



EESTI VABARIIK
PATENDIAMET

(11) EE 201400038 A

(51) Int.Cl.
A61K 35/747 (2015.01)
A23L 1/30 (2015.01)
C12R 1/25 (2015.01)

(12) PATENDITAOTLUS

(21) Patenditaotluse number:	P201400038	(71) Patenditaotleja:	OÜ Tervisliku Piima Biotehnoloogia Arenduskeskus Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, EE
(22) Patenditaotluse esitamise kuupäev:	31.10.2014	(72) Leiutise 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 Truusalu Vanemuise 45-59, 51003 Tartu, EE Epp Sepp Kaarli pst 11-47, 10119 Tallinn, EE Raik-Hiio 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
(43) Patenditaotluse avaldamise kuupäev:	16.11.2015	(74) Patendivolnik:	Sirje Kahu Patendibüroo Ustervall OÜ Kivi 21-6, 51009 Tartu, EE
(30) Prioriteediandmed:	03.04.2014 US 244284		
(83) Bioloogilise aine, sh mikroorganismi tüve deponeerimise andmed:	DSM 21379, 16.04.2008, DSMZ		

(54) Hüpokolestereemilist ja antimikroobset agenti probiootilist mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldav kompositsioon kasutamiseks südame-veresoonkonna haiguste ja *Clostridium difficile* põhjustatava kõhulahtisuse ennetamiseks

(57) Leiutus käsitleb *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kasutamist hüpokolestereemilise, antimikroobse ja antioksidatiivse agendina. Nimetatud tüve sisaldavatel toiduainetel ja toidulisanditel on südant kaitsev toime. Mikroorganismi *L. plantarum* Inducia kasutatakse kolesterooli metabolismi häirete ja südameveresoonkonna haiguste ennetamiseks, kuna ta vähendab LDL-kolesterooli taset ja samaaegselt tõstab organismi antioksidatiivset aktiivsust, mõjutades oksidatiivse stressi markereid soovitud suunas - oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiinide (ox-LDL) tase ja oksidatiivse stressi indeks (OSI) vähenevad. Tüve *L. plantarum* Inducia kasutatakse ka antimikroobse agendina endogeenset või eksogeenset päritolu *Clostridium difficile* põhjustatud kõhulahtisuse (CDAD) riski vähendamiseks. *L. plantarum* Inducia takistab *Clostridium difficile* eoste germinatsiooni ja *Clostridium difficile* vegetatiivsete rakkude paljunemist. Tüvi *L. plantarum* Inducia on kasutatav samaaegselt antibiootikumraviga. *Clostridium difficile* vastased kompositsioonid võivad lisaks sisaldada ka ksüliitooli.

(57) The invention relates to a microorganism strain *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 for use as hypocholesterolemic, antimicrobial 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). *L. plantarum* Inducia can be used as an antimicrobial agent in lowering risk of *Clostridium difficile* associated diarrhoea (CDAD) of endogenous or exogenous origin by preventing germination of *C. difficile* spores and by suppressing proliferation of *C. difficile* vegetative cells. *L. plantarum* Inducia can be used simultaneously with antibiotic treatment. The compositions against *C. difficile* may further comprise xylitol.

HÜPOKOLESTEREEMILIST JA ANTIMIKROOBSET AGENTI PROBIOOTILIST MIKROORGANISMI TÜVE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* INDUCIA DSM 21379 SISALDAV KOMPOSITSIOON KASUTAMISEKS SÜDAME-VERESOONKONNAHAIGUSTE JA *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* PÕHJUSTATAVA
5 KÕHULAHTISUSE ENNETAMISEKS

TEHNIKAVALDKOND

Käesolev leiutus kuulub mikrobioloogia ja toitumise valdkonda ning käsitleb tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM21379, millel on mitmeid biotehnoloogilisi rakendusi.

10

TEHNIKA TASE

LDL-kolesterool

Kõrgenenud kolesteroolitase on südame-veresoonkonna haiguste väljakujunemisel üheks oluliseks teguriks. Kõrge kolesteroolitaseme kahjulik mõju on tingitud kolesterooli erinevatest partikkelitest, eelkõige madala tihedusega lipoproteiinidest (LDL-
15 kolesteroolist, *low density lipoprotein - cholesterol*) ja apolipoproteiinist B (ApoB). LDL-kolesterool moodustab 60-70 protsenti kogu üldkolesteroolist ja transpordib kolesterooli, triglütseriide, rasvlahustuvaid vitamiine ja antioksüdante. LDL-kolesterool on oluline modulaator ateroskleroosi ennetamisel ja südame-veresoonkonna tervise säilitamisel. Oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiinid (ox-LDL) on LDL-partiklite
20 oksüdatiivse stressi markeriks. Ox-LDL-i võib pidada koronaarsete südamehaiguste riski biokeemiliseks markeriks. LDL-kolesterool on laialdaselt tunnustatud kui südame-veresoonkonna riski marker. Arvukate kliiniliste katsete tulemused kinnitavad LDL-kolesterooli sõltumatut rolli südame isheemiatõve tekkimisel ja kujunemisel (<http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communique/2011/11.html>).

25 Probiootiliste mikroobide hüpokolestereemilise 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
30 of lactobacilli strains. Int Dairy J. 2005: 15: 391-398; Lye, H.S., Rahmat-Ali, G.R., Liong, M.T. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that

mimic the human gastrointestinal tract, Int Dairy J. 2010: 20 (3): 169–175). Sapisoolade hüdrolaas (BSH, *bile salt hydrolase*) (EC 3.5.1.24; cholylglycine/kolüülglütsiin hüdrolaas) on ensüüm, mis katalüüsib glütsiini ja/või tauriinkonjugeeritud sapisoolade hüdrolüüsi vabadeks sapisooladeks ja aminohappe jääkideks. Piimhappebakterite, kaasa
 5 arvatud *Lactobacillus sp* hulgas on BSH aktiivsus tugevalt seotud mikroobi loomuliku 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
 10 laktobatsillid assimileerivad toiduainetest kolesterooli (Gilliland, S. E., Nelson, C. R., 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 kompositsioonina alandavad kolesterooli nii *in vitro* kui *in vivo*
 15 tingimustes. Nimetatud tüvedel on sapisoolade hüdrolaasi BSH aktiivsus, samuti antagonistlik aktiivsus patogeensete tüvede (*Salmonella enterica* Enteritidis, *Salmonella enterica* Typhimurium, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium ramosus*, *Enterococcus faecalis*) suhtes ja neid tüvesid saab kasutada probiootiliste bakteritena.

Pereira koos oma kaastöötajatega on demonstreerinud lühikese ahelaga rasvhapete 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
 25 determination of its cholesterol-lowering properties. Appl Environ Microbiol, 69, 4743-4752).

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
 30 activity. J. Dairy Sci., 82: 2530-2535).

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).

5 Probiootilise tootena mõistetakse kindlat tüve sisaldavat preparaati, mis toimib peremeesorganismi mitmetele funktsioonidele (antiinfektsioossed, morfoloogilised, 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
10 beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek. 2002: 82, 279-289; Ljungh, A., 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
15 piimatoodetega, nagu jogurt, keefir, juust või toidulisanditena. Käärsoole mikrofloora on tasakaalustatud ja soole limaskesta mikrofloora ei muutu kergesti. Siiski, piisavates doosides (päevane doos vähemalt 10^9 PMÜ) manustamine võimaldab demonstreerida probiootikumi toimet.

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

Lactobacillus plantarum on looduses 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:
25 4:320–403).

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

Tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 on kirjeldatud kui antimikroobset
30 peptiidi plantariitsini tootva, tsütokiin IL-6 indutseeriva, putressiini tootva ja soole 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

5 *Clostridium difficile* tuvastati 1970-ndatel aastatel kui antibiootikumi-seoselise kõhulahtisuse tekitaja. 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). Eksogeenset päritolu *C.*
10 *difficile* infektsiooni põhjuseks on nakatumine *C. difficile* eostega. Haiguse põhjustavad mitte eosed, vaid vegetatiivsete rakkude toodetud toksiinid. Endosporide 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
15 Microbiol. 2010;161(9):730-4).

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

Clostridium difficile infektsioon kordub umbes 20 protsendil patsientidest ja tõuseb 40
25 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* kolonisatsioonil ja endogeenset päritolu haigestumisel. Korduvate *C. difficile*
30 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 erinevate raviskeemide abil, sh probiootikumide manustamisega. 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 sobilikkust *C. difficile* jaoks. Eelnevad uuringud soovivad 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., 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.

Samas ei oma kõik probiootikumid eelpoolmainitud mehhanisme.

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 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 leidnud katse läbiviijad 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 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).

10 Ksülitooli kasutamine

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.

Manustatud ksülitool ei absorbeeru täielikult ja imendumata osa saab kasutada kiudainena bakteriaalsel fermentatsioonil muutes ksülitooli lühikese ahelaga rasvhapeteks, mida kasutatakse energeetilistes 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., K. P. Fisher The Need for Special Foods and Sugar Substitutes by Individuals with Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1978: 1; 231-240).

Varasemates uuringutes oleme leidnud, et 1 protsendi ksülitooli lisamine kasvukeskkonda takistas *Clostridium difficile* VPI 10463 vegetatiivste 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 manustamine 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 kultiveeritud *Clostridium difficile* vegetatiivsete rakkudega.

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

Mõned autorid on väitnud, et loomudelites 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).

- 10 Seega on endiselt vajadus leida probiootilisi tüvesid, mis efektiivselt vähendavad LDL-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 15 21379 deponeeritud tüve *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava kompositsiooni kasutamiseks hüpokolestereemilise agendina kolesterooli metabolismi häirete ja nendest lähtuvate südame-veresoonkonna haiguste ennetamiseks LDL-kolesterooli taseme vähendamise teel veres ja samaaegselt kasutamiseks antioksidatiivse agendina inimkeha antioksidatiivse aktiivsuse tõstmiseks oksüdatiivse stressi markeri - 20 oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiinide (ox-LDL) taseme ning oksüdatiivse stressi indeksi (OSI) ja peroksiidide üldhulga (TPX) vähendamise abil. Seega omavad *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldavad kompositsioonid ja toidutooted südant kaitsvat toimet.

Leiutise teine eesmärk on pakkuda tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 25 sisaldav kompositsioon kasutamiseks antimikroobse agendina endogeenset ja/või 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.

- 30 *Clostridium difficile* vastased kompositsioonid võivad lisaks sisaldada ka ksülitooli.

L. plantarum Inducia sisaldavaid kompositsioone saab kasutada toiduainete, toidulisandite, farmaatsia- või veterinaartoodete tootmiseks. Toiduained võivad olla piima- või lihatooted, maiustused jne. Piimatooted võivad olla hapendatud piimatooted, juust, jogurt jne.

- 5 Toidulisandit võib kasutada pulbrina (kapslid, pastillid, tabletid, pulbrikotikesed jne) või vedelal (ampullid) kujul. Tüve võib kasutada ka külmuivatatuna.

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

JOONISTE LOETELU

- 10 Fig 1 keskkonna pH väärtused tüve *L. plantarum* Inducia sisaldavas ksülitooli lisandiga 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
15 ja maksas määratuna pöördtranskriptsiooni (RT) ja reaalaja PCR amplifikatsiooniga (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
20 hüperemia peensooles.
Fig 5b eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. Mõõdukas hüperemia jämesooles ja intensiivne punetus
Fig 5c eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. Mõõdukas hüperemia kõhunäärmes
25 Fig 5d eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. Mõõdukas hüperemia põrnas.
Fig 5e) eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused
Pseudomembraanid peensooles
Fig 5f) eksperimentaalse CDAD infektsiooni morfoloogilised muutused. PMN
30 infiltratsioon pseudomembraanidega jämesooles.

LEIUTISE TEOSTAMISE NÄITED

Leiutist illustreerivad järgnevad näited, mis ei piira leiutise ulatust.

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

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

- 5 Järgneva *in vitro* testi eesmärk oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sapphappe 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 Probiootikumid SA).

- 10 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% taurodeoksükoolhappe 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
- 15 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).

- 20 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 vere näitajatele ja soolestiku mikrofloorale" eesmärk oli hinnata tüve *L. plantarum* Inducia sisaldava jogurti LDL-kolesterooli taseme alandamise võimet veres

- 25 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
5 happesuseni pH 4,2 ... 4,5 ja jahutati + 23 ... + 27 °C. Jogurt magustati 5% suhkruga, 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
10 Tartu Ülikooli Inimuuringu eetika komitee poolt (protokoll number 190T-11, 2010). Uuringusse lülitumisel kirjutasid kõik osalejad alla kirjalikule nõusoleku vormile ja neil oli võimalus uuringust igal 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,
15 keefir jne) üks kuu enne uuringu algust, kuid jätkata oma tavapärasest toitumist. Kaks osalejate gruppi alustasid samaaegselt 3-nädala pikkust vastavalt ilma probiootilise lisandita kontroll-jogurti või *L. plantarum* Inducia DSM 21379 (4×10^7 PMÜ/g) sisaldava test-jogurti tarbimist 150 g päevas. Probiootilise tüve *L. plantarum* Inducia päevane doos oli 6×10^9 PMÜ. Pärast kahe nädala pikkust vaheperioodi (*wash out*)
20 lülitusid osalejad 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 (18,5-24,9 kg/m^2), ülekaalulisus (≥ 25.0 kg/m^2) ja rasvumine (≥ 30.0 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 Paastuvere proovid koguti neli korda: katsesse sisenemisel, pärast testtoote (probiootiline või kontroll-jogurt) 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 Kliinikum Ühendlabor, Eesti). Tavapäraste laborimõõtmiste referentsväärtustena kasutati *Nordic Reference Interval Project* poolt pakutud referentsintervalle (NORIP, Rustard P., Felding P., Fransson 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.* 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 väärtusena ja lisati standardhälve (keskmised \pm SD). Algväärtuste ja mõjutuse tulemuste võrdlemiseks kasutati paaris t-testi või Wilcoxon testi, olenevalt normaaljaotusest.

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

Läbiviidud *cross-over* uuringus tervete vabatahtlike kaks gruppi 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 väärtus
	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 väärtus
üldkolesterool	5,1 ± 1,1	5,2 ± 0,9	0,952
LDL-kolesterool	3,4 ± 1,0	3,4 ± 1,2	0,873
HDL-kolesterool	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 ** Fisheri täpne test

Tabel 3. Vereseerumi metaboolsed näitajad uuringu jooksul

	probiootiline jogurt		kontrolljogurt		P väärtused *BL1 vs PRO / BL2 vs PL (BL1 vs BL2, PRO vs PL)
	algfase 1	probiootiline periood	algfase 2	platseebo periood	
Üld- kolesterool	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- kolesterool	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- kolesterool	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: algfase 1; PRO: probiootiline periood (st *L. plantarum* Inducia sisaldav probiootikum); BL2: algfase 2; PL: platseebo periood.

Pärast *L. plantarum* Inducia DSM 21379 tarbimist ilmneseid 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 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*)

Topeltpimedas kahe paralleelse õlaga uuringus ISRCTN26344255 tarbisid kergelt

hüperkolestereemilised (≥ 3.0 mmol / L LDL-kolesterooli tase) täiskasvanud (n = 136) 8 nädala jooksul päevas 150g probiootilist jogurtit (*L. plantarum* Inducia DSM 21379 päevane doos oli 5×10^9 PMÜ) või kontroll-jogurtit. 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).

150 g *L. plantarum* Inducia DSM 21379 (keskmise päevane doos 5×10^9 PMÜ) sisaldava 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).

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 sisaldava jogurti manustamise 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 üliluslik ka platseebo grupi suhtes ($p=0,026$). Platseeborühmas muutust ei täheldatud.

20 *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava 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 platseebo grupiga ($p = 0,04$). Platseeborühmas muutust ei täheldatud.

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-kolesterooli (mmol/l) taseme muutus peale 8 nädalast *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava jogurti tarbimist

		Mõjutus			
		<i>L.plantarum</i>	Platseebo	p-väärtus ^a	
		Inducia			
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	0,44		
	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: gruppide-vaheline

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

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

		Mõjutus		
		<i>L. plantarum</i> Inducia	Plaatsebo	p-väärtus ^a
<i>W0:</i> <i>ox-LDL</i>	Keskmine	67,95	61,41	0,068
	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>	Keskmine	66,31	62,02	0,234
	Std	17,27	17,87	
	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>	Keskmine	62,9	61,58	0,575
	Std	15,48	16,97	
	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-kolesterooli taseme (mmol/l) muutus peale 8 nädalast *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava jogurti tarbimist

		Mõjutus		p-väärtus ^a
		<i>L.plantarum</i> Inducia	Platseebo	
Muutus W4 - W0 ox-LDL	Keskmine	-1,85	0,61	0,116
	Std	7,27	9,2	
	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	
Muutus W8 - W0 ox-LDL	Keskmine	-4,1	0,55	0,026
	Std	8,84	10,57	
	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 ox-LDL	keskmine	-2,78	-0,16	0,097
	Std	8,6	9,41	
	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: gruppide vaheline (probiootilise ja platseebo grupi vaheline) olulisus, p-väärtus^b: grupi sisene olulisus.

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

		Mõjutus		
		<i>L.plantarum</i> Inducia	Platseebo	p-väärtus ^a
W0: OSI	Keskmine	29,11	34,29	0,230
	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	
W4: OSI	Keskmine	27,27	32,17	0,210
	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	
W8: OSI	Keskmine	24,13	33,24	0,011
	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	

^aWilcoxon test; W0:visiit 2, mõjutuse algus; W4: visiit 3, peale 4 nädalst mõjutust; W8:

5 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
Muutus W4 - W0 OSI	Keskmine	-0,8	-1,3	0,848
	Std	7,82	10,27	
	Min	-22,3	-22,61	
	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	
Muutus W8 - W0 OSI	Keskmine	-5,37	-1,69	0,040
	Std	8,47	11,41	
	Min	-32,84	-35	
	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	
Muutus W8 - W4 OSI	Keskmine	-4,73	1,1	0,010
	Std	7,04	14,77	
	Min	-22,55	-32,18	
	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 (probiootilise ja platseebo grupi vaheline) olulisus, p-väärtus^b: grupi sisene olulisus.

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

		Mõjutus		
		<i>L. plantarum</i> Inducia	Platseebo	p-väärtus ^a
W0: TPX	Keskmine	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	
Keskmine		414,8	498,05	
Std		257,56	288,77	
Min		73	102	
Q1		175	250	
Mediaan		363,5	422,5	
Q3		573	700	
Max		924	1284	
W8: TPX	N	45	37	0,009
	Keskmine	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; W8: visiit 4, peale 8 nädalast mõjutust.

5 Probiotilise (*L. plantarum* Inducia sisaldav jogurt) grupi sees oli stabiilne peroksiidide üldhulga langus kogu uuringu vältel (Tabel 7a ja 7b). Platseebo grupis mingit efekti ei täheldatud. Olulist antioksidatiivse kogumahtuvus muutust (*total antioxidative 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>	Platseebo	p-väärtus ^a
		Inducia		
Muutus W4 - W0	Keskmine	-23,48	-18,47	0,903
	Std	77,07	137,07	
TPX	Min	-271	-325	
	Q1	-51	-72	
	Mediaan	-15	-18,5	
	Q3	21	62	
	Max	143	383	
	p-väärtus ^b	0,044	0,416	
Muutus W8 - W0	Keskmine	-84,22	-36	0,227
	Std	116,4	147,78	
TPX	Min	-473	-453	
	Q1	-115	-118,5	
	Mediaan	-56	-54,5	
	Q3	-26	68,5	
	Max	84	261	
	p-väärtus ^b	<0,001	0,225	
W8 difference from W4	Keskmine	-67,91	-17,61	0,052
	Std	113,93	155,41	
TPX	Min	-486	-466	
	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 nädalast mõjutust; W8: visiit 4, peale 8 nädalast mõjutust; p-väärtus^a: gruppide vaheline

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

Tabel 8a. Antioksidatiivse 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	

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

Tabel 8b. Antioksidatiivse kogumahtuvuse (TAC, mmol Trolox ekvivalent/l) taseme muutus pärast *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldava 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
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
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

^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 (probiootilise ja platseebo grupi vaheline) olulisus; p-väärtus^b: grupisisene olulisus.

Järeldus. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldav jogurt omab südameveresoonekonna haiguste eest kaitsvat toimet alandades LDL-kolesterooli taset veres, lisaks kaitseb inimkeha oksüdatiivsete kahjustuste eest ja tõstab antioksidatiivset 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

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

5

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

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

10 Mikroobitüved külvati tahkele söötmele ning inkubeeriti anaeroobses keskkonnas. Füsioloogilises lahuses 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.

15 Erinevatel 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.

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
Monokultuuri 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> Inducia	5,3	0	0

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.*
 5 *plantrum* Inducia DSM 21379 hulk pärast 48 tunnist inkubatsiooni mõnevõrra langes nii monoklutturis (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.*
 15 *plantarum* Inducia DSM 21379 antagonistliku aktiivsuse erinevaid mehhanisme - kas toimivad pigem orgaanilised happed või bakteriootsiinid.

Materjal (tüved) (Tabel 10)

L. plantarum Inducia DSM 21379

Clostridium difficile referentstüved 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 mikroitiiterplaatidel (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 puljongi 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

väärtuseni 6,0 ning mõlemad supernatandid filtersteriliseeriti.

C. difficile tüvesid säilitati -80°C klaaskuulikestega mikrokatsutites ja aktiveerimiseks külvati 3x hobusevere lisandiga *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA) söötmele ja inkubeeriti anaeroobses keskkonnas (anaeroobne käsiboks, 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 antimikroobse aktiivsuse hindamiseks tehti järgmised katsesegud: 20 µl *C. difficile* rakususpensioonile lisati 180 µl: (1) steriilne BHI puljong (kontroll), (2) rakuvaba BHI supernatant, (3) rakuvaba neutraliseeritud supernatant, (4) lahjendatud rakuvaba supernatant (1:1 steriilses BHI puljongis) ja (5) lahjendatud neutraliseeritud rakuvaba supernatant (1: 1 steriilses BHI puljongis).

C. difficile kasvu (optilise tiheduse väärtuse muutus) hinnati pärast 48 tunni inkubatsiooni, optiline tihedus mõõdeti MTP lugejaga OD_{620nm} juures ning seejärel arvutati kasvumuutus.

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. Statistiliste andmete analüüsiks kasutati PAST Statistics veebipõhist programmi.

Tabel 10. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 naturaalse ja neutraliseeritud supernatandi ja lahjendatud 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. plantarum</i> Inducia supernatandis (naturaalne või neutraliseeritud)		<i>C. difficile</i> tihedus <i>L. plantarum</i> Inducia 1:1 lahjendatud supernatandis (supernatant: BHI puljong) (naturaalne või neutraliseeritud)	
		Naturaalne	Neutraliseeritud	naturaalne	neutraliseeritud
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±0,03 ^{a,d,e,f}	0,234±0,13 ^b ;d	0,112±0,08 ^c ;e	0,350±0,10 ^f

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

- 5 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

produktioonist naturaalses tootes (pH alandamine) ja väiksemas hulgas antimikroobsete peptiidsete ühendite tootmisest, mis on aktiivsed ka peale supernatandi neutraliseerimist (Tabel 10).

5 Näide 6. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasvu ja pH väärtuste 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, mikroaeroobses 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 tunni inkubatsiooni järel.

15 *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasvas 24 tunni jooksul võrdselt nii 5 protsendilise ksülitooli lisandiga kui ilma ksülitoolita söötmes. 5 protsendilise ksülitooli lisandiga söötmes oli *L. plantarum* Inducia DSM 21379 kasv tihedam mikroaeroobses keskkonnas võrreldes 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 mikroaeroobses 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
Mikroaeroobne	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 väärtuselt 6,2 väärtuseni 5,0 nii mikroaeroobses kui anaeroobses keskkonnas, kuid jäi tunduvalt madalamaks võrreldes glükoosi sisaldava kontrollsöötmeaga, milles pH langes väärtuselt 7,5 väärtuseni 3,2 (joonis Fig 1).

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

5 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 keskkonnas 5% ksülitooli lisandiga söötmes 2 kuni 120 tundi. Viidi läbi kaks paralleelkatset. Ksülitooli detekteerimiseks kasutati mass-spektromeetrit QTRAP 3200
 10 (Applied Biosystems, USA). Proove tseentrifuugiti 3 minutit 10000 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, ioonipaariid 151/101 (ksülitool) ja 121/77 (sisemine standard) tuvastati mitmekordse reaktsiooni monitoorimisel (MRM).
 15 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).

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

Ksülitool (mM)	Korduskatsed	1					
		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-spektromeetri analüüs kinnitas, et *L. plantarum* Inducia kasutab ksülitooli väga väheses koguses.

C. difficile referentstüvede kasv ksülitooli ja ampitsilliini sisaldavas söötmes.

Uuringu eesmärgiks oli jäljendada soolestiku keskkonda *in vitro* katses Süüria hamstritel välja töötatud *C. difficile* infektsiooni mudelile 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. Erinevate ksülitooli (0,1-5 protsendilise) ja ampitsilliini (0,75 µl/ml) kontsentratsioonide toime 48 tunni jooksul *Clostridium difficile* ja *L. plantarum* Inducia DSM 21379 monokultuuride kasvule anaeroobses keskkonnas ja BHI söötmes

Eksperimentaalsed 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 h	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

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

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

Uuringu eesmärk oli hinnata *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja *C. difficile* referentstüvede elulemust kooskultiveerimisel ksülitooli ja ampitsilliini erinevate
20 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 lisandiga BHI söötmes (1, 2a, 2b).

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

Tabel 14. *C. difficile* referentstüvede inhibitsioon kooskultiveerimisel *L. plantarum* 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	7,0
	referentstüvi M	5,5	8,5	8,0
4. <i>C. difficile</i> VPI	<i>L. plantarum</i>	5,0	0	0
5. referentstüvi M	Inducia	5,0	5,0	2,0

10 *L. plantarum* Inducia DSM 21379 (3) *C. difficile* referentstüvede (4, 5) kooskultiveerimisel ksülitooli ja ampitilliini lisandiga BHI söötmes (hamstri mudeli jäljendamine) 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).

15 Seega, hamstri mudelit jäljendav *in vitro* katse tõestas *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
 20 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 germinatsioon.

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
5 vahekorras 1:10.

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

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

Segu	kontroll (\log_{10} PMÜ/ml)			Experiment, <i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379 lisati (\log_{10} CFU/ml) Katsesegu, lisatud <i>L. plantarum</i> Inducia DSM 21379 (\log_{10} PMÜ/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).

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

Näide 9. Loomkatse

20 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.

Toetudes meie *in vitro* katsete tulemustele uurisime, kas *L. plantarum* Inducia DSM 21379 manustamine aitab vähendada *C. Difficile* 'ga nakatatud hamstrite suremust. Enne
 5 ampitsilliini manustamist (30 mg/kg) manustasime hamstritele sondiga 5-l järjestikusel päeval *L. plantarum* Inducia DSM 21379 suspensiooni 10^{10} PMÜ/ml kas 5 protsendilise ksülitooli lisandiga või ilma. *L. plantarum* Inducia DSM 21379 manustamist jätkasime kogu katse vältel. Hamstrid nakatati 10-30 *C. difficile* VPI 10463 eosega katse 7-ndal
 10 päeval. Hamstreid jälgiti järgnevad 5 päeva ja *C. difficile* infektsiooni sümptomite 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 ellujäänud hamstrite arv					toksiini test tulemus/loomade arv grupis	5-ndal päeval ellujäänute %
	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)	5	2	2	1	0	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*
 15 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 4-l ellujäänud 5-st loomast ja ainult ühel ellujäänud loomadest oli test positiivne. Seega, *L. plantarum* Inducia DSM 21379 ja ksülitooli kombinatsioon
 20 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 ellujäänud 6-l hamstril 7-st 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 ellujäänud hamstrate 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) eeltoidetud	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

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

Hamstrate ellujäämismäär oli 22 protsenti 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. plantarum* Inducia DSM 21379 happe produtseerimise ja SCFA profiil kaudu.

C. difficile ga nakatatud hamstrite morfoloogilised uuringud

5 *Clostridium difficile* infektsiooni moduleerimiseks kasutati tüüpilist hamstri mudelit, kuna patogeneesi peamine modulaator on toksiinide poolt põhjustatud organite kahjustus. Meie katses kasutatav *C. difficile* VPI 10643 omab nii A kui B toksiooni ning need toksiinid esinesid ka maksas ja peensooles (joonised Fig 2 ja Fig 3).

10 *C. difficile* infektsioonist ellujäänud hamstritel ei leitud lahkamisel ulatuslikke limaskestast kahjustusi, pseudomembraane ega polümorfonukleaarsete rakkude infiltratsiooni (joonis Fig 4a).

C. difficile infektsioonist kahjustatud hamstrate surma-eelseteks iseloomulikeks leidudeks oli põletik koos polümorfonukleaaride infiltratsiooniga limaskestast ja pseudomembraanide olemasolu. Raske enterokoliit põhjustas punaliblede ja polümorfonukleaarsete leukotsüütide infiltratsiooni soole limaskestast, maksa ja põrna, põhjustades loomade surma. Elundites esines hüperemia (joonis Fig 5f).

PATENDINÕUDLUS

1. Probiootilist mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldav kompositsioon kasutamiseks kolesterooli metabolismi häirete ja nendest lähtuvate südame-veresoonkonna haiguste ennetamiseks LDL-kolesterooli taseme vähendamise teel veres ja samaaegseks inimkeha antioksidatiivse aktiivsuse tõstmiseks oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiinide (ox-LDL) taseme ning oksidatiivse stressi indeksi (OSI) vähendamise abil.
2. Probiootilist mikroorganismi tüve *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 sisaldav kompositsioon kasutamiseks *Clostridium difficile* põhjustatud kõhulahtisuse (CDAD) riski vähendamiseks *Clostridium difficile* eoste germinatsiooni takistamise ja *Clostridium difficile* vegetatiivsete rakkude paljunemise allasurumise teel.
3. Kompositsioon vastavalt punktile 2, mis sisaldab lisaks ksülitooli.
4. Kompositsioon vastavalt punktile 1 või 2, mis on valitud rühmast, mis sisaldab farmaatsia-, toidu- või veterinaarset kompositsiooni.
5. Toiduaine mis sisaldab kompositsiooni vastavalt punktile 1 või 2.
6. Toiduaine vastavalt punktile 5, milleks on piimatoode.
7. Toiduaine vastavalt punktile 6, milleks on fermenteeritud piimatoode.
8. Toiduaine vastavalt punktile 7, milleks on juust
9. Toiduaine vastavalt punktile 7, milleks on jogurt.
10. Toidulisand, mis sisaldab kompositsiooni vastavalt punktile 1, 2 või 3.
11. Farmaatsia- või veterinaariatode, mis sisaldab kompositsiooni vastavalt punktile 1, 2 või 3.
12. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kasutamiseks hüpokolestereemilise agendina kolesterooli metabolismi häirete ja südame-veresoonkonna haiguste ennetamiseks veres LDL-kolesterooli taseme alandamise abil.
13. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kasutamiseks antioksidatiivse agendina inimkeha antioksidatiivse aktiivsuse tõstmiseks oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiinide (ox-LDL) taseme vähendamise teel.
14. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kasutamiseks antimikroobse agendina eksogeenset ja/või endogeenset päritolu *Clostridium difficile* põhjustatud kõhulahtisuse (CDAD) riski vähendamiseks *Clostridium difficile* eoste

germinatsiooni takistamise ja *Clostridium difficile* vegetatiivsete rakkude paljunemise allasurumise teel.

15. *Lactobacillus plantarum* Inducia DSM 21379 kasutamiseks antimikroobse agendina, vastavalt punktile 14 koos ksülitooliga.

1/5

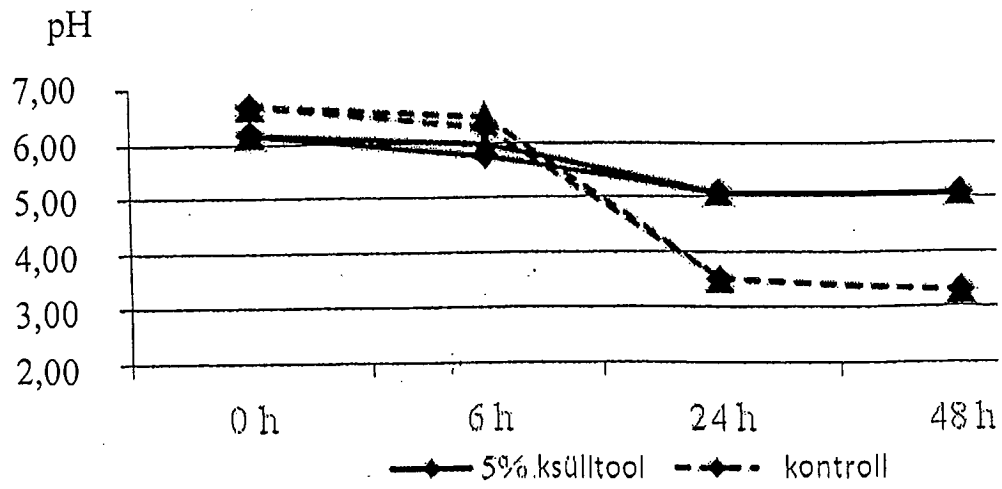


Fig. 1

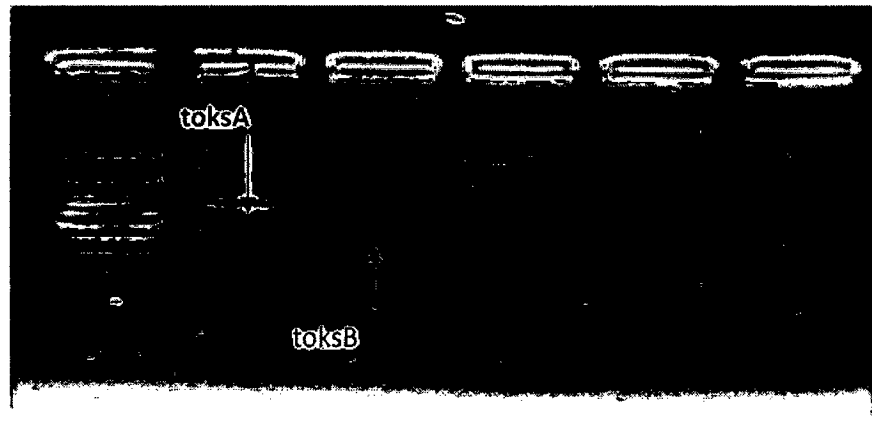


Fig. 2

3/5

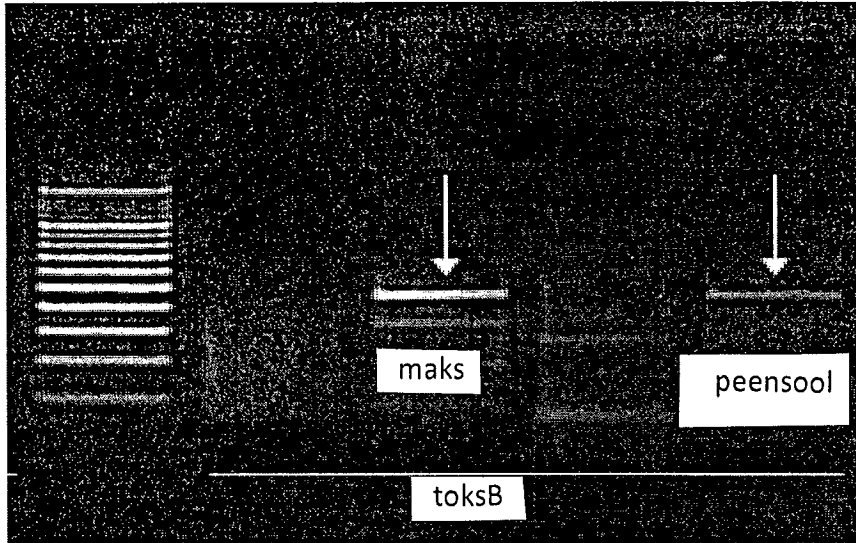


Fig. 3

4/5

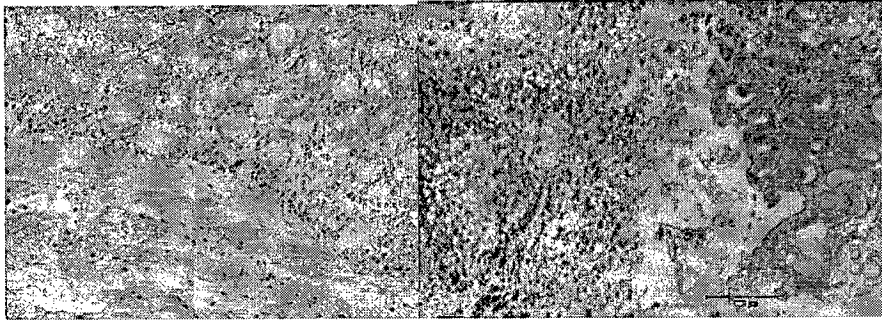


Fig 4a

Fig 4b

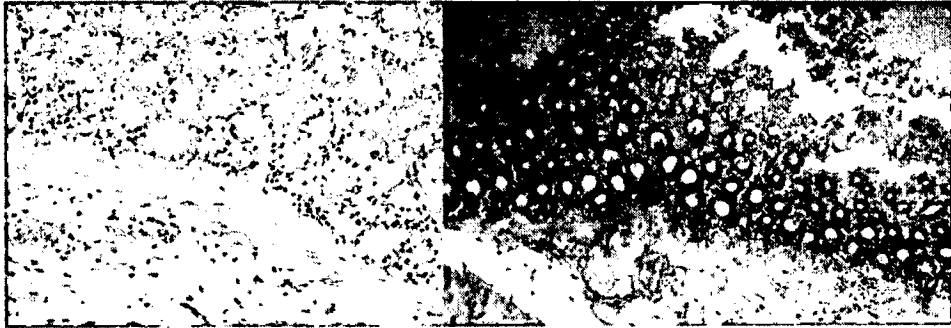


Fig 5a

Fig 5b



Fig 5c

Fig 5d

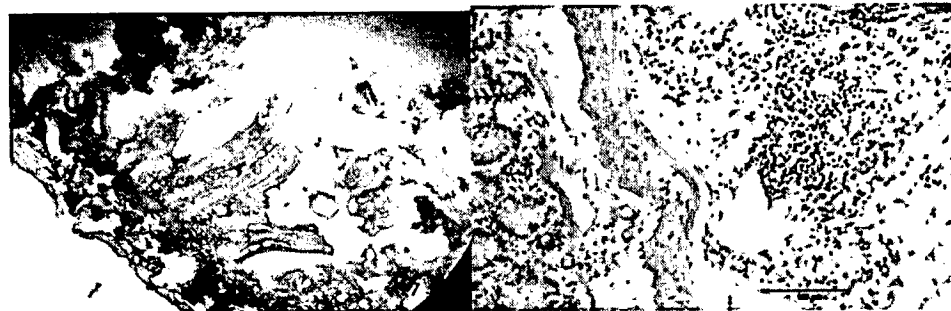


Fig 5e

Fig 5f