

**UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu**

**Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt**



**Mgr inż. Patrycja Wróblewska**

**LAKTOFERMENTOWANE WYSŁODKI BURACZANE  
JAKO CZYNNIK UWRAŻLIWIAJĄCY NA INSULINĘ  
KONIE Z SYNDROMEM METABOLICZNYM EMS**

LACTOFERMENTED SUGAR BEET PULP AS AN INSULIN  
SENSITIZING FACTOR IN HORSES WITH METABOLIC  
SYNDROME EMS

**Rozprawa doktorska**

Promotor pracy:

**dr hab. inż. Andrzej Wiliczek, prof. uczelni**

**Wrocław, 2023**

*Składam serdeczne podziękowania promotorowi Panu Profesorowi Andrzejowi Wiliczkiwiczowi za opiekę, życzliwość oraz pomoc w opracowaniu niniejszej rozprawy doktorskiej.*

-

*Serdecznie dziękuję Panu Profesorowi Krzysztofowi Maryczowi za wszelką pomoc, cenne uwagi i wskazówki oraz umożliwienie przeprowadzenia badań molekularnych i cytobiologicznych. Dziękuję także całemu zespołowi Międzynarodowego Instytutu Medycyny Translacyjnej za pomoc w realizacji badań.*

-

*Pragnę również podziękować Panu Profesorowi Mariuszowi Korczyńskiemu za pomoc merytoryczną i poświęcony czas przy redagowaniu pracy. Dziękuję także całemu zespołowi Katedry Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa za życzliwość oraz miłą atmosferę podczas realizacji tej pracy.*

*Pracę dedykuje mojej Rodzinie.  
Dziękuję Wam za Wasze wsparcie, motywację,  
zrozumienie i to, że zawsze we mnie wierzyliście.  
To dzięki Wam, dotarłam tu, gdzie jestem.  
Dziękuję także mojemu dziadkowi Władkowi,  
który zaszczepił we mnie miłość do koni.*

# SPIS TREŚCI

<b>OBJAŚNIENIE ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW .....</b>	<b>7</b>
<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>1. WPROWADZENIE .....</b>	<b>14</b>
<b>2. PRZEGLĄD LITERATURY .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Zespół metaboliczny u koni .....</b>	<b>15</b>
2.1.2. Otyłość w EMS .....	16
2.1.2.1. Tkanka tłuszczowa w otyłości .....	16
2.1.3 Insulinooporność .....	18
2.1.4. Ochwat .....	19
<b>2.2. Zastosowanie probiotyków i prebiotyków w żywieniu koni.....</b>	<b>20</b>
2.2.1. Probiotyki .....	20
2.2.2. Prebiotyki.....	22
<b>2.3. Wysłodki buraczane jako źródło prebiotyku.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4. Laktofermentacja żywności.....</b>	<b>25</b>
<b>3. CELE PRACY .....</b>	<b>28</b>
<b>4. MATERIAŁY i METODY .....</b>	<b>28</b>
4.1. Przygotowanie inokulum mikrobiologicznego.....	28
4.1.2. Proces laktofermentacji wysłodków buraczanych .....	29
4.2. Analiza chemiczna biomasy z wysłodków buraczanych.....	29
4.3. Aktywność przeciwnadkwasotwórcza oraz całkowita zawartość polifenoli .....	30
4.3.1. Odczynniki i standardy .....	30
4.4. Związki polifenolowe i pojemność przeciwutleniająca.....	30
4.4.1 Procedura ekstrakcji.....	30
4.4.2. Całkowita zawartość związków polifenolowych.....	30
4.4.3. Zdolność antyoksydacyjna.....	30
4.5. Oznaczanie ilościowe sacharozy w biomacie z wysłodków buraczanych .....	31
4.5.1. Przygotowanie próbek do analiz .....	31
4.5.2. Analiza NMR.....	31
4.5.3. Profilowanie węglowodanów.....	32
4.6. Oznaczanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (KKT) .....	33
4.7. Badania molekularne i cytobiologiczne .....	33

4.7.1. Izolacja komórek ASC pochodzących od koni .....	33
4.7.2. Hodowla komórkowa ASC .....	34
4.7.3. Przygotowanie ekstraktów z fermentowanych wysłodków buraczanych.....	34
4.7.4. Model eksperymentalny.....	34
4.7.5. Właściwości proliferacyjne komórek ASC.....	35
4.7.6. Aktywność $\beta$ - galaktozydazy .....	36
4.7.7. Barwienie immunofluorescencyjne .....	36
4.7.8. Barwienie organelli .....	37
4.7.9. Analiza ekspresji genów (qRT- PCR).....	37
4.7.10. Cytometria mikrokapilarna .....	40
4.8. Analiza statystyczna .....	41
<b>5. OMÓWIENIE WYNIKÓW .....</b>	<b>42</b>
5.1. Analiza fizyko- chemiczna fermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych ...	42
5.1.1. Zmiany wartości pH w biomacie z fermentowanych wysłodków buraczanych w zależności od czasu fermentacji .....	42
5.1.2. Skład chemiczny biomasy z laktofermentowanych wysłodków buraczanych ..	44
5.1.3. Całkowita zawartość polifenoli oraz właściwości antyoksydacyjne .....	47
5.1.4. Analiza węglowodanów niestrukturalnych (NSC) .....	53
5.1.4.1. Oznaczanie sacharozy .....	53
5.1.4.2. Profilowanie węglowodanów .....	55
5.1.5. Koncentracja krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w biomacie z wysłodków buraczanych .....	57
5.2. Badania molekularne i cytobiologiczne komórek ASC z dodatkiem ekstraktów z wysłodków buraczanych.....	62
5.2.1. Test żywotności komórek .....	62
5.2.2. Ekstrakty z LR promują proliferację progenitorowych komórek ASC .....	64
5.2.2.1. Test migracji komórek ASC.....	64
5.2.2.2. Test klonogeny .....	66
5.2.2.3. Czas podwojenia populacji (PDT) .....	67
5.2.2.4. Barwienie immunofluorescencyjne dla markerów proliferacji .....	69
5.2.3. Wpływ ekstraktu z udziałem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> na morfologię komórki	71
5.2.4. Ekspresja mikroRNA związanych z proliferacją komórek.....	73
5.2.5 Zmiany w ekspresji genów związanych z apoptozą .....	74
5.2.5.1. Zmiany ekspresji genów metodą RT- qPCR.....	74

5.2.5.2. Wizualizacja aktywnej kaspazy-3 .....	81
5.2.6. Wykrywanie apoptozy za pomocą testu Aneksyny V .....	83
5.2.7. Wpływ ekstraktów z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> na potencjał błon mitochondrialnych .....	85
5.2.8. Wizualizacja cytochromu c .....	88
5.2.9. Wpływ laktofermentownego ekstraktu z wysłodków buraczanych na starzenie się komórek .....	90
5.2.10. Wpływ ekstraktów na cytokiny pro- i przeciwzapalne .....	92
5.2.11. Wizualizacja aktywnej interleukiny (IL) -1 $\beta$ w komórkach ASC .....	101
5.2.12. MikroRNA w insulinooporności .....	102
5.2.13. Zmiany ekspresji genów związanych z insulinoopornością .....	105
5.2.14. Stres oksydacyjny .....	108
<b>6. DYSKUSJA .....</b>	<b>114</b>
6.1. Laktofementacja wysłodków buraczanych wpływa na poprawę parametrów chemicznych .....	114
6.2. Efekt zastosowania laktofermentowanych wysłodków buraczanych na komórki progenitorowe pochodzące z tkanki tłuszczowej koni (ASC) .....	122
<b>7. PODSUMOWANIE .....</b>	<b>130</b>
<b>8. PIŚMIENNICTWO .....</b>	<b>131</b>
<b>9. SPIS TABEL .....</b>	<b>156</b>
<b>10. SPIS WYKRESÓW .....</b>	<b>156</b>
<b>11. SPIS RYCIN .....</b>	<b>164</b>

## OBJAŚNIENIE ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW

- ABTS – 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)
- ADF – włókno kwaśno detergentowe (*ang.* acid detergent fiber)
- ANOVA – analiza wariancji
- ASC – komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (*ang.* Adipose- derived Stem Cells)
- BAD – antagonistą śmierci komórkowej związany z Bcl-2 (*ang.* Bcl-2 agonist of cell death)
- BAK – homologiczny antagonistą/zabójcą BCL2 (*ang.* Bcl-2 homologous antagonist killer)
- BAW – związki bezazotowe wyciągowe
- BAX – białko X związane z Bcl- 2 (*ang.* Bcl-2-associated X protein)
- BCL2 – chłoniak z komórek B2 (*ang.* B-cell lymphoma-2)
- BH3 – domena białek proapoptotycznych
- BO – białko ogólne
- CASP – kaspaza (*ang.* caspase)
- CAT – katalaza (*ang.* catalase)
- cDNA – komplementarny DNA
- CFU-F – jednostki tworzące kolonie fibroblastów (*ang.* colony forming unit – fibroblast)
- CTRL – grupa kontrolna
- Cyt c – cytochrom c
- DAPI – 4',6-diamidyno-2-fenylindol
- DEPC – woda DEPC (*ang.* DEPC-Treated Water)
- DMSO – dimetylosulfotlenek
- DPPH – 2,2-difenyl-1-pikrylohydrazyl
- FBS - płodowa surowica bydlęca (*ang.* Fetal Bovine Serum)
- EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy (*ang.* ethylenediaminetetraacetic acid)
- EMS – syndrom metaboliczny u koni (*ang.* Equine metabolic syndrome)
- ER – retikulum endoplazmatyczne (*ang.* endoplasmic reticulum)
- FRAP – metoda oparta na redukcji kompleksu Fe (III) (*ang.* Ferric reducing antioxidant power)
- GI – indeks glikemiczny (*ang.* glycemic index)
- GLUT 4 – transporter glukozy typu 4 (*ang.* Glucose transporter type 4)

GPx – peroksydaza glutationowa (*ang.* Glutathione peroxidase)

GRAS – powszechnie uważane za bezpieczne (*ang.* Generally recognized as Safe)

HBSS - zrównoważony roztwór soli Hanksa (*ang.* Hanks' Balanced Salt Solution)

IL – interleukina

IR – insulinooporność (*ang.* Insulin resistance)

IRS – substrat receptora insuliny (*ang.* Insulin receptor substrate)

INSR – receptor insuliny (*ang.* Insulin receptor)

Ki- 67 – antygen Ki-67 – marker proliferacji komórkowej

KKT – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe

LAB – bakterie kwasu mlekowego (*ang.* Lactic acid bacteria)

LR – *Lactobacillus rhamnosus*

LZO – lotne związki organiczne

MAPK - kinaza aktywowana mitogenami (*ang.* mitogen activated protein kinases)

MetS – syndrom metaboliczny (*ang.* Metabolic syndrome)

miR – MikroRNA

MSC – Mezenchymalne komórki macierzyste (*ang.* Mesenchymal stem cells)

NSC – węglowodany niestrukturalne (*ang.* Non-structural carbohydrates)

NDF - włókno neutralno- detergentowe (*ang.* Neutral detergent fiber)

NMR – Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (*ang.* Magnetic Resonance Imaging)

PA – *Pediococcus acidilactici*

PBS – roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym (*ang.* Phosphate Buffered Saline)

PFA – paraformaldehyd (*ang.* paraformaldehyde)

PI3K - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (*ang.* phosphatidyl inositol 3-kinase)

P21 – inhibitor kinaz cyklinozależnych

P53 – czynnik supresorowy guza

PDT – czas podwojenia populacji (*ang.* population doubling time)

RNA – kwas rybonukleinowy

ROS – reaktywne formy tlenu (*ang.* reactive oxygen species)

SA- Beta- galaktozydaza – (*ang.* SA- beta-galactosidase)

SOD1 – dysmutaza ponadtlenkowa komórkowa (*ang.* cellular superoxide dismutase)



SOD2 – dysmutaza ponadtlenkowa mitochondrialna (*ang.* mitochondrial superoxide dismutase)

TGF $\beta$  – transformujący czynnik wzrostu  $\beta$  (*ang.* lymphotoxin-alpha)

TNF $\alpha$  – czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (*ang.* tumor necrosis factor  $\alpha$ )

TUN – tunikamycyna

WAT – biała tkanka tłuszczowa (*ang.* White adipose tissue)

WS – włókno surowe

## STRESZCZENIE

Zespół metaboliczny u koni (EMS z ang. Equine Metabolic Syndrome) jest chorobą endokrynologiczną, której patogenezą związana jest z opornością na insulinę (IR), otyłością, nieprawidłowym odkładaniem tkanki tłuszczowej w specyficznych miejscach, przewlekłym lub przebyłym ochwatem oraz miejscowym i/ lub ogólnoustrojowym stanem zapalnym. Obecnie, coraz większe zainteresowanie znajduje żywność laktofermentowana, która zawiera dobroczynne bakterie, określane, jako naturalne probiotyki. Wykazano, że niektóre szczepy z rodzaju *Lactobacillus spp.* promują szereg działań prozdrowotnych, w tym wykazują właściwości przeciwcukrzycowe poprzez zwiększenie wrażliwości tkanek na insulinę.

Celem przeprowadzonych badań było w pierwszym etapie określenie wpływu fermentacji wysłodków buraczanych bez dodatku mikroorganizmów probiotycznych oraz z udziałem heterogenicznych szczepów bakterii probiotycznych *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* na skład chemiczny, wartość pH, a także całkowitą zawartość polifenoli wraz z określeniem aktywności antyoksydacyjnej metodą DPPH, FRAP i ABTS. Ponadto w materiałach fermentacyjnych określono zawartość krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (KKT) oraz węglowodanów prostych z wyodrębnieniem sacharozy. Suche melasowane wysłodki buraczane w formie pelletu, poddano fermentacji według schematu: fermentowane wysłodki buraczane bez dodatku mikroorganizmów probiotycznych (CTRL - kontrola), laktofermentowane wysłodki buraczane z dodatkiem szczepu *Lactobacillus rhamnosus* (LR) i laktofermentowane wysłodki buraczane z dodatkiem szczepu *Pediococcus acidilactici* (PA). Proces fermentacji obejmował okres sześciu dni - w każdym dniu pobrana została próba fermentowanego materiału do dalszych analiz.

Analiza składu chemicznego oraz KKT została przeprowadzona w materiale świeżym oraz podsuszonym. Całkowitą zawartość polifenoli, aktywność przeciwutleniającą oraz zawartość cukrów prostych analizowano w materiale podsuszonym.

W przeprowadzonym badaniu wykazano pozytywny wpływ zastosowania szczepów bakterii probiotycznych na właściwości fizyko-chemiczne biomasy z wysłodków buraczanych w porównaniu do wysłodków buraczanych fermentowanych w sposób spontaniczny. Na szczególną uwagę zasługuje szczep *Lactobacillus rhamnosus*. Fermentacja prowadzona z jego udziałem charakteryzowała się najkorzystniejszym profilem, zarówno pod kątem składników odżywczych, krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, całkowitą zawartością polifenoli, właściwościami przeciwutleniającymi oraz redukcją cukrów prostych.

W związku z otrzymanymi wynikami, do dalszych badań molekularnych i cytobiologicznych wybrano szczep probiotyczny *Lactobacillus rhamnosus*.

Dodatkowo celem pracy była ocena wpływu fermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL) i laktofermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych z dodatkiem szczepu probiotycznego *Lactobacillus rhamnosus* w badaniach *in vitro* na komórkach progenitorowych (ASC) tkanki tłuszczowej pobranej od koni. Badania molekularne i cytobiologiczne obejmowały określenie aktywności migracyjnej, żywotności i tempa proliferacji, apoptozy, markera starzenia się komórek, stresu oksydacyjnego i dynamiki mitochondriów komórek ASC. Ponadto określono ekspresję genów pro- i przeciwzapalnych, genów związanych z insulinoopornością, a także ekspresję miRNA. Przeprowadzono także barwienie immunofluorescencyjne dla markera Ki-67, cytokiny prozapalnej IL1 $\beta$  oraz kaspazy 3. Morfologię komórek ASC wizualizowano za pomocą barwienia fluorescencyjnego.

W toku przeprowadzonych badań *in vitro* wykazano, że ekstrakty pobrane z laktofermentacji wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* wpływają na zwiększone tempo migracji, proliferacji, wykazują wyższy potencjał klonogeny i krótszy czas podwojenia populacji w porównaniu do fermentacji wysłodków buraczanych bez udziału szczepu probiotycznego. Hodowanie komórek ASC w obecności ekstraktów z *Lactobacillus rhamnosus* wpłynęło na obniżenie stanu zapalnego oraz ekspresję genów związanych z apoptozą. Dodatkowo związki te wykazały pozytywny wpływ na dynamikę mitochondriów. Zastosowanie ekstraktów z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* spowodowało zmniejszenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) oraz poprawę ekspresji SOD2, który odpowiedzialny jest za ochronę komórek przed apoptozą mitochondrialną.

Podsumowując, ekstrakty z laktofermentowanych wysłodków buraczanych z dodatkiem szczepu probiotycznego *Lactobacillus rhamnosus* wpłynęły na poprawę walorów odżywczych fermentowanej biomasy. Ponadto badania na komórkach ASC potwierdziły, że laktofermentowane wysłodki buraczane mogą stanowić narzędzie terapeutyczne w przeciwdziałaniu wystąpienia syndromu metabolicznego u koni.

## ABSTRACT

The equine metabolic syndrome (EMS) is an endocrine disease whose pathogenesis is related to insulin resistance (IR), obesity, abnormal fatty tissue deposition at specific spots, chronic or past laminitis, and local and / or systemic inflammation. Currently, more and more interest is found in lactofermented foods that contain beneficial bacteria, referred to as natural probiotics. It has been shown that some LAB strains of the genus *Lactobacillus spp.* conduce to a number of pro-health activities, including antidiabetic properties by increasing the sensitivity of tissues to insulin.

The aim of the research in the first stage was to determine the effect of sugar beet pulp fermentation without the addition of probiotic microorganisms and with the participation of heterogeneous strains probiotic bacteria of *Lactobacillus rhamnosus* and *Pediococcus acidilactici* on the chemical composition, pH values, as well as the total content of polyphenols along with antioxidant activity by DPPH, FRAP and ABTS methods. Moreover, the content of short-chain fatty acids (SCFA) and simple carbohydrates with the isolation of sucrose in the fermentation materials was determined. Dried molassed sugar beet pulp in the form of pellets, fermented according to the scheme: sugar beet pulp without the addition of probiotic microorganisms (CTRL), lactofermented sugar beet pulp with the addition of *Lactobacillus rhamnosus* (LR) and lactofermented sugar beet pulp with the addition of *Pediococcus acidilactici* (PA). The fermentation process lasted six days, on each day a sample of the fermented material was collected for further analysis.

The chemical composition and SCFA analysis was carried out in fresh and dried material. The total content of polyphenols, antioxidant activity and the content of simple sugars were detected in the dried material.

The study showed a positive effect of the use of probiotic bacteria strains on the physico-chemical properties of the biomass from beet pulp compared to spontaneously fermented sugar beet pulp. Particularly, the *Lactobacillus rhamnosu* strain is noteworthy. Fermentation carried out with its participation was characterized by the best profile, both in terms of nutrients, short-chain fatty acids, the total content of polyphenols and antioxidant properties and the reduction of simple sugars. Due to the obtained results, the *Lactobacillus rhamnosus* strain was selected for molecular testing.

In addition, the aim of the study was to evaluate the effect of fermented sugar beet pulp extracts without the addition of microorganisms (CTRL) and lactofermented beet pulp extracts with the addition of the *Lactobacillus rhamnosus* bacterial strain in in vitro tests on progenitor cells (ASC) of adipose tissue collected from horses. Molecular and cytobiological studies included determination of migratory activity, viability and proliferation rate, apoptosis, a marker of cell destruction, oxidative stress and the dynamics of ASC mitochondria. In addition, the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory genes and genes related to insulin resistance as well as miRNA expression were determined. Immunofluorescence staining was also performed for the marker Ki-67, the pro-inflammatory cytokine IL1 $\beta$  and the caspase 3. The morphology of ASC cells was visualized by fluorescent staining.

In the course of in vitro studies it was shown that the extracts taken from the fermentation of beet pulp with the addition of *Lactobacillus rhamnosus* increase the rate of migration, proliferation, and show a higher clonogenic potential and a shorter doubling time of the population. Culturing ASC cells with application of *Lactobacillus rhamnosus* extracts reduced inflammation and the expression of genes related to apoptosis. Additionally, these compounds had a positive effect on the dynamics of mitochondria. The use of extracts with the addition of *Lactobacillus rhamnosus* reduced reactive oxygen species (ROS) compared to control group and improved the expression of SOD2, which is responsible for protecting cells against mitochondrial apoptosis.

To summarize, extracts of lactofermented sugar beet pulp with the addition of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* improved the nutritional value of the fermented biomass. In addition, studies on ASC cells confirmed that lactofermented beet pulp can be a therapeutic tool in counteracting the occurrence of the metabolic syndrome in horses.

# 1. WPROWADZENIE

W ostatnich latach eskalacja zespołu metabolicznego u ludzi (MetS z ang. Metabolic Syndrome) stanowi istotny problem wśród populacji na całym świecie. Patogeneza syndromu metabolicznego związana jest głównie z czynnikami środowiskowymi, które obejmują zwiększone spożycie kalorii, przekraczające zapotrzebowanie metaboliczne organizmu, a także brak aktywności fizycznej (Matsuzawa i in. 2011; Pekgor i in. 2019). W następstwie czynniki te mogą prowadzić do przewlekłej otyłości, nadciśnienia tętniczego, insulinooporności oraz podwyższonego stężenia trójglicerydów we krwi (Blau i in. 2019). Jedną z poważniejszych chorób współczesnego świata nie dotyczy wyłącznie gatunku ludzkiego. Prewalencja syndromu metabolicznego coraz częściej spotykana jest także u koni (EMS z ang. Equine Metabolic Syndrome) (Patterson Rosa i in. 2020), co stanowi ogromne wyzwanie zarówno dla lekarzy weterynarii, jak i hodowców koni. Syndrom metaboliczny u koni jest chorobą endokrynologiczną, której patogeneza związana jest z insulinoopornością (IR), otyłością centralną i/lub regionalną, a także przebytym lub aktualnym ochwatem (Frank i in. 2011). Przyczyny wystąpienia tej jednostki chorobowej u koni, podobnie jak u ludzi, związane są z predyspozycjami osobniczymi, a także nieprawidłowym zarządzaniem dietą tych zwierząt. Za główny czynnik żywieniowy prowadzący do EMS uważane jest przekroczenie ilości energii w dawce pokarmowej, a także przekarmianie koni węglowodanami niestrukturalnymi (NSC z ang. Non- structural carbohydrates) (Marycz i in. 2018). W związku z tym, że EMS należy do zaburzeń metabolicznych, można w pewnym stopniu zapobiegać tej jednostce chorobowej poprzez zastosowanie odpowiedniej dietoterapii, która będzie prowadziła do zmniejszenia masy ciała koni, a także obniżenia odpowiedzi na insulinę po posiłku poprzez wyeliminowanie węglowodanów prostych w diecie (Geor i Harris, 2009). Coraz częściej odnotowuje się korzystne właściwości spożywania żywności laktofermentowanej z dodatkiem szczepów bakterii probiotycznych, ze względu na pozytywny wpływ na zdrowie, także w odniesieniu do chorób metabolicznych (Jakubczyk i in. 2019). Dobroczynny efekt spożywania sfermentowanej żywności obserwuje się przede wszystkim poprzez jej oddziaływanie na modulację flory jelitowej. Wszelkie zmiany w społeczności mikrobiomu powiązane są z dysfunkcją metabolizmu organizmu, a także przewlekłym stanem zapalnym o niskim stopniu nasilenia, co z kolei może prowadzić do rozwoju otyłości, insulinooporności, a w efekcie do ochwatu, czyli głównych składowych syndromu metabolicznego (Mokkala i in. 2016; Durham i in. 2019).

## 2. PRZEGLĄD LITERATURY

### 2.1. Zespół metaboliczny u koni

Zespół metaboliczny u koni (EMS) to zbiór czynników ryzyka, na które składa się otyłość, insulinooporność (IR), w konsekwencji prowadzące do wystąpienia ochwatu (Frank, 2009). Dodatkowo EMS może objawiać się także hyperleptynemią, hypertriglicerydemią lub dyslipidemią, a także podwyższonymi markerami stanu zapalnego na poziomie miejscowym jak i ogólnoustrojowym (Frank i in. 2010). Do wystąpienia EMS są szczególnie predysponowane konie ras ciężkich (zimnokrwiste), prymitywnych (kuce, koniki polskie), a także niektóre linie rasy czystej krwi arabskiej i andaluzyjskiej (Durham i in. 2019). Zespół metaboliczny może wystąpić także u innych koni niezależnie od rasy, z powodu nieprawidłowego zarządzania dietą w połączeniu ze zmniejszoną aktywnością fizyczną (Stewart-Hunt i in. 2006; Marycz i in. 2019). W związku z powyższym sugeruje się, że otyłość u koni stanowi główny czynnik ryzyka wystąpienia zespołu metabolicznego, insulinooporność ma z kolei istotne znaczenie dla patofizjologii tej choroby, a ochwat jest jej efektem klinicznym.

Istotną rolę w rozwoju EMS odgrywa rodzaj węglowodanów zawartych w diecie koni. Węglowodany w żywieniu koni dzielą się na niestrukturalne (NSC) w tym cukry proste, skrobia i fruktany oraz strukturalne (SC z ang. Structural carbohydrates), do których zalicza się celulozę i hemicelulozę oraz pektyny (Longland i Byrd, 2006). Przy prawidłowym zachowaniu praktyk żywieniowych, pierwsza grupa, czyli NSC trawione są w jelicie cienkim do monosacharydów, z kolei druga grupa SC rozkładana jest przez florę zasiedlającą jelito grube koni, głównie jelito ślepe do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (KKT). W przypadku, gdy ilość węglowodanów niestrukturalnych w diecie przekracza zdolność do trawienia w jelicie cienkim, treść ta przechodzi do jelita grubego, czego skutkiem jest nadmierna produkcja kwasu mlekowego, obniżenie pH jelit, a w konsekwencji dysbioza autochtonicznej mikroflory jelitowej (Biddle i in. 2013). Ponadto przeciążenie NSC w jelicie cienkim może prowadzić także do innych niepożądanych skutków zdrowotnych u koni, gdyż glukoza stanowiąca substrat z rozkładu NSC aktywuje trzustkę do uwalniania wysokich ilości insuliny, co w rezultacie może prowadzić do ochwatu i/lub insulinooporności (Marycz i in. 2018). Sugeruje się także, aby w diecie u koni z EMS udział węglowodanów niestrukturalnych stanowił 10 - 12% lub poniżej tej wartości suchej masy dawki pokarmowej, co może zminimalizować ryzyko hiperinsulinemii i ochwatu (Harris i in. 2017).

## **2.1.2. Otyłość w EMS**

W dzisiejszych czasach epidemia otyłości stanowi narastający problem wśród populacji na całym świecie, także w odniesieniu do koni. Otyłość definiowana jest przez Światową Organizację Zdrowia (WHO z ang. World Health Organization), jako nadmierne lub nieprawidłowe nagromadzenie tkanki tłuszczowej, stanowiące zagrożenie dla stanu zdrowia (WHO, 2016). Szacuje się, że nadwaga występuje u ponad 50% populacji udomowionych koni, natomiast 15-30% cierpi na otyłość (Menzies-Gow i in. 2017, Harker i in. 2011, Hitchens i in. 2015, Pratt-Phillips i in. 2010). Konie z EMS charakteryzują się otyłością ogólną i/lub regionalną, gdzie nagromadzenie tkanki tłuszczowej obserwowane jest miejscowo w okolicach więzadła karkowego, u nasady ogona, a także w okolicach oczu (Johnson i in. 2009).

### **2.1.2.1. Tkanka tłuszczowa w otyłości**

Głównym zadaniem tkanki tłuszczowej jest magazynowanie nadmiaru energii w postaci triacylogliceroli, a także ich kontrola i regulacja w organizmie. Z drugiej strony, tkanka tłuszczowa spełnia funkcje narządu dokrewnego, wydzielającego szeroką gamę bioaktywnych cząstek (AlZaim i in. 2020).

Tkanka tłuszczowa odgrywa kluczową rolę w rozwoju otyłości, a także związanych z tym stanem powikłań. Narząd ten składa się z adipocytów oraz komórek zwanych pod nazwą frakcji zrębu naczyniowego znajdującej się w tkance łącznej, w skład której wchodzi m.in. makrofagi, fibroblasty, komórki tuczne, pericyty, komórki śródbłonka naczyniowego, a także komórki progenitorowe linii adipogenicznej. Ponadto tkanka tłuszczowa stanowi rezerwuuar multipotencjalnych komórek progenitorowych, zwanych także mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (MSC) (Zuk i in. 2001). W organizmie koni, tradycyjny podział obejmuje białą tkankę tłuszczową (WAT z ang. White Adipose Tissue), zwaną także żółtą, ze względu na zintensyfikowane włączenie pigmentów egzogennych rozpuszczalnych w tłuszczach (karotenoidy) oraz brunatną tkankę tłuszczową (BAT z ang. Brown Adipose Tissue) (Lieblich, 2010). W przypadku otyłości u koni jak i ludzi badania skupiają się głównie na białej tkance tłuszczowej, gdyż WAT uznawana jest za główny magazyn energii, ale także za aktywny narząd hormonalny i metaboliczny. WAT wydziela adipokiny (adipocytokiny) takie jak leptynę, wisfatynę, rezystynę oraz białko wiążące retinol typu 4, a także mediatory zapalne w postaci cytokin prozapalnych (m.in. czynnik martwicy nowotworu TNF- $\alpha$ , interleukiny IL-1, IL-6) (Starosta i in. 2013). Z kolei BAT odpowiada głównie za termogenezę w następstwie ekspresji genów m.in. białka rozprzegającego- 1 (UP1) (Trujillo i in. 2006).



Nadmierne spożycie kalorii prowadzi do magazynowania lipidów w komórkach tłuszczowych, a w efekcie do hipertrofii i/lub hiperplazji adipocytów. Taki efekt obserwuje się także w tkance tłuszczowej koni otyłych z EMS charakteryzujący się powiększeniem rozmiarów adipocytów (hipertrofia) lub zwiększeniem liczby komórek tłuszczowych (hiperplazja) (Basińska i in. 2015). Ponadto otyłość prowadzi do dysfunkcji tkanki tłuszczowej, czego efektem jest wydzielanie cytokin prozapalnych, a także infiltracji makrofagów, powodując wystąpienie przewlekłego stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia. Podobnie u koni tkanka tłuszczowa w stanie otyłości, cechuje się zmienioną sygnalizacją insuliny, zwiększonym metabolizmem glikokortykoidów (Morgan i in. 2017), upośledzeniem funkcji mitochondriów (Marycz i in. 2018), zmienionym lipidomem oraz podwyższonym stężeniem leptyny w osoczu (Elzinga i in. 2016). Ponadto odnotowano zwiększoną ekspresję cytokiny prozapalnej interleukiny 6 (IL-6) w biopsji tkanki tłuszczowej koni z EMS, a także interleukiny 6 i TNF $\alpha$  w surowicy. Otyłość prowadzi także do stresu oksydacyjnego, ze względu na wysoką aktywność reaktywnych form tlenu (ROS z ang. reactive oxygen species) w porównaniu do zdolności obrony antyoksydacyjnej organizmu (De Marchi i in., 2013).

Kontrola kondycji ciała koni stanowi istotny aspekt wpływający na wstępne rozpoznanie rozwijających się stanów chorobowych u koni, a także pełni kluczową rolę w diagnozowaniu rozwijającej się otyłości (Pyrek i in. 2022; Pollard i in. 2017), stąd może być swoistym wyznacznikiem stanu zdrowia i dobrostanu zwierzęcia (Hemsworth i in. 2015). Jednym z systemów oceny tkanki tłuszczowej u koni jest punktowa ocena kondycji ciała opracowana przez Henneke i in. (1983) (BCS z ang. Body Condition Score), składająca się z 9 punktowej skali (1- koń ekstremalnie chudy, 9- koń ekstremalnie otyły). Inną równie przydatną metodą, która ocenia miejscowe nagromadzenie tkanki tłuszczowej jest ocena CNS (z ang. Cresty Neck Scoring), w skali 0- 4 punktów, polegająca na pomiarze akumulacji tłuszczu na grzebieniu szyjnym, które jest częstym regionem brany pod uwagę przy określaniu regionalnej otyłości powiązanej z EMS (Carter i in. 2009). Dla lekarzy weterynarii, a także dietetyków koni obie metody oceny kondycji ciała mogą być kluczowe w rozpoznaniu rozwijającej się otyłości, a co za tym idzie w kierunku możliwego wystąpienia syndromu metabolicznego.

### 2.1.3 Insulinooporność

Insulinooporność (IR z ang. Insulin resistance) jest stanem, który obejmuje zmniejszoną wrażliwość tkanek docelowych takich jak mięśnie szkieletowe, komórki tkanki tłuszczowej (adipocyty) i komórki wątroby (hepatocyty) w odpowiedzi na działanie insuliny, mimo jej prawidłowego lub podwyższonego poziomu we krwi (Freeman i in. 2020).

Insulina jest hormonem anabolicznym, która spełnia w organizmie wiele kluczowych funkcji metabolicznych, między innymi bierze udział w utrzymaniu homeostazy glukozy i lipidów (Jeżek i in. 2018). Dostarczana z pożywieniem glukoza jest źródłem energii dla komórek zarówno ludzkich, jak i zwierzęcych, a jej prawidłowy poziom warunkuje zachowanie zdrowia organizmu. W mięśniach szkieletowych, wątrobie, a także tkance tłuszczowej w normalnych fizjologicznych warunkach, wzrastający poziom glukozy we krwi po posiłku, aktywuje komórki  $\beta$ - trzustki do wydzielania insuliny, która następnie wiąże się z receptorami zlokalizowanymi na powierzchni komórek (Boucher i in. 2014). Działanie insuliny zachodzi poprzez receptor insulinowy, który należy do receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej (De Meyts i in. 2004). Receptory występują w różnej ilości na powierzchni błon komórek, choć najbardziej zasobne w nie są komórki tłuszczowe (adipocyty), mięśnie szkieletowe oraz komórki wątroby (hepatocyty) (Chadt i Al-Hasani, 2020). Receptor insulinowy składa się z dwóch podjednostek  $\alpha$  i dwóch podjednostek  $\beta$  (LeRoith i Roberts, 2003). Wiązane insuliny z receptorem podjednostki  $\alpha$ , znajdującej się na powierzchni komórki, prowadzi do zmian konformacyjnych przenoszonych na podjednostkę  $\beta$ , która zlokalizowana jest wewnątrz komórki, co wyzwała aktywację kinazy tyrozynowej, stanowiąc kluczowy etap w transdukcji sygnału insuliny przez błonę plazmatyczną do komórek (Virkamäki i in. 1999). Aktywna kinaza tyrozynowa z ATP doprowadza do fosforylacji białek zwanych substratami receptora insuliny IRS-1 i IRS2. Następnie ma miejsce pobudzenie dwóch szlaków sygnalizacji tj. pierwszy prowadzi do aktywacji PI3K generujący metaboliczną odpowiedź na insulinę, drugi szlak MAPK odpowiada za działanie mitogenne insuliny (Cantley, 2002; Denton, 1995). Zdarzenia te wpływają z kolei na rekrutację białka transportowego GLUT4 na powierzchnię błony komórek, w ten sposób ułatwiając wychwyty glukozy przez komórki (Zisman i in. 2000). GLUT4 jest białkiem transportowym insulinozależnym, tak więc, jego działanie jest ściśle związane ze stymulacją hormonu insuliny (Stöckli i in. 2011).

Natomiast kiedy komórki docelowe są niewrażliwe na działanie insuliny i z tego powodu nie mogą w pełni wykorzystać glukozy do metabolizmu energetycznego, poziom glukozy we

krwi wzrasta, a komórki  $\beta$ -trzustki produkują więcej insuliny w celu rekompensacji nadmiaru glukozy we krwi, co stanowi istotny czynnik rozwijającej się insulinooporności (Kahn i in. 2006). Na poziomie komórkowym insulinooporność rozwija się poprzez obniżoną dostępność receptora insulinowego, z powodu niedotlenienia organizmu (hipoksja) oraz stresu oksydacyjnego, który wpływa na pobudzenie szlaków zapalnych, a także hamowanie szlaków sygnałowych insuliny (Stafeev i in. 2017; Tadros i Frank, 2013). Sugeruje się także, że insulinooporność może występować w odpowiedzi na działanie cytokin prozapalnych wydzielanych przez tkankę tłuszczową w otyłości, wpływając hamująco na szlaki sygnałowe insuliny w tkankach organizmu (Ota, 2014).

#### **2.1.4. Ochwat**

Kliniczna otyłość, a także dysregulacja insuliny, czyli czynniki należące do zespołu metabolicznego (EMS), mogą przyczyniać się do rozwoju ochwatu u koni – poważnej, jak również bolesnej choroby kopyt. Pomimo znajomości czynników ryzyka, które wywołują ten stan u koni, schorzenie to stanowi nadal ogromne wyzwanie dla lekarzy weterynarii. Cechą charakterystyczną ochwatu jest utrata przyczepności między blaszkami naskórka wewnętrznej ściany kopyta, a międzypalcowymi blaszkami skóry właściwej leżącej poniżej dystalnej części paliczka (Visser i in. 2011). Ochwat nie jest chorobą śmiertelną, jednak w wielu przypadkach ze względu na stadium rozwoju choroby, a także związany z tym ból i osłabienie konieczna jest eutanazja zwierzęcia, która uznawana jest za jedną z najczęstszych przyczyn śmierci koni (Orsini i in. 2010; Pollard i in. 2020). Oprócz strat emocjonalnych na drodze koń – właściciel, występują także straty ekonomiczne (Marchitelli, 2019).

Syndrom metaboliczny występujący u koni jest ściśle powiązany z wystąpieniem ochwatu. W pierwszej kolejności mechanizm rozwoju ochwatu wewnątrzwydzielniczego skojarzono z wadliwym wychwytem glukozy przez tkanki. Jednak po wstępnych badaniach uznano, że w tkance kopytowej obecne są transportery glukozy typu 1 (GLUT1), które działają niezależnie od insuliny. Ponadto receptory insuliny zlokalizowane są w naczyniach krwionośnych kopyta, a nie na komórkach blaszkowatych (Huntington i in. 2010). Następnie odnotowano, że insulina biorąca udział w regulacji kurczenia i rozszerzania się naczyń krwionośnych może przyczyniać się u koni z IR do rozwoju ochwatu. W normalnych fizjologicznych warunkach odpowiedź insuliny powoduje rozszerzanie naczyń krwionośnych pod wpływem tlenu azotu, natomiast kurczenie odbywa się za sprawą endoteliny- 1, dzięki równowadze szlaków sygnałowych insuliny (PI3K/ MAPK). W przypadku IR dochodzi do

zablokowania szlaku PI3K, z kolei szlak MAPK odpowiedzialny za kurczenie naczyń funkcjonuje prawidłowo (Venugopal i in. 2011). W związku z tym utrudniony jest przepływ krwi przez naczynia włosowate poprzez zakrzepy gromadzące się w naczyniach doprowadzających oraz odprowadzających krew do kopyta.

## **2.2. Zastosowanie probiotyków i prebiotyków w żywieniu koni**

### **2.2.1. Probiotyki**

Probiotyki według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO z ang. World Health Organisation) definiowane są, jako żywe mikroorganizmy, które dostarczane do diety w odpowiednich ilościach przynoszą korzyści zdrowotne gospodarzowi (FAO/WHO 2002). Szereg pozytywnych właściwości dostarczanych przez probiotyki wynika przede wszystkim z obecności w nich żywych szczepów dobroczynnych bakterii. Wśród bakterii probiotycznych stosownych jako suplementy diety główną rolę odgrywają bakterie kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus* (LAB), *Bifidobacterium*, a także niektóre drożdże (Holzapfel i in. 2001). W żywieniu koni uznaje się, że korzystne właściwości wykazują szczepy *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococci*, *Bifidobacterium* i *Streptococcus* (Schoster i in. 2013). Aby probiotyk mógł spełniać prozdrowotne funkcje musi być odporny na działanie kwasów żołądkowych, wykazywać właściwości adhezyjne do błony śluzowej nabłonka jelit, a także działanie przeciwdrobnoustrojowe dla bakterii patogennych i chorobotwórczych (Kechagia i in. 2013). Większość bakterii LAB posiada status GRAS (z ang. Generally recognized as Safe), czyli ogólnie uważanych za bezpieczne dla organizmu (Patel i in. 2014). Mikrobiom w jelicie grubym i okrężnicy odgrywa kluczową rolę w zdrowiu i chorobie. Szczególnie takie czynniki jak stres, niewłaściwa dieta bogata w węglowodany niestrukturalne, nagła zmiana dawki pokarmowej w przypadku przejścia na żywienie pastwiskowe wpływają na zachwianie społeczności flory jelitowej (Ganda i in. 2023; Fernandes i in. 2014). Zastosowanie probiotyków jako potencjalnej terapii w leczeniu chorób metabolicznych było przedmiotem licznych badań naukowych (Mallappa, 2012). Literatura naukowa dotycząca stosowania probiotyków w odniesieniu do bezpośredniego tłumienia zespołu metabolicznego u koni jest ograniczona. Natomiast pewne mechanizmy działania probiotyków można przypisać ich korzystnemu działaniu na modulację flory jelitowej, a co za tym idzie poprawę metabolizmu organizmu. Skład prawidłowej mikroflory jelitowej jest stały u koni i obejmuje głównie przedstawicieli *Firmicutes* i *Bacteroides* oraz w mniejszej liczebności *Proteobacteria*, *Sprichaetes*, *Verrucomicrobia*, *Fibrobacteres* i *Actionbacteria*. W badaniu na 20 koniach,

gdzie autorzy analizowali skład porównawczy flory jelitowej u koni zdrowych i koni z EMS wykazano, że mikrobiom koni z EMS składał się głównie z przedstawicieli bakterii związanych z rozwojem otyłości (Elzinga i in. 2016). Ponadto zmiany w składzie flory jelitowej poprzez zastosowanie probiotyków i odpowiedniej diety mogą prowadzić do wzrostu pożytecznych mikroorganizmów, wpływając na utratę wagi w przypadku otyłości (Delzenne i in. 2011). W związku z tym zastosowanie probiotyków w kontekście modulacji flory jelitowej może być obiecującym narzędziem terapeutycznym wpływającym na zmniejszenie ryzyka wystąpienia EMS.

Jednym z dobrze znanych i przebadanych szczepów bakterii probiotycznych jest *Lactobacillus rhamnosus* (LR). W kilku artykułach autorzy odnotowują jego dobroczynne właściwości w obszarze związanym z syndromem metabolicznym. W badaniach na modelach zwierzęcych wykazano, że szczep *Lactobacillus rhamnosus* GG poprzez modulację mikrobiomu jelitowego u otyłych myszy poprawia wrażliwość komórek na insulinę (Ji i in. 2018; Kim i in. 2013). Podobnie *Lactobacillus rhamnosus* LS-8 wyizolowany z sfermentowanej żywności wpływał na obniżenie masy ciała i redukcję insulinooporności u otyłych myszy, a także na zmniejszoną ekspresję cytokin prozapalnych (IL-6, IL1 $\beta$  i TNF $\alpha$ ) w surowicy oraz mRNA w tkance tłuszczowej (Wang i in. 2019). Wykazano, że *Lactobacillus rhamnosus* GG w połączeniu z innymi szczepami probiotycznymi, a także prebiotycznymi, był w stanie metabolizować te probiotyki prowadząc do produkcji KKT (LeBlanc i in. 2017). W przypadku dorosłych zdrowych koni stosowanie preparatu probiotycznego z *Lactobacillus rhamnosus* GG nie przyniosło oczekiwanego rezultatu w kontekście dłuższej kolonizacji do komórek nabłonka jelit. Może być to spowodowane faktem, że szczep ten nie działał właściwie na zdrowe konie. W przypadku suplementacji tym probiotykiem u źrebiąt wykazano pozytywne właściwości adhezyjne do jelit, co może być związane z tym, że mikrobiom przewodu pokarmowego źrebiąt nie jest jeszcze w pełni ukształtowany (Weese i in. 2002).

Drugim znanym szczepem probiotycznym jest *Pediococcus acidilactici*, który należy do rodziny *Lactobacillaceae*. Doniesiono, że spożywanie tego probiotyku skutkowało obniżeniem poziomu trójglicerydów i cholesterolu, a także regulowało poziom lipidów wraz z tłumieniem stanów zapalnych. Ponadto u myszy karmionych dietą wysokocukrową i wysokotłuszczową szczep ten wykazywał pozytywne właściwości na homeostazę glukozy, w tym działanie przeciwhiperglykemiczne (Cabello-Olmo i in. 2022).

### 2.2.2. Prebiotyki

Definicja prebiotyków odnosi do substratów dietetycznych, które są selektywnie wykorzystywane przez żywiciela, przynosząc korzyści zdrowotne gospodarzowi (Gibson i in. 2017). Innymi słowy prebiotyki są pożywką dla dobroczynnych mikroorganizmów obecnych w przewodzie pokarmowym, wpływając w ten sposób na modulację całego mikrobiomu (Flint, 2012). Mechanizm ten polega na degradacji przez florę jelitową niestrawnych części składników odżywczych, zwanych prebiotykami, przez co pozyskują energię do przeżycia i wzrostu (Gibson i in. 2004). Znana jest szeroka gama prebiotyków, większość z nich to podzbiór grup węglowodanów o różnej strukturze molekularnej, choć nie jest to reguła, wyjątkiem mogą być np. polifenole. Chociaż uznaje się, że prebiotyki należą do włókna pokarmowego, to nie każde włókno pokarmowe jest prebiotykiem. Istnieje pewna klasyfikacja, a mianowicie prebiotyk: musi być odporny na działanie kwasów żołądkowych, a także enzymów trawiennych gospodarza, wchłanianie w górnym odcinku przewodu pokarmowego oraz prebiotyk powinien być fermentowany przez florę jelitową, a także stymulować wzrost i aktywność pożytecznych bakterii zasiedlających jelito grube (Song i in. 2015). W żywieniu koni z danych literaturowych wnioskuje się, że do prebiotyków zaliczane są fruktooligosacharydy (FOS), mannanooligosacharydy (MOS), a także wysłodki buraczane czy łuski soi.

Efekt działania fruktooligosacharydów (FOS), zależy od składu i aktywności metabolicznej mikroflory w przewodzie pokarmowym koni. Po zastosowaniu w dawce pokarmowej FOS w ilość 8 g lub 24 g dziennie, wykryto zmiany w kale u koni młodych, z jednoczesnym obniżeniem pH i wzrostem zawartości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (KKT), głównie octowego, propionowego i masłowego (Berg i in. 2005). KKT wchłaniane są przez komórki nabłonka jelit i poprzez wątrobę przedostają się w niskich stężeniach do krążenia ogólnoustrojowego (Comalada i in. 2006). Między innymi KKT biorą udział w metabolizmie glukozy, lipidów i cholesterolu, a także w kontroli zaburzeń metabolicznych, w związku z tym KKT mogą korzystnie wpływać na poziom glukozy, a także masę ciała (Kimura i in. 2014). Udowodniono, że krótkołańcuchowe FOS podawane koniom w ilości 30 g dziennie przez 3 tygodnie mogą łagodzić zmiany w mikroflorze jelitowej wywołane nagłą zmianą diety, szczególnie wysoką podażą skrobi (Respondek i in. 2008). Autorzy wykazali także pozywany wpływ stosowania FOS w ilości 45 g / dzień, co wpływało na wzrost wrażliwości na insulinę u otyłych koni (Respondek i in. 2011).

Kolejną grupę prebiotyków stanowią mannanooligosacharydy, które pozyskiwane są ze ścian komórkowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Odnotowano, że MOS ma zdolność wiązania bakterii chorobotwórczych, hamując ich namnażanie, a także wykazują korzystny wpływ na stabilizację dobroczynnej flory jelitowej zwierząt (Rosen, 2006).

Wśród polisacharydów zaliczanych do prebiotyków to pektyna budzi coraz większe zainteresowanie. Związek ten składa się z polimerów kwasu galakturonowego, który znajduje się w środkowej blaszce komórek roślinnych (Gilaverte i in. 2011). Pektyny mogą być ekstrahowane z produktów ubocznych m. in. z wysłodków buraczanych.

Badania wskazują, że pektyny wykazują potencjał ochronny dla bakterii probiotycznych podczas przejścia przez żołądek do jelit, co związane jest z ich funkcjonalnością (Larsen i in 2019). Pektyna jest prawie całkowicie rozkładana przez florę jelitową koni, co skutkuje produkcją KKT (Do Prado i in. 2017). Ponadto w niektórych przypadkach zastąpienie zbóż bogatych w skrobię, paszami zawierającymi pektyny np. wysłodkami buraczanymi wpłynęło na zmniejszenie ryzyka fermentacji skrobi w jelicie grubym, dostarczając przy tym energii na podobnym poziomie (Miraglia i in. 2006).

W odniesieniu do chorób metabolicznych włókno pokarmowe wpływa na zmniejszenie hiperglikemii, gdyż opóźnia wchłanianie węglowodanów, a także wzmacnia uczucie sytości, co z kolei wpływa na zmniejszone przyrosty masy ciała (Post in. 2012). Natomiast w przypadku osobników cierpiących na insulinooporność włókno pokarmowe, poprzez fermentacje w jelicie grubym do KKT, może wpływać na zwiększenie obwodowej wrażliwości na insulinę (Johnston i in. 2010; Robertson i in. 2012). Wykazano, że diety na bazie włókna pokarmowego zmniejszają hiperglikemie po posiłkową, poprzez wolniejsze wchłanianie węglowodanów, a także dzięki swojej strukturze wpływają na uczucie sytością, co w rezultacie ma wpływ na kontrolowanie masy ciała – istotna kwestia w przypadku otyłości (Post i in. 2012).

Odnotowano także, że diety oparte na włóknie pokarmowym mają niski indeks glikemiczny (z ang. GI – Glycemic Index), co ma kluczowe znaczenie dla koni cierpiących na syndrom metaboliczny. Indeks glikemiczny związany jest z klasyfikacją żywności zawierającej cukry proste (glukoza, skrobia), na podstawie ich potencjału do wzrostu stężenia glukozy we krwi po posiłku. Formułowanie dawek pokarmowych dla koni, które wpływają na osłabienie odpowiedzi glikemicznej może mieć fundamentalne znaczenie dla łagodzenia insulinooporności, a także ochwatu i innych następstw zdrowotnych związanych z syndromem metabolicznym (Kronfeld i in. 2005).

### 2.3. Wysłodki buraczane jako źródło prebiotyku

Wysłodki buraczane są produktem ubocznym, powstającym po ekstrakcji sacharozy z buraków cukrowych. Ze względu na skład chemiczny, komponent ten jest z powodzeniem stosowany w żywieniu zwierząt, w tym także koni. Wysłodki składają się głównie z polisacharydów (65-80%) w tym celulozy (22- 30%), hemiceluloz (22 -32%), pektyny (24-32%) oraz śladowej ilości ligniny (1-2%). Wysłodki buraczane zawierają także niewielki poziom sacharozy (do 10% suchej masy), glukozy, kwasu galakturonowego i arabinozy (Leijdekkers i in 2013) oraz związane estrowo kwas octowy (3,9% s. m.) i kwas ferulowy (0,8% s. m.) (Finkenstadt, 2013). Do składników odżywczych głównie zaliczane jest białko ogólne (7-10%) i popiół surowy (5%). Ze względu na wysoki udział włókna rozpuszczalnego (około jedna trzecia pektyn) wysłodki buraczane rozkładane są przez florę bakteryjną zasiedlającą okrężnicę koni do krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (KKT) (Jensen i in. 2016). Wysłodki charakteryzują się niskim indeksem glikemicznym, co może wpłynąć na jego potencjalne zastosowanie w przypadku koni cierpiących na syndrom metaboliczny. Podczas badań porównujących wpływ wysłodków buraczanych, otrębów pszennych i ryżowych, płatków owsianych, a także ziaren zbóż w żywieniu koni w celu dostarczenia z każdej dawki 4 Mcal energii na reakcje glikemiczną, wykazano, że wysłodki buraczane miały najniższy indeks glikemiczny, co stanowiło kluczowy czynnik, jako potencjału w zapobieganiu hiperinsulinemii u koni (Rodiek i in. 2007). Inni autorzy zaobserwowali także, że zastąpienie owsa wysłodkami buraczanymi wpłynęło na niższy poziom insuliny w osoczu ( $p \leq 0,05$ ) po 60 i 90 minutach karmienia w spoczynku (Palmgren Karlsson i in. 2002). Ze względu na właściwości pęczniące wysłodki przed podaniem koniom muszą zostać namoczone w wodzie, gdyż podane w formie granulatu mogą pęcznieć w żołądku, co prowadzi do kolek i innych zaburzeń żołądkowo- jelitowych. Moczenie pasz jest także dobrym rozwiązaniem dla koni cierpiących na syndrom metaboliczny, gdyż w ten sposób usunięta zostaje znaczna część węglowodanów niestrukturalnych (NSC) (Frank i in. 2010). Natomiast wraz z węglowodanami wypłukaniu ulegają także składniki mineralne, w związku z tym konieczne jest uzupełnienie diety konia o niezbędne składniki mineralne (McGowan i in. 2013). Pomimo tego, że wysłodki buraczane charakteryzują się niskim udziałem węglowodanów prostych to pewne ilości monosacharydów są obecne w tym komponencie. Dla koni z syndromem metabolicznym dąży się przede wszystkim do zminimalizowania cukrów prostych w diecie, ponieważ w ten sposób można wpłynąć na tempo uwalnianie glukozy do krwioobiegu, zmniejszając tym samym wyrzut insuliny. W celu obniżenia zawartości cukrów, a tym samym uniknięcia wypłukania



minerałów, kontrolowany proces fermentacji z udziałem bakterii probiotycznych może mieć korzystny efekt (Capurso i Capurso 2020; Wolever, 2017). Ponadto dzięki wytwarzanym przez bakterie probiotyczne metabolity - postbiotyki, przygotowany w ten sposób komponent pokarmowy może być dodatkowo wzbogacony o substancje bioaktywne (witaminy, bioaktywne peptydy, związki przeciwutleniające) (Verardo i in. 2020).

## **2.4. Laktofermentacja żywności**

Sztuka fermentacji żywności oraz napoi to jedna z najstarszych metod przetwarzania produktów spożywczych, znana od czasów starożytnych. Fermentacja początkowo służyła przede wszystkim do celów konserwacji, co zapobiegało psuciu się żywności. Dopiero w połowie XIX wieku nastąpił kluczowy rozwój w zakresie koncepcji fermentacji żywności i zaczęto szerzej przyglądać się procesom zachodzącym w czasie przetwarzania matrycy żywnościowej, za sprawą rozwoju dziedziny zwaną mikrobiologią (Kabak i in. 2011). Od tego przełomowego kroku w nauce nastąpił wzrost różnorodnych szczepów probiotycznych, a co istotne zrozumienie szlaków metabolicznych prowadzonych przez drobnoustroje, co potęgowało coraz większym rozwojem w branży fermentacyjnej. Do produkcji tego rodzaju żywności często wybierane są bakterie kwasu mlekowego (LAB), w tym *Lactobacillus*, *Enterococcus* i *Bifidobacterie* oraz grzyby, drożdże i inne bakterie (*Bacillus*) (Rezac i in. 2018; Tamang i in. 2016). Znane są dwie główne metody fermentacji żywności: pierwsza z nich fermentacja naturalna zwana również spontaniczną, zależna od mikroflory autochtonicznej obecnej w matrycy żywnościowej bądź w środowisku fermentacyjnym, przykładem może być kiszona kapusta. W tym rodzaju fermentacji należy stworzyć przede wszystkim warunki beztlenowe dla prawidłowego wzrostu i rozwoju mikroorganizmów oraz w celu eliminacji niepożądanego flory dodatek soli lub octu (Voidarou i in. 2021). Innym rodzajem fermentacji spontanicznej może być back-slopping, czyli przeniesienie wcześniej sfermentowanej partii jako inokulum do świeżego materiału (Holzapfel i in. 2002; Akpi i in. 2019). Kolejnym rodzajem konserwowania materiału spożywczego jest fermentacja kontrolowana, która polega na dodatku do żywności kultur starterowych szczepów bakteryjnych, w tym przypadku znany jest konkretny szczep przeprowadzający fermentację. Podczas tego rodzaju fermentacji następują przemiana węglowodanów m.in. do kwasu mlekowego i innych kwasów organicznych, zapewniając w ten sposób konkurencję nad innymi patogenami (Hansen i in. 2002). Stosuje się także symbiotyczne właściwości szczepów bakterii LAB z drożdżami (SCOBY) (Dufresne i Farnworth, 2000). Z czasem udowodniono, że fermentacja żywności niesie za sobą szereg pozytywnych właściwości:

- ze względu na występowanie probiotycznych mikroorganizmów, głównie bakterii kwasu mlekowego (LAB) (Marco i in. 2017). Przyjmuje się, że większość sfermentowanych produktów zawiera około  $10^6$  CFU/g, natomiast stężenia bakterii probiotycznych mogą się różnić (Rezac i in. 2018),
- ważne jest także podłoże dla wzrostu i rozwoju mikroorganizmów w postaci materiału fermentowanego, ponieważ odgrywa ono istotną rolę w transporcie bakterii probiotycznych do jelit, dzięki swojemu działaniu ochronnemu przeciw niskiemu pH soków trawiennych i kwasów żółciowych w przewodzie pokarmowym. W ten sposób możliwa jest kolonizacja bakterii probiotycznych i ich adhezja do nabłonka jelit (Bove i in. 2013),
- zmiana smaku, tekstury, właściwości organoleptycznych (Hansen i in. 2002)
- zwiększa się również strawność składników pokarmowych, poprawiając tym samym biodostępność składników odżywczych (minerały, witaminy).
- metabolity wytworzone podczas działalności mikrobiologicznej mogą wykazywać właściwości prozdrowotne m.in. poliaminy i bioaktywne peptydy, które wpływają korzystnie na układ odpornościowy, sercowo- naczyniowy oraz metaboliczny (Derrien i in. 2015),
- składniki obecne w sfermentowanej żywności jak np. witaminy czy prebiotyki z matrycy żywnościowej przynoszą dodatkowe źródło składników pokarmowych (Marco i in. 2017; Salazar i in. 2016)
- fermentacja obniża także poziom substancji antyodżywczych, poprzez ich rozkład do związków dostępnych dla enzymów trawiennych (np. związki fenolowe) (Abu-Salem i in. 2014) (Filannino i in. 2015) lub fermentacja zakwasu zmniejsza zawartość oligosacharydów czy disacharydów, co sprawia, że jest on bezpieczny dla osób cierpiących na choroby jelit (Laatikainen i in. 2016),

Żywność fermentowana ma wiele właściwości wpływających korzystnie na stan zdrowia ludzi i zwierząt. Badania wskazują na potencjalną rolę spożywania żywności probiotycznej z udziałem bakterii LAB na rekonwalescencje po operacjach jamy brzusznej, w celu zminimalizowania ryzyka następstw rozwoju sercowo naczyniowych, a także zmniejszenia obciążenia patogenami (Chilton i in. 2015). Ponadto fermentacja włókna pokarmowego wykazywała działanie przeciwglukemiczne, przeciwzapalne i immunomodulacyjne (Selhub i in. 2014; Moussa i in. 2012; Mueller i in. 2011), co sugeruje efekt synergistycznego współdziałania prebiotyków z probiotykami.

Ponadto udowodniono, że w przypadku otyłości, spożywanie sfermentowanej żywności może wpłynąć na redukcję masy ciała, tkanki tłuszczowej, cytokin zapalnych, a także markerów stresu oksydacyjnego (Nam i in. 2015; Hamadate i in. 2013; Lee i in. 2015). Wykazano, że produkty z kierowaną fermentacją z użyciem szczepów bakterii LAB, mogą przynosić lepsze korzyści niż fermentacja spontaniczna bez dodatku mikroorganizmów (Park i in. 2012). Istotny jest także czas trwania procesu fermentacji, gdyż w badaniu przeprowadzonym na otyłych ochotnikach, fermentacja kimichi (koreańskich napój) prowadzona przez 12 dni wykazywała lepsze wyniki w postaci zmniejszenia tkanki tłuszczowej, poziomu insuliny, leptyny i glukozy na czczo w porównaniu do kimichi fermentowanego przez 1 dzień (Kim i in 2012).

W przypadku koni jednym ze znanych form przetwarzania komponentów paszowych jest konserwacja materiałów roślinnych w postaci kiszonki lub sianokiszonki. Kiszonki ze względu na niższy udział suchej masy, a także wyższy udział kwasów organicznych (Harris in. 2017), charakteryzują się lepszą strawnością w porównaniu do pasz włóknistych takich jak siano (Muhonen i in. 2008). Ponadto dane literaturowe wskazują, że dobrze przygotowana kiszonka jest chętniej preferowana przez konie w porównaniu z paszami objętościowymi suchymi (Müller i in. 2007).

### 3. CELE PRACY

Celem badań było wytworzenie laktofermentowanych wyśłodków buraczanych z dodatkiem szczepów bakterii probiotycznych *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici*, charakteryzujących się obniżonym indeksem glikemicznym, podwyższonym potencjałem przeciwutleniającym oraz wysokim udziałem włókna pokarmowego o potencjale probiotycznym, a także charakterystyka chemiczna powstałych w toku fermentacji surfaktantów.

Dodatkowo celem pracy była ocena wpływu ekstraktów fermentowanych wyśłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (CTRL) i ekstraktów laktofermentowanych wyśłodków buraczanych z dodatkiem szczepu bakterii *Lactobacillus rhamnosus* (LR) w badaniach *in vitro* na kulturze komórek macierzystych tkanki tłuszczowej pochodzącej od koni (EqASC).

### 4. MATERIAŁY I METODY

#### 4.1. Przygotowanie inokulum mikrobiologicznego

##### 4.1.1. Szczepy bakterii i podłoża

W celu przeprowadzenia procesu fermentacji zastosowano dwa szczepy bakterii kwasu mlekowego, a mianowicie *Lactobacillus rhamnosus* NCIMB 8010 i *Pediococcus acidilactici* NCIMB 8018 otrzymane z National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria, Wielka Brytania. W pierwszej kolejności szczepy bakteryjne poddano liofilizacji, zawieszono w 1 ml bulionu De Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) (Biomaxima; Polska) i hodowano w 37°C przez 48 godzin w 25 ml tej samej pożywki w warunkach wstrząsania 160 RPM (LS 500 POL- EKO Aparatura; Polska). Po hodowli zawiesinę bakteryjną dodano do 250 ml bulionu MRS i hodowano do gęstości optycznej (OD) 1,0 przy 600 nm w tych samych warunkach. Komórki zebrano przez odwirowanie przy  $3500 \times g$  przez 15 min w 4°C (Mpw 380-R, Mpw Med. Instrument; Polska). Osad komórek przemyto i ponownie zawieszono bezpośrednio w 150 ml pożywki hodowlanej. Tak uzyskane inokulum zostało następnie dodane do 1500 ml bulionu MRS w 5000 ml kolbie. Następnie inokulum *Lactobacillus rhamnosus* przygotowano w stężeniu  $2,3 \times 10^7$ , natomiast *Pediococcus acidilactici* w stężeniu  $1,9 \times 10^7$ .

#### **4.1.2. Proces laktofermentacji wysłodków buraczanych**

Do zainicjowania fermentacji wykorzystane suche melasowane wysłodki buraczane „Toffi” w formie pelletu, pochodzące z cukrowni Miejska Górka, województwo wielkopolskie. Wysłodki buraczane w ilości 500 g umieszczono w słojach fermentacyjnych i dodano wody w ilości 3:1. Słoje fermentacyjne zostały umieszczone w pomieszczeniu, gdzie panowała stała temperatura na poziomie 37° C. Fermentacje przeprowadzono w trzech grupach: pierwszą stanowiły wysłodki buraczane bez udziału szczepów bakterii probiotycznych (CTRL), drugą laktofermentowane wysłodki buraczane z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* (LR), natomiast trzecią laktofermentowane wysłodki buraczane z dodatkiem *Pediococcus acidilactici* (PA). Przed wprowadzeniem inokulum bakteryjnego zmierzono wartość pH środowiska fermentacyjnego każdego słoja, analogicznie po dodaniu szczepów bakteryjnych i w każdym następnym dniu trwania fermentacji. Po około 1 godzinie pobrano materiał (nadsącz oraz biomasę) do dalszych badań „0”, a kolejne po 1, 2, 3, 5 i 6 dniach fermentacji. Próby początkowe stanowiły ekstrakty wodne wraz z wysłodkami buraczanymi, jako próba kontrolna w dniu 0, natomiast pozostałe próby stanowiły zakwasy fermentacyjne. Po zakończeniu fermentacji próby zebrano do dalszych analiz do plastikowych moczówek, a także hermetycznych woreczków.

#### **4.2. Analiza chemiczna biomasy z wysłodków buraczanych**

Świeża biomasa z wysłodków buraczanych, składająca się z biomasy kontrolnej bez dodatku szczepu bakterii probiotycznych, a także z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* oraz *Pediococcus acidilactici*, zostały poddane analizie chemicznej z prób pobranych w dniu 0 po dodaniu szczepów bakterii probiotycznych oraz w ostatnim dniu fermentacji (dzień 6). Wszystkie próbki biomasy przeanalizowano w trzech powtórzeniach i podano otrzymane wartości średnie. Analizy zostały przeprowadzone metodą weendeńską (AOAC 2001). Współczynnik podsuszenia obliczono, jako różnica między materiałem świeżym, a materiałem podsuszonym. Suchą masę (SM) oznaczano metodą wagową (AOAC: 934.01), białko ogólne (BO) z wykorzystaniem Analizator FOSS Tecator 2300 Kjeltac (FOSS Tecator, Hoganas, AB, Szwecja) (metoda Kjeldahla, AOAC: 984.13), popiół surowy (PS) (metodą wagową 942.05), ekstrakt eterowy (EE) (metodą Soxleta, AOAC 920.30A), z wykorzystaniem systemu ekstrakcji BUCHI, Flawil, Szwajcaria), włókno surowe (WS) (metoda Hannenberg i Stohmann, AOAC 978.10), frakcje włókna surowego, takie jak włókno neutralne detergentowe (NDF) i włókno kwaśno detergentowe (ADF, AOAC 973.18) przy użyciu aparatu Fibertec 2010 FOSS

(FOSS Fibertec, Hoganas AB, Szwecja), (AOAC, 2011). Związki bezazotowe wyciągowe (BAW) obliczono w g/kg suchej masy stosując wzór:

$$BAW = 1000 - (BO + PS + WS + EE)$$

### **4.3. Aktywność przeciwrodnikowa oraz całkowita zawartość polifenoli**

#### **4.3.1. Odczynniki i standardy**

Wszystkie odczynniki i rozpuszczalniki organiczne były czystości analitycznej. Etanol, 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl (DPPH), chlorek żelaza, węglan sodu, triazyna tripirydylu (TPTZ), peroksydisiarczan potasu, kwas 2,2'-azyno-bis (3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) (ABTS), odczynnik Folina-Ciocalteu oraz kwas 6-hydroksy-2,5,7,8-tetrametylochromano-2-karboksylowy (Trolox) otrzymano z Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

### **4.4. Związki polifenolowe i pojemność przeciwutleniająca**

#### **4.4.1 Procedura ekstrakcji**

Po zamrożeniu próbki poddano liofilizacji i sproszkowano w młynku laboratoryjnym (IKA 11A, Staufen, Niemcy). Próbki proszku (0,05 g) ekstrahowano 1,5 ml 80% metanolu zakwaszonego 1% HCl (obj./obj.) przez 24 h w warunkach chłodniczych. W tym czasie próbki dwukrotnie poddano sonikacji (300 W, 40 kHz; Sonic 6D, Polsonic, Warszawa, Polska) przez 20 min ze sporadycznym wstrząsaniem. Następnie zawiesinę odwirowano przy 19 000 x g przez 10 min, a supernatant przesączono przez hydrofilową membranę PTFE 0,20 µm (filtr Millex Smplicity™, Merck, Darmstadt, Niemcy) i zastosowano do analizy.

#### **4.4.2. Całkowita zawartość związków polifenolowych**

Całkowitą zawartość związków polifenolowych określono zgodnie z metodą opisaną przez Gao i in. (2000). W skrócie, 5 µl ekstraktów z wysłodków zmieszano z 50 µl 10% węglanu sodu, 100 µl H<sub>2</sub>O i 10 µl odczynnika Folina-Ciocalteu. Następnie mieszaninę wytrząsano przez 30 s, a wynik odczytano po 1 godz. Wyniki zarejestrowano przy 765 nm na czytniku płytek Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA). Wyniki wyrażono jako mg kwasu galusowego na 100 g suchej masy. Wyniki są wyrażone, jako średnia czterech powtórzeń.

#### **4.4.3. Zdolność antyoksydacyjna**

Zdolność antyoksydacyjną próbek oznaczono na czytniku płytek Synergy H1 (BioTek, Winooski, VT, USA). Zastosowano metody DPPH (Yen i Chen, 1995), ABTS (Re i in. 1999)

oraz FRAP (Benzie i Strain, 1996). Krzywe standardowe przygotowano przy użyciu różnych stężeń Troloxu. Wszystkie wyniki wyrażono, jako równoważniki Trolox na 100 g suchej masy (mMol Tx/100 g sm).

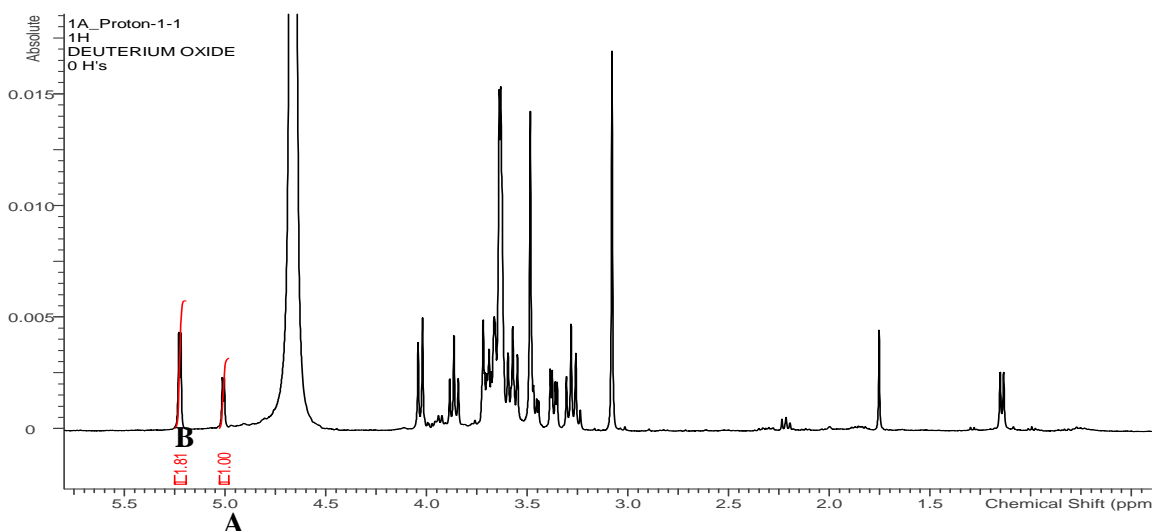
#### **4.5. Oznaczanie ilościowe sacharozy w biomasie z wysłodków buraczanych**

##### **4.5.1. Przygotowanie próbek do analiz**

Początkowo próbki biomasy kontrolnej bez dodatku mikroorganizmów oraz z udziałem szczepów bakterii *Lactobacillus rhamnosus* i *Pediococcus acidilactici* zliofilizowano i sproszkowano w mrożeniu laboratoryjnym, aż do uzyskania jednolitej masy. Tak przygotowane próbki zostały umieszczone w hermetycznych woreczkach do czasu przeprowadzenia analiz. Przed rozpoczęciem badań przygotowano wzorzec wewnętrzny przy użyciu trehalozy w ilości 4 mg i wody deuterowej ( $D_2O_2$ ). W kolejnym etapie odmierzone po około 100 mg każdej próbki do probówki typu Eppendorf, następnie dodano wcześniej przygotowany stock w ilości 40  $\mu$ l trehalozy o stężeniu 100 mg/ml i uzupełniono wodą deuterowaną ( $D_2O$ ) w ilości 2 ml. Po tym probówki Eppendorf umieszczono w zlewce i wstawiono na 20 minut do myjki ultradźwiękowej w celu rozbicia większych cząstek. Następnie próbki poddano wirowaniu przez 20 minut (13 000 RPM). Po odwirowaniu supernatant ostrożnie zlano do czystych probówek typu Eppendorf i dodano 0,5 ml chloroformu. Po czasie, ponownie wstawiono probówki na 2 minuty do odwirowania (13 000 RPM). W dalszej kolejności zebrano supernatant z probówki Eppendorf i przeniesiono do szklanych probówek na NMR.

##### **4.5.2. Analiza NMR**

Analiza NMR ( $^1H$ -NMR) została wykonana za pomocą spektrometru DRX Avance<sup>TM</sup> 600 MHz NMR (Bruker, Billerica, MA, USA). Widma zbierano w liczbie 16 skanów. Odpowiednie przesunięcia dla trehalozy (A) oraz sacharozy (B) zostały przedstawione na Rysunku 1.



Rys. 1. Przesunięcia widm dla trehalozy (A) i sacharozy (B).

Analizę wyników przeprowadzono za pomocą oprogramowania ACD/Spectrum Processor 2021.2.1 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ONT, Kanada). Analiza ilościowa została przeprowadzona w oparciu o wyznaczenie współczynnika odpowiedzi aparatu w stosunku do krzywych kalibracyjnych analizowanych węglowodanów.

#### 4.5.3. Profilowanie węglowodanów

Analiza jakościowa profilu węglowodanów zawartych w wysłodkach buraczanych została wykonana za pomocą aparatu GCMS QP 2020 Plus (Shimadzu, Kioto, Japonia) wyposażonego w kolumnę kapilarną Zebron ZB-5 MSi (30 m×0.25 mm×0.25 μm; Phenomenex, Torrance, CA, USA). Celem przygotowania analizy, 100 mg każdej próbki wraz z 0,5 mg myo-inozytoli jako wzorzec wewnętrzny, zostało wyekstrahowanych 10 ml mieszaniny metanolu i wody destylowanej (80:20). Następnie ekstrakt został przefiltrowany i odparowany za pomocą rotacyjnej wyparki próżniowej. Celem upochodnienia próbki, suchy ekstrakt został zawieszony w mieszaninie 250 μl bezwodnej pirydyny (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy) 250 μl odczynnika do sylilacji BSTFA (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy) i inkubowany przez 45 min w 60 °C.

Anality były nasykowane w temperaturze dozownika 280 °C (split 20, hel, jako gaz znośny), a następnie poddane rozdzielaniu według następującego programu temperaturowego: 150 °C przez 1 min, następnie do 180 (narost 1 °C/min), następnie do 300 °C (narost 4 °C/min) i utrzymany przez 10 min. Warunki pracy modułu MS: tryb skanowania 40-1050 *m/z*, temperatura źródła jonów 250 °C. Identyfikacja węglowodanów została wykonana za pomocą porównania ze standardami analitycznymi czystych substancji.



#### **4.6. Oznaczanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (KKT)**

Lotne związki organiczne (LZO) z analizowanych wyśłodków buraczanych zebrano z fazy nadpowierzchniowej (HS) z wykorzystaniem techniki mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Próby w ilości 2 g przed SPME umieszczono w wialkach 20 ml zamykanych nakrętkami z septą wykonaną z PTFE. Wialki inkubowano w 40°C, a następnie do próby wprowadzono włókno SPME (DVB/CAR/PDMS), długość 1 cm, grubość fazy stacjonarnej 50/30 µm) i LZO ekstrahowano przez 5 minut. Włókno SPME wprowadzono do dozownika GC i przeprowadzono desorpcję analitów i ich rozdzielanie za pomocą chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Do LZO zastosowano aparat GC-MS Agilent 7890A(GC) i 5975C (MS) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Rozdział realizowano z wykorzystaniem kolumny kapilarnej HP-5ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) Parametry rozdziału GC splitless, dozownik 260°C, początkowa temperatura pieca 40°C przetrzymanie 2,0 min, następnie 4°C min<sup>-1</sup> do 160°C, następnie 20°C min<sup>-1</sup> do 280°C. Całkowity czas pracy wynosił 38 min. Iloraz masy do ładunku (m/z) w zakresie 40 – 400 m/z prędkością skanowania 3.95 skanu/s po jonizacji elektronami (EI). Identyfikację analitów przeprowadzono w oparciu o porównanie zebranych widm z widmami z biblioteką widm masowych NIST17.

#### **4.7. Badania molekularne i cytobiologiczne**

##### **4.7.1. Izolacja komórek ASC pochodzących od koni**

Komórki ASC pochodzące od koni pozyskano z kolekcji komórek dzięki uprzejmości Międzynarodowego Instytutu Medycyny Translacyjnej (MIMT).

Fragmety tkanki tłuszczowej przemyto etanolem oraz dwukrotnie PBS. Następnie fragmenty tkanek homogenizowano przy użyciu narzędzi chirurgicznych (skalpel, nożyczki) i przeniesiono do kolagenazy typu IV, którą zwieszono w DMSO i wymieszano w medium F-12. Tkanekę inkubowano w inkubatorze z udziałem CO<sub>2</sub> przez 40 minut w 37 °C, co 10 minut wstrząsając. Następnie fragmenty tkanki tłuszczowej odwirowano (1500 x g) przez 10 minut. Otrzymany supernatant przemyto PBS i odwirowano (300 x g) przez 5 minut. Następnie po odwirowaniu osad z komórkami zawieszono w 5 ml medium pełnym zawierającym 1% PS (Penicylina/ Streptomycyna), 10% FBS (płodowa surowica bydlęca) oraz medium LG (DMEM Low Glucose w/ L-Glutamine w/ Sodium Pyruvate) i umieszczono w kolbie hodowlanej T-25.

#### **4.7.2. Hodowla komórkowa ASC**

Podczas hodowli komórki znajdowały się w inkubatorze w temperaturze 37°C i 5% CO<sub>2</sub> i wilgotności 95%. Hodowle komórkowe początkowo umieszczono w butelkach T-25 i hodowano z DMEM, 10% płodową surowicą bydlęcą (FBS) i 1 % roztworem PS, następnie medium hodowlane zmieniano, co 2 – 3 dni. Po osiągnięciu 70% konfluencji, komórki ASC pasażowano przy użyciu roztworu - Trypsyna EDTA. Po trzecim pasażu komórki ASC zostały wykorzystane do dalszych badań.

#### **4.7.3. Przygotowanie ekstraktów z fermentowanych wysłodków buraczanych**

Ekstrakty z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* oraz bez udziału szczepu probiotycznego odwirowano (21 000 x g) przez 10 minut w temperaturze 4°C, po czym otrzymany supernatant został zebrany do próbówki typu Eppendorf i procedura została powtórzona – wirowanie (21 000 x g) przez 10 minut. Następnie uzyskany ekstrakt został przefiltrowany przez filtr 0,22 µM.

#### **4.7.4. Model eksperymentalny**

Model eksperymentalny obejmował kontrolę (CTRL), gdzie komórki były hodowane w medium pełnym przez cały okres trwania doświadczenia. Następnie hodowla komórek w tunikamycynie (TUN), gdzie komórki inkubowano przez 24 godziny w medium zawierającym 5µM tunikamycyny, a następnie 24 godziny inkubacji w medium pełnym. Z kolei grupy eksperymentalne obejmowały 24 godziny inkubacji w medium z tunikamycyną, a następnie 24 godziny inkubacji w medium zawierającym ekstrakt z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepu probiotycznego oraz z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* (tabela 1). W celu wyboru odpowiedniego stężenia ekstraktów do dalszych badań na komórkach przeprowadzono test TOX-8 ASSAY.

Tabela 1. Model eksperymentalny.

<b>Grupa Badawcza</b>	<b>0h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>
CTRL (kontrola)	Medium pełne	Medium pełne	Medium pełne
TUN	Medium pełne	Tunikamycyna 5 $\mu\text{M}$	Medium pełne
EX 0'	Medium pełne	Tunikamycyna 5 $\mu\text{M}$	Ekstrakt z wysłodków buraczanych dzień „0” 500 $\mu\text{M}$
EX 3'	Medium pełne	Tunikamycyna 5 $\mu\text{M}$	Ekstrakt z wysłodków buraczanych dzień „3” 500 $\mu\text{M}$
EX 6'	Medium pełne	Tunikamycyna 5 $\mu\text{M}$	Ekstrakt z wysłodków buraczanych dzień „6” 500 $\mu\text{M}$
LR CTRL	Medium pełne	Tunikamycyna 5 $\mu\text{M}$	Ekstrakt z wysłodków buraczanych przed dodaniem mikroorganizmów 500 $\mu\text{M}$
LR 0'	Medium pełne	Tunikamycyna 5 $\mu\text{M}$	Ekstrakt z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> dzień „0” 500 $\mu\text{M}$
LR 1'	Medium pełne	Tunikamycyna 5 $\mu\text{M}$	Ekstrakt z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> dzień „1” 500 $\mu\text{M}$
LR 2'	Medium pełne	Tunikamycyna 5 $\mu\text{M}$	Ekstrakt z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> dzień „2” 500 $\mu\text{M}$
LR 3'	Medium pełne	Tunikamycyna 5 $\mu\text{M}$	Ekstrakt z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> dzień „3” 500 $\mu\text{M}$
LR 6'	Medium pełne	Tunikamycyna 5 $\mu\text{M}$	Ekstrakt z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> dzień „6” 500 $\mu\text{M}$

#### 4.7.5. Właściwości proliferacyjne komórek ASC

Wskaźnik żywotności komórek oceniano za pomocą testu opartego na resazuryinie (zestaw TOX8 In Vitro Toxicology Assay Kit, Sigma Aldrich, Poznań, Polska). Po inkubacji komórek w mediach – jak opisano powyżej, media pohodowlane zastąpiono 10% roztworem resazuryiny przygotowanym w medium wzbogaconym o antybiotyki. Komórki następnie inkubowano w 37°C przez 2 godziny. Po tym czasie medium pohodowlane w objętości 100  $\mu\text{L}$  umieszczono w 96-studzienkowej płytce i przeprowadzono pomiar spektrofotometryczny przy

600 nm dla prób badanych i 690 nm, jako referencyjnej długości fali dla resazuryiny. Test TOX8 prowadzono po 24 godzinach hodowli i powtórzono po 48 godzinach.

W teście klonogennym komórki wysiano na 6-studzienkową płytkę przy początkowej gęstości  $1 \times 10^2$ . Po całonocnej inkubacji w celu przyłączenia się komórek, grupy potraktowano tunikamycyną i/lub ekstraktem. Po 7 dniach komórki przemyto trzy razy PBS utrwalano w 4% schłodzonym PFA i ponownie przemyto trzy razy PBS. Następnie barwiono przez 5 minut w temperaturze pokojowej pararozaniliną i ponownie przemyto trzykrotnie PSB w celu usunięcia nadmiaru barwnika. Kolonie zawierające więcej niż 50 komórek policzono a wskaźnik tworzenia kolonii (CFU) uzyskano stosując wzór opisany przez Kornicka K. i in. (2019).

Przeprowadzono również test ekspansji w celu oceny zdolności do migracji komórek. Komórki potraktowano odpowiednimi związkami, jak opisano powyżej, przed zarysowaniem pojedynczych warstw komórek. Serię zdjęć mikrofotograficznych wykonano w godzinach 0, 12 i 24, szerokość blizny analizowano za pomocą programu ImageJ.

W celu oceny wartości PDT trzykrotnie pasażowane ASC wysiano na 24-studzienkowych płytkach, z gęstością  $2 \times 10^2$  na studzienkę. Po odpowiednim czasie oraz obserwacji zbadano ilość komórek.

#### **4.7.6. Aktywność $\beta$ - galaktozydazy**

Wykrywanie aktywności SA-  $\beta$ -galaktozydazy (SA- $\beta$ -gal) enzymu lizosomalnego związanego ze starzeniem się komórek, przeprowadzono przy użyciu zestawu Senescence Cells Histochemical Staining Kit zgodnie z instrukcją producenta. W skrócie, komórki utrwalono buforem na bazie formaldehydu (RT, 6 min), przemyto PBS i inkubowano z roztworem X-gal zawierającym 5-bromo-4-chloro-3-indolilo-b- D - galaktopiranozyd przez noc w 37°C. Zabarwione na niebiesko komórki starzejące się zaobserwowano i zobrazowano przy użyciu mikroskopu odwróconego (Leica, Niemcy). Co najmniej 100 komórek zliczono w celu określenia procentu komórek SA- $\beta$ -gal-dodatnich.

#### **4.7.7. Barwienie immunofluorescencyjne**

Proliferację oceniano za pomocą barwienia antygenem jądrowym Ki-67. Komórki progenitorowe ASC zostały utrwalone w 4% PFA przez 15 minut w RT, przepłukane PBS, a następnie ASC permeabilizowano przez 20 minut w 0,2% Tween i ponownie przepłukano w PBS przez 15 min. Następnie komórki inkubowano z przeciwciałem I-rz Ki-67 (1:1000

w 10% surowicy koziej w PBS) i inkubowano przez noc w temperaturze 4°. Po inkubacji komórki przepłukano trzykrotnie PBS i inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym w PBS Atto 594 (1:1000) (Abcam, Wielka Brytania) przez 1 godzinę, RT w ciemności. Następnie komórki ASC przepłukano w PBS i układano na szkiełka podstawowe.

Barwienie immunofluorescencyjne w przypadku przeciwciała IL- 1 $\beta$  oraz cytochromu C przeprowadzono analogicznie jak w przypadku antygenu Ki- 67. Stężenia przeciwciał zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2. Lista przeciwciał użytych do barwień immunofluorescencyjnych.

Przeciwciała	Koncentracja	Numer katalogowy	Firma
IL- 1 $\beta$	1:500	ab7722	Abcam
Ki-67	1:1000	obr10033	Biorbyt
Cas3	1:1000	C8487	Sigma
CytC	1:500	Nb100-56503	Novous

#### 4.7.8. Barwienie organelli

Morfologia ASC została oceniona za pomocą mikroskopii konfokalnej. W celu wizualizacji mitochondriów, organelle zostały wybarwione barwnikiem MitoRed. Najpierw supernatant zastąpiono świeżą pożywką hodowlaną zawierającą 0,1% MitoRed i komórki inkubowano przez 30 min w 37°C. Cytoszkielec wizualizowano przy użyciu Phalloidin-Atto 590 (Sigma-Aldrich, USA) w komórkach utrwalonych 4% PFA. Po utrwaleniu komórki przemyto trzykrotnie PBS następnie permeabilizowano stosując 0,5% X-100 (inkubacja 15 min, RT; Sigma-Aldrich, USA). Po tym komórki przepłukano PBS i inkubowano z roztworem Phalloidin-Atto 590 w PBS (rozcieńczenie 1:1000) w temperaturze pokojowej przez 45 min w ciemności. Wybarwione komórki przemyto PBS i wybarwiono kontrastowo 4',6-diamidyno-2-fenylindolem (DAPI). Komórki analizowano i wykonywano zdjęcia przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Leica TCS SPE, Leica Microsystems, Wetzlar, Niemcy). Zdjęcia analizowano za pomocą oprogramowania ImageJ.

#### 4.7.9. Analiza ekspresji genów (qRT- PCR)

Po 24 godzinach hodowli komórek ASC od dodania ekstraktów z laktofermentowanych wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* oraz ekstraktów bez dodatku mikroorganizmów probiotycznych, komórki przepłukano PBS i zawieszono w z 1 ml trizolu TRI Reagent. Następnie całkowity RNA został wyizolowany z komórek po hodowli. Po

izolacji, RNA rozpuszczono w wodzie traktowanej DEPC, a następnie poddano analizie jakościowej i ilościowej przy użyciu nanospektrofotometru (WPA Biowave II). Rozkład enzymatyczny genomowego DNA (gDNA) oraz syntezę komplementarnego DNA (cDNA) wykonano z zastosowaniem Takara PrimeScript RT Reagent Kit z gDNA Eraser (Perfect Real Time) zgodnie z protokołem otrzymanym od producenta. Do każdej z zastosowanej reakcji zostało zużytych 150 ng całkowitego RNA. Zarówno trawienie genomowego DNA, jak i syntezę cDNA przeprowadzono przy użyciu termocyklera T100 (Bio-Rad). Reakcje qRT-PCR przeprowadzono przy użyciu zestawu SensiFAST SYBR Green Kit (Bioline). Każda mieszanina reakcyjna zawierała 2,5  $\mu$ L cDNA i 7,5  $\mu$ L mix (SensiFAST SYBR 5  $\mu$ L, Primer Stock 0,5  $\mu$ L, woda 2  $\mu$ L). Stężenie starterów wynosiło 0,5  $\mu$ M. Wszystkie reakcje qRT-PCR przeprowadzono za pomocą systemu wykrywania CFX Connect™ Real-Time PCR (Bio-Rad). W qRT-PCR zostały określone poziomy ekspresji markerów apoptozy tj. czynnik supresorowy guza (p53), inhibitor kinaz cyklinozależnych (p21), białka proapoptotyczne z rodziny BCL-2 (BAX, BAD), chłoniak z komórek B2 (BCL-2), kaspazy (Casp-9, Casp- 3), markery pro- i przeciwzapalne tj. interleukiny (IL- 1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10, IL-4, IL-13, TGF $\beta$ ), markery stresu oksydacyjnego dysmutaza ponadtlenkowa komórkowa (SOD1), dysmutaza ponadtlenkowa mitochondrialna (SOD2), katalaza (CAT) i peroksydaza glutationowa (GPX) oraz ekspresja genów związana z inuslinoopornością tj. transporter glukozy typu 4 (GLUT4), substrat receptora insuliny (IRS) oraz receptor insuliny (INSR). Sekwencje starterów użytych w teście qRT-PCR przedstawiono w tabeli 3.

W celu określenia ekspresji MikroRNA (miRNA) 500 ng RNA poddano odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (Takara Bio Europe), a następnie ilościowej reakcji PCR (objętość końcowa 20  $\mu$ l) z użyciem Sensifast Sybr (Takara Bio Europe). Poziom ekspresji miRNA analizowano za pomocą Real-Time PCR stosując zestaw do syntezy pierwszej nici MicroRNA zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta. W skrócie, mieszanina reakcyjna zawierała wodę, zestaw SensiFast SYBR & Fluorescein (Bioline, Londyn, Wielka Brytania), starter specyficzny dla miRNA, starter 3' mRQ i cDNA. Jako próbkę odniesienia zastosowano starter U6F i starter U6R. Względny poziom ekspresji obliczono porównując grupy badane z grupą kontrolną metodą  $2^{-\Delta\Delta CQ}$ . Sekwencje starterów zastosowanych do analizy ekspresji miR przedstawiono w tabeli 4.

Tabela 3. Sekwencje starterów użytych w teście qRT- PCR.

Lp.	Nazwa genu	Sekwencja starterów 5'-3'
1.	BAX	F: GGCACCTCTTCCCTCCTTTCT R: CGATGCGCTTGAGACACTCG
2.	BCL2	F: TTCTTTGAGTTCGGTGGGGT R: GGGCCGTACAGTTCACAA
3.	p21	F: GAAGAGAAACCCCCAGCTCC R: TGA CTGCATCAAACCCACA
4.	p53	F: TACTCCCCTGCCCTCAACAA R: AGGAATCAGGGCCTTGAGGA
7.	CASP3	F: GGCAGACTTCCTGTATGCGT R: CCATGGCTACCTTGCGGTTA
8.	CASP9	F: CACCTTCCCAGGCTTTGTCT R: GGCTCTGGCCTCAGTAAGTT
9.	TGFβ	F: ATTCCTGGCGCTACCTCAGT R: GCTGGAACTGAACCCGTTGAT
10.	IRS	F: CTGCTGGGGGTTTGGAGAAT R: TAAATCCTCACTGGAGCGGC
11.	TNFα	F: CTTGTGCCTCAGCCTCTTCTCCTTC R: GGTTGACCTTGGACGGGTAG
12.	IL-4	F: GCTGAACAACCTCACAGATGG R: CAGCCCTGCAGATTTCTTT
13.	IL-10	F: CTAGGGAACGAAGCATCCAGG R: TCAGGAGAGAGGTACCACAGG
14.	IL1β	F: GGGATGAAAGATGGGAAGC R: TTTCCATTTTCTCTTTGGGTA
15.	IL-13	F: AGCAGTCATTGCTCTCGCTT R: CTCCACACCATGCTGCCATT
16.	BAD	F: GGACCGAGGATGAAGGGATG R: GGAAGGAGACCTGGAACCTCG
18.	IL-6	F: CGTCACTCCAGTTGCCTTCT R: GCCAGTACCTCCTTGCTGTT
19.	INSR	F: CAGTCAACGAGTCTGCCAGT R: CCCGGTGCACAACTTCTTG
21.	GLUT4	F: CGGGTTTTCAACAGATCGGC R: CACCTTCTGTGGGGCATTGA

22.	GPX	F: TCGAGCCCAACTTCACACTC R: AAGTTCCAGGCGACATCGTT
23.	CAT	F: ACTCCCATTGCGGTTTCGATT R: TCAGGTGCGTTTGAGGGTTT
24.	SOD1	F: CATTCCATCATTGGCCGCAC R: GAGCGATCCCAATCACACCA
25.	SOD2	F: GGACAAACCTGAGCCCCAAT R: TTGGACACCAGCCGATACAG

Tabela 4. Sekwencja starterów użytych do analizy ekspresji miRNA w teście qRT- PCR.

Lp.	Nazwa genu	Sekwencja starterów 5'-3'
1.	miR- 146	TGAGAACTGAATTCCATGGGTT
2.	miR- 101	TACAGTACTGTGATAACTGAA
3.	miR- 17	CAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG
4.	miR- 103	AGCAGCATTGTACAGGGCTATGA
5.	miR- 130	CAGTGCAATGTTAAAAGGGCAT
6.	miR- 107	AGCAGCATTGTACAGGGCTATCA
7.	miR- 155	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGTT

#### 4.7.10. Cytometria mikrokapilarna

Wewnątrzkomórkowe reaktywne formy tlenu (ROS) zostały wykryte przy zastosowaniu zestawu Muse® Oxidative Stress Kit, opartego na dihydroetydynie (DHA). Zmiany potencjału błony mitochondrialnej oceniono przy użyciu zestawu Muse® Mitopotential Assay Kit, co pozwoliło na ocenę czterech populacji komórek – żywych, zdepolaryzowanych/ żywych, zdepolaryzowanych/ martwych oraz martwych.

Komórki zebrano przy użyciu trypsyny-EDTA 1x w PBS zgodnie z opisanym powyżej traktowaniem, przemyto HBSS i zmieszano z working solution przygotowanym w 1x Buforze Testowym. Po 30 min inkubacji w 37°C, przeprowadzono analizę przy użyciu analizatora komórek Muse™ (Merck, Darmstadt, Niemcy).

W celu określenia wpływu ekstraktów na apoptozę komórek ASC przeprowadzono test za pomocą zestawu Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit. Test został wykorzystany do określenia odsetka komórek żywych i martwych oraz wczesnej i późnej apoptozy. Profil apoptozy i procent żywych komórek określono za pomocą Muse™ Analizator komórek.



Procedura bramkowania populacji komórek została oparta na kontroli pozytywnej i negatywnej. Wyniki uzyskano za pomocą analizatora komórek Muse (Merck, Darmstadt, Niemcy).

#### 4.8. Analiza statystyczna

Materiał liczbowy uzyskany w doświadczeniach uporządkowano i opracowano w formie tabel oraz wykresów przy pomocy programu Microsoft Excel 2016. Testem Saphiro-Wilka sprawdzano normalność rozkładów w poszczególnych grupach doświadczalnych w zależności od analizowanej cechy. Do obliczeń statystycznych związanych z badaniami molekularnymi i cytobiologicznymi komórek ASC zastosowano program GraphPad Prism 8.0 (San Diego, Kalifornia, USA) z jednokierunkową analizą wariancji (ANOVA). Pozostałe wyniki doświadczeń wykonano przy pomocy programu Statistica 13.0 (Statsoft Inc.). Wyniki opracowano metodą analizy wariancji w układzie jedno i dwuczynnikowym. Dane dotyczące liczby bakterii zostały przekształcone przy zastosowaniu transformacji logarymicznej. Istotności różnic między wartościami średnimi w obrębie efektów głównych określono przy pomocy testu Tuckey'a.

Doświadczenia były analizowane statystycznie według następujących modeli:

– jednoczynnikowy:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

– dwuczynnikowy:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

gdzie,

poszczególne symbole oznaczają:

$y_{ij}$  ub  $y_{ijk}$  – wartość obserwowanej zmiennej zależnej

$\mu$  – średnia ogólna w populacji generalnej (wpływ czynników wspólnych dla wszystkich elementów populacji)

$\alpha_i$  – wpływ zastosowania szczepu bakteryjnego

$\beta_j$  – wpływ dnia inkubacji bakteryjnej

$\varepsilon_{ij}$  ( $\alpha\beta$ )<sub>ij</sub> – interakcję pomiędzy zastosowanym szczepem bakteryjnym i dniem inkubacji bakteryjnej

$\varepsilon_{ijk}$  – wpływ czynników losowych

## 5. OMÓWIENIE WYNIKÓW

### 5.1. Analiza fizyko- chemiczna fermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych

#### 5.1.1. Zmiany wartości pH w biomase z fermentowanych wysłodków buraczanych w zależności od czasu fermentacji

Kluczowym etapem rozpoczynającym doświadczenie było określenie odpowiednich warunków do zainicjowania procesu fermentacji. Na prawidłowy przebieg fermentacji wpływa wiele czynników, w tym między innymi czas i wartość pH fermentowanego środowiska. W niniejszych badaniach odnotowano zmiany wartości pH w czasie 6- dniowego okresu fermentacji zarówno w wysłodkach buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (CTRL), a także w laktofermentowanych wysłodkach buraczanych zawierających szczepy bakterii probiotycznych *Lactobacillus rhamnosus* (LR) lub *Pediococcus acidilactici* (PA).

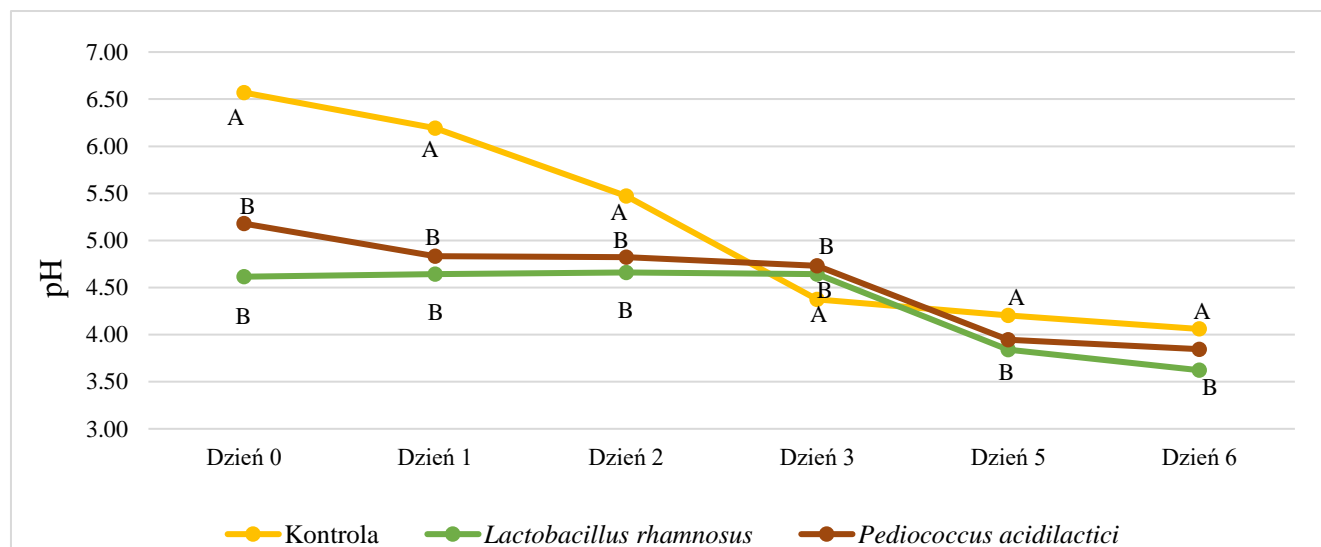
Analizując wartość odczynu pH z całego okresu fermentacji pomiędzy grupami, wykazano statystycznie istotnie niższe wartości pH w przypadku grup LR i PA w porównaniu do grupy CTRL ( $p \leq 0,01$ ). Odnotowano również statystycznie istotne obniżenie odczynu pH w całym procesie fermentacji (dni) ( $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ ). Dodatkowo wykazano wysoko istotne interakcje między szczepami bakteryjnymi, a dniem inkubacji fermentowanych wysłodków buraczanych ( $p \leq 0,01$ ) (tabela 5).

Rozpatrując zmiany wartości pH w każdym dniu fermentacji, w pierwszym okresie procesu tj. dzień 0, 1, 2 i 3 stwierdzono statystycznie istotne różnice pomiędzy grupą wysłodków bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (CTRL), a biomasami z dodatkiem szczepów bakterii LR i PA ( $p \leq 0,01$ ). Z kolei w dniu 5 i 6 wysoko istotne różnice odnotowano między grupą CTRL a LR ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 1).

Tabela 5. Zmiany wartości pH fermentowanych wysłodków buraczanych bez udziału szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz laktofermentowanych wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* w odniesieniu do różnic między grupami oraz czasem fermentacji,  $\bar{x} \pm SD$ .

Wyszczególnienie	Szczep bakteryjny			Dzień						SEM	Wartość p		
	Kontrola	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0	1	2	3	5	6		Szczep bakteryjny	Dzień inkubacji	Interakcja
pH	5,16 <sup>A</sup> ±1,01	4,32 <sup>B</sup> ±0,44	4,53 <sup>C</sup> ±0,54	5,46 <sup>Aa</sup> ±0,90	5,22 <sup>Bb</sup> ±0,74	4,98 <sup>Cc</sup> ±0,38	4,61 <sup>Dd</sup> ±0,19	4,00 <sup>Ee</sup> ±0,18	3,83 <sup>Ef</sup> ±0,22	0,11	0,000	0,000	0,000

A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ ; a, b przy  $p \leq 0,05$



Wykres 1. Przedstawienie liniowej zależności zmian pH na przestrzeni czasu fermentacji w biomase z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomase z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici*. A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ .

### 5.1.2. Skład chemiczny biomasy z laktofermentowanych wysłodków buraczanych

W celu oznaczenia składu chemicznego składników pokarmowych przeprowadzono analizę weendeńską. W fermentowanej biomase bez dodatku mikroorganizmów (CTRL), a także w laktofermentowanych biomasach z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) lub *Pediococcus acidilactici* (PA) oznaczono zawartość suchej masy (SM), białka ogólnego (BO), włókna surowego (WS), popiołu surowego (PS), tłuszczu surowego (TS), związków bezazotowych wyciągowych (BAW), włókna neutralno-detergentowego (NDF) oraz włókna kwaśno-detergentowego (ADF).

Analizując skład chemiczny fermentowanych biomas z wysłodków buraczanych w materiale świeżym, zaobserwowano statystycznie istotne różnice w zawartości WS i BO pomiędzy grupą kontrolną, LR i PA ( $p \leq 0,01$ ). Ponadto odnotowano wysoko istotny wzrost zawartości PS, NDF i ADF między grupą z dodatkiem LR, a grupą kontrolną ( $p \leq 0,01$ ). Nie zaobserwowano różnic statystycznych w zawartości SM, TS i BAW pomiędzy grupami. W toku przeprowadzonych badań w odniesieniu do czasu trwania fermentacji stwierdzono wysoko istotny wzrost składników pokarmowych we wszystkich grupach doświadczalnych pomiędzy dniem początkowym (dzień 0) a ostatnim trwania fermentacji (dzień 6) ( $p \leq 0,01$ ) (tabela 6).

Analiza składu chemicznego laktofermentowanych wysłodków buraczanych w materiale podsuszonym wykazała statystycznie istotny wzrost zawartości BO i WS w grupie zawierającej szczepy bakterii probiotycznych LR i PA w porównaniu do grupy CTRL ( $p \leq 0,01$ ). Z kolei w przypadku związków bezazotowych wyciągowych (BAW) zaobserwowano istotnie statystycznie niższe wartości średnie w grupach LR i PA w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobne tendencje wykazano w przypadku zawartości frakcji włóknistych NDF i ADF między grupą PA, a grupą kontrolną ( $p \leq 0,01$ ). Nie odnotowano istotnych różnic w zawartości PS i TS pomiędzy grupami doświadczalnymi. Stwierdzono także statystycznie istotny wzrost zawartości składników pokarmowych pomiędzy dniem początkowym (dzień 0) a ostatnim (dzień 6) trwania fermentacji ( $p \leq 0,01$ ) (tabela 7).

Tabela 6. Skład chemiczny fermentowanych wyśłodków buraczanych bez udziału szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz laktofermentowanych wyśłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* w odniesieniu do różnic między grupami, a także dniem fermentacji w materiale świeżym (%),  $\bar{x} \pm SD$ .

Wyszczególnienie	Szczep bakteryjny			Czas porania		SEM	Wartość p		
	Kontrola	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Dzień 1	Dzień 6		Szczep bakteryjny	Dzień fermentacji	Interakcje
Sucha masa	9,45	9,86	10,11	8,69 <sup>A</sup>	10,92 <sup>B</sup>	0,31	0,560	0,000	0,240
	±2,27	±2,03	±1,31	±1,91	±0,85				
Włókno surowe	1,31 <sup>A</sup>	1,63 <sup>B</sup>	1,49 <sup>C</sup>	1,43 <sup>A</sup>	1,52 <sup>B</sup>	0,04	0,020	0,000	0,00
	±0,19	±0,17	±0,14	±0,24	±0,19				
Białko ogólne	1,00 <sup>A</sup>	1,26 <sup>B</sup>	1,14 <sup>C</sup>	1,02 <sup>A</sup>	1,25 <sup>B</sup>	0,03	0,000	0,000	0,240
	±0,13	±0,21	±0,10	±0,13	±0,16				
Popiół surowy	0,70 <sup>Ab</sup>	0,87 <sup>Bb</sup>	0,72 <sup>Ac</sup>	0,71 <sup>A</sup>	0,84 <sup>B</sup>	0,02	0,000	0,000	0,010
	±0,08	±0,13	±0,04	±0,09	±1,00				
Tłuszcz surowy	0,03	0,04	0,03	0,03 <sup>A</sup>	0,04 <sup>B</sup>	0,00	0,280	0,010	0,000
	±0,02	±0,01	±0,01	±0,01	±0,01				
Bezazotowe wyciągowe	6,40	6,07	6,69	5,49 <sup>A</sup>	7,28 <sup>B</sup>	0,29	0,600	0,000	0,430
	±1,98	±1,85	±1,32	±1,81	±1,01				
NDF	4,45 <sup>A</sup>	5,30 <sup>B</sup>	4,40 <sup>A</sup>	4,35 <sup>A</sup>	5,09 <sup>B</sup>	0,11	0,000	0,000	0,730
	±0,40	±0,69	±0,52	±0,49	±0,65				
ADF	1,97 <sup>A</sup>	2,27 <sup>B</sup>	1,96 <sup>A</sup>	1,90 <sup>A</sup>	2,23 <sup>B</sup>	0,05	0,000	0,000	0,360
	±0,28	±0,33	±0,18	±0,21	±0,28				

A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ ; a, b przy  $p \leq 0,05$

Tabela 7. Skład chemiczny fermentowanych wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz laktofermentowanych wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* w odniesieniu do różnic między grupami, a także dniem fermentacji w suchej masie (%),  $\bar{x} \pm SD$ .

Wyszczególnienie	Szczep bakteryjny			Czas pobrania		SEM	Wartość p		
	Kontrola	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Dzień 1	Dzień 6		Szczep bakteryjny	Dzień fermentacji	Interakcje
<b>Włókno surowe</b>	14,79 <sup>Ab</sup>	15,74 <sup>B</sup>	15,65 <sup>Ba</sup>	16,01 <sup>A</sup>	14,77 <sup>B</sup>	0,23	0,000	0,010	0,000
	±0,81	±1,83	±1,24	±1,56	±0,85				
<b>Białko ogólne</b>	11,28 <sup>A</sup>	12,04 <sup>B</sup>	11,95 <sup>B</sup>	11,43 <sup>A</sup>	12,09 <sup>B</sup>	0,09	0,000	0,000	0,140
	±0,35	±0,51	±0,40	±0,38	±0,47				
<b>Popiół surowy</b>	7,96	8,30	7,99	8,01	8,16	0,10	0,310	0,460	0,080
	±0,63	±0,78	±0,36	±0,61	±0,64				
<b>Tłuszcz surowy</b>	0,35	0,36	0,31	0,31	0,37	0,02	0,470	0,110	0,000
	±0,18	±0,10	±1,00	±0,13	±0,14				
<b>Bezazotowe wyciągowe</b>	65,62 <sup>A</sup>	63,56 <sup>B</sup>	64,11 <sup>B</sup>	64,24	64,62	0,25	0,000	0,250	0,000
	±1,44	±1,26	±1,04	±1,98	±0,83				
<b>NDF</b>	50,45 <sup>A</sup>	50,86 <sup>A</sup>	46,05 <sup>B</sup>	48,92	49,31	0,62	0,000	0,670	0,010
	±2,98	±3,00	±3,21	±4,73	±2,41				
<b>ADF</b>	22,19 <sup>A</sup>	21,72 <sup>A</sup>	20,52 <sup>B</sup>	21,31	21,65	0,21	0,000	0,340	0,170
	±0,99	±1,32	±0,93	±1,24	±1,33				

A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ ; a, b przy  $p \leq 0,05$

### 5.1.3. Całkowita zawartość polifenoli oraz właściwości antyoksydacyjne

Określenie całkowitej zawartości polifenoli metodą Folina-Ciocalteu, a także aktywność przeciwutleniającą mierzona, jako zdolność wychwytywania wolnych rodników (DPPH i ABTS) oraz zdolność redukcji żelaza (FRAP) przeprowadzono w fermentowanych wysłodkach buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (CTRL) oraz w laktofermentowanej biomase z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) lub *Pediococcus acidilactici* (PA).

Najwyższą aktywność antyoksydacyjną DPPH wykazano w grupie kontrolnej (1,10 mMol TE/100g), przy czym odnotowano wysoko istotne różnice między wszystkimi grupami doświadczalnymi ( $p \leq 0,01$ ). W metodzie ABTS wysokie właściwości przeciwutleniające zaobserwowano w biomase z dodatkiem szczepu LR (1,024 mMol TE/100g), z kolei statystycznie istotne różnice występowały między grupą CTRL, a grupami z dodatkiem szczepów bakterii probiotycznych LR i PA ( $p \leq 0,01$ ). Test mocy przeciwutleniającej redukującej żelazo FRAP wykazał najwyższy potencjał antyoksydacyjny w biomase z dodatkiem szczepu *Pediococcus acidilactici* (PA) (0,39 mMol TE/100g). Stwierdzono także statystycznie istotne różnice między PA w porównaniu do CTRL i LR ( $p \leq 0,01$ ) (tabela 8).

Całkowita zawartość polifenoli była statystycznie istotnie wyższa w biomasach z dodatkiem szczepów bakterii probiotycznych LR i PA (0,17 mg/100g) w porównaniu do grupy kontrolnej (0,14 mg/100g) ( $p \leq 0,01$ ). Ponadto zaobserwowano statystyczne istotne różnice w czasie trwania fermentacji pomiędzy poszczególnymi dniami doświadczenia w odniesieniu do aktywności przeciwutleniającej metodami DPPH ABTS i FRAP oraz całkowitej zawartości polifenoli ( $p \leq 0,01$ ) ( $p \leq 0,05$ ). Wykazano również wysoko istotne interakcje między szczepami bakteryjnymi w porównaniu do czasu fermentacji ( $p \leq 0,01$ ) (tabela 8).

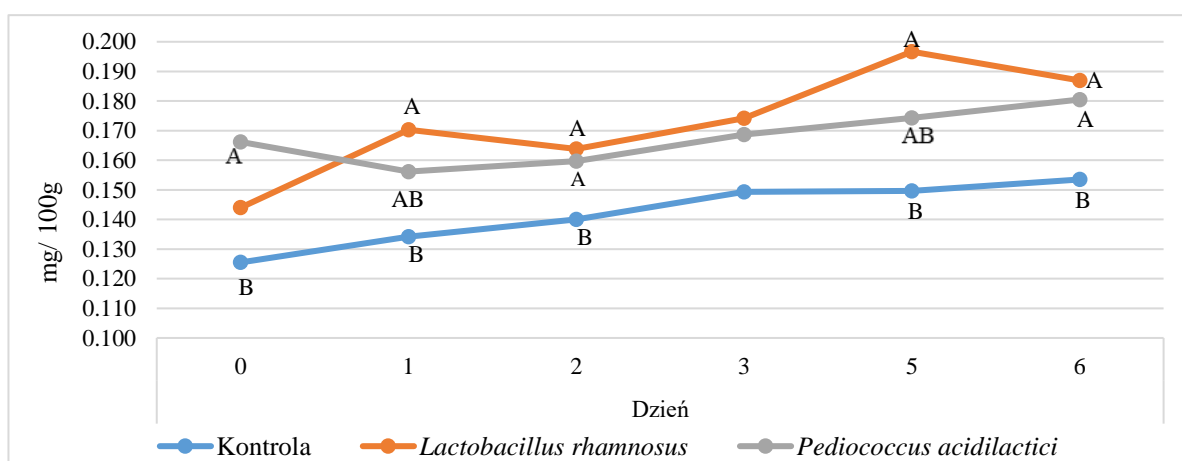
Tabela 8. Całkowita zawartość polifenoli [mg/100g] oraz aktywność antyoksydacyjna (DPPH, FRAP i ABTS) [mMol TE/100g] w fermentowanej biomasie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomasie z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici*,  $\bar{x} \pm SD$ .

Wyszczególnienie	Szczep bakteryjny			Dzień						SEM	Wartość p		
	Kontrola	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0	1	2	3	5	6		Szczep bakteryjny	Dzień inkubacji	Interakcje
<b>DPPH</b>	1,10 <sup>A</sup>	1,06 <sup>C</sup>	1,08 <sup>B</sup>	1,10 <sup>Aa</sup>	1,09 <sup>Bb</sup>	1,09 <sup>Bb</sup>	1,08 <sup>Cc</sup>	1,07 <sup>CDd</sup>	1,07 <sup>Dd</sup>	0,003	0,000	0,000	0,000
	±0,01	±0,023	±0,01	±0,01	±0,01	±0,01	±0,02	±0,03	±0,02				
<b>ABTS</b>	1,06 <sup>A</sup>	1,024 <sup>B</sup>	1,03 <sup>B</sup>	1,06 <sup>A</sup>	1,05 <sup>AB</sup>	1,04 <sup>ABC</sup>	1,03 <sup>BC</sup>	1,02 <sup>BC</sup>	1,03 <sup>C</sup>	0,003	0,000	0,000	0,000
	±0,02	±0,03	±0,02	±0,02	±0,02	±0,01	±0,01	±0,03	±0,03				
<b>FRAP</b>	0,34 <sup>A</sup>	0,340 <sup>A</sup>	0,39 <sup>B</sup>	0,33 <sup>D</sup>	0,35 <sup>CD</sup>	0,39 <sup>CD</sup>	0,38 <sup>BC</sup>	0,41 <sup>AB</sup>	0,43 <sup>A</sup>	0,007	0,000	0,000	0,000
	±0,04	±0,06	±0,04	±0,04	±0,04	±0,02	±0,02	±0,05	±0,05				
<b>Polifenole</b>	0,14 <sup>A</sup>	0,17 <sup>B</sup>	0,17 <sup>B</sup>	0,15 <sup>C</sup>	0,15 <sup>BC</sup>	0,16 <sup>BC</sup>	0,16 <sup>AB</sup>	0,17 <sup>A</sup>	0,17 <sup>A</sup>	0,003	0,000	0,000	0,030
	±0,01	±0,02	±0,01	±0,02	±0,01	±0,01	±0,01	±0,02	±0,02				

A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ ; a, b przy  $p \leq 0,05$

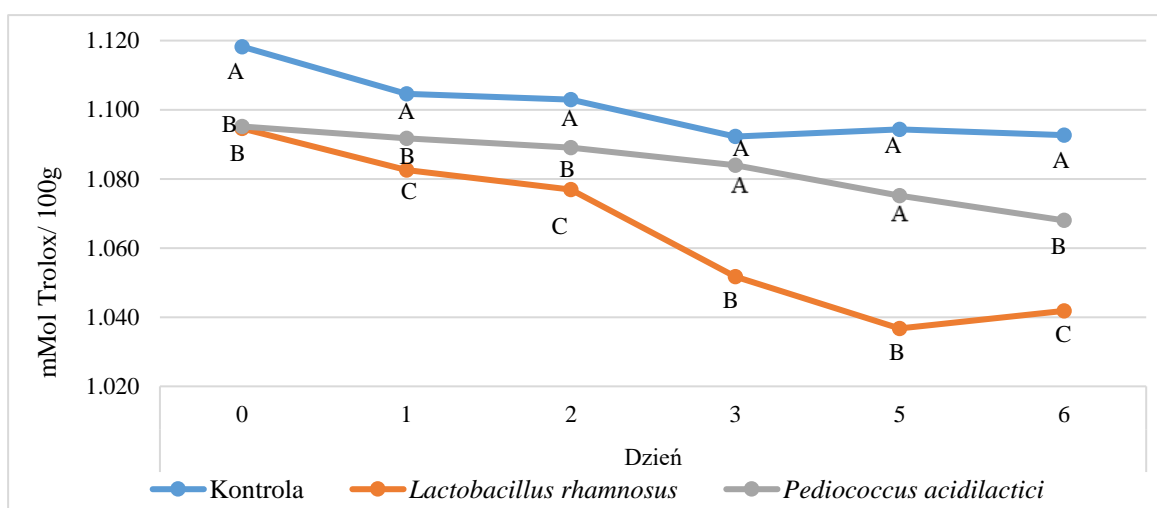


Analizując zmiany w całkowitej zawartości polifenoli w grupach doświadczalnych, biorąc pod uwagę czas trwania fermentacji (dni), zaobserwowano wzrastający udział związków polifenolowych w grupie CTRL rozpoczynając od wartości 0,13 mg/100g w dniu 0 osiągając maksymalny wynik w dniu 6 na poziomie 0,15 mg/100g. W grupie LR również odnotowano podobne tendencje, odpowiednio 0,14 mg/100g w dniu 0 do 0,18 mg/100g w ostatnim dniu fermentacji, przy czym najwyższy wynik uzyskano w dniu 5 fermentacji wynoszący 0,20 mg/100g. W grupie PA wykazano tendencje wzrostową wraz z postępującym procesem fermentacji od 0,17 mg/100g w dniu 0 do wartości maksymalnej 0,18 mg/100g w dniu 6. Ponadto stwierdzono wysoko istotne różnice między grupą CTRL a LR i PA w dniu 2 i 6 trwania fermentacji ( $p \leq 0,01$ ). W dniu 0 odnotowano wysoko istotne różnice między CTRL a PA ( $p \leq 0,01$ ), natomiast w dniu 1 i 5 zaobserwowano statystycznie istotne różnice między CTRL a LR ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 2).



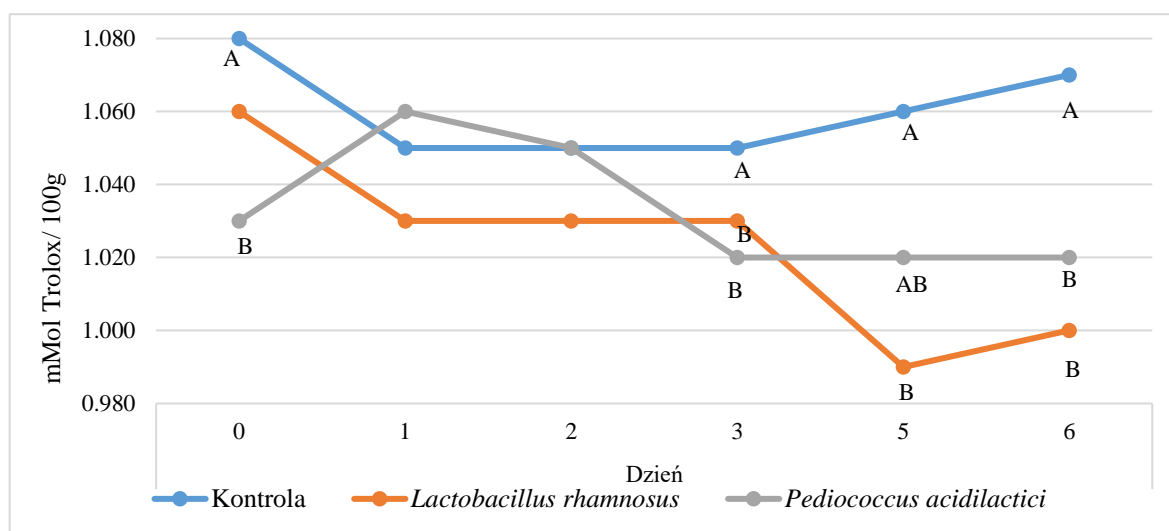
Wykres 2. Całkowita zawartość polifenoli w fermentowanej biomase z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomase z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* w zależności od dnia fermentacji biomasy [mg/100g]. A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ .

W metodzie DPPH w zależności od czasu fermentacji zaobserwowano liniowy spadek aktywności przeciwutleniającej we wszystkich grupach doświadczalnych. W przypadku grupy CTRL początkowa wartość wynosiła 1,12 mMol TE/100g, natomiast w dniu 6 odnotowano wartość maksymalną na poziomie 1,09 mMol TE/100g. Podobne wyniki odnotowano w grupie LR w dniu rozpoczynającym laktofermentację 1,09 mMol TE/100g do 1,04 mMol TE/100g w dniu 6, analogicznie w grupie PA od 1,09 mMol TE/100g do 1,07 mMol TE/100g. Ponadto wykazano wysoko istotne różnice w dniu 0 między CTRL a LR ( $p \leq 0,01$ ). Natomiast w dniu 3 oraz 5 trwania fermentacji odnotowano statystycznie istotne różnice między grupą CTRL a LR ( $p \leq 0,01$ ), z kolei w dniu 1, 2 oraz 6 między wszystkimi grupami doświadczalnymi ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 3).



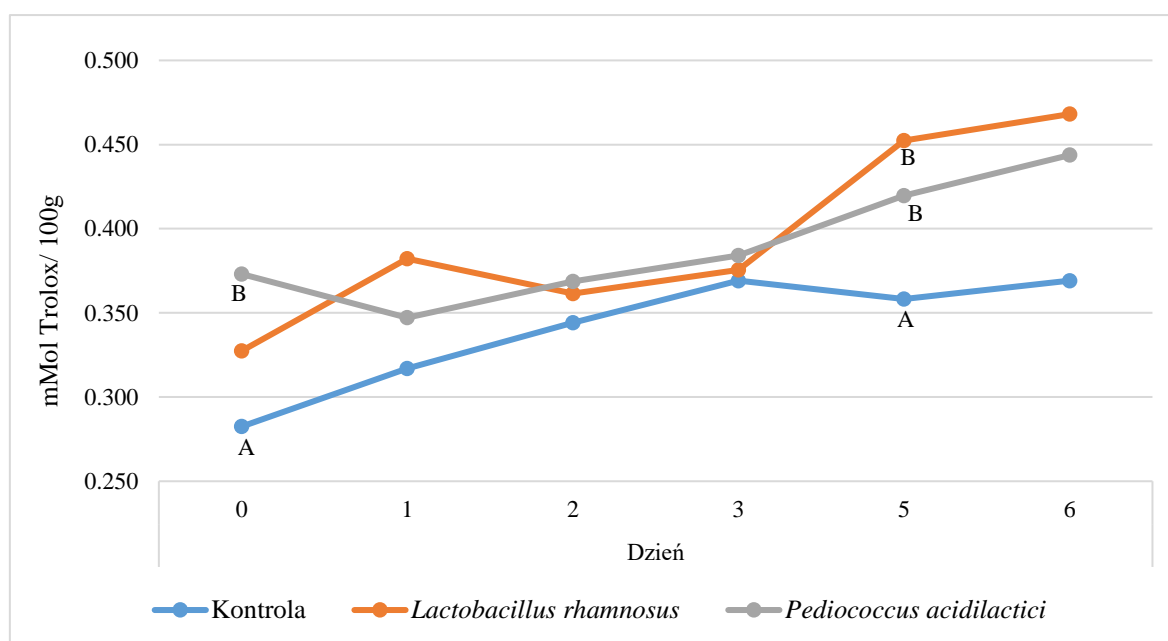
Wykres 3. Aktywność antyoksydacyjna fermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz laktofermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* oznaczana metodą DPPH w zależności od dnia fermentacji. A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ .

W przypadku oceny aktywności przeciwutleniającej metodą ABTS w odniesieniu do czasu fermentacji, w grupie biomasy CTRL obserwuje się niewielki spadek właściwości przeciwutleniającej rozpoczynając od dnia początkowego na poziomie 1,08 mMol TE/100g osiągając wartości 1,07 mMol TE/100g w dniu 6. Podobne tendencje wykazano w grupie LR, od dnia 0 wartość ABTS wynosiła 1,06 mMol TE/100g, natomiast w ostatnim dniu odnotowano wartość na poziomie 1,00 mMol TE/100g. W grupie PA stwierdzono początkowy wzrost aktywności antyoksydacyjnej od 1,03 mMol TE/100g w dniu 0, po czym w dniu ostatnim trwania fermentacji wartość wyniosła 1,02 mMol TE/100g. Pomiedzy grupami obserwuje się wysoko istotne różnice między grupą CTRL a PA ( $p \leq 0,01$ ) w dniu 0, w dniu 3 i 6 stwierdzono wysoko istotne różnice między CTRL a LR i PA ( $p \leq 0,01$ ), natomiast w dniu 5. W dniu 1 i 2 nie wykazano różnic statystycznych (wykres 4).



Wykres 4. Aktywność antyoksydacyjna fermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz laktofermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* oznaczana metodą ABTS, w zależności od dnia fermentacji. A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ .

W metodzie zdolności redukcji żelaza metodą FRAP zaobserwowano wzrost właściwości przeciwutleniających, zarówno w grupie CTRL od 0,28 mMol TE/100g w dniu 0 do 0,37 mMol TE/100g w dniu 6. Podobne stwierdzenia odnotowano w grupach LR w dniu rozpoczynającym proces fermentacji na poziomie 0,33 mMol TE/100g do 0,47 mMol TE/100g w dniu ostatnim. W grupie PA analogicznie 0,37 mMol TE/100g (dzień 0) i 0,44 mMol TE/100g (dzień 6). Pomiędzy grupami odnotowano statystycznie istotne różnice w dniu 0 między CTRL a PA ( $p \leq 0,01$ ), z kolei w dniu 5 między CTRL a LR i PA ( $p \leq 0,01$ ). W dniu 1, 2, 3 i 6 nie wykazano różnic statystycznych między grupami doświadczalnymi (wykres 5).



Wykres 5. Aktywność antyoksydacyjna fermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz laktofermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* oznaczana metodą FRAP, w zależności od dnia fermentacji. A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ .

#### 5.1.4. Analiza węglowodanów niestrukturalnych (NSC)

##### 5.1.4.1. Oznaczanie sacharozy

W celu oceny wpływu laktofermentacji na obniżenie cukrów prostych przeprowadzono oznaczanie zawartości sacharozy w fermentowanych wysłódkach buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (CTRL) oraz w laktofermentowanych wysłódkach buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) lub *Pediococcus acidilactici* (PA).

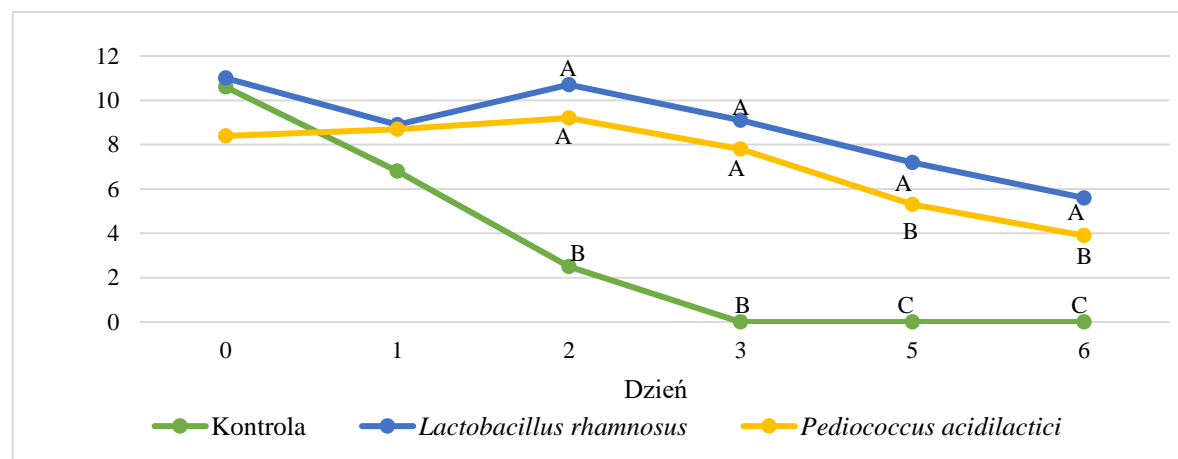
Analizując zmiany w zawartości cukru prostego pomiędzy grupami doświadczalnymi podczas całego procesu fermentacji, najniższe wartości uzyskano w grupie CTRL (3,35 mg/kg), następnie w grupie PA (7,06 mg/g) i LR (8,84 mg/g) ( $p \leq 0,01$ ). Ponadto średnie wartości ukazują liniowy spadek udziału sacharozy wraz z postępującym procesem fermentacji w odniesieniu do wszystkich grup doświadczalnych, rozpoczynając od wartości na poziomie 8,39 mg/g do 3,64 mg/g w ostatnim dniu fermentacji ( $p \leq 0,01$ ). Zaobserwowano także wysoko istotne interakcje między szczepem bakteryjnym a czasem fermentacji (dni) ( $p \leq 0,01$ ) (tabela 9).

Zaobserwowano również istotne różnice statystyczne w zawartości sacharozy pomiędzy grupami doświadczalnymi w zależności od dnia fermentacji. w grupie CTRL początkowa zawartość sacharozy wynosiła 10,6 mg/g wykazując liniową tendencję spadkową i osiągając w dniu 2 (2,5 mg/g). Interesującym jest fakt, że od dnia 3 do końca fermentacji nie odnotowano udziału sacharozy w biomasie bez udziału szczepów bakterii probiotycznych. W przypadku laktofermentowanych biomas z dodatkiem szczepów bakterii probiotycznych obserwuje się równomierną redukcję sacharozy dla LR o 5,4 mg/g i PA o 4,5 mg/g. Ponadto zaobserwowano statystycznie istotne różnice w dniu 2 i 3 między CTRL a LR i PA ( $p \leq 0,01$ ) natomiast w dniu 5 i 6 między wszystkimi grupami doświadczalnymi ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 6).

Tabela 9. Zawartość sacharozy w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* (mg/100g),  $\bar{x} \pm SD$ .

Wyszczególnienie	Szczep bakteryjny			Dzień						SEM	Wartość p		
	Kontrola	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0	1	2	3	5	6		Szczep bakteryjny	Dzień fermentacji	Interakcje
Sacharoza	3,35 <sup>A</sup>	8,84 <sup>B</sup>	7,08 <sup>C</sup>	8,39 <sup>A</sup>	8,66 <sup>B</sup>	7,05 <sup>C</sup>	5,61 <sup>C</sup>	3,64 <sup>D</sup>	3,64 <sup>D</sup>	0,57	0,000	0,000	0,000
	±4,56	±2,76	±2,93	±2,48	±1,59	±4,40	±4,27	±3,35	±3,14				

A, B, C – wartości p istotne dla  $p \leq 0,01$ ; a, b, c w przypadku  $p \leq 0,05$



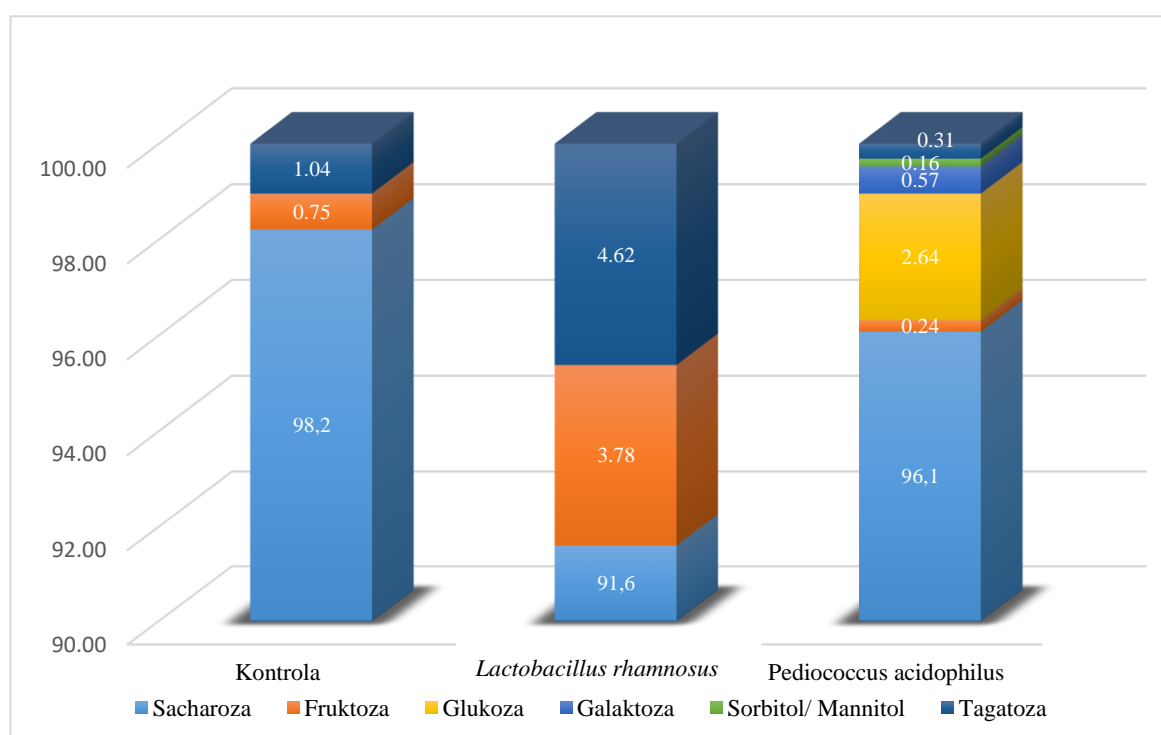
Wykres 6. Zmiany zawartości sacharozy w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* w zależności od dnia fermentacji (mg/100g).

A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ .

#### 5.1.4.2. Profilowanie węglowodanów

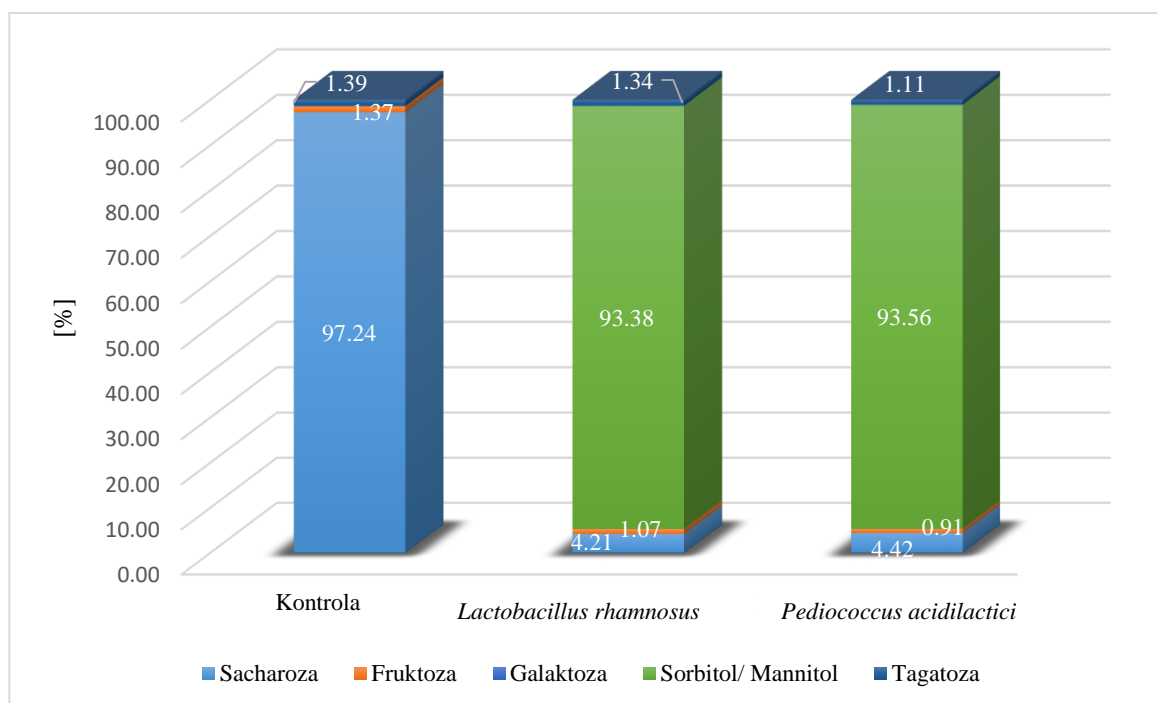
W celu identyfikacji sacharydów powstałych podczas procesu fermentacji przeprowadzono profilowanie węglowodanów w fermentowanych wysłodkach buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (CTRL) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) lub *Pediococcus acidilactici* (PA) w dniu rozpoczynającym oraz ostatnim fermentacji.

W dniu „0” profil węglowodanowy był zróżnicowany pomiędzy grupami doświadczalnymi. W grupie CTRL odnotowano wysoki udział sacharozy (98,2%), niewielki udział tagatozy (1,04%) oraz fruktozy (0,75%). W grupie laktofermentowanej biomasy z udziałem LR obserwuje się także najwyższą kumulację sacharozy (91,6%), następnie fruktozy (3,78%) oraz tagatozy (4,62%). W grupie biomasy z dodatkiem PA stwierdzono również najwyższe nagromadzenie sacharozy (96,1%), następnie tagatozy (0,31%) i fruktozy (0,24%). Interesującym jest również fakt pojawienia się nowych węglowodanów m.in. glukozy (2,64%), galaktozy (0,57%) oraz sorbitolu/ mannitolu (0,16%) (wykres 7).



Wykres 7. Udział ilościowy i jakościowy węglowodanów w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z dodatkiem szczepów *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* w dniu 0 fermentacji (%).

W ostatnim dniu fermentacji obserwuje się zmiany w koncentracji węglowodanów w porównaniu do dnia początkowego. W grupie kontrolnej stwierdzono niewielki spadek zawartości sacharozy o 0,96%, a także wzrost koncentracji fruktozy o 0,65% i tagatozy o 0,35%. W grupie biomasy z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* sacharoza uległa obniżeniu aż o 87,36%, podobnie fruktoza o 2,71% i tagatoza o 3,28%. Po 6- dniowej fermentacji stwierdzono także pojawienie się w biomacie nowych węglowodanów, a mianowicie sorbitolu/ mannitolu (93,8%). Podobne wyniki uzyskano w grupie biomasy z dodatkiem *Pediococcus acidilactici*, gdzie udział sacharozy obniżył się o 91,68%, z kolei koncentracja fruktozy i tagatozy i sorbitolu/ mannitolu wzrosła, odpowiednio o 0,67% i 0,8% i 93,4%. W grupie tej proces fermentacji spowodował całkowitą redukcję glukozy i galaktozy (wykres 8).



Wykres 8. Udział ilościowy i jakościowy węglowodanów w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z dodatkiem szczepów *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* w 6 dniu fermentacji (%).



### 5.1.5. Koncentracja krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w biomasie z wysłodków buraczanych

W celu określenia udziału krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (KKT), przeprowadzono analizę HPLC w fermentowanych wysłodkach buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (CTRL) oraz w laktofermentowanych wysłodkach buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) lub *Pediococcus acidilactici* (PA). W analizie stwierdzono obecność kwasu octowego, kwasu propionowego, kwasu masłowego oraz kwasu mlekowego.

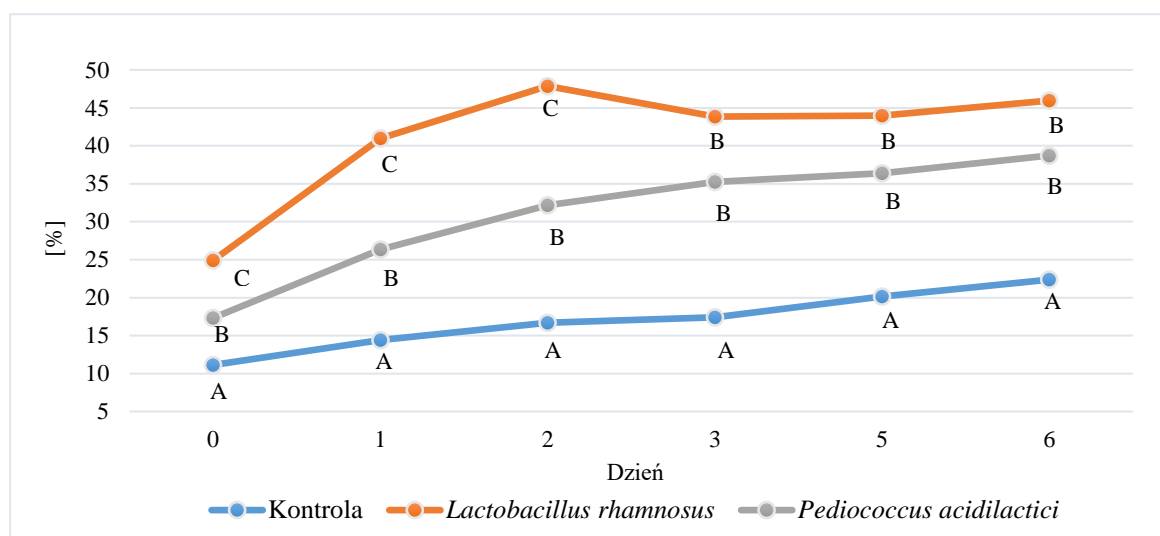
Pomiędzy poszczególnymi grupami doświadczalnymi na przestrzeni czasu trwania doświadczenia wykazano wysoko istotne różnice w zawartości kwasu octowego oraz mlekowego ( $p \leq 0,01$ ). W analizie koncentracji kwasu masłowego statystycznie istotne różnice stwierdzono między grupą kontrolną i *Pediococcus acidilactici* a grupą z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus*, w której to odnotowano najwyższą koncentrację obydwu kwasów organicznych ( $p \leq 0,01$ ). Z kolei w zawartości kwasu propionowego zaobserwowano wysoko istotne różnice między grupą kontrolną i grupą z dodatkiem LR w porównaniu do grupy z dodatkiem PA, przy czym szczep ten charakteryzował się najwyższą zdolnością produkcji kwasu propionowego w czasie fermentacji biomasy z wysłodków buraczanych ( $p \leq 0,01$ ). Analizując czas trwania fermentacji we wszystkich grupach doświadczalnych (od 0 – 6 dnia) zaobserwowano statystycznie istotny wzrost kwasu octowego, mlekowego i propionowego ( $p \leq 0,01$ ) oraz statystycznie istotny spadek kwasu masłowego ( $p \leq 0,01$ ) (tabela 10).

Tabela 10. Zawartość kwasów organicznych w fermentowanej biomacie z wysłdków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłdków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* (%),  $\bar{x} \pm SD$ .

Wyszczególnienie	Szczep bakteryjny			Dzień						SEM	Wartość p		
	Kontrola	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	0	1	2	3	5	6		Szczep bakteryjny	Dzień fermentacji	Interakcje
Kwas octowy	17,02 <sup>A</sup>	41,26 <sup>B</sup>	31,03 <sup>C</sup>	17,80 <sup>A</sup>	27,25 <sup>B</sup>	32,23 <sup>C</sup>	32,17 <sup>C</sup>	33,50 <sup>C</sup>	35,68 <sup>C</sup>	1,65	0,000	0,000	0,000
	±3,89	±8,02	±8,11	±6,02	±11,7	±13,6	±12,1	±10,9	±10,7				
Kwas masłowy	0,08 <sup>A</sup>	1,06 <sup>B</sup>	0,14 <sup>A</sup>	0,44 <sup>A</sup>	0,44 <sup>B</sup>	0,62 <sup>A</sup>	0,42 <sup>BC</sup>	0,28 <sup>C</sup>	0,38 <sup>BC</sup>	0,08	0,000	0,000	0,000
	±0,19	±0,51	±0,24	±0,33	±0,67	±0,94	±0,64	±0,43	±0,14				
Kwas mlekowy	0,00 <sup>A</sup>	6,46 <sup>B</sup>	3,46 <sup>C</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	3,97 <sup>B</sup>	15,87 <sup>C</sup>	1,08	0,000	0,000	0,000
	0,00	±10,79	±7,52	0,00	0,00	0,00	0,00	±4,97	±12,6				
Kwas propionowy	0,00 <sup>Ab</sup>	0,39 <sup>Ac</sup>	2,21 <sup>Ba</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	0,43 <sup>A</sup>	0,34 <sup>A</sup>	0,00 <sup>A</sup>	4,42 <sup>B</sup>	0,42	0,000	0,000	0,000
	0,00	±0,60	±5,13	0,00	0,00	±0,70	±0,52	0,00	±6,71				

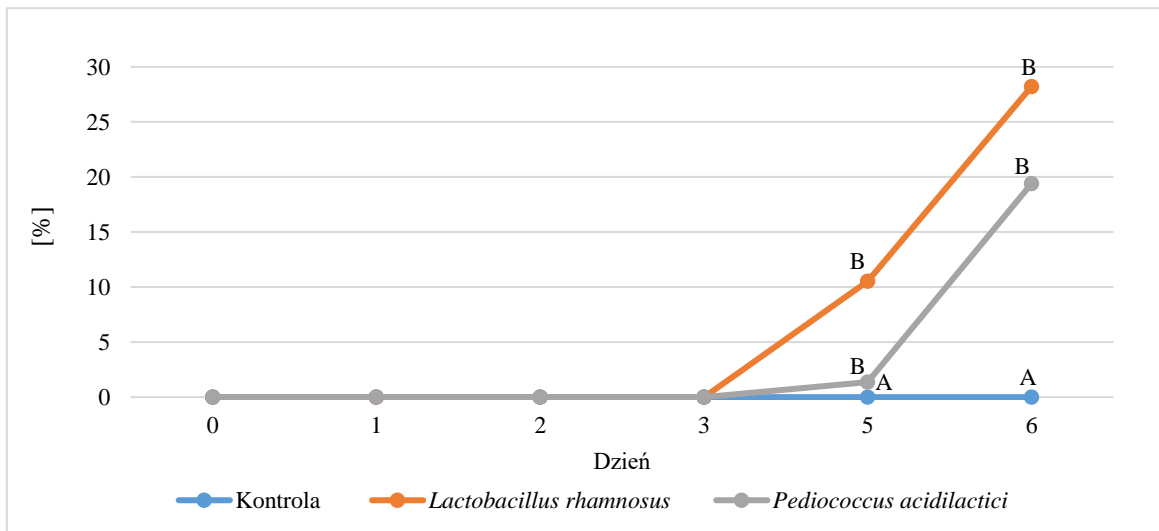
A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ ; a, b przy  $p \leq 0,05$

Analizując zawartość kwasu octowego w poszczególnych dniach trwania fermentacji, w przypadku CTRL wartość początkowa kształtowała się na poziomie 11,1% i osiągnęła udział maksymalny w dniu 6 (22,4%). W grupie z dodatkiem LR zawartość kwasu octowego była równa 24,9%, przy czym najwyższą wartość odnotowano w dniu 2 na poziomie 47,8%, w grupie PA w dniu 0 zawartość kwasu octowego wynosiła 17,3% i wzrastała liniowo osiągając maksymalny wynik w dniu 6 fermentacji na poziomie 38,7%. Ponadto zaobserwowana statystycznie istotne różnice między grupami doświadczalnymi tj. LR, PA i CTRL ( $p \leq 0,01$ ), z kolei w dniu 3, 5 i 6 stwierdzono statystycznie istotny wzrost kwasu octowego między CTRL a LR i PA ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 9).



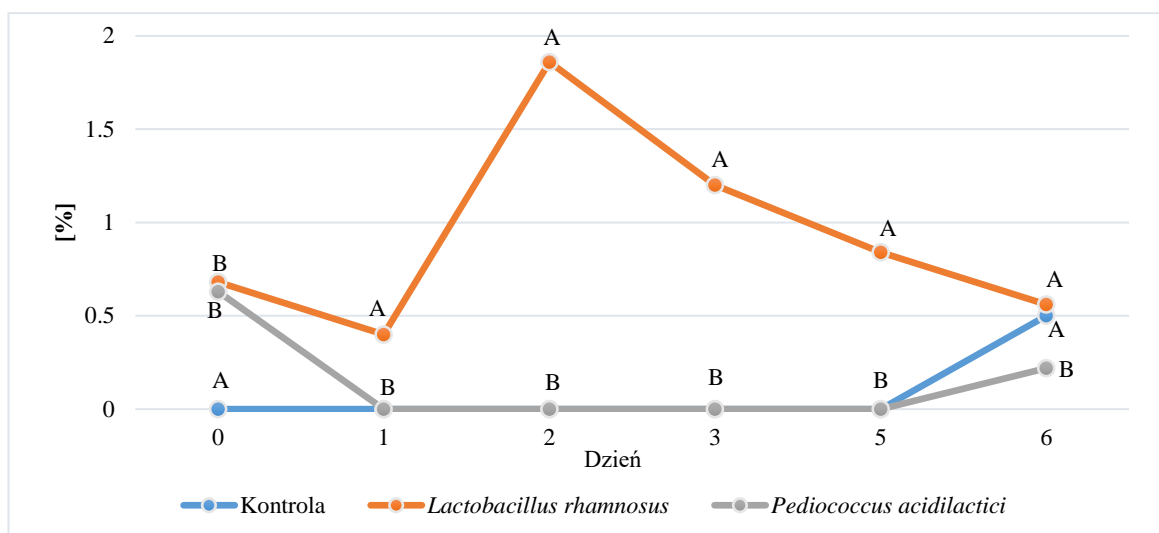
Wykres 9. Koncentracja kwasu octowego w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici*, pole pod wykresem krzywej (%). A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ .

Kolejnym analizowanym związkiem był kwas mlekowy. W początkowych dniach, tj. od dnia 0 do 3 nie zaobserwowano pojawienia się kwasu mlekowego w fermentowanych biomasach, zarówno w CTRL jak i LR i PA. W dniu 5 odnotowano wzrost udziału kwasu mlekowego w grupie LR na poziomie 10,5%, osiągając wartość 28,2% w ostatnim dniu fermentacji. Podobne tendencje uzyskano także w grupie PA, w dniu 5 wartość ta kształtowała się na poziomie 1,38%, z kolei w dni 6 trwania fermentacji wartość wynosiła 19,4% kwasu mlekowego. Ponadto zaobserwowano statystycznie istotny wzrost kwasu mlekowego w grupie LR i PA w porównaniu d CTRL ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 10).



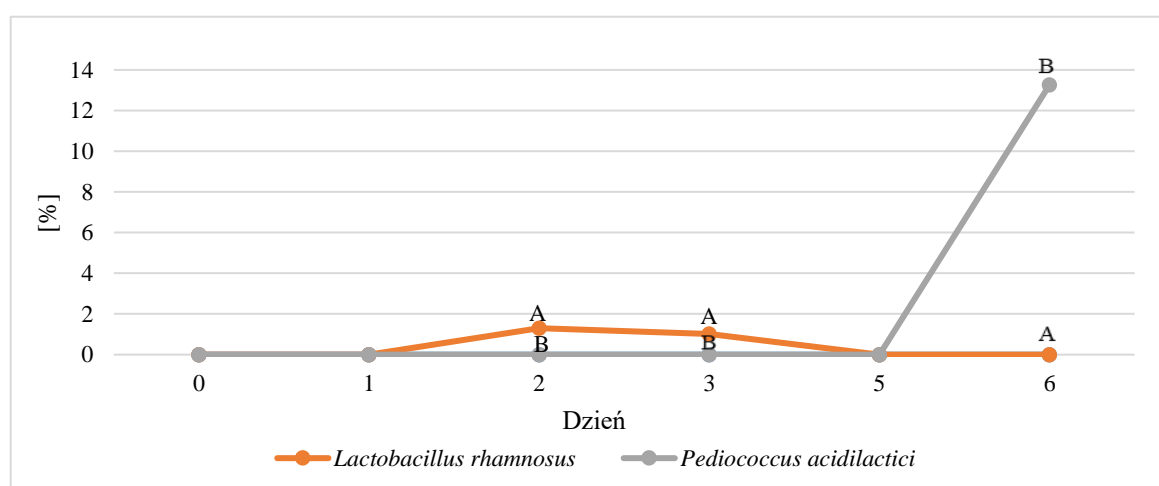
Wykres 10. Koncentracja kwasu mlekowego w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici*, pole pod wykresem krzywej (%) A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ .

W odniesieniu do kwasu masłowego obserwuje się nieznaczny wzrost udziału związku organicznego w każdej grupie doświadczalnej na przestrzeni trwania fermentacji. W grupie CTRL nie odnotowano udziału kwasu masłowego do dnia 5 (0,00%), z kolei w ostatnim dniu fermentacji wykazano nieznaczny wzrost na poziomie 0,50%. W grupie z dodatkiem LR zawartość kwasu masłowego była zróżnicowana, rozpoczynając od 0,68% w dniu 0, osiągając maksymalny wynik w dniu 2 na poziomie 1,86%, po czym obserwuje się tendencję spadkową do dnia 6, gdzie końcowa wartość wynosiła 0,56%. W przypadku grupy PA stwierdzono pojawienie się kwasu masłowego w dniu 0 na poziomie 0,63%, następnie przez kolejne dni nie zaobserwowano kwasu masłowego, natomiast wzrost nastąpił w ostatnim dniu fermentacji na poziomie 0,22%. Ponadto obserwuje się statystycznie wysoko istotne różnice w dniu 0 między CTRL a LR i PA ( $p \leq 0,01$ ), następnie w dniu 1, 2, 3 i 5 wykazano wysoko istotne różnice między LR a CTRL i PA ( $p \leq 0,01$ ). Z kolei w ostatnim dniu fermentacji zaobserwowano statystycznie istotny wzrost kwasu masłowego między PA a CTRL i LR ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 11).



Wykres 11. Koncentracja kwasu masłowego w fermentowanej biomase z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomase z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici*, pole pod wykresem krzywej (%). A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ .

Podczas procesu fermentacji zaobserwowano także niewielki udział kwasu propionowego w grupie LR i PA, z kolei w grupie CTRL nie odnotowano obecności kwasu propionowego przez cały okres trwania fermentacji. W przypadku LR wykazano wzrost kwasu propionowego w dniu 2 na poziomie 1,30%, po czym wartość ta spadła do 1,02% w dniu 3 i w następnych dniach aż do zakończenia fermentacji zaobserwowano zahamowanie produkcji tego kwasu organicznego. Z kolei w grupie PA odnotowano pojawienie się kwasu propionowego w ostatnim dniu fermentacji na poziomie 13,3%. Odnotowano wysoko istotne różnice między LR a PA ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 12).

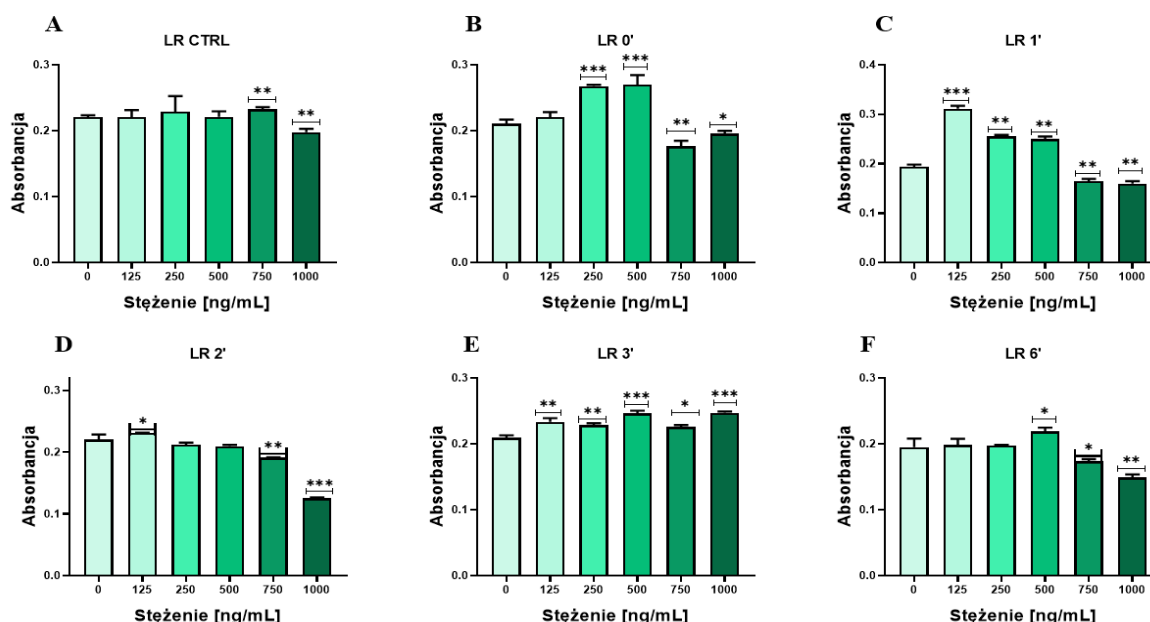


Wykres 12. Koncentracja kwasu propionowego w fermentowanej biomase z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomase z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici*, pole pod wykresem krzywej (%). A, B istotne przy  $p \leq 0,01$ .

## 5.2. Badania molekularne i cytobiologiczne komórek ASC z dodatkiem ekstraktów z wysłodków buraczanych

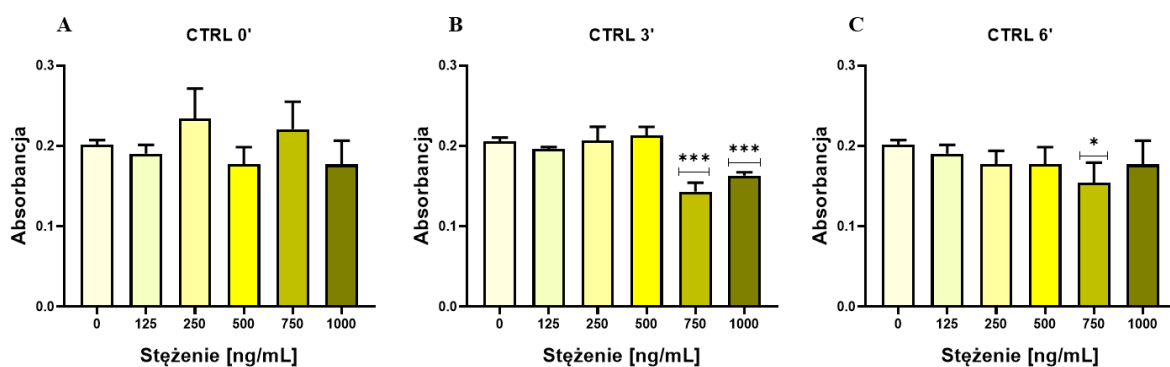
### 5.2.1. Test żywotności komórek

W celu określenia, a także wyboru korzystnego stężenia fermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR), a także fermentowanych ekstraktów bez udziału mikroorganizmów probiotycznych (CTRL') do dalszych badań, przeprowadzono analizę cytotoksyczności (TOX8 Assay). Do analiz molekularnych zostały wybrane ekstrakty z biomas pobranych przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL) oraz pobrane w dniu 0 (LR0'), pierwszym (LR1'), drugim (LR2'), trzecim (LR3') oraz szóstym (LR6'). W większości przypadków zaobserwowano, że wyższe stężenia ekstraktów na poziomie 750 – 1000 ng/mL wykazują działanie cytotoksyczne na komórki ASC pobrane od koni (odnotowano spadek absorbancji), w porównaniu do stężenia podczas hodowania komórek w medium kontrolnym (0 ng/ mL). Z kolei stężenia na poziomie 125 – 500 ng/mL wykazują wzrost absorbancji, co świadczy o tym, że stężenia te nie działają cytotoksyczne na komórki ASC. Do dalszych badań postanowiono przeprowadzić doświadczenie na komórkach działając stężeniem ekstraktów z laktofermentowanych wysłodków buraczanych na poziomie 500 ng/mL (wykres 13).



Wykres 13. Ocena cytotoksyczności ekstraktów wysłodków buraczanych w ekstrakcie kontrolnym przed dodaniem szczepów bakterii probiotycznych (LR CTRL) (A), a także laktofermentowanych ekstraktów z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* pobranych w dniach 0 (LR 0') (B), pierwszym (LR1') (C), drugim (LR2') (D), trzecim (LR3') (E) oraz szóstym (LR6') (F). Gwiazdka (\*) odnosi się do porównania grup traktowanych ekstraktami z *Lactobacillus rhamnosus* do medium kontrolnego (0 ng/ ml), \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

W drugiej grupie doświadczalnej, gdzie zastosowano fermentowane wysłodki buraczane bez udziału szczepu *Lactobacillus rhamnosus* wybrano biomasy pobrane w dniach 0 (CTRL 0'), trzecim (CTRL 3') oraz szóstym (CTRL 6'), gdyż po wstępnych badaniach nie zaobserwowano szczególnych zmian po zastosowaniu ekstraktów pobranych w dniach 1, 2 oraz 5. W teście żywotności odnotowano także, że stężenia na poziomie 750 – 1000 ng/mL wykazują działanie cytotoksyczne na komórki ASC. Natomiast w przypadku stężenia na poziomie 500 ng/mL odnotowano wzrost absorbancji, w związku z tym również wybrano to stężenie do dalszych badań (wykres 14).



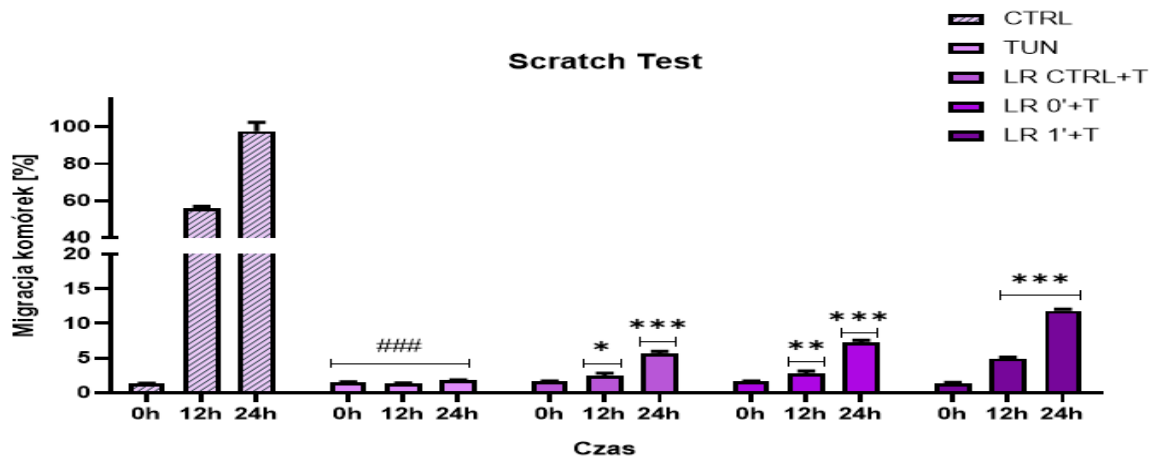
Wykres 14. Ocena cytotoksyczności fermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepu *Lactobacillus rhamnosus* pobranych w dniu 0 (CTRL 0') (A), oraz w dniach trzecim (CTRL 3') (B) i szóstym (CTRL 6') (C) trwania fermentacji. Gwiazdka (\*) odnosi się do porównania grup traktowanych ekstraktami do medium kontrolnego (0 ng/ml), \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

## 5.2.2. Ekstrakty z LR promują proliferację progenitorowych komórek ASC

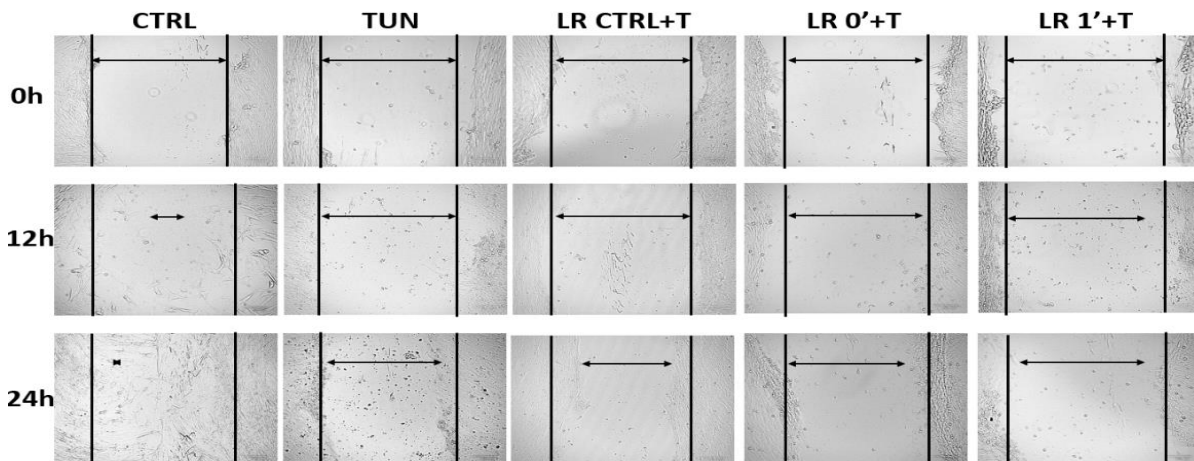
### 5.2.2.1. Test migracji komórek ASC

W celu zbadania aktywności migracyjnej komórek ASC w obecności fermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) przeprowadzono test ekspansji. Aktywność migracyjną komórek ASC traktowanych tunikamycyną i/lub ekstraktami z *Lactobacillus rhamnosus* oceniano po 12 oraz 24 godzinach inkubacji. Zaobserwowano, że po traktowaniu komórek ASC tunikamycyną (TUN) nastąpiło zahamowanie migracji komórek w porównaniu do komórek hodowanych w medium pełnym (CTRL). Z kolei w grupach doświadczalnych z udziałem LR można zaobserwować wyraźny wzrost aktywności komórek ASC odpowiednio po 12 jak i po 24 godzinach hodowli. W ekstrakcie kontrolnym przed dodaniem mikroorganizmów (LR CTRL+T), a także pobranym w dniu 0 (LR0'+T) i pierwszym (LR1'+T) obserwuje się wysoko istotne różnice po 24 godzinach inkubacji w porównaniu do komórek traktowanych tunikamycyną ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 15) (rycina 1). Laktofermentowane ekstrakty (LR) pobrane w dniach drugim (LR2'+T), trzecim (LR3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) również powodowały wzrost aktywności migracyjnej komórek ASC w porównaniu do TUN, zarówno po 12 jak i 24 godzinach hodowli ( $p \leq 0,001$ ), przy czym ekstrakt pobrany w dniu 3 (LR3'+T) wykazywał najwyższą zdolność migracyjną komórek ASC (wykres 16) (rycina 2).

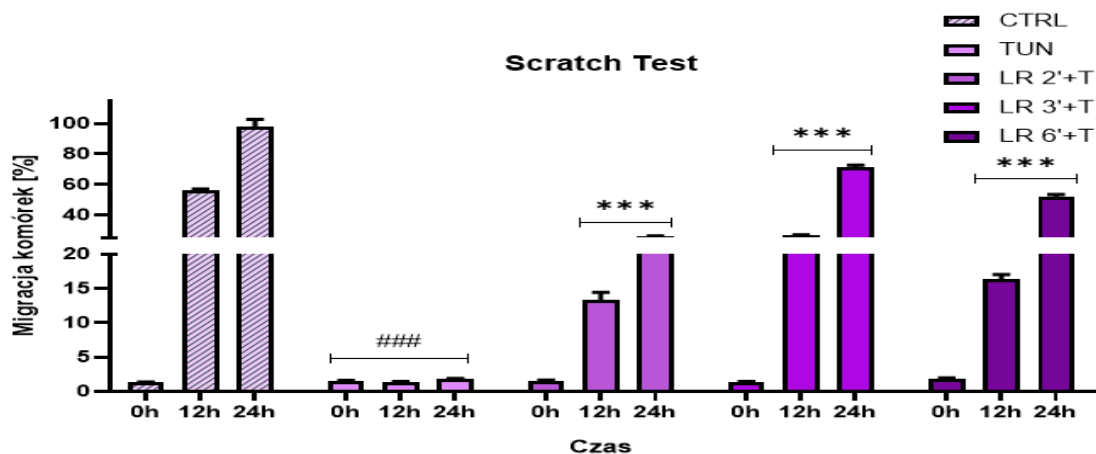




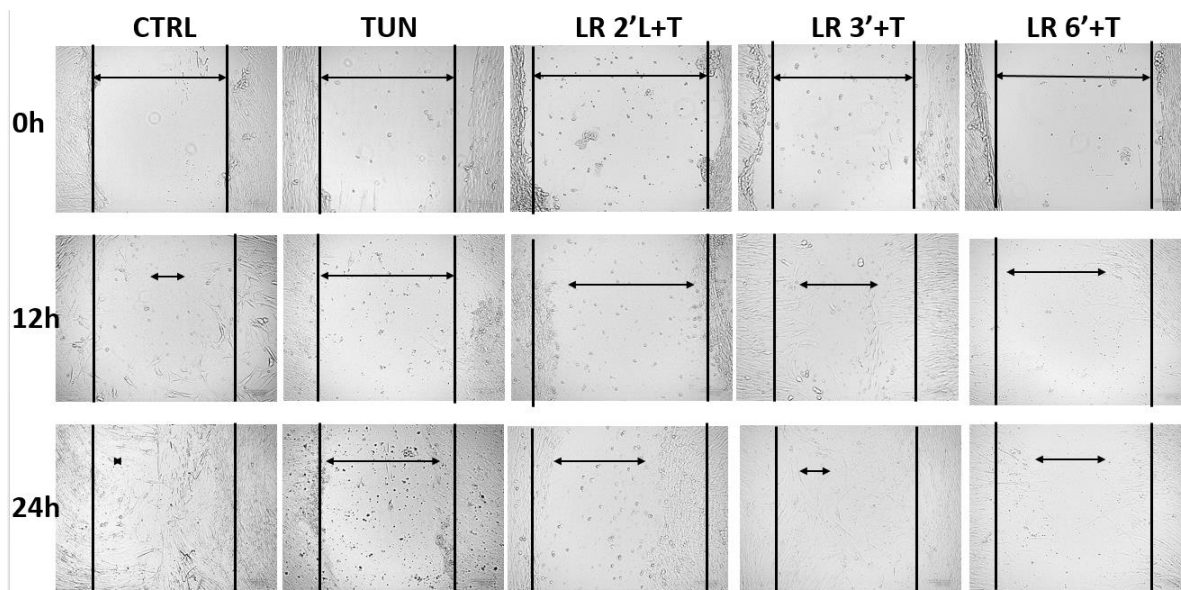
Wykres 15. Tempo migracji komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną oraz inkubowanych z ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* pobranymi w dniu 0 (LR0'+T) i 1 (LR1'+T). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .



Rycina 1. Przedstawienie graficzne tempa migracji komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniu 0 (LR0'+ T) i 1 (LR1'+T). Czarne pionowe linie ukazują brzeg blizny, podczas gdy strzałki pokazują zbieg blizny.



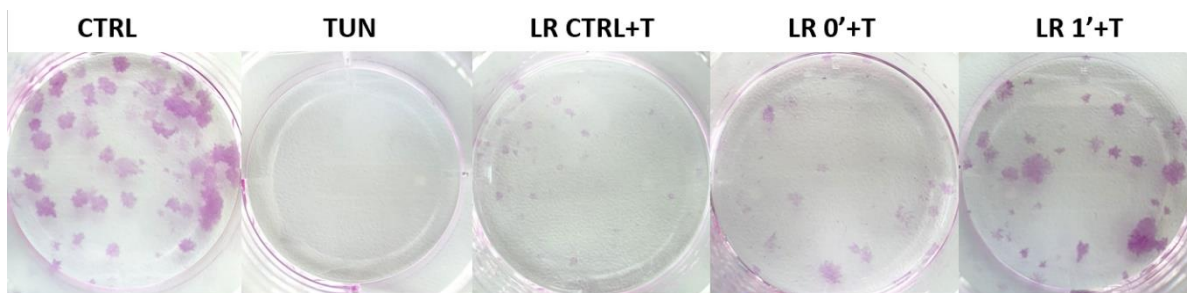
Wykres 16. Tempo migracji komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną oraz inkubowanych z ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* pobranymi w dniu 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/# dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .



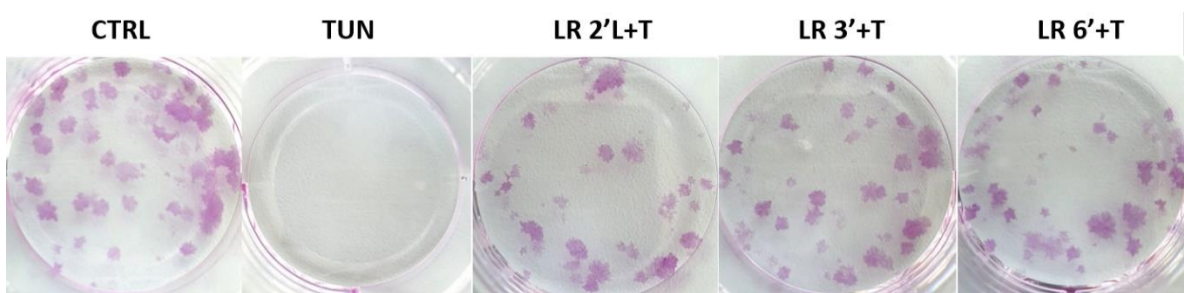
Rycina 2. Przedstawienie graficzne tempa migracji komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniu 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T). Czarne pionowe linie ukazują brzeg blizny, podczas gdy strzałki pokazują zbieg blizny.

### 5.2.2.2. Test klonogeny

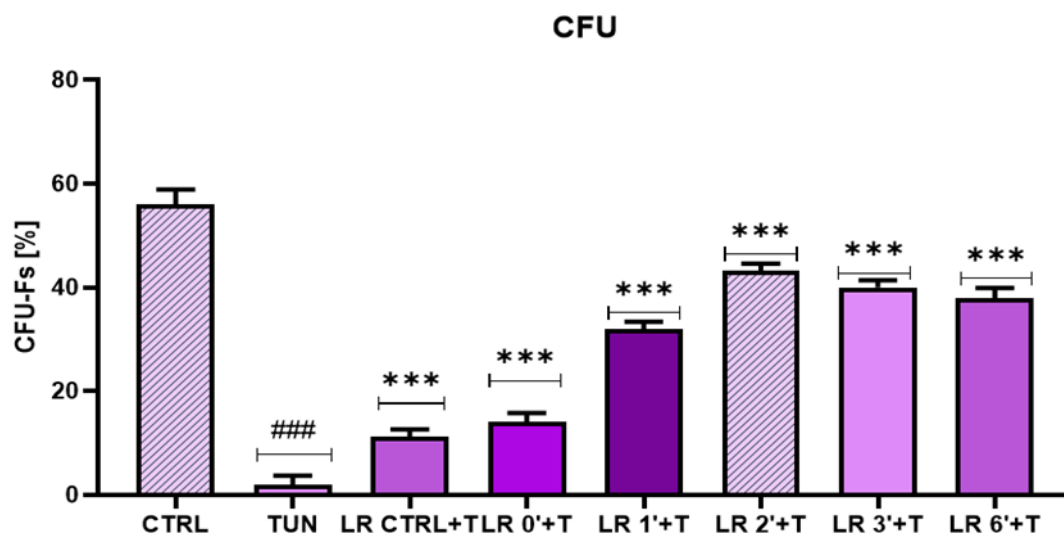
Zdolność komórek do tworzenia kolonii przeprowadzono przy pomocy testu klonogenego prekursora fibroblastów (CFU-F). Traktowanie komórek ASC tunikamycyną wpłynęło na zahamowanie tworzenia kolonii w porównaniu do medium pełnego (CTRL). Największą liczbę kolonii komórek ASC wykazano w hodowli z ekstraktem z *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranym w dniu drugim fermentacji (LR2'+T) w porównaniu do komórek traktowanych tunikamycyną (TUN). Nieznacznie niższą liczbę kolonii obserwowano także po zastosowaniu ekstraktu pobranego w dniu trzecim fermentacji (LR3'+T), choć wyniki nie różniły się istotnie statystycznie względem siebie ( $p \leq 0,001$ ). Powyższe obserwacje zostały przedstawiane jakościowo na zdjęciach (rycina 3 i 4) oraz ilościowo na wykresie (wykres 17).



Rycina 4. Wizualizacja CFU-F wybarwionych pararozaniliną w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniu 0 (LR0'+T) oraz 1 (LR1'+T).



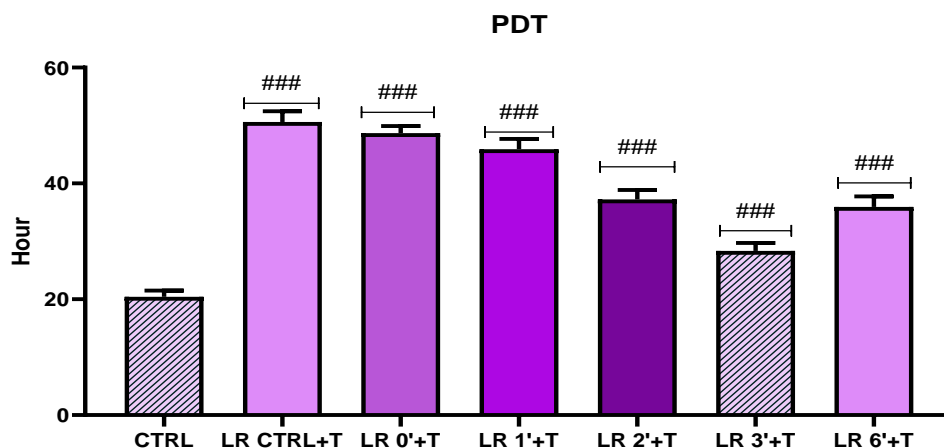
Rycina 3. Wizualizacja CFU-F wybarwionych pararozaniliną w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniu 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T).



Wykres 17. Test CFU-F przedstawiający ilość kolonii składających się z więcej niż 50 komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* pobranych w poszczególnych dniach trwania fermentacji. Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

### 5.2.2.3. Czas podwojenia populacji (PDT)

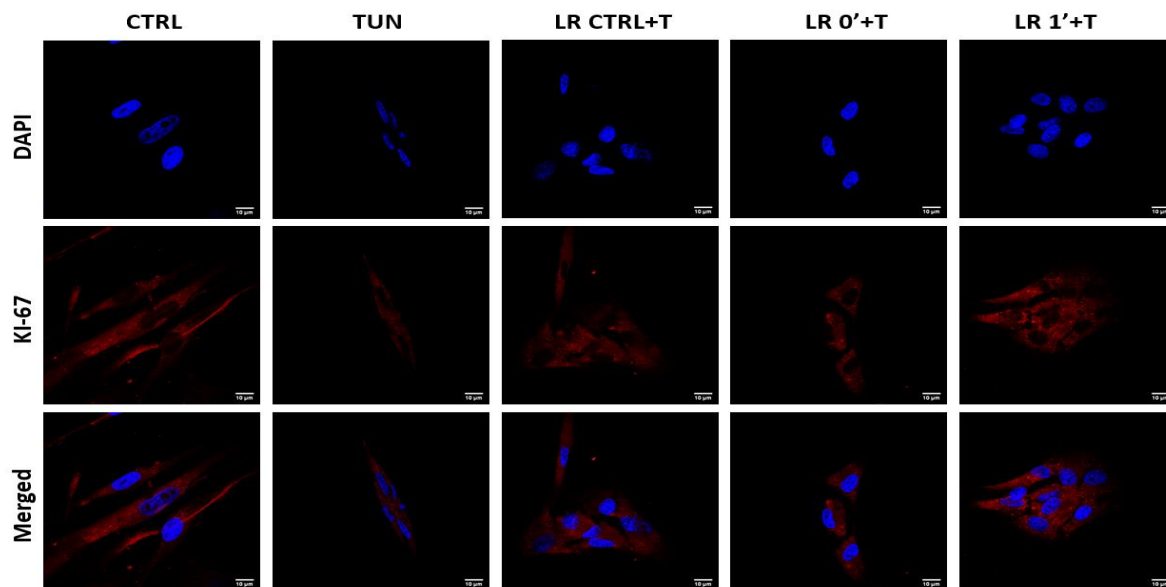
W celu określenia czasu podwojenia populacji przeprowadzono test PDT. Ze względu na wysoką śmiertelność oraz brak proliferacji komórek traktowanych tunikamycyną, grupa ta nie była brana pod uwagę w teście PDT. Zaobserwowano natomiast, że komórki hodowane w medium pełnym (CTRL) podwoiły swoją populację już po 20 godzinach, z kolei komórki traktowane ekstraktem przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL+T) oraz fermentowanymi ekstraktami z *Lactobacillus rhamnosus* pobranymi w dniu 0 (CTRL0'+T) i pierwszym (LR1'+T) potrzebowały prawie 60 godzin na podwojenie swojej populacji. W zastosowanych ekstraktach pobranych w dniu drugim (LR2'+T) oraz szóstym (LR6'+T) podwojenie populacji nastąpiło po około 40 godzinach. Natomiast w ekstrakcie pobranym w dniu trzecim (LR3'+T), komórki podwoiły swoją populację po około 30 godzinach, co powoduje, że ekstrakt ten przywraca ich zdolności proliferacyjne na poziomie zbliżonym do grupy kontrolnej (wykres 18).



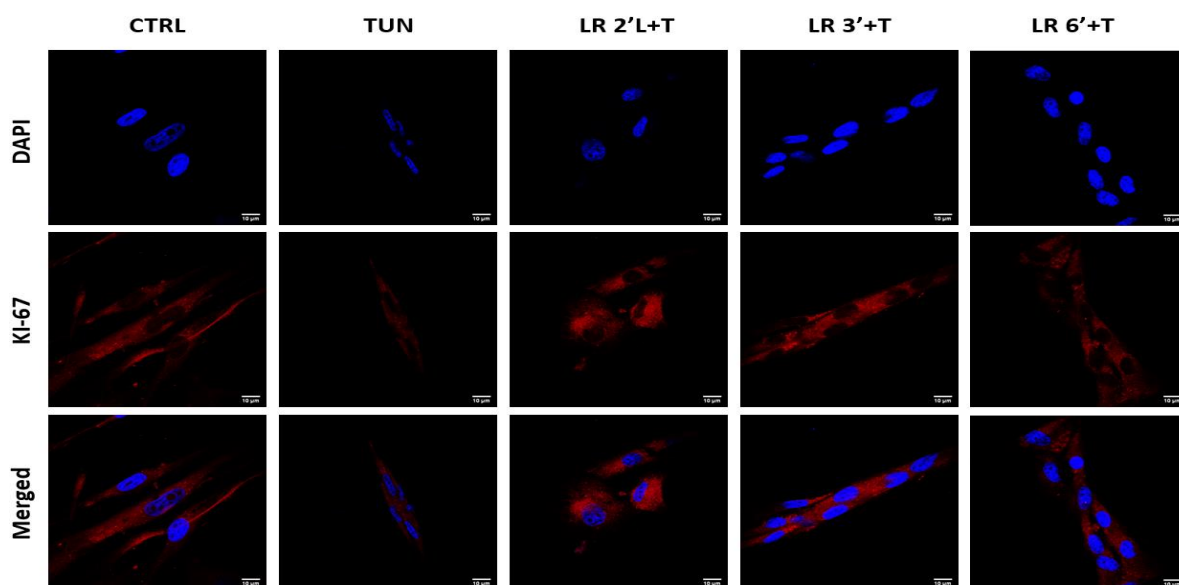
Wykres 18. Test PDT przedstawiający czas podwojenia populacji w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), oraz traktowanych ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* pobranymi w poszczególnych dniach trwania fermentacji. Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania grup eksperymentalnych do medium (CTRL). # dla  $p \leq 0,05$ , ## dla  $p \leq 0,01$ , ### dla  $p \leq 0,001$ .

#### 5.2.2.4. Barwienie immunofluorescencyjne dla markerów proliferacji

W celu określenia wewnątrzkomórkowej ekspresji markera Ki-67, który jest związany z proliferacją komórek, przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne. Traktowanie komórek ASC tunikamycyną (TUN) spowodowało spadek ekspresji markera Ki-67 w porównaniu do hodowli komórek w medium pełnym (CTRL), o czym świadczy brak czerwonego sygnału. Z kolei w grupach doświadczalnych z LR zaobserwowano wyraźny wzrost ekspresji markera Ki-67 w komórkach ASC traktowanych fermentowanym ekstraktem z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* pobranym w dniu drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR3'+T) procesu fermentacji w porównaniu do komórek ASC traktowanych tunikamycyną, co potwierdza wpływ tych ekstraktów na szybsze tempo proliferacji ASC (rycina 5, rycina 6).



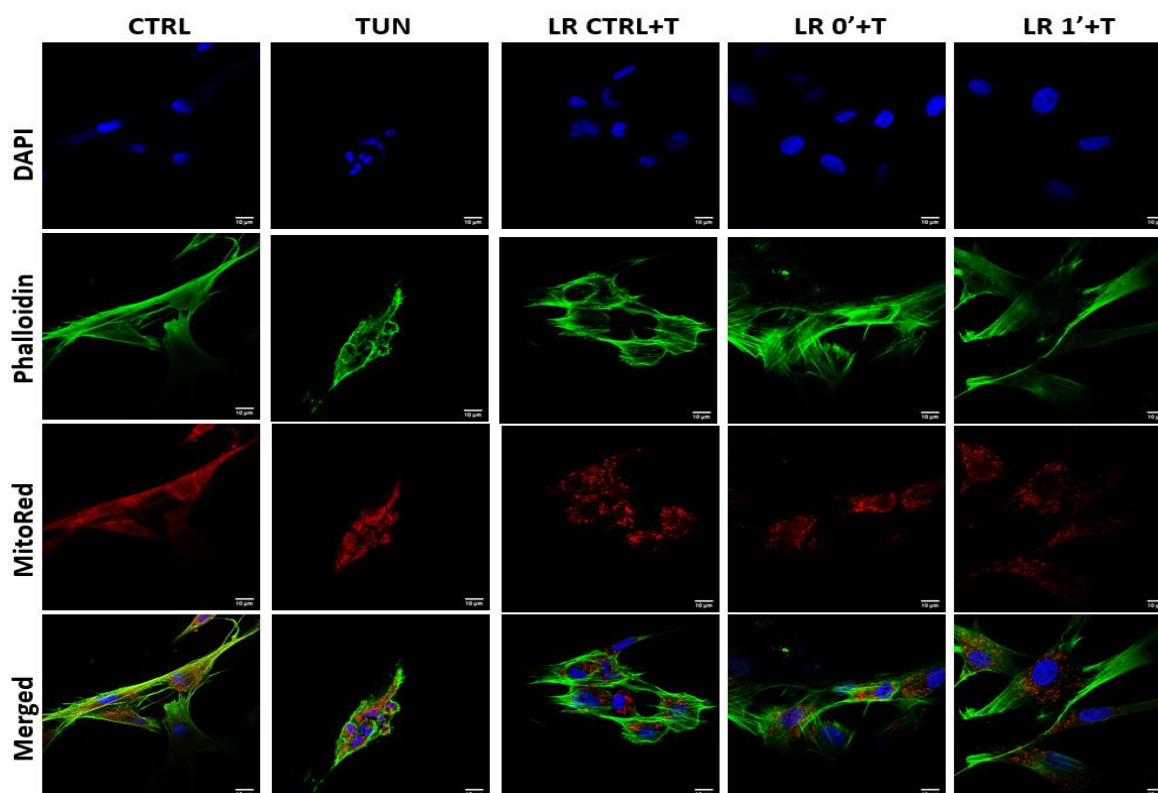
Rycina 5. Reprezentatywne obrazy barwienia immunofluorescencyjnego dla markera Ki-67 (czerwony) i jąder (niebieski) w komórkach hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranych w dniach 0 (LR0'+T) oraz 1 (LR1'+T).



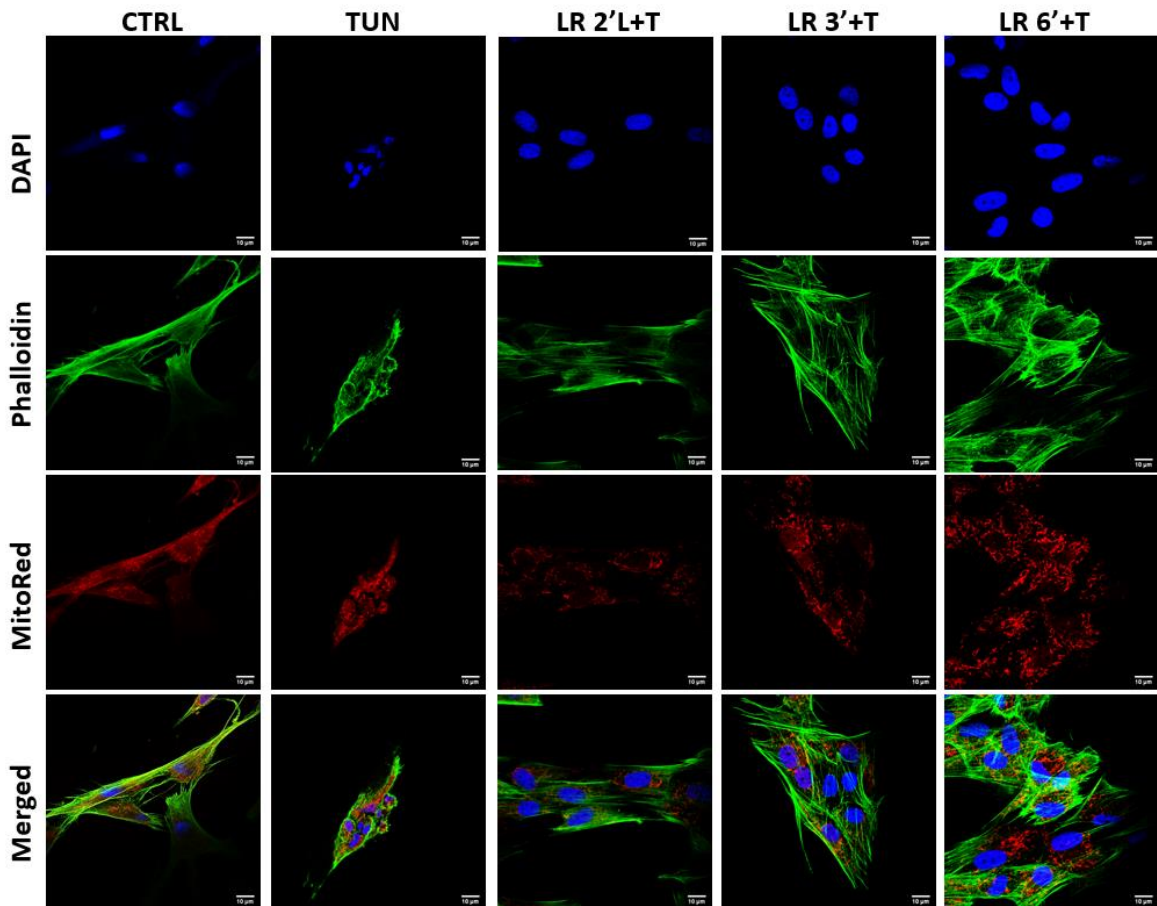
Rycina 6. Reprezentatywne obrazy barwienia immunofluorescencyjnego dla markera Ki-67 (czerwony) i jąder (niebieski) w komórkach hodowanych z medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych udziałem *Lactobacillus rhamnosus* pobranymi w dniach 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T).

### 5.2.3. Wpływ ekstraktu z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* na morfologię komórki

Zmiany morfologii oraz ultrastruktury komórek ASC obserwowano za pomocą mikroskopii konfokalnej. Traktowanie komórek ASC tunikamycyną (TUN) spowodowało zmniejszenie wielkości jąder komórkowych, a także zredukowanie włókien aktynowych. Po zastosowaniu laktofermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) zaobserwowano, że zbliżoną morfologię w porównaniu do medium pełnego wykazywał głównie ekstrakt pobrany w dniu trzecim (LR3'+T) trwania fermentacji. Świadczy o tym również rozwinięty cytoszkielet jak i sieć mitochondrialna oraz kształt jąder i ich centralne rozmieszczenie w komórce po zastosowaniu tego ekstraktu. Natomiast ekstrakt kontrolny przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL'+T) oraz fermentowane ekstrakty pobrane w dniu pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) oraz szóstym (LR6'+T) wykazywały większą średnicę jąder komórkowych i ich rozproszone rozmieszczenie w komórce w porównaniu do komórek hodowanych w medium pełnym (CTRL). Ponadto powiększone jądra mogą być biomarkerami starzenia się komórek. Dodatkowo sieć mitochondrialna była zlokalizowana wokół jąder (rycina 7, rycina 8).



Rycina 7. Reprezentatywne fotografie przedstawiające morfologię komórek ASC: jąder komórkowych (DAPI) (niebieski), cytoszkieletu aktynowego (falloidyna) (zielony), mitochondriów (MitoRed) (czerwony) hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu probiotycznego (CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* pobranymi w dniu 0 (LR0'+T) oraz 1 (LR1'+T).



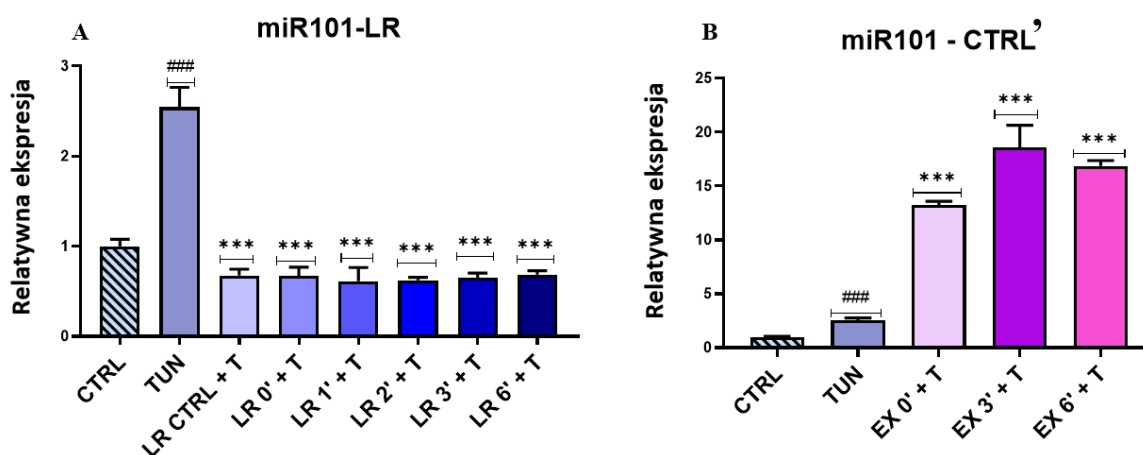
Rycina 8. Reprezentatywne fotografie przedstawiające morfologie komórek ASC: jąder komórkowych (DAPI) (niebieski), cytoszkieletu aktynowego (falloidyna) (zielony), mitochondriów (MitoRed) (czerwony) hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* pobranymi w dniach 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T).



#### 5.2.4. Ekspresja mikroRNA związanych z proliferacją komórek

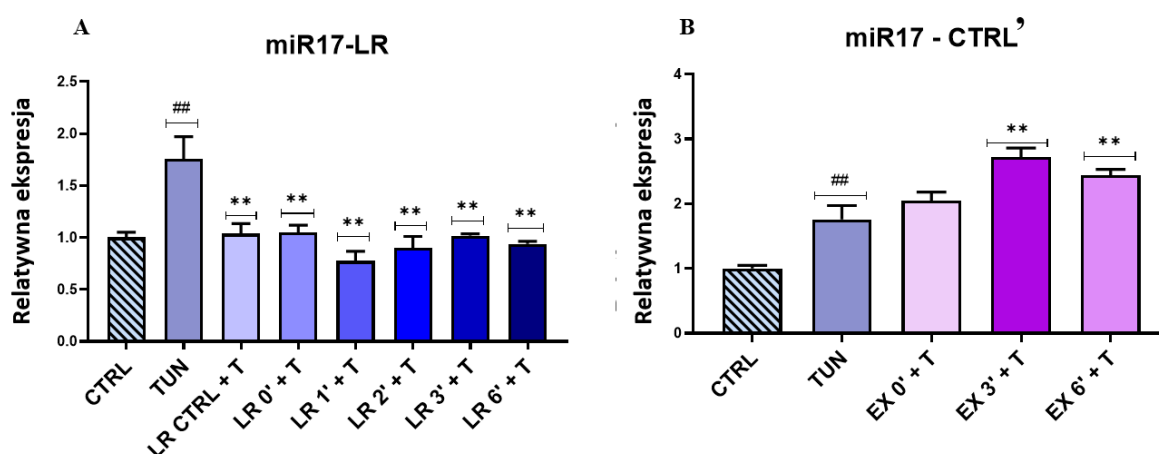
W celu oceny względnej ekspresji mikroRNA (miR) związanych z tempem proliferacji komórek przeprowadzono test z zastosowaniem qRT-PCR w komórkach hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T), laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu probiotycznego (CTRL').

W obu grupach doświadczalnych tunikamycyna spowodowała wzrost ekspresji miR- 101 w porównaniu do medium pełnego (CTRL). W przypadku ekstraktów z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* wykazano spadek ekspresji miR- 101 w komórkach ASC traktowanych każdym z poszczególnych ekstraktów tj. kontrolnym przed dodaniem szczepów probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz w ekstraktach fermentowanych z LR pobranymi w dniu 0 (LR0'+T), a także pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T), trzecim (LR3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) w porównaniu do TUN ( $p \leq ,001$ ) (wykres 19A). Z kolei ASC traktowane ekstraktami bez udziału szczepu bakterii probiotycznych wykazywało nadekspresję miR- 101, zarówno w ekstrakcie pobranym w dniu 0 (EX0'+T) oraz w dniach trzecim (EX3'+T) jak i szóstym (EX6'+T) ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN (wykres 19 B).



Wykres 19. Względna ekspresja miR - 101 związana z tempem proliferacji w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także miR-101 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/#### dla  $p \leq 0,001$ .

Analizując kolejne MikroRNA związane z proliferacją komórek, zaobserwowano wzrost ekspresji miR-17 w komórkach ASC traktowanych TUN w porównaniu do hodowli komórek w medium pełnym dla obu grup eksperymentalnych. W grupie z dodatkiem LR odnotowano spadek ekspresji miR-17 w komórkach, po zastosowaniu każdego z poszczególnych ekstraktów tj. w ekstrakcie kontrolnych przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL +T), pobranym w dniu 0 (LR0'+T), a także pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T), trzecim (LR3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) w porównaniu do tunikamycyny ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 20A). W grupie ekstraktów bez udziału szczepu LR pobranym w dniu 0 (EX0'+T) nie zaobserwowano różnic statystycznych. Z kolei w ekstraktach pobranych w dniach trzecim (EX3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) wykazano wzrost ekspresji miR-17 w komórkach ASC w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 20B).



Wykres 20. Względna ekspresja miR- 17 związanych z tempem proliferacji w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także miR-17 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/# dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

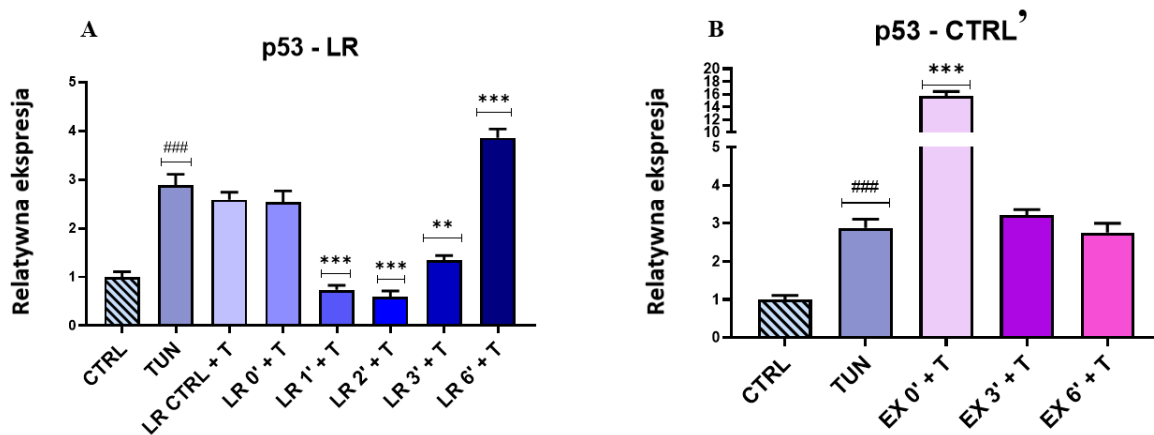
## 5.2.5 Zmiany w ekspresji genów związanych z apoptozą

### 5.2.5.1. Zmiany ekspresji genów metodą RT- qPCR

Apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki stanowi podstawowy mechanizm wpływający na homeostazę tkanek ssaków. W celu określenia ekspresji genów związanych z apoptozą przeprowadzono test RT- qPCR dla p53, p21, BAX, BCL2, BAD oraz kaspazy- 3 (Casp-3) i kaspazy- 9 (Casp-9) dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych

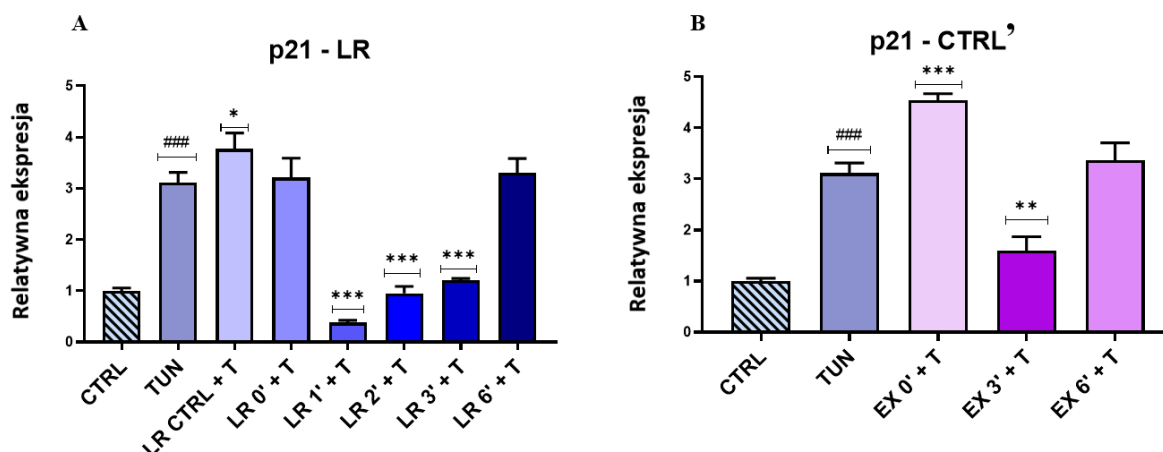
z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) i fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu *Lactobacillus rhamnosus* (CTRL').

Zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji genu p53 po zastosowaniu TUN na komórki ASC w porównaniu do medium pełnego (CTRL) w obu grupach doświadczalnych. Potraktowanie komórek badanymi związkami tj. kontrolnymi przed dodaniem szczepu LR (LR CTRL + T) oraz pobranym w dniu 0 (LR 0' + T) nie wpłynęło na zmianę poziomu ekspresji p53 w ASC. Z kolei związki pobrane w dniu pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) ( $p \leq 0,001$ ) oraz trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,01$ ) fermentacji doprowadziły do zredukowania ekspresji pro-apoptycznego genu, w porównaniu do TUN. Odwrotne zjawisko, czyli nadekspresję genu p53 zanotowano podczas zastosowania związku pobranego w dniu szóstym (LR6'+T) fermentacji ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 21A). W celu potwierdzenia właściwości antyapoptycznych fermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych, zbadano również wpływ ekstraktu bez obecności szczepu LR. W tym przypadku zastosowanie ekstraktów pobranych w dniach trzecim (EX'3+T) oraz szóstym (EX'6+T) nie wpłynęło na zmianę ekspresji genu p53. Natomiast zaobserwowano wzrost ekspresji pro-apoptycznego białka p53 w ekstrakcie pobranym w dniu 0 (EX'0 +T) w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 21B)



Wykres 21. Względna ekspresja genu p53 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja p53 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR)(A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/## dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

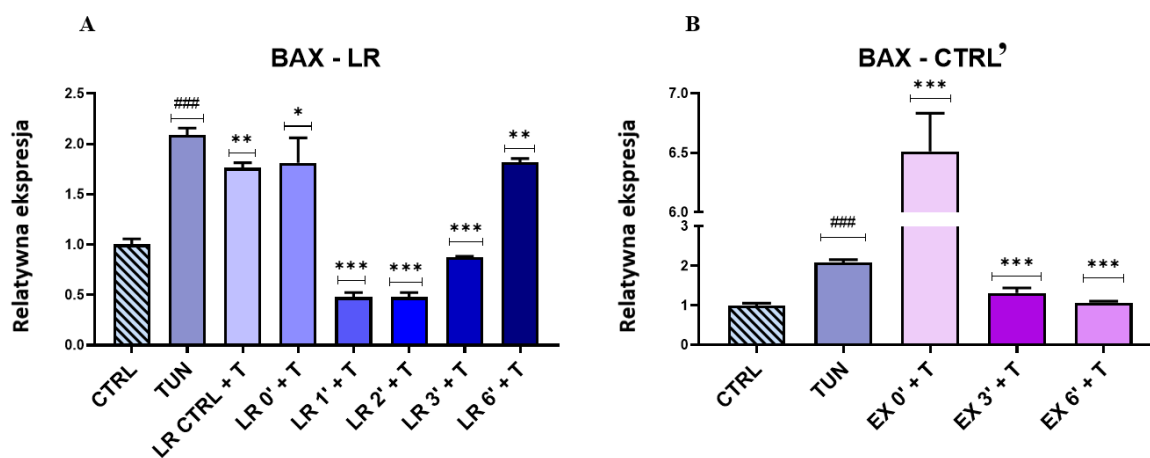
Wykazano także wzrost ekspresji pro- apoptotycznego genu p21 w komórkach ASC po zastosowaniu TUN w porównaniu do medium pełnego (CTRL) dla obu grup eksperymentalnych. Zastosowanie fermentowanego ekstraktu z dodatkiem LR pobranego w dniu 0 (LR'0 +T) oraz w dniu szóstym (LR6' +T) nie wpłynęło na zmianę ekspresji genu p21 w ASC. Zaobserwowano spadek ekspresji genu p21 po traktowaniu komórek ASC ekstraktami z LR pobranymi w dniu pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR'3+T) trwania fermentacji ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN. Z kolei ekstrakt przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL' +T), jako jedyny spowodował wzrost ekspresji genu p21 w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,05$ ) (wykres 22A). W grupie doświadczalnej bez dodatku szczepu LR (CTRL') ekstrakt pobrany w dniu 6 (EX'6 +T) nie wpłynął na zmianę ekspresji genu p21 w ASC. Natomiast wykazano obniżenie ekspresji genu p21 po zastosowaniu ekstraktu pobranego w dniu 0 (EX0' +T) w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ). W przeciwieństwie do tego, traktowanie komórek ASC ekstraktem pobranym w dniu 3 (EX3' +T) spowodowało obniżenie ekspresji genu p21 ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do TUN (wykres 22B).



Wykres 22. Względna ekspresja genu p21 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja p21 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłódków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłódków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/## dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

W badaniu oceniającym wpływ laktofermentowanych wysłódków na pro- apoptotyczny gen BAX traktowanie komórek ASC tunikamycyną spowodowało wzrost ekspresji mRNA BAX w porównaniu do medium pełnego (CTRL) w obu grupach, zarówno LR i CTRL'. W grupie doświadczalnej ekstraktów z dodatkiem LR zastosowanie ekstraktu przed dodaniem

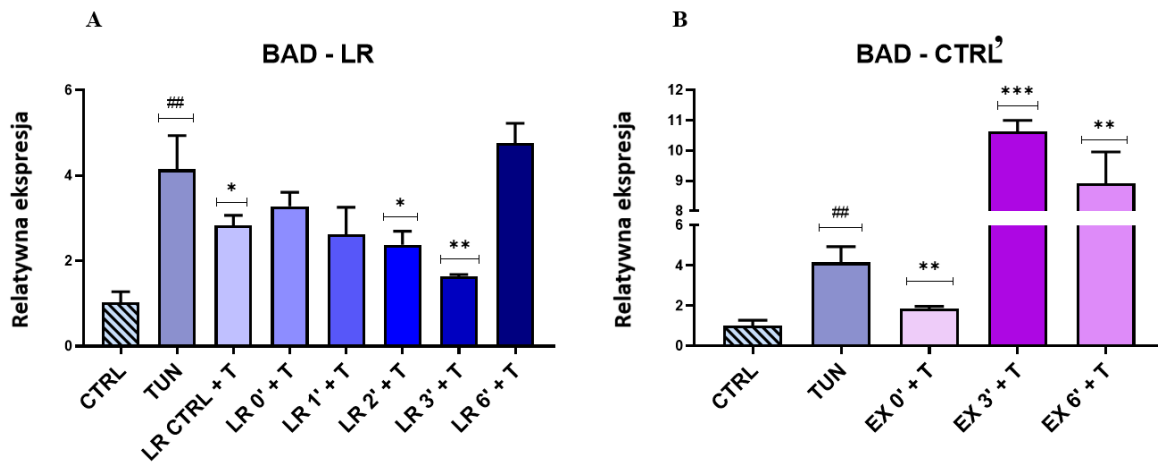
szczepu bakterii probiotycznych (LR'CTRL+ T) oraz pobranym w dniu 0 (LR'0+T) spowodowało obniżenie ekspresji genu BAX, odpowiednio ( $p \leq 0,01$ ), ( $p \leq 0,05$ ) w porównaniu do TUN. Podobne obserwacje odnotowano w przypadku zastosowania ekstraktów pobranych w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T), trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,001$ ), a także szóstym (LR6'+T) trwania fermentacji ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 23A). W grupie bez udziału szczepu LR (CTRL') traktowanie komórek ASC ekstraktem pobranym w dniu 0 (EX0'+T) spowodowało dwukrotny wzrost ekspresji mRNA BAX w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,01$ ). Po zastosowaniu ekstraktów pobranych w dniach trzecim (EX3'+T) oraz szóstym (EX6'+T) odnotowano istotny spadek ekspresji pro-apoptycznego genu BAX ( $p \leq 0,01$ ) (Wykres 23B).



Wykres 23. Histogramy przedstawiające ekspresję genu BAX w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja BAX dla komórek ASC traktowanych ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz ekstraktami bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

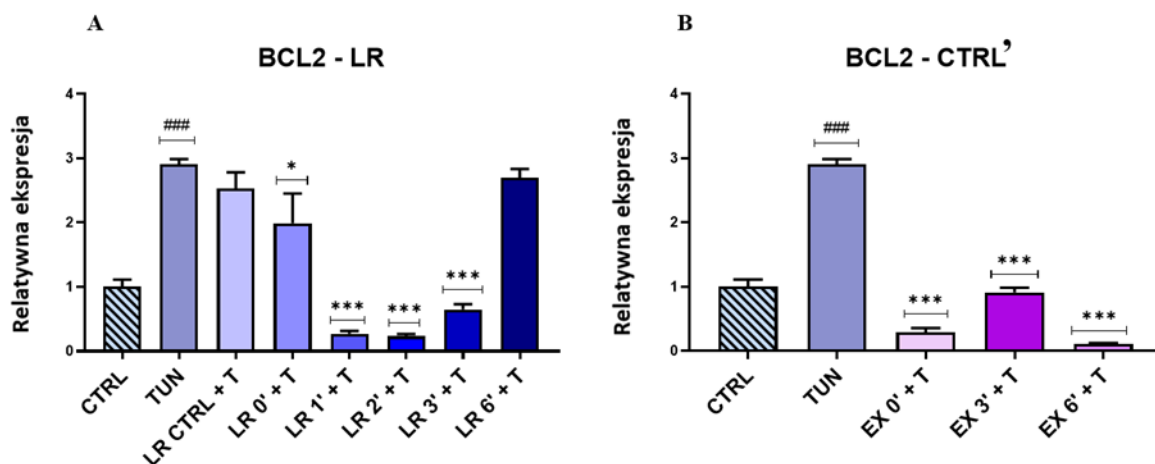
BAD, kolejne białko należące do rodziny białek BCL-2, który jest również inicjatorem apoptozy w komórkach. Tunikamycyna spowodowała wyraźny wzrost ekspresji BAD w obu grupach doświadczalnych w porównaniu do medium pełnego (CTRL). W grupie LR ekstrakty pobrane w dniu 0 (LR'0 +T) oraz pierwszym (LR1'+T) i szóstym (LR6'+T) nie wpłynęły na zmianę ekspresji BAD w ASC. Z kolei obserwuje się obniżenie ekspresji genu BAD w ASC po zastosowaniu ekstraktu kontrolnego (LR CTRL+T) oraz pobranych w dniach drugim (LR2'+T) ( $p \leq 0,05$ ) i trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do TUN (wykres 24A). W grupie bez udziału LR (CTRL') nastąpił istotny wzrost ekspresji genu BAD po wprowadzeniu na ASC ekstraktów pobranych w dniu trzecim (EX3'+T) oraz szóstym (EX6'+T), odpowiednio ( $p \leq$

0,001), ( $p \leq 0,01$ ). W ekstrakcie pobranym w dniu 0 (EX'0 +T) zaobserwowano natomiast obniżenie ekspresji genu BAD ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do TUN (wykres 24B).



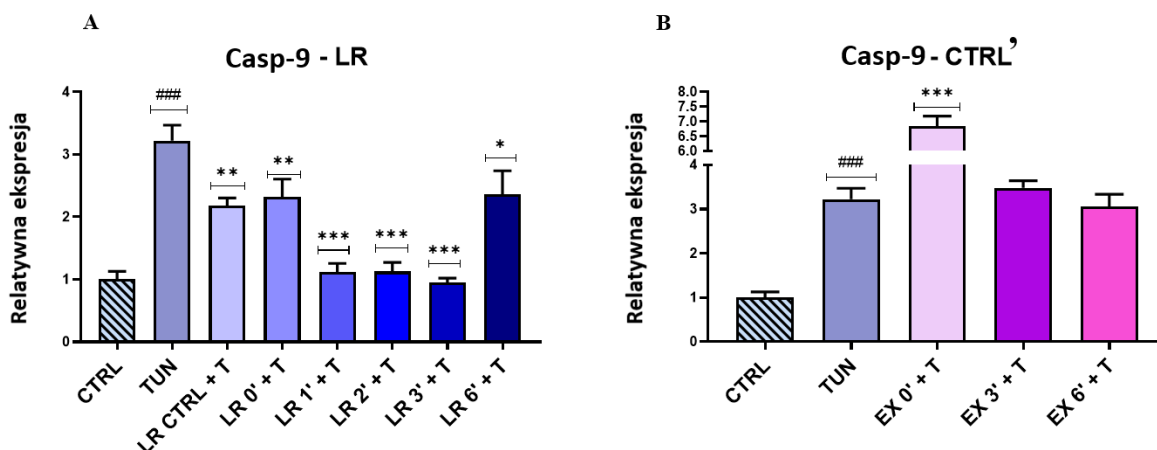
Wykres 24. Histogramy przedstawiające ekspresję genu BAD w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja BAD dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/## dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

Białka BCL2 mają właściwości antyapoptotyczne, w związku z tym zapobiegają apoptozie komórek w organizmie. Traktowanie komórek ASC tunikamycyną prowadziło do zaburzenia homeostazy komórek, indukując ekspresję mRNA BCL2 w porównaniu do medium pełnego (CTRL). W grupie doświadczalnej z dodatkiem LR zastosowanie ekstraktu przed dodaniem szczepu LR (LR CTRL +T) oraz pobranego w dniu szóstym (LR6'+T) nie wpłynęło na zmianę ekspresji genu BCL2 w ASC. Zaobserwowano zredukowanie ekspresji BCL2 podczas traktowania komórek ASC ekstraktem pobranym w dniu 0 (LR0' +T) ( $p \leq 0,05$ ) oraz w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) i trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN (wykres 25A). Analogicznie w grupie bez udziału szczepu LR (CTRL') wykazano spadek ekspresji BCL2 w ekstrakcie pobranym w dniu 0 (EX0'+T) oraz pobranymi w dniu trzecim (EX3'+T) i szóstym (EX6'+T) ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN (wykres 25B).



Wykres 25. Histogramy przedstawiające ekspresję genu BCL2 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja BCL2 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłódków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłódków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

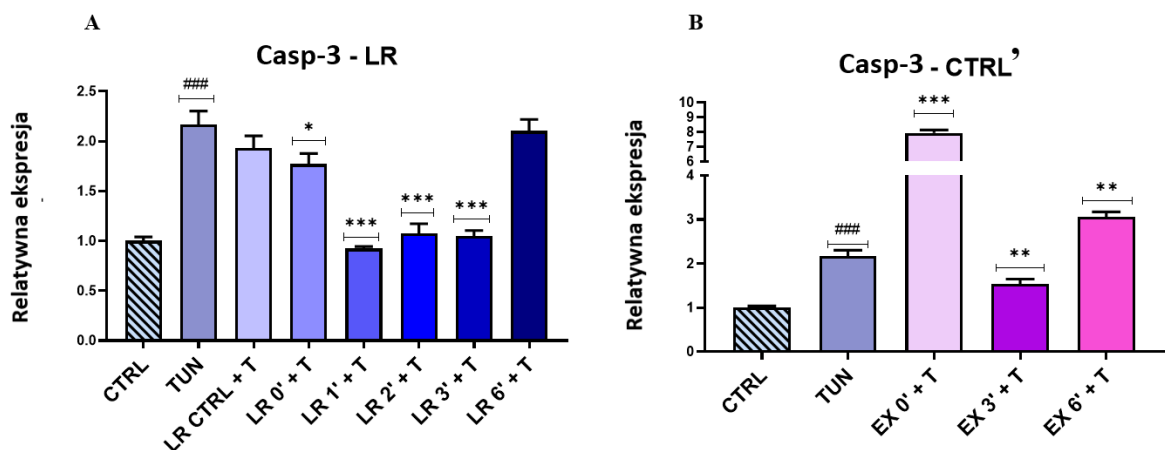
Kaspazy obecne są w komórce w formie proenzymu i są aktywowane podczas zdarzeń związanych z apoptozą. Enzym kaspaza-9 (Casp-9) pełni funkcje kaspazy inicjatorowej i jest jedną z najważniejszych kaspaz realizujących apoptozę w komórkach organizmu. Tunikamycyna spowodowała wzrost ekspresji kaspazy-9 w obu grupach doświadczalnych w porównaniu do medium pełnego (CTRL). Co ciekawe, wykazano obniżenie ekspresji kaspazy-9 w komórki ASC traktowanych ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz pobranym w dniu 0 (LR0'+T) ( $p \leq 0,01$ ), a także w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T), trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,001$ ) oraz szóstym (LR6'+T) ( $p \leq 0,05$ ) (wykres 26A). Ekspresje kaspazy-9 zbadano także w grupie bez udziału szczepu LR (CTRL'). W komórkach ASC traktowanych ekstraktami pobranymi w dniach trzecim (EX3'+T) oraz szóstym (EX6'+T) nie odnotowano zmian w ekspresji Casp-9, natomiast po dodaniu ekstraktu pobranego w dniu 0 (EX0'+T) odnotowano istotny wzrost ekspresji kaspazy-9 w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 26B).



Wykres 26. Histogramy przedstawiające ekspresję kaspazy-9 (Casp-9) w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja kaspazy-9 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

Kaspaza-3 (Casp-3) jest proenzymem efektorowym aktywowanym przez kaspazę-9. Tunikamycyna spowodowała wzrost ekspresji kaspazy-3 w ASC w obu grupach doświadczalnych w porównaniu do medium pełnego (CTRL). W grupie eksperymentalnej LR ekstrakt kontrolny przed dodaniem szczepów probiotycznych (LR CTRL+T) oraz pobrany w dniu szóstym (LR6'+T) fermentacji nie wpływały na zmianę ekspresji Casp-3. Z kolei wykazano obniżenie ekspresji kaspazy-3 w fermentowanym ekstrakcie z LR pobranym w dniu 0 (LR0'+T) ( $p \leq 0,05$ ) oraz w ekstraktach pobranych w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN (wykres 27A). W grupie bez udziału szczepów probiotycznych (CTRL') zaobserwowano natomiast prawie dwukrotny wzrost ekspresji kaspazy-3 w ekstrakcie pobranym w dniu 0 (EX'0+T) ( $p \leq 0,001$ ) oraz w ekstrakcie pobranym w dniu szóstym (EX6'+T) ( $p \leq 0,01$ ). Związek pobrany w dniu trzecim (EX3'+T) spowodował spadek ekspresji Casp-3 ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do TUN (wykres 27B).

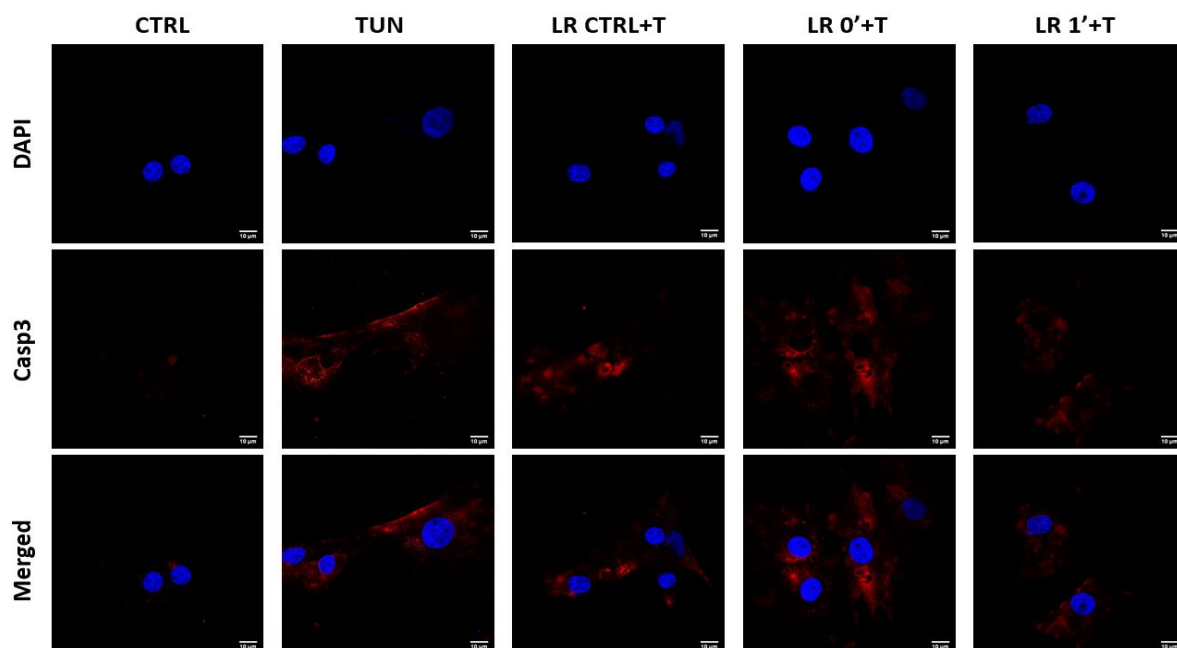




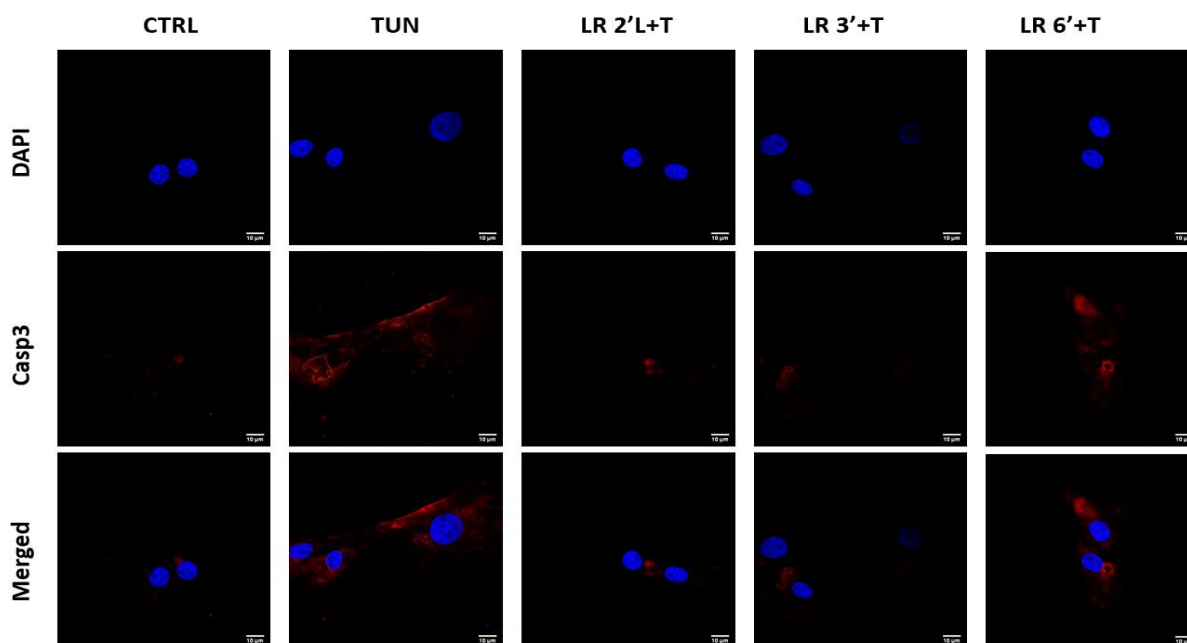
Wykres 27. Histogramy przedstawiające ekspresję kaspazy-3 (Casp-3) w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja kaspazy-3 (Casp-3) dla komórek ASC traktowanych ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz ekstraktami bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/# dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/# dla  $p \leq 0,001$ .

### 5.2.5.2. Wizualizacja aktywnej kaspazy-3

W celu wizualizacji ekspresji aktywnej kaspazy-3 w komórkach ASC przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne. Traktowanie ASC tunikamycyną spowodowało wzrost ekspresji genu Casp-3 w porównaniu do komórek hodowanych w medium pełnym, o czym świadczy wyraźnie zaznaczony czerwony sygnał. Podobne obserwacje odnotowano w ekstrakcie przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T), a także w laktofermentowanym ekstrakcie pobranym w dniu 0 (LR0'+T), pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) oraz szóstym (LR6'+T) w porównaniu do tunikamycyny. Z kolei traktowanie komórek ASC laktofermentowanym ekstraktem pobranym w dniu 3 (LR3'+T) nie aktywowało w komorach ASC kaspazy-3, o czym świadczy brak widocznego czerwonego sygnału (rycina 9, rycina 10).



Rycina 9. Reprezentatywne obrazy przedstawiające wizualizacje aktywnej kaspazy-3 w komórkach ASC pod wpływem hodowania komórek ASC w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem przed dodaniem szczepów bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłódków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* pobranymi w dniach 0 (LR0'+T) oraz 1 (LR1'+T). Jądra komórkowe zostały wybarwione kontrastowo (DAPI) (niebieski).

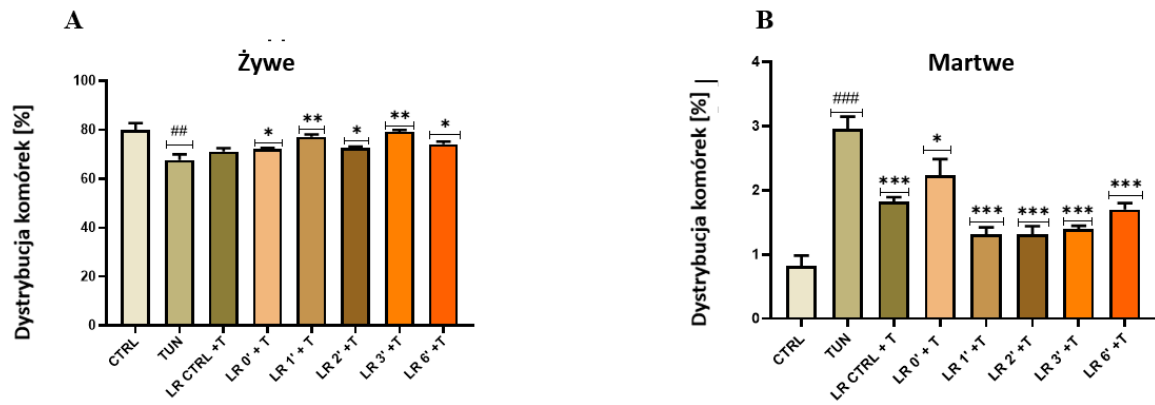


Rycina 10. Reprezentatywne obrazy przedstawiające wizualizacje aktywnej kaspazy-3 w komórkach ASC pod wpływem hodowania komórek ASC w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłódków buraczanych dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* pobranymi w dniach 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR'+T). Jądra komórkowe zostały wybarwione kontrastowo (DAPI) (niebieski).

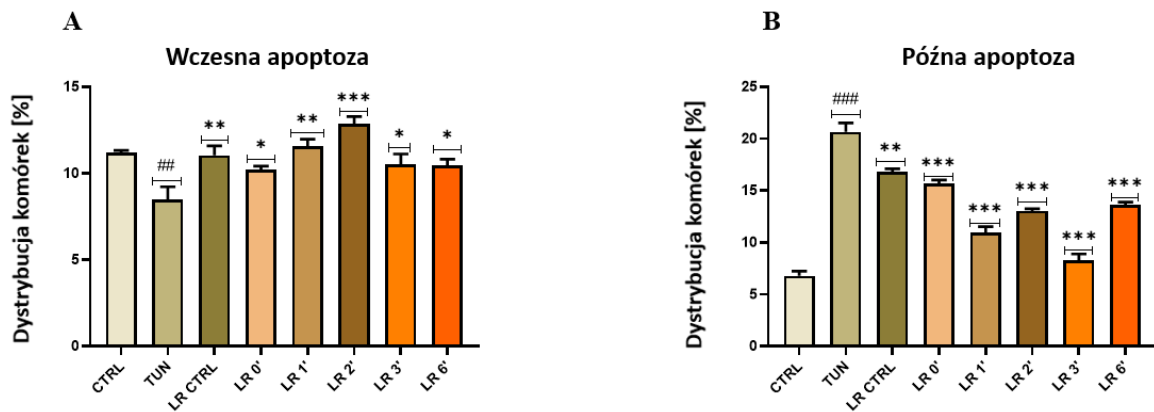
### 5.2.6. Wykrywanie apoptozy za pomocą testu Aneksyny V

W celu potwierdzenia czy laktofermentowane ekstrakty z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* mają wpływ na apoptozę komórek ASC, przeprowadzono barwienie za pomocą aneksyny V Muse (Test Aneksyny V) dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR). Statystycznie istotne różnice w liczbie żywych komórek zaobserwowano w laktofermentowanych ekstraktach pobranych w dniu 0 (LR0'+T), drugim (LR2'+T) i szóstym (LR6'+T) ( $p \leq 0,05$ ), a także w ekstraktach pobranych w dniach pierwszym (LR1'+T) oraz trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do TUN (wykres 28A). W przypadku liczby martwych komórek istotne statystycznie różnice odnotowano w stosując na komórki ASC każdy z ekstraktów tj. przed dodaniem szczepów probiotycznych (LR CTRL+T) oraz pobranych w dniu 0 (LR0'+T), odpowiednio ( $p \leq 0,001$ ) i ( $p \leq 0,05$ ), a także w ekstraktach pobranych w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T), trzecim (LR3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN (wykres 28B) (rycina 11).

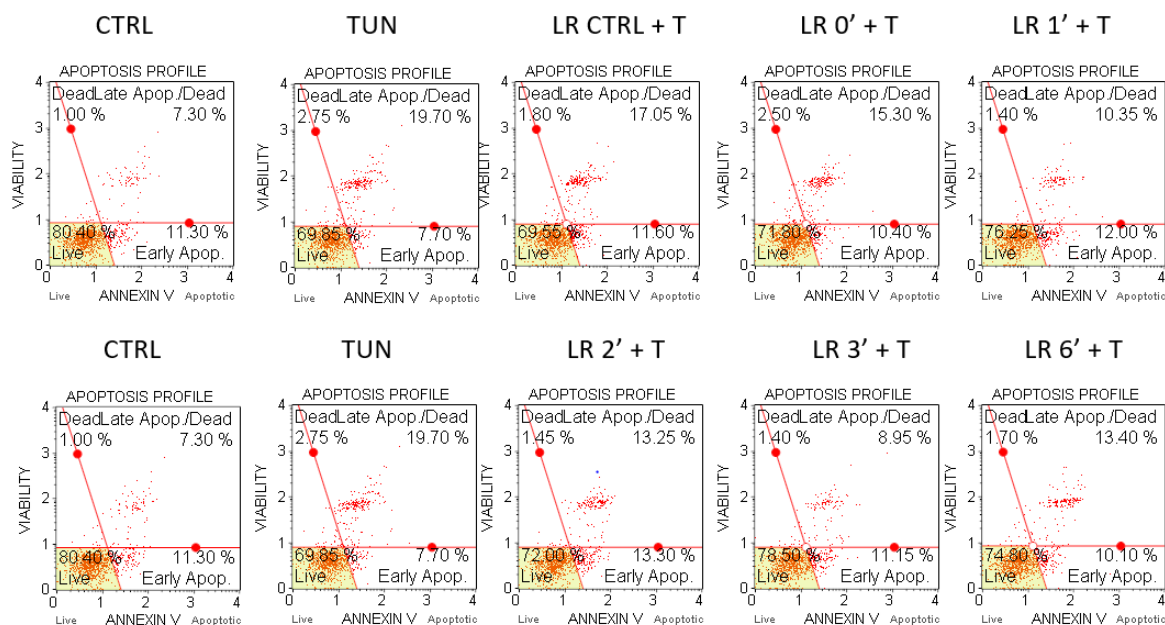
Odnotowano także statystycznie istotny wzrost liczby komórek wczesnej apoptozy w ekstraktach kontrolnych przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL+T) oraz w ekstrakcie pobranych w dniu 0 (LR0'+T), odpowiednio ( $p \leq 0,01$ ), ( $p \leq 0,05$ ) a także w ekstraktach pobranych w dniach pierwszym (LR1'+T) ( $p \leq 0,01$ ), drugim (LR2'+T) ( $p \leq 0,001$ ), trzecim (LR3'+T) i szóstym (LR6'+T) ( $p \leq 0,05$ ) w porównaniu do TUN (wykres 29A). Odwrotne zależności zaobserwowano w przypadku odsetka komórek później apoptozy. W grupie traktowanej tunikamycyną odnotowano znaczną ilość komórek w później apoptozie w porównaniu do TUN. Z kolei po zastosowaniu ekstraktów z LR odnotowano wyraźne zmniejszenie liczby komórek później apoptozy w ekstrakcie kontrolnym przed dodaniem szczepów (LR CTRL +T) oraz po dodaniu szczepów w dniu 0 (LR0'+T) ( $p \leq 0,01$ ), a także w każdym ekstrakcie z udziałem LR ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 29B) (rycina 11).



Wykres 28. Przedstawienie procentu żywych komórek (A) oraz martwych komórek (B) dla ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną, a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .



Wykres 29. Przedstawienie procentu komórek wczesnej apoptozy (A) oraz późnej apoptozy (B) dla ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną, a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .



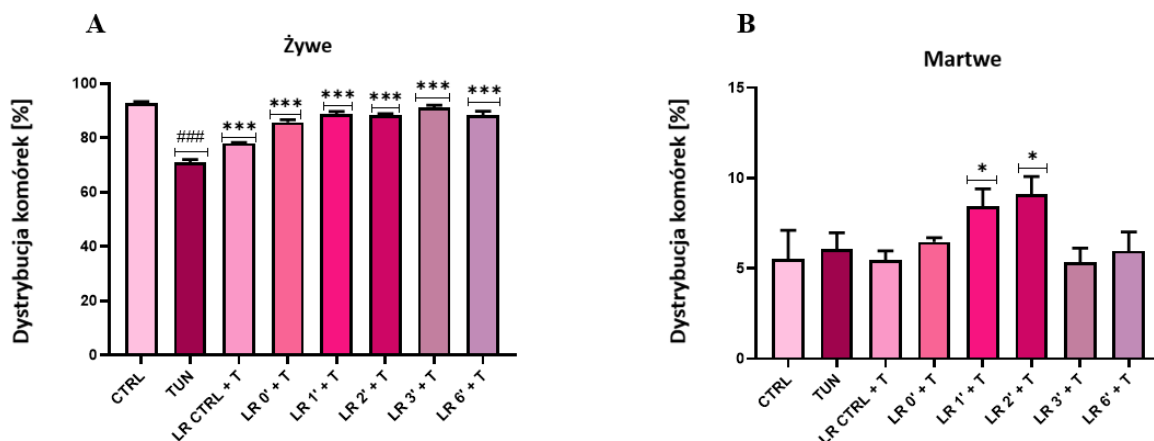
Rycina 11. Reprezentatywne wykresy pozyskane z Muse Cell Analyzer dla testu Aneksyna V dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną, ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR).

### 5.2.7. Wpływ ekstraktów z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* na potencjał błon mitochondrialnych

Utrata integralności potencjału błony mitochondrialnej może stanowić swoisty znak rozpoznawczy w zainicjowaniu apoptozy. W celu sprawdzenia czy ekstrakty z laktofermentowanych wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* mogą hamować proces apoptozy poprzez zwiększenie potencjału błony mitochondrialnej przeprowadzono test oparty na cytometrii przepływowej (Muse) dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR).

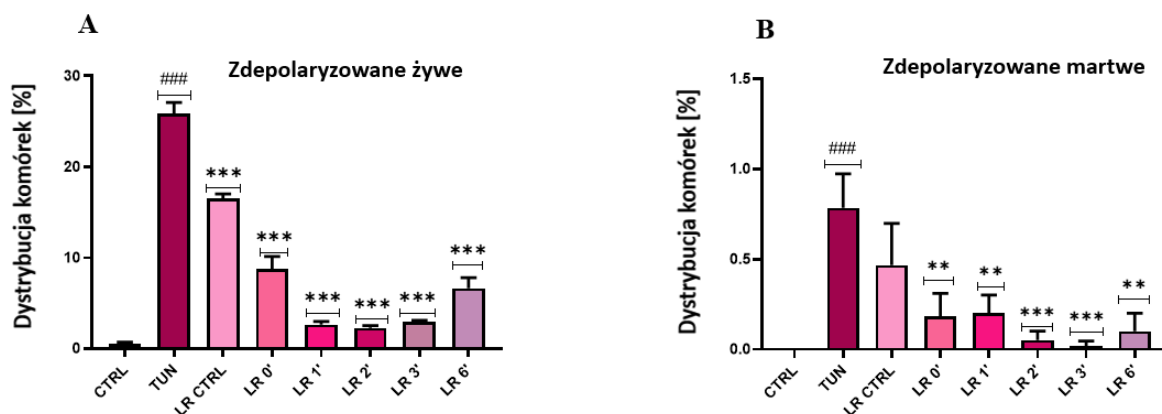
Wyniki wskazują, że traktowanie komórek ASC tunikamycyną spowodowało obniżenie procentu żywych komórek w porównaniu do medium pełnego (CTRL). Po inkubowaniu komórek z ekstraktami z *Lactobacillus rhamnosus* obserwuje się wzrost liczby żywych komórek w każdym z ekstraktów tj. kontrolnych przed dodaniem szczepów (LR CTRL+T) i pobranych w dniach 0 (LR0'+T) pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T), trzecim (LR3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 30A).

W przypadku komórek martwych obserwuje się istotne statystycznie różnice w dniu pierwszym (LR1'+T) oraz drugim (LR2'+T) w porównaniu do tunikamycyny z tendencjami rosnącymi ( $p \leq 0,05$ ). W pozostałych ekstraktach nie odnotowano różnic statystycznych (wykres 30B). Uzyskane dane ukazują, że ekstrakty pobrane z poszczególnych dni fermentacji wpływają na wzrost liczby żywych komórek na poziomie około 80%, przy czym ekstrakt pobrany w dniu trzecim fermentacji wykazują wzrost żywych komórek na poziomie około 90%.



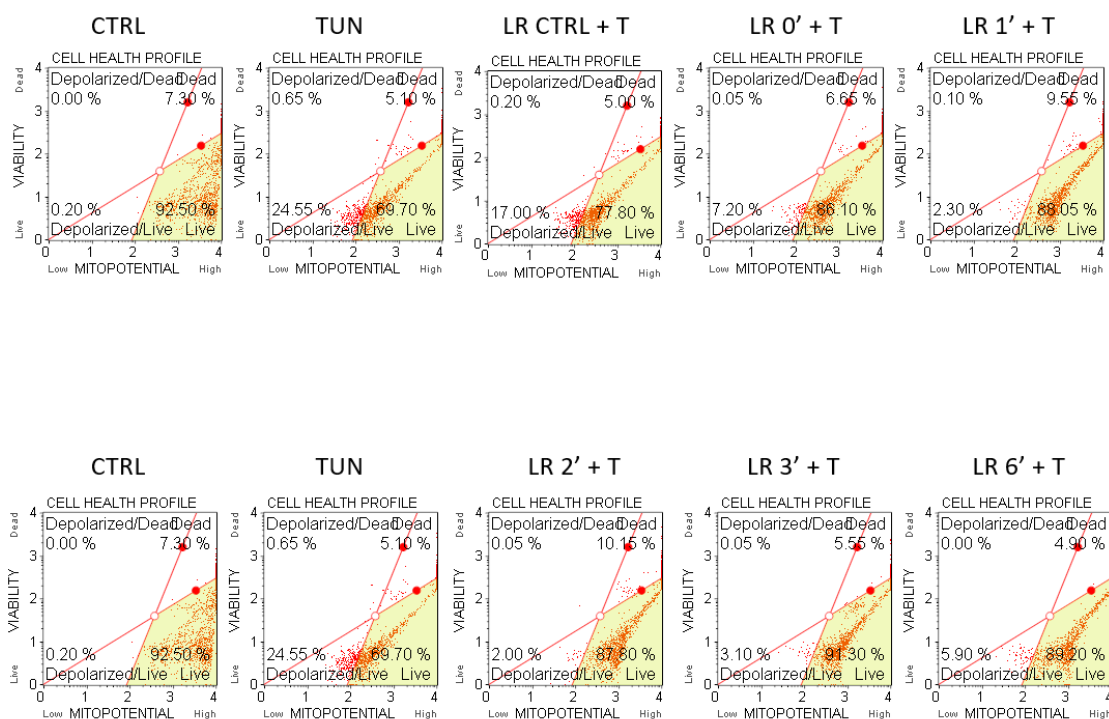
Wykres 30. Histogramy przedstawiające procent komórek żywych (A) i martwych (B) dla ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/#### dla  $p \leq 0,001$ .

Działanie tunikamycyny na komórki ASC spowodowało istotny wzrost komórek zdepolaryzowanych żywych jak i martwych w porównaniu do medium pełnego (CTRL) (wykres 31A). Natomiast po inkubowaniu komórek ASC z ekstraktami z dodatkiem LR nastąpił spadek komórek zdepolaryzowanych żywych ( $p \leq 0,001$ ) oraz martwych w ekstrakcie kontrolnych (LR CTRL+T) i pobranych w dniu 0 (LR0'+T), pierwszym (LR1'+T) i szóstym (LR6'+T) ( $p \leq 0,01$ ) oraz drugim (LR2'+T) i trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do tunikamycyny (wykres 31B).



Wykres 31. Histogramy przedstawiające procent komórek zdepolaryzowanych żywych (A) i zdepolaryzowanych martwych (B) dla ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłódków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/# dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

Dane pozyskane z Muse Cell Analyzer wskazują na wzrost o 20% liczby żywych komórek posiadających zdepolaryzowaną błonę mitochondrialną po traktowaniu komórek ASC tunikamycyną w porównaniu do medium kontrolnego. Po zastosowaniu ekstraktów z laktofermentowanych wysłódków buraczanych obserwuje się spadek komórek ze zdepolaryzowanymi błonami mitochondrialnymi w porównaniu do tunikamycyny (rycina 12).

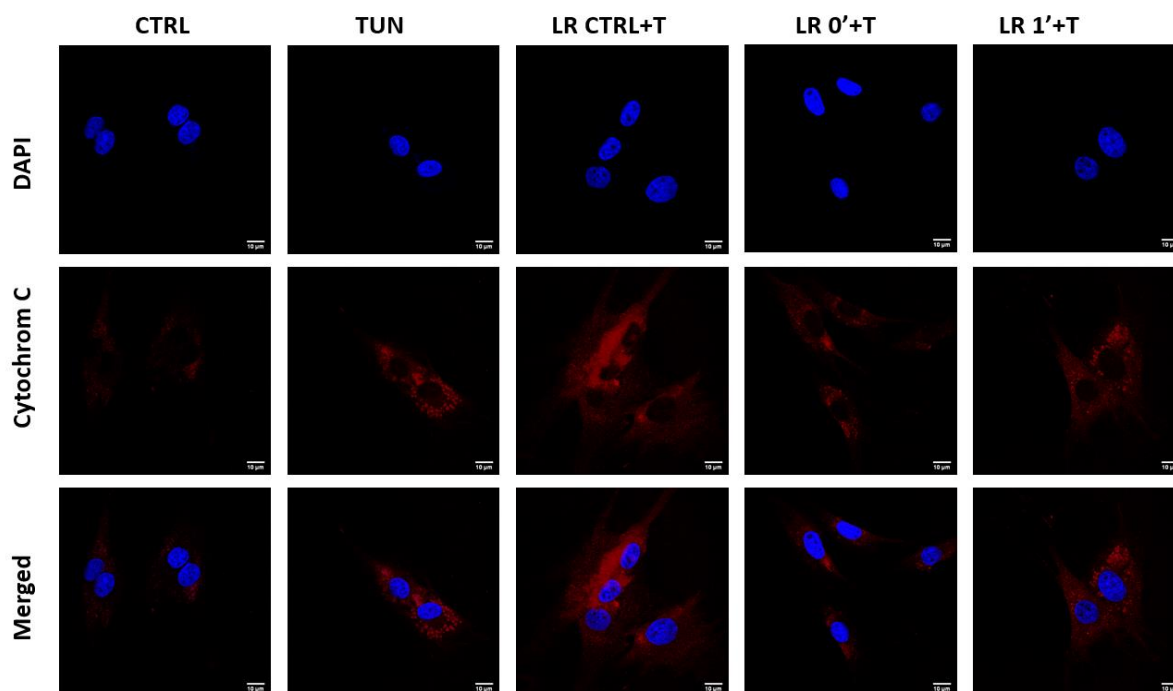


Rycina 12. Obrazy pozyskane Muse Cell Analyzer przedstawiające procent żywych i martwych zdepolaryzowanych komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną, ekstraktem kontrolnym (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłódków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR).

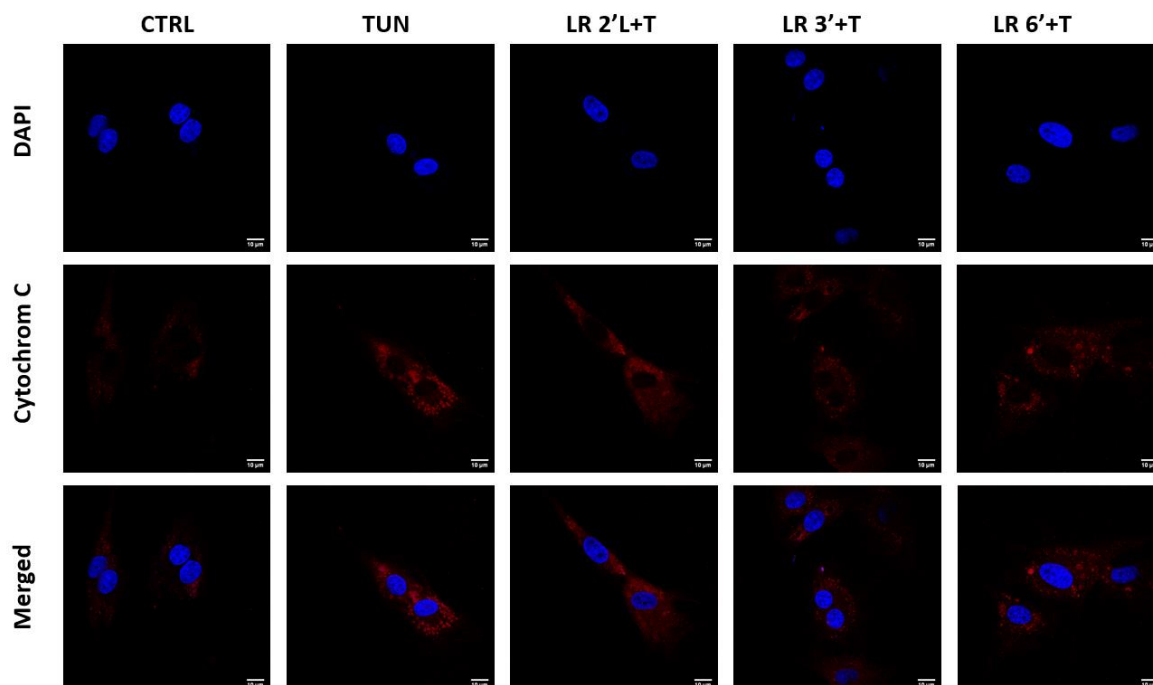
### 5.2.8. Wizualizacja cytochromu c

W celu sprawdzenia czy traktowane komórki ASC ekstraktami z *Lactobacillus rhamnosus* zmniejsza wewnętrzny szlak apoptotyczny przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne lokalizacji cytochromu c, dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR). Cytochrom c uwalniany jest z mitochondriów i aktywuje zależne od kaspaz sygnały apoptotyczne. Tunikamycyna spowodowała wzrost sygnału cytochromu c (intensywny czerwony kolor) w porównaniu do medium pełnego (CTRL). Odnotowano także obecność cytochromu c w komórkach traktowanych ekstraktem przed dodaniem szczepów probiotycznych (LR CTRL+T) oraz pobranych w dniach 0 (LR0'+T), pierwszym (LR1'+T) i drugim (LR2'+T), co zostało przedstawione w postaci czerwonego sygnału. W ekstraktach pobranych w dniach trzecim (LR3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) nie zaobserwowano sygnału świadczącego o obecności cytochromu c poza mitochondriami w komórkach ASC (rycina 13, rycina 14).





Rycina 13. Reprezentatywne obrazy pokazujące uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniach 0 (LR0'+T) i 1 (LR1'+T). Jądra komórkowe zostały wybarwione kontrastowo (DAPI) (niebieski).

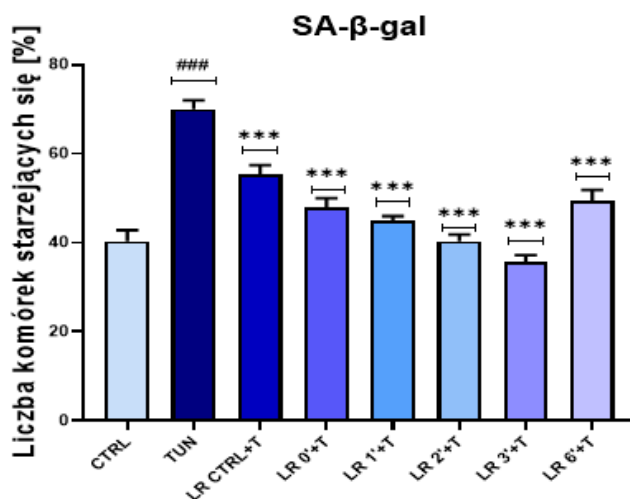


Rycina 14. Reprezentatywne zdjęcia pokazujące uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniach 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T). Jądra komórkowe zostały wybarwione kontrastowo (DAPI) (niebieski).

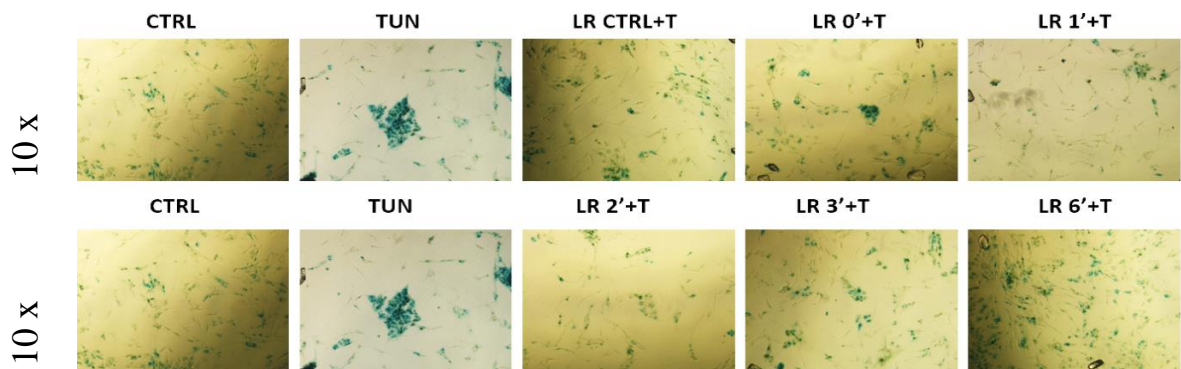
### 5.2.9. Wpływ laktofermentownego ekstraktu z wysłodków buraczanych na starzenie się komórek

W celu oceny wpływu fermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych z udziałem probiotycznego szczepu *Lactobacillus rhamnosus* (LR) na aktywność starzenia się komórek, przeprowadzono test SA-β-galaktozydazy (SA-β-gal) dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR).

Traktowanie komórek ASC tunikamycyną spowodowało zaburzenie homeostazy w komórkach, doprowadzając w ten sposób do zwiększania starzenia komórek, co objawiło się pojawieniem niebieskiego zabarwienia w komórkach ASC. W grupie doświadczalnej z udziałem ekstraktów z LR odnotowano zmniejszony udział komórek SA-β-gal dodatnich w porównaniu do tuniakmycyny po zastosowaniu ekstraktu kontrolnego przed dodaniem szczepów (LR CTRL+T) oraz w ekstraktach pobranych w dniach 0 (LR0'+T), pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T), trzecim (LR3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) ( $p \leq 0,001$ ). Spośród wszystkich ekstraktów, związek pobrany w dniu trzecim (LR3'+T) spowodował obniżenie procentowej ilości komórek SA-β-gal dodatnich poniżej 40% (wykres 32) (rycina 15).



Wykres 32. Ocena ilościowa komórek SA-β-gal (dodatnich) w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także SA-β-gal dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tuniakmycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \*\* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tuniakmycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

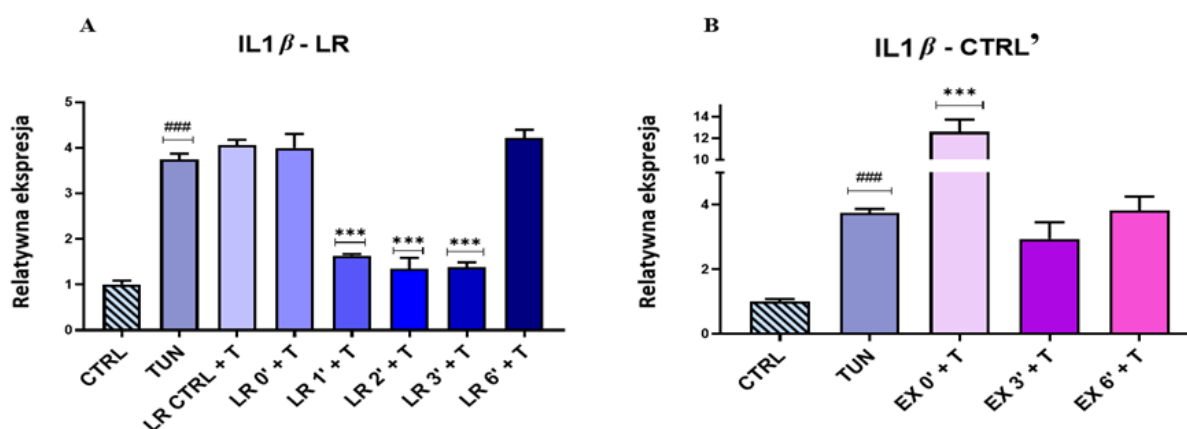


Rycina 15. Reprezentatywne obrazy testu SA-β-gal związanego ze starzeniem się komórek dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także SA-β-gal dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepów (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłódków buraczanych dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR).

## 5.2.10. Wpływ ekstraktów na cytokiny pro- i przeciwzapalne

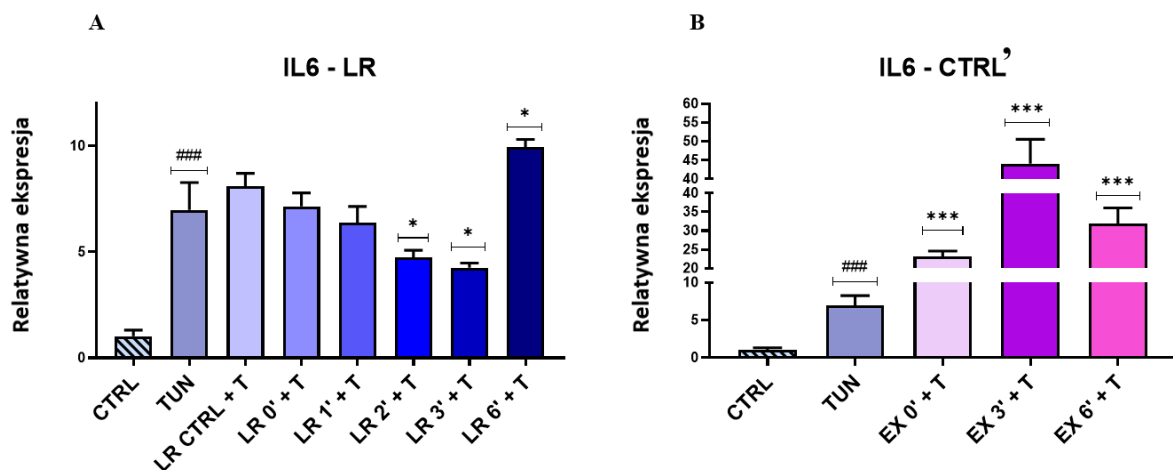
W celu wykazania zmian w ekspresji cytokinin pro- i przeciwzapalnych oraz miRNA, które związane są z zapoczątkowaniem zapalenia w organizmie, przeprowadzono RT- qPCR w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) oraz ekstraktem pobranym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T), laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL').

Interleukina (IL)- 1 $\beta$  jest kluczowym mediatorem odpowiedzi zapalnej w organizmie. Tunikamycyna spowodowała względny wzrost ekspresji IL-1 $\beta$  w komórkach ASC w obu grupach doświadczalnych w porównaniu do medium kontrolnego (CTRL). W grupie z udziałem LR w ekstrakcie kontrolnym (LR CTRL+T) oraz pobranych w dniach 0 (LR0'+T) i szóstym (LR6'+T) nie wykazano zmian w ekspresji interleukiny 1 $\beta$  w porównaniu do TUN. Po potraktowaniu komórek ASC ekstraktami pobranymi w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR3'+T) nastąpiło obniżenie ekspresji prozapalnej IL-1 $\beta$  w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 33A). Z kolei w grupie bez dodatku szczepu LR (CTRL') w ekstraktach pobranych w dniach trzecim (EX3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) nie odnotowano różnic statystycznych w porównaniu do TUN. W ekstrakcie kontrolnym (EX0'+T) wykazano trzykrotny wzrost ekspresji genu IL-1 $\beta$  w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 33B).



Wykres 33. Względna ekspresja genów IL- 1 $\beta$  w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja IL-1 $\beta$  dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/## dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

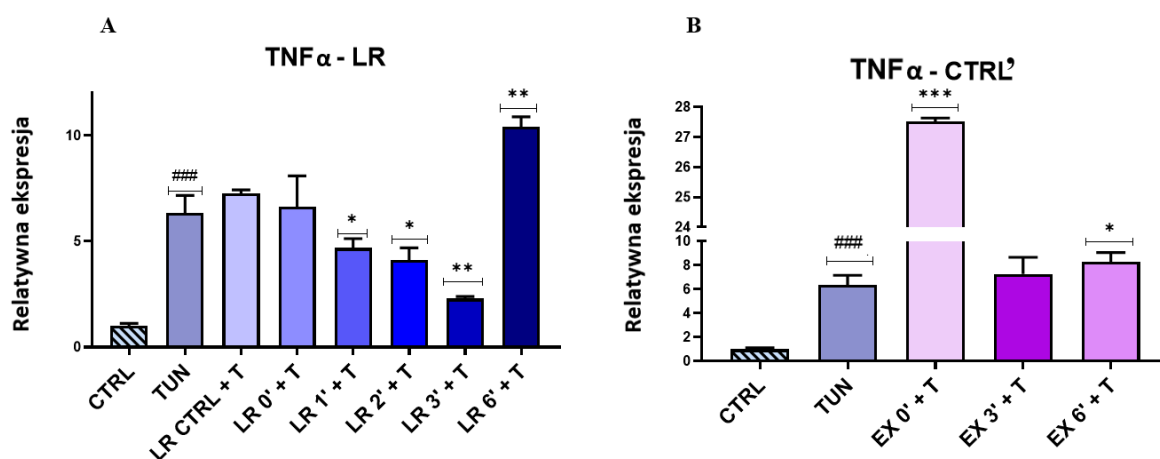
Interleukina 6 (IL-6) należy również do rodziny cytokin prozapalnych. Tunikamycyna wpłynęła na wzrost ekspresji IL-6 zarówno w grupie ekstraktów z udziałem LR jak i bez dodatku szczepu bakterii probiotycznych w porównaniu do medium pełnego (CTRL). W grupie eksperymentalnej z dodatkiem LR w ekstrakcie kontrolnym przed dodaniem szczepu (LR CTRL+ T) oraz pobranych w dniach 0 (LR0'+T) i pierwszym (LR1'+T) nie zaobserwowano różnic statystycznych w porównaniu do TUN. Po zastosowaniu ekstraktów pobranych w dniach drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR3'+T) odnotowano spadek ekspresji prozapalnej cytokiny IL-6 ( $p \leq 0,05$ ) w porównaniu do TUN. Ekstrakt pobrany w dniu szóstym (LR6'+T) wykazywał wzrost ekspresji prozapalnej interleukiny 6 w komórkach ASC ( $p \leq 0,05$ ) (wykres 34A). Natomiast w grupie bez udziału szczepu LR (CTRL') wykazano wysoki istotny wzrost ekspresji IL-6 we wszystkich ekstraktach tj. pobranych w dniach 0 (EX0'+T), trzecim (LR3'+T) i szóstym (LR6'+T) ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN (wykres 34B).



Wykres 34. Względna ekspresja genów IL-6 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja IL-6 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłoków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłoków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

Czynnik martwicy nowotworu TNF $\alpha$  jest jednym z najważniejszych cytokin prozapalnych w organizmie. Tunikamycyna spowodowała wzrost ekspresji TNF $\alpha$  w komórkach ASC w porównaniu do medium pełnego (CTRL) w obu grupach eksperymentalnych. W grupie z dodatkiem LR traktowanie komórek ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz pobranych w dniu 0 (LR0'+T) nie wykazano różnic statystycznych w porównaniu do TUN. Zaobserwowano spadek ekspresji

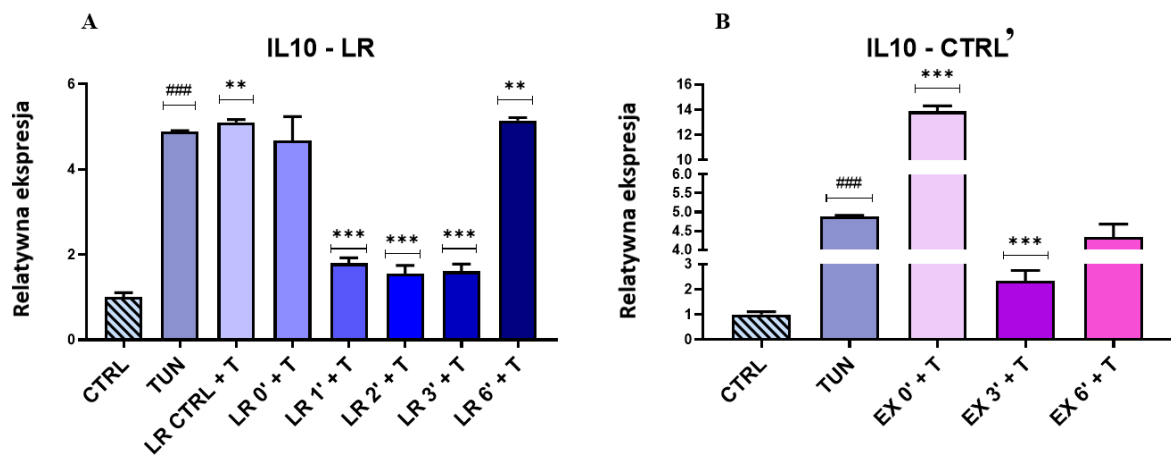
TNF $\alpha$  w ekstraktach LR pobranych w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) ( $p \leq 0,05$ ) oraz trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do TUN. W ekstrakcie pobranym w dniu szóstym (LR6'+T) wykazano wzrost ekspresji TNF $\alpha$  w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 35A). W przypadku grupy doświadczalnej bez dodatku LR (CTRL') po traktowaniu komórek ASC ekstraktem pobranym w dniu trzecim (EX3'+T) nie zaobserwowano zmian w ekspresji TNF $\alpha$ . Natomiast w ekstrakcie pobranym w dniu 0 (EX0'+T) oraz pobranym w dniu 6 (EX6'+T) wykazano wzrost ekspresji czynnika TNF $\alpha$  w porównaniu do TUN, odpowiednio ( $p \leq 0,001$ ) i ( $p \leq 0,05$ ) (wykres 35B).



Wykres 35. Względna ekspresja genów TNF $\alpha$  w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja TNF $\alpha$  dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłoków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłoków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/## dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

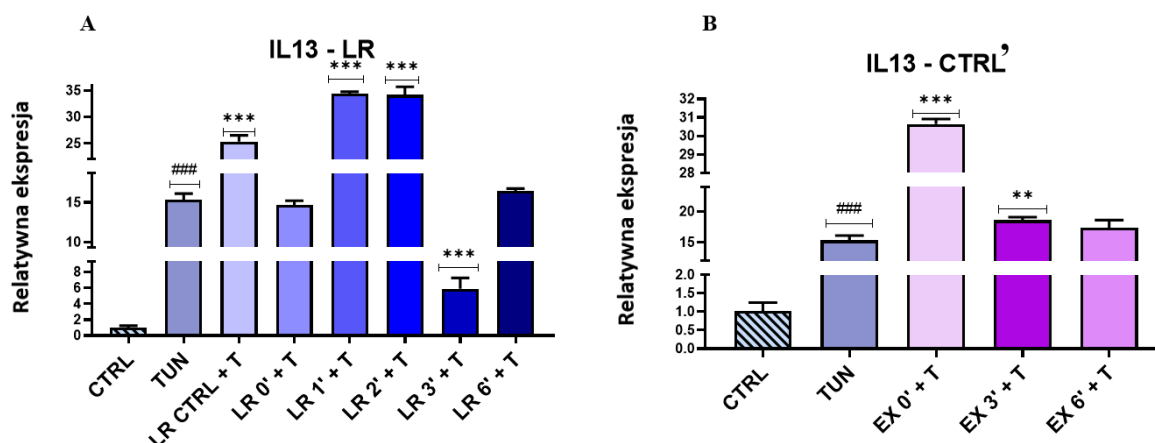
Interleukina (IL) -10 należy do cytokin przeciwzapalnych, hamujących wytwarzanie cytokin prozapalnych. Tunikamycyna spowodowała wzrost ekspresji IL-10 w obu grupach eksperymentalnych w porównaniu do medium pełnego (CTRL). W grupie LR w ekstrakcie pobranym w dniu 0 (LR0'+T) nie wykazano różnic statystycznych w porównaniu do TUN. Wykazano istotny spadek ekspresji IL-10 w ekstraktach LR pobranych w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,001$ ). W ekstrakcie kontrolnym przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL+T) oraz pobranym w dniu szóstym (LR6'+T) odnotowano wzrost ekspresji IL-10 ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do TUN (wykres 36A). Z kolei w grupie bez obecności LR (CTRL') ekstrakt pobrany w dniu szóstym (EX6'+T) nie wpływał na zmiany ekspresji IL-10 w komórkach ASC. Związek pobrany w dniu 0 (EX0'+T) wykazywał prawie dwukrotny wzrost ekspresji przeciwzapalnej cytokiny IL-10 ( $p \leq 0,001$ ),

a podczas zastosowania ekstraktu pobranego dniu 3 (EX3'+T) można zaobserwować spadek ekspresji przeciwzapalnej interleukiny 10 (wykres 36B).



Wykres 36. Względna ekspresja genów IL-10 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja IL-10 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

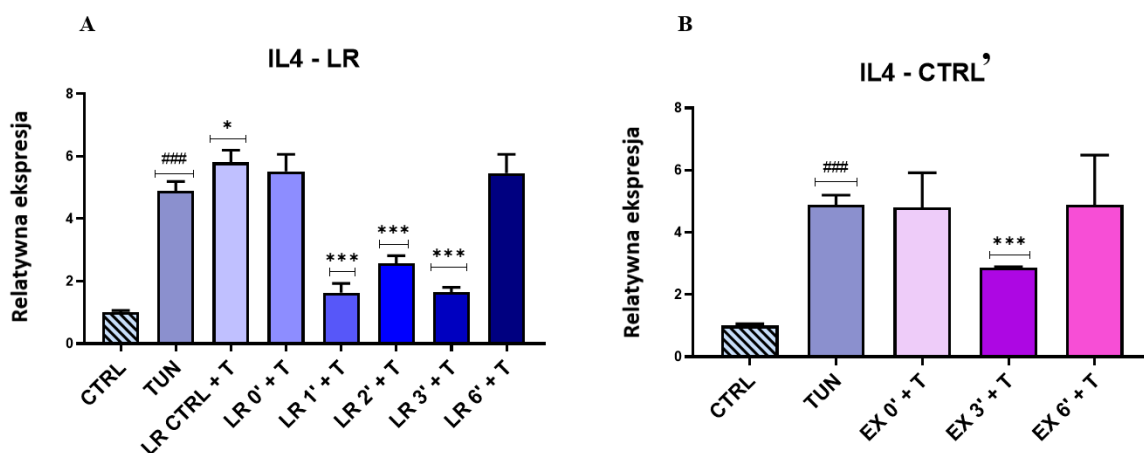
Interleukina (IL)-13 należy również do silnych cytokin przeciwzapalnych w organizmie. Tunikamycyna wpłynęła na wzrost ekspresji IL-13 w obu grupach doświadczalnych w porównaniu do medium pełnego (CTRL). W grupie z dodatkiem LR po zastosowaniu ekstraktu pobranego w dniach 0 (LR0'+T) i szóstym (LR6'+T) nie odnotowano zmian w ekspresji IL-13 w ASC. W ekstrakcie kontrolnym przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL+T) oraz pobranym w dniu pierwszym (LR1'+T) i drugim (LR2'+T) nastąpił wzrost ekspresji przeciwzapalnej interleukiny-13 w ASC porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ). Natomiast ekstrakt pobrany w dniu trzecim (LR'3+T) wpłynął na obniżenie ekspresji IL-13 w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 37A). W grupie doświadczalnej bez udziału LR (CTRL') traktowanie ASC ekstraktem pobranym w dniu szóstym (EX6'+T) nie spowodowało zmian w ekspresji IL-13. Natomiast istotny wzrost IL-13 odnotowano po użyciu związków pobranych w dniach 0 (EX0'+T) oraz trzecim (EX3'+T), odpowiednio ( $p \leq 0,001$ ), ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do TUN (wykres 37B).



Wykres 37. Względna ekspresja genów IL-13 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja IL-13 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

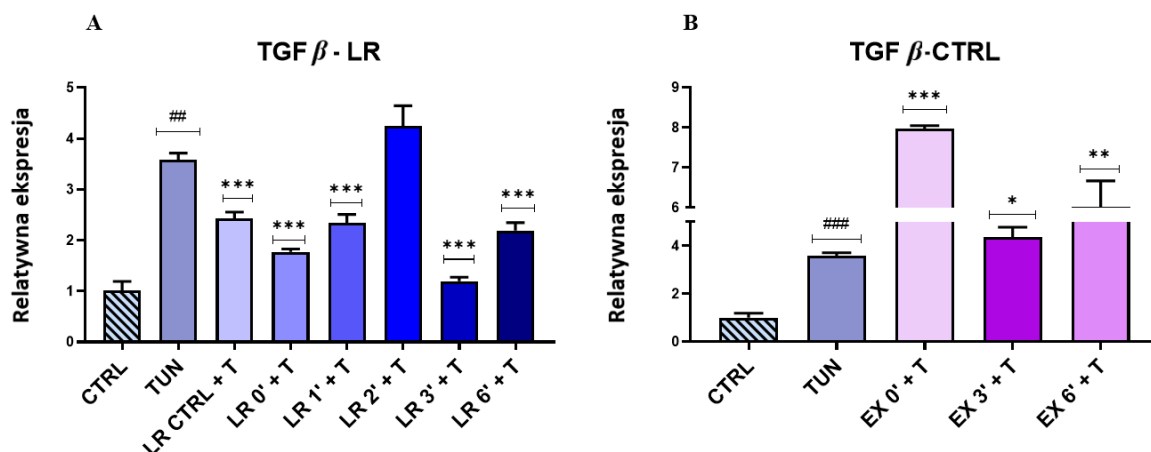
Interleukina (IL)- 4 pełni również funkcje przeciwzapalna w organizmie. Traktowanie komórek ASC tunikamycyną (TUN) wpłynęło na wzrost ekspresji IL-4 w obu grupach doświadczalnych w porównaniu do medium pełnego (CTRL). W grupie z dodatkiem LR ekstrakt pobrany w dniach 0 (LR0'+T) i szóstym (LR6'+T) nie spowodował zmian w ekspresji interleukiny 4 w ASC. Z kolei ekstrakty pobrane w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR3'+T) wpłynęły na obniżenie ekspresji IL-4 w komórkach ASC w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ). Ekstrakt kontrolny przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL+T) spowodował wzrost ekspresji IL-4 w porównaniu do TUN (wykres 38A). W grupie bez obecności szczepu LR (CTRL') ekstrakty pobrane w dniach 0 (EX0'+T) i szóstym (EX6'+T) nie wpłynęły na zmiany ekspresji IL-4 w ASC. Co ciekawe, jedynie ekstrakt pobrany w dniu trzecim (EX3'+T) wpłynął na obniżenie ekspresji IL-4 w komórkach ASC w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 38B).





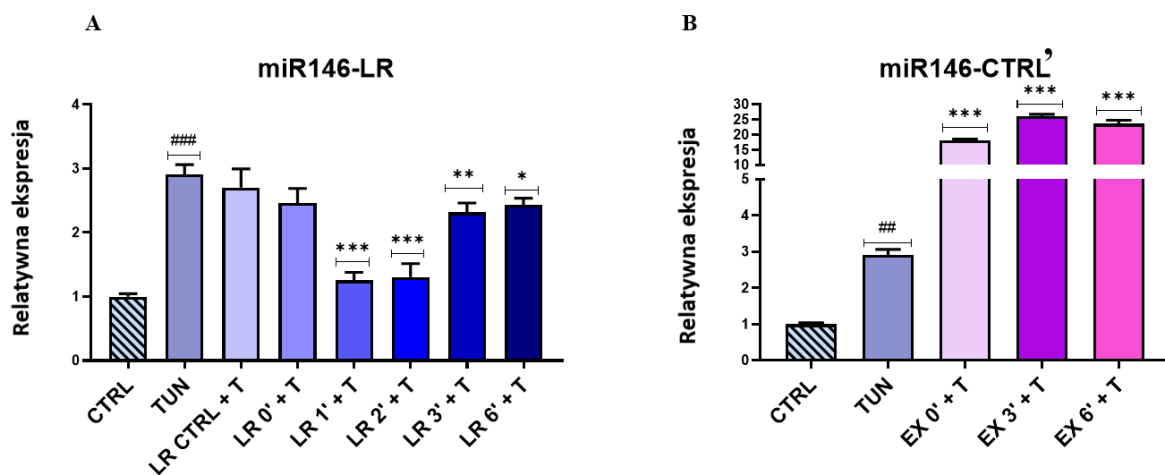
Wykres 38. Względna ekspresja genów IL-4 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja IL-4 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/# dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

Transformujący czynnik beta ( $TGF\beta$ ) odgrywa rolę w regulacji wielu procesów komórkowych, m.in. proliferacja i różnicowanie komórek, a także w apoptozie, posiada także właściwości przeciwzapalne. Tunikamycyna spowodowała znaczny wzrost ekspresji  $TGF\beta$  w obu grupach doświadczalnych w porównaniu do medium pełnego (CTRL). W grupie z udziałem LR w ekstrakcie pobranym w dniu drugim (LR2'+T) nie odnotowano różnic statystycznych. Z kolei zaobserwowano obniżoną ekspresję  $TGF\beta$  w ASC po zastosowaniu zarówno ekstraktu kontrolnego przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL+T) oraz pobranych w dniach 0 (LR0'+T), pierwszym (LR1'+T), trzecim (LR3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 39A). Natomiast w grupie bez dodatku szczepu LR (CTRL') odnotowano znaczący wzrost ekspresji czynnika  $TGF\beta$  w ASC po inkubacji wszystkich ekstraktów tj. pobranych w dniach 0 (EX0'+T) ( $p \leq 0,001$ ) trzecim (EX3'+T) ( $p \leq 0,05$ ) i szóstym (EX6'+T) ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do TUN (wykres 39B).



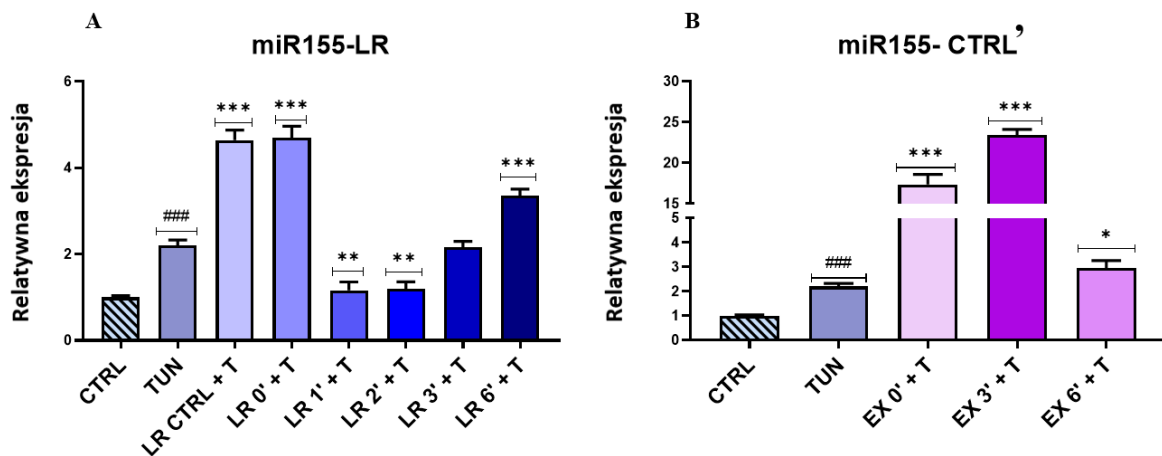
Wykres 39. Względna ekspresja genów TGFβ w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja TGFβ dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/#### dla  $p \leq 0,001$ .

Mikro RNA (miRNA) 146 bierze udział w wielu kaskadach przeciwzapalnych w organizmie. Tunikamycyna spowodowała wzrost ekspresji miR-146 w obu grupach badawczych w porównaniu do medium pełnego (CTRL). W ekstrakcie kontrolnym w grupie LR przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL+T) oraz pobranym w dniu 0 (LR0'+T) nie wykazano różnic statystycznych w porównaniu do TUN. Z kolei wykazano obniżenie miR-146 w ekstraktach pobranych w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) ( $p \leq 0,001$ ), a także trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,01$ ) i szóstym (LR6'+T) ( $p \leq 0,05$ ) w porównaniu do TUN (wykres 40A). W grupie bez dodatku mikroorganizmów (CTRL') zaobserwowano odwrotne zależności, gdyż wykazano wzrost ekspresji miR-146 w ASC po zastosowaniu każdego ekstraktu tj. (EX0'+T), (EX3'+T) oraz (EX6'+T) ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do tunikamycyny (wykres 40B).



Wykres 40. Względna ekspresja genów miR-146 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja miR-146 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/## dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

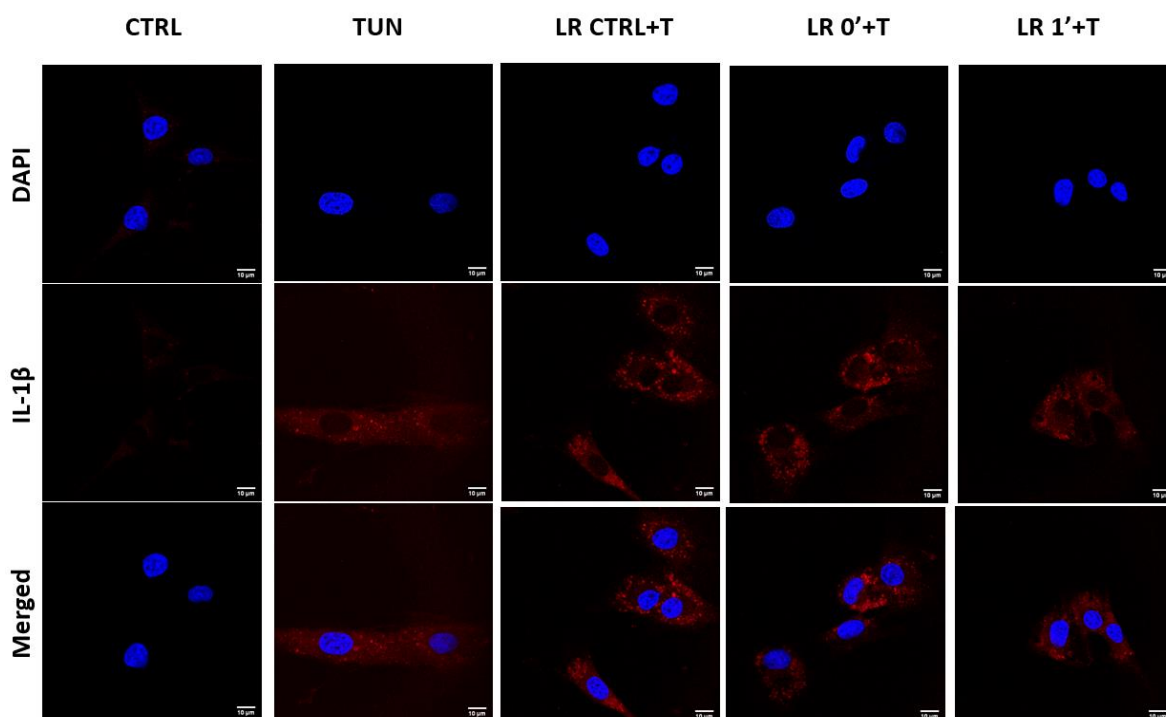
MikroRNA miR -155 odgrywa kluczową rolę w wielu fizjologicznych procesach w organizmie, w tym odpowiada za regulację wrażliwości na insulinę w tkance tłuszczowej, wątrobie i mięśniach. Ponadto odnotowano także, że miR-155 jest kluczowym regulatorem stanu zapalnego. W tym przypadku tunikamycyna spowodowała wzrost ekspresji miR-155 w komórkach ASC obu grup doświadczalnych w porównaniu do medium pełnego (CTRL). W grupie LR ekstrakt pobrany w dniu trzecim (LR3'+T) nie wpływał na ekspresję miR-155. Z kolei w ekstrakcie kontrolnym przed dodaniem szczepów (LR CTRL+ T) oraz pobranym w dniu 0 (LR0'+T) oraz szóstym (LR6'+T) zaobserwowano wzrost ekspresji miR-155 w ASC w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ). W tej samej grupie ekstrakty pobrane w dniach pierwszym (LR1'+T) i drugim (LR2'+T) wpływały na spadek ekspresji miR-155 w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 41A). Natomiast w grupie bez udziału szczepu LR (CTRL') wykazano istotny wzrost ekspresji miR-155 w ASC po użyciu ekstraktów pobranych w dniach 0 (EX0'+T), trzecim (EX3'+T) ( $p \leq 0,001$ ) oraz szóstym (EX6'+T) ( $p \leq 0,05$ ) w porównaniu do TUN (wykres 41B).



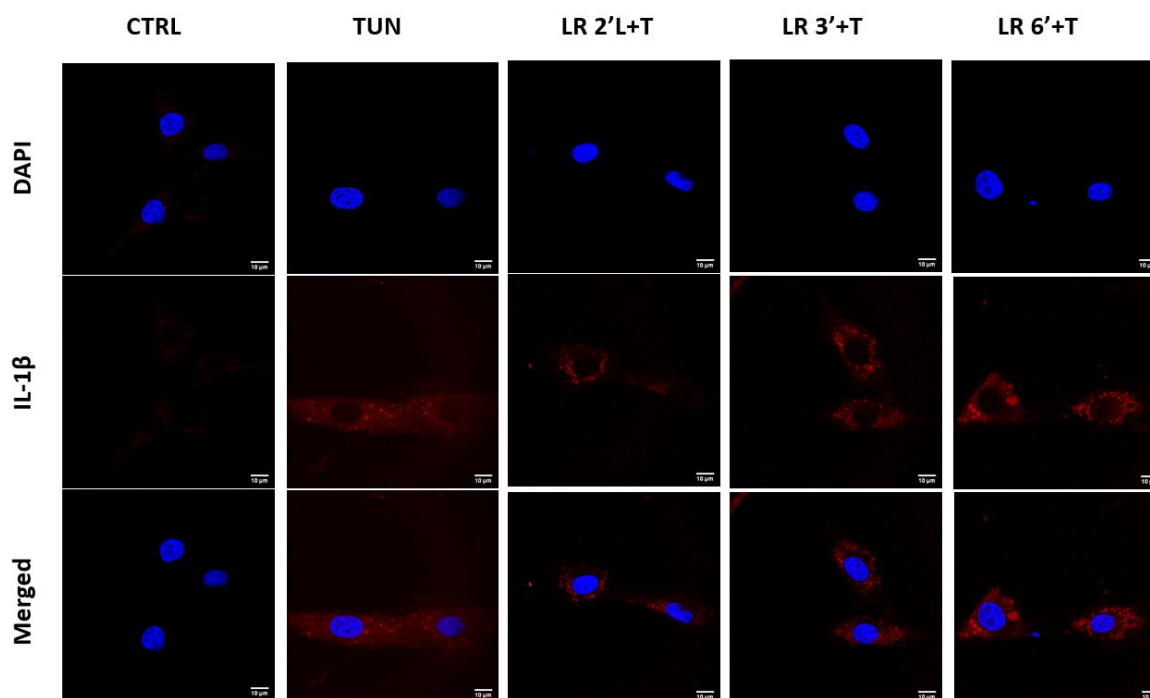
Wykres 41. Względna ekspresja genów miR-155 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja miR-155 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/#### dla  $p \leq 0,001$ .

### 5.2.11. Wizualizacja aktywnej interleukiny (IL) -1 $\beta$ w komórkach ASC

W celu wizualizacji interleukiny (IL) -1 $\beta$  w komórkach ASC przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłoków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR). Traktowanie komórek ASC tunikamycyną spowodowało wzrost poziomu białka IL-1 $\beta$  w porównaniu do medium pełnego (CTRL), o czym świadczy widoczny czerwony sygnał. Podobnie obserwacje odnotowano w ekstrakcie kontrolnym przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL+T) oraz pobranych w dniach 0 (LR0'+T), pierwszym (LR1'+T) oraz szóstym (LR6'+T). Natomiast w ekstraktach pobranych w dniach drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR3'+T) można zaobserwować niewielki czerwony sygnał, co świadczy o redukcji poziomu interleukiny 1 $\beta$  w komórkach (rycina 16, rycina 17).



Rycina 16. Reprezentatywne obrazy przedstawiające wizualizację poziomu interleukiny 1 $\beta$  w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłoków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniach 0 (LR0'+T) i 1 (LR1'+T). Jądra komórkowe zostały wybarwione kontrastowo (DAPI) (niebieski).



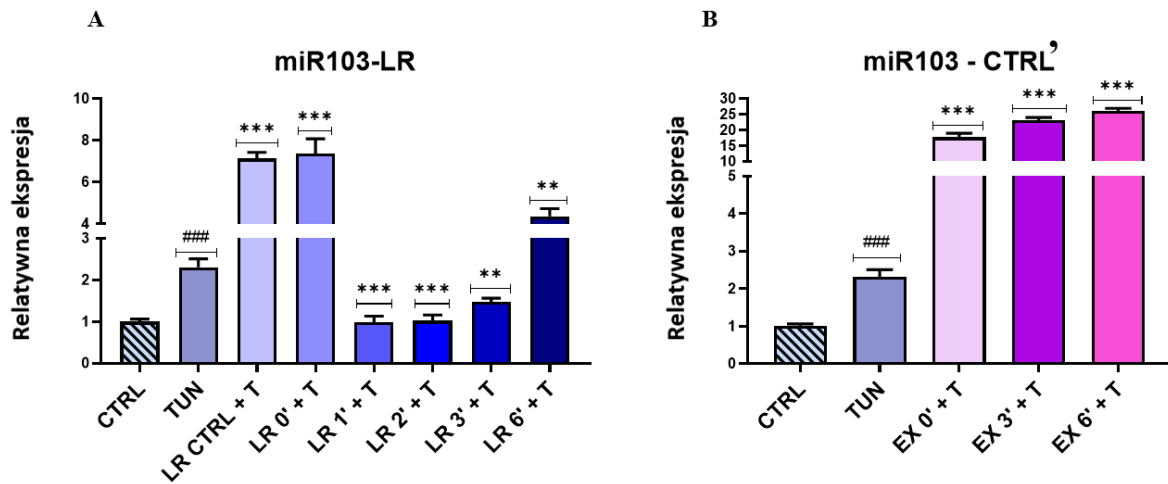
Rycina 17. Reprezentatywne obrazy przedstawiające wizualizacje poziomu interleukiny $1\beta$  w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniach 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T). Jądra komórkowe zostały wybarwione kontrastowo (DAPI) (niebieski).

### 5.2.12. MikroRNA w insulinooporności

MikroRNA (miRNA) bierze udział w wielu procesach biologicznych, w tym także w metabolizmie organizmu, różnicowaniu adipocytów, a także w regulacji wydzielania insuliny. Przeprowadzono qRT-PCR dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także dla ASC pod wpływem ekstraktu kontrolnego przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T), laktofermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) oraz fermentowanych wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL').

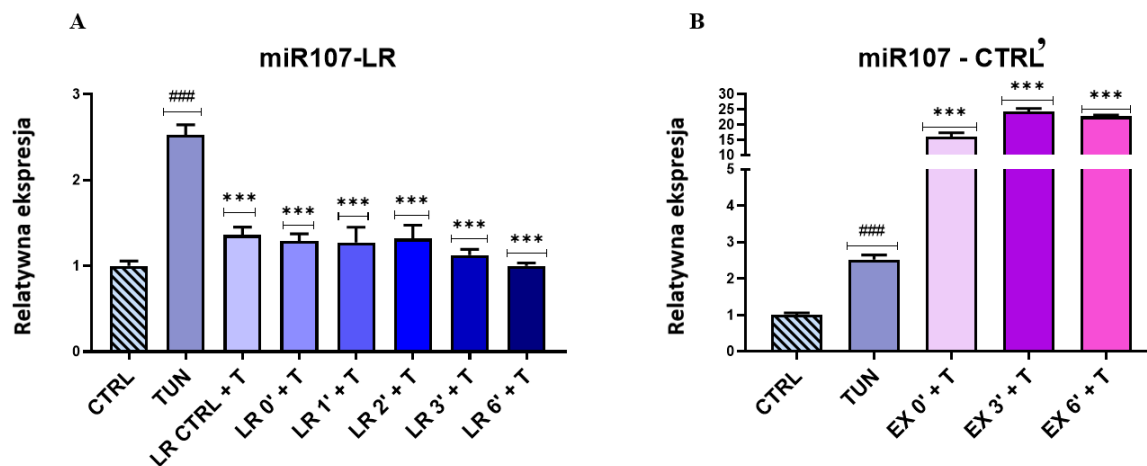
W przypadku MikroRNA-103 komórki ASC traktowane tunikamycyną wykazywały wzmożoną ekspresję miR-103 w porównaniu do medium pełnego (CTRL) w obydwu grupach doświadczalnych. W grupie LR odnotowano istotny wzrost ekspresji miRNA-130 w ASC po wpływie ekstraktów kontrolnego przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL'+T) i pobranych w dniach 0 (LR0'+T) ( $p \leq 0,001$ ) oraz szóstym (LR6'+T) ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do TUN. Wykazano spadek ekspresji miR-103 po zastosowaniu ekstraktów pobranych w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) ( $p \leq 0,001$ ) oraz trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,01$ )

w porównaniu do TUN (wykres 42A). Natomiast w grupie doświadczalnej bez obecności szczepu LR (CTRL') wykazano prawie dziewięciokrotny wzrost ekspresji miR-103 zarówno w ekstrakcie pobranym w dniu 0 (EX0'+T), trzecim (EX3'+T) i szóstym (EX6'+T) w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 42B).



Wykres 42. Względna ekspresja genów miR-103 dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja miR-103 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/#### dla  $p \leq 0,001$ .

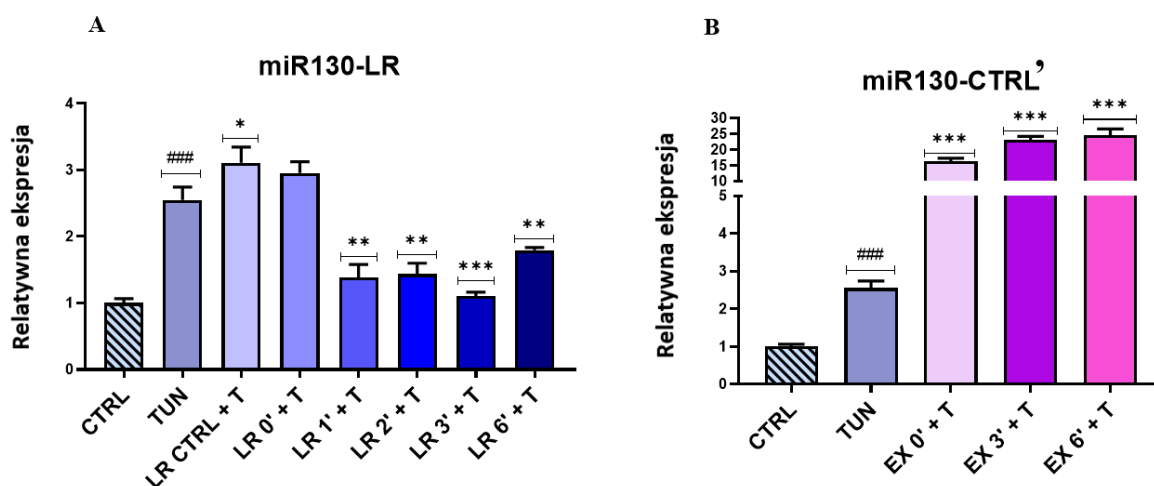
Analizując kolejne MikroRNA zaangażowane w regulację wydzielania insuliny wykazano, że tunikamycyna spowodowała wzrost miR-107 w obu grupach eksperymentalnych w porównaniu do medium pełnego (CTRL). W grupie z dodatkiem LR wykazano spadek ekspresji miR-107 w ASC po aplikacji każdego związku pobranego z poszczególnych dni fermentacji ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN (wykres 43A). Z kolei w grupie bez udziału szczepu LR (CTRL') zaobserwowano odwrotny efekt, gdyż odnotowano wzrost ekspresji miRNA-107 w ASC po ekstraktach pobranych w dni 0 (EX0'+T) trzecim (EX3'+T) i szóstym (EX6'+T) w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 43B).



Wykres 43. Względna ekspresja genów miR-107 dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja miR-107 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłoków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłoków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/## dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

MikroRNA-130 jest także powiązany z regulacją homeostazy glukozy w organizmie. W tym przypadku również zaobserwowano wzrost ekspresji miR-130 w komórkach ASC traktowanych tunikamycyną w porównaniu do hodowli ASC w medium pełnym (CTRL). W grupie LR ekstrakt pobrany w dniu 0 (LR0'+T) nie wykazywał zmian ekspresji miR-130 w ASC. W ekstrakcie kontrolnym przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL') odnotowano z kolei wzrost ekspresji miR-130 w ASC w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,05$ ). Pozostałe ekstrakty wykazywały spadek ekspresji miR-130 tj. pobrane w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) ( $p \leq 0,01$ ), trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,001$ ) oraz szóstym (LR6'+T) ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 44A). W grupie doświadczalnej bez udziału szczepu LR (CTRL') wykazano wpływ ekstraktów na tendencję wzrostową ekspresji miRNA-130 w ASC, zarówno w ekstrakcie pobrany w dniu 0 (EX 0'+T), trzecim (EX3'+T) i szóstym (EX6'+T) ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN (wykres 44B).





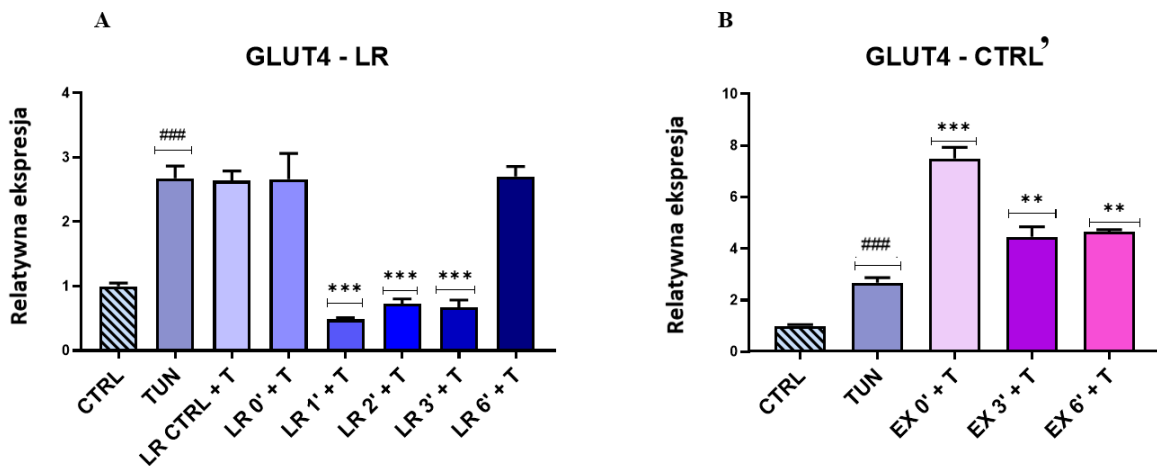
Wykres 44. Względna ekspresja genów miR-130 dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja miR-130 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/# dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

### 5.2.13. Zmiany ekspresji genów związanych z insulinoopornością

W rozwoju insulinooporności ważną rolę odgrywają czynniki genetyczne, które wpływają na sygnalizację insuliny. Za pomocą testu RT- qPCR oceniono ekspresję genów związanych insulinoopornością takich jak receptor insuliny (INSR), substrat receptora insuliny (IRS) oraz transportera glukozy typu 4 (GLUT 4) w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) oraz ekstraktem pobranym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T), fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) oraz fermentowanymi ekstraktami bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL').

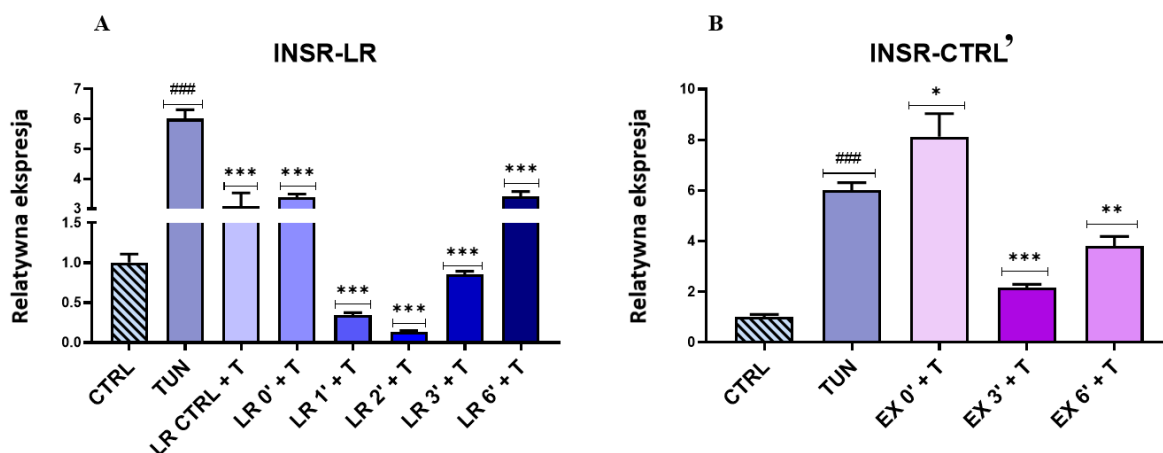
Transporter glukozy 4 (GLUT4) jest odpowiedzialny za transport glukozy do komórek docelowych, regulowany przez hormon insulinę. Traktowanie komórek tunikamycyną wpłynęło na wzrost ekspresji białka transportowego GLUT4 w obu grupach eksperymentalnych w porównaniu do hodowli ASC w medium pełnym (CTRL). W grupie z udziałem LR ekstrakt kontrolny przed dodaniem szczepu LR (LR CTRL'+T), pobrany w dniu 0 (LR0'+T) oraz szóstym (LR6'+T) nie wpływał na ekspresję GLUT4 w ASC. Zaobserwowano spadek ekspresji GLUT4 po zastosowaniu ekstraktów pobranych w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR3'+T) w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ). W pozostałych ekstraktach nie wykazano różnic statystycznych (wykres 45A). W grupie bez

udziału szczepu LR (CTRL') odnotowano wzrost ekspresji GLUT4 w ASC zarówno po zastosowaniu związku pobranego w dniach 0 (EX0'+T) ( $p \leq 0,001$ ) trzecim (EX3'+T) i szóstym (EX6'+T) ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do TUN (wykres 45B).



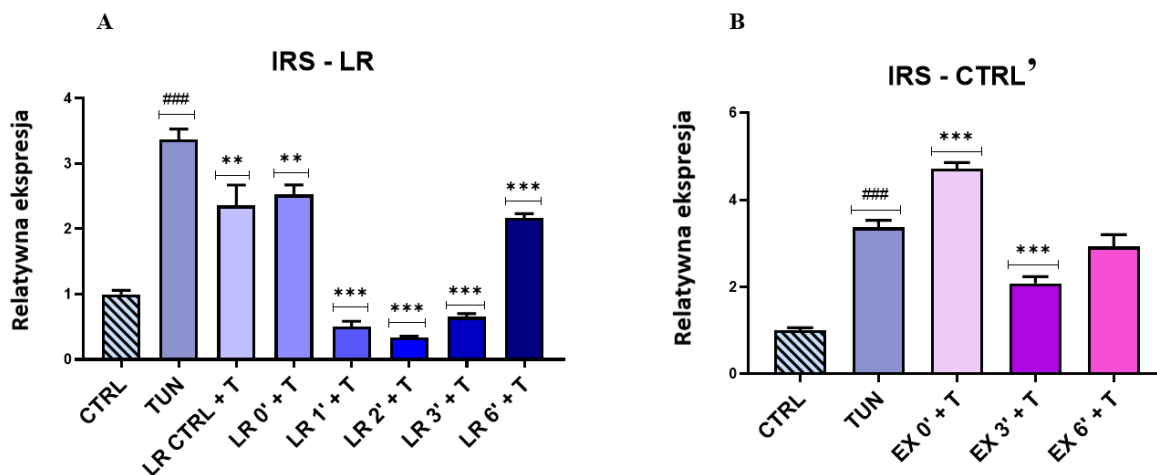
Wykres 45. Przedstawienie relatywnej ekspresji markerów insulinooporności GLUT4 dla hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja GLUT4 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/# dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

Ekspresja receptora insulinowego INSR była podwyższona w komórkach ASC traktowanych tunikamycyną w obu grupach doświadczalnych w porównaniu do ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL). Potraktowanie komórek związkami z LR spowodowało obniżenie ekspresji INSR zarówno pod wpływem ekstraktu kontrolnego przed dodaniem szczepów (LR CTRL') jak i pobranych w dniu 0 (LR'0+T), pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T), trzecim (LR3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) trwania fermentacji ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN (wykres 46A). W grupie bez udziału szczepu LR (CTRL') odnotowano wzrost ekspresji markera INSR w ASC po zastosowaniu ekstraktu pobranego w dniu 0 (EX0'+T) w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,05$ ). Pozostałe związki pobrane w dniach trzecim (LR3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) wpłynęły na obniżenie ekspresji INSR w porównaniu do TUN odpowiednio ( $p \leq 0,001$ ), ( $p \leq 0,01$ ) (wykres 46B).



Wykres 46. Przedstawienie relatywnej ekspresji markerów insulinooporności INSR dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja INSR dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłoków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłoków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

Ekspresja substratu receptora insuliny (IRS), w przypadku tunikamycyny wykazywała istotny wzrost zarówno w grupie z udziałem LR, jak i bez udziału mikroorganizmów probiotycznych w porównaniu do medium pełnego (CTRL). W grupie doświadczalnej z dodatkiem LR nastąpił spadek ekspresji IRS zarówno w ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL') i pobranym w dniach 0 (LR0'+T) ( $p \leq 0,01$ ), pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T), trzecim (LR3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) trwania fermentacji ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN (wykres 47A). Natomiast w przypadku grupy bez obecności LR (CTRL') ekstrakt pobrany w dniu 6 fermentacji (EX6'+T) nie wpłynął na ekspresję IRS w ASC. Związek pobrany w dniu 0 (EX0'+T) spowodował wzrost ekspresji IRS ( $p \leq 0,001$ ), z kolei w ekstrakcie pobranym w dniu trzecim (EX3'+T) zaobserwowano odwrotny efekt obniżenia ekspresji IRS w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ) w ASC (wykres 47B).



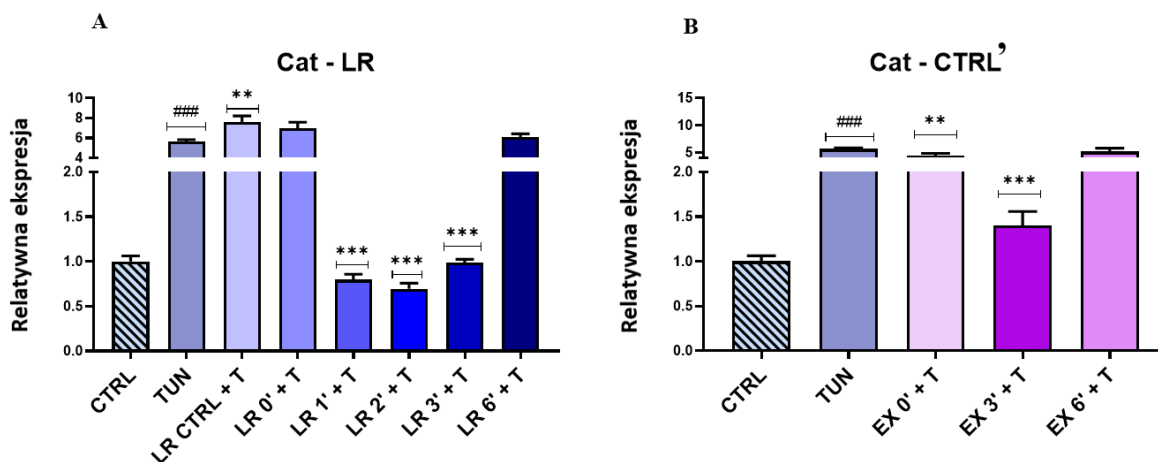
Wykres 47. Przedstawienie relatywnej ekspresji markera insulinooporności IRS dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja IRS dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/#### dla  $p \leq 0,001$ .

#### 5.2.14. Stres oksydacyjny

W celu określenia ekspresji enzymów antyoksydacyjnych w komórkach ASC przeprowadzono analizę ekspresji katalazy (CAT), dysmutazy ponadtlenkowej komórkowej (SOD1) i mitochondrialnej (SOD2) oraz peroksydazy glutationowej (GPX) w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) oraz ekstraktem pobranym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T), fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) oraz fermentowanymi ekstraktami bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL').

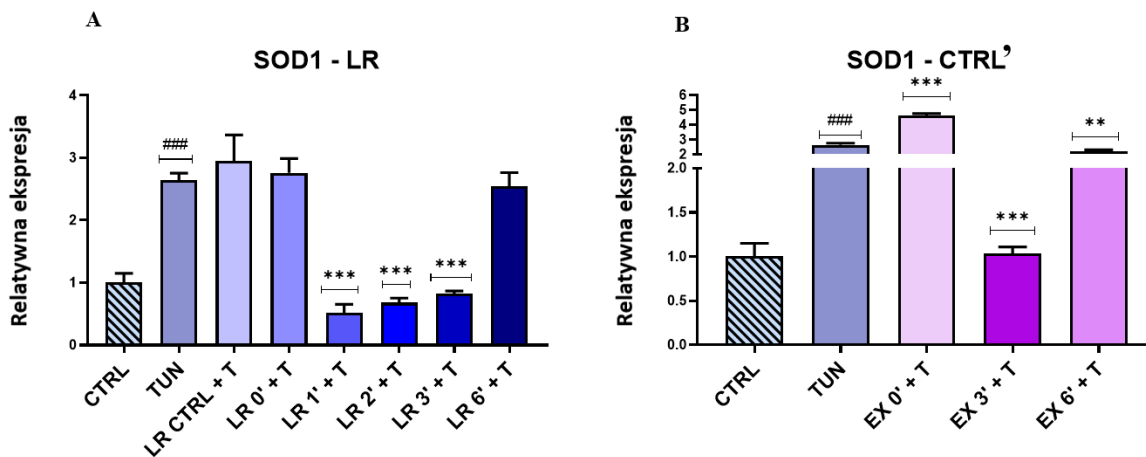
Jednym z ważniejszych enzymów antyoksydacyjnych jest katalaza, która powoduje rozkład cząsteczek nadtlenu wodoru. W komórkach ASC traktowanych tunikamycyną zaobserwowano wzrost ekspresji katalazy (CAT) w obu grupach doświadczalnych w porównaniu do ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL). W grupie LR po zastosowaniu ekstraktów pobranych w dniach 0 (LR0'+T) oraz szóstym (LR6'+T) nie zaobserwowano różnic statystycznych w porównaniu do TUN. Natomiast ekstrakt kontrolny przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL'+T) wpłynął na wzrost ekspresji CAT w ASC w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,01$ ). Ekstrakty pobrane w dniach pierwszym (LR1'+T) drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR3'+T) procesu fermentacji wpłynęły na obniżenie ekspresji CAT w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 48A). W grupie bez udziału szczepu LR

(CTRL') ekstrakt pobrany w dniu szóstym (EX6'+T) fermentacji nie wpływał na ekspresję CAT. Z kolei zaobserwowano obniżoną ekspresję CAT w ekstrakcie kontrolnym (EX0'+T) oraz pobranym w dniu trzecim (EX3'+T) odpowiednio ( $p \leq 0,01$ ) ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN (wykres 48B).



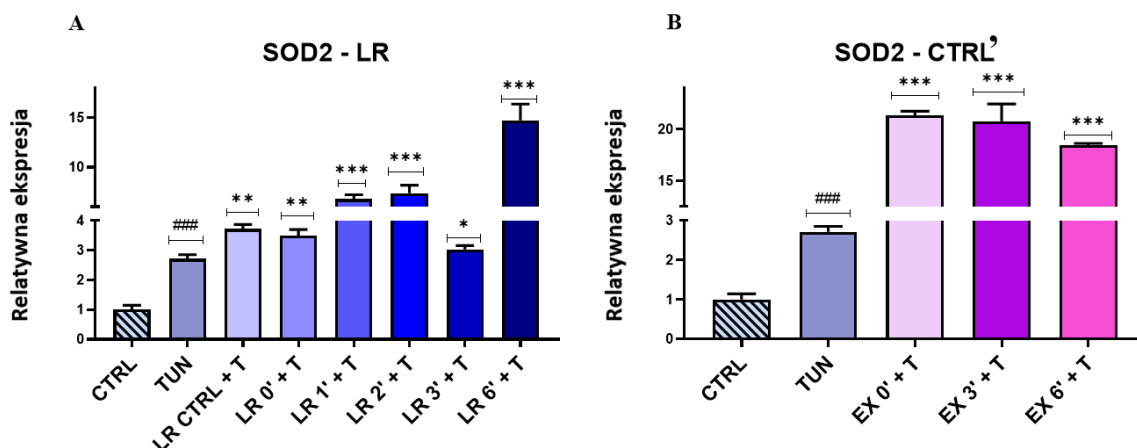
Wykres 48. Przedstawienie relatywnej ekspresji genów przeciwoksydacyjnych CAT dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja CAT dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szejceu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

W przypadku dysmutazy ponadtlenkowej komórkowej (SOD1) również tunikamycyna spowodowała wzrost ekspresji SOD1 w komórkach ASC w obu grupach doświadczalnych w porównaniu komórek hodowanych w do medium pełnego (CTRL). W grupie z dodatkiem LR nie zaobserwowano różnic statystycznych w ekstrakcie kontrolnym przed dodaniem szczepu probiotycznego (LR CTRL'+T) oraz pobranym w dniu 0 (LR0'+T) i szóstym dniu fermentacji (LR6'+T). Zaobserwowano natomiast obniżenie ekspresji SOD1 po zastosowaniu związków pobranych w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR3'+T) w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 49A). W grupie bez udziału szczepu LR (CTRL') wykazano wzrost ekspresji SOD1 w ASC po ekstrakcie pobranym w dniu 0 (EX0'+T) ( $p \leq 0,001$ ), natomiast w związkach pobranych w dniach trzecim (EX3'+T) oraz szóstym (EX6'+T) odnotowano spadek ekspresji SOD1 w ASC, odpowiednio ( $p \leq 0,001$ ), ( $p \leq 0,01$ ) w porównaniu do TUN (wykres 49B).



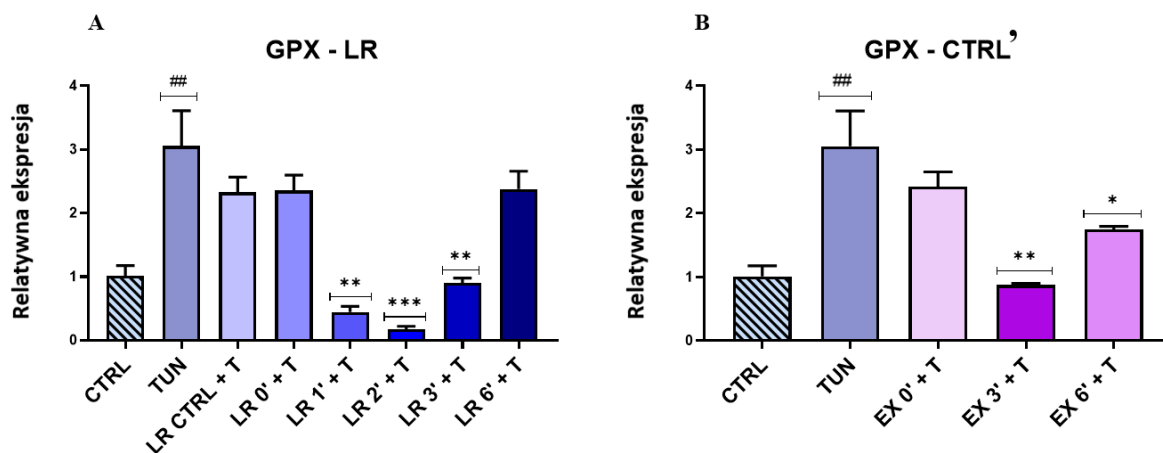
Wykres 49. Przedstawienie relatywnej ekspresji genów SOD1 dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja SOD1 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

W odniesieniu do dysmutazy ponadtlenkowej mitochondrialnej również tunikamycyna spowodowała wzrost ekspresji SOD2 w komórkach ASC w obu grupach doświadczalnych w porównaniu do hodowli komórek w medium pełnym (CTRL). W grupie z dodatkiem LR zaobserwowano wzrost ekspresji SOD2 w ASC po ekstraktach kontrolnych przed dodaniem szczepów (LR CTRL') oraz pobranych w dniach 0 (LR0'+T) ( $p \leq 0,01$ ) pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) oraz szóstym (LR6'+T) ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN. Ekstrakt pobrany w dniu trzecim (LR3'+T) spowodował spadek ekspresji SOD2 w ASC w porównaniu do TUN ( $p \leq 0,05$ ) (wykres 50A). Natomiast w grupie bez udziału mikroorganizmów probiotycznych (CTRL') wykazano wzrost ekspresji SOD2 w komórkach po zastosowaniu ekstraktu pobranego w dniu 0 (EX0'+T) ( $p \leq 0,001$ ) oraz trzecim (EX3'+T) i szóstym (EX6'+T) ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN (wykres 50B).



Wykres 50. Przedstawienie relatywnej ekspresji genów przeciwoksydacyjnych SOD2 dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja SOD2 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału mikroorganizmów (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/## dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

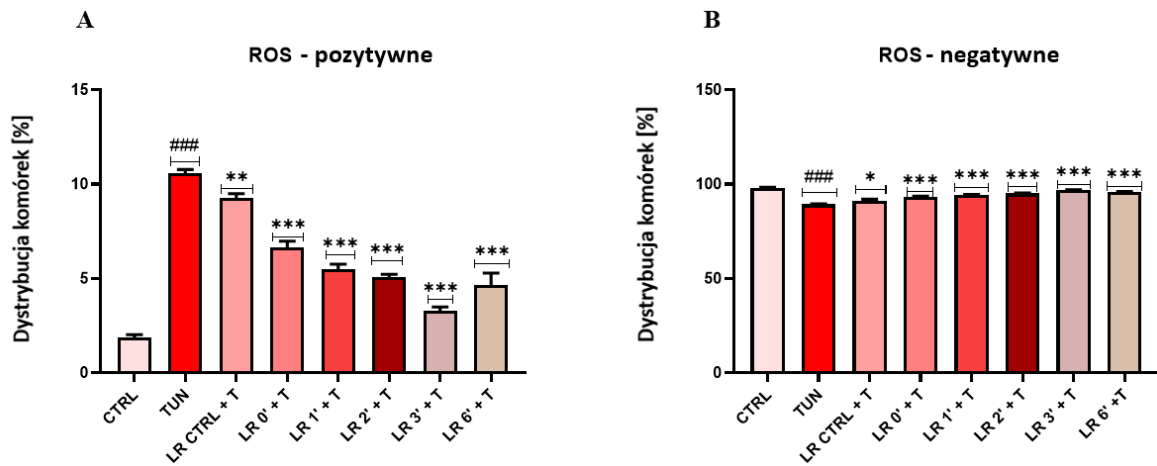
Ekspresja peroksydazy glutationowej (GPX), była z kolei statystycznie istotnie podwyższona w komórkach ASC traktowanych tunikamycyną zarówno w grupie z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* jak i bez udziału mikroorganizmów w porównaniu do hodowli ASC w medium pełnym (CTRL). W grupie doświadczalnej z udziałem LR w ekstraktach kontrolnych przed dodaniem szczepów (LR CTRL') oraz pobranych w dniu 0 (LR0'+T) oraz szóstym (LR6'+T) fermentacji nie zaobserwowano różnic statystycznych. Z kolei odnotowano obniżoną ekspresję GPX po użyciu ekstraktów pobranych w dniach pierwszym (LR1'+T) ( $p \leq 0,01$ ), drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR3'+T) ( $p \leq 0,001$ ) w porównaniu do TUN (wykres 51A). W grupie bez udziału mikroorganizmów (CTRL') ekstrakt pobrany w dniu 0 (EX0'+T) nie wpłynął na ekspresję GPX w ASC. Z kolei wykazano spadek ekspresji GPX w ekstraktach pobranych w dniach trzecim (EX3'+T) ( $p \leq 0,01$ ) oraz szóstym (EX6'+T) ( $p \leq 0,05$ ) w porównaniu do TUN (wykres 51B).



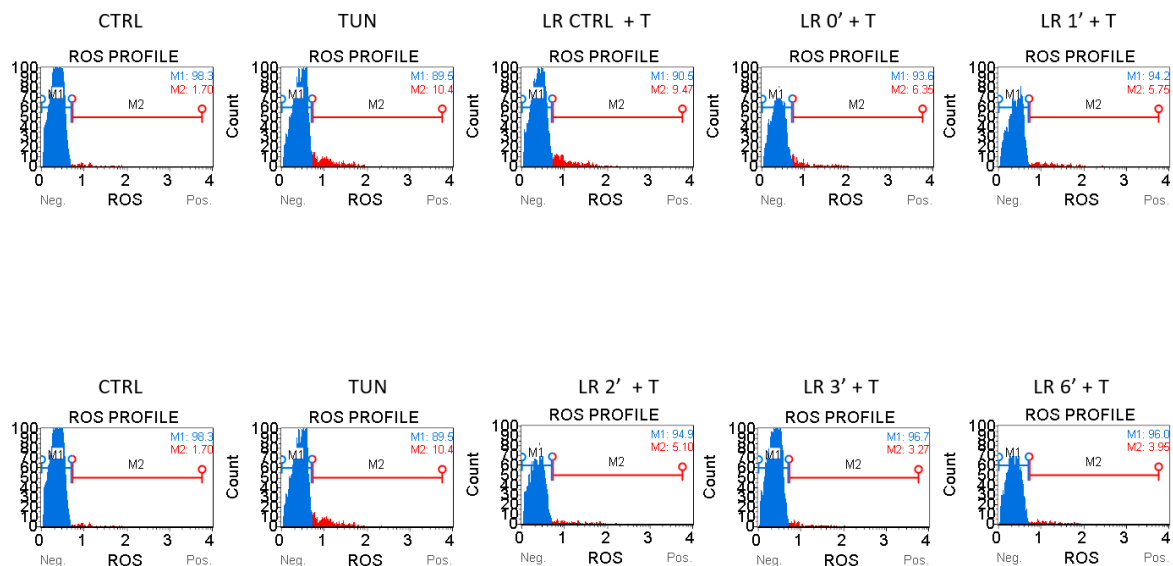
Wykres 51. Przedstawienie relatywnej ekspresji genów przeciwoksydacyjnych GPX dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja GPX dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłdków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłdków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/## dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .

Przeanalizowano także wytwarzanie ROS dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłdków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) za pomocą testu Muse Oxidative Stress. Komórki ASC traktowane tunikamycyną wykazywały znaczny wzrost poziomu komórek ROS<sup>+</sup> w porównaniu do komórek hodowanych w medium pełnym. Zaobserwowano ponadto znaczący spadek komórek ROS<sup>+</sup> w ekstraktach kontrolnych przed dodaniem szczepów (LR CTRL + T) i po dodaniu szczepów (LR0'+T) ( $p \leq 0,01$ ) oraz pobranych w dniach 1, 2, 3, 6 ( $p \leq 0,001$ ) porównaniu do tunikamycyny (wykres 52A). Z kolei wykazano spadek komórek ROS po zastosowaniu tuniakmycyny na komórki ASC, natomiast w ekstraktach wykazano istotne różnice w każdym ekstrakcie pobranym w poszczególnym dniu tj. kontrolnym (LR CTRL+T) ( $p \leq 0,01$ ) oraz w dniu pierwszym (LR0'+T), drugim (LR2'+T), trzecim (LR3'+T) oraz szóstym (LR6'+T) ( $p \leq 0,001$ ) (wykres 52B) (rycina 18).





Wykres 52. Średnie odsetki wszystkich komórek ROS+ (A) oraz ROS- (B) w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) oraz traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR). Dane statystycznie istotne dla # w przypadku porównania tunikamycyny (TUN) do medium pełnego (CTRL) oraz \* w przypadku porównywania grup doświadczalnych do tunikamycyny. \*/# dla  $p \leq 0,05$ , \*\*/### dla  $p \leq 0,01$ , \*\*\*/### dla  $p \leq 0,001$ .



Rycina 18. Wykresy punktowe dla wewnątrzkomórkowej produkcji ROS wykryte przez barwienie fluorescencyjne dihydroetydyną (DHE) dla ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR).

## 6. DYSKUSJA

### 6.1. Laktofementacja wysłodków buraczanych wpływa na poprawę parametrów chemicznych

Prawidłowy przebieg fermentacji zależy od wielu czynników, m. in. temperatury, czasu, substratu i dostępności składników odżywczych dla bakterii uczestniczących w tym procesie, a także od wartości pH (Xiang i in. 2019). Bakterie *Lactobacillus spp.* wytwarzają kwasy organiczne, głównie kwas mlekowy, który do obniża pH, dzięki czemu dochodzi do wykluczenia bakterii patogennych (Schnurer i in. 2005). Stopniowe i progresywne zmiany pH świadczą o dostosowaniu oraz aklimatyzacji szczepów bakterii w środowisku fermentowanym (Rault i in. 2009).

W niniejszej pracy wykazano równomierny spadek odczynu pH w grupach doświadczalnych ekstraktów z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) oraz *Pediococcus acidilactici* (PA) podczas 6- dniowej fermentacji, przy czym w grupie biomasy LR początkowa wartość wynosiła 4,62, a w kolejnych dniach wahała się pomiędzy pH 4,66 a 4,44. Ten stan może być związany z wysoką aktywnością bakterii LAB, a także wydzielaniem związków bioaktywnych do środowiska fermentowanego. Gwałtowne obniżenie pH poniżej 4,0 nastąpiło z kolei w dniach 5 oraz 6 fermentacji, odpowiednio 3,84 i 3,62. W przypadku biomasy z dodatkiem PA odnotowano równomierne obniżenie odczynu pH z każdym dniem postępującej fermentacji, rozpoczynając od pH wyjściowego równego 5,18 do 4,73 w dniu 3. Podobnie jak w przypadku fermentacji z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* można zaobserwować wyraźny spadek odczynu pH w dniach 5 oraz 6, odpowiednio 3,94 i 3,85. W biomacie z wysłodków buraczanych bez udziału mikroorganizmów probiotycznych odnotowano także liniowy spadek wartości pH, natomiast znacznie wolniejszy niż w przypadku biomas z udziałem szczepów bakterii probiotycznych. W grupie tej odczyn pH uległ obniżeniu do 4,02 w ostatnim dniu fermentacji, co sugeruje niższy poziom namnożenia bakterii kwasu mlekowego. Cao i in. (2011), przeprowadzali fermentacje kapusty czerwonej i pekińskiej oraz sałaty z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* i wysłodków buraczanych. W badaniach stwierdzili spadek wartości pH również po trzech dniach procesu fermentacji do pH około 4,0 i analogicznie jak w niniejszych badaniach najniższe wartości odnotowano do pH około 3,7 po 5 i 7 w dniu fermentacji bez wyraźnych zmian do dnia 30. Marzo i in. (2021) podczas 48 godzinnej fermentacji wysłodków buraczanych z dodatkiem szczepów *Lactobacillus plantarum* oraz *Lactobacillus casei* zaobserwowali spadek wartości pH z poziomu wyjściowego

6,0 do 4,89. W innej pracy Zheng i in. (2011) wykazali, że traktowanie wysłódków buraczanych szczepami *Lactobacillus spp.* istotnie obniżyło pH poniżej 4,5 po 14 dniach fermentacji, natomiast dopiero po 28 dniach odnotowano spadek pH poniżej 4,0 w przypadku *Lactobacillus plantarum* B38 (pH 3,91), *Lactobacillus plantarum* L11a1 (pH 3,81), *Lactobacillus plantarum* 8014 (pH 3,99) *Lactobacillus brevis* (pH 3,74) i *Lactobacillus fermentum* (pH 3,72). Stwierdzono także, że wartości pH poniżej 4,0 są niekorzystne dla przeżycia bakterii probiotycznych (Yilmaz-Ersan i in. 2014). Ponadto optymalne pH dla wzrostu bakterii *Lactobacillus rhamnosus* mieszczą się w zakresie od 6,0 – 4,5. Zgodnie z tym stwierdzeniem w przypadku odczynu pH najkorzystniejsze wyniki uzyskano w dniu trzecim trwania fermentacji, zarówno dla *Lactobacillus rhamnosus* jak i *Pediococcus acidilactici*.

Zapasnik i in. (2022) wykazali, że laktofermentacja ma korzystny wpływ na wartość odżywczą oraz strawność żywności. Kwaśne środowisko fermentacji wzmaga aktywność enzymów produkowanych przez określone bakterie, m.in. fitazy, amylazy, proteazy, lipazy, modyfikując wartość odżywczą surowca poprzez hydrolizę tłuszczów, białek i polisacharydów, zwiększając biodostępność składników pokarmowych, w tym witamin i minerałów (Melini i in. 2019; Sharma 2020; Chugh i Kamal-Eldin, 2020). W niniejszej pracy wykazano, wzrost zawartości suchej masy w materiałach po 6- dniowej fermentacji, zarówno w biomase kontrolnej bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych, a także w laktofermentowanej biomase z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* i *Pediococcus acidilactici*. Zjawisko to może być związane z obecnością melasy w wysłódkach buraczanych, która dostarcza dodatkowych substratów, promujących wytworzenie kwasu mlekowego, co z kolei wpływa na obniżenie wartości pH oraz zapobiega utracie suchej masy (Muck i in. 2018; Chen i in. 2017). W odniesieniu do składu chemicznego, proces fermentacji z dodatkiem szczepów bakterii wpłynął na zredukowanie większości składników odżywczych, co związane jest z odżywczymi potrzebami mikroorganizmów niezbędnymi do ich wzrostu i rozwoju, a także ich wymaganiami metabolicznymi (Dallal i in. 2017). W przypadku zawartości białka ogólnego niższy udział tego składnika pokarmowego w biomasach z dodatkiem szczepów probiotycznych w porównaniu do biomasy kontrolnej, można wynikać z faktu, że niektóre mikroorganizmy wykorzystują amoniak, który uwalniany jest w procesie katabolizmu aminokwasów do wzrostu komórek bakteryjnych, co jest zgodne z obserwacjami Amanullah i in. (2014). Ponadto wytwarzane przez bakterie LAB proteazy, rozkładają i uwalniają białka, zwiększając w ten sposób biodostępność wolnych aminokwasów i peptydów (Çabuk i in. 2018). Bakterie probiotyczne wpływają także na poprawę strawności białka oraz wartość

odżywczą surowców poprzez degradacji białek zapasowych do form rozpuszczalnych, dzięki czemu są lepiej przyswajalne w organizmie (Skalickova i in. 2022). Bartkiene i in (2019), wykazali, że zawartość białka ogólnego znacznie obniżyła się w trakcie fermentacji produktów ubocznych jęczmienia po 24, 48 oraz 72 godzinach odpowiednio o 29,4%, 26,8% i 21,2% w przeliczeniu na suchą masę. Podobne obserwacje odnotowali Chupeerach i in. (2021), którzy podczas fermentacji liści herbaty, uzyskali tendencje spadkową w przypadku zawartości białka. Udział włókna surowego jak i frakcji włókna (NDF, ADF) występowały z kolei w wyższych stężeniach w biomasach z dodatkiem szczepów bakterii probiotycznych (LR i PA) w porównaniu do biomasy bez dodatku mikroorganizmów probiotycznych (CTRL). Zjawisko to związane jest z faktem, że bakterie kwasu mlekowego podczas fermentacji wpływają na wzrost poziomu NDF, ADF, co jest zgodne z Wang i in. (2018). Ponadto w fermentowanych biomasach zawartość tłuszczu surowego uległa obniżeniu w grupie biomasy z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus*, gdyż niektóre bakterie LAB podczas fermentacji mogą przyczyniać się do powstawania wolnych kwasów tłuszczowych, które jednocześnie są prekursorami charakterystycznych związków zapachowych (Gardini i in. 2016). w przypadku związków bezazotowych wyciągowych (BAW) obserwuje się pomiędzy grupami wyższy udział BAW w przypadku wysłodków bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL) w porównaniu do wysłodków laktofermentowanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* i *Pediococcus acidilactici*. Wynika to z faktu, że BAW składa się głównie z wielocukrów zapasowych jak i dwucukrów oraz cukrów prostych, w związku, z czym mikroorganizmy kwasu mlekowego wykorzystały dostępne węglowodany, jako źródło węgla (Papagianni, 2007). Podobne tendencje w swoich pracach wykazali Vandenberghe i in. (2007) podczas fermentacji wycieków z manioku oraz liści oliwek (Altop i in. 2018).

Proces fermentacji wpływa także na produkcję metabolitów wtórnych, do których należą polifenole. Związki te naturalnie występują w żywności, szczególnie obecne są w owocach, warzywach, zbożach czy niektórych przyprawach (Sharma i in. 2020; Singla i in. 2019). Produkty bogate w polifenole są wysoko cenione ze względu na potencjał przeciwutleniający, który zwiększa homeostazę komórkową redoks, zarówno u ludzi jak i zwierząt (Basu i in. 2013; Hurst i in. 2020; Pandey i Rizvi, 2009), a także charakter przeciwwzapalny (Chiva-Blanch i Visioli, 2012). Syndrom metaboliczny charakteryzuje się brakiem równowagi oksydacyjnej i ogólnoustrojowym stanem zapalnym o niskim stopniu nasilenia (Fuentes i in. 2013; McCracken i in. 2018). W związku z tym zawarte w żywności polifenole mogą mieć korzystny wpływ na zapobieganie rozwojowi chorób metabolicznych (Upadhyay i Dixit, 2015), w tym

zwiększenie insulino-wrażliwości (Gothai i in. 2016), modulacji masy ciała (Yang i in. 2016) i homeostazy lipidowej (Murillo i in. 2017). Fermentacja żywności z udziałem szczepów bakterii probiotycznych powoduje biotransformację złożonych cząstek polifenoli do prostych i rozpuszczalnych związków, wpływając tym samym na wzrost biodostępności, a także wyższy poziom składników bioaktywnych w fermentowanym surowcu (Hole i in. 2012; Escrivá i in. 2021; Hwang i in. 2021). W niniejszych badaniach odnotowano, wzrost całkowitej zawartości polifenoli we wszystkich grupach doświadczalnych w czasie procesu fermentacji. W laktofermentowanej biomacie z dodatkiem szczepu probiotycznego *Lactobacillus rhamnosus* maksymalną zawartość polifenoli wykazano w dniu 5 (0,19 mg/100g), w biomacie z dodatkiem *Pediococcus acidilactici* oraz w biomacie bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych w dniu 6, odpowiednio 0,18 mg/100g i 0,15 mg/ 100g. Profil polifenoli jest zmienny w czasie fermentacji ze względu na metabolizm bakterii probiotycznych oraz wpływ enzymów endogennych mikroorganizmów. Obserwowane zmiany ilościowe polifenoli w laktofermentowanych biomasach z udziałem bakterii probiotycznych mogą być związane z degradacją wiązań glikozydowych materiału włóknistego, obecnego w wysłódkach buraczanych, zwiększając dostępność związków bioaktywnych (Jaiswal i Abu-Ghannam, 2013). Podobne wyniki uzyskali autorzy pracy, w której podczas fermentacji przecieru jabłkowego z udziałem szczepu *Lactobacillus rhamnosus*, zaobserwowali wzrost całkowitej zawartości polifenoli w porównaniu do przecieru jabłkowego niepoddanego fermentacji (kontrola), odpowiednio LR 64,2 mg/ 125g, kontrola 47,02 mg/ 125g (Tenore i in. 2019). Autorzy pracy, w której produktem fermentowanym były otręby ryżowe, wykazali, że po 48 godzinnej fermentacji z udziałem szczepu *Lactobacillus plantarum* dwukrotnie wzrosła zawartość polifenoli w porównaniu do otrąb niefermentowanych (Nisa i in. 2019).

Antyoksydanty to związki chemiczne odgrywające kluczową rolę w zapobieganiu i obniżaniu uszkodzeń oksydacyjnych wywołanych przez wolne rodniki (Aarti i in. 2017). Nieprawidłowe mechanizmy antyoksydacyjne mogą wpływać na wystąpienie stresu oksydacyjnego, który z kolei przyczynia się do wystąpienia wielu chorób, w tym także chorób metabolicznych. Wykazano, że niektóre metabolity wytwarzane przez szczepy LAB mogą ograniczać powstawanie wolnych rodników, redukując tym samym powstawanie ROS i przyczyniając się do wzrostu właściwości przeciwutleniających w fermentowanej żywności (Kononiuk i Karwowska, 2019; Saadoun i in. 2021). Aktywność antyoksydacyjną fermentowanej biomasy z wysłódków buraczanych przeprowadzono za pomocą trzech metod DPPH, ABTS i FRAP. W niniejszej pracy wykazano wysoką aktywność antyoksydacyjną,

zarówno w grupie kontrolnej jak i w grupach z dodatkiem mikroorganizmów probiotycznych w dniu rozpoczynającym fermentację (DPPH i ABTS). W grupie kontrolnej biomasy bez mikroorganizmów probiotycznych aktywność antyoksydacyjna określana wymienionymi metodami wzrastała z każdym dniem fermentacji. Z kolei analizując biomasy z dodatkiem LR i PA obserwuje się liniowy spadek stężenia związków przeciwutleniających w biomasach. Zjawisko początkowych wysokich wartości można wytłumaczyć obecnością w wysłodkach buraczanych melasy, która zawiera wysoki udział przeciwutleniaczy (Filipčev i in. 2010; Koprivica i in. 2009). Wraz z postępującą fermentacją mikroorganizmy zużywają melasę ze względu na obecność cukrów prostych do metabolizmu i wzrostu, w związku z czym aktywność antyoksydacyjna obniża się. Z kolei w metodzie FRAP odnotowano wzrost aktywności antyoksydacyjnej, zarówno w grupie *Lactobacillus rhamnosus* i *Pediococcus acidilactici* w porównaniu do grupy kontrolnej. Wyniki przedstawione w pracach innych autorów również wykazują podobne tendencje, podczas oceny właściwości przeciwutleniających fermentowanego napoju warzywno-owocowego, najlepsze parametry aktywności antyoksydacyjnej wystąpiły między 4 a 8 dniem fermentacji (Yang i in. 2018). Podobne wyniki otrzymano w pracy gdzie analizowano wpływ fermentacji soku z papai z użyciem szczepów *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus plantarum*, w tym przypadku zawartość ABTS znacząco spadła podczas 48 godzinnej fermentacji z udziałem *Lactobacillus acidophilus*, natomiast najwyższą wartość uzyskano po 36 godzinnej fermentacji, w przypadku DPPH z udziałem tego szczepu aktywność również miała tendencje spadkową po 48 godzinach. Z kolei fermentacja z *Lactobacillus plantarum* wykazała wzrost ABST oraz DPPH po 48h (Chen i in. 2018).

Proces fermentacji wpływa także na wzrost zawartości w surowcach krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (KKT), które wykazują działanie prozdrowotne dla organizmu. Związkom tym przypisuje się ich korzystny wpływ na wzrost integralności błony jelitowej (Silva i in. 2020), niwelowanie prozapalnych odpowiedzi immunologicznych (Parada Venegas i in. 2019), a także zmianę sygnalizacji szlaków w komórkach organizmu (Tan i in. 2014). Wykazano, że KKT mogą być także produkowane przez heterofermentatywne bakterie kwasu mlekowego, poprzez szlak fosfoketalozy pentozowej (Pessione i in. 2012). Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe spożywane z dietą przynoszą wiele korzyści zdrowotnych, w tym także w odniesieniu do chorób metabolicznych, poprzez przeciwdziałanie otyłości wywołanej dietą oraz działanie ochronne przed insulinoopornością poprzez uczestnictwo w metabolizmie glukozy (Byrne i in. 2015; Sahuri-Arisoylu i in. 2016; DeVadder

i in. 2014). Wykazano także, że KKT odgrywa kluczową rolę, w metabolizmie cholesterolu, glukozy, a także lipidów (Besten i in. 2013). Produkty otrzymane na bazie laktofermentacji z dodatkiem szczepów *Lactobacillus spp.* bogate są w kwas mlekowy, octowy oraz niewielkie ilości kwasu masłowego i propionowego (Hati i in. 2019).

W niniejszych badaniach, analizując udział poszczególnych kwasów organicznych w biomasach z wysłodów buraczanych bez dodatku mikroorganizmów probiotycznych oraz z udziałem szczepów *Lactobacillus rhamnosus* (LR) i *Pediococcus acidilactici* (PA) we wszystkich grupach doświadczalnych, wykazano najwyższą zawartość kwasu octowego, następnie mlekowego, masłowego i najniższe stężenie kwasu propionowego. Najwyższa zawartość kwasu octowego w biomasach z dodatkiem szczepów bakterii probiotycznych związana jest z heterofermentacyjnym charakterem bakterii LAB (Axelsson i in. 2004). Ponadto odnotowano, że wysokie stężenia kwasu octowego i mlekowego wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe dla grzybów i bakterii patogennych w czasie fermentacji (Mieszkin i in. 2017). Kwas mlekowy zaobserwowano pod koniec procesu fermentacji, co może być związane z dłuższym czasem degradacji włókna wysłodków oraz utrudnionym dostępem do cukrów prostych pochodzących z melasy w początkowych dniach fermentacji. Podczas oceny organoleptycznej biomasy zarówno z LR jak i PA odnotowano przyjemny zapach biomas.

Niemniej jednak autorzy jednej z prac wykazali, że fermentowany sok marchwiowy z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* cechują się zwiększonym udziałem KKT (kwas octowy 0,42 mg/ml, kwas propionowy 0,72 mg/ml, kwas masłowy 0,95 mg/ml) w porównaniu do soku bez udziału mikroorganizmów probiotycznych (kwas octowy 0,16 mg/ml, kwas propionowy 0,51, kwas masłowy 0,64 mg/ml). Ponadto w tej pracy autorzy za efekt zwiększonej produkcji KKT w fermentowany soku uznali fermentacje włókna pokarmowego obecnego w marchwi (Hu i in. 2019). W badaniach analizujących udział poszczególnych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w produkcie na bazie fermentowanego napoju ryżowego, z którego wyizolowano pięć szczepów bakterii *Lactobacillus* wykazano największą produkcję kwasu octowego, następnie mlekowego i niewielkie ilości kwasu masłowego (Hati i in. 2019). Podobne obserwacje odnotowano podczas 24 godzinnej fermentacji szczepem *Lactobacillus spp.*, w której nastąpił wzrost KKT, w tym octanu, propionianu i maślanu w mleku odtłuszczonym uzupełnionym dodatkowo inuliną, jako prebiotyku, co sugeruje synergiczne działanie szczepu i substratu (Asarat i in. 2015).

Proces fermentacji wpływa także na obniżenie cukrów prostych w matrycy żywnościowej. Mikroorganizmy probiotyczne, w zależności od szczepu mogą metabolizować różne rodzaje węglowodanów, dzięki enzymom: transporterzy ABC, hydrolazy glikozylowe, a także układy fosfotransferazy i fosfoenolopirogronianowy (Pokusaeva i in. 2011). Bakterie probiotyczne wykorzystują monosacharydy do wzrostu i rozwoju, przekształcając je do kwasów organicznych (Kelly i in. 2021; Wang i in. 2021). Ponadto w czasie fermentacji węglowodanów przez bakterie probiotyczne powstają egzopolisacharydy, które jak wykazano wpływają na właściwości organoleptyczne, a także mają charakter prebiotyczny (Baruah i in. 2022; Oerlemans i in. 2021).

Składniki diety, takie jak cukry mają kluczowy wpływ na regulację masy ciała oraz stężenia glukozy we krwi po posiłku. Przyjmuje się, że pasze dla koni z EMS powinny zawierać  $\leq 10\%$  węglowodanów niestrukturalnych (Durham i in. 2019).

Analizując zawartość sacharozy w badanych materiałach biomasy z wysłodków buraczanych zaobserwowano jej liniowy spadek wraz z postępującym procesem fermentacji we wszystkich grupach doświadczalnych. W grupie kontrolnej bez udziału bakterii probiotycznych od dnia trzeciego odnotowano całkowite obniżenie zawartości sacharozy, zjawisko to może być spowodowane namnożeniem i działalnością innych mikroorganizmów i grzybów podczas fermentacji, które szybko wykorzystują i metabolizują cukry do wzrostu. Natomiast w laktofermentowanej biomacie z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* i *Pediococcus acidilactici* obserwowano równomierną degradację sacharozy, co odzwierciedla także spadek wartości pH i obecność kwasu mlekowego pod koniec procesu fermentacji.

Wyniki uzyskane podczas profilowania węglowodanów w dniu rozpoczynającym proces fermentacji oraz w dniu ostatnim, wskazują na potencjalną rolę obu szczepów w ograniczeniu zawartości cukrów prostych, które mogą wpłynąć na fenotyp metaboliczny, w porównaniu do grupy bez udziału bakterii probiotycznych. Początkowo sacharoza stanowiła największą część węglowodanów w biomacie w poszczególnych grupach doświadczalnych. Związane jest to z udziałem melasy z buraków cukrowych, która zawarta była w surowcu wyjściowym. Melasa z buraków cukrowych zawiera na ogół około 50- 60% sacharozy (Palmonari i in. 2020) i jest często stosowana w procesach fermentacji w celu obniżenia pH, a co za tym idzie zakwaszenia materiału kiszonkarskiego poprzez dostarczenie cukrów redukujących dla wzrostu bakterii LAB (Liu i in. 2020). Obecna fruktoza oraz glukoza w przypadku PA powstała prawdopodobnie podczas metabolizowania sacharozy. Co ciekawe, już na początku fermentacji, a także na końcu obecna jest tagatoza. Tagatoza jest cukrem o niskiej kaloryczności, w smaku zbliżonym do sacharozy, przy czym zawiera około 30% kaloryczności



sacharozy (Kim i in. 2004). Cukier ten uznany jest także jako środek niskoglikemiczny ze względu na niską absorbancję i metabolizowanie w organizmie. Ponadto wykazano, że po spożyciu nie wpływa na wzrost glukozy we krwi, a także obniża masę ciała oraz niweluje objawy związane z cukrzycą typu II (Jørgensen i in. 2004). W grupie z udziałem *Pediococcus acidilactici* można zaobserwować także niewielki udział sorbitolu/ mannitolu. Cukry te należą do cukrów alkoholowych, zwane także poliolami charakteryzują się niską kalorycznością, niskim indeksem glikemicznym, ponadto wykazują właściwości prebiotyczne, podobnie do tagatozy. Alkohole cukrowe wpływają także korzystnie na stan zdrowia gospodarza, między innymi zapobiegają wystąpieniu cukrzycy oraz otyłości, mają właściwości antyoksydacyjne (Çakir, 2019). Wykazano także, że bakterie heterofermentujące bakterie LAB wytwarzały mannitol wykorzystując fruktozę jako akceptora elektronów, co jest zgodne z niniejszymi wynikami, ponieważ w ostatnim dniu fermentacji (dzień 6) fruktoza została całkowicie wykorzystana przez bakterie probiotyczne (Wisselink in. 2002). W ostatnim dniu fermentacji stwierdzono wysoki udział sacharozy jedynie w grupie bez dodatku mikroorganizmów LAB o 1%, natomiast w grupie z udziałem mikroorganizmów sacharoza została zużyta przez *Lactobacillus rhamnosus* o 87,4 % oraz *Pediococcus acidilactici* o 91,7%. Metabolizm fermentacyjny szczepów bakterii mlekowych powoduje, że są odpowiednie do produkcji alkoholu cukrowego, także w podczas fermentacji żywności (Monedero i in. 2010). Autorzy innej pracy podczas fermentacji wytlóków z brzoskwini bez udziału mikroorganizmów zaobserwowali niewielki spadek sacharozy z 24,58 mg/ ml w godzinie 0 do 24,54 mg/ ml w 60 godzinie fermentacji. Z kolei podczas fermentacji wytlóków z dodatkiem *Lactobacillus plantarum* Yang i in. (2022) odnotowali spadek z 24,53 mg/ ml w godzinie 0 do 23,37 mg/ ml po 60 godzinnej fermentacji. W tej pracy wykazano obecność fruktozy, glukozy i sorbitolu także w grupie bez udziału mikroorganizmów LAB. W przypadku fermentowanych wytlóków zawartość sorbitolu również wzrosła z poziomu 0,77 mg/ ml do 0,80 mg/ ml po 60 godzinach. Także zawartość fruktozy uległa obniżeniu w sfermentowanych wytlókach z 3,57 w godzinie 0 do 2,13 w ostatnim dniu fermentacji. Z kolei zawartość glukozy obniżyła się z 3,04 do 1,69 po 60 godzinach. Inni autorzy podczas fermentacji rokitnika nie wykazali istotnych różnic w zawartości fruktozy oraz sorbitolu podczas 72 godzinnej fermentacji przez *Lactobacillus plantarum*, ponadto odnotowali wyższy udział cukrów ogółem (Tkacz i in. 2020).

## **6.2. Efekt zastosowania laktofermentowanych wysłodków buraczanych na komórki progenitorowe pochodzące z tkanki tłuszczowej koni (ASC)**

Kluczowym objawem zespołu metabolicznego koni (EMS) jest otyłość, która w konsekwencji może prowadzić do insulinooporności. Tkanka tłuszczowa oprócz magazynowania energii jest narządem aktywnym, zarówno metabolicznie jak i hormonalnie, wpływając w ten sposób na funkcje innych narządów w organizmie. Ponadto tkanka tłuszczowa jest źródłem wydzielania cytokin i adipokin o charakterze pro- jak i przeciwzapalnym, a także może akumulować czynniki stresu oksydacyjnego, które odgrywają kluczową rolę w rozwoju EMS (Marycz i in. 2016; Suagee i in. 2012; Vick i in. 2007; Frank, 2010).

W niniejszych badaniach przebadano wpływ ekstraktów z laktofermentowanych wysłodków buraczanych na komórkach progenitorowych pozyskanych z tkanki tłuszczowej pochodzących od koni cierpiących na syndrom metaboliczny. w tym celu, dodatkowo zastosowana tunikamycyna, naturalnie występujący antybiotyk, wywołujący stres retikulum endoplazmatycznego (ER), który jest dodatnio skorelowany z apoptozą w adipocytach (Cnop i in. 2012; van der Kallen i in. 2009). Jak podają dane literaturowe stres ER wywołuje insulinooporność, a także prowadzi do uszkodzenia mitochondriów i indukcji stresu oksydacyjnego, konsekwencją czego jest wystąpienie stanu zapalnego (Okla i in. 2015; Alicka i Marycz 2018; Chaudhari i in. 2014). W związku z tym, że dieta odgrywa istotną rolę w zapobieganiu i/lub leczeniu syndromu metabolicznego u koni, postawiono hipotezę, że laktofermentowane wysłodki buraczane z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* będą wpływały na funkcje metaboliczne, w tym zapobiegały apoptozie komórek progenitorowych pochodzących z tkanki tłuszczowej koni.

Pierwszym etapem było określenie odpowiedniego stężenia dla laktofermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) oraz fermentowanych ekstraktów bez obecności mikroorganizmów probiotycznych (CTRL') wpływających na żywotność komórek ASC. Badania wykazały, że ASC pochodzące od koni z EMS cechują się niską żywotnością, a także są skorelowane ze stresem oksydacyjnym (Kornicka i in. 2019). W niniejszym badaniu określającym wpływ ekstraktów z dodatkiem LR, a także ekstraktu bez dodatku szczepu bakterii probiotycznych na komórki, nie wykazano efektu cytotoksycznego w stężeniu 500 ng/ mL oraz niższym.

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) posiadają unikalne cechy, w tym właściwości regeneracyjne, immunomodulujące i multipotencjalne, modulują proliferację komórkową i biorą udział w starzeniu komórkowym, dlatego stały się przedmiotem wielu badań w medycynie ludzkiej jak i weterynaryjnej (Kornicka i in. 2018).

Migracja komórek jest niezbędnym i ściśle regulowanym procesem prowadzącym do kształtowania tkanek, ich unaczynienia, a także gojenia ran. Regeneracja uszkodzeń jest uporządkowanym procesem odbudowy prawidłowej struktury tkanek (Grada i in. 2017). Pierpont i in. (2014) wykazali, że przewlekły stan zapalny towarzyszący otyłości związany jest z upośledzeniem metabolizmu glukozy, a także przyczynia się do zaburzenia gojenia ran. W niniejszej pracy traktowanie komórek ekstraktem z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* pobranym w dniu trzecim fermentacji (LR3'+T), wykazało wzrost tempa migracji komórek ASC na poziomie 80% po 24 godzinach inkubacji. Podobnie Han i in. (2019) w swoich badaniach użyli szczepu *Lactobacillus reuteri*, gdzie po 72 godzinach inkubacji komórek macierzystych dziąseł (GMSC), szczep ten doprowadził do zwiększonej zdolności migracyjnej, w porównaniu z grupą kontrolną, bez dodatku szczepu probiotycznego.

W bieżących badaniach wykazano także wysoką zdolność do tworzenia kolonii w teście CFU-F pod wpływem ekstraktu pobranego w dniu drugim (LR2'+T) trwania fermentacji na poziomie około 45% CFU-F, co dawało wynik najbardziej zbliżony do komórek hodowanych w medium pełnym, dla którego CFU-F wynosiło około 55%. Podobne obserwacje uzyskano także po zastosowaniu ekstraktu pobranego w dniu trzecim (LR3'+T) (około 42% CFU-F). W teście czasu podwojenia populacji komórek (PDT) wykazano, że komórki ASC traktowane ekstraktem LR pobranym w dniu trzecim (LR3'+T) potrzebowały około 30 godzin na podwojenie populacji, co daje wynik zbliżony do komórek hodowanych w medium pełnym (PDT = 20 godzin).

Komórki macierzyste charakteryzują się wysokim potencjałem proliferacyjnym oraz zdolnością do różnicowania się (Salem i in. 2010). Frazier i in. (2013) wykazali, że komórki ASC pobrane od otyłych osobników miały niższy potencjał proliferacyjny *in vitro*. Ponadto stwierdzono, że ASC pobrane od koni z EMS cechują się niższą aktywnością proliferacyjną, a także obniżoną ekspresją markera Ki-67 (Marycz i in. 2016). Białko wewnątrzjądrowe Ki-67 jest powszechnie znanym markerem proliferacji, ponieważ jest aktywny we wszystkich fazach cyklu komórkowego G1, S, G2, M, oprócz fazy spoczynkowej (G0) (Scholzen i in. 2000). W celu sprawdzenia wpływu laktofermentowanych wysłodków buraczanych z dodatkiem

*Lactobacillus rhamnosus* na ekspresję markera Ki-67 przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne. Uzyskane dane wskazują, że ekstrakty z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* wpływają na wzmożoną ekspresję markera proliferacji, co skutkowało pojawieniem się sygnału czerwonego świadczącego o obecności białka Ki-67 w komórkach (Alicka i in. 2020).

MikroRNA to stosunkowo nowe biomarkery, które służą do wykrywania wielu chorób. Deregulacje miRNA opisano w cukrzycy typu II, syndromie metabolicznym, czy niealkoholowym stłuszczeniu wątroby (Bracken i in. 2016). Sugeruje się, że otyłość skutkuje rozregulowaniem ekspresji miR w tkance tłuszczowej, co z kolei dotyczy zmian w ekspresji genów związanych z opornością na insulinę (Ibarra i in. 2021). Zastosowanie ekstraktów z laktofermentowanych wyśłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* zredukowało ekspresję miR-101 oraz miR-17 w komórkach ASC, co związane jest z wyższym tempem proliferacji. Natomiast odwrotny efekt zaobserwowano w ekstraktach bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych, gdzie ekspresja zarówno miR-101 jak i miR-17 była istotnie wyższa w porównaniu do tunikamycyny. Wyższe ekspresje miR-101 oraz miR-17 prowadzą do zwiększenia apoptozy oraz starzenie się różnych typów komórek w tym także mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC). Badania wskazują także, że miR-101 jest podwyższony w surowicy u osób cierpiących na cukrzycę typu II (T2D), a także w białej tkance tłuszczowej (WAT) najądrza u myszy karmionych dietą wysokotłuszczową (Higuchi i in. 2015).

Apoptoza, czyli zaprogramowana śmierć komórki odgrywa istotną rolę w zachowaniu homeostazy komórek i tkanek (Elmore 2007; Fuchs i Steller, 2011). W regulacji apoptozy uczestniczą białka należące do rodziny BCL2 (ang. B cell lymphoma 2). Białka te pomimo podobnej struktury, pełnią odmienne funkcje, gdyż wpływają na hamowanie sygnałów apoptotycznych (białko BCL2) bądź działają proapoptotycznie inicjując śmierć komórki za pomocą innych białek biorących udział w apoptozie (m.in. BAD, BAX, BAK). Proapoptotyczne białka zawierające pojedynczą domenę BH3, do których należy m.in. BAD, wykrywa i przekazuje sygnały apoptotyczne i aktywują białka BAX i BAK. Z kolei te wielodomenowe proapoptotyczne białka BAX i BAK, wywołują destabilizację zewnętrznej błony mitochondrialnej i w konsekwencji uwalniają czynniki apoptogenne tj. cytochrom c z mitochondriów do cytozolu (Letai, 2008; Kelly i in. 2011). Następnie cytotoksyczne szlaki sygnałowe powodują aktywację czynnika apoptotycznego aktywującego proteazę-1 (Apaf-1) kaspaz efektorowych, czego konsekwencją jest śmierć komórek (Alkhoury i in. 2010). Inną

ścieżką aktywacji apoptozy jest uruchomienie genu p53. Czynnikiem transkrypcyjnym o własnościach supresora nowotworowego (p53) bierze udział w wewnątrzkomórkowej ścieżce apoptozy w odpowiedzi na uszkodzenie DNA. Kluczowym czynnikiem wpływającym na uszkodzenie DNA w otyłości jest stres oksydacyjny, a także stan zapalny o niskim stopniu nasilenia (Setayesh i in. 2018; Cerda i in. 2014; Włodarczyk i in. 2018; Zaki i in. 2018). Gen p53 prowadzi do zahamowania antyapoptotycznych białek BCL2, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji białek proapoptotycznych (Perez-Galan i in. 2006).

Dane literaturowe wskazują, że ekspresja proapoptotycznych genów jest podwyższona u koni z EMS (Marycz i in. 2016). Podczas rozwoju otyłości ekspansja tkanki tłuszczowej wpływa na aktywację sygnalizacji apoptotycznej, w tym szlaków mitochondrialnych i jądrowych. W niniejszych badaniach wykazano, że ekstrakty z laktofermentowanych wysłodków buraczanych obniżają ekspresję genów proapoptotycznych tj. p53 i p21, BAX i BAD, co jest skorelowane z obserwacją obniżenia ekspresji kaspazy 3 i kaspazy 9. Ponadto nie zaobserwowano aktywnego białka kaspazy 3 w barwieniu immunofluorescencyjnym w ekstrakcie pobranym w dniu trzecim (LR3'+T) fermentacji. Stwierdzono również, że ekstrakty z dodatkiem LR nie wpływają na wzrost ekspresji BCL2 w komórkach ASC w porównaniu do traktowania komórek tunikamycyną, co jest analogiczne do wyników Mularczyk i in. (2021). Potwierdzeniem uzyskanych wyników było sprawdzenie czy dochodzi do uwolnienia cytochromu c, w związku z inicjacją szlaku apoptotycznego mitochondrialnego (BAD, BAX) (Marycz i in. 2016). Podczas barwienia immunofluorescencyjnego cytochromu c, zaobserwowano redukcję czerwonego sygnału, po zastosowaniu ekstraktu pobranego w dniu szóstym (LR6'+T). Zbliżone wyniki uzyskali Sharma i in. (2011), którzy oceniali wpływ probiotyków *Lactobacillus acidophilus* i *Enterococcus lactis* w hepatocytach. Autorzy Ci obserwowali obniżenie ekspresji białka proapoptotycznego BAX po zastosowaniu probiotyków, a uwalnianiu cytochromu c do cytozolu w porównaniu do grupy kontrolnej (traktowanie komórek acetaminofenem). Podobnie traktowanie komórek wątroby przy NAFLD *Lactobacillus rhamnosus* LV108 obniżyło ekspresję cytochromu, co świadczyło o zahamowaniu apoptozy (Qu i in. 2018). Traktowanie mysich komórek wątrobowych probiotykiem *Enterococcus lactis* wpłynęło na zmniejszenie aktywacji kaspaz 3 oraz kaspazy 9, BAX oraz cytochromu c (Sharma i in. 2012).

W przeprowadzonym teście wykrywania apoptozy za pomocą testu Aneksyny V, odnotowano wyraźny wzrost procentu żywych komórek po zastosowaniu ekstraktów z dodatkiem szczepu probiotycznego z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* w porównaniu do

komórek traktowanych TUN. Jednocześnie zaobserwowano obniżenie procentu martwych komórek po wprowadzeniu ekstraktu z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus*, co jest zgodne z Mularczyk i in. (2021).

Zaburzenie potencjału mitochondrialnego jest istotnym czynnikiem w stresie oksydacyjnym i nadprodukcji reaktywnych form tlenu, a co za tym idzie aktywacji szlaków proapoptotycznych w komórkach u koni cierpiących na EMS. Ekstrakt z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* wpłynął na spadek całkowitej liczby żywych i martwych komórek wykazujących zdepolaryzowany potencjał błony mitochondrialnej w ASC. Mularczyk i in. (2021) wykazała podobny efekt po zastopowaniu emulsji bogatej w probiotyki na komórki HepG2 pochodzące od koni. Przyjmuje się, że stres oksydacyjny związany jest z wieloma zaburzeniami organizmu m.in. otyłością, syndromem metabolicznym, insulinoopornością i stanami zapalnymi (Morgan i in. 2015). Tkanka tłuszczowa jest dodatnio skorelowana z ryzykiem wstąpienia EMS, w związku z tym ten endokrynnny narząd jest źródłem reaktywnych form tlenu, które przy wysokich stężeniach mogą mieć negatywne skutki na białka, lipidy i DNA. Wykazano także, wzrost reaktywnych form tlenu (ROS) w tkance tłuszczowej otyłych myszy, co jest skorelowane ze zmniejszoną ekspresją enzymów antyoksydacyjnych (Furukawa i in. 2004). Do kluczowych enzymów antyoksydacyjnych w komórce należy dysmutaza ponadtlenkowa 1 (SOD1 lub Cu/ZnSOD), która obecna jest w cytozolu komórki i odpowiada za 70 – 80% całkowitej aktywności komórkowej SOD (Lewandowski i in. 2018; Perry i in. 2010). Drugim znanym enzymem antyoksydacyjnym jest dysmutaza ponadtlenkowa mitochondrialna (SOD2 lub MnSOD), który odpowiada za neutralizację anionu ponadtlenkowego, zapobiegając aktywacji białek rozprzęgających (UCPs). Białka te z kolei są odpowiedzialne za wydzielanie insuliny, w związku z czym utrzymanie SOD2 na odpowiednim poziomie ma istotne znaczenie w kontekście otyłości (Echtay i in. 2002; Echtay i in. 2002; Krauss i in. 2003). Wykazano także, że ROS jest zwiększone w tkance tłuszczowej otyłych myszy co związane jest ze zmniejszoną ekspresją enzymów antyoksydacyjnych np. SOD. Ponadto nadmierna akumulacja reaktywnych form tlenu (ROS) przyczynia się do zakłócenia szlaku sygnałowego insuliny prowadząc do insulinooporności (IR) (Marycz i in. 2018). W niniejszych badaniach zastosowanie ekstraktów z dodatkiem LR wpłynęło na zmniejszenie reaktywnych form tlenu (ROS) w porównaniu do traktowania komórek tunikamycyną oraz poprawę ekspresji SOD2, który odpowiedzialny jest za ochronę komórek przed apoptozą mitochondrialną.

Jedną ze składowych elementów syndromu metabolicznego jest otyłość, w której obserwuje się podwyższoną ekspresję markerów prozapalnych, co w konsekwencji prowadzi do wystąpienia stanu zapalnego o niskim stopniu nasilenia (Stępień i in. 2014). Tkanka tłuszczowa, oprócz magazynowania energii jest także aktywnym narządem metabolicznym i wydziela zarówno cytokiny przeciwzapalne tj. IL-4, IL-10, IL-13, a także cytokiny prozapalne, w tym IL1 $\beta$ , IL6 oraz TNF $\alpha$  (Kershaw i Flier, 2004; Rasouli i Kern, 2008). Wykazano, że nadmierne wydzielanie cytokin prozapalnych tj. TNF $\alpha$ , IL-6 i IL1 $\beta$  prowadzi do ogólnoustrojowego i miejscowego stanu zapalnego u koni z syndromem metabolicznym. W niniejszym badaniu odnotowano, że ekstrakt z laktofermentowanych wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* pobrany w dniach drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR3'+T), wpłynął na obniżenie cytokin prozapalnych tj. interleukiny 1 $\beta$ , czynnika martwicy nowotworu-  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) oraz interleukiny 6. Z kolei nie zaobserwowano obniżenia ekspresji w przypadku cytokin przeciwzapalnych tj. interleukiny (IL)-10 i interleukiny (IL)-4 oraz transformującego czynnika wzrostu (TGF $\beta$ ). Natomiast wykazano wzrost ekspresji przeciwzapalnej interleukiny (IL)-13 w ekstraktach pobranych w dniu pierwszym (LR1'+T) oraz drugim (LR2'+T). IL-13 jest obecna w tkance tłuszczowej i chroni przed rozwojem insulinooporności. Podobne wnioski zaobserwowali badacze, którzy wykazali obniżenie cytokin prozapalnych IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  i IL-6 w surowicy otyłych myszy po suplementacji *Lactobacillus fermentum*, a także podwyższenie cytokin przeciwzapalnych tj. IL-4 oraz IL-10 (Wu i in. 2021). Autorzy innej pracy wykazali, że suplementacja przez 10 tygodni *Lactobacillus paracrrasei* również obniżyła ekspresję markerów zapalnych (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-6) w tkance tłuszczowej u myszy otyłych oraz zwiększyła ekspresje genów przeciwzapalnych interleukiny (IL)-10 (Ji i in. 2022). Produkowane w stanach zapalnych tkanki tłuszczowej cytokiny prozapalne takie jak IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 prowadzą do zaburzeń usuwania glukozy z organizmu, a tym samym zwiększają prawdopodobieństwo rozwoju insulinooporności (Suagee i in. 2012). W badaniach *in vitro* wykazano, że TNF $\alpha$  wpływa znacząco na obniżenie ekspresji białka GLUT4, a także substratu receptora insuliny IR. Podobnie IL- 1 $\beta$  obniża wychwyt glukozy stymulowany insuliną w komórkach tłuszczowych (adipocytach), poprzez zmniejszenie poziomu transportera glukozy typu IV (GLUT4), a także ilość białka IRS-1. W badaniu na mysim modelu karmionych dietą wysokotłuszczową po podaniu preparatu z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* JL1 stwierdzono także obniżoną ekspresję genów prozapalnych tj. IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  i IL6. W związku z tym wykazano, że probiotyk ten może korzystnie wpływać na poprawę zaburzeń metabolizmu lipidów oraz obniżyć stan zapalny wywołany nagromadzeniem tłuszczu (Yang i in. 2021). W badaniach na myszach

z cukrzycą odnotowano obniżenie poziomu IL1 $\beta$  i TNF $\alpha$  w przypadku podawania metforminy w połączeniu z fermentowaną pastą warzywną (Zulkawi i in. 2018). Następnie również u myszy żywionych dietą wysokotłuszczową synergiczne działanie  $\beta$ -glukanów pochodzących z jęczmienia, a także *Lactobacillus plantarum* S58 znacząco obniżyło poziom cytokin zapalnych ( $p \leq 0,05$ ) w porównaniu do kontroli (Tang i in. 2020). W przypadku myszy u których początkowo wywołano otyłość dietą wysokotłuszczową, następnie zostały karmione dietą na bazie skórki cytryny poddanej 24h fermentacji z udziałem *Leuconostoc mesenteroides* wykazano znacznie podwyższoną ekspresję cytokin przeciwzapalnych w surowicy w tym IL10, IL 4 w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast znacznie zmniejszył się udział IL6, TNF $\alpha$  i IL1 $\beta$  (Pan i in. 2022). Podobnie myszy suplementowane dodatkiem *Lactobacillus fermentum* wykazywały zwiększenie udział cytokin przeciwzapalnych IL- 10 i IL- 4, co świadczy o hamującym niskiego stopnia związanego z otyłością (Wu i in. 2021).

Nadwaga wpływa na przyspieszenie starzenia tkanki tłuszczowej, co jest ściśle powiązane z występowaniem stresu oksydacyjnego i zapaleniem (Santos i Sinha, 2021; Ou i in. 2022). Proces starzenia komórkowego wpływa na zmiany na poziomie molekularnym, komórkowym oraz organizmu (Tollefsbol, 2007). Zmiany takie jak stres oksydacyjny, uszkodzenie DNA oraz skrócenie telomerów może prowadzić do starzenia, gdzie komórki przechodzą szereg zmian metabolicznych i morfologicznych i w konsekwencji przestają się dzielić (Ben-Porath i Weinberg, 2005). Ponadto starzenie się komórek związane jest z zatrzymaniem proliferacji, powiększeniem jądra komórkowego i nabyciem prozapalnego fenotypu wydzielniczego (Gorgoulis i in. 2019). Jednym z dobrze przebadanych markerów starzenia jest SA-  $\beta$ - galaktozydaza (SA- $\beta$ -gal) (Huang i Rivera-Pérez, 2014). W niniejszych badaniach wykazano zmniejszony procent komórek SA- $\beta$ -gal<sup>+</sup> po traktowaniu komórek ASC ekstraktami z wysłodków buraczanych z udziałem LR, z tym, że najlepszy wynik (spadek poniżej 40%) uzyskano w ekstrakcie pobranym w dniu trzecim (LR3'+T). Podobne wyniki uzyskali Kumar i in. (2020), którzy oceniali wpływ *Lactobacillus fermentum* na starzenie się preadipocytów.

Nadmierne nagromadzenie tkanki tłuszczowej, a także związana z tym faktem otyłość może przyczynić się do rozwoju insulinooporności zarówno u ludzi jak i koni. Tkanka tłuszczowa jest jednym z najbardziej wrażliwych na insulinę organów, zaraz obok wątroby i tkanki mięśniowej (Longo i in. 2019). Mechanizm wiązania insuliny na powierzchni komórek rozpoczyna się od kaskady zdarzeń, w której główną rolę odgrywa receptor insuliny (INSR), należący do klasy receptorów kinazy tyrozynowej (Ward i Lawrence, 2009). Po aktywacji



INSR dochodzi do rekrutacji białek zwanych receptorami substratu insuliny (IRS), w następstwie czego poprzez MPK/ PI3K regulują dalszą odpowiedź komórki na insulinę (Gutiérrez-Rodelo i in. 2017). W niniejszych badaniach traktowanie komórek ASC ekstraktami z wysłodków buraczanych nie wpłynęło na wzrost ekspresji genu receptora insuliny (INRS), substratu receptora insuliny (IRS), w porównaniu do traktowanych komórek tunikamycyną. Autorzy innych prac wykazali, że *Lactobacillus plantarum* stymulował wychwyt glukozy w mysich adipocytach 3T3- L1, a także regulował ekspresje mRNA IRS związanych z metabolizmem glukozy (Lee i in. 2018). Ponadto suplementacja *Lactobacillus casei* u myszy wpłynęła na aktywację szlaku PI3K/AKT poprzez zwiększenie ekspresji mRNA IRS, AKT i PI3K w wątrobie u myszy z cukrzycą typu II. W niniejszych badaniach wykazano także obniżoną ekspresję transportera glukozy typu 4 (GLUT4), który pośredniczy w stymulowanym przez insulinę wychwycie glukozy zarówno w adipocytach jak i tkance tłuszczowej. Wysokie poziomy ekspresji GLUT4 korelują ze zwiększoną wrażliwością na insulinę. Autorzy innych prac odnotowali zwiększone poziomy GLUT4 w tkance tłuszczowej myszy po suplementacji *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus crispatus* oraz *Bacillus subtilis* (Memarrast i in. 2017). Podobnie zaobserwowano podwyższoną ekspresję dla receptora glukozy GLUT4 w komórkach tłuszczowych myszy po zastosowaniu *Lactobacillus casei*. Natomiast odwrotne korelacje zaobserwował Jangra i in. (2019), gdzie *Lactobacillus casei* podawany wraz z dietą wysokotłuszczową myszą, nie różnił się istotnie od grupy otrzymującej wyłącznie dietę wysokotłuszczową.

Wykazano, że niektóre MikroRNA tj. miR- 103 oraz miR- 107 są zaangażowane w metabolizm energetyczny organizmu, w tym w regulację sygnalizacji insuliny i homeostazę glukozy (Wilfred i in. 2007; Rottiers i Naar, 2012). W niniejszej pracy wykazano obniżoną ekspresję wymienionych MikroRNA, szczególnie w ekstraktach z wysłodków buraczanych pobranych w dniach pierwszym (LR1'+T), drugim (LR2'+T) oraz trzecim (LR3'+T). Uzyskane wyniki są zgodne z Trajkovski i in. (2011), który w badaniach na otyłych myszach powiązał obniżoną ekspresję miR- 103 i miR – 107 ze zwiększonym stymulowanym insuliną wychwytem glukozy, zmniejszeniem wielkości komórek tłuszczowych, a także stabilizacją receptora insulinowego.

## 7. PODSUMOWANIE

Wysłodki buraczane poddane procesowi laktofermentacji z dodatkiem szczepów bakterii probiotycznych *Lactobacillus rhamnosus* i *Pediococcus acidilactici* wykazują lepsze właściwości fizyko-chemiczne w porównaniu do wysłodków fermentowanych bez dodatku mikroorganizmów probiotycznych.

Szczepy probiotyczne *Lactobacillus rhamnosus* i *Pediococcus acidilactici* wpłynęły na poprawę składu chemicznego biomasy, wykazując wyższy udział polifenoli ogółem, potencjałem antyoksydacyjnym, a także profilem kwasów tłuszczowych wraz z obniżeniem cukrów prostych, w tym sacharozy.

Najkorzystniejsze wyniki otrzymano podczas laktofermentacji biomasy z udziałem *Lactobacillus rhamnosus*, w związku z czym biomasa z dodatkiem tego szczepu probiotycznego wykorzystana została do badań molekularnych i cytobiologicznych.

Traktowanie komórek ASC pochodzących od koni ekstraktem z laktofermentowanych wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* wpłynęło na poprawę żywotności, potencjału klonogenego, migracji i proliferacji komórek.

Zastosowanie laktofermentowanych ekstraktów w obecności szczepu *Lactobacillus rhamnosus* wykazywało działanie anty-apoptotyczne i antyoksydacyjne poprzez modulację metabolizmu i dynamiki mitochondriów.

Ekstrakt z wysłodków buraczanych z dodatkiem szczepu *Lactobacillus rhamnosus* wykazywał działanie przeciwzapalne oraz wpływał pozytywnie na modulację mikroRNA związanych z zapaleniem.

Laktofermentacja wysłodków buraczanych ze szczepem probiotycznym *Lactobacillus rhamnosus* nie wpłynęła na ekspresję genów związanych z insulinoopornością. Zaobserwowano natomiast korzystny wpływ ekstraktów na obniżenie ekspresji mikroRNA powiązanych z regulacją homeostazą glukozy w organizmie.

## 8. PIŚMIENICTWO

1. Aarti C., Khusro A., Varghese R., Arasu M.V., Agastian P., Al-Dhabi N.A., Ilavenil S., Choi K.C. 2017. In vitro studies on probiotic and antioxidant properties of *Lactobacillus brevis* strain LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of Nor-East India LWT. Food Science and Technology, 86, 438-446.
2. Abu-Salem F.M., Mohamed R., Gibriel A., Rasmy N.M.H. 2014. Levels of Some Antinutritional Factors in Tempeh Produced From Some Legumes and Jojobas Seeds. International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, 8, 296–301.
3. Akpi U. K., Nnamchi C. I., Ugwuanyi J. O. 2019. Development of starter culture for the production of African condiments and seasoning agents. Advances in Microbiology, 10, 12, 599–622. doi: 10.4236/aim.2020.1012044.
4. Alicka M., Kornicka-Garbowska K., Kucharczyk K., Kępska M., Röcken M., Marycz K. 2020. Age-dependent impairment of adipose-derived stem cells isolated from horses. Stem Cell Research & Therapy, 11 (1), 1–20.
5. Alicka M., Marycz K. 2018. The effect of chronic inflammation and oxidative and endoplasmic reticulum stress in the course of metabolic syndrome and its therapy. Stem Cells International, 4274361. doi: 10.1155/2018/4274361.
6. Alkhouri N., Gornicka A., Berk M.P., Thapaliya S., Dixon L.J., Kashyap S., Schauer P.R., Feldstein A.E. 2010. Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. Journal of Biological Chemistry, 285, 3428–3438.
7. Altop A., Coskun I., Filik G., Kucukgul A., Bekiroglu Y.G., Çayan H., Gungor E., Sahin A., Erener G. 2018. Amino acid, mineral, condensed tannin, and other chemical contents of olive leaves (*Olea europaea* L.) processed via solid-state fermentation using selected *Aspergillus niger* strains. Ciencia e Investigacion Agraria, 45, 220–230.
8. AlZaim I., Hammoud S.H., Al-Koussa H., Ghazi A., Eid A.H., El-Yazbi A.F. 2020. Adipose Tissue Immunomodulation: a Novel Therapeutic Approach in Cardiovascular and Metabolic Diseases. Frontiers in Cardiovascular Medicine, 7, 602088.
9. Amanullah S.M., Kim D.H., Lee H.J., Joo Y.H., Kim S.B., Kim S.C. 2014. Effects of microbial additives on chemical composition and fermentation characteristics of barley silage. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 27, 511–517.
10. Asarat M., Apostolopoulos V., Vasiljevic T., Donkor O. 2015. Short-chain fatty acids produced by synbiotic mixtures in skim milk differentially regulate proliferation and

cytokine production in peripheral blood mononuclear cells. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66 (7), 755–765.

11. Axelsson L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Wright AV, Ouwehand a (eds) *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, 3rd Edition. Marcel Dekker, New York, 1–67.
12. Bartkiene E., Mozuriene E., Lele V., Zokaityte E., Gruzauskas R., Jakobsone I., Juodeikiene G., Ruibys R., Bartkevics V. 2019. Changes of bioactive compounds in barley industry by-products during submerged and solid state fermentation with antimicrobial *Pediococcus acidilactici* strain LUHS29. *Food Science & Nutrition*, 8, 340-350, 10.1002/fsn3.131.
13. Baruah R., Rajshee K., Halami P. M. 2022. Exopolysaccharide producing microorganisms for functional food industry. In A. K. Rai, S. P. Singh, A. Pandey, C. Larroche, & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 15, 337–354.
14. Basinska K., Marycz K., Śmieszek A., Nicpoń J. 2015. The production and distribution of IL-6 and TNF- $\alpha$  in subcutaneous adipose tissue and their correlation with serum concentrations in Welsh ponies with equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Science*, 16 (1), 113–120. doi: 10.4142/jvs.2015.16.1.113.
15. Basu A., Betts N. M., Mulugeta A., Tong C., Newman E., Lyons T. J. 2013. Green tea supplementation increases glutathione and plasma antioxidant capacity in adults with the metabolic syndrome. *Nutrition Research*, 33(3), 180–187.
16. Ben-Porath I., Weinberg RA. 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biolog*, 37, 961–976.
17. Benzie I.F.F., Strain J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
18. Berg E.L., Fu C.J., Porter J.H., Kerley M.S. 2005. Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horse: effects on fecal pH, microbial content, and volatile fatty acid concentrations. *Journal of Animal Science*, 83, 1549–1553.
19. Besten GD., Eunen KV., Groen AK., Venema K., Reijngoud D-J., Bakker BM. 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54, 2325–2340.

20. Biddle A.S., Black S.J., Blanchard J.L. 2013. An in vitro model of the horse gut microbiome enables identification of lactate-utilizing bacteria that differentially respond to starch induction. *PLoS ONE*, 8.
21. Blaue D., Schedlbauer C., Starzonek J., Gittel C., Brehm W., Einspanier A., Vervuert I. 2019. Effects of body weight gain on insulin and lipid metabolism in equines. *Domestic Animal Endocrinology*, 68, 111–118.
22. Boucher J., Kleinridders A., Kahn C.R. 2014. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6 (1).
23. Bove P., Russo P., Capozzi V., Gallone A., Spano G., Fiocco D. 2013. *Lactobacillus plantarum* passage through an oro-gastro-intestinal tract simulator: Carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and probiosis. *Microbiological Research*, 168, 351–359.
24. Bracken C.P., Scott H.S., Goodall G.J. 2016. a network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Stem Cell Research & Therapy*, 17, 719–732. doi: 10.1038/nrg.2016.134.
25. Byrne CS., Chambers ES., Morrison DJ., Frost G. 2015. The role of short chain fatty acids in appetite regulation and energy homeostasis. *International Journal of Obesity*, 39(9), 1331–8.
26. Cabello-Olmo M., Oneca M., Pajares M.J., Jiménez M., Ayo, J., Encío I.J., Barajas, M., Araña M. 2022. Antidiabetic Effects of *Pediococcus acidilactici* pA1c on HFD-Induced Mice. *Nutrients*, 14, 692.
27. Çakir E. 2019. PRODUCTION OF SUGAR ALCOHOLS WITH BIOTECHNOLOGICAL METHODS. *International Journal of Food Engineering Research*, Volume 5 (2), 47 – 58.
28. Cantley L.C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296, 1655-1657.
29. Cao Y., Cai Y., Takahashi T., Yoshida N., Tohno M., Uegaki R., Nonaka K., Terada F. 2011. Effect of lactic acid bacteria inoculant and beet pulp addition on fermentation characteristics and in vitro ruminal digestion of vegetable residue silage. *Journal of Dairy Science*, 94, 3902-3912.
30. Capurso A., Capurso C. 2020. The Mediterranean way: why elderly people should eat wholewheat sourdough bread-a little known component of the Mediterranean diet and healthy food for elderly adults. *Aging Clinical and Experimental Research*, 32, 1–5.

31. Carter R.A., Geor R.J., Staniar W.B., Cubitt T.A., Harris P.A. 2009. Apparent adiposity assessed by standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *The Veterinary Journal*, 179, 204-210.
32. Cerda C., Sanchez C., Climent B., Vazquez A., Iradi A., El Amrani F., Bediaga A., Saez G.T. 2014. Oxidative stress and DNA damage in obesity-related tumorigenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 824, 5–17
33. Chadt A., Al-Hasani H. 2020. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflügers Archiv*. 472, 1273–1298.
34. Chaudhari N., Talwar P., Parimisetty A., Lefebvre d’Hellencourt C., Ravanan P. 2014. a molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 213.
35. Çabuk B., Nosworthy M.G., Stone A.K., Korber D.R., Tanaka T., House J.D. Nickerson M.T. 2018. Effect of Fermentation on the Protein Digestibility and Levels of Non-Nutritive Compounds of Pea Protein Concentrate. *Food Technology and Biotechnology*, 56, 257–264.
36. Chen W., Chen R., Chen W., Chen H., Zhang G. 2018. Comparative evaluation of the antioxidant capacities, organic acids, and volatiles of papaya juices fermented by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Food Quality*, 1–12.
37. Chen X., Li W., Gao C., Zhang X., Weng B., Cai Y. M. 2017. Silage preparation and fermentation quality of kudzu, sugarcane top and their mixture treated with lactic acid bacteria, molasses and cellulase. *Animal Science Journal*, 88, 1715–1721. doi: 10.1111/asj.12840.
38. Chilton SN., Burton JP., Reid G. 2015. Inclusion of fermented foods in food guides around the world. *Nutrients* 7, 390–404.
39. Chugh B., Kamal-Eldin, A. 2020. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Current Opinion in Food Science*, 32, 76–82.
40. Chupeerach C., Aursalung A., Watcharachaisoponsiri T., Whanmek K., Thiyajai P., Yosphan K., Sritalahareuthai V., Sahasakul Y., Santivarangkna C., U. Suttisansanee. 2021. The effect of steaming and fermentation on nutritive values, antioxidant activities, and inhibitory properties of tea leaves. *Foods*, 10 (1), 117, 10.3390/foods10010117.
41. Cnop M., Fougere F., Velloso LA. 2012. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine*, 18, 59–68.
42. Comalada M., Bailon E., de Haro O., Lara-Villoslada F., Xaus J., Zarzuelo A., Gálvez J. 2006. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and

- survival depend on the cellular phenotype. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 132, 487–497.
43. Dallal M. S., Zamaniahari S., Davoodabadi A., Hosseini M., Rajabi Z. 2017. Identification and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional persian pickled vegetables. *GMS Hygiene and Infection Control*, 12, 1–7.
  44. De Meyts P. 2004. Insulin and its receptor: structure, function and evolution. *Bioessays*, 26, 1351-1362.
  45. Delzenne N.M., Neyrinck A.M., Backhed F., Cani P.D. 2011. Targeting gut microbiota in obesity: Effects of prebiotics and probiotics. *Nature Reviews Endocrinology*, 7, 639–646. doi: 10.1038/nrendo.2011.126
  46. Denton R.M., Tavaré J.M. 1995. Does mitogen-activated-protein kinase have a role in insulin action? The cases for and against. *European Journal of Biochemistry*, 227, 597-611.
  47. Derrien M., Vlieg J.E.V.H. 2015. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in Microbiology*, 23, 354–366.
  48. De Marchi E., Baldassari F., Bononi A., Wieckowski M. R., Pinton P. 2013. Oxidative stress in cardiovascular diseases and obesity: role of p66Shc and protein kinase C. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 11, 564961.
  49. DeVadder F., Kovatcheva-Datchary P., Goncalves D., Vinera J., Zitoun C., Duchamp A., Bäckhed F., Mithieux G. 2014. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell*, 156, (1-2), 84–96.
  50. Do Prado S.B.R., Ferreira G.F., Harazono Y., Shiga T.M., Raz A., Carpita N.C., Fabi J.P. 2017. Ripening-induced chemical modifications of papaya pectin inhibit cancer cell proliferation. *Scientific Reports*, 7, 16564.
  51. Dufresne C., Farnworth E. 2000. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International*, 33, 409–421. doi: 10.1016/S0963-9969(00)00067-3.
  52. Durham A.E., Frank N., McGowan C.M., Menzies-Gow N.J., Roelfsema E., Vervuert I., Feige K., Fey K. 2019. ECEIM consensus statement on equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33, 335-349.
  53. Echtay K.S., Murphy M.P., Smith R.A.J., Talbot D.A., Brand, M.D. 2002. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein 2 from the matrix side. Studies using targeted antioxidants. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 47129–47135.
  54. Echtay K.S., Roussel D., Jekabsons M.B., Stuart J.A. 2002. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*, 415, 96–99.

55. Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35(4), 495–516.
56. Elzinga S. E., Weese J. S., Adams, A. A. 2016. Comparison of the fecal microbiota in horses with equine metabolic syndrome and metabolically normal controls fed a similar all-forage diet. *Journal of Equine Veterinary Science*, 44, 9–16. doi: 10.1016/j.jevs.2016.05.010.
57. Escrivá L., Manyes L., Vila-Donat P., Font G., Meca G., Lozano M. 2021. Bioaccessibility and bioavailability of bioactive compounds from yellow mustard flour and milk whey fermented with lactic acid bacteria. *Food & Function*, 12(22), 11250–11261.
58. Fernandes K. A., Kittelmann S., Rogers C. W., Gee E. K., Bolwell C. F., Bermingham E. N., Thomas, D. G. 2014. Faecal microbiota of forage-fed horses in New Zealand and the population dynamics of microbial communities following dietary change. *PLoS ONE* 9, e112846, doi.org/10.1371/journal.pone.0112846.
59. Filannino P., Bai Y., Di Cagno R., Gobbetti M., Gänzle M.G., Di Cagno R. 2015. Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology*, 46, 272–279.
60. Filipčev B., Lević L., Bodroža-Solarov M., Mišljenović N., Koprivica G. 2010. Quality characteristics and antioxidant properties of breads supplemented with sugar beet molasses-based ingredients. *International Journal of Food Properties*, 13 (5), 1035-1053.
61. Finkenstadt VL. A. 2013. Review on the complete utilization of the sugarbeet, *Sugar Technology*, 16(4), 339- 346.
62. Flint H.J. 2012. The impact of nutrition on the human microbiome. *Nutrition Reviews*, 70, S10–S13.
63. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO) Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002.
64. Frank N. 2009. Equine metabolic syndrome. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29, 259-267.
65. Frank N. 2011. Equine metabolic syndrome. *Veterinary Clinics of North America—Equine Practice*, vol. 27 (1), 73–92, 2011.
66. Frank N., Geor R.J., Bailey S.R., Durham A.E., Johnson P.J. 2010. Equine metabolic syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24, 467-475.



67. Frazier TP., Gimble JM., Devay JW., Tucker HA., Chiu ES., Rowan B.G. 2013. Body mass index affects proliferation and osteogenic differentiation of human subcutaneous adipose tissue-derived stem cells. *BMC Molecular and Cell Biology*, 14, 34. pmid:23924189.
68. Freeman A.M., Pennings N. 2020. *Insulin Resistance*; StatPearls: Treasure Island, FL, USA.
69. Fuchs Y., Steller H. 2011. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell* 147(4), 742–58.
70. Fuentes E., Fuentes F., Vilahur G., Badimon L., Palomo I. 2013. Mechanisms of chronic state of inflammation as mediators that link obese adipose tissue and metabolic syndrome. *Mediat. Inflamm*, 136584. doi: 10.1155/2013/136584.
71. Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M., Shimomura I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome *Journal of Clinical Investigation*, 114, 1752-1761.
72. Chiva-Blanch G. and Visioli F. 2012. Polyphenols and health: moving beyond antioxidants. *Journal of Berry Research*, 2, 63–71.
73. Ganda E., Chakrabarti A., Sardi M.I., Tench M., Kozłowicz B.K., Norton S., Warren L.K., Khafipour E. 2023. *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product improves robustness of equine gut microbiome upon stress. *Frontiers in Veterinary Science*, 24, 10 - 1134092.
74. Gao X., Ohlander M., Jeppsson N., Björk L., Trajkovski V. 2000. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1485–1490.
75. Gardini F., Özogul Y., Suzzi G., Tabanelli G., Özogul F. 2016. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 12–18.
76. Geor RJ., Harris P. 2009. Dietary management of obesity and insulin resistance: countering risk for laminitis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 25, 51-65.
77. Gibson G.R., Hutkins R., Sanders M.L., Prescott S.L., Reimer R.A., Salminen S.J., Scot K., Stanton C., Swanson K.S., Cani P.D., Verbeke K., Reid G. 2017. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the

- definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14, 491-502.
78. Gibson GR. 2004. Fibre and effects on probiotics (the prebiotic concept). *Clinical Nutrition Supplements*, 1(2), 25–31. doi:10.1016/j.clnu.2004.09.005.
  79. Gilaverte S., Susin I., Pires A. V., Ferreira E. M., Mendes C. Q., Gentil R. S., Rodrigues G. H. 2011. Diet digestibility, ruminal parameters and performance of Santa Ines sheep fed dried citrus pulp and wet brewer grain. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40, 639–647. doi:10.1590/S1516-35982011000300024.
  80. Gorgoulis V., Adams P.D., Alimonti A., Bennett D.C., Bischof O., Bishop C., Campisi J., Collado M., Evangelou K., Ferbeyre G., Gil J., Hara E., Krizhanovsky E., Jurk D., Maier A.B., Narita M., Niedernhofer L., Passos J.F., Robbins P.D., Schmitt C.A., Sedivy J., Vougas K., von Zglinicki T., Zhou D., Serrano M., Demaria M. 2019. Cellular senescence: defining a path forward. *Cell*, 179, 813-827.
  81. Gothai S., Ganesan P., Park S.-Y., Fakurazi S., Choi D.-K., Arulselvan P. 2016. Natural phyto-bioactive compounds for the treatment of type 2 diabetes: inflammation as a target. *Nutrients*, 8 (8), 461.
  82. Grada A., Otero-Vinas M., Prieto-Castrillo F., Obagi Z., Falanga V. 2017. Research techniques made simple: Analysis of collective cell migration using the wound healing assay *The Journal of Investigative Dermatology*, 137 (2), e11-e16.
  83. Gutiérrez-Rodelo C., Roura-Guiberna A., Olivares-Reyes J.A. 2017. Molecular mechanisms of insulin resistance: An update. *Gaceta Médica de México*, 153, 214–228.
  84. Harker I., Harris P., Barfoot C. 2011. The body condition score of leisure horses competing at an unaffiliated championship in the UK. *Journal of Equine Veterinary Science*, 5, 253–254. doi: 10.1016/j.jevs.2011.03.058.
  85. Hamadate N., Nakamura K., Hirai M., Yamamoto T., Yamaguchi H., Iizuka M., Yamamoto, E., Iwama Y., Yazawa K. 2013. Effect of a Dietary Supplement Containing Kurozu (a Japanese Traditional Health Drink) Concentrate on Several Obesity-Related Parameters in Obese Japanese Adults: a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Functional Foods in Health and Disease*, 3, 310.
  86. Han N., Jia L., Su Y., Du J., Guo L., Luo Z., Liu Y. 2019. *Lactobacillus reuteri* extracts promoted wound healing via PI3K/AKT/ $\beta$ -catenin/TGF $\beta$ 1 pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, 10, 243.

87. Hansen E.B. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 119–131. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00238-6.
88. Harris P.A., Ellis A.D., Fradinho M.J., Jansson A., Julliand V., Luthersson N., Santos A.S., Vervuert I. 2017. Review: Feeding conserved forage to horses: Recent advances and recommendations. *Animal*, 11, 958–967. doi: 10.1017/S1751731116002469.
89. Hati S., Patel M., Mishra B.K., Das S. 2019. Short-chain fatty acid and vitamin production potentials of *Lactobacillus* isolated from fermented foods of Khasi Tribes, Meghalaya, India. *Annals of Microbiology*, 69, 1191–1199.
90. Hemsworth LM., Jongman E., Coleman GJ. 2015. Recreational horse welfare: The relationships between recreational horse owner attributes and recreational horse welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 165, 1–16.
91. Henneke DR., Potter GD., Kreider JL., Yeates BF. 1983. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*, 15(4), 371–372.
92. Higuchi C., Nakatsuka A., Eguchi J., Teshigawara S., Kanzaki M., Katayama A., Yamaguchi S., Takahashi N., Murakami K., Ogawa D., Sasaki S., Makino H., Wada J. 2015. Identification of circulating miR-101, miR-375 and miR-802 as biomarkers for type 2 diabetes. *Metabolism*, 64(4), 489–497.
93. Hitchens P., Hultgren J., Frössling J., Emanuelson U., Keeling L. 2015. Prevalence of equine obesity in Sweden assessed from official animal welfare control data. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57, O7. doi: 10.1186/1751-0147-57-S1-O7.
94. Hole A. S., Rud I., Grimmer S., Sigl S., Narvhus J., Sahlstrøm S. 2012. Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(25), 6369–6375.
95. Holzapfel W.H. 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 197–212. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00707-3
96. Holzapfel WH., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 365S–373S.

97. Hu R., Zeng F., Wu L., Wan X., Chen Y., Zhang J., Liu B. 2019. Fermented carrot juice attenuates type 2 diabetes by mediating gut microbiota in rats. *Food and Function*, 10, 2935-2946.
98. Huang T., Rivera-Pérez J. A. 2014. Senescence-associated beta-galactosidase activity marks the visceral endoderm of mouse embryos but is not indicative of senescence. *Genesis*, 52, 300-308. doi.org/10.1002/dvg.22761.
99. Huntington PJ., Pollitt C., McGowan C. 2010. Recent research into laminitis. *NZ Equine Vet Practitioner*. 34, 7–20.
100. Hurst R. D., Lyall K. A., Wells R. W., Sawyer G. M., Lomiwes D., Ngametua N., Hurst S. M. 2020. Daily consumption of an anthocyanin-rich extract made from new zealand blackcurrants for 5 weeks supports exercise recovery through the management of oxidative stress and inflammation: a randomized placebo controlled pilot study. *Frontiers in Nutrition*, 7.
101. Hwang C. E., Kim S. C., Kim D. H., Lee H. Y., Suh H. K., Cho K. M., Lee J. H. 2021. Enhancement of isoflavone aglycone, amino acid, and CLA contents in fermented soybean yogurts using different strains: Screening of antioxidant and digestive enzyme inhibition properties. *Food Chemistry*, 340, 128199.
102. Ibarra PE., García-Solís P., Solís-Sáinz JC., Cruz-Hernández A. 2021. Expression of miRNA in obesity and insulin resistance: a review. *Stem Cell Research & Therapy*, 72, 73–80.
103. Jaiswal AK., Abu-Ghannam N. 2013. Kinetic studies for the preparation of probiotic cabbage juice: Impact on phytochemicals and bioactivity. *Industrial Crops and Products*, 50, 212–218.
104. Jakubczyk A., Karaś M., Złotek U., Szymanowska U., Baraniak B., Bochnak J. 2019. Peptides obtained from fermented faba bean seeds (*Vicia faba*) as potential inhibitors of an enzyme involved in the pathogenesis of metabolic syndrome. *LWT-FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY*, 105, 306–313.
105. Jangra S., Sharma R.K., Pothuraju R., Bhakri G. 2019. Milk fermented with *Lactobacillus casei* NCDC19 improves high fat and sucrose diet alters gene expression in obese mice. *International Dairy Journal*, 90, 15-22.
106. Jensen R. B., Austbø D., Blache D., Bach Knudsen K. E., Tauson A. H. 2016. The effect of feeding barley or hay alone or in combination with molassed sugar beet pulp on the metabolic responses in plasma and caecum of horses. *Animal Feed Science and Technology*, 214, 53–655.

107. Ježek P., Jabůrek M., Holendová B., Plecítá-Hlavatá L. 2018. Fatty acid-stimulated insulin secretion vs. Lipotoxicity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23 (6), 1483.
108. Ji Y, Park S, Park H., Hwang E., Shin H., Pot B., Holzapfel W.H. 2018. Modulation of active gut microbiota by *Lactobacillus rhamnosus* GG in a diet induced obesity murine model. *Frontiers in Microbiology*, 9, 710.
109. Ji Y., Xie Q., Mengc X., Wangd W., Lia S., Langa X, Zhaoa CH., Yuana Y., Ye H. 2022. *Lactobacillus paracasei* improves dietary fatty liver by reducing insulin resistance and inflammation in obese mice model. *Journal of Functional Foods*, 95, 105150.
110. Johnson PJ., Wiedmeyer CE., Messer NT., Ganjam VK. 2009. Medical implications of obesity in horses—lessons for human obesity. *J Diabetes Sci Technol*, 3, 163–74.
111. Johnston KL., Thomas EL., Bell JD., Frost GS., Robertson MD. 2010. Resistant starch improves insulin sensitivity in metabolic syndrome. *Diabetic Medicine*, 12:391–397. doi: 10.1111/j.1464-5491.2010.02923.x.
112. Jørgensen F., Hansen O.C., Stougaard P. 2004. Enzymatic conversion of d-galactose to d-tagatose: Heterologous expression and characterisation of a thermostable l-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacter mathranii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 816-822.
113. Kabak B., Dobson A.D.W. 2011. An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 248–260.
114. Kahn S.E., Hull R.L., Utzschneider K.M. 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444 (7121), 840-846.
115. Kechagia M., Basoulis D., Konstantopoulou S., Dimitriadi D., Gyftopoulou K., Skarmoutsou N., Fakiri E.M. 2013. Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutrition*, 481651. doi: 10.5402/2013/481651.
116. Kelly P.N., Strasser A. 2001. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death & Differentiation*, 18, 1414–1424.
117. Kelly S. M., Munoz-Munoz J., van Sinderen D. 2021. Plant glycan metabolism by *Bifidobacteria*. *Front Microbiol*, 12, 609418.
118. Kershaw E.E., Flier J.S. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89, 2548-2556.
119. Kim B., Hong V.M., Yang J., Hyun H., Im J.J., Hwang J., Yoon S., Kim J.E. 2016. a review of fermented foods with beneficial effects on brain and cognitive function. *Preventive Nutrition and Food Science*, 21, 297–309.

120. Kim P. 2004. Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65, 243–249.
121. Kim SW., Park KY., Kim B., Kim E., Hyun CK. 2013. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431, 258–263.
122. Kimura I., Inoue D., Hirano K., Tsujimoto G. 2014. The SCFA receptor GPR43 and energy metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 5 (85).
123. Kononiuk A.D., Karwowska M. 2019. Influence of freeze-dried acid whey addition on biogenic amines formation in a beef and deer dry fermented sausages without added nitrite. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(2), 332-338.
124. Koprivica G., Mišljenović N., Lević L., Kuljanin T. 2009. Influence of the nutrients present in sugar beet molasses and saccharose solutions on the quality of osmodehydrated carrot. *Časopis za procesnu tehniku i energetiku u poljoprivredi/PTEP*, 13 (2), 184-187.
125. Kornicka K., Szłapka-Kosarzewska J., Śmieszek A., Marycz K. 2019. 5-Azacytidine and Resveratrol Reverse Senescence and Ageing of Adipose Stem Cells via Modulation of Mitochondrial Dynamics and Autophagy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23, 237–259, <https://doi.org/10.1111/jcmm.13914>.
126. Krauss S., Zhang C.-Y., Scorrano L., Dalgaard L.T., St-Pierre J., Grey S.T., Lowell B.B. 2003. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic  $\beta$  cell dysfunction. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 1831–1842.
127. Kronfeld D.S., Treiber K.H., Hess T.M., Boston R.C. 2005. Insulin resistance in the horse: definition, detection and dietetics *Journal of Animal Science*, 83E, E22-E31.
128. Kumar R., Sharma A., Gupta M., Padwad Y., Sharma R. 2020. Cell-free culture supernatant of probiotic *Lactobacillus fermentum* protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced premature senescence by suppressing ROS-Akt-mTOR axis in murine preadipocytes. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 563–76.
129. Laatikainen R., Koskenpato J., Hongisto S., Lopenen J., Poussa T., Hillilä M., Korpela R. 2016. Randomised clinical trial: Low-FODMAP rye bread vs. regular rye bread to relieve the symptoms of irritable bowel syndrome. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 44, 460–470.

130. Larsen N., Bussolo de Souza C., Krych L., Barbosa Cahu T., Wiese M., Kot W., Mayer Hensen K., Blennow A., Venema K., Jaspersen L. 2019. Potential of pectins to beneficially modulate the gut microbiota depends on their structural properties. *Frontiers in Microbiology.*, 10, 223. doi: 10.3389/fmicb.2019.00223.
131. LeBlanc J. G., Chain F., Martin R., Bermúdez-Humarán L.G., Courau S., Langella P. 2017. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microbial Cell Factories*, 16, 79.
132. Lee E., Jung S.-R., Lee S.-Y., Lee N.-K., Paik H.-D., Lim S.-I. 2018. *Lactobacillus plantarum* Strain Ln4 Attenuates Diet-Induced Obesity, Insulin Resistance, and Changes in Hepatic mRNA Levels Associated with Glucose and Lipid Metabolism. *Nutrients*, 10, 643.
133. Lee K.H., Song J.L., Park E.S., Ju J., Kim H.Y., Park K.Y. 2015. Anti-Obesity Effects of Starter Fermented Kimchi on 3T3-L1 Adipocytes. *Preventive Nutrition and Food Science*, 20, 298–302.
134. Leijdekkers A.G., Bink J.P., Geutjes S., Schols H.A., Gruppen H. 2013. Enzymatic saccharification of sugar beet pulp for the production of galacturonic acid and arabinose; a study on the impact of the formation of recalcitrant oligosaccharides. *Bioresource Technology*, 128, 518–525.
135. LeRoith D, Roberts CT. 2003. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Letters*, 195, 127–37.
136. Letai A.G. 2008. Diagnosing and exploiting cancer's addiction to blocks in apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 8, 121–132.
137. Lewandowski Ł., Kepinska M., Milnerowicz H. 2018. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase activity by selected environmental xenobiotics. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 58, 105–113.
138. Liebich HG. 2010. Funktionelle Histologie der Haussugetiere. In *Lehrbuch und Farbatlas fr Praxis und Studium [Functional histology of house mammals: textbook and color atlas of practice and study]*. 5th Edn, 77–79. Schattauer GmbH: Stuttgart, Germany, 2010.
139. Liu, B., Yang Z., Huan H., Gu H., Xu N., Ding Ch. 2020. Impact of molasses and microbial inoculants on fermentation quality, aerobic stability, and bacterial and fungal microbiomes of barley silage. *Scientific Reports*, 10, 1–10.

140. Longland A.C., Byrd B.M. 2006. Pasture nonstructural carbohydrates and equine laminitis. *Journal of Nutrition*, 136, 2099S-2102S.
141. Longo M., Zatterale F., Naderi J., Parrillo L., Formisano P., Raciti GA., Beguinot F., Miele C. 2019. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (20). doi.org/10.3390/ijms20092358.
142. Mallappa R. H., Rokana N., Duary R. K., Panwar H., Batish V. K. and Grover S. 2012. Management of metabolic syndrome through probiotic and prebiotic interventions. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16, 20–27. doi: 10.4103/2230-8210.91178.
143. Marchitelli B. 2019. An objective exploration of euthanasia and adverse events. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 49, 3, 553-563.
144. Marco M.L., Heeney D., Binda S., Cifelli C.J., Cotter P.D., Foligné B., Gänzle M., Kort, R., Pasin G., Pihlanto A., Smid E.J., Hutkins R. 2017. Health benefits of fermented foods: Microbiota and beyond. *Current Opinion in Biotechnology*, 44, 94–102.
145. Marycz K., Kornicka K., Basinska K., Czyrek A. 2016. Equine metabolic syndrome affects viability, senescence, and stress factors of equine adipose-derived mesenchymal stromal stem cells: new insight into EqASCs isolated from EMS horses in the context of their aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–17.
146. Marycz K., Kornicka K., Grzesiak J., Śmieszek A., Szłapka J. 2016. Macroautophagy and Selective Mitophagy Ameliorate Chondrogenic Differentiation Potential in Adipose Stem Cells of Equine Metabolic Syndrome: New Findings in the Field of Progenitor Cells Differentiation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3718468.
147. Marycz K., Michalak I., Kornicka K. 2018. Advanced nutritional and stem cells approaches to prevent equine metabolic syndrome. *Research in Veterinary Science*, 118, 115–125.
148. Marycz, K. Szłapka-Kosarzewska, J. Geburek, F. Kornicka-Garbowska, K. 2019. Systemic administration of rejuvenated adipose-derived mesenchymal stem cells improves liver metabolism in equine metabolic syndrome (EMS)—New approach in veterinary regenerative medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 15, 842–850.
149. Marzo C., Díaz A.B., Caro I., Blandino A. 2021. Valorisation of fungal hydrolysates of exhausted sugar beet pulp for lactic acid production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101, 4108–4117.



150. Matsuzawa Y., Funahashi T., Nakamura T. 2011. The concept of metabolic syndrome: Contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 18, 629–639. doi: 10.5551/jat.7922.
151. McCracken E., Monaghan M., Sreenivasan S. Pathophysiology of the metabolic syndrome. 2018. *Clinics in Dermatology*, 36, 14–20. doi: 10.1016/j.clindermatol.2017.09.004.
152. McGowan CM., Dugdale AH., Pinchbeck GL., Argo CMcG. 2013. Dietary restriction in combination with a nutraceutical supplement for the management of equine metabolic syndrome in horses. *Journal of Veterinary*, 196, 153–159.
153. Menzies-Gow N.J., Harris P.A., Elliott J. 2017. Prospective cohort study evaluating risk factors for the development of pasture-associated laminitis in the United Kingdom. *Journal of Equine Veterinary Science*, 49, 300–306. doi: 10.1111/evj.12606.
154. Melini F., Melini V., Luziatelli F., Ficca A.G., Ruzzi M. 2019. Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. *Nutrients*, 11, 1189.
155. Memarrast F., Ghafouri-Fard S., Kolivand S., Jafari-Nodooshan S., Neyazi N., Sadroddiny E., Motevaseli E. 2017. Comparative evaluation of probiotics on plasma glucose, lipid, and insulin levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 33 (7) 10.1002/dmrr.2912.
156. Mieszkin S., Hymery N., Debaets S., Coton E., Blay GL., Valence F., Mounier J. 2017. Action mechanisms involved in the bioprotective effect of *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1.Np against *Yarrowia lipolytica* in fermented milk *International Journal of Food Microbiology*, 248, 47–55.
157. Miraglia N., Bergero D., Polidori M., Peiretti P. G., Ladetto G. 2006. The effects of a new fibre-rich concentrate on the digestibility of horse rations. *Livestock Science*, 100, 10–13. doi:10.1016/j.livprodsci.2005.11.003.
158. Mokkala K., Roytio H., Munukka E., Pietila S., Ekblad U., Ronnema T., Erola E., Laiho A., Laitinen K. 2016. Gut microbiota richness and composition and dietary intake of overweight pregnant women are related to serum zonulin concentration, a marker for intestinal permeability. *The Journal of Nutrition*, 146, 1694–1700. doi: 10.3945/jn.116.235358.
159. Monedero V., Pérez-Martínez G., Yebra MJ. 2010. Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1003–1015.

160. Morgan R., Keen J., McGowan C. 2015. Equine metabolic syndrome. *Veterinary Record*, 177, 173–179.
161. Morgan R.A., Beck K.R., Nixon M., Homer N. Z. M., Crawford A. A., Melchers D., Houtman R., Meijer O. C., Stomby A., Anderson A. J., Upreti R., Stimson R. H., Olsson T., Michael T., Cohain A., Ruusalepp A., Schadt E. E., Björkegren J. L. M., Andrew R., Kenyon Ch. J., Hadoke P. W. F., Odermatt A., Keen J. A., Walker B. R. 2017. Carbonyl reductase 1 catalyzes 20 $\beta$ -reduction of glucocorticoids, modulating receptor activation and metabolic complications of obesity. *Scientific Reports*, 7, 10633.
162. Moussa L., Bézirard V., Salvador-Cartier C., Bacquié V., Lencina C., Lévêque M., Braniste V., Ménard S., Théodorou V., Houdeau E. 2012. a low dose of fermented soy germ alleviates gut barrier injury, hyperalgesia and faecal protease activity in a rat model of inflammatory bowel disease. *PLoS ONE*, 7, e49547.
163. Muck R. E., Nadeau E., Mcallister T. A., Contreras-Govea F. E., Kung L. J. 2018. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, 101, 3980–4000. doi: 10.3168/jds.2017-13839.
164. Mueller T., Voigt W. 2011. Fermented wheat germ extract-nutritional supplement or anticancer drug? *Nutrition Journal*, 10, 89.
165. Muhonen S. Ph.D. Thesis. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae*; Uppsala, Sweden: Sep 30, 2008. *Metabolism and Hindgut Ecosystem in Forage Fed Sedentary and Athletic Horses*.
166. Mularczyk M., Bourebaba Y., Kowalczyk A., Marycz K., Bourebaba L. 2021. Probiotics-rich emulsion improves insulin signaling in Palmitate/Oleate-challenged human hepatocarcinoma cells through the modulation of Fetuin-A/TLR4-JNK-NF- $\kappa$ B pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111560.
167. Müller C., Udén P. 2007. Preference of horses for grass conserved as hay, haylage or silage. *Animal Feed Science and Technology*, 132, 66–78. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2006.02.013.
168. Murillo A.G., Fernandez M.L. 2017. The Relevance of Dietary Polyphenols in Cardiovascular Protection. *Current Pharmaceutical Design*. 23, 2444–2452
169. Nam Y.R., Won S.B., Chung Y.S., Kwak C.S., Kwon Y.H. 2015. Inhibitory Effects of Doenjang, Korean Traditional Fermented Soybean Paste, on Oxidative Stress and Inflammation in Adipose Tissue of Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrition Research and Practice*, 9, 235–241.

170. Nisa K., Rosyida V.T., Nurhayati S., Indrianingsih A.W., Darsih C., Apriyana W. 2019. Total phenolic contents and antioxidant activity of rice bran fermented with lactic acid bacteria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. DOI 10.1088/1755-1315/251/1/012020.
171. Oerlemans M. M. P., Akkerman R., Ferrari M., Walvoort M. T. C., de Vos, P. 2021. Benefits of bacteria-derived exopolysaccharides on gastrointestinal microbiota, immunity and health. *Journal of Functional Foods*, 76, 104289.
172. Okla M., Wang W., Kang I., Pashaj A., Carr T., Chung S. 2015. Activation of Toll-like receptor 4 (TLR4) attenuates adaptive thermogenesis via endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 26476–26490.
173. Orsini JA., Wrigley J., Riley P. 2010. Home care for horses with chronic laminitis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 26(1), 215-23.
174. Ota T. 2014. Obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)*, 5, 204. doi: 10.3389/fendo.2014.00204.
175. Ou M. Y., Zhang H., Tan P. C., Zhou S. B., Li Q. F. 2022. Adipose tissue aging: Mechanisms and therapeutic implications. *Cell Death And Disease*. 13 (4), 300. 10.1038/s41419-022-04752-6.
176. Palmgren Karlsson C., Jansson A., Essén-gustavsson B., Lindberg J. E. 2002. Effect of molassed sugar beet pulp on nutrient utilisation and metabolic parameters during exercise. *Equine Veterinary Journal*, 34, 44–49.10.1111/j.2042-3306.2002.tb05390.x.
177. Palmonari A., Cavallini D., Sniffen CJ., Fernandes L., Holder P., Fagioli L., Fusaro I., Biagi G., Formigoni A., Mammi L. 2020. Short communication: Characterization of molasses chemical composition. *Journal of Dairy Science*, 103 , 6244–6249.
178. Pan L., Wang Q., Qu L., Liang L., Han Y., Wang X., Zhou Z. 2022. Pilot-scale production of exopolysaccharide from *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 and its application in set yogurt. *Journal of Dairy Science*, 105 1072–1083. 10.3168/jds.2021-20997.
179. Pandey K. B., Rizvi S. I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270–278.
180. Papagianni M. 2007. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 25, 3, 244-63.
181. Parada Venegas D., De la Fuente M. K., Landskron G., González M. J., Quera R., Dijkstra G., Harmsen H.J.M., Fabet K.M., Hermoso, M. A. 2019. Short chain fatty acids

- (SCFAs)-mediated gut epithelial and immune regulation and its relevance for inflammatory bowel diseases. *Frontiers in Immunology*, 10.
182. Park J.A., Tirupathi Pichiah P.B., Yu J.J., Oh S.H., Daily J.W., Cha Y.S. 2012. Anti-Obesity Effect of Kimchi Fermented with *Weissella Koreensis* OK1-6 as Starter in High-Fat Diet-Induced Obese C57BL/6J Mice. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 1507–1516.
  183. Patel A., Shah N., Prajapati J.B. 2014. Clinical application of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection-a brief review. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 47, 429–437. doi: 10.1016/j.jmii.2013.03.010.
  184. Patterson Rosa L., Mallicote M.F., Long M.T., Brooks S.A. 2020. Metabogenomics reveals four candidate regions involved in the pathophysiology of Equine Metabolic Syndrome. *Molecular and Cellular Probes*, 53, 101620.
  185. Pratt-Phillips S.E., Owens K.M., Dowler L.E., Cloninger M.T. 2010. Assessment of resting insulin and leptin concentrations and their association with managerial and innate factors in horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 30, 127–133. doi: 10.1016/j.jevs.2010.01.060.
  186. Pekgor S., Duran C., Berberoglu U., Eryilmaz M.A. 2019. The Role of Visceral Adiposity Index Levels in Predicting the Presence of Metabolic Syndrome and Insulin Resistance in Overweight and Obese Patients. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 17, 296–302. doi: 10.1089/met.2019.0005.
  187. Perez-Galan P., Roue G., Villamor N., Montserrat E., Campo E., Colomer D. 2006. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*, 107, 257–264.
  188. Perry J.J.P., Shin D.S., Getzoff E.D., Tainer J.A. 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1804, 245–262.
  189. Pessione E. 2012. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 86.
  190. Pierpont Y.N., Dinh T.P., Salas R.E., Johnson E.L., Wright T.G., Robson M.C., Payne W.G. 2014. Obesity and surgical wound healing: a current review. *ISRN Obesity*, 638936
  191. Pokusaeva K., Fitzgerald G. F., van Sinderen D. 2011. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes & nutrition*, 6(3), 285–306.

192. Pollard D., Wylie CE., Newton JR., Verheyen KLP. 2020. Factors Associated with Euthanasia in Horses and Ponies Enrolled in a Laminitis Cohort Study in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine*, 104833. pmid:31751854.
193. Pollard D., Wylie CE., Verheyen K.L.P., Newton J.R. 2017. Assessment of horse owners' ability to recognise equine laminitis: a cross-sectional study of 93 veterinary diagnosed cases in Great Britain *Equine Veterinary Journal*, 49, 759–66.
194. Post R.E., Mainous 3rd A.G., King D.E., Simpson K.N. 2012. Dietary fiber for the treatment of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Journal of the American Board of Family Medicine*, 25, 16-23.
195. Pyrek P., Siwińska N., Zak-Bochenek A. 2022. Reproducibility of the body condition score assessment in Silesian horses, using the 9-point BCS scale. *Veterinary Research Communications*.
196. Qu H., Yu H., Gu R., Chen D., Chen X., Huang Y., Xi W., Huang Y. 2018. Proteomics for studying the effects of *L. rhamnosus* LV108 against non-alcoholic fatty liver disease in rats. *RSC Advances*, 8, 38517–38528. doi: 10.1039/c8ra06771f.
197. Rasouli N., Kern P.A. 2008. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93, 64-73.
198. Rault A., Bouix M., Béal C. 2009. Fermentation pH influences the physiological-state dynamics of *Lactobacillus bulgaricus* CFL1 during pH-controlled culture. *Appl Environ Microbiol* 75(13), 4374–4381. <https://doi.org/10.1128/AEM.02725-08>.
199. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
200. Respondek F., Goachet A.G., Julliand V. 2008. Effects of dietary short-chain fructooligosaccharides on the intestinal microflora of horses subjected to a sudden change in diet. *Journal of Animal Science*, 86, 316–323.
201. Respondek F., Myers K., Smith T.L., Wagner A., Geor R.J. 2011. Dietary supplementation with short-chain fructo-oligosaccharides improves insulin sensitivity in obese horses. *Journal of Animal Science*, 89, 77–83.
202. Rezac S., Kok C.R., Heermann M., Hutkins R. 2018. Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1785.
203. Robertson M.D., Wright J.W., Loizon E., Debard C., Vidal H., Shojaee-Moradie F., Russell-Jones D., Umpleby A.M. 2012. Insulin-sensitizing effects on muscle and

- adipose tissue after dietary fiber intake in men and women with metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97, 3326–3332.
204. Rodiek A. V., Stull C. L. 2007. Glycemic index of ten common horse feeds. *Journal of Equine Veterinary Science*, 25, 205–211. doi:10.1016/j.jevs.2007.04.002.
  205. Rottiers V., Naar A. M. 2012. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13, 239–250.
  206. Rosen G.D. 2006. Holo-analysis of the efficacy of Bio-Mos® in broiler nutrition. *British Poultry Science*, 48, 21-26.
  207. Saadoun H. J., Calani L., Cirlini M., Bernini V., Neviani E., Del Rio D., Galaverna G., Lazzi C. 2021. Effect of fermentation with single and co-culture of lactic acid bacteria on okara: Evaluation of bioactive compounds and volatile profiles. *Food and Function*, 12, 3033–3043
  208. Sahuri-Arisoylu M., Brody LP., Parkinson JR., Parkes H., Navaratnam N., Miller AD., Thomas EL., Frost G., Bell JD. 2016. Reprogramming of hepatic fat accumulation and ‘browning’ of adipose tissue by the short-chain fatty acid acetate. *International Journal of Obesity*, 40(6), 955–63.
  209. Salazar N., Gueimonde M., de Los Reyes-Gavilan C.G., Ruas-Madiedo P. 2016. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Fermentable Substrates by the Intestinal Microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1440–1453.
  210. Salem HJ., Thiemermann C. 2010. Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. *Stem Cells*, 28, 585–596.
  211. Santos AL., Sinha S. 2021. Obesity and aging: molecular mechanisms and therapeutic approaches. *Ageing Research Reviews*, 67, 101268.
  212. Scholzen T., Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182, 3, 311–322.
  213. Schoster A. Probiotic Use in Equine Gastrointestinal Disease. 2013. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 34, 13–24. doi: 10.1016/j.cveq.2017.11.004.
  214. Selhub E.M., Logan A.C., Bested A.C. 2014. Fermented foods, microbiota, and mental health: Ancient practice meets nutritional psychiatry *Journal of Physiological Anthropology*, 33, 2
  215. Setayesh T., Nersesyan A., Misik M., Ferk F., Langie S., Andrade V.M., Haslberger A., Knasmuller S. 2018. Impact of obesity and overweight on DNA stability: Few facts and many hypotheses. *Mutation Research*, 777, 64–91. doi: 10.1016/j.mrrev.2018.07.001.

216. Sharma R., Garg P., Kumar P., Bhatia S.K., Kulshrestha S. 2020. Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Foods. *Fermentation*, 6, 106.
217. Sharma S., Chaturvedi J., Chaudhari B.P., Singh R.L., Kakkar P. 2012. Probiotic *Enterococcus lactis* ITRHR1 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Nutrition*, 28, 173-181.
218. Sharma S., Singh R.L., Kakkar P. 2011. Modulation of Bax/Bcl-2 and caspases by probiotics during acetaminophen induced apoptosis in primary hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 770-779.
219. Silva Y. P., Bernardi A., Frozza R. L. 2020. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11.
220. Singla R.K., Dubey A.K., Garg A., Sharma R.K., Fiorino M., Ameen S.M., Haddad M.A., Al-Hiary M. 2019. *Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures*. Oxford University Press; Oxford, UK.
221. Schnurer J. and Magnusson J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 70–78. doi: 10.1016/j.tifs.2004.02.014.
222. Skalickova S., Ridoskova A., Slama P., Skladanka J., Skarpa P., Smykalova, I., Horacek J., Dostalova R., Horky, P. 2022. Effect of lactic fermentation and cooking on nutrient and mineral digestibility of peas. *Frontiers in Nutrition*, 9.
223. Stafeev IS., Vorotnikov AV., Ratner EI., Menshikov MY., Parfyonova YV. 2017. Latent Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue. *International Journal of Endocrinology*, 5076732. <https://doi.org/10.1155/2017/5076732>.
224. Starosta R., Brzuskiewicz A., Bykowska A., Komarnicka U.K., Bażanów B., Florek M. 2013. a novel copper(I) complex, [CuI(2,2'-biquinoline)P(CH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]—synthesis, characterisation and comparative studies on biological activity. *Polyhedron*. 50(1):481–489. doi: 10.1016/j.poly.2012.11.033.
225. StatSoft, Inc. 2022 . STATISTICA (data analysis software system), version 13. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
226. Stewart-Hunt L., Geor RJ., McCutcheon LJ. 2006. Effects of short-term training on insulin sensitivity and skeletal muscle glucose metabolism in standardbred horses. *Equine veterinary journal. Supplement*, 36, 226-232.

227. Stępień M., Stępień A., Wlazeł RN., Paradowski M., Banach M., Rysz J. 2014. Obesity indices and inflammatory markers in obese non-diabetic normo- and hypertensive patients: a comparative pilot study. *Lipids in Health and Disease*, 13, 29.
228. Song D., Ibrahim S., Hayek S. 2015. Recent application of probiotics in food and agricultural science. *Probiotics*.
229. Stöckli J., Fazakerley D. J., James, D. E. 2011. GLUT4 exocytosis *Journal of Cell Science*, 124, 4147–4159.
230. Suagee J.K., Corl B.A., Geor R.J. 2012. a potential role for pro-inflammatory cytokines in the development of insulin resistance in horses. *Animals (Basel)*, 2, 243.
231. Tadros EM., Frank N. 2013. Endocrine disorders and laminitis. *Equine Veterinary Education*. 25, 152–162.
232. Tamang J.P., Shin D.-H., Jung S.-J., Chae S.-W. 2016. Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 578.
233. Tan J., McKenzie C., Potamitis M., Thorburn A. N., Mackay C. R., Macia L. 2014. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Advances in Immunology*, 121, 91–119.
234. Tang T., Song J., Li J., Wang H., Zhang Y, Suo H. 2020. Synbiotic Consisting of *Lactobacillus Plantarum* S58 and Hull-Less Barley  $\beta$ -glucan Ameliorates Lipid Accumulation in Mice Fed With a High-Fat Diet by Activating AMPK Signaling and Modulating the Gut Microbiota. *Microbiota Carbohydrate Polymers*, 243, 116398.
235. Tenore G. C., Caruso D., Buonomo G., D’Avino M., Ciampaglia R., Maisto M. 2019. Lactofermented annurca apple puree as a functional food indicated for the control of plasma lipid and oxidative amine levels: results from a randomised clinical trial. *Nutrients* 11 (1), 122–136. doi: 10.3390/nu11010122.
236. Tkacz K., Chmielewska J., Turkiewicz I.P., Nowicka P., Wojdyło A. 2022. Dynamics of changes in organic acids, sugars and phenolic compounds and antioxidant activity of sea buckthorn and sea buckthorn-apple juices during malolactic fermentation. *Food Chemistry*, 332, 127382.
237. Tollefsbol T. 2007. Techniques for analysis of biological aging. *Methods in Molecular Biology*, 371: 1–7. pmid:17634569.
238. Trajkovski M., Hausser J., Soutschek J., Bhat B., Akin A., Zavolan M., Heim M.H., Stoffel M. 2011. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature*, 474(7353), 649–653.



239. Trujillo ME., Scherer PE. 2006. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocrine Reviews*, 27, 762–778.
240. Upadhyay S. and Dixit M. 2015. Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 504253, 15.
241. Vandenberghe LP., Soccol CR., Pandey A., Lebeault J-M. 2000. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol*, 74,175-8.
242. van der Kallen CJ., van Greevenbroek MM., Stehouwer CD., Schalkwijk CG. 2009. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the development of diabetes: is there a role for adipose tissue and liver? *Apoptosis*, 14, 1424–1434. doi: 10.1007/s10495-009-0400-4.
243. Venugopal CS., Eades S., Holmes EP., Beadle RE. 2011. Insulin resistance in equine digital vessel rings: An in vitro model to study vascular dysfunction in equine laminitis. *Equine Veterinary Journal*, 43(6), 744–9. pmid:21496102.
244. Verardo V., Gómez-Caravaca A.M., Tabanelli G. 2020. Bioactive components in fermented foods and food by-products. *Foods*, 9, 153, 10.3390/foods9020153.
245. Vick MM., Adams AA., Murphy BA., Sessions DR., Horohov DW., Cook RF., Shelton BJ., Fitzgerald BP. 2007. Relationships among inflammatory cytokines, obesity, and insulin sensitivity in the horse. *Journal of Animal Science*, 85, 1144–1155.
246. Virkamäki A., Ueki K., Kahn C.R. 1999. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 103, 931-943
247. Visser M. B., Pollitt C. C. 2011. Immunohistochemical distribution of laminin-332 and collagen type IV in the basement membrane of normal horses and horses with induced laminitis. *Journal of Comparative Pathology*, 145, 80–87. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.11.009.
248. Voidarou C., Antoniadou M., Rozos G., Tzora A., Skoufos I., Varzakas T., Lagiou A., Bezirtzoglou E. 2021. Fermentative Foods: Microbiology, biochemistry, potential human health benefits and public health issues. *Foods*, 10, 69. doi: 10.3390/foods10010069
249. Wang T., Yan H., Lu Y., Li X., Wang X., Shan Y., Yi Y., Liu B., Zhou Y., Lü X. 2019. Anti-obesity effect of *Lactobacillus rhamnosus* LS-8 and *Lactobacillus crustorum* MN047 on high-fat and high-fructose diet mice base on inflammatory response alleviation and gut microbiota regulation. *European Journal of Nutrition*.

250. Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai X., Xie J., Wang Y., Geng, W. 2021. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.
251. Ward C.W., Lawrence M.C. 2009. Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. *Bioessays*, 31, 422–434.
252. Weese JS., Anderson ME. 2002. Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. *Canadian Veterinary Journal*, 43, 771 – 774.
253. Wilfred B. R., Wang W.-X., Nelson, P. T. 2007. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Molecular Genetics and Metabolism*, 91, 209–217. doi: 10.1016/j.ymgme.2007.03.011.
254. Wisselink HW., Weusthuis RA., Eggink G., Hugenholtz J., Grobden GJ. 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*, 12, 151–161.
255. Włodarczyk M., Jablonowska-Lietz B., Olejarz W., Nowicka G. 2018. Anthropometric and dietary factors as predictors of DNA damage in obese women. *Nutrients*, 10, 578. doi: 10.3390/nu10050578.
256. Wolever TM. 2017. Yogurt is a low-glycemic index food. *Journal of Nutrition*. 147, 1462–1467.
257. Wu Y., Li X., Tan F., Zhou X., Mu, J., Zhao X. 2021. *Lactobacillus fermentum* CQPC07 attenuates obesity, inflammation and dyslipidemia by modulating the antioxidant capacity and lipid metabolism in high-fat diet induced obese mice. *Journal of Inflammation*, 18, 5.
258. Xiang H., Sun-Waterhouse D., Waterhouse GIN., Cui C., Ruan Z. 2019. Fermentation-enabled wellness foods: a fresh perspective. *Food Sci Hum Wellness*, 8, 203–43. 10.1016/j.fshw.2019.08.003.
259. Yang C. S., Zhang J., Zhang L., Huang J., Wang Y. Mechanisms of body weight reduction and metabolic syndrome alleviation by tea. 2016. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60, (1), 160–174.
260. Yang M., Zheng J., Zong X., Yang X., Zhang Y., Man C., Jiang Y. 2021. Preventive Effect and Molecular Mechanism of *Lactobacillus rhamnosus* JL1 on Food-Borne Obesity in Mice. *Nutrients*, 13, 3989.
261. Yang W., Liu J., Zhang Q., Liu H., Zhenzhen LV., Zhang Ch., Jiao Z. 2022. Changes in nutritional composition, volatile organic compounds and antioxidant activity of peach

- pulp fermented by lactobacillus. *Food Bioscience*, 49, 101894. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101894>.
262. Yang X., Zhou J., Fan L., Qin Z., Chen Q., Zhao L. 2018. Antioxidant properties of a vegetable-fruit beverage fermented with two *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Science and Biotechnology*, 27, 1719–1726.
  263. Yen G.C., Chen H.Y. 1995. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 27–32.
  264. Yilmaz-Ersan L., Kurdal E. 2014. The Production of set-type-bio-yoghurt with commercial probiotic culture. *International Journal of Chemical Engineering and Application*, 5, 402–408.
  265. Zaki M., Basha W., El-Bassyouni H.T., El-Toukhy S., Hussein T. 2018. Evaluation of DNA damage profile in obese women and its association to risk of metabolic syndrome, polycystic ovary syndrome and recurrent preeclampsia, *Genes and Diseases*, 5, 367–373. doi: 10.1016/j.gendis.2018.03.001.
  266. Zapasnik A., Sokolowska B., Bryla M. 2022. Role of lactic acid bacteria in food preservation and safety. *Foods*, 11.
  267. Zheng Y., Yu C., Cheng Y.-S., Zhang R., Jenkins B., VanderGheynst J.S. 2011. Effects of ensilage on storage and enzymatic degradability of sugar beet pulp. *Bioresource Technology*, 102, 1489-1495.
  268. Zisman A., Peroni O.D., Abel E.D., Michael M.D., Mauvais-Jarvis F., Lowell B.B., Wojtaszewski J.F., Hirshman M.F., Virkamaki A., Goodyear L.J. Kahn C.R., Kahn B.B. 2000. Targeted Disruption of the Glucose Transporter 4 Selectively in Muscle Causes Insulin Resistance and Glucose Intolerance. *Nature Medicine*, 6, 924–928.
  269. Zuk PA., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell JW., Katz AJ., Benhaim P., Lorenz HP., Hedrick MH. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7, 211–228. doi: 10.1089/107632701300062859.
  270. Zulkawi N., Ng K.H., Zamberi N.R., Yeap S.K., Satharasinghe D.A., Tan S.W., Ho W.Y., Abd Rashid N.Y., Md Lazim M.I., Jamaluddin A., Jamaluddin A., Alitheen N.B., Long K. 2018. Antihyperglycemic and anti-inflammatory effects of fermented food paste in high-fat diet and streptozotocin-challenged mice. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 1373–1383, doi: 10.3389/fcimb.2012.00086.

## 9. SPIS TABEL

Tabela 1. Model eksperymentalny .....	35
Tabela 2. Lista przeciwciał użytych do barwień immunofluorescencyjnych .....	37
Tabela 3. Sekwencje starterów użytych w teście qRT- PCR. ....	39
Tabela 4. Sekwencja starterów użytych do analizy ekspresji miRNA w teście qRT- PCR	40
Tabela 5. Zmiany wartości pH fermentowanych wysłodków buraczanych bez udziału szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz laktofermentowanych wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnossus</i> lub <i>Pediococcus acidilactici</i> w odniesieniu do różnic między grupami oraz czasem fermentacji .....	43
Tabela 6. Skład chemiczny fermentowanych wysłodków buraczanych bez udziału szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz laktofermentowanych wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnossus</i> lub <i>Pediococcus acidilactici</i> w odniesieniu do różnic między grupami, a także dniem fermentacji w materiale świeżym (%) .....	45
Tabela 7. Skład chemiczny fermentowanych wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz laktofermentowanych wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnossus</i> lub <i>Pediococcus acidilactici</i> w odniesieniu do różnic między grupami, a także dniem fermentacji w suchej masie (%). ....	46
Tabela 8. Całkowita zawartość polifenoli [mg/100g] oraz aktywność antyoksydacyjna (DPPH, FRAP i ABTS) [mMol TE/100g] w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem <i>Lactobacillus rhamnossus</i> lub <i>Pediococcus acidilactici</i> . ....	48
Tabela 9. Zawartość sacharozy w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem <i>Lactobacillus rhamnossus</i> lub <i>Pediococcus acidilactici</i> (mg/100g). ....	54
Tabela 10. Zawartość kwasów organicznych w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz z w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem <i>Lactobacillus rhamnossus</i> lub <i>Pediococcus acidilactici</i> (%). ....	58

## 10. SPIS WYKRESÓW

Wykres 1. Przedstawienie liniowej zależności zmian pH na przestrzeni czasu fermentacji w biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem <i>Lactobacillus rhamnossus</i> lub <i>Pediococcus acidilactici</i> .....	43
---	----

- Wykres 2. Całkowita zawartość polifenoli w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* w zależności od dnia fermentacji biomasy..... 49
- Wykres 3. Aktywność antyoksydacyjna fermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz laktofermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* oznaczana metodą DPPH w zależności od dnia fermentacji..... 50
- Wykres 4. Aktywność antyoksydacyjna fermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz laktofermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* oznaczana metodą ABTS, w zależności od dnia fermentacji..... 51
- Wykres 5. Aktywność antyoksydacyjna fermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz laktofermentowanej biomasy z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* oznaczana metodą FRAP, w zależności od dnia fermentacji..... 52
- Wykres 6. Zmiany zawartości sacharozy w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* w zależności od dnia fermentacji ..... 54
- Wykres 7. Udział ilościowy i jakościowy węglowodanów w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z dodatkiem szczepów *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* w dniu 0 fermentacji (%). ..... 55
- Wykres 8. Udział ilościowy i jakościowy węglowodanów w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z dodatkiem szczepów *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici* w 6 dniu fermentacji (%). ..... 56
- Wykres 9. Koncentracja kwasu octowego w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici*, pole pod wykresem krzywej (%). ..... 59
- Wykres 10. Koncentracja kwasu mlekowego w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici*, pole pod wykresem krzywej (%). ..... 60
- Wykres 11. Koncentracja kwasu masłowego w fermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomacie z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici*, pole pod wykresem krzywej (%). ..... 61

- Wykres 12. Koncentracja kwasu propionowego w fermentowanej biomase z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepów bakterii probiotycznych (kontrola) oraz w laktofermentowanej biomase z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* lub *Pediococcus acidilactici*, pole pod wykresem krzywej (%)..... 61
- Wykres 13. Ocena cytotoksyczności ekstraktów wysłodków buraczanych w ekstrakcie kontrolnym przed dodaniem szczepów bakterii probiotycznych (LR CTRL) (A), a także laktofermentowanych ekstraktów z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* pobranych w dniach 0 (LR 0') (B), pierwszym (LR1') (C), drugim (LR2') (D), trzecim (LR3') (E) oraz szóstym (LR6') (F)..... 62
- Wykres 14. Ocena cytotoksyczności fermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepu *Lactobacillus rhamnosus* pobranych w dniu 0 (CTRL 0') (A), oraz w dniach trzecim (CTRL 3') (B) i szóstym (CTRL 6') (C) trwania fermentacji..... 63
- Wykres 15. Tempo migracji komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną oraz inkubowanych z ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* pobranymi w dniu 0 (LR0'+T) i 1 (LR1'+T)..... 65
- Wykres 16. Tempo migracji komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną oraz inkubowanych z ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* pobranymi w dniu 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T)..... 66
- Wykres 17. Test CFU-F przedstawiający ilość kolonii składających się z więcej niż 50 komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* pobranych w poszczególnych dniach trwania fermentacji. .... 68
- Wykres 18. Test PDT przedstawiający czas podwojenia populacji w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), oraz traktowanych ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* pobranymi w poszczególnych dniach trwania fermentacji..... 69
- Wykres 19. Względna ekspresja miR - 101 związana z tempem proliferacji w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także miR-101 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B)..... 73
- Wykres 20. Względna ekspresja miR- 17 związanych z tempem proliferacji w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także miR-17 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym

przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B) ..... 74

Wykres 21. Względna ekspresja genu p53 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja p53 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR)(A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B)..... 75

Wykres 22. Względna ekspresja genu p21 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja p21 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B)..... 76

Wykres 23. Histogramy przedstawiające ekspresję genu BAX w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja BAX dla komórek ASC traktowanych ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz ekstraktami bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B) ..... 77

Wykres 24. Histogramy przedstawiające ekspresję genu BAD w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja BAD dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B)..... 78

Wykres 25. Histogramy przedstawiające ekspresję genu BCL2 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja BCL2 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B)..... 79

Wykres 26. Histogramy przedstawiające ekspresję kaspazy-9 (Casp-9) w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja kaspazy-9 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz

fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B) .....	80
Wykres 27. Histogramy przedstawiające ekspresję kaspazy-3 (Casp-3) w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja kaspazy-3 (Casp-3) dla komórek ASC traktowanych ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LR) (A) oraz ekstraktami bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B).....	81
Wykres 28. Przedstawienie procentu żywych komórek (A) oraz martwych komórek (B) dla ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną, a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LR).....	84
Wykres 29. Przedstawienie procentu komórek wczesnej apoptozy (A) oraz późnej apoptozy (B) dla ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną, a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LR).....	84
Wykres 30. Histogramy przedstawiające procent komórek żywych (A) i martwych (B) dla ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LR).....	86
Wykres 31. Histogramy przedstawiające procent komórek zdepolaryzowanych żywych (A) i zdepolaryzowanych martwych (B) dla ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LR).....	87
Wykres 32. Ocena ilościowa komórek SA-β-gal (dodatnich) w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także SA-β-gal dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LR).....	90
Wykres 33. Względna ekspresja genów IL- 1β w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja IL-1 β dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B) .....	92



Wykres 34. Względna ekspresja genów IL- 6 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja IL- 6 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B) ..... 93

Wykres 35. Względna ekspresja genów TNF $\alpha$  w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja TNF $\alpha$  dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B) ..... 94

Wykres 36. Względna ekspresja genów IL- 10 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja IL-10 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B) ..... 95

Wykres 37. Względna ekspresja genów IL-13 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja IL-13 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B) ..... 96

Wykres 38. Względna ekspresja genów IL- 4 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja IL- 4 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B) ..... 97

Wykres 39. Względna ekspresja genów TGF $\beta$  w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja TGF $\beta$  dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B) ..... 98

Wykres 40. Względna ekspresja genów miR-146 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja miR-146 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). ..... 99

Wykres 41. Względna ekspresja genów miR-155 w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja miR-155 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B). ..... 100

Wykres 42. Względna ekspresja genów miR-103 dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja miR-103 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B) ..... 103

Wykres 43. Względna ekspresja genów miR-107 dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja miR-107 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B) ..... 104

Wykres 44. Względna ekspresja genów miR-130 dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja miR-130 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B) ..... 105

Wykres 45. Przedstawienie relatywnej ekspresji markerów insulinoporności GLUT4 dla hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja GLUT4 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B)..... 106

Wykres 46. Przedstawienie relatywnej ekspresji markerów insulinoporności INSR dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja INSR dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B)..... 107

Wykres 47. Przedstawienie relatywnej ekspresji markera insulinoporności IRS dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja IRS dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B)..... 108

Wykres 48. Przedstawienie relatywnej ekspresji genów przeciwoksydacyjnych CAT dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja CAT dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez dodatku szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B)..... 109

Wykres 49. Przedstawienie relatywnej ekspresji genów SOD1 dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja SOD1 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B)..... 110

Wykres 50. Przedstawienie relatywnej ekspresji genów przeciwoksydacyjnych SOD2 dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) i traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja SOD2 dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału mikroorganizmów (CTRL') (B)..... 111

Wykres 51. Przedstawienie relatywnej ekspresji genów przeciwoksydacyjnych GPX dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) dla obu grup doświadczalnych, a także ekspresja GPX dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) (A) oraz fermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych bez udziału szczepu bakterii probiotycznych (CTRL') (B)..... 112

Wykres 52. Średnie odsetki wszystkich komórek ROS+ (A) oraz ROS- (B) w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) oraz traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR)..... 113

## 11. SPIS RYCIN

Rycina 1. Przedstawienie graficzne tempa migracji komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniu 0 (LR0'+T) i 1 (LR1'+T). Czarne pionowe linie ukazują brzeg blizny, podczas gdy strzałki pokazują zbieg blizny..... 65

Rycina 2. Przedstawienie graficzne tempa migracji komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniu w dniu 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T). Czarne pionowe linie ukazują brzeg blizny, podczas gdy strzałki pokazują zbieg blizny. .... 66

Rycina 3. Wizualizacja CFU-F wybarwionych pararozaniliną w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniu 0 (LR0'+T) oraz 1 (LR1'+T). .... 67

Rycina 4. Wizualizacja CFU-F wybarwionych pararozaniliną w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniu 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T)..... 67

Rycina 5. Reprezentatywne obrazy barwienia immunofluorescencyjnego dla markera Ki-67 (czerwony) i jąder (niebieski) w komórkach hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniach 0 (LR0'+T) oraz 1 (LR1'+T). .... 70

Rycina 6. Reprezentatywne obrazy barwienia immunofluorescencyjnego dla markera Ki-67 (czerwony) i jąder (niebieski) w komórkach hodowanych z medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z udziałem *Lactobacillus rhamnosus* pobranymi w dniach 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T). .... 70

Rycina 7. Reprezentatywne fotografie przedstawiające morfologie komórek ASC: jąder komórkowych (DAPI) (niebieski), cytoszkieletu aktynowego (faloidyna) (zielony), mitochondriów (MitoRed) (czerwony) hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu probiotycznego (CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> pobranymi w dniu 0 (LR0'+T) oraz 1 (LR1'+T).....	71
Rycina 8. Reprezentatywne fotografie przedstawiające morfologie komórek ASC: jąder komórkowych (DAPI) (niebieski), cytoszkieletu aktynowego (faloidyna) (zielony), mitochondriów (MitoRed) (czerwony) hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> pobranymi w dniach 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T).....	72
Rycina 9. Reprezentatywne obrazy przedstawiające wizualizacje aktywnej kaspazy-3 w komórkach ASC pod wpływem hodowania komórek ASC w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem przed dodaniem szczepów bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> pobranymi w dniach 0 (LR0'+T) oraz 1 (LR1'+T).....	82
Rycina 10. Reprezentatywne obrazy przedstawiające wizualizacje aktywnej kaspazy-3 w komórkach ASC pod wpływem hodowania komórek ASC w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), ekstraktem przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> pobranymi w dniach 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR'+T).....	82
Rycina 11. Reprezentatywne wykresy pozyskane z Muse Cell Analyzer dla testu Aneksyna V dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną, ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LR).....	85
Rycina 12. Obrazy pozyskane Muse Cell Analyzer przedstawiające procent żywych i martwych zdepolaryzowanych komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną, ekstraktem kontrolnym (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LR).....	87
Rycina 13. Reprezentatywne obrazy pokazujące uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL) traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL+T) oraz laktofermentowanych ekstraktów z wysłodków buraczanych z dodatkiem <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LR) pobranymi w dniach 0 (LR0'+T) i 1 (LR1'+T).....	89
Rycina 14. Reprezentatywne zdjęcia pokazujące uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytoplazmy ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną	

(TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniach 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T).  
..... 89

Rycina 15. Reprezentatywne obrazy testu SA- $\beta$ -gal związanego ze starzeniem się komórek dla komórek ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także SA- $\beta$ -gal dla komórek ASC traktowanych ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepów (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR). ..... 91

Rycina 16. Reprezentatywne obrazy przedstawiające wizualizację poziomu interleukiny 1 $\beta$  w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniach 0 (LR0'+T) i 1 (LR1'+T). ..... 101

Rycina 17. Reprezentatywne obrazy przedstawiające wizualizacje poziomu interleukiny 1 $\beta$  w komórkach ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu bakterii probiotycznych (LR CTRL'+T) oraz laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR) pobranymi w dniach 2 (LR2'+T), 3 (LR3'+T) oraz 6 (LR6'+T).  
..... 102

Rycina 18. Wykresy punktowe dla wewnątrzkomórkowej produkcji ROS wykryte przez barwienie fluorescencyjne dihydroetydyną (DHE) dla ASC hodowanych w medium pełnym (CTRL), traktowanych tunikamycyną (TUN), a także ekstraktem kontrolnym przed dodaniem szczepu probiotycznych (LR CTRL'+T) i laktofermentowanymi ekstraktami z wysłodków buraczanych z dodatkiem *Lactobacillus rhamnosus* (LR). ..... 113