



Proteksi Probiotik pada Mukosa Ileum Mencit yang Terpajan Lipopolisakarida *Escherichia Coli*

Alpha Fardah Athiyyah *, Ariani Setiawati *, Andy Darma *, Anang Endaryanto *, I Ketut Sudiana **, Reza Ranuh *, Subijanto MS *

ABSTRACT

Probiotic's protection in ileal mucosa of mice after lipopolysaccharide Escherichia coli

Background: Gastrointestinal infection is one of the major causes of morbidity in children. Diarrhea is the common manifestation. Diarrheal prevention needs a balance mucosal immune system. Probiotic used in prevention of gastrointestinal infection needs to be considered. The aim of the study is to prove probiotic protection in ileal mucosa after lipopolysaccharide (LPS) *Escherichia coli* O55:B5 inoculation anatomically and immunologically.

Method: Experimental study with male Balb/c, age 10-12 weeks, body weight 30-40g and randomized into treatment group and placebo group. Treatment group received mix probiotic for 14 days and on day 15 were inoculated by LPS *Escherichia coli* O55:B5, and day 16-21 were given mix probiotic again. Placebo group received LPS *Escherichia coli* O55:B5 on day 15. Mice necropsy were conducted at day 22. Immunohistochemistry examination used to look for amount expression cell for IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 dan TGF- β in ileal mucosa. Scanning electron microscope was used to see ileal mucosal structure. Statistic analysis used in this study was multivariate analysis.

Results: Sixteen Balb/c mice were randomized into 2 groups, each group consist 8 mice. There was significant difference on amount of cells expression IL-5 ($p=0.022$), IL-6 ($p=0.05$), and also on amount of cells expression TGF- β ($p=0.036$). On probiotic-LPS group, there was no Th1 domination but on the other hand, Treg became dominant. Th1 and Th2 response were still balance. Structural damages occurred in LPS group and did not occur in probiotic-LPS group.

Conclusion: Probiotic protection in ileal Balb/c mice mucosa after LPS *Escherichia coli* O55:B5 inoculation is through anatomy and immunology changes.

Keywords: Probiotic, LPS, *Escherichia coli*, protection, immunology

ABSTRAK

Latar belakang: Infeksi gastrointestinal dengan manifestasi tersering diare merupakan salah satu infeksi yang sering terjadi pada anak. Pencegahan diare memerlukan keseimbangan sistem imun mukosa yang baik. Penggunaan probiotik untuk pencegahan terhadap infeksi gastrointestinal perlu dipikirkan. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan proteksi probiotik pada ileum mencit yang terpajan lipopolisakarida (LPS) *Escherichia coli* O55:B5 secara anatomis dan imunologis.

Metode: Uji eksperimental dengan menggunakan mencit Balb/c jantan berusia 10-12 minggu, berat badan 30-40g dan dirandomisasi menjadi kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan mendapatkan mix probiotik selama 14 hari, hari ke-15 mendapatkan LPS *Escherichia coli* O55:B5 dan hari ke-16-21 kembali mendapatkan mix probiotik. Kelompok kontrol mendapatkan LPS *Escherichia coli* O55:B5 saja pada hari ke-15. Seluruh mencit dinekropsi pada hari ke-22. Pemeriksaan imunohistokimia untuk melihat ekspresi sel penghasil sitokin IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 dan TGF- β di jaringan ileum. Scanning microscope electron (SEM) untuk melihat struktur mukosa ileum. Analisis statistik yang digunakan adalah analisis multivariat.

Hasil: Enam belas ekor mencit Balb/c terbagi menjadi dua kelompok, masing-masing 8 mencit. Pada kelompok probiotik-LPS didapatkan perbedaan bermakna dibandingkan dengan kelompok LPS pada jumlah penghasil sitokin IL-5 ($p=0,022$), IL-6 ($p=0,050$) dan jumlah sel penghasil sitokin TGF- β ($p=0,036$). Pada kelompok probiotik-LPS, dominasi respon Th1 tidak terlihat lagi dan

* Departemen Ilmu Kesehatan Anak RSU Dr. Soetomo Universitas Airlangga, Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 6-8, Surabaya.

Email: alpha_achmadi@yahoo.co.id

** UPT Mikroskopi Elektron Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 6-8, Surabaya.

menimbulkan dominasi Treg pada kelompok ini. Posisi Th1 dan Th2 masih dapat dipertahankan secara seimbang. Kerusakan struktur yang terjadi pada kelompok LPS tidak didapatkan pada kelompok Probiotik-LPS.

PENDAHULUAN

Infeksi gastrointestinal merupakan salah satu infeksi yang sering terjadi pada anak. Manifestasi tersering dari infeksi gastrointestinal ini adalah diare. Diare sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan yang menonjol. Di Amerika Serikat hampir 40% kunjungan pasien di unit rawat jalan dan unit gawat darurat adalah akibat diare.¹ Di Instalasi Rawat Inap Anak RSUD Dr. Soetomo selama tahun 2009, pasien diare sekitar 25% dari seluruh anak yang dirawat di Instalasi Rawat Inap Anak RSUD Dr. Soetomo.² Banyak hal yang telah dilakukan untuk mengurangi kejadian diare seperti perbaikan hygiene dan sanitasi, pemberian oralit dan zink pada setiap penderita diare, pemberian vitamin A dan vaksinasi terhadap rotavirus, tetapi kejadian diare masih tetap tinggi.³

Pencegahan diare memerlukan sistem imun mukosa yang baik. Pemberian probiotik dipikirkan sebagai pencegahan terhadap infeksi gastrointestinal. Keberadaan mikrobiota dalam saluran cerna mempunyai peran yang penting dalam menjalankan fungsi regulasi sistem imun mukosa. Mikroba komensal melakukan "cross-talk" dengan sel epitel dan memicu respon imun untuk mencegah proses infeksi.⁴

Respon imun yang ditimbulkan masing-masing strain probiotik tidak sama. Penelitian dengan menggunakan 12 strain *Bifidobacteria* mempertegas hal ini.⁵ Homeostasis adalah kondisi yang diperlukan oleh semua individu untuk mempertahankan kondisi dalam keadaan sehat dan normal. Pengenalan bakteri komensal berbeda dibandingkan dengan bakteri patogen. Pengenalan ini banyak dilakukan oleh TLR, sehingga respon inflamasi yang timbul pada pengenalan bakteri komensal adalah inflamasi yang masih dalam homeostasis.^{6,7} Salah satu mekanisme yang penting dalam homeostasis sistem imun mukosa yang diduga dipengaruhi oleh probiotik adalah keseimbangan dari sitokin yang dihasilkan oleh sel Th1 dan Th2. Keseimbangan dari respons imun ini terjaga oleh mekanisme regulasi silang, dan sitokin yang dihasilkan oleh sel Tregulator (Treg), dimana sitokin ini penting dalam menjaga homeostasis mekanisme pengaturan imun dalam mencegah inflamasi mukosa yang berlebihan dan reaksi autoimun.⁸⁻¹² Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan proteksi probiotik pada ileum mencit yang terpajan LPS *Escherichia coli* melalui keseimbangan Th1-Th2-Treg.

Simpulan: Proteksi probiotik pada mukosa ileum yang terpajan LPS *Escherichia coli* terjadi secara anatomi dan imunologi.

METODE

Subyek penelitian

Penelitian ini merupakan uji eksperimental menggunakan subyek penelitian mencit putih dari galur *Mus musculus (Balb/c mice)* yang berumur 10-12 minggu dengan berat badan per ekor antara 30-40 gram dan berjenis kelamin jantan yang dibagi menjadi dua kelompok secara acak. Unit analisis yang diperiksa dalam penelitian ini adalah ileum mencit Balb/c.

Bahan penelitian

Probiotik yang dipakai dari jenis *Mix bacteria/Multi species* dengan komposisi *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacteria breve*, *Bifidobacteria infantis*, dan *Streptococcus thermophilus*. Probiotik diberikan dengan dosis 10⁹/kgBB/hari sehingga setiap mencit akan mendapatkan dosis rata-rata 3x10⁷. Proses pengemasan ulang dilakukan dengan bantuan Bagian Produksi Instalasi Farmasi RSUD Dr. Soetomo Surabaya dalam bentuk *sachet aluminium foil*.

Lipopolisakarida (LPS) yang dipakai adalah LPS dari kuman *Escherichia coli* serotype 055:B5. LPS diberikan dengan dosis 250 µg/kgBB, sehingga setiap mencit akan mendapatkan dosis rata-rata 7,5 µg. LPS ini diencerkan dengan NaCl 0,9% dengan perbandingan 10:1, dan diberikan melalui sonde lambung.

Perlakuan

Enam belas ekor mencit dilakukan randomisasi menjadi 2 kelompok, masing-masing terdiri dari 8 mencit. Kelompok perlakuan diberikan probiotik selama 14 hari, pada hari ke-15 diberikan LPS, dan pada hari ke-16 sampai 21 kembali diberikan probiotik. Kelompok plasebo diberikan plasebo selama 14 hari, diberikan LPS pada hari ke-15, dan kembali diberikan plasebo sampai hari ke-21. Seluruh mencit dinekropsi pada hari ke-22, dan diambil jaringan ileum.

Imunohistokimia

Pengecatan imunohistokimia dilakukan melihat ekspresi sel penghasil sitokin IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 dan TGF-β di jaringan ileum. Pengecatan dilakukan di Laboratorium Patobiologi Gramik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Pada tiap sayatan dihitung jumlah sel yang menghasilkan sitokin-sitokin tersebut.

Mikroskop elektron

Scanning electron microscope (SEM) dilakukan pada jaringan ileum mencit untuk melihat kondisi mukosa ileum. SEM dilakukan di UPT Mikroskopi Elektron Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Analisis statistik

Analisis statistik yang digunakan adalah analisis multivariat untuk menganalisis pengaruh pemberian probiotik atau LPS terhadap perubahan ekspresi sel-sel penghasil sitokin dari respons Th1, Th2, dan Treg pada mukosa usus. Agar nilai ekspresi sel penghasil masing-masing sitokin dapat dibandingkan, maka dilakukan *mean rank* pada masing-masing sitokin dan kemudian dibandingkan dan dibuat gambar keseimbangan.

HASIL

Selama penelitian berlangsung tidak didapatkan efek samping dan komplikasi karena perawatan dan pemberian materi penelitian yang meliputi tanda-tanda klinis penting seperti perubahan perilaku hewan (perubahan pola makan/minum, aktivitas hewan),

penurunan berat badan, pola nafas, diare, muntah, dan sebagainya. Tabel 1 menunjukkan karakteristik kelompok.

Tabel 1. Karakteristik kelompok

	Kelompok probiotik-LPS	Kelompok LPS
n	8 ekor	8 ekor
Jenis kelamin	Jantan	Jantan
Umur (mg)	10-12	10-12
Rerata (SB) BB awal (g)	31,62 (1,59)	33,87 (3,27)
Rerata (SB) BB akhir (g)	34,50 (1,19)	35,62 (3,20)

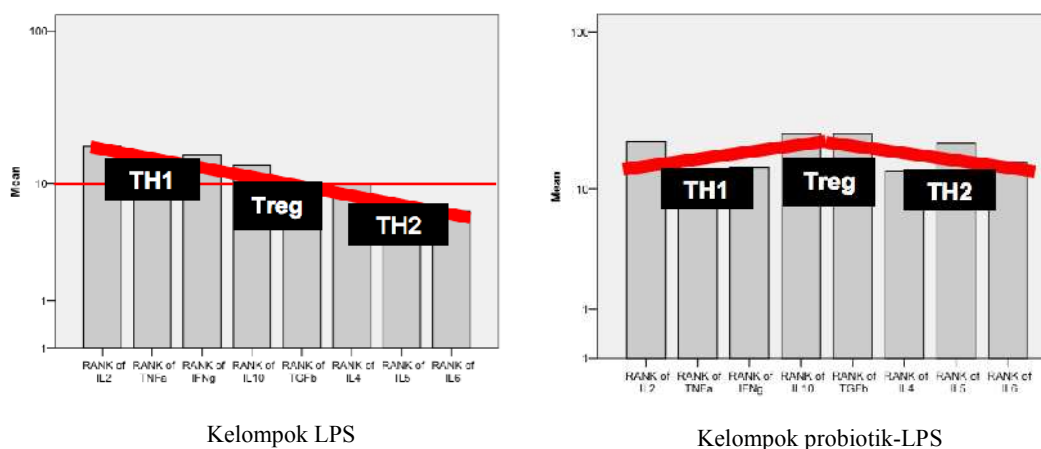
Pada pemeriksaan imunohistokimia, dapat terlihat profil sitokin yang dihasilkan oleh respon imun mukosa usus. Tabel 2 di bawah ini menunjukkan bahwa pada kelompok probiotik-LPS didapatkan perbedaan bermakna jumlah penghasil sitokin IL-5 (p=0,022), IL-6 (p=0,050) yang merupakan cerminan respons dari sel Th2 dan jumlah sel penghasil sitokin TGF-β (p=0,036) yang merupakan cerminan respons sel Treg yang lebih tinggi secara bermakna dibandingkan kelompok LPS, namun tidak bermakna pada respons imun sel Th1.

Tabel 2. Perbandingan jumlah sel penghasil sitokin dari sel Th1, Th2, dan Treg antara kelompok probiotik-LPS dan kelompok LPS

Sel	Sitokin	Probiotik-LPS	LPS	P
Th1	IL-2	113,25 (50,89)	103,50 (50,83)	0,692
	TNF-α	21,62 (7,90)	21,50 (5,75)	0,971
	IFN-γ	61,25 (57,42)	61,50 (36,68)	0,991
Th2	IL-4	67,62 (20,92)	68,75 (15,00)	0,939
	IL-5	54,25 (18,79)	24,87 (9,50)	0,002*
	IL-6	27,25 (11,73)	16,25 (4,77)	0,050*
Treg	IL-10	61,75 (23,08)	36,75 (31,25)	0,136
	TGF-β	13,62 (7,89)	6,25 (1,16)	0,036*

Nilai ini adalah jumlah sel penghasil sitokin pada tiap sayatan

* Perbedaan bermakna pada nilai p<0,05



Gambar 1. Profil keseimbangan respons Th1, Th2 dan Treg pada kelompok LPS dan kelompok probiotik-LPS

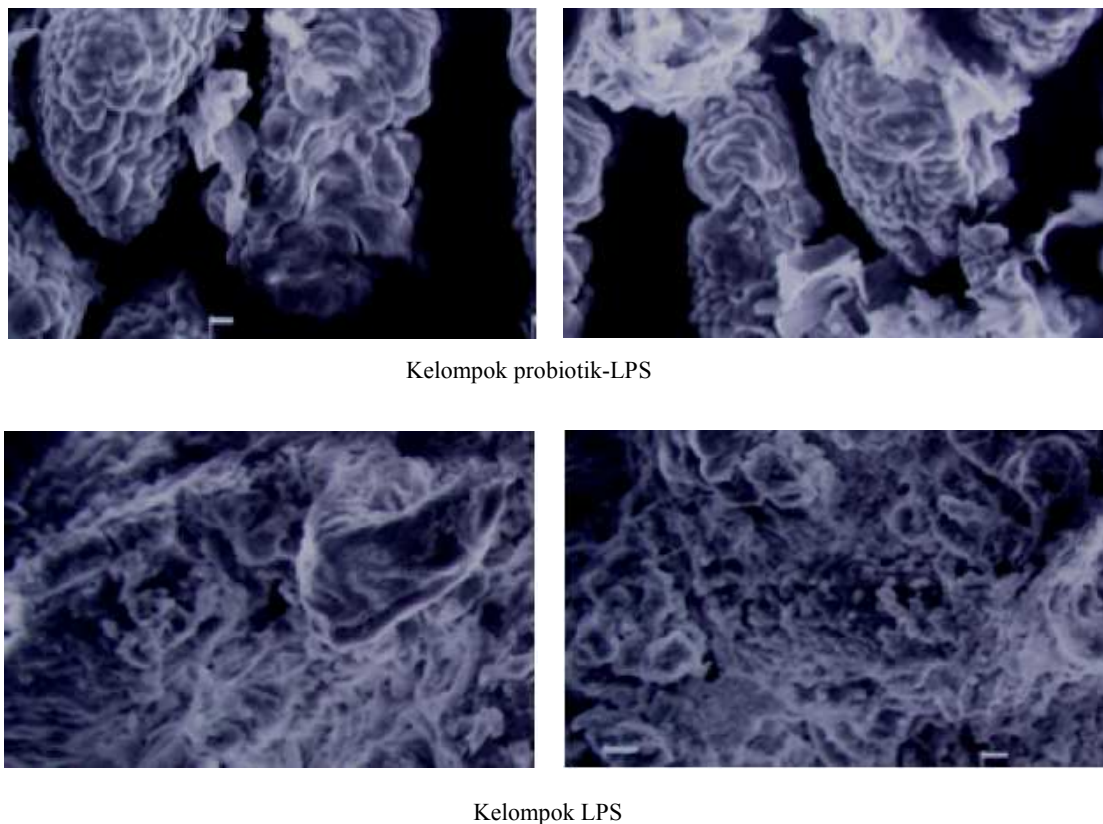
Untuk memberikan gambaran perbedaan profil imunologis dalam aspek keseimbangan sel Th1-Treg-Th2 yang dicerminkan dari sel penghasil sitokinnya, maka disusun dalam bentuk diagram batang yang mencerminkan posisi relatif masing-masing sel penghasil sitokin terhadap sel penghasil sitokin lainnya dalam satu kelompok. Untuk mendapatkan kesetaraan data antar sel penghasil sitokin ini, maka variabel dari tiap-tiap sel penghasil sitokin ini akan diurutkan berdasarkan *ranking* data. Proses pengurutan data ini pada prinsipnya adalah menggantikan rerata dengan titik tengah (*median*). *Ranking* tiap-tiap sel penghasil sitokin menjadi dasar penyusunan grafik profil imunologis dari kelompok LPS dan kelompok probiotik-LPS.

Pemberian LPS sebagai model infeksi (dari bakteri gram negatif) pada mencit sehat menimbulkan peningkatan respons Th1 dan penurunan respons Th2. Secara profil keseimbangan imunologis menunjukkan dominasi respons Th1. Pengaruh terhadap respons Treg hampir tidak didapatkan, bahkan respons dari Treg cenderung lebih rendah pada kelompok LPS ini. Pada kelompok yang sudah mendapat probiotik dan kemudian terpajan LPS (kelompok probiotik-LPS), dominasi respon Th1 tidak terlihat lagi dan menimbulkan dominasi Treg pada kelompok ini. Posisi Th1 dan Th2 masih dapat dipertahankan secara seimbang.

Gambar 2 menunjukkan bahwa pada pemeriksaan *scanning electron microscope* (SEM) terdapat kerusakan struktur mukosa ileum mencit pada kelompok yang mendapatkan LPS dibandingkan dengan kelompok mencit probiotik-LPS.

PEMBAHASAN

Penelitian ini ditujukan untuk membuktikan efek proteksi probiotik pada ileum mencit Balb/c yang terpajan LPS *Escherichia coli*. Mencit Balb/c yang dipakai pada penelitian ini mempunyai bias genetik ke arah respons Th2. Beberapa strain mencit B10D2, C3H/HeJ, C57BL/6 mempunyai kecenderungan bias genetik ke arah respons Th1.^{13,14} Kelompok LPS pada penelitian ini merupakan model yang menggambarkan suatu perjalanan alamiah bila individu mendapatkan paparan patogen, dalam hal ini mencit coba mendapat perlakuan pemberian LPS. Pemberian LPS peroral dapat meningkatkan respons inflamasi, merangsang pembentukan sitokin proinflamasi, dan menstimulasi keseimbangan ke arah respons sel Th1.¹⁵⁻¹⁷ LPS merupakan salah satu komponen bakteri gram negatif yang sering dipakai untuk percobaan imunologis untuk menggambarkan proses infeksi, yang sering digunakan adalah kelompok yang berasal dari *Eshericia coli*.¹⁸



Gambar 2. *Scanning electron microscope* pada mukosa ileum mencit pada kelompok LPS dan kelompok probiotik-LPS

Profil imunologis yang didapatkan pada kelompok LPS (Gambar 1) adalah adanya peningkatan respons Th1 dan penurunan respons Th2. Pemberian LPS merubah keseimbangan Th1-Th2 yang ada pada mencit Balb/c sehat yang cenderung ke arah dominasi Th2. Diferensiasi sel Th0 menjadi efektor sel Th1 maupun Th2 dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain rangsangan suatu APC, lingkungan sitokin di sekitarnya, cara antigen masuk, dan dosis antigen.¹⁹ Reaksi inflamasi akibat adanya patogen dapat menyebabkan ketidakseimbangan respons Th1-Treg-Th2. Kejadian infeksi pada manusia dan mencit terutama terarah pada diferensiasi respons imun ke arah respons sel Th1, karena sel Th1 menghasilkan sitokin yang berfungsi sebagai respons inflamasi dan aktivasi sel T sitotoksik.^{19,20}

Profil imunologis kelompok probiotik-LPS (Gambar 1), menunjukkan dominasi ke arah respons sel Treg. Peningkatan respons sel Treg setelah pemberian probiotik memiliki makna yang sangat penting. Sitokin yang dihasilkan sel Treg berperan dalam toleransi dan keseimbangan imunitas. Adanya sel Treg dan sitokin yang dihasilkannya (IL-10, TGF- β) dapat melindungi permukaan mukosa terhadap respons inflamasi yang destruktif. Defisiensi sitokin ini menyebabkan inflamasi yang tidak terkontrol di permukaan mukosa. TGF- β sering dihasilkan pada keadaan *turnover* seluler yang tinggi, dan sebagai regulator dengan fungsinya menghambat aktivitas makrofag yang berlebihan, mengatur proliferasi dan diferensiasi efektor sel T, memicu proliferasi dan aktivasi sel B, mengatur produksi sitokin oleh *Natural Killer cell*, *switching* IgA, serta mengatur kemotaksis leukosit. TGF- β merupakan sitokin utama (*primary suppressor cell*) yang lebih penting dalam menjalankan fungsi Treg. Studi probiotik *bifidobacterium infantis* memberikan efek imunomodulasi yang tidak tergantung dari IL-10, namun fungsi Treg dalam menekan respons inflamasi pada gastrointestinal tetap dapat dipertahankan, kemungkinan hal tersebut merupakan peran TGF- β .²¹ Peneliti lain menyatakan bahwa sitokin IL-10 lebih berperan dalam keadaan yang didominasi oleh respons Th1, dalam menggeser keseimbangan ke arah respons Th2.²² Kadar TGF- β yang rendah selain mengganggu sistem imun juga dapat mengganggu perkembangan mikroflora di usus.^{19,23,24} Bukti lain menunjukkan bahwa respons sel Treg yang meningkat setelah pemberian probiotik tidak hanya mengatur keseimbangan Th1-Th2, namun juga mengatur sel efektor Th1 dan Th2.²⁵

Sitokin-sitokin yang dihasilkan kelompok probiotik-LPS dibandingkan dengan kelompok LPS (Tabel 1) mempunyai perbedaan bermakna pada nilai sel penghasil sitokin IL-5, IL-6 (cerminan respon sel Th2)

dan nilai TGF- β (cerminan respon sel Treg), sedangkan pada respons sel Th1 tidak didapatkan perbedaan yang bermakna. Hasil tersebut menunjukkan tidak didapatkan lagi dominasi respons sel Th1 seperti yang ditunjukkan pada kelompok LPS. Pada kelompok Probiotik-LPS ini, respons Th1 yang meninggi oleh karena pemberian LPS tidak akan menyebabkan keadaan yang patologis bila diimbangi oleh respons Th2 dan Treg yang juga meningkat, sehingga terbentuk keseimbangan Th1-Th2 pada level yang baru. Pada percobaan lain juga disebutkan bahwa pemberian LPS akan merangsang respons Th1 namun tidak mengontrol pengaturan sekresi oleh sel Th2. Probiotik membantu memodifikasi respons imun dengan mengimbangi melalui peningkatan respons IL-4 dari sel Th2.²⁶

Proteksi probiotik secara imunologis sejalan dengan kondisi anatomis mukosa ileum pada pemeriksaan *scanning electron microscope* (SEM). Kerusakan struktur mukosa ileum mencit terjadi pada kelompok yang mendapatkan LPS dibandingkan dengan kelompok mencit probiotik-LPS. Nan Li. dkk. dalam studinya menggunakan LPS *Escherichia coli* O127:B8 untuk menginduksi kerusakan mukosa ileum²⁷, hal ini serupa dengan yang kami dapatkan dari penelitian ini bahwa pada pemberian LPS *Escherichia coli* O55:B5 juga terdapat kerusakan struktur mukosa ileum. Pemberian probiotik sebelum terpajan LPS melindungi kerusakan struktur mukosa ileum. Hal ini membuktikan pada kelompok probiotik-LPS yang tidak terjadi kerusakan struktur mukosa ileum terdapat proteksi probiotik melalui keseimbangan Th1-Th2-Treg.

SIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini adalah terdapat proteksi probiotik pada mukosa ileum mencit yang terpajan LPS *Escherichia coli* secara imunologis melalui keseimbangan Th1-Th2-Treg dan secara anatomis. Penelitian ini merupakan salah satu landasan ilmiah untuk melakukan penelitian klinis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Flores AR, Szilagyi PG, Auinger P, Fisher SG. Estimated burden of rotavirus-associated diarrhea in ambulatory settings in the United States. *Pediatrics*. 2010;125:e191-8.
2. Data IRNA Anak RSU Dr. Soetomo, 2010.
3. Grimwood K, Forbes DA. Acute and persistent diarrhea. *Pediatr Clin North Am*. 2009;56(6):1343-61.
4. Corthesy B, Gaskins HR, Mercenier A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J. Nutr*. 2007;137:781S-790S.
5. López P, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A. Distinct bifidobacterium strains drive different immune

- responses in vitro. *Int. J. Food Microbiology* 2010;138:157-65.
6. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Host interaction of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Microbiology* 2010;8:171-84.
 7. Sansonetti PJ. To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question. *Mucosal Immunology* 2011;4(1):8-14.
 8. Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobbato N. Probiotic bacteria for humans: clinical systems for evaluation of effectiveness. *J Dairy Sci.* 1995;78:1597-1606.
 9. Perdigon G, Fuller R, Raya R. Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2001;2:27-42.
 10. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology.* 6th ed. Edinburgh: Mosby; 2001;15-45.
 11. Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature Med.* 2002;8:567-73.
 12. Fujihashi K, McGhee JR. Th1/Th2/Th3 cells for regulation of mucosal immunity, tolerance, and inflammation. In: Mestecky J, Lam ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR, Mayer L. *Mucosal Immunology*, 3rd ed. London: Elsevier Academic; 2005;539-55.
 13. Weid T, Bulliard C, Schiffrin EJ. Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4⁺ T cell with low proliferative capacity that produce transforming growth factor- β and interleukin-10. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001;8:695-701.
 14. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol.* 2004;172:2731-8.
 15. Ronco J, Guy B. Adjuvants for mucosal vaccines. In: Fuller R, Perdigon G, Eds. *Probiotics 3: Immunomodulation by the Gut Microflora and Probiotics.* London: Kluwer Academic Publisher; 2000; 29-68.
 16. Alexander C, Rietschel E. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin.* 2001;7:167-200.
 17. Perdigon G, Galdeano CM, Valdez JC, Medici M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56:S21-S26.
 18. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2003;67:593-656.
 19. Mills KH, McGuirk P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. *Semin. Immunol.* 2004;16(2):107-17.
 20. Erickson KL, Hubbardne. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J. Nutr.* 2000; 130:403S-409S.
 21. Sheil B, MacSharry J, O'Callaghan L, O'Riordan A, Waters A, Morgan J, et al. Role of interleukin (IL-10) in probiotic-mediated immune modulation: an assessment in wild-type and IL-10 knock-out mice. *Clin. Exp. Immunol.* 2006;144(2):273-80.
 22. Blum S, Schiffrin EJ. Intestinal microflora and homeostasis of the mucosal immune response: implications for probiotic bacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2003;4:53-60.
 23. Maasen CBM, Laman JD, Boersma WJA, Claassen E. Modulation of cytokine expression by lactobacilli and its possible therapeutic use. In: Fuller R, Perdigon G, Eds. *Probiotics 3. Immunomodulation by the gut microflora and probiotics.* London: Kluwer Academic Publisher; 2000:176-92.
 24. Lan RY, Mackay IR, Gershwin ME. Regulatory T cells in the prevention of mucosal inflammatory diseases: patrolling the border. *J. Autoimmun.* 2007;29:272-80.
 25. Rook GAW, Brunet LR. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut* 2005;54(3):317-20.
 26. Vaarala O. Immunological effects of probiotics with special reference to lactobacilli. *Clin. Exp. Allergy.* 2003;33:1634-40.
 27. Nan Li, Kellym L, Mao ZF, Don S, Patricia L, Roshan P, et al. Glutamine decreases lipopolysaccharide-induced intestinal inflammation in infant rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286:G914-G921.