

Utjecaj upale na adheziju probiotskih i patogenih bakterija na epitelne stanice kolona

Mustač, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:568928>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)

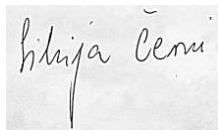


Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Martina Mustač

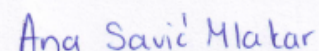
**UTJECAJ UPALE NA ADHEZIJU PROBIOTSKIH I
PATOGENIH BAKTERIJA NA EPITELNE STANICE KOLONA**

Diplomski rad



Biljana Černa

Zagreb, 2021.



Ana Savić Mlatar

«Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za imunologiju, Centru za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Ane Savić Mlakar. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.»

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ UPALE NA ADHEZIJU PROBIOTSKIH I PATOGENIH BAKTERIJA NA EPITELNE STANICE KOLONA

Martina Mustać

Rooseveltov trg, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Narušavanjem crijevne mikrobiote smanjenjem brojnosti bakterija vrsta *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp., istodobnom kolonizacijom patogenim sojevima bakterije *Escherichia coli* te prekomjernim upalnim procesom dolazi do narušavanja integriteta crijevne barijere debelog crijeva. U ovakvim uvjetima smanjuje se ekspresija proteina *zonula occludens* (ZO-1), jednog od ključnih proteina interstaničnih čvrstih spojeva (proteinski spojni kompleksi koji reguliraju selektivno kretanje otopljenih tvari kroz epitel), što rezultira poremećajem integriteta crijevne barijere, a povezuje se s nastankom upalnih bolesti crijeva. Posljedično dolazi i do povećanja metabolizma sulfida što dodatno pridonosi pogoršanju imunopatološkog procesa. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj probiotske bakterije (*Lactobacillus reuteri*) na modulaciju strukture epitelne barijere i kolonizacije enteropatogenog soja bakterije *Escherichia coli* na upalno kondicioniranu staničnu liniju kolorektalnog adenokarcinoma, Caco-2, koja je uzgajana u hipoksičnim uvjetima te podvrgnuta tretmanu medijem s natrijevim sulfidom i proupalnim citokinima (IFN- γ , TNF- α i IL-1 β). Fluorescentno obilježena probiotska bakterija (*L. reuteri*) i enteropatogena bakterija *E. coli* 3014 nasađene su na stanice Caco-2 uz različito vrijeme inkubacije. Potom su kulturama dodana fluorescentno obilježena monoklonska antitijela za protein ZO-1. Analiza ekspresije proteina ZO-1 ukazala je na trend povećanja u pristunosti natrijeva sulfida, trend smanjenja u prisutnosti enteropatogene bakterije *E. coli* te trend povećanja u prisutnosti bakterije *L. reuteri*. Rezultati sugeriraju da enteropatogena bakterija *E. coli* 3014 negativno utječe na integritet epitelne barijere dok *L. reuteri*, kao probiotska bakterija, utječe na rekonstituiranje upalom narušene strukture epitela.

43 stranice, 13 slika, 2 tablice, 26 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: Caco-2, *Lactobacillus reuteri*, *Escherichia coli*, ZO-1, proupalni citokini, natrijev sulfid

Voditelj: dr. sc. Ana Savić Mlakar, znanstvena suradnica

Suvoditelj: dr. sc. Silvija Černi, doc.

Ocjenitelji: doc. dr. sc. Silvija Černi, izv. prof. dr. sc. Jasna Lajtner, izv. prof. dr. sc. Renata Šošćarić

Rad prihvaćen: 4.2.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

THE IMPACT OF INFLAMMATION ON ADHESION OF PROBIOTIC AND PATHOGENIC BACTERIA TO COLON EPITHELIAL CELLS

Martina Mustač

Rooseveltovo trg, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Disruption of the intestinal microbiota by reducing the number of bacterial species of *Lactobacillus* sp. and *Bifidobacterium* sp., simultaneous colonization by pathogenic strains of *Escherichia coli* and excessive inflammatory process leads to disruption of the integrity of the intestinal barrier of the colon. Under such conditions, the expression of the protein *zonula occludens* (ZO-1), one of the key proteins of intercellular solid compounds (protein binding complexes that regulate the selective movement of solutes through the epithelium), decreases, resulting in a disruption of the integrity of the intestinal barrier, and is associated with the development of inflammatory bowel disease. Consequently, there is an increase in sulfide metabolism, which further contributes to the deterioration of the immunopathological process. The aim of this study was to examine the influence of probiotic bacteria (*Lactobacillus reuteri*) on the modulation of the epithelial barrier structure and colonization of the enteropathogenic strain of *Escherichia coli* on the inflammatory-conditioned colorectal adenocarcinoma cell line, Caco-2, which was grown under hypoxic conditions and treated with sodium sulfide medium and proinflammatory cytokines (IFN- γ , TNF- α and IL-1 β). Fluorescently labeled probiotic bacteria (*L. reuteri*) and enteropathogenic bacteria *E. coli* 3014 were implanted into Caco-2 cells at different incubation times. Fluorescently labeled monoclonal antibodies for the ZO-1 protein were then added to the cultures. Analysis of ZO-1 protein expression indicated an increasing trend in the presence of sodium sulfide, a decreasing trend in the presence of the enteropathogenic bacterium *E. coli*, and an increasing trend in the presence of *L. reuteri*. The results suggest that the enteropathogenic bacterium *E. coli* 3014 negatively affects the integrity of the epithelial barrier while *L. reuteri*, as a probiotic bacterium, affects the reconstitution of the inflammatory-damaged epithelial structure.

43 pages, 13 figures, 2 tables, 26 references, original in: Croatian

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: Caco-2, *Lactobacillus reuteri*, *Escherichia coli*, ZO-1, pro-inflammatory cytokines, sodium sulfide

Supervisor: Dr. Ana Savić Mlakar, Research associate

Cosupervisor: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Silvija Černi, Asst. Prof., Dr. Jasna Lajtner, Assoc. Prof, Dr. Renata Šoštarić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 4.2.2021.

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Crijevna mikrobiota	1
1.2. Bakterija <i>Escherichia coli</i>	2
1.3. Crijevni epitel i proupalni citokini	3
1.4. Probiotici i mehanizmi njihova djelovanja	6
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	9
3.1. Materijali.....	10
3.1.1. Reagencije.....	10
3.1.2. Fluorescentne boje i antitijela	11
3.1.3. Citokini i sulfidi	11
3.1.4. Instrumenti i oprema	12
3.1.5. Stanice i bakterije.....	12
3.1.6. Računalni programi.....	13
3.2. Metode	14
3.2.1. Uzgoj stanične linije kolorektalnog adenokarcinoma	14
3.2.2. Indukcija upalnog stanja u epitelnim stanicama kolorektalnog adenokarcinoma	14
3.2.3. Potvrda indukcije upalnog stanja u epitelnim stanicama kolorektalnog adenokarcinoma.....	15
3.2.4. Uzgoj probiotskih bakterija <i>L. reuteri</i> i enteropatogenih bakterija <i>E. coli</i>	16
3.2.5. Obilježavanje probiotskih bakterija <i>L. reuteri</i> i enteropatogenih bakterija <i>E. coli</i> za analizu fluorescencijskom mikroskopijom i protočnom citometrijom	17
3.2.6. Analiza probiotske bakterije <i>L. reuteri</i> i enteropatogene bakterije <i>E. coli</i> obilježenih bojom 5(6)-karboksifluorescein N-hidrosukcinimidil ester pomoću protočne citometrije	17
3.2.7. Analiza obilježenih adheriranih probiotskih bakterija <i>L. reuteri</i> i enteropatogenih bakterija <i>E. coli</i> fluorescencijskom mikroskopijom	18
3.2.8. Ispitivanje utjecaja probiotske bakterije <i>L. reuteri</i> na sposobnost adhezije enteropatogene bakterije <i>E. coli</i> na epitelnim stanicama kolorektalnog adenokarcinoma	19
3.2.9. Ispitivanje utjecaja probiotske bakterije <i>L. reuteri</i> i enteropatogene bakterije <i>E. coli</i> na ekspresiju proteina <i>zonula occludens</i>	20
3.2.10. Statistička obrada podataka.....	21
4. REZULTATI.....	22
4.1. Efikasnost obilježavanja bakterijskih stanica <i>L. reuteri</i> i <i>E. coli</i> fluorescentnim bojama	22

4.2. Adhezija bakterija <i>L. reuteri</i> i <i>E. coli</i> u uvjetima bez upale i s upalom.....	25
4.3. Utjecaj probiotske bakterije <i>L. reuteri</i> na adheziju enteropatogene bakterije <i>E. coli</i>	29
4.4. Ekspresija proteina <i>zonula occludens</i> u prisutnosti bakterija <i>L. reuteri</i> i <i>E. coli</i>	32
5. RASPRAVA	35
7. LITERATURA	40
8. ŽIVOTOPIS.....	43

POPIS KRATICA

Caco-2 –epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma (engl. *Cancer coli-2*)

CFSE – fluorescentna boja za obilježavanje bakterijskih stanica; 5(6)-karboksifluorescein N-hidrosukcinimidil ester (engl. *5(6)-carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimide ester*)

DAPI – fluorescentna boja za jezgru; 4',6-diamidino-2-fenilindol (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DMEM/F-12 – Dulbeccov modificirani hranjivi medij (engl. *Dulbecco's modified eagle medium/Ham's F12*)

EPEC – enteropatogena *Escherichia coli* (engl. *Enteropathogenic Escherichia coli*)

FBS – teleći fetalni serum (engl. *Fetal bovine serum*)

HT-29 – stanična linija ljudskog kolorektalnog adenokarcinoma epitelnih obilježja (engl. *human colorectal adenocarcinoma cell line with epithelial morphology*)

IF – intenzitet imunofluorescencije (engl. *Immunofluorescence intensity*)

IFN- γ – interferon gama

IgA – imunoglobulin A

IL-1 β – interleukin 1 beta

MAMPs – molekularni obrasci povezani s mikrobima (engl. *Microbe-Associated Molecular Patterns*)

MOI – multiplicitet infekcije (engl. *Multiplicity of infection*)

MRS agar – engl. *de Man, Rogosa, Sharpe agar*

MUC2 – mucin-2

NOD2/CARD15 – engl. *Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2/caspase recruitment domain-containing protein 15*

PBS – fosfatni pufer (engl. *Phosphate-buffered saline*)

BSA – goveđi serumski albumin (engl. *Bovine serum albumin*)

StainIn Green – boja za obilježavanje bakterijskih stanica; (engl. *StainIn Green Nucleic Acid Stain*)

TNF- α – faktor nekroze tumora alfa

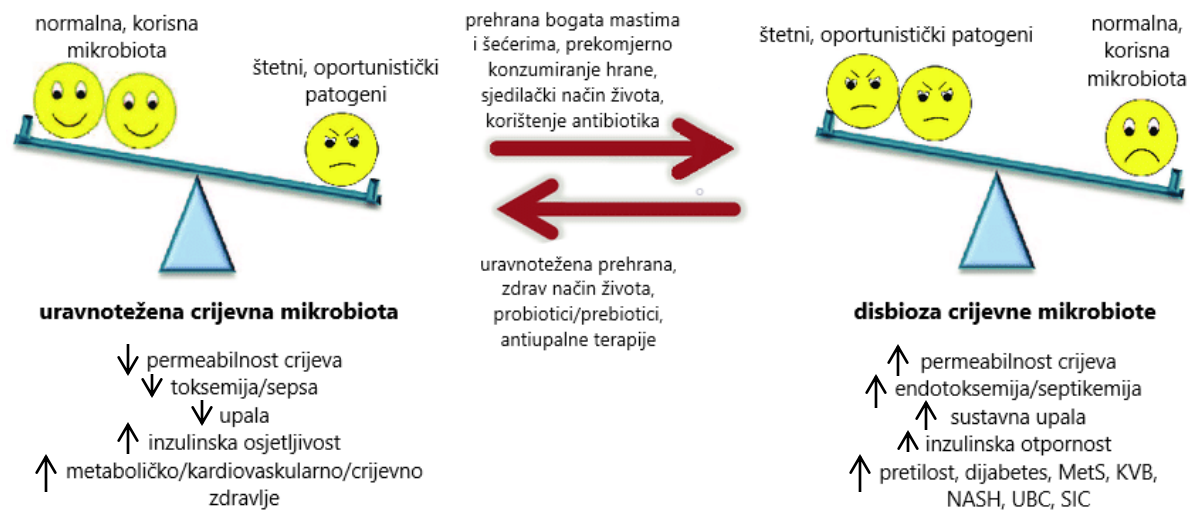
UC – upalne bolesti crijeva

ZO-1 – *zonula occludens-1*; protein

1.UVOD

1.1. Crijevna mikrobiota

Ljudska mikrobiota, kompleksna skupina komenzala, superiorna je cijelom ljudskom tijelu, kako brojčano tako i metaboličkom raznolikošću. Tu ubrajamo bakterije, gljive, arheje, protiste i viruse. Mikrobiota, posebice mikrobiota crijeva koja sadrži 90% svih vrsta komenzala, ima pozitivne učinke na razvoj, održavanje i regulaciju različitih sustava u ljudskom tijelu od kojih je najvažniji utjecaj na imunosni i neurološki sustav te metabolizam (Srinivasan i sur. 2018). Crijevna mikrobiota broji preko 1000 simbiotskih bakterijskih vrsta koje osiguravaju neke vitalne funkcije za domaćina: održavanje integriteta crijevne barijere, opskrba esencijalnim nutrijentima, metabolizam kompleksnih polisaharida, obrana od kolonizacije patogenima i dr. (Chow i sur. 2011). Narušavanje crijevne mikrobiote (disbioza) najčešće se očituje u smanjenju zastupljenosti bakterija vrsta *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp., a povećanja u brojnosti vrsta roda *Bacteroides*. Disbiozu uzrokuje mnogo faktora, a neki od njih su povećani stres, prehrana bogata šećerima i različitim aditivima, korištenje antibiotika, alkoholizam i dr. (Slika 1) (Nagpal i sur. 2014). Djelovanjem jednog ili više faktora dolazi do poremećaja homeostaze između imunosnog sustava domaćina i crijevne mikrobiote što se povezuje s nastankom upalnih bolesti crijeva, tumora debelog crijeva, dijabetesa, pretilosti, metaboličkog sindroma, pa čak i neuroloških poremećaja (Mirsepasi-Lauridsen i sur. 2019). Upalne bolesti crijeva (UBC) kronični su poremećaji gastrointestinalnog trakta u koje ubrajamo ulcerozni kolitis i Kronovu bolest (Ito i sur. 2006). Patogeneza UBC-a je multifaktorijalna te uključuje, uz okolišne faktore, prekomjerni imunosni odgovor na komenzale u genetski podložnom domaćinu. Crijevna mikroflora u UBC-u istražena je u brojnim studijama, a određene vrste poput *Mycoplasma* spp., *Mycobacterium* spp., *Clostridioides difficile*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus* spp., *Escherichia coli* te neki virusi ubrajaju se u moguće inicijatore i promotore upale (Mirsepasi-Lauridsen i sur. 2019; Sorbara i Pamer 2018). Dokazi koji podržavaju prekomjerni imunosni odgovor na komenzale uključuju povezanost nepatogenih bakterija u razvoju ulceroznog kolitisa u genetski izmijenjenim životinjama. Istraživanja su pokazala da je s Kronovom bolešću povezana povećana koncentracija cirkulirajućih antibakterijskih antitijela kao i gen za NOD2/CARD15, receptor za bakterijski peptidoglikan (Subramanian i sur. 2006).



Slika 1. Važnost uravnotežene prehrane i mikrobiote crijeva te posljedice disbioze crijeva. MetS = metabolički sindrom, KVB = kardiovaskularne bolesti, NASH = nealkoholni steatohepatitis, UBC = upalne bolesti crijeva, SIC = sindrom iritabilnog crijeva (preuzeto i modificirano prema Nagpal i sur. 2014).

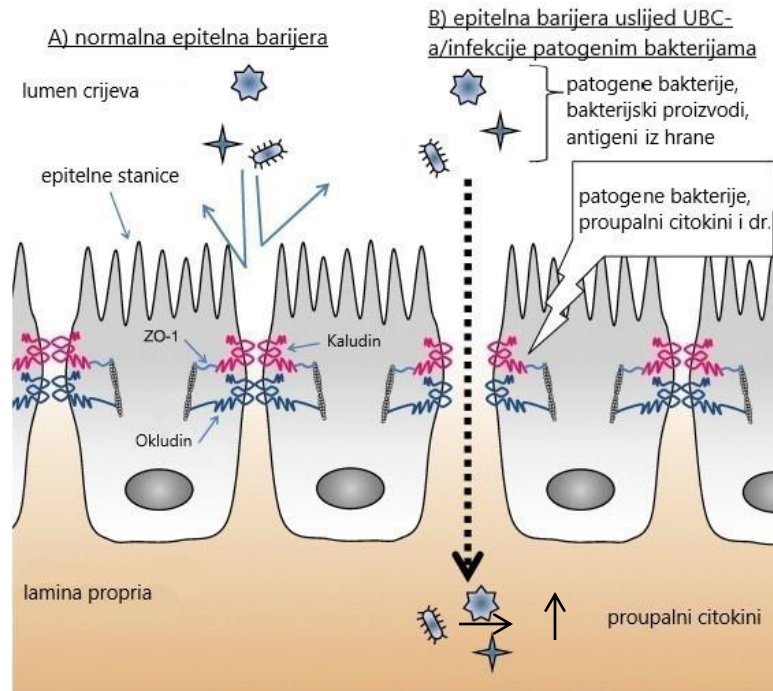
1.2. Bakterija *Escherichia coli*

Bakterija *E. coli* je fakultativna anaerobna gram-negativna bakterija koja naseljava intestinalni trakt odmah po rođenju i pomaže u održavanju normalne crijevne homeostaze. Postoje različiti sojevi *E. coli*: komenzalni soj bez faktora virulencije, crijevni patogeni soj, izvancrijevni patogeni soj i drugi (Mirsepasi-Lauridsen i sur. 2019). Nekoliko studija pokazalo je da kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva (UBC) postoji povišena prisutnost enteropatogene bakterije *E. coli* na površini crijevnog epitela (Rhodes 2007). Smatra se da je za patogenost crijevnog soja ove bakterije (EPEC, engl. *Enteropathogenic Escherichia coli*) odgovoran način adhezije enteropatogene bakterije *E. coli* na epitelne stanice. Kada se enteropatogena *E. coli* (EPEC) veže na membranu epitelnih stanica, enterociti gube svoje mikrovile kao odgovor na preslagivanje citoskeleta ispod adherirane bakterije. Sama infekcija bakterijom *E. coli* rezultira stvaranjem proupalnih citokina, i posljedično, njenom daljnjom kolonizacijom epitela. Također, pokazano je da bakterija *E. coli* direktno smanjuje ekspresiju proteina *zonula occludens* (ZO-1) te tako utječe na povećanje crijevne permeabilnosti i gubitka integriteta epitelne barijere (Zhang i sur. 2010). Upaljeno crijevo samo po sebi predstavlja okoliš s ograničenom količinom željeza, što može inducirati izlučivanje antimikrobnih proteina od strane samih patogenih bakterija, čime

one sprječavaju kolonizaciju probiotskih bakterija, odnosno nastavljaju vlastitu (Sorbara i Pamer 2018; Zhang i sur. 2010).

1.3. Crijevni epitel i proupalni citokini

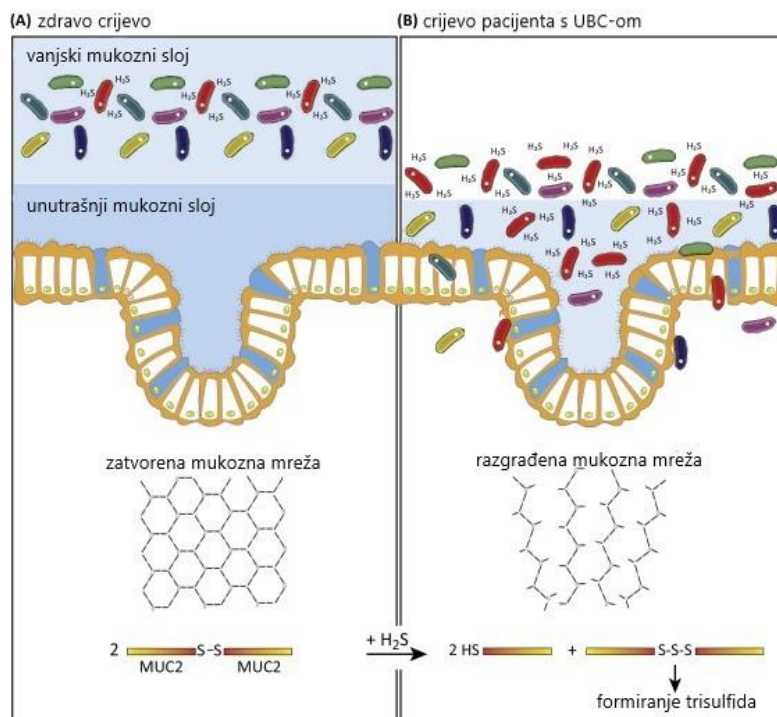
U gastrointestinalnom traktu, na mjestima gdje je tkivo u direktnom doticaju s vanjskim okolišem ili unutrašnjim odjeljcima koji su u doticaju s njim, nalaze se mukozne površine koje su, između ostalog, sastavljene i od epitelnih stanica. Crijevni epitel održava ravnotežu između selektivnog aktivnog i pasivnog transporta iona, nutrijenata, vode i otpada te istodobnog formiranja barijere koja štiti od ulaska različitih patogena. Ključnu ulogu u održavanju ravnoteže između ovih dvaju svojstava ima apikalni spojni kompleks. Ova struktura građena je od tri interstanična spoja koji se, krećući od apikalnog prema bazalnom djelu epitela, nazivaju čvrsti spojevi (engl. *tight junction*; lat. *zonula occludens*), pojasni spojevi (engl. *adherens junction*; lat. *zonula adherens*) i dezmosomi (engl. *desmosome*; lat. *macula adherens*). Upravo čvrsti spojevi čine selektivno permeabilnu epitelnu barijeru koja ograničava brzinu i količinu transporta prostorom između stanica te sprječava penetraciju patogena prisutnih u gastrointestinalnom lumenu (Strober i Fuss 2011; Buckley i Turner 2018). Ovaj spoj građen je od transmembranskih proteina kao što su okcludin, tricelulin, različiti kladini i spojne adhezijske molekule te periferni membranski proteini kao što su *zonula occludens* (ZO)-1, 2, 3 i cingulin. *Zonula occludens* proteini su ujedno ciljevi i efektori različitih signalnih puteva te tako mijenjaju sklop, funkciju i utječu na održavanje epitelne barijere. No, kod upalnih bolesti crijeva ili kod infekcije bakterijom *E. coli* 3014, epitelna barijera popušta i postaje nefunkcionalna, odnosno dolazi do poremećaja selektivne permeabilnosti i integriteta, što omogućava prolaz patogena i aktivaciju upalnog procesa karakteriziranog povećanom infiltracijom leukocita i proizvodnjom proupalnih citokina kao što su interferon gamma (IFN- γ), faktor nekroze tumora alfa (TNF- α) i interleukin 1 beta (IL- β). Proupalni citokini uzrokuju povišenje crijevne epitelne permeabilnosti čime dodatno doprinose upali (Slika 2) (Landy i sur. 2016; Suzuki i Hara 2011).



Slika 2. Proteini čvrstih spojeva crijevnog epitela kao fizička barijera. A) Proteini čvrstih spojeva crijevnog epitela reguliraju crijevnu međustaničnu propusnost. B) Oštećenje barijere inducirano izvanstaničnim podražajima, poput proupalnih citokina i infekcije patogenim bakterijama, omogućuje patogenim bakterijama, njihovim proizvodima i antigenima iz hrane da prođu epitel i uđu u cirkulaciju. Posljedično dolazi do upale i imunodne reakcije u tkivima, uključujući i crijeva, što rezultira nastankom crijevnih, ali i mnogih drugih bolesti. ZO-1 = protein čvrstih spojeva *zonula occludens* (preuzeto i modificirano prema Suzuki i Hara 2011).

Pokazano je da IFN- γ dovodi do skoro potpunog gubitka proteina *zonula occludens* (ZO-1) (Youakim i Ahdieh 1999), a isti učinak na snižavanje ekspresije proteina ZO-1, kao i njegove izmijenjene lokalizacije, pokazan je u slučaju modulacije stanica Caco-2 (epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma) korištenjem TNF- α (Ma i sur. 2004). Studija u kojoj je korišten citomix (kombinacija proupalnih citokina IFN- γ , IL-1 β i TNF- α) dodatno je potvrdila učinak ovih citokina na povećanje permeabilnosti staničnog monosloja Caco-2 sniženjem ekspresije proteina ZO-1 na razini mRNA te na proteinskoj razini (Han i sur. 2003). Direktan dokaz o njihovoj ključnoj ulozi u povećanju permeabilnosti crijevne barijere proizlazi iz potpunog dokidanja povećanja permeabilnosti korištenjem blokirajućih anti-IFN- γ , IL-1 β i TNF- α antitijela (Buckley i Turner 2018; Reinecker i sur. 1993). Veliku ulogu u patogenezi upalnih bolesti crijeva (UBC), osim proupalnih citokina, ima i sulfid, a nastaje kao rezultat oksidacije organskih spojeva do vodikovog sulfida od strane bakterija koje reduciraju sulfat. Sulfid kojeg

stvaraju ove bakterije oštećuje epitel svojim genotoksičnim djelovanjem i/ili inhibitornim djelovanjem na metabolizam kratkolančanih masnih kiselina, što vodi ka inicijaciji upalnih bolesti crijeva i tumora debelog crijeva. Sulfid degradira polimernu mucin-2 (MUC2) mrežu redukcijom disulfidnih veza, uzrokujući smanjenje viskoznosti mukoznog sloja. Ovakvim djelovanjem sulfida povećava se permeabilnost crijevne mukozne površine (Slika 3) (Ijssennagger i sur. 2016). Životinjski modeli istraživanja UBC-a uključuju primjenu dekstran natrij sulfata (DSS) koji inicira upalno stanje u crijevima i negativno regulira ekspresiju proteina ZO-1 (Poritz i sur. 2007). Kroz takav mukuzni sloj lakše prolaze bakterije kao što su *E. coli* i *Akkermansia muciphila* (mucin degradirajuća bakterija) te nastavljaju daljnju razgradnju mukozne mreže. S obzirom na prolaz i translokaciju bakterija kroz epitel crijeva, potiče se upalni imunosni odgovor koji doprinosi inicijaciji i progresiji bolesti. Daljnjim povećavanjem crijevne permeabilnosti, povećava se ulazak različitih antigena, a njihovim prepoznavanjem i aktivacijom stanica imunskog sustava dolazi do izlučivanja proupalnih citokina i kemokina da bi se na to mjesto privuklo još više upalnih stanica. Sukladno, primjena antibiotika pospješuje regeneraciju oštećenog epitela i smanjenje patologije u UBC-a kroz dokidanje proizvodnje medijatora upale (Ijssennagger i sur. 2016).



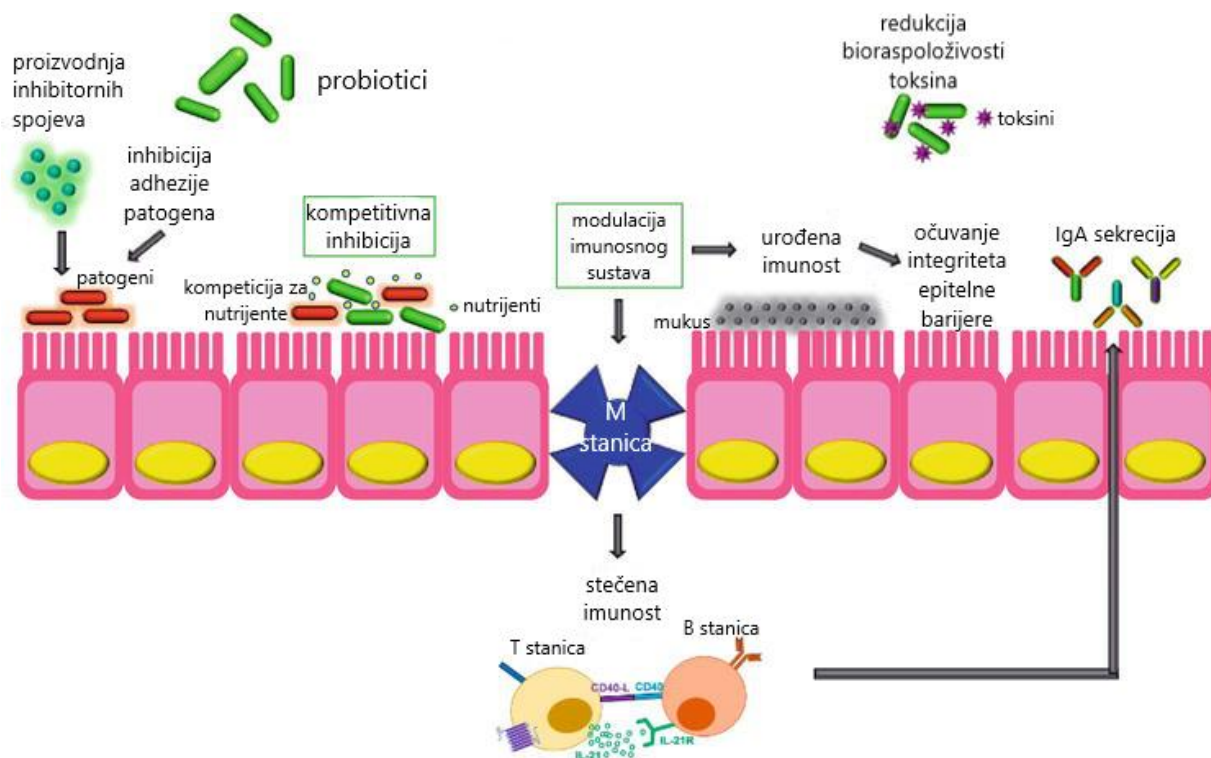
Slika 3. Predloženi model negativnog utjecaja sulfida na mukoznu mrežu kod pacijenata s upalnim bolestima crijeva. A) bakterije ne mogu penetrirati kroz unutrašnji mukozni sloj zbog strukture zatvorene mukozne mreže. U zdravom crijevu su proteini MUC2 međusobno povezani disulfidnim vezama (S-S). B) U prisutnosti povećanog broja bakterija koje reduciraju sulfat, kao u pacijenata s upalnim bolestima crijeva, raste koncentracija vodikova sulfida što uzrokuje degradaciju vanjske i unutarnje mukozne mreže, penetraciju bakterija te posljedično, upalu. U prisutnosti vodikovog sulfata, veze između proteina MUC2 reducirane su te dolazi do formiranja trisulfidnih veza. UBC = upalne bolesti crijeva, MUC2 = mucin 2 mreža, H_2S = vodikov sulfid (preuzeto i modificirano prema Ijssennagger i sur. 2016).

1.4. Probiotici i mehanizmi njihova djelovanja

Probiotici su različite vrste i sojevi živih mikroorganizama koji unaprjeđuju zdravlje domaćina te su zastupljeni u hrani ili dodacima prehrani. Neke vrste probiotika pokazuju povoljan učinak u upalnim bolestima crijeva (UBC), dijareji, konstipaciji i iritabilnom sindromu crijeva. Taj učinak rezultat je imunomodulatornog učinka kroz poticanje IgA-posredovanog imunskog odgovora, odnosno sposobnosti negativne regulacije upalnog procesa. Osim toga, probiotici pozitivno djeluju na funkciju epitelne barijere crijeva povećavajući rezistenciju epitelne barijere stimulacijom proizvodnje mukusa i antimikrobnih peptida, odnosno povećanjem

ekspresije proteina kompleksa čvrstih spojeva (Slika 4) (Hernandez-Patlan i sur. 2020). Na primjer, bakterije *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* i *Bifidobacterium lactis* povećavaju stupanj fosforilacije proteina *zonula occludens* (ZO-1) i okcludina na modelu stanica kolorektalnog adenokarcinoma epitelnih obilježja (HT-29) i epitelnih stanica kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2). *Lactobacillus plantarum* mijenja stupanj ekspresije gena za okcludin i proteine citoskeleta (Madsen, 2012). Jedan od najistraživanijih probiotika, bakterija *Lactobacillus reuteri*, prava je autohtona vrsta laktobacila koju nalazimo u ljudskom gastrointestinalnom traktu, mokraćnom traktu i koži. Pokazan je višestruki učinak bakterije *L. reuteri* na različite funkcije organizma i to kroz unaprjeđenje zdravlja crijevnih bolesti, reduciranje infekcija, povećanje apsorpcije nutrijenata, minerala i vitamina, moduliranje imunskog odgovora domaćina, održavanje integriteta crijevne barijere te reduciranje translokacije bakterija (Srinivasan i sur. 2018). Iako većina vrsta laktobacila izlučuje antimikrobni reuterin, spoj različitih formi 3-hidroksipropionaldehida (3-HPA), bakterija *L. reuteri* ga izlučuje puno više nego što je to bioenergetski potrebno. Reuterin inhibira većinu patogenih mikroorganizama, pogotovo gram-negativnih bakterija, a sami laktobacili su rezistentni na ovaj spoj. Uz reuterin, bakterija *L. reuteri* izlučuje i mliječnu kiselinu, octenu kiselinu, etanol, reutericiklin i egzopolisaharid. Svi ovi spojevi pokazuju pozitivan utjecaj i regresiju gastrointestinalnih bakterijskih infekcija koje uključuju *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile* i *Salmonella*. Egzopolisaharid ima važnu ulogu u formiranju biofilma na epitelnoj površini koji sprječava vezanje patogenih sojeva bakterije *Escherichia coli*. Također, ovaj spoj inhibira ekspresiju gena proupalnih citokina, posebice interleukina 1 beta (IL-1 β) te tako održava integritet epitelne barijere, a istovremeno potiče aktivaciju i funkciju regulatornih limfocita T (Mu i sur. 2018). Postoje i mehanizmi kojima se probiotici suprotstavljaju kolonizaciji crijevnim patogenima. Neki sojevi laktobacila i bifidobakterija mogu se vezati za aktivna mjesta na crijevnim epitelnim stanicama gdje se vežu i patogeni te im tako onemogućiti pristup aktivnom mjestu. Neki sojevi laktobacila stvaraju pile koji se vežu na mukus i tako povećavaju njihovu mogućnost kolonizacije te induciraju stvaranje mukusa koji služi kao dodatna prevencija u sprječavanju vezanja patogena. Probiotska kompetitivna inhibicija adhezije patogena djelomično je posredovana kompeticijom za lektin-vezujuća mjesta na receptorima za glikokonjugate. Također, probiotici ispoljavaju molekularne obrasce povezane s mikroorganizmima (MAMPs; engl. *Microbe-Associated Molecular Patterns*)

koji se vežu za odgovarajuće receptore koji ujedno prepoznaju i obrasce patogena, te tako sprječavaju njihovo vezanje za stanice (Hernandez-Patlan i sur. 2020; Madsen 2012). Na primjer, bakterija *L. reuteri* ima sposobnost eliminacije bakterije *H. pylori* iz gastrointestinalnog trakta kompetitivnom inhibicijom, vezujući se za glikolipidne receptore na koje se veže i ova patogena bakterija. Upravo zbog toga postoji mogućnost korištenja ovog probiotika u liječenju bolesti uzrokovanih bakterijom *H. pylori* čime se izbjegavaju negativni utjecaji složene i dugotrajne antibiotske terapije na normalnu crijevnu mikrobiotu (Mu i sur. 2018). U istraživanjima s epitelnim stanicama kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) dokazana je povećana ekspresija faktora nekroze tumora alfa (TNF- α) dodatkom probiotičke bakterijske vrste *Bifidobacterium longum* u pacijenata s crijevnim bolestima, no u kombinaciji probiotika i prebiotika, dolazi do redukcije razine TNF- α . Također, druga istraživanja bilježe povećanu ekspresiju drugih citokina induciranih probioticima (Hernandez-Patlan i sur. 2020; Bahrami i sur. 2011).



Slika 4. Mehanizmi djelovanja probiotika. M stanice = crijevne epitelne stanice koje vrše transport antigena, odnosno patogena u subepitelni prostor gdje stanice imunskog sustava (T i B stanice) prepoznaju antigene i pokreću imunski odgovor koji rezultira stvaranjem antitijela IgA (imunoglobulin A) (preuzeto i modificirano prema Hernandez-Patlan i sur 2020).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ispitati kako probiotska bakterija *L. reuteri* utječe na modulaciju strukture epitelne barijere i kolonizaciju enteropatogene bakterije *E. coli* soja 3014 u uvjetima *in vitro* na stanicama crijevnog epitela kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) u kojima su inducirani uvjeti upale.

Da bi se ostvario glavni zadani cilj, određeni su specifični ciljevi:

1. Protočnom citometrijom i fluorescencijskom mikroskopijom odrediti efikasnost obilježavanja probiotske bakterije (*Lactobacillus reuteri*) i enteropatogene bakterije (*Escherichia coli* 3014) fluorescentnim bojama 5(6)-karboksifluorescein N-hidrosukcinimidil ester (CFSE) i *StainIn Green Nucleic Acid Stain (StainIn Green)*.
2. Kvalitativnom analizom (fluorescencijskom mikroskopijom) odrediti sposobnost adhezije probiotskih (*L. reuteri*) i enteropatogenih (*E. coli* 3014) bakterija za stanice Caco-2 u uvjetima upale, izazvane korištenjem proupalnih citokina TNF- α , IFN- γ , IL- β i natrijeva sulfida.
3. Kvantitativnom analizom (brojanjem bakterijskih kolonija na odgovorajućim krutim hranjivim podlogama) odrediti eventualni utjecaj probiotskih bakterija (*L. reuteri*) na sposobnost adhezije enteropatogebakterije (*E. coli* 3014).
4. Odrediti utjecaj upale te prisutnosti probiotskih (*L. reuteri*) i enteropatogenih (*E. coli* 3014) bakterija na očuvanje integriteta epitelnog monosloja praćenjem ekspresije proteina *zonula occludens* (ZO-1) fluorescencijskom mikroskopijom i analizom intenziteta fluorescencije proteina ZO-1 korištenjem programa *ImageJ*.

3. MATERIJALI I METODE:

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- Dulbeccov modificirani hranjivi medij (DMEM/F12; engl. *Dulbecco's modified eagle medium/Ham's F12*, Gibco, Thermo Fisher Scientific) za uzgoj stanica obogaćen:
 - 10%- tnim telećim fetalnim serumom (FBS; engl. *Fetal bovine serum*, Gibco, Thermo Fisher Scientific)
 - 1%- tnim antibiotikom i antimikotikom Penicilin/Streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific)
 - L-glutaminom (engl. *L-glutamine*, Gibco, Thermo Fisher Scientific)
dalje zvan „medij s antibiotikom“
- Dulbeccov modificirani hranjivi medij (DMEM/F12; engl. *Dulbecco's modified eagle medium/Ham's F12*, Gibco, Thermo Fisher Scientific) obogaćen:
 - 10%- tnim telećim fetalnim serumom (FBS; engl. *Fetal bovine serum*, Gibco, Thermo Fisher Scientific)
 - L-glutaminom (engl. *L-glutamine*, Gibco, Thermo Fisher Scientific)
dalje zvan „medij bez antibiotika“
- teleći fetalni serum (FBS, engl. *Fetal bovine serum*)
- fiziološka otopina (engl. *Saline solution*; izotonična 0.9%-tna otopina natrijeva klorida)
- fosfatni pufer (PBS; engl. *Phosphate-buffered saline*, Lonza, 1x, 6.7 mMPO₄)
- 4%-tni formaldehid u fosfatnom puferu (PBS) (engl. *Formaldehyde*, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)
- 30%-tni alkohol glicerol (engl. *Glycerol*, Gibco, Thermo Fisher Scientific)
- goveđi serumski albumin u prahu (BSA; engl. *Bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich)
- 0.1 %- tna otopina goveđeg albumina (BSA) u fosfatnom puferu (PBS)
- 0.5%-tna otopina goveđeg albumina (BSA) u fosfatnom puferu (PBS)
- 1%-tna otopina goveđeg albumina (BSA) u fosfatnom puferu (PBS)

- 5%-tna otopina goveđeg albumina (BSA) u fosfatnom puferu (PBS)
- tripsin (engl. *Trypsin*, Institut za imunologiju, 0,25%)
- akutaza (engl. *Accutase*, Inovative Cell Technologies, 100x), mješavina enzima s proteolitičkim i kolagenolitičkim djelovanjem, što znači da oponaša djelovanje tripsina i kolagenaze
- tripansko modriilo (engl. *Trypan blue*)
- kruti hranjivi medij za rast vrsta roda *Lactobacillus* (engl. *DeMan-Rogosa-Sharpe Agar*, MRS Agar)
- krvni kruti hranjivi medij za rast vrsta roda *Escherichia* (engl. *Blood agar plates*)

3.1.2. Fluorescentne boje i antitijela

Za obilježavanje probiotskih (*L. reuteri*) i enteropatogenih (*E. coli* 3014) bakterija:

- CFSE (engl. *5(6)-carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimide ester*, BioLegend)
- *StainIn Green* (*StainIn Green Nucleic Acid Stain*, highQu)

Za obilježavanje jezgri stanica Caco-2:

- 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*)

Za obilježavanje proteina *zonula occludens* (ZO-1)

- *Alexa Fluor 647* konjugirano ZO-1 monoklonsko antitijelo (engl. *Alexa Fluor 647 conjugated ZO-1 monoclonal antibody*, Invitrogen)

3.1.3. Citokini i sulfidi

Proupalni citokini i sulfidi dodani „mediju bez antibiotika“ u svrhu indukcije upalnog stanja na stanicama Caco-2:

- interferon gama (IFN- γ ; engl. *Interferon gamma*, Milteny Biotec, 50 $\mu\text{g/ml}$)
- faktor nekroze tumora alfa (TNF- α ; engl. *Tumor necrosis factor alpha*, Milteny Biotec, 50 $\mu\text{g/ml}$)
- interleukin 1-beta (IL-1 β ; engl. *Interleukin 1-beta*, Milteny Biotec, 50 $\mu\text{g/ml}$)

- natrijev sulfid (Na_2S engl. *Sodium sulfide*, Sigma-Aldrich, 1M) dodan mediju u koncentraciji od 0.4 mM

3.1.4. Instrumenti i oprema

- fluorescencijski mikroskop (*EVOS FLC Cell Imager*, Thermo Fisher Scientific)
- protočni citometar (*Leica LSRII Flow Cytometer*, BD Biosciences)
- CO_2 inkubator (*Heraeus Kendro Heracell 150 CO_2 Incubator*, Thermo Fisher Scientific)
- stolna centrifuga s hlađenjem 5810R (*Eppendorf Refrigerated Centrifuge 5810R*, Eppendorf)
- invertni mikroskop (Zeiss)
- tresilica (*LSE Platform Rocker*, Corning)
- termostatirana tresilica (*Termoblok Thermomixer comfort 1.5 mL*, Eppendorf)
- T25 flask s nagnutim grlom (25 cm^2 , Costar)
- pločica s 48 jažica (engl. *48-well plate*, Costar)
- Bürker-Türk komorica za brojanje stanica (Sigma-Aldrich)
- epruvete za reagense i centrifugiranje (15 ml, 50 ml, Costar)
- mikroepruvete (2 mL, Eppendorf)
- pipete s promjenjivim volumenom (0.1-2.5 μL , 0.5-10 μL , 2-20 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL , Eppendorf)
- sterilni nastavci s filterom za pipete (10, 20, 100, 200, 1000 μL , Eppendorf)
- serološke pipete za jednokratnu upotrebu (2, 5, 10, 25 ml, Costar)

3.1.5. Stanice i bakterije

- stanice crijevnog epitela kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2; ATCC HTB-37, ATCC) koje potječu od muške osobe u starosti od 72 godine
- probiotska bakterija vrste *Lactobacillus reuteri* (BioGaia probiotske kapi)
- enteropatogena bakterija vrste *Escherichia coli* soja 3014 (donacija Prehrambeno-Biotehnološkog fakulteta; ATCC 25922).

3.1.6. Računalni programi

- *GraphPad Prism 6 (GraphPad Software)*
- *ImageJ (Fluorescent Imaging Software)*

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj stanične linije kolorektalnog adenokarcinoma

Stanična linija kolorektalnog adenokarcinoma, Caco-2, kultivirana je u bočici od 25 mL u koju je prethodno dodano 5 mL medija s antibiotikom. Stanična linija Caco-2 razvijana je pri uvjetima 5%-tnog ugljikova dioksida (CO₂), hipoksije (postignuto slabim odvrnućem čepa bočice) i 95%-tne vlažnosti pri 37°C u inkubatoru. Nakon toga, invertnim mikroskopom potvrđena je konfluentnost stanica (popunjenost podloge bočice stanicama Caco-2) od 60-80% te su stanice pasażirane toplim tripsinom kroz četiri minute u inkubatoru (hipoksija, vlažnost 95%, 37°C, 5% CO₂) radi odvajanja stanica od podloge u bočici. Proces tripsinizacije zaustavljen je dodatkom trostruko većeg volumena medija s antibiotikom (3 mL). Sadržaj bočice je resuspendiran pipetom od 5 mL, prenesen u epruvetu od 15 mL te centrifugiran pet minuta pri 300 x g. Nakon centrifugiranja, talog je resuspendiran u 1 mL medija s antibiotikom. Od toga je uzeto 10 µL suspenzije stanica radi određivanja ukupnog broja stanica koja je pomiješana s 10 µL fosfatnog pufera (PBS) i 80 µL boje tripansko modriilo koja omogućuje razlikovanje mrtvih (plavo obojane stanice) od živih stanica koje ostaju svjetlije i nebojane. Zatim je s 10 µL tako pripremljene suspenzije napunjena Bürker-Türk komorica za brojanje te su stanice prebrojane pod mikroskopom. Nakon što je određen ukupni broj stanica, za daljnje održavanje kulture stanica Caco-2, u bočicu od 25 mL pipetom je prebačen volumen stanica koji odgovara broju od 0,25 x 10⁶ stanica te je u bočicu dodano 5 mL medija s antibiotikom. Za optimalnu analizu stanica fluorescencijskom mikroskopijom, na pločice s 48 jažica za kulturu stanica (engl. *48-well plate*, Costar) nasadeno je 10 000 stanica po jažici te dodano 200 µL medija s antibiotikom. Pločica je potom odložena u inkubator (hipoksija, vlažnost 95%, 37°C, 5% CO₂) do tretiranja stanica Caco-2 proupalnim citokinima i natrijevim sulfidom (Na₂S).

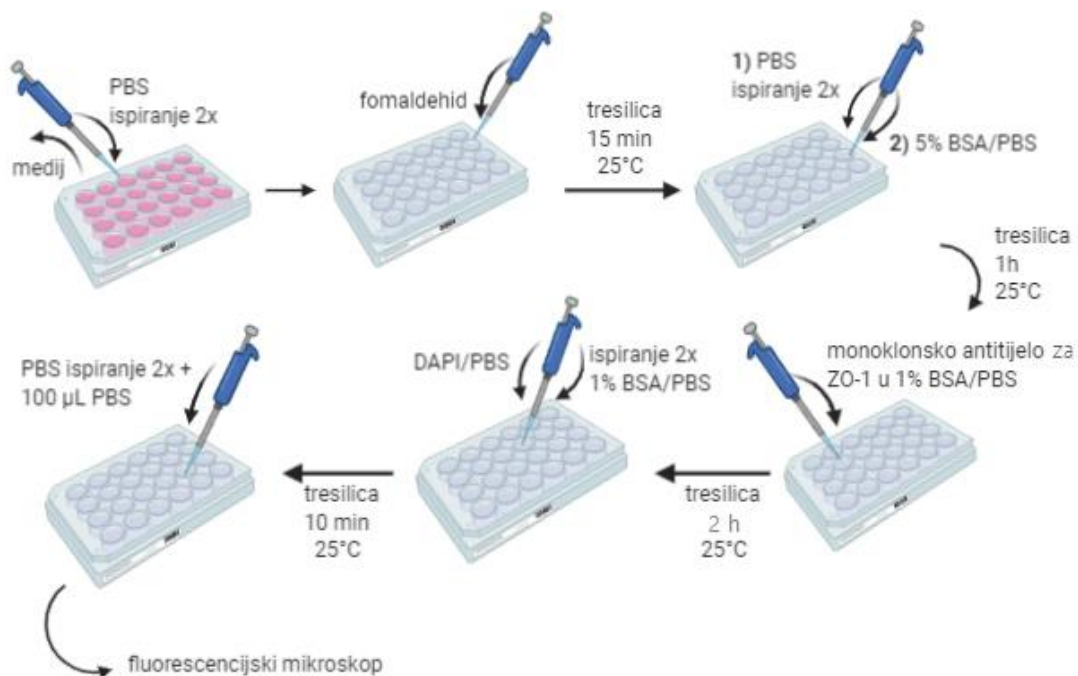
3.2.2. Indukcija upalnog stanja u epitelnim stanicama kolorektalnog adenokarcinoma

S ciljem indukcije upalnog stanja, epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) pri konfluentnosti (popunjenosti podloge bočice stanicama Caco-2) od 40-50%, utvrđenoj invertnim mikroskopom, na pločici s 48 jažica tretirane su kombinacijom proupalnih citokina, faktorom nekroze tumora alfa (TNF-α), interferonom gama (IFN-γ) i interleukinom 1 beta (IL-1β) (svi u koncentraciji 10 ng/mL) te 0.4 mM natrijevim sulfidom (Na₂S). Izračunom je dobiven

volumen proupalnih citokina i natrijeva sulfida koji je dodan u određeni volumen medija bez antibiotika s obzirom na broj tretiranih jažica (200 μ L medija bez antibiotika po jažici). Nakon dodatka 200 μ L suspenzije u jažice, pločica je odložena u inkubator na 72 h (hipoksija, vlažnost 95%, 37°C, 5% CO₂).

3.2.3 Potvrda indukcije upalnog stanja u epitelnim stanicama kolorektalnog adenokarcinoma

Iz jažica na pločici uklonjen je medij i stanice su isprane dva puta fosfatnim puferom (PBS). Stanice su potom fiksirane pomoću 4%-tnog formaldehida u puferu PBS kroz 15 minuta na tresilici pri 25°C te su, nakon toga, stanice ponovno isprane dva puta s puferom PBS. Za blokiranje nespecifičnog vezanja korišten je 5%-tni goveđi albumin (BSA) u fosfatnom puferu (PBS), odnosno 5%-tni BSA/PBS, te je pločica inkubirana jedan sat na tresilici pri 25°C. Istekom perioda inkubacije, iz jažica je uklonjen 5%-tni BSA/PBS te su stanice bojane dodatkom monoklonskog antitijela za protein *zonula occludens* (ZO-1) (1 μ g/mL) u 1%-tnom goveđem albuminu u fosfatnom puferu (1% BSA/PBS) kroz dva sata na tresilici pri 25°C, u mraku. Nakon toga, stanice su isprane dva puta 1%-tnim BSA/PBS nakon čega je slijedilo bojanje jezgri stanica bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) u fosfatnom puferu (PBS), odnosno DAPI/PBS (konačna koncentracija 300 ng/ml), u periodu inkubacije od 10 minuta na tresilici pri 25°C. Potom su stanice isprane dva puta s puferom PBS od ostatka boje, po jažici je dodano 100 μ L pufera PBS te se u svrhu potvrde upalnog stanja imunofluorecencijskom analizom pomoću uređaja *EVOS FLC Cell Imager* odredila ekspresija proteina ZO-1 (Slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz obilježavanja stanica kolorektalnog adenokarcinoma monoklonskim antitijelom za protein *zonula occludens* te jezgri stanica bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). PBS = fosfatni pufer korišten za ispiranje jažica, formaldehid korišten kao stanični fiksativ, 5% BSA/PBS = 5%-tni goveđi serum u fosfatnom puferu korišten za blokiranje nespecifičnog vezanja, monoklonsko antitijelo za ZO-1 = monoklonsko antitijelo za obilježavanje proteina *zonula occludens*, 1% BSA/PBS = 1%-tni goveđi serum u fosfatnom puferu, DAPI/PBS = fluorescentna boja za obilježavanje jezgri stanica u fosfatnom puferu.

3.2.4. Uzgoj probiotskih bakterija *L. reuteri* i enteropatogenih bakterija *E. coli*

Probiotska bakterija *L. reuteri* i odabrana enteropatogena bakterija, *E. coli* soja 3014, uzgajane su u odgovarajućim hranjivim tekućim podlogama u svrhu određivanja apsolutnog broja na krutom hranjivom mediju. Nakon uzgoja bakterija u tekućoj hranjivoj podlozi, bakterije su isprane, resuspendirane u mediju za zamrzavanje kojeg je činio 30%-tni alkohol glicerol i fiziološka otopina, alikvotirane u epruvete od 0.5 mL te pohranjene pri -80°C do daljnjeg korištenja. Pojedinačni alikvoti su korišteni za daljnje pokuse na petrijevim pločama sa krutim hranjivim podlogama i pokuse nasađivanja bakterija na monosloj epitelnih stanica kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2).

3.2.5. Obilježavanje probiotskih bakterija *L. reuteri* i enteropatogenih bakterija *E. coli* za analizu fluorescencijskom mikroskopijom i protočnom citometrijom

Za obilježavanje bakterija korištene su sljedeće fluorescentne boje: 5(6)-karboksifluorescein N-hidrosukcinimidil ester (engl. *5(6)-carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimide ester*; CFSE) koja se veže preko amino skupina za proteine i *StainIn Green Nucleic Acid Stain (StainIN Green)* koja se veže za genomsku DNA, te obje pružaju mogućnost vizualizacije bakterija fluorescencijskom mikroskopijom i detekciju protočnom citometrijom. Izvorna suspenzija enteropatogene bakterije *E. coli* 3014 ($2,75 \times 10^{10}$ bakterija) bila je razrijeđena 1:100, iz čega je, u svrhu obilježavanja bojama CFSE i *StainIn Green*, u dvije epruvete uzeto po 260×10^6 bakterija. Period inkubacije bojom CFSE (konačna koncentracija $50 \mu\text{M}$) iznosio je 60 minuta u termostatiranoj tresilici pri 37°C (300 rpm), dok je za 1x i 10x boju *StainIn Green* iznosio 30 minuta pri 4°C . Od originalne suspenzije probiotske bakterije *L. reuteri*, 85×10^6 bakterija, uzeto je po 10×10^6 bakterija u dvije epruvete od 15 mL, te su bakterije isprane od glicerola u fiziološkoj otopini ($2700 \times \text{g}$, 15 minuta). Nakon ispiranja, talog je prebačen u dvije epruvete s ciljem obilježavanja bojama CFSE i *StainIn Green*. Obilježavanje ovim bojama pratilo je iste postavke kao i za bakteriju *E. coli*; CFSE ($50 \mu\text{M}$) i *StainIn Green* (1x i 10x). Nakon isteka perioda inkubacije od 60 minuta za boju CFSE, bakterije su centrifugirane pri $2700 \times \text{g}$ 15 minuta, a na talog je dodano 1 mL medija bez antibiotika dok je po završetku inkubacije od 30 minuta za boju *StainIn Green*, sadržaj epruveta prebačen u polipropilenske epruvete od 15 mL i ispran dva puta s 0.5%-tnim goveđim albuminom (BSA) u fosfatnom puferu (PBS), odnosno 0.5%-tni BSA/PBS i centrifugiran pri $2700 \times \text{g}$ 15min (2x). Nakon toga je na talog dodano 1 mL medija bez antibiotika. Epruvete s obilježenim bakterijama (*L. reuteri* i *E. coli*) fluorescentnom bojom *StainIn Green* odmah su analizirane protočnom citometrijom.

3.2.6. Analiza probiotske bakterije *L. reuteri* i enteropatogene bakterije *E. coli* obilježenih bojom 5(6)-karboksifluorescein N-hidrosukcinimidil ester pomoću protočne citometrije

Epruvete s bakterijama *L. reuteri* i *E. coli* 3014 obilježene fluorescentnom bojom 5(6)-karboksifluorescein N-hidrosukcinimidil ester (CFSE), prema gore navedenom postupku, podijeljene su na četiri jednaka dijela i kultivirane pri 37°C kroz različito vrijeme. S ciljem

određivanja maksimalnog vremena unutar kojeg je moguće detektirati obilježene bakterije bojom CFSE (*L. reuteri* i *E. coli*), odnosno optimalni period inkubacije tijekom kojeg ne dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije kao posljedice umnožavanja bakterija, obje bakterije obilježene bojom CFSE inkubirane su u sljedećim vremenskim razmacima:

- 1) bakterije *L. reuteri* i *E. coli* obilježene bojom CFSE i odmah analizirane,
- 2) bakterije *L. reuteri* i *E. coli* obilježene bojom CFSE i analizirane nakon inkubacije u trajanju od 1 h,
- 3) bakterije *L. reuteri* i *E. coli* obilježene bojom CFSE i analizirane nakon isteka inkubacije u trajanju od 2 h,
- 4) bakterije *L. reuteri* i *E. coli* obilježene bojom CFSE i analizirane nakon isteka inkubacije u trajanju od 3 h.

Svaka epruveta predstavljala je određenu vremensku točku, a nakon isteka svakog perioda inkubacije epruvete su analizirane protočnom citometrijom.

3.2.7. Analiza obilježenih adheriranih probiotskih bakterija *L. reuteri* i enteropatogenih bakterija *E. coli* fluorescencijskom mikroskopijom

S ciljem određivanja maksimalnog vremena unutar kojeg je moguće detektirati obilježene bakterije fluorescencijskom mikroskopijom te optimalnog broja bakterija po jednoj epitelnj stanici kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2), odnosno multipliciteta infekcije (engl. *Multiplicity of infection*; MOI) za adheziju bakterija, posebice za enteropatogenu bakteriju *E. coli* 3014, pripremljeni su različiti omjeri bakterija u odnosu na broj stanica (MOI). MOI 5 (pet bakterija u odnosu na jednu stanicu), MOI 10 (deset bakterija u odnosu na jednu stanicu) i MOI 20 (20 bakterija u odnosu na jednu stanicu). Bakterije obilježene bojama 5(6)-karboksifluorescein N-hidrosukcinimidil ester (CFSE) ili *StainIn Green Nucleic Acid (StainIn Green)*, nasađene su na pripremljene monoslojeve stanica Caco-2 u jažicama pločice za kultivaciju te kultivirane jedan i tri sata u svrhu određivanja maksimalnog vremena unutar kojeg je fluorescencijskom mikroskopijom moguće detektirati fluorescentno obilježene bakterije. Nakon isteka kultivacije, pokupljen je medij s neadheriranim bakterijama, jažice su isprane dva puta s fosfatnim puferom (PBS) te su stanice s adheriranim bakterijama fiksirane u 4%-tnom formaldehidu u puferu PBS kroz 15 minuta na tresilici pri 25°C. Jažice su zatim isprane, a jezgre

stanica Caco-2 obojane su bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) u fosfatnom puferu (PBS), odnosno DAPI/PBS (konačna koncentracija 300ng/ml), kroz 10 minuta. Jažice su ponovno isprane puferom PBS i analizirane pomoću uređaja *EVOS FLC Cell Imager*.

3.2.8. Ispitivanje utjecaja probiotske bakterije *L. reuteri* na sposobnost adhezije enteropatogene bakterije *E. coli* na epitelnim stanicama kolorektalnog adenokarcinoma

Namjera ovog pokusa bila je ispitati ima li probiotska bakterija *L. reuteri* izravan (period inkubacije u trajanju od 1h) ili neizravan (period inkubacije u trajanju od 3h; utjecaj preko modificiranja epitelnih stanica) utjecaj na sposobnost adhezije enteropatogene bakterije *E. coli* 3014 za stanice kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2). S druge strane, bakterija *E. coli* nije mogla biti korištena kroz duže vrijeme inkubacije obzirom da se intenzitet fluorescencije boje (6)-karboksifluorescein N-hidrosukcinimidil ester (CFSE), korištene za obilježavanje bakterija, smanjuje prilikom njenog umnažanja proporcionalno vremenu kultiviranja. Sukladno tome, određeno je maksimalno vrijeme inkubacije bakterije *E. coli* u trajanju od 1h. Slijedom navedenog, korišteni su sljedeći uvjeti inkubacija bakterija na monosloju netretiranih i upalno tretiranih epitelnih stanica Caco-2 koji su utvrđeni prethodnim pokusima:

- 1) sama bakterija *L. reuteri* s vremenom inkubacije od 3h,
- 2) sama bakterija *E. coli* s vremenom inkubacije od 1h,
- 3) prethodna inkubacija bakterije *L. reuteri* od 3h i naknadno nasađivanje *E. coli* s vremenom inkubacije od 1h,
- 4) istovremena inkubacija bakterija *L. reuteri* i *E. coli* od 1h.

Obje bakterije, *L. reuteri* i *E. coli*, nasađene su na stanični monosloj Caco-2 pri multiplicitetu infekcije 20 (MOI 20; 20 bakterija u odnosu na jednu stanicu Caco-2). Učinak bakterije *L. reuteri* na sposobnost adhezije bakterije *E. coli* praćen je kvalitativno (fluorescencijska mikroskopija pomoću uređaja *EVOS FLC Cell Imager*) i kvantitativno (nasađivanje na krutu selektivnu hranjivu podlogu). Nakon isteka inkubacije bakterija (*L. reuteri* i *E. coli*) sa stanicama Caco-2, za analizu pod fluorescencijskim mikroskopom, neadherirane bakterije *L. reuteri* i *E. coli* uklonjene su ispiranjem, a nakon fiksacije u 4%-tnom formaldehidu u fosfatnom puferu (PBS) i ponovnog ispiranja, stanice su obojane fluorescentnom bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). Analiza je provedena pomoću uređaja *EVOS FLC Cell Imager*. Nakon isteka inkubacije bakterija (*L. reuteri* i *E. coli*) sa stanicama Caco-2, za nasađivanje na krute selektivne

hranjive podloge, stanice Caco-2 s adheriranim bakterijama disocirane su korištenjem akutaze (engl. *Accutase*), mješavine enzima sa proteolitičkim i kolagenolitičkim djelovanjem, što znači da oponaša djelovanje tripsina i kolagenaze. Disocirane stanice nakon djelovanja akutaze prebačene su u epruvete od 2 mL s fiziološkom otopinom, u ukupnom volumenu od 1 mL. Ukupni broj vijabilnih adherentnih bakterija *L. reuteri* i *E. coli* određen je metodom nasađivanja decimalnih razjedenja bakterija na krute hranjive podloge (engl. *spot plate technique*). Bakterija *L. reuteri* nasađena je na krutu selektivnu hranjivu podlogu za rast vrsta roda *Lactobacillus* (engl. *DeMan-Rogosa-Sharpe Agar*, MRS agar), a bakterija *E. coli* na krvnu krutu selektivnu hranjivu podlogu za rast vrsta roda *Escherichia* (engl. *Blood agar plates*). Bakterije su na krutim hranjivim podlogama inkubirane preko noći pri 37°C i 5% CO₂. Sljedeći dan prebrojane su izrasle kolonije bakterija. Apsolutni broj adheriranih bakterija *E. coli* i *L. reuteri* određen je prema sljedećem izrazu:

Apsolutni broj adheriranih bakterija (CFU) = broj izraslih bakterijskih kolonija x ukupni faktor razjedenja (nasađeno je 100 µL nerazjedenjene bakterijske suspenzije) x ukupni volumen početne bakterijske suspenzije u mL (volumen bakterijske suspenzije koja je nasađena na stanice Caco-2, volumen medija i pufera PBS za ispiranje).

3.2.9. Ispitivanje utjecaja probiotske bakterije *L. reuteri* i enteropatogene bakterije *E. coli* na ekspresiju proteina *zonula occludens*

Kako bismo ispitali kakav utjecaj probiotska bakterija *L. reuteri* i enteropatogena bakterija *E. coli* 3014 imaju na ekspresiju proteina *zonula occludens* (ZO-1) epitelnih stanica kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) u uvjetima upale, korišteni su sljedeći uvjeti za kvalitativnu analizu fluorescencijskom mikroskopijom i kvantitativnu analizu programom *ImageJ*:

- 1) Stanice Caco-2 rastle su 72 sata u mediju bez proupalnih citokina i natrijeva sulfida kako bi se vidjela osnovna razina ekspresije proteina ZO-1 u neupalnim uvjetima,
- 2) Stanice Caco-2 rastle su 72 sata u mediju bez proupalnih citokina, uz dodatak natrijeva sulfida kako bi se odredio učinak sumpora na ekspresiju ZO-1,

3) Stanice Caco-2 rasle su 72 sata u mediju sa proupalnim citokinima i natrijevim sulfidom bez bakterija kako bi se vidio kombinirani učinak prouplanih citokina i natrijeva sulfida na ekspresiju ZO-1.

Za utvrđivanje utjecaja bakterija na ekspresiju proteina *zonula occludens* (ZO-1) korišteni su sljedeći uvjeti:

- 1) Stanice Caco-2 rasle su 72 sata u mediju s proupalnim citokinima i natrijevim sulfidom te naknadno inkubirane jedan sat s bakterijom *E. coli*,
- 2) Stanice Caco-2 rasle su 72 sata u mediju s proupalnim citokinima i natrijevim sulfidom te naknadno inkubirane tri sata s bakterijom *L. reuteri*,
- 3) Stanice Caco-2 rasle su 72 sata u mediju s proupalnim citokinima i natrijevim sulfidom te naknadno inkubirane jedan sat s bakterijama *L. reuteri* i *E. coli*,
- 4) Stanice Caco-2 rasle su 72 sata u mediju s proupalnim citokinima i natrijevim sulfidom te naknadno inkubirane tri sata s bakterijom *L. reuteri* te nakon toga, jedan sat s bakterijom *E.coli*.

Fluorescencijskom mikroskopijom pomoću uređaja *EVOS FLC Cell Imager* provedena je analiza izmijenjene ekspresije proteina *zonula occludens* (ZO-1) uslijed upalne modulacije stanica Caco-2 te nakon adhezije probiotskih (*L. reuteri*) i enteropatogenih (*E. coli* 3014) bakterija. Analiza intenziteta ekspresije proteina ZO-1 provedena je korištenjem programa *ImageJ (Fluorescent Imaging Software)*.

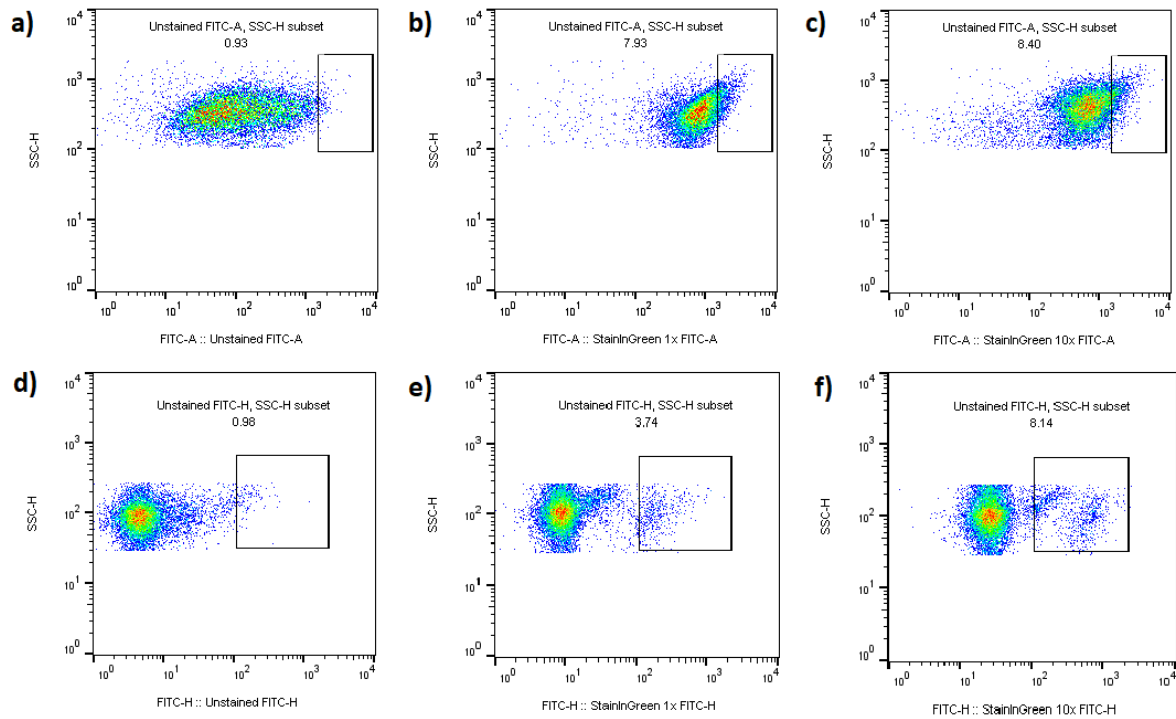
3.2.10. Statistička obrada podataka

Svi eksperimenti provedeni su u triplikatu, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Statistička značajnost je određena neparametarskim testom *Mann-Whitney U* i *One-way ANOVA* analizom varijance. Statistička obrada provedena je na programu *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software).

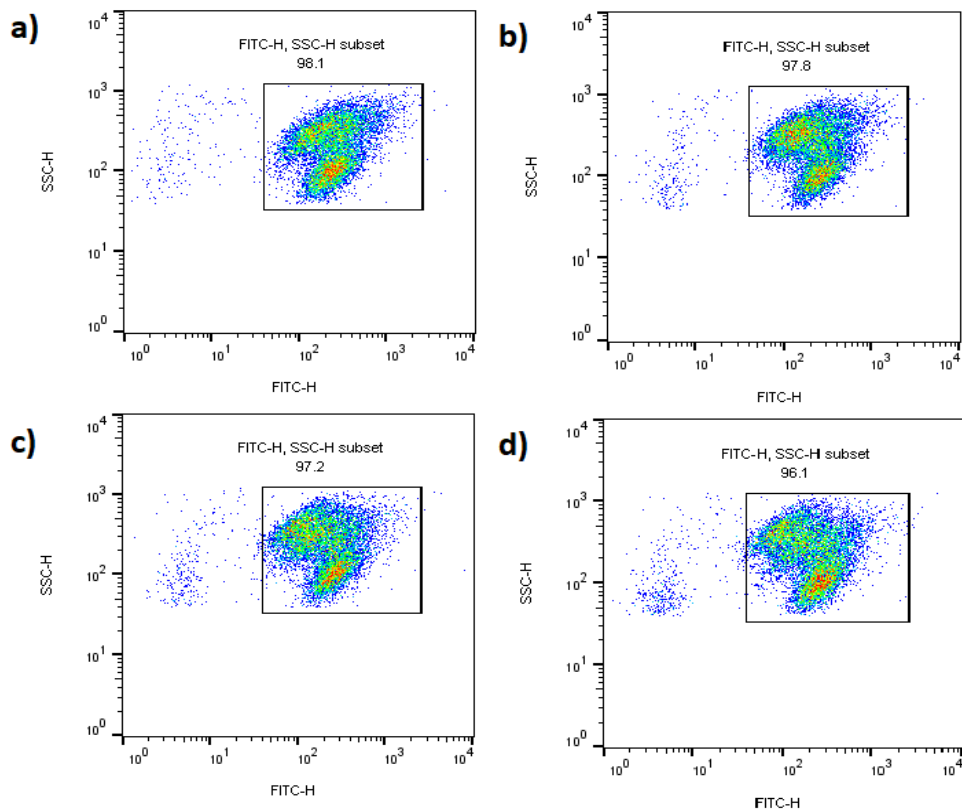
4. REZULTATI

4.1. Efikasnost obilježavanja bakterijskih stanica *L. reuteri* i *E. coli* fluorescentnim bojama

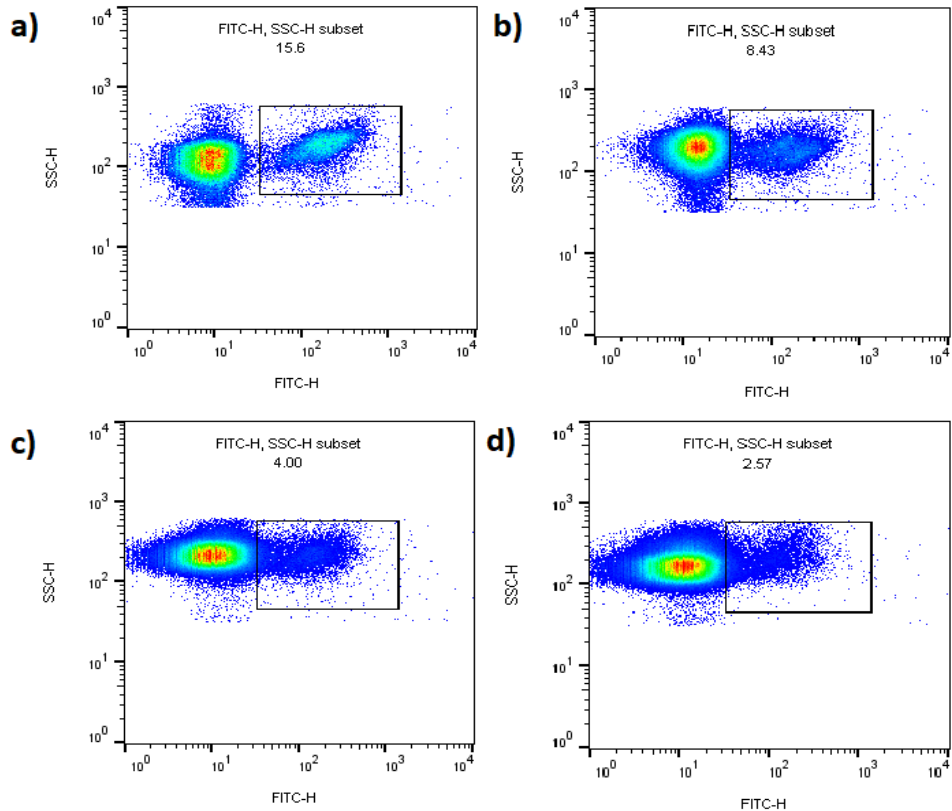
Svrha ovog pokusa bila je odrediti efikasnost obilježavanja bakterija odabranim fluorescentnim bojama te maksimalno vrijeme inkubacije fluorescentno obilježenih bakterija nakon kojeg je moguća vizualizacija pomoću fluorescentne mikroskopije. Nakon obilježavanja probiotske (*L. reuteri*) i enteropatogene (*E. coli* 3014) bakterije fluorescentnom bojom *StainIn Green Nucleic Acid Stain (StainIn Green)*, obje bakterije su protočnom citometrijom pokazale zadovoljavajuće rezultate obilježenosti pri koncentracijama boje 1x i 10x (Slika 6). Međutim, unatoč zadovoljavajućim rezultatima pri obje koncentracije boje *StainIn Green*, bakterija *E. coli* se fluorescencijskom mikroskopijom nije mogla detektirati. Iz tog razloga, u daljnjim pokusima odlučeno je korištenje fluorescentne boje 5(6)-karboksifluorescein N-hidrosukcinimidil ester (CFSE). Rezultati na Slici 7 pokazuju kako se fluorescencija boje CFSE kod bakterije *L. reuteri* ne mijenja značajno kroz navedeni period inkubacije (jedan, dva i tri sata inkubacije), za razliku od bakterije *E. coli* kod koje je vidljiv značajan pad intenziteta fluorescencije boje CFSE već nakon jednog sata inkubacije (Slika 8). Iz dobivenih rezultata određeno je da najduži period inkubacije za bakteriju *E. coli* iznosi 1 h, dok se za bakteriju *L. reuteri* mogu koristiti i dulji periodi, što je uzeto u obzir pri daljnjem planiranju eksperimenata.



Slika 6. Intenzitet fluorescencije bakterija *L. reuteri* i *E. coli* nakon tretmana bojom *StainIn Green* utvrđen protočnom citometrijom: a) neobilježena *L. reuteri*, b) *L. reuteri* u koncentraciji 1x tretirana bojom *StainIn Green*, c) *L. reuteri* u koncentraciji 10x tretirana bojom *StainIn Green*, d) neobilježena *E. coli*, e) *E. coli* u koncentraciji 1x tretirana bojom *StainIn Green*, f) *E. coli* u koncentraciji 10x tretirana bojom *StainIn Green*. FITC-H/SSC-H subset = bakterije obilježene bojom *StainIn Green*.



Slika 7. Intenzitet fluorescencije bakterija *L. reuteri* nakon tretmana bojom CFSE utvrđen protočnom citometrijom: a) neobilježena *L. reuteri*, b) *L. reuteri* nakon isteka jednosatne inkubacije tretirana bojom CFSE, c) *L. reuteri* nakon isteka dvosatne inkubacije tretirana bojom CFSE, d) *L. reuteri* nakon isteka trosatne inkubacije tretirana bojom CFSE. FITC-H/SSC-H subset = bakterije obilježene bojom CFSE.

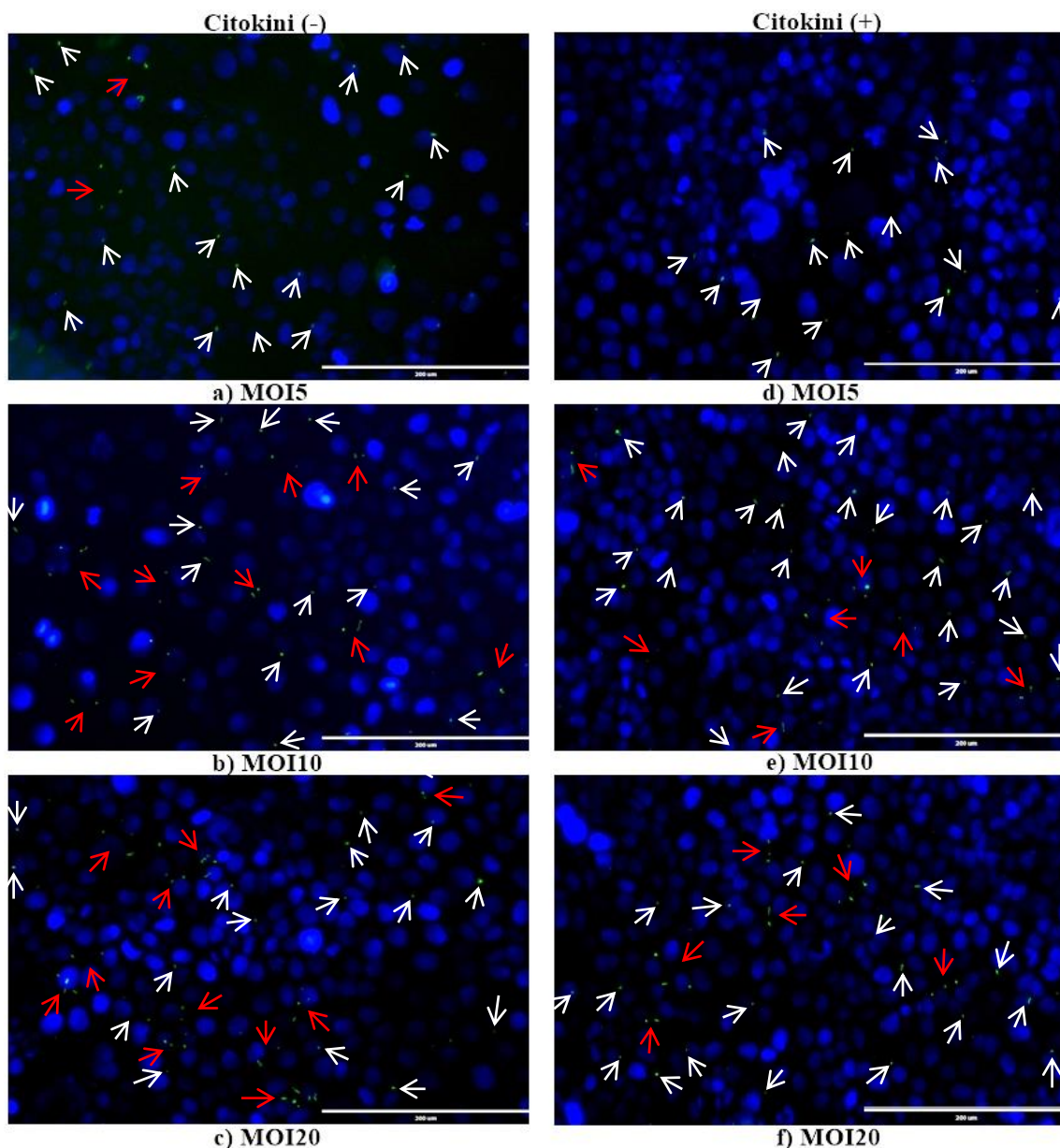


Slika 8. Intenzitet fluorescencije bakterija *E. coli* nakon tretmana bojom CFSE utvrđen protočnom citometrijom: a) neobilježena *E. coli*, b) *E. coli* nakon isteka jednosatne inkubacije tretirana bojom CFSE, c) *E. coli* nakon isteka dvosatne inkubacije tretirana bojom CFSE, d) *E. coli* nakon isteka trosatne inkubacije tretirana bojom CFSE. FITC-H/SSC-H subset = bakterije obilježene bojom CFSE.

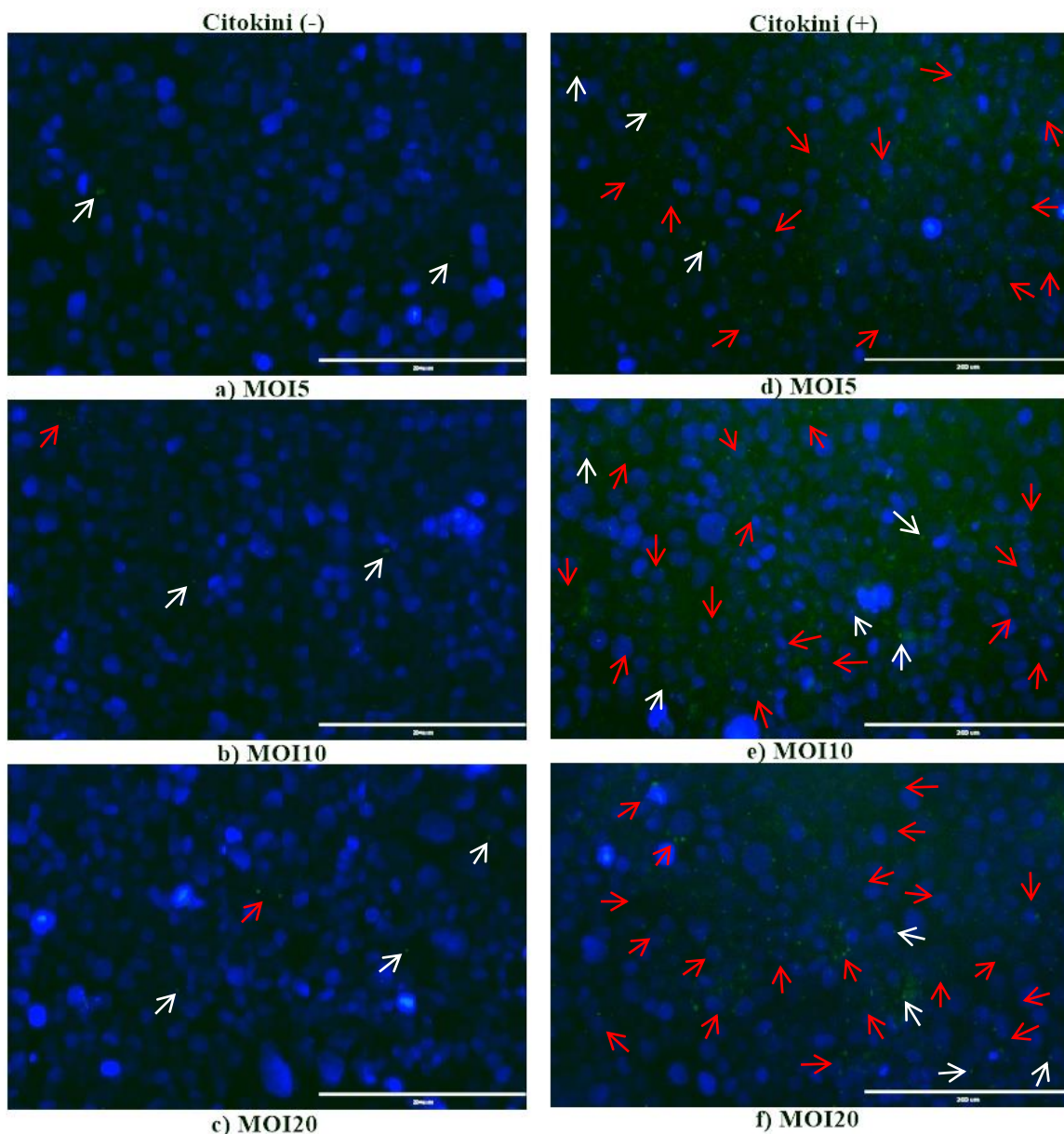
4.2. Adhezija bakterija *L. reuteri* i *E. coli* u uvjetima bez upale i s upalom

Probiotske bakterije (*L. reuteri*) i enteropatogene bakterije (*E. coli* 3014) obilježene su fluorescentnom bojom 5(6)-karboksifluorescein N-hidrosukcinimidil ester (CFSE) za nasađivanje na netretirane i proupalnim citokinima tretirane stanice kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2). Stanice Caco-2 tretirane suspenzijom proupalnih citokina odložene su u inkubator na 72 h (hipoksija, vlažnost 95%, 37°C, 5% CO₂). Nakon toga, na stanice Caco-2 nasađeni su različiti omjeri fluorescentno obilježenih bakterija (*L. reuteri* i *E. coli*) u odnosu na stanice (multiplicitet infekcije; MOI). MOI5 (pet bakterija u odnosu na jednu stanicu), MOI10 (10 bakterija u odnosu na jednu stanicu) i MOI20 (20 bakterija u odnosu na jednu stanicu).

Istekom inkubacije od jednog sata te analizom pod fluorescencijskim mikroskopom, odnosno brojanjem biljega po vidnom polju uzimajući u obzir omjer bakterijskih stanica nasadenih na stanice Caco-2, uočen je trend jednake adhezije bakterije *L. reuteri* na stanični monosloj Caco-2 u oba slučaja (bez upale i s upalom). Uspoređujući oba uvjeta za isti MOI, nije bilo vidljive razlike u adheziji bakterije *L. reuteri* na stanični monosloj (Slika 9). S druge strane, u uvjetima bez upale, enteropatogena bakterija *E. coli* 3014 bila je slabo vidljiva pod fluorescencijskim mikroskopom, odnosno ukazivala je na trend smanjenja adhezije na stanični monosloj Caco-2. Krećući od MOI5 prema MOI20, u uvjetima bez upale, bakterija *E. coli* pokazala je trend najveće adhezije pri MOI20. Kod uvjeta s upalom, bakterija *E. coli* ukazala je na trend povećanja adhezije na stanični monosloj (u odnosu na uvjet bez upale), od toga najbolje u omjeru 1:20 (krećući od MOI5 prema MOI20) (Slika 10). Iz ovih rezultata zaključujemo da bakterija *L. reuteri* jednako adherira na stanični monosloj Caco-2 neovisno o upali ($p=0.831$), za razliku od bakterije *E. coli* koja ukazuje na trend povećanja adhezije za upalno izmijenjeni stanični monosloj Caco-2.



Slika 9. Usporedba adhezije probiotske bakterije *L.reuteri* različitih MOI na normalne i upalno kondicionirane epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2): a-c) adherirana bakterija *L. reuteri* pri MOI 5, MOI 10 i MOI 20 na netretiranim stanicama Caco-2, d-f) adherirana bakterija *L. reuteri* u uvjetima upale pri MOI 5, MOI 10 i MOI 20. Citokini (-): netretirane stanice Caco-2, Citokini (+): stanice Caco-2 tretirane proupalnim citokinima (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β), MOI = multiplicitet infekcije; broj bakterijskih stanica u odnosu na stanice Caco-2, MOI 5 = pet bakterija u odnosu na jednu stanicu, MOI 10 = 10 bakterija u odnosu na jednu stanicu, MOI 20 = 20 bakterija u odnosu na jednu stanicu, plava boja = jezgre Caco-2 stanica obojane fluorescentnom bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), zeleno = bakterije *L. reuteri* obilježene fluorescentnom bojom CFSE, bijele strelice označuju jednu bakteriju *L. reuteri*, a crvene strelice više bakterija *L. reuteri* na jednom mjestu.



Slika 10. Usporedba adhezije patogene bakterije *E. coli* različitih MOI na normalne i upalno kondicionirane epitelne stanice kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2): a-c) adherirana bakterija *E. coli* pri MOI 5, MOI 10 i MOI 20 na netretiranim stanicama Caco-2, d-f) adherirana bakterija *E. coli* u uvjetima upale pri MOI 5, MOI 10 i MOI 20. Citokini (-): netretirane stanice Caco-2, Citokini (+): stanice Caco-2 tretirane proupalnim citokinima (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β), MOI = multiplicitet infekcije; broj bakterijskih stanica u odnosu na stanice Caco-2, MOI 5 = pet bakterija u odnosu na jednu stanicu, MOI 10 = 10 bakterija u odnosu na jednu stanicu, MOI 20 = 20 bakterija u odnosu na jednu stanicu, plava boja = jezgre Caco-2 stanica obojane fluorescentnom bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), zelena = bakterije *E. coli* obilježene fluorescentnom bojom CFSE, bijele strelice označuju jednu bakteriju *E. coli*, a crvene strelice više bakterija *E. coli* na jednom mjestu.

U svrhu kvantitativne analize, nakon isteka inkubacije bakterija (*L. reuteri* i *E. coli* 3014) sa stanicama Caco-2 za nasađivanje na krute selektivne hranjive podloge, stanice sa adheriranim bakterijama disocirane su djelovanjem akutaze (*Accutase*). Nakon toga je provedeno trostruko nasađivanje enteropatogene bakterije *E. coli* 3014 na krvnu krutu hranjivu podlogu za rast vrsta roda *Escherichia* (engl. *Blood agar plates*) i probiotske bakterije *L. reuteri* na krutu hranjivu podlogu za rast vrsta roda *Lactobacillus* (engl. *DeMan-Rogosa-Sharpe Agar*, *MRS Agar*). Iako je analizom istog multipliciteta infekcije (MOI) pomoću fluorescencijskog mikroskopa uočen trend povećanja adhezije bakterije *E. coli* za upalno modificirani stanični monosloj Caco-2, kvantitativna analiza nije pokazala postojanje statistički značajne razlike ($p=0,667$) zbog prevelikih varijacija u rezultatima (Tablica 1).

Tablica 1. Srednja vrijednost apsolutnog broja i standardna devijacija izraslih kolonija bakterije *E. coli* i *L. reuteri* adheriranih na stanicama kolorektalnog adenokarcinoma, Caco-2, bez uvjeta inducirane upale i s uvjetima inducirane upale. Citokini (-) = broj izraslih kolonija bakterija adheriranih na netretiranim stanicama Caco-2, citokini (+) = broj izraslih kolonija bakterija adheriranih na stanicama Caco-2 tretiranim medijem s proupalnim citokinima. Bakterije *E. coli* na kruti hranjivi medij nasađene su nerazrjeđene, bakterije *L. reuteri* u razrjeđenju 1:1000, apsolutni broj bakterija izražen je u CFU (*Colony-forming unit*).

Adhezija	Citokini (-)	Citokini (+)
<i>E. coli</i>	3 900 ± 2 800	4 580 ± 3 340
<i>L. reuteri</i>	588 000 ± 264 000	633 000 ± 159 000

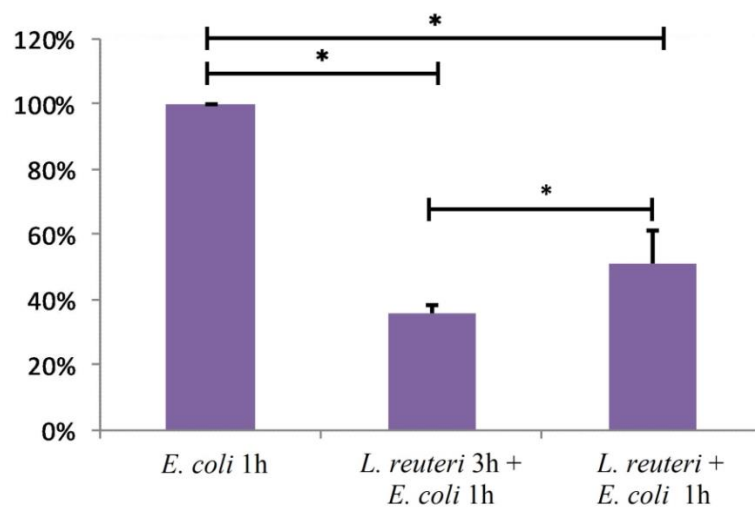
4.3. Utjecaj probiotske bakterije *L. reuteri* na adheziju enteropatogene bakterije *E. coli*

Po isteku inkubacije (*E. coli* u trajanju od 1 h, prethodna inkubacija stanica Caco-2 s *L. reuteri* u trajanju od 3 h te naknadna inkubacija *E. coli* u trajanju od 1 h, kokultivacija *L. reuteri* i *E. coli* u trajanju od 1 h) te disociranjem stanica Caco-2 s adheriranim bakterijama, nasađivanje enteropatogenih bakterija *E. coli* 3014 adheriranih na stanicama Caco-2 na krute krvne hranjive podloge provedeno je ukupno tri puta. Rezultati sva tri mjerenja pokazali su da je srednja vrijednost naraslih kolonija adherirane bakterije *E. coli* u uvjetima upale bila 458 kolonija, što je uzeto kao maksimum vezanja (100%). Prethodna inkubacija stanica kolorektalnog

adenokarcinoma (Caco-2) s bakterijom *L. reuteri* u trajanju od tri sata, smanjila je sposobnost adhezije bakterije *E. coli* za 64,38%, a istovremena inkubacija obiju bakterija, *L. reuteri* i *E. coli*, u trajanju od jednog sata za 48,80%. Statističkom usporedbom apsolutnih brojeva adheriranih bakterija pri pojedinim uvjetima nije dobivena statistički značajna razlika zbog velikih varijacija u rezultatima (Tablica 2), dok se uniformiranjem rezultata izraženih preko postotaka adheriranih bakterija *E. coli* (100% predstavlja broj adheriranih bakterija *E. coli* na stanicama Caco-2 bez *L. reuteri*) pokazao značajan utjecaj *L. reuteri* na smanjenje sposobnosti enteropatogene bakterije *E. coli* da adherira za stanični monosloj Caco-2 ($p=0.0032$) (Slika 11).

Tablica 2. Srednja vrijednost apsolutnog broja i standardna devijacija izraslih kolonija adherirane bakterije *E. coli* na stanicama kolorektalnog adenokarcinoma, Caco-2, u uvjetima inducirane upale. Citokini (+) = broj izraslih kolonija bakterija *E. coli* adheriranih na stanicama Caco-2 tretiranim medijem s proupalnim citokinima. Bakterije *E. coli* adherirane na stanice na kruti hranjivi medij nasadene su nerazrjeđene, apsolutni broj bakterija izražen je u CFU (*Colony-forming unit*).

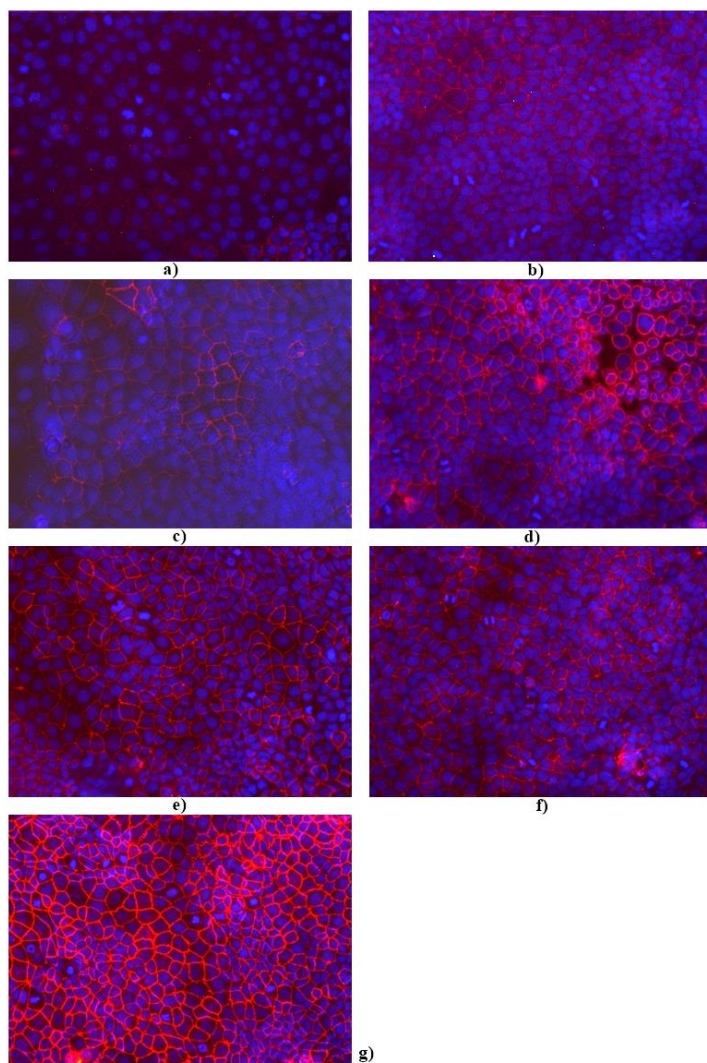
Adherirane bakterije	Citokini (+)
<i>E.coli</i> 1h	4 580 ± 3 340
<i>L.reuteri</i> predkultivacija 3h i <i>E.coli</i> 1h	1 690 ± 1 796
Kultivacija <i>L.reuteri</i> i <i>E.coli</i> 1h	2 116 ± 1 373



Slika 11. Broj izraslih kolonija bakterije *E. coli* adherirane na stanicama kolorektalnog adenokarcinoma nakon isteka navedenih inkubacija bakterija te nasađivanja bakterije *E. coli* na krute krvne hranjive podloge u uvjetima inducirane upale. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija tri mjerenja u postocima. Statistički značajne razlike označene su sa * $p < 0.01$. *E. coli* 1h = bakterija *E. coli* inkubirana 1h na stanicama kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2), *L. reuteri* 3h + *E. coli* 1h = bakterija *L. reuteri* prethodnoinkubirana te naknadno inkubirana *E. coli* 1h na stanicama Caco-2, *L. reuteri* i *E. coli* 1h = istovremena inkubacija bakterija 1h na stanicama Caco-2.

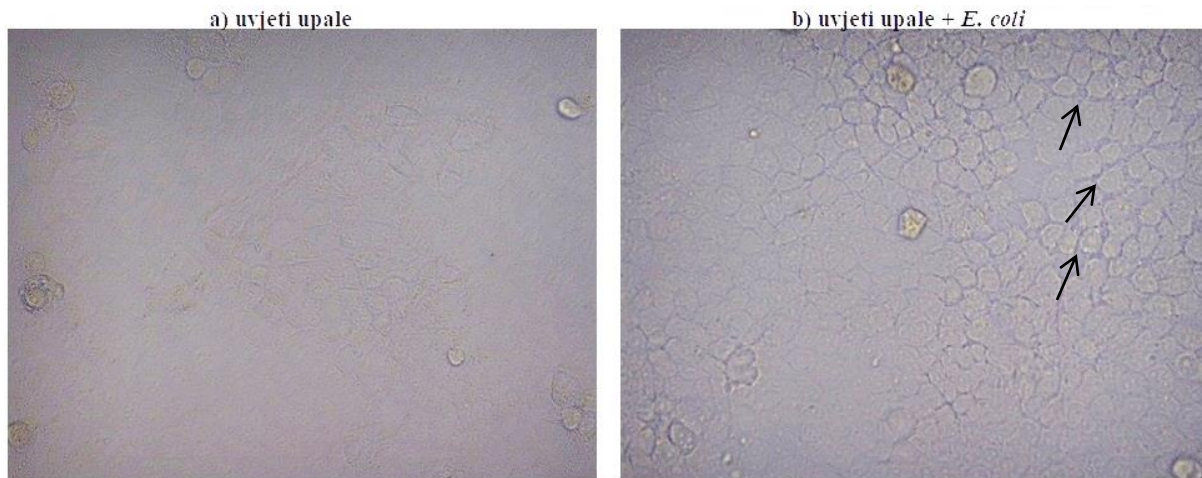
4.4. Ekspresija proteina *zonula occludens* u prisutnosti bakterija *L. reuteri* i *E. coli*

Na slici 12a vidljiva je bazalna razina ekspresije proteina *zonula occludens* (ZO-1) na monosloju epitelnih stanica kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) u mediju bez proupalnih citokina, s intenzitetom fluorescencije (IF) od 45.190. Zanimljivo je da dodatak natrijeva sulfida (Na_2S) u medij dovodi do povećanja intenziteta fluorescencije proteina ZO-1 na vrijednost 67.201 (Slika 12b). Budući da je u daljnjim uvjetima korišten medij s dodatkom Na_2S i proupalnim citokinima (interferon gama; $\text{IFN-}\gamma$, faktor nekroze tumora alfa; $\text{TNF-}\alpha$, interleukin 1 beta; $\text{IL-1}\beta$), kao negativna kontrola određivanja učinka proupalnih citokina te *L. reuteri* odnosno *E. coli* 3014 na ekspresiju proteina ZO-1 služio je uvjet u kojem su stanice Caco-2 tretirane medijem s dodatkom Na_2S (Slika 12b). Na slici 12c, vidljivo je da dodatak proupalnih citokina dovodi do smanjenja intenziteta fluorescencije proteina ZO-1 na vrijednost 56.609, u odnosu na učinak samog Na_2S s intenzitetom fluorescencije od 67.201. (Slika 12b). Slično, smanjenje ekspresije proteina ZO-1 nalazimo i kod stanica tretiranih proupalnim citokinima te dodatno izloženih djelovanju bakterije *E. coli* 3014 (IF 56.617) (Slika 12d) u trajanju od 60 minuta. Suprotno, izlaganje upalno kondicioniranih stanica Caco-2 djelovanju bakterije *L. reuteri* (Slika 12e) ili *L. reuteri* i *E. coli* (Slika 12f) u trajanju od jednog sata, očuvalo je ekspresiju proteina ZO-1 (IF 63.180 i IF 65.565) slično vrijednosti za negativnu kontrolu (Slika 12b). Ipak, najveći iznos intenziteta fluorescencije proteina ZO-1 (104.608) primijećen je u uvjetu prethodne inkubacije stanica Caco-2 s bakterijom *L. reuteri* u trajanju od tri sata unatoč naknadne inkubacije s *E. coli* (Slika 12g). Ovaj set eksperimenata rađen je u duplikatu, a prikazane su reprezentativne slike za pojedine uvjete za koje je izražen IF kao srednja vrijednost dobivenih podataka u duplikatu.



Slika 12. Ekspresija proteina ZO-1 na staničnom monosloju epitelnih stanica kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) u različitim uvjetima kultivacije: a) bazalna razina ekspresije proteina ZO-1 staničnog monosloja Caco-2, b) razina ekspresije proteina ZO-1 staničnog monosloja Caco-2 s Na_2S , c) razina ekspresije proteina ZO-1 monosloja Caco-2 kondicioniranog upalnim citokinima s dodatkom Na_2S , d) razina ekspresije proteina ZO-1 monosloja Caco-2 kondicioniranog upalnim citokinima s dodatkom Na_2S i inkubacijom bakterije *E. coli* (1h), e) razina ekspresije proteina ZO-1 monosloja Caco-2 kondicioniranog upalnim citokinima s dodatkom Na_2S i inkubacijom bakterije *L. reuteri* (1h), f) razina ekspresije proteina ZO-1 monosloja Caco-2 kondicioniranog upalnim citokinima s dodatkom Na_2S i istovremenom inkubacijom bakterija *E. coli* i *L. reuteri* (1h), g) razina ekspresije proteina ZO-1 monosloja Caco-2 kondicioniranog upalnim citokinima s dodatkom Na_2S i prethodnom inkubacijom bakterije *L. reuteri* (3h) i inkubacijom bakterije *E. coli* (1h). ZO-1 = protein *zonula occludens*, Na_2S = natrijev sulfid, plavo = jezgre stanica Caco-2 obojane fluorescentnom bojom 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI); crveno = fluorescencija proteina ZO-1 nakon dodatka *Alexa Fluor 647* konjugiranog ZO-1 monoklonskog antitijela.

Iako se na Slici 12d vizualno čini da enteropatogena bakterija *E. coli* 3014 uzrokuje jači signal za protein ZO-1 u odnosu na tretman stanica samo s proupalnim citokinima (Slika 12c), fluorescentnom mikroskopijom samih stanica pod vidljivim svjetlom uočeno je da *E. coli* uzrokuje odizanje stanica Caco-2 iz monosloja, što posljedično dovodi i do izmijenjene fluorescencije ZO-1 (Slika 13).



Slika 13. Razlike u stanicama Caco-2: lijevo – stanice su priljubljene jedna uz drugu; desno – na određenim mjestima staničnog monosloja, stanice su fizički odvojene i odignute što, u ovom slučaju, dovodi do prividno povećane ekspresije proteina ZO-1. Uvjeti upale = medij s proupalnim citokinima i natrijevim sulfidom, uvjeti upale + *E. coli* = medij s proupalnim citokinima, natrijevim sulfidom i bakterijom *E. coli*, ZO-1 = protein *zonula occludens*.

5. RASPRAVA

Adhezija probiotskih bakterija *L. reuteri* na crijevni epitel, uz ostalo, važna je i za inhibiciju vezanja patogena te njihovu daljnju kolonizaciju ili imunomodulaciju. Nekoliko studija je pokazalo da bakterija *L. reuteri* ima veliki kapacitet za kolonizaciju i adheziju za crijevni epitel unatoč nepovoljnim uvjetima u gastrointestinalnom traktu (Srinivasan i sur. 2018; Wang i sur. 2018). Sukladno, rezultati ovog istraživanja ukazali su na trend nepromijenjene adhezije bakterije *L. reuteri* na monosloj epitelnih stanica kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) neovisno o upalnim uvjetima. S druge strane, enteropatogena bakterija *E. coli* 3014 pokazala je trend povećane adhezije za upalno izmijenjen stanični monosloj Caco-2 što je u skladu s nalazima povećane prisutnosti bakterije *E. coli* na površini crijevnog epitela bolesnika s upalnim bolestima crijeva (UBC), odnosno u uvjetima akutne upale (Rhodes 2007). U ovom istraživanju za obilježavanje i uspješnu detekciju bakterija *L. reuteri* i *E. coli* korištena je fluorescentna boja 5(6)-karkoksifluorescein N-hidrosukcinimidil ester (CFSE). Iako se u početku planiralo korištenje boje *StainIn Green Nucleic Acid Stain (StainIn Green)* koja slobodno ulazi u bakterijske stanice i veže se za DNA, rezultati usporednih analiza protočnom citometrijom i fluorescencijskom mikroskopijom utvrdili su slabiju moć razlučivanja intenziteta fluorescencije u odnosu na boju CFSE, osobito u slučaju bakterije *E. coli*. Dodatno, intenzitet fluorescencije obilježenih bakterija *L. reuteri* i *E. coli* smanjuje se s obzirom na vrijeme kultiviranja i umnožavanja bakterija. Mogući razlog uspjeha korištenja boje CFSE u odnosu na boju *StainIn Green* proizlazi iz činjenice da se boja CFSE veže za amino skupine proteina, dok se boja *StainIn Green* veže za genomsku DNA bakterija. S obzirom na dostupnu količinu substrata vezanja ovih fluorescentnih boja, ne iznenađuje činjenica da je intenzitet fluorescencije obilježenih prema neobilježenim bakterijama (engl. *Stain index*) veći za boju CFSE, posebno u slučaju bakterija *E. coli* koje sadrže relativno manju količinu DNA u odnosu na *L. reuteri* (Baumstummeler i sur. 2011).

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na mogući pozitivan učinak djelovanja probiotskih bakterija na oporavak epitela u uvjetima upale te predstavljaju mogući koristan dodatak standardnoj terapiji upalnih bolesti crijeva (UBC). Izlaganje epitelnih stanica kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) probiotskim bakterijama *L. reuteri* ukazuje na trend smanjenja adhezije enteropatogenih bakterija *E. coli* 3014, s najvećim inhibitornim učinkom u uvjetima

kada su stanice prethodno kultivirane s bakterijama *L. reuteri* u trajanju od tri sata. U tom slučaju trend smanjenja kolonizacije staničnog monosloja Caco-2 *E. coli* vjerojatno je posljedica neizravnog učinka bakterija *L. reuteri* na stanice Caco-2. Trend smanjenja kolonizacije staničnog monosloja Caco-2 *E. coli* zamijećen je i kod istovremenog izlaganja stanica Caco-2 *L. reuteri* i *E. coli* u trajanju od jednog sata, što znači da *L. reuteri*, uz neizravni učinak, vjerojatno ima i izravni učinak na smanjenje kolonizacije *E. coli*. Vjerojatni mehanizam izravnog djelovanja *L. reuteri* je kompetitivna inhibicija veznih mjesta, kao što su to pokazali Wang i sur. (2018). Također, poznato je da bakterije *L. reuteri* proizvode baktericidne spojeve kojima mogu negativno utjecati na patogene bakterije, odnosno *E. coli* (Srinivasan i sur. 2018). U provedenim pokusima, kada su stanice Caco-2 istovremeno izložene djelovanju *L. reuteri* i *E. coli*, bakterije *E. coli* imale su veću mogućnost pronalaženja aktivnih veznih mjesta, što je rezultiralo većim brojem adheriranih bakterija u odnosu na broj adheriranih bakterija na stanicama Caco-2 koje su prethodno izložene djelovanju *L. reuteri* u trajanju od tri sata. Glavni nedostatak ovog istraživanja je relativno mali broj ponavljanja eksperimenata budući da je kod provedenih ispitivanja uočena velika varijacija dobivenih rezultata. Međutim, ovo je preliminarno istraživanje s naglaskom na uspostavu i optimizaciju *in vitro* (istraživanja na stanicama izvan njihova normalnog biološkog okruženja) modela za procjenu sposobnosti probiotskih vrsta u modulaciji patoloških procesa povezanih s UBC-om. Visoke vrijednosti standardnih devijacija za izrasle bakterijske kolonije (*L. reuteri* i *E. coli*) na krutim hranjivim podlogama nasadenima u triplikatima vjerojatno bi se smanjile većim brojem ponovljenih pokusa.

Poznato je da tretman staničnog monosloja kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) proupalnim citokinima IFN- γ , TNF- α i IL-1 β povećava propusnost uslijed narušavanja integriteta kompleksa čvrstih spojeva. Youakim i Ahideh (1999) istaknuli su povezanost IFN- γ te TNF- α (Ma i sur., 2004) s povećanjem permeabilnosti monosloja stanica Caco-2 i to kroz smanjenu ekspresiju proteina ZO-1. Han i sur. (2003) dodatno su potvrdili negativan učinak ovih citokina, korištenjem kombinacije proupalnih citokina (citomix) IFN- γ , TNF- α i IL- β na modelu stanica Caco-2. Provedeni pokusi ukazali su na negativan učinak proupalnih citokina na smanjenje ekspresije ZO-1 u odnosu na netretirani stanični monosloj fluorescencijskom mikroskopijom. Osim citokina, stanice Caco-2 su dodatno tretirane s natrijevim sulfidom te je na taj način približen *in vitro* (istraživanja na stanicama izvan njihova normalnog biološkog okruženja) model uobičajenim životinjskim modelima istraživanja UBC-a koji koriste sumporne spojeve za

izazivanje bolesti. Naime, Poritz i sur. (2007), korištenjem dekstran natrij sulfata (DSS) kao induktora kolitisa na mišjem modelu, dokazali su da sumporni spojevi povećavaju permeabilnost epitelnog monosloja. Inicijalni mehanizam djelovanja sumpornih spojeva na epitelne stanice uključuje toksičnost i staničnu smrt, a zatim i razvoj upalnog procesa kao posljedicu narušavanja crijevne barijere i translokacije mikrobiote (Kitajima i sur. 1999). U prikazanom pokusu stanice Caco-2 bile su uzgajane u mediju s proupalnim citokinima (IFN- γ , TNF- α IL-1 β) uz dodatak natrijeva sulfida (Na₂S), i u tim uvjetima, detektiran je veći broj adheriranih *E. coli* 3014 u odnosu na netretirane stanice, iako nije pokazana statistički značajna razlika. Osim što se koriste za indukciju UBC-a u životinjskim modelima, kroz izazivanje stanične smrti i gubitak monosloja, pitanje je da li sumpor i njegovi spojevi mogu utjecati i na druge mehanizme koji doprinose karakterističnim patološkim nalazima. Suprotno očekivanju, u ovim pokusima, dodatak natrijeva sulfida u medij za kultivaciju ukazao je na povećanu ekspresiju proteina ZO-1 u stanicama Caco-2 u odnosu na stanice uzgajane u potpunom mediju bez natrijeva sulfida. Međutim, tretman stanica Caco-2 proupalnim citokinima ukazao je na smanjenu ekspresiju proteina ZO-1, unatoč prisutnom natrijevom sulfidu. Iako su Zhang i sur. (2010) pokazali da same *E. coli* smanjuju ekspresiju proteina ZO-1 i narušavaju crijevnju barijeru, u ovom istraživanju nisu uočeni dodatni učinci bakterije *E. coli* u odnosu na sam proupalni medij. Mogući razlog je prekratka inkubacija bakterija *E. coli* sa stanicama Caco-2, no u ovim postavkama eksperimenata dulja inkubacija nije bila moguća zbog nemogućnosti vizualizacije fluorescentnom mikroskopijom, odnosno citotoksičnog učinka metabolita *E. coli*. I nakon jednog sata izlaganja stanica Caco-2 enteropatogenom bakterijom *E. coli* 3014 moguće je uočiti narušavanje integriteta epitelnog monosloja i odizanje stanica s podloge. Nadalje, prividno jači intenzitet fluorescencije antitijelom obilježenog proteina ZO-1 u prisustvu bakterije *E. coli* je posljedica djelovanja bakterije na same stanice, tj. stanice na određenim mjestima se odizaju iz monosloja vjerojatno kao posljedica smrti uslijed toksičnog djelovanja bakterijskih toksina, što dovodi do nespecifičnog vezanja antitijela.

Prema rezultatima ovog istraživanja, probiotske bakterije *L. reuteri* pokazuju potencijalno zaštitno djelovanje te bi povećanje kolonizacije crijeva ovim bakterijama moglo pozitivno djelovati u liječenju upalnih bolesti crijeva (UBC) sprječavajući oštećenja epitelnje barijere i posljedične kolonizacije epitela patogenim bakterijama. I druge studije pokazale su slično djelovanje bakterija *L. reuteri* u upalnim uvjetima povećanom razinom ekspresije proteina

zonula occludens (ZO-1) i očuvanjem integriteta epitelne barijere, ne samo kod UBC-a nego i drugim bolestima. Pozitivan učinak bakterija *L. reuteri* pokazan je kod djece s atopijskim dermatitisom gdje je narušena funkcija epitelne barijere direktno povezana s patogeneзом (Mu i sur. 2018). U uvjetima kultivacije epitelnih stanica kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) *in vitro* (istraživanja na stanicama izvan njihova normalnog biološkog okruženja) s bakterijama *L. reuteri*, sa i bez patogene bakterije *E. coli*, uočena je povećana ekspresija proteina ZO-1. Prethodna inkubacija stanica Caco-2 s bakterijom *L. reuteri* te nakon toga, dodatna inkubacija s bakterijom *E. coli* ukazala je na povećanje ekspresije proteina ZO-1. Ono je bilo i više nego kod predinkubacije samo s bakterijom *L. reuteri*. Moguće objašnjenje je u kinetici ekspresije proteina ZO-1 budući da je ukupno vrijeme kultivacije stanica Caco-2 u prisustvu bakterije *L. reuteri* u prvom slučaju bilo četiri sata, a u drugom tri sata, što se planira istražiti dodatnim pokusima u budućnosti.

Niska zastupljenost proteina epitelne barijere ZO-1 uslijed upalnog stanja, dodatkom probiotskih bakterija *L. reuteri* gdje vrijeme inkubacije s probiotskom bakterijom ima važnu ulogu, ukazuje na promjenu zastupljenosti početno niske ekspresije proteina ZO-1. Istovremena inkubacija epitelnih stanica kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) s bakterijama *L. reuteri* i *E. coli* u trajanju od jednog sata je bila, po svemu dosad utvrđenom, prekratka za statistički značajno povećanu *de novo* (novu) ekspresiju proteina *zonula occludens* (ZO-1). Ipak, bakterija *L. reuteri* i u ovakvim uvjetima pokazuje mogući pozitivan probiotski učinak većom ekspresijom proteina ZO-1. Osim pozitivnih učinaka bakterija *L. reuteri* u *in vitro* (istraživanja na stanicama izvan njihova normalnog biološkog okruženja) istraživanjima, kod *in vivo* (istraživanja na živim organizmima) modela životinjskog kolitisa induciranog djelovanjem dekstran natrij sulfata (DSS), primjena bakterija *L. reuteri* povećala je ekspresiju proteina ZO-1 i očuvala integritet crijevne barijere.

6. ZAKLJUČAK

Provedenim preliminarnim istraživanjem doneseni su sljedeći zaključci:

1. Da bi se mogle vizualizirati, enteropatogene bakterije *E. coli* 3014 obilježene su bojom 5(6)-karboksifluorescein N-hidrosukcinimidil ester (CFSE) koja se veže na amino skupine proteina, za razliku od boje *StainIn Green Nucleic Acid Stain (StainIn Green)*, koja se veže na genomsku DNA bakterije. Bakterije *E. coli* imaju malu količinu genomske DNA te se, obilježene bojom *StainIn Green*, ne mogu vizualizirati fluorescencijskom mikroskopijom.
2. Enteropatogene bakterije *E. coli* 3014 pokazuju moguću povećanu sposobnost adhezije za stanice kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) u upalnim uvjetima iako nije utvrđena statistički značajna razlika. Probiotska bakterija *L. reuteri* pokazala je nepromijenjeni trend adhezije za stanice Caco-2 u oba uvjeta (u prisutnosti i odsutnosti proupalnih citokina).
3. Probiotska bakterija *L. reuteri* smanjuje sposobnost adhezije enteropatogene bakterije *E. coli* 3014 za stanice kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) gdje je utvrđena statistički značajna razlika ($p=0.032$). Vjerojatni mehanizmi podrazumijevaju izravni utjecaj bakterija *L. reuteri* na *E. coli* (kokultivacija 1h) kao i neizravan utjecaj preko Caco-2 stanica (predkultivacija 3h).
4. Enteropatogena bakterija *E. coli* 3014 ukazuje na smanjenje ekspresije proteina *zonula occludens (ZO-1)* u uvjetima upalnog stanja na stanicama kolorektalnog adenokarcinoma (Caco-2) prema vrijednosti intenziteta fluorescencije te, prema tome, postoji mogućnost negativnog utjecaja na integritet monosloja i funkciju epitelne barijere. Probiotska bakterija *L. reuteri* ukazuje na povećanje ekspresije proteina ZO-1 u uvjetima upalnog stanja na stanicama Caco-2 te na taj način ukazuje na moguće sudjelovanje u održavanju integriteta monosloja i funkcije barijere, što bi se moglo iskoristiti za terapiju upalnih bolesti crijeva.

7. LITERATURA

1. Bahrami, B., Child, M. W., Macfarlane, S., Macfarlane, G. T. (2011): Adherence and cytokine induction in Caco-2 cells by bacterial populations from a three-stage continuous-culture model of the large intestine. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 2934–2942.
2. Baumstummeler, A., Chollet, R., Meder, H., Olivieri, F., Rouillon, S., Waiche, G., Ribault, S. (2011): Development of a nondestructive fluorescence-based enzymatic staining of microcolonies for enumerating bacterial contamination in filterable products. *Journal of Applied Microbiology*. 110.
3. Buckley, A., Turner, J. R. (2018): Cell biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 10.
4. Chow, J., Tang, H., Mazmanian, S. K. (2011): Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. In *Current Opinion in Immunology*. 23: 473–480.
5. Han, X., Fink, M. P., Delude, R. L. (2003): Proinflammatory cytokines cause NO-dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock*. 19: 229-257.
6. Hernandez-Patlan, D., Solis-Cruz, D., Hargis, B. M., Tellez, G. (2020): The use of probiotics in poultry production for the control of bacterial infections and aflatoxins. *Prebiotics and Probiotics - Potential Benefits in Nutrition and Health*.
7. Ijssennagger, N., van der Meer, R., van Mil, S. W. C. (2016): Sulfide as a Mucus Barrier-Breaker in Inflammatory Bowel Disease? *Trends in Molecular Medicine*. 22: 190–199.
8. Ito, R., Shin-Ya, M., Kishida, T., Urano, A., Takada, R., Sakagami, J., Imanishi, J., Kita, M., Ueda, Y., Iwakura, Y., Kataoka, K., Okanoue, T., Mazda, O. (2006): Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clinical and Experimental Immunology*. 146: 330–338.
9. Kitajima, S., Takuma, S., Morimoto, M. (1999): Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Experimental Animals*. 48: 137.
10. Landy, J., Ronde, E., English, N., Clark, S. K., Hart, A. L., Knight, S. C., Ciclitira, P. J., Al-Hassi, H. O. (2016): Tight junctions in inflammatory bowel diseases and

- inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 22: 3117-3126.
11. Ma, T. Y., Iwamoto, G. K., Hoa, N. T., Akotia, V., Pedram, A., Boivin, M. A., Said, H. M. (2004): TNF- α -induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF- κ B activation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 286: 367–376.
 12. Madsen, K. L. (2012): Enhancement of Epithelial Barrier Function by Probiotics. *Journal of Epithelial Biology and Pharmacology* 5, (Suppl 1-M8): 55-59.
 13. Mirsepasi-Lauridsen, H. C., Vallance, B. A., Krogfelt, K. A., Petersen, A. M. (2019): *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 32.
 14. Mu, Q., Tavella, V. J., Luo, X. M. (2018): Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Frontiers in Microbiology*. 9.
 15. Nagpal, R., Yadav, H., Marotta, F. (2014): Gut microbiota: The next-gen frontier in preventive and therapeutic medicine? *Frontiers in Medicine*.
 16. Poritz, L. S., Garver, K. I., Green, C., Fitzpatrick, L., Ruggiero, F., Koltun, W. A. (2007): Loss of the Tight Junction Protein ZO-1 in Dextran Sulfate Sodium Induced Colitis. *Journal of Surgical Research*. 140: 12–19.
 17. Rhodes, J. M. (2007): The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. 56: 610–612.
 18. Reinecker, H.-C., Steffen, M., Witthoef, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R. P., Raedler, A. (1993): Enhanced secretion of tumour necrosis factor- α , IL-6, and IL-1 β by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clinical and Experimental Immunology*. 94: 174-181.
 19. Sorbara, M. T., Pamer, E. G. (2018): Interbacterial mechanisms of colonization resistance and the strategies pathogens use to overcome them. *Mucosal Immunology*. 12.
 20. Srinivasan, R., Kesavelu, D., Veligandla, K. C., Muni, S. K., Mehta, S. C. (2018): *Lactobacillus reuteri* DSM 17938: Review of Evidence in Functional Gastrointestinal Disorders. *Pediatrics & Therapeutics*. 8.
 21. Strober, W., Fuss, I. J. (2011): Proinflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 140: 1756–1767.

22. Subramanian, S., Campbell, B. J., Rhodes, J. M. (2006): Bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 19: 475–484.
23. Suzuki, T., Hara, H. (2011): Role of flavonoids in intestinal tight junction regulation. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 22.
24. Wang, T., Teng, K., Liu, G., Liu, Y., Zhang, J., Zhang, X., ... Zhong, J. (2018): *Lactobacillus reuteri* HCM2 protects mice against Enterotoxigenic *Escherichia coli* through modulation of gut microbiota. *Scientific Reports*. 8.
25. Youakim, A., Ahdieh, M. (1999): Interferon- γ decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 276: G1279–G1288.
26. Zhang, Q., Li, Q., Wang, C., Liu, X., Li, N., Li, J. (2010): Enteropathogenic *Escherichia coli* changes distribution of occludin and ZO-1 in tight junction membrane microdomains in vivo. *Microbial Pathogenesis*. 48: 28-34.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Čakovcu, 19.6.1996. Osnovnu školu „Sveta Marija“ završavam u Svetoj Mariji te upisujem klasičnu gimnaziju „Srednja škola Čakovec“ u Čakovcu. Nakon srednjoškolskog obrazovanja upisujem preddiplomski studij biologije na Biološkom odsjeku, Sveučilišta Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku. Tijekom preddiplomskog studija sudjelujem u organiziranju društvenog događaja na fakultetu „BIOLOGiJA“ te „Tjedan mozga“. Nakon završetka preddiplomskog studija, 2018. godine upisujem Diplomski studij eksperimentalne biologije, smjer Fiziologija i imunobiologija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Uspješno polažem tečaj za osposobljavanje osoba koje rade sa pokusnim životinjama A kategorije. Također, sudjelujem u organiziranju „Noći biologije“ te Dana karijere na PMF-u „WorkIn' Science“. Tijekom studija odrađujem praksu u imunološkom laboratoriju Centra za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji Sveučilišta u Zagrebu.