

Bibliotheca IPC *Probiotica*  
*MMIX Vol. I*

Göran Molin

*Lactobacillus*  
*plantarum 299v*

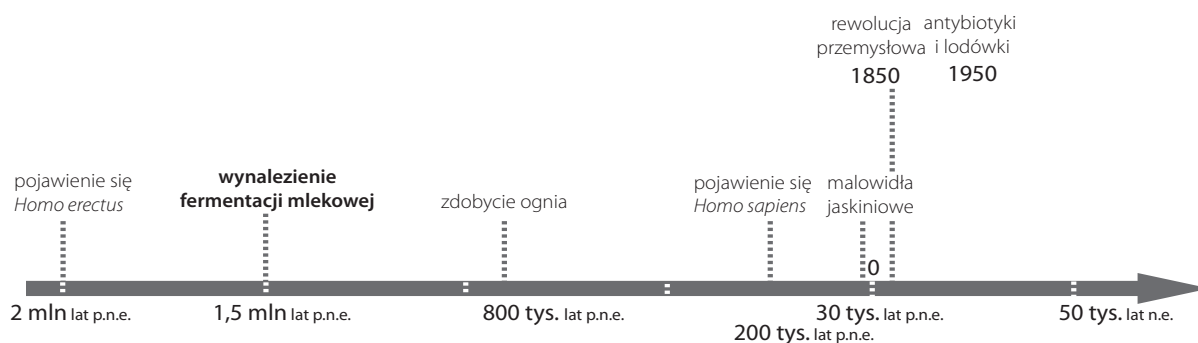
# Spis treści

I. <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	3
1. Konsumpcja żywych bakterii kwasu mlekowego (probiotyków)	3
II. Bakterie kwasu mlekowego, <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> oraz <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	4
2.1 Bakterie kwasu mlekowego, definicja	4
2.2 Gatunek <i>Lactobacillus plantarum</i>	5
2.3 Szczep bakteryjny <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	6
III. Wpływ na poszczególne narządy i układy organizmu	7
3.1 Jelitowa flora bakteryjna	7
3.1.1 Probiotyki i równowaga bakteryjna	7
3.1.2 Stan błony śluzowej jelita i ograniczona translokacja	10
3.2 Czynniki ryzyka choroby wieńcowej	12
3.3 Zespół jelita drażliwego	12
3.4 Zapalenie jelit	13
3.5 Modulacja układu immunologicznego	14
3.5.1 Ekspresja cytokin w komórkach, badania <i>in vitro</i>	14
3.5.2 Badania na szczurach	15
3.5.3 Odpowiedź immunologiczna u dzieci HIV seropozytywnych	15
3.5.4 Zmniejszenie ogólnoustrojowej reakcji zapalnej u pacjentów w stanie krytycznym	16
3.6 Biegunka wywołana przez <i>Clostridium difficile</i>	16
3.7 Aktywność antyoksydacyjna w surowicy	16
IV. Względy bezpieczeństwa	17
V. Piśmiennictwo	19

# I. *Lactobacillus plantarum* 299v

## 1. Konsumpcja żywych bakterii kwasu mlekowego (probiotyków)

Konsumpcja żywych bakterii kwasu mlekowego (lactic acid bacteria – LAB) zawartych w sfermentowanych pokarmach mlecznych od długiego czasu była stałym elementem diety człowieka. Istnieją archeologiczne dowody na to, że ludzkość od zarania dziejów stosowała tę technikę przetwarzania żywności i że została ona prawdopodobnie wynaleziona 1,5 miliona lat temu przez wczesne humanoidy (Leakey 1993; Leakey 1995) (patrz ryc. 1). Tym samym, ludzie od zarania dziejów spożywali znaczne ilości żywych LAB, przy czym prawdopodobnie bakterie związane z roślinami spożywano znacznie wcześniej niż związane z pokarmami mlecznymi. Fermentacja mlekowa jest najprostszą i często najbezpieczniejszą metodą konserwacji żywności stosowaną w Europie jeszcze przed rewolucją przemysłową, równie często jak obecnie w Afryce. Dlatego też nie jest niczym niezwykłym, że przewód pokarmowy człowieka (gastro-intestinal tract – GI) ewoluując, przystosował się do spożycia żywych LAB. Spożycie to uległo znacznemu zmniejszeniu w dwudziestym wieku, zwłaszcza w krajach rozwiniętych, co można uznać za przyczynę prowadzącą do powstawania zaburzeń żołądkowo-jelitowych, a nawet dysfunkcji układu immunologicznego.



Ryc. 1. Orientacyjna skala czasowa rozwoju gatunku ludzkiego, pokazująca chronologicznie używanie techniki fermentacji mlekowej.

Od kiedy zaczęto szerzej dostrzegać korzystny wpływ pewnych typów żywych bakterii na zdrowie człowieka, zaczęto je określać jako „probiotyki”. Początkowo pojęcie „probiotyki” oznaczało, że spożywanie pewnych typów żywych mikroorganizmów może zapewniać równowagę między dobroczynnymi i szkodliwymi bakteriami mikroflory przewodu pokarmowego (Parker 1974; Fuller 1989). Jednakże do dnia dzisiejszego pojęcie „probiotyków” jest używane częściej w znaczeniu ogólnym do opisywania żywych bakterii, które po spożyciu pozytywnie oddziałują na zdrowie człowieka.

## II. Bakterie kwasu mlekowego, *Lactobacillus*, *Lactobacillus plantarum* oraz *Lactobacillus plantarum* 299v

### 2.1 Bakterie kwasu mlekowego, definicja

Organizmy przekształcające węglowodany do kwasów karboksylowych, głównie kwasu mlekowego, są tradycyjnie nazywane bakteriami kwasu mlekowego (lactic acid bacteria – LAB). Mikrobiolodzy używają tego terminu od dawna. Już w 1919 roku duński mikrobiolog Orla Jensen próbował zdefiniować główne cechy LAB jako „prawdziwe bakterie kwasu mlekowego należące do naturalnej grupy nieruchliwych, nieprzetrwalnikujących, Gram-dodatnich ziarniaków i pałeczek, które podczas fermentacji cukru produkują głównie kwas mlekowy”. Bazując na podobnych definicjach, w grupie LAB utworzono odrębne jednostki taksonomiczne. Mimo to LAB nie tworzą w systematyce oddzielnie wyodrębnionej grupy ze względu na relacje międzygatunkowe, jakie zachodziły w trakcie ewolucji. Jest to jedynie grupa funkcjonalna, używana przez mikrobiologów, stosowana dla bakterii nieszkodliwych zarówno dla żywności, jak i dla zdrowia ludzkiego, które występują naturalnie w pożywieniu poddawanemu fermentacji mlekowej. Metaanalizy opublikowanych badań klinicznych wykazały, że różne rodzaje bakterii kwasu mlekowego mogą być używane w celu zapobiegania biegunkom wywołanym antybiotykami (D’Souza i in. 2002) oraz skrócenia czasu trwania ostrych biegunek u dzieci (Huang i in. 2002).

Z systematycznego punktu widzenia LAB obejmują stosunkowo szeroki zakres jednostek taksonomicznych. To, jak wiele rodzajów i gatunków powinno zaliczać się do LAB zależy od tego, ile wyróżnimy różnych typów pożywienia powstałego w wyniku fermentacji mlekowej oraz od wymogów jakościowych, jakie wyznaczymy tym produktom. Na przykład: im wyższa jest jakość spożywcza produktów fermentacji mlekowej, tym mniej typów bakterii zwykle bierze udział w fermentacji końcowej. W przypadku produktów niższej jakości wszystkie typy niepożądanych organizmów mogą być również obecne w produkcie końcowym. Jedynym warunkiem koniecznym dla wszystkich organizmów związanych z fermentacją mlekową jest ten, że muszą one produkować kwas mlekowy oraz być nieszkodliwe w przypadku konsumpcji w dużych ilościach nawet dla konsumentów z chorobami osłabiającymi ich układ immunologiczny. Rodzaje bakterii produkujących kwas mlekowy, pojawiające się często w dużych ilościach w tradycyjnych, samoistnie fermentujących produktach fermentacji mlekowej to: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, oraz *Streptococcus thermophilus* (jak również inne, blisko spokrewnione gatunki). Rodzaje *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* oraz *Oenococcus* mają ze sobą stosunkowo bliskie powiązania filogenetyczne i mogą być określane wspólnym, potocznym mianem „bakterii mlekowych”. Jednakże bakterie z rodzajów *Lactococcus* oraz *S. thermophilus* nie mają nic wspólnego, pod względem filogenetycznym, z bakteriami mlekowymi poza przynależnością do tej samej ogólnej grupy ewolucyjnej tzn. gromady *Firmicutes* (bakterii Gram-dodatnich, mających niską zawartość guaniny i cytozyny w genomie).

## 2.2 Gatunek *Lactobacillus plantarum*

*L. plantarum* jest gatunkiem bakterii należącym do ogromnego i względnie różnorodnego rodzaju *Lactobacillus*, który składa się z około 90 nazwanych i potwierdzonych gatunków. Tradycyjnie *Lactobacillus spp.* dzieli się na grupy funkcjonalne w zależności od ich zdolności fermentacyjnych: bezwzględnie homofermentujące (Grupa I), względnie heterofermentujące (Grupa II) oraz bezwzględnie heterofermentujące (Grupa III) (Kandler i Weiss 1986). Grupa I fermentuje heksozy wyłącznie do kwasu mlekowego, lecz nie jest w stanie fermentować glukonianu ani pentoz, podczas gdy Grupa II fermentuje heksozy do kwasu mlekowego, ale jest też zdolna do fermentacji pentoz i/lub glukonianu. Grupa III fermentuje heksozy do kwasu mlekowego, kwasu octowego i/lub etanolu oraz dwutlenku węgla. *L. plantarum* jest bakterią względnie heterofermentującą. Szczep wzorcowy *L. plantarum* to ATCC 14917 (Handler i Weiss 1986).

*L. plantarum* różni się od wielu innych przedstawicieli gatunku *Lactobacillus* w następujących aspektach:

- 1) *L. plantarum* posiada stosunkowo duży genom, co wskazuje na zdolności przystosowywania się do różnych warunków (Kleerebezem i in. 2003).
- 2) *L. plantarum* wykazuje zadziwiającą zdolność do fermentacji wielu różnych węglowodanów.
- 3) *L. plantarum* przejawia wysokie zapotrzebowanie na mangan w okresie wzrostu oraz posiada zdolność gromadzenia dużych ilości manganu (Archibald and Fridovich 1981b). Pierwiastek ten zapewnia *L. plantarum* ochronę przed toksycznym działaniem tlenu poprzez redukcję wolnych rodników tlenu do nadtlenku wodoru ( $H_2O_2$ ) (Archibald and Fridovich 1981a). Powstały w ten sposób nadtlenek wodoru  $H_2O_2$  może być przekształcony do tlenu  $O_2$  oraz wody przez pseudokatalazę z udziałem manganu (Kono i Fridovich 1983a, 1983b).
- 4) *L. plantarum* posiada wysoką tolerancję dla niskiego pH (Daeschel oraz Nes 1995). Fakt, iż bakterie *L. plantarum* często dominują w produktach fermentacji mlekowej, w których pH wynosi zwykle poniżej 4.0 oraz jest w stanie przeżyć w kwaśnym środowisku ludzkiego żołądka (Johansson i in. 1993), wskazuje na ich wysoką odporność na warunki kwasowe.
- 5) *L. plantarum* może też wykazywać zdolność tannazy (Osawa i in. 2000; Vaquero i in. 2004) oraz jest zdolny do metabolizowania kwasów fenolowych (Barthelmebs i in. 2000; Barthelmebs i in. 2001).

*L. plantarum* często naturalnie występuje w dużych ilościach w wielu pokarmach poddanych fermentacji mlekowej, a zwłaszcza w pokarmach pochodzenia roślinnego na przykład: w marynowanych oliwkach (Fernández Gonzalez i in. 1993), kaparach (kapar ciernisty; Pulido i in. 2005), kiszanej kapuście (Dedicatoria i in. 1981), kiszonych ogórkach (McDonald i in. 1993), zakwasie chlebowym (Lönner i Ahrné 1995), nigeryjskim ogi (robionym z kukurydzy lub sorgo) (Johansson 1995a), etiopskim kocho (robionym ze skrobi z *Ensete ventricosum*) (Gashe 1987; Nigatu 1998), etiopskim zakwasie robionym z miłki abisyńskiej (*Eragrostis tef*) (Gashe 1987; Nigatu 1998) oraz manioku (Oyewole oraz Odunfa 1990; Moorthy oraz Mathew 1998). Dlatego też jest oczywiste, że osoby spożywające produkty poddane fermentacji mlekowej pochodzenia roślinnego spożywają również duże ilości bakterii *L. plantarum*. Co więcej, *L. plantarum* pojawia się też w soku winogronowym oraz w winie (Vaquero i in. 2004).

*L. plantarum* często występuje naturalnie na powierzchni błony śluzowej ludzkiego przewodu pokarmowego, od jamy ustnej aż do odbytnicy (Molin i in. 1993; Ahrné i in. 1998).

Genotypowanie dwudziestu różnych szczepów *L. plantarum* pochodzących z różnych źródeł, było przeprowadzane z użyciem mikromacierzy zawierających zbiór małych fragmentów genomowych szczepu *L. plantarum* WCFS1 (Molenaar i in. 2005). Wykazano, że geny odpowiedzialne za transport cukrów i ich katabolizm znacznie różniły się między poszczególnymi szczepami, podczas gdy geny odpowiedzialne za biosyntezę lub rozkład związków o złożonej budowie, takich jak białka, lipidy i DNA pozostawały niezmienione (Molenaar i in. 2005).

## 2.3 Szczep bakteryjny *Lactobacillus plantarum* 299v

Szczep *L. plantarum* 299v (=DSM 9843) został wyizolowany z błony śluzowej ludzkiego jelita (Molin 1993) i jest zaliczany do podgrupy genetycznej w obrębie gatunku *L. plantarum* (Johansson i in. 1995b), którego przedstawiciele występują naturalnie na powierzchni błony śluzowej ludzkiego jelita, ale są również obecne w tradycyjnych pokarmach uzyskiwanych drogą fermentacji mlekowej (Molin i in. 1993; Ahrné i in. 1998). Udowodniono, że szczepy z tej podgrupy są zdolne do przywierania do komórek ludzkiej śluzówki *in vitro*, oraz że adhezja jest oparta na mechanizmie wiązania mannozy (Adlerberth i in. 1996; Ahrné i in. 1998).

Co więcej, szczepy *L. plantarum* należące do tego konkretnego podtypu często dominują wśród pałeczek kwasu mlekowego *Lactobacillus* u zdrowych osób zarówno w śluzówce odbytnej, jak i w jamie ustnej (Molin i in. 1993; Ahrné i in. 1998). Mechanizm przylegania oparty na wiązaniu mannozy okazał się mieć kluczowe znaczenie dla właściwości modulacyjnych układu immunologicznego przez *L. plantarum* 299v, co potwierdzono w badaniach *in vitro* z wykorzystaniem linii ludzkich komórek nabłonkowych okrężnicy HT-29 (McCracken i in. 2002). Ponadto udowodniono, że mechanizm ten warunkuje również zdolność *L. plantarum* 299v do zmniejszania translokacji bakterii u zakażonych szczurów (zob. niżej).

Szczep *L. plantarum* 299v, który został wyizolowany ze zdrowej błony śluzowej ludzkiego jelita (Molin i in. 1993; Johansson i in. 1993; Johansson i in. 1995b), opatentowano w Europie i USA (właścicielem wszystkich praw jest Probi AB, Lund, Sweden). Blisko spokrewnione szczepy *L. plantarum* mogą być określone i identyfikowane poprzez analizę całkowitego DNA chromosomalnego z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych (restriction endonuclease analysis – REA) takich jak *EcoRI* i *Clal* oraz tradycyjnej elektroforezy żelowej z wykorzystaniem agarozы (Johansson i in. 1995b). Metoda ta została użyta pomyślnie do zdefiniowania i wyizolowania szczepu *L. plantarum* 299v z bioptatów błony śluzowej w badaniach przeprowadzonych u ludzi (Johansson i in. 1993). *L. plantarum* 299v może być również wyizolowany z materiału biopsyjnego błony śluzowej jelita czczego oraz odbytnej po jego podaniu doustnym (Johansson i in. 1993). U niektórych osób *L. plantarum* 299v może nawet dominować wśród flory bakterii mlekowych błony śluzowej po 11 dniach po zakończeniu jego podawania (Johansson i in. 1993).

Co więcej, ekspresja genów *L. plantarum* 299v została wykazana *in vivo* w ludzkich jelitach (de Vries i in. 2006). Przed operacją trzech pacjentów, u których zdiagnozowano raka okrężnicy przyjmowali *L. plantarum* 299v ( $10^{11}$  CFU na dobę przez jeden tydzień). Całkowite RNA zostało wyizolowane z błony śluzowej chirurgicznie usuniętych fragmentów tkanki jelitowej i zhybrydowane do DNA mikromacierzy zawierającej klony odpowiadające genom *L. plantarum*. Obecność żywych bakterii *L. plantarum* 299v na śluzówce została potwierdzona, a spożyte komórki

*L. plantarum* 299v były metabolicznie aktywne u wszystkich pacjentów, co potwierdziło wykrycie około 10% genów, które podlegały ekspresji na mikromacierzy DNA (de Vries i in. 2006).

*L. plantarum* 299v zawiera cztery plazmidy o rozmiarach 4, 9, 15 oraz 21 megadaltonów (Mda) (Johansson i in. 1995d). Szczep ten posiada taką samą mapę restrykcyjną rybosomalnego RNA jak szczep wzorcowy *L. plantarum* (ATCC 14917T) z czterema operonami ujawnionymi po rozszczepieniu z udziałem endonukleazy *EcoR1* oraz pięcioma operonami po rozszczepieniu z *HindIII* (Johansson i in. 1995d).

Gdy genom *L. plantarum* 299v został porównany z 19 innymi szczepami *L. plantarum* na mikromacierzach zawierających zbiór fragmentów genomowych szczepu *L. plantarum* WCFS1 (Molenaar i in. 2005) udowodniono, że *L. plantarum* 299v różni się genetycznie od wszystkich pozostałych badanych szczepów i był najbliższym spokrewniony ze szczepem *L. plantarum* 299 (=DSM6595) (Molenaar i in. 2005).

### III. Wpływ na poszczególne narządy i układy organizmu

#### 3.1 Jelitowa flora bakteryjna

##### 3.1.1 Probiotyki i równowaga bakteryjna

Powszechnie wiadomo, że duża ilość bakterii mlekowych neutralizuje inne patogenne lub potencjalnie patogenne bakterie, zarówno w żywności poddanej fermentacji mlekowej jak i ludzkim jelicie (De Vuyst oraz Vandamme 1994a, 1994b). Początkowo pojęcie „probiotyki” oznaczało, że na równowagę pomiędzy dobroczynnymi bakteriami a bakteriami szkodliwymi mikroflory przewodu pokarmowego pozytywny wpływ może mieć spożywanie pewnych typów żywych mikroorganizmów (Parker 1974; Fuller 1989). *L. plantarum* 299v po doustnym podaniu u ludzi, identyfikowane są w dużych ilościach na błonie śluzowej odbytu (Nobaek i in. 2000) oraz w stolcu (Johansson i in. 1998; Nobaek i in. 2000; Önning i in. 2003; Goossens i in. 2003; Berggren i in. 2003; Goossens i in. 2005). *L. plantarum* 299v przylegają do błony śluzowej migdałków bezpośrednio po doustnym podaniu (Stjernquist-Desatnik i in. 2000). *L. plantarum* 299v zwiększa całkowitą liczbę bakterii mlekowych zdolnych do przeżycia w stolcu (Goossens i in. 2003; Berggren i in. 2003; Goossens i in. 2005; Goossens i in. 2006a; Goossens i in. 2006c).

Co więcej, obecność żywych i aktywnych metabolicznie *L. plantarum* 299v na śluzówce ludzkiego jelita po podaniu bakterii w formie napoju została potwierdzona poprzez hybrydyzację do DNA mikromacierzy, zawierającej klony pokrywające się z genomem *L. plantarum* (De Vries i in., 2006).

Nawet jeśli dzisiejsza definicja probiotyków jest używana w szerszym zakresie, probiotykami pozostają te same mikroorganizmy mające dobroczynne działanie po podaniu ludziom i zwierzętom. Pierwotna idea przeciwdziałania szkodliwym bakteriom w przewodzie pokarmowym ciągle pozostaje interesująca. W każdym przypadku pytanie brzmi: które elementy flory jelitowej powinny być blokowane? To, że probiotyki powinny hamować rozwój patogenów jest oczywiste, jednak mikroflora jelitowa składa się z wielu organizmów, nie tylko patogennych. Niestety, ludzka

flora jelitowa jest słabo zbadana i wiele jej składników nie zostało jeszcze systematycznie opisanych nawet na poziomie rodzaju (Langendijk i in. 1995). Przykłady często pojawiających się składników ludzkiej flory jelitowej, które prawdopodobnie mogą mieć negatywny wpływ na zdrowie i przez to powinny być zwalczane to *Bacteroides fragilis* (oraz być może inne gatunki *Bacteroides*) oraz gatunki z rodziny *Enterobacteriaceae* (na przykład *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*). Te grupy bakterii występujące w normalnej florze są również często przyczyną infekcji brzusznych i sepsy.

Gatunki *Lactobacillus* często są obecne w różnych ilościach w ludzkim przewodzie pokarmowym, jednak zwykle występują one w mniejszych ilościach niż inne składniki normalnej flory takie jak na przykład: *Bacteroides*, *clostridia/eubacteria/ruminococci* (Moore i Holdeman 1974; Finegold i in. 1983; Wang i in. 2005). Jednakże spożywane probiotyki nie tylko działają w okrężnicy, ale też wchodzą w kontakt ze śluzówką jamy ustnej, a następnie śluzówką jelita oraz jej mikrobiologicznymi mieszkańcami na całej długości jelita cienkiego. Oznacza to, że probiotyki kontaktują się z olbrzymią powierzchnią, którą zamieszkują populacje bakteryjne mniejsze niż te obecne w okrężnicy. Działanie bakterii w jelicie cienkim prawdopodobnie ma również wpływ na środowisko w okrężnicy.

W testach *in vitro* wykazano, że *L. plantarum* 299v (DSM 9843) posiada właściwości przeciwbakteryjne, działając przeciw takim, potencjalnie patogennym gatunkom jak: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* oraz *Enterococcus faecalis* (Jacobsen i in. 1999) i posiada stosunkowo silne właściwości antagonistyczne w stosunku do *Salmonella enterica* (Hütt i in. 2006) oraz bardziej umiarkowane działanie antagonistyczne w stosunku do *Helicobacter pylori* (Hütt i in. 2006).

Ponadto, kiedy zdrowym ochotnikom podawano mieszankę szczepów bakterii mlekowych zawierającą *L. plantarum* 299v, ilość bakterii mlekowych w jelitach wzrastała. Występowało jednocześnie zmniejszenie liczby Gram-ujemnych bakterii beztlenowych *Enterobacteriaceae* oraz redukujących siarczany *Clostridia* (laseczek beztlenowych) (Johansson i in. 1993).

*Enterobacteriaceae* są genetycznie blisko spokrewnioną rodziną zawierającą wiele gatunków patogennych, a w pewnych warunkach zazwyczaj niepatogeni przedstawiciele z tej grupy mogą przejawiać potencjalne właściwości chorobotwórcze np. w sytuacjach osłabienia obrony immunologicznej gospodarza. Antagonistyczny efekt *L. plantarum* 299v w stosunku do *Enterobacteriaceae* (Mao i in. 1996a; Adawi i in. 1997; Wang i in. 2001; Osman i in. 2005) oraz Gram-ujemnych anaerobów (Mao i in. 1996a) został potwierdzony w badaniach eksperymentalnych przeprowadzonych u szczurów przy użyciu modeli doświadczalnych w ciężkich stanach klinicznych. Wykazano również, że szczep *L. plantarum* 299v hamuje adhezję enteropatogennych oraz enterokrwotocznych *Escherichia coli* do komórek nabłonkowych jelita *in vitro* poprzez stymulowanie ekspresji mucyny, co oznacza, że komórki nabłonkowe jelita produkują więcej mucyn, które ograniczają dostęp patogenów do ich powierzchni (Mack i in. 1999; Mack i in. 2003). Zdolność *L. plantarum* 299v do redukcji reakcji wydzielniczej w komórkach nabłonkowych jelita w odpowiedzi na działanie enteropatogennych *E. coli* (EPEC) została wykazana w badaniach *in vitro* (Michail i Abernathy, 2002). Zaobserwowany efekt był spowodowany zmniejszonym przywieraniem EPEC do komórek nabłonka (Michail i Abernathy, 2002). Wykazano również, że podczas kolonizacji bakterie *L. plantarum* 299v konkurują z *E. coli* u gnotobiotycznych szczurów (Herías i in. 1999).

Gram-ujemne bakterie beztlenowe są częstą przyczyną zakażeń wtórnych po zabiegach operacyjnych jamy brzusznej (Nichols 1980; Offenbartl i Bengmark 1990; Wittman 1991). Co więcej,



bakterie Gram-ujemne zawsze produkują endotoksyny oraz wywołują gwałtowne reakcje zapalne, nawet gdy są obecne w małych ilościach. Sugeruje się również, że bakterie te mogą wytwarzać w jelitach substancje rakotwórcze (Rowland 1992; Roberfroid i Gibbson 1994). U szczurów narażonych na ostre uszkodzenie wątroby wszczepienie Gram-ujemnych *Bacteroides fragilis* wywołuje nasilenie zmian hepatotoksycznych (Adawi i in. 1999a). Niektóre szczepy *B. fragilis* mogą wydzielać toksynę, która aktywuje zależne od beta kateniny przekazywanie sygnału w jądrze komórkowym nabłonka jelita grubego, co może mieć związek z efektem onkogennym (Wu i in. 2003). Hamujący efekt *L. plantarum* 299v w stosunku o bakterii *Bacteroides* został wykazany w kontrolowanej próbie z zastosowaniem placebo u pacjentów z nieaktywnym wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego (Goossens i in. 2006b).

Grupa redukujących siarczany *Clostridia* może zawierać podgrupy produkujące toksyny. Poza tym redukujące siarczany *Clostridia* produkują siarkowodór ( $H_2S$ ), który jest czynnikiem genotoksycznym nawet w tak niewielkim stężeniu jak 250  $\mu\text{mol/L}$ , co stanowi ilość podobną do tej, jaka znajduje się w ludzkiej okrężnicy (Attene-Ramos i in. 2006).

W badaniu przeprowadzonym w Tanzanii szczep *L. plantarum* 299v był wykorzystywany jako kultura startowa do produkcji zbożowego napoju poddawanego fermentacji mlekowej o nazwie Togwa. *L. plantarum* 299v był używany do produkcji 50% testowego Togwa, podczas gdy pozostałe 50% było produkowane metodami tradycyjnymi (Kingamkono i in. 1999).

*L. plantarum* są obecne w dużych ilościach w samoistnie fermentującym napoju Togwa (Mugula 2001). U dzieci poniżej 5 roku życia, które spożywały ten produkt raz dziennie przez 13 kolejnych dni badano ilość enteropatogenów kałowych, takich jak *Campylobacter*, enteropatogennych *Escherichia coli*, *Salmonella* oraz *Shigella* i stwierdzono, że w czasie badania procent dzieci z wyizolowanymi enteropatogenami kałowymi znamienne się zmniejszył (Kingamkono i in. 1999).

Spożywanie probiotyków może pozytywnie wpływać na florę przewodu pokarmowego prowadząc do zmniejszenia ilości bakterii potencjalnie patogennych, co zaobserwowano przy zliczaniu płytek z *Enterobacteriaceae* oraz redukujących siarczany *Clostridia* (Johansson 1993). Badania przeprowadzone metodą podwójnie ślepej próby pod kontrolą placebo na zdrowych ochotnikach, którym podawano *L. plantarum* 299v w napoju owocowym ( $2 \times 10^{10}$  CFU na dobę przez 3 tygodnie) wykazały, że w stolcu zwiększyła się całkowita ilość kwasów karboksylowych (Johansson i in. 1998) oraz stężenie kwasu octowego i propionowego (Johansson i in. 1998). Nie wykazano natomiast zdolności do produkcji kwasu propionowego przez bakterie *L. plantarum* 299v. Kwasy karboksylowe są produkowane przez mikroflorę przewodu pokarmowego, więc zmiana ich zawartości w stolcu wskazuje na istotne zmiany mikroflory bakteryjnej. Wzrost stężenia kwasu octowego i propionowego należy uważać za zjawiska korzystne dla zdrowia. Obydwa rodzaje krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych są wykorzystywane jako źródło energii przez komórki błony śluzowej jelita. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe są głównym źródłem energii dla komórek błony śluzowej okrężnicy. Dlatego też zwiększona zawartość tych kwasów w świetle jelita wpływa korzystnie na stan śluzówki.

Co więcej, wchłonięty kwas propionowy przechodzi poprzez krążenie wrotne do wątroby, gdzie wpływa korzystnie zarówno na metabolizm tłuszczów jak i ogranicza występowanie stanów zapalnych. Zdrowe osoby otrzymujące *L. plantarum* 299v odczuwały zmniejszenie intensywności wzdęć podczas okresu trwania terapii (Johansson i in. 1998), co mogło być spowodowane zmniejszeniem ilości bakterii wytwarzających gazy w przewodzie pokarmowym.

### 3.1.2 Stan błony śluzowej jelita i ograniczona translokacja

Działanie *L. plantarum* 299v na stan błony śluzowej jelita i jej funkcję ochronną zostało dogłębnie zbadane podczas eksperymentów na szczurach. Kiedy oceniano stan śluzówki, używając jako wskaźnika zawartość w niej białek lub rRNA i DNA, zaobserwowano znaczne polepszenie kondycji szczurów z ciężkim uszkodzeniem wątroby, którym wcześniej podano *L. plantarum* 299v (Kasravi i in. 1997; Adawi i in. 1999b). Polepszenie stanu śluzówki wykazywały również szczury z zapaleniem jelita cienkiego i okrężnicy, którym podawano *L. plantarum* 299v (Mao i in. 1996a). W badaniu tym mierzono przenikalność EDTA (kwasu etylenodiaminotetraoctowego) przez śluzówkę i udowodniono, że jest ona mniejsza u zwierząt otrzymujących *L. plantarum* 299v (Mao i in. 1996a).

Translokacja – przejście żywych bakterii przez błonę nabłonkową do blaszki właściwej, a następnie do krezkowych węzłów chłonnych oraz możliwie do innych tkanek (Berg i Garlington 1979), może być ograniczona dzięki poprawie stanu błony śluzowej jelita.

Translokacja może być badana u szczurów z ciężkim uszkodzeniem wątroby wywołanym wstrzyknięciem D-galaktozoaminy powodującej ciężkie zapalenie wątroby (Kasravi i in. 1996a; Kasravi i in. 1996b). 24 godziny po wywołaniu uszkodzenia wątroby, bakterie jelitowe można było znaleźć w narządach takich jak wątroba i śledziona oraz we krwi wrotnej i tętniczej. Uszkodzenie wątroby nie wpływa bezpośrednio na błonę śluzową jelita, jednak obrona immunologiczna zwierzęcia jest poważnie osłabiona, co pozwala translokującym bakteriom na przemieszczanie się poza krezkowe węzły chłonne i wątrobę. Wykazano, że podanie zwierzętom *L. plantarum* 299v wpływa na znaczne ograniczenie translokacji bakterii ze światła przewodu pokarmowego do krwi oraz innych narządów i tkanek organizmu (Adawi i in. 1997; Adawi i in. 1999a; Kasravi i in. 1997; Wang i in. 2001; Osman i in. 2005).

Dowiedziano również, że niektóre inne szczepy gatunku *Lactobacillus* również dają pozytywne efekty w leczeniu niewydolności wątroby (Adawi i in. 1997), jednakże szczep *L. plantarum* 299v wydaje się być w tym przypadku szczególnie efektywny.

Interesujące są wyniki identyfikacji typów bakterii translokujących u szczurów z niewydolnością wątroby (Wang i in. 2001). U szczurów, które nie otrzymywały bakterii mlekowych większość bakterii znalezionych w wątrobie pochodziło z dominujących populacji mikroflory jelitowej tzn. *L. animalis*, *L. reuteri* oraz *L. acidophilus* (*Lactobacillus* są znacznie liczniejsze u szczurów niż u ludzi), ale również *Proteus vulgaris*, *Bacteroides distasonis*, *Enterococcus faecalis* oraz *Staphylococcus aureus*. *P. vulgaris* oraz *S. aureus* znajdowano w krwi tętniczej (Wang i in.) Jednakże podawanie zwierzętom *L. plantarum* 299v przez 8 dni przed uszkodzeniem wątroby nie tylko zmniejszyło tempo translokacji do wątroby, ale również hamowało przedostawanie się do krwi bakterii innych niż *L. animalis*, *L. reuteri* oraz *L. acidophilus*, których obecność stwierdzono w wątrobie (Wang i in. 2001). Tym samym podanie *L. plantarum* nie tylko zmniejsza tempo translokacji, ale też najwyraźniej kontroluje mikroflorę jelitową i zwiększa dominację bakterii *Lactobacillus*. Wypada też zaznaczyć, że bakterie *L. plantarum* 299v nigdy nie zostały znalezione w organizmie poza jelitami pomimo dużych dawek podawanych w terapii (Wang i in. 2001). Podawanie *L. plantarum* 299v szczurom w wodzie pitnej przez tydzień zmniejszyło przepuszczalność jelita wywołaną przez *E. coli* (Mangell i in. 2002). Wykazano to w badaniach segmentów jelita w specjalnej komorze Ussinga, podczas których mierzono ich przepuszczalność po podaniu mannitolu. Wystawienie na działanie bakterii *E. coli* w komorze Ussinga zwykle zwiększa przepuszczalność jelit, jednak podawanie żywym szczurom *L. plantarum* 299v likwidowało wzrost przepuszczalności (Mangell i in. 2002).

U szczurów z niewydolnością wątroby wiele z bakterii jelitowych mających zdolność translokacji dociera do wątroby, co zwiększa ryzyko zapalenia i znacznie pogarsza jej stan. To pogorszenie można zmierzyć poprzez pomiar aktywności enzymów wątrobowych we krwi. W przypadku niewydolności wątroby wykazano, że terapia z zastosowaniem *L. plantarum* 299v zmniejsza aktywność transaminazy asparaginowej oraz aminotransferazy alaninowej we krwi wskazując na polepszenie stanu wątroby (Adawi i in. 1997; Kasravi i in. 1997; Adawi i in. 1999b).

Profilaktyczne działanie *L. plantarum* 299v w stosunku do translokacji zauważono również podczas innych eksperymentów na szczurach. *L. plantarum* 299v znacznie zmniejsza translokację u szczurów z zapaleniem jelita cienkiego i okrężnicy wywołanym przez metotreksat (Mao i in. 1996a). W tym eksperymencie badano grupę zwierząt ze zmienioną zapalnie i uszkodzoną błoną śluzową jelit w odróżnieniu od populacji zwierząt z niewydolnością wątroby, u których śluzówka pozostawała nie zmieniona. Podanie bakterii mlekowych szczurom z zapaleniem jelita cienkiego i okrężnicy zmniejszało uszkodzenia błony śluzowej powstałe w wyniku chemioterapii (Mao i in. 1996a). Zmniejszoną translokację ze światła jelita do krążenia obwodowego zaobserwowano również po podaniu *L. plantarum* 299v u szczurów z zapaleniem trzustki (Mangiante i in. 2001), z wywołanym siarczanem sodu zapaleniem okrężnicy (Osman i in. 2004) oraz u szczurów z posocznicą (Mangell i in. 2006).

Istnieje kilka teorii tłumaczących to, w jaki sposób *L. plantarum* 299v może poprawiać stan śluzówki i zmniejszać tempo translokacji. Jedną z nich tłumaczy to tradycyjnym efektem probiotycznym, w którym przyjmowane szczepy probiotyczne zwalczają patogenne bakterie. Te agresywne i niebezpieczne bakterie mogą wywoływać i utrzymywać stan zapalny, mogą być też szczególnie przystosowane do translokacji i zdolne do zwalczania obrony immunologicznej gospodarza. Jest również możliwe, że szczepy probiotyczne nie tylko neutralizują niebezpieczne składniki flory bakteryjnej, ale też mogą wspomagać jej dobroczynne elementy. Ścisłe rzecz ujmując, dominacja mlekowych bakterii zamieszkujących jelita szczurów zwiększyła się po podawaniu *L. plantarum* 299v (Wang i in. 2001). Stwierdzone zostało to również u ludzi, kiedy ilość kwasu propionowego w stolcu wzrastała po spożyciu *L. plantarum* 299v, ponieważ szczep 299v nie jest zdolny do samodzielnej produkcji tego kwasu (Johansson i in. 1998).

Z drugiej strony wzmocnienie efektu bariery ochronnej może być też spowodowane immunomodulacją (patrz niżej) oraz stymulacją wytwarzania mucyn w komórkach ludzkiej śluzówki. Co więcej, w eksperymentach na szczurach z posocznicą dowiedziono, że zależna od mannozy zdolność adhezji *L. plantarum* 299v była istotna dla ich zdolności blokowania translokacji (Mangell i in. 2006).

W prospektywnym badaniu z losowym doбором próby na pacjentach przechodzących planowe operacje jamy brzusznej wykazano, że stężenie immunoglobuliny klasy M (IgM) na powierzchni śluzówki osób z prawidłową błoną śluzową jelita cienkiego zwiększyło się w grupie kontrolnej, podczas gdy u pacjentów, którym przed operacją podawano *L. plantarum* 299v pozostawało niezmienione (Woodcock i in. 2004). Wzrost stężenia IgM może wskazywać na translokację bakterii (Woodcock i in. 2001; Woodcock i in. 2004).

### 3.2 Czynniki ryzyka choroby wieńcowej

Wykazano, że *L. plantarum* 299v zawarty w napoju ProViva zmniejsza wiele czynników ryzyka choroby wieńcowej u osób szczególnie na nie narażonych. W jednym z badań przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby pod kontrolą placebo wykazano że u mężczyzn, u których stwierdzono nieznacznie podwyższone stężenie cholesterolu, po spożyciu napoju ProViva zawierającego *L. plantarum* 299v, dochodzi do zmniejszenia stężenia cholesterolu całkowitego oraz cholesterolu LDL (Bukowska i in. 1998). W badaniu uczestniczyło 30 osób podzielonych na dwie grupy, z których jedna otrzymywała 200 ml napoju owocowego zawierającego  $5 \times 10^7$  CFU *L. plantarum* 299v w 1 ml przez 6 tygodni, natomiast grupa placebo otrzymywała napój bez bakterii mlekowych. Spadek stężenia cholesterolu był niewielki, jednak statystycznie znaczący (Bukowska i in. 1998). Ale co bardziej zaskakujące, w tym samym badaniu obserwowano znamienne ( $p < 0,001$ ) o 13,5% zmniejszenie stężenia fibrynogenu w surowicy krwi (Bukowska i in. 1998). Fibrynogen jest białkiem ostrej fazy, którego podwyższone stężenie wskazuje na stan zapalny w organizmie, oraz stanowi niezależny czynnik ryzyka w chorobie wieńcowej (Kannel i in. 1987).

Wyniki późniejszego, także kontrolowanego placebo i przeprowadzonego metodą podwójnie ślepej próby badania na 38 zdrowych palaczach papierosów wykazały, że spożywanie napoju ProViva w ilości 400 ml na dobę przez sześć tygodni nie tylko znacznie zmniejszyło stężenie fibrynogenu, ale też izoprostanów F<sub>2</sub> i IL-6 będących także markerami stanów zapalnych (Naruszewicz i in. 2002). Co więcej, *L. plantarum* 299v zawarty w ProViva pozytywnie wpływał na ciśnienie tętnicze krwi oraz odpowiedź na insulinę i leptynę (Naruszewicz i in. 2002).

### 3.3 Zespół jelita drażliwego

Zespół jelita drażliwego (ang. irritable bowel syndrome – IBS) występuje często, jednak jego przyczyna nie jest znana. Zespół ten nie jest odrębną chorobą, lecz raczej stanowi zbiór zaburzeń powodujących różne objawy takie jak: bóle brzucha, biegunkę, zaparcia lub zmienną aktywność jelit. Nieznajomość przyczyny tego schorzenia stwarza duże problemy diagnostyczne. Podejmowano liczne próby określenia kryteriów, które umożliwiłyby postawienie pewnej diagnozy w tym zespole (Manning i in. 1978; Thompson i in. 1992).

Uważa się, że od 20 do 50% pacjentów zgłaszających się do gastroenterologa ma objawy IBS, jednak należy zaznaczyć, że większość osób z objawami zespołu jelita drażliwego w ogóle nie szuka pomocy medycznej (Maxvell i in. 1997). IBS jest przewlekłym, nawracającym schorzeniem, które prawdopodobnie pojawia się u większości dorosłych w pewnym okresie ich życia.

U połowy pacjentów objawy pojawiają się przez ukończeniem 35. roku życia, a u 40% pacjentów między 35-50. rokiem życia (Maxvell i in. 1997). IBS stwierdzono u 18% dorosłej populacji Bristolu w Wielkiej Brytanii (Heaton i in. 1992).

*L. plantarum* 299v zawarty w napoju ProViva podawano pacjentom z IBS w dwóch badaniach przeprowadzonych metodą podwójnie ślepej próby i kontrolowanych placebo w Polsce (Niedzielin i in. 2001) oraz w Szwecji (Nobaek i in. 2000). W obydwu badaniach pacjenci zostali podzieleni na dwie grupy, z których pierwsza otrzymywała *L. plantarum* 299v, natomiast druga podobny napój pozbawiony *L. plantarum* 299v (placebo). Badanie szwedzkie objęło pacjentów z objawami o lekkim lub umiarkowanym nasileniu, głównie o charakterze wzdęć i dolegliwości

bólowych brzucha (Nobaek i in. 2000), podczas gdy polskie badanie przeprowadzono wśród pacjentów, którzy oprócz wzdęć i bólu doświadczali problemów z nieregularnymi wypróżnieniami i zmienną konsystencją stolca (Niedzielin i in. 2001).

W przypadku polskiego badania stopień intensywności kilku objawów IBS zmniejszył się w grupie, której podawano *L. plantarum* 299v, a odsetek pacjentów całkowicie wolnych od objawów był wyższy niż w grupie placebo (Niedzielin i in. 2001).

W badaniu szwedzkim *L. plantarum* 299v znacznie zmniejszał subiektywne odczuwanie wzdęć (Nobaek i in. 2000). Bóle również uległy znacznemu zmniejszeniu zarówno w grupie poddawanej terapii, jak i w grupie z placebo, jednak efekt był bardziej wyraźny w grupie, której podawano *L. plantarum*. 12 miesięcy po leczeniu, pacjenci którym podawano *L. plantarum* 299v deklarowali ogólną poprawę funkcjonowania przewodu pokarmowego w porównaniu z grupą otrzymującą placebo (Nobaek i in. 2000).

Wzdęcia i bóle odczuwane przez pacjentów z IBS mogą być powodowane przez nieprawidłową fermentację w jelitach prowadzącą do zwiększonej produkcji gazu, szczególnie wodoru (King i in. 1998). W małym badaniu wykonanym metodą podwójnie ślepej próby i kontrolowanym placebo mierzono ilość i skład produkowanego gazu po 4 tygodniach podawania *L. plantarum* 299v zawartym w ProViva i nie zanotowano żadnej różnicy w porównaniu z grupą kontrolną (Sen i in. 2002). Jednak gdy pacjentom podano 20 g laktulozy ilość wodoru w wydychanym powietrzu znacznie spadła w grupie, której podawano *L. plantarum* 299v. Tym samym mikroflora jelitowa musiała być w jakiś sposób zmieniona. Trzeba jednak zwrócić uwagę na to, że badanie przeprowadzone przez Sena i in. (2002) było, niestety, przygotowane w nieprawidłowy sposób, który uniemożliwiał ocenę różnic pomiędzy grupami. Co więcej, sześciu pacjentów w grupie poddawanej terapii spożywało jedynie 125 ml ProViva na dobę ( $5 \times 10^7$  CFU/dobę), co stanowi stosunkowo małą dawkę. Na przykład w badaniu Nobaeka i in. (2000) pacjenci spożywali 400 ml ProViva dziennie.

### 3.4 Zapalenie jelit

Choroby zapalne jelit (inflammatory bowel disease – IBD) charakteryzują się przewlekłym stanem zapalnym całego przewodu pokarmowego. Może być on ograniczony do jelita grubego (wrzodziejące zapalenie okrężnicy) lub usytuowany gdziekolwiek wzdłuż przewodu pokarmowego (Choroba Leśniowskiego-Crohna). Wrzodziejące zapalenie jelita grubego jest stosunkowo powierzchniowym zapaleniem błon śluzowych, podczas gdy choroba Leśniowskiego-Crohna jest zapaleniem pełnościennym i ziarninującym. Uważa się, że niekontrolowana reakcja immunologiczna, jaka powstaje w odpowiedzi na obecne w jelitach składniki, prowadzi do przewlekłego procesu zapalnego. Etiologia IBD pozostaje jednak nadal nieznaną. Wydaje się, że czynniki mikrobiologiczne biorą udział w patogenezie IBD, a bakterie jelitowe prawdopodobnie są ważnym czynnikiem kontrolującym jego rozwój i warunkującym przewlekły charakter (Ardizzone i in. 1999; Campieri i Gionchetti 2001; Schuttlitz i Sartor 2000). W warunkach tych zachodzą złożone interakcje między bakteriami, śluzówką i układem immunologicznym, jednak wciąż niewiele wiadomo na ich temat (Campieri i Gionchetti 2001).

Możliwości zastosowania bakterii *L. plantarum* 299v w zwalczaniu stanów zapalnych były badane podczas różnych eksperymentów przeprowadzonych na zwierzętach. U szczurów z zapaleniem jelita cienkiego i okrężnicy wywołanym przez metotretksat podawanie *L. plantarum* 299v łagodziło

uszkodzenia śluzówki wywołane przez chemioterapię (Mao i in. 1996a). Co więcej, zapalenie błony śluzowej jelita u szczurów po radioterapii zostało złagodzone poprzez podanie *L. plantarum* 299v w postaci sfermentowanego napoju zbożowego (Liu i in. 2001).

W badaniu przeprowadzonym na myszach z niedoborem interleukiny 10 (IL-10) w środowisku pozbawionym bakterii (germ-free) i pozbawionym specyficznych patogenów (specific pathogen free – SPF) obserwowano, że podanie *L. plantarum* 299v zapobiegało zapaleniu jelit przed przeniesieniem myszy do środowiska SPF (Schultz i in. 1998; Schulttz i Sartor 2000; Schultz i in. 2002). Wykazano także, że *L. plantarum* 299v występujący jako jedyna bakteria w organizmie myszy SPF nie wywołuje stanu zapalnego jelit, lecz tylko łagodną odpowiedź immunologiczną. Shultz i in. (2002) wnioskuje: „te wyniki wskazują, że *L. plantarum* może hamować powstawanie zapalenia jelit inicjowanego przez nieprawidłową odpowiedź immunologiczną i sugerują potencjalne zastosowanie tej bakterii w leczeniu zapaleń jelit u ludzi”. Obserwowano również, że *L. plantarum* 299v w sposób bardziej wydajny niż inny probiotyczny szczep *Lactobacillus rhamnosus* GG zapobiega powstawaniu zapalenia okrężnicy u myszy gnotobiotycznych IL-10 z chowu wsobnego 129SvEv skolonizowanych przez bakterie SPF (Veltkamp i in. 1999).

W przypadku zapalenia okrężnicy wywołanego przez sól sodową siarczanu dekstranu (DSS) u szczurów, podawanie *L. plantarum* 299v obniżało współczynnik aktywności choroby (Disease Activity Index – DAI), czyli łagodziło jej przebieg (Osman i in. 2004). DSS jest podawana zwierzętom w wodzie pitnej i po 5 dniach rozwija się u nich zapalenie okrężnicy. Uszkodzenia wywołane przez DSS oraz ich lokalizacja (zwykle po lewej stronie okrężnicy) wykazują podobieństwo do wrzodziejącego zapalenia jelita grubego u ludzi.

## 3.5 Modulacja układu immunologicznego

### 3.5.1 Ekspresja cytokin w komórkach, badania *in vitro*

Odpowiedź cytokinowa w jednojądrzastych komórkach ludzkiej krwi obwodowej różni się między różnymi gatunkami *Lactobacillus*. Dowiedziono, że różne szczepy *L. plantarum* pochodzenia jelitowego są zdolne do stymulowania produkcji cytokin IL-12 oraz IL-10 w jednojądrzastych komórkach krwi (Hessle i in. 1999). W porównaniu do *E. coli* synteza IL-10 była niższa, natomiast produkcja IL-12 w tych komórkach była wyższa. W tym samym badaniu zastosowanie *L. paracasei* skutkowało produkcją większych ilości IL-12, natomiast *L. rhamnosus* wywoływał zwiększone wytwarzanie IL-10. Odpowiedź komórek jednojądrzastych mierzona wytwarzaniem IL-10 oraz IL-12 była bardziej zrównoważona pod wpływem *L. plantarum*, niż pozostałych dwóch gatunków *Lactobacillus* (Hessle i in. 1999).

Ekspresja cytokin w produkowanych w szpiku kostnym mysich komórkach dendrytycznych, podanych działaniu różnych probiotycznych szczepów *Lactobacillus* również była zróżnicowana (Christensen i in. 2002). Zasadnicze różnice między szczepami można określić biorąc pod uwagę ich zdolność pobudzającą syntetyzę IL-12 oraz TNF- $\alpha$  w komórkach dendrytycznych. Ranking testowanych szczepów przedstawiał się następująco: *L. casei* podgat. *alactus* CHCC3137 >> *L. plantarum* Lb1 > *L. fermentum* Lb20 > *L. johnsonii* La1 > *L. plantarum* 299v >> *L. reuteri* DSM 12246 (Christensen i in. 2002).

Podobne, lecz mniej znaczące różnice zaobserwowano wśród testowanych szczepów pod względem indukcji IL-6 oraz IL-10.

Zdolność indukowania przez cytokinę prozapalną czynnika martwicy nowotworu TNF- $\alpha$ , syntezy cytokiny IL-8 w odpowiedzi na obecność *L. plantarum* 299v była analizowana przy użyciu linii komórek nabłonkowych okrężnicy HT-29 (McCracken i in. 2002). Wyniki pokazały, że TNF- $\alpha$  zwiększał czułość komórek HT-29 na *L. plantarum* 299v oraz że ekspresja IL-8 mRNA była wyższa niż ta wywołana jedynie przez TNF- $\alpha$ . Jednak nawet jeśli ekspresja została zwiększona, to wydzielanie IL-8 było zaskakująco mniejsze w komórkach HT-29, które zostały wystawione na działanie *L. plantarum* 299v. Oznacza to, że nawet jeśli *L. plantarum* 299v zwiększa czułość komórek HT-29, to bakterie te wykazują również rolę ochronną poprzez zmniejszanie wydzielania IL-8 (IL-8 jest silną cytokiną prozapalną) (McCracken i in. 2002).

Do pewnego stopnia wyjaśnia to paradoks, że *L. plantarum* 299v jest zdolny zarówno do sterowania reakcji immunologicznej jak i do wywierania działania antyzapalnego.

### 3.5.2 Badania na szczurach

Podanie *L. plantarum* 299v powoduje normalizację zawartości przeciwciał klasy IgA w jelitach szczurów z zapaleniem jelita cienkiego i okrężnicy wywołanym metotreksatem, oraz ilości limfocytów CD4 i CD8 w blaszce właściwej jelita (Mao i in. 1996b).

*L. plantarum* 299v może modulować odpowiedź na antygeny pojawiające się w jelicie. Kolonizacja jelita gnobiotycznych szczurów *L. plantarum* 299v i *Escherichia coli* powoduje wzrost stężenia całkowitego IgA w surowicy oraz zwiększenie zawartości IgA oraz IgM swoistych w stosunku do *Escherichia coli* w porównaniu ze szczurami skolonizowanymi jedynie przez *E. coli* (Herías i in. 1999). W grupie, której podawano *L. plantarum* 299v wykazano również znaczny wzrost zagęszczenia komórek CD25 pozytywnych w blaszce właściwej oraz zmniejszenie odpowiedzi proliferacyjnej komórek śledziony po stymulacji konkawaliną A (ConA) tydzień po kolonizacji (Herías i in. 1999).

Stwardnienie rozsiane (SM) jest przewlekłą chorobą zapalną centralnego układu nerwowego o podłożu autoimmunologicznym. Leczenie eksperymentalnego autoimmunologicznego zapalenia mózgu i rdzenia kręgowego (experimental autoimmune encephalomyelitis – EAE) u myszy z SM za pomocą *L. plantarum* 299v ograniczyło rozwój EAE (Lavasani i in. 2006). Terapia za pomocą *Lactobacillus paracasei* PCC 101 lub *Lactobacillus delbrueckii* podgat. *bulgaricus* DSM 20081 nie przyniosła efektów (Lavasani i in. 2006).

### 3.5.3 Odpowiedź immunologiczna u dzieci HIV seropozytywnych

Dzieci będące od urodzenia nosicielami wirusa nabytego braku odporności (HIV) otrzymywały *L. plantarum* 299v w postaci sfermentowanego napoju owsianego (liofilizowanego) podczas badania pilotażowego. Wyniki sugerowały, że *L. plantarum* 299v wywołuje specyficzną odpowiedź immunologiczną po suplementacji doustnej (Cunningham-Rundles i in. 2000; Cunningham-Rundles i in. 2002).

### 3.5.4 Zmniejszenie ogólnoustrojowej reakcji zapalnej u pacjentów w stanie krytycznym

103 pacjentów będących w stanie krytycznym podzielono na dwie grupy, z których jedna (n=52) otrzymywała napój zawierający *L. plantarum* 299v (ProViva, truskawkowy) w połączeniu z leczeniem konwencjonalnym, a druga kontrolna (n=51) była poddana tylko leczeniu konwencjonalnemu (McNaught i in. 2005). Piętnastego dnia badania stężenie IL-6 w surowicy było znacznie niższe w grupie poddawanej terapii w porównaniu do grupy kontrolnej (McNaught i in. 2005). IL-6 jest cytokiną produkowaną przez wiele typów komórek m.in. przez limfocyty, fibroblasty i monocyty. Ma ona wielokierunkowe działanie ogólnoustrojowe, obejmujące aktywację limfocytów B i T oraz indukcję wytwarzania białek ostrej fazy w wątrobie. IL-6 zdaje się być dobrym wskaźnikiem aktywacji kaskady cytokin oraz dobrym czynnikiem prognostycznym w niewydolności wielonarządowej prowadzącej do śmierci (Blackwell oraz Christman, 1996). Dlatego też dojelitowe podanie *L. plantarum* 299v pacjentom w stanie krytycznym wiązało się z osłabieniem ogólnoustrojowej reakcji zapalnej (McNaught i in. 2005). Wiązało się to ze zmianą stężenia EndoCAB (serum antiendotoxin core antibody), co wskazuje na zmniejszoną ekspozycję na endotoksyny (McNaught i in. 2005).

## 3.6 Biegunka wywołana przez *Clostridium difficile*

Nawracająca biegunka wywołana przez bakterie *Clostridium difficile* jest poważną chorobą, która często wymaga długotrwałej antybiotykoterapii, co niestety, w wielu przypadkach nie zapobiega nawrotom choroby. W badaniu przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby pod kontrolą placebo badano przydatność podawania *L. plantarum* 299v w zapobieganiu nawracających biegunek wywołanych przez *Clostridium difficile* (Wullt i in. 2003). Nawrót objawów klinicznych stwierdzono u 4 z 11 pacjentów, którzy otrzymywali metronidazol w połączeniu z *L. plantarum* 299v, oraz u 6 z 9 pacjentów, którzy otrzymywali metronidazol w połączeniu z placebo. Badanie było ograniczone do 21 pacjentów, więc jego wyniki nie mają wagi statystycznej. Mimo to, została wykazana tendencja w kierunku mniejszej liczby nawrotów w grupie otrzymującej bakterie mlekowe w porównaniu z grupą z placebo w 3 miesiące od zakończenia badania, co ustalono na podstawie wywiadów telefonicznych w okresie po zakończeniu badania. Aby uzyskać wagę statystyczną z mocą 80%, powinno się przebadać 40 pacjentów w każdej grupie. Wyniki te zachęcają do przeprowadzenia dalszych badań wieloośrodkowych (Wullt i in. 2003).

## 3.7 Aktywność antyoksydacyjna w surowicy

Wypoczynek oraz odpowiednie odżywianie są ważne w okresie rekonwalescencji po przebytych stresie fizjologicznym, intensywnym treningu i innych obciążeniach organizmu.

W przeciwnym wypadku stres oksydacyjny może wywołać powstanie reaktywnych cząsteczek tlenu (reactive oxygen species – ROS), które powodują uszkodzenia tkanek. Antyoksydanty chronią organizm przed takimi uszkodzeniami i uważa się, że zawierające je pokarmy mogą zapobiegać różnym schorzeniom takim jak miażdżyca i nowotwory. W badaniu kontrolowanym placebo wykazano, że u zdrowych ochotników pijących mieszankę antyoksydantów oraz *L. plantarum* 299v



(ProViva Active®, Skånemejerier, Malmö) wzrosła aktywność antyoksydacyjna oraz zawartość selenu i selenoproteiny P w surowicy. Wzrosła także całkowita zawartość bakterii mlekowych w stolcu (Önning i in. 2003). Jednakże ostateczna rola *L. plantarum* 299v w tym procesie nie została w tym badaniu wyjaśniona.

Zjawisko niedotlenienie-reperfuzja (I/R) w okrężnicy jest to stan zapalny prowadzący do uszkodzenia tkanek, w którym główną rolę odgrywa pewien reaktywny rodzaj tlenu. U myszy I/R antyoksydacyjna aktywność probiotyków i innych antyoksydantów może być oceniona *in vivo*. Połączenie *L. plantarum* 299v oraz owoców głogu, które są bogate w biologicznie aktywne polifenole wykazujące właściwości antyoksydacyjne (co może być ważne w zapobieganiu preoksydacji lipidów) było badane u myszy I/R (Håkansson i in. 2005). *L. plantarum* 299v wykazuje aktywność enzymatyczną w stosunku do polifenoli (tanin), które to rozkłada do flawonoidów i w ten sposób zwiększa antyoksydacyjne właściwości głogu. Wykazano, że podawanie owoców głogu w połączeniu z *L. plantarum* 299v znacznie zmniejszało preoksydację lipidów (za wskaźnik preoksydacji przyjęto zawartość dwualdehydu malonowego – MDA) w tkance jelita ślepego oraz ilość żywych *Enterobacteriaceae* w stolcu. Odkryto pozytywną korelację między zawartością MDA i ilością *Enterobacteriaceae*. Wyniki te potwierdzają synergistyczną/addytywną rolę owoców głogu i *L. plantarum* w ograniczaniu preoksydacji lipidów (Håkansson i in. 2005).

## IV. Względy bezpieczeństwa

Bezpieczeństwo spożywania dużych ilości żywych bakterii zostało zakwestionowane, ponieważ istnieją doniesienia, że bakterie z gatunku *Lactobacillus*, włączając szczepy *L. plantarum*, zostały wyizolowane z tkanek zakażonych pacjentów (Aguirre i Collins 1993). Saxelin i wsp. oceniali zdolność bakterii gatunku *Lactobacillus* do wywoływania ciężkich zakażeń i bakteriemii w populacji fińskiej i wykazali bardzo niski potencjał patogenny tego szczepu (Saxelin i in. 1996).

Fakt, iż wiele tradycyjnych pokarmów uzyskiwanych drogą fermentacji mlekowej zawiera duże ilości *L. plantarum* (Dedicatoria i in. 1981; Gashe 1985; Gashe 1987; Oyewole i Odunfa 1990; Fernández Gonzalez i in. 1993; McDonald i in. 1993; Lönner i Ahrné 1995; Johansson i in. 1995c; Moorthy i Mathew 1998) oraz, że produkty te uznawane są za zdrowe i całkowicie bezpieczne, niewątpliwie wskazuje na to, że żywe bakterie *L. plantarum* mogą być bezpiecznie spożywane. Staje się to oczywiste, jeśli weźmiemy pod uwagę długą historyczną tradycję spożywania produktów uzyskiwanych poprzez fermentację mlekową. Co więcej, w przypadku *L. plantarum* 299v bezpieczeństwo to zostało bezpośrednio potwierdzone w wielu badaniach.

*L. plantarum* 299v podawano w dawce dobowej  $10^{10}$  CFU dwóm pacjentom z zespołem krótkiego jelita, u których stwierdzono nadmierny wzrost bakterii w jelicie cienkim (połączony z kwasimą mleczanową; Vanderhoof i in. 1998). Nie stwierdzono żadnych niekorzystnych następstw podawania *L. plantarum* 299v.

Po analizie wyników całego badania kazuistycznego obejmującego sześciu pacjentów, zauważono natomiast, że: „wstępne doświadczenia wskazują, że probiotyki mogą zmieniać florę bakteryjną do organizmów niepatogennych i mogą wykazywać większą efektywność i skutkować zmniejszeniem występowania długoterminowych powikłań” (Vanderhoof i in. 1998).

*L. plantarum* 299v był podawany w dawce  $2 \times 10^{10}$  CFU na dobę 64 pacjentom przechodzącym planowe operacje jamy brzusznej przez co najmniej tydzień przed operacją i w okresie pooperacyjnym. Nie obserwowano żadnych negatywnych następstw, takich jak na przykład wzmożona translokacja bakteryjna (McNaught i in. 2002).

*L. plantarum* 299v podawano przez dłuższy czas w dużych dawkach dzieciom zakażonym wirusem HIV, mającym upośledzoną funkcję układu immunologicznego bez żadnych negatywnych skutków (Cunningham-Rundles i in. 2000; Cunningham-Rundles i in. 2002).

*L. plantarum* 299v podawano pacjentom w stanie krytycznym leczonym na oddziale intensywnej opieki medycznej bez obserwowania żadnych działań niepożądanych (Klarin i in. 2005; McNaught i in. 2005). Nie stwierdzono także bakteriemii (Klarin i wsp. 2005) wywołanej *L. plantarum* 299v.

Ryzyko wywołania zapalenia wsierdza sprawdzano podczas badania doświadczalnego przeprowadzonego na szczurach (Adawi i in. 2002). W badaniu tym cewnik wprowadzono przez prawą tętnicę szyjną do światła lewej komory serca. Pozycję cewnika ustalono, a nacięcie zeszyto. Po 48 godzinach wstrzyknięto  $10^8$  CFU *L. plantarum* 299v (0,5 ml zawiesiny bakteryjnej) przez żyłę ogonową. Cztery dni po wstrzyknięciu szczepu *L. plantarum* szczury zostały uśpione, a ich krew, tkankę serca i cewnik zbadano na obecność bakterii. Nie znaleziono śladów *L. plantarum* 299v w żadnej z próbek (Adawi i in. 2002). Wynika z tego, że nawet podczas badań doświadczalnych przeprowadzonych w nietypowych i można powiedzieć „ekstremalnych” warunkach z użyciem niezwykle wysokich dawek bakterii wstrzykniętych bezpośrednio do krwiobiegu zwierząt z implantem z obcego materiału w tętnicy i sercu, szczep *L. plantarum* nie kolonizował układu krążenia i nie spowodował niekorzystnych następstw.

Wyniki tych badań wskazują, że przyjmowanie *L. plantarum* 299v jest całkowicie bezpieczne dla wszystkich konsumentów, również tych poważnie chorych.

## V. Piśmiennictwo

- Adawi D., Kasravi F.B., Molin G. and Jeppsson B. (1997). Effect of *Lactobacillus* supplementation with and without arginine on liver damage and bacterial translocation in an acute liver injury model, *Hepatology* 25: 642-647.
- Adawi D., Molin G., Ahrné S. and Jeppsson B. (1999a). Modulation of the colonic bacterial flora affects differently bacterial translocation and liver injury in an acute liver injury model. *Microb. Ecol. Health Dis.* 11: 47-54.
- Adawi D., Molin G. and Jeppsson B. (1999b). The role of nitric oxide inhibition on the effects of arginine and *Lactobacillus* administration in acute liver injury, *Ann. Surg.*, 228: 748-755.
- Adawi D., Molin G., Ahrné S. and Jeppsson B. (2002). Safety of the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (= strain 299v) in an endocarditis animal model, *Microb. Ecol. Health Dis.*, 14: 50-53.
- Adlerberth I., Ahrné S., Johansson M.L., Molin G., Hanson L.Å. and Wold A.E. (1996). A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2244-2251.
- Aguirre M. and Collins M.D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection, *J. Appl. Bacteriol.* 75: 95-107.
- Ahrné S., Nobaek S., Jeppsson B., Adlerberth I., Wold A. and Molin G. (1998). The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa, *J. Appl. Microbiol.* 85: 88-94.
- Archibald F. and Fridovich I. (1981a). Manganese and defence against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*, *J. Bacteriol.* 145: 442-451.
- Archibald F. and Fridovich I. (1981b). Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria, *J. Bacteriol.* 146: 928-936.
- Ardizzone S., Bollani S., Manzionna G. and Porro G.B. (1999). Inflammatory bowel disease approaching the 3<sup>rd</sup> millennium: pathogenesis and therapeutic implications, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 11: 17-32.
- Attene-Ramos M.S., Wagner E.D., Plewa M.J. and Gaskins H.G. (2006). Evidence that hydrogen sulphide is a genotoxic agent. *Molecular Cancer Research* 4: 9-14.
- Barthelmebs L., Divies C. and Cavin J.F. (2000). Knockout of the p-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism, *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3368-3375.
- Barthelmebs L., Divies C. and Cavin J.F. (2001). Molecular characterization of the phenolic acid metabolism in the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum*, *Lait*, 81: 161-171.
- Berg R.D. and Garlington A.W. (1979). Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model, *Infect. Immunol.* 23: 403-411.
- Berggren A., Söderberg L., Önning G., Johansson Hagslätt M.L. and Axelsson I. (2003). Intestinal function, microflora and nutrient intake of children after administration of a fermented oat product containing *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v). *Microbial Ecology in Health and Disease* 15: 160-168.
- Blackwell T.S. and Cristman J.W. (1996). Sepsis and cytokines: current status. *British Journal of Anaesthetics* 77: 110-117.
- Bukowska H., Pieczul-Mróż J., Jastrzebski K., Chelstowski K. and Naruszewicz M. (1998). Significant decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of the diet with *Lactobacillus plantarum* (ProViva) in subjects with moderately elevated cholesterol concentrations, *Atherosclerosis*, 137: 437-438.
- Campieri M. and Gionchetti P. (2001). Bacteria as the cause of ulcerative colitis, *Gut*, 48: 132-135.
- Christensen H.R., Frokiaer H. and Pestka J.J. (2002). Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells, *J. Immunol.* 168: 171-178.
- Cunningham-Rundles S., Ahrné S. and Bengmark S. (2000). Probiotics and immune response. *Am. J. Gastroenterol.* 95 (1, Supplement, 2000): S22-S25.
- Cunningham-Rundles, S., Ahrné, S., Abuav-Nissbaum, B.S., and Dnistrian, A. (2002). Development of immunocompetence: role of micronutrients and microorganisms, *Nutrition Reviews* 60 (5): S68-S72.
- Daeschel M.A. and Nes I.F. (1995). *Lactobacillus plantarum*: physiology, genetics and applications in foods, in *Food Biotechnology Microorganisms*, Hui Y.H. and Khachatourians G.G., Eds., VCH Publishers, Inc., New York, chap. 21, pp. 721-743.
- Dedicatoria R.F., Aspiras R.B. and Sanchez P.C. (1981). The fermentation inoculation with lactic acid bacteria to increase the nutritive value of sauerkraut, *Kalikasan* 10: 214-219.

- D'Souza A.L., Rajkumar C., Cooke J. and Bulpitt C.J. (2002). Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ* 324: 1361.
- De Vries M.C., Marco M., Kleerebezem M., Mangell P., Ahrné S., Molenaar D., de Vos W.M., Vaughan E.E. (2006). Transcription profiling reveals global gene expression of *Lactobacillus plantarum* in the human gastrointestinal tract. In PhD-thesis: Analyzing global gene expression of *Lactobacillus plantarum* in the human gastrointestinal tract. By: Maaike C de Vries. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- De Vuyst L. and Vandamme E.J. (1994a). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, in *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*, De Vuyst L. and Vandamme E.J., Eds., Blackie Academic & Professional, London, pp. 91-142.
- De Vuyst L. and Vandamme E.J. (1994b). Lactic acid bacteria and bacteriocins: Their practical importance, in *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*, De Vuyst L. and Vandamme E.J., Eds., Blackie Academic & Professional, London, pp. 1-11.
- Fernández Gonzalez M.J., García P.G., Fernández A.G. and Quintana M.C.D. (1993). Microflora of the aerobic preservation of directly brined green olives from Hojiblanca cultivar, *J. Appl. Bacteriol.* 75: 226-233.
- Finegold S.M., Sutter V.L. and Mathisen G.E. (1983). Normal Indigenous flora, in *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*, Hentges, D.J., Ed., Academic Press, New York, pp. 3-31.
- Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals, *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-368.
- Gashe B.A. (1985). Involvement of lactic acid bacteria in the fermentation of tef (*Eragrostis tef*), an Ethiopian fermented food, *J. Fd. Sci.* 50: 800-801.
- Gashe, B.A. (1987). Kocho fermentation, *J. Appl. Bacteriol.* 62: 473-74.
- Goossens D., Jonkers D., Russel M., Stobberingh E., van den Bogaard A. and Stockbriigger R. (2003). The effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition and metabolic activity in faeces of healthy volunteers: a placebo-controlled study on the onset and duration of effects. *Alliment. Pharmacol. Ther.* 18: 495-505.
- Goossens D., Jonkers D., Russel M., Thijs A., van den Bogaard A., Stobberingh E. and Stockbriigger R. (2005). Survival of the probiotic, *L. plantarum* 299v and its effect on the faecal bacterial flora, with and without gastric acid inhibition. *Digestive and Liver Disease* 37: 44-50.
- Goossens D., Jonkers D., Russel M., Stobberingh E. and Stockbriigger R. (2006a). The effect of a probiotic drink with *L. plantarum* 299v on the bacterial composition in faeces and mucosal biopsies of rectum and ascending colon. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 23: 255-263.
- Goossens D., Jonkers D., Stobberingh E., Molin G., Ahrné S., Russel M. and Stockbriigger R. (2006b). The faecal and mucosal bacterial composition of patients with inactive UC: can it be changed by *L. plantarum* 299v? In: The effect of the probiotic *L. plantarum* 299v on the intestinal flora: Methodological studies in health and disease. PhD-thesis by D. Goossens. Chapter 6. The Nutrition and Toxicology Research Institute Maastricht, Maastricht, 2006.
- Goossens D., Jonkers D., Russel M., Vaughan, E., Stobberingh E. and Stockbriigger R. (2006c). Bowel cleansing with subsequent intake of *Lactobacillus plantarum* 299v does not change the composition of the faecal flora. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 18: 139-146.
- Hiitt P., Shchepetova I., Loivukene K., Kullisaar T. and Mikelsaar M. (2006). Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *Journal of Applied Microbiology* 100: 1324-1332.
- Håkansson Å., Stene C., Mihaescu A., Molin G., Ahrné S., Thorlacius H. and Jeppsson B. (2005). Rosa Hip and *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 Reduce Ischemia/Reperfusion Injury in the Mouse Colon. *Digestive Diseases and Sciences (in press)*.
- Heaton K.W., Creed F., Drossman D.A., Heaton K.W. and Mazzacca G. (1992). Symptoms of irritable bowel syndrome in a British urban community: consulters and non consulters, *Gastroenterol.* 102: 1962-1967.
- Herías M.V., Hessle C., Telemo E., Midtvedt T., Hansson L.Å. and Wold A.E. (1999). Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats, *Clin. Exp. Immunol.* 116: 283-90.
- Hessle C., Hansson L.Å. and Wold A.E. (1999). Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production, *Clin. Exp. Immunol.* 116: 276-282.
- Huang I., Bousvaros A., Lee J.W., Diaz A. and Davidson E.J. (2002). Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children. *Digestive Diseases and Sciences* 47: 2625-2634.
- Jacobsen C.N., Rosenfeldt Nielsen V., Hayford A.E., Moller P.L., Michaelsen K.F., Poerregaard A., Sandström B., Tvede M. and Jakobsen M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans, *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4949-4956.

- Johansson M.L., Molin G., Jeppsson B., Nobaek S., Ahrné S. and Bengmark S. (1993). Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: In vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora, *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 15-20.
- Johansson M.L. (1995a). Systematics and starter culture selection of *Lactobacillus* for human intestine and Nigerian ogi, with special reference to *Lactobacillus plantarum*. Ph.D. thesis, Division of Food Technology, Lund University, Lund, Sweden.
- Johansson M.L., Quednau M., Ahrné S. and Molin G. (1995b). Classification of *Lactobacillus plantarum* by restriction endonuclease analysis of total chromosomal DNA using conventional agarose gel electrophoresis, *Int. J. System. Bacteriol.* 45: 670-675.
- Johansson M.L., Sanni A., Lönner C. and Molin G. (1995c). Phenotypically based taxonomy using API 50CH of lactobacilli from Nigerian ogi, and the occurrence of starch fermenting strains, *Internat. J. Fd. Microbiol.* 25: 159-68.
- Johansson M.L., Molin G., Pettersson B., Uhlén M. & Ahrné S. (1995d). Characterisation and species recognition of *Lactobacillus plantarum* strains by fragment length polymorphism (RFLP) of the 16S rRNA gene. *Journal of Applied Bacteriology* 79: 536-541.
- Johansson M.L., Nobaek S., Berggren A., Nyman M., Björck I., Ahrné S., Jeppsson B. and Molin G. (1998). Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content in faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats, *Int. J. Fd. Microbiol.* 42: 29-38.
- Kannel W.B., Wolf P.A., Castelli W.P. and D'Agostino R.B. (1987). Fibrinogen as a cardiovascular risk of cardiovascular disease: the Framingham study, *J. Am. Med. Assoc.* 258: 1183.
- Kandler O. and Weiss N. (1986). Regular, nonsporulating Gram-positive rods, in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sneath H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J. Eds., Williams & Wilkins, Baltimore, vol. 2, pp. 1208-1234.
- Kasravi F.B., Wang L., Wang X.D., Molin G., Bengmark S. and Jeppsson B. (1996a). Bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine, *Hepatology* 23: 97-103.
- Kasravi F.B., Adawi D., Molin G., Bengmark S., Jeppsson B. (1996b). Dynamics of bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine in rat. *APMIS* 104: 135-140.
- Kasravi F.B., Adawi D., Molin G., Bengmark S. and Jeppsson B. (1997). Effect of oral supplementation of lactobacilli on bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine, *J. Hepatol.* 26: 417-424.
- King T.S., Elia M. and Hunter J.O. (1998). Abnormal colonic fermentation in irritable bowel syndrome, *Lancet* 352: 1187-1189.
- Kingamkono R., Sjögren E. and Svanberg U. (1999). Enteropathogenic bacteria in faecal swabs of young children fed on lactic acid-fermented cereals, *Epidemiol. Infect.* 122: 23-32.
- Klarin B., Johansson M-L., Molin G., Larsson A., Jeppsson B. (2005). Adhesion of the probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum* 299v onto the gut mucosa in critically ill patients: a randomised open trial. *Critical Care* 9: R285-R293.
- Kleerebezem M., Boekhorst J., van Kranenburg R., Molenaar D., Kuipers O.P., Leer R., Turchini R., Peters S.A., Sandbrink H.M., Fiers M.W.E.J., Stiekema W., Lankhorst R.M.K., Bron P.A., Hoffer S.M., Groot M.N.N., Kerkhoven R., de Vries M., Ursing B., de Vos W.M. and Siezen R.J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 1990-1995.
- Kono Y. and Fridovich I. (1983a). Isolation and characterization of the pseudocatalase of *Lactobacillus plantarum*: A new manganese containing enzyme, *J. Biol. Chem.* 258: 6015-6019.
- Kono Y. and Fridovich I. (1983b). Functional significance of manganese catalase in *Lactobacillus plantarum*, *J. Bacteriol.* 155: 742-746.
- Lavasani S., Buske S., Fåk F., Dzhambazov B., Molin G., Alenfall J. and Weström B. (2006). Oral administration of unique probiotic strains successfully ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. In: Novel Immunotherapies and immunoregulation in a chronic inflammatory disease of the central nervous system. Doctoral thesis by Shahram Lavasani, Faculty of Medicine, Lund university, Lund.
- Langendijk P.S., Schut F., Jansen G.J., Raangs G.C., Kamphuis M.H. and Welling G.W. (1995). Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples, *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3069-3075.
- Leakey R. (1993). *På spaning efter människans ursprung*, Natur och Kultur, Stockholm [Swedish translation from: *Origins reconsidered, in search of what makes us human*, Bantam Doubleday Dell Publishing Group, Inc., New York, 1992].

- Leakey R. (1995). *Hur människan blev till*, Natur och Kultur, Stockholm [Swedish translation from: *The origin of humankind*, HarperCollins Publishers, Inc., 1994].
- Liu Q., Nobaek S., Adawi D., Mao Y., Wang M., Molin G., Ekelund M. and Jeppsson B. (2001). Administration of *Lactobacillus plantarum* 299v reduces side effects of external radiation on colonic anastomotic healing in an experimental model, *Colorectal Disease* 3: 245-252.
- Lönner C. and Ahrné S. (1995). *Lactobacillus*: Baking, in *Food Biotechnology Microorganisms*, Hui, Y.H. and Khachatourians G.G., Eds., VCH Publishers Inc., Eureka, California, 797-844.
- Mack D.R., Michail, S., Wei S., McDougall L. and Hollingsworth M.A. (1999). Probiotics inhibit enteropathogenic *E.coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression, *Am. J. Physiol.* 276: G941-G950.
- Mack D.R., Ahrné S., Hyde L., Wei S. and Hollingsworth M.A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52: 827-833.
- Mangell P., Nejdfors P., Wang M., Ahrné S., Weström B., Thorlacius H., and Jeppsson B. (2002). *Lactobacillus plantarum* 299v inhibits *Escherichia coli*-induced intestinal permeability, *Digestive Diseases and Sciences* 47: 511-516.
- Mangell, P., Lennernäs, P., Wang, M., Olsson, C., Ahrné, S., Molin, G., Thorlacius, H. and Jeppsson, B. (2006). Adhesive capability of *L. plantarum* 299v is important for preventing bacterial translocation in endotoxaemic rats. *APMIS* (in press).
- Mangiante G., Colucci G., Canepari P., Bassi C., Nicoli N., Casaril A., Marinello P. and Bengmark S. (2001). *Lactobacillus plantarum* reduces infection of pancreatic necrosis in experimental acute pancreatitis, *Digest. Surg.* 18: 47-50.
- Manning A.P., Thompson W.G., Heaton K.W. and Morris A.F. (1978). Towards positive diagnosis of the irritable bowel, *BMJ* 2: 653-654.
- Mao Y., Nobaek S., Kasravi B., Adawi D., Stenram U., Molin G. and Jeppsson B. (1996a). The effect of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats, *Gastroenterology* 111: 334-344.
- Mao Y., Yu J., Ljungh Å., Molin G. and Jeppsson B. (1996b). Intestinal immune response to oral administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC, *Lactobacillus plantarum* DSM 9843, pectin and oatbase on Methotrexate-induced enterocolitis in rats, *Microb. Ecol. Health Dis.* 9: 261-270.
- Mao Y., Nobaek S., Adawi D., Molin G. and Jeppsson B. (1997). Comparison of the effects of different *Lactobacillus* strains in reducing bacterial translocation on Methotrexate induced enterocolitis in rats, *Digest. Surg.* 14: 284-291.
- Marklinder I. and Lönner C. (1994). Fermented oatmeal soup: influence of additives on the properties of a nutrient solution for enteral feeding, *Food Microbiology* 11: 505-513.
- Marklinder I. (1996). Lactic acid-fermented oats and barely for human dietary use, Ph.D. Thesis, Acta Universitatis Upsaliensis, Uppsala, Sweden.
- Maxvell P.R., Mendall M.A. and Kumar D. (1997). Irritable bowel syndrome, *Lancet* 350: 1691-1695.
- McCracken V.J., Chun T., Baldeón M.E., Ahrné S., Molin G., Mackie R.I. & Gaskins H.R. (2002). TNF- $\alpha$  sensitizes HT-29 colonic epithelial cells to intestinal lactobacilli. *Experimental Biology and Medicine* 227: 665-670.
- McDonald L.C., Shieh D.H., Fleming H.P., McFeeters R.F. and Thompson R.L. (1993). Evaluation of malolactic-deficient strains of *Lactobacillus plantarum* for use in cucumber fermentations, *Food Microbiology* 10: 489-99.
- McNaught C.E., Woodcock N.P., MacFie J. and Mitchell C.J. (2002). A prospective randomised study of the probiotic *Lactobacillus plantarum* 299v on indices of gut barrier function in elective surgical patients. *Gut* 51: 827-831.
- McNaught C.E., Woodcock N.P., Anderson A.D.G. and MacFie J. (2005). A prospective randomised trial of probiotics in critically ill patients. *Clinical Nutrition* 24: 211-219.
- Michail S. and Abernathy F. (2002). *Lactobacillus plantarum* reduces the in vitro secretory response of intestinal epithelial cells to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 35: 350-355.
- Molenaar D., Bringel F., Schuren F.H., de Vos W., Siezen R.J. & Kleerebezem M. (2005). Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *Journal of Bacteriology* 187: 6119-6127.
- Molin N., Albertsson K.E., Bengmark S. & Larsson K. (1991a). Nutrient composition and method for the preparation there of. Swedish patent: 463796; Norway: 178321; Denmark: 171057; Germany: DE 689 07 057 T2; European patent: 0415941 (granted: Luxembourg, Netherlands; Belgium, France, Italy, Austria, Great Britain, Singapore, Switzerland); U.S.A. patent: 5.190755; Australia: 620858; Patent application: Japan No. 8846.
- Molin G., Jeppsson B., Ahrné S., Johansson M.L., Nobaek S., Ståhl M. and Bengmark S. (1993). Numerical taxonomy of *Lactobacillus* spp. associated with healthy and diseased mucosa of the human intestines, *J. Appl. Bacteriol.* 74: 314-323.

- Molin G. and Ahrné S. (1999). Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* 299v. pp. 850-853, in Proc. Symp., Tuijtelaars A.C.J., Samson R.A., Rombouts F.M. and Notermans S., Eds., Food Microbiology and Safety into the Next Millennium, Seventeenth International Conference of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene, Veldhoven, Ponsen & Looyen, Wageningen.
- Molin G. (1995). *Lactobacillus* strains for fermented oatmeal soup in PRO VIVA™, pp. 213-223, in Proc. Symp. Les Bactéries Lactiques: Quelles souches? Pur quels marchés? [Lactic acid bacteria: Which strain? For which markets?], Lactic 94, Caen, 1994, Centre de Publications de l'Université de Caen, Caen Cedex, France.
- Molin G. (2001). Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v, *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (Iss. 2; Suppl. S): 380S-385S.
- Molin G. (2003). The role of *Lactobacillus plantarum* in foods and in human health. In: *Handbook of Fermented Functional Foods*. chap. 13; pp. 305-342. E. R. Farnworth (ed). CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.
- Moore W.E. and Holdeman L.V. (1974). Human fecal flora: the normal flora of 20 Japanese-Hawaiians, *Appl. Microbiol.* 27: 961-979.
- Moorthy S.N. and Mathew G. (1998). Cassava fermentation and associated changes in physicochemical and functional properties, *Crit. Rev. Fd. Sci. Nut.* 38: 73-121.
- Mugula K.K. (2001). Microbiology, fermentation and shelf-life extension of *togwa*, a Tanzanian indigenous food, Ph.D. thesis, NHL, Agricultural University of Norway, Ås, Norway.
- Naruszewicz M., Johansson M.L., Zapolska-Downar D. and Bukowska H. (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers, *Am. J. Clin. Nutr.*, 76: 1249-1255.
- Nichols R.L. (1980). Infections following gastrointestinal surgery. Intraabdominal abscesses, *Surg. Clin. N. Am.* 60: 197-212.
- Niedzielin K., Kordecki H. and Birkenfeld B. (2001). A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299v in patients with irritable bowel syndrome, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatology* 13: 1143-1147.
- Nigatu A. (1998). Systematics of *Lactobacillus* and *Pediococcus* isolated from fermented tef (*Eragrostis tef*) and kocho (*Ensete ventricosum*) and microbiological status of baked products, Ph.D. thesis, School of Graduate Studies, Addis Ababa University, Addis Ababa, Ethiopia.
- Nobaek S., Johansson M.L., Molin G., Ahrné S. and Jeppsson B. (2000). Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome, *Am. J. Gastroenterol.* 95: 1231-1238.
- Offenbartl K. and Bengmark S. (1990). Intraabdominal infection and gut origin sepsis, *World J. Surg.* 14: 191-195.
- Olah A., Belagyi T., Issekutz A., Gamal M.E. and Bengmark S. (2002). Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *British Journal of Surgery* 89: 1103-1107.
- Önning G., Berggren A., Drevelius M., Jeppsson B., Lindberg A.M., Johansson Hagslätt M.L. (2003). Influence of a drink containing different antioxidants and *Lactobacillus plantarum* 299v on plasma total antioxidant capacity, selenium status and faecal microbial flora. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 54: 281-289.
- Osawa R., Kuroiso K., Goto S. and Shimzu A. (2000). Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods, *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3093-3097.
- Osman N., Adawi D., Ahrne S., Jeppsson B. & Molin G. (2004). Modulation of the effect of dextran sulfate sodium-induced acute colitis by the administration of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Digestive Diseases and Sciences* 42: 320-327.
- Osman N., Adawi D., Ahrne S., Jeppsson B. & Molin G. (2005). Probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* affect the translocation and intestinal load of *Enterobacteriaceae* differently after D-galactose-induced liver injury in rats. *Microbial Ecology in Health and Disease* 17: 40-46.
- Oyewole O.B. and Odunfa S.A. (1990). Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production, *J. Appl. Bacteriol.* 68: 145-152.
- Parker R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story, *Anim. Nutr. Health* 29: 4-8.
- Pulido R.P., Omar N.B., Abriouel H., López R.L., Canamero M.M. and Gálvez (2005). Microbiological study of lactic acid fermentation of caper berries by molecular and culture dependant methods. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7872-7879.

- Rayes N., Hansen S., Seehofer D., Muller A.R., Serke S., Bengmark S. and Neuhaus P. (2002a). Early enteral supply of fiber and Lactobacilli versus conventional nutrition: a controlled trial in patients with major abdominal surgery. *Nutrition* 18: 609-615.
- Rayes N., Seehofer D., Hansen S., Boucsein K., Muller A.R., Serke S., Bengmark S. and Neuhaus P. (2002b). Early enteral supply of lactobacillus and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. *Transplantation* 15: 123-127.
- Roberfroid M.B. and Gibson G.R. (1994). Colonic microflora – nutrition and health. Proc., Workshop on colonic microflora: Nutrition and health, ILSI Europe, Barcelona, [Summary published in *Nutr. Rev.* 53: 27-130, 1995].
- Rowland I.R. (1992). Metabolic interactions in the gut. in *Probiotics: The Scientific Basis*. Fuller, R., Ed. Chapman & Hall, London, pp. 29-53.
- Saxelin M., Chuang N.H., Chassy B., Rautelin H., Makela P.H., Salminen S. and Gorbach S.L. (1996). Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989-1992. *Clin. Infect. Dis.* 22: 564-566.
- Schultz M. and Sartor R.B. (2000). Probiotics and inflammatory bowel diseases, *Am. J. Gastroenterology* 95 (Suppl): S19-S21.
- Schultz M., Veltkamp C., Dieleman L.A., Wyrick P.B., Tonkonogy S.L. and Sartor R.B. (1998). Continuous feeding of *Lactobacillus plantarum* attenuates established colitis in interleukin-10 deficient mice, *Gastroenterology* 114: A4426.
- Schultz M., Veltkamp C., Dieleman L.A., Grenther W.B., Wyrick P.B., Tonkonogy S.L. and Sartor R.B. (2002). *Lactobacillus plantarum* 299v in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm. Bowel. Dis.* 8: 71-80.
- Sen S., Mullan M.M., Parker T.J., Woolner J.T., Tarry S.A. and Hunter J.O. (2002). Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. *Digestive Diseases and Sciences* 47: 2615-2620.
- Stjernquist-Desatnik A., Warfving H. and Johansson M.L. (2000). Persistence of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 on human tonsillar surface after oral administration in fermented oatmeal gruel. *Acta Otolaryngol* (Suppl.) 543: 215-219.
- Thompson W.G., Creed F., Drossman D.A., Heaton K.W. and Mazzacca G. (1992). Functional bowel disease and functional abdominal pain, *Gastroenterol. Internat.* 5: 75-91.
- Vaquero I., Marcobal A. and Muñoz R. (2004). Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology* 96: 199-204.
- Vanderhoof J.A., Young R.J., Murray N. and Kaufman S.S. (1998). Treatment strategies for small bowel bacterial overgrowth in short bowel syndrome. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 27: 155-160.
- Wang M., Adawi D., Molin G., Pettersson B., Jeppsson B. and Ahmé S. (2001). Identification of the translocating bacteria in rats with acute liver injury and their relation to the bacterial flora of the intestinal mucosa, *APMIS*, 109: 551-558.
- Wang M., Ahmé S., Jeppsson B. & Molin G. (2005). Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. *FEMS Microbial Ecology (in press)*.
- Veltkamp C., Tonkongy S.L., Schulz M. et al. (1999). *Lactobacillus plantarum* is superior to *Lactobacillus GG* in preventing colitis in IL-10 deficient mice [Abstract]. *Gastroenterology* 116: A838.
- Wittman D.H. (1991). *Intraabdominal Infections. Pathophysiology and Treatment*, Marcel Dekker, New York, pp. 20-29.
- Woodcock N.P., Robertson J., Morgan D.R., Gregg K.L., Mitchell C.J. and MacFie J. (2001). Bacterial translocation and immunohistochemical measurement of gut immune function. *J. Clin. Pathol.* 54: 619-623.
- Woodcock N.P., McNaught C.E., Morgan D.R., Gregg K.L. and MacFie J. (2004). An investigation into the effect of a probiotic on gut immune function in surgical patients. *Clinical Nutrition* 23: 1069-1073.
- Wu S., Morin P.J., Maouyo M.D. and Sears C.L. (2003). *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology* 124: 392-400.
- Wullt M., Johansson Hagslätt M.L. and Odenholt I. (2003). *Lactobacillus plantarum* 299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: A double-blind placebo-controlled trial. *Scandinavian Journal of Infect. Dis.* 35: 365-367.