



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

การปรับภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติก

Immunomodulation of Probiotic Lactic Acid Bacteria

ศิริวรรณ เจริญศรี (Siriwan Charoensri)¹ มาลัย ทวีโชติภักดิ์ (Malai Taweechoitipatr)²เบญจมาศ วงศ์สัตยอนันท์ (Benjamas Wongsatayanon)³ ขวัญนันท์ นันทวิสัย (Kwannan Nantavisai)⁴

บทคัดย่อ

แบคทีเรียกรดแลคติกมีประโยชน์และความสำคัญในการเป็นโพรไบโอติก ซึ่งบางสายพันธุ์มีคุณสมบัติเฉพาะสามารถปรับการสร้างไซโตไคน์ได้ การศึกษาครั้งนี้ได้เลือกแบคทีเรียกรดแลคติก 24 สายพันธุ์ โดยใช้แอนติเจนแบบเซลล์แตก และเซลล์มีชีวิต จากแต่ละสายพันธุ์มาทดสอบการปรับภูมิคุ้มกันของการสร้างไซโตไคน์ชนิดอินเตอร์เฟอรอนแกมมา (IFN- γ) และอินเตอร์ลิวคิน 4 (IL-4) ในเซลล์โมโนไซต์ชนิด THP-1 ผลการศึกษาพบว่าสายพันธุ์ MSMC66-1 แบบเซลล์แตกกระตุ้นการสร้าง IFN- γ ขณะที่สายพันธุ์ MSMC25-2 ยับยั้งการสร้าง IFN- γ และเป็นที่น่าสนใจที่สายพันธุ์ MSMC25-2 แบบเซลล์มีชีวิตกระตุ้นการสร้าง IFN- γ ได้ ในขณะที่สายพันธุ์ MSMC66-1 และสายพันธุ์ MSMC99-1 ยับยั้ง IFN- γ การศึกษาใน IL-4 พบว่าสายพันธุ์ MSMC25-2 และสายพันธุ์ MSMC99-1 แบบเซลล์แตกกระตุ้นการสร้าง IL-4 ขณะที่สายพันธุ์ MSMC66-1 ยับยั้ง IL-4 นอกจากนี้พบว่าสายพันธุ์ MSMC25-2 และสายพันธุ์ MSMC66-1 แบบเซลล์มีชีวิตกระตุ้นการสร้าง IL-4 แต่สายพันธุ์ MSMC99-1 ยับยั้งการสร้าง IL-4 การปรับภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกแบบเซลล์มีชีวิต สายพันธุ์ MSMC25-2 และสายพันธุ์ MSMC66-1 พบการลดลงของการมีชีวิต 1 ลอการิทึม ที่พีเอช 3.0 และเพิ่มขึ้น 1 ลอการิทึม ที่พีเอช 4.0 แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ MSMC25-2 และสายพันธุ์ MSMC66-1 พบมีการลดลงของการมีชีวิต 1 ลอการิทึม ที่ความเข้มข้นน้ำดี 0.3% และ 0.8% และอนาคตอาจมีการศึกษาเกี่ยวกับสายพันธุ์ที่สามารถปรับภูมิคุ้มกันเพื่อนำมาเป็นอิมมูโนโพรไบโอติกอีกด้วย

คำสำคัญ: แบคทีเรียโพรไบโอติก แบคทีเรียกรดแลคติก อิมมูโนโพรไบโอติก อินเตอร์เฟอรอนแกมมา อินเตอร์ลิวคิน-4

Abstract

Lactic acid bacteria have been beneficial and significantly used as probiotics. Some specific strains can modulate the production of cytokines. In this study, the selected 24 strains of lactic acid bacteria which consisted of sonicated cells and viable cells were investigated for the immunomodulation on interferon (IFN)-gamma and interleukin-4 (IL-4) in THP-1 monocytic cells. The results revealed that sonicated cell of MSMC66-1 strain can stimulate IFN- γ while sonicated cell of MSMC25-2 strain inhibited IFN- γ . Interestingly, viable cell of MSMC25-2 strain stimulated IFN- γ whereas viable cell of MSMC66-1 and MSMC99-1 strains inhibited IFN- γ . According to the IL-4 study, sonicated cell of MSMC25-2 and MSMC99-1 strains can stimulate IL-4 while sonicated cell of MSMC66-1 strain can inhibit IL-4. Furthermore, the viable cell of MSMC25-2 and MSMC66-1 strains can stimulate IL-4 but MSMC99-1 strain can inhibit IL-4. On the immunomodulatory strains of viable cells, MSMC25-2 and MSMC66-1, showed the decrease of viability 1 log value in pH 3.0 and increase 1 log value in pH 4.0. The viability of MSMC25-2 and MSMC66-1 strains showed the decrease 1 log value in 0.3% and 0.8% bile. A further study on the immunomodulatory strains could be useful for immunoprobiotics.

Keywords: Probiotics, Lactic acid bacteria, Immunoprobiotics, Interferon-Gamma, Interleukin-4

1 นิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวภาพการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

charoensri.st@gmail.com

2 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ malai@g.swu.ac.th

3 รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ benjamas.swu@yahoo.com

4 อาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ kwannan@yahoo.com



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

บทนำ

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพ สามารถปรับภูมิคุ้มกัน (immunomodulation) ลดอาการของลำไส้อักเสบ (inflammatory bowel disease) (Young SL, 2004, pp. 686-690), (Kamada N, 2008, pp. 214-220) ลดอาการของโรคภูมิแพ้ (allergic diseases) เป็นต้น โพรไบโอติกตามคำนิยามของ FAO/WHO ในปี 2002 หมายถึงจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเมื่อร่างกายได้รับเข้าไปในปริมาณที่เพียงพอจะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (FAO/WHO, 2002) โพรไบโอติกนั้นสามารถผลิตกรดแลคติกที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายเป็นอย่างมาก จึงเรียกว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นและมีการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกที่ดีจำนวนมาก แบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่ในรูปเซลล์แตก และเซลล์มีชีวิตล้วนมีคุณสมบัติเป็นอิมมูโนโพรไบโอติก (immunoprobiotics) สามารถปรับภูมิคุ้มกันได้ (Ou CC, 2011, pp. 260-267)

ไซโตไคน์มีบทบาทสำคัญในการปรับภูมิคุ้มกันในเซลล์ทีเฮลเปอร์ (helper T cell หรือ Th) ให้มีการตอบสนองอย่างสมดุลหรือไม่สมดุลระหว่าง Th1 และ Th2 ไซโตไคน์ ซึ่งถ้ามีการตอบสนองอย่างไม่สมดุลจะส่งผลทำให้เกิดโรคทางภูมิคุ้มกันต่างๆ (Abbas AK, 2012) ถ้ามีการสร้าง Th1 ไซโตไคน์มากเกินไปจะส่งผลต่อการเกิดการอักเสบแบบเรื้อรัง แต่ถ้ามีการสร้าง Th2 ไซโตไคน์มากเกินไปจะทำให้เกิดโรคภูมิแพ้ต่างๆ ซึ่งในปัจจุบันอุบัติการณ์ของการเกิดโรคภูมิแพ้สูงขึ้นเรื่อยๆ (Ou CC, 2011, pp. 260-267)

โพรไบโอติกแบคทีเรียมีความสัมพันธ์และบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายผ่านทางสารน้ำและผ่านทางเซลล์ (Cross M, 2011, pp. 891-901) ซึ่งช่วยให้ภูมิคุ้มกันมีการตอบสนองที่สมดุล โดยแต่ละสายพันธุ์มีกลไกการทำงานที่จำเพาะในการปรับภูมิคุ้มกันของการกระตุ้นไซโตไคน์ที่แตกต่างกันไป จากการเปรียบเทียบเด็กกลุ่มธรรมดาและกลุ่มที่เป็นภูมิแพ้ (Ouwehand AC, 2001, pp. 144-145) พบว่ามีแบคทีเรียในลำไส้ที่แตกต่างกัน ซึ่งกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิแพ้อาจมีความสัมพันธ์ระหว่างอุบัติการณ์ของโรคและแบคทีเรียในลำไส้ด้วย จะเห็นได้ว่าโพรไบโอติกแบคทีเรียมีความสำคัญและบทบาทเกี่ยวข้องกับการปรับภูมิคุ้มกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ องค์ประกอบและรูปแบบของแอนติเจนด้วย (McFarland LV, 2009, pp. 274-280) โดยพบว่าข้อมูลการศึกษาในรูปแบบแอนติเจนของโพรไบโอติกแบคทีเรียยังมีไม่มาก จึงนำมาสู่การศึกษาครั้งนี้ โดยสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบแอนติเจนของโพรไบโอติกแบคทีเรียโดยใช้สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากคนไทย เพื่อศึกษาคุณสมบัติการปรับภูมิคุ้มกันในการสร้าง Th1 ไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และ Th2 ไซโตไคน์ชนิด IL-4

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก ที่สามารถปรับภูมิคุ้มกันในการสร้างไซโตไคน์ชนิดอินเตอร์เฟอรอนแกมมา และอินเตอร์ลิวคิน 4
2. เพื่อเปรียบเทียบแอนติเจนแต่ละรูปแบบของแบคทีเรียกรดแลคติกในการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์
3. เพื่อทดสอบคุณสมบัติการทนกรดและความเข้มข้นน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

อุจจาระของทารกหลังคลอดทั้งเพศชายและเพศหญิง ในการเก็บตัวอย่างมารดาเป็นผู้ให้ความยินยอมในรูปแบบฟอร์มให้คำยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inform consent) ซึ่งได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์เรียบร้อยแล้ว ในการเก็บ fresh fecal specimen ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อป้ายแล้วใส่ใน Cary-Blair transport medium (Oxoid, Hampshire, England) และส่งทำการทดสอบโดยเร็วที่สุด

การคัดแยกและการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก

นำตัวอย่างอุจจาระของทารกมาเจือจางลงครั้งละ 10 เท่าในน้ำเกลือธรรมดาที่มีความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (normal saline solution) ในแต่ละความเข้มข้นดูมา 200 µl เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด deMan-Rogosa-Sharpe (MRS) (Oxoid, Hampshire, England) โดยวิธี spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาชนะเลี้ยงบักเตรีที่สภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic jar) ที่มี Anaerobic Gas Pak เพื่อปรับให้อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน (0% O₂, 5% CO₂, 5% H₂, 90% N₂) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจะคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ (pure culture) สำหรับใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้มาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นด้วยวิธีย้อมสีแกรม (Gram stain) ศึกษารูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) จากนั้นทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) โดยจะคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีแกรมบวก (gram positive) รูปร่างกลม (cocci) แท่งกลม (coccobacilli) แท่ง (rod) แท่งสั้น (short rod) แท่งยาว (long rod) และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งจะคัดเลือกและเก็บรักษาเชื้อไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีกลีเซอรอล (glycerol) 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

การเตรียมแอนติเจนแบบเซลล์แตก (sonicated cells) ของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ 24 สายพันธุ์นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกลโคโลนีเดี่ยวๆมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS แบบเหลว (broth) ปรับปริมาณเซลล์ให้มีจำนวนประมาณ 10⁹CFU/ml โดยเทียบกับสารละลายที่มีความเข้มข้นมาตรฐาน (McFarland standard) ในการทดสอบแอนติเจนแบบเซลล์แตก นำแบคทีเรียไปปั่นเพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนตะกอนที่มีแบคทีเรีย (pellet) ละลายด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) แบบที่ไม่ผสมเซรัม (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) นำเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องสลายผนังเซลล์โดยใช้ความถี่สูง (sonicator) และตรวจสอบการแตกละเอียดของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

การเตรียมเซลล์มีชีวิต (viable cells) ของแบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้ 24 สายพันธุ์นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อบ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ มาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth นำมาปรับปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติก ให้มีจำนวนประมาณ 10^9 CFU/ml เทียบกับสารละลายที่มีความขุ่นมาตรฐาน ในการเตรียมตัวเซลล์ที่มีชีวิต นำมาปั่นเพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกในส่วนตะกอน ละลายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเหลว RPMI 1640 แบบที่ไม่ผสมเซรัม (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) แล้วใช้ทดสอบทันที

การทดสอบการปรับภูมิคุ้มกันโดยแบคทีเรียกรดแลกติก ในเซลล์โมโนไซตชนิด THP-1

เพาะเลี้ยงเซลล์โมโนไซตชนิด THP-1 (ATCC-TIB 202) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเหลว RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, USA) ที่เติมซีรัมที่ได้จากตัวอ่อนวัว (Fetal Bovine Serum (FBS)) 10% (Gibco-Invitrogen, USA) ในฟลาคส์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue Culture Flasks) (Corning, USA) บ่มในตู้บ่มที่มีความชื้น อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% สำหรับการทดสอบการปรับการสร้างไซโตไคน์ (bioassay) นับจำนวนเซลล์ด้วยอุปกรณ์ที่ใช้นับจำนวนเซลล์ (Hemocytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope) (Nikon TMS No. 300679: Nikon, Japan) เพื่อปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ตามต้องการ แล้วเติมเซลล์ปริมาตร 200 μ l ลงในแต่ละหลุมของจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แบบ 96 หลุม (96-well tissue culture plate) (Corning, USA) โดยให้มีเซลล์จำนวน 5×10^5 cells/well จากนั้นเติมรูปแบบแอนติเจนแบบเซลล์แตก หรือเซลล์ที่มีชีวิต ลงในแต่ละหลุมปริมาณ 20% ของ 10^6 cells/ml ส่วนของตัวควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเหลว RPMI 1640 และ MRS broth จากนั้นบ่มที่สภาวะเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนของเหลวที่อยู่เหนือตะกอน (supernatants) เพื่อนำมาทดสอบหาปริมาณไซโตไคน์ชนิด IFN- γ หรือ IL-4 ด้วยวิธี sandwich ELISA (Preprotech, USA) ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ ตรวจสอบโดยวิธีการย้อมด้วยสีซีย้อมเซลล์ (Trypan-blue) (Gibco-Invitrogen, USA)

ทดสอบคุณสมบัติการทนกรดและความเข้มข้นน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก

นำสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้มาทดสอบความสามารถในการทนกรด ที่พีเอช 2.0 พีเอช 3.0 และ พีเอช 4.0 ใน MRS broth โดยใช้ 1 นอร์มัลลิตีของกรดไฮโดรคลอริก และทดสอบความสามารถในการทนความเข้มข้นของน้ำดีที่ 0.3% และ 0.8% ใน MRS broth โดยใช้น้ำดีจากวัว (bile bovine) และใช้ MRS broth เป็นตัวควบคุม (control) นำแบคทีเรียกรดแลกติกมาปรับความเข้มข้นประมาณ 10^9 CFU/ml เทียบกับสารละลายที่มีความขุ่นมาตรฐาน แล้วจึงนำมาทดสอบ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาชนะเลี้ยง บักเทรียที่สภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic jar) ที่มี Anaerobic Gas Pak เพื่อปรับให้อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน (0% O₂, 5% CO₂, 5% H₂, 90% N₂) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลกติกใน MRS broth ที่ใช้ทดสอบความทนกรด-ความเข้มข้นน้ำดี ตามที่กำหนด มาทำการเจือจาง 10 เท่า (serial 10-fold dilutions) เป็น 10^{-1} - 10^{-10} ใน PBS pH 7.2 แล้วนำมาเลี้ยงใน MRS agar โดยเทคนิค spread plate technique แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาชนะเลี้ยงบักเทรียที่สภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic jar) ที่มี Anaerobic Gas Pak เพื่อปรับให้อยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน (0% O₂, 5% CO₂, 5% H₂, 90% N₂) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดสอบอย่างน้อย 3 ครั้ง แต่ละครั้งทำซ้ำ 3 ครั้ง (triplicate) ผลที่ได้แสดงในรูปแบบ Mean $\pm$ standard error of mean (SEM) นำค่าเฉลี่ยมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (One way ANOVA) ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism[®] version 5.01 โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} \leq 0.05$

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบการปรับภูมิคุ้มกันของการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ

แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติปรับภูมิคุ้มกันของการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ จำนวน 24 สายพันธุ์ในรูปแบบเซลล์แตก (sonicated cells) สายพันธุ์ MSMC66-1 สามารถกระตุ้นการสร้าง IFN- γ เพิ่มขึ้นมากที่สุด คือ 95% และรูปแบบเซลล์แตก สายพันธุ์ MSMC25-2 และสายพันธุ์ MSMC50-3 สามารถยับยั้งการสร้าง IFN- γ ได้ 38% และ 28% ตามลำดับ ในรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) สายพันธุ์ MSMC25-2 สามารถกระตุ้นการสร้าง IFN- γ ได้สูงสุด 39% และสายพันธุ์ที่ยับยั้งการสร้าง IFN- γ ได้คือสายพันธุ์ MSMC66-1 สายพันธุ์ MSMC99-1 สายพันธุ์ MSMC 120-1 และสายพันธุ์ MSMC 120-2 โดยมีระดับการยับยั้งของ IFN- γ คือ 33% 62% 51% และ 55% ตามลำดับ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย MRS ไม่มีผลในการกระตุ้นและยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ ดังแสดงในตารางรูปที่ 1

ผลการทดสอบการปรับภูมิคุ้มกันของการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-4

แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติปรับภูมิคุ้มกันของการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-4 จำนวน 24 สายพันธุ์ในรูปแบบเซลล์แตก มี 3 สายพันธุ์ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-4 เพิ่มขึ้น คือ สายพันธุ์ MSMC25-2 สายพันธุ์ MSMC99-1 และสายพันธุ์ 166-1 ได้ 74% 78% และ 76% ตามลำดับ และสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการสร้าง IL-4 ได้ดีมี 5 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ MSMC64-1 สายพันธุ์ MSMC120-1 สายพันธุ์ MSMC120-2 สายพันธุ์ MSMC172-2 และสายพันธุ์ MSMC230-2 ได้ 67% 63% 81% 66% และ 72% ตามลำดับ ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตมี 5 สายพันธุ์ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-4 เพิ่มขึ้นมากที่สุด คือสายพันธุ์ MSMC25-2 สายพันธุ์ MSMC50-3 สายพันธุ์ MSMC64-1 สายพันธุ์ MSMC66-1 และสายพันธุ์ MSMC230-2 ได้ 73% 82% 74% 100% และ 98% ตามลำดับ และมี 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการสร้าง IL-4 ได้มากที่สุด คือสายพันธุ์ MSMC99-1 สายพันธุ์ MSMC120-1 และสายพันธุ์ MSMC120-2 โดยมีระดับการยับยั้งของ IL-4 เท่ากับ 90% 72% และ 67% ตามลำดับ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย MRS ไม่มีผลในการกระตุ้นและยับยั้งการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-4 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 2

ผลการทดสอบการปรับภูมิคุ้มกันของการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และ IL-4

แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ศึกษาการปรับการสร้างไซโตไคน์ทั้งชนิด IFN- γ และ IL-4 โดยรูปแบบแอนติเจนแบบเซลล์แตก และแบบเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์โมโนไซตชนิด THP-1 และหาปริมาณของไซโตไคน์ด้วยวิธี sandwich ELISA โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานแสดงปริมาณของไซโตไคน์ที่เปลี่ยนแปลง

ผลการทดสอบจากแบคทีเรียกรดแลคติกแลค จำนวน 24 สายพันธุ์ พบว่าแอนติเจนรูปแบบเซลล์แตก และแบบเซลล์ที่มีชีวิต จำนวน 2 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ ได้มากกว่า



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

39% และ 6 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติในการยับยั้ง การสร้าง IFN- γ ได้มากกว่า 28% ส่วนสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้าง IL-4 ในรูปแบบเซลล์แตก และแบบเซลล์ที่มีชีวิตมี 7 สายพันธุ์ ซึ่งกระตุ้นการสร้างได้มากกว่า 73% และ 6 สายพันธุ์มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้าง IL-4 มากกว่า 63% ในเซลล์โมโนไซต์ชนิด THP-1 ความสามารถในการปรับภูมิคุ้มกันของไซโตไคน์ IFN- γ และ IL-4 มีระดับแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางรูปที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 ผลการปรับการสร้างไซโตไคน์ IFN- γ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกแลคในแอนติเจนรูปแบบเซลล์แตก (sonicated cells) และแบบเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) ในเซลล์โมโนไซต์ชนิด THP-1

IFN-Y Sonicated cells	Concentration (pg/ml)
RPMI (ตัวควบคุม)	195
MRS (ตัวควบคุม)	225
3-1	235
4-4	210
5-1	185
11-3	171
20-1	167
25-2	121
28-1	224
28-2	236
35-2	175
37-5	214
39-1	166
50-3	141
64-1	214
66-1	383
71-4	188
81-2	195
99-1	165
120-1	235
120-2	222
137-1	199
166-1	159
172-2	213
209-1	241
230-2	178

IFN-Y Viable cells	Concentration (pg/ml)
RPMI (ตัวควบคุม)	189
MRS (ตัวควบคุม)	236
3-1	158
4-4	208
5-1	182
11-3	163
20-1	217
25-2	262
28-1	146
28-2	218
35-2	168
37-5	192
39-1	163
50-3	153
64-1	137
66-1	126
71-4	157
81-2	162
99-1	71
120-1	93
120-2	85
137-1	174
166-1	195
172-2	159
209-1	168
230-2	140

ตารางที่ 2 ผลการปรับการสร้างไซโตไคน์ IL-4 โดยแบคทีเรียกรดแลคติกแลคในแอนติเจนรูปแบบเซลล์แตก (sonicated cells) และแบบเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) ในเซลล์โมโนไซต์ชนิด THP-1

IL-4 Sonicated cells	Concentration (pg/ml)
----------------------	-----------------------

IL-4 Viable cells	Concentration (pg/ml)
-------------------	-----------------------



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

RPMI (ตัวควบคุม)	123	RPMI (ตัวควบคุม)	100
MRS (ตัวควบคุม)	110	MRS (ตัวควบคุม)	101
3-1	147	3-1	93
4-4	171	4-4	75
5-1	91	5-1	99
11-3	75	11-3	74
20-1	148	20-1	148
25-2	214	25-2	173
28-1	85	28-1	89
28-2	72	28-2	98
35-2	75	35-2	89
37-5	124	37-5	88
39-1	67	39-1	147
50-3	116	50-3	182
64-1	40	64-1	174
66-1	76	66-1	200
71-4	121	71-4	92
81-2	131	81-2	104
99-1	219	99-1	10
120-1	45	120-1	28
120-2	23	120-2	33
137-1	157	137-1	115
166-1	216	166-1	131
172-2	42	172-2	92
209-1	76	209-1	91
230-2	34	230-2	198

ผลการทดสอบคุณสมบัติการทนกรดและความเข้มข้นน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก

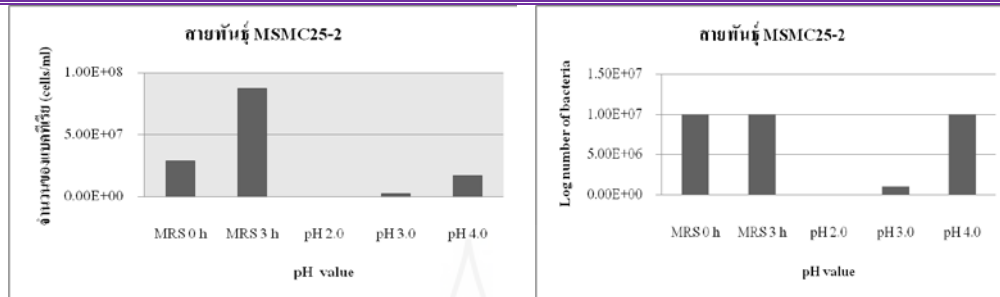
ผลการทดสอบคุณสมบัติการทนกรดของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก

การทดสอบความสามารถในการทนต่อกรด ที่พีเอช 2.0 พีเอช 3.0 และพีเอช 4.0 ใน MRS broth สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการปรับการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และ IL-4 ที่คัดเลือกรวมจำนวน 3 สายพันธุ์ ผลจากการทดสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อที่ค่าพีเอชต่างๆ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่พีเอช 2.0 พีเอช 3.0 และพีเอช 4.0 การปรับภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิต สายพันธุ์ MSMC25-2 และสายพันธุ์ MSMC66-1 แสดงให้เห็นถึงการมีชีวิตรอดลดลง 1 ลอการิทึม ที่พีเอช 3.0 และมีชีวิตรอดเพิ่มขึ้น 1 ลอการิทึม ที่พีเอช 4.0 ซึ่งที่พีเอช 2.0 ไม่พบแบคทีเรียมีชีวิตเหลืออยู่ คือไม่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมคือ MRS broth แต่ที่พีเอช 3.0 และพีเอช 4.0 พบว่าแบคทีเรียมีชีวิตรอดมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อพีเอชที่เพิ่มขึ้นได้ ดังแสดงในกราฟภาพที่ 1, 2 และ 3



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference



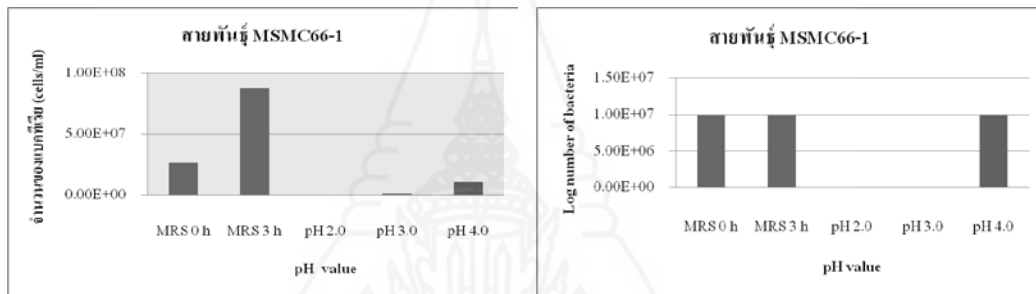
ก.

ข.

ภาพที่ 1 การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ MSMC25-2 หลังจากบ่มที่พีเอชต่างๆ

ก: จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย

ข: Log number of bacteria



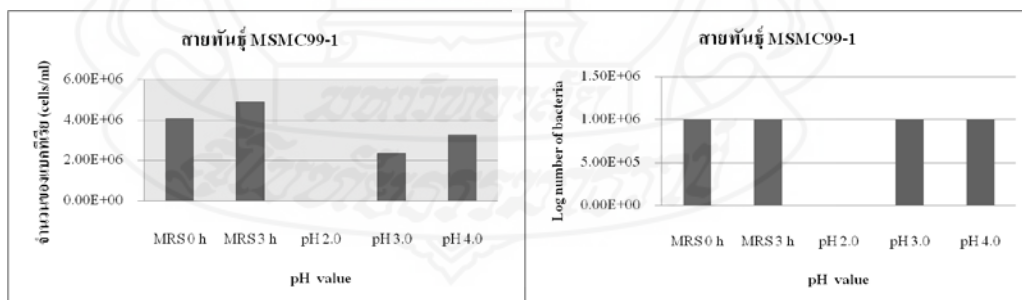
ก.

ข.

ภาพที่ 2 การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ MSMC66-1 หลังจากบ่มที่พีเอชต่างๆ

ก: จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย

ข: Log number of bacteria



ก.

ข.

ภาพที่ 3 การมีชีวิตรอดของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ MSMC99-1 หลังจากบ่มที่พีเอชต่างๆ

ก: จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย

ข: Log number of bacteria

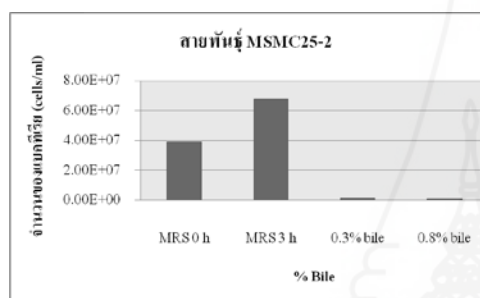


การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

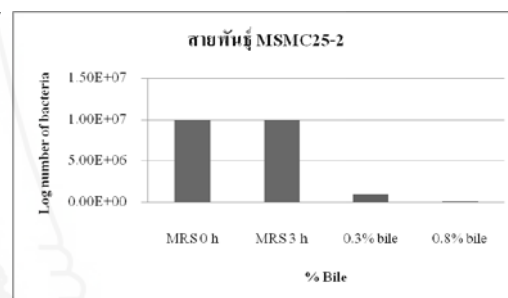
The 5th STOU Graduate Research Conference

ผลการทดสอบคุณสมบัติการทนความเข้มข้นน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก

การทดสอบความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของน้ำดีที่ 0.3% และ 0.8% ใน MRS broth สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการปรับการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และ IL-4 ที่ดี ที่อยู่ในรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิต โดยคัดเลือกมาจำนวน 3 สายพันธุ์ จากการทดสอบความสามารถของการมีชีวิตรอดในความเข้มข้นต่างๆของน้ำดี ที่ 3 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ MSMC25-2 และสายพันธุ์ MSMC66-1 มีชีวิตรอดลดลง 1 ลอการิทึม ที่ความเข้มข้นน้ำดี 0.3% และ 0.8% เมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม คือ MRS broth ดังแสดงในกราฟภาพที่ 4, 5 และ 6



ก.

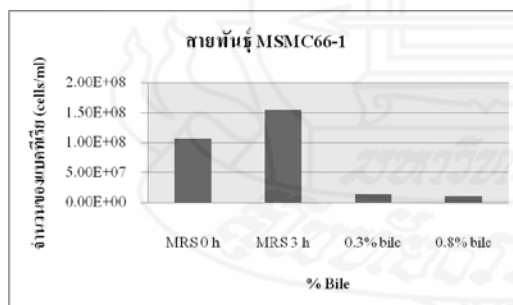


ข.

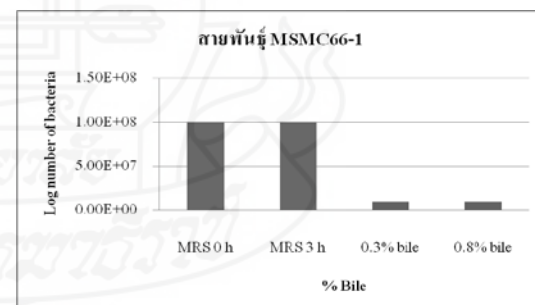
ภาพที่ 4 แสดงความทนทานต่อน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ MSMC25-2

ก: จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย

ข: Log number of bacteria



ก.



ข.

ภาพที่ 5 แสดงความทนทานต่อน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ MSMC66-1

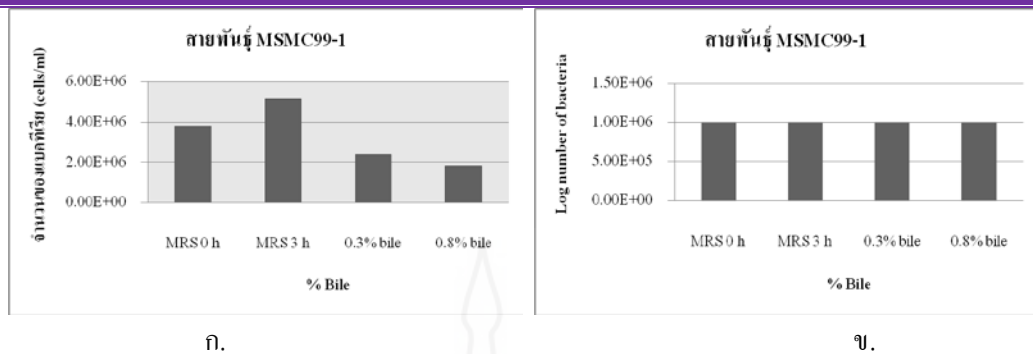
ก: จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย

ข: Log number of bacteria



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference



ภาพที่ 6 แสดงความทนทานต่อน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ MSMC99-1

ก: จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย

ข: Log number of bacteria

อภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติก ในการปรับการสร้างไซโตไคน์ Th1 ชนิด IFN- γ และ Th2 ชนิด IL-4 จากรูปแบบเซลล์แตก (sonicated cells) และรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิต (viable cells) ของแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 24 สายพันธุ์ พบว่า 2 สายพันธุ์ ซึ่งบางสายพันธุ์เป็นรูปแบบเซลล์แตก และบางสายพันธุ์เป็นรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิต มีคุณสมบัติในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และ IL-4 ใน เซลล์โมโนไซต์ชนิด THP-1 ได้ตั้งแต่ 39% ถึง 100% และแบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์ซึ่งบางสายพันธุ์เป็นรูปแบบเซลล์แตก และบางสายพันธุ์เป็นรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิต มีคุณสมบัติในการยับยั้งภูมิคุ้มกันในการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และ IL-4 ได้ตั้งแต่ 51% ถึง 90% โดยมีระดับการปรับการสร้างและยับยั้งไซโตไคน์แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ แสดงว่าแต่ละสายพันธุ์มีความจำเพาะในการปรับการสร้างและยับยั้งไซโตไคน์ที่ต่างกัน โดยมีรูปแบบเซลล์แตก และรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิต จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ ได้มากกว่า 39% และ 6 สายพันธุ์มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้าง IFN- γ ได้มากกว่า 28% ส่วนในรูปแบบเซลล์แตก และรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิต จำนวน 7 สายพันธุ์ มีความสามารถกระตุ้นการสร้าง IL-4 ได้มากกว่า 73% และ 6 สายพันธุ์มีคุณสมบัติในการยับยั้งการสร้าง IL-4 มากกว่า 63% สายพันธุ์ที่เป็นรูปแบบเซลล์แตก และรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิตที่สามารถกระตุ้นการสร้าง IFN- γ ได้สูงสุดคือ MSMC66-1 ได้ 96% ส่วนสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการสร้าง IFN- γ ได้สูงที่สุด คือ MSMC99-1 ได้ 62% และสายพันธุ์ที่เป็นรูปแบบเซลล์แตก และรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิต ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง IL-4 ได้สูงสุดคือ MSMC66-1 ได้ 100% ส่วนสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการสร้าง IL-4 ได้สูงที่สุด คือ MSMC99-1 ได้ 90% ในการปรับภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งรูปแบบเซลล์ที่มีชีวิตนั้นสายพันธุ์ MSMC25-2 และสายพันธุ์ MSMC66-1 แสดงให้เห็นการลดลงของการมีชีวิตรอด ที่พีเอช 3.0 ค่าลดลง 1 ลอการิทึม และเพิ่มขึ้น 1 ลอการิทึม ที่พีเอช 4.0 แต่ที่พีเอช 2.0 ไม่พบการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ MSMC25-2 และสายพันธุ์ MSMC66-1 พบว่ามีการรอดชีวิตลดลง 1 ลอการิทึม ที่ความเข้มข้นน้ำดี 0.3% และ 0.8%



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของแอนติเจนของแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งได้มีการศึกษาการปรับการตอบสนอง โดยการศึกษาการปรับการสร้าง Th1 cytokine และ Th2 cytokine พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus salivarius* สามารถกระตุ้นการสร้าง Th2 cytokine ชนิด IL-4 และ IL-5 และลด Th1 cytokine ในขณะที่ *Lactobacillus salivarius* ต่างสายพันธุ์ สามารถกระตุ้นการสร้าง Th1 cytokine ชนิด IL-12 และ IFN-gamma ใน เซลล์โมโนไซต์ชนิด THP-1 ได้ (Drago L, 2010, pp. 1-5)

การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกในการปรับภูมิคุ้มกันในหนูที่เป็นโรค Crohn (CD) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus rhamnosus* มีผลทำให้การผลิต Th1 ไซโตไคน์ชนิด IFN และ IL-2 ในกลุ่มที่เป็นโรค Crohn (CD) ลดลง (Ng SC, 2009, pp.300-10) นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus rhamnosus* GG สามารถยับยั้งการตอบสนองของ Th2 ไซโตไคน์ในผู้ป่วยที่เป็นภูมิแพ้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการลด Th2 ไซโตไคน์ชนิด IL-4 และ IL-5 (Shida K, 2002, pp. 563-570) ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดอาการแพ้ และพบการเพิ่มจำนวนของ Th1 ไซโตไคน์ชนิด IL-12 และ IFN- γ มากขึ้น และยังมีการศึกษาเกี่ยวกับอาการเด็กที่แพ้นมวัว ที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus rhamnosus* GG ทำให้มีการผลิตของ Th1 ไซโตไคน์ชนิด IFN- γ เพิ่มขึ้น และในขณะเดียวกันก็ลดการผลิตของ Th2 ไซโตไคน์ชนิด IL-4 ด้วย (Pohjavuori E, 2004, pp. 131-136) จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถปรับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันได้โดยอาศัยไซโตไคน์หลายชนิดทำงานร่วมกัน จากการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกนี้ จึงเป็นจุดสนใจที่สำคัญในการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาประยุกต์ใช้ในการปรับภูมิคุ้มกันให้สมดุลและเป็นแนวทางในการพัฒนาโพรไบโอติกที่ดีและเกิดประโยชน์ต่อสุขภาพได้

ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัย

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ได้ข้อมูลและพิสูจน์ได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติที่สำคัญในการปรับภูมิคุ้มกันของการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และชนิด IL-4 ในเซลล์โมโนไซต์ชนิด THP-1 ได้ ซึ่งสายพันธุ์ที่กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ ได้นี้จะนำมาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยปรับภูมิคุ้มกันในผู้ที่มีความบกพร่องของการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ (cell mediated immunity) ส่วนสายพันธุ์ที่กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์ชนิด IL-4 จะนำมาประยุกต์ใช้เพื่อช่วยส่งเสริมผู้ที่มีความบกพร่องของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทางสารน้ำ (humoral immunity) และยังสามารถนำมาควบคุมซึ่งกันและกันได้ด้วย จากการศึกษาครั้งนี้สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการปรับภูมิคุ้มกันในการสร้างไซโตไคน์ชนิด IFN- γ และชนิด IL-4 ได้นั้น ถือได้ว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพและมีความสำคัญในการพัฒนาเพื่อเป็นโพรไบโอติกที่ดี ซึ่งน่าจะมีประโยชน์ในการนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันได้ จึงจะต้องศึกษาต่อไปในรายละเอียดและกลไกต่างๆ ในการปรับการสร้างไซโตไคน์ เพื่อที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ อันจะก่อให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์ได้ในอนาคต



การจัดประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช ครั้งที่ 5

The 5th STOU Graduate Research Conference

เอกสารอ้างอิง

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (2012). Cellular and molecular immunology. Elsevier Saunders. 7th ed. Philadelphia
- Cross ML. (2011). Anti-allergy properties of fermented foods. *Int Immunopharmacol.* 1(5), 891-901.
- Drago L., et al. (2010). Strain-dependent release of cytokines modulated by *Lactobacillus salivarius* human isolates in an *in vitro* model. *BCM research notes.* 1-5.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ont. Canada.
- Kamada N, et al. (2008). Nonpathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inhibits signal transduction in intestinal epithelial cells. *Infection and immunity.* 76(1), 214-220.
- McFarland LV. (2009). Evidence-based review of probiotics for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile* infections. *Anaerobe.* 15, 274-280.
- Ng SC, et al. (2009). Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflamm Bowel Dis.* 15(2), 300-10.
- Ou CC, et al. (2011). Heat killed lactic acid bacteria enhance immunomodulatory potential by skewing the immune response toward Th1 polarization. *J food science.* 76, 260-267.
- Ouwehand AC, et al. (2001). Differences in *Bifidobacterium* flora composition in allergic and healthy infants. *J Allergy Clin Immunol.* 108, 144-145.
- Pohjavuori E, et al. (2004). *Lactobacillus* GG effect in increasing IFN-gamma production in infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 114, 131-136.
- Shida K, et al. (2002). *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin Experiment Allergy.* 32, 563-570.
- Young SL, et al. (2004). Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 11(4), 686-690.