Interakcije nužne za održavanje stabilnosti zajednice uključuju mutualizam, intenzivnu kompeticiju, otpornost i prilagodljivost komensalnih organizama te mnoštvo metaboličkih i drugih međustaničnih interakcija (Robinson i sur., 2010; Stecher i Hardt, 2011).

Neuravnoteženost bilo kojeg od prethodno navedenih faktora unutar mikrobne ekologije ljudskog sustava, definira se kao disbioza. Može biti uzrokovana promjenom

povezanim su okolišnim i ekološkim faktorima koja narušava stabilnost ljudske mikrobiote i vodi k raznim oboljenjima. Disbioza je ravnotežna promjena unutar zajednice, koju zajednica nije uspjela ispraviti. Ta promjena uključuje gubitak raznovrsnosti vrsta unutar komensalne mikrobiote što rezultira povećanjem osjetljivosti ljudskog tijela na kolonizaciju, rast i razvoj invazivnih ili oportunističkih patogena poput *C. jejuni*, *Clostridium spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *L. monocytogenes*, koji se nalaze u kontaminiranoj hrani. Kad je stabilnost mikrobiote narušena, postoji veliki potencijal da patogeni mikroorganizmi koloniziraju gastrointestinalni trakt i kompeticijom nadvladaju autohtonu mikrobiotu domaćina (Packey i Sartor, 2009). Ravnoteža podrazumijeva održavanje stalne raznolikosti i funkcionalnosti zajednice tijekom vremena usprkos poremećajima koji mogu narušiti strukturu mikrobiote (Robinson i sur., 2010). Neprikladno održavanje mikrobiote povezano je s razvitkom različitih bolesti poput upalnih bolesti crijeva, Chronove bolesti te kroničnog enteritisa.



Slika 2. Uzajamni utjecaj crijevne mikrobiote i domaćina. Poremećaji u sastavu mikrobiote povezani su s različitim nuspojavama, upalnim procesima i bolestima. Razjašnjavanje metaboličkih puteva unutar mikroba i domaćina omogućit će otkrivanje novih terapijskih lijekova u svrhu poboljšanja zdravlja čovjeka (Althani i sur., 2016).

2.6. Klinički dokazani učinci probiotika na bolesti crijeva

Veliki broj crijevnih poremećaja povezan je s neuravnoteženom GIT mikrobiotom. Znanstveni dokazi potvrđuju važnu ulogu koju probiotici imaju u probavnom sustavu čovjeka, posebno pri ublažavanju simptoma raznih bolesti. Konzumacija probiotika ima dokazano pozitivne učinke na prevenciju ili liječenje nekih bolesti GIT-a čovjeka, kao npr.:

1) Dijareja

a) Infektivna dijareja: najčešći uzročnik je rotavirus. Akutna infektivna dijareja novorođenčadi je najviše istraženo stanje GIT-a koje se liječi probioticima. Djeca su glavni predmeti istraživanja zbog važnosti sprječavanja širenja bolesti i smanjenja potrebe za konzumacijom antibiotika (Aureli i sur., 2011). Bakterijski patogeni koji uzrokuju infektivnu dijareju su bakterije iz roda *Escherichia*, *Salmonella*, *Campylobacter* i *Shigella*, testirani u velikom broju kliničkih istraživanja kao suplementi u rehidracijskoj terapiji liječenja infektivne dijareje. Dobiveni rezultati su pokazali značajno i dosljedno skraćanje vremena trajanja i učestalosti dijareje. Za liječenje i prevenciju dijareje uzrokovane korištenjem antibiotika, koriste se razne probiotičke bakterije, posebice laktobacili. U posljednjim istraživanjima, *L. acidophilus* i *L. casei* pokazali su se najučinkovitijim vrstama za smanjenje rizika pojave dijareje (Yoon, 2011).

b) Dijareja uzrokovana bakterijom *Clostridium difficile*: *Clostridium difficile* oportunistni je patogen često odgovoran za dijareju kod ljudi s osjetljivim probavnim sustavom. Bakterija *L. rhamnosus* GG pokazala je pozitivne učinke kod liječenja takvih pacijenata (O'May i Macfarlane, 2005).

c) Dijareja uzrokovana putovanjem: BMK iz roda *Lactobacillus*, nisu se pokazale učinkovite u liječenju takve dijareje, koja je najčešće uzrokovana enterotoksičnom bakterijom *E. coli* (O'May i Macfarlane, 2005; Harish, 2006).

2) Upalne bolesti crijeva

BMK mogu pozitivno djelovati na crijevnu peristaltiku te smanjiti opstipaciju smanjenjem intestinalnog pH (Mallett i sur., 1989).

a) Pouchitis: kronična upala ilealnog rezervoara. Tretman s probioticima poput *L. rhamnosus* GG i *L. acidophilus* smanjuje rizik od pouchitisa smanjenjem mukozne upale (Gosselink, 2004).

b) Chronova bolest: zahvaća cijeli GIT te ju karakterizira upalni proces u dubokom sloju tkiva. *L. rhamnosus* se koristi za smanjenje ozbiljnosti bolesti nakon operacije (Prantera i sur., 2002).

c) Ulcerozni kolitis: akutna ili kronična bolest koja pogađa debelo crijevo. Probiotičke BMK pokazuju obećavajuće rezultate u liječenju iste bolesti (Harish, 2006).

3) Sindrom iritabilnog crijeva

Ova bolest obuhvaća veliku grupu gastrointestinalnih poremećaja poput dijareje, opstipacije, nadutosti te abdominalne boli. *L. plantarum* soj 299V i *E. faecium* PR88 mogli bi biti učinkoviti u liječenju sindroma iritabilnog crijeva (Niedzielin, 1998).

4) Infekcija s *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori, česta kronična bakterijska infekcija u ljudi koja uzrokuje mnoge probleme poput kroničnog gastritisa, raka želuca te čira na želucu. Probiotičke bakterije *L. salivarius*, *L. casei* Shirota i *L. acidophilus* pokazale su se obećavajućim u inhibiciji rasta *H. pylori* *in vitro* (Hamilton-Miller, 2003).

5) Karcinom crijeva

Antikarcinogeni učinak probiotika može se pripisati kombinaciji mehanizama poput indukcije pro ili antiupalnog i sekretornog odgovora koji mogu inhibirati karcinogenezu (Soccol i sur., 2010). *In vitro* istraživanja su pokazala antimitagenu aktivnost određenih sojeva iako još ne postoje znanstveni dokazi da konzumacija probiotika može spriječiti nastanak karcinoma crijeva u ljudi (Rafter, 2003). Postoji hipoteza da sojevi BMK imaju antikancerogeno djelovanje zbog smanjenja aktivnosti enzima beta-glukuronidaza.

6) Intolerancija laktoze

Najčešći poremećaj probave ugljikohidrata u crijevima. Pokazalo se da probiotici poboljšavaju probavu laktoze kod odraslih i kod djece i ublažavaju simptome intolerancije (Roberfroid, 2000).

7) Kolesterol u krvi

Nedavno je dokazano da neki sojevi probiotičkih bakterija poput *L.plantarum* i *Enterococcus faecium* mogu značajno smanjiti kolesterol u krvi i pomoći u snižavanju krvnog tlaka (Cavallini i sur., 2009).

8) Drugi poremećaji

Iako se probiotici najčešće koriste u liječenju bolesti crijeva, sve se češće proučava njihov utjecaj na smanjenje simptoma alergijskih reakcija, uključujući dermatitis, rinitis, bakterijsku vaginozu te alergije na hranu (Harish, 2006).

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

U ovom radu su nizom *in vitro* eksperimenata ispitana svojstva odabranih sojeva bakterija mliječne kiseline iz roda *Lactobacillus* prikazana u Tablici 2. Navedeni sojevi su izolirani i identificirani u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te pohranjeni pri -80 °C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola.

Tablica 2. Bakterijski sojevi korišteni u ovom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus helveticus</i>	M92	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	D6	MRS, 37 °C, anaerobno
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	SF9B	MRS, 37 °C, anaerobno

3.1.2. Hranjive podloge

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

- MRS (De Man-Rogosa-Sharpe) agar sastava (g/L): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; MgSO₄ · 7H₂O 0,1; MnSO₄ · 7H₂O 0,05; Na-acetat 5; agar 20. Podloga se priprema u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge je 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C/15 min.
- MRS bujon: istog sastava kao MRS agar, samo bez dodanog agara

Za kultivaciju Caco-2 stanične linije korišten je:

- MEM (eng. minimum essential medium): minimalni esencijalni medij s dodatkom 10 % toplinski inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma.

3.1.3. Kemikalije

- fosfatni pufer (PBS), „Kemika“, Hrvatska,
- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD,

- etanol, „Kemika“, Hrvatska,
- TEMED, „Sigma“, SAD,
- metilensko modriilo, „Sigma“, SAD,
- pepton, „Biolife“, Malazija,
- mesni ekstrakt, „Biolife“, Malazija,
- kvašćev ekstrakt, „Difco“, SAD,
- Tween 80, „Sigma“, SAD,
- magnezijev sulfat, „Alkaloid“, Makedonija,
- manganov sulfat, „Merck“, Njemačka,
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija,
- tripsin, „Invitrogen“, SAD,
- Triton X-100, „Sigma“, SAD,
- fiziološka otopina,
- akrilamid,
- agar.

3.1.4. Aparature i pribor

- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija,
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija,
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija,
- centrifuga 5804 R, Eppendorf,
- Anaerocult A. Merck, Njemačka®Anaerocult,
- čitač mikrotitarskih pločica LKB 5060-006, „GDV“, Italija,
- Hamilton igle, „Hamilton Bonaduz AG“, Švicarska,
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD,
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska,
- Petrijeve zdjelice,
- mikrotitarske pločice s 24 bunarića,
- mikrotitarske pločice s 96 bunarića,
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska.

3.2. Metode rada

3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama i staničnih linija

Probiotički sojevi čuvani su pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola. Dan prije ekperimenta inokulirani su u svježju optimalnu MRS tekuću podlogu te inkubirani pri optimalnoj temperaturi rasta prema uvjetima navedenim u Tablici 2.

Stanice Caco-2 stanične linije uzgojene su u minimalnom esencijalnom mediju u T-boci volumena 25 cm^3 i održavane pri 37°C i 5%-tnoj atmosferi CO_2 u MEM mediju s dodatkom 10 % (v/v) toplinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma ($56\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 30 min).

Gluten, korišten u ovom radu, izolirala je istraživačka skupina Odjela za biotehnologiju Sveučilišta u Rijeci pod vodstvom prof. dr. sc. Roberta Antolovića.

3.2.2. Adhezija stanica bakterija mliječne kiseline na Caco-2 staničnu liniju

3.2.2.1. Kultivacija Caco-2 stanične linije

Caco-2 stanična linija je kontinuirana stanična linija koja sadrži heterogene ljudske tumorske stanice kolorektalnog epitela, prikladne za provjeru sposobnosti adhezije bakterija. Zamrznuta stanična linija Caco-2 stanica s 10% glicerola se otopi u vodenoj kupelji na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ te centrifugira 5 minuta pri 100 okretaja u minuti (o/min) kako bi se uklonio supernatant koji sadrži ostatke medija i krioprotektivnog sredstva glicerola. Talog stanica se zatim resuspendira u 1 ml svježeg MEM medija prethodno zagrijanog na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i ponovno centrifugira 5 minuta pri 1000 o/min. Potom slijedi propagacija stanicama u Petrijevim zdjelicama promjera 5 cm. Nakon 24 sata stanice se nasađuju u T-bocu volumena 25 cm^3 i u njoj se uzgajaju i održavaju do subkonfluentnog stanja (Freshney, 2000) pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ i u 5%-tnoj atmosferi CO_2 , u minimalnom esencijalnom mediju te s dodatkom 10 % (v/v) toplinom inaktiviranog fetalnog goveđeg seruma ($56\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 30 min). Svaka 2 dana se stanicama dodaje svježi medij.

Priprema subkonfluentnih stanica za eksperiment započinje uklanjanjem medija pomoću pipete sa stanica poraslih u monosloju u T-bocama. Zbog α_2 -makroglobulina, serum u mediju ima antitripsinsku aktivnost pa se prije dodatka tripsina mora ukloniti. Preostale stanice zalijepljene za dno boce isperu se PBS puferom kako bi se uklonile sve tvari iz medija koje bi mogle ometati djelovanje tripsina. Zatim se na isprane stanice dodaje 0,25% (v/v)

tripsin u količini dovoljnoj da prekrije dno (1 ili 2 mL, ovisno o volumenu boce). Vrijeme izloženosti tripsinu ovisi o vrsti stanica i starosti tripsina zbog čega je potrebna kontrola mikroskopom kako bi se utvrdilo kad dolazi do odljepljivanja stanica s dna T-boce, prelaska oblika stanica iz vretenastog u okrugli i pokretanja u smjeru kretanja tripsina. Kad se uvrđi da su se stanice odlijepile, dodaje se medij sa serumom kako bi se zaustavilo proteolitičko djelovanje tripsina (Freshney, 2000), ali ako stanice lako agregiraju u nakupine, brojanje se može vršiti direktno u tripsinu ili u mješavini tripsina i medija.

Nakon tripsiniziranja, 20 μ L stanične suspenzije se nanosi na Bürker-Türkovu komoricu volumena 10^{-4} mL, koja se sastoji od četiri velika kvadrata, a svaki veliki kvadrat sastoji se od 16 malih. Stanice se broje u gornjem lijevom i donjem desnom velikom kvadratu te se iz broja izbrojenih stanica izračuna srednja vrijednost.

Caco-2 stanice se pripreme u 2 plastične pločice s 24 jažice, tako da se u svaku jažicu dodaje po 1 mL suspenzije koncentracije 10^5 stanica.

3.2.2.2. Priprema stanica bakterija mliječne kiseline za adheziju na Caco-2 staničnu liniju

Sojevi bakterija mliječne kiseline navedeni u Tablici 2, uzgoje se u 3 paralele po 5 mL MRS bujona u anaerobnim uvjetima pri 37 °C. Nakon prekonoćne inkubacije slijedi centrifugiranje stanične suspenzije 5 min pri 4200 o/min. Biomasa stanica se ispere s 10 mL fiziološke otopine te se vrši provjera optičke gustoće (A_{620}) u mikrotitarskoj pločici iz 100 μ L suspenzije stanica u fiziološkoj otopini. Optička gustoća podesi se na vrijednost OD=1 resuspendiranjem dvije paralele biomase stanica u čistom MEM mediju i jedne paralele u MEM mediju s dodatkom glutena. 100 μ L suspenzije svakog soja u mediju sa i bez glutena, pripremljene kako je opisano u poglavlju prenese se na mikrotitarsku pločicu i naprave se razrjeđenja do 10^{-6} (10 μ L suspenzije u 90 μ L PBS-a). Početan broj stanica bakterija mliječne kiseline u pripremljenim staničnim suspenzijama određuje se indirektnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.2.3.

3.2.2.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Petrijeve zdjelice s MRS hranjivom podlogom nacijspe se sa svih 6 priređenih decimalnih razrjeđenja suspenzije bakterijskih stanica u obliku kapi od 10 μ l u 3 paralele. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri 37 °C, izbroje se porasle kolonije, te se izračuna broj bakterijskih stanica po mililitru uzorka.

3.2.2.4. Adhezija stanica bakterija mliječne kiseline na Caco-2 staničnu liniju

Ispituje se utjecaj glutena na adheziju bakterija mliječne kiseline na Caco-2 staničnu liniju. Kao pozitivna kontrola se koristi suspenzija BMK u čistom MEM mediju. Ispituje se i utjecaj predinkubacije otopine glutena na Caco-2 stanicama na adheziju BMK. Caco-2 stanice se prije izvođenja eksperimenta isperu 2 puta s 1 mL fosfatnog pufera (Goh i sur., 2009). U jažice s uzgojenim i ispranim Caco-2 stanicama doda se po 1 mL suspenzije stanica bakterija mliječne kiseline u pripremljenim medijima sa i bez glutena, odnosno 0,5 mL medija u kojem je resuspendiran gluten (1 mg/mL). Pločice se stave na inkubaciju na 37 °C.

Nakon pola sata, u jažice u koje je dodano samo 0,5 mL medija s glutenom, doda se 0,5 mL suspenzije stanica u čistom MEM mediju, te se inkubacija nastavlja još pola sata. Nakon isteka tog vremena, stanice se isperu 3 puta s po 1 mL fosfatnog pufera radi uklanjanja svih bakterijskih stanica koje se nisu adhezirale. Nakon ispiranja, stanice se inkubiraju 10 min u 1 mL 0,05 % (v/v) otopine Triton X-100 kako bi se uništile stanice Caco-2 stanične linije i resuspendirale sve bakterijske stanice adhezirane na Caco-2 crijevne epitelne stanice. Sadržaj svake jažice prebaci se u epice označene brojevima 1-30 i centrifugira 5 minuta na 13 000 rpm. Talog stanica resuspendira se u 1 mL fosfatnog pufera i naprave se mikrorazrijeđenja do 10^{-6} u fosfatnom puferu u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica radi provjere broja adheziranih stanica indirektnom metodom kako je opisano u poglavlju 3.2.2.3. Postotak adhezije izračuna se prema jednadžbi:

$$\text{adhezija (\%)} = (\text{CFU/mL adheziranih bakterija} / \text{CFU/mL dodanih bakterija}) \times 100.$$

3.2.3. Preživljavanje bakterija mliječne kiseline u fiziološkoj otopini sa i bez prisutnosti glutena

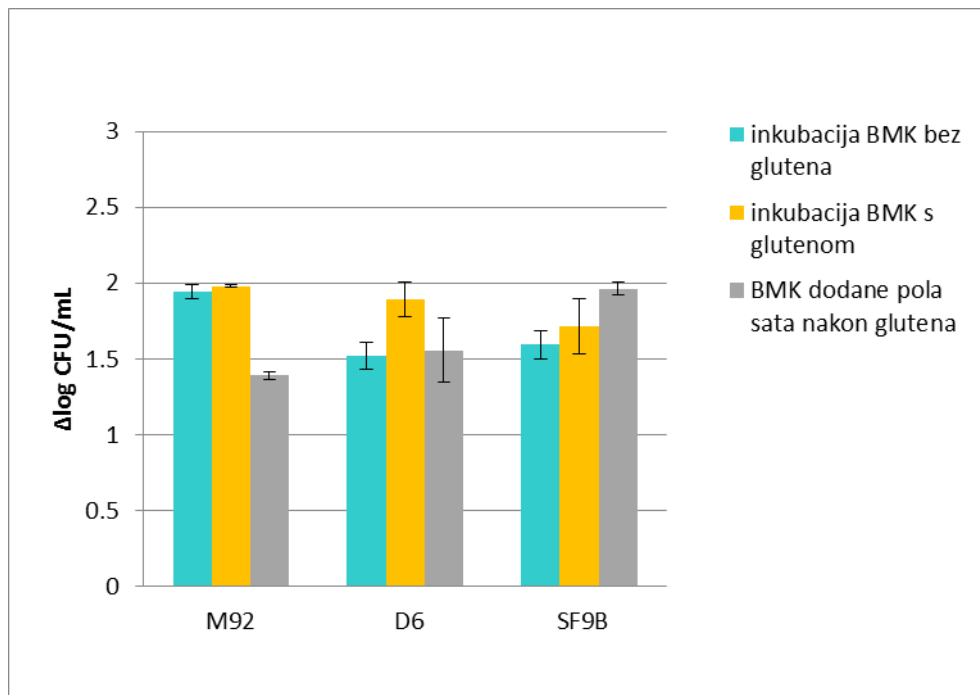
Bakterije mliječne kiseline navedene u Tablici 2, uzgoje se u 2 paralele svježeg MRS bujona. Prekonočne kulture uzgojenih sojeva BMK se centrifugiraju 5 minuta pri 4200 o/min kako bi se uklonili ostaci hranjive podloge. Talog stanica svakog soja prve paralele se resuspendira u 3 ml fiziološke otopine, a talog stanica svakog soja druge paralele se resuspendira u 3 ml fiziološke otopine u koju je prethodno dodan gluten ($\gamma=1$ mg/ml). Početan broj bakterijskih stanica u svakoj suspenziji se odredi indirektnom metodom kako je opisano u poglavlju 3.2.2.3. Nakon dvosatne inkubacije uzoraka u obje otopine, ponovi se određivanje broja bakterijskih stanica indirektnom metodom kako bi se odredio konačan broj preživjelih stanica.

4. REZULTATI

4.1. Adhezija stanica bakterija mliječne kiseline na Caco-2 staničnu liniju u prisutnosti glutena

Ispitan je utjecaj glutena u mediju na adheziju odabranih *Lactobacillus* sojeva na Caco-2 staničnu liniju. Također je ispitan utjecaj polusatne predinkubacije medija s dodatkom glutena na adheziju potom dodanih stanica BMK. Rezultati eksperimenta izraženi su u vrijednostima $\Delta\log$ (Slika 3), što je razlika između logaritama početnog broja bakterijskih stanica (CFU/mL) i broja adheziranih stanica (CFU/mL) nakon adhezije na Caco-2 stanice. Što je vrijednost dobivenog $\Delta\log$ niža, više se bakterijskih stanica adheziralo na Caco-2 staničnu liniju.

Postotak adhezije svih ispitanih sojeva u priređenim medijima sa i bez glutena, prikazan je u Tablici 3.



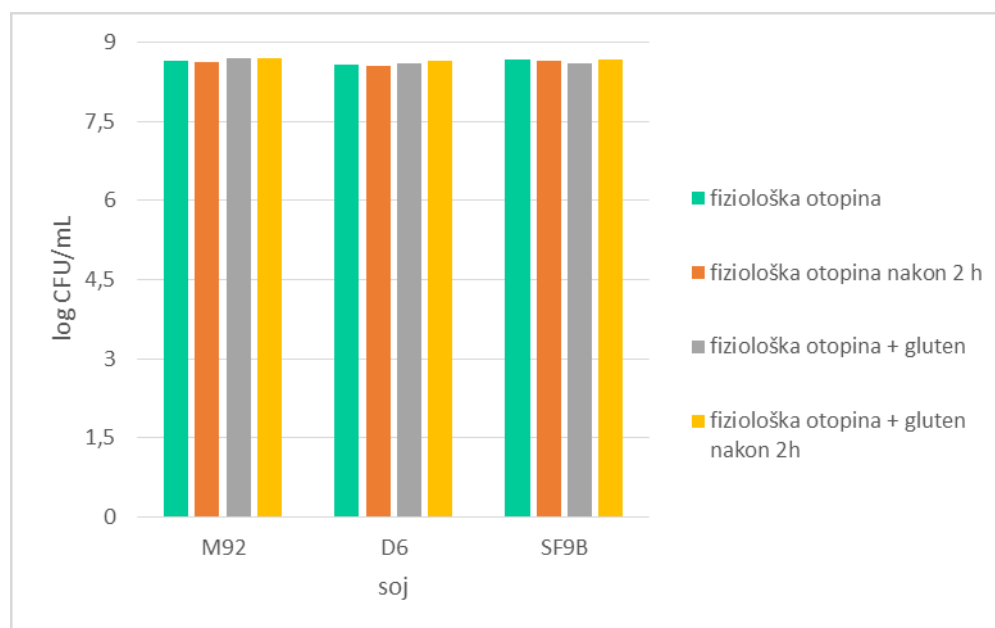
Slika 3. Utjecaj glutena na adheziju bakterija mliječne kiseline na Caco-2 staničnu liniju.

Tablica 3. Postotak adhezije stanica bakterija mliječne kiseline resuspendiranih u mediju s glutenom i bez glutena te u mediju bez glutena u jažicama u kojima je prethodno pola sata inkubiran medij s glutenom.

Soj	% adhezije BMK		
	medij bez glutena	medij s glutenom	medij s glutenom predinkubiran 0.5 h
M92	1,15%	1,05%	4,08%
D6	3,11%	1,33%	3,15%
SF9B	2,61%	2,10%	1,09%

4.2. Preživljavanje bakterija mliječne kiseline u fiziološkoj otopini sa i bez prisutnosti glutena

Provedeno je *in vitro* ispitivanje utjecaja glutena ($\gamma=1$ mg/mL) na preživljavanje *Lactobacillus helveticus* M92, *L. brevis* D6 i *L. paraplantarum* SF9B u fiziološkoj otopini. Rezultati su vidljivi na Slici 4.



Slika 4. Rezultati preživljavanja *Lactobacillus* sojeva u fiziološkoj otopini sa i bez dodatka glutena nakon 2 h inkubacije.

5. RASPRAVA

Crijevnu mikrobiotu čini mnoštvo živih mikroorganizama, većinom bakterija, prisutnih u probavnom sustavu domaćina. Mikrobiota ima značajan utjecaj na zdravlje domaćina. Počinje se formirati rođenjem i razlikuje se kod svakog pojedinca ovisno o načinu poroda, higijenskim uvjetima mjesta rođenja, načinu ishrane itd. Djeca rođena vaginalnim putem imaju više korisnih anaeroba iz iz rodova *Bacteroides* i *Bifidobacterium*, a manje *Clostridium* spp. u odnosu na djecu rođenu carskim rezom. Dojena djeca putem majčinog mlijeka unose niz složenih imunoregulatornih tvari, oligosaharida i esencijalnih masnih kiselina koje pozitivno utječu na formiranje zdrave mikrobiote i održavanje ravnoteže između korisnih, oportunističkih i patogenih mikroorganizama u GIT-u. Uslijed terapije antibioticima, loše prehrane, bolesti ili različitih stresnih uvjeta iz okoliša, može doći do narušavanja ravnoteže crijevne mikrobiote što često zahtjeva primjenu različitih probiotičkih pripravaka. Bakterije mliječne kiseline se dugi niz godina koriste kao starter kulture u proizvodnji različitih mliječnih i ne-mliječnih proizvoda, no sve češće se razmatra njihova terapijska uloga.

BMK prisutne u probavnom traktu metaboliziraju ugljikohidrate i snižavaju intestinalni pH uslijed proizvodnje mliječne i octene kiseline. Osim toga, proizvode i različite visokomolekularne (bakteriocini) i niskomolekularne (H_2O_2 , CO_2 , diacetil, reuterin, reuterin, reuterin, reuterin itd.) spojeve koji imaju antimikrobnu aktivnost i nepovoljno djeluju na kolonizaciju i rast oportunističkih i patogenih bakterija. Poboljšavaju metabolizam laktoze, utječu na sintezu vitamina B, stimuliraju imunosni sustav i proizvodnju proteolitičkih enzima, sudjeluju u suzbijanju urogenitalnih i crijevnih infekcija mehanizmom kompetitivne ekskluzije patogena, reguliraju koncentraciju kolesterola, sudjeluju u suzbijanju alergijskih infekcija i potiču resorpciju magnezija, željeza i kalcija.

Ulaskom u gastrointestinalni trakt, bakterije su izložene nizu stresnih uvjeta. Pojedini sojevi BMK osim uobičajenih staničnih mehanizama za preživljavanje nepovoljnih uvjeta posjeduju i makromolekularni sloj S-proteina vezan na peptidoglikanski sloj stanične stijenke, koji štiti stanicu tijekom naglih promjena temperature, niskog pH, sokova gušterače i visoke koncentracije žučnih soli. Adhezija bakterijskih stanica na epitelne stanice GIT-a je jedan od najvažnijih izbornih kriterija pri odabiru probiotičkih sojeva budući da predstavlja neophodan preduvjet za kolonizaciju gastrointestinalnog sustava. Kad probiotičke bakterije dospiju u debelo crijevo, moraju se vezati za crijevne resice ili adhezirati na mukozni sloj kako ne bi bile uklonjene iz crijeva uslijed peristaltike (Fernandez i sur., 2003). Na sposobnost adhezije laktobacila na Caco-2 staničnu liniju utječu brojni čimbenici poput pH vrijednosti, uvjeta

reakcije, početnog broja dodanih bakterijskih stanica itd. Stanične linije epitelnih stanica humanog podrijetla, poput Caco-2 crijevnih epitelnih stanica, često se koriste kao *in vitro* simulacijski modeli kojima se može dobiti dobar uvid u interakcijske mehanizme koji se odvijaju u *in vivo* uvjetima. Brojne složene fizikalno-kemijske interakcije, čiji mehanizam nije u potpunosti razjašnjen, sudjeluju u adheziji stanica mikroorganizama na crijevni epitel. Sposobnost adhezije se prvenstveno bazira na nespecifičnim interakcijama između adhezina (najčešće proteina) i receptora. Smatra se da i S-proteini bakterija mliječne kiseline imaju ulogu adhezina. Svi sojevi korišteni u ovom radu posjeduju sloj S-proteina veličine 40-55 kDa.

Rezultati prikazani na Slici 3 ukazuju da gluten primijenjen u koncentraciji $\gamma=1$ mg/mL nema utjecaja na adheziju ispitanih bakterija mliječne kiseline na Caco-2 stanice. Iako je kod soja *L. paraplantarum* SF9B postotak adhezije (Tablica 3) bio najviši u mediju bez dodanog glutena, takav rezultat je beznačajan jer je razlika u broju adheziranih stanica u mediju sa i bez glutena manja od pola logaritamske jedinice (Slika 3). Bakterijski soj *L. helveticus* M92 najbolju adheziju na Caco-2 stanice pokazuje u staničnim suspenzijama gdje je gluten dodan pola sata prije samog soja M92. Budući da rezultati variraju između sojeva i suspenzija, ne može se uočiti pravilo ponašanja stanica nakon dodatka glutena i ne mogu se donijeti zaključci o štetnom učinku primijenjene koncentracije glutena na adheziju bakterija mliječne kiseline na Caco-2 stanice crijevnog epitela.

Gluten je protein prisutan u žitaricama (raž, pšenica, ječam i pir) koji se sastoji od dvije frakcije; glijadina i glutenina. Koristi se u pekarskim proizvodima za poboljšavanje tehnoloških i organoleptičkih svojstava jer tijestu daje viskoznost i elastičnost te pojačava kapacitet vezanja vode. Glijadinin, sastavna komponenta glutena, predstavlja problem velikoj populaciji ljudi koji boluju od celijakije. Zbog sveprisutnosti glutena u prehrani čovjeka, često se ispituje njegova uloga u različitim oštećenjima sluznice i cjelokupnog probavnog sustava čak i kod ljudi koji ne boluju od celijakije. Određene grupe istraživača smatraju da visoke koncentracije glutena u prehrani mogu dovesti do pojave različitih autoimunih bolesti poput dijabetesa tipa 1, lupusa i poremećaja štitnjače. Zbog svakodnevnog unošenja glutena u organizam čovjeka, potrebno je ispitati njegov utjecaj na mikrobiotu. Upravo zato, ispitan je i utjecaj glutena ($\gamma=1$ mg/mL) na preživljavanje *Lactobacillus helveticus* M92, *L. brevis* D6 i *L. paraplantarum* SF9B u fiziološkoj otopini. Rezultati vidljivi na Slici 4 pokazuju da gluten primijenjen u navedenoj koncentraciji nema utjecaj na preživljavanje ispitanih sojeva u fiziološkoj otopini.

6. ZAKLJUČCI

- 1) Gluten primijenjen u koncentraciji $\gamma=1$ mg/mL nije imao utjecaja na adheziju ispitanih bakterija mliječne kiseline na Caco-2 stanice.
- 2) Svi ispitani sojevi (*L. helveticus* M92, *L. brevis* D6 i *L. paraplantarum* SF9B) su se adhezirali na Caco-2 crijevne epitelne stanice, bez obzira na dodatak glutena.
- 3) Dodatak glutena ($\gamma=1$ mg/mL) nije imao utjecaja na preživljavanje ispitanih bakterija mliječne kiseline tijekom 2h inkubacije u fiziološkoj otopini.

7. LITERATURA

- Althani, A. A., Marei, H. E., Hamdi, W. S., Nasrallah, G. K., El Zowalaty, M. E., Al Khodor, S., Al-Asmakh, M., Abdel-Aziz, H. and Cenciarelli, C. (2016) Human Microbiome and its Association With Health and Diseases. *J. Cell. Physiol.*, **231**, 1688–1694.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., Chevallier, I. (2006) Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. *Food Control.*, **17**, 454–461.
- Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A. M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F. (2011) Probiotics And Health: An Evidence-based Review. *Pharmacol. Res.*, **63**, 366-376.
- Backhed, F. (2011) Programming of host metabolism by the gut microbiota. *Ann. Nutr. Metab.*, **58**, 44–52.
- Bernardeau, M., Guguen, M., Vernoux, J.P. (2006) Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiol. Rev.*, **30**, 487-513.
- Bjorck, L. (1985) The lactoperoxidase system. *Natural antimicrobial systems*, IDF Square Vergote 1040 Brussels, 18-30.
- Brown, K., DeCoffe, D., Molcan, E., Gibson, D.L. (2012) Diet-induced dysbiosis of the intestinal microbiota and the effects on immunity and disease. *Nutrients*, **4**, 1095–1119.
- Carriere, J., Bretin, A., Barnich, N., Nguyen, H.T.T. (2015) Crohn’s disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* induce secretion of exosomes with pro-inflammatory activity by intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, **148**, S-710.
- Cavallini, D. C., Bedani, R., Bomdespacho, L. Q., Vendramini, R. C., Rossi, E. A., (2009) Effects Of Probiotic Bacteria, Isoflavoned And Simvastatin On Lipid Profile And Atherosclerosis In Cholesterol-fed Rabbits: A randomized Double-Blind Study. *Lipids Health Dis.* **8**, Article 1.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L.W., Knight, R. (2012) The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, **148**, 1258–1270.
- Coeuret, V., Gueguen, M., Vernoux, J. P. (2004) Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.*, **97**, 147-156.

- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., Turnbaugh, P. J. (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, **505**, 559–563.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., Relman, D. A. (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, **308**, 1635–1638.
- Erturk-Hasdemir, D., Kasper, D. L. (2013) Resident commensals shaping immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, **25**, 450–455.
- Fagarasan, S., Muramatsu, M., Suzuki, K., Nagaoka, H., Hiai, H., Honjo, T. (2002) Critical roles of activation- induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science*, **298**, 1414–1427.
- Falk, P. G., Hooper, L. V., Midtvedt, T., Gordon, J. I. (1998) Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**, 1157–1170.
- Fernandez, M. F., Boris, S., Barbés, C. (2003) Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.*, **94**, 449-455.
- Freshney, R. I. (2000) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 6. izd, John Wiley & Sons, New Jersey, str. 40.
- Figuroa-Gonzalez, I., Quijano, G., Ramirez, G., Cruz-Guerrero, (2011) Probiotics And Prebiotics- Perspectives And Challenges. *J. Sci. Food Agric.*, **91**, 1341-1348.
- Florou-Paneri, P., Christaki, E., Bonos, E. (2013) Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. U: Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes, (Marcelino Kongo, J., ured.), *J. InTech.*, **10**, 589-604.
- Frizzo L. S., Soto, L. P., Zbrun, M. V., Signorini, M. L., Bertozzi, E., Sequeira, G., Armesto. Rodriguez, R., Rosmini, M. R., (2011) Effect Of Lactic Acid Bacteria And Lactose On Growth Performance And Intestinal Microbial Balance Of Artificially Reared Calves. *Livestock sci.*, **140**, 246-252.
- Guarner, F., Malagelada, J.R. (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet*, **361**, 512–519.
- Guarner, F. (2006) Enteric flora in health and disease. *Digestion*, **73**, Suppl 1, 5-12.

- Goh, Y. J., Azcarate-Peril, M. A., O'Flaherty, S., Durmaz, E., Valence, F., Jardin, J., Lortal, S., Klaenhammer, T. R. (2009) Development and application of a upp-based counterselective gene replacement system for the study of the S-layer protein SlpX of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 3093-3105.
- Gosselink, M. P., Schouten, W. R., Van Lieshout, L. M., Hop, W. C., Laman, J. D., Ruseler-Van Embden, J. G. (2004) Delay Of The First Onset Of Pouchitis By Oral Intake Of The Probiotic Strain Lactobacillus Rhamnosus GG. *Dis. Colon rectum.*, **47**, 876-884.
- Hamilton-Miller, J. M. (2003) The role of probiotics in the treatment and prevention of Helicobacter pylori infection. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **22**, 360-366.
- Harish, K., Varghese (2006) Probiotics In Humans- Evidence Based Review. *Calicut Med. J.* **4**: e3.
- Hattori, M., Taylor, T. D. (2009) The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res.*, **16**, 1–12.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., et al. (2014) Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **11**, 9.
- Hooper, L. V., Midtvedt, T., Gordon, J. I. (2002) How host microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.*, **22**, 283–307.
- Jakobsson, H. E., Jernberg, C., Andersson, A. F., Sjolund-Karlsson, M., Jansson, J. K., Engstrand, L. (2010) Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PloS One* **5**:e9836.
- Josephs-Spaulding, J., Beeler, E., Singh, O.V. (2016) Human microbiome versus food-borne pathogens: friend or foe. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100**, 4845.
- Kim, J., Jung, M. Y., Chang, Y. H., Kim, S., Kim, S. J., Park, Y. H. (2007) Probiotic properties of Lactobacillus and Bifidobacterium strains isolated from porcine gastrointestinal tract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 1103–1111.
- Kligler, B., Hanaway, P., Cohrssen, A. (2007) Probiotics in children. *Pediatr. Clin. North. Am.* **54**, 949-967.
- Leahy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D. (2005) Getting better with Bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 1303–1315.

Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J.M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J. Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H. B., Juncker, A. S., Bertalan, M., Levenez, F., Pons, N., Rasmussen, S., Sunagawa, S., Tap, J., Tims, S., Zoetendal, E. G., Brunak, S., Clément, K., Dore, J., Kleerebezem, M., Kristiansen, K., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., de Vos, W.M., Zucker, J. D., Raes, J., Hansen, T., Bork, P., Wang, J., Ehrlich, S.D., Pedersen, O. (2013) Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, **500**, 541–546.

Ley, R. E., Peterson, D. A., Gordon, J. I. (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, **124**, 837–848.

Lievin-Le Moal, V., Servin, A. L. (2006) The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides and microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.*, **19**, 315–337.

Lindgren, S. E., Dobrogosz, W. J. (1990) Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, *FEMSMicrobiol. Rev.*, **87**, 149–164.

Lorca, G. L., de Valdez G. F. (2009) *Lactobacillus* Stress Responses. *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*, str. 115–138.

O'May G. A., Macfarlane G. T. (2005) Health Claims Associated With Probiotics. In: Tamime AY, editor. Probiotic Dairy Products. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Mallett, A. K., Bearne, C. A., Rowland, I. R. (1989) The Influence Of Incubation Ph On The Activity Of Rat And Human Gut Flora Enzymes. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 433-437.

Niedzielin, K., Kordecki, K., (1998) New Possibility In The Treatment Of Irritable Bowel Syndrome: Probiotics As A Modification Of The Microflora Of The Colon. *Gastroenterology*, **114**: A402.

Packey, C. D, Sartor, R. B. (2009) Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, **22**, 292–301.

Prantera, C., Scribano, M. L., Falasco, G., Andreoli, A., Scribano, M. L., Falasco, G., Andreoli, A., Luzi, C. (2002) Ineffectiveness Of Probiotics In Preventing Recurrence After Curative Resection For Crohn's Disease: A Randomized Controlled Trial With *Lactobacillus* GG. *Gut*, **51**, 405-409.

- Rafter, J., (2003) Probiotics And Colon Cancer. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **17**, 849-859.
- Reid, G. (2008) Probiotic lactobacilli for urogenital health in women, *J. Clin. Gastroenterol.* (Suppl. 3), **42**, 234–236.
- Roberfroid, M. B., (2000) Prebiotics And Probiotics: Are They Functional Foods? *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**(S), 1682S-1687S.
- Robinson, C. J., Bohannon, B. J. M., Young, V. B. (2010) From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **74**, 453–476.
- Rosendale, D. I., Maddox, I. S., Miles, M. C., Rodier, M., Skinner, M., Sutherland, J. (2008) High-throughput microbial bioassays to screen potential New Zealand functional food ingredients intended to manage the growth of probiotic and pathogenic gut bacteria. *Int. J. Food. Sci. Technol.*, **43**, 2257–2267.
- Sánchez, B., De Los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., Gueimonde, M. (2009) Probiotic fermented milks: Present and future. *Int. J. Dairy Technol.*, **62**, 472–483.
- Schroeter, J., Klaenhammer, T. (2009) Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, **292**, 1–6.
- Shah, N.P. (2007) Functional Cultures And Health Benefits. *Int. Dairy. J.*, **17**, 1262-1277.
- Stecher, B., Hardt, W. D. (2011) Mechanisms, controlling pathogen colonization of the gut. *Curr. Opin. Microbiol.*, **14**, 82–91.
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. D. S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., Lindnen, J. D. D., Pandey, A., Thomaz-Soccol, 2010 Vandenberghe LPDS, Spier M. R., Medeiros, A. B. P., Yamaguishi, C. T., Lindnen, J. D. D., Pandey, A., Thomaz-Soccol (2010) The Potential Of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol.*, **48**, 413-434.
- Šušković, J., „Sastav crijevne mikroflore“, Predavanja iz kolegija „Probiotici i starter kulture“, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, 2014.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A. L., Habjanič, K., Matošić, S. (2010) Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* 9862 (3), 296–307.

Tojo, R., Suárez, A., Clemente, M. G., De Los Reyes-Gavilán, C. G. et al. (2014) Intestinal microbiota in health and disease: Role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J. Gastroenterol.*, **20**, 15163–15176.

Vila, B., Esteve-Garcia, E., Brufau, (2010) Probiotic Micro-organisms: 100 Years Of Innovation And Efficacy; Modes Of Action. *World Poult. Sci.*, **66**, 369-380.

Yatsunenکو, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczynski, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, **486**, 222–227.

Yoon SS, Sun 2011 (2011) Probiotics, Nuclear Receptor Signaling, and Anti-Inflammatory Pathways. *Gastroenterol. Res. Pract.* Article ID: 971938.