

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Vliv probiotických mikroorganismů na hojení ran *in vitro*

Bakalářská práce

Autor práce: Lenka Prokešová

Obor studia: Výživa a potraviny

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

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 17. 4. 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu práce, Ing. Ivo Doskočilovi, Ph. D., za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, ochotu a přátelský přístup při psaní této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala přátelům a rodině za poskytnutou pomoc a podporu nejen při psaní této práce, ale i v průběhu celého studia.

Vliv probiotických mikroorganismů na hojení ran *in vitro*

Souhrn

Probiotické mikroorganismy tvoří nedílnou součást lidského střevního mikrobiomu. Jedná se o živé organismy, především *Lactobacillus* spp. a *Bifidobacterium* spp., které vykazují pozitivní přínos pro lidské zdraví díky snaze o udržení potřebné střevní homeostázy, modifikaci mikrobiomu a ochranu proti patogenům. V gastrointestinálním traktu (GIT) vzniká z různorodých důvodů množství menších či větších porušení integrity sliznice, tedy poranění, která často vedou ke vzniku zánětů a střevních onemocněních. Proto je nezbytné těmto problémům předcházet například pomocí pravidelné konzumace potravin a doplňků stravy obsahující probiotika.

Cílem této práce bylo otestovat vybrané druhy probiotik, které by mohly napomáhat hojení střevního epitelu a tím pozitivně ovlivňovat činnost GIT. Celkem byly testovány 4 kmeny *Lactobacillus* spp. v podmínkách *in vitro*. Na modelech tvořených buněčnými liniemi kolorektálního karcinomu tlustého střeva Caco-2 a HT29 byl vytvořen škrábanec a byla sledována rychlost hojení poranění.

Na buněčné linii Caco-2 se jednalo o *L. rhamnosus*, *L. gasseri* a *L. plantarum*, na buňkách HT29 byly testovány *L. rhamnosus*, *L. gasseri* a *L. fermentum*. Obě buněčné linie vykazovaly známky zrychleného hojení ale i zpomalené re-epitelizace, a to v závislosti na daném časovém úseku a konkrétním kmeni. Celkově lepších výsledků, tedy rychlejšího hojení vzniklého poranění dosahovaly buňky Caco-2, kdy rychlost uzavírání poškození byla více jak trojnásobná oproti buňkám HT29. Na buněčné linii Caco-2 vykazoval ve 48. hodině nejvyšší nárůst tkáně kontrolní vzorek s 65,12 % následován *L. rhamnosus* s 57,85 %, *L. plantarum* s 57,10 % a nejméně úspěšným *L. gasseri* s 52,91 %. Na monovrstvě HT29 bylo hojení celkově značně pomalejší. Největší obnovy tkáně ve 48. hodině dosáhl *L. fermentum* s 15,33 %. *L. gasseri* po pomalejším nástupu vykazoval konečných 13,49 %, což je stále příznivější výsledek, než měl kontrolní vzorek s 12,39 %. *L. rhamnosus* v porovnání s Caco-2 buňkami dosáhl opačného výsledku a množství zhojené tkáně bylo pouze 6,11 % po 48 hodinách.

Vliv probiotik na nárůst epitelální tkáně, tedy hojení vzniklého poranění, se ukázal jako částečný, kdy se úspěšnost měnila v závislosti na daném časovém úseku i kmeni.

Klíčová slova: hojení ran, střevní epitel, probiotika, poranění, laktobacily

Effect of probiotic microorganisms on wound healing *in vitro*

Summary

Probiotic microorganisms take important part of human intestinal microbiome. Identified as living organisms, primarily *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genus, they are known for their extensive benefits on human health and well-being, for maintaining intestinal homeostasis, microbiome modifications and pathogen protection. They prevent or significantly diminish inflammation process in human body. The mucous membrane integrity is disrupted in GIT by various reasons, causing damage that leads to inflammation and intestinal diseases. Therefore, it is crucial to prevent the above mentioned issues by regular food intake and supplements with probiotics.

The goal of the thesis is to lead a research on selected types of probiotics that may help healing the intestinal epithelium and thus positively influence GIT general health. Four *Lactobacillus* species were tested in conditions *in vitro*. A scratch was made on colorectal colon cell-lines models Caco-2 and HT29 and the speed of healing was observed.

The cell-line Caco-2 was tested on *L. rhamnosus*, *L. gasseri* and *L. plantarum*; *L. rhamnosus*, *L. gasseri* and *L. fermentum* were used on HT29. Both cell lines showed indications of fastened healing process, as well as protracted reepithelialization according to specific species and time given. Caco-2 cells showed better overall results, that is faster healing, since the speed of closing the wound was more than triple to HT29 line. The highest increase of tissue after 48 hours on monolayer Caco-2 could be seen on blind control with 65,12 %, followed by *L. rhamnosus* with 57,85 %, *L. plantarum* with 57,10 %. The least successful subject was *L. gasseri* with 52,91 % closure. HT29 monolayer proved significantly slower healing. The highest level of healing was achieved by *L. fermentum*, 15,33 % in 48 hours specifically. *L. gasseri* reached 13,49 % after slow onset, which means better result than 12,39 % blind control. *L. rhamnosus* in comparison with Caco-2 cells showed opposite result as the amount of healed tissue was only 6,11 % after 48 hours.

The influence of probiotics on increase of epithelial tissue (healing) appears to be only partial, where the success rate was variable based on the time scale and species itself.

Keywords: wound healing; intestinal epithelium; probiotics; injuries, lactobacili

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Cíl práce a hypotéza.....	8
3 Literární přehled.....	9
3.1 Anatomie a fyziologie trávicího traktu	9
3.1.1 Anatomie GIT.....	9
3.1.2 Stavba stěny trávicí trubice	10
3.2 Mikrobiom lidského trávicího traktu	12
3.2.1 Imunitní systém.....	14
3.3 Poranění střevního epitelu.....	15
3.3.1 Vznik poranění.....	15
3.3.2 Hojení poranění.....	16
3.3.3 Léčba poranění.....	17
3.4 Probiotické organismy	18
3.4.1 Druhy probiotických mikroorganismů.....	18
3.4.1.1 <i>Lactobacillus spp.</i>	20
3.4.2 Vlastnosti probiotik.....	21
3.4.3 Probiotika v potravě.....	22
3.4.4 Vliv probiotik na hojení ran.....	23
4 Materiál a Metodika	25
4.1 Materiál	25
4.2 Metodika	25
4.2.1 Kultivace buněčných tkání.....	25
4.2.2 Založení 24 jamkové destičky	26
4.2.3 Příprava buněčného lyzátu probiotik	26
4.2.4 Zkouška hojení rány s působením laktobacilů <i>in vitro</i>	26
4.2.5 Statistické vyhodnocení	26
5 Výsledky.....	27
5.1 Buněčná linie Caco-2	27
5.2 Buněčná linie HT29	30
6 Diskuze.....	33
7 Závěr.....	38
8 Seznam použité literatury.....	39
9 Seznam použitých zkratk.....	48
10 Seznam použitých obrázků a tabulek	49

1 Úvod

V současné době jsou probiotika a produkty, ve kterých jsou obsaženy, velmi oblíbeným tématem jak u laické veřejnosti, tak na poli odborném. Střevní mikrobiom přirozeně obsahuje obrovské množství probiotických mikroorganismů, jejichž pozitivní přínos pro lidské zdraví je znám již mnoho let. Velmi aktuálním a diskutovaným tématem je mechanismus účinku probiotik spolu s přesným složením mikrobiomu a rozdílnost mezi jednotlivými kmeny ve vztahu k jejich využití. Spektrum účinku probiotik je velmi rozsáhlé, ať už se jedná o prevenci či léčbu střevních onemocnění, vliv na imunitní systém člověka nebo jeho metabolismus.

Střevní mikrobiom může být narušen zánětlivým střevním onemocněním, nevhodnou životosprávou nebo následkem léčby antibiotiky, kdy dochází k narušení střevní slizniční bariéry, a tím ke vzniku poranění střevního epitelu. Konzumace probiotik tak může těmto problémům částečně předcházet či mírnit jejich následky. Jejich schopnost hojení střevního epitelu se liší např. v závislosti na pH, konkrétním složení a množství, spolu se schopností kolonizovat střevní trakt.

2 Cíl práce a hypotéza

Cílem práce je otestovat různé kmeny probiotik na jejich schopnost podpořit hojení střevního epitelu. K tomu budou využity jak humánní, tak animální kmeny, které by bylo možné vyžívat v klinické praxi.

Na základě stanoveného cíle byla v této bakalářské práci stanovena následující hypotéza, že „některé druhy probiotik mohou při konzumaci napomáhat hojení střevního epitelu, případně toto hojení výrazně urychlit“.

3 Literární přehled

3.1 Anatomie a fyziologie trávicího traktu

Trávicí soustava je tvořena gastrointestinálním traktem (GIT), játry a slinivkou břišní. Vlastní GIT je trubice rozčleněná na jednotlivé oddíly: dutinu ústní, hltan, jícen, žaludek, tenké a tlusté střevo. Délka GIT člověka se pohybuje rozmezí 5 - 7 metrů a jeho celková plocha činí až 300 m² (Zoetendal et al. 2008). Úkolem GIT je mechanicky a chemicky přeměnit živiny přijaté stravou v podobě složitých biomolekul na jednodušší nízkomolekulární látky, které dokáže lidské tělo metabolizovat (Marieb 2015). Dochází zde k absorpci a resorpci přijaté potravy, která je peristaltickými pohyby posouvána dále až ke konečníku, kde dochází k defekaci (Kittnar 2011). Současně však musí GIT chránit organismus před potenciálně škodlivými antigeny a patogeny (Blackshaw et al. 2007).

3.1.1 Anatomie GIT

První část trávicí trubice je dutina ústní přizpůsobená k přijímání potravy a jejímu mechanickému rozmělnění (Kittnar 2011). Dutinu ústní tvoří tváře, spodní a horní patro a jazyk. Dále jsou součástí mandle, zuby vsazené do dásní a tři páry velkých slinných žláz: podjazykové, podčelistní a příušní, které spolu s menšími slinnými žlázami produkují až 1,5 l slin denně (Gilroy 2017). Sliny jsou čirá viskózní tekutina složená z vody, organických solí, trávicích enzymů Ptyalinu a mucinu, který zajišťuje skluznost potravy (Ployon et al. 2017). Ptyalin neboli slinná α -amyláza zajišťuje enzymatické štěpení sacharidů a má svou nezastupitelnou roli pro slizniční imunitu dutiny ústní, kde zabraňuje přilnutí a reprodukci bakterií (Sakač et al. 2014). Hltan je společný trubicovitý orgán cest dýchacích i trávicích, který se skládá z nosohltanu, ústní části hltanu a hrtanu (Hudák and Kachlík, 2013). Z hltanu potrava přechází do jícnu, skrz který prochází nezměněna a je peristaltickými pohyby posouvána dále do žaludku (Marieb 2015).

Žaludek je vakovitý orgán, nacházející se přibližně v levé horní části dutiny břišní, jeho tvar i pozice bývá individuální v závislosti na daném jedinci (Hudák & Kachlík 2013). Je tvořen čtyřmi částmi: česlem, žaludeční klenbou, tělem žaludku a vrátníkem, jehož součástí je vrátníkový svěrač přecházející ve dvanáctník (Gilroy 2017).

Účelem žaludku je skladovat, rozmělnit a částečně trávit makromolekuly obsažené v potravinách a regulovat rychlost vyprazdňování obsahu žaludku do tenkého střeva (Vander et al. 2000). V žaludku je potrava mechanicky mělněna, přítomná kyselina chlorovodíková (HCl) řídí aktivaci pepsinogenu na pepsin a zajišťuje nízké pH potřebné pro aktivaci žaludečních enzymů a zničení patogenů přijatých s potravou. Probíhá zde denaturace a štěpení proteinů na peptidy pomocí pepsinu, a až 30 % potravy přijatých triacylglycerolů je zde pomocí žaludeční lipázy štěpeno na 1,2-diacylglyceroly. Sousto se postupně mění na tráveninu – chymus, která se dostává do tenkého střeva reprezentující střední úsek GIT (Kittnar 2011).

Tenké střevo se skládá ze tří částí: dvanáctníku (*duodenum*), lačnicku (*jejunum*) a kyčelníku (*ileum*). Dvanáctník je první a nejkratší část tenkého střeva ve tvaru podkovy. Lačník je místem nejintenzivnějšího trávení, proto je tvořen silnější stěnou a vyššími slizničními řasami, než je tomu u kyčelníku a tlustého střeva (Gilroy 2017). Tlusté střevo, které tvoří poslední část GIT, je přibližně 1,5 metru dlouhé a 6,5 cm široké. Skládá se ze slepého střeva, na které je připojen červovitý přívěsek apendix, dále tračnicku (vzestupný, příčný, sestupný a esovitá klička), který reprezentuje hlavní část tlustého střeva a poslední částí je konečník (Hudák & Kachlík 2013).

Konečná fáze trávení probíhá právě v tlustém střevě. Žlázy tlustého střeva vylučují hlen zvaný mucus a trávenina zmenšuje svůj objem mimo jiné působením saprofytických střevních bakterií, které fermentují zbývající sacharidy, dále uvolňují vodík, oxid uhličitý a metanové plyny způsobující nadýmání. Taktéž tyto bakterie štěpí zbylé proteiny na aminokyseliny, které se rozkládají na jednodušší látky jako je indol, skatol, mastné kyseliny a sirovodík (Tortora & Derrickson 2008).

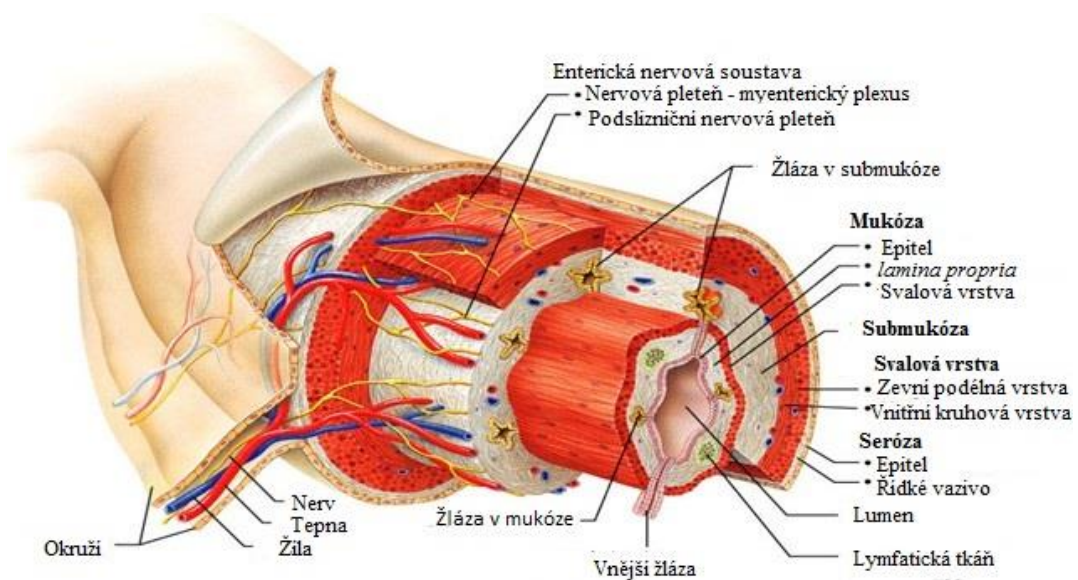
3.1.2 Stavba stěny trávicí trubice

Stěna trávicí trubice se od jícnu až po konečník skládá ze čtyř základních, na sebe navazujících vrstev, kterými jsou mukóza neboli sliznice, submukóza, svalová vrstva a seróza (obrázek č. 1).

Sliznice je nejhlubší vrstva, která vystylá celou trávicí trubicí. Jejím úkolem je sekrece hlenové vrstvy zvané mucus, trávicích enzymů, hormonů, elektrolytů a vody, dále absorpce konečných produktů trávení do krve a ochrana proti patogenům procházejících skrz trávicí

trakt. V závislosti na konkrétní oblasti GIT může sliznice vykonávat jednu nebo všechny tyto funkce dohromady (Kim & Pritts 2017). Na povrchu je pokryta hlenovou vrstvou nazývanou mucus. Jedná se o viskózní gel, který je vylučován pohárkovými buňkami hostitele a působí jako ochranná vrstva spolu s mechanickou bariérou. Hlen je každých 4–5 hodin pravidelně obnovován a je složen z 95 % z vody, dále z mucinových glykoproteinů, lipidů a anorganických solí (Aulton & Taylor 2013; Li et al. 2015).

Sliznice se skládá z dalších tří na sebe navazujících vrstev: epitelu, slizničního vaziva v podobě *lamina propria* a hladké svaloviny – *lamina muscularis mucosae*. Slizniční epitel, který lemuje linii GIT, je v přímém kontaktu s živinami přijatými potravou a hraje velmi důležitou roli při sekreci enzymů a hlenu (Tortora & Derrickson 2008). Slizniční vazivo se skládá z pojivové tkáně, lymfatických a krevních cév. Nachází se zde také lymfatická tkáň, která obsahuje velké množství bílých krvinek, zejména makrofágů a lymfocytů. Právě tyto intraepitelové lymfocyty chrání integritu epitelu a zabraňují jeho případnému poškození vyvolaného patogeny či indukci zánětlivých imunitních reakcí (Cheroutre et al. 2011; Gropper & Smith 2012). Vrstva hladké svaloviny je zodpovědná za místní pohyby mukózy, kdy dochází například k posunu potravy, která ulpěla na stěně sliznice. V tenkém střevě se jedná o sérii pohybů, které několikanásobně zvětšují jeho povrch (Marieb 2015).



Obrázek č. 1: Jednotlivé vrstvy gastrointestinálního traktu. Upraveno dle (Cremon et al. 2018).

Sliznice je jednou z nejrychleji proliferujících tkání v těle, která je udržována v dynamicky ustáleném stavu díky regulaci proliferace epiteliálních buněk, zastavení růstu a buněčné apoptóze, což umožňuje její pravidelnou regeneraci. Ta u lidí trvá v řádu 4-5 dní a s přibývajícím věkem tato schopnost postupně klesá. Jakákoliv odchylka, která nastane, může vést ke ztrátě strukturní i funkční integrity, a tím k rozvoji onemocnění jako jsou vředy či nádorová onemocnění. Samotný růst sliznice je regulován stejnými hormony, které ovlivňují metabolismus v jiných tkání, ale gastrointestinální sliznice reaguje také na příjem a přítomnost pozřené potravy (Sipos et al. 2011; N. Jaladanki & Wang 2016).

Submukóza neboli podslizniční vazivo je nepříliš pevná tkáň kolagenových a elastinových vláken, obsahující krevní cévy, nervovou pletěň a žlázy produkující trávicí enzymy (Kittnar 2011). Svalová vrstva nacházející se v dutině ústní, hltanu, horní části jícnu a ve svěrači obsahuje příčně pruhovanou svalovinu, která umožňuje polykání a kontrolované vyměšování. Ve zbytku trávicí trubice je tato vrstva z hladké svaloviny umožňující peristaltické pohyby a napomáhá mísení tráveniny (Tortora & Derrickson 2008).

Seróza je poslední vrstva stěny trávicí trubice. Skládá se z pojivové tkáně a peritonea, což je blána, která obklopuje a chrání orgány dutiny břišní a hrudní. Peritoneum je velmi dobře krevně zásobeno a je selektivně propustné (Gropper & Smith 2012).

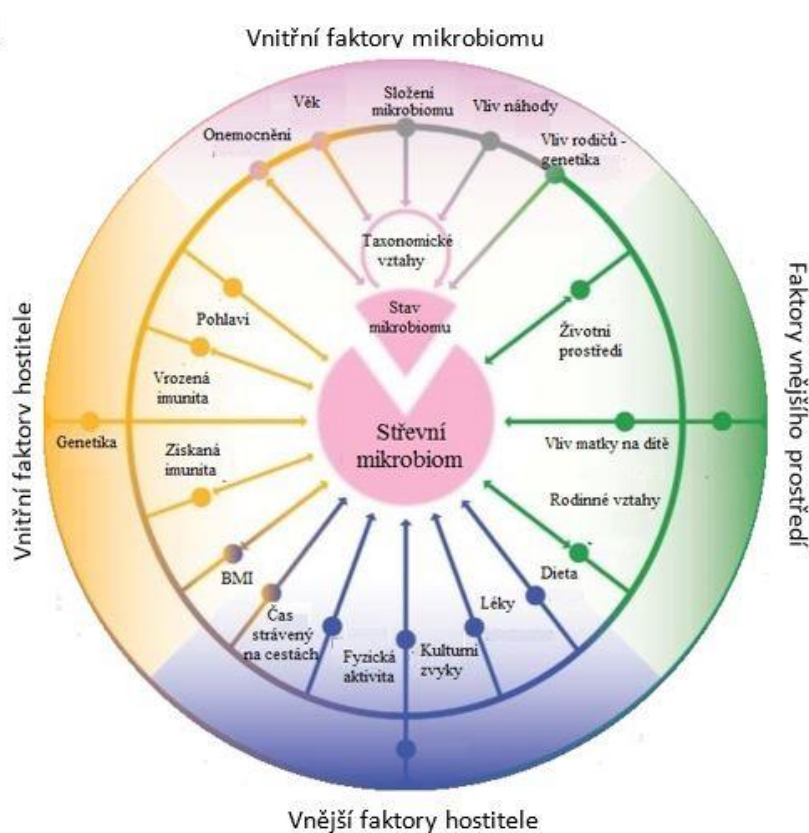
3.2 Mikrobiom lidského trávicího traktu

Mikroby kolonizují veškerý povrch lidského těla, který je vystaven vnějšímu prostředí, přičemž největší množství se nachází v trávicím traktu, dále v ústech a na kůži. Jedná se o mikrobiální systém, který se začíná tvořit bezprostředně po narození. Mikrobiom hraje velmi důležitou roli v oblasti zdraví a onemocnění u lidí, někdy je označován také jako náš „zapomenutý orgán“. Podílí se na hospodaření s energií a metabolických dějích, například fermentaci či absorpci nestrávených sacharidů. To je pravděpodobně jeden z důvodů, který působil jako evoluční hnací síla pro vytvoření symbiotických bakterií. Střevní mikrobiom ovlivňuje imunitní systém a vysílá signály, které podporují zrání buněk imunitního systému a jeho vývoj (Palmer et al. 2007; Clemente et al. 2012).

Mikrobiom trávicího traktu (TT) nezahrnuje pouze bakterie, ale součástí jsou také všechny mikroorganismy kolonizující střevo, jako jsou viry, houby a kvasinky. V mikrobiomu nalezneme přibližně 10^{13-14} bakterií více jak 35 tisíců druhů, jejichž množství

a rozmanitost vzrůstá směrem od žaludku ke střevům (Derikx et al. 2016). Mezi složením, aktivitou mikrobiomu TT a zdravím člověka existuje těsná souvislost, proto zájem o tuto problematiku stále roste (Maccaferri et al. 2011). Naše porozumění lidskému mikrobiomu se vyvíjí rychlým tempem i díky vysokokapacitnímu, velmi přesnému sekvenování DNA mikrobiálních komunit z lidského GIT nemocných i zdravých jedinců. Avšak úspěšné převedení získaných poznatků do praxe bude potřebovat mnoho dalšího času a úsilí (Gilbert et al. 2018; Schmidt et al. 2018).

Trvalá interakce mezi hostitelem a mikroblem mívá zpravidla pozitivní účinky na zdraví hostitele i přesto, že jsou některé bakteriální kmeny považovány za potenciální patogeny. Dominantními anaerobními bakteriemi v trávicím traktu člověka jsou kmeny *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* a *Clostridium* následovány fakultativně anaerobními kmeny *Escherichia* a *Lactobacillus* (Prakash et al. 2011). Přesné složení mikrobiomu je u každého jedince jedinečné. Rozdíly, které se našly ve složení mikrobiomu u dvojvaječných dvojčat nebyly větší než ty, které byly nalezeny mezi dvojčaty jednovaječnými. To naznačuje, že složení mikrobiomu je závislé mimo genetické výbavy také na environmentálních faktorech (obrázek č. 2) (Gilbert et al. 2018).



Obrázek č. 2: Faktory ovlivňující mikrobiom. Upraveno dle (Cremon et al. 2018).

3.2.1 Imunitní systém

Trávicí trakt je považován za největší imunologický orgán v těle obratlovců, který představuje jak vrozenou, tak po narození získanou imunologickou bariéru. Slizniční imunitní systém trávicího traktu je souhrnně označován jako GALT - gut-associated lymphoid tissue (García-Arrarás 2014).

Trávicí trakt je kontinuálně vystavován zdrojům vnějšího prostředí, jako jsou například bakterie a viry. Ty se do těla hostitele dostávají s přijatou potravou nebo mohou být součástí střevního mikrobiomu (Peterson & Artis 2014). Z tohoto důvodu má GIT rozsáhlý systém ochrany. Jedná se o nízké pH žaludku, slizniční bariéru pokrytou hlenovou vrstvou, velké množství buněk imunitního systému a přítomnost komensálních bakterií hojně kolonizující trávicí trakt (Zoetendal et al. 2008).

Lidský GIT se vyznačuje svou schopností tolerance antigenů přijatých potravou a obrovským počtem symbiotických mikroorganismů nacházejících se ve střevním lumenu. Současně má pomocí různorodých mechanismů schopnost rozpoznat a signalizovat přítomnost patogenů, které porušují střevní chemické a fyzikální bariéry, například skrz Imunoglobulin A (IgA), antimikrobiální peptidy, hlenovou vrstvu mucus či těsně propojené buňky střevního epitelu. Střevní mikrobiom má klíčovou roli v regulaci a vývoji imunitního systému (O'Hara et al. 2006; Sommer & Bäckhed 2013). Bakterie mezi sebou soutěží o své místo na střevním epitelu a nepatogenní bakterie mohou svou adherencí zabránit přilnutí a průchodu patogenů do buněk střevního epitelu. Některé střevní bakterie produkují různé druhy látek, od mastných kyselin a peroxidů až po specifické bakteriociny, které dokáží inhibovat či zabít potenciální patogenní bakterie (Guarner & Malagelada 2003; Quigley 2013).

Imunitní systém, stejně jako mikrobiom, s přibývajícím věkem snižuje svou schopnost aktivní ochrany. Stárnutí je úzce spojeno s otupením získané imunity a zároveň aktivací vrozené, což má za následek chronické záněty nízkého stupně (Kim & Pritts 2017). Velmi důležitým důvodem narušení střevní stěny a celkově homeostázy je i konzumace antibiotik, včetně krátkodobé. Jakobsson et al. (2010) uvádí obrovský pokles střevního mikrobiomu, tedy i celkové bakteriální diverzity již po týdnu užívání antibiotik. Ačkoliv dochází k postupné regeneraci mikrobiomu, ani 4 roky po ukončení léčby nedošlo k jeho plnému obnovení, navíc po této době přetrvávala i částečná rezistence k antibiotikům.

Narušení střevní homeostázy může dále vést také k neočekávané aktivaci infekce chronického HIV, vzniku atopie nebo syndromu dráždivého tračníku (Sekirov et al. 2010).

V případě, že střevní mikroorganismy či jejich produkty penetrují přes hranici střevní sliznice, buňky imunitního systému okamžitě zahajují obrannou reakci. Pokud dojde k poškození tkáně a přítomných buněk, jsou aktivovány zánětlivé odpovědi imunitního systému – vzniká tedy zánět. Tyto drobné místní záněty způsobují gastrointestinální hypomobilitu až zhoršení průchodnosti střeva neboli ileus (Hakansson & Molin 2011; Lata & Juránková 2011).

3.3 Poranění střevního epitelu

3.3.1 Vznik poranění

Ve střevním epitelu může dojít k poranění z mnoha různých důvodů. Buňky mohou být poškozeny toxickými látkami v lumenu, procesem trávení, vznikem zánětů, vzájemným působením mikrobů, oxidačním stresem či farmaceutiky, kdy dochází k porušení střevní ochranné bariéry (Iizuka & Konno 2011). Jedna z látek, která může ovlivnit prostupnost střevní bariéry skrz apoptózu enterocytů, nekrózu či změnou těsně propojených spojů buněk střevního epitelu (tight junctions - TJs) mající význam při udržení celistvosti epiteliální vrstvy, je derivát oxidu dusnatého peroxynitrit (Chokshi et al. 2008). TJs je multiproteinový komplex, který tvoří selektivně propustný prostor mezi sousedními buňkami epitelu, čímž reguluje transport skrz tuto cestu na malé, hydrofilní molekuly a ionty. Porušení této bariéry má za následek průnik patogenů, což vyvolá poruchu imunitního systému sliznice, následovanou zánětem. To může být spouštěcím mechanismem pro střevní a systémová onemocnění (Seltana et al. 2010; Lee 2015). Další z příčin vzniku poranění může být za běžných fyziologických podmínek porušení integrity povrchové sliznice, a to například vlivem enzymů, vlastním mikrobiomem, složkami přijaté potravy a dalšími (Kim & Ho 2010).

K velmi významným důvodům poranění břišní dutiny patří úrazy, především autonehody (Kim et al. 2004). Dalším velmi častým poraněním v klinické praxi, a to hlavně u dětí, je mechanické poškození předmětem, který je přijatý skrz dutinu ústní. Zpravidla se jedná o mince, hračky, ostré předměty, ale i kosti a běžnou potravu. Velké množství těchto cizích předmětů projde trávicím traktem bez poškození, v některých případech však dochází

ke komplikacím (Kay & Wyllie 2005). Diagnostika bývá mnohdy obtížná, klinické příznaky mohou být jak akutní, tak chronické a mohou připomínat akutní zánět pobřišnice, nádor břišní stěny či vznikající absces. V horším případě může požití cizího tělesa vyústit až v perforaci střev (Hsu et al. 2005; Goh et al. 2006).

Další riziko perforace vzniká při endoskopických vyšetřeních a zákrocích, jako je kolonoskopie či polypektomie, která se využívá při léčbě kolorektálního karcinomu neboli nádoru tlustého střeva. Terapeutická kolonoskopie způsobuje většinou menší trhlinky, kdežto při kolonoskopii diagnostické je riziko perforace mnohem větší. Výjimkou není ani barotrauma způsobené přílišnou insuflací vzduchu do dutiny břišní či nemožnost dostat se k místu problému. Léčba je v případě menšího poranění konzervativní, většinou je však nezbytný chirurgický zásah. Riziko perforace střev spočívá v kontaminaci dutiny břišní střevním obsahem, po které následuje celková sepse organismu (Panteris et al. 2009; Loffeld et al. 2011). Ta nastává v důsledku peritonitidy a následně vzniklého bakteriální zánětu. Jedná se o velmi nebezpečný, život ohrožující stav (Maier et al. 2004).

Peritonitida nemusí vzniknout pouze následkem perforace, ale také jako důsledek prasknutí peptických vředů, apendixu při zánětu slepého střeva, dále divertikulitidy či idiopatických střevních zánětů (inflammatory bowel disease - IBD) mezi něž patří ulcerózní kolitida (UC) a Crohnova choroba (CD) (Agarwal et al. 2008). Divertikulitida je onemocnění, při němž se v tlustém střevě nachází výchlípky neboli divertikly. Často je doprovázena dalšími komplikacemi jako je neprůchodnost střev, vznik píštělí, či abscesem (Rafferty et al. 2006).

Tato zánětlivá střevní onemocnění mohou být způsobena mutacemi a poruchou regulace Toll-like receptorů imunitního systému (TLR), které jsou aktivovány komensálními bakteriemi a jsou jedním z mechanismů pomáhajících k udržení střevní homeostázy (Iizuka & Konno 2011). Na zmíněnou poruchu regulace navazuje poměrně agresivní imunitní odpověď, která se objevuje právě u lidí s genetickou predispozicí k těmto onemocněním (Sartor 2004).

3.3.2 Hojení poranění

Hojení ran je jeden z nejkompexnějších biologických procesů, který nastává v průběhu našeho života (Gurtner et al. 2008). Rychlé a efektivní hojení střevního epitelu je

zásadní pro správnou funkci tenkého střeva, a tím i celého trávicího traktu (Seltana et al. 2010).

Hojení je proces migrace epiteliálních buněk, který je zahájen v případě, že dojde k poranění a je závislý na rovnováze tří buněčných funkcí: restituci, proliferaci a diferenciaci buněk střevního epitelu sousedících s poraněnou oblastí a závisí na něm opětovné uzavření povrchového epitelu. Samotné hojení je ovlivněno mnoha faktory: gastrointestinálními regulačními peptidy zahrnujícími růstový faktor a cytokininy, dále TLR, stravovacími návyky a mnohými dalšími jako jsou molekuly peptidů zahrnující extracelulární matrix, faktory srážení krve i molekuly, které s peptidy nesouvisí jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem, fosfolipidy, nukleotidy adeninu a stopové prvky (Dignass 2001; Iizuka & Konno, 2011).

3.3.3 Léčba poranění

Jak již bylo řečeno, poranění a onemocnění střev se často skládá z většího množství problémů, které spolu velmi úzce souvisí. Proto je i léčba velmi komplexní a různorodá. Základem bývají antibiotika pro odeznění zánětů a eliminaci či snížení bakteriálních kmenů v závislosti na spektru jejich působení (Sartor 2004). Zejména při IBD se přistupuje ke dlouhodobé, konzervativní léčbě zahrnující právě podávání antibiotik, dále kortikosteroidů, aminosalicilátů či imunopresiv (Carter et al. 2004). Jak při konzervativní, tak i v rámci předoperační a pooperační léčby se u gastrointestinálních poruch často vyskytuje malnutrice a s ní související deficit mikronutrientů a vitamínů. Tento problém se řeší jak dietními opatřeními, tak velmi často také enterální a parenterální výživou. Vyčerpání či úbytek nutričních živin je spojen se změnami tělesného složení, poškozením tkáně a funkčností orgánů, tyto faktory vedou k narušení imunitní i svalové funkce (Ward 2003; Meisnerová 2011). Malnutrice je spojována také s pomalejším hojením a zvýšeným výskytem pooperačních komplikací. Je zřejmé, že porozumění úloze výživy při hojení ran GIT je velmi důležité, ať už se jedná o hojení pooperační, peptických vředů nebo IBD. I tak zůstává tato problematika stále poměrně neprozkoumaná a je nezbytné vyměnit modelové systémy na hlodavcích za klinické a translační výzkumy u lidí (Mukherjee et al. 2016).

Jednou z možností, jak obnovit prospěšné kmeny *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* ve střevech je podávání probiotik, prebiotik či jejich kombinace – synbiotik (Sartor 2004).

3.4 Probiotické organismy

Termín „Probiotika“ pochází z řeckého sousloví „Pro Bios“ (pro život). Moderní historie probiotik je datována mezi konec 19. a začátek 20. století. První myšlenka o přítomnosti a využití přátelských mikroorganismů lidského těla pochází od Henryho Tissiera, pediatra Pasteurova institutu. S myšlenkou přínosu probiotických mikroorganismů pro lidské zdraví je však častěji spojován Eliee Metchnikov, který připisoval dlouhověkost bulharských venkovanů konzumaci fermentovaných mléčných produktů jako je jogurt (Ozen & Dinleyici 2015; Friedrich et al. 2017). Metchnikov popsal mikroorganismy, které fermentují obsah střev a produkují prospěšné metabolické produkty (např. mléčnou kyselinu), což byl klíčový objev vzhledem k faktu, že střevní buňky tuto schopnost nemají. Navíc předpokládal, že mléčná kyselina zabraňuje toxicitě tlejících mikrobů. To přispělo k myšlence, že laktobacily mohou příznivě ovlivňovat gastrointestinální ekosystém, zmírňovat nemoci a stárnutí (Schepper et al. 2017).

Termín probiotikum poprvé definovali Lilly a Stillwell v roce 1965. Označili jím látku produkovanou jedním prvokem, stimulující růst jiného prvoka. Později byl tento termín používán pro krmné a potravní doplňky určené pro výživu hospodářských zvířat a lidí. Pojem v tomto období zahrnoval jak živé kultury bakterií, tak mikrobiální metabolity, enzymy a aminokyseliny, které pozitivně ovlivňují mikroflóru trávicího traktu. Fuller roku 1989 publikoval definici „Probiotika jsou živé mikrobiální a krmné potravní doplňky, které příznivě ovlivňují hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiocenózy“ (Rada 2010). Tato definice se od následující, která je platná v současnosti liší pouze minimálně. Světová zdravotnická organizace (World Health Organization) definuje probiotika jako živé organismy, které při podávání v přiměřeném množství poskytují hostiteli zdravotní přínos (Rowland et al. 2008).

3.4.1 Druhy probiotických mikroorganismů

V gastrointestinálním traktu najdeme zhruba 10 bilionů bakterií, které působí pozitivně na lidské zdraví. V rámci stejného druhu se často objevují různorodé účinky, proto bývá příznivý účinek probiotik specifický pro daný kmen (Iqbal et al. 2014; Schepper et al. 2017). Mikroorganismy používané jako probiotické lze rozdělit do tří skupin:

- a) Nepatogenní – Rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* a *Saccharomyces*
- b) Patogenní – *Bacillus cereus*
- c) Potencionálně patogenní – *Enterococcus* a některé druhy bakterií mléčného kvašení

Především u skupiny b) a c) je nezbytná jistá opatrnost, a to v souvislosti nejen s patogenitou, ale i se skrytými nosiči rezistence k antibiotikům a možnou toxicitou.

Nejčastějšími mikroorganismy používané jako probiotika je heterogenní skupina gram pozitivních bakterií mléčného kvašení (BMK) (Watson & Preedy; 2015). I přes rozdílný fylogenetický vývoj je často mezi BMK díky podobnému metabolismu řazený také rod *Bifidobacterium* (Klijn et al. 2005). Konkrétní nejpoužívanější druhy probiotik jsou uvedeny v tabulce č. 1

Přínos BMK pro lidské zdraví vyplývá mimo jiné z jejich fermentačního výsledného metabolitu, kterým je mléčná kyselina. Biochemicky se BMK dělí na dvě skupiny: homofermentativní (rody *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*) a heterofermentativní (rod *Leuconostoc* a některé poddruhy laktobacilů), které produkují mimo mléčné kyseliny i řadu dalších produktů jako je CO₂, octová kyselina a ethanol (Klaenhammer et al. 2005; Schepper et al. 2017)

Tabulka č. 1: Mikroorganismy nejčastěji využívané jako probiotika (Saad et al. 2013)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Ostatní BMK	Ostatní
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli strain Nissle</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbruecki</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

3.4.1.1 *Lactobacillus spp.*

Rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* patří k těm nejdůležitějším v odvětví potravinářské mikrobiologie a potravinářství. Laktobacily jsou gram pozitivní, kataláza negativní tyčinky, které jsou nepohyblivé, anaerobní a izolují se z lidského gastrointestinálního a genitourinárního traktu, kde tvoří přirozenou součást mikrobiomu. Jejich izolace je možná také z různých rostlinných či živočišných zdrojů. Taxonomicky se jedná o prokaryotické buňky, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilly*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae* (Carretto et al. 2001; Felis & Dellaglio 2007).

Růst laktobacilů je přímo závislý na dostupnosti živin, pH a teplotě. Laktobacily jsou velmi náročné mikroorganismy, které vyžadují bohatá média a ideální podmínky pro kultivaci. Avšak produkce bakteriocinů, a tím i antibakteriální aktivita se s prostředím bohatým na živiny a bez dostatku mikroorganismů snižuje (Barbosa et al. 2018).

U kmenů laktobacilů včetně komponent buněčných stěn bylo zjištěno, že vykazují imunomodulační aktivitu, a to zejména v *in vitro* experimentech. Pozitivní výsledky byly již popsány i u *in vivo* modelů, klinické studie jsou stále předmětem výzkumu (Liévin-Le Moal & Servin 2014).

Tabulka 2a: Terapeutické a profylaktické vlastnosti specifických laktobacilů na lidské zdraví. Dle přehledového článku (Parvez et al. 2006).

Probiotický kmen	Prokázané účinky
<i>Lactobacillus</i>	U podávání probiotik, převážně z kmenů <i>Lactobacillus</i> , bylo prokázáno zlepšení stavu pouchitidy Zlepšení trávení laktózy, snížení nesnášenlivosti laktózy u jedinců s tímto problémem, snížení průjmů u dětí a jedinců se syndromem krátkého střeva Mikrobiální interferenční terapie – použití nepatogenních bakterií k odstranění patogenů a jako doplněk k antibiotikům. Vylepšená imunitní funkce mukózy, sekrece mucinu a prevence onemocnění
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Snížení frekvence průjmu u pacientů po radioterapii pánve Snížené frekvence polypů, adenomů, rakovina tlustého střeva u pokusných zvířat Prevence urogenitální infekce s následným vystavením <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Snížená hladina cholesterolu

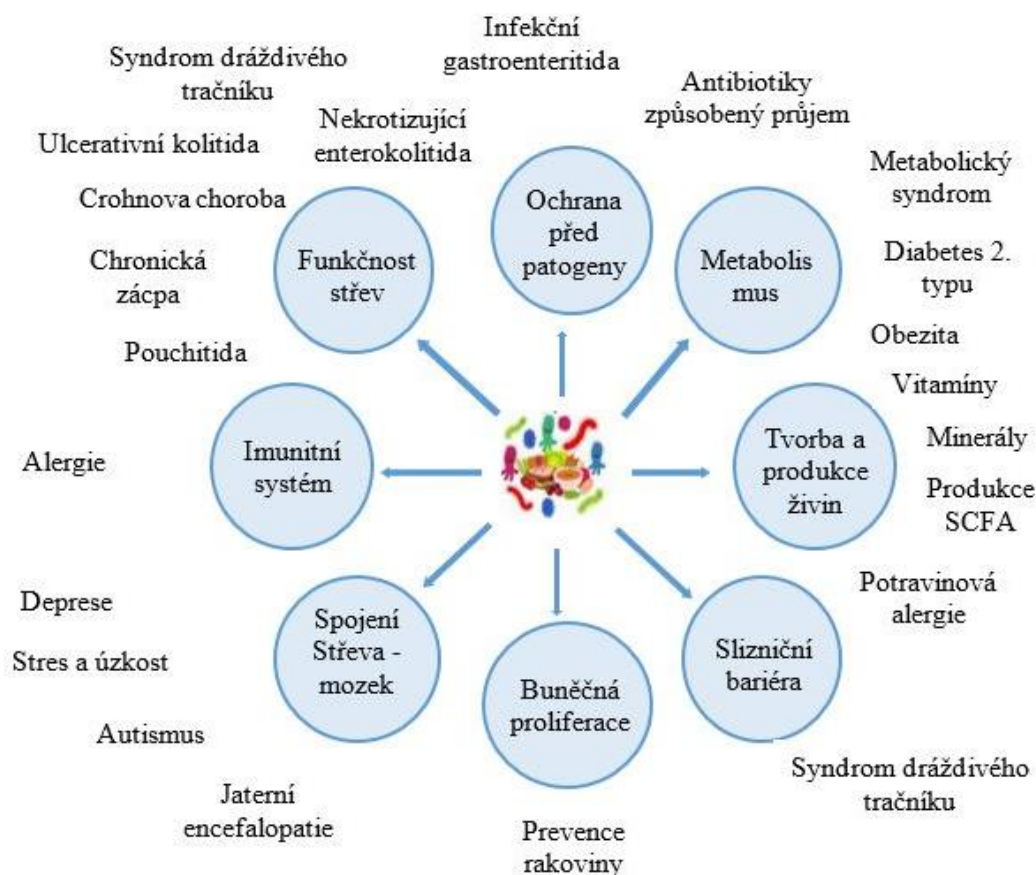
Tabulka 2b: Terapeutické a profylaktické vlastnosti specifických laktobacilů na lidské zdraví. Dle přehledového článku (Parvez et al. 2006).

Probiotický kmen	Prokázané účinky
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Snížený výskyt průjmu v denních centrech při podání polovině dětí Velmi efektivní při redukci zánětů ve střevech: enterokolitidy u krys, nadměrný růst bakterií tenkého střeva u dětí, pouchitidy Redukce bolestivosti a zácpy u syndromu dráždivého tračníku Snížení nadýmání, bolesti a zácpy u syndromu dráždivého tračníku v klinických studiích Pozitivní efekt na zlepšení imunity u infekce HIV u dětí
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Zkrácení doby trvání akutní gastroenteritidy Zkrácení doby trvání akutního průjmu
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Zlepšení buněčné imunity u zdravých, dospělých jedinců v klinických studiích
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Potlačení a vyhubení <i>Helicobacter pylori</i> v tkáňových kulturách a zvířecích modelech díky sekreci kyseliny mléčné

3.4.2 Vlastnosti probiotik

Zařazení mikroorganismů mezi probiotika má několik nezbytných předpokladů. Aby se z potenciálních probiotických kmenů stalo probiotikum, prvním předpokladem je jejich izolace následována určením jejich klíčových vlastností jako je: odolnost vůči žaludeční kyselosti a žlučovým solím, adheze k hlenům, intestinálním epitelialním buňkám a buněčným liniím a dále jejich antimikrobiální a antagonistický účinek. Posledním kritériem je ověření bezpečnosti pro člověka pomocí taxonomického zařazení, *in vitro* a *in vivo* testů, klinickými studiiemi a sekvenováním genomu (Shokryazdan et al. 2017).

Mezi pozitivní účinky probiotik na zdraví člověka patří mnoho zdravotních přínosů (obrázek č. 3)



Obrázek č.3: schématické znázornění hlavních mechanismů účinku, při kterých probiotika vykazují své příznivé účinky. Upraveno dle (Cremon et al. 2018).

3.4.3 Probiotika v potravě

Probiotika jsou v současnosti široce využívána jako takzvané funkční potraviny, které podporují homeostázu střevní mikroflóry a pomáhají při léčbě gastrointestinálních poruch (Lam et al. 2007). Probiotické potraviny, doplňky stravy a nápoje jsou využívány v mnoha zemích světa a pro svoje slibné zdravotní účinky a zanedbatelné vedlejší účinky se stávají stále oblíbenějšími (Sanders et al. 2018). V případě zařazení probiotických mikroorganismů do potravinářského průmyslu je nezbytné dbát na bezpečnost – původ a nepatogenitu, dále na funkčnost – životaschopnost a perzistenci v GIT spolu s imunomodulací a antitumogenními vlastnostmi. Jen tak lze zajistit optimální přínos pro spotřebitele (Saarela et al. 2000).

Pravidelná konzumace probiotik může být efektivní prevencí k udržení střevní homeostázy a ochraně těla před infekcí. Probiotické přípravky jsou dostupné v mnoha různých formách, jako jsou tablety, prášek, potraviny a kojenecká výživa (Sanders 2003).

Nejpoužívanější probiotické mikroorganismy pocházejí z rodů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Enterococcus*. Dalšími bakteriálními rody a druhy jsou *Bacillus*, *Clostridium butyricum*, *Propionibacterium*, ale také kvasinky a plísně. Tyto kultury jsou dnes běžně přidávány do mléčných kysaných výrobků, sýrů, fermentovaných masných výrobků, ale i do náplní sušenek a oplatků. Probiotické mikroorganismy nachází uplatnění ve výživě lidí i zvířat (Rada 2010).

3.4.4 Vliv probiotik na hojení ran

Probiotika mohou vykazovat pozitivní přínos pro střeva pomocí různorodých mechanismů, jako je například: posílení střevní bariéry, inhibice zánětlivých a stimulace protizánětlivých cytokinů, inhibice růstu patogenních bakterií a konkurenční adheze k hlenu a epitelu (Ohland & MacNaughton 2010; Guandalini & Sansotta 2019).

Potenciální příznivé účinky konzumace probiotik běžnou fortifikovanou stravou na zdraví střev jsou stále rozsáhle zkoumány. Mohammedsaeed et al. (2015) uvádí, že by bakteriální lyzáty mohly představovat bezpečnější alternativu k použití živých probiotických bakterií v oblasti hojení ran, a to proto, že potenciální riziko vstupu živých bakterií do krevního řečiště skrz poranění nebylo dosud posouzeno. Bakteriální lyzáty představují rovněž jednodušší požadavky na výrobu a udržení potřebné životaschopnosti v oblasti rány.

Lam et al. (2007) ve své studii na krysách potvrdil hypotézu účinku *Lactobacillus rhamnosus* při žaludečních vředech. *Lactobacillus rhamnosus* byl podáván přímo do žaludku po dobu tří dnů po indukci vředu a úspěšně v žaludeční sliznici kolonizoval, zejména na okrajích vředu. Mechanismem tohoto účinku je pravděpodobně útlum buněčné apoptózy a současná podpora proliferace buněk a procesu novotvorby cév neboli angiogeneze. Na krysách byl zkoumán i kefir. Zvířata s kožním zraněním infikovaným *Staphylococcus aureus*, která byla ošetřena přípravkem ze sušených kefirových zrn vykazovala lepší schopnost hojení, než tomu bylo u jedinců ošetřených antibiotiky (Rodrigues et al. 2005).

Studie na krysách ukazují, že úspěšné použití probiotik se odvíjí také od toho, jak je dané probiotikum komplementární k základnímu mikrobiálnímu složení daného jedince (Schmidt et al. 2018). Buffie et al. (2015) uvádí, že podáváním *Clostridium scindens* bylo dosaženo zvýšení mikrobiální diverzity a rezistence vůči infekci způsobené *Clostridium difficile* v kombinaci s podáváním antibiotik. Tento výsledek je založen na klinických údajích, modelech myši, metagenomických analýzách a matematickém modelování.

Obrovský potenciál, především u IBD a tam, kde jednotlivé kmeny probiotických mikroorganismů neuspěly, je připisován patentované probiotické směsi VSL #3, která je předmětem mnoha klinických studií (Guandalini et al. (2010); Michail & Kenche (2011); Wong et al. (2015); Staudacher et al. (2017)). Jedná se o přípravek z osmi různých bakteriálních kmenů: *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *Lactobacillus acidophilus*, *L.casei*, *L. delbrueckii ssp.bulgaricus*, *L. plantarum* a *Streptococcus salivarius ssp. Thermophilus*. Přesný mechanismus fungování této směsi není doposud znám, studie *in vivo* a *in vitro* ukazují, že VSL #3 může pomoci modulovat imunitní odpověď hostitele, složení mikrobiomu, protizánětlivé dráhy, odpovědi na viscerální bolest a slizniční ochranou bariéru (Chapman et al. 2006; Connell et al. 2018). Poněkud překvapivý je fakt, že vliv této směsi ještě nebyl vyzkoušen ve spojení s hojením ran (Cinque et al. 2017). Dle Derwa et al. (2017) může být směs VSL #3 efektivní v indukci remise a prevenci recidivy UC.

Na základě přehledového článku předpokládá Guandalini & Sansotta (2019) budoucnost probiotik při onemocnění GIT ve výzkumu lepších bakteriálních kmenů v laboratorním prostředí, kdy aplikace metagenomiky může pomoci identifikovat specifické kmeny s přesvědčivým efektem na IBD a dále ve výzkumu možných kombinací kmenů, které mohou působit synergicky.

4 Materiál a Metodika

4.1 Materiál

Testovány byly celkem 4 kmeny z rodu *Lactobacillus* - *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri* a *Lactobacillus plantarum*, které měla k dispozici katedra Mikrobiologie, výživy a dietetiky. Dále byly použity buněčné linie Caco-2 a HT29, pocházející z kolorektálního adenokarcinomu tlustého střeva, penicilin a streptomycin, pyruvát sodný, hydrogenuhličitan sodný, neesenciální aminokyseliny, fetální bovinní sérum (FBS), fosfátový pudr (PBS – Phosphate Buffered Saline), trypsin a Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), vše zakoupeno od firmy Sigma – Aldrich (CZ – Czech republic). Pro tkáňové kultury byly použity 24 jamkové destičky, serologické pipety, kultivační láhve a Petriho misky od firmy Thermo Fisher Scientific (UK - United Kingdom).

4.2 Metodika

4.2.1 Kultivace buněčných tkání

Kultivace buněčné linie kolorektálního adenokarcinomu Caco-2 a HT29 probíhala DMEM médiu, které bylo doplněno 10% FBS, 1% hydrogen uhličitanem sodným, 1% penicilinem a streptomycinem, 1% pyruvátem sodným, 1% neesenciálními aminokyselinami. Kultivace probíhala v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C, 95% vlhkosti a 5% CO₂ atmosféře po dobu 7 dní. Buněčné linie byly umístěny v kultivačních lahvích o velikosti 75 cm², přičemž medium bylo obden měněno za čerstvé. Poslední den byly buněčné monovrstvy sklizeny.

Při sklizení byly buňky opláchnuty 5 ml PBS, ten byl následně odstraněn. Dále se k buňkám přidalo 5 ml trypsinu, který působil po dobu 3-5 minut. Po této době byl trypsin zneutralizován pomocí 1 ml DMEM media. Následně byly buňky pomocí plastové škrabky uvolněny ze dna kultivační láhve a vloženy do 15 ml centrifugační zkumavky typu Falcon. Ta byla centrifugována po dobu 10 minut. Staré medium bylo nahrazeno novým o objemu 5 ml, ve kterém postupně došlo pomocí serologické pipety k resuspendaci buněk. 15 ml DMEM media spolu s 1 ml připravené suspenze bylo vloženo do nové kultivační láhve a uloženo v CO₂ inkubátoru.

4.2.2 Založení 24 jamkové destičky

Pro zjištění počtu buněk v 1 ml suspenze byla použita metoda počítání v Bürkerově komůrce. Buňky byly obarveny trypanovou modří, z roztoku byla odebrána kapka do Bürkerovi komůrky, kde byl spočítán obsah buněk v 1 ml a pomocí výpočtu byla následně zjištěna přesná koncentrace sklizených buněk. Buněčná kultura byla naředěna na koncentraci $2,5 \times 10^5$ na 1 ml a napipetována do jamek.

4.2.3 Příprava buněčného lyzátu probiotik

Příprava lyzátů proběhla dle metody Mohammedsaeed et al. (2014), která byla modifikována pro naše účely. Laktobacily v množství 10 ml 10^6 CFU/ml byly centrifugovány při $2000 \times g$ po dobu 10 minut, následně $3\times$ promyty 10 ml PBS, resuspendovány v 5 ml PBS a dále extrahovány pomocí ultrazvuku po dobu 15 minut v ledové vodní lázni. Pro filtraci vzorku kvůli odstranění zbylých bakterií byl použit stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,22 μm .

4.2.4 Zkouška hojení rány s působením laktobacilů *in vitro*

Po 24 h inkubaci bylo dno jamky pokryto buňkami z 80 až 90 %. Pomocí 200 μl špičky bylo ve všech jamkách způsobeno poranění ve tvaru dvou svislých rýh. Uvolněné buňky ze starého média byly odstraněny pomocí promytí jamek s PBS, které bylo provedeno $3\times$.

Následně bylo přidáno 900 μl DMEM a 100 μl buněčného lyzátu. Pomocí mikroskopu ZEISS PrimoVert a fotoaparátu ZEISS AxioCam 512 color byly z každé rýhy pořízeny fotografie. Celkově se jedná o 4 fotografie z každé jamky. Měření probíhalo následně u HT29 po 16; 24 a 48 hodinách u Caco-2 po 24 a 48 hodinách. Pořízené fotografie byly následovně analyzovány pomocí open-source programu TScratch (<https://github.com/cselab/TScratch>), který vyhodnocuje % volného prostoru na pořízené fotografii.

4.2.5 Statistické vyhodnocení

Analýza pořízených fotografií byla vytvořena pomocí programu TScratch, který automaticky vyhodnocuje velikost poškozeného místa v jednotlivých časových bodech pro získání údajů o rychlosti hojení. Získaná data byla ve finále analyzována v programu MS excel, kde proběhla i tvorba grafů. Pro statistický výpočet byl použit párový *t*-test a statistická významnost byla posouzena na hladině $p < 0,05$.

5 Výsledky

Cílem práce bylo zjistit, jak mohou odlišné kmeny laktobacilů ovlivňovat schopnost hojení buněčné monovrstvy tvořené buněčnými liniemi Caco-2 a HT29. Na buněčné linii Caco-2 byly testovány lyzáty kmenů *L. rhamnosus*, *L. gasseri* a *L. plantarum*, ten byl jako jediný z vyjmenovaných na buněčné linii HT29 vyměněn za *L. fermentum*. V obou *in vitro* modelech byl jako kontrola použit PBS pufr.

Na buněčné monovrstvě Caco-2 bylo pořízeno a vyhodnoceno celkem 120 snímků v rozmezí 0, 24 a 48 hodin. Na buněčné monovrstvě HT29 probíhal sběr častěji – v rozmezí 0, 16, 24 a 48 hodin a bylo zde pořízeno celkem 148 snímků. Průběh hojení jednotlivých kmenů je zobrazen na obrázcích č. 4 a 5. Výsledky byly statisticky zpracovány v programu Microsoft Excel, v tabulkách č. 4 a 5 je znázorněna šířka škrábanců v % a jejich postupné uzavírání v daných časových intervalech s vyhodnocenými aritmetické průměry, které pro úplnost doplňují směrodatné odchylky. Grafy č. 1 a 2 znázorňují průběh průměrného nárůstu epiteliální tkáň, tedy samotné hojení v daných časových úsecích.

5.1 Buněčná linie Caco-2

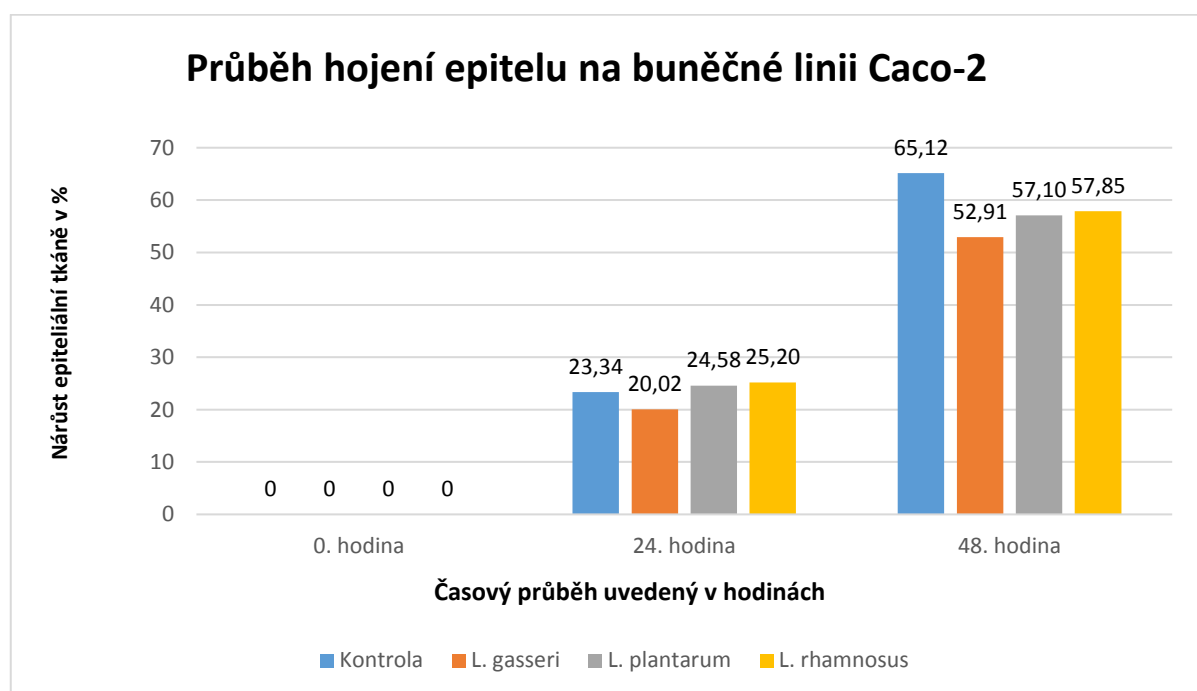
Výsledky hojení střevního epitelu získané na buněčné linii Caco-2 dokumentujte tabulka č. 3, graf č. 2 a obrázek č. 4.

Tabulka č. 3 - Buněčná re-epitelizace epiteliálních buněk kolorektálního adenokarcinomu buněčné linie Caco-2 s vybranými kmeny laktobacilů.

Kmen	Šířka škrábance v % na buněčné monovrstvě Caco-2	
	24 hodin	48 hodin
Kontrola	Průměr ± SD 76,66 ± 8,89	Průměr ± SD 34,88 ± 11,24
<i>Lactobacillus gasseri</i>	79,98 ± 9,09	47,09 ± 11,52*
<i>Lactobacillus plantarum</i>	75,42 ± 7,33	42,90 ± 8,31*
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	74,80 ± 7,22	42,15 ± 9,95*

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry ± směrodatné odchylky šířky škrábance v %. * statisticky významné rozdíly hodnot ($p < 0,05$)

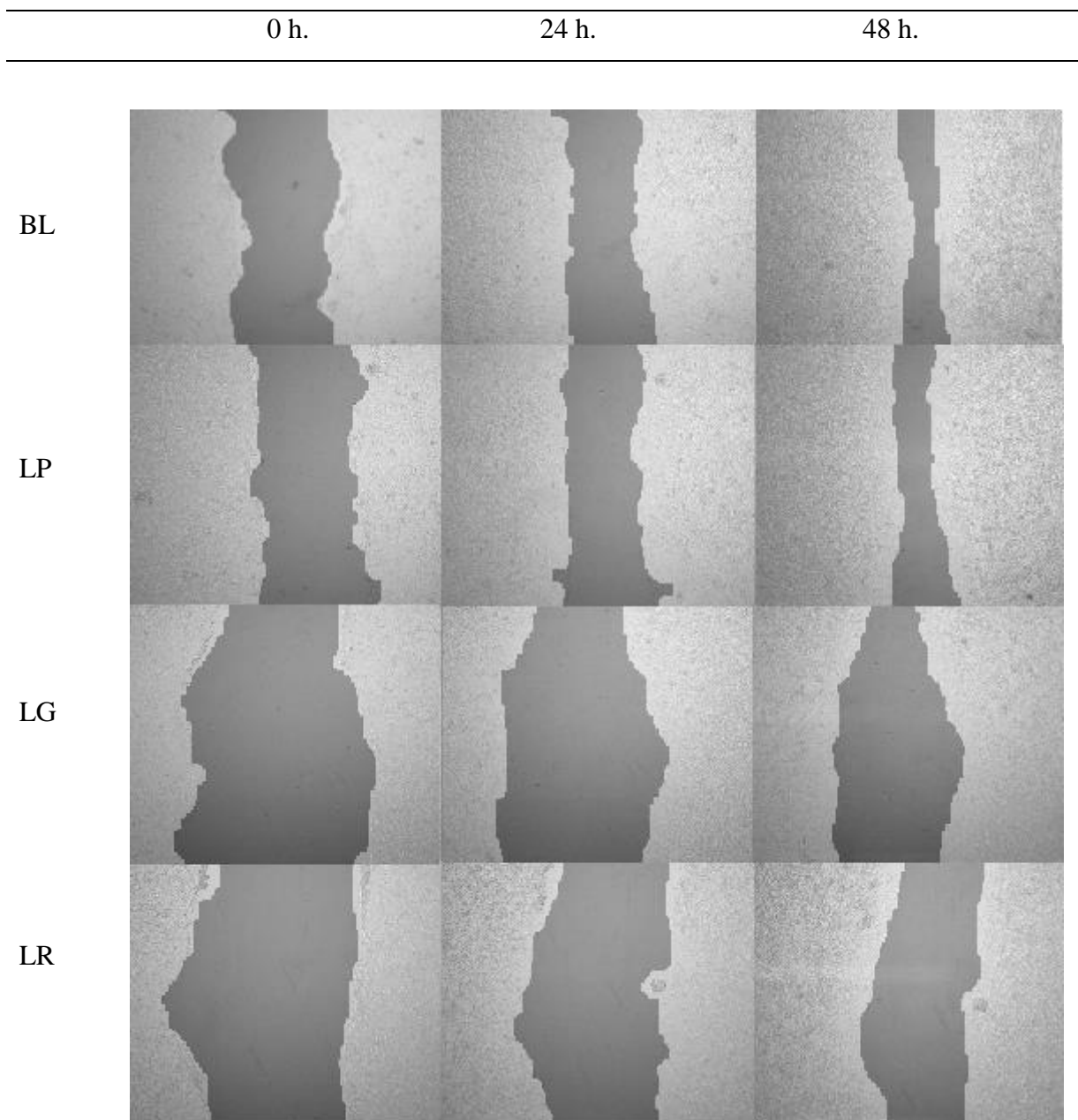
Tabulka č. 3 zobrazuje postupné zatahování vytvořeného poranění pomocí daných kmenů laktobacilů, kdy v 0. hodině byla šířka poranění 100 % a postupem času docházelo k jeho zužování, tedy k hojení poškozené tkáně. Z tabulky je patrné, že nejlepších výsledků dosáhl v rámci probiotik *L. rhamnosus*, i zde však bylo v konečném úseku – tedy ve 48. hodině zřejmé, že se hojení, oproti kontrole které zbývalo pouze 34,88 % do úplného uzavření rány, zpomalilo.



Graf č. 1. Grafické znázornění hojení buněčné linie Caco-2 v časových intervalech 0, 24 a 48 hodin. Byly zde použity vzorky lyzátů probiotik *L. gasseri* (■), *L. plantarum* (■), *L. rhamnosus* (■) a kontrolní vzorek (■).

Tento graf č.1 je vyobrazením nárůstu epitelální tkáně buněčné linie Caco-2 v časových úsecích 24 a 48 hodin vůči počátečnímu času 0. V prvním pozorovaném časovém úseku – tedy ve 24. hodině jsou hodnoty poměrně vyrovnané. Největší obnova epitelální tkáně je patrná u *L. rhamnosus* s 25,2 %, jen o 0,62 % méně je hodnota *L. plantarum*. U *L. gasseri* s 20,02 % je patrná známka zpomalené re-epitelizaci oproti kontrole, která dosáhla 23,34 %. Právě kontrola s 65,12 % dosáhla nejlepších výsledků ve 48. hodině, kdy je zřejmá tendence zpomalujícího se nárůstu epitelální tkáně u všech vzorků obsahující probiotika. Po kontrole má největší hodnotu opět *L. rhamnosus* s 57,85 %, těsně následovaný *L. plantarum* s 57,10 %. Na poslední příčce zůstal *L. gasseri* s 52,91 %.

Následující snímek (obrázek. č. 4) zachycuje postupný průběh hojení tkáně tvořené buněčnou linií Caco-2 pomocí laktobacilů v daných časových intervalech.



Obrázek č. 4 Snímky mechanicky způsobeného poranění monovrstvy Caco-2 buněk a jejich re-epitelizace. Focení probíhalo v časových intervalech 0, 16, 24 a 48 hodin. Byly zde použity lyzáty probiotik *L.plantarum* (LP), *L. gasseri* (LG), *L. rhamnosus* (LR) a kontrola (BL). Fotky byly pořízeny pomocí mikroskopu ZEISS PrimoVert a fotoaparátu ZEISS Axiocam 512 color.

5.2 Buněčná linie HT29

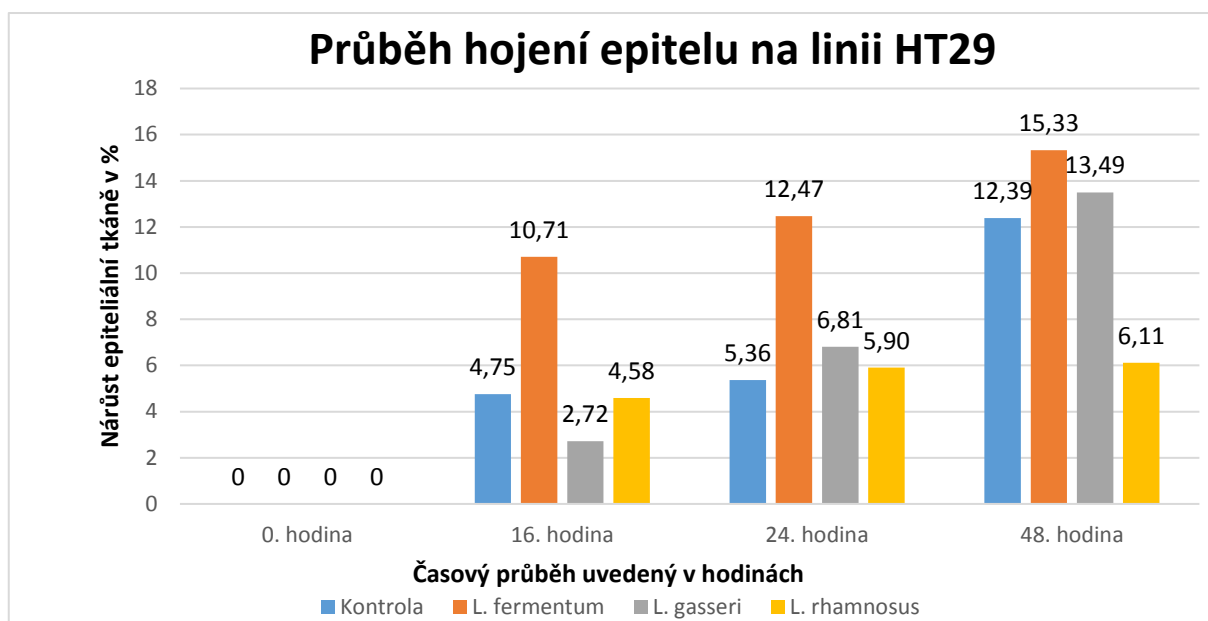
Výsledky hojení střevního epitelu získané na buněčné linie HT29 dokumentujte tabulka č. 4, graf č. 2 a obrázek č. 5.

Tabulka č. 4 - Buněčná re-epitelizace epitelálních buněk kolorektálního adenokarcinomu buněčné linie HT29 s vybranými kmeny laktobacilů.

Kmen	Šířka škrábane v % na buněčné monovrstvě HT29		
	16 hodin	24 hodin	48 hodin
Kontrola	Průměr ± SD 95,25 ± 3,84	Průměr ± SD 94,64 ± 2,76	Průměr ± SD 87,61 ± 4,58*
<i>Lactobacillus fermentum</i>	89,29 ± 5,34	87,53 ± 5,98*	84,67 ± 7,54*
<i>Lactobacillus gasseri</i>	97,28 ± 2,34	93,19 ± 5,52	86,51 ± 6,70*
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	95,42 ± 1,61	94,10 ± 3,41	93,89 ± 2,89

Výsledky jsou vyjádřeny jako průměry ± směrodatné odchylky šířky škrábane v %. * statisticky významné rozdíly hodnot ($p < 0,05$)

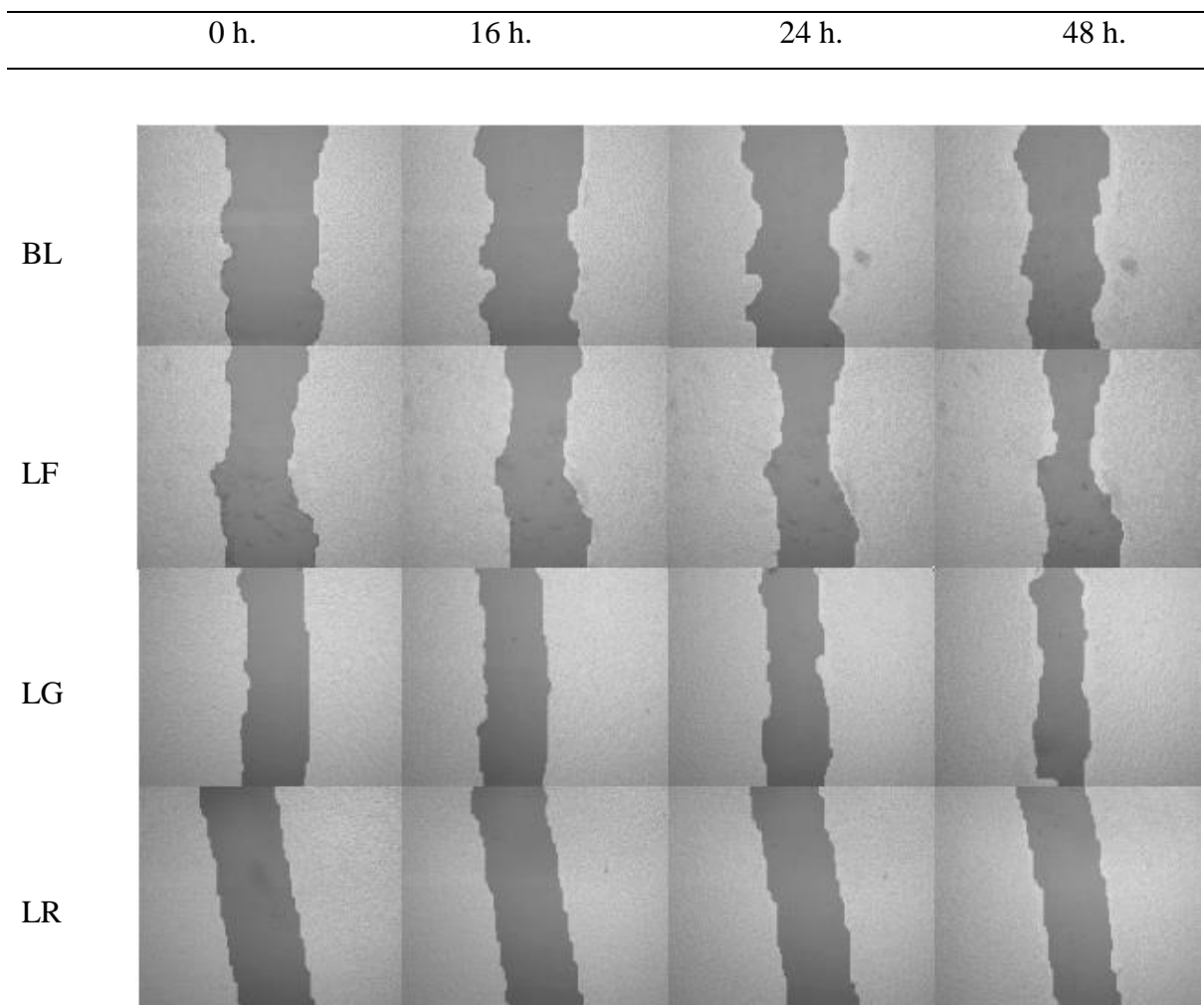
Tabulka č. 4 zobrazuje postupné uzavírání vytvořeného poranění pomocí daných kmenů laktobacilů, kdy v 0. hodině byla šířka poranění 100 % a postupem času docházelo k jeho zužování, tedy k hojení poškozené tkáně. Je patrné, že nejlepších výsledků dosáhl ve všech časových úsecích *L. fermentum*. *L. gasseri* ukazuje nejpomalejší uzavírání rány v 16. hodině s hodnotou, kdy poranění dosahovalo 97,28 %, postupem času však došlo ke zrychlení hojení a ve 48. hodině vykazoval lepší výsledky než kontrola. Nejméně úspěšný v tomto pokusu se zdá být *L. rhamnosus* se šířkou škrábane 93,89 %, poranění se tedy za tuto dobu uzavřelo pouze o 6,11 %.



Graf č. 2. Grafické znázornění hojení buněčné linie HT29 v časových intervalech 0, 16, 24 a 48 hodin. Byly zde použity vzorky lyzátů probiotik *L.fermentum* (■), *L. gasseri* (■), *L. rhamnosus* (■) a kontrolní vzorek (■).

Tento graf č.2 je znázorněním nárůstu epitelální tkáně buněčné linie HT29 v časových úsecích 16, 24 a 48 hodin vůči počátečnímu času 0. Jak je vidět, úspěšnost jednotlivých kmenů se v průběhu času měnila, nejpatrnější je to u *L. gasseri*, který měl v 16. hodině úspěšnost pouze 2,72 %, avšak ve 24. hodině to bylo již 6,81 % a ve 48. hodině 13,49 %, což je lepší výsledek, než měla kontrola (12,39 %) i *L. rhamnosus* (6,11 %). U *L. rhamnosus* lze konstatovat zpomalení nárůstu epitelální tkáně, tedy zpomalené hojení oproti kontrole. Nejlepší výsledky na této buněčné linii vykazoval *L. fermentum*, a to ve všech časových úsecích s hodnotami 10,71 %, 12,47 %, 15,33 %, i z těchto čísel je však zřejmé, že v průběhu času se hojení zpomalovalo.

Následující snímek (obrázek č. 5) zachycuje postupný průběh hojení tkáně tvořené buněčnou linií HT29 pomocí laktobacilů v daných časových intervalech.



Obrázek č. 5. Snímky mechanicky způsobeného poranění monovrstvy HT29 buněk a jejich re-epitelizace. Focení probíhalo v časových intervalech 0, 16, 24 a 48 hodin. Byly zde použity lyzáty probiotik *L. fermentum* (LF), *L. gasseri* (LG), *L. rhamnosus* (LR) a kontrola (BL). Fotky byly pořízeny pomocí mikroskopu ZEISS PrimoVert a fotoaparátu ZEISS Axiocam 512 color.

Z obrázků č. 4 a 5 i z grafického zobrazení je zcela zřejmé, že hojení na buněčné linii Caco-2 dosáhlo v tomto pokusu mnohem lepších výsledků, než tomu bylo u linie HT29. Nejlepší výsledek na buňkách Caco-2 – *L. rhamnosus*, který dosáhl za 48 hodin 65,12% zhojení způsobeného poranění, což je oproti nejméně úspěšnému *L. fermentum* s výsledkem 13,49 % na linii HT29 významný rozdíl.

6 Diskuze

Současný výzkum na poli mikrobiologie, imunologie a lidského zdraví je zaměřován na složení a aktivitu mikrobiomu, což je velmi úzce spojené s tématem probiotických organismů a jejich přínosem pro lidské zdraví. Fermentované produkty obsahující živé mikroorganismy se již od Starověku uvádějí jako zdraví prospěšné potraviny (Sánchez et al. 2017). Různé probiotické kmeny mají odlišné účinky a tím i rozdílný vliv na hostitele, většinou probiotických bakterií můžeme připsat hlavní i vedlejší pozitivní účinky na fyziologii a zdraví GIT. Klinické testy Bernaola Aponte et al. (2011); Ritchie & Romanuk (2012); AlFaleh & Anabrees (2014) ukazují pozitivní vliv konzumace probiotik při obtížích jako je: infekční průjem a průjem následkem léčby antibiotiky, zhoršená průchodnost střev, syndrom dráždivého tračníku, bolest břicha a nadýmání, ulcerózní kolitida a nekrotizující enterokolitida (Hill et al. 2014). Mezi mechanismy účinku, díky kterým probiotika fungují, patří například modulace hostitelského imunitního systému, posílení ochranné střevní bariéry, inhibice růstu patogenních bakterií, tvorba protizánětlivé odpovědi a konkurenční adherence k epitelu a hlenu (Ohland & MacNaughton 2010; Plaza-Díaz et al. 2017).

Testy *in vitro* jsou rozhodující pro posouzení bezpečnosti probiotických kmenů. Mezi nejběžnější testy používané pro výzkum v souvislosti s efektem probiotik patří: rezistence vůči žlučedním a žlučovým kyselinám, adherence k mucus, lidskému epitelu a buněčným liniím, antimikrobiální aktivita proti potenciálně patogenním bakteriím, schopnost snížení adherence patogenů na povrchu a aktivita hydrolázy žlučových solí. Námí zkoumaný vliv probiotik na hojení ran střevního epitelu patří tedy mezi doposud relativně neprozkoumanou oblast výzkumu. Účinnost každého *in vitro* testu s pozitivním výsledkem je nutné později zvalidovat v testech *in vivo* (Sánchez et al. 2017).

Cílem práce bylo zjistit vliv 4 lyzátních laktobacilů (*L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. plantarum* a *L. fermentum*) na schopnost podpořit hojení střevního epitelu. Testování proběhlo na dvou buněčných liniích Caco-2 a HT29. Caco-2 je oblíbená, velmi často používaná linie, která při kultivaci vykazuje buněčnou monovrstvu, která napodobuje morfologické, funkční a biochemické vlastnosti enterocytů, navíc je vysoce stabilní a celistvá (Saez-Tenorio et al. 2019). HT29 je buněčná linie, která obsahuje pohárkové buňky sekretující mucus, entero-endokrinní buňky i enterocyty (Donetti et al. 2014). Jelikož se však jednalo o první pokusy tohoto typu na pracovišti, byly zvoleny samostatné linie a nikoliv směsná kultura,

kteřá vytvářívá realističtější *in vitro* model lidského střevního epitelu v porovnání s jednotlivými liniemi (Saez-Tenorio et al. 2019).

Na buněčné linii Caco-2 byly zkoumány *L. gasseri*, *L. plantarum*, a *L. rhamnosus*, a na buněčné linii HT29 byl *L. plantarum* vyměněn za *L. fermentum*. Ze získaných výsledků je patrné, že u buněčné linie HT29 po 48hodinové expozici bylo dosaženo nejlepšího výsledku u *L. fermentum* a *L. gasseri*. Naproti tomu *L. gasseri* u buněčné linie Caco-2 nevykazoval po 48 hodinách výrazně vyšší hojení poškozené tkáně, přitom po 24hod. expozici vykazovaly všechny testované lyzáty zrychlení oproti neošetřené kontrole. Z dosažených výsledků je patrné, že buněčná linie Caco-2 má výrazně lepší schopnost hojit poškození, než je tomu u buněčné linie HT29.

Ačkoli *L. gasseri* u nás neměl pozitivní výsledky na rychlost hojení buněčné linie Caco-2, globálně je tento kmen považován za velmi perspektivní pro jeho dobrou adheenci, produkci metabolitů s antimikrobiální aktivitou, schopnost přežití při nízkém pH i za přítomnosti žaludečních kyselin. Vliv na úspěšnost může mít i skutečnost, že dané kmeny mají své další podkmeny, které vykazují různorodé schopnosti (Bogovič Matijašić et al. 2003; Ferreira et al. 2011).

Vliv na hojení může mít i fakt, že buněčné linie Caco-2 i HT29 jsou schopné zvyšovat produkci a uvolňování protizánětlivých cytokinů po expozici na zánětlivé stimuly. To bylo potvrzeno i v *in vitro* studii, kdy přebytek živin způsobil nástup zánětlivého stavu právě v důsledku produkce prozánětlivých cytokinů nebo volných radikálů (Bottani et al. 2019). Velmi zajímavých výsledků při hojení střevního epitelu dosáhl Seltana et al. (2010) kombinací linie Caco-2 s lidskými myofibroblasty izolovanými z lačnicku 16-18 týdenního plodu. Kultivace monovrstev Caco-2 probíhala na myofibroblastech, čímž byla vytvořena bazální membrána, která obsahovala mnoho důležitých složek nacházejících se na rozhraní epitel – mezenchym ve střevě. Drobné léze byly vytvořeny v buněčných monovrstvách na plastu i směsné kultuře. Hojení na směsné kultuře se ukázalo mnohem účinnější, navíc zahrnovalo uchování komponent bazální membrány. Následné experimenty ukázaly, že přidání kolagenu typu I či lidského fibronektinu ke kultivačnímu médiu významně urychluje uzavření rány na buňkách epitelu.

Probiotické mikroorganismy mají jako součást léčby svou nezpochybnitelnou roli, výzkum probíhá na mnoha zvířecích modelech, především krysách a králících. Jak uvádí Doron & Snyderman (2015), velkou výhodou probiotik je, že jsou již mnoho let považovány za

mikroorganismy s malým bezpečnostním rizikem pro většinu populace. Teoretická rizika související s konzumací probiotik jsou popisovány jako infekce, škodlivá metabolická aktivita, nadměrná metabolická stimulace u vnímavých jedinců a vedlejší gastrointestinální problémy.

Účinnost kmene *L. rhamnosus* na hojení střevního epitelu byla potvrzena i u potkanů s indukovanými žaludečními vředy. Probiotika byla v tomto případě podávána 3 po sobě jdoucí dny po indukci vředu. *L. rhamnosus* úspěšně kolonizoval v žaludeční sliznici, zejména na okraji vředu. Také výrazně, v závislosti na dávce, redukoval oblast žaludečních vředů. Buněčná apoptóza k poměru buněčné proliferace byla silně snížena. Angiogeneze byla rovněž významně stimulována společně s indukcí exprese vaskulárního endotelového růstového faktoru. Tato zjištění naznačují, že *L. rhamnosus* zlepšuje hojení žaludečních vředů prostřednictvím výše uvedených mechanismů (Lam et al. 2007). I opakovaná aplikace probiotik do vytvořené rány by tedy mohla významně přispět k rychlejšímu hojení rány, přičemž přesné poměry a frekvence opakování by mohly být předmětem dalšího výzkumu.

Doposud nejsou publikace věnujících se vlivu probiotik na rychlost hojení střevního epitelu u člověka. Jsou však studie, při kterých jsou sledovány jejich vlastnosti na hojení, a to zejména kožního epitelu. Tam se určitá probiotika jeví jako velmi perspektivní. Mezi takové patří i *L. fermentum* použitý ve formě probiotických náplastí na hojení ran situovaných na uších bílých králíků. Tyto náplasti dále obsahovaly glukózu, dusitan a chlorid sodný a jejich použití výrazně urychlilo hojení ischemických ran i ran do kterých se dostala infekce, což by mohlo v budoucnu pomoci hojení chronických vředů (Jones et al. 2012). *L. fermentum* dosáhl i v našem pokusu v rámci buněčné linie HT29 největší obnovy epitelální tkáně, a to ve všech časových úsecích. Oproti tomu lyzát tohoto probiotického kmene byl spolu s dalšími využit na modifikaci TTj lidských epidermálních keratinocytů. *L. fermentum* jako jediný ze zkoumaných laktobacilů a bifidobakterií vykazoval snížení životaschopnosti buněk a snížení exprese TTj proteinů v keratinocytech a tím nevyhnutelně došlo také ke snížení ochranné bariéry, která byla měřena pomocí transepiteliální elektrické rezistence. Jako nejefektivnější probiotika se ukázali *L. longum* a *L. rhamnosus*. Zajímavým výsledkem je, že modulace TTj je u *L. longum* zprostředkována pomocí TLR, nicméně při neutralizaci těchto receptorů *L. rhamnosus* nereagoval a nadále pozitivně působil na TTj. To naznačuje, že některé probiotické kmeny mají podobné účinky, které jsou však způsobeny odlišnými mechanismy. Na úspěšnost probiotik měla vliv i koncentrace, kdy při 10^6 CFU/ml bylo dosaženo lepších

výsledků v porovnání s kontrolou, nicméně při nižší koncentraci 10^2 CFU/ml byly výsledky ve srovnání s kontrolou velmi podobné (Sultana et al. 2013). Lyzát *L. rhamnosus* úspěšně působil na hojení kůže, kdy byla potvrzena zvýšená proliferace a migrace na monovrstvě keratinocytů, čímž došlo k velmi významnému urychlení re-epitalizace poškozených buněk keratinocytů. Tento proces probíhal za pomoci exprese různých genů včetně chemokinu CXCL2 a jeho receptoru CXCR2. Tyto chemokinové receptory se podílejí na hojení běžných ran, kde podněcují právě proliferaci i migraci keratinocytů. Výsledky ukazovaly 95% uzavření rány za 18 hodin od způsobení poranění, zatímco náš nejlepší výsledek s lyzátem *L. rhamnosus* byl 57,85 % ve 48. hodině, což byl také nejlepší výsledek vzorku obsahující probiotikum, této bakalářské práce (Mohammedsaeed et al. 2015). Při porovnání je však nezbytné brát v potaz velkou odlišnost mezi hojením ve střevech a na kůži.

I *L. plantarum* byl zkoumán ve spojení s hojením ran, a to konkrétně v souvislosti s přínosem lokální probiotické léčby na popáleniny. U pacientů s popáleninami je častá komplikace přítomnost infekce, která pravděpodobně přispívá i k masivnímu zjizvení při poranění tohoto typu. Popáleniny s aplikovaným *L. plantarum* či kontrolou byly infikovány bioluminiscenčním *Pseudomonas aeruginosa*, který je běžným patogenem při zraněních tohoto typu, časový průběh infekce byl sledován pomocí množství vyzářeného světla, po uzavření ran došlo ke kompletní analýze. *L. plantarum* prokazatelně omezil jak závažnost, tak délku infekce, dále došlo k významnému snížení koncentrace jak kolagenu mRNA typu I, tak kolagenních proteinů akumulovaných v infikovaném poranění, což vede ke zmenšení jizev. Překvapením byl fakt, že probiotická léčba ukázala téměř ekvivalentní účinek u neinfikovaných ran (Satish et al. 2017). Studie Earley et al. (2015) se zabývala složením střevního mikrobiomu u pacientů s popáleninami. U těchto pacientů byla prokázána porušená ochranná bariéra střevního epitelu, což může dále vést k translokaci bakterií nebo jejich produktů (např. endotoxinu) ze střevního lumenu do tělního oběhu, čímž se zvyšuje riziko sepse u imunokompromitovaných pacientů. Léčba využívající probiotika byla nasazena 20 imunokompromitovaným pediatrickým pacientům s popáleninami, kdy byly probiotika podávána po dobu 16 měsíců a důraz byl kladen i na celkovou bezpečnost související s podáváním probiotik u daných jedinců. Dny, kdy byla přítomna infekce a léčba antibiotiky byla tedy nezbytná se významně nelišily, ačkoliv snižující se potřeba antimykotik nahrává probiotické léčbě. I přesto, že délka pobytu pacientů byla stejná, čas potřebný k ukončení hojení ran byl u kontrolní skupiny delší. U pacientů s probiotickou léčbou byla zaznamenána

pouze plynatost jako negativní účinek. Probiotika byla tedy i u této rizikovější populace uznána za bezpečná, navíc s velmi slibnými výsledky, které však musí být ověřené na větším vzorku populace (Mayes et al. 2015).

Skutečnost, že záleží nejen na probiotickém kmeni, ale i na konkrétním probiotickém přípravku potvrzuje výzkum, který probíhal na půdě univerzity v Itálii. Na střevním epitelu byla zkoumána směs VSL #3, pocházející ze dvou různých výrobních míst (Itálie, Spojené státy americké – USA). Předmětem zájmu byla především buněčná morfologie, životaschopnost, migrace a poškození způsobené H_2O_2 . Lyzát vyrobený v USA vedl k prokazatelně rychlejšímu hojení poškozené monovrstvy doprovázeného aktivací cytoskeletu a migrací buněk, což je významná součást procesu hojení. Navíc tento lyzát působil antioxidantně a způsoboval inhibici cytotoxického účinku vyvolaného H_2O_2 . Lyzát vyrobený v Itálii těchto účinků schopen nebyl. Každý výrobce probiotických preparátů, speciálně těch, které tvoří více kmenů s vysokými koncentracemi, má vlastní zdroje probiotických mikroorganismů i různorodé procesy pro jejich kultivaci, lyofilizaci, spojení více kmenů do jednoho preparátu i samotné balení a všechny tyto části výrobních procesů mají vliv na samotný preparát. I samotný úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) upozorňuje, že změny ve výrobním procesu nebo zařízení by mohly vést ke změnám samotného biologického produktu a někdy se vyžadují dodatečné klinické studie pro prokázání bezpečnosti, identity, čistoty i účinnosti produktu (Cinque et al. 2017).

Je zcela zřejmé, že probiotické mikroorganismy jsou v současnosti velmi oblíbeným doplňkem pozitivně ovlivňující lidské zdraví, ať už ovlivněním složení mikrobiomu, udržováním funkce střevní bariéry či modulací hostitelského imunitního systému. Schopnost hojení sliznice je velmi důležitá pro udržení střevní homeostázy. Změny ve střevním mikrobiomu mohou tedy negativně ovlivnit schopnost re-epitelizaci tkáně i obranné mechanismy vůči patogenům a následné infekci. Při výzkumu přínosu probiotik na hojení ran musíme brát v potaz mnoho aspektů: vlastnosti jednotlivých kmenů případně jejich podkmenů, použitý materiál a linie střevních buněk, vliv prostředí, množství použitých mikroorganismů a jejich schopnost adherence i životaschopnosti. Výsledky získané v testech *in vitro* je následně nutné potvrdit v klinické praxi.

7 Závěr

Cílem práce bylo otestovat různé kmeny probiotik na jejich schopnost podpořit hojení střevního epitelu, což je velmi důležitá vlastnost pro správné fungování GIT, a tedy i zdraví hostitele.

Kmeny *L. rhamnosus*, *L. gasseri* a *L. plantarum* zkoumané na buněčné monovrstvě Caco-2 přinesly pozitivní výsledky, jimiž byla potvrzena hypotéza, že některé druhy probiotik mohou napomáhat hojení střevního epitelu, případně ho urychlit. Hojení poranění bylo ve všech časových intervalech zřetelné.

Pro správné zhodnocení výsledků je třeba brát v potaz, že se jedná o testy *in vitro*. Důležitá je zde samotná příprava lyzátů, zvolená koncentrace, schopnost adherence probiotik i vhodnost použité buněčné linie, jelikož všechny tyto aspekty ovlivňují úspěšnost výsledků. Je zřejmé, že vliv probiotik na hojení ran je omezený a pro úspěšné převedení do klinické praxe bude potřeba dalších výzkumů. I přesto není pochyb o tom, že konzumace výrobků obsahující probiotika pozitivně ovlivňuje funkčnost GIT.

8 Seznam použité literatury

- Agarwal N, Saha S, Srivastava A, Chumber S, Dhar A, Garg S. 2008. Peritonitis: 10 years' experience in a single surgical unit. *Tropical Gastroenterology* **28**:117-120.
- AlFaleh K, Anabrees J. 2014. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Evidence-Based Child Health: A Cochrane Review Journal* **9**:584-671.
- Aulton ME, Taylor K. 2013. *Aulton's Pharmaceuticals: The Design and Manufacture of Medicines*. Churchill Livingstone/Elsevier.
- Barbosa MS, Jurkiewicz C, Landgraf M, Todorov SD, Franco B. 2018. Effect of proteins, glucose and NaCl on growth, biosynthesis and functionality of bacteriocins of *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in foods during storage at 4° C: Tests in food models. *LWT* **95**:167-171.
- Bernaola Aponte G, Bada Mancilla CA, Carreazo Pariasca NY, Rojas Galarza RA. 2011. Cochrane Review: Probiotics for treating persistent diarrhoea in children. *Evidence-Based Child Health: A Cochrane Review Journal* **6**:1867-1889.
- Blackshaw LA, Brookes SJH, Grundy D, Schemann M. 2007. Sensory transmission in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterology & Motility* **19**:1-19
- Bogovič Matijašić B, Narat M, Zorič M. 2003. Adhesion of two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on Caco-2 cells. *Food Technology and Biotechnology* **41**:83-88.
- 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.
- Buffie CG, Bucci V, Stein RR, McKenney PT, Ling L, Gobourne A, No D, Liu H, Kinnebrew M, Viale A. 2015. Precision microbiome reconstitution restores bile acid mediated resistance to *Clostridium difficile*. *Nature* **517**:205.
- Carretto E, Barbarini D, Marzani FC, Fumagalli P, Monzillo V, Marone P, Emmi V. 2001. Catheter-related bacteremia due to *Lactobacillus rhamnosus* in a single-lung transplant recipient. *Scandinavian journal of infectious diseases* **33**:780-782.
- Carter MJ, Lobo AJ, Travis SPL. 2004. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* **53**:v1-v16.

- Chapman TM, Plosker GL, Figgitt DP. 2006. VSL#3 probiotic mixture - A review of its use in chronic inflammatory bowel diseases. *Drugs* **66**:1371-1387.
- Cheroutre H, Lambomez F, Mucida D. 2011. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* **11**:445.
- Chokshi NK, Guner YS, Hunter CJ, Upperman JS, Grishin A, Ford HR. 2008. The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal necrotizing enterocolitis. *Seminars in perinatology* **32**:92-99.
- Cinque B, La Torre C, Lombardi F, Palumbo P, Evtoski Z, Jr Santini S, Falone S, Cimini A, Amicarelli F, Cifone MG. 2017. VSL# 3 probiotic differently influences IEC-6 intestinal epithelial cell status and function. *Journal of cellular physiology* **232**:3530-3539.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* **148**:1258-1270.
- Connell M, Shin A, James-Stevenson T, Xu H, Imperiale TF, Herron J. 2018. Systematic review and meta-analysis: Efficacy of patented probiotic, VSL# 3, in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterology & Motility* **30**:e13427.
- Cremon C, Barbaro MR, Ventura M, Barbara G. 2018. Pre-and probiotic overview. *Current opinion in pharmacology* **43**:87-92.
- Derikx LAAP, Dieleman LA, Hoentjen F. 2016. Probiotics and prebiotics in ulcerative colitis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **30**:55-71.
- Derwa Y, Gracie DJ, Hamlin PJ, Ford AC. 2017. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **46**:389-400.
- Dignass AU. 2001. Mechanisms and modulation of intestinal epithelial repair. *Inflammatory bowel diseases* **7**:68-77.
- Donetti E, Arnaboldi F, Cornaghi L, De Luca P, Maggioni M, Fiorilli A, Ferraretto A. 2014. An innovative in vitro co-culture of Caco2 and HT-29 cells for mimicking human intestinal epithelium: a morphological analysis. *Italian Journal of Anatomy and Embryology* **119**:1.
- Doron S, Snyderman DR. 2015. Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases* **60**:129-134.

- Earley ZM, et al. 2015. Burn Injury Alters the Intestinal Microbiome and Increases Gut Permeability and Bacterial Translocation. *Plos One* **10**:16.
- Felis GE, Dellaglio F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Current issues in intestinal microbiology* **8**:44.
- Ferreira CL, GrzeŚKowiak Ł, Collado MC, Salminen S. 2011. In vitro evaluation of *Lactobacillus gasseri* strains of infant origin on adhesion and aggregation of specific pathogens. *Journal of food protection* **74**:1482-1487.
- Friedrich AD, Paz ML, Leoni J, González Maglio DH. 2017. Message in a Bottle: Dialog between Intestine and Skin Modulated by Probiotics. *International Journal of Molecular Sciences* **18**:1067.
- García-Arrarás JE. 2014. Intestinal Regeneration: The Developmental Biology Approach. Pages 515-573. *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*. Elsevier.
- Gilbert JA, Blaser MJ, Caporaso JG, Jansson JK, Lynch SV, Knight R. 2018. Current understanding of the human microbiome. *Nature medicine* **24**:392.
- Gilroy AM. 2017. *Anatomy and Essential Textbook*. Thieme Medical Publishers, New York.
- Goh BKP, Chow PKH, Quah H-M, Ong H-S, Eu K-W, Ooi LLPJ, Wong W-K. 2006. Perforation of the gastrointestinal tract secondary to ingestion of foreign bodies. *World journal of surgery* **30**:372-377.
- Gropper SS, Smith JL. 2012. *Advanced nutrition and human metabolism*. Cengage Learning. Wadsworth
- Guandalini S, Magazzu G, Chiaro A, La Balestra V, Di Nardo G, Gopalan S, Sibal A, Romano C, Canani RB, Lionetti P. 2010. VSL# 3 improves symptoms in children with irritable bowel syndrome: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **51**:24-30.
- Guandalini S, Sansotta N. 2019. Probiotics in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease.
- Guarner F, Malagelada JR. 2003. Gut flora in health and disease. *The Lancet*. **361**:512-519.
- Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. 2008. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**:314.
- Hakansson A, Molin G. 2011. Gut microbiota and inflammation. *Nutrients*. **3**:637-682.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S. 2014. Expert consensus document: The International Scientific

- Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Gastroenterology & hepatology* **11**:506.
- Hsu S-D, Chan D-C, Liu Y-C. 2005. Small-bowel perforation caused by fish bone. *World Journal of Gastroenterology: WJG* **11**:1884.
- Hudák R, Kachlík D. 2013. *Memorix anatomie*. Triton, Praha.
- Iizuka M, Konno S. 2011. Wound healing of intestinal epithelial cells. *World journal of gastroenterology: WJG* **17**:2161.
- Iqbal MZ, Qadir MI, Hussain T, Janbaz KH, Khan YH, Ahmad B. 2014. Probiotics and their beneficial effects against various diseases. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* **27**:405-415
- Jakobsson HE, et al. 2010. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PloS one* **5**:12
- Jaladanki NR, Wang J-Y. 2016. *Regulation of Gastrointestinal Mucosal Growth*, Second Edition. Morgan & Claypool Publishers.
- Jones M, Ganopolsky JG, Labbé A, Gilardino M, Wahl C, Martoni C, Prakash S. 2012. Novel nitric oxide producing probiotic wound healing patch: preparation and in vivo analysis in a New Zealand white rabbit model of ischaemic and infected wounds. *International wound journal* **9**:330-343.
- Kay M, Wyllie R. 2005. Pediatric foreign bodies and their management. *Current gastroenterology reports* **7**:212-218.
- Kim HC, Shin HC, Park SJ, Park SI, Kim HH, Bae WK, Kim IY. 2004. Traumatic bowel perforation: analysis of CT findings according to the perforation site and the elapsed time since accident. *Clinical imaging* **28**:334-339.
- Kim Y, Pritts TA. 2017. *The Gastrointestinal Tract. Geriatric Trauma and Critical Care*. Springer.
- Kim YS, Ho SB. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current gastroenterology reports* **12**:319-330.
- Kittnar O, Jandová K, Kuriščák E, Langmeier M, Marešová D, Mlček M, Mysliveček J., Pokorný, J, Riljak V, Trojan S. 2011. *Lékařská fyziologie*. Grada. Praha.
- Klaenhammer TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate-Peril MA, Altermann E. 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* **29**:393-409.

- Klijn A, Mercenier A, Arigoni F. 2005. Lessons from the genomes of bifidobacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **29**:491-509.
- Lam EKY, Yu L, Wong HPS, Wu WKK, Shin VY, Tai EKK, So WHL, Woo PCY, Cho CH. 2007. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats. *European journal of pharmacology* **565**:171-179.
- Lata J, Juránková J. 2011. Střevní mikroflóra, slizniční bariéra a probiotika u některých interních chorob. *Praktické lékařství* **7**:212-217.
- Lee SH. 2015. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intestinal research* **13**:11-18.
- Li H, Limenitakis JP, Fuhrer T, Geuking MB, Lawson MA, Wyss M, Brugiroux S, Keller I, Macpherson JA, Rupp S. 2015. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nature communications* **6**:8292.
- Liévin-Le Moal V, Servin AL. 2014. Anti-infective activities of lactobacillus strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clinical microbiology reviews* **27**:167-199.
- Loffeld R, Engel A, Dekkers PEP. 2011. Incidence and causes of colonoscopic perforations: a single-center case series. *Endoscopy* **43**:240-242.
- Maccaferri S, Biagi E, Brigidi P. 2011. Metagenomics: key to human gut microbiota. *Digestive Diseases* **29**:525-530.
- Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Hüser N, Holzmann B, Stier A, Pfeffer K, Heidecke C-D. 2004. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* **21**:505-512.
- Marieb NE, Hoehn NK. 2015. *Human Anatomy & Physiology*. Pearson Education Limited, Harlow.
- Mayes T, Gottschlich MM, James LE, Allgeier C, Weitz J, Kagan RJ. 2015. Clinical safety and efficacy of probiotic administration following burn injury. *Journal of Burn Care & Research* **36**:92-99.
- Meisnerová ME. 2011. Nutriční podpora u střevních zánětů. *Interní medicína pro praxi* **1**:35-37.

- Michail S, Kenche H. 2011. Gut microbiota is not modified by randomized, double-blind, placebo-controlled trial of VSL# 3 in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Probiotics and antimicrobial proteins* **3**:1-7.
- Mohammedsaeed W, Cruickshank S, McBain AJ, O'Neill CA. 2015. Lactobacillus rhamnosus GG lysate increases re-epithelialization of keratinocyte scratch assays by promoting migration. *Scientific reports* **5**:16147.
- Mohammedsaeed W, McBain AJ, Cruickshank SM, O'Neill CA. 2014. Lactobacillus rhamnosus GG inhibits the toxic effects of Staphylococcus aureus on epidermal keratinocytes. *Applied and environmental microbiology* **80**:5773-5781
- Mukherjee K, Kavalukas SL, Barbul A. 2016. Nutritional aspects of gastrointestinal wound healing. *Advances in wound care* **5**:507-515.
- O'Hara AM, O'Regan P, Fanning A, O'Mahony C, MacSharry J, Lyons A, Bienenstock J, O'Mahony L, Shanahan F. 2006. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by Bifidobacterium infantis and Lactobacillus salivarius. *Immunology* **118**:202-215.
- Ohland CL, MacNaughton WK. 2010. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **298**:G807-G819.
- Ozen M, Dinleyici EC. 2015. The history of probiotics: the untold story. *Beneficial microbes* **6**:159-165.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology* **5**:e177.
- Panteris V, Haringsma J, Kuipers EJ. 2009. Colonoscopy perforation rate, mechanisms and outcome: from diagnostic to therapeutic colonoscopy. *Endoscopy* **41**:941-951.
- Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology* **100**:1171-1185.
- Peterson LW, Artis D. 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews Immunology* **14**:141.
- Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda F, Vilchez-Padial L, Gil A. 2017. Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. *Nutrients* **9**:555.
- Ployon S, Morzel M, Canon F. 2017. The role of saliva in aroma release and perception. *Food chemistry* **226**:212-220.

- Prakash S, Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Cantor A. 2011. The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**:12
- Quigley EMM. 2013. Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterology & hepatology* **9**:560
- Rada V. 2010. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní medicína pro praxi* **12**:92-97.
- Rafferty J, Shellito P, Hyman NH, Buie WD. 2006. Practice parameters for sigmoid diverticulitis. *Diseases of the colon & rectum* **49**:939-944.
- Ritchie ML, Romanuk TN. 2012. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PloS one* **7**:e34938.
- Rodrigues KL, Caputo LRG, Carvalho JCT, Evangelista J, Schneedorf JM. 2005. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents* **25**:404-408.
- Rowland I, Melton L, Gray J, Bulpitt C, Hickson M, Smith M, Foxton J, Keshav S. 2008. Latest research and thinking into the power of probiotics. *Practice Nurse* **35**:1-4.
- Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter J-M, Bressollier P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology* **50**:1-16.
- Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology* **84**:197-215.
- Saez-Tenorio M, Domenech J, García-Rodríguez A, Velázquez A, Hernández A, Marcos R, Cortés C. 2019. Assessing the relevance of exposure time in differentiated Caco-2/HT29 cocultures. Effects of silver nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology* **123**:258-267.
- Sakač N, Regušić L, Sak-Bosnar M, Jozanović M, Breslauer N. 2014. Direct potentiometric determination of ptyalin in saliva. *Int. J. Electrochem. Sci* **9**:7097-7109.
- Sanders ME. 2003. Probiotics: considerations for human health. *Nutrition reviews* **61**:91-99.
- Sanders ME, Merenstein D, Merrifield CA, Hutkins R. 2018. Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin* **43**:212-225.
- Sartor RB. 2004. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* **126**:1620-1633.

- Satish L, Gallo PH, Johnson S, Yates CC, Kathju S. 2017. Local Probiotic Therapy with *Lactobacillus plantarum* mitigates scar formation in rabbits after burn injury and infection. *Surgical infections* **18**:119-127.
- Schepper JD, Irwin R, Kang J, Dagenais K, Lemon T, Shinouskis A, Parameswaran N, McCabe LR. 2017. Probiotics in Gut-Bone Signaling. *Advances in experimental medicine and biology* **1033**:225-247.
- Schmidt TSB, Raes J, Bork P. 2018. The human gut microbiome: from association to modulation. *Cell* **172**:1198-1215.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews* **90**:859-904.
- Seltana A, Basora N, Beaulieu JF. 2010. Intestinal epithelial wound healing assay in an epithelial–mesenchymal co-culture system. *Wound Repair and Regeneration* **18**:114-122.
- Shokryazdan P, Faseleh Jahromi M, Liang JB, Ho YW. 2017. Probiotics: From Isolation to Application. *Journal of the American College of Nutrition* **36**:666.
- Sipos F, Leiszter K, Tulassay Z. 2011. Effect of ageing on colonic mucosal regeneration. *World Journal of Gastroenterology: WJG* **17**:2981.
- Sommer F, Bäckhed F. 2013. The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology* **11**:227
- Staudacher HM, Lomer MCE, Farquharson FM, Louis P, Fava F, Franciosi E, Scholz M, Tuohy KM, Lindsay JO, Irving PM. 2017. A diet low in FODMAPs reduces symptoms in patients with irritable bowel syndrome and a probiotic restores bifidobacterium species: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* **153**:936-947.
- Sultana R, McBain AJ, O'Neill CA. 2013. Strain-dependent augmentation of tight-junction barrier function in human primary epidermal keratinocytes by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* lysates. *Applied and environmental microbiology* **79**:4887-4894.
- 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 & food research* **61**:1600240.
- Tortora GJ, Derrickson BH. 2008. *Principles of anatomy and physiology*. John Wiley & Sons.
- Vander JA, Sherman HH, Luciano SD. 2000. *Human physiology*. The McGraw-Hill Companies, New York

- Ward N. 2003. Nutrition support to patients undergoing gastrointestinal surgery. *Nutrition Journal* **2**:18.
- Watson R, Preedy V. 2015. *Probiotics, Prebiotics and Synbiotics*. Academic Press.
- Wong RK, Yang C, Song G-H, Wong J, Ho K-Y. 2015. Melatonin regulation as a possible mechanism for probiotic (VSL# 3) in irritable bowel syndrome: a randomized double-blinded placebo study. *Digestive diseases and sciences* **60**:186-194.
- Zoetendal EG, Rajilić-Stojanović M, De Vos WM. 2008. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* **57**:1605-1615.

9 Seznam použitých zkratek

CD	Crohnova choroba
CO₂	oxid uhličitý
CZ	Česká republika (Czech Republic)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
FBS	fetální bovinní sérum
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration)
GALT	střevní lymfatická tkáň (gut-associated lymphoid tissue)
GIT	gastrointestinální trakt
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IBD	zánětlivé onemocnění střev (inflammatory bowel disease)
IgA	imunoglobulin A
BMK	bakterie mléčného kvašení
MALT	slizniční imunitní systém (mucosa-associated lymphatic tissue)
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
SD	směrodatná odchylka
TJs	těsně propojené buňky střevního epitelu (tight junctions)
TLR	toll-like receptory imunitního systému
TT	trávicí trakt
UC	ulcerózní kolitida
USA	Spojené státy americké
UK	Spojené království (United Kingdom)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

10 Seznam použitých obrázků a tabulek

Obrázek č. 1: Jednotlivé vrstvy gastrointestinálního traktu.....	11
Obrázek č. 2: Faktory ovlivňující mikrobiom	13
Obrázek č. 3: Schématické znázornění hlavních mechanismů účinku, při kterých probiotika vykazují své příznivé účinky.....	22
Obrázek č. 4: Snímky mechanicky způsobeného poranění monovrstvy Caco-2 buněk a jejich re-epitelizace	29
Obrázek č. 5: Snímky mechanicky způsobeného poranění monovrstvy HT29 buněk a jejich re-epitelizace	32
Tabulka č. 1: Mikroorganismy nejčastěji využívané jako probiotika.....	19
Tabulka č. 2a: Terapeutické a profylaktické vlastnosti specifických laktobacilů na lidské zdraví.....	20
Tabulka č. 2b: Terapeutické a profylaktické vlastnosti specifických laktobacilů na lidské zdraví.....	21
Tabulka č. 3 Buněčná re-epitelizace epiteliálních buněk kolorektálního adenokarcinomu buněčné linie Caco-2 s vybranými kmeny laktobacilů.....	27
Tabulka č. 4: Buněčná re-epitelizace epiteliálních buněk kolorektálního adenokarcinomu buněčné linie HT29 s vybranými kmeny laktobacilů.	30
Graf č. 1 - Grafické znázornění hojení buněčné linie Caco-2.....	28
Graf č. 2 - Grafické znázornění hojení buněčné linie HT29.....	31