

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Adheze probiotických mikroorganismů na buňky střevní mukózy

Bakalářská práce

Autor práce: Kristýna Panenková

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci Adheze probiotických mikroorganismů na buňky střevní mukózy jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. 4. 2014

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za vedení práce, a také Ing. Ivo Doskočilovi za jeho cenné rady a odborný dohled.

Souhrn

Probiotické bakterie jsou běžnou součástí střevního mikrobiomu, který dále tvoří další aerobní i anaerobní bakterie, houby, viry a další mikroorganismy. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které mají pozitivní efekt pro hostitele a mohou chránit organismus před patogeny a efektivně chránit střevní sliznici. Pro funkčnost probiotik je třeba, aby byla schopna překonat biologické bariéry, jako je kyselina chlorovodíková, žluč, nebo pankreatické a střevní šťávy. Jednotlivé kmeny jsou na tyto podmínky rozdílně adaptované, a proto se také jejich pozitivní účinky na hostitele různí. Místem hlavního účinku je střevní sliznice, kde probiotika adherují a kompetují s patogeny o vazebná místa. V boji proti patogenům využívají probiotika i dalších svých schopností. Jsou schopna například snižovat hodnotu pH ve střevě, produkovat baktericidní látky, nebo vázat a metabolizovat toxické metabolity. Schopnost probiotik adherovat na střevní epitelální buňky se u jednotlivých kmenů výrazně liší. Probiotika jsou užívána jako doplňky stravy, nebo jako součást fermentovaných mléčných výrobků. Mezi nejvyužívanější kmeny řadíme *Lactobacillus spp.* a *Bifidobacterium*. Účinky probiotik ale nejsou omezeny pouze na gastrointestinální trakt. Jsou užívána také například v rámci léčby urogenitálních infekcí, nebo alergií. Některé studie naznačují, že by také mohla hrát roli v prevenci karcinogenní aktivity.

Směsná kultura epitelových buněk Caco-2 a HT29-MTX představuje dva hlavní typy buněk (absorpční a pohárkové) nalezené v epitelu tenkého střeva. Na buňkách Caco-2, HT-29 a HT29-MTX a jejich směsných kulturách kultivovaných *in vitro* byla testována adheze vybraných kmenů probiotických bakterií. Cílem bylo dospět k buněčnému poměru s co nejlepší schopností adherence bifidobakterií a laktobacilů a zároveň s co nejvyšší odolností proti mechanickému poškození během kultivace buněk. Testovány byly celkem tři kmeny bifidobakterií (*B. animalis ssp. lactis*, *B. bifidum* a *B. longum ssp. suis*) a jeden kmen laktobacilu (*L. Fructivorans*).

Na jednotlivých liniích nejlépe adherovaly bifidobakterie *B. bifidum*, v průměru 17,63 % na HT-29 a 25,88 % bakterií na Caco-2. Vyšší adheze bakterií na buňky Caco-2 naznačuje, že pro vyšší adhezi bakterií u směsných jednotek budou Caco-2 ve větším zastoupení oproti HT29-MTX. Jako nejvhodnější se ukázal poměr 10 : 90 HT29-MTX/Caco-2.

Klíčová slova: adheze, HT-29 MTX, Caco-2, probiotika, bifidobakterie, laktobacily

Summary

Probiotic bacteria are common part of intestinal microbiome, which is created together with another aerobic and anaerobic bacteria, fungus, viruses and another microorganisms. It's defined as live microorganisms, that have positive effect for host and can protect organism from pathogens and effectively protect intestinal mucosa. For the function of probiotic it's needed for them to be able overcome biologic barriers, like hydrochloric acid, bile, or pancreatic and intestinal juices. Single strains are differently adapted to these conditions, and that's why it's positive effects for host vary. The place of the main effect is intestinal mucosa where probiotics adhere and compete with pathogens for binding sites. In the fight against pathogens, probiotics use their other abilities. It's for example able to lower pH value in intestines, produce bactericidal substances or bind and metabolize toxic metabolites. The ability of probiotics to adhere on intestinal epithelial cells is quite variable. Probiotics are used as dietary supplement, or as a part of fermented milk products. The most frequently used strains are *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Effects of probiotics are not limited to only gastrointestinal tract. It's also used as a part of medical treatment of urogenital infections or allergies, for example. Some studies show, that it could also be a part of prevention of carcinogenic activity.

Mixed culture of epithelial Caco-2 and HT29-MTX represents two main types of cells (absorptive and goblet) found in epithelium of small intestine. Adhesion of selected strains of probiotic bacteria was tested on the Caco-2, HT-29 and HT29-MTX cells and its mixed cultures cultivated *in vitro*. The aim was to reach to cell ratio with the best ability to adhere bifidobacteria and lactobacilli and simultaneously with the most resistance against mechanical damage while the cell cultivation. Three bifidobacterial strains were tested (*B. animalis ssp. lactis*, *B. bifidum* and *B. longum ssp. suis*) and one strain of lactobacillus (*L. Fructivorans*).

On single lines best adhered bacteria *B. bifidum*, at average 17,63% on HT-29 and 25,88% bacteria on Caco-2. Higher adhesion of bacteria on Caco-2 cells indicate, that for higher bacterial adhesion of mixed units will the Caco-2 in higher representation compared to HT29-MTX. As the best ratio of HT29-MTX/Caco-2 appeared 10 : 90.

Keywords: adhesion, HT-29 MTX, Caco-2, probiotics, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*

1. Obsah

1	Úvod	7
2	Cíl práce.....	8
3	Literární přehled	9
3.1	Probiotické organismy	9
3.2	Probiotické kmeny	11
3.3	Probiotické vlastnosti	12
3.4	Účel probiotik v organismu.....	13
3.5	Užívání probiotik	13
3.6	Prebiotické organismy.....	14
3.7	Symbiotika	15
3.8	Buňky střevní mukosy.....	16
3.8.1	Caco-2	17
3.8.2	HT-29.....	18
3.9	Mucin	18
3.10	Adherence	19
3.10.1	Faktory ovlivňující adhezi	21
4	Materiál a metody.....	22
4.1	Materiál	22
4.1.1	Složení DMEM media	22
4.2	Metodika	23
4.2.1	Kultivace tkání	23
4.2.2	Selekce HT29-MTX	23
4.2.3	Založení 24jamkové destičky	23
4.2.4	Adheze bakterií	24
5	Výsledky.....	25
6	Diskuse	27
7	Závěr.....	33
8	Použitá literatura.....	34
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	39
10	Seznam použitých obrázků a tabulek	41

1 Úvod

V současné době jsme prostřednictvím reklamy neustále pod tlakem výrobců různých potravin a potravinových doplňků, kde je neustále zdůrazňován pozitivní efekt probiotických organismů na lidské zdraví. Fakt, že probiotické organismy jsou prospěšné pro lidský organismus, je nepopíratelný, avšak efekt jednotlivých potravin a potravinových doplňků je rozporuplný, jak už to v komerčním světě bývá.

Pro správné působení a využití probiotik pocházejících z potravin je důležitá jejich schopnost adherovat na epitel střeva. V případě, kdy jsou vazebná místa na distální části mikrokřků obsazena adherovanými bifidobakteriemi nebo laktobacily, nejsou už tato místa volná pro adhezi patogenních mikroorganismů, jako je *E. coli* a jiné. V důsledku toho může dojít ke snížení výskytu různých průjmových onemocnění a je podpořena imunita a tím i celkové zdraví člověka.

Adherence je tedy základním předpokladem pro posouzení zdravotní prospěšnosti vybraného kmene probiotik. Stupeň adheze lze jistit pomocí *in vitro* a *in vivo* testů. *In vivo* testy jsou náročné, vzhledem k potřebě velkého počtu zkoumaných jedinců. Na rozdíl od *in vitro* testů, kde je posuzován zejména vliv různé potravy na množení probiotik.

2 Cíl práce

Cílem práce je vyvinout *in cellulo* metodu pro selekci kmenů probiotických mikroorganismů schopných adherovat na kultivované buňky střevního epitelu. Schopnost adheze je jednou ze základních probiotických vlastností mikroorganismu. S pomocí vyvinuté metody bude otestováno několik kmenů sbírky mikroorganismů KMVD.

3 Literární přehled

3.1 Probiotické organismy

Počátek pozorování pozitivního vlivu některých bakterií je připisován Metchnikoffově průkopnické práci z počátku roku 1900. V té navrhl, že tyto prospěšné bakterie mohou být podávány s cílem nahrazovat škodlivé mikroorganismy za prospěšné. Samotný termín probiotika, odvozený z řeckého jazyka a znamenající „pro život“ byl ale poprvé použit až v roce 1960 v práci Lilly and Stillwell, kteří probiotika popsali jako „jedním mikroorganismem vylučovanou látku, která stimuluje růst látky jiné“, tedy jako kontrast k termínu antibiotikum (Schrezenmeier and de Vrese, 2001).

Nejčastěji jsou probiotické organismy definované jako bakterie, které po požití mohou působit na vývoj a udržení zdravého střevního mikrobiomu a jeho funkcí. Také ovlivňují vrozené imunitní reakce jedince a podílí se na zlepšení trávení potravin. Každý jedinec si pěstuje svou unikátní střevní mikroflóru, od ostatních se lišící poměrem těchto bakterií a zastoupením jednotlivých druhů (Stone et al., 2013). Mikrobiom gastrointestinálního traktu představuje nejsložitější ekosystém v lidském těle a tvoří úzce spojenou jednotku s hostitelem (Candela et al., 2008). Střevní mikrobiom je tvořen z aerobních a anaerobních bakterií, virů, hub a dalších mikroorganismů. Metody sekvenční analýzy ribozomální DNA a RNA ukazují, že počet mikrobiálních kmenů obsažených ve střevní mikroflóře může dosahovat celkového počtu až 40 000 kmenů. Střevní mikrobiom obsahuje 10× více buněk, než je buněk v lidském organismu, a 100× více genů, než je obsaženo v celém lidském genomu. Složení mikroflóry střevního traktu je rozdílné podle lokalizace (tab. 1). Všechny tyto mikroorganismy slouží společně s imunitním slizničním systémem k ochraně organismu hostitele (Lata and Juránková, 2011).

Tab. 1: Složení mikroflóry lidského GIT

Mikroorganismy	Počty mikroorganismů (kolonie tvořící jednotky - cfu/g)			
	Žaludek	Jejunum	Ileum	Kolon
Celkový počet bakterií	0-10 ³	0-10 ⁵	10 ³ -10 ⁹	10 ¹⁰ -10 ¹²
Aerobní bakterie				
Čeď <i>Enterobacteriaceae</i>	0-10 ²	0-10 ³	10 ² -10 ⁷	10 ⁴ -10 ¹⁰
Streptokoky	0-10 ³	0-10 ⁴	10 ² -10 ⁶	10 ⁵ -10 ¹⁰
Stafylokoky	0-10 ²	0-10 ³	10 ² -10 ⁵	10 ⁴ -10 ⁹
Laktobacily	0-10 ³	0-10 ⁴	10 ² -10 ³	10 ⁶ -10 ¹⁰
Kvasinky	0-10 ³	0-10 ²	10 ² -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁶
Anaerobní bakterie				
Bakteroidy	Vzácné	0-10 ³	10 ³ -10 ⁷	10 ¹⁰ -10 ¹²
Bifidobakterie	Vzácné	0-10 ⁴	10 ³ -10 ⁹	10 ⁴ -10 ¹¹
Peptostreptokoky	Vzácné	0-10 ³	10 ² -10 ⁶	10 ¹⁰ -10 ¹²
Klostridia	Vzácné	Vzácné	10 ² -10 ⁴	10 ⁶ -10 ¹¹
Eubakterie	Vzácné	Vzácné	Vzácné	10 ¹⁰ -10 ¹²

(Lata and Juránková, 2011)

Lidská střevní mikroflóra hraje klíčovou roli v lidské výživě a zdraví tím, že podporuje přísun živin, dále podporuje prevenci kolonizace, formování patogenů a udržuje normální slizniční imunitu. Vyčerpání individuální mikrobiální flóry může mít za následek vyšší náchylnost k infekci enteropatogenními bakteriemi, jako je *Salmonella*, *Shigella*, enterotoxigenní *E. coli* nebo *Vibrio cholerae* (de Vrese and Marteau, 2007). Aby se toto riziko snížilo, doporučuje se užívání potravinových doplňků s obsahem probiotických bakterií (Candela et al., 2008). Účinek probiotik je přísně omezen na jeden definovaný kmen a nemůže být zobecňován pro více kmenů (Seksik et al., 2008).

Probiotika mají potencionální zdravotní přínos v případě zhoršeného zdravotního stavu, jako je gastrointestinální infekce, urogenitální infekce, alergie a některé střevní poruchy, kterými trpí značná část světové populace (Senok et al., 2005). Řada výzkumů, založených především na zvířecích modelech *in vitro*, prokázala široký rozsah možných mechanismů, kterými by probiotika mohla hrát roli v prevenci kolorektálního karcinomu (Chong, 2014). Například Pala et al. (2011) zveřejnili studii, kde byl navrhován jogurt a další fermentované výrobky jako součást prevence proti kolorektálnímu karcinomu. Výsledky ukázaly, že vysoký příjem jogurtu je významně spojený se snížením rizika onemocnění kolorektálního karcinomu, což naznačuje, že jogurt a probiotika v něm obsažená, by měl být významnou součástí stravy.

Blahodárné účinky probiotik jako farmaceutických prostředků jsou závislé na užitém kmenu a včasné introdukci. Kombinace vybraných probiotických kmenů se ukázala být účinnější, než užití jednoho samostatného kmenu. Vykazuje totiž vyšší profylaktické účinky (Sarkar, 2013).

Mnoho probiotických produktů je rutinně užíváno zcela zdravými jedinci. Na trh je také uváděno velké množství probiotických doplňků stravy, jako jsou acidofilní mléka, probiotické kapsle nebo kapky, zaměřených právě na zdravé jedince. Tvrzení, že pravidelné užívání těchto výrobků přispěje ke zdravému životnímu stylu a dlouhodobě snižuje riziko vzniku chronických gastrointestinálních, respiračních nebo srdečních obtíží, přivedlo k jejich pravidelné konzumaci mnoho lidí. Nicméně neexistují žádné studie, které by tvrdily, že dlouhodobé užívání probiotik pomáhá udržovat dobrý zdravotní stav, potvrzovaly (Senok et al., 2005).

3.2 Probiotické kmeny

Použití exogenních probiotik jako je *Lactobacillus spp.* a *Bifidobacterium spp.* bylo navrženo jako způsob, jak posílit obranu sliznice, a to zejména u tenkého střeva, orgánu poměrně málo kolonizovaném oproti tlustému střevu. V souvislosti s tím bylo zjištěno, že *L. johnsonii* La1 a *L. casei* GG mají u buněčných i zvířecích modelů antipatogenní účinky (Granato et al., 1999). Kmeny používané v probiotických produktech jsou zaznamenány v tabulce 2. Obecně jsou ale v současné době pro výrobu probiotik nejvíce využívány kmeny rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Chen et al. 2013). Na trh byly ale jako probiotika uváděny i další kmeny jako je *Escherichia*, *Enterococcus* a *Saccharomyces* a to i přes to, že přetrvávají obavy, pokud jde o bezpečnost používání těchto organismů pro tento účel (Senok et al., 2005).

Specifické kmeny probiotických mikroorganismů mohou znamenat pro hostitele zdravotní výhody. Nicméně tyto účinky nelze extrapolovat na jiné kmeny, protože jsou pro daný kmen specifické (Senok et al., 2005).

Tab. 2: Mikroorganismy používané v probiotických produktech

Kmeny Laktobacilů	Kmeny Bifidobakterií	Ostatní Bakterie mléčného kvašení (LAB)	Jiné než LAB
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecalis</i> ^a	<i>Bacillus cereu</i> ^{a,d}
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> ^d
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactoc. lactis</i> ^c	
<i>L. gallinarum</i> ^a	<i>B. breve</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i> ^c	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ^{ad}
<i>L. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Ped. acidilactici</i> ^c	
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i> ^b	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ^a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^d
(<i>L. paracasei</i>)	<i>B. longum</i>	<i>Strep. thermophilus</i>	
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

^a Používané především u zvířat; ^b Pravděpodobně shodné s *B. animalis*; ^c Málo známé probiotické vlastnosti; ^d především farmaceutické prostředky

(Holzapfel et al. 1998)

3.3 Probiotické vlastnosti

Vybrané kmeny probiotik by měly být schopny překonat biologické bariéry jako je kyselina chlorovodíková v žaludku nebo žluč v tenkém střevě, dosáhnout místa působení s cílem uplatnit své zdraví prospěšné účinky, a jejich bezpečnost a účinnost musí být prokázána u každého kmene a v každém výrobku. Aby se projevíly léčebné účinky, musí být kromě toho k dispozici dostatečné množství životaschopných mikroorganismů po celou dobu použitelnosti přípravku (Chen et al., 2013).

Collins and Gibson (1999) doplňují sedm klíčových vlastností, které hodnotí efektivitu probiotik:

- 1) měla by mít pozitivní efekt na hostitele
- 2) neměla by být patogenní ani toxická
- 3) měla by obsahovat velké množství životaschopných buněk
- 4) měla být schopná metabolismu a přežití ve střevě
- 5) měla by zůstat životaschopná během skladování i během spotřeby
- 6) měla by mít dobré senzorycké vlastnosti
- 7) měla by být izolována ze stejného druhu jako je hostitel, pro kterého jsou určena

3.4 Účel probiotik v organismu

Probiotika nejen, že stimulují růst zdravých bakterií jako jsou bifidobakterie a laktobacily ve střevě, ale také zvyšují odolnost proti patogenům (Panesar et al., 2013). Adheze probiotik na hostitelské střevní buňky může být důležitým předpokladem pro imunomodulační účinky probiotik a díky kompetici probiotických bakterií s patogeny o místa přichycení mají i podíl na vylučování patogenů (Gleisner et al., 2012).

Podle Mombelli and Gismondo (2000) mohou být probiotika alternativou, nebo doplňkem při léčbě antibiotiky. Rovnováha mezi prospěšnými a potenciálně patogenními mikroorganismy je v lidském těle velmi křehká a za určitých podmínek, zvláště při užívání antibiotik, je tato přirozená rovnováha narušena zvýšeným množstvím potencionálních patogenů nebo zvýšenou virulencí. Bylo prokázáno, že mnoho kmenů probiotických mikroorganismů dokáže inhibovat růst, adhezi na střevní buňky a metabolickou aktivitu enteropatogenních bakterií, jako je *Salmonella*, *Shigella*, enterotoxigenní *E. coli* nebo *Vibrio cholerae* (de Vrese and Marteau, 2007).

Mechanismem účinku probiotických mikroorganismů na tyto patogeny je například snižování hodnoty pH ve střevě, produkce baktericidních látek, jako jsou organické kyseliny (kyselina mléčná, kyselina octová, kyselina máselná), peroxid vodíku a bakteriociny, aglutinace patogenních mikroorganismů, adherence na buněčný povrch sliznice, kompetice o zkvasitelné substráty nebo receptory, posílený bariérový efekt na střevní sliznici, metabolity chránící střevo (arginin, glutamin, mastné kyseliny s krátkým řetězcem, nebo konjugované linolové kyseliny), vazba toxických metabolitů a jejich metabolismus, imunologické mechanismy, nebo regulace střevní motility a produkce hlenu (de Vrese and Marteau, 2007).

3.5 Užívání probiotik

Pro podání probiotik existují různé způsoby. Perorální podání ve formě potravin nebo farmaceutik je nejobvyklejší. Oproti perorálnímu podání má ale mnohé výhody užití rektální terapie. Příkladem jejich výhod může být pestřejší výběr mikroorganismů, které nemusí být pH rezistentní a navíc mohou být využity nebo uloženy v místě působení v případě střevních poruch. Vaginální podání probiotik je využíváno v prevenci nebo léčbě bakteriální vaginózy, nebo při recidivujících infekcích močových cest u žen (Mombelli and Gismondo, 2000).

Probiotika jsou užívána buď jako lyofilizované výrobky, kde je zastoupený jediný kmen nebo kombinace různých kmenů, případně jako geneticky modifikovaná probiotika (Seksik et al., 2008). V potravinách jsou probiotika ve dvou základních formách – suspendovaná v mléce, nebo ve fermentovaných mléčných výrobcích. Tyto produkty mohou poskytnout ochranné prostředí pro mikroorganismy a zvýšit procento jejich přežití, nicméně z výsledků studie podle Ouwehand et al. (2001) vyplývá, že například mléko může také výrazným způsobem snížit schopnost adheze jinak dobře adherujících kmenů. Adhezi výrazně snižuje zejména mléko, které obsahuje větší množství tuku. Probiotika jsou obecně u většiny lidí dobře snášena. Ve výjimečných případech se ale u jednotlivců může objevit průjem nebo zácpa, zvracení, flatulence, bolesti břicha a nevolnost. Při podávání probiotik citlivějším jedincům, včetně imunosupresivních jednotlivců a novorozenců je proto nutná zvýšená opatrnost. Stejně jako vitaminy je mnoho druhů probiotik uváděno na trh bez nutného předpisu a přes obchody se zdravou výživou. Některé přípravky jsou kontrolovány a testovány lépe než ostatní. Na rozdíl od vitaminů jsou ale probiotika živé organismy a jejich účinnost závisí na jejich životaschopnosti. Ve výsledku se tedy jejich účinnost v organismu může lišit s ohledem na použitou směs kmenů, zpracování, skladování nebo podle způsobu podání (Stone et al., 2013).

3.6 Prebiotické organismy

Prebiotika jsou, podle práce Gibson and Roberfroid (1995), nestravitelné složky potravy, které příznivě ovlivňují hostitele selektivní stimulací růstu a aktivity omezeného počtu bakteriálních druhů obývajících lidské střevo. Tato kritéria ovšem splňují pouze některé nestravitelné, ale zkvasitelné oligosacharidy jako je inulin, laktulóza nebo některé oligosacharidy. Prebiotika proto byla Gibson et al. (2004) předefinována na selektivně fermentované složky potravy, které umožňují specifické změny, a to jak ve složení, tak v činnosti gastrointestinální mikroflóry, znamenající příznivý vliv na pohodu a zdraví hostitele. Podle těchto autorů splňují kritéria pro zařazení do probiotik pouze dva nestravitelné oligosacharidy:

- 1) inulin a fruktany inulinového typu, vyrobené částečnou hydrolyzou inulinu nebo synteticky z monomerů
- 2) (trans-) galaktooligosacharidy (de Vrese and Marteau, 2007).

Podle Collins and Gibson (1999) je pro kvalifikaci jednotlivých složek potravin jako prebiotikum, nutné splňovat tyto následující podmínky:

- nesmí být ani hydrolyzovány, ani absorbovány v horní části gastrointestinálního traktu,
- musí být selektivním substrátem pro omezený počet potenciálně prospěšných komensálních bakterií tlustého střeva a podněcovat jejich růst a mikrobiální aktivitu,
- na základě toho musí být schopné zlepšit složení střevní mikroflóry.

Obecně jsou mezi prebiotika řazeny nestravitelné oligosacharidy, zejména pak fruktooligosacharidy. Bylo prokázáno, že stimulují růst endogenních bifidobakterií a také tyto prebiotika, s největší pravděpodobností pomocí fermentovaných produktů, modulují metabolismus lipidů (Gibson and Roberfroid, 1995). Kromě toho působí také jako vláknina, náhražka cukru, po převedení na mastné kyseliny s krátkým řetězcem také jako zdroj energie pro střevní buňky, nebo jako stimulant imunitních systémů (Panesar et al., 2013).

Hlavní charakteristikou prebiotik je odolnost proti trávicím enzymům v lidském střevě, schopnost kvašení díky střevní mikroflóře tlustého střeva a bifidogenní a pH snižující účinky. Snižením pH prebiotika inhibují některé kmeny potenciálně patogenních bakterií, zejména *Clostridium*, a zabraňují tím průjmům (de Vrese and Marteau, 2007).

3.7 Symbiotika

Další možností v řízení střevní mikroflóry je užití symbiotik, tedy kombinaci probiotik a prebiotik. Živé mikrobiální doplňky – probiotika mohou být použity ve spojení s vhodným substrátem – prebiotiky (Collins and Gibson, 1999). Kombinace probiotik a prebiotik má synergický účinek. Podporují růst stávajících kmenů probiotických bakterií v tlustém střevě a také působí na zlepšení přežití, implantaci a růst kmenů nových (Liong, 2008).

Symbiotická kombinace inulinu a oligofruktózy s *L. plantarum* a *L. bifidum* zvyšuje růst bifidobakterií, ale hlavně potlačuje pro člověka patogenní kmeny jako je *Campylobacter jejuni*, *E. coli* a *Salmonella enteritidis in vitro* než jakékoliv jiné testované sacharidy (de Vrese and Marteau, 2007). Příkladem symbiotik mohou být fruktooligosacharidy ve spojení s bifidobakteriálním kmenem nebo laktitol v kombinaci s laktobacily. Tato kombinace by mohla zlepšit přežití probiotických organismů, protože je zde přímo k dispozici vhodný

substrát pro jeho fermentaci (Collins and Gibson, 1999). Pro správnou funkčnost symbiotických kombinací je nezbytná adherence jednotlivých kmenů na střevní epitelální buňky (de Vrese and Marteau, 2007).

3.8 Buňky střevní mukosy

Sliznice střeva je už od narození vystavována vnějšímu prostředí a hraje zásadní roli v absorpci a metabolismu živin, léčiv a jiných látek procházejících střevním lumenem. Ve struktuře sliznice tenkého a tlustého střeva existují kvalitativní i kvantitativní rozdíly (Quaroni and Hochman, 1996).

Stěna střeva má laminární strukturu, na vnitřní straně sliznice střeva je tenká, silně zvlněná vrstva epitelových buněk – enterocytů. Ty jsou pokryty střevními klky (Grajek and Olejnik, 2004). Největší klky nalezneme v distálním duodenu a proximálním jejunu, jejich velikost se směrem k ileocekálnímu ventilu zmenšuje. Vnější vrstva sliznice střeva se skládá z vrstvy buněk hladké svaloviny, případně se podílejí na pohybu klků (Quaroni and Hochman, 1996).

Vrchní část buněčné membrány vnitřní strany střeva tvoří kartáčový lem, který je složený z četných, 1 μm dlouhých mikroklků. Díky kartáčovému lemu se povrch střeva zvětší 20 – 30 \times . Jeden čtvereční milimetr střevní sliznice může pokrývat až 200 milionů mikroklků (Grajek and Olejnik, 2004).

Enterocyty obklopuje silná ochranná vrstva – glykokalyx, složený z glykoproteinů a polysacharidů. V glykokalyxu se také shromažďuje velké množství enzymů, vyloučených enterocyty. Patří mezi ně oligo-1,6-glukosidázy, glukoamyláza, sacharázy, laktáza, maltáza, enterokináza a střevní lipázy (Grajek and Olejnik, 2004).

Epitelové buňky exprimují také jak povrchové, tak intracelulární receptory, které mohou snímat bakteriální a virové komponenty a umožňují tak reagovat na tyto složky produkcí látek, pomáhajících zachovávat epitelovou integritu. Nejdůležitější z těchto látek jsou TLR receptory, které jsou schopné aktivovat buněčnou odpověď na možné nebezpečí (Boirivant and Strober, 2007).

Charakteristickým znakem epiteliální buňky je polární struktura s oddělenou basolaterální a apikální částí. Tvar buňky je válcovitý a podlouhlý, s jádrem umístěným ve spodní části. Enterocyty se tvoří v kryptách mezi klky, na které se posléze přemísťují a diferencují se. Životnost enterocytu se uvádí okolo 2 - 5 dní, poškozený enterocyt dokáže zregenerovat za pouhých 20 minut (Grajek and Olejnik, 2004).

Ko-kultury Caco-2 a HT29-MTX představují dva hlavní typy buněk (absorpční a pohárkové) nalezené v epitelu tenkého střeva (Mahler et al., 2009).

3.8.1 Caco-2

Z modelů buněčných kultur je nejlépe popsána a nejčastěji používaná buněčná linie Caco-2 (Hilgendorf et al., 1999). Byla izolována z kolorektálního karcinomu 72letého muže kavkazského původu. Tato buněčná linie je schopna růst adherentně na pevných površích a mikroporézních (Grajek and Olejnik, 2004). Buněčné linie Caco-2 jsou využívány *in vitro* jako model lidských střevních epiteliálních buněk, a to díky jejich funkční i fyzické podobnosti (Wong and Ustunol, 2006). Pěstované *in vitro*, za standardních kultivačních podmínek a v nepřítomnosti induktorů diferenciace, spontánně vykazují znaky strukturální a funkční diferenciace a polarizace (Pinto et al., 1983) a mezi sebou tvoří těsné spoje, čímž se podobají normálním střevním epiteliálním buňkám. Na hranici mikroklků také vykazují struktury připomínající kartáčový lem podobnost (Wong and Ustunol, 2006).

Od ostatních buněčných linií stejného původu se liší tím, že se za obvyklých podmínek buněčné kultivace po 2 – 3 týdnech spontánně diferencuje do monovrstev polarizovaných buněk, jejichž struktura je typická pro enterocyty, s jádrem nacházejícím se v bazální části, s hustým zastoupením mitochondrií a s kartáčovým lemem v apikální části. Díky tomuto typu konstrukce jsou Caco-2 buněčné linie využívány jako model linie enterocytů v *in cellulo* kulturách (Artursson and Karlsson, 1991; Grajek and Olejnik, 2004).

3.8.2 HT-29

Do sbírky tkáňových kultur patří také HT-29, která byla izolována od 44leté ženy kavkazského původu a stejně jako Caco-2 byla izolována z adenokarcinomu tkáně tlustého střeva. V *in cellulo* kulturách je jeho morfologie typická pro epitelové buňky, avšak netvoří kartáčový lem. Velká část buněčné populace HT-29 je tvořena pohárkovými buňkami, tudíž produkuje velké množství mucinu. Jejich struktura zahrnuje mikrokilky, fylamenta, silně vakuolizované mitochondrie, endoplazmatické retikulum s volnými ribozomy, kapénky lipidů a velké množství lysozomů (Grajek and Olejnik, 2004).

Expresí mucinu byla analyzována, ve vztahu k buněčnému růstu, v rodičovských HT-29 a ve dvou populacích hlen-sekretujících HT-29, vybraných podle adaptace na methotrexat (HT29-MTX), nebo adaptace na 5-fluorouracil (HT29-FU). Tyto dvě populace exprimují zralé muciny, lišící se v jejich imunoreaktivitě na protilátky proti žaludečním mucinům (HT29-MTX) a mucinům tlustého střeva (HT29-FU) (Lesuffleur et al., 1993).

Buňky HT-29, HT29-MTX a HT29-FU vykazují rozdílné vzory mucinů genové exprese MUC1-MUC5. HT29-MTX jsou rezistentní vůči methotrexatu a produkují velké množství mucinu. Od parentálních buněk HT-29 se liší v mnoha směrech. Mají nižší obsah hydroxy-aminokyselin a prolinu a vyšší poměr GlcNAc/GalNAc, dále se liší nižším obsahem kyseliny sialové a vyšším obsahem síranu. Hlavními exprimovanými geny buněk HT29-MTX jsou MUC1, MUC2, MUC3 a MUC5C (Huet et al., 1995).

3.9 Mucin

Gastrointestinální trakt je pokrytý tenkou vrstvou hlenu, složeného z vysoce glykosilovaných proteinů, zvaných muciny (Velcich et al., 2002). Působí jako bariéra chránící hostitele před škodlivými antigeny a podporuje motilitu lumenu střeva. Tato vrstva hlenu je první fyzickou bariérou hostitelských buněk proti stimulaci bakteriemi ve střevě. Adheze tohoto hlenu je tedy prvním krokem nutným pro interakci probiotických organismů s hostitelskými buňkami ve snaze vyvolat konkrétní reakci. V lidském intestinálním traktu se vrstva hlenu může lišit ve své tloušťce od 30 do 300 μm . Obecně se jeho tloušťka zvyšuje směrem z tenkého střeva do konečníku (Maxwell and Miller, 2011).

Muciny dělíme na sekreční a membránové. Sekreční muciny tvoří viskózní hlen tracheobronchiální, gastrointestinální a reprodukční soustavy a obvykle tvoří extrémně velké oligomery spojením proteinových monomerů pomocí disulfidových vazeb. Tyto buňkou vyloučené proteiny zůstávají na apikálním konci epiteliálních buněk ve formě gelovitého hleny (Gendler and Spicer, 1995).

Buňky sekretující mucin, cylindrické pohárkové buňky, jsou řídky rozmístěny mezi buňky epitelové. V jejich rozšířené části jsou mucinogenní zrna, tvořená převážně glykoproteiny - mucinem. Mucin je z rozšířené apikální části buňky sekretován do střeva, kde tvoří hydrofilní membránu na jeho povrchu. V hleny se hromadí mnoho proteinů účastnících se trávení a transportu živin do organismu. Přejodem do tlustého střeva se počet pohárkových buněk zvyšuje, v samotném tlustém střevě se poměr enterocytů k pohárkovým buňkám rovná 2 : 1 (Grajek and Olejnik, 2004).

V současné době je známo několik různých genů kódujících apomucin (Lesuffleur et al., 1993). Hlen v tenkém i tlustém střevě se skládá především z MUC2 a MUC3 (Gum, 1995) a předpokládá se, že oba proteiny mají podobné receptory v podobných koncentracích. To potvrzuje i velmi silná korelace mezi adhezí k oběma typům hleny (Ouweland et al., 2001).

Kromě úlohy mucinů v oblasti ochrany a lubrikace epitelu, jsou muciny spojovány s proliferací, diferenciací a karcinogenezí. Zdá se že muciny mají úlohu v progresi nádorů, invazi a metastázách a také přežívání nádorových buněk a ochraně proti imunitním reakcím hostitele (Leteurtre et al., 2003).

Pro účinnost potencionálních probiotik je nezbytné, aby na mucin nebo lidské epiteliální buňky a buněčné linie byla tato probiotika schopna adherovat. Testování adheze *in vitro* u potencionálních probiotik je doporučeno FAO a WHO (González-Rodríguez et al., 2012).

3.10 Adherence

Hlenová vrstva pokrývající epitelové buňky je pro požití mikroorganismy první kontaktní plochou po vstupu do střeva a je považována za místo důležité pro adhezi

a následnou kolonizaci těchto bakterií (Ouwehand et al., 2001). Různé mikroorganismy preferují pro adhezi různá stanoviště, která se mohou lišit u jednotlivých druhů hostitelů.

Tato stanoviště rozdělujeme na:

- 1) povrch epiteliálních buněk,
- 2) krypty v ileu, slepém a tlustém střevě,
- 3) gelovitý hlen pokrývající epitel,
- 4) lumen střeva (Schrezenmeier and de Vrese, 2001).

Adheze patogenních bakterií na epitel střevních buněk je důležitým předpokladem pro kolonizaci mikroorganismů a projevy virulence. Zejména patogenní bakterie tvoří velmi úzké spojení se střevní sliznicí, což je prvním krokem k bakteriální infekci a zahájení infekčních onemocnění. Laktobacily a bifidobakterie ve fermentovaných mléčných výrobcích mohou pomoci při prevenci střevních infekcí tím, že inhibují uchycení patogenních bakterií na jejich vazebná místa na kartáčovém lemu (Bernet et al., 1994). Adherence probiotik na střevní sliznici může prodloužit dobu jejich působení na trávicí trakt (Ouwehand et al., 2001), čímž je podpořeno vylučování patogenů a interakce s buňkami epiteliálního imunitního systému hostitele (Jensen et al., 2011). Schopnost probiotik adherovat *in vivo* je považováno za důležité kritérium při výběru potenciálních probiotických kmenů (Ouwehand et al., 2001). Bakterie schopné adherovat na hlen, ale neschopné adherovat k epitelu střevní sliznice mohou být spolu s degradovanými muciny vyplaveny dál trávicím traktem (Buck et al., 2005).

Podle studie, provedenou Granato et al. (1999) se zdá, že adheze laktobacilů a bifidobakterií nezávisí na jedinečném a všudypřítomném mechanismu. Byl prokázán význam kyseliny lipoteichoové (LTA) jako mediátoru adheze *Lactobacillus spp.* i jiných bakterií na lidské epiteliální buňky Caco-2. Adheze *Lactobacillus spp.* na epiteliální buňky závisí také na fyziologii bakterií a fyzikálně-chemických parametrech, které mohou být závislé na stavu růstu (Granato et al., 1999). Jensen et al. (2012) potvrzuje, že adheze bakterií na střevní epitel je multifaktoriální jev, který zahrnuje elektrostatické interakce, hydrofobní reakce nebo specifickou bakteriální strukturu, jako jsou vnější přívěsky.

3.10.1 Faktory ovlivňující adhezi

Byl testován vliv na adhezi působením kyseliny a pepsinu, jakožto simulace prostředí trávicího traktu. Výsledky ukázaly, že jednotlivé kmeny jsou těmito podmínkami různě ovlivněny (Ouweland et al., 2001).

Dalšími faktory, kterými by mohla být ovlivněna adheze, jsou proteiny, identifikované na povrchu bakteriálních buněk některých probiotických druhů, které by mohly podporovat adhezi těchto bakterií na mukózní vrstvy střeva, extracelulární matrix a na receptory cytoplazmatické membrány střevních buněk (Bove et al., 2013). Zvýšená adheze probiotik na hlenovou vrstvu střeva může být také pozitivním vedlejším účinkem užívání některých kyselině nebo žluči odolných bakterií. Ty vznikají přizpůsobováním rodičovských kmenů na expozici postupně zvyšující se koncentraci žlučových solí. U těchto bakterií je díky tomuto procesu výrazně zlepšená mikrobiální životaschopnost v drsných podmínkách gastrointestinálního traktu (Reyes-Gavilán et al., 2011).

Jelikož laktobacily jsou pro výzkumné účely obvykle pěstovány na mediu MRS (růstové medium pojmenované podle jeho vynálezců Man, Rogosa a Sharpe), ale pro průmyslovou výrobu jsou pěstovány na mediu na bázi mléka, byl testován také vliv různých kultivačních medií na adhezi bakterií. Kultivační media adhezní schopnost zkoumaných kmenů bakterií silně ovlivňovala (Ouweland et al., 2001).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

Byly použity buněčné tkáně Caco-2, HT-29, HT29-MTX, které jsou adenokarcinomem tlustého střeva. Dále methotrexat, Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), penicilin a streptomycin, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, neesenciální aminokyseliny, fetální bovinní sérum (FBS), fosfat bufer saline (PBS) a trypsin. To vše od firmy Sigma-Aldrich (CZ). Plastik pro tkáňové kultury: 24 jamkové destičky, serologické pipety, kultivační láhve, Petriho misky od firmy Nunc (UK).

4.1.1 Složení DMEM media

Medium pro kultivaci buněčných tkání:

450 ml DMEM,

50 ml FBS,

5 ml hydrogenuhličitan sodný,

5 ml pyruvát sodný,

5 ml neesenciální aminokyseliny,

5 ml penicilin a streptomycin

Medium pro vlastní test adherence:

450 ml DMEM, medium bez dalších příměsí, které by mohly být nevhodné pro mikroorganismy.

4.2 Metodika

4.2.1 Kultivace tkání

DMEM medium a FBS byly zahřáty na 37 °C po dobu 20 minut. Pomocí vakuové odsávačky bylo odstraněno staré medium z kultivační láhve a tkáň byla propláchnuta 1× PBS. PBS bylo následně odstraněno a bylo přidáno 5 ml trypsinu s dobou inkubace 3 minuty. Následně byl přidán 1 ml DMEM media na neutralizaci trypsinu. Pomocí plastové sterilní škrabky byly buňky uvolněny ze dna kultivační láhve a její obsah byl přenesen serologickou pipetou do 15 ml zkumavky. Ta byla dána centrifugovat na 200× g po dobu 10 minut. Staré medium bylo opatrně odsáto pomocí serologické pipety, a to bez porušení usazených buněk na dně zkumavky. Do zkumavky bylo následně přidáno 5 ml media a pomocí serologické pipety, opětovným nasáváním a vyprazdňováním obsahu zkumavky, došlo k rozvolnění usazených buněk. Po důkladném rozvolnění buněk bylo do nové kultivační láhve přidáno 15 ml nového media a poté přidán 1 ml buněčné suspenze. Láhev byla popsána a uložena v CO₂ inkubátoru s 5% CO₂ atmosférou a teplotou 37 °C. Medium bylo měněno každé dva dny.

4.2.2 Selekcce HT29-MTX

Buněčná linie HT-29 byla ošetřena methotrexatem o koncentraci 4 µg/ml media. Methotrexat byl přidán do kultivační láhve při zakládání. Následně bylo DMEM medium standardně měněno každé dva dny bez dalšího přidání methotrexatu. Po 7 dnech byla buněčná linie sklizena a využita k testování.

4.2.3 Založení 24jamkové destičky

Z důkladně rozpuštěné buněčné suspenze byl pomocí Bürkerovy komůrky spočítán obsah buněk v 1 ml suspenze. Pomocí výpočtu byla zjištěna přesná koncentrace buněk. Poté byla určená koncentrace buněk, buď samostatných tkání nebo ko-kultury, napipetována do 24jamkové destičky do 12 pozic v objemu 300 µl a uložena v kultivačním boxu. Krmení buněk probíhalo každé dva dny až do stáří 14 dnů, kdy u nich došlo k plné diferenciaci mikroklků a byly vhodné pro adhezní testy.

4.2.4 Adheze bakterií

Z monovrstev bylo odstraněno staré medium a každá jamka byla propláchnuta 3× pomocí PBS. Následně byl přidán 1 ml buněčné suspenze obsahující bifidobakterie nebo laktobacily o koncentraci 10^8 cfu, kde byl pufr v poměru 1:1 k mediu DMEM bez suplementů, které by mohly zapříčinit agregaci, případně smrt bakterií. Bifidobakterie a laktobacily byly přidány do určených jamek a zároveň byly přidány do jedné jamky, která neobsahovala buněčnou monovrstvu. Tato jamka sloužila jako kontrola. Destička byla umístěna do anaerostatu zároveň s katalyzátorem nebo samostatně a vložena do inkubátoru na dvě hodiny.

Po dvou hodinách byla destička vyjmuta a pipetou byl z destičky odebrán kontrolní vzorek. Ten byl uložen do sterilní mikrozkušavky, a byl 2 minuty centrifugován. Poté bylo odstraněno medium a na 30 vteřin přidán 1 % TRITON, který byl následně neutralizován kultivačním mediem a dále naředěn na požadovanou koncentraci.

Tekutý obsah jamek s buněčnými tkáněmi, byl odstraněn pomocí odsávačky. Následně byly monovrstvy 3× propláchnuty pomocí sterilního PBS tak, aby byly odstraněny veškeré neadherované bifidobakterie a laktobacily. Po propláchnutí byl do jamek přidán 1% TRITON v množství 300 μ l na dobu 30 vteřin a následně neutralizován 700 μ l kultivačního media. Během 30 vteřin došlo k narušení buněčných membrán střevních tkání, ale nebyly poškozeny bifidobakterie a laktobacily. Veškerý obsah jamek byl přenesen do zkumavek, kde došlo k naředění na požadovanou koncentraci.

Obsah zkumavek byl 10× naředěn na 5 koncentrací. Vzorky byly zočkovány do Petriho misek s MRS mediem a uzavřeny do anaerostatu nebo samostatně vloženy do inkubátorů s 37 °C na dva dny. Po dvou dnech byly spočteny obsahy bifidobakterií a laktobacilů na Petriho miskách.

5 Výsledky

Testování adherence probíhalo ve dvou fázích. V první fázi byly testovány samostatné buněčné linie Caco-2 a HT-29 (tab. 3). V druhé fázi se testovala směsná kultura těchto buněčných linií a to v rozdílných koncentracích tak, aby se dospělo k buněčnému poměru s co nejlepší schopností adherence bifidobakterií a laktobacilů a zároveň s co nejvyšší odolností proti mechanickému poškození během kultivace buněk. Byly testovány celkem tři kmeny bifidobakterií a to *B. animalis ssp. lactis*, *B. bifidum* a *B. longum ssp. suis* a jeden kmen laktobacilu *Lactobacillus Fructivorans*, kdy se jejich inokulační dávky pohybovaly v rozmezí 1×10^7 - 10^8 . Testované poměry koncentrací buněk HT29-MTX/Caco-2 byly 70 : 30 (tab. 4), 10 : 90 (tab. 5) u bifidobakterií, a v poměru 10 : 90 u *Lactobacillus Fructivorans* (tab. 6).

Tab. 3: Procento adherovaných buněk na samostatných buněčných liniích

% adherovaných bifidobakterií na jednotlivých liniích		
	HT-29 2×10^4 buněk/ml media	Caco-2 2×10^4 buněk/ml media
	Průměr ± SD	Průměr ± SD
<i>B. animalis ssp. lactis</i>	3,42 ± 1,2	1,37 ± 0,3
<i>B. bifidum</i>	17,63 ± 5,2	25,88 ± 9,3
<i>B. longum ssp. suis</i>	13,95 ± 1,7	7,10 ± 1,1

Tab. 4: Procento adherovaných buněk na směsné kultuře buněčných linií v poměru 70 : 30

% adherovaných bifidobakterií ve směsné kultuře HT29-MTX/Caco-2 $2 \times 10^4 / 1,4 \times 10^4$ buněk /ml media		
	Průměr ± SD	
<i>B. animalis ssp. lactis</i>	2,86 ± 0,2	
<i>B. bifidum</i>	16,67	-*
<i>B. longum ssp. suis</i>	9,725 ± 5,6	

*Bylo stanoveno pouze jedno měření

Tab. 5: Procento adherovaných buněk na směsné kultuře buněčných linií v poměru 10 : 90

% adherovaných bifidobakterií směsné kultuře Ht29MTX/Caco-2; 0,4×10 ⁴ /3,6×10 ⁴ buněk/ml media			
	Průměr	±	SD
<i>B. animalis ssp. lactis</i>	2,23		-*
<i>B. bifidum</i>	21,12		-*
<i>B. longum ssp. suis</i>	18,76		-*

*Bylo stanoveno pouze jedno měření

Tab. 6: Procento adherovaných buněk na směsné kultuře buněčných linií v poměru 10 : 90

% adherovaných bifidobakterií směsné kultuře Ht29MTX/Caco-2; 0,4×10 ⁴ /3,6×10 ⁴ buněk/ml media				
		Průměr	±	SD
<i>Lactobacillus</i>	S kravským mlékem	2,3	±	0,8
<i>Fructivorans</i>	Bez kravského mléka	2,9	±	0,7

6 Diskuse

Onemocněními jako jsou alergie, urogenitální nebo gastrointestinální infekce, střevní poruchy, jako je syndrom dráždivého tračníku, různá průjemová onemocnění nebo zácpy, trpí v současné době značná část světové populace. V léčbě i prevenci těchto onemocnění mohou hrát probiotika významnou roli. Mají-li probiotika zajistit jakýkoliv příznivý účinek na hostitele, musí být schopna dosáhnout lumenu střeva (Stone et al., 2013), tedy odolat stresu spojeným s průchodem gastrointestinálního traktu (Bove et al., 2013), a určitou dobu ve střevě setrvat. Bylo provedeno několik studií, zkoumajících stupeň odolnosti jednotlivých kmenů probiotik proti rizikům gastrointestinálního traktu. U bakteriálních buněk *Lactobacillus plantarum* WCFS1, v různých médiích, bylo testováno, do jaké míry podléhají simulovanému orogastrointestinálnímu traktu. Jako medium bylo použito mléko, fyziologický roztok, MRS bujón a homogenáty z běžných a o glukany obohacených těstovin. Bylo zjištěno, že medium, se kterým jsou probiotika vpravena do orogastrointestinálního traktu, může přispívat k jejich probiotickému působení, a to zvýšením odolnosti vůči stresu při průchodu trávicím traktem, nebo zvýšením střevní kolonizace. Přítomnost zkvasitelných substrátů, stejně jako výskyt mléčných bílkovin a lipidů, může udržovat bakteriální metabolismus a chránit prokaryotické buňky před drastickými podmínkami prostředí (Charteris et al., 1998). Oproti tomu u fyziologického roztoku jako media bylo, díky nedostatku živin a špatnému bariérovému efektu, zaznamenáno vysoké procento úhynu bakterií. U MRS media, media speciálně navrženého pro bakterie mléčného kvašení, byl jeho ochranný účinek potvrzen dobrou životaschopností mikroorganismů. Je pravděpodobné, že MRS medium implementuje růst bakterií a zajišťuje bakteriím ochranu v gastrointestinálním traktu (Bove et al., 2013). V porovnání s mediem MRS byla adheze *L. reuteri* ING1 a *L. brevis* PEL1, pěstovaných v mléčné syrovátce, mediu LDM nebo API výrazně nižší, avšak u *Lactobacillus* GG, pěstovaného na API a BHI, nebo u *L. rhamnosus* E-800, pěstovaného na LDM byla adheze výrazně vyšší než u kultivace v MRC nebo mléčné syrovátce. Na adhezi kmene *L. rhamnosus* LC-705 neměl typ kultivačního media žádný vliv (Ouwehand et al., 2001).

U laktobacilů střevního původu a původem z fermentovaných mléčných výrobků byla porovnávána jejich schopnost přežít působení nízkého pH a žluči, a jejich metabolická aktivita v přítomnosti žlučových solí a mucinů. Tři kmeny potravinového původu *L. sakei*, *L. plantarum* a *L. paracasei* byly vybrány pro jejich potenciální schopnosti přežít působení

kyseliny chlorovodíkové o pH 2,5 po dobu jedné hodiny. *L. johnsonii* LA1 byl použit jako dobře charakterizovaná kontrola. Postupná expozice bakterií kyselině chlorovodíkové a žluči byla zkoumána tak, že bakteriální buňky ve stacionární fázi byly vystaveny pH 1,0 až 2,5 a kyselině cholové ve dvou krocích, aby byl napodoben průchod gastrointestinálním traktem. Tolerance na gastrointestinální tekutiny byla nejvyšší u probiotického kmene střevního původu. Kritická mez pro přežití *L. Johnsonii* expozici kyselině chlorovodíkové a cholové bylo pH 1,5. Podobná tolerance na kyselinu chlorovodíkovou byla pozorována u některých kmenů *L. plantarum* potravinového původu, avšak žádný z těchto kmenů nepřežil následnou expozici kyseliny cholové při pH 1,5. Kritická mez pro přežití následného působení kyseliny cholové u kmenů druhu *L. Paracasei* byla dosažena na pH 2,0. U kmenů druhu *L. sakei* bylo zaznamenáno významné množství přeživších bakterií i při hodnotě pH 2,5. Vliv lidské žluči na kyselinou oslabené bakterie byl podobný jako u působení kyseliny cholové a degradace mucinů nebyla u laktobacilů pozorována (Haller et al., 2001).

Žádoucí schopností probiotických bakterií je jejich adheze na hostitelskou střevní sliznici. Jedná se o důležitý krok v kolonizačním procesu, který zaručuje setrvání bakterie ve střevním traktu, čímž je umožněna modulace imunity hostitele a vylučování patogenů. Schopnost adherence se mezi jednotlivými kmeny významně liší (Ouweland et al., 2001). Byly stanoveny také adhezní vlastnosti tří probiotických kmenů, *Lactobacillus rhamnosus* DR20, *Lactobacillus acidophilus* HN017 a *Bifidobacterium lactis* DR10, a to na lidských střevních buněčných liniích včetně Caco-2, HT-29 a HT29-MTX. Výsledky byly porovnány s vlastnostmi komerčních probiotických kmenů *Lactobacillus acidophilus* LA1 a *Lactobacillus rhamnosus* GG. Jako negativní kontrola byl použit neadherující kmen *Lactobacillus bulgaricus* LB1. Byly použity dvě nezávislé metody pro kvantifikaci adhezivitu jednotlivých kmenů. V první metodě byly adherované bakterie detekovány Gramovým barvením a sečítány pod mikroskopem v různých oblastech. Bakterie byly také označeny radioizotopy a rozsah adheze byl určen scintilačním sčítáním. Všechny tři kmeny vykazovaly silnou adhezi na lidské střevní buněčné linie *in vitro*. Výsledek byl zaznamenán v podobě adhezenčního indexu, který značí průměrný počet adherovaných bakterií na 100 epiteliálních buněk. Adhezenční index tří studovaných kmenů se pohyboval u buněčné linie Caco-2 99 ± 17 adherovaných bakterií na 100 epiteliálních buněk a u HT-29 219 ± 36 adherovaných bakterií na 100 epiteliálních buněk. U buněčných linií HT29-MTX byl adhezenční index dvakrát až třikrát vyšší (Gopal et al., 2000). Ouweland et al. (2001) testoval adhezi potenciálních

nových kmenů *Lactobacillus brevis* PEL1, *L. reuteri* ING1, *L. rhamnosus* VTT E-800 a *L. rhamnosus* na model lidského střevního hleny. Výsledky byly porovnávány s dobře prozkoumaným probiotickým kmenem *L. rhamnosus* GG a bylo zjištěno, že tři z pěti zkoumaných kmenů, včetně *L. rhamnosus* GG, vykazovaly v modelu hleny vysokou adhezi, střední adhezi vykazoval kmen *L. brevis* PEL1 a *L. rhamnosus* LC-705 adheroval minimálně.

Adherence na buněčné linie Caco-2 byla prokázána u několika bakteriálních kmenů z fermentovaných mléčných výrobků *in vitro*. Pro testy adherence byly použity buněčné linie Caco-2 v koncentraci 2.5×10^5 buněk/ml. Adheze v přítomnosti homologního stráveného supernatantu byla pozorována u *L. johnsonii* LA1 (11,9 %), *L. plantarum* LTH 2966 (11,1 %), *L. plantarum* LTH 2963 (10,8 %), *L. plantarum* LTH 2611 (6,1 %), *L. paracasei* LTH 2552 (3,9 %), *L. paracasei* LTH 2579 (5,9 %), *L. paracasei* LTH 2568 (3,7 %), *L. paracasei* LTH 2570 (7,2 %), *L. sakei* LTH 4122 (2,1 %), *L. sakei* LTH 1185 (5,0 %) a *L. sakei* LTH 681 (11,0 %). V těchto experimentech, pH buněčné kultury supernatantu bylo upraveno na hodnotu 5,0 (Haller et al., 2001).

Ve studii Jensen et al. (2011) byla zkoumána adheze osmnácti probiotických kmenů na buněčné linie Caco-2, HT-29 a LS 174T v koncentraci 106 cfu ($\pm 0,5$ log) v 1 ml. Výsledná adheze u zkoumaných kmenů byla vysoce variabilní (< 1 % až 25 %), v závislosti na bakteriálním kmenu a lidských buňkách. Kmeny *L. reuteri* DSM 20016, mm4-1a, a fjl1 vykazovaly oproti ostatním testovaným kmenům obecně vysoký stupeň adheze na všechny testované epiteliální buňky, a to 11 – 26 %. Kmen *L. plantarum* MF 1298 vykazoval střední stupeň adheze (6,5 až 8,9 %) na všech testovaných buněčných liniích a *L. rhamnosus* GG adheroval poměrně málo, na Caco-2 2,7 %, na HT-29 1,5 % a středně na LS 174T 4,5 %. *P. pentosaceus* Q3 adheroval celkem dobře na HT-29 (6,2 %) ve srovnání s buňkami Caco-2 a LS174T. Pro silně adherující kmeny *L. plantarum* MF1298, *L. reuteri* DSM 20016, mm4-1a a afj1 se jako nejvhodnější typ buněk pro adhezi jeví buňky Caco-2, následující buňkami LS 174T a HT-29.

Na povrchu bakteriálních buněk některých probiotických druhů byly identifikovány proteiny, které by mohly podporovat adhezi těchto bakterií na mukózní vrstvy střeva, na extracelulární matrix a na receptory cytoplazmatické membrány střevních buněk. Hlen vázící proteiny byly charakterizovány u *Lactobacillus reuteri* 1063 a u *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Na manózu specifikovaný adhezín pravděpodobně zprostředkováváající

vazby na receptory hostitelských epitelových buněk, obsahujících manózu, byl identifikován u *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Fibrokinetin vázající protein s názvem alfa-1 enoláza (EnoA1), byl identifikován a funkčně charakterizován u *Lactobacillus plantarum* LM8 (Bove et al., 2013).

Gugliemetti et al. (2008) zjistili, že lidský střevní izolát *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 pevně adheroval na buňky Caco-2. Ošetření proteinázou K a chloridem lithným ukázalo, že klíčovou roli v adhezi MIMBb75 na buňky Caco-2 mají proteiny. Studium buněčné stěny byl identifikován povrchový protein, značený BopA. Protein byl chromatograficky purifikován a bylo zjištěno, že působí jako promotor adheze na Caco-2 buňky. Protein odpovídající BopA a jeho genu byl nalezen i u dalších osmi vysoce adherujících kmenů *Bifidobacterium bifidum*. Nakonec bylo zjištěno, že *B. bifidum* MIMBb75 a BopA mají vliv na produkci interleukinu-8 na Caco-2 epiteliálních buňkách. BopA je první popsáný protein, který je přímo zapojený do adheze bifidobakterií na epiteliální buňky Caco-2 a vykazující imunomodulační aktivitu.

Byl zkoumán vliv pH na adhezi dvou kmenů *Lactobacillus* na lidské střevní buňky Caco-2. Jeden kmen, *Lactobacillus johnsonii* La1, adheroval za každého pH mezi 4 a 7 druhý, *L. acidophilus* La10, na tuto buněčnou linii za stejných experimentálních podmínek neadheroval. Ve výsledku lze tedy říci, že vliv pH může hrát důležitou roli ve zvýšení adheze laktobacilů, pH ovšem není jediným faktorem. Důkazem mohou být neadherované bakterie *Lactobacillus acidophilus* LA10, které neadherovaly za žádného pH, oproti tomu bakterie *Lactobacillus johnsonii* LA1 adherovaly za každého pH v rozmezí od 4 do 7, a stupeň adheze se od sebe výrazně nelišil (Granato et al., 1999). Ve studii Jensen et al. (2011) byly probiotické bakterie vystaveny simulované žaludeční šťávě o pH 3 a simulované šťávě tenkého střeva o pH 7,5. Bakteriální tolerance k simulované žaludeční a střevní šťávě byla testována smícháním 15 μ l 10^8 cfu/ml bakteriální suspenze s 1000 ml žaludeční nebo střevní šťávy. Kmeny *Lactobacillus reuteri* DSM 20016, mm4-1a a fj1 a *Pediococcus pentosaceus* Q3 zachovaly stejnou úroveň životaschopnosti až 180 minut, *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 vykazoval po 180 minutách nepatrnou redukci životaschopnosti 0,5-log, kmeny *L. plantarum* WCFS1, NC8, MF 1298, AD2 a kmeny *Lactobacillus rhamnosus* GG

a *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 odhalily mírné snížení životaschopnosti a to 1 až 2-log po 180 minutách. *Lactobacillus plantarum* 299v vykazovaly snížení životaschopnosti vysoké, 4-log, zatímco u *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus farciminis* a všech kmenů *Lactobacillus sakei* došlo po 180 minutách v simulované žaludeční šťávě k úplně ztrátě životaschopnosti. Simulovanou šťávu tenkého střeva s pankreatinem a žlučí tolerovaly všechny testované kmeny téměř stejně, u žádného z kmenů nedošlo k vyšší ztrátě životaschopnosti než 1-log. Mezi kmeny, které udržely svou životaschopnost v simulované šťávě tenkého střeva s pankreatinem a žlučí po dobu 240 minut, patří *L. plantarum* WCFS1, NC8, MF1298, AD2, *L. sakei* 23K a LS 25, *P. pentosaceus* Q3, a *L. reuteri* mm41-a a fj1. Mezi kmeny s minimálním snížením životaschopnosti od 0,1 do 0,5-log patřily *L. plantarum* 299v, *L. pentosus* MF1300, *L. sakei* MF1053, *L. gasseri* ATCC 33323, a *L. reuteri* DSM20016 a DSM 17938. Kmeny s rozsahem ztráty životaschopnosti od 0,5 do 1-log byly *L. sakei* Lb790, *L. rhamnosus* GG, a *L. farciminis* MF1318.

Adhezi probiotických bakterií na buňky střevní mukózy dochází ke zlepšení prevence kolonizace a formování patogenů a udržení normální slizniční imunity. Byla zkoumána ochranná role vybraných kmenů probiotických bakterií rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* vůči enteropatogenní infekci. Buněčné kultury Caco-2 byly vysazeny v koncentraci 1×10^5 buněk/ml media v jedné jamce 24jamkové destičce pro tkáňové kultury. Buňky HT-29 byly v koncentraci 1×10^6 buněk/ml media v jedné jamce 24jamkové destičky pro tkáňové kultury. Podle experimentálních dat byly kmeny *Lactobacillus acidophilus* Bar13, *Lactobacillus plantarum* Bar10, *Bifidobacterium longum* Bar33 a *Bifidobacterium lactis* Bar30 účinné při přesunu enteropatogenů *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli* H10407 z buněčné vrstvy Caco-2. Probiotické bakterie *Lactobacillus acidophilus* Bar13 a *Bifidobacterium longum* Bar33 byly navíc kladně hodnoceny také pro jejich imunomodulační aktivitu na IL-8 produkovaných buňkami HT-29. Oba kmeny tedy vykazovaly potenciál pro ochranu enterocytů při akutní zánětlivé reakci Candela et al. (2008).

V rámci studie Haller et al. (2001) byl také zkoumán vliv fáze růstu probiotických bakterií na jejich potenciální odolnost působení kyselin a žlučí. Prokázán byl u *L. sakei* LTH 681, u kterého byl baktericidní účinek kyseliny chlorovodíkové v kombinaci s kyselinou cholové maximální (pokles o > 5 log cfu/ml) v časně exponenciální fázi růstu (5 - 8 h). V pozdní exponenciální fázi růstu (12 h) byla tolerance zvýšena (pokles o 2,8 log cfu/ml). Nejsilnější tolerance (pokles o 1,4 log cfu/ml) byla prokázána ve stacionární fázi růstu

bakterií (24 h). Počet bakteriálních buněk v této fázi se po působení kyseliny chlorovodíkové a žlučových solí snížil z 8,1 log cfu/ml na 6,7 log cfu/ml. Na konci stacionární fázi růstu (48 h) byl relativní počet odolných buněk (pokles o 1,5 log cfu/ml) srovnatelný se stacionární fází růstu, a to i když se hustota buněk bakteriálních kultur snížila z 8,1 na 7,4 log cfu/ml. Z výsledků je tedy patrné, že fáze růstu probiotických bakterií má významný vliv na jejich potenciální odolnost expozici kyselin a žluči.

V lidském střevě jsou zastoupeny dva hlavní buněčné fenotypy, sekreční a pohárkové buňky. Bernet et al. (1994) zkoumal adhezi kmene *Lactobacillus acidophilus* LA1 na lidské Caco-2 a HT29-MTX buňky v buněčné kultuře. Buňky byly vysazeny v koncentraci 2×10^4 HT29-MTX buněk/cm² a $1 - 4 \times 10^4$ Caco-2 buněk/cm². U kmene *Lactobacillus acidophilus* LA1 byla pozorována silná adheze na difuzní vzorek hlenu, vylučovaného homogenní subpopulací buněk HT29-MTX. Stupeň adheze celých buněk *Lactobacillus acidophilus* LA 1 na hlen sekterující buňky se zdála vyšší než na buňky Caco-2.

Polarizované buňky Caco-2 buněčné linie jsou často využívány jako *in vitro* model lidských epiteliálních buněk, a to pro svou jak funkční, tak i fyzickou podobnost (Wong and Ustunol, 2006). Caco-2 buňky jsou schopné exprese genů kódujících protein 1, který váže kyselinu retinovou a protein 2, který váže retinol. Také mají receptor pro termostabilní enterotoxin a epidermální růstový faktor (Grajek a Olejnik, 2004).

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo vyhodnotit nejlepší poměr jednotlivých střevních buněk ve směsné kultuře modelující skutečné střevo v *in cellulo* systému. Jak vyplývá z výsledků, směsná kultura buněčných linií Caco-2 a HT29-MTX v poměru 90 : 10 se v našem *in cellulo* modelu jeví jako nejvhodnější poměr střevních buněk. Vhodnost tohoto poměru je dána relativně vysokou odolností této směsné kultury po 14denní kultivaci, a zároveň zachováním vlastností modelu střeva, tak aby byl stále vhodný pro testování adheze probiotických bakterií. Tento výsledek je i v souladu s publikovanou literaturou, kdy se poměry buněk pohybují od 50 : 50 do 90 : 10 pro Caco-2 : HT29-MTX buněčné linie.

8 Použitá literatura

ARTURSSON P., KARLSSON J., 1991. Correlation between oral drugs absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 175(3), 880-885

BERNET M. F., BRASSART D., NEESER J. R., SERVIN A. L., 1994. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*. 35, 483-489

BOIRIVANT M., STROBER W., 2007. The mechanism of action of probiotics. *Current Opinion in Gastroenterology*. 22, 679-692

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

BUCK B. L., ALTERMANN E., SVINGERUD T., KLAENHAMMER T. R., 2005. Functional Analysis of Putative Adhesion Factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (12), 8344-8351

CANDELA M., PERNA F., CARNEVALI P., VITALI B., CIATI R., GIONCHETTI P., RIZZELLO F., CAMPIERI M., BRIGIDI P., 2008. Interaction of probiotics *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International Journal of Food Microbiology*. 125, 286-292

COLLINS D. M., GIBSON G. R., 1999. Probiotics, prebiotics, and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Society for Clinical Nutrition*. 69, 1052S-7S

DE VRESE M., MARTEUA P. R., 2007. Probiotics and Prebiotics: Effect on Diarrhea. *The Journal of Nutrition*. 137, 803S-811S

GENDLER S. J., SPICER A. P., 1995. Epithelial mucine genes. *Annual Reviews of Physiology*. 57, 607-634

- GIBSON G. R., PROBERT H. M., VAN LOO J., RASTALL R. A., ROBERFROID M. B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*. 17 (2), 259-275
- GIBSON G. R., ROBERFROID M. B., 1995. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota – Introducing the Concept of Prebiotics. *Journal of Nutrition*. 125 (6), 1401-1412
- GLEISNER M., GRIMM V., ZHURINA D., YUAN J., RIEDEL CH. U., 2012. Improved adhesive properties of recombinant bifidobacteria expressing the *Bifidobacterium bifidum*-specific lipoprotein BopA. *Microbial cell Factories*. 11:80
- GONZÁLEZ-RODROGIEZ I., SÁNCHEZ B., RUIZ L., TURRONI F., VENTURA M., RUAS-MADIEDO P., GUEIMONDE M., MARGOLLES A., 2012. Role of Extracellular Transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in Mucin Adhesion and Aggregation. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (11), 3992-3998
- GOPAL P. K., PRASAD J., SMART J., GILL HARSHARANJIT S. G., 2000. *In vitro* adherence properties of *Lactococcus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 67, 207-216
- GRAJEK W., OLEJNIK A., 2004. Epithelial cell cultures in vitro as a model to study functional properties of food. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 13/54, 5-24
- GRANATO D., PERROTI F., MASSEREY I., ROUVET M., GOLLIARD M., SERVIN A., BRASSART D., 1999. Cell Surface-Associated Lipoteichoic Acid Acts as an Adhesion Factor for Attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to Human Enterocyte-Like Caco-2 Cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 65 (3), 1071-1077
- GUGLIEMETTI S., TAMAGNINI I., MORA D., MINUZZO M., SCARAFONI A., ARIOLI S., HELLMAN J., KARP M., PARINI C., 2008. Implication of an Outer Surface Lipoprotein in Adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 Cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 74 (15), 4695-4702
- GUM J. R., 1995. Human mucin glycoproteins: Varied structures predict diverse properties and specific functions. *Biochemical Society Transactions*. 23, 795-799

- HALLER D., COLBUS H., GÄNZLE M. G., SCHERENBACHER P., BODE C., HAMMES W. P., 2001. Metabolic and Functional Properties of Lactic Acid Bacteria in the Gastrointestinal Ecosystem: A comparative *in vitro* Study between Bacteria of Intestinal and Fermented Food Origin. *Systematic and Applied Microbiology*. 24, 218-226
- HILGENDORF C., SPAHN-LANGGUTH H., REGÅRDH C. G., LIPKA E., AMIDON G. L., LANGGUTH P., 1999. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured Cell Lines: Permeabilities Via Diffusion, Inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport. *Journal of Pharmaceutical sciences*. 89 (1), 63-75
- HOLZAPFEL W. H., HABERER P., SNEL J., SCHILLINGER U., HUIS IN'T VELD, J. H. J., 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 41, 85-101
- HUET G., KIM I., DE BOLOS C., LO-GUIDICE J. M., MOREAU O., HEMON B., RICHEL C., DELANNOY P., REAL F. X., DEGAND P., 1995. Characterization of mucins and proteoglycans synthesized by a mucin-secreting HT-29 cell subpopulation. *Journal of Cell Science*. 108, 1275-1285
- CHARTERIS W. P., KELLY P. M., MORELLI L., COLLINS J. K., 1998. Development and applications of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 84, 759-768
- CHEN T., WU Q., LI S., XIONG S., JIANG S., TAN Q., ZHANG Z., ZHU D., WEI H., 2013. Microbiological quality and characteristics of probiotic products in China. *Journal of the science of food and agriculture*. 94 (1), 131-138
- CHONG E. S. L., 2014. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World J Microbiol Biotechnol*. 30, 351-374
- JENSEN H., GRIMMER S., NATERSTAD K., AXELSSON L., 2012. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 153, 216-222
- LATA J., JURÁNKOVÁ J., 2011. Střevní mikroflóra, slizniční bariéra a probiotika u některých interních chorob. *Interní medicína pro praxi*. 13 (2), 63-69

- LESUFFLEUR T., PORCHET N., AUBERT J. - P., SWALLOW D., GUM J. R., KIM Y. S., REAL F. X., ZWEIBAUM A., 1993. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC 5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *Journal of Cell Science*. 106, 771-783
- LETEURTRE E., GOUYER V., ROUSSEAU K., MOREAU O., BARBAT A., SWALLOW D., HUET G., LESUFFLEUR T., 2004. Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate. *Biology of the Cell*. 96, 145-15
- LIONG MIN-TZE, 2008. Roles of Probiotics and Prebiotics in Colon Cancer Prevention Postulated Mechanism and *In-vivo* Evidence – Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 9, 854-863
- MAHLER G. J., SHULER M. L., GLAHN R. P., 2009. Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an *in vitro* digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 20, 494-502
- MAXWELL L. V. T., MILLER M. J., 2011. *Lactobacillus* Adhesion on Mucus. *Nutrients*. 3, 616-636
- MOMBELLI B., GISMONDO M. R., 2000. The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 16, 531-536
- OUWEHAND A. C., TUOMOLA E. M., TÖLKKÖ S., SALMINEN S., 2001. Assessment of adhesion properties of novel probiotics strains to human intestinal mucus. *International Journal of Food Microbiology*. 64, 119-126
- PALA V., SIERI S., BERRINO F., VINEIS P., SACERDOTE C., PALLI D., MASALA G., PANICO S., MATTIELLO A., TUMINO R., GIURDANELLA M. C., ANGOLI C., GRIONI S., KROGH V., 2011. Yogurt consumption and risk of colorectal cancer in the Italian European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition cohort. *International Journal of Cancer*. 129 (11), 2712-2719
- PANESAR P. S., KUMARI S., PANESAR R., 2013. Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 33 (4), 345-364

- PINTO M., ROBINE-LEON S., APPAY M.-D., KEDINGER M., TRIADOU N., DUSSAULX E., LACROIX B., SIMON-ASSAMANN P., HAFFEN K., FOGH J., ZWEIBAUM A., 1983. Enterocyte-like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture. *Biology of the Cell*. 47 (3), 323-330
- QUARONI A., Hochman J., 1996. Development of intestinal cell models for drug transport and metabolism studies. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 22, 3-52
- DE LOS REYES-GAVILÁN C. G., SUARÉZ A., FERNÁNDEZ-GARCÍA M., MARGOLLES A., GUEIMONDE M., RUAS-MADIEDO P., 2011. Adhesion of bile-adapted Bifidobacterium strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Research in Microbiology*. 162, 514-519
- SARKAR S., 2013. Potential of probiotics as pharmaceutical agent: a review. *British Food Journal*. 115(11), 1658-1687
- SEKSIK P., DRAY X., SOKOL H., MARTEAU P., 2008. Is there any place for alimentary probiotics, prebiotics or symbiotics, for patients with inflammatory bowel disease? *Molecular Nutrition & Food Research*. 52, 906-912
- SENOK A. C., ISMAEEL A. Y., BOTTA G. A., 2005. Probiotics: facts and myths - Review. *Clinical microbiology and infection*. 11 (12), 958-966
- SCHREZENMEIER J., de VRESE M., 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotics – approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73, 361-364
- STONE S., EDMONDS R., ROSENTHAL K. S., 2013. Probiotics. Helping out the normal flora. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 21 (5), 305-311
- VELCICH A., YANG W. C., HEYER J., FRAGALE A., NICHOLAS C., VIANI S., KUCHERLAPATI R., LIPKIN M., YANG K., AUGENLICHT L., 2002. Colorectal Cancer in Mice Genetically Deficient in the Mucin Muc2. *Science*. 295, 1726-1729
- WONG C., USTUNOL Z., 2006. Mode of Inactivation of Probiotics Bacteria Affects Interleukin 6 and Interleukin 8 Production in Human Intestinal Epithelial-like Caco-2 Cells. *Journal of Food Protection*. 69, 2285-2288

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

API: růstové medium pojmenované podle American Petroleum Institute

BHI: Brain-heart infusion medium, růstové medium vyráběné z vývaru kravských nebo prasečích srdcí a mozků

CFU: kolonie tvořící jednotka

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's medium

DNA: deoxyribonukleová kyselina

FAO: Food and Agriculture Organization; Organizace pro výživu a zemědělství

FBS: fetální bovinní sérum

FU: 5-fluorouracil

GalNAc: N-acetylgalaktosamin

GIT: gastrointestinální trakt

GlcNAc: N-acetylglukosamin

LAB: lactic acid bacteria; bakterie mléčného kvašení

LDM: růstové medium modifikované z Lewinových mořských rozsivek

LOG: logaritmus

LTA: kyselina lipoteichoová

MRS: růstové medium pojmenované podle jeho vynálezců Man, Rogosa a Sharpe

MTX: methotrexat

MUC: geny kódující membránové proteiny z řady mucinů

PBS: fosfat bufer saline

RNA: ribonukleová kyselina

SD: směrodatná odchylka

TLR: Toll-like receptor

WHO: World Health Organization; Světová zdravotnická organizace

10 Seznam použitých obrázků a tabulek

Tab. 1: Složení mikroflóry lidského GIT (Lata and Juránková, 2011).....	10
Tab. 2: Mikroorganismy používané v probiotických produktech (Holzapfel et. al. 1998)	12
Tab. 3: Procento adherovaných buněk na samostatných buněčných liniích.....	25
Tab. 4: Procento adherovaných buněk na směsné kultuře buněčných linií v poměru 70:30....	25
Tab. 5: Procento adherovaných buněk na směsné kultuře buněčných linií v poměru 10:90....	26
Tab. 6: Procento adherovaných buněk na směsné kultuře buněčných linií v poměru 10:90....	26