

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Miroslav R. Dinić

**UTICAJ BIOAKTIVNIH MOLEKULA
LAKTOBACILA NA PROCESE
AUTOFAGIJE I INFLAMACIJE U *in vitro* I
in vivo SISTEMIMA**

doktorska disertacija

BEOGRAD, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Miroslav R. Dinić

**INFLUENCE OF BIOACTIVE MOLECULES
OF LACTOBACILLI ON AUTOPHAGY AND
INFLAMATION PROCESSES IN *in vitro*
AND *in vivo* SYSTEMS**

doctoral dissertation

BELGRADE, 2018

MENTORI:

dr Marina Milenković, redovni profesor
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Jovanka Lukić, naučni saradnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Jelena Đokić, naučni saradnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Begović, viši naučni saradnik
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo
Univerzitet u Beogradu

dr Radica Stepanović-Petrović, redovni profesor
Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Na moje veliko zadovoljstvo, deo eksperimenata urađen je u saradnji sa Katedrom za farmakologiju i Katedrom za mikrobiologiju i imunologiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Ovom prilikom bih se zahvalio:

Mentoru, prof. dr Marini Milenković, dugujem neizmernu zahvalnost na ukazanom poverenju, razumevanju i bezuslovnoj podršci. Hvala Vam na velikom trudu i vremenu koje ste posvetili planiranju eksperimenata, diskusijama i korisnim sugestijama, na veštito optimističnom pristupu svakom problemu i na svim lepim rečima koje imate za mene.

Mentoru, dr Jovanki Lukić, zahvaljujem što me je uvela u svet eksperimentalne nauke i svojom posvećenošću i savetima mi omogućila da savladam sve prepreke u istraživanjima. Takođe sam joj zahvalan na kritičkoj oceni rada.

Želim posebno da istaknem doprinos dr Jelene Đokić i da joj zahvalim na velikoj pomoći prilikom realizacije ove teze. Hvala na upornosti i uloženom trudu u eksperimentalnom radu koji nije uvek tekao po planu. A iznad svega, hvala Jeleni na iskrenom prijateljstvu, kao i na kritičkoj oceni rada.

Dr Jeleni Begović, zahvaljujem na ukazanom poverenju, pomoći, podršci, slobodi koju sam imao u realizaciji eksperimenata, kao i na kritičkoj oceni teze.

Prof. dr Radici Stepanović-Petrović, izražavam duboko poštovanje i veliku zahvalnost na doprinosu u planiranju eksperimenata, tumačenju dobijenih rezultata, stručnim savetima i kritičkoj oceni teze.

Dr Nataši Golić, dugujem posebnu zahvalnost što mi je omogućila da prve korake u eksperimentalnom radu ostvarim u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju, kao i na bezgraničnoj pomoći i podršci.

Dr Milanu Kojiću, rukovodiocu projekta, zahvaljujem se na prijemu u laboratoriju i vrednim smernicama i savetima tokom mog dosadašnjeg naučno-istraživačkog rada.

Veliku zahvalnost dugujem kolegi Urošu Pecikozu na pomoći oko in vivo eksperimenata i dr Magdaleni Stevanović na pomoći oko fizičko-hemijske karakterizacije egzopolisaharida.

Dragim kolegama iz lab 06: Amarelici, Ivki, Đorđu, Jelki, Branku, Maji, Mici, Kaći, Sanji, Brankici, Goci, Goksiju, Dušanki, Nemanji M., Nikoli, Nemanji S., Mini i malom Nidži koji su rad činili mnogo lakšim i lepšim. Posebno bih zahvalio Mariji na velikoj pomoći u mojim eksperimentalnim počecima, Duletu na prijateljstvu i dizajnerskom umeću koje je upotpunilo ovaj rad, Kaji, mom saborcu i prijatelju na ovom dugom putovanju, Milkici, Emi i Ceci na podršci i prijateljstvu. Abrovi Rule! ☺

Slatkim pacovčićima, timu koji pobeđuje, kao i svim kolegama u IMGGI-u.

Bokici, Vesni i Ivani, kao i Sneži i Milicama, hvala na neiscrpoj inspiraciji, podršci, sarkastičnom oblikovanju stvarnosti, beskrajnim šalama i iskrenom prijateljstvu.

“When the snows fall and the white winds blow, the lone wolf dies, but the pack survives”.

-George R. R. Martin-

I na kraju bih se ovim rečima beskrajno zahvalio mojoj porodici, mami, tati i sestri Milici na bezuslovnoj podršci, strpljenju, razumevanju i ljubavi.

Uticaj bioaktivnih molekula laktobacila na procese autofagije i inflamacije u *in vitro* i *in vivo* sistemima

REZIME

Izolacija i karakterizacija bakterijskih biomolekula koji interaguju sa receptorima ćelija domaćina predstavlja ključ za razumevanje mehanizama probiotičkog dejstva laktobacila. Savremena istraživanja probiotičkih bakterija usmerena su ka identifikaciji biomolekula koji mogu modulirati različite signalne puteve u humanim ćelijama. Svi molekuli koji su poreklom iz probiotika i odgovorni su za njihov pozitivan efekat na zdravlje domaćina nazvani su postbiotici. Zbog slabijeg imunostimulišućeg potencijala, njihova primena predstavlja bezbednu alternativu primeni živih bakterija.

Ovo istraživanje je imalo za cilj da testira mogućnost primene postbiotika u ublažavanju simptoma bola i neželjenih efekata koji nastaju kao posledica primene analgetika. Tačnije, definisana su dva specifična cilja istraživanja: (i) ispitati uticaj bioaktivnih molekula odabranih sojeva laktobacila na proces autofagije u hepatocitima *in vitro*, kao i protektivni efekat ovih molekula kod toksičnosti izazvane paracetamolom i (ii) ispitati potencijalni imunomodulatorni efekat egzopolisaharida (EPS-CG11) izolovanog iz soja *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11, u *in vivo* eksperimentalnim modelima inflamacije. Eksperimenti u kulturi hepatocita uključili su praćenje stepena oštećenja HepG2 ćelija izloženih toksičnoj koncentraciji paracetamola i procesa autofagije, sa ciljem identifikacije potencijalnog mehanizma delovanja postbiotika. Metodološki, vijabilnost HepG2 ćelija analizirana je MTT i LDH esejima. Autofagija je praćena Western blot analizom određivanjem ekspresije p62/SQSTM1 proteina i akumulacijom liposolubilne forme LC3 proteina. Dodatno, autofagija je analizirana praćenjem ekspresije *BECN1*, *Atg5*, *p62/SQSTM1* i *PINK1* gena i autofagnog fluksa. Za analizu imunomodulatornog efekta EPS-CG11 korišćena su dva *in vivo* modela inflamacije izazvane karageninom: model inflamatornog bola i model peritonitisa kod pacova Wistar soja. U eksperimentu inflamatornog bola praćeni su: vremenski tok razvoja hiperalgezije i edema šapica nakon profilaktičke sistemske primene EPS-CG11, ekspresija medijatora inflamacije (IL-1 β ,

TNF- α , IL-6 i iNOS), infiltracija neutrofila (ekspresija MPO enzima) i aktivacija/infiltracija monocita (ekspresija CD14 markera). U cilju dodatne karakterizacije imunomodulatornog potencijala, efekat EPS-CG11, analiziran je u modelu peritonitisa kod Wistar pacova, praćenjem infiltracije imunskih ćelija (ukupan broj ćelija i ekspresija CD14 markera), ekspresije medijatora inflamacije u infiltriranim ćelijama (IL-1 β , TNF- α , IL-6 i iNOS) i koncentracije citokina u peritoneumskoj tečnosti (TNF- α , IL-10 i IL-6).

U *in vitro* istraživanjima je pokazano da je ekstrakt soja *Lactobacillus fermentum* BGHV110 stimulisao autofagiju u HepG2 ćelijama, što je zaključeno na osnovu povećane konverzije LC3 proteina i povećane ekspresije *BECN1*, *p62/SQSTM1* i *PINK1* gena. Vijabilnost ćelija se nije menjala tokom tretmana. Dodatno, ovaj ekstrakt je ublažio oštećenje HepG2 ćelija izloženih toksičnoj koncentraciji paracetamola. Zaštitni efekat korelisao je sa intenzitetom aktivirane autofagije, na osnovu čega se može zaključiti da je aktivacija autofagije od strane ekstrakta, jedan od mehanizama koji doprinosi preživljavanju ćelija. Dodatno, povećana ekspresija *p62/SQSTM1* gena uzrokovana biomolekulima iz ekstrakta ukazala je na aktivaciju antioksidativne odbrane ćelija. Rezultati *in vivo* eksperimenata pokazali su da EPS-CG11 ostvaruje dozno-zavisno antihiperalgezijsko i antiedematozno dejstvo nakon sistemske profilaktičke primene. Analiza ekspresije gena inflamatornih medijatora u inflamiranim šapicama ukazala je da EPS-CG11 svoj efekat ostvaruje regulišući ekspresiju IL-1 β citokina, a samim tim i ekspresiju iNOS gena. Takođe, smanjena ekspresija MPO enzima povezuje se sa smanjenom infiltracijom i/ili aktivacijom neutrofila. Sa druge strane, EPS-CG11 je izazvao povećanje nivoa iRNK za *CD14* marker monocita, sugerišući uključenost monocita/makrofaga u supresiju inflamacije. Imunomodulatorno delovanje EPS-CG11 potvrđeno je u modelu peritonitisa, gde je EPS-CG11 ispoljio imunosupresivni efekat. Ovaj zaključak je izveden na osnovu podatka da je u peritoneumu pretežno detektovano prisustvo anti-inflamatornih medijatora nakon primene EPS-CG11. EPS-CG11 doveo je do smanjenja nivoa medijatora inflamacije (IL-1 β , TNF- α i iNOS), dok je koncentracija anti-inflamatornog IL-10 citokina bila povećana. Dodatno, povećana koncentracija IL-6 citokina ukazala je na njegovu ulogu u regulaciji intenziteta inflamacije. S obzirom da EPS-CG11

nije uticao na infiltraciju ćelija može se zaključiti da je za imunosupresivni efekat neophodan direktan kontakt EPS-CG11 i ćelija.

Opisano istraživanje pokazalo je da različiti biomolekuli laktobacila imaju potencijal da ublaže oštećenje hepatocita izazvano paracetamolom u *in vitro* uslovima, kao i simptome povezane sa inflamacijom u *in vivo* sistemu. Pretpostavljeni mehanizmi delovanja postbiotika su aktiviranje zaštitne autofagije, odnosno imunosupresija. U ovom radu je prvi put opisano antihiperalgzijsko dejstvo kao novo svojstvo bakterijskih egzopolisaharida. Sa aspekta primene, ovakvi rezultati otvaraju polje za dalja *in vivo* i klinička istraživanja primene postbiotika laktobacila kao suplemenata u terapiji bola, a sa ciljem ublažavanja simptoma bola i/ili neželjenih efekata analgetika.

Ključne reči: laktobacili, egzopolisaharid, postbiotici, autofagija, hepatotoksičnost, hiperalgzija, medijatori inflamacije, imunosupresija

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska mikrobiologija

UDK broj: 579.864:[612.014:616-092.18-002(043.3)]

Influence of bioactive molecules of lactobacilli on autophagy and inflammation processes in *in vitro* and *in vivo* systems

SUMMARY

Isolation and characterization of bacterial biomolecules involved in the interaction with the receptors of the host cells represent the key factor for understanding the mechanisms of probiotic action of lactobacilli. Novel studies regarding probiotic bacteria have been focused on the identification of biomolecules which can modulate different signaling pathways in human cells. All molecules that originate from probiotics which are responsible for its positive effects on the host's health are called postbiotics. Their application represents the safe alternative to the use of live bacteria and its immunostimulating potential.

This research aimed to test the possibility of using postbiotics in alleviation of pain symptoms and analgesics side effects. More precisely, two main objectives of this research were: (i) to examine the influence of bioactive molecules of selected strains of lactobacilli on the autophagy process in the hepatocytes, *in vitro*, as well as protective effect of these molecules in paracetamol-induced toxicity and (ii) to examine the potential immunomodulatory effect of exopolysaccharide (EPS-CG11) isolated from *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 strain, in *in vivo* experimental models of inflammation. Experiments in the hepatocytes culture included monitoring the degree of damage of HepG2 cells exposed to the toxic paracetamol concentration and the autophagy process, with the aim of identification of potential mechanism of postbiotic action. Methodologically, the cell viability was monitored by MTT and LDH assays. Autophagy was monitored by Western blot analysis, in order to determine the expression of the p62/SQSTM1 protein and the accumulation of the liposoluble form of the LC3 protein. Further, the autophagy was analyzed by monitoring the expression of *BECN1*, *Atg5*, *p62/SQSTM1* and *PINK1* genes and the autophagy flux. For the analysis of the immunomodulatory effect of EPS-CG11, two *in vivo* models of carrageenan-induced inflammation were used: an inflammatory pain model and a peritonitis model in the Wistar

rats. In the inflammatory pain experiment following parameters were monitored: the time course of hyperalgesia and paws edema development after prophylactic systemic administration of the EPS-CG11, expression of the inflammatory mediators (IL-1 β , TNF- α , IL-6 and iNOS), neutrophil infiltration (MPO enzyme expression) and activation/infiltration of monocytes (expression of CD14 marker). In order to further characterize the immunomodulatory potential, the effect of EPS-CG11 were analyzed in the peritonitis model in Wistar rats, monitoring the degree of immune cell infiltration (total cell number and CD14 marker expression), expression of the inflammatory mediators in infiltrated cells (IL-1 β , TNF- α , IL-6 and iNOS) and cytokines concentration (TNF- α , IL-10 and IL-6) in the peritoneal fluid were analyzed.

In vitro experiments revealed that the extract prepared from the *Lactobacillus fermentum* BGHV110 strain stimulated autophagy in HepG2 cells, which was concluded based on the increased conversion of LC3 protein and the increased expression of *BECN1*, *p62/SQSTM1* and *PINK1* genes. Cell viability did not change during the treatment. Additionally, the extract prepared from *Lactobacillus fermentum* BGHV110 strain alleviated the damage of HepG2 cells exposed to the toxic concentration of paracetamol. The protective effect correlated with the intensity of activated autophagy and it could be concluded that the activation of autophagy by the extract represents one of the mechanisms that contribute to the survival of the cells. In addition, the increased expression of the *p62/SQSTM1* gene caused by biomolecules from the extract indicated an activation of the antioxidant cell defense. Results of *in vivo* experiments showed that EPS-CG11 exhibited dose-dependent antihyperalgesic and antiedematous effects after systemic prophylactic administration. The analysis of the gene expression of inflammatory mediators in inflamed paws showed that EPS-CG11 exhibits its effect by regulating the expression of the *IL-1 β* and *iNOS* genes. Also, reduced expression of MPO enzyme was associated with reduced neutrophil infiltration and/or activation. On the other hand, the EPS-CG11 induced an increase in mRNA levels of the *CD14* monocytes marker, suggesting the involvement of monocytes/macrophages in the suppression of inflammation. Immunomodulatory effect of the EPS-CG11 was confirmed in the peritonitis model, where EPS-CG11 exhibited an immunosuppressive effect. This conclusion is based on the fact that anti-inflammatory

mediators were predominantly present in the peritoneum after EPS-CG11 administration. The EPS-CG11 reduced levels of the inflammatory mediators (IL-1 β , TNF- α and iNOS), while the concentration of anti-inflammatory IL-10 cytokine was increased. In addition, the increased concentration of IL-6 cytokine indicated its role in regulation of the inflammation intensity. As EPS-CG11 did not affect cell infiltration, it could be concluded that EPS-CG11 requires direct contact with the cells in order to exhibit immunosuppressive effect.

This study showed that different biomolecules from lactobacilli have the potential to alleviate paracetamol-induced hepatocytes damage in *in vitro* conditions, as well as symptoms associated with inflammation in the *in vivo* system. The presumed mechanism of postbiotics action is the activation of protective autophagy or immunosuppression. Also, this study for the first time reports an antihyperalgesic effect as the novel property of bacterial exopolysaccharides. From the aspects of the application, these results open the field for further *in vivo* and clinical studies of the use of postbiotics of lactobacilli as supplements in the pain treatment, in order to alleviate the symptoms of pain and/or analgesics side effects.

Key words: lactobacilli, exopolysaccharide, postbiotics, autophagy, hepatotoxicity, hyperalgesia, inflammatory mediators, immunosuppression

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Pharmaceutical Microbiology

UDC number: 579.864:[612.014:616-092.18-002(043.3)]

SADRŽAJ:

1. UVOD	2
1.1. Bakterije mlečne kiseline - Rod <i>Lactobacillus</i>	3
1.2. Mehanizmi probiotičkog dejstva laktobacila	4
1.2.1. Površinski molekuli bakterija u interakciji sa ćelijama domaćina	9
1.2.2. Sekretovani i unutarćelijski molekuli bakterija u interakciji sa ćelijama domaćina	14
1.3. Bol i inflamacija.....	17
1.3.1. Autofagija	18
1.3.1.1. Autofagija i probiotici	21
1.3.2. Inflamatorni medijatori i mehanizam inflamatornog odgovora	22
1.3.3. Inflamatorni bol	24
1.3.3.1. Bol i probiotici	25
2. CILJEVI RADA	27
3. MATERIJAL I METODE	30
3.1. Bakterijski sojevi	30
3.2. Prajmeri.....	30
3.3. Medijumi za kultivaciju bakterija i priprema bakterijskih ekstrakata	32
3.4. Izolacija i prečišćavanje egzopolisaharida.....	32
3.5. Fizičko-hemijska karakterizacija egzopolisaharida	33
3.5.1. Mikroskopska analiza	33
3.5.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom	33
3.5.3. Termogravimetrijska analiza	34
3.5.4. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija	34
3.6. Ćelije.....	34
3.7. Dizajn <i>in vitro</i> eksperimenata	35
3.8. Testovi vijabilnosti ćelija.....	36
3.8.1. MTT esej	36
3.8.2. LDH esej.....	36

3.9.	Western blot analiza.....	37
3.10.	Izolacija RNK iz ćelija i tkiva	39
3.11.	Reverzna transkripcija.....	39
3.12.	Kvantitativni PCR	40
3.13.	Eksperimentalne životinje	41
3.14.	Dizajn <i>in vivo</i> eksperimenata	42
3.14.1.	Model inflamatornog bola kod pacova.....	42
3.14.1.1.	Izazivanje inflamacije i tretman	42
3.14.1.2.	Ispitivanje antiedematozne aktivnosti	43
3.14.1.3.	Ispitivanje antihiperalgezijske aktivnosti	43
3.14.2.	Model peritonitisa.....	44
3.15.	Elisa test	45
3.16.	Statistička obrada rezultata.....	46
4.	REZULTATI	48
4.1.	UTICAJ BIOAKTIVNIH MOLEKULA LAKTOBACILA NA PROCES AUTOFAGIJE U HEPATOCITIMA	48
4.1.1.	Uticaj bakterijskih ekstrakata na proces autofagije u HepG2 ćelijama	48
4.1.2.	Efekat ekstrakta soja <i>Lactobacillus fermentum</i> BGHV110 u <i>in vitro</i> modelu hepatotoksičnosti izazvane paracetamolom	51
4.1.3.	Autofagija kao mehanizam koji posreduje u hepatoprotektivnom efektu BGHV110.....	52
4.1.3.1.	Uticaj BGHV110 ekstrakta na autofagiju u HepG2 ćelijama izloženim toksičnoj koncentraciji paracetamola	52
4.1.3.2.	Analiza autofagnog fluksa.....	55
4.1.3.3.	Inhibicija autofagije smanjuje hepatoprotektivni efekat BGHV110.....	56
4.2.	IMUNOMODULATORNI EFEKAT EGZOPOLISAHARIDA SOJA <i>Lactobacillus paraplantarum</i> BGCG11	57
4.2.1.	Fizičko-hemijska karakterizacija egzopolisaharida EPS-CG11	57
4.2.1.1.	Kvalitativna analiza EPS-CG11	57
4.2.1.2.	Termičke osobine EPS-CG11	59

4.2.2.	Efekti EPS-CG11 u eksperimentalnom modelu inflamatornog bola.....	61
4.2.2.1.	Uticaj EPS-CG11 na razvoj edema i hiperalgezije	61
4.2.2.2.	Analiza infiltriranih ćelija u inflamiranom tkivu šapica	62
4.2.2.3.	Ekspresija inflamatornih medijatora u tkivu šapica	63
4.2.3.	Efekti EPS-CG11 u eksperimentalnom modelu peritonitisa	64
4.2.3.1.	Uticaj EPS-CG11 na infiltraciju ćelija	64
4.2.3.2.	Ekspresija medijatora inflamacije u peritoneumu	65
5.	DISKUSIJA	69
5.1.	UTICAJ BIOAKTIVNIH MOLEKULA LAKTOBACILA NA PROCES AUTOFAGIJE U HEPATOCITIMA	70
5.2.	IMUNOMODULATORNI EFEKAT EGZOPOLISAHARIDA SOJA <i>Lactobacillus paraplantarum</i> BGCG11	75
5.3.	PRIMENA BIOAKTIVNIH MOLEKULA LAKTOBACILA U TERAPIJI BOLA – ZNAČAJ DOBIJENIH REZULTATA.....	82
6.	ZAKLJUČCI	85
7.	LITERATURA	87

Uvod

1. UVOD

Milioni mikroorganizama koji nastanjuju različite ekološke niše na Zemlji predstavljaju dinamički rezervoar gena odgovornih za produkciju bioaktivnih metabolita (Li i sar., 2009). Na osnovu velikog diverziteta, mikroorganizmi pružaju veliki potencijal za traženje novih farmakološki aktivnih molekula. Trenutno, može se reći da između 20-50% svih lekova prisutnih na farmaceutskom tržištu čine molekuli izolovani iz prirodnih izvora, uključujući i bakterije (Kingston, 2011). Pored antimikrobnih molekula koji se najčešće mogu izolovati iz bakterija, bakterijski površinski molekuli i metaboliti, koji mogu da modulišu različite signalne puteve u eukariotskim ćelijama, predmet su sve većeg broja istraživanja (Lebeer i sar., 2010). U složenim biološkim sistemima, bakterijski solubilni medijatori su odgovorni za međubakterijsku komunikaciju, kao i interakcije između bakterija i domaćina. Mikroorganizmi prisutni u gastro-intestinalnom (GI) traktu čoveka upravo predstavljaju jednu takvu složenu ekološku zajednicu sačinjenu od stotina mikroorganizama koji su evoluirali zajedno sa čovekom (Backhed i sar., 2005). Zajednica mikroorganizama u GI traktu čini crevnu mikrobiotu koja učestvuje u različitim fiziološkim procesima koji su korelisani sa dobrim zdravstvenim statusom ljudi (Rajilić-Stojanović, 2013). Crevna mikrobiota učestvuje u metabolizmu ugljenih hidrata i proteina, sintezi vitamina, inhibira rast pojedinih patogenih bakterija, reguliše integritet epitelne barijere i funkcionisanje imunskog sistema. Analizom biosintetskog kapaciteta crevne mikrobiote otkriveni su genski klasteri odgovorni za sintezu velikog broja „malih“ molekula sa potencijalom da se primene kao budući antibiotici, imunosupresivi i antineoplastici (Donia i sar., 2014; Walsh, 2008). Rod *Lactobacillus* smatra se jednim od najbolje proučenih konstituenata mikrobiote GI trakta, uzimajući u obzir dugu istoriju bezbedne upotrebe predstavnika ovog roda u humanoj ishrani (Walter, 2008). Ova činjenica opravdava dalju potragu za novim bioaktivnim molekulima u okviru različitih vrsta koje pripadaju rodu *Lactobacillus* koji se na osnovu fizioloških karakteristika, ubraja u širu grupu takozvanih bakterija mlečne kiseline (BMK).

1.1. Bakterije mlečne kiseline - Rod *Lactobacillus*

Bakterije mlečne kiseline (BMK) predstavljaju raznovrsnu grupu Gram-pozitivnih bakterija loptastog (koke) ili štapičastog (bacili) oblika grupisanih na osnovu zajedničkih morfoloških, metaboličkih i fizioloških karakteristika. BMK se odlikuju odsustvom enzima oksidaze i katalaze, asporogene su, spadaju u grupu anaerobnih ili fakultativno anaerobnih bakterija i kao krajnji proizvod fermentacije ugljenih hidrata stvaraju mlečnu kiselinu. BMK su svrstane u grupu važnih industrijskih mikroorganizama koje su najveću primenu našle u proizvodnji fermentisanih proizvoda (Carr i sar., 2002; von Wright i Axelsson, 2012).

Laktobacili su štapičaste, Gram-pozitivne, mikroaerofilne bakterije koje pripadaju razdelu *Firmicutes*, klasi *Bacilli* i redu *Lactobacillales* (Barrangou i sar., 2012). Rod obuhvata preko stotinu različitih vrsta od kojih su najpoznatije *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* i *Lb. salivarius* našle primenu u tehnološkoj i farmaceutskoj industriji (Kleerebezem i Vaughan, 2009). Laktobacili nastanjuju različite ekološke niše u prirodi. Mogu se naći na mukoznim membranama sisara, u fermentisanim proizvodima, na površini biljaka ili u zemljištu. Kod ljudi i životinja predstavljaju deo mikrobiote GI trakta, kože i urogenitalnog trakta (Barrangou i sar., 2012). Iako su vrlo često identifikovani u uzorcima fecesa, laktobacili čine svega 0,01-0,6% mikrobiote GI trakta ljudi. Njihov broj varira između 10^6 - 10^8 ćelija po gramu fecesa, a smatra se da su najzastupljeniji u duodenumu i jejunumu. Najdominantnije vrste izolovane iz GI trakta čoveka uključuju: *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* i *Lb. reuteri* (Lebeer i sar., 2008). Laktobacili koji se mogu naći u GI traktu mogu biti autohtoni ili alohtoni (tranzijentni) za čoveka. Autohtoni laktobacili kolonizuju mukozu creva zahvaljujući adhezivnim molekulima koje poseduju i tolerantnosti imunskog sistema domaćina prema njima (Reuter, 2001). Alohtoni laktobacili su uglavnom poreklom iz hrane ili usne duplje i predstavljaju privremene kolonizatore crevne mukoze. Njihovo prisustvo u GI traktu je ograničeno i traje svega nekoliko dana (Tannock, 1999). *Lb. gasseri*, *Lb. reuteri*, *Lb. crispatus*, *Lb. salivarius* i *Lb. ruminis* smatraju se autohtonim kolonizatorima GI trakta čoveka (Lebeer i sar., 2008). Za

razliku od mikrobiote odraslog čoveka, crevna mikrobiota kod dece je vrlo nestabilna. Laktobacili su zastupljeni oko 10^5 ćelija po gramu fecesa kod novorođenčadi, dok je kod jednogodišnjaka njihov broj isti kao kod odraslih (Mackie i sar., 1999).

Laktobacili su nepatogene bakterije koji su zbog svog GRAS statusa (engl. *Generally Recognized As Safe*) i pozitivnog efekta na zdravlje ljudi postali predmet velikog broja istraživanja. Ideja o upotrebi BMK kao suplemenata potekla je od strane ruskog naučnika Ilje Iljiča Mečnikova koji je početkom 20. veka predložio da se male količine potencijalno štetnih metabolita koje proizvode “loše” crevne bakterije mogu neutralisati konzumiranjem bakterija prisutnih u fermentisanim mlečnim proizvodima (Walter, 2008). Danas se mikroorganizmi sa pozitivnim efektom na zdravlje ljudi nazivaju probiotici. Prema definiciji probiotici predstavljaju žive mikroorganizme koji nakon primene u odgovarajućoj količini, ostvaruju pozitivne efekte na zdravlje domaćina (FAO-WHO, 2006). Probiotici uglavnom potiču iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Probiotici su se pokazali kao najefektivniji u terapijama crevnih infekcija i dijareja uzrokovanih primenom antibiotika širokog spektra dejstva (Sazawal i sar., 2006). Takođe, pokazano je da njihova primena može smanjiti rekurentnost dijareja povezanih sa bakterijom *Clostridium difficile* (Pillai i Nelson, 2008). Zabeleženi su i pozitivni rezultati primene probiotika kod inflamatornih bolesti creva, sindroma iritabilnog kolona i kolorektalnog karcinoma (Aragon i sar., 2010; Hedin i sar., 2007; Liong, 2008). Iako je GI trakt mesto gde se očekuje da probiotici ostvare najveći broj efekata, njihova primena može poboljšati simptome bolesti koje nisu striktno vezane za GI trakt. Tako su probiotici našli primenu u prevenciji i tretmanu urogenitalnih infekcija, dentalnog karijesa, atopijskih bolesti i alergija na hranu (Boyle i Tang, 2006; Falagas i sar., 2007; Meurman i Stamatova, 2007). Iako se generalno smatraju bezbednim, upotreba probiotika kod imunokompromitovanih osoba se ne preporučuje (Liong, 2008b).

1.2. Mehanizmi probiotičkog dejstva laktobacila

Probiotici svoje pozitivne efekte ostvaruju kroz 3 osnovna mehanizma delovanja: (i) inhibicijom štetnog delovanja patogenih bakterija, (ii) jačanjem epitelne barijere domaćina i (iii) modulacijom imunskog odgovora (Vanderpool i sar., 2008).

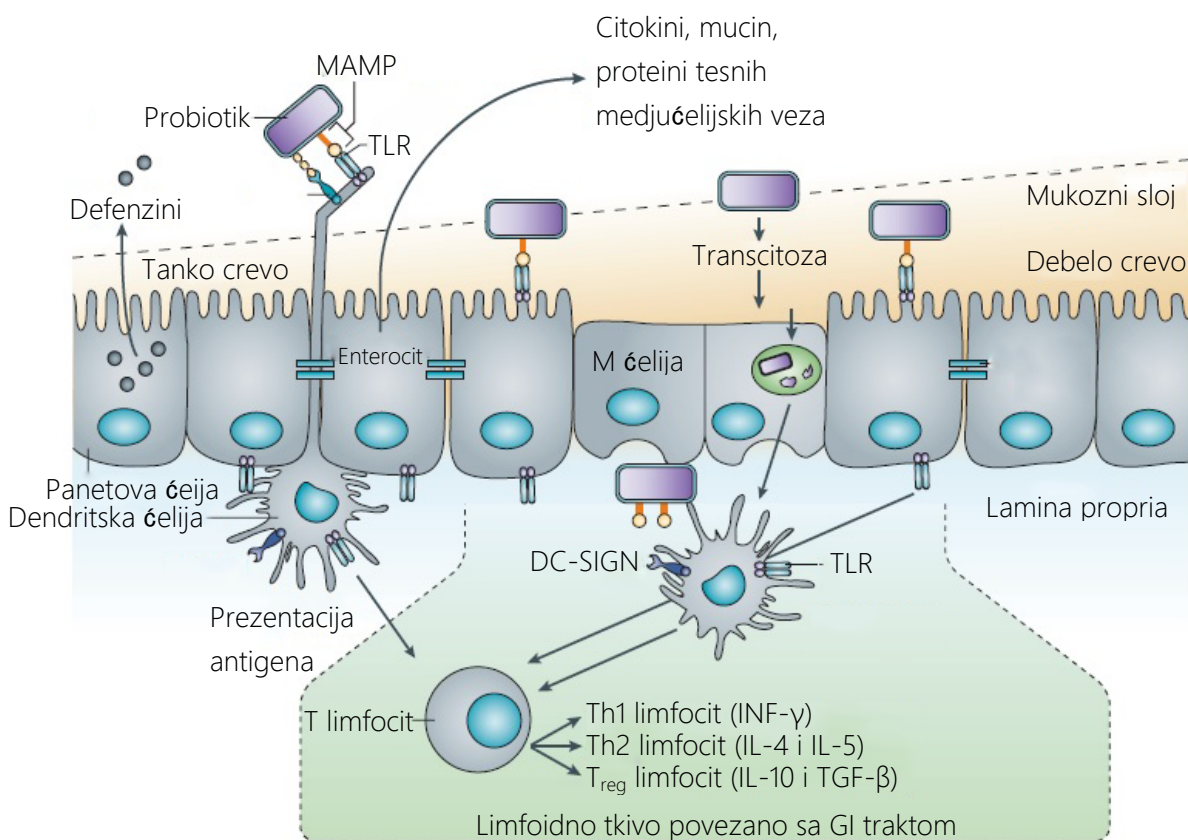
Inhibitorno delovanje na patogene bakterije probiotici ostvaruju produkcijom antimikrobnih supstanci, inhibicijom adhezije patogenih bakterija za crevnu mukozu, vezivanjem toksina i kompeticijom za nutrijente (Oelschlaeger, 2010). Laktobacili proizvode organske kiseline (sirćetna, mlečna i propionska), vodonik-peroksid, rojterin i bakteriocine koji direktno inhibiraju rast drugih vrsta bakterija (Nes i sar., 2012; Vanderpool i sar., 2008). Probiotici u GI traktu mogu da inhibiraju vezivanje patogena i njihovih toksina za mukozu creva kompetitivno blokirajući receptore neophodne za adheziju patogena (Vanderpool i sar., 2008). Istraživanja su pokazala da u adheziji bakterija za crevnu mukozu učestvuju bakterijski adhezivni molekuli i glikolipidni receptori na površini crevnog epitela (Mukai i sar., 2004). Konkretno, adhezivni molekuli koji učestvuju u vezivanju bakterija za epitelne ćelije uključuju: sortaza zavisne proteine, mukus-vezujuće proteine, proteine površinskog sloja (engl. *Surface layer*, S-layer), lipoteihoičnu kiselinu i egzopolisaharide (Lebeer i sar., 2008). Pored mehanizma kompetitivne ekskluzije patogena, probiotici ostvaruju anti-adhezivni efekat i degradacijom glikolipidnih receptora domaćina, formiranjem biofilma, sintezom liganada za receptore domaćina, produkcijom biosurfaktanata i supresijom transkripcije gena koji kodiraju adhezivne molekule patogena (De Klerk i sar., 2016; Oelschlaeger, 2010). Kompeticija za dostupne nutrijente uglavnom se ogleda u različitim načinima korišćenja hranljivih materija koje su u ograničenoj količini prisutne u crevima. Najbolji primer je gvožđe, koje predstavlja esencijalni element svih bakterija izuzev laktobacila.

Jačanje epitelne barijere i imunomodulacija odvijaju se putem interakcije laktobacila sa intestinalnim epitelnim ćelijama (IEĆ) i imunskim ćelijama pozicioniranim ispod crevnog epitela, na prvom mestu dendritskim ćelijama (DĆ). Mehanizmi interakcije probiotika sa IEĆ i imunskim ćelijama sumirani su na **Slici 1**. IEĆ i DĆ interaguju sa bakterijama preko receptora za prepoznavanje molekulskih obrazaca (engl. *Pattern-Recognition Receptors*, PRRs) koji se vezuju za visoko konzervisane molekulske obrasce na površini bakterija (engl. *Microorganism-Associated Molecular Patterns*, MAMPs). Ovi obrasci se nalaze najčešće na površini mikroorganizama i nisu prisutni na ćelijama domaćina (Medzhitov, 2007). Najbolje proučeni PRR su *Toll*-u slični receptori (engl. *Toll-Like Receptors*, TLR) koji predstavljaju transmembranske proteine koji se nalaze na

površini ćelije ili na membrani endozoma. Za prepoznavanje površinskih molekula probiotika odgovorni su: TLR2 koji podleže heterodimerizaciji sa TLR1 ili TLR6 u zavisnosti od liganda, TLR4, TLR5 i TLR9. Od navedenih receptora, TLR9 je jedini smešten intracelularno na membrani endozoma (Lebeer i sar., 2010). PRR koji pripadaju grupi receptora sličnih nukleotidnom oligomerizacionom domenu (engl. *Nucleotide-binding Oligomerization Domain containing protein (NOD)-Like Receptors*, NLR) i lektinski receptori C tipa (engl. *C-type Lectin Receptors*, CLR) takođe učestvuju u prepoznavanju površinskih molekula probiotika (Hoving i sar., 2014; Strober i sar., 2006). Za razliku od većine TLR i CLR, NLR su smešteni u citoplazmi ćelija.

Intestinalne epitelne ćelije (IEĆ) predstavljaju najvažnije ćelije koje su odgovorne za održavanje normalne funkcije intestinalne barijere. Laktobacili, u najvećoj meri posredstvom TLR i NLR, stimulišu različite signalne puteve u IEĆ, čija aktivacija rezultira produkcijom anti-mikrobnih molekula, zaštitnih proteina i mucina, regeneracijom oštećenog epitela i inhibicijom apoptoze posredovane citokinima. Dodatno se stimuliše produkcija hemokina, kao što je IL-8 koji je odgovoran za hemotaksu neutrofila, kao i pro-inflamatornih citokina (IL-1 β , IL-6). Integritet intestinalne barijere održava se zahvaljujući proteinima tesnih međućelijskih veza (engl. *Tight junction proteins*). Oštećenjem ovih struktura nastaju prekidi u barijeri čime se povećava propustljivost crevne mukoze (Vanderpool i sar., 2008). Istraživanja su pokazala da primena određenih probiotičkih sojeva stimuliše reparaciju intestinalne barijere delujući na proteine tesnih međućelijskih veza kao što su ZO-1 (engl. *Zonula Occludens-1*) i okludin (Seth i sar., 2008). Ovi efekti su uglavnom posredovani aktivacijom p38/MAPK i Akt signalnih puteva (Resta-Lenert i Barrett, 2006). Sa druge strane, stimulacija istih receptora na DĆ dovodi do aktivacije različitih transkripcionih faktora (NF- κ B, AP-1) što se manifestuje produkcijom pro-inflamatornih ili anti-inflamatornih citokina, hemokina i ekspresijom ko-stimulatornih molekula. Na nezrelim DĆ, pored TLR prisutni su i CLR, kao što je DC-SIGN (engl. *Dendritic Cell-Specific ICAM3-Grabbing Nonintegrin*) koji prepoznaju polisaharide bakterija (Geijtenbeek i sar., 2002). Nezrele DĆ koje se nalaze u subepitelnom sloju nakon kontakta sa antigenima počinju da proizvode citokine i ekspresiraju ko-stimulatorne molekule (Medzhitov, 2007). Aktivirane DĆ migriraju do regionalnih mezenteričnih

limfnih čvorova ili limfoidnog tkiva povezanog sa GI traktom (engl. *Gut-Associated Lymphoid Tissue*, GALT), gde učestvuju u aktivaciji naivnih T i B limfocita. Naivni T limfociti se diferenciraju u pomoćničke (engl. *T-helper*, Th) ili regulatorne T limfocite (T_{reg}). U okviru pomoćničkih T limfocita razlikujemo najmanje tri tipa ćelija: Th1 limfociti koji proizvode pro-inflamatorne citokine ($TNF-\alpha$, $INF-\gamma$), Th2 limfociti koji proizvode IL-4 i IL-5 citokine i Th17 limfocite koji proizvode IL-17 i IL-22 citokine (Lebeer i sar., 2008). Th1 limfociti su odgovorni za eliminisanje virusa i intracelularnih bakterija, Th2 limfociti su uključeni u eliminaciji parazita, dok Th17 limfociti reaguju na ekstracelularne bakterije i gljivice. Prekomerna aktivnost Th1/Th17 limfocita povezuje se sa autoimunskim bolestima, za razliku od Th2 limfocita koji su uključeni u patogenezu atopijskih bolesti (Zhu i Paul, 2008).



Slika 1. Mehanizmi interakcija probiotika sa IEC i DC u GI traktu.

Preuzeto i prevedeno iz Lebeer i sar., 2010.

Regulatorni T limfociti su najvažniji za održavanje balansirano imenskog odgovora i smatraju se ključnim ćelijama koje posreduju u imunosupresivnom delovanju probiotika. Konačna reakcija domaćina na unete laktobacile zavisi od balansa aktivacije Th i T_{reg} limfocita, vodeći ka imunostimulišućem odnosno anti-inflamatornom odgovoru.

Na osnovu nabrojanih mehanizama delovanja probiotika, uočava se da su efekti probiotika posledica metaboličke aktivnosti bakterijskih ćelija *in situ*, sa jedne strane, i prisustva određenih strukturnih molekula unutar ili na površini bakterijskih ćelija, sa druge strane. Prvi efekat pripisuje se živim bakterijama, dok drugi efekat ostvaruju kako žive, tako i mrtve ćelije. Iako probiotici, jačanjem epitelne barijere, sistemom negativne povratne sprege, obezbeđuju kontrolu sopstvene brojnosti od strane domaćina (Hooper, 2009), u određenim situacijama, pre svega kod imunokompromitovanih osoba, postoji rizik od gubitka ravnoteže i prekomernog umnožavanja probiotika. Ovo za posledicu može imati prekomernu aktivaciju imenskog sistema domaćina i/ili lokalnu ili sistemsku infekciju (Liong, 2008b). Kako bi se izbegla ovakva situacija, nova istraživanja u oblasti probiotika usmerena su ka identifikovanju i izolovanju molekula koji su odgovorni za probiotički efekat laktobacila. Primena izolovanih i prečišćenih molekula koji imaju određeni pozitivan efekat predstavlja bezbednu alternativu primeni živih bakterija s obzirom da ne postoji rizik od njihovog nekontrolisanog umnožavanja (Tsilingiri i sar., 2012). Svi molekuli koji su proizvod primarnog ili sekundarnog metabolizma ili bilo koji oslobođeni molekuli poreklom iz probiotika koji mogu da ostvare pozitivan efekat na zdravlje domaćina nazvani su postbiotici (Patel i Denning, 2013). Postbiotici, pored bezbednosti, imaju dodatnu prednost u odnosu na probiotike, koja se ogleda u manjoj varijabilnosti biološkog odgovora. Komercijalno dostupni preparati živih bakterija mogu, usled različitog načina pripreme i različitih uslova skladištenja, imati različit odnos živih i mrtvih ćelija, što može uticati na biološki efekat nakon primene. Primenom postbiotika smanjuje se nepredvidljivost u reakciji domaćina na tretman postbioticima. Istraživanja su pokazala da primena postbiotika stimuliše različite signalne puteve u ćelijama domaćina. Najveći broj istraživanja usmeren je ka testiranju postbiotika na animalnim modelima kolitisa, uzimajući u obzir da je pozitivan efekat terapijske primene probiotika kod inflamatornih bolesti creva izostajao, upravo zbog dodatne stimulacije imenskog sistema (Tsilingiri i

Rescigno, 2013). Pregled potencijalnih postbiotika čija primena je pokazala značajne efekte, kao i ispitivanje novih efekata određenih postbiotika predmet je ove doktorske disertacije.

1.2.1. Površinski molekuli bakterija u interakciji sa ćelijama domaćina

Molekuli prisutni na ćelijskom zidu bakterija su u najvećoj meri odgovorni za njihov probiotički efekat. Ovi molekuli predstavljaju postbiotike koji interaguju sa receptorima eukariotskih ćelija. Najveći broj probiotika pripada Gram-pozitivnim bakterijama čiji se ćelijski zid sastoji iz sloja peptidoglikana na čijoj površini se u najvećoj meri nalaze teihoična kiselina i polisaharidi (Delcour i sar., 1999). Bitno je napomenuti da postoje i Gram-negativne bakterije koje se koriste kao probiotici, kao što je *E. coli* soj Nissle 1917. Ćelijski zid Gram-negativnih bakterija sastoji se iz tankog sloja peptidoglikana, periplazmatskog prostora i spoljašnje membrane u kojoj se nalazi lipopolisaharid (engl. *LipoPolySaccharide*, LPS) (Erridge i sar., 2002). Glavni makromolekuli ćelijskog zida dele istu strukturnu organizaciju između bakterijskih vrsta, ali ih razlikuje prisustvo različitih modifikacija tipa glikozilacije i acetilacije koje doprinose specifičnom efektu bakterijskog soja (Lebeer i sar., 2010).

Peptidoglikan je najzastupljenija komponenta ćelijskog zida Gram-pozitivnih bakterija. Sastoji se iz polisaharidnih lanaca koje čine N-acetilmuraminska kiselina i N-acetilglukozamin povezani β -(1,4) glikozidnom vezom. Lanci su međusobno unakrsno povezani pentapeptidima koji su vezani za N-acetilmuraminsku kiselinu. Sekvenca pentapeptida kod laktobacila je sledeća: L-alanin, D-glutaminska kiselina, L-lizin ili mezo-diaminopimelinska kiselina, D-alanin i D-alanin. Najveći broj varijacija između bakterijskih sojeva se upravo dešavaju u sekvenci pentapeptida građenjem amida, ali je uočena i O-acetilacija šećernih komponenti (Delcour i sar., 1999). Fragmente peptidoglikana prepoznaje TLR2 nakon autolize bakterija. Njegova aktivacija zahteva dimerizaciju sa TLR6 i prisustvo CD14 ko-receptora. Takođe, smatra se da su u najvećem broju slučajeva NLR odgovorni za intracelularno prepoznavanje peptidoglikana (Travassos i sar., 2004). NOD1 prepoznaje γ -D-glutamil-mezo-diaminopimelinsku kiselinu prisutnu

uglavnom kod Gram-negativnih bakterija, ali i nekih *Lb. plantarum* sojeva. NOD2 prepoznaje fragment peptidoglikana - muramil-dipeptid (Cario, 2005). Fragmenti peptidoglikana dospevaju preko PEPT1 transportera u citoplazmu IEC ili fagocitozom u DC (Strober i sar., 2006; Vavricka i sar., 2004). Primena izolovanog peptidoglikana kao postbiotika pokazala je pozitivan efekat u modelu kolitisa kod miševa. U studiji Fernandez i sar. (2011) pokazano je da peptidoglikan izolovan iz soja *Lb. salivarius* ostvaruje anti-inflamatorni efekat. Kasnije je utvrđeno da je ovaj efekat posredovan aktivacijom NOD2 receptora, povećanom sekrecijom IL-10 citokina i ekspanzijom regulatornih DC i T_{reg} limfocita.

Teihoična kiselina predstavlja drugu po zastupljenosti komponentu ćelijskog zida Gram-pozitivnih bakterija. Ovaj makromolekul izgrađen je iz monomernih jedinica koje čine poliglicerol fosfat ili poliribitol fosfat koje su kovalentno vezane za peptidoglikan. Ukoliko je polimer vezan za citoplazmatsku membranu bakterija onda govorimo o lipoteihoičnoj kiselini (Neuhaus i Baddiley, 2003). Teihoičnu i lipoteihoičnu kiselinu prepoznaje TLR2, tek nakon lize bakterijske ćelije. Njegova aktivacija zahteva heterodimerizaciju sa TLR6 i prisustvo CD14 i CD36 ko-receptora (Nilsen i sar., 2008). Kako su ove strukture prisutne gotovo u svim bakterijama, IEC su razvile mehanizme tolerancije na konstantno prisustvo ovih struktura poreklom iz komensalnih bakterija creva. Istraživanja su pokazala da prečišćeni derivati lipoteihoične kiseline dobijene iz sojeva *Lb. johnsonii* La1 i *Lb. acidophilus* La10 mogu da inhibiraju produkciju IL-8 hemokina u IEC, najverovatnije kompetitivnim vezivanjem za solubilnu formu CD14 ko-receptora (Vidal i sar., 2002). Međutim, mnogo veći uticaj lipoteihoična kiselina ostvaruje na profesionalnim antigen prezentujućim ćelijama (DC). Iako je u većini slučajeva lipoteihoična kiselina povezana sa imunostimulišućim efektom koji nastaje posredstvom aktivacije TLR2, Grangette i sar., 2005 su pokazali da modifikacije u polimeru diktiraju tip imunskog odgovora. Tačnije, ovi autori su utvrdili da izostanak d-alanilacije lipoteihoične kiseline u *Lb. plantarum* NCIMB8826 soju, vodi ka povećanoj produkciji IL-10 citokina i smanjenoj produkciji pro-inflamatornih citokina od strane mononuklearnih ćelija izolovanih iz periferne krvi. Primena ovako modifikovane lipoteihoične kiseline smanjila je inflamaciju u modelu kolitisa kod miševa.

Laktobacili na površini svog ćelijskog zida mogu sadržati različite polisaharidne molekule. Ovi polisaharidi mogu biti čvrsto vezani za površinu peptidoglikana u obliku kapsule (engl. *Capsular PolySaccharides*, CPS) ili mogu biti slabo vezani za površinu bakterije ili sekretovani u spoljašnju sredinu, egzopolisaharidi (engl. *ExoPolySaccharides*, EPS) (Caggianiello i sar., 2016). Kod patogenih bakterija CPS predstavljaju glavne faktore virulencije koji inhibiraju fagocitozu i omogućavaju izbegavanje imunskog odgovora, „skrivanjem“ molekulskih obrazaca bakterija. Međutim, jako malo se zna o ulozi CPS u interakciji probiotika i ćelija domaćina. Yasuda i sar. (2008) su u svom istraživanju pokazali da CPS soja *Lb. casei* Shiota može da suprimira pro-inflamatorni odgovor makrofaga, *in vitro*. Efekat CPS-a (polisaharid A) koji je izolovan iz crevne bakterije *Bacteroides fragilis* je jedan od najbolje okarakterisanih polisaharida opisan do sada. Primena prečišćenog polisaharida A smanjila je inflamaciju u modelu kolitisa indukujući stvaranje T_{reg} limfocita, delujući preko TLR2. S obzirom da se radi o polisaharidu koji je povezan sa aktivacijom TLR2, verovatno je aktivacija ovog receptora posledica unakrsnog vezivanja TLR2 i CLR prisutnih na DĆ (Lebeer i sar., 2010).

Egzopolisaharidi laktobacila pokazuju veliku strukturnu varijabilnost. Njihove molekulske mase kreću se u rasponu 10⁴-10⁶ Da. Na osnovu sastava monosaharidnih jedinica podeljeni su na homopolisaharide koji su izgrađeni iz istih monosaharida i heteropolisaharide koje čine različiti monosaharidi. Homopolisaharidi su podeljeni na glukane (polimeri glukoze) i fruktane (polimeri fruktoze). U grupi glukana najzastupljeniji su polimeri kod kojih je glukoza povezana α-(1,6) glikozidnom vezom i koji se nazivaju dekstranima. Drugi po zastupljenosti je mutan, linearni polimer sastavljen iz molekula glukoze povezanih α-(1,3) glikozidnom vezom. I na kraju, rojteran, koji se karakteriše povezivanjem molekula glukoze α-(1,4) glikozidnom vezom i karakterističan je za vrstu *Lb. reuteri*. Pored najzastupljenijih α-glukana, laktobacili mogu sintetisati i β-glukane kod kojih su polimeri glukoze najčešće povezani β-(1,3) glikozidnom vezom. Što se tiče fruktana, razlikuju se dva osnovna tipa: linearni levani kod kojih su molekuli fruktoze povezani β-(2,6) glikozidnom vezom i inulinu slični polisaharidi koji se karakterišu β-(2,1) glikozidnom vezom. Inulinu slični polisaharidi se ne mogu razgraditi od strane enzima u tankom crevu čoveka i našli su primenu kao prebiotici. Heteropolisaharidi su sastavljeni iz

više različitih monosaharida, od kojih su najčešće prisutni glukoza, galaktoza i ramnoza. Takođe, aminošećeri i poliolni često ulaze u sastav heteropolisaharida. Zbog prisustva glukuronske kiseline ili fosfatne grupe uglavnom su negativno naelektrisani. Poseduju različiti tip glikozidnih veza zbog čega su polimeri razgranate strukture (Badel i sar., 2011). Egzopolisaharidi ostvaruju važnu zaštitnu funkciju i učestvuju u održavanju homeostaze bakterijskih ćelija. Odgovor na pitanje zašto bakterije ulažu toliko energije u sintezu ovako kompleksnih struktura leži upravo u prednostima koje dobijaju. Na primer, vrste koje proizvode EPS zaštićeni su od delovanja enzima drugih bakterija i domaćina kada se nađu u GI traktu, što im omogućava preživljavanje u kompetitivnim mikrobiološkim zajednicama (Lebeer i sar., 2008). Pored dobro poznate funkcije EPS-a u preživljavanju bakterija, sve je više istraživanja koja pokazuju njegov pozitivan efekat na zdravlje domaćina. Literaturni podaci ukazuju da EPS može da ostvari citotoksični efekat na ćelije karcinoma indukujući apoptozu i autofagiju (programirana ćelijska smrt tip-2) (Di i sar., 2017; Kim i sar., 2010). Takođe, pokazano je da EPS može smanjiti krvni pritisak i nivo glukoze u krvi, da deluje antioksidativno i da smanjuje adheziju patogenih bakterija za IEC (Maeda i sar., 2004; Tang i sar., 2017; Živković i sar., 2016). Međutim, najznačajniji biološki efekat EPS-a ogleda se u modulaciji imunskog odgovora domaćina, a tip odgovora zavisi od strukture i sastava polimera. Do danas nije u potpunosti razjašnjeno koji su receptori domaćina odgovorni za prepoznavanje EPS-a. U najvećoj meri smatra se da CLR, kao što je DC-SIGN receptor, zajedno sa TLR2 i CD14 ko-receptorom učestvuju u modulaciji imunskog odgovora (Jones i sar., 2014). EPS izolovan iz soja *Lb. paracasei* DGU stimuliše produkciju pro-inflamatornih citokina (TNF- α i IL-6) u ćelijskoj liniji humanih monocita THP-1 i predstavljen je od strane autora kao molekul koji doprinosi jačanju imunskog odgovora domaćina (Balzaretta i sar., 2017). Sa druge strane, u istraživanju Nikolić i sar. (2012) pokazano je da EPS soja *Lb. paraplantarum* BGCG11 ispoljava anti-inflamatorni efekat na mononuklearne ćelije izolovane iz periferne krvi, dok derivat ovog soja koji je izgubio sposobnost sinteze EPS-a ne ispoljava ovakav efekat na mononuklearne ćelije. Autori su još pokazali da primena prečišćenog EPS-a kao postbiotika, indukuje povećanu sintezu IL-10 citokina u kulturi mononuklearnih ćelija. *Lb. paraplantarum* soj BGCG11 proizvodi EPS-CG11 velike molekulske mase (2×10^6 Da),

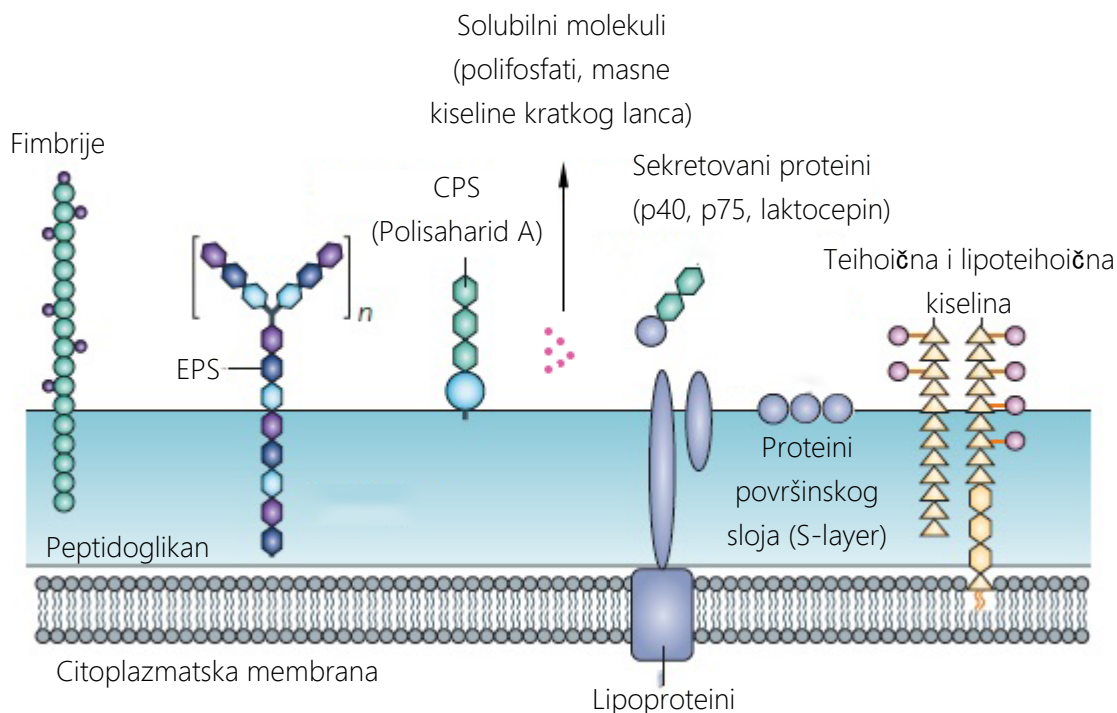
sastavljen od glukoze (75,7%), ramnoze (20,5%), galaktoze (2,1%) i manoze (1,7%) (Cerning i sar., 1994). Dalja istraživanja vezana za imunomodulatorni potencijal EPS-CG11 su predmet dela ove doktorske teze.

Proteini površinskog sloja grade proteinski omotač Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Ovi proteini formiraju dvodimenzionalni porozni sloj kvadratne ili heksagonalne simetrije, sačinjen iz identičnih subjedinica glikoproteina. Njegova molekulska masa kreće se između 40-200 kDa. Subjedinice su povezane za površinu ćelijskog zida bakterija nekovalentnim vezama i poseduju karakterističnu osobinu da formiraju strukture pravilnog oblika kada se nađu u rastvorima (Hynönen i Palva, 2013). Proteinima površinskog sloja se uglavnom pripisuje uloga u adheziji bakterija, međutim grupa autora je pokazala da protein površinskog sloja A (SlpA) bakterije *Lb. acidophilus* NCFM reguliše funkciju DC⁺ posredstvom DC-SIGN receptora. Preciznije, nakon primene SlpA detektovana je povećana koncentracija IL-10 i smanjena koncentracija IL-12p70 citokina u kulturi DC⁺ dobijenih iz periferne humane krvi. Nakon toga u eksperimentima koevokultivacije ovih DC⁺ sa naivnim T limfocitima detektovan je porast IL-4 citokina čime je potvrđen anti-inflamatorni efekat SlpA, *in vitro*. S obzirom da je DC-SIGN uključen u prepoznavanje ugljenih hidrata bakterija, pretpostavlja se da je glikozilacija ovog proteina neophodna za ostvarivanje ovog efekta (Konstantinov i sar., 2008).

Fimbrije (pili) prisutne su i kod Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija sa osnovnom ulogom u adheziji bakterija (Proft i Baker, 2009). Njihov doprinos probiotičkom potencijalu laktobacila je jako malo ispitan. Smatra se da je glavni receptor koji ih prepoznaje TLR4 uz prisustvo ko-receptora glikosfingolipida. Ova interakcija opisana je kod patogene bakterije *E. coli*. Neki probiotički sojevi laktobacila, kao što je *Lb. rhamnosus* GG, poseduju fimbrije odgovorne za adheziju bakterija za glikoproteine mukusa, međutim njihova interakcija sa PRR i potencijalni efekat do sada nisu ispitivani (Lebeer i sar., 2010).

LPS i flagela bakterija su dva važna MAMP-a, čiji su mehanizmi signalizacije u potpunosti okarakterisani. LPS molekul interaguje sa TLR4 i MD2 receptorima uz prisustvo LPS-vezujućeg proteina i CD14 ko-receptora (Triantafilou i sar., 2004). Sa druge strane flagelin, protein koji izgrađuje flagele bakterija, prepoznaje TLR5. Ove strukture

nisu svojstvene laktobacilima, jer su zastupljene uglavnom u Gram-negativnim bakterijama. Međutim, bitno je napomenuti da je pokazano da flagela probiotičkog soja *E. coli* Nissle 1917 koreliše sa njenim probiotičkim efektom, indukujući produkciju β -defenzina od strane IEC (Schlee i sar., 2007).



Slika 2. Površinski i sekretovani biomolekuli probiotika.

Preuzeto i modifikovano iz Lebeer i sar., 2010

1.2.2. Sekretovani i unutarćelijski molekuli bakterija u interakciji sa ćelijama domaćina

Probiotici ostvaruju veliki broj pozitivnih efekata bez direktnog kontakta sa ćelijama domaćina. Ovi efekti posredovani su sekretovanim i solubilnim molekulima, od kojih najveći broj čine ekstracelularni proteini (Sánchez i sar., 2008). Gram-pozitivne bakterije najveći broj proteina sekretuju u spoljašnju sredinu pomoću dva sistema: opšteg sekretornog puta i specifičnog sistema za sekreciju proteina. Opšti sekretorni put se karakteriše postojanjem signalnog peptida koji je vezan za protein koji se transportuje kroz

membranu bakterije. Najpoznatiji signalni peptidi su: signalni peptid I (Ala-X-Ala) i signalni peptid II/lipoboks (Leu-Ala-Gly-Cys). U ovom sistemu proteini sintetisani kao preproteini transportuju se u nascentnom obliku kroz hidrofилne kanale formirane od strane *Sec* proteina. Sa druge strane, specifični sistem za sekreciju proteina uglavnom podrazumeva postojanje transportera (npr. ABC transporter) koji sekretuje protein u savijenoj formi (Sanchez i sar., 2010).

Sekretovani proteini probiotika mogu da difunduju kroz crevnu mukozu ostvarujući kontakt sa IEC ili imunskim ćelijama. Njihov efekat se ogleda u stimulaciji produkcije mukusa, defenzina, citokina, hemokina i jačanju proteinskih međućelijskih veza. Najbolje okarakterisani proteini su hidrolaze p40 i p75 koje proizvodi soj *Lb. rhamnosus* GG. Istraživanja su pokazala da p40 i p75 proteini inhibiraju TNF- α indukovanu apoptozu IEC. Ovaj efekat je rezultat aktivacije Akt signalnog puta, najverovatnije posredovan aktivacijom receptora za epidermalni faktor rasta (Yan i sar., 2007). U drugom eksperimentalnom modelu, pokazano je da p40 i p75 proteini učestvuju u zaštiti epitelne barijere aktivacijom protein kinaze C (Seth i sar., 2008). Konačno, u *in vivo* eksperimentu, p40 molekul primenjen preventivno ili terapijski smanjio je inflamaciju u modelu kolitisa, aktivirajući receptor za epidermalni faktor rasta (Yan i sar., 2011). Bitno je napomenuti da ovi efekti nikada nisu uočeni nakon primene živog *Lb. rhamnosus* GG soja kao probiotika. Još jedan protein koji je pokazao anti-inflamatorni potencijal je laktocepin. Laktocepin je proteaza kodirana *prtP* genom, a izolovana je iz bakterije *Lb. paracasei*. Istraživanje urađeno od strane von Schillde i sar. (2012) identifikovalo je laktocepin kao proteazu koja selektivno degraduje protein 10 indukovano sa IFN- γ (engl. *IFN- γ -Inducible Protein 10*, IP-10) označen i kao CXCL10 zbog funkcije hemokina, koji je odgovoran za regrutovanje aktiviranih T limfocita na mesto inflamacije. Primena laktocepina u modelu kolitisa i ileitisa kod miševa značajno je smanjila nivo CXCL10 hemokina, infiltraciju limfocita i stepen inflamacije. Pored enzimske aktivnosti, proteini bakterija mogu delovati i kao inhibitori enzima. Serpin, inhibitor serinskih proteaza, detektovan je u supernatantu kulture probiotika *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCC2705 (Ivanov i sar., 2006). Serpin je pokazao da efikasno inhibira elastaze poreklom iz pankreasa i neutrofila. Neutrofili su prve ćelije koje dospevaju na mesto inflamacije pod dejstvom pro-inflamatornih citokina.

Inhibicija elastaza neutrofila koje su direktno uključene u patogenezu inflamatornih bolesti smatra se dobrom strategijom za njihovu prevenciju. U velikom broju istraživanja na različitim ćelijskim linijama i sistemima organa pokazan je pozitivan efekat probiotika koji je ostvaren delovanjem sekretovanih medijatora. Međutim, hemijska struktura molekula prisutnih u supernatantima bakterijskih kultura, koji su odgovorni za ove efekte i dalje ostaje nedefinisana, što je i opravdalo potrebu za uvođenjem termina postbiotika (Tsilingiri i sar., 2012).

Polifosfati predstavljaju polimere fosfatnih rezidua koje sintetišu i akumuliraju bakterije kao odgovor na nepovoljne nutritivne uslove sredine (Alcántara i sar., 2014). Korist od ovih jedinjenja nemaju samo bakterijske ćelije, uzimajući u obzir nova istraživanja koja upućuju da je probiotički efekat laktobacila posredovan ovim jedinjenjima. Polifosfati su identifikovani kao aktivni molekuli soja *Lb. brevis* SBC8803 (Segawa i sar., 2011). U navedenom istraživanju je pokazano da su polifosfati ostvarili anti-inflamatorni efekat u modelu kolitisa kod miševa. Dodatni eksperimenti na Caco-2 ćelijama utvrdili su da polifosfati smanjuju oksidativno oštećenje epitela stimulišući ekspresiju proteina toplotnog stresa 27 (*Heat Shock Protein 27*, HSP-27) preko p38/MAPK signalnog puta koji ima važnu ulogu u zaštiti ćelija u uslovima stresa jer deluje anti-oksidativno i anti-apoptotski.

Intracelularni molekuli bakterija su opisani kao nosioci probiotičkog efekta pojedinih bakterijskih sojeva. U dinamičkom sistemu GI trakta ovi molekuli potencijalno interaguju sa ćelijama domaćina tek nakon lize bakterija. Uočeno je da proteini koji su neophodni za osnovne fiziološke procese bakterija, kao i genetički materijal, mogu delovati na različite signalne puteve u ćelijama domaćina. Na primer, u soju *Lb. johnsonii* La1, faktor elongacije Tu (engl. *Elongation Factor Thermo unstable*, EF-Tu) i protein GroEL, neophodan za pravilno savijanje proteina, stimulisali su CD14 zavisnu produkciju IL-8 hemokina u IEC (Bergonzelli i sar., 2006; Granato i sar., 2004). Sa druge strane, mnogo je više radova koji opisuju efekte DNK i RNK molekula poreklom iz probiotika. U prisustvu pro-inflamatornih stimulusa, DNK izolovana iz VSL#3 probiotske smeše smanjila je produkciju IL-8 hemokina, aktivaciju p38/MAPK i NF-κB signalnih puteva u HT-29 ćelijskoj liniji (Jijon i sar., 2004). Kasniji eksperimenti pokazali su da je DNK iz VSL#3

smeše probiotika smanjila inflamaciju u modelu kolitisa delujući posredstvom TLR9. TLR9 je odgovoran za prepoznavanje nemetilovanih CpG ponovaka bakterijske DNK (Rachmilewitz i sar., 2004). Suprotno, Iliev i sar. (2005) su u genomskoj DNK izolovanoj iz *Lb. rhamnosus* GG soja pronašli TTTCGTTT oligonukleotidnu sekvencu koja je pokazala imunostimulišuću aktivnost u brojnim esejima. RNK molekul se takođe može svrstati u potencijalne postbiotike na osnovu rezultata koje su predstavili Yoshida i sar., 2011. RNK izolovana iz *Lb. gasseri* LG2809 soja, inhibirala je proliferaciju CD4⁺ limfocita delujući preko MyD88 (engl. *Myeloid Differentiation primary response 88*) adaptorskog proteina. Analizirajući potencijalne PRR uključene u prepoznavanju RNK, autori sugerišu da je TLR7 odgovoran za imunosupresivni efekat bakterijske RNK.

Kao što predstavljeni literaturni podaci pokazuju interakcija postbiotika sa IEC i imunskim ćelijama rezultira modulacijom različitih signalnih puteva. Okarakterisani molekuli sa definisanim mehanizmom dejstva koji se mogu primeniti bez straha od neželjenih reakcija mogu biti dragocena alternativa savremenim probioticima u lečenju inflamatornih bolesti creva. Isto tako, njihova moguća primena u drugim patološkim stanjima koja nisu striktno vezana za GI trakt predstavlja važno polje savremenih istraživanja. Neki od primera okarakterisanih postbiotika prikazani su na **Slici 2**.

1.3. Bol i inflamacija

Bol i inflamacija su u najvećem broju slučajeva međusobno povezani. Prema definiciji Međunarodnog udruženja za proučavanje bola, bol predstavlja neprijatan osećaj i emocionalno iskustvo izazvano stvarnim ili potencijalnim oštećenjem tkiva. Sa druge strane, inflamacija je odgovor organizma koji se pokreće usled delovanja štetnih stimulusa (noksi) i predstavlja koordinisanu aktivnost velikog broja medijatora. Terapija bola podrazumeva uklanjanje ili ublažavanje bola primenom klasičnih i adjuvantnih analgetika. U grupu klasičnih analgetika ubrajamo nesteroidne anti-inflamatorne lekove (NSAIL), opioidne analgetike i paracetamol. Kao adjuvantni analgetici najčešće se koriste antidepressivi i antiepileptici (Tomić i Stepanović-Petrović, 2011). Pojava neželjenih efekata, kao što je hepatotoksičnost, prati primenu nekih analgetika. Jedan od primera koji

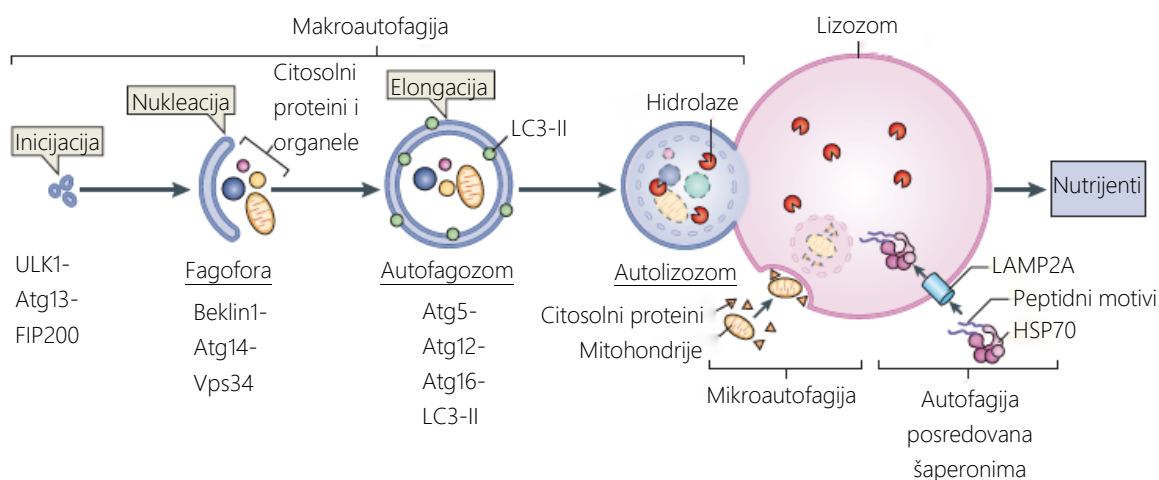
ilustruje datu tvrdnju je hepatotoksičnost koja se može javiti nakon hronične primene diklofenaka. Sa druge strane, paracetamol je lek sa analgetičkim i antipiretičkim dejstvom koji je bezbedan kada se primeni u terapijskoj dozi (Lee, 2004). Međutim, ukoliko se predozira, paracetamol takođe može izazvati oštećenja jetre. Metabolizam paracetamola uključuje njegovu oksidaciju citohrom CYP2E1 enzimom, pri čemu nastaje visokoreaktivan metabolit N-acetil-p-benzohinonimin (NAPHI). Navedeni metabolit se vezuje za glutation u jetri čime se neutrališe njegov toksični efekat. Kada se depoi glutationa isprazne u stanjima intoksikacije, NAPHI se vezuje za mitohondrijske i druge ćelijske proteine uzrokujući njihovu disfunkciju. Jedan od mehanizama odbrane ćelija od toksičnosti ksenobiotika je autofagija. Farmakološka modulacija autofagije pokazala se vrlo efikasnim i novim pristupom za ublažavanje akutnih oštećenja jetre koja su najčešće uzrokovana primenom visokih doza lekova. Nova istraživanja pokazuju da je u ćelijama koje su bile izložene toksičnoj koncentraciji paracetamola uočena aktivirana autofagija (Hinson i sar., 2010; Ni i sar., 2012a). Rezultati predstavljeni od strane Ni i sar. (2012b) jasno pokazuju da farmakološka stimulacija autofagije rapamicinom smanjuje toksično delovanje paracetamola. Na osnovu toga može se zaključiti da intoksikacija lekovima predstavlja dijagnozu gde se akutnom stimulacijom autofagije može ostvariti pozitivan terapijski efekat.

1.3.1. Autofagija

Autofagija je katabolički proces razgradnje nefunkcionalnih proteina i oštećenih organela, neophodan za razviće, diferencijaciju i preživljavanje ćelija. Do sada su okarakterisana tri osnovna tipa autofagije: makroautofagija, mikroautofagija i autofagija posredovana šaperonima. Svi tipovi autofagije dovode do proteolitičke degradacije citosolnog materijala u lizozomima (Glick i sar., 2010). Tipovi i osnovne faze autofagije prikazani su na **Slici 3**. Makroautofagija se karakteriše formiranjem vezikula dvoslojne membrane koje se nazivaju autofagozomi. U procesu fuzije autofagozomi isporučuju odabrani materijal lizozomima kada se formiraju strukture koje se nazivaju autolizozomi (Klionsky i sar., 2014). U procesu mikroautofagije nastaju invaginacije membrane

lizozoma čime se direktno preuzima citosolni materijal za degradaciju. I na kraju, kod autofagije posredovane šaperonima odabrani materijal se transportuje kroz membranu lizozoma u kompleksu sa šaperonima (npr. HSP-70). Termin autofagija najčešće se odnosi na proces makroautofagije (Kaur i Debnath, 2015). Formiranje autofagozoma prolazi kroz 3 različite faze: a) faza inicijacije, b) faza nukleacije i c) faza elongacije/zatvaranja autofagozoma. Jedan od glavnih regulatora autofagije je mTOR kompleks (engl. *Mammalian Target Of Rapamycin*). U prisustvu amino kiselina, faktora rasta i izvora energije mTOR kompleks suprimira autofagiju inhibicijom ULK1 (engl. *Unc-51 Like autophagy activating Kinase*) kompleksa. Ovaj kompleks formiraju serin/treonin ULK1 kinaza, Atg13 (engl. *AuTophagy related protein 13*) i FIP200 (engl. *200 kDa Focal adhesion kinase family-Interacting Protein*) molekuli. U suprotnom, u nedostatku nutrijenata, inhibiran je mTOR kompleks što sprečava fosforilaciju serin/treonin ULK1 kinaze i Atg13 i omogućava formiranje ULK1 kompleksa (faza inicijacije) (Rautou i sar., 2010). Aktivirana ULK1 kinaza fosforiliše Beklin-1 i Ambra1 (engl. *Activating Molecule in Beclin-1-Regulated Autophagy*) proteine koji sa Atg14L i fosfatidil inozitol 3 kinazom (PI3K) klase III čine PI3K klase III kompleks. Aktivacija ovog kompleksa dovodi do nastanka inozitol 3 fosfata što predstavlja fazu nukleacije (Sun, 2016). Aktivacija oba kompleksa dovodi do formiranja fagofore u citoplazmi najverovatnije od membrane endoplazmatičnog retikuluma. Bitno je napomenuti da kada postoji nutritivni deficit aktivira se i cJUN kinaza koja fosforiliše Bcl-2 protein čime se suprimira inhibični efekat ovog proteina na Beklin-1. U fazi elongacije dolazi do rasta fagofore i formiranja autofagozoma. U ovoj fazi uključena su dva konjugaciona sistema: Atg5-Atg12-Atg16 kompleks proteina i kompleks koji čine Atg4 proteaza i LC3 (engl. *microtubule-associated protein Light Chain 3*) protein. LC3 protein iseca Atg4 proteaza formirajući takozvanu hidrosolubilnu LC3-I formu proteina. C terminalne rezidue LC3-I forme proteina bivaju aktivirane vezivanjem ATP molekula posredstvom Atg7, nakon čega se aktivirani LC3-I protein prenosi na Atg3 protein koji olakšava njegovo vezivanje za fosfatidiletanolamin. Konjugacijom LC3-I forme sa fosfatidiletanolaminom nastaje liposolubilna LC3-II forma. LC3-II forma proteina se ugrađuje u rastuću fagoforu i sa spoljašnje i unutrašnje strane posredstvom Atg5-Atg12-Atg16 kompleksa koji se nakon zatvaranja autofagozoma odvaja

sa njegove površine (Glick i sar., 2010; Rautou i sar., 2010). Smatra se da LC3-II protein ima ulogu receptora na rastućoj membrani vezivanjem adaptorskih proteina. Najbolji primer je p62/SQSTM1 (engl. *SeQueSTrosoMe1*) adaptorski molekul koji vezuje proteinske agregate ili oštećene organele (npr. mitohondrije) i zajedno sa njima podleže proteolizi u autolizozomima (Pankiv i sar., 2007). Kada je formiranje autofagozoma završeno spajanjem krajeva fagoforne membrane, sledi proces njegove fuzije sa lizozomom.



Slika 3. Pregled tipova i osnovnih faza autofagije.

Preuzeto i prevedeno iz Kaur i Debnath, 2015

Generalno se autofagija karakteriše nasumičnim regrutovanjem materijala za degradaciju, međutim veliki broj rezultata ukazuje na selektivnu interakciju fagofore sa oštećenim organelama i proteinskim agregatima. Jedan od važnih selektivnih oblika autofagije je uklanjanje oštećenih mitohondrija procesom koji se označava kao mitofagija. Mitohondrije imaju ključnu ulogu u preživljavanju ćelija i regulisanju energetskog metabolizma u ćelijama. Zbog toga je njihovo selektivno uklanjanje usled disfunkcije bilo koje etiologije visoko regulisani proces i zahteva koordinisanu aktivnost mitohondrijskih i citosolnih proteina (Zhang, 2013). Uklanjanje oštećenih mitohondrija mitofagijom obuhvata procese makroautofagije i selektivnog prepoznavanja i regrutovanja oštećenih mitohondrija. Najbolje okarakterisani mehanizam prepoznavanja i regrutovanja oštećenih mitohondrija je PINK1-Parkin signalni put. Vezivanjem za oštećene mitohondrije PINK1

(engl. *PTEN-induced putative kinase 1*) inicira Parkinom posredovanu mitofagiju njegovim vezivanjem za oštećene mitohondrije. U fiziološkim uslovima PINK1 se konstantno transportuje sa spoljašnje do unutrašnje membrane mitohondrija gde se inaktivira pod uticajem PARL proteina (engl. *Presenilin-Associated Rhomboid-like Protein*). Međutim usled oštećenja mitohondrija PINK1 se akumulira na spoljašnjoj membrani i regrutuje Parkin protein. Parkin kao citosolna E3 ubikvitin ligaza interaguje sa adaptorskim molekulima kao što su p62/SQSTM1, NBR1 (engl. *Neighbor of BRCA Gene 1*) ili optineurin koji se vezuju za LC3-II receptorni molekul na autofagozomima što omogućava mitofagiju (Ding i Yin, 2012).

Savremena istraživanja povezala su disfunkciju autofagije sa mnogim bolestima. Akumulacija proteinskih agregata usled inhibirane autofagije može uzrokovati oštećenje ćelije i ćelijsku smrt. Ovaj fenomen je od najvećeg značaja kod tkiva koja čine visoko diferencirane ćelije. Disfunkcija autofagije povezana je sa neurodegenerativnim (Parkinsonova i Alchajmerova bolest) i kardiovaskularnim bolestima, kao i bolestima pluća, bubrega i jetre (Zhang, 2013). Ako se posebno osvrnemo na ulogu autofagije u jetri, istraživanja pokazuju da je autofagija uključena u patogenezu različitih bolesti, koje su uglavnom hroničnog karaktera. Autofagija je u jetri na niskom bazalnom nivou i njena stimulacija je povezana sa različitim pozitivnim efektima. Autofagija štiti jetru od akutnih oštećenja (ishemija, ksenobiotici), učestvuje u razgradnji lipidnih kapljica kod bolesti masne jetre, učestvuje u razgradnji proteinskih agregata kod deficijencija α 1-antitripsina ili alkoholnog hepatitisa, dok je nishodna regulacija ovog procesa uočena kod hepatocelularnog karcinoma (Rautou i sar., 2010).

1.3.1.1. Autofagija i probiotici

Istraživanja koja su povezala autofagiju sa imunskim odgovorom, a posebno sa PRR, ukazala su jasno da crevna mikrobiota moduliše autofagiju (Delgado i sar., 2008). Bilo direktnim kontaktom ili posredstvom solubilnih medijatora rezultati ukazuju da laktobacili i bifidobakterije mogu da aktiviraju ili suprimiraju autofagiju u IEC. Najveće istraživanje sprovedeno do sada pokazalo je da supernatanti bakterija *Bifidobacterium breve*, *Lb.*

plantarum i *Lb. rhamnosus* GG indukuju autofagiju i ekspresiju HSP-27 u humanoj epitelnj ćelijskoj liniji C2BBel i na taj način štite epitelne ćelije od oksidativnog oštećenja uzrokovanog vodonik peroksidom (Inaba i sar., 2016). Han i sar. (2016) su testirali uticaj supernatanta bakterijske kulture soja *Bifidobacterium bifidum* ATCC29521 u modelu LPS-om izazvanog oštećenja intestinalnih epitelnih ćelija pacova (IEC-18). Istraživanje je pokazalo da supernatant bakterijske kulture inhibira toksično dejstvo LPS-a modulacijom autofagije. Sa druge strane, primena živih probiotika suprimirala je autofagiju koju su aktivirali *Salmonella* Infantis i humani rotavirus u modelima infekcija kod prasića i zamoraca (Wu i sar., 2013; Zhang i sar., 2018). Zhang i sar. (2018) su utvrdili da je supresija autofagije nakon primene soja *Lb. rhamnosus* GG u IEC, posledica aktivacije receptora za epidermalni faktor rasta i Akt signalnog puta. Ova supresija autofagije dovodi do povećanog preživljavanja ćelija i sprečava dalju diseminaciju salmonele. Međutim, izuzev ovih eksperimenata usko vezanih za IEC, ne postoje podaci o uticaju postbiotika na proces autofagije u drugim ćelijama.

1.3.2. Inflamatorni medijatori i mehanizam inflamatornog odgovora

Generalno gledano osnovne komponente inflamatornog puta su: inicijatori, senzori, medijatori i efektori. Inicijatori inflamatornog odgovora deluju preko različitih senzora koji pokreću produkciju specifičnih medijatora. Oslobođeni medijatori menjaju homeostazu tkiva u cilju adaptacije na novonastalo stanje. Inicijatori inflamacije se mogu podeliti na egzogene i endogene. Egzogeni inicijatori mogu biti mikroorganizmi (MAMP i faktori virulencije) ili različiti alergeni, toksini, iritanti i strana tela (Medzhitov, 2008). Endogeni inicijatori inflamacije su signalni molekuli koje oslobađaju oštećena tkiva ili tkiva sa izmenjenom funkcijom. Ovi molekuli su uglavnom u stanju homeostaze fizički odvojeni od senzornih molekula. Najbolji primeri su: ATP, K⁺, mokraćna kiselina, proizvodi razgradnje ekstracelularnog matriksa itd (Rock i Kono, 2008). Kao odgovor senzornih molekula na prisustvo noksi dolazi do oslobađanja inflamatornih medijatora. Neki od medijatora su presintetisani i deponovani u granulama mastocita, bazofila i trombocita. Drugi se nalaze u cirkulaciji u neaktivnoj formi, a postoji i grupa medijatora koja se sintetiše tek nakon

stimulacije. Inflamatorne medijatore, na osnovu njihovih biohemijskih osobina, možemo podeliti na: vazoaktivne amine, vazoaktivne peptide, komponente komplementa, metabolite arahidonske kiseline, citokine, hemokine i proteolitičke enzime. Vazoaktivni amini (histamin i serotonin) deponovani su u granulama mastocita i ostvaruju kompleksan efekat na nivou vaskularnog endotela povećavajući njegovu permeabilnost što omogućava ekstravazaciju regrutovanih aktiviranih imunskih ćelija i inflamacijskih molekula. Vazoaktivni peptidi mogu biti presintetisani i deponovani u sekretornim vezikulama (supstanca P) ili mogu nastati proteolitičkom obradom prekursora (bradikinin). Bradikinin je proizvod aktivnosti kalikrein-kininskog kaskadnog puta koji deluje kao vazodilatator. Arahidonska kiselina se metaboliše pomoću ciklooksigenaza (engl. *CycloOxygenase*, COX) 1 i 2, kada nastaju prostaglandini i tromboksani ili pomoću lipooksigenaze koja formira leukotrijene i lipoksine. Prostaglandini PGE₂ i PGI₂ deluju vazodilatatorno (Medzhitov, 2008). Lipoksini deluju anti-inflamatorno inhibirajući infiltraciju neutrofila i stimulišući infiltraciju imunosupresivnih makrofaga koje proizvode faktore rasta, TGF-β i IL-10 (Serhan, 2007). Citokini (TNF-α, IL-1β, IL-6) učestvuju u procesu „aktivacije endotela“, migracije neutrofila i stimulisanju odgovora akutne faze. U zapaljenju ih proizvode mnoge ćelije od kojih su najvažnije makrofage i mastociti (Medzhitov, 2008). Hemokini stimulišu hemotaksu neutrofila ka inflamiranom tkivu, dok proteolitički enzimi učestvuju u razgradnji proteina ekstracelularnog matriksa (elastaza i katepsini) ili produkciji baktericidnih molekula kao što je hipohlorasta kiselina (mijeloperoksidaza, MPO). Navedeni enzimi su lokalizovani u granulama neutrofila odakle bivaju oslobođeni nakon njihove aktivacije (Segal, 2005).

Mehanizmi urođenog inflamatornog odgovora pokrenuti usled infekcije su najbolje okarakterisani. Aktivirane tkivne makrofage koje prepoznaju MAMP bakterija posredstvom PRR, kao i aktivirani mastociti, oslobađaju medijatore inflamacije. Glavni efekat proinflatornih medijatora jeste „aktivacija endotela“ postkapilarnih venula, čime se omogućava ekstravazacija plazme i leukocita. Selektivnu migraciju leukocita (dominantno neutrofila) omogućavaju eksprimirani selektini na površini endotela koji reaguju sa integrinima i receptorima za hemokine na leukocitima (Pober i Sessa, 2007). Nakon prelaska u tkivo, neutrofil se aktiviraju bilo direktnim kontaktom sa mikroorganizmima ili

citokinima produkovanih od strane rezidualnih makrofaga. Aktivirani neutrofilni oslobađaju sadržaj svojih granula koji uključuje slobodne kiseonične radikale (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), reaktivne radikale azota (azot monoksid, NO) ili enzime. Ovi medijatori nisu selektivni za mikroorganizme tako da je kolateralno oštećenje lokalnog tkiva neizbežno (Nathan, 2006). Uspešni akutni inflamatorni odgovor rezultira eliminacijom patogena i reparacijom tkiva koja je posredovana od strane infiltriranih i tkivnih makrofaga. Promena u metabolizmu arahidonske kiseline, od produkcije pro-inflamatornih prostaglandina ka anti-inflamatornim lipoksinima, je ključna za rezoluciju inflamacije (Serhan, 2007).

1.3.3. Inflamatorni bol

Inflamatorni bol nastaje kao posledica hiperaktivacije primarnih senzornih nervnih završetaka usled delovanja različitih medijatora inflamacije. Kao jedan od osnovnih znakova zapaljenja, bol ima važnu fiziološku ulogu u stvaranju percepcije o povredama tkiva (Linley i sar., 2010). Medijatori inflamacije kao što su histamin, serotonin, bradikinin, joni (H^+ , K^+), ATP, NO, prostaglandini i pro-inflamatorni citokini mogu delovati direktno na ogoljene nervne završetke (nociceptore) ili aktivirati lokalne ćelije sa sposobnošću produkcije algogenih (bolnih) supstanci (Basbaum i sar., 2009). Na primer, supstanca P koja se oslobađa iz senzornih nerava može stimulisati degranulaciju mastocita koja rezultira oslobađanjem algogenog serotonina (Medzhitov, 2008). Sa druge strane, bradikinin koji dospeva na mesto inflamacije usled povećane propustljivosti krvnih sudova direktno deluje nadražajno na nociceptore. Pro-inflamatorni citokini (TNF- α , IL-1 β i IL-6) su prvi citokini koji se sekretuju u inflamiranom tkivu od strane makrofaga. U eksperimentalnim uslovima, administracija ovih citokina izaziva pojavu bolne preosetljivosti (hiperalgezije). Pojava hiperalgezije je verovatno posledica njihovog indirektnog dejstva, što ilustruje činjenica da IL-1 β stimuliše produkciju supstance P i PGE₂ u neuronima (Zhang i An, 2007).

1.3.3.1. Bol i probiotici

Primena probiotika kao adjuvantnih i pomoćnih suplemenata u terapiji bola razmatrana je samo u kontekstu ublažavanja visceralnog bola povezanog sa bolestima GI trakta. Najveći broj podataka o upotrebi probiotika potiče iz eksperimenata na životinjama koji ukazuju da probiotici mogu da modulišu visceralne senzacije (Theodorou i sar., 2014). Pregledom literature može se reći da primena probiotika iz roda *Lactobacillus* smanjuje visceralni bol na sledeće načine: delujući na kontrakcije citoskeleta epitelnih ćelija, smanjujući ekspresiju Fos proteina u kičmenoj moždini, povećavajući ekspresiju opioidnih i kanabinoidnih receptora u GI traktu (Ait-Belgnaoui i sar., 2005; Ait-Belgnaoui i sar., 2009; Rousseaux i sar., 2007). Za veliki broj probiotičkih sojeva je pokazano da ispoljavaju analgetički efekat u različitim modelima bola, dok precizan mehanizam delovanja još uvek nije razjašnjen. Smanjenje visceralnog bola kod pacova takođe može biti posredovano i ubijenim bakterijama i njihovim solubilnim produktima sugerišući da površinski i sekretovani bioaktivni molekuli laktobacila (postbiotici) doprinose ovom efektu (Theodorou i sar., 2014).

Ciljevi rada

2. CILJEVI RADA

Identifikacija i karakterizacija bakterijskih biomolekula koji interaguju sa receptorima eukariotskih ćelija predstavlja ključ za razumevanje mehanizama probiotičkog dejstva bakterija. Blage varijacije u strukturi MAMP-ova koje postoje između bakterija diktiraju prirodu njihove interakcije sa ćelijskim receptorima i potencijalnim ko-receptorima domaćina. Na osnovu ovih podataka izolacija i karakterizacija bakterijskih bioaktivnih molekula, kao i ispitivanje njihovog dejstva na različite ćelije i ćelijske procese, postali su deo savremenih istraživanja u oblasti probiotika. Imajući u vidu da laktobacili imaju potencijal da modulišu procese inflamacije i autofagije, odgovorne za nastanak bola, odnosno odbranu ćelija od oštećenja, glavni cilj ovog rada bio je testiranje mogućnosti primene postbiotika laktobacila u tretmanu inflamatornog bola i prevenciji oštećenja hepatocita izazvanih primenom toksičnih koncentracija paracetamola. U skladu sa tim postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

1. Ispitati uticaj bioaktivnih molekula laktobacila na proces autofagije u hepatocitima:

- Ispitati efekat ekstrakata pripremljenih od sojeva *Lb. fermentum* BGHI14, *Lb. fermentum* BGHV110 i *Lb. salivarius* BGHO1 na proces autofagije u intaktnim HepG2 ćelijama;
- Ispitati efekat odabranog ekstrakta u *in vitro* modelu hepatotoksičnosti izazvane paracetamolom u HepG2 ćelijama;
- Ispitati ulogu autofagije u protektivnom efektu odabranog ekstrakta u *in vitro* modelu hepatotoksičnosti izazvane paracetamolom u HepG2 ćelijama.

2. Analizirati imunomodulatorni efekat egzopolisaharida soja *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11:

- Ispitati da li egzopolisaharid EPS-CG11 ostvaruje antiedematozni i antihiperalgezijski efekat u modelu inflamatornog bola kod pacova;
- Ispitati uticaj EPS-CG11 na produkciju medijatora inflamacije i infiltraciju ćelija u modelu inflamatornog bola;
- Ispitati imunomodulatorni efekat EPS-CG11 u modelu peritonitisa kod pacova.

Materijal i metode

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Bakterijski sojevi

Bakterijski sojevi korišćeni u istraživanju prikazani su u **Tabeli 1**.

Tabela 1. Spisak bakterijskih sojeva i njihovih karakteristika.

Bakterijski soj	Karakteristike	Literatura
<i>Lactobacillus fermentum</i>		
BGHI14	Humani intestinalni izolat	Lukić i sar., 2013
BGHV110	Humani vaginalni izolat	Begović, 2008
<i>Lactobacillus salivarius</i>		
BGHO1	Humani oralni izolat Bac ⁺ , Bac ^{Im}	Strahinić i sar., 2007
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>		
BGCG11	EPS ⁺ , prirodni izolat iz domaćeg sira	Kojić i sar., 1992

EPS⁺ - proizvodi egzopolisaharid; Bac⁺ - proizvodi bakteriocin; Bac^{Im} – imunitet na bakteriocin

3.2. Prajmeri

Prajmeri korišćeni u istraživanjima prikazani su u **Tabeli 2 i 3**.

Tabela 2. Spisak prajmera korišćenih za umnožavanje humanih gena.

Naziv prajmera	Sekvenca 5'→3'	Literatura
β -aktin_F	TTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGA	Li i sar., 2015
β -aktin_R	TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAGCA	
BECNI_F	CTGGGACAACAAGTTTGACCAT	Liu i sar., 2014
BECNI_R	GCTCCTCAGAGTTAACTGGGTT	

<i>Atg5_F</i>	CACAAGCAACTCTGGATGGGATTG	He i sar., 2013
<i>Atg5_R</i>	GCAGCCAC GGACGAAACAG	
<i>p62/SQSTM1_F</i>	GCCAGAGGAACAGATGGAGT	Sahani i sar., 2014
<i>p62/SQSTM1_R</i>	TCCGATTCTG GCATCTGTAG	
<i>PINK1_F</i>	GGGGAGTATGGAGCAGTCAC	Kim i sar., 2013
<i>PINK1_R</i>	CATCAGGGTAGTCGACCAGG	
<i>TGF-β_F</i>	AAGGACCTCGGCTGGAAGTGG	Dragičević i sar., 2017
<i>TGF-β_R</i>	CCGGGTTATGCTGGTTGTACAG	

Tabela 3. Spisak prajmera korišćenih za umnožavanje gena pacova.

Naziv prajmera	Sekvenca 5'→3'	Literatura
<i>β-actin_F</i>	AGCCATGTACGTAGCCATCC	Mousavi i sar., 2009
<i>β-actin_R</i>	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	
<i>GAPDH_F</i>	CCCCCAATGTATCCGTTGTG	Tanga i sar., 2004
<i>GAPDH_R</i>	TAGCCCAGGATGCCCTTTAGT	
<i>TNF-α_F</i>	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC	Peinnequin i sar., 2004
<i>TNF-α_R</i>	TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC	
<i>IL-1β_F</i>	GGAAGGCAGTGTCACTCATTGTG	Tilleux i sar., 2007
<i>IL-1β_R</i>	GGTCCTCATCCTGGAAGCTCC	
<i>IL-6_F</i>	GTGGCTAAGGACCAAGACCA	Lugrin i sar., 2015
<i>IL-6_R</i>	ACCACAGTGAGGAATGTCCA	
<i>iNOS_F</i>	GACCAGAACTGTCTCACCTG	Choi i sar., 2012
<i>iNOS_R</i>	CGAACATCGAACGTCTCACA	
<i>CD14_F</i>	TCTGAGGGTCCTGGTCAACA	Lukić i sar., 2017
<i>CD14_R</i>	TTGTGAGCACCGATGGACAA	

3.3. Medijumi za kultivaciju bakterija i priprema bakterijskih ekstrakata

Za rast laktobacila korišćen je *De Man-Rogosa-Sharpe* (MRS) medijum (Merck GmbH, Darmstadt, Nemačka). Humani izolati su kultivisani u tečnom medijumu na 37°C, dok je *Lb. paraplantarum* BGCG11 kultivisan u tečnom medijumu na 30°C. Sve bakterije su rasle u anaerobnim uslovima. Anaerobna sredina postignuta je kultivacijom bakterija u anaerobnim posudama u kojima je za generisanje anaerobije dodat Anaerocult A (Merck). Za pripremu čvrstih podloga korišćen je agar u finalnoj koncentraciji 1,7% (Torlak, Beograd, Srbija).

Ekstrakti bakterijskih sojeva *Lb. fermentum* BGHI14, *Lb. fermentum* BGHV110 i *Lb. salivarius* BGHO1 pripremani su iz prekonocnih kultura nakon što je optička gustina kultura (OD₆₀₀) merena na spektrofotometru Ultrospec 500 pro (Amersham Bioscience, Little Chalfont, Ujedinjeno Kraljevstvo) izjednačena. Nakon toga, 200 ml kulture je centrifugirano 10 min na 4°C pri brzini od 5000 rpm u kliničkoj centrifugi (5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Bakterijski pelet ispran je dva puta u PBS-u (engl. *Phosphate Buffered Saline*) i finalno 10 puta ukoncentrisan resuspendovanjem peleta u 20 ml PBS-a. Ekstrakti su pripremljeni homogenizacijom bakterija u francuskoj presi (SLM Instruments, Inc. Urbana, IL, SAD) nakon čega je dobijena suspenzija liofilizovana korišćenjem Alpha 1-4 LSC Plus liofilizatora, Martin Christ, Nemačka.

3.4. Izolacija i prečišćavanje egzopolisaharida

Izolacija egzopolisaharida EPS-CG11 soja *Lb. paraplantarum* BGCG11 urađena je prema protokolu koji su opisali Ruas-Madiedo i sar. (2006). U cilju što boljeg prinosa polimera, po 200 µl prekonocne bakterijske kulture utrljano je na 100 *Petri* šolja koje su sadržale MRS agar. Zatim su *Petri* šolje inkubirane 48 h na 30°C. Nakon isteka inkubacije, bakterije su sakupljene sterilnom bidestilovanom vodom (2 ml po *Petri* šolji). Ekstrakcija EPS-CG11 izvršena je dodatkom jednog volumena 2 M NaOH mešanjem suspenzije 24 h na sobnoj temperaturi. Zatim je suspenzija bakterija centrifugirana u *Sorvall* centrifugi (8000 rpm, 20 min, 4°C) i sakupljen supernatant. Precipitacija ekstrahovanog EPS-CG11

izvršena je dodavanjem dva volumena 96% etanola, nakon čega je supernatant inkubiran 48 h na 4°C. Posle inkubacije, supernatant je odliven, a precipitirani EPS-CG11 sušen 1 h na 37°C i resuspendovan u sterilnoj bidestilovanoj vodi. EPS-CG11 je prečišćen dijalizom u crevima za dijalizu 12-15 kDa (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Nemačka) tri dana na 4°C sa promenom bidestilovane vode svakog dana. Kako bi se smanjio sadržaj nukleinskih kiselina i proteina, EPS-CG11 je dalje tretiran DNazom tip-I (Sigma-Aldrich) u finalnoj koncentraciji 2,5 µg/ml u trajanju od 6 h na 37°C, nakon čega je dodata pronaza E (Sigma-Aldrich) u finalnoj koncentraciji 50 µg/ml i inkubacija nastavljena još 18 h na 37°C. Ostatak proteina istaložen je dodatkom trihlorsirćetne kiseline (12% finalna koncentracija) i mešanjem u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi. Kako bi se uklonili precipitirani proteini, rastvor je centrifugiran u *Sorvall* centrifugi (10000 rpm, 20 min, 4°C). Sakupljen je supernatant čija je pH vrednost podešena na 7 pomoću 10N NaOH i prečišćavanje je nastavljeno dijalizom u crevima za dijalizu tri dana na 4°C. Nakon toga, EPS-CG11 je liofilizovan.

3.5. Fizičko-hemijska karakterizacija egzopolisaharida

3.5.1. Mikroskopska analiza

Površinske karakteristike i prostorna organizacija liofilizovanog EPS-CG11 posmatrana je pod svetlosnim mikroskopom OPTICA B-500MET (Optica SRL, Italija). Za fotografisanje uzoraka korišćena je OPTIKAM PRO 8LT-4083.18 kamera opremljena CCD senzorom. Iako se svetlosna mikroskopija ne koristi tako često za proučavanje biopolimera, Kim i Willett (2001) su u svom radu pokazali potencijal ove metode za ovu vrstu analize.

3.5.2. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom

Kvalitativna analiza EPS-CG11 urađena je primenom infracrvene spektroskopije sa Furijeovom transformacijom (engl. *Fourier-Transform InfraRed spectroscopy*, FTIR). Svaki molekul poseduje karakterističan vibracioni spektar u IR oblasti pa se primenom ove

metode mogu analizirati strukturne karakteristike biopolimera i identifikovati jedinjenja (Ramesan i Surya, 2016). FTIR spektar uzorka snimljen je u opsegu talasnih dužina 400-4000 cm^{-1} u Nicolet iS10 spektrometru sa Smart iTX dodatkom (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) sa rezolucijom od 4 cm^{-1} i 32 skeniranja metodom ometene totalne refleksije (engl. *Attenuated Total Reflectance*, ATR). OMNIC softver je korišćen za analizu i grafičko predstavljanje podataka.

3.5.3. Termogravimetrijska analiza

Termička stabilnost i dekompozicija EPS-CG11 utvrđena je termogravimetrijskom analizom (TGA) u Setsys Evolution aparatu (SETARAM Instrumentation, Caluire-et-Cuire, Francuska). Uzorak (zapremine 100 μl) je zatvoren u aluminijumsku posudicu i postepeno zagrevan u struji sintetskog vazduha pri protoku od 50 ml/min, brzinom od 10°C/min u temperaturnom intervalu 25-900°C. Odgovarajući DTG (engl. *Differential ThermoGravimetric*) signal koji predstavlja gubitak mase u toku zagrevanja kao i % gubitka mase izračunati su pomoći CALISTO softvera.

3.5.4. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija

Promene agregacionog stanja i drugi toplotom izazvani fenomeni karakteristični za polisaharide kao što su: topljenje, dehidracija, bubrenje i želatinizacija analizirani su diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (engl. *Differential Scanning Calorimetry*, DSC) u DSC EVO 131 aparatu (SETARAM Instrumentation). Uzorak (zapremine 30 μl) je zatvoren u aluminijumsku posudicu i postepeno zagrevan i hlađen u struji azota, brzinom od 10°C/min u temperaturnom intervalu 25-200°C.

3.6. Čelije

Efekti bakterijskih ekstrakata ispitivani su na ćelijskoj liniji hepatocelularnog karcinoma HepG2 (ATCC HB-8065). Čelije su gajene u CO_2 inkubatoru u vlažnoj

atmosfera sa 5% CO₂ na temperaturi od 37°C u DMEM (engl. *Dulbecco's Modified Eagle's medium*) medijumu za kultivaciju ćelija sa nižom koncentracijom glukoze od 1 g/L. DMEM medijum je obogaćen dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (engl. *Fetal Bovine Serum*, FBS), 2 mM L-glutamina, 100 µg/ml streptomicina i 100 U/ml penicilina. Sve navedene hemikalije za kultivaciju ćelija nabavljene su od Gibco, Life Technologies. Ćelije su po odmrzavanju iz tečnog azota gajene u flaskovima površine 75 cm² (T-75, Sarstedt, Nümbrecht, Nemačka) i pasažirane svakih pet dana. Kako bi se ćelije odlepile sa površine flaska korišćen je 0,25% tripsin u PBS-u koji je sadržao 1mM EDTA (Torlak).

3.7. Dizajn *in vitro* eksperimenata

Za sva *in vitro* ispitivanja, ćelije su zasejavne u ploče sa 24 bazena (2×10^5 ćelija/bazenu) i tretirane 24 h nakon zasejavanja. Ćelije su 6 h pre tretmana inkubirane u DMEM medijumu koji je sadržao visoku koncentraciju glukoze kako bi se suprimirala bazalna autofagija (Kobayashi i sar., 2012). Ćelije su tretirane 16 h, različitim koncentracijama ekstrakata bakterijskih sojeva *Lb. fermentum* BGHI14, *Lb. fermentum* BGHV110 i *Lb. salivarius* BGHO1 kako bi se odabrala odgovarajuća koncentracija ekstrakta koja nema uticaj na vijabilnost ćelija. Svi liofilizovani ekstrakti rastvoreni su u DMEM medijumu. Odabrane koncentracije ekstrakata korišćene su za tretmane ćelija iz kojih su izolovani proteini za Western blot analizu.

U eksperimentima citotoksičnosti, paracetamol je korišćen u koncentraciji od 50 mM i direktno je rastvoren u DMEM medijumu. Ćelije su tretirane u istom trenutku ekstraktom odabranog soja i paracetamolom u trajanju od 6 h i 16 h. Nakon 6 h iz ćelija je izolovana RNK, dok su nakon 16 h urađeni testovi vijabilnosti, izolovani proteini i RNK.

Farmakološka inhibicija autofagije u cilju procene autofagnog fluksa urađena je primenom hlorokina u koncentraciji od 25 µM. Hlorokin inhibira autofagiju povećavajući pH vrednost u lizozomima što rezultira inhibicijom spajanja autofagozoma i lizozoma. Hlorokin je dodat u isto vreme kad i tretman u cilju procene efekta na vijabilnost ćelija i 4 h pre kraja tretmana u cilju analize ekspresije proteina. Autofagija je analizirana praćenjem ekspresije relevantnih gena i proteina.

3.8. Testovi vijabilnosti ćelija

Uticaj različitih tretmana na vijabilnost HepG2 ćelija praćena je nakon 16 h primenom kolorimetrijskih metoda koje su zasnovane na merenju aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze ili laktat dehidrogenaze.

3.8.1. MTT esej

MTT esej korišćen je u cilju procene uticaja različitih tretmana na metaboličku aktivnost HepG2 ćelija. MTT esej zasniva se na redukciji žute tetrazolijumske boje [*3-(4,5-diMetilTiazol-2-il)-2,5-difenil Tetrazolijum bromid*] (Serva, Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemaćka) mitohondrijskim dehidrogenazama u ljubićasto obojene kristale formazana. Esej je urađen prema protokolu koji je opisao Mosmann (1983). Po završenom tretmanu, ćelije su isprane PBS puferom i potom je u bazene dodato 200 µl DMEM medijuma koji je sadržao 0,5 mg/ml MTT boje. Nakon inkubacije od 4 h u CO₂ inkubatoru, nastali formazan rastvoren je dodatkom 10% rastvora SDS (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate*) koji je sadržao 0,01 M HCl. Absorbancija je merena u spektrofotometru za čitanje mikrotitarskih ploća (Plate Reader Infinite 200 pro, MTX Lab Systems, Beć, Austrija) na 570 nm. Intenzitet dobijene ljubićaste boje direktno je proporcionalan metaboličkoj aktivnosti tj. vijabilnosti ćelija. Rezultati su predstavljeni kao procenat (%) vijabilnosti ćelija u odnosu na kontrolu.

3.8.2. LDH esej

LDH (engl. *Lactate DeHydrogenase*) esej korišćen je za određivanje citotoksićnosti razlićitih tretmana merenjem aktivnosti oslobođene laktat dehidrogenaze iz mrtvih ćelija primenom komercijalnog kita za merenje citotoksićnosti (Cytotoxicity Assay Kit, Thermo Scientific). Aktivnost oslobođene laktat dehidrogenaze merena je u supernatantima kultura prema uputstvima proizvođaća. Absorbancija je merena na 490 nm u spektrofotometru za čitanje mikrotitarskih ploća (MTX Lab Systems). Zbog interferencije koja je postojala

između paracetamola i LDH eseja, samo su tretmani kod kojih je paracetamol primenjen u istoj dozi (50 mM) upoređeni, a rezultati su predstavljeni kao vrednosti absorbancije (Xu i sar., 2003). Vrednost absorbancije je obrnuto proporcionalna citotoksičnom efektu tretmana.

3.9. Western blot analiza

Ukupni proteini iz HepG2 ćelija i tkiva šapica pacova ekstrahovani su primenom RIPA (engl. *RadioImmunoPrecipitation Assay*) pufera (50 mM Tris-HCl pH=7,4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,25% natrijum dezoksiholat) kome je u cilju sprečavanja degradacije proteina neposredno pre upotrebe dodat proteinazni inhibitor (Roche, Bazel, Švajcarska) i 1 mM PMSF (engl. *Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride*) (Sigma-Aldrich). Po završetku tretmana, HepG2 ćelije su oprane u PBS-u i na njih je direktno u bazene dodato po 200 µl pufera za ekstrakciju. Iz šapica, nakon što je tkivo pulverizovano u tečnom azotu pomoću tarionika i pistila, dodato je po 500 µl pufera za ekstrakciju. Suspenzije ćelija i tkiva u RIPA puferu inkubirane su 1 h na ledu, nakon čega su centrifugirane (12000 rpm, 15 min, 4°C) (5417R, Eppendorf) i supernatanti sakupljeni za dalju analizu. Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijski primenom Bradford-ovog reagensa (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, SAD). Za konstruisanje standardne krive korišćene su poznate koncentracije albumina goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) u opsegu 1-20 mg/ml. Absorbanca je merena na 595 nm na UltraSpec 3300 pro aparatu (Amersham Bioscience). Intenzitet dobijene plave boje direktno je proporcionalan koncentraciji proteina u uzorcima. Ista količina proteina svakog uzorka (20 µg) resuspendovana je u 2 × *Laemmli* puferu (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-merkptoetanol, 0,004% bromfenol plavo i 125 mM Tris HCl, pH=6,8) i uzorci su inkubirani 5 min na 95°C. Razdvajanje proteina u uzorcima izvršeno je na osnovu molekulske mase tehnikom SDS-poliakrilamidne gel elektroforeze (SDS-PAGE). Pravljen je diskontinuiran sistem gelova koji se sastojao od gela za koncentrisanje i gela za razdvajanje. Gel za koncentrisanje sadržao je: 7% akrilamid/bisakrilamid, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,07% amonijum persulfat i 0,1% TEMED. Komponente gela za razdvajanje bile su: 12% akrilamid/bisakrilamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS,

0,07% amonijum persulfat i 0,1% TEMED. Pufer za elektroforezu sastojao se iz 25 mM Trisa pH 8,3, 186 mM glicina i 0,1% SDS-a. Elektroforeza je tekla pri konstantnoj struji od 20 mA. Razdvojeni proteini preneti su na nitroceluloznu membranu promera 0,2 μm (GE Healthcare, Little Chalfont, Ujedinjeno Kraljevstvo) primenom aparature za vlažni transfer (Bio-Rad Mini trans-blot system, Bio-Rad Laboratories) prema uputstvu proizvođača. Za detekciju p62 proteina korišćena je PVDF (engl. *PolyVinylidene DiFluoride*) membrana promera 0,45 μm (Millipore Corporation, Billerica, MA, SAD). Nakon transfera proteina, membrane su inkubirane preko noći na 4°C u 10% rastvoru obranog mleka (Merck) u TBST (engl. *Tris Buffered Saline-Tween 20*) puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl i 0,05% Tween-20). Na ovaj način sprečava se nespecifično vezivanje antitela za membranu. Pozicija željenog proteina na membrani određena je primenom smeše proteina poznate molekulske mase (engl. *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder*) (Thermo Scientific). Sledećeg dana, membrane su inkubirane 2 h na sobnoj temperaturi sa sledećim antitelima: anti-LC3B antitelo iz zeca (1:2000, Thermo Scientific), anti-p62 antitelo iz zamorca (1:1000, Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Nemačka), anti-MPO antitelo iz miša (1:1000, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo) i anti- β -aktin antitelo iz zeca (1:1000, Thermo Scientific). Membrane su potom isprane 3 puta po 15 minuta TBST puferom. Nakon ispiranja, membrane su inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi sa sekundarnim kozjim IgG antitelima obeleženim peroksidazom rena (engl. *HorseRadish Peroxidase*, HRP): anti-zečjim antitelom (1:10000, Thermo Scientific), anti-mišjim (1:10000, Amersham Biosciences) i anti-zamorčevim antitelom (1:10000, Novex Life Technologies). Posle 3 ispiranja u TBST-u na membrane je nanet ECL supstrat (engl. *Enhanced ChemiLuminescence*, Immobilon Western, Merck Milipore) za HRP u trajanju od jednog minuta. U prisustvu vodonik-peroksida, HRP katalizuje reakciju oksidacije luminola do 3-aminofalata, koja je praćena emisijom svetlosti. Emitovana svetlost je zabeležena na rendgenskom filmu. Intenzitet hemiluminiscence direktno je proporcionalan količini proteina vezanog za membranu. Denzitometrijska analiza ekspresije proteina urađena je primenom ImageJ softvera. Indukcija autofagije predstavljena je kao odnos LC3-II i LC3-I forme proteina. Ekspresija MPO i p62 proteina izražena je relativno u odnosu na β -aktin.

3.10. Izolacija RNK iz ćelija i tkiva

Izolacija ukupne RNK iz HepG2 ćelija, peritoneumskih ćelija pacova i tkiva šapica pacova urađena je prema protokolu koji su opisali Lukić i sar. (2013). Za izolaciju je korišćen denaturišući rastvor koji se sastojao iz: 4 M guanidin tiocijanata, 25 mM natrijum-citrata, 0,1 M 2-merkapttoetanol i 0,5% natrijumove soli N-lauroilsarkozina. Tkivo šapica je pulverizovano u tečnom azotu pomoću tarionika i pistila. Nakon toga, usitnjeno tkivo je resuspendovano u denaturišućem rastvoru i ostavljeno na ledu. Zaleđene ćelije su resuspendovane direktno u denaturišućem rastvoru. Nakon topljenja, tkivo i ćelije su dodatno homogenizovani automatskom pipetom nastavkom od 1 ml. Dalje je dodata jednaka zapremina kiselog fenola (pH=4), 1/10 zapremine 2 M natrijum acetata (pH=4) i 1/5 zapremine hloroforma. Homogenati ćelija i tkiva su pažljivo izmućkani i ostavljeni na ledu 10-15 min. Smeša je centrifugirana 20 min na 13000 rpm, 4°C (5417R, Eppendorf) i gornja faza prebačena u nove tube. Korak fenolske ekstrakcije ponovljen je kako bi se smanjio sadržaj proteina i eliminisala potencijalna genomska DNK. RNK je precipitirana dodatkom jedne zapremine izopropanola inkubacijom na -20°C u trajanju od 30 min i centrifugiranjem na 13000 rpm, 4°C u trajanju od 20 min (5417R, Eppendorf). Talog je resuspendovan u denaturišućem rastvoru i postupak je ponovljen. Nakon što je RNK isprecipitirana po drugi put, talog je resuspendovan u 75% etanolu i smeša centrifugirana na 13000 rpm, 4°C u trajanju od 20 min (5417R, Eppendorf). Talog je osušen na sobnoj temperaturi (10-15 min) i resuspendovan u bidestilovanoj vodi bez RNaza. Koncentracija izolovane RNK određena je na Nanovue Plus spektrofotometru (GE Healthcare). Izolovana RNK čuvana je na -80°C.

3.11. Reverzna transkripcija

Sinteza komplementarne DNK (engl. *complementary DNA*, cDNK) urađena je prema protokolu proizvođača reverzne transkriptaze (Thermo Scientific). Kao početna matrica u reakciji reverzne transkripcije korišćeno je 200 ng RNK izolovane iz peritoneumskih ćelija, 500 ng RNK izolovane iz HepG2 ćelija i 1000 ng RNK izolovane iz tkiva šapica.

Određenoj koncentraciji RNK dodato je 100 pmola nasumičnih heksamera (Thermo Scientific) i bidestilovane vode. Finalna zapremina smeše bila je 13 μ l. Smeša je inkubirana 5 min na 65°C u cilju denaturisanja sekundarnih struktura RNK molekula. Zatim je u reakciju dodato: 20 U RiboLock ribonukleaznog inhibitora (Thermo Scientific), 1 mM dNTP smeše (Thermo Scientific), 200 U RevertAid H Minus reverzne transkriptaze (Thermo Scientific) i 1 \times reakcionog pufera, do konačne zapremine od 20 μ l. Uslovi reakcije bili su sledeći: 10 min na 25°C, 60 min na 42°C i 10 min na 70°C. Paralelno, za svaki uzorak postavljena je reakcija bez reverzne transkriptaze kako bi se proverila potencijalna kontaminacija genomskom DNK. Provera sintetisane cDNK, kao i odsustvo kontaminacije genomskom DNK izvršeno je lančanom reakcijom polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR). Reakciona smeša sastojala se iz: 1 U Kapa Taq DNK Polimeraze (Kapa Biosystems, Cape Town, Južna Afrika), 1 \times reakcionog pufera sa magnezijumom, 0,2 mM dNTP (Thermo Scientific), 10 pmola prajmera za konstitutivno eksprimiran gen (β -aktin ili GAPDH) i 1 μ l sintetisane cDNK ili 1 μ l kontrolnog uzorka koji nije sadržao enzim reverznu transkriptazu. PCR program bio je sledeći: početna denaturacija DNK na 94°C 5 min, zatim 30 ciklusa koja su se sastojala iz denaturacije DNK na 94°C 30 s, hibridizacije prajmera na 55°C 30 s i sinteze fragmenata na 72°C 30 s. PCR program završen je sintezom nedovršenih fragmenata na 72°C u trajanju od 7 min. Umnoženi fregmenti provereni su metodom horizontalne elektroforeze na 2% agaroznom gelu. Gelovi su pravljeni rastvaranjem agaroze u 1 \times TAE (engl. 40 mM *Tris-Acetate* pH = 8, 1 mM *EDTA*) puferu uz dodavanje etidijum bromida (0,5 μ g/ml). Elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 80 V. Veličina umnoženih DNK fragmenata određena je pomoću DNK standarda (engl. *GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder*) (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija). PCR i reakcije reverzne transkripcije urađene su u Gene AmpR System 2 700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) aparatu.

3.12. Kvantitativni PCR

Sintetisana cDNK korišćena je za kvantifikaciju ekspresije gena metodom kvantitativnog PCR-a (engl. *quantitative*, qPCR). Konačna zapremina reakcije iznosila je

10 µl i sadržala je 4 pmola prajmera, 1 × KAPA SYBR FAST Universal Master Mix (Kapa Biosystems), 0,2 µl Rox Low Reference boje i 1 µl cDNK matrice. Umnožavanje cDNK izvršeno je aparatom 7500 Real Time System (Applied Biosystems) po sledećem programu: aktivacija enzima 3 min na 95°C i 40 ciklusa od po 15 s na 95°C i od po 60 s na 60°C. Korišćeni prajmeri prikazani su u Tabeli 2 i 3. Efikasnost prajmera i procena količine cDNK potrebne za izvođenje reakcije određeni su u eseju apsolutne kvantifikacije. Korišćena su desetostruka razblaženja cDNK (1/10-1/10000). U eseju relativne kvantifikacije ekspresija gena izračunata je po formuli $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak i Schmittgen, 2001). Vrednost $\Delta\Delta Ct$ (Ct , prazna vrednost ciklusa) predstavlja razliku između ΔCt željenog uzorka i ΔCt uzorka koji je definisan kao kalibrator. Vrednost ΔCt predstavlja razliku između Ct vrednosti dobijene za ciljni gen i Ct vrednosti dobijene za konstitutivno eksprimirani gen (β -aktin ili GAPDH, unutrašnja kontrola). Kao kalibratori postavljene su netretirane ćelije ili zdravi pacovi.

3.13. Eksperimentalne životinje

Eksperimenti su izvedeni na mužjacima pacova Wistar soja težine 200-250 grama koji su uzgajani na farmi Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Životinje su nakon preuzimanja čuvane u Vivarijumu Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu pod standardnim laboratorijskim uslovima: temperatura $22\pm 1^\circ\text{C}$, kontrolisani ciklusi svetla (12 h) i mraka (12 h) i relativna vlažnost vazduha od 60%. Životinje (5-6 pacova po kavezu) su boravile u polipropilenskim kavezima sa žičanom rešetkom sa gornje strane. Hrana u obliku specijalnih briketa za ishranu eksperimentalnih životinja (Vetprom, Beograd, Srbija) i voda bili su dostupni 24 h dnevno. Svi eksperimenti su izvođeni uvek u isto doba dana (od 8 do 16 h), kako bi se izbegle cirkadijalne varijacije u bihevioralnim testovima. Svaka životinja je korišćena u eksperimentu samo jednom. Sve eksperimentalne procedure odobrene su od strane Etičke komisije za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (br. dozvole 323-07-1193/2014-05). U radu sa eksperimentalnim životinjama poštovani su etički principi definisani u Direktivi Evropske Unije o zaštiti životinja koje se koriste u istraživačke svrhe (2010/63/EU), kao i

pravilnikom za rad sa eksperimentalnim životinjama Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.14. Dizajn *in vivo* eksperimenata

Ispitivanje potencijalnog anti-inflamatornog dejstva egzopolisaharida EPS-CG11 izolovanog iz probiotičkog soja *Lb. paraplantarum* BGCG11 urađeno je na eksperimentalnim modelima peritonitisa i inflamatornog bola na pacovima Wistar soja.

3.14.1. Model inflamatornog bola kod pacova

Anti-inflamatorno i antihiperalgzijsko dejstvo egzopolisaharida ispitano je u eksperimentalnom modelu inflamatornog bola po protokolu opisanom od strane Tomić i sar. (2004). Inflamacija je izazvana intraplantarnom (i.pl.) injekcijom karagenina u zadnju desnu šapicu pacova. Karagenin je po hemijskoj strukturi pro-inflamatorni polisaharid izolovan iz crvene alge *Chondrus crispus*. Inflamacija izazvana karageninom je akutnog karaktera, visoko reproducibilna i praćena brzom pojavom kardinalnih znakova zapaljenja kao što su eritem, edem i bolna preosetljivost (hiperalgezija) (Morris, 2003). Zapaljenska reakcija posredovana je oslobađanjem pro-inflamatornih medijatora. Inicijalno dolazi do oslobađanja histamina, bradikinina i serotonina, a kasnije, u održavanju zapaljenske reakcije učestvuju NO, prostaglandini (PGE₂) i citokini oslobođeni iz infiltriranih neutrofila. Medijatori zapaljenja aktiviraju nociceptore i/ili povećavaju njihovu osetljivost na delovanje drugih medijatora u inflamiranom tkivu šapice.

3.14.1.1. Izazivanje inflamacije i tretman

Eksperimentalne životinje (ukupno 24) bile su podeljene u četiri grupe koje su se sastojale od 6 životinja. Svim životinjama inflamacija je izazvana i.pl. injekcijom 1% rastvora λ-karagenina (Sigma-Aldrich; 0,1 ml/šapici). Liofilizovan EPS-CG11 rastvoren je u 0,9% rastvoru NaCl i primenjen intraperitonealno (i.p.) u dozi od 3, 4 i 5 mg/kg u

volumenu od 2 ml/kg (3 test grupe). Kontrolna grupa životinja tretirana je i.p. 0,9% rastvorom NaCl. Svi tretmani primenjeni su 60 min pre karageninske injekcije. Nakon 60 min merena je antiedematozna i antihiperalgezijska aktivnost.

3.14.1.2. Ispitivanje antiedematozne aktivnosti

Razvoj edema i efekat tretmana EPS-CG11 praćen je merenjem volumena šapice pre i nakon izazivanja inflamacije primenom pletizmometra (Ugo Basile, Komerio, Italija) prema protokolu opisanom od strane (Stepanović-Petrović i sar., 2012). Pletizmometar sadrži dve spojene posude ispunjene tečnošću. U veću posudu se uranja šapica pacova uvek do iste anatomske tačke. U drugoj posudi nalazi se elektroda koja registruje povećanje zapremine tečnosti istisnute nakon uranjanja šapice. Rezultat se očitava na ekranu (ml). Bazalni volumen šapice meren je pre izazivanja inflamacije. Posle tretmana volumen šapice meren je u 7 vremenskih tačaka u trajanju od 300 min nakon izazivanja inflamacije. Prosečna vrednost 2 merenja je korišćena u formuli. Rezultati su prikazani kao razlika u volumenu šapice (dV) posle tretmana i pre izazivanja inflamacije po sledećoj formuli:

$$dV \text{ (ml)} = \text{volumen šapice posle tretmana (ml)} - \text{bazalni volumen iste šapice (ml)}.$$

Procenat antiedematoznog dejstva (%AE) tretmana izračunat je prema sledećoj formuli (Stepanović-Petrović i sar., 2012):

$$\%AE = [(\text{srednja vrednost dV kontrolne grupe} - \text{dV vrednost pojedinačne životinje u test grupi}) / \text{srednja vrednost dV kontrolne grupe}] \times 100.$$

3.14.1.3. Ispitivanje antihiperalgezijske aktivnosti

Hiperalgizija i uticaj različitih tretmana na hiperalgiziju merena je na svakih 30 min, 4 h od izazivanja inflamacije primenom Von Frey anesteziometra (IITC Life Science,

Woodland Hills, CA, SAD). Test je izveden prema protokolu koji su predstavili Vivancos i sar. (2004). Tokom testiranja, životinje su bile smeštane u plastične kutijice na rešetkastom postolju. Korišćenjem fleksibilnih filamenata povezanih sa mikroprocesorom za obradu jačine pritiska ispitivano je antihiperalgezijsko dejstvo tretmana na mehaničku stimulaciju. Filamentima se pritiska plantarna regija šapica i trenutak kada životinja ispolji bolno ponašanje (trzaj šapice), na displeju se očitava vrednost pritiska (g). Bazalna vrednost pritiska na šapicu merena je pre indukovanja inflamacije. Posle tretmana pritisak aplikovan na inflamiranu šapicu meren je u 7 vremenskih tačaka u trajanju od 300 min nakon izazivanja inflamacije. Prosečna vrednost 4 merenja je korišćena u formuli. Rezultati su prikazani kao razlika u pritisacima (df) pre (bazalna vrednost) i posle izazivanja inflamacije za svaku vremensku tačku prema formuli (Vivancos i sar., 2004):

$$df(g) = \text{pritisak (g) aplikovan na šapicu pre izazvane inflamacije} - \text{pritisak (g) aplikovan na šapicu posle izazvane inflamacije.}$$

Procenat antihiperalgezijskog dejstva (AH%) tretmana izračunat je prema sledećoj formuli (Stepanović-Petrović i sar., 2012):

$$\%AH = \left[\frac{\text{srednja vrednost df kontrolne grupe} - \text{df vrednost pojedinačne životinje u test grupi}}{\text{srednja vrednost df kontrolne grupe}} \right] \times 100.$$

Po završetku bihejvioralnih testova životinje su žrtvovane rastućom koncentracijom ugljen dioksida. Šapice su uzorkovane, zaleđene u tečnom azotu i sačuvane na -80°C u cilju izolacije RNK i proteina.

3.14.2. Model peritonitisa

Model peritonitisa korišćen je u cilju ispitivanja uticaja EPS-CG11 na migraciju leukocita i produkciju inflamatornih medijatora. Peritonitis je izazvan intraperitonealnom primenom 1% rastvora λ -karagenina (Sigma-Aldrich, 2ml/kg) prateći protokol koji su

opisali Barth i sar. (2016). Životinje (ukupno 15) bile su podeljene u 3 grupe po 5 životinja. Jedan sat pre primene karagenina jedna grupa životinja tretirana je i.p. 0,9% rastvorom NaCl (pozitivna kontrola), dok je druga, i.p. dobila 5 mg/kg EPS-CG11 rastvorenog u 0,9% rastvoru NaCl (test grupa). Treća eksperimentalna grupa tretirana je i.p. samo 0,9% rastvorom NaCl (zdrava kontrola). Nakon četiri sata, životinje su žrtvovane rastućom koncentracijom ugljen dioksida. Peritoneum je ispran sa 4 ml RPMI-1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute-1640*) medijuma (Gibco, Life Technologies) koji je sadržao FBS (10%) kako bi se sakupile peritoneumske ćelije i odredili citokini. Jednake zapremine medijuma (3 ml) sakupljene su iz svake životinje. Kako bi se odredio ukupan broj peritoneumskih ćelija u svakoj životinji, deo sakupljene suspenzije ćelija je $10 \times$ razblažen u *Türk* (gencijana violet u 2% sirćetnoj kiselini) rastvoru. Ćelije su prebrojane pod svetlosnim mikroskopom koristeći hemocitometar (Neubauerova komora). *Türk* rastvor je korišćen kako bi se isključilo potencijalno brojanje eritrocita. Rezultati su predstavljeni kao broj ćelija po ml peritoneumske tečnosti. Suspenzija ćelija je centrifugirana 5 min na 2000 rpm (5417R, Eppendorf). Sakupljeni supernatanti čuvani su na -20°C u cilju određivanja koncentracije citokina, dok je talog ćelija sačuvan na -80°C kako bi se izolovala RNK.

3.15. Elisa test

Elisa test (engl. *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) predstavlja enzimsku imunološku metodu koja je korišćena kako bi se odredila koncentracija TNF- α , IL-6 i IL-10 citokina u peritoneumskoj tečnosti. Metoda se zasniva na primeni antitela specifičnog za određeni antigen koji služi za oblaganje ploče sa 96 bunarića i drugog antitela (specifičnog za isti antigen) koje je konjugovano biotinom. Nastali kompleks antitelo-antigen-antitelo(biotin) detektuje se dodavanjem streptavidina koji je konjugovan sa HRP enzimom. Streptavidin se visokim afinitetom vezuje za biotin. Dodavanje supstrata za HRP (tetrametil benzidin, TMB) dovodi do pojave plave boje. Reakcija se prekida dodavanjem 2 M H₂SO₄. Intenzitet nastale boje direktno je proporcionalan koncentraciji antigena. Koncentracija se tačno određuje korišćenjem standarda i konstruisanjem standardne krive. Koncentracija TNF- α i IL-6 citokina određena je u sakupljenim supernatantima primenom *DuoSet ELISA*

komercijalnog kita (R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD), dok je koncentracija IL-10 određena primenom komercijalnog kita *IL-10 Rat ELISA Kit* (Novex Life Technologies). Testovi su izvedeni prema uputstvima proizvođača.

3.16. Statistička obrada rezultata

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška (engl. *Standard Error of the Mean*, SEM). Statistička obrada rezultata urađena je pomoću SigmaPlot 11 (Systat Software, Inc., Richmond, CA, SAD) i SPSS 20.0 programa za Windows. Grafički prikaz rezultata urađen je u GraphPad Prism programu. Od statističkih testova korišćeni su: Studentov t-test za poređenje kontrolne i test grupe i jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) praćena Tukey *post hoc* testom za poređenje više eksperimentalnih grupa. Za statističku obradu rezultata u bihejvioralnim eksperimentima korišćena je dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) za ponovljena merenja praćena Tukey HSD *post hoc* testom. Dva faktora čiji je uticaj testiran bili su: tretman i vreme. Vrednost verovatnoće $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

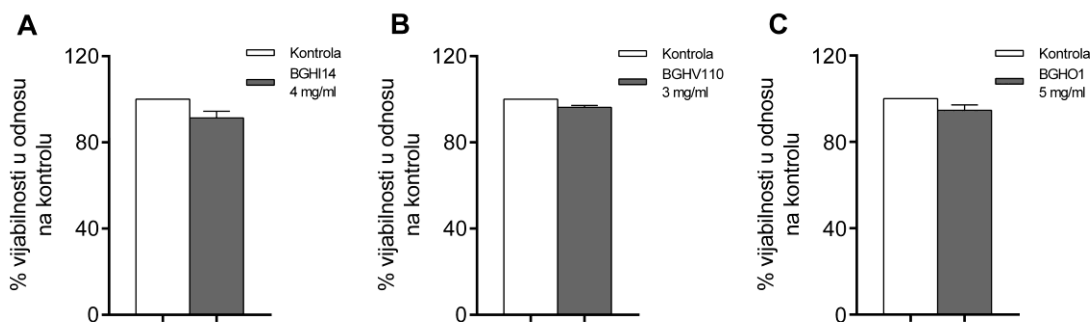
Rezultati

4. REZULTATI

4.1. UTICAJ BIOAKTIVNIH MOLEKULA LAKTOBACILA NA PROCES AUTOFAGIJE U HEPATOCITIMA

4.1.1. Uticaj bakterijskih ekstrakata na proces autofagije u HepG2 ćelijama

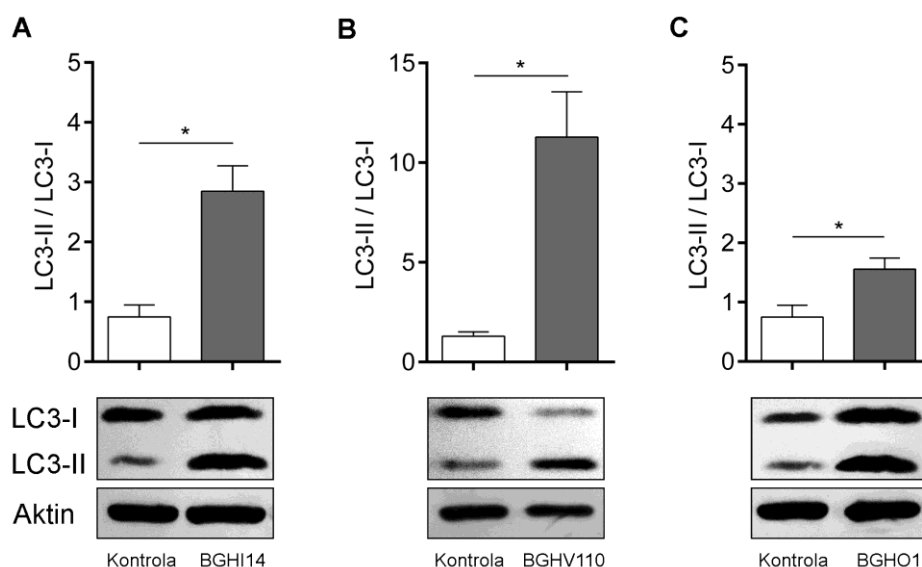
U preliminarnim eksperimentima testirana je sposobnost tri ekstrakta laktobacila iz laboratorijske kolekcije: *Lb. fermentum* BGHI14, *Lb. fermentum* BGHV110 i *Lb. salivarius* BGHO1, da indukuju autofagiju u HepG2 ćelijama, *in vitro*. Sposobnost bakterijskih ekstrakata da stimulišu autofagiju u HepG2 ćelijama praćena je Western blot analizom. Jedan od najčešće korišćenih markera autofagije je LC3 protein koji se nalazi u obliku hidrosolubilne LC3-I forme i liposolubilne LC3-II forme. Konverzija LC3-I u LC3-II formu proteina karakteristična je za stvaranje autofagozoma i povezana je sa povećanjem njihovog broja, odnosno sa povećanim intenzitetom autofagije (Mizushima i sar., 2010). Koncentracije ekstrakata koje ne deluju toksično na HepG2 ćelije nakon primene u trajanju od 16 h ispitivane su MTT testom.



Slika 4. Uticaj bakterijskih ekstrakata na vijabilnost ćelija. HepG2 ćelije tretirane su 16 h ekstraktima sojeva (A) *Lb. fermentum* BGHI14, (B) *Lb. fermentum* BGHV110 i (C) *Lb. salivarius* BGHO1. Metabolička aktivnost ćelija određena je MTT esejom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM triplikata kultura.

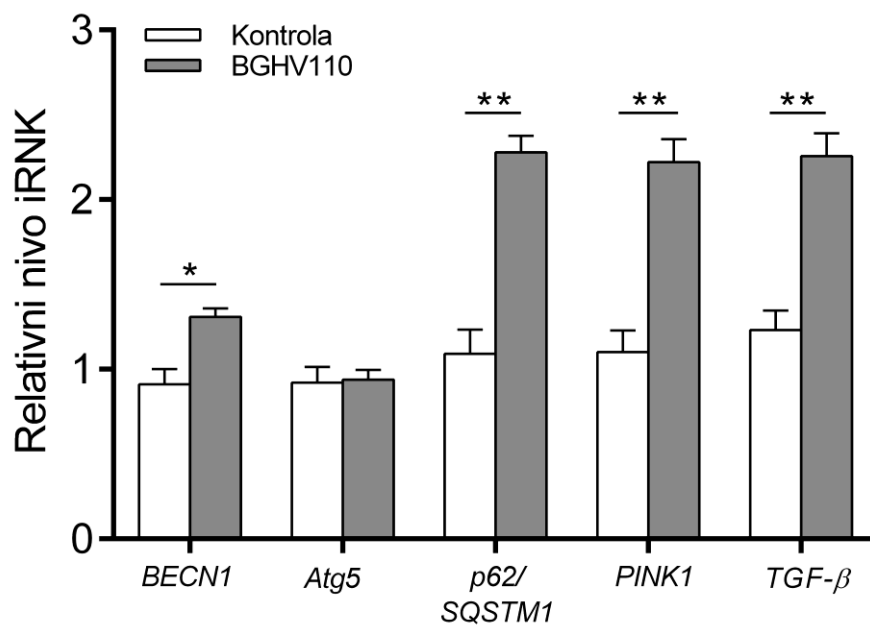
Rezultati MTT esaja (**Slika 4**) pokazali su da metabolička aktivnost nije bila statistički značajno promenjena kada su ćelije tretirane sa: 4 mg/ml BGHI14 ekstrakta ($91,37 \pm 3,09\%$); 3 mg/ml BGHV110 ekstrakta ($96,22 \pm 0,89\%$) i 5 mg/ml BGHO1 ekstrakta ($94,7 \pm 2,4\%$). Ove koncentracije su korišćene u narednim eksperimentima u kojima je testiran uticaj ekstrakata na proces autofagije.

Analizom konverzije LC3 proteina koja je prikazana kao LC3-II/LC3-I odnos, pokazano je da je nivo konverzije najizraženiji u ćelijama tretiranim BGHV110 ekstraktom ($11,28 \pm 2,28$ puta; $p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Ekstrakt pripremljen od soja BGHI14 povećao je konverziju LC3 proteina $2,84 \pm 0,43$ puta ($p < 0,05$), dok je nivo konverzije indukovao od strane BGHO1 bio $1,55 \pm 0,19$ puta ($p < 0,05$) veći u poređenju sa netretiranim ćelijama. Rezultati Western blot analize prikazani su na **Slici 5**. Na osnovu dobijenih rezultata, ekstrakt pripremljen od soja BGHV110 pokazao je najveći potencijal da stimuliše autofagiju i izabran je za dalje eksperimente.



Slika 5. Konverzija LC3 proteina u HepG2 ćelijama pod uticajem bakterijskih ekstrakata. Reprezentativni Western blot i denzitometrijska analiza konverzije LC3 proteina u ćelijama tretiranim odabranim koncentracijama ekstrakata sojeva (A) *Lb. fermentum* BGHI14, (B) *Lb. fermentum* BGHV110 i (C) *Lb. salivarius* BGHO1 u trajanju od 16 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM četvorplikata kultura. Studentov t-test je korišćen za poređenje kontrolne i test grupe (* $p < 0,05$).

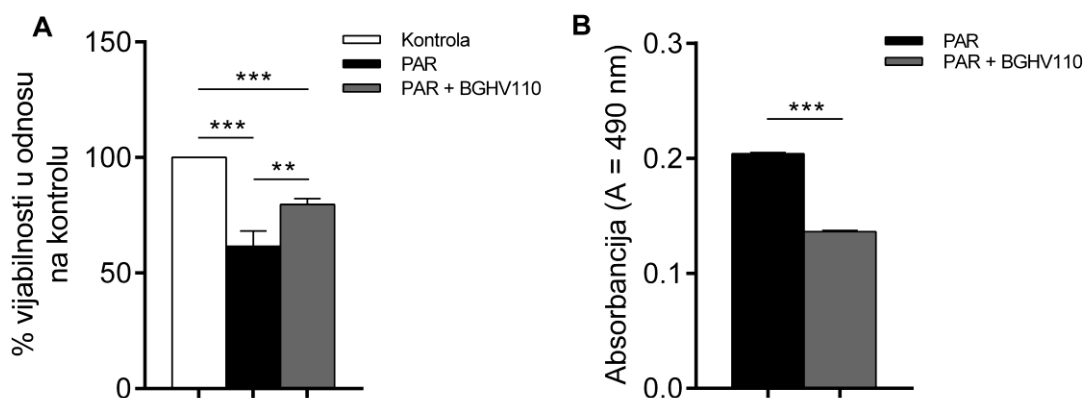
Sposobnost BGHV110 da stimuliše autofagiju potvrđena je analizom transkripcije gena koji su uključeni u proces autofagije. Analizirani su *BECN1*, gen koji kodira beclin-1 protein neophodan za formiranje fagofore na početku procesa, *Atg5*, gen koji kodira Atg5 protein koji učestvuje u procesu ekspanzije fagofore i *p62/SQSTM1*, gen koji kodira adaptorski protein uključen u proces zatvaranja fagofore i regrutovanja materijala za degradaciju. Takođe, analizirana je ekspresija i *PINK1* i *TGF-β* gena. PINK1 funkcioniše kao inicijator uklanjanja oštećenih mitohondrija procesom autofagije (mitofagija), dok je TGF-β citokin za koji je pokazano da stimuliše autofagiju u hepatocitima (Suzuki i sar., 2010). U skladu sa rezultatima dobijenim Western blot metodom, nakon 16 h tretmana BGHV110 ekstraktom, u ćelijama je detektovano statistički značajno povećanje nivoa iRNK za *BECN1* ($p < 0,05$), *p62/SQSTM1* ($p < 0,01$), *PINK1* ($p < 0,01$) i *TGF-β* ($p < 0,01$) gene, bez promene u nivou iRNK za *Atg5* gen (**Slika 6**).



Slika 6. Uticaj BGHV110 ekstrakta na ekspresiju gena u HepG2 ćelijama. Ćelije su tretirane BGHV110 ekstraktom u trajanju od 16 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM triplikata kultura. Studentov t-test je korišćen za poređenje kontrolne i test grupe (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

4.1.2. Efekat ekstrakta soja *Lactobacillus fermentum* BGHV110 u *in vitro* modelu hepatotoksičnosti izazvane paracetamolom

U skladu sa pokazanim pozitivnim efektom BGHV110 ekstrakta na proces autofagije u hepatocitima, dalje je analiziran njegov potencijal da uspori ili umanjí oštećenje ćelija izloženih toksičnoj koncentraciji paracetamola. Metabolička aktivnost ćelija merena je pomoću MTT eseja. Rezultati su pokazali da tretman paracetamolom u koncentraciji od 50 mM dovodi do statistički značajnog smanjenja metaboličke aktivnosti sa 100% na $61,5 \pm 6,65\%$ ($p < 0,001$) u poređenju sa kontrolnim ćelijama. Međutim, ćelije koje su pored paracetamola tretirane i BGHV110 ekstraktom pokazale su statistički značajno veću metaboličku aktivnost ($79,7 \pm 2,47\%$) u poređenju sa ćelijama tretiranim samo paracetamolom ($p < 0,01$) (Slika 7A). Paralelno, toksičnost tretmana praćena je određivanjem nivoa oslobođenog LDH enzima iz ćelija. Rezultati su pokazali statistički značajno manji nivo LDH enzima u medijumu kada su pored paracetamola ćelije bile izložene i BGHV110 ekstraktu ($p < 0,001$) (Slika 7B).

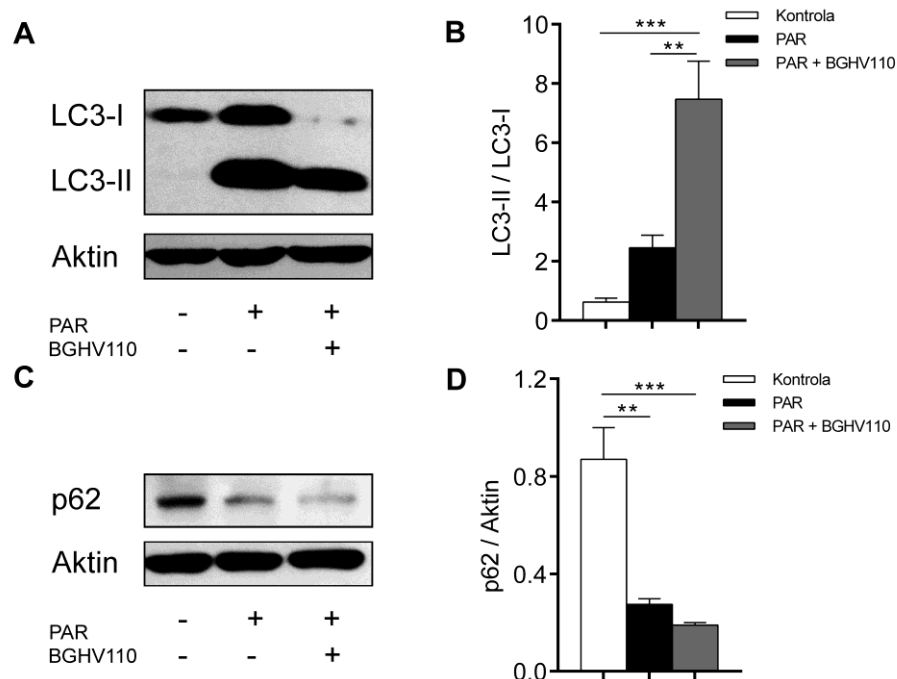


Slika 7. Uticaj BGHV110 ekstrakta na vijabilnost HepG2 ćelija tretiranih toksičnom koncentracijom paracetamola. Ćelije su ko-tretirane 50 mM paracetamolom (PAR) i BGHV110 ekstraktom u trajanju od 16 h. Vijabilnost ćelija određena je (A) MTT i (B) LDH esejima. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM četvoroplikata (MTT) i triplikata (LDH) kultura. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.1.3. Autofagija kao mehanizam koji posreduje u hepatoprotektivnom efektu BGHV110

4.1.3.1. Uticaj BGHV110 ekstrakta na autofagiju u HepG2 ćelijama izloženim toksičnoj koncentraciji paracetamola

Paralelno sa testovima vijabilnosti, urađena je Western blot analiza konverzije LC3 proteina kako bi se ispitalo da li je autofagija mehanizam kojim BGHV110 ekstrakt ostvaruje zaštitni efekat. Rezultati su pokazali da je LC3-II/LC3-I odnos statistički značajno povećan kod ćelija ko-tretiranih paracetamolom i BGHV110 ekstraktom u odnosu na kontrolne ćelije ($p < 0,001$) i ćelije tretirane samo paracetamolom ($p < 0,01$) (Slika 8A,B).

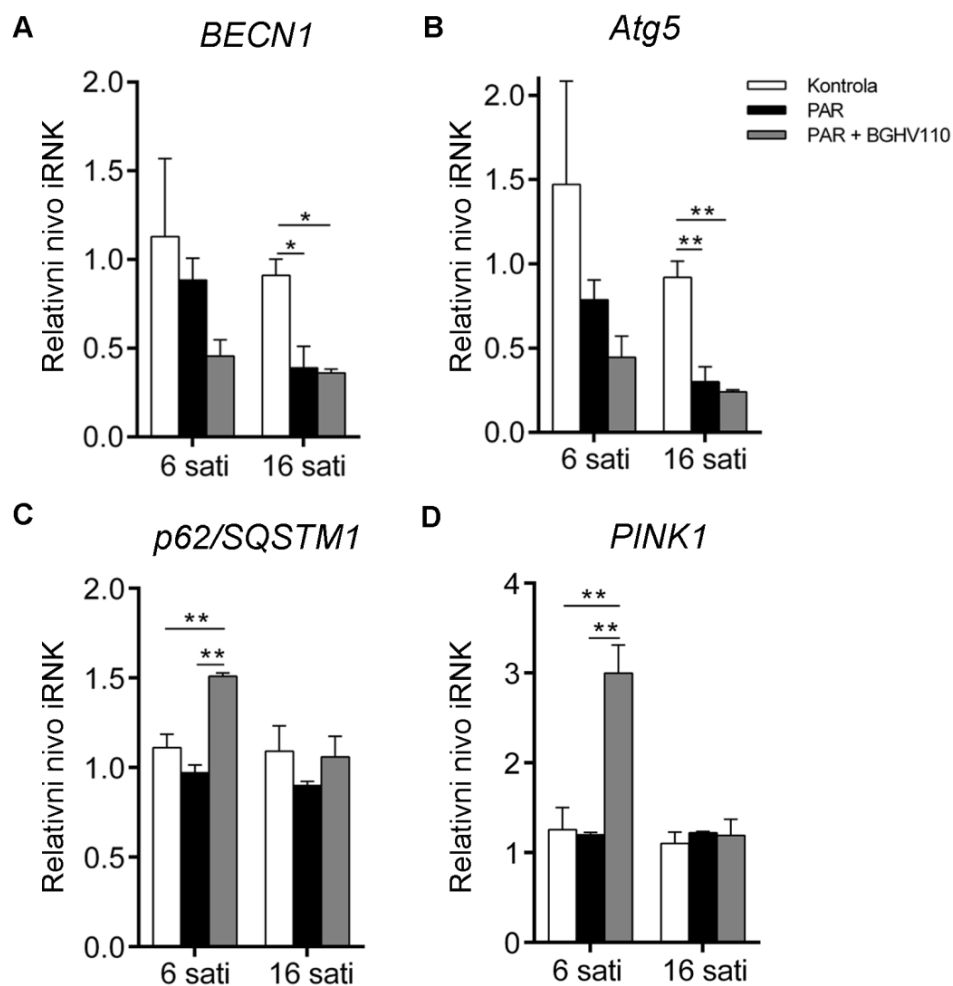


Slika 8. Uticaj BGHV110 ekstrakta na autofagiju u HepG2 ćelijama tretiranim toksičnom koncentracijom paracetamola. (A) Konverzija LC3 proteina i (C) ekspresija p62 proteina analiziranih Western blot metodom i (B, D) odgovarajuća denzitometrijska analiza. Ćelije su tretirane 50 mM paracetamolom (PAR) i BGHV110 ekstraktom u trajanju od 16 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM petoplikata (LC3) i četvoroplikata (p62) kultura. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Iako je na osnovu literature poznato da se autofagija aktivira kao zaštitni odgovor ćelije na izloženost toksičnoj koncentraciji paracetamola, određivanjem LC3-II/LC3-I odnosa nije dobijena statistički značajna razlika između paracetamolom tretiranih i kontrolnih ćelija. Kako LC3-II forma odražava broj autofagozoma u ćeliji, a s obzirom da je ova forma u ko-tretmanu bila nešto manje ekspimirana u odnosu na onu prisutnu u ćelijama tretiranim paracetamolom, dodatno je ispitana ekspresija p62 proteina, čija degradacija odražava aktiviranu autofagiju (Mizushima i sar., 2010). Ekspresija p62 proteina bila je najmanja u ćelijama ko-tretiranim paracetamolom i BGHV110 ekstraktom ($p < 0,001$). Značajno smanjenje uočeno je i kod ćelija tretiranih samo paracetamolom ($p < 0,01$), što je potvrdilo već poznatu činjenicu da paracetamol stimuliše autofagiju (**Slika 8C,D**). Degradacija p62 proteina bila je izraženija u ko-tretmanu u poređenju sa ćelijama tretiranim paracetamolom, što je bilo u skladu sa zaključkom izvedenim na osnovu konverzije LC3 proteina. Iako statistički značajna razlika između ko-tretmana i tretmana paracetamolom nije postignuta zbog razlika u nivoima ekspresije p62 proteina u nezavisnim ponavljanjima, bio je evidentan opadajući trend u ekspresiji p62 proteina.

U daljim eksperimentima analizirana je ekspresija ostalih gena uključenih u proces autofagije. Generalno, u ćelijama ko-tretiranim paracetamolom i BGHV110 ekstraktom, kao i onim ćelijama koje su bile tretirane samo paracetamolom uočeno je smanjenje nivoa transkripcije *BECN1* i *Atg5* gena u poređenju sa kontrolnim ćelijama (**Slika 9A,B**). Ovo smanjenje transkripcije nije bilo statistički značajno nakon 6 h tretmana, međutim analiza ekspresije iRNK nakon 16 h pokazala je statistički značajno smanjenje u oba tretmana u poređenju sa kontrolnim ćelijama (*BECN1*, $p < 0,05$ i *Atg5*, $p < 0,01$). Razlike između ćelija ko-tretiranih paracetamolom i BGHV110 ekstraktom i ćelija tretiranih samo paracetamolom nije zapažena, sugerišući da je supresija ekspresije *BECN1* i *Atg5* gena posledica dejstva visoke koncentracije paracetamola. Ovi rezultati ukazuju na sniženu autofagiju kod ćelija tretiranih paracetamolom ili u ko-tretmanu što je u suprotnosti sa rezultatima dobijenim analizom ekspresije proteina LC3-II/LC3-I i p62. Zbog nesklada između dobijenih rezultata analizirano je da li je drugi signalni put odgovoran za proces autofagije u ovim ćelijama. Kako su mitohondrije u ćeliji prve pogođene toksičnim delovanjem paracetamola, ispitano je da li aktivacija PINK1-Parkin signalnog puta

učestvuje u indukciji autofagije oštećenih mitohondrija (mitofagija) u našim eksperimentalnim uslovima. Analizirana je ekspresija *PINK1* gena, koji funkcioniše kao inicijator mitofagije i *p62/SQSTM1* gena, koji je neophodan za završetak procesa.

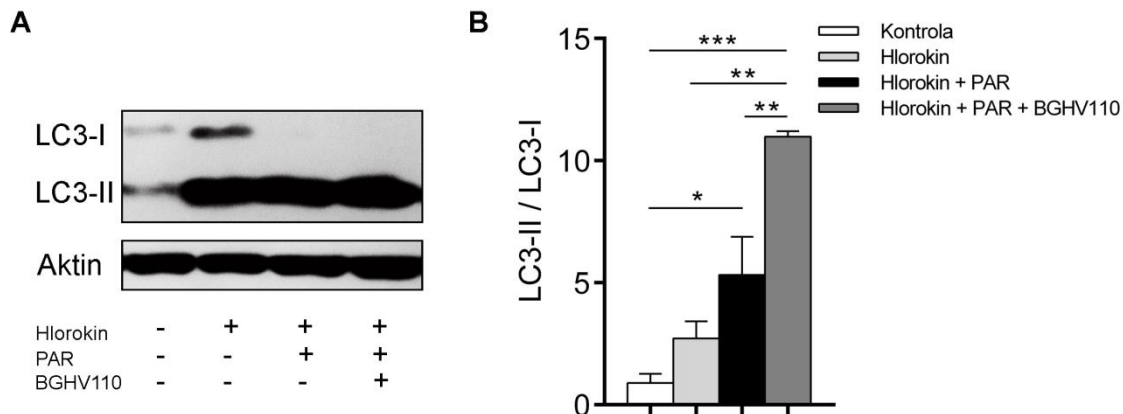


Slika 9. Uticaj BGHV110 ekstrakta na ekspresiju gena u HepG2 ćelijama tretiranim toksičnom koncentracijom paracetamola. (A) Ekspresija *BECN1*, (B) *Atg5*, (C) *p62/SQSTM1* i (D) *PINK1* gena u ćelijama koje su tretirane 50 mM paracetamolom (PAR) i BGHV110 ekstraktom u trajanju od 6 h i 16 h. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM triplikata kultura. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Nivo transkripcije *PINK1* i *p62/SQSTM1* gena nakon 6 h tretmana bio je značajno veći u ćelijama ko-tretiranim paracetamolom i BGHV110 ekstraktom u poređenju sa ćelijama tretiranim samo paracetamolom i kontrolnim ćelijama (*PINK1*, $p < 0,01$ i *p62/SQSTM1*, $p < 0,01$). Nakon 16 h tretmana, nivo iRNK ovih gena bio je na istom nivou kao u kontrolnim ćelijama (Slika 9C,D).

4.1.3.2. Analiza autofagnog fluksa

Povećana konverzija LC3 proteina u kojoj dominira akumulacija LC3-II forme, može ukazati i na inhibiciju nishodnih procesa uključenih u autofagiju. Iz tog razloga neophodno je bilo analizirati autofagni fluks koji odražava dinamiku samog procesa. Autofagni fluks analiziran je primenom autofagnog inhibitora hlorokina. Hlorokin povećava pH vrednost unutar lizozoma što dovodi do inhibicije autofagne proteolize, koja se eksperimentalno uočava povećanom konverzijom LC3 proteina i akumulacijom LC3-II forme.

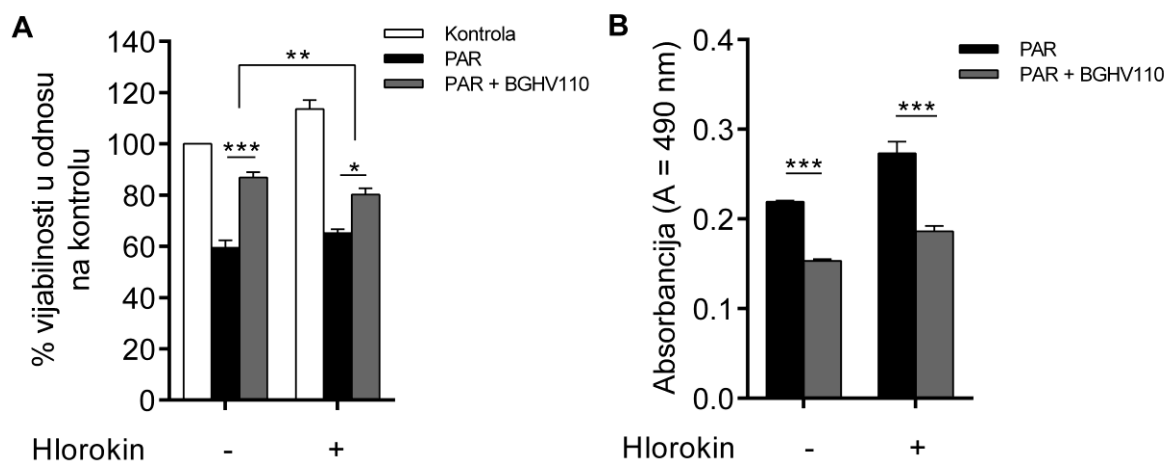


Slika 10. Uticaj BGHV110 ekstrakta na autofagni fluks u HepG2 ćelijama tretiranim toksičnom koncentracijom paracetamola. (A) Reprezentativni Western blot konverzije LC3 proteina i (B) denzitometrijska analiza. Ćelije su tretirane 50 mM paracetamolom (PAR) i BGHV110 ekstraktom u trajanju od 16 h u prisustvu ili odsustvu hlorokina (4 h; 25 μ M). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM triplicate kultura. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Primenom BGHV110 ekstrakta i paracetamola u prisustvu hlorokina značajno je povećana konverzija LC3 proteina u poređenju sa ćelijama tretiranim samo hlorokinom ($p < 0,01$). Takođe, u prisustvu hlorokina, postojala je statistički značajna razlika između ćelija ko-tretiranih BGHV110 ekstraktom i paracetamolom i ćelija tretiranih samo paracetamolom ($p < 0,01$). Uočeno je da je i sam paracetamol povećao autofagni fluks ($p < 0,05$) (**Slika 10A,B**).

4.1.3.3. Inhibicija autofagije smanjuje hepatoprotektivni efekat BGHV110

Na osnovu prikazanih rezultata, konačna potvrda da je autofagija mehanizam koji posreduje u hepatoprotektivnom efektu BGHV110 ekstrakta, dobijena je u eksperimentu inhibicije autofagije i praćenja vijabilnosti ćelija. Autofagija je inhibirana hlorokinom u isto vreme kada su ćelije tretirane paracetamolom sa ili bez ekstrakta. Hlorokin u koncentraciji od 25 μM nije uticao na vijabilnost ćelija u toku tretmana.



Slika 11. Uticaj inhibicije autofagije na vijabilnost ćelija tretiranih BGHV110 ekstraktom i toksičnom koncentracijom paracetamola. Ćelije su ko-tretirane 50 mM paracetamolom (PAR) i BGHV110 ekstraktom u trajanju od 16 h u prisustvu ili odsustvu hlorokina (16 h; 25 μM). Vijabilnost ćelija određena je (A) MTT i (B) LDH esejima. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM triplikata kultura. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Rezultati MTT esejja pokazali su da je razlika u metaboličkoj aktivnosti između ćelija tretiranih samo paracetamolom i onih ko-tretiranih BGHV110 ekstraktom i paracetamolom u odsustvu hlorokina, bila statistički značajno veća ($27,42 \pm 1,86\%$) od iste te razlike u tretmanima kod kojih je hlorokin bio dodat ćelijama ($15,07 \pm 1,21\%$; $p < 0,01$). Tačnije, može se reći da je hlorokin smanjio metaboličku aktivnost ćelija koje su bile izložene paracetamolu i BGHV110 ekstraktu u poređenju sa istim tim tretmanom kada hlorokin nije bio prisutan (**Slika 11A**). Sa druge strane, LDH esej je pokazao da se u medijumu ćelija izloženih hlorokinu detektuje nešto veći nivo oslobođenog enzima u odnosu na tretmane bez hlorokina, ali ovaj efekat nije statistički značajan (**Slika 11B**).

4.2. IMUNOMODULATORNI EFEKAT EGZOPOLISAHARIDA SOJA *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11

4.2.1. Fizičko-hemijska karakterizacija egzopolisaharida EPS-CG11

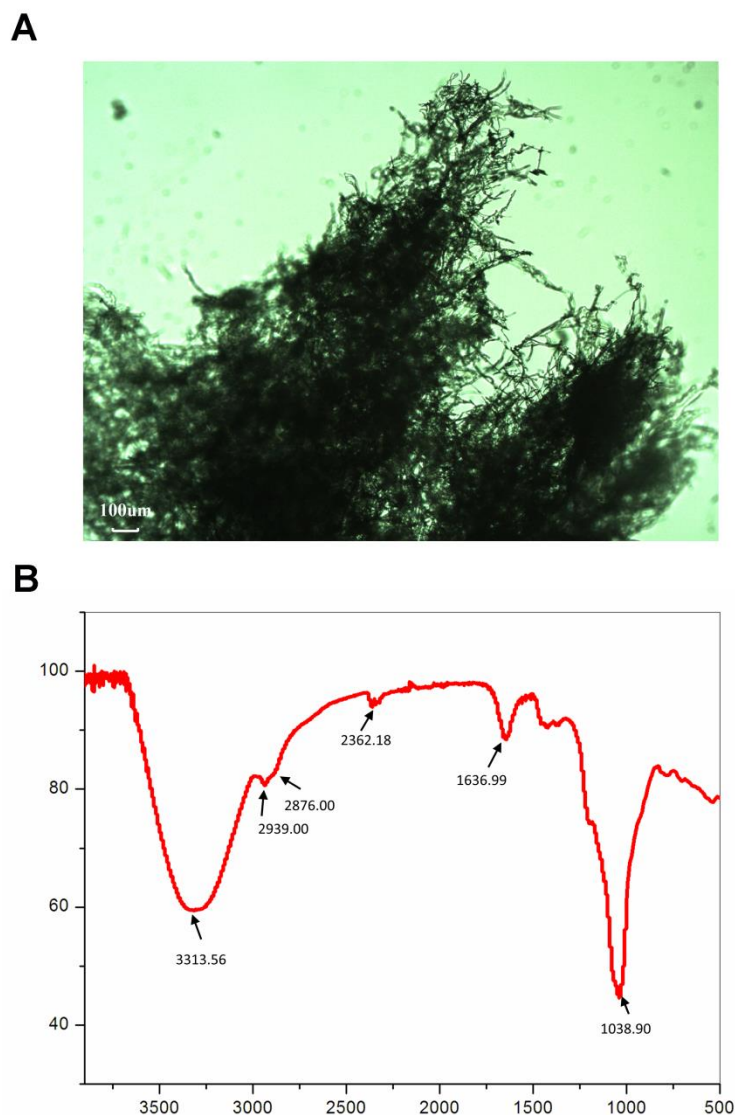
Važan korak u razvojnem procesu novog leka je definisanje fizičko-hemijskih osobina molekula i identifikacija farmakofora odgovornih za njegovo terapijsko dejstvo. Poznavanje ovih osobina omogućava da se adekvatnom formulacijom spreči degradacija molekula i obezbedi efektivna primena i delovanje leka.

4.2.1.1. Kvalitativna analiza EPS-CG11

U prvom koraku, izolovani egzopolisaharid EPS CG11 analiziran je pod svetlosnim mikroskopom. Na reprezentativnoj mikrografiji uočava se da je polisaharid vlaknaste morfologije veličine oko nekoliko mikrometara (**Slika 12A**). Vlakna su međusobno isprepletana u formi trodimenzionalne mreže. Ovakva strukturna organizacija EPS-CG11 smatra se veoma uobičajnom za biopolimere (Urbani i sar., 2012).

Analizom FTIR spektra izolovanog materijala utvrđeno je da se zaista radi o polisaharidu. Svaki molekul poseduje sebi svojstven spektar u IR oblasti tako da se primenom FTIR metode mogu identifikovati funkcionalne grupe i hemijske veze prisutne u

molekulu. FTIR spektar EPS-CG11 prikazan je na **slici 12B**. Analizom spektra otkriveno je prisustvo hidroksilnih, karboksilnih i amidnih grupa karakterističnih za tipični polisaharid. Apsorpcioni maksimum na $3313,56\text{ cm}^{-1}$ odgovara vibracijama -OH i -NH grupa (Coates i sar., 2006).



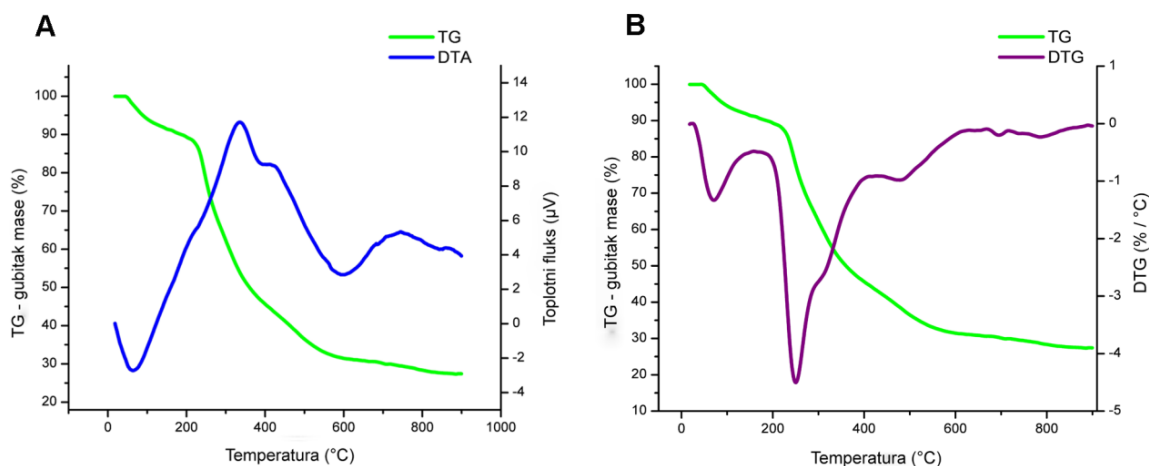
Slika 12. (A) Reprezentativna mikrofografija i (B) FTIR spektar EPS-CG11 izolovanog iz soja *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11.

Literaturni podaci ukazuju da se postojanje velikog broja hidroksilnih grupa ispoljava u obliku intenzivnih istežućih vibracija na ovoj talasnoj dužini (Nataraj i sar., 2008). Ova

vibracija karakteriše ugljovodonični prsten koji je odgovoran za hidrosolubilnost molekula. Male trake na 2939 cm^{-1} i 2876 cm^{-1} javljaju se kao posledica C–H istežućih vibracija karakterističnih za metilenske (–CH₂) i/ili metil (–CH₃) grupe prisutne u heksozama (glukoza ili galaktoza) ili deoksiheksozama (ramnoza). Apsorpcioni maksimum na $2362,18\text{ cm}^{-1}$ odgovara C–O istežućoj vibraciji. Traka na $1636,99\text{ cm}^{-1}$ odgovara C=O grupi, dok je traka na $1038,90\text{ cm}^{-1}$ posledica istežuće vibracije C–O grupe ili fosfatne funkcionalne grupe i usko je povezana sa alkoholima, etrima ili polisaharidima (Coates i sar., 2006). Literatura ukazuje da se acetat, piruvat, sukcinat i fosfat često mogu naći kao konstituenti polisaharida (Lembre i sar., 2012). Poslednja traka u spektru na $1038,90\text{ cm}^{-1}$ takođe potvrđuje polisaharidnu strukturu izolovanog polimera (Nataraj i sar., 2008).

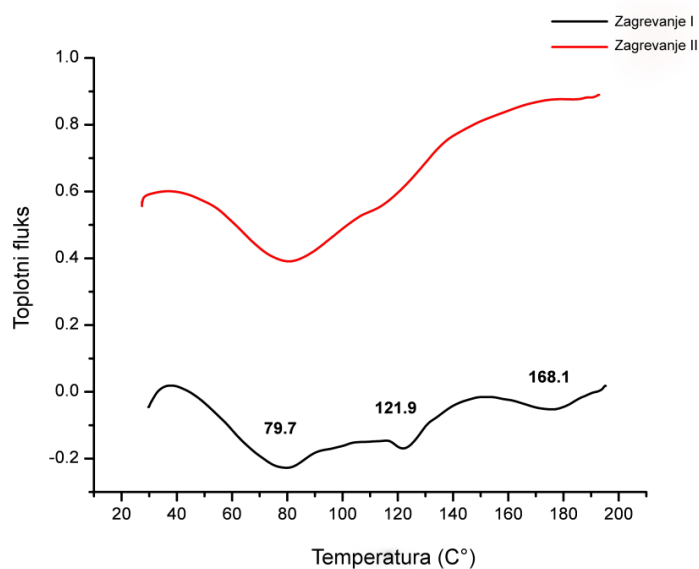
4.2.1.2. Termičke osobine EPS-CG11

Lekovite supstance koje prolaze kroz farmaceutsko-tehnološke procese koji podrazumevaju visoku temperaturu, moraju posedovati zadovoljavajuće termičke osobine kako bi se usled apsorpcije ili emisije toplote izbegle potencijalne strukturne deformacije, degradacija ili topljenje. Stoga su termičke osobine EPS-CG11 određene primenom termogravimetrijske analize (**Slika 13A,B**). Razgradnja polisaharida uzrokovana povećanom temperaturom odvija se kroz nekoliko različitih faza (Chowdhury i sar., 2011). Na početku procesa, gubitak mase uzrokovan je evaporacijom adsorbovane i kristalne vode. Kod EPS-CG11 ova dva procesa su kombinovana i odvijaju se u intervalu $46\text{--}215^\circ\text{C}$ sa gubitkom mase od 11,5%. Sledeća faza podrazumeva dekompoziciju molekula usled raskidanja C–O i C–C veza što je praćeno evaporacijom CO, CO₂ i vode. Ova faza se odvija u temperaturnom intervalu $215\text{--}663^\circ\text{C}$ i praćena je gubitkom mase od 58,1%. Najveći gubitak mase uzorka odigrava se na temperaturi od $250,3^\circ\text{C}$. Preciznije, na osnovu DTG signala koji odražava gubitak mase u odnosu na temperaturu ova faza se može podeliti na 3 podfaze: (i) $215\text{--}264^\circ\text{C}$ sa gubitkom mase od 16,3%; (ii) $264\text{--}409^\circ\text{C}$ sa gubitkom mase od 27,6% i (iii) $409\text{--}663^\circ\text{C}$ sa gubitkom mase od 14,2%. I konačno u intervalu od $680\text{--}895^\circ\text{C}$ detektuje se mali gubitak mase od 3,1%. Na kraju analize uočen je suvi ostatak koji se može povezati sa Na⁺, K⁺, Ca²⁺ i PO₄³⁻.



Slika 13. Analiza termičke stabilnosti EPS-CG11 izolovanog iz soja *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. (A) TG/DTA i (B) TG/DTG krive dobijene termogravimetrijskom analizom.

Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija urađena je zagrevanjem uzorka do 200°C, pošto je na osnovu TG analize pokazano da je EPS-CG11 stabilan u ovom opsegu temperatura. DSC analiza je pokazala da EPS-CG11 apsorbuje toplotu na temperaturi od: 79,7, 121,9 i 168,1°C (**Slika 14**).



Slika 14. DSC termogram EPS-CG11 izolovanog iz soja *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11.

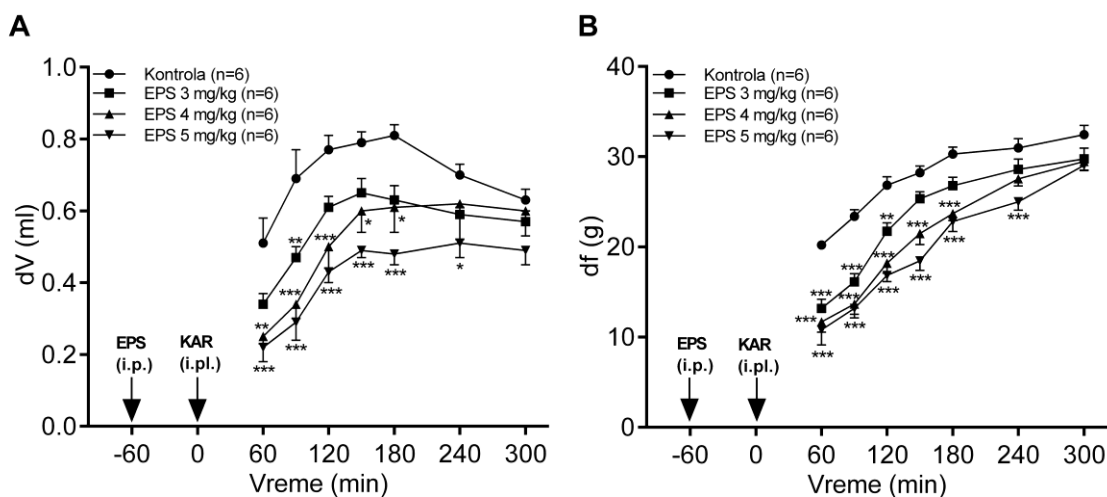
Kako bi se potvrdilo da su endotermni događaji posledica evaporacije vode, uzorak je nakon hlađenja drugi put zagrejan do 200°C. U ovom eksperimentu endotermni događaji nisu uočeni, što je potvrdilo da promene u uzorku dolaze isključivo od evaporacije vode i ne utiču na strukturu polimera.

4.2.2. Efekti EPS-CG11 u eksperimentalnom modelu inflamatornog bola

U modelu inflamatornog bola kod pacova, EPS-CG11 je ispoljio statistički značajno, dozno-zavisno antiedematozno i antihiperalgzijsko dejstvo nakon sistemske primene.

4.2.2.1. Uticaj EPS-CG11 na razvoj edema i hiperalgzije

Nakon sistemske primene, (3-5 mg/kg; i.p.) EPS-CG11 je statistički značajno i dozno zavisno smanjio razvoj edema koji nastaje kao posledica injekcije karagenina ($p < 0,001$). Najizraženiji antiedematozni efekat uočen je u intervalu između 60-90 min nakon aplikovanja karagenina, a odgovarajući %AE iznose: 34, 51,3 i 58 za doze od 3, 4 i 5 mg/kg (**Slika 15A**). Takođe, sistemska primena navedenih doza EPS-CG11 dovela je do statistički značajnog smanjenja razlika u pritiscima df (g) aplikovanih na šapicu pre i posle izazivanja inflamacije ($p < 0,001$). Maksimalno anti-hiperalgzijsko dejstvo EPS-CG11 je ispoljio 60 min nakon injekcije karagenina, a odgovarajući %AH iznose: 34,8, 42,2 i 46,5 za doze od 3, 4 i 5 mg/kg (**Slika 15B**). Kako je doza od 5 mg/kg ispoljila najizraženiji efekat na edem i hiperalgziju, izabrana je za dalje eksperimente i analize.

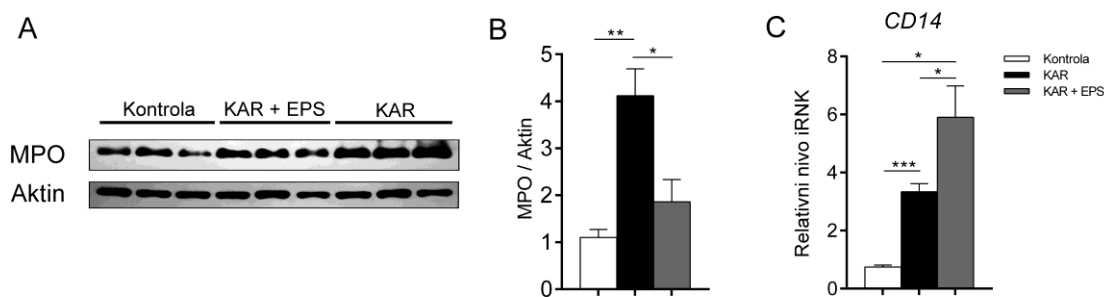


Slika 15. Vremenski tok sistemskog antiedematoznog i antihiperalgezijskog dejstva EPS-CG11 (EPS). Rezultati su predstavljeni kao: **(A)** razlika u volumenu šapica dV (ml) između post-tretmana i bazalnog volumena šapica i **(B)** razlika u pritiscima aplikovanih na šapicu df (g) pre i posle izazivanja inflamacije. EPS je primenjen sistemski (i.p.) 60 min pre injekcije karagenina (KAR) (označeno strelicama). Svaka tačka predstavlja srednju vrednost \pm SEM razlike u volumenu šapica (dV) ili aplikovanog pritiska (df) dobijenih testiranjem 6 životinja. Dvofaktorska ANOVA za ponovljena merenja praćena Tukey HSD *post hoc* testom je korišćena za poređenje tretmana u odnosu na kontrolu (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.2.2. Analiza infiltriranih ćelija u inflamiranom tkivu šapica

Druga faza inflamatornog procesa izazvanog karageninom praćena je infiltracijom ćelija (pretežno neutrofila), koje doprinose održavanju inflamacije produkcijom citokina. U cilju analize uticaja EPS-CG11 tretmana na infiltraciju ćelija, praćena je ekspresija MPO enzima i CD14 molekula u tkivu šapica. MPO se oslobađa iz granula neutrofila nakon njihove aktivacije, pa se može koristiti kao pouzdani marker aktivacije i infiltracije neutrofila (Lau i sar., 2005). CD14 molekul funkcioniše kao LPS vezujući protein koji interaguje sa TLR4 dovodeći do aktivacije ćelija. Kako je njegova ekspresija najizraženija na površini cirkulišućih monocita i tkivnih makrofaga, često se koristi kao njihov marker. Rezultati Western blot analize su pokazali da je u šapicama životinja kod kojih je sistemski primenjen EPS-CG11, statistički značajno smanjena ekspresija MPO enzima u poređenju sa životinjama koje su dobile samo injekciju karagenina ($p < 0,05$). Takođe, očekivano

injekcija karagenina je značajno povećala ekspresiju MPO enzima u poređenju sa zdravim kontrolama ($p < 0,01$) (**Slika 16A,B**). Ovaj rezultat nedvosmisleno ukazuje da EPS-CG11 suprimira aktivaciju neutrofila i/ili smanjuje njihovu infiltraciju na mestu inflamacije. Sa druge strane, nivo iRNK za *CD14* molekul bio je statistički značajno veći u šapicama životinja kod kojih je pre izazivanja inflamacije sistemski primenjen EPS-CG11, u poređenju sa životinjama koje su tretirane samo karageninom ($p < 0,05$). (**Slika 16C**).

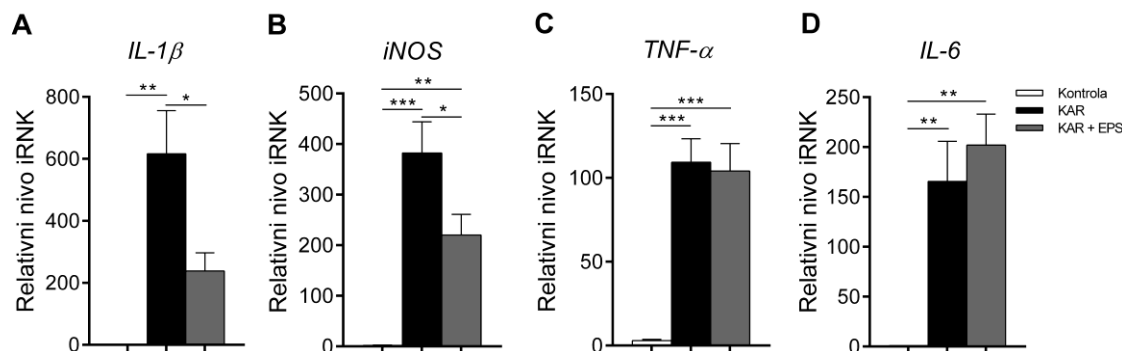


Slika 16. Uticaj sistemske primene EPS-CG11 na infiltraciju ćelija u modelu inflamatornog bola. (A) Reprezentativni Western blot i (B) denzitometrijska analiza ekspresije MPO enzima i (C) nivo iRNK *CD14* molekula u tkivu šapica pacova tretiranih i.p. sa 5 mg/kg EPS-CG11, 60 min pre injekcije karagenina (KAR). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM šest životinja. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.2.2.3. Ekspresija inflamatornih medijatora u tkivu šapica

U daljim eksperimentima analizirana je ekspresija gena za pro-inflamatorne citokine (TNF- α , IL-1 β i IL-6), kao i iNOS kako bi se utvrdilo da li je transkripcija ovih gena potencijalno inhibirana dejstvom EPS-CG11. Kao što je bilo i očekivano injekcija karagenina dovela je do povećanja transkripcije svih testiranih gena u poređenju sa zdravim kontrolama. Ekspresija *IL-1 β* i *iNOS* gena bila je statistički značajno manja u grupi životinja kod kojih je EPS-CG11 primenjen sistemski pre karageninske injekcije u poređenju sa karageninskom kontrolom ($p < 0,05$) (**Slika 17A,B**). Međutim, sistemska

primena EPS-CG11 nije uticala na transkripciju *TNF- α* i *IL-6* gena, koja je ostala na visokom nivou (Slika 17C,D).



Slika 17. Uticaj sistemske primene EPS-CG11 na ekspresiju pro-inflamatornih medijatora u modelu inflamatornog bola. Nivo ekspresije (A) *IL-1 β* , (B) *iNOS*, (C) *TNF- α* i (D) *IL-6* iRNK u tkivu šapica pacova tretiranih i.p. sa 5 mg/kg EPS-CG11, 60 min pre injekcije karagenina (KAR). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM šest životinja. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

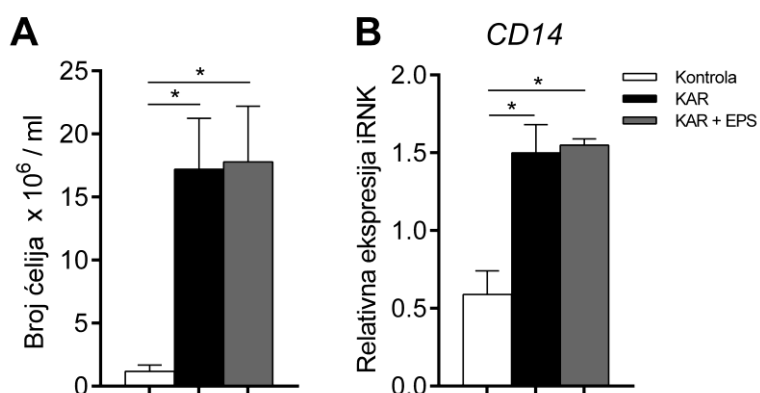
4.2.3. Efekti EPS-CG11 u eksperimentalnom modelu peritonitisa

U modelu peritonitisa kod pacova, nakon sistemske primene EPS-CG11, u peritoneumu je predominantno detektovano prisustvo anti-inflamatornih medijatora čime je potvrđeno da EPS-CG11 reguliše produkciju pro-inflamatornih citokina.

4.2.3.1. Uticaj EPS-CG11 na infiltraciju ćelija

Na osnovu poznatih činjenica iz literature, i.p. injekcija karagenina uzrokuje migraciju leukocita (pretežno neutrofila) u peritoneumsku šupljinu. Rezultati našeg eksperimenta bili su u skladu sa literaturnim podacima, jer je broj ukupnih ćelija prisutnih u peritoneumu 4 h po davanju karagenina bio statistički značajno veći u poređenju sa zdravim kontrolama ($p < 0,05$). Međutim, sistemska primena EPS-CG11 nije imala uticaja na

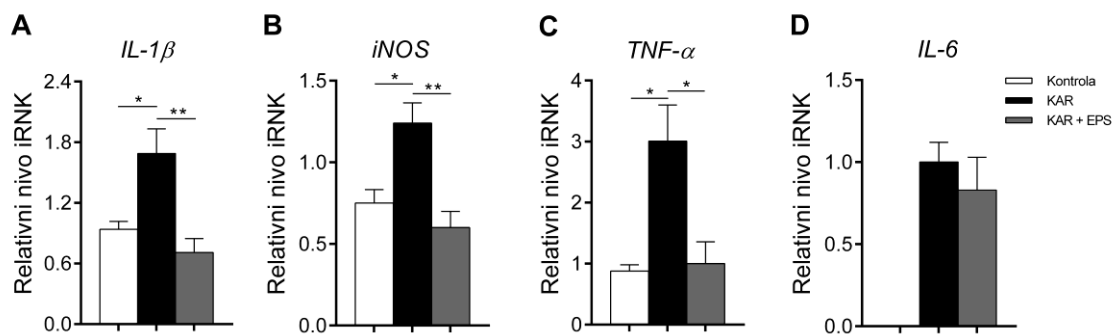
infiltraciju ćelija, koja je bila u nivou karageninskih kontrola (**Slika 18A**). Dodatno, u peritoneumskim ćelijama nije detektovana promena transkripcije *CD14* gena uzrokovana sistemskom primenom EPS-CG11 (**Slika 18B**). Na osnovu dobijenih rezultata, jasno je da u modelu peritonitisa EPS-CG11 nije uticao na migraciju ćelija uzrokovanu karageninom.



Slika 18. Uticaj sistemske primene EPS-CG11 na infiltraciju ćelija u modelu peritonitisa. (A) Broj ćelija u peritoneumu i (B) nivo *CD14* iRNK u peritoneumskim ćelijama. Životinje su tretirane i.p. sa 5 mg/kg EPS-CG11 60 min pre i.p. injekcije karagenina (KAR). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM pet životinja. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* $p < 0,05$).

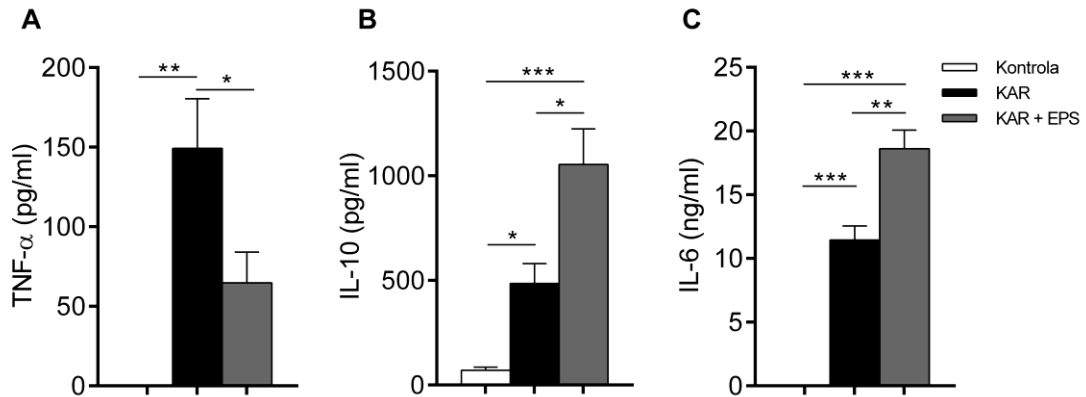
4.2.3.2. Ekspresija medijatora inflamacije u peritoneumu

Pored praćenja stepena infiltracije ćelija nakon primene EPS-CG11, analiziran je i nivo transkripcije gena za *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6* i *iNOS* u infiltriranim ćelijama prisutnim u peritoneumu. Primena EPS-CG11 60 min pre karageninske injekcije dovela je do statistički značajnog smanjenja nivoa iRNK za *TNF- α* ($p < 0,05$), *IL-1 β* ($p < 0,01$) i *iNOS* ($p < 0,01$) u poređenju sa karageninskom kontrolom (**Slika 19A,B,C**). Jedino je transkripcija gena za *IL-6* nakon karageninske injekcije ostala ista nakon sistemske primene EPS-CG11 u poređenju sa karageninskom kontrolom (**Slika 19D**).



Slika 19. Uticaj sistemske primene EPS-CG11 na ekspresiju pro-inflamatornih medijatora u modelu peritonitisa. Nivo ekspresije (A) *IL-1β*, (B) *iNOS*, (C) *TNF-α* i (D) *IL-6* iRNK u peritoneumskim ćelijama pacova tretiranih i.p. sa 5 mg/kg EPS-CG11, 60 min pre i.p. injekcije karagenina (KAR). Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SEM pet životinja. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Analiza koncentracija citokina sekretovanih od strane infiltriranih ćelija pokazala je delimično poklapanje sa prethodno iznetim rezultatima genske ekspresije. Analizirani su nivoi *TNF-α*, *IL-10* i *IL-6* citokina. Injekcija karagenina je uzrokovala porast nivoa sva tri analizirana citokina u pripremljenim supernatantima peritoneumske tečnosti. Koncentracije *TNF-α* bile su značajno manje kada je EPS-CG11 primenjen sistemski pre izazivanja inflamacije ($p < 0,05$) (Slika 20A). Interesantno, detektovan je statistički značajno veći nivo sekretovanih *IL-10* ($p < 0,05$) i *IL-6* ($p < 0,01$) citokina u grupi životinja koje su kao profilaksu dobile EPS-CG11 u poređenju sa karageninskim kontrolama (Slika 20B,C). Koncentracije *TNF-α* i *IL-6* kod zdravih kontrolnih životinja bile su ispod nivoa detekcije testa.



Slika 20. Uticaj sistemske primene EPS-CG11 na sekreciju citokina u modelu peritonitisa. Koncentracije (A) TNF- α , (B) IL-10 i (C) IL-6 citokina u supernatantima peritoneumske tečnosti pacova tretiranih i.p. sa 5 mg/kg EPS CG11, 60 min pre i.p. injekcije karagenina (KAR). Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti \pm SEM pet životinja. Jednofaktorska ANOVA i Tukey *post hoc* test su korišćeni za poređenje tretmana (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Diskusija

5. DISKUSIJA

Poznavanje mehanizama kojima probiotici i postbiotici ostvaruju svoje efekte u eksperimentalnim modelima omogućava optimalan izbor probiotika i/ili njihovih bioaktivnih molekula za kasniju kliničku primenu. Kako su nova istraživanja ukazala da su efekti probiotika u GI traktu u većoj meri posredovani površinskim ili sekretovanim molekulima, istraživanja u ovoj oblasti su se usmerila ka identifikaciji i karakterizaciji ovih jedinjenja. Primena probiotika za ublažavanje blagih do umerenih simptoma bolesti GI trakta, kao što su dijareja ili konstipacija pokazala je više nego zadovoljavajući efekat (Tsilingiri i Rescigno, 2013). Sa druge strane, jasnih zaključaka o primeni probiotika kao terapije dva klinički najvažnija inflamatorna oboljenja GI trakta (ulcerozni kolitis i Kronova bolest) i dalje nema. Iako je primena probiotika povezana sa produženjem perioda remisije kod ovih bolesti, njihova terapijska primena u fazi relapsa je i dalje vrlo obeshrabrujuća. Snažno imunostimulišuće dejstvo koje se vezuje za žive bakterije predstavljalo je glavni razlog njihovog štetnog delovanja u akutnoj fazi inflamacije. Kako bi se pozitivni rezultati prekliničkih studija primenili i u kliničkoj praksi, predložena je primena prečišćenih i okarakterisanih biomolekula poreklom iz probiotika za koje je jasno pokazano da modulišu željene signalne puteve u ćelijama domaćina (postbiotici) (Patel i Denning, 2013; Tsilingiri i sar., 2012). Ovi molekuli su odgovorni za probiotički efekat živih probiotičkih sojeva i predstavljaju alternativu koja omogućava da se izbegnu neželjene reakcije poput prekomerne stimulacije imunskog sistema nakon primene živih bakterija. Veliki broj istraživanja bavi se ispitivanjem efekta postbiotika kod različitih oboljenja GI trakta. Međutim, ako se uzme u obzir njihova bezbedna primena i mogućnost modulacije različitih signalnih puteva, opravdano je istraživanja usmeriti ka proučavanju dejstva i efekata ovih molekula i na druge sisteme organa kao što su jetra, kardiovaskularni ili nervni sistem.

5.1. UTICAJ BIOAKTIVNIH MOLEKULA LAKTOBACILA NA PROCES AUTOFAGIJE U HEPATOCITIMA

Paracetamol predstavlja jedan od najčešće korišćenih analgetika za ublažavanje bola. Prekomerna upotreba visokih doza paracetamola može dovesti do ozbiljnog oštećenja jetre. Naše istraživanje je pokazalo da ekstrakt soja *Lb. fermentum* BGHV110 ostvaruje protektivan efekat u *in vitro* modelu hepatotoksičnosti izazvane paracetamolom, aktivirajući autofagiju. Toksični efekat paracetamola zahteva transformaciju leka posredstvom CYP2B1 enzima koji prevodi paracetamol u toksični NAPHI metabolit (Hinson i sar., 2010). S obzirom da su kao *in vitro* model u našem istraživanju korišćene HepG2 ćelije, koje imaju nizak nivo ekspresije ovog enzima, letalna koncentracija koja je izazvala smrt 50% ćelija (LC₅₀) iznosila je 50 mM (Westerink i Schoonen, 2007). Ova LC₅₀ vrednost je oko 5 puta veća u poređenju sa koncentracijom koja je primenjena u drugim studijama u kojima su korišćeni primarni hepatociti (Xie i sar., 2014). Nezavisno od CYP2B1 enzima, reakcijom deacetilacije paracetamola nastaje drugi toksični metabolit p-aminofenol, koji takođe može biti uzrok oštećenja HepG2 ćelija u našim eksperimentalnim uslovima (Miyakawa i sar., 2015). Slično istraživanje koje je uradila grupa indijskih autora pokazalo je da postbiotici sojeva *Lb. acidophilus* MTCC447 i *Enterococcus lactis* IITRHR1 mogu ublažiti oštećenje hepatocita izazvano paracetamolom (Sharma i sar., 2011). Tačnije, autori su pokazali da lizati ovih sojeva povećavaju nivo glutationa, stimulišu ekspresiju anti-apoptotskog Bcl-2 proteina i smanjuju oksidativno oštećenje ćelija. Imajući u vidu literaturne podatke o značaju autofagije kao ćelijskog reparativnog procesa kod toksičnosti izazvane paracetamolom, pretpostavljeno je da će sposobnost bakterijskih ekstrakata da indukuju autofagiju u hepatocitima, pozitivno korelisati sa stepenom zaštite hepatocita izoloženih toksičnoj koncentraciji paracetamola. Stoga je selekcija ekstrakta laktobacila u preliminarnom eksperimentu vršena na osnovu njegovog potencijala da stimuliše proces autofagije u HepG2 ćelijama. Na osnovu rezultata tretmana HepG2 ćelija, *Lb. fermentum* BGHV110 se pokazao kao najbolji kandidat. Biomolekuli iz ekstrakta ovog soja stimulisali su autofagiju, što je zaključeno na osnovu konverzije LC3 proteina i povećane ekspresije *BECN1*, *p62/SQSTM1* i *PINK1* gena. Bitno je napomenuti

da je vijabilnost ćelija ostala nepromenjena, što je ukazalo da se ne radi o autofagnoj ćelijskoj smrti. Povećana ekspresija *PINK1* i *p62/SQSTM1* gena sugerise da se radi o aktivaciji PINK1-Parkin signalnog puta. Ovom zaključku ide u prilog i povećanje ekspresije gena za TGF- β . Suzuki i sar. (2010) su pokazali da TGF- β stimuliše autofagiju u ćelijama humanog hepatocelularnog karcinoma (HuH7) aktivirajući signalizaciju koja uključuje Smad proteine. Pored Smad proteina, koji su glavni prenosioci signala sa receptora za TGF- β , uočena je aktivacija i c-JUN kinaze, koja je uključena u fosforilaciju Bcl-2 proteina. Beklin-1 se preko svog BH3 domena nalazi u kompleksu sa Bcl-2 proteinom u svom neaktivnom obliku. Fosforilacija Bcl-2 proteina uzrokuje disocijaciju beclin-1 proteina koji funkcioniše kao stimulator autofagije (Zhou i sar., 2015). Aktivacija Smad i c-JUN proteina povećava ekspresiju *BECN1* i *PINK1* gena što dovodi do stimulacije autofagije. Može se pretpostaviti da je povećana ekspresija *TGF- β* gena u našem eksperimentu, rezultirala sekrecijom TGF- β citokina koji je delovao parakrino na susedne ćelije. Ranije studije su pokazale da probiotici mogu stimulisati produkciju TGF- β citokina od strane Caco-2 ćelija (Golić i sar., 2017) i DĆ (Sakai i sar., 2014), a studija kolonizacije respiratornog trakta patogenima *Streptococcus pneumoniae* i *Haemophilus influenzae* je dokazala da bakterije stimulišu TGF- β produkciju aktivacijom TLR (Beisswenger i sar., 2009). Ne može se isključiti aktivacija i drugih signalnih puteva koja može biti posredovana različitim PRR, naročito ako se ima u vidu da su PRR odgovorni za inicijalnu stimulaciju autofagije kao odgovor ćelije na invaziju patogena (Oh i Lee, 2014). Prepoznavanje bakterija posredstvom TLR i NLR i njihova aktivacija, direktno je korelisana sa stimulacijom autofagije. Ispitivanja na mišijim makrofagama RAW264.7 jasno su pokazala da LPS kao ligand TLR4, jednolančana RNK kao ligand TLR3 i dvolančana RNK kao ligand TLR7 stimulišu autofagiju. Međutim, primena čistih oligonukleotida koji aktiviraju TLR9 je dala dvosmislene rezultate, verovatno usled razlika primenjenih oligonukleotida i njihovih koncentracija. Sa druge strane, iako je stimulacija autofagije peptidoglikanom kao ligandom TLR2 izostala, smatra se da istovremena stimulacija TLR2, TLR6 i dektin-1 receptora sinergističkim efektom više agonista rezultira aktivacijom autofagije (Delgado i Deretić, 2009). Za peptidoglikan je pokazano da prevashodno indukuje autofagiju nakon endocitoze gde biva prepoznat od strane NOD1

receptora i RIP2 kinaze (Irving i sar., 2014). U slučaju BGHV110 ekstrakta TLR1, TLR2, TLR6 i TLR9 predstavljaju potencijalne kandidate. Ovoj grupi receptora mogu se priključiti i različiti CLR, kao i NOD1 i NOD2 intracelularni senzori. Imajući u vidu potencijal PRR liganada u stimulaciji autofagije, a pre svega to da je često pokazano da je za indukciju autofagije neophodan sinergistički efekat više različitih MAMP-ova, ekstrakti laktobacila u ovom istraživanju upravo predstavljaju skup najrazličitijih agonista PRR. Međutim, uloga PRR u aktivaciji autofagije od strane BGHV110 ekstrakta zahteva dodatna istraživanja. Sa druge strane, jetra je prvi organ do kojeg dospevaju absorbovani nutrijenti iz GI trakta. Zajedno sa nutrijentima, jetra je stalno izložena uticaju bakterijskih molekula. TLR su ispoljeni u gotovo svim ćelijama u jetri i imaju važnu ulogu u fiziološkim i patofiziološkim procesima. U poređenju sa drugim organima, ekspresija TLR je na nižem nivou čime je postignuta veća tolerancija jetre na TLR ligande crevne mikrobiote (Mencin i sar., 2009; Seki i Brenner, 2008). Ove činjenice opravdavaju ispitivanje uticaja bioaktivnih molekula laktobacila na proces autofagije u hepatocitima, pogotovo što su dosadašnja istraživanja pokazala da pojedini sojevi laktobacila mogu da suprimiraju oštećenje jetre izazvano oksidativnim stresom, alkoholom i patogenima ili ublažiti simptome hepatične encefalopatije (Forsyth i sar., 2009; Rishi i sar., 2009; Segawa i sar., 2008).

U eksperimentima je uočeno da je paracetamol *per se* indukovao autofagiju u HepG2 ćelijama i pri tako visokoj koncentraciji od 50 mM. Međutim, aktivacija autofagije u ćelijama ko-tretiranim sa BGHV110 ekstraktom i paracetamolom bila je nekoliko puta izraženija u poređenju sa ćelijama tretiranim samo paracetamolom. Ova tvrdnja izvedena je na osnovu analize konverzije LC3 proteina i praćenja autofagnog fluksa, kao i ekspresije p62 proteina. Dodatno, nakon primene inhibitora autofagije, vijabilnost ćelija u ko-tretmanu se smanjila u poređenju sa odgovarajućom kontrolom bez inhibitora, ali je i dalje stepen oštećenja ćelija bio manji u odnosu na ćelije tretirane samo paracetamolom. Ovaj rezultat je ukazao da pored autofagije BGHV110 ekstrakt indukuje i dodatne mehanizme koji doprinose zaštitnom efektu ovog soja. Na osnovu rezultata ekspresije gena, u ćelijama ko-tretiranim paracetamolom i BGHV110 ekstraktom u trajanju od 6h, detektovano je povećanje nivoa iRNK za *p62/SQSTM1* gen u poređenju sa ćelijama tretiranim samo paracetamolom. Interesantno, p62/SQSTM1 kao adaptorski protein ima važnu ulogu u

antioksidativnoj odbrani ćelija. Povećan nivo p62/SQSTM1 proteina može ukazati na aktivaciju Nrf-2 (engl. *nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2*) transkripcionog faktora koji reguliše ekspresiju gena za antioksidativne enzime. Glavni enzimi čija transkripcija zavisi od aktivnosti Nrf-2 su: glutation-S-transferaza i NADPH dehidrogenaza (Nguyen i sar., 2009). Nrf-2 se nalazi u neaktivnom obliku u citosolu u kompleksu sa Keap1 proteinom (engl. *Kelch-like ECH-associated protein 1*). Literaturni podaci pokazuju da p62/SQSTM1 učestvuje u vezivanju Keap1 proteina uzrokujući disocijaciju Nrf-2 koji se transportuje u jedro i aktivira transkripciju pomenutih gena (Ichimura i sar., 2013). Jones i sar. (2015) su opisali mehanizam kojim laktobacili ostvaruju zaštitni efekat u GI traktu, a koji uključuje aktivaciju NADPH oksidaze. NADPH oksidaza proizvodi reaktivne radikale kiseonika (ROS) što rezultira aktivacijom Nrf-2 transkripcionog faktora i sintezom antioksidativnih enzima. Naše istraživanje prvi put je povezalo povećanu ekspresiju *p62/SQSTM1* gena sa laktobacilima. Analiza ekspresije gena nakon 16h pokazala je da se povećan nivo iRNK za *p62/SQSTM1* gen vratio na nivo kontrole. Ovaj rezultat u saglasnosti je sa rezultatima drugih istraživanja koja pokazuju da antioksidativni enzimi inhibiraju aktivnost Nrf-2 negativnom povratnom spregom. Imajući u vidu da je p62/SQSTM1 protein transkripciono regulisan od strane Nrf-2, ovo može biti jedan od razloga smanjene ekspresije ovog gena (Jain i sar., 2010).

U ćelijama koje su istovremeno tretirane sa BGHV110 ekstraktom i paracetamolom, nakon 6 h tretmana, uočeno je i povećanje transkripcije *PINK1* gena u poređenju sa ćelijama tretiranim samo paracetamolom. Povećanje ekspresije *PINK1* gena ukazuje na aktivaciju PINK1-Parkin signalnog puta koji je odgovoran za selektivno uklanjanje oštećenih mitohondrija putem mitofagije (Williams i Ding, 2015). Smanjenje ekspresije *BECN1* i *Atg5* gena u ovim ćelijama sugerise da aktivirana autofagija verovatno nije stimulisana standardnim signalnim putem ili da se povećana ekspresija ovih gena desila u prvim satima tretmana nakon čega je suprimirana negativnom povratnom spregom. Ovom tumačenju idu u prilog i rezultati studija koje pokazuju da signalni putevi koji regulišu selektivnu mitofagiju ne uključuju aktivaciju beclin-1 i Atg5 proteina (Chu i sar., 2007; Ma i sar., 2015). Nakon 16h tretmana, ekspresija *PINK1* gena se smanjila na nivo ekspresije u kontrolnim ćelijama. Kao što je slučaj sa *p62/SQSTM1* genom, i transkripcija *PINK1* gena

je direktno regulisana od strane Nrf-2, pa ovaj signalni put može uticati na smanjenje ekspresije ovog gena (Murata i sar., 2015). Takođe, kako je aktivacija autofagije vremenski zavisna, smatra se da se glavni signalni događaji dešavaju između drugog i osmog sata, tako da analiza nakon 16h tretmana možda nije adekvatna kako bi se detektovale pojedinačne promene u ekspresiji svih gena uključenih u stimulaciju autofagije (Vucicevic i sar., 2011). Dalje, tretman paracetamolom nije promenio ekspresiju *p62/SQSTM1* i *PINK1* gena ni posle 6h niti na kraju eksperimenta (16h). Ovaj rezultat ukazuje da su mehanizmi akutnog ćelijskog odgovora na stres bili mnogo intenzivniji kada su ćelije bile izložene i ekstraktu BGHV110. Može se pretpostaviti da je BGHV110 ekstrakt izazvao nizak nivo oksidativnog stresa koji je pokrenuo aktivaciju p62/SQSTM1–Nrf-2–PINK1 složene kaskade rezultirajući aktivacijom mitofagije i produkcijom antioksidanasa što je sve dovelo do delimično protektivnog efekta ovog ekstrakta. Ovo objašnjenje se slaže sa teorijom hormeze kojom se definiše odgovor ćelija na ksenobiotike i štetne stimulse okoline. Po ovoj teoriji nizak nivo stresa štiti ćelije od mnogo opasnijih stimulusa. Danas se veliki broj pozitivnih efekata probiotika upravo objašnjava ovom teorijom (Jones i sar., 2015).

Interesantno, primena paracetamola, bez obzira na prisustvo BGHV110 ekstrakta, izazvala je opadanje nivoa iRNK za *BECN1* i *Atg5* gen nakon 6h tretmana, dok je na kraju eksperimenta ovo smanjenje dostiglo i statističku značajnost. Ovakav rezultat je u suprotnosti sa rezultatima ekspresije LC3-II izoforme i p62 proteina kod ovih ćelija, koji ukazuju na stimulaciju procesa autofagije nakon primene paracetamola. U prilog našim rezultatima, postoje literaturni podaci koji ukazuju da inhibicija beklina-1 može stimulisati autofagiju (Li i sar., 2013). Autori su pokazali da je inhibicija beklina-1 stimulisala autofagiju i proliferaciju Miapaca-2 ćelija karcinoma pankreasa i smanjila apoptozu izazvanu primenom gemcitabina. Sa druge strane, uočena negativna regulacija genske ekspresije može biti i posledica visoke koncentracije paracetamola koja je primenjena. Verovatno je do inicijacije autofagije došlo još u prvom satu tretmana, nakon čega su ćelije suprimirale transkripciju gena koji nisu od vitalnog značaja za preživljavanje. Ovo je slučaj i sa *Atg5* genom čija transkripcija je regulisana negativnom povratnom spregom. Studija od strane Hu i sar. (2011) objašnjava da upravo Atg5 protein inhibira svoju sopstvenu

transkripciju, jer je njegova uloga u procesu ekspanzije fagofore i sazrevanju autofagozoma tranzijentna.

5.2. IMUNOMODULATORNI EFEKAT EGZOPOLISAHARIDA SOJA *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11

Bakterijski egzopolisaharidi dobijaju sve više na značaju kako se iz godine u godinu povećava broj studija koje predstavljaju nove efekte i polja moguće primene ovih polimera. Izgrađeni iz različitih monomernih jedinica povezanih u linearne i razgranate lance, egzopolisaharidi se ističu svojom raznolikošću. Polje njihove primene evoluiralo je od industrije ka medicini. Najbolji primer predstavlja *Leuconostoc mesenteroides* koji proizvodi dekstran molekulske mase 70 kDa koji se danas u medicini koristi za uspostavljanje i održavanje volumena krvi. Egzopolisaharidi laktobacila se karakterišu velikim strukturnim varijacijama. Oko 30 vrsta roda *Lactobacillus* proizvode EPS, između kojih su: *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum* i drugi. Međutim, nizak prinos EPS-a od strane laktobacila je razlog zašto ove bakterije nisu više eksploatisane. Najbolji prinos polimera opisan je kod vrste *Lb. rhamnosus* koja proizvodi oko 2,7 g/L polisaharida u poređenju sa prosečnom produkcijom EPS-a od strane laktobacila (1 g/L) (Badel i sar., 2011). *Lb. paraplantarum* BGCG11, izolovan iz belog mekog sira proizvedenog u domaćinstvu, proizvodi EPS molekulske mase 2×10^6 Da koji je po sastavu heteropolisaharid. Sastoji se iz glukoze (75,7%), ramnoze (20,5%), galaktoze (2,1%) i manoze (1,7%). Produkcija i sastav EPS-CG11 direktno zavise od uslova kultivisanja. Pokazano je da se veća količina polimera sintetiše pri nižim temperaturama rasta (28-30°C) i da njegov sastav zavisi od šećera prisutnih u podlozi (Cerning i sar., 1994; Kojić i sar., 1992). Jedan od ključnih koraka fizičko-hemijske karakterizacije polisaharida je analiza njihove stabilnosti. Za supstance koje imaju potencijal da se primene kao lekovi ispitivanje termičke stabilnosti je od izuzetnog značaja kako bi se u postupcima proizvodnje izbegla potencijalna degradacija molekula (Shamsipur i sar., 2013). Prema literaturnim podacima termička stabilnost EPS-a zavisi od njihove strukture i sastava. Termogravimetrijska

analiza je pokazala da je maksimalna temperatura koju EPS-CG11 toleriše 250,3°C. Pri ovoj temperaturi dolazi do dekompozicije najveće količine polimera. Na kraju analize detektovan je ukupan gubitak mase od 72,7% početnog uzorka i ostala je veća količina suvog ostatka koja potiče od različitih soli. Ovi rezultati su u skladu sa šemom dekompozicije koja je opisana za polimere koje proizvode *Lb. plantarum* i *Lb. kefiranofaciens* (Ahmed i sar., 2013; Wang i sar., 2010). Dodatno DSC analiza je pokazala da EPS-CG11 ne podleže procesima kao što su topljenje, dehidratacija, bubrenje i želatinizacija. Kako su vrednosti entalpija bile niske (7-11 J/g) može se zaključiti da pri ovim temperaturama ne dolazi do topljenja uzorka. Takođe, kako proces želatinizacije zahteva prisustvo veće količine vode u sistemu, isključena je mogućnost želatinizacije polimera. Najverovatnije su uočeni endotermni događaji posledica dehidratacije uzorka i evaporacije vode. Uzimajući u obzir šemu dekompozicije EPS-CG11 polimera može se reći da ovaj molekul poseduje zadovoljavajuće termičke osobine i da može podneti različite tehnološke procese u kojima temperatura ne prelazi 150°C (Ahmed i sar., 2013).

Polisaharidi različitog porekla su identifikovani kao molekuli koji mogu ublažiti simptome inflamatornog bola. U modelu karageninom izazvane inflamacije šapica miševa pokazano je da polisaharid morske crvene alge *Digenea simplex* inhibira inflamaciju i razvoj hiperalgezije smanjujući nivo IL1- β i TNF- α citokina (Pereira i sar., 2014). Hemijskim modifikacijama polisaharida uočeno je da se spektar njihove aktivnosti povećava. Jedna od takvih modifikacija je uvođenje negativno naelektrisane sulfatne grupe koja učestvuje u različitim elektrostatičkim interakcijama (Chopin i sar., 2015). Bogati izvor sulfonovanih polisaharida jesu morske alge i trave. Morska trava *Solieria filiformis* proizvodi sulfonovan polisaharid koji je pokazao anti-hiperalgezijski i anti-edematozni efekat kod glodara (de Araújo i sar., 2011). Anti-inflamatorni efekat polisaharida uglavnom je posredovan supresijom produkcije IL1- β i/ili TNF- α citokina što se odražava na smanjenje edema i bolne preosetljivosti. U najvećem broju istraživanja korišćeni su polisaharidi izolovani iz algi i lišajeva, dok EPS bakterija, a posebno probiotičkih sojeva, nikad nije razmatran kao mogući antihiperlgezijski agens (Chaves i sar., 2013; Córdova i sar., 2013). Uloga EPS-a u ostvarivanju probiotičkog efekta laktobacila je dobro istražena. Veliki broj studija ukazuje da njegova primena može regulisati različite patofiziološke

procesu. Istraživanja koja su rađena na *Lb. paraplantarum* BGCG11 soju odlično ilustruju široki spektar dejstva i upotrebe EPS-a i bakterija koje ih proizvode. Pored bakteriocina, EPS je identifikovan kao važan makromolekul u borbi protiv patogenih bakterija. U istraživanjima sa HT29-MTX ćelijskom linijom pokazano je da *Lb. paraplantarum* BGCG11 smanjuje adheziju patogena, kao što su *E. coli* i *Listeria monocytogenes*. Ovaj rezultat se objašnjava činjenicom da sloj EPS-a štiti epitelne ćelije od kontakta sa patogenim bakterijama. Dalje, pokazano je da prečišćeni EPS-CG11 učestvuje u održavanju integriteta epitelne barijere. U eksperimentu u kome su HT29-MTX ćelije inficirane bakterijom *C. difficile*, zapaženo je smanjenje produkcije IL-8 hemokina indukovano od strane patogena kod ćelija koje su bile tretirane sa EPS-CG11. Takođe, uočeno je da EPS-CG11 štiti integritet epitelne barijere od toksičnog dejstva *L. monocytogenes* (Živković i sar., 2015). U *in vivo* eksperimentu, *per os* primena *Lb. paraplantarum* BGCG11 soja ublažila je simptome dijabetesa indukovano streptozotocinom. Kod eksperimentalnih životinja koje su dobijale probiotik uočeno je smanjenje glikemije i oštećenja jetre i bubrega. Autori smatraju da su ovi efekti posledica aktivacije Akt signalnog puta i smanjenja nivoa inflamacije (Mihailović i sar., 2017). *Lb. paraplantarum* BGCG11 soj je pokazao anti-inflamatorni efekat u kulturi polimorfonuklearnih leukocita u poređenju sa derivatom soja koji je izgubio sposobnost produkcije EPS-CG11 (Nikolić i sar., 2012). Na osnovu pretpostavke da je EPS-CG11 molekul odgovoran za anti-inflamatorni efekat BGCG11 soja i da se inflamacija može kontrolisati primenom prečišćenog EPS-a praćen je njegov efekat u dva eksperimentalna modela inflamacije. Prvi model uključio je ispitivanje uticaja EPS-CG11 na razvoj inflamatornog bola kod pacova, dok je u modelu peritonitisa preciznije analiziran njegov imunomodulatorni efekat.

Rezultati primene EPS-CG11 u modelu karageninom izazvane inflamacije šapice kod Wistar pacova su u saglasnosti sa ostalim studijama koje su opisale primenu polisaharida kao molekula koji smanjuju hiperalgeziju. Uočeno je dozno-zavisno smanjenje edema i bolnih senzacija kod pacova kojima je i.p. dat EPS-CG11. Inflamacija izazvana karageninom je bifaznog karaktera. U prvoj fazi razvoja edema koja traje prvih sat vremena, oslobađaju se serotonin, bradikinin, histamin i neki od proizvoda COX-2 enzima (PGE₂). U narednih 2h, dolazi do infiltracije neutrofila i oslobađanja NO i pro-

inflamatornih citokina, dok se proces sinteze prostaglandina nastavlja (Coura et al., 2015). Imajući u vidu da je EPS-CG11 ostvario najjači efekat u prvih 2h nakon i.pl. injekcije karagenina može se pretpostaviti da je EPS-CG11 delovao na obe faze inflamacije. Životinje su žrtvovane na kraju eksperimenta te je relevantno bilo u šapicama odrediti nivo medijatora inflamacije druge faze edema. Uticaj EPS-CG11 na oslobađanje bradikininina, serotoninina i histamina zahteva dodatne eksperimente u kojima bi se umesto karagenina u šapice primenio svaki od navedenih medijatora i ispratio vremenski tok razvoja edema. Na osnovu dobijenih rezultata i podataka iz literature u šapicama je analiziran nivo IL-1 β , TNF- α i IL-6 citokina. Pro-inflamatorni citokini su pokazali da mogu izazvati i mehaničku i termičku hiperalgeziju nakon sistemske primene. Nasuprot pro-inflamatornim citokinima, za anti-inflamatorni IL-10 citokin je pokazano da inhibira prenos nociceptivnih signala. Takođe, IL-10 funkcioniše kao supresor sinteze pro-inflamatornih citokina (Zhang i An, 2007). U tkivu šapica pacova koji su dobili EPS-CG11 detektovano je smanjenje nivoa iRNK za *IL-1 β* , dok je ekspresija gena za *TNF- α* i *IL-6* ostala nepromenjena u odnosu na pozitivnu karageninsku kontrolu. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima koji su predstavljeni za polisaharid glukomanan izolovan iz lišaja *Heterodermia obscurata* (Córdova i sar., 2013). Autori su uočili da polisaharid smanjuje transmisiju bolnih signala inhibirajući sintezu IL-1 β citokina u nervu *ischadicus*, dok nivoi TNF- α nisu bili promenjeni. Pored pro-inflamatornih citokina, određen je i nivo ekspresije *iNOS* gena. Azot monoksid je mali molekul koji nastaje kao proizvod aktivnosti tri izoforme enzima NO sintaze. NO sintaza katalizuje reakciju prevođenja L-arginina i kiseonika u NO. Neuronalna NOS (nNOS) je konstitutivno eksprimirana pretežno u neuronima centralnog i perifernog nervnog sistema. Inducibilna NOS (iNOS) je eksprimirana u ćelijama koje reaguju na LPS, citokine i druge agense. NO se smatra bitnim faktorom u patofiziologiji inflamatornih bolesti i septičnog šoka. Endotelna NOS (eNOS) je eksprimirana samo u endotelnim ćelijama krvnih sudova, gde NO funkcioniše kao vazodilatator (Förstermann i Sessa, 2012). U tkivu šapica životinja koje su tretirane sa EPS-CG11 detektovano je smanjenje nivoa iRNK za *iNOS* gen u poređenju sa karageninskom kontrolom. Transkripcija *iNOS* gena direktno je pozitivno regulisana od strane IL-1 β citokina (Pautz i sar., 2010). Samim tim, uočena supresija transkripcije *iNOS* gena je verovatno posledica inhibirane sinteze IL-1 β

citokina. Dodatno, IL-1 β reguliše ekspresiju i COX-2 enzima koji je odgovoran za produkciju prostaglandina (PGE₂). COX-2 je inducibilna forma enzima ciklooksigenaze koja se eksprimira pod uticajem faktora rasta, citokina i LPS-a u inflamiranom tkivu (Kulkarni i sar., 2000). Stoga, može se pretpostaviti da se efekat EPS-CG11 na smanjenje IL-1 β citokina indirektno odrazio i na produkciju prostaglandina tokom inflamacije. Da je ova pretpostavka opravdana pokazuje i polisaharid izolovan iz crvene morske alge *Gracilaria cornea* koji je anti-inflamatorni efekat ispoljio supresijom produkcije pro-inflamatornih citokina (IL-1 β i TNF- α), ali takođe suprimirajući ekspresiju i COX-2 enzima (Coura i sar., 2015). Nakon sat vremena od izazivanja inflamacije dolazi do ekstravazacije tečnosti i neutrofila iz dilatiranih krvnih sudova. Infiltracija neutrofila učestvuje u održavanju inflamacije. Rezultati su pokazali da je nivo MPO proteina u šapicama pacova tretiranih sa EPS-CG11 bio značajno manji u odnosu na pozitivnu kontrolu. MPO nivo odražava funkcionalnost neutrofila, a može ukazati i na stepen migracije ćelija. Rezultat upućuje na zaključak da je EPS-CG11 anti-inflamatorni efekat ostvario i inhibicijom infiltracije neutrofila i/ili supresijom njihove aktivacije tj. oslobađanja medijatora inflamacije. Ovaj efekat često prati dejstvo polisaharida i većina istraživanja ukazuju na smanjenu aktivnost MPO u šapicama glodara.

Model peritonitisa izazvan karageninom pokazao se kao izuzetno pogodan za izučavanje infiltracije i funkcije neutrofila u akutnom inflamatornom odgovoru (Barth i sar., 2016). Nivo iRNK za *IL-1 β* i *iNOS* gene bio je smanjen kod pacova tretiranih i.p. sa EPS-CG11 i karageninom u poređenju sa karageninskom kontrolom. Dodatno, uočeno je smanjenje nivoa TNF- α kako na nivou transkripcije gena, tako i na nivou proteina u peritoneumskoj tečnosti, dok su neočekivano nivoi IL-10 i IL-6 citokina bili povećani. Povećanje IL-10 citokina povezuje se sa anti-inflamatornim efektom. Tačnije, produkcija IL-10 citokina inhibira aktivaciju pro-inflamacijskih limfocita, NK ćelija (engl. *Natural Killer*) i makrofaga koje učestvuju u eliminaciji patogena, ali i doprinose oštećenju tkiva. IL-10 produkuju makrofage i dendritske ćelije, ali takođe i B limfociti i pojedini subtipovi CD4⁺ i CD8⁺ limfocita. IL-10 svoju anti-inflamatornu aktivnost ispoljava supresijom ekspresije glavnog kompleksa tkivne podudarnosti klase II (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC klase II) i kostimulatornih molekula B7-1/B7-2 na dendritskim ćelijama i

makrofagama, kao i inhibicijom sinteze pro-inflamatornih citokina (IL-1 β , IL-12, IL-18 i TNF- α) (Couper i sar., 2008). Zbog navedenih efekata, otkriće molekula koji stimulišu produkciju IL-10 citokina smatra se važnim ciljem u istraživanjima vezanim za inflamatorne bolesti. Iako je primena EPS-CG11 izazvala povećanje nivoa IL-6 citokina u peritoneumskoj tečnosti, ekspresija *IL-6* gena u infiltriranim ćelijama nije se razlikovala između EPS-CG11/karagenin eksperimentalne grupe i karageninske kontrole. Kao i u šapicama, EPS-CG11 nije uticao na transkripciju *IL-6* gena. Visok nivo IL-6 citokina ukazuje na to da su možda ćelije koje ne pripadaju infiltriranim imunskim ćelijama doprinele povećanju nivoa ovog citokina. Ćelije endotela imaju sposobnost produkcije IL-6 citokina, pa se može pretpostaviti da direktna stimulacija endotela lokalnih krvnih sudova i ekstravazacija tečnosti usled povećane propustljivosti krvnih sudova doprinosi povećanju nivoa ovog citokina (Gonçalves i sar., 2011). Međutim, tumačenje uloge IL-6 citokina u ovakvom modelu inflamacije nije jednostavno, s obzirom da se njegov efekat može kategorisati i kao pro-inflamatorni i kao anti-inflamatorni, u različitim okolnostima. Iako se nivo IL-6 citokina povećava u stanju inflamacije, istraživanja pokazuju da IL-6 kontroliše nivo ostalih pro-inflamatornih citokina i reguliše intenzitet inflamatornog procesa. Studija na miševima kojima je nedostajao gen za IL-6 citokin (*IL-6^{-/-} knockout*), pokazala je da ove životinje imaju mnogo veće koncentracije pro-inflamatornih citokina nakon primene LPS-a, u poređenju sa kontrolnim (*wild type*) životinjama (Xing i sar., 1998). Svi predstavljeni rezultati upućuju da je stimulacija produkcije IL-6 citokina od strane EPS-CG11 doprinela supresiji inflamacije i da IL-6 ispoljava regulatornu funkciju u ovom eksperimentu. Kao što je već rečeno, model peritonitisa se najčešće koristi za praćenje infiltracije leukocita i to pretežno neutrofila. Brojanje ukupnih ćelija u peritoneumu pokazalo je da EPS-CG11 ne menja stepen infiltracije ćelija nakon karageninske injekcije. Samim tim, smanjen nivo pro-inflamatornih medijatora ne predstavlja posledicu inhibicije infiltracije neutrofila. EPS-CG11 svoj imunosupresivni efekat verovatno ostvaruje direktnim kontaktom sa ciljnim ćelijama, primarno peritoneumskim makrofagama. Da smanjenje produkcije pro-inflamatornih citokina ne mora da zavisi od stepena infiltracije neutrofila ilustruju rezultati istraživanja koje su sproveli Hassimotto i sar. (2013). Ova grupa je pokazala da sličan efekat kao EPS-CG11 ostvaruje i antocijanin, cijanidin-3-glukozid, kada se primenjuje

profilaktički. Tačnije, autori su uočili da je cijanidin-3-glukozid, primenjen 30 min pre izazivanja peritonitisa karageninom, smanjio stepen inflamacije suprimirajući ekspresiju COX-2 enzima i sintezu prostaglandina PGE₂, dok je infiltracija neutrofila ostala nepromenjena.

Usled profilaktičke i.p. primene EPS-CG11 u opisanoj studiji, prve ćelije koje ostvaruju kontakt sa polisaharidom jesu rezidentne peritoneumske makrofage. Praćenjem nivoa ekspresije markera monocita/makrofaga CD14, uočeno je da je EPS-CG11 povećao nivo iRNK za *CD14* gen u tkivu šapice u poređenju sa karageninskom kontrolom. Interesantno, u modelu peritonitisa EPS-CG11 nije menjao ekspresiju CD14 markera koja je bila na nivou karageninske kontrole. Takođe, sam karagenin je indukovao povećanje ekspresije CD14 molekula u oba eksperimentalna modela u poređenju sa zdravim kontrolama. Povećanje ekspresije CD14 markera može se tumačiti na dva načina. Prvo, ovo povećanje može odražavati infiltraciju monocita na mestu inflamacije ili ukazati na ulogu CD14 molekula kao ko-receptora u prepoznavanju ova dva polisaharida (karagenina i EPS-CG11). Za karagenin kao pro-inflamatorni polisaharid je već pokazano da svoj efekat ostvaruje posredstvom TLR4 i Bcl-10 proteina aktivirajući NF- κ B (Bhattacharyya i sar., 2008). Bitno je napomenuti da CD14 molekul nije jedinstven marker monocita/makrofaga, jer je njegovo prisustvo opisano i na neutrofilima (Haziot i sar., 1993). Međutim, kako je na osnovu ekspresije MPO enzima zaključeno da je infiltracija neutrofila smanjena, povećan nivo CD14 molekula bez sumnje odražava povećanu infiltraciju ili aktivnost monocita/makrofaga u šapicama. Tkivne makrofage se aktiviraju pod uticajem različitih faktora sredine ispoljavajući pro-inflamatorni (M1) ili anti-inflamatorni (alternativni, M2) fenotip (Mantovani i sar., 2013). U modelu peritonitisa povećana sekrecija IL-10 i IL-6 citokina i smanjena ekspresija *IL-1 β* , *TNF- α* i *iNOS* gena u životinjama tretiranim EPS-CG11 i karageninom u odnosu na karageninsku kontrolu, ukazuje da je i.p. injekcija EPS-CG11 uticala na polarizaciju makrofaga ka imunosupresivnom fenotipu. Dodatno, rezultati novijih istraživanja ukazuju da IL-6 funkcioniše kao bitan faktor stimulacije alternativnog fenotipa makrofaga. Sanmarco i sar. (2017) su pokazali da IL-6 inhibira IL-1 β zavisnu produkciju NO, stimulišući aktivaciju imunosupresivnih makrofaga u toku infekcije izazvane parazitom *Trypanosoma cruzi*. Pored ovoga, Bhaumik i sar. (2001) su pokazali da

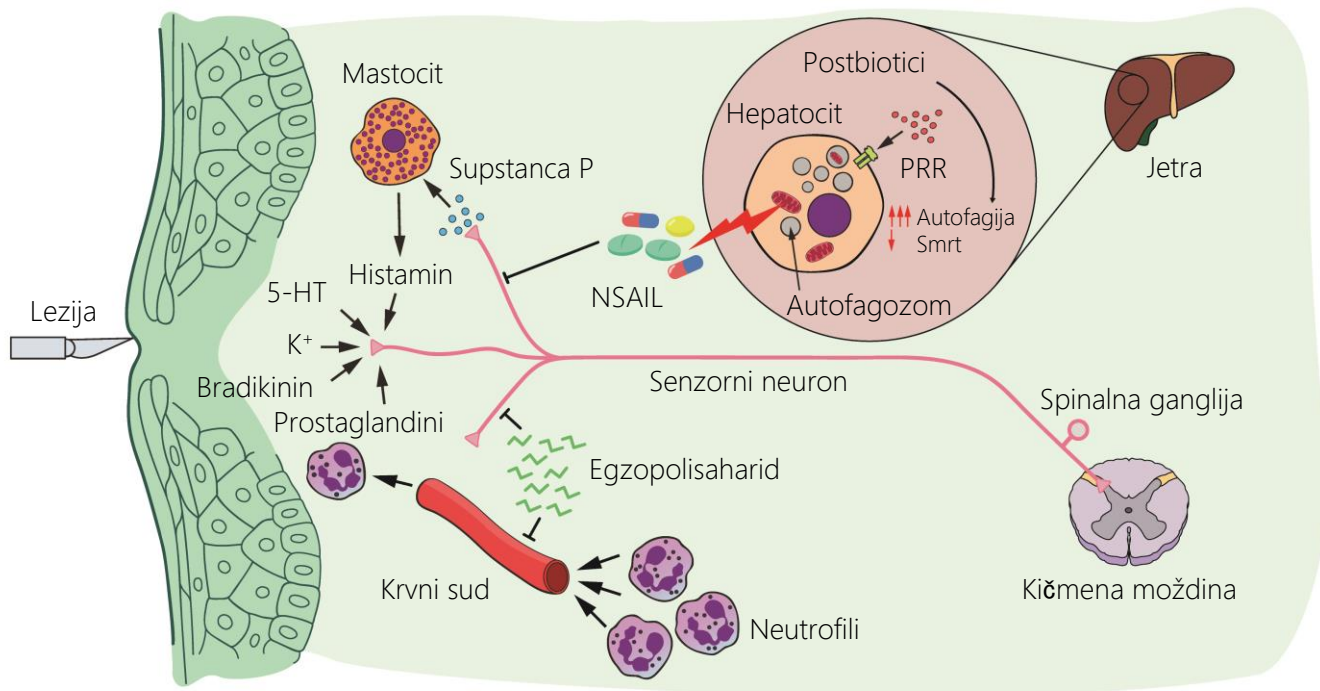
makrofage migriraju iz peritoneuma do tkiva zahvaćenih inflamacijom. Rezultati ovih istraživačkih grupa u potpunosti su u skladu sa našim zapažanjima i sugerišu da je došlo do priliva većeg broja imunosupresivnih makrofaga u šapicu u modelu inflamatornog bola. Takođe, svaki novi EPS zbog velike varijabilnosti može delovati kao donekle nov MAMP i aktivirati različite PRR na makrofagama ili dendritskim ćelijama (Balzaretta i sar., 2017). Tako da se povećanje ekspresije CD14 markera može tumačiti i kao povećanje aktivnosti rezidentnih peritoneumskih makrofaga, gde bi CD14 mogao da funkcioniše kao ko-receptor u prepoznavanju EPS-CG11.

Generalno gledano, neobjašnjene razlike koje postoje u produkciji pojedinih citokina (TNF- α) i infiltraciji ćelija između ova dva eksperimentalna modela su najverovatnije posledica različitih načina primene EPS-CG11 i karagenina.

5.3. PRIMENA BIOAKTIVNIH MOLEKULA LAKTOBACILA U TERAPIJI BOLA – ZNAČAJ DOBIJENIH REZULTATA

Visoki standardi u farmaceutskoj praksi zahtevaju konstantno unapređivanje terapije bola usled velikog broja neželjenih efekata karakterističnih za hroničnu primenu klasičnih analgetika. Poboljšanje u terapiji ostvareno je kombinacijom više analgetika koji različitim mehanizmima ostvaruju analgetičko dejstvo. Imajući u vidu pozitivan uticaj postbiotika u modelima bola, ovaj rad je predstavio dva hipotetička mehanizma kojima postbiotici mogu doprineti terapiji bola (**Slika 21**). Prvo, EPS testiranog probiotičkog soja *Lb. paraplantarum* BGCG11 ostvario je analgetički efekat u modelu inflamatornog bola delujući preventivno na pojavu bolne preosetljivosti. Ovaj efekat predstavlja novu osobinu EPS-a i može uputiti na testiranje analgetičkog efekta i drugih biomolekula probiotika. Drugo, hepatotoksičnost se može javiti kao neželjeno dejstvo nekih NSAIL. U ovoj studiji okarakterisan je mehanizam pomoću koga postbiotici mogu sprečiti oštećenje jetre uzrokovano toksičnim metabolitima lekova, što je od velikog značaja za predisponirane osobe. Kombinovanje identifikovanih bioaktivnih molekula probiotika sa lekovima koji mogu dovesti do oštećenja jetre predstavlja novu strategiju kojom se može sprečiti

oštećenje hepatocita. U oba istraživanja postbiotici ostvaruju profilaktički efekat pa bi njihovu moguću primenu trebalo razmatrati sa stanovišta preventivne suplementacije.



Slika 21. Hipotetički mehanizmi pozitivnog dejstva postbiotika kao suplemenata u terapiji bola

Deo slike preuzet i modifikovan iz Barrett i sar., 2010.

Zaključci

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata predstavljenih u ovom istraživanju mogu se doneti sledeći zaključci:

- **Biomolekuli laktobacila štite hepatocite od toksičnih efekata paracetamola stimulacijom autofagije.**
 1. Biomolekuli prisutni u ekstraktima sojeva *Lb. fermentum* BGHI14, *Lb. fermentum* BGHV110 i *Lb. salivarius* BGHO1 stimulišu autofagiju u HepG2 ćelijama.
 2. Ekstrakt pripremljen od soja *Lb. fermentum* BGHV110 ispoljio je najizraženiji potencijal u stimulaciji autofagije u HepG2 ćelijama, što je pored stimulacije konverzije LC3 proteina dodatno potvrđeno detekcijom povećane ekspresije relevantnih gena: *BECN1*, *p62/SQSTM1*, *PINK1* i *TGF-β*.
 3. U *in vitro* modelu hepatotoksičnosti izazvane paracetamolom, bioaktivni molekuli iz ekstrakta soja *Lb. fermentum* BGHV110 smanjili su oštećenje HepG2 ćelija.
 4. Analizom povezanosti autofagije i protektivnog efekta ekstrakta soja *Lb. fermentum* BGHV110 utvrđeno je da je stimulacija autofagije, u koju su uključeni PINK1 i p62/SQSTM1, jedan od mehanizama koji doprinosi preživljavanju ćelija izloženih toksičnoj koncentraciji paracetamola. S obzirom da je p62/SQSTM1 uključen i u antioksidativne mehanizme ćelija, ovaj rezultat može da ukaže na njegov mogući doprinos profilaktičkom delovanju BGHV110 ekstrakta u ovom modelu.
- **Egzopolisaharid soja *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 ostvaruje dozno-zavisno antiedematozno i antihiperalgezijsko dejstvo u modelu inflamatornog bola i suprimira inflamaciju u modelu peritonitisa kod pacova.**

1. Egzopolisaharid EPS-CG11 soja *Lb. paraplantarum* BGCG11 pokazao je zadovoljavajuće termičke osobine. Farmaceutsko-tehnološki procesi u kojima temperatura ne prelazi 150°C neće uticati na strukturu polimera.
2. U modelu inflamatornog bola kod pacova, EPS-CG11 je ostvario dozno-zavisno antiedematozno i antihiperalgezijsko dejstvo nakon sistemske profilaktičke primene.
3. EPS-CG11 ostvaruje antiedematozno i antihiperalgezijsko dejstvo regulacijom inflamatornog procesa. EPS-CG11 smanjuje ekspresiju medijatora inflamacije (IL-1 β i iNOS), kao i aktivnost/infiltraciju neutrofila.
4. EPS-CG11 povećava ekspresiju CD14 molekula, markera makrofaga u šapicama. S obzirom na smanjenu produkciju pro-inflamatornih citokina, povećana ekspresija ovog molekula u šapicama može ukazati na ulogu makrofaga u rezoluciji inflamacije. Takođe, povećanje ekspresije CD14 molekula nakon primene EPS-CG11, ukazuje na njegovu ulogu ko-receptora u prepoznavanju EPS-CG11 od strane makrofaga.
5. U modelu peritonitisa, EPS-CG11 je ostvario imunosupresivni efekat. Kod životinja kod kojih je profilaktički i.p. primenjen EPS-CG11 smanjen je nivo medijatora inflamacije (IL-1 β , TNF- α i iNOS), dok je koncentracija anti-inflamatornog IL-10 citokina bila povećana. Dodatno, povećana koncentracija IL-6 citokina ukazala je na njegovu ulogu u regulaciji intenziteta inflamacije.
6. Imunosupresivni efekat u modelu peritonitisa, EPS-CG11 najverovatnije ostvaruje direktnim kontaktom sa imunskim ćelijama bez uticaja na njihovu infiltraciju.

7. LITERATURA

- Ahmed, Z., Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, A., Khan, S.T., 2013. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir - Part II. Food Hydrocoll. 30, 343–350.
- Ait-Belgnaoui, A., Han, W., Lamine, F., Eutamene, H., Fioramonti, J., Bueno, L., Theodorou, V., 2005. *Lactobacillus farciminis* treatment suppresses stress induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cell cytoskeleton contraction. Gut 55, 1090–1094.
- Ait-Belgnaoui, A., Eutamene, H., Houdeau, E., Bueno, L., Fioramonti, J., Theodorou, V., 2009. *Lactobacillus farciminis* treatment attenuates stress-induced overexpression of Fos protein in spinal and supraspinal sites after colorectal distension in rats. Neurogastroenterol. Motil. 21, 567–e19.
- Alcántara, C., Blasco, A., Zúñiga, M., Monedero, V., 2014. Accumulation of polyphosphate in *Lactobacillus* spp. and its involvement in stress resistance. Appl. Environ. Microbiol. 80, 1650–1659.
- Aragon, G., Graham, D.B., Borum, M., Doman, D.B., 2010. Probiotic therapy for irritable bowel syndrome. Gastroenterol. Hepatol. (N. Y). 6, 39–44.
- Backhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., Gordon, J.I., 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science (80-.). 307, 1915–1920.
- Badel, S., Bernardi, T., Michaud, P., 2011. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. Biotechnol. Adv. 29, 54–66.
- Balzaretti, S., Taverniti, V., Guglielmetti, S., Fiore, W., Minuzzo, M., Ngo, H.N., Ngere, J.B., Sadiq, S., Humphreys, P.N., Laws, A.P., 2017. A novel rhamnose-rich hetero-exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus paracasei* DG activates THP-1 human monocytic cells. Appl. Environ. Microbiol. 83, e02702–16.
- Barrangou, R., Lahtinen, S.J., Ibrahim, F., Ouwehand, A.C., 2012. Genus *Lactobacillus*. In: Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects, 4th ed. CRC Press, 77-86.
- Barrett, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., Brooks, H.L., 2010. Ganong's review of medical physiology, 25th ed. Mc Graw Hill, 169.

- Barth, C.R., Funchal, G.A., Luft, C., de Oliveira, J.R., Porto, B.N., Donadio, M.V.F., 2016. Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. *Eur. J. Immunol.* 46, 964–970.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G., Julius, D., 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267–284.
- Begović, J., 2008. Molekularna karakterizacija humanih izolata laktobacila rezistentnih na antibiotike. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu.
- Beisswenger, C., Lysenko, E.S., Weiser, J.N., 2009. Early bacterial colonization induces Toll-like receptor-dependent transforming growth factor beta signaling in the epithelium. *Infect. Immun.* 77, 2212–20.
- Bergonzelli, G.E., Granato, D., Pridmore, R.D., Marvin-Guy, L.F., Donnicola, D., Corthesy-Theulaz, I.E., 2006. GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 74, 425–434.
- Bhattacharyya, S., Gill, R., Chen, M.L., Zhang, F., Linhardt, R.J., Dudeja, P.K., Tobacman, J.K., 2008. Toll-like receptor 4 mediates induction of the Bcl10-NFkappaB-interleukin-8 inflammatory pathway by carrageenan in human intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 283, 10550–8.
- Bhaumik, S., Mitra, R., Varalakshmi, C., Khar, A., 2001. Activated macrophages migrate to the subcutaneous tumor site via the peritoneum: a novel route of cell trafficking. *Exp. Cell Res.* 266, 44–52.
- Boyle, R.J., Tang, M.L.K., 2006. The role of probiotics in the management of allergic disease. *Clin. Exp. Allergy* 36, 568–576.
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M., Spano, G., 2016. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3877–3886.
- Cario, E., 2005. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 54, 1182–1193.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N., 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit. Rev.*

- Microbiol. 28, 281–370.
- Cerning, J., Renard, C.M., Thibault, J.F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., Topisirović, L., 1994. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. Appl. Environ. Microbiol. 60, 3914–9.
- Chaves, L. de S., Nicolau, L.A.D., Silva, R.O., Barros, F.C.N., Freitas, A.L.P., Aragão, K.S., Ribeiro, R. de A., Souza, M.H.L.P., Barbosa, A.L. dos R., Medeiros, J.-V.R., 2013. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 35, 93–100.
- Choi, J.-Y., Nam, S.-A., Jin, D.-C., Kim, J., Cha, J.-H., 2012. Expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated rat kidneys. J. Histochem. Cytochem. 60, 301–315.
- Chopin, N., Sinquin, C., Ratiskol, J., Zykwincka, A., Weiss, P., Cérantola, S., Le Bideau, J., Collic-Jouault, S., 2015. A direct sulfation process of a marine polysaccharide in ionic liquid. Biomed Res. Int. 2015, 508656.
- Chu, C.T., Zhu, J., Dagda, R., 2007. Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy and autophagic stress: implications for neurodegeneration and cell death. Autophagy 3, 663–6.
- Coates, J., 2006. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: Encyclopedia of analytical chemistry. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
- Córdova, M.M., Martins, D.F., Silva, M.D., Baggio, C.H., Carbonero, E.R., Ruthes, A.C., Iacomini, M., Santos, A.R.S., 2013. Polysaccharide glucomannan isolated from *Heterodermia obscurata* attenuates acute and chronic pain in mice. Carbohydr. Polym. 92, 2058–2064.
- Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M., 2008. IL-10: The master regulator of immunity to infection. J. Immunol. 180, 5771–5777.
- Coura, C.O., Souza, R.B., Rodrigues, J.A.G., Vanderlei, E. de S.O., de Araújo, I.W.F., Ribeiro, N.A., Frota, A.F., Ribeiro, K.A., Chaves, H.V., Pereira, K.M.A., da Cunha, R.M.S., Bezerra, M.M., Benevides, N.M.B., 2015. Mechanisms involved in the anti-

- inflammatory action of a polysulfated fraction from *Gracilaria cornea* in rats. PLoS One 10, e0119319.
- de Araújo, I.W.F., Vanderlei, E. de S.O., Rodrigues, J.A.G., Coura, C.O., Quinderé, A.L.G., Fontes, B.P., de Queiroz, I.N.L., Jorge, R.J.B., Bezerra, M.M., Rodrigues e Silva, A.A., Chaves, H.V., Monteiro, H.S.A., de Paula, R.C.M., Benevides, N.M.B., 2011. Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. Carbohydr. Polym. 86, 1207–1215.
- de Klerk, N., Maudsdotter, L., Gebreegziabher, H., Saroj, S.D., Eriksson, B., Eriksson, O.S., Roos, S., Lindén, S., Sjölander, H., Jonsson, A.B., 2016. Lactobacilli reduce *Helicobacter pylori* attachment to host gastric epithelial cells by inhibiting adhesion gene expression. Infect. Immun. 84, 1526–1535.
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., Hols, P., 1999. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 76, 159–84.
- Delgado, M.A., Deretić, V., 2009. Toll-like receptors in control of immunological autophagy. Cell Death Differ. 16, 976–983.
- Delgado, M.A., Elmaoued, R.A., Davis, A.S., Kyei, G., Deretić, V., 2008. Toll-like receptors control autophagy. EMBO J. 27, 1110–21.
- Di, W., Zhang, L., Wang, S., Yi, H., Han, X., Fan, R., Zhang, Y., 2017. Physicochemical characterization and antitumour activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* SB27 from yak milk. Carbohydr. Polym. 171, 307–315.
- Ding, W.-X., Yin, X.-M., 2012. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. Biol. Chem. 393, 547–64.
- Donia, M.S., Cimermančić, P., Schulze, C.J., Wieland Brown, L.C., Martin, J., Mitreva, M., Clardy, J., Linnington, R.G., Fischbach, M.A., 2014. A systematic analysis of biosynthetic gene clusters in the human microbiome reveals a common family of antibiotics. Cell 158, 1402–1414.
- Dragičević, S., Milošević, K., Nestorović, B., Nikolić, A., 2017. Influence of the polymorphism C-509T in the *TGFBI* gene promoter on the response to montelukast.

- Pediatr. Allergy. Immunol. Pulmonol. 30, 239–245.
- Erridge, C., Bennett-Guerrero, E., Poxton, I.R., 2002. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect.* 4, 837–51.
- FAO-WHO, 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and nutritional paper No. 85, 1–50.
- Falagas, M.E., Betsi, G.I., Athanasiou, S., 2007. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 657–64.
- Fernandez, E.M., Valenti, V., Rockel, C., Hermann, C., Pot, B., Boneca, I.G., Grangette, C., Grangette, C., 2011. Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut* 60, 1050–1059.
- Förstermann, U., Sessa, W.C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–37, 837a–837d.
- Forsyth, C.B., Farhadi, A., Jakate, S.M., Tang, Y., Shaikh, M., Keshavarzian, A., 2009. *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 43, 163–172.
- Geijtenbeek, T.B.H., Engering, A., Van Kooyk, Y., 2002. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *J. Leukoc. Biol.* 71, 921–31.
- Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F., 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221, 3–12.
- Golić, N., Veljović, K., Popović, N., Djokić, J., Strahinić, I., Mrvaljević, I., Terzić-Vidojević, A., 2017. In vitro and in vivo antagonistic activity of new probiotic culture against *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens*. *BMC Microbiol.* 17, 108.
- Gonçalves, D.O., Calou, I.B.F., Siqueira, R.P., Lopes, A.A., Leal, L.K.A., Brito, G.A.C., Tomé, A.R., Viana, G.S.B., 2011. In vivo and in vitro anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of lovastatin in rodents. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 44, 173–81.
- Granato, D., Bergonzelli, G.E., Pridmore, R.D., Marvin, L., Rouvet, M., Corthésy-Theulaz, I.E., 2004. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of

- Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect. Immun.* 72, 2160–9.
- Grangette, C., Nutten, S., Palumbo, E., Morath, S., Hermann, C., Dewulf, J., Pot, B., Hartung, T., Hols, P., Mercenier, A., 2005. From the cover: enhanced antiinflammatory capacity of a *Lactobacillus plantarum* mutant synthesizing modified teichoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 10321–10326.
- Han, C., Ding, Z., Shi, H., Qian, W., Hou, X., Lin, R., 2016. The role of probiotics in lipopolysaccharide-induced autophagy in intestinal epithelial cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 38, 2464–2478.
- Hassimotto, N.M.A., Moreira, V., Nascimento, N.G. do, Souto, P.C.M. de C., Teixeira, C., Lajolo, F.M., 2013. Inhibition of carrageenan-induced acute inflammation in mice by oral administration of anthocyanin mixture from wild mulberry and cyanidin-3-glucoside. *Biomed Res. Int.* 2013, 1–10.
- Haziot, A., Tsuberi, B.Z., Goyert, S.M., 1993. Neutrophil CD14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor-alpha in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 150, 5556–65.
- He, Z., Liu, H., Agostini, M., Yousefi, S., Perren, A., Tschan, M.P., Mak, T.W., Melino, G., Simon, H.U., 2013. p73 regulates autophagy and hepatocellular lipid metabolism through a transcriptional activation of the ATG5 gene. *Cell Death Differ.* 20, 1415–24.
- Hedin, C., Whelan, K., Lindsay, J.O., 2007. Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proc. Nutr. Soc.* 66, 307–315.
- Hinson, J.A., Roberts, D.W., James, L.P., 2010. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb. Exp. Pharmacol.* 369–405.
- Hooper, L. V., 2009. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 367–374.
- Hoving, J.C., Wilson, G.J., Brown, G.D., 2014. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell. Microbiol.* 16, 185–94.
- Hu, Z., Zhang, J., Zhang, Q., 2011. Expression pattern and functions of autophagy-related gene atg5 in zebrafish organogenesis. *Autophagy* 7, 1514–27.

- Hynönen, U., Palva, A., 2013. *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5225–43.
- Ichimura, Y., Waguri, S., Sou, Y., Kageyama, S., Hasegawa, J., Ishimura, R., Saito, T., Yang, Y., Kouno, T., Fukutomi, T., Hoshii, T., Hirao, A., Takagi, K., Mizushima, T., Motohashi, H., Lee, M.-S., Yoshimori, T., Tanaka, K., Yamamoto, M., Komatsu, M., 2013. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol. Cell* 51, 618–631.
- Iliev, I.D., Kitazawa, H., Shimosato, T., Katoh, S., Morita, H., He, F., Hosoda, M., Saito, T., 2005. Strong immunostimulation in murine immune cells by *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA containing novel oligodeoxynucleotide pattern. *Cell. Microbiol.* 7, 403–414.
- Inaba, Y., Ueno, N., Numata, M., Zhu, X., Messer, J.S., Boone, D.L., Fujiya, M., Kohgo, Y., Musch, M.W., Chang, E.B., 2016. Soluble bioactive microbial mediators regulate proteasomal degradation and autophagy to protect against inflammation-induced stress. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 311, G634–G647.
- Irving, A.T., Mimuro, H., Kufer, T.A., Lo, C., Wheeler, R., Turner, L.J., Thomas, B.J., Malosse, C., Gantier, M.P., Casillas, L.N., Votta, B.J., Bertin, J., Boneca, I.G., Sasakawa, C., Philpott, D.J., Ferrero, R.L., Kaparakis-Liaskos, M., 2014. The immune receptor NOD1 and kinase RIP2 interact with bacterial peptidoglycan on early endosomes to promote autophagy and inflammatory signaling. *Cell Host Microbe* 15, 623–635.
- Ivanov, D., Emonet, C., Foata, F., Affolter, M., Delley, M., Fisseha, M., Blum-Sperisen, S., Kochhar, S., Arigoni, F., 2006. A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase-like serine proteases. *J. Biol. Chem.* 281, 17246–17252.
- Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Bowitz Larsen, K., Atesoh Awuh, J., Øvervatn, A., McMahon, M., Hayes, J.D., Johansen, T., 2010. *p62/SQSTM1* is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J. Biol. Chem.* 285, 22576–22591.
- Jijon, H., Backer, J., Diaz, H., Yeung, H., Thiel, D., McKaigney, C., De Simone, C.,

- Madsen, K., 2004. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 126, 1358–73.
- Jones, R.M., Desai, C., Darby, T.M., Luo, L., Wolfarth, A.A., Scharer, C.D., Ardita, C.S., Reedy, A.R., Keebaugh, E.S., Neish, A.S., 2015. Lactobacilli modulate epithelial cytoprotection through the Nrf2 pathway. *Cell Rep.* 12, 1217–1225.
- Jones, S.E., Paynich, M.L., Knight, K.L., 2014. Exopolysaccharides: sweet success with probiotic therapeutics. *Inflamm. Cell Signal.* 1.
- Kaur, J., Debnath, J., 2015. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 461–472.
- Kim, S.-J., Khan, M., Quan, J., Till, A., Subramani, S., Siddiqui, A., 2013. Hepatitis B virus disrupts mitochondrial dynamics: induces fission and mitophagy to attenuate apoptosis. *PLoS Pathog.* 9, e1003722.
- Kim, S., Willett, J.L., 2001. An optical microscope for the study of biopolymer solutions under shear field. *Rev. Sci. Instrum.* 72, 4252–4260.
- Kim, Y., Oh, S., Yun, H.S., Oh, S., Kim, S.H., 2010. Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 123–30.
- Kingston, D.G.I., 2011. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J. Nat. Prod.* 74, 496–511.
- Kleerebezem, M., Vaughan, E.E., 2009. Probiotic and gut Lactobacilli and Bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. *Annu. Rev. Microbiol.* 63, 269–290.
- Klionsky, D.J., Eskelinen, E.-L., Deretić, V., 2014. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... wait, I'm confused. *Autophagy* 10, 549–51.
- Kobayashi, S., Xu, X., Chen, K., Liang, Q., 2012. Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Autophagy* 8, 577–592.
- Kojić, M., Vujčić, M., Banina, A., Cocconcelli, P., Cerning, J., Topisirović, L., 1992. Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11, isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4086–8.

- Konstantinov, S.R., Smidt, H., de Vos, W.M., Bruijns, S.C.M., Singh, S.K., Valence, F., Molle, D., Lortal, S., Altermann, E., Klaenhammer, T.R., van Kooyk, Y., 2008. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 19474–19479.
- Kulkarni, S.K., Jain, N.K., Singh, A., 2000. Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 22, 291–8.
- Lau, D., Mollnau, H., Eiserich, J.P., Freeman, B.A., Daiber, A., Gehling, U.M., Brümmer, J., Rudolph, V., Münzel, T., Heitzer, T., Meinertz, T., Baldus, S., 2005. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 431–6.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J., 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 171–184.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J., 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 728–764.
- Lee, W.M., 2004. Acetaminophen and the U.S. acute liver failure study group: lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology* 40, 6–9.
- Lembre, P., Lorentz, C., Di, P., 2012. Exopolysaccharides of the biofilm matrix: a complex biophysical world. In: *The complex world of polysaccharides*. InTech.
- Li, X., Guo, J., Dai, S., Ouyang, Y., Wu, H., Sun, W., Wang, G., 2009. Exploring and exploiting microbial diversity through metagenomics for natural product drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 9, 1525–35.
- Li, X., Xu, M., Liu, M., Ji, Y., Li, Z., 2015. TNF-alpha and IL-6 inhibit apolipoprotein A-IV production induced by linoleic acid in human intestinal Caco2 cells. *J. Inflamm.* 12, 22.
- Li, X., Yan, J., Wang, L., Xiao, F., Yang, Y., Guo, X., Wang, H., 2013. Beclin1 inhibition promotes autophagy and decreases gemcitabine-induced apoptosis in Miapaca2 pancreatic cancer cells. *Cancer Cell Int.* 13, 26.
- Linley, J.E., Rose, K., Ooi, L., Gamper, N., 2010. Understanding inflammatory pain: ion

- channels contributing to acute and chronic nociception. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 459, 657–669.
- Liong, M.-T., 2008a. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: postulated mechanisms and in-vivo evidence. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 854–63.
- Liong, M.-T., 2008b. Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutr. Rev.* 66, 192–202.
- Liu, K., Shi, Y., Guo, X., Wang, S., Ouyang, Y., Hao, M., Liu, D., Qiao, L., Li, N., Zheng, J., Chen, D., 2014. CHOP mediates ASPP2-induced autophagic apoptosis in hepatoma cells by releasing Beclin-1 from Bcl-2 and inducing nuclear translocation of Bcl-2. *Cell Death Dis.* 5, e1323.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Lugrin, J., Parapanov, R., Rosenblatt-Velin, N., Rignault-Clerc, S., Feihl, F., Waeber, B., Müller, O., Vergely, C., Zeller, M., Tardivel, A., Schneider, P., Pacher, P., Liaudet, L., 2015. Cutting edge: IL-1 α is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction. *J. Immunol.* 194, 499–503.
- Lukić, J., Jančić, I., Mirković, N., Bufan, B., Djokić, J., Milenković, M., Begović, J., Strahinić, I., Lozo, J., 2017. *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus salivarius* differently modulate early immunological response of Wistar rats co-administered with *Listeria monocytogenes*. *Benef. Microbes* 8, 809–822.
- Lukić, J., Strahinić, I., Milenković, M., Golić, N., Kojić, M., Topisirović, L., Begović, J., 2013. Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with rat colonic mucosa: implications for colitis induction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5735–44.
- Ma, T., Li, J., Xu, Y., Yu, C., Xu, T., Wang, H., Liu, K., Cao, N., Nie, B., Zhu, S., Xu, S., Li, K., Wei, W., Wu, Y., Guan, K., Ding, S., 2015. Atg5-independent autophagy regulates mitochondrial clearance and is essential for iPSC reprogramming. *Nat. Cell Biol.* 17, 1379–1387.
- Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskins, H.R., 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1035S–1045S.
- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S., Kitamura, S., 2004. Effects of an

- exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors* 22, 197–200.
- Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A., Locati, M., 2013. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* 229, 176–185.
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428–435.
- Medzhitov, R., 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819–826.
- Mencin, A., Kluwe, J., Schwabe, R.F., 2009. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut* 58, 704–720.
- Meurman, J., Stamatova, I., 2007. Probiotics: contributions to oral health. *Oral Dis.* 13, 443–451.
- Mihailović, M., Živković, M., Jovanović, J.A., Tolinački, M., Sinadinović, M., Rajić, J., Uskoković, A., Dinić, S., Grdović, N., Golić, N., Vidaković, M., 2017. Oral administration of probiotic *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 attenuates diabetes-induced liver and kidney damage in rats. *J. Funct. Foods* 38, 427–437.
- Miyakawa, K., Albee, R., Letzig, L.G., Lehner, A.F., Scott, M.A., Buchweitz, J.P., James, L.P., Ganey, P.E., Roth, R.A., 2015. A cytochrome P450-independent mechanism of acetaminophen-induced injury in cultured mouse hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 354, 230–237.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., Levine, B., 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140, 313–326.
- Morris, C.J., 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. In: *Inflammation protocols*. Humana Press, New Jersey, 115–122.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mousavi, S.A., Fønhus, M.S., Berg, T., 2009. Up-regulation of uPARAP/Endo180 during culture activation of rat hepatic stellate cells and its presence in hepatic stellate cell lines from different species. *BMC Cell Biol.* 10, 39.
- Mukai, T., Kaneko, S., Matsumoto, M., Ohori, H., 2004. Binding of *Bifidobacterium*

- bifidum* and *Lactobacillus reuteri* to the carbohydrate moieties of intestinal glycolipids recognized by peanut agglutinin. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 357–62.
- Murata, H., Takamatsu, H., Liu, S., Kataoka, K., Huh, N., Sakaguchi, M., 2015. NRF2 regulates PINK1 expression under oxidative stress conditions. *PLoS One* 10, e0142438.
- Nataraj, S., Schomäcker, R., Kraume, M., Mishra, I.M., Drews, A., 2008. Analyses of polysaccharide fouling mechanisms during crossflow membrane filtration. *J. Memb. Sci.* 308, 152–161.
- Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 173–182.
- Nes, I.F., Kjos, M., Diep, D.B., 2012. Antimicrobial components of lactic acid bacteria. In: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, 4th ed. CRC Press, 286–311.
- Neuhaus, F.C., Baddiley, J., 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 686–723.
- Nguyen, T., Nioi, P., Pickett, C.B., 2009. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 284, 13291–5.
- Ni, H.-M., Bockus, A., Boggess, N., Jaeschke, H., Ding, W.-X., 2012a. Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology* 55, 222–232.
- Ni, H.-M., Jaeschke, H., Ding, W.-X., 2012b. Targeting autophagy for drug-induced hepatotoxicity. *Autophagy* 8, 709–710.
- Nikolić, M., López, P., Strahinić, I., Suárez, A., Kojić, M., Fernández-García, M., Topisirović, L., Golić, N., Ruas-Madiedo, P., 2012. Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 158, 155–162.
- Nilsen, N.J., Deininger, S., Nonstad, U., Skjeldal, F., Husebye, H., Rodionov, D., von Aulock, S., Hartung, T., Lien, E., Bakke, O., Espevik, T., 2008. Cellular trafficking of

- lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling; role of CD14 and CD36. *J. Leukoc. Biol.* 84, 280–291.
- Oelschlaeger, T.A., 2010. Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 57–62.
- Oh, J.E., Lee, H.K., 2014. Pattern recognition receptors and autophagy. *Front. Immunol.* 5, 300.
- Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.-A., Outzen, H., Øvervatn, A., Bjørkøy, G., Johansen, T., 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* 282, 24131–24145.
- Patel, R.M., Denning, P.W., 2013. Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: what is the current evidence? *Clin. Perinatol.* 40, 11–25.
- Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., Kleinert, H., 2010. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23, 75–93.
- Peinnequin, A., Mouret, C., Birot, O., Alonso, A., Mathieu, J., Clarençon, D., Agay, D., Chancerelle, Y., Multon, E., 2004. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol.* 5, 3.
- Pereira, J.G., Mesquita, J.X., Aragão, K.S., Franco, Á.X., Souza, M.H.L.P., Brito, T. V., Dias, J.M., Silva, R.O., Medeiros, J.-V.R., Oliveira, J.S., Abreu, C.M.W.S., de Paula, R.C.M., Barbosa, A.L.R., Freitas, A.L.P., 2014. Polysaccharides isolated from *Digenea simplex* inhibit inflammatory and nociceptive responses. *Carbohydr. Polym.* 108, 17–25.
- Pillai, A., Nelson, R.L., 2008. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004611.
- Pober, J.S., Sessa, W.C., 2007. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 803–815.
- Proft, T., Baker, E.N., 2009. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 613–635.

- Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K., Lee, J., Takabayashi, K., Raz, E., 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126, 520–8.
- Rajilić-Stojanović, M., 2013. Function of the microbiota. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 27, 5–16.
- Ramesan, M.T., Surya, K., 2016. Fabrication and characterization of biopolymer nanocomposites from natural resource materials. *Polym. Compos.* 38, E66–E73.
- Rautou, P.-E., Mansouri, A., Lebrech, D., Durand, F., Valla, D., Moreau, R., 2010. Autophagy in liver diseases. *J. Hepatol.* 53, 1123–1134.
- Resta-Lenert, S., Barrett, K.E., 2006. Probiotics and commensals reverse TNF- α - and IFN- γ -induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 130, 731–746.
- Reuter, G., 2001. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2, 43–53.
- Rishi, P., Mavi, S.K., Bharrhan, S., Shukla, G., Tewari, R., 2009. Protective efficacy of probiotic alone or in conjunction with a prebiotic in *Salmonella*-induced liver damage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69, 222–230.
- Rock, K.L., Kono, H., 2008. The inflammatory response to cell death. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3, 99–126.
- Rousseaux, C., Thuru, X., Gelot, A., Barnich, N., Neut, C., Dubuquoy, L., Dubuquoy, C., Merour, E., Geboes, K., Chamailard, M., Ouwehand, A., Leyer, G., Carcano, D., Colombel, J.-F., Ardid, D., Desreumaux, P., 2007. *Lactobacillus acidophilus* modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors. *Nat. Med.* 13, 35–37.
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C.G., Salminen, S., 2006. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Prot.* 69, 2011–5.
- Sahani, M.H., Itakura, E., Mizushima, N., 2014. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional

- upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy* 10, 431–441.
- Sakai, F., Hosoya, T., Ono-Ohmachi, A., Ukibe, K., Ogawa, A., Moriya, T., Kadooka, Y., Shiozaki, T., Nakagawa, H., Nakayama, Y., Miyazaki, T., 2014. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 induces TGF- β expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. *PLoS One* 9, e105370.
- Sánchez, B., Bressollier, P., Urdaci, M.C., 2008. Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 54, 1–17.
- Sanchez, B., Urdaci, M.C., Margolles, A., 2010. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiology* 156, 3232–3242.
- Sanmarco, L.M., Ponce, N.E., Visconti, L.M., Eberhardt, N., Theumer, M.G., Minguez, Á.R., Aoki, M.P., 2017. IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1863, 857–869.
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S., Black, R.E., 2006. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infect. Dis.* 6, 374–382.
- Schlee, M., Wehkamp, J., Altenhoefer, A., Oelschlaeger, T.A., Stange, E.F., Fellermann, K., 2007. Induction of human-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect. Immun.* 75, 2399–2407.
- Segal, A.W., 2005. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 197–223.
- Segawa, S., Fujiya, M., Konishi, H., Ueno, N., Kobayashi, N., Shigyo, T., Kohgo, Y., 2011. Probiotic-derived polyphosphate enhances the epithelial barrier function and maintains intestinal homeostasis through integrin-p38 MAPK pathway. *PLoS One* 6, e23278.
- Segawa, S., Wakita, Y., Hirata, H., Watari, J., 2008. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 371–377.
- Seki, E., Brenner, D.A., 2008. Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease:

- Update. *Hepatology* 48, 322–335.
- Serhan, C.N., 2007. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 101–137.
- Seth, A., Yan, F., Polk, D.B., Rao, R.K., 2008. Probiotics ameliorate the hydrogen peroxide-induced epithelial barrier disruption by a PKC- and MAP kinase-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294, G1060-9.
- Shamsipur, M., Pourmortazavi, S.M., Beigi, A.A.M., Heydari, R., Khatibi, M., 2013. Thermal stability and decomposition kinetic studies of acyclovir and zidovudine drug compounds. *AAPS PharmSciTech* 14, 287–293.
- Sharma, S., Singh, R.L., Kakkar, P., 2011. Modulation of Bax/Bcl-2 and caspases by probiotics during acetaminophen induced apoptosis in primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 49, 770–779.
- Stepanović-Petrović, R.M., Micov, A.M., Tomić, M.A., Ugrešić, N.D., 2012. The local peripheral antihyperalgesic effect of levetiracetam and its mechanism of action in an inflammatory pain model. *Anesth. Analg.* 115, 1457–1466.
- Strahinić, I., Busarčević, M., Pavlica, D., Milašin, J., Golić, N., Topisirović, L., 2007. Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral Microbiol. Immunol.* 22, 111–117.
- Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A., Watanabe, T., 2006. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 9–20.
- Sun, W.-L., 2016. Ambra1 in autophagy and apoptosis: implications for cell survival and chemotherapy resistance. *Oncol. Lett.* 12, 367–374.
- Suzuki, H.I., Kiyono, K., Miyazono, K., 2010. Regulation of autophagy by transforming growth factor- β (TGF- β) signaling. *Autophagy* 6, 645–647.
- Tang, W., Dong, M., Wang, W., Han, S., Rui, X., Chen, X., Jiang, M., Zhang, Q., Wu, J., Li, W., 2017. Structural characterization and antioxidant property of released exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1. *Carbohydr. Polym.* 173, 654–664.
- Tanga, F., Raghavendra, V., DeLeo, J., 2004. Quantitative real-time RT-PCR assessment of

- spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem. Int.* 45, 397–407.
- Tannock, G.W., 1999. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 265–78.
- Theodorou, V., Ait-Belgnaoui, A., Agostini, S., Eutamene, H., 2014. Effect of commensals and probiotics on visceral sensitivity and pain in irritable bowel syndrome. *Gut Microbes* 5, 430–629.
- Tilleux, S., Berger, J., Hermans, E., 2007. Induction of astrogliosis by activated microglia is associated with a down-regulation of metabotropic glutamate receptor 5. *J. Neuroimmunol.* 189, 23–30.
- Tomić, M.A., Vučković, S.M., Stepanović-Petrović, R.M., Ugrešić, N., Prostran, M.Š., Bošković, B., 2004. The anti-hyperalgesic effects of carbamazepine and oxcarbazepine are attenuated by treatment with adenosine receptor antagonists. *Pain* 111, 253–260.
- Tomić, M., Stepanović-Petrović, R., 2011. Terapija bola i glavobolje. Farmakoterapija za farmaceute. Farmaceutski fakultet, Univerziteta u Beogradu, 357-386.
- Travassos, L.H., Girardin, S.E., Philpott, D.J., Blanot, D., Nahori, M.-A., Werts, C., Boneca, I.G., 2004. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO Rep.* 5, 1000–1006.
- Triantafilou, M., Brandenburg, K., Kusumoto, S., Fukase, K., Mackie, A., Seydel, U., Triantafilou, K., 2004. Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses. *Biochem. J.* 381, 527–536.
- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., Rescigno, M., 2012. Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut* 61, 1007–1015.
- Tsilingiri, K., Rescigno, M., 2013. Postbiotics: what else? *Benef. Microbes* 4, 101–107.
- Urbani, R., Sist, P., Pletikapić, G., Misić, T., Svetličić, V., Zutić, V., 2012. Diatom polysaccharides: extracellular production, isolation and molecular characterization. In: *The complex world of polysaccharides*. InTech.

- Vanderpool, C., Yan, F., Polk, B.D., 2008. Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 14, 1585–1596.
- Vavricka, S.R., Musch, M.W., Chang, J.E., Nakagawa, Y., Phanvijhitsiri, K., Waypa, T.S., Merlin, D., Schneewind, O., Chang, E.B., 2004. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* 127, 1401–9.
- Vidal, K., Donnet-Hughes, A., Granato, D., 2002. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus johnsonii* strain La1 and *Lactobacillus acidophilus* strain La10 antagonize the responsiveness of human intestinal epithelial HT29 cells to lipopolysaccharide and gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* 70, 2057–64.
- Vivancos, G.G., Verri, W.A., Cunha, T.M., Schivo, I.R.S., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2004. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 37, 391–9.
- von Schillde, M.-A., Hörmannspurger, G., Weiher, M., Alpert, C.-A., Hahne, H., Bäuerl, C., van Huynegem, K., Steidler, L., Hrnčir, T., Pérez-Martínez, G., Kuster, B., Haller, D., 2012. Lactocepine secreted by *Lactobacillus* exerts anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines. *Cell Host Microbe* 11, 387–396.
- von Wright, A., Axelsson L., 2012. Lactic acid bacteria: an introduction. In: *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, 4th ed. CRC Press, 2-14.
- Vučičević, L., Misirkić, M., Janjetović, K., Vilimanovich, U., Sudar, E., Isenović, E., Prica, M., Harhaji-Trajković, L., Kravić-Stevović, T., Bumbaširević, V., Trajković, V., 2011. Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway. *Autophagy* 7, 40–50.
- Walsh, C.T., 2008. The chemical versatility of natural-product assembly lines. *Acc. Chem. Res.* 41, 4–10.
- Walter, J., 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4985–96.
- Wang, Y., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., Bai, X., 2010. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet

- Kefir. *Carbohydr. Polym.* 82, 895–903.
- Westerink, W.M.A., Schoonen, W.G.E.J., 2007. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. in Vitro* 21, 1581–1591.
- Williams, J.A., Ding, W.-X., 2015. Targeting Pink1-Parkin-mediated mitophagy for treating liver injury. *Pharmacol. Res.* 102, 264–269.
- Wu, S., Yuan, L., Zhang, Y., Liu, F., Li, G., Wen, K., Kocher, J., Yang, X., Sun, J., 2013. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG mono-association suppresses human rotavirus-induced autophagy in the gnotobiotic piglet intestine. *Gut Pathog.* 5, 22.
- Xie, Y., McGill, M.R., Dorko, K., Kumer, S.C., Schmitt, T.M., Forster, J., Jaeschke, H., 2014. Mechanisms of acetaminophen-induced cell death in primary human hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279, 266–274.
- Xing, Z., Gauldie, J., Cox, G., Baumann, H., Jordana, M., Lei, X.F., Achong, M.K., 1998. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 101, 311–20.
- Xu, J., Ma, M., Purcell, W.M., 2003. Characterisation of some cytotoxic endpoints using rat liver and HepG2 spheroids as in vitro models and their application in hepatotoxicity studies. I. Glucose metabolism and enzyme release as cytotoxic markers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189, 100–11.
- Yan, F., Cao, H., Cover, T.L., Washington, M.K., Shi, Y., Liu, L., Chaturvedi, R., Peek, R.M., Wilson, K.T., Polk, D.B., 2011. Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 121, 2242–2253.
- Yan, F., Cao, H., Cover, T.L., Whitehead, R., Washington, M.K., Polk, D.B., 2007. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* 132, 562–575.
- Yasuda, E., Serata, M., Sako, T., 2008. Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4746–55.
- Yoshida, A., Yamada, K., Yamazaki, Y., Sashihara, T., Ikegami, S., Shimizu, M., Totsuka,

- M., 2011. *Lactobacillus gasseri* OLL2809 and its RNA suppress proliferation of CD4(+) T cells through a MyD88-dependent signalling pathway. *Immunology* 133, 442–51.
- Zhang, J., 2013. Autophagy and mitophagy in cellular damage control. *Redox Biol.* 1, 19–23.
- Zhang, J.-M., An, J., 2007. Cytokines, inflammation, and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* 45, 27–37.
- Zhang, W., Zhu, Y.-H., Yang, G.-Y., Liu, X., Xia, B., Hu, X., Su, J.-H., Wang, J.-F., 2018. *Lactobacillus rhamnosus* GG affects microbiota and suppresses autophagy in the intestines of pigs challenged with *Salmonella* Infantis. *Front. Microbiol.* 8, 2705.
- Zhou, Y.-Y., Li, Y., Jiang, W.-Q., Zhou, L.-F., 2015. MAPK/JNK signalling: a potential autophagy regulation pathway. *Biosci. Rep.* 35.
- Zhu, J., Paul, W.E., 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557–69.
- Živković, M., Hidalgo-Cantabrana, C., Kojić, M., Gueimonde, M., Golić, N., Ruas-Madiedo, P., 2015. Capability of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-producing isogenic strain NB1, to counteract the effect of enteropathogens upon the epithelial cell line HT29-MTX. *Food Res. Int.* 74, 199–207.
- Živković, M., Miljković, M.S., Ruas-Madiedo, P., Markelić, M.B., Veljović, K., Tolinački, M., Soković, S., Korać, A., Golić, N., 2016. EPS-SJ exopolisaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on *E. coli* association to Caco-2 cells. *Front. Microbiol.* 7, 286.

BIOGRAFIJA AUTORA

Miroslav R. Dinić je rođen 22.01.1988. godine u Zaječaru, Republika Srbija. Farmaceutski fakultet, Univerziteta u Beogradu, studijski program magistar farmacije, upisao je školske 2007/08. godine, a diplomirao 11.09.2012. godine sa prosečnom ocenom 9,04. Nakon obavljenog pripravničkog staža, 2013. godine je položio stručni ispit za farmaceute. Doktorske akademske studije iz farmaceutske mikrobiologije na Farmaceutskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, upisao je školske 2012/2013. godine. Od oktobra 2014. godine zaposlen je kao istraživač pripravnik u Laboratoriji za molekularnu mikrobiologiju, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu. Angažovan je na realizaciji projekta “Izučavanje gena i molekularnih mehanizama u osnovi probiotičke aktivnosti bakterija mlečne kiseline izolovanih sa područja zapadnog balkana” (OI 173019). Godine 2017. izabran je u zvanje istraživača saradnika.

Autor je i koautor 7 objavljenih radova: 5 radova u vrhunskim međunarodnim časopisima M21 kategorije i 2 rada u međunarodnim časopisima M23 kategorije. Na međunarodnim i domaćim naučnim skupovima ima 10 saopštenja. Dobitnik je Godišnje nagrade Farmaceutskog fakulteta za naučno-istraživački rad na poslediplomskim studijama za 2016. godinu, kao i FEMS stipendije za mlade naučnike (2018) koja će mu omogućiti tromesečni boravak u CECAD Institutu, Univerziteta u Kelnu, Nemačka, u laboratoriji prof. dr Aleksandre Trifunović.

Član je Udruženja mikrobiologa Srbije i Srpskog društva za molekularnu biologiju.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани: Мирослав Динић

Број уписа: 4/12

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај биоактивних молекула лактобацила на процесе аутофагије и инфламације у *in vitro* и *in vivo* системима

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 06.04.2018.

M. Dinić

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: Мирослав Динић

Број уписа: 4/12

Студијски програм: Докторске академске студије, модул: фармацеутска
микробиологија

Наслов рада: Утицај биоактивних молекула лактобацила на процесе аутофагије
и инфламације у *in vitro* и *in vivo* системима

Ментор: проф.др Марина Миленковић, др Јованка Лукић

Потписани Мирослав Динић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**. Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада. Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 06. 04. 2018.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај биоактивних молекула лактобацила на процесе аутофагије и инфламације у *in vitro* и *in vivo* системима

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 06.04.2018.





Lactobacillus fermentum Postbiotic-induced Autophagy as Potential Approach for Treatment of Acetaminophen Hepatotoxicity

Miroslav Dinić¹, Jovanka Lukić^{1*}, Jelena Djokić¹, Marina Milenković², Ivana Strahinić¹,
Nataša Golić¹ and Jelena Begović¹

¹ Laboratory for Molecular Microbiology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, ² Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia

OPEN ACCESS

Edited by:

Rebeca Martin,
INRA Centre Jouy-en-Josas, France

Reviewed by:

Sanja Schneider,
VU University Amsterdam,
Netherlands
Leda Giannuzzi,
National University of La Plata,
Argentina

*Correspondence:

Jovanka Lukić
lukicjovanka@imgge.bg.ac.rs

Specialty section:

This article was submitted to
Food Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 20 January 2017

Accepted: 22 March 2017

Published: 06 April 2017

Citation:

Dinić M, Lukić J, Djokić J,
Milenković M, Strahinić I, Golić N
and Begović J (2017) *Lactobacillus*
fermentum Postbiotic-induced
Autophagy as Potential Approach for
Treatment of Acetaminophen
Hepatotoxicity.
Front. Microbiol. 8:594.
doi: 10.3389/fmicb.2017.00594

The aim of this study was to investigate the potential of postbiotics originated from *Lactobacillus fermentum* BGHV110 strain (HV110) to counteract acetaminophen (APAP)-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. This strain was selected according to its autophagy inducing potential, based on previous studies reporting protective role of autophagy in APAP caused cellular damage. Cell viability was assessed using MTT and LDH assays, while autophagy was monitored by qPCR analysis of *BECN1*, *Atg5*, *p62/SQSTM1*, and *PINK1* mRNA expression and by Western blot analysis of p62/SQSTM1 and lipidated LC3 accumulation. Our results showed that detrimental effect of APAP on cell viability was suppressed in the presence of HV110 which was linked with increased conversion of LC3 protein and p62/SQSTM1 protein degradation. Additionally, higher *p62/SQSTM1* and *PINK1* mRNA transcription were noticed in cells co-treated with APAP/HV110, simultaneously. In conclusion, this study suggests that HV110 enhances activation of PINK1-dependent autophagy in HepG2 cells and its eventual co-supplementation with APAP could be potentially used for alleviation of hepatotoxic side effects caused by APAP overdose.

Keywords: autophagy, *Lactobacillus fermentum*, postbiotics, acetaminophen, hepatotoxicity

INTRODUCTION

Acetaminophen [paracetamol, *N*-acetyl-*p*-aminophenol (APAP)] is widely used analgesic and antipyretic drug which is safe and effective at a therapeutic dose (Lee, 2004). However, acute or cumulative overdose can cause hepatic necrosis and liver failure (Larson et al., 2005). The mechanisms of APAP-induced liver injury described to this moment include generation of reactive metabolite, *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) and *p*-aminophenol (PAP) (Miyakawa et al., 2015). Given an important role of autophagy in elimination of damaged organelles, including mitochondria, it has been shown that activation of autophagy could serve as a cellular adaptive mechanism to counteract APAP-induced hepatotoxicity (Igusa et al., 2012; Ni et al., 2012).

Autophagy is tightly regulated and highly inducible catabolic cellular process involved in degradation of organelles and long-living proteins. During this process double-membrane vesicles (autophagosomes) are formed and fused with lysosomes while enclosed material is degraded. Literature data suggest that deregulation of autophagy is highly associated with various liver diseases. For example, in liver ischemia reperfusion injury autophagy exhibits prosurvival activity, while in hepatocellular carcinoma autophagy level is decreased (Rautou et al., 2010). Therefore,

therapeutics capable to induce autophagy could be beneficial for liver associated pathological conditions.

In addition to well-known autophagy promoting stimuli (e.g., starvation, rapamycin, hormones), upregulation of autophagy can occur in bacterial, viral, and parasitic infections (Lum et al., 2005; Mizushima et al., 2010). Irving et al. (2014) demonstrated that peptidoglycan derived from *Helicobacter pylori* and *Pseudomonas aeruginosa* promotes autophagy in epithelial cells via NOD1 receptor activation. Moreover, several studies reported potential of some *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* species to stimulate or suppress autophagy (Wu et al., 2013; Lin et al., 2014; Motevaseli et al., 2016).

Lactobacilli are beneficial bacteria, commonly used as probiotics. It has been shown that certain *Lactobacillus* strains were associated with suppression of liver injury caused by oxidative stress, pathogens, hepatic encephalopathy, and alcoholic liver disease (Segawa et al., 2008; Forsyth et al., 2009; Rishi et al., 2009). However, novel trends in probiotic supplementation are oriented toward replacement of live bacteria with non-viable bacterial extracts and metabolic by-products, termed postbiotics (Konstantinov et al., 2013; Patel and Denning, 2013). This new approach reduces health risks associated with consumption of live bacteria, especially concerning their high immune stimulating potential (Tsilingiri et al., 2012). Recent data showed that postbiotics can modulate different cellular pathways. Sharma et al. (2011) reported the cyto-protective activity of supernatants obtained from probiotics *Enterococcus lactis* IITRHR1 and *Lactobacillus acidophilus* MTCC447 against APAP induced hepatotoxicity. Particularly, the authors showed that the postbiotics have potential to restore glutathione level, reduce generation of major oxidative stress markers and to enhance production of anti-apoptotic (Bcl-2) protein.

Considering the fact that mitochondrial damage is a critical event in APAP-induced oxidative stress and cellular necrosis, activation of PINK1-Parkin signaling pathway is crucial for upregulation of mitochondrial autophagy. PINK1 is required for Parkin recruitment to damaged mitochondria when mitochondrial membrane potential is impaired, causing recruitment of p62/SQSTM1, an autophagy adaptor molecule, which is essential for final mitochondrial clearance (Williams and Ding, 2015).

In the light of above presented facts, we assessed the potential of autophagy inducing postbiotics originated from *Lactobacillus fermentum* BGHV110 strain to improve the viability of human hepatoma HepG2 cells exposed to APAP. Hence, according to our knowledge the results of this study for the first time suggest on the cyto-protective effect of postbiotics in APAP mediated hepatotoxicity.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strain and Preparation of the Bioactive Lysate (Postbiotic)

Lactobacillus fermentum BGHV110, a human isolate from Laboratory collection, was used in the study. Determination of the species identity was performed by 16S rDNA sequencing

using UNI16SF and UNI16SR primers complementary to 16S rDNA (Jovcic et al., 2009). PCR amplification was performed using KAPA *Taq* DNA polymerase kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). Reaction mixture contained: 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 50 mM each of the dNTPs, 1 U of *Taq* polymerase, 5 pM of each primer (for multiplex PCR 0.25 μM of each primer), and 0.1 μg of template DNA in a final volume of 50 μl. The PCR product was purified with QIAquick PCR Purification KIT (Qiagen, Hilden, Germany) and sequenced by Macrogen (Seoul, South Korea). The BLAST algorithm¹ was used to determine the most related DNA sequences in the NCBI GenBank database.

Bacteria were cultured in MRS broth (Merck, Darmstadt, Germany) at 37°C under anaerobic conditions using Anaerocult A (Merck). In order to obtain bioactive lysate overnight culture was pelleted (5000 rpm, 10 min) and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). Bacterial pellet was 10 times concentrated in PBS followed by homogenization in a French press (three passages). Homogenized bacterial suspension was lyophilized (Alpha 1–4 LSC Plus Freeze dryer, Martin Christ, Germany) and stored at +4°C until further use.

Cell Culture and Treatments

Human hepatoma cell line HepG2 was cultured in low glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine (Gibco, Life Technologies). The cells were maintained in 75 cm² flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ and split at 80% confluence every 5 days. Cells were seeded in 24-well plate (2 × 10⁵ cells) and incubated at 37°C overnight followed by cells pretreatment with complete DMEM containing high glucose concentration in order to downregulate autophagy (Kobayashi et al., 2012). After 6 h, cells were treated with different concentrations of postbiotics obtained from *Lactobacillus fermentum* BGHV110 strain (HV110) in order to select appropriate dose for further experiments. Postbiotic was dissolved in complete DMEM medium and added to the cells in specific final concentration. In all other experiments seeded cells were treated with 50 mM APAP (Sigma-Aldrich, Germany) alone or co-treated with 50 mM APAP and selected dose of lyophilized HV110. To analyze autophagic flux, simultaneously with treatments, cells were exposed to lysosomotropic agent chloroquine (Sigma-Aldrich) at a concentration of 25 μM, to inhibit autophagosome-lysosome fusion. After 16 h of incubation, cells were subjected to following analysis.

Metabolic Activity of HepG2 Cells

Metabolic activity of HepG2 cells was examined by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay (Serva, Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) as described by Mosmann (1983). After the treatment, the cells were washed with PBS and MTT dissolved in complete media was added at the final concentration of 0.5 mg/ml. After 4 h of incubation, at 37°C with 5% CO₂, the media was aspirated and 10% SDS-0.01 N HCl was added to dissolve formazan.

¹<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

The absorbance was measured with a microplate reader (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) at a wavelength of 570 nm. Results are presented as percentage of metabolic activity of treated cells compared to control.

Cytotoxicity Assay

The level of cytotoxicity in the cell cultures was measured by lactate dehydrogenase (LDH) Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific) which detects LDH released from dead cells. After treatments, supernatants were collected and LDH activity was determined by following the manufacturer's instructions. The absorbance was measured at 450 nm on a microplate reader (Tecan). Since there is an interference between APAP and LDH assay (Xu et al., 2003) only the treatments where APAP is used in the same dose are compared and results are presented as absorbance at 450 nm.

Western Blotting

Following the different treatments, cells were lysed with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH = 7.4; 150 mM NaCl; 1% NP-40; 0.25% sodium deoxycholate) containing Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Basel, Switzerland) and 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich), for 30 min on ice. Cell lysate was centrifuged at 12000 rpm for 15 min at 4°C and the protein concentration was measured using Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories). Total cell proteins (20 µg) were separated on 12% SDS-PAGE and transferred to 0.2 µm nitrocellulose membrane (GE Healthcare) using a Bio-Rad Mini *trans*-blot system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). In case of p62 detection, proteins were transferred to 0.45 µm PVDF membrane (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Immunoblots were blocked in a 10% non-fat dry milk in TBS-Tween (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl, and 0.05% Tween-20) overnight at 4°C followed by 2 h incubation at room temperature with the primary antibodies; anti-LC3 (1:2000; Thermo Fischer Scientific), anti-p62 (1:1000; Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany) and anti-β-actin (1:1000; Thermo Fischer Scientific). The membranes were subsequently washed and incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (goat anti-rabbit; 1:10000; Thermo Fischer Scientific and goat anti-guinea pig; 1:10000; Novex Life Technologies) for 1 h at room temperature. Proteins were detected by enhanced chemiluminescence (Immobilon Western, Merck Milipore). The intensity of the bands was quantified using ImageJ software. p62 was normalized to β-actin loading control. Autophagy induction was measured by calculation of LC3-II/LC3-I ratio.

Quantitative Real-time PCR

Total RNA was extracted from HepG2 cells as previously described by Lukic et al. (2013) with slight modifications. Cells were washed with PBS and lysed in denaturing solution (4 M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.1 M β-mercaptoethanol, 0.5% [wt/vol] *N*-lauroylsarcosinate sodium salt) followed by acid phenol (pH 4) extractions and isopropanol precipitation. cDNA was generated from 0.5 µg total RNA according to the reverse transcriptase manufacturer's protocol (Thermo Scientific). Quantitative PCR was carried out on 7500

real-time PCR system (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) using KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) under the following conditions: 3 min at 95°C activation, 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C. All used primers (Table 1) were purchased from Thermo Fisher Scientific.

Statistical Analysis

All data are presented as mean values ± standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA with the Tukey's *post hoc* test were used to compare multiple groups. The differences between control and experimental groups were compared using Student's *t*-test. Values at $p < 0.05$ or less were considered to be statistically significant. All experiments were repeated at least three times. Statistical analysis was carried out using SPSS 20.0 for Windows. Graphs were drawn in the GraphPad Prism software (trial version).

RESULTS

HV110 Exhibits Dose-dependent Effect on Cell Viability

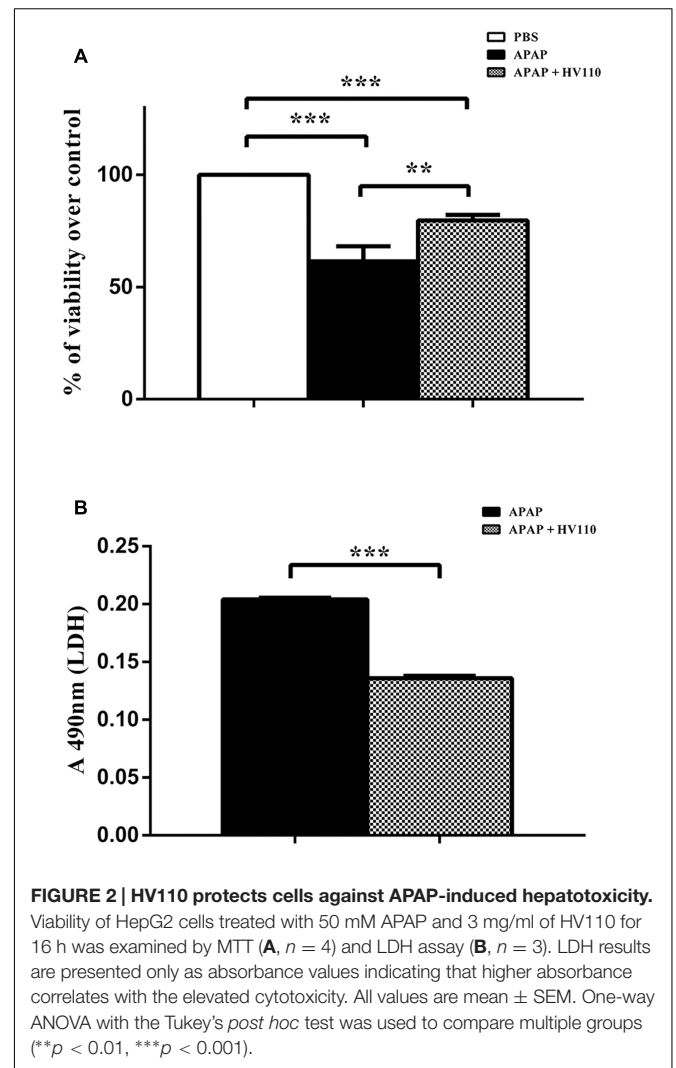
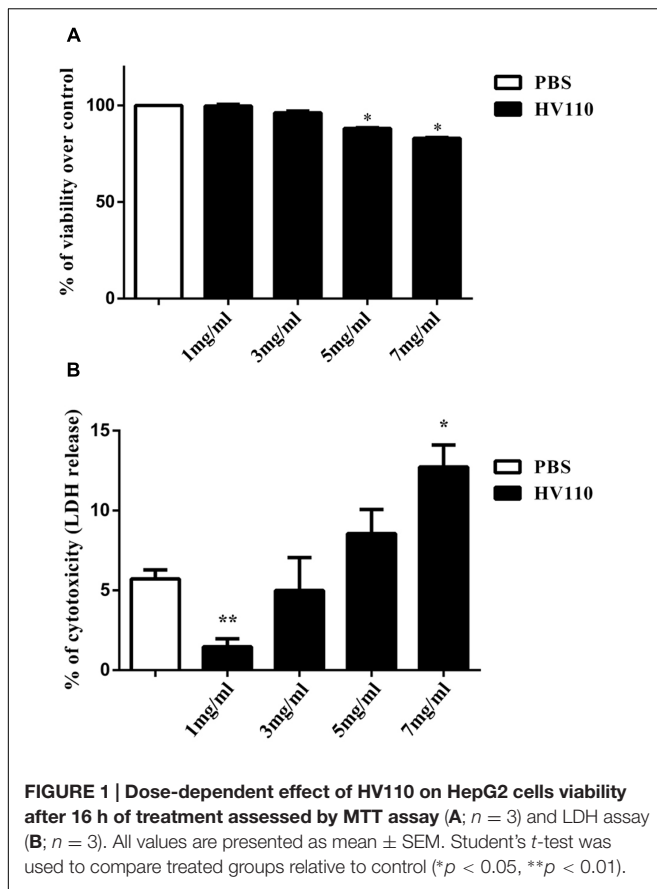
We initially investigated in which way HV110 affects metabolic activity of HepG2 cells. The results of MTT assay showed dose-dependent effect of HV110 on HepG2 metabolic activity. Doses of 5 and 7 mg/ml of HV110 significantly ($p < 0.05$) decreased cell metabolic activity to $88.11 \pm 0.43\%$ and $83.06 \pm 0.35\%$, respectively (Figure 1A). As detected decrease in metabolic activity could point on cell death, the level of LDH released in the cell culture was examined in order to determine the HV110 cytotoxicity. Only when applied in dose of 7 mg/ml, significantly higher ($p < 0.05$) LDH level in supernatants of the treated cells was detected in comparison to control (Figure 1B). Since the dose of 3 mg/ml didn't change cell metabolic activity or cause cell damage, this dose was used in further experiments.

HV110 Protects Cells against APAP-Induced Hepatotoxicity

In order to explore the potential cyto-protective role of selected dose of HV110 in APAP-induced hepatotoxicity, cell viability

TABLE 1 | The list of primers used in this study.

Primer name	Primer sequence 5'–3'	Reference
β-Actin forward	TTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGA	Li et al., 2015
β-Actin reverse	TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAGCA	
BECN1 forward	CTGGGACAACAAGTTTGACCAT	Liu et al., 2014
BECN1 reverse	GCTCCTCAGAGTTAAACTGGGTT	
ATG5 forward	CACAAGCAACTCTGGATGGGATTG	He et al., 2013
ATG5 reverse	GCAGCCAC GGACGAAACAG	
p62/SQSTM forward	GCCAGAGGAACAGATGGAGT	Sahani et al., 2014
p62/SQSTM reverse	TCCGATTCTG GCATCTGTAG	
PINK1 forward	GGGGAGTATGGAGCAGTCAC	Kim et al., 2013
PINK1 reverse	CATCAGGGTAGTCGACCAGG	



in the presence of APAP was assessed using MTT and LDH assays. As expected, MTT assay shows that APAP in a dose of 50 mM significantly ($p < 0.001$) reduced cell viability to $61.5 \pm 6.65\%$. Interestingly, the significant ($p < 0.01$) increase in cell viability to $79.7 \pm 2.47\%$ was observed in the APAP/HV110 co-treated cells, compared to APAP treated cells (Figure 2A). In parallel, LDH release in the media was measured and the results showed significantly lower ($p < 0.001$) toxic effect of APAP in the presence of HV110. Due to interference between APAP and LDH assay, the results of LDH assay are presented only as absorbance values, indicating that higher absorbance correlate with the increased cytotoxicity (Figure 2B).

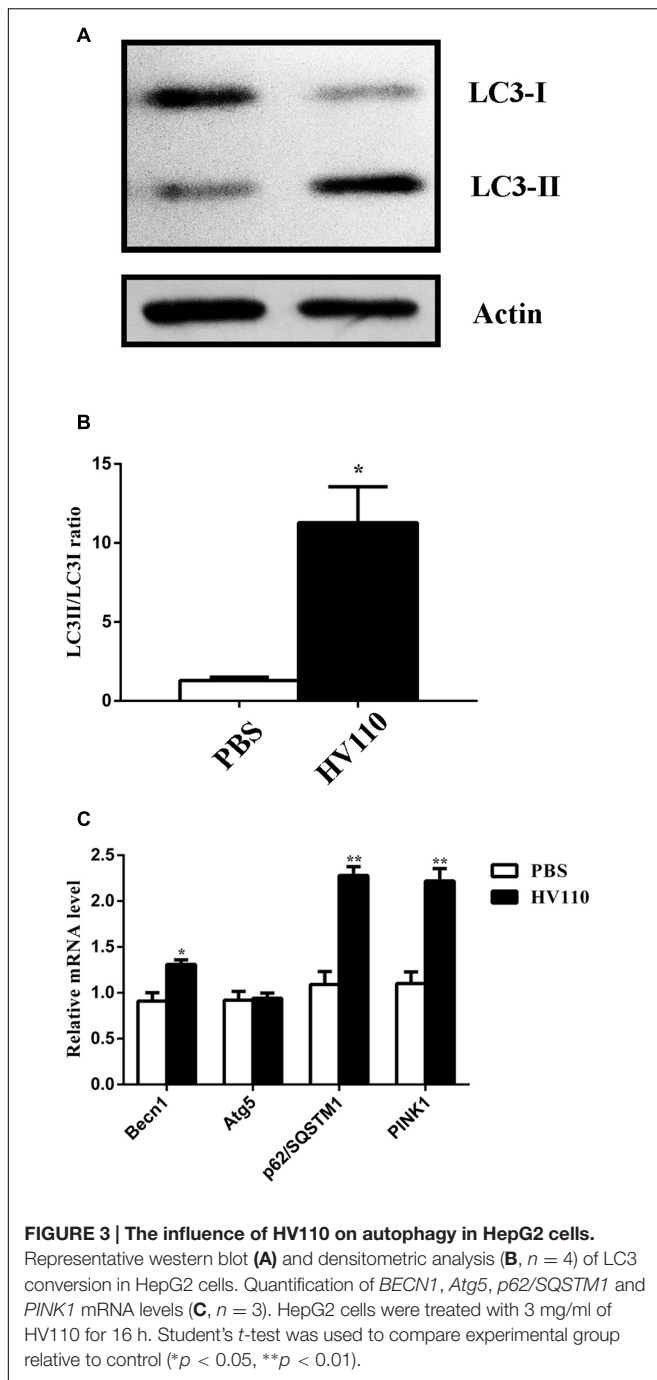
The Influence of HV110 on Autophagy in HepG2 Cells

One of the key cellular adaptive mechanisms involved in attenuation of APAP-induced liver injury is autophagy. To investigate whether autophagy is correlated with protective effect of HV110 on HepG2 cells several factors involved in autophagy process were monitored. At first, conversion of the soluble LC3-I to lipid-bound LC3-II form of LC3 protein, a commonly used marker of autophagosomes formation associated with number of autophagosomes, was assessed by Western blot analysis. The potential of HV110 alone to trigger protective autophagy in HepG2 cells was investigated. Results revealed the significant increase ($p < 0.05$) of LC3-II/LC3-I conversion

compared to the control cells (Figures 3A,B). In addition, the expression of *BECN1* a gene involved in nucleation step, and *Atg5* gene, involved in elongation step of autophagy process, were determined. The results showed that the expression of *BECN1* was significantly increased ($p < 0.05$) in cells treated with HV110, while the expression of *Atg5* remained unchanged, in comparison to control untreated cells (Figure 3C).

Further, the LC3-II/LC3-I ratio in APAP/HV110 co-treatment of HepG2 cells was followed. The results showed significant increase of LC3-II/LC3-I conversion in APAP/HV110 treated cells compared to cells treated with APAP alone ($p < 0.01$) and untreated control cells ($p < 0.001$), respectively (Figures 4A,B). Interestingly, although the treatment with APAP alone induced conversion of LC3 protein, it should be noted that this induction was not statistically significant in comparison to untreated cells.

Next, we investigated p62/SQSTM1 protein degradation by autophagy machinery. As a cargo receptor, p62/SQSTM1 binds to LC3 protein and contributes to clearance of ubiquitinated proteins. Consistent with the above mentioned results, APAP treatment as well as APAP/HV110 co-treatment caused



significant degradation of p62/SQSTM1 protein compared to control, respectively ($p < 0.01$, $p < 0.001$). However, difference in p62/SQSTM1 degradation between APAP treatment and APAP/HV110 co-treatment is visible on western blot, but didn't reach statistically significance (Figures 4C,D).

Autophagosomes' accumulation could be a consequence either of autophagy activation or inhibition of downstream autophagy steps. Therefore, assessment of autophagy flux, which reflects the dynamics of the process, is essential. Results of autophagy flux monitoring showed significant increase

conversion of LC3 marker and accumulation of LC3-II in the APAP/HV110 co-treated cells compared to chloroquine treated control ($p < 0.01$; Figures 5A,B), supporting the above mentioned evidence of autophagy activation.

However, levels of mRNA of *BECN1* and *Atg5* genes were decreased after 6 h and reached statistical significant decrease after 16 h of treatment ($p < 0.05$, $p < 0.01$) with no differences between APAP and APAP/HV110 co-treated groups (Figures 4E,F).

Autophagy Inhibition Decreases the Protective Effect of HV110

With the aim of the final confirmation of involvement of HV110-induced autophagy in protective effect on HepG2 cells against APAP, the autophagy was inhibited by chloroquine. The results of MTT assay showed that chloroquine added to the APAP/HV110 co-treated HepG2 cells decreased cell survival compared to the same treatment without chloroquine. More precisely, the difference between bars representing the percentage of viable cells after APAP/HV110 co-treatment and the percentage of viable cells after APAP treatment, without added chloroquine, was significantly higher ($27.42 \pm 1.86\%$) than in the presence of chloroquine ($15.07 \pm 1.21\%$) ($p < 0.01$; Figure 5C). This result supports our assumption of autophagy involvement in survival of cells treated with HV110. Additionally, LDH levels in supernatants of the cells treated with APAP, HV110 and chloroquine were much higher compared to treatment with no chloroquine added, but statistical significance wasn't achieved (Figure 5D). Considering the fact, that APAP/HV110 co-treated cells in the presence of chloroquine, still exhibit significantly higher viability rate compared to only APAP treated cells (MTT; $p < 0.05$ and LDH; $p < 0.001$) in the presence of chloroquine, the additional mechanism(s) involved in protective effect of HV110 on APAP-induced hepatotoxicity could be assumed.

Gene Expression Profile Revealed the Activation of PINK1 Autophagy Pathway

To analyze whether the PINK1-Parkin signaling pathway could be responsible for autophagy activation, we followed the expression of *PINK1* and *p62/SQSTM1* genes by qPCR. Results revealed that *PINK1* and *p62/SQSTM1* mRNAs were significantly induced in cells treated only with HV110 ($p < 0.01$) (Figure 3C).

Next, the expression profile of *PINK1* and *p62/SQSTM1* in APAP-induced hepatotoxicity was studied. The expression of the analyzed genes was not changed after the APAP treatment, regardless of the exposure time. Interestingly, the levels of *PINK1* and *p62/SQSTM1* mRNAs were increased in cells co-treated with both APAP and HV110 for 6 h, compared to control and APAP treated cells ($p < 0.01$; Figure 4E). After 16 h of APAP/HV110 treatment, the genes' expression returned to the control level (Figure 4F).

DISCUSSION

The literature data regarding the involvement of probiotics in autophagy activation are still limited. Most of the research in this

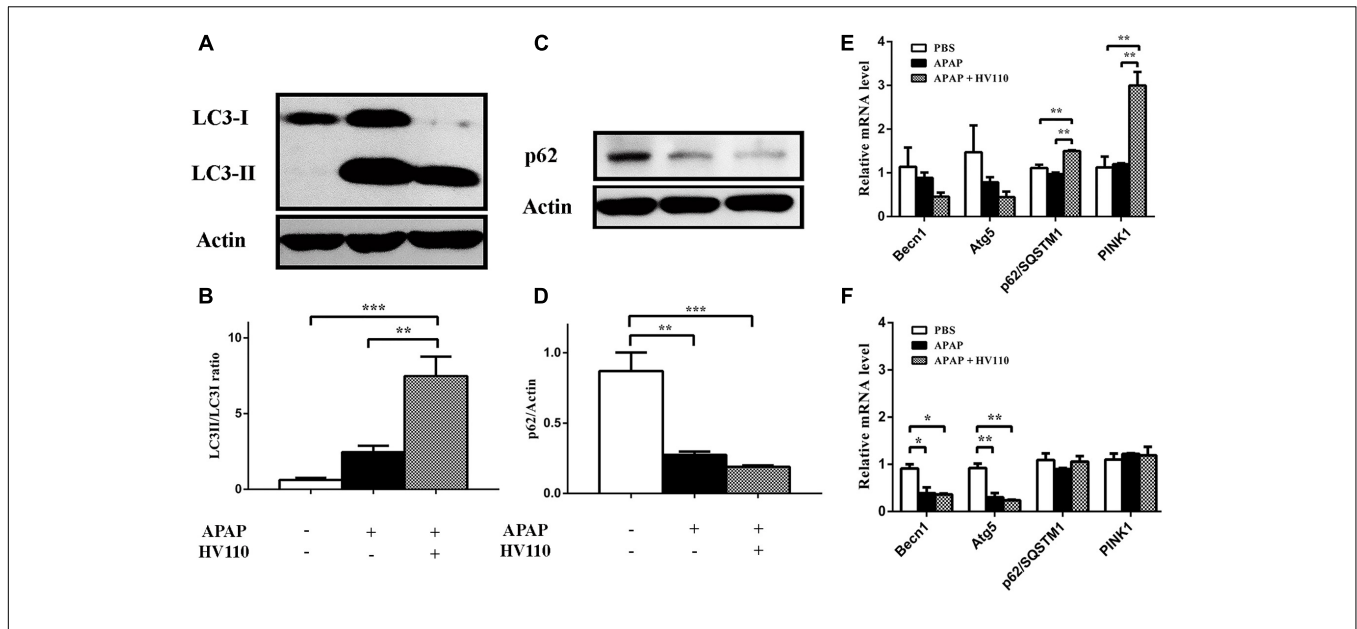


FIGURE 4 | Correlation between autophagy and HV110 protective effects. Evaluation of LC3 conversion and p62 degradation by immunoblot (A,C) and densitometric analysis (B, n = 5; D, n = 4) in HepG2 cells treated with 50 mM APAP and 3 mg/ml of HV110 for 16 h. The mRNA expression levels of *BECN1*, *Atg5*, *p62/SQSTM1* and *PINK1* after 6 h (E, n = 3) and 16 h (F, n = 3) of treatments with APAP and HV110. Values are expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA with the Tukey's *post hoc* test were used to compare multiple groups (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

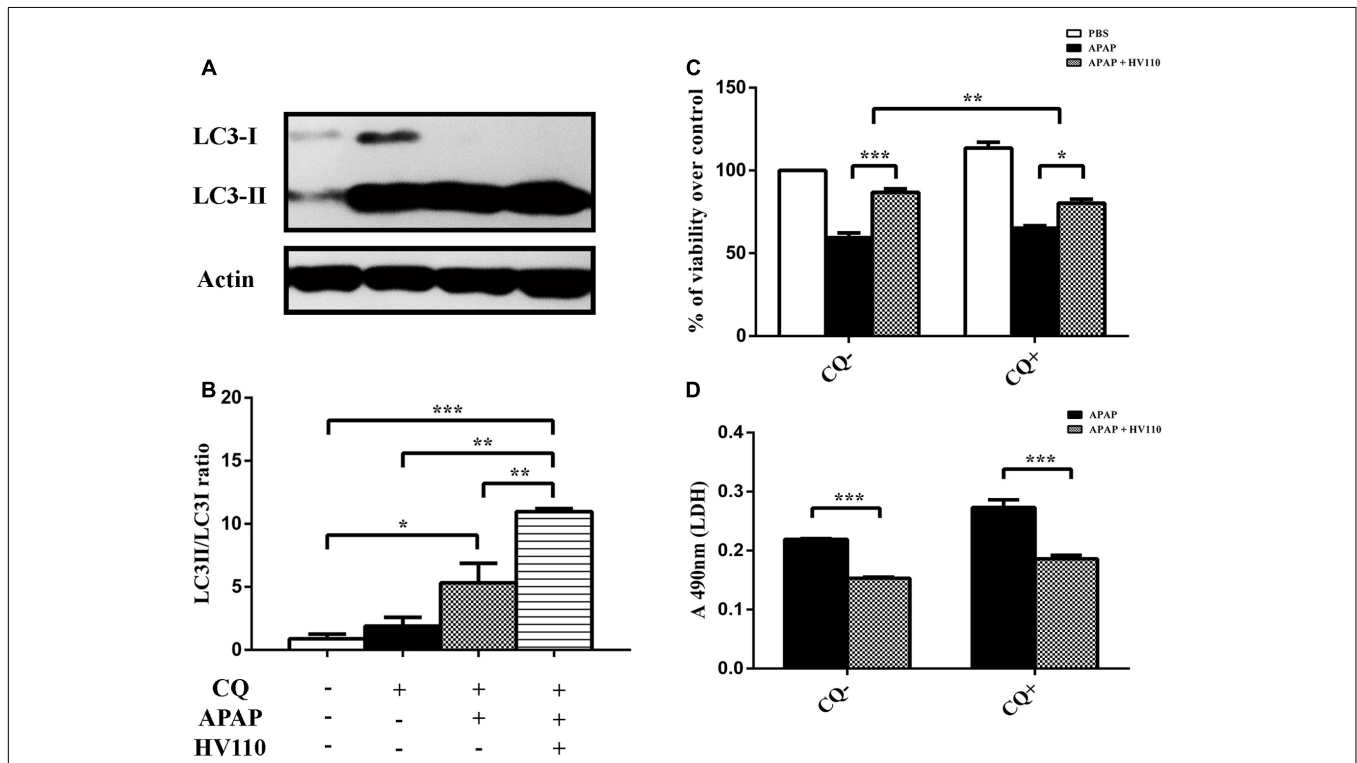


FIGURE 5 | Autophagy flux assessment. Representative western blot (A) and densitometric analysis (B, n = 3) of LC3 conversion in HepG2 cells treated for 16 h with 50 mM APAP and 3 mg/ml of HV110 in the absence or presence of chloroquine (CQ, 25 μM). In parallel, cell viability of HepG2 cells were evaluated using MTT assay (C, n = 3) and LDH assay (D, n = 3). All values are presented as mean ± SEM. For comparison of multiple groups, one-way ANOVA with the Tukey's *post hoc* test were used (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001).

field has been focused on the influence of pathogenic bacteria on autophagy machinery, while little space was given to the research on potential of beneficial bacteria to stimulate autophagy (Escoll et al., 2016; Zhang et al., 2016). This is the first report indicating that postbiotic HV110, originated from *Lactobacillus fermentum* BGHV110 strain, is potent inducer of autophagy in HepG2 cells, as demonstrated by increased LC3 lipidation and mRNA expression of *BECN1*, *PINK1*, and *p62/SQSTM1*. Bacterial lysates are rich in different pathogen associated molecular patterns (PAMPs) which can trigger autophagy through Toll-like receptor (TLR) signaling (Delgado et al., 2008). TLRs play an important role in liver physiology and pathophysiology due to the liver's exposure to gut-derived bacterial products and they are expressed in all cells present in the liver (Seki and Brenner, 2008; Mencin et al., 2009). Also, research over the last few years identified another class of pattern recognition receptors (PRRs), NOD-like receptors, involved in autophagy (Oh and Lee, 2014). On the other side, it has been described that overstimulation of PRRs can lead to induction of apoptosis. For example, TLR2 and TLR4 ligands present in the mycobacterial cell wall were identified as active ingredients of BCG treatment of superficial bladder tumors (Salaun et al., 2007; Subramaniam et al., 2016). This could be a reason for dose dependent decreased of cell viability caused by HV110 which was obtained in this study. However, involvement of PRRs in HV110 induced autophagy and impact on cell viability should be tested in further experiments.

Our finding that HV110 exhibits potential to induce protective autophagy served as the starting point to examine its cyto-protective effects against APAP-induced hepatotoxicity, which was shown that could be alleviated by autophagy induction (Ni et al., 2012). APAP exerts its toxic effects by two mechanisms: by CYP450-dependent NAPQI generation and by formation of PAP, as the result of APAP deacetylation (Miyakawa et al., 2015). CYP450-dependent pathway is activated immediately after APAP exposure and it lasts for the first several hours of exposure. However, after prolonged exposure to APAP, PAP-mediated pathway is activated with higher impact on cell viability compared to CYP450-dependent pathway. We thus assume that, in spite of lower expression of CYP450 enzymes in HepG2 cells (Westerink and Schoonen, 2007), our experimental setup provided enough and sustainable damage in HepG2 cells.

Though numerous studies investigated the effects of cytoprotective agents applied to hepatocytes before or after the addition of cytotoxic agents, our study was concerned with simultaneous HV110/APAP application. According to the results presented by Sharma et al. (2011) post-treatment with cytoprotective probiotics could not effectively reduce hepatocyte damage after APAP exposure, though pre and co-treatment were shown to be effective in the same study. This indicates that cell damage inflicted by high APAP doses is irreversible, as also evident from case studies reporting liver failure after intake of high APAP doses. Eventually, incorporation of postbiotics in formulations containing hepatotoxic drugs could significantly reduce the side effects and the degree of intoxication.

HV110 succeeded to alleviate APAP induced cell damage, as evidenced from MTT and LDH assays. Although APAP exposure *per se* induced protective autophagy in HepG2 cell line, induction

of autophagy was threefold higher in APAP/HV110 co-treated cells, according to the degree of LC3 protein conversion and 1.5-fold higher based on the *p62/SQSTM1* protein degradation. Chloroquine also favored the formation of autophagic vesicles containing cellular components in cells stimulated with HV110. Moreover, presence of chloroquine resulted in decreased survival of the cells exposed to APAP/HV110, suggesting the role of HV110-induced autophagy in the cells' protection. However, after chloroquine treatment, percentage of viable cells exposed to APAP/HV110 has not decreased to the viability level of those treated only with APAP, suggesting involvement of other protective mechanisms.

According to the results of mRNA expression, APAP/HV110 treated cells elevated mRNA levels of *p62/SQSTM1* and *PINK1* after 6 h. The main role of *PINK1* in cells is to promote Parkin-mediated mitophagy by recruiting Parkin to damaged mitochondria (Williams and Ding, 2015). Along with its protective function and the potential to activate mitophagy, it was shown that *PINK1* may also have an important role in activation of basal and starvation-induced autophagy by interacting with Beclin-1 protein (Michiorri et al., 2010). On the other hand, *p62/SQSTM1* is a molecular adapter between degradation substrates and molecules involved in autophagosome formation and antioxidant defense (Lamark et al., 2009; Rautou et al., 2010; Ichimura et al., 2013). Elevated *p62/SQSTM1* mRNA synthesis in cells co-treated with APAP/HV110 implies activation of NF-E2-related factor 2 (Nrf-2), an important transcription factor that regulates the expression of antioxidant specific genes. Recent data showed that *p62/SQSTM1* also plays important role in regulation of Nrf2 activity. The *p62* binds to Kelch-like ECH-associating protein 1 (Keap1) causing release of Nrf2 and consequent transcription of genes, including those involved in xenobiotic and ROS (reactive oxygen species) detoxification (Ichimura et al., 2013). Jones et al. (2015) provided evidence that lactobacilli can elicit their beneficial influences in the gut through direct contact with NADPH oxidases on a cell surface, resulting in ROS generation and consequential activation of Nrf2 signaling. However, according to our knowledge this is the first study that reports link between postbiotics and *p62/SQSTM1* as possible new mechanism of postbiotics activation of Nrf2 pathway in hepatocytes. *PINK1* gene upregulation suggests that HV110 treatment triggers a low sub-lethal level of oxidative stress that could be reflected at the level of transcription of *PINK1* which is highly sensitive to subtle changes in intracellular environment.

Although APAP/HV110 co-application induced changes in *PINK1* and *p62/SQSTM1* mRNA expression after 6 h treatment, the values returned to basal levels after prolonged treatment (16 h). It was shown that antioxidants produced by cells as response to oxidative damage, in this case caused by APAP, inhibit Nrf2 dependent gene transcription, via negative feedback (Murata et al., 2015). Considering the fact that *PINK1* regulation, as well as regulation of *p62/SQSTM1* transcription is dependent on Nrf2 protein, this could explain downregulation of *PINK1* and *p62/SQSTM1* mRNA expression after 16 h treatment, which was obtained in this study (Jain et al., 2010; Murata et al., 2015). Interestingly, we did not detect any changes in *PINK1*

and *p62/SQSTM1* expression, in cells treated only with APAP, neither after 6 h nor after 16 h of treatment. This suggests that mechanisms which lead to acute cellular response were more intensively activated in the presence of HV110. It could be assumed that rapid activation of these mechanisms might have elevated cellular defensive system, including autophagy response which aided cellular survival, as demonstrated in MTT and LDH assays. All above mentioned results are consistent with the concept of “hormesis,” a response to xenobiotic and environmental stimuli, where low stress levels are protective against more destructive stimuli. This concept has generally been given as an explanation for beneficial effects of microbes upon the host (Jones et al., 2015).

In spite of their well-known role in autophagy induction, we surprisingly noticed a decrease of *BECN1* and *Atg5* transcription in APAP treated cells, for which increased LC3 lipidation was obtained. This was irrespective of HV110 presence. Beclin-1, in complex with class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) is crucial for the nucleation phase of autophagosome formation, while *Atg5* conjugates to *Atg12* and facilitates the lipidation of LC3 protein (Rautou et al., 2010; Otomo et al., 2013). Aside from being indispensable for autophagy, Beclin-1 has additional roles not related to autophagosomes formation. Beclin-1 is known as haplo-insufficient tumor-suppressor and accumulating evidence of data suggests its down-regulation in cancers (Li et al., 2013; Huang et al., 2014). Findings of Li et al. (2013) show that down-regulation of Beclin-1 triggered autophagy, decreased apoptosis and stimulated proliferation of cells exposed to gemcitabine in MiaPaca2 tumor cells. Therefore, lower levels of *BECN1* mRNA in APAP-treated cells could be explained as a cellular attempt to overcome toxicity caused by very high APAP dose. In the case of *Atg5* gene downregulation, the results could be explained by the role of *Atg5* protein to regulate its own transcription through a feedback inhibition loop, as demonstrated by Hu et al. (2011).

CONCLUSION

Our study demonstrated protective effect of autophagy activated by postbiotic HV110 originated from *Lactobacillus fermentum*

REFERENCES

- Delgado, M. A., Elmaoued, R. A., Davis, A. S., Kyei, G., and Deretic, V. (2008). Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J.* 27, 1110–1121. doi: 10.1038/emboj.2008.31
- Escoll, P., Rolando, M., and Buchrieser, C. (2016). Modulation of host autophagy during bacterial infection: sabotaging host munitions for pathogen nutrition. *Front. Immunol.* 7:81. doi: 10.3389/fimmu.2016.00081
- Forsyth, C. B., Farhadi, A., Jakate, S. M., Tang, Y., Shaikh, M., and Keshavarziana, A. (2009). *Lactobacillus* GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 43, 163–172. doi: 10.1016/j.alcohol.2008.12.009
- He, Z., Liu, H., Agostini, M., Yousefi, S., Perren, A., Tschan, M. P., et al. (2013). p73 regulates autophagy and hepatocellular lipid metabolism through a transcriptional activation of the ATG5 gene. *Cell Death Differ.* 20, 1415–1424. doi: 10.1038/cdd.2013.104

BGHV110 strain in APAP induced cytotoxicity in HepG2 cells. To the best of our knowledge, this is the first study to correlate autophagy inductive potential of lactobacilli to their protective effects against drug-induced toxicity. Taken together, this could be of special relevance for designing of new analgetic drug formulations with added postbiotic for prevention of possible hepatotoxic side effects, although the safety and health promoting efficacy of such drugs should be further tested.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MD: performed main work, analyzed, interpreted the data and draft the work; JL: conception and design of experiments, performed part of the experiments, analyzed, interpreted the data and critically revised the manuscript; JD: performed part of the experiments, analyzed and interpreted the data; MM: supervised the work, analyzed the data and critically revised the manuscript; IS: analyzed, interpreted and critically revised the manuscript; NG: supervised the work, analyzed and interpreted the data, draft the work; JB: conception and design of the work, supervised the work, analyzed and interpreted the data and critically revised the manuscript. All authors finally approved the version to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

FUNDING

This work was supported by Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (grant no. 173019).

ACKNOWLEDGMENT

MD is grateful to Nemanja Mirkovic from the Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, for liophilization of HV110 postbiotic.

- Hu, Z., Zhang, J., and Zhang, Q. (2011). Expression pattern and functions of autophagy-related gene *atg5* in zebrafish organogenesis. *Autophagy* 7, 1514–1527. doi: 10.4161/auto.7.12.18040
- Huang, X., Qi, Q., Hua, X., Li, X., Zhang, W., Sun, H., et al. (2014). Beclin 1, an autophagy-related gene, augments apoptosis in U87 glioblastoma cells. *Oncol. Rep.* 31, 1761–1767. doi: 10.3892/or.2014.3015
- Ichimura, Y., Waguri, S., Sou, Y. S., Kageyama, S., Hasegawa, J., Ishimura, R., et al. (2013). Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol. Cell.* 51, 618–631. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.003
- Igusa, Y., Yamashina, S., Izumi, K., Inami, Y., Fukada, H., and Komatsu, M. (2012). Loss of autophagy promotes murine acetaminophen hepatotoxicity. *J. Gastroenterol.* 47, 433–443. doi: 10.1007/s00535-011-0500-0
- Irving, A. T., Mimuro, H., Kufer, T. A., Lo, C., Wheeler, R., Turner, L. J., et al. (2014). The immune receptor NOD1 and kinase RIP2 interact with bacterial peptidoglycan on early endosomes to promote autophagy and inflammatory

- signalling. *Cell Host Microbe* 15, 623–635. doi: 10.1016/j.chom.2014.04.001
- Jain, A., Lamark, T., Sjøttem, E., Larsen, K. B., Awuh, J. A., Overvatn, A., et al. (2010). p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J. Biol. Chem.* 285, 22576–22591. doi: 10.1074/jbc.M110.118976
- Jones, R. M., Desai, C., Darby, T. M., Luo, L., Wolfarth, A. A., Scharer, C. D., et al. (2015). Lactobacilli modulate epithelial cytoprotection through the Nrf2 pathway. *Cell Rep.* 12, 1217–1225. doi: 10.1016/j.celrep.2015.07.042
- Jovic, B., Begovic, J., Lozo, J., Topisirovic, L., and Kojic, M. (2009). Dynamic of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Arch. Biol. Sci.* 61, 159–165. doi: 10.2298/ABS0902159J
- Kim, S. J., Khan, M., Quan, J., Till, A., Subramani, S., and Siddiqui, A. (2013). Hepatitis B virus disrupts mitochondrial dynamics: induces fission and mitophagy to attenuate apoptosis. *PLoS Pathog.* 9:e1003722. doi: 10.1371/journal.ppat.1003722
- Kobayashi, S., Xu, X., Chen, K., and Liang, Q. (2012). Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Autophagy* 8, 577–592. doi: 10.4161/auto.18980
- Konstantinov, S. R., Kuipers, E. J., and Peppelenbosch, M. P. (2013). Functional genomic analyses of the gut microbiota for CRC screening. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10, 741–745. doi: 10.1038/nrgastro.2013.178
- Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I., and Johansen, T. (2009). NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle* 8, 1986–1990. doi: 10.4161/cc.8.13.8892
- Larson, A. M., Polson, J., Fontana, R. J., Davern, T. J., Lalani, E., and Hynan, L. S. (2005). Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study. *Hepatology* 42, 1364–1372. doi: 10.1002/hep.20948
- Lee, W. M. (2004). Acetaminophen and the US acute liver failure study group: lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology* 40, 6–9. doi: 10.1002/hep.20293
- Li, X., Xu, M., Liu, M., Ji, Y., and Li, Z. (2015). TNF- α and IL-6 inhibit apolipoprotein A-IV production induced by linoleic acid in human intestinal Caco 2 cells. *J. Inflamm.* 12:22. doi: 10.1186/s12950-015-0069-0
- Li, X., Yan, J., Wang, L., Xiao, F., Yang, Y., Guo, X., et al. (2013). Beclin1 inhibition promotes autophagy and decreases gemcitabine-induced apoptosis in MiaPaca2 pancreatic cancer cells. *Cancer Cell Int.* 13, 26. doi: 10.1186/1475-2867-13-26
- Lin, R., Jiang, Y., Zhao, X. Y., Guan, Y., Qian, W., Fu, X. C., et al. (2014). Four types of *Bifidobacteria* trigger autophagy response in intestinal epithelial cells. *J. Dig. Dis.* 15, 597–605. doi: 10.1111/1751-2980.12179
- Liu, K., Shi, Y., Guo, X., Wang, S., Ouyang, Y., Hao, M., et al. (2014). CHOP mediates ASP2-induced autophagic apoptosis in hepatoma cells by releasing Beclin-1 from Bcl-2 and inducing nuclear translocation of Bcl-2. *Cell Death Dis.* 5:e1323. doi: 10.1038/cddis.2014.276
- Lukic, J., Strahinic, I., Milenkovic, M., Golic, N., Kojic, M., Topisirovic, L., et al. (2013). Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with rat colonic mucosa: implications for colitis induction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5735–5744. doi: 10.1128/AEM.01807-13
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T. C., et al. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120, 237–248. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.046
- Mencin, A., Kluwe, J., and Schwabe, R. F. (2009). Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. *Gut* 58, 704–720. doi: 10.1136/gut.2008.156307
- Michiorri, S., Gelmetti, V., Giarda, E., Lombardi, F., Romano, F., Marongiu, R., et al. (2010). The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. *Cell Death Differ.* 17, 962–974. doi: 10.1038/cdd.2009.200
- Miyakawa, K., Albee, R., Letzig, L. G., Lehner, A. F., Scott, M. A., Buchweitz, J. P., et al. (2015). A cytochrome P450-independent mechanism of acetaminophen-induced injury in cultured mouse hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 354, 230–237. doi: 10.1124/jpet.115.223537
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Levine, B. (2010). Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 140, 313–326. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.028
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Motevaseli, E., Azam, R., Akrami, S. M., Mazlomy, M., Saffari, M., Modarresi, M. H., et al. (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 J.* 17, 601–607.
- Murata, H., Takamatsu, H., Liu, S., Kataoka, K., Huh, N. H., and Sakaguchi, M. (2015). NRF2 regulates PINK1 expression under oxidative stress conditions. *PLoS ONE* 10:e0142438. doi: 10.1371/journal.pone.0142438
- Ni, H. M., Bockus, A., Boggess, N., Jaeschke, H., and Ding, W. X. (2012). Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology* 55, 222–232. doi: 10.1002/hep.24690
- Oh, J. E., and Lee, H. K. (2014). Pattern recognition receptors and autophagy. *Front. Immunol.* 5:300. doi: 10.3389/fimmu.2014.00300
- Otomo, C., Metlagel, Z., Takaesu, G., and Otomo, T. (2013). Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 59–66. doi: 10.1038/nsmb.2431
- Patel, M. R., and Denning, W. P. (2013). Therapeutic use of prebiotics, probiotics, and postbiotics to prevent necrotizing enterocolitis: What is the current evidence? *Clin. Perinatol.* 40, 11–25. doi: 10.1016/j.clp.2012.12.002
- Rautou, P.-E., Mansouri, A., Lebecq, D., Durand, F., Valla, D., and Moreau, R. (2010). Autophagy in liver diseases. *J. Hepatol.* 53, 1123–1134. doi: 10.1016/j.jhep.2010.07.006
- Rishi, P., Mavi, S. K., Bharrhan, S., Shukla, G., and Tewari, R. (2009). Protective efficacy of probiotic alone or in conjunction with a prebiotic in *Salmonella*-induced liver damage. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69, 222–230. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00703.x
- Sahani, M. H., Itakura, E., and Mizushima, N. (2014). Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy* 10, 431–441. doi: 10.4161/auto.27344
- Salaun, B., Romero, P., and Lebecque, S. (2007). Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 37, 3311–3318. doi: 10.1002/eji.200737744
- Segawa, S., Wakita, Y., Hirata, H., and Watari, J. (2008). Oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 ameliorates alcoholic liver disease in ethanol-containing diet-fed C57BL/6N mice. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 371–377. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.023
- Seki, E., and Brenner, D. A. (2008). Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 48, 322–335. doi: 10.1002/hep.22306
- Sharma, S., Singh, R. L., and Kakkar, P. (2011). Modulation of Bax/Bcl-2 and caspases by probiotics during acetaminophen induced apoptosis in primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 49, 770–779. doi: 10.1016/j.fct.2010.11.041
- Subramaniam, M., In, L. L., Kumar, A., Ahmed, N., and Nagoor, N. H. (2016). Cytotoxic and apoptotic effects of heat killed *Mycobacterium indicus pranii* (MIP) on various human cancer cell lines. *Sci. Rep.* 28, 19833. doi: 10.1038/srep19833
- Tsilingiri, K., Barbosa, T., Penna, G., Caprioli, F., Sonzogni, A., Viale, G., et al. (2012). Probiotic and postbiotic activity in health and disease: comparison on a novel polarised ex-vivo organ culture model. *Gut* 61, 1007–1015. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300971
- Westerink, W. M., and Schoonen, W. G. (2007). Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* 21, 1581–1591. doi: 10.1016/j.tiv.2007.05.014
- Williams, J. A., and Ding, W. X. (2015). Targeting Pink1-Parkin-mediated mitophagy for treating liver injury. *Pharmacol. Res.* 102, 264–269. doi: 10.1016/j.phrs.2015.09.020
- Wu, S., Yuan, L., Zhang, Y., Liu, F., Li, G., Wen, K., et al. (2013). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG mono-association suppresses human rotavirus-induced autophagy in the gnotobiotic piglet intestine. *Gut Pathog.* 5:22. doi: 10.1186/1757-4749-5-22
- Xu, J., Ma, M., and Purcell, W. M. (2003). Characterisation of some cytotoxic endpoints using rat liver and HepG2 spheroids as in vitro models and their application in hepatotoxicity studies. I. Glucose metabolism and enzyme release as cytotoxic markers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189, 100–111. doi: 10.1016/S0041-008X(03)00089-9

Zhang, Y., Li, Y., Yuan, W., Xia, Y., and Shen, Y. (2016). Autophagy is associated with pathogenesis of haemophilus parasuis. *Front. Microbiol.* 7:1423. doi: 10.3389/fmicb.2016.01423

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Dinić, Lukić, Djokić, Milenković, Strahinić, Golić and Begović. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Exopolysaccharide Produced by Probiotic Strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 Reduces Inflammatory Hyperalgesia in Rats

Miroslav Dinić^{1*}, Uroš Pecikoza², Jelena Djokić¹, Radica Stepanović-Petrović², Marina Milenković³, Magdalena Stevanović⁴, Nenad Filipović⁴, Jelena Begović¹, Nataša Golić¹ and Jovanka Lukić¹

¹ Laboratory for Molecular Microbiology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, ² Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia,

³ Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia, ⁴ Institute of Technical Sciences of the Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, Serbia

OPEN ACCESS

Edited by:

Li-Long Pan,
Fudan University, China

Reviewed by:

Luigi Brunetti,
Università degli Studi "G. d'Annunzio"
Chieti-Pescara, Italy

Carole L. Wilson,
Medical University of South Carolina,
United States

*Correspondence:

Miroslav Dinić
mdinic@imgge.bg.ac.rs

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 08 November 2017

Accepted: 03 January 2018

Published: 17 January 2018

Citation:

Dinić M, Pecikoza U, Djokić J,
Stepanović-Petrović R, Milenković M,
Stevanović M, Filipović N, Begović J,
Golić N and Lukić J (2018)

Exopolysaccharide Produced by
Probiotic Strain *Lactobacillus*
paraplantarum BGCG11 Reduces
Inflammatory Hyperalgesia in Rats.

Front. Pharmacol. 9:1.

doi: 10.3389/fphar.2018.00001

The aim of this study was to test the potential of high molecular weight exopolysaccharide (EPS) produced by the putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 (EPS CG11) to alleviate inflammatory pain in Wistar rats. The EPS CG11 was isolated from bacterial surface and was subjected to Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and thermal analysis. FTIR spectra confirmed the polysaccharide structure of isolated sample, while the thermal methods revealed good thermal properties of the polymer. The antihyperalgesic and antiedematous effects of the EPS CG11 were examined in the rat model of inflammation induced by carrageenan injection in hind paw. The results showed that the intraperitoneal administration of EPS CG11 produced a significant decrease in pain sensations (mechanical hyperalgesia) and a paw swelling in a dose-dependent manner as it was measured using Von Frey anesthesiometer and plethysmometer, respectively. These effects were followed by a decreased expression of *IL-1 β* and *iNOS* mRNAs in rat's paw tissue suggesting that the antihyperalgesic and antiedematous effects of the EPS CG11 are related to the suppression of inflammatory response. Additionally, we demonstrated that EPS CG11 exhibits immunosuppressive properties in the peritonitis model induced by carrageenan. Expression levels of pro-inflammatory mediators *IL-1 β* , *TNF- α* and *iNOS* were decreased, together with the enhanced secretion of anti-inflammatory *IL-10* and *IL-6* cytokines, while neutrophil infiltration was not changed. To the best of our knowledge, this is the first study which reports an antihyperalgesic effect as the novel property of bacterial EPSs. Given the high demands of pharmaceutical industry for the replacement of commonly used analgesics due to numerous side effects, this study describes a promising natural compound for the future pharmacological testing in the area.

Keywords: exopolysaccharide, *Lactobacillus paraplantarum*, probiotic, hyperalgesia, inflammation, *IL-1 β* , *iNOS*

INTRODUCTION

Management of pain caused either by abnormal excitation of peripheral sensory neurons or by existing local inflammation, currently leads the list of mostly demanded drugs at the pharmaceutical market. Inflammatory pain results from the increased excitation of peripheral nociceptive sensory neurons as a consequence of the accumulation of inflammatory mediators (Linley et al., 2010). Every tissue injury is followed by production of different endogenous factors released from activated nociceptors, tissue-resident sentinel cells (endothelial cells, keratinocytes, and fibroblasts) and recruited immune cells (mast cells, basophils, platelets, macrophages, and neutrophils). These factors represent a wide spectrum of signaling molecules including bradykinin, histamine, serotonin, ions (K^+ , H^+), ATP, nitric oxide (NO), prostaglandins, pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) and growth factors (Basbaum et al., 2009; Ji et al., 2014). Some of these factors act directly on the peripheral sensory neurons affecting the specific receptors and producing a spontaneous pain, while others activate immune cells and stimulate the release of additional pain-inducing agents (Kidd and Urban, 2001). IL-1 β and TNF- α represent the first cytokines formed in injured tissue and targeting these cytokines with appropriate antibodies could delay the onset of the inflammatory pain (Zhang and An, 2007). However, in spite of a major breakthrough of antibody immunotherapy, the development of novel most cost-effective drugs with potential to modulate the production of pro-inflammatory cytokines remains a significant goal in pain management.

Among the plenty of natural compounds, polysaccharides have been recognized as molecules with anti-nociceptive and anti-inflammatory activity. Bacteria from *Lactobacillus* genus possess the ability to produce different kind of polysaccharides attached to the cell surface. These polysaccharides can be associated to the bacterial cell wall forming a capsule (capsular polysaccharides) or can be loosely attached or secreted into the bacterial environment [exopolysaccharides (EPSs)] (Caggianiello et al., 2016). Lactobacilli produce both homo- and heteroexopolysaccharides exhibiting a great structural variability with different physico-chemical and biological properties (Badel et al., 2011). Beside the well-established role of EPSs in the maintenance of bacterial homeostasis and survival, the number of studies reporting the health promoting potential of EPSs has increased extensively. For instance, EPSs have been identified as the inducers of apoptosis and autophagy in the cancer cell lines (Kim et al., 2010; Di et al., 2017). Moreover, the findings of Maeda et al. (2004) revealed the effects of EPS on blood pressure and blood glucose levels, while Tang et al. (2017) demonstrated its antioxidant activity. However, one of the major pharmacological effect of EPSs lies in the modulation of immune system response and its diverse composition dictates different immunomodulatory properties (Jones et al., 2014). Given the above literature data regarding the application of EPSs in the regulation of different pathophysiological conditions, in this study, we intended to evaluate the eventual antihyperalgesic and/or antiedematous

potential of the EPS isolated from *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 strain.

Lactobacillus paraplantarum BGCG11, isolated from a soft, white, artisanal cheese, produces a high-molecular-weight EPS (around 2×10^6 Da) composed of glucose (75.7%), rhamnose (20.5%), galactose (2.1%), and mannose (1.7%) (Cerning et al., 1994; Zivkovic et al., 2015). Our previous studies showed that *L. paraplantarum* BGCG11 strain exhibits an anti-inflammatory effect on peripheral blood mononuclear cells (PBMC), unlike the non-EPS derivative strains which induce the higher pro-inflammatory response of PBMC. Furthermore, the upregulation of IL-10, anti-inflammatory cytokine production was detected in the culture of PBMC treated with purified EPS CG11 (Nikolic et al., 2012). Hence, it could be hypothesized that the inflammation of different etiology could be controlled by EPS CG11 treatment.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strain and Culture Condition

Lactobacillus paraplantarum strain BGCG11 from the laboratory collection of the Laboratory of Molecular Microbiology, Institute of Molecular Genetics and Genetic Engineering, University of Belgrade, Serbia was used in this study. The strain was grown overnight at 30°C in deMan-Rogosa-Sharpe (MRS) broth (Merck, Darmstadt, Germany).

EPS Isolation and Purification

The EPS produced by BGCG11 strain was isolated by spreading 200 μ l of overnight bacterial culture on 100 MRS plates containing 1.7% of agar (Torlak, Belgrade) in order to increase the yield of the polymer. Plates were incubated for 48 h at 30°C. After incubation time, EPS extraction was performed according to the protocol provided by Ruas-Madiedo et al. (2006), consisting in an initial extraction, ethanol precipitation and dialysis. Afterward, to reduce the content of nucleic acids and proteins, crude EPS fraction was further purified by the addition of DNase type-I (Sigma-Aldrich, final concentration 2.5 μ g/ml) for 6 h at 37°C, followed by Pronase E (Sigma-Aldrich, final concentration 50 μ g/ml) treatment overnight at 37°C. Finally, the precipitation of remaining proteins was done by the addition of trichloroacetic acid (12% final concentration) at room temperature for 30 min. The mixture was centrifuged (10000 rpm, 20 min, 4°C) and the supernatant was collected and its pH adjusted to 7. The supernatant was dialyzed using 12–14 kDa molecular mass cutoff dialysis bag (Sigma-Aldrich) and finally lyophilized (Alpha 1–4 LSC Plus Freeze dryer, Martin Christ, Germany).

Microscopy Analysis

The sample surface was observed by the OPTICA B-500MET light microscope (Optica SRL, Italy) after lyophilization and with no further preparation, by transmitted polarized and ordinary (not polarized) light. The images were collected with OPTIKAM PRO 8LT-4083.18 camera equipped with

scientific-grade CCD sensor. Although not so often employed for studying biopolymer structures, the light microscopy had demonstrated to have the potential for being used as a tool in such characterization (Sanghoon and Willett, 2001).

Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The qualitative analysis of the sample was performed by FTIR spectroscopy, which has been frequently used as a tool for detection of the structural characteristics of biopolymers (Ramesan and Surya, 2016). FTIR spectra of the samples were recorded in the range of 400–4000 cm^{-1} using a Thermo Scientific Nicolet iS10 Spectrometer equipped with Smart iTX accessory (Thermo Scientific, Inc., United States) at 4 cm^{-1} spectral resolution and 32 scans. FTIR spectra were collected in the reflection mode with the built-in diamond attenuated total reflectance (ATR) sampling technique. The OMNIC Software was used for the acquisition, processing, analyzing, and managing FTIR data in a graphical environment.

Thermal Analysis

Thermal behavior of the sample was analyzed on two separate devices. Thermal stability and decomposition were determined using Setsys Evolution instrument (SETARAM, France). The sample was placed in alumina crucible (volume 100 μl) and subjected to the heating regime of 10°C/min from ambient temperature up to 900°C in the atmosphere of synthetic air (flow rate 50 ml/min). The corresponding differential thermogravimetric (DTG) signal and the mass loss were obtained by help of the CALISTO software taking the first derivative of the thermogravimetric analysis (TGA) signal and calculating the vertical difference on the marked horizontal points.

The potential phase transitions and the other thermally induced phenomena characteristic for polysaccharides like melting, gelatinization, swelling, or dehydration were further analyzed on the SETARAM apparatus DSC EVO 131. The accurately measured sample was placed in 30 μl sealed aluminum pans. The sample was heated/cooled from room temperature up to 200°C with a heating rate of 10°C/min and using nitrogen as a purge gas. An empty aluminum pan was used as a reference.

Animals

Male Wistar rats ($n = 39$, weighing 200–250 g) used in the experiments were purchased from the Military Medical Academy Breeding Farm, Belgrade, Serbia. The rats were housed in the temperature-controlled room ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) with food and water available *ad libitum* under a 12 h light/dark cycle. This study was carried out in accordance with the recommendations of Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes, Institutional Animal Care and The Use Committee of the Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Serbia. The protocol was approved by the Institutional Animal Care and The Use Committee of the Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Serbia (No. 323-07-1193/2014-05).

Induction of Paw Inflammation and Treatment Administration

The rats were randomly divided into four groups ($n = 6$) and inflammation of the rat's hind paw was induced by an intraplantar (i.pl.) injection of carrageenan λ (Sigma–Aldrich; 0.1 ml/paw; 1% m/V, dispersed in 0.9% NaCl) (Morris, 2003; Stepanović-Petrović, 2012). Carrageenan-induced inflammation is followed by the development of edema and nociceptive hypersensitivity (hyperalgesia) (Morris, 2003; Vivancos et al., 2004; Stepanović-Petrović, 2012) and was used to test both the antiedematous and antihyperalgesic activity of lyophilized EPS CG11. The rats were treated intraperitoneally (i.p.), in a volume of 2 ml/kg, with 0.9% NaCl (group I, untreated control) or 3, 4, and 5 mg/kg of lyophilized EPS CG11 dissolved in 0.9% NaCl (groups II, III, and IV, respectively), 60 min before carrageenan injection.

Antiedematous Activity Assessment

Antiedematous activity was assessed with a plethysmometer (Ugo Basile, Comerio, Italy), by measuring the increase in paw volume following carrageenan injection, as described previously (Stepanović-Petrović, 2012). The basal paw volumes were measured before the treatment application. The post-treatment paw volumes were measured in seven time points, during 300 min after the carrageenan injection. The results are expressed as the difference (dV) between the post-treatment and the basal paw volumes according to the following formula:

$$\text{dV} = \text{post-treatment volume of the inflamed paw (ml)} - \text{basal volume of the same paw (ml)}$$

The measurements were repeated two times at each time point and the average dV of each rat was used for further calculations. The percentage of antiedematous activity (%AE) was calculated according to the following formula (Stepanović-Petrović, 2012):

$$\%AE = \left[\frac{\text{(control group average dV)} - \text{dV of each rat in the test group}}{\text{control group average dV}} \right] \times 100$$

Antihyperalgesic Activity Assessment

The development of mechanical hyperalgesia following carrageenan injection and the antihyperalgesic effects of EPS CG11 were assessed by measuring paw withdrawal thresholds (PWTs) using an electronic Von Frey anesthesiometer (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, United States) as described previously (Vivancos et al., 2004). The rats were placed in transparent boxes on the top of a metal grid and allowed to acclimatize for 30 min before testing. A plastic, semi-flexible filament coupled with a force transducer was used to deliver the mechanical stimulus. The tip of the filament was applied perpendicularly to the plantar surface of the right hind paw and the pressure was gradually increased until the rat withdrew its paw (the force, in grams, required to elicit brisk paw withdrawal was recorded on a digital screen). The average of four PWT measurements was used for further calculations.

Basal PWTs were measured before treatment application. Post-treatment PWTs were measured in seven time points, during 300 min after the induction of inflammation. The results are expressed as the difference (df) between basal and post-treatment PWTs according to the following formula (Vivancos et al., 2004):

$$\text{df} = \text{basal PWT before the induction of inflammation (g)} - \text{post-treatment PWT after the induction of inflammation (g)}.$$

The percentage of antihyperalgesic activity (%AH) was calculated according to the following formula (Stepanović-Petrović, 2012):

$$\%AH = [(\text{control group average df} - \text{df of each rat in the test group}) / (\text{control group average df})] \times 100.$$

Immediately after the experiments animals were sacrificed using CO₂ gas. The paws were collected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis.

Peritonitis Model

The evaluation of immunological effect of the EPS CG11 was determined in peritonitis model induced by i.p. injection of 1% carrageenan solution as previously described by Barth et al. (2016). One hour before carrageenan administration animals were treated i.p. with saline ($n = 5$, positive control) or 5 mg/kg of lyophilized EPS CG11 ($n = 5$, treatment group). Additionally, one group of animals was treated i.p. only with saline as negative control ($n = 5$). The rats were killed 4 h later and the peritoneal cavity was washed with 4 ml of RPMI medium (Gibco, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Life Technologies) to collect peritoneal cells and released cytokines. The equal volume of injected media was recovered from the peritoneal cavity in all experimental groups ($V = 3$ ml). The total cell number was determined in the Neubauer chamber in the Türk solution to exclude erythrocytes counting. The results are presented as the number of cells per ml of peritoneal fluid. The peritoneal fluid were further centrifuged (2000 rpm, 5 min) and supernatants were collected and stored on -20°C for cytokines determination, while pelleted cells were frozen on -80°C for RNA extraction.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

The levels of TNF- α , IL-6, and IL-10 were measured in the peritoneal fluid using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions. ELISA kits for TNF- α and IL-6 were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN, United States) while IL-10 was from Novex Life Technologies. The results are presented as the concentrations of cytokines per ml of peritoneal fluid.

Quantitative Real-Time PCR

The total RNA extraction from the rat paws and peritoneal cells was performed as previously described by Lukic et al.

(2013). Briefly, the frozen paws were pulverized in liquid nitrogen using mortar and pestle and resuspended in denaturing solution, while peritoneal cells were directly resuspended in denaturing solution. Afterward, acid phenol (pH = 4) extraction were performed followed by isopropanol precipitation. The acid phenol extraction step was repeated two times. Reversed transcription was done using 1 μ g of isolated RNA as a template (200 ng of RNA from peritoneal cells), according to the instructions of the enzyme manufacturer (Thermo Scientific). Random hexamers (Applied Biosystems) and RiboLock RNase inhibitor (Thermo Scientific) were used in the reactions. Synthesized cDNA was further amplified in 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems) using KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, United States) under the following conditions: 3 min at 95°C activation, 40 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C. The results were normalized to endogenous controls (β -actin or GAPDH) and expressed as relative target abundance using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. Primers used in the study are listed in **Table 1**. All primers were purchased from Thermo Scientific.

Western Blot

Protein lysates were obtained from a paw tissue previously pulverized in liquid nitrogen using RIPA buffer and subsequently subjected to Western blot analysis as described by Dinic et al. (2017). Briefly, the extracted proteins (20 μ g) were separated on 12% SDS-PAGE and transferred to 0.2 mm nitrocellulose membrane (GE Healthcare) using Bio-Rad Mini *trans*-blot system (Bio-Rad, Hercules, CA, United States). The membranes were incubated for 2 h with anti-myeloperoxidase (MPO) antibody (1:1000; Abcam) and anti- β -actin (1:1000; Thermo Scientific). The membranes were washed and incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (goat anti-rabbit; 1:10000; Thermo Scientific and goat anti-mouse; 1:10000; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, United States) for 1 h at room temperature. Proteins were detected by enhanced chemiluminescence (Immobilon Western, Merck Millipore).

TABLE 1 | The list of primers used in this study.

Primer name	Primer sequence 5'-3'	Reference
β -Actin forward	AGCCATGTACGTAGCCATCC	Mousavi et al., 2009
β -Actin reverse	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA	
GAPDH forward	CCCCAATGTATCCGTTGTG	Tanga et al., 2004
GAPDH reverse	TAGCCCAGGATGCCCTTAGT	
TNF- α forward	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC	Peinnequin et al., 2004
TNF- α reverse	TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC	
IL-1- β forward	GGAAGGCAGTGTCACTCATTGTG	Tilleux et al., 2007
IL-1- β reverse	GGTCTCATCTGGAAGCTCC	
IL-6 forward	GTGGCTAAGGACCAAGACCA	Lugrin et al., 2015
IL-6 reverse	ACCACAGTGAGGAATGTCCA	
iNOS forward	GACCAGAACTGTCTCACCTG	Choi et al., 2012
iNOS reverse	CGAACATCGAACGTCTCACA	
CD14 forward	TCTGAGGGTCTGGTCAACA	Lukic et al., 2017
CD14 reverse	TTGTGAGCACCGATGGACAA	

The intensity of the bands was quantified using ImageJ software. The results were normalized to β -actin loading control.

Statistical Analysis

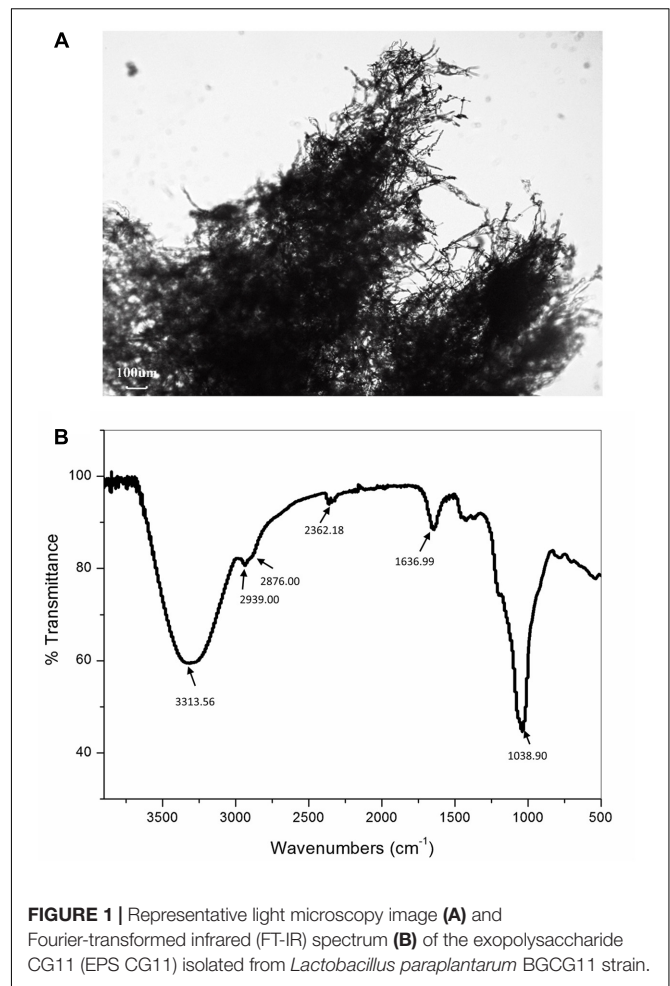
The statistical analysis was performed using SigmaPlot 11 (Systat Software, Inc., Richmond, CA, United States) and SPSS 20.0 for Windows. All the results are presented as means \pm standard error of the means (SEM). The differences between corresponding group means in antiedematous/antihyperalgesic activity experiment were assessed by using a two-way repeated-measures ANOVA followed by Tukey HSD test for *post hoc* comparisons (the type of treatment was the between-subject factor and time after treatment application was the within-subject factor). One-way ANOVA with the Tukey's *post hoc* test were used to compare multiple groups in all other experiments. A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant. Graphs were drawn in the GraphPad Prism software (trial version).

RESULTS

Microscopy and FTIR Analysis of the EPS CG11

The representative image shows that polysaccharides chains are arranged in the form of fibers with a diameter of around few microns. These fibers are further entangled with each other in a three-dimensional mesh. Such three-dimensional structure is not unusual since, among other biopolymers, the polysaccharides show the greatest chemical and structural variety (Urbani et al., 2012). This wide chemical and structural variability can be explained by the multiple hydroxyl functionality of the five- and six-carbon sugars. From the literature it is known, the replacement of one or more of such sugar hydroxyl functionalities by amine, ester, carboxylate, phosphate or sulfonate groups, leads to the frequent occurrence of tree-like branching and to the huge number of possible polymeric conformations of different solution behavior (Aspinall, 1982; Urbani et al., 2012). From the **Figure 1A** also randomly distributed spherical particles can be seen within the polymer network.

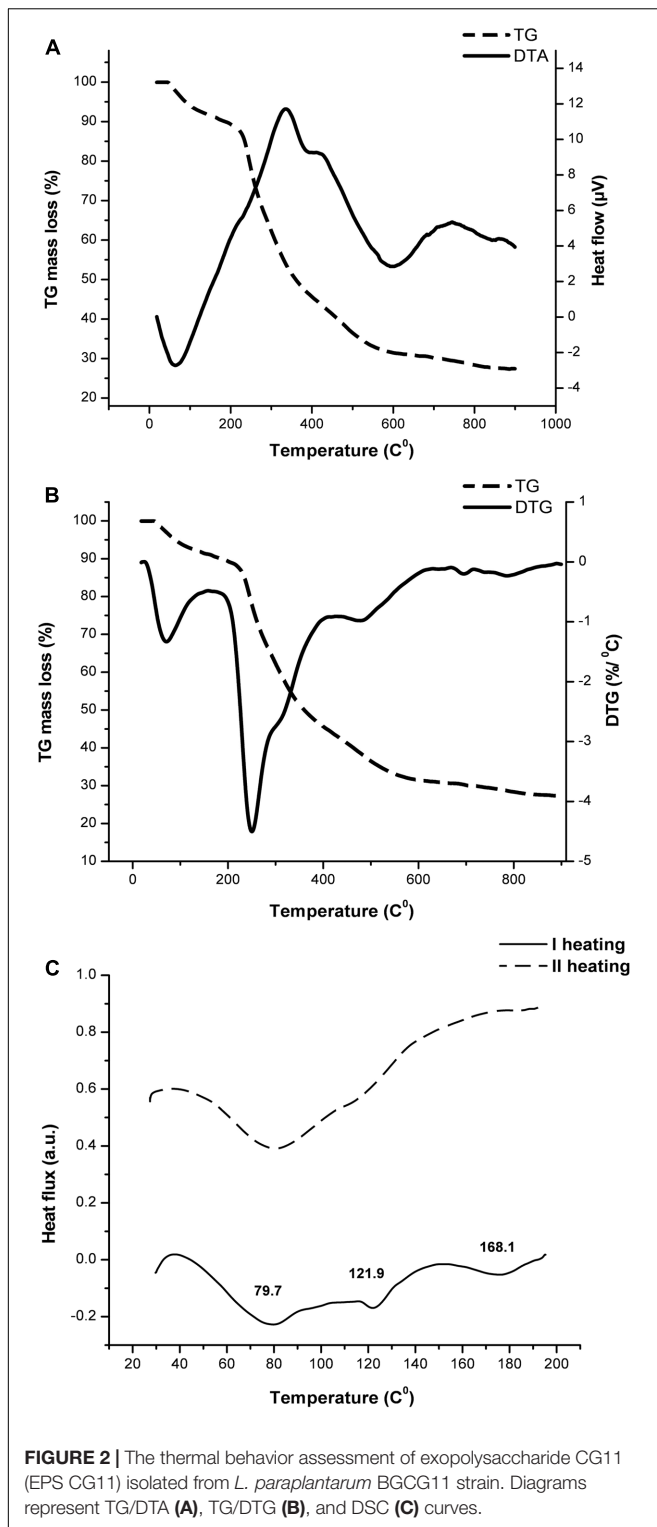
The analysis of the FTIR spectra was used to identify purified material as the polysaccharide by qualitative assessment of functional groups and chemical bonds present in the specimen. The representative FTIR spectrum is presented in **Figure 1B**. The analysis revealed the presence of carboxyl, hydroxyl, and amide groups corresponding to a typical polysaccharide. The spectrum has a broad absorption band at 3313.56 cm^{-1} assigned to $-\text{OH}$ or $-\text{NH}$ vibrations (Silverstein et al., 1981; Coates, 2000). The data from the literature revealed that the polysaccharides contain a significant number of hydroxyl groups, which exhibit an intense broad stretching vibration in that region (Nataraj et al., 2008). This is the characteristic absorption band of the carbohydrate ring and is responsible for the water solubility of polysaccharides. A small band at 2939 and 2876 cm^{-1} also points to C-H stretching vibrations of $-\text{CH}_2$ methylene and $-\text{CH}_3$ methyl groups



commonly existing in hexoses, like glucose or galactose or deoxyhexose, like rhamnose. The band at 2362.18 cm^{-1} corresponds to the C-O stretch vibration. The band at 1636.99 cm^{-1} is associated with C = O group, while the band at 1038.90 cm^{-1} belongs to C-O stretch vibration or phosphate functional group (P-O-C stretch) and it is commonly associated with alcohols, ethers or polysaccharides (Coates, 2000). The strongest absorption band at 1038.90 cm^{-1} indicates that the substance is a polysaccharide (Nataraj et al., 2008). Also from the literature, it is known that polysaccharides generally consist of monosaccharides and some non-carbohydrate substituents (such as acetate, pyruvate, succinate, and phosphate) (Lembre et al., 2012). Apart from those peaks, in the spectra of our sample, no other peaks can be identified.

Thermal Properties of the EPS CG11

Substances that undergo through high temperature pharmaceutical processes must possess suitable thermal properties in order to avoid some structural deformation, degradation, or melting due to absorption or emission of the heat. Therefore, the TGA analysis was carried out to determine the thermal stability and decomposition pattern of the EPS CG11. According to Chowdhury et al. (2011),



polysaccharides undergo degradation through several distinct phases. **Figures 2A,B** show TG/DTA and TG/DTG thermograms of isolated EPS CG11. At the beginning, weight loss occurs because of desorption of physically absorbed water which is then followed by the removal of structural water or dehydration.

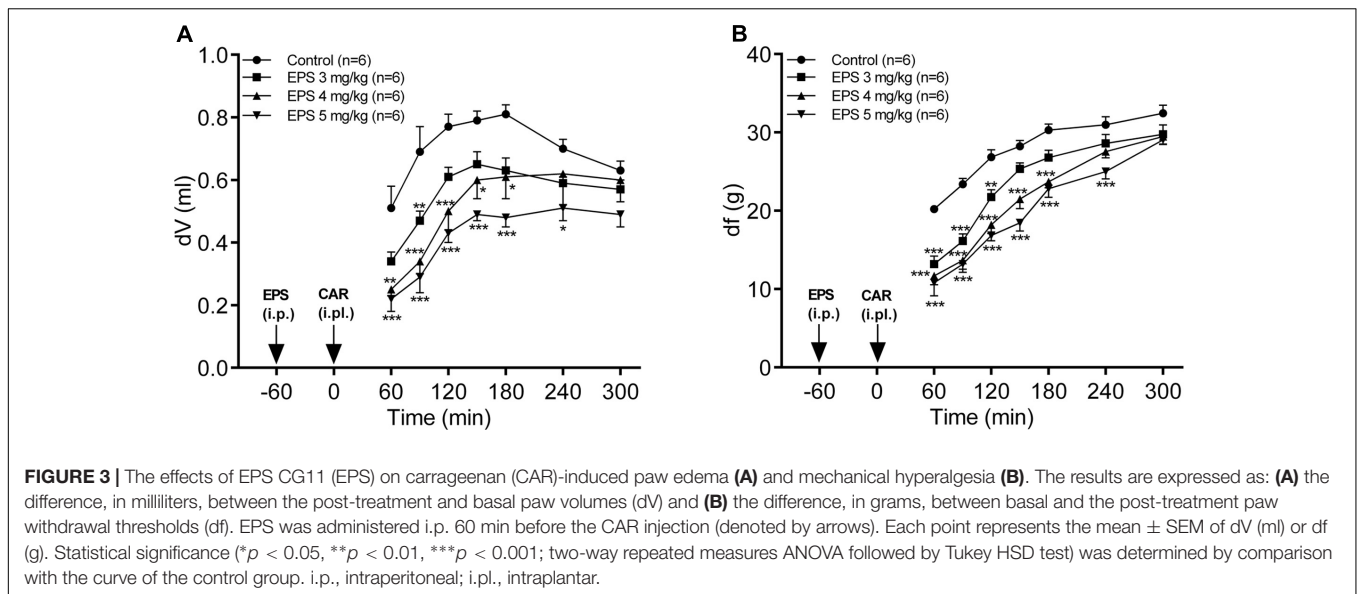
In our sample, these two processes are combined and take place in the temperature interval 46–215°C. The endothermic profile of DTA signal confirmed this theory. The calculated weight loss (Δm) for this stage is 11.5% of initial mass. The next step involves the decomposition of material which includes breaking down of C–O, C–C bonds mainly followed by the evaporation of CO, CO₂, and H₂O. In this decomposition process the total mass loss is 58.1% starting from 215 to 663°C with the highest rate at 250.3°C. Based on DTG signal, the decomposition can be further separated in three stages: (i) 215–264 with $\Delta m = 16.3\%$; (ii) 264–409°C with $\Delta m = 27.6\%$; and (iii) 409–663°C with $\Delta m = 14.2\%$. On the DTA curve, the decomposition is expressed through exothermic shoulder, which at the same time indicates the complexity of the process itself. In the remaining part of TGA curve, there is a small change in the mass of 3.1%, starting from 680 to 895°C after which the signal becomes stable. After completing the analysis, it is observed a significant amount of solid residue which could be correlated with a presence of cations (Na⁺, K⁺, and Ca²⁺) or phosphoric groups.

The differential scanning calorimetric (DSC) analysis was done in a lower temperature region, i.e., up to 200°C where the sample is stable according to the TGA analysis. The DSC signal shown on **Figure 2C** reveals the absorption of heat at three temperatures 79.2, 121.9, and 168.1°C, respectively. The values of associated enthalpies (7–11 J/g) exclude the possibility for consideration of these events as melting processes. Also gelatinization requires a larger amount of water in the system. Most likely these endothermic events could be attributed to the removal of moisture and dehydration through evaporation, since EPS is a very hydrophilic molecule. To confirm this assumption, after cooling, the sample was subjected to the second heating regime under the same conditions. The endothermic event at higher temperature did not occur during the second run. This observation indicates that changes in the sample come only from water, without a significant influence on the polymer conformation.

EPS CG11 Exhibits Dose-Dependent Antiedematous and Antihyperalgesic Effects in the Model of Carrageenan-Induced Paw Inflammation

The administration of EPS CG11 (3–5 mg/kg; i.p.) produced a significant and dose-dependent reduction of carrageenan-induced edema ($p < 0.001$). Maximal antiedematous effects were observed from 60 to 90 min after carrageenan treatment and were 34, 51.3, and 58% for EPS CG11 doses of 3, 4, and 5 mg/kg, respectively (**Figure 3A**).

In the case of hyperalgesia assessed by measuring PWT, EPS CG11 (3–5 mg/kg; i.p.) caused a significant decrease of carrageenan-induced mechanical hyperalgesia, in a dose-dependent manner ($p < 0.001$). The peak antihyperalgesic effects were achieved 60 min after carrageenan application and were 34.8, 42.2, and 46.5% for EPS CG11 doses of 3, 4, and 5 mg/kg,



respectively (Figure 3B). Since the dose of 5 mg/kg produces the most promising effect, it was chosen for further analysis.

The Expression of Inflammatory Mediators in Rat's Paw Tissue

Having in mind that EPS CG11 administration alleviated the carrageenan-induced rat paw edema, we proceeded with the analysis of gene expression of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , and IL-6) as well as iNOS to determine whether the transcription of some of these genes could be potentially altered by the EPS CG11. The effect of the EPS CG11 on gene expressions in the rats paw tissue is presented in Figure 4. As expected, the carrageenan injection in the rats paw tissue significantly elevates mRNA levels of all tested genes compared to saline administration. The mRNA expression of IL-1 β and iNOS genes in the paw tissues of rats treated with 5 mg/kg of EPS CG11/carrageenan were significantly lower compared to the expression levels of these genes in the rats injected only with carrageenan ($p < 0.05$). More precisely, IL-1 β expression showed 2.6 fold reduction when EPS CG11 was administered, while iNOS mRNAs were reduced 1.7 times (Figures 4A,B). However, EPS CG11 administration did not change the transcription levels of TNF- α and IL-6 genes which retained a high mRNA levels induced by carrageenan (Figures 4C,D). These results indicate the potential of i.p. injected EPS CG11 to suppress inflammatory response via regulation of IL-1 β production on periphery.

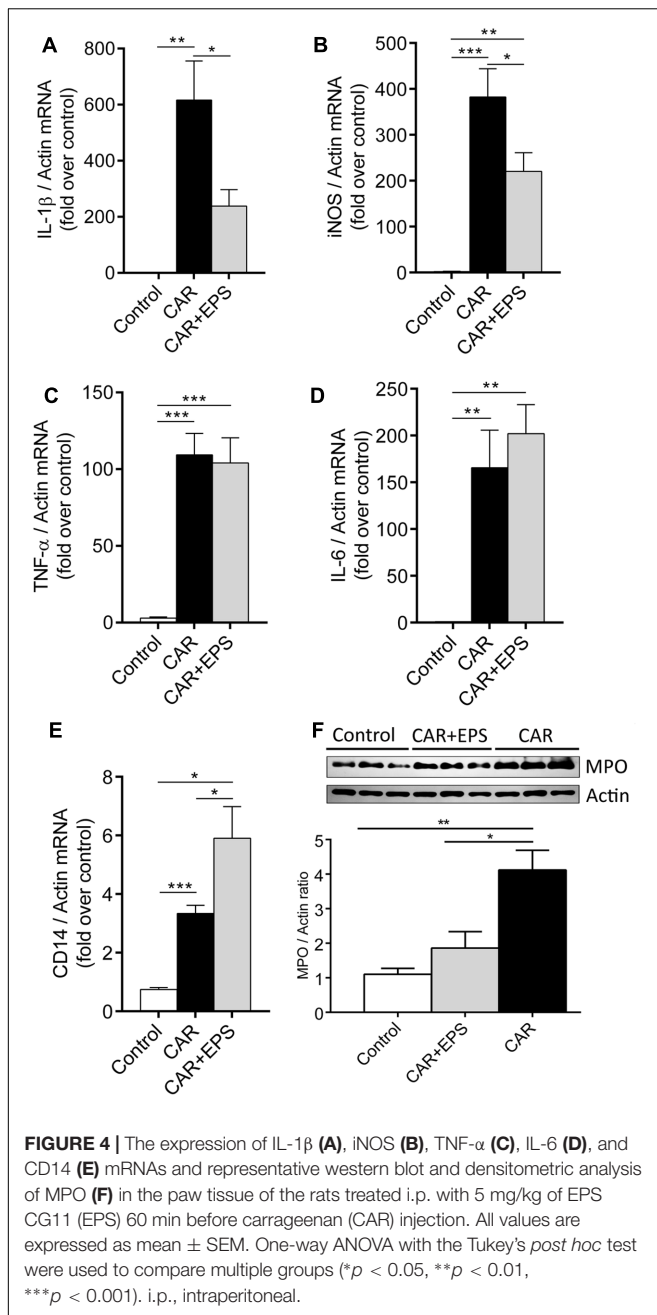
Further, we assessed the expression of MPO, an enzyme used as a marker of neutrophil recruitment and activation, and CD14, a macrophages tissue marker. The results revealed the reduced level of MPO enzyme and the elevated level of CD14 mRNA in the paw tissue of animals co-treated with EPS CG11/carrageenan compared to carrageenan controls, suggesting that i.p. injected EPS CG11 suppress the function of neutrophils in the paw tissue, but also pointed out the potential contribution of macrophages to the suppression of inflammation (Figures 4E,F).

EPS CG11 Shows the Immunosuppressive Properties in the Peritonitis Model

To confirm our hypothesis on the regulation of cytokines production by EPS CG11, a peritonitis model was used. As the previous studies have reported, carrageenan caused the migration of immune cells, predominantly neutrophils, into the peritoneal cavity and the total cell number was significantly higher in the animals receiving carrageenan relative to healthy control animals ($p < 0.05$). However, the i.p. injection of EPS CG11 treatment (5 mg/kg) did not affect carrageenan induced-immune cells migration (Figure 5A). Additionally, in the contrast to the paw tissue, i.p. injected EPS CG11 did not affect CD14 mRNA level in the infiltrated cells induced by the carrageenan administration (Figure 5D).

We further used the qPCR analysis to investigate the changes in the expression of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and iNOS genes in the infiltrated cells. Interestingly, the mRNA levels of IL-1 β , TNF- α , and iNOS in EPS CG11/carrageenan treated animals were significantly lower compared to only carrageenan treated animals ($p < 0.01$; $p < 0.05$; $p < 0.01$, respectively), while the transcription of IL-6 gene was on the same level between these two groups of animals (Figures 5B,C,E,F). In other words, the levels of IL-1 β , TNF- α and iNOS mRNAs was reduced for 2.4; 3 and 2 times, respectively, compared to carrageenan controls.

The results of the ELISA measurements revealed that the EPS CG11 administration led to the significant reduction of high level of TNF- α induced by carrageenan ($p < 0.05$) (Figure 5H). Interestingly, the higher levels of IL-10 and IL-6 in peritoneal fluid in the animals treated both with EPS CG11 and carrageenan compared to the animals received only carrageenan or healthy control animals were detected (Figures 5G,I). Finally, carrageenan itself has led to significantly higher levels of all three cytokines, while in the healthy control animals the levels of IL-6 and TNF- α were under the detection limit (Figures 5G–I).



Therefore, all the above mentioned results led us to conclusion that immunosuppressive mediators were predominantly present in the peritoneal cavity when EPS CG11 was administered.

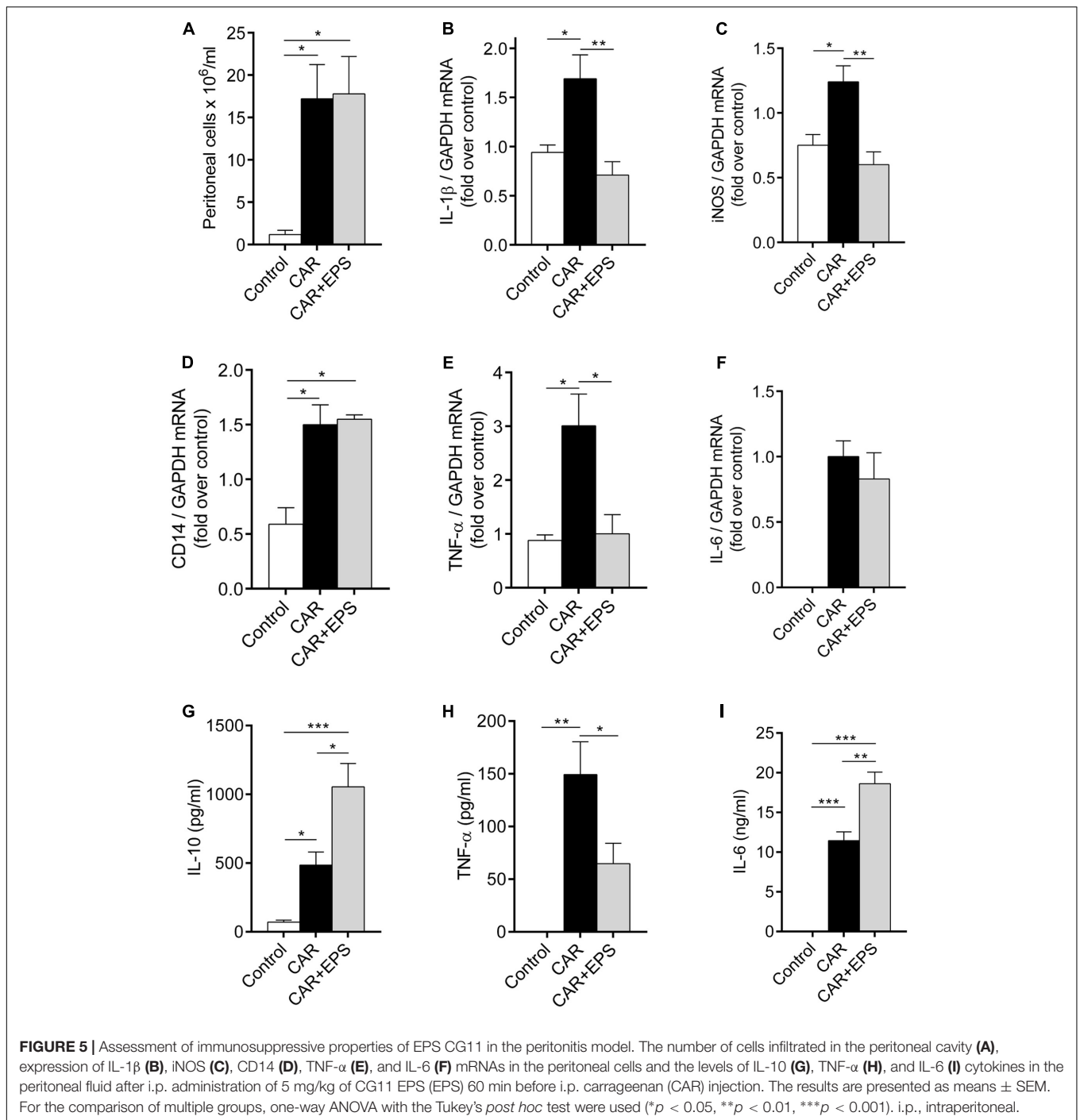
DISCUSSION

A huge diversity of microbial world enables us to constantly search new molecules with a potential to interact with the host cells. Presently, between 20 and 50% of medications originate from natural sources including bacteria (Kingston, 2011). Besides antimicrobial molecules usually found in bacteria, cell surface

macromolecules as well as bacterial metabolites have been extensively studied due to their key role in the interaction with host receptors (Dinić et al., 2017). Different modifications (e.g., glycosylation) of surface molecules and/or the presence of strain exclusive molecules (e.g., EPSs) dictate strain specific effects, which explain applications of numerous bacterial strains as probiotics (Lebeer et al., 2010; Zivkovic et al., 2016). It's well-documented that EPS production is involved in the probiotic beneficial effects. Therefore, in the light of rising application of bacterial EPSs, here we demonstrate the novel ability of EPS CG11 to suppress a pain sensation via regulation of inflammatory response.

Previous studies reported that strain *L. paraplantarum* BGCG11 produces ropy, big-size polymer around 2×10^6 Da, mainly composed of glucose and rhamnose with the traces of galactose and mannose, but further information regarding stability of the polymer is missing (Cerning et al., 1994; Zivkovic et al., 2015). As one of the important steps in drug design and development is the investigation of thermal behavior of new molecules in order to collect stability information for adequate pharmaceutical processing (Shamsipur et al., 2013). According to the literature data, the thermal stability of EPSs from various bacterial sources may vary. The TGA curve of EPS CG11 showed that maximal degradation temperature of the polymer was 250.3°C , while the overall mass loss at the end of the analysis was 72.7%. This is in accordance with the decomposition temperature reported for EPSs isolated from *L. plantarum* and *L. kefiranofaciens* (Wang et al., 2010; Ahmed et al., 2013). On the other hand, low enthalpy values (7–11 J/g) of EPS CG11 measured in DSC analysis, confirmed that this EPS molecule did not undergo phase transition processes unlike KF5 EPS produced by *L. plantarum* which melting temperature was 86.35°C , with the enthalpy value of 133.5 J/g (Ahmed et al., 2013). These different observations in the thermal behavior of these two EPSs could be explained by different structures and monosaccharide composition of the polymers. Hence, it can be said that EPS CG11 possesses good thermal properties and could undergo through various technological processing where temperature reach 150°C (Ahmed et al., 2013).

It has been shown that the crude polysaccharides as well as sulfated ones isolated from lichens and seaweeds exhibit potential to alleviate inflammatory pain in rodents by suppressing IL-1 β and/or TNF- α production (Chaves et al., 2013; Córdova et al., 2013). The results obtained in our study are in accordance with the literature data regarding the polysaccharide application as pain relief agents. The dose-dependent reduction of pain sensations as well as paw edema was noticed after the administration of EPS CG11 in carrageenan-induced paw inflammation in rats. The carrageenan administration evokes biphasic edema. The first phase of edema last for 1 h and is reflected in the release of histamine, bradykinin, serotonin and cyclooxygenase products (8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$; 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ and prostaglandin E_2 ; PGE $_2$). During the second phase, which last for the next 2 h, neutrophil infiltration, the liberation of cytokines and NO occur, while prostaglandins production continue (Vinegar et al., 1969; Ozdol and Melli, 2004). Taking into account that the effect of EPS CG11 was the strongest for 2 h



after the carrageenan administration we could assume that EPS CG11 influences both phases of inflammation.

Based on these findings, we analyzed the influence of EPS CG11 on a release of inflammatory mediators important for hyperalgesia and inflammation. Numerous studies focused on the pro-inflammatory cytokines showed that injections of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 produce both mechanical and thermal hyperalgesia. On the other hand, a release of potent anti-inflammatory cytokine IL-10 attenuates spinally mediated

pain, counter-regulating the synthesis of pro-inflammatory cytokines (Zhang and An, 2007). In the paw tissue of EPS CG11/carrageenan treated rats, EPS CG11 caused a downregulation of *IL-1 β* and *iNOS* mRNA levels, while the levels of *TNF- α* and *IL-6* mRNAs were not changed compared to carrageenan controls. The same effect was observed by Córdova et al. (2013) reporting that the analgesic effect of glucomannan depended on the inhibition of IL-1 β release, without the affection of TNF- α production in the sciatic nerve. Additionally, as the

transcription of *iNOS* gene is regulated by IL-1 β (Pautz et al., 2010), the decrease in *iNOS* mRNA levels measured in the paws of animals treated with EPS CG11/carrageenan compared to carrageenan controls is probably the consequence of IL-1 β downregulation. Taking into account that the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), which is responsible for the synthesis of prostaglandins (8-iso-PGF_{2 α} and PGE₂) during the first phase of carrageenan inflammation, is stimulated by IL-1 β production, we could assume that the decreased level of IL-1 β mRNA caused by EPS CG11 contributed to its anti-inflammatory effect by acting on the prostaglandins synthesis in the beginning of the inflammatory process (Molina-Holgado et al., 2000). Also, the decreased MPO level detected in the paw tissue in the group of animals receiving EPS CG11/carrageenan suggested that anti-inflammatory effect of EPS CG11 could be the consequence of impaired neutrophils' function in the paw.

In order to understand the role of EPS CG11 in the modulation of cytokines' production we additionally used the carrageenan-induced peritonitis model suitable for the investigation of leukocyte migration (Barth et al., 2016). As was noticed in the paw tissue, the expression of IL-1 β and *iNOS* mRNAs showed approximately the same level of reduction in the peritoneal cells after EPS CG11/carrageenan administration compared to carrageenan controls. Additionally, level of TNF- α , as well as the transcription of TNF- α gene, was significantly reduced in the same group of animals, together with the increased level of anti-inflammatory cytokine IL-10. In the case of IL-6, which is categorized as either anti-inflammatory or pro-inflammatory cytokine, under various circumstances (Zhang and An, 2007), there is a discrepancy between its mRNA and protein level in peritoneum of EPS CG11/carrageenan treated rats. Although, the protein level of IL-6 was elevated in the peritoneum, the mRNA level was unchanged and in accordance with that obtained in the paw tissue. Given that, the cell infiltration in the peritoneal cavity was the same irrespectively of EPS CG11 treatment, it could be concluded that the reduction of pro-inflammatory cytokines was not related to lower infiltration of neutrophils. A similar effect was exhibited by cyanidin-3-glucoside, an anthocyanin, when administered prophylactically, as we did with EPS CG11, in the carrageenan-induced peritonitis model (Hassimotto et al., 2013). More precisely, the authors noted that cyanidin-3-glucoside given 30 min before carrageenan alleviated inflammation by suppressing COX-2 expression and PGE₂ synthesis, with no effect on neutrophil influx.

Further, the elevated level of *CD14* mRNA in the rat hind paw, pointed to the possibility that EPS CG11 exhibits its anti-inflammatory effect by acting on macrophages. Therefore, based on the higher secretion of IL-10 and the lower levels of IL-1 β and *iNOS* mRNAs observed in EPS CG11/carrageenan treated rats in the peritonitis model, it could be assumed that the intraperitoneal injection of EPS CG11 probably influenced the peritoneal macrophages to acquire the immunosuppressive properties. Together with the report of Bhaumik et al. (2001) that macrophages migrate from the peritoneal cavity to the subcutaneous tissue, above results suggest

the potential involvement of peritoneal macrophages in the resolution of paw inflammation. However, as neutrophils also express CD14 molecule, this hypothesis about macrophages infiltration/migration needs to be confirmed in further experiments. Altogether, the differences in cytokine production and the cells migration between the paw tissue and the peritoneal cavity are most probably due to the differences of EPS CG11 and carrageenan application route in these two models of inflammation. So, in the inflammatory pain model, only cells that are exposed to the EPS CG11 are those migrating from the peritoneum, while all other cells in the inflamed paw are exposed only to carrageenan. At contrary, in model of peritonitis, resident as well as all infiltrated cells are exposed to the EPS CG11 and carrageenan simultaneously.

Finally, considering the results obtained in this study, we can conclude that EPS CG11 is highly promising antihyperalgesic molecule with good physico-chemical properties which makes it a potential candidate for further investigation and drug-development.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MD: performed the main work, conception and design of the experiments, analyzed and interpreted the data, and drafted the work; UP: performed *in vivo* experiments, analyzed and interpreted the data, and made a part of the draft related to antihyperalgesic and antiedematous experiments; JD and MM: conception and design related to immunology, supervised the work, analyzed and interpreted the data, and critically revised the manuscript; RS-P: conception and design related to antihyperalgesic and antiedematous experiments, supervised the work, analyzed and interpreted the data, and critically revised the manuscript; MS and NF: performed part of the work related to physico-chemical analysis, analyzed and interpreted the data, and made a part of the draft; JB, NG, and JL: supervised the work, analyzed and interpreted the data, and critically revised the manuscript. All authors finally approved the version to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

FUNDING

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (grant nos. 173019, 175045, and III45004).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Nemanja Mirković from the Faculty of Agriculture, University of Belgrade for the lyophilization of EPS CG11 and Leontina Keričan, an English professor from the Faculty of Pharmacy, University of Belgrade for the proofreading of the manuscript.

REFERENCES

- Ahmed, Z., Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, A., and Khan, S. T. (2013). Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir—Part II. *Food Hydrocoll.* 30, 343–350. doi: 10.1016/j.jbiomac.2008.06.011
- Aspinall, G. O. (1982). *The Polysaccharides*. New York, NY: Academic Press, 248.
- Badel, S., Bernardi, T., and Michaud, P. (2011). New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* 29, 54–66. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.08.011
- Barth, C. R., Funchal, G. A., Luft, C., de Oliveira, J. R., Porto, B. N., and Donadio, M. V. (2016). Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. *Eur. J. Immunol.* 46, 964–970. doi: 10.1002/eji.201545520
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., and Julius, D. (2009). Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell* 139, 267–284. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028
- Bhaumik, S., Mitra, R., Varalakshmi, C., and Khar, A. (2001). Activated macrophages migrate to the subcutaneous tumor site via the peritoneum: a novel route of cell trafficking. *Exp. Cell Res.* 266, 44–52. doi: 10.1006/excr.2001.5201
- Caggianiello, G., Kleerebezem, M., and Spano, G. (2016). Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 3877–3886. doi: 10.1007/s00253-016-7471-2
- Cerning, J., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Bouillanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M., et al. (1994). Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3914–3919.
- Chaves, L. S., Nicolau, L. A., Silva, R. O., Barros, F. C., Freitas, A. L., Aragao, K. S., et al. (2013). Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 35, 93–100. doi: 10.3109/08923973.2012.707211
- Choi, J. Y., Nam, S. A., Jin, D. C., Kim, J., and Cha, J. H. (2012). Expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated rat kidneys. *J. Histochem. Cytochem.* 60, 301–315. doi: 10.1369/0022155411436131
- Chowdhury, S. R., Manna, S., Saha, P., Basak, R. K., Sen, R., Roy, D., et al. (2011). Composition analysis and material characterization of an emulsifying extracellular polysaccharide (EPS) produced by *Bacillus megaterium* RB-05: a hydrodynamic sediment-attached isolate of freshwater origin. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1381–1393. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05162.x
- Coates, J. (2000). “Interpretation of infrared spectra, a practical approach,” in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, ed. R. A. Meyers (Chichester: John Wiley & Sons), 10815–10837.
- Córdova, M. M., Martins, D. F., Silva, M. D., Baggio, C. H., Carbonero, E. R., Ruthes, A. C., et al. (2013). Polysaccharide glucomannan isolated from *Heterodermia obscurata* attenuates acute and chronic pain in mice. *Carbohydr. Polym.* 92, 2058–2064. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.11.041
- Di, W., Zhang, L., Wang, S., Yi, H., Han, X., Fan, R., et al. (2017). Physicochemical characterization and antitumor activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* SB27 from yak milk. *Carbohydr. Polym.* 171, 307–315. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.03.018
- Dinic, M., Lukic, J., Djokic, J., Milenkovic, M., Strahinic, I., Golic, N., et al. (2017). *Lactobacillus fermentum* postbiotic-induced autophagy as potential approach for treatment of acetaminophen hepatotoxicity. *Front. Microbiol.* 8:594. doi: 10.3389/fmicb.2017.00594
- Hassimotto, N. M., Moreira, V., Do Nascimento, N. G., Souto, P. C., Teixeira, C., and Lajolo, F. M. (2013). Inhibition of carrageenan-induced acute inflammation in mice by oral administration of anthocyanin mixture from wild mulberry and cyanidin-3-glucoside. *Biomed Res. Int.* 2013:146716. doi: 10.1155/2013/146716
- Ji, R. R., Xu, Z. Z., and Gao, Y. J. (2014). Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 13, 533–548. doi: 10.1038/nrd4334
- Jones, S. E., Paynich, M. L., and Knight, K. L. (2014). Exopolysaccharides: sweet success with probiotic therapeutics. *Inflamm. Cell Signal.* 1:e334.
- Kidd, B. L., and Urban, L. A. (2001). Mechanisms of inflammatory pain. *Br. J. Anaesth.* 87, 3–11. doi: 10.1093/bja/87.1.3
- Kim, Y., Oh, S., Yun, H. S., Oh, S., and Kim, S. H. (2010). Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 51, 123–130. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02859.x
- Kingston, D. G. I. (2011). Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J. Nat. Prod.* 74, 496–511. doi: 10.1021/np100550t
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 171–184. doi: 10.1038/nrmicro.2297
- Lembre, P., Lorentz, C., and Di Martino, P. (2012). “Exopolysaccharides of the biofilm matrix: a complex biophysical world,” in *The Complex World of Polysaccharides*, ed. D. N. Karunaratne (Rijeca: InTech), 371–392.
- Linley, J. E., Rose, K., Ooi, L., and Gamper, N. (2010). Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. *Pflügers Arch.* 459, 657–669. doi: 10.1007/s00424-010-0784-6
- Lugrin, J., Parapanov, R., Rosenblatt-Velin, N., Rignault-Clerc, S., Feihl, F., Waeber, B., et al. (2015). Cutting edge: IL-1 α is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction. *J. Immunol.* 194, 499–503. doi: 10.4049/jimmunol.1401948
- Lukic, J., Jancic, I., Mirkovic, N., Bufan, B., Djokic, J., Milenkovic, M., et al. (2017). *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus salivarius* BGBU1-4 differently modulate early immunological response of Wistar rats co-administered with *Listeria monocytogenes*. *Benef. Microbes* 31, 1–14. doi: 10.3920/BM2017.0007
- Lukic, J., Strahinic, I., Milenkovic, M., Golic, N., Kojic, M., Topisirovic, L., et al. (2013). Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGH114 with rat colonic mucosa: implications for colitis induction. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 5735–5744. doi: 10.1128/AEM.01807-13
- Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S., and Kitamura, S. (2004). Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. *Biofactors* 22, 197–200. doi: 10.1002/biof.5520220141
- Molina-Holgado, E., Ortiz, S., Molina-Holgado, F., and Guaza, C. (2000). Induction of COX-2 and PGE₂ biosynthesis by IL-1 β is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine astrocytes. *Br. J. Pharmacol.* 131, 152–159. doi: 10.1038/sj.bjp.0703557
- Morris, C. J. (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol. Biol.* 225, 115–121. doi: 10.1385/1-59259-374-7:115
- Mousavi, S. A., Fønhus, M. S., and Berg, T. (2009). Up-regulation of uPARAP/Endo180 during culture activation of rat hepatic stellate cells and its presence in hepatic stellate cell lines from different species. *BMC Cell Biol.* 10:39. doi: 10.1186/1471-2121-10-39
- Nataraj, S., Schomacker, R., Kraume, M., Mishra, M. I., and Drews, A. (2008). Analyses of polysaccharide fouling mechanisms during crossflow membrane filtration. *J. Memb. Sci.* 308, 152–161. doi: 10.1016/j.memsci.2007.09.060
- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suárez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., et al. (2012). Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGC11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 158, 155–162. doi: 10.1016/j.jifoodmicro.2012.07.015
- Ozdol, N. C., and Melli, M. (2004). Formation of 8-isoprostaglandin F₂ α and prostaglandin E₂ in carrageenan-induced air pouch model in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 506, 189–197. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.10.050
- Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., and Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23, 75–93. doi: 10.1016/j.niox.2010.04.007
- Peinnequin, A., Mouret, C., Birot, O., Alonso, A., Mathieu, J., Clarençon, D., et al. (2004). Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol.* 5:3. doi: 10.1186/1471-2172-5-3
- Ramesan, M. T., and Surya, K. (2016). Fabrication and characterization of biopolymer nanocomposites from natural resource materials. *Polym. Compos.* 38, E66–E73. doi: 10.1002/pc.23978
- Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., Margolles, A., de los Reyes-Gavilán, C. G., and Salminen, S. (2006). Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J. Food Prot.* 69, 2011–2015. doi: 10.4315/0362-028X-69.8.2011

- Sanghoon, K., and Willett, J. L. (2001). An optical microscope for the study of biopolymer solutions under shear field. *Rev. Sci. Instrum.* 72:4252. doi: 10.1063/1.1412263
- Shamsipur, M., Pourmortazavi, S. M., Miran Beigi, A. A., Heydari, R., and Khatibi, M. (2013). Thermal stability and decomposition kinetic studies of acyclovir and zidovudine drug compounds. *AAPS PharmSciTech* 14, 287–293. doi: 10.1208/s12249-012-9916-y
- Silverstein, R. M., Bassler, G. C., and Morrill, T. C. (1981). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 4th Edn. New York, NY: John Wiley and Sons.
- Stepanović-Petrović, R. M., Micov, A. M., Tomic, M. A., and Ugresic, N. D. (2012). The local peripheral antihyperalgesic effect of levetiracetam and its mechanism of action in an inflammatory pain model. *Anesth. Analg.* 115, 1457–1466. doi: 10.1213/ANE.0b013e31826c7fc2
- Tang, W., Dong, M., Wang, W., Han, S., Rui, X., Chen, X., et al. (2017). Structural characterization and antioxidant property of released exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SRFM-1. *Carbohydr. Polym.* 173, 654–664. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.06.039
- Tanga, F. Y., Raghavendra, V., and DeLeo, J. A. (2004). Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain. *Neurochem. Int.* 45, 397–407. doi: 10.1016/j.neuint.2003.06.002
- Tilleux, S., Berger, J., and Hermans, E. (2007). Induction of astrogliosis by activated microglia is associated with a down-regulation of metabotropic glutamate receptor 5. *J. Neuroimmunol.* 189, 23–30. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.06.011
- Urbani, R., Sist, P., Pletikapic, G., Mistic Radic, T., Svetlicic, V., and Zutic, V. (2012). “Diatom polysaccharides: extracellular production, isolation and molecular characterization,” in *The Complex World of Polysaccharides*, ed. D. N. Karunaratne (Rijeca: InTech).
- Vinegar, R., Schreiber, W., and Hugo, R. (1969). Biphasic development of carrageenin edema in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 166, 96–103.
- Vivancos, G. G., Verri, W. A. Jr., Cunha, T. M., Schivo, I. R., Parada, C. A., Cunha, F. Q., et al. (2004). An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 391–399. doi: 10.1590/S0100-879X2004000300017
- Wang, Z., Li, C., Liu, P., Ahmed, Z., Xiao, P., and Bai, X. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydr. Polym.* 82, 895–903. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.06.013
- Zhang, J. M., and An, J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *Int. Anesthesiol. Clin.* 45, 27–37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e
- Zivkovic, M., Miljkovic, M., Ruas-Madiedo, P., Strahinic, I., Tolinacki, M., Golic, N., et al. (2015). Exopolysaccharide production and ropy phenotype are determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1387–1396. doi: 10.1128/AEM.03028-14
- Zivkovic, M., Miljkovic, M. S., Ruas-Madiedo, P., Markelic, M. B., Veljovic, K., Tolinacki, M., et al. (2016). EPS-SJ exopolisaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on *E. coli* association to Caco-2 cells. *Front. Microbiol.* 7:286. doi: 10.3389/fmicb.2016.00286

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Dinić, Pecikoza, Djokić, Stepanović-Petrović, Milenković, Stevanović, Filipović, Begović, Golić and Lukić. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

