

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Porovnání *in cellulo* modelu pro testování adhesivních
vlastností probiotik**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Iveta Ondráčková

Obor studia: Výživa a potraviny

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

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Porovnání *in cellulo* modelu pro testování adhesivních vlastností probiotik" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. července 2020

Poděkování

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

Porovnání *in cellulo* modelu pro testování adhesivních vlastností probiotik

Souhrn

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které mají pozitivní vliv na zdraví hostitele. Pro maximalizaci možného pozitivního efektu je nezbytné, aby mělo probiotikum dobrou schopnost adherovat na střevní hlen a epitelální buňky. K hodnocení adheze je nejčastěji využíváno různých *in vitro* buněčných linií, jako jsou Caco-2, HT29 nebo HT29-MTX. Jedná se o buněčné linie kolorektálního karcinomu, jejichž nevýhodou je to, že mají jiné vlastnosti než zdravé buněčné linie. Dosud je ale pouze minimum výsledků na zdravé buněčné linii střevního epitelu.

Cílem této práce bylo stanovit adhezi *Lactobacillus plantarum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus* a *L. reuteri* na různých buněčných liniích střevního epitelu. Adheze laktobacilů byla stanovena pomocí buněčné linie Caco-2, HT29, HT29-MTX a směsných kultur Caco-2/HT29-MTX a Caco-2/HT29. Zároveň byly laktobacily testovány také pomocí zdravé buněčné linie tenkého (FHS 74Int.) a tlustého (CCD 841Con) střeva. Následně byly pro stanovení % adheze použity standartní kultivační metody využívající ROGOSA agar s kultivací 72 h.

Na buněčnou linii HT29 laktobacily adherovaly okolo 68 % a rozdíly mezi druhy nebyly patrné. Obdobně tomu bylo i u buněčné linie HT29-MTX (77 %). Při porovnání těchto dvou modelů bylo zjištěno, že 3 ze 4 testovaných laktobacilů lépe adherují na buněčnou linii HT29-MTX, tudíž hypotézu, že je buněčná linie HT29 vhodnější než HT29-MTX produkující MUC5, nelze potvrdit. Nejvyšší hodnoty adheze byly zjištěny u buněčné linie Caco-2, kdy nejvýrazněji adheroval *L. plantarum* (94,3 %) a naopak nejméně *L. rhamnosus* (66,5 %). Dále bylo zjištěno, že rozdíly mezi směsnými kulturami s produkcí mucinu (Caco-2/HT29-MTX) a bez ní (Caco-2/HT29) nejsou patrné. Adheze se v průměru lišila pouze o 3 %. Obdobně vysokých hodnot adheze bylo dosaženo i u zdravé buněčné linie tenkého střeva (FHS 74Int.), kdy se průměrná adheze pohybovala okolo 77 %. Naproti tomu buněčná linie CCD 841Con není vhodná pro stanovení adheze probiotik. V průběhu kultivace nebyla schopná vytvořit odpovídající buněčný model.

Z dosažených výsledků není patrný výrazný rozdíl mezi hodnotami adheze na jednotlivé buněčné modely. Z hlediska kultivačních požadavků jsou tedy buněčné modely založené na kolorektálních karcinomech vhodnější než normální zdravé buňky.

Klíčová slova: adheze; probiotika; HT29; HT29-MTX; CCD 841Con

Comparison of *in cellulo* models for testing of probiotics adhesive properties

Summary

Probiotics are living microorganisms that have a positive effect on the health of the host. To maximize the possible positive effect, it is essential that the probiotic has a good ability to adhere to intestinal mucus and epithelial cells. Various *in vitro* cell lines, such as Caco-2, HT29 or HT29-MTX, are most commonly used to assess adhesion. These are colorectal cancer cell lines, the disadvantage of which is that they have different properties than healthy cell lines. So far, however, there is only a minimum of results on a healthy intestinal epithelial cell line.

The aim of this thesis was to determine the adhesion of *Lactobacillus plantarum*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus* and *L. reuteri* on different cell lines of the intestinal epithelium. Lactobacillus adhesion was determined using the Caco-2, HT29, HT29-MTX cell line and mixed cultures Caco-2 / HT29-MTX and Caco-2 / HT29. At the same time, lactobacilli were also tested using a healthy small intestine (FHS 74Int.) and large intestine (CCD 841Con) cell line. Subsequently, standard culture methods using ROGOSA agar with a culture of 72 h were used to determine the % adhesion.

On the HT29 cell line, lactobacilli adhered to about 68 % and no differences between strains were seen. The situation was similar for the HT29-MTX cell line (77 %). Comparing the two models, it was found that 3 of the 4 lactobacilli tested adhered better to the HT29-MTX cell line, so the hypothesis that the HT29 cell line is more suitable than the MUC5-producing HT29-MTX cannot be confirmed. The highest values of adhesion were found in the cell line Caco-2, where *L. plantarum* adhered the most (94.3 %) and *L. rhamnosus* the least (66.5 %). Furthermore, it was found that the differences between mixed cultures with (Caco-2/HT29-MTX) and without mucin production (Caco-2 / HT29) are not apparent. Adhesion differed on average by only 3 %. Similarly high values of adhesion were achieved in a healthy small intestinal cell line (FHS 74Int.), where the average adhesion was around 77 %. In contrast, the CCD 841Con cell line is not suitable for determining probiotic adhesion. During the culture, it was not able to create a suitable cell model.

The achieved results do not show a significant difference between the values of adhesion to individual cell models. Thus, in terms of culture requirements, cell models based on colorectal cancers are more suitable than normal healthy cells.

Keywords: adhesion; probiotics; HT29; HT29-MTX; CCD 841Con

Obsah

1 Úvod	7
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	8
3 Literární rešerše	9
3.1 Mikrobiota trávicího traktu	9
3.2 Probiotika	10
3.2.1 Vlastnosti a požadavky na probiotika.....	10
3.2.2 Významné druhy probiotik	11
3.2.3 Zdroje probiotik	14
3.2.4 Účinky probiotik.....	15
3.2.5 Mechanismus působení probiotik	17
3.3 Adheze probiotik na střevní trakt	19
3.3.1 Střevní trakt	19
3.3.2 Mechanismus adherence	20
3.3.3 Faktory ovlivňující adhezi	23
3.4 Testování adherence probiotik	24
3.4.1 Metody <i>in vitro</i> testování.....	24
4 Metodika	28
4.1 Materiál	28
4.2 Metoda	28
4.2.1 Kultivace tkáňových kultur.....	28
4.2.2 Založení destičky	28
4.2.3 Příprava inokul probiotik	29
4.2.4 Testování adheze	29
4.2.5 Statistika	29
5 Výsledky	30
5.1 Stanovení adheze <i>L. gasseri</i>	30
5.2 Stanovení adheze <i>L. rhamnosus</i>	31
5.3 Stanovení adheze <i>L. plantarum</i>	32
5.4 Stanovení adheze <i>L. reuteri</i>	33
5.5 Porovnání adheze jednotlivých laktobacilů	34
6 Diskuze	36
7 Závěr	41
8 Literatura	42
9 Seznam použitých zkratk a symbolů	50

1 Úvod

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které mohou příznivě ovlivňovat zdravotní stav hostitele prostřednictvím vzájemné interakce. Jejich pozitivní účinky jsou známy již celá desetiletí, ale termín probiotika, který pochází z řeckého výrazu „pro život“, byl poprvé použit až v roce 1960. Velmi často se také uvádí, že se jedná o druhý mozek člověka.

Mezi probiotika jsou řazeny některé druhy bakterií a další mikroorganismy, přičemž nejvíce prozkoumanými a zároveň nejpoužívanějšími probiotiky jsou bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Můžeme je nalézt v celé řadě fermentovaných potravin, a to zejména v mléčných a masných výrobcích a výrobcích připravovaných kvašením obilovin, ovoce nebo zeleniny. Druhou možností je, že jsou přijímány jako doplněk stravy, a to zejména v průběhu onemocnění a podávání antibiotik.

Bylo prokázáno, že probiotika vykazují širokou škálu prospěšných účinků pro hostitele. Pozitivně působí při prevenci a léčbě různých zdravotních problémů spojených s gastrointestinálním traktem (GIT), jako je například zánětlivé onemocnění střev, syndrom dráždivého tračníku nebo infekční průjem. Účinně mohou působit ale také i při onemocnění, které přímo nesouvisí s GIT, a to při obezitě, *diabetu mellitus* II. typu, cholesterolémií nebo při nealkoholickém onemocnění jater.

Aby byl mikrobiální kmen deklarován jako probiotikum, musí splňovat některá bezpečnostní a funkční kritéria. Pro dostatečnou funkčnost je nezbytné, aby bylo schopné přežít podmínky v GIT a následně adherovat na střevní epitelální buňky a střevní hlen hostitele. Adherenční schopnost probiotik je důležitá z mnoha důvodů. Je nezbytným procesem pro jejich perzistenci, proliferaci a přechodné kolonizaci ve střevech, a tedy pro dosažení očekávaného zdravotního účinku. Tím, že probiotické organismy mají schopnost se přichytit na střevních epitelálních buňkách, čímž dochází k blokaci adhezivních míst, zabraňují kolonizaci patogeních bakterií, které jsou nositeli různých onemocnění. Na adherenci je také úzce závislá jejich schopnost modulovat imunitní systém hostitele.

Z tohoto důvodu se jeví jejich testování na buněčných liniích lidského střevního epitelu a modelech z nich vytvořených jako vhodný první krok pro případné budoucí využití. V současné době jsou využívány zejména modely buněčných linií Caco-2 a HT29, případně HT29-MTX. Buněčná linie HT29-MTX je buněčná linie odvozená od HT29, která je schopna produkovat mucin. Jedná se ale o mucin typu MUC5AC, který převládá nad MUC2, jenž je laktobacily preferován. Z tohoto důvodu se jeví jako vhodnější buněčná linie HT29. Nevýhodou všech výše zmíněných buněčných linií je to, že se jedná o buněčné linie kolorektálního karcinomu a jejich vlastnosti tak mohou být od normálních buněk střevního epitelu pozměněny.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Využití buněčné linie HT29 při testování adhečních vlastností probiotik je vhodnější buněčnou linií než HT29-MTX, která produkuje MUC5. Stejně jako buněčné linie kolorektálního karcinomu lze pro testování adhečních vlastností využít i buňky zdravé.

Cílem práce je otestovat dva kmeny probiotik se schopností adherovat na různých buněčných modelech. Dále určit, jaký model se nejlépe hodí pro testování a zda lze využít i normální buňky tlustého střeva CCD 841Con.

3 Literární rešerše

3.1 Mikrobiota trávicího traktu

Gastrointestinální trakt (GIT) je přirozeně osídlen rozmanitou střevní mikrobiotou, která tvoří s hostitelem symbiotický vztah (Behnsen et al. 2013). Střevní mikrobiotu tvoří přibližně 10^{14} buněk (Nishiyama et al. 2016) zahrnujících více než tisíc různých druhů bakterií (Engen et al. 2015). Kromě GIT jsou mikrobiotou osídleny i další části lidského těla, jako je kůže, ženské pohlavní orgány a horní cesty dýchací. Celá tato skupina mikrobů se nazývá jako „mikrobiota“ a soubor genů jako „mikrobiom“. Bakteriální buňky přispívají k celkové lidské hmotnosti zhruba 1,5 až 2 kg (Tojo et al. 2014) a jejich počet $10\times$ překračuje počet tělních buněk tvořících lidské tělo (George Kerry et al. 2018).

V jednotlivých částech GITu je mikrobiota odlišná. Liší se jak v počtu bakterií, tak v jednotlivých druzích. Žaludek je osídlen méně než 10^2 kolonií tvořících jednotek (KTJ)/ml, které zahrnují mimo jiné laktobacily a streptokoky. V tenkém střevě sídlí 10^2 – 10^3 KTJ/ml, včetně bakterií *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterococcus* a *Bacteroides*. Největší mikrobiální populaci obsahuje tlusté střevo, které je kolonizováno 10^{10} – 10^{12} KTJ/ml (Behnsen et al. 2013). Nejvíce jsou v něm zastoupeny bakterie rodu *Bacteroides* a *Bifidobacterium* (Meijers et al. 2019). Zde také dochází k mikrobiální fermentaci nestrávených složek potravy, která následně poskytuje živiny a energii hostiteli (Tojo et al. 2014).

Vývoj střevní mikrobioty je postupný a komplexní proces (Sarkar et al. 2016). Před narozením je lidský GIT sterilní a je kolonizován bezprostředně po narození. GIT dětí narozených přirozenou cestou je kolonizován hlavně vaginální a střevní mikrobiotou matky, zatímco GIT těch, které se narodí pomocí císařského řezu jsou osídleny především mikroorganismy z nemocničního prostředí. Přirozeně narozený novorozenec má pak vyšší počet bifidobakterií a bakterií rodu *Bacteroides*. Naopak u novorozenců narozených císařským řezem převažuje *Clostridium difficile* (Biasucci et al. 2010; Sarkar et al. 2016). Kolonizace začíná fakultativními anaeroby, jako jsou laktobacily, enterokoky a enterobakterie. Jakmile tyto mikroorganismy spotřebují zbytkový kyslík, začnou převládat přísně anaerobní bakterie zahrnující bifidobakterie, klostridie a bakteroidy, což má za následek postupné snižování poměru fakultativních anaerobů vůči přísným anaerobům (Vlasova et al. 2016).

Kromě způsobu narození má vliv na rozvoj střevní mikrobioty také typ výživy (Biasucci et al. 2010). Testováním mikrobiologického složení mateřského mléka bylo zjištěno, že obsahuje značné množství bifidobakterií, ale i dalších bakterií identických s těmi, které byly detekovány ve stolici kojenců, což naznačuje, že by mateřské mléko mohlo přispívat k založení a rozvoj mikrobioty dětí (Grimm et al. 2014). U kojenců se bifidobakterie začínají objevovat mezi 2. a 5. dnem po narození, přičemž svého maxima dosahují po 1. týdnu narození, čímž se stávají převládající bakteriální složkou střevní mikrobioty kojenců (Vlasova et al. 2016). U přirozeně narozených a kojených dětí tvoří bifidobakterie až 95 % všech bakterií. Nejčastěji nalázanými druhy jsou *Bifidobacterium longum*, *B. bifidum* a *B. breve* (Grimm et al. 2014). Pro kojené jedince je také typický nižší počet bakteroidů, eubakterií, peptokoků, veillonel, klostridií a enterobakterií než u novorozenců krmených kojeneckou výživou (Kavanaugh et al. 2013). Po období kojení se složení střevní mikrobioty rychle mění, a to důsledkem podávání pevné stravy, vystavením potravinářským a environmentálním mikroorganismům a dalších faktorů, jako je

hygiena nebo léčba antibiotiky. Během prvních tří let života se střevní mikrobiota postupně vyvíjí v mikrobiotu dospělých jedinců (Grimm et al. 2014).

U dospělých dominují bakterie z kmene Firmicutes a Bacteroidetes, které společně představují kolem 80 % bakteriální mikrobioty. 10 % zastupují bakterie z kmene Actinobacteria, přičemž až 100 % z nich jsou zástupci z rodu *Bifidobacterium* (Grimm et al. 2014). V menším množství jsou pak zastoupeny také kmeny Proteobacteria a Verrucomicrobia (Vlasova et al. 2016).

Každý jednotlivý organismus má specifický „bakteriální otisk prstů“ (Behnsen et al. 2013), který je ovlivňován řadou vnějších a vnitřních faktorů (Tojo et al. 2014). Na stav střevního mikrobiomu má vliv například věk, strava, životní styl, expozice toxiny, hodnota pH, náchylnost k infekci nebo také léčba antibiotiky (Sarkar et al. 2016; Wilkins & Sequoia 2017).

Bylo zjištěno, že „optimální rovnováha“ mezi patogenními a nepatogenními bakteriemi v GIT má zásadní význam pro udržení dobrého zdraví (Sarkar et al. 2016). Nerovnováha střevní mikrobioty může vést k různým akutním a chronickým poruchám (Presti et al. 2015).

K optimální rovnováze mikrobioty mohou přispívat dietní zásahy, jako je například příjem probiotik (Sarkar et al. 2016). Probiotika tedy mohou působit preventivně nebo dokonce léčit některé poruchy, včetně malabsorpce laktózy, akutního průjmu, syndromu dráždivého tračníku, nekrotizující enterokolitidy a mírných forem zánětlivého onemocnění střev (Presti et al. 2015).

3.2 Probiotika

Termín „probiotika“ pochází z řeckého výrazu „pro život“ a poprvé byl definován v roce 1989 jako „doplňek stravy živých mikroorganismů, který příznivě ovlivňuje hostitele zlepšením jeho mikrobiální rovnováhy“ (Kumar Bajaj et al. 2015). Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation, WHO) a Organizace pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organization, FAO) definují probiotika jako „živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v přiměřených množstvích, poskytují zdravotní přínos pro hostitele“ (Kadlec & Jakubec 2014; Sarao & Arora 2017).

Většinou se jedná o bakterie, které se vyskytují přirozeně v lidském střevě. Jsou široce studovány ve spojitosti s řadou gastrointestinálních chorob, přičemž nejvíce prozkoumanými jsou bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* a kvasinky rodu *Saccharomyces* (Wilkins & Sequoia 2017). Mnohé studie (Cotter et al. 2005; Behnsen et al. 2013; Floch 2014) uvádí, že probiotika hrají velmi důležitou roli při modulaci gastrointestinálních, imunologických i respiračních funkcí. Pozitivní vliv mají především na trávicí systém hostitele, kde zabraňují růstu patogenních mikroorganismů.

3.2.1 Vlastnosti a požadavky na probiotika

Podle návrhů WHO, FAO a EFSA (European Food Safety Authority, Evropský úřad pro bezpečnost potravin) musí probiotické druhy splňovat jak kritéria bezpečnosti a funkčnosti, tak i kritéria související s jejich technologickou užitečností. Bezpečnost probiotik je definována jeho původem, neexistencí asociace s patogenními kulturami a profilem odolnosti vůči antibiotikům (Markowiak et al. 2017). Funkčnost je dána schopností přežít v GIT a také schopností adherovat na střevní buňky (Kadlec & Jakubec 2014; Sarao & Arora 2017). Výzkum

odolnosti probiotických mikroorganismů vůči prostředí GIT je zaměřen především na jejich citlivost vůči nízké pH hodnotě, proteolytickým enzymům a žlučovým solím (Maragkoudakis et al. 2006). Dále u nich nesmí být prokázána produkce plynů (Kadlec & Jakubec 2014). Jak uvádí Markowiak et al. (2017), probiotika by také měla mít podložené účinky na zdraví.

Mimo to musí mít probiotika dobré technologické vlastnosti, aby vydržely a přežily podmínky během výroby, zpracování, skladování a přepravy výrobků (Kumar Bajaj et al. 2015). Obecně platí, že bakterie z *Lactobacillus* spp. jsou vůči faktorům při zpracování produktů odolnější než *Bifidobacterium* spp. Lépe odolávají vůči nízkému pH a zároveň se lépe přizpůsobují mléku a jiným potravinovým substrátům. Velký počet probiotických druhů laktobacilů je proto pro potravinářské aplikace technologicky vhodnější než zástupci bifidobakterií (Tripathi & Giri 2014).

Významnými faktory, které ovlivňují přežití probiotik během trávení je například vodní aktivita, redoxní potenciál, obsah proteinů a cukrů, hodnota pH nebo teplota daného potravinového nosiče (Kumar Bajaj et al. 2015).

Probiotika podléhají předpisům obsaženým v obecném potravinovém zákoně, podle kterých by měla být bezpečná pro zdraví lidí i zvířat. V Evropě zavedla EFSA termín QPS (Kvalifikovaný předpoklad bezpečnosti, Qualified Presumption of Safety) zahrnující některá další kritéria pro hodnocení bezpečnosti bakteriálních doplňků, včetně historie bezpečného používání a absence rizika získané rezistence na antibiotika. Ve Spojených státech by mikroorganismy používané pro spotřební účely měly mít status GRAS (Všeobecně považovaný za bezpečný, Generally Recognized as Safe), jenž je regulován FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, Food and Drug Administration) (Markowiak et al. 2017; Markowiak & Śliżewska 2018). Mezi organismy, které jsou obecně považovány za bezpečné, patří laktobacily, laktokoky, bifidobakterie a kvasinky. Existují však i jiné probiotické organismy, jako je *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp. nebo *Streptococcus* spp., které nejsou obecně považovány za bezpečné, ale jsou používány jako probiotika (Sarao & Arora 2017).

3.2.2 Významné druhy probiotik

Mezi probiotika patří řada bakterií, některé kvasinky a plísně (Tripathi & Giri 2014). Nejvýznamnějšími probiotiky (tab. 1) jsou bakterie z rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, které jsou současně dominantní složkou střevní mikrobioty zdravých lidí. Mimo to jsou významnými probiotiky také bakterie rodu *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Enterococcus* (Sarao & Arora 2017). Z kvasinek jsou nejběžněji využívanými druhy *Saccharomyces cerevisiae* a *S. boulardii*. Probiotikem z vláknitých mikroskopických hub je například *Aspergillus oryzae* (Tripathi & Giri 2014).

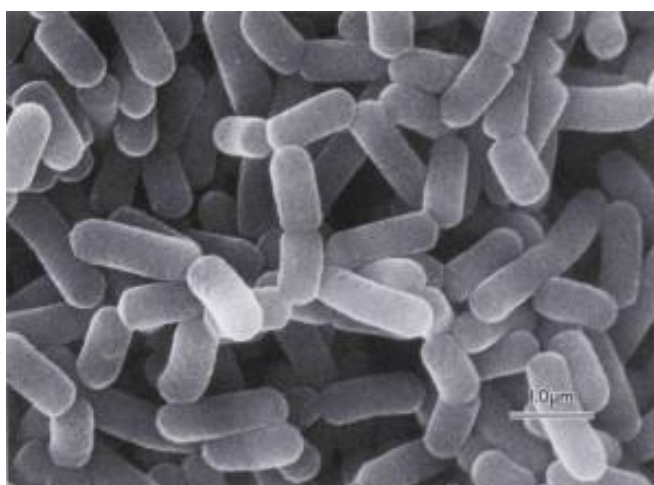
Tabulka 1: Druhy probiotik využívané v lidské výživě (Chikkamath et al. 2018).

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Další mikroorganismy
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Bacillus clausii</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. longum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. pentosus</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

Většina z dosud známých probiotik patří mezi grampozitivní bakterie, nicméně jsou mezi ně řazeny i některé gramnegativní bakterie. Nejčastěji používaným gramnegativním druhem je *Escherichia coli* Nissle 1917, který byl poprvé izolován v roce 1917 a v současné době je obsažen v léku nazývaném Mutaflor, který je používán k léčbě infekčních průjemových onemocnění a zánětlivých onemocnění střev (Behnsen et al. 2013).

Lactobacillus spp.

Laktobacily jsou acidofilní, grampozitivní, nesporulující bakterie, které patří do kmene Firmicutes (Nishiyama et al. 2016). Tyto bakterie mají tvar tyčinek (obr. 1) lišících se svojí délkou a obecně jsou řazeny mezi fakultativními anaeroby, které jsou schopné růstu v anaerobním i aerobním prostředí (Celebioglu & Svensson 2018). V přírodě je tento heterogenní rod široce rozšířen a představuje ho více jak 200 druhů a poddruhů. Přirozeně jsou laktobacily obsaženy v mnoha rostlinných i živočišných zdrojích. Nalezneme je například v kravském a mateřském mléce (Vinderola et al. 2017).



Obrázek 1: Tyčinkovitý tvar *L. casei*

(Zdroj: <http://buffalobeerbiochemist.com/beer-science-lactobacillus-in-beer/>)

Lactobacillus spp. je běžnou součástí lidské mikrobioty, přičemž mají schopnost kolonizovat různé části těla. Ke kolonizaci GITu dochází několika druhy, včetně *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* a *L. salivarius* (Celebioglu & Svensson 2018).

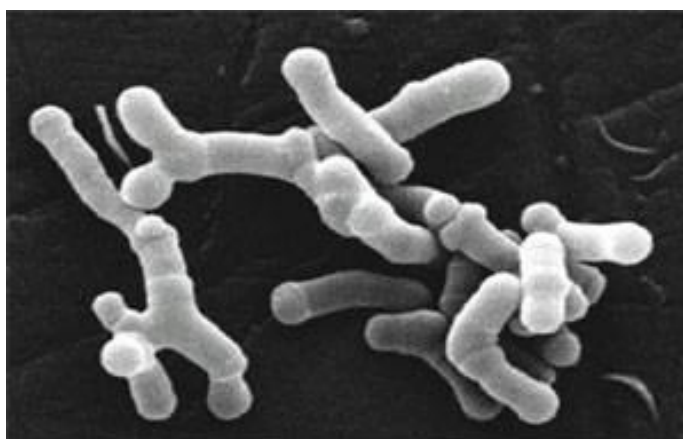
Je známo, že laktobacily mají významnou úlohu při udržování lidského zdraví prostřednictvím stimulace imunity hostitele a přispíváním k udržování rovnovážné mikrobioty (Koll et al. 2008). Zároveň však mohou také snižovat hladinu cholesterolu v séru, a tím opět pozitivně přispívat k celkovému zdraví. Předpokládá se, že tento účinek má několik mechanismů, mezi které je zahrnuta enzymatická dekonjugace žlučových kyselin, asimilace cholesterolu probiotiky, ko-precipitace cholesterolu s dekonjugovanou žlučí, vazba cholesterolu na buněčné stěny probiotik a začlenění cholesterolu do buněčných membrán probiotik během růstu (Ooi & Liong 2010).

Zároveň se laktobacily podílejí na trávení laktózy (Krishnamoorthy et al. 2018) a v neposlední řadě vykazují antimikrobiální aktivitu produkcí antimikrobiálních látek. Navíc bylo prokázáno, že konzumací potravin obsahujících probiotické laktobacily dochází ke snížení výskytu zubního kazu (Koll et al. 2008). V posledních několika desetiletích existuje zvýšená snaha o izolaci nových druhů vykazujících při požití pozitivní zdravotní účinek (Maragkoudakis et al. 2006).

Laktobacily mají dlouhou historii využití, a to zejména v mlékárenském průmyslu (Sarao & Arora 2017), kdy se významně podílejí na výrobě fermentovaných mléčných výrobků, jako například sýrů, jogurtů nebo kefiru (Maragkoudakis et al. 2006). Procesem fermentace produkují mléčnou kyselinu jako hlavní konečný produkt (Celebioglu & Svensson 2018), čímž dochází ke snížení pH, což potravinu činí odolnější vůči kažení. Dále jsou využívány při výrobě piva, kakaa, kysaného zelí, jablečného vína a dalších fermentovaných potravin (Arshad et al. 2018).

Bifidobacterium spp.

Bifidobakterie patřící do kmene Actinobacteria (Vinderola et al. 2017) jsou nepohyblivé, nesporulující, přísně anaerobní, grampozitivní bakterie vyznačující se neobvyklou morfologií připomínající tvar písmene „V“ nebo „Y“ (obr. 2) (Grimm et al. 2014).



Obrázek 2: *B. longum*

(Zdroj: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium_longum)

Poprvé k jejich izolaci došlo ze stolice kojence, a to již v roce 1899 vědcem Tissierem. Od této doby byly izolovány z mnoha dalších zdrojů, jako je například ústní dutina, hmyzí střevo nebo trávicí trakt různých savců (O'Callaghan & van Sinderen 2016).

Během desetiletí mnohé studie (Jiang et al. 1996; Wang et al. 2007; Ataie-Jafari et al. 2009) ukázaly, že některé druhy bifidobakterií mají příznivý vliv na zdravotní stav hostitele, což vzbudilo velký zájem o jejich použití v potravinářském, mlékárenském a farmaceutickém průmyslu, kde jsou v dnešní době hojně využívány (Grimm et al. 2014).

Pomocí pokusů na myších (Asahara et al. 2001; Frick et al. 2007; Fukuda et al. 2011) bylo zjištěno, že některé bifidobakterie činí hostitele rezistentní vůči infekcím způsobených bakteriemi, jako je *Salmonella enterica*, enteropatogenní *E. coli* nebo *Yersinia enterocolitica* (Grimm et al. 2014). Podáním vysokých dávek bifidobakterií dochází také ke snižování počtu bakterie *Clostridium perfringens*, která je známá jako producent nebezpečných toxinů (O'Callaghan & van Sinderen 2016), jako je perfringolysin O (PFO), enterotoxin (CPE) a β -2 toxin (CPB2) (Meijers et al. 2019). Naopak *Staphylococcus aureus* a *C. difficile* bifidobakteriemi inhibováni nejsou (Arbolea et al. 2010).

3.2.3 Zdroje probiotik

Probiotické mikroorganismy mohou být přijímány buď konzumací fermentovaných potravin, nebo jako doplňky stravy (Vera-Pingitore et al. 2016). Doplňky stravy jsou k dispozici jako tobolky, gely, pasty, kapky nebo tablety. Tyto probiotické doplňky mohou obsahovat buď pouze jeden druh, nebo jsou směsí několika druhů mikroorganismů.

V menším množství jsou obsaženy také v různých fermentovaných potravinách, do kterých jsou záměrně během výroby přidávány (Chikkamath et al. 2018). Významným potravinovým zdrojem jsou například mléčné a masné výrobky a výrobky připravované kvašením obilovin, ovoce a zeleniny (Tripathi & Giri 2014). Globální trh potravinářských výrobků obsahujících probiotika neustále velmi rychle roste a je stále rozsáhle zkoumáno, do kterých potravin by mohla být dále probiotika přidávána (Vera-Pingitore et al. 2016). Některé nedávné studie (Possemiers et al. 2010; Govender et al. 2014; Sarao & Arora 2017) ukazují, že dobrými nosiči probiotik mohou být potraviny, jako jsou například cereálie nebo čokoláda, ale i ovocné šťávy.

Probiotické kultury jsou do potravin přidávány uměle ve vysoce koncentrované formě, buď jako zmrazené kultury, nebo formou lyofilizovaných prášků. Zmrazené kultury obsahují nejméně 10^{10} KTJ/g, zatímco lyofilizované kultury obsahují více než 10^{11} KTJ/g (Tripathi & Giri 2014). Je stanoveno, že v době spotřeby výrobek musí obsahovat minimálně 10^6 KTJ probiotik v ml výrobku (Tripathi & Giri 2014; Sarao & Arora 2017).

Přidáním probiotik do potravin může docházet ke změně chuti i vůně výrobku, a to důsledkem produkce různých metabolických látek, jako je například octová kyselina produkovaná bifidobakteriemi. Je proto důležité, aby tato možná změna byla brána v úvahu při jejich výběru a následné aplikaci. Nesmí totiž dojít k nepříznivému ovlivnění kvality ani sensorických vlastností produktu (Tripathi & Giri 2014). Kvalita probiotického produktu zahrnuje bezpečnost, účinnost a správné označování výrobku. Důležité je, aby bylo důkladně ověřováno, zda není produkt znečišťován nežádoucími mikroby (Sanders et al. 2018).

3.2.4 Účinky probiotik

Zdravotní přínosy probiotik byly zkoumány jak pomocí *in vitro*, tak i *in vivo* metod zahrnujících pokusy na zvířatech (Fooks & Gibson 2002; Demirer et al. 2006; Kumar Bajaj et al. 2015; Li et al. 2016; Bubnov et al. 2017). Bylo zjištěno, že probiotika mají pozitivní účinek při onemocnění GITu, jako je například syndrom dráždivého tračníku, onemocnění způsobené bakterií *Helicobacter pylori*, zánětlivé onemocnění střev nebo infekční průjem (Johnson-Henry et al. 2004; Moayyedi et al. 2010; Markowiak et al. 2017). Kromě toho jsou účinná také při prevenci a léčbě průjmů spojených s užíváním antibiotik. Z tohoto důvodu je doporučováno, aby pacienti zahájili užívání probiotik v první den léčby antibiotiky a pokračovali po dobu jednoho až dvou týdnů po dokončení léčby (Wilkins & Sequoia 2017).

Pozitivní účinky mají také na prevenci a léčbu alergických onemocnění (např. atopická dermatitida), na obezitu, syndrom inzulínové rezistence, *diabetes mellitus* II. typu a nealkoholické onemocnění jater (Markowiak et al. 2017). Mohou taktéž příznivě působit při cholesterolemii (Ataie-Jafari et al. 2009) a mají schopnost zmírňovat laktózovou intoleranci (Montalto et al. 2006; Kumar Bajaj et al. 2015).

Probiotické mikroorganismy jsou mimo to také schopny modulovat imunitní systém hostitele. Tento účinek je výrazně spojen s jejich schopností adherovat na slizniční vstevu střeva. Bylo zjištěno, že čím silnější adhezivní vlastnosti kmeny mají, tím dochází k výraznějšímu účinku na imunitní systém. Zjistilo se, že silněji adhezivní druhy, jako je *L. rhamnosus* nebo *L. johnsonii* zesilují antigenově specifické imunitní odpovědi, zatímco u nízké adhezivních bakterií, *Lactophilus rhamnosus*, *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* případně *S. thermophilus* nebyl tento účinek prokázán (Majamaa et al. 1995; Schiffrin et al. 1997; Ouwehand et al. 1999; Ouwehand & Salminen 2003). Sarao a Arora (2017) uvádí, že imunomodulační jsou také probiotika *B. longum*, *L. acidophilus*, *L. casei subsp. rhamnosum* a *L. helveticus*.

Zároveň mohou některá probiotika vykazovat také anti-patogenní účinky. Jedná se o multifaktoriální aktivitu zahrnující mechanismy jako je sekrece antimikrobiálních látek, kompetitivní přilnutí k sliznici a epitelu, posílení střevní epiteliální bariéry a modulaci imunitního systému (Bermudez-Brito et al. 2012). Některá probiotika mohou účinně inhibovat vývoj patogenních bakterií, jako jsou *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli*, různé druhy rodu *Shigella*, *Staphylococcus* a *Yersinia* (Markowiak et al. 2017). Tato vlastnost je kmenově specifická a obvykle se testuje laboratorně pomocí *in vitro* metod využívajících buněčné linie, které byly infikovány patogeny (Monteagudo-Mera et al. 2019). V rámci několika klinických studií (Manley et al. 2007; Szachta et al. 2011; Monteagudo-Mera et al. 2019) se prokázaly například antipatogenní účinky *L. rhamnosus* proti enterokokům.

Pomocí *in vitro* (Jorgensen et al. 2017) i *in vivo* (Iniesta et al. 2012) metod bylo zjištěno, že podávání probiotik snižuje výskyt patogenů v ústní dutině. Bylo pozorováno, že během probiotické léčby došlo k významnému snížení výskytu streptokoka, který v ústní dutině souvisí se vznikem zubního kazu (Monteagudo-Mera et al. 2019; Pahumunto et al. 2019). Několik studií (Krasse et al. 2006; Rungsri et al. 2017; Monteagudo-Mera et al. 2019) také uvádí, že během léčby byl zjištěn přírůstek probiotických mikroorganismů v ústní dutině, což by mohlo naznačovat možnou přechodnou kolonizaci. Je však nutné provést další testy, které by tyto závěry potvrdily. Dále bylo při studiu antipatogenní aktivity zjištěno, že experimentálně

poškozené žaludeční sliznice se hojí rychleji, když jsou osídleny laktobacily. Ty totiž blokují kolonizaci tkáně rány bakteriemi *E. coli*, které v případě nepřítomnosti laktobacilů hojení zpomalují (Ouwehand & Salminen 2003). Účinky probiotik na hojení ran v GITu byly rozsáhle zkoumány prostřednictvím různých experimentálních modelů, včetně vředů vyvolaných octovou kyselinou, ran v plné tloušťce a střevních anastomóz. Bylo zjištěno, že kromě antipatogenní aktivity se na příznivém vlivu laktobacilů na proces hojení podílí i aktivací epitelálních buněk a stimulací proliferace nebo migrace fibroplastů. Dále také zjistili, že přítomnost *L. plantarum* koreluje se zvýšenou syntézou kolagenu ve střevu (Demirer et al. 2006).

Probiotika mají také schopnost zvyšovat vstřebávání vitaminů a minerálních sloučenin a stimulují tvorbu organických kyselin a aminokyselin. Mimo to mohou být také schopna produkovat enzymy, jako je esteráza, lipáza, dále pak koenzymy A, Q, NAD a NADP. Některá probiotika, jako je *L. plantarum*, *L. reuteri*, *B. adolescentis* a *B. pseudocatenulatum* jsou přirozenými producenty vitaminů skupiny B, a to B1, B2, B3, B6, B9 a B12 (Markowiak et al. 2017).

Tyto zdravotní přínosy však nevykazují všechna probiotika. Jsou v nich obrovské rozdíly na úrovni kmene, rodu i druhu (Kumar Bajaj et al. 2015). K dosažení požadovaných účinků probiotika na zdraví, je zapotřebí správné dávkování (Sarao & Arora 2017), je tedy nezbytné, aby byl jejich denní příjem pravidelný a množství dosahovalo alespoň 10^8 - 10^9 KTJ (Tripathi & Giri 2014). Převážná většina publikovaných výsledků těchto zdravotních účinků byla provedena *in vitro* (Jorgensen et al. 2017) nebo pomocí zvířecích modelů (Demirer et al. 2006; Kumar Bajaj et al. 2015; Li et al. 2016; Bubnov et al. 2017), doposud však neexistují prokazatelné výsledky z klinických studií. To vedlo EFSA k zamítnutí všech zdravotních tvrzení o prospěšnosti probiotik (Grimm et al. 2014).

Ovlivnění účinků probiotik

Za účelem zajištění výše popsaných příznivých zdravotních účinků na hostitele je důležité, aby probiotikum přežilo podmínky GIT. Především musí být schopno odolávat kyselému prostředí, žlučovým a žaludečním enzymům, a poté adherovat na střevní epitel (Ranadheera et al. 2012). V některých případech i mrtvé nebo inaktivované probiotické kmeny, nebo dokonce pouze jejich buněčné složky mohou mít stále některé prospěšné účinky, byť jen v omezené míře (Sarkar et al. 2016).

Tyto účinky se mohou lišit v důsledku působení různých faktorů. Mohou být ovlivňovány jak složením potravinového nosiče, výrobními postupy, podmínkami skladování, tak i fyzikálně-chemickými vlastnostmi probiotika. Potravinové výrobky s vhodnou hodnotou pH (> 5) a vysokou pufrací kapacitou zvyšují pH žaludku, a tím zároveň zvyšují stabilitu probiotik. Složky potravinového nosiče mohou také poskytnout určitou ochranu probiotikům snížením jejich fyzické expozice drsnému prostředí v GITu. Kromě toho určité složky potravinového substrátu mohou interagovat s probiotiky, aby se změnil jejich funkční výkon. Například bylo zjištěno, že vysoký obsah tuku v sýrech chrání probiotika během průchodu GITem. Z těchto důvodů je proto podání probiotik ve vhodné potravinové matici jedním z nevhodnějších prostředků maximalizace probiotické účinnosti (Ranadheera et al. 2012).

Předpokládá se, že kombinace různých druhů probiotik může také zvýšit jejich účinky na zdraví hostitele (Moussavi & Adams 2010; Salminen et al. 2010). Některé *in vivo* studie

(Kajander et al. 2005; Kajander et al. 2008) hodnotily účinek kombinace probiotik, jako je *L. rhamnosus*, *Propionibacterium freudenreichii* a *B. lactis*, která se poté ukázala být účinná v klinických studiích u pacientů se syndromem dráždivého tračníku.

V některých případech je pak ale možné, že účinek kombinovaných probiotik bude kontraaktivní. Z tohoto důvodu musí být kmeny vhodně vybrány. Je nutné vědecky ověřit možný výskyt potenciálních interakcí, včetně synergie i antagonismu (Moussavi & Adams 2010; Salminen et al. 2010). Jak je nám známo, tak dosud je jen několik studií (Ouwehand et al. 2000; Collado et al. 2007; Salminen et al. 2010), které by se zabývaly vzájemnými interakcemi probiotik s ohledem na adhezivní schopnosti. Bylo ale zjištěno, že adheze v GITu hostitele může být zvýšena, ale i snížena ve srovnání s použitím pouze jednotlivých druhů probiotik.

Příznivý účinek probiotik může být také zvýšen současným užíváním prebiotik, tj. nestravitelných složek potravy, které stimulují růst a aktivitu prospěšných bakterií v tlustém střevě. Těmito složkami jsou zejména oligosacharidy a polysacharidy, které jsou rezistentní vůči žaludečním kyslinám, enzymatické hydrolyze a gastrointestinální absorpci. Naopak mohou být využity střevní mikrobiotou, což má za následek její selektivní růst a zvýšení aktivity (Kadlec & Jakubec 2014). Hlavními zdroji probiotik je především zelenina, ovoce a obiloviny, které jsou součástí našeho každodenního jídelníčku (George Kerry et al. 2018).

3.2.5 Mechanismus působení probiotik

Mechanismy působení probiotik jsou složité, pravděpodobně jsou u různých druhů odlišné, a i přes intenzivní zaměření na výzkum probiotických přínosů nejsou všechny dosud zcela známy (Wilkins & Sequoia 2017). Mezi identifikované mechanismy patří snížení lumenálního pH, soutěžení s patogeny o adhezivní místa a zdroje výživy, sekrece antimikrobiálních látek, inaktivace toxinů, stimulace imunitního systému (Salminen et al. 2010), posílení střevní bariéry, modulace střevní mikrobioty a protinádorová aktivita (Salminen et al. 2010; Kumar Bajaj et al. 2015).

Sekrece antibakteriálních látek

Mnohá probiotika mají antibakteriální účinek, který je způsoben prostřednictvím produkce vedlejších metabolitů. Tyto bakteriální produkty jsou obecně nazývány jako postbiotika a lze je definovat jako neživotaschopné bakteriální produkty probiotických mikroorganismů, které mají biologickou aktivitu. Obecně postbiotika zahrnují bakteriální metabolické vedlejší produkty, jako jsou bakteriociny, organické kyseliny, ethanol, diacetyl, acetaldehydy, peroxid vodíku, exopeptidy nebo exopolysacharidy (Adriana et al. 2016; George Kerry et al. 2018). Tyto produkty mají široké inhibiční vlastnosti vůči různým patogenním mikroorganismům, a proto je lze použít jako alternativu k antibiotikům (Ooi et al. 2015; George Kerry et al. 2018). Postbiotika jsou netoxická, nepatogenní a odolná vůči hydrolyze trávicími enzymy (George Kerry et al. 2018). Tyto látky inhibují růst patogenů buď jednotlivě, nebo synergicky (Kumar Bajaj et al. 2015).

Bylo zjištěno, že probiotika produkují širokou škálu bakteriocinů, přičemž nejběžnějším z nich je nicin. U bakterie *L. acidophilus* byla prokázána produkce třech bakteriocinů, a to acidofilinu, laktoidinu a acidolinu. Antimikrobiální látkou u bakterie *L. plantarum* je laktolin.

Zjistilo se, že laktobacily a bifidobakterie tímto mechanismem inhibují řadu patogenů, a to včetně bakterií *E. coli*, *Salmonella*, *H. pylori* a *Listeria monocytogenes*. Běžné mechanismy působení zprostředkované bakteriociny zahrnují destrukci cílových buněk tvorbou pórů nebo inhibicí syntézy buněčných stěn. Například výše zmíněný nisin tvoří komplex s konečným prekurzorem buněčné stěny, lipidem II, čímž je syntéza buněčné stěny inhibována (Kumar Bajaj et al. 2015).

Dalšími zástupci antimikrobiálních produktů jsou organické kyseliny, z nichž zejména octová a mléčná kyselina, mají silný inhibiční účinek proti gram-negativním bakteriím a byly považovány za hlavní antimikrobiální látky odpovědné za inhibiční aktivitu probiotik proti patogenům. Nedisociovaná forma organické kyseliny vstupuje do bakteriální buňky a disociuje se až uvnitř cytoplazmy patogena. Smrt patogenů je pak způsobena snížením intracelulární hodnoty pH nebo akumulací ionizované formy organické kyseliny (Bermudez-Brito et al. 2012).

Někteří zástupci rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* mají schopnost produkovat tzv. dekonjugované žlučové kyseliny (deriváty žlučových kyselin), což prokazuje silnější antibakteriální účinek než žlučové soli produkované hostitelem (Markowiak et al. 2017).

Inaktivace patogenních toxinů

Inhibice působení bakteriálních toxinů je založena na akcích vedoucích k inaktivaci toxinů a napomáhání při odstraňování toxinů ven z těla. Nápomocná detoxikace toxinů může probíhat adsorpcí. Některé kmeny je mohou vázat na svoji buněčnou stěnu a snižovat tak působení těchto toxinů. Může dojít také ke snížení produkce toxinů, což je spojeno s probiotickou produkcí nativních enzymů, vitamínů a antimikrobiálních látek. Účinnost některých probiotik v boji proti průjmu pravděpodobně souvisí právě s jejich schopností chránit hostitele před nebezpečnými toxiny (Markowiak et al. 2017).

Soupeření s patogeny o vazebná místa a živiny

Tím, že probiotické organismy ulpívají na střevních epiteliálních buňkách a blokují adhezivní místa, zabraňují kolonizaci patogeních bakterií. Adheze ke slizniční vrstvě je zprostředkována různými povrchovými determinanty bakterií, které interagují s epiteliálními buňkami a mucinózním hlenem (Kumar Bajaj et al. 2015). Dostupná data naznačují, že kombinací některých probiotických kmenů může být inhibice adheze patogenu zlepšena. Prokázalo se například, že při společném použití známých probiotických druhů, jako je *L. rhamnosus* a *B. lactis*, byla významně zvýšena inhibice adheze *Bacteroides vulgatus*, *C. difficile*, *S. aureus* a *Cronobacter sakazakii* oproti samostatnému testování těchto dvou druhů. Stále je ale nutné, aby byla provedena další testování, která příslušné mechanismy objasní (Salminen et al. 2010).

Jsou-li ve střevech přítomna probiotika, která využívají živiny, zbývá pak méně pro patogenní bakterie, čímž jim brání v další proliferaci a růstu. V takto omezujícím prostředí pak patogeny hladoví a nakonec uhynou (Kumar Bajaj et al. 2015). Jednou z nezbytných živin pro většinu bakterií je železo. Ukázalo se, že bakterie rodu *Lactobacillus* jej však ve svém přirozeném prostředí nepotřebují, což může být jejich zásadní výhoda oproti jiným mikroorganismům (Markowiak et al. 2017). Ukázalo se, že například *L. acidophilus*

a *L. delbruecki*, mají schopnost železo vyvázat ve formě hydroxidu železitého na svůj povrch, a tím jej činit nedostupným pro nežádoucí mikroorganismy, pro které je nezbytné (Kumar Bajaj et al. 2015).

3.3 Adheze probiotik na střevní trakt

Jak již bylo výše zmíněno, adheze probiotik je důležitá z mnoha důvodů. Avšak pro deklarování mikrobiálního druhu jako probiotika musí být splněna některá kritéria. Jedním z těchto kritérií je právě jeho dobrá adheze na střevní epitelální buňky a střevní hlen. Adheze je nezbytným procesem pro perzistenci a proliferaci probiotických mikroorganismů ve střevech a je předpokladem pro přechodnou kolonizaci (Kadlec & Jakubec 2014; Valeriano et al. 2014). Ačkoli tato schopnost probiotických bakterií nutně nezajišťuje zdravotní přínos pro hostitele, připojení probiotik ke střevní sliznici je pro vyvolání účinku velmi důležité (Adriana et al. 2016; Krishnamoorthy et al. 2018).

U některých probiotik souvisí navíc s potenciální ochrannou rolí proti enteropatogenům (Valeriano et al. 2014) prostřednictvím soutěžení o vazebná místa hostitelských buněk (Kumar Bajaj et al. 2015). Se schopností probiotik adherovat na střevní trakt je spjata mimo jiné také jejich schopnost modulovat imunitní systém (Valeriano et al. 2014), ale na druhé straně i schopnost enteropatogenních bakterií adherovat je spojena s jejich škodlivým účinkem (Laparra & Sanz 2009).

Bakteriální adheze je komplikovaný proces, při kterém dochází ke kontaktu bakteriální buněčné membrány (Adriana et al. 2016) a střevní sliznice hostitele (Moussavi & Adams 2010). Je ovlivněna mnoha faktory (Valeriano et al. 2014), ke kterým patří vícenásobné povrchové biofyzikální a biochemické vlastnosti bakterií i střevní sliznice, jako jsou pasivní síly, elektrostatické interakce, hydrofobita, sterické síly a výskyt specifických buněčných povrchových komponentů (Moussavi & Adams 2010).

3.3.1 Střevní trakt

Zjednodušeně se střevní sliznice skládá ze tří hlavních složek, a to střevních epitelových buněk, hlenu pokrývajícího tento epitel a přirozené mikrobioty. Tyto oddíly spolu vzájemně reagují a jsou v dynamické rovnováze (Ouwehand & Salminen 2003).

Epitelová tkáň tvořící výstelku střeva je složena z různých typů sloupcových buněk. Po celé délce střeva jsou rozptýleny jednobuněčné pohárkové buňky (Van Tassell & Miller 2011), což jsou specializované epitelové buňky, které produkují glykoproteiny - muciny. Sekretované muciny polymerují za vzniku viskozní gelové vrstvy. Tato hlenová vrstva pokrývá epitel a je rozdělena na dvě strukturně odlišné vrstvy, vnější volnou vrstvu, kterou lze snadno odstranit, a vnitřní vrstvu, která je pevně připojena k epitelu. Vnitřní slizová vrstva vymezuje ochrannou zónu a je odolná vůči průniku bakterií, což zabraňuje enormní bakteriální zátěži epitelu. Vnější vrstva je naopak na mikroorganismy bohatá. Hlen představuje fyzikální a chemickou bariéru (Hooper & Macpherson 2010), která chrání střevní epitel před účinkem patogenů, enzymů, toxinů, dále před dehydratací a mechanickým poškozením (Van Tassell & Miller 2011).

Hlenová vrstva pokrývající GIT je prvním kontaktním místem mezi střevní mikrobiotou a hostitelem (Nishiyama et al. 2016). Skládá se převážně z vody, glykoproteinů mucinového typu, solí a lipidů (Celebioglu & Svensson 2018).

Muciny jsou velké extracelulární proteiny, které představují hlavní strukturální složky hlenové vrstvy (Hooper & Macpherson 2010). Jsou silně glykosylované (asi 80 % hmotnosti) O-oligosacharidovými řetězci (O-glykany) zajišťujícími viskozitu a gelové vlastnosti (Celebioglu & Svensson 2018).

Proteinové části mucinů mají centrální glykosylovanou oblast složenou ze sekvencí bohatých na serin, threonin a prolin, N- a C-terminální kulovité struktury s relativně nízkou glykosylací a domény bohaté na cystein, které zprostředkovávají disulfidické vazby v dimerech a polymerech (Celebioglu & Svensson 2018). Lidský hlen je tvořen rodinou 17 strukturálně odlišných mucinů (MUC). V tenkém i tlustém střevě se vrstva hlenu skládá hlavně z MUC2, zatímco MUC1, MUC5AC a MUC6 jsou hlavní muciny v žaludku (Hooper & Macpherson 2010).

Mezi tenkým a tlustým střevem existují značné rozdíly vyplývající z rozdílů ve fyziologii. Příkladem je tloušťka hlenové vrstvy, která se směrem z lačnicku (120 mm) do tlustého střeva (830 mm) zvětšuje, což mikrobům v tlustém střevě poskytuje rozsáhlejší slizniční stanoviště ve srovnání s horními částmi tenkého střeva. Sekrece, složení a degradace střevního hlenu je ovlivňována přirozenou mikrobiotou i probiotiky. V Lieberkūnových kryptách tenkého střeva jsou narozdíl od krypt tlustého střeva obsaženy Panethovy buňky, které produkují antimikrobiální látky, jako jsou defensiny a lysozym. Krypty tlustého střeva jsou naopak hlubší, tudíž je sliznice silnější. Navíc sliznice obsahuje více pohárkových buněk produkujících mucin, což způsobuje, že je vrstva hlenu silnější (Ouweland & Salminen 2003).

3.3.2 Mechanismus adherence

Obecně jsou pro bakteriální adhezi k eukaryotickým buňkám nebo povrchům tkáně potřebné dva faktory, a to specifický receptor, a to buď sacharid nebo peptidový zbytek, a ligand – povrchová struktura nebo makromolekula (Adriana et al. 2016).

Adherence na střevní sliznici je zpočátku nejspíše způsobena nescifickými fyzikálními interakcemi (Adriana et al. 2016), jako jsou stérické a hydrofobní interakce, které vedou k reverzibilnímu připojení na hostitele (Van Tassell & Miller 2011). Uvádí se, že existuje korelace mezi hydrofobitou a adhezí. Bylo prokázáno, že přítomnost některých povrchových proteinů, například proteináz ukotvených v buněčné stěně, zvyšuje u některých bakterií mléčného kvašení hydrofobitu, a tím i jejich adherenci (Pan et al. 2006; Zhang et al. 2015; Radziwill-Bienkowska et al. 2017; Monteagudo-Mera et al. 2019).

Nescifické fyzikální interakce následně umožňují vznik specifické interakce mezi ligandem (nazývaným jako adhezin) a komplementárními receptory (Adriana et al. 2016). Přítomnost těchto specifických adhezinů na buněčném povrchu je důležitým faktorem, který koreluje se schopností adheze (Monteagudo-Mera et al. 2019). Jako receptory slouží sacharidové řetězce nacházející se na buňkách epitelu tlustého střeva (Adriana et al. 2016) nebo i glykany hlenové vrstvy, které zároveň těmto bakteriím poskytují energii k udržení růstu (Hooper & Macpherson 2010).

Proteiny S-vrstvy (SLPs)

Povrch téměř všech taxonomických skupin bakterií je pokryt proteinovou strukturou, S-vrstvou, která se skládá z četných identických podjednotek a vykazuje tloušťku 5–25 nm (do

Carmo et al. 2018). Tyto podjednotky tvoří symetrickou, porézní vrstvu podobnou mřížce. Jsou drženy pohromadě a pojí se k sacharidům buněčné stěny. S-vrstva je tedy jednou z prvních bakteriálních složek interagujících s gastrointestinálním povrchem lidského hostitele, kdy SLPs zprostředkovávají bakteriální adhezi. Mimo to mohou mít také ochranné nebo enzymatické funkce (Hynonen & Palva 2013). V řadě studií (Schneitz et al. 1993; Kos et al. 2003; Jakava-Viljanen & Palva 2007; Tallon et al. 2007) bylo prokázáno, že ztráta těchto proteinů z bakteriálního povrchu chemickým ošetřením nebo pokrytí vrstvy jinými molekulami během kultivace způsobí snížení adheze k různým cílům. Nicméně role proteinu S-vrstvy v adhezenci nebyla v těchto studiích přímo prokázána.

SLPs jsou proteiny s molekulovou hmotností v rozmezí od 25 do 200 kDa a jsou obvykle bohaté na kyselé a hydrofobní aminokyseliny vykazující obecně nízký izoelektrický bod (pI) (do Carmo et al. 2018). Distribuce a typ SLPs se mezi kmeny liší (Monteagudo-Mera et al. 2019). Různé typy těchto proteinů se vážou na různé cíle. Například proteiny CbsA a SlpB se vážou na kolagen typu I a IV a protein SLPa detekován u *L. acidophilus* se váže na dendritické buňky (Wang et al. 2017), čímž může ovlivňovat imunomodulaci uvolňováním IL-12 z těchto buněk. Bylo zjištěno, že tento protein je u *L. acidophilus* hlavním proteinem povrchové vrstvy a hraje také klíčovou roli při vazbě na buněčnou linii Caco-2 (Ashida et al. 2011). Další proteiny S-vrstvy zprostředkovávají vazbu na receptory, jako je fibronectin a laminin a také na lidské epitelové buněčné linie (Wang et al. 2017).

Proteiny vázající se na fibronectin („fibronectin-binding proteins“)

Mezi adheziny dále patří také proteiny vázající se na fibronectin (FnBPs). Fibronectin je extracelulární matricový glykoprotein, který se ve střevě nachází v nerozpustné formě (Monteagudo-Mera et al. 2019). Je produkován různými typy buněk, včetně střevních epitelálních buněk. Tyto proteiny vázící se specificky na fibronectin se nacházejí v celé řadě gram-pozitivních a gram-negativních bakterií, a to jak patogenů, tak i komenzálů. Jeden bakteriální druh má často i více různých typů těchto proteinů (Hymes et al. 2016).

Přítomnost FnBPs u probiotických bakterií zvyšuje jejich adhezivní schopnost, a tím zároveň podporuje vylučování patogenních bakterií. Naopak jejich výskyt u některých patogenů, vzhledem k jejich potencionálnímu napadení hostitelských epitelálních buněk, je spojena s jejich schopností virulence (Monteagudo-Mera et al. 2019).

Proteiny vázající se na hlen („mucus-binding proteins“)

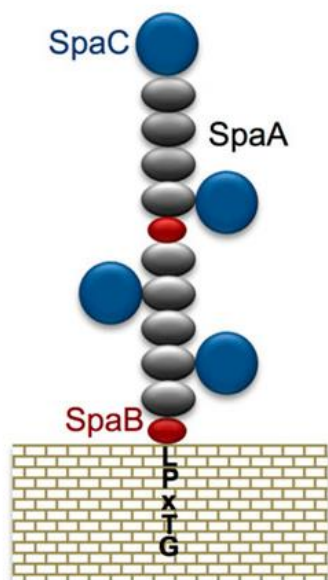
Mucin vázající proteiny (MUBs) jsou povrchové adhezivní proteiny obsahující domény Mub a/nebo MucBP, které jsou spojeny s peptidoglykanovou buněčnou stěnou a jsou schopny vázat se na hlen střevní sliznice. Ačkoli domény MucBP lze nalézt v různých bakteriálních druzích, včetně patogenních bakterií, jako je například *L. monocytogenes*, domény Mub jsou téměř bez výjimek přítomny pouze u bakterií mléčného kvašení izolovaných z lidského GIT (Monteagudo-Mera et al. 2019).

Pily (fimbrie)

Adheze je také podporována pomocí struktur, jako jsou tzv. pily (fimbrie), což jsou tenká proteinová rozšíření vycházející z bakteriálních buněk (Van Tassell & Miller 2011). Pily jsou komplexy skládající se z několika druhů proteinových podjednotek. Jednotlivé podjednotky jsou složeny ze stovek sloupků, které jsou uspořádány do spirály a tvoří tak dlouhé tyčovitě tělo. Špička pilusu obsahuje několik různých proteinů a je ukončena adhezivem. Je popsáno několik druhů pilusu, které se liší svojí funkcí, molekulovou strukturou, lokalizací na buněčném povrchu a mechanismy sekrece a sestavování. Často je bakteriální buňka opatřena více než jedním typem těchto struktur (Hori & Matsumoto 2010).

Široce popsaným typem jsou pily typu IV vyskytující se převážně u gramnegativních bakterií, ale nedávno se ukázalo, že i některé grampozitivní bakterie mohou mít pily tohoto typu. Tento typ pilu vychází z pólů bakteriální buňky, a kromě adhezivních funkcí zprostředkovávají také pohyb bakterií bez použití bičků, tvorbu biofilmu a horizontální přenos genů (Hori & Matsumoto 2010; Piepenbrink & Sundberg 2016).

U některých druhů laktobacilů byla naopak zjištěna přítomnost pilusu SpaCBA, který se skládá ze 3 podjednotek, SpaA, SpaB a SpaC (obr. 3). Zatímco podjednotka SpaA je hlavní vláknitá složka, SpaB a SpaC jsou složkami vedlejšími. Podjednotka SpaC je umístěna na špičce pilusu a odpovídá za vazbu na hlen. Pily tohoto typu vykazují vysokou adhezivní schopnost, která byla stanovena například u probiotické bakterie *L. rhamnosus* (Monteagudo-Mera et al. 2019). U mnoha patogenů mají pily funkci virulentních faktorů, které podporují jejich připojení k hostiteli (Van Tassell & Miller 2011).



Obrázek 3: Struktura pilusu typu SpaCBA, podjednotky: SpaA (šedá), SpaB (červená) a SpaC (modrá) (Nishiyama et al. 2016).

Agregace

Adhezivní schopnost zahrnuje nejen interakci bakteriálních buněk s hostitelskými buňkami, ale také společné propojení bakteriálních buněk, tzv. agregace, a to buď bakterií různých druhů (koagregace), nebo stejného druhu (autoagregace) (Monteagudo-Mera et al.

2019). Schopnost agregace zvyšuje přilnavost na střevní trakt a byla prokázána například u laktobacilů nebo u *B. longum* (Laparra & Sanz 2009). Nedávná studie (Jørgensen et al. 2017) uvádí se, že *L. reuteri* je schopen agregovat s kvasinkami *Candida albicans* během vytváření biofilmu, čímž probiotikum inhibovalo růst těchto kvasinek.

Biofilmy jsou často spojovány s infekcí, protože tvorba této strukturované komunity mikroorganismů způsobuje to, že jsou patogeny odolnější vůči obraně hostitele a antimikrobiálním sloučeninám. Tvorba a vývoj biofilmu probiotických bakterií je prospěšnou vlastností, která podporuje adhezi a stálost ve střevě a zároveň zabraňuje kolonizaci nežádoucích bakterií (Monteagudo-Mera et al. 2019).

3.3.3 Faktory ovlivňující adhezi

Adheze probiotických mikroorganismů je ovlivňována řadou faktorů, mezi které patří faktory související se způsobem kultivace *in vitro*, jako je bakteriální koncentrace, složení pufru, inkubační doba a růstové médium. Adheze *in vivo* je ovlivňována normální střevní mikrobiotou, trávením a potravinovou maticí (Ouweland & Salminen 2003).

Jedna z hlavních funkcí normální střevní mikrobioty je považována za konkurenční vyloučení nových mikroorganismů vstupujících do střeva, čímž poskytuje hostiteli ochranu před napadením potenciálních patogenů. To však může také snížit šance probiotik adherovat na střevní trakt, ale kvantifikace těchto účinků musí být důkladněji prozkoumána (Ouweland & Salminen 2003; Van Tassell & Miller 2011).

Je pravděpodobné, že i proces trávení narušuje adhezi probiotik. To ukazuje, že po požití může být adhezivní kapacita probiotických mikroorganismů značně snížena (Ghalia et al. 2013). Průchod střevním traktem může tedy nejen modulovat životaschopnost probiotik, ale pravděpodobně také měnit jejich adhezivní schopnost. Bakterie mohou být před trávícími faktory chráněny potravinovou maticí, která ale zároveň může adhezi narušovat (Ouweland et al. 2001). Bylo pozorováno, že například působení mastných kyselin vyskytujících se v mléce adhezivní vlastnosti některých laktobacilů snižuje (Van Tassell & Miller 2011). Volstatova et al. (2016) uvádí, že přidání hydrolyzovaného mléka připomínající žaludeční trávení má za následek celkové snížení adheze vybraných druhů.

V současné době je věnována pozornost i dalším složkám potravy, které by mohly mít vliv na adhezi probiotik. Mezi takové složky můžeme řadit i biologicky aktivní látky, kdy zejména fenolové sloučeniny mají schopnost zvyšovat adhezi probiotik na buněčných modelech. Bylo zjištěno, že jablečné extrakty z dužiny a šlupky mají rozdílné vlastnosti na adhezi probiotik. Pravděpodobně v důsledku rozdílného obsahu fenolových sloučenin ve šlupce a dužině jablka. Tyto fenolové sloučeniny jsou prostřednictvím svých hydroxylových skupin schopné interakce protein-protein a zvyšovat tak adhezi na střevní model (Volstatova et al. 2017). K významné stimulaci adheze *L. acidophilus* dochází také při přidavku resveratrolu a ferukové kyseliny (Celebioglu et al. 2018). Naopak Jarošová et al. (2018) uvádí, že samotný resveratrol adhezivní vlastnosti vybraných druhů probiotik (*L. fermentum*, *L. brevis*, *L. gasseri* a *L. plantarum*) výrazně neovlivňuje.

Kromě fenolových sloučenin modulují adhezivní vlastnosti i prebiotika. Koh et al. (2013) uvádí, že tagatóza pozitivně ovlivňuje adhezi *L. casei* a *L. rhamnosus* na střevní buňky. Kromě toho bylo zjištěno, že dochází ke snížení hladiny cholesterolu. Dalším prebiotikem, které je

schopno ovlivňovat adhezi jsou oligosacharidy z mateřského mléka (HMO). HMO jsou schopné snižovat schopnost adheze *Clostridium butyricum*, naproti tomu u bifidobakterií nebyl zaznamenán výraznější vliv (Musilova et al. 2017).

3.4 Testování adherence probiotik

Interakce probiotik a střevní sliznice je testována jak při *in vitro*, tak i *in vivo* podmínkách. Kvůli snadnému přístupu, jednoduché manipulaci a relativně nízkým nákladům jsou nejběžnější *in vitro* metody využívající buněčné modely (Yadav et al. 2017). Jejich výsledky jsou ale pouze hrubými náznaky potenciálu probiotika adherovat ke střevní sliznici (Dimitrov et al. 2014). Výsledné hodnoty jsou většinou ovlivněny jak buněčným modelem, tak i inkubačními podmínkami. Ty by měly být co nejvíce shodné s fyziologickými. Faktory, které ovlivňují *in vitro* adhezi, jsou například pH, růstová fáze bakterií, hustota bakterií, intenzita vymývání atd. (Archer et al. 2018).

I přesto jsou však *in vitro* experimenty klíčové při pochopení mechanismů adheze, při výběru probiotických kandidátů, ale i při objevu nových probiotik (Van Tassell & Miller 2011; Monteagudo-Mera et al. 2019). Je však obtížné tyto výsledky extrapolovat do lidského střevního traktu, kde působí jiné faktory ovlivňující adhezi. Mezi ně patří například peristaltické pohyby, imunitní systém hostitele nebo konkurence dalších zástupců mikrobioty. Z toho důvodu nám neumožňují poskytnout skutečný obraz o typu interakcí s bakteriemi (Monteagudo-Mera et al. 2019). Stále je proto zapotřebí dalšího výzkumu, aby se zlepšily a standardizovaly dostupné experimentální protokoly zaměřené na zlepšení reprodukovatelnosti a snížení procenta falešně pozitivně nebo negativně identifikovaných druhů s probiotickým potenciálem. Kromě toho bude možná nutné vyvinout nové metody, které rozšíří testování účinných vlastností podporujících zdraví (Dimitrov et al. 2014).

Použitím metod *in vivo* a *ex vivo* je sice GIT prostředí lépe ilustrováno (Yadav et al. 2017), ale testování je mnohem náročnější, a tedy i vzácnější. Při pokusech na lidech jsou probiotické druhy nejběžněji stanovovány ve vzorcích stolice pro jejich neinvazivní techniku odběru. Ačkoli je stanovení probiotických bakterií ze stolice známkou jejich přežití drsných podmínek v GIT, neznamená to celkový počet bakterií, který adheroval na střevní sliznici. Nicméně použití invazivních vzorků, například biopsií, by mohlo při testování adherence pomoci mnohé objasnit (Monteagudo-Mera et al. 2019).

3.4.1 Metody *in vitro* testování

Všechny modely používané pro *in vitro* testování adheze mají své specifické výhody i nevýhody, které jsou shrnuty v tab. 2 (Van Tassell & Miller 2011). Z tohoto důvodu je proto vhodné posoudit adhezi potenciálních probiotik na více než jednom modelu, přičemž jeden doplňuje druhý.

Tabulka 2: Přehled *in vitro* modelů testování adherence (Van Tassell & Miller 2011).

Model	Popis	Výhody	Nevýhody
Imobilizovaný hlen	Hlen obvykle imobilizovaný na mikrotitrační destičce	Rychlé, izoluje interakce hlenu a mikrobu od jiných podmínek <i>in vivo</i>	Obtížné oddělit hlenově specifické interakce od hydrofobních interakcí
Buněčné linie	Polární monovrstva enterocytů připomínající střevní tkáň	Poskytuje podmínky <i>in vitro</i> nejpodobnější prostředí <i>in vivo</i>	Pochází z rakovinných 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 hlenu
HT29-MTX	Buněčná linie HT29 ošetřená methotrexátem za účelem sekrece hlenu	Přítomnost hlenu	Nemusí představovat vhodnou expresi genu MUC
ko-kultury	Smíšená kultura hlen sekretujících a neseekretujících buněk	Lepší reprezentace buněčných typů vyskytujících se v epiteliální tkáni	Málo literárních zdrojů zabývajících se touto metodou
Celá tkáň	Celá nebo vyříznutá tkáň	Poskytuje podmínky nejpodobnější prostředí <i>in vivo</i>	Nákladné, obtížné získat

Imobilizovaný střevní hlen

Nejjednodušší test adherence *in vitro* je založen na imobilizaci komerčně dostupného mucinu na mikrotitrační destičku (Kadlec & Jakubec 2014). K tomuto testu může být použit také střevní hlen izolovaný ze vzorku stolice nebo z resekované tkáně, což umožňuje studium adheze na hlen, který pochází ze subjektů různých skupin lišících se věkem, zdravotním stavem, stravou atd. (Ouwehand & Salminen 2003). Tento model umožňuje také testovat a srovnávat interakci mezi bakteriemi a konkrétními muciny, o nichž je známo, že jsou exprimovány v daném hostitelském místě. Dále lze touto metodou izolovat interakce mikrobů na mucin od interakcí na hostitelské buňky (Van Tassell & Miller 2011).

Nevýhodou tohoto modelu je to, že neobsahuje základní enterocyty, což není zásadním problémem, protože ve skutečnosti je na samotné enterocyty vázána pouze menšina střevních bakterií. Zajímavé je, že existuje dobrá korelace mezi adhezí na imobilizovaný hlen a adhezí při použití modelu buněčných linií Caco-2, důvod však nebyl blíže zkoumán (Ouwehand & Salminen 2003).

Lidské buněčné linie Caco-2 a HT29

Nejčastěji používanými modely při hodnocení adheze mikroorganismů, nejen probiotik, jsou buněčné linie, které napodobují situaci *in vivo* lépe než imobilizovaný střevní hlen, ale stále to jsou pouze *in cellulo* podmínky. Pro studium adheze ke střevním epiteliálním buňkám se

obvykle používají zejména buňky odvozené od lidského kolorektálního karcinomu, Caco-2 a HT29 (Kadlec & Jakubec 2014; Adriana et al. 2016; Archer et al. 2018).

Buněčná linie Caco-2 byla izolována v roce 1974 z lidského adenokarcinomu tlustého střeva. V pozdních stádiích buněčná linie tvoří buňky polarizovanou monovrstvu s přítomností těsných spojení a apikálních pravidelných mikroklyků, které jsou uspořádány do typického kartáčového lemu. Tyto mikroklyky jsou velmi podobné těm, které byly pozorovány v normálním tenkém i tlustém střevě (Zweibaum et al. 2011). Ačkoli je buněčná linie Caco-2 široce využívána pro studium bakteriální adheze, a to díky jejich morfologické a funkční podobnosti s lidskými enterocyty tenkého střeva, ale to, že se jedná o heterogenní linii kombinovanou s různými kulturními podmínkami, ztěžuje srovnání výsledků mezi laboratořemi. Zatímco buněčná linie Caco-2 je vhodná jako intestinální enterocytový model, není sama schopná produkovat a replikovat mucin (Yadav et al. 2017).

Buněčná linie adenokarcinomu tlustého střeva HT29 byla izolována již v roce 1964 z nádoru tlustého střeva 44leté kavkazské ženy. Ultrastrukturální rysy hlášené pro buňky HT29 zahrnují mikroklyky, mikrofilamenta, velké vakuované mitochondrie s tmavými granulemi, hladké a drsné endoplazmatické retikulum, lipidové kapičky, málo primárních a mnoho sekundárních glukóz (Cencic & Langerholc 2010).

Přestože mají buněčné linie Caco-2 a HT29 široké využití při *in cellulo* testování buněčných linií zdaleka nejsou dokonalými *in cellulo* modely pro studium interakcí probiotik-hostitel. Potenciální nevýhodou při použití těchto buněk tkáňových kultur je to, že se jedná o nádorové buněčné linie (Archer et al. 2018), které mohou být nestabilní (Kadlec & Jakubec 2014), a navíc se mohou svou fyziologií lišit od normálních střevních epiteliálních buněk (Ouwehand & Salminen 2003).

Nádorové buněčné linie mají na buněčném povrchu rozdílné složení sacharidů než normální buňky. Střevní nádorové buněčné linie tedy exprimují vyšší množství sacharidů sialového typu než buňky zdravé. Další nevýhodou je to, že mají smíšený fenotyp tenkého a tlustého střeva (Cencic & Langerholc 2010). Také většinou neprodukují mucin a netvoří tak hlenovou vrstvu, která ve střevě za běžných podmínek buňky pokrývá a chrání. Obecně tedy tvoří pouze jednu část střevní sliznice (Ouwehand & Salminen 2003). Ve většině *in vitro* experimentálních modelů jsou epiteliální buňky kultivovány jako 2D monovrstvy na plastovém povrchu (Cencic & Langerholc 2010).

Použití těchto buněčných linií je velmi užitečné pro identifikaci mechanismu adheze a molekul, které se na adhezi podílejí. Například použitím buněčné linie HT29 byl nedávno identifikován nový protein, vázající cholin A, který je nezbytný pro adhezi probiotika *L. salivarius* REN. Identifikace adhezivních molekul a jejich genů by také mohla být užitečná pro vytvoření vektorů pro zvýšení adhezivních schopností jiných méně adhezivních probiotických kmenů (Monteagudo-Mera et al. 2019).

Buněčné linie HT29 může být diferencována pomocí methotrexátu na pohárkové buňky (Laparra & Sanz 2009; Gagnon et al. 2013), které neustále produkují mucinovou vrstvu. Tyto diferencované buňky jsou označeny jako HT29-MTX (Kadlec & Jakubec 2014). Tato buněčná linie však produkuje muciny typu MUC5AC a MUC5B, které jsou exprimovány výrazně rychleji než MUC2, což by mohlo být významnou nevýhodou při studiu adheze k tlustému střevu, kde naopak převládá mucin MUC2 (Van Tassell & Miller 2011; Gagnon et al. 2013).

Jak uvádí Van Tassell a Miller (2011), může produkce mucinozního hlenu touto buněčnou linií zvyšovat adhezi bakteriálních buněk ve srovnání se samotnými buňkami Caco-2 nebo HT29, což potvrzuje důležitost přítomnosti hlenu pro bakteriální adhezi.

Buněčná linie HT29-MTX je primárně složena z pohárkových buněk, které do modelu začleňují vrstvu hlenu, 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, které lépe simulují *in vivo* podmínky (Van Tassell & Miller 2011). Laparra a Sanz (2009) publikovali, že adheze na ko-kultury je nižší než na samotnou buněčnou linii Caco-2, a to pravděpodobně v důsledku překryvu mucinozní vrstvou z buněčné linie HT29-MTX i vazebných míst na buněčné linii Caco-2, čímž dochází k nezpřístupnosti pro bakterie.

Z výše zmíněných důvodů je cílem této práce porovnat jednotlivé modely využívající nádorové buněčné linie a dosažené výsledky porovnat s výsledky na zdravých buněčných liniích.

4 Metodika

4.1 Materiál

Lidské buněčné linie kolorektálního karcinomu HT29, Caco-2, HT29-MTX a zdravé buněčné linie tenkého střeva FHS 74Int. a tlustého střeva CCD 841Con, buněčné linie byly zakoupeny od American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginie, USA); fetální bovinní sérum (FBS), fosfátový pufr (PBS), Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM), penicilin a streptomycin, hydrogenuhličitan sodný, pyruvát sodný, neesenciální aminokyseliny, epidermální růstový faktor (EGF), triton X-100 - vše zakoupeno od Sigma-Aldrich. Kultivační medium X47 bylo pořízeno od ATCC. *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri* a *L. gasseri* pocházející ze sbírky KMVD.

Kultivační láhve, serologické pipety, petriho misky (VWR International s.r.o.), 24-jamkové destičky (NUNC), Rogosa agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK).

4.2 Metoda

4.2.1 Kultivace tkáňových kultur

K testování adheze byly použity buněčné linie kolorektálního adenokarcinomu HT29 a Caco-2, modifikovaná buněčná linie produkující mucin HT29-MTX a buněčné linie zdravých buněk lidského střeva FHS 74Int. a CCD 841Con, dále pak směsné kultury.

Caco-2, HT29 a HT29-MTX byly kultivovány v EMEM s 10 % FBS, 1 % hydrogenuhličitanu sodného, 1 % pyruvátu sodného, 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % penicilinu a streptomycinu. Buněčná linie FHS 74Int. byla kultivována v mediu hydrocore X47 s 10 % FBS, 1 % sodium bicarbne, 1 % ATB a 30 μ l/1l EGF.

Buněčné linie byly kultivovány v kultivačních lahvích přibližně 7 dní, kdy každý druhý den docházelo k výměně media za čerstvé. Po 7 dnech a při dosažení 90% konfluence byla buněčné vrstvy promyty pomocí PBS. Po odstranění PBS bylo přidáno 5 ml trypsinu na dobu přibližně 3 minut. Po této době bylo k suspenzi přidáno 5 ml odpovídajícího media. Celý obsah láhve byl převeden do centrifugační zkumavky a 10 minut točen při 200 \times g. Následně byl odstraněn trypsin a nahrazen čerstvým mediem, ve kterém byly buňky rozředěny a buněčná suspenze v poměru 1:10 byla přidána do nové kultivační láhve s čerstvým mediem a umístěna do CO₂ kultivačního boxu.

Zbytek buněčné suspenze byl následně naředěn na požadované koncentrace pro založení 24-ti jamkových destiček.

4.2.2 Založení destičky

Samostatné buněčné linie byly naředěny na koncentraci 4×10^4 , směsné kultury Caco-2/HT29 a Caco-2/HT29-MTX byly připraveny v poměru 9:1 se stejnou finální koncentrací. Naředěná buněčná suspenze byla pipetována do destičky a umístěna do CO₂ inkubátoru. Takto byla destička inkubována minimálně 14 dní a krmena 2-3 \times týdně.

4.2.3 Příprava inokul probiotik

Bylo odebráno 5 ml přes noc narostlé kultury LAC do zkumavky. Bakterie byly zcentrifugovány 10 minut při 1000× g, 3× promyty v PBS a následně rozmíchány v 5 ml téhož pufru. Vznikla tak suspenze, která obsahovala přibližně přibližně 10^6 - 10^7 buněk v 1 ml a byla použita pro další testování.

4.2.4 Testování adheze

Buněčné linie byly následně 3× promyty 1 ml PBS, čímž došlo k očištění buněčných linií od antibiotik a fetálního séra, jejichž přítomnost by mohla způsobovat nežádoucí agregaci přidaných probiotik.

Poté bylo do každé jamky napipetováno 900 ml EMEM media bez suplementů a 100 ml jednotlivých probiotik. Následně byla destička inkubována v CO₂ inkubátoru po dobu 90 minut. Následně bylo médium s probiotiky odstraněno a monovrstvy buněčných linií byly 3× promyty PBS, tak aby nebyla narušena integrita buněčné monovrstvy, ale došlo k odstranění nenaadherovaných probiotik. Poté bylo do jamek přidáno přidáno 300 µl 1% Triton-X100 na 1 minutu pro uvolnění adherovaných buněk. Následně bylo přidáno 700 µl PBS, které neutralizovalo Triton.

Poté byla pomocí 10× ředění připravena ředící řada suspenze adherovaných buněk. Následně byly jednotlivá ředění pipetována v opakování na Petriho misku a 2× zalita Rogosa agarem. Obdobně se postupovalo i u inokula. Petriho misky byly umístěné dnem vzhůru v inkubátoru při 37 °C na 72 h. po inkubaci byl sečten počet kolonií na jednotlivých miskách. Ze získaných výsledků byl vypočítán LOG KTVJ/ml. Výsledné hodnoty byly přepočítány na % adherence, dle následujícího vzorce:

$$\text{Adheze (\%)} = \frac{\text{Počet bakterií ve vzorku}}{\text{Počet bakterií v inokulu}} \times 100 \%$$

4.2.5 Statistika

Data byla vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka. Pro statistické porovnání jednotlivých buněčných *in vitro* modelů a testovaných druhů probiotik byl použit program Graphpad Prism 6. 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 otestovat schopnost adheze vybraných laktobacilů *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri* a *L. gasseri* pomocí několika rozdílných *in cellulo* modelů buněčných linií. Byly použity buněčné linie HT29, Caco-2, HT29-MTX a směsné kultury Caco-2/HT29-MTX a Caco-2/HT29. Dále byla použita také zdravá buněčné linie tenkého střeva FHS 74Int. a tlustého střeva CCD 841Con.

Již při kultivaci se prokázalo, že buněčná linie CCD 841Con není vhodná pro testování adheze probiotik. Tato buněčná linie nesplňovala požadavky kladené na tuto metodu. Po 14 dnech stále nebyla vytvořena konfluentní monovrstva. To nastalo až mezi 3. a 4. týdnem po založení. Během nutného proplachování a další manipulace se ale ukázalo, že monovrstva je velmi nestabilní a nebylo možné po konečném proplachování získat konzistentní monovrstvu vhodnou pro další testování. Z tohoto důvodu musela být tato buněčná linie nakonec vyřazena z našeho plánovaného testování.

Dále se pokračovalo v testování na ostatních *in vitro* modelech. Bylo zjištěno, že je výsledná adheze testovaných laktobacilů v případě použití všech těchto modelů velmi vysoká a pohybuje se v rozmezí 57,5 až 94,3 %. Výsledné průměrné hodnoty adheze jsou uvedeny v tab.3.

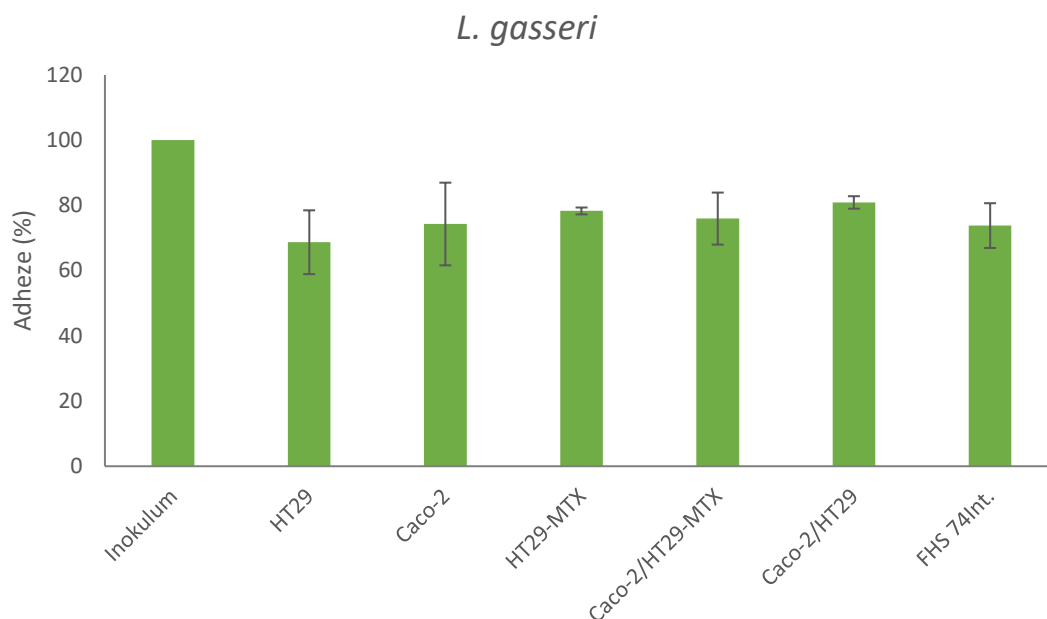
Tabulka 3.: Výsledné adheze (průměr ± SD %) laktobacilů na jednotlivé buněčné modely.

	HT29	Caco-2	HT29- MTX	Caco-2/ HT29-MTX	Caco-2/ HT29	FHS 74Int.
	průměr ± SD %					
<i>L. gasseri</i>	68,7±9,8	74,3±12,7	78,3±1,1	76,0±8,0	80,9±1,9	73,8±6,9
<i>L. rhamnosus</i>	57,5±9,7	66,5±1,0	79,8±1,1	72,8±4,9	69,1±4,1	75,7±1,7
<i>L. plantarum</i>	68,9±4,0	94,3±18,9	75,8±1,6	85,2±3,1	83,7±2,8	77,3±0,7
<i>L. reuteri</i>	78,7±15,3	67,4±4,5	78,3±1,1	69,0±9,2	71,2±8,0	83,0±12,0

5.1 Stanovení adheze *L. gasseri*

Bylo zjištěno, že *L. gasseri* adheruje k buněčným liniím v rozmezí 68,7 a 80,9 %, přičemž nejnižší adhezi vykazuje k buněčné linii HT29. Naproti tomu k buněčné linii Caco-2 se % adheze zvyšuje o více jak 5 % a k buněčné linii HT29-MTX dokonce o 10 %. V případě směsných kultur se adheze zvyšuje o 7 (Caco-2/HT29), respektive 12 % (Caco-2/HT29). Toto probiotikum velmi dobře adheruje i ke zdravé buněčné linii FHS 74Int., a to téměř ze 74 %. Procenta adheze *L. gasseri* k jednotlivým buněčným liniím jsou zobrazena na obr. 4.

Ze získaných výsledků je patrné, že adheze *L. gasseri* k jednotlivým modelům se téměř neliší. Mezi jednotlivými *in vitro* modely neexistují statisticky významné rozdíly.



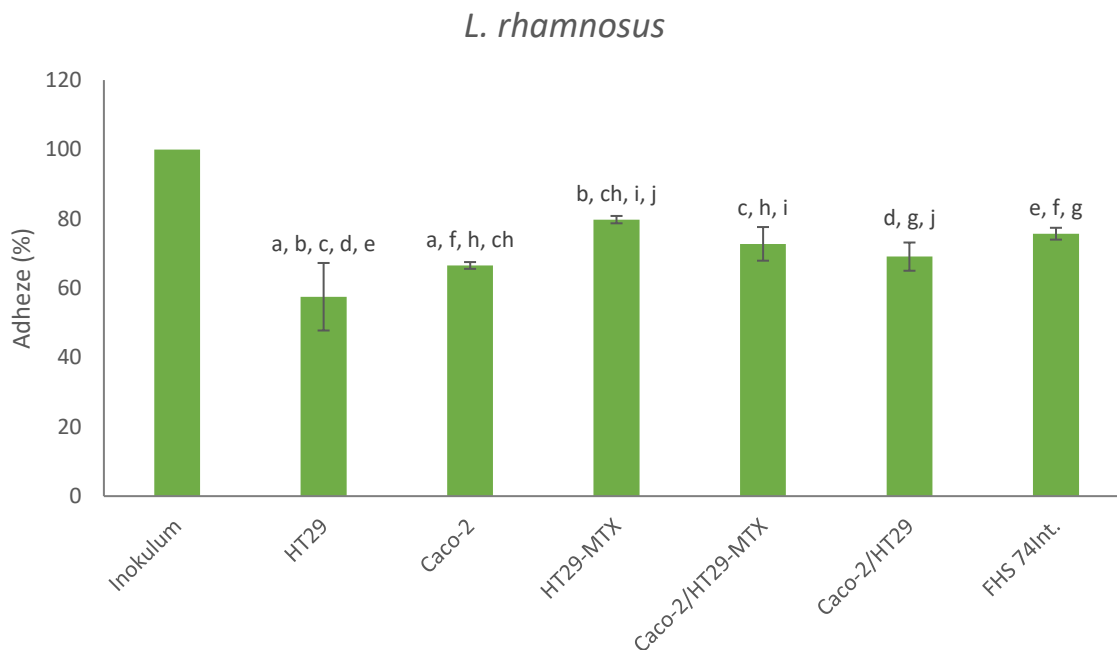
Obrázek 4: Adheze *L. gasseri*

průměrné hodnoty adheze (%) k jednotlivým modelům, v porovnání s inokulem (100 %), a směrodatné odchylky. Mezi jednotlivými modely neexistuje statisticky významný rozdíl.

5.2 Stanovení adheze *L. rhamnosus*

L. rhamnosus adheruje k vybraným buněčným modelům v rozmezí 57,5 a 79,8 %. Zdaleka nejméně adheruje toto probiotikum k buněčné linii HT29. K buněčné linii Caco-2 je jeho adheze o 9 % vyšší a při použití směsné kultury Caco-2/HT29 vzrostla adheze téměř o 12 %. Ještě vyšších hodnot pak dosahuje ke směsné kultuře Caco-2/HT29-MTX a ke zdravé buněčné linii FHS 74Int. Nejlépe však tento druh adheruje k buněčné linii produkující mucin (HT29-MTX), přičemž hodnota této adheze převyšuje adhezi k buněčné linii HT29 o více jak 22 %. Procenta adheze *L. rhamnosus* k jednotlivým buněčným liniím jsou zobrazena na obr. 5.

Adheze *L. rhamnosus* k buněčné linii HT29 se statisticky významně liší od adheze k buněčné linii Caco-2, HT29-MTX, Caco-2/HT29-MTX, Caco-2/HT29 a FHS 74Int. Statisticky významný je také rozdíl mezi buněčnou linií FHS 74Int. a Caco-2 a zároveň mezi FHS 74Int. a Caco-2/HT29. Naopak adheze k FHS 74Int. se statisticky významně neliší od HT29-MTX a Caco-2/HT-MTX. Adheze k HT29-MTX se statisticky významně liší od adheze k buněčným liniím Caco-2, Caco-2/HT29-MTX a Caco-2/HT29. Zároveň se statisticky významně liší adheze ke Caco-2 a Caco-2/HT29-MTX. Naopak neexistuje statisticky významný rozdíl mezi Caco-2 a Caco-2/HT29, a mezi směsnými kulturami Caco-2/HT29 a Caco-2/ HT29-MTX.



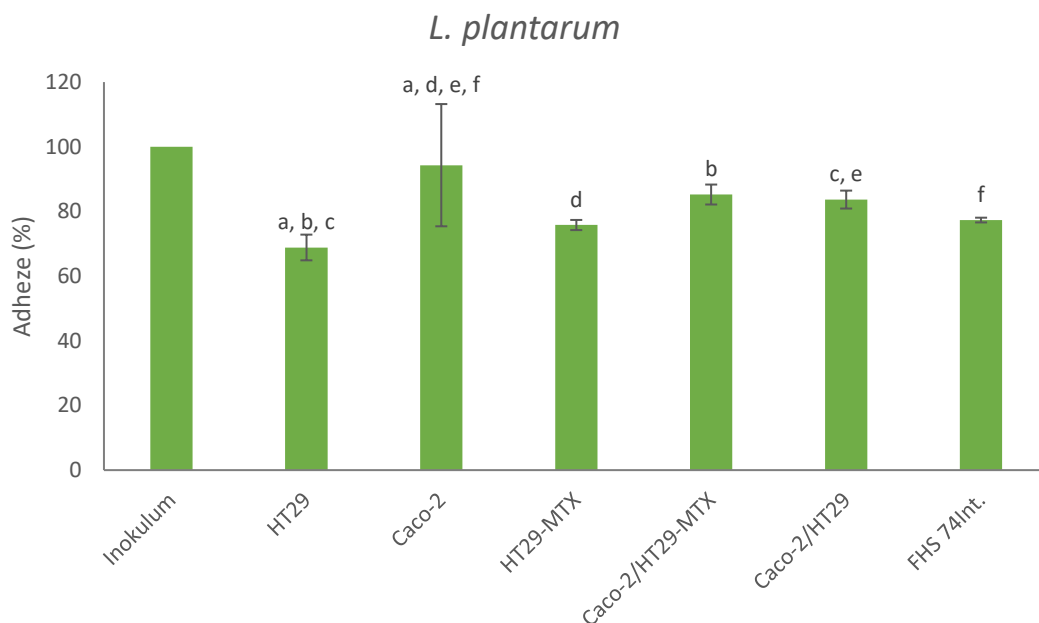
Obrázek 5: Adheze *L. rhamnosus*

průměrné hodnoty adheze (%) k jednotlivým modelům, v porovnání s inokulem (100 %), a směrodatné odchylky. Stejně písmeno (a, b, c, d, ...) vyjadřuje statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými modely.

5.3 Stanovení adheze *L. plantarum*

L. plantarum adheruje k použitým buněčným liniím mezi 68,9 a 94,3 %, přičemž nejméně adheruje k buněčné linii HT29. Za použití buněčné linie HT29-MTX vzrostla adheze o necelých 7 % a v případě zdravé buněčné linie FHS 74Int. o více než 8 %. Velmi dobře adheruje i ke směsným kulturám Caco-2/HT29-MTX a Caco-2/HT29. Nejvyšší hodnoty pak nabývá adheze k buněčné linii Caco-2, která o téměř 26 % převyšuje nejméně preferovanou buněčnou linii HT29. Procenta adheze *L. plantarum* k jednotlivým buněčným liniím jsou zobrazena na obr.6.

Statisticky významný rozdíl je v tomto případě mezi buněčnou linií HT29 a buněčnými liniemi Caco-2, Caco-2/HT29-MTX, Caco-2/HT29. Naopak neexistuje statisticky významný rozdíl mezi adhezí k HT29 a HT29-MTX, mezi HT29 a FHS 74Int. ani mezi Caco-2 a HT29-MTX. Statisticky významně se liší také adheze *L. plantarum* ke Caco-2 od adheze k HT29-MTX, Caco-2/HT29 a FHS 74Int. Statisticky významný rozdíl neexistuje mezi adhezí *L. plantarum* na buněčné linie HT29-MTX, Caco-2/HT29-MTX, Caco-2/HT29 a FHS 74Int.



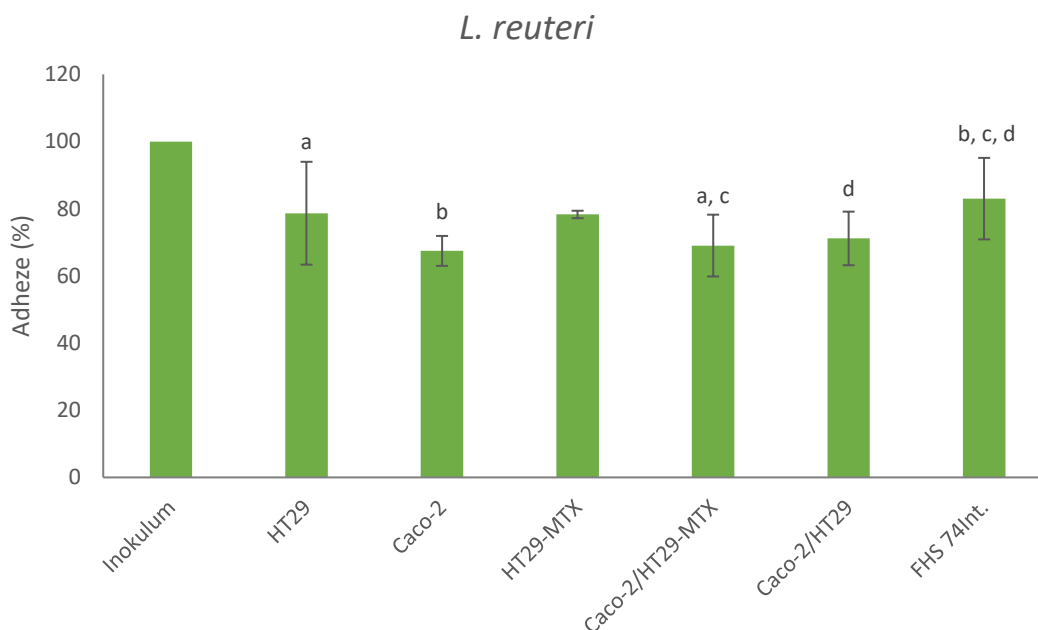
Obrázek 6: Adheze *L. plantarum*

průměrné hodnoty adheze (%) k jednotlivým modelům, v porovnání s inokulem (100 %), a směrodatné odchylky. Stejné písmeno (a, b, c, d, ...) vyjadřuje statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými modely.

5.4 Stanovení adheze *L. reuteri*

L. reuteri k vybraným buněčným liniím adhezuje mezi 67,4 a 83,0 %. Jeho nejnižší adheze je k buněčné linii Caco-2, což je ale pouze o necelé 2 % nižší, než je tomu v případě směsné kultury Caco-2/HT29-MTX. O něco lépe ale adhezuje ke směsné kultuře Caco-2/HT29. Vyšších hodnot pak nabývá adheze k buněčné linii HT29-MTX, která se liší od jeho adheze k HT29 o pouhých 0,4 %. Tento druh nejlépe adhezuje ke zdravé buněčné linii FHS 74Int. a to z 83,0 %. Procenta adheze *L. reuteri* k jednotlivým buněčným liniím jsou zobrazena na obr.7.

Adheze *L. reuteri* k buněčné linii HT29 se statisticky významně liší pouze od adheze ke směsné kultuře Caco-2/HT29-MTX. Mezi touto buněčnou linií a zbylými testovanými buněčnými liniemi statisticky významný rozdíl neexistuje. Dále existuje statisticky významný rozdíl mezi zdravou buněčnou linií FHS 74Int. a Caco-2 a také mezi FHS 74Int. a směsnými kulturami Caco-2/HT29-MTX a Caco-2/HT29.



Obrázek 7: Adheze *L. reuteri*

průměrné hodnoty adheze (%) k jednotlivým modelům, v porovnání s inokulem (100 %), a směrodatné odchylky. Stejné písmeno (a, b, c, d) vyjadřuje statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými modely.

5.5 Porovnání adheze jednotlivých laktobacilů

Statisticky byly porovnány mezi sebou i výsledky adheze těchto 4 druhů laktobacilů k jednotlivým buněčným liniím, přičemž bylo zjištěno, že se statisticky významně liší adheze *L. plantarum* k buněčným liniím Caco-2 od *L. gasseri*, *L. rhamnosus* a *L. reuteri*, jejichž adheze byla k této buněčné linii daleko nižší. Dále bylo zjištěno, že je statisticky rozdílná i adheze *L. plantarum* a *L. rhamnosus* ke směsné kultuře Caco-2/HT29. Statisticky významný rozdíl existuje také mezi adhezí *L. plantarum* a *L. rhamnosus*, a i mezi *L. plantarum* a *L. reuteri* ke směsné kultuře Caco-2/HT29-MTX. Statistické porovnání průměrných % adheze pomocí testu ANOVA je zobrazeno v tab.4.

Tabulka 4.: Porovnání průměrné adheze (%) jednotlivých laktobacilů k vybraným *in vitro* modelům - ANOVA (na hladině $p < 0,05$)

	Kmen	HT29				Caco-2				HT29-MTX				Caco-2/HT29-MTX				Caco-2/HT29				FHs				Inokulum						
		L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.	L.			
		<i>plantarum</i>	<i>gasseri</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>reuteri</i>	<i>plantarum</i>	<i>gasseri</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>reuteri</i>	<i>plantarum</i>	<i>gasseri</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>reuteri</i>	<i>plantarum</i>	<i>gasseri</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>reuteri</i>	<i>plantarum</i>	<i>gasseri</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>reuteri</i>	<i>plantarum</i>	<i>gasseri</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>reuteri</i>	<i>plantarum</i>	<i>gasseri</i>	<i>rhamnosus</i>	<i>reuteri</i>			
HT29	<i>L. plantarum</i>	-	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	N	A	N	N	N	N	A	N	N	N	N
	<i>L. gasseri</i>	N	-	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	A	N	N	N	
	<i>L. rhamnosus</i>	N	N	-	A	A	A	A	N	A	A	A	A	A	A	A	N	A	A	A	N	A	N	A	A	N	N	A	N	N	N	
	<i>L. reuteri</i>	N	N	A	-	A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N
Caco-2	<i>L. plantarum</i>	A	A	A	A	-	A	A	A	A	A	N	N	N	A	A	A	A	N	A	A	A	N	A	A	A	N	N	N	N	N	
	<i>L. gasseri</i>	N	N	A	N	A	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	
	<i>L. rhamnosus</i>	N	N	A	N	A	N	-	N	N	N	A	N	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	A	A	N	N	A	N	N	N	
	<i>L. reuteri</i>	N	N	N	N	A	N	N	-	N	N	N	N	A	N	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N
HT29-MTX	<i>L. plantarum</i>	N	N	A	N	A	N	N	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	
	<i>L. gasseri</i>	N	N	A	N	A	N	N	N	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	
	<i>L. rhamnosus</i>	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	-	N	N	A	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N
	<i>L. reuteri</i>	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N
Caco-2/HT29-MTX	<i>L. plantarum</i>	A	A	A	N	N	N	A	A	N	N	N	N	-	N	A	A	N	N	A	A	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	
	<i>L. gasseri</i>	N	N	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	
	<i>L. rhamnosus</i>	N	N	A	N	A	N	A	N	N	N	A	N	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N
	<i>L. reuteri</i>	N	N	N	A	A	N	N	N	N	N	N	N	-	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	A	N
Caco-2/HT29	<i>L. plantarum</i>	A	A	A	N	A	N	A	A	N	N	N	N	A	-	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	
	<i>L. gasseri</i>	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	
	<i>L. rhamnosus</i>	N	N	A	N	A	N	N	N	N	N	A	N	N	A	N	-	N	N	N	A	A	N	N	A	N	A	N	N	N	N	
	<i>L. reuteri</i>	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	-	N	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	A	N
FHs	<i>L. plantarum</i>	N	N	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N	N	A	N	N	N	N	
	<i>L. gasseri</i>	N	N	N	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	-	N	N	N	N	A	N	N	N	N
	<i>L. rhamnosus</i>	N	N	A	N	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	-	N	N	N	N	A	N	N	N	N
	<i>L. reuteri</i>	A	A	A	N	N	N	A	A	N	N	N	N	A	N	N	A	A	N	N	A	A	N	N	-	N	N	N	N	N	A	N
Inokulum	<i>L. plantarum</i>	A	N	N	N	N	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	-	N	N	N	N	N	
	<i>L. gasseri</i>	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	-	N	N	N	N	
	<i>L. rhamnosus</i>	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	-	N	N	N	N
	<i>L. reuteri</i>	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	N	A	N	N	A	N	N	N	N	N	N	-	N

(A – mezi vzorky je statisticky významný rozdíl na hladině $p < 0,05$; N – mezi vzorky není statisticky významný rozdíl na hladině $p < 0,05$)

6 Diskuze

Spolu s různými faktory, jako je schopnost přežití v prostředí GITu nebo produkce antimikrobiálních látek, je schopnost probiotik adherovat na střevní epitelové buňky jednou z nejdůležitějších kritérií pro výběr nových probiotických druhů (Makinen et al. 2012). Bakteriální adheze je považována za nezbytnou podmínku pro probiotickou selekci, protože může ovlivnit dobu setrvání bakterií ve střevním traktu, a tedy i schopnost probiotik modulovat imunitní systém. Souvisí také se schopností inhibice střevních patogenů a s dalšími prospěšnými zdravotními přínosy. Přestože jsou klinické studie definitivním nástrojem pro stanovení probiotické funkčnosti, je před výběrem nutné nejslibnější kandidáty probiotik nejprve otestovat pomocí modelů *in vitro* (Laparra & Sanz 2009).

Nejčastěji se adheze testuje pomocí buněčných linií Caco-2 a HT29, což jsou buňky izolované z adenokarcinomů tlustého střeva. V diferencovaném stavu mají rysy enterocytů, čímž napodobují typické vlastnosti epitelu tenkého střeva, a to včetně dobře vyvinutého kartáčového lemu (Bermudez-Brito et al. 2013).

Bianchi et al. (2004) ve studii využívali buněčnou linii Caco-2 k porovnání adhezivních schopností tří druhů laktobacilů (*L. plantarum* 122E, *L. casei* 172I, *L. bulgaricus* AY) a dvou druhů bifidobakterií (*B. breve* Bbr8, *B. infantis* Bi1). Výsledná adheze se pohybovala mezi 4 a 10 %, přičemž nejvyšší hodnoty adheze nabývala směs dvou bifidobakterií - *B. breve* a *B. infantis*. Zde uvedená adheze byla daleko nižší než adheze námi testovaných laktobacilů na buněčnou linii Caco-2, která se pohybovala mezi 66,5 a 94,3 %. Nejvíce na tuto buněčnou linii adheroval *L. plantarum*, jehož hodnota adheze statisticky významně převyšovala adhezi zbylých druhů. V nedávné studii (Devi et al. 2018) byl rovněž za probiotikum s nejvyšší mírou adheze považován *L. plantarum*, který adheroval ze 62 %, což je ale o více než 32 % méně, než je tomu u námi testovaného *L. plantarum*. To by mohlo být způsobeno jiným zdrojem, ze kterého byl izolován. Několik druhů laktobacilů bylo testováno i v další studii (Moussavi & Adams 2009), kde za pomoci této buněčné linie pozorovali, jak se jejich adheze mění po přidání dalšího probiotika, *Propionibacterium jensenii*. Nejvyšší míra adheze byla stanovena rovněž u *L. plantarum*, který zde adheroval z více než 80 %. Slabší míru adheze měl pak *L. casei* a *L. rhamnosus*. Vysoká míra přilnavosti *L. plantarum* nebyla po přidání dalšího probiotika významně ovlivněna. K výraznému snížení ale došlo u *L. casei* a *L. rhamnosus*, což poukazuje na důležitost hodnocení adheze před výrobou směsných probiotických produktů.

Většina studií (Gagnon et al. 2004; Botes et al. 2008; Monteagudo-Mera et al. 2012; García-Cayuela et al. 2014; Pisano et al. 2014) však uvádí, že adheze probiotik k této buněčné linii dosahuje daleko nižších hodnot, než ukazují naše výsledky. Například dle Monteagudo-Mera et al. (2012) *L. rhamnosus* izolovaný z mléčných produktů adheruje z pouhých 9,24 %. Pisano et al. (2014) uvádí, že laktobacily izolované z mléčných výrobků ze Sardinie adherují k této buněčné linii od 3 do 20 %. Rovněž i Botes et al. (2008) uvádí daleko nižší % adheze. Dle nich na tuto buněčnou linii adheruje *L. rhamnosus* GG z 9,2 % a *L. plantarum* 423 z 8 %, což je zhruba 10× méně, než je tomu v našem případě. I zde pravděpodobně hraje roli původ izolace druhu, případně bude za rozdílnými výsledky stát i způsob kultivace buněčných modelů a metodika vlastního pokusu. Ještě daleko horší schopnost adherovat na tuto buněčnou linii mají dle Gagnon et al. (2004) bifidobakterie, jejichž adheze není vyšší než 5 %. K nízkým hodnotám adhezí došli také García-Cayuela et al. (2014), jenž pomocí buněčné linie Caco-2

testovali to, jak může adheze různých typů *L. plantarum* souviset s jejich agregačními schopnostmi. Adheze testovaných laktobacilů byla velmi variabilní a pohybovala se v rozmezí 4,98 a 14,38 %, což je opět daleko nižší než námi stanovená hodnota. Bylo zde zjištěno, že míra agregace s adhezivní schopností k buněčné linii Caco-2 přímo nekoreluje. To naznačuje, že adhezní vlastnosti bakterií mohou být ovlivněny i dalšími faktory, jako jsou například elektrostatické interakce, sterické síly a specifické bakteriální struktury, které jsou u jednotlivých druhů probiotik odlišné. Velké rozdíly mezi výslednými adhezemi výše uvedených studií mohou být kromě použití odlišného druhu probiotika způsobeny i dalšími faktory ovlivňujícími *in vitro* adhezi. Významný vliv mají i různé inkubačními podmínkami, jako je například složení pufry, pH hodnota, růstová fáze a koncentrace bakterií, inkubační doba, růstové médium nebo intenzita vymývání (Ouweland & Salminen 2003; Archer et al. 2018).

Dále byla adheze vybraných laktobacilů testována pomocí buněčné linie HT29, ke které však byla adheze o 9-16 % nižší, než v případě buněčné linie Caco-2. Tuto buněčnou linii využívali i Son et al. (2017), kteří pomocí ní testovali adhezivní schopnosti bakterií mléčného kvašení izolovaných z místních fermentovaných potravin. Došli zde k závěru, že nejvyšší adhezi na tuto buněčnou linii měly 4 izolované druhy, a to *Leuconostoc mesenteroides*, *L. plantarum*, *L. brevis* a *L. perolens*. Hodnoty se pohybovaly v rozmezích 2,86–12,37 %, což je výrazně nižší než naše výsledné hodnoty, které dosahovaly až 78,7 %. V našem případě na HT29 buňky nejlépe adheroval *L. reuteri* a naopak nejhůře *L. rhamnosus*, což se shoduje s výsledky Hasannejad Bibalan et al. (2017), kteří publikovali, že adheze *L. reuteri* k HT29 mnohonásobně převyšuje hodnoty zbylých laktobacilů. Adheze *L. plantarum* a *L. gasseri* byla k této buněčné linii téměř totožná (68,9 a 68,7 %) a jen o něco málo převyšuje hodnotu ze studie Satish Kumar et al. (2011), kde zjistili, že *L. plantarum* adheruje téměř z 60 %. Naopak dle Lee et al. (2014) *L. plantarum* izolovaný z kimchi k HT29 adheruje z pouhých 7 %, což je zhruba 13× méně než tomu je v našem případě. Je však otázka, co tak význaný rozdíl způsobuje.

Tyto dvě základní buněčné linie odvozené od lidského kolorektálního karcinomu, Caco-2 a HT29, jsou v řadě studií často porovnávány. Například Sharma a Kanwar (2017) pomocí nich testovali 11 různých bakterií izolovaných z tradičních fermentovaných potravin z Himaláji. Popisují zde, že adheze izolátů k HT29 buňkám (4,11 do 12,88 %) je relativně vyšší než ke Caco-2 buňkám (2,45 do 9,55 %). Jako probiotikum s nejvyšší adhezí určili *L. plantarum*, které adherovalo k buňkám HT29 z 12,88 % a k buňkám Caco-2 z 9,55 %. Vyšší procento adheze k buňkám HT29 než ke Caco-2 stanovili také Yu et al. (2017), kteří zjistili, že čtyři testované typy *Lactobacillus ruminis* vykazovaly k buňkám Caco-2 velmi špatnou adhezi (0,5–2%). Adheze k buňkám HT29 dosahovala až 7 %. Výsledky našeho měření jsou však se studiemi Sharma a Kanwar (2017) a Yu et al. (2017) v rozporu. Zjistili jsme, že *L. plantarum* i *L. rhamnosus* naopak výrazně lépe adherují k buňkám Caco-2 než k HT29. Ke stejnému výsledku došli i Jensen et al. (2012), kteří určili, že pro druhy probiotik o vysoké schopnosti adherovat (*L. plantarum* MF1298, *L. reuteri* DSM 20016, mm4-1a a fj1) jsou pro bakteriální adhezi oproti buňkám HT29 výhodnější buňky Caco-2. Dle našich výsledků se v případě *L. reuteri* a *L. gasseri* adheze k těmto dvou buněčným liniím významně neliší.

Hojně využívaná je také buněčná linie HT29-MTX, která se od buněčné linie HT29 liší především tím, že je tvořena pohárkovými buňkami schopnými vylučovat mucin (Bermudez-Brito et al. 2013). Hlavními exprimovanými muciny jsou MUC5AC a MUC5B, které jsou

rovněž vysoce exprimovány v žaludku a v horním střevním traktu. A však MUC2, který je hlavní složkou hlenu nacházejícím se v tlustém střevu, je těmito buňkami produkován pouze minimálně (Laparra & Sanz 2009). Odlišný typ mucinu může mít na výslednou adhezi výrazný vliv. Přesto adheze k této buněčné linii HT29-MTX námi testovaných laktobacilů byla rovněž velmi vysoká. Pohybovala se v rozmezí 75,8 až 79,8 %, což je mnohonásobně vyšší, než uvádí jiné studie. Velmi nízké procento adheze detekovali například Benítez-Cabello et al. (2019). Ti stanovili, že míra adheze laktobacilů izolovaných z oliv se pohybuje v rozmezí 0,17 (*L. plantarum* Lpl12) a 2,25 % (*L. pentosus* Lp14). Velmi nízkou schopnost adheze vykazují i *L. plantarum*, jenž byl izolován z ovčího a koziho mléka (0,9 - 9,34 %) (Mahmoudi et al. 2019). Vyšší adhezi mají laktobacily izolované z jogurtových produktů, která se pohybuje v rozmezí 20 až 40 % (Schillinger et al. 2005). Tyto výsledky podporují domněnku, že MUC2 má význam pro adhezi probiotik a díky nízké produkci u buněčné linie HT29-MTX je snížena i adheze. Přesto *L. plantarum* získaný z mléčných fermentovaných potravin z Keni, dosahuje adheze až 76 % (Mathara et al. 2008), což se téměř ztotožňuje s hodnotami našeho měření.

Porovnání buněčné linie produkující mucin, HT29-MTX, s buněčnou linií HT29 nebo Caco-2 je předmětem mnoha studií (Gopal et al. 2001; Laparra & Sanz 2009; Turpin et al. 2012). Například Laparra a Sanz (2009) ve své studii zjistili, že adheze *L. rhamnosus* GG k buněčné linii HT29-MTX dosahuje minimálních hodnot (0,84 %), ale daleko lépe adhezuje k buněčné linii Caco-2 (5,17 %) a k samotnému mucinu tvořeného typem MUC2 (10,21 %), což je v souladu s hypotézou, která uvádí, že MUC5AC a MUC5B produkované diferencovanou buněčnou linií HT29-MTX mohou výslednou adhezi snižovat. To, že probiotika daleko lépe adherují na MUC2 potvrdili také Li et al. (2008), kteří testovali adheze laktobacilů k hlenu extrahovanému z různých částí tenkého střeva. Adheze ke hleny ilea, který je více bohatý na MUC2, byla vyšší než na duodenální a jejunální hlen. Naše výsledky hypotézu, že je buněčná linie HT29 při testování adhečních vlastností probiotik vhodnější než HT29-MTX, však nepotvrzují. V případě testování *L. plantarum* se ukázalo, že se adheze k buněčné linii HT29 významně neliší od výsledků získaných za použití buněčné linie HT29-MTX. Nižší byla však adheze k této buněčné linii produkující mucin ve srovnání s buněčnou linií Caco-2. V případě *L. gasseri* a *L. reuteri* se ukázalo, že mezi buněčnou linií HT29-MTX a HT29 a ani mezi HT-MTX a Caco-2 není výrazný rozdíl. Naproti tomu *L. rhamnosus* dokonce výrazně lépe adhezuje k buněčné linii HT29-MTX oproti HT29 (o 22 %) i Caco-2 (o 13 %), což naši hypotézu vyvrací. K podobným závěrům došli také Gopal et al. (2001). Dle jejich výsledků je schopnost adheze k buněčné linii HT29-MTX tří probiotických druhů – *L. rhamnosus* DR20, *L. acidophilus* HN017 a *B. lactis* DR10 2-3× vyšší než k buněčným liniím Caco-2 a HT29. Popisují zde, že je možné, že tento výsledek může být způsoben spíše fyzickým zachycením buněk v hleny než jejich vyšší specifickou afinitou k této buněčné linii. Stejně tak Bernet et al. (1994) stanovili, že míra adheze *L. acidophilus* LA 1 je daleko vyšší k buněčným liniím produkujícím mucin než k buněčným liniím Caco-2. Dále také Turpin et al. (2012) testovali 30 různých bakterií mléčného kvašení izolovaných z rostlinných fermentovaných potravin a určili, že je jejich míra adheze velmi variabilní a pohybuje se v rozmezí 0,6 až 30,0 % k HT29 buňkám. O něco vyšších hodnot (0,5 % do 34,8 %) pak dosahovala v případě buněčné linie HT29-MTX. Dle Mahmoudi et al. (2016) laktobacily izolované z velbloudího mléka mají vysokou míru adheze jak k buněčné linii produkující mucin, HT29-MTX,

tak i k buněčné linii Caco-2. Hodnota adheze dosahovala u některých druhů až 30 %, což je ale stále daleko méně, než ukazují naše hodnoty.

Buněčné linie Caco-2, HT29 a HT29-MTX jsou využívány nejen k testování adheze různých druhů probiotik, ale i k testování interakcí mezi hostitelem a střevními patogeny. Například Gagnon et al. (2013) za použití těchto buněčných linií stanovovali adhezivní schopnosti salmonel. Došli k závěru, že salmonely ve srovnání s Caco-2 a HT29 daleko lépe adherují k buňkám HT29-MTX, a to pravděpodobně kvůli jejich vysoké přilnavosti na mucinovou vrstvu. Výsledná adheze k buňkám Caco-2 a HT29 se téměř nelišila. To naznačuje, že buněčná linie HT29-MTX, s fyziologicky relevantnějšími charakteristikami při tvorbě slizové vrstvy, by mohla být pro studium interakcí mezi střevními buňkami a patogeny vhodnější.

K testování adhezivních schopností vybraných druhů laktobacilů byla v této práci využita i směsná kultura Caco-2/HT29-MTX (9:1), jejíž výhodou je to, že je reprezentována jak absorpčními enterocyty, tak i pohárkovými buňkami produkujícími mucin, a tudíž lépe napodobuje skutečný model tlustého střeva, než jednotlivé buněčné linie (Laparra & Sanz 2009). Mahler et al. (2009) uvedli, že hodnoty bakteriální adheze k této ko-kultuře bývají znatelně nižší než hodnoty získané pomocí Caco-2, a to z toho důvodu, že vrstva mucinu produkovaná buňkami HT29-MTX nejspíše pokrývá potenciální vazebné složky membrán buněk Caco-2, což je činí nepřístupnými pro bakteriální adhezi. Navíc jsou zde, stejně tak jako u samotné buněčné linie HT29-MTX, produkovány muciny typu MUC5AC a MUC5B, na které se probiotika vážou v menší míře než na MUC2 (Laparra & Sanz 2009). Námi stanovené hodnoty adheze laktobacilů k této směsné kultuře jsou rovněž velmi vysoké a pohybují se v rozmezí 69,0 a 85,2 %. Nejlépe na ni adheruje *L. plantarum* a naopak nejhůře *L. reuteri*. Tyto hodnoty jsou však výrazně vyšší než hodnoty uváděné v ostatní literatuře. Například dle Volstatova et al. (2016) *L. gasseri* R adheruje z téměř 14 % a *L. casei* FMP z pouhých 3 %. Dále pak Volšátová et al. (2015) stanovili, že adheze *L. gasseri* je kolem 7 % a *L. plantarum* adheruje ještě o 2 % méně. Jarošová et al. (2018) uvádí, že na tuto směsnou kulturu nejlépe adheruje *L. gasseri* (18,96 %), který je následován *L. plantarum* (7,26 %). Další dva druhy – *L. brevis* a *L. fermentum* vykazovaly adhezi velmi špatnou, a to 1,09, respektive 0,36 %. K vyšším hodnotám adhezí došli v nedávné studii (Krausova et al. 2019), ve které byla testována adheze laktobacilů a bifidobakterií izolovaných ze stolic kojenců, telat a selat. Výsledná adheze se pohybovala mezi hodnotami 17,7 a 37,2 %, přičemž nejvyšší schopnost adheze měl *L. reuteri*. Kadlec a Jakubec (2014) uvádí, že adheze *L. rhamnosus* CCDM 150 k linii Caco-2/HT29-MTX je pouze kolem 15 % a *Enterococcus faecium* CCDM 945 adheruje z více než 50 %. Naopak Laparra a Sanz (2009) publikovali, že adheze *L. rhamnosus* GG je k této směsné kultuře velmi nízká (0,85 %). Zároveň popisují, že je tato hodnota srovnatelná s adhezí na buněčnou linii HT29-MTX a výrazně nižší než adheze k buněčné linii Caco-2. Co se týče námi testovaného *L. rhamnosus*, je jeho adheze k této směsné kultuře naopak vyšší než adheze k samotným buňkám Caco-2 i HT29. K buněčné linii HT29-MTX však adheruje o 7 % více než k této směsné kultuře.

Směsná kultura tvořená buněčnou linií Caco-2 a HT29 se oproti té předešlé používá výrazně méně. Zjistili jsme, že adheze laktobacilů na Caco-2/HT29 nabývá hodnot v rozmezí 69,1 % a 83,7 %. Nejvyšší adhezi vykazoval *L. plantarum*, který však ještě daleko lépe adheruje k samotné buněčné linii Caco-2, a to o více než 10 %. Naopak adheze k samotným buňkám

HT29 je v jeho případě téměř o 15 % nižší a v případě *L. rhamnosus* o téměř 12 %. *L. gasseri* a *L. reuteri* mají srovnatelnou adhezi na Caco-2/HT29 a na buněčnou linii Caco-2 i HT29. Z našich výsledků lze také usoudit, že laktobacily na směsnou kulturu Caco-2/HT29 adherují téměř stejnou měrou jako na ko-kulturu tvořenou buňkami Caco-2 a buňkami produkující mucin, HT29-MTX.

Nevýhodou všech výše zmíněných buněčných linií je to, že se jedná o buněčné linie kolorektálního karcinomu a jejich vlastnosti tak mohou být od normálních buněk střevního epitelu pozměněny (Ouwehand & Salminen 2003). Z tohoto důvodu byly v této práci stanoveny adhezivní vlastnosti laktobacilů i pomocí zdravých buněčných linií, které dosud v žádných studiích k tomu účelu využity nebyly. V této práci bylo ale zjištěno, že všechny testované laktobacily velice dobře adherují ke zdravé buněčné linii tenkého střeva FHS 74Int. Získané hodnoty se pohybovaly mezi 70 a 80 % a byly srovnatelné s mírou adheze k ostatním testovaným *in cellulo* modelům. *L. reuteri* adheruje na tuto buněčnou linii dokonce lépe než na buněčné linie kolorektálního karcinomu. Můžeme tedy potvrdit, že tuto zdravou buněčnou linii tenkého střeva lze k testování adheze využít také. Naproti tomu zdravá buněčná linie tlustého střeva CCD 841Con není vhodnou buněčnou linií pro testování adhezivních vlastností, což se potvrdilo již při její kultivaci, kdy nebylo možné získat stabilní monovrstvu.

7 Závěr

- V této diplomové práci bylo zjištěno, že testované laktobacily – *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri* a *L. gasseri* velmi dobře adherují na všechny použité *in cellulo* modely. Bylo zjištěno, že námi stanovená adheze byla daleko vyšší než adheze z jiných studií, ale zároveň se ztotožňovala s některými výsledky z posledních let. Výrazný rozdíl může být zapříčinen nejen rozdílným druhem, ale i zdrojem, ze kterého testovaný druh pochází. Mimoto mají na výslednou adhezi výrazný vliv také inkubační podmínky a metodika vlastního pokusu.
- Hypotéza, která říká, že je buněčná linie HT29 při testování adherečních vlastností probiotik vhodnější buněčnou linií než HT29-MTX, nebyla v této práci potvrzena. Adheze *L. plantarum*, *L. gasseri* a *L. rhamnosus* se naopak průměrně o 13 % zvyšovala při použití buněčné linie produkující mucin, HT29-MTX, oproti buněčné linii HT29, která se produkcí mucinu nevyznačuje. V případě *L. reuteri* byly výsledné hodnoty adheze k těmto dvěma buněčným liniím téměř totožné.
- Vysoká míra adheze byla zjištěna i při použití zdravých buněčných linií tenkého střeva FHS 74Int., tudíž můžeme potvrdit, že tento model lze rovněž pro *in vitro* testování adhezivních vlastností využít. Naproti tomu zdravá buněčná linie tlustého střeva je k testování adheze probiotik nevhodná. To se ukázalo již při kultivaci, kdy nebylo možné získat její stabilní monovrstvu pro následné testování.
- Existuje možnost, že takto vysoká procenta adheze mohou být způsobena kontaminací probiotických kultur, čímž dochází k ovlivnění celkového počtu kolonií. Z tohoto důvodu by bylo vhodné uskutečnit další kontrolní měření se 100% čistými kulturami laktobacilů.

8 Literatura

- Adriana N, Ilona M, Katarzyna Ś, Zdzisława L, Elżbieta K. 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.
- Arboleya S, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Solis G, Salminen S, de Los Reyes-Gavilan CG, Gueimonde M. 2010. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-milk. *Int J Food Microbiol* **149**:28-36.
- Archer AC, Kurrey NK, Halami PM. 2018. In vitro adhesion and anti-inflammatory properties of native Lactobacillus fermentum and Lactobacillus delbrueckii spp. *Journal of Applied Microbiology* **125**:243-256.
- Arshad F-A, Mehmood R, Hussain S, Khan A, Saqib Khan M. 2018. Lactobacilli as Probiotics and their Isolation from Different Sources. *British Journal of Research* **05**.
- Asahara T, Nomoto K, Shimizu K, Watanuki M, Tanaka R. 2001. Increased resistance of mice to salmonella enterica serovar typhimurium infection by synbiotic administration of bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology* **91**:985-996.
- Ashida N, Yanagihara S, Shinoda T, Yamamoto N. 2011. Characterization of adhesive molecule with affinity to Caco-2 cells in Lactobacillus acidophilus by proteome analysis. *J Biosci Bioeng* **112**:333-337.
- Ataie-Jafari A, Larijani B, Alavi Majd H, Tahbaz F. 2009. Cholesterol-lowering effect of probiotic yogurt in comparison with ordinary yogurt in mildly to moderately hypercholesterolemic subjects. *Ann Nutr Metab* **54**:22-27.
- Behnsen J, Deriu E, Sassone-Corsi M, Raffatellu M. 2013. Probiotics: properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **3**:a010074-a010074.
- Benítez-Cabello A, Torres-Maravilla E, Bermúdez-Humarán L, Langella P, Martín R, Jiménez-Díaz R, Arroyo-López FN. 2019. Probiotic Properties of Lactobacillus Strains Isolated from Table Olive Biofilms. *Probiotics and antimicrobial proteins*:10.1007/s12602-12019-09604-y.
- Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Fontana L, Muñoz-Quezada S, Gil A. 2013. In vitro cell and tissue models for studying host-microbe interactions: a review. *The British journal of nutrition* **109 Suppl 2**:S27-S34.
- Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Munoz-Quezada S, Gomez-Llorente C, Gil A. 2012. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* **61**:160-174.
- Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. 1994. Lactobacillus acidophilus LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* **35**:483-489.
- Bianchi M, Del Rio D, Pellegrini N, Sansebastiano G, Neviani E, Brighenti F. 2004. A fluorescence-based method for the detection of adhesive properties of lactic acid bacteria to Caco-2 cells. *Letters in applied microbiology* **39**:301-305.
- 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.
- Botes M, Loos B, van Reenen CA, Dicks LM. 2008. Adhesion of the probiotic strains Enterococcus mundtii ST4SA and Lactobacillus plantarum 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. *Arch Microbiol* **190**:573-584.

- Bubnov RV, Babenko LP, Lazarenko LM, Mokrozub VV, Demchenko OA, Nechypurenko OV, Spivak MY. 2017. Comparative study of probiotic effects of *Lactobacillus* and *Bifidobacteria* strains on cholesterol levels, liver morphology and the gut microbiota in obese mice. *Epma j* **8**:357-376.
- Celebioglu HU, Delsoglio M, Brix S, Pessione E, Svensson B. 2018. Plant Polyphenols Stimulate Adhesion to Intestinal Mucosa and Induce Proteome Changes in the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Mol Nutr Food Res* **62**.
- Celebioglu HU, Svensson B. 2018. Dietary Nutrients, Proteomes, and Adhesion of Probiotic *Lactobacilli* to Mucin and Host Epithelial Cells. *Microorganisms* **6**:90.
- Cencic A, Langerholc T. 2010. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology--a review. *Int J Food Microbiol* **141 Suppl 1**:S4-14.
- Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. 2007. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: In vitro evaluation of different methods. *Journal of Microbiological Methods* **71**:71-74.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* **3**:777-788.
- Demirer S, Aydıntug S, Aslım B, Kepenekci I, Sengül N, Evirgen O, Gerceker D, Andrieu MN, Ulusoy C, Karahüseyinoglu S. 2006. Effects of probiotics on radiation-induced intestinal injury in rats. *Nutrition* **22**:179-186.
- Devi SM, Kurrey NK, Halami PM. 2018. In vitro anti-inflammatory activity among probiotic *Lactobacillus* species isolated from fermented foods. *Journal of Functional Foods* **47**:19-27.
- Dimitrov Z, Gotova I, Chorbadjiyska E. 2014. In vitro characterization of the adhesive factors of selected probiotics to Caco-2 epithelium cell line. *Biotechnology, biotechnological equipment* **28**:1079-1083.
- do Carmo FLR, Rabah H, De Oliveira Carvalho RD, Gaucher F, Cordeiro BF, da Silva SH, Le Loir Y, Azevedo V, Jan G. 2018. Extractable Bacterial Surface Proteins in Probiotic-Host Interaction. *Frontiers in microbiology* **9**:645-645.
- Engen PA, Green SJ, Voigt RM, Forsyth CB, Keshavarzian A. 2015. The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota. *Alcohol research : current reviews* **37**:223-236.
- Floch MH. 2014. Recommendations for probiotic use in humans-a 2014 update. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* **7**:999-1007.
- Fooks LJ, Gibson GR. 2002. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology* **39**:67-75.
- Frick JS, Fink K, Kahl F, Niemiec MJ, Quitadamo M, Schenk K, Autenrieth IB. 2007. Identification of commensal bacterial strains that modulate *Yersinia enterocolitica* and dextran sodium sulfate-induced inflammatory responses: Implications for the development of probiotics. *Infection and Immunity* **75**:3490-3497.
- Fukuda S, et al. 2011. *Bifidobacteria* can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* **469**:543-549.
- Gagnon M, Kheadr EE, Le Blay G, Fliss I. 2004. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by *bifidobacterial* strains of human origin. *Int J Food Microbiol* **92**:69-78.
- Gagnon M, Zihler Berner A, Chervet N, Chassard C, Lacroix C. 2013. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. *Journal of microbiological methods* **94**:274-279.

- García-Cayuela T, Korany A, Bustos I, Cadinanos L, Requena T, Peláez C, Martínez-Cuesta MC. 2014. Adhesion Abilities of Dairy Lactobacillus Plantarum Strains Showing an Aggregation Phenotype. *Food Research International* **57**:44-50.
- George Kerry R, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin H-S, Das G. 2018. Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal of Food and Drug Analysis* **26**:927-939.
- Ghalia S, Hassan Z, Abubakr M. 2013. Factors that Affect the Adhesion of Probiotics Bacteria to Resist Rice Starch. *Journal of Biology and Life Science* **4**:2157-6076.
- Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. 2001. In vitro adherence properties of Lactobacillus rhamnosus DR20 and Bifidobacterium lactis DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic Escherichia coli. *Int J Food Microbiol* **67**:207-216.
- Govender M, Choonara YE, Kumar P, du Toit LC, van Vuuren S, Pillay V. 2014. A review of the advancements in probiotic delivery: Conventional vs. non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. *AAPS PharmSciTech* **15**:29-43.
- Grimm V, Westermann C, Riedel CU. 2014. Bifidobacteria-host interactions--an update on colonisation factors. *Biomed Res Int* **2014**:960826.
- Hasannejad Bibalan M, Eshaghi M, Rohani M, Esghaei M, Darban-Sarokhalil D, Pourshafie MR, Talebi M. 2017. Isolates of Lactobacillus plantarum and L. reuteri display greater antiproliferative and antipathogenic activity than other Lactobacillus isolates. *Journal of medical microbiology* **66**:1416-1420.
- Hooper LV, Macpherson AJ. 2010. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* **10**:159-169.
- Hori K, Matsumoto S. 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal* **48**:424-434.
- Hymes JP, Johnson BR, Barrangou R, Klaenhammer TR. 2016. Functional Analysis of an S-Layer-Associated Fibronectin-Binding Protein in Lactobacillus acidophilus NCFM. *Appl Environ Microbiol* **82**:2676-2685.
- Hynonen U, Palva A. 2013. Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:5225-5243.
- Chikkamath V, Kummari S, Naik V, Nagappa AN. 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotic on human health and disease-A review. *Manipal Journal of Pharmaceutical Sciences* **4**:19-24.
- Iniesta M, Herrera D, Montero E, Zurbriggen M, Matos AR, Marin MJ, Sanchez-Beltran MC, Llama-Palacio A, Sanz M. 2012. Probiotic effects of orally administered Lactobacillus reuteri-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* **39**:736-744.
- Jakava-Viljanen M, Palva A. 2007. Isolation of surface (S) layer protein carrying Lactobacillus species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues. *Vet Microbiol* **124**:264-273.
- Jarošová V, Duskocil I, Volstatova T, Havlik J. 2018. Adhesive Property of Different Strains of Lactobacilli in The Presence of Resveratrol. *Scientia Agriculturae Bohemica* **49**:291-296.
- 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.
- Jiang T, Mustapha A, Savaiano DA. 1996. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing Bifidobacterium longum. *J Dairy Sci* **79**:750-757.

- Johnson-Henry KC, Mitchell DJ, Avitzur Y, Galindo-Mata E, Jones NL, Sherman PM. 2004. Probiotics Reduce Bacterial Colonization and Gastric Inflammation in *H. pylori*-Infected Mice. *Digestive Diseases and Sciences* **49**:1095-1102.
- Jorgensen MR, Kragelund C, Jensen PO, Keller MK, Twetman S. 2017. Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species in vitro. *J Oral Microbiol* **9**:1274582.
- Jørgensen MR, Kragelund C, Jensen PØ, Keller MK, Twetman S. 2017. Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species in vitro. *Journal of oral microbiology* **9**:1274582-1274582.
- Kadlec R, Jakubec M. 2014. The effect of prebiotics on adherence of probiotics. *Journal of Dairy Science* **97**:1983-1990.
- Kajander K, Hatakka K, Poussa T, Färkkilä M, Korpela R. 2005. A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: A controlled 6-month intervention. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **22**:387-394.
- Kajander K, Myllyluoma E, Rajilić-Stojanović M, Kyrönpalo S, Rasmussen M, Järvenpää S, Zoetendal EG, De Vos WM, Vapaatalo H, Korpela R. 2008. Clinical trial: Multispecies probiotic supplementation alleviates the symptoms of irritable bowel syndrome and stabilizes intestinal microbiota. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **27**:48-57.
- Kavanaugh DW, O'Callaghan J, Buttó LF, Slattery H, Lane J, Clyne M, Kane M, Joshi L, Hickey RM. 2013. Exposure of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* to Milk Oligosaccharides Increases Adhesion to Epithelial Cells and Induces a Substantial Transcriptional Response. *PloS one* **8**:e67224-e67224.
- Koll P, Mandar R, Marcotte H, Leibur E, Mikelsaar M, Hammarstrom L. 2008. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol Immunol* **23**:139-147.
- Kos B, Suskovic J, Vukovic S, Simpraga M, Frece J, Matosic S. 2003. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol* **94**:981-987.
- Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. 2006. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Swed Dent J* **30**:55-60.
- Krausova G, Hyrslova I, Hynstova I. 2019. In Vitro Evaluation of Adhesion Capacity, Hydrophobicity, and Auto-Aggregation of Newly Isolated Potential Probiotic Strains. *Fermentation* **5**:100.
- Krishnamoorthy M, Nayak BK, Nanda A. 2018. In vivo and in vitro characterization of probiotic organisms for their microbial adhesion property isolated from Coconut toddy. *Karbala International Journal of Modern Science* **4**:341-346.
- Kumar Bajaj B, Claes IJ, Lebeer S. 2015. Functional mechanisms of probiotics. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences.* **4**:321-327.
- Laparra JM, Sanz Y. 2009. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett Appl Microbiol* **49**:695-701.
- Lee N-K, Kim S-Y, Han K, Eom S, Paik H-D. 2014. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters. *LWT - Food Science and Technology* **58**:130-134.
- Li J, Sung CYJ, Lee N, Ni Y, Pihlajamäki J, Panagiotou G, El-Nezami H. 2016. Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**:E1306-E1315.

- Li XJ, Yue LY, Guan XF, Qiao SY. 2008. The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. *Journal of applied microbiology* **104**:1082-1091.
- Mahler GJ, Shuler ML, Glahn RP. 2009. Characterization of Caco-2 and HT29-MTX cocultures in an in vitro digestion/cell culture model used to predict iron bioavailability. *The Journal of nutritional biochemistry* **20**:494-502.
- Mahmoudi I, Moussa OB, Khaldi T, Kebouchi M, Soligot-Hognon C, Leroux Y, Hassouna M. 2019. Adhesion Properties of Probiotic Lactobacillus Strains Isolated from Tunisian Sheep and Goat Milk. *Journal of Agricultural Science and Technology* **21**:587-600.
- Mahmoudi I, Moussa OB, Khaldi TEM, Kebouchi M, Soligot C, Le Roux Y, Hassouna M. 2016. Functional in vitro screening of Lactobacillus strains isolated from Tunisian camel raw milk toward their selection as probiotic. *Small Ruminant Research* **137**:91-98.
- Majamaa H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T. 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **20**:333-338.
- Makinen K, Berger B, Bel-Rhliid R, Ananta E. 2012. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *Journal of Biotechnology* **162**:356-365.
- Manley KJ, Fraenkel MB, Mayall BC, Power DA. 2007. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. *Med J Aust* **186**:454-457.
- Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E. 2006. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* **16**:189-199.
- Markowiak P, Śliżewska K. 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut pathogens* **10**:21-20.
- Markowiak P, Śliżewska K, Katarzyna Ś, Paulina M. 2017. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* **9**:1021.
- Mathara JM, Schillinger U, Kutima PM, Mbugua SK, Guigas C, Franz C, Holzapfel WH. 2008. Functional properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Current microbiology* **56**:315-321.
- Meijers B, Evenepoel P, Anders H-J. 2019. Intestinal microbiome and fitness in kidney disease. *Nature Reviews Nephrology* **15**:531-545.
- Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quigley EMM. 2010. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* **59**:325-332.
- Montalto M, Curigliano V, Santoro L, Vastola M, Cammarota G, Manna R, Gasbarrini A, Gasbarrini G. 2006. Management and treatment of lactose malabsorption. *World journal of gastroenterology* **12**:187-191.
- Monteagudo-Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. 2019. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. **103**:6463-6472.
- Monteagudo-Mera A, Rodríguez-Aparicio L, Rúa J, Martínez-Blanco H, Navasa N, García-Armesto MR, Ferrero MÁ. 2012. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods* **4**:531-541.
- Moussavi M, Adams M. 2009. An In Vitro Study on Bacterial Growth Interactions and Intestinal Epithelial Cell Adhesion Characteristics of Probiotic Combinations. *Current microbiology* **60**:327-335.

- Moussavi M, Adams MC. 2010. An in vitro study on bacterial growth interactions and intestinal epithelial cell adhesion characteristics of probiotic combinations. *Curr Microbiol* **60**:327-335.
- Musilova S, Modrackova N, Duskocil I, Svejstil R, Rada V. 2017. Influence of human milk oligosaccharides on adherence of bifidobacteria and clostridia to cell lines. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **64**:1-8.
- Nishiyama K, Sugiyama M, Mukai T. 2016. Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin. *Microorganisms* **4**.
- O'Callaghan A, van Sinderen D. 2016. Bifidobacteria and Their Role as Members of the Human Gut Microbiota. *Frontiers in microbiology* **7**:925-925.
- Ooi L-G, Liong M-T. 2010. Cholesterol-Lowering Effects of Probiotics and Prebiotics: A Review of in Vivo and in Vitro Findings. *International Journal of Molecular Sciences* **11**:2499-2522.
- Ooi MF, Mazlan N, Foo HL, Loh TC, Mohamad R, Rahim RA, Ariff A. 2015. Effects of carbon and nitrogen sources on bacteriocin-inhibitory activity of postbiotic metabolites produced by *Lactobacillus plantarum* I-UL4. *Malaysian Journal of Microbiology* **11**:176-184.
- Ouwehand A, Kirjavainen P, Grönlund M-M, Isolauri E, Salminen S. 1999. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal* **9**:623-630.
- Ouwehand A, Tölkö S, Salminen S. 2001. The Effect of Digestive Enzymes on the Adhesion of Probiotic Bacteria In Vitro. *Journal of Food Science* **66**:856-859.
- Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV, Tölkö S, Salminen SJ. 2000. The mucus binding of *Bifidobacterium lactis* Bb12 is enhanced in the presence of *Lactobacillus* GG and *Lact. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Letters in Applied Microbiology* **30**:10-13.
- Ouwehand AC, Salminen S. 2003. In vitro adhesion assays for probiotics and their in vivo relevance: a review. *Microbial ecology in health and disease* **15**:175-184.
- Pahumunto N, Sophatha B, Piwat S, Teanpaisan R. 2019. Increasing salivary IgA and reducing *Streptococcus mutans* by probiotic *Lactobacillus paracasei* SD1: A double-blind, randomized, controlled study. *J Dent Sci* **14**:178-184.
- Pan W-H, Li P-L, Liu Z. 2006. The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Anaerobe* **12**:148-152.
- Piepenbrink KH, Sundberg EJ. 2016. Motility and adhesion through type IV pili in Gram-positive bacteria. *Biochem Soc Trans* **44**:1659-1666.
- Pisano MB, Viale S, Conti S, Fadda ME. 2014. Preliminary evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Sardinian dairy products. **2014**:286390.
- Possemiers S, Marzorati M, Verstraete W, Van de Wiele T. 2010. Bacteria and chocolate: a successful combination for probiotic delivery. *Int J Food Microbiol* **141**:97-103.
- Presti I, et al. 2015. Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**:5613-5626.
- Radziwill-Bienkowska JM, Robert V, Drabot K, Chain F, Cherbuy C, Langella P, Thomas M, Bardowski JK, Mercier-Bonin M, Kowalczyk M. 2017. Contribution of plasmid-encoded peptidase S8 (PrtP) to adhesion and transit in the gut of *Lactococcus lactis* IBB477 strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* **101**:5709-5721.
- Ranadheera CS, Evans CA, Adams MC, Baines SK. 2012. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. *Food Research International* **49**:619-625.

- Rungsri P, Akkarachaneeyakorn N, Wongsuwanlert M, Piwat S, Nantarakchaikul P, Teanpaisan R. 2017. Effect of fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* SD11 on oral microbiota of healthy volunteers: A randomized clinical trial. *J Dairy Sci* **100**:7780-7787.
- Salminen S, Nybom S, Meriluoto J, Collado MC, Vesterlund S, El-Nezami H. 2010. Interaction of probiotics and pathogens—benefits to human health? *Current Opinion in Biotechnology* **21**:157-167.
- Sanders ME, Merenstein D, Merrifield CA, Hutkins R. 2018. Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin* **43**:212-225.
- Sarao LK, Arora M. 2017. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**:344-371.
- Sarkar S, Sur A, Sarkar K, Majhi R, Basu S, Chatterjee K, Sikder B. 2016. Probiotics: A Way of Value Addition in Functional Food. *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics* **5**:290-293.
- Satish Kumar R, Kanmani P, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V. 2011. *Lactobacillus plantarum* AS1 binds to cultured human intestinal cell line HT-29 and inhibits cell attachment by enterovirulent bacterium *Vibrio parahaemolyticus*. *Letters in applied microbiology* **53**:481-487.
- Sharma S, Kanwar SS. 2017. Adherence potential of indigenous lactic acid bacterial isolates obtained from fermented foods of Western Himalayas to intestinal epithelial Caco-2 and HT-29 cell lines. *Journal of food science and technology* **54**:3504-3511.
- Schiffirin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A. 1997. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr* **66**:515s-520s.
- Schillinger U, Guigas C, Heinrich Holzappel W. 2005. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. *International Dairy Journal* **15**:1289-1297.
- Schneitz C, Nuotio L, Lounatma K. 1993. Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *J Appl Bacteriol* **74**:290-294.
- Son S-H, Jeon H-L, Yang S-J, Sim M-H, Kim Y-J, Lee N-K, Paik H-D. 2017. Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional Korean fermented foods based on β -glucosidase activity. *Food science and biotechnology* **27**:123-129.
- Szachta P, Ignys I, Cichy W. 2011. An evaluation of the ability of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG to eliminate the gastrointestinal carrier state of vancomycin-resistant enterococci in colonized children. *J Clin Gastroenterol* **45**:872-877.
- Tallon R, Arias S, Bressollier P, Urdaci MC. 2007. Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. *J Appl Microbiol* **102**:442-451.
- Tojo R, Suarez A, Clemente MG, de los Reyes-Gavilan CG, Margolles A, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. 2014. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol* **20**:15163-15176.
- Tripathi MK, Giri SK. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods* **9**:225-241.
- Turpin W, Humblot C, Noordine ML, Thomas M, Guyot JP. 2012. Lactobacillaceae and cell adhesion: genomic and functional screening. *PLoS One* **7**:e38034.

- Valeriano VD, Parungao-Balolong MM, Kang D-K. 2014. In vitro evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1. *Journal of Applied Microbiology* **117**:485-497.
- Van Tassell ML, Miller MJ. 2011. *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients* **3**:613-636.
- Vera-Pingitore E, Jimenez ME, Dallagnol A, Belfiore C, Fontana C, Fontana P, von Wright A, Vignolo G, Plumed-Ferrer C. 2016. Screening and characterization of potential probiotic and starter bacteria for plant fermentations. *LWT - Food Science and Technology* **71**:288-294.
- Vinderola G, Gueimonde M, Gomez-Gallego C, Delfederico L, Salminen S. 2017. Correlation between in vitro and in vivo assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. *Trends in Food Science & Technology* **68**:83-90.
- Vlasova AN, Kandasamy S, Chattha KS, Rajashekara G, Saif LJ. 2016. Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species. *Veterinary immunology and immunopathology* **172**:72-84.
- Volstatova T, Havlik J, Potuckova M, Geigerová M. 2016. Milk digesta and milk protein fractions influence the adherence of *Lactobacillus gasseri* R and *Lactobacillus casei* FMP to human cultured cells. *Food Funct.* **7**.
- Volstatova T, Marsik P, Rada V, Geigerova M, Havlik 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.
- Volštátová T, Havlík J, Doskočil I, Geigerová M, Rada V. 2015. Effect Of Hydrolyzed Milk On The Adhesion Of Lactobacilli To Intestinal Cells. *Scientia Agriculturae Bohemica* **46**:21-25.
- Wang C, Shoji H, Sato H, Nagata S, Ohtsuka Y, Shimizu T, Yamashiro Y. 2007. Effects of oral administration of bifidobacterium breve on fecal lactic acid and short-chain fatty acids in low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **44**:252-257.
- Wang R, Jiang L, Zhang M, Zhao L, Hao Y, Guo H, Sang Y, Zhang H, Ren F. 2017. The Adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a Human Intestinal Epithelial Cell Line Requires S-layer Proteins. *Sci Rep* **7**:44029.
- Wilkins T, Sequoia J. 2017. Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *Am Fam Physician* **96**:170-178.
- Yadav AK, Tyagi A, Kumar A, Panwar S, Grover S, Saklani AC, Hemalatha R, Batish VK. 2017. Adhesion of Lactobacilli and their anti-infectivity potential. *Crit Rev Food Sci Nutr* **57**:2042-2056.
- Yu X, Åvall-Jääskeläinen S, Koort J, Lindholm A, Rintahaka J, von Ossowski I, Palva A, Hynönen U. 2017. A Comparative Characterization of Different Host-sourced *Lactobacillus ruminis* Strains and Their Adhesive, Inhibitory, and Immunomodulating Functions. *Frontiers in microbiology* **8**:657-657.
- Zhang B, Zuo F, Yu R, Zeng Z, Ma H, Chen S. 2015. Comparative genome-based identification of a cell wall-anchored protein from *Lactobacillus plantarum* increases adhesion of *Lactococcus lactis* to human epithelial cells. *Scientific Reports* **5**:14109.
- Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E, Louvard D. 2011. Use of Cultured Cell Lines in Studies of Intestinal Cell Differentiation and Function.

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

CPB2 *Clostridium perfringens* β -2 toxin

CPE *Clostridium perfringens* enterotoxin

EFSA Evropský úřad pro bezpečnost potravin

FAO Organizace pro výživu a zemědělství

FDA Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

FnBPs Proteiny vázající se na fibronektin

GIT Gastrointestinální trakt

GRAS Obecně považováno za bezpečný

HMO Oligosacharidy mateřského mléka

KTJ Kolonii tvořící jednotku

MUBs Mucin vázající proteiny

MUC Mucin

PFO Perfringolysin O

QPS Kvalifikovaný předpoklad bezpečnosti

SLPs Proteiny S-vrstvy

WHO Světová zdravotnická organizace