



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urša PETROVIČ

PROBIOTIKI IN IMUNOMODULACIJA

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Urša PETROVIČ

PROBIOTIKI IN IMUNOMODULACIJA

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

PROBIOTICS AND IMMUNOMODULATION

B. SC. THESIS

Academic Study Programmes

Ljubljana, 2017

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje Študija biotehnologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zoologijo

Član: izr. prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predstavitve: 04.09.2017

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 602.3:579.864:606:61:579.6(043.2)
- KG probiotiki/ probiotični mikroorganizmi/ imunomodulacija/ imunski odziv/
Lactobacillus/ Bifidobacterium/ Escherichia coli Nissle 1917
- AV PETROVIČ, Urša
- SA NARAT, Mojca (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
- LI 2017
- IN PROBIOTIKI IN IMUNOMODULACIJA
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP VIII, 20, [2] str., 1 pregl., 1 sl., 1 pril., 67 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki ob prejemu v zadostni količini nudijo pozitivne vplive na zdravje gostitelja. Preko interakcije z gostiteljevim gastrointestinalnim traktom so sposobni vplivati na njegov prirojeni in pridobljeni imunski odziv. Probiotiki vplivajo na sposobnost fagocitoze makrofagov in drugih celic, vplivajo na število in učinkovitost celic NK, spodbujajo produkcijo citokinov in protiteles IgA, preko celic DC vplivajo na celice T_{reg}, ter uravnavajo ravnovesje med T_{h1} in T_{h2} celičnimi sub-populacijami. Delovanje probiotikov je sevno specifično. *L. reuteri*, je na primer zaviral produkcijo citokina IL-8, medtem ko jo je sev *L. plantarum* 299v spodbujal. Nekateri probiotiki imajo sposobnost uravnavati imunski odziv, glede na zdravstveno stanje gostitelja. *L. rhamnosus* GG je pri zdravih posameznikih stimuliral fagocitozno aktivnost ter jo inhibiral pri preobčutljivih na mleko. Najbolj pogosto uporabljeni probiotiki so G⁺ mlečnokislinske bakterije iz rodu *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, vendar tudi G⁻ bakterije, na primer *E. coli* Nissle 1917, veliko obetajo, saj kažejo večje imunostimulatorne učinke; verjetno zaradi različnih PAMP na njihovi površini. Probiotiki s svojimi imunomodulatornimi lastnostmi kažejo velik potencial za uporabo pri zdravljenju različnih bolezni (diareja, ulcerozni kolitis, preobčutljivosti, alergije, atopični dermatitis, avtoimunske bolezni idr.), uporabni pa bi bili tudi kot adjuvantni oralnim cepivom.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 602.3:579.864:606:61:579.6(043.2)
- CX probiotics/ probiotic microorganisms/ immunomodulation/ immune response/
Lactobacillus/ Bifidobacterium/ Escherichia coli Nissle 1917
- AU PETROVIČ, Urša
- AA NARAT, Mojca (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in
Biotechnology
- PY 2017
- TI PROBIOTICS AND IMMUNOMODULATION
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VIII, 20, [2] p., 1 tab., 1 fig., 1 ann., 67 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. Through interaction with the host gastrointestinal tract, they are able to influence its innate and adaptive immune response. Probiotics affect the ability of phagocytosis of macrophages and other cells, affect the number and efficiency of NK cells, stimulate the production of cytokines and IgA antibodies, affect the T_{reg} cells via DC cells, and balance T_h1 and T_h2 sub-populations. Probiotics are strain specific. *L. reuteri*, for example, inhibited the production of cytokine IL-8, while the strain *L. plantarum* 299v stimulated it. Some probiotics have the ability to control the immune response, depending on the health status of the host. *L. rhamnosus* GG stimulated phagocytosis in healthy individuals and inhibited it in milk-hypersensitive patients. The most commonly used probiotics are G + lactic acid bacteria from the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, but also G-bacteria, for example *E. coli* Nissle 1917, are very promising, as they show greater immunostimulatory effects; probably due to different PAMPs on their surface. Probiotics, with their immunomodulatory properties, show great potential for use in the treatment of various diseases (diarrhea, ulcerative colitis, hypersensitivity, allergies, atopic dermatitis, autoimmune diseases, etc.) and they would also be useful as adjuvants to oral vaccines.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PRILOG.....	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD	1
2 PROBIOTIKI	1
2.1 PREBIOTIKI – HRANA PROBIOTIKOM.....	2
2.2 KRITERIJI ZA UPORABO PROBIOTIKOV PRI LJUDEH.....	2
2.3 NAČINI DELOVANJA PROBIOTIKOV	3
3 IMUNSKI SISTEM	3
3.1 PRIROJENA IMUNOST	3
3.2 PRIDOBLJENA IMUNOST	4
3.3 MUKOZNA IMUNOST	5
3.3.1 Interakcija probiotikov z gastrointestinalnim traktom gostitelja	5
3.3.1.1 Črevesna mikrobiota	7
4 IMUNOMODULATORNE LASTNOSTI PROBIOTIKOV	8
4.1 VPLIV PROBIOTIKOV NA PRIROJENO IMUNOST	8
4.1.1 Makrofagi in fagocitoza	8
4.1.2 Celice naravne ubijalke (celice NK)	9
4.1.3 Enterocite in produkcija citokinov.....	9
4.2 VPLIV PROBIOTIKOV NA PRIDOBLJENO IMUNOST	10
4.2.1 Produkcija protiteles IgA	10
4.2.2 Dendritične celice in celice T_{reg}.....	11

4.2.2.1	T _{reg} odziv in topni faktorji	12
4.2.3	Th1/Th2 ravnovesje	13
5	RAZLIKE MED G+ IN G- PROBIOTIKI V MODULACIJI IMUNSKEGA SISTEMA	14
6	ZAKLJUČEK	15
7	VIRI	15
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primeri probiotičnih mikroorganizmov (Holzapfel in sod., 2001: 366).....	1
---	---

KAZALO SLIK

Slika 1: Epitelno tkivo tankega in debelega črevesja (Maynard in sod., 2012: 27).....	6
---	---

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vpliv probiotičnih sevov na prirojeno in pridobljeno imunost	
---	--

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

APC	antigen-predstavitevna celica
DC	dendritična celica
GALT	mukoza in limfatično tkivo v prebavnem raktu (angl. gut-associated lymphoid tissue)
IFN- γ	interferon gama
IgA	imunoglobulin A
IgG1	imunoglobulin G1
IgG2a	imunoglobulin G2a
IL-1/2/...	interlevkin 1/2/...
KVČB	kronična vnetna črevesna bolezen (angl. inflammatory bowel disease)
MALT	mukozna tkiva in limfatično tkivo (angl. mucosa-associated lymphoid tissue)
MAMP	z bakterijami povezani molekularni vzorci (angl. microbial-associated molecular pattern)
MHC I/II	glavni histokompatibilni kompleks I/II
NK	celica naravna ubijalka
PAMP	s patogeni povezani molekularni vzorci (angl. pathogen-associated molecular pattern)
PRR	vzorčno prepoznavni receptor (angl. pattern recognition receptors)
TGF- β	transformirajoči rastni faktor beta
T _h	celica T pomagalka
TNF- α	nekrotizirajoči faktor alfa
T _{reg}	regulatorna celica T

1 UVOD

Probiotiki so živi mikroorganizmi, ki preko interakcije z gostiteljevim gastrointestinalnim traktom, nudijo pozitivne vplive na zdravje gostitelja. Nekateri načini delovanja probiotikov so skupni številnim mikroorganizmom, spet drugi so bolj sevno specifični. Diplomsko delo je osredotočeno na sevno specifične vplive probiotikov na modulacijo imunskega odziva gostitelja. Razumevanje le teh je pomembno pri izbiri primernih sevov probiotikov za zdravljenje različnih bolezni.

2 PROBIOTIKI

Etimološko beseda probiotik izhaja iz grščine in pomeni »za življenje«. Definicija se je z leti in pridobljenim znanjem o njih stalno spreminjala. Trenutno je najbolj priznana definicija svetovnih organizacij FAO (Organizacija za prehrano in kmetijstvo) in WHO (Svetovna zdravstvena organizacija), ki probiotike definirata kot »žive mikroorganizme, ki ob prejemu (ne zaužitju, ker jih lahko dobimo tudi s pomočjo npr. vaginalnih mazil) v zadostni količini nudijo pozitivne vplive na zdravje gostitelja« (Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002). Poudariti je potrebno, da probiotiki niso nujno stalni prebivalci gastrointestinalnega trakta, pogoj pa je, da imajo pozitiven vpliv na zdravje človeka ali živali (Holzapfel in sod., 2001).

Kandidate za probiotike običajno izbiramo iz združbe komenzalnih mikroorganizmov, ki naseljujejo črevesje. Komenzali ne nudijo nujno pozitivnih učinkov na človekovo zdravje, vendar so prilagojeni na človeka, kar močno olajša iskanje primernih sevov mikroorganizmov za probiotike (Holzapfel in sod., 2001).

Najbolj pogosto uporabljeni probiotični sevi so iz rodu *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, ki so po Gramu pozitivne (G+), mlečnokislinske, paličaste bakterije. Med probiotike spada tudi po Gramu negativna (G-) bakterija *Escherichia coli* Nissle 1917 in nekatere kvasovke (Preglednica 1).

Preglednica 1: Primeri probiotičnih mikroorganizmov (Holzapfel in sod., 2001: 366)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Druge mlečnokislinske bakterije	Ne-mlečnokislinske bakterije
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. gasseri</i>			
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

2.1 PREBIOTIKI – HRANA PROBIOTIKOM

Prebiotik, kot ga definirajo Gibson in sod. (2017), je substrat, ki ga selektivno uporabljajo gostiteljski mikroorganizmi, hkrati pa prinaša pozitivne učinke na zdravje. Včasih je bila definicija omejena samo na ogljiko-hidratne substrate, zadnja definicija pa omogoča uporabo koncepta prebiotikov tudi za ostale snovi, kot so na primer konjugirane linolejske kisline in polinenasičene maščobne kisline (Gibson in sod., 2017).

Najbolj preučeni prebiotiki so fruktani (inulin, frukto-oligosaharidi - FOS) in galaktani (galakto-oligosaharidi - GOS). Ob prehodu čez tanko črevo ostanejo nerazgrajeni, zato jih lahko bakterije v debelem črevesju uporabijo kot substrat za fermentacijo. Produkti fermentacije neprebavljenih prehrabnih vlaknin so kratkoverižne maščobne kisline (SCFA – acetat, propionat in butirat), ki pozitivno vplivajo na celice intestinalnega epitela: zagotavljajo primeren pH (5) v črevesju, pozitivno vplivajo na proliferacijo, diferenciacijo celic epitela, ter omogočajo rast koristnim mikroorganizmom, kar zavira rast in viabilnost patogenih bakterij (Gibson in sod., 2017).

Prebiotiki lahko sodelujejo pri selektivnem spodbujanju rasti in delovanja že obstoječih avtohtonih vrst, kar kaže velik potencial za pozitivno moduliranje že obstoječe komezalne mikroflore. Uporabni so tudi za selektivno spodbujanje rasti in delovanja probiotikov, ki jih v telo, za doseganje pozitivnih učinkov na zdravje, vnesemo namenoma (Gibson in sod., 2017).

2.2 KRITERIJI ZA UPORABO PROBIOTIKOV PRI LJUDEH

Da seve probiotičnih mikroorganizmov lahko uporabimo pri ljudeh, morajo ustrezati spodnjim kriterijem.

Mikroorganizmi morajo biti (Borchers in sod., 2009):

- **identificirani (rod, vrsta in sev);** najbolj priznana metoda za določitev vrste je DNA-DNA hibridizacija, za določitev seva pa je potrebno izvesti elektroforezo v pulzirajočem električnem polju (PFGE). Sev mora biti shranjen v mednarodni zbirki kultur;
- **varni za uporabo v prehrani in zdravstvu;** ne smejo biti patogeni, ne smejo degradirati črevesnega mukoznega tkiva, ne smejo nositi prenosljivih genov za rezistenco na antibiotik, ne smejo konjugirati žolčnih kislin in morajo biti občutljivi na antibiotike;
- **spособni preživeti v črevesnem traktu;** odporni na želodčno kislino in žolč;
- **spособni pritrditve na mukozno tkivo,**
- **spособni vsaj začasno naseliti človeško črevo ali vagino,**
- **spособni producirati antimikrobne substance,**
- **spособni antagonizirati patogenim bakterijam,**
- **stabilni med procesiranjem in hranjenjem.**

Poleg tega, pa morajo imeti klinično dokumentirane in validirane pozitivne lastnosti na zdravje (Borchers in sod., 2009).

2.3 NAČINI DELOVANJA PROBIOTIKOV

V zadnjih letih je bilo narejenih veliko študij, ki so raziskovale potencialne koristi delovanja probiotikov za preventivo, kot tudi za zdravljenje številnih bolezni. Nekatere načine delovanja lahko pripisujemo širokemu spektru probiotikov, spet drugi so bolj sevno specifični (Hill in sod., 2014).

Široko razširjeni načini delovanja, ki jih lahko pripišemo večini preučevanih probiotikov, so produkcija kislin in kratkoverižnih maščobnih kislin (SCFA - butirata), normalizacija porušene črevesne mikrobiote, kompeticija s patogeni za hranila in vezavna mesta ter regulacija peristaltike črevesja. Načini delovanja, ki jih lahko zasledimo na ravni vrste so sinteza vitaminov (B kompleks, K), neposredni antagonizem patogenom, krepitev črevesnega epitela, encimska aktivnost (npr. razkrajanje neprebavljivih virov ogljika, kot so rastlinski polisaharidi ali sinteza β -galaktozidaze), nevtralizacija rakotvornih snovi in metabolizem žolčnih soli. Sevno specifični načini delovanja pa obsegajo vpliv na živčni sistem (produkcija živčnih prenašalcev), vpliv na endokrini sistem in vpliv na imunski sistem gostitelja (imunomodulacija in pravilno dozorevanje imunskega sistema) (Hill in sod., 2014).

Čeprav je pri enem samem sevu možno opaziti več načinov delovanja, je preveč pričakovati, da bo en sam sev sposoben opravljati vse zgoraj naštet. Pri zdravljenju je zato pomembno, da probiotične seve med seboj pravilno kombiniramo (Sanchez in sod., 2017).

3 IMUNSKI SISTEM

Človeško telo je vsakodnevno izpostavljeno napadu virusov, bakterij in parazitov, zato je evolucija sesalce opremila s številnimi mehanizmi obrambe pred njimi. Mikroorganizmi naseljujejo Zemljo že vsaj 2,5 milijarde let, koevolucija pa je prinesla to, da so avtohtoni prebivalci človekovega intestinalnega trakta sodelovali pri oblikovanju obrambne funkcije telesa (Hooper in Gordon, 2001).

Imunski sistem v splošnem delimo na dve veji: prirojena (nespecifična) in pridobljena (specifična) imunost, ki delujeta sinergistično. Pridobljena imunost se je razvila dokaj pozno, zato veliko vrst, z izjemo sesalcev, preživi tudi brez nje (Cummings in sod., 2004).

3.1 PRIROJENA IMUNOST

Prirojeni imunski odziv je prva linija obrambe pred okužbo. Obramba je takojšnja a nespecifična pri prepoznavanju antigenov. Vnetna reakcija, ki sledi, sproži kaskado procesov za eliminacijo tujka. Glavni akterji prirojene imunosti so fagocitne celice, kot so neutrofilci, monociti in makrofagi, ki s pomočjo kemotakse pridejo na mesto okužbe, saj jih privlači okolica, kjer vdirajo patogeni (Cummings in sod., 2004).

Prav tako so pri prirojeni imunosti zelo pomembne celice naravne ubijalke (NK), ki so sposobne ubiti z virusi okužene celice. Celice NK imajo vlogo pri izvajanju imunološkega nadzora, sposobne pa so ubiti tudi nekatere vrste tumorskih celic (Cummings in sod., 2004). Dendritične celice (DC), v sodelovanju z makrofagi in monociti, omogočajo sodelovanje prirojene in pridobljene imunosti, saj delujejo kot profesionalne antigen-predstavitvene celice (APC). APC so ključne pri aktivaciji pridobljenega imunskega sistema, saj same celice T niso sposobne reagirati s prostim antigenom, ampak samo z antigenom, ki ga predstavijo APC. Celice prirojene imunosti vplivajo na celice pridobljene imunosti s produkcijo citokinov (proteini, ki so odgovorni za komunikacijo med celicami) in so ključnega pomena pri regulaciji izida imunskega odziva - tako prirojenega kot tudi pridobljenega (Cummings in sod., 2004).

Naloga prirojene imunosti je tudi razlikovanje med sebi lastnimi in tujimi komponentami. To razlikovanje je možno, ker mikroorganizmi na svoji površini izražajo tipične molekule (PAMP oz. MAMP - Pathogen/Microbial-Associated Molecular Patterns), ki jih DC prepoznajo s svojimi receptorji (PRR - Pattern-Recognition Receptors) ter se na te antigene primerno odzovejo (Cummings in sod., 2004).

3.2 PRIDOBLJENA IMUNOST

Pridobljeni imunski odziv se razvija počasneje od prirojenega, vendar s časom pridobi na povečani antigeni specifičnosti in spominu. Glavne celice pridobljene imunosti so limfociti B in T, ki imajo specifične receptorje za antigene (B celični – BCR in T celični receptor – TCR). Limfociti B so odgovorni za sintezo in izločanje protiteles, kar je glavna značilnost protitelesne (humoralne) imunosti. Limfociti T so glavni pri celično posredovani imunosti. Celice T delimo na celice T pomagalke (Th oz. CD4+) in citotoksične celice T (CTL oz. CD8+) (Cummings in sod., 2004).

Celice T same niso sposobne prepoznati antigena. Antigena determinanta mora biti najprej predstavljena v MHC kompleksu, nato pa se zgodi povezava s TCR. Celice T CD8+ prepoznavajo antigene, predstavljene v MHC I, medtem ko celice T CD4+ prepoznavajo antigene, predstavljene v MHC II kompleksu. Molekule MHC I na svoji površini izražajo vse celice z jedrom, MHC II pa samo APC (DC, celice B in makrofagi) (Cummings in sod., 2004).

Celice T za svojo polno aktivacijo torej potrebujejo povezavo med receptorjem TCR in v MHC kompleksu predstavljeno antigensko determinanto, poleg tega pa potrebujejo tudi kostimulatorni signal aktivirane antigen-predstavitvene celice. Interakcija med MAMP oz. PAMP in PRR omogoča zorenje antigen-predstavitvenih celic, ki pozneje narekujejo razvoj imunskega odziva. Ta je lahko efektorski (T_{h1} , T_{h2} , T_{h17} in T_{reg} oz. CD4+ pomagajo pri aktivaciji in regulaciji drugih celic npr. makrofagov in celic B) ali citotoksični (CTL oz. CD8+ ciljno ubijajo okužene celice) (Wang in sod., 2014).

Celična tipa T_{h1} in T_{h2} se razlikujeta po citokinih, ki jih proizvajata, po citokinih na katere se odzivata in po imunskih odzivih v katere sta vpletena. Celice T_{h1} sintetizirajo pro-inflamatorne citokine kot so IFN- γ , TNF- α in IL-2, T_{h2} pa citokine IL-4, IL-5, IL-6 in IL-13.

Citokini celic T_{h1} stimulirajo fagocitozo in uničenje mikrobnih patogenov, medtem ko T_{h2} citokini spodbujajo sintezo protiteles proti velikim ekstracelularnim parazitom. Naivne celice T preidejo skozi prehodno fazo (T_{h0}) in nato postanejo aktivirane celice. IL-12 in IFN- γ sta citokina, ki spodbudita diferenciacijo proti T_{h1} , IL-4, IL-5 in IL-13 pa proti T_{h2} celičnemu tipu (Cummings in sod., 2004).

Poleg T_{h1} in T_{h2} obstajata tudi T_{h17} in T_{reg} , podseta celic T_h . T_{h17} producira IL-17, njegovo diferenciacijo pa usmerjata TGF- β in IL-6. Celice T_{reg} celice, ki producirajo IL-10, TGF- β pa je glavni faktor za usmerjanje njihove diferenciacije. Odgovorne so za ohranjanje imunske tolerance in za preprečevanje pojava avtoimunskih bolezni (Bettelli in sod., 2006)

Pri izvidu imunskega odziva igra pomembno vlogo razmerje med celicami T_{h1} in T_{h2} in njihovo produkcijo citokinov. Primerno ravnovesje je težko ohranjati, saj se celična tipa med seboj zavirata. Ko je prisotnih več celic T_{h1} je imunski odgovor usmerjen v odstranitev intracelularnih patogenov, pri T_{h2} pa proti parazitskim in ekstracelularnim vnetjem. Imunski odziv, ki je odraz prevelikega števila celic T_{h1} , je povezan s kroničnimi vnetji (arthritis, multipla skleroza), medtem ko so za presežek celic T_{h2} značilne alergijske reakcije (Cummings in sod., 2004).

3.3 MUKOZNA IMUNOST

Mukozni imunski sistem je ključen del imunskega sistema, ki lokalno omejuje prehod mikroorganizmov skozi epitel. Sestavljata ga tako prirojeni, kot tudi pridobljeni imunski odziv (Veza in sod., 2016).

Večina srečanj organizma z antigeni se dogaja na mukoznih površinah, ki obdajajo gastrointestinalni, respiratorni, genitalni in urinarni trakt. Ker probiotike večinoma v telo dobimo oralno, so idealni za vplivanje na mukozo gastrointestinalnega trakta, ki obsega več kot 300 m² in producira 70 do 85% vseh imunskih celic v organizmu (Delcenserie in sod., 2008).

3.3.1 Interakcija probiotikov z gastrointestinalnim traktom gostitelja

Probiotični mikroorganizmi z gostiteljem sodelujejo na treh ravneh njihovega gastrointestinalnega trakta: mukus (sloj sluzi), epitelno tkivo in GALT (angl. gut-associated lymphoid tissue) (Sanchez in sod., 2017).

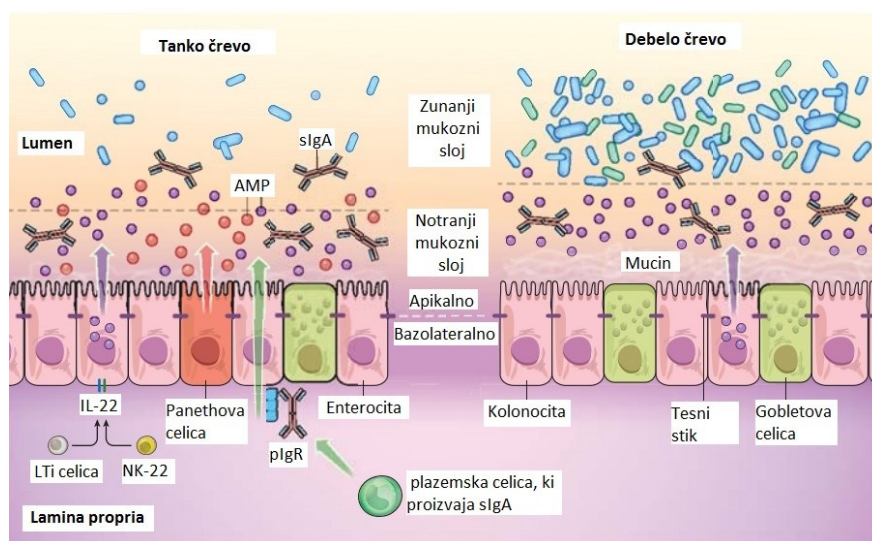
Mukus je razdeljen na dva dela, na zunanji in notranji sloj (Slika 1). V zunanjem sloju molekule mucina tvorijo rahel gel v katerem se nahaja relativno veliko število bakterij, kot tudi antimikrobni peptidi (AMP; angl. antimicrobial protein) in IgA protitelesa (nastanejo iz IgM), katerih naloga je, da omejujejo število komezalov, ki naseljujejo ta del mukoznega sloja in pomagajo pri obrambi proti bakterijam in toksinom. poseben izotip plazemskih celic B izloča dimerna protitelesa IgA. Diferenciacijo teh celic omogočajo celice CD4+in citokina IL-10 ter TGF- β , ki sta prisotna v črevesju. V lumen črevesja protitelesa IgA nato prenesejo enterocite. Nasprotno je notranji sloj mukusa precej kompakten, v njem ni bakterij oz. so tam

zelo redke. Direktno je povezan z epitelnimi celicami in jih ščiti pred dostopom bakterij (Delcenserie in sod., 2008; Johansson in sod., 2011).

Drugi nivo interakcije probiotikov s človeškim gastrointestinalnim traktom je epitelno tkivo (Slika 1). Sestavljajo ga različne epitelne celice, ki skupaj tvorijo sloj, ki obdaja celoten intestinalni lumen: enterocite in kolonocite so specializirane za absorpcijo hranil, Goblet-ove celice so specializirane za produkcijo mucina, glavne komponente mukusa, Paneth-ove celice izločajo različne antimikrobne snovi, kot so defenzini (npr. antimikrobni peptid Reg III γ) in nazadnje še celice M, ki so nekakšni mediatorji med molekulami/mikroorganizmi, ki so prisotni v intestinalnem lumnu in prirojeno imunostjo, specializirane pa so tudi za transepiteljski transport iz lumna v lamnio propio do limfoidnih foliklov. Žal veliko število patogenih mikroorganizmov izkorišča prav to lastnost celic, da preidejo črevesni epitel in napadejo gostitelja (Goto in Ivanov, 2013).

Interakcija črevesnih epitelnih celic s probiotiki je na tem nivoju zelo pomembna, saj omogočajo vzpostavitev močne pregrade črevesnega epitela. To dosežejo z ojačanjem tesnih stikov tako, da se membrani dveh sosednjih epitelijskih celic dovolj zblížata in na ta način zapreta stranske dele enterocit. Dokazano je bilo tudi, da se DC s svojimi dendriti obnašajo kot obrambne celice v intestinalnem lumnu, brez da bi porušile tesne stike med celicami epitela. Med epitelnimi celicami lahko najdemo še posebne intraepitelne limfocite (IEL), ki so večinoma CD8⁺, vendar CD4⁺ tipi niso izvzeti (Delcenserie in sod., 2008).

Zadnja točka interakcije probiotikov z gostiteljem je GALT, ki je eden izmed delov mukoznega imunskega sistema (MALT). Nahaja se v spodnjem delu gastrointestinalnega trakta, sestavljajo pa ga večinoma Peyerjeve ploščice in limfoidne celice, ki so difuzno razporejene po mukoznem tkivu. Peyerjeve ploščice so specializirane za imunski nadzor. V njih poteka interakcija med APC, kot so dendritične celice, makrofagi in enterocite, in celicami T ter B, po direktnem ali M-celično posredovanem pregledovanju vsebine črevesja (Kamada in sod., 2013).



Slika 1: Epitelno tkivo tankega in debelega črevesja (Maynard in sod., 2012: 27)

V študiji sta Galdeano in Perdigon (2004) uporabila fluorescenčno označene lactobacille, ki sta jih oralno dozirala mišim. 10 minut po hranjenju s probiotiki, je bilo možno zaznati fluorescenco v imunskih celicah Peyerjevih ploščic, v plasti mukoznega tkiva, ki leži pod epitelijem tankega črevesja (lamina propria), in v imunskih celicah limfnih vozlov v debelem črevesju. V Peyerjevih ploščicah je fluorescenčno označen *L. casei* ostal kar dva do tri dni. Te ugotovitve potrjujejo, da lahko probiotiki ali njihovi produkti dosežejo črevesni mukozni imunski sistem, tam vztrajajo nekaj časa in tako aktivirajo specifičen imunski odziv (Galdeano in Perdigon, 2004).

Tako kot druge bakterije majo tudi probiotične bakterije določene visoko ohranjene molekule, ki jim pravimo MAMP. Le te prepoznavajo specifični receptorji, ki se nahajajo na površini ali v membrani organelov epiteljskih in dendritičnih celic. Ta povezava je ključna za ohranjanje normalne interakcije med intestinalno mikrobioto in gostiteljem. Nekateri izmed receptorjev, ki se nahajajo na epitelnih ali imunskih celicah so iz družine Toll, Nod, C-tip lektinskih in RIG-I receptorjev. Interakcija med MAMP/PAMP in PRR kasneje vodi razvoj imunskega odziva (Kamada in sod., 2013).

3.3.1.1 Črevesna mikrobiota

Gastrointestinalni trakt sesalcev je poseljen z velikim številom različnih mikrobov, ki jim skupno pravimo črevesna mikrobiota (Hooper in Gordon, 2001). DNA sekvenciranje naslednje generacije je omogočilo globlje razumevanje sestave mikrobnih populacij, ki naseljujejo naš prebavni trakt in tudi ostale dele telesa, kot so zgornje dihale poti, koža, usta in vagina. Mnogo znanstvenikov meni, da bi morali mikrobioto v našem telesu obravnavati kot samostojen organ, saj ima metabolni potencial, ki se lahko enači z jetri (Sommer in Backhed, 2013). V črevesju naj bi bilo skupno $10^{12} - 10^{14}$ mikrobnih celic, kar je 10-krat več kot je evkariontskih celic v telesu (razmerje 10:1). V samem debelem črevesju, kjer jih je največ, pa $10^{11} - 10^{12}$ celic/ml vsebine črevesja, kar predstavlja 50-60% suhe mase iztrebka (Ley in sod., 2006).

Obstajajo številna nasprotna mnenja, kakšna je optimalna sestava človeške črevesne mikrobiote, ker je med posamezniki veliko variacij. Ocenili so namreč, da ima posameznik mikrobioto sestavljeno iz več kot 100 različnih vrst. Identificirali pa so jih več kot 1500, ki so del človeške črevesne mikrobiote, zato je težko ali celo nesmiselno določiti tipične enterotipe posameznih osebkov (Sanchez in sod., 2017).

Kolonizacija mikrobov v črevesju se zgodi postopoma. Začne se ob rojstvu in se nadaljuje tekom sledečih razvojnih faz. Tako se tvori intestinalna mikrobiota, ki je edinstvena vsakemu posamezniku. Proces kolonizacije zagotavlja formacijo primerne fizične imunološke pregrade med okoljem in gostiteljem, ki prispeva k ohranjanju zdravega gastrointestinalnega trakta. Na sestavo komenzalne mikrobiote najverjetneje vplivajo način prehrane in tudi drugi faktorji, kot so geografska lokacija, klimatski pogoji in higiena (Delcenserie in sod., 2008).

Interakcija med gostiteljem in mikrobioto je še posebej pomembna v neonatalnem obdobju. Vzpostavitev normalne makrobiote predstavlja največji antigenski izziv za imunski sistem in tako pomaga pri dozorevanju GALT-a. Ob rojstvu črevesnega imunskega sistema še ni.

Razvije se sočasno s pojavom intestinalne mikrobiote, ki postaja bolj in bolj raznovrstna s spremembo prehranjevalnih navad. Pri starosti okoli dveh let, je mikrobiota primerljiva z mikrobioto odraslega človeka (Delcenserie in sod., 2008).

4 IMUNOMODULATORNE LASTNOSTI PROBIOTIKOV

Z načrtnim vnosom pravilno izbranih sevov probiotikov imamo možnost, da vplivamo na delovanje imunskega sistema gostitelja. V nadaljnjem besedilu je opisano, kako interakcija med probiotiki in gostiteljem modulira prirojeno in pridobjeno imunost.

4.1 VPLIV PROBIOTIKOV NA PRIROJENO IMUNOST

4.1.1 Makrofagi in fagocitoza

Mnogo sevov probiotikov ima sposobnost vplivati na obrambne mehanizme prirojene imunosti, kot je na primer fagocitoza. Perdigon in sod. (1988) so dokazali, da *L. acidophilus* in *L. casei* (izolirana iz človeških iztrebkov) vplivata na povečanje fagocitozne kapacitete glodalnih peritonealnih makrofagov. Dokazano je bilo tudi, da je *L. acidophilus* La1 povečal fagocitozno sposobnost levkocitov, izoliranih iz krvi ljudi, ki so uživali probiotike, kar je v skladu z adhezijskim potencialom tega seva. Bakterija *B. lactis* BB12 ima proti *L. acidophilus* La1 nekoliko slabše adhezijske sposobnosti, vendar je kljub temu fagocitozo znatno povečala (Schiffrin in sod., 1995; Schiffrin in sod., 1997).

Pelto in sod. (1998) so dokazali, da so mlečni produkti, ki vsebujejo *L. rhamnosus* GG, signifikantno povečali izražanje pomembnih fagocitoznih receptorjev kot so CR1, CR3, FcγRIII in FCαR pri neutrofilcih zdravih posameznikov. Omembe vredno je to, da so pacienti, ki trpijo za preobčutljivostjo na mleko, kazali povečano izražanje teh receptorjev, ki pa se je zmanjšala, ko so začeli z uživanjem mleka, ki je vsebovalo bakterijo *L. rhamnosus* GG. Avtorji raziskave so zaključili, da *L. rhamnosus* GG stimulira fagocitozno aktivnost pri zdravih posameznikih, ter jo inhibira pri osebah, ki so preobčutljive na mleko (Pelto in sod., 1998).

Raziskava Donnet-Hughes in sod. (1999) je pokazala, da *L. johnsonii* La1 povečuje sproščanje reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) iz fagocitov, izoliranih iz človeške krvi, po uporabi probiotika. Poleg tega se je po zaužitju *L. rhamnosus* HN001 in *B. lactis* HN109, povišala tudi *ex vivo* fagocitozna sposobnost mononuklearnih (T, B, celice NK in monociti) in polimorfonuklearnih fagocitov (nevtrofilci, bazofilci, eosinofilci) (Gill in sod., 2001a; Sheih in sod., 2001).

Dvorožňáková in sod. (2016) so izvedli študijo, pri kateri so preučevali vpliv probiotikov na miši, okužene s parazitom *Trichinella spiralis*. Mišim so dnevno dozirali 100 μl probiotičnih sevov s koncentracijo 10⁹ CFU/ml in jih z larvami *T. spiralis* okužili sedmi dan. Probiotiki so spodbudili fagocitozno aktivnost polimorfonuklearnih levkocitov in prispevali k preprečitvi inhibicije fagocitoze tretji teden po okužbi. Največji stimulatívni učinek so dosegli s tremi sevi: *Enterococcus durans* ED26E/7, *L. fermentum* AD1 = CCM7421 in *L. plantarum* 17L/1.

Zaključili so, da povečanje fagocitoze prispeva k ubijanju parazita in preprečuje migracijo novorojenih ličink v mišično tkivo, ter tako zmanjšuje breme parazita v gostitelju (Dvorožňáková in sod., 2016).

4.1.2 Celice naravne ubijalke (celice NK)

Probiotični organizmi vplivajo na delovanje celic naravnih ubijalk (celice NK), ki so vrsta citotoksičnih limfocitov, ključnih za delovanje prirojene imunosti.

Gill in sod. (2001b) ter Sheih in sod. (2001) so dokazali, da sta seva *L. rhamnosus* HN001 in *B. lactis* HN019 znatno povečala citotoksični potencial celic NK (iz 71% na 147%). Le ta se je po prenehanju uživanja probiotikov zmanjšal, vendar je vrednost še vedno ostala nad izhodiščno vrednostjo, izmerjeno pred jemanjem probiotikov. Ugotovili so tudi, da so pozitivni učinki probiotikov na fagocitozo in delovanje celic NK večji pri imunsko oslabeledih, ponavadi starejših posameznikih. Redno uživanje probiotikov lahko zato pripomore k izboljšanju delovanja njihove prirojene imunosti (Gill in sod., 2001b; Sheih in sod., 2001).

Uporaba probiotičnega seva *L. casei* subsp. *casei* JCM 1134 je v kombinaciji s prebiotikom dekstranom povečala učinkovitost delovanja celic NK. Ogawa in sod. (2006) menijo, da so za to verjetno odgovorne s strani probiotika inducirane epiteljske celice, ki s produkcijo citokina IL-15 vplivajo na celice NK (spodbujajo njihovo proliferacijo). Sev *L. casei* Shirota je prav tako povečal aktivnost celic NK in sicer preko spodbujanja produkcije citokina IL-12 (s perifernimi krvnimi celicami; PBMC), ki je prav tako pomemben pri aktivnosti celic NK. Probiotiki imajo zato verjetno zelo pomembno vlogo pri spodbujanju nadzorne funkcije celic NK (Takeda in sod., 2006).

Olivares in sod. (2007) pa so dokazali, da lahko peroralni vnos *L. fermentum* CECT5716 poveča imunski odziv posameznikov, cepljenih s cepivom proti gripi, s povečanjem deleža celic NK. Prav tako so Rask in sod. (2013) zasledili povečanje populacije celic NK pri 57 zdravih posameznikih ob uživanju *L. paracasei* 8700 (DSM13434).

4.1.3 Enterocite in produkcija citokinov

Sev *E. coli* Nissle 1917 je induciral produkcijo citokina IL-8 pri celicah HT-29 (človeške črevesne adenokarcinoma celice, ki lahko izražajo lastnosti, značilne za zrele črevesne epitelne celice, kot so na primer Gobletove celice). Lactobacilli in bifidobakterije, ki jih vsebuje široko uporabljen probiotik VSL#3 (G+ bakterije; *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. plantarum*, in *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*), niso imeli te sposobnosti (Lammers in sod., 2002). *L. plantarum* 299v je prav tako povečal nivo IL-8 mRNA v celicah HT-29, ki so bile predhodno stimulirane s TNF- α . Pri tej interakciji je bila nujna prisotnost viabilnih bakterij, saj povečanega izražanja IL-8 ni bilo moč zaslediti, če je bila adhezija *L. plantarum* 299v na celice HT-29 inhibirana (McCracken in sod., 2002).

Citokin IL-8 je verjetno glavni citokin, ki ga proizvajajo enterocite po interakciji s probiotičnimi mikroorganizmi. Deluje predvsem kot kemoatraktant za neutrofilce. Sevi probiotikov se med seboj razlikujejo po svoji zmogljivosti indukcije produkcije IL-8 – nekateri sevi delujejo celo zaviralno. Na primer sev *L. reuteri*, ki ima protivnetni učinek na epitelne črevesne celične linije T84 in HT-29, saj zmanjšuje njihovo produkcijo IL-8 (Ma in sod., 2004). Do teh ugotovitev so prišli s preučevanjem interakcije probiotikov s celičnimi modeli, zato ni nujno, da je to realen prikaz stanja in vivo.

Poleg IL-8 lahko enterocite izločajo tudi druge citokine, na primer IL-6. Citokin IL-6 je vključen v številne biološke procese, kot je na primer končna diferenciacija limfocitov B. Poznan je tudi po številnih vnetnih, kot tudi protivnetnih sposobnostih, saj zavira izražanje IL-1 in TNF- α mRNA iz monocit, ki so bile prehodno stilmulirane z LPS (Vinderola in sod., 2005). V raziskavi so Ruiz in sod. (2005) uporabili podgane, katerih prebavni trakt je naseljeval samo *B. Lactis* BB12. Pokazali so, da so bile črevesne epitelne celice sposobne sinteze IL-6, največjo sintezo pa so zabeležili peti dan po kolonizaciji probiotika. Tudi Vinderola in sod. (2005) so pri miših z uporabo sevov *L. casei* CRL 431 in *L. helveticus* R389 dosegli povišano izločanje citokina IL-6. Probiotični sevi *L. casei* subs. *casei* JCM 1134, *L. paracasei* ssp. *paracasei* JCM in *L. acidophilus* JCM 1132 pa so inducirali produkcijo IL-15 (pomemben za proliferacijo celic NK) v celicah CaCo-2 (Ogawa in sod., 2006).

V raziskavi so Tien in sod. (2006) z analizo DNA-mikromrež pokazali, da je sev *L. casei* DN-114 001 zmanjšal izražanje kemokinov, ki so odgovorni za privabljanje makrofagov in dendritičnih celic, v celicah CaCo-2, izpostavljenih *Shigella flexneri*. Sev *L. rhamnosus* GG pa je inhibiral s citokini povzročeno apoptozo (TNF- α , IL-1 α , IFN- γ) črevesnih epitelnih celic (Yan in Polk, 2002).

Iz zgornjih raziskav je razvidno, da je interakcija med probiotiki in celicami črevesnega epitela ključna za produkcijo citokinov in je začetni korak imunomodulacije, saj se začne pred srečanjem s celicami imunskega sistema.

4.2 VPLIV PROBIOTIKOV NA PRIDOBLJENO IMUNOST

4.2.1 Produkcija protiteles IgA

Veliko probiotikov ima sposobnost stimulirati B celično produkcijo protiteles IgA, ki pomagajo ohranjati črevesno humoralno imunost. Naloga IgA je vezava antigenov in s tem preprečevanje, da bi ti prišli do epitela.

Pri ljudeh, ki so pred cepljenjem proti *Salmonella typhi* Ty21 pili mleko, ki je vsebovalo seva *B. bifidum* BB12 in *L. acidophilus* La1, so opazili znatno povečanje serumskega IgA (Link-Amster in sod., 1994). Isolauri in sod. (1995) so izvedli podobno raziskavo, kjer so otroci med drugim in petim letom starosti prejeli probiotični sev *L. rhamnosus* GG sočasno z oralnim cepivom proti rotavirusom. Tudi pri njih se je povečalo število celic, ki izločajo IgA. Laktobacili bi zato lahko bili uporabni kot adjuvantni oralnim cepivom, saj hkrati stabilizirajo mukozno pregrado in obenem povečajo sprejemanje antigenov v Peyerjevih ploščicah ter tako omogočajo povečanje humoralnega odziva (Isolauri in sod., 1995).

Prav tako so pri zdravih otrocih, ki so nekaj mesecev po cepljenju proti otroški paralizi (polio virus) uživali pripravek s sevom *B. lactis* BB12, opazili povečanje antipoliiovirusnega IgA in povečanje IgA v iztrebkih. Antipoliiovirusni IgA je odgovoren za preprečevanje pomnoževanja polio virusa v gastrointestinalnem traktu s preprečevanjem adhezije na mukozne površine (Fukushima in sod., 1998).

Nekatere izmed raziskav so poudarjale, da se ob oralnem uživanju probiotikov, zviša serumska vrednost IgA. Vendar pa obstaja razlika med serumskim IgA in tistim, ki je prisoten v črevesju, saj ima slednji dimerno obliko, ter vsebuje sekretorno komponento, potrebno za sekrecijo. Zato ni nujno, da so povišane vrednosti serumskega IgA odraz realnega stanja v prebavnem traktu. Park in sod. (2002) so preučevali IgA produkcijo črevesnih mukoznih limfoidnih celic pri miših. Dokazali so, da je probiotični sev *B. bifidum* BB11 znatno povečal produkcijo IgA v Peyerjevih ploščicah in v mezenteričnih limfnih vozlih. Ugotovili so tudi to, da so za imunostimulatorne lastnosti probiotika odgovorne predvsem njegove celične komponente in ne snovi, ki jih izloča v okolico (Park in sod., 2002).

LeBlanc in sod. (2004) so iz mleka, fermentiranega z *L. helveticus* R389, izolirali peptidno frakcijo, ki je prispevala k indukciji IgA imunskega odziva v miškah, okuženih z *E. coli* O157:H7. Raziskava je dokaz, da lahko »nežive« komponente probiotikov vplivajo na imunski status gostitelja, čeprav to ni zajeto v trenutni definiciji probiotičnih mikroorganizmov (LeBlanc in sod. 2004).

Poleg tega se zdi, da je vpliv probiotikov na humoralno imunost odvisen od njihove sposobnosti kolonizacije črevesja. Čeprav sta seva *L. johnsonii* NCC 533 in *L. paracasei* NCC 2461 kazala podobno adhezijo na CaCo-2 celice, je bil *L. johnsonii* boljši v kolonizaciji črevesja gnotobiotičnih mišk in posledično boljši stimulator produkcije črevesnega IgA, kot *L. paracasei* (Ibnou-Zekri in sod., 2003).

Povečanje produkcije IgA se zgodi predvsem zaradi spremembe citokinskega okolja v sluznici črevesja. Probiotični mikroorganizmi inducirajo epitelijsko izražanje TGF- β , IL-10 in IL-6, ti pa potencirajo IgA produkcijo preko maturacije celic B (He in sod., 2007).

Omembe vredno je tudi to, da bi lahko s pravilno izbranimi sevi probiotikov vplivali na povečanje izražanja transmembranskega receptorja (pIgR) na bazolateralni strani intestinalnih epitelnih celic, kar bi povečalo prehod IgA skozi epitelne celice v lumen črevesja (Resendiz-Albor in sod., 2010).

4.2.2 Dendritične celice in celice T_{reg}

Probiotični organizmi lahko modulirajo imunski odziv z vplivom na diferenciacijo in proliferacijo dendritičnih celic, ki so ključne pri določanju ravnovesja med T celičnimi subpopulacijami in pri razvoju oralne tolerance.

V raziskavi so Drakes in sod. (2004) uporabili znan probiotični pripravek VSL #3, ki so ga oralno dozirali mišim. Probiotična mešanica VSL #3 je povečala izražanje kostimulatornih

molekul, potrebnih za aktivacijo celic T: CD80, CD86, CD40 in MHC II na površini DC. Vendar DC, ki so bile inkubirane s probiotiki, niso bile sposobne inducirati proliferacije celic T. Opazili so predvsem močno izražanje citokina IL-10 in manjše izražanje IL-12. IL-10 je glaven T_H2 (in T_{reg}) citokin, ki zavira produkcijo IL-12 in posledično tudi ostale T_H1 citokine (TNF- α , IFN- γ), kar preprečuje pojav inflamatorne kaskade in omogoča doseganje antigensko specifične tolerance. Rezultati kažejo na to, da lahko probiotiki modulirajo fenotip in produkcijo citokinov DC. Zmožnost uravnavanja citokinskega profila DC predstavlja veliko korist, predvsem pri zdravljenju črevesnih in tudi drugih bolezni (Drakes in sod. 2004).

Hart in sod. (2004) so DC prav tako inkubirali s probiotičnim pripravkom VSL #3. Ugotovili so, da je VSL #3 zmanjšal vnetne učinke lipopolisaharidov (LPS) z zmanjšanjem z LPS inducirane produkcije IL-12, ob ohranjanju produkcije IL-10. Od vseh bakterijskih sevov v probiotičnem pripravku, so bile pri indukciji sinteze IL-10 najbolj uspešne bifidobakterije. Bifidobakterije zmanjšujejo tudi izražanje CD80 v DC in T-celično produkcijo IFN- γ .

Smits in sod. (2005) so ugotovili, da lahko nekateri probiotiki vplivajo na DC tako, da te začnejo spodbujati razvoj T_{reg} celic, ki producirajo citokin IL-10. Najbolj uspešna sta bila seva *L. reuteri* ASM20016 in *L. casei* NIZO B255, medtem ko *L. plantarum* NIZO B253 pri indukciji diferenciacije celic T v T_{reg} celice ni bil uspešen. Zdi se, da *L. reuteri* in *L. casei* svoje pozitivne učinke posredujejo preko vezave s proteinom DC-SIGN (angl. C-type lectin, DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin), značilnim za DC.

Poleg tega, so v živalskem modelu kronične vnetne črevesne bolezni (KVČB), povzročenem s celicami T_H1 , s tri tedenskim doziranjem VSL #3, dosegli veliko izboljšanje stanja. Pozitivne učinke probiotičnega pripravka so pripisali povečani produkciji IL-10 in predvsem povečanemu številu celic T_{reg} , ki so izražale TGF- β – citokin z močnimi imunosupresivnimi lastnostmi (Di Giacinto in sod., 2005).

Zanimivo je tudi, da je sev *L. paracasei* NCC2461 sodeloval pri vzpostavitvi oralne tolerance na β -laktoglobulin (BLG) pri miših, saj so encimi probiotičnega seva *L. paracasei* NCC2461 prispevali k hidrolizi BLG na peptide, ki so nato stimulirali T_{reg} -celično produkcijo IL-10 (Prioult in sod., 2003; Prioult in sod., 2004)

Zgornje raziskave kažejo, da veliko probiotikov z vplivom na dendritične celice posreduje protivnetne lastnosti, zlasti s spodbujanjem razvoja celic T_{reg} . Res je, da je večina citokinskih profilov DC usmerjena v protivnetne odzive, a se moramo zavedati, da so lastnosti probiotikov, tudi v tem primeru, sevno specifične. Mohamadzadeh in sod. (2005) so na primer dokazali, da nekateri sevi laktobacilov (npr. *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. gasseri*) preko DC usmerjajo razvoj T celic v T_H1 podset, saj producirajo veliko IL-12 in IL-18, a ne IL-10.

4.2.2.1 T_{reg} odziv in topni faktorji

T_{reg} odziv je direktno povezan z ohranjanjem intestinalne homeostaze in razvijanjem odpornosti na stalno prisotno mikrobioto (Wang in sod., 2014). Probiotiki, ki inducirajo T_{reg} odziv, so izredno pomembni pri vnetnih boleznih, kot je npr. KVČB. Pri živalih, vzgojenih v sterilnem okolju (t.i. »germ-free«), so opazili, da kolonizacija z modelno mikrobioto inducira

vpoklic in produkcijo celic T_{reg} v intestinalnem mukoznem tkivu, kar je nujno za ohranjanje nizke stopnje vnetja v intestinalni mukozi.

Nekatere probiotične bakterije, npr. laktobacili, ta proces najverjetneje povzročijo preko produkcije imunomodulatornih peptidov, kot je STp. Ta peptid inducira anti-inflamatorni citokinski profil v DC, medtem ko zavira inflamatorne mediatorje - tako v zdravih ljudeh, kot tudi pri ljudeh z ulceroznim kolitisom (Bernardo in sod., 2012; Al-Hassi in sod., 2014).

Introdukcijo T_{reg} odziva so opazili tudi pri nekaterih predstavnikih Clostridium klastra IV, XIVa in XVIII. (Atarashi in sod., 2013). Homeostatski učinek je dosežen s produkcijo SCFA, predvsem butirata. Topni dejavniki, ki jih sintetizirajo probiotiki, so poleg tega, da so zmožni stimulirati gostiteljev imunski sistem, zmožni vplivati tudi direktno na epitel. Producenti butirata, v tem primeru, igrajo zelo pomembno vlogo pri vzdrževanju epitelov, saj je butirat eden izmed glavnih virov energije za enterocite (Louis in sod., 2014).

4.2.3 Th1/Th2 ravnovesje

Probiotiki modulirajo $CD4^+$ T-celično diferenciacijo; in sicer v prid T_{h1} (vnetni odziv) ali v prid T_{h2} (protivnetni odziv, značilen tudi za alergije) podseta. Ravnovesje med celicami Th1 in Th2 je ključno za ohranjanje homeostaze.

Probiotični sevi *L. plantarum* NCIMB8826, *L. lactis* MG1363, *L. casei* ATCC393 in *L. rhamnosus* GG so vsi inhibirali T_{h2} odziv pri pacientih, alergičnih na hišne pršice, tako, da so znatno zmanjšali IL-4 in IL-5 produkcijo v perifernih krvnih celicah (PBMC; celice T, B, NK in monocite). Ta mehanizem je potekal le ob prisotnosti monocit in je bil odvisen od T_{h1} citokinov IL-12 in IFN- γ (Pochard in sod., 2002).

Zgornje ugotovitve so potrdili tudi Won in sod. (2011). Iz kimčija, tradicionalne korejske hrane, so izolirali seve laktobacilov, ki so jih kokultivirali z mišjimi belimi krvničkami (izolirane iz vranice, splenocite), občutljivimi na ovalbumin. Visoko produkcijo IL-12, ki spodbudi diferenciacijo in aktivacijo T_{h1} celic, in najnižjo produkcijo IL-4, so zasledili pri štitih sevih: *L. plantarum* CJLP55, CJLP56, CJLP133, in CJLP136. Te ugotovitve kažejo, da lahko laktobacili iz kimčija zmanjšajo T_{h2} alergijsko reakcijo preko makrofagov, ki inducirajo T_{h1} odziv in tako ponovno vzpostavijo primerno ravnovesje med T_{h1} in T_{h2} (Won in sod., 2011).

Po drugi strani, so v raziskavi, kjer so otroci z atopičnim dermatitidom, prejeli probiotični sev *L. rhamnosus* GG, ugotovili, da je ta močno povečal serumske koncentracije IL-10 (Pessi in sod., 2000). Citokin IL-10 producirajo T_{h2} celice in tudi DC, monocite, T_{reg} in B celice. Njegova primarna naloga pa je inhibicija T_{h1} celičnega odziva in s tem spodbujanje T_{h2} protivnetnega delovanja (Moore in sod., 2001).

IL-10 je glavni citokin pri ohranjanju tolerance do komenzalnih bakterij v črevesju. Če ga v črevesju ni, se pri miših v črevesju pojavi močno vnetje (Kuhn in sod., 1993). Madsen in sod. (1999) so dokazali, da se je pri miših s pomanjkanjem IL-10, ob prejemu seva *L. reuteri*, zmanjšala možnost pojava kolitisa. Prav tako so pri IL-10 »knock-out« miškah z dodajanjem

L. salivarius UCC118 in *B. infantis* 35624, opazili protivnetne učinke, ki so bili posledica zmanjšane produkcije vnetnih citokinov IL-12, IFN- γ in TNF- α v celicah Peyerjevih ploščic, produkcija TGF- β pa je ostala nespremenjena. Rezultati kažejo na to, da imajo probiotiki v črevesju protivnetno funkcijo, ter da se imunski odziv lahko obrne tudi v smer T_h2 celic (McCarthy in sod, 2003).

Laktobacili so učinkovali tudi na eksperimentalni živalski model avtoimunega encefalomielitisa (EAE). Vplivi so bili sevno specifični; *L. reuteri* je EAE poslabšal, medtem ko sta seva *L. casei* in *L. murines* zavirala bolezen (Maassen in sod., 1998). Torej probiotiki lahko vplivajo na avtoimunske bolezni, vendar je potrebno opraviti še veliko študij na ljudeh, da bi lahko z gotovostjo trdili kateri sevi so koristni za določeno bolezen. Dejstvo je, da obstaja tveganje, da probiotik usmeri imunski sistem proti T_h1 odzivu in tako še poslabša stanje pacienta s T_h1 povzročeno avtoimunsko boleznijo.

Zgornje raziskave kažejo, da probiotiki usmerjajo T_h1/T_h2 ravnovesje v smer enega ali drugega podseta. Obstajajo pa tudi taki, ki vplivajo na oba. Na primer, doziranje probiotičnih sevov *L. casei* CRL 431, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CRL 423 in *L. acidophilus* CRL 730 je v miših povečalo sistemsko produkcijo protiteles IgG1, ki so značilna za Th1 odziv, *L. acidophilus* CRL 730 pa je hkrati povzročil tudi povečano izražanje IgG2a, ki so značilna za odziv celic Th2 (Perdigon in sod., 2002).

5 RAZLIKE MED G+ IN G- PROBIOTIKI V MODULACIJI IMUNSKEGA SISTEMA

Lactobacilli spp. (po G+) in *Escherichia coli* Nissle 1917 (po G-) sta dva probiotka, ki jih pogosto uporabljajo pri zdravljenju otrok s KVČB in otrok z diarejo, povzročeno s strani človeškega rotavirusa. Kandasamy in sod. (2017) so primerjali pozitivne učinke po G+ in po G- probiotikov na moduliranje imunskega sistema gnotobiotičnih prašičev. Ob enakih kolonizacijskih sposobnostih obeh sevov, je po G- *E. coli* Nissle 1917 spodbudila večjo produkcijo IgA kot G+ *L. rhamnosus* GG, kar pomeni, da ima *E. coli* večji protitelesni (IgA) imunostimulacijski učinek, kot *L. rhamnosus* GG. Razlika v stopnji indukcije sinteze protiteles IgA verjetno izhaja iz tega, da G- bakterija vzbudi višjo produkcijo IL-10. Razlog za razlike v produkciji IL-10 pa so najverjetneje različni PAMP na površini G- in G+ bakterij. Ugotovili so tudi, da je kolonizacija gnotobiotičnih prašičev z G+ in G- bakterijami hkrati, bolj okreplila produkcijo IgA, kot pri prašičih, ki so jim dozirali samo z G+ ali G-, kar kaže na aditivne učinke sinergije med G+ in G- mikroorganizmi (Kandasamy in sod., 2017).

Poleg tega je G- *E. coli* Nissle 1917 vplivala na povečanje števila aktiviranih DC, bolj kot G+ *L. rhamnosus* GG. Povečala pa je tudi citotoksičnost celic NK, za kar so najverjetneje odgovorne visoke serumske vrednosti IL-12 (Kandasamy in sod., 2017).

Ob okužbi organizma z virusom, lahko komenzalni mikroorganizmi in probiotiki virusno okužbo z vezavo na virus preprečijo ali spodbudijo. Ugotovili so, da se *E. coli* Nissle 1917 veže na človeški rotavirus in tako prepreči njegovo adhezijo na epitelne celice, s tem pa prepreči okužbo. Preverjali so tudi vezavo *L. rhamnosus* GG, vendar sev ni bil tako uspešen kot po G- bakterija (Kandasamy in sod., 2017).

Če povzamemo, ima G- *E. coli* Nissle 1917 večje imunomodulatorne učinke kot G+ *L. rhamnosus* GG in je bolj uporabna pri zdravljenju bolezni, predvsem diareje, povzročene z rotavirusom. Vendar še vedno ni dovolj dokazov, da bi to lahko posplošili za vse G- in G+ probiotike in komezale, saj je njihovo delovanje od seva do seva različno.

6 ZAKLJUČEK

Probiotični mikroorganizmi lahko s svojimi sevno specifičnimi imunomodulatornimi lastnostmi vplivajo na zdravje ljudi in živali. Že Hipokrat je pravil, da vse bolezni izhajajo iz črevesja in to ni daleč od resnice. Poleg zdravljenja črevesnih bolezni, se potencial probiotikov kaže tudi pri zdravljenju različnih alergij, preobčutljivosti, težav s kožo, avtoimunskih bolezni itd., uporabni pa bi bili tudi kot adjuvanti oralnim cepivom.

Probiotiki svoje imunomodulatorne lastnosti posredujejo preko interakcije z gostiteljevim črevesnim epitelom. Imunski sistem usmerjajo z vplivom na fagocitozne sposobnosti makrofagov in drugih celic, s povečevanjem števila in učinkovitosti celic NK, s spodbujanjem produkcije citokinov, s spodbujanjem produkcije protiteles IgA, z vplivom na DC in posledično na T_{reg} celice, ter z uravnavanjem ravnovesja T_h1/T_h2.

Namen raziskav vpliva probiotikov na imunski sistem je predvsem zbrati čim več informacij, da bi probiotične seve lahko uporabili za zdravljenje bolezni ali kot podporno terapijo. Izvedenih je bilo že veliko raziskav, ki veliko obetajo, vendar je pred tem, da bi probiotiki postali stalna praksa pri zdravljenju, potrebno opraviti še veliko dela. Natančno je potrebno določiti mehanizme delovanja posameznih sevov na gostiteljev imunski sistem in optimizirati odmerek ter kombinacijo sevov, za doseganje želenih rezultatov. To je pomembno, saj lahko z napačnim izborom probiotičnih sevov stanje bolniku še poslabšamo.

Prihodnost probiotičnih mikroorganizmov vidim v biotehnoloških posegih, kjer bi z rekombinantnimi tehnikami ustvarili seve z želenimi imunomodulatornimi in tehnološkimi lastnostmi, kar bi močno olajšalo delo z njimi.

7 VIRI

Al-Hassi H. O., Mann E. R., Sanchez B., English N. R., Peake S. T., Landy J., Man R., Urdaci M., Hart A. L., Fernandez-Salazar L., Lee G. H., Garrote J. A., Arranz E., Margolles A., Stagg A. J., Knight S. C., Bernardo D. 2014. Altered human gut dendritic cell properties in ulcerative colitis are reversed by *Lactobacillus plantarum* extracellular encrypted peptide STp. *Molecular Nutrition & Food Research*, 58: 1132-1143

Atarashi K., Tanoue T., Oshima K., Suda W., Nagano Y., Nishikawa H., Fukuda S., Saito T., Narushima S., Hase K., Kim S., Fritz J. V., Wilmes P., Ueha S., Matsushima K., Ohno H., Ollé B., Sakaguchi S., Taniguchi T., Morita H., Hattori M., Honda K. 2013. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature*, 500: 232-236

- Bernardo D., Sanchez B., Al-Hassi H. O., Mann E. R., Urdaci M. C., Knight S. C., Margolles A. 2012. Microbiota/host crosstalk biomarkers: regulatory response of human intestinal dendritic cells exposed to *Lactobacillus* extracellular encrypted peptide. *PLoS One*, 7, 5: e36262, doi:10.1371/journal.pone.0036262: 8 str.
- Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T. B., Oukka M., Weiner H. L., Kuchroo V. K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 441: 235-238
- Borchers A. T., Selmi C., Meyers F. J., Keen C. L., Gershwin M. E. 2009. Probiotics and immunity. *Journal of Gastroenterology*, 44: 26-46
- Cummings J. H., Antoine J. M., Azpiroz F., Bourdet-Sicard R., Brandtzaeg P., Calder P. C., Gibson G. R., Guarner F., Isolauri E., Pannemans D., Shortt C., Tuijelaars S., Watzl B. 2004. PASSCLAIM--gut health and immunity. *European Journal of Nutrition*, 43, 2: 118-173
- Delcenserie V., Martel D., Lamoureux M., Amiot J., Boutin Y., Roy D. 2008. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology*, 10: 37-54
- Di Giacinto C., Marinaro M., Sanchez M., Strober W., Boirivant M. 2005. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *The Journal of Immunology*, 174: 3237-3246
- Donnet-Hughes A., Rochat F., Serrant P., Aeschlimann J. M., Schiffrin E. J. 1999. Modulation of Nonspecific Mechanisms of Defense by Lactic Acid Bacteria: Effective Dose. *Journal of Dairy Science*, 82: 863-869
- Drakes M., Blanchard T., Czinn S. 2004. Bacterial Probiotic Modulation of Dendritic Cells. *Infection and Immunity*, 72: 3299-3309
- Dvorožňáková E., Bucková B., Hurníková Z., Revajová V., Lauková A. 2016. Effect of probiotic bacteria on phagocytosis and respiratory burst activity of blood polymorphonuclear leukocytes (PMNL) in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Veterinary Parasitology*, 231: 69-76
- Fukushima Y., Kawata Y., Hara H., Terada A., Mitsuoka T. 1998. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *International Journal of Food Microbiology*, 42: 39-44
- Galdeano C. M., Perdigon G. 2004. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 673-681
- Gibson G. R., Hutkins R., Sanders M. E., Prescott S. L., Reimer R. A., Salminen S. J., Scott K., Stanton C., Swanson K. S., Cani P. D., Verbeke K., Reid G. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14, 8: 491-502
- Gill H. S., Rutherford K. J., Cross M. L. 2001a. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *Journal of Clinical Immunology*, 21: 264-271

- Gill H. S., Rutherford K. J., Cross M. L., Gopal P. K. 2001b. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74: 833-839
- Goto Y., Ivanov, Ii. 2013a. Intestinal epithelial cells as mediators of the commensal-host immune crosstalk. *Immunology & Cell Biology*, 91: 204-214
- Hart A. L., Lammers K., Brigidi P., Vitali B., Rizzello F., Gionchetti P., Campieri M., Kamm M. A., Knight S. C., Stagg A. J. 2004. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, 53: 1602-1609
- He B., Xu W., Santini P. A., Polydorides A. D., Chiu A., Estrella J., Shan M., Chadburn A., Villanacci V., Plebani A., Knowles D. M., Rescigno M., Cerutti A. 2007. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity*, 26: 812-826
- Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G. R., Merenstein D. J., Pot B., Morelli L., Canani R. B., Flint H. J., Salminen S., Calder P. C., Sanders M. E. 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11: 506-514
- Holzappel W. H., Haberer P., Geisen R., Bjorkroth J., Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 365-373
- Hooper L. V., Gordon J. I. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292: 1115-1118
- Ibnou-Zekri N., Blum S., Schiffrin E. J., Von Der Weid T. 2003. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties in vitro. *Infection and Immunity*, 71: 428-436
- Isolauri E., Joensuu J., Suomalainen H., Luomala M., Vesikari T. 1995. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine*, 13: 310-312
- Johansson M. E., Larsson J. M., Hansson G. C. 2011. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 1: 4659-4665
- Kamada N., Seo S. U., Chen G. Y., Nunez G. 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 3: 321-335
- Kandasamy S., Vlasova A. N., Fischer D. D., Chattha K. S., Shao L., Kumar A., Langel S. N., Rauf A., Huang H.-C., Rajashekara G., Saif L. J. 2017. Unraveling the Differences between Gram-Positive and Gram-Negative Probiotics in Modulating Protective Immunity to Enteric Infections. *Frontiers in Immunology*, 8: 334
- Kuhn R., Lohler J., Rennick D., Rajewsky K., Muller W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75: 263-274
- Lammers K. M., Helwig U., Swennen E., Rizzello F., Venturi A., Caramelli E., Kamm M. A., Brigidi P., Gionchetti P., Campieri M. 2002. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *The American Journal of Gastroenterology*, 97: 1182-1186

- LeBlanc J., Fliss I., Matar C. 2004. Induction of a Humoral Immune Response following an *Escherichia coli* O157:H7 Infection with an Immunomodulatory Peptidic Fraction Derived from *Lactobacillus helveticus*-Fermented Milk. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11: 1171-1181
- 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
- Link-Amster H., Rochat F., Saudan K. Y., Mignot O., Aeschlimann J. M. 1994. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 10: 55-63
- Louis P., Hold G. L., Flint H. J. 2014. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nature Reviews Microbiology*, 12: 661-672
- Ma D., Forsythe P., Bienenstock J. 2004. Live *Lactobacillus rhamnosus* [corrected] is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infection and Immunity*, 72: 5308-5314
- Maassen C. B., Van Holten J. C., Balk F., Heijne Den Bak-Glashouwer M. J., Leer R., Laman J. D., Boersma W. J., Claassen E. 1998. Orally administered *Lactobacillus* strains differentially affect the direction and efficacy of the immune response. *The Veterinary Quarterly*, 20, 3: 81-83
- Madsen K. L., Doyle J. S., Jewell L. D., Tavernini M. M., Fedorak R. N. 1999. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology*, 116: 1107-1114
- Maynard C. L., Elson C. O., Hatton R. D., Weaver C. T. 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489: 231-241
- McCarthy J., O'mahony L., O'callaghan L., Sheil B., Vaughan E. E., Fitzsimons N., Fitzgibbon J., O'sullivan G. C., Kiely B., Collins J. K., Shanahan F. 2003. Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut*, 52: 975-980
- Mccracken V. J., Chun T., Baldeon M. E., Ahrne S., Molin G., Mackie R. I., Gaskins H. R. 2002. TNF-alpha sensitizes HT-29 colonic epithelial cells to intestinal lactobacilli. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, 227: 665-670
- Mohamadzadeh M., Olson S., Kalina W. V., Ruthel G., Demmin G.L., Warfield K.L., Bavari S., Klaenhammer T. R. 2005. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 2880-2885
- Moore K. W., De Waal Malefyt R., Coffman R. L., O'garra A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, 19: 683-765
- Ogawa T., Asai Y., Tamai R., Makimura Y., Sakamoto H., Hashikawa S., Yasuda K. 2006. Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clinical and Experimental Immunology*, 143: 103-109
- Olivares M., Diaz-Ropero M. P., Sierra S., Lara-Villoslada F., Fonolla J., Navas M., Rodriguez J. M., Xaus J. 2007. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition*, 23: 254-260

- Park J. H., Um J. I., Lee B. J., Goh J. S., Park S. Y., Kim W. S., Kim P. H. 2002. Encapsulated *Bifidobacterium bifidum* potentiates intestinal IgA production. *Cell Immunol*, 219: 22-27
- Pelto L., Isolauri E., Lilius E. M., Nuutila J., Salminen S. 1998. Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clinical & Experimental Allergy*, 28: 1474-1479
- Perdigon G., De Macias M. E., Alvarez S., Oliver G., De Ruiz Holgado A. P. 1988. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Immunology*, 63: 17-23
- Perdigon G., Maldonado Galdeano C., Valdez J. C., Medici M. 2002. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 4: 21-26
- Pessi T., Sutas Y., Hurme M., Isolauri E. 2000. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clinical & Experimental Allergy*, 30: 1804-1808
- Pochard P., Gosset P., Grangette C., Andre C., Tonnel A.-B., Pestel J., Mercenier A. 2002. Lactic acid bacteria inhibit T_H2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 110: 617-623
- Prioult G., Fliss I., Pecquet S. 2003. Effect of Probiotic Bacteria on Induction and Maintenance of Oral Tolerance to β -Lactoglobulin in Gnotobiotic Mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10: 787-792
- Prioult G., Pecquet S., Fliss I. 2004. Stimulation of Interleukin-10 Production by Acidic β -Lactoglobulin-Derived Peptides Hydrolyzed with *Lactobacillus paracasei* NCC2461 Peptidases. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 11: 266-271
- Rask C., Adlerberth I., Berggren A., Ahren I. L., Wold A. E. 2013. Differential effect on cell-mediated immunity in human volunteers after intake of different lactobacilli. *Clinical & Experimental Immunology*, 172: 321-332
- Resendiz-Albor A. A., Reina-Garfias H., Rojas-Hernandez S., Jarillo-Luna A., Rivera-Aguilar V., Miliar-Garcia A., Campos-Rodriguez R. 2010. Regionalization of pIgR expression in the mucosa of mouse small intestine. *Immunology Letters*, 128: 59-67
- Ruiz P. A., Hoffmann M., Szesny S., Blaut M., Haller D. 2005. Innate mechanisms for *Bifidobacterium lactis* to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats. *Immunology*, 115: 441-450
- Sanchez B., Delgado S., Blanco-Miguez A., Lourenco A., Gueimonde M., Margolles A. 2017. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61, 1, doi: 10.1002/mnfr.201600240: 42 str.
- Schiffrin E. J., Brassart D., Servin A. L., Rochat F., Donnet-Hughes A. 1997. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66: 515-520
- Schiffrin E. J., Rochat F., Link-Amster H., Aeschlimann J. M., Donnet-Hughes A. 1995. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 78: 491-497

- Sheih Y. H., Chiang B. L., Wang L. H., Liao C. K., Gill H. S. 2001. Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *The Journal of the American College of Nutrition*, 20: 149-156
- Smits H. H., Engering A., Van Der Kleij D., De Jong E. C., Schipper K., Van Capel T. M., Zaat B. A., Yazdanbakhsh M., Wierenga E. A., Van Kooyk Y., Kapsenberg M. L. 2005. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 115: 1260-1267
- Sommer F., Backhed F. 2013. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11: 227-238
- Takeda K., Suzuki T., Shimada S. I., Shida K., Nanno M., Okumura K. 2006. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clinical and Experimental Immunology*, 146: 109-115
- Tien M. T., Girardin S. E., Regnault B., Le Bourhis L., Dillies M. A., Coppee J. Y., Bourdet-Sicard R., Sansonetti P. J., Pedron T. 2006. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *The Journal of Immunology*, 176: 1228-1237
- Veza T., Rodríguez-Nogales A., Algieri F., Utrilla M., Rodríguez-Cabezas M., Galvez J. 2016. Flavonoids in Inflammatory Bowel Disease: A Review. *Nutrients*, 8: 211, doi:10.3390/nu8040211: 22 str.
- Vinderola G., Matar C., Perdigon G. 2005. Role of Intestinal Epithelial Cells in Immune Effects Mediated by Gram-Positive Probiotic Bacteria: Involvement of Toll-Like Receptors. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12: 1075-1084
- Wang Y., Begum-Haque S., Telesford K. M., Ochoa-Reparaz J., Christy M., Kasper E. J., Kasper D. L., Robson S. C., Kasper L. H. 2014. A commensal bacterial product elicits and modulates migratory capacity of CD39(+) CD4 T regulatory subsets in the suppression of neuroinflammation. *Gut Microbes*, 5: 552-561
- Won T. J., Kim B., Song D. S., Lim Y. T., Oh E. S., Lee D. I., Park E. S., Min H., Park S.-Y., Hwang K. W. 2011. Modulation of Th1/Th2 Balance by *Lactobacillus* Strains Isolated from Kimchi via Stimulation of Macrophage Cell Line J774A.1 In Vitro. *Journal of Food Science*, 76: 55-61
- Yan F., Polk D. B. 2002. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 50959-50965

ZAHVALA

Za usmerjanje pri izdelavi diplomskega dela se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mojci Narat. Prav tako se zahvaljujem Andražu, Romani in Otu za vso podporo pri pisanju.

Priloga A
Vpliv probiotičnih sevov na prirojeno in pridobljeno imunost

Vpliv na imunski sistem	Probiotični sev	Vir
Sposobnost fagocitoze	↑ <i>L. acidophilus</i> ↑ <i>L. casei</i> ↑ <i>L. acidophilus</i> La1 ↑ <i>B. lactis</i> BB12 ↑ <i>L. rhamnosus</i> GG – pri zdravih; ↓ <i>L. rhamnosus</i> GG – pri preobčutljivih na mleko ↑ <i>L. rhamnosus</i> HN001 ↑ <i>B. lactis</i> HN109 ↑ <i>Enterococcus durans</i> ED26E/7 ↑ <i>L. fermentum</i> AD1 = CCM7421 ↑ <i>L. plantarum</i> 17L/1	Perdigon in sod., 1988; Schiffirin in sod., 1995; Schiffirin in sod., 1997; Pelto in sod., 1998; Gill in sod., 2001a; Sheih in sod., 2001; Dvorožňáková in sod., 2016
Aktivnost/število NK celic	↑ <i>L. rhamnosus</i> HN001 ↑ <i>B. lactis</i> HN019 ↑ <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> JCM 1134 # + dekstran ↑ <i>L. casei</i> Shirota ↑ <i>L. fermentum</i> CECT5716 ↑ <i>L. paracasei</i> 8700 (DSM13434)	Gill in sod., 2001b; Sheih in sod., 2001; Ogawa in sod., 2006; Takeda in sod., 2006; Olivares in sod., 2007; Rask in sod., 2013
Produkcija citokinov:		
IL-8	↑ <i>E. coli</i> Nissle 1917 ↑ <i>L. plantarum</i> 299v ↓ <i>L. reuteri</i> (American Type Culture Collection)	Lammers in sod., 2002; McCracken in sod., 2002; Ma in sod., 2004
IL-6	↑ <i>B. Lactis</i> BB12 ↑ <i>L. casei</i> CRL 431 ↑ <i>L. helveticus</i> R389	Ruiz in sod., 2005; Vinderola in sod., 2005
IL-15	↑ <i>L. casei</i> subs. <i>casei</i> JCM 1134 ↑ <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> JCM ↑ <i>L. acidophilus</i> JCM 1132	Ogawa in sod., 2006
Kemokini	↓ <i>L. casei</i> DN-114 001	Tien in sod., 2006
Produkcija IgA	↑ <i>B. bifidum</i> BB12 ↑ <i>L. acidophilus</i> La1 ↑ <i>L. rhamnosus</i> GG ↑ <i>B. lactis</i> BB12 ↑ <i>B. bifidum</i> BB11 ↑ <i>L. helveticus</i> R389 –peptidna frakcija ↑ <i>L. johnsonii</i> NCC 533	Link-Amster in sod., 1994; Isolauri in sod., 1995; Fukushima in sod., 1998; Park in sod., 2002; LeBlanc in sod., 2004; Ibnou-Zekri in sod., 2003;
Vpliv na DC in T_{reg} celice	VSL 3# - moduliranje citokinskega profila DC, povečano št. T _{reg} celic <i>L. reuteri</i> ASM20016 in <i>L. casei</i> NIZO B255– vezava na DC-SIGN, spodbujanje diferenciacije T celic v T _{reg}	Drakes in sod., 2004; Smits in sod., 2005
Th1/Th2 ravnovesje:		
↑T _{h1} ↓ T _{h2}	<i>L. plantarum</i> NCIMB8826 <i>L. lactis</i> MG1363 <i>L. casei</i> ATCC393 <i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. plantarum</i> CJLP55, CJLP56, CJLP133, CJLP136	Pochard in sod., 2002; Won in sod., 2011
↓ T _{h1} ↑T _{h2}	<i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. salivarius</i> UCC118 <i>B. infantis</i> 35624	Pessi in sod., 2000; McCarthy in sod., 2003
↑T _{h1} ↑T _{h2}	<i>L. acidophilus</i> CRL 73 0	Perdigon in sod., 2002