



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Neja PRISTOVŠEK

## **DELOVANJE PROBIOTIKOV PROTI VIRUSOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Neja PRISTOVŠEK

**DELOVANJE PROBIOTIKOV PROTI VIRUSOM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana

**ANTIVIRAL ACTIVITY OF PROBIOTICS**

B. SC. THESIS

Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition

Ljubljana, 2018

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študijskega programa 1. stopnje Živilstvo in prehrana. Delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala znan. svet. dr. Bojano Bogovič Matijašič in za recenzentko izr. prof. dr. Barbko Jeršek.

Mentorica: znan. svet. dr. Bojana BOGOVIČ MATIJAŠIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Recenzentka: izr. prof. dr. Barbka JERŠEK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Mentorica:

Recenzentka:

Datum zagovora:

Neja Pristovšek

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

- ŠD Du1
- DK UDK 615.281.8 + 615.372 : 579.8 (043)=163.6
- KG probiotiki, virusi, HIV, mikrobiota, virusne respiratorne okužbe, virusni gastroenteritis, HPV, virus herpes simpleks, kokseki virus
- AV PRISTOVŠEK, Neja
- SA BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (mentorica), JERŠEK, Barbka (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2018
- IN DELOVANJE PROBIOTIKOV PROTI VIRUSOM
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja Živilstvo in prehrana)
- OP V, 24 str., 56 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Respiratorne, gastrointestinalne, spolno prenosljive in druge infekcije, ki jih povzročajo virusi, so zelo razširjene, soočamo pa se tudi z naraščajočo odpornostjo proti protivirusnim zdravilom. V svetu narašča povpraševanje po novih nekonvencionalnih protivirusnih zdravilih za obvladovanje oziroma lajšanje virusnih infekcij, ki predstavljajo alternativo za tista, ki so v uporabi danes. Med njimi omenjajo tudi probiotike. Medtem ko je učinkovanje probiotikov na bakterijske infekcije relativno dobro pojasnjeno (tekmovanje za hranila, neposredna inhibicija, vpliv na imunski sistem), pa so delovanje probiotikov proti virusom začeli raziskovati šele v zadnjem času. Pozitivne učinke probiotikov pri virusnih infekcijah je mogoče pripisati predvsem izboljšanju črevesne homeostaze in barierne funkcije črevesa. Posamezni probiotični sevi so sposobni vplivati na mukozni ali sistemski imunski odziv. Vplivajo lahko na signalne poti, tako da izboljšajo imunski odgovor na viruse. Specifični sevi rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* lahko zavirajo replikacijo virusa influence. *L. rhamnosus* GG zmanjša možnost okužbe zgornjega dihalnega trakta. V primeru akutnega gastroenteritisa seve *L. rhamnosus* GG, *L. reuteri* DSM 17938, *S. boulardii* CNCM I-745 uporabljamo za zdravljenje driske. Pri bolnikih, okuženih z virusom HIV, pa so izboljšanje pod vplivom probiotikov (*L. rhamnosus*, *L. casei*) pripisali izboljšanjemu zdravljenju sluznice preko modulacije mikrobiote, zmanjšanju vnetja in izboljšanju fizične in imunske integritete črevesne mukoze. Prav tako se je protivirusno delovanje rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* izkazalo kot učinkovito pri virusnih spolnih okužbah.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

ND Du1  
DC UDC 615.281.8 + 615.372 : 579.8 (043)=163.6  
CX probiotics, viruses, HIV, microbiota, viral respiratory infections, viral gastroenteritis, HPV, herpes simplex virus, coxsackievirus  
AU PRISTOVŠEK, Neja  
AA BOGOVIČ MATIJAŠIĆ, Bojana (supervisor), JERŠEK, Barbka (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology  
PY 2018  
TI ANTIVIRAL ACTIVITY OF PROBIOTICS  
DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes: Field Food Science and Nutrition)  
NO V, 24 p., 56 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Respiratory, gastrointestinal, sexually transmitted and other viral infections are very common and resistance to antiviral drugs is growing. The interest for new unconventional antiviral medications for control of virus diseases and symptom relief, as an alternative to those which are in use nowadays is growing worldwide. Among them probiotics are also mentioned. While the effect of probiotics on bacterial infections is relatively well understood (competition for nutrients, direct inhibition and effect on immune system), the research of antiviral activity of probiotics has only begun in recent times. The positive effects of probiotics against viral infections can be attributed primarily to the improvement of intestinal homeostasis and the gut barrier function. Specific probiotic strains are able to affect the mucosal or systemic immune response. They can modulate signalling pathways by improving immune response to virus. Specific strains of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* can inhibit replication of influenza virus. *L. rhamnosus* GG decreases the possibility of the upper respiratory tract infections. In the case of acute gastroenteritis, *L. rhamnosus* GG, *L. reuteri* DSM 17938, *S. boulardii* CNCM I-745 strains can be used for the treatment of diarrhea. The improvements in patients infected with HIV, under the influence of probiotics (*L. rhamnosus*, *L. casei*) were assigned to modulation of the microbiota, reduction of the inflammation and improvement of physical and immune integrity of gut mucosa. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* also proved to be effective in viral sexually transmitted diseases.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE</b>	<b>V</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PROBIOTIKI</b>	<b>1</b>
<b>3 MEHANIZMI DELOVANJA PROBIOTIKOV PROTI VIRUSOM</b>	<b>2</b>
3.1 NEPOSREDNI VPLIV DELOVANJA PROBIOTIKOV NA VIRUSE	2
3.2 STIMULACIJA IMUNSKEGA SISTEMA	3
3.3 PRODUKCIJA PROTIVIRUSNIH NEPROTEINSKIH SNOVI	3
3.4 PRODUKCIJA PROTIVIRUSNIH PROTEINSKIH SNOVI	3
<b>4 DELOVANJE PROBIOTIKOV PROTI VIRUSNIM DIHALNIM OKUŽBAM</b>	<b>4</b>
4.1 MEHANIZMI DELOVANJA PROBIOTIKOV PRI VIRUSNIH DIHALNIH OKUŽBAH	4
4.2 POVZROČITELJI VIRUSNIH DIHALNIH OBOLENJ	5
<b>5 MIKROBIOTA IN UPORABA PROBIOTIKOV PRI OKUŽENIH Z VIRUSOM HIV</b>	<b>7</b>
5.1 MIKROBIOTA PRI OBOLELIH Z VIRUSOM HIV	8
5.2 ZDRAVLJENJE IN UPORABA PROBIOTIKOV PRI OBOLELIH Z VIRUSOM HIV	9
<b>6 UPORABA PROBIOTIKOV PRI AKUTNEM VIRUSNEM GASTROENTERITISU</b>	<b>11</b>
6.1 ZDRAVLJENJE AKUTNEGA GASTROENTERITISA	11
<b>7 DELOVANJE PROBIOTIKOV PRI VIRUSNIH OKUŽBAH SPOLOVIL</b>	<b>13</b>
7.1 PROBIOTIKI IN MLEČNA KISLINA	13
7.2 HUMANI PAPILOMA VIRUS	14
7.3 VIRUS HERPES SIMPLEKSA I IN II	15
<b>8 VPLIV PROBIOTIKOV NA VIRUSE KOKSEKI</b>	<b>16</b>
8.1 BOLEZEN DLANI, PODPLATOV IN UST	17
8.2 KOKSEKI VIRUS B	17
<b>9 POVZETEK</b>	<b>19</b>
<b>10 VIRI</b>	<b>20</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## 1 UVOD

Gastrointestinalni trakt sesalcev gosti veliko in raznoliko število različnih mikroorganizmov, znanih kot črevesna mikrobiota. Bakterije, arheje, glivice, praživali, virusi, vsi bivajo in medsebojno sodelujejo z gostiteljem, z epitelnimi in imunskimi celicami. Eni od pomembnejših so probiotiki (Sánchez in sod., 2016). Po navedbah FAO/WHO so to "živi mikroorganizmi, ki pozitivno vplivajo na gostiteljevo zdravje, če so uporabljeni v zadostni količini" (WHO, 2002). Pogosto uporabljeni probiotiki so mlečnokislinske bakterije (*L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. casei*, *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*), *B. subtilis*, *E. coli*, kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*) in plesni (*Aspergillus oryzae*) (Adhikari in Kim, 2017).

Veliko število bolezni in črevesnih motenj povezujejo z neuravnoteženo mikrobioto v gastrointestinalnem traktu. Znanstveni dokazi podpirajo pomembne vloge, ki jih imajo probiotiki v prebavnem sistemu. Poznano je, da obnavljajo mikrobno ravnovesje in imajo koristne učinke na zdravje gostitelja, pri preprečevanju ali zdravljenju bolezni. Že Hipokrat je zasnoval koncept probiotikov, ko je zapisal: "Naj bo hrana vaše zdravilo in vaše zdravilo naj bo vaša hrana" (Al Kassaa in sod., 2014). Veliko število smrtnih primerov, ki so posledica okužb, se je zmanjšalo zaradi izboljšane prehrane. V zadnjem desetletju pa je znanost odkrila jasno povezavo med prehrano, imunsko funkcijo in potekom nalezljivih bolezni. Tudi hitri razvoj novih pristopov za gensko manipulacijo mlečno kislinskih bakterij je ustvaril pot za razvoj rekombinantnih sevov, z izražanjem antigenov, ki vodijo do indukcije imunosti in s tem zaščitne vloge (Chua in sod., 2017).

Respiratorne, gastrointestinalne, spolno prenosljive in druge infekcije, ki jih povzročajo virusi, so zelo razširjene. Naraščajoča odpornost proti protivirusnim zdravilom se povečuje. V svetu narašča povpraševanje po novih nekonvencionalnih protivirusnih zdravilih za obvladovanje oziroma lajšanje virusnih infekcij, ki predstavljajo alternativo za tista, ki so v uporabi danes (Al Kassaa in sod., 2014). Namen diplomskega dela je bil preučiti, kako probiotiki delujejo na viruse.

## 2 PROBIOTIKI

Že od antičnih časov so fermentirane izdelke uporabljali za obnovo in vzdrževanje zdravja. Na začetku prejšnjega stoletja je Nobelov nagrajenec, ruski imunolog Ilija Mečnikov predstavil svojo zamisel o uživanju koristnih živih mikroorganizmov. Predlagal je pitje fermentiranega mleka z laktobacili (Kerry in sod., 2018).

Na trgu je veliko probiotičnih izdelkov, ki se razlikujejo glede na količino in vrsto mikroorganizmov in njihov vpliv na gostitelja. Glavna razlika med probiotičnimi formulacijami je prisotnost enega ali več različnih sevov v istem produktu. Kombinacije posameznih sevov so lahko bolj koristne kot en sam sev, saj delujejo na različnih mestih in zagotavljajo različne načine delovanja, ki ustvarjajo sinergistične učinke. Bistveno pa je, da v izdelkih s kombinacijami več sevov, mikrobni sevi ne tekmujejo za hranila in

energijske vire ter ne zavirajo rasti drugega seva (Pandey in sod., 2015).

Nizek pH v želodcu in izločanje žolčnih soli v dvanajstnik ustvarjata v gastrointestinalnem traktu neprimerno okolje za rast mikroorganizmov. Njihova stopnja preživetja je specifična za določeno vrsto in sev. Na primer vrsta *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ima najvišjo kislinsko toleranco med bakterijami rodu *Bifidobacterium*, ki ima kot vrsta že na splošno dobro odpornost proti kislim razmeram. Imajo več zaščitnih mehanizmov, ki jim omogočajo prilagodljiv odziv na izpostavljenost nizkemu pH, kot je sposobnost izključevanja protonov iz notranjosti s pomočjo povečanega delovanja H<sup>+</sup> ATPaze. Isti mehanizem deluje pri acidotolerantni *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, ki znatno poveča sintezo H<sup>+</sup> ATPaze na celični membrani, ko je inkubirana v kislih razmerah. Bistven kriterij za preživetje probiotičnih kultur v tankem črevesu je tudi stopnja odpornosti proti žolčnim solem. Hidrolaze žolčnih soli so encimi, ki ščitijo bakterijsko celico pred toksičnostjo protonirane oblike žolčnih soli, tako da jih pretvorijo v šibkejšo nekonjugirano obliko. Zato sta odpornost proti nizkemu pH in sposobnost hidroliziranja žolčnih soli pomembni značilnosti pri izbiri probiotičnih sevov za prehrano ljudi (Begley in sod., 2006).

Probiotiki imajo veliko vlogo pri vzdrževanju črevesnega mikrobnega ravnovesja - evbioze, predvsem z zaviranjem rasti patogenih bakterij. Ta inhibicija je lahko posledica izločanja inhibitornih spojin, kot so bakteriocini in organske kisline. Lahko pa delujejo pri adheziji na črevesni epitelij, blokirajo vezavo patogenih mikroorganizmov, ki tekmujejo za enak črevesni receptor. Povzročajo lahko tudi povečano proizvodnjo mucina, ki preprečuje adhezijo škodljivih mikroorganizmov, kot so enteropatogene bakterije vrste *Escherichia coli*. Sposobnost adhezije in vsaj začasna kolonizacija črevesja je zaželjena lastnost, ki omogoča njihov koristni vpliv na gostitelja. Ključnega pomena je tudi razvoj biofilma. To je še en mehanizem, ki ga probiotične bakterije uporabljajo za kolonizacijo črevesja. Gre za površinski skupek mikroorganizmov. Ti izločajo zunajcelične produkte in so pritrjeni na podlago. Tako si lahko povečajo dostopnost hranilnih snovi, ohranjajo aktivnost zunajceličnih encimov in se zaščitijo pred delovanjem antibiotikov in patogenov (Toscano in sod., 2017).

### 3 MEHANIZMI DELOVANJA PROBIOTIKOV PROTI VIRUSOM

Probiotiki delujejo na viruse z več mehanizmi: z neposrednim medsebojnim vplivanjem na viruse, s proizvodnjo protivirusnih inhibitornih snovi in/ali s stimulacijo imunskega sistema.

#### 3.1 NEPOSREDNI VPLIV DELOVANJA PROBIOTIKOV NA VIRUSE

To je najpogostejši način inaktivacije virusov s probiotiki. Tak primer je virus stomatitisa, ki ga inaktivirajo *L. paracasei* A14, *L. paracasei* F19, *L. paracasei/rhamnosus* Q8, *L. plantarum* M1.1 in *L. reuteri* DSM12246. Dokazali so tudi, da *E. faecium* NCIMB 10415 z direktno fizično interakcijo prispeva k inhibiciji virusa influence. Iz vaginalne mikrobiote izoliran *L. gasseri* CMUL57 lahko inhibira delovanje virus herpes simpleksa 2, vendar ne



golega virusa kokseki (Al Kassaa in sod., 2014).

### 3.2 STIMULACIJA IMUNSKEGA SISTEMA

Mlečnokislinske bakterije, še posebej predstavnice rodu *Lactobacillus*, imajo lahko pomembno vlogo pri protivirusni in protimikrobni aktivnosti in tako pomembno prispevajo k delovanju imunskega sistema gostitelja. Iz živilskih izdelkov izoliran *L.plantarum* YU, je v mišjih peritonealnih makrofagih sprožil visoko aktivnost interlevkinov 12 (Al Kassaa in sod., 2014). Interlevkini so skupina citokinov, ki jih izločajo makrofagi in so pomembni medcelični mediatorji, ki sodelujejo pri komunikaciji, zlasti med levkociti in drugimi celicami imunskega sistema. Interlevkin 12 pa je pomemben, ker spodbuja celice ubijalke, hkrati pa zavira celice pomagalke (Zundler in Neurath, 2015). Sev *L. plantarum* YU, izoliran iz živilskih izdelkov, izboljša proizvodnjo naravnih celic ubijalk v vranici in imunoglobulina A v Peyerjevih ploščah, ki v krvi veže tuje molekule in omogoča njihov prenos skozi jetrne celice v žolč. S tem omogoči, da se imunski sistem ne odzove z vnetno reakcijo na antigene, ki pridejo v telo s hrano in vdihanim zrakom. *L. plantarum* YU aktivira Th1. Th1 so celice pomagalke, ki izločajo citokine, ki so odgovorni za ubijanje intracelularnih parazitov in za ohranjanje avtoimunskih odzivov. Aktivacija Th1 in hkrati produkcija imunoglobulina A ugodno vplivata na protivirusno delovanje *L. plantarum* YU proti virusu influence H1N1, ki je pri nas poznan kot prašičja gripa.

### 3.3 PRODUKCIJA PROTIVIRUSNIH NEPROTEINSKIH SNOVI

*Lactobacillus* sp. proizvajajo vodikov peroksid, naravni mikrobicid, ki ga najdemo v ekosistemu človeške vagine. Strupen je za številne mikroorganizme, tudi za virusa človeške imunske pomanjkljivosti tipa HIV-1 in HSV-2. Vse bakterije rodu *Lactobacillus* proizvajajo mlečno kislino, ki je končni produkt njihovega metabolizma ogljikovih hidratov. Kisli pH inaktivira HSV-2. HSV-2 je genitalni herpes in je ireverzibilno inaktiviran že pri takšnih koncentracijah mlečne kisline, ki ustrezajo vrednosti pH, zaznani v zdravi človeški vagini (Al Kassaa in sod., 2014). Nekatere vrste rodu *Lactobacillus* pa lahko tudi proizvedejo spojine, ki naj bi preprečile virusno replikacijo v gostiteljskih celicah. Tako je neproteinski del celične stene bakterijskega seva *L. brevis*, izoliranega iz vagine, zmanjšal replikacijo virusa HSV2. Kislini produkti *Lactobacillus* so zmanjšali aktivnost limfocitov T, kar je povzročilo zmanjšanje občutljivosti za limfocite tudi za HIV-1 (Al Kassaa in sod., 2014).

### 3.4 PRODUKCIJA PROTIVIRUSNIH PROTEINSKIH SNOVI

Bakteriocini so ribosomsko sintetizirani majhni proteini, večinoma kationski amfilni peptidi, ki imajo protimikrobne lastnosti. So del naravnega obrambnega mehanizma bakterij. Sestavljeni so iz aminokislin in tvorijo polipeptidno verigo. Probiotiki jih proizvajajo *in situ* in proizvajajo se jih lahko z genskim inženiringom. Bakteriocine laktobacilov delimo na dve skupini, to sta bakteriocini I in bakteriocini II. V razred I spadajo bakteriocini, ki so po translaciji modificirani. Ti se delijo na lantibiotike, linaridine, proteuzine, cianobaktine, azeolin vsebujoč peptide, tiopeptide, laso peptide, skitibiotike, botromicine, glikocine in modificirane mikrocine. Skupina II so nemodificirani peptidi (Al Kassaa in sod., 2014). Večina bakteriocinov deluje tako, da tvorijo pore v membranah tarčnih celic, kar povzroča zmanjšanje intracelularne pH in

inhibicijo encimskih procesov. Nizin spada v skupino bakteriocinov I in se veže na lipid II. Lipid II je glavni transporter peptidoglikanskih podenot iz citoplazme v celično steno. S tem preprečuje pravilno sintezo celičnih sten, kar vodi k celični apoptozi. Lipid II lahko uporabijo tudi kot prekursorsko molekulo, da se začne formacija por, ki vodi v hitrejšo celično apoptozo (Chikindas in sod., 2018).

Bakteriocini stafilokokcin 188, enterocin AAR-74, enterocin AAR-71 in erviniocin NA4 so testirali proti virusu has, izoliranem iz toplotno neobdelane odpadne vode iz čistilne naprave. Stafilokokcin 188 in enterocin AAR-74 sta zmanjšala število virusov za 10-krat, medtem ko enterocin AAR-71 in erviniocin NA4 nista pokazala takšnih rezultatov. Stafilokokcin 188 je bil aktiven tudi proti virusu influence in virusu atipične kokošje kuge, ki so jih proučevali s pomočjo modelov *in vitro* in *in vivo*. Proti virusu herpes simpleks I so učinkovali bakteriocini enterocin ST5Ha, izoliran iz seva *Enterococcus faecium* ST5Ha, enterocin ST4V iz seva *Enterococcus mundtii* ST4V, enterocin NKR-5-3C, izoliran iz seva *Enterococcus faecium* NKR-5-3, labirintopeptin A1, izoliran iz *Actinomadura namibiensis* DSM 6313, enterocin CRL35 izoliran iz *Enterococcus mundtii* CRL35 in subtolozin, izoliran iz *Bacillus amyloliquefaciens*. Proti virusu herpes simpleks II sta učinkovala enterocin ST4V in enterocin CRL35 (Al Kassaa in sod., 2014).

Pomembna lastnost večine bakteriocinov je majhna toksičnost pri peroralnem zaužitju. Izjema je citolizin, ki je citotoksičen in ga izločajo nekateri bakterijski sevi rodu *Enterococcus*. Spada v skupino lantibiotikov. Ker so bakteriocini peptidi, jih je lažje sintetizirati s pomočjo bioinženiringa kot antibiotike. To naredimo z manipulacijo gena za bakteriocin, z izkoriščanjem biosintetičnih encimov za produkcijo peptidov ali pa s kemično sintezo protimikrobih snovi (Chikindas in sod., 2018).

## **4 DELOVANJE PROBIOTIKOV PROTI VIRUSNIM DIHALNIM OKUŽBAM**

Virusne respiratorne okužbe so med najpogostejšimi obolenji pri ljudeh, njihovo preprečevanje pa je pomemben izziv za javno zdravje. Trenutno so na voljo protivirusna zdravila in cepiva za preprečevanje in zdravljenje virusov influence in adenovirusov. Za viruse, ki povzročajo prehlad, ni na voljo učinkovitih terapij. Edini trenutni pristop je preprečevanje prenosa virusov z izogibanjem telesnih stikov in s higieno rok. Raziskave nakazujejo, da lahko probiotiki zmanjšajo tveganje ali trajanje simptomov virusne okužbe dihal.

### **4.1 MEHANIZMI DELOVANJA PROBIOTIKOV PRI VIRUSNIH DIHALNIH OKUŽBAH**

Dihalni trakt je prekrit z epitelno sluznično površino, ki je nenehno izpostavljena številnim mikroorganizmom in tako služi kot primarno mesto vstopa za respiratorne viruse. Pritrditev virusa na gostiteljsko celico je prvi, bistven korak v procesu bolezni. Probiotiki se lahko neposredno vežejo na virus in zavirajo pritrditev virusa na receptor gostitelja. Specifični sevi rodu *Lactobacillus* so tako sposobni inaktivirati virus vezikularnega

stomatitisa, ki je gripi podoben virus. Probiotiki lahko za delovanje proti respiratornim virusom uporabljajo tudi mehanizem produkcije protivirusnih snovi. Metaboliti specifičnih sevov rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* lahko preprečijo okužbo z virusom influence tako, da zavirajo replikacijo tega virusa.

Dihalni virusi okužijo celice z različnimi mehanizmi in uporabljajo različne receptorje, zato so tudi protivirusni učinki probiotikov specifični za sev.

Protivirusni citokini, kot so interferoni, proinflamatorni citokini in kemokini, so pomembni za prepoznavanje antigena v epitelih celicah in efektorskih celicah, zato igrajo ključno vlogo pri virusnih okužbah. Probiotiki lahko delujejo proti respiratornim virusim tudi s stimulacijo imunskega odziva, preko črevesja, ali z vplivanjem na povečano aktivnost naravnih celic ubijalk (NK-celice) in makrofagov. V dendritičnih celicah glodalcev sta *Lactobacillus acidophilus* NCFM in *Lactobacillus acidophilus* X37 vplivala na izražanje genov za interferon in interlevkine (IFN- $\beta$ , IL-12, IL-10), ki igrajo zaščitno vlogo pred virusi. *Lactobacillus rhamnosus* Lc705 je v človeških makrofagih znatno povečal količino specifičnih protiteles, še posebej proti virusu influence B, po cepljenju proti gripi (Lehtoranta in sod., 2014). Tako imajo peroralno zaužiti specifični probiotiki rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* adjuvantni učinek na humoralno imunost.

#### 4.2 POVZROČITELJI VIRUSNIH DIHALNIH OBOLENJ

Obstaja več kot 200 različnih vrst virusov, ki povročajo bolezni dihal. Človeški rinovirusi so največja skupina respiratornih virusov, ki vsebujejo več kot 150 serotipov. Poznani so tudi pod imenom navadni prehlad in povzročajo virusno bolezen zgornjih dihal. Simptomi so kašelj, otekle žrela, izcedek iz nosu, kihanje in povišana telesna temperatura (Lehtoranta in sod., 2014). Patogeneza navadnih simptomov je povezana z vnetnim odzivom na virus. Rezultati več študij so pokazali, da so koncentracije vnetnih citokinov, zlasti interlevkina 8, in vnetni odzivi povezani z resnostjo simptomov. Tako je interakcija med črevesnim mikrobiomom in prirojenim imunskim odzivom možni mehanizem, s katerim bi lahko probiotiki vplivali na virusno okužbo. Študije na živalskih modelih kažejo, da mikrobiom črevesja lahko zagotavlja nizko stopnjo stimulacije prirojenega imunskega odziva. Ta modulira občutljivost za gostitelja na virusno okužbo (Ichinohe in sod., 2011). Opravili so tudi študijo, kjer so opravili podrobno oceno učinka uživanja *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04 na odziv gostitelja z okužbo rinovirusa. Probiotik je zmanjšal virusni titer v nosni votlini. Uporaba probiotika pa ni vplivala na vnetje spodnjih dihal, kar so izmerili z izdihanim dušikovim oksidom (Turner in sod., 2017).

Druga najpogostejša skupina virusov, ki povročajo infekcije zgornjih in spodnjih dihalnih poti pri ljudeh, so humani enterovirusi, ki spadajo k družini pikornavirusov. Okužba lahko povzroči širok razpon simptomov. Lahko gre za črevesno (bolečine v trebuhu, bruhanje) ali kožno (izpuščaji na koži) obliko. Povzročata lahko akutni hemoragični konjunktivitis. Če je prizadet osrednji živčni sistem, se lahko razvije meningitis, encefalitis ali nevritis obraznega živca. Pri dihalni obliki so simptomi zamašen nos, izcedek iz nosu, suh kašelj, povišana telesna temperatura, mišična bolečina in splošna šibkost. Leta 2014 so poročali o

izbruhu infekcije z enterovirusom EV-D68. Prvič je bil odkrit leta 1962 in do leta 2014 ni bil pogosto zapažen (Muir, 2017).

Gripa, ki jo povzroči virus influence, se kaže v povišani telesni temperaturi, tresavici, občutku mrzlice, glavobolu, suhem kašlju, bolečinah v mišicah, bolečem grlu in utrujenosti. Virus influence je sestavljen iz osmih enoverižnih segmentov RNA. Pri ljudeh so najprej ugotovili samo tri podvrste H1, H2 in H3. Nedavno pa so izolirali tudi H5, H7 in H9, za katere so domnevali, da okužijo samo ptice. Dejstvo, da se lahko podvrste virusa prenesejo iz populacije ptic na populacijo ljudi, povzroča veliko zaskrbljenost, da bi takšne okužbe lahko vodile do druge pandemije virusa influence. Potreba po učinkovitem nadzoru okužbe z virusom je zato velikega pomena. Razvoj učinkovitih preventivnih zdravil je zahteven, saj ima virus influence veliko genetsko raznolikost. Na živalskih modelih so opravili študijo, kjer so miši, okužene z virusom influence, hranili z *Lactobacillus rhamnosus* M21. V kontrolni skupini pa so bile miši hranjene s posnetim mlekom. Proučevali so stopnjo preživetja, vnetje pljuč, spremembe citokinov in raven sekretornega IgA. Zaradi okužbe z virusom so umrle vse miši v kontrolni skupini in 60% tistih miši, ki so jih hranili z *L. rhamnosus* M21. Peroralno zauživanje omenjenega probiotika je zaviralo vnetni odziv v pljučih, znatno povečalo raven interferona gama (IFN-g) in interleukina 12 v pljučih. Povečala se je tudi raven sekretijskega imunoglobulina A (sIgA), ki ima velik zaščitni pomen pri virusnih okužbah gripe. Peroralno zaužiti probiotiki so v tankem črevesju vstopali v stik z membranskimi epiteljskimi celicami (celice M), kjer so spodbujali celice imunskega sistema (dendritične celice, makrofage, limfocite...). Aktivirani limfociti B migrirajo v pljuča, preko sluznice, ki izloča IgA. IgA je specifičen za virus influence in vključen v mehanizme inaktivacije virusa, medtem ko nespecifičen IgA preprečuje adhezijo virusa na sluznico gostitelja. Obvladovanje okužbe virusa influence s probiotiki, ki povečujejo raven IgA, so zato ključnega pomena (Song in sod., 2016). Pri zdravih odraslih osebah je *Lactobacillus fermentum* CETC5716 zmanjšal število obolenj na dihalnem traktu in povečal nastajanje antigena IgA po cepljenju proti virusu influence in tako povečal njegovo učinkovitost (Olivares in sod., 2007).

Respiratorni sincicijski virus povzroča akutne okužbe dihal v vseh starostnih obdobjih, vendar najpogosteje zbolijo otroci mlajši od pet let. Infekcija poteka kot okužba zgornjih dihal. Je glavni vzrok bronhiolitisa in virusne pljučnice pri mlajših otrocih. Redko se pojavijo tudi nevrološki zapleti, izjemno redko pa lahko pride tudi do vnetja srčne mišice in motenj srčnega ritma. Eriko Chiba in sodelavci so ugotovili, da *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 in *Lactobacillus rhamnosus* CRL1506 peroralno ali intranazalno zaužita v pljučih zmanjšata titer virusa in miši ščitita pred okužbo (Chiba in sod., 2013).

Otroci, ki obiskujejo vrtec, so bili vključeni v klinično raziskavo. Pri otrocih, ki so uživali *Lactobacillus rhamnosus* GG, se je zmanjšalo število okužb zgornjega dihalnega trakta, zmanjšalo število zdravljenj z antibiotiki in posledično število odsotnih dni iz vrta. *Lactobacillus rhamnosus* GG je tudi pri hospitaliziranih otrocih zmanjšal možnost okužbe zgornjega dihalnega trakta (Kumpu in sod., 2013). Tudi pri nedonošenčkih je omenjeni probiotik zmanjšal stopnjo okužbe (Luoto in sod., 2014). Med drugim so rezultati metaanaliz naključnih študijskih raziskav pokazali, da lahko *Lactobacillus rhamnosus* GG zmanjša pojav akutnega vnetja srednjega ušesa, ki pa je lahko bakterijskega ali virusnega izvora. Med virusi, ki ga povzročajo, so respiratorni sincicijski virus, človeški rinovirusi,

adenovirusi, virusi parainfluence in človeški koronavirusi. Uporaba *Lactobacillus rhamnosus* GG torej ugodno vpliva na okužbe zgornjega dihalnega trakta, medtem ko pri okužbah spodnjega dihalnega trakta ni bilo takšnih razlik med kontrolno skupino in tistimi, ki so uživali *L. rhamnosus* GG (Liu in sod., 2013). Tudi *Lactobacillus casei* DN114001 je zmanjšal pojavnost okužb zgornjega dihalnega trakta, *Lactobacillus fermentum* CECT5716 pa pojavnost zgornjega in spodnjega dihalnega trakta. Uporaba *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 je pri zdravih novorojenčkih zmanjšala možnost okužbe dihalnega trakta, vendar pa ni učinkovito zmanjšala pojava akutnega vnetja srednjega ušesa in znakov okužbe. Kombinacija sevov *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* Lc705, *Bifidobacterium breve* Bb99 in *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS je pri otrocih, dovzetnih za vnetje ušes, kombinacija *Lactobacillus rhamnosus* GG in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 pa pri zdravih novorojenčkih, zmanjšala pojav ponavljajočih se okužb dihalnega trakta. Na zmanjšanje akutnih okužb je vplivala kombinacija probiotikov *Lactobacillus acidophilus* in *Bifidobacterium bifidum*. Kombinacija dvanajstih različnih vrst bakterij, ki je vključevala vrste *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* in *Enterococcus*, je bila popolnoma neučinkovita za zmanjšanje pogostosti okužbe ali za zmanjšanje trajanja znakov bolezni (Lehtoranta in sod., 2014).

Raziskave o delovanju probiotika *Lactobacillus fermentum* VRI003 med atleti, ki tečejo na dolge razdalje, so pokazale zmanjšanje trajanja dni znakov okužbe respiratornega trakta, niso pa je preprečile (Cox in sod., 2010). *Lactobacillus fermentum* PCC je pri tekmovalnih kolesarjih zmanjšal obsežnost znakov okužb, pri kolesarkah pa se to ni zgodilo (West in sod., 2011). Pri igralcih ameriškega nogometa je kombinacija probiotikov *L. gasseri*, *B. bifidum*, *B. longum* zmanjšala pojavnost okužb zgornjega respiratornega trakta, ni pa ublažila simptomov. Pri tekačih maratona probiotik *L. rhamnosus* GG ni zmanjšal incidence okužb zgornjega respiratornega trakta in ni ublažil simptomov (Kekkonen in sod., 2007).

V zadnjih letih so z novimi, visoko zmogljivimi molekularnimi tehnikami, odkrili tudi nove viruse, kot so človeški boca virus, človeški metapnevmovirus, novi človeški koronavirus HKU1 in NL63. Kombinacija sevov *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus rhamnosus* Lc705, *Bifidobacterium breve* Bb99 in *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermani* Js je zmanjšala količino človeškega bocavirusa v nazofarinksu pri otrocih (Lehtoranta in sod., 2014).

## **5 MIKROBIOTA IN UPORABA PROBIOTIKOV PRI OKUŽENIH Z VIRUSOM HIV**

Virus človeške imunske pomanjkljivosti (HIV) je virus, ki napade imunski sistem in oslabi sposobnost telesa za boj proti okužbam in boleznim. Spada v družino retrovirusov. Poznamo dva podtipa virusa, HIV-1 in HIV-2. HIV-1 je genetsko mogoče razdeliti na podtipе M, N, O in P. Podtip M je odgovoren za globalno pandemijo virusa. Vsak podtip je povezan z določenim geografskim območjem. Podtip B prevladuje v Ameriki, Avstraliji in zahodni Evropi, medtem ko v južni Afriki in Indiji prevladuje podtip C (Lewthwaite in Melhuish, 2018). Ključnega pomena pri obrambi telesa so levkociti, med katere spadajo

limfociti B, celice pomagalke, naravne celice ubijalke. Zelo pomembne so celice pomagalke, ki prepoznajo tuj antigen in aktivirajo limfocite B in celice ubijalke. Sočasno v sluznici povzroči izražanje receptorja CCR5. Limfocite B začnejo izločati protitelesa, ki onesposobijo patogeni mikroorganizem. Celice ubijalke pa uničijo okužene celice gostitelja. Virus HIV napade celice pomagalke in s tem je odprta pot mikroorganizmom, ki vsakodnevno napadajo naše telo (Burgener in sod., 2015). Ko virus vstopi v celico, začne izkoriščati njen podvojevalni mehanizem. Ker spada v skupino retrovirusov, je njegov genski material v obliki RNA. RNA se začne prepisovati v DNA pod vplivom reverzne transkriptaze. To je encim, ki ga ima virus v svoji kapsuli. Pri osebi, okuženi s HIV, se zato pojavijo resne okužbe, ki bi se jih lahko zdrava oseba običajno obranila. Pri osebah, okuženih s HIV, pri katerih se bolezen razvijejo zaradi škode, ki jih je povzročil HIV, govorimo o AIDS. AIDS je sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti in je zadnja stopnja okužbe s HIV.

HIV se prenaša na različne načine. Prisoten je v krvi in telesnih tekočinah okuženega posameznika. Prenasa se s spolnim stikom, zelo pogosto preko heteroseksualnega stika. Lahko se okužimo preko krvi in s prenosom matere na otroka. Mati lahko okuži otroka s svojim mlekom ali pri porodu. To predstavlja problem predvsem v nerazvitih državah (Lewthwaite in Melhuish, 2018).

## 5.1 MIKROBIOTA PRI OBOLELIH Z VIRUSOM HIV

Probiotiki, kot so *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* in koliformne bakterije, lahko obogatijo naš prebavni sistem, nevtralizirajo škodljive mikrobe in obnovijo ravnovesje med bakterijami. Lahko vplivajo na gostitelja z modulacijo imunskega sistema, omejevanjem kolonizacije patogenih mikroorganizmov, vplivajo tudi na vnetne črevesne motnje in metabolne motnje. Koristni so tudi pri driski, ki je povezana z antibiotiki in pri obnavljanju normalne prepustnosti črevesja, homeostaze. Ker HIV napada celice pomagalke je imunski sistem oslavljen. Spremeni se črevesna pregrada, povečajo se sistemska vnetja, na primer vnetje sluznice. HIV bistveno spreminja celotno mikrobo kolonizacijo v črevesju in tudi mikrobo sestavo v ustni votlini. Celotno površino človeškega telesa, pljuča, ustna votlina, vaginalna sluznica, gastrointestinalni trakt naseljujejo mikrobi. Približno 99 % mikrobiote se nahaja v gastrointestinalnem traktu, ki ima velik vpliv med človeškim razvojem na mukozne in imunske funkcije. Večina sevov je strogo anaerobnih. Prisotni pa so tudi fakultativni anaerobi in aerobi. Prevladujejo rodovi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*. Pojavljajo pa se tudi rodovi *Escherichia*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Clostridium* in drugi. Mlečnokislinske bakterije so glavna skupina probiotičnih bakterij. Večina probiotikov je bila izolirana neposredno iz človeškega gastrointestinalnega trakta oziroma blata. Patogeni mikroorganizmi po zaužitju prodrejo v visoko kolonizirano plast sluznice, kjer tekmujejo s trenutno mikrobioto za hranilne snovi in adhezijo receptorjev črevesnih epitelnih celic. Črevesna pregrada je sestavljena iz tesno povezanih enterocitov, dezmosomov, epitelnih celic, ki proizvajajo sluz in tako ovirajo prehod mikrobom. Vnos probiotikov lahko zmanjša tveganje za bolezni, povezane z disfunkcijo črevesne bariere. Probiotiki lahko delujejo na črevesno bariero s povečanjem izločanja sluzi, protimikrobnih peptidov, produkcijo sekretornih IgA, onemogočanjem adherence konkurenčnih patogenov. Del limfoidnega tkiva je tudi črevesno limfoidno tkivo. Zaradi svoje fiziološke funkcije pri absorpciji hranil je to tanka plast. Njena krhkost

in prepustnost ustvarjata podvrženost za okužbe, zato velika večina okužb, ki napadajo telo uporablja to pot. Funkcionalni pomen črevesnega limfoidnega tkiva pri obrambi telesa temelji na veliki populaciji plazemskih celic, ki proizvajajo protitelesa (D'Angelo in sod., 2017).

Bolniki z okužbo z virusom HIV imajo pogosto nizko stopnjo želodčne kislosti. Zaradi previsoke vrednosti pH so tako dovzetni za večjo tveganje oportunističnih okužb. To lahko vpliva na povečano kolonizacijo bakterij v zgornjem prebavnem traktu, kar ima ključno vlogo pri kronični driski, izgubi teže, disfagiji, pri kateri so najpogostejši simptomi slabost, bruhanje, nezmožnost požiranja in bolečine v trebuhu. Pri ljudeh, okuženih s HIV ali s sindromom pridobljene imunske pomanjkljivosti (AIDS), je stena tankega črevesja okvarjena, površina mikrovilov se zmanjša. Te spremembe so odgovorne za malabsorpcijo, prebavno neugodje in zmanjšan vnos hranil. Okužba s HIV povzroči razgradnjo črevesne pregrade, spremembo homeostatskega ravnovesja, z obogatitvijo bodisi provnetnih ali patogenih mikroorganizmov (na primer *Pseudomonas*, *Candida albicans*) ter z zmanjšanjem zastopanosti rodov *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*. Povečana translokacija mikrobov in bakterijskih produktov povzroča sistemski imunski odziv, kar dodatno škoduje, saj povečuje prenos bakterij. Posledično se poveča sistemsko vnetje in s tem tudi napredovanje virusa HIV. V začetni fazi okužbe je imunski sistem gostitelja nepripravljen za napad virusa, ki se reproducira pri zelo veliki hitrosti v lamini propriji in se nato širi po celem telesu. Okoli polovice celic pomagalk v lamini propriji je izčrpanih že v zgodnji in akutni okužbi z virusom HIV. Posledica reduciranih celic pomagalk se kaže v izgubi funkcije črevesne bariere ter izgubi citokinov, ki so potrebni za vzdrževanje črevesne bariere (D'Angelo in sod., 2017).

## 5.2 ZDRAVLJENJE IN UPORABA PROBIOTIKOV PRI OBOLELIH Z VIRUSOM HIV

Zaenkrat še nimamo zdravila, ki bi HIV v telesu popolnoma uničil. Poznamo protiretrovirusna zdravila, ki delujejo na principu zaviranja reverzne transkriptaze in inhibiciji proteaz. Zaviralci reverzne transkriptaze zavirajo transkripcijo virusne RNA v DNA, inhibitorji proteaz pa zavirajo nastajanje novih virusov z onemogočanjem proizvodnje virusnih beljakovin. Življenska doba okuženih ljudi je tako podaljšana (Dubey in sod., 2018). Vendar pa protiretrovirusno zdravljenje v otroštvu in adolescenci lahko povzroči metabolične motnje, škodljive učinke na prehranski status in slabost, predvsem v prvih mesecih zdravljenja. Bolniki lahko imajo lipodistrofijo, zmanjšano mineralizacijo kosti, pomanjkanje mikrohranil, predvsem vitaminov A, C, E, D in mineralov. Pri odraslih dolgotrajno uživanja zdravil poveča tveganje za razvoj bolezni srca in ožilja, sladkorne bolezni in drugih bolezni (Golucci in sod., 2017).

Uporaba probiotikov je lahko poceni in potencialno koristna za zmanjšanje obolevnosti in umrljivosti. Učinkovitost dodajanja določenih sevov probiotikov v prehrano je bila pri bolnikih, ki uživajo protiretrovirusna zdravila dokazana in še posebej izkazana kot dodatna strategija, ki izboljša antioksidativno obrambo in imunsko funkcijo telesa. S spreminjanjem črevesne mikrobiote obnavljajo epitelno tkivo. S preprečevanjem zmanjšanja števila CD4+ celic zmanjšajo tveganje prenosa virusa in dobo hospitalizacije zaradi različnih okužb. Bolniki, ki se zdravijo z s protiretrovirusnimi zdravili (CD4+ celice < 200), imajo manjše število mikroorganizmov rodu *Lactobacillus* in povišano raven interleukina 6. Njihovo

število lipopolisaharidov je povečano. Lipopolisaharidi so markerji napredovanja bolezni. Porabnikom jogurta s probiotično kulturo *Lactobacillus rhamnosus*, se je povečalo povprečno število celic CD4+, v obdobju uporabe treh let (D'Angelo in sod., 2017).

Prehransko dopolnilo z *Lactobacillus casei* Shirota je v obdobju 4-tedenskega uživanja, pri bolnikih, okuženim s HIV, pozitivno vplivalo na viruloško, imunološko in bakteriološko vlogo, na povečanje celic CD56+, limfocitov T in na zmanjšanje vnetnega stanja z znatnim povečanjem interlevkinov 23. Probiotični sev *Lactobacillus casei* Shirota se na Japonskem uporablja za proizvodnjo mlečnih fermentiranih izdelkov že več kot osemdeset let, razširjen pa je tudi v mnogih drugih državah. Je multifunkcionalni probiotik, ki deluje kot imunski stimulant in imunski regulator. Poleg tega naj bi bila probiotična prehranska dopolnila koristna tudi pri zmanjševanju dejavnikov tveganja za kardiovaskularne bolezni, kot je hiperholesterolemija, in izboljšanju prehranskega statusa in kakovosti življenja (Falasca in sod., 2015).

Nekatera protiretrovirusna zdravila (Zidovudin, Videx EC) za zdravljenje virusa HIV lahko povečajo raven glukoze v krvi in povzročajo inzulinsko rezistenco, kar pogosto vodi v sladkorno bolezen tipa 2, še posebej pri bolnikih z določeno predispozicijo (Kalra in sod., 2011). Zaradi vsestranske uporabe probiotikov v zadnjem času vse več pozornosti namenjajo tudi raziskovanju vpliva probiotikov na sladkorno bolezen tipa 2. Dokazano je bilo, da lahko probiotiki zmanjšujejo raven glukoze v krvi in preprečujejo uničenje beta celic trebušne slinavke, ki izločajo inzulin, v živalskih modelih. Kljub temu pa so humane klinične študije pokazale mešane rezultate. V nekaterih študijah probiotiki niso imeli učinka, pri drugih pa so ugotovili velik učinek zniževanja glukoze. Vpliv probiotikov na metabolizem glukoze deluje na več načinov. Dokazana je protioksidativna aktivnost probiotikov, ki z zaviranjem peroksidacije lipidov in povečanjem vsebnosti glutathiona, superoksid dismutaze, katalaze in glutathion peroksidaze zmanjšuje oksidativno škodo. Lahko delujejo na inzulinsko rezistenco s povečanjem celic ubijalk v jetrih, z vplivom na ekspresijo faktorja tumorske nekroze (TNF- $\alpha$ ), s povečanjem biološke dostopnosti gliklazida, zdravila za sladkorno bolezen tipa 2, in upočasnjeno absorpcijo glukoze v črevesju. Probiotika *Lactobacillus acidophilus* in *Lactobacillus casei* sta na modelu podgan pozitivno delovala na glukozno toleranco in hiperglikemijo, na zmanjšanje krvnega tlaka in znižanje skupnega holesterola in trigliceridov (Ruan in sod., 2015).

Bakterijska vaginoza lahko poveča tveganje za prenos ali pridobitev virusa HIV. Deluje na povečanje proinflammatoryh citokinov in povzroča motnje v delovanju sluznice. Ženske, ki imajo vagino kolonizirano z mikrobioto, v kateri prevladujejo laktobacili, manj verjetno pridobijo virus HIV od partnerja (Burgener in sod., 2015). Probiotična intervencija je lahko profilaktična za bakterijsko vaginozo. Fiziološka koncentracija mlečne kisline naj bi imela širok spekter virucidne aktivnosti, ki je večja od medijev, ki so nakisani na isti pH z ocetno ali perklorovo kislino. Inaktivacija virusa HIV z mlečno kislino je nepovratna, vendar ne povzroča razpada virusa in izgube površinskega proteina gp120. Naslednje generacije virusa HIV, z zmanjšano občutljivostjo za mlečno kislino, bi lahko predstavljale problem pri tem načinu inhibicije virusa z mlečno kislino (Tachedjian in sod., 2017).

Prav tako se lahko kot posledica sistemske bolezni HIV pojavi paradontalna bolezen. Gre za vnetje obzobnih tkiv. Probiotiki in mlečna kislina inhibirajo rast peroralnih patogenih



bakterij (D'Angelo in sod., 2017). Predstavnice *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus uberis* in *Streptococcus rattus* zmanjšajo krvavanje dlesni in izboljšanje klinične in mikrobiološke parametre bolezni (Gupta, 2011).

Kronična bolezen ledvic je ena izmed pogostih komplikacij okužbe z virusom HIV in pomemben vzrok umrljivosti. Je progresivna izguba ledvične funkcije v obdobju nekaj mesecev ali let. Znaki bolezni niso specifični, vključujejo slabost, zmanjšan apetit, probleme s spanjem, potenje, in splošno slabo počutje. Hipertenzija, sladkorna bolezen, črna rasa, visoka starost, nizka vrednost celic CD4<sup>+</sup> in visoka virusna obremenitev so visoki dejavniki tveganja za obolenje. Ugotavlja se s krvnim testom, s katerim določijo vrednosti kreatinina, ki je produkt razgradnje mišičnega metabolizma. Višje vrednosti kreatinina pomenijo nižjo stopnjo glomerularne filtracije in posledično zmanjšano sposobnost ledvic za izločanje odpadnih produktov (Winston in sod., 2008). Bolniki s kronično boleznijo ledvic imajo spremenjeno črevesno mikrobioto, kar spodbuja povečano tvorbo toksinov. S prehranskim dopolnjevanjem bolnikov s specifično kombinacijo sevov probiotikov in koristnimi prebiotiki, za podporo rasti koristne mikrobiote, se izboljša črevesna bakterijska sestava, zatira rast patogenih bakterij in zmanjša proizvodnja toksinov (George in sod., 2016).

## **6 UPORABA PROBIOTIKOV PRI AKUTNEM VIRUSNEM GASTROENTERITISU**

Virusni gastroenteritis je vnetje sluznice želodca, tankega črevesja ali debelega črevesja. Poznan je tudi kot želodčna gripa. Je nalezljiva in zelo pogosta bolezen, ki se prenaša s tesnim stikom okuženih ljudi in s kontaminirano hrano ali vodo, še posebej v vrtcih, šolah in domovih za ostarele. Najpogostejši znaki okužbe so driska, slabost, bruhanje, bolečine v mišicah, glavoboli, vročina in izguba apetita. Najpogostejši povzročitelji virusnega gastroenteritisa so rotavirusi in kalici virusi, med katere spadajo norovirus, adenovirus in astrovirus (Desselberger, 2017). Gastroenteritis bakterijskega izvora je veliko manj pogost (okoli 10 %), povzročajo pa ga bakterije *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Shigella* (Barrett in Fhogartaigh, 2017). Rotavirus je vodilni vzrok smrti zaradi driske pri majhnih otrocih po vsem svetu in povzroči več kot pol milijona smrtnih primerov virusnega gastroenteritisa letno, v manj razvitih državah. Povzroči približno 70 % primerov gastroenteritisa pri otrocih, mlajših od pet let.

### **6.1 ZDRAVLJENJE AKUTNEGA GASTROENTERITISA**

Čeprav se globalno uporabljata dve oralni cepivi z živimi oslABLJENIMI virusi, Rotarix in RotaTeq, epidemije gastroenteritisa v manj razvitem svetu še zdaleč niso obvladljive. Učinkovitost cepiva je tam manjša. Nekateri možni vzroki za to so v dejstvu, da so otroci okuženi že v zgodnji starosti, v visoki virusni obremenitvi in v pomanjkanju protiteles v materinem mleku (Villena in sod., 2016).

Najpogostejši zaplet gastroenteritisa je dehidracija. Ker se pri dehidraciji zmanjša volumen zunajcelične tekočine, se zmanjša tudi volumen krvne plazme in posledično pade krvni

tlak. Če je stopnja dehidracije visoka, se lahko zmanjša pretok krvi skozi tkiva in nastopi stanje šoka in nato smrt. Zaradi tega je priporočeno uživanje peroralnih rehidracijskih raztopin z ustrezno osmolarnostjo (<270 mOsm/liter). Uporaba teh se je izkazala za najbolj koristno sredstvo pri obvladovanju akutnega gastroenteritisa, vendar pa peroralne rehidracijske raztopine ne zmanjšajo trajanje driske. V redkih primerih je potrebna tudi intravenska rehidracija.

Uporaba antibiotikov pri večini vrst gastroenteritisa ni potrebna, razen pri otrocih mlajših od šest mesecev in imunsko oslabljenih ali pri potrjenih primerih šigeloze in salmoneloze.

Cink se je izkazal kot koristen pri zmanjševanju trajanja driske in verjetnosti ponovitve gastroenteritisa v manj razvitih državah. WHO in UNICEF priporočata cink kot zdravilo pri driskah, ki trajajo od 10 do 14 dni, kar naj bi zmanjšalo umrljivost za 23 %. To pa ne velja za razvite države, kjer je pomanjkanje cinka redko (Noone, 2017).

Veliko raziskav obravnava tudi uporabo probiotikov in prebiotikov pri zdravljenju pri akutnem gastroenteritisu. Obstajajo dokazi, da specifični sevi probiotikov zmanjšajo trajanje driske. Najbolj proučeni sevi probiotičnih bakterij in njihov vpliv na gastroenteritis so *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Lactobacillus acidophilus* LA5, *Bifidobacterium lactis* Bb12, *Escherichia coli* Nissle 1917 in nekatere kvasovke, kot je na primer *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745. Leta 1994 so dokazali, da *Bifidobacterium lactis* in *Streptococcus thermophilus* lahko zmanjšata pojavnost akutne driske, pri skupini dojenčkov starih od pet do dvanajst mesecev (Saavedra in sod., 1994). Ta študija je spodbudila raziskovalce, da so začeli z raziskavami, z različnimi probiotičnimi sevi, z različnimi količinami dodanimi v dojenčkove mlečne formule ali dodanimi ločeno, da bi ocenili učinkovitost probiotikov pri preprečevanju akutnega gastroenteritisa. Nadaljni rezultati večine študij so pokazali zmerne koristi probiotikov. Metaanalize objavljenih študij kažejo, da izbrani sevi (*Lactobacillus casei* GG, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus reuteri*) zmanjšajo trajanje driske za približno en dan. Zaradi večje učinkovitosti je bila v nekaterih študijah predlagana uporaba probiotikov v začetnih fazah bolezni (Vandenplas, 2016).

Probiotik *Lactobacillus casei* Shirota naj bi imel pri bolnikih z akutnim gastroenteritisom tudi pozitivne učinke delovanja na ledvice, vnetja in motiliteto črevesja. Zaradi hude dehidracije lahko akutni gastroenteritis spremlja tudi odpoved ledvic. *Lactobacillus casei* Shirota naj bi povečal hitrost glomerulne filtracije po vsaj tretjem dnevu uporabe in zmanjšal vrednosti kreatinina po vsaj šestem dnevu uporabe. Faktor vnetja CRP naj bi se znatno zmanjšal v nekaj dneh zauživanja (Akoglu in sod., 2015).

Možni mehanizmi delovanja so stimulacija prirojenega in pridobljenega imunskega sistema, stimulacija Toll-u podobnih receptorjev (TLR3). To je vrsta proteinov, ki imajo ključno vlogo pri imunskem sistemu. So prepoznavni receptorji, ki prepoznajo molekule, ki so zastopane v patogenih mikroorganizmih in so hkrati različne od gostiteljskih molekul. Ostali možni načini delovanja so konkurenca s patogenimi mikroorganizmi za vezavna mesta, znižanje pH intestinalnega lumna, proizvodnje mucinov, kratkih maščobnih kislin, ki spodbujajo rast in diferenciacijo celic črevesne sluznice, normalizacija prepustnosti črevesja in povečana produkcija rotavirusnih protiteles (Villena in sod., 2016).

Organizacija ESPGHAN je leta 2014 objavila priporočila glede uporabe probiotikov pri zdravljenju akutnega gastroenteritisa, pri čemer je svetovala uporabo *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (Vandenplas, 2016).

Prebiotiki pa so živila ali dodatki, običajno v obliki oligosaharidov, ki pospešujejo rast, razmnoževanje in aktivnost koristnih probiotičnih bakterij. Raziskav o neposrednem koristnem vplivu prebiotikov na gastroenteritis je veliko manj, skoraj nič (Noone, 2017).

## 7 DELOVANJE PROBIOTIKOV PRI VIRUSNIH OKUŽBAH SPOLOVIL

### 7.1 PROBIOTIKI IN MLEČNA KISLINA

Vaginalni epitel je notranja plast vagine, sestavljena iz več plasti skvamoznih celic. Sluz, ki se nahaja na epitelu, izloča materični vrat in maternica. Epitel naseljujejo mikroorganizmi, ki imajo lahko komenzalno vlogo (samo ena vrsta mikroorganizmov ima pri tem korist, gostitelj pa nima ne škode ne koristi), lahko delujejo mutualistično (oba mikroorganizma imata koristi) ali parazitsko (škodljivo za gostiteljski mikroorganizem). V stanju evbioze vaginalno mikrobioto pri ženskah v reproduktivni dobi sestavljajo *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii*, ki proizvajajo velike količine mlečne kisline. Kadar je to dinamično ravnovesje porušeno, nastopi stanje disbioze, kjer se zmanjša število laktobacilov, ali pa jih sploh ni. Laktobacili so aerotolerantni anaerobi, ki s fermentacijo glukoze proizvajajo mlečno kislino in tako vplivajo na sam pH nožnice. *Lactobacillus crispatus* proizvaja večje količine mlečne kisline v primerjavi z *Lactobacillus iners* in *Lactobacillus jensenii*. Mlečna kislina v vagini je v obliki L- in D- izomer. Razmerje med posameznima je odvisno od vrste in seva laktobacila. *Lactobacillus crispatus* in *Lactobacillus gasseri* proizvajata D- in L- mlečno kislino, medtem ko *Lactobacillus iners* samo L-izomero in *Lactobacillus jensenii* samo D-izomero. Dobro dokazana višja zaščita *L. crispatus* proti patogenimi se pripisuje večji zaščitni vlogi D- mlečne kisline. Protonirana oblika mlečne kisline prevladuje pri vrednostih pH pod pKa 3,9. Laktatni anion prevladuje pri vrednostih pH nad pKa 3,9. In vitro študije kažejo, da imata protonirana oblika mlečne kisline in laktatni anion različne lastnosti. Dokazano je, da ima mlečna kislina, ne laktatni anion, protimikrobne in imunomodulatorne učinke. Za razliko od laktatnega aniona je protonirana oblika mlečne kisline prepustna skozi membrano in vstopa v celico brez uporabe transporterjev monokarboksilata ali receptorja GPR81, ki veže laktat. Po vstopu zakisa citosol patogenih bakterij in s tem ovira intracelularne funkcije. To vodi v celično apoptozo. Zaželjeno merilo za probiotike je zato njihova sposobnost, da močno zakisajo vagino z mlečno kislino. Tisti, ki temeljijo na izločanju mlečne kisline, bi morali zakisati vagino na pH 3,9, da bi dosegli stanje, kjer bi prevladovala protonirana oblika mlečne kisline. Zaželjena izbira probiotikov na osnovi vrste *Lactobacillus* je v veliki meri določena, tudi zaradi njihove sposobnosti proizvodnje protimikrobnih dejavnikov (vodikov peroksid) in sposobnosti vezave na vaginalne epitelne celice.

Predstavniki vrst *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, *Lactobacillus reuteri* RC-14, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus fermentum* so bili ocenjeni kot najbolj učinkoviti vaginalni probiotiki. Lahko se vnašajo neposredno v vaginalni trakt v obliki kapsul, aplikatojev ali s tamponi z liofiliziranimi laktobacili, lahko pa oralno. Učinkovitost oralnega vnašanja probiotika temelji na predpostavki, da se peroralni probiotik lahko prenese iz gastrointestinalnega trakta skozi rektum na spodnji del reproduktivnega trakta (Tachedjian in sod., 2017).

## 7.2 HUMANI PAPILOMA VIRUS

Humani papiloma virus (HPV) je DNA virus družine papiloma virusov. Povzročitelj okužbe v keratinocitih kože in sluznice. Večina tipov humanega papiloma virusa ne povzročata simptomov, nekateri tipi pa lahko povzročijo kožne bradavice. Ljudje se lahko okužijo z več kot enim tipom virusa. Več kot 90 % okužb HPV izgine iz telesa po približno dveh letih. Nekateri tipi (HPV-16 in HPV-18) pa so odgovorni za 70 % primerov raka materničnega vratu. HPV-16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 in 58 skupaj povzročijo 90 % raka materničnega vratu v svetu (Mitra in sod., 2016).

Z dobro organiziranimi presejalnimi programi in ob visoki stopnji pregledanosti žensk (bris materničnega vratu), je možno zmanjšati incidenco in umrljivost. Lahko povzročijo redko stanje, poznano kot respiratorna papilomatoza, pri kateri se pojavijo bradavice na grlu, ki ovirajo dihanje. Če niso kirurško odstranjene, povzročajo raka na grlu. Faktorji tveganja za okužbo so zgodnja starost prvega spolnega odnosa, več partnerjev, kajenje in slabo delovanje imunskega sistema. Med nosečnostjo se lahko virus prenese iz matere na otroka. Ni pa razširjen na običajnih predmetih. Cepiva lahko preprečijo okužbo, če so mladi inokulirani dovolj zgodaj. Za cepljenje se trenutno uporabljata dve cepivi. Obe sta izdelani po principu rekombinatne tehnologije, pri kateri beljakovine tvorijo virusom podobne delce. Ker cepljenje proti HPV ne prepreči nastanka vseh rakov materničnega vratu, mora presejanje potekati še naprej, tudi pri ženskah, ki so bile že cepljene (Atkinson in sod., 2018).

Probiotiki so prav tako priporočeni pri okužbi z HPV, na kar kažejo in vitro in in vivo dokazi. Zdravljenje cervikalnih celic (potencialno rakave celice ploščatega epitela materničnega vratu) okuženih s HPV-16 s probiotikom *Bifidobacterium adolescentis*, je zmanjšalo E6 in E7 mRNA, kar predstavlja nov potencialen terapevtski vir virusnih preoblikovanih celic. E6 in E7 sta onkogeni, ki spreminjata celični cikel tako, da zadržita diferenciran gostiteljski keratinocit v stanju, ki je najbolj ugodno za okrepitev in replikacijo virusnega gena (Mitra in sod., 2016).

*Lactobacillus rhamnosus*, skupaj z *Lactobacillus crispatus*, sta bila dokazana kot citotoksična za rakave celice materničnega vratu, okužene s HPV-18. Hkrati se je izkazalo, da nista citotoksična za normalno delujoče celice, ne glede na vrednost pH in količino laktata (Motevaseli in sod., 2014). Poleg tega je randomizirana študija s 54 HPV pozitivnimi ženskami, z nizko stopnjo potencialno rakavih cervikalnih celic materničnega vratu, ki so se zdravile z oralno aplikacijo seva *Lactobacillus casei* Shirota, pokazala

zmanjšanje potencialno rakavih celic iz 29 % na 19 %, v primerjavi z nezdravljeno kontrolno skupino (Verhoeven in sod., 2013).

Prebiotiki so najbolj proučeni v prebavnem traktu, nekaj spodbudnih študij *in vitro* in *in vivo* pa kaže na podobno delovanje tudi v vagini. Fruktooligosaharidi in galaktooligosaharidi spodbujajo rast *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii* in *Lactobacillus vaginalis in vitro*. Ti rezultati so spodbudni in predstavljajo zelo poceni in varno obliko zdravljenja za bolezen, ki je z zdravili ni mogoče zdraviti brez tveganja za zmanjšanje reproduktivne funkcije (Mitra in sod., 2016).

### 7.3 VIRUS HERPES SIMPLEKSA I IN II

Virus herpesa simpleksa je rod virusov iz družine herpesvirusov, ki zajema dve vrsti: herpes simpleks I in herpes simpleks II. Prva epizoda življenjskega cikla herpesa je lahko povezana s povišano telesno temperaturo, oteklimi bezgavkami, glavoboli, okužbe kože, oči, možganov, sluznic. Okužba se kaže kot mehurčast izpuščaj okoli ustnic, nosnic, v predelu spolovil ali kot keratokonjunktivitis in meningoencefalitis. Sčasoma se simptomi aktivne bolezni zmanjšujejo, tako se izmenjuje obdobja aktivne bolezni in latentne faze. Virus se prenese z neposrednim stikom telesnih tekočin z okuženo osebo. Genitalni herpes je uvrščen med spolno prenosljive bolezni in se med porodom lahko prenese na dojenčka. Prenos lahko poteče, čeprav virus ni v obdobju aktivne bolezni. Po okužbi se virusi transportirajo preko senzoričnih živcev v telesa živčnih celic, kjer živijo doživljenjsko. Zato je tisti človek, ki je enkrat okužen, okužen za vse življenje. Vzroki ponovitve vključujejo zmanjšano delovanje imunskega sistema, stres, hormonske motnje, izpostavljenost sončnemu sevanju (Kumar in sod., 2016).

Trenutno ni na voljo ne cepiva, ne zdravila po okužbi. Uporabljajo pa se protivirusna zdravila, kot so Aciklovir in Valaciklovir, za zmanjšanje resnosti simptomov. Pojav mutacij v virusni DNA-polimerazi in timidin kinazi je povzročil povečanje odpornosti na zdravila, kot je na primer Aciklovir. Razširjenost in povečana odpornost virusa je motivirala raziskovalce, da proučijo uporabo probiotikov za njegovo možno preprečitev (Jiang in sod., 2016). Genitalni herpes povzročata virus herpes simpleksa I (HSV-1) in virus herpes simpleksa II (HSV-2). HSV-1 je lahko povzročitelj tudi oralnega herpesa. Protitelesa HSV-1 najdemo v 90 % splošne populacije. Približno 30 % bolnikov ima ponavljajoče se okužbe (An in sod., 2012).

Leta 2015 so raziskali protivirusne učinke supernatanta probiotične kulture *Lactobacillus acidophilus* A5 na standardni sev virusa herpes simpleksa II. Rezultati študije so pokazali znatno zmanjšanje replikacije HSV-2 v prisotnosti omenjene probiotične kulture. Možen mehanizem delovanja je preprečevanje adhezije virusnega plašča. Primerjava rezultatov z divjimi sevi v vaginalnih vzorcih kaže na večjo inhibitorno moč virusa divjih sevov v primerjavi s standardnimi sevi (Goudarzi in Fazeli, 2015). Probiotik *Lactobacillus crispatus* učinkovito zavira vstop virusa herpes simpleksa II (HSV-2) v vero celicah. *Lactobacillus crispatus* naj bi blokiral receptorje za HSV-2 na površini celic in preprečil virusni vstop v začetnih stopnjah okužbe in vdor virusnih delcev z neposredno interakcijo *L. crispatus* z virusnim plaščem HSV-2 (Mousavi in sod., 2018).

*Bifidobacterium adolescentis* SPM 0214 deluje protivirusno na virus HSV-1 v vero celicah. V raziskavi so uporabili test redukcije nevtralizacije plaka (PRNT, angl. plaque reduction neutralization test). To je tehnika za ocenjevanje učinkovitosti potencialno antivirskih spojin, kjer se serumski vzorec razredči in zmeša z virusno suspenzijo. Inkubacija omogoča delovanje protiteles z virusom. To se vlije čez enojni sloj gostiteljskih celic. Površina celičnih plasti je prekrita s plastjo agarja ali karboksimetil celuloze, kar prepreči naključno širitev virusa. Koncentracijo se lahko oceni s številom plakov (regije okuženih celic), nastalih po nekaj dneh in z mikroskopskim opazovanjem, fluorescenčnimi protitelesi ali s specifičnimi barvili, ki reagirajo z okuženimi celicami. Ko so s HSV-1 okužene vero celice zdravili z nizko koncentracijo *B. adolescentis* SPM 0214, se je pojavilo večje število plakov. Ko pa so bile celice obdelane z višjo koncentracijo *B. adolescentis* SPM 0214, se je pojavilo le nekaj plakov. Zato je vnos *B. adolescentis* SPM 0214 potencialno novo terapevtsko orodje proti HSV-1 (An in sod., 2012).

Prav tako so bile dokazane antiviruse aktivnosti probiotičnega seva *Lactobacillus rhamnosus* 06CC2. Ocenjevali so neposredni učinek *Lactobacillus rhamnosus*, v primerjavi z neprobiotičnim sevom *Escherichia coli*, na s HSV-1 okuženih vero celicah. Uporabljali so test redukcije nevtralizacije plaka in test ELISA za ugotavljanje faktorja tumorske nekroze alfa (TNF- $\alpha$ ), interferona gama (IFN- $\gamma$ ) in dušikovega oksida. Pristnost *Lactobacillus rhamnosus* 06CC2 je povečala sposobnost preživetja makrofagov pred in po okužbi s HSV-1, v primerjavi z *Escherichia coli* kot neprobiotično bakterijo. Koncentracija faktorja tumorske nekroze alfa je bila višja v celicah, obdelanih z *E. coli*, kot pri probiotičnem sevu. Probiotični sev pa je aktiviral povečano produkcijo IFN- $\gamma$  v splenocitah, kar je povezano z aktivnostjo naravnih celic ubijalk (NK celice) in transkripcijo IFN- $\gamma$  in  $\beta$ 2 receptorjev interlevkina 12. Pri proizvodnji dušikovega oksida ni bilo razlik med bakterijama *Lactobacillus rhamnosus* 06CC2 in *Escherichia coli*. Rezultati te študije kažejo, da probiotični sev izboljša sposobnost preživetja makrofagov za odpravo in inaktivacijo HSV-1, v primerjavi z neprobiotičnim sevom. Receptorsko zasedanje makrofagnih mest zmanjša učinkovitost HSV-1 s strani obeh bakterij (Khani in sod., 2012).

## 8 VPLIV PROBIOTIKOV NA VIRUSE KOKSEKI

Virusi kokseki so enterovirusi. Enterovirusi so RNA virusi, poimenovani po svoji črevesni poti. Pripadajo družini pikornavirusov. Serološke študije so odkrile enainsedemdeset serotipov človeškega enterovirusa. Za njih je značilna visoka stopnja mutacije, zaradi pogoste rekombinacije (Muir, 2017). Črevesni virusi so lahko patogeni ali zdravju neškodljivi. Patogene lahko razvrstimo v dve skupini. Na tiste, ki se razmnožijo v črevesnem epitelu in povzročajo gastroenteritis, na primer rotavirusi. Druga skupina (virus kokseki) pa so takšni virusi, ki se najprej namnožijo, pogosto brez znakov okužbe in se nato razširijo na ciljne organe, kjer povzročajo različne bolezni, kot so meningitis, encefalitis, miokarditis, perikarditis, akutni hemoragični konjunktivis, bolezen dlani, podpaltov in ust, paralitična obolenja (Colbe´re-Garapin in sod., 2007).

Poznamo kokseki viruse A in kokseki viruse B. Obe skupini lahko povzročata vročinske krče, izpuščaje, bolezni zgornjih dihal in aseptični meningitis. Na splošno je skupina A bolj

nagnjena k povzročanju okužb kože in sluznice (herpangina, akutni hemoragični konjunktivitis, bolezen dlani, podplato in ust). Skupini B pripada 6 serotipov in pogosto okuži srce, pljuča, trebušno slinavko, jetra in povzroča pleurodinijo, miokarditis, perikarditis (Muir, 20017). Tudi razvoj inzulinsko odvisne sladkorne bolezni je bil povezan z okužbo trebušne slinavke s kokseki virusom B ( El Kfoury in sod., 2017).

## 8.1 BOLEZEN DLANI, PODPLATOV IN UST

Bolezen dlani, podplato in ust je pogosta virusna okužba, ki prizadane predvsem dojenčke in otroke, mlajše od petega leta. Glavna najpogostejša povzročitelja bolezni sta kokseki virus A sev 16 (CV-A16) in enterovirus 71 (EV71). V večini primerov je bolezen blaga, izzveni sama in ne zahteva posebnega zdravljenja. Redke so hujše klinične manifestacije z nevrološkim zapleti, vključno z možganskim encefalitisom, meningitisom. Trenutno še ni na voljo učinkovitega cepiva ali posebnega protivirusnega zdravljenja.

Ker je fekalno-oralna pot glavna pot prenosa bolezni dlani, podplato in ust, lahko prisotnost nekaterih probiotičnih bakterij v gastrointestinalnem traktu omejuje prenos virusa med otroki in zagotovi določeno zaščito pred boleznijo. Po okužbi se kokseki virus in EV71 najprej namnožita na sluznici želodca, nato se virusni delci kopičijo v mišicah, kjer se virus še bolj namnoži. Na podlagi tega so Ang in kolegi (2016) ocenjevali protivirusno aktivnost komercialno dostopnih probiotikov *Lactobacillus reuteri* Protectis in *Lactobacillus casei* Shirota *in vitro* na človeških skeletnih celicah in celicah debelega črevesja, proti kokseki virusom A, B in enterovirusom 71. Ugotovili so, da ima *L. reuteri* Protectis protivirusno aktivnost proti CV-A16, CV-A6 in EV71, ne pa proti CV-B2. Probiotični sev *L. casei* Shirota ni pokazal protivirusne aktivnosti proti zgoraj omenjenim virusom. Iz tega lahko sklepamo, da je protivirusni učinek, ugotovljen pri *L. reuteri* Protectis, sevno specifičen (Ang in sod., 2016).

## 8.2 VIRUS KOKSEKI B

Virus kokseki B4 (CV-B4) je eden izmed šestih serotipov skupine B virusov kokseki. Okuži lahko različna človeška tkiva (osrednji živčni sistem, endokrine in eksokrine žleze trebušne slinavke, jetra, rjavo maščobo) in povzroči nenormalno delovanje ali uničenje različnih organov in celic. Uniči lahko naravne celice ubijalke in Langerhansove otočke trebušne slinavke, kar lahko privede do celične apoptoze beta celic, ki izločajo inzulin. Virusna okužba tako poveča tveganje za sladkorno bolezen tipa 1.

Dva od petih sevov *Bifidobacterium longum* sta pokazala protivirusno delovanje na virus CV-B4 takrat, ko so bifidobakterije inkubirali skupaj z virusnimi delci pred inokulacijo celic. Niti en sev pa ni bil učinkovit v primeru, ko so inkubirali bifidobakterije pred inokulacijo celic z virusom. Analizirali so tudi lipoproteinske agregate celičnih sten, ki jih izločajo izbrani sevi. Njihov protivirusni učinek je bil dokazan v primeru, ko so jih inkubirali skupaj z virusnimi delci pred inokulacijo črevesnih epitelnih celic. Beljakovinska frakcija iz izločenih bifidobakterijskih lipoproteinov je bila identificirana kot inhibitor zgodnje stopnje okužbe s CV-B4. Sevi *Bifidobacterium longum*, ki ne izločajo lipoproteinske agregate celičnih sten, niso mogli zaščititi celic pred okužbo s CV-B4. Vsi sevi *B. longum* sicer imajo gen, ki kodira izločanje lipoproteinov, vendar je količina izločanja specifična za sev in odvisna od same fermentacije. Preprečitev okužbe

po inokulaciji je povezana z interakcijo med bifidobakterijskim lipoproteinom in virusnim plaščem, ki blokira virusno prepoznavanje celičnega receptorja (El Kfoury in sod., 2017).

Prav tako so bakterije vrste *Bifidobacterium longum* uporabili v študiji kot nosilko interleukina 12 (IL-12), ki ima pomembno vlogo pri zdravljenju številnih nalezljivih bolezni, z intravenskim ali intramuskularnim vnašanjem. To sta nepopolna načina in lahko povzročata nezaželene učinke. Namen te študije je bil razviti nov sistem za oralno uživanje IL-12, z gensko spremenjeno *Bifidobacterium longum* in raziskati učinkovitost interleukina 12 na miokarditis (vnetje srčne mišice), ki ga povzroča virus kokseki B3, na miših. Rezultati so pokazali, da je *B. longum* primeren eksogeni nosilec za gensko ekspresijo IL-12 in njegovo izločanje v prebavnem traktu. Tako lahko peroralno dajanje IL-12 iz *B. longum*, dva tedna po okužbi zmanjša resnost miokarditisa, saj občutno zmanjša virusne titre v srcu. IL-12 regulira izražanje mRNA Th1 citokinov (IFN- $\gamma$  in TNF- $\alpha$ ) v srčnem tkivu (Yu in sod., 2012).



## 9 POVZETEK

Človeški patogeni virusi imajo zelo velik zdravstveni, socialni in gospodarski vpliv. So pomembni vzroki za obolevost in umrljivost ljudi po vsem svetu. V zadnjih letih so številne raziskave pokazale jasno povezavo med prehrano, imunsko funkcijo telesa in stopnjo incidence nalezljivih bolezni.

Probiotiki se lahko zaužijejo v obliki hrane (predvsem fermentiranih mlečnih izdelkov), prehranskih dopolnil in zdravil. Njihovi učinki so specifični za sev. Da bi bil probiotik učinkovit, mora preživeti kislo okolje v želodcu in biti odporen na žolčne kisline. Prav tako mora biti sposoben vsaj za krajši čas kolonizirati gastrointestinalni trakt in delovati na izločanje citokinov iz črevesnih epitelnih celic. Njihova sposobnost adhezije na črevesno sluznico je pomembna lastnost, s katero ovirajo naselitev konkurenčnih patogenih mikroorganizmov. Na viruse lahko delujejo z več mehanizmi: z neposrednim medsebojnim vplivanjem na viruse, s proizvodnjo protivirusnih inhibitornih snovi in/ali s stimulacijo imunskega sistema.

Gastrointestinalni trakt je tarča veliko različnih virusov. Probiotiki pogosto izvirajo iz črevesne mikrobiote in nekatere seve (*Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745...) uporabljamo za zdravljenje driske, ki se pojavi pri akutnem virusnem gastroenteritisu. Bolezen dlani, podplato in ust je pogosta virusna okužba, ki prizadane predvsem dojenčke in otroke, mlajše od petega leta. Ugotovili so, da ima *L. reuteri* Protectis protivirusno aktivnost proti CV-A16, CV-A6 in EV71, ne pa proti CV-B2. Virusna okužba z virusom kokseki B, pa lahko povzroča pleurodinijo, miokarditis in pericarditis. *B. longum* lahko zmanjša resnost miokarditisa in občutno zmanjša virusne titre v srcu.

Pri virusnih respiratornih okužbah, ki so ena izmed najpogostejših obolenj pri ljudeh, uporabljamo metabolite specifičnih sevov rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium*, ki zavirajo replikacijo virusa influence. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04 zmanjšuje virusne titre rinovirusa v nosni votlini. *Lactobacillus rhamnosus* GG pri hospitaliziranih otrocih zmanjša možnost okužbe zgornjega dihalnega trakta.

Virus HIV bistveno spreminja celotno mikrobno sestavo v črevesju in ustni votlini. Probiotiki s spreminjanjem črevesne mikrobiote obnavljajo epitelno tkivo. S preprečevanjem zmanjšanja števila CD4+ celic, zmanjšajo tveganje prenosa virusa in dobo hospitalizacije zaradi različnih okužb. *Lactobacillus rhamnosus* poveča povprečno število CD4+ celic. *Lactobacillus casei* pozitivno vpliva na viruloško, imunološko in bakteriološko sliko, na povečanje CD56+ celic in limfocitov T. Učinkovitost uživanja določenih sevov se je izkazala kot odlična strategija, tudi pri obvladovanju stranskih učinkov protiretrovirusnih zdravil.

Prav tako se je protivirusno delovanje probiotikov iz rodov *Lactobacillus* in *Bifidobacterium* izkazalo kot učinkovito pri spolnih okužbah z virusi.

Uporaba probiotikov je lahko cenovno dostopna in potencialno koristna za zmanjšanje obolevnosti in umrljivosti pri virusnih okužbah.

## 10 VIRI

- Adhikari P. A., Kim W. K. 2017. Overview of prebiotics and probiotics: focus on performance, gut health and immunity – a review. *Annals of Animal Science*, 17, 4: 949-966
- Akoglu B., Loytved A., Nuiding H., Zeuzem S., Faust D. 2015. Probiotic *Lactobacillus casei* Shirota improves kidney function, inflammation and bowel movements in hospitalized patients with acute gastroenteritis – a prospective study. *Journal of Functional Foods*, 17: 305-313
- Al Kassaa I., Hober D., Hamze M., Chibib N. E., Drider D. 2014. Antiviral potential of lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6, 3-4: 177-185
- An H. M., Lee D. K., Kim J. R., Lee S. W., Cha M. K., Lee K. O., Ha N. J. 2012. Antiviral activity of *Bifidobacterium adolescentis* SPM 0214 against Herpes simplex virus type 1. *Archives of Pharmacal Research*, 35, 9: 1665-1671
- Ang L. Y. E., Too H. K. I., Tan E.L., Chow T. W., Shek P. L., Tham E., Alonso S. 2016. Antiviral activity of *Lactobacillus reuteri* Protectis against Coxsackievirus A and Enterovirus 71 infection in human skeletal muscle and colon cell lines. *Virology Journal*, 13: 111
- Atkinson A., Studwell C., Bejarano S., Castellón A. M. Z., Espinal J. A. P., Deharvengt S., La Rochelle E. P. M., Kennedy L. S., Tsongalis G. J. 2018. Rural distribution of Human papilloma virus in low and middle income countries. *Experimental and Molecular Pathology*, 104, 2: 146-150
- Barrett J., Fhogartaigh N. C. 2017. Bacterial gastroenteritis. *Medicine*, 45, 11: 683-689
- Begley M., Hill C., Gahan C. G. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3: 1729-1783
- Burgener A., McGowan I., Klatt N. R. 2015. HIV and mucosal barrier interactions: consequences for transmission and pathogenesis. *Current Opinion in Immunology*, 36: 22-30
- Chiba E., Tomosada Y., Vicozo-Pinto M. G., Salva S., Takahashi T., Tsukida K., Kitazawa H., Alvarez S., Villena J. 2013. Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* improves resistance of infant mice against respiratory Syncytial virus infection. *International Immunopharmacology*, 17, 2: 373-382
- Chikindas M. L., Weeks R., Drider D., Chistyakov V. A., Dicks L. MT. 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*, 49: 23-28.
- Chua K. J., Kwok W. C., Aggarwal N., Sun T., Chang M. W. 2017. Designer probiotics for the prevention and treatment of human diseases. *Current Opinion in Chemical Biology*,

40: 8-16

Colbe're-Garapin F., Martin-Latil S., Blondel B., Mousson L., Pelletier I., Autret A., Francois A., Niborski V., Grompone G., Catonnet G., Van de Moer A. 2007. Prevention and treatment of enteric viral infections: possible benefits of probiotic bacteria. *Microbes and Infection*, 9, 14-15: 1623-1631

Cox A. J., Pyne D. B., Saunders P. U., Fricker P. A. 2010. Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. *British Journal of Sports Medicine*, 44, 4: 222-226

D'Angelo C., Reale M., Constantini E. 2017. Microbiota and probiotics in health and HIV infection. *Nutrients*, 9: 615, doi: 10.3390/nu9060615: 15 str.

Desselberger U. 2017. Viral gastroenteritis. *Medicine*, 45, 11: 690-694

Dubey P., Dubey U. S., Dubey B. 2018. Modeling the role of acquired immune response and antiretroviral therapy in the dynamics of HIV infection. *Mathematics and Computers in Simulation*, 144: 120-137

El Kfoury K. A., Romond M., Scuotto A., Alidjinou E. K., Dabboussi F., Hamze M., Engelmann I., Sane F., Hober D. 2017. Bifidobacteria-derived lipoproteins inhibit infection with Coxsackievirus B4 *in vitro*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50, 2: 177-185

Falasca K., Vecchiet J., Ucciferri C., Di Nicola M., D'Angelo C., Reale M. 2015. Effect of probiotic supplement on cytokine levels in HIV-infected individuals: A preliminary study. *Nutrients*, 7, 10: 8335-8347

FAO/WHO. 2002. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, London Ontario, Canada, April 30 – May 1, 2002. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 11 str.

George M., Joseph L., George D. 2016. Role of prebiotic and probiotic in the management of chronic kidney disease patients. *International Journal of Medical Research & Health Sciences*, 5, 2: 50-53

Golucci A. P. B. S., Marson F. A. L., Valente M. F. F., Branco N. M., Prado C. C., Nogueira R. J. N. 2018. Influence of AIDS antiretroviral therapy on the growth pattern. *Jornal de Pediatria*, doi: 10.1016/j.jpmed.2018.02.006: 11 str. (v tisku)

Goudarzi M. M., Fazeli M. R. 2015. Isolation of *Lactobacillus acidophilus* and assessment for its antiviral effect against Herpes Simplex virus type II. *Molecular Genetics Microbiology and Virology*, 30, 4: 237-241

Gupta G. 2011. Probiotics and periodontal health. *Journal of Medicine and Life*, 4, 4: 387-394

- Ichinohe T., Pan I. K., Kumamoto Y., Peaper D. R., Ho J. H., Murray T. S., Iwasaki A. 2011. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract Influenza A virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 13: 5354-5359
- Jiang J. C., Feng H., Lin Y. C., Guo X. R. 2016. New strategies against drug resistance to Herpes simplex virus. *International Journal of Oral Science*, 8, 1: 1-6
- Kalra S., Kalra B., Agrawal N., Unnikrishnan A. 2011. Understanding diabetes in patients with HIV/AIDS. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 3: 2, doi: 10.1186/1758-5996-3-2: 7 str.
- Kekkonen R. A., Vasankari T. J., Vouirmaa T., Haathela T., Julkunen I., Korpela R. 2007. The effect of probiotics on respiratory infections and gastrointestinal symptoms during training in marathon runners. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 17, 4: 352-363
- Kerry R. G., Patra J. K., Gouda S., Park Y., Shin H., Das G. 2018. Benefaction of probiotics for human health: a review. *Journal of Food and Drug Analysis*, doi: 10.1016/j.jfda.2018.01.002: 13 str. (v tisku)
- Khani S., Motamedifar M., Golmoghaddam H., Hosseini H.M., Hashemizadeh Z. 2012. In vitro study of the effect of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against Herpes simplex virus type 1. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16, 2: 129-135
- Kumar S. P., Chandy M. L., Shanavas M., Khan S., Suresh K. V. 2016. Pathogenesis and life cycle of Herpes simplex virus infection-stages of primary, latency and recurrence. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 28, 4: 350-353
- Kumpu M., Lethoranta L., Roivainen M., Rönkkö E., Ziegler T., Söderlund-Venermo M., Kautiainen H., Järvenpää S., Kekkonen R., Hatakka K., Korpela R., Pitkäranta A. 2013. The use of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and viral findings in the nasopharynx of children attending day care. *Journal of Medical Virology*, 85, 9: 1632-1638
- Lehtoranta L., Pitkäranta A., Korpela R. 2014. Probiotics in respiratory virus infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33, 8: 1289-1302
- Lewthwaite P., Melhuish A. 2018. Natural history of HIV/AIDS. *Medicine*, doi: 10.1016/j.mpmed.2018.03.010: 5. str (v tisku)
- Liu S., Hu P., Du X., Zhou T., Pei X. 2013. *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for preventing respiratory infections in children: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Indian Pediatrics*, 50, 4: 377-281
- Luoto R., Ruuskanen O., Waris M., Kalliomaki M., Salminen S., Isolauri E. 2014. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: a randomized, placebo-controlled trial. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133,

2: 405-413

Muir P. 2017. Enteroviruses. *Medicine*, 45, 12: 794-797

Mitra A., MacIntyre D. A., Marchesi J.R., Lee Y. S., Bennett P. R., Kyrgiou M. 2016. The vaginal microbiota, Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know<sup>SEP</sup> and where are we going next. *Microbiome*, 4: 58, doi: 10.1186/s40168-016-0203-0: 15 str.

Motevaseli E., Azam R., Akrami S. M., Mazlomy M., Saffari M., Modarressi M. H., Daneshvar M., Ghafouri-Fard S. 2016. The effect of *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus rhamnosus* culture supernatants on expression of autophagy genes and HPV E6 and E7 oncogenes in the HeLa cell line. *Cell Journal*, 17, 4: 601-607

Mousavi E., Makvandi m., Teimoori A., Ataei A., Ghafari S., Samarbaf-Zadeh A. 2018. Antiviral effects of *Lactobacillus crispatus* against HSV-2 in mammalian cell lines. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81, 3: 262-267

Noone M. 2012. Management of acute gastroenteritis in children. *Paediatrics and Child Health*, 22, 10: 426-431

Olivares M., Diez-Ropero M. P., Sierra S., Lara-Villoslada F., Fonollá J., Navas M., Xaus J. 2007. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition*, 23, 3: 254-260

Pandey K. R., Naik S., R., Vakil B. V. 2015. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 12: 7577-7587

Ruan Y., Sun J., He J., Chen F., Chen R., Chen H. 2015. Effect of probiotics on glycemic control: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. *PloS One*, 10, 7: e0132121, doi: 10.1371/journal.pone.0132121: 17 str.

Saavedra J. M., Bauman N. A., Oung I., Perman J. A., Yolken R. H. 1994. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of Rotavirus. *Lancet*, 344, 8929: 1046-1049

Sánchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenço A., Gueimonde M., Margolles A. 2017. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61, 1: 1600240, doi: 10.1002/mnfr.201600240: 15 str.

Song J. A., Kim H. J., Hong S. K., Lee D. H., Song C. S., Kim T. K., Choi I. S., Lee J. B., Parl S. Y. 2016. Oral intake of *Lactobacillus rhamnosus* M21 enhances the survival rate of mice lethally infected with Influenza virus. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49, 1: 16-23

Tachedjian G., Aldunate M., Bradshaw C.S., Cone R.A. 2017. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Research in*

Microbiology, 168, 9-10: 782-792

Toscano M., De Grandi R., Pastorelli L., Vecchi M., Drago L. 2017. A consumer's guide for probiotics: 10 golden rules for a correct use. *Digestive and Liver Disease*, 49, 11: 1177-1184

Turner R. B., Woodfolk J. A., Borish L., Steinke J. W., Patrie J. T., Muehling L. M., Lahtinen S., Lehtinen M. J. 2017. Effect of probiotic on innate inflammatory response and viral shedding in experimental rhinovirus infection – a randomised controlled trial. *Beneficial Microbes*, 8, 2: 207-215

Vandenplas Y. 2016. Probiotics and prebiotics in infectious gastroenteritis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30, 1: 49-53

Verhoeven V., Renard N., Makar A., Van Royen P., Bogers J. P., Lardon F., Peeters M., Baay M. 2013. Probiotics enhance the clearance of Human papillomavirus- related cervical lesions: a prospective controlled pilot study. *European Journal of Cancer Prevention*, 22, 1: 46-51

Villena J., Vizoso-Pinto M. G., Kitazawa H. 2016. Intestinal innate antiviral immunity and immunobiotics: beneficial effects against rotavirus infection. *Frontiers in Immunology*, 7: 563, doi: 10.3389/fimmu.2016.00563: 39 str.

West N. P., Pyne D. B., Cripps A. W., Hopkins W. G., Eskesen D. C., Jairath A., Christophersen C. T., Conlon M. A., Fricker P. A. 2011. *Lactobacillus fermentum* (PCC®) supplementation and gastrointestinal and respiratory-tract illness symptoms: a randomised control trial in athletes. *Nutritional Journal*, 10: 30, doi: 10.1186/1475-2891-10-30.: 36 str.

Winston J., Deray G., Hawkins T., Szczech L., Wyatt C., Young B. 2008. Kidney disease in patients with HIV infection and AIDS. *Clinical Infectious Diseases*, 47, 11: 1449-1457

Yu Z., Huang Z., Sao C., Huang Y., Zhang F., Yang J., Lian J., Zeng Z., Luo W., Zeng W., Deng Q. 2012. *Bifidobacterium* as an oral delivery carrier of interleukin-12 for the treatment of Cocksackie virus B3-induced myocarditis in the Balb/c mice. *International Immunopharmacology*, 12, 1: 125-130

Zundler S., Neurath M. F. 2015. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 26, 5: 559-568

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici znan. svet. dr. Bojani Bogovič Matijašič za strokovne usmeritve, hitro odzivnost, vso pomoč, podporo in zaupanje pri pisanju diplomske naloge. Zahvaljujem se recenzentki izr. prof. dr Barbki Jeršek za njeno recenzijo.

Iskrena zahvala gre tudi k moji družini in prijateljem, ki so mi ves čas študija stali ob strani in me podpirali.