

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv extraktů z konopí na adhezi probiotik v *in vitro*
modelu**

Diplomová práce

Bc. Anežka Kopecká

Výživa a potraviny

Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

Konzultant: Ing. Barbora Lampová

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv extraktů z konopí na adhezi probiotik v *in vitro* modelu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ivo Doskočilovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za trpělivost, cenné rady při jejím zpracování a za profesionální vedení v laboratoři. Následně bych chtěla poděkovat Ing. Barboře Lampové za její čas, odborné konzultace týkající se dané problematiky a za pomoc při gramatické a stylistické kontrole práce.

Vliv extraktů z konopí na adhesi probiotik v *in vitro* modelu

Souhrn

Konopí (*Cannabis* spp.) je rostlina známá především pro své psychotropní účinky. Mimo to má ale i spoustu zdraví prospěšných lékařských účinků – využívá se při léčbě psychických onemocnění a má prokázané analgetické, antiemetické a antispatické účinky. Doposud však ale neexistují informace o interakci konopí s probiotiky v trávicím traktu, a to hlavně o jeho vlivu na adhesi probiotických bakterií. Adhese je nepostradatelnou antipatogenní vlastností probiotik, protože zabraňuje patogenním organismům přilnout ke střevní sliznici a následné kolonizaci střev.

Cílem této práce bylo otestovat schopnost vybraných extraktů konopí pocházejících z genotypu s pracovním názvem „McLove“ sklizených v 10. a 14. týdnu zralosti ovlivnit adhesi probiotických kmenů *L. gasseri*, *L. plantarum* a *L. reuteri* v *in vitro* buněčném modelu. Ke stanovení adhese byly využité buněčné linie Caco-2 a HT29, kdy na 95 % konfluentní monovrstvu byly přidány jednotlivé vzorky v testované koncentraci 50, 10 a 3 µg/ml společně s fluorescenčně značenými testovanými bakteriálními kmeny.

Průměrné hodnoty adhese se pohybovaly v rozmezí od 45,05 do 127,58 %. Pouze v 5 případech došlo ke zvýšení adhese. Jednalo se o *L. gasseri* na Caco-2 linií s extraktem konopí sklizeného v 10. týdnu o koncentraci 10 µg/ml, *L. reuteri* na HT29 s oběma extrakty konopí o shodné koncentraci 50 µg/ml a *L. plantarum* na obou liniích s konopím z 10. týdne s totožnou koncentrací 10 µg/ml. Průměrně docházelo k vyšší adhesi u konopí sklizeného v 10. týdnů než u konopí o stáří 14. týdnů, což je zapříčiněno odlišným stupněm zralosti, kdy s rostoucím stářím rostliny klesá i obsah fenolických látek a terpenů.

Z dosažených výsledků lze tvrdit, že hypotéza byla potvrzena, a konopí má významný vliv na adhesi probiotik.

Klíčová slova: Bakterie mléčného kvašení; *Lactobacillus gasseri*; *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus reuteri*; intestinální model; fluorescence

The effect of cannabis extracts on the adhesion of probiotic microorganisms *in vitro*

Summary

Cannabis spp. is a plant known mainly for its psychotropic effects. However, it also has many health benefits – it is used in the treatment of mental illness and has proven analgesic, antiemetic and antispasmodic effects. Nevertheless, there is still no information about the interaction of cannabis with probiotics in the digestive tract, especially its effect on the adhesion of probiotic bacteria. Adhesion is an essential antipathogenic property of probiotics because it prevents pathogenic organisms from adhering to the intestinal mucosa and subsequent colonisation of the gut.

The aim of this thesis was to test ability selected cannabis extracts from the genotype with the work title "McLove" harvested at 10 and 14 weeks of maturity to affect the adhesion of probiotic strains *L. gasseri*, *L. plantarum* and *L. reuteri* in an *in vitro* cell model. The Caco-2 and HT29 cell lines were used to determine adhesion by adding single samples at the tested concentrations of 50, 10 and 3 µg/ml together with fluorescently labelled test bacterial strains to a 95% confluent monolayer.

The average adhesion values ranged from 45.05 to 127.58%. In 5 cases was the adhesion increased. These were *L. gasseri* on the Caco-2 line with cannabis extract harvested at week 10 at a concentration of 10 µg/ml, *L. reuteri* on HT29 with both cannabis extracts at the same concentration of 50 µg/ml and *L. plantarum* on both lines with cannabis from week 10 at the identical concentration of 10 µg/ml. Higher adhesion occurred with the cannabis harvested at 10 weeks than with the 14-week-old cannabis, which is due to the different maturity stage, where the phenolic and terpene content decreases with increasing plant age.

Achieved results can confirmed that the hypothesis was true, and *Cannabis* spp. has a significant effect on the adhesion of probiotics.

Keywords: Lactic acid bacteria; *Lactobacillus gasseri*; *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus reuteri*; intestinal model; fluorescence

Obsah

1	Úvod	7
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3	Literární rešerše	9
3.1	Trávicí soustava	9
3.2	Střevní mikrobiota	10
3.3	Probiotika.....	12
3.3.1	Funkce probiotik.....	13
3.3.2	Významné druhy probiotik	15
3.3.3	Rod <i>Lactobacillus</i>	15
3.4	Mechanismy působení probiotik.....	17
3.4.1	Adhese	18
3.5	Konopí	21
3.5.1	Životní cyklus rostliny.....	22
	Fáze růstu	22
	Fáze kvetení.....	23
	Sklizeň konopí.....	24
3.5.2	Léčebné využití konopí.....	24
3.5.3	Legislativa používání konopí v ČR	24
3.6	Biologicky aktivní látky v konopí	25
3.6.1	Kanabinoidní sloučeniny	25
	Δ^9 -tetrahydrokanabinol (THC).....	26
	Kanabidiol (CBD).....	27
	Kanabigerol (CBG).....	28
3.6.2	Fenoly	28
3.6.3	Terpeny.....	29
3.7	Konopí a probiotika	29
4	Metodika.....	31
4.1	Materiál.....	31
4.2	Metoda.....	31
4.2.1	Příprava testovaných extraktů konopí.....	31
4.2.2	Kultivace buněčných linií.....	31
4.2.3	Založení 96-jamkové destičky	32
4.2.4	Příprava bakteriální suspenze	32
4.2.5	Testování adhese.....	32
4.2.6	Statistická analýza	33
5	Výsledky.....	34
5.1	Stanovení adhese <i>L. gasseri</i>	34
5.2	Stanovení adhese <i>L. reuteri</i>	35
5.3	Stanovení adhese <i>L. plantarum</i>	36
5.4	Porovnání adhese jednotlivých laktobacilů	36
6	Diskuze	41
7	Závěr.....	45
8	Literatura	46
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	56

1 Úvod

Marihuana, kanabis, tráva – všechny tyto názvy jsou alternativními pro rostlinu známou především jako konopí seté (*Cannabis sativa L.*). Konopí je známé pro své rekreační využití, kdy je využíváno jeho psychotropního efektu, což ho ve spoustě zemích činí nelegálním. Česká republika není výjimkou a jeho pěstování je zde regulováno Zákonem č. 366/2021 Sb. O návykových látkách.

Konopí ovšem není pouze omamná látka, ale i rostlina využívaná v ekologii, agronomii, průmyslu nebo v lékařství. Tato rostlina totiž obsahuje více než 1400 přírodních látek, z nichž nejvíce prostudovány jsou kanabinoidy Δ^9 -tetrahydrokanabinol (THC) a kanabidiol (CBD). THC člověku navozuje pocit dobré nálady a halucinace a stává se tak důvodem, proč je na něm člověk závislý. Je však zaznamenáno ale i množství cenných účinků – analgetický, antispatický, antiemetický a využívá se při léčbě depresí, Alzheimerovy choroby a dalších. CBD je další významná látka konopí, která na rozdíl od THC nejeví známky psychoaktivních účinků. CBD se vykazuje anxiolytickými, antipsychotickými, antischizofrenními, antiavertivními, protizánětlivými, antioxidačními a dalšími četnými zdraví prospěšnými účinky.

V současnosti je již známo mnoho účinků konopí na lidské zdraví. Doposud se ale nikdo nezabýval interakcí konopí po kontaktu s probiotiky v trávicím traktu. Na základě dostupných studií o vlivu biologicky aktivních látek na adhezi probiotik na in vitro modely trávicího traktu. Předpokládáme tak, že i námi testované vzorky konopí budou mít pozitivní vliv na adhezi námi testovaných kmenů laktobacilů.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Užívání léčebného konopí má významný vliv na zvýšení adheze bakterií mléčného kvašení na buňky gastrointestinálního traktu.

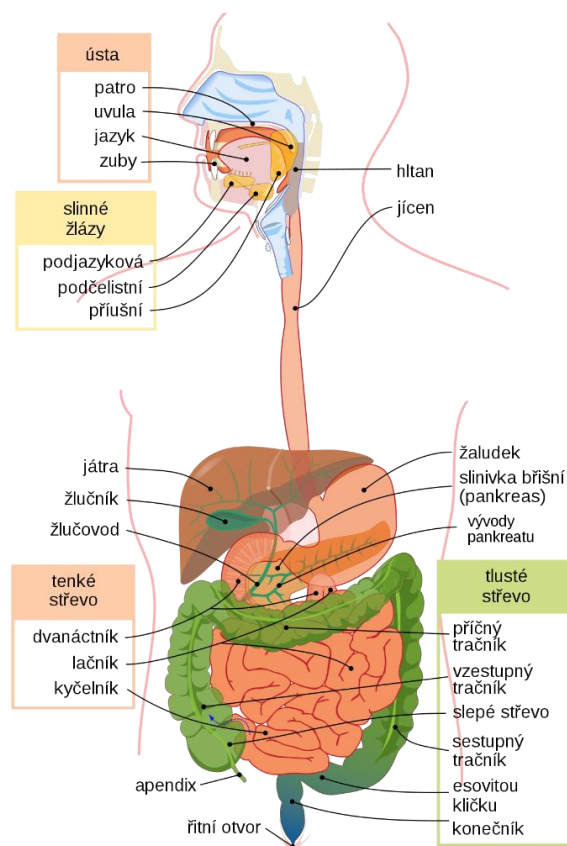
Cílem práce je otestovat vybrané extrakty z konopí v rozdílném stupni zralosti na jejich schopnost ovlivňovat adhezi probiotik v *in vitro* buněčném modelu.

3 Literární rešerše

3.1 Trávicí soustava

Trávicí soustava je zcela nepostradatelnou součástí lidského organismu. Základní funkcí trávicího traktu je příjem potravy, její rozmělnění a následný transport do orgánů se schopností živiny z potravy trávit a absorbovat nebo v opačném případě vyloučit (Liao et al. 2009; Reed & Wickham 2009; Cheng et al. 2010). Dochází zde také ke zprostředkování imunologické obrany proti působení nežádoucích látek (Cheng et al. 2010).

Výše zmíněných životně důležitých poslání je dosaženo na základě funkcí jednotlivých orgánů gastrointestinálního traktu (GIT) (viz Obrázek 1), a to konkrétně dutiny ústní, hltanu, jícnu, žaludku, tenkého střeva a tlustého střeva (Rehfeld & Nylander & Karnovova 2017 (I)). GIT je navíc doplněn o pomocné trávicí struktury, kam řadíme jazyk, zuby, slinné žlázy, játra, žlučník a slinivku břišní (Rehfeld & Nylander & Karnovova 2017 (II)). Všechny tyto orgány zaujímají plochu 150–200 m² a plní svoji specifickou funkci. Zuby a jazyk pomáhají mechanickému trávení potravy. Žaludek a tenké střevo jsou odpovědné za chemické trávení základních živin (sacharidů, lipidů a proteinů) a jejich vstřebávání v nejjednodušší možné formě jako monosacharidy, mastné kyseliny a aminokyseliny. V tlustém střevě naopak dochází k zahuštění a zhutnění potravy a jejímu následnému skladování či vyloučení jejich nestravitelných zbytků (Cheng et al. 2010). Tlusté střevo navíc řadíme k orgánům, které jsou nejhustěji osídleny střevní mikrobiotou a má funkci resorpce vody a elektrolytů a produkce vitamínu K a B (Tojo 2014).



Obrázek 1: Trávicí soustava člověka (Mariana Ruiz. 2006).

3.2 Střevní mikrobiota

Střevní mikrobiota každého jedince je unikátní systém (Behnsen et al. 2013) a ovlivňuje řadu metabolických a fyziologických procesů v organismu (Cani et al. 2013; Tojo 2014). Jedná se o funkce související s výdejem energie a homeostázou organismu, ale může také napomáhat imunitnímu systému a působit jako bariéra proti patogenním organismům a toxickým látkám. Na základě těchto funkcí je často považována za aktivně funkční orgán (Tojo 2014). V celém organismu včetně GIT dominuje celkovými počty mikroorganismů tlusté střevo, které obývá přibližně 10^{10} – 10^{12} kolonií tvořících jednotek (KTJ)/ml (Behnsen et al. 2013), což odpovídá přibližně 1,5-2 kg lidské hmotnosti (Tojo 2014). Celková střevní mikrobiota pak svými počty přesahuje hodnotu 10^{14} KTJ/ml bakterií (Behnsen et al. 2013). Celý ekosystém disponuje vysokou rozmanitostí a zahrnuje nejméně 1000 různých druhů mikroorganismů a představuje více než $150\times$ větší množství genů než lidský genom (Fruhauf 2017). Nachází se zde různorodá mikrobiální populace zahrnující bakterie, viry (bakteriofágy), houby, kvasinky, methanogenní *Archea* a prvoky. Hojně zastoupeny jsou převážně striktně anaerobní bakterie, kdy se jedná především o zástupce z řad *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* a *Verrucomicrobia* (Tojo 2014).

Osídlení střev mikrobiotou začíná po porodu jedince. Do té doby je obsah střev sterilní (Biasucci et al. 2010; Tojo 2014; Rinninella et al. 2019). Velký vliv na složení mikrobioty má doba těhotenství, délka a způsob porodu, věk, antibiotická léčba, nemocniční hygiena a typ výživy (Musilová et al. 2015). Děti narozené přirozenou cestou, vaginálně, jsou ihned kolonizovány organismy vaginální mikrobioty jejich matky (Biasucci et al. 2010), s dominujícími druhy *Lactobacillus* a *Prevotella* (Hasan & Yang 2019). Naopak novorozenci narození pomocí císařského řezu, jsou kolonizováni mikrobiotou vnějšího prostředí (pokožka matky apod.) a mají nižší počet bifidobakterií (viz Tabulka 1) (Biasucci et al. 2010). Kolonizace střeva laktobacily a bifidobakteriemi u kojenců narozených císařským řezem může začít až po 10 dnech, respektive po 1 měsíci (Musilová et al. 2015). Vysoké rozdíly v druhovém složení střevní mikrobioty kojenců má na svědomí i způsob krmení (Rinninella et al. 2019). Matky dětí narozených císařským řezem mají opožděný nástup laktace, s čímž souvisí i nutriční vliv na střevní mikrobiotu kojence, kdy nedostatečné podpoření mikrobiomu mateřským mlékem (Biasucci et al. 2010), tedy nedostatek bifidobakterií a nadměra klostridií (Musilová et al. 2015), může vést k dlouhodobým následkům (Biasucci et al. 2010), jako jsou například chronické poruchy imunity, astma, artritida či zánětlivá onemocnění střev. Strava těchto kojenců bývá často doplněna o umělou výživou a dominujícími druhy jejich střevní mikrobioty jsou *Escherichia coli* a *Clostridium difficile*. Naopak u dětí kojených mateřským mlékem je spatřována střevní mikrobiota s rozmanitějším a komplexnějším osídlením rodem *Bifidobacterium* a současně nižšími počty jedinců druhu *C. difficile* a *E. coli*. Podle Rinninella et al. (2019) lze tedy tvrdit, že dítě, které je kojené vyváženou mikrobiotou mateřského mléka a narodilo se vaginální cestou, je považováno za zcela zdravé.

Tabulka 1: Rozdíly v mikrobiotě na základě typu porodu (Biasucci et al. 2012, Hasan & Yang 2019)

Vaginální porod	Císařský řez
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Propionibacterium</i> spp.
<i>Staphylococcus</i>	
<i>Bacteroides fragilis</i>	
<i>Streptococcus</i>	
<i>Prevotella</i>	
<i>Lactobacillus</i>	

Značné změny ve složení střevní mikrobioty jsou způsobené přechodem na pevnou stravu. Mikrobiota kojených dětí a dětí s krmených umělou výživou začíná od této chvíle dostávat jednotnou podobu. Potraviny s vysokým obsahem vlákniny a sacharidů mají u dětí na svědomí nárůst zástupců kmenů *Firmicutes* a *Prevotella*, zatímco potraviny s obsahem živočišných bílkovin způsobí nárůst jedinců patřících ke kmenu *Bacteroides*. Ve věku 1 roku je dětská mikrobiota charakteristická řadou druhů zahrnující převážně *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Clostridium coccooides* spp. a *Clostridium botulinum* spp. (Rinninella et al. 2019).

Střevní mikrobiota se stává zcela stabilní při dosažení věku 3 let a začíná se složením a rozmanitostí nejvíce podobat té dospělé. Dominantními kmeny mikrobioty dospělého jedince jsou *Firmicutes* (*Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae*), *Bacteroidetes* (*Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* a *Rikenellaceae*), a *Actinobacteria* (*Bifidobacteriaceae* a *Coriobacteriaceae*) (Tojo 2014). K dalším výraznějším změnám v různorodosti střevní mikrobioty může dojít až u osob starších 70 let, což může být ovlivněno změnami trávení a vstřebávání živin či slabostí imunitního systému (Rinninella et al. 2019).

Střevní mikrobiota není ovlivněna pouze způsobem porodu, má na ní vliv řada dalších vnitřních a vnějších faktorů (Sarkar et al. 2016; Tojo 2014). Zásadní vliv na kvantitativní i kvalitativní složení mikrobioty má věk, strava, hodnota pH, způsob životního stylu, léčba antibiotiky (Sarkar et al. 2016) nebo dlouhotrvající léčba chronických onemocnění (Tojo 2014), dále také onemocnění typu obezita, diabetes, autoimunitní onemocnění a kardiovaskulární onemocnění (např. hypertenze). Na složení mikrobioty má také vliv celkový imunologický stav hostitele, interakce jednotlivých složek mikrobioty nebo dostupnost fermentovatelného materiálu ve střevech (Hasan & Yang 2019).

Střevní mikrobiota plní řadu důležitých funkcí, které mají podstatný význam pro lidské zdraví. Velmi důležitou schopností je stimulace imunitního systému (Biasucci et al. 2010; Behnsen et al. 2013; Tojo 2014; Derrien et al. 2019). Mikrobiota totiž působí jako antiinfekční bariéra, jelikož inhibuje přilnutí (adhesi) patogenů, a tak i jejich kolonizaci a produkci toxických metabolitů (Biasucci et al. 2010; Behnsen et al. 2013; Tojo 2014; Lazar et al. 2018). Kromě bariérové funkce je střevní sliznice účinná při asimilaci antigenu, což je nezbytné pro vyvolání specifických imunitních odpovědí. Ochrana proti infekčním agens je doplněna lymfatickými tkáněmi, které jsou považovány za největší imunitní orgán (Markowiak & Slizewska 2017). Nenahraditelnou funkcí střevní mikrobioty je fermentace rozpustné vlákniny, jejíž výsledkem je vytvoření mastných kyselin s krátkým řetězcem (short chain fatty acids, SCFA), konkrétně se jedná o butyrát, acetát a propionát

(Biasucci et al. 2010; Behnsen et al. 2013; Tojo 2014; Lazar et al. 2018). SCFA jsou organické kyseliny s jedním až šesti atomy uhlíku v acylovém řetězci, jsou rozpustné ve vodě a snadno se vstřebávají. Přírodně se nachází v ovoci, zelenině a mléčných tucích (Russell 2011). Mají protizánětlivé účinky a výrazně inhibují proliferaci rakovinných buněk. Konkrétně butyrát významně podporuje homeostázu v tlustém střevě, jelikož tvoří primární zdroj energie prokolonocyty. Mikrobiota GIT se dále podílí na tvorbě a skladování energie (Biasucci et al. 2010; Behnsen et al. 2013; Tojo 2014; Lazar et al. 2018). Mimo to je zodpovědná za homeostázu glukózy a lipidů (Cani et al. 2018). Za zmínku stojí rovněž syntéza vitaminů B1, B2, B5, B6, B12, K, listové kyseliny a biotinu druhy *Bacteroides fragilis* a *E. coli* (Biasucci et al. 2010; Lazar et al. 2018).

Všechny výše zmíněné funkce jsou dány mezidruhovou rovnováhou střevní mikrobioty známou pod názvem eubióza. Při porušení eubiózy dochází k dysbióze, která bývá klíčovým faktorem při vzniku infekčních i neinfekčních onemocnění (Lazar et al. 2018). Nerovnováha a nestabilita se týká kvantitativních i kvalitativních změn ve střevní mikrobiotě, její metabolické aktivity a lokální distribuce. Často následně dochází ke gastrointestinálním problémům, kterými mohou být zánětlivá onemocnění střev, kolorektální karcinom, či syndrom dráždivého tračníku (Tojo 2014). Nedostatečná stimulace imunitního systému mikrobiotou může mít pak za následek diabetes I. typu, obezitu, aterosklerózu, atopii, nealkoholické tučnění jater nebo revmatoidní artritidu (Lazar et al. 2018).

Pro nápravu dysbiózy, tedy zlepšení střevního profilu se využívají jako součást lidské stravy probiotika (Behnsen et al. 2013).

3.3 Probiotika

Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které při správném podávání poskytují pozitivní účinek na zdraví hostitelského organismu (Behnsen et al. 2013; Singh et al. 2013; Sanders 2018; WHO & FAO 2006).

Eli Metchnikoff, ruský nositel Nobelovy ceny, jako první prohlásil, že lze upravit naši střevní mikrobiotu nahrazením škodlivých mikrobů těmi užitečnými (Behnsen et al. 2013; WHO & FAO 2006; George Kelly et al. 2018). Spolu s francouzským vědcem Henrym Tissierem navrhli využití látek produkovaných mikroorganismy jako potravinový doplněk zlepšující střevní mikrobiotu. Samotný termín probiotikum byl však poprvé použit a definován až později Havenaarem a Huis in 't Veldem (WHO & FAO 2006; George Kelly et al. 2018).

Účinné probiotikum musí být bezpečné pro smýšlené využití. Bezpečnost probiotik zahrnuje faktory patogenity, infekčnosti, virulence zahrnující toxicitu a metabolickou aktivitu. Probiotikum je navrženo tak, aby splňovalo schopnost adheze k hostitelské epiteliální tkáni, odolnost vůči tělním tekutinám a toleranci žluči, schopnost odstanění nebo alespoň snížení patogeních organismů, výrobu prospěšných látek a zlepšení složení střevní mikrobioty (Nandyopadhyay & Mandal 2014). Neexistuje však žádná konkrétní definice požadavků na jejich výše zmíněné vlastnosti nebo schopnost vyrovnat se s aktuální střevní mikrobiotou člověka. Není definován ani konkrétní zdroj probiotického kmene a složení probiotika (Sanders 2018). Probiotikum by mělo mít příznivý účinek na hostitele, zároveň by mělo obsahovat velké množství životaschopných buněk, mělo by přežít průchod a metabolismus

ve střevech, skladování a používání a současně by mělo mít v pořádku senzorní vlastnosti (Nandyopadhyay & Mandal 2014).

3.3.1 Funkce probiotik

Užívání probiotik má četné přínosy pro zdraví jedince. Používají se při prevenci a léčbě nemocí a různých zdravotních stavů (Biasucci et al. 2010; Singh et al. 2013; George Kelly et al. 2018). Jedná se často o využití jejich antidiabetických, protizánětlivých, protinádorových, antialergických a angiogenních vlastností. Dalším z benefitů užívání probiotik je významný účinek na celou centrální nervovou soustavu (CNS) včetně mozku (Singh et al. 2013; George Kelly et al. 2018). Často se také používají při snižování vedlejších účinků antibiotik, při prevenci zubního kazu a dalších periodontálních chorob (Singh et al. 2013).

Antipatogenní aktivita probiotik je považována za jejich nejpříznivější vlastnost. Bylo zjištěno, že vliv probiotik na druhy *Salmonella enterica*, *Serovar typhimurium* a *C. difficile* jim umožňuje produkci SCFA, kterými jsou octová kyselina (acetát), propionová (propionát), máselná (butyrát) a mléčná (laktát), které slouží jako ochrana proti patogenům. SCFA zároveň pomáhají udržovat vhodné pH střev, které je nezbytné pro produkci bakteriálních enzymů. Dalšími mikrobiálními látkami produkovanými probiotiky s těmito prospěšnými účinky jsou bakteriociny, ethanol, organické kyseliny, acetaldehydy, peptidy, diacetyl a peroxid vodíku. Peptidy a bakteriociny se podílejí na zvýšení permeability membrány cílových buněk, což nakonec vede až k buněčné smrti. Kromě produkce těchto sloučenin přímo ovlivňují patogeny, jelikož stimulují antipatogenní obranné dráhy, které produkují defensin (George Kelly et al. 2018) a současně s nimi soutěží o vazebné místo, které pro patogeny slouží jako zdroj živin a růstu (Behnsen et al. 2013; Singh et al. 2013; George Kelly et al. 2018).

Probiotika jsou hojně využívána při léčbě antibiotiky (Ubeda & Pamer 2012). Termíny probiotika a antibiotika pochází z řečtiny a dají se volně přeložit do češtiny jako fráze „pro život“, resp. „proti životu“ (WHO & FAO 2006; Behnsen et al. 2013; George Kelly et al. 2018). Podávání antibiotik je zodpovědné za změnu složení střevní mikrobioty a tím i ovlivnění imunitního systému vedoucí v některých případech až k nepříznivým účinkům na zdraví. Antibiotickými změnami v mikrobiotě mohou být podporovány virové a bakteriální infekce nebo alergie. Některé ze změn v mikrobiotě a imunitě způsobené používáním antibiotik lze obnovit právě podáním probiotických bakterií nebo bakteriálních ligandů (Ubeda & Pamer 2012).

Antidiabetická aktivita probiotik se dá vysvětlit tím, že ve střevní mikrobiotě není optimální poměr počtů mezi kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes*, což koreluje s koncentrací glukózy v krevní plazmě. Tyto změny v mikrobiomu zároveň zvyšují invazi oportunních patogenů, které jsou odolné oxidačnímu stresu a jsou schopné redukovat sulfáty a inhibovat růst bakterií produkujících butyrát (George Kelly et al. 2018).

Crohnova choroba a ulcerózní kolitida patří k nejčastěji indikovaným chronickým zánětlivým onemocněním střev (IBD). Na základě četných výzkumů bylo zjištěno, že velkou roli v těchto onemocněních má opět nerovnováha střevní mikrobioty (Tojo 2014; George Kelly et al. 2018). Jsou prokázány kvalitativní i kvantitativní změny ve složení mikrobioty. Jedná se především o ztrátu anaerobních bakterií, dočasnou nestabilitu s nadměrným či naopak nedostatečným zastoupením některých druhů. Při ulcerózní kolitidě byl

zjištěn nadbytek bakterií z rodu *Desulfovibrio*, který má schopnost generovat sulfidy. Crohnova choroba se projevuje nedostatečným množstvím druhu *Faecalibacterium prausnitzii*, který je známý pro své protizánětlivé vlastnosti (Tojo 2014). Tyto choroby jsou obecně spojovány se zhoršenou produkcí SCFA, zejména acetátu, propionátu a butyrátu, které mají významné protizánětlivé účinky a zlepšují propulzní funkci tlustého střeva (Tojo 2014; George Kelly et al. 2018). Nejčastěji jsou k léčbě IBD využívané bakterie rodů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterobacter* a druh *E. coli* (Behnsen et al. 2013; George Kelly et al. 2018).

Nádorová onemocnění jsou velmi vážná a těžce léčitelná (George Kelly et al. 2018) a jsou silně ovlivněna genetickými faktory. Určitou roli při vzniku nádorových onemocnění představují rovněž nepříznivé vnější faktory prostředí. Předpokládá se, že nepřetržitě vystavení sliznice tlustého střeva mikroorganismům a jejich metabolitům vede až ke karcinogenezi. Metabolity, podílející se na karcinogenezi kolorektálního karcinomu, participují na tvorbě acetaldehydu a reaktivních forem kyslíku, na desulfuraci žlučových kyselin, produkci sirovodíku, sekundární transformaci žlučových solí, produkci aglykonů z inaktivovaných škodlivých sloučenin, bakteriální β -glukuronidázy a na produkci aromatických aminů azoreduktázami a nitroreduktázami (Tojo 2014). V posledních letech se objevují možnosti využití probiotik jako jeden ze způsobů léčby. Studie (Kahouli et al. 2015) prokázala, že probiotický kmen *Lactobacillus fermentum* NCIMB-5221 a-8829 má vysokou schopnost potlačit vznik buněk kolorektálního karcinomu a zároveň podporuje růst přirozených buněk epitelu tlustého střeva a produkci organismem žádaných SCFA. Probiotické kmeny *Lactobacillus acidophilus* LA102 a *Lactobacillus casei* LC232 rovněž vykazují výrazné cytotoxické aktivity s *in vitro* antiproliferativní aktivitou proti dvěma buněčným liniím kolorektálního karcinomu Caco-2 a HRT-18 (George Kelly et al. 2018).

V současnosti se zvažují prospěšné účinky probiotik při léčbě alergických onemocněních. *In vitro* studie Song et al. 2016 vztahující se k druhu *Lactobacillus plantarum* L67 ukázala potenciál k jeho použití při prevenci nežádoucích zdravotních poruch souvisejících s alergiemi, a to produkcí interleukinu-12 a interferonu- γ v hostiteli. Také druh *L. plantarum* 06CC2 významně zmírňuje alergické příznaky snížením hladiny celkového i specifického imunoglobulinu E, ovalbuminu a histaminu (George Kelly et al. 2018).

Angiogeneze je nezbytný proces novotvorby krevních kapilár. Jedná se o proces hojení ran zprostředkovaný formou buněčných odpovědí k regeneraci poškozených tkání (Cheng et al. 2013). Účinnými jsou nepatogenní probiotické kvasinky druhu *Saccharomyces boulardii*, které chrání před poraněním a zánětem střev. Molekulární mechanismy, kterými probiotika zprostředkovávají tyto příznivé účinky, však zůstávají stále nejasné (George Kelly et al. 2018).

Studie George Kellyho et al. 2018 se v poslední době věnovala objasnění vlivu střevní mikrobioty na CNS. Jedná se o osu účinku „mikrobiota-střeva-mozek“, kde funguje obousměrná komunikace. Aplikace probiotik ukázala pozitivní účinky převážně u dětí s poruchou autistického spektra (druhy *Lactobacillus helveticus* R0052 a *Bifidobacterium longum* R0175) (Umbrello & Esposito 2016), u pacientů trpících syndromem chronické únavy (druh *L. casei*) nebo při potlačení úzkostí a depresí (*Lactobacillus brevis* DPC6108 a *Bifidobacterium dentium*) (George Kelly et al. 2018).

3.3.2 Významné druhy probiotik

Mikroorganismy používané jako probiotika jsou nejčastěji bakterie, které se přirozeně nachází v našem gastrointestinálním traktu. Zpravidla se jedná o druhy z rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* a rod kvasinek *Saccharomyces*. Mimo to jsou významnými probiotiky bakterie rodu *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Streptococcus* (viz Tabulka 2) (George Kelly et al. 2018). Poslední zmíněné kmeny se většinou v potravinách přirozeně nenachází a konzumují se proto ve formě tzv. doplňků stravy. K dosažení kladných účinků probiotik musí být dodrženy pokyny pro výběr správných kmenů a jejich dávkování (Douglas & Sanders 2008).

Tabulka 2: Významné druhy bakterií využívaných jako probiotika

Probiotické bakteriální rody	Zúčastněné druhy
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. bulgaricus</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. jensenii</i> , <i>P. freudenreichii</i>
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. productus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. laterosporus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. plantarum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. sanguis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>S. salivarius</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i> , <i>B. catenulatum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. bifidum</i>
<i>Bacteroides</i>	<i>B. uniformis</i>
<i>Akkermansia</i>	<i>A. muciniphila</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i>

3.3.3 Rod *Lactobacillus*

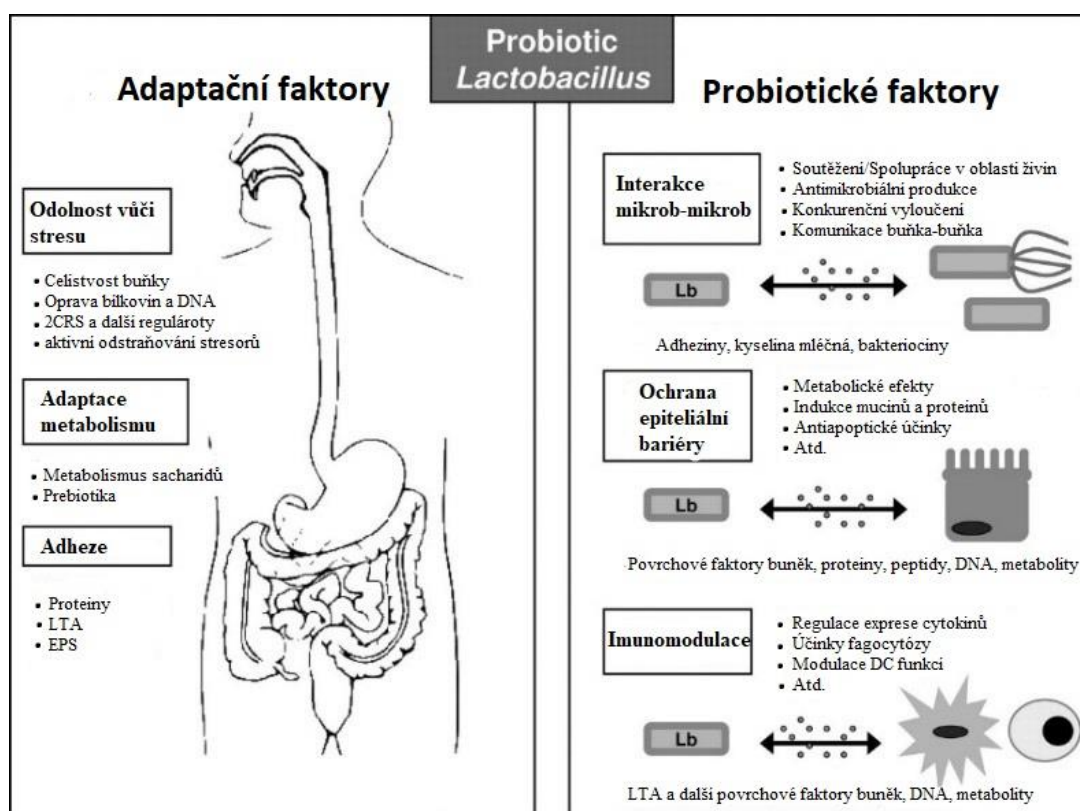
Rod *Lactobacillus* zahrnuje početnou heterogenní skupinu grampozitivních a nesporulujících bakterií tyčinkovitého tvaru (Lebeer et al. 2008; Salvetti et al. 2012), které jsou důležitou součástí běžné lidské mikrobioty. Většina druhů laktobacilů jsou fakultativně anaerobní (Kumar & Kumar 2015). Růstová teplota laktobacilů se pohybuje v hodnotách mezi 2 až 53 °C a pH v rozmezí od 3 do 8 (Salvetti et al. 2012). Řadíme je k bakteriím mléčného kvašení (BMK), protože konečným produktem metabolismu sacharidů je mléčná kyselina – laktát (Lebeer et al. 2008; Salvetti et al. 2012). Vedlejšími produkty metabolismu BMK jsou acetát, ethanol, CO₂, mravenčí kyselina a jantarová kyselina (Salvetti et al. 2012).

Taxonomicky rod *Lactobacillus* řadíme do kmene *Firmicutes* (Lebeer et al. 2008; Salvetti et al. 2012), třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales*, čeledě *Lactobacillaceae* (Lebeer et al. 2008).

Druhy osidlující lidské tělo dělíme na původní autochtonní laktobacily, např. *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, *L. reuteri* a cizí alochtonní laktobacily, např. *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus johnsonii*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. plantarum* a další (Lebeer, 2008).

Laktobacily jsou výživově náročné a vyžadují pro růst komplexní média obsahující sacharidy, aminokyseliny, peptidy, mastné kyseliny a jejich estery, vitaminy a soli (Lebeer et al. 2008; Salvetti et al. 2012).

Laktobacily v těle zastávají 3 základní funkce. Jedná se konkrétně o inhibici patogenů a obnovu mikrobiální homeostázy prostřednictvím interakcí mikrob-mikrob, zlepšení funkce epiteliální bariéry, a nakonec zahrnuje modulace imunitních odpovědí. Optimální a životu prospěšné aktivity laktobacilů jsou zprostředkovávány dvěma základními faktory: adaptačními a probiotickými (viz Obrázek 2) (Lebeer et al. 2008).



Obrázek 2: Adaptační a probiotické faktory rodu *Lactobacillus* (Lebeer et al. 2008).

Adaptační faktory zahrnují prospěšné činnosti bakterií, kterými jsou funkce spojené s odolností proti stresu, aktivním metabolismem přizpůsobeným prostředí hostitele a přilnavostí ke střevní sliznici a hlenu. Probiotické faktory proti adaptačním obsahují tři základní mechanismy probiotického působení. Jedná se konkrétně o udržování mikrobiální rovnováhy, ochranu epitelu a imunomodulaci. Znalost těchto vlivů a mechanismů působení pomáhá odborníkům určit optimální frekvenci, dávku a způsob podání potenciálního probiotika *Lactobacillus* (Lebeer et al. 2008).

Lactobacillus spp. mají pro lidský organismus rozsáhlé zdravotní účinky. Nejširší využití mají pro léčbu a prevenci enterických infekcí a postantibiotických syndromů (Kumar & Kumar 2015). Vysoké množství metaanalýz (McFarland 2007) prokázalo účinnost některých laktobacilů při akutním infekčním průjmu a při prevenci průjmů souvisejících

s antibiotiky. Slibné výsledky účinku působení bakterií se projevují také v oblasti prevence aIBD, v prevenci onemocnění kolorektálním karcinomem a při léčbě syndromu dráždivého tračníku. Mimo GIT existují důkazy o pozitivních účincích při prevenci a léčbě urogenitálních onemocnění, bakteriální vaginózy žen, atopických chorob, přecitlivělosti na potraviny a při prevenci vzniku zubního kazu. Výše jmenovaných pozitivních vlastností na lidský organismus je dosaženo bakteriální produkcí metabolitů, které inhibují růst patogenních organismů, nebo produkcí antimikrobiálních látek tzv. bakteriocinů. Bakteriociny jsou malé bílkoviny mající toxické účinky na patogenní bakterie, které jsou pro lidský organismus škodlivé (Slattery 2019). Antipatogenní účinky laktobacilů se dají vysvětlit pomocí adheze (Kadlec & Jakubec 2014).

Probiotické laktobacily mají na základě pozitivních výsledků na lidské zdraví vysoký bezpečnostní profil a jejich tolerance je obvykle vynikající. Problém může nastat ojediněle při podávání probiotických laktobacilů pacientům s oslabenou imunitou nebo s diagnostikovaným velmi vážným onemocněním. V těchto případech může dojít k infekci probiotickými bakteriemi (Lebeer et al. 2008; Donor & Snyderman 2015). Třemi nejčastějšími infekcemi způsobenými laktobacily jsou endokarditida, bakteriemie a lokalizované infekce, kterými jsou například abscesy (Doron & Snyderman 2015).

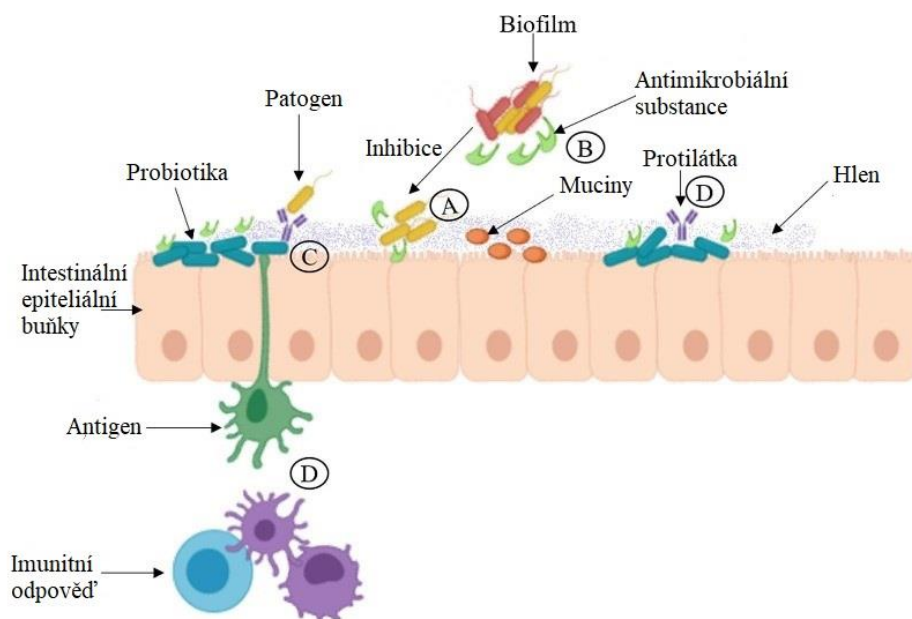
V potravinářství je rod *Lactobacillus* naprosto nezbytný při výrobě fermentovaných potravin (Lebeer et al. 2008; Salvetti et al. 2012). Tento fakt poprvé zaznamenal Elie Metchnikoff, který konstatoval, že fermentovaná mléka obsahující zástupce rodu *Lactobacillus* mají pozitivní vliv na zdravý život bulharských rolníků (Mackowiak 2013). Laktobacily se v současnosti běžně používají k fermentaci všedních potravin, jako jsou jogurty, sýry, nakládaná zelenina, zelí a kváskový chléb. Fermentací vzniká kyselina mléčná, která způsobuje pokles pH, jehož důsledkem je inhibice růstu hnilobných a patogenních bakterií. Kromě toho tyto organismy zvyšují nutriční hodnotu fermentovaných potravin. Toto má za následek proces produkce kyseliny mléčné bakteriemi, což vede ke zvýšení produkce esenciálních aminokyselin a vitamínů spolu se zvýšenou biologickou dostupností minerálů (Slover & Danziger 2008).

3.4 Mechanismy působení probiotik

Všechny zdraví prospěšné účinky probiotik jsou následkem čtyř mechanismů jejich fungování (viz Obrázek 3). Tyto mechanismy jsou:

1. Výroba antimikrobiálních látek
2. Soutěž s patogeny o adhezi k epitelu a o živiny
3. Imunomodulace hostitele
4. Inhibice produkce bakteriálních toxinů (Markowiak & Slizewska 2017).

První dva výše zmíněné mechanismy jsou spojené s přímým účinkem na jiné mikroorganismy a jsou důležité při profylaxi a k udržení střevní rovnováhy hostitele. Oba tyto mechanismy mohou vést ke imunologické modulaci (Schachtsiek et al. 2004). Při imunologické modulaci dochází k uvolňování některých rozpustných složek mikroorganismy, což má za následek přímou či nepřímou aktivaci imunologických buněk (Oelschlaeger 2010). Tyto účinky probiotik mají následně důležitou roli při prevenci a léčbě nakažlivých nebo zánětlivých onemocněních a ovlivňují tak zdravotní stav hostitele. Poslední z výše zmíněných probiotických účinků je založen na funkci akcí vedoucích k deaktivaci toxinů a jejich odstranění z těla (Markowiak & Slizewska 2017).



Obrázek 3: Mechanismy působení probiotik. (A) Konkurenční vyloučení patogenních mikroorganismů. (B) Výroba antimikrobiálních látek. (C) Zvýšená adheze na střevní sliznici a zlepšení epiteliální bariéry. (D) Stimulace imunitního systému (Markowiak & Slizewska 2017).

3.4.1 Adhese

Adhese je antipatogenní vlastností probiotických mikroorganismů a je považována za kritérium pro probiotický mikroorganismus, který bude mít příznivé účinky na lidské zdraví. Lze tvrdit, že probíhající adheze probiotik stimuluje imunitní systém organismu a také hojení tkání sliznic (Kadlec & Jakubec 2014).

Adhese patogenních organismů k povrchu střevních sliznic je považována za první fázi při propuknutí střevních infekcí (Markowiak & Slizewska 2017). Souvislost adheze s probiotiky je spatřována především ve vzájemném soutěžení patogenních mikroorganismů s probiotickými o místo pro adhezi na epiteliální sliznici. Místa adheze jsou pro organismy velmi důležitá, protože slouží jako zdroj živin a energie. Další významnou funkcí probiotik je následná antagonizace patogenních organismů a přímá modulace imunitní odpovědi hostitele. Inhibice adheze vyloučením patogenu probiotiky pak může zabránit kolonizaci střev patogeny a zamezit tak šíření infekce (Singh et al. 2013).

Účinek adheze je ovlivněn jak druhem patogenu, tak i probiotickým kmenem. Bakterie s vyšší adhezní schopností mají spíše negativní vliv na zdraví hostitele, a naopak patogeny s nižší adhezní schopností jsou vůči hostiteli méně virulentní. Probiotika ulpívající na epiteliálních buňkách v gastrointestinálním traktu mohou dále modulovat domorodé mikroby, zvyšovat intestinální epiteliální bariéru, nebo sekreci antimikrobiálních látek (Nowak et al. 2016).

Epiteliální tkáň, tvořící výstelku střeva, se skládá z několika typů sloupcových a pohárových buněk. Pohárové buňky jsou jednobuněčné žlázy produkující glykoproteiny zvané muciny, které tvoří hlen (Van Tassell et al. 2011). Vrstva hlenu je biochemicky komplexní médium bohaté na glykoproteiny, antimikrobiální peptidy, imunoglobuliny a mnoho dalších střevních proteinů a lipidů (Juge 2012). Hlen vytvořený muciny obecně slouží jako ochrana před patogeny, enzymy, toxiny, dehydratací a oděrem (Van Tassell et al. 2011; Juge 2012). Za základní funkci celé vrstvy hlenu se však považuje především jeho schopnost

zamezení adheze škodlivým organismům k podkladovému epitelu a zároveň poskytnutí prostředí pro adhezi nepatogenním organismům (Van Tassell et al. 2011).

Muciny (MUC) tvořící hlen se rozdělují na 17 různých typů. Společným rysem je opakovaná sekvence aminokyselin bohatých na prolinové, threoninové a serinové vrstvy (PTS domény), kde dochází k O-glykosidickým vazbám mezi jádrem proteinu a N-acetylgalaktosaminovým koncem oligosacharidů. Tyto vysokomolekulární oligomerní glykoproteiny se produkují ve střevě jako membránově vázané (MUC1, MUC3, MUC4 MUC12, MUC13 a MUC17) nebo sekretované muciny (MUC2, MUC5B, MUC5AC a MUC6) (Van Tassell et al. 2011; Juge 2012). Membránové muciny hrají velkou roli v imunomodulačních účincích bakteriálních interakcí s epiteliální membránou (Van Tassell et al. 2011).

Adhesi k epiteliálnímu hlenu podporují látky zvané adhesiny. Adhesiny jsou molekuly na povrchu organismů, které podporují adhesivní funkci mikroorganismů. Konkrétním příkladem je např. mucin-vázající proteiny (MUB). MUB jsou proteiny buněčného povrchu obsahující typický signální peptid a LP x TG ukotvující motiv na C konci pro kovalentní připojení k bakteriální buněčné stěně (Juge, 2012). Nejznámější je protein vázající hlen MUB produkovaný druhem *Lactobacillus reuteri* (Van Tassell et al. 2011; Juge 2012).

Důležitou roli při adhezi mají extracelulární části bakterií – bičíky, pili a fimbrie. Tyto části bakterií hrají hlavní roli k přilnutí k jejich hostiteli, tedy při adhezi bakterií k hlenu (Juge 2012).

Bičíky se nejčastěji využívají k plavání ve vodním prostředí nebo k průchodu přes pevné povrchy některými organismy. Adhesivní vlastnosti k řadě hostitelských receptorů, včetně mucinů a hovězího hlenu mají konkrétně bičíky EPEC E2348 / 69 (O127: H6) a EHEC EDL933 (O157: H7) a jejich bičíkové monomery (Erdem et al. 2007). Adhesivní vlastnosti bakteriálních bičíků k hlenu byly dříve často hlášeny u druhu *C. difficile* jako hlavní příčiny nozokomiálních infekcí u starších pacientů a pacientů se sníženou imunitou. Bičíkové proteiny se údajně podílejí na připojení patogenních bakterií k hlenové vrstvě střeva, první bariéře během kolonizace (Juge 2012).

Fimbrie jsou útvary na povrchu bakterií skládající se z proteinových podjednotek, které mají v průměru rozměry mezi 2 až 8 nm a obvykle sahají do vzdálenosti 1–2 μm od bakteriálního povrchu. Fimbrie umožňují bakteriím specificky přilnout k velkému počtu cílů, včetně savčích buněk, hostitelských proteinů a dalších mikrobiálních buněk (Chessa et al. 2008).

Pili jsou delší než fimbrie a rovněž se skládají převážně z proteinových podjednotek (pilinů) uspořádaných do trubkovité struktury, která umožňuje průchod genetického materiálu během konjugace. V průměru může být na povrchu bakteriální buňky přítomno jedno až deset konjugačních pili a až více než 400 fimbrií (Juge 2012).

Schopnost adheze probiotik je zkoumána v *in vivo* i *in vitro* podmínkách (Van Tassell et al., 2011). Stanovit adhezi mikroorganismů metodou *in vivo* je obtížné a složité, a proto převažuje využití modelů mající *in vitro* podmínky, které mohou být prováděny na různých povrchích stimulujících prostředí střeva (viz Tabulka 3). Nejčastěji se využívají buňky odvozené od lidského kolorektálního karcinomu, Caco-2 a HT29 (Kadlec et al. 2011; Kadlec & Jakubec 2014). Tyto modely byly vyvinuty primárně pro studium absorpce a permeability v tenkém střevě (Van Tassell et al. 2011). Modely lidského

kolorektálního karcinomu mají široké využití při *in cellulo* testování buněčných linií, ale nejsou zcela dokonalými modely pro interakci probiotik s hostitelem. Jejich největší nevýhodou je nestabilita a fyziologická odlišnost od normálních střevních epitelálních buněk – většinou tyto nádorové buňky neprodukuje mucin, a tak se netvoří hlen (Kadlec & Jakubec 2014).

Tabulka 3: Přehled *in vitro* modelů testování adherence (Kadlec et al. 2011; Kadlec & Jakubec 2014).

Model	Popis	Výhody	Nevýhody
Imobilizovaný hlen	Hlen obvykle imobilizovaný na mikrotitrační destičce	Rychlé, izoluje interakce hleny a mikrobu od jiných podmínek	Obtížné oddělit hlenově specifické interakce od hydrofobních interakcí
Buněčné linie	Polární monovrstva enterocytům připomínající střevní tkáň	Poskytuje podmínky <i>in vitro</i> nejpodobnější prostředí <i>in vivo</i>	Pochází z rakovinotvorných buněk, mohou se lišit od zdravé tkáně. Není reprezentativní pro poměry buněčných typů
Caco-2/HT29	Nádorová buněčná linie kolorektálního karcinomu	Jednoduché, dobře zavedené v literatuře	Není zohledňována přítomnost hleny
HT29-MTX	Buněčná linie HT29 ošetřená methotrexátem za účelem exkrece hleny	Přítomnost hleny	Nemusi představovat vhodnou expresi genu MUC
ko-kultury	Smíšená kultura hlen sekretujících a neseekretujících buněk	Lepší reprezentace buněčných typů vyskytujících se v epitelální tkáni	Málo lineárních zdrojů zabývajících se touto metodou
Celá tkáň	Celá nebo vyříznutá tkáň	Poskytuje podmínky nejpodobnější prostředí <i>in vivo</i>	Nákladné, obtížné získat

Buněčná linie Caco-2 vytváří homogenní a polarizovanou jednoduchou vrstvu, která se svou podobou a charakterem blíží lidským enterocytům. Fluorescenční značení bakterií ve spojení s jednovrstvou kulturou Caco-2 buněk je vhodný model pro studie adherence a může být využíván jako alternativa k radioaktivně značeným bakteriím. Nicméně, kultury Caco-2 buněk nevytvářejí dostatečnou vrstvu mukusu, a proto i hodnoty adherence některých bakteriálních kmenů (např. *L. rhamnosus* GG, *B. lactis* Bb12 nebo *B. animalis* IATA-A2) k Caco-2 buňkám jsou výrazně nižší než k mucinu. Naopak adherence některých kmenů patogenních bakterií *E. coli* k Caco-2 kulturám je vyšší než k mucinu. Od Caco-2 buněčné linie byly odvozeny buněčné linie C2BBE, které vytvářejí jednoduchou polarizovanou vrstvu buněk s apikální kartáčovou vrstvou srovnatelnou s buňkami v humánním intestinu (Kadlec et al. 2011)

Buněčná linie HT29-MTX vznikla z izolace HT29 buněk adaptovaných na methotrexát (MTX), které se diferencují na pohárkové buňky (Van Tassell et al. 2011; Kadlec et al. 2011), začleňující do modelu vrstvu hleny. Produkce hleny buňkami HT29-MTX zvyšuje adhesi bakteriálních buněk ve srovnání se samotnými buňkami Caco-2 nebo HT29, což dále podporuje důležitost přítomnosti hleny pro bakteriální adhesi. Tato produkce hleny, ale stále přesně nepředstavuje poměr enterocytů a pohárových buněk v epitelové vrstvě střev. V reakci na tuto nevýhodu byly vyvinuty modely využívající ko-kultury Caco-2 a HT29-MTX v daném poměru 90:10, které lépe simulují přirozené *in vivo* podmínky. Buňky HT29 se také diferencují v přítomnosti 5-fluorouracilu, aby vylučovaly MUC2, a přestože by to více napodobovalo

prostředí tlustého střeva, zdá se, že model HT29-FU byl dosud použit pouze při studiu patogenů (Van Tassell et al. 2011).

Jednou možností je také adherence bakterií k mucinu. Jedná se o nejjednodušší model, který je založen na imobilizaci komerčně dostupného mucinu na povrchu mikrotitračních destiček. Výsledky adherence však vykazují vyšší variabilitu než u výše zmíněných buněčných kultur (Laparra & Sanz 2009). Používá se rovněž humánní mucin získaný ze vzorku stolice (Kadlec et al. 2011).

Adherence probiotických bakterií je nejčastěji vyjadřována jako procento bakterií adherovaných k počátečnímu množství bakterií přidaných k zvolenému médiu (např. k Caco-2 buňkám). V případě použití radioaktivně značených bakterií je adherence vyjádřena jako procento radioaktivity naměřené po adherenci ve srovnání s radioaktivitou mikrobiální suspenze přidané k zvolenému médiu. Podobně i v případě využití fluorescenčního značení bakterií. Pro kvalitativní vyhodnocení procesu adherence jsou využívány elektronové mikroskopy (Kadlec et al. 2011). Rozdíly v adhezní schopnosti bakterií k mucinu, kulturám HT29-MTX a Caco-2:HT29-MTX (90:10) mohou být způsobeny rozdílným typem mucinu v uvedených modelech. Bylo prokázáno, že adherence u různých metod *in vitro* se liší dokonce i u stejného kmene, což naznačuje, že bakteriální struktury, zahrnuté do procesu vazby na epitelální buňky a mukózní vrstvu, mohou být rozdílné.

Adherence může být pozitivně ovlivněna takovými faktory, jako je použité medium, teplota a pH. Rovněž bivalentní ionty, jako třeba Ca^{2+} mohou bakteriální adherenci ovlivnit (Zarate et al. 2002). Adhesi probiotik může ovlivňovat také celá řada biologicky aktivních látek rostlinného původu. Bylo již dokázáno, že různé polyfenoly ovlivňují pozitivní adhesi (Volštátová et al. 2017). Polyfenoly jsou chemicky a biologicky aktivní sekundární metabolity rostlin odvozené od fenylalaninu a tyrosinu. Vyskytují se zejména v rostlinných produktech (Hervert-Hernández & Goni, 2011). Výskyt polyfenolů byl potvrzen také v konopí (Pollastro & Minassi & Fresu 2018).

3.5 Konopí

Konopí (*Cannabis* spp.) je historicky významnou rostlinou pocházející ze střední Asie (Andre et al. 2016; Landa et al. 2020). Má dlouholetou tradici pěstování a užívání v kulturách celého světa (Balant 2021). Tradičně se využívalo jako zdroj textilních vláken či v lidovém léčitelství (Consentino 2012; Andre et al. 2016; Balant 2021). Dále konopí sloužilo jako cenný zdroj potravy nebo bylo součástí šamanských rituálů. I přes jeho významné pozitivní využití je konopí v současnosti známé pro své rekreační využití a psychoaktivní vlastnosti (Balant 2021). Po druhé světové válce bylo právě kvůli zmíněným narkotickým vlastnostem pěstování konopí omezeno (Cosentino et al. 2012). V současnosti probíhá snaha o znovuuvedení konopí do běžného systému pěstování plodin kvůli svým ekologickým, agronomickým a průmyslovým vlastnostem (Cosentino et al. 2012; Andre et al. 2016). V současné době se pěstují konopné odrůdy produkující olej, biomasu nebo dokonce obojí (Andre et al. 2016). Nicméně, v mnoha státech je pěstování konopí, s výjimkou povolení pro vědecký výzkum a farmaceutické použití, stále zakázáno (Micalizzi et al. 2021).

Existují 4 typy konopí, které je od sebe důležité odlišit: technické, rekreační, léčivé a léčebné. Technické konopí se využívá pro účely průmyslové a stavební, v technických oborech, ve výživě a potravinářství a v kosmetickém průmyslu. Rekreační konopí

je v České republice považováno za nelegální. Léčivé konopí se využívá při samoléčení či lidovém léčení a jedná se o odvětví podobné rekreačnímu pouze s odlišným úmyslem držitele. Léčebné konopí je v ČR oficiálně uznáváno a jedná se o konopí používané v lékařské praxi se známým obsahem hlavních účinných látek (Landa et al. 2020).

Klasifikace konopí do určité čeledi je velmi problematické. Původně bylo konopí řazeno do řádu kopřivotvaré (*Urticaceae*) a čeledi morušovité (*Moraceae*). Nyní je konopí seté řazeno do čeledi konopovité (*Cannabaceae*) spolu s další hospodářsky i farmaceuticky významnou rostlinou, chmelem otáčivým (*Humulus lupulus*) (Casano et al. 2011; Landa et al. 2020).

Existuje pouze jeden druh konopí, kterým je *Cannabis sativa* L. pod nějž spadají tři poddruhy – konopí seté (*Cannabis sativa* spp. *sativa*), konopí indické (*Cannabis sativa* ssp. *indica*) a konopí rumištní (*Cannabis sativa* ssp. *ruderalis*) (Casano et al. 2011). Cox et al. 2019 zmiňuje také možnou existenci čtvrtého druhu *Cannabis afghanica*.

3.5.1 Životní cyklus rostliny

Konopí je jednoletá krátkodenní rostlina, která roste v téměř každém podnebí vyjma pouštních a polárních oblastí (ElSohly et al. 2017).

Pro schopnost růstu konopí je velmi důležité zachovávat vhodné podmínky – dostatek světla, uhlíku, kyslíku, vodíku, ideální teplotu a vlhkost a vhodný substrát s dostatkem živin. Klíčovým faktorem je především světelný cyklus (fotoperioda), jelikož umožňuje rostlině mít schopnost fotosyntetizovat a růst. Pro schopnost fotosyntézy je důležitá dostupnost CO₂ a kyslíku. Rostlině je důležité poskytovat také dostatek vody, protože se jedná o prostředek pro přenos živin. Živiny nezbytné pro růst konopí jsou dusík, fosfor, draslík, vápník, síra a hořčík, dále železo, bor, mangan, měď, chlor a zinek (Adams 2012). Ideální teplota pro vývoj rostliny se pohybuje v rozmezí 25-30 °C (ElSohly et al. 2017), pH pro půdu mezi 6 a 7 a relativní vlhkost při vegetativní fázi 50–80 % a během kvetení pod 60 % (Adams 2012).

Rostlině proto prospívá slunné prostředí s lehkou půdou bohatou na dostatek živin a vody. Ideálním prostředím jsou tedy farmářská pole, okolí silnic a železnic a břehy řek (ElSohly 2007).

Životní cyklus rostliny se skládá ze dvou důležitých částí: fáze růstu a fáze kvetení. Tyto dvě fáze se dále dělí na 4 dílčí stádia, a to klíčení a růst, vegetativní stádium, kvetení a tvorbu semen, a nakonec stárnutí (Adams 2012).

Fáze růstu

Fáze růstu zahrnuje klíčení, růst a vegetativní fázi. V této fázi jsou pro rostlinu ideální podmínky 18 hodin světla a 6 hodin tmy během dne.

Růst je velmi komplexní proces, kdy se semena stávají aktivními (Adams 2012). Proto, aby se tato fáze mohla uskutečnit, je velmi důležité dodržení ideálních podmínek. Teplota by se měla pohybovat okolo hodnoty 24 °C. Nižší teploty růst rostliny spíše potlačují (ElSohly et al. 2017). Dalším důležitým faktorem je dodržení vlhkosti, kdy se semeno po zvlhčení povrchu pootevře a umožní růst klíčku (Adams 2012). Klíčení rostliny obvykle trvá 3-7 dní (ElSohly 2007).

Rostlina začíná růst a vytvoří se první dva listy, které však nejsou považovány za pravé. Mladé sazenice vypadají jako dospělé rostliny a během první fáze růstu se začínají objevovat první série skutečných listů po kotyledonech (Adams 2012).

Vegetativní fáze rostliny probíhá většinou na jaře. V tomto období rostlina vyvíjí strukturu, která unese těžké květy. Rostlina roste do výšky i šířky, přibývají nová patra listů a postranní větve rostou do maximální délky (Adams 2012). Konečná výška konopí je obvykle do 5 m (Micalizzi et al. 2021).

Fáze kvetení

Fáze kvetení probíhá při kratších dnech, kdy je pouze 12 hodin světlo (Adams 2012). Na délku dne je konopí velmi citlivé a při malém přerušení noci světlem už rostlina nemusí plnohodnotně vykvést (ElSohly 2007). První květy se objeví zhruba po 2 až 3 týdnech, kdy je téměř zcela dokončen vývoj rostliny.

Je důležité zmínit, že konopí je dvoudomou rostlinou, tzn. existence samčích i samičích rostlin, případně ale i rostlin jednodomých nebo androgenních. Přibližně o dva týdny dříve kvetou samčí rostliny (Adams 2012). Samčí rostlina tvoří květy po celé rostlině. Květy se ve správný okamžik otevrou a vypustí lehký pyl. Pyl se následně usazuje na pestíkách květu samičí rostliny, která je opylena. Po opylení samičí rostliny se v pohárku vytvoří semeno (ElSohly 2007; Adams 2012).

Během vegetativní fáze je nemožné navzájem odlišit samčí a samičí rostlinu. Je to možné až při růstu pohlavních orgánů a květů (viz Obrázek 4). Samčí pohlavní orgány připomínají malé zvonky a vyskytují se v hroznech (Adams 2012). Samčí květ je spíše malý a velmi nenápadný (Mediavilla et al 1998). Samičí pohlavní orgány složené ze skupiny kalichů s pestíky (Adams 2012), jsou výraznější a objevují se v hustých shlucích. U jednodomých rostlin se květenství obou pohlaví nachází nedaleko sebe (ElSohly 2007).



Obrázek 4: Oboupohlavní, samčí a samičí květenství (Adams 2012).

Při zrání rostliny začnou být květy mohutnější a začínají být intenzivně cítit tvořící se pryskyřici (Adams 2012). Pryskyřice je jedním z nejcennějších konopných produktů s psychoaktivními a léčivými účinky, je bohatá na žláznaté trichomy, které mají sekundární metabolity, kterými jsou fytocannabinoidy a těžké terpeny zodpovědné za charakteristický zápach rostliny (Micalizzi et al. 2021). Při dozrávání rostliny se zpomaluje tvorba pohárků a velké množství pestíků začíná hnědnout a listy žloutnout. V okamžiku, kdy zhnědne 70 % pohárků, je vhodné rostlinu sklízet. Pokud rostlinu nesklídíme, tak rostlina umírá, listy

opadávají a stonek zesiluje. Rostlina, která se dostala až do této fáze, ztrácí svou léčebnou hodnotu (Adams 2012).

Sklizeň konopí

Doba sklizně má významný vliv na použití a kvalitu rostliny, ale je velmi složité tento správný moment určit. Konopí sklizené příliš brzy má lehčí chuť a omamné účinky než u zralejších rostlin. Nejlepší metoda na rozpoznání zralosti je sledování pryskyřice. Během zrání má jantarovou až průhlednou barvu. Poté ale pryskyřice začíná reagovat s kyslíkem a opět se začne objevovat jantarová barva, což signalizuje počátek rychlé sklizně. Rostlina ihned po sklizení není připravená ke spotřebě kvůli přítomnosti chlorofylu a rovněž aktivní látky ještě nejsou zcela přeměněny. Sušení je tedy velmi zásadní proces mající vliv na výslednou chuť produktu. Základem je nechat rostlinu po sklizni naživu co nejdéle, aby mohlo dojít k přeměně chlorofylu na cukry (Adams 2012).

3.5.2 Léčebné využití konopí

Pro své četné pozitivní účinky na lidský organismus je konopí hojně využíváno pro lékařské účely.

Konopná léčba musí plnit hlavní zásadu lékařství - „hlavně neškodit“. Na základě vysokého bezpečnostního profilu je konopí považováno za rostlinu s obrovskou terapeutickou šíří (WHO 1986; Landa et al 2020).

Při léčbě konopím se pacienti rozdělují do 4 konkrétních kategorií:

1. Pacienti se zájmem o konopnou léčbu, kteří nemají dobrý vztah k syntetickým léčivům
2. Pacienti s nízkou poddajností ke klasické analgetické terapii
3. Pacienti s alespoň částečně či málo fungující standardní terapií, kdy je léčebné konopí podáváno ve snaze vylepšit jejich funkční zdatnost, umožnit jim větší společenské a pracovní uplatnění a podpořit jejich pohybovou aktivitu
4. Pacienti s vysokými dávkami analgetik, často sporně fungujícími, které provází již významné množství nežádoucích účinků (Landa et al. 2020).

Konopí se využívá především k léčbě bolesti. Bolest je definována jako nepříjemný smyslový a emocionální subjektivní prožitek.

Léčba bolesti konopím je ovlivněna na základě analgetického žebříčku Světové zdravotnické organizace (World health organisation, WHO). Konopí lze aplikovat při léčbě každého stupně intenzity bolesti a pro terapii je zásadní diagnostikovat typ bolesti, její příčinu a intenzitu (WHO 1986).

Hojně se těchto účinků tlumení bolesti využívá i u nádorových onemocnění (Landa et al. 2020). Cílem léčby bolesti nádorových onemocnění je hlavně zmírnění intenzity bolesti, aby došlo alespoň k jejímu potlačení na snesitelnou úroveň (WHO 2019).

3.5.3 Legislativa používání konopí v ČR

Pěstování konopí je regulováno zákony. Jedná se o zákon o návykových látkách (366/2021 Sb.) a vyhláškou o stanovení podmínek pro předepisování, přípravu, distribuci, výdej a používání individuálně připravovaných léčivých přípravků s obsahem konopí pro léčebné použití (Zákon 236/2015).

Základní institucí zabývající se konopím je Státní agentura pro konopí pro léčebné použití (SAKL), která spadá pod Státní ústav pro kontrolu léčiv (SÚKL).

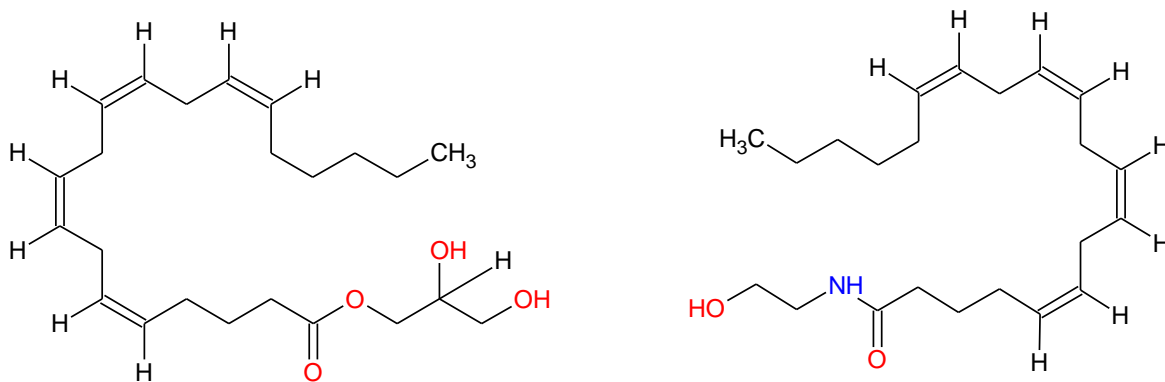
3.6 Biologicky aktivní látky v konopí

Konopí je velice složitá rostlina s ohledem na množství chemických sloučenin. Bylo identifikováno více než 1400 přírodních látek (Landa et al. 2020) vytvořených sekundárním metabolismem. Tyto látky zahrnují kanabinoidy, terpeny a terpenoidy a fenolické látky obsahující flavonoly a flavony, stilbeny a lignany. Dále se v konopí vyskytují aminokyseliny, alkaloidy, glykosidy, aminy, cukry, uhlovodíky, ketony, mastné kyseliny, vitaminy a další (Andre et al. 2016).

3.6.1 Kanabinoidní sloučeniny

Přibližně 144 biologicky aktivních látek v konopí je označováno za tzv. kanabinoidy (Landa 2020). Tyto látky jsou přítomné v pryskyřici produkované žlázami samičího květenství (Adams 2012; Landa 2020). Největší pozornost je věnována Δ^9 -tetrahydrokanabinolu (Δ^9 THC), kanabidiolu (CBD) kanabinolu (CBN), kanabigerolu (CBG) (Landa et al. 2020). Dále se za kanabinoidy považují kanabichromen, kanabielsoin, kanabidivarin a další (ElSohly et al. 2017).

Působení těchto látek v těle má na svědomí endokanabinoidní systém (EKS), který zahrnuje kanabinoidní receptory (Pertwee 2009), kanabinoidy a biodegradační enzymy. EKS uvolňuje endokanabinoidy, které se naváží na receptory a spouští širokou škálu biologických funkcí. Endokanabinoidy jsou signalizační molekuly vytvářené naším tělem. Jedná se konkrétně o anandamid (AEA) a 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (viz Obrázek 5).



Obrázek 5: Vzorec anandamidu (nalevo) a 2arachidonoylglycerolu (napravo) (vlastní zpracování)

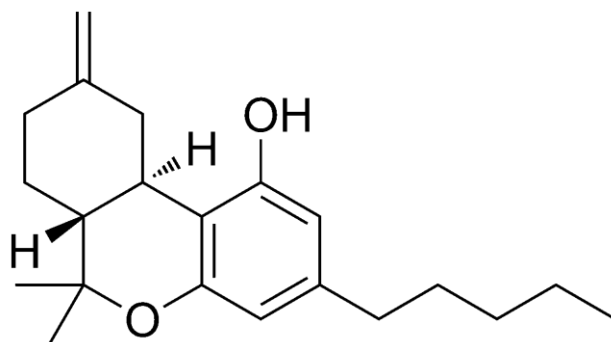
Na receptory EKS se nemusí vázat ale pouze endokanabinoidy vytvářené naším tělem, ale také fytoKANABINOIDY (kanabinoidy obsažené v rostlinách) (Pertwee 2009). Pokud se tyto kanabinoidy dostanou do těla, tak mohou spustit reakci prostřednictvím navázání na kanabinoidní receptory CB1 a CB2 (Landa et al. 2020). Receptory CB1 jsou obsaženy v našem mozku a bývají spojovány s náladou, emocemi a chutí k jídlu. Tento typ receptoru preferuje např. kanabinoid THC. Naproti tomu kanabinoid CBD preferuje receptor CB2 nacházející se v imunitním systému a v centrální nervové soustavě (Pertwee 2009). Dále existují i podtypy receptorů s řídicími funkcemi a nimi jsou: receptory spojené s G proteinem číslo 55 (GPR55), 18 (GPR18) a 119 (GPR119), vanilloidový receptor 1 (TRPV1) a 2 (TRPV2), wasabi receptor (TRPA1), mntolový receptor

(TRPM8) a jaderné PPAR receptory (Landa et al. 2020). Princip fungování EKS je na základě teorie klíče a zámku, kdy fytoKANABINOIT je klíčem a receptor je zámkem (Pertwee 2009).

Δ^9 -tetrahydrokanabinol (THC)

THC (viz Obrázek 6) je nejlépe prozkoumanou kanabinoidní látkou konopí (Landa et al. 2009). Poprvé ho syntetizoval Mechoulam v roce 1967 (Weber et al. 2009). Tato složka marihuany má psychomimetické účinky. Právě obsah THC je důvodem využití konopí jako tzv. rekreační drogy, což znamená, že po aplikaci se objevují zrakové, sluchové a hmatové iluze, dochází k příjemným stavům dobré nálady a pocíťování euforie (Landa et al. 2020; Pertwee 2009), ale také zhoršení paměti, chybnému vnímání času a vyvolání ospalosti (Pertwee 2009). Po požití konopí se pouze výjimečně objevuje nepříjemný prožitek s depresivní náladou a panickými či úzkostnými stavy. Tyto pocity se většinou objevují při předávkování (Landa et al. 2020).

THC je látka zodpovědná za psychickou závislost na marihuaně. Závislost je sice mírná, ale i tak při náhlém vysazení THC může dojít ke vzniku abstinčního syndromu (Zehra et al. 2018; Landa et al. 2020).



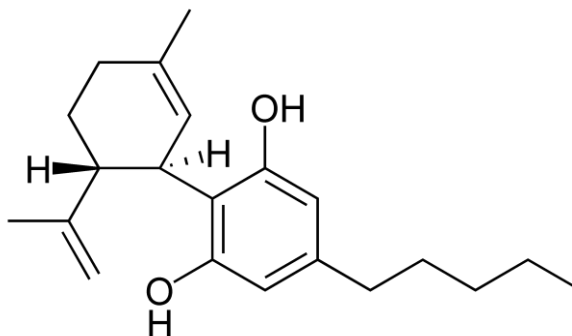
Obrázek 6: Vzorec THC (vlastní zpracování)

THC má mimo psychoaktivních účinků i mnoho cenných terapeutických vlastností. Prokázány jsou analgetické, antiemetické a antispasmodické účinky a účinek na apetit (Landa et al. 2020).

Analgetický účinek THC vyjadřuje jeho schopnost tlumit bolest. Velmi často se využívá ke zmírnění nádorové bolesti, dále při léčbě bolesti při poranění míchy, při neuropatické bolesti a při terapii chronických bolestí u neuropatie a fibromyalgie (Landa et al. 2020). Dalšími příklady používání THC jako analgetika je utišení bolesti zad, bolesti hlavy a migrény (Naef et al. 2003). Protikřečový (antispasmodický) účinek souvisí s analgetickými účinky, a proto je THC hojně využíváno u pacientů s roztroušenou sklerózou a s ní souvisejících bolestí (Russo 2016; Landa et al. 2020). Cenné jsou rovněž účinky THC na apetit, jelikož THC stimuluje chuť k jídlu. Tato vlastnost je hojně využívána u pacientů trpících nemocemi, které jsou spojovány s úbytkem hmotnosti, např. HIV/AIDS (Landa et al. 2020). THC bývá často spojováno se zabráněním rozvoji Alzheimerovy choroby. THC totiž zabraňuje enzymu acetylcholinesteráze urychlit tvorbu amyloidních plaků v mozku účinněji než předepisované léky (Landa et al. 2020). Uvádí se také příznivý účinek při depresích a neurodegenerativních poruchách (Weber et al. 2009).

Kanabidiol (CBD)

Kanabidiol (viz Obrázek 7) je látka v konopí, která nemá psychoaktivní účinky. V posledních letech je velmi zkoumána, jelikož se jedná o látku, která je plně legální a má rovněž příznivé účinky na lidské zdraví (Landa et al. 2020).



Obrázek 7: Vzorec CBD (vlastní zpracování)

CBD je hlavním kanabinoidem, který není považován za psychotropní a vykazuje anxiolytické vlastnosti (Uhernik et al. 2018). Anxiolytický účinek spočívá v odstraňování nebo alespoň snižování úzkosti (Landa et al. 2020).

Nejvýznamnější jsou neuroleptické (antipsychotické) účinky CBD (Landa et al. 2020). Předpokládá se, že CBD má vysoký terapeutický potenciál pro léčbu psychiatrických stavů, které ovlivňují kognitivní aspekty učení a paměti, včetně úzkostí a posttraumatických stresových poruch (Uhernik et al. 2018). Paradoxem konopí je, že vysoký obsah THC vede k psychózám, naopak CBD tyto účinky výrazně snižuje až potlačuje (Uhernik et al. 2018; Landa et al. 2020). Mimo potlačování psychotických příznaků má za následek zlepšení poruch vnímání a poruch v komunikaci (Uhernik et al. 2018). Kanabinoidní receptory CB1, na které se CBD váže, se totiž rovněž účastní modulace učení a jsou velmi důležité pro krátkodobou a pracovní paměť (Landa et al. 2020).

Stejně jako THC je i CBD používáno při léčbě neurodegenerativních onemocněních, kam řadíme Alzheimerovu chorobu, Parkinsonovu chorobu a amyotrofickou laterální sklerózu (Iuvone et al. 2009).

Používá se také jako neuroprotektant – ochraňuje nervové buňky před poškozením a může být významnou prevencí před onemocněními spojenými s oxidačním stresem (Landa et al. 2020).

Kanabidiol pozitivně ovlivňuje nádorová onemocnění. V současné léčbě onkologických onemocnění se stále víc prosazuje využívání konopí jako léčebného prostředku (Landa et al. 2020). CBD zeslabuje karcinogenezi tlustého střeva a inhibuje proliferaci buněk kolorektálního karcinomu prostřednictvím aktivace receptorů CB1 a CB2. Kanabinoidy prokázaly přímé protinádorové účinky a rovněž se používají jako stimulanty chuti k jídlu a jako antiemetika (Romano et al. 2014).

Na rozdíl od THC, které se vyžívá jako stimulant chuti k jídlu u hubnoucích pacientů, CBD jeho funkci potlačuje, a naopak brání člověku mít chuť k jídlu. Dalším opačným účinkem je také jeho boj proti tvorbě závislostí. CBD totiž snižuje abstinenci příznaky, které vznikají při zastavení požívání drog, včetně THC (Landa et al. 2020).

Prokázáný je také pozitivní vliv CBD u pacientů trpících epilepsií. Přípravky s obsahem kanabidiolu se ukázaly jako účinné, pokud selhala léčba antiepileptickými léky. Často se konopí používá při léčbě epilepsie u dětí (Landa et al. 2020).

Pozitivní vliv je spatřován i při autoimunitních onemocněních, jako je revmatoidní artritida a diabetes mellitus 1. typu. CBD brání vzniku, ale zároveň i rozvoji těchto onemocnění (Landa et al. 2020).

Kanabidiol blokuje i tvorbu různých cytokinů, proto se CBD stejně tak jako THC využívá při terapii u AIDS, rakoviny nebo zánětů a infekcí (Landa et al. 2020).

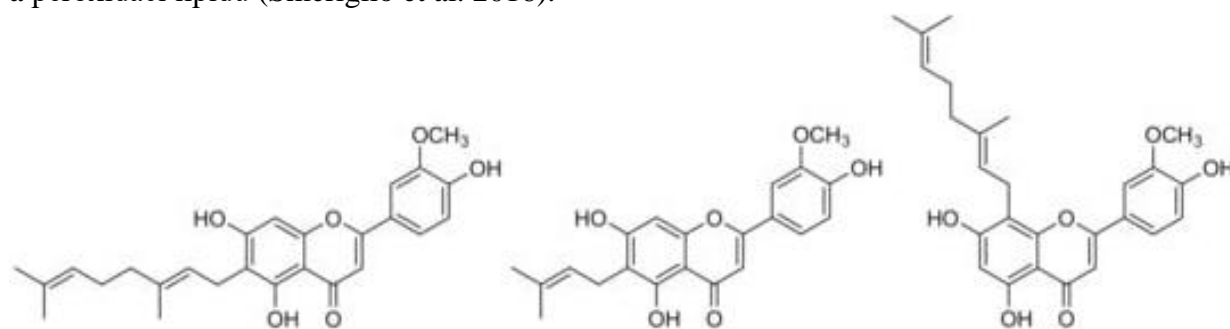
Kanabigerol (CBG)

Kanabigerol je z výše zmíněných látek nejméně prostudován a používán, je však ale dokázáno, že má rovněž protizánětlivé a antioxidační účinky. Největší potenciál využití je spatřován při léčbě nespecifických střevních zánětů (Crohnova choroba a ulcerózní kolitida) (Borrelli et al. 2013). Navíc se jedná o antikarcinogenní látku nacházející se prakticky bez THC (Landa et al. 2020).

3.6.2 Fenoly

Ve studii Radwan et al. 2021 bylo kromě kanabinoidů z rostliny izolováno 42 nekanabinoidních fenolů. Fenolové sloučeniny jsou v konopí zastoupeny třemi hlavními třídami, a to: flavonoidy, stilbeny, lignany (Isidore et al 2021).

Mezi flavonoidy se jmenovitě řadí flavony, flavanony, flavonoly a flavanoly (Izzo et al. 2020). V konopí se vyskytují běžné flavonoidy jako vitexin, apigenin, luteolin, kaempferol, orientin a kvercetin, ale také unikátní flavony pro konopí jako kanaflavin A, B a C (viz Obrázek 8) (Isidore et al. 2021). Rea et al. 2019 uvádí, že kanaflaviny vykazují tak vysokou protizánětlivou aktivitu, která je třicetkrát vyšší než aspirin. Flavonoidy se obecně považují za účinné antioxidanty, kvůli svým vlastnostem pohlcovat volné radikály a jsou také chelátory kovových iontů, mají tedy schopnost chránit tkáň před volnými kyslíkovými radikály a peroxidací lipidů (Smeriglio et al. 2016).



Obrázek 8: Vzorce kanaflavinu A, B a C (zprava) (Isidore 2021)

Konopné stilbeny lze rozdělit do tří hlavních typů na základě jejich struktury: fenantreny, dihydrostilbeny a spiroindany. Kanipren, dihydrostilben jedinečný pro konopí, vykazuje vysoce protizánětlivou aktivitu. Rovněž spiroindany kanabispiron a kanabispirenon vykazují protizánětlivé, a navíc i protinádorové účinky (Isidore 2021). Ne všechny stilbeny však lze považovat za zdraví prospěšné – Sanchez-Duffhues et al. 2009 uvádí, že nejlépe charakterizovaná látka denbinobin má prooxidační a proapoptickou aktivitu k buněčným liniím lidské leukémie.

Nejčastěji zastoupenými lignany jsou cannabisin A, B a C, N-trans-kafeoyltyramin (Izzo et al. 2020), N-trans-kumaroyltyramin a N-trans-feruloyltyramin (Isidore et al. 2021). Dalšími látkami vyskytujícími se v květenství rostliny byly hydroxyskořicové kyseliny (konkrétně chlorogenová, kávová, kumarová a ferulová kyselina) (Izzo et al. 2020). Lignany jsou molekuly podléhající velkému zájmu farmaceutického sektoru, jelikož mají širokou škálu důležitých biologických vlastností, včetně antioxidačních, protizánětlivých a antihyperlipidemických aktivit (Isidore et al. 2021)

3.6.3 Terpeny

Terpeny jsou lipofilní uhlovodíkové látky zodpovědné za aromatické vlastnosti konopí (Isidore et al. 2021). Terpeny tvoří po kanabinoidech druhou největší skupinu složek konopí (Radwan et al. 2021). Hlavními jsou monoterpeny, seskviterpeny a triterpeny. V rámci této skupiny látek byly prokázány zdraví prospěšné účinky – konkrétně jsou protizánětlivé, analgetické, anxyolitické, antibakteriální (Isidore et al. 2021), antioxidační, atidepresivní, protinádorové, neuroprotektivní, antimutagenní, antialergické nebo antibitotické (Nuutinen 2018). Kromě toho jsou mono a seskviterpeny hlavními složkami konopného esenciálního oleje, který lze použít v kosmetice nebo jako dochucovadlo v potravinářském průmyslu (Isidore et al 2021).

Nejčastějšími monoterpeny jsou α -pinen a β -pinen. Tyto dva monoterpeny inhibují aktivitu acetylcholinesterázy v mozku, tudíž se uvádí, že napomáhají paměti a minimalizují kognitivní dysfunkce (Sommano et al. 2020). Dalším charakteristickým terpenem je β -myrcen (Radwan et al. 2021), který má analgetický účinek a úzce souvisí s účinkem THC a CBD, protože stimuluje uvolňování endogenních opioidů. Jedním z monoterpenů, obsažených v konopí, je také limonen, který přes předpoklad nízké afinity ke kanabinoïdním receptorům zvyšuje hladinu serotoninu a dopaminu, čímž je zodpovědný za anxiolytické, antistresové a sedativní účinky (Sommano et al.2020).

Prvním seskviterpenem identifikovaným v konopí byl α -karyofylen (Radwan et al. 2021). Dalším seskviterpenem obsaženým v rostlině je β -karyofylen, který má charakteristické aroma pepře a je nejdostupnějším seskviterpenem v rostlinách a extraktech konopí. Jsou u něj prokázány gastroprotektivní, analgetické, antibakteriální, antidepresivní, protizánětlivé, protinádorové, neuroprotektivní a další účinky (Sommano et al. 2020). Dalšími významnými seskviterpeny jsou α -humulen, α -kurkumen, guaial, α -selinen, nerolidol, α -guaaien, a další (Radwan et al. 2021).

3.7 Konopí a probiotika

Do současné doby nebylo zcela prokázáno, že konopí nepůsobí inhibičně na růst probiotických bakterií typu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Rostliny konopí jsou bohaté na přírodní sloučeniny s antimikrobiálními vlastnostmi. Antimikrobiální aktivita extraktu z konopných semen může souviset s vysokým obsahem polyfenolů, zejména caffeoyltyrainu a cannabisinu A, B a C. Semena *C. sativa* selektivně inhibují růst potencionálně patogenních kmenů a zároveň nevykazují aktivitu působící proti probiotickým bakteriím rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*. Extrakt ze semen *C. sativa* má selektivně inhibiční účinek proti patogenním kmenům a také potenciál funkce jako antibiofilmové činidlo. Biofilmy jsou tvořeny buněčnými bakteriemi se schopností přilnout k povrchu. Je prokázáno, že infekce

související s biofilmem způsobily více než 75 % lidských mikrobiálních infekcí (Frassinetti et al 2020).

Doposud ale neexistují žádné konkrétní informace o vlivu konopí na adhesi probiotik.

4 Metodika

4.1 Materiál

Byly testovány 2 vzorky konopí a jeho vliv na adhezi probiotických kmenů *L. gasseri*, *L. plantarum* a *L. reuteri*. K testům adheze byly použity kolorektálního karcinomu tlustého střeva Caco-2 a HT29-MTX, penicilin a streptomycin, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, neesenciální aminokyseliny, fetální bovinní sérum (FBS), fosfátový pufr (PBS – Phosphate Buffered Saline), trypsin a Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM). Pro tkáňové kultury byly dále použity 96jamkové destičky, serologické pipety, kultivační láhve. Etanolové extrakty konopí sklizené v 10. a 14. týdnu v koncentraci 8,19 mg/ml rozpuštěný v dimethylsulfoxidu.

4.2 Metoda

4.2.1 Příprava testovaných extraktů konopí

Extrakty konopí v EtOH byly získány od Ing. Matěje Malíka z Katedry agroenvironmentální chemie a výživy rostlin ČZU.

Rostliny byly pěstovány ve vnitřních prostorách se speciální kapánkovou závlahou v denním režimu. Mikroklima bylo udržováno s optimální relativní vlhkostí a koncentrací CO₂. Teplota pak byla závislá na denním cyklu a pohybovala se v rozmezí od 22 do 25 °C, což platilo také o světelném režimu.

Pro pokus byl využit uniformní rostlinný materiál pocházející z genotypu s pracovním názvem „McLove“.

Pro testování byly sklizeny rostliny v rozdílném stupni zralosti – 10. a 14. týden. Všechny části rostliny vyjma kořenu (květ, stonek a list) byly před samotnou analýzou homogenizovány – zmrazeny tekutým dusíkem a rozemlety v třecí misce.

Pro extrakci biologicky aktivních látek z homogenizovaných rostlin byla použita metoda dynamická macerace. Navážené vzorky (0,3 g) s přidanými 10 ml rozpouštědla (EtOH) byly macerovány za stálého míchání na magnetické míchačce při 300 otáčkách za minutu. Filtrát pak byl převeden do zkumavek odkud byly odebrány části rostliny a přesunuty zpět do původních kádinek s přidanými 10 ml rozpouštědla. Tento krok byl třikrát zopakován.

Vzorek byl následně rozdělen na dvě části. Z první části bylo odebráno 0,5 ml, které byly 12× zředěny. Po zředění byly vzorky filtrovány a analyzovány na HPLC.DAD pro stanovení chemického profilu biologicky aktivních látek v rostlině.

Druhá část vzorku byla odpařena na vakuové rotační odparce Heidolf a zbytek byl rozpuštěn v DMSO na výslednou koncentraci 8,19 mg/ml DMSO. Takto připravený zásobní roztok byl následně využit pro testování adheze probiotických kmenů.

4.2.2 Kultivace buněčných linií

Pro testování adheze byly použity buněčné linie kolorektálního karcinomu HT29 a Caco-2. Tyto linie byly kultivovány v DMEM médiu s 10 % FBS, 1 % hydrogenuhličitanu sodného, 1 % pyruvátu sodného, 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % penicilinu a streptomycinu.

Buněčné linie byly kultivovány v kultivačních lahvích přibližně 7 dní při teplotě 37 °C. v 5% CO₂ a vlhčené atmosféře. Během kultivace docházelo každé 3 dny k výměně média za čerstvé. Po 7 dnech, kdy bylo dosaženo 90% konfluency, bylo odstraněno staré médium, buněčná vrstva byla promyta pomocí 5 ml PBS a po odstranění PBS bylo přidáno 5 ml trypsinu,

který působil po dobu 3 minut a následně bylo neutralizováno přidáním 5 ml DMEM média. Pomocí plastové škrabky došlo k uvolnění buněk ze dna kultivační lahve a celý obsah byl přenesen do 15ml centrifugační zkumavky typu Falcon. Vzorek ve zkumavce byl centrifugován 10 minut při 2 000 otáčkách. Následně byl odstraněn supernatant.

Usazené buňky byly rozpuštěny v 5 ml DMEM média. Ze sklizených buněk byla založena nová kultivační lahev, kdy byly buňky naředěny v poměru 1:10 v novém médiu. Takto připravená láhev byla uložena v CO₂ inkubátoru s teplotou 37 °C.

Zbytek buněčné linie byl následně naředěn na požadované koncentrace pro založení 96jamkových destiček.

4.2.3 Založení 96-jamkové destičky

Prvním krokem pro založení 96-jamkové destičky bylo spočítání počtu životaschopných buněk. Z buněčné suspenze bylo napipetováno 100 µl sklizených buněk do zkumavky typu Eppendorf a smícháno se 100 µl tripanové modře. Následně bylo odebráno 10 µl suspenze ananeseno na Bürkerovu komůrku na skleněné destičce. Destička byla vložena do přístroje na počítání buněk EVE – NanoEnTek a byla zjištěna přesná koncentrace buněk.

Následně byly buněčné linie naředěny médiem na konečnou koncentraci 1×10^5 pro samostatné buněčné linie (Caco-2 buňky, HT buňky). Do každé jamky 96-jamkové destičky bylo následně napipetováno 100 µl takto naředěné suspenze. Takto připravené destičky byly uloženy v inkubátoru s řízenou atmosférou při teplotě 37 °C s 5% CO₂ po dobu 3 dnů. Po 3 dnech došlo k plné konflucenci monovrstvy a buněčné kultury tak byly připraveny k testování.

4.2.4 Příprava bakteriální suspenze

Bakterie byly pěstovány přes noc kultivovány při 37 °C ve Wilkins bujónu po dobu 24 hodin. Po kultivaci bylo odebráno 5 ml narostlé kultury do centrifugační zkumavky. Suspenze byla následně zcentrifugována při 1000 × g otáčkách, 3× promyta v PBS a následně rozmíchána v 5 ml PBS. Poté byl k bakteriím přidán fluorescein isothiokyanátu na finální koncentraci 25 µg/ml. Zkumavky byly následně inkubovány v teplotním inkubátoru po dobu 30 minut za tmy. Suspenze nabarvených bakterií byla následně centrifugována při 1000 × g otáčkách, 2× promyta pomocí PBS a rozmíchána v 5 ml stejného pufru.

4.2.5 Testování adheze

Před přidáním bakteriální suspenze bylo z každé jamky destičky odstraněno staré médium a jednotlivé jamky byly dvakrát opatrně promyty pomocí 100 µl PBS. Do jamek bylo následně přidáno 90 µl LAC media a do každé jamky 10 µl laktobacilů se vzorky konopí s finální koncentrací testovaných extraktů 50, 10, 5, 0 µg/ml.

Destička byla vložena na 90 minut do inkubátoru. Po inkubaci bylo médium s nenaadherovanými bakteriemi 2× promyto 100 µl PBS a následně je do nich napipetováno 100 µl PBS. Poté destička byla měřena na čtečce mikrotitračních destiček Tecan Infinite M200 při vlnové délce excitace 495 nm a emise 519 nm.

Pro výpočet adherovaných bakterií byl použit následující vzorec:

$$\% \text{ adherence} = \frac{\text{samotné laktobacily}}{\text{laktobacily s testovaným vzorkem}} \times 100$$

4.2.6 Statistická analýza

Data byla vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka. Pro statistické porovnání jednotlivých buněčných in vitro modelů a testovaných druhů probiotik byl použit program Graphpad Prism 9.3. Pro vyhodnocení byla použita oboustranná analýza rozptylu – ANOVA s následným použitím Sidakova testu. Rozdíly byly považovány za statisticky významné v hladině významnosti $p \leq 0,05$.

5 Výsledky

Cílem této práce bylo zjistit, zda přítomné vzorky konopí ovlivní adhesivní vlastnosti probiotických bakterií *L. gasseri*, *L. plantarum* a *L. reuteri*. Adherence byla vyjádřena jako procento bakterií adherovaných k počátečnímu počtu bakterií v médiu. K testování byly použity buněčné linie HT29 a buněčné linie Caco-2.

Bylo zjištěno, že výsledná adheze testovaných laktobacilů s přidávanými vzorky konopí dosahuje na obou liniích vysokých hodnot a pohybuje se v rozmezí 45,05 až 127,58 %. Nejnižší hodnota adheze byla patrná u *L. gasseri* za přítomnosti vzorku konopí 120 při koncentraci 3 µg/ml na buněčné linii Caco-2. Naopak nejvyšší adheze bylo dosaženo na buněčné linii HT29, a to *L. reuteri* za přítomnosti vzorku konopí sklizeného ve 14. týdnu o koncentraci 50 µg/ml. Výsledné hodnoty adheze (průměr ± SD) v % jsou uvedeny v Tabulce číslo 4.

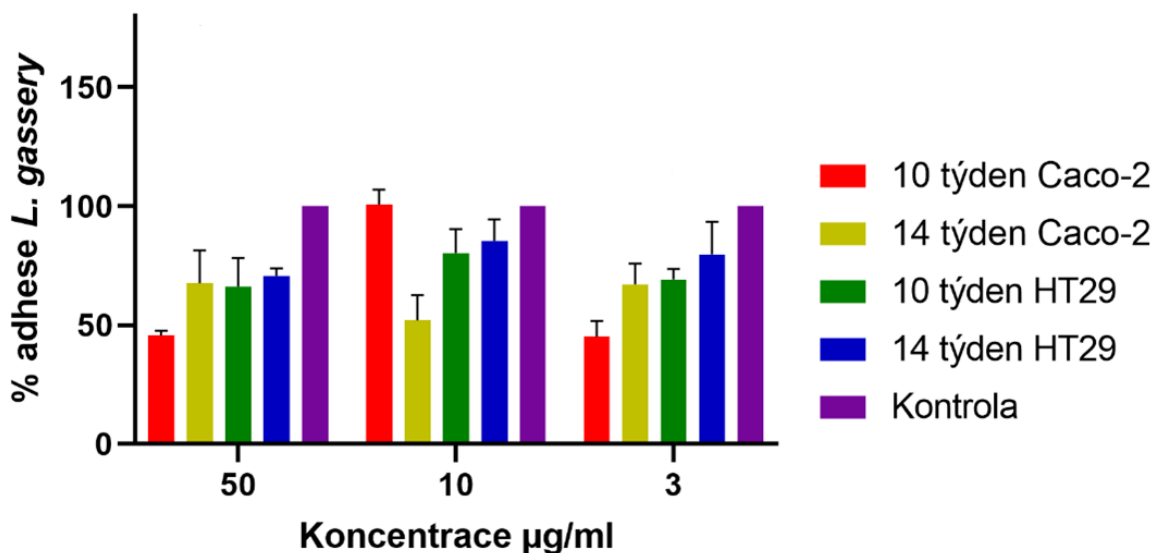
Tabulka 4: Výsledné adheze (průměr ± SD %) laktobacilů na jednotlivé buněčné modely

Týden	µg/ml	<i>L. gasseri</i>		<i>L. reuteri</i>		<i>L. plantarum</i>	
		% adheze průměr ± směrodatná odchylka					
		Caco-2	HT29	Caco-2	HT29	Caco-2	HT29
10.	50	45,66 ± 2,01	66,26 ± 12,04	72,24 ± 14,46	118,58 ± 7,26	90,88 ± 7,50	91,58 ± 6,77
	10	100,77 ± 6,23	80,31 ± 10,03	70,20 ± 18,74	79,10 ± 4,84	117,99 ± 4,67	102,57 ± 5,42
	3	45,05 ± 6,60	69,16 ± 4,41	52,48 ± 18,20	78,81 ± 3,07	96,59 ± 6,96	80,9 ± 11,11
14.	50	67,55 ± 13,84	70,67 ± 3,25	78,60 ± 8,70	127,58 ± 22,73	94,65 ± 13,52	95,56 ± 13,89
	10	51,97 ± 10,67	85,37 ± 9,03	75,73 ± 8,08	93,91 ± 7,93	63,34 ± 5,19	69,81 ± 9,96
	3	67,16 ± 8,71	79,68 ± 13,71	75,73 ± 7,78	84,56 ± 21,87	74,24 ± 12,01	80,14 ± 10,61

5.1 Stanovení adheze *L. gasseri*

L. gasseri s přítomností konopí adheruje k buněčným liniím v rozmezí 45,05 až 100,77 %, přičemž nejnižší adhezi vykazuje s přítomností vzorku konopí o stáří 10 týdnů o koncentraci 3 µg/ml k linii Caco-2. Nejvyšší hodnota byla patrná u téhož vzorku konopí při koncentraci 10 µg/ml na těžce buněčné linii. Hodnoty adheze *L. gasseri* k buněčné linii Caco-2 byly velmi rozmanité a pohybovaly se v intervalu o velikosti 55 %. Naopak u linie HT29 byly hodnoty více sjednoceny a dosahovaly hodnot od 66,26 do 85,37 %. Nejvyšší hodnoty adheze u linie HT29 pak byly patrné v kombinaci *L. gasseri* s extraktem z konopí sklizeného ve 14. týdnu (10 µg/ml) a nejnižší u extraktu z 10. týdne (50 µg/ml).

Při pohledu na výsledky adheze laktobacilu *L. gasseri* lze vidět, že se ve spoustě případech od sebe statisticky významně liší (viz Obrázek 9).

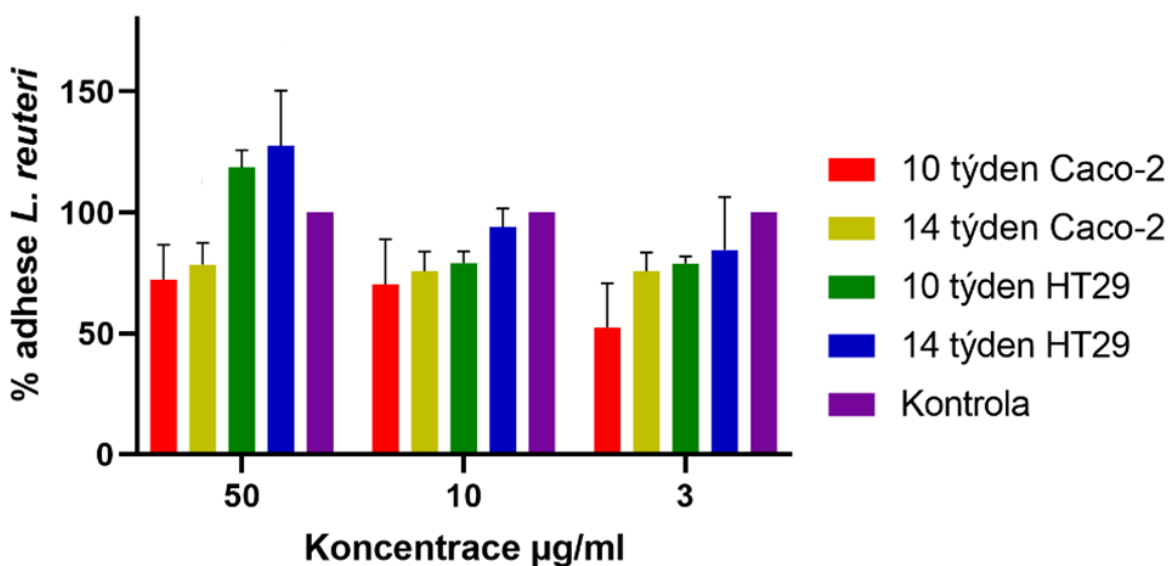


Obrázek 9: Adheze *L. gasseri* – průměrné hodnoty adheze (%) s přítomností konopí k jednotlivým modelům, v porovnání s kontrolou (100 %).

5.2 Stanovení adheze *L. reuteri*

Bylo zjištěno, že laktobacilus *L. reuteri* adheruje v hodnotách v rozmezí od 52,48 do 127,58 %. Nejnižší adheze se objevila na linii Caco-2 u vzorku konopí starého 10 týdnů o koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ a nejvyšší hodnoty adheze pak bylo dosaženo u vzorku o stáří 14 týdnů a koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ na buněčné linii HT29. Hodnoty adheze objevující se u buněčné linie Caco-2 jsou vyrovnané, vyjma nejnižší hodnoty 52,48 %, kdy se pohybovaly v rozmezí 8 %. Hodnoty adheze k linii Caco-2 jsou více rozmanité, a dokonce ve dvou případech přesahují hodnotu 100 % (vzorky sklizené v 10. i 14. týdnu o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$).

Statisticky významné rozdíly jsou znázorněny na Obrázku 10. Nejvíce vysokých statistických rozdílů vykazuje *L. reuteri* při kombinaci kultur Caco-2 a HT29 a koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$.

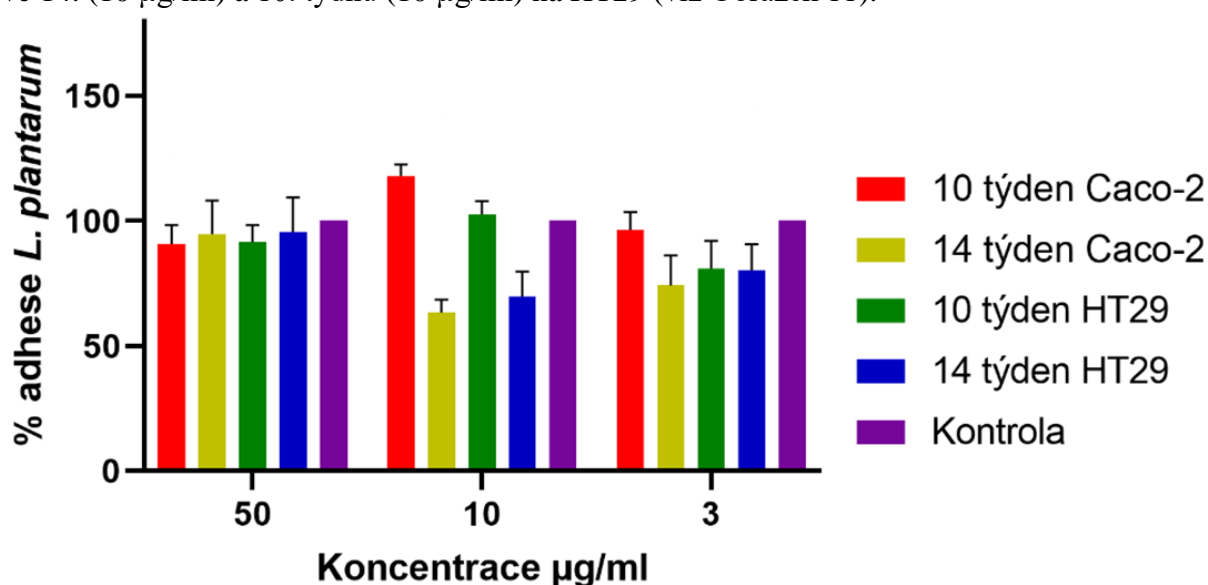


Obrázek 10: Adheze *L. reuteri* – průměrné hodnoty adheze (%) s přítomností konopí k jednotlivým modelům, v porovnání s kontrolou (100 %).

5.3 Stanovení adheze *L. plantarum*

Adheze probiotického druhu *L. plantarum* v kombinaci s konopím adhezuje od 63,34 do 117,99 %. Obě hodnoty jsou charakteristické pro buněčnou linii Caco-2. Vyšší hodnota se vyskytuje u vzorku 120 o koncentraci 10 µg/ml, nižší pak u vzorku 124 při totožné koncentraci. Ve výsledcích lze vidět, že adheze *L. plantarum* dosahuje ve dvou případech hodnot přes 100 % - je tomu tak u extraktu z konopí z 10. týdne o koncentraci 10 µg/ml na obouh buněčných liniích.

Statisticky významné hodnoty v adhezi *L. plantarum* nejsou tak četné jako u adheze *L. gasseri* a *L. reuteri*. Nejvyšší statisticky významné rozdíly jsou patrné u konopí sklizeného v 10. týdnu (10 µg/ml) na buněčné linii Caco-2 v kombinaci se vzorky konopí sklizeného ve 14. týdnu (10 µg/ml; 3 µg/ml) na Caco-2, 10. a 14. týdnu (3 µg/ml) na HT29. Dále byl prokázán vysoký statisticky významný rozdíl mezi extrakty konopí sklizeného ve 14. (10 µg/ml) a 10. týdnu (10 µg/ml) na HT29 (viz Obrázek 11).



Obrázek 11: Adheze *L. plantarum* – průměrné hodnoty adheze (%) s přítomností konopí k jednotlivým modelům, v porovnání s kontrolou (100 %).

5.4 Porovnání adheze jednotlivých laktobacilů

Statisticky byly porovnány mezi sebou i výsledky vlivu přidávaných extraktů z konopí na adhezi jednotlivých druhů laktobacilů k vybraným buněčným liniím Caco-2, HT29 a směsné kultuře Caco-2/HT29.

Z výsledků je patrné, že na buněčné linii Caco-2 dochází k významným statistickým rozdílům adheze *L. plantarum* v kombinaci s extraktem konopí sklizeného v 10. týdnu (10 µg/ml) od *L. gasseri* a *L. reuteri* v kombinaci s oběma vzorky konopí v téměř všech koncentracích (viz. Tabulka 5a).

Na linii HT29 se svojí adhezí od ostatních významně statisticky liší *L. reuteri* se vzorkem o stáří 14 dní (50 µg/ml). Je zaznamenán statisticky významný rozdíl obou vzorků konopí ovšech koncentracích ve spojení s *L. gasseri* od ostatních testovaných druhů laktobacilů. Několika statisticky významných rozdílů si lze všimnout i u *L. reuteri* s konopím sklizeným v 10. týdnu (50 µg/ml), a to především s druhem *L. gasseri* a opět s konopím o stáří 10 týdnu (viz Tabulka 5b).

Na směsné kultuře je patrný statisticky významný rozdíl v adhezi *L. reuteri* s extraktem konopí z 10. týdne (50 µg/ml) a adhezí všech testovaných laktobacilů vyjma *L. gasseri* + 10. týden (10 µg/ml) na Caco-2, *L. plantarum* + 10. a 14. týden (3 µg/ml, resp. 50 µg/ml) Caco-2. Mnoho statisticky významných rozdílů vykazuje adheze *L. reuteri* se vzorkem sklizeným v 10. týdnu (50 µg/ml) na linii HT29 v porovnání s ostatními laktobacily (viz Tabulka 5c).

Tabulka 5a: Porovnání vlivu konopí na průměrnou adhesi (%) jednotlivých laktobacilů k Caco-2 linii – ANOVA (na hladině $p < 0,05$)

Týden	Kmen	$\mu\text{g/ml}$	10.									14.												
			<i>L. gasseri</i>			<i>L. reuteri</i>			<i>L. plantarum</i>			<i>L. gasseri</i>			<i>L. reuteri</i>			<i>L. plantarum</i>						
			3	10	50	3	10	50	3	10	50	3	10	50	3	10	50	3	10	50				
10.	<i>L. gass</i>	3		****	N	N	N	N	N	N	****	****	****	N	N	N	N	N	*	N	N	****		
		10	****		****	***	N	N	N	N	N	N	N	N	***	N	N	N	N	N	N	N	N	
		50	N	****		N	N	N	****	****	****	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	****	
	<i>L. reut</i>	3	N	***	N		N	N	***	****	**	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	**	
		10	N	N	N	N		N	N	****	N	N	N	N	N	N	N	N	**	N	N	N	N	
		50	N	N	N	N	N	N	N	N	***	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	<i>L. plan</i>	3	****	N	****	***	N	N		N	N	N	****	N	N	****	N	N	N	N	N	N	N	
		10	****	N	****	****	****	****	**	N		N	****	****	****	**	**	N	****	****	****	N	N	
		50	****	N	****	**	N	N	N	N	N	N	N	**	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
14.	<i>L. gass</i>	3	N	N	N	N	N	N	N	****	****	**	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		10	N	***	N	N	N	N	N	****	****	**	N		N	N	N	N	N	N	N	N	**	
		50	N	N	N	N	N	N	N	N	****	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
	<i>L. reut</i>	3	N	N	N	N	N	N	N	N	**	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		10	N	N	N	N	N	N	N	N	**	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		50	*	N	N	N	N	N	N	N	**	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	<i>L. plan</i>	3	N	N	N	N	N	N	N	N	***	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		10	N	N	N	N	N	N	N	N	****	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		50	****	N	****	**	N	N	N	N	N	N	N	**	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

(* , ** , *** , **** - mezi vzorky existuje statisticky významný rozdíl na hladině $p < 0,05$; N – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl na hladině $p < 0,05$)

Tabulka 5b: Porovnání vlivu konopí na průměrnou adhesi (%) jednotlivých laktobacilů k HT29 linii – ANOVA (na hladině p <0,05)

Týden	Kmen μg/ml	10.									14.									
		<i>L. gasseri</i>			<i>L. reuteri</i>			<i>L. plantarum</i>			<i>L. gasseri</i>			<i>L. reuteri</i>			<i>L. plantarum</i>			
		3	10	50	3	10	50	3	10	50	3	10	50	3	10	50	3	10	50	
10.	<i>L. gass</i>	3	N	N	N	N	N	****	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		10	N		N	N	N	*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		50	N	N		N	N	****	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	<i>L. reut</i>	3	N	N	N		N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		10	N	N	N	N		N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		50	****	*	****	N	N		*	N	N	**	N	***	N	N	N	**	****	N
	<i>L. plan</i>	3	N	N	N	N	N	*		N	N		N	N	N	N	N	N	N	N
		10	N	N	N	N	N	N		N		N		N	N	N	N	N	N	N
		50	N	N	N	N		N		N	N		N	N	N	N	N	N	N	N
14.	<i>L. gass</i>	3	N	N	N	N	N	**	N	N	N		N	N	***	N	N	N	N	
		10	N	N	N	N	N	N		N	N	N	N	N	**	N	N	N	N	
		50	N	N	N	N	N	N	***	N	N	N	N	N	****	N	N	N	N	
	<i>L. reut</i>	3	N	N	N	N	N	N		N	N	N		N	*	N	N	N	N	
		10	N	N	N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
		50	****	**	****	**	**	N	**	N	N	***	**	****	*	N		***	****	N
	<i>L. plan</i>	3	N	N	N	N	N	**	N	N	N		N	N	***		N	N	N	
		10	N	N	N	N	N	****	N	N	N		N	N	****		N		N	
		50	N	N	N	N	N	N		N	N	N		N	N	N	N	N	N	

(*,**,***,**** - mezi vzorky existuje statisticky významný rozdíl na hladině p < 0,05; N – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl na hladině p < 0,05)

Tabulka 5c: Porovnání vlivu konopí na průměrnou adhesi (%) jednotlivých laktobacilů ke směsné kultuře Caco-2/HT29 – ANOVA (na hladině p < 0,05)

Týden	Kmen	µg/ml	10.									14.								
			<i>L. gasseri</i>			<i>L. reuteri</i>			<i>L. plantarum</i>			<i>L. gasseri</i>			<i>L. reuteri</i>			<i>L. plantarum</i>		
			3	10	50	3	10	50	3	10	50	3	10	50	3	10	50	3	10	50
10.	<i>L. gass</i>	3	N	*	N	N	N	****	*	****	****	*	***	N	****	****	****	**	N	****
		10	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		50	N	N	N	N	N	****	*	****	****	*	***	N	**	****	****	*	N	****
	<i>L. reut</i>	3	N	N	N	N	N	****	N	****	**	N	*	N	N	**	****	N	N	***
		10	N	N	N	N	N	****	N	N	N	N	N	N	N	N	****	N	N	N
		50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	****	N	N	N
	<i>L. plan</i>	3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
		10	****	*	****	*	*	N	*	N	N	N	N	N	**	*	****	**	****	N
		50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
14.	<i>L. gass</i>	3	N	N	N	N	N	****	N	N	N	N	N	N	N	N	****	N	N	N
		10	N	N	N	N	N	****	N	N	N	N	*	N	N	**	****	N	N	***
		50	N	N	N	N	N	****	N	N	N	N	N	N	N	N	****	N	N	N
	<i>L. reut</i>	3	N	N	N	N	N	**	N	N	N	N	N	N	N	N	***	N	N	N
		10	N	N	N	N	N	**	N	****	**	N	N	N	N	N	***	N	N	N
		50	N	N	N	N	N	**	N	*	N	N	N	N	N	N	***	N	N	N
	<i>L. plan</i>	3	N	N	N	N	N	***	N	N	N	N	N	N	N	N	****	N	N	N
		10	N	N	N	N	N	****	N	*	N	N	N	N	N	N	****	N	N	N
		50	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

(*,**,***,**** - mezi vzorky existuje statisticky významný rozdíl na hladině p < 0,05; N – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl na hladině p < 0,05)

6 Diskuze

Zdravý střevní mikrobiom člověka se odhaduje na 10^{14} mikroorganismů, které společně kódují 3-4 miliony genů, tedy 150× více než je lidský genom. Je zodpovědný za spoustu fyziologických procesů v lidském těle. Střevní mikrobiotu ovlivňuje celá řada vnějších a vnitřních faktorů, zahrnující věk, způsob životního stylu, léčbu antibiotiky nebo chronické nemoci a spousta dalších faktorů. Pokud dojde ke kvalitativním či kvantitativním změnám, a tak i narušení střevní mikrobioty, může dojít k dysbióze. Dysbióza může vyústit v infekční nebo neinfekční nemoc (Mizock 2015) a k její léčbě se pak využívají probiotika (Behnsen et al. 2013).

Probiotika jsou živé mikroorganismy mající pozitivní zdravotní vliv na svého hostitele (Sanders et al. 2018; Plaza-Diaz et al. 2019). Mechanismy účinku probiotik zahrnují modulaci imunitního systému, vhodnou interakci se střevní mikrobiotou, produkci SCFA (Sanders et al. 2018) a antimikrobiálních látek a interakci na ose střevo-mozek (Plaza-Diaz et al. 2019).

Stimulace systému může být dána jako adheze probiotických organismů (Kadlec & Jakubec 2014). Pozitivní účinek adheze spočívá v soutěžení probiotických mikroorganismů s patogenními o místa sloužící jako zdroj živin a energie. Bez přilnutí patogenního organismu k epitelu střeva nemůže dojít ke kolonizaci střev a následnému šíření infekce a dojde místo toho k jeho vyloučení (Singht et al. 2013).

Pro analýzu bakteriálních interakcí se střevními buňkami je k dispozici několik technik *in vitro*, které simulují adhesi k hostiteli. Nejběžněji využívané jsou kultury kolorektálního karcinomu Caco-2 a HT29 (Celebioglu & Svenssonová 2018). V rámci naší práce byly využity oba tyto modely a byla zjišťována adhezenční schopnost probiotických kmenů *L. gasseri*, *L. plantarum* a *L. reuteri*.

Byla zkoumána interakce probiotik s extrakty konopí, konkrétně vliv konopí na adhesi probiotik. Konopí je komplexní rostlina obsahující více než 1400 chemických látek. Převládajícími látkami jsou pro konopí unikátní kanabinoidy, konkrétně CBD, Δ^9 -THC, CBG a další (Atakan 2012). Dalšími neméně důležitými látkami konopí jsou terpenické sloučeniny, fenolické látky, alkaloidy, aminokyseliny, cukry aj. (Andre et al. 2016). Všechny zmíněné látky mají významný vliv na zdraví člověka (Landa et al. 2020). Konkrétně u polyfenolů bylo studií Volštátové et al. 2017 potvrzeno zvýšení adheze probiotických kmenů *L. gasseri* a *L. casei* k modelu střevního epitelu Caco-2 a HT29, tudíž existuje hypotéza, že extrakt konopí bude mít rovněž významný vliv na adhesi probiotických mikroorganismů. Avšak nebyla zatím provedena konkrétní studie, která by toto tvrzení přímo zkoumala a potvrdila, nebo ho naopak vyvrátila.

Biologicky aktivní látky obsažené v konopí, například myrcen, α -pinen a β -pinen, β -karyofylen, α -humulen, limonen, linalooly, terpinolen a další (Nissen et al. 2010; Frassinetti et al. 2020; Janatová et al. 2022), působí na buňky střevního epitelu a rovněž na vlastní bakterie v trávicím traktu, jak publikoval Gjawali & Ibrahim (2012). Fenolové sloučeniny mají vliv na životaschopnost a růst probiotik. Ukázalo se, že fenolické sloučeniny rostlin ve většině případů s koncentracemi v rozmezí 2,5–45 $\mu\text{g/ml}$ aktivují růst střevní mikrobioty (Volštátová et al. 2017), konkrétně laktobacilů a bifidobakterií. Zjistil také,

že chlorogenová a kávová kyselina obsažena v konopí pak inhibiční a antimikrobiální aktivitu proti patogenním mikroorganismům (Gjawali & Ibrahim 2012).

Mimo tyto dvě látky, také kvercetin, obsažený v semenech konopí, má prokazatelně inhibiční vliv na patogenní bakterie. Konkrétně u kvercetinu (koncentrace 5, 10, 22,5 a 45 $\mu\text{g/ml}$) pak bylo prokázáno statisticky významné zvýšení hydrofobicity buněčného povrchu laktobacilů, což vykazuje souvislost s adhezí probiotických organismů ke střevnímu epitelu (Santos et al. 2019). Kvercetin o koncentraci 0,53 a 0,002 $\mu\text{g/ml}$ byl ve studii Volštátové et al. (2017) vyhodnocen jako neaktivnější použitý polyfenol, který zvyšoval adhesi *L. gasseri* až o 95 %. V těsném závěsu pak byla chlorogenová kyselina, která zvyšovala adhesi probiotických organismů o nejméně 50 %. Závěrem její studie je fakt, že fenolické látky silně napomáhají adhezí probiotických laktobacilů, a tak i kolonizaci střevní sliznice.

V naší práci však průměrných hodnot adheze nad 100 % dosáhlo pouze 5 vzorků. Jednalo se o *L. gasseri* na Caco-2 linii s extraktem konopí sklizeného v 10. týdnu (10 $\mu\text{g/ml}$), *L. reuteri* na HT29 s oběma extrakty konopí (oba 50 $\mu\text{g/ml}$), kdy silnější byl ten z 14. týdne a nakonec i *L. plantarum* na obou liniích s konopím z 10. týdne (oba 10 $\mu\text{g/ml}$). Toto může být vysvětleno tím, že kmeny *L. reuteri* a *L. plantarum* mají dobrou adhesivní schopnost k buněčným liniím a hlenu (Jensen et al. 2012). Studie Dimitriho et al. (2014) zkoumající tendence jednotlivých kmenů laktobacilů k adhezí k buněčné linii Caco-2 toto tvrzení potvrdila. Zjistila totiž, že kmen *L. plantarum*, a v tomto případě i *L. gasseri* mají v porovnání s ostatními nejvyšší tendenci k adhezí, nezkoumal však ve své studii *L. reuteri*. To na rozdíl od něj zkoumal ve své studii Jensen et al. (2012) porovnávající adhesivní schopnosti různých laktobacilů – potvrdil výbornou schopnost adheze u *L. reuteri* k buňkám Caco-2.

Společné pro vzorky dosahující adheze nad 100 % bylo stáří 10 týdnů. Nejvyšších průměrných procentuálních hodnot adheze pak dosahoval kmen *L. plantarum*, kdy adheze dosahovala často přes 90 %. Konopí staré 14 týdnů, vyjma *L. gasseri* takto vysokých hodnot adheze nedosahovalo.

Vzhledem k faktu, že obsah kanabinoidů, terpenů i dalších biologicky aktivních látek v konopí se v průběhu růstu mění, je načasování sklizně klíčovým faktorem k ovlivnění konečného chemického složení (Jin et al. 2019). Ke správnému určení sklizně je ideální každodenní sledování rostliny – maximální výtěžnost s ohledem na chemické složení nastává při změně barvy trichomů na bílou barvu, případně světle hnědou až jantarovou (Ubeed et al. 2022). Typická doba sklizně rostliny se dle literatury pohybuje od 7 do 14 týdnu (Janatová et al. 2018; Massuela et al. 2022). Tento časový interval zahrnuje i naše dva zkoumané extrakty z konopí sklizené v 10. a 14. týdnu života rostliny. Jelikož je optimální rozsah sklizně dosti široký, zajímal nás rozdíl mezi týdny.

Studie Massuela et al. (2022) testovala obsah biologicky aktivních látek (konkrétně THC a CBD) v závislosti na době sklizně od 6. do 12. týdne. Výsledky jeho studie zjistily nejvyšší koncentraci látek v 9.–10. týdnu sklizně rostliny a od té doby byl sledován klesající trend obsahu biologicky aktivních látek v extraktech. Potvrdil tím domněnku, že koncentrace látek v rostlinách může souviset se stárnutím rostlin, kdy nedochází k tak intenzivní syntéze metabolitů. Vliv vospělosti konopí na obsah sekundárních metabolitů zkoumala také studie od Tremlové et al. (2020). Došlo zde k porovnání složení 3 extraktů z konopí sklizeného v 10., 15. a 19. týdnu. Při analýze polyfenolů došlo ke zjištění, že celkový obsah polyfenolických sloučenin dosahoval maxima v 10. týdnu a minima v 15. týdnu,

obsah polyfenolů tedy stárnutím klesal. Následně byly sledovány terpeny, které dosáhly identických výsledků jako v případě polyfenolů – po 15. týdnu jejich obsah opět významně klesal. Totéž bylo potvrzeno také u kanabinoidů, tudíž je potvrzena výše zmíněná studie Massuela et al. (2022), který dosáhl v případě kanabinoidů stejných výsledků. Tremlová et al. (2020) zkoumala navíc vliv data sklizně na obsah THC v konopí, které jako jediné vykazovalo zvyšující se koncentraci s postupem času. Z našich výsledků, kdy u konopí ze 14. týdne nedocházelo k výraznému zvýšení adheze probiotických kmenů, se dá předpokládat, že samotné THC nemá přímý pozitivní vliv na zvýšení adheze a může tak mít i na svědomí adhezi probiotických kmenů nedosahující ani 100 %.

Vzhledem k dostupné literatuře (Janatová et al. 2018; Jin et al. 2019; Tremlová et al. 2020; Massuela et al. 2022) je zřejmé, že obsah bioaktivních látek v konopí s postupem zrání výrazně klesá a byl tak potvrzen vliv doby sklizně konopí na obsah biologicky aktivních látek v jeho extraktech. Konopí sklizené v absolutní zralosti by mělo být chemickým složením rozmanitější a hodnotnější než konopí dosahující vysokého stáří. Polyfenoly i terpeny nacházející se v rostlinách konopí mají mimo zdraví prospěšné účinky potvrzený i účinek na zvýšení adheze probiotických organismů až o 50 %. Lze tedy tvrdit, že s vyšším obsahem biologicky aktivních látek v konopí, by měla růst i průměrná adheze laktobacilů ke střevnímu epitelu. V našem případě toto potvrzeno bylo, jelikož průměrná adheze laktobacilů s přidanými extrakty konopí sklizeného v 10. týdnu dosahovaly vyšších průměrných hodnot adheze než extrakty konopí sklizeného ve 14. týdnu. Jelikož konopí je ale rostlinou s převládajícími kanabinoidy jako bioaktivními látkami, tak fenolické i terpenické látky pak s vysokou pravděpodobností nevykazují dostatečný účinek na celkové zvýšení adheze nad 100 %. Tento fakt může být vysvětlen cytotoxickými účinkami kanabinoidních látek, které jsou považovány za inhibitory tvorby a růstu nádorů (Janatová et al. 2022).

Fytokanabinoidy mají prokazatelné protinádorové vlastnosti, včetně inhibice buněčné migrace, proliferace a angiogeneze a indukce apoptózy v rakovinných buňkách. Kanabinoidní látky totiž spouštějí smrt rakovinných buněk prostřednictvím různých cest přenosu signálu, včetně oxidativního stresu, zastavení buněčného cyklu, autofagie a apoptózy (Peeri et al. 2021; Peeri & Koltai 2022). Konkrétně THC inhibuje růst rakovinných buněk a spolu s CBD vykazuje synergickou inhibici buněčné proliferace v buněčných liniích (Mazuz et al. 2020; Peeri & Koltai 2022). Tento synergismus je známý pod pojmem „efekt doprovodu“ a jedná se buď o „intra-entourage“ – synergismus mezi fytokanabinoidy, nebo o tzv. „inter-entourage“, což znamená posílení biologické aktivity prostřednictvím interakce fytokanabinoidů a dalších sekundárních metabolitů konopí (Peeri & Koltai 2022), např. terpeny (Janatová et al. 2022).

Lze tvrdit, že pokud bude skutečně potvrzen cytotoxický účinek fytokanabinoidů v kombinaci s dalšími biologicky aktivními látkami, jako jsou terpeny či polyfenolické látky, na buňky kolorektálního karcinomu v *in vitro* modelech, musí adheze probiotických kmenů dosahovat rovněž nižších hodnot. S úmrtím buněk v modelu totiž ztrácí model i svá místa adheze pro probiotické mikroorganismy. Toto potvrzuje ve své studii zabývající se selektivní cytotoxickou aktivitou extraktů z konopí Janatová et al. (2022). Zjistila totiž, že některé biologicky aktivní látky konopí, konkrétně např. myrcen, β -elemen, β -selinen, α -bisabololoxid, β -ocimen a β -karyofylenoxid, pozitivně ovlivňují selektivitu cytotoxické aktivity proti nádorovým buňkám. Všechny zkoumané extrakty vykazovaly toxické účinky na buněčné

linie kolorektálního karcinomu HT29 a Caco-2. Vliv konopných extraktů na buněčné linie Caco-2 a HT29 zkoumala rovněž Moccia et al. 2019 a také potvrdila schopnost biologicky aktivních látek konopí aktivovat apoptickou buněčnou smrt rakovinných buněk. Zároveň je Frassinettim et al. (2020), který zkoumal antimikrobiální a antibiofilmovou aktivitu extraktu semen *Cannabis sativa* potvrzeno, že extrakty z konopí vykazují sice antimikrobiální aktivitu vůči patogenním mikroorganismům, ale současně nevykazují žádné inhibiční vlastnosti proti probiotickým bakteriím.

Cytotoxický vliv biologicky aktivních látek obsažených v konopí na rakovinné buňky tedy vysvětluje naše výsledky, kdy adheze probiotických kmenů ve většině případů nedosahovala hodnot nad 100 %. Fenolické látky i terpeny pak vykazují s fytoKANABINOIDY synergický cytotoxický efekt a podporují schopnost vyvolat buněčnou smrt. I přes to, že tyto látky mají prokázaný účinek zvyšovat adhesivní vlastnosti zdraví prospěšných mikroorganismů, je tedy nutno brát v potaz i tuto jejich schopnost a vysvětlit tím i naše výsledky.

7 Závěr

V této diplomové práci byl prokázán významný vliv konopí v rozdílném stupni zralosti na zvýšení adheze probiotických kmenů *L. reuteri*, *L. gasseri* a *L. plantarum* na buňky v *in vitro* modelu Caco-2 a HT29. V 5 případech probiotické organismy s přidáním vzorky konopí adherovaly s průměrnými hodnotami adheze přesahující 100 %. Hypotéza tvrdící, že užívání konopí má významný vliv na zvýšení adheze bakterií mléčného kvašení na buňky gastrointestinálního traktu byla potvrzena konkrétně u vzorků *L. gasseri* na Caco-2 linii s extraktem konopí z 10. týdnu (10 µg/ml), *L. reuteri* na HT29 s oběma extrakty konopí (50 µg/ml) a *L. plantarum* na obou liniích s konopím z 10. týdne (10 µg/ml).

Nejvyšší průměrné adheze dosáhlo *L. reuteri* na buněčné linii HT29 s extraktem konopí o stáří 14. týdnů s koncentrací 50 µg/ml, a to 127,58 %. Naopak nejnižší adheze vykazovalo *L. gasseri* s extraktem konopí z 10. týdne o koncentraci 3 µg/ml na buněčné linii Caco-2 hodnotou 45,05 %. Extrakty z konopí sklizeného v 10. týdnu však dosahovaly často vyšších průměrných hodnot adheze, než vzorky staré 14 týdnů. Byl prokázán vliv stupně zralosti rostliny na obsah biologicky aktivních látek v jejich částech. S postupem zrání obsah biologicky aktivních látek v konopí výrazně klesal.

Fytokanabinoidy spolu s fenolickými látkami a terpeny obsaženými v konopí vykazují protinádorovou aktivitu. Cytotoxická schopnost těchto látek může mít na svědomí snížení počtu buněk ve zkoumaných *in vitro* modelech, a tak i nižší množství buněk, ke kterým by mohly probiotické kmeny adherovat. Tudíž nemůže být dosaženo vyšších průměrných procentuálních hodnot adheze.

8 Literatura

- Adams P. 2019. Weedology/Marihuana – Vše o pěstování konopí. Positive Publishers. ISBN 978-90-7658-335-8.
- Awaisheh SS. 2012. Probiotic Food Products Classes, Types, and Processing. Probiotics. Available from <https://www.intechopen.com/chapters/39646>.
- Andre ChM, Hausman JF, Guerriero G. 2016. *Cannabis sativa*: The Plant of the Thousand and One Molecules. Frontiers in Plant Science. Available from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00019/full>.
- Atakan Z. 2012. *Cannabis*, a complex plant: different compounds and different effects on individuals. Therapeutic Advances in Psychopharmacology. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2045125312457586>.
- Balant M, Gras A, Ruz M, Valles J, Vitales D, Garnatje T. 2021. Traditional uses of Cannabis: An analysis of the CANNUSE database. Journal of Ethnopharmacology. **279**. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874121005912#bib66>.
- Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. 2013. Probiotics: Properties, Examples and Specific Applications. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. **3**:3. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23457295/>.
- Belury M. 2002. Not all trans-fatty acids are alike: What consumers may lose when we oversimplify nutrition facts. Journal of the American Dietetic Association. **102**: 1606-1607. Available from <https://www.proquest.com/openview/f7330710ed906cedb1a76b39b27de471/1?pq-origsite=gscholar&cbl=49142>.
- Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. 2010. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. Early Human Development. **86**:13-15. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378378209002680>.
- Borrelli F et al. 2013. Beneficial effect of the non-psychotropic plant cannabinoid cannabigerol on experimental inflammatory bowel disease. Biochemical Pharmacology. **85**:1306-1316. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295213000543>.
- Cani PD, Everard A, Duparc T. 2013. Gut microbiota, enteroendocrine functions and metabolism. Current Opinion in Pharmacology. **13**:935-940. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489213001689>.
- Casano S, Grassi G, Martini V, Michelozzi M. 2011. Variations in Terpene Profiles of Different Strains of *Cannabis sativa* L. Fundacion Canna. Available from <https://www.fundacion-canna.es/en/variations-terpene-profiles-different-strains-cannabis-sativa-l>.
- Celebioglu HU & Svensson B. 2018. Dietary Nutrients, Proteomes, and Adhesion of Probiotic Lactobacilli to Mucin and Host Epithelial Cells. Microorganism **6**: 90. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/6/3/90/htm>.
- Cosentino SL, Testa G, Scordia D, Copani V. 2012. Sowing time and prediction of flowering of different hemp (*Cannabis sativa* L.) genotypes in southern Europe. Industrial Crops and

- Products. **37**: 20-33. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669011004444#bib0015>.
- Cox EJ, Maharo N; Patilea-Vrana G, Unadkat JD, Rettie AE, McCune JS, Paine MF. 2019. A marijuana-drug interaction primer: Precipitants, pharmacology, and pharmacokinetics. *Pharmacology & Therapeutics*. **201**: 25-38. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725819300750>.
- Derrien M, Alvarez AS, de Vos WM. 2019. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology*. **27**:997-1010. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X19302148>.
- Dimitri Z, Gotova I, Chordbadjiyska E. 2014. In vitro characterization of the adhesive factors of selected probiotics to Caco-2 epithelium cell line. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. **28**: 1079-1083. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2014.969948>.
- Doron S & Snyderman DR. 2015. Risk and Safety of Probiotics. *Clinical Infect Disease*. 60:129-134. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4490230/>.
- Douglas LC & Sanders ME. 2008. Probiotics and Prebiotics in Dietetics Practice. *Journal of the American Dietetic Association*. **108**:510-521. Available from <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-baaf5bf9-1607-37b9-8a7b-8a001e38ad84>.
- ElSohly MA, Radwan MM, Gul W, Chandra S, Galal A. 2017. Phytochemistry of *Cannabis sativa* L. Phytocannabinoids. 1-36. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45541-9_1.
- ElSohly MA. 2007. Marijuana and the Cannabinoids. Humana Press. 1-17. Available from https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=G_XtSXd4JHOC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Marijuana+and+the+cannabinoids&ots=MKnvbLQe1G&sig=w7xvjedMHlp3ERc8DXqBngLAORE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.
- Erdem AL, Avelino F, Xicohtencatl-Cortes J, Giron JA. 2007. Host Protein Binding and Adhesive Properties of H6 and H7 Flagella of Attaching and Effacing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JB.00464-07>.
- Frassinetti S, Moccia E, Caltavuturo L, Gabriele M, Longo V, Bellani L, Giorgi G, Giorgetti L. 2018. Nutraceutical potential of hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds and sprouts. *Food Chemistry*. **262**: 56-66. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618307180>.
- Frassinetti S, Gabriele M, Moccia E, Longo V, Di Gioia D. 2020. Antimicrobial and antibiofilm activity of *Cannabis sativa* L. seeds extract against *Staphylococcus aureus* and growth effects on probiotic *Lactobacillus* spp. *LWT*. **124**. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643820301377>.
- Fruhauf P. 2017. Střevní mikrobiota a možnosti ovlivnění. *Pediatrická praxe*. **18**: 239-240.

- Gjawali R. & Ibrahim SA. 2012. Impact of plant derivatives on the growth of foodborne pathogens and the functionality of probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **95**: 29-45. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-012-4117-x>.
- George Kelly R, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G. 2018. Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis*. **26**:927-939. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949818300309>.
- Hakl M. 2015. Léčba chronické bolesti. *Remedia*. **25**:422-426.
- Hasan N & Yang H. 2019. Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *Microbiology*. Available from: <https://peerj.com/articles/7502/#fig-3>.
- Hervert-Hernández D & Goni I. 2011. Dietary Polyphenols and Human Gut Microbiota: a Review. *Food Reviews International*. **27**. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/87559129.2010.535233?scroll=top&needAccess=true>.
- Huestis MA. 2007. Human Cannabinoid Pharmacokinetics. *Chem Biodivers*. **4**:1770-1804. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2689518/>.
- Cheng LK, O 'Grady G, Du P, Egbuji JU, Windsor JA, Pullan AJ. 2010. Gastrointestinal system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. **2**:65-79. Available from <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/wsbm.19>.
- Cheng et al. 2013. Probiotic Yeast Inhibits VEGFR Signaling and Angiogenesis in Intestinal Inflammation. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0064227>.
- Chessa D, Winter MG, Nuccio SP, Tukel C, Baumler AJ. 2008. RosE represses Std fimbrial expression in *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium*. *Molecular Microbiology*. **68**: 573-587. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2958.2008.06185.x>.
- Iuvone T, Esposito G, Filippis D, Scuderi C, Steardo L. 2009. Cannabidiol: A Promising Drug for Neurodegenerative Disorders? *CNS Neuroscience & Therapeutics*. **15**:65-75. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1755-5949.2008.00065.x>.
- Izzo L, Castaldo L, Narvaez A, Graziani G, Gaspari A, Rodriguez-Carrasco Y, Ritieni A. 2020. Analysis of Phenolic Compounds in Commercial *Cannabis sativa* L. Inflorescences Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Herbal Medicine Research*. **25**. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/3/631/htm>.
- Janatová A, Fraňková A, Tlustoš P, Hamouz K, Božik M, Klouček P. 2018. Yield and cannabinoids contents in different cannabis (*Cannabis sativa* L.) genotypes for medical use. *Industrial Crops and Products*. **112**: 363-367. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669017308221>.
- Janatová A, Doskočil I, Božik M, Fraňková A, Tlustoš P, Klouček P. 2022. The chemical composition of ethanolic extracts from six genotypes of medical cannabis (*Cannabis*

- sativa* L.) and their cytotoxic activity. *Chemico-Biological Interactions*. **353**. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279722000059>.
- 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. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160511006805#ec0010>.
- Jin D, Jin S, Chen J. 2019. Cannabis Indoor Growing Conditions, Management Practices, and Post-Harvest Treatment: A Review. *American Journal of Plant Sciences*. **10**: 22. Available from: https://www.scirp.org/html/5-2604131_93052.htm?pagespeed=noscript.
- Juge N. 2012. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in Microbiology*. **20**:30-39. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X11001879>.
- Kadlec R, Křížová L, Halová D. 2011. *In vitro* modely adherence probiotik: Přehled. *Mlékárenské listy*. **124**:1-2. Available from http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2011/124_s_i-iii.pdf.
- Kadlec R, Jakubec M. 2014. The effect of prebiotics on adherence of probiotics. *Journal of Dairy Science*. **97**:1983-1990. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24485681/>.
- Kahouli I, Malhotra M, Alaoul-Jamali MA, Prakash S. 2015. In-Vitro Characterization of the Anti-Cancer Activity of the Probiotic Bacterium *Lactobacillus Fermentum* NCIMB 5221 and Potential against Colorectal Cancer Cells. *Journal of Cancer Science & Therapy*. **7**: 224-235. Available from <https://pdfs.semanticscholar.org/a4d1/220c155e8b0f300f91dd44e0e5e5af18fdd2.pdf>.
- Kumar A & Kumar D. 2015. Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. *Anaerobe*. **33**: 117-123. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996415000323>.
- Landa L et al. 2020. Léčebné konopí v současné medicínské praxi. GRADA. ISBN: 978-80-247-3967-0.
- Laparra J.M. & Sanz Y. 2009. Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett. Appl. Microbiol.*, **49**: 695-701.
- Lazar V et. al. 2018. Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Frontiers in Immunology*. **9**. Available from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01830/full>.
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. 2008. Genes and Molecules of *Lactobacilli* Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **72**:728-764. Available from <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/MMBR.00017-08>.
- Liao DH, Zhao JB, Gregersen H. 2009. Gastrointestinal tract modelling in health and disease. *World Journal of Gastroenterology*. **15**. <https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v15/i2/169.htm>.

- Moccia S, Siano F, Russo GL, Volpe MG, La Cara F, Pacifico S, Piccolella S, Picariello G. 2019. Antiproliferative and antioxidant effect of polar hemp extracts (*Cannabis sativa* L., Fedora cv.) in human colorectal cell lines. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. **71**: 410-423. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09637486.2019.1666804?scroll=top&needAccess=true>.
- Mackowiak PA. 2013. Recycling Metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in Public Health*. **1**: 52. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2013.00052/full>.
- Markowiak P. & Slizewska K. 2017. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*. **9**. Available from <https://www.mdpi.com/2072-6643/9/9/1021>.
- Massuela DC, Hartung J, Munz S, Erpenbach F, Graeff-Honninger S. 2022. Impact of Harvest Time and Pruning Technique on Total CBD Concentration and Yield of Medicinal Cannabis. *Plants*. Available from: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/1/140/htm>.
- Mazuz M et al. 2020. Synergistic cytotoxic activity of cannabinoids from cannabis sativa against cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) in-vitro and ex-vivo. *Oncotarget*. **11**: 1141-1156. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7138167/>.
- McFarland LV. 2007. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Medicine and Infectious Disease*. **5**: 97-105. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1477893905000918>.
- Mediavilla V, Jonquera M, Schmid-Slembrouck I, Soldati A. 1998. *Journal of the International Hemp Association*. **65**: 68-74. Available from [http://hokkaido-hemp.net/Decimal%20code%20for%20growth%20stages%20of%20hemp\(1998\).pdf](http://hokkaido-hemp.net/Decimal%20code%20for%20growth%20stages%20of%20hemp(1998).pdf).
- Micalizzi G, Vento F, Alibrando F, Donnarumma D, Dugo P, Mondello L. 2021. *Cannabis Sativa* L.: a comprehensive review on the analytical methodologies for cannabinoids and terpenes characterization. *Journal of Chromatography A*. **1637**. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967320311389?via%3Dihub>.
- Ministerstvo zdravotnictví. 2021. Zákon č. 366 ze dne 8.10.2021. o návykových látkách a o změně některých dalších zákonů. Česká republika. Available from: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2021-366>.
- Ministerstvo zdravotnictví. 2007. Zákon č. 378 ze dne 31.12.2007 o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů. Česká republika. Available from: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2007-378>.
- Ministerstvo zdravotnictví. 2015. Zákon č. 236 ze dne 17.9.2015 o stanovení podmínek pro předepisování, přípravu, distribuci, výdej a používání individuálně připravovaných léčivých přípravků s obsahem konopí pro léčebné použití. Česká republika. Available from: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2015-236>.
- Mizock AB. 2015. Probiotics. *Disease-a-Month*. **61**: 259-290. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011502915000607?via=ihub>.

- Musilová S, Rada V, Vlková E, Bunešová V, Nevoral J. 2015. Colonisation of the gut by bifidobacteria is much more common in vaginal deliveries than Caesarean sections. *Acta Paediatrica*. **104**: 184-186. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25601553/>.
- Nandyopadhyay B & Mandal NC. 2014. Probiotics, Prebiotics and Synbiotics – In Health Improvement by Modulating Gut Microbiota: The Concept Revisited. **3**: 410-420. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Biplab-Bandyopadhyay/publication/354022410_Probiotics_Prebiotics_and_Synbiotics_-_In_Health_Improvement_by_Modulating_Gut_Microbiota_The_Concept_Revisited/links/611f5f131e95fe241ae335f6/Probiotics-Prebiotics-and-Synbiotics-In-Health-Improvement-by-Modulating-Gut-Microbiota-The-Concept-Revisited.pdf.
- Naef M, Curatolo M, Felix ST, Nielsen LA, Zbinden A, Brenneisen R. 2003. The analgesic effect of oral delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), morphine, and a THC-morphine combination in healthy subjects under experimental pain conditions. *Pain*. **105**:79-88. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304395903001635>.
- Newmeyer MN, Swortwood MJ, Barnes AJ, Abulseoud OA, Scheidweiler KB, Huestis MA. 2016. Free and Glucuronide Whole Blood Cannabinoids' Pharmacokinetics after Controlled Smoked, Vaporized, and Oral Cannabis Administration in Frequent and Occasional Cannabis Users: Identification of Recent Cannabis Intake. *Clinical Chemistry*. **62**:1579-1592. Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/62/12/1579/5612073?login=true>.
- Nissen L, Zatta A, Stefanini I, Grandi S, Sgorbati B, Biavati B, Monti A. 2010. Characterization and antimicrobial activity of essential oils industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*. **81**: 413-419. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X09002780>.
- Nowak A, Motyl I, Śliżewska K, Libudzisz Z, Klewicka E. 2016. Adherence of probiotic bacteria to human colon epithelial cells and inhibitory effect against enteric pathogens – *In vitro* study. *International Journal of Dairy Technology*. **69**:532-539. Available from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1471-0307.12286>.
- Nuutinen T. 2018. Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **157**: 198-228. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523418306408>.
- Oelschlaeger TA. 2010. Mechanism of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology*. **300**: 57-62. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422109000861>.
- Peeri H. & Koltai H. 2022. Cannabis Biomolecule Effects on Cancer Cells and Cancer Stem Cells: Cytotoxic, Anti-Proliferative, and Anti-Migratory Activities. *Biomolecules*. **12**. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/4/491/htm>.
- Peeri H. et al. 2021. Specific Compositions of Cannabis sativa Compounds Have Cytotoxic Activity and Inhibit Motility and Colony Formation of Human Glioblastoma Cells In Vitro. *Cancers*. **13**. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/7/1720/htm>.

- Pertwee RG. 2009. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. *British Journal of Pharmacology*. **147**: 163-171. Available from: <https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/sj.bjp.0706406>.
- Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. 2019. Mechanism of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*. **10**: 49-66. Available from: https://academic.oup.com/advances/article/10/suppl_1/S49/5307225?login=true.
- Pollastro F, Minassi A, Fresu LG. 2018. Cannabis Phenolics and their Bioactivities. *Current Medicinal Chemistry*. **25**: 1160-1185. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2018/00000025/00000010/art00004>
- Radwan MM, Chandra S, Gul S, ElSohly M. 2021. Cannabinoids, Phenolics, Terpenes and Alkaloids of Cannabis. *Molecules*. **26**. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/9/2774/htm>.
- Rea KA, Casaretto JA, Al-Abdul-Wahid MS, Sukumaran A, Geddes-McAlister J, Rothstein SJ, Akhtar TA. 2019. Biosynthesis of cannflavins A and B from *Cannabis sativa* L. *Phytochemistry*. **164**: 162-171. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942218303819>.
- Reed KK, Wickham R. 2009. Review of the Gastrointestinal Tract: From Macro to Micro. *Seminars in Oncology Nursing*. **25**:3-14. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749208108000739>.
- Rehfeld A, Nylander M, Karnov K. 2017. The Digestive System I, II. *Compendium of Histology*. Available from: https://www.researchgate.net/publication/319587111_The_Digestive_System_I_The_Alimentary_Canal.
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano G, Gasbarrini A, Mele M. 2019. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. **7**. <https://www.mdpi.com/2076-2607/7/1/14>.
- Romano B, Borrelli F, Pagano E, Cascio MG, Pertwee RG, Izzo AA. 2014. Inhibition of colon carcinogenesis by a standardized *Cannabis sativa* extract with high content of cannabidiol. *Phytomedicine*. **21**:631-639. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711313004728>.
- Russell DA, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. 2011. Metabolic activities and probiotic potential of *bifidobacteria*. *International Journal of Food Microbiology*. **149**:88-105. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511003382>.
- Russo EB. 2016. Clinical Endocannabinoid Deficiency Reconsidered: Current Research Supports the Theory in Migraine, Fibromyalgia, Irritable Bowel, and Other Treatment-Resistant Syndromes. *Cannabis Cannabinoid Research*. **1**:154-165. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5576607/>.

- Sanders ME, Merenstein D, Merrifield CA, Hutkins R. 2018. Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin*. **43**: 212-225. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/nbu.12334>.
- Sánchez-Duffhues G, Calzado MA, García de Vinuesa A, Appendino G, Fiebich BL, Looock U, Lefarh-Risse A, Krohn K, Munoz E. 2009. Denbinobin inhibits nuclear factors- κ B and induces apoptosis via reactive oxygen species generation in human leukemic cells. *Biochemical Pharmacology*. **77**: 1401-1409. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295209000288>.
- Salvetti E, Torriani S, Felis GE. 2012. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. **4**:217-226. Available from <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12602-012-9117-8>.
- Sarkar SA, Sarkar K, Majhi R, Basu S. 2016. Probiotics: A Way of Value Addition in Functional Food. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*. 290-293. Available from https://www.researchgate.net/publication/303070202_Probiotics_A_Way_of_Value_Addition_in_Functional_Food.
- Schachtsiek M, Hammes WP, Hertel CH. 2004. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001 T Surface Protein Cpf Mediating Coaggregation with and Aggregation among Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. Available from: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.70.12.7078-7085.2004>.
- Singh VP, Sharma J, Babu S, Singla A. 2013. Probiotics: A Way of Value Addition in Functional Food. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics*. 290-293. Available from <https://www.jpma.org.pk/article-details/400>.
- Slover ChM, Danziger L. 2008. *Lactobacillus*: a Review. *Clinical Microbiology Newsletter*. **30**:23-27. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019643990800007X>.
- Smeriglio A, Galati EM, Monfore MT, Lanuzza F, Dangelo V, Circosta C. 2016. Polyphenoli Compounds and Antioxidant Activity of Cold-Pressé Seed Oil from Finola Cultivar of *Cannabis sativa* L. *Phytotherapy Research*. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ptr.5623?saml_referrer.
- Sommano SR, Chittasupho CH, Ruksiriwanich W, Jantrawut P. 2020. The Cannabis Terpenes. *Molecules*. **25**. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/24/5792/htm>.
- Song S, Lee SJ, Park DJ, Oh S, Lim KT. 2015. The anti-allergic activity of *Lactobacillus plantarum* L67 and its application to yogurt. *Journal of Dairy Science*. **99**: 9372-9382. Available from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030216307093>.
- Tojo R. 2014. Intestinal microbiota in health and disease: Role of *bifidobacteria* in gut homeostasis. *World Journal of Gastroenterology*. **20**. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25386066/>.

- Tran T, Kavuluru R. 2020. Social media surveillance for perceived therapeutic effects of cannabidiol (CD) products. *International Journal of Drug Policy*. **77**:102688. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955395920300293>.
- Tremlová B, Koudelková Mikulášková H, Hajduchová K, Jancikova S, Kaczorová D, Zeljkovic SC, Dordevic D. 2020. Influence of Technological Maturity on the Secondary Metabolites of Hemp Concentrate (*Cannabis sativa* L.). *Foods*. **10**. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/6/1418/htm>.
- Ubeda C, Pamer EG. 2012. Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends in Immunology*. **33**:459-466. Available from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22677185/>
- Ubeed HMS, Wills RBH, Chandapala J. 2022. Post-Harvest Operations to Generate High-Quality Medicinal Cannabis Products: A Systemic Review. *Molecules*. **27**. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/5/1719/htm>
- Uhernik AL, Montoya ZT, Balkissoon CD, Smith JP. 2018. Learning and memory is modulated by cannabidiol when administered during trace fear-conditioning. *Neurobiology of Learning and Memory*. **149**: 68-76. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074742718300224>.
- Umbrello G & Esposito S. 2016. Microbiota and neurologic diseases: potential effects of probiotics. *Journal of Translational Medicine*. **14**. Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-016-1058-7>.
- Van Tassell ML, Miller MJ. 2011. *Lactobacillus* Adhesion to Mucus. *Nutrients*. **3**:613-636. Available from <https://www.mdpi.com/2072-6643/3/5/613>.
- Volštátová T, Maršík P, Rada V, Geigerová M, Havlík J. 2017. Effect of apple extracts and selective polyphenols on the adhesion of potential probiotic strains of *Lactobacillus gasseri* R and *Lactobacillus casei* FMP. *Journal of Functional Foods*. **35**: 391-397. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464617303213>
- Weber J, Schley M, Casutt M, Gerber H, Schuepfer G, Rukwied R, Schleiner W, Ueberall M, Konrad Ch. 2009. Tetrahydrocannabinol (Delta 9-THC) Treatment in Chronic Central Neuropathic Pain and Fibromyalgia Patients: Results of a Multicenter Survey. *Anesthesiology Research and Practice*. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/arp/2009/827290/>.
- World Health Organisation (WHO). 1986. Cancer pain relief. Available from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37896/9241544821.pdf;jsessionid=A85F3B3C38BA471ABC993A016BE619A8?sequence=1>.
- World Health Organisation (WHO) & Food agronomic organisation (FAO). 2006. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. 2006. FAO & WHO. Available from <http://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>.
- World Health Organisation (WHO). 2019. WHO Guidelines for the pharmacological and radiotherapeutic management of cancer pain in adults and adolescents. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241550390>.

- Zarate G, Morata De AV, Peraz CA, Gonzales S. 2002. Some factors affecting the adherence of probiotic *Propionibacterium acidipropionici* CRL 1198 to intestinal epithelial cells. *Canadian Journal of Microbiology*. **48**: 449-457. Available from: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/w02-036>.
- Zehra A, Burns J, Liu CK, Manza P, Wiers CE, Volkow ND, Wang GJ. 2018. Cannabis Addiction and the Brain: a Review. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. **13**:438-452. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/S11481-018-9782-9>.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

BMK Bakterie mléčného kvašení

CBD Kanabidiol

CBG Kanabigerol

CNS Centrální nervová soustava

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's medium

FBS Fetální bovinní sérum

GIT Gastrointestinální trakt

IBD Zánětlivé onemocnění střev

MTX Methotrexát

MUB Mucin vázající proteiny

MUC Muciny

PBS Fosfátový pufr

PTS Prolinové, threoninové a serinové vrstvy

SAKL Státní agentura pro léčebné použití

SCFA Mastné kyseliny s krátkým řetězcem, Short chained fat acids

SÚKL Státní úřad pro kontrolu léčiv

THC Δ^9 -tetrahydrokanabinol

WHO Světová zdravotnická organizace, World health organisation

