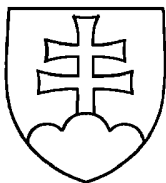


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

# ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 18.08.1998  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: PO 8699, PP 3225  
(32) Dátum priority: 21.08.1997, 28.04.1998  
(33) Krajina priority: AU, AU  
(40) Dátum zverejnenia: 12.09.2000  
(86) Číslo PCT: PCT/NZ98/00122, 18.08.1998

(21) Číslo dokumentu:

## 219-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

|       |     |       |
|-------|-----|-------|
| C     | 12N | 1/20  |
| A     | 61K | 35/74 |
| A     | 23C | 9/12  |
| A     | 23C | 9/123 |
| A     | 23C | 9/127 |
| A     | 23L | 1/24  |
| // (C | 12N | 1/20  |
| C     | 12R | 1:225 |
| C     | 12R | 1:23  |
| C     | 12R | 1:00) |

(71) Prihlasovateľ: NEW ZEALAND DAIRY BOARD, Wellington, NZ;

(72) Pôvodca vynálezu: Gill Harsharnjit S., Palmerston North, NZ;  
Smart John B., Palmerston North, NZ;  
Gopal Pramod K., Palmerston North, NZ;

(74) Zástupca: Patentservis Bratislava, a. s., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Baktérie mliečneho kvasenia zvyšujúce imunitu**

(57) Anotácia:  
Sú opísané nové baktérie *Lactobacillus rhamnosus* HN001 a HN067, *Lactobacillus acidophilus* HN017 a *Bifidobacterium lactis* HN019. Každý kmeň poskytuje pri trávení účinky zvýšenej imunity.

Baktérie mliečneho kvasenia zvyšujúce imunitu

### Oblasť techniky

Tento vynález sa týka nových kmeňov baktérií mliečneho kvasenia a ich použitia na zvyšovanie imunity.

### Doterajší stav techniky

Konzumácia produktov s obsahom baktérií mliečneho kvasenia (BMK) je spojená s radom pozitívnych účinkov na zdravie, ktoré zahŕňajú zvýšenie imunity. Existujú tisíce kmeňov baktérií mliečneho kvasenia, ale iba niektoré kmene vykazujú vlastnosti podporujúce zdravie. Schopnosť týchto baktérií tolerovať kyseliny a žlčové soli, prichytiť sa k mukozálnym epitelovým bunkám a prežiť prechod cez gastrointestinálny trakt sa považuje za významné kritérium na výber kmeňov podporujúcich zdravie. Doteraz sa identifikovalo iba niekoľko kmeňov baktérií mliečneho kvasenia s dokázaným zdravotným úžitkom.

Kmene BMK ukazujúce dobrú adhéziu k bunkám mukozálneho epitelu tenkého čreva, čím sa prepožičiavajú na terapeutické použitie a sú známe z novozélandského patentu 248057. Mikroorganizmy opísané v tomto patente zvyšujú prirodzenú imunitu (fagocytová funkcia) a získanú imunitu (odpovede na protilátky a odpovede lymfocytovej proliferácie).

Je žiadatel'né mať ďalšie BMK, ktoré zvyšujú široké spektrum imunitných odpovedí vrátane fagocytovej funkcie.

Predmetom tohto vynálezu je nájsť cestu smerom k dosiahnutiu týchto želaní alebo aspoň navrhnúť verejnosti užitočný výber imunitu zvyšujúcich baktérií mliečneho kvasenia.

### Podstata vynálezu

V jednom aspekte vynález pozostáva z biologicky čistej kultúry *Lactobacillus rhamnosus* HN001, AGAL depozitné číslo NM97/09514 s dátumom 18. august 1997.

V inom aspekte vynález pozostáva z biologicky čistej kultúry *Lactobacillus rhamnosus* HN067, AGAL depozitné číslo NM97/01925 s dátumom 17. február 1998.

V inom aspekte vynález pozostáva z kompozície biologicky čistej kultúry z hocijakého *Lactobacillus acidophilus* HN017, AGAL depozitné číslo NM97/09515 s dátumom 18. august 1997, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus rhamnosus* HN067 alebo *Bifidobacterium lactis* HN019, AGAL depozitné číslo NM97/09513 s dátumom 18. august 1997 v imunostimulujúcej koncentrácii s fyziologicky prijateľným excipientom alebo rozpúšťadlom.

V jednom uskutočnení táto kompozícia obsahuje dva alebo viac takých kmeňov.

Výhodne fyziologicky prijateľným excipientom alebo rozpúšťadlom je potravina.

Výhodne je potravinou hocijaké kulturované mlieko, jogurt, syr, 1 mliečny nápoj alebo práškové mlieko.

Alternatívne je táto kompozícia farmaceutickou kompozíciou a excipient alebo rozpúšťadlo je farmakologicky prijateľný excipient alebo rozpúšťadlo.

Imunitu zvyšujúce fyziologicky prijateľné biologicky čisté kmene homológov alebo mutantov hocijakého kmeňa:

*Lactobacillus acidophilus* HN0017,

*Lactobacillus rhamnosus* HN001,

*Bifidobacterium lactis* HN019 alebo

*Lactobacillus rhamnosus* HN067.

V inom uskutočnení vynález môže pozostávať zo spôsobu zvýšenia prirodzenej a získanej imunity, ktorý pozostáva z podávania cicavcovi hocijakej z vyššie uvedenej biologicky čistej kultúry pri imunostimulačnom dávkovom pomere.

V inom uskutočnení vynálezu sú prítomné dve alebo tri v podstate biologicky čisté kultúry vyššie definovaných kmeňov.

Výhodne sa kultúra podáva vo forme kompozície s fyziologicky prijateľným excipientom alebo rozpúšťadlom.

Výhodne fyziologicky prijateľným excipientom alebo rozpúšťadlom je potravina.

Výhodne je potravinou kulturované mlieko, jogurt, syr, mliečny nápoj alebo práškové mlieko.

Tento vynález tiež spočíva v častiach, prvkoch a znakoch vzťahovaných k alebo indikovaných v opise prihlášky, jednotlivo alebo kolektívne, a v niektorej alebo vo všetkých kombináciách dvoch alebo viacerých častí, prvkov alebo znakov, pričom špecifické celé čísla tu uvedené, ktoré majú známe ekvivalenty v stave techniky, ku ktorým sa vzťahuje vynález, sa považujú za tu zavedené akoby jednotlivo vopred dané.

#### Stručný prehľad obrázkov na výkrese

Obrázok 1 ukazuje účinok kŕmenia myší s produktom fermentovaným s *L. rhamnosus* HN001 alebo nefermentovaným produktom s obsahom *L. rhamnosus* HN001 na fagocytovú aktivitu periférálnych krvných leukocytov ako je opísané v príklade 5. BALB/c myšiam sa dodával do mliečnej diéty s obsahom  $10^9$  cfu (za deň) *L. rhamnosus* HN001 buď vo fermentovanom alebo nefermentovanom produkte počas 14 dní. Fagocytová aktivita periférálnych krvných leukocytov sa stanovila použitím prietokovej cytometrie a fluoresceínizotiokyanátom značenej *Escherichia coli*. Hodnoty sú priemerné +/- štandardná chyba. Významné rozdiely (ANOVA, SAS program) z kontroly: \*\* $P < 0,0001$ .

Obrázok 2 ukazuje účinok kŕmenia myší so živými *L. rhamnosus* HN001 alebo teplom usmrtenými *L. rhamnosus* HN001 na fagocytovú aktivitu periférálnych krvných leukocytov ako je opísané v príklade 7. BALB/c myšiam sa dodávalo do mliečnej diéty a orálne podávalo  $10^9$  cfu (za deň) živých alebo teplom usmrtených *L. rhamnosus* HN001 počas 14 dní. Fagocytová aktivita periférálnych krvných leukocytov a peritoneálnych makrofágov sa stanovila použitím prietokovej cytometrie a fluoresceínizotiokyanátom značenej *Escherichia coli*. Hodnoty sú priemerné +/- štandardná chyba. Významné rozdiely (ANOVA, SAS program) z kontroly: \*\* $P < 0,0001$ .

Obr. 3 ukazuje účinok podávania myšiam *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019 na translokáciu baktérií u myši vyvolanou s *S. typhimurium* ako je opísané v príklade 8. Nekrmené a s *B. lactis* HN019 alebo s *L. rhamnosus* HN001 kŕmené BALB/c myši sa orálne vystavili *S. typhimurium*, po čom nasledovalo nepretržité denné kŕmenie. Šesť dní po vystavení sa myši humánne usmrtili a ich pečene a sleziny sa zhromaždili na monitorovanie bakteriálnej translokácie. Tkanivové suspenzie zo zhromaždených orgánov sa potom kultúrovali na MacConkey agarových platniach počas 24 až 48 hodín pred výpočtami. Hodnoty sú priemerné +/- štandardná chyba. Významné rozdiely (ANOVA, SAS program) z kontroly:  $P < 0,05$ .

Obrázok 4 ukazuje účinok kŕmenia myši s *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019 na fagocytovú aktivitu periférálnych krvných leukocytov z myši vystavených *S. typhimurium* ako je opísané v príklade 8. Nekrmené a s *B. lactis* HN019 alebo s *L. rhamnosus* HN001 kŕmené BALB/c myši sa orálne vystavili *S. typhimurium*, po čom nasledovalo nepretržité denné kŕmenie. Fagocytová aktivita periférálnych krvných leukocytov sa stanovila šesť dní po vystavení s použitím prietokovej cytometrie a fluoresceínizotiokyanátom značenej *Escherichia coli*. Hodnoty sú priemerné +/- štandardná chyba. Hodnoty (priemer +/- štandardná chyba) s rozdielnym písmom sú výrazne odlišné (ANOVA, SAS program):  $P < 0,01$ .

Obrázok 5 ukazuje účinok kŕmenia myši s *L. rhamnosus* HN001 alebo s *B. lactis* HN019 na proliferačné odpovede slezinových lymfocytov z myši vystavených *S. typhimurium* ako je opísané v príklade 8. Nekrmené a s *B. lactis* HN019 alebo s *L. rhamnosus* HN001 kŕmené BALB/c myši sa orálne vystavili *S. typhimurium*, po čom nasledovalo nepretržité denné kŕmenie. Šesť dní po vystavení sa merali proliferačné odpovede slezinových lymfocytov kolorimetricky a potom sa zaviedol 5-bróm-2'-deoxyuridín na záverečnú inkubáciu trvajúcu 16 hodín z 96 hodín. Hodnoty sú priemerné +/- štandardná chyba. Hodnoty (priemer +/- štandardná chyba) s rozdielnym písmom sú výrazne odlišné (ANOVA, SAS program):  $P < 0,01$ .

### Príklady uskutočnenia vynálezu

Zmrazené sušené kultúry štyroch bakteriálnych kmeňov uložené v Australian Government Analytical Laboratories (AGAL) The New South Wales Regional Laboratory, 1 Suakin Street, Pymble, NSW 2073, Australia. Detaily uloženia sú:

| Kmeň                  | Číslo            | Dátum            |
|-----------------------|------------------|------------------|
| <i>L. acidophilus</i> | HN017 NM97/09515 | 18. august 1997  |
| <i>L. rhamnosus</i>   | HN001 NM97/09514 | 18. august 1997  |
| <i>B. lactis</i>      | HN019 NM97/09513 | 18. august 1997  |
| <i>L. rhamnosus</i>   | HN067 NM97/01925 | 11. február 1998 |

U týchto štyroch vyššie identifikovaných kmeňov sa zistilo, že zvyšujú široké spektrum imunitných odpovedí vrátane prirodzených a získaných imunitných odpovedí.

#### Príklad 1

#### Morfológia a všeobecné vlastnosti

Na potvrdenie taxonomickej charakterizácie kmeňov sa použila RAPD analýza, 16S rRNA sekvencovanie a SDS-PAGE analýzy. Zistilo sa tiež, že *L. acidophilus* HN017 sa geneticky líši od *L. acidophilus* (LC1) z novozélandského patentu č. 248057.

Na potvrdenie taxonomickej charakterizácie *L. rhamnosus* HN067 sa použila RAPD analýza, 16S rRNA sekvencovanie a SDS-PAGE analýzy; druhovo špecifické priméry použité na charakterizáciu *L. rhamnosus* HN067 na molekulovej úrovni zahŕňali Pr I (predný) 5-CAGACTGAAAGTCTGACGG-3 a Pha II (reverzný) 5-GCGATGCGAATTTCTATTATT-3.

Morfológia a vlastnosti pri fermentácii cukrov týchto kmeňov sú detailne uvedené v tabuľkách 1 a 2.

Tabuľka 1 - Morfológia a ostatné charakteristiky

| <i>L. acidophilus</i><br>HN017                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <i>L. rhamnosus</i><br>HN001                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | <i>B. lactis</i><br>HN019                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <i>L. rhamnosus</i><br>HN067                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Krátke až stredné tyčinky s okrúhlymi koncami, vo všeobecnosti sú jednotlivé alebo v pároch alebo v krátkych reťazcoch pri raste v MRS kultúre.<br>Gram pozitívne, netvorí spóry, katalázovo negatívne fakultatívne anaerobické tyčinky s optimálnym rastom pri 37+/-1 °C a optime pH 6,0-6,5. Sú obligátne homofermentatívne baktérie a z glukózy neprodukujú plyn. | Krátke až stredné tyčinky so štvorcovými koncami v reťazcoch, vo všeobecnosti 0,7x1,1 x2,0-4,0 mikrom pri raste v MRS kultúre.<br>Gram pozitívne, nepohyblivé, netvorí spóry, katalázovo negatívne fakultatívne anaerobické tyčinky s optimálnym rastom pri 37+/-1 °C a optime pH 6,0-6,5. Sú obligátne heteromentatívne baktérie a z glukózy neprodukujú plyn. | Mikroaerofilné až anaeróbne tyčinky s charakteristickým tvarom ako v strede predĺžené bunky, "V" alebo stupňovité usporiadanie buniek pri raste na TPY agarových doskách. V MR5 kultúre s 0,05 % cysteín hydrochloridom tvoria v strede predĺžené bunky a spoločne usporiadané (vyčnievajúce končatiny) bunky.<br>Gram pozitívne, nepohyblivé a netvorí spóry, katalázovo negatívne tyčinky s optimálnym rastom pri teplote 37+/-1 C a optimálnom pH | Krátke až stredné tyčinky so štvorcovými koncami v reťazcoch, vo všeobecnosti 0,7x1,1 x2,0-4,0 mikrom pri raste v MRS kultúre.<br>Gram pozitívne, netvorí spóry, katalázovo negatívne fakultatívne anaerobické tyčinky s optimálnym rastom pri 37+/-1 °C a optime pH 6,0-6,5. Sú obligátne heteromentatívne baktérie a z glukózy neprodukujú plyn. |

|  |  |                                                                              |  |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------|--|
|  |  | 6,0-7,0. Fruk-<br>tóza-6-fosfo-<br>rečnan fosfo-<br>ketolázovo<br>pozitívne. |  |
|--|--|------------------------------------------------------------------------------|--|

Tabuľka 2 - Glycidový fermentačný model vybraných kmeňov *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*

| S1. č. | Meno baktérie               | Bodové ohodnotenie* |
|--------|-----------------------------|---------------------|
| 1      | <i>L. acidophilus</i> HN017 | 5755546             |
| 2      | <i>L. rhamnosus</i> HN001   | 5757177             |
| 3      | <i>B. lactis</i> HN019      | 1051622             |
| 4      | <i>L. rhamnosus</i> HN067   | 5757175             |

Použil sa prístroj na fermentáciu cukrov API 50 CH na stanovenie glycidového fermentačného modelu.

\*Bodové ohodnotenia sú založené na bodových ohodnoteniach 22 významných cukrov (Bergeyho príručka).

#### Príklad 2

##### Adhézia k črevným bunkám

Schopnosť probiotických kmeňov priľnúť k ľudským črevným epitelovým bunkám (HT-29 a CaCo-2) sa určila *in vitro* s použitím diferencovaných bunkových línií. Monovrstvy HT-29 a CaCo-2 buniek rástli na krycích sklíčkach a boli umiestnené vo viacjamkových nádobách. K vrstvám buniek sa dodalo  $10^8$  cfu/ml BMK v 1 ml použitého kultúrového supernatantu spolu s 1 ml DMEM média a inkubovalo sa počas 1 hodiny pri 37 °C v 10 % CO<sub>2</sub> - 90 % vzduchu. Monovrstvy sa premyli štyrikrát s PBS, fixovali sa v metanole, filtrovali sa Gramovým spôsobom a množstvo baktérií, ktoré priľnulo k epitelovým bunkám sa stanovilo mikroskopicky. V priemere sa spočítalo 20 polí a výsledky sú zosumarizované v tabuľke 3.

Tabuľka 3 - Priľnavosť k HT-29 a CaCo-2 bunkovým líniam

| Kmeň                        | HT-29    | CaCo-2   |
|-----------------------------|----------|----------|
| <i>L. acidophilus</i> HN017 | 98 ± 17  | 171 ± 16 |
| <i>L. rhamnosus</i> HN001   | 161 ± 18 | 218 ± 35 |
| <i>B. lactis</i> HN019      | 188 ± 27 | 194 ± 25 |

Množstvo (priemer +/- SEM) baktérií/100 epitelových buniek

### Príklad 3

#### Zvýšenie prirodzenej a získanej imunity

Účinky zvyšujúce imunitu troch kmeňov *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017 a *B. lactis* HN019 sa skúšali stanovením fagocytovej (krvné leukocyty a peritoneálne makrofágy) funkcie a kvantifikovaním koncentrácií špecifických protilátok na proteínové antigény s použitím simulovaných odpovedí na vakcíny u myši.

Použil sa naesledujúci experimentálny protokol:

1. Použili sa šesť až sedem týždňov staré myši BALB/c s hmotnosťou 20 - 30 g.
2. Myši boli náhodne rozmiestnené do rôzne ošetrovaných skupín (tabuľka 4).
3. Myšiam sa podával *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019 ( $10^9$  cfu/deň) v 50 µl odstredeného mlieka počas 10 dní. Kontrolné myši prijímali iba 50 µl práškoveho odstredeného mlieka.
4. Všetky myši prijímali počas experimentu diétu založenú na práškovom odstredenom mlieku.

Krvné leukocyty a makrofágy z myši prijímajúcich *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019 ukázali výrazne vyššiu fagocytovú kapacitu v porovnaní s bunkami z kontrolných myši (tabuľka 4). Tvorba kyslíkových radikálov (oxidačný impulz) leukocyty z probioticky kŕmených

myši bola tiež vyššia ako u kontrolných myši (údaje nie sú uvedené).

Tabuľka 4 - Účinok diéty *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 a *B. lactis* HN019 na fagocytovú funkciu u myši

| Ošetrenie                   | % Krvných leukocytov s fagocytovou aktivitou | % Peritoneálnych makrofágov s fagocytovou aktivitou |
|-----------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Kontrola                    | 14,33 ± 0,87                                 | 66,1 ± 3,5                                          |
| <i>L. acidophilus</i> HN017 | 22,7 ± 1,21**                                | 79,0 ± 1,0**                                        |
| <i>L. rhamnosus</i> HN001   | 24,84 ± 0,93**                               | 80,5 ± 1,8**                                        |
| <i>B. lactis</i> HN019      | 23,19 ± 0,95**                               | 77,4 ± 2,6*                                         |

BALB/c myšiam sa orálne podávalo  $10^9$  cfu (za deň) *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019 počas 10 dní. Fagocytová aktivita krvných leukocytov a peritoneálnych makrofágov sa stanovila s použitím prietokovej cytometrie a fluoresceínizotiokyanátom značených *Escherichia coli*. Hodnoty boli priemerné +/- štandardná chyba. Významné rozdiely (Studentov t test) z kontroly: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ .

Koncentrácia špecifických IgG protilátok v sére a v črevných zvyškoch myši prijímajúcich *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019 bola tiež vyššia ako u kontrolných myši (tabuľka 5).

Tabuľka 5 - Účinok diéty *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 a *B. lactis* HN019 na sérové a mukozálne protilátkové odpovede

| Ošetrovanie                 | Sérová protilátková<br>odpoveď<br>(jednotky/ml) | Mukozálna protilát-<br>ková odpoveď<br>(jednotky/ml) |
|-----------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Kontrola                    | 80,2 ± 6,0                                      | 1350 ± 96,0                                          |
| <i>L. acidophilus</i> HN017 | 134,6 ± 25,2*                                   | 1548 ± 270,0                                         |
| <i>L. rhamnosus</i> HN001   | 118,5 ± 12,5**                                  | 1512 ± 198,0                                         |
| <i>B. lactis</i> HN019      | 158,1 ± 51,6***                                 | 1548 ± 234,0                                         |

MALB/c myšiam sa orálne podávalo  $10^9$  cfu (za deň) *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019 počas 10 dní. Myši sa imunizovali s toxínom cholery (antigén používaný na simulovanú enterickú infekciu) v dňoch 0 a 7. Koncentrácia špecifických protilátok v sére a črevných sekrétoch sa merala s použitím ELISA na desiaty deň. Hodnoty boli priemerné +/- štandardná chyba. Významné rozdiely (Studentov t test) z kontroly: \* $P < 0,08$ , \*\* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,01$ .

#### Príklad 4

Imunostimulačné účinky, ktoré nasledovali po kŕmení s BMK počas štyroch týždňov

Imunostimulačné účinky *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 a *B. lactis* HN019 sa stanovili u myši s použitím nasledujúceho experimentálneho protokolu:

1. Použili sa šesť až sedem týždňov staré myši BALB/c s hmotnosťou 20 - 30 g.
2. Myši boli náhodne rozmiestnené (18/skupina) do rôzne ošetrovaných skupín.
3. Po aklimatizácii (počas 7 dní) sa myšiam podával *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019

( $10^9$  cfu/deň) v 50  $\mu$ l odstredeného mlieka počas 28 dní (od dňa 0 do dňa 28). Kontrolné myši prijímali iba 50  $\mu$ l odstredeného mlieka (bez mikroorganizmov).

4. Myšiam sa ponúkla počas experimentu diéta založená na práškovom odstredenom mlieku a voda *ad libitum*.
5. Imunostimulačné účinky sa stanovili monitorovaním fagocytovej aktivity krvných leukocytov a peritoneálnych makrofágov, NK-bunkovej aktivity slezinových lymfocytov, odpovedí lymfocytovej proliferácie (bunky sleziny) na T-bunkový mitogén, ConA (indikátor bunkovo sprostredkovanej imunity) a protilátkové odpovede na tetanovú vakcínu.

Ako je vidieť z tabuľky 6, leukocyty (neutrofily, monocyty a makrofágy) z myši prijímajúcich *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019 vykázali výrazne vyššiu fagocytovú aktivitu (indikátor prirodzenej a získanej imunity) ako leukocyty kontrolných myši.

Tabuľka 6 - Účinok diéty *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 a *B. lactis* HN019 u myši

| Ošetrenie                   | % Krvných leukocytov<br>s fagocytovou<br>aktivitou | % Peritoneálnych ma-<br>krofágov s fagocyto-<br>vou aktivitou |
|-----------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Kontrola                    | 15,5                                               | 72,67                                                         |
| <i>L. acidophilus</i> HN017 | 29,4**                                             | 82,2*                                                         |
| <i>L. rhamnosus</i> HN001   | 24,2**                                             | 82,8**                                                        |
| <i>B. lactis</i> HN019      | 31,1**                                             | 83,0**                                                        |

Myši (18/skupina) dostávali  $10^9$  cfu (za deň) *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019 v 50  $\mu$ l odstredeného mlieka počas 28 dní. Fagocytová aktivita krvných leukocytov/peritoneálnych makrofágov sa stanovila na 28 deň s použitím prietokovej cytometrie a fluoresceínizotiochynátom značených *E. coli*. Hodnoty sú priemerom najmenších

štvorcov. Významné rozdiely (SAS analýza): \* $P < 0,002$ , \*\* $P < 0,0005$ .

Konzumácia *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019 počas 28 dní tiež viedla k nárastu NK-bunkovej aktivity, odpovedí lymfocytovej proliferácie na ConA a protilátkové odpovede na tetanovú vakcínu. Pri všetkých týchto indikátoch imunoschopnosti, myši prijímajúce *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019 mali vyššie odpovede ako kontrolné myši (tabuľka 7).

Spolu tieto výsledky ukázali, že podávanie počas predĺženého času *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019 je schopné indukovať trvalé zvýšenie niektorých aspektov prirodzenej a získanej imunity.

Tabuľka 7 - Účinok diéty *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 a *B. lactis* HN019 na NK-bunkovú aktivitu a odpovedí lymfocytovej proliferácie na ConA a protilátkové odpovede na tetanovú vakcínu.

| ConA<br>Ošetrovanie         | NK-bunková<br>aktivita (%) | Lymfocytová<br>proliferácia<br>ConA(absor-<br>bancia) | Protilátkové<br>odpovede na<br>tetanovú<br>vakcínu<br>(jednotky/ml) |
|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Kontrola                    | 8,8                        | 1,4 ± 0,125                                           | 402,5 ± 41,4                                                        |
| <i>L. acidophilus</i> HN017 | 9,9                        | 1,6 ± 0,44                                            | 923,9 ± 116,0*                                                      |
| <i>L. rhamnosus</i> HN001   | 11,5                       | 1,8 ± 0,1*                                            | 711,5 ± 127,2*                                                      |
| <i>B. lactis</i> HN019      | 10,5                       | 1,7 ± 0,5*                                            | 844,6 ± 134,7*                                                      |

Myši (18/skupina) dostávali  $10^9$  cfu (za deň) *L. acidophilus* HN017, *L. rhamnosus* HN001 alebo *B. lactis* HN019 v 50  $\mu$ l odstredeného mlieka počas 28 dní (tj. odo dňa 0 do 28 dňa). NK-bunková aktivita slezinových lymfocytov sa stanovila na 28. deň s použitím prietokovej cytometrie a s D275 značených

Yac-1 buniek. Odpovede lymfocytovej proliferácie slezinových lymfocytov na ConA sa merali na 28. deň s použitím komerčného zariadenia na bunkovú proliferáciu (Boehringer Mannheim, Nemecko). Na protilátkové odpovede sa myši imunizovali s tetanovou vakcínou (50 µl/dávka, CSL, Austrália) na 7. a 21. deň. Koncentrácia špecifických protilátok sa stanovila s použitím ELISA; antigén dodaný výrobcom vakcín (CSL, Austrália) sa použil na pokrytie platní. Hodnoty boli priemerami najmenších štvorcov 18 myši. Významné rozdiely (SAS analýza): \* $P < 0,05$ .

#### Príklad 5

Zvýšenie prirodzenej a získanej imunity s použitím fermentovaných produktov oproti použitiu nefermentovaných produktov

Cieľom bolo stanoviť imunitu zvyšujúcu účinnosť jogurtu (fermentovaného) s probiotickým kmeňom *L. rhamnosus* HN001 v porovnaní s nefermentovaným produktom obsahujúcim *L. rhamnosus* HN001. Imunitu zvyšujúce účinky sa skúšali stanovením fagocytovej funkcie (periferálnych krvných leukocytov a peritoneálnych makrofágov) a odpovedí lymfocytovej proliferácie na B-bunkový mitogén (LPS).

Použil sa nasledujúci experimentálny protokol:

1. Použili sa šesť až sedem týždňov staré myši BALB/c s hmotnosťou 20 - 30 g.
2. Myši boli náhodne rozmiestnené do rôzne ošetrovaných skupín.
3. Kontrolné myši počas experimentu prijímali diétu založenú na práškovom plnotučnom mlieku.
4. Testované myši prijímali 2,5 g jogurtu pripraveného s použitím *L. rhamnosus* HN001 ( $10^9$  cfu/deň) alebo 2,5 g plnotučného mlieka s obsahom *L. rhamnosus* HN001 ( $10^9$  cfu/deň) ako aj diétu založenú na práškovom plnotučnom mlieku počas 14 dní.

#### Výsledky

Myši prijímajúce jogurt pripravený s *L. rhamnosus* HN001 alebo plnotučné mlieko *L. rhamnosus* HN001 vykázali výrazne

vyššiu hladinu fagocytovej aktivity periférálnych krvných leukocytov ako bolo pozorované u myši prijímajúcich kontrolnú diétu (Obr. 1). Vzrast bol pozorovaný či bol *L. rhamnosus* HN001 dodávaný v jogurte (fermentovanom s *L. rhamnosus* HN001) alebo v nefermentovanom produkte obsahujúcom *L. rhamnosus* HN001. Nebol rozdiel v hladine fagocytovej aktivity medzi myšami prijímajúcimi fermentovaný jogurt vyrobený s použitím *L. rhamnosus* HN001 v porovnaní s nefermentovaným produktom plnotučného práškoveho mlieka (PPM) s obsahom *L. rhamnosus* HN001.

Nefermentovaný produkt a s *L. rhamnosus* HN001 fermentovaný produkt dodávaný myšiam ukázal vyššie lymfocytové proliferáčné odpovede na LPS ako kontrolné myši (tabuľka 8). Nebol výrazný rozdiel u odpovedí medzi myšami prijímajúcimi nefermentovaný produkt obsahujúci *L. rhamnosus* HN001 a myšami prijímajúcimi produkt fermentovaný s *L. rhamnosus* HN001.

Tabuľka 8 - Účinok fermentovaného alebo nefermentovaného *L. rhamnosus* HN001 na odpovede lymfocytovej proliferácie u myši

| Ošetrenie                                      | Lymfocytová proliferácia na LPS<br>(absorbancia) |
|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Kontrola (PPM)                                 | 0,4699 ± 0,028                                   |
| PPM fermentované s <i>L. rhamnosus</i> HN001   | 0,5361 ± 0,028                                   |
| PPM nefermentované s <i>L. rhamnosus</i> HN001 | 0,5518 ± 0,028*                                  |

BALB/c myššiam sa podávala mliečna diéta obsahujúca  $10^9$  cfu (za deň) *L. rhamnosus* HN001 buď v nefermentovanom produkte alebo v jogurte vyrobenom s *L. rhamnosus* HN001 (fermentovaný produkt) počas 14 dní. Kontrolné myši prijímali mliečnu diétu bez BMK. Proliferatívne odpovede sa merali kolorimetricky po zavedení 5-bróm-2'- deoxyuridínu počas posledných 16 hodín z 96 hodín inkubácie. Hodnoty boli priemerné +/- štandardná chyba. Významné rozdiely (Studentov t test) z kontroly: \*P = 0,05.

Tiež z týchto výsledkov vyplýva, že kŕmenie s *L. rhamnosus* HN001 zvyšuje rozsah imunitných funkcií zahŕňajúcich fagocytovú aktivitu a lymfocytovú bunkovú proliferáciu. *L. rhamnosus* HN001 prítomný buď vo fermentovanom alebo nefermentovanom produkte je účinný pri vyvolaní zvýšenia imunitných funkcií; s fermentovaným produktom dáva väčšiu odpoveď na niektoré funkcie a v nefermentovanom produkte býva významný u iných.

#### Príklad 6

Zvýšenie prirodzenej a získanej imunity pomocou *L. rhamnosus* HN067

#### Experiment 1

Imunitu zvyšujúce účinky *L. rhamnosus* HN067 sa stanovili monitorovaním fagocytovej kapacity periférálnych krvných leukocytov a peritoneálnych makrofágov (indikátor nešpecifickej imunity) a kvantifikovaním koncentrácií špecifických protilátok na imunizačný antigén, cholerový toxín (použitý na simulovanie odpovedí na enterické vakcíny) u myší.

Použil sa nasledujúci experimentálny protokol:

1. Použili sa BALB/c myši staré šesť až sedem týždňov s hmotnosťou 20 - 30 g. Počas experimentu prijímali diétu založenú na odstredenom mlieku.
2. Myšiam v testovanej skupine (n=6) sa orálne podával *L. rhamnosus* HN067 ( $10^9$  cfu/deň) v 50  $\mu$ l odstredeného mlieka počas 10 dní. Kontrolné myši (n=6) prijímali iba 50  $\mu$ l práškoveho odstredeného mlieka (bez BMK).

#### Výsledky

Krvné leukocyty a peritoneálne makrofágy z myší prijímajúcich *L. rhamnosus* HN067 ukázali výrazne vyššiu fagocytovú aktivitu (zvýšená fagocytová funkcia) v porovnaní s bunkami z kontrolných myší. Výsledky sú dané v tabuľke 9 nižšie.

Tabuľka 9 - Účinok diéty *L. rhamnosus* HN067 na fagocytovú funkciu

| Ošetrovanie               | % Krvných leukocytov s fagocytovou aktivitou | % Peritoneálnych makrofágov s fagocytovou aktivitou |
|---------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Kontrola                  | 13,1 ± 1,5                                   | 76,4 ± 1,9                                          |
| <i>L. rhamnosus</i> HN067 | 23,7 ± 1,5**                                 | 87,2 ± 1,9*                                         |

BALB/c myši boli kŕmené s diétou založenou na mlieku s alebo bez orálneho podávania *L. rhamnosus* HN067 ( $10^9$  cfu/deň) počas 10 dní. Fagocytová aktivita krvných leukocytov a peritoneálnych makrofágov sa stanovila s použitím prietokovej cytometrie a fluoresceínizotioxyanátom značených *E. coli*. Hodnoty predstavujú priemer najmenších štvorcov +/- štandardná chyba metódy najmenších štvorcov. Významné rozdiely (SAS program) z kontroly: \*P=0,0005, \*\*P=0,0001.

Koncentrácia špecifických protilátok na choleroxý toxín, antigén, ktorý sa použil na orálnu imunizáciu, v sére a v črevných zvyškoch myši prijímajúcich *L. rhamnosus* HN067 bola tiež výrazne vyššia ako u kontrolných myši (tabuľka 10).

Tabuľka 10 - Účinok podávania diéty *L. rhamnosus* HN067 na sérum a mukozálne protilátkové odpovede na choleroxý toxín

| Ošetrovanie               | Protilátková odpoveď v sére (jednotky/ml) | Mukozálna protilátková odpoveď (jednotky/ml) |
|---------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Kontrola                  | 63,1 ± 43,2                               | 1969,7 ± 279,5                               |
| <i>L. rhamnosus</i> HN067 | 246,5 ± 43,2**                            | 2995,5 ± 465,2*                              |

BALB/c myši sa kŕmili s diétou založenou na mlieku s alebo bez *L. rhamnosus* HN067 ( $10^9$  cfu/deň) počas 10 dní. Myši sa orálne imunizovali s choleroxým toxínom (10 µg/dávka),

antigénom používaným na simulovanú enterickú infekciu, v deň 0 a 7. Hladiny protilátok v sére a črevných sekrétoch sa merali s použitím ELISA na desiaty deň. Hodnoty predstavujú priemer najmenších štvorcov +/- štandardná chyba metódy najmenších štvorcov. Významné rozdiely (SAS program) z kontroly: \*P=0,02, \*\*P=0,0039.

## Experiment 2

Imunostimulačné účinky *L. rhamnosus* HN067 sa testovali u myší s použitím nasledujúceho protokolu:

1. Použili sa BALB/c myši staré šesť až sedem týždňov s hmotnosťou 20 - 30 g. Počas experimentu sa im predkladala diéta založená na práškovom odstredenom mlieku a voda *ad libitum*.
2. Po aklimatizácii počas 7 dní sa myšiam v skupine 1 (n = 20) orálne podávalo  $10^9$  cfu (za deň) *L. rhamnosus* HN067 v 50  $\mu$ l odstredeného mlieka počas 14 dní. Kontrolné myši (skupina 2, n = 20) prijímali odstredené mlieko bez mikroorganizmov.
3. Imunostimulačné účinky sa testovali monitorovaním fagocytovej aktivity krvných leukocytov a peritoneálnych makrofágov a odpoveďami proliferácie slezinových lymfocytov na fytohemaglutinín (PHA) a lipopolysacharid (LPS) (T- a B-bunkové mitogény).

## Výsledky

Krvné leukocyty a peritoneálne makrofágy z myší prijímajúcich *L. rhamnosus* HN067 vykazovali výrazne vyššiu fagocytovú aktivitu (indikátor prirodzenej imunity) ako leukocyty a makrofágy z kontrolných myší (tabuľka 11).

Tabuľka 11 - Účinok diéty *L. rhamnosus* HN067 na fagocytovú funkciu u myši

| Ošetrovanie               | % Krvných leukocytov s fagocytovou aktivitou | % Peritoneálnych makrofágov s fagocytovou aktivitou |
|---------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Kontrola                  | 13,7 ± 0,07                                  | 64,6 ± 2,1                                          |
| <i>L. rhamnosus</i> HN067 | 22,5 ± 0,07**                                | 75,8 ± 1,7*                                         |

BALB/c myšiam sa podávala mliečna diéta s alebo bez orálneho podávania *L. rhamnosus* HN067 ( $10^9$  cfu/deň) počas 14 dní. Fagocytová aktivita krvných leukocytov/peritoneálnych makrofágov sa stanovila na 14. deň s použitím prietokovej cytometrie a fluoresceínizotioxyanátom značených *E. coli*. Hodnoty predstavujú priemer najmenších štvorcov +/- štandardná chyba metódy najmenších štvorcov. Významné rozdiely (SAS program) z kontroly: \* $P=0,002$ , \*\* $P=0,0001$ .

Myši prijímajúce *L. rhamnosus* HN067 počas 14 dní tiež ukázali vyššie odpovede lymfocytovej proliferácie na PHA a LPS v porovnaní s kontrolnými myšami (tabuľka 12).

Tabuľka 12 - Účinok podávania *L. rhamnosus* HN067 na odpovede lymfocytovej proliferácie na PHA a LPS

| ConA ošetrovanie          | Lymfocytová proliferácia na PHA | Lymfocytová proliferácia na LPS |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| Kontrola                  | 1,18 ± 0,08                     | 0,99 ± 0,07                     |
| <i>L. rhamnosus</i> HN067 | 1,37 ± 0,07*                    | 1,24 ± 0,06**                   |

BALB/c myšiam sa podávala mliečna diéta s alebo bez orálneho podávania *L. rhamnosus* HN067 ( $10^9$  cfu/deň) počas 14 dní. Odpovede lymfocytovej proliferácie slezinových buniek na PHA a LPS sa stanovili na 14. deň s použitím komerčného zariadenia na bunkovú proliferáciu (Boehringer Mannheim,

Germany). Hodnoty predstavujú priemer najmenších štvorcov +/- štandardná chyba metódy najmenších štvorcov. Významné rozdiely (SAS program) z kontroly: \* $P < 0,08$ , \*\* $P < 0,01$ .

Súhrnne myši prijímajúce *L. rhamnosus* HN067 ukázali výrazné rozšírenie rozsahu hostiteľských imunitných odpovedí zahŕňajúcich leukocytovú fagocytovú funkciu, protilátkové odpovede na orálnu imunizáciu a odpovede na lymfocytovú proliferáciu na T- a B-bunkové mitogény. Krvné leukocyty (neutrofily a monocyty) a makrofágy sú hlavnými efektormi prirodzenej imunity a hrajú hlavnú úlohu v ochrane pred bakteriálnymi infekciami. Korelácie medzi *in vitro* odpoveďami lymfocytovej proliferácie na mitogény (T- a B-bunkové mitogény) a imunosposobilosťou jednotlivca sa tiež zdokumentovali. Preto tieto výsledky predpokladajú, že podávanie *L. rhamnosus* HN067 je schopné zvýšiť niektoré aspekty prirodzenej a získanej imunity.

#### Príklad 7

Zvýšenie prirodzenej a získanej imunity s použitím živých a teplom usmrtených *L. rhamnosus* HN001

Cieľom tejto štúdie bolo vyšetriť imunitu zvyšujúce účinky probiotického kmeňa *L. rhamnosus* HN001, keď je prítomný v živej alebo teplom usmrtenej forme. Účinok na imunitnú funkciu sa testoval určením fagocytovej aktivity periférálnych krvných leukocytov. Účinok živých a teplom usmrtených *L. rhamnosus* HN001 na humorálnu imunitu sa študoval imunizáciou myši s cholerovým toxínom a meraním koncentrácií produkovaných špecifických protilátok.

Použil sa nasledujúci experimentálny protokol:

1. Použili sa BALB/c myši staré šesť až sedem týždňov s hmotnosťou 20 - 30 g.
2. Myši sa náhodne roztriedili do rôzne ošetrovaných skupín.
3. Počas experimentu kontrolné myši prijímali diétu založenú na práškovom odstredenom mlieku.
4. Testované myši prijímali  $10^9$  cfu/deň živých *L. rhamnosus* HN001 alebo  $10^9$  cfu/deň teplom usmrtených *L. rhamnosus*

HN001 za deň ako aj diétu založenú na práškovom odstredenom mlieku počas 14 dní.

5. Myši sa orálne imunizovali s cholerovým toxínom v dňoch kŕmenia 0 a 7.

#### Výsledky

Podávanie *L. rhamnosus* HN001 výrazne zvýšilo hladinu fagocytovej aktivity periférálnych krvných leukocytov v porovnaní s myšami prijímajúcimi kontrolnú diétu (Obr. 2). Tento nárast sa pozoroval či už bol *L. rhamnosus* HN001 dodávaný v živej alebo v teplom usmrtenej forme. Neboli zistené rozdiely v úrovniach fagocytovej aktivity medzi myšami prijímajúcimi živé *L. rhamnosus* HN001 a teplom usmrtené *L. rhamnosus* HN001.

Podávanie živých a mŕtvych *L. rhamnosus* HN001 indukovalo nárast sérových aj mukozálnych protilátkových odpovedí v porovnaní s kontrolnými myšami. Ale hladina odpovede bola výrazne vyššia u myši kŕmených živým *L. rhamnosus* HN001 (tabuľka 13).

Tabuľka 13 - Účinok živých a teplom usmrtených *L. rhamnosus* HN001 na sérové a mukozálne protilátkové odpovede na cholerový toxín u myši

| Ošetrenie                                           | Sérová protilátková<br>odpoveď<br>(jednotky/ml) | Mukozálna proti-<br>látková odpoveď<br>(jednotky/ml) |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Kontrola                                            | 88,69 ± 18,52                                   | 708,6 ± 146,9                                        |
| Živý <i>L. rhamnosus</i><br>HN001                   | 214,89 ± 62,33*                                 | 2054,5 ± 285,8***                                    |
| Teplom usmrtený <i>L.</i><br><i>rhamnosus</i> HN001 | 174,89 ± 44,78                                  | 1533,6 ± 319,3                                       |

BALB/c myši sa kŕmili mliečnou diétou a orálne sa im podávalo  $10^3$  cfu (za deň) *L. rhamnosus* HN001 buď v živej alebo teplom usmrtenej forme počas 14 dní. Kontrolné myši neprijímali BMK. Myši sa orálne imunizovali s cholerovým toxínom v deň 0 a

7. Protilátkové odpovede (sérum a črevné sekréty) sa merali s použitím ELISA na 14. deň. Hodnoty boli priemer +/-štandardná chyba. Výrazné rozdiely (Studentov t test) z kontroly: \*P=0,05, \*\*\*P=0,0005.

Tieto výsledky predpokladajú, že živé aj teplom usmrtené *L. rhamnosus* HN001 sú schopné zvýšiť aspekty prirodzenej aj získanej imunity u myší.

#### Príklad 8

Antiinfekčné vlastnosti *B. lactis* HN019 a *L. rhamnosus* HN001

Cieľom tejto štúdie bolo:

1. Stanoviť ochrannú účinnosť *B. lactis* HN019 a *L. rhamnosus* HN001 proti gastrointestinálnemu patogénu *Salmonella typhimurium*.
2. Určiť úlohu imunostimulácie indukovanej *B. lactis* HN019 a *L. rhamnosus* HN001 v ochrane proti infekcii spôsobenej *S. typhimurium* u myší.

Antiinfekčné vlastnosti sa stanovili meraním bakteriálnej translokácie v pečeni a slezine. Účinky zvýšenej imunity sa skúšali určením fagocytovej funkcie (periferálne krvné leukocyty a peritoneálne makrofágy) a odpoveďami lymfocytovej proliferácie na T-bunkový mitogén (PHA).

Použil sa nasledujúci experimentálny protokol:

1. Použili sa BALB/c myši staré šesť až sedem týždňov s hmotnosťou 20 - 30 g.
2. Myši sa náhodne rozmiestnili do 4 rôzne ošetrovaných skupín a boli individuálne ubytované.
3. Všetky myši prijímali počas experimentu diétu založenú na práškovom plnotučnom mlieku.
4. Testované myši začali denne prijímať *B. lactis* HN019 a *L. rhamnosus* HN001 ( $10^9$  cfu/deň) 7 dní pred nákazou a pokračovali počas trvania pokusu.
5. Myši prijímajúce *B. lactis* HN019 a *L. rhamnosus* HN001 a kontrolná skupina (bez BMK) sa orálne nakazili so

*Salmonella typhimurium* (ATCC 1772)  $8 \times 10^5$  cfu/deň počas piatich dní so začiatkom v siedmom dni.

6. Neinfikovaná kontrolná skupina neprijímala *S. typhimurium*.
7. Na šiesty deň po nákuze sa myši použili na meranie bakteriálnej translokácie v pečeni a slezine a stanovenie imunitných funkcií.

#### Výsledky

Myši prijímajúce *B. lactis* HN019 a *L. rhamnosus* HN001 ukázali výrazne nižšie hladiny bakteriálnej translokácie v pečeni a slezine ako myši kŕmené samotným *S. typhimurium* (Obr. 3).

Vyvolanie infekcie malo za následok výrazné potlačenie fagocytovej funkcie (Obr. 4); fagocytová aktivita kontrolných myši nakazených s *S. typhimurium* bola výrazne nižšia ako u neinfikovaných myši. Ale infikovanie s *S. typhimurium* nemalo žiaden účinok na fagocytovú schopnosť periférálnych krvných leukocytov myši kŕmených s *B. lactis* HN019 alebo *L. rhamnosus* HN001. Toto sa ukázalo podobné hladinám fagocytovej aktivity u myši kŕmených *B. lactis* HN019 alebo *L. rhamnosus* HN001 a nakazených *S. typhimurium* a normálnych neinfikovaných kontrolných myši.

Myši kŕmené s *B. lactis* HN019 alebo *L. rhamnosus* HN001 ukázali vyššie odpevede lymfocytovej proliferácie na PHA ako kontrolná skupina nakazená *S. typhimurium* (Obr. 5). Nebol výrazný rozdiel v odpovedi medzi myšami prijímajúcimi *B. lactis* HN019 alebo *L. rhamnosus* HN001 a neinfikovanou kontrolnou skupinou myši.

Spoločne tieto výsledky predpovedajú, že kŕmenie s *B. lactis* HN019 alebo *L. rhamnosus* HN001 je schopné zabezpečiť ochranu proti enterickým patogénom akým je *Salmonella typhimurium*. Zvýšená odolnosť voči infekciám je sprevádzaná zvýšením imunitnej činnosti.

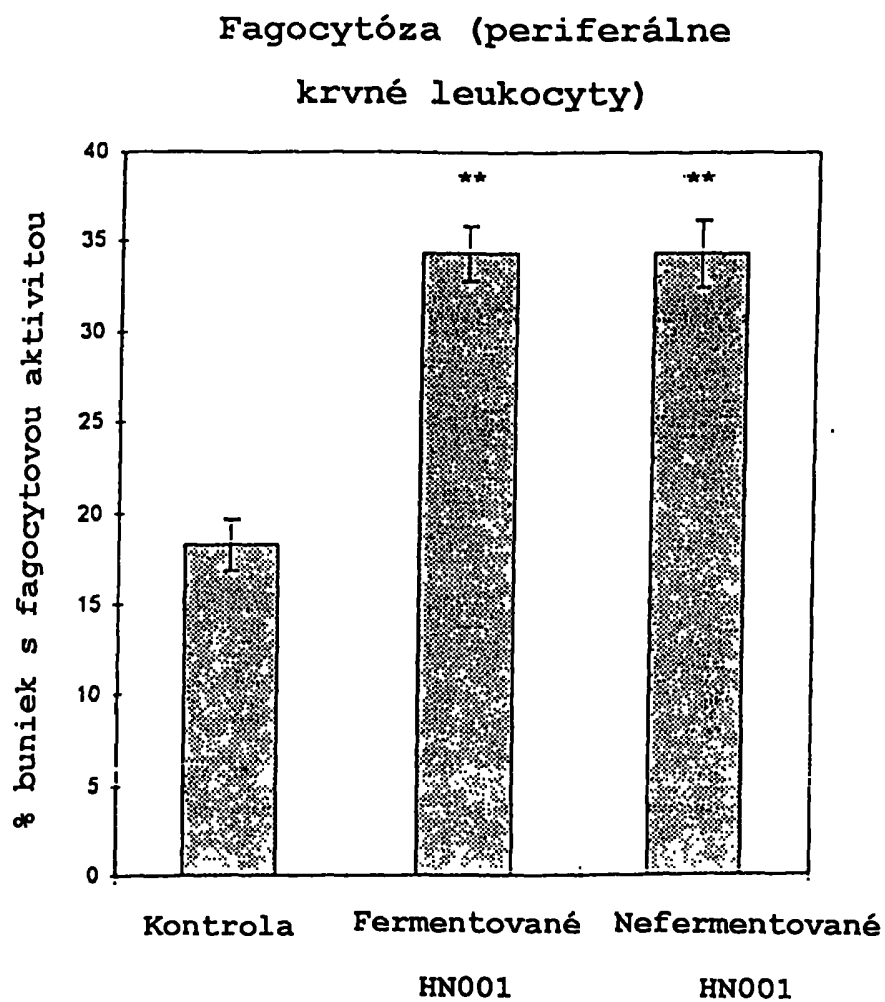
## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Biologicky čistá kultúra buď *L. rhamnosus* HN001 AGAL depozitné číslo NM97/09514 s dátumom 18. augusta 1997 alebo *L. rhamnosus* HN067 AGAL depozitné číslo NM97/01925 s dátumom 11. februára 1998.
2. Biologicky čistá kultúra *L. rhamnosus* HN001 AGAL depozitné číslo NM97/09514 s dátumom 18. augusta 1997.
3. Biologicky čistá kultúra *L. rhamnosus* HN067 AGAL depozitné číslo NM97/01925.
4. Kompozícia biologicky čistej kultúry niektorého z *L. rhamnosus* HN001 podľa nároku 2, *L. rhamnosus* HN067 podľa nároku 3, *B. lactis* HN019 AGAL depozitné číslo NM97/09513 s dátumom 18. augusta 1997 alebo *L. acidophilus* HN017 AGAL depozitné číslo NM97/09515 s dátumom 18. augusta 1997 v imunostimulačnej koncentrácii s fyziologicky prijateľným excipientom alebo rozpúšťadlom.
5. Kompozícia podľa nároku 4, vyznačujúca sa tým, že obsahuje hocijaké dva alebo viacero uvedených kmeňov.
6. Kompozícia podľa nároku 4 alebo 5, vyznačujúca sa tým, že fyziologicky prijateľným excipientom alebo rozpúšťadlom je potravina.
7. Kompozícia podľa nároku 6, vyznačujúca sa tým, že potravinou je hocijaké kulturované mlieko, jogurt, syr, mliečny nápoj alebo mliečny prášok.
8. Kompozícia podľa nároku 4 alebo 5, vyznačujúca sa tým, že je farmaceutickou kompozíciou a excipient alebo rozpúšťadlo je farmakologicky prijateľný excipient alebo rozpúšťadlo.
9. Imunitu zvyšujúce fyziologicky prijateľné biologicky čisté kmene homológov alebo mutantov hocijakého kmeňa:  
*L. acidophilus* HN017  
*L. rhamnosus* HN001  
*B. lactis* HN019

*L. rhamnosus* HN067.

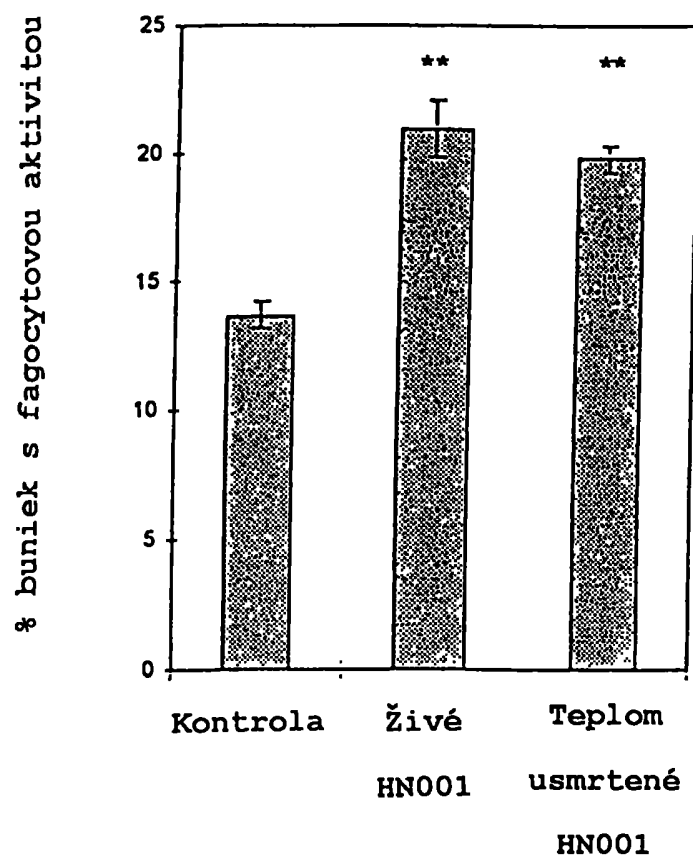
10. Spôsob zvýšenia prirodzenej a získanej imunity, vyznačujúci sa tým, že obsahuje podanie cicavcovi biologicky čistých kultúr podľa niektorého z nárokov 1 až 3 a 9 v imunostimulačnom dávkovom pomere.
11. Spôsob podľa nároku 10, vyznačujúci sa tým, že sú prítomné biologicky čisté kultúry dvoch alebo troch vyššie definovaných kmeňov.
12. Spôsob zvýšenia prirodzenej a získanej imunity, vyznačujúci sa tým, že obsahuje podanie cicavcovi kompozície podľa niektorého z nárokov 4 až 8.
13. Spôsob podľa nároku 10, vyznačujúci sa tým, že fyziologicky prijateľným excipientom alebo rozpúšťadlom je potravina.
14. Spôsob podľa nároku 10, vyznačujúci sa tým, že potravinou je kulturované mlieko, jogurt, syr, mliečny nápoj alebo mliečny prášok.

1/3



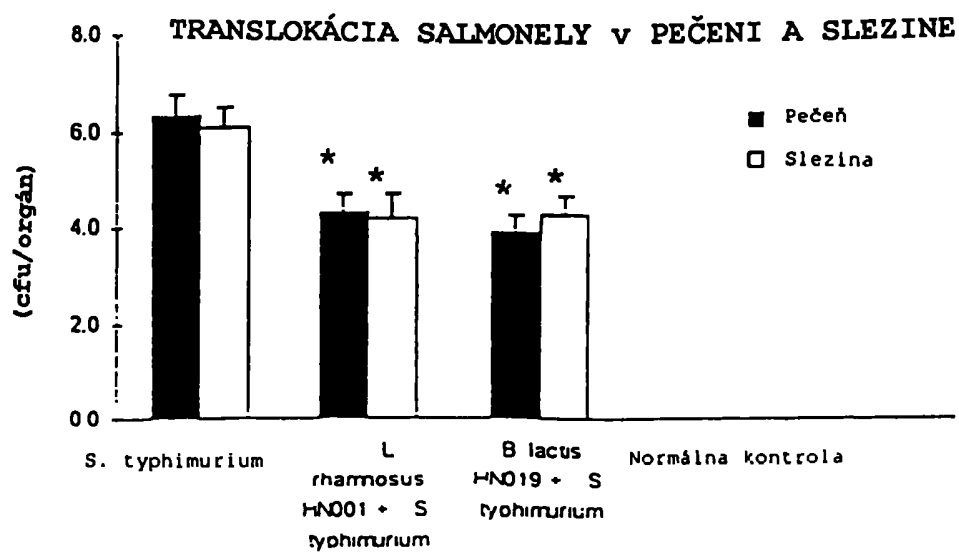
Obr. 1

### Fagocytóza (periferálne krvné leukocyty)

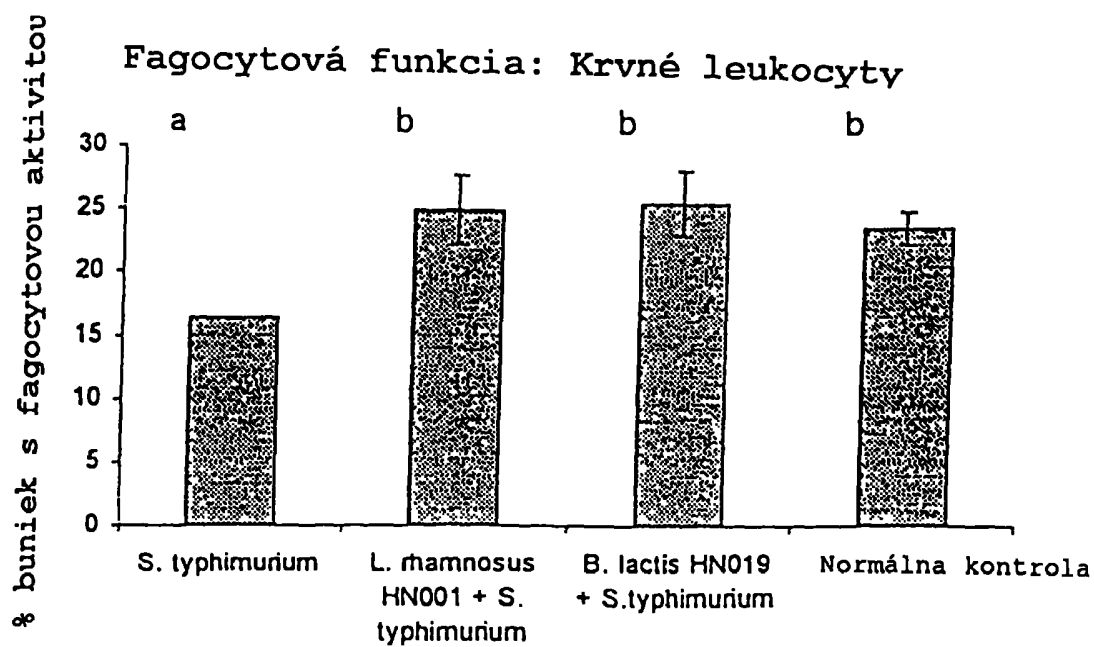


Obr. 2

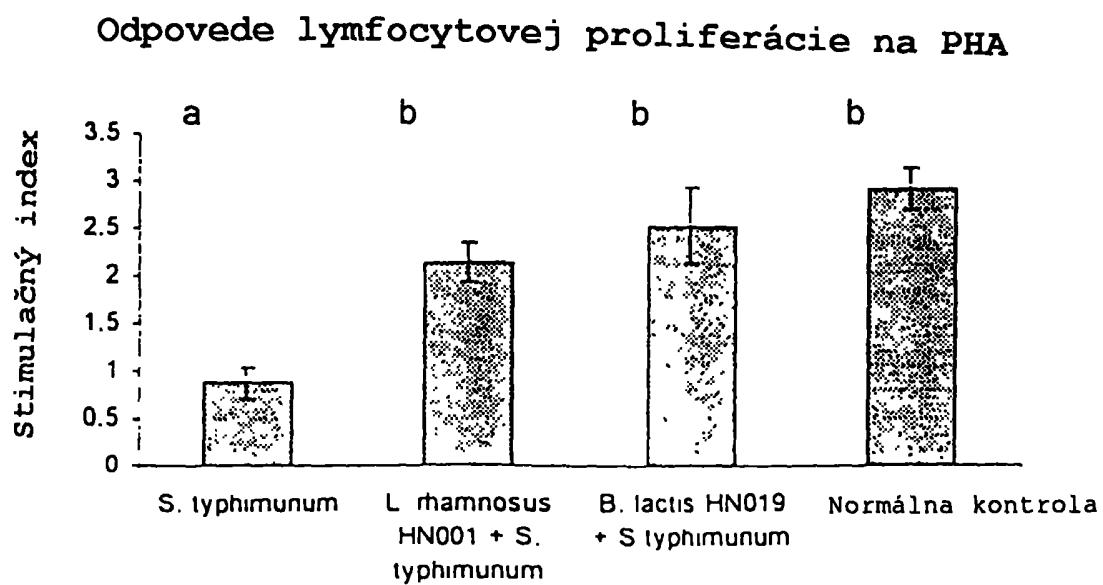
Log množstva životaschopných baktérií



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5