

# Afslutningsrapport

## **Probiotiske bakterier**

Belysning af interaktioner med det cellulære immunsystem, stimulering af tarmepithelets forsvarsmekanismer og gavnlige indvirkning på spædbørns immunstatus, tarmslimhinde og dermed sundhed

Mejeribrugets ForskningsFond  
Rapport nr. 2009-96

April 2009

# Afslutningsrapport

## Probiotiske bakterier

Belysning af interaktioner med det cellulære immunsystem, stimulering af tarmepithelets forsvarsmekanismer og gavnlige indvirkning på spædbørns immunstatus, tarmslimhinde og dermed sundhed.

## Projektleder

Professor Mogens Jakobsen  
Institut for Fødevarevidenskab  
Fødevaremikrobiologi  
Det Biovidenskabelige Fakultet  
Københavns Universitet  
Rolighedsvej 30  
1958 Frederiksberg C  
Tlf. 3533 3216  
Fax 3528 3214  
E-mail: [moj@life.ku.dk](mailto:moj@life.ku.dk)

## Øvrige deltagere

Professor Kim Fleischer Michaelsen, Institut for Human Ernæring, KU-LIFE, e-mail: [kfm@life.ku.dk](mailto:kfm@life.ku.dk), tlf. 3533 2483.  
Professor Hanne Frøkiær, Institut for Grundvidenskab og Miljø, KU-LIFE, e-mail: [hafr@life.ku.dk](mailto:hafr@life.ku.dk), tlf. 3533 2714.  
Lektor Finn K. Vogensen, Institut for Fødevarevidenskab, KU-LIFE, e-mail: [fkv@life.ku.dk](mailto:fkv@life.ku.dk), tlf. 3533 3211.  
Ph.d.-studerende Nadja Larsen, Institut for Fødevarevidenskab, KU-LIFE, e-mail: [nf@life.ku.dk](mailto:nf@life.ku.dk), tlf. 3533 3235.  
Ph.d.-studerende Rikke Gøbel, Institut for Human Ernæring, KU-LIFE, e-mail: [rg@life.ku.dk](mailto:rg@life.ku.dk), tlf. 3533 3548.  
Postdoc Hanne Risager Christensen, Biocentrum-DTU (indtil 1. marts 2005).

## Samarbejdspartnere

Dr. Avrelia Cencic, University of Maribor, Slovenien  
Overlæge, dr.med. Anders Pærregaard, H:S Hvidovre Hospital  
Dr Guido Ferlazzo, University of Messina, Italien

## **Øvrige finansieringskilder**

Projektet var støttet af Innovationsloven.

## **Projektperiode**

April 2003 til juni 2008.

## Resume af det samlede projekt

Indtagelse af visse bakterier er rapporteret at have sundhedsfremmende egenskaber. Det har været projektets overordnede formål at få bedre viden om sådanne probiotiske bakterier med særlig henblik på en positiv påvirkning af immunforsvaret. Tarmen og dens omliggende væv udgør kroppens største og mest aktive immunologiske organ. Det har derfor været et formål at udvikle og anvende *in vitro* funktionelle cellemodeller til belysning af probiotiske bakteriers påvirkning af tarmens slimhinde og tilknyttede celler fra immunsystemet. Det har sluttelig været et væsentligt formål at kunne eftervise positive indvirkninger på immunsystemet hos mennesker.

Projektet har med held optimeret og anvendt to cellemodeller. De er baseret på henholdsvis dendritiske celler fra mus og mennesker og sande celler fra svinets tyndtarm. Dendritiske celler, som bl.a. er integreret i tarmslimhinden, kan stimuleres af forskellige bakterier til opregulering af receptorer på overfladen og produktion af cytokiner, som har afgørende betydning for immunstatus. I alt 42 potentielt probiotiske stammer af lactobaciller og bifidobakterier blev undersøgt. Der er skabt ny viden og observeret markante forskelle i de immunreaktioner som fremkaldes af de undersøgte lactobaciller og bifidobakterier. Sidstnævnte samt enkelte lactobaciller kan således forhindre en uønsket inflammatorisk reaktion, som kan fremkaldes af andre bakterier. Generelt er påvist betydelige og undertiden modsatrettede forskelle i kulturernes evne til at undertrykke eller stimulere en inflammatorisk reaktion.

Flere af de undersøgte bakterier har i et af projektets modelsystemer vist sig at kunne beskytte celler fra tarmslimhinden mod et modelvirus. Det er også for nogle bakterier observeret, at de inducerer dannelsen af kvælstofilte (NO) i tarmcellerne, som i passende lave koncentrationer beskytter mod patogener og betændelsestilstande i tarmen. Stimuleringen af tarmceller blev især observeret for lactobaciller, mens de undersøgte bifidobakterier selv dannede NO. De resultater, som er opnået ved de nævnte *in vitro*-studier, og de observerede kvalitative og kvantitative forskelle bør tages i betragtning ved udvælgelse af kulturer til mejeriindustrien.

To kommercielle probiotiske kulturer *Bifidobacterium lactis* BI-07 og *Lactobacillus acidophilus* NCFM blev udvalgt til et interventionsstudium for 62 børn i alderen 7-24 måneder med atopisk dermatitis. Der blev ikke påvist en overordnet sundhedsfremmende effekt af de to probiotiske stammer. Der blev heller ikke observeret en signifikant påvirkning af børnenes immunstatus samt permeabilitetsforholdene og sammensætningen af bakteriepopulationen i deres tarm. Et overraskende udfald af studiet, som forstærker ønsket om flere forsøg med mennesker.

## English Summary

It has been reported that intake of certain microorganisms has a beneficial influence on human health. The main objective of the current project was to obtain new knowledge on probiotic bacteria especially with respect to their effects on immune response. The gut and surrounding tissues comprise the largest and most efficient part of the human immune system. Therefore, an important task was to develop and implement *in vitro* cell models in order to elucidate the effects of probiotic bacteria on the intestinal epithelium and the associated cells of the immune system. Finally, a major aim was to demonstrate the positive effects of probiotics on the human immune system.

Two cell models were optimized and successfully applied in the project. The models were based on dendritic cells, of mouse and human origin, and cells from the intestinal tract of pigs. When dendritic cells, integrated in the gut epithelium, are exposed to bacterial stimuli, they can up-regulate various surface receptors and cytokines, which are of a prime importance for immune status. In total, 42 potential probiotic strains of lactobacilli and bifidobacteria were investigated. New scientific information was obtained and it was observed that most strains stimulated formation of cytokines by the dendritic cells. Considerable differences were revealed between the tested strains. Bifidobacteria and a few strains of lactobacilli were capable of inhibiting an undesirable inflammatory response stimulated by other bacteria. Generally, not only pronounced differences but also opposite effects in the ability of the cultures to inhibit or stimulate an immune response were observed.

Several of the investigated potential probiotic bacteria were able to protect the intestinal epithelial cells from infective virus in the model systems. It was also observed that some of bacteria induced formation of nitric oxide (NO) by epithelial cells, which in certain low concentrations provides protection against pathogens and inflammation in the gut. Stimulation of the gut cells to produce NO was especially observed for lactobacilli; while the tested strains of bifidobacteria themselves were able to produce NO.

The *in vitro* results obtained and the qualitative and quantitative differences established between strains should be taken into account for culture selection in the dairy industry. Two commercial probiotic cultures, *Bifidobacterium lactis* BI-07 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM, were chosen for the intervention studies including 62 young children with atopic dermatitis. It was shown that the two probiotic strains did not have a major beneficial effect on health. Significant changes of the immune status, the intestinal permeability and the composition of intestinal bacteria were not detected. These surprising results indicate a need for further human studies.

## Projektets baggrund og mål

Indtagelse af visse bakterier via fødevarer eller kosttilskud er rapporteret at have sundhedsfremmende egenskaber. Mejeribrugets ForskningsFond har under indsatsområdet "Sundhed og Ernæring" ønsket at få bedre viden om sådanne probiotiske bakterier med særlig henblik på mulige positive interaktioner med immunforsvaret.

Tarmbakteriers indflydelse på immunsystemet har i de seneste år fået stor bevågenhed i relation til befolkningens almene sundhedstilstand. Tarmen og det omliggende væv udgør kroppens største og mest aktive immunologiske organ samtidig med, at tarmbakteriernes indflydelse på reguleringen af immunsystemet tillægges stor betydning. Det er derfor nærliggende at forsøge at påvirke denne regulering via tilførsel af probiotika.

I tidligere studier støttet af Mejeribrugets ForskningsFond har projektgruppen vist, at forskellige mælkesyrebakterier har meget varierende, stammebestemte probiotiske egenskaber med hensyn til deres evne til at adhærere til tarmceller og til at hæmme andre bakteriers vækst (Jacobsen et al., 1999). De tidligere studier har også vist sundhedsfremmende effekter af udvalgte probiotiske stammer hos børn med diarre og astmaeksem (Rosenfeldt et al., 2002 a, b og 2003). De tilgrundliggende mekanismer bag disse positive effekter af probiotika er imidlertid ukendte. Tidligere har projektgruppen udviklet en model baseret på murine dendritiske celler (DC), som kan anvendes til screening såvel som til mekanistiske studier af bakteriers indvirkning på det cellulære immunsystem (Christensen et al., 2002). Projektgruppen har tillige deltaget i udviklingen af en funktional cellemodel, som hviler på sande epithelceller (Cencic og Jakobsen, 2002) og kan anvendes til studier af probiotikas indvirkning på tarmceller og det tilhørende cellulære immunsystem. Disse nye og lovende *in vitro*-modeller har sammen med en større antal potentielt probiotiske bakterier, der er indsamlet i de førnævnte projekter, været et centralt udgangspunkt for indeværende projekt. Et udtalt behov for verificering af *in vitro*-studier gennem humane interventionsstudier har endvidere været en væsentlig baggrund for i indeværende projekt at anvende potentielle probiotiske kulturer til interventionsstudier til børn med atopisk dermatitis med det formål at eftervise positive indvirkninger på immunsystemet hos mennesker.

## Resultater og diskussion

### Undersøgelse af kulturer i cellemodeller for immunmodulerende egenskaber

I et sammenlignende studium blev 42 forskellige stammer (Tabel 1) af slægterne *Lactobacillus* og *Bifidobacterium*, hvoraf de fleste er humane isolater, screenet for deres evne til at modne murine dendritiske celler (DC) og til at stimulere produktionen af cytokinerne: IL-6, IL-10, IL-12 og TNF- $\alpha$  (Zeuthen et al., 2009). Alle bakterier var i forskellig grad i stand til at inducere en modning af DC, målt ved opregulering af overflademærker, men deres evne til at inducere cytokinerne varierede, som det fremgår af Figur 1.

**Tabel 1.** Bakterier anvendt i projektet

Nr.	Bakterier	Stammer	Isoleret fra/Origin
	<b>Nye isolater (IFV, KU)</b>		
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	X37	Voksen, biopsi
2	<i>Lactobacillus casei</i>	D12	Voksen, fæces
3	<i>Lactobacillus casei</i>	I23	Voksen, fæces
4	<i>Lactobacillus paracasei</i>	A14	Voksen, fæces
5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	B32	Voksen, fæces
6	<i>Lactobacillus casei/ paracasei</i>	61R3	Ost
7	<i>Lactobacillus casei /paracasei</i>	8R2	Ost
8	<i>Lactobacillus paracasei/ rhamnosus</i>	Z11	Voksen, biopsi
9	<i>Lactobacillus paracasei /rhamnosus</i>	Q85	Voksen, biopsi
10	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	E5	Voksen, fæces
11	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	G26	Voksen, fæces
12	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	I12	Voksen, fæces
13	<i>Lactobacillus ruminis</i>	Q95	Voksen, biopsi
14	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Q47	Voksen, biopsi
15	<i>Lactobacillus plantarum</i>	M.1.1	Barn, fæces
16	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	D14	Voksen, fæces
17	<i>Lactobacillus reuteri</i>	E14	Voksen, fæces
18	<i>Lactobacillus reuteri</i>	M.7.1	Barn, fæces
19	<i>Bifidobacterium</i>	M.16.2	Barn, fæces
20	<i>Bifidobacterium</i>	M.97.2	Barn, fæces
21	<i>Bifidobacterium</i>	P.30.5	Barn, fæces
22	<i>Bifidobacterium</i>	S.13.1	Barn, fæces
23	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Z9	Voksen, biopsi
24	<i>Bifidobacterium longum</i>	Z8	Voksen, biopsi
25	<i>Bifidobacterium longum</i>	Q46	Voksen, biopsi
26	<i>Bifidobacterium longum</i>	Q45	Voksen, biopsi
27	<i>Bifidobacterium longum</i>	Q50	Voksen, biopsi
	<b>Kendte stammer</b>		
28	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NCFM	Danisco A/S
29	<i>Lactobacillus acidophilus (johnsonii)</i>	LA1	Nestle
30	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NCBF 1748	Arla
31	<i>Lactobacillus casei</i>	Nikka	Chr. Hansen
32	<i>Lactobacillus casei</i>	Shirota	Yakult
33	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>	F19	Arla Foods
34	<i>Lactobacillus paracasei ssp paracasei</i>	CRL 431	Chr. Hansen
35	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	19070	Michael Tvede
36	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LGG	Valio
37	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	HN001	Gill
38	<i>Lactobacillus plantarum</i>	299V	ProViva
39	<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSM12246	KU, IFV
40	<i>Lactobacillus reuteri</i>		Biogaia
41	<i>Bifidobacterium lactis</i>	Bi-07	Danisco A/S
42	<i>Bifidobacterium lactis</i>	HN019	Gill
43	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BB14	Chr. Hansen
44	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSM 20082	DSMZ
45	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSM20239	DSMZ
46	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	DSM20456	DSMZ

47	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSM 20091	DSMZ
48	<i>Bifidobacterium breve</i>	DSM 20213	DSMZ
49	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	DSM 20103	DSMZ
50	<i>Bifidobacterium infantis</i>	DSM20088	DSMZ
51	<i>Enterococcus faecium</i>	Gaio	Arla Foods

Bifidobakterierne udviste en meget ensartet evne til at inducere IL-10, men kun ganske lave mængder af IL-12, hvorimod der sås en stor variation i evnen til at inducere IL-12 og TNF- $\alpha$  blandt laktobacillerne. Fælles for de stammer af laktobaciller og bifidobakterier, der kun var i stand til at inducere meget lave mængder af IL-12, var, at de var i stand til at inhibere den IL-12, TNF- $\alpha$  og IL-23-produktion, der blev induceret af stammer med evnen til at inducere højde mængder af disse cytokiner (Zeuthen et al., 2006). Evnen til at stimulere til en høj produktion af IL-12, TNF- $\alpha$  og IL-23 antyder, at bakterierne er i stand til at booste og dermed modne immunsystemet og polarisere det væk fra et allergisk respons. Evnen til at inhibere et sådant respons, hvilket sås for alle bifidobakterier, kan være vigtig for at undgå en for voldsom reaktion fra det umodne immunsystem. Viden om, hvad der er vigtigst for det umodne immunforsvar, er for nuværende sparsom.

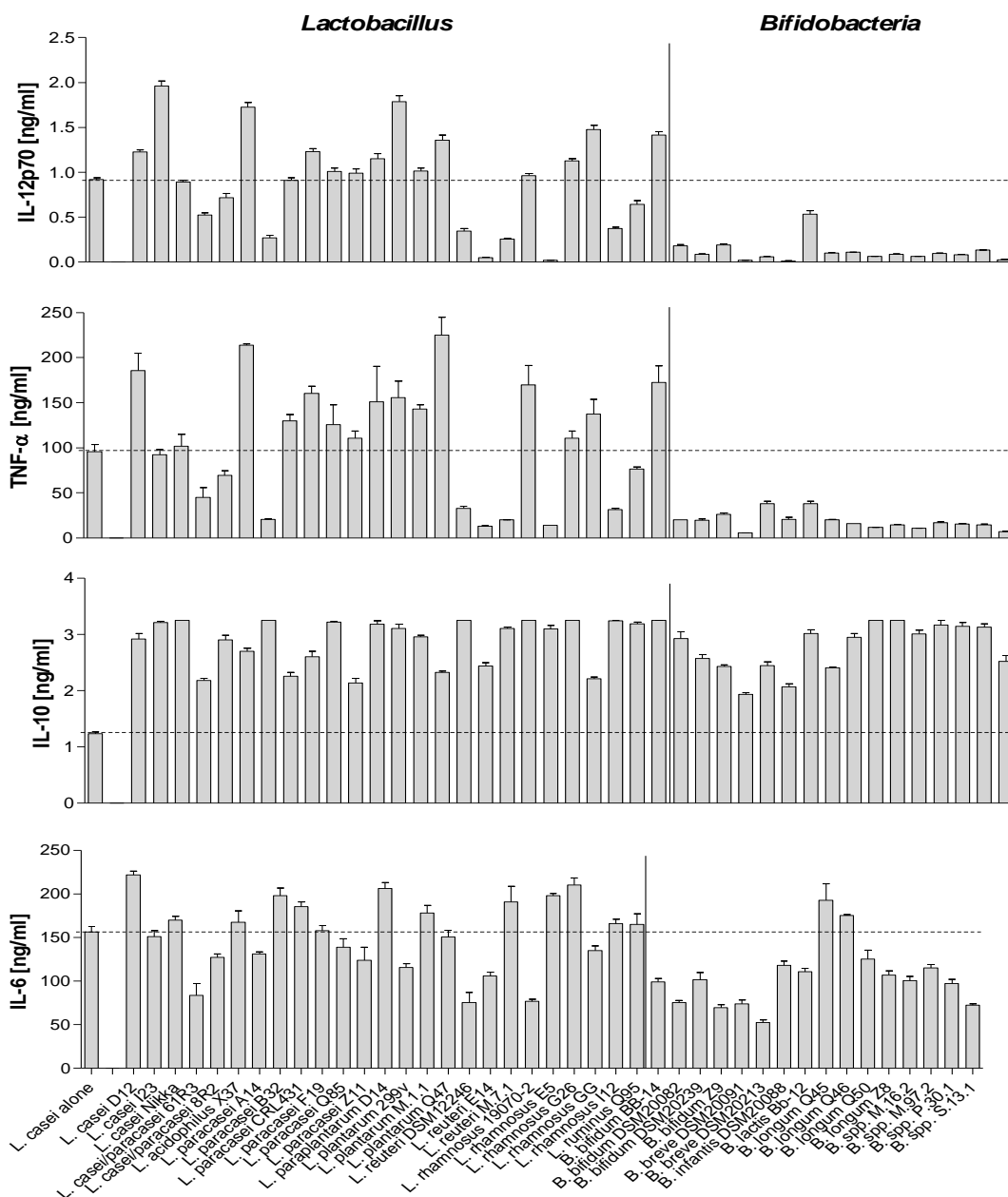
Der blev gennemført et præliminært, mekanistisk studium af de immunmodulerende egenskaber. Et antal stammer blev testet for deres evne til at inducere udtryk af overflademærkerne MHC II, CD 80, CD 86 og CD 40 hos dendritiske celler. Det sås, at alle stammer var i stand til at inducere modning målt ved opregulering af disse markører, men at styrken i opregulering varierede afhængig af stammen (Zeuthen et al., 2006, 2009). Dette betyder, at der kun er mindre forskelle i bakteriernes evne til at stimulere immunforsvaret. Cytokinmønsteret varierer derimod. Cytokinerne, der produceres ved denne stimulering påvirker typen af immunrespons, fx inflammation vs. tolerance.

Nogle få bakteriestammer blev udvalgt til studier af, hvilke komponenter der dels gav anledning til stimulering af DC-modning og IL-12 produktion og dels var i stand til at hæmme stimulering af IL-12. Dette arbejde er meget krævende og hæmmes af, at det er yderst vanskeligt at oprense de enkelte mikrobielle komponenter tilstrækkeligt. De overordnede konklusioner er, at hele bakterier er en forudsætning for en stimulering af DC, der fører til en høj produktion af IL-12 og TNF- $\alpha$ , mens visse enkeltkomponenter, især lipoprotein, er aktive i forbindelse med bakteriers evne til at inhibere IL-12 (Zeuthen et al., 2008a).

For at undersøge hvilke receptorer på DC, der er involveret i responset mod bakterierne, blev DC fra mus, som mangler Toll-like receptor-2 (TLR2) og nucleotide-binding oligomerization domain-2 (NOD2), testet for deres evne til at respondere på de samme stammer og komponenter herfra. Resultaterne fra disse forsøg indikerer, at immunstimulering foregår via interaktion mellem bakteriens peptidoglykan og cellernes NOD2-receptor, mens inhibering involverer interaktion mellem lipoprotein og TLR2 (Zeuthen et al., 2008a).

Som led i projektets metodeudvikling blev en procedure til generering af humane DC etableret og bakteriernes effekt på murine og humane DC sammenlignet. Der blev fundet god overensstemmelse mellem respons fra de to typer DC, idet der også for humane DC sås en stærkere og mere varieret induktion af IL-12 fra laktobaciller, mens alle bifidobakterier kun gav anledning til et lavt IL-12 niveau samtidig med et betydeligt IL-10 niveau (Zeuthen et al., 2006 og 2009). Det blev hermed fastslået, at murine DC fungerer som en effektiv og relevant model til at teste humanrelaterede bakterier.





**Figur 1.** Stimulering af cytokinproduktion i dendritiske celler af *Lactobacillus* og *Bifidobacterium*. Den stiplede linje viser cytokinproduktionen ved tilsætning af *L. casei* alene (første søjle til venstre). Alle de andre søjler repræsenterer produktionen af cytokiner, når DC stimuleres med både *L. casei* og den indikerede bakterie.

### Undersøgelse af kulturer i cellemodeller for deres interaktioner med tarmceller og celler fra det cellulære immunsystem

Som led i projektets metodeudvikling blev der etableret et tokammersystem med den humane Caco-2-cellelinie og humane DC. I det øverste kammer vokser Caco-2-cellerne på en polymermembran til de danner et sammenflydende monolag. I det nederste kammer tilsættes umodne DC. Bakterier tilsættes Caco-2-cellerne i det øverste lag, og der måles, om DC modnes ved tilsætning af bakterier. De resultater, der blev opnået med systemet, kan sammenfattes som følger. Gramnegative bakterier gav anledning til en svag stimulering af DC, mens grampositive laktobaciller var i stand til at inhibere denne stimulering. Ved

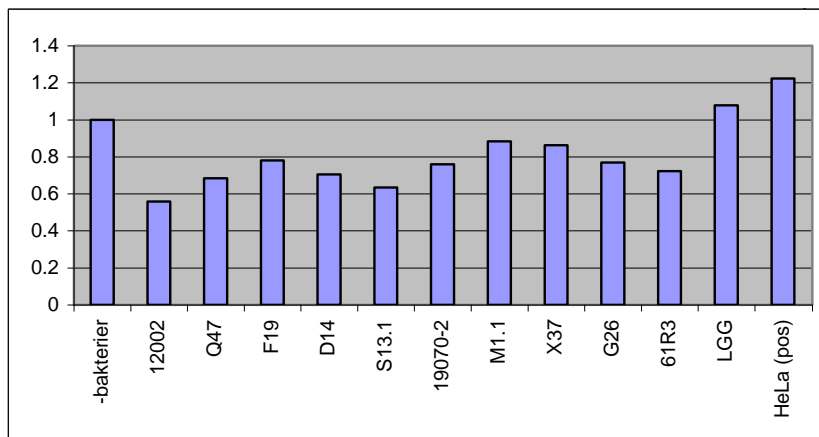
sammenligning med andre resultater fremkommet i litteraturen i samme periode konkluderes det, at lactoperoxidase (LPS) fra de gramnegative bakterier er i stand til at trænge igennem monolaget af Caco-2-celler, hvorved nogle bakterier kan komme i direkte kontakt med DC og stimulere disse. Laktobaciller kan på den anden side hindre den permeabilisering (gennemtrængning), der forårsages af LPS. Modelsystemet viser således – hvad der også inden for de seneste år er fundet *in vivo* – at LPS i nogen udstrækning kan påvirke tarmens permeabilitet og antyder derfor, at probiotiske bakterier i den forbindelse kan opretholde tarmens integritet.

For at studere effekten af de stimulerede DC er flercellesystemer med hhv. DC og T-celler og DC og NK-celler etableret og anvendt. Dette har givet indsigt i betydningen af hhv. overflademærker og cytokiner for aktiveringen af T- og NK-celler (Fink et al., 2007 a, b; Zeuthen et al., 2008 b).

En anden model, som blev taget i anvendelse i projektet er baseret på sande tyndtarmsepitelceller (IPEC-J2) isoleret fra tyndtarmen af neonatale grise. De blev brugt som model for den humane tarm, da de har fælles morfologiske og fænotypiske karakteristika. Cellerne blev stillet til rådighed fra Antony Bliklager, North Carolina State University, gennem University of Maribor, Slovenien.

Probiotiske stammers immunologiske påvirkning af IPEC-J2, blev målt ved aktivering af transskriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B regulerer gener af betydning for immunsystemet og det inflammatoriske (betændelsesagtige) respons. Aktivering af NF- $\kappa$ B formodes at spille en rolle ved forskellige sygdomme. Aktivering af NF- $\kappa$ B er undersøgt for 12 udvalgte stammer. Der er observeret signifikante forskelle mellem stammerne, men de undersøgte probiotiske stammer af laktobaciller og bifidobakterier hæmmer generelt aktiveringen af NF- $\kappa$ B, når mængden af aktiveret NF- $\kappa$ B sammenlignes med mængden af NF- $\kappa$ B fra IPEC-J2-cellerne alene (Figur 2).

Den antivirale effekt af laktobaciller og bifidobakterier er undersøgt i et system bestående af IPEC-J2 og makrofager (3D4/21 fra gris), som er blevet tilsat bakterier og efterfølgende er blevet eksponeret af Vesicular Stomatitis Virus (VSV). Denne virus, der er patogen over for blandt andet grise, lyses IPEC-J2-celler. Ved denne undersøgelse er det blevet undersøgt, om de probiotiske bakterier kan beskytte IPEC-J2 og 3D4/21 mod lysis fremkaldt af VSV-virus. Forsøgene er udført for to bifidobakterier, *B. breve* (DSM20091) og *B. longum* Q46, samt fem laktobaciller, *L. paracasei* A14, *L. paracasei* F19, *L. paracasei/rhamnosus* Q 85, *L. plantarum* M1.1 og *L. reuteri* DSM 12246 (Botic et al., 2007; Ivec et al., 2007). Alle undersøgte stammer var i stand til at reducere virusinfektivitet. Der blev observeret op til 60 procents reduktion afhængigt af koncentrationen af probiotiske bakterier. Den største antivirale aktivitet havde stammerne *L. paracasei* A14, *L. paracasei* F19, *L. plantarum* M1.1 og *B. longum* Q46. Det blev konstateret, at alle undersøgte bakterier forhindrede VSV-binding til cellernes monolag ved direkte binding af VSV og ved etablering af en antiviral tilstand i de forbehandlede monolag. Desuden blev virusinfektivitet reduceret ved anvendelsen af vækstmediet fra kulturerne, hvilket indikerer en udskillelse af antivirale substanser i forbindelse med bakteriernes vækst. Disse resultater tyder på, at mælkesyrebakterier kan etablere "cross-talk" med tarmepitelet og/eller makrofager, hvilket fører til antiviral respons. Der blev endvidere vist, at de undersøgte laktobaciller og bifidobakterier havde evnen til at mindske viral infektion ved produktion af NO og inflammatoriske cytokiner, eksempelvis, IL-6 og INF- $\gamma$  (Ivec et al., 2007). Disse antivirale effekter var positivt korreleret til aktiviteten af mitochondriale dehydrogenaser i makrofagerne, og mitochondrial aktivitet kan muligvis anvendes som biomarkør for probiotikas hæmning af virusreplikation.



**Figur 2.** Probiotiske stammers immunologiske påvirkning af IPEC-J2, målt ved aktivering af transskriptionsfaktor NF- $\kappa$ B. Y-aksen viser ændringer i aktivering af NF- $\kappa$ B i forhold til negativ kontrol, som ikke er tilsat probiotiske kulturer (- bakterier). Værdier under 1,0 svarer til en hæmning.

Følgende stammer er undersøgt: 12002 – *Lactobacillus reuteri* DSM12246; Q47 – *Lactobacillus rhamnosus*; F19 – *Lactobacillus paracasei*; D14 – *Lactobacillus paraplantarum*; S.13.1 – *Bifidobacterium*; 19070 – *Lactobacillus plantarum*; M.1.1 – *Lactobacillus plantarum*; X37 – *Lactobacillus acidophilus*; G26 – *Lactobacillus rhamnosus*; 61R3 – *Lactobacillus casei/paracasei*; LGG – *Lactobacillus rhamnosus*. HeLa kraft celler – positiv kontrol.

Et omfattende studium af bakteriers evne til at stimulere produktion af kvælstofoxid (NO) i sande epithelceller fra tyndtarmen (IPEC-J2) og makrofager blev gennemført for 39 stammer af laktobaciller og bifidobakterier (Pipenbahr et al., 2009). Resultaterne viste, at de fleste laktobaciller var i stand til at stimulere NO-produktion i IPEC-J2 og makrofager, mens bifidobakterier kun kunne stimulere NO-produktion i makrofager. *L. casei* D12, *L. plantarum* M1.1, *L. reuteri* DSM 12246, *B. bifidum* BB14 og *B. infantis* DSM 20088, viste den højeste potentiale for stimulering af NO-produktion i makrofager. NO er en intracellulær mediator som bl.a. har antimikrobiel aktivitet. Disse resultater er således vigtige mht. belysning af den beskyttelse, probiotiske bakterier kan give, især i forbindelse med bekæmpelse af tarminfektioner.

### Udvælgelse af stammer til interventionsforsøg for børn med atopisk dermatitis

På grundlag af de eksperimentelle studier blev *L. acidophilus* X37 og *B. longum* Q46 udvalgt til interventionsforsøg med børn. Disse blev valgt som to repræsentanter for hhv. en stærkt IL-12-stimulerende og dermed Th1 polariserende stamme (X37) og en svagt IL-12-stimulerende og (samtidig) IL-12-inhiberende stamme (Q46). Der var mange af stammerne, der kunne kategoriseres inden for de to grupper. X37 og Q46 blev valgt fra disse grupper ud fra deres gode adhæsionsegenskaber. Desværre viste det sig umuligt at fremstille disse kulturer i driftsskala pga. sammenklustring af bakteriecellerne. Dette problem gjorde sig gældende på et sent tidspunkt i procesoptimeringen, og der var ikke tid til at optimere processen for andre kulturer. Som alternativ blev det besluttet at anvende de kommercielle stammer *L. acidophilus* NCFM og *B. lactis* Bi-07 til det humane interventionsstudium. Begrundelsen for valg af disse stammer var, at deres immunmodulerende egenskaber gik i samme retning som de oprindeligt udvalgte kulturer. Endvidere har de to kulturer en lang tradition for kommerciel anvendelse som probiotika og dermed en dokumenterbar sikkerhed, som ville gøre den etiske godkendelse af

interventionsforsøget overskuelig i tid og omfang. Begge kulturer produceres af Danisco A/S.

### **Interventionsforsøg for børn med atopisk dermatitis; en undersøgelse af effekten på eksem, immunstatus, tarmens inflammation og permeabilitet samt intestinal mikropopulation**

Atopisk dermatitis (AD) er en multifaktoriel inflammatorisk hudsygdom med stigende forekomst hos børn i den vestlige verden. Der vides relativt lidt om årsagerne bag udvikling af AD, men tidligere studier har foreslået, at indtag af probiotiske bakterier som *Lactobacillus* og *Bifidobacterium* mindsker sværhedsgraden af AD hos børn (Rosenfeldt et al., 2003). Der blev gennemført et blokrandomiseret, dobbeltblindet interventionsstudiet med tre grupper, hvoraf to grupper blev randomiseret til et dagligt indtag på  $1 \times 10^{10}$  CFU af hhv. *B. lactis* BI-07 og *L. acidophilus* NCFM og den tredje gruppe fik tildelt placebo. Undersøgelsen inkluderede 62 børn i alderen 7 til 24 måneder, med en gennemsnitsalder på 18 måneder.

Der blev opnået følgende resultater:

**Sværhedsgrad af eksem:** Sværhedsgraden af eksemet og subjektive symptomer blev klassificeret ved hjælp af den internationale anerkendte metode SCORing Atopic Dermatitis (SCORAD) indeks. Der er blevet påvist en signifikant ( $P=0,013$ ) forbedring på SCORAD-indeks efter intervention for gruppen, der dagligt har indtaget *B. lactis* BI-07 (Tabel 2). Dog ses der desuden en tilnærmelsesvis signifikant bedring i placebogruppen ( $P=0,052$ ). Analyse af den samlede ændring i SCORAD-indeks mellem baseline og efter endt intervention var signifikant ( $P=0,001$ ), svarende til et overordnet fald i SCORAD-indeks uafhængig af gruppe. Det betyder, at man efter en strikt statistisk vurdering må konkludere, at der ikke var effekt af interventionerne, hvilket stemmer overens med det nyligt publicerede review (Boyle et al., 2008), der på baggrund af den eksisterende litteratur konkluderer, at probiotika ikke kan anvendes som behandling af eksem-relaterede symptomer. Denne konklusion er overraskende i forhold til resultaterne af det nævnte interventionsforsøg (Rosenfeldt et al., 2003).

**Tabel 2.** Forskel i SCORAD-indeks før og efter intervention for 62 børn med atopisk dermatitis.

<b>SCORAD-indeks</b>				
<b>Gruppe</b>	<b>Før intervention</b>	<b>Efter intervention</b>	<b>Forskel</b>	<b>P</b>
<i>Placebo</i>	21,5	14,0	-7,5	0,052
<i>NCFM</i>	16,0	15,0	-1,0	0,227
<i>BI-07</i>	21,0	15,0	-6,0	0,013*

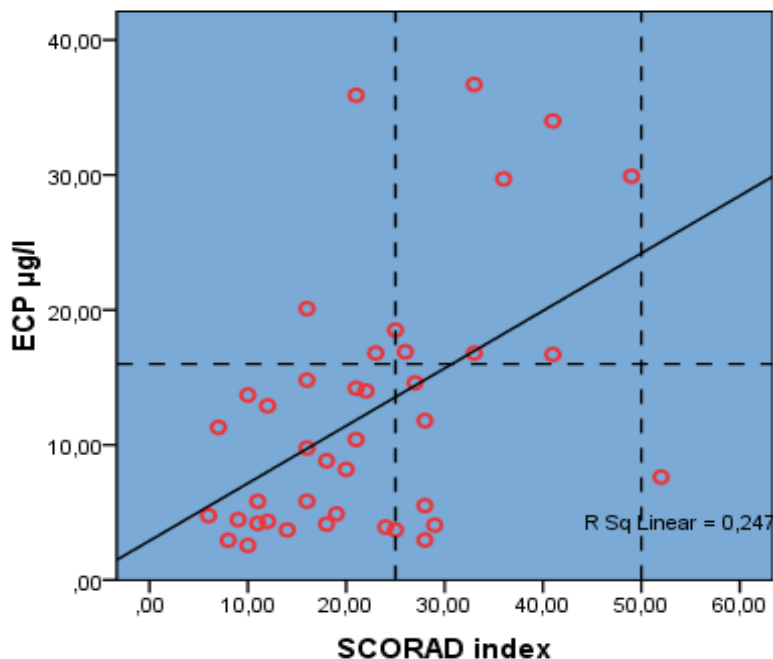
\*Signifikant ændring fra baseline (Wilcoxon signed rank test)

**Inflammation:** Der blev ved baseline påvist en positiv korrelation mellem eosinophil cation-protein (ECP) og SCORAD-indeks (Figur 3), hvilket i overensstemmelse med den eksisterende litteratur viser, at ECP er et brugbart mål for graden af inflammation samt en indikation af sværhedsgraden af eksem. Der blev ikke fundet signifikant forskel mellem de tre interventionsgrupper fra før til efter intervention med hensyn til IgE total, IgE specifik for æg og mælk, IL-10, IFN- $\gamma$  og IL-31 (Tabel 3). Samtidigt viste data en signifikant korrelation mellem ECP og total IgE ( $P=0,027$ ), hvilket indikerer, at børn med øget fødevarerensibilitet har en højere grad af inflammation og dermed sværhedsgrad af eksem.

**Tabel 3.** Ændringer af immunologiske parameter for tre grupper af børn med atopisk dermatitis efter indtagelsen af probiotika (NCFM, Bi-07 og placebo).

Parameter	P
Total IgE	0,663
Specifik IgE æg	0,780
Specifik IgE mælk	0,244
IL-10	0,472
IFN- $\gamma$	0,680
IL-31	0,673

(Kruskal-Wallis test)



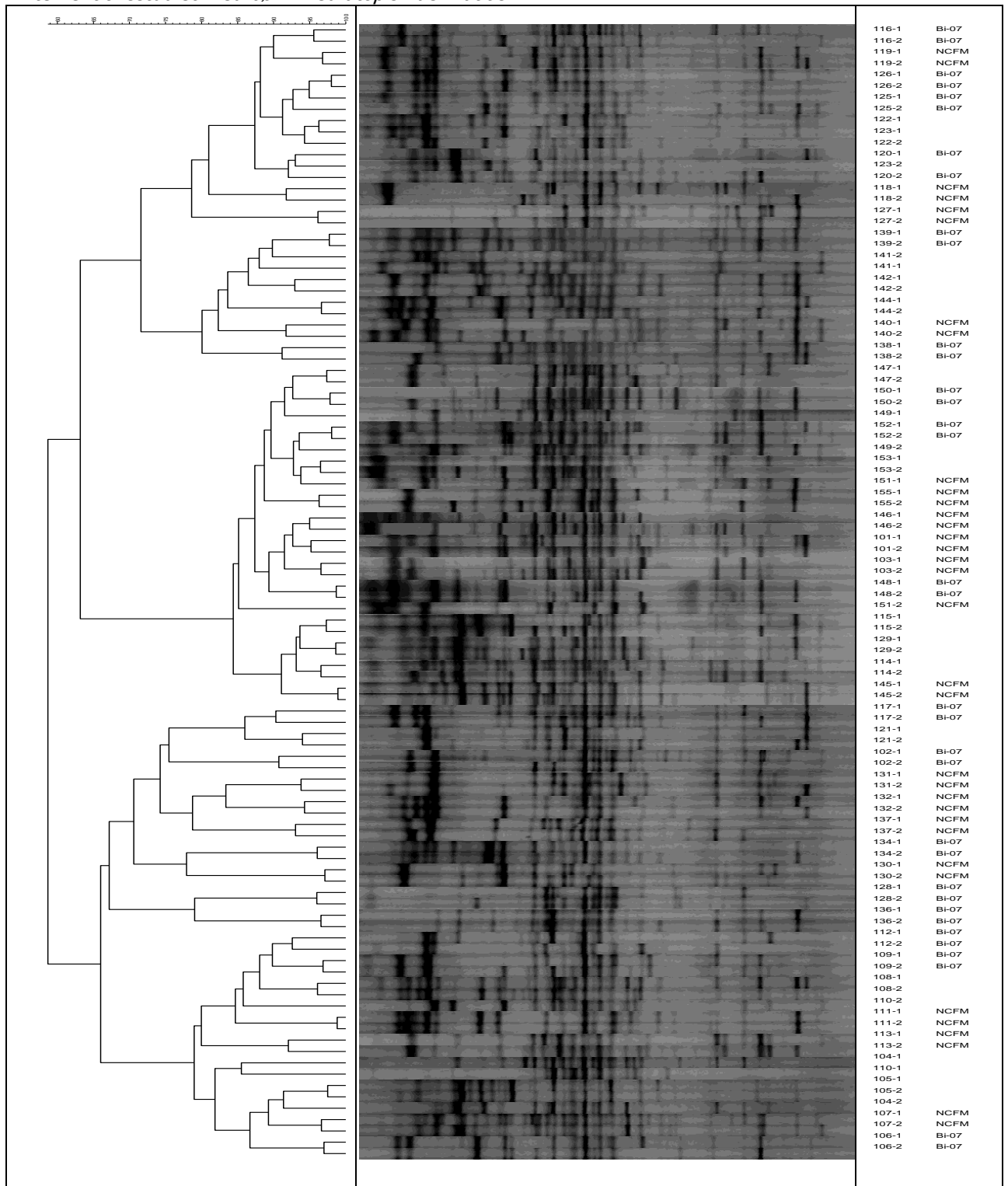
**Figur 3.** Korrelation mellem ECP og SCORAD-indeks. Den horisontale linje indikerer cut-off for ECP (Eosinophil Cation Protein) og de to vertikale linjer viser inddelingen af sværhedsgraden af eksem ved SCORAD (SCORing Atopic Dermatitis) indeks. <25 = mild, >25<50 = moderat, >50 = svær.

**Sammensætning af mikrobiota i tarmen:** Molekylærbiologiske teknikker baserede på Denaturerende Gradient Gel Elektroforese (DGGE) og real-time PCR (qPCR) er blevet udviklet og anvendt til karakterisering af totale og specifikke bakteriepopulationer i afføringsprøver (Larsen et al., 2009 a). Analysen af de totale og bifidobakterie-specifikke DGGE-profiler viste generelt en gruppering på personniveau (Figur 4 og 5), hvilket indikerer, at børn har en individuel og stabil sammensætning af dominerende bakterier i tarmen.

DNA-profiler opnået med *Lactobacillus*-specifikke primere viste karakteristiske ændringer i DNA-mønstre efter indgivelse af NCFM, således at der forekom et stærkt bånd svarende til *L. acidophilus* og diversiteten af de fleste DGGE-profiler blev reduceret (Larsen et al., 2009 a og Figur 6). Disse resultater kunne ikke bekræftes ved qPCR, som viste, at indholdet af de dominerende arter af mælkesyrebakterier, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *Lc. mesenteroides*, ikke var formindsket efter interventionen (Tabel 4). Det kan derfor konkluderes, at

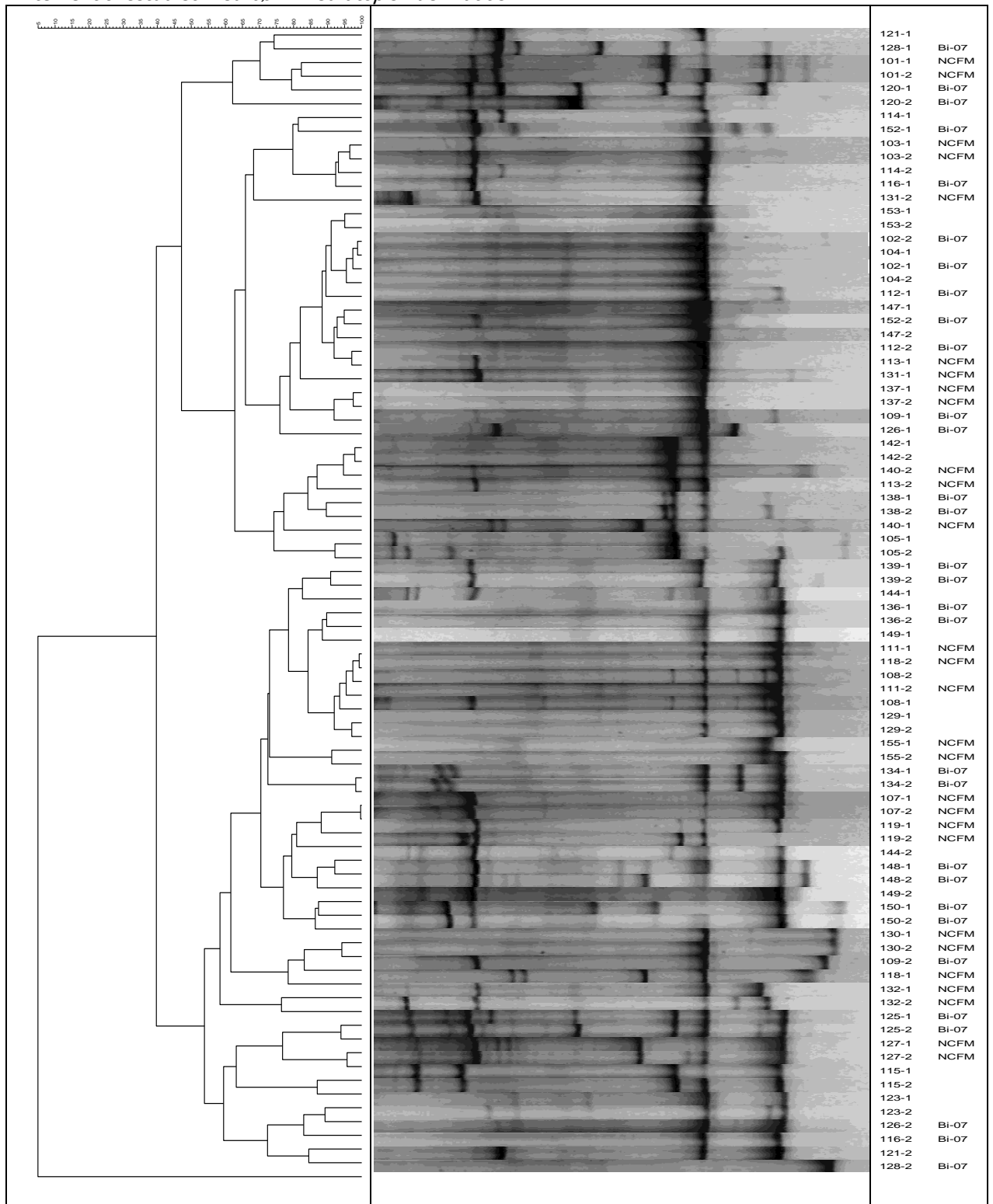
ændringer i DGGE-profiler skyldes PCR-bias pga. høj forekomst og præferentiel amplifikation af *L. acidophilus*. Antallet af *L. acidophilus* og *B. lactis* i afføringsprøver var betydeligt højere efter indtagelsen af probiotiske stammer, sammenlignet med tilsvarende antal før interventionen (Tabel 4), hvilket tyder på, at de probiotiske bakterier overlever tarmpassagen. Som det fremgår fra analyseresultaterne har de probiotiske stammer, *L. acidophilus* NCFM og *B. lactis* BI-07, ingen virkning på sammensætning af mælkesyrebakterier og bifidobakterier i tarmen. Disse resultater er ikke i overensstemmelse med den forventede indvirkning af probiotika på sammensætningen af mikropopulationen i fæces og dermed i tarmkanalen.

**Figur 4.** Klusteranalyse af DGGE-profiler af den totale mikrobiota i fæces fra interventionsstudiet med børn med atopisk dermatitis<sup>1</sup>



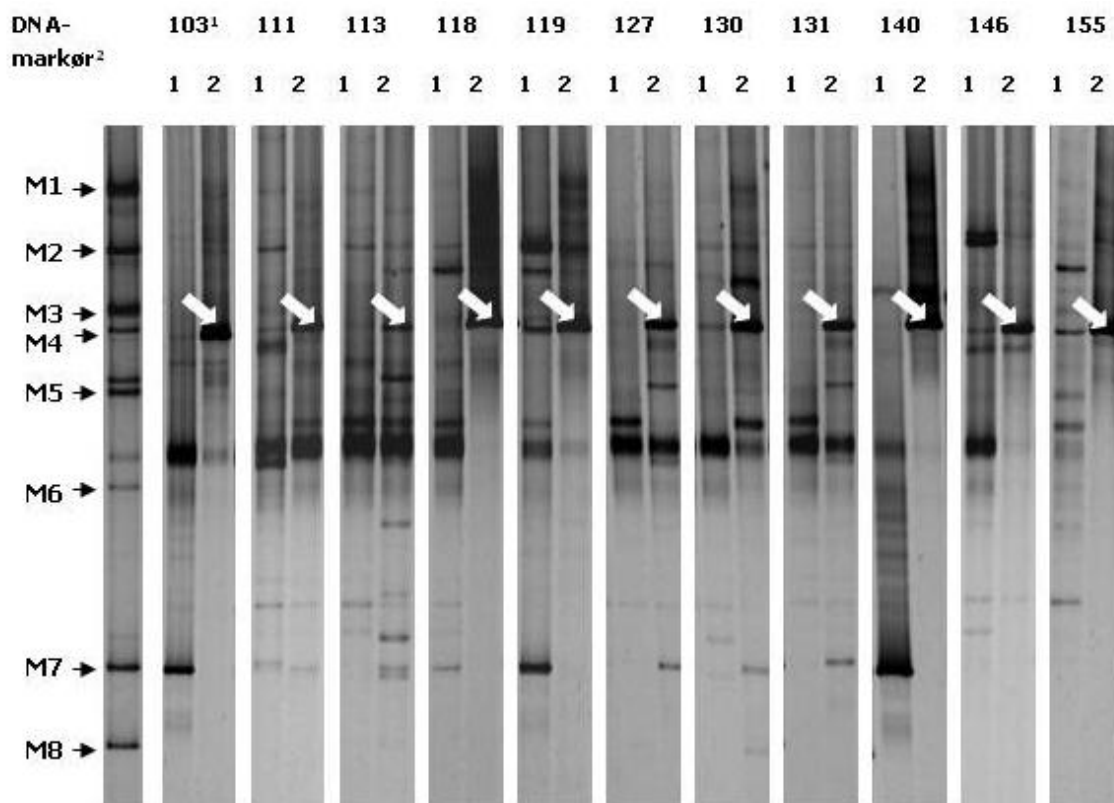
<sup>1</sup> Deltagernes nummer og indtagelsen af probiotiske bakterier (*L. acidophilus* NCFM og *B. lactis* Bi-07) eller placebo (blank) er vist i højre søjle: prøver (-1) og (-2) opsamlet hhv. før og efter interventionen.

**Figur 5.** Klusteranalyse af bifidobakterie-specifikke DGGE-profiler i fæces fra interventionsstudiet med børn med atopisk dermatitis<sup>1</sup>.



<sup>1</sup> Deltagernes nummer og indtagelsen af probiotiske bakterier (*L. acidophilus* NCFM og *B. lactis* Bi-07) eller placebo (blank) er vist i højre søjle: prøver (-1) og (-2) opsamlet hhv. før og efter interventionen.





<sup>1</sup> Deltagernes nummer og prøver opsamlet før (1) og efter (2) interventionstudiet. DNA-bånd svarende til *L. acidophilus* er markeret med hvide pile i prøverne efter indtagelsen af NCFM.

<sup>2</sup> DNA-markør: M1 – *L. pentosus*; M2 – *L. sakei*; M3 – *L. gasseri*; M4 – *L. acidophilus*; M5 – *L. helveticus*; M6 – *L. ruminis*; M7 – *L. casei*; M8 – *L. reuteri*.

**Figur 6.** *Lactobacillus* gruppe-specifikke DGGE-profiler i fæces fra interventionsstudiet med børn med atopisk dermatitis før og efter indtagelsen af *L. acidophilus* NCFM.

**Table 4.** Kvantificering af bakterier ved real-time PCR i afføringsprøver opsamlet i interventionsstudiet med børn med atopisk dermatitis før og efter indtagelsen af *L. acidophilus* NCFM og *B. lactis* Bi-07.

Bakterier	Bakteriekoncentration CFU/g fæces ( $\pm$ SD)	
	Før intervention	Efter intervention
<i>Gruppe A (NCFM-indtag)</i>		
Alle bakterier	10,4 $\pm$ 0,5	10,5 $\pm$ 0,3
<i>Lactobacillus</i> gruppe	6,2 $\pm$ 0,3	7,3 $\pm$ 0,7*
<i>L. acidophilus</i>	Ikke detekteret	7,1 $\pm$ 0,8*
<i>Leuconostoc</i> gruppe	5,7 $\pm$ 0,5	5,8 $\pm$ 0,6
<i>L. gasseri</i>	5,0 $\pm$ 0,5	4,7 $\pm$ 0,5
<i>Gruppe B (Bi-07-indtag)</i>		
Alle bakterier	10,4 $\pm$ 0,3	10,4 $\pm$ 0,3
Bifidobakterier	9,2 $\pm$ 0,6	9,1 $\pm$ 0,5
<i>B. lactis</i>	Ikke detekteret	6,8 $\pm$ 0,8*

\*Signifikant forskel efter indtagelsen af probiotika sammenlignet med målingerne før interventionen.

## Samlet konklusion

Projektets hovedkonklusioner kan sammenfattes i følgende punkter:

1. Projektet har med held optimeret og anvendt to funktionelle cellemodeller til *in vitro*-studier af potentielle probiotiske bakteriers immunmodulerende egenskaber og deres interaktioner med tarmepithel. De to modeller er i projektet anvendt til at undersøge 42 potentielle, probiotiske stammer af laktobaciller og bifidobakterier.
2. De undersøgte stammer viste tydelige *in vitro*-immunmodulerende egenskaber udtrykt ved stammebestemte cytokinprofiler. Stammernes evne til at inducere dannelsen af cytokiner varierede betydeligt kvalitativt såvel som kvantitativt og var undertiden modsatrettede.
3. Mekanistiske studier indikerede, at hele bakterieceller er en forudsætning for stimulering af dendritiske celler til dannelse af visse cytokiner. Forsøg med dendritiske celler i et tokammersystem med tarmceller indikerede, at probiotiske bakterier kan have betydning for opretholdelse af tarmintegriteten.
4. *In vitro*-studier af 12 potentielt probiotiske stammers indvirkning på tarmceller viste, at de kunne hæmme en faktor, der regulerer udtryk af gener involveret i inflammation. Et sammenlignende studium for 27 stammer viste, at flere kunne stimulere tarmcellerne til dannelse af kvælstofilde (NO), som i passende lave koncentrationer kan beskytte mod patogener og betændelsestilstande i tarmen.
5. Det blev påvist, at visse laktobaciller og bifidobakterier *in vitro* kan beskytte tarmceller og makrofager mod virus.
6. Til projektets interventionsstudium som omfattede 62 børn med atopisk dermatitis blev udvalgt to kommercielle probiotiske kulturer, *Bifidobacterium lactis* BI-07 og *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Det var i dette interventionsstudium ikke muligt at påvise en overordnet

sundhedsfremmende effekt af de to probiotiske stammer. Specifikt var der ingen signifikant påvirkning af børnenes immunstatus, tarmens permeabilitet og sammensætningen af bakteriepopulationen i deres tarm.

## **Referencer, som ikke er inkluderet i liste over projektets publikationer og offentliggørelser**

Boyle, R.J., Bath-Hextall, F.J., Leonardi-Bee, J., Murrell, D.F., Tang, M.L.K. 2008. Probiotics for treating eczema. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, issue 4.

Christensen, H. R., Frokiaer, H., Pestka, J. J. 2002. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J. Immunol.* 168:171-178.

Jacobsen, C.N., Nielsen, V.R., Hayford, A.E., Møller, P.L., Michaelsen, K.F., Pærregaard, A., Sandström, B., Tvede, M., Jakobsen, M. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4949-4956.

Rosenfeldt, V., Michaelsen, K.F., Jakobsen, M., Larsen, C.N., Møller, P.L., Pedersen, P., Tvede, M., Weyrehter, H., Valerius, N.H., Pærregaard, A. 2002a. Effect of probiotic lactobacillus strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatr Infect Dis.* 21:411-6.

Rosenfeldt, V., Michaelsen, K.F., Jakobsen, M., Larsen, C.N., Møller, P.L., Pedersen, P., Tvede, M., Weyrehter, H., Valerius, N.H., Pærregaard, A. 2002b. Effect of probiotic lactobacillus strains on acute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers. *Pediatr Infect Dis.* 21:417-9.

Rosenfeldt, V., Nielsen, S.D., Benfeldt, E., Michaelsen, K.F., Jeppesen, D.L., Valerius, N.H., Pærregaard, A. 2003. Effect of probiotic lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 111:389-95.

## Publikationer og præsentationer

### Artikler i internationale tidsskrifter

Botic, T., Klingberg, T. D., Weingartl, H., Celic, A. 2007. A novel eukaryotic cell culture model to study antiviral activity of potential probiotic bacteria. *Int. J. Food Microb.* 115: 227-234.

Fink, L.N., Zeuthen, L. H., Ferlazzo, G., Frøkiær, H. 2007a. Human antigen-presenting cells respond differently to gut-derived probiotic bacteria but mediate similar strain-dependent NK and T-cell activation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51:535-546.

Fink, L.N., Zeuthen, L. H., Christensen, H.R., Morandi, B., Frøkiær, H., Ferlazzo, G. 2007b. Distinct gut-derived lactic acid bacteria elicit divergent dendritic cell-mediated NK cell responses. *Int. Immunol.* 12:1319–1327.

Ivec, M., Botic, T., Koren, S., Jakobsen, M., Weingartl, H., Celic, A. 2007. Interactions macrophages with probiotic bacteria lead to increased antiviral response against vesicular stomatitis virus. *Antiviral Research.* 75:266-274.

Larsen, N., Nissen, P., Willats, W.G.T., 2007. The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of *Lactobacillus* ssp. and *E. coli* O138. *Int. J. Food Microb.* 114: 113-119.

Larsen, N., Vogensen, F.K., Gøbel, R., Michaelsen, K.F., Jakobsen, M. 2008. The effect of *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-07 on the diversity within the *Lactobacillus* group and genus *Bifidobacterium* in the intestinal microbiota of young children with atopic dermatitis. *Int. J. Food Microb.* (submitted).

Larsen, N., Michaelsen, K.F., Pærregaard, A., Vogensen, F.K., Jakobsen, M. 2008. A comparative study on adhesion and recovery of potential probiotic strains of *Lactobacillus* spp. by in-vitro assay and analysis of colon biopsies. *Microbiol. Ecol. Health Dis.* (submitted).

Nielsen, D., Møller, P.L., Rosenfeldt, V., Pærregaard, A., Michaelsen, K.F., Jakobsen, M. 2003. Case study of the distribution of mucosa-associated *Bifidobacterium* species, *Lactobacillus* species. and other lactic acid bacteria in the human colon. *App. Environ. Microbiol.* 69: 7545-7548.

Nielsen, S., Nielsen, D., Lauritzen, L., Jakobsen, M., Michaelsen, K.F. 2007. Impact of diet on the intestinal microbiota in 10-months old infant. *J Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 44: 613-618.

Ouoba, L.I.V., Lei, V., Jensen, L.B. 2008. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Int. J. Food Microb.* 121:217–224.

Pipenbahr, N, Moeller, P. L., Dolinsek, J., Jakobsen, M., Weingartl, H., Celic, A. 2009. Nitric oxide (NO) production in mammalian non-tumorigenic epithelial cells of the small intestine and macrophages induced by individual strains of lactobacilli and bifidobacteria. *Int. Dairy J.* 19: 166–171.

Zeuthen, L.H., Christensen, H.R., Frøkiær, H. 2006. Lactic acid bacteria inducing a weak IL-12 and TNF- $\alpha$  response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with Gram negative bacteria. *Clin. Vaccine Immunol.* 13:365-375.

Zeuthen, L.H., Fink, L., Frøkiær, H. 2008a. TLR2 and NOD2 play divergent roles in the recognition of gut-derived lactobacillus and bifidobacteria in human and murine dendritic cells. *Immunol.* 124:489-502.

Zeuthen, L.H., Fink, L.N., Frøkiær, H. 2008b. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and TGF  $\beta$ , *Immunol.* 123: 197-208.

Zeuthen, L.H., Christensen, H.R., Vogensen, F., Jacobsen, M., Frøkiær, H. 2009. Screening of a large panel of lactic acid bacteria for immunomodulating properties in dendritic cells. Manuscript in prep.

### **Populærvideenskabelige artikler**

Christensen, H.R., Kjær, T.R., Brix, S., Frøkiær, H. 2004. Kosten påvirker vores immunforsvar – men hvordan? *Dansk Kemi* 84: 26-27.

### **Studenteropgaver: Master thesis**

Henningsen, V. Probiotic bacteria to young children with atopic dermatitis – an investigation of the effect on immune response and gut inflammation. November 2008.

Nielsen, N. M. Immunological and clinical evaluation of atopic dermatitis in young children treated with probiotics. November 2008.

Witt, K. C. Alfa1-antitrypsin og Calprotectin i fæces hos 9 til 24 måneder gamle børn; effekten af atopisk dermatitis, alder og andre faktorer. November 2007.

### **Indlæg ved faglige kongresser**

Christensen, H.R., Frøkiær, H. 2005. Characterization of a large panel of lactic acid bacteria derived from the human gut for their capacity to polarize dendritic cells. *J. Biotechnol.* 118: S142-S142 Suppl. 1 2005.

Christensen, H.R., Frøkiær, H. 2003. Characterization of a large panel of human lactic acid bacteria for dendritic cell polarization capacity. Abstract of 9th European Nutrition Conference, Oktober, Rom, Italien.

Christensen, H.R., Frøkiær, H. 2004. Characterization of a large panel of human lactic acid bacteria for dendritic cell polarization capacity. Abstract af 9th international Symp., On Immunological, Chemical and Clinical Problems of Food Allergy. Budapest, Ungarn.

Fink, L.N., Frøkiær, H. 2007. Probiotic bacteria interact differently with dendritic cells from gut and spleen. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51: 79 Suppl. 1.

Larsen, N., Vogensen, F.K., Michaelsen, K.F., Pærregaard, A., Jakobsen, M. Survival and colonization of potential probiotic strains of Lactobacillus in the human intestinal tract. Conference Beneficial Microbes, 29.-30. maj 2008, Amsterdam, Holland.

Larsen, N., Vogensen, F.K., Michaelsen, K.F., Jakobsen, M. The effect of L.acidophilus NCFM and B.animalis subsp. lactis BI-07 on the diversity within the Lactobacillus group and genus Bifidobacterium in the intestinal microbiota of young children. 3rd International Probiotic Conference, 4.-7. juni 2008, Slovakiet.

Larsen, N., Vogensen, F.K., Michaelsen, K.F., Jakobsen, M. Probiotic cultures affect the composition of intestinal microbiota and possibly atopic dermatitis in children. MFF-Seminar, 6. december 2007, Aarhus.

Zeuthen, L.H., Christensen, H.R., Frøkiær, H. 2005. Weak IL-12/TNF-alpha inducing lactic acid bacteria differentially modulated the action of commensal G+ and G- bacteria on human DC's. Abstract of Nutrition, Immune Functions and Health, Paris, Frankrig.

Zeuthen, L.H., Fink, L.N., Frøkiær, H. 2007. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through the distinct action of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor beta. Annals of Nutrition and Metabolism, 51: 166-166 Suppl. 1 (abstract).

## **Forskeruddannelse**

### **Ph.d.-projekter**

Lisbeth Nielsen Fink "Immunomodulatory properties of probiotic bacteria – Effects on dendritic cells and their interactions with NK cells and T cells"(2007). Biocentrum, DTU.

Louise Hjerrild Zeuthen "Interactions between the gut microbiota, epithelial cells and dendritic cells" (2007). Biocentrum, DTU.

Nadja Larsen "Diversity and dynamic of the human gastrointestinal microbiota as affected by probiotic bacteria and chronic low grade inflammation" (2009) Institut for Fødevarevidenskab, KU-LIFE.

Rikke Gøbel "Probiotics in children; the interaction between diet, probiotics, intestinal microbiota and gut function" (2009). Institut for Human Ernæring, KU-LIFE.

### **Forskningsophold**

Lisbeth Nielsen Fink. Forskningsophold ved Laboratory of Immunology, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, Italien.

## **Samarbejdsrelationer – nationalt og internationalt**

I projektet har der været samarbejde med følgende forskere:

Professor Guido Ferlazzo, Laboratory of Immunology and Biotherapy, Department of Human Pathology, University of Messina, Messina, Italien.

Dr. Ester de Jong, Department of Cell Biology and Histology, Academic Medical Centre of the University of Amsterdam, Amsterdam, Holland.

Sektionsleder, seniorforsker, Tine Rask Licht, Fødevareinstituttet, Afdeling for Mikrobiologi og Risikovurdering, DTU.

## **Resultaternes praktiske og videnskabelige betydning for mejeribruget**

Projektet har udviklet og med held brugt funktionelle cellemodeller til *in vitro* påvisning af probiotiske egenskaber. Generelt er der for det store antal af laktobaciller og bifidobakterier, der er undersøgt i projektet, påvist udtalte immunmodulerende egenskaber. Der er dog observeret betydelige og i flere tilfælde modsatrettede forskelle i kulturernes evne til at stimulere eller hæmme en immunreaktion, hvilket må tages i betragtning ved udvælgelse af kulturer. Et forhold, som har særlig betydning ved anvendelse af blandingskulturer.

For flere af de undersøgte kulturer blev der påvist en beskyttelse af celler mod virus, hvilket kan indikere nye anvendelsesmuligheder for probiotiske bakterier.

To kommercielle probiotiske kulturer, *Bifidobacterium lactis* BI-07 og *Lactobacillus acidophilus* NCFM, blev udvalgt til et interventionsstudium for 62 børn i alderen 7-24 mdr. med atopisk dermatitis. Der blev ikke påvist en overordnet sundhedsfremmende effekt af de to probiotiske stammer. Der blev heller ikke observeret en signifikant påvirkning af børnenes immunstatus samt permeabilitetsforholdene og sammensætningen af bakteriepopulationen i deres tarm. Et overraskende udfald af studiet som forstærker ønsket om flere forsøg med mennesker for dokumentation af sundhedsfremmende virkninger.

## **Relationer til andre/nye mejerirelaterede samarbejdsprojekter**

I projektet er der blevet videreført *in vitro*-modeller, der tidligere er udviklet i MFF-projektet "In vitro-metoder til vurdering af mikroorganismers adhæsionsegenskaber med henblik på probiotisk effekt" (2002). Sammen med andre nye projekter under MFF, "Nutrigenomisk tilgang til probiotikas molekylære virkningsmekanismer" og "Probiotika mod irritable tyktarm", skaber det aktuelle projekt en ny viden om probiotikas sundhedsfremmende virkning.

# **MEJERIFORENINGEN**

**Mejeribugets ForskningsFond**

Frederiks Allé 22 · DK-8000 Århus C

Tel 8731 2000 · [ddb@mejeri.dk](mailto:ddb@mejeri.dk)

[www.mejeri.dk/forskning](http://www.mejeri.dk/forskning)