

**Efekti oralne primene *L. rhamnosus*  
LA68 na imunski sistem C57 BL/6  
miševa**

# Probiotici

Definicija:

- Živi mikroorganizmi koji, kada se konzumiraju u dovoljnoj količini, izazivaju zdravstveni boljitak kod konzumenta
- Najčešće korišćeni probiotici pripadaju rodovima

Lactobacillus i Bifidobacterium

# Laktične bakterije

## Lactobacilli

Najpoznatije karakteristike

G+ bacili – ćelijski zid (rigidna struktura- omogućava otpornost na osmotski stres)

Dobile ime zbog proizvodnje mlečne (laktične) kiseline

GRAS status

Proizvodnja hrane i sastojci hrane

Najpoznatije vrste Laktobacillusa:

- *L. plantarum*
- *L. rhamnosus*
- *L. acidophilus*
- *L. reuteri*
- *L. brevis*
- *L. casei*
- *L. fermentum*
- *L. sakei...*

# Geni i molekuli laktobacilusa sa probiotskom ulogom

Imunostimulatorni molekuli:

- DNK, RNK
- Lipotejhojna kiselina (LTA)
- peptidoglikan (PGN)
- Bakterijski proteini sa konzerviranim motivima, Lipoproteini
- polisaharidi, egzo- polisaharidi, produkti bakterijskog metabolizma
- Bakteriocini

*Lebeer et al. 2008*

- SFA, masne kiseline kratkog lanca
- Većina spomenutih su polimerni molekuli prepoznati od strane organizma domacina pomoću molekula urođenog imunskog sistema tzv. pattern recognition receptors (PRR) ili molekula koji prepoznaju repetitivne strukture.

# Neka patološka stanja na kojima je testirano dejstvo oralne primene laktobacilusa

Patološka stanja na koja probiotici dokazano imaju pozitivan efekat i patološka stanja na koja mogu imati pozitivan efekat uključuju:

- dijareja,
- gastroenteritis,
- Crohn-ova bolest i ulcerativni kolitis,
- cancer,
- oslabljen imunski sistem,
- alergije kod dece,
- slabo napredovanje novorođenčadi,
- hiperlipidemija,
- oboljenja jetre,
- *Helicobacter pylori* infekcije,
- Infekcije genitourinarnog trakta...

*Brown, AC. & Valiere A. 2004*

# *L. rhamnosus* LA68

- Soj sa Instituta za virusologiju, vakcine i serume, Torlak
- Na tržištu Srbije u preparatu za vaginalnu primenu od 1976-2007. godine pod nazivom **Laktovag**
- Cilj rada je ispitivanje imunološkog efeketa oralne primene LA68 na miševima

## **Laboratorijski miš**

- Jednostavan model sistem, zauzima malo prostora
- Ima kratak životni vek (kraće trajanje eksperimenta)
- **Strogo kontrolisani eksperimentalni uslovi**

Korišćeni su **C57 BL/6** miševi



Soj LA68 primenjivan je oralno 4 x nedeljno tokom mesec dana  
 $2 \times 10^9$  CFU po dozi

Miševi anestezirani, izvadjena krv radi dobijanja **seruma**

određivanje koncentracije citokina

biohemijski parametri

**Izolovani splenociti**

*in vitro* stimulacija

merenje zastupljenosti leukocitnih  
populacija protočnom citometrijom

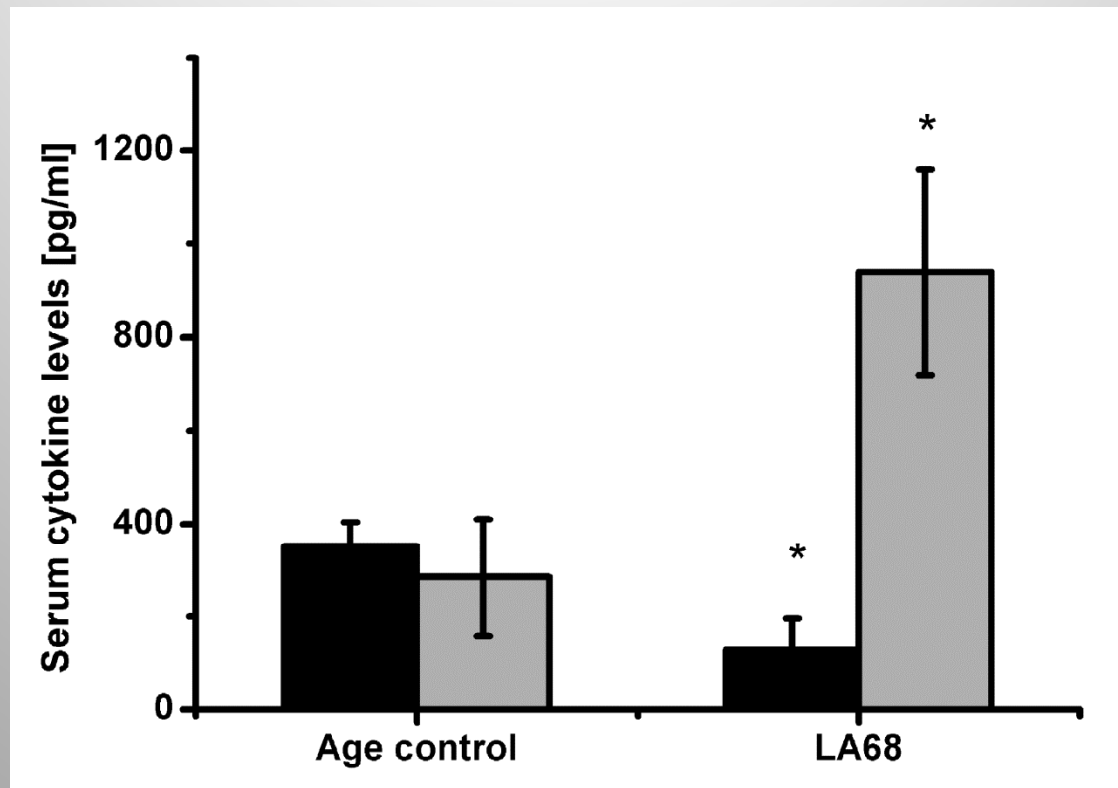
# Rezultati

## Težina i osnovni biohemijski parametri

Parametar [jedinice]	Starosna kontrola	LA68
Početna težina (g)	19.5 ± 1.32	19.2 ± 0.92
Finalna težina (g)	21.0 ± 1.25	20.35 ± 0.75
Težina jetre(g)	1.07 ± 0.08	1.05 ± 0.05
Težina mozga (g)	0.30 ± 0.02	*0.32 ± 0.01
Glukoza (mg/dl)	219.46 ± 61.8	187.39 ± 30.81
Trigliceridi (mg/dl)	72.57 ± 18.58	65.93 ± 13.27
Holesterol (mg/dl)	43.63 ± 13.13	27.03 ± 20.08
ALT [IU/l]	120.67 ± 49.99	62.50 ± 24.39
AST [IU/l]	180.50 ± 32.51	210.50 ± 55.98



## Serumski citokini



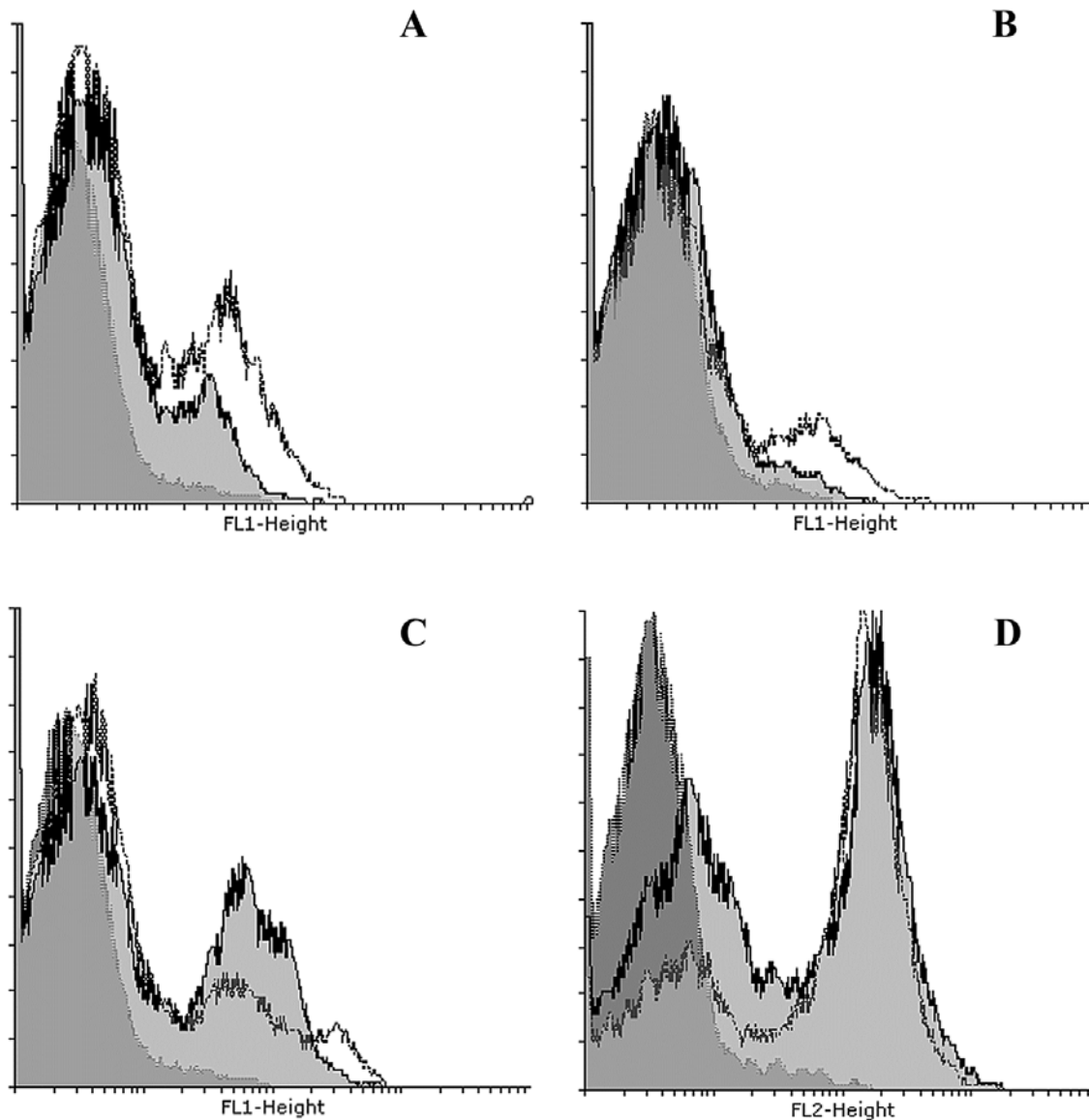
Količina citokina u serumu C57 BL/6 miševa. LA68 – eksperimentalna grupa.

Crni stubovi IL-10,

Svetlo sivi stubovi IFN- $\gamma$ .

P<0.05 \*

# Protočna citometrija



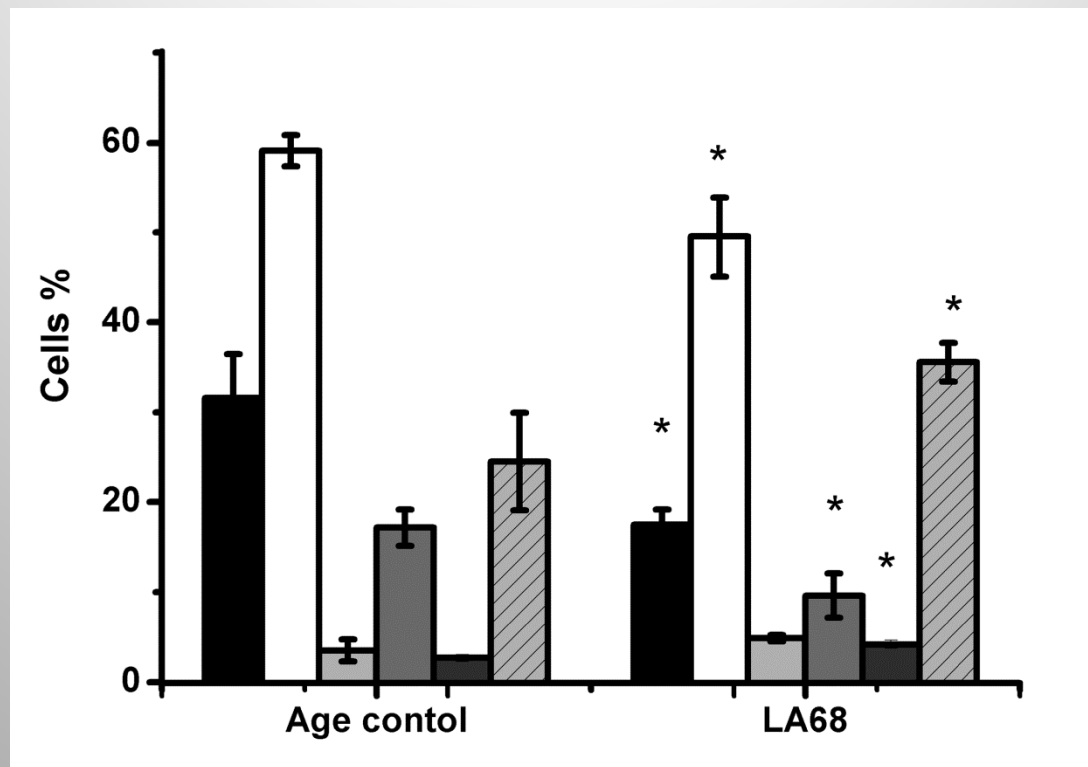
**A) CD3 - T ćelijski marker;**

**B) CD25, marker aktiviranih T ćelija;**

**C) CD11b marker granulocitno/monocitne loze;**

**D) CD19, B ćelijski marker.**

Tamno sivo – kontrola bojenja  
Belo – starosna kontrola  
Svetlo sivo – LA68



**Crno – CD3+ ćelije;**

**Belo – CD19+ ćelije;**

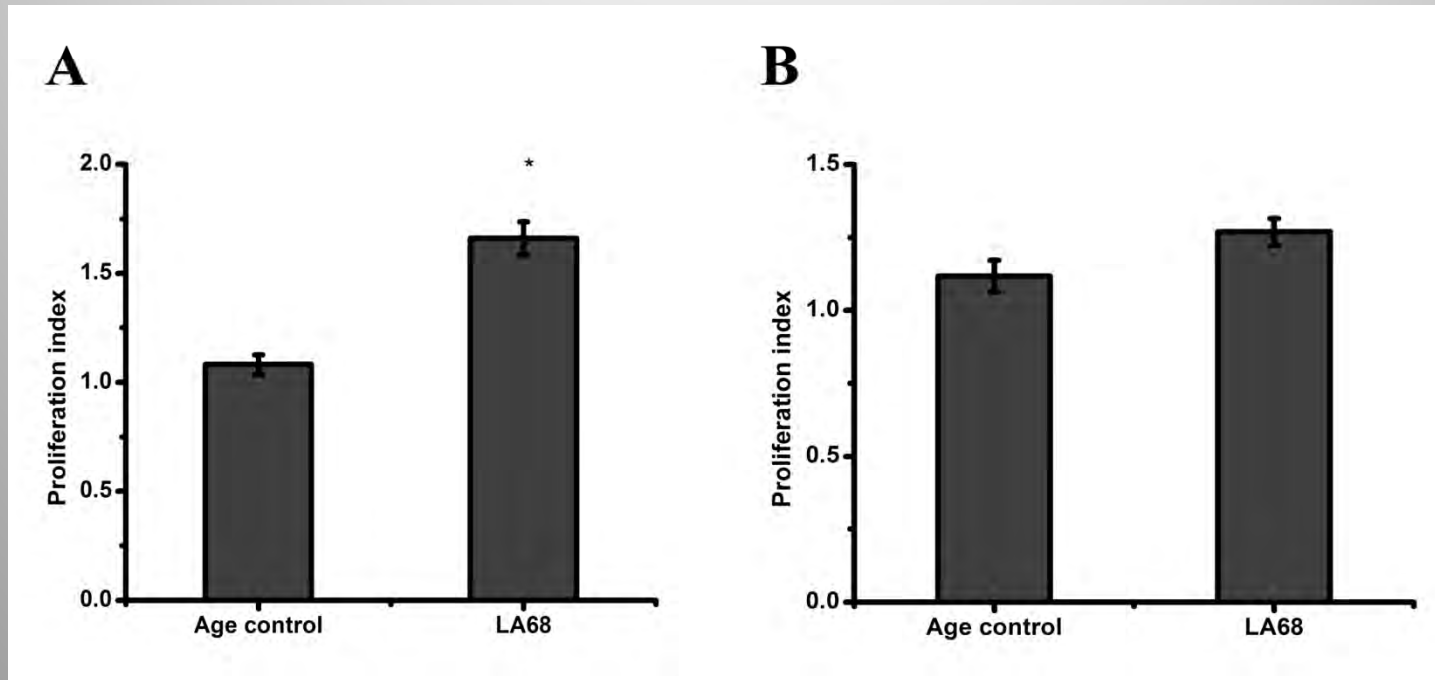
**Svetlo sivo – NK ćelije;**

**Sivo – CD25+ ćelije;**

**Tamno sivo – CD16/32+ ćelije;**

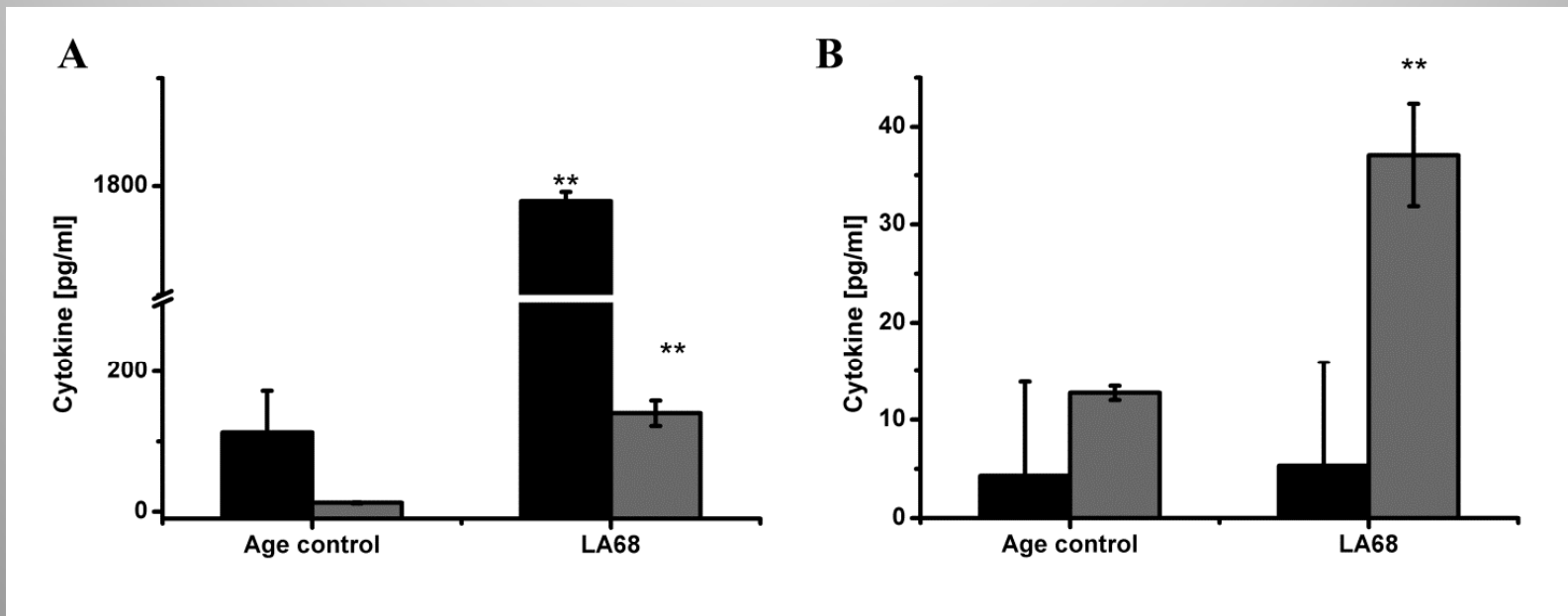
**Svetlo sivo šrafirano – CD11b+ ćelije.**

## *In vitro* stimulacija



MTT esej koji pokazuje metaboličku aktivnost splenocita. Nakon stimulacije  
A) LPS-om; B) PGN-om. Prikazane su srednje vrednosti proliferacionog indeksa (dobijenog deljenjem signala stimulisanih ćelija sa signalom nestimulisanih)  $\pm$  SD.

# Sekrecija citokina nakon *in vitro* stimulacije splenocita LPS-om i PGN-om



A) Stimulacija LPS-om

B) stimulacija -om;

crni stubovi IL-6;

sivi stubovi IL-10

# Sumirano

- Oralna aplikacija soja LA68 dovodi do značajnog smanjenja zastupljenosti CD3+, CD25+ i CD19+ ćelija i do povećanja CD11b+ and CD16/CD32+ ćelija u slezini eksperimentalnih miševa.
- Detektovana je i povećana osetljivost na stimulaciju merenjem ćelijske proliferacije i sekrecije IL-6 po stimulaciji.
- U serumu eksperimentalnih miševa detektovan je povišeni nivo IFN- $\gamma$  i smanjenje IL-10. Težina životinja i biohemijski parametri nisu se razlikovali medju grupama i ulazili su u opseg normalnih vrednosti za ovaj soj laboratorijskog miša.

# Zaključak

*Dobijeni rezultati ukazuju na povećanu osetljivost splenocita na stimulaciju, aktivaciju Th1 tipa imunskog odgovora i pomeranje leukocitne populacije ka monocitno/granulocitnoj populaciji.*

*Nastale promene mogu pomoći organizmu u odbrani protiv određenih vrsta infekcija i umanjiti simptome alergije.*

*Oralna primena soja LA68, izaziva opisani efekat na imunski sistem koji može delovati protektivno u određenim situacijama*

# Zahvaljujem

- Kolegama i saradnicima:
- Ljiljani Dimitrijević
- Brižiti Đorđević,
- Neveni Ivanović,
- Geir Mathiesenu,
- Ireni Živković
- Vladimiru Petrušiću i
- Nadi-Trišić Milanović