

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Adherence probiotických mikroorganismů na buňky střevní mukózy

Bakalářská práce

Autor práce: Kristýna Řehořová

Obor studia: Výživa a potraviny

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

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

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

V Praze dne 17.4. 2018

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce, Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D., za ochotu a trpělivost při jejím zpracování, odborné vedení a přátelský přístup.

Adherence probiotických organismů na buňky střevní mukózy

Souhrn

Probiotické organismy jsou spolu s dalšími bakteriemi, vláknitými houbami, kvasinkami a viry nedílnou součástí lidského střevního mikrobiomu. Podporou střevní homeostázy a stimulováním imunitního systému hrají základní roli v lidském zdraví. Důležitá je také jejich úloha v ochraně střeva před nežádoucími látkami a patogeny. Pro plné využití pozitivních účinků probiotik je zásadní jejich schopnost adherence na buňky střevní sliznice. Tím brání kolonizaci patogenních bakterií a jsou tak snížena rizika spojená s vyvoláním střevních onemocnění.

K udržování správné rovnováhy střevního mikrobiomu je dnes doporučována pravidelná konzumace fermentovaných mléčných výrobků, kde jsou probiotika důležitou složkou. Pro svoje zdraví prospěšné účinky se v dnešní době těší velké oblibě kvašené mléčné nápoje, kde jsou probiotické organismy zastoupeny v hojném počtu, zejména rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

Cílem této práce bylo zjistit, která probiotika, vyskytující se v tradičních mléčných fermentovaných nápojích produkovaných v oblasti střední Asie, mají nejlepší adhezenční vlastnosti a tím tedy největší vliv na lidské zdraví. Testování probíhalo *in vitro* na buněčném modelu tvořeného z buněčných linií kolorektálního karcinomu tlustého střeva Caco-2 a HT29-MTX.

Celkem bylo testováno 7 kmenů rodu *Lactobacillus*, které byly izolovány ze třech druhů fermentovaných nápojů vyrobených z velbloudího, kobyliho a jačího mléka. Nejlepší adhezenční vlastnosti vykazovaly laktobacily izolované z nápoje Kurut, kde *L. brevis* 8-6M adheroval z 37,1 %, *L. crustorum* 8-9M z 24,8 % a *L. paracasei* 8-2M z 19,9 %. Naopak nejhůře adherovaly kmeny *L. helveticus* 5-2M a *L. pontis* 5-5M nalezené v nápoji Shubat. Zde docházelo k adhezi z 7,3 %, *L. pontis* 5-5M neadheroval vůbec. *L. kefiranofaciens* 6-2M a *L. pontis* 6-12M izolované z Kumysu adherovaly z 18,4 % a 12,5 %.

Vysoký adhezenční potenciál tak nebyl zcela potvrzen, je ale zjevné, že konzumace těchto produktů přináší zdraví prospěšné účinky pro trávicí trakt.

Klíčová slova: probiotika, *in vitro*, buněčný model, adherence, kvašené mléčné nápoje

Adhesion of probiotic microorganisms to the intestinal mucosa

Summary

Probiotic organisms, together with other bacteria, filamentous fungi, yeasts and viruses, are an integral part of a human intestinal microbiome. By supporting intestinal homeostasis and stimulating immune system, probiotics play an essential role in human health. Their role in protecting the gut from harmful substances and pathogens is also important. For taking advantages of the positive effects of probiotics, their ability to adhere to the intestinal mucosa is crucial. This prevents the colonization of pathogenic bacteria which leads to reducing the risks associated with the intestinal diseases.

Nowadays, in order to maintain the balance of the gut microbiome, regular consumption of fermented dairy products, where probiotics play an important part, is recommended. For health benefits, fermented milk beverages are very popular today. Probiotic organisms, especially the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, are represented there in abundant numbers.

The aim of this thesis was to find out which probiotics occurring in traditional fermented milk beverages produced in Central Asia had the best adhesive properties thus the greatest impact on human health. The adhesion was tested *in vitro* on a cell model composed of the colorectal cancer cell lines Caco-2 and HT29-MTX.

Seven *Lactobacillus* strains isolated from three types of fermented beverages made from camel, mare and yak milk were tested. Lactobacilli isolated from the beverage Kurut showed the highest ability to adhere, where *L. brevis* 8-6M adhered from 37,1 %, *L. crustorum* 8-9M from 24,8 % and *L. paracasei* 8-2M from 19,9 %. By contrast, *L. helveticus* 5-2M and *L. pontis* 5-5M found in Shubat demonstrated weak adhesion of 7,3 %, *L. pontis* 5-5M did not adhere at all. *L. kefiranofaciens* 6-2M and *L. pontis* 6-12M were isolated from Koumiss and adhered from 18,4 and 12,5 %.

Although, the high adhesive potential has not been confirmed at all, it is obvious that the consumption of these products brings health benefits to the digestive tract.

Keywords: probiotics, *in vitro*, cell model, adhesion, fermented milk beverages

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce a hypotéza	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Anatomie a fyziologie gastrointestinálního systému	3
3.1.1 Stavba trávicí trubice	3
3.2 Mikrobiom lidského trávicího traktu	6
3.2.1 Imunitní systém.....	9
3.2.2 Střevní onemocnění a patogenní organismy	10
3.3 Probiotické organismy	11
3.3.1 Druhy probiotických organismů	11
3.3.1.1 <i>Lactobacillus</i>	12
3.3.1.2 <i>Bifidobacterium</i>	14
3.3.1.3 Ostatní rody.....	14
3.3.2 Vlastnosti probiotik.....	15
3.3.3 Úloha probiotik v organismu	16
3.3.4 Možné užívání probiotik.....	17
3.3.5 Adherence	18
3.3.6 Produkty obsahující probiotika.....	20
3.4 Tradiční kvašené nápoje	22
4 Metodika a materiál.....	27
4.1 Materiál	27
4.2 Metodika	27
4.2.1 Kultivace buněčných tkání.....	27
4.2.2 Založení 24jamkové destičky	28
4.2.3 Adherence laktobacilů ke střevním buňkám.....	28
4.2.4 Statistická analýza.....	29
5 Výsledky.....	30
6 Diskuze.....	33
7 Závěr	37
8 Seznam použité literatury	38

9 Seznam použitých zkratk	46
10 Seznam použitých obrázků a tabulek	47

1 Úvod

V současné době se do popředí zájmu značně dostala snaha o zdravý životní styl. Velká pozornost je věnována především potravinám a potravinovým doplňkům příznivě ovlivňující organismus a podporující imunitní systém. Probiotika a probiotické produkty jsou proto stále častěji diskutovanějším tématem, nejenom po odborné stránce, ale také v laické veřejnosti.

Probiotické organismy jsou přirozenou součástí lidského střevního mikrobiomu. Zdraví prospěšné účinky probiotik jsou známy již řadu let a mnohé studie jsou dnes věnovány jejich mechanismům účinku ve funkci imunitního systému a jejich vlivu v prevenci a terapii střevních onemocnění. Aby byly probiotické účinky plně využity, je nezbytná jejich schopnost adherence na střevní sliznici. Tím zabraňují kolonizaci nežádoucích patogenních organismů a je tak ovlivněno celkové zdraví člověka.

Probiotika patří mezi bakterie mléčného kvašení, proto hrají důležitou roli také při výrobním procesu fermentovaných potravin. Schopností fermentovat sacharidy za vzniku různých metabolitů zajišťují požadované organoleptické vlastnosti a zároveň výživovou hodnotu těchto potravin. K fermentovaným produktům se řadí zejména mléčné výrobky, pro svou výbornou nutriční hodnotu a vysoký obsah probiotických organismů jsou dnes v zájmu mnoha studií tradiční fermentované mléčné nápoje, které byly řadu let zcela opomíjeny.

2 Cíl práce a hypotéza

Cílem práce je otestování probiotik izolovaných z tradičních mléčných nápojů produkovaných v oblasti střední Asie. Ty byly již identifikovány a pojmenovány. Avšak u nich nejsou známy adhezenční vlastnosti a s tím spojená zdravotní prospěšnost pro lidský trávicí trakt.

Hypotézou je, že některé druhy probiotik přítomné v tradičních kvašených nápojích z mléka produkovaných v Asii mají vysoký adhezenční potenciál.

3 Literární rešerše

3.1 Anatomie a fyziologie gastrointestinálního systému

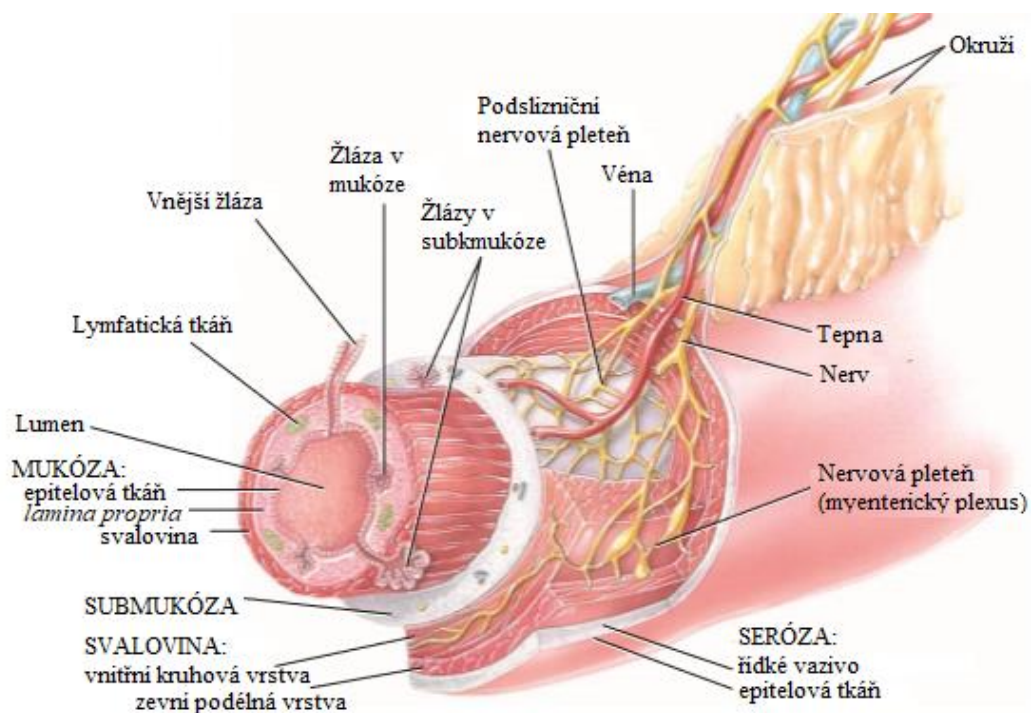
Trávicí soustava má v organismu zcela zásadní a nepostradatelnou úlohu spočívající v rozkladu potravy a biopolymerů na jednoduché nízkomolekulární látky. Tyto nízkomolekulární látky jsou následně využity tělními buňkami a tím je přispěno k homeostázi. Celkově trávicí systém provádí několik základních procesů zahrnující příjem potravy, peristaltiku, trávení, absorpci a defekaci (Rizzo, 2015). Mimo tyto primární funkce je trávicí trakt také největším imunologickým orgánem v těle chránícím před exogenními patogenními organismy (Denbow, 2015).

Trávicí systém se skládá z gastrointestinálního traktu (GIT) neboli trávicí trubice a pomocných trávicích struktur. Trubice se rozprostírá od dutiny ústní po konečník a zahrnuje hltan, jícen, žaludek a tenké a tlusté střevo (Whitney and Rolfes, 2016). Do pomocných trávicích struktur se řadí zuby, jazyk, slinné žlázy, játra, žlučník a pankreas. Zuby a jazyk pomáhají při fyzickém rozpadu jídla, ostatní pomocné trávicí struktury vylučují sekrety a enzymy, které pomáhají při chemickém rozkladu potravin (Tortora and Derrickson, 2008). Tenké střevo je hlavním místem trávení a absorpce většiny živin z potravin. Jeho výstelka je tvořena klky a mikrokšky, čímž poskytují mnohonásobně zvětšený povrch pro resorpci živin. Naproti tomu se tlusté střevo podílí na vstřebávání vody a probíhá zde bakteriální fermentace složek, které jsou odolné vůči normálnímu trávení (Elliott and Elliott, 2009).

3.1.1 Stavba trávicí trubice

Stěna GIT od dolního jícnu po konečník má stejné základní, čtyřvrstevné uspořádání tkání. Tyto čtyři vrstvy traktu tvoří sliznice (mukóza), submukóza, svalová bariéra a seróza (obr. 1). Střevní sliznice je nejdůležitější součástí celého GIT. Vystýlá celou trávicí trubici, slouží jako bariéra pro střevní organismy a je zodpovědná za absorpci vitamínů, živin, elektrolytů a vody (Kim and Pritts, 2017). Skládá se z vrstvy epitelu, vrstvy pojivové tkáně *lamina propria* a tenké vrstvy hladkého svalstva. Epitelová vrstva funguje při ochraně, sekreci enzymů, hlenu a absorpci živin, *lamina propria* tuto vrstvu podporuje a poskytuje jí krevní zásobení. Obsahuje také většinu buněk lymfatické tkáně tvořící slizniční imunitní systém (MALT – mucosa-associated lymphatic tissue). Svalová vlákna vytvářejí záhyby, které výrazně zvyšují trávicí a absorpční oblast (Tortora and

Derrickson, 2008, Rizzo, 2015). Slizniční epitel se regeneruje každých 4–5 dní a obsahuje také mnoho obranných mechanismů, které udržují slizniční integritu. S přibývajícím věkem se každý z těchto obranných mechanismů tlumí, snižuje se sekrece sliznice a epitel je náchylnější k poškození (Kim and Pritts, 2017). Submukóza je podslizniční vrstva a skládá se z pojivové tkáně, která váže sliznici ke svalovině. Ta umožňuje peristaltické pohyby a je zodpovědná za místní pohyby trávicí trubice. Seróza tvoří nejokrajovější část, obsahuje lymfatické a krevní cévy, které zásobují orgány (Kittnar et al., 2011).

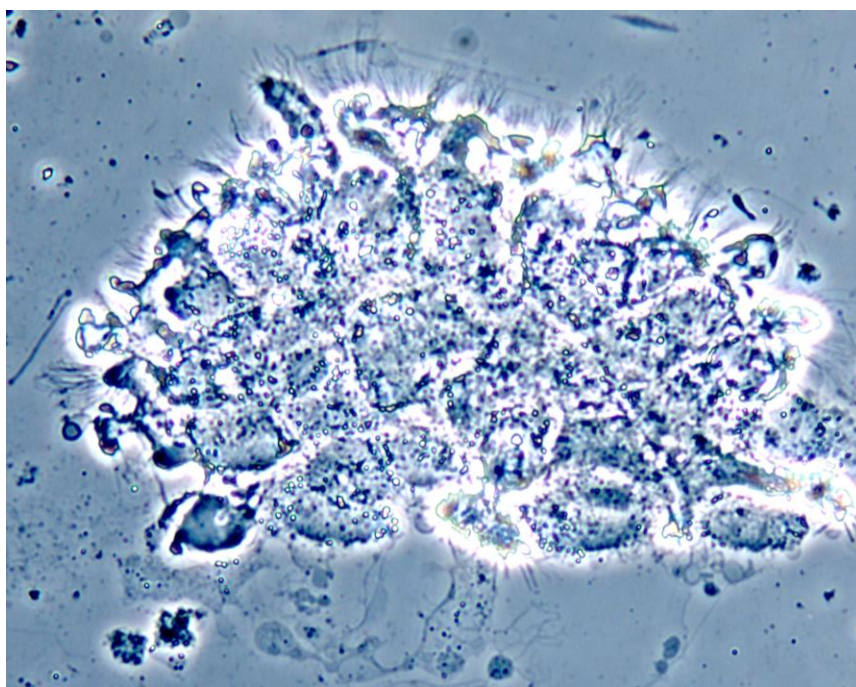


Obr. 1: Jednotlivé vrstvy gastrointestinálního traktu (Upraveno dle Tortora and Derrickson (2008)).

Trávicí trubice je pokrytá vrstvou hlenu, produkovanou specializovanými sekrečními buňkami. Je složena z glykoproteinů, nespecifických antimikrobiálních látek a specifických antimikrobiálních imunoglobulinů. Složky této bariéry kolísají v jednotlivých částech traktu, dynamicky reagují na infekci a jsou regulovány vlivem vrozené a adaptivní imunity (McGuckin et al., 2011). Derrien et al. (2010) uvádějí několik základních funkcí této hlenové vrstvy. V prvé řadě funguje jako bariéra a obranný systém chránící epitelální buňky před mechanickým poškozením nebo vniknutím škodlivých látek. Také slouží jako substrát pro růst, adhezi a ochranu

mikrobiálních buněk, které jsou přítomny v lumenu GI traktu. V průběhu celého trávicího traktu se struktura hlenové vrstvy výrazně liší a kolísá v tloušťce 150–700 μm . Žaludek a tlusté střevo mají dvojitou vrstvu hlenu. Tenčí vnitřní vrstva je sterilní a je spojena se sliznicí, vnější vrstva je místem pro komenzální bakterie. Tenké střevo je naopak tvořeno pouze jedinou volnou a slabší vrstvou (McGuckin et al., 2011, Johansson et al., 2011).

Hlavní složku představují vysoce glykosylované proteiny – muciny, které dále obsahují soli a lipidy. Na základě jejich struktury jsou muciny rozděleny na sekreční a membránové. Sekreční muciny jsou produkovány speciálními pohárkovými buňkami ve střevech a dýchacích cestách, charakterizované vysokou molekulovou hmotností (Derrien et al., 2010). Jsou uskupené do velkých oligomerů spojených disulfidickými vazbami mezi aminovými a karboxylovými konci cysteinu těchto mucinů. Toto oligomerní uspořádání dodává hlenu jeho typický gelovitý charakter, který je nesmírně důležitý pro ochranu celého gastrointestinálního traktu (McGuckin et al., 2011). Muciny vázané na membránu jsou naproti tomu syntetizovány epitelíálními buňkami a integrovány do jejich plazmatických membrán. Pravděpodobně budují glykokalyx, ochrannou vrstvu enterocytů, kde působí jako difúzní bariéra (Johansson et al., 2013).



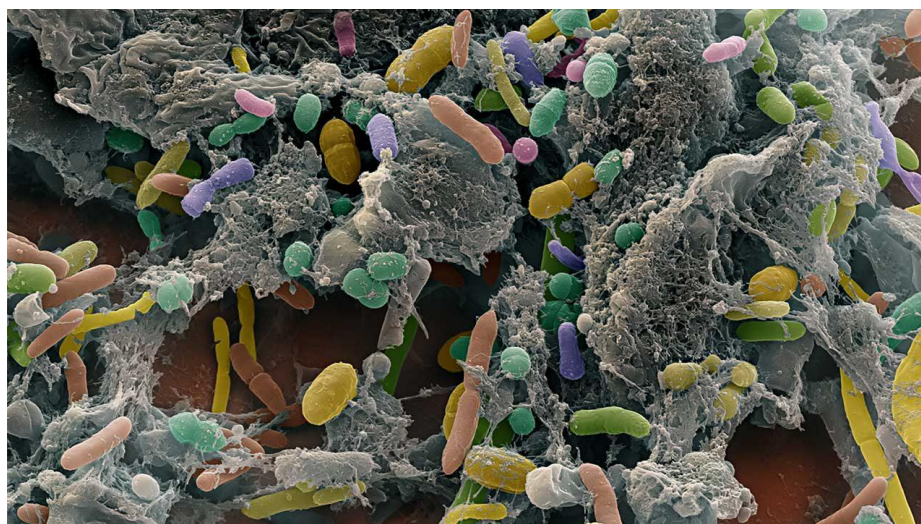
Obr. 2: Buňky sekretující mucin a tvořící glykokalyxovou vrstvu.

V dnešní době je podle Organizace na výzkum lidského genomu (HUGO – Human Genome Organization) známo celkem 17 lidských genů kódujících muciny (Derrien et al., 2010). Jejich zastoupení je odlišné v celém trávicím traktu. Nejvýznamnějším a hlavním intestinálním mucinem je mucin typu MUC2, který vyplňuje vrstvu v tenkém i tlustém střevě a je zcela rezistentní vůči endogenním proteázám. MUC1 přítomný v žaludečním epitelu je také dobře znám jako antigen rakovinových buněk, který může regulovat jejich růst a apoptózu. Muciny jsou tak nepostradatelnou složkou hlenové vrstvy, která poskytuje ochranné funkce v celém GIT a která rovněž hraje zásadní roli pro mikroorganismy a jejich schopnost adherence (Johansson et al., 2013, Van Tassell and Miller, 2011).

3.2 Mikrobiom lidského trávicího traktu

Mikroorganismy vyskytující se v trávicím traktu jsou označovány jako střevní mikrobiom a významně ovlivňují zdravotní stav hostitele. Hrají základní roli v lidském zdraví podporou střevní homeostázy a stimulováním rozvoje imunitního systému, brání průniku patogenních organismů a nežádoucích látek a přispívají k zpracování živin a získávání energie. Narušení střevní mikrobioty je spojeno s rostoucím počtem chorob zahrnující zánětlivé onemocnění střev (IBD – inflammatory bowel disease), nekrotizující enterokolitidu, diabetes, obezitu, rakovinu, alergii či astma (Azad et al., 2013). Mezi mikrobiomem nemocných a zdravých jedinců byly pozorovány značné rozdíly již na konci 19. století. Tato prospěšná mikrobiota nalezená v GIT byla označena jako probiotika (Parvez et al., 2006).

Střevní mikrobiom představuje komplexní ekosystém a kromě probiotických bakterií se dále skládá z kvasinek, vláknitých hub a virů (obr. 3). Zatímco *Eukarya* jsou zastoupeny jediným kmenem, bakteriální komunita v lidském GIT je neobyčejně rozmanitá (Rajilić-Stojanović et al., 2007). Odhaduje se, že lidská mikrobiota obsahuje až 10^{14} bakterií, což je $10\times$ více než počet lidských buněk přítomných v našem těle (Sekirov et al., 2010). Zastoupení mikroorganismů se v jednotlivých oddílech GIT výrazně liší (tab. 1), přičemž většinu střevní mikrobioty tvoří anaerobní mikroorganismy, z nichž dominují rody *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a *Clostridium*. Doplnění jsou fakultativně anaerobními a aerobními bakteriemi (Quigley, 2013).



Obr. 3: Mikrobiální diverzita střevního mikrobiomu.

(http://www.sciencemag.org/sites/default/files/styles/article_main_large/public/image/s/cc_gutmicrobiota_16x9.jpg?itok=dGLliRaF)

Tab. 1: Složení mikrobioty GIT (Zbořil et al., 2005).

	Žaludek	Jejunum	Ileum	Kolon
Celkové množství bakterií	10–10 ³	0–10 ⁵	10 ³ –10 ⁹	10 ¹⁰ –10 ¹²
Anaeroby				
<i>Eubakterie</i>	ojediněle	ojediněle	ojediněle	10 ⁹ –10 ¹²
<i>Klostridie</i>	ojediněle	ojediněle	10 ² –10 ⁴	10 ⁶ –10 ¹¹
<i>Streptokoky anaerobní</i>	ojediněle	0–10 ³	10 ² –10 ⁶	10 ¹⁰ –10 ¹²
<i>Bifidobakterie</i>	ojediněle	0–10 ⁴	10 ³ –10 ⁸	10 ⁸ –10 ¹¹
<i>Bakteroidy</i>	ojediněle	0–10 ³	10 ³ –10 ⁷	10 ¹⁰ –10 ¹²
Aeroby a fakultativní anaeroby				
Plísně/kvasinky	0–10 ²	0–10 ²	10 ² –10 ⁴	10 ⁴ –10 ⁶
<i>Laktobacily</i>	0–10 ³	0–10 ⁴	10 ² –10 ⁵	10 ⁶ –10 ¹⁰
<i>Stafylokoky</i>	0–10 ²	0–10 ³	10 ² –10 ⁵	10 ⁴ –10 ⁹
<i>Streptokoky aerobní</i>	0–10 ³	0–10 ⁴	10 ² –10 ⁶	10 ⁵ –10 ¹⁰
Koliformní bakterie	0–10 ²	0–10 ³	10 ² –10 ⁷	10 ⁴ –10 ¹⁰

Mikrobiota kolonizuje prakticky každý povrch lidského těla, který je vystaven vnějšímu prostředí. Nejsilněji kolonizovaným orgánem je gastrointestinální trakt, přičemž samotné tlusté střevo obsahuje více než 70 % všech mikrobů v lidském těle (Sekirov et al., 2010). Bakterie mající tendenci přilnout k povrchu sliznice se účastní interakcí s hostitelským imunitním systémem, zatímco bakterie vyplňující lumen střeva jsou důležitější pro metabolické interakce s potravinami nebo produkty trávení (Quigley, 2013).

V průběhu života se mikrobiální složení intestinálního traktu výrazně mění. Kolonizace lidského střeva mikroby začíná již před porodem, kdy je novorozenec vystaven matčině mikrobiotě. Nejnovější studie naznačují, že mikrobiota je přítomna v placentě, tudíž je trakt novorozence osídlen již těsně před narozením. Jeho další osidlování je ovlivněno mnoha faktory, zejména způsobem porodu, působením antibiotik či stravou (Gritz and Bhandari, 2015). Pro novorozence je nejvhodnější výživou mateřské mléko, protože podporuje růst prospěšných bakterií mnohem intenzivněji ve srovnání s umělou kojeneckou výživou. Obsahuje antimikrobiální látky, bifidobakterie a laktobacily, které jsou důležité při zprostředkování odpovědi vrozené a adaptivní imunity při obraně proti patogenům (Gareau et al., 2010). Velké rozdíly byly nalezeny v mikrobiomu novorozenců narozených přirozeným porodem a císařským řezem. U přirozeného porodu byla kolonizace střeva ovlivněna mateřskou vaginální mikrobiotou s převažujícími rody *Lactobacillus* a *Prevotella*. U dětí narozených císařským řezem byla zaznamenána kolonizace spíše epidermálními rody *Clostridium*, *Staphylococcus* či *Propionibacterium* s nedostatkem anaerobních bakterií *Bacteroidetes* a *Bifidobacterium* (Gritz and Bhandari, 2015).

Mikrobiota novorozenců je tak charakterizována nízkou rozmanitostí s relativní převahou bakterií kmene *Proteobacteria* a *Actinobacteria*. Potom se mikrobiota stává mnohem rozmanitější díky vzniku bakterií *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Předpokládá se, že tato počáteční kolonizace se podílí na utváření složení střevního mikrobiomu v dospělosti. Do konce prvního roku života je mikrobiální profil pro každé dítě odlišný, ve věku 2,5 roku se mikroflóra v GIT stabilizuje a již plně se podobá mikrobiotě dospělého jedince z hlediska složení (Quigley, 2013). Toto období zrání mikrobioty může být kritické, protože narušení mikrobioty v raném dětství může negativně ovlivnit výskyt onemocnění v pozdějším životě (Gareau et al., 2010). Proto jsou například děti narozené císařským řezem daleko více vystaveny zvýšenému riziku astmatu, obezity a diabetu (Azad et al., 2013).

Mikrobiota GIT zůstává stabilní až do stáří, kdy dochází k výraznějším fyziologickým změnám, které ovlivňují trávení, vstřebávání potravin a imunitní funkce. Životní styl a zejména strava hrají velkou roli, protože stárnutí je často doprovázeno přijímáním menšího množství potravin obsahující vlákninu. Nižší přívod vlákniny vede k poklesu rozmanitosti mikrobiomu, což může mít neblahý vliv na správné fungování GIT (O'Toole and Jeffery, 2015). Riziko podvýživy ve stáří je spojeno se zvýšeným počtem bakterií *Bacteroidetes* a rodu *Clostridium*, zatímco počet zástupců rodu *Bifidobacterium* se snižuje (Claesson et al., 2011).

3.2.1 Imunitní systém

Komensální a probiotické bakterie mohou podporovat integritu střevní bariéry a přispívat k obranyschopnosti střeva hostitele především tím, že brání invazi patogenních bakterií a pomáhají rozvíjet imunitní systém, který je zodpovědný za rozpoznání, reakci a adaptaci na nesčetné množství cizích molekul. Střevo odolává patogenním bakteriím prostřednictvím mechanické a imunitní bariéry. Mechanická bariéra se skládá z vrstvy epitelálních buněk, enterocytů a hlenu. Imunitní bariéru tvoří imunoglobuliny, lymfocyty, makrofágy, neutrofilní granulocyty a mezenterické lymfatické uzliny (Zhang et al., 2015). Přibližně 70 % lidského imunitního systému se nachází právě ve střevě, tvořící střevní lymfatickou tkáň – GALT (gut-associated lymphoid tissue), proto je trávicí trakt největším imunitním orgánem (Butel, 2014).

Aktivace imunitní odezvy vyžaduje rozpoznání specifických receptorů buněk vrozené imunity. Nepatogenní probiotické bakterie interagují s těmito imunitními buňkami a s buňkami střevního epitelu k zahájení imunitních signálů. Bylo prokázáno, že modulují produkci imunoglobulinů, zejména sekrečního imunoglobulinu A (IgA), který hraje důležitou roli v mukózní imunitě a přispívá k bariéře proti patogenním bakteriím a virům (Gupta and Garg, 2009). Mnohé probiotické kmeny se zdají být schopné stimulovat produkci IgA pomocí B-lymfocytů, které váží antigeny a tím omezují jejich přístup k epitelu (Gourbeyre et al., 2011). Aktivací bílkovinných receptorů schopných rozeznávat cizí, a tedy potenciálně nebezpečné struktury je následně indukována tvorba prozánětlivých cytokinů. Mnoho probiotických účinků v regulaci imunity je zprostředkováno narušením rovnováhy těchto prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů. Proto mohou být probiotika použita terapeuticky ke zmírnění střevního zánětu a k normalizaci dysfunkce střevní sliznice (Ya et al., 2008).

Střevní ekosystém může vážně ovlivnit nemoc a s ní spojená léčba. Často dochází k nárůstu koliformních a potenciálně patogenních mikrobů, ke zvýšenému riziku salmonelové či klostridiové infekce. Změny mohou působit také prokinetika, antibiotika či laxativa, neboť zcela usmrť přirozenou mikrobiotu, zejména anaeroby (Lata a Juránková, 2011). Hluboký účinek na mikrobiotu mají obzvláště antibiotika, při jejichž nadměrném užívání dochází ke zvýšení antibiotik-rezistentních patogenů. Obecně dochází k dlouhodobému poklesu bakteriální diverzity a snížení odolnosti proti kolonizaci. Některé taxony se neobnoví ani po měsících po léčbě, což může způsobit trvalé změny ve struktuře mikrobiomu. Opakované používání antibiotik má za následek zvýšení genů rezistentních na tyto látky (Clemente et al., 2012).

3.2.2 Střevní onemocnění a patogenní organismy

Je zjevné, že jakékoliv změny ve střevním mikrobiomu mají prospěšné i negativní důsledky na lidské zdraví. Poruchy normální rovnováhy mezi střevní mikrobiotou a hostitelem jsou spojeny zejména se zánětlivými onemocněními střev jako je Crohnova choroba, vředová kolitida či syndrom dráždivého tračníku (IBS – irritable bowel syndrome) (Guinane and Cotter, 2013). Ačkoli má většina střevních bakterií příznivé účinky, některé druhy jsou patogenní a mohou se podílet na vzniku těchto akutních a chronických onemocnění, včetně kolorektálního karcinomu (CRC – colorectal cancer) a infekčních průjmů (Uccello et al., 2012).

Kolonizace střevní sliznice bakteriálními střevními patogeny vede k vyvolání silné zánětlivé odpovědi, která má účinek na snížení životaschopnosti střevní mikrobioty. Řada patogenů z kmene *Proteobacteria* využívá svých toxických účinků k vyvolání odpovědi hostitele, která destabilizuje původní mikrobiotu a negativně ovlivňuje jak její ochranné, tak imunomodulační funkce (Sekirov et al., 2010).

Předpokládá se, že mikrobiální dysbióza ve střevě se podílí na patogenezi IBS prostřednictvím usnadnění adheze patogenů ke střevní stěně. Vyznačuje se bolestí břicha a změněnou peristaltikou střev a je charakterizována obzvláště nárůstem bakterií rodu *Clostridium* a snížením počtu bifidobakterií (Guinane and Cotter, 2013). *Clostridium difficile* je hlavní příčinou nosokomiální infekce se symptomy od mírného průjmu po těžkou sepsi a enterokolitidu (Culligan et al., 2009). *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* nebo patogenní *Escheria coli* se řadí mezi nejčastější a nejzávažnější původce akutních i chronických průjmů (De Vrese and Offick, 2010).

Významný vliv na snížení fekálních hnilobných mikroorganismů jako jsou koliformní bakterie mají probiotické organismy. Tyto účinky mohou být zprostředkovány adhezí na enterocyty a snížením pH. Probiotika mohou také působit proti rozvoji CRC prostřednictvím mechanismu soupeření o vazebná místa s patogenními organismy (Uccello et al., 2012). Produkují bakteriociny a degradují toxiny produkované patogenními organismy. Někdy může jako vazebné místo působit samotné probiotikum, když se patogen připojí k probiotickému povrchu spíše než k mukóze hostitele (McFarland, 2015).

3.3 Probiotické organismy

První poznatky o existenci prospěšných bakterií v lidském střevě jsou připisovány ruskému imunologovi a držiteli Nobelovy ceny Ilji Iljiči Mečnikovovi. Počátkem 20. století vyslovil teorii, že dlouhověkost bulharských rolníků je důsledkem jejich konzumace fermentovaných mléčných výrobků. Byl přesvědčen, že jogurt obsahuje organismy nezbytné k ochraně střeva před nepříznivými účinky jiných škodlivých bakterií a že mohou mít pozitivní vliv na trávení a imunitní systém (Gasbarrini et al., 2016). Izoloval *Bacillus bulgaricus* a prosazoval jeho použití jako terapii k udržení homeostázy a zabránění stárnutí. Tím zvýšil oblíbenost jogurtu, který dodnes tvoří základ pro probiotické bakterie (Vieira et al., 2013).

Termín „probiotikum“ byl však poprvé použit až v roce 1965, kdy Lilly a Stillwell definovali probiotika jako látku vylučovanou jedním organismem, která stimuluje růst jiného (Gupta and Garg, 2009). Dnes jsou probiotika podle Světové zdravotnické organizace (WHO – World Health Organization) a Organizace pro výživu a zemědělství (FAO – Food and Agriculture Organization) definována jako živé nepatogenní mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství příznivě ovlivňují zdravotní stav hostitele (Boirivant and Strober, 2007).

3.3.1 Druhy probiotických organismů

Mnoho probiotických organismů, které jsou nedílnou součástí střevní mikrobioty, byly používány pro jejich prospěšné vlastnosti již dlouho předtím, než byl termín probiotikum vůbec poprvé použit. Kmeny stejného probiotického rodu mohou vykazovat různé vlastnosti, můžou však mít podobný vliv a obdobné imunitní účinky (Sanders, 2008). Většina mikroorganismů, které

jsou dnes brány jako probiotika, jsou gram-pozitivní bakterie. Mezi nejčastěji používané (tab. 2) patří bakterie mléčného kvašení (LAB – lactic acid bacteria), které jsou již mnoho let využívány při výrobě potravin. V kombinaci s nepřítomností lipopolysacharidů a nedostatkem vylučovaných proteáz to činí z mnoha LAB ideální organismy pro použití jako probiotika (Behnsen et al., 2013).

Bakterie mléčného kvašení rozdělujeme do dvou skupin na základě jejich hlavního produktu metabolismu. Homofermentativní skupina, zahrnující převážně rody *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a *Lactobacillus*, produkuje jako hlavní metabolit kyselinu mléčnou. Do skupiny heterofermentativních bakterií patří *Leuconostoc* a některé laktobacily a na rozdíl od homofermentativních produkují ekvimolární množství laktátu, CO₂, ethanolu nebo acetátu (Vasiljevic and Shah, 2008). Některé rody jako *Lactococcus* a *Streptococcus* jsou také důležitými složkami lidské endogenní mikrobioty v tenkém a tlustém střevě (Behnsen et al., 2013).

Tab. 2: Nejčastěji používané druhy LAB v probiotických produktech (Parvez et al., 2006).

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	<i>B. animalis</i>		<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. brevis</i>			

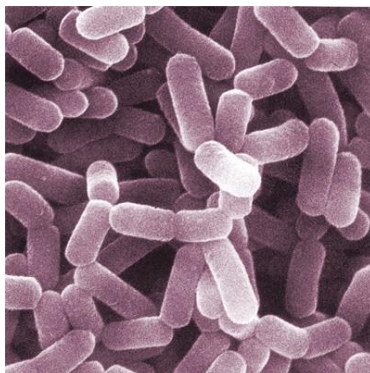
3.3.1.1 *Lactobacillus*

Hlavními rody LAB používanými zejména při léčbě střevních dysfunkcí jsou *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Jedná se o nesporulující, anaerobní tyčinkovité bakterie (obr. 4 a 5) s negativní reakcí katalázy (Vasiljevic and Shah, 2008). Jsou převládající složkou lidského střevního

mikrobiomu a hrají velmi důležitou roli při prevenci invaze tkání enteropatogeny. Velmi účinné jsou při modulaci prozánětlivé odpovědi v intestinálních epitelálních buňkách vyvolané například *Salmonellou* (Candela et al., 2008).

Rod *Lactobacillus* spadá pod kmen *Firmicutes*, třída *Bacilli*. Vyskytuje se všudypřítomně v přírodě, zejména v prostředí bohatém na sacharidy a patří k nejpočetnějším rodům, obsahující přes 100 popsanych druhů. *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. reuteri* a *L. brevis* patří k nejběžnějším laktobacilům izolovaným z lidského střeva (Vasiljevic and Shah, 2008). Několik druhů je nezbytných pro výrobu fermentovaných potravin, používají se také jako startovací kultury nebo konzervační prostředky. *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* je společně se *Streptococcus thermophilus* používán jako startérová kultura pro výrobu jogurtů. Nejsou však odolné žluči, tudíž nekolonizují trávicí trakt. Nejčastěji přítomnými rody ve fermentovaných mléčných produktech se schopností kolonizace bývají *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* a *L. reuteri* (Shah, 2007).

Původně byly laktobacily rozděleny na základě jejich růstové teploty (2–53 °C) a fermentace hexózy, kde se jako optimální podmínky pro růst jeví teploty v rozmezí 30–40 °C a pH 5,5–6,2. Dnes se laktobacily rozdělují do skupin obligátně homofermentativních a fakultativně/obligátně heterofermentativních, založených na typu fermentovaných cukrů a produktech fermentace (Salvetti et al., 2012).



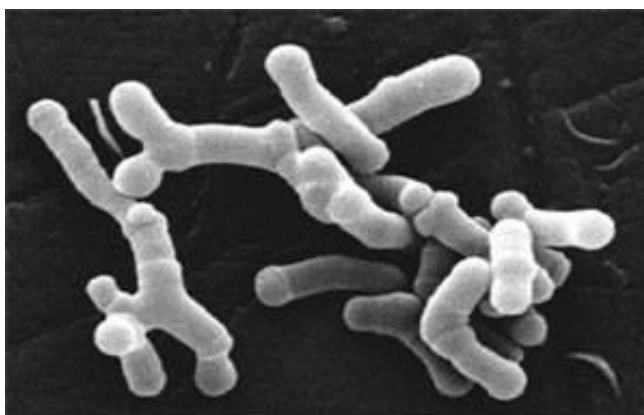
Obr. 4: Tvar *Lactobacillus* spp.

(<http://supplementsglobal.com/products/lactobacillus-casei/>)

3.3.1.2 *Bifidobacterium*

Podobně jako laktobacily jsou i bifidobakterie důležitou složkou GIT. Významnou úlohu však hrají zejména v zažívacím traktu kojenců. Kolonizace bifidobakteriemi začíná během pár dní po narození a zastoupení zůstává poměrně stabilní až do dospělosti, kdy jejich počet klesá (Shah, 2007). Značné rozdíly v počtu bifidobakterií byly nalezeny mezi dětmi kojenými mateřským mlékem a umělou kojeneckou výživou. Vyšší hladina bifidobakterií u dětí kojených mateřským mlékem byla přičtena bifidogenním oligosacharidům obsaženým v tomto mléce (Arboleya et al., 2011).

V současnosti existuje 29 druhů, z nichž 14 je lidského původu. K nejvýznamnějším druhům nalezených u lidí se řadí *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* a *B. longum*. Jako optimální podmínky pro růst se jeví teploty v rozmezí 37–41 °C při pH 6–7 (Shah, 2007). *B. animalis* ssp. *lactis*, je výhradně nalézán v mléčných kysaných výrobcích, zatímco v lyofilizovaných produktech bývají zastoupeny také druhy *B. longum*, *B. breve* a *B. bifidum* (Pechar et al., 2013). Na rozdíl od laktobacilů některé bifidobakterie produkují kromě mléčné kyseliny i octovou v molárním poměru 3:2 a kvůli svým specifickým vlastnostem jsou jejich izolace a růst v laboratoři často velmi obtížné a zrádné (Vasiljevic and Shah, 2008).



Obr. 5: Tvar *Bifidobacterium* spp.

(<http://supplementsglobal.com/products/bifidobacterium-longum/>)

3.3.1.3 Ostatní rody

Kromě LAB se v současné době v probiotických přípravcích používají také organismy rodu *Bacillus*, *Escherichia*, kvasinky (*Sacharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces boulardii*) a vláknité

houby (například *Aspergillus oryzae*) (Parvez et al., 2006). Tyto mikroby se obvykle nenacházejí jako složky v potravinách, ale pouze v doplňcích stravy (Douglas and Sanders, 2008). *Escherichia coli* nebo *Propionibacterium* jsou používány méně často, představují vyšší možné riziko nepříznivých účinků, tak jako některé druhy rodu *Enterococcus*. V některých případech mohou způsobit systémové infekce v hostiteli a způsobovat rezistenci vůči antibiotikům (Butel, 2014).

Rod *Enterococcus* se často vyskytuje v tradičních fermentovaných produktech a může být součástí některých startovacích kultur, nicméně jeho záměrné používání v mléčných fermentovaných výrobcích stále zůstává kontroverzní, zejména proto, že některé druhy jsou považovány za příležitostné patogeny (Vasiljevic and Shah, 2008).

Výjimkou je gram-negativní bakterie *Escherichia coli Nissle 1917*. Poskytuje odolnost proti kolonizaci patogenů a v současnosti je obsažena v léčivém přípravku Mutaflor, který se používá k léčbě jak infekčních průjemových onemocnění, tak IBD (Behnsen et al., 2013).

3.3.2 Vlastnosti probiotik

Abychom mohli o mikroorganismech uvažovat jako o probiotických, musí splňovat řadu kritérií. Zásadní je jejich schopnost přilnout k slizničním buňkám střeva. Pro maximální aktivitu by kmen měl být schopen dosáhnout místa působení, kolonizovat toto konkrétní místo a být schopen růstu (Nagpal et al., 2012). Protože se probiotika užívají převážně perorálně, musí přežít průchod z dutiny ústní do střeva a podmínky panující v GIT, aby mohla dosáhnout střevního epitelu a došlo k adhezi a případné kolonizaci. Je proto nesmírně důležitá jejich odolnost vůči žaludečním kyselinám, žlučovým solím a pankreatickým šťávám (McFarland, 2015).

Mikroorganismy používané v probiotických přípravcích by měly být obecně označovány jako bezpečné, musí být prokázán jejich příznivý efekt na hostitele a užívání nesmí představovat žádná zdravotní rizika spojená především s vyvoláním nemoci. Mají antikarcinogenní aktivitu, nezpůsobují alergické reakce a stimulují imunitní systém (Butel, 2014). Schopnost inhibovat patogenní organismy a produkovat antimikrobiální látky je pro probiotikum prvořadá, i když ne všechna probiotika působí přímo proti patogenu. Regulují imunitní odpověď a stabilizují střevní mikroflóru, typicky pro zánětlivé onemocnění střev (McFarland, 2015).

V neposlední řadě musí zůstat stabilní během výrobních procesů potravin a konzervace a po celou dobu trvanlivosti produktu přetrvávat jako životaschopné (Parvez et al., 2006). Probiotické

organismy by měly být přednostně lidského původu a pro dostatečné množství zdravotních přínosů byla doporučena minimální denní dávka 10^9 KTJ (kolonie tvořící jednotky) (Gupta and Garg, 2009).

3.3.3 Úloha probiotik v organismu

Na hostitele mají probiotické bakterie četné a rozmanité vlivy. Ovlivňují střevní prostředí, jeho správné složení, epiteliální a mukózní bariérovou funkci a přispívají k příznivému a rovnovážnému stavu slizniční a následně pak celkové imunity. Vyvíjejí své účinky na mnohé typy buněk zapojených do vrozených a adaptivních imunitních odpovědí jako jsou epiteliální a dendritické buňky, monocyty, B a T-lymfocyty (Ng et al., 2009). Mezi probiotickými bakteriálními druhy existují významné rozdíly, které mohou být způsobeny právě různými mechanismy působení probiotik. A to zejména ve schopnosti produkovat proteiny a metabolity přímo interagující s hostitelskými buňkami. Účinnost také významně závisí na jejich schopnosti přežít v kyselém a alkalickém prostředí, stejně jako na schopnosti adherovat a kolonizovat tlusté střevo (Nagpal et al., 2012).

Produkcí toxických metabolitů inhibují růst potenciálně patogenních bakterií, čímž zvyšují hladinu bakterií s protizánětlivými účinky a předcházejí tak zánětům střev (Zhang et al., 2015, Parkes, 2007). Konečnými produkty metabolismu jejich růstu jsou organické kyseliny (mléčná a octová kyselina), které mají tendenci snižovat pH střevního obsahu, což vytváří méně žádoucí podmínky právě pro škodlivé bakterie (Parvez et al., 2006). Mohou také ovlivňovat další ochranné funkce střevní sliznice včetně syntézy a sekrece antibakteriálních peptidů a mucinů, čímž zabraňují adherenci a kolonizaci těchto patogenních bakterií (Boirivant and Strober, 2007). Rovněž podporují vstřebávání živin, zvyšují stravitelnost potravin a roli hrají také při syntéze vitamínů a při absorpci vápníku, hořčíku a železa (Nagpal et al., 2012).

Částečné štěpení laktózy a stimulace aktivity střevní slizniční laktázy (β -galaktosidázy) jsou předpokládány jako možný mechanismus účinku proti některým typům průjmu. Běžně je mléčný cukr štěpen laktázou na glukózu a galaktózu, které jsou vstřebány v tenkém střevě. Při absenci tohoto enzymu laktóza není vstřebávána v tenkém střevě, ale prochází až do střeva tlustého, kde je přirozenou střevní mikrobiotou fermentována na laktát, vodík, metan a mastné kyseliny s kratším řetězcem. Tyto procesy se pak mohou projevit bolestmi břicha, nadýmáním či průjmy (Adams

et al., 2016). Laktobacily používané v průmyslu při výrobě mléčných výrobků mají aktivní β -galaktosidázu, což jim umožňuje štěpit laktózu na jednoduché cukry a snižovat tak její vysokou koncentraci. Můžou tak ovlivnit průběh a vážnost průjmu způsobeného například rotaviry (Gupta and Garg, 2009).

3.3.4 Možné užívání probiotik

Je třeba si uvědomit, že ačkoli je probiotikům připisován příznivý efekt, existuje horní hranice bezpečnosti, jak je uváděno ve studiích na zvířatech a v *in vitro* testech. Je vhodné vybírat konkrétní druh probiotického organismu pro konkrétní zdravotní stav a péči, protože ne všechna probiotika mají stejné vlastnosti a aktivitu (Lin, 2003). Přestože je většina účinků probiotik prospěšná, mělo by být před terapeutickou aplikací zvažováno také několik možných negativních dopadů. Největším problémem se jeví riziko bakteriémie, fungémie a sepse (Vieira et al., 2013).

Perorální podávání probiotik může být prospěšné v mnoha případech zdravotních potíží jak uvnitř, tak mimo gastrointestinální trakt (Parvez et al., 2006). Imunitní stimulační účinky probiotik by mohly být zvláště přínosné u zdravých lidí s lehce narušenými imunitními funkcemi, jako jsou stresovaní a starší lidé, novorozenci či ženy během těhotenství. Bylo prokázáno, že tyto skupiny jsou vystaveny zvýšenému riziku infekčních a neinfekčních onemocnění a dodatečný přísun probiotik vedl nejen k nárůstu potenciálně prospěšných střevních bakterií, ale také ke zvýšené aktivaci nespecifické imunitní odpovědi (Sanders et al., 2010).

Velkou roli hrají probiotické organismy při léčbě gastrointestinálních onemocněních. Mechanismy účinku se však prokazatelně liší podle druhu probiotického organismu a druhu choroby (Gareau et al., 2010). Laktobacily zvyšují integritu střevní bariéry, což může vést k udržování imunitní tolerance, snižování přenosu bakterií přes střevní sliznici a následnému zmírnění rozvoje gastrointestinálních infekcí, IBS a IBD. V posledních letech bylo prováděno mnoho studií u pacientů s IBS, kde po ošetření probiotiky prokazovali jasné známky snížení bolesti a flatulence (Hemarajata and Versalovic, 2013). Pro léčení IBD se jako nejvíce účinná ukázala řada probiotik v kombinaci laktobacilů (*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*) a bifidobakterií (*B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*). Laktobacily a *Saccharomyces boulardii* mají také velký přínos při léčbě průjmů a podíl na zkrácení doby trvání (Vieira et al., 2013).

3.3.5 Adherence

Pro dosažení zdraví prospěšných účinků se jako základní vlastnost jeví adherence na buňky střevní mukózy, která je považována za nezbytný předpoklad pro antagonistickou aktivitu proti patogenům, stimulaci imunitního systému a kolonizaci trávicího traktu (Zheng et al., 2013). Podle Jensen et al. (2012) je adheze multifaktoriální proces, který zahrnuje elektrostatické i hydrofobní interakce a specifické bakteriální struktury.

Důležitým hlediskem pro účinek adherence je přítomnost hlenové vrstvy mezi lumenem a epiteliálními buňkami. Přítomnost hlenu je zvláště důležitá v tlustém střevě, kde je vrstva nejsilnější a mikroorganismy se zde vyskytují v hojném množství. Tato vrstva hlenu je prvním místem kontaktu pro mikroorganismy vstupující do střeva, adheze k tomuto hlenu je proto prvním krokem, který je vyžadován pro interakci probiotických organismů s hostitelskými buňkami a následnému vyvolání jakékoli konkrétní reakce (Van Tassell and Miller, 2011).

Testy adherence se nejčastěji provádí v *in vitro* podmínkách na modelech s epiteliálními buněčnými liniemi. Jedná se o značné zjednodušení situací *in vivo*, které jsou daleko náročnější a složitější. Výsledky proto vedou k omezeným závěrům a nemohou být přímo aplikovány na tyto situace (Jensen et al., 2012, Van Tassell and Miller, 2011). Pro metody *in vitro* se nejvíce používají buněčné linie Caco-2 a HT-29. Jde o řadu buněk izolovaných z lidského epiteliálního kolorektálního adenokarcinomu. Caco-2 patří k nejlépe popsaným buněčným liniím, schopným růstu na pevném povrchu a na mikroporézních membránách. Produkují enzymy (disacharidázy a peptidázy) a transportní proteiny typické pro absorpci buněk epitelu. Jsou také odolné proti viru HIV (Human Immunodeficiency Virus). Buněčné linie HT-29 na rozdíl od Caco-2 buněk netvoří strukturu kartáčového lemu (Grajek and Olejnik, 2004), produkují však mucin a představují dobře charakterizovaný model pro studium imunitních odpovědí enterocytů na bakteriální infekce (Candela et al., 2008).

Působením methotrexátu (MTX) na buněčné linie HT-29 může dojít k separaci pohárkových buněk sekretující velké množství mucinu, umožňující tak studovat vliv mucinové vrstvy na interakci bakterií s povrchem střeva. Tato buněčná linie HT29-MTX se skládá především z buněk pohárkových a proto přesně nereprezentuje poměr enterocytů a pohárkových buněk ve střevní epitelové vrstvě. Proto se používá směsná kultura s buněčnou linií Caco-2 představující enterocyty a HT29-MTX reprezentující pohárkové buňky v poměru 9:1, který nejvíce odpovídá přirozeným

podmínkám ve střevě. Diferenciované pohárkové buňky HT29-MTX exprimují mucin typu MUC5AC a MUC5B mnohem rychleji než mucin typu MUC2, což by mohlo být významnou nevýhodou při studiu mikrobiální adheze v tlustém střevě, kde převládá MUC2 (Pontier et al., 2001, Van Tassell and Miller, 2011).

Většina klinických studií potvrzuje, že probiotické organismy kolonizují GIT a poskytují přínos hostiteli, avšak pouze krátkodobě. Je tudíž nezbytné zvažovat faktory ovlivňující jejich schopnost adherovat a přetrvávat ve střevě. Bakterie zpočátku přilnou k povrchu GIT nesespecifickými fyzikálními interakcemi (prostorové a hydrofobní), které vedou k reverzibilnímu uchycení (Van Tassell and Miller, 2011). Existují významné rozdíly v adhezi probiotických bakterií k epitelu a mucinu, které jsou dány schopností bakterií přilnout k receptorům umístěným na povrchu enterocytů či ve vrstvě mucinu. Přilnavost bakterií přímo k enterocytům je indikací, že adherující bakterie produkují adhesiny s afinitou k epiteliálním receptorům (Grajek and Olejnik, 2004).

Adhesiny, látky proteinové povahy zprostředkovávající a podporující adhezi, mohou být klasifikovány podle jejich cílů ve střevní sliznici, podle lokalizace na povrchu bakterií (proteiny S-vrstvy) či dle způsobu, jakým jsou na tento povrch navázány (Vélez et al., 2007). Nejvíce studovaným příkladem bakteriálních adhezínů je protein typu MUB (mucus-binding protein) produkovaný *L. reuteri*. Protein MUB obsahuje opakující se funkční domény, které jsou odpovědné za adhezivní vlastnosti proteinu. Tyto proteiny obsahují výhradně bakterie mléčného kvašení, zejména laktobacily a přirozeně se nachází ve střevních výklencích. Přestože mechanismy ještě nejsou úplně známy, studie naznačují, že interakce sacharidů a proteinů hrají klíčovou roli při adhezi těchto proteinů na oligosacharidy vázané v mucinech (Van Tassell and Miller, 2011).

Adhezní vlastnosti jsou známy především u laktobacilů a značně se liší u kmenů a druhů. Abdulla et al. (2014) testovali 6 kmenů laktobacillů izolovaných z mléka, jogurtu a sýra a našli nejen různé adherentní schopnosti (od 8 % do 50 %), ale také různé schopnosti inhibovat patogenní bakterie. Nejvyšší schopnost adherence vykazovaly *L. paracasei* a *L. plantarum*, *L. fermentum* naopak neadheroval téměř vůbec. Probiotické organismy adherují na enterocyty lépe než enteropatogenní bakterie a například *L. casei* ssp. *raimnosus* omezuje adhezi patogenní *E. coli* (Grajek and Olejnik, 2004). Bylo zjištěno, že *L. plantarum* produkuje adhezín typu Msa (mannose-specific adhesin) a je rezistentní jak na žaludeční kyselinu, tak na žluč, což mu umožňuje adherovat

k buněčným sliznicím. Tato základní vlastnost probiotických organismů se tak může jevit jako důležitý faktor umožňující adhezenci (McFarland, 2015).

Vě většině případů souvisí s adhezenčními vlastnostmi buněk schopnost agregace. Shlukování mikrorganismů stejného kmene (autoagregace) či geneticky odlišných organismů (koagregace) má značný význam v lidském střevě. Vztah mezi autoagregací a schopností adhezence je zaznamenán obzvláště u některých druhů bifidobakterií. Důležitá je také jejich koagregace s patogenními organismy. Mnoho autorů uvádí, že koagregační schopnosti laktobacilů by mohly umožnit vytvoření bariéry, která brání kolonizaci patogenními organismy (Bao et al., 2010). Existuje také určitá korelace mezi hydrofóbností povrchu buněk bakterií a adhezí ke sliznici. Jiné studie však tuto domněnku vyvracejí, protože bakterie s vysokou tendencí adhezence vykazovaly poměrně nízkou povrchovou hydrofóbnost (Van Tassell and Miller, 2011). Vedle těchto faktorů je také zaznamenáno, že adhezi mohou ovlivňovat exopolysacharidy produkované laktobacily. Jedná se o polysacharidy s dlouhým řetězcem složené z rozvětvených, opakujících se jednotek cukrů nebo derivátů cukrů volně připojených k povrchu buněk. U *L. acidophilus* byla adheze přičítána produkci různých typů exopolysacharidů (Vélez et al., 2007).

3.3.6 Produkty obsahující probiotika

Probiotické bakterie jsou již mnoho let používány při konzervování potravin a při správném používání jsou pokládány za bezpečné. Po staletí se fermentace používá k ochraně, zlepšování kvality nebo úpravě chuti obilovin, ovoce, zeleniny, luštěnin a masa (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010). Kromě tradičních nutričních funkcí mají i prospěšné zdravotní účinky, proto mohou být považovány za funkční potravinu. LAB se používají v přípravě probiotických produktů, zejména mléčných výrobků. Jsou obsaženy také v nakládaných olivách a okurkách, zelí a mastných výrobcích (Lin, 2003). Minimální požadavek pro počet živých buněk obsažených v probiotických produktech do konce doby expirace činí 10^6 KTJ v 1 g či 1 ml výrobku (Pechar et al., 2013).

Největší kategorií potravin, která obsahuje živé a aktivní kultury, jsou fermentované mléčné výrobky jako jsou sýry, jogurty, acidofilní mléka a kefíry. Tyto produkty jsou zdrojem potenciálně prospěšných živých bakterií, převážně rodu *Lactobacillus* (Douglas and Sanders, 2008). Pro potravinářský průmysl jsou tyto bakterie velmi důležité kvůli své schopnosti přeměnit

fermentované cukry na mléčnou kyselinu, ethanol a jiné metabolity, což mění vlastnosti produktu snížením pH a vytvářením tak nepříznivých podmínek pro růst potenciálně patogenních mikroorganismů (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010). Některým LAB, obzvláště rodům *Lactobacillus* a *Lactococcus* jsou také připisovány fungicidní vlastnosti se schopností produkovat nízkomolekulární sloučeniny složené z organických kyselin, reuterinu, peroxidu vodíku, proteinových složek a fenolových sloučenin. Produkci těchto specifických bakteriálních metabolitů mohou potenciálně bránit růstu plísní a tím zabránit akumulaci jejich mykotoxinů v některých potravinách a snížit tak zdravotní rizika pro konzumenta. *L. plantarum* se ukázal jako účinný proti některým plísním rodu *Penicillium*, *Aspergillus* a *Fusarium* (Dalié et al., 2010).

Ačkoli je většina současných probiotických potravin většinou mléčného původu, v dnešní době existuje rostoucí poptávka po probiotických produktech na bázi ne-mléčných výrobků. Probiotické organismy se začleňují do různých přípravků a uvádějí se na trh také jako doplňky ve formě prášků, tablet, kapslí a přípravků sušených mrazem (Rivera-Espinoza and Gallardo-Navarro, 2010). Příklady vybraných produktů jsou uvedeny v tabulce 3.

Tab. 3: Příklady probiotických druhů obsažených ve vybraných produktech (De Vuyst et al., 2008, McFarland, 2015).

Mikrobiální kmen	Forma	Značka produktu	Cílová aplikace
<i>Lactobacillus casei</i>	Fermentovaný nápoj	Actimel (Danone)	Imunitní odezva, prevence
<i>Lactobacillus casei</i>	Fermentované mléko	Yakult	Zácpa, <i>H. pylori</i> infekce
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Kapsle	Gynophilus	Vaginální problémy
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ovocné nápoje	ProViva	IBS, CDI
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Jogurt	Activia (Danone)	Průchod střevy, zácpa
<i>Enterococcus faecium</i>	Prášek	Bioflorin	Akutní průjem
<i>Escherichia coli Nissle 1917</i>	Kapsle	Mutaflor	Onemocnění střev
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Tablety	Enterol	Průjem

3.4 Tradiční kvašené nápoje

Pro svůj vysoký obsah laktobacilů a LAB a s nimi spojené probiotické účinky jsou dnes v zájmu mnoha studií tradiční kvašené nápoje z kobyliho a velbloudího mléka. Tyto tradiční nápoje produkované v Mongolsku, Kazachstánu a dalších zemích střední Asie jsou pro svoje zdraví prospěšné účinky široce konzumovány již tisíce let a po staletí jsou považovány za nejlepší produkty využívané v léčebné terapii (Liu et al., 2011, Danova et al., 2005).

Život a blahobyt těchto obyvatel je závislý především na chovu hospodářských zvířat a obzvláště na produkci mléka, které je pro tamější obyvatele jednou z nejzákladnějších potravin. Přibližně 40 % obyvatelstva žijící na venkově jsou kočovní pastevcí, proto produkce mléka a výroba tradičních mléčných výrobků představují obrovské kulturní bohatství a důležitou součást jejich každodenního života. Tradiční metody a postupy pro vytváření řady specifických výrobků jsou dlouhodobě předávány z generace na generaci (Yu et al., 2011).

Po dlouhá léta vzbuzují velkou pozornost především velbloudi kvůli své schopnosti přizpůsobit se náročným environmentálním podmínkám stejně tak jako pro složení a terapeutické vlastnosti jejich mléka. Důležitou roli hrají především v oblastech se suchým podnebím, jejich mléko se složením podobá mléku kravskému (tab. 4) a pro svůj vysoký obsah nenasycených mastných kyselin má výbornou nutriční hodnotu. Minimální množství β -kaseinu a β -laktoglobulinu, složek způsobující alergickou reakci, umožňuje konzumaci i lidem s alergií na mléko kravské, kde jsou tyto alergeny zastoupeny v hojném počtu (Konuspayeva et al., 2009). Velbloudí mléko má antimikrobiální aktivitu a inhibuje některé patogenní bakterie. Benmechernene et al. (2013) izolovali *Leuconostoc mesenteroides* a prokázali, že dva kmeny (B7 a Z8) vykazují dobré probiotické vlastnosti v *in vitro* podmínkách a mohou být použity jako ochranné kultury k inhibici růstu patogenních bakterií v potravinách. Také byl prokázán obsah několika ochranných bílkovin včetně lysozymu, laktoperoxidázy, laktoferinu, imunoglobulinu a vitamínu C (Benmechernene et al., 2013).

Tab. 4: Průměrné složení mléka kobyliho, mateřského a kravského (Navrátilová et al., 2016).

	Mléko		
	Kobylí	Mateřské	Kravské
Tuk (g.kg ⁻¹)	12,1	36,4	36,1
Hrubé bílkoviny (g.kg ⁻¹)	21,4	14,2	32,5
Laktóza (g.kg ⁻¹)	63,7	67,0	48,8
Popeloviny (g.kg ⁻¹)	4,2	2,2	7,6
Energetická hodnota (kcal.kg ⁻¹)	480	677	674

Konzumace velbloudího mléka byla doporučena jako alternativní léčba pro řadu zdravotních problémů jako jsou alergie a virové infekce. Velká pozornost je věnována hypoglykemické aktivitě pozorované u diabetu typu 1. Pro vysokou koncentraci inzulínu je velbloudí mléko navrhováno jako doplněk k inzulínové terapii vedoucí ke snížení dávek inzulínu potřebných pro pacienty s diabetem typu 1 (Al Kanhal, 2010). To naznačuje, že antidiabetická aktivita velbloudího mléka je zprostředkována imunomodulačním účinkem na β -buňky pankreatu. Aminokyselinová sekvence některých bílkovin izolovaných z velbloudího mléka je bohatá na cystin, což vykazuje podobnost s inzulínovou skupinou peptidů. Velbloudí mléko tak může mít přímý účinek na aktivaci inzulínového receptoru a jeho funkci v hlavních cílových tkáních (Abdulrahman et al., 2016).

Velice populární je v zemích střední Asie také mléko kobyli, které je bohaté na stopové prvky, antibiotika a celou řadu vitamínů (A, B₁, B₂, B₁₂, C, D, E) (Yu et al., 2011). Podobá se mléku lidskému (tab. 4), má však vyšší koncentraci polynenasycených mastných kyselin. Je všeobecně známo, že mléko klisen je přiměřeným zdrojem výživy pro kojence a účinné při prevenci některých lidských chorob. Společně s velbloudím mlékem je základní surovinou pro výrobu tradičního mléčného fermentovaného nápoje Kumysu (Liu et al., 2011).

Tradiční Kumys se vyrábí z čerstvého kobyliho nebo velbloudího mléka smícháním s již hotovým fermentovaným výrobkem. Směsi se uchovávají ve vhodném vaku, který je tradičně vyroben ze zvířecí kůže. Během fermentace je nutné udržovat teplotu skladování při 20–30 °C, aby

se vyvinuly příchutě a proběhl správný proces. Po dosažení silné pěny a kyselé chuti je Kumys připraven ke konzumaci. Konečným produktem je tak homogenní kapalina s mléčnou či světle žlutou barvou. Hlavní produkční sezóna se pohybuje od konce května do podzimu (Liu et al., 2011).

Kumys vzniká spontánním kvašením laktózy, kde hlavní roli hrají laktobacily a kvasinky (*Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida*). Během fermentace laktobacily okyselují mléko a kvasinky mění surovinu na sycený, mírně alkoholický nápoj s obsahem až 2 % alkoholu (Danova et al., 2005). Po fermentaci tak dochází ke snížení obsahu laktózy a ke zvýšení aminokyselin, mastných kyselin a mléčné kyseliny, která je důsledkem velmi nízkého pH (< 4). Aromatické složky, jako je octová kyselina, alkohol a estery, dodávají Kumysu jedinečnou a mírně kyselou chuť. Tabulka 5 znázorňuje průměrný obsah živin obsažený v tomto nápoji. S vysokým obsahem nenasycených mastných kyselin, jejich nízkou molekulovou hmotností a obsahem vápníku se Kumys snadno tráví a vstřebává. Četné studií ukazují, že Kumys má terapeutické účinky na kardiovaskulární a neurologické onemocnění, tuberkulózu a diabetes (Liu et al., 2011).

Tab. 5: Průměrný obsah jednotlivých složek obsažených v Kumysu (Liu et al., 2011).

Složení	Tuk (%)	Laktóza (%)	Bílkoviny (%)	Alkohol (%)	Volné aminokyseliny (%)	Mastné kyseliny (%)	Vitamín C (mg/100 g)
Obsah	1,75	2,8	2,0	2,2	1,77	1,65	78,4

Hlavními laktobacily vyskytujícími se v Kumysu jsou *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. casei* a *L. kefir*, s vyšší tolerancí vůči kyselinám (Liu et al., 2011). Yu et al. (2011) zkoumali LAB a kvasinky izolované ze vzorků tradičních fermentovaných mongolských výrobků. *Streptococcus thermophilus* a *L. helveticus* byly dominantními druhy obsaženými v těchto výrobcích, představující 29, respektive 21 % ze všech izolovaných druhů. *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. kefir*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Leuconostoc mesenteroides* byly identifikovány v nižší četnosti. Druhovú různorodost závisí na samotné surovině a výrobních procesech, stejně jako na lokalitě, kde byly produkty vyrobeny (Yu et al.,

2011). V závislosti na obsahu mléčné kyseliny a kmenech laktobacilů můžeme Kumys rozdělit na 3 typy – „silný“, „mírný“ a „lehký“. „Silný“ Kumys je tvořen *L. bulgaricus* a *L. rhamnosus*, které mléko okyselí na pH 3,6–3,3 a jejichž procento přeměny laktózy na mléčnou kyselinu činí přibližně 80–90 %. „Mírný“ Kumys obsahuje *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* a *L. fermentum*, jež mají omezenou okyselovací schopnost a na konci procesu upravují pH na 4,5–3,9. Je považován za nápoj s nejlepší vůní a chutí. „Lehký“ Kumys je mírně okyselený produkt s pH 4,5–5,0 a je tvořen *Str. thermophilus* a *Str. cremoris* (Danova et al., 2005).

Ya et al. (2008) izolovali *L. casei Zhang* (*LcZhang*), který vykazoval vysoký probiotický potenciál a vysokou imunomodulační aktivitu. Výsledky ukázaly, že po perorálním podávání *LcZhang* byla zvýšena hladina IgA ve střevě. *LcZhang* dokázal stabilně zvýšit hladinu IgA po dobu nejméně 30 dnů, je proto zřejmé, že může mít schopnost zlepšit odolnost gastrointestinální sliznice proti infekcím. *LcZhang* také zvýšil celkovou hladinu glykoproteinového imunoglobulinu G (IgG), který se podílí na sekundární odpovědi tvorbou protilátek po rozpoznání antigenu. Běžné hodnoty IgG byly naměřeny až po 10 dnech podání *LcZhang*, je proto patrné, že některé biologicky aktivované peptidy uvolněné z *LcZhang* mohou zahrnovat spouštěcí sekundární protilátkové odpovědi. Jiná studie byla zaměřena na protizánětlivé účinky *L. helveticus*, přítomnost proteinu S-vrstvy a jeho úlohu při podpoře imunomodulační aktivity. Bylo zaznamenáno zmírnění hladiny některých receptorů v makrofázích a zvýšená regulace protizánětlivých cytokinů. Přesná role proteinů S-vrstvy v imunitních reakcích však zůstává stále ne zcela pochopitelná a k objasnění mechanismů účinků je zapotřebí dalších studií. Je však očividné, že *L. helveticus* může být užitečný při vývoji přípravků pro prevenci nebo léčbu onemocnění spojených se zánětem (Rong et al., 2015).

Dalším speciálním populárním produktem je Shubat, fermentovaný výrobek připravený z velbloudího mléka. Vzhledově velmi podobný jogurtu, avšak díky obsahu CO₂ lehce perlivý s vysokým stupněm kyselosti (pH kolem 3,8). V některých oblastech je Shubat používán jednak jako tradiční nápoj, jednak jako lidová medicína. Domorodci věří, že fermentované velbloudí mléko má léčebné vlastnosti s antidiabetickými, protirakovinnými či protituberkulózními účinky (Rahman et al., 2009). Podobně jako Kumys se i Shubat vyrábí smícháním čerstvého a již hotového fermentovaného výrobku. Kdykoli je část produktu odebrána ke spotřebě, přidává se část surového mléka, aby se doplnil objem. Směs se po několik hodin udržuje při teplotě 25–30 °C, aby se dosáhlo typické chuti. Tento postup v nahrazování pak pokračuje po několik měsíců. Specifické vlastnosti

výrobků závisí na obsažené mikrobiotě, která se liší dle výrobní technologie a ekologické lokality, kde byl výrobek produkován (Shori, 2012). Rahman et al. (2009) izolovali a charakterizovali dominantní mikroflóru v tomto nápoji. Ve zkoumaných vzorcích byly dominantními mikroorganismy LAB a kvasinky. Při použití fenotypových a molekulárních metod byly identifikovány převládající rody *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* a *Kluyveromyces*. Nejčastěji izolovanými druhy byly *L. sakei* (26 %), *Ent. faecium* (14 %) a *Kl. marxianus* (14 %).

Typickým tradičním produktem je i Kurut, výrobek vzniklý z přirozeně fermentovaného jačího mléka. Velký ekonomický a nutriční význam má pro obyvatele žijící v Qinghai v severozápadní Číně. Pro dosažení určitého stupně kyselosti, alkoholu a požadované vůně se Kurut vyrábí fermentací ve speciální nádobě po době nejméně 7–8 dní při teplotě 10–25 °C. Stejně jako u Kumysu či Shubatu je pro Kurut zásadní přítomnost LAB, které jsou zodpovědné za vůni, texturu a konzervační vlastnosti a jsou zde zastoupeny ve větším množství než v jiných tradičních fermentovaných nápojích. Kurut je bohatý na kasein, imunoglobuliny, sérový albumin, β -laktoglobulin a α -laktalbumin (Nikkhah, 2011). Byly izolovány kmeny LAB, které byly identifikovány podle fenotypové charakterizace a sekvenční analýzy 16S rRNA (ribosomal ribonucleic acid) genu. Převažujícím rodem byl rod *Lactobacillus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* patřily k nejčastěji izolovaným druhům. Tyto studie mohou poskytovat údaje pro další studium zahrnující selekci kmenů probiotik a návrh startérové kultury pro průmyslovou výrobu tradičních fermentovaných produktů v budoucnu (Sun et al., 2010).

4 Metodika a materiál

4.1 Materiál

Bylo testováno celkem 7 kmenů rodu *Lactobacillus* izolovaných z různých tradičních fermentovaných nápojů produkovaných v oblasti střední Asie. Tyto kmeny byly již identifikovány podle fenotypové organizace a sekvenční analýzy 16S DNA (deoxyribonucleic acid) genu. *L. helveticus* 5-2M a *L. pontis* 5-5M izolované z fermentovaného nápoje Shubat, *L. kefiranofaciens* 6-2M a *L. pontis* 6-12M z Kumysu a *L. paracasei* 8-2M, *L. brevis* 8-6M a *L. crustorum* 8-9M izolované z Kurutu.

Dále byly k testům adherence použity buněčné linie Caco-2 a HT29-MTX kolorektálního karcinomu tlustého střeva, penicilin a streptomycin, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, neesenciální aminokyseliny, fetální bovinní sérum (FBS), fosfátový pufr (PBS – Phosphate Buffered Saline), Rogosový agar, trypsin, triton X-100 a Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), vše zakoupeno od firmy Sigma-Aldrich (CZ – Czech Republic). Pro tkáňové kultury byly dále použity 24jamkové 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

Buněčné linie byly kultivovány v DMEM mediu, které bylo doplněno 10% FBS, 1% hydrogenuhličitanem sodným, 1% pyruvátem sodným, 1% neesenciálními aminokyselinami a 1% penicilinem a streptomycinem. Kultury byly inkubovány 7 dní při teplotě 37 °C v CO₂ inkubátoru v 5% CO₂ atmosféře. Medium bylo každé dva dny měněno za čerstvé a sedmý den byly buněčné linie sklizeny.

Kultivace probíhala v kultivačních láhvích o velikosti 75 cm² v 15 ml DMEM media. Buňky byly nejprve opláchnuty 5 ml PBS, které bylo odstraněno a následně bylo přidáno 5 ml tripsinu na dobu 3–5 minut. Po uplynuté době byl tripsin neutralizován 5 ml DMEM media. Pomocí plastové škrabky se buňky uvolnily ze dna kultivační láhve a celý obsah byl přenesen do 15 ml centrifugační zkumavky typu Falcon. Ta byla vložena do centrifugy a centrifugována po dobu 10 minut. Staré medium bylo následně nahrazeno 5 ml nového a pomocí serologické pipety, opětovným nasáváním

a vyprazdňováním, došlo k rozvolnění usazených buněk. Do nové kultivační láhve bylo přidáno 15 ml DMEM media a 1 ml připravené suspenze. Takto připravená láhev byla uložena v CO₂ inkubátoru po dobu 7 dní.

4.2.2 Založení 24jamkové destičky

Z připravené buněčné suspenze byla poté nanesena kapka na Bürkerovu komůrku, aby byl spočítán obsah buněk v 1 ml suspenze. Výpočtem byla následně zjištěna přesná koncentrace sklizených buněk. Směsná kultura tvořená buněčnými liniemi Caco-2 a HT29-MTX byla pipetována v objemu 500 µl do 24jamkové destičky při hustotě $3,6 \times 10^4$ Caco-2 a $0,4 \times 10^4$ HT29-MTX. Destička byla uložena v kultivačním boxu při teplotě 37 °C s 5% CO₂ atmosférou. Po 14denní kultivaci došlo k plné diferenciaci mikroklků a buněčné kultury tak byly připraveny k testování.

4.2.3 Adherence laktobacilů ke střevním buňkám

K testům adherence byly použity kmeny laktobacilů izolované z mléčných nápojů. Byla aplikována metodika dle Jensen et al. (2012). Laktobacily byly kultivovány v Rogosovém a MRS (de Man, Rogosa and Sharp) agaru, 3× promyty PBS a centrifugovány po dobu 10 minut. Následně bylo provedeno ředění kmenů v PBS na výslednou koncentraci 1×10^7 KTJ/ml.

Před přidáním bakteriální suspenze byly buněčné monovrstvy promyty PBS, aby se odstranila antibiotika. Do promytých buněčných kultur bylo následně přidáno 900 µl čistého DMEM media a 100 µl bakteriální suspenze s koncentrací 1×10^7 KTJ rozpuštěné v PBS v koncentraci 1 mg/ml. Výsledná koncentrace poté byla 1×10^6 KTJ/ml. Do kontrolní jamky bylo přidáno pouze PBS. Pro každý kmen byly jamky připraveny v duplikátu. Destička se poté inkubovala 2 hodiny v CO₂ inkubátoru při teplotě 37 °C a v 5% CO₂ atmosféře. Po 2 hodinové inkubaci byla odstraněna neadherovaná probiotika pomocí PBS, monovrstvy buněk byly 3× promyty. Buněčná monovrstva s adherovanými probiotiky byla poté sklizena pomocí 300 µl 1% Tritonu X-100 naředěného 700 µl PBS. Celý obsah jamky byl následně převeden do eppendorfky a 4× naředěn. Tato suspenze byla v objemu 100 µl napipetována do Petriho misky a zalita Rogosovým agarem. Po zatuhnutí byly Petriho misky obráceny dnem vzhůru a vloženy do inkubátoru s teplotou 37 °C. Po 3 dnech kultivace byly misky vyhodnoceny a byla zjištěna celková

adherenční schopnost testovaných kmenů probiotik. Ta byla vyjádřena jako procento adherovaných bakterií z celkového počtu bakterií v inokulační dávce.

4.2.4 Statistická analýza

Pro každý kmen byla prováděna 2 měření v duplikátu, výsledky jsou proto vyjádřeny jako průměr se směrodatnou odchylkou (SD) a medián. Statistické vyhodnocení a tvorba grafů byla provedena v programu MS Excel. K porovnání výběrů byl použit dvouvýběrový *t*-test a párový test. Statistická významnost byla posouzena na hladině $p < 0,05$.

5 Výsledky

Cílem práce bylo zjistit, jaké adhezenční schopnosti mají kmeny laktobacilů vyskytující se v tradičních mléčných fermentovaných nápojích produkovaných v oblasti střední Asie. Bylo testováno celkem 7 kmenů rodu *Lactobacillus* v inokulační dávce 1×10^6 . *L. helveticus* 5-2M a *L. pontis* 5-5M izolované z mléčného nápoje Shubat, *L. kefiranofaciens* 6-2M a *L. pontis* 6-12M z nápoje Kumys a *L. paracasei* 8-2M, *L. brevis* 8-6M a *L. crustorum* 8-9M izolované z fermentovaného nápoje Kurut. Testování bylo prováděno na směsné buněčné kultuře, která byla tvořena buněčnými liniemi Caco-2 a HT29-MTX o poměru 9:1.

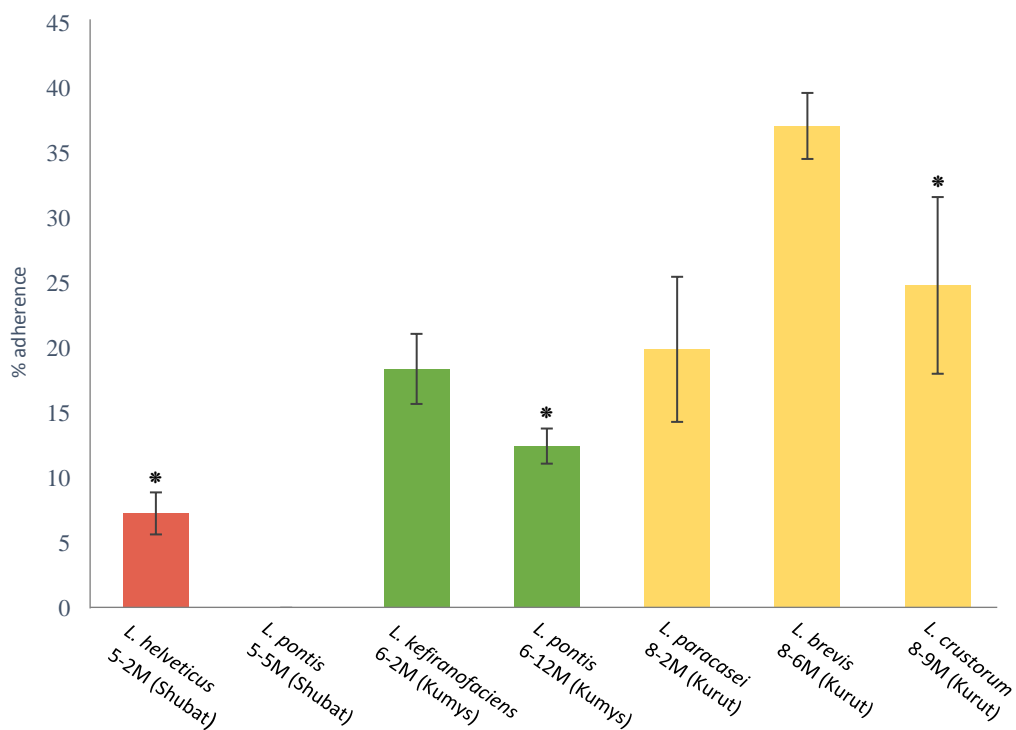
Schopnost adherence se u zkoumaných laktobacilů pohybovala v rozmezí 0–37,1 %. Nejlepší adhezenční vlastnosti vykazovaly laktobacily izolované z nápoje Kurut, kde *L. brevis* 8-6M adheroval z 37,1 %, *L. crustorum* 8-9M z 24,8 % a *L. paracasei* 8-2M z 19,9 %. Naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny u laktobacilů z produktu Shubat, kde adherence dosahovala 7,3 % u *L. helveticus* 5-2M, *L. pontis* 5-5M neadheroval vůbec. *L. kefiranofaciens* 6-2M a *L. pontis* 6-12M izolované z Kumysu adherovaly z 18,4 % a 12,5 %. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6 a v obrázku 6.

Bylo provedeno statistické srovnání adherence jednotlivých kmenů ve vztahu k inokulační dávce. Statisticky významné rozdíly byly nalezeny u *L. crustorum* 8-9M, kde docházelo k adhezi v rozmezí 16,04–33,42 %. Statisticky významné rozdíly existují také u kmenů *L. pontis* 6-12M a *L. helveticus* 5-2M, které adherovaly v rozmezí 11,67–14,79 % a 5,33–9,21 %. Ostatní kmeny adherovaly ke střevním buňkám bez statisticky významných rozdílů (tab. 6).

Tab. 6: Statistické zhodnocení schopnosti adherence jednotlivých kmenů laktobacilů ke ko-kultuře složené z buněčných linií kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT29-MTX.

Kmen	Nápoj	% adherence	
		průměr ± SD	medián
<i>L. brevis</i> 8-6M	Kurut	37,09 ± 2,54	37,44
<i>L. crustorum</i> 8-9M		24,82 ± 6,80 *	24,90
<i>L. paracasei</i> 8-2M		19,89 ± 5,58	18,07
<i>L. kefiranofaciens</i> 6-2M	Kumys	18,39 ± 2,70	17,24
<i>L. pontis</i> 6-12M		12,45 ± 1,35 *	11,67
<i>L. helveticus</i> 5-2M	Shubat	7,27 ± 1,62 *	7,27
<i>L. pontis</i> 5-5M		0 ± 0	0

* statisticky významné rozdíly hodnot ($p < 0,05$)



Obr. 6: Grafické znázornění adhezenčních schopností jednotlivých kmenů laktobacilů ke směsné kultuře složené z buněčných linií Caco-2 a HT29-MTX. Hodnoty jsou vyjádřeny v % jako průměr ± směrodatná odchylka; * statisticky významné rozdíly hodnot ($p < 0,05$).

Dále bylo provedeno porovnání adheujících kmenů z nápoje Kumys a Kurut. Byly nalezeny statisticky významné rozdíly v % adherence ($p < 0,05$) mezi kmeny *L. kefiranofaciens* 6-2M a *L. pontis* 6-12M, *L. paracasei* 8-2M a *L. brevis* 8-6M a také mezi kmeny *L. brevis* 8-6M a *L. crustorum* 8-9M. Statisticky významný rozdíl neexistuje mezi kmeny *L. paracasei* 8-2M a *L. crustorum* 8-9M. Pro přehlednění je porovnání znázorněno v tabulce 7.

Tab. 7.: Vyjádření hodnot statisticky významných rozdílů mezi jednotlivými kmeny.

Porovnávané kmeny	P - hodnoty
<i>L. kefiranofaciens</i> 6-2 M – <i>L. pontis</i> 6-12M	0,014305 *
<i>L. paracasei</i> 8-2M – <i>L. brevis</i> 8-6M	0,00284 *
<i>L. paracasei</i> 8-2M – <i>L. crustorum</i> 8-9M	0,370087
<i>L. brevis</i> 8-6M – <i>L. crustorum</i> 8-9M	0,026341 *

* $p < 0,05$

6 Diskuze

Adherence patří k nejzákladnějším vlastnostem probiotických organismů a je zcela zásadní pro kolonizaci trávicího traktu. Přináší jedny z mnoha zdravotních výhod, které tyto organismy poskytují. Hlavním místem účinku je střevní sliznice, která je pokryta vrstvou hlenu, jež nabízí vazebná místa pro střevní bakterie (Zheng et al., 2013). Pro sledování adhezenčních schopností *in vitro* jsou aplikovány různé modely využívající především střevní buněčné linie Caco-2, HT-29 a HT29-MTX. Jednotlivé linie se však liší produkcí mucinu, proto se často používají ko-kultury simulující obdobné podmínky vyskytující se v lidském střevě. Kadlec et al. (2011) uvádí, že v intestinálním epitelu jsou zastoupeny dva základní typy buněk – buňky pohárkové a enterocyty. Caco-2 buňky reprezentují enterocyty, nevytváří však vrstvu mucinu. Tu naopak tvoří buněčné linie HT-29 a HT29-MTX, které zastupují buňky pohárkové secernující mucin. Pro naše testování proto byla zvolena směsná kultura složená z buněčných linií Caco-2 a HT29-MTX v poměru 9:1, který nejvíce odpovídá přirozeným podmínkám ve střevě.

Při testování adherence probiotik je třeba zohlednit vlastnosti jednotlivých kmenů, střevních buněk a brát v potaz faktory, které by mohly testování ovlivnit. Jensen et al. (2012) zmiňují možné faktory ovlivňující schopnost adheze jako jsou vazebné proteiny na povrchu některých probiotických druhů, MUB produkovaný *L. reuteri* a Msa identifikovaný u *L. plantarum*. Mnoho dalších LAB obsahuje podobné domény naznačující přítomnost potenciálních vazebných proteinů. Jako jedny z faktorů přispívající k adhezi k epiteliálním buňkám také uvádí exopolysacharidy produkované některými bakteriemi. Abdulla et al. (2014) stanovovali povrchovou hydrofobicitu bakterií za účelem testování možné korelace mezi touto fyzikálně-chemickou vlastností a schopností adherovat ke střevnímu hlenu. Hydrofobicita kmenů byla zkoumána za použití chloroformu, xylenu a n-hexadekanu. Bylo zjištěno, že zkoumané kmeny vykazují jiný stupeň hydrofobnosti. Vysoké procento buněk *L. paracasei* (77,4 %) přilnulo ke xylenu, polárnímu rozpouštědlu, *L. fermentum* vykazoval silnou afinitu k chloroformu. Fyzikálně-chemické vlastnosti, jako je hydrofobicita, hrají hlavní úlohu při počáteční interakci s hostitelskou tkání a jeví se taktéž jako významný faktor pro úspěšnou bakteriální adhezi.

Důležitou vlastností probiotických organismů je také rezistence vůči žluči a kyselinám, zásadní je rovněž antibakteriální aktivita, která je přičítána produkci H₂O₂, organických kyselin (mléčná a octová kyselina), proteinových sloučenin a cyklických dipeptidů. Produkce těchto

antimikrobiálních látek se jeví jako účinná proti patogenům, při konzervaci potravin a z probiotik činí vhodné organismy pro startérové kultury používané při výrobních procesech fermentovaných mléčných produktů (Abdulla et al., 2014). Tyto výrobky mají již po staletí nenahraditelné místo v lidské výživě a jejich léčivé vlastnosti a vysoké nutriční hodnoty byly známy člověku i v dávných dobách. Zdravotní přínos je zprostředkován nejenom aktivitou probiotických organismů, ale také působením biologicky aktivních složek, které jsou přítomny v syrovém mléce (Ebringer et al., 2008).

V této práci jsme ověřovali adhezenční schopnosti probiotik vyskytujících se v tradičních fermentovaných mléčných produktech produkovaných v oblasti střední Asie. Probiotické kmeny byly izolovány ze třech druhů nápojů – Kurut, Kumys a Shubat, kde Kurut byl připraven z mléka jačího, Kumys z kobyliho a Shubat z velbloudího. Testováno bylo celkem 7 kmenů, *L. helveticus* 5-2M a *L. pontis* 5-5M izolované z nápoje Shubat, *L. kefiranofaciens* 6-2M, *L. pontis* 6-12M z nápoje Kumys a *L. paracasei* 8-2M, *L. brevis* 8-6M a *L. crustorum* 8-9M z produktu Kurut. Výsledky ukázaly vysokou míru variability ve schopnosti adherence v rozmezí 0–37,1 %. Nejlepší adhezenční vlastnosti vykazovaly kmeny izolované z nápoje Kurut, kde nejlépe adheroval *L. brevis* 8-6M (37,1 %), u *L. crustorum* 8-9M a *L. paracasei* 8-2M docházelo k adhezi z 24,8 % a z 19,9 %. Naopak jako nejhůře adherující se jevíly kmeny z produktu Shubat, kde *L. helveticus* 5-2M adheroval z 7,3 %, u *L. pontis* 5-5M byla zaznamenána nulová schopnost adherence. Laktobacily *L. kefiranofaciens* 6-2M a *L. pontis* 6-12M izolované z nápoje Kumys adherovaly z 18,4 % a 12,5 %. Jako možný faktor vysvětlující vysoké rozdíly v % adherence u jednotlivých kmenů se tak jeví složení jednotlivých nápojů, kde každý nápoj byl připravený z jiného mléka.

Podobná studie byla zaznamenána u Jensen et al. (2012), kde byla zkoumána adheze 18-ti probiotických kmenů na buněčných liniích Caco-2, HT-29 a LS-174T. Výsledky ukázaly taktéž vysokou míru variability v % adherence (< 1–25 %). Nejvyšší schopnost adheze na všech testovaných buněčných liniích vykazovaly kmeny *L. reuteri* DSM 20016, mm4-1a, fj1 (11–26 %), zatímco kmen *L. reuteri* DSM 17938 prokázal skoro nulovou adhezní schopnost. Rozdíly ve stupni adheze si Jensen et al. (2012) vysvětlují úrovní uspořádání genů, kde kmeny DSM 20016, mm4-1a, fj1 spadají do jedné fylogenetické skupiny, zatímco kmen DSM 17938 do jiné. Abdulla et al. (2014) testovali 6 kmenů rodu *Lactobacillus* izolovaných ze syrového mléka (*L. paracasei*), z jogurtu (3 kmeny *L. acidophilus*), ze smetany (*L. fermentum*) a ze sýra (*L. plantarum*). Vysoká schopnost adherence byla nalezena u *L. paracasei*, který adheroval téměř z 50 %, u *L. plantarum*

docházelo k adhezi ze 40 %. U jednoho kmene *L. acidophilus* byl zaznamenán stupeň adherence na 30 %, zbylé kmeny adherovaly z 10 %, respektive z 8 %. Tyto kmeny byly tudíž vyhodnoceny jako neadherující.

Adhezí ke střevní sliznici brání probiotické organismy průniku nežádoucích látek a patogenních bakterií, různými mechanismy účinku s nimi soupeří o vazebná místa ve sliznici, čímž regulují imunitní systém a předchází tak střevním onemocněním (Jensen et al., 2012). Konzumací fermentovaných mléčných produktů byla prokázána zvýšená produkce cytokinů, fagocytární aktivita a tvorba protilátek. Studie také ukazují, že fermentované mléčné produkty mají hypocholesterolemické účinky a některé laktobacily vykazují schopnost snižovat hladinu cholesterolu v krvi. Byla taktéž zaznamenána jejich antikarcinogenní aktivita, účinky se však liší u jednotlivých kmenů (Panesar, 2011).

Ve studii Zheng et al. (2013) byly hodnoceny funkční vlastnosti LAB izolovaných z tibetských keřirových zrn, jež jsou přirozeným startérem pro fermentované nápoje konzumované v Tibetu. Tři izoláty *Lactobacillus* identifikované jako *L. acidophilus* LA15, *L. plantarum* B23 a *L. kefir* D17 vykazovaly rezistenci na kyseliny a žlučové soli. Také byla zaznamenána *in vitro* adherence k buňkám Caco-2, jež se pohybovala v rozmezí 6,5–13,2 %. Míra adheze kmenů LA15 a D17 byla významně nižší v porovnání s kmenem B23, jenž vykazoval nejvyšší stupeň adherence. Tyto kmeny byly poté dále vybrány pro další stanovení jejich účinku snižujícího hladinu cholesterolu u potkanů. Výsledky všech tří kmenů potvrdily hypotézu, že LAB mají pozitivní účinky na snižování hladiny cholesterolu. Mnoho studií se zabývalo mechanismy účinku působící proti patogenům, Candela et al. (2008) zkoumali ochrannou úlohu laktobacilů a bifidobakterií vůči infekčním enteropatogenům *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli*. Podle zaznamenaných výsledků se *L. acidophilus* Bar13, *L. plantarum* Bar10, *B. longum* Bar33 a *B. lactis* Bar30 jeví jako účinné v inhibici adheze patogenů k vrstvě buněk Caco-2. Kmeny *L. acidophilus* Bar13 a *B. longum* Bar33 byly navíc zkoumány pro imunomodulační aktivitu na interleukiny produkované buňkami HT-29. Oba kmeny ukázaly potenciál chránit enterocyty před akutní zánětlivou reakcí.

V rámci studie (Guo et al., 2015) byly porovnávány probiotické vlastnosti dominantních laktobacilů izolovaných z tradičního nápoje Kumys a fermentované potraviny Suan-tsai. Celkem bylo izolováno 30 kmenů, 14 kmenů (8 *L. helveticus*, 6 *L. brevis*) z 8 vzorků Suan-tsai a 16 kmenů (7 *L. helveticus*, 5 *L. acidophilus*, 2 *L. plantarum* a 2 *L. casei*) ze 7 vzorků Kumysu. Laktobacily

izolované z Kumysu vykazovaly vyšší odolnost k žluči, účinky snižující cholesterol a vyšší stupeň adheze než testované kmeny ze vzorků Suan-tsai. Adherenční schopnost laktobacilů byla stanovována na buněčných liniích HT-29, kam byly laktobacily přidány v koncentraci 1×10^8 , výsledná adherence byla poté vyjádřena jako počet bakterií adheujících ke 100 HT-29 buňkám, naměřené hodnoty se pohybovaly v rozmezí 47,7–373 bakteriálních buněk / 100 HT-29 buněk. Nejlepší adhenční vlastnosti vykazovaly *L. acidophilus* a *L. plantarum*. Hodnoty rezistence vůči žluči se pohybovaly v rozmezí 1,6–34,2 %, kde nejlepších výsledků dosáhl opět *L. acidophilus*. V jedné z nejnovějších studií (Abudumilike et al., 2016) byly testovány bakterie z tradičního nápoje Shubat, které byly identifikovány jako LAB se schopností rezistence na kyseliny a soli. Adherenční schopnost vybraných kmenů (*L. brevis* M3-3, *Leuconostoc lactis* Le2-1, *Enterococcus* sp. M4-3-2, *Enterococcus faecium* M3-1) byla ověřována na buněčné linii Caco-2, kde nejvíce adheující kmenem byl *Enterococcus faecium* M3-1. Rovněž byla u těchto kmenů prokázána antibakteriální aktivita. S cílem získat nové a účinné kmeny, které pozitivně ovlivňují zdraví spotřebitelů, byl zkoumán probiotický potenciál 17 LAB izolovaných z jačího mléka. Byla prokázána rezistence vůči kyselému pH a žluči, trávení laktózy, antimikrobiální, antioxidační či protinádorová aktivita (Kaur et al., 2017).

Můžeme tak konstatovat, že probiotické organismy zcela nepopíratelně hrají zásadní roli v lidském zdraví, ať už podporou rozvoje imunitního systému či bráněním průniku nežádoucích látek a organismů. Adherence je považována za nezbytný předpoklad pro antagonistickou aktivitu a mohou ji ovlivňovat i takové faktory, jako je teplota, pH či použité médium. Nicméně musíme zohledňovat fakt, že všechna testování jsou prováděna *in vitro*, kde dochází ke značnému zjednodušení situací *in vivo* a kde jsou podmínky lehce odlišné od přirozených podmínek v GIT. Aplikování stejných závěrů na situace *in vivo* tak musíme brát s malou rezervou.

7 Závěr

Cílem této práce bylo otestování adhezenčních schopností probiotik vyskytujících se v tradičních fermentovaných mléčných nápojích produkovaných v oblasti střední Asie. Schopnost přilnout ke střevní sliznici je základní vlastností probiotických organismů, je důležitá pro následnou kolonizaci střeva a tím pozitivně ovlivňuje zdraví hostitele.

Celkem bylo zkoumáno 7 kmenů ve třech druzích nápojů. Výsledky prokázaly vysoký adhezenční potenciál laktobacilů pouze v jednom ze zkoumaných produktů. Nejlepší adhezenční vlastnosti vykazovaly *L. brevis* 8-6M, *L. crustorum* 8-9M a *L. paracasei* 8-2M izolované z nápoje Kurut. Zde docházelo k adhezi z 37,1 %, 24,8 % a 19,9 %. Z nápoje Kumys byly izolovány *L. kefiranofaciens* 6-2M a *L. pontis* 5-5M s adhezenční schopností 18,4 % a 12,5 %. U posledního zkoumaného nápoje Shubat byla zaznamenána velmi nízká schopnost adherence, kde *L. helveticus* adheroval 5-2M ze 7,3 % a *L. pontis* 5-5M neadheroval vůbec.

V *in vitro* podmínkách na modelu střevního epitelu tak dobře adherovaly pouze laktobacily z mléčného nápoje Kurut. Jelikož se jedná o testy *in vitro*, je obtížné aplikovat stejné závěry na situace *in vivo*, tedy v lidském GIT, kde adherenci může ovlivnit spousta dalších faktorů. Nicméně, *in vitro* experimenty jsou nezbytné pro pochopení mechanismů účinku a poskytují důležité informace týkající se jednotlivých kmenů. Ačkoli nebyl prokázán vysoký adhezenční potenciál u všech zkoumaných laktobacilů, není pochyb o tom, že pravidelná konzumace fermentovaných mléčných produktů přináší zdraví prospěšné účinky a je tudíž předpokladem pro správnou kolonizaci střev a udržení homeostázy střevního mikrobiomu.

8 Seznam použité literatury

- Abdulla, A. A., Abed, T. A. & Saeed, A. M. 2014. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of six *Lactobacillus* strains. *British Microbiology Research Journal*, 4, 381-391.
- Abdulrahman, A. O., Ismael, M. A., Al-Hosaini, K., Rame, C., AL-Senaigy, A. M., Dupont, J. & Ayoub, M. A. 2016. Differential effects of camel Milk on insulin receptor signaling—Toward Understanding the insulin-like Properties of camel Milk. *Frontiers in endocrinology*, 7, 4.
- Abudumilike, N., Keyisier, S., Yibulayin, A. & Rehemana, N. 2016. Study on cell adhesion and probiotic characteristics of dominant lactic acid bacteria in traditional fermented camel milk-shubat. *Food & Machinery*, 4, 013.
- Adams, M. R., Moss, M. O., McClure, P. J. 2016. Food microbiology. 4th ed. Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK. p. 562. ISBN: 978-1-84973-960-3.
- Al Kanhal, H. A. 2010. Compositional, technological and nutritional aspects of dromedary camel milk. *International Dairy Journal*, 20, 811-821.
- Arboleya, S., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., Clara, G. & Gueimonde, M. 2011. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *International journal of food microbiology*, 149, 28-36.
- Azad, M. B., Konyaa, T., Maughan, H., Guttman, D. S., Field, C. J., Chari, R. S., Sears, M. R., Becker, A. B., Scott, J. A. & Kozyrskyj, A. L. 2013. Gut microbiota of healthy Canadian infants: profiles by mode of delivery and infant diet at 4 months. *Canadian Medical Association Journal*, 185, 385-394.
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y. & Zhang, H. 2010. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21, 695-701.
- Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M. & Raffatellu, M. 2013. Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3, a010074.

- Benmechernene, Z., Chentouf, H. F., Yahia, B., Fatima, G., Quintela-Baluja, M., Calo-Mata, P. & Barros-Velázquez, J. 2013. Technological aptitude and applications of *Leuconostoc mesenteroides* bioactive strains isolated from Algerian raw camel milk. *BioMed research international*, 2013.
- Boirivant, M. & Strober, W. 2007. The mechanism of action of probiotics. *Current opinion in gastroenterology*, 23, 679-692.
- Butel, M. J. 2014. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et maladies infectieuses*, 44, 1-8.
- Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vitali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., Rizzello, F., Campieri, M. & Brigidi, P. 2008. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *International journal of food microbiology*, 125, 286-292.
- Claesson, M. J., Cusack, S., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., de Weerd, H., Flannery, E., Marchesi, J. R., Falush, D., Dinan, T. & Fitzgerald, G. 2011. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4586-4591.
- Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W. & Knight, R. 2012. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148, 1258-1270.
- Culligan, E. P., Hill, C. & Sleator, R. D. 2009. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. *Gut pathogens*, 1, 19.
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M. & Richard-Forget, F. 2010. Lactic acid bacteria—Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food control*, 21, 370-380.
- Danova, S., Petrov, K., Pavlov, P. & Petrova, P. 2005. Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains involved in koumiss fermentation. *International journal of dairy technology*, 58, 100-105.

- De Vrese, M. & Offick, B. 2010. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *Bioactive Foods in Promoting Health*.
- Denbow, D. M. 2015. Gastrointestinal anatomy and physiology. *Sturkie's Avian Physiology (Sixth Edition)*. Elsevier.
- Derrien, M., Van Passel, M. W. J., Van de Bovenkamp, J. H. B., Schipper, R., DE VOS, W. & Dekker, J. 2010. Mucin-bacterial interactions in the human oral cavity and digestive tract. *Gut microbes*, 1, 254-268.
- Douglas, L. C. & Sanders, M. E. 2008. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *Journal of the American dietetic association*, 108, 510-521.
- Ebringer, L., Ferenčík, M. & Krajčovič, J. 2008. Beneficial health effects of milk and fermented dairy products. *Folia Microbiologica*, 53, 378-394.
- Elliott, W. H., Elliott, D. C. 2009. Biochemistry and molecular biology. 4th ed. Oxford University Press. New York. p. 568. ISBN: 978-0-19-922671-9.
- Gareau, M. G., Sherman, P. M. & Walker, W. A. 2010. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 7, 503-514.
- Gasbarrini, G., Bonvicini, F. & Gramenzi, A. 2016. Probiotics History. *Journal of clinical gastroenterology*, 50, S116-S119.
- Gourbeyre, P., Denery, S. & Bodinier, M. 2011. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of leukocyte biology*, 89, 685-695.
- Grajek, W. O. & Olejnik, A. 2004. Epithelial cell cultures in vitro as a model to study functional properties of food. *Pol J Food Nutr Sci*, 13, 5-24.
- Gritz, E. C. & Bhandari, V. 2015. The human neonatal gut microbiome: a brief review. *Frontiers in pediatrics*, 3, 17.

- Guinane, C. M. & Cotter, P. D. 2013. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 6, 295-308.
- Guo, C.-F., Zhang, S., Yuan, Y.-H., Yue, T.-L. & Li, J.-Y. 2015. Comparison of lactobacilli isolated from Chinese suan-tsai and koumiss for their probiotic and functional properties. *Journal of Functional Foods*, 12, 294-302.
- Gupta, V. & Garg, R. 2009. Probiotics. *Indian journal of medical microbiology*, 27, 202.
- Hemarajata, P. & Versalovic, J. 2013. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 6, 39-51.
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K. & Axelsson, L. 2012. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 153, 216-222.
- Johansson, M. E. V., Larsson, J. M. H. & Hansson, G. C. 2011. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host–microbial interactions. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108, 4659-4665.
- Johansson, M. E. V., Sjövall, H. & Hansson, G. C. 2013. The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 10, 352-361.
- Kadlec, R., Křížová, L., Halová, D. In vitro modely adherence probiotik – přehled [online]. *Mlékařské listy*. 2011 [cit. 2018-04-06]. Dostupné z <
http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2011/124_s_i-iii.pdf>
- Kaur, M., Singh, H., Jangra, M., Kaur, L., Jaswal, P., Dureja, C., Nandanwar, H., Chaudhuri, S. R., Raje, M. & Mishra, S. 2017. Lactic acid bacteria isolated from yak milk show probiotic potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 101, 7635-7652.
- Kim, Y. & Pritts, T. A. 2017. The gastrointestinal tract. *Geriatric Trauma and Critical Care*. Springer.

- 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. 800 s. ISBN: 978-80-247-3068-4.
- Konuspayeva, G., Faye, B. & Loiseau, G. 2009. The composition of camel milk: a meta-analysis of the literature data. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 95-101.
- Lata, J., Juránková, J. 2011. Střevní mikroflóra, slizniční bariéra a probiotika u některých interních chorob. *Interní medicína pro praxi*. 13(2). 63-69.
- Lin, D. C. 2003. Probiotics as functional foods. *Nutrition in clinical practice*, 18, 497-506.
- Liu, S.-N., Han, Y. & Zhou, Z.-J. 2011. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, 44, 643-651.
- McFarland, L. V. 2015. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60, S85-S90.
- McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P. & Florin, T. H. 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 265.
- Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P. V., Jain, S. & Yadav, H. 2012. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS microbiology letters*, 334, 1-15.
- Navrátilová, P., Borkovcová, I., Pospíšil, J., Nutriční a terapeutické vlastnosti kobyliho mléka [online]. *Mlékařské listy*. 2016 [cit. 2018-02-25]. Dostupné z <http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2016/158-159/veda_15816-19.pdf>.
- Ng, S. C., Hart, A. L., Kamm, M. A., Stagg, A. J. & Knight, S. C. 2009. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory bowel diseases*, 15, 300-310.
- Nikkhah, A. 2011. Science of camel and yak milks: human nutrition and health perspectives. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 667.
- O'Toole, P. W. & Jeffery, I. B. 2015. Gut microbiota and aging. *Science*, 350, 1214-1215.

- Panesar, P. S. 2011. Fermented dairy products: starter cultures and potential nutritional benefits. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 47.
- Parkers, G. C. 2007. An overview of probiotics and prebiotics. *Nursing standard*, 21, 43-47.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S. & Kim, H. Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology*, 100, 1171-1185.
- Pechar, R., Rada, V., Musilová, Š., Bunešová, V., Vlková, E., Kmet, V., Killer, J. Hodnocení probiotických výrobků společností pro probiotika a prebiotika [online]. *Mlékařské listy*. 2013 [cit. 2018-02-03]. Dostupné z http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2013/139_i-iv.pdf.
- Pontier, C., Pachot, J., Botham, R., Lenfant, B. & Arnaud, P. 2001. HT29-MTX and Caco-2/TC7 monolayers as predictive models for human intestinal absorption: Role of the mucus layer. *Journal of pharmaceutical sciences*, 90, 1608-1619.
- Quicgley, E. M. M. 2013. Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterology & hepatology*, 9, 560.
- Rahman, N., Xiaohong, C., Meiqin, F. & Mingsheng, D. 2009. Characterization of the dominant microflora in naturally fermented camel milk shubat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1941-1946.
- Rajilić-Stojanović, M., Smidt, H. & de Vos, W. M. 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environmental microbiology*, 9, 2125-2136.
- Rivera-Espinoza, Y. & Gallardo-Navarro, Y. 2010. Non-dairy probiotic products. *Food microbiology*, 27, 1-11.
- Rizzo, D. C. 2015. *Fundamentals of anatomy and physiology*, Cengage Learning.
- Rong, J., Zheng, H., Liu, M., Hu, X., Wang, T., Zhang, X., Jin, F. & Wang, L. 2015. Probiotic and anti-inflammatory attributes of an isolate *Lactobacillus helveticus* NS8 from Mongolian fermented koumiss. *BMC microbiology*, 15, 196.

- Salvetti, E., Torriani, S. & Felis, G. E. 2012. The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 4, 217-226.
- Sanders, M. E. 2008. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases*, 46, S58-S61.
- Sanders, M. E., Akkermans, L. M. A., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J. T., Hörmannspurger, G. & Huys, G. 2010. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut microbes*, 1, 164-185.
- Sekirov, I., Ruseell, S. L., Antunes, L. C. M. & Finlay, B. B. 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90, 859-904.
- Shah, N. P. 2007. Functional cultures and health benefits. *International dairy journal*, 17, 1262-1277.
- Shori, A. B. 2012. Comparative study of chemical composition, isolation and identification of micro-flora in traditional fermented camel milk products: Gariss, Suusac, and Shubat. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11, 79-88.
- Sun, Z., Liu, W., Gao, W., Yang, M., Zhang, J., Wu, L., Wang, J., Menghe, B., Sun, T. & Zhang, H. 2010. Identification and characterization of the dominant lactic acid bacteria from kurut: The naturally fermented yak milk in Qinghai, China. *The Journal of general and applied microbiology*, 56, 1-10.
- Tortora, G. J. & Derrickson, B. H. 2008. *Principles of anatomy and physiology*, John Wiley & Sons.
- Uccello, M., Malaguarnera, G., Basile, F., D'Agata, V., Malaguarnera, M., Bertino, G., Vacante, M., Drago, F. & Biondi, A. 2012. Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. *BMC surgery*, 12, S35.
- Van Tassell, M. L. & Miller, M. J. 2011. *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, 3, 613-636.
- Vasiljevic, T. & Shah, N. P. 2008. Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18, 714-728.

- Vieira, A. T., Teixeira, M. M. & Martins, F. S. 2013. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Frontiers in immunology*, 4.
- Vélez, M. P., de Keersmaecker, S. C. J. & Vanderleyden, J. 2007. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS microbiology letters*, 276, 140-148.
- Whitney, E. N., Rolfes, S. R. 2016. Understanding nutrition. 14th ed. Cengage Learning. Belmont, CA. p. 928. ISBN: 978-1-285-87434-0.
- Ya, T., Zhang, Q., Chu, F., Merritt, J., Bilige, M., Sun, T., Du, R. & Zhang, H. 2008. Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: a newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China. *BMC immunology*, 9, 68.
- Yu, J., Wang, W. H., Menghe, B. L. G., Jiri, M. T., Wang, H. M., Liu, W. J., Bao, Q. H., Lu, Q., Zhang, J. C. & Wang, F. 2011. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *Journal of dairy science*, 94, 3229-3241.
- Zbořil, V., Prokopová, L., Hertlová, M. 2005. Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti. Grada. Praha. 156 s. ISBN: 80-247-0584-2.
- Zhang, Y.-J., Li, S., Gan, R.-Y., Zhou, T., Xu, D.-P. & Li, H.-B. 2015. Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International journal of molecular sciences*, 16, 7493-7519.
- Zheng, Y., Lu, Y., Wang, J., Yang, L., Pan, C. & Huang, Y. 2013. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan kefir grains. *PloS one*, 8, e69868.

9 Seznam použitých zkratk

CRC	kolorektální karcinom (colorectal cancer)
CZ	Česká republika (Czech Republic)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization)
FBS	fetální bovinní sérum
GALT	střevní lymfatická tkáň (gut-associated lymphoid tissue)
GIT	gastrointestinální trakt
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HUGO	Organizace na výzkum lidského genomu (Human Genome Organization)
IBD	zánětlivé onemocnění střev (inflammatory bowel disease)
IBS	syndrom dráždivého tračníku (irritable bowel syndrome)
IgA	imunoglobulin A
IgG	imunoglobulin G
KTJ	kolonie tvořící jednotky
LAB	bakterie mléčného kvašení (lactic acid bacteria)
MALT	slizniční imunitní systém (mucosa-associated lymphatic tissue)
MRS	de Man, Rogosa and Sharp
MTX	methotrexát
MUB	mucus-binding protein
MUC	geny kódující membránové proteiny z řady mucinů
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina (ribosomal ribonucleic acid)
SD	směrodatná odchylka
UK	Spojené království (United Kingdom)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

10 Seznam použitých obrázků a tabulek

Obr. 1: Jednotlivé vrstvy gastrointestinálního traktu.....	4
Obr. 2: Buňky sekretující mucin a tvořící glykokalyxovou vrstvu.....	5
Obr. 3: Mikrobiální diverzita střevního mikrobiomu.	7
Obr. 4: Tvar <i>Lactobacillus</i> spp.	13
Obr. 5: Tvar <i>Bifidobacterium</i> spp.	14
Obr. 6: Grafické znázornění aderenčních schopností jednotlivých kmenů laktobacilů ke směsné kultuře složené z buněčných linií Caco-2 a HT29-MTX.....	31
Tab. 1: Složení mikrobioty GIT.....	7
Tab. 2: Nejčastěji používané druhy LAB v probiotických produktech.	12
Tab. 3: Příklady probiotických druhů obsažených ve vybraných produktech.....	21
Tab. 4: Průměrné složení mléka kobyliho, mateřského a kravského.....	23
Tab. 5: Průměrný obsah jednotlivých složek obsažených v Kumysu.....	24
Tab. 6: Statistické zhodnocení schopnosti adherence jednotlivých kmenů laktobacilů ke ko-kultuře složené z buněčných linií kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT29-MTX.....	31
Tab. 7: Vyjádření hodnot statisticky významných rozdílů mezi jednotlivými kmeny.	32