

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Vliv složek mléka na expresi MUC- 2 u Caco-2 buněk a  
HT29-MTX buněk**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Helena Horáková**

**Vedoucí práce: Doc. Ing. Jaroslav Havlík, Ph.D.**

© 2016 ČZU v Praze

### Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Vliv složek mléka na expresi MUC- 2 u Caco-2 buněk a HT29-MTX buněk " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 15.3.2016

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Jaroslavu Havlíkovi, Ph.D. za vedení práce a také Ing. Zuzaně Hroncové za trpělivost, ochotu a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat.

# Vliv složek mléka na expresi MUC- 2 u Caco-2 buněk a HT29-MTX buněk

## Souhrn

Konzumace mléka a mléčných výrobků je opakovaně v lidovém povědomí dávána do souvislosti se zahleňováním. Hlen je směs glykoproteinů, mucinů a jiných látek vytvářených specializovanými slizničními buňkami. Má ochranný vliv na jeho složení a míra exprese může mít široké souvislosti. Například v trávicím traktu je hlen poskytovatelem vazebných míst pro komensální a symbiotickou mikrofloru, substrátem, ochrannou vrstvou nebo signální látkou. Produkce a složení mucinu je velmi obtížné studovat *in vivo*, zejména pak u lidí. Z tohoto důvodu jsou široce uplatňovány modely umožňující některé tyto vztahy simulovat. Cílem práce bylo zjistit, nakolik může přidání mléka zvýšit produkci a expresi mucinu (MUC2) v modelu lidského tenkého střeva založeného na liniích nádorových buněk Caco-2 a HT29-MTX.

V *in vitro* směsném modelu nádorových buněk Caco-2 a HT29-MTX narostlých v souvislé vrstvě na polystyrenovém podkladu byl studován efekt přídavku hydrolyzovaného mléka vůči kontrole a byla stanovena exprese genu pro MUC-2 s pomocí RT-PCR a komerčně dostupných primerů. Před vlastním experimentem byly vybrány vhodné netoxické koncentrace mléčného hydrolyzátu na základě stanovení cytotoxicity ( $IC_{50}$ ) za použití MTT testu na Caco-2, HT29-MTX buňkách a ko-kultuře Caco-2/HT29-MTX.

Z experimentu je zřejmé, že po aplikaci hydrolyzátu kravského mléka se exkrece MUC-2 zvýšila téměř třikrát oproti normálnímu fyziologickému stavu. MUC-3 se vylučoval 4,5krát více než je normální fyziologický stav bez kontaktu s mlékem. Nejméně ze všech zkoumaných mucinů se vylučoval MUC-13, kdy se jeho exkrece zvýšila dvakrát oproti normálnímu fyziologickému stavu. Naproti tomu největší zaznamenané vylučování měl MUC-17, který se vyloučil až 5krát více oproti normálnímu fyziologickému stavu.

Předpokládaná hypotéza, že přítomnost mléka a jeho složek v modelu zvyšuje expresi a sekreci mucinu MUC-2, byla provedeným experimentem potvrzena. Výsledky analýzy qRT-PCR pro čtyři různé geny mucinu (MUC2, MUC3, MUC13 a MUC17) ukazují, že po kontaktu buněk s hydrolyzátem mléka se exkrece mucinů prokazatelně zvýšila a to až několikrát oproti běžnému fyziologickému stavu.

**Klíčová slova:** mucin, exprese, mléko, zahleňování, hlen, MUC-2

# Effect of milk components on MUC-2 expression in Caco-2 and HT29-MTX cells

## Summary

Milk consumption of milk and dairy products has often in folk awareness been linked to mucus production. Mucus is a mixture of glycoproteins, mucins and other substances produced by specialized mucosal cells. It has a protective effect and its composition and degree of expression may have a wide context. For example, in the digestive tract mucus provides binding sites for commensal and symbiotic microbiota, the substrate, protective layer or the signal substance. It is very difficult to study production and composition of mucin *in vivo*, especially in humans. For this reason, there are widely applied models to stimulate some of these relationships. The aim of this thesis was to find whether adding of milk may increase the production and expression of mucin (MUC-2) in intestinal human model based on a cancer cell lines Caco-2 and HT29-MTX.

In *in vitro* mixture model of tumor cells Caco-2 and HT29-MTX grown in a layer of the PS was studied the effect of the addition of hydrolyzed milk compared to the control and was determined the gene expression for MUC-2 by using the qPCR and commercially available primers. Prior the experiment, appropriate concentrations of milk hydrolysate were selected based on cytotoxicity screening ( $IC_{50}$ ) by using the MTT assay on Caco-2, HT29-MTX cells, and co-culture of Caco-2/HT29-MTX.

From the experiment is evident that after the application of cow's milk hydrolysate the excretion of MUC-2 increased three times more than the normal physiological state. Mucin-3 was secreted 4.5 times more than the normal physiological state without contact with the milk. From of all tested mucin was the excreted at least the MUC-13, when the excretion increased 2 times from the normal physiological condition. In contrast, the largest excretion had MUC-17, which increased 5 times more than the normal physiological state.

Hypothesis was carried out, the presence of milk and its components in the model increases the expression and secretion of mucin MUC-2, an experiment confirmed. Analysis results of qRT-PCR in four different genes mucin (MUC2, MUC3, MUC13 and MUC17) show that after contacting the cells with the hydrolyzate of milk mucins excretion demonstrably increased up several times compared to the normal physiological condition.

**Keywords:** mucin, expression, milk, mucus production, mucus, MUC-2

# 1 OBSAH

<b>1</b>	<b>OBSAH</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Úvod</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Cíl práce</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>Hypotéza</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>6</b>
<b>4.1</b>	<b>Mléko ve výživě</b>	<b>6</b>
4.1.1	Složení mléka	6
4.1.2	Nežádoucí reakce organismu na konzumaci mléka	9
4.1.3	Mléko a zdraví	11
<b>4.2</b>	<b>Hlen a muciny</b>	<b>13</b>
4.2.1	Složení hlenu	13
4.2.2	Organizace hlenové vrstvy	17
4.2.3	MUC2	19
4.2.4	MUC3	20
4.2.5	MUC13	21
4.2.6	MUC17	21
4.2.7	Muciny a bakterie	22
<b>4.3</b>	<b>Klinická a epidemiologická studie o zahleňování mlékem</b>	<b>23</b>
4.3.1	Stimulace produkce hlenu	25
4.3.2	Mechanismus vystavení buněk dýchacích cest mléčným proteinem	27
4.3.3	Hypotéza zahleňování	27
<b>5</b>	<b>Materiál a metody</b>	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Příprava hydrolyzátu mléka</b>	<b>28</b>
<b>5.2</b>	<b>Příprava buněčných kultur</b>	<b>28</b>
<b>5.3</b>	<b>Test stanovení inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub></b>	<b>29</b>
<b>5.4</b>	<b>Expresce mucinu a RNA testy</b>	<b>29</b>
<b>5.5</b>	<b>Extrakce RNA a qRT-PCR analýza</b>	<b>29</b>
<b>6</b>	<b>Výsledky</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>Diskuze</b>	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>Závěr</b>	<b>40</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použité literatury</b>	<b>41</b>
<b>10</b>	<b>Seznam zkratk</b>	<b>51</b>

## 2 Úvod

Zejména v poslední době se mléko dostalo do rozsáhlých diskuzí ohledně jeho účinků na organismus. Mateřské mléko je první s čím se naše tělo setká jako s potravou. Ale je nutná následná konzumace i kravského mléka? Touto problematikou se zabývá čím dál tím více lidí zvláště pro to, že většina z nich má v povědomí, že mléko zahleňuje. Kořeny této hypotézy sahají hluboko do naší historie a to téměř až do 12. století, kdy se poprvé spojila problematika zahleňování, dýchacích obtíží a konzumace mléka. Tuto teorii podporuje i tradiční čínská medicína, která řadí mléko do hlen-tvořivých potravin a tudíž se doporučuje mléku spíše vyhýbat. Vyvrátit nebo potvrdit tuto hypotézu není jednoduché a nelze to zcela jednoznačně. Existuje mnoho různých názorů a studií, které ji jak potvrzují tak i vyvracejí.

Hlen je hustá tělní tekutina vylučovaná sliznicemi. Je to přirozená součást našeho organismu, která má důležitou úlohu zvlhčovat a chránit trávicí, dýchací i rozmnožovací soustavu v těle. Hlen je po chemické stránce koloidní směs, která obsahuje mucin, anorganické soli a dále v malém množství imunoglobuliny a antiseptické enzymy např. lysozym. Muciny působí jako ochranná bariéra proti různým nepříznivým vlivům, trávicím šťávám a inhibují vazbu bakterií a usnadňují luminální motilitu.

## 3 Cíl práce

Cílem práce je zjistit, nakolik může přidání mléka zvýšit produkci a expresi mucinu MUC-2 v modelu normálního lidského tenkého střeva založeného na buněčných nádorových liniích Caco-2 a HT29-MTX.

### 3.1 Hypotéza

Hypotézou je, že přítomnost mléka a jeho složek v modelu zvyšuje expresi a sekreci mucinu MUC-2.



## 4 Literární rešerše

### 4.1 Mléko ve výživě

Savčí mléko je první potravou, s kterou se setkáme, a jako taková dodává veškerou energii a živiny potřebné k zajištění řádnému růstu a vývoji v poporodním období. Konzumace mléka obecně končí v době odstavu, s výjimkou člověka, ten pije mléko i v dospělosti. Mléčné výrobky jsou obecně považovány za vyvážené a výživné potraviny, jsou často zahrnuty jako důležitá součást zdravé výživy. Mléko je nepochybně všudypřítomnou potravinou v lidské stravě, a je předmětem několika zdravotních diskusí. Sdružení o spotřebě mléka a zdravé výživy zařadilo mléko do doporučených potravin. Nutriční bohatství mléka je nezpochybnitelné, je dobrým zdrojem hodnotných proteinů s vysokou biologickou rolí a důležitými vitaminy a esenciálními minerály. Přes některé nedávné hypotézy o možných pejorativních účincích mléka, zůstává nadále hojně konzumovanou potravinou. Nelze jednoznačně zhodnotit, zda je mléko jen zdravé anebo i našemu organismu může škodit.

#### 4.1.1 Složení mléka

Termín mléko by se měl vztahovat pouze na kravské mléko produkované zdravými zvířaty (Godden, 2008).

Chemické složení mléka může být ovlivněno několika faktory, jako je živočišný druh a genetika, životní prostředí, laktační fáze a nutriční stav (Caroli et al., 2009; Kalac and Samkova, 2010).

Průměrně se kravské mléko skládá z 87 % z vody, 4 až 5 % z laktózy, 3 % z bílkovin, 3 až 4 % z tuku, 0,8 % z minerálních látek a 0,1 % z vitaminů (Haug et al., 2007; Lindmark et al., 2003).

#### 4.1.1.1 Mléčné proteiny

Mléko se v lidské stravě považuje za důležitý zdroj bílkovin, dodá přibližně 32 g proteinů/l. Proteiny mléka mohou být rozděleny na rozpustné a nerozpustné. Rozpustné proteiny, syrovátkové bílkoviny, představují 20 % z mléčných proteinů, zatímco nerozpustné, kaseiny, představují 80 % (Haug et al., 2007; Severin et Wenshui, 2005). Oba jsou klasifikovány jako vysoce kvalitní bílkoviny. Ve skutečnosti jsou mléčné proteiny často považovány za nejlepší zdroj bílkovin s ohledem na esenciální aminokyselinové skóre (Shaafsma, 2000; Boye et al., 2012).

K vysoce kvalitní a biologické hodnotě mléčných bílkovin se prokázalo více biologických rolí a to u několika bioaktivních peptidů, které vznikají z enzymatické hydrolyzy bílkovin. Tyto hlavní biologické funkce zahrnují antibakteriální, antivirové, protiplísňové, antioxidační, antihypertenzivní, antimikrobiální, antitrombotické, opioidní a imunomodulační role, kromě zlepšení vstřebávání dalších živin (Mills et al., 2011).

##### Funkční význam syrovátkových bílkovin

Rozpustné proteiny obsahují následující bílkoviny:  $\beta$ -laktoglobulin,  $\alpha$ -laktalbumin, imunoglobuliny (IgG), sérový albumin, laktoferin, laktoperoxidázu, lysozym, proteózy-peptonu a transferin (Severin and Wenshui, 2005). Laktoferin, laktoperoxidáza a lysozym mají důležitou antimikrobiální funkci (Jenssen and Hancock, 2009; Min et al., 2005). Ukázalo se, že laktoferin spolu s  $\beta$ -laktoglobulinem a lactoalbuminem potlačující rozvoj nádorového onemocnění (Parodi, 2007).

##### Funkční role kaseinů

Hlavní význam kaseinů je jejich funkce jako nosiče a to především pro vápník a fosfor. Transportem vápníku a fosforu se tvoří koagulát a tím se zlepší jejich stravitelnost v žaludku (Holt et al., 2013). Kaseinové bílkoviny se dále dělí na tři typy a-, b- a c-. Nejběžnější proteiny kravského mléka jsou  $\beta$ -kasein A1 a  $\beta$ -kasein A2. Mléka s vysokým obsahem  $\beta$ -kaseinu A1 se označuje jako "A1 mléko", zatímco mléko s vysokým obsahem  $\beta$ -kaseinu A2 se nazývá "A2 mléko."

Experimentální studie ukázala, že některé peptidy zasahují do gastrointestinálního (GI) traktu a iniciují výrobu mucinu, čímž se zabraňuje přilnutí patogenů na střevní povrch, což ovlivňuje střevní pohyblivost, která může mít mimo jiné roli při regulaci hmotnosti (De Noni and Cattaneo, 2010).

#### 4.1.1.2 Vitaminy a minerály

Vápník je v mléce přirozeně přítomen jako makroprvek ve vyšším množství. Průměrná koncentrace vápníku je 1200 mg/l mléka, která se rozděluje mezi micelární a vodnou fázi. Kromě vápníku je mléko také dobrým zdrojem fosforu, který je přítomen v organické a anorganické formě. Průměrná koncentrace fosforu v mléce je asi 950 mg/l (Gaucheron, 2011). I když to není tak značné, lze v mléce nalézt také hořčík, v jednom litru mléčného materiálu je 120 mg hořčíku, což odpovídá 29 % doporučené denní dávky pro tento minerál (Insel et al., 2003). Mléko je také dobrým zdrojem stopových prvků, jako je zinek a selen. Průměrné minerální složení mléka je uvedeno v tabulce 1.

Mléko obsahuje vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E) a ve vodě rozpustné vitaminy (B komplex a vitamin C) (Haug et al., 2007, Gaucheron, 2011). V některých zemích je odstředěné mléko obohaceno o vitaminy A a D kvůli ztrátám po odtučnění. Přestože je celosvětově mléko považováno za dobrý zdroj vitamínu D, není v něm obsažen v přílišném množství, s výjimkou mléka, které je o něj obohaceno.

<b>Minerál</b>	<b>[mg/100 g]</b>	<b>Množství v 1 šálku [244 g]</b>	<b>[%] DDD</b>
<b>Vápník</b>	119-124	297,5–310	37–40
<b>Fosfor</b>	93-101	232,5–252,5	16–32
<b>Hořčík</b>	11-14	27,5–35	8–10
<b>Draslík</b>	151-166	377,5–415	8-9
<b>Zinek</b>	0,4-0,6	1–1,5	9-14

**Tabulka 1** Průměrné složení minerálů mléka.

## 4.1.2 Nežádoucí reakce organismu na konzumaci mléka

Po konzumaci mléka se mohou u některých lidí objevit nežádoucí účinky. Týká se to jedinců trpících takzvanou laktózovou intolerancí, což pro ně znamená, že by se měli alespoň částečně vyhýbat mléčným výrobkům anebo konzumovat výrobky se zbytkovým obsahem laktózy jako je jogurt nebo sýr. Další možné nežádoucí reakce způsobuje alergie na mléčnou bílkovinu. U tohoto typu alergie je nutné se kompletně vyhýbat všem výrobkům z mléka včetně mléka samotného.

### 4.1.2.1 Intolerance laktózy

Laktóza je hlavní sacharid přítomný v mléce. Jedná se o disacharid složený z glukózy a galaktózy. Ta může být přítomna ve dvou isomerních formách, alfa ( $\alpha$ ) a beta ( $\beta$ ). Laktóza se hydrolyzuje  $\beta$ -galaktosidázou známou jako laktáza (Schaafsma, 2008). Tento enzym je spojen se sliznicí tenkého střeva, poté co proběhne hydrolyza laktózy, glukózy a galaktózy je absorbován a dopraven do jater, kde je galaktóza přeměněna na glukózu (Lomer et al., 2008). U savců se aktivita  $\beta$ -galaktosidázy výrazně snižuje po odstavu.

Intolerance laktózy způsobuje několik GI symptomů vyvolaných laktózou a cukernou fermentací v tlustém střevě, jsou to břišní křeče a nadýmání, plynatost, průjem, nevolnost a zvracení. V průběhu fermentace je vytvořeno několik sloučenin, jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem, methan a oxid uhličitý, které také mohou mít vliv na střevní motilitu, způsobovat zácpu a zvyšovat vnitřní tlak střev (Berkey et al., 2009).

Množství laktózy, která může způsobit tyto příznaky, je značně individuální, záleží na stupni deficitu  $\beta$ -galaktosidázy. Naproti klasickým příznakům laktózové intolerance, nedostatek  $\beta$ -galaktosidázy může způsobit vážné metabolické následky a to v případě, že laktózo-netolerantní jedinci budou i nadále přijímat zvýšené dávky laktózy (Schaafsma, 2008)

Před několika lety bylo jedinou možností léčby laktózové intolerance zamezení příjmu produktů s laktózou. Nicméně, některé studie naznačují, že jedinci se sníženou hladinou  $\beta$ -galaktosidázy mohou spotřebovat až 11 g laktózy denně bez nežádoucích příznaků (Kalliomäki et al., 2010). Střevní bakterie mohou přispět svou metabolickou aktivitou na zlepšení tolerance laktózy (He et al., 2008), takže konzumace mléčných bakterií nebo specifických probiotik může toleranci zlepšit (Kalliomäki et al., 2010).

#### 4.1.2.2 Alergie na mléčnou bílkovinu

Alergie na protein kravského mléka je obvykle první potravinovou alergií u dětí a její prevalence se pohybuje v rozmezí 2 až 7,5 % (Caffarelli et al., 2010). Může být charakterizována jako imunologicky zprostředkovaná nežádoucí reakce na kravské mléčné bílkoviny, většinou je tato alergie vyvinuta v novorozeneckém období nebo během prvních let života. Bezprostřední reakce jsou anafylaxe, kožní reakce s kopřivkou, otok, respirační potíže, GI tíseň včetně zvracení, průjmu a krvavé stolice (Fiocchi et al., 2010). Podobné reakce jsou i ty s pozdním nástupem. Tyto opožděné reakce se mohou projevit od jedné hodiny do několika dní po požití kravského mléka. Nejčastěji se jedná o alergie na syrovátkové bílkoviny, především  $\beta$ -laktoglobulin, ale může být také podporována kaseiny (Caffarelli et al., 2010).

#### 4.1.2.3 Galaktozemie

Galaktozemie je metabolická porucha, která může být i dědičná vzhledem k nedostatku galaktózy-1-fosfát-uridylyltransferázy. Galaktóza-1-fosfát se zvyšuje v krvi a hromadí se v tkáních jako například v centrální nervové soustavě, očích, játrech, ledvinách a erytrocytech (Bosch, 2006).

Klinický obraz galaktozemie je variabilní v různých populacích. Při klasické galaktozemií jsou již v první den novorozence, kdy začne konzumovat mléko, viditelné potíže při krmení, žloutenka, letargie a hepatomegalie (Suzuki et al., 2001). Pokud není vážná galaktozemie léčena, je doprovázena fatální poruchou funkce jater a ledvin u novorozenců a malých dětí. Dá se tomu zabránit vyloučením galaktózy v dietě. Navzdory celoživotní dietě dochází u většiny pacientů k opožděnému vývoji a zpomalenému růstu. Hlavními zásadami při řízení všech typů galaktozemie je odstranění všech zdrojů galaktózy z diety a pokud je to možné zejména u kojenců a malých dětí vyloučit i mateřské mléko. Dietní opatření se začínají bezlaktózovou počáteční a následnou kojeneckou dětskou výživou s obsahem laktózy  $\leq 10$  mg/100 kcal. U starších kojenců, dětí i dospělých se ze stravy musí vyloučit, resp. omezit, potraviny obsahující mléko nebo laktózu tak, aby denní příjem laktózy nepřesáhl 25 mg/100 kcal. Přesná hranice pro příjem galaktózy/laktózy, pod kterou se neobjevují nežádoucí účinky, nemůže být stanovena. Pro pacienty s galaktozemií, bez ohledu na zbytkový obsah laktózy, nejsou vhodné mléčné nápoje, ve kterých je laktóza částečně enzymaticky hydrolyzovaná na glukózu a galaktózu, a ze které není galaktoza odstraněna (Suzuki et al., 2001).

### 4.1.3 Mléko a zdraví

Studie týkající se konzumace mléka prokázaly kontroverzní a komplexní vlivy na lidské zdraví. Je důležité si uvědomit, že lidé jsou jediní savci, kteří jako dospělí konzumují mléko dále po odstavu, což vyvolává některé otázky, zda tento zvyk je dobré dále podporovat. Některé studie podporují konzumaci mléka a mléčných výrobků (Rice et al., 2013), kdežto jiné ji spojují se zvýšeným rizikem několika západních onemocnění, jako je diabetes, CVD (kardiovaskulární onemocnění) a rakoviny (Melnik, 2009).

#### 4.1.3.1 Spotřeba mléka a kardiovaskulární onemocnění

Mléko je komplexní potravina, a proto je možné najít jak komponenty, které vyvíjejí ochranné účinky na kardiovaskulární zdraví, tak ty, které mohou mít vlivy pejorativní. Hlavním problémem při odkazování na možný negativní vliv mléka na srdeční onemocnění je obsah nasycených tuků v mléce, které představují 70 % celkového mléčného tuku. Nadměrná konzumace nasycených tuků byla v minulosti spojena se zvýšeným rizikem CVD (Melnik, 2009).

Nicméně tři hlavní SFA (nasycené mastné kyseliny), které jsou přítomny v lipidech mléka, mají zcela odlišné metabolické účinky na hladinu lipidů v krvi, což může mít komplexní pozitivní účinek na kardiovaskulární zdraví (Rice et al., 2013). Další složky mléka, jako jsou minerály (vápník, hořčík a draslík), mohou také ovlivnit kardiovaskulární zdraví.

Ve skutečnosti jsou mléčné výrobky často prezentovány jako významné dietní součásti, jsou považovány za zdravé a kardioprotektivní. Široce známá a uplatňovaná léčba hypertenze a prevence je Dietní přístup k Stop Hypertenze (DASH). DASH doporučuje denní konzumaci nízkotučného mléka a dalších mléčných výrobků (Bazzano et al., 2013).

#### 4.1.3.2 Spotřeba mléka a rakovina

Není zcela jasné, zda zvýšená spotřeba mléka zvyšuje nebo snižuje riziko rakoviny. Rakovina je komplexní a multifaktoriální onemocnění, není tedy možné jednoznačně prokázat účinek jedné potraviny anebo živiny na její původ anebo rozvoj. Umírněná konzumace

mléčných výrobků byla doporučena jako zdravá a byla navržena jako část ochranného dietního vzorce pro prevenci chronických onemocnění, včetně rakoviny (Rice et al., 2013).

Oproti tomu kontrolované a case-control studie ukázaly jen velmi malé nebo žádné vlivy umírněné konzumace mléka na kolorektální karcinom, na rakovinu prsu, rakovinu prostaty a močového měchýře (Aune et al., 2012).

Pejorativní vlivy spotřeby mléka na vznik rakoviny jsou nejčastěji připisovány přítomnosti inzulínu podobnému růstovému faktoru (IGF) -1, a na druhé straně obsahu tuku (Aune et al., 2012).

#### 4.1.3.3 Vliv spotřeby mléka v přibývání na váze, obezita diabetes 2. typu

Několik epidemiologických studií řešilo možný vliv spotřeby mléka na riziko vzniku diabetu 2. typu. Výsledky získané nejdelší kohortovou studií ukázaly, že vyšší příjem mléka byl spojen se snížením relativního rizika vzniku diabetu, toto bylo potvrzeno i poslední metaanalýzou. Paralelně některé hypotézy navrhovali, že syrovátkové proteiny mohou působit na glykémii a inzulínové reakce stejně jako ve fázi sytosti, což by pomohlo snížit nadměrný příjem potravy a tím zabránit přibývání na váze (Elwood et al., 2007).

#### 4.1.3.4 Spotřeba mléka a prevence osteoporózy

Nejčastěji poukazovaným příznivým účinkem mléka je obsah vápníku a jeho vliv na zdraví kostí. Nízká kostní hmotnost je hlavním rizikovým faktorem pro vznik osteoporózy a je známo, že kostní hmota v pozdějším věku klesá, vrcholu kostní hmoty dosáhneme během růstu. Spotřeba mléka byla spojována s vyšší hustotou kostí, což působí jako ochranný faktor. Nicméně spojit spotřebu mléka a osteoporózu není úplně jednoduché. Osteoporóza je komplexní a multifaktoriální onemocnění. Srovnání kostního zdraví Evropanů a Asiatů není zcela jednoznačné, vzhledem k zcela jinému životnímu stylu, v Asijských zemích mají jiné stravovací návyky a i více pohybu, který osteoporózu ovlivňuje (Kopf-Bolanz et al., 2012).

## 4.2 Hlen a muciny

Lidské střevo se skládá ze dvou hlavních typů buněk, z absorpčních buněk a z buněk uzavřených, které jsou stejně jako pohárkové buňky odpovědné za vylučování ochranné vrstvy hlenu (Laparra and Sanz, 2009). Hlen je velmi důležitý pro ochranu gastrointestinálního traktu, tento fakt je zřejmý už delší dobu, nicméně zájem o hlubší porozumění organizace hlenu a jeho hlavní složky se začal objevovat teprve nedávno. Hlavními stavebními kameny hlenu jsou muciny, to jsou velké, vysoce glykosylované proteiny (Hollingsworth and Swanson, 2004; Hattrup and Gendler, 2008; Johanson and Hansson, 2011). Typicky jsou tyto muciny tvořeny z více než 80 % sacharidy a ty jsou soustředěny do mucinových domén (Lang et al., 2007). Tyto domény jsou postaveny na bílkovinné jádro, které je bohaté na aminokyseliny prolin, serin a threonin (tzv. PTS sekvencí). Tyto sekvence jsou často nazývané VNTRs (variabilní počet tandemových opakování), sekvence aminokyselin jsou často opakovány v tandemu, i když to tak není vždy.

PTS sekvence mohou být velmi dlouhé, například největší je v MUC2 mucinu asi 2300 aminokyselin (Gum et al., 2007). Hydroxylová skupina aminokyselin threoninu a serinu se stává místem pro připojení N-acetylgalaktosamin (GalNAc), který se připojuje do Golgiho aparátu. Peptidyl-GalNAc transferáza je jedinečná pro každý orgán a buněčný typ (Bennett et al., 2012). Zbytky GalNA jsou pak rozšířeny a rozvětveny glykosyltransferázami, generovanými komplexními směsí glykanových epitopů (Jensen et al., 2010). Jakmile je tato glykosylace dokončena na konci Golgiho aparátu se mucin domény rozšíří do dlouhých tyčí. Odhaduje se, že 2300 aminokyselin tlusté domény MUC2 mucinu tvoří asi 0,45  $\mu\text{m}$  dlouhé tyče (Ambort et al., 2012). Tyto dlouhé tuhé tyče jsou tak hustě pokryty glykany, že jejich proteinové jádro je zcela chráněno před degradací proteázami. Mucinové glykanové domény vážou velké množství vody, a tím vytváří většinu z typických gelovitých vlastností mucinů (Jensen et al., 2010).

### 4.2.1 Složení hlenu

Organizace systému hlenu se liší výrazně v celém trávicím traktu. V ústech produkují slinné žlázy MUC5B a MUC7, které promazávají spolknutou potravu kvůli snadnějšímu průchodu jícnem. Žaludek má dvě vrstvy hlenu, které se skládají z vnitřní vrstvy (připojený hlen) a vnější volné vrstvy hlenu (nepřipojený) (Atuma et al., 2011). Žlázy v žaludku a



dvanáctníku vylučují gelotvorný mucin MUC6. Tenké střevo má, narozdíl od žaludku a tlustého střeva, jen jeden typ povrchového hleny složeného z MUC2. Tento hlen je nepřipojený a snadno odlučitelný (Gum et al., 1994). V tlustém střevě se tvoří opět dvě vrstvy hleny, vnitřní hustá a připojená vrstva hleny a vnější volná nepřipojená vrstva hleny. MUC2 se chová odlišně v tenkém střevě i v tlustém střevě (Weiss et al., 1996).

#### 4.2.1.1 Žaludek: hlen a kyselina chlorovodíková

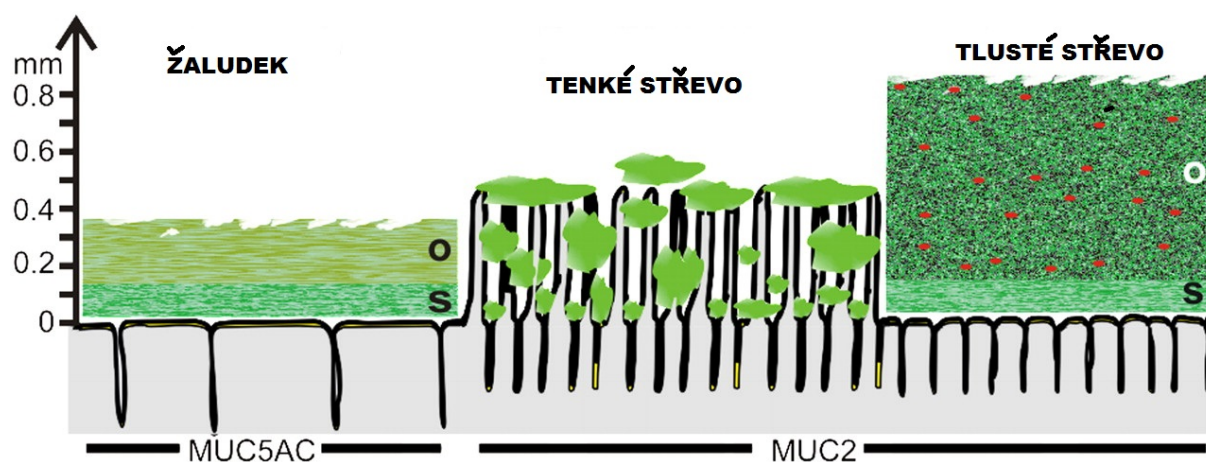
Jako u tlustého střeva má žaludek dvě vrstvy hleny (Atuma et al., 2011). Vnitřní vrstva hleny tvořena MUC5AC působí jako difúzní bariéra pro kyselinu chlorovodíkovou. Kyselina chlorovodíková se vyrábí ve žlázách a je vylučován spolu s MUC6 a pepsinem. Je zajímavé, že tyto žlázné sekrety jsou schopny překročit povrch vnitřní vrstvy slizu skrze to, co vypadá jako dočasné kanálky (Johanson et al., 2011). Tyto kanály jsou následně okamžitě uzavřeny, ale zanechávají otisk v povrchovém hleny. Jak žlázy mohou odolat velmi vysoké koncentraci protonů (pH 1-2) není známo, ale je pravděpodobné, že MUC6 v tom hraje velkou roli (Phillipson et al., 2008).

#### 4.2.1.2 Tenké střevo: hlen a sekrece

V tenkém střevě je volná nepřipojená vrstva hleny. Jako u tlustého střeva je tato vrstva tvořena MUC2, hlenová vrstva tenkého střeva má podobné vlastnosti jako vnější vrstva hleny tlustého střeva. I když jde o stejný mucin chovají se odlišně (Phillipson et al., 2008).

Tenké střevo obvykle omezuje bakteriální expozici. Aby se minimalizovalo riziko kontaktu mezi virulentními bakteriemi a epitelem, hlen tenkého střeva obsahuje vysoké koncentrace antibakteriálních peptidů a proteinů sekretovaných jako Panethovy buňky a enterocyty (Phillipson et al., 2008). Tyto antibakteriální látky zabíjí nebo zachycují bakterie, a tím zajišťují, že se epitelové buňky nedostanou do kontaktu s bakteriemi (Vaishnav et al., 2011). Vrstva hleny je důležitou součástí ochrany proti bakteriálnímu napadení, neboť omezuje difuzi a vytváří gradient antibakteriálních látek. Panethovy buňky ve spodní části krypt vylučují nejen antibakteriální peptidy a lysozym, ale i proteiny jako je například MUC2 a DMBT1 (DMBT1 v zhoubných mozkových nádorech je gen kódující protein). (Johansson and Hansson, 2011). Kombinovaná sekrece mucinů a tekutin z krypty zajišťuje, že tento prostor normálně zůstává sterilní.

Muciny působí jako ochranná bariéra proti různým nepříznivým vlivům, trávicím šťávám a inhibují vazbu bakterií a usnadňují lumenální motilitu (Boegh and Nielsen, 2015). První linií obrany proti mikrobiálnímu napadení v trávicím traktu je vylučování glykanů do vrstvy slizu. Pod vrstvou slizu je druhá bezpečnostní bariéra, kterou vytváří vrstva hlenu vázaná na GI epitel a tvořící nepřetržitou gelovou matici složenou především z komplexních glykoproteinů (Kavanaugh et al., 2015). Muciny chrání epitelové buňky proti napadení mikrobiálními patogeny tím, že zamezí jejich přístup pomocí jednoduché sterické zábrany (fyzikálně-chemická bariéra) anebo prostřednictvím specifických interakcí (Dai et al., 2000). Muciny tentého střeva inhibují virovou replikaci (Yolken et al., 1994), což může omezit míru onemocnění a rychlost vylučování virových patogenů do střevního traktu (Mack et al., 2003).

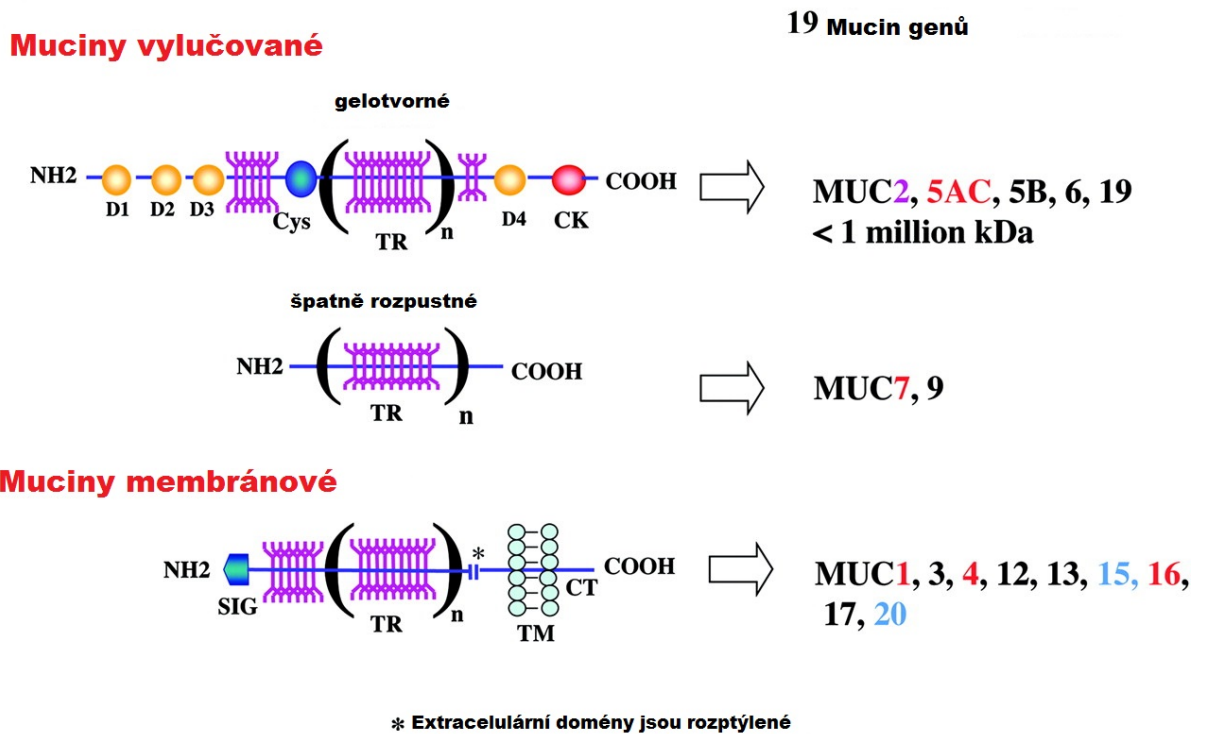


**Obrázek 1** Schematické zobrazení rozložení hlenu ve střevech.

Na obrázku 1 je uvedeno schématické znázornění mucinů v trávicím traktu. Červené tečky ilustrují bakterie ve vnější vrstvě hlenu tlustého střeva. Geny kódující hlenotvorné muciny jsou znázorněny zeleně v pohárkových buňkách v různých částech střeva. Vnější volná vrstva hlenu je označena písmenem O, vnitřní rozvrstvené, pevně připojená vrstva hlenu je značena písmenem S. Tloušťka hlenu a délka klků, která se mění podél délky střeva, není na obrázku znázorněna (Johansson et al., 2008).

Na obrázku 2 je znázorněna struktura dvou tříd mucinů, vylučované a membránové, kterých bylo identifikováno devatenáct. Pro obě třídy mucinů je charakteristická přítomnost tandemových opakování (TRS) aminokyselin v jejich proteinové části, které se mohou lišit co do počtu (n) mezi jednotlivými muciny. Tandemové repetice jsou bohaté na serin a threonin, což jsou místa O-glykosylované (YYY, v tmavě růžové). Až 80 % z hmotnosti mucinů

mohou tvořit O-glykany. Muciny gelotvorné jsou největšími proteiny v těle, mají několik D domén (D1, D2, a tak dále) a na cystein bohatých domén (Cys, CK). Tyto domény D umožňují homomultimerizaci jednotlivých molekul gelotvorných mucinů, která umožňuje polymeraci za vzniku viskózního gelu. Muciny spojené s membránou mají jednu doménu tzv. membránu překlenující (TM) a krátký cytoplazmatický konec (CT) (Johansson et al., 2008).



**Obrázek 2:** Struktura dvou tříd mucinu

#### 4.2.1.3 Složení mucinu

Studie prokázaly, že obě hlenové vrstvy (vnitřní i vnější) mají téměř shodné proteinové profily. Gelotvorný mucin MUC2 je hlavní složkou hlenu. Další komponenty hlenu jsou složeny z antiseptických enzymů (lysosom), imunoglobulinů, anorganických solí, proteinů (laktoferin) a glykoproteinů známých jako muciny (Johansson et al., 2008).

## 4.2.2 Organizace hlenové vrstvy

Ve střevní vrstvě hleny je nejlépe popsán MUC2 mucin tlustého střeva. Tento mucin je složen z monomerů a má hmotnost asi 2,5 MDa, z nichž 20 % tvoří proteinové jádro a zbytek je tvořen glykany. Monomery jsou kovalentně vzájemně propojeny, jak v dimery v C-koncích a jako trimery v jejich N-koncích, tvoří velkou síťovitou strukturu (Lidell et al., 2003). Před vypuštěním do střevního lumenu je MUC2 uložen v pohárkových buňkách granule a je připojen na platformě, prstencově tvořené vápníkem řízené interakce mezi MUC2 a N-koncem (Ambort et al., 2012). Po uvolnění vápníku je v chelátu přítomen pravděpodobně hydrogenuhličitan a mucin se začne odvíjet jako deštník, rozšiřuje se a až 1000krát zvětší svůj objem. Vzniklé sítě se pak spontánně organizují do plochých desek, které mají tendenci se na sebe skládat, podobně jako střešní tašky, pro vytvoření lamelární vnitřní vrstvy slizu (Johanson et al., 2011). Tato vrstva zůstává ukotvena na epitelových buňkách, nemůže se odsát (tedy původně nazvaný pevně uchycený mucin), je vysoce organizovaný a neumožňuje průnik bakterií.

Na lumenální hranici vnitřní vrstvy hleny je hlen převeden do vnější vrstvy hleny v relativně ostré linii. Vnější vrstva hleny je vytvořena z vnitřní vrstvy, obsahuje tedy stejné složky, ale je zajímavé, že má značně odlišné vlastnosti: mucin je volný, nepřipojený a umožňuje bakteriální průnik. Přechod od pevné do volné formy je pravděpodobně způsoben důsledkem proteolytického štěpení v rámci MUC2, tento přechod může být částečně inhibován proteázou. Toto štěpení umožňuje mucinu zvětšit svůj objem 3-4krát, aniž by se narušila polymerní síť. Přesný mechanismus pro převod z vnitřní na vnější vrstvu hleny ještě není zcela objasněn, ale je známo, že se generuje sám (Johanson et al., 2011).

### 4.2.2.1 Transmembránové muciny

Kromě jednoho nebo několika mucinových domén mají všechny muciny domény, které jim dávají specifické vlastnosti. Transmembránové muciny mají transmembránovou doménu, která jim umožňuje ukotvení v buněčné membráně. Tyto muciny mají jednu velkou N-terminální mucinovou doménu a krátký cytoplazmatický C-konec (Hollingsworth and Swanson, 2004). Na vnější straně membrány mají tyto muciny buď SEA-doménu (SEA-muciny jsou MUC1, MUC3, MUC12, MUC13 a MUC17) nebo NIDO-AMOP-vWD (von Willebrandova) doménu (pouze MUC4) (Hattrup and Gendler, 2008).

Je zajímavé, že obě z těchto domén se odštěpí v průběhu biosyntézy, ale jsou drženy pohromadě silnou nekovalentní vazbou. Tyto dvě části jsou drženy pohromadě čtyřmi beta skládanými listy, dva z vnější části mucinové domény a dva z ukotvené části membrány. Tyto části mohou být od sebe odtaženy během mechanického namáhání, aby se zabránilo prasknutí buněčné membrány (síla, která může narušit SEA domény je menší než síly nutné k narušení membrány) (Macao et al., 2006). Štěpení MUC4 se koná v doméně vWD. Mechanismy, které jsou zapojeny jsou méně jasné, ale oba enzymatické a autokatalytické procesy už byly navrženy (Soto et al., 2006). Transmembránové muciny se nacházejí na apikální straně epiteliálních buněk. MUC3, MUC12 a MUC17 pravděpodobně budují glycocalyx, někdy také nazývaný chmýří na mikroklcích enterocytů (Weiss et al., 1996). MUC13 je také bohatý na enterocyty, ale má jen krátkou mucinovou doménu (Williams et al., 2001). Enterocyty glycocalyxu pravděpodobně tvoří ochranný kartáč pro periciliární prostor na plicních buňkách a pravděpodobně působí jako difuzní bariéra v gastrointestinálním traktu, zajišťuje stabilní buněčnou membránu a inhibuje nežádoucí průchod velkých molekul (Hatrup and Gendler, 2008). MUC1, který je přítomen v žaludečním epitelu, má ochranné účinky proti infekci *Helicobacter pylori* (Linden et al., 2009). MUC1 je také dobře známý jako antigen pro karcinom, může modulovat růst a apoptózu. MUC3, MUC12 a MUC17 mají cytoplazmatické konce, které interagují s různými PDZ proteiny (PDZ všechny pomáhají při lokalizaci buněčných element). PDZ domény jsou především zapojeny do ukotvení receptorů bílkovin na cytoskelet. (Malmberg et al., 2008). Kromě ochranné funkce, transmembránové muciny se pravděpodobně podílejí na apikálním snímání povrchu buněk a signalizaci (Hatrup and Gendler, 2008).

#### 4.2.2.2 Gelotvorné muciny

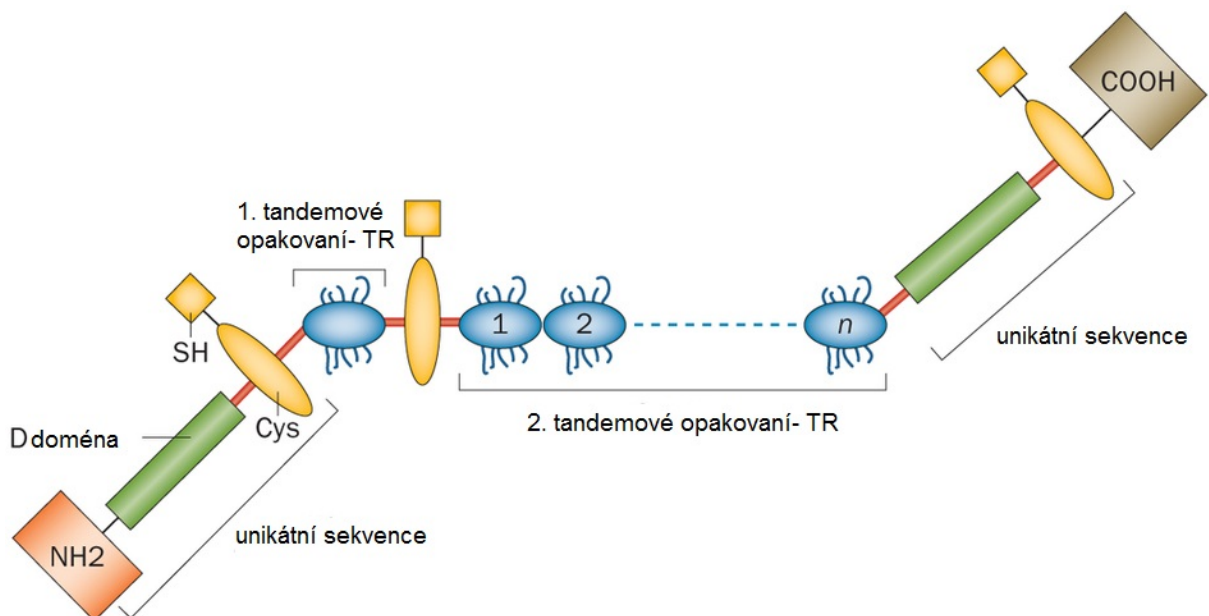
Gelotvorné muciny mají centrální mucinové domény a ty jsou lemovány s N-terminální částí (zapojeny do oligomerizací) a C-terminální, tvoří tedy dimerní strukturu. Tato skupina mucinů využívá svých N-konců a C-konců a tvoří velké polymery, které spolu s mucin doménami tvoří gely, které tvoří typický hlen a mají zásadní význam pro ochranu gastrointestinálního traktu (Gum et al., 1994). Hlavní střevní mucin, MUC2, je odolný proti endogenním proteázám, centrální mucinové domény jsou chráněny glykany, a N-konce a C-konce jsou stabilizovány četnými příčnými vazbami mezi aminokyselinami cysteinu. Zejména trávicí enzymy nejsou schopny strávit jiné glykany než škrob a některé disacharidy, jiné

opuštějí muciny beze změny. Hlavní funkcí gelotvorných mucinů je vybudovat hlen, který spolu s dalšími složkami chrání a promazává gastrointestinální trakt. Studie dle Caldara et al. (2012) naznačují, že nativní čerstvý sliz je nelepivý a nehydrofobní.

## 4.2.3 MUC2

### 4.2.3.1 Struktura MUC2

Proteinové jádro lidského mucinu 2 obsahuje přibližně 5179 aminokyselin. Typická sekvence aminokyselin pro MUC2 je vysoká frekvence prolinu, threoninu a serinu (PTS). Tyto PTS jsou tandemově uspořádány z repetitivních sekvencí složených z 23 aminokyselin, jsou označovány jako tandemové repetice. V Golgiho aparátu se na PTS váží O-glykosidickou vazbou glykany. Když se na PTS navaží glykany má tato forma vzhled dlouhého rozvětveného prutu, který se velice podobá kartáčku se štětinami, kde kartáč je centrální jádro tvořené bílkoviny a štětiny jsou tvořeny z vystupujících O-glykanů, schematicky je struktura znázorněna na obrázku 3. Tato konformace přispívá mucinu k jeho vysoké schopnosti vázat vodu. Všechna dosavadní pozorování poukazují na to, že vytvoření MUC2 je náročný proces a pokud by v těchto procesech nastaly problémy, mohou vzniknout různé defekty v hleny tlustého i tenkého střeva (Lang et al., 2004).



**Obrázek 3:** Struktura MUC2

První tandemové opakování sekvence se nachází v centrální části konstrukce. Tato sekvence je bohatá na serin, threonin a prolin, a skládá se z 21 opakování motivu nepravidelného aminokyselin. Druhé tandemové opakování sekvence se skládá z 23 aminokyselin, s variabilním počtem tandemových opakování od 51-115. Cys-domény jsou přítomny mezi N-terminální oblastí a první opakujícím tandemem, a také je přítomna mezi první a druhou tandemovou oblastí repetice. N-koncová oblast se skládá z disulfidových bohatých D-domén, D1, D2, D' a D3. (Theodoratou et al., 2014)

#### 4.2.3.2 Sekrece MUC2

Mucin 2 je uložen v sekreční granule pohárkových buněk. Po uvolnění ze sekreční granule se výrazně zvětší objem mucinu, rozprostře se a vznikne tak organizovaná vrstva pod vnitřní vrstvou hlenu. Tento proces je pravděpodobně usnadněn síťovitou strukturou MUC2 polymeru. Takto organizované vrstvy mucinu tvoří rozvrstvený vzhled vnitřní vrstvy hlenu (Johansson et al., 2008).

#### 4.2.3.3 MUC2 vlastnosti

MUC2 ve vnitřní pevné vrstvě hlenu je, stejně jako MUC2 v sekrečních váčcích, nerozpustný v choatropní soli guanidin hydrochlorid. Oproti tomu vnější volná vrstva v hlenu je v choatropní soli rozpustná snadno. Transformace MUC2 z nerozpustné formy na rozpustnou odráží proteolytické štěpení, které probíhá ve vnější vrstvě hlenu. Toto štěpení umožňuje hlenu zvětšit svůj objem až čtyřikrát. Tato expanze je zřejmě řízena schopností mucinových glykanů vázat vodu (Johansson et al., 2008).

#### 4.2.4 MUC3

MUC3 gen je exprimován v tenkém střevě i v tlustém střevě, pyloru a ve sliznici. MUC3 se skládá ze dvou odlišných genů MUC3A a MUC3B, z nichž každý má dvě domény (Khatri et al., 1997). MUC3 ukazuje homologii k epidermálnímu růstovému faktoru, protože má 17-aminokyselinových tandemových repetic bohatých na threonin a serin a karboxyterminální domény bohaté na cystein (Gum et al, 1997). MUC3A je glykoprotein, spojený s membránou, která je přítomna u karcinomů a je tedy rizikovým faktorem

(Kitamoto et al., 2010). Není příliš exprimován v tlustém střevě. Subcelulární MUC3 nebo jeho změněné exprese mohou také přispívat v procesu invaze rakoviny a metastáz. MUC3A stejně jako MUC1 hraje důležitou roli v adhezi buňka-buňka, v ochraně před imunitní reakcí nebo signalizačními procesy a může tak zvýšit malignitu nádoru (Rakha et al., 2005). Některé studie ukázaly, že upregulace MUC3 v buňkách tlustého střeva je v korelaci se sníženou vazbou enteropatogenních *Escherichia coli* (Mack et al., 2003).

#### 4.2.5 MUC13

MUC13 protein je obvykle lokalizován na apikálním povrchu epiteliálních buněk, je důležitý pro ochranu a promazání povrchu sliznice. Obecně exprese mucinu a to jak vylučovaný a spojený s buněčnou membránou představuje ochrannou bariéru proti osídlení patogenních bakterií. Podobně jako u jiných mucinů se MUC13 vyznačuje opakujícím se tandemem (TR). MUC13 se skládá z cytoplazmatické domény, která obsahuje potenciální fosforylační místa, která by mohla být zapojena do buněčné signalizace (Maher et al., 2011). MUC13 je důležitou součástí trávicí homeostázy. Alely MUC13 jako i MUC1 jsou zapojeny do infekce bakterií *Helicobacter pylori* (Sheng a kol., 2013). Exprese MUC13 může být změněna v benigních podmínkách tlustého střeva, jako jsou například Crohnova choroba nebo ulcerózní kolitida (Moehle et al., 2006). Zvýšená exprese MUC13 byla nalezena v gastroenterologii a v ovariálních karcinomech (Shimamura et al., 2005).

#### 4.2.6 MUC17

MUC17 obsahuje cytoplazmatickou doménu. Cytoplazmatická doména obsahuje potenciální fosforylační místa pro tyrosin a serin, dále obsahuje prodlouženou opakující se extracelulární glykosylovanou doménu, SEA (doména MUC17 pojmenávaná podle proteinů spermie, enterokináza a agrin) modul domény s koncovou karboxylovou skupinou se dvěma doménami podobné EGF (Epidermální růstový faktor) a konečně transmembránovou doménu (Gum et al., 2002). MUC17 je normálně exprimován ve vysokých množstvích v kolonocytech, při normálním stavu se exprimuje v proximálním a distálním traktu tlustého střeva a na luminální straně epiteliálních buněk, zatímco při zánětlivých a nádorových onemocnění je exprese tohoto proteinu významně snížena (Senapati et al., 2010). Výsledky ukazují, že MUC17 hraje patogenní úlohu při nádorových a zánětlivých onemocnění tlustého



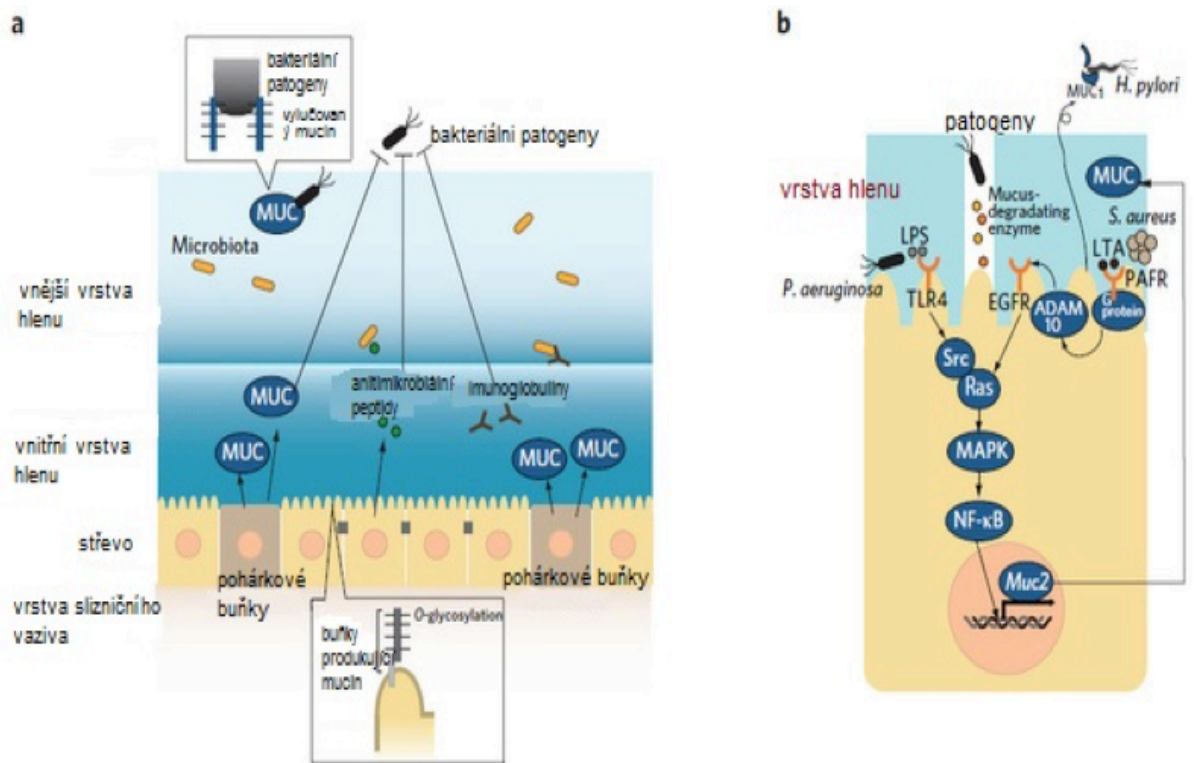
střeva. Kromě toho je schopnen s omezením pro invazi bakteriálních patogenů a chrání epiteliální buňky proti bakteriální infekci (Resta-Lénert et al., 2011), redukcí MUC17 se zvýší propustnost pro patogeny. Jiné studie neukázaly žádný rozdíl v expresi MUC17 mezi adenomatózními polypy, (trubkovité a tubulovité adenomy) a rakovinou tlustého střeva. Ukazuje se že ztráta MUC17 může vést k rozvoji rakoviny tlustého střeva (Moehle et al., 2006).

#### 4.2.7 Muciny a bakterie

Muciny, sekreční protein nebo polymery složené převážně z polysacharidů pokrývají povrch sliznice střeva a jsou potencionálními místy pro uchycení střevních bakterií (Kleessen and Blaut, 2005). Polymery mohou tvořit ochranou bariéru proti kolonizaci některých bakterií, jiné bakterie je používají jako prostředek k ulpívání na povrchu střeva. V důsledku toho dochází k osídlování mikroorganismů jednoho a následně více druhů bakterií a podporuje se tak rozvoj mikrokolonií a biofilmů (Hooper and Gordon, 2001). Probiotické biofilmy jsou účinné při dlouhodobější kolonizaci a zároveň obnovují chybějící funkce při různých onemocněních (Jones and Versalovic, 2009).

Absence MUC2 ve střevě a její dopad zkoumala studie o myších bez MUC2 (Velcich et al., 2002). V závislosti na prostředí a podmínkách se u těchto myší vyvíjel více či méně závažný zánět tlustého střeva, průjem, prolaps a neprospívání, a zároveň se zvýšilo riziko vzniku rakoviny tlustého střeva (Johansson et al., 2008; Velcich et al., 2002). Při řezu tlustým střevem myší bez MUC2 byly analyzovány bakterie, pomocí FISH na bakteriální 16S rRNA, které byly nalezeny v přímém kontaktu s epiteliálními buňkami a hluboko v kryptách (Johansson et al, 2008). Některé epitelové buňky také měly intracelulární bakterie. Nedostatek MUC2 tedy znamená, že neexistuje žádná polymerní síť, která by udržovala vrstvy hlenu pohromadě. To má za následek ztrátu vnitřní vrstvy slizu, která chrání epitelové buňky. Pozorování u myší bez MUC2 také ukazují, že imunitní systém tlustého střeva reaguje zánětem, když jsou bakterie v neustálém těsném kontaktu s epitelovými buňkami.

Na obrázku 4 je schematicky znázorněna vrstva hlenu sloužící jako první linie ochrany proti bakteriálním patogenům a jak patogenní bakteriální infekce způsobuje tvorbu MUC2 a) prostřednictvím TLR-závislých nebo b) nezávislých TLR-NF-kB drah (Theodoratou et al., 2014).



**Obrázek 4:** Řez tlustým stěvem: a) s MUC2; b) bez MUC2

### 4.3 Klinická a epidemiologická studie o zahleňování mlékem

Už dlouhou dobu existuje hypotéza, která spojuje nadměrnou produkci hlenu a zhoršení astmatu, se zvýšenou konzumací mléka a mléčných výrobků. Kořeny této teorie sahají až do 12. století, kdy se poprvé o této problematice zmínil Mojžiš Maimonides, který spojil konzumaci mléka a zhoršení dýchacích schopností (Rosner, 1984). I tradiční čínská medicína tvrdí, že mléko patří do skupiny potravin takzvaně hlen-tvořivých a proto doporučuje se mléku vyhýbat (The Dairy Council, 2012). Rozšířená představa, že děti s astmatem by se měly mléku vyhnout, byla ještě více posilována v posledních desetiletích. Obavy z konzumace mléka byly ještě více upevněny po vydání knihy, *Dítě Dr. Spocka a péče o dítě*, kde americký pediatr tvrdí, že astma a další respirační problémy se mohou zhoršit právě konzumací mléka a tak doporučuje úplné odstranění mléka ze stravy dítěte (Spock and Needlam, 1998). Tato teorie je u mnoha rodičů ještě dnes silně zakořeněna i přesto, že existuje jen málo vědeckých důkazů, které spojují příjem mléka s astmatem, i když některé

studie je nepřímo potvrzují (Pinnock et al. (1989); Rowe and Rowe, 1956; Yusoff et al., 2004) . Obecně lidé, kteří věří, že jim mléko způsobí vyšší zahlenění v krku, přestože mají často sníženou spotřebu mléka na den, mívají vyšší příznaky zahlenění, než ti, kteří teorii nevěří (Arney and Pinnock, 1993).

Přestože několik studií zkoumalo vlivy mléčných výrobků na bronchitidu (zánět průdušek), nikdy se žádný významný vliv neprokázal. Existuje studie, která srovnává pacienty, kteří denně vypili 300 ml UHT mléka s pacienty, kteří pili placebo ve formě rýžového nápoje. Mezi oběma skupinami nebyly nalezeny žádné rozdílné účinky působení, UHT mléka a rýžového mléka, na stav průdušek a zahlenění (Woods et al., 1998).

Pinnock and Arney (1993) testovali teorii o zahleňování mlékem v randomizované, dvojitě zaslepené studii se 125 subjekty. Šedesát z nich obdrželo 300 ml mléka a 65 dostalo placebo ze sojového nápoje. Čtyřicet čtyři respondentů z první skupiny věřilo, že mléko zahleňuje a 29 subjektů z druhé skupiny také věřilo, že mléko zvyšuje sekreci hlenu. Věřící teorii o zahleňování mlékem z obou skupin mnohem častěji hlásili příznaky jako "povlak v ústech", "hodně hlenu" a "silnější sliny". Tyto údaje byly měřeny v čase nula, 5 minut, 4 hodiny a při snídani další den. Vyšetřovatelé dospěli k závěru, že nebyl žádný zásadní rozdíl mezi placebem ze sójového nápoje a mlékem.

Další výzkum srovnával zdravé pacienty a pacienty trpícími astmatem. Obě skupiny pily plnotučné mléko, odstředěné mléko a vodu. Nebyly nalezeny žádné rozdíly ve stavu dýchacích cest pacientů z obou skupin. Pouze se zjistila lehce zhoršená dýchací schopnost u pacientů, kteří vypili mléko plnotučné, pokles byl ale přisouzen rozdílu v obsahu tuku mezi mléky a vodou (Haas et al., 1991)

Také v jiné studii testovali spojení mezi spotřebou mléka a produkcí hlenu. Zkoumali 21 osob, 11 s astmatem a 10 bez astmatu. Každý z testovaných vypil 453,6 gramů plnotučného mléka, odtučněného mléka a vody, každý nápoj pili v jiný den. Po vypití se vždy testoval usilovný výdech za 1 sekundu (FEV1), nucený expirační průtok (50 % vitální kapacity) a plicní rozptylující kapacitu oxidu uhelnatého (DLCO). Měření probíhalo v 30-minutových intervalech po dobu 3 hodin. Konzumace plnotučného mléka a odstředěného mléka nebyla spojena s jakoukoli významnou změnou v FEV1 nebo v nuceném expiračním průtoku na 50% vitální kapacitu. Nicméně, u subjektů s astmatem, se hodnota DLCO postupně snižovala o 6,8 % každou hodinu celé 3 hodiny testování po konzumaci plnotučného mléka. Toto snížení, ale neproběhlo po vypití vody nebo odtučněného mléka. Ve skupině subjektů bez astmatu nebyl pozorován žádný významný pokles v hodnotě DLCO. Proto se neprokázala

žádná zjevná změna odporu v dýchacích cestách. Závěr tedy je, že mléčné lipidy mohou ovlivnit výměnu plynů u pacientů s astmatem (Haas et al., 1991).

V kontrastu k předchozím studiím existuje i řada studií naznačujících, že po vyloučení mléčných výrobků ze stravy se mohou zlepšit příznaky astmatu. V roce 1950 Rowe and Rowe navrhli určité potraviny, které by teoreticky mohly zhoršovat nebo přispět k rozvoji astmatu. Zjistili, že u subjektů, kterým tyto potraviny ze stravy vyloučily se symptomy astmatu velmi často zlepšily (Rowe and Rowe, 1956). Bohužel ale po vývoji léků na léčbu astmatu přestala mít tato zjištění klinický význam.

Pinnock et al. (1989) zjistili, že pokud bylo mléko vyloučeno ze stravy subjektu, tak se příznaky kašle a zahlenění nosní sliznice zlepšily, a to především v noci. Jednalo se o dvojitě zaslepenou studii.

V poslední době proběhla jediná prospektivní studie, ve které 22 dětí s astmatem (13 jich bylo v experimentální skupině a 9 v kontrolní skupině) dodržovalo dietu bez vajec a mléka po dobu osmi týdnů. Děti z experimentální skupiny vykazovaly zřetelné snížení koncentrací IgG (nejvýznamnější třída protilátek) k vaječnému albuminu a k beta-laktoglobulinu. U 5 dětí z experimentální skupiny, byl vrchol výdechového průtoku průduškami výrazně zvýšen v porovnání s dětmi z kontrolní skupiny (Yusoff et al., 2004).

Podobně velkou roli hrála dieta, která vylučuje mléko, v další dvojitě zaslepené kontrolované studii, při níž se zkoumalo potlačení dětské migrény. Zjistilo se, že nejen migréna, ale i astma a ekzém se zlepšily, pokud se ze stravy vyloučí mléko (Egger et al., 1983).

V jiné dvojitě zaslepené studii o chronické zácpě byla nalezena souvislost s konzumací kravského mléka. Ty děti, které měly reakci na kravské mléko, měly také souběžně vyšší frekvenci výskytu rýmy, dermatitidy a zánětu průdušek (Iacono et al., 1998). Tato pozorování naznačují, že v některých situacích vyloučení kravského mléka může být příznivé.

#### 4.3.1 Stimulace produkce hlenu

Dva hlavní muciny produkované v dýchacích cestách jsou MUC5AC a MUC5B. V tkáních dýchacích cest zdravých jedinců pohárkové buňky obvykle vylučují MUC5AC, zatímco žlázy slizničních buněk typicky vylučují MUC5B. MUC5AC a MUC5B jsou normálně přítomny, v nižší hladině, v hlenu dýchacích cest, zatímco v hlenu u pacientů s astmatem, bronchitidou nebo cystickou fibrózou nejsou (Kirkham et al., 2002). Podobné

nálezky byly i u chronického onemocnění vedlejších dutin dýchacích a nosních polypóz (Ding and Zheng, 2007). Nadprodukce hlenu je charakteristickým příznakem astmatu (Aikawa et al., 1996). Zánět je nezbytným předpokladem pro výrobu MUC5AC mucin genové exprese a produkci hlenu (Tanabe et al., 2008).

Další protein, u kterého bylo prokázáno, že specificky zvyšuje výrobu MUC5AC je  $\beta$ -casomorphin-7 ( $\beta$ -CM-7). Beta-CM-7 patří do skupiny opioidního peptidu a je odvozen od rozdělení z A1 mléka (mléko obsahující beta kasein). Opioidní peptid je malá bílkovina, která má schopnost vazby na opioidní receptor v mozku. Jde o velice malou molekulu, která snadno projde přes bariéru mezi mozkem a krevním řečištěm. Opioidní receptory jsou receptory spřažené s G proteinem, nacházející se na synaptických membránách neuronů. Na tento typ receptorů se vážou nejen přirozené tělní opioidy, tedy zejména enkefaliny a endorfiny, ale i přírodní opiáty (morfin, kodein) a další. Mléko se skládá ze směsi vody, tuků, bílkovin, laktózy a minerálů. Většina alergií na mléko je spojena s těmito proteiny (Woodford, 2007). Bylo prokázáno, že v tlustém střevě člověka  $\beta$ -CM-7 stimuluje produkci hlenu ze střevních MUC5AC žláz (Zoghbi et al., 2006). Nicméně, žádné studie nezkoumaly vztah mezi specifickým složením konzumovaného mléka a produkcí hlenu a astmatu.

Jiná studie se zabývala debatami o gastrointestinálních účincích A1 typu beta-kaseinu v kravském mléce ve srovnání s typem A2. Ve studiích *in vitro* a na zvířatech se ukázalo, že trávení A1, ale ne A2  $\beta$ -kaseinu, ovlivňuje gastrointestinální motilitu a zánět, přes působení již zmiňovaného  $\beta$ -casomorphin-7. V této dvojitě zaslepené, randomizované 8-týdenní zkřížené studii bylo podrobena testování čtyřicet jedna samic a samců. Účastníci podstoupili 2-týdenní mléčné vymývání (rýžové mléko nahradilo mléčné výrobky), následující 2 týdny se konzumovala mléka (750 ml/den), která obsahovala buď beta-kasein A1 nebo A2, poté účastníci prošli druhou vymývací fází a závěrečné 2 týdny alternativně konzumovali buď A1 nebo A2 mléko. Výsledek této studie ukázal, že A1 beta-kasein mléko vedlo k výrazně vyšším hodnotám konzistence stolice ve srovnání s A2 beta-kaseinem. Také se projevil významný vztah mezi bolestmi břicha a konzistencí stolice na dietě A1, ale nikoli na A2 dietě. Tyto výsledky tedy ukazují rozdíly v gastrointestinální reakci u některých dospělých lidí konzumujících mléko s obsahem beta-kasein A1 k typu beta-kaseinu A2. Ale k potvrzení je zapotřebí ještě rozsáhlejších studií s větším počtem účastníků (De Noni and Cattaneo, 2010).

### 4.3.2 Mechanismus vystavení buněk dýchacích cest mléčným proteinem

Důkazy naznačují, že některé potravinové deriváty se mohou dostat do dýchacího systému zdravých jedinců a to navzdory vysoké žaludeční kyselosti a enzymatické aktivity tenkého střeva. Sampson (1999) prohlašuje, že 2 % z požitých potravin se vstřebávají skrz střevo v podobě, která je dostatečně imunologicky neporušená a proto vytváří potravinové alergie.

V různých situacích, jako je trauma, bylo prokázáno, že i větší makromolekuly mohou vstupovat do portálního oběhu. Stres a následné uvolnění kortikotropin-uvolňujícího faktoru (CRF) zvyšuje gastrointestinální slizniční propustnost. U potkanů CRF zvýšil iontovou sekreci a slizniční propustnost pro makromolekuly (Tache and Perdue, 2004). To poskytuje fyziologické vysvětlení pro zvýšenou střevní propustnost pozorovanou po traumatu a popáleninách (Hollander, 1999). Zvýšená střevní propustnost s následným únikem makromolekul byla také pozorována v souvislosti s delším užíváním mnohých nesteroidních protizánětlivých léků (Bjarnason et al., 1986). U kojenců a malých dětí, kteří mají více nezralé slizniční bariéry, je rovněž absorbováno vyšší procento potravin v neporušeném stavu (Kost et al., 2009).

Proto v situacích, které představují zvýšenou střevní slizniční propustnost, mohou mléčné bílkoviny najít cestu do krevního oběhu a tak stimulovat v dýchacích cestách produkci hlenu.

### 4.3.3 Hypotéza zahlenění

Hypotéza je, že A1 mléko zvyšuje produkci hlenu v dýchacích cestách v subpopulaci lidí, kteří mají zvýšenou střevní propustnost. Konkrétně  $\beta$ -CM-7 působí přes receptory na pohárkových buňkách, aby zvýšil MUC5AC genovou expresi a tak se zvyšuje sekrece hlenu. K tomu dojde pouze ve specificky aktivovaných tkáních a pouze tehdy, pokud by byl  $\beta$ -CM-7 schopen přecházet do krevního oběhu (Woodford, 2007).

## 5 Materiál a metody

### 5.1 Příprava hydrolyzátu mléka

Podle simulovaného harmonizovaného trávicího *in vitro* modelu (Minekus et al. 2014) byl připraven hydrolyzát z kravského mléka (syrové kravské mléko, farma Hole - Oldřich Poláček, CZ). Simulované žaludeční (SGF) a simulované duodenální (SDF) šťávy byly připraveny dle Kopf-Bolantza et al. (2012) a Versantvoorta et al. (2005).

K 5 ml kravského mléka bylo přidáno 5 ml SGF obohaceného o prasečí pepsin (2000 U/ml SGF); žaludeční fáze byla provedena po dobu 2 h při teplotě 37°C a pH 3 (upraveno pomocí 1M kyseliny chlorovodíkové). Žaludeční fáze byla ukončena neutralizací přidavkem 0,5M hydrogenuhličitanu sodného (Merci, Brno, CZ). Dále bylo přidáno 10 ml SDF a 10 mM žlučových solí. Fáze střevního trávení byla provedena při teplotě 37°C po dobu 2 h a pH 7 (upraveno pomocí 1M NaOH). Použité enzymy (Sigma-Aldrich, Praha, CZ) pro střevní trávení byly: prasečí trypsin (100 U/ml SDF), hovězí chymotrypsin (50U/ml SDF), prasečí lipáza (2000 U/ml SDF) a kolipáza (molární poměr lipázy/kolipázy : 1/2). Trávenina byla zamrazena na -80°C.

Získaný hydrolyzát byl před experimentem exprese mucinu naředěn v DMEM médiu na koncentraci 1,5 µg/ml.

### 5.2 Příprava buněčných kultur

Buněčná linie lidských epiteliálních buněk adenokarcinomu Caco-2 byla získána z ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA); buněčná linie HT29-MTX produkující mucin byla zakoupena ze Sigma-Aldrich (Praha, CZ). Buněčné linie (pasáže P37 a P74, v uvedeném pořadí) byly kultivovány v DMEM médiu obohaceném o 20 % fetálního hovězího séra (FBS), 1 % neesenciálních aminokyselin, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu a inkubovány při 37 °C a 5% (v/v) CO<sub>2</sub>. Výměna média probíhala každé dva dny.

Buněčné linie byly zaočkovány do NUNC 24-jamkových kultivačních destiček o koncentraci 3,6 x 10<sup>4</sup> Caco-2 buněk a 0,4 x 10<sup>4</sup> HT29-MTX buněk v 1 ml DMEM média pro stanovení exprese mucinu a RNA. Připravené destičky byly inkubovány po dobu 14 ± 1 den do nárůstu 80% konfluentní buněčné monovrstvy. Plastik pro buněčné kultury byl zakoupen z Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

### 5.3 Test stanovení inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub>

Před vlastním experimentem byly vybrány vhodné netoxické koncentrace mléčného hydrolyzátu na základě stanovení cytotoxicity (IC<sub>50</sub>). Životaschopnost buněk byla měřena použitím MTT testu na Caco-2, HT29-MTX buňkách a ko-kultuře Caco-2/HT29-MTX. Buněčné linie Caco-2 a HT29-MTX byly zaočkovány do NUNC 96-jamkových destiček v koncentraci  $2,5 \times 10^3$  a směsná kultura Caco-2/HT29-MTX v koncentraci  $3,6 \times 10^3$  Caco-2 buněk a  $0,4 \times 10^3$  HT29-MTX buněk a inkubovány po dobu 24 hodin při teplotě 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Poté byl k buňkám přidán hydrolyzát mléka v dvojkovém sériovém ředění (0,008 - 16,5 µg/ml) po dobu 72 hodin. Následně bylo přidáno MTT činidlo (1 mg/ml) v DMEM médiu a inkubováno po dobu dalších 2 hodin při teplotě 37°C. Po inkubaci byly supernatanty z jednotlivých jamek odsáty a přidáno 100 µl DMSO. Následně byla změřena absorbance při 555 nm s použitím přístroje Tecan Infinite M200 (Tecan Austria GmbH, Grödig, AT). Mortalita pro každou koncentraci hydrolyzátu byla vynesena v procentech do grafu a použita ke stanovení 50% inhibiční koncentrace (IC<sub>50</sub>).

### 5.4 Expresé mucinu a RNA testy

Z 24-jamkové destičky s plně diferenciovanou narostlou monovrstvou směsné kultury Caco-2/HT29-MTX bylo odsáto médium, ke každé jamce byl přidán 1 ml naředěného mléčného hydrolyzátu (1,5 µg/ml) a destička byla inkubována po dobu 48 hodin. Jako kontrola bylo přidáno DMEM médium.

Pro extrakci RNA a následnou analýzu pomocí RT-PCR bylo z jamek odsáto médium, neadherované buňky byly odstraněny promytím pomocí sterilního PBS, poté byly adherované buňky uvolněny přidávkem 300 µl 1% trypsinu (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) s následným přidávkem 700 µl PBS.

### 5.5 Extrakce RNA a qRT-PCR analýza

Celková RNA byla z buněk trávicího traktu izolována pomocí kitu RNeasy® mini Kit (Qiagen; Velno, NL) a ošetřena DNázou I (Sigma-Aldrich, Praha, CZ). Následně byla převedena mRNA na cDNA (400 ng na vzorek) pomocí reverzní transkriptázy (iScript cDNA synthesis kit, BioRad, Hercules, CA, USA).

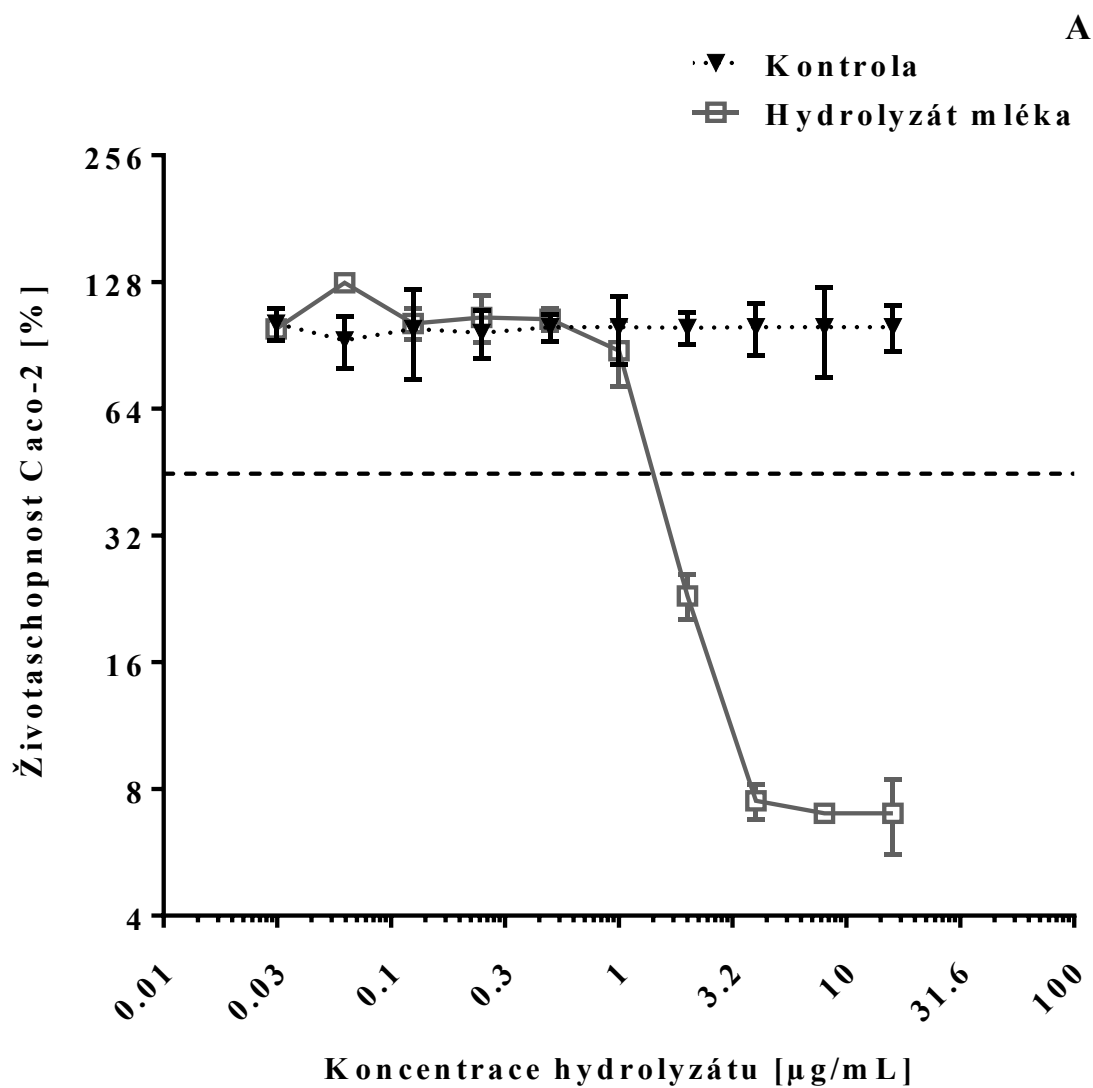


Produkt byl uskladněn při teplotě -20 °C. Jako referenční gen byl použit  $\beta$ -aktin (kódující, 5'-CTTCCTGGGCATGGAGTC-3' a antikódující, 5'-GCAATGATCTTGATCTTCATTGTG-3'). Specifické primery pro lidský MUC2, MUC3, MUC13 a MUC17 byly zakoupeny od společnosti Bio-Rad (Hercules, USA). Reakční směs (20  $\mu$ l) real-time RT-PCR byla složena z 10 ng cDNA, 250 nM primerov a 1x Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) použitého podle pokynů výrobce. PCR reakce proběhla na přístroji StepOnePlus real-time PCR System (Applied Biosystems) za stanovených termocyklačních podmínek. Hodnoty relativní genové exprese byly vypočteny za použití beta-aktinu, jako endogenního referenčního genu, a buňky s čistým DMEM bez mléčného hydrolyzátu byly použity jako kontrolní vzorek. Relativní hodnota exprese genu byla vypočítána podle Livak, Schmittgen (2001). Statistická analýza byla provedena pomocí t-testu za použití GraphPad InStat v. 6.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

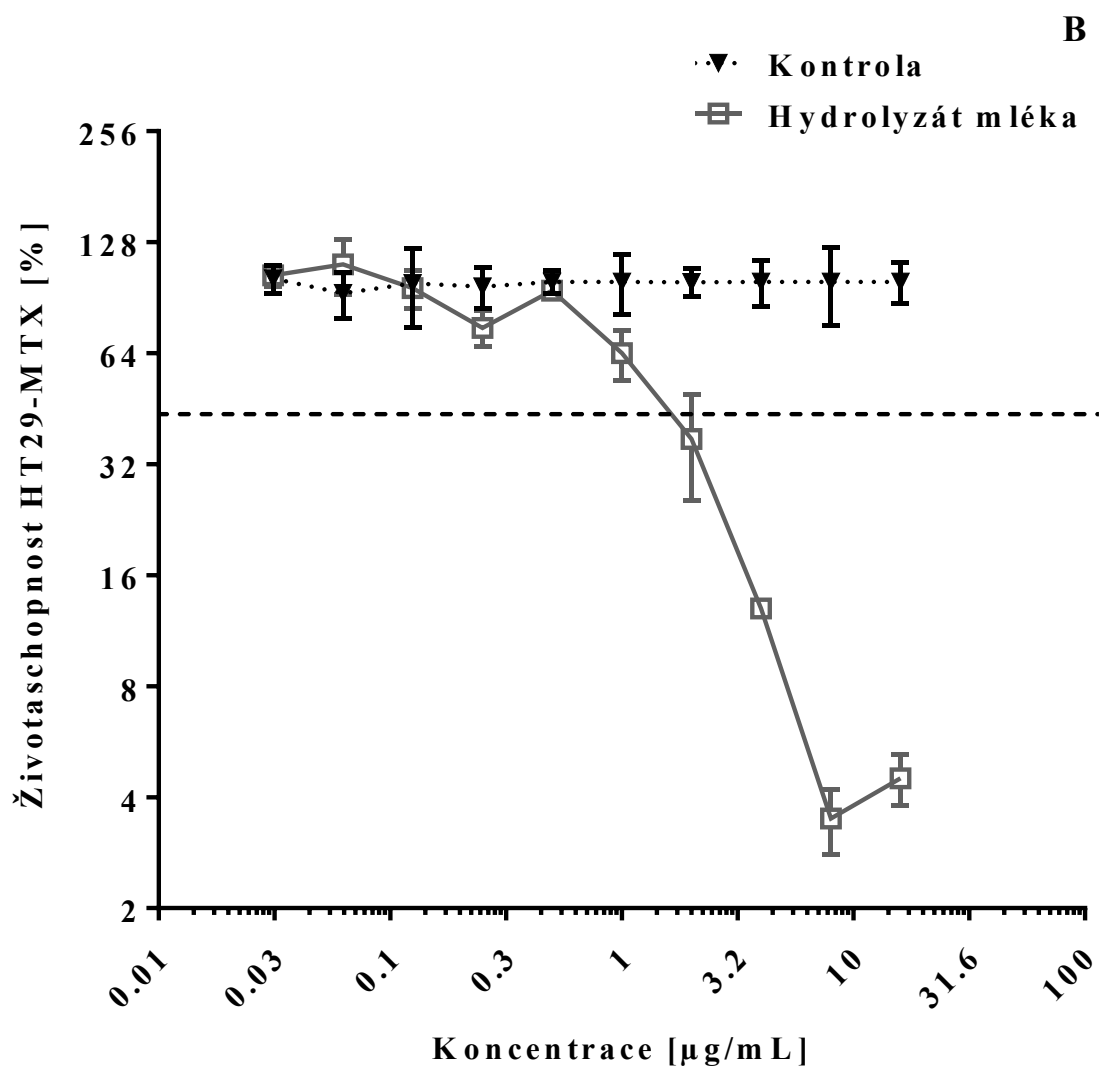
## 6 Výsledky

Pro stanovení exprese mucinu bylo nutné ověřit životaschopnost buněčných linií Caco-2, HT29-MTX a ko-kultury Caco-2/HT29-MTX po přidavku hydrolyzátu mléka pomocí 50% inhibičního testu cytotoxicity ( $IC_{50}$ ). Caco-2, HT29-MTX a směsná kultura Caco-2/HT29-MTX byly ošetřeny pomocí fermentovaného mléčného hydrolyzátu v rozmezí koncentrací 0,008 - 16,5  $\mu\text{g/ml}$  (v dvojkovém ředění).  $IC_{50}$  hydrolyzátu mléka bylo zjištěno 1,57  $\mu\text{g/ml}$  u Caco-2 buněčné linie, 1,56  $\mu\text{g/ml}$  u HT29-MTX a 1,5  $\mu\text{g/ml}$  u ko-kultury Caco-2/HT29-MTX (Graf 1, 2, 3).

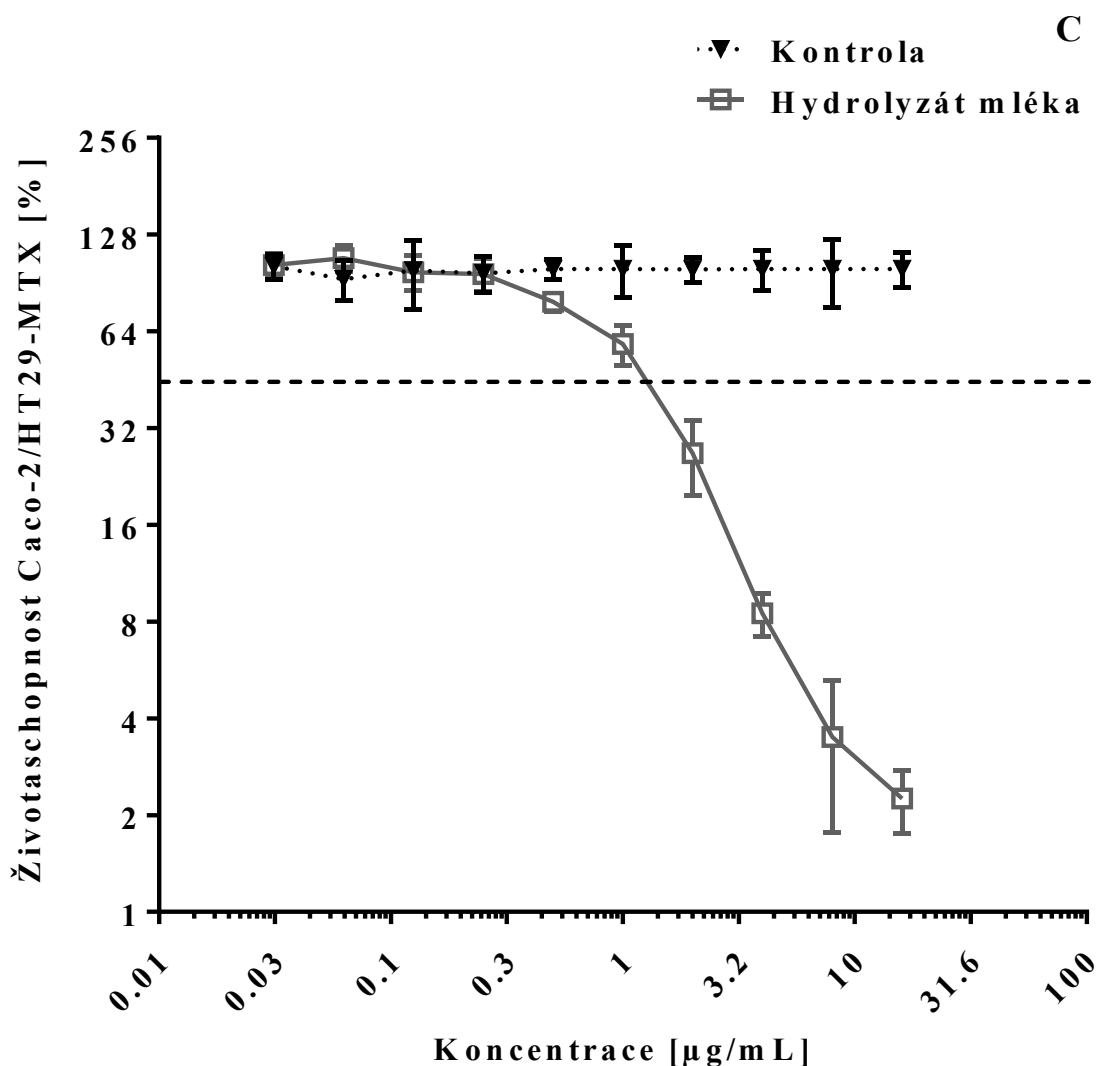
Při koncentraci hydrolyzátu kravského mléka vyšší než 1,57  $\mu\text{g/ml}$ , byla zaznamenána rapidní inhibice životaschopnosti Caco-2 buněk. Dále, při použité koncentraci hydrolyzátu kravského mléka vyšší než 1,56  $\mu\text{g/ml}$ , došlo ke značnému snížení životaschopnosti HT29-MTX buněk. A koncentrace hydrolyzátu kravského mléka vyšší než 1,5  $\mu\text{g/ml}$  u směsné ko-kultury Caco-2/HT29-MTX způsobila snížení životaschopnosti o 50 %.



**Graf 1** Životaschopnost Caco-2 buněk po přidavku deseti různých koncentrací hydrolyzátu mléka (0,008 - 16,5  $\mu\text{g/ml}$ ). Hodnoty jsou vyjádřeny jako procento životaschopnosti buněk v porovnání s kontrolou  $\pm$  standardní odchylka (SD), N = 3.



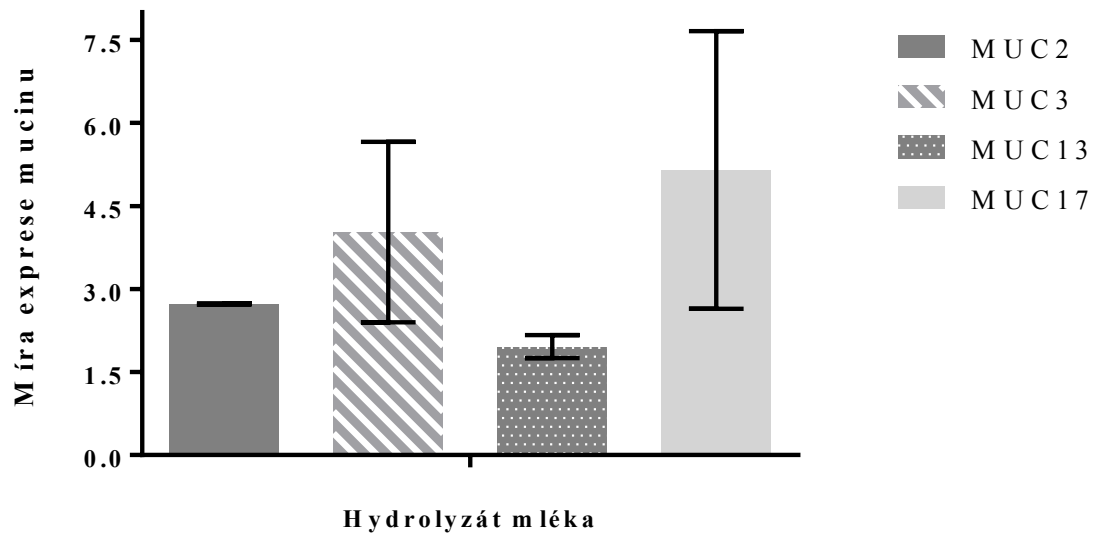
**Graf 2** Vyjádření životaschopnosti HT29-MTX buněk po přidavku hydrolyzátu mléka. Hodnoty jsou vyjádřeny jako procento životaschopnosti buněk v porovnání s kontrolou  $\pm$  standardní odchylka (SD), N = 3.



**Graf 3** Křivka grafu znázorňuje životaschopnost ko-kultury Caco-2/HT29-MTX buněk po aplikaci 10-ti různých koncentrací hydrolyzátu mléka. Hodnoty jsou vyjádřeny jako procento životaschopnosti buněk v porovnání s kontrolou  $\pm$  standardní odchylka (SD), N = 3.

Na grafu 4 byla vyjádřena exprese MUC2, MUC3, MUC13 a MUC17. Byla použita koncentrace hydrolyzátu, kterou jsme získali z předchozího experimentu stanovení cytotoxicity, tedy koncentrace 1,5 µg/ml. Z grafu je zřejmé, že po aplikaci hydrolyzátu kravského mléka se exkrece MUC2 zvýšila téměř 3krát oproti normálnímu fyziologickému stavu na hodnotu  $2,73 \pm 0,01$ . V případě MUC3 došlo k 4,5násobnému vyloučení daného mucinu proti normálnímu fyziologickému stavu bez kontaktu s mlékem na hodnotu  $4,03 \pm 1,63$ . Nejméně ze všech zkoumaných mucinů se vylučoval MUC-13, kdy jeho exkrece se zvýšila téměř dvakrát ( $1,96$

$\pm 0,21$ ) oproti normálnímu fyziologickému stavu. Naproti tomu největší zaznamenané vylučování bylo pozorováno u MUC17, který se vyloučil až pětinašobně oproti normálnímu fyziologickému stavu na konečnou hodnotu  $5,15 \pm 2,51$ .



**Graf 4.** Závislost stupně exprese mucinu na hydrolyzátu mléka určená analýzou pomocí qRT-PCR čtyř různých genů mucinu (MUC2, MUC3, MUC13 a MUC17). Hodnoty jsou uvedeny jako průměr  $\pm$  standardní odchylka (SD).

## 7 Diskuze

Výsledky analýzy qRT-PCR pro čtyři různé geny mucinu (MUC2, MUC3, MUC13 a MUC17) ukazují, že po působení hydrolyzátu mléka na buněčné linie se exkrece mucinů prokazatelně zvýšila oproti běžnému fyziologickému stavu. Tento výzkum podpořil hypotézu ohledně zahleňování mlékem. Mucin má ve střevním traktu mnoho funkcí, nelze tedy zcela jednoznačně určit, zda je zvýšená exkrece mucinu pouze protektivní anebo by mohla mít i nějaké nepříznivé účinky.

Všechny zkoumané muciny jsou lokalizovány v gastrointestinálním traktu, kde tvoří ochrannou bariéru proti různým nepříznivým vlivům, trávicím šťávám, inhibují vazbu bakterií a usnadňují luminální motilitu (Boegh and Nielsen, 2015). Ve střevě kromě ochranné funkce tvoří muciny takzvané biofilmy. V GIT mohou být bakterie volně žijící nebo připojené k povrchu hlenové sliznice. Připojené bakterie produkují mikrokolonie, což vede k rozvoji biofilmů. Tyto biofilmy se zpočátku mohou skládat pouze z jednoho bakteriálního druhu, ale často se vyvinou do komplexního společenství složeného z různých bakteriálních druhů (Kleessen and Blaut, 2005). Biofilmy jsou tedy mikrobiálně odvozená přisedlá společenství připojená k povrchu polysacharidů, proteinů a nukleových kyselin. Vyznačující se tím, že buňky, které jsou nevratně připojené k substrátu nebo rozhraní nebo k sobě navzájem, jsou uloženy v matici extracelulárních polymerních látek, které vyrobili, a vykazují tak změněný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a genové transkripce (Donlan and Costerton, 2002).

Obecně platí, že první krok v tvorbě biofilmu je nespecifický, jde o reverzibilní připevnění bakterií na substrát povrchu. Jakmile jsou ale bakterie trvale připojeny, začnou syntetizovat nerozpustné exopolysacharidy (EPS), kterými obalují adherentní bakterie v trojrozměrné matici. S akumulací EPS a rozmnožování bakterií se kolonie vyvinou do zralého biofilmu. Matrix EPS nejen pomáhá buňkám udržovat substrát, ale je i pastí pro živiny zachycené z vody. Matrix EPS také chrání bakterie proti imunitní reakci hostitele, predátorů a antimikrobiálních látek (Costerton et al., 1995). Muciny a jiné sekreční proteiny nebo polymery složené převážně z polysacharidů pokrývají ve střevě povrchy sliznic a jsou proto potenciální přílnavým místem pro střevní bakterie (Kleessen and Blaut, 2005). I když tyto polymery mohou tvořit bariéru proti kolonizaci některých bakterií, jiné bakterie je mohou použít jako prostředek k uchycení na povrchu. Toto vede ke vzniku adhezní mikrobiální vrstvy jednoho druhu bakterií, která v důsledku toho může podporovat kolonizaci jiných mikroorganismů a to prostřednictvím spolupráce, podporuje se tak rozvoj mikrokolonií a biofilmů. Interakce mezi populacemi těchto komunit jsou složité a jak mikrobiální -

mikrobiální a mikrobiální - hostitelské vztahy jsou závislé na intra- a mezidruhových komunikačních systémech (Hooper and Gordon, 2001). Vady v povrchových buněčných funkcích mohou mít vliv na vznik biofilmu a schopnosti probiotik přetrvávat a kolonizovat střevo *in vivo*. Probiotické biofilmy jsou účinnější při dlouhodobé kolonizaci a obnovují chybějící funkce v nepříznivých stavech (Jones and Versalovic, 2009). Střevní sliznice poskytuje bariéru proti invazi patogenů a zároveň zůstává vysoce propustná pro efektivní výměnu živin v celém svém povrchu. V souladu s těmito požadavky jsou biofilmy porézní, což umožňuje živinám projít, ale jsou zároveň i bariérou pro některé větší molekuly a jiné mikroorganismy (Palestrant et al., 2004). Lidská gastrointestinální mikroflóra je složitý ekosystém. Změny prostorového rozložení, komunity, nebo složení mikroflóry trávicího traktu mohou změnit střevní fyziologii a imunitu. Probiotika biofilmu mají pravděpodobně zásadní význam pro dlouhodobou remodelaci složení a funkce střevního mikrobiomu (Hooper and Gordon, 2001).

Existují důkazy, že složení a tloušťka vrstvy hleny tlustého střeva je ovlivněna a regulována střevními bakteriemi a zvláštními výživovými složkami jako jsou oligosacharidy. Tyto dietní komponenty jsou pravděpodobně ovlivněny druhem a celkovým počtem specifických bakteriálních druhů, přítomných v tlustém střevě a v důsledku toho se mění konečné produkty bakteriálního kvašení.

Tlusté střevo poskytuje ideální prostředí pro růst mnoha rodů bakterií, a u zdravých jedinců se předpokládá, že kolonii tvoří  $10^{11}$ - $10^{12}$  jednotek bakterií (O'Hara and Shanahan, 2006). Obecně existuje symbiotický vztah mezi bakteriemi a hostitelem, který lze považovat za mutualisticky-komenzální (Hooper and Gordon, 2001). Některé druhy bakterií kolonizují tlusté střevo přednostně. Z nich bifidobakterie a laktobacily jsou normálně přítomny v tlustém střevu zdravých lidí v rozmezí od  $10^8$ - $10^{10}$  KJT/ml (Lidbec and Nord, 1993; Borriello et al., 2003). Tyto bakteriální druhy přežijí v tlustém střevě prostředí chudé na mono- a disacharidy, a to prostřednictvím jejich schopnosti rozkládat a využít pestré škálu sacharidů s použitím různých exo- a endoglykosidáz (Katayama et al., 2005). K bakteriální kolonizaci dochází prostřednictvím konkrétního připojení bakteriálních povrchových proteinů (lektinů) na doplňkové oligosacharidy na sliznici nebo na vrstvě slizu a na povrchu potravinových komponentů, nebo nespecificky přes nízkou hydrofilní afinitu anebo hydrofobní interakci s muciny (Van den Abbeele et al., 2009; Roos and Jonsson, 2002). Bakteriálním lpěním na hlenové vrstvě, na povrchu sliznice a jejich vylučovaných metabolitech, bylo prokázáno, že se mění geny mucinu a výraz proteinů aktivací různých signálních kaskád a sekrečních prvků, což má za následek změny ve vrstvě hleny (Gaudier et al., 2004). Tyto změny mohou ovlivnit



nejen tloušťku hlenové vrstvy, ale také složení samotných mucinů (Meslin et al., 1999). Je známo, že zavedením snadno zkvasitelných složek potravy (polysacharidy - škrob, neškrobové, nebo nestravitelné oligosacharidy) se moduluje mucin genová exprese (Daddaoua et al., 2006).

Populace HT29-MTX buněk (vylučuje širokou škálu různých mucinů) byla použita v *in vitro* střevním modelu k určení, že bakteriální adheze kmene *Lactobacillus johnsonii* a mucinů je závislá na pH (Granato et al., 2004). Ve studii Berneta et al. (1993) zjistili, že adheze dvou bakteriálních kmenů *L. acidophilus* a čtyř různých bifidobakteriálních druhů inhibuje přichycení enteropatogenních bakteriálních druhů a dále adherence kmene *L. plantarum* ve výsledcích zvýšila produkci MUC2 a MUC3 a inhibovali adhezi enteropatogenních *E. coli*. Kromě toho bylo prokázáno, že mléčný opioidní peptid b-casomorphin-7 vyvolává zvýšený výskyt MUC5AC mRNA se současným nárůstem jeho sekrece (Zoghbi et al., 2006). Martinez-Augustin et al. (2003) ověřili pomocí svých experimentů, že oligosacharidy kozího mléka mohou modulovat expresi mucinu, a tím snížit expresi MUC2 a MUC3.

Směs tkáňových kultur Caco-2/HT29-MTX představuje důležitý *in vitro* střevní model pro hodnocení účinků různých komponentů na expresi mucinu a bakteriální adherence. Nicméně, potenciální nevýhodou je, že jsou odvozeny z nádorových buněk a mohou mít odlišné buněčné struktury a regulační mechanismy než mají zdravé buňky (Ouweland and Salminen, 2003). V důsledku těchto poznatků získaných pomocí *in vitro* testů mohou být použity pouze jako vodítka k jevům, ke kterým by mohlo docházet v podmínkách *in vivo*.

Kromě výše uvedených pozitivních účinků je se zvýšenou produkcí MUC13 spojována rakovina žaludku. Muciny jsou vylučovány jako transmembránové glykoproteiny, které jsou exprimovány hlavně v trávicím traktu. Těmto typům proteinů byla věnována značná část výzkumu rakoviny žaludku, protože některé transmembránové muciny se podílejí na vzniku nádorů a stávají se tak atraktivním cílem pro diagnostiku a terapii rakoviny. Muciny byly použity také pro klasifikaci rakoviny žaludku a to pomocí rozlišení mezi žaludečním a střevním fenotypem. Ukázalo se, že transmembránový mucin MUC13 se u karcinomu žaludku vytváří v mnohem větší míře. Nadměrná exprese MUC13 byla ověřena ve více než polovině vzorků zkoumaných pomocí kvantitativní real-time reverzní transkripce-polymerázové řetězové reakce a imunoblotové analýzy (Shimamura et al., 2005). V imunohistochemické analýze se MUC13 obarvil a byl pozorován u 74 114 případů karcinomu žaludku (64,9%), převážně střevního typu ( $P < 0,001$ ), a v 9 z 10 případů u střevní metaplazie (změna tkáně v jinou, rovněž diferencovanou, ovšem na daném místě neobvyklou), u

prekancerózní léze intestinálního typu rakoviny žaludku nebyl MUC13 pozorován v normální žaludeční sliznici. Kromě toho byl identifikován vzor obarveného MUC13 charakteristický pro histologický typ: obarvení se nacházelo na apikální straně trubkových žláz ve střevním typu a cytoplasmu v difuzním typu. Tyto výsledky naznačují, že MUC13 je dobrý marker pro diferenciaci sliznice gastrointestinálního traktu, a že to může mít určitou roli, která koreluje se vznikem dvou různých žaludečních nádorů (Shimamura et al., 2005).

Ze zjištěných výsledků exprese mucinů vyplývá, že po kontaktu s hydrolyzátem kravského mléka došlo ve všech případech mucinů ke zvýšení, což podporuje teorii o zahleňování mlékem. Nicméně není příliš mnoho studií, které by poskytovaly přímé důkazy, že by mléko sekreci mucinu zvyšovalo.

Studie podle Clastra et al. (2002) se zabývala hypotézou, že mléčné proteiny nebo jejich hydrolyzáty mohou regulovat expresi střevního mucinu. Tato hypotéza byla zkoumána v izolovaném vaskulárním perfundovaném (promývaném) krysím jejunu (lačníku) za použití enzymu-linked immunosorbent assay pro krysí střevní mucin. Po aplikaci hydrolyzátu kaseinu se značně stimulovala sekrece mucinu v krysím jejunu (maximální odezva na 417 % kontrol). Hydrolyzát laktalbuminu (5%) také vyvolal zvýšenou expresi mucinu. Naproti tomu kasein a směs aminokyselin byly bez účinku, také kuřecí vaječný albumin a jeho hydrolyzát nebo hydrolyzát masa nezměnily uvolňování mucinu ve střevu. Beta-casomorphin-7, opioidní peptid, který se uvolní z beta-kaseinu po požití mléka, vyvolává silnou sekreci mucinu a intraarteriální  $\beta$ -casomorphin-7 výrazně zvýšil sekreci mucinu (Claustre et al., 2002).

Zoghbi et al. (2005) zkoumající beta-casomorphin-7 prokázali, že opioidní peptid silně stimuluje sekreci mucinu v krysím jejunu přes nervové dráhy a aktivaci opioidního receptoru. V této studii byl zkoumán vliv  $\beta$ -casomorphinu-7 v *in vitro* podmínkách u krys a v lidských střevních mucin-produkujících buňkách (DHE a HT29-MTX) s použitím kvantitativní a semikvantitativní qRT-PCR a ELISA, zda-li mohou působit přímo na pohárkové buňky střeva. Přítomnost u opioidních receptorů byla demonstrována u potkanů na pohárkových buňkách v horní polovině krypty tenkého střeva a ve dvou buněčných liniích pomocí imunohistochemie a qRT-PCR. V krysích DHE buňkách  $\beta$ -casomorphin-7 zvýšil expresi krysího mucinu 2 (rMUC) a rMUC3, ale ne rMUC1, rMUC4 a rMUC5AC. Tento účinek byl závislý na dávce a čase. Sekrece mucinu se po 8 hodinách stimulace maximálně zvýšila. V lidských buňkách HT29-MTX  $\beta$ -casomorphin-7 ( $10^{-4}$  M) se výrazně zvýšil hladinu mRNA MUC5AC a sekreci tohoto mucinu. Závěrem lze říci,  $\beta$ -casomorphin-7 může významně přispět k expresi mucinu prostřednictvím přímého účinku na pohárkové buňky střeva a aktivací  $\mu$ -opiátových receptorů (Zoghbi et al., 2005).

## 8 Závěr

Předpokládaná hypotéza, že přítomnost mléka a jeho složek v modelu zvyšuje expresi a sekreci mucinu MUC-2, byla provedeným experimentem potvrzena. Výsledky analýzy qRT-PCR pro čtyři různé geny mucinu (MUC2, MUC3, MUC13 a MUC17) ukazují, že po kontaktu buněk s hydrolyzátem mléka se exkrece mucinů prokazatelně zvýšila a to až několikrát oproti běžnému fyziologickému stavu.

Zajímavé by bylo tuto analýzu provést i pro další druhy mléka, a porovnat tak účinky kravského mléka například s jiným živočišným mlékem a se zástupci rostlinných mlék jako je sojové nebo rýžové mléko.

## 9 Seznam použité literatury

1. T. Aikawa, S. Shimura, H. Sasaki, M. Ebina, and T. Takashima. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest*, 1992.
2. D. Ambort. Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming muc2 mucin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, (109):5645–5650, 2012.
3. W. K. Arney and C. B. Pinnock. The milk mucus belief: sensations associated with the belief and characteristics of believers. *Appetite*, 1993.
4. C. Atuma, V. Strugala, A. Allen, and L. Holm. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, (280), 2001.
5. D. Aune, R. Lau, D. S. Chan, R. Vieira, D. C. Greenwood, E. Kampman, and T. Norat. Dairy products and colorectal cancer risk: a systematic review and metaanalysis of cohort studies. *Ann Oncol*, 2012.
6. L. A. Bazzano, T. Green, T. N. Harrison, and K. Reynolds. Dietary approaches to prevent hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 2013.
7. E. P. Bennett. Control of mucin-type o-glycosylation: a classification of the polypeptide gainac-transferase gene family. *Glycobiology*, (22): 736–756, 2012.
8. C. S. Berkey, G. A. Colditz, H. R. Rockett, A. L. Frazier, and W. C. Willett. Dairy consumption and female height growth: prospective cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2009.
9. M. F. Bernet, D. Brassart, J. R. Neeser, and A. L. Servin. *Appl. Environ. Microbiol*, (59): 4121–4128, 1993.
10. P. Bjarnason, P. Williams, T. Smethurst, J. Peters, and A. J. Levi. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on the permeability of the human small intestine. *Gut*, 1986.
11. H. Boegh and M. Nielson. Mucus as a barrier to drug delivery – understanding and mimicking the barrier properties. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2015.
12. S. P. Borriello, W. P. Hammes, W. Holzapfel, P. Marteau, J. Schrezenmeir, M. Vaara, and V. Valtonen. *Clin. Infect. Dis.*, 36(775-780), 2003.
13. M. Bosch. Classical galactosaemia revisited. *J Inherit Metab Dis.*, 2006.
14. J. Boye, R. Wijesinha-Bettoni, and B. Burlingame. Protein quality evaluation twenty

- years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *Br J Nutr*, 2012.
15. F. Caffarelli, B. Baldi, L. Bendandi, M. Calzone, Marani, and P. Pasquinelli. Cow's milk protein allergy in children: a practical guide. *Ital J Pediatr*, 2010.
  16. M. Caldara. Mucin biopolymers prevent bacterial aggregation by retaining cells in the free-swimming state. *Curr. Biol.*, (22): 2325–2330, 2012.
  17. M. Caroli, S. Chessa, and G. J. Erhardt. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *J Dairy Sci*, 2009.
  18. J. Claustre, F. Troumi, A. Trompette, G. Jourdan, H. Guignard, J. Chayvialle, and P. Plaisancié. Effects of peptides derived from dietary proteins on mucus secretion in rat jejunum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002.
  19. J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 1995.
  20. A. Daddaoua, V. Puerta, P. Requena, A. Martinez-Ferez, E. Gaudix, F. S. de Medina, A. zarzuelo, M. D. Suarez, J. J. Boza, and O. Martinez-Augustin. Goat milk oligosaccharides are anti-inflammatory in rats with hapten-induced colitis. *J. Nutr.* (136): 672–676, 2006. 34
  21. D. Dai, N. N. Nanthkumar, D. S. Newburg, and W. A. Walker. Role of oligosaccharides and glycoconjugates in intestinal host defense. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000.
  22. P. Van den Abbeele, C. Grootaert, S. possemiers, W. Verstraete, K. Verbeken, and T Van de Wiele. Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by lactobacilli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (83): 349–359, 2009.
  23. G. Q. Ding and C. Q. Zheng. The expression of muc5ac and muc5b mucin genes in the mucosa of chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Am J Rhinol*, 2007.
  24. R. M. Donlan and J. W. Costerton. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 2002.
  25. J. Egger, C. M. Carter, J. Wilson, M. W. Turner, and J. F. Soothill. Is migraine food allergy, a double blind controlled trial of oligoantigenic diet treatment? *Lancet*, 1983.
  26. P. C. Elwood, J. E. Pickering, and A. M. Fehily. Milk and dairy consumption, diabetes and the metabolic syndrome: the caerphilly prospective study. *J Epidemiol Community Health*, 2007.
  27. A. Fiocchi, H. J. Schünemann, J. Brozek, P. Restani, K. Beyer, R. Troncone, A. Martelli, L. Terracciano, S. L. Bahna, F. Rancé, M. Ebisawa, R. G. Heine, A. Assa'ad,

- H. Sampson, E. Verduci, G. R. Bouygue, C. Baena-Cagnani, W. Canonica, and R. F. Lockey. Diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (dracma): a summary report. *J Allergy Clin Immunol*, 2010.
28. F. Gaucheron. Milk and dairy products: a unique micronutrient combination. *Am Coll Nutr*, 2011.
  29. E. Gaudier, A. Jarry, H. M. Blottiere, P. de Coppet andf M. P. Buisine, J. P. Aubert, C. Laboisse, C. Cherbut, and C. Hoebler. Characterization of innate immune responses to enteric bacterial pathogens in intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.*, (287), 2004.
  30. S. Godden. Colostrum management for dairy calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2008. 35
  31. D. Granato, G. E. Bergonzelli, R. D. Pridmore, L. Marvin, M. Rouvet, and I. E. Cortesy-Theulaz. Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect. Immun.*, (72): 2160–2169, 2004.
  32. J. R. Gum, J. W. Hicks, N. W. Toribara, B. Siddiki, and Y. S. Kim. Molecular cloning of human intestinal mucin (muc2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von willebrand factor. *J. Biol. Chem.*, (269): 2440–2446, 1994.
  33. F. Haas, M. C. Bishop, J. Salazar-Schicchi, K. V. Axen, D. Lieberman, and D. Axen. Effects of milk ingestion on pulmonary function in healthy and asthmatic subjects. *J Asthma*, 1991.
  34. L. Hatrup and S. J. Gendler. Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *Ann. Rev. Physiol*, (70):431–457, 2008.
  35. A. Haug, A. T. Høstmark, and O. M. Harstad. Bovine milk in human nutrition — a review. *Lipids Health Dis*, 2007.
  36. T. He, K. Venema, M. G. Priebe, G. W. Welling, R-J. M. Brummer, and R. J. Vonk. The role of colonic metabolism in lactose intolerance. *Eur J Clin Invest*, 2008.
  37. H. Hollander. Intestinal permeability, leaky gut and intestinal disorders. *Curr Gastroenterol Rep*, 1999.
  38. M. A. Hollingsworth and B. J. Swanson. Mucin in cancer: Protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer*, (4): 45–60, 2004.
  39. J. A. Holt, Carver, H. Ecroyd, and D. C. Thorn. Caseins and the casein micelle: Their biological functions, structures, and behavior in foods. *Journal of Dairy Science*, 2013.

40. L. V. Hooper and J. I. Gordon. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, (292): 1115–1118, 2001.
41. G. Iacono, F. Cavataio, G. Montalto, A. Florena, M. Tumminello, M. Soresi, A. Notarbartolo, and A. Carroccio. Intolerance of cow's milk and chronic constipation in children. *N Engl J Med*, 1998. 36
42. P. M. Insel, R. E. Turner, and D. Ross. *Nutrition*. Jones Bartlett Learning, 2004.
43. P. H. Jensen, D. Kolarich, and N. H. Packer. Mucin-type o-glycosylation — putting the pieces together. *FEBS J.*, (277): 81–94, 2010.
44. H. Jenssen and R. E. Hancock. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochemie*, 2009.
45. M. E. Johansson and G. C. Hansson. Composition and functional role of the mucus layers in the intestine. *Cell mol. life sci.*, (68): 3535–3641, 2011.
46. M. E. Johansson and G. C. Hansson. Keeping bacteria at a distance. *Science*, 334(182–183), 2011.
47. M. E. Johansson, M. Phillipson, J. Petersson, A. Velcich, L. Holm, and G. C. Hansson. The inner of the two MUC2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008.
48. S. E. Jones and J. Versalovic. Probiotic lactobacillus reuteribiofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*, 2009.
49. G. Jourdan, J. Y. Scoazec, and P. Plaisancié. *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.*, (290), 2006.
50. P. Kalac and E. Samkova. The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech J Anim Sci*, 2010.
51. M. Kalliomäki, J-M. Antoine, U. Herz, G. T. Rijkers, J. M. Wells, and A. Mercenier. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of allergic diseases by probiotics. *J Nutr*, 2010.
52. T. Katayama, K. Fujita, and K. Yamamoto. Beneficial Microorganisms in Medical and Health Applications. *J. Biosci. Bioeng.*, 99(457–465), 2005.
53. D. Kavanaugh, J. O'Callaghan, M. Kilcoyne, M. Kane, L. Joshi, and R. M. Hickey. The intestinal glycome and its modulation by diet and nutrition. *Nutrition Reviews*, 2015. 37
54. S. Kirkham, J. K. Sheehan, D. Knight, P. S. Richardson, and D. J. Thornton. Heterogeneity of airway mucus variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochem J*, 2002.
55. B. Kleessen and M. Blaut. Modulation of gut mucosal biofilms. *Br J Nutr*, 2005.

56. K. A. Kopf-Bolanz, F. Schwander, M. Gijs, G. Vergères, R. Portmann, and L. Egger. Validation of an in vitro digestive system for studying macronutrient decomposition in humans. *J Nutr*, 2012.
57. N. V. Kost, O. Y. Sokolov, O. B. Kurasova, A. D. Dimitriev, J. N. Tarakanova, M. V. Gabaeva, Y. A. Zolotarev, A. K. Dadayan, S. A. Grachev, E. V. Korneeva, I. G. Mikheeva, and A. A. Zozulya. B-casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. *Peptides*, 2009.
58. T. Lang, M. Alexandersson, G. C. Hansson, and T. Samuelsson. Bioinformatic identification of polymerizing and transmembrane mucins in the puffer fish *fugu rubripes*. *Glycobiology*, 2004.
59. T. Lang, C. G. Hansson, and T. Samuelsson. Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, (104): 16209–16214, 2007.
60. M. Laparra and Y. Sanz. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett Appl Microbiol*, 2009.
61. A. Lidbeck and E. C. Nors. Lactobacilli and the normal human anaerobic microflora. *Clin. Infect. Dis.*, (16), 1993.
62. M. E. Lidell, M. E. Johansson, M. Mörgelin, N. Asker, J.R. Gum, Y.S. Kim, G. C. Hansson. The recombinant c-terminus of the human muc2 mucin forms dimers in cho cells and heterodimers with full-length muc2 in Is 174t cells. *Biochem. J.*, (372), 2003.
63. S. K. Linden, Y. H. Sheng, A. L. Every, K. M. Miles, E. C. Skoog, T. H. J. Florin, P. Sutton, M. A. McGuckin. Muc1 limits helicobacter pylori infection both by steric hindrance and by acting as a releasable decoy. *PLoS Pathog*, (5), 2009.
64. H. Lindmark-Månsson, R. Fondén, and H. E. Pettersson. Composition of Swedish dairy milk. *International Dairy Journal*, 2003. 38
65. J. Livak and T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2<sup>-delta delta c (t)</sup> method. *Methods*, 2001.
66. M. C. Lomer, G. C. Parkes, and J. D. Sanderson. Review article: lactose intolerance in clinical practice—myths and realities. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008.
67. B. Macao, D. G. Johansson, C. G. Hansson, and T. Härd. Auto-proteolysis coupled to protein folding in the sea domain of the membrane-bound muc1 mucin. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, (13): 71–76, 2006.
68. R. Mack, S. Ahrne, L. Hyde, S. Wei, and M. A. Hollingsworth. Extracellular muc3 mucin secretion follows adherence of lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*, 2003.



69. K. Malmberg. The transmembrane muc17 mucin c-terminus binds to the scaffold protein pdzk1 that stably localizes in to the enterocyte apical membrane in the small intestine. *Biochem. J.*, (410):283–289, 2008.
70. O. Martinez-Augustintin, V. Puerta, A. Martinez-Ferez, L. Baró, E. López-Huertas, and M. Suarez. *Clin. Nutr.*, (22), 2003.
71. C. Melnik. Milk — the promoter of chronic western diseases. *Med Hypotheses*, 2009.
72. C. Meslin, N. Fontaine, and C. Andrieux. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integr. Physiol.*, (123):672–676, 1999.
73. S. Mills, R. P. Ross, C. Hill, G. F. Fitzgerald, and C. Stanton. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. *International Dairy Journal*, 2011.
74. M. Seacheol, Linda J. Harris, and John M. Krochta. Antimicrobial effects of lactoferrin, lysozyme, and the lactoperoxidase system and edible whey protein films incorporating the lactoperoxidase system against salmonella enterica and Escherichia coli o157:h7. *Journal of Food Science*, 2005.
75. M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Ballance, T. Bohn, C. Borlieu, F. Carrière, R. Boutrou, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, L. Egger, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. Mackie, S. Marze, D. J. McClements, O. Ménard, I. Recio, C. N. Santos, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. Wickham, W. Weitschies, and A. Brodkorb. A standardised static in vitro digestion method suitable for food — an international consensus. *Food Funct*, 2014.
76. I. De Noni and Stefano Cattaneo. Occurrence of —casomorphins 5 and 7 in commercial dairy products and in their digests following in vitro simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 2010.
77. M. O’Hara and F. Shanahan. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.*, (7):688–693, 2006.
78. C. Ouwehand and S. Salminen. In vitro Adhesion Assays for Probiotics and their in vivo Relevance: A Review. *Microb. Ecol. Health Dis.*, (15):175–184, 2003.
79. D. Palestrant, Z. E. Holzknecht, B. H. Collins, W. Parker, S. E. Miller, and R. R. Bollinger. Microbial biofilms in the gut: visualization by electron microscopy and by acridine orange staining. *Ultrastruct Pathol*, 2004.
80. P. W. Parodi. A role for milk proteins and their peptides in cancer prevention. *Curr Pharm Des*, 2007.
81. M. Phillipson, M. E. Johansson, J. Henriksnäs, J. Petersson, S. J. Gendler, S. Sandler, A.

- E. Persson. The gastric mucosal layers: constituents and regulation of accumulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*, (295), 2008.
82. B. Pinnock and W. K. Arney. The milk–mucus belief: sensory analysis comparing cow’s milk and a soy placebo. *Appetite*, 1993.
83. B. H. Rice, E. E. Quann, and G. D. Miller. Meeting and exceeding dairy recommendations: effects of dairy consumption on nutrient intakes and risk of chronic disease. *Nutrition Reviews*, 71(4):209–223, April 2013.
84. S. Roos and H. Jonsson. A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology*, (148): 433–442, 2002.
85. F. Rosner. Moses Maimonides’ treatise on asthma. *Thorax*, April 1981.
86. A. H. Rowe and A. Rowe jr.. Bronchial asthma in adults — causes and treatment. *Calif Med*, pages 228–233, April 1950.
87. A. H. Rowe and A. Rowe. Allergic bronchial asthma and rhinitis — the importance of studies for sensitivity to foods. *Calif Med*, pages 33–35, July 1956.
88. H. A. Sampson. Food allergy. Part. 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol*, pages 717–728, May 1999.
89. M. Sasaki, H. Ikeda, and Y. Nakanuma. Expression profiles of muc mucins and trefoil factor family (tff) peptides in the intrahepatic biliary system: physiological distribution and pathological significance. *Prog Histochem Cytochem*, pages 61–110, April 2007.
90. G. Schaafsma. Criteria and significance of dietary protein sources in humans: The protein digestibility–corrected amino acid score. *The Journal of Nutrition*, 2000.
91. G. Schaafsma. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18(5): 458–465, May 2008.
92. S. Séverin and X. Wenshui. Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2005.
93. T. Shimamura, H. Ito, J. Shibahara, A. Watanabe, Y. Hippo, H. Taniguchi, Y. Chen, T. Kashima, T. Ohtomo, F. Tanioka, H. Iwanari, T. Kodama, T. Kazui, H. Sugimura, M. Fukayama, and H. Aburatani. Overexpression of muc13 is associated with intestinal–type gastric cancer. *Cancer Sci*, May 2005.
94. P. Soto, J. Zhang, and K. L. Carraway. Enzymatic cleavage as a processing step in the maturation of muc4 / sialomucin complex. *J. Cell. Biochem.*, (97):1267–1274, 2006.
95. B. Spock. *Dr. Spock’s Baby and Child Care*. Paperback, 9 edition, June 2004.
96. M. Suzuki, C. West, and E. Beutler. Large–scale molecular screening for galactosemia alleles in a pan–ethnic population. *Hum Genet*, 2001.

97. Y. Taché and M. H. Perdue. Role of peripheral crf signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol Motil*, pages 137–142, April 2004
98. T. Tanabe, K. Fujimoto, M. Yasuo, K. Tsushima, K. Yoshida, H. Ise, and M. Yamaya. Modulation of mucus production by interleukin-13 receptor alpha2 in the human airway epithelium. *Clin Exp Allergy*, January 2008.
99. E. Theodoratou, H. Campbell, N. T. Ventha, D. Kolarich, M. Puci-Bakovič, V. Zoldoö, D. Fernandes, I. K. Pemberton, I. Rudan, N. A. Kennedy, M. Wuhrer, E. Nimmo, V. Annese, D. P. McGovern, J. Satsangi, and G. Lauc. The role of glycosylation in ibd. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2014.
100. S. Vaishnava. The antibacterial lectin regIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*, (335):255–258, 2011.
101. A. Velcich, W. Yang, J. Heyer, A. Fragale, C. Nicholas, S. Viani, R. Kucherlapati, M. Lipkin, K. Yang, and L. Augenlicht. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin muc2. *Science*, March 2002.
102. C. H. M. Versantvoort, A. G. Oomen, E. Van de Kamp, C. J. M. Rompelberg, and J. A. M. Sips. Application of an in vitro digestion model in assessing bioaccessibility mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1): 31–40, January 2005.
103. A. A. Weiss, M. W. Babyatsky, S. Ogata, and A. Chen. Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in human normal, malignant, and inflammatory intestinal tissues. *J. Histochem. Cytochem*, (44): 1161–1166, 1996.
104. S. J. Williams. MUC13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells. *J. Biol. Chem.*, (276): 18327–18336, 2001.
105. K. Woodford. *Devil in the Milk*. Chelsea Green Publishing, March 2009.
106. R. K. Woods, J. M. Weiner, M. Abramson, F. Thien, and E. H. Walters. Do dairy products induce bronchoconstriction in adults with asthma? *J Allergy Clin Immunol*, 1998.
107. R. H. Yolken, C. Ojeh, I. A. Khatri, U. Sajjan, and J. F. Forstner. Intestinal mucins inhibit rotavirus replication in an oligosaccharide-dependent manner. *J Infect Dis*, 1994.
108. N. A. Yusoff, S. M. Hampton, J. W. Dickerson, and J. B. Morgan. The effects of exclusion of dietary egg and milk in the management of asthmatic children: a pilot study. *J R Soc Promot Health*, 2004.
109. S. Zoghbi, A. Trompette, J. Claustre, M. El Homsy, J. Garzón, G. Jourdan, J. Y. Scoazec, and P. Plaisancié. Beta-casomorphin-7 regulates the secretion and expression

of gastrointestinal mucins through a mu-opioid pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006.



## 10 Seznam zkratek

ATCC -	American Type Culture Collection
cDNA-	Complementary deoxyribonucleic acid; Komplementární deoxyribonukleová kyselina
CRF -	Corticotrophin- releasing hormone; Kortikotropin uvolňující hormon
CVD-	Cardiovascular disease; Kardiovaskulární onemocnění
DASH-	Dietary approaches to stop hypertension; Dietní přístup k Stop Hypertenze
DHE-	Dihydroergotamin
DLCO-	Diffusing capacity for carbon oxide; Difúzní kapacita pro oxid uhelnatý
DMBT1-	Deleted in malignant brain tumors 1 protein; Odstranění v maligních nádorech mozku 1 protein
DMEM-	Dulbeccem modifikované Eaglově médiu
DMSO-	Dimetylsulfoxid
E. coli-	Escherichia coli
EGF-	Epidermal growth factor; Epidermální růstový faktor
ELISA -	Enzyme-linked immuno sorbent assay; Analytická metoda využívaná ke kvantitativnímu stanovení různých antigenů.
EPS-	Exopolysacharidy
FBS-	Fetal Bovine Serum; Fetální hovězí sérum
FEV1 -	Tiffenaův index, usilovná vitální kapacita za 1 sekundu
FISH -	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization; Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
GalNAc-	N-acetylgalaktosamin
GI-	Gastrointestinal; Gastrointestinální
GIT-	Gastrointestinal tract, Gastrointestinálny trakt
IC <sub>50</sub> -	Maximální inhibiční koncentrace poloviny
IGF-	Insulin-like growth factor-1; Inzulín podobný růstovému faktoru
IgG-	Immunoglobulin G; Imunoglobulin G
MDa -	Molekulární hmotnost
MTT-	Test na metabolickou aktivitu buniek
NIDO-AMOP-vWD-	Membrána charakteristická pro membránový mucin MUC4
NUNC 96-	Destičky 96-ti jamkové pro PCR Multiply Sarstedt
PBS-	Phosphate buffered saline; Fyziologický roztok pufovaný fosfátem

PDZ-	Proteinové domény zapojeny do ukotvení na cytoskelet
PS-	Fosfatidylserin
PTS-	Prolin, serin a threonin
qRT-PCR -	Quantitative real-time polymerase chain reaction; Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálním čase
RT-PCR-	Reverse transcription polymerase chain reaction; Reverzně transkripční polymerázové řetězová reakce
RNA-	Ribonucleic acid; Ribonukleová kyselina
rRNA-	Ribozom ribonucleic acid; Ribozomální ribonukleová kyselina
SD-	Standard deviation; Standardní odchylka
SDF-	Simulated duodenal fluid; Simulované duodenální šťávy
SEA-	Domain Sperm protein, Enterokinase and Agrin; Doména pojmenávaná podle proteiny spermie, enterokináza a agrin
SFA-	Saturated fatty acids; Nasycené mastné kyseliny
SGF-	Simulated gastric fluid; Simulované žaludeční tekutiny
TRS-	Tandem repeat sequences; Tandemové opakování aminokyselinových sekvencí
UHT-	Ultra high temperature; Mimořádně vysoká teplota zpracování
VNTRs-	Variable number tandem repeat sequences; Variabilní počet tandemových opakování
vWD -	Von Willebrand factor type D domain; Von Willebrandův faktor typu D domény
β-CM-7-	β-casomorphin-7