

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Možnost využití probiotik při hojení ran

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Alena Formáčková

Obor studia: Výživa a potraviny

Vedoucí práce: Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Možnost využití probiotik při hojení ran" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové 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 diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24.7.2020

Alena Formáčková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za cenné rady, odborné vedení a pomoc při vypracování diplomové práce.

Možnost využití probiotik při hojení ran

Souhrn

Probiotika jsou živé mikroorganismy, o nichž je známo, že vykazují četné pozitivní účinky na zdraví hostitele, zejména na jeho gastrointestinální trakt, kde udržují mikrobiální homeostázu. Mezi základní mechanismy účinku probiotických bakterií patří převážně modulace imunitního systému hostitele, inhibice patogenních mikroorganismů či tvorba protizánětlivé odpovědi. Probiotika jsou využívána i jako prevence či léčba kožních onemocnění a mohou urychlovat proces hojení ran.

Cílem této diplomové práce bylo otestovat vliv vybraných druhů laktobacilů na rychlost hojení buněčného poškození a podporu buněčné migrace. Při přípravě buněčných lyzátů pomocí ultrazvukového homogenizátoru byly vybrány tři bakteriální kmeny: *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei* a *L. reuteri* o původní koncentraci 10^6 KTJ/ml. Následně bylo na *in vitro* modelu kolorektálního adenokarcinomu buněčné linie HT29 a modelu kožního epitelu buněčné linie NHDF-Neo vytvořeno poškození. Pomocí inverzního mikroskopu byla sledována rychlost jeho hojení a migrace buněk v daných časových intervalech. Pořízené snímky byly analyzovány v programu opensource TSscreetch a výsledky statisticky vyhodnoceny.

Všechny testované kmeny vykazovaly po 24h expozici známky hojení epitelu. U sledování rychlosti hojení došlo u vzorků ošetřených LAC ke zpomalené reepitelizaci u obou typů buněčné linie, naopak u sledování buněčné migrace se použití LAC jeví jako přínosné po porovnání s kontrolou. Nejrychlejšího hojení na buněčné linii HT29 dosáhl *L. paracasei*, kde šířka rány byla o 3,02 % větší oproti kontrole. U kožního modelu po 24h vykazoval nejlepší výsledky *L. acidophilus*, kde došlo ke zmenšení, ale rána byla o 7,49 % větší v porovnání s kontrolou. Na rozdíl od toho buněčná migrace na buněčné linii HT29 probíhala po 24h nejrychleji u vzorku s *L. paracasei*, kde rána byla menší o 5,85 % oproti kontrole. Po stejné době byla na buněčné linii NHDF-Neo u vzorku *L. acidophilus* míra reepitelizace o 2,25 % větší v porovnání s kontrolou. Výrazně zpomalené známky reepitalizace v porovnání s kontrolním vzorkem vykazoval *L. reuteri*.

Získané hodnoty poukazují na fakt, že různé druhy probiotik vykazují částečný vliv na rychlost procesu hojení vzniklého poškození. Úspěšnost je závislá především na daném probiotickém kmeni, buněčné linii, ale i čase expozice. Je pravděpodobné, že jiné bakteriální kmeny mohou vykazovat významnější aktivitu při reepitelizaci.

Klíčová slova: Probiotika; poranění; buněčná migrace; střevní epitel; kožní epitel; buněčný lyzát.

Possibility of using probiotics in wound healing

Summary

Probiotics are live microorganisms administered to improve microbial balance, particularly in the gastrointestinal tract, where they maintain microbial homeostasis. The basic mechanisms of action of probiotic bacteria mainly include modulation of the host's immune system, inhibition of pathogenic microorganisms or the formation of an anti-inflammatory response. Probiotics are also used to prevent / or treat skin diseases and can speed up the wound healing process.

The aim of this diploma thesis was to test the effect of selected species of lactobacilli on the rate of healing of cell damage and the promotion of cell migration. When preparing cell lysates using an ultrasonic homogenizer, three bacterial strains were selected: *Lactobacillus acidophilus*, *L. paracasei* and *L. reuteri* with an initial concentration of 10^6 CFU/ml. Subsequently, the in vitro model of colorectal adenocarcinoma of the HT29 cell line and the skin epithelial model of the NHDF-Neo cell line developed damage and the rate of cell healing and migration at given time intervals was monitored using an inverted microscope. The captured images were analyzed in the opensource TSsretch program and the results were statistically evaluated.

All tested strains showed signs of epithelial healing after 24 hours of exposure. In monitoring the rate of healing, samples treated with LAC showed a slow reepithelialization in both cell line types, while in monitoring cell migration, the use of LAC appears to be beneficial compared to the control. The fastest healing on HT29 cell lines was achieved by *L. paracasei*, where the wound with was 3,02 % larger than the control. In the skin model after 24 hours, *L. acidophilus* showed the best results, where there was a reduction, but the wound was 7,49 % larger compared to the control. In contrast, cell migration on the HT29 cell line was fastest after 24 h in a sample with *L. paracasei*, where the wound was 5,85 % smaller than the control. After the same time, the rate of reepithelialization on the NHDF-Neo cell line in the *L. acidophilus* sample was 2,25 % higher compared to the control. *L. reuteri* showed significantly slower signs of reepitalization compared to the control sample.

The obtained values indicate the fact that different types of probiotics have a partial effect on the speed of the healing process of the damage. Success depends mainly on the probiotic strain, cell line, but also the time of exposure. It is likely that other bacterial strains may show more significant reepithelialization activity.

Keywords: Probiotics; injuries; cell migration; intestinal epithelium; skin epithelium; cell lysate.

Obsah

1 Úvod	7
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Základní definice poranění	9
3.1.1 Fáze hojení ran.....	10
3.1.2 Faktory narušující hojení ran	13
3.1.3 Léčba ran	14
3.1.3.1 Bakterie a hojení ran.....	14
3.2 Probiotické mikroorganismy	16
3.2.1 <i>Lactobacillus</i> spp.....	18
3.2.2 Mechanismus a účinky působení probiotik	19
3.3 Mikrobiota lidského těla.....	25
3.3.1 Střevní mikrobiom.....	25
3.3.2 Kožní mikrobiom	29
4 Materiál a Metodika	32
4.1 Materiál.....	32
4.2 Metodika	32
4.2.1 Kultivace buněčných linií.....	32
4.2.2 Založení mikrotitrační destičky	32
4.2.3 Příprava buněčného lyzátu	33
4.2.4 Hojení ran a buněčná migrace	33
4.2.5 Statistické vyhodnocení.....	33
5 Výsledky.....	34
5.1 <i>In vitro</i> model střevního epitelu	34
5.1.1 Rychlost hojení poškození.....	34
5.1.2 Rychlost buněčné migrace.....	35
5.2 <i>In vitro</i> model kožního epitelu.....	35
5.2.1 Rychlost hojení poškození.....	35
5.2.2 Rychlost buněčné migrace.....	36
6 Diskuze	38
7 Závěr	43
8 Literatura.....	44

1 Úvod

První zmínky o probiotických mikroorganismech jako součást stravy se objevují již ve starověkých římských a řeckých spisech. Vědomé využívání účinku probiotik na lidského zdraví je však datován až na začátek minulého století. Pravidelné konzumaci probiotických mikroorganismů je přisuzován příznivý vliv zejména na gastrointestinální trakt konzumenta. To lze předpokládat i z doslovného překladu řeckého slova „pro bios“ znamenající „pro život“.

Nejčastěji používanými probiotiky jsou bakterie rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*, které jsou i přirozenou součástí lidské bakteriální mikrobioty. Největší počet a nejrozmanitější bakteriální osídlení se vyskytuje ve střevě, kde jsou ideální podmínky pro jejich přežití, růst a rozmnožování. Mezi faktory ovlivňující jejich průchod trávicím traktem patří nízké žaludeční pH, používání antibiotik a schopnost probiotických mikroorganismů přilnout ke sliznici střeva a trvale ji kolonizovat.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Probiotika izolovaná z trávicího traktu člověka mohou mít pozitivní efekt na rychlost hojení ran v rozdílných buněčných modelech.

Cílem práce je pomocí *in vitro* modelu simulovat poranění střevního a kožního epitelu a sledovat rychlost buněčné migrace a hojení vlastního poranění po přidání buněčných lyzátů získaných z probiotik izolovaných z trávicího traktu.

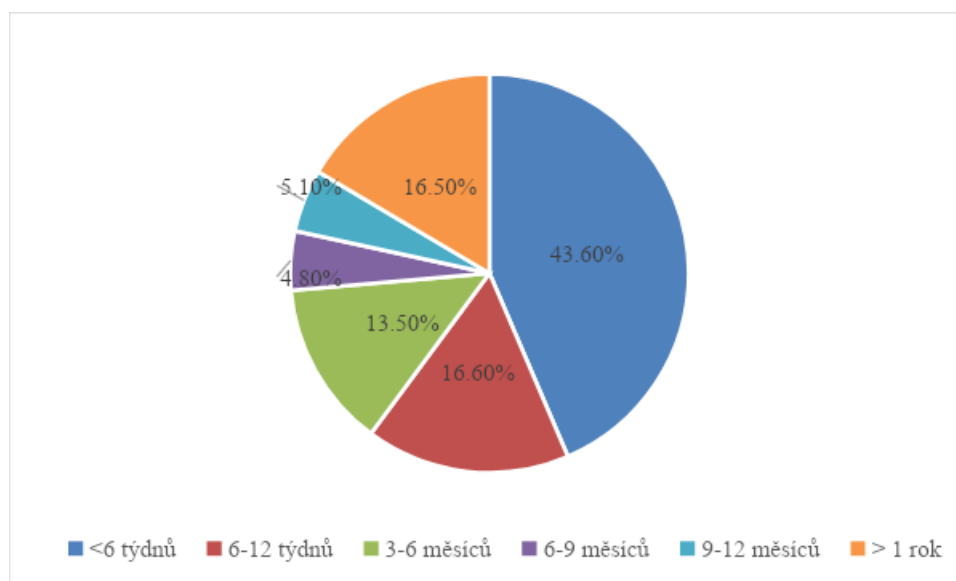
3 Literární řešerše

3.1 Základní definice poranění

Poranění neboli rána je definována jako narušení či poškození anatomické struktury a funkce kůže, sliznice či jiné tkáně (Seebauer et al. 2019). Nejběžnější, jednoduché, povrchové rány zasahují do kůže a podkožní tkáně a jejich hojení probíhá většinou bez komplikací, zatímco u komplexních, hlubokých ran dochází k významné ztrátě nebo devitalizaci tkáně, což je často spojeno se sekundární komplikací jako je například infekce rány v důsledku poškození přirozené ochranné bariéry a následné invazi mikroorganismů do místa poranění. Při hlubších ranách, sahajících do subkutánní tkáně může dojít k poškození šlach, svalů, cév, nervů, parenchymálních orgánů, kostí či jiných struktur (Kumar & Leaper 2008; Velnar et al. 2009). Tyto rány mohou být způsobeny úmyslně či náhodně jako důsledek interních či externích patologických procesů působících na postižené sliznici nebo orgánu. Jakékoliv formy poškození tkáně narušují homeostázu vnitřního prostředí, tím jsou spuštěny obranné fyziologické procesy jako je krvácení, kontrakce cév, aktivace koagulačního a komplementového systému, zánětová odpověď a další na sebe navazující reakce (Robson et al. 2001). Jak uvádí Strecker-McGraw et al. (2007), lze rány klasifikovat podle typu poškození na rány bodnou, řznou, sečnou, tržnou, zhmožděninou nebo odřeninu. Další způsob dělení je na základě času potřebného k úplnému zahojení poraněné tkáně na akutní a chronické.

Akutní ránou je myšleno přerušení celistvosti jakékoliv tkáně vzniklé při traumatickém poškození nebo po chirurgickém zákroku. K zahojení akutní rány dojde obvykle samovolně během 5 až 30 dnů (Velnar et al. 2009). Naproti tomu u chronické rány dochází k přerušení celistvosti jakékoliv tkáně vyžadující i přes adekvátní léčbu dlouhou dobu rekonvalescence, a to více jak 6 týdnů. Mezi chronické rány nejsou zahrnuty ty rány, které i přes normální hojení vyžadují kvůli své velikosti delší dobu na reepitelizaci (Seebauer et al. 2019). Léčba těchto ran je často komplikována několika faktory, které prodlužují jednotlivé fáze hojení. Mezi tyto faktory patří především infekce v místě poranění, tkáňová hypoxie, vznik exsudátu, přítomnost nadměrné hladiny prozánětlivých cytokinů až nekróza tkáně. Chronické rány proto často podléhají recidivě (Velnar et al. 2009). Chronické rány můžeme dělit dle Šitum & Kolić (2011) na typické, které představují 95 %, a atypické (5 %). Typickou chronickou ránou se rozumí ischemická, neurotrofní, hypostatická rána, ale i diabetické a dekubitální vředy. Osmdesát procent chronických ran přítomných na dolních končetinách je způsobeno chronickou žilní nedostatečností. Atypické rány jsou spojeny s autoimunitními poruchami, metabolickými a genetickými chorobami, ale i psychickým stavem a vnějším prostředím (Morton & Phillips 2016).

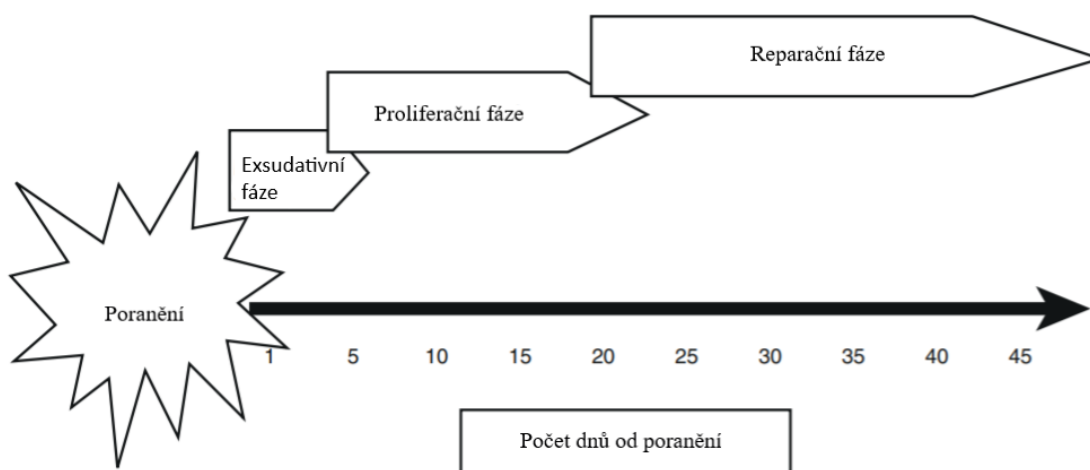
Z výsledků průzkumu Dowsett et al. (2014) vyplývá, že více jak 55 % ran vyžaduje ke svému plnému zahojení nejméně 6 týdnů (Obrázek 1).



Obrázek 1: Časová náročnost hojení ran (upraveno dle Dowsett et al. 2014).

3.1.1 Fáze hojení ran

Rány se hojí ve třech na sebe navazujících fázích (Obrázek 2), které jsou považovány za jedny z nejsložitějších procesů v lidském organismu. Každá rána tedy prochází fází exsudativní, proliferační a reparační (Gurtner et al. 2008; Seebauer et al. 2019).



Obrázek 2: Jednotlivé fáze hojení ran - exsudativní, proliferační a reparační fáze hojení ran a jejich průměrné trvání ve dnech na začátku poranění (upraveno dle Nitsch & Astifidis 2016).

Exsudativní fáze

Charakteristickým projevem v první fázi je otok v oblasti poranění. Otok je vyvolán zvýšeným kapilárním tlakem a vazoaktivními mediátory (histamin, serotonin), které způsobují nárůst vaskulární permeability. Krevní plazma vstupuje do extravaskulárního prostoru, zvýšený parciální tlak oxidu uhličitého a nedostatek kyslíku vede ke tkáňové acidóze. Výsledkem je, že kolagenové vlákno bobtná a vzniká tak otok rány (Li et al. 2005;

Pitzer & Patel 2011; Seebauer et al. 2019). Během toho již dochází k hemostázy a čištění rány. Při hemostázy nastává okamžitě reflexní vazokonstrikce poškozených krevních cév, která je zprostředkována tromboxanem A₂ a trvá 5-10 minut. V důsledku cévního poškození se z endotelu uvolňují glykoproteiny jako je fibronectin, laminin a von Willebrandův faktor (vWF). Trombocyty vycházející z poškozených cév a adherují na obnažený subendoteliální kolagen, tento proces zajišťuje především vWF tím, že propojuje destičkový glykoprotein (GP Ib) a kolagen. Následně fibronectin spolu s lamininem aktivují koagulaci a další procesy iniciující formaci sraženiny. Dochází k agregaci trombocytů prostřednictvím fibrinogenu. Aktivované trombocyty uvolňují prostaglandiny a vazoaktivní látky, jako jsou například serotonin, histamin, proteázy a tromboxan, které slouží k aktivaci cílových buněk. Primární hemostáza končí tvorbou destičkového bílého trombu (Han & Ceilley 2017).

Po počáteční vazokonstrikci nastává vazodilace cév. Při sekundární hemostáze dochází k aktivaci celé řady koagulačních procesů. Koagulační proces zajišťují proteiny cirkulující volně v plazmě v neaktivním stavu. Vytvoří se hustá fibrinová síť, do které se následně zachytávají erythrocyty, leukocyty a trombocyty. Vzniká krevní, červený trombus, který slouží jako dočasná matrice (Gonzalez et al. 2016; Han & Ceilley 2017).

Během exsudativní fáze také dochází k migraci zánětlivých buněk. Granulocyty a monocyty patří mezi první buňky, které se objeví hned po zranění a slouží zejména k prevenci a eliminaci zánětlivého stavu rány. Během fagocytózy dochází k čistícímu procesu a na jeho konci se granulocyty a monocyty začnou s exsudátem (zánětlivý extravaskulární výpotek) shlukovat na povrchu rány. Během procesu dochází k uvolňování zánětlivých mediátorů a to neutrofilními granulocyty, které aktivují fibroblasty a epitelové buňky (Giles 2007; Sergeeva et al. 2016).

Monocyty se pomocí integrinových receptorů vážou na kolagenové nebo fibronectinové fragmenty, mění fenotyp a svou funkci, a nakonec se diferencují na tkáňové makrofágy, které zprostředkovávají přechod rány ze zánětlivé fáze do fáze opravy (proliferační fáze) (Seebauer et al. 2019). Jsou dominantním typem buněk v ráně po cca 48 hodinách na poškození. Během jejich přítomnosti v místě poranění dochází k produkci signálních proteinů- cytokinů a chemokinů, které regulují migraci imunitních buněk (neutrofilů, T-buňky) do místa infekce (Li et al. 2005; Pitzer & Patel 2011; Seebauer et al. 2019).

Proliferační fáze

Přibližně po dvou dnech po poranění přechází rána v případě nekomplikovaného hojení do proliferační fáze, která v průměru trvá 10 dní (Seebauer et al. 2019). Tato druhá fáze hojení zahrnuje proces reepitelizace, angiogeneze, fibroplazie a kolagenové depozice (Davis & McLister 2016).

Migrující makrofágy z okolní tkáň regulují migraci fibroblastů do místa poškození prostřednictvím růstových faktorů. Dochází ke stimulaci proliferace fibroblastů pomocí cytokinů, jako je například transformující růstový faktor α , β (TGF- α , TGF- β), destičkový růstový faktor (PDGF) a interleukin 1 (IL-1), které jsou uvolňovány zánětlivými buňkami a trombocyty (Tabulka 1) (Palta et al. 2014). Fibroblasty vylučují prokolagen, ten se dále štěpí na tropokolagen a následně agreguje na fibrily, které se spojí a vytvoří kolagenové vlákno (Pitzer & Patel 2011). Nově vytvořená granulační tkáň bohatá na kolagen III. typu nahradí prozatimní matici na bázi fibrinu. Další důležitou složkou extracelulární matrice

granulační tkáň jsou glykosaminoglykany a proteoglykany, které jsou syntetizovány a uvolňovány fibroblasty. Současně dochází k novotvorbě cév-angiogenezi, kde síť fibrinových vláken vytváří matrici pro růst nově vytvořené cévy (Robson et al. 2001).

Tabulka 1: Přehled vybraných růstových faktorů a interleukinů, jejich hlavních zdrojů a funkcí (upraveno dle Frei et al. 2008).

	Hlavní zdroj	Hlavní funkce
EGF	submaxilární slinná žláza, Brunnerova žláza	podpora proliferace epitelálních buněk
TGF-α	T-, B-lymfocyty	chemotaxe fibroblastů a eosinofilů, angiogeneze, proliferace embryonálních kmenových buněk
TGF-β	aktivované TH ₁ a NK-buňky	protizánětlivý, podpora hojení ran, inhibice proliferace mikrořágů a lymfocytů
PDGF	trombocyty, endoteliální buňky, placenta	podpora proliferace pojivové tkáňe a buněk hladkého svalstva
IL-1	monocyty, mikrořagy	Imunitní a zánětlivá reakce, aktivace fibroblastů, indukce TH ₂ , krvetvorba

EGF-epitelový růstový faktor; TGF- α , β -transformující růstový faktor α , β ; PDGF-destičkový růstový faktor; IL-1- Interleukin 1; NK-buňky- „Natural Killer“ neboli buňky řazené do nespecifické imunity projevující se spontánní cytotoxickou reakcí

Proliferace a migrace endoteliálních buněk je stimulována faktory označovanými jako TAF (tumor angiogenesis factors) (Börset et al. 1996; Robson et al. 2001). Mezi důležité aktivátory v procesu angiogeneze patří VEGF (vaskulární endotelový růstový faktor), FGF (fibroblastový růstový faktor), EGF (epidermální růstový faktor), PDGF (destičkový růstový faktor). Nově vytvořené krevní kapiláry dodávají živiny a vedou kyslík do postižené tkáňe. Angiogeneze je proto velmi důležitou součástí reparativního procesu. Snížená koncentrace či aktivita růstových faktorů může vést ke zpomalenému a komplikovanému hojení. Husté seskupení vaskulárních smyček dává tkáni typický granulární vzhled (Seebauer et al. 2019).

Otevřená rána je uzavírána migrací buněk (např. keratinocyty) na okraje rány a nastává reepitalizace povrchu poškozené tkáňe. Včasný povrchový pokrytí rány poskytuje efektivní ochranu proti mikrobiální invazi, zejména při poraněních kůže. Při poranění v hlubších měkkých tkáních, jako je například poranění břišní stěny je proces epitelizace irelevantní (Robson et al. 2001).

Během stahování rány dochází ke kontrakcím. Část fibroblastů se diferenciuje na kontraktilní fibroblasty (myofibroblasty), které zajišťují přiblížení okrajů rány a způsobují již zmíněnou kontrakci (Pitzer & Patel 2011).

Reparační fáze

Konečná fáze hojení nastupuje při hojení bez komplikací 3.– 8. den po poranění a může trvat i několik týdnů. V průběhu reparační fáze se zvyšuje pevnost rány v důsledku dozrávání granulační tkáňe, zesíťením a maturací kolagenních vláken (Davis & McLister 2016).

Po vytvoření souvislé epitelální vrstvy dochází ke zpomalení migrace keratinocytů. Kolagen III. typu je postupně nahrazován stabilnějším kolagenem I. typu prostřednictvím matricových metaloproteáz uvolňujících se do extracelulárního prostoru. TIMP (tkáňové inhibitory metaloproteáz) zabraňují nadměrné proteolýze a zajišťují rovnováhu mezi syntézou a degradací kolagenu. Narušení tohoto vyváženého vztahu může vézt prodloužení hojení,

nebo k němu nemusí vůbec dojít, vzniká tak chronická rána. Probíhající syntéza kolagenu I. typu vytváří silnou kolagenovou síť, která vytváří zrající pevnou a pružnou jizvu a zároveň mizí zarudnutí povrchu (Gonzalez et al. 2016). Konečná zralá jizva dosahuje maximálně 70–80 % ze své původní tahové síly (Pitzer & Patel 2011).

3.1.2 Faktory narušující hojení ran

Přerušení komplexních oprav a remodelačních procesů během hojení vede ke klinickým poruchám hojení ran. Faktory, které ovlivňují průběh hojení ran (Tabulka 2) lze rozdělit na lokální a systémové (Seebauer et al. 2019).

Lokální faktor, který prodlužuje proces hojení je například příliš vysušená rána, udržení vlhkého prostředí v ráně zamezí buněčné dehydrataci a následnému odumírání buněk. Hojení také prodlužuje nepřiměřený nebo trvalý tlak v místě poranění, který narušuje krevní zásobení kapilární sítě, což brání toku krve do okolní tkáně. Bakteriální kontaminace vede nejen k prodloužení zánětlivé fáze, ale také ovlivňuje epitelizaci, kontrakci rány a ukládání kolagenu. Bakteriální endotoxiny stimulují fagocytózu a uvolňování kolagenázy, to vede ke zvýšené degradaci kolagenu a destrukci okolní tkáně. Pro léčebný proces má značný význam i správná traumatizace chirurgické tkáně. Nesprávné provedení vede k poruchám krevního zásobení v postižené tkáni a může způsobit tvorbu nekrózy (Thomas Hess 2011; Seebauer et al. 2019).

Tabulka 2: Základní rozdělení faktorů narušující hojení ran (upraveno dle Seebauer et al. 2019).

Lokální faktory	Systémové faktory
Nepřiměřený tlak v místě rány	Věk
Traumatizace chirurgické tkáně, edém	Nedostatečná výživa
Cizí těleso	Chronická onemocnění
Infekce	Imunosuprese, radioterapie
Serom	Cévní nedostatečnost
Vysoušení rány	Psychologické faktory
Nekróza	Kouření, alkohol

Důležitým systémovým faktorem prodlužující proces hojení je věk nemocného. Rány starších lidí se z pravidla hojí pomaleji. S rostoucím věkem se snižují regenerační a reparativní procesy. Negativní vliv mají především nutriční nedostatky, jako je například nedostatek vitamínu C, který snižuje oxidační stres během hojení a podporuje zesíťování kolagenu. Důležité je i zajistit dostatek vitamínu A, B, K, minerálních látek (Zn, Mg, Ca, Se, Mn), působících jako katalyzátory a kofaktory. Správná a vyvážená strava je proto velmi důležitá. Mezi chronická onemocnění ohrožující hojení ran patří ischemická choroba srdeční, periferní cévní onemocnění, nádorová onemocnění a diabetes mellitus (Seebauer et al. 2019).

V důsledku užívání různých stimulantů, jako je například chronické kouření cigaret dochází k potlačení některých fází hojení. Nikotin zvyšuje uvolňování vasopresinu z hypofýzy, což vede k vazokonstrikci a ke snížené kapilární perfuzi. Kromě toho oxid

uhelnatý kompetitivně inhibuje vazbu kyslíku na hemoglobin a způsobuje tak snížené okysličení tkáně. Kouření také zvyšuje agregaci destiček a viskozitu krve (Gonzalez et al. 2016). Dle Seebauer et al. (2019) chronické užívání nikotinu a alkoholu zpomaluje tvorbu kolagenu a buněčnou proliferaci erytrocytů, makrofágů a fibroblastů.

3.1.3 Léčba ran

Standardním postupem při léčbě ran je udržení vlhkého prostředí pomocí vhodného obvazu. Nejčastěji se používá všestranný transparentní obvas, který je vodotěsný a může obsahovat antibakteriální látky. Dalším způsobem krytí rány je hydrogelový obvas, který zajišťuje potřebnou hydrataci rány. Některé hydrogelové obvazy umožňují i absorpci exsudátu a úlevu na bolesti. Rány lze kryt i hydrokoloidním obvazem, absorpčním pěnovým krytím, hydrofilní gázou či aglinátovým krytím s koloidním stříbrem (Wietlisbach 2013). Nanočástice stříbra vykazují antibakteriální, antimykotickou, antivirovou, antiangiogenní aktivitu a inhibují tvorbu biofilmu (Kalishwaralal et al. 2010).

Před aplikací obvazu je nutné ránu vypláchnout antiseptickým či fyziologickým roztokem. Zejména důležité je odstranění veškeré odumřelé tkáně, dokud nebude přítomná pouze růžově zbarvená granulační tkáň (Wietlisbach 2013). Nejbezpečnější a nejsnadnější způsob odstranění nechtěné tkáně je pomocí autolytického debridementu, kde je využívána činnost mateloproteáz a žírných buněk. Nekrotickou tkáň lze odstranit i enzymatickým debridementem, kde jsou externě dodávány enzymy, či mechanicky pomocí chirurgických nástrojů (Nitsch & Astifidis 2016).

Dle Davis & McLister (2016) jsou a budou náklady na léčení chronických ran velkou finanční zátěží pro zdravotnické služby. Existují rozdílné odhady nákladů spojené s léčbou ran, ale ve většině případů se částka pohybuje v řádech několika miliard korun ročně. Například náklady na léčbu ran se ve Velké Británii odhadují na 3 miliardy britských liber za rok a ve Spojených státech amerických na 25 miliard amerických dolarů za rok.

3.1.3.1 Bakterie a hojení ran

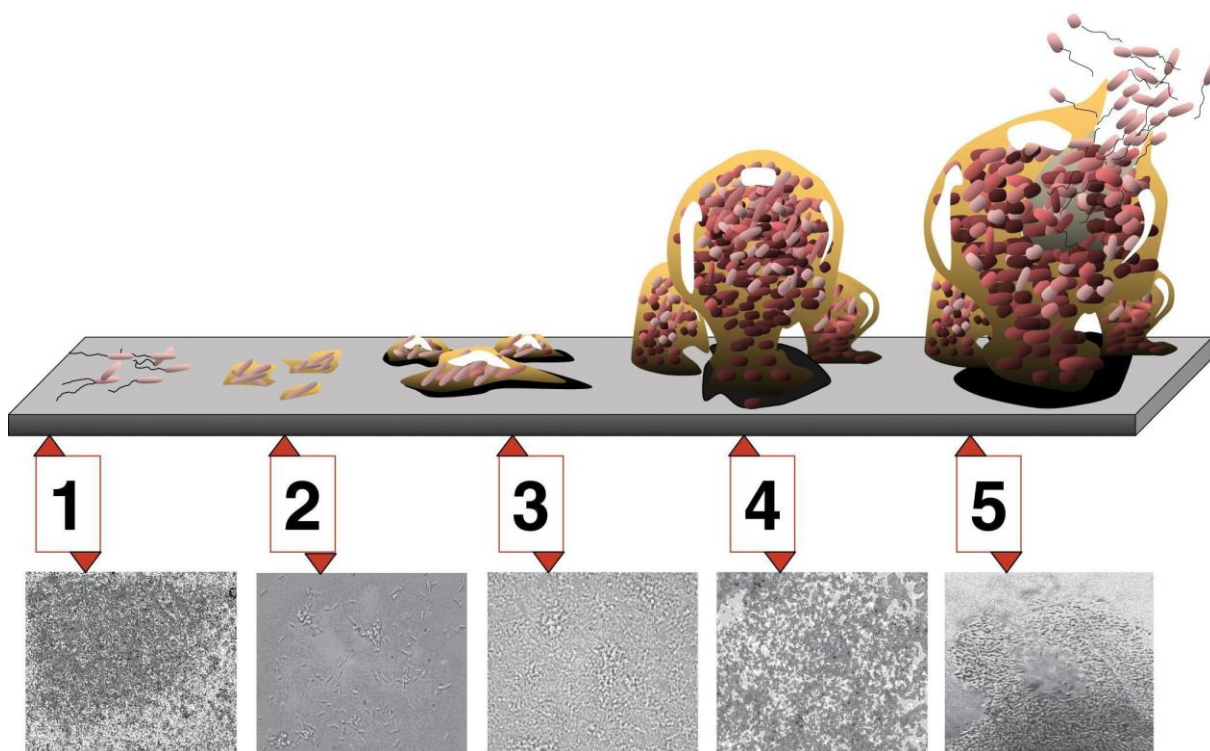
Přirozené bakteriální osídlení kůže se sestává z počtu $\leq 10^5$ kolonií tvořících jednotky (KTJ) v cm^2 , aniž by byly způsobeny klinické problémy. U otevřených ran je však přítomnost $>10^5$ KTJ/ cm^2 tkáně obecně brána jako klinická infekce (Edwards & Harding 2004).

Velká část těchto mikroorganismů tvoří strukturované konsorcium přichycené na kolonizovaném povrchu nazývané jako biofilm (Flemming & Wingender 2010; Wu et al. 2015). Adherující bakterie na povrchu produkují extracelulární polymerní látky, které tvoří biofilmovou matici, základní stavební složku biofilmu, kde vznikají další buňky. Následným dělením se tvoří mikrokolonie, které se diferencují v biofilm. Z biofilmu se mohou uvolňovat planktonické buňky a začít kolonizovat další místa (Obrázek 3). Extracelulární polymerní látky imobilizují buňky, udržují je v dlouhodobé těsné blízkosti a umožňují tak intenzivní vzájemnou interakci (Kalishwaralal et al. 2010).

Pro bakterie biofilm představuje velmi strategické místo na přežití. V biofilmu se buňky stávají rezistentní k účinkům antibiotik, jsou 50-1000 odolnější oproti ostatním bakteriím. Také nepodléhají obranným mechanismům hostitele, což vede k nárůstu obtíží při léčbě ran. Jakmile se tedy objeví biofilmová infekce, je velmi těžké ji odstranit (Flemming &

Wingender 2010; Wu et al. 2015). Výskyt biofilmu v místě poranění je uváděn jako hlavní faktor přispívající k mnohonásobným chronickým zánětlivým onemocněním. Phillips PL et al. (2010) předpokládají, že většina chronických ran obsahuje alespoň na některé části biofilmová společenství.

Některé bakterie v biofilmovém fenotypu produkují pigmenty, které lze za optimálních podmínek vizuálně detekovat. Například gram-negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa* produkuje toxický zelený pigment pyokyanin a zabarvuje hnis do modrozelené barvy (Cutting & White 2004).



Obrázek 3: Základní fáze tvorby biofilmu (Davis & McLister 2016). 1. Iničiální přilnutí, 2. Ireverzibilní přilnutí, 3. Zrání I., 4. Zrání II., 5. Uvolňování planktonických buněk a šíření kolonií. Na obrázku je znázorněna i tvorba biofilmu pod mikroskopem.

Klíčovou roli při hojení ran hraje polymikrobiální interakce, jako například méně invazivní druhy mikroorganismů mohou být synergické s virulentnější formou. Zpočátku jsou rány kolonizovány gram-pozitivními mikroorganismy, zatímco v chronické ráně trvající několik měsíců lze detekovat různé patogenní druhy, včetně anaerobní mikroflóry. Zhoršení rány způsobují například aerobní gram-negativní tyčinky *Pseudomonas aeruginosa*, fakultativně anaerobní gram-pozitivní *Staphylococcus aureus* a b-hemolytické streptokoky (Edwards & Harding 2004).

Dle množství bakterií v ráně lze vzájemnou interakci s hostitelem rozdělit do několika stupňů na pouhou povrchovou kontaminaci rány, kolonizaci rány, kde dochází k jejich množení, následuje kritická kolonizace rány s počtem $>10^5$ KTJ/cm². Posledním stupněm je infekce rány, při níž dochází k buněčnému poškození a vyvolá již zmíněnou zánětlivou reakci (Cutting & White 2004).

3.2 Probiotické mikroorganismy

Termín probiotiku pochází z řeckého slova „pro bios“ znamenající „pro život“ (Islam 2016). Probiotické mikroorganismy neboli probiotika jsou definována jako živé nepatogenní mikroorganismy, které při podávání adekvátním množstvím pozitivně ovlivňují zdraví konzumenta, především jeho gastrointestinální trakt. (Borchers et al. 2009; Williams 2010). Tato zmíněná definice zdůrazňuje dva důležité aspekty: zaprvé, že použité bakterie v probiotické formulaci musí být živé, protože pouze živé mikroby mají funkční vlastnosti zdraví prospěšné hostiteli, a za druhé existuje souvislost mezi dávkou a účinkem. Pokud se tedy v klinické praxi používají probiotické přípravky, musí být jasně uveden dávkovací režim a další specifikace používání (Cinque et al. 2016).

Historie využívání probiotik v medicíně sahá do roku 1907, kdy se ruský vědec a nositel Nobelovy ceny (1908) Elie Metchnikoff domníval, že dlouhověkost rolníků žijících na Balkáně souvisí s nadměrnou konzumací kyselého mléka obsahujícího *Lactobacillus bulgaricus*. Metchnikoff doporučoval pravidelnou konzumaci fermentovaných mléčných výrobků obsahující laktobacily vzhledem ke schopnosti eliminovat patogenní střevní bakterie. To lze považovat za první odkaz a první pochopení současného probiotického konceptu (Sánchez et al. 2017). Deset let poté byl poprvé izolován kmen *Escherichia coli* (*E. coli* nissle 1917) a byl použit k léčbě pacientů trpících bacilární úplavicí způsobenou gramnegativní bakterií *Shigella dysenteriae*. Od té doby se stále častěji vyskytují v odborné literatuře zmínky o probiotických mikroorganismech (Mackowiak 2013; Islam 2016). Mezi běžně používané probiotické mikroorganismy patří zejména bakterie mléčného kvašení (BMK) rodu *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Bifidobacterium* (Tabulka 3). BMK produkují mléčnou kyselinu jako hlavní metabolický produkt. V současné době je využívána i probiotická kvasinka *Sacharomyces boulardii* (Reid 2006).

Používaná probiotika musí být bezpečné pro potravinářské a klinické použití, tzn. nepatogenní, nedegradující střevní sliznici, nerezistentní na antibiotika a jejich činností nedochází ke konjugaci žlučových kyselin. Probiotika musí být tolerantní vůči kyselinám a pankreatickým enzymům vyskytujících se v trávicím traktu, aby přežila průchod a dostala se do míst účinku. Mezi další kritéria, která musí probiotika splňovat patří schopnost přilnout na sliznici a kolonizovat lidské střevo (alespoň dočasně), být stabilní během zpracování a skladování a mít klinicky zdokumentované a ověřené pozitivní účinky na lidské zdraví (Borchers et al. 2009).

Tabulka 3: Přehled bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií patřící mezi probiotika (upraveno dle Holzapfel et al. 2001).

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i>	Další BMK
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecali</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. delbrueckii bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus imulinus</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. johnsonii</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

Probiotika jsou běžně k sehnání jako doplněk stravy ve formě tablet, prášků, tobolek, nebo jsou součástí fermentovaných mléčných výrobků (jogurty, keřirové mléko atd.) (Williams 2010). V posledním desetiletí se zvýšil vědecký a komerční zájem o studium probiotik a prebiotik v souvislosti s jejich vlivem na lidské zdraví. Ve své publikaci Doron & Snyderman (2015) zmiňují jako hlavní výhodu probiotik to, že jsou řadu let považovány za mikroorganismy s minimálním bezpečnostním rizikem pro většinu populace. V roce 2011 zpráva zveřejněná Agenturou pro výzkum a kvalitu zdravotní péče (AHRQ) dospěla k závěru, že ačkoli žádné stávající klinické studie neodhalily důkazy o zvýšeném riziku používání probiotik, „současná literatura není schopna dostatečně a s jistotou zodpovědět otázky týkající se úplné bezpečnosti probiotik vycházející z intervenčních studií. Dle zprávy vydané společně Světovou zdravotnickou organizací (WHO) a Organizací pro výživu a zemědělství (FAO) z roku 2002 mohou být probiotika teoreticky zodpovědná za vedlejší účinky typu systémová infekce, nežádoucí metabolická aktivita bakteriálních buněk, nadměrná stimulace imunitního systému vedoucí k autoimunitním onemocněním a riziko přenosu genetického materiálu mezi probiotiky a rezidentní střevní mikrobiotou. Ve studiích Goldenberg et al. (2013) a Johnston et al. (2012) jsou uváděny při užívání probiotik drobné nežádoucí gastrointestinální příznaky, jako jsou křeče v oblasti břicha, nevolnost, řídká stolice, plynatost a nechutenství. Vedlejší příznaky se většinou objevovaly u jedinců trpících imunitním oslabením, syndromem krátkého střeva či předčasně narozených kojenců (Doron & Snyderman 2015). Přesto aby bylo možné uvádět jakékoliv zdravotní údaje je třeba, aby probiotické přípravky měly prokázáný prospěšný efekt prostřednictvím vhodných klinických zkoušek u cílové skupiny pacientů (Cinque et al. 2016).

Při výběru probiotického přípravku jsou nezbytné následující vlastnosti: specifický kmen musí být charakterizován pomocí vhodných fenotypových a genotypových technik, musí být definována matrice, ve které jsou kmeny dodávány, musí být uveden počet živých

KTJ (kolonie tvořící jednotky), které jsou v dané dávce a tento stav by měl platit do konce doby použitelnosti (Donelli et al. 2013; Cinque et al. 2016). Jejich účinnost závisí na schopnosti odolat průchodu trávicím traktem na místo působení bez změny jejich formy a schopností kolonizace střevní sliznice. Pro eliminaci negativních účinků kyselin trávicího traktu mohou být některé probiotické přípravky vyráběny ve formě speciálních mikrokapslí s patentovaným zapouzdřením, které je během jejich kritického průchodu ochrání (Williams 2010).

V posledních letech došlo k radikálnímu zvýšení zájmu o užívání probiotik, dle údajů ze Statista.com z roku 2014 přesáhl prodej probiotických doplňků stravy 1,1 miliard dolarů, na celém světě představují tržby z prodeje přibližně 25 miliard USD. Vzhledem k vysoké poptávce po probiotických přípravcích je na trhu dostupné široké spektrum těchto výrobků různých značek, složení a technologie zpracování, a ne všechny jsou stejně účinné. Proto výběr konkrétního přípravku pro dané onemocnění je velmi důležitý (Islam 2016). Nejčastěji studované a používané probiotické bakterie jsou *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*, kde první dva probiotické rody se nejvíce používají ve studiích souvisejících s lidským zdravím (Lolou & Panayiotidis, 2019). Tyto mikroorganismy se přirozeně vyskytují ve střevní mikrobiotě, proto je většina studií zaměřena na jejich vliv v kontextu přirozené funkce ve střevech a jako preventivní či terapeutické prostředky proti vzniku různých onemocnění (Mori et al. 2016; Sánchez et al. 2017).

3.2.1 *Lactobacillus* spp.

Bakterie rodu *Lactobacillus* spp. jsou grampozitivní, nesporeující, anaerobní, nepohyblivé tyčinky či kokobacily s obsahem GC (podíl guanino-cytosinového komplementárního páru) obvykle na 50 mol % (Tannock 2004). Optimální teplota růstu je mezi 30-40 °C, ale jsou schopny růst i při mnohem nižších teplotách. Optimální pH se pohybuje v rozmezí 5,5-6,2, růst pozitivně stimuluje i zvýšený obsah CO₂ v prostředí (okolo 5 %) (Salvetti et al. 2012).

Laktobacily se vyskytují v hojné míře tam, kde jsou k dispozici substráty bohaté na zkvasitelné sacharidy, jako například sliznice člověka (ústní dutina, GIT, genitourinární trakt), rostliny, materiály rostlinného původu, fermentované potraviny či půda a odpadní vody (Tannock 2004; Van Tassell & Miller 2011). V současné době je uznáno přes osmdesát druhů laktobacilů, které lze klasifikovat dle metabolických vlastností na obligátně homofermentativní, fakultně heterofermentativní a obligátně heterofermentativní laktobacily (Tannock 2004; Van Tassell & Miller 2011). Homofermentativní proces (metabolická skupina A) zahrnuje přeměnu hexóz pomocí glykolýzy (neboli Embden-Meyerhof-Parnasova dráha) s produkcí více jak 85 % mléčné kyseliny. Pentózy a glukonáty nefermentují. Mezi homofermentativní laktobacily patří například *L. delbreckii ssp. delbrueckii*, *L. delbreckii ssp. bulgaricus*, *L. delbreckii ssp. lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. farciminis* a *L. yamanashiensis*.

Při fakultativně heterofermentativní fermentaci (metabolická skupina B) vznikají kromě kyseliny mléčné i další produkty (etanol, octová a mravenčí kyselina). Fakultativně heterofermentativní laktobacily jsou schopny degradace pentóz i glukonátu pomocí indukované fosfoketolázy. Do fakultativně heterofermentativní laktobacily lze zařadit *L.*

alimentarius, *L. bavaricus* (*L. sake*), *L. casei ssp. casei*, *L. casei ssp. pseudoplantarum*, *L. casei ssp. rhamnosus*, *L. casei ssp. tolerans*, *L. curvatus*, *L. maltaromaticus*, *L. plantarum* a *L. sake* (*L. bavaricus*).

Obligátně heterofermentativní laktobacily (metabolická skupina C) fermentují pentózy a hexózy za vzniku mléčné kyseliny, octové kyseliny (etanolu) a CO₂. Oproti homofermentativní glykolýze, heterofermentativní přeměna zahrnuje jiný mechanismus fermentace přes 6- fosfoglukanovou kyselinu a vznikající pentózy (Salveti et al. 2012). Patří sem *L. bifermatas*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. confusus*, *L. divergens*, *L. fructivorans*, *L. hadotolerans*, *L. kadleri*, *L. kefir*, *L. reuteri*, *L. sanfranciscensis* a *L. viridescens*.

Rod *Lactobacillus* spp. je fylogeneticky klasifikován do devíti skupin, na *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. perolens*, *L. salivarius*, *L. pediococcus* a *L. vitulinus – cateformis* (Tannock 2004; Pot & Tsakalidou 2009).

Bakterie *Lactobacillus* spp. se považují za jeden z nejdůležitějších rodů z hlediska potravinářského a biotechnologického. Laktobacily jsou v potravinářství využívány především jako bakterie mléčného kvašení při výrobě zakysaných mléčných výrobků (jogurty, sýry, zakysaná mléka), fermentované zeleniny, fermentovaných masných výrobků a jako součást kvásku při výrobě chleba (Tannock 2004)

Některé laktobacily jsou schopny produkce bakteriocinů, které inhibují růst střevních patogenních bakterií, jako například *L. acidophilus* tvoří acidocin B. Bakteriocin acidocin B znemožňuje růst nežádoucím bakteriím jako je například *Listeria monocytogenes* a *Clostridium sporogenes*. *L. plantarum* produkuje bakteriocin inhibující *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* a znemožňuje jim uchycení na slizniční výstelku střeva. *Lactobacillus salivarius* produkuje bakteriocin ABP-118 inhibující růst patogenních bakterií *Bacillus*, *Listeria*, *Enterococcus* a *Staphylococcus* (Tannock 2004; Pot & Tsakalidou 2009).

3.2.2 Mechanismus a účinky působení probiotik

Základním mechanismem působení probiotik, respektive bakterií mléčného kvašení, je produkce mléčné kyseliny, propionové kyseliny a octové kyseliny, které snižují pH ve střevě a inhibují tím růst patogenních organismů, čímž obnovují rovnováhu střevní mikroflóry. Dalším antimikrobiálním mechanismem, který potlačuje růst patogenních mikroorganismů a vytváří bariérový efekt je tvorba peroxidu vodíku, organických kyselin, oxidu uhličitého, biosurfaktanů a antimikrobiálních peptidů-bakteriocinů (Borchers et al. 2009; Williams 2010).

Probiotika snižují kolonizaci patogenních mikroorganismů v močovém a gastrointestinálním traktu blokadí jejich adheze na epitel. Některé probiotické kmeny mají imunostimulační účinky. Podporují fagocytární aktivitu lymfocytů a makrofágů, stimulují produkci cytokinů a protilátek (IgA) (Borchers et al. 2009; Williams 2010).

Probiotika jsou doporučována jako preventivní opatření k udržení zdraví, zejména při onemocněních gastrointestinálního traktu, méně jsou používána jako podpurná terapie při specifických chronických onemocněních. V klinické praxi jsou nejčastěji probiotika doporučována při průjemových onemocněních, zánětlivých střevních onemocněních, jako prevence alergických reakcí, kolorektálního karcinomu a stimulaci imunity (Tabulka 4) (Ouweland et al. 2002; Ringel 2012). Dle Reid G. (2006) některé probiotické organismy

produkují antimikrobiální látky bakteriociny, které inhibují růst či způsobují smrt patogenních mikroorganismů. Svým působením narušují biofilmy, tím usnadňují antibiotické působení a celkově posilují slizniční imunitní systém. Bakteriociny zvyšují propustnost vnitřní membrány u gram-negativních bakterií, to vede k narušení syntézy buněčné stěny a tvorbě pórů vazbou na peptidoglykanový prekurzor (Lukic et al. 2017). Data podporující jejich použití jsou však často protichůdná, především u léčby GIT. Nejvíce důkazů potvrzující pozitivní vliv probiotik souvisí s léčbou akutního průjmu a idiopatických střevních onemocnění (Islam 2016).

Akutní gastroenteritida (akutní průjmové onemocnění) je zánětlivé infekční onemocnění zažívacího traktu. Může mít virový i bakteriální původ. Nejčastější příčinou akutního průjmového onemocnění u kojenců a dětí do věku 5 let je rotavirus, který napadá epitelální buňky tenkého střeva (Ouwehand et al. 2002; Reid et al. 2003). Canani et al. (2007) své studii potvrzuje, že funkčnost probiotik při léčbě akutních průjmů, zejména možnost využití *Lactobacillus rhamnosus* a *Saccharomyces boulardii* u dětí s infekčním rotavirovým průjmem. Některé probiotické kmeny (bifidobakterie, laktobacily) lze užívat i jako prevenci proti cestovatelskému průjmu, syndromu dráždivého tračníku (IBS) či při bolestech břicha a nadýmání (Williams 2010; Ringel 2012). Některé studie také prokazují vliv probiotik na snížení frekvence průjmu, kterým lidé trpí při užívání antibiotik (McFarland 2006).

Tabulka 4: Vybrané probiotické mikroorganismy a jejich klinicky zdokumentované pozitivní přínosy pro lidské zdraví (upraveno dle Ouwehand et al. 2002).

Rod	Druh	Bakteriální kmen	Přínos pro zdraví
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La5	Zmírnění průjmu způsobeného antibiotickou léčbou
	<i>casei</i>	Shirota	Zkrácení doby trvání rotavirové enteritidy
	<i>fermentum</i>	KLD	Snížení recidivy rakoviny močového měchýře; Imunomodulační účinky
	<i>johnsonii</i>	La1	Orální imunoterapie; Inhibice kolonizace sliznice žaludku <i>Helicobacter pylori</i>
	<i>paracasei</i>	F19	
	<i>plantarum</i>	299v	Zmírnění příznaků syndromu dráždivého tračniku; Snížení LDL cholesterolu
	<i>reuteri</i>	SD2112	Zkrácení doby trvání rotavirové enteritidy
	<i>rhamnosus</i>	GG	Zkrácení doby trvání rotavirového průjmu; Imunomodulační účinky; Zmírnění příznaků syndromu dráždivého tračniku; Léčba a prevence alergických onemocnění
	<i>salivarius</i>	UCC118	Zkrácení doby trvání rotavirové enteritidy
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>		Zkrácení doby trvání rotavirové enteritidy
	<i>longum</i>	BB536	
	<i>lactis</i>	Bb12	Léčba a prevence alergických onemocnění; zmírnění příznaků a prevence proti cestovatelskému průjmu; Zkrácení doby trvání rotavirové enteritidy; Orální imunoterapie
<i>Propionibacterium</i>	<i>freudenreichii</i>	JS	
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>		
	<i>cereus</i>	toyoi	
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	Nissle 1917	Snížení množství relapsů u zánětlivého onemocnění střev
<i>Enterococcus</i>	<i>faecium</i>	SF68	
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	<i>boulardii</i>	Snížení množství relapsů u zánětlivého onemocnění střev

Mezi chronická zánětlivá střevní onemocnění (idiopatické střevní onemocnění IBD), které způsobují narušení střevního mikrobiomu patří Crohnova choroba (CD) a ulcerózní kolitida (UC). Hlavní příčina těchto onemocnění není zcela zřejmá, ale pravděpodobně důležitou roli hraje genetická predispozice, vysoký hygienický standard v dětském období a kouření. Úpravou střevní mikrobioty pomocí vhodných probiotických mikroorganismů lze

snížit počet relapsů, prodloužit dobu remise a celkově zmírnit většinu příznaků onemocnění (Ouweland et al. 2002).

Syndrom dráždivého tračníku (IBS) je chronické onemocnění postihující 3-25 % světové populace. Některé studie prokázaly zmírnění některých příznaků IBS (bolesti břicha, zácpa/ průjem) při používání probiotických přípravků v důsledku udržení normální gastrointestinální mikroflóry. Nicméně, pro potvrzení pozitivních výsledků je zapotřebí více definitivních výsledků (McFarland 2006).

Hirayama & Rafter (2000) uvádí, že strava s vysokým obsahem živočišného tuku, masa a nízkým obsahem vlákniny mění složení střevní mikrobioty. Snižuje se množství bifidobakterií, naopak narůstá hladina hnilobných bakterií *Bacteroides* a *Clostridium*, zvyšujících bakteriální enzymovou aktivitu, především aktivitu β -glukuronidázy, azoreduktázy, ureázy, nitroreduktázy a reduktázy kyseliny cholové, které přeměňují prokarcinogeny na karcinogenní látky a přispívají tak ke zvýšenému riziku kolorektálního karcinomu. Konzumace vybraných probiotických mikroorganismů (*L. rhamnosus* GG a *Bifidobacterium animalis* spp. *lactis* Bb12) zabraňuje této nežádoucí enzymové aktivitě a snižuje tak riziko rakoviny tlustého střeva a konečníku (Borchers et al. 2009).

Přibližně 20 % populace ve vyspělých zemích trpí alergickým onemocněním. Tato zmíněná nejčastější porucha imunity způsobuje závažné zdravotní problémy. Alergické stavy často vycházejí ze změn složení střevní mikroflóry ihned po narození, kdy se ve větší míře vyskytují klostridie oproti bifidobakteriím. Dle studie Lodinova-Zadnikova et al. (2003) má vliv i druhové složení bifidobakterií, častější alergické reakce jsou spojovány s *Bifidobacterium longum*, naopak méně s *B. bifidum*. Podání probiotického nepatogenního kmene *Escherichie coli* po narození ve střevě stimuluje reakci lokálních protilátek. Úmyslná kolonizace střeva bakterií *E. coli* tedy radikálně snižuje alergická onemocnění, a to až do dvacátého roku života. Podle hygienické hypotézy narůstá náchylnost k alergickým onemocněním v důsledku zvýšené hygieny v dětském věku a nedostatku mikrobiálních podnětů, vedoucích k utlumení vývoje imunitního systému. Podporují se tak alergie zprostředkované imunoglobulinem E (IgE) (Borchers et al. 2009).

V posledních desetiletích došlo také k výraznému nárůstu lidí trpících atopickým ekzémem. Williams (2010) ve své studii potvrzuje 50% snížení frekvence výskytu atopického ekzému u dětí během prvních dvou let života, kterým byl podáván probiotický přípravek po dobu prvních 6 měsíců života. Probiotikum bylo předepisováno i těhotným ženám dva až čtyři týdny před očekávaným datem porodu. Ve skupině těhotných žen se také potvrdil pozitivní účinek konzumace probiotického přípravku obsahující *Lactobacillus rhamnosus*, který snižuje depresi a úzkostný porod (Slykerman et al. 2017).

Osoby trpící chronickými a epizodickými migrénami uvádějí významné snížení její frekvence a omezení konzumace léků na zmírnění symptomů migrény po suplementaci probiotického přípravku po dobu 10 dnů (Martami et al. 2019).

Až 75 % populace trpí primární, geneticky podmíněnou laktózovou intolerancí. Laktózová intolerance je definována jako podmíněná metabolická porucha neschopnosti trávit mléčný cukr (laktózu) z mléka a mléčných výrobků v důsledku nedostatečné aktivity enzymu β -galaktosidázy, který je produkován buňkami tenkého střeva a je nezbytný pro rozštěpení laktózy na monosacharidy galaktózu a glukózu. Nedostatečné natrávení laktózy způsobuje podráždění sliznice tlustého střeva a následné bolesti břicha, plynatost a průjemy. β -

galaktosidázu jsou schopny produkovat i bakterie mléčného kvašení (např. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *S. thermophilus*) jako sekundární metabolit (Park & Haenlein 2013). Konzumace fermentovaných mléčných výrobků tedy výrazně pomáhá k natrávení laktózy ve střevech a minimalizaci nežádoucích stavů (Ouweland et al. 2002)

Preventivním užíváním probiotik lze také předcházet kvasinkové infekci pochvy-vaginální kandidóze, způsobenou narušením vaginální mikroflóry, zejména kvasinkou *Candida albicans* (Williams 2010).

Jako denní efektivní dávka probiotik pro dospělého člověka se obvykle uvádí 10 až 20 miliard KTJ. Dávkování se liší v závislosti na daném probiotickém druhu a žádaném účinku. Tabulka 5 shrnuje doporučené dávkování pro různé probiotické kmeny. Fermentované mléčné výrobky, které jsou označovány jako „živé a aktivní“ by měly obsahovat minimálně 10^6 - 10^7 KTJ v 1 g výrobku (Williams 2010).

I přes řadu pozitivních účinků probiotik na lidské zdraví, mohou mít také nežádoucí účinky, především u kriticky nemocných a imunokompromitovaných pacientů. Takto nemocní lidé by měli zvážit rizika a výhody užívání probiotik před jejich konzumací a konzumovat je na odborným dohledem. Pravidelná konzumace probiotických doplňků stravy by měla být konzultována s lékařem i v době těhotenství a v kojeneckém věku.

Tabulka 5: Přehled některých probiotických kmenů a jejich doporučené dávkování při určitém onemocnění.

Indikace	Probiotický kmen	Doporučené dávkování	Zdroj
Akutní infekční průjem u kojenců a dětí	LGG	Alespoň 10^{10} – 10^{11} KTJ denně formou rehydratačního roztoku po dobu 2-5 dní	(Guandalini et al. 2000)
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	10^{10} – 10^{11} denně až 5 dní	(Van Niel et al. 2002)
Průjem spojený s antibiotiky	<i>Saccharomyces boulardii</i>	4×10^9 – 2×10^{10} KTJ denně 1-4 týdny	(McFarland 2006)
	LGG	6×10^9 – 4×10^{10} KTJ denně 1-2 týdny	(McFarland 2006)
Cestovní průjem	LGG	2×10^9 KTJ denně 2 dny před plánovanou cestou až po návrat zpět	(Williams 2010)
	<i>S. boulardii</i>	5×10^9 – 2×10^{10} KTJ denně 5 dní před plánovanou cestou až po návrat zpět	(McFarland 2007)
IBS	VSL#3	9×10^{11} KTJ denně po dobu 8 týdnů	(McFarland & Dublin 2008)
	<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	10^6 – 10^{10} denně po dobu 4 týdnů	(McFarland & Dublin 2008)
Ulcerózní kolitida (UC)	<i>E. coli</i> Nissle 1917	Aktivní UC: 5×10^{10} KTJ dvakrát denně až do remise (max. 12 týdnů), následně pokračovat ve stejné dávce jednou denně Neaktivní UC: 5×10^{10} KTJ denně	(Williams 2010)
	VSL#3	$1,8 \times 10^{12}$ KTJ (dva 3g sáčky) dvakrát denně po dobu 6 týdnů v kombinaci s konvenční léčbou	(Bibiloni et al. 2005)
Crohnova choroba	<i>S. boulardii</i>	Udržovací 1 g denně po dobu 6 měsíců v kombinaci s Mesalazinem	(Guslandi et al. 2000)
Prevence atopických onemocnění	LGG	10^{10} KTJ denně 2-4 týdny před očekávaným porodem, následně kojenecké podání po dobu 6 měsíců	(Kalliomäki et al. 2001)
Vaginální kandidóza	LGG	10^9 KTJ dvakrát denně ve formě čípku po dobu 7 dnů	(Williams 2010)
	<i>L. acidophilus</i>	250 ml jogurtu obsahující $\geq 10^8$ KTJ/ml denně po dobu 6 měsíců	(Williams 2010)

LGG-*Lactobacillus rhamnosus*, KTJ-kolonie tvořící jednotky, VSL#3- směs osmi probiotických druhů (*Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. longum*, *Bifidobacterium breve*, *B. infantis*, and *Streptococcus thermophilus*) prodáváných jako koncentrovaný doplněk stravy ve formě sáčků.

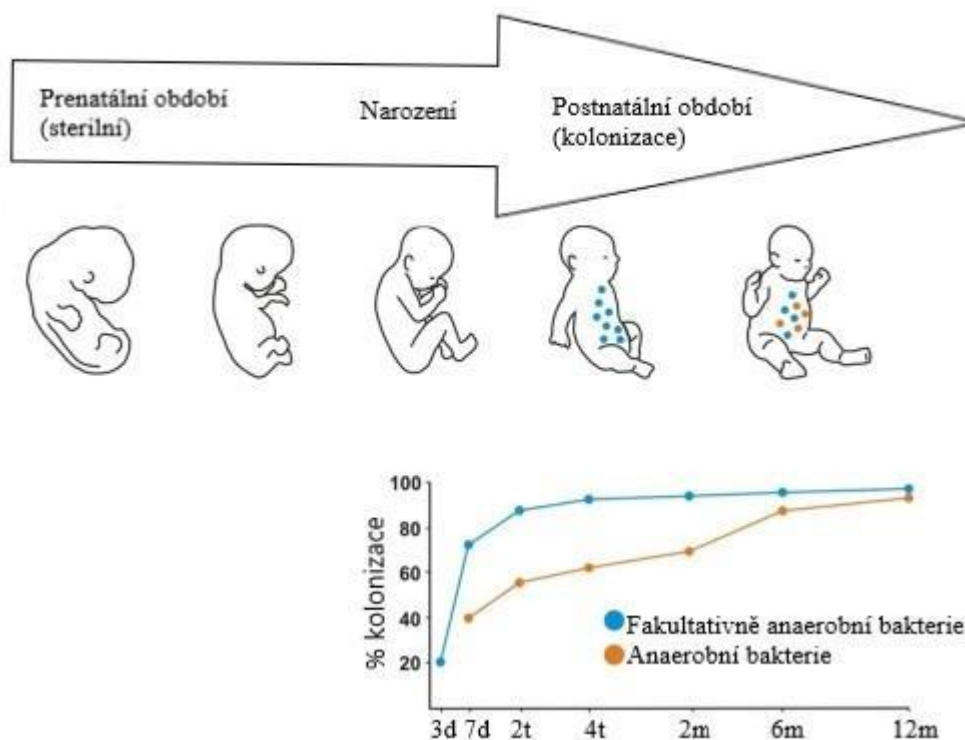
Mezi nejčastější nežádoucí účinky lze zařadit trávicí potíže, plynatost, nevolnost a vyrážku. U lidí s velmi oslabenou imunitou zvyšují riziko infekce. Tyto vedlejší účinky jsou z pravidla dočasné a po určité době samy odezní. Během užívání přípravku obsahující laktobacily byly nahlášeny vzácné případy septického stavu, endokarditidy a jaterního abscesu. Při pravidelné konzumaci *S. boulardii* se ojediněle vyskytla fungémie u pacientů trpících závažnými komorbiditami. Nicméně riziko, že užívání probiotik vyvolá pro život nebezpečný stav či onemocnění je velmi nízké (Horwitch et al. 1995; Hibberd & Davidson 2008; Islam 2016).

3.3 Mikrobiota lidského těla

Po celá léta bylo mikrobiální osídlení lidského těla označováno jako „mikroflóra lidského těla“. Výraz „mikroflóra“ lze doslovně přeložit jako „malé rostliny“. Bakterie, viry, kvasinky a prvoci jsou však taxonomicky velmi odlišné na rostlinné říši, doporučuje se tedy spíše používat termín „mikrobiota“ (Dinan & Cryan 2012).

3.3.1 Střevní mikrobiom

Každý jedinec má pro sebe charakteristické složení střevní mikrobioty, dokonce i střevní mikrobiota homozygotních dvojčat se liší (Isolauri et al. 2004). Na formování střevní mikrobioty se podílí několik faktorů. Nejvýznamnějším faktorem je způsob porodu (vaginální, císařský). Střevo embrya a plodu je sterilní, ke kolonizaci dochází postupně až během přirozeného porodu a je téměř autentický s mateřskou mikrobiotou. Přirozený porod vystaví dítě mateřské vaginální mikroflóře obsahující převážně *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* a *Peptococcus*. Naopak při porodu císařským řezem kolonizuje střevo převážně mateřská kožní mikroflóra, s dominantními mikroorganismy jako je *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* a mikroorganismy z vnějšího prostředí, nejčastěji tedy z prostředí nemocnice. Jak znázorňuje Obrázek 4 první mikroorganismy, které kolonizují trávicí trakt jsou fakultativně anaerobní. Po přibližně třech dnech začínají převažovat anaerobní mikroorganismy, nejspíš díky fakultativně anaerobním organismům, které redukuje redoxní potenciál ve střevech a tvoří tak optimální prostředí pro anaeroby (Isolauri et al. 2004; Jandhyala et al. 2015).



Obrázek 4: Vývoj mikrobiomu GIT v raném dětství (upraveno dle Grenham et al. 2011).

V prenatálním období je GIT plodu sterilní, kolonizace začíná během porodu fakultativně anaerobními bakteriemi (modrá barva), později se objevují anaerobní bakterie (oranžová barva). Do 1 roku má dítě podobný mikrobiom dospělému člověku.

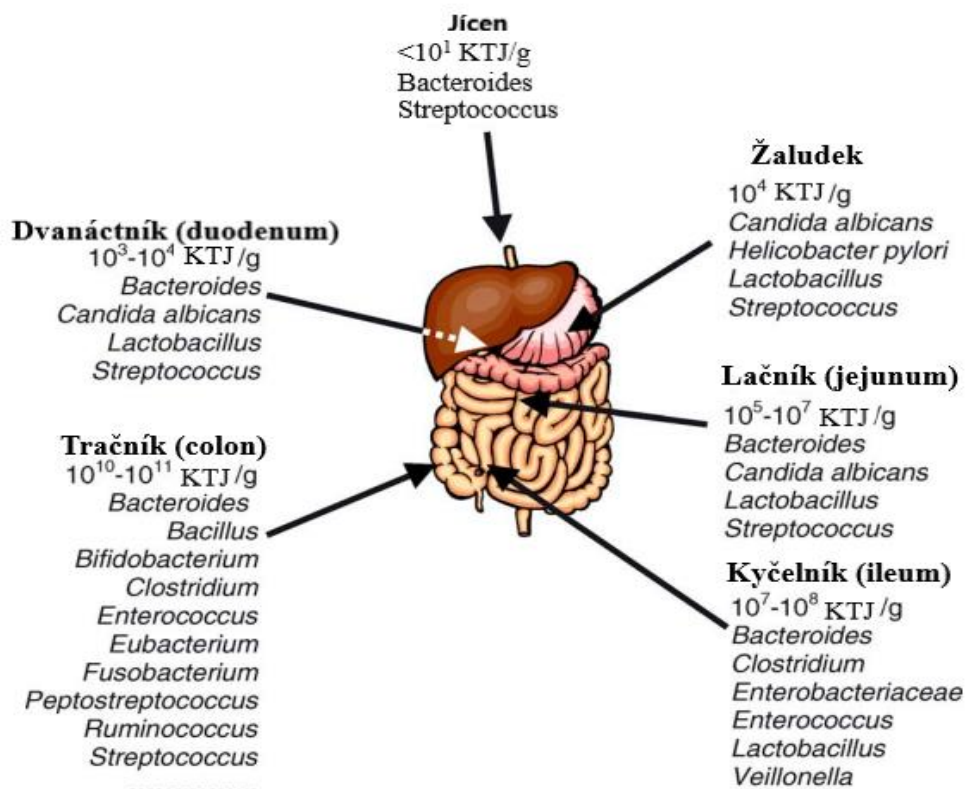
Nejen porod, ale i strava v kojeneckém věku ovlivňuje střevní mikrobiom, je uváděn rozdíl u kojenců stravovaných pouze mateřským mlékem a u kojenců odchovaných na umělé výživě. U kojených dětí se vyskytuje vyšší hladina *Bifidobacterií* a *Lactobacillus*, zatímco u kojenců na umělé výživě dominují ve střevech bakterie *Enterococcus*, *Enterobacteria*, *Bacteroides*, *Clostridium* a *Streptococcus*. Ale rozdíly jsou díky moderním umělým kojeneckým výživám výrazně nižší, než tomu bylo v minulosti (Isolauri et al. 2004; Jandhyala et al. 2015). Strava hraje důležitou roli i v pozdějším věku, velmi rozdílný mikrobiom mají všežravci na vegetariánů a veganů. Obecně je strava bohatá na ovoce, zeleninu a vlákninu spojována vyšší rozmanitostí a bohatostí střevního mikrobiomu. Dalším faktorem podílejícím na složení střevní mikrobioty je časté používání antibiotik (Isolauri et al. 2004; Jandhyala et al. 2015).

Lidské střevo obsahuje cca 10^{13} - 10^{14} bakterií, skládajících se z více než 35 000 druhů. Celkově je normální, zdravá střevní mikrobiota tvořena převážně bakteriemi *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Actinobacteria* a *Verrucomicrobia* (Jandhyala et al. 2015).

Bakteriální osídlení trávicí trubice je prostorově i časově velmi rozdílné v celkovém počtu bakterií (KTJ/g), na 10^1 KTJ/g v jícnu po obsah 10^{12} KTJ/g v tlustém střevu (Obrázek 5). Rozmanitost mikrobioty je i na úrovni rodu, z pravidla je *Streptococcus* dominantním rodem distálního jícnu, dvanáctníku a lačnicku. Žaludeční sliznici kolonizuje *Helicobacter pylori*, který může získat patogenní fenotyp a způsobit žaludeční vředy a jiné gastrointestinální potíže (Jandhyala et al. 2015). Více jak 70 % bakterií v lidském těle

se nachází v tlustém střevu. Z 80 % je střevní mikrobiom bakteriemi *Bacteroidetes* (*Bacteroides*, *Prevotella*) a *Firmicutes* (*Lactobacillus*). Zbytek tvoří *Proteobacteria* a *Actinobacteria*. Tlusté střevo kolonizují i primární patogeny, například *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera* a *E.coli* (Gillespie et al. 2011; Huttenhower et al. 2012; Hollister et al. 2014). Vyšší výskyt mikroorganismů ve spodní části trávicího traktu způsobuje nižší aktivita antimikrobiálních látek.

Vyskytují se i axiální rozdíly ve složení mikrobiálních druhů mezi mukózním a lumenálním povrchem střeva, kde lze pozorovat i anaerobní mikroorganismy. *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* a *Ruminococcus* patří mezi lumenální bakteriální rody a lze je identifikovat ve stolici, zatímco v mukózní vrstvu kolonizuje pouze *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* a *Akkermansia* (Swidsinski et al. 2005).



Obrázek 5: Bakteriální osídlení gastrointestinálního traktu (upraveno dle Isolauri et al. 2004; Jandhyala et al. 2015). Obrázek znázorňuje druhy bakterií a jejich počet kolonií tvořící jednotky (KTJ) v 1 gramu.

Přestože má každý jedinec pro sebe specifický mikrobiom lze střevní mikrobiom klasifikovat do tří střevních skupin neboli do tří enterotypů: enterotyp A s převažujícím bakteriálním rodem *Bacteroides*, enterotyp B s převažujícím bakteriálním rodem *Prevotella* a posledním je enterotyp C, kde převládá rod *Ruminococcus*. Enterotypové rozdělení vzniklo na základě jiné cesty získávání energie při fermentaci substrátů, které jsou dostupné ve střevě. Rozdělení do těchto tří skupin není závislé na pohlaví, věku, BMI ani rase, ale pravděpodobně souvisí s dietními návyky. Strava s vysokým obsahem proteinů a živočišných tuků se přiřazuje k lidem s enterotypem A. U lidí s enterotypem B se jídelníček skládá především ze sacharidů a u lidí s enterotypem C převažuje strava bohatá na polynenasycené mastné kyseliny a alkohol (Jandhyala et al. 2015).

Pro růst a aktivitu potřebných bakterií je nezbytný pravidelný příjem prebiotik, které slouží jako stimulanty těchto reakcí. Prebiotika jsou nejčastěji oligosacharidy (Tabulka 6) (oligofruktóza, inulin, galaktooligosacharidy a laktulóza) a komplexní polysacharidy (B-glukany, celulóza), které mimo příznivých účinků na střevní bakterie mají i pozitivní vliv na zdraví člověka. Tyto nestravitelné sloučeniny vykazují bifidogenní efekt, tzn. množství blahodárných probiotických bakterií kolísá v závislosti na přísunu prebiotické látky, která jejich růst selektivně podporuje (Lolou & Panayiotidis, 2019). Prebiotika působí imunostimulačně, zmírňují zácpu a působí preventivně proti střevním onemocněním a průjmu (Ringel, 2012).

Tabulka 6: Základní definice probiotik, prebiotik a synbiotik (Ringel 2012)

Probiotika	Živé mikroorganismy, které při podávání adekvátním množstvím, přispívají ke zlepšení zdravotního stavu hostitele
Prebiotika	Nestravitelné oligosacharidy, které stimulují růst anebo aktivitu střevní bakterie či skupiny bakterií, které mají pozitivní vliv na zdraví hostitele
Synbiotika	Kombinace probiotik a prebiotik se synergickým účinkem

Střevní mikrobiom, respektive obsah nežádoucích patogenních mikroorganismů ve střevech je často spojován s celou řadou onemocnění, jako například s Crohnovou chorobou, zánětlivým onemocněním střev, IBS, metabolickými onemocněními (obezita, diabetes), alergickými onemocněními či neurodevelopmentálními poruchami (Kennedy et al. 2014; Jandhyala et al. 2015). Souvislost složení střevního mikrobiomu s těmito onemocněními však není zcela potvrzená. Například několik studií ukázalo, že u pacientů se zánětlivým střevním onemocněním došlo ke změně střevní mikrobioty (zvýšený nárůst *Proteobacterií* a pokles *Firmicutes*, *Bacteroidetes*), i když není jasné, zda jsou tyto změny příčinou onemocnění, nebo jsou výsledkem zánětlivé odpovědi a rozsáhlé změny tkáně v GIT (Macfarlane et al. 2009).

Dle Isolauri et al. (2004) je metabolická aktivita střevní mikrobioty srovnatelná s aktivitou jater. Střevní mikrobiota se podílí na fermentaci exogenních a endogenních zdrojů uhlíku, štěpí komplexní sacharidy, díky tomu jsme schopni strávit ovoce a zeleninu. Fermentací různých druhů oligosacharidů se vytváří mastné kyseliny s krátkým řetězcem (acetát, butyrát a propionát) a tím zvyšuje rychlost proliferace epitelu, jeho integritu a reguluje diferenciaci buněk, tím se snižuje karcinogenní riziko (Sirisinha 2016). Některé bakteriální druhy produkují řadu významných vitaminů – vitamin K, B₁₂, niacin a pyridoxin (Topping & Clifton 2001). Střevní mikrobiota chrání proti patogenním mikroorganismům a moduluje imunitní i nervový systém (Isolauri et al. 2004; Sirisinha 2016)

Pro vyšetření a zjištění složení střevního mikrobiomu je nejjednodušší odběr vzorku stolice, nejlépe endoskopicky či během chirurgického zákroku (Isolauri et al. 2004). Při kvalitativním i kvantitativním studiu střevního mikrobiomu se používají dostupné genetické metody. Tyto metody vyplývají z charakterizace diverzity společenství na základě analýzy genů přítomných ve vzorku, nebo na systému genetického dekódování, který funguje na principu čtení sekvence bází molekuly DNA zkoumaného organismu. Identifikace a klasifikace vychází z hypotézy, že změna v pořadí bází určitých sekvencí pocházejících z různých mikroorganismů odráží jejich taxonomické rozdíly (Taberlet et al. 2012). V dnešní

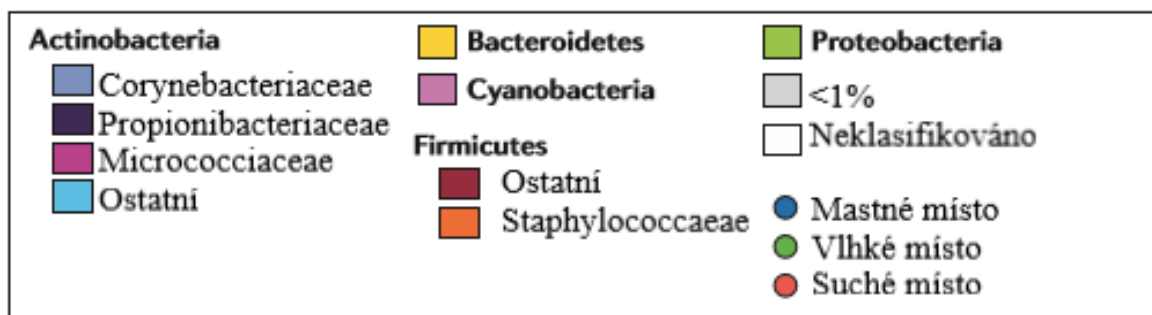
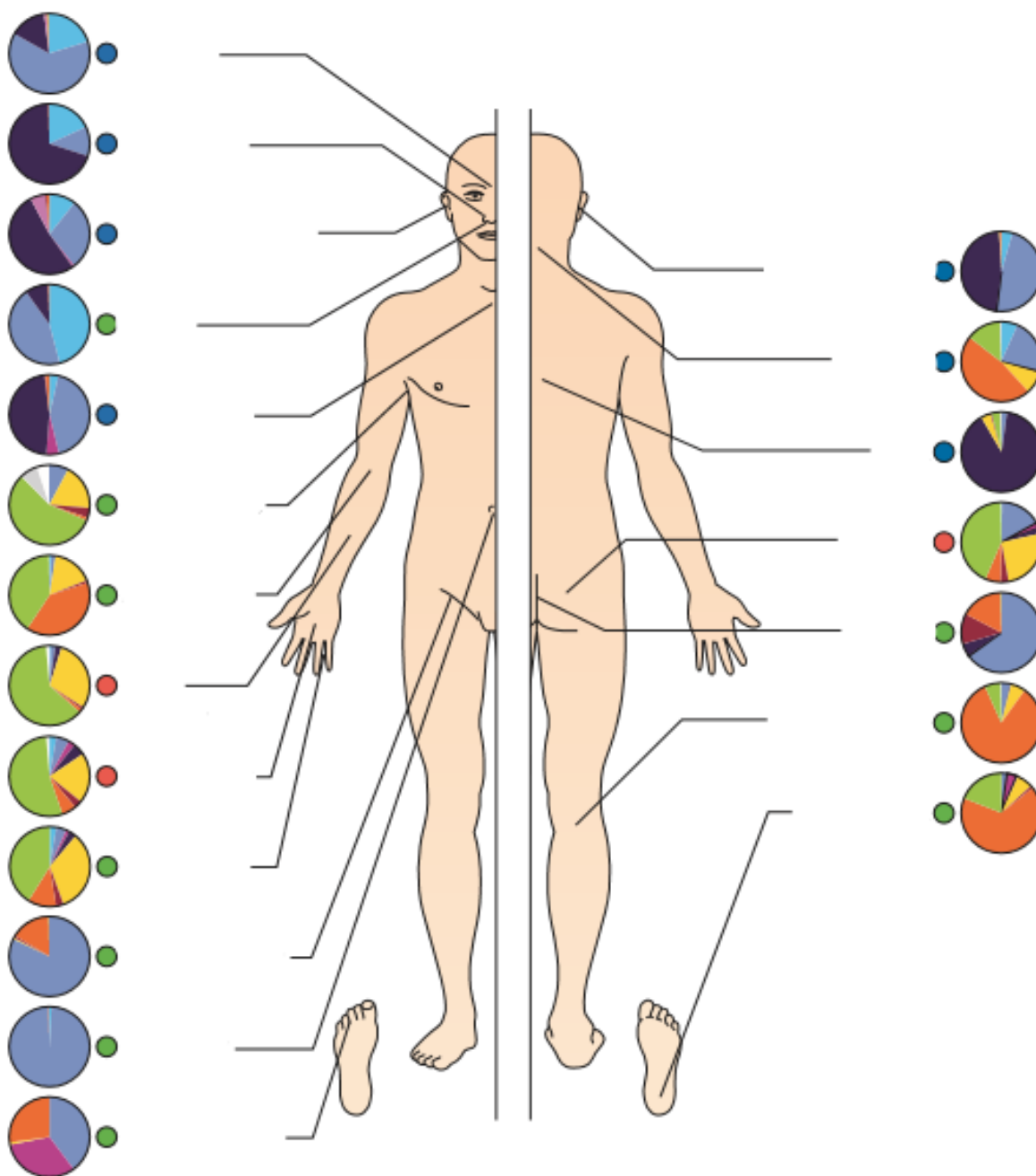
době se nejčastěji používá sekvenační metoda nové generace (NGS), která oproti starší metodě (Sangerovo sekventování, pyrosekventování) umožňuje levnější, rychlejší a přesnější generování většího množství dat (Ansorge 2009).

3.3.2 Kožní mikrobiom

Kůže je největší orgán lidského těla působící jako fyzická ochranná bariéra, která zabraňuje invazi patogenních mikroorganismů a zároveň poskytuje ideální podmínky pro prospěšné komenzální bakterie. Ochrana proti nežádoucím mikroorganismům je zajištěna antibakteriální aktivitou potu a mazu, kyselým pH (4-6) a přítomností saprofytických mikroorganismů. Narušení rovnováhy mezi nežádoucími a zdravými prospěšnými mikroorganismy vede k různým kožním onemocněním a může vyústit až k chronickým stavům. Kromě fyzické bariéry tvoří kůže i imunologickou bariéru. (Grice & Segre 2011).

Kůže odděluje vnitřní prostředí organismu na vnějšího prostředí a je kolonizována rozmanitým množstvím mikroorganismů včetně bakterií, virů, vláknitých hub a roztočů (Byrd et al. 2018).

Jak je znázorněno na obrázku 6 bakteriální osídlení kůže se mění vzhledem k rozdílné anatomii kůže v různých částech těla. V oblasti s vyšší teplotou a vlhkostí, jako je například třísla, podkolení jamka, loketní jamka a chodidla, lze najít například *Corynebacterium* a *Staphylococcus aureus*. Další faktor, který ovlivňuje složení mikroorganismů objevujících se na kůži je množství mazových žláz. Oblasti s vysokou hustotou mazových žláz, jako je obličej, hrudník a záda podporují růst lipofilních mikroorganismů, například bakterií *Propionibacterium* spp., hub *Malassezia* spp. a roztočů. Roztoč *Demodex folliculorum* (Trudník tukový) se nejčastěji vyskytuje v období puberty. Vzhledem k relativně suchému povrchu rukou a nohou se zde kvantitativně nachází nejméně mikroorganismů, lze identifikovat *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* a *Bacteroidetes* (Grice & Segre 2011).



Obrázek 6: Topografická distribuce bakterií na povrchu kůže (upraveno dle Grice & Segre 2011).

Obrázek znázorňuje klasifikaci bakterií, které kolonizují jednotlivá místa kůže. Modrý kruh znázorňuje mastné oblasti (obličej, dekolť, záda), zelený kruh vlhké oblasti (podkolenní jamka, loketní jamka, chodidla), červený kruh suché oblasti lidského těla (ruce).

Mikrobiální složení kůže ovlivňuje i prostředí ve kterém se daný jedinec nachází, věk a pohlaví. Mikrobiální rozdílnost mezi mužským a ženským pohlavím si lze vysvětlit jejich fyziologickými a anatomickými rozdíly, například hormonální rozdílností, odlišnou tvorbou potu a mazu. Dalším faktorem je například hygiena jednotlivce, výběr oblečení, povolání a četnost užívání antibiotik (Grice & Segre 2011; Byrd et al. 2018).

4 Materiál a Metodika

4.1 Materiál

V experimentech byly kultivovány tři bakteriální kmeny z rodu *Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *L. paracasei* a *L. reuteri*, které poskytla katedra Mikrobiologie, výživy a dietetiky (FAPPZ). *In vitro* model střevního a kožního epitelu byl vytvořen z buněčných linií HT29 a NHDF-Neo. Bylo použito Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), penicilin, streptomycin, pyruvát sodný, hydrogenuhličitan sodný, neesenciální aminokyseliny, fetální bovinní sérum (FBS), fosfátový pudr (PBS – Phosphate Buffered Saline) a trypsin (vše zakoupeno na firmy Sigma – Aldrich CZ). Firma Thermo Fisher Scientific (UK) poskytla 24 jamkové, jednorázové mikrotitrační destičky, serologické pipety, kultivační láhve a Petriho misky pro tkáňové kultury. Dále byl spotřebován běžný laboratorní materiál a využit inverzní mikroskop ZEISS PrimoVert s kamerou ZEISS AxioCam 512 color.

4.2 Metodika

4.2.1 Kultivace buněčných linií

V plastových kultivačních lahvích o velikosti 75 cm² byly pěstovány buněčné linie kolorektálního karcinomu HT29 a kožního epitelu NHDF-Neo. Kultivace probíhala v DMEM mediu obohaceným o 10% FBS, 1% hydrogenuhličitan sodný, 1% penicilin a streptomycin a 1% neesenciálních aminokyselin po dobu 7 dní v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C, 95% vlhkosti a 5% CO₂ atmosféře. Subkultivace byla prováděna každé 2 dny.

Buněčné monovrstvy byly po 7 dnech sklizeny a následně pročištěny 5 ml PBS, poté byl odstraněn. K buňkám bylo přidáno 5 ml trypsinu po dobu 3-5 minut, poté byla provedena neutralizace 1 ml DMEM media.

Ze dna kultivační lahve byly pomocí plastové škrabky uvolněny buněčné linie a celý obsah byl kvantitativně převeden do 15 ml centrifugační zkumavky (typ Falcon), která byla po dobu 10 minut centrifugována. Poté bylo staré medium nahrazeno novým o objemu 5 ml, kde došlo k resuspendaci buněk. Do nové kultivační lahve bylo odebráno 15 ml DMEM media a 1 ml suspenze z centrifugační zkumavky. Nová kultivační láhev byla vložena do CO₂ inkubátoru při stejné teplotě a atmosféře jako předešlá.

4.2.2 Založení mikrotitrační destičky

V 1 ml suspenze byl zjištěn obsah buněk dle metody počítání v Bürkerově komůrce. Metoda spočívá v odbarvení buněk trypanovou modří, následným odebráním kapky do již zmíněné Bürkerovy komůrky, kde dochází pomocí výpočtů k přesnému určení koncentrace sklizených buněk. V mém případě se jednalo o koncentraci 2,5 x 10⁵/ 1 ml.

Ve 24jamkové destičce již byly připravené a přichycené silikonové inserty zabraňující vytvoření souvislé monovrstvy, k nim byla připipetována buněčná suspenze, aby se zabránilo vzniku vzduchových bublin v blízkosti insert. Takto připravená destička se nechala v CO₂ inkubátoru 24 hodin.

4.2.3 Příprava buněčného lyzátu

Pro přípravu buněčného lyzátu bylo použito 10 ml 10^6 KTJ/ml vybraných laktobacilů: *L. acidophilus*, *L. paracasei* a *L. reuteri*, které byly 5 minut centrifugovány 3× po sobě při $2000 \times g$ a po každé centrifugaci promyty 10 ml PBS. Následně proběhla resuspendace v 5 ml PBS a extrakce pomocí ultrazvukového homogenizátoru po dobu 15 minut v ledové vodní lázni. Pro odstranění nechtěných zbylých celých bakterií byl použit stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,22 μm .

4.2.4 Hojení ran a buněčná migrace

Po 24hodinové inkubaci bylo z destičky odstraněno staré medium a pomocí pinzety opatrně odstraněna silikonová inserta, jamka byla následně promyta pomocí PBS aby došlo k odstranění neadherovaných buněk. Následně se do každé jamky přidalo 900 μl medium s obsahem FBS u vzorků zkoumající rychlost hojení ran a medium bez FBS u sledování buněčné migrace a 100 μl vzorkem testovaného bakteriálního lyzátu. Následně byla destička opatrně přemístěna na inverzní mikroskop, kde došlo k pořízení fotografie dané jamky v daných intervalech pro buněčnou migraci 0, 24, 48, 72 a 120 hodin a u hojení ran 0, 24, 48 a 72 hodin pro střevní buněčnou linii. U kožního epitelu to bylo pro buněčnou migraci 0, 2, 22 a 24 hodin a hojení 0, 2, 4, 22, 24 a 44 hodin. Pro správnou orientaci v zorném poli měl mikroskop na své konstrukci pravítka, která zobrazovala souřadnice výchozích bodů znázorňující místo první pozice snímku. V dalších časových intervalech se pozice vybraných snímků opakovala.

Získané fotografie byly následně analyzovány pomocí programu open source TSscrech, který analyzuje plochu s buňkami a bez nich. Získaná data byla následně statisticky zpracována.

4.2.5 Statistické vyhodnocení

Získané údaje byly přepočítány v Microsoft Excel a následně statisticky analyzovány v programu Graphpad Prism 6, kde byla provedena dvoufaktorová ANOVA.

5 Výsledky

V této práci byly *in vitro* testovány buněčné lyzáty *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. reuteri* a jejich schopnost ovlivnit hojení a rychlost migrace buněčné monovrstvy tvořené buněčnými liniemi HT29 a NHDF-Neo po mechanickém poškození. Pomocí inverzního mikroskopu byly v daných časových intervalech pořízeny snímky *in vitro* modelů střevního a kožního epitelu.

5.1 *In vitro* model střevního epitelu

5.1.1 Rychlost hojení poškození

Výsledky rychlosti hojení poškození na *in vitro* modelu kolorektálního adenokarcinomu buněčné linie HT29 znázorňuje tabulka 7, kde bylo hodnoceno, zda existuje statisticky významný rozdíl ve schopnosti ovlivnění vybraných bakteriálních kmenů rychlost hojení střevního epitelu.

Tabulka 7: Šířka zarostlé plochy místa poškození v % na buněčné monovrstvě *in vitro* modelu střevního epitelu. Statistické zhodnocení schopnosti ovlivnění jednotlivých kmenů bakterií rychlost hojení.

Kmen	24 hodin	48 hodin	72 hodin
	Průměr ± SD		
<i>L. acidophilus</i>	57,73 ± 2,73 ^a	88,68 ± 3,91 ^b	98,44 ± 7,31 ^{ab}
<i>L. paracasei</i>	62,70 ± 4,31 ^a	96,84 ± 4,57 ^b	99,70 ± 3,49 ^b
<i>L. reuteri</i>	47,00 ± 1,07 ^a	75,50 ± 5,11 ^b	95,93 ± 4,64 ^{ab}
Kontrola	65,72 ± 2,68 ^a	99,16 ± 3,73 ^b	99,59 ± 3,2 ^b

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry ± směrodatné odchylky šířky zarostlé plochy místa poškození v %. Hodnoty v rádcích s rozdílnými indexy (a, b) v daných časových intervalech vyjadřují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$.

Po 24hodinové expozici vykazovaly všechny vzorky ošetřené laktobacily (LAC) statisticky významně rozdílnou zpomalenou známku reepitelizace tkáně oproti ničím neošetřenému, kontrolnímu vzorku. Největší nárůst epitelální tkáně po 24hodinách lze tedy pozorovat u kontrolního vzorku s přídatkem PBS pufru, a to se statisticky významným rozdílem s hodnotou 65,72 %. Z LAC nejlepších výsledků, i když s mírně inhibičním účinkem dosáhl se statisticky významným rozdílem *L. paracasei* s 57,73 % šířkou obnovené tkáně. Ve stejném intervalu dle průměrných hodnot má nejnižší nárůst tkáně vzorek s probiotickým kmenem *L. reuteri* s 47 % zarostlé tkáně. Po 48 hodinách zůstává pořadí stejné. Po kontrolním s téměř zahojeným poškozením 99,16 %, se statisticky významně nejrychleji obnovuje tkáň, kde byl ve vzorku použit probiotický kmen *L. paracasei* s hodnotou 96,84 %. V posledním pozorovaném úseku jsou všechna poškození zacelená o více než 95 %. Největší nárůst tkáně v intervalu 72 hodin je patrný u *L. paracasei* s 99,70 %, oproti kontrole, kde je hojení pomalejší o 0,11 %. Od předešlého měření se statisticky významně nelišil. Nejpomalejší obnova proběhla u vzorku s probiotickým kmenem *L. reuteri*, kde byla hodnota se statisticky významným rozdílem, a to 95,93 % uzavřené rány.

5.1.2 Rychlost buněčné migrace

Dále byla statisticky hodnocena rychlost migrace buněk buněčné linie HT29 na *in vitro* modelu kolorektálního adenokarcinomu. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8.

Tabulka 8: Procentuální znázornění reepitalizované tkáně *in vitro* modelu střevního epitelu. Statistické zhodnocení schopnosti ovlivnění jednotlivých kmenů bakterií rychlost buněčné migrace.

Kmen	24 hodin	48 hodin	72 hodin
	Průměr ± SD		
<i>L. acidophilus</i>	28,42 ± 4,10 ^a	50,54 ± 2,99 ^a	61,69 ± 2,84 ^a
<i>L. paracasei</i>	30,85 ± 5,49 ^a	48,35 ± 6,94 ^a	53,34 ± 6,28 ^b
<i>L. reuteri</i>	4,59 ± 4,58	9,60 ± 5,16	21,77 ± 6,18
Kontrola	25,00 ± 6,31 ^a	49,90 ± 2,59 ^b	60,98 ± 3,34 ^b

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry ± směrodatné odchylky šířky zarostlé plochy místa poškození v %. Hodnoty v rádcích s rozdílnými indexy (a, b) v daných časových intervalech vyjadřují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$ oproti předešlému měření.

Tabulka 8 znázorňuje statistické hodnocení průměrných hodnot ± směrodatná odchylka rychlosti migrace buněk v daných časových intervalech. Uvedené hodnoty byly získány stejným způsobem jako v předešlé tabulce (Tabulka 7). V tabulce lze vidět postupný procentuální nárůst hodnot, který znázorňuje buněčnou migraci v daných časových intervalech v porovnání s počátečním časem 0 hodin, kde buňky nevykazovaly žádnou aktivitu do místa poškození (0 % reepitalizace).

Ve 24. hodině dochází ke statisticky významně nejrychlejší buněčné migraci u vzorku s probiotickým kmenem *L. paracasei* s 30,85 % zarostlou plochou. Velmi podobnou hodnotu měl i vzorek s přidavkem *L. acidophilus* s 28,42 %. Výrazně nejpomalejší buněčná migrace, bez statisticky významného rozdílu, proběhla u vzorku s *L. reuteri* (4,59 %), který vykazuje výrazné známky zpomalené reepitelizace oproti kontrolnímu vzorku, kde byla šířka rány uzavřenější o 20,41 %. Ve všech časových úsecích zůstalo pořadí vzorků stejné. Na konci měření po 72 hodinách měl nejlepší výsledky, tzn nejrychlejší migraci buněk, vzorek s probiotickým druhem *L. acidophilus*, kde došlo k 61,69 % nárůstu epitelální tkáně, bez statisticky významného rozdílu. Nejméně úspěšný byl v tomto měření vzorek obsahující *L. reuteri* s šířkou poranění 78,23 %. Tkáň se tedy během 72 hodin reepitalizovala pouze o 21,77 % bez statisticky významného rozdílu a je tak zjevná snížená schopnost obnovy tkáně při porovnání s kontrolou.

5.2 *In vitro* model kožního epitelu

5.2.1 Rychlost hojení poškození

Statisticky zpracované výsledky rychlosti hojení poškození na *in vitro* modelu kožního epitelu buněčné linie NHDF-Neo znázorňuje tabulka 9.

Tabulka 9: Šířka zarostlé plochy v místě poškození v % na buněčné monovrstvě *in vitro* modelu kožního epitelu. Statistické zhodnocení schopnosti ovlivnění jednotlivých kmenů bakterií rychlost hojení.

Kmen	2 hodiny	24 hodin	44 hodin
	Průměr ± SD		
<i>L. acidophilus</i>	0,84± 2,86	43,42±7,24 ^a	72,66±6,12 ^b
<i>L. paracasei</i>	1,45 ± 3,33	40,99± 3,09 ^a	58,60± 3,01 ^a
<i>L. reuteri</i>	0,16± 2,94	27,77± 6,66 ^a	49,46± 3,09 ^b
Kontrola	1,08±2,72	50,91±4,26 ^a	72,41±7,12 ^a

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry ± směrodatné odchylky šířky zarostlé plochy místa poškození v %. Hodnoty v řádcích s rozdílnými indexy (a, b) v daných časových intervalech vyjadřují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$.

Data byla získána a statisticky vyhodnocena stejným způsobem jako u pokusu rychlosti hojení poškození střevního epitelu (Tabulka 7). V 0. hodině je míra reepitalizace kožní tkáně 0 %, postupem času docházelo k jejímu hojení-procentuálnímu nárůstu hodnot.

Po 2 hodinách jsou hodnoty poměrně vyrovnané. Největší nárůst epiteliální tkáně lze pozorovat u vzorku s přidavkem probiotického kmene *L. paracasei* s 1,45 % bez statisticky významného rozdílu, naopak nejmenší obnova kožní tkáně je zjevná u vzorku *L. reuteri* s 0,16 % bez statisticky významného rozdílu. Po 24 hodinách se na přední příčce dostal kontrolní vzorek se statisticky významným rozdílem s 50,91 % zarostlé plochy, vzorky s LAC tedy vykazují zpomalenou reepitelizaci. Na konečném měřeném úseku proběhla statisticky významně největší obnova tkáně u vzorku s *L. acidophilus*, kde byla šířka obnovené tkáně 72,66 %, výsledek byl srovnatelný s kontrolou, která vykazovala pomalejší reepitelizace o pouhých 0,25 %. Výrazně zpomalená je obnova tkáně u vzorku s přidavkem *L. reuteri*, která má o 22,95 % méně zarostlé plochy oproti kontrole.

5.2.2 Rychlost buněčné migrace

Výsledky statistické analýzy ve schopnosti vybraných bakteriálních kmenů ovlivnit rychlost migrace buněk buněčné linie NHDF-Neo na *in vitro* modelu kožního epitelu znázorňuje tabulka 10. Uvedené hodnoty byly získány stejným způsobem jako v předešlých tabulkách.

Tabulka 10: Procentuální znázornění reepitalizované tkáně *in vitro* modelu kožního epitelu. Statistické zhodnocení schopnosti ovlivnění jednotlivých kmenů bakterií rychlost buněčné migrace.

Kmen	4 hodiny	22 hodin	24 hodin
	Průměr ± SD		
<i>L. acidophilus</i>	2,13±3,69 ^a	8,64±4,77 ^b	32,44±4,12 ^{ab}
<i>L. paracasei</i>	1,54±0,99	2,84±2,97	4,20±4,37 ^a
<i>L. reuteri</i>	5,25±2,15 ^a	4,93±3,19 ^a	10,62±6,74 ^a
Kontrola	4,54±3,82 ^a	25,51±8,12 ^b	30,19±7,54 ^b

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry ± směrodatné odchylky šířky zarostlé plochy místa poškození v %. Hodnoty v rádcích s rozdílnými indexy (a, b) v daných časových intervalech vyjadřují statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $p < 0,05$.

Z výše uvedených hodnot lze zhodnotit, že statisticky významně nejrychleji probíhala buněčná migrace po 4 hodinách u vzorku s probiotickým přídatkem *L. reuteri* s 5,25 % zarostlou poškozenou plochou. Ostatní vzorky vykazují inhibiční účinky na proces buněčné migrace, protože nepřesahují hodnotu 1 %. Po 22 hodinách výrazně nejrychleji migrují buňky u kontrolního vzorku, kde míra zarostlé plochy je 25,51 % se statisticky významným rozdílem, u LAC se tedy objevuje zpomalená reepitelizace poškozené tkáně. U vzorku *L. reuteri* dochází ke zmenšení reepitalizované tkáně, kde po 4 hodinách byla zarostlá plocha 5,25 % a po 22 hodinách pouze 4,93 %. Nejspíše se jedná o chybné měření v důsledku manuální práce s mikroskopem a kamerou. V posledním měřeném úseku došlo k statisticky významně nejrychlejší migraci buněk do místa poškození u vzorku *L. acidophilus* s 32,44 %. Velmi podobným výsledky vykazoval i kontrolní vzorek s 30,19 % zarostlou plochou. Nejpomalejší buněčná migrace byla naměřena u vzorku *L. paracasei* s pouhými 4,20 % zarostlé plochy poškození, který se statisticky významně lišil od předchozího měření.

6 Diskuze

Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou probiotika živé mikroorganismy, které „pokud jsou podávány v adekvátním množství mohou hostiteli přinášet prostřednictvím řady mechanismů zdravotní přínos“. Nejčastěji studované a používané probiotické bakterie jsou *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus*, kde první dva probiotické rody se nejvíce používají ve studiích souvisejících s lidským zdravím. Za tímto účelem jsou probiotika používána ke studiu a léčbě zejména střevních chorob (Lolou & Panayiotidis 2019). Vliv probiotických mikroorganismů je i hojně využíván v rámci experimentálních intervenčních studií zaměřených na prevenci nebo léčbu kožních onemocnění, například atopické dermatitidy či hojení ran (Kim et al. 2010). Pro posouzení bezpečnosti a výzkum efektivity probiotik jsou rozhodující *in vitro* testy. Nejběžněji používané jsou *in vitro* testy zjišťující rezistenci probiotických organismů vůči žaludečním a žlučovým kyselinám, schopnost adhezce k sliznici, lidskému epitelu či buněčným liniím, antimikrobiální aktivitu vůči nežádoucím mikroorganismům a aktivitu hydrolázy žlučových solí (Sánchez et al. 2017).

Existuje celá řada *in vitro* testů zkoumající vliv probiotik na hojení ran. Archer et al. (2018) provedli studii na buněčné linii kolorektálního adenokarcinomu, tvořeného HT29 a Caco-2 buňkami, zkoumající vliv lyzátů laktobacilů na schopnost adheze a stimulace imunitní odpovědi. Všechny testované druhy vykazovaly vysokou míru adheze k oběma buněčným liniím. Při sledování schopnosti laktobacilů stimulace cytokinů účastnicích se významně na imunitní odpovědi podněcoval *L. fermentum* expresi interleukinů (IL- 1, IL- 6, IL-10), zatímco exprese TNF- α (tumor nekrotizující faktor) byla potlačena. *L. delbrueckii* stimuloval expresi IL-1, ale v expresi dalších cytokinů nedošlo. Dle získaných výsledků jsou tak některé druhy laktobacilů schopny modulace imunitního systému udržováním rovnováhy mezi prozánětlivými a protizánětlivými cytokiny. Podobné výsledky jsou popsány i v několika experimentálních studiích Viařu-Bolocan et al. (2013), které vysvětlují, že probiotické bakterie zvyšují počet T-lymfocytů, CD4+ buněk a sekreci imunoglobulinu A. Stimulují proliferaci lymfocytů a produkci cytokinů, které jsou nezbytným mediátorem sledu událostí hojení ran a podílejí se na regulaci imunitní odpovědi. Výzkumná práce Vissers et al. (2010) zaměřená na hodnocení imunomodulačního účinku *L. acidophilus* a *L. plantarum* na profily cytokinů a proliferativní odezvu periferních krevních mononukleárních buněk dospěla k závěru, že testované kmeny byly schopny indukovat produkci cytokinů IL-1b, IL-10, IFN- α a TNF- α .

V této diplomové práci probíhalo *in vitro* testování probiotických druhů *Lactobacillus* spp., konkrétně *L. acidophilus*, *L. paracasei* a *L. reuteri*, kde jsme zjišťovali, zda mají jejich lyzáty pozitivní vliv na hojení buněčné monovrstvy či rychlost migrace buněk do místa poškození. Pro testování byly použity dva druhy buněčných linií. První monovrstvu tvořily buňky lidského adenokarcinomu tlustého střeva HT29. Při testování *in vitro* modelu kožního epitelu byla použita buněčná linie NHDF-Neo (Human Dermal Fibroblasts-Neonatal), tedy lidské neonatální dermální fibroblasty.

V rámci *in vitro* prováděném testování jsme se zaměřili na rychlost migrace buněk do místa poškození a celkovou rychlost reepitalizace poškozené tkáně v daném čase. Při zjišťování rychlosti hojení mechanického poškození buněčné linie HT29 jsme zjistili, že největší míra reepitalizace po 24hodinové expozici proběhla u kontrolního vzorku, kde

se přibližná šířka mechanicky vytvořeného škrábance zmenšila o 65,72 % od počáteční hodiny. Velmi podobný výsledek jsme zjistili i u vzorku obsahující *L. paracasei*, který se od kontroly lišil pouze o 3,02 %. U *in vitro* modelu kožního epitelu tvořeného NHDF-Neo buňkami se nejlepší výsledky po 24 hodinách objevily opět u kontrolního vzorku s 50,91% reepitalizací poškození. Následoval vzorek s *L. acidophilus*, kde se hodnoty lišili o 7,49 %. Oproti tomu u vzorku s přídatkem *L. reuteri* jsme naměřili výrazně nejnižších výsledků. U vzorků sledujících rychlost migrace buněk bylo nejlepších výsledků dosaženo u vzorků s *L. paracasei* a *L. acidophilus* na buněčné linii HT29. Rychlost buněčné migrace probíhala výrazně pomaleji než u sledování celkové rychlosti hojení, kde bylo přidáno fetální bovinní sérum (FBS). U sledovaného vzorku obsahující *L. paracasei* se šířka vytvořeného škrábance zmenšila pouze o 30,85 %. V porovnání s šířkou škrábance ve stejný čas s kontrolním vzorkem se hodnoty liší pouze o 5,85 %. Nejnižších výsledků opět dosáhl vzorek s přídatkem *L. reuteri*, kde přibližná reepitalizace poškození nepřesáhla ani 5 %. U buněčné linie NHDF-Neo probíhala rychlost migrace podobně, nejlepších výsledků dosáhl vzorek obsahující *L. acidophilus* s 32,44 % zacelením rány, následovala kontrola s 30,19 %, rozdíl míry reepitelizace je tedy o 2,25 % nižší. Ze získaných výsledků je patrné, že hojení ran ovlivňuje přítomnost FBS, které ho podporuje. Vzorky sledující rychlost migrace buněk přídatkem FBS neobsahují, nejsou jím tedy ovlivněny a dávají nám tak lepší představu o reakci buněk na dané podněty. Při porovnání všech vzorků na konci měření lze říci, že se zvýšené známky hojení u obou typů buněčných linií dosáhl vzorek s probiotickým *L. acidophilus* a následně kontrolní vzorek. *L. acidophilus* tedy může mít pozitivní účinek na zvýšené hojení epitelu tvořeného buňkami HT29 i NHDF-Neo. Naopak u lyzátu *L. reuteri* je viditelná snížená rychlost reepitelizace buněčné monovrstvy při porovnání s výsledky kontroly. U všech vzorků byl zaznamenán značný nárůst epitelální tkáně, statisticky lze zhodnotit, že veškeré uvedené hodnoty šířky zarostlé plochy poškození z počáteční hodiny se statisticky významně liší na hladině významnosti 0,5 ($P < 0,05$) na následných naměřených hodnotách v určitých časových intervalech pro daný typ buněčné monovrstvy. Naměřené výsledky poukazují na fakt, že buněčná linie HT29 má lepší schopnost hojit poškození oproti buněčné linii NHDF-Neo. Střevní buňky HT29 zvyšují produkci signálních molekul cytokinů, které reagují na zánětlivé stimuly a významně se účastní při imunitní odpovědi (Bottani et al., 2019).

Pozitivní vliv *L. acidophilus* byl potvrzen i ve studii Sivieri et al. (2013). Testování probíhalo na simulátoru modelu lidského střevního mikrobiálního systému (Shime), ve kterém lze zřídit podmínky podobající se skutečnému *in vivo* testování. Po dobu 4 týdnů bylo do simulátoru přidáváno 5 ml 10^8 KTI/ml *L. acidophilus* a následně odebráno několik vzorků pro mikrobiologickou analýzu složení střevního mikrobiomu a analýzu obsahu mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA) a amoniaku. Z výsledků je patrné ovlivnění složení střevní mikrobiální komunity po kolonizaci *L. acidophilus*. Došlo k výraznému zvýšení laktobacilů a bifidobakterií, a to minimálně o 2 log KTI ve všech částech tlustého střeva oproti původnímu složení. Ve všech kompartmentech tlustého střeva byl však pozorován i vysoký nárůst klostridií, které mohou být škodlivé z důvodu jejich metabolické aktivity a patogenního charakteru. Dle Possemiers et al. (2010) vysoký počet klostridií nemusí nutně souviset s negativními účinky na zdraví, protože mnoho druhů *Clostridium* spp. je spojeno s produkcí SCFA. Produkce SCFA je považována za přínosnou, protože tyto

sloučeniny jsou schopny inhibice některých patogenních mikroorganismů, čímž podporují obranyschopnost. Rychlost a množství SCFA ve střevech závisí především na bakteriálním druhu a době průchodu střevem. U dalších mikrobiálních rodů nedošlo v průběhu léčby *L. acidophilus* k významné změně v množství. Dalším aspektem, pokud jde o metabolickou aktivitu, je produkce amoniaku, která je markerem proteolytické aktivity mikrobiální populace. Během podávání *L. acidophilus* došlo k významné redukci v produkci amonných iontů, které mohou při trvalém zvýšeném množství způsobit jaterní kóma.

Výrazně lepších výsledků než v mé diplomové práci dosáhl bakteriální kmen *L. reuteri* v *in vitro* studii Mohammedsaeed et al. (2015). Cílem bylo zjistit, zda jsou určité lyzáty probiotických kmenů *Lactobacillus* prospěšné při hojení kožních ran. K posouzení míry reepitalizace poškozené tkáně byly vybrány lidské epidermální keratinocyty, které byly mechanicky poškrábány, následně na ně aplikovány bakteriální lyzáty a dokumentovány v průběhu daných časových intervalů. Reepitalizace ošetřených vrstev byla podobně jako v našem pokusu porovnána s kontrolním vzorkem. Po 18 hodinách bylo u vzorku obsahující *L. reuteri* 90,40 % plochy poškození uzavřeno v porovnání s kontrolní monovrstvou, kde byla zreepitalizovaná tkáň pouze 75,20 %. Tato studie prokázala, že schopnost zvýšené reepitalizace *L. reuteri* byla pravděpodobně způsobena zvýšenou stimulací buněčné migrace a proliferace keratinocytů. Ve výzkumu byl neúspěšnější bakteriální lyzát *L. rhamnosus* GG s 95 % zreepitalizovanou tkání. Analýza poranění ošetřených *L. rhamnosus* GG poukázala na zvýšenou expresi genů, včetně chemokinu CXCL2 a jeho receptoru CXCR2, které stimulují již zmíněnou proliferaci a migraci keratinocytů, zároveň působí i na snížení toxicity patogenních mikroorganismů a schopnosti jejich adheze.

Peral et al. (2009) provedli malou studii s pacienty na oddělení popálenin a plastické chirurgie, kteří trpěli kombinací popálenin druhého a třetího stupně. Studie byla prováděna se záměrem porovnání léčby popálenin s běžně používaným antimikrobiálním přípravkem sulfadiazinem stříbrným (SD-Ag) a léčbou pomocí bakterioterapie, konkrétně s *L. plantarum*. Ve skupině pacientů s popáleninami druhého stupně byla účinnost léčby *L. plantarum* srovnatelná s léčbou SD-Ag. Účinnost snížení výskytu nechtěných virulentních bakterií, separace nekrotické tkáně a zvýšení tvorby granulační tkáně bylo u použití *L. plantarum* 71% a u SD-Ag 73% úspěšnost celkového hojení. U pacientů s popálením klasifikovaným jako třetí stupeň vykazovala vyšší účinnost léčba *L. plantarum* se 75 %, zatímco SD-Ag pouze 65 %, tedy o 10 % nižší úspěšnost. Pozitivní účinek kultury *L. plantarum* pozorované ve zmíněné studii může způsobovat skutečnost, že profil cytokinů indukovaný *L. plantarum* v zánětlivých buňkách má odlišnou intenzitu než jiné látky nebo patogenní bakterie vyskytující se v dané ráně. Jeví se tak vyšší protizánětlivá aktivita a tím i možná vyšší účinnost hojení. V *in vitro* studii Sandri et al. (2014) se ukázalo, že SD-Ag se jeví cytotoxicky vůči fibroblastům a keratinocytům a následně tím zpomaluje celý proces hojení. Použití *L. plantarum* při hojení popálenin bylo efektivní a méně nákladnou alternativou ošetření. Před zahájením léčby popálenin kulturou *L. plantarum* v souvislosti se současnými léčebnými metodami jsou vyžadovány další studie léčby a profylaxe infekcí s *L. plantarum* (Mohammedsaeed et al. 2015).

Ve studii Oryan et al. (2019) byl proveden *in vitro* experiment zkoumající regenerační potenciál kefiru na hojení mechanicky vytvořené rány na buněčné linii lidských dermálních fibroblastů v daných časových intervalech. Kefír obsahující probiotické mikroorganismy,

včetně laktobacilů, byl porovnán s SD-Ag a kontrolním vzorkem, ve kterém nebyla žádná látka podporující hojení. Pro rychlost buněčné migrace byla měřena šířka plochy neuzavřené rány. Procentuální nárůst reepitalizované tkáně je výrazně vyšší v ranách léčených kefirem oproti ostatním dvěma vzorkům. Kefír posílil proliferační fázi, což způsobilo 85% uzavření rány po 7 dnech, oproti tomu u vzorku ošetřeného SD-Ag bylo uzavření 57 % a u ničím neošetřeného vzorku pouze 35 %. Do 14 dnů však proběhlo úplná obnova tkáně u všech vzorků. Stejný způsob experimentu probíhal i *in vivo* na potkaních modelech, kde došlo k podobným výsledkům. Opět po 14 dnech žádná z vytvořených ran nebyla viditelná, ale neléčené poškození a léčba SD-Ag vykazovala povrchové příznaky zánětu a zarudnutí. Antimikrobiální a antioxidační aktivita kefiru byla potvrzena i ve studiích Thomson et al. (2012) a Yilmaz-Ersan et al. (2016). Celkově tento test naznačuje, že má kefir značnou schopnost urychlit hojení ran, a proto být možným alternativním způsobem léčení ran a popálenin.

Arck et al. (2010) se ve své studii věnuje relativně nové hypotéze vzájemného vlivu tří významných orgánů „osa střevo-mozek-kůže“, kde naznačuje, že modulace mikrobiomu konzumací probiotik může mít příznivé účinky například na zánětlivé stavy kůže. Studie na zvířatech analyzované Erdman & Poutahidis (2016) a Tsiouris et al. (2017) ukazují vhodnost použití *L. reuteri* a dalších probiotických laktobacilů při léčbě kožních poranění. Účinnost laktobacilů, konkrétně *L. acidophilus* byla potvrzena i experimentálními studiemi na potkanech, kterým byla způsobena kožní rána a následně jim byl po dobu 10 dnů orálně podáván přípravek obsahující probiotickou bakterii. Rány byly porovnávány s kontrolní skupinou v určitých časových intervalech a následně statisticky vyhodnoceny. Ve srovnání s kontrolou byla celková doba úplné reepitalizace výrazně rychlejší. Jizva vykazovala vyšší pevnost a bez známek zarudnutí. Při analýze mikroskopického řezu granulační tkáně byl ve skupině ošetřené *L. acidophilus* zjištěn zvýšený obsah granulační tkáně se zvýšenou infiltrací buněk lymfocyty, makrofágy a mírně zvýšený obsah kolagenu. Uvedená studie potvrzuje perspektivu, že orální podávání vhodného druhu probiotických bakterií může mít pozitivní účinek na homeostázu kůže a výrazný vliv na hojení ran (Gudadappanavar et al. 2017).

Při testování účinků probiotik na léčbu poranění a prevenci nebo léčbu různých onemocnění je třeba brát v úvahu veškeré vlastnosti jednotlivých kmenů probiotických mikroorganismů, buněčných linií a složení materiálu použitého během pokusu. Kromě regulace imunitního systému hostitele probiotickými mikroorganismy může být hojení ran z velké části ovlivněno i vnějšími faktory, jako je stáří jedince a jeho stravovací návyky. Důležitý je především dostatečný příjem vitaminů a minerálních látek, které fungují jako kofaktory enzymů účastnících se procesu hojení ran (Askelson et al. 2014; Rutherford et al. 2012). *L. acidophilus* zvyšuje absorpci vitamínu D a E z potravy (Oda et al., 2016), některé druhy laktobacilů jsou dokonce schopny produkce vitamínu B₁₂, který je prospěšný při hojení poškození (Roager et al. 2014).

Dle výše zmíněných studií nelze pochybovat o účincích probiotických bakterií používaných jako součást léčby v procesu hojení ran. Dohledat lze velké množství *in vitro* i *in vivo* studií převážně na modelech hlodavců týkajících se vlivu probiotik na hojení zejména kožního epitelu. Avšak aktuální data studující vliv probiotik na rychlost hojení ran především střevních buňkách dosud chybí, přitom důležitým aspektem pro udržení střevní homeostázy je

správná schopnost hojení sliznice. Obecně lze zhodnotit, že určité probiotické bakterie podporují expresi vybraných cytokinů a dalších látek podílejících se na proliferaci a migraci buněk a tím pomáhají urychlit celkové hojení a eliminovat případné komplikace.

Zatímco některé výše zmíněné studie stanovily mechanismy, kterými probiotika mohou ovlivnit specifické procesy zapojené do patofyziologie různých onemocnění, jiné se zaměřili například na fermentované mléčné výrobky obsahující směs probiotik a jejich schopnost dosáhnout prospěšného vlivu na zdraví konzumenta. Rostoucí výzkum probiotických mikroorganismů a jejich důležitá role v lidském zdraví poukazuje na novou perspektivu a terapeutický potenciál jako alternativní a bezpečný přístup léčby pacientů s poruchou hojení ran. Aby však bylo možné tak učinit v praxi, je třeba objasnit přesný mechanismus působení daného probiotického kmene a následně jejich účinnost a bezpečnost potvrdit v klinické praxi.

7 Závěr

Na *in vitro* modelu kolorektálního adenokarcinomu buněčné linie HT29 a *in vitro* modelu kožního epitelu tvořeného buněčnou linií NHDF-Neo byly testovány probiotické kmeny *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. paracasei* a jejich vliv na rychlost hojení mechanicky způsobeného poškození a buněčnou migraci. Naměřené výsledky poukazují na fakt, že některé probiotické druhy jsou schopny urychlit hojení ran, čímž lze potvrdit i naši hypotézu.

Ze všech testovaných probiotických laktobacilů vykazoval kmen *L. acidophilus* statisticky významně nejrychlejší schopnost reepitalizace poškozené buněčné monovrstvy, z čehož lze soudit jeho pozitivní účinek na zvýšené hojení epitelální tkáň. Z výsledků je patrná i zpomalená schopnost obnovy tkáň u *L. reuteri*, ale u všech vzorků byl v průběhu času pozorován značný nárůst epitelu.

Při konečném hodnocení námi naměřených výsledků je třeba zohlednit možné ovlivnění samotné přípravy bakteriálních lyzátů, jejich koncentraci, vhodnost použití buněčné linie, ale i manuální měření vzorků, jelikož všechny tyto aspekty mohou mít vliv na správnost výsledků.

8 Literatura

- Ansorge WJ. 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *New biotechnology* **25**: 195-203.
- Arck, P., Handjiski, B., Hagen, E., Pincus, M., Bruenahl, C., Bienenstock, J., & Paus, R. 2010. Is there a “gut-brain-skin axis”? *Experimental Dermatology* **19**: 401-405.
- Archer, A. C., Kurrey, N. K., & Halami, P. M. 2018. In vitro adhesion and anti-inflammatory properties of native *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Journal of Applied Microbiology* **125**(1): 243–256.
- Askelson, T. E., Campasino, A., Lee, J. T., & Duong, T. 2014. Evaluation of phytate-degrading *Lactobacillus* culture administration to broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* **80**(3): 943–950.
- Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. 2005. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *American Journal of Gastroenterology* **100**:1539–1546.
- Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. 2009. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* **44**:26–46.
- Börset M, Hjorth-Hansen H, Seidel C, Sundan A, Waage A. 1996. Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma. *Blood* **88**:3998–4004.
- Bottani, M., Cornaghi, L., Donetti, E., & Ferraretto, A. 2019. Excess of nutrient-induced morphofunctional adaptation and inflammation degree in a Caco2/HT-29 in vitro intestinal co-culture. *Nutrition* **58**: 156–166.
- Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. 2018. The human skin microbiome. Nature Publishing Group.
- Canani RB et al. 2007. Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: Randomised clinical trial of five different preparations. *British Medical Journal* **335**:340–342. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17690340> (accessed February 12, 2020).
- Cinque B, La Torre C, Lombardi F, Palumbo P, Van der Rest M, Cifone MG. 2016. Production Conditions Affect the In Vitro Anti-Tumoral Effects of a High Concentration Multi-Strain Probiotic Preparation. *PLOS ONE Library of Science* **11**. Available from <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0163216> (accessed March 4, 2020).
- Cutting KF, White R. 2004. Defined and refined: criteria for identifying wound infection revisited.
- Davis J, McLister A. 2016. Introduction to Wound Management. Smart Bandage Technologies 1-35. Elsevier. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128037621000011> (accessed December 1, 2019).
- Dinan TG, Cryan JF. 2012. September. Regulation of the stress response by the gut microbiota: Implications for psychoneuroendocrinology.
- Donelli G, Vuotto C, Mastromarino P. 2013. Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. *Microbial Ecology in Health & Disease* **24**.
- Doron, S., & Snyderman, D. R. 2015. Risk and Safety of Probiotics.
- Dowsett C, Bielby A, Searle R. 2014. Reconciling increasing wound care demands with available resources. *Journal of Wound Care* **23**:552–562.
- Edwards R, Harding KG. 2004, April. Bacteria and wound healing.
- Erdman, S. E., & Poutahidis, T. 2016. Microbes and Oxytocin: Benefits for Host Physiology and Behavior. *International Review of Neurobiology* **131**: 91-126.

- Flemming HC, Wingender J. 2010. The biofilm matrix.
- Frei, R., Biosca, F. E., Handl, M., & Trč, T. 2008. The Role of Growth Factors in the Human Organism and Their Use in Medicine, Especially in Orthopedics and Traumatology.
- Giles B. 2007. Wound Healing in Spontaneous Perforation or Myringotomy and Middle Ear Reconstruction. *Ear, Nose & Throat Journal* **86**:30–32. Available from <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/014556130708611s11> (accessed March 24, 2020).
- Gillespie JJ et al. 2011. Patric: The comprehensive bacterial bioinformatics resource with a focus on human pathogenic species. *Infection and Immunity* **79**:4286–4298. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21896772> (accessed February 28, 2020).
- Goldenberg, J. Z., Ma, S. S. Y., Saxton, J. D., Martzen, M. R., Vandvik, P. O., Thorlund, K., Guyatt, G. H., & Johnston, B. C. 2013. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*
- Gonzalez, A. C. D. O., Andrade, Z. D. A., Costa, T. F., & Medrado, A. R. A. P. (2016). Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia* **91**(5):614-620.
- Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. 2011. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Frontiers in Physiology* **2**.
- Grice EA, Segre JA. 2011. The skin microbiome. Nature Publishing Group.
- Guandalini S et al. 2000. Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: A multicenter European trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **30**:54–60.
- Gudadappanavar, A., Hombal, P., Timashetti, S., & Javali, S. 2017. Influence of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* on wound healing in male Wistar rats - an experimental study. *International Journal of Applied and Basic Medical Research* **7**(4): 233.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. 2008. Wound repair and regeneration. Nature Publishing Group.
- Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. 2000. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences* **45**:1462–4. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10961730> (accessed February 23, 2020).
- Han G, Ceilley R. 2017. *Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments*. Springer Healthcare.
- Hibberd PL, Davidson LE. 2008. Safety of probiotics. *Agro Food Industry Hi-Tech* **19**:30–33. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18181712> (accessed February 21, 2020).
- Hirayama K, Rafter J. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. Elsevier Masson SAS.
- Hollister EB, Gao C, Versalovic J. 2014. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology* **146**:1449–1458. W.B. Saunders. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486050> (accessed February 28, 2020).
- Horwitch CA, Furseth HA, Larson AM, Jones TL, Olliffe JF, Spach DH. 1995. Lactobacillemia in three patients with AIDS. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **21**:1460–2. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8749632> (accessed February 21, 2020).
- Huttenhower C et al. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**:207–214.

- Islam SU. 2016. Clinical Uses of Probiotics. *Medicine* **95**.
- Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. 2004. Probiotics.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. 2015. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology* **21**:8836–8847.
- Johnston, B. C., Ma, S. S. Y., Goldenberg, J. Z., Thorlund, K., Vandvik, P. O., Loeb, M., & Guyatt, G. H. 2012. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Internal Medicine* **157**: 878-888.
- Kalishwaralal K, BarathManiKanth S, Pandian SRK, Deepak V, Gurunathan S. 2010. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **79**:340–344.
- Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **357**:1076–1079.
- Kennedy PJ, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G. 2014. Irritable bowel syndrome: A microbiome-gut-brain axis disorder? WJG Press. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339800> (accessed February 25, 2020).
- Kim, J. Y., Kwon, J. H., Ahn, S. H., Lee, S. Il, Han, Y. S., Choi, Y. O., Lee, S. Y., Ahn, K. M., & Ji, G. E. 2010. Effect of probiotic mix (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*) in the primary prevention of eczema: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Pediatric Allergy and Immunology* **21**:386-393.
- Kumar S, Leaper DJ. 2008. Classification and management of acute wounds.
- Li W, Dasgeb B, Phillips T, Li Y, Chen M, Garner W, Woodley DT. 2005. Wound-healing perspectives. W.B. Saunders.
- Lodinova-Zadnikova R, Cukrowska B, Tlaskalova-Hogenova H. 2003. Oral administration of probiotic *Escherichia coli* after birth reduces frequency of allergies and repeated infections later in life (after 10 and 20 years). *International Archives of Allergy and Immunology* **131**:209–211.
- Lolou, V., & Panayiotidis, M. I. 2019. Functional role of probiotics and prebiotics on skin health and disease. *Fermentation* **5**(2): 41.
- Lukic J, Chen V, Strahinic I, Begovic J, Lev-Tov H, Davis SC, Tomic-Canic M, Pastar I. 2017. Probiotics or pro-healers: the role of beneficial bacteria in tissue repair. *Wound Repair and Regeneration* **25**:912–922. Blackwell Publishing Inc. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29315980> (accessed March 4, 2020).
- Macfarlane G, Blackett K, Nakayama T, Steed H, Macfarlane S. 2009. The Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. *Current Pharmaceutical Design* **15**:1528–1536.
- Mackowiak PA. 2013. Recycling Metchnikoff: Probiotics, the Intestinal Microbiome and the Quest for Long Life. *Frontiers in Public Health* **1**:52. Frontiers Media S. A. Available from <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2013.00052/abstract> (accessed February 18, 2020).
- Martami F, Togha M, Seifishahpar M, Ghorbani Z, Ansari H, Karimi T, Jahromi SR. 2019. The effects of a multispecies probiotic supplement on inflammatory markers and episodic and chronic migraine characteristics: A randomized double-blind controlled trial. *Cephalalgia* **39**:841–853.
- McFarland L V. 2006. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *American Journal of Gastroenterology* **101**:812–822. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16635227> (accessed February 23, 2020).

- McFarland L V. 2007. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Medicine and Infectious Disease* **5**:97–105. Elsevier USA. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17298915> (accessed February 23, 2020).
- McFarland L V., Dublin S. 2008, May 7. Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome.
- Mohammedsaeed, W., Cruickshank, S., McBain, A. J., & O'Neill, C. A. 2015. *Lactobacillus rhamnosus* GG Lysate Increases Re-Epithelialization of Keratinocyte Scratch Assays by Promoting Migration. *Scientific Reports* **5**(1).
- Mori, N., Kano, M., Masuoka, N., Konno, T., Suzuki, Y., Miyazaki, K., & Ueki, Y. 2016. Effect of probiotic and prebiotic fermented milk on skin and intestinal conditions in healthy young female students. *Bioscience of Microbiota, Food and Health* **35**(3): 105–112.
- Morton LM, Phillips TJ. 2016. Wound healing and treating wounds Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. Mosby Inc.
- Nitsch H, Astifidis R. 2016. Wound Care. Pages 1–11 Hand and Upper Extremity Rehabilitation. Elsevier. Available from <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781455756476000010> (accessed December 7, 2019).
- Oda, Y., Tu, C. L., Menendez, A., Nguyen, T., & Bikle, D. D. 2016. Vitamin D and calcium regulation of epidermal wound healing. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **164**: 379–385.
- Oryan, A., Alemzadeh, E., & Eskandari, M. H. 2019. Kefir Accelerates Burn Wound Healing Through Inducing Fibroblast Cell Migration In Vitro and Modulating the Expression of IL-1 β , TGF- β 1, and bFGF Genes In Vivo. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **11**(3): 874–886.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications* 279-289. Available from http://link.springer.com/10.1007/978-94-017-2029-8_18 (accessed February 11, 2020).
- Palta S, Saroa R, Palta A. 2014. Overview of the coagulation system. *Indian Society of Anaesthetists*.
- Park YW, Haenlein GFW. 2013. Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health. John Wiley & Sons, Oxford. Available from <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118534168> (accessed February 17, 2020).
- Peral, M. C., Huaman Martinez, M. A., & Valdez, J. C. 2009. Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns. *International Wound Journal*. **6**(1): 73–81.
- Phillips PL, Wolcott RD, Fletcher J, Schultz GS. 2010. Biofilms made easy. *Wounds international*.
- Pitzer GB, Patel KG. 2011. Proper Care of Early Wounds to Optimize Healing and Prevent Complications.
- Possemiers, S., Marzorati, M., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. 2010. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. *International Journal of Food Microbiology* **141**(1–2): 97–103.
- Pot B, Tsakalidou E. 2009. Taxonomy and Metabolism of Lactobacillus. *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*:1–56.
- Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. 2006. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice.
- Reid G. 2006. Probiotics to prevent the need for, and augment the use of, antibiotics. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 291-295.

- Ringel Y. 2012. Using Probiotics in Gastrointestinal Disorders ORIGINAL CONTRIBUTIONS. The American Journal of Gastroenterology Supplements **1**. Available from www.amjgastro.com (accessed February 21, 2020).
- Roager, H. M., Sulek, K., Skov, K., Frandsen, H. L., Smedsgaard, J., Wilcks, A., Skov, T. H., Villas-Boas, S. G., & Licht, T. R. 2014. *Lactobacillus acidophilus* NCFM affects vitamin E acetate metabolism and intestinal bile acid signature in monocolonized mice. Gut Microbes **5**(3).
- Robson MC, Steed DL, Franz MG. 2001. Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories. Current Problems in Surgery **38**:A1.
- Rutherford, S. M., Chung, T. K., Thomas, D. V., Zou, M. L., & Moughan, P. J. 2012. Effect of a novel phytase on growth performance, apparent metabolizable energy, and the availability of minerals and amino acids in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for broilers. Poultry Science **91**(5): 1118–1127.
- Salvetti E, Torriani S, Felis GE. 2012. The Genus Lactobacillus: A Taxonomic Update. Probiotics and Antimicrobial Proteins **4**:217–226. Available from <http://link.springer.com/10.1007/s12602-012-9117-8> (accessed February 12, 2020).
- Sandri, G., Bonferoni, M. C., Ferrari, F., Rossi, S., Aguzzi, C., Mori, M., Grisoli, P., Cerezo, P., Tenci, M., Viseras, C., & Caramella, C. 2014. Montmorillonite-chitosan-silver sulfadiazine nanocomposites for topical treatment of chronic skin lesions: In vitro biocompatibility, antibacterial efficacy and gap closure cell motility properties. Carbohydrate Polymers, **102**(1): 970–977.
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco-Míguez, A., Lourenço, A., Gueimonde, M., & Margolles, A. 2017. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. Molecular Nutrition and Food Research **61**(1).
- Seebauer C, Lucas C, Kindler S, Metelmann HR. 2019. Wound management—biology and wound healing disorders. Diabetologie **15**:479–491.
- Sergeeva NS, Shanskii YD, Sviridova IK, Karalkin PA, Kirsanova VA, Akhmedova SA, Kaprin AD. 2016. Analysis of reparative activity of platelet lysate: Effect on cell monolayer recovery in vitro and skin wound healing in Vivo. Bulletin of Experimental Biology and Medicine **162**:138–145.
- Sirisinha S. 2016. The potential impact of gut microbiota on your health: Current status and future challenges. Allergy and Immunology Society of Thailand.
- Sivieri, K., Morales, M. L. V., Adorno, M. A. T., Sakamoto, I. K., Saad, S. M. I., & Rossi, E. A. 2013. *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 improved “ gut health” in the SHIME® reactor. BMC Gastroenterology **13**(1): 1–9.
- Slykerman RF et al. 2017. Effect of Lactobacillus rhamnosus HN001 in Pregnancy on Postpartum Symptoms of Depression and Anxiety: A Randomised Double-blind Placebo-controlled Trial. EBioMedicine **24**:159–165. Elsevier B.V. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28943228> (accessed April 6, 2020).
- Strecker-McGraw MK, Jones TR, Baer DG. 2007. Soft Tissue Wounds and Principles of Healing. W.B. Saunders.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. 2005. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: A fluorescence in situ hybridization study in mice. World Journal of Gastroenterology **11**:1131–1140.
- Šitum M, Kolić M. 2011. Podjela kroničnih rana i algoritam diferencijalno- dijagnostičkih postupaka.
- Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E. 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. Molecular Ecology **21**:2045–2050. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22486824> (accessed February 26, 2020).

- Tannock GW. 2004. A special fondness for lactobacilli. American Society for Microbiology (ASM).
- Thomas Hess C. 2011. Checklist for factors affecting wound healing. *Advances in skin & wound care* **24**:192.
- Thomson, C. H., Hassan, I., & Dunn, K. 2012. Yakult: A role in combating multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*? *Journal of Wound Care* **21**(11): 566–569.
- Topping DL, Clifton PM. 200. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. American Physiological Society. Available from <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.2001.81.3.1031> (accessed February 27, 2020).
- Tsiouris, C. G., Kelesi, M., Vasilopoulos, G., Kalemikerakis, I., & Papageorgiou, E. G. 2017. The efficacy of probiotics as pharmacological treatment of cutaneous wounds: Meta-analysis of animal studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **104**:230–239).
- Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA. 2002. *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: A meta-analysis. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927715> (accessed February 23, 2020).
- Van Tassell ML, Miller MJ. 2011. Lactobacillus Adhesion to Mucus. *Nutrients* **3**:613–636. Available from <http://www.mdpi.com/2072-6643/3/5/613> (accessed February 6, 2020).
- Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. 2009. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. Field House Publishing LLP.
- Viașu-Bolocan, L., Popescu, F., & Bică, C. 2013. Probiotics and their Immunomodulatory Potential. *Current health sciences journal* **39**: 204-209.
- Vissers, Y. M., Snel, J., Zuurendonk, P. F., Smit, B. A., Wichers, H. J., & Savelkoul, H. F. J. 2010. Differential effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* strains on cytokine induction in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **59**(1): 60–70.
- Wietlisbach CM. 2013. Wound Care. *Fundamentals of Hand Therapy: Clinical Reasoning and Treatment Guidelines for Common Diagnoses of the Upper Extremity* 206-218.
- Williams NT. 2010. Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy* **67**:449–458. Available from <https://academic.oup.com/ajhp/article/67/6/449/5130018> (accessed February 7, 2020).
- Wu H, Moser C, Wang HZ, Høiby N, Song ZJ. 2015. Strategies for combating bacterial biofilm infections. Sichuan University Press.
- Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., Akpınar-Bayazit, A., & Sahin, S. 2016. The Antioxidative Capacity of Kefir Produced from Goat Milk. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* **7**(1): 22–26.

