



(51) Int.Cl.
A61K 35/747 (2015.01)
A23L 33/135 (2017.01)
A61P 9/00 (2017.01)

(12) PATENDIKIRJELDUS

(21) Patenditaotluse number:	P201400038
(22) Patenditaotluse esitamise kuupäev:	31.10.2014
(30) Prioriteediandmed:	03.04.2014 US 244284
(24) Patendi kehtivuse alguse kuupäev:	31.10.2014
(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev:	16.11.2015
(45) Patendikirjelduse avaldamise kuupäev:	16.10.2017
(83) Bioloogilise aine, sh mikroorganismi tüve deponeerimise andmed:	DSM 21379 16.04.2008 DSMZ

(73) Patendiomanik:
BioCC OÜ Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, EE
(72) Leituse autorid:
Marika Mikelsaar Jakobsoni 11-4, 51005 Tartu, EE
Epp Songisepp Tähe 105-7, 50107 Tartu, EE
Merle Rätsep Alasi 31-49, 50109 Tartu, EE
Pirje Hütt Kulli 10-2, 50416 Tartu, EE
Imbi Smidt Voika küla, Nõo vald, 61622 Tartu maakond, EE
Kai Truuusalu Vanemuise 45-59, 51003 Tartu, EE
Epp Sepp Kaarli pst 11-47, 10119 Tallinn, EE
Raik-Hiiu Mikelsaar Jakobsoni 11-4, 51005 Tartu, EE
Kalle Kilk Suur kaar 21-3, 50404 Tartu, EE
Jelena Stsepetova Muru 12-28, 50303 Tartu, EE
Siiri Kõljalg Elva 6, 50404 Tartu, EE
Mirjam Vallas Ravila 76-34, 50408 Tartu, EE

(74) Patendivolink:

Sirje Kahu
Patendibüroo Ustervall OÜ
Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE

(54) Hüpopolestereemilist probiootilist mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldav kompositsioon kasutamiseks südame-veresoonkonnahaiguste ennetamiseks

(57) Leiutis käitleb *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kasutamist hüpoplestereemilise, antimikroobse ja antioksüdatiivse agendina. Nimetatud tüve sisaldavatel toiduainetel ja toidulisanditel on südant kaitsev toime. Mikroorganismi *L. plantarum* Inducia kasutatakse kolesteroli metabolismi häirete ja südameveresoonkonnahaiguste ennetamiseks, kuna ta vähendab LDL-kolesteroli taset ja samaaegselt tõstab organismi antioksüdatiivset aktiivsust, mõjutades oksüdatiivse stressi markereid soovitud suunas - oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiinide (ox-LDL) tase ja oksüdatiivse stressi indeks (OSI) vähenevad.

(57) The invention relates to a microorganism strain *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 for use as hypocholesterolemic and anti-oxidative agent. The food products and compositions comprising said strain have a cardio-protective effect. *L. plantarum* Inducia is used in preventing cholesterol metabolism disorders and cardiovascular disorders by reducing the level of LDL-cholesterol, and simultaneously as an anti-oxidative agent for use in enhancing anti-oxidative activity of human body by reducing the levels of oxidative stress markers - oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and oxidative stress index (OSI).

HÜPOKOLESTEREEMILIST PROBIOOTILIST MIKROORGANISMI TÜVE
LACTOBACILLUS PLANTARUM INDUCIA DSM 21379 SISALDAV
 KOMPOSITSOON KASUTAMISEKS SÜDAME-VERESOONKONNA HAIGUSTE
 ENNETAMISEKS

5 TEHNIKAVALDKOND

Käesolev leiutis kuulub mikrobioloogia ja toitumise valdkonda ning käsitleb tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379, millel on mitmeid biotehnoloogilisi rakendusi.

TEHNIKA TASE

10 LDL-kolesterol

Kõrgenenum kolesterolitase on südame-veresoonkonna haiguste väljakujunemisel üheks oluliseks teguriks. Kõrge kolesterolitaseme kahjulik mõju on tingitud kolesteroli erinevatest partiklitest, eelkõige madala tihedusega lipoproteiinidest (LDL-kolesterolist, *low density lipoprotein - cholesterol*) ja apolipoproteiinist B (ApoB).

15 LDL-kolesterol moodustab 60-70 protsendi kogu üldkolesterolist ja transpordib kolesteroli, triglütseriide, rasvlahustuvaid vitamiine ja antioksüdante. LDL-kolesterol on oluline modulaator ateroskleroosi ennetamisel ja südame-veresoonkonna tervise säilitamisel. Oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiinid (ox-LDL) on LDL-partiklite oksüdatiivse stressi markeriks. Ox-LDL-i võib pidada koronaarsete südamehaiguste 20 riski biokeemiliseks markeriks. LDL-kolesterol on laialdaselt tuntud kui südame-veresoonkonna riski marker. Arvukate kliiniliste katsete tulemused kinnitavad LDL-kolesteroli sõltumatut rolli südame isheemiatõve tekkimisel ja kujunemisel (<http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communique/2011/11.html>).

Probiootiliste mikroobide hüpopolestereemilise mõju üheks peamiseks mehhanismiks on sapisoolade hüdrolaasne aktiivsus (Pereira, D. I., McCartney, A. L., Gibson, G. R. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. Appl Environ Microbiol. 2003; 69: 4743-4752; Liong, M. T., Shah, N. P. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. Int Dairy J. 2005; 15: 391–398; Lye, H. S., Rahmat-Ali, G. R., Liang, M. T. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that

hüdrolaas (BSH, *bile salt hydrolase*) (EC 3.5.1.24; cholylglycine/kolüülglütsiinhüdrolaas) on ensüüm, mis katalüüsib glütsiini ja/või tauriinkonjugeeritud sapisoolade hüdrolüusi vabadeks sapisooladeks ja aminohappe jäärkideks. Piimhappebakterite, kaasa arvatud *Lactobacillus sp* hulgas on BSH aktiivsus tugevalt seotud mikroobi loomuliku 5 kasvukeskkonnaga ning on enam täheldatud inimese soolestiku koloniseerivate mikroobide korral, kuid BSH aktiivsus on siiski tüvespetsiifiline omadus.

Tervise seisukohast on äärmiselt oluline soole limaskesta epiteelirakkude ja seedekulgla mikrofloora omavaheline tihe interaktsioon. Loomulikku mikrofloorasse kuuluvad laktobatsillid assimileerivad toiduainetest kolesterooli (Gilliland, S. E., Nelson, C. R., 10 Maxwell, C., 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. Appl Environ Microbiol, 49, 377-381). In patent of Cuñé Castellana, 2009 (EP2485743B1; AB Probiotics S.A.). *Lactobacillus plantarum* tüved CECT 7528, CECT 7526 ja CECT 7529 üksikult või koos kompositsoonina alandavad kolesterooli nii *in vitro* kui *in vivo* tingimustes. Nimetatud tüvedel on sapisoolade hüdrolaasi BSH aktiivsus, samuti 15 antagonistlik aktiivsus patogeensete tüvede (*Salmonella enterica Enteritidis*, *Salmonella enterica Typhimurium*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium ramnosus*, *Enterococcus faecalis*) suhtes ja neid tüvesid saab kasutada probiootiliste bakteritena.

Pereira koos oma kaastöötajatega on demonstreerinud lühikese ahelaga rasvhapete 20 kontsentratsiooni, eriti propionaadi molaarse proportsiooni ja/või sapisoolade dekonjugatsiooni olulist rolli *Lactobacillus fermentum*'i kolesterooli langetamise mehhanismis (Pereira, D. I., McCartney, A. L., Gibson, G. R., 2003. An *in vitro* study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. Appl Environ Microbiol, 69, 4743-25 4752).

Siiski on *Lactobacillus sp* tüvede mõju seerumi kolesterooli tasemele tüvespetsiifiline ja sõltub tüve päritolust ning konkreetsetest omadustest (Tanaka, H., K. Doesburg, T. Iwasaki and I. Mireau, (1999) Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. J. Dairy Sci., 82: 2530-2535).

30 Probiootikum

Probiootikum on elus mikrobiaalne toidu komponent, millel on piisavates doosides manustatuna kasulikud omadused inimese tervisele (Joint FAO/WHO Working Group

on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf> Retrieved 14.03.2014).

- Probiootilise tootena mõistetakse kindlat tüve sisaldavat preparaati, mis toimib peremeesorganismi mitmetele funktsioonidele (antiinfektsioosset, morfoloogilised, 5 immunoloogilised, metaboolsed) eesmärgiga soodsalt mõjutada tervist kas füsioloogilise aktiivsuse toetamise või haiguste riski vähendamise kaudu. On üldtunnustatud, et sama liigi piires võivad erinevatel tüvedel olla erinevad probiootilised omadused (Ouwehand, A. C., Salminen, S., Isolauri, E., Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek. 2002: 82, 279-289; Ljungh, A., 10 Wadström, T., Lactic acid bacteria as probiotics. Curr Issues Intest Microbiol. 2006: 7, 73-89).

Levinumad probiootilised mikroobid kuuluvad perekondadesse *Bifidobacteria* ja *Lactobacillus*. Probiootilisi mikroobe manustatakse tavapäraselt fermenteeritud piimatoodetega, nagu jogurt, keefir, juust, või toidulisanditena. Kääärsoole mikrofloora 15 on tasakaalustatud ja soole limaskesta mikrofloora ei muutu kergesti. Siiski, piisavates doosides (päevane doos vähemalt 10^9 PMÜ) manustumine võimaldab demonstreerida probiootikumi toimet.

Probiootikumide terapeutiline eesmärk on vähendada või elimineerida potentsiaalseid patogeene ja toksiine, sünteesida toitaineid, antioksüdante, kasvufaktoreid, stimuleerida 20 soole motoorikat ja moduleerida kaasasündinud ja adaptiivset immuunsust.

Lactobacillus plantarum on loodusles laialt levinud, leidudes fermenteeritud taimsel materjalil, piima- ja lihatoodetes ja samuti inimese soolestikus (Hammes, W. P., Weiss, N. and Hertel, K. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. Prokaryotes. 2006: 4:320–403).

25 Liigi *L. plantarum* tüved on saadaval probiootilise toidulisandina (*L. plantarum* 299v, DSM 9843, Probi AB, Sweden) ja kuuluvad samuti eri tüvesid sisaldava toidulisandi VSL#3 koostisesse (*L. plantarum* 299v, DSM 9843, Probi AB, Sweden).

Tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 on kirjeldatud kui antimikroobset peptiidi plantariitsini tootva, tsütokiin IL-6 indutseeriva, putressiini tootva ja soole 30 lümfikudet, loomuliku rakulist immuunsust ja soole limaskesta kaitsebarjääri parandava probiootikumina (Mikelsaar *et al.*, EP2288360B1, 2009, Tervisliku Piima Biotehnoloogiate Arenduskeskus OÜ).

Soolestiku häiritud mikrobiaalökoloogia

Seedetrakti mikrofloorat võivad tugevasti tasakaalust välja viia laia toimespektriga antibiootikumide kasutamine infektsioonide raviks ja põletiku komplikatsioonid.

Clostridium difficile infektsioon

Clostridium difficile tuvastati 1970-ndatel aastatel kui antibiootikumi-seoselise 5 kõhulahtisuse tekijaja. Eoseid moodustav, anaeroobne soolestiku patogeen *Clostridium difficile* on levinud haiglates ja vanadekodudes (Britton, R. A., Young, V. B., Interaction between the intestinal microbiota and host in *Clostridium difficile* colonization resistance. Trends Microbiol. 2012; 20, 313-319). Eksõgeenset päritolu *C. difficile* infektsiooni põhjuseks on nakatumine *C. difficile* eostega. Haiguse põhjustavad 10 mitte eosed, vaid vegetatiivsete rakkude toodetud toksiinid. Endospooride moodustamine on oluline mikroobi põhjustatud haiguse levikul. Haiguse esile kutsumiseks on vajalik spooride germinatsioon ja vegetatiivsete rakkude kasv (Burns D. A, Heap J. T. Minton N. P. *Clostridium difficile* spore germination: an update. Res Microbiol. 2010;161(9):730-4).

15

20 *C. difficile* infektsiooniga patsientidest veerandil (25 protsendil) kujuneb välja pseudomembranoosne koliit (PMK). *Clostridium difficile* põhjustatud kõhulahtisus (CDAD, *Clostridium difficile associated diarrhea*) suurendab suremust, voodipäevade arvu ja suurendab oluliselt kulutusi üldistele tervishoiuteenustele. Tänaseni röhutavad 25 ravijuhisid vankomütsiini kasutust mõõduka ja raske pseudomembranoosse koliidi puhul (<http://www.uptodate.com/contents/clostridium-difficile-in-adults-treatment>, alla laaditud 14.03.2014).

30 *Clostridium difficile* infektsioon kordub umbes 20 protsendil patsientidest ja tõuseb 40 kuni 60 protsendini järgnevate retsidiivide korral (Kelly, C. P., LaMont, J. T., *Clostridium difficile* - more difficult than ever. N Engl J Med. 2008; 359, 1932-1940). Antibiootikumravi rikub kompleksse ja tasakaalustatud mikroorganismide mitmekesisuse, mis on peamine faktor haiguse patogeneesis, *Clostridium difficile* kolonisatsioonis ja endogeenset päritolu haigestumisel. Korduvate *C. difficile* infektsioonidega CDI (*Clostridium difficile* infection) patsientide soolefloora mitmekesisus on oluliselt vähenenud võrreldes kontrollgrupiga (Chang, J. Y., Antonopoulos, D. A., Kalra, A., Tonelli, A., Khalife, W. T., Schmidt, T. M., Young, V. B. Decreased diversity of the fecal Microbiome in recurrent *C. difficile*-associated

- diarrhea. J Infect Dis. 2008; 197, 435-438). Mikroobide mitmekesisuse säilitamine ja taastamine võimaldaks luua uusi strateegiaid. Otsustava tähtsusega selle haiguse ennetamises ja ravis on leida võimalus antibiootikumravi käigus ja foonil teisenenud mikrofloora taastamiseks eri raviskeemide abil, sh probiootikumide manustamisega.
- 5 Enamik probiootikume koloniseerivad soolestiku ajutiselt, toodavad bakteritsiidseid happeid ja peptiide ning edendavad mikroobide omavahelist võitlust, võideldes toitainete ja epiteelile kinnitumise eest. Need mõjutused tunduvad vähendavat keskkonna sobilikku C. *difficile* jaoks. Eelnevad uuringud soovitavad CDI ennetamiseks kasutada probiootikumide kombinatsioone, mis sisaldavad liike *L. acidophilus* ja *L. casei*, *S. boulardii* või *L. rhamnosus*. Doosid, mis on suuremad kui 10^9 PMÜ/päevas, on efektiivsemad kui madalamad doosid.

- Probiootikumide antimikroobset aktiivsust on pakutud üheks mehhanismiks C. *difficile*-ga võitlemisel. Piimhappebakterid toodavad lühikese ahelaga rasvhappeid, mis alandavad soolestiku pH-d ja takistavad C. *difficile* kinnitumist (McFarland, L. V., 15 Beneda, H. W., Clarridge, J. E., Raugi, G. J. Implications of the changing face of C. *difficile* disease for health care practitioners. Am J Infect Control. 2007; 35, 237-253). Probiootikumide teine võimalus kaitsta soolestiku barjäärifunktsiooni võib olla C. *difficile* A ja B toksiinide seondumise takistamine ja seeläbi soole epiteelile pseudomembraanide tekke takistamine.
- 20 Samas ei oma kõik probiootikumid eelpoolmainitud mehhaniisme. Laktobatsillide tüvespetsiifilisus on oluline faktor, mida tuleb arvestada C. *difficile* infektsiooni profülaktikaks ja raviks uute potentsiaalsete probiootikumide otsimisel (Tejero-Sariñena S., Barlow J., Costabile A, Gibson G. R., Rowland I. Antipathogenic activity of probiotics against *Salmonella Typhimurium* and *Clostridium difficile* in 25 anaerobic batch culture systems: Is it due to synergies in probiotic mixtures or the specificity of single strains? Anaerobe. 2013; 24; 60-65).
- Veelgi enam, mõned kliinilised uuringud pole suutnud anda statistiliselt piisavaid tõendeid tõestamaks teatud probiootikumide efektiivsust CDAD ennetamiseks. Suures randomiseeritud kliinilises katses, mis hõlmas 2941 antibiootikumravi saavat eakat, ei 30 leidnud katse läbivijad CDI riski vähenemist probiootikumi (*Lactobacillus acidophilus* ja *Bifidobacterium bifidum* segu) saavate eakate hulgas võrreldes kontrollgrupiga (RR 0.71; 95% CI 0.34-1.47; p =0.35) (Allen, S. J., Wareham, K., Wang, D., Bradley, C.,

Hutchings, H., Harris, W., Dhar, A., Brown, H., Foden, A., Gravenor, M. B., Mack, D. Lactobacilli and bifidobacteria in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in older inpatients (PLACIDE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. Lancet. 2013; 382, 1249-1257). Pärast 5 aastaid kestnud kliinilistes uuringutes erinevate probiootikumide toime uurimist CDI ravis on endiselt arutluse all probiootikumi tüve, doosi ja toime kasutamine raviskeemis (Naaber, P., Mikelsaar, M., Interactions between Lactobacilli and antibiotic-associated diarrhea. Adv Appl Microbiol. 2004; 54: 231-260).

Ksülitooli kasutamine

10 Ksülitool on 5-C suhkrualkohol, pentitool ja seda leidub taimedes, seentes ja algloomades. Ksülitool on oluline imetajate süsivesikute metabolismi vaheprodukt, näiteks inimveri sisaldab kuni 8×10^{-5} M ksülitooli.

15 Manustatud ksülitool ei absorbeeru täielikult ja imendumata osa saab kasutada kiudainena bakteriaalsel fermentatsioonil muutes ksülitooli lühikese ahelaga rasvhapeteks, mida kasutatakse energеetilistes radades. Ksülitool mõjutab mõnede mikrofloora liikide kasvu jämesooles, soodustades indigeense mikrofloora kasvu ja aktiivsust. Üks gramm ksülitooli sisaldab 2,4 kcal, võrreldes glükoosiga, mis sisaldab 3,87 kcal ühes grammis. Ksülitooli reklaamitakse kui "ohutut" diabeetikutele ja hüperglükeemiat põdevatele isikutele (Talbot J. M., Fisher K. P., The Need for Special 20 Foods and Sugar Substitutes by Individuals with Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1978; 1; 231-240).

25 Varasemates uuringutes oleme leidnud, et 1 protsendi ksülitooli lisamine kasvukeskkonda takistas *Clostridium difficile* VPI 10463 vegetatiivsete rakkude kinnitumist CACO-2 rakkudele, tõenäoliselt blokeerides rakul olevad retseptorid. Hamstri mudelisse kohaldatuna (Naaber, P., Lehto, E., Salminen, S., Mikelsaar, M., Inhibition of adhesion of *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996; 14, 205-209) kaitses 1 ml 20 protsendilise ksülitooli ja *Lactobacillus rhamnosus* GG lahuse manustumine loomi raske enterokoliidi tekkimise vastu (Naaber, P., Lehto, E., Salminen, S., Mikelsaar, M., Inhibition of adhesion of *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996; 14, 205-209). Nendes katsetes, kus kasutati ksülitooli ja probiootikumi *Lactobacillus rhamnosus* GG kombinatsiooni, nakatati rakukultuuri ja hamstreid eelnevalt anaeroobsetes tingimustes 30

kultiveeritud *Clostridium difficile* vegetatiivsete rakkudega.

Kliinilises praktikas (meditsiiniasutustes) või vanadekodudes aga areneb haigus nakatumisel aeroobsetele tingimustele ülimalt vastupidavate *C. difficile* eostega. Eoste germinatsioon toimub peremeesorganismis.

- 5 Mõned autorid on väitnud, et loommadelites võivad mõningad suhkrud sarnaselt glükoosile blokeerida *C. difficile* A ja B toksiinide ekspressiooni (Karlsson, S., Burman, L. G., Akerlund, T. Induction of toxins in *Clostridium difficile* is associated with dramatic changes of its metabolism. *Microbiology*. 2008; 154, 3430-3436).

Seega on endiselt vajadus leida probiootilisi tüvesid, mis efektiivselt vähendavad LDL-

- 10 kolesterooli, eriti ox-LDL-i ning vähendavad ka *Clostridium difficile* nakatumise riski.

LEIUTISE OLEMUS

Käesolev leiutis pakub mikroobikollektsioonis Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH 16.04.2008 registreerimisnumbriga DSM 21379 deponeeritud tüve *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldaava kompositsooni 15 kasutamiseks hüpopolestereemilise agendina kolesterooli metabolismi häirete ja nendest lähtuvate südame-veresoonkonna haiguste ennetamiseks LDL-kolesterooli taseme vähendamise teel veres ja samaaegseks kasutamiseks antioksiidiativse agendina inimkeha antioksiidiativse aktiivsuse tõstmiseks oksüdatiivse stressi markeri - oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiinide (ox-LDL) taseme ning oksüdatiivse 20 stressi indeksi (OSI) ja peroksiidide üldhulga (TPX) vähendamise abil. Seega omavad *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldaavad kompositsoonid ja toidutooted südant kaitsvat toimet.

Leiutise teine eesmärk on pakkuda tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisalav kompositsoon kasutamiseks antimikroobse agendina endogeenset ja/või 25 eksogeenset päritolu *Clostridium difficile* põhjustatud kõhulahtisuse (CDAD) riski vähendamiseks *Clostridium difficile* eoste germinatsiooni takistamise ja *Clostridium difficile* vegetatiivsete rakkude paljunemise allasurumise teel. *L. plantarum* Inducia on kasutatav samaaegselt antibiootikumraviga.

Clostridium difficile vastased kompositsoonid võivad lisaks sisaldada ka ksülitooli.

- 30 *L. plantarum* Inducia sisaldaava kompositsoone saab kasutada toiduainete,

toidulisandite, farmaatsia- või veterinaartoodete tootmiseks. Toiduained võivad olla piima- või lihatooted, maiustused jne. Piimatooted võivad olla hapendatud piimatooted, juust, jogurt jne.

Toidulisandit võib kasutada pulbrina (kapslid, pastillid, tabletid, pulbrikotikesed jne)

5 või vedelal (ampullid) kujul. Tüve võib kasutada ka külmkuivatatuna.

Tüve *L. plantarum* Inducia DSM 21379 efektiivne doos on vahemikus 1×10^9 PMÜ kuni 1×10^{10} PMÜ, soovitavalt 5×10^9 PMÜ päevas.

JOONISTE LOETELU

Fig 1 keskkonna pH väärtsused tüve *L. plantarum* Inducia sisaldavas ksülitooli lisandiga

10 ja modifitseeritud MRS kontrollsöötmes mikroaeroobses ja anaeroobses keskkonnas.

Fig 2 toksiinide A ja B geenide olemasolu tüvel *C. difficile* VPI 10643 määratuna pöördtranskriptsiooni (RT) ja reaalaja PCR amplifikatsiooniga (qPCR).

Fig 3 toksiin B geeni esinemine ampitsilliini ja *C. difficile* mõjutatud hamstri peensooles ja maksas määratuna pöördtranskriptsiooni (RT) ja reaalaja PCR amplifikatsiooni

15 (qPCR) meetodiga.

Fig 4a jämesoole normaalne limaskest pärast probiootikumi manustamist.

Fig 4b jämesoole *C. difficile* infektsiooniga limaskest.

Fig 5a eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. Mõõdukas hüpereemia peensooles.

20 Fig 5b eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. Mõõdukas hüpereemia jämesooles ja intensiivne punetus.

Fig 5c eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. Mõõdukas hüpereemia kõhunäärmes.

Fig 5d eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. Mõõdukas 25 hüpereemia põrnas.

Fig 5e eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused Pseudomembraanid peensooles.

Fig 5f eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. PMN infiltratsioon pseudomembraanidega jämesooles.

30

LEIUTISE TEOSTAMISE NÄITED

Leiutist illustreerivad järgnevad näited, mis ei piira leiutise ulatust.

I. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasutamine hüpopolestereemilise agendina LDL-kolesterooli taseme vähendamise teel veres

Näide 1. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sapphapee hüdrolaasi aktiivsus

Järgneva *in vitro* testi eesmärk oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sapphapee soolade hüdrolaasi aktiivsust.

Meetodid. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sapisoolade hüdrolaasi BSH aktiivsust hinnati analoogselt Cuñé Castellana, 2009 kasutatud meetodiga (EP 2 485743 B1; AB Probiotikumid SA).

Kolme *Lactobacillus* spp tüve kasvatati mikroaeroobsetes tingimustes üleöö MRS agaril temperatuuril 37°C. Pärast inkubeerimist kultuuride suspensioon standardiseeriti McFarland standardi 3,0 järgi. BSH aktiivsust hinnati monokultuuridel. Steriliseeritud paberdiskid immutati vastava kultuuriga ning inkubeeriti MRS söötmel, millele oli lisatud 4% taurodeoksükoolhape Na soola (*taurodeoxycholic acid* TDCA, Sigma, USA) ja 0,37 g/l CaCl₂ (w/v). Petri tasse inkubeeriti anaeroobselt 37 °C juures 72 h ja mõõdeti diskide ümber olev pretsipitatsiooni tsoon. BSH aktiivsuse arvutamiseks lahutati paberdiski diameetrist (DD, mm) pretsipitatsiooni diameeter (IZD, mm) ja jagati tulemus kahega, BSH aktiivsus = (IZD-DD) / 2 (Tabel 1).

Tabel 1. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sapisoolade hüdrolaasi (BSH) aktiivsus

	BSH aktiivsus (mm)
<i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379	1.7
<i>L. plantarum</i> BAA 793	1.5
<i>L. gasseri</i> DSM 23882	0.75

L. plantarum Inducia BSH aktiivsus oli kõrgem kui referentstüvedel *L. plantarum* BAA793 ja *L. gasseri* DSM 23882 (tabel 1).

Näide 2. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 LDL-kolesterooli vähendamise võime Kliinilise mõjutuskatse ISRCTN79645828 "Probiootilise jogurti toime tervete vabatahtlike verenäitajatele ja soolestiku mikroflooraal" eesmärk oli hinnata tüve *L. plantarum* Inducia sisaldava jogurti LDL-kolesterooli taseme alandamise võimet veres lühiajalise manustamise (3 nädalat) järel.

Jogurti valmistamine. Probiootiline jogurt valmistati normaliseeritud ja pastöriseeritud

(+92 ... + 95 °C 5 min) lehmapiimast, kasutades *L. plantarum* Inducia DSM 21379 (2×10^{11} CFU/g) lisajuuretisena (1g/t piimale). Pastöriseeritud piim jahutati 35 ... + 43 °C enne segamist starterkultuuride ja probiootilise tüvega. Piima fermenteeriti kuni happesuseeni pH 4,2 ... 4,5 ja jahutati + 23 ... + 27 °C. Jogurt magustati 5% suhkruga, 5 pakendati plastikust topsidesse ja jahutati +2 ... + 6 °C. Kontrolliks kasutati ilma probiootilise lisandita jogurtit.

- Kliinilise uuringu disain. Topeltpime platseebo-kontrollitud (DBPC) *cross-over* uuring viidi läbi vastavalt Helsinki deklaratsiooni juhistele. Kliiniline uuring kiideti heaks Tartu Ülikooli Inimuuringute eetika komitee poolt (protokoll number 190T-11, 2010).
- 10 Uuringusse lülitumisel kirjutasid kõik osalejad alla kirjalikule nõusoleku vormile ja neil oli võimalus uuringust igal ajal taganeda. Uuringu eesmärk oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava jogurti toimet tervete vabatahtlike (n=49) tervise biomarkeritele. Osalejatel paluti loobuda probiootilistest toodetest (nt toidulisandid, jogurtid, juust, keefir jne) üks kuu enne uuringu algust, kuid jätkata oma tavapärist 15 toitumist.
- Kaks osalejate gruppi alustasid samaaegselt 3nädala pikkust vastavalt ilma probiootilise lisandita kontrolljogurti või *L. plantarum* Inducia DSM 21379 (4×10^7 PMÜ/g) sisaldava testjogurti tarbimist 150 g päevas. Probiootilise tüve *L. plantarum* Inducia päevane doos oli 6×10^9 PMÜ. Pärast kahe nädala pikkust vaheperioodi (*wash out*) lülitusid osalejad 20 ümber teise kolme nädala pikkuse probiootilise või kontroll- jogurti tarbimise perioodile.
- Kliinilised uuringud. Osalejaid uuriti kliiniliselt, vereplasma proovid koguti hommikul tühja kõhuga ja enne ravimite, tubaka, alkoholi ja kohvi või tee tarvitamist. Iga osaleja kohta koguti antropomeetrilised näitajad. Kehamassiindeks (KMI) arvutati kehakaalu 25 (kg) jagamisel pikkuse ruuduga (m^2). KMI alusel liigitati terved vabatahtlikud katses osalejad järgmiselt: normaalne kaal ($18,5\text{--}24,9 \text{ kg/m}^2$), ülekaalulitus ($\geq 25,0 \text{ kg/m}^2$) ja rasvumine ($\geq 30,0 \text{ kg/m}^2$) (WHO. The International Task Force. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva, Switzerland. WHO/Nut/NCD/98. 1998;1).
- 30 Paastuvvere proovid koguti neli korda: katsesse sisenemisel, pärast testtoote (probiootiline või kontrolljogurt) tarbimist, pärast kahe nädalast vaheperioodi ning teise

testtoote tarbimise perioodi lõpus.

Hematoloogilised näitajad, plasma lipiidid: üldkolesterooli, LDL-kolesterooli, HDL-kolesterooli ja triglütseriidid määrati kohalikus kliinikumi laboris, sertifitseeritud ja standardiseeritud laboratoorsete meetodite abil (Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabor,

- 5 Eesti). Tavapäraste laborimõõtmiste referentsväärustustena kasutati *Nordic Reference Interval Project* poolt pakutud referentsintervalle (NORIP, Rustard P., Felding P., Franszon L., Kairisto V., Lahti A., Martensson A., Hyltoft Petersen P., Simonsson P., Steensland H., Uldall A. The Nordic Reference Interval Project 2000: recommended reference intervals for 25 common biochemical properties. Scand J Clin Lab Invest.
- 10 2004;64:271 – 284).

Statistilised analüüsid

Statistiliste analüüside läbiviimiseks kasutati R 2.10.1 (<http://www.r-project.org>, alla laaditud 25.03.2014) ja GraphPad Prism versiooni 4.00 Windowsile (GraphPad Software, San Diego, CA). Kõiki tulemusi väljendati keskmise väärustusena ja lisati 15 standardhälve (keskmised \pm SD). Algväärtuste ja mõjutuse tulemuste võrdlemiseks kasutati paarisi t-testi või Wilcoxon testi, olenevalt normaaljaotusest.

Erinevused loeti statistiliselt oluliseks, kui väärus oli $p < 0,05$.

Läbiviidud *cross-over* uuringus tervete vabatahtlike kaks gruuppi oma kliiniliste andmete poolest ei erinenud (tabel 2).

20 Tabel 2. Tervete vabatahtlike näitajate algtase

Vanus	Grupp 1 n=25	Grupp 2 n=24	P väärus
	35,8 \pm 12,0 19,0 – 58,0 (34,0)	38,0 \pm 12,7 19,0 – 62,0 (36,5)	0,617
sugu F / M) **	18 / 7	18 / 6	1,0
HbA1c *	5,5 \pm 0,2	5,5 \pm 0,3	0,976
BMI KMI	23,8 \pm 4,3 18,1 – 34,6 (22,7)	25,2 \pm 5,2 18,6 – 43,4 (25,3)	0,297
vöö//puus	0,78 \pm 0,06 0,68 – 0,97 (0,77)	0,79 \pm 0,07 0,68 – 0,94 (0,79)	0,434
süstoolne vererõhk	118,3 \pm 10 101,0 -144,5 (118,0)	121,6 \pm 15,5 98,5 – 158,0 (117,8)	0,660
diastoolne vererõhk	77,5 \pm 7,4 63,5 – 92,5 (76,7)	78,6 \pm 8,8 65,5 – 98,5 (79,3)	0,719

Vanus	Grupp 1 n=25	Grupp 2 n=24	P väärthus
üldkolesterol	5,1 ± 1,1	5,2 ± 0,9	0,952
LDL-kolesterol	3,4 ± 1,0	3,4 ± 1,2	0,873
HDL-kolesterol	1,7 ± 0,4	1,7 ± 0,5	0,719
Triglütseriidid	1,2 ± 1,0	1,1 ± 0,3	0,298
Glükoos	4,9 ± 0,5	4,9 ± 0,4	0,560

*, glükohemoglobiin ** Fisheritäpne test

Tabel 3. Vereseerumi metaboolised näitajad uuringu jooksul

	probiootiline jogurt		kontrolljogurt		P väärthused *BL1 vs PRO / BL2 vs PL (BL1 vs BL2, PRO vs PL)
	algtase 1	probiootiline periood	algtase 2	platseebo periood	
Üld- kolesterol	5,2 ± 1,0 3,0 – 8,1 (5,1)	5,1 ± 0,9 3,2 – 7,1 (5,0)	5,1 ± 0,9 3,2 – 7,5 (4,9)	5,1 ± 0,9 3,5 – 7,7 (5,0)	0,081 / 1,0 (0,588, 0,172)
LDL- kolesterol	3,3 ± 1,0 1,3 – 6,2 (3,3)	3,0 ± 0,9 1,2 – 5,0 (2,9)	3,3 ± 1,1 1,1 – 6,1 (3,2)	3,1 ± 1,0 0,9 – 5,6 (2,9)	<0,001 / 0,099 (0,358, 0,329)
HDL- kolesterol	1,7 ± 0,5 0,8 – 3,1 (1,8)	1,7 ± 0,5 1,0 – 3,3 (1,7)	1,7 ± 0,5 0,9 – 3,0 (1,8)	1,7 ± 0,5 0,9 – 3,1 (1,7)	0,569 / 0,402 (0,896, 0,788)
Tri- glütseriidid	1,1 ± 0,8 0,4 – 4,4 (0,9)	1,1 ± 0,6 0,3 – 3,9 (0,9)	1,1 ± 0,6 0,5 – 4,0 (1,0)	1,1 ± 0,6 0,5 – 4,1 (1,0)	0,694 / 0,456 (0,834, 0,412)

*BL1: algtase 1; PRO: probiootiline periood (st *L. plantarum* Inducia sisaldav

5 probiootikum); BL2: algtase 2; PL: platseebo periood.

Pärast *L. plantarum* Inducia DSM 21379 tarbimist ilmnesid muutused LDL-kolesterooli hulgas. LDL-kolesterooli sisaldus vähenes pärast *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava jogurti tarbimist (tabel 3).

Seega *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava jogurti tarbimine 3 nädala jooksul

10 vähendas LDL-kolesterooli taset veres 9,1%.

Näide 3. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava jogurti toime oksüdatiivse stressi markeritele, oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiinile (oxLDL), oksüdatiivse stress indeksile (OSI, *oxidative stress index*) ja peroksiidide üldhulgale (TPX, *total peroxide count*)

15 Topeltpimedas kahe paralleelse õлага uuringus ISRCTN26344255 tarbisid kergelt

5 hüperkolestereemilised (≥ 3.0 mmol / L LDL-kolesterooli tase) täiskasvanud (n = 136) 8 nädala jooksul päevas 150 g probiootilist jogurtit (*L. plantarum* Inducia DSM 21379 päevane doos oli 5×10^9 PMÜ) või kontrolljogurtit. Probiootilise toote lühiajaline mõju mõõdeti pärast 4-nädalast mõjutamist ja püsivat mõju mõõdeti uuringu lõpus, st pärast 8 nädalast mõjutust.

Uuring oli heaks kiidetud Tartu Ülikooli Inimuuringute eetika komitee poolt (protokoll number 207/M-11 19.09.2011).

10 150 g *L. plantarum* Inducia DSM 21379 (keskmise päevane doos 5×10^9 PMÜ) sisaldaava jogurti igapäevane tarbimine põhjustas pideva LDL-kolesterooli taseme languse probiootilises grupis 4 ja 8 nädalase tarbimise järel (-0,12 mmol/l; p = 0,04) ja peale 8 nädalat jogurti tarbimist võrreldes algtasemega (-0,09 mmol/l; p = 0,029) (tabel 4a ja 4b).

15 Ox-LDL on LDL-kolesterooli partiklite-spetsiifiline oksüdatiivse stressi marker, mida võib pidada üheks südame- ja veresoonkonnahaiguste biokeemilise riski markeriks. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldaava jogurti manustumise tulemuseks oli püsiv ox-LDL taseme vähenemine probiootilise jogurti grupis 8 nädalase mõjutuse järel (tabel 5a ja 5b). Muutus 8 nädala ja algtaseme näitude vahel oli statistiliselt oluline (-4,10 U / L; p=0,003). Muutus oli ülimuslik ka platseebogrupi suhtes (p=0,026). Platseeborühmas muutust ei tähdeldatud.

20 20 *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldaava jogurti manustamine põhjustas ka oksüdatiivse stressi indeksi (OSI) olulise alanemise (-5,37; p <0,001) peale 8 nädalast tarbimist (tabel 6a ja 6b). Muutus oli oluline ka võrreldes platseebogrupiga (p = 0,04). Platseeborühmas muutust ei tähdeldatud.

Tabel 4a. LDL-kolesterooli tase (mmol/l) visiitide jooksul

		Mõjutus		
		<i>L. plantarum</i>	Platseebo	p-väärtus ^a
		Inducia		
W0: LDL	keskmine	3,56	3,6	0,804
	Std	0,59	0,67	
	Min	2,52	2,42	
	Q1	3,12	3,08	
	Mediaan	3,5	3,52	
	Q3	3,86	4,06	
	Max	5,06	5,27	
W4: LDL	Keskmine	3,56	3,59	0,552
	Std	0,64	0,73	
	Min	2,66	2,19	
	Q1	3,08	3,02	
	Mediaan	3,49	3,66	
	Q3	3,93	4,09	
	Max	5,38	4,97	
W8: LDL	Keskmine	3,48	3,59	0,350
	Std	0,67	0,69	
	Min	2,13	2,29	
	Q1	2,96	3,04	
	Mediaan	3,38	3,59	
	Q3	3,9	4,06	
	Max	5,32	5,35	

^aWilcoxon; W0: visiit 2, mõjutuse algus; W4: visiit 3, peale 4-nädalast mõjutust; W8:
5 visiit 4, peale 8-nädalast mõjutust.

Tabel 4b. LDL-kolesteroli (mmol/l) taseme muutus peale 8-nädalast *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava jogurti tarbimist

		Mõjutus		
		<i>L.plantarum</i> Inducia	Platseebo	p-väärtus ^a
muutus W4-W0	Keskmine	0,01	-0,02	0,629
	Std	0,41	0,48	
LDL	Min	-0,85	-0,93	
	Q1	-0,28	-0,33	
	Mediaan	-0,01	-0,07	
	Q3	0,22	0,22	
	Max	1,35	1,42	
	p-väärtus ^b	0,700	0,443	
muutus W8 - W0	Keskmine	-0,09	-0,01	0,207
	Std	0,43	0m4	
LDL	Min	-1,01	-0,83	
	Q1	-0,39	-0,2	
	Mediaan	-0,13	-0,02	
	Q3	0,15	0,17	
	Max	1,41	1,4	
	p-väärtus ^b	0,029	0,847	
muutus W8 - W4	Keskmine	-0,12	0,03	0,058
	Std	0,42	0,43	
LDL	Min	-1,68	-1,17	
	Q1	-0,31	-0,3	
	Mediaan	-0,08	0,07	
	Q3	0,11	0,28	
	Max	0,79	0,83	
	p-väärtus ^b	0,040	0,357	

^aWilcoxon test; ^bWilcoxon test; W0: visiit 2, mõjutuse algus; W4: visiit 3, peale 4-nädalast mõjutust; W8: visiit 4, peale 8-nädalast mõjutust, p-väärtus^a: gruppidevaheline

5 (platseebo ja probiootilise gruvi vaheline) olulisus, p-väärtus^b: grupsisene olulisus.

Tabel 5a. Ox-LDL-kolesterooli (mmol/l) tase visiitide jooksul

		Mõjutus		
		<i>L. plantarum</i>	Plaatsebo	p-väärtus ^a
		Inducia		
		Keskmine	67,95	61,41
<i>W0:</i> <i>ox-LDL</i>	Std	17,75	17,95	
	Min	37,6	32,7	
	Q1	53,95	46,4	
	Mediaan	66,2	55,6	
	Q3	83	74	
	Max	108,3	108,2	
<i>W4:</i> <i>ox-LDL</i>	Std	17,27	17,87	0,234
	Min	40,7	34,4	
	Q1	51,9	47,9	
	Mediaan	61,5	56,7	
	Q3	77,1	76,6	
	Max	111,2	100	
<i>W8:</i> <i>ox-LDL</i>	Std	15,48	16,97	0,575
	Min	40,1	37,4	
	Q1	48,6	47,1	
	Mediaan	62,05	61,7	
	Q3	73,15	74,2	
	Max	99,2	105,6	

^aWilcoxon test; W0: visiit 2, mõjutuse algus; W4: visiit 3, peale 4-nädalast mõjutust;

5 W8: visiit 4, peale 8-nädalast mõjutust

Tabel 5b. LDL-kolesteroli taseme (mmol/l) muutus peale 8-nädalast *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava jogurti tarbimist

	Mõjutus	<i>L.plantarum</i> Inducia	Platseebo	p-väärtus ^a
	Keskmine	-1,85	0,61	0,116
Muutus W4 - W0	Std	7,27	9,2	
ox-LDL	Min	-17,7	-15,7	
	Q1	-6,7	-3,9	
	Mediaan	-1,6	0,2	
	Q3	2	4,7	
	Max	20,2	37,9	
	p-väärtus ^b	0,055	0,811	
	Keskmine	-4,1	0,55	0,026
Muutus W8 - W0	Std	8,84	10,57	
ox-LDL	Min	-26	-27,4	
	Q1	-8,1	-5,3	
	Mediaan	-3,95	0,2	
	Q3	1,05	6,3	
	Max	14	32,3	
	p-väärtus ^b	0,003	0,726	
Muutus W8 - W4	keskmene	-2,78	-0,16	0,097
	Std	8,6	9,41	
ox-LDL	Min	-24,4	-31,6	
	Q1	-8,3	-6,1	
	Mediaan	-2,9	1,4	
	Q3	3	4,6	
	Max	16,2	16,6	
	p-väärtus ^b	0,039	0,652	

^aWilcoxon test; ^bWilcoxon test; W0: visiit 2, mõjutuse algus; W4: visiit 3, peale 4-nädalast mõjutust; W8: visiit 4, peale 8-nädalast mõjutust; p-väärtus^a: gruppidevaheline (platseebo ja probiootilise gruvi vaheline) olulisus, p-väärtus^b: gruvi sisene

5 vaheline (platseebo ja probiootilise gruvi vaheline) olulisus, p-väärtus^b: gruvi sisene

olulisus.

Tabel 6a. Oksüdatiivse stressi indeks (OSI) uuringu väitel

		Mõjutus		
		<i>L.plantarum</i>	Platseebo	p-väärtus ^a
		Inducia		
	Keskmine	29,11	34,29	0,230
W0: OSI	Std	17,92	19,98	
	Min	5,36	0	
	Q1	14,7	19,24	
	Mediaan	24,84	31,8	
	Q3	40,52	48,03	
	Max	71,05	94,71	
	Keskmine	27,27	32,17	0,210
W4: OSI	Std	18,85	19,8	
	Min	4,83	0	
	Q1	12,14	16,25	
	Mediaan	25,09	29,07	
	Q3	35,47	46,78	
	Max	72,59	75,98	
	Keskmine	24,13	33,24	0,011
W8: OSI	Std	15,31	17,98	
	Min	4	0	
	Q1	13,65	17,59	
	Mediaan	20,62	35,03	
	Q3	31,87	46,61	
	Max	61,49	65,77	

5 ^aWilcoxon test; W0: visiit 2, mõjutuse algus; W4: visiit 3, peale 4-nädalst mõjutust; W8: visiit 4, peale 8-nädalast mõjutust.

Tabel 6b. Oksüdatiivse stressi indeksi (OSI) muutus peale 8 nädala pikkust *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava jogurti tarbimist

		Mõjutus		
		<i>L. plantarum</i> Inducia	Platseebo	p-väärtus ^a
	Keskmine	-0,8	-1,3	0,848
	Std	7,82	10,27	
Muutus W4 - W0	Min	-22,3	-22,61	
OSI	Q1	-4,01	-7,25	
	Mediaan	-0,46	1,09	
	Q3	3,23	4,05	
	Max	30,08	27,2	
	p-väärtus ^b	0,505	0,696	
	Keskmine	-5,37	-1,69	0,040
Muutus W8 - W0	Std	8,47	11,41	
	Min	-32,84	-35	
OSI	Q1	-8,72	-7,85	
	Mediaan	-3,95	0	
	Q3	-0,42	5,25	
	Max	16,99	25,09	
	p-väärtus ^b	<0,001	0.568	
	Keskmine	-4,73	1,1	0,010
Muutus W8 - W4	Std	7,04	14,77	
	Min	-22,55	-32,18	
OSI	Q1	-8,55	-7,03	
	Mediaan	-3,82	1,39	
	Q3	-0,11	6,87	
	Max	11,78	60,39	
	p-väärtus ^b	<0,001	0,717	

^aWilcoxon test; ^bWilcoxon test; W0: visiit 2, mõjutuse algus; W4: visiit 3, peale 4-nädalast mõjutust; W8: visiit 4, peale 8-nädalast mõjutust; p-väärtus^a: gruppide-

vaheline (platseebo ja probiootilise gruvi vaheline) olulisus, p-väärtus^b: grupisisene olulisus.

Tabel 7a. Peroksiidide üldhulk (TPX, mol/l) visiitide ajal

	W0: TPX	Keskmne	Mõjutus		p-väärtus ^a
			<i>L. plantarum</i> Inducia	Platseebo	
W0: TPX	Keskmne	443,98		516,53	0,247
	Std	255,3		289,82	
	Min	81		75	
	Q1	255		300	
	Mediaan	397,5		524,5	
	Q3	644		690	
	Max	945		1468	
W4: TPX	N	46		38	0,189
	Keskimne	414,8		498,05	
	Std	257,56		288,77	
	Min	73		102	
	Q1	175		250	
	Mediaan	363,5		422,5	
	Q3	573		700	
W8: TPX	N	45		37	0,009
	Keskmne	367,84		502,92	
	Std	209,55		240,8	
	Min	64		77	
	Q1	210		316	
	Mediaan	346		465	
	Q3	469		737	
	Max	838		1015	

^aWilcoxon test; W0: visiit 2, mõjutuse algus; W4: visiit 3, peale 4-nädalast mõjutust;

5 W8: visiit 4, peale 8-nädalast mõjutust.

Probiootilise (*L. plantrum* Inducia sisaldav jogurt) gruvi sees oli stabiilne peroksiidide üldhulga langus kogu uuringu välitel (tabel 7a ja 7b). Platseebogrupsis mingit efekti ei täheldatud. Olulist antioksüdatiivse kogumahtuvus muutust (*total antioxidantive*

capacity) ei täheldatud (tabel 8a ja 8b).

Tabel 7b. Peroksiidide üldhulga (TPX, mol/l) muutused peale 8-nädalast *L. plantarum* Inducia sisaldava jogurti tarbimist

		Mõjutus		
		<i>L. plantarum</i>		p-väärtus ^a
		Inducia	Platseebo	
	Keskmine	-23,48	-18,47	0,903
Muutus W4 - W0	Std	77,07	137,07	
	Min	-271	-325	
TPX	Q1	-51	-72	
	Mediaan	-15	-18,5	
	Q3	21	62	
	Max	143	383	
	p-väärtus ^b	0,044	0,416	
	Keskmine	-84,22	-36	0,227
Muutus W8 - W0	Std	116,4	147,78	
	Min	-473	-453	
TPX	Q1	-115	-118,5	
	Mediaan	-56	-54,5	
	Q3	-26	68,5	
	Max	84	261	
	p-väärtus ^b	<0,001	0,225	
	Keskmine	-67,91	-17,61	0,052
W8 difference from W4	Std	113,93	155,41	
	Min	-486	-466	
TPX	Q1	-87	-89,5	
	Mediaan	-55	-3	
	Q3	-2	67	
	Max	114	295	
	p-väärtus ^b	<0,001	0,758	

^aWilcoxon test; ^bWilcoxon test; W0: visiit 2, mõjutuse algus; W4: visiit 3, peale 4-

5 nädalast mõjutust; W8: visiit 4, peale 8-nädalast mõjutust; p-väärtus^a: gruppide-

vaheline (platseebo ja probiootilise gruvi vaheline) olulisus, p-väärtus^b: grupisisene olulisus.

Tabel 8a. Antioksüdatiivse kogumahtuvuse (TAC, mmol Trolox ekvivalent/l) tase visiitide jooksul

		Mõjutus		
		<i>L. plantarum</i>	Platseebo	p-väärtus ^a
		Inducia		
W0: TAC	Keskmine	1,52	1,48	0,361
	Std	0,25	0,19	
	Min	1,01	1,03	
	Q1	1,34	1,34	
	Mediaan	1,52	1,44	
	Q3	1,69	1,58	
	Max	2,01	1,94	
W4: TAC	Keskmine	1,49	1,47	0,541
	Std	0,23	0,19	
	Min	0,93	1,13	
	Q1	1,33	1,35	
	Mediaan	1,53	1,43	
	Q3	1,69	1,63	
	Max	1,84	1,85	
W8: TAC	Keskmine	1,53	1,46	0,106
	Std	0,21	0,2	
	Min	1,12	1,12	
	Q1	1,43	1,29	
	Mediaan	1,53	1,46	
	Q3	1,61	1,66	
	Max	2,07	1,9	

5 ^aWilcoxon test; W0: visiit 2, mõjutuse algus; W4: visiit 3, peale 4-nädalast mõjutust; W8: visiit 4, peale 8-nädalast mõjutust.

Tabel 8b. Antioksiidatiivse kogumahtuvuse (TAC, mmol Trolox ekvivalent/l) taseme muutus pärast *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldaava jogurti manustamist 8 nädala jooksul

		Mõjutus	<i>L. plantarum</i> Inducia	Platseebo	p-väärtus ^a
Muutus W4 - W0	Keskmine	-0,03	-0,01	0,256	
	Std	0,23	0,15		
	Min	-0,51	-0,44		
TAC	Q1	-0,14	-0,06		
	Mediaan	-0,05	0,01		
	Q3	0,09	0,1		
	Max	0,63	0,23		
	p-väärtus ^b	0,274	0,692		
Muutus W8 - W0	Keskmine	0	-0,02	0,891	
	Std	0,22	0,19		
	Min	-0,49	-0,44		
TAC	Q1	-0,13	-0,13		
	Mediaan	0,01	-0,03		
	Q3	0,1	0,14		
	Max	0,52	0,44		
	p-väärtus ^b	0,811	0,574		
Muutus W8 - W4	Keskmine	0,04	-0,01	0,237	
	Std	0,2	0,16		
	Min	-0,41	-0,36		
TAC	Q1	-0,11	-0,12		
	Mediaan	0,06	0,02		
	Q3	0,13	0,08		
	Max	0,66	0,38		
	p-väärtus ^b	0,342	0,706		

^aWilcoxon test; ^bWilcoxon test; W0: visiit 2, mõjutuse algus; W4: visiit 3, peale 4-

5 nädalast mõjutust; w8: visiit 4, peale 8-nädalast mõjutust; p-väärtus^a: gruppidevaheline (platseebo ja probiootilise gruvi vaheline) olulisus; p-väärtus^b: grupisisene olulisus.

Järeldus. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldaava jogurt omab südameveresoonkonnahaiguste eest kaitsvat toimet alandades LDL-kolesterooli taset veres,

lisaks kaitseb inimkeha oksüdatiivsete kahjustuste eest ja tõstab antioksüdatiivset aktiivsust, alandades oksüdatiivse stressi markereid ox-LDL, OSI ja TPX.

II. Tüve *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasutamine antimikroobse agendina, *C. difficile* spooride germinatsiooni ja vegetatiivsete rakkude proliferatsiooni takistajana

- 5 Näide 4. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 antagonistlik aktiivsus *C. difficile* vegetatiivsete rakkude vastu anaeroobses keskkonnas *in vitro*

Uuringu eesmärk oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 antagonistlikku aktiivsust *C. difficile* tüvede vastu anaeroobses keskkonnas.

- 10 Meetodid. Testitud tüved: *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *C. difficile* VPI 10463 (ATCC 43255), hüpervirulentne tüvi M 13042.

Mikroobitüved külvati tahkele söötmele ning inkubeeriti anaeroobses keskkonnas. Füsioloogilises lahus tehti mikroobide suspensiooni vastavalt MacFarlandi standardile 3 (10^8 PMÜ/ml). 200 ml BHI söödet inokuleeriti nimetatud suspensiooniga (0,2 ml) saavutamaks lõpp-kontsentratsiooni 10^5 PMÜ/ml.

Eri ajahetkedel tehti bakterioloogilised väljakülvid (0,1 ml) MRS ja LAB160 söötmetele. Väljakülve inkubeeriti paralleelselt anaeroobses ja mikroaeroobses keskkonnas. Kasvu hinnati 2-5 päeva pärast ja tulemused väljendati log₁₀ PMÜ/ml.

- 20 Tabel 9. *C. difficile* referentstüvede vegetatiivsete rakkude proliferatsiooni pidurdus kooskultiveerimisel tüvega *L. plantarum* Inducia DSM 21379 0, 24, pärast 48 tundi

	kasv (log PMÜ/ml)		
	0 h	24 h	48h
Monokoltuuri proliferatsioon BHI söötmes			
<i>L. plantarum</i> Inducia	5,3	8,0	6,3
	5,8	4,6	7,5
Kliiniline referentstüvi M 13042	5,3	5,3	7,5
<i>L. plantarum</i> Inducia ja <i>C. difficile</i> vegetatiivsete rakkude proliferatsioon kooskultiveerimisel BHI söötmes	0 h	24 h	48 h
<i>L. plantarum</i> Inducia koos tüvega <i>C. difficile</i> VPI	5,8	8,8	7,3
<i>L. plantarum</i> Inducia koos referentstüvega M	5,6	8,5	6,0
<i>C. difficile</i> VPI10463 koos tüvega <i>L. plantarum</i> Inducia	5,5	0	0

<i>C. difficile</i> M 13042 koos tüvega <i>L. plantarum</i>	5,3	0	0
Inducia			

C. difficile vegetatiivsete rakkude täielik inhibeerimine BHI söötmes *L. plantarum* Inducia DSM 21379 poolt ilmnes pärast 48-tunnist inkubatsiooni mikroobide elulemuse kontrollväljakülvide selektiivsetele söötmetele MRS ja LAB160. Suurim *L. plantarum* Inducia DSM 21379 tihedus BHI söötmes oli pärast 24-tunnist inkubatsiooni. *L. plantrum* Inducia DSM 21379 hulk pärast 48-tunnist inkubatsiooni mõnevõrra langes nii monoklutsuuris (6.3 log PMÜ/g) kui kombinatsioonis *C. difficile*'ga (7.3 ja 6.0 log PMÜ/g) (tabel 9).

- Näide 5. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 supernatandi mõju *Clostridium difficile* referents- ja kliiniliste tüvede vegetatiivsetele rakkudele
- 10 Antud *in vitro* katse eesmärk oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 antimikroobset toimet *C. difficile* referents- ja kliinilisest materjalist isoleeritud tüvede (kliiniliste tüvede) vegetatiivsetele rakkudele. Naturaalse (happelise) ja neutraliseeritud (antimikroobsed ained, nt peptiidid) supernatandi toime eristamine võimaldab hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 antagonistliku aktiivsuse erinevaid mehanisme - kas 15 toimivad pigem orgaanilised happed või bakteriotsiinid.

- Materjal (tüved) (tabel 10)
- L. plantarum* Inducia DSM 21379
- Clostridium difficile* referenttüved VPI 10463 ja M 13042
- 20 *Clostridium difficile* kliinilised isolaadid (11 tüve)

- Meetodid. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 supernatandi antimikroobset toimet testiti *C. difficile* referents- ja kliiniliste tüvede suhtes mikrotiiterplaatidel (MTP). *L. plantarum* Inducia DSM 21379 säilitati -80 °C klaaskuulikestega mikrokatsutites ja 25 aktiveerimiseks kultiveeriti 3x0,15 protsendilise agari lisandiga MRS puljongis ning inkubeeriti mikroaeroobses keskkonnas (10-protsendiline CO₂) temperatuuril 37 °C 24 tundi. BHI puljungi inokuleerimiseks kasutati üleöö kasvanud *L. plantarum* Inducia DSM 21379, mida lisati BHI puljongile 1 protsent v/v ja suspensiooni inkubeeriti mikroaeroobsetes tingimustes 24 tundi. Supernatandi antimikroobse aktiivsuse 30 hindamiseks tsentrifuugiti 24 tunni vanust suspensiooni ning eraldati supernatant.

Mõõdeti supernatandi pH ja supernatant jagati kaheks osaks. Üks osa supernatandist jäeti naturaalselt happeliseks ja teine osa neutraliseeriti 6N NaOH-ga kuni pH väärthuseni 6,0 ning mõlemad supernatandid filtersteriliseeriti.

- 5 *C. difficile* tüvesid säilitati -80 °C klaaskuulikestega mikrokatsutites ja aktiveerimiseks külvati 3x hobusevere lisandiga *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA) söötmele ja inkubeeriti anaeroobses keskkonnas (anaeroobne käsboks, gaasisegu 90% N:5% CO₂:5% H₂) 24 tundi. Üleöö kasvanud *C. difficile* kultuuri kasutati suspensiooni tegemiseks, mis vastas tihedusele Mac Farland 3,0. *L. plantarum* Inducia DSM 21379
10 antimikroobse aktiivsuse hindamiseks tehti järgmised katsesegud: 20 µl *C. difficile* rakususpensioonile lisati 180 µl: (1) steriilne BHI puljong (kontroll), (2) rakuvala BHI supernatant, (3) rakuvala neutraliseeritud supernatant, (4) lahjendatud rakuvala supernatant (1:1 steriilses BHI puljongis) ja (5) lahjendatud neutraliseeritud rakuvala supernatant (1:1 steriilses BHI puljongis).
- 15 *C. difficile* kasvu (optilise tiheduse väärtsuse muutus) hinnati pärast 48 tunni inkubatsiooni, optiline tihedus mõõdeti MTP lugejaga OD_{620nm} juures ning seejärel arvutati kasvumuutus.
- 20 *L. plantarum* Inducia DSM 2137 inhibeerivat toimet hinnati Kruskal-Wallise testiga, kus *C. difficile* kasvutihedust (OD_{620nm}) kontrollsöötmes võrreldi *C. difficile* kasvu tihedusega loodusliku ja neutraliseeritud supernatandis. Statistiklike andmete analüüsiks kasutati PAST Statistics veebipõhist programmi.

Tabel 10. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 naturaalse ja neutraliseeritud supernatandi ja lajhendatud supernatandi antimikroobne aktiivsus *C. difficile* referents- ja kliiniliste tüvede suhtes 48-tunnise inkubatsiooni järel

<i>C. difficile</i> tüved	<i>C. difficile</i> tihedus BHI puljongis (kontroll)	<i>C. difficile</i> tihedus <i>L.</i> <i>plantarum</i> Inducia supernatandis (naturaalne või neutraliseeritud)		<i>C. difficile</i> tihedus <i>L.</i> <i>plantarum</i> Inducia 1:1 lajhendatud supernatandis (supernatant: BHI puljong) (naturaalne või neutraliseeritud)	
		Naturaal- ne	Neutralisee- ritud	naturaalne	neutraliseeri- tud
CDE	0,259	0,023	0,150	0,113	0,395
CDP1	0,478	0,007	0,305	-0,007	0,294
CDP2	0,510	0,001	0,550	0,193	0,651
CDP3	0,493	0,009	0,363	0,114	0,334
CDP4	0,386	0,004	0,247	0,084	0,343
CDP5	0,311	0,003	0,192	0,097	0,369
CDP6	0,503	0,003	0,208	0,107	0,264
CDP7	0,402	0,091	0,315	0,126	0,325
CDP8	0,110	0,002	0,170	0,019	0,316
CDP9	0,090	0,032	0,170	0,103	0,334
CDP10	0,209	0,023	0,050	0,093	0,331
VPI 10643	0,420	0,044	0,076	0,329	0,290
M 13042	0,402	0,005	0,249	0,083	0,304
Mean ± SD	0,352±0,15 ^{a,b} ; ^c	0,019±0,0 3 ^{a;d;e,f}	0,234±0,13 ^b ; ^d	0,112±0,08 ^c ; ^e	0,350±0,10 ^f

5 ^a p<0,0001; ^b p<0,05; ^c p<0,01; ^d p<0,001; ^e p<0,01; ^f p<0,001

Kliinilisest materjalist isoleeritud tüved: *C. difficile* CDE, CDP 1-9; referentstüved: *C. difficile* VPI 10463 (ATCC 43255) ja *C. difficile* M13042 (Kanadas isoleeritud

ribotüübi O27 pandeemiline tüvi).

Seega, *L. plantarum* Inducia DSM 21379 antimikroobne aktiivsus on tingitud nii happe produktsioonist naturaalses tootes (pH alandamine) ja väiksemas hulgas antimikroobsete peptiidsete ühendite tootmisest, mis on aktiivsed ka peale supernatandi 5 neutraliseerimist (tabel 10).

Näide 6. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasvu ja pH väärustete testimine ksülitooliga söötmes kultiveerimisel

Katse eesmärk oli hinnata, kas ksülitool mõjutab *L. plantarum* Inducia DSM 21379 antagonistlikku aktiivsust *C. difficile* vastu.

- 10 *L. plantarum* Inducia (10^5 CFU/ml) inkubeeriti MRS söötmes, milles glükoos oli asendatud 5 protsendilise ksülitooliga või ei kasutatud suhkrut üldse, mikraeroobses või anaeroobses keskkonnas. Laktobatsillide hulk loendati ja avaldati PMÜ/ml söötme kohta. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ksülitooli kasutamist kontrolliti 2-, 6-, 24- ja 48-tunnise inkubatsiooni järel.
- 15 *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasvas 24 tunni jooksul võrdsest nii 5-protsendilise ksülitooli lisandiga kui ilma ksülitoolita söötmes. 5-protsendilise ksülitooli lisandiga söötmes oli *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasv tihedam mikraeroobses keskkonnas vörreldes anaeroobse keskkonnaga, milles oli kasv 2 log madalam (tabel 11).
- 20 Tabel 11. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 hulk (log PMÜ/ml) protsendilise ksülitooli või glükoosi lisandiga MRS söötmes, kultiveerimisel mikraeroobses või anaeroobses keskkonnas

Kasvu tingimused	Söötmesse lisatud suhkur	<i>L. plantarum</i> (log PMÜ/ml) hulk erinevates inkubatsiooni ajapunktides				
		0	2h	6 h	24 h	48 h
Mikraeroobne	ksülitool	5,6	5,60	6,24	8,0	7,2
	glükoos	5,41	5,48	6,94	8,8	9,0
Anaeroobne	ksülitool	5,6	5,70	6,00	7,4	7,15
	glükoos	5,41	5,70	6,96	9,1	9,1

See katse tõestas, et *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ei kasuta MRS söötmesse lisatud ksülitooli efektiivselt. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasvatamisel modifitseeritud

MRS söötmes mõõdeti pH langust. Glükoosiga kontrollsöötmes oli orgaaniliste hapete tootmisest tingitud pH madalam anaeroobses keskkonnas. pH langes ksülitooli sisaldavas söötmes väärthuselt 6,2 väärthuseni 5,0 nii mikroaeroobses kui anaaeroobses keskkonnas, kuid jäi tunduvalt madalamaks võrreldes glükuosi sisaldaava 5 kontrollsöötmeega, milles pH langes väärthuselt 7,5 väärthuseni 3,2 (joonis fig 1).

Ksülitooli metaboliseerimine *L. plantarum* Inducia DSM 21379 poolt.

Uuringu eesmärk oli mõõta ksülitooli kasutamist *L. plantarum* Inducia DSM 21379 mikroaeroobses ja anaeroobses keskkonnas.

Meetodid: *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasvatati mikroaeroobses ja anaeroobses 10 keskkonnas 5% ksülitooli lisandiga söötmes 2 kuni 120 tundi. Viidi läbi kaks paralleelkatset. Ksülitooli detekteerimiseks kasutati mass-spektromeetrit QTRAP 3200 (Applied Biosystems, USA). Proove tsentrifuugiti 3 minutit 10 000 g, tehti 100x lahjendus ja 50 µl segati 50 µl sisemise standardiga (5 mM D4 merevaikhape atsetonitriilis, 50 µl). Mass-spektromeetrisse süstiti 5 µl lahjendust, milles kasutati 50- protsendilist atsetonitriil/vee segu. Substraadid, ioonipaarid 151/101 (ksülitool) ja 15 121/77 (sisemine standard) tuvastati mitmekordse reaktsiooni monitoorimisel (MRM). Kontsentratsioon arvutati kaubandusliku ksülitooli (Sigma-Aldrich, Saksamaa) kindla kontsentratsiooniga lahuste kalibreerimiskõvera alusel.

Korduskatsetes selgus, et *L. plantarum* Inducia kasutas ksülitooli väga väikeses koguses, suhkru hulk söötmes püsis algväärtuse lähedane, muutus oli 0-0,6 mM (tabel 12).

20 Tabel 12. Ksülitooli hulk (mM) pärast tüvega *L. plantarum* Inducia DSM 21379 inkubeerimist 5 protsendilise ksülitooli lisandiga söötmes 120 tunni jooksul, mikroaeroobses ja anaeroobses keskkonnas

Ksülitool 1 (mM)	Kordus- katsed		0 h	2 h	6 h	24 h	48 h	120 h
5% ksülitooli, mikroaeroobne	I	3,1	ND	3,2	2,5	3,2	ND	
	II	3,4	3,4	3,3	3,2	3,3	3,3	
5% ksülitooli, anaeroobne	I	3,1	ND	2,8	3,2	2,5	ND	
	II	3,4	3,4	3,2	3,2	3,3	3,5	

ND – ei tuvastatud

Seega mass-spektomeetri analüüs kinnitas, et *L. plantarum* Inducia kasutab ksülitooli

väga väheses koguses.

C. difficile referentstüvede kasv ksülitooli ja ampitsilliini sisaldavas söötmes.

Uuringu eesmärgiks oli jälgendada soolestiku keskkonda *in vitro* katses Süuria hamstritel välja töötatud *C. difficile* infektsiooni mudeliga sarnaselt.

- 5 Ksülitooli ja ampitsilliini mõju *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *C. difficile* referentstüvede (VPI 10463 ja hüpertoksiline tüvi M 13042, ribotüüp O27) kasvule testiti BHI söötmes *in vitro*.

Tabel 13. Eri ksülitiooli (0,1-5-protsendilise) ja ampitsilliini (0,75 µl/ml) kontsentratsioonide toime 48 tunni jooksul *Clostridium difficile* ja *L. plantarum* Inducia

10 DSM 21379 monokultuuride kasvule anaeroobses keskkonnas ja BHI söötmes

Eksperimen-taalsed modulaatorid	<i>L. plantarum</i> Inducia log PMÜ/g		<i>C. difficile</i> VPI log PMÜ/g		<i>C. difficile</i> M log PMÜ/g	
	0 h	48 h	0 h	48	0 h	48 h
BHI kontroll	5,9	9,8	5,3	7,2	4,9	7,1
0,1% ksülitool	5,3	8,0	4,7	6,4	5,0	6,9
1 % ksülitool	5,0	8,0	5,5	7,3	4,8	6,7
2,5% ksülitool	5,5	8,3	5,0	6,7	5,0	6,0
5 % ksülitool	5,5	7,8	5,0	7,1	5,0	6,7
Ampicillin 0,75 µl/ml	5,3	7,1	5,8	7,0	4,7	7,0

L. plantarum Inducia DSM 21379 ja kahe *C. difficile* referentstüve hulk tõusis BHI puljongis (kontroll) peaaegu 2 kuni 4 logaritmi 48 tunni pikkuse inkubatsiooni järel. Ksülitooli ja ampitsilliini lisamine ei mõjutanud *C. difficile* tüvede elulemust (Tabel 13).

L. plantarum Inducia DSM 21379 kasv oli alla surutud ca 2 logaritmi võrra nii 5-

15 protsendilise ksülitooli kui 0,75 µl/ml ampitsilliini lisamisel. Seega antibiootikumi ja kuni 5-protsendilise ksülitooli lahuse manustamisel on *L. plantarum* Inducia elulemus soolestiku mikrokeskkonnas tagatud.

Näide 7. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *C. difficile* referentstüvede elulemus kooskultiveerimisel, ksülitooli ja ampitsilliini erinevatel kontsentratsioonidel.

20 Uuringu eesmärk oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *C. difficile* referentstüvede elulemust kooskultiveerimisel ksülitooli ja ampitsilliini erinevate kontsentratsioonide juures.

L. plantarum Inducia DSM 21379 ja *C. difficile* referentstüvedega inokuleeriti 5-

protsendilise ksülitooli ja 0,75 µl/ml ampitsilliini lisandiga BHI sööde ja inkubeeriti anaeroobses keskkonnas (aneroobne box Concept 400, UK) 24 ja 48 tundi. *L. plantarum* Inducia DSM 21379, *C. difficile* referentstüvede VPI ja M elulemust peale kooskultiveerimist kontrolliti monokultuurina 5 protsendilise ksülitooli ja ampitsilliini 5 lisandiga BHI söötmes (1, 2a, 2b).

Uuritavate mikroobide hulga määramiseks tehti kümnendlahjendused. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 külvati MRS söötmele ja inkubeeriti mikraaeroobses keskkonnas ning *C. difficile* külvati LAB160 söötmele ja inkubeeriti anaeroobses keskkonnas.

Tabel 14. *C. difficile* referentstüvede inhibitsioon kooskultiveerimisel *L. plantarum* 10 Inducia DSM 21379 protsendilise ksülitooli ja 0,75 µl/ml ampitsilliini lisandiga BHI söötmes anaeroobses keskkonnas 0, 24, 48 tundi.

Tüved/kooskultivatsioon	Kasv (log, PMÜ/ml)		
	0 h	24 h	48h
1. <i>L. plantarum</i> Inducia	5,7	8,5	7,3
2. a. <i>C. difficile</i> VPI	5,0	7,7	7,2
2.b. <i>C. difficile</i> M referentstüvi	5,0	7,3	7,3
3. <i>L. plantarum</i> Inducia	<i>C. difficile</i> VPI	6,0	8,3
	referentstüvi M	5,5	8,5
4. <i>C. difficile</i> VPI	<i>L. plantarum</i>	5,0	0
5. referentstüvi M	Inducia	5,0	5,0
			2,0

15 *L. plantarum* Inducia DSM 21379 (3) *C. difficile* referentstüvede (4, 5) ko- kultiveerimisel ksülitooli ja ampitilliini lisandiga BHI söötmes (hamstri mudeli jälgendamine) oli *C. difficile* vegetatiivsete rakkude kasv inhibeeritud. VPI tüve puhul oli täielik kasv täielikult inhibeeritud ja M tüve puhul osaline kasvu inhibitsioon 5 logaritmi võrra (5,0-2,0 log PMÜ/ml).

Seega, hamstri mudelit jälgendav *in vitro* katse töestas *C. difficile* täielikku või osalist inhibeerimist, kui manustada loomadele ainult *L. plantarum* Inducia DSM 21379 (tabel 5) või selle kombinatsiooni ksülitooliga (tabel 14).

Näide 8. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 ja ksülitooli kombinatsioon inhibeerivad *Clostridium difficile* referentstüve VPI eoste germinatsiooni

Katse eesmärgiks oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 võimet takistada *Clostridium difficile* eoste germinatsiooni *L. plantarum* Inducia DSM 21379 eelneval

preinkubeerimisel söötmes. Kontrolliti ka ksülitooli ja taurokolaadi mõju *Clostridium difficile* eoste germinatsioonile. Taurokolaat on peensooles leiduv aine, mis soodustab *Clostridium difficile* eoste germinatsiooni.

5 *L. plantarum* Inducia DSM 21379 inkubeeriti erinevaid lisandeid sisaldavas BHI puljongis, anaeroobses keskkonnas 24 tundi. Pärast *L. plantarum* Inducia DSM 21379 inkubeerimist lisati *Clostridium difficile* eosed ning lisati kontsentreeritud BHI söödet vahekoras 1:10.

Kontrolli ja katsesegusid inkubeeriti anaeroobses keskkonnas 48 tundi. Kontroll ja katsesegud külvati Fastiodious Anaeroobne Agar söötmele (FAA) ja MRS söötmele, 10 katse alguses, 24 tunni möödudes ja 48 tunni möödudes. Arvutati *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *Clostridium difficile* hulgad.

Tabel 15. *Clostridium difficile* hulgad (\log_{10}) eri lisanditega söötmetes (*L. plantarum* Inducia DSM 21379, ksülitool, taurokolaat)

Segu	kontroll (\log_{10} PMÜ/ml)			Experiment, <i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379 lisati (\log_{10} CFU/ml)		
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
BHI	2,95	6,05	7,45	nd	nd	7,18
BHI + ksülitool	2,94	7,37	7,95	nd	nd	nd
BHI + ksülitool + Na-taurokolaathüdraat	3,83	7,83	7,96	nd	nd	nd
BHI + ksülitool + taurodeoksükoolhape	3,38	8,07	7,67	nd	nd	nd

nd- mitte tuvastatav, (alla määramispiiri, 1,00 \log_{10} PMÜ/ml).

15 *L. plantarum* Inducia DSM 21379 preinkubeerimine ksülitooli või ksülitooli ja taurokolaadi kombinatsiooniga BHI söötmes inhibeerib *Clostridium difficile* germinatsiooni (tabel 15). Ksülitooli ja/või taurokolaadi lisamine BHI söötleme ei mõjutanud *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasvu. Antud tulemused toetavad loomkatse tulemusi.

Näide 9. Loomkatse

Uuringu eesmärk oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 mõju referentstüve *Clostridium difficile* VPI 10463 eostega nakatud infektsiooniga hamstritel.

Süüria hamstrid (*Mesocricetus auratus*) sobivad hästi *Clostridium difficile* infektsiooni mudeliks. Rikkudes hamstrite käärsoole mikrofloora antibiootikumide manustamisega ja seejärel manustades loomadele *C. difficile* eoseid, kujuneb loomadel *C. difficile* kõhulahtisus vähem kui 48 tunni jooksul ja annab 100 protsendilise suremuse.

- 5 Toetudes meie *in vitro* katsete tulemustele uurisime, kas *L. plantarum* Inducia DSM 21379 manustumine aitab vähendada *C. difficile*'ga nakatatud hamstrite suremust. Enne ampitsilliini manustamist (30 mg/kg) manustasime hamstritele sondiga 5-l järestikusel päeval *L. plantarum* Inducia DSM 21379 suspensiooni 10^{10} PMÜ/ml kas 5-protsendilise ksülitooli lisandiga või ilma. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 10 manustamist jätkasime kogu katse välitel. Hamstrid nakatati 10-30 *C. difficile* VPI 10463 eosega katse 7. päeval. Hamstreid jälgiti järgnevad 5 päeva ja *C. difficile* infektsiooni sümpтомite ilmnedes: märg saba – tehti *C. difficile* A/B toksiini test X/pect Remel test). Kontrollgrupina kasutati *C. difficile* VPI tüvega nakatud hamstreid.

Tabel 16. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja/või ksülitooliga eeltoidetud ja *C. difficile*'ga nakatatud hamstrid (n=15)

Test grupid	<i>C. difficile</i> ga nakatud ellujää nud hamstrite arv					toksiini test tulemus/loomade arv grupis	5-nal päeval ellujää nute %
	päev 1	päev 2	päev 3	päev 4	päev 5		
<i>C. difficile</i> VPI 10463I (n=15)	15	6	4	2	2	2 negatiivne/15	2/15 13%
<i>C. difficile</i> VPI +Inducia (n=5)						0 negatiivne/5	0/5 0%
<i>C. difficile</i> VPI + ksülitool (n=9)	9	9	9	5	5	4 negatiivne/9	5/9 56%
<i>C. difficile</i> VPI + ksülitool + Inducia (n=9)	9	7	7	7	7	7 negatiivne/9	7/9 78%

Seega, *C. difficile* eostega nakatatute seas kõrgeim ellujäämise määr oli *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja ksülitooli lahusega ette toidetud loomade grupis (tabel 16). Antud juhul olid kõik ellu jäänud hamstrite (7/9) toksiini testid negatiivsed, st *C. difficile* eoste germinatsioon oli alla surutud. Ainult ksülitooli manustamisel oli toksiinitest negatiivne neljal loomal ellujää nud viiest ja ainult ühel ellujää nud 20

loomadest oli test positiivne. Seega. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja ksülitooli kombinatsioon surub alla eoste germinatsiooni toksiini tootvateks vegetatiivseteks rakkudeks. A ja B toksiini leidumise korral kontrollisime ka *C. difficile* kasvu olemasolu peale Inducia ja ksülitooliga mõjutamist (Tabel 17). *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja ksülitooliga ettetoidetud ellujää nud kuuel hamstril seitsmest ei tuvastatud *C. difficile* vegetatiivseid rakke (ainult ühel juhul leiti *C. difficile* kasv) peen- ja jämesooles. Nii anaeroobide kui indigeensete laktobatsillide hulka asendav *L. plantarum* Inducia DSM 21379 hulk oli peen- ja jämesooles kõrge. See näitab *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja ksülitooli manustamise kasulikkust soole mikrofloora stabiliseermisel ja taastamisel peale ampitsilliini manustamist ja *C. difficile* eostega nakatumisel.

Tabel 17. Anaeroobide, laktobatsillide, *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *C. difficile* hulgad *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja ksülitooliga ettetoidetud ja ellujää nud hamstrite peensooles ja jämesooles

katsegrupid	Hams-ter ID	tühisool (PMÜ log10/g)			niudesool (PMÜ log10/g)		
		AN	Indu-cia	<i>C.d.</i>	AN	Indu-cia	<i>C.d.</i>
<i>C. difficile</i> VPI + ksülitool + Inducia (n=7)	T2-1	6,48	4,00	0,00	7,48	6,70	0,00
	T2-2	5,20	4,30	0,00	7,04	7,00	0,00
	T2-3	7,48	4,30	0,00	7,30	6,70	0,00
	T2-4	8,70	6,00	5,00	8,11	7,60	7,00
	T2-5	4,48	0,00	0,00	7,30	6,00	0,00
	T2-7	7,18	5,00	0,00	8,11	6,78	0,00
	T2-8	8,34	6,00	0,00	8,43	6,00	0,00
<i>C. difficile</i> VPI + ksülitool(n=5) eeltoodetud	Xyl-1	5,30	ND	2,00	8,43	ND	0,00
	Xyl-2	7,11	ND	0,00	8,30	ND	0,00
	Xyl-3	7,60	ND	5,00	8,38	ND	7,60
	24-1	7,35	ND	0	7,0	ND	0
	24-2	7,15	ND	0	7,8	ND	0

15 AN – anaeroobid *C.d.* – *Clostridium difficile*

Hamstrite ellujäämismäär oli 22 protsendi suurem tänu *L. plantarum* Inducia DSM

21379 manustamisele (tabel 16). Seda tõestas ka toksiini puudumine jämesoole sisus (tabel 17).

L. plantarum Inducia DSM 21379 hulk oli kõrge tühisooles (vahemikus 0-6,0, mediaan

4,0 PMÜ log₁₀/g) ja niudesooles (6,0-7,6, mediaan 6,7). Tõenäoliselt toimis *L.*

- 5 *plantarum* Inducia DSM 21379 happe produtseerimise ja SCFA profil kaudu.

C. difficile'ga nakatatud hamstrite morfoloogilised uuringud

Clostridium difficile infektsiooni moduleerimiseks kasutati tüüpilist hamstri mudelit,

kuna patogeneesi peamine modulaator on toksiinide poolt põhjustatud organite

- 10 kahjustus. Meie katses kasutatav *C. difficile* VPI 10643 omab nii A kui B toksiini ning need toksiinid esinesid ka maksas ja peensooles (joonised fig 2 ja fig 3).

C. difficile infektsioonist ellujäänud hamstritel ei leitud lahkamisel ulatuslikke limaskesta kahjustusi, pseudomembraane ega polümorfonukleaarsete rakkude infiltratsiooni (joonis fig 4a).

- 15 *C. difficile* infektsioonist kahjustatud hamstrite surmaelseteks iseloomulikeks leidudeks oli põletik koos polümorfonukleaaride infiltratsiooniga limaskesta ja pseudomembraanide olemasolu. Raske enterokoliit põhjustas punaliblede ja polümorfonukleaarsete leukotsüütide infiltratsiooni soole limaskesta, maksa ja põrna, põhjustades loomade surma. Elundites esines hüpereemia (joonis fig 5f).

PATENDINÕUDLUS

1. Probiootilist mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldav kompositsoon kasutamiseks kolesteroli metabolismi häirete ja nendest lähtuvate südame-veresoонkonnahaiguste ennetamiseks LDL-kolesteroli taseme vähendamise teel veres ja samaaegseks inimkeha antioksüdatiivse aktiivsuse tõstmiseks oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiinide (ox-LDL) taseme ning oksüdatiivse stressi indeksi (OSI) vähendamise abil.
10
2. Kompositsoon vastavalt punktile 1, mis on valitud rühmast, mis sisaldab farmaatsia-, toidu- või veterinaarset kompositsooni.
3. Toiduaine, mis sisaldab kompositsooni vastavalt punktile 1.
4. Toiduaine vastavalt punktile 3, milleks on piimatoode.
- 15 5. Toiduaine vastavalt punktile 4, milleks on fermenteeritud piimatoode.
6. Toiduaine vastavalt punktile 5, milleks on juust.
7. Toiduaine vastavalt punktile 6, milleks on jogurt.
8. Toidulisand, mis sisaldab kompositsooni vastavalt punktile 1.
9. Farmaatsia- või veterinaariatoode, mis sisaldab kompositsooni vastavalt punktile
20 1.
10. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kasutamiseks hüpokolestereemilise agendina kolesteroli metabolismi häirete ja südame-veresoонkonnahaiguste ennetamiseks veres LDL-kolesteroli taseme alandamise abil.

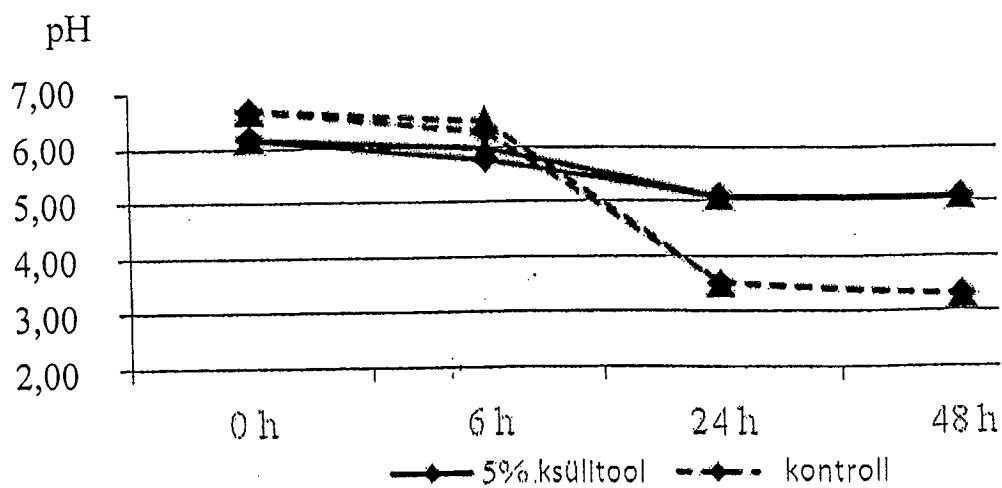


Fig. 1

2/5

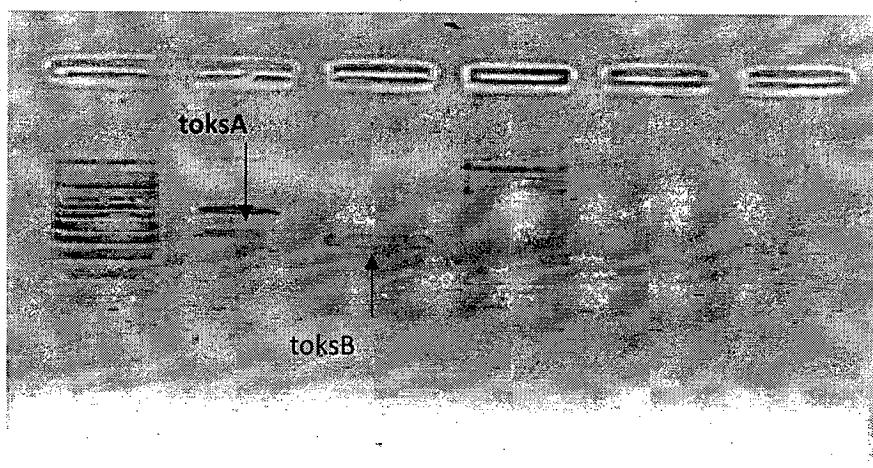


Fig. 2

3/5

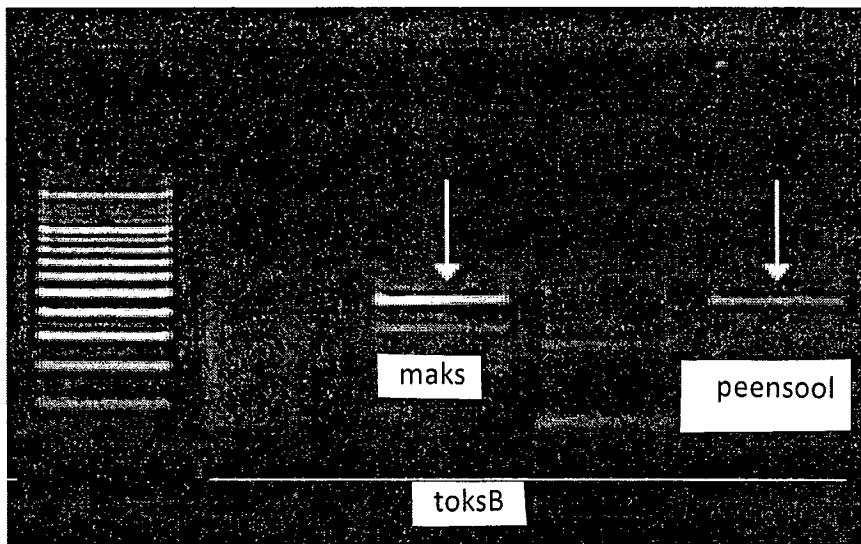


Fig. 3

4/5

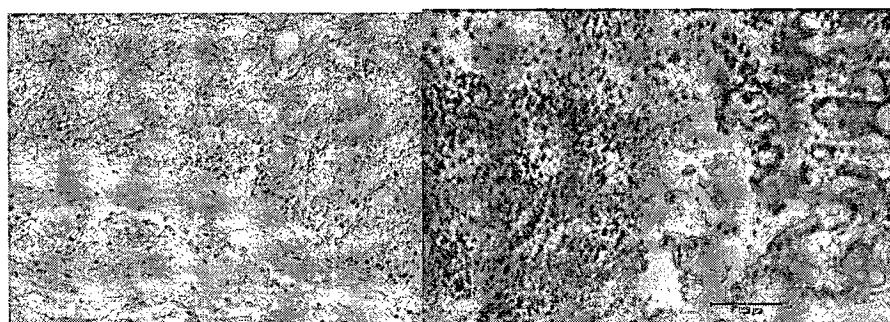


Fig 4a

Fig 4b

5/5

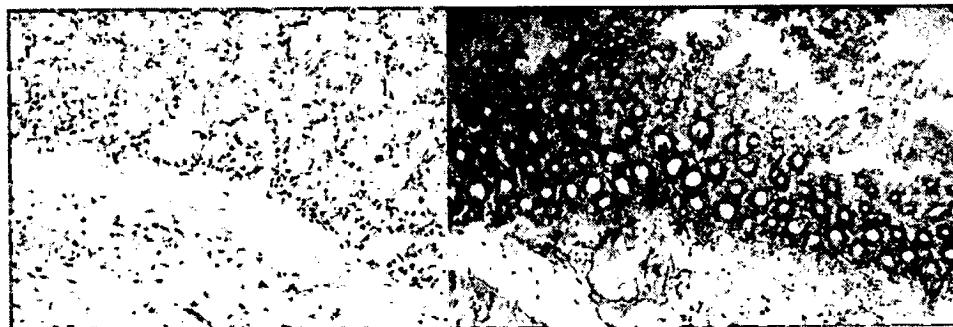


Fig 5a

Fig 5b



Fig 5c

Fig 5d



Fig 5e

Fig 5f